



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0033522
(43) 공개일자 2017년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 5/02 (2006.01) A61K 31/69 (2006.01)
C12N 5/079 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07F 5/02 (2013.01)
A61K 31/69 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0131337
(22) 출원일자 2015년09월17일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
동아에스티 주식회사
서울특별시 동대문구 천호대로 64(용두동)
가천대학교 산학협력단
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (북정동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정광원
인천광역시 남동구 구월로 192, 1504동 1103호 (구
월동, 구월힐스테이트 롯데캐슬골드아파트)
김홍란
인천광역시 남동구 인주대로604번길 49-44 (구월
동, 금강빌라)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

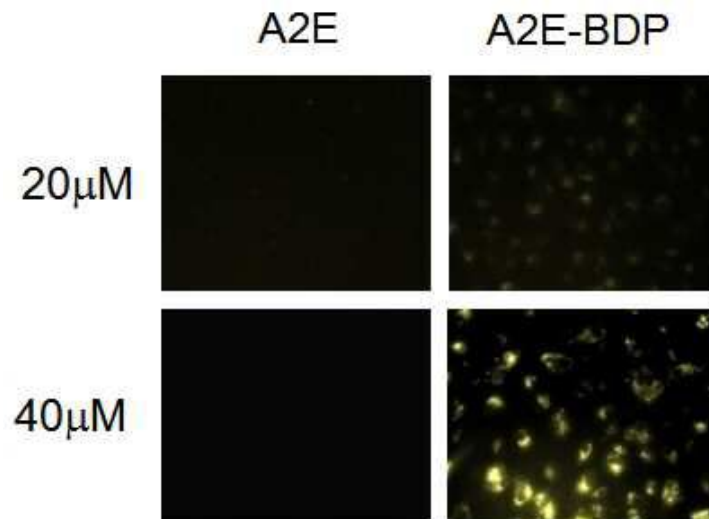
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 A2E-BDP 및 이를 이용한 세포내 A2E 축적 억제제 또는 축적된 A2E의 제거제 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 A2E-BDP (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine-BODIPY FL) 및 이를 이용한 세포내 A2E 축적 억제제; 축적된 A2E의 제거제; 또는 황반변성 치료제 또는 예방제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0621 (2013.01)

G01N 33/5058 (2013.01)

(72) 발명자

정세영

서울특별시 동대문구 천장산로11길 17, 204동 150
3호 (이문동, 이문삼성래미안아파트)

백남준

경기도 용인시 기흥구 중부대로 375, 101동 606호
(신갈동, 기흥역롯데캐슬스카이)

권용삼

경기도 용인시 기흥구 금화로58번길 10, 408동
1501호 (상갈동, 금화마을주공4단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10048028

부처명 산업통상지원부

연구관리전문기관 산업기술평가관리원

연구사업명 산업핵심기술개발사업

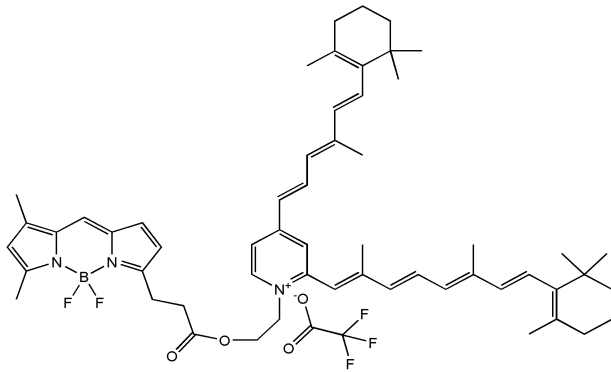
연구과제명 글로벌 시장 진출용 고령친화형 눈건강 기능성 식품소재 개발 및 글로벌 제품화

기 여 율 1/1

주관기관 동아에스티 주식회사

연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

[화학식 1]



(c) 세포의 형광 강도를 분석하는 단계를 포함하는 세포내 A2E (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine) 축적 억제제의 스크리닝 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, (d) 시험물질을 처리하지 않고 A2E-BDP를 처리한 세포의 형광 강도와 비교하여 (c) 단계의 세포의 형광 강도가 더 작으면 시험물질을 세포내 A2E 축적 억제제로 판별하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 5

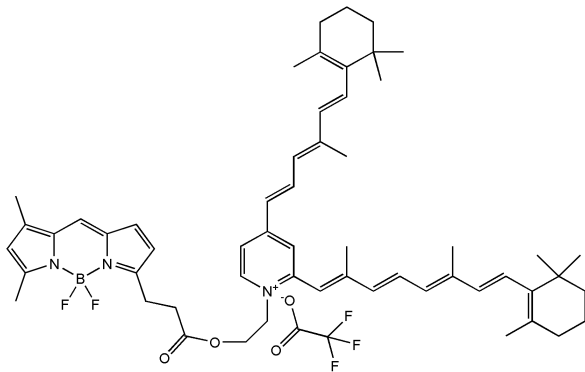
제3항 또는 제4항에 있어서, 세포가 망막색소상피세포인 방법.

청구항 6

(a) 세포에 시험물질을 처리하는 단계;

(b) 세포에 하기 화학식 1로 표시되는 A2E-BDP (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine-BODIPY FL)를 처리하는 단계; 및

[화학식 1]



(c) 상기 세포의 형광 강도를 분석하는 단계를 포함하는, 황반변성 치료제 또는 예방제의 스크리닝 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, (d) 시험물질을 처리하지 않고 A2E-BDP를 처리한 세포의 형광 강도와 비교하여 (c) 단계의 세포의 형광 강도가 더 작으면 시험물질을 황반변성 치료제 또는 예방제로 판별하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 세포가 망막색소상피세포인 방법.

