

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 7월 4일 (04.07.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/100660 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/407 (2006.01) *A61K 31/05* (2006.01)
A61K 31/429 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/011631
- (22) 국제출원일: 2012년 12월 27일 (27.12.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0146450 2011년 12월 29일 (29.12.2011) KR
10-2012-0074204 2012년 7월 6일 (06.07.2012) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 120-749 서울시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이형근 (LEE, Hyungkeun); 135-968 서울시 강남구 대치1동 삼성아파트 107-1503, Seoul (KR). 심중우 (SHIM, Jongwoo); 121-824 서울시 마포구 망원2동 436-3 보라맨션 B-202호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 남앤드남 (NAM & NAM WORLD PATENT & LAW FIRM); 100-813 서울시 중구 서소문로 117 (서소문동, 대한항공빌딩 3층), Seoul (KR).

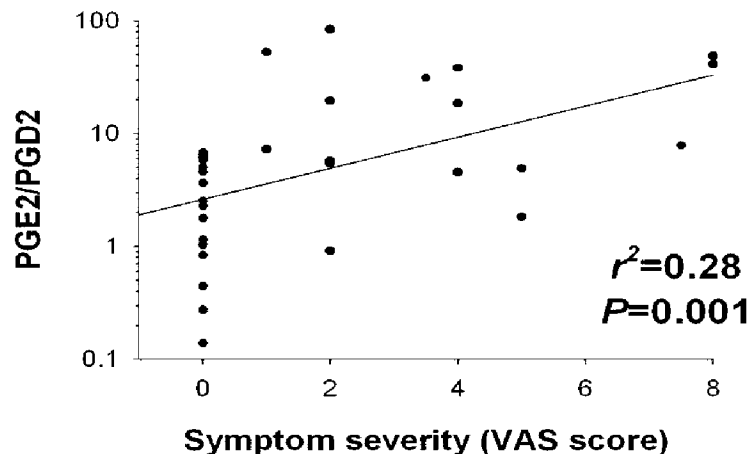
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OF EYE PAIN, CONTAINING PGE2 SYNTHESIS INHIBITOR

(54) 발명의 명칭 : PGE2 합성 억제제를 포함하는 안구 통증 치료용 약학 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for the treatment of eye pain, containing a PGE2 synthesis inhibitor. The use of the pharmaceutical composition for the prevention or treatment of eye pain according to the present invention, which contains the PGE2 synthesis inhibitor as an active ingredient, makes it possible to alleviate the symptoms of eye pain by selectively inhibiting the PGE2 expression level, and also has the advantages of treating and preventing xerophthalmia and of overcoming and preventing eye discomfort caused by various inflammation-inducing circumstances including following surgery. Also, by using a kit for detecting the amount of PGE2, PGD2 and COX2, the present invention makes it possible to easily diagnose eye-pain symptoms in clinical practice, and can be widely used in checking the state not only of patients having xerophthalmia but also patients following eye surgery.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2013/100660 A2



본 발명은 PGE2 합성 억제제를 포함하는 안구 통증 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 PGE2 합성 억제제를 유효성분으로 포함하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 이용하면 PGE2의 발현 수준을 선택적으로 억제시킴으로써 안구 통증 증상을 호전시킬 수 있고, 나아가 안구건조증의 치료 및 예방, 수술 후 상태 등의 다양한 염증 발현 상황에 의한 안구 불편감 해소 및 예방에 효과가 있다. 또한, PGE2, PGD2 및 COX2의 양을 검출하는 키트를 이용하여 임상에서 손쉽게 안구 통증 증상을 진단할 수 있어 안구건조증 환자 뿐만 아니라 안 수술 후 환자의 상태를 파악하는 데 널리 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: P G E2 합성 억제제를 포함하는 안구 통증 치료용 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 PGE2 합성 억제제를 포함하는 안구 통증 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 안구건조증은 전 세계적으로 다양한 역학적 연구에 이용되는 연구 집단, 연령 및 진단 기준에 따라 유병률이 5.5-15%로 보고된 매우 일반적인 질환이다. 이 질환은 안구통증, 불규칙한 각막 표면, 흐리고 변동폭이 커진 시력(blurred and fluctuating vision) 및 증가된 각막 궤양의 위험성과 같은 특징을 가진다. 불안정한 눈물막(tear film)으로부터 유래된 만성 안구 건조증 및 건성 각막염에서 변경된 각막 투과성은 염증을 일으키는 것으로 알려져 왔고, 이는 눈물에 염증 매개 케모카인 및 사이토카인의 증가, 결막 상피에 의한 면역 활성화 및 접착 분자(HLA-DR 및 세포간 접착 분자 [ICAM-1])의 발현 증가, 그리고 결막(conjunctiva)에 T 림프구 수의 증가에 의해 입증되었다. 건성 각결막염(keratoconjunctivitis sicca, KCS)으로부터 생긴 각막 궤양은 시력 감퇴, 시력 상실 및 심지어 눈의 소실을 야기할 수 있다. MMP-9(matrix metalloproteinase-9)의 농도 및 활성화는 안구 건조증 환자의 눈물뿐만 아니라 실험용 안구 건조증(EDE) 마우스의 각막 상피 및 눈물에서도 크게 증가하는 것으로 보고되어 왔다. 안구건조증은 일반적으로 눈물이 부족하거나 그 성분에 변동이 생겨 눈물층(Tear film)에 이상이 생기면서 여러 가지 불편한 증상을 일으키게 된다. 최근에는 눈물막의 조성의 변화에 의한 질환, 라식수술 후에 일어나는 안구건조증과 같은 신경인성(neurogenic) 요소로 인한 새로운 형태의 안구건조증들이 발생하여 그 정의가 더욱 확대해석 되고 있다(American Journal of Ophthalmology, 140. 507, 2005).
- [4] 이러한 안구건조증은 안과를 방문하는 전체 환자의 50% 이상에서 발견되고 있고, 노령 인구, 특히, 갱년기를 지난 여성들의 70 내지 80% 이상이 안구건조증으로 인한 눈의 불편을 호소하고 있다. 과거에는 안구건조증의 발생 원인이 눈물샘에서의 눈물 생성 저하로 인한 수성층의 부족에 기인한 것으로 생각하였으나, 최근에는 외부자극으로 인한 염증반응 또는 내인성 염증반응이 1차 요인으로 밝혀지고 있으며, 이로 인한 각막상피세포의 장애 및 각막상피세포 및 각막실질세포 간의 상호작용의 저하로 발생하는 만성적 안구 표면손상이 문제가 되고 있다. 안구건조증은 노화, 호르몬 변화, 환경적인 요인(바람, 열, 먼지, 담배연기, 헤어드라이어), 눈 깜박거림 빈도의 감소(VDT

