(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0004370
(43) 공개일자 2011년01월13일

(51) Int. Cl.
A61K 36/48 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7021294
(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년02월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2010년09월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/034712
(87) 국제공개번호 WO 2009/108577
국제공개일자 2009년09월03일
(30) 우선권주장
12/036,565 2008년02월25일 미국(US)

(71) 출원인
내셔널 양밍 유니버시티
타이완 11211 R.O.C., 타이페이, 페이토 디스트릭트, 리농 스트리트 2구역, 155
(72) 발명자
우, 롱-쭌
대만 타이페이 112 베이토우 디스트릭트 리농 스트리트 섹션2 넘버 155
(74) 대리인
홍순우, 김해중

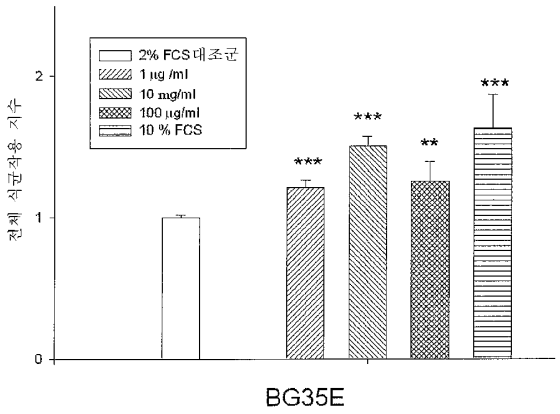
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 안질환을 치료하기 위한 검은 콩의 용도

(57) 요 약

본 발명은 망막 색소 상피(RPE) 장애와 관련된 질환 또는 질병의 치료를 필요로 하는 인간에게 유효량의, 검은 콩의 종피, 또는 검은 콩 또는 이의 종피의 알코올 추출물인 검은 콩(*Glycine max (L.) Merr*) 생성물을 투여함을 포함하여, 망막 색소 상피(RPE) 장애와 관련된 질환 또는 질병을 치료하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



BG35E

특허청구의 범위

청구항 1

망막 색소 상피(retinal pigment epithelium; RPE) 장애와 관련된 질환 또는 질병의 치료를 필요로 하는 인간에게 유효량의 검은 콩(*Glycine max (L.) Merr*) 생성물을 투여함을 포함하여, 망막 색소 상피(RPE) 장애와 관련된 질환 또는 질병을 치료하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 인간에게 RPE의 기능을 증가시키는데 효과적인 양의 검은 콩 생성물을 투여함을 포함하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 검은 콩 생성물이 RPE의 식균 능력(phagocytic ability)을 증가시키는데 효과적인 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 망막 색소 상피 장애와 관련된 질환 또는 질병이 RPE 기능이상과 관련이 있는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 망막 색소 상피 장애와 관련된 질병이 망막 박리, 시각 기능의 손실, 또는 혈애 망막 장벽 누출인 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 망막 색소 상피 장애와 관련된 질환이 증식유리체망막병증(proliferative vitreoretinopathy), 연령관련 황반 변성(age related macula degeneration), 색소성 망막염(retinitis pigmentosa), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 반점각막이상증(macular dystrophy), 또는 맥락막혈관신생(choroidal neovascularization)인 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 검은 콩 생성물이 액체 형태인 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 검은 콩 생성물이 건조 형태인 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 검은 콩 생성물이 검은 콩의 종피, 또는 검은 콩 또는 이의 종피의 알코올 추출물인 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 검은 콩 생성물이 검은 콩의 종피인 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 검은 콩 생성물이 검은 콩 또는 이의 종피의 알코올 추출물인 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 알코올 추출물이 검은 콩 또는 이의 종피의 에탄올 추출물인 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 에탄올 추출물이, 검은 콩을 수중 10%(v/v) 이상의 에탄올을 함유한 용매로 추출함으로써 제

조되는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 용매가 수중 35%(v/v) 에탄올을 함유하는 방법.

청구항 15

제 1항에 있어서, 검은 콩 생성물이 경구로 투여되는 방법.

청구항 16

세포를 유효량의 검은 콩(*Glycine max (L.) Merr*) 생성물로 처리함을 포함하여, 망막 색소 상피(RPE)의 식균 작용(phagocytosis)을 증가시키는 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 검은 콩 생성물이 검은 콩의 종피, 또는 검은 콩 또는 이의 종피의 알코올 추출물인 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 검은 콩 생성물이 검은 콩 또는 이의 종피의 알코올 추출물인 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 알코올 추출물이 검은 콩 또는 이의 종피의 에탄올 추출물인 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 에탄올 추출물이, 검은 콩을 수중 10%(v/v) 이상의 에탄올을 함유한 용매로 추출함으로써 제조되는 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서, 용매가 수중 35%(v/v) 에탄올을 함유하는 방법.

명 세 서

배 경 기 술

[0001] 검은 종피를 갖는 콩의 한 종류인 검은 콩(*Glycine max (L.) Merr*)은 중국 전통 의학에서 건강 식품 및 약초로서 오랫동안 사용되어 오고 있으며, 이에 따라 수년 동안 의학적 효과가 연구되고 있다. 몇몇 중국 의약품집(Chinese medical codices)에는 검은 콩이 해독제, 항염증 약물 및 혈액 영양소로서 제공될 수 있다고 기술되어 있다.

[0002] 상세하게, 검은 콩 식물성 화학물질(phytochemical)은 전이가능한 인간 방광 암종의 성장 및 마우스에서의 종양 혈관 신생을 억제하며[Zhou JR et al, *Cancer Res.* 58(22):5231-81999,1998]; 항산화 활성을 나타내는 검은 콩은 저밀도 지질단백질 산화를 감소시키는데, 이는 산화-관련 질환의 예방에 있어 중요한 역할을 수행할 수 있다[Takahashi. R et al, *J Agric Food Chem.*, 53(11):4578-82, 2005].

