



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0123502
(43) 공개일자 2017년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/39 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61K 9/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/39 (2013.01)
A61K 38/1808 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0053154
(22) 출원일자 2016년04월29일
심사청구일자 2016년04월29일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
박세광
부산광역시 남구 분포로 111, 235동 2301호(용호
동, 엘지메트로시티아파트)
노국환
부산광역시 북구 함박봉로140번길 21, 107동 306
호(만덕동, 만덕3단지주공아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

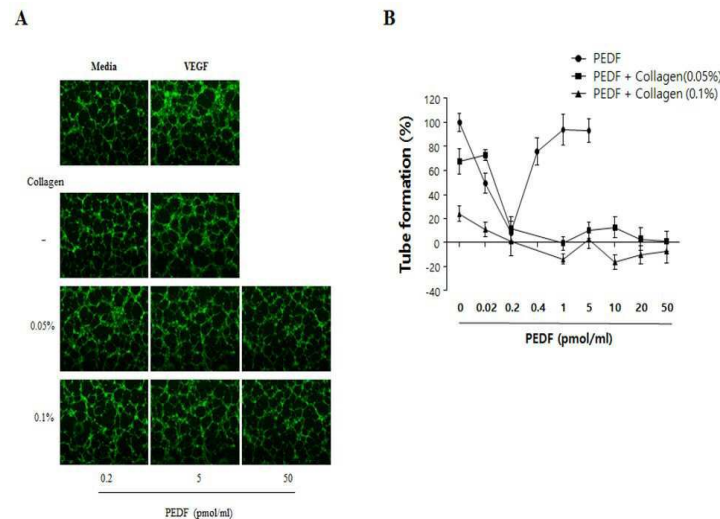
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 콜라겐 및 색소 상피성 인자를 유효성분으로 함유하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 약학조
성물

(57) 요약

본 발명은 콜라겐 및 색소 상피성 인자(Pigmented Epithelium Derived Factor)를 유효성분으로 함유하는 신생
혈관질환 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 콜라겐 타입 I 과 PEDF 병용 투여를 통
하여 PEDF의 짧은 항혈관신생 활성주기에 증가시키고, PEDF의 투여 용량 범위를 확장시킬 수 있으므로, 종래의
PEDF 잦은 주입에 따른 불편함과 그에 따른 부작용 문제를 해결할 수 있으며, 다양한 혈관신생질환 치료제로 적
용이 가능하다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/0048 (2013.01)

A61K 9/06 (2013.01)

(72) 발명자

정하나

부산광역시 부산진구 냉정로 189-7, 303호(개금동, 프리덤원룸)

김연예

경상남도 김해시 월산로 112-56, 905동 2104호(부곡동, 월산마을부영9단지아파트)

최일환

부산광역시 남구 분포로 111, 114동 904호(용호동, 엘지메트로시티아파트)

김현웅

부산광역시 해운대구 청사포로 27, 101동 301호

정원교

부산광역시 남구 분포로 111, 128동 2101호(용호동, 엘지메트로시티아파트)

오정환

부산광역시 남구 분포로 111, 106동 1006호(용호동, 엘지메트로시티아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525005409

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발

연구과제명 해양 생물 유래 생체진단치료용 적용소재 선정 및 효능검증

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교산학협력단

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

콜라겐을 유효성분으로 함유하며, 색소 상피성 인자(Pigmented Epithelium Derived Factor)의 항혈관신생 효과를 증진시키는 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 콜라겐은 콜라겐 타입 I 인 것을 특징으로 하는 항혈관신생 효과를 증진시키는 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 콜라겐 타입 I 은 돼지에서 분리되는 것을 특징으로 하는 항혈관신생 효과를 증진시키는 조성물.

청구항 4

콜라겐 및 색소 상피성 인자(Pigmented Epithelium Derived Factor)를 유효성분으로 함유하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 콜라겐은 콜라겐 타입 I 인 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 콜라겐 타입 I 은 돼지에서 분리되는 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 약학조성물은 안구 내 혈관 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

청구항 4에 있어서, 상기 신생혈관질환은 각막 신생혈관질환, 당뇨병성 망막증, 맥락막 신생혈관질환 및 나이관련 황반변성으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

청구항 4에 있어서, 상기 약학조성물은 색소 상피성 인자 0.01~50 중량% 및 콜라겐 타입 I 50~99.99 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 10

청구항 4에 있어서, 상기 약학조성물은 콜라겐 타입 I 및 색소 상피성 인자를 약제학적으로 허용 가능한 담체와 혼합하여 점안제 형태의 안약; 젤 형태의 안연고 또는 주사제로 제공되는 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 콜라겐 및 색소 상피성 인자를 유효성분으로 함유하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 황반은 망막의 중심부에 위치한 신경조직으로 시세포의 대부분이 이곳에 모여 있으며, 물체의 상이 맺히는 곳으로 중심시력을 담당한다. 황반변성은 나이가 들면서 진행되는 경우가 많은 안구질환으로 황반 부분에 변성이 일어나 시력장애를 일으키는 질환으로, 발병 초기에는 시야가 흐려지고 가까운 곳의 시력이 뒤틀려서 보이다가 나중에는 실명에 이르게 된다.