발명의 설명

기술분야

- [0001] 본 발명은 A2E-BDP (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine-BODIPY FL) 및 이를 이용한 세포내 A2E 축적 억제제; 축적된 A2E의 제거제; 또는 황반변성 치료제 또는 예방제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 나이관련 황반변성(AMD, age-related macular degeneration)은 시력에 매우 중요한 역할을 하는 망막 황반부에 나이가 들면서 여러 가지 변화가 동반되어 생기는 질병으로서(H.R. Coleman, C.-C. Chan, F.L. Ferris III, E.Y. Chew, Age-related macular degeneration, The Lancet 372 (2008) 1835-1845) 여러 가지 유전적, 환경적 요인과 발병과의 상관성이 보고된 바 있다.
- [0003] 전체 황반변성의 90%를 차지하는 건식 황반변성의 발병 원인으로는 인종, 흡연, 산화적 스트레스, 리포푸신의 침착 등의 다양한 인자들이 제시되고 있다(X. Ding, M. Patel, C.-C. Chan, Molecular pathology of age-related macular degeneration, Progress in retinal and eye research 28 (2009) 1-18.; R.D. Jager, W.F. Mieler, J.W. Miller, Age-related macular degeneration, New England Journal of Medicine 358 (2008) 2606-2617.; J.R. Yates, A.T. Moore, Genetic susceptibility to age related macular degeneration, Journal of medical genetics 37 (2000) 83-87.). 이러한 위험인자 중 가장 큰 비중을 차지하는 것은 리포푸신(lipofuscin)의 망막색소상피세포 내 침착이다(C.J. Kennedy, P.E. Rakoczy, I.J. Constable, Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review, Eye 9 (1995) 763-771.).
- [0004] 리포푸신은 세포노화의 마커로 불리기도 하는데 세포내의 불포화지방산의 과산화에 의해 리소솜내에 형성되는 불용성 색소로서 노화성 색소라고도 한다. 또한 리포푸신은 신경세포 및 정상세포내에 짙은 황색의 자가형광을 띠는 다수의 세포 내 과립을 말한다(L.E. Lamb, J.D. Simon, A2E: A Component of Ocular Lipofuscin, Photochemistry and photobiology 79 (2004) 127-136.). 여러가지 원인에 의하여 망막색소상피세포에 비정상적으로 축적된 리포푸신은 청색광을 받으면 광산화가 되어 세포사멸을 일으키는데 이는 대표적인 망막 질환의 원인 중 하나임과 동시에 나이관련 황반변성의 주요 원인 중 하나로 알려져있다(J.R. Sparrow, M. Boulton, RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology, Experimental eye research 80 (2005) 595-606.; R.W. Young, PATHOPHYSIOLOGY OF AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION, Survey of Ophthalmology 31 (1987) 291-306.).
- [0005] 대표적인 리포푸신의 일종으로는 A2E (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine)가 있는데, A2E는 망막색소상피세포를 사멸시키는 주요인자로서 photoreceptor outer segment membrane에서 all-trans-retinal과 phosphatidyl ethanolamine의 축합반응에 의해 형성되어 RPE lysosome에 축적된다(J.R. Sparrow, N. Fishkin, J. Zhou, B. Cai, Y.P. Jang, S. Krane, Y. Itagaki, K. Nakanishi, A2E, a byproduct of the visual cycle, Vision research 43 (2003) 2983-2990.; S.C. Finnemann, L.W. Leung, E. Rodriguez-Boulan, The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium, Proceedings of the National Academy of Sciences 99 (2002) 3842-3847.). 축적된 A2E는 청색광을 조사하면 망막색소상피세포(RPE)의 사멸을 유도하고 RPE 세포로부터 주요물질들을 공급받는 photoreceptor (황반에 밀집되어 있음) 세포의 2차적 사멸로 이어져 나이관련 황반변성이 발생한다고 알려져 있다(M. Suter, C. Reme, C. Grimm, A. Wenzel, M. Jaaattela, P. Esser, N. Kociok, M. Leist, C. Richter, Age-related Macular Degeneration THE LIPOFUSCIN COMPONENTN-RETINYL-N-RETINYLIDENE ETHANOLAMINE DETACHES PROAPOPTOTIC PROTEINS FROM MITOCHONDRIA AND INDUCES APOPTOSIS IN MAMMALIAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS, Journal of Biological Chemistry 275 (2000) 39625-39630.).
- [0006] A2E에 의한 망막세포 사멸 과정으로는 다음과 같은 연구결과가 보고된 바 있다. 먼저, A2E가 많이 축적 되면 lysosomal pH가 높아져 알칼리성으로 변하게 되고(J. Liu, W. Lu, D. Reigada, J. Nguyen, A.M. Laties, C.H. Mitchell, Restoration of lysosomal pH in RPE cells from cultured human and ABCA4/ mice: pharmacologic approaches and functional recovery, Investigative ophthalmology & visual science 49 (2008) 772-780), lysosomal acid phosphatase들의 활성이 억제되며(E. Poliakov, N.V. Strunnikova, J.-k. Jiang, B. Martinez, T. Parikh, A. Lakkaraju, C. Thomas, B.P. Brooks, T.M. Redmond, Multiple A2E treatments lead to melanization of rod outer segment-challenged ARPE-19 cells, Molecular vision 20 (2014) 285.) 미토콘드리아에서 proapoptotic proteins들이 분리된다(M. Suter, C. Reme, C. Grimm, A. Wenzel, M. Jaaattela, P. Esser, N. Kociok, M. Leist, C. Richter, Age-related Macular Degeneration THE LIPOFUSCIN COMPONENTN-

RETINYL-N-RETINYLDENE ETHANOLAMINE DETACHES PROAPOPTOTIC PROTEINS FROM MITOCHONDRIA AND INDUCES APOPTOSIS IN MAMMALIAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS, *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 39625-39630.).