[0003] 망막 색소 상피(retinal pigment epithelium; RPE)는 부르크막(Bruch's membrane)과 광수용체 사이에 위치되어 있는, 망막의 표면층에서의 단일층 세포이다. RPE의 상부에서 융모 공정(villous process)은 광수용체의 외절(outer segment)에 연결되며, RPE의 하부에서의 기저 주름(basal infolding)은 부르크막을 통해 맥락막에 연결된다. RPE는 맥락막 및 망막의 독성 물질 및 대사산물을 효과적으로 제거하거나 전달할 수 있기 때문에, 이는 혈액-망막 장벽을 형성한다. 또한, RPE는 광 수용, 광 자극으로 인한 간상 세포 및 원추 세포로부터 분리된 외절의 식균화, 식포(phagosome)의 이화, 세포외 기질 및 멜라닌의 합성, 약제의 해독화, 광수용체의 외절을 재생산하기 위한 필수 물질의 제공, 비타민 A의 저장 및 전달, 로도스핀의 합성, 및 망막의 접착력의 형성과 같은 수많은 기능들을 갖는다[Wenzel et al., *Progress in Retinal and Eye Research* 24: 275-306, 2005].

[0004] 통계에 따르면, 랫트의 RPE는 하루에 광 자극으로 인해 간상 세포와 원추 세포로부터 분리된 25000개 외절들을 제거할 수 있는데, 이는 자주 일어나는 식세포 대사작용의 중요성을 명확하게 나타내는 것이다[Mayerson and

Hall, *The Journal of Cell Biology*, 103:299-308, 1986]. RPE의 정상 식균 작용(phagocytosis)은 망막에서 광수용체의 건강을 유지하는데 중요한 역할을 수행한다. 일단 RPE의 식균 능력이 감소되면, 광수용체의 변성을 초래할 것이다[Wenzel et al, *Progress in Retinal and Eye Research* 24: 275-306, 2005]. 이에 따라, RPE 기능을 유지하기 위하여, 시각 시스템(visional system)이 매우 중요하다. 지금까지, RPE 장애와 관련된 질환/질병에 대한 우수한 치료법은 존재하지 않는다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 검은 콩(*Glycine max (L.) Merr*)이 식균 능력과 같은 RPE 기능을 증가시키는데 예상치 못한 효능을 가지고 있다는 발견을 기초로 한 것이다.

[0006] 이에 따라, 본 발명의 일 양태는 망막 색소 상피(RPE) 장애와 관련된 질환 또는 질병의 치료를 필요로 하는 인간에게 유효량의 검은 콩 생성물을 투여함을 포함하여, 망막 색소 상피(RPE) 장애와 관련된 질환 또는 질병을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일 구체예에서, 검은 콩 생성물은 검은 콩의 종피, 또는 검은 콩 또는 이의 종피의 알코올 추출물이다.

[0007] 본 발명의 다른 양태는 세포를 유효량의 상술된 바와 같은 검은 콩 생성물로 처리함으로써 RPE의 식균 작용을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 하나 이상의 구체예들의 상세한 설명은 하기 설명에서 기술된다. 본 발명의 다른 특징들 또는 장점들은 여러 구체예들의 하기 상세한 설명, 및 첨부된 청구범위로부터 명확하게 될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0009] 본 발명의 상기 개요, 뿐만 아니라 하기 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 보다 잘 이해될 것이다. 본 발명을 예시할 목적으로, 도면에 바람직한 구체예들이 도시되어 있다. 그러나, 본 발명은 도시된 명확한 배열 및 수단으로 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

도면에서,

도 1a 및 도 1b는 RPE의 식균 작용에 대한 검은 콩 추출물의 효과를 도시한 다이아그램이다. 추출물(BG35E)은, 전체 검은 콩을 35%(v/v) 에탄올로 추출함으로써 제조된 것이다. *는 $P < 0.05$를 나타내는 것이며; **는 $P < 0.01$을 나타내는 것이며; ***는 $P < 0.001$을 나타내는 것이다.

도 2a 및 도 2b는 RPE의 식균 작용에 대한 검은 콩 추출물의 효과를 도시한 다이아그램이다. 추출물(BGSC35E)은, 검은 콩의 종피를 35%(v/v) 에탄올로 추출함으로써 제조된 것이다. *는 $P < 0.05$를 나타내는 것이며; **는 $P < 0.01$을 나타내는 것이며; ***는 $P < 0.001$을 나타내는 것이다.

도 3a 및 도 3b는 검은 콩 추출물(BGSC35E)로 처리된 안구 결함 마우스의 a-파 및 b-파를 각각 도시한 다이아그램이다. a-파 및 b-파는 망막전위도(ERG)에 의해 측정된 것이다. *는 $P < 0.05$를 나타낸 것이며; **는 $P < 0.01$을 나타낸 것이며; ***는 $P < 0.001$을 나타낸 것이다.

도 4a 및 도 4b는 검은 콩의 종피로부터 제조된 검은 콩 생성물(BGSC)로 처리된 안구 결함 마우스의 b-파를 각각 도시한 다이아그램이다. b-파는 ERG에 의해 측정된 것이다. *는 $P < 0.05$를 나타낸 것이며; **는 $P < 0.01$을 나타낸 것이며; ***는 $P < 0.001$을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본원에서 사용되는 하기 용어들은 청구범위 및 명세서를 보다 잘 해석하는데 사용될 수 있다.

[0011] 단수는 본원에서 하나 또는 하나를 초과하는 (즉, 적어도 하나) 문법적 대상을 칭하는 것으로 사용된다. 예로서, "성분"은 하나의 성분 또는 하나를 초과하는 성분을 의미한다.