증후군), 콘택트렌즈착용, 라식수술, 약물복용에 의한 원인, 자가면역질환(루푸스, 류마티스관절염 그리고 Sjogren's 증후군)등 다양한 원인에 의해 발병할 수 있다(American Journal of Ophthalmology, 137, 337-342, 2004).

- [5] 한편, 염증을 줄여주기 위해 사용되는 비 특이적인 COX 효소 억제제인 NSAID는 프로스타글란딘(prostaglandin) 레벨을 비특이적으로 줄여주는 효과를 가지고 있다. 이 약물은 염증을 줄여주고 통증을 줄여줄 수 있다고 알려져 있지만, leukotrienes, lipoxins, hydroperoxyeicosatetraenoic acids 등을 생성하는 부가적인 활성화가 일어나는 것으로도 알려져 있다. 안과 영역에서는 비 특이적 COX 효소 억제제가 개발되어 점안제로 사용되고 있으나, 상기 명시된 부가적 염증 산물의 활성화에 의해 각막 천공 등의 심각한 부작용이 학계에 보고되어 있다.
- [6] 이에 본 발명자들은 안구건조증을 포함하여 안구 통증을 유발하는 안질환을 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물을 개발하고자 예의 노력한 결과, 안구 통증 증상이 있는 환자의 눈물에서 정상인에 비하여 PGE2(prostaglandin E2)의 발현 수준이 높음을 확인하였고, PGE2 합성 억제제를 동물모델에 점안한 경우 안구 통증 치료 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 PGE2 합성 억제제를 유효성분으로 포함하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하고, PGE2의 수준을 측정할 수 있는 안구 통증 진단용 키트를 제공하는 데 있다.

[9]

과제 해결 수단

- [10] 본 발명에 따르면, 안구 통증 증상이 있는 환자의 눈물에서 PGE2의 수준이 높고 PGD2의 수준이 낮은 것을 토대로 PGE2 합성 억제제를 유효성분으로 포함하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하고, PGE2 수준을 감소시키는 안구 통증 완화제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 나아가, 환자의 눈물에서 PGE2 수준, PGD2 수준 및 COX2 수준을 측정하여 안구 통증을 진단할 수 있는 키트 및 안구 통증 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다.
- [11] 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, PGE2 합성 억제제를 유효성분으로 포함하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [12] 본 발명은 다른 구체예에서 PGE2 합성 억제제를 유효성분으로 포함하는 안구 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [13] 본 발명에 있어서, 상기 PGE2 합성 억제제는 5-Deoxy-A12, 14-PGJ2, Exisulind, NS-398, Leukotnene C4, mk-886, Analogues of MK-886, MF63, Thienopyrrole,

Naphthalene disulphonamide, Resveratrol 및 γ -hydroxybutenolide로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[14] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 PGE2의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[15] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 안구 통증은 안구건조증, 염증성 안질환 또는 콘택트렌즈 사용에 기인한 안구 통증인 것을 특징으로 할 수 있다.

[16] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 현탁액, 산제, 분말제, 과립제, 정제, 서방형 제제, 주사제, 연고제, 점안제, 캡슐제, 콘택트렌즈 세정제 또는 콘택트렌즈 윤활제 형태임을 특징으로 할 수 있고, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[17] 본 발명에 있어서, 상기 건강기능식품은 캡슐제, 정제, 과립제, 분말제 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있다.