[0007] 시각회로는 레티노이드가 망막상피세포에서 섭취된 후에 일련의 효소반응을 거쳐 11-cis-retinal로 전환되어 rod outer segment로 이동되고 빛을 받아 생성된 all-trans-retinal이 all-trans-retinol 형태로 다시 망막색소상피세포로 이동되는 순환경로로 시각기능에 관여되는 중심과정이다. A2E는 이런 시각회로 과정에서 RPE65 isomerohydrolase를 억제하여 all-trans-retinal 및 지질막의 구성성분인 phosphatidyl ethanolamine과 반응하여 11-cis retinal의 전환과정을 억제하고 phagocytosed outer segments의 인지질을 degradation시킨다(G. Moiseyev, O. Nikolaeva, Y. Chen, K. Farjo, Y. Takahashi, J.-x. Ma, Inhibition of the visual cycle by A2E through direct interaction with RPE65 and implications in Stargardt disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (2010) 17551-17556.; S.C. Finnemann, L.W. Leung, E. Rodriguez-Boulan, The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002) 3842-3847.). 뿐만 아니라 망막색소상피세포에 A2E가 축적이 되면 염증성 케모카인과 사이토카인이 생성되고 NLRP3 inflammasome을 활성화시켜 케모카인 IL-8 및 MCP-1, MCG, MIP-1 α , 사이토카인 IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α 의 수준을 증가시키며(O.A. Anderson, A. Finkelstein, D.T. Shima, A2E induces IL-1ss production in retinal pigment epithelial cells via the NLRP3 inflammasome, *PLoS One* 8 (2013) e67263.), 혈관생성인자인 VEGF-A의 발현도 증가시킨다(J. Zhou, B. Cai, Y.P. Jang, S. Pachydaki, A.M. Schmidt, J.R. Sparrow, Mechanisms for the induction of HNE-MDA-and AGE-adducts, RAGE and VEGF in retinal pigment epithelial cells, *Experimental eye research* 80 (2005) 567-580.). 또한 A2E가 축적된 망막색소상피세포는 카스파제-3가 활성화되어 세포사멸을 일으키고 빛에 의하여 A2E가 산화되면 다양한 구조의 oxi-form으로 전환되어 oxygen anion, singlet oxygen, hydrogen peroxide과 같은 활성산소를 생성할 수 있다(S. Ben-Shabat, Y. Itagaki, S. Jockusch, J.R. Sparrow, N.J. Turro, K. Nakanishi, Formation of a nonaoxirane from A2E, a lipofuscin fluorophore related to macular degeneration, and evidence of singlet oxygen involvement, *Angewandte Chemie International Edition* 41 (2002) 814-817.).

[0008] 이런 활성산소들은 세포를 공격하여 세포사멸을 일으킨다(J.R. Sparrow, J. Zhou, S. Ben-Shabat, H. Vollmer, Y. Itagaki, K. Nakanishi, Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE, *Investigative ophthalmology & visual science* 43 (2002) 1222-1227.) 또한 A2E는 광조사에 의하여 산화되어 peroxy-A2E와 furano-A2E를 생성하고 이렇게 형성된 A2E 산화물은 C3 보체계를 매개로 한 염증반응을 활성화시킬 수 있다(G.S. Hageman, D.H. Anderson, L.V. Johnson, L.S. Hancox, A.J. Taiber, L.I. Hardisty, J.L. Hageman, H.A. Stockman, J.D. Borchardt, K.M. Gehrs, A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 7227-7232.). 그러므로 망막세포기능장애에 의한 시력저하는 A2E의 산화와 밀접한 관련이 있고 따라서 나이관련 황반변성의 주된 원인이 될 수 있다(J. Zhou, Y.P. Jang, S.R. Kim, J.R. Sparrow, Complement activation by photooxidation products of A2E, a lipofuscin constituent of the retinal pigment epithelium, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006) 16182-16187.).

[0009] 황반변성에 대한 바람직한 접근법은 발병을 미연에 예방하거나 혹은 발병 이후라도 병변의 진행을 늦추고 더 이상 시력이 떨어지지 않도록 하는 것이다. 따라서 망막색소상피세포의 사멸을 유도하는 대표적인 인자인 리포푸신, 그 중에서 특히 A2E 축적을 억제하는 물질을 발굴하면 황반변성 예방 또는 치료제로서 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0010] 그런데 지금까지 세포내 A2E의 농도를 측정하는 방법은 세포에 축적된 A2E를 유기용매를 이용하여 추출한 뒤 HPLC (high-performance liquid chromatography)로 정량하는 것인데(E. Poliakov, N.V. Strunnikova, J.-k. Jiang, B. Martinez, T. Parikh, A. Lakkaraju, C. Thomas, B.P. Brooks, T.M. Redmond, Multiple A2E treatments lead to melanization of rod outer segment-challenged ARPE-19 cells, *Molecular vision* 20 (2014) 285.), 이는 세포에 축적된 A2E를 추출하는 여러 단계의 과정을 거치게 되어, 시험결과의 오차가 크고, 측정시간이 오래 걸리며, 측정 정도를 실시간으로 확인할 수 없으며, 결정적으로 A2E의 축적을 억제하는 물질을 대량으로 스크리닝할 때 효율이 크게 떨어지는 단점이 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011]