[0012] 본원에서 사용되는 용어 "검은 콩의 알코올 추출물"은, 검은 콩 또는 이의 종피를 알코올 함유 용매, 예를 들어 에탄올 또는 메탄올을 10 내지 100%(v/v)의 농도로 함유한 용매로 추출함으로써 제조된 추출물을 칭하는 것이다.

[0013] 본원에서 사용되는 용어 "망막 색소 상피(RPE)"는 망막 시각 세포에 영양 공급하는 감각신경 망막 외측의 색소 세포층을 칭하는 것으로서, 하부 맥락막 및 상부 망막 시각 세포에 견고히 부착되어 있다. RPE는 색소 과립이 조밀하게 패킹되어 있는 육각형 세포의 단일 층으로 이루어져 있고, 매일 대략 30 내지 100 시신경원반(disc)의

턴오버율(turn over rate)로 폐기 시신경원반의 소화 및 식균 작용을 초래한다.

[0014] 본원에서 사용되는 용어 "망막 색소 상피 장애와 관련된 질환 또는 질병"은 RPE의 식균 능력의 감소 또는 트랜스 레티날(trans retinal)의 이성질체화와 같은, RPE 기능이상과 관련된 질환 또는 질병을 칭하는 것이다. RPE 기능이 감소되거나 상실될 때, 시력 손실, 실명, 망막 박리 또는 혈액-망막 장벽의 누출을 초래하도록, 망막 세포는 세포사멸하고 지지 조직의 하부층으로부터 분리될 수 있다[Martin L. Katz, *Arch Gerontol Geriatr.*, 34(3):359-70, 2002]. 망막 색소 상피 장애와 관련된 질병은 망막 색소 상피 분리와 같은 망막 분리[Tabandeh et al, *Retina.*, 26(9): 1063-9, 2006; Zayit-Soudry et al, *Survey of Ophthalmology*, 52(3):227-43, 2007], 시각 기능의 손실, 및 혈액-망막 장벽 누출을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, RPE의 장애는 다양한 질환을 초래할 것이며, 증식유리체망막병증[Lee J.J. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(9):3117-24, 2002], 연령관련 황반 변성(AMD)[Zarbin M.A., *Archives of Ophthalmology*, 122(4):598-614, 2004; Feher J. et al., *Neurobiology of Aging*, 27(7):983-93, 2006], 색소성 망막염, 당뇨병성 망막증, 반점각막이상증, 및 맥락막혈관신생[Imamura Y. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30):11282-7, 2006; Tabandeh H., et al., *Retina*, 26(9): 1063-9, 2006]을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 구 "RPE 장애와 관련된 질환/질병을 치료하는" 또는 "RPE 장애와 관련된 질환/질병의 치료"는 RPE 장애와 관련된 질환/질병, 이러한 질환/질병의 증상, 또는 이러한 질환/질병에 대한 소질(predisposition)을 지닌 피검체에, 이러한 질환/질병, 이러한 질환/질병의 증상, 또는 이러한 질환/질병에 대한 소질을 치료하거나, 치유하거나, 경감시키거나, 완화시키거나, 변화시키거나, 고치거나, 개선시키거나, 영향을 미칠 목적으로, 본원에 기술된 검은 콩 생성물의 적용 또는 투여를 칭하는 것이다.

[0016] 본원에서 사용되는 용어 "유효량"은 이를 필요로 하는 피검체에 하나 이상의 다른 활성제와 함께 투여시에, 피검체에 치료학적 효과를 제공하기 위해 요구되는 각 활성제의 양을 칭하는 것이다. 유효량은 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 투여 경로, 부형제 사용량, 및 다른 활성제와의 동시-사용에 따라 변경된다. 본 발명에 따르면, 유효량은 망막 색소 상피의 기능을 증가시키는데 효과적인 양을 칭한다.

[0017] 본 발명은 망막 색소 상피(RPE) 장애와 관련된 질환 또는 질병의 치료를 필요로 하는 인간에게 유효량의 검은콩(*Glycine max (L.) Merr*) 생성물을 투여함을 포함하여, 망막 색소 상피(RPE) 장애와 관련된 질환 또는 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 검은 콩 생성물은 검은 콩의 종피, 또는 검은 콩 또는 이의 종피의 알코올 추출물이다. 검은 콩 생성물은 널리 공지되거나 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 예에서, 검은 콩 생성물은 검은 콩의 종피일 수 있으며, 예를 들어, 상기 종피는 탈곡기에 의해 검은 콩으로부터 직접 껍질이 벗겨지고 작은 조각들로 부서질 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 예에 따르면, 검은 콩 생성물은 검은 콩 또는 이의 종피의 알코올 추출물일 수 있다. 알코올 추출물은 임의의 기준에 따라 얻어질 수 있거나 당업자에 의해 통상적으로 사용되는 기준에 따라 얻어질 수 있다. 예를 들어, 추출물은, 검은 콩 또는 이의 종피를 알코올 함유 용매, 예를 들어 에탄올 또는 메탄올을 10 내지 100%(v/v)의 농도로 함유한 용매로 추출함으로써 제조될 수 있다. 특정 예에서, 검은 콩 추출물은, 검은 콩을 알코올-함유 용매 중에서 적합한 온도 하에 충분한 시간 동안 담근 후에, 불용성 콩 물질을 예를 들어 여과로 제거하여 액체 형태의 검은 콩 추출물을 형성함으로써 얻어진다. 임의적으로, 생성물은 예를 들어 증발에 의해 추가로 건조되어 건조 형태의 생성물을 수득할 수 있다. 알코올 함유 용매는 10 내지 100%(v/v) 알코올, 및 하나 이상의 다른 적합한 용매, 예를 들어 물, 에탄올 또는 메탄올을 함유하는 용매일 수 있다. 본 발명의 일 예에서, 알코올 함유 용매는 수중 에탄올을 함유한 용매이다. 더욱 바람직하게, 용매는 수중 적어도 10%(v/v) 에탄올, 가장 바람직하게 수중 35%(v/v) 에탄올이다. 본 발명의 특정 예에서, 추출물은 (1) 전체 검은 콩 또는 이의 종피를 제공하는 단계, (2) 전체 콩 또는 이의 종피를 수중 35%(v/v) 에탄올을 함유한 용매로 추출하는 단계, (3) 이에 따라 형성된 가용성 분획물을 수집하는 단계, 및 임의적으로 (4) 수집된 가용성 분획물을 건조하는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된다.