[18] 본 발명은 또 다른 구체예에서, (a) 서열번호 1로 표시되는 PGE2 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;

[19] (b) 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및

[20] (c) 상기 단백질의 양 또는 활성이 감소조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 안구 통증을 완화시키는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[21] 본 발명은 또 다른 구체예에서, (a) 서열번호 1로 표시되는 PGE2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;

[22] (b) 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및

[23] (c) 상기 유전자의 발현량이 감소조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 안구 통증을 완화시키는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법을 제공하고, 상기 PGE2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[24] 본 발명은 또 다른 구체예에서, (a) 서열번호 3으로 표시되는 COX2 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;

[25] (b) 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및

[26] (c) 상기 단백질의 양 또는 활성이 감소조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 안구 통증을 완화시키는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[27] 본 발명은 또 다른 구체예에서, (a) 서열번호 3으로 표시되는 COX2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;

[28] (b) 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및

[29] (c) 상기 유전자의 발현량이 감소조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 안구 통증을 완화시키는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법을 제공하고, 상기 COX2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [30] 본 발명은 또 다른 구체예에서, COX2 억제제를 유효성분으로 포함하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [31] 본 발명은 또 다른 구체예에서, (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 서열번호 1로 표시되는 PGE2의 수준을 측정하는 단계;
- [32] (b) 상기 PGE2의 수준을 정상 대조군 시료의 수준과 비교하는 단계를 포함하는 안구 통증 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [33] 본 발명에 있어서, 상기 정보제공방법은 PGD2 또는 COX2의 수준을 측정하여 정상 대조군 시료의 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 이 때, PGE2 및 COX2 수준이 정상 대조군보다 과발현되고, PGD2 수준이 정상 대조군보다 저발현되는 경우에 안구 통증이 있는 것으로 판단할 수 있다.
- [34] 본 발명은 또 다른 구체예에서, PGE2에 부착된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 안구 통증 진단 또는 예측용 키트를 제공한다.
- [35] 본 발명에 있어서, 상기 안구 통증 진단 또는 예측용 키트는 PGD2에 부착된 단백질 또는 COX2에 부착된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [36] 상기 키트는 PGE2, PGD2 및 COX2에 검출을 위한 단백질을 부착시키고 상기 부착 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 부착된 단백질은 고추냉이 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase), 염기성 포스파타아제(alkaline phosphatase) 또는 β -갈락토시다아제일 수 있다.
- [37] 본 발명에 있어서, 상기 PGE2, PGD2 및 COX2의 수준은 효소-결합된 면역흡착시험(ELISA), 방사선면역측정법(RIA), 기체크로마토그래피-질량분석(GC-MS), 액체크로마토그래피-질량분석(LC-MS) 또는 LC-MS/MS으로 측정하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [38] 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물, 기능성 식품(neutraceutical) 조성물 또는 식품 조성물로 제조될 수 있다.
- [39] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수

있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 점막 투여 및 점안 투여 등으로 투여할 수 있다.

- [40] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 1일 당 0.001-100 mg/kg(체중), 0.01-80 mg/kg(체중), 0.1-60 mg/kg(체중)일 수 있다. 또한, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다. 특히, 점안 투여의 경우에는, 0.001 내지 3%(w/v, 이하 동일), 바람직하게는 0.01 내지 1% 정도의 제제를 1일 1회 내지 수회 점안한다.
- [41] 본 발명의 약제학적 및 건강식품상의 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [42] 본 발명의 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물의 제형은 용액, 현탁액, 시럽제, 에멀전, 리포솜, 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제, 서방형제제 점안제(eye drop), 캡슐제, 콘택트렌즈 세정제 및 콘택트렌즈 윤활제이고, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [43] 본 발명에서 "진단"이란 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 말하며, 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후를 판정하는 것을 포함한다.
- [44] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시료"는 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 양 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화합물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [45] 유전자의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press (2001)), 노던블롯팅(Peter B. Kaufma et al., Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press (2001)) 또는 인 시투(in situ) 혼성화 반응(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press (2001))을 이용하여 실시할 수 있다.
- [46] RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 시료를 처리한 세포에서 총 RNA를 분리한 다음, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 단일가닥 cDNA를 제조한다. 이어, 단일가닥 cDNA를 주형으로 이용하고, 유전자-특이적

프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 실시한다. 유전자-특이적 프라이머 세트는 하기 표 2에서 열거 되어 있다. 그런 다음, PCR 증폭 산물을 전기영동하고, 형성된 밴드를 분석하여 유전자의 발현량 변화를 측정한다.

- [47] 단백질의 양의 변화는 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 표지된 단백질-특이 항체가 이용될 수 있다. 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (a) 시료가 처리된 세포로부터 추출물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (b) 단백질-특이 항체와 상기 세포 추출물을 반응시키는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (d) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다. 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 셀이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이트 플레이트이다. 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF (enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) 및 o-페닐렌디아민(OPD)과 같은 기질이 이용될 수 있다. 상기 ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