- (비특허문헌 0001) [1] H.R. Coleman, C.-C. Chan, F.L. Ferris III, E.Y. Chew, Age-related macular degeneration, *The Lancet* 372 (2008) 1835-1845.
- (비특허문헌 0002) [2] X. Ding, M. Patel, C.-C. Chan, Molecular pathology of age-related macular degeneration, *Progress in retinal and eye research* 28 (2009) 1-18.
- (비특허문헌 0003) [3] R.D. Jager, W.F. Mieler, J.W. Miller, Age-related macular degeneration, *New England Journal of Medicine* 358 (2008) 2606-2617.
- (비특허문헌 0004) [4] J.R. Yates, A.T. Moore, Genetic susceptibility to age related macular degeneration, *Journal of medical genetics* 37 (2000) 83-87.
- (비특허문헌 0005) [5] C.J. Kennedy, P.E. Rakoczy, I.J. Constable, Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review, *Eye* 9 (1995) 763-771.
- (비특허문헌 0006) [6] L.E. Lamb, J.D. Simon, A2E: A Component of Ocular Lipofuscin, *Photochemistry and photobiology* 79 (2004) 127-136.
- (비특허문헌 0007) [7] J.R. Sparrow, M. Boulton, RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology, *Experimental eye research* 80 (2005) 595-606.
- (비특허문헌 0008) [8] R.W. Young, PATHOPHYSIOLOGY OF AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION, *Survey of Ophthalmology* 31 (1987) 291-306.
- (비특허문헌 0009) [9] J.R. Sparrow, B. Cai, Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2, *Investigative ophthalmology & visual science* 42 (2001) 1356-1362.
- (비특허문헌 0010) [10] J.R. Sparrow, N. Fishkin, J. Zhou, B. Cai, Y.P. Jang, S. Krane, Y. Itagaki, K. Nakanishi, A2E, a byproduct of the visual cycle, *Vision research* 43 (2003) 2983-2990.
- (비특허문헌 0011) [11] S.C. Finnemann, L.W. Leung, E. Rodriguez-Boulan, The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002) 3842-3847.
- (비특허문헌 0012) [12] M. Suter, C. Reme, C. Grimm, A. Wenzel, M. Jaaattela, P. Esser, N. Kociok, M. Leist, C. Richter, Age-related Macular Degeneration THE LIPOFUSCIN COMPONENTN-RETINYL-N-RETINYLDENE ETHANOLAMINE DETACHES PROAPOPTOTIC PROTEINS FROM MITOCHONDRIA AND INDUCES APOPTOSIS IN MAMMALIAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS, *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 39625-39630.
- (비특허문헌 0013) [13] J. Liu, W. Lu, D. Reigada, J. Nguyen, A.M. Laties, C.H. Mitchell, Restoration of lysosomal pH in RPE cells from cultured human and ABCA4/ mice: pharmacologic approaches and functional recovery, *Investigative ophthalmology & visual science* 49 (2008) 772-780.
- (비특허문헌 0014) [14] E. Poliakov, N.V. Strunnikova, J.-k. Jiang, B. Martinez, T. Parikh, A. Lakkaraju, C. Thomas, B.P. Brooks, T.M. Redmond, Multiple A2E treatments lead to melanization of rod outer segment-challenged ARPE-19 cells, *Molecular vision* 20 (2014) 285.
- (비특허문헌 0015) [15] G. Moiseyev, O. Nikolaeva, Y. Chen, K. Farjo, Y. Takahashi, J.-x. Ma, Inhibition of the visual cycle by A2E through direct interaction with RPE65 and implications in Stargardt disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (2010) 17551-17556.
- (비특허문헌 0016) [16] O.A. Anderson, A. Finkelstein, D.T. Shima, A2E induces IL-1ss production in retinal pigment epithelial cells via the NLRP3 inflammasome, *PLoS One* 8 (2013) e67263.
- (비특허문헌 0017) [17] J. Zhou, B. Cai, Y.P. Jang, S. Pachydaki, A.M. Schmidt, J.R. Sparrow,

Mechanisms for the induction of HNE-MDA-and AGE-adducts, RAGE and VEGF in retinal pigment epithelial cells, Experimental eye research 80 (2005) 567-580.

(비특허문헌 0018) [18] S. Ben-Shabat, Y. Itagaki, S. Jockusch, J.R. Sparrow, N.J. Turro, K. Nakanishi, Formation of a nonaoxirane from A2E, a lipofuscin fluorophore related to macular degeneration, and evidence of singlet oxygen involvement, Angewandte Chemie International Edition 41 (2002) 814-817.

(비특허문헌 0019) [19] J.R. Sparrow, J. Zhou, S. Ben-Shabat, H. Vollmer, Y. Itagaki, K. Nakanishi, Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE, Investigative ophthalmology & visual science 43 (2002) 1222-1227.

(비특허문헌 0020) [20] J.R. Sparrow, H.R. Vollmer-Snarr, J. Zhou, Y.P. Jang, S. Jockusch, Y. Itagaki, K. Nakanishi, A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation, Journal of Biological Chemistry 278 (2003) 18207-18213.

(비특허문헌 0021) [21] G.S. Hageman, D.H. Anderson, L.V. Johnson, L.S. Hancox, A.J. Taiber, L.I. Hardisty, J.L. Hageman, H.A. Stockman, J.D. Borchardt, K.M. Gehrs, A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration, Proc Natl Acad Sci U S A 102 (2005) 7227-7232.

(비특허문헌 0022) [22] J. Zhou, Y.P. Jang, S.R. Kim, J.R. Sparrow, Complement activation by photooxidation products of A2E, a lipofuscin constituent of the retinal pigment epithelium, Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (2006) 16182-16187.

(비특허문헌 0023) [23] C. Vives-Bauza, M. Anand, A.K. Shirazi, J. Magrane, J. Gao, H.R. Vollmer-Snarr, G. Manfredi, S.C. Finnemann, The age lipid A2E and mitochondrial dysfunction synergistically impair phagocytosis by retinal pigment epithelial cells, Journal of Biological Chemistry 283 (2008) 24770-24780.

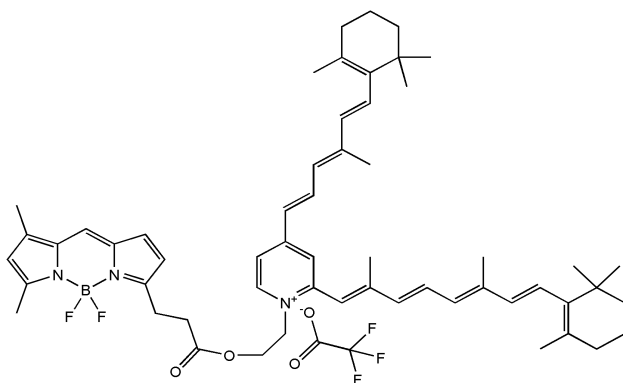
(비특허문헌 0024) [24] Q. Bian, S. Gao, J. Zhou, J. Qin, A. Taylor, E.J. Johnson, G. Tang, J.R. Sparrow, D. Gierhart, F. Shang, Lutein and zeaxanthin supplementation reduces photooxidative damage and modulates the expression of inflammation-related genes in retinal pigment epithelial cells, Free Radical Biology and Medicine 53 (2012) 1298-1307.