[0003] 나이관련 황반변성(Age-related macular degeneration)은 최근 65세 이상 노인에게서 가장 흔한 실명의 원인이며, 세계 3위의 실명유발 질병으로, 세계적으로 3 천만명 정도가 이병으로 고통받고 있으며, 매년 50 만명의 환자가 이 질병으로 인해 시력을 잃고 있다.

[0004] 우리나라에서도 65세 이상의 16.5%가 초기 황반변성을 앓고 있음, 고령인구의 증가로 유병율이 점차 증가하고 있다. 발병 시기 또한 60대에서 4, 50대의 중장년층으로 낮아지고 있는 추세이다.

[0005] 나이관련 황반변성은 크게 위축성과 삼출성 두 가지 유형으로 분류되는데 위축성 유형은 황반변성의 90%를 차지하며 황반부의 망막색소상피 등의 이상이 나타나 중심시력이 서서히 떨어지는 질환으로, 현재까지는 금연, 자외선 차단 및 황산화제 복용 이외의 시력저하를 회복시키는 치료방법은 전무한 상태이다.

[0006] 또한, 삼출성은 나이관련 황반변성의 10% 정도를 차지하며 위축성 유형보다 시력장애가 빠르고 심각하게 나타난다. 삼출성의 경우, 맥락막혈관신생, 망막색소상피박리, 감각망막박리, 망막색소상피 과열들의 안저소견을 동반하며, 나이관련 황반변성으로 인한 실명의 70~90%가 삼출성 병변에 의한 것으로 알려져있다.

[0007] 색소상피성 인자(Pigment epithelium derived factor; PEDF)는 항신생혈관 효과를 나타내는 단백질로, 혈관신생에 의한 다양한 질환의 치료제로 고려되는 물질이며, 현재 PEDF를 황반변성 치료제로 사용하기 위한 연구가 진행되고 있으나, 짧은 반감기에 따른 반복적인 주입이 필요하고, 질병 치료를 위해 적용될 수 있는 농도 범위가 좁다는 문제점이 지적되고 있다. 이에 따라, 상기 PEDF의 문제점을 해결하여 황반변성 치료 효과를 극대화할 수 있는 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2005-0120714호(2005년 12월 22일 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 색소 상피성 인자의 항혈관신생 효과를 증진시키기 위해 콜라겐 타입 I 을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공하며, 콜라겐 타입 I 및 색소 상피성 인자를 유효성분으로 함유하는 안구 신생혈관질환 예방 또는 치료제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 콜라겐을 유효성분으로 함유하며, 색소 상피성 인자(Pigmented Epithelium Derived Factor)의 항혈관신생 효과를 증진시키는 조성물을 제공할 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명은 콜라겐 및 색소 상피성 인자(Pigmented Epithelium Derived Factor)를 유효성분으로 함유하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, PEDF와 콜라겐 타입 I 을 병용 투여할 경우, PEDF를 고용량으로 처리하였을 때 나타나는 혈관신생 효과가 억제되었으며, PEDF의 항혈관신생 효과를 장기간 유지시킬 수 있음이 확인됨에 따라, 콜라겐 타

입 I 은 PEDF 약물 운반체 또는 어주번트(adjuvant)로 활용할 수 있으며, 콜라겐 타입 I 과 PEDF 병용 투여될 경우, PEDF의 짧은 항혈관신생 활성주기를 증가시켜 종래의 PEDF 잦은 주입에 따른 불편함과 그에 따른 부작용 문제를 해결하고, PEDF의 투여 용량 범위를 확장시킬 수 있으므로, 다양한 혈관신생질환 치료제로 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 색소 상피성 인자(Pigmented Epithelium Derived Factor; PEDF)의 투여농도에 따른 항혈관신생 효과를 확인한 결과로, 도 1A는 재조합 사람 VEGF-165를 처리하여 관 형성을 유도시킨 HUVECs 세포에 대조군으로 아바스틴(avstin) 0.2 mg/ml과 0.02, 0.2, 0.4, 1 및 5 pg/ml PEDF를 각각 처리하고 4시간 배양한 후 각 그룹의 관 형성 정도를 확인한 결과이며, 도 1B는 레이저 조사를 통하여 망막 병변을 유도시킨 마우스 동물모델에 PBS 또는 PEDF 0.01, 0.05 및 0.1 pmole을 각각 처리한 후 혈관신생 정도를 확인한 결과이다.