[0020] 본 발명에 따르면, 검은 콩 생성물은 실시예 2에 기술된 바와 같이 RPE의 식균 능력의 증가 측면에서와 같이, 당해 분야에서 통상적으로 사용되거나 널리 공지된 방법 또는 모델에 의해 확인된, 망막 색소 상피의 기능을 증가시키고[Mayerson and Hall, *The Journal of Cell Biology*, 103:299-308, 1986], 본 명세서의 실시예 3 및 실시예 4에 기술된 바와 같이 안과 결함을 지닌 마우스 모델에서 b-파를 회복하는 능력[Thorn W. Mittag et al., *Exp Eye Res.*, 69:677-683, 1999]에 있어서 효과적인 것으로 예상치 못하게 밝혀졌다. 이에 따라, 본 발명은

RPE 장애와 관련된 질환 또는 질병의 치료를 필요로 하는 피검체에 유효량의 상술된 바와 같은 검은 콩 생성물을 투여함을 포함하여, RPE 장애와 관련된 질환 또는 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명에 따른 검은 콩 생성물은 식품, 식이 조성물, 또는 약제 조성물 형태일 수 있다. 일 예에서, 검은 콩 생성물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제, 및 임의적으로 다른 약제학적 활성제와 혼합되어 약제 조성물을 형성시킬 수 있다. 본 약제 조성물을 위해 적합한 담체 또는 부형제는 조성물의 활성 성분과 양립가능하고(바람직하게, 활성 성분을 안정화시킬 수 있고) 치료될 피검체에 유해하지 않는다는 측면에서 "허용가능"해야 한다. 담체의 예는 콜로이드성 이산화규소, 마그네슘 스테아레이트, 셀룰로즈, 소듐 라우릴 설페이트, D&C 엘로우 # 10, 미정질 셀룰로즈, 만니톨, 글루코즈, 탈지 분유, 폴리비닐피롤리돈, 및 전분, 또는 이들의 조합물을 포함한다. 약제 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 또는 액체와 같은 여러 형태일 수 있다.

[0022] 본 발명에 따르면, 상술된 조성물은 적합한 경로, 예를 들어 경구 투여로 투여될 수 있다. 경구 투여를 위한 고체 제형은 옥수수 전분, 젤라틴, 락토즈, 아카시아, 수크로즈, 미정질 셀룰로즈, 카올린, 만니톨, 디칼슘 포스페이트, 칼슘 카르보네이트, 소듐 클로라이드, 또는 알긴산과 같은 적합한 담체 또는 부형제를 함유할 수 있다. 이러한 고체 제형은 장에서 방출되도록 디자인될 수 있다. 예를 들어, 이러한 조성물은 장에서 약물을 방출하기 위해 작은 창자 또는 큰 창자의 pH에서 용해하거나 분산하는 장용 폴리머를 포함하는 기질 또는 벽(wall) 또는 클로저(closure)를 각각 갖는 고체 서브-유닛(sub-unit) 또는 캡슐 구획에 한정된다.

[0023] 다른 예에서, 본원에 기술된 검은 콩 생성물은 식료품 또는 식품 보충제(예를 들어, 영양 공급물 또는 약초 생성물)의 성분이다. 이러한 식료품은 식품 산업에서 임의의 표준법 또는 통상적으로 사용되는 방법들에 의해 제조될 수 있다.

[0024] 더욱 상세히 기술하지 않는 한, 당업자는 상기 상세한 설명을 기초로 하여, 본 발명을 이의 가능한 최대한의 범위로 사용할 수 있는 것으로 여겨진다. 이에 따라, 하기 특정 구체예들은 단지 예시적인 것으로서 해석되는 것으로, 어떠한 방식으로도 나머지 설명을 제한하지 않는다. 본원에 인용된 모든 문헌들은 참고문헌으로 포함된다.

[0025] 실시예 1: 검은 콩 생성물의 제조

[0026] 전체 검은 콩을 탈곡기로 껍질을 벗겨서 제 1 검은 콩 생성물을 제조하고, 이를 작은 조각으로 부수어서 검은 콩의 종피(BGSC)를 수득하였다.

[0027] 2 kg의 전체 검은 콩을 20L의 수중 35%(v/v) 에탄올로 추출하여 104.15 g의 에탄올 추출물(BG35E)을 수득하여, 전체 검은 콩으로부터 제 2 검은 콩 생성물을 제조하였다.

[0028] 검은 콩의 종피를 미니 시험 탈곡기로 제거하고, 종피를 수집하고(1.05 kg의 양), 얻어진 종피를 수중 35%(v/v) 에탄올로 추출하여 117.25 g의 미정제 추출물(BGSC35E)을 수득하여, 검은 콩의 종피로부터 제 3의 검은 콩 생성물을 제조하였다.