발명의 내용

해결하려는 과제

본 발명의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 A2E-BDP (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine-BODIPY FL)를 제공하는 것이다:

[화학식 1]

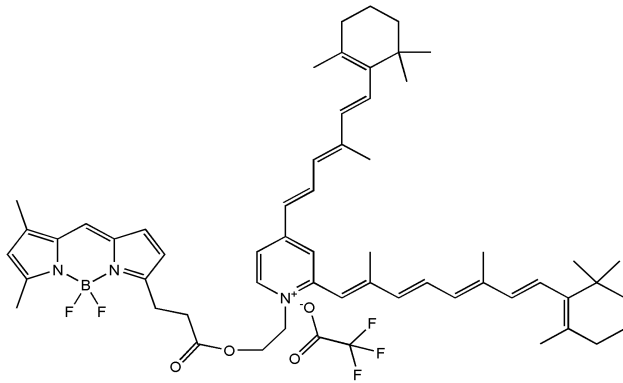


[0015] 또한, 본 발명의 목적은 (a) 세포에 시험물질을 처리하는 단계; (b) 세포에 상기 화학식 1로 표시되는 A2E-BDP (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine-BODIPY FL)를 처리하는 단계; 및 (c) 세포의 형광 강도를 분석하는 단계를 포함하는 세포내 A2E (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine) 축적 억제제, 축적된 A2E의 제거제, 또는 황반변성 치료제 또는 예방제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 A2E-BDP (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine-BODIPY FL)를 제공한다:

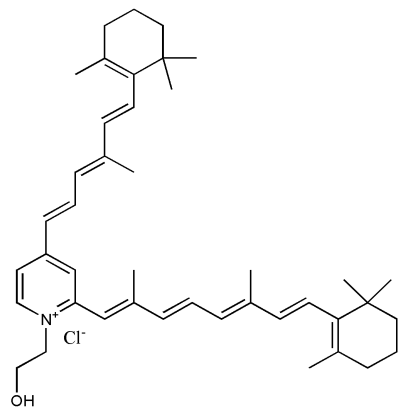
[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 본 발명에서 "A2E"는 *N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine을 화학명칭으로 하는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 의미한다:

[0020] [화학식 2]



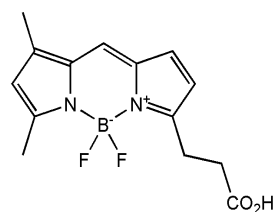
[0021]

[0022] 상기 A2E는 당업자에게 공지된 방법(예를 들어, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, pp. 14609-14613)으로 합성하거나, 상업적으로 구매하여 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명에서 "BODIPY"는 형광 염료 중 하나인 보론-디피로메텐(boron-dipyrrromethene)을 의미하며 BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665 등을 포함한다.

[0024] 상기 BODIPY FL은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 의미한다:

[0025] [화학식 3]

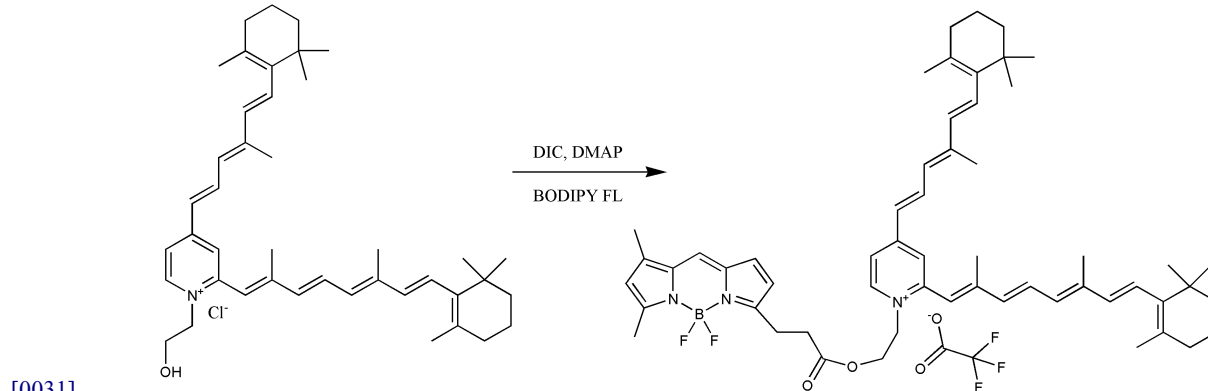


[0026]

[0027] 상기 BODIPY, BODIPY FL 등은 당업자에게 공지된 방법으로 합성하거나, 상업적으로 구매하여 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0029] 다른 하나의 양태로, 본 발명은 하기의 반응식 1에 따라 A2E (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine)를 BODIPY FL과 반응시켜 제1항의 A2E-BDP (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine-BODIPY FL)를 제조하는 방법을 제공한다:

[0030] [반응식 1]



[0032] (상기 반응식 1에서 DIC는 *N,N*-디이소프로필카르보디이미드(*N,N*-diisopropylcarbodiimide)이고, DMAP은 4-디메틸아미노피리딘(4-dimethylaminopyridine)이다).

[0033] 보다 상세하게 본 발명의 A2E-BDP는 BODIPY FL을 THF에 녹인 후 DIC 및 DMAP를 반응액에 가하고 위 반응액에 A2E를 가한 후 교반하여 수득할 수 있다.

[0035] 상기 A2E는 황반변성을 일으키는 주된 원인인 갈색지방단백질복합체인 리포푸신의 한 종류로서, 빛에 민감한 특징을 가진다. A2E는 photoreceptor outer segment membrane에서 all-trans-retinal과 phosphatidylethanolamine의 축합반응으로 형성되어 망막색소상피세포의 리소솜에 축적된다. 축적된 A2E는 빛, 특히 청색광에 의하여 과산화되고, 다양한 구조의 oxi-form으로 전환되어 망막색소상피세포 내 독성을 유발하여 세포사멸을 일으키고 궁극적으로 황반변성을 유발하는 것으로 알려져있다.