도 2는 돼지에서 분리된 콜라겐 타입 I 의 투여농도에 따른 항혈관신생 효과를 확인한 결과로, 도 2A는 재조합 사람 VEGF-165를 처리하여 관 형성을 유도시킨 HUVECs 세포에 대조군으로 아바스틴(avstin) 0.2 mg/ml과 돼지에서 분리된 콜라겐을 각각 0.01, 0.05 및 0.1 %로 각각 처리하고 4시간 배양한 후, 각 그룹의 관 형성 정도를 촬영한 이미지결과이며, 도 2B는 각각의 콜라겐이 처리된 실험군의 혈관신생 정도를 정량한 그래프이며, 도 2C는 레이저 조사를 통하여 망막 병변을 유도시킨 마우스 동물모델에 돼지에서 분리된 콜라겐을 각각 0.1, 0.5 및 1%로 처리하고 대조군으로 PBS를 처리한 후 신생혈관의 크기를 형광현미경으로 촬영한 이미지이며, 도 2D는 각 농도의 콜라겐이 처리된 동물모델 실험군을 신생혈관의 크기를 정량한 그래프이다.

도 3은 관 형성 세포모델에서 색소 상피성 인자(PEDF) 운반체로 콜라겐 타입 I 의 활용 가능성을 확인한 결과로, 도 3A는 재조합 사람 VEGF-165를 처리하여 관 형성을 유도시킨 HUVECs 세포모델에 0.05 및 0.1% 콜라겐 타입 I 과 PEDF 0.02, 0.2, 0.4, 1, 5, 10, 20 및 50 pmol/ml을 각각 혼합하여 투여하고 각 실험군의 관 형성 정도를 형광현미경으로 촬영한 결과중 대표적인 이미지 결과이며, 도 3B는 상기 방법으로 투여된 각 실험군에서 관 형성 정도를 정량한 결과이다.

도 4는 레이저 조사를 통하여 신생혈관 형성이 유도된 동물모델에서 색소 상피성 인자(PEDF) 운반체로 돼지에서 분리된 콜라겐 타입 I 의 활용 가능성을 확인한 결과로, 도 4A는 레이저 조사 후 0.05 pmole PEDF 단독 또는 0.1% 콜라겐 단독 또는 0.25, 2.5 및 25 pmole PEDF와 0.1% 콜라겐 혼합하여 투여된 시기를 나타낸 모식도이며, 도 4B는 상기 방법으로 처리된 각 실험군에서 생성된 신생혈관의 크기를 확인한 결과이다.

도 5는 콜라겐 및 PEDF 혼합물의 투과성을 확인한 결과로, PBS에 0.05, 0.1 및 0.2% 농도로 녹인 콜라겐을 PEDF와 각각 혼합한 혼합물에 380-780 nm 가시광선과장에서 10nm 단위로 흡광도를 측정하여 각 혼합물의 투과성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 콜라겐을 유효성분으로 함유하며, 색소 상피성 인자(Pigmented Epithelium Derived Factor)의 항혈관신생 효과를 증진시키는 조성물을 제공할 수 있다.

[0015] 보다 상세하게 상기 콜라겐은 콜라겐 타입 I 일 수 있으며, 상기 콜라겐 타입 I 은 돼지에서 분리된 것일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 콜라겐 및 색소 상피성 인자(Pigmented Epithelium Derived Factor)를 유효성분으로 함유하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0017] 상기 약학조성물은 안구 내 혈관 생성을 억제할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 따르면, 레이저를 조사를 통하여 망막 병변이 유도된 실험동물에 0.1, 0.5 및 1% 농도의 돼지 유래 콜라겐 타입 I 을 투여하고 콜라겐의 혈관신생 억제 효과를 확인한 결과, 도 2C 및 도 2D와 같이 콜라겐의 처리 농도가 증가할수록 혈관신생이 억제되기보다 증가되는 것으로 나타났다.

[0019] 상기 결과로부터 고농도의 콜라겐은 혈관신생을 억제하기 위한 치료제로 부적합한 것으로 확인되었다.