[0029] 실시예 2: RPE의 식균작용에 대한 검은 콩 추출물 (BG35E 및 BGSC35E)의 효과

[0030] *RPE의 제조*

[0031] 새로운 소의 눈을 도살장에서 도살 후 2 내지 3 시간 내에 수집하였다. 소 눈의 표면을 요오드 팅크(tincture)로 살균한 후에, PBS(포스페이트-완충 염수) 완충액으로 2회 세척하였다. 소 눈을 절개하고 수정체, 유리체 및 망막을 차례로 제거한 후에, 절개된 눈을 0.01% EDTA(에틸렌 디아민 테트라-아세트산, Sigma, USA)로 40분 동안 처리한 후에 5% 트립신(Merck, Germany)으로 15분 동안 처리하였다. 이후에, 둥근 첨단이 구비된 핀셋으로 눈을 약간 가압하고 여러 차례 피펫팅(pipetting)한 후에, RPE의 단일 세포를 얻었다. 피펫팅된 용액을 10% FCS(우태아 혈청, GIBCO (Gaithersburg, USA))을 함유한 DMEM(둘베코의 개질된 이글 배지, Gibco (Gaithersburg, USA)) 내에 배치시킨 후에, 37℃에서 5% CO_2와 함께 습윤화된 대기를 지닌 인큐베이터에서 인큐베이션시켰다. 세포가 컨플루언시(confluency)에 도달할 때까지 배지를 5 내지 6일 마다 교체하였다. 세포를 0.05% 트립신 및 0.02% EDTA를 함유한 배지로 2차 배양하였다. 생활성 시험을 위해 사용되는 주요 세포는 세포의 5번째 및 6번째 발생물이다.

[0032] *간상외절(Rod Outer Segment; ROS)의 제조*

[0033] 새로운 소 눈을 도살장으로부터 획득한 후에 얼음 위에 유지시키고 30 분 동안 빛에 노출시켰다. 소 눈의 표면을 요오드 팅크로 멸균시킨 후에, 한크(Hank's) 완충액으로 2회 세척하였다. 소 눈을 절개하고 수정체와 유리

체를 차례로 제거한 후에, 망막을 꺼내고, 조각들로 절단한 후에, 20% 수크로즈로 함유한 20mM 트리스-HCl로 처리하였다. 세포 용액을 4℃에서 3 시간 동안 교반한 후에, 공극 크기가 각각 300, 220, 110, 74, 53, 및 10 메시(mesh)인 필터(Small Parts , Miami, USA)로 여과하였다. ROS의 갯수를 계수한 후에, ROS를 바이알 당 1×10^8 ROS의 갯수로 분취하고, 바이알을 -20℃에서 저장하였다.

[0034] *플루오레세인 이소티오시아네이트-ROS(FITC-ROS)의 제조*

[0035] 저장된 ROS 용액을 해동시키고, 현탁액을 제거하였다. 얻어진 용액을 10% 수크로즈를 함유한 700 ml 보레이트 완충액(pH 8.0)과 혼합한 후에, 1/1,000 중량의 ROS의 속도로 FITC 분말(Invitrogen, USA)을 첨가하였다. 얻어진 용액을 4℃에서 1.5 시간 동안 교반하였다. ROS 상에 부착되지 않은 결합되지 않은 FITC를 20% 수크로즈를 함유한 20mM 트리스-아세테이트(pH 7.2)로 세척하여 제거하였다. 이후에 ROS 용액을 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 상기 기술된 관련 단계들을 여러 차례 반복하여 FITC-ROS의 펠렛을 수득하였다. 마지막으로, 상기 펠렛을 2.5% 수크로즈를 함유한 DMEM에 용해시켰다.

[0036] *시험관내에서 RPE의 식균 작용의 능력의 시험*

[0037] RPE를 1×10^4 세포/ml의 농도로 제공하고, 10% FCS DMEM을 함유한 96 웰 플레이트에 시딩하였다. 48 시간 인큐베이션 후에, 배양된 배지를 2% FCS DMEM으로 교체한 후에 각 웰에 20 ㎕의 BG35E 또는 BGSC35E를 0.1, 1, 10, 또는 100 ㎍/ml의 농도로 첨가하였다. 또한, 양성 대조군으로서 하나의 웰에 10% FCS를 첨가하고, 대조군으로서 블랭크 웰(2% FCS가 첨가)을 사용하였다. 1일 인큐베이션 후에, 20 ㎕의 FITC-ROS 용액을 각 웰에 첨가하고, 4 시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 상청액을 제거하여 각 웰에 대해 펠렛을 수득하였다. 각 웰의 펠렛을 2.5% 수크로즈/PBS로 여러 차례 세척하였다. 이후에, 전체 (외부 및 내부) ROS를 시토-플루오로미터(Cyto-Fluorometer)(Ex 필터: 485/20 nm, Em 필터: 530/25 nm)로 계수하였다. 또한, 외부 접착 FITC-라벨링된 ROS를 플루오로켄치 염료(FluoroQuench Dye)를 첨가하여 제거한 후에 식균된 ROS (섭취 식균 작용)을 측정하였다.

[0038] *결과*

[0039] 도 1a를 참조하여, 100 ㎍/ml의 BG35E로 처리된 ROS-FITC에서의 전체 식균 작용 지수는 대조군으로서 2% FCS로 처리된 ROS-FITC 보다 1.25배 높았다. 한편, 10 ㎍/ml의 BG35E로 처리된 ROS-FITC에서의 전체 식균 작용 지수는 대조군으로서 2% FCS로 처리된 ROS-FITC 보다 1.5배 높았다. 도 1b에 도시된 바와 같이, 1 ㎍/ml의 BG35E로 처리된 ROS-FITC에서의 섭취 식균 작용 지수는 대조군으로서 2% FCS로 처리된 것 보다 1.24배 높았다. 0.1 ㎍/ml의 BG35E로 처리된 ROS-FITC에서의 섭취 식균 작용 지수는 대조군으로서 2% FCS로 처리된 것 보다 높았다.