[0036] 종래 A2E의 세포내 축적 및 축적된 A2E의 제거 확인은 세포에서 축적된 A2E의 추출과정을 포함하는 복잡한 정량과정을 포함하나, 본 발명의 A2E-BDP는 우수한 형광 발광효과가 있어 간편하고 정확하게 A2E의 확인이 가능하다.

[0037] 구체적인 일 실험예에서, A2E와 A2E-BDP를 인간망막색소상피세포에 축적시킨 후 형광현미경으로 관찰하였을 때 A2E는 관찰되지 않는 반면 A2E-BDP는 쉽게 확인되었다(도 1). 또한, A2E-BDP를 인간망막색소상피세포에 처리하고 형광광도계(VICTOR™ X3, PerkinElmer, USA)로 형광강도를 측정하였을 때 농도의존적으로 형광강도가 증가하는 것이 확인되었으며(도 2), 이러한 농도 의존적 형광검출의 증가는 형광현미경 이미지로도 쉽게 관찰되었다(도 3).

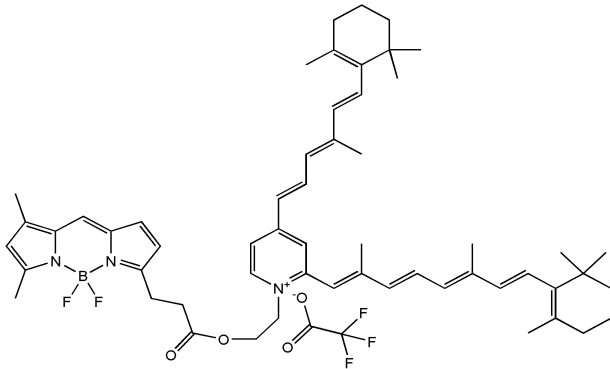
[0039] 또한, 본 발명의 A2E-BDP는 상기 A2E와 마찬가지로 세포, 특히 망막색소상피세포 내에 축적되어 빛, 특히 청색광의 조사로 세포사멸을 유발한다.

[0040] 구체적인 일 실험예에서, 인간망막색소상피세포에 A2E 또는 A2E-BDP를 처리한 후 청색광을 조사하여 세포사멸 여부를 현미경으로 관찰하였고, 세포생존률을 MTT 검정으로 측정하였다. 그 결과, A2E-BDP를 축적시킨 인간망막색소상피세포에서도 A2E를 축적시킨 인간망막색소상피세포에서와 마찬가지로 청색광에 의하여 세포사멸이 유도됨을 관찰할 수 있었다(도 4). MTT 검정에 의한 세포생존률 측정에서도 A2E-BDP가 청색광 조사에 의하여 약 25% 정도의 세포사멸이 유도됨을 확인할 수 있었다(도 5).

[0041] 이와 같이 본 발명의 A2E-BDP는 형광 강도가 높아 세포내 A2E의 축적 측정이 간편하고, 정확하므로, 이를 새로운 방법으로 활용하여 A2E의 세포내 축적 억제제 및 축적된 A2E의 제거제 후보물질의 스크리닝용(검색용) 또는 A2E의 세포내 축적 억제제 및 축적된 A2E의 제거제 후보물질의 효능 평가용 방법으로 사용할 수 있다.

[0043] 따라서, 다른 하나의 양태로서 본 발명은 (a) 세포에 시험물질을 처리하는 단계; (b) 세포에 하기 화학식 1로 표시되는 A2E-BDP (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine-BODIPY FL)를 처리하는 단계; 및 (c) 세포의 형광 강도를 분석하는 단계를 포함하는 세포내 A2E (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine) 축적 억제제 또는 축적된 A2E의 제거제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0044] [화학식 1]



[0045]

[0046] 상기 형광 강도는 당업자에게 공지된 모든 측정 장치를 사용하여 분석할 수 있으며, 예를 들어 형광현미경, 형광광도계 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 또한, 본 발명의 상기 세포내 A2E 축적 억제제의 스크리닝 방법은 (d) 시험물질을 처리하지 않고 A2E-BDP를 처리한 세포의 형광 강도와 비교하여 (c) 단계의 세포의 형광 강도가 더 작으면 시험물질을 세포내 A2E 축적 억제제로 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

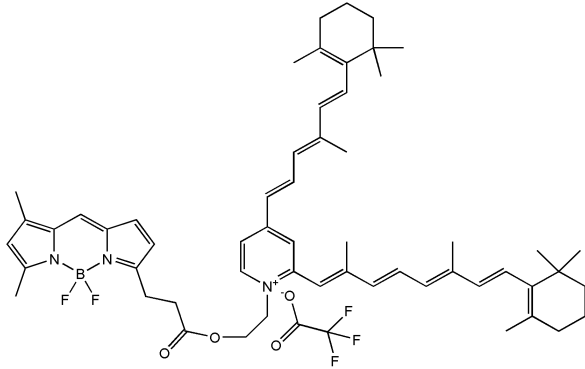
[0048] 상기 세포는 바람직하게 망막색소상피세포이고, 보다 바람직하게 인간망막색소상피세포이다.

[0049] 구체적인 일 실험예에서, 본 발명의 A2E-BDP를 이용하여 시험물질이 세포내 A2E 축적 억제제인지 여부를 스크리닝하였다. 보다 상세하게, 인간망막색소상피세포에 시험물질로서 루테인을 처리하고 A2E-BDP를 처리하여 루테인에 의한 세포내 A2E 축적 억제 효과를 확인하였다. 그 결과, 루테인 처리에 의하여 농도 의존적으로 세포내 A2E의 축적이 억제되는 것이 확인되었다(도 6). 또한, 루테인에 의한 세포내 A2E의 축적 억제효과는 형광현미경으로도 쉽게 관찰되었다(도 7).

[0051] 상기 세포내 A2E의 축적은 앞서 설명한 바와 같이 황반변성의 주된 원인이 되므로, 세포내 A2E의 축적 억제효과 또는 축적된 A2E의 제거 효과를 가진 물질은 황반변성 치료제 또는 예방제로 사용될 수 있다.