[0020] 그러나 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 재조합 사람 VEGF-165 처리에 의해 관 형성이 유도된 HUVECs 세포에 색소상피성 인자(PEDF)를 단독 투여하거나 콜라겐 타입 I 과 혼합하여 투여한 결과, 도 3과 같이 0.2 pmol/ml 농도의 PEDF 단독 투여군과 PEDF 및 콜라겐 혼합 투여군에서 관 형성 억제 효과가 유사하게 나타났으나, PEDF가

단독으로 투여된 실험군에서는 처리된 PEDF 농도가 증가할수록 관 형성이 급격하게 증가한 반면, 콜라겐과 고농도의 PEDF가 혼합투여된 실험군에서는 관 형성 억제효과가 지속적으로 나타났다.

- [0021] 또한, 레이저를 조사를 통하여 망막 병변이 유도된 실험동물에 PEDF를 단독으로 투여하거나 0.1% 농도의 돼지 유래 콜라겐 타입 I 과 PEDF를 혼합투여한 후 콜라겐의 혈관신생 억제 효과를 확인한 결과, 도 4와 같이 PEDF 단독 투여군과 콜라겐과 PEDF 25 pmole 혼합물 투여군 중 혼합물 투여군의 혈관신생 억제효과가 PEDF 단독 투여군과 유사하게 나타나는 것으로 확인되었다. 상기 결과로부터 저농도의 PEDF를 5회 투여하였을 때 나타나는 효과와 고농도의 PEDF를 콜라겐과 혼합하여 1회 투여하였을 때 유사한 효과를 나타내는 것이 확인되었다.
- [0022] 따라서 PEDF와 콜라겐을 혼합하여 투여할 경우, PEDF가 고용량으로 처리되었을 때 나타나는 혈관신생 효과가 억제되고, PEDF의 투여횟수를 감소시키면서 PEDF의 항혈관신생 효과를 장기간 유지시킬 수 있음이 확인되었다.
- [0023] 상기 신생혈관질환은 각막 신생혈관질환, 당뇨병성 망막증, 맥락막 신생혈관질환 및 나이관련 황반변성으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 나이관련 황반변성일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 약학조성물은 색소 상피성 인자 0.01~50 중량% 및 콜라겐 타입 I 50~99.99 중량%를 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 약학조성물은 색소 상피성 인자 및 콜라겐 타입 I 을 약제학적으로 허용 가능한 담체와 혼합하여 점안제 형태의 안약; 젤 형태의 안연고 또는 주사제로 제공할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 콜라겐 타입 I 및 색소 상피성 인자를 유효성분으로 포함하는 신생혈관질환 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0027] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0029] 상기 펩타이드의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0034] <실험예 1> 관 형성 분석(Tube formation assay)

[0035] 48-웰 플레이트를 200 μ l 매트릭젤(Matrigel)로 코팅하고 37℃에서 1시간 유지시켰으며, HUVECs 세포는 37℃에

서 15분간 칼세인(Calcein)-AM으로 염색하였다.

[0036] 염색된 HUVECs 세포를 매트릭스로 코팅된 플레이트의 각 웰에 2×10^4 세포로 분주하고, 제조합 사람 VEGF-165를 각 웰에 처리하여 세포의 관(tube) 형성을 유도하였다.

[0037] 그 후, 콜라겐(Collagen) 타입 I 및 PEDF를 각각 단독 처리하거나, 혼합 처리하고, 37℃에서 4시간 동안 배양한 후, 각 그룹의 관 형성 정도를 확인하였다.

[0038] 관 형성 정도 확인은 Micromanipulator (Olympus)를 이용한 사진 촬영을 수행하고, 관의 길이를 측정하여 비교하였다.

[0040] <실험예 2> 맥락막 신생혈관 형성 모델 제작

[0041] 5 내지 8 주령 C57BL/6 마우스를 오리엔트에서 구입하여 사용하였다.

[0042] 각 마우스에 5 mg/mL 트로피카마이드(Tropicamide; santen pharmaceutical co. ltd, Kita-ku, Osaka, Japan) 점안액을 사용하여 동공을 팽창시키고, 100 mg/kg 케타민(ketamine; Huons, SEONGNAM-SI, GYEONGGI-DO, Korea)과 10 mg/kg 자일라진(xylazine; BAYER, Leverkusen, Germany)을 복강 내에 주사하여 마취하였다.

[0043] 마취 후 마우스 고정대에 마우스를 고정시키고, 세극등 현미경 레이저 시스템을 이용하여 150~210 mW 세기의 레이저를 0.1초간 조사하여 50~100 μ m 사이즈의 병변을 마우스의 망막에 3, 6, 9 및 12시 방향으로 총 4개의 병변을 제작하였다. 이때 레이저 조사 시 방울이 맺히듯 만들어야 하는데, 이는 Bruch's 막을 파괴하여 신생혈관(CNV)을 형성하는데 중요하다.