- [48] 진단용 키트로 활용하기 위하여, PGE2, PGD2 및 COX2는 검출가능하게 표식되는 것이 바람직하다. 생분자들을 표식시키는데 사용가능한 다양한 방법들이 당업자에게 잘 알려져 있고, 본 발명의 범주내에서 고려된다. 상기 방법들은 Tijssen, 'Practice and theory of enzyme immuno assays', Burden, RH and von Knippenburg (Eds), Volume 15 (1985), 'Basic methods in molecular biology'; Davis LG, Dibmer MD; Battey Elsevier (1990), Mayer et al., (Eds) 'Immunochemical methods in cell and molecular biology' Academic Press, London (1987), or in the series 'Methods in Enzymology', Academic Press, Inc에 기술되어 있다.
- [49] 당업자에게 공지되어 있는 표식 방법과 많은 다른 표식들이 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 표식 종류의 예로는 효소, 방사성 동위원소, 콜로이드 금속, 형광 화합물, 화학발광 화합물 및 생발광 화합물이 있다.
- [50] 통상적으로 사용되는 표식들은 형광물질(가령, 플루레신, 로다민, 텍사스 레드 등), 효소(가령, 고추냉이 퍼옥시다아제, β -갈락토시다아제, 알칼리 포스파타아제), 방사성 동위원소(가령, ^{32}P 또는 ^{125}I), 바이오틴, 디곡시게닌, 콜로이드 금속, 화학발광 또는 생발광 화합물(가령, 디옥세탄, 루미놀 또는 아크리디늄)을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 효소 또는 바이오티닐기의 공유 결합법, 요오드화법, 인산화법, 바이오틴화법 등과 같은 표식 방법들이 당 분야에 잘 알려져 있다.
- [51] 검출 방법들로는 오토라디오그래피, 형광 현미경, 직접 및 간접 효소반응 등이 있으며, 이에 제한되지는 않는다. 통상적으로 사용되는 검출 분석법으로는 방사성 동위원소 또는 비-방사성 동위원소 방법이 있다. 이들은 그중에서도 웨스턴블롯팅, 오버레이-분석법, RIA(Radioimmuno Assay) 및 IRMA(Immune Radioimmunometric Assay), EIA(Enzyme Immuno Assay), ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), FIA(Fluorescent Immuno Assay) 및 CLIA(Chemiluminescent Immune Assay)이 있다.

[52]

발명의 효과

- [53] 본 발명에 따른 PGE2 합성 억제제를 유효성분으로 포함하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 이용하면 PGE2의 발현 수준을 선택적으로 억제시킴으로써 안구 통증 증상을 호전시킬 수 있고, 나아가 안구건조증의 치료 및 예방에 효과가 있다. 또한, PGE2, PGD2 및 COX2의 양을 검출하는 키트를 이용하여 임상에서 손쉽게 안구 통증 증상을 진단할 수 있어 안구건조증 환자 뿐만 아니라 안 수술 후 환자의 상태를 파악하는 데 널리 활용될 수 있다.
- [54] **도면의 간단한 설명**
- [55] 도 1은 안구 통증 증상이 있는 환자의 눈물에 포함된 PGE2/PGD2 레벨 정도와 환자의 증상 정도 간의 관련성을 나타내는 그래프이다.

- [56] 도 2는 안구 통증을 유발시킨 마우스에 COX2 억제제를 점안한 후, 안구 불편감 정도를 나타낸 결과이다.
- [57] 도 3은 안구 통증을 유발시킨 마우스에 COX2 억제제를 점안한 후, TNF-alpha의 mRNA 레벨을 측정한 결과이다.
- [58] 도 4는 안구 통증을 유발시킨 마우스에 COX2 억제제를 점안한 후, IL-1의 mRNA 레벨을 측정한 결과이다.

[59]

발명의 실시를 위한 형태

- [60] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[61]

[62] 실시예 1

[63] 안구 통증 환자의 눈물 성분 분석

- [64] non-Sjogren형 안구 통증 증세를 보이는 환자 23명과 정상안 17명의 눈물을 폴리에스테르 섬유 로드(polyester fiber rod (TRANSORB® WICKS, FILTRONA, Richmond, VA))를 이용하여 수집한 후 나노규모의 액체크로마토그래피-탠덤 질량분석(Nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry(LC-MS/MS)) 방법을 통해 눈물 속 프로스타글란딘(prostaglandin)의 수준을 측정하였다(an Applied Biosystem/MDS Sciex 4000 Qtrap quadrupole mass spectrometer (AB/MDS Sciex, Concord, Canada)를 이용).

- [65] 그 결과, 안구 통증 증세를 보이는 환자군의 눈물 속에서 PGE2 수준이 정상안에 비하여 3배 이상 증가 되었고, PGD2 수준은 정상안의 7% 수준으로 감소하였을 확인하였다(표 1).

[66]

[67] 표 1

[Table 1]

	건성안 환자 (n=46)	대조군 (n=33)	p value
PGE2 (ng/ml)	136.25±170.82	43.89±41.83	0.003**
PGD2 (ng/ml)	5.41±11.00	72.15±202.42	0.028*

[68]

[69] 실시예 2

[70] PGE2 수준에 따른 안구 통증 증상 정도의 확인

- [71] 안구 통증 증세를 보이는 환자군과 정상군에서, 눈물을 채취하기 전에 증상의 정도를 시각통증척도(Visual analogue scale)를 이용하여 확인하였다. 시각통증척도는 0 부터 10 까지의 눈금으로 되어 있고, 0은 증상이 없는 상태,

10은 참을 수 없는 통증 혹은 불편감을 표현하는 상태로, 환자의 증상을 정도를 점수화하여 확인하였다. 이를 프로스타글란딘 수준의 변화와 관련성이 있는지를 통계학적으로 분석하였다.

[72] 그 결과, 안구 통증으로 인한 환자의 불편감이 증가할수록 PGE2/PGD2 비율의 값이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 1).