[0052] 따라서, 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 세포에 시험물질을 처리하는 단계; (b) 세포에 하기 화학식 1로 표시되는 A2E-BDP (*N*-retinylidene-*N*-retinylethanolamine-BODIPY FL)를 처리하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 형광 강도를 분석하는 단계를 포함하는, 황반변성 치료제 또는 예방제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0053] [화학식 1]



[0054]

[0055] 상기 형광 강도는 당업자에게 공지된 모든 측정 장치를 사용하여 분석할 수 있으며, 예를 들어 형광현미경, 형광광도계 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 또한, 상기 황반변성 치료제 또는 예방제의 스크리닝 방법은 (d) 시험물질을 처리하지 않고 A2E-BDP를 처리한 세포의 형광 강도와 비교하여 (c) 단계의 세포의 형광 강도가 더 작으면 시험물질을 황반변성 치료제 또는 예방제로 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0057] 상기 세포는 바람직하게 망막색소상피세포이고, 보다 바람직하게 인간망막색소상피세포이다.

[0058] 이와 같이 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 A2E-BDP의 우수한 형광 강도를 이용하므로 황반변성 치료제 또는 예방제 후보물질의 스크리닝용(검색용) 또는 황반변성 치료제 또는 예방제 후보물질의 효능 평가용 방법으로 활용될 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 측정시간이 짧고, 실시간으로 측정을 확인할 수 있어, A2E의 세포내 축적 억제제, 축적된 A2E의 제거제, 또는 황반변성 치료제 또는 예방제 후보물질(들)을 대량으로 스크리닝하기에 적합하다.

발명의 효과

[0061] 본 발명의 A2E-BDP는 세포내 A2E의 축적 측정이 간편하고, 정확하므로, A2E의 세포내 축적 억제제, 축적된 A2E의 제거제, 또는 황반변성 치료제 또는 예방제 후보물질의 스크리닝용 또는 A2E의 세포내 축적 억제제, 축적된 A2E의 제거제, 또는 황반변성 치료제 또는 예방제 후보물질의 효능 평가용 방법으로 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 20 μ M 및 40 μ M 농도의 A2E 또는 A2E-BDP를 처리한 인간망막색소상피세포의 형광현미경 관찰결과를 나타낸 것이고,

도 2는 A2E 또는 A2E-BDP를 처리한 인간망막색소상피세포의 형광강도를 형광광도계로 확인한 결과를 나타낸 것이고,

도 3은 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M 및 60 μ M 농도의 A2E-BDP를 처리한 인간망막색소상피세포의 형광현미경 관찰결과를 나타낸 것이고,

도 4는 20 μ M 농도의 A2E 또는 A2E-BDP를 처리한 인간망막색소상피세포의 청색광(BL) 노출시간에 따른 세포사멸 여부를 현미경으로 관찰한 결과이고(CTR: control (대조군)),

도 5는 20 μ M 농도의 A2E 또는 A2E-BDP를 처리한 인간망막색소상피세포의 청색광(BL) 노출시간에 따른 세포생존률(cell viability)을 MTT 검정으로 측정한 결과그래프이고(control: 대조군),

도 6은 3.12 μ M, 6.25 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M 및 50 μ M 농도의 루테인을 처리한 후, 10 μ M 농도의 A2E 또는 A2E-BDP를 처리한 인간망막색소상피세포의 형광강도를 fluorescence microplate reader로 측정한 결과이고,

도 7은 50 μ M 농도의 루테인을 처리한 후, 10 μ M 농도의 A2E-BDP를 처리한 인간망막색소상피세포의 형광현미

경 관찰결과를 나타낸 것이다.