[0044] 망막에 병변이 제작된 직후, 대조군에는 PBS, 실험군에는 콜라겐(collagen) 타입 I, PEDF 및 콜라겐 타입 I 과 PEDF의 혼합물을 마우스 눈의 유리체 내에 주사하고, 1일 또는 5일간 1일 1회 동일한 방법으로 투여하였다.

[0045] 레이저 조사 후 14일째 케타민 (100 mg/kg) 및 자일라진(10 mg/kg)을 사용하여 각 실험군의 마우스를 마취하고, 25 mg/ml 농도의 FITC-dextran (sigma aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 μ l를 retro-orbital에 주입하여 30분간 망막 혈관을 염색하였다.

[0046] 염색된 안구를 분리하여 10% 포르말린(formalin)에 넣어 30분간 고정시킨 후, 현미경 상에서 고정된 안구의 망막이 다치지 않게 조심스럽게 안구 주위의 근육, 각막, 홍채, 수정체 및 유리체를 제거하고, 3, 6, 9 및 12시 방향으로 4부분을 절개한 후 커버슬립(Coverslip)을 덮고, 형광 현미경을 통해 병변을 촬영한 후, 크기를 측정하여 대조군과 비교하였다.

[0048] <실시에 1> 색소상피성 인자(Pigment epithelium derived factor; PEDF) 한계점 확인

[0049] 색소상피성 인자(PEDF)의 항신생혈관 효과를 실험예 1의 관 형성 분석 실험 및 실험예 2의 맥락막 신생혈관 모델에서 확인하였다.

[0050] 그 결과, 도 1A와 같이 PEDF 0.2pg/ml 가 처리된 실험군에서는 관 형성 억제 효과가 최대로 나타났으나, 그 이상의 고농도로 처리된 경우 관 형성이 다시 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 도 1B와 같이 레이저에 의해 유도된 혈관신생(CNV) 모델에서는 PEDF가 0.01, 0.5 및 0.1 pmole로 처리된 경우 유의성 있게 감소되었으나, 10 pmole의 고농도로 처리된 경우 혈관신생(CNV)이 다시 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0051] 상기 결과로부터 색소상피성 인자(PEDF)는 관 형성을 억제하고, 레이저에 의해 유도된 혈관신생을 억제하는 효과를 나타내었으나, PEDF가 고농도로 처리될 경우, 다시 혈관신생이 유도되는 것으로 확인됨에 따라, 혈관신생 억제를 위해 처리될 수 있는 PEDF의 농도가 매우 제한적인 것을 확인할 수 있었다.

[0053] <실시에 2> 콜라겐 항혈관신생 효과 확인

[0054] 콜라겐 타입 I 이 관 형성 및 혈관신생에 미치는 효과를 확인하기 위해, 실험예 1과 같이 준비된 HUVECs 세포에 돼지 콜라겐에서 추출된 콜라겐 타입 I 을 각각 0.01, 0.05 및 0.1% 농도로 처리하고 관 형성 정도를 확인하였다.