[73]

[74] **실시예 3**

[75] 안구 통증을 유발시킨 마우스 실험

[76] B6 마우스를 dry eye chamber를 이용하여 안구통증을 유발시키는 환경에 1주일 간 노출시킨 후, 실험군과 대조군으로 나누어 PGE 합성 억제제로 알려진 각 물질을 실험군에 점안하였다. 실험군에는 5 μ g/ml의 celecoxib(sigma)를 하루에 두 번 점안하고, 대조군에는 0.1%의 히알루론산(hyaluronic acid)을 점안하였다.

[77] 점안 1 주일 후, 실험군과 대조군 마우스의 각막 손상 상태를 표준화된 프로토콜을 이용하여 측정하였다. 그 결과, celecoxib을 점안한 실험군의 경우 각막 손상의 정도가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다(도 2).

[78] 또한, 점안 1 주일 후 실험군과 대조군 마우스의 안구를 적출하여 안구표면에서의 TNF-alpha, IL-1 mRNA의 수준을 real time RT-PCR로 측정하였다. 그 결과, celecoxib을 점안한 실험군의 경우, TNF-alpha, IL-1 mRNA 수준이 크게 감소함을 확인하였다(도 3, 도 4).

[79]

[80] **실시예 4**

[81] 안구 통증 환자를 대상으로 한 PGE2 합성 억제제 투여 실험

[82] 안구 통증 증세가 있는 환자를 대상으로 PGE2 합성 억제제를 점안하고, 대조군과 비교하여 눈 깜빡임의 횟수가 감소하였는지를 확인하였다. 사용된 PGE2 합성 억제제는 15-Deoxy-A12, 14-PGJ2, Exisulind, NS-398, Leukotnene C4, mk-886, Analogues of MK-886, MF63, Thienopyrrole, Naphthalene disulphonamide, Resveratrol, γ -hydroxybutenolide를 사용하였다.

[83] 그 결과, PGE 합성 억제제를 점안한 경우, 안구의 불편감을 줄여주어 대조군에 비하여 눈 깜빡임의 횟수가 감소한 것을 확인하였다(표 2).

[84]

[85] 표 2

[Table 2]

사용된 물질	치료군 (n=10)의 눈 깜빡임(회수/5min)	Control 군 (n=10)의 눈 깜빡임(회수/5min)	Pvalue
15-Deoxy-A12, 14-PGJ2	11	25	0.03*
Exisulind	14	18	0.02*
NS-398	13	20	0.015*
Leukotnene C4	17	21	0.04*
mk-886	15	24	0.04*
Analoguesof MK-886	10	27	0.012*
MF63	9	24	0.02*
Thienopyrrole	13	23	0.005*
Naphthalene disulphonamide	16	20	0.004*
Resveratrol	17	19	0.04*
γ -hydroxybutenolide	18	22	0.037*

[86]

[87] 실시예 5[88] 안구 통증 환자를 대상으로 한 선택적 **COX2** 억제제 투여 실험

[89] 선택적 **COX2** 억제제가 비선택적 **COX2** 억제제에 비하여 안구 통증 증세 감소에 효과적인지 여부를 확인하기 위하여, 선택적 **COX2** 억제제, 비선택적 **COX2** 억제제 및 NSAID를 투여하였다. 안구 통증 증세가 있는 환자를 대상으로 선택적 **COX2** 억제제를 점안하고, 비선택적 **COX2** 억제특성을 가지는 대조군(Diclofenac)과 비교하여 눈 깜빡임의 횟수가 감소하였는지를 확인하였다. 사용된 선택적 **COX2** 억제제는 구조적으로 분류하여 각 대표 물질로 Nimesulud, Celecoxib, Meloxicam, S-2474(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene), cis-Stilbenes를 사용하였고, 선택적 **COX2** 억제제 특성을 갖는 NSAID로 Ibuprofen을 포함하였다.

[90] 그 결과, 선택적 **COX2** 억제제를 점안한 경우, 안구의 불편감을 줄여주어 대조군에 비하여 눈 깜빡임의 횟수가 감소한 것을 확인하였다(표 3).

[91]

[92] 표 3

[Table 3]

분류	사용된 물질	치료군 눈 깜빡임 횟수(n=3)	대조군 눈 깜빡임 횟수(n=3)	p value
선택적 COX-2 억제제 특성을 갖는 Classic NSAID	Ibuprofen	17	25	0.03
디아릴- 또는 아릴-헥테로아 릴 에테르 및 티오에테르	Nimesulud	16	22	0.04
비아시날 디아릴 헥테로사이클	Celecoxib	17	23	0.012
구조적으로 변형된 classic NSAID 및 다른 화합물	Meloxicam	20	26	0.04
항산화 구성성분을 가지는 화합물	S-2474	15	27	0.004
1,2-디아릴에틸 렌 유도체	cis-Stilbenes	22	29	0.03

[93]

[94] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[95]

산업상 이용가능성

[96] 본 발명에 따른 PGE2 합성 억제제를 유효성분으로 포함하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 이용하면 PGE2의 발현 수준을 선택적으로 억제시킴으로써 안구 통증 증상을 호전시킬 수 있고, 나아가 안구건조증의 치료

및 예방에 효과가 있어 유용하다.

[97]

서열목록 Free Text

- [98] 서열번호 1 및 2는 각각 PGE2 단백질 서열 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 나타내고, 서열번호 3 및 4는 각각 COX2 단백질 서열 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 나타낸다.