[0040] 도 2a를 참조하여, ROS-FITC가 검은 콩의 종피의 추출물(BGSC35E)과 함께 인큐베이션되었을 때 유사한 결과가 나타났다. 10 ㎍/ml의 BGSC35E로 처리된 ROS-FITC에서의 전체 식균 작용 지수는 2% FCS로 처리된 것 보다 1.37배 높았다. 또한, 1 ㎍/ml의 BGSC35E로 처리된 ROS-FITC에서의 전체 식균 작용 지수는 대조군으로서 2% FCS로 처리된 것 보다 1.55배 높았다. 도 2b를 참조하여, 10 ㎍/ml의 BGSC35E로 처리된 ROS-FITC에서의 섭취 식균 작용 지수는 대조군으로서 2% FCS로 처리된 것 보다 1.26배 높았으며, 1 ㎍/ml의 BGSC35E로 처리된 ROS-FITC에서의 섭취 식균 작용 지수는 대조군으로서 2% FCS로 처리된 것 보다 1.55배 높았다. 결론적으로, 도 1 및 도 2에서, 검은 콩의 추출물(BG35E) 또는 검은 콩의 종피의 추출물(BGSC35E)과 함께 인큐베이션한 후에, RPE의 식균 능력이 향상되는 것으로 밝혀졌다.

[0041] 실시예 3: 안과 결합을 지닌 마우스 모델에서 검은 콩 추출물(BGSC35E)의 효과

[0042] *마우스 망막전위도(Electroretinogram; ERG) 모델*

[0043] 10주령의 BALB/c 수컷 마우스를 정상군(건강한 마우스), 대조군(BGSC35E으로 처리함 없이 빛에 의해 손상됨), 10 mg/kg 체중의 용량으로 BGSC35E로 처리된 군(BGSC35E 10 mg/kg), 40 mg/kg 체중의 용량으로 BGSC35E로 처리된 군(BGSC35E 40 mg/kg), 또는 160 mg/kg 체중의 용량으로 BGSC35E로 처리된 군(BGSC35E 160 mg/kg)으로 무작위적으로 분류하였다. 각 군은 5마리의 마우스를 포함하였고, 충분한 사료 및 물이 제공되었다. BGSC35E 처리 첫째 날을 0일로 규정하였다. a-파(a-wave) 및 b-파(b-wave) 진폭을 -1, 1, 7, 13 및 19일에 ERG로 측정하였다.

[0044] -5일에, 정상적으로 빛에 반응하는 마우스를 시험을 위해 선택하였다. -1일에, 마우스를 어두운 곳에서 24 시간 동안 유지시켰다. 복강내 아베르틴(400 mg/kg 체중)으로 마취시킨 후에, 마우스를 따뜻한 패드 위에 배치시

켜 체온을 유지시켰다. 동공을 1% 시클로펜톨레이트로 확장시키고, 1% 프로파라카인으로 마취시켰다. 금 와이어 루프 전극을 각막에 배치시키고, 금 와이어 차동 전극(differential electrode)을 각 마우스의 혀에 배치시켰다. 기준 전극을 머리에 부착하였다. 마우스의 눈을 500 내지 575 nm의 파장을 갖는 6 볼트의 LED에 5,000 lux의 세기로 1 msec 동안 노출시켰다. 마우스의 a-파 및 b-파 진폭을 ERG로 측정하고, 정상 조건하 및 2시간 광 노출 후에 기록하였다.

[0045] *결과*

[0046] 도 3a를 참조하여, 40 mg/kg의 용량으로 BGSC35E로 처리된 마우스 및 160 mg/kg 용량으로 처리된 마우스는 a-파를 회복시키는 능력을 갖는 것으로 밝혀졌다. 13일에 40 mg/kg 또는 160 mg/kg 용량으로 BGSC35E로 처리된 마우스의 a-파의 세기 수치는 1일에 처리된 마우스와 비교하여 150% 이상 증가되는 것으로 밝혀졌다. 19일에 160 mg/kg의 용량으로 BGSC35E로 처리된 마우스의 a-파의 세기 수치는 또한 1일에 처리된 마우스와 비교하여 150% 이상 증가되는 것으로 밝혀졌다.

[0047] 도 3b를 참조하여, 대조군 및 40 mg/kg 용량으로 BGSC35E로 처리된 마우스 및 160 mg/kg 용량으로 처리된 마우스는 b-파를 회복하는 능력을 갖는 것으로 밝혀졌다. 대조군 및 13일 및 19일에 40 mg/kg 또는 160 mg/kg의 용량으로 BGSC35E로 처리된 마우스의 b-파의 세기 수치는 1일에 처리된 마우스와 비교하여 증가되는 것으로 밝혀졌다. 7일에 40 mg/kg의 용량으로 BGSC35E로 처리된 마우스의 b-파의 세기 수치는 또한 1일에 처리된 것과 비교하여 상당히 증가되는 것으로 밝혀졌다($p<0.001$). 상기의 결과를 고려할 때, BGSC35E로 처리된 마우스는 비정상 ERG 배열을 회복하는 능력을 갖는데, 이는 BGSC35E가 RPE 기능을 증가시키는 효능을 제공하고, 안구 질환의 치료에서 사용될 수 있음을 나타내는 것이다.