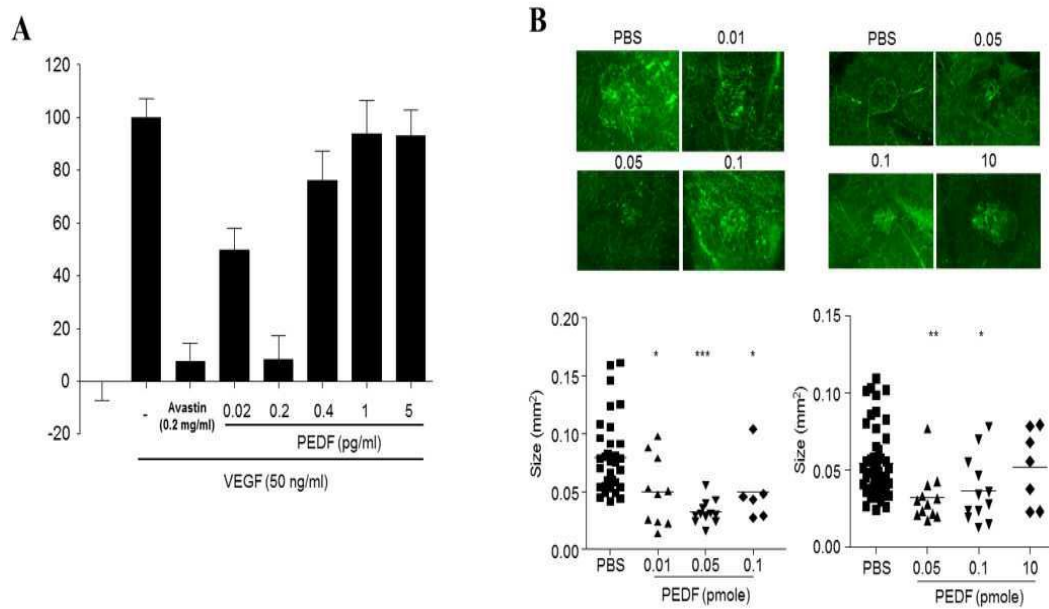
- [0055] 그 결과, 도 2A 및 도 2B와 같이 콜라겐의 농도 의존적으로 관 형성 억제가 나타났다.
- [0056] 그러나 망막 병변이 유도된 실험동물에 0.1, 0.5 및 1% 농도로 돼지에서 분리된 콜라겐 타입 I 을 투여하고 콜라겐의 혈관신생 억제 효과를 확인한 결과, 도 2C 및 도 2D와 같이 콜라겐 처리 농도가 증가할수록 혈관신생 크기가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0057] 상기 결과로부터 고농도의 콜라겐은 혈관신생을 억제하기 위한 치료제로 부적합한 것으로 확인되었다.
- [0059] <실시예 3> 관 형성 모델에서 콜라겐과 색소상피성 인자 병용 처리 효과 확인
- [0060] 관 형성 모델을 통하여 색소상피성 인자(PEDF) 운반체로서의 콜라겐의 가능성을 확인하였다.
- [0061] 실험에 1과 같이 제작된 관 형성 모델에 색소상피성 인자를 단독 투여하거나 콜라겐과 혼합하여 투여한 결과, 도 3과 같이 0.2 pmol/ml 농도의 PEDF 단독 투여군과 콜라겐 혼합 투여군에서는 관 형성 억제 효과가 유사하게 나타났으나, 고농도의 PEDF가 단독으로 투여된 실험군에서는 관 형성이 급격하게 증가된 반면, 콜라겐과 고농도의 PEDF가 혼합처리된 실험군에서는 관 형성 억제효과가 지속적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.
- [0062] 상기 결과로부터 PEDF의 좁은 처리농도 범위의 문제점을 해결하기 위한 방법으로 콜라겐과의 병용투여가 제안될 수 있다.
- [0064] <실시예 4> 맥락막 신생혈관 형성 동물모델에서 콜라겐과 색소상피성 인자 병용 처리 효과 확인
- [0065] 앞선 실험결과로부터 제안된 색소상피성 인자(PEDF) 운반체로서의 콜라겐 타입 I 의 가능성을 맥락막 신생혈관 형성 동물모델에서 확인하였다.
- [0066] 먼저, 실험에 2와 같이 제작된 맥락막 신생혈관 형성 동물모델에 도 4A와 같은 방법으로 대조군에는 0.05 pmole 농도의 PEDF를 5회 주사하였으며, PEDF 및 콜라겐 타입 I 혼합물 투여군에는 0.1% 콜라겐 타입 I 과 0.25, 2.5 및 25 pmole 농도의 PEDF를 1회 주사하였다.
- [0067] 그 결과, 도 4B와 같이 고농도의 PEDF 및 콜라겐 혼합물 투여군의 혈관신생 억제효과가 저농도의 PEDF 단독 투여군과 유사하게 나타났다.
- [0068] 상기 결과로부터 PEDF와 콜라겐을 혼합하여 투여할 경우, PEDF를 고용량으로 처리하였을 때 나타나는 혈관신생 촉진효과가 억제됨에 따라 PEDF 투여 횟수를 감소시키고, PEDF의 항혈관신생 효과를 장기간 유지시킬 수 있음이 확인되었다.
- [0069] 따라서, 콜라겐 타입 I 은 PEDF 약물 운반체 또는 어주번트(adjuvant)로써의 활용이 가능한 것이 확인되었으며, 콜라겐 타입 I 과 PEDF 병용 투여는 PEDF의 짧은 항혈관신생 활성주기를 연장시켜 종래의 PEDF 잦은 주입에 따른 불편함과 그에 따른 부작용 문제를 해결할 수 있으며, PEDF의 투여 용량 범위를 확장시킬 수 있으므로, 다양한 혈관신생질환 치료제로 적용이 가능하다.
- [0071] <실시예 5> 콜라겐 및 PEDF 혼합물의 투과성 확인
- [0072] 콜라겐 타입 I 및 PEDF 혼합물이 치료효과를 나타내는 농도에서 가시광선 파장의 빛 투과도를 확인하여 치료제 주사 시 상기 혼합물이 기존 시야에 미치는 영향을 분석하였다.
- [0073] 콜라겐 타입 I 을 0.05, 0.1 및 0.2% 농도로 PBS에 용해시킨 후 PEDF와 혼합하여 380 내지 780nm 가시광선 파장에서 10 nm 단위로 흡광도를 측정하였다.
- [0074] 그 결과, 도 5와 같이 콜라겐 타입 I 및 PEDF 혼합물과 PBS의 가시광선의 파장 투과도가 유사한 것으로 확인되었다.
- [0075] 상기 결과로부터 콜라겐 타입 I 및 PEDF 혼합물 주사는 기존 시야를 방해하지 않는 것으로 확인됨에 따라, 효과적인 치료방법으로 이용될 수 있다.