청구범위

- [청구항 1] PGE2 합성 억제제를 유효성분으로 포함하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 PGE2 합성 억제제는 5-Deoxy-A12, 14-PGJ2, Exisulind, NS-398, Leukotnene C4, mk-886, Analogues of MK-886, MF63, Thienopyrrole, Naphthalene disulphonamide, Resveratrol 및 γ -hydroxybutenolide로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 PGE2의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 현탁액, 산제, 분말제, 과립제, 정제, 서방형 제제, 주사제, 연고제, 점안제, 캡슐제, 콘택트렌즈 세정제 또는 콘택트렌즈 윤활제 형태임을 특징으로 하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서,
상기 안구 통증은 안구건조증, 염증성 안질환 또는 콘택트렌즈 사용에 기인한 안구 통증인 것을 특징으로 하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] PGE2 합성 억제제를 유효성분으로 포함하는 안구 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서,
상기 PGE2 합성 억제제는 5-Deoxy-A12, 14-PGJ2, Exisulind, NS-398, Leukotnene C4, mk-886, Analogues of MK-886, MF63, Thienopyrrole, Naphthalene disulphonamide, Resveratrol 및 γ -hydroxybutenolide로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 안구 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 9] 제 7항에 있어서,
상기 건강기능식품은 PGE2의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 안구 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 10] 제 7항에 있어서,
상기 건강기능식품은 캡슐제, 정제, 과립제, 분말제 또는 음료

- 형태임을 특징으로 하는 안구 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 11] 제 7항에 있어서,
상기 안구 통증은 안구건조증, 염증성 안질환 또는 콘택트렌즈 사용에 기인한 안구 통증인 것을 특징으로 하는 안구 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 12] (a) 서열번호 1로 표시되는 PGE2 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
(b) 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및
(c) 상기 단백질의 양 또는 활성이 감소조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 안구 통증을 완화시키는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서,
상기 안구 통증은 안구건조증, 염증성 안질환 또는 콘택트렌즈 사용에 기인한 안구 통증인 것을 특징으로 하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법.
- [청구항 14] (a) 서열번호 1로 표시되는 PGE2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
(b) 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및
(c) 상기 유전자의 발현량이 감소조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 안구 통증을 완화시키는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법.
- [청구항 15] 제 14항에 있어서,
상기 PGE2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법.
- [청구항 16] 제 14항에 있어서,
상기 안구 통증은 안구건조증, 염증성 안질환 또는 콘택트렌즈 사용에 기인한 안구 통증인 것을 특징으로 하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법.
- [청구항 17] (a) 서열번호 3으로 표시되는 COX2 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
(b) 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및
(c) 상기 단백질의 양 또는 활성이 감소조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 안구 통증을 완화시키는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법.
- [청구항 18] 제 17항에 있어서,
상기 안구 통증은 안구건조증, 염증성 안질환 또는 콘택트렌즈 사용에 기인한 안구 통증인 것을 특징으로 하는 안구 통증

- 완화제의 스크리닝 방법.
- [청구항 19] (a) 서열번호 3으로 표시되는 COX2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
(b) 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및
(c) 상기 유전자의 발현량이 감소조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 안구 통증을 완화시키는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법.
- [청구항 20] 제 19항에 있어서,
상기 COX2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법.
- [청구항 21] 제 19항에 있어서,
상기 안구 통증은 안구건조증, 염증성 안질환 또는 콘택트렌즈 사용에 기인한 안구 통증인 것을 특징으로 하는 안구 통증 완화제의 스크리닝 방법.
- [청구항 22] COX2 억제제를 유효성분으로 포함하는 안구 통증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 23] (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 서열번호 1로 표시되는 PGE2의 수준을 측정하는 단계;
(b) 상기 PGE2의 수준을 정상 대조군 시료의 수준과 비교하는 단계를 포함하는 안구 통증 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 24] 제 23항에 있어서,
PGD2 또는 COX2의 수준을 측정하여 정상 대조군 시료의 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 안구 통증 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 25] 제 23항 또는 제 24항에 있어서,
상기 PGE2, PGD2 또는 COX2의 수준은 효소-결합된 면역흡착시험(ELISA), 방사선면역측정법(RIA), 기체크로마토그래피-질량분석(GC-MS), 액체크로마토그래피-질량분석(LC-MS) 또는 LC-MS/MS에 의해서 측정하는 것을 특징으로 하는 안구 통증을 위한 정보제공방법.
- [청구항 26] PGE2에 부착된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 안구 통증 진단 또는 예측용 키트.
- [청구항 27] 제 26항에 있어서,
PGD2에 부착된 단백질 또는 COX2에 부착된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 안구 통증 진단 또는 예측용 키트.
- [청구항 28] 제 26항 또는 제 27항에 있어서,
상기 부착된 단백질은 고추냉이 퍼옥시다아제(horseradish

peroxidase), 염기성 포스파타아제(alkaline phosphatase) 및 $\beta\beta$ -갈락토시다아제로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 안구 통증진단 또는 예측용 키트.