[0048] 실시예 4: 안구 결함을 지닌 마우스 모델에서 검은 콩의 종피(BGSC)의 효과

[0049] *마우스 망막전위도(ERG) 모델*

[0050] 10주령의 BALB/c 수컷 마우스를 정상군(건강한 마우스), 대조군(BGSC으로 처리함 없이 빛에 의해 손상됨), 80 mg/kg 체중의 용량으로 BGSC로 처리된 군(BGSC 80 mg/kg), 또는 250 mg/kg 체중의 용량으로 BGSC로 처리된 군(BGSC 250 mg/kg)으로 무작위적으로 분류하였다. 각 군은 5마리의 마우스를 포함하였고, 충분한 사료 및 물이 제공되었다. BGSC 처리 첫째 날을 0일로 규정하였다. b-파 진폭을 -5, 0 및 15일에 ERG로 측정하였다.

[0051] -5일에, 정상적으로 빛에 반응하는 마우스를 시험을 위해 선택하였다. -1일에, 마우스를 어두운 곳에서 24 시간 동안 유지시켰다. 복강내 아베르틴(400 mg/kg 체중)으로 마취시킨 후에, 마우스를 따뜻한 패드 위에 배치시켜 체온을 유지시켰다. 동공을 1% 시클로펜톨레이트로 확장시키고, 1% 프로파라카인으로 마취시켰다. 금 와이어 루프 전극을 각막에 배치시키고, 금 와이어 차동 전극(differential electrode)을 각 마우스의 혀에 배치시켰다. 기준 전극을 머리에 부착하였다. 마우스의 눈을 500 내지 575 nm의 파장을 갖는 6 볼트의 LED에 5,000 lux의 세기로 1 msec 동안 노출시켰다. 마우스의 b-파 진폭을 ERG로 측정하고, 정산 조건하 및 2시간 광 노출 후에 기록하였다.

[0052] 동일한 프로토콜 후에, 40, 160 또는 640 mg/kg 용량으로 BGSC로 처리된 마우스, 정상군 및 대조군을 시험하였다. 마우스의 b-파 진폭을 -4, 2, 9 및 16일에 ERG로 측정하였다.

[0053] *결과*

[0054] 도 4a를 참조하여, 80 mg/kg의 용량으로 BGSC로 처리된 마우스 및 250 mg/kg의 용량으로 처리된 마우스는 b-파를 회복하는 능력을 갖는 것으로 밝혀졌다. 15일에 80 mg/kg의 용량으로 BGSC로 처리된 마우스의 b-파의 세기 수치는 0일에 처리된 것과 비교하여 상당히 증가되는 것으로 밝혀졌다($p<0.05$).

[0055] 도 4b를 참조하여, 40mg/kg, 160mg/kg, 또는 640mg/kg의 용량으로 BGSC로 처리된 마우스는 b-파를 회복하는 능력을 갖는 것으로 밝혀졌다. 9일 및 16일에 160mg/kg 또는 640mg/kg의 용량으로 BGSC로 처리된 마우스의 b-파의 세기 수치는 2일에 처리된 것과 비교하여 증가되는 것으로 밝혀졌다. 상기의 결과를 고려할 때, BGSC로 처리된 마우스는 비정상 ERG 배열을 회복하는 능력을 갖는데, 이는 BGSC가 RPE 기능을 증가시키는 효능을 제공하고, 안구 질환의 치료에서 사용될 수 있음을 나타내는 것이다.

[0056] 다른 구체예들

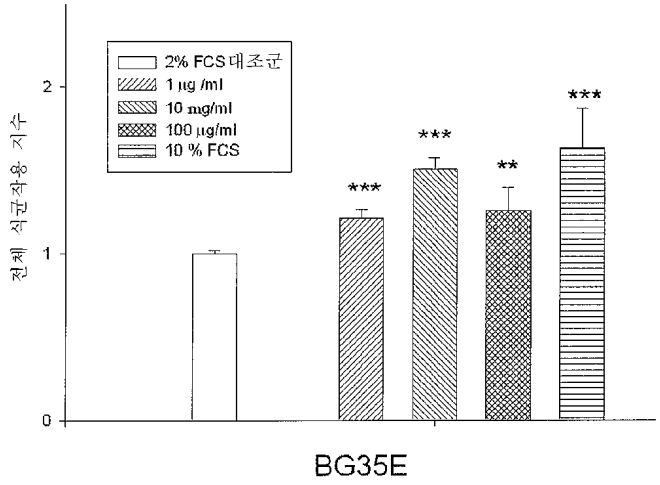
[0057] 본 명세서에 기술된 모든 특징들은 임의의 조합으로 합쳐질 수 있다. 본 명세서에 기술된 각 특징은 동일하거나, 균등하거나, 유사한 목적을 제공하는 대안적인 특징으로 대체될 수 있다. 이에 따라, 달리 명확하게 기술

되지 않는 한, 기술된 각 특징은 균등하거나 유사한 특징들의 일반적인 시리즈의 일 예이다.

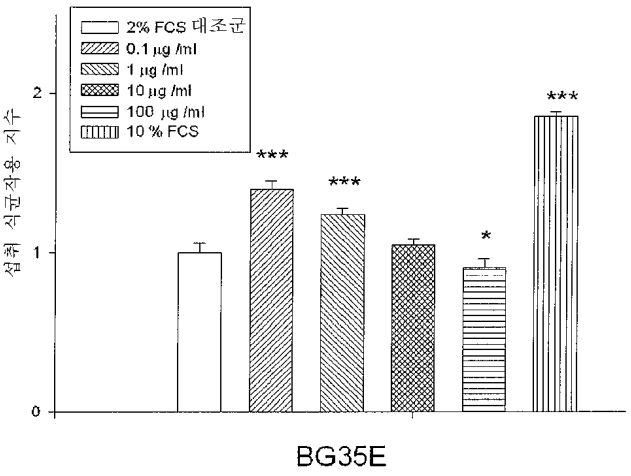
[0058] 상기 설명으로부터, 당업자는 본 발명의 필수적인 특징을 용이하게 확인할 수 있으며, 이의 정신 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 발명의 다양한 변형예 및 개질예를 본 발명을 여러 용법 및 상태에 적용시킬 수 있다. 이에 따라, 다른 구체예들은 또한 청구범위 내에 포함된다.