[0077]

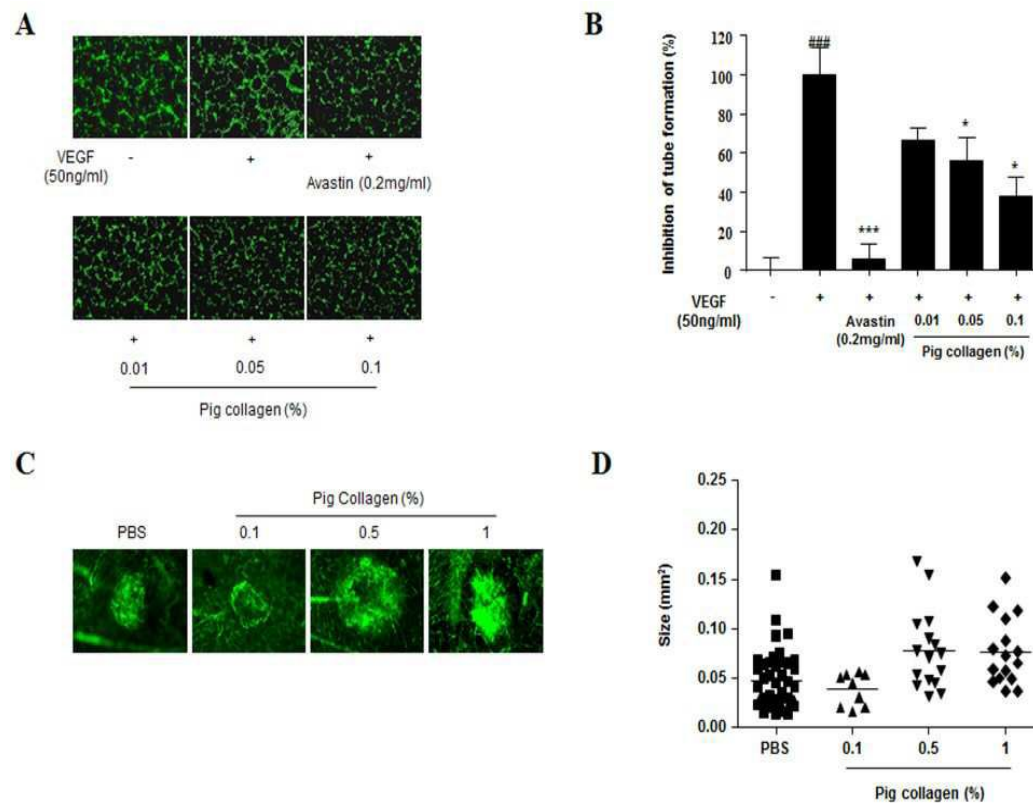
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