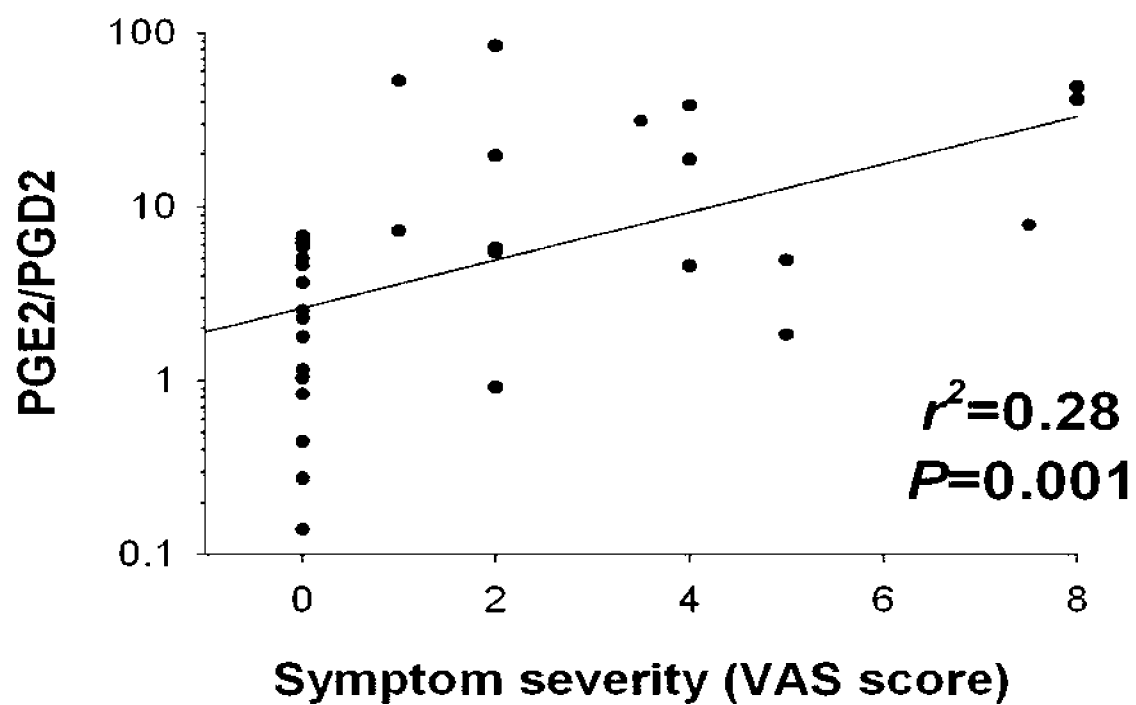
[청구항 29] PGE2 합성 억제제를 포유동물에 투여하여 안구통증을 예방 또는 치료하는 방법.

[청구항 30] COX2 억제제를 포유동물에 투여하여 안구통증을 예방 또는 치료하는 방법.

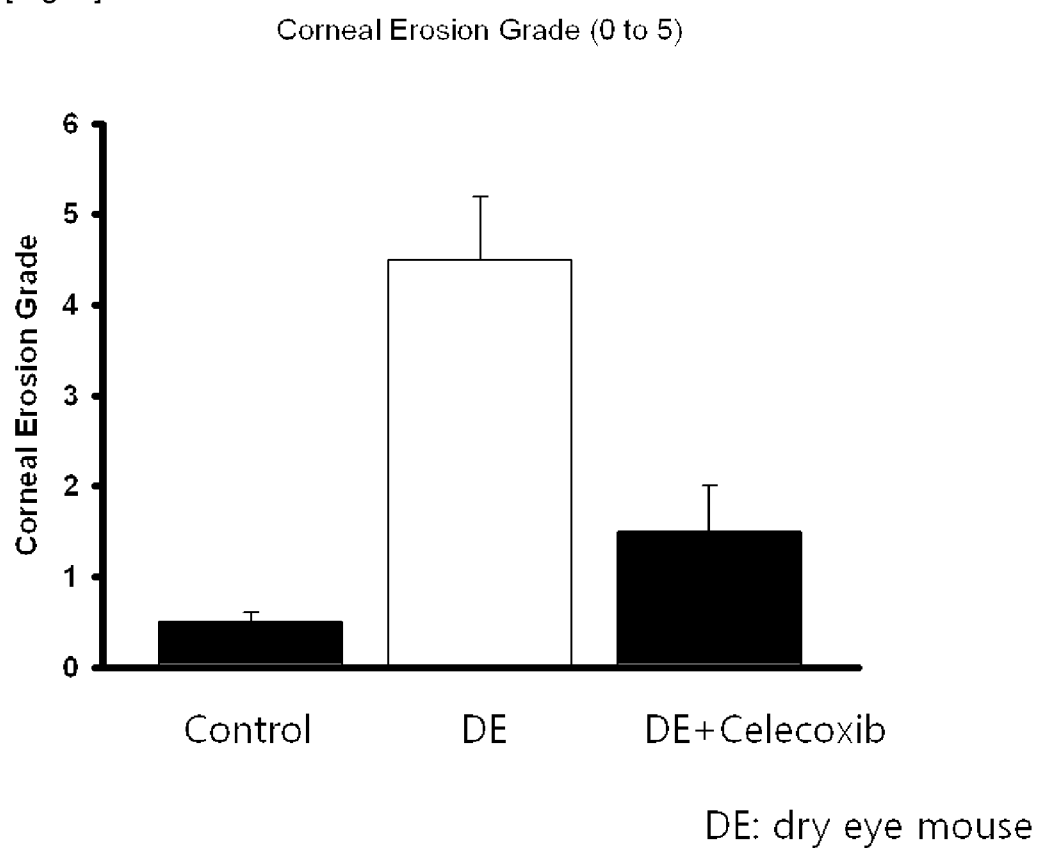
[청구항 31] 안구통증을 예방 또는 치료하기 위한 PGE2 합성 억제제의 용도.