도면

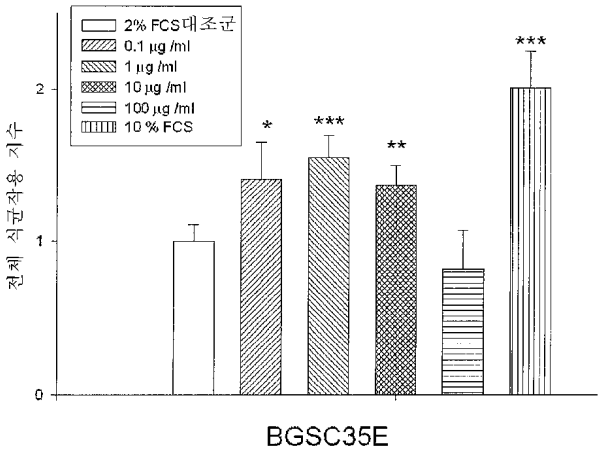
도면1a



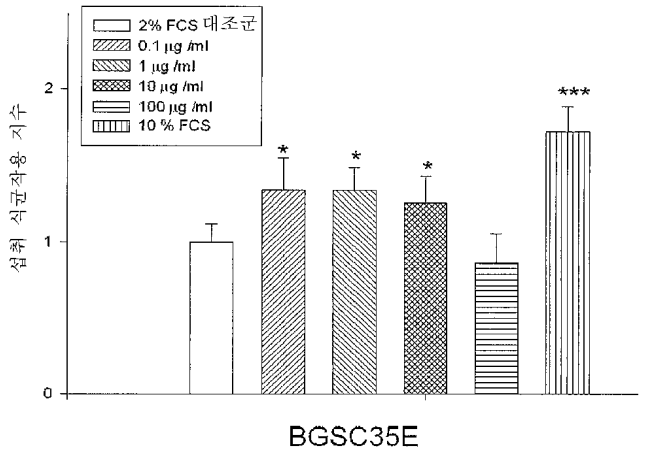
도면1b



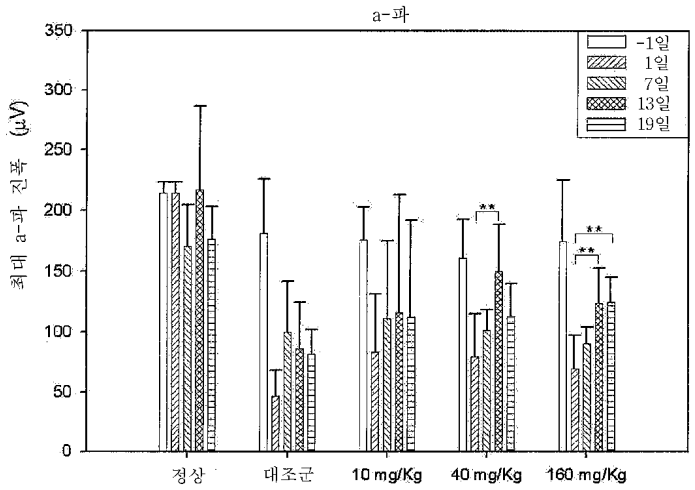
도면2a



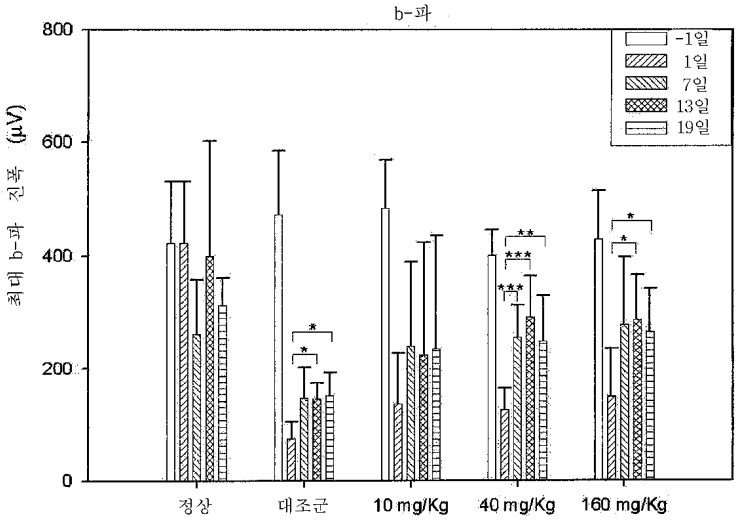
도면2b



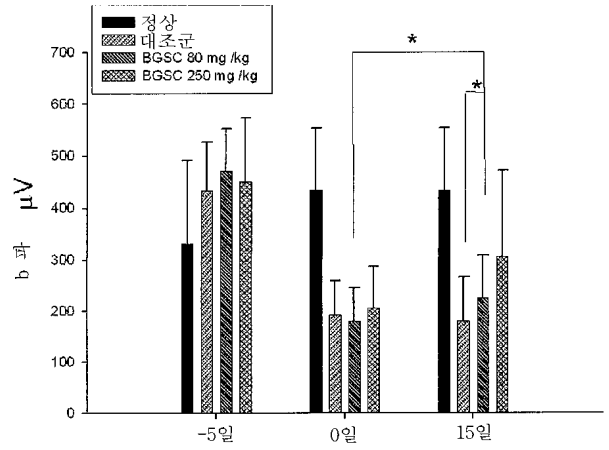
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