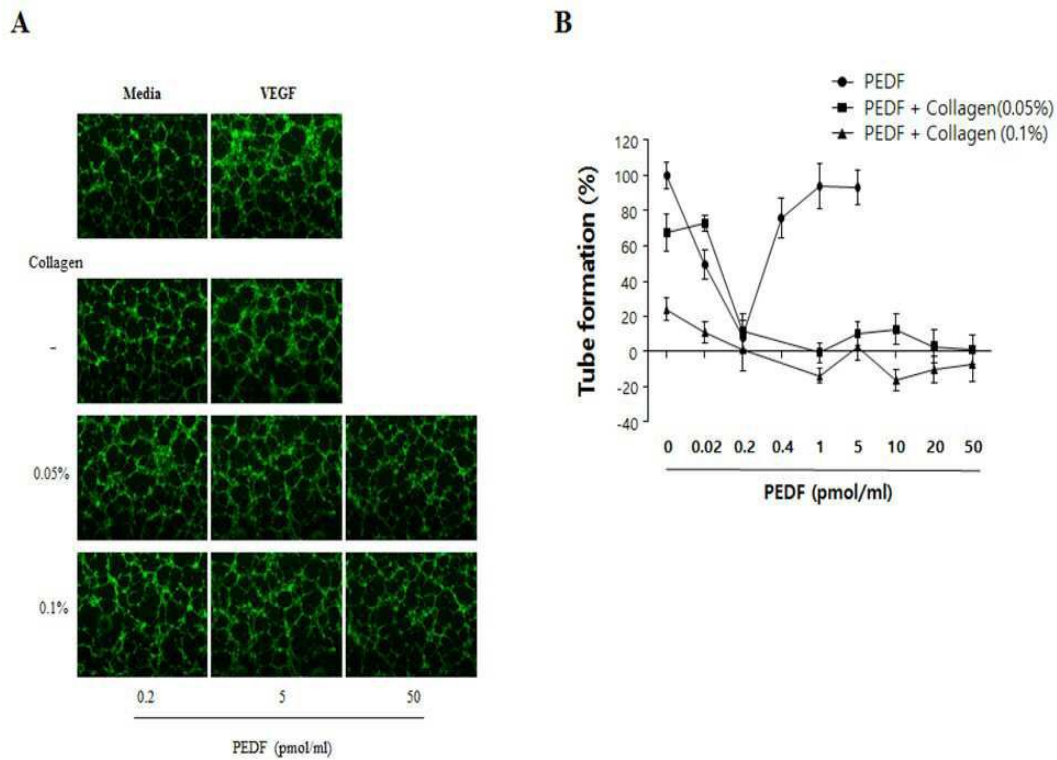
도면1



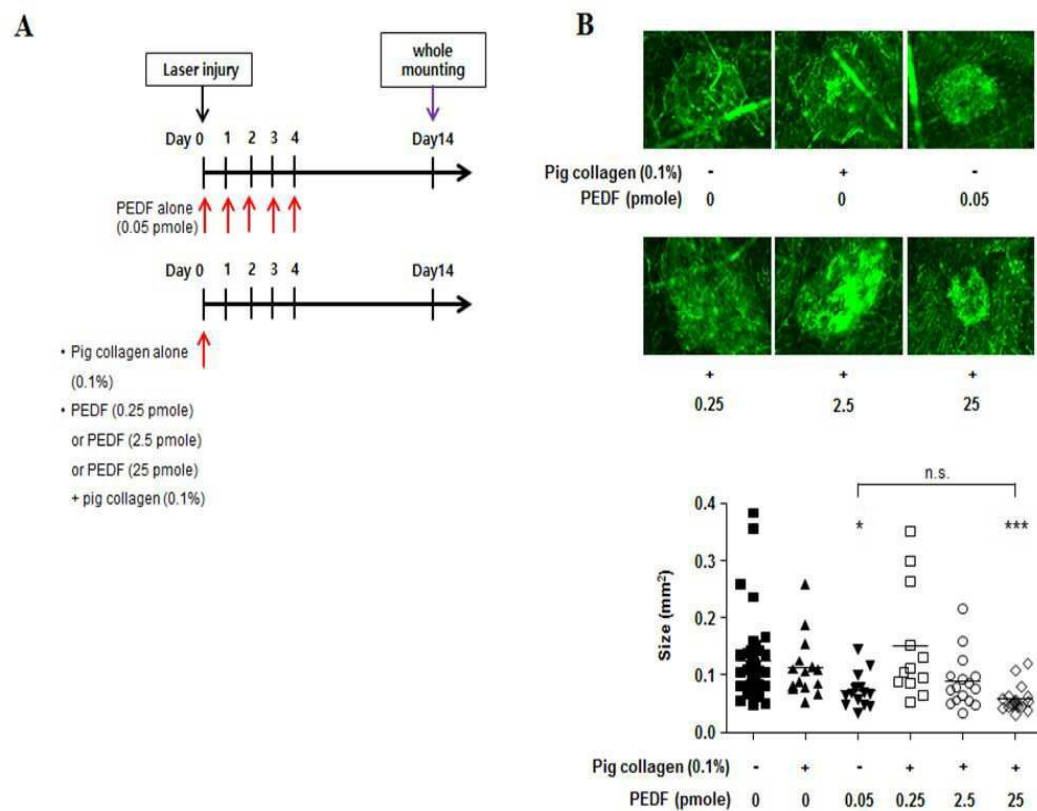
도면2



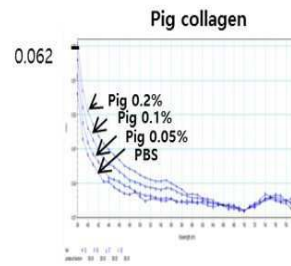
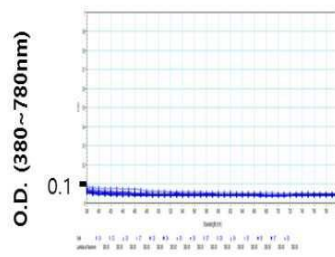
도면3



도면4



도면5



- Collagen concentration
: 0.05, 0.1, 0.2%
- visible light (가시광선)
- 380~780 nm