[청구항 32] 안구통증을 예방 또는 치료하기 위한 COX2 억제제의 용도.

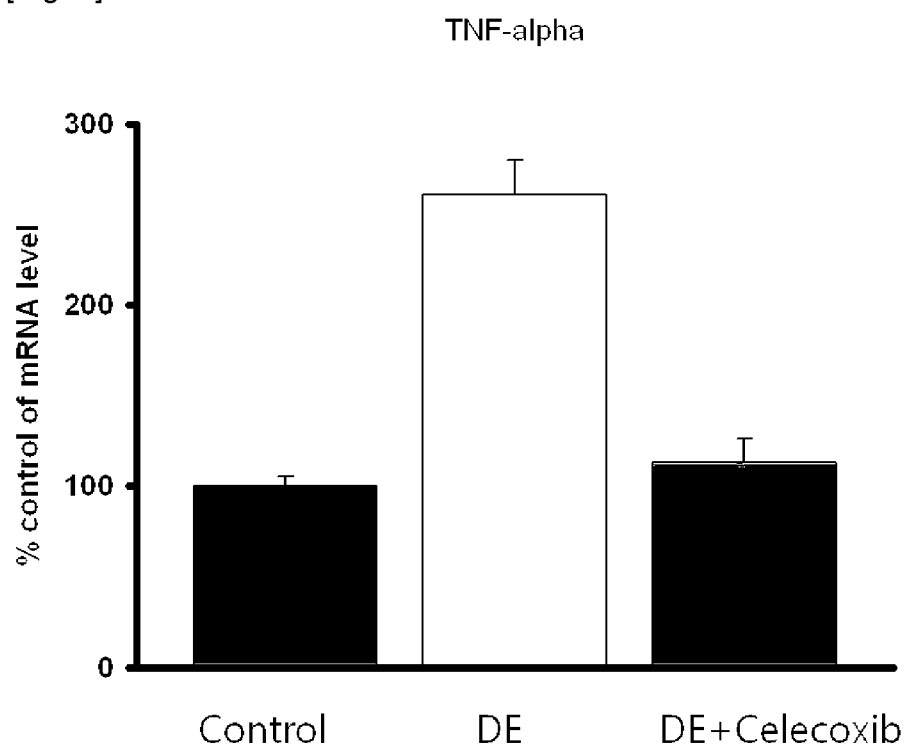
[Fig. 1]



[Fig. 2]

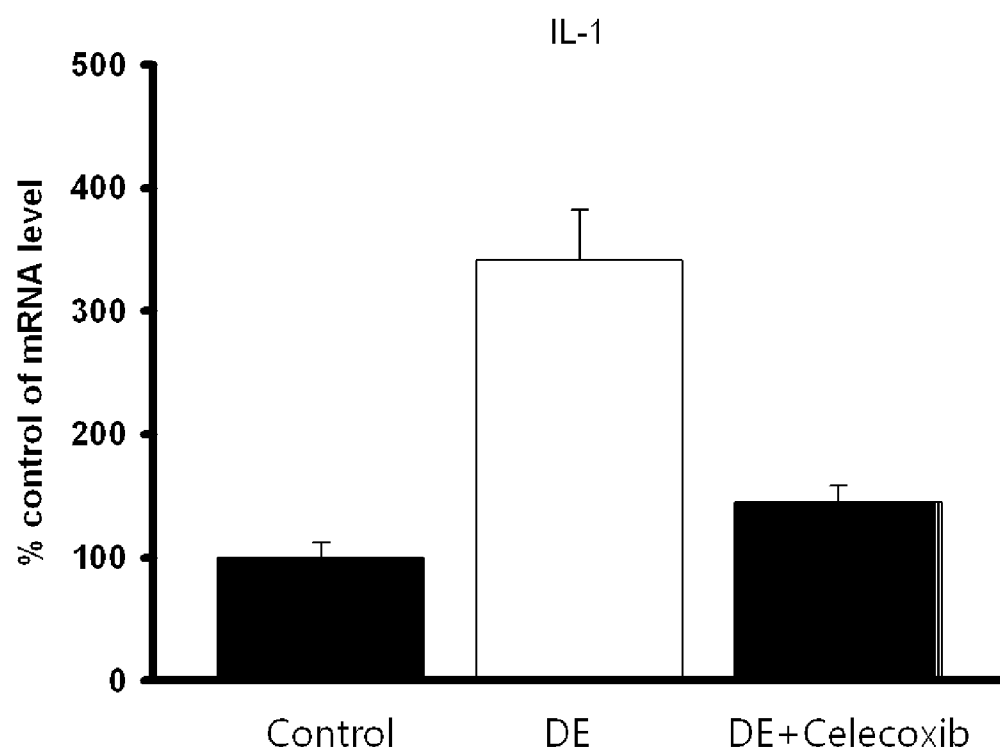


[Fig. 3]



DE: dry eye mouse

[Fig. 4]



DE: dry eye mouse