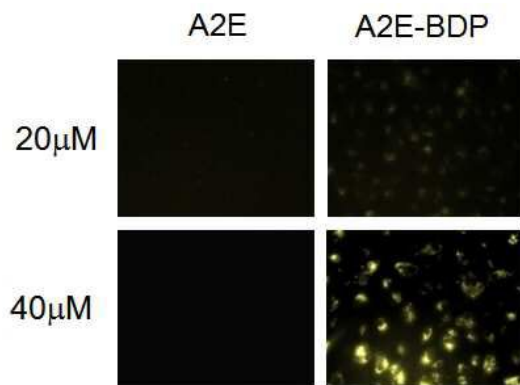
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0063] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0065] **실시예 1: A2E 및 A2E-BDP의 합성**
- [0066] A2E는 기존 문헌을 통해 알려져 있는 방법으로 합성하였다(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, pp. 14609-14613). 구체적으로 all-*trans*-retinal (100 mg, 352 μmol)과 에탄올아민(9.5 mg, 155 μmol)을 에탄올(3.0 ml)에 넣고 아세트산(9.3 ml, 155 μmol) 존재 하에 상온에서 2일간 차광하여 교반하였다. 반응물을 감압농축 후 실리카겔 크로마토그래피 상에서 MeOH : CH₂Cl₂ : trifluoroacetic acid (TFA) (8 : 92 : 0.001)으로 용출(elution)하여 분리하였다. NMR 상에서 전체 약 5%에 해당되는 iso-A2E는 HPLC를 통해 분리 제거함으로써 순수한 A2E를 정제하였다. A2E-TFA염의 TFA를 제거하기 위해 디클로로메탄에 용해하고 포화 염화나트륨 용액으로 세척하였다. 얻어진 유기층은 황산나트륨을 통하여 건조 후 감압 농축시키고 추가 정제 없이 다음 단계에 사용되었다. 상품으로 구입 가능한 BODIPY FL (Life technologies)을 THF (2 ml)로 녹였다. 반응액에 DIC (*N,N'*-diisopropylcarbodiimide)와 DMAP (4-dimethylaminopyridine)를 가한 후에 앞서 얻은 A2E를 넣었다. 반응액을 24시간 동안 교반하였고 TLC를 이용하여 정제하였다. 전개조건은 10% 디클로로메탄의 메탄올에 0.2% TFA가 포함된 조건이었다. 최종적으로 암갈색의 A2E-BDP 4mg을 얻었다. (97%의 순도, 분석조건: 430nm UV ESI-MS m/z=865.5 (calculated for C₅₆H₇₁BF₂N₃O₂⁺, 866.56, [M]⁺))
- [0068] **실험예 1: A2E 및 A2E-BDP의 세포내 축적 측정**
- [0069] **1-1: A2E 및 A2E-BDP의 축적 측정 방법**
- [0070] 인간망막색소상피세포(ARPE-19)를 1.5×10⁴ 세포/웰의 밀도로 96-웰 하얀 조직 배양 플레이트(white tissue culture plates)에 분주하였다. ARPE-19 세포에 A2E와 A2E-BDP를 각각 10 μM, 20 μM, 40 μM 및 60 μM 농도로 24시간 처리한 뒤 PBS 완충액(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄)으로 ARPE-19 세포를 수회 세척 후 형광 현미경(Nikon NIS-Elements, AR, Japan)으로 이미지를 측정하였다.
- [0071] 또한, A2E 축적의 정량적 측정을 위하여 A2E 또는 A2E-BDP가 10 μM, 20 μM, 40 μM, 및 60 μM 농도로 각각 처리된 ARPE-19 세포를 PBS 완충액(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄)으로 수회 세척 후 100 μl의 RIPA 완충액(25 mM Tris·HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.01% NP-40, 1% 소듐 디옥시콜레이트, 0.1% SDS)으로 세포를 용해하고 각 웰의 형광 강도를 fluorescence microplate reader (VICTOR[™] X3, PerkinElmer, USA)를 이용하여 측정하였다.
- [0073] **1-2: A2E 및 A2E-BDP의 축적 측정 결과**
- [0074] A2E와 A2E-BDP를 각각 20 μM 및 40 μM 농도로 인간망막색소상피세포(ARPE-19 세포)에 축적시킨 후 형광현미경(Nikon NIS-Elements, AR, Japan)으로 관찰하였을 때 A2E는 관찰되지 않는 반면 A2E-BDP는 쉽게 확인되었다(도 1).
- [0075] 또한, A2E-BDP를 10 μM, 20 μM, 40 μM 및 60 μM 농도로 각각 ARPE-19 세포에 처리하고 형광광도계(VICTOR[™] X3, PerkinElmer, USA)로 형광 강도를 측정하였을 때 농도의존적으로 형광 강도가 증가하였으며(도 2), 이러한 농도 의존적 형광강도의 증가는 형광현미경 이미지로도 쉽게 관찰되었다(도 3).
- [0077] **실험예 2. 청색광 조사에 의한 세포사멸 및 세포생존율 측정**
- [0078] **2-1: 청색광 조사에 의한 세포사멸 및 세포생존율 측정 방법**

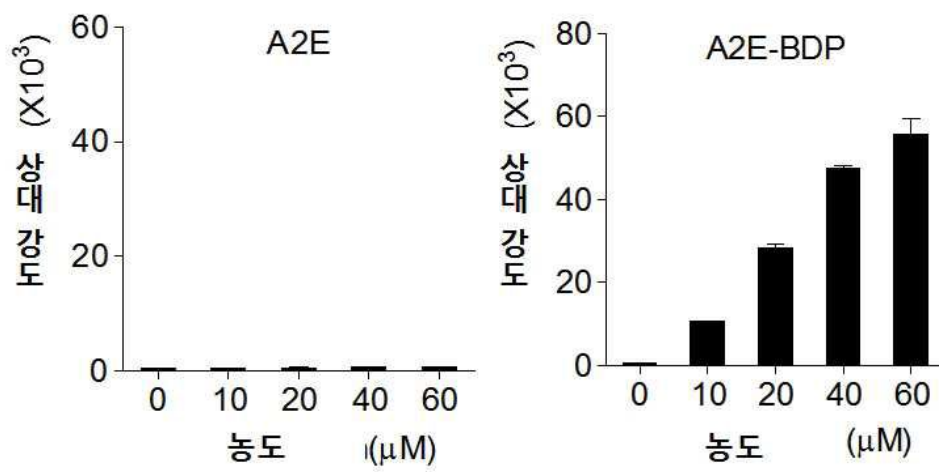
- [0079] 인간망막색소상피세포(ARPE-19 세포)에 축적된 A2E는 청색광(BL) 조사 시 세포독성을 유발하는 것으로 알려져있다. 이에 A2E와 동일하게 A2E-BDP가 세포 내에서 청색광(blue light, BL)에 의한 세포독성 유도 기능이 있는지 확인해보았다.
- [0080] 구체적으로, 인간망막색소상피세포(ARPE-19 세포)를 4×10^3 세포/웰 밀도로 96-웰 조직 배양 플레이트에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. A2E 또는 A2E-BDP를 20 μ M 농도로 처리한 후에 청색광(BL, 430 nm, 6000 lux)을 15분간 조사하여 세포사멸 여부를 현미경으로 관찰하였다.
- [0081] 또한, 세포생존률은 MTT 검정법을 이용하여 측정하였다. MTT 검정은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액이 살아있는 세포의 미토콘드리아의 디하이드로게나아제(dehydrogenases)에 의해서 포르마잔(formazan)으로 변화하는 것을 측정함으로써 세포의 생존여부를 확인하는 방법이다. 상기 청색광을 조사한 인간망막색소상피세포에 MTT 용액(5 mg/mL)을 20 μ L씩 넣고 3시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 뒤 100 μ L DMSO (Dimethyl sulfoxide)를 넣고 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다(BioTeK Instrument, USA).
- [0083] **2-2: 청색광 조사에 의한 세포사멸 및 세포생존률 측정 결과**
- [0084] 그 결과, A2E-BDP를 축적시킨 ARPE-19 세포에서도 A2E를 축적시킨 세포에서와 마찬가지로 청색광에 의하여 세포사멸이 유도됨을 관찰할 수 있었다(도 4). MTT 검정에 의한 세포생존률 측정에서도 A2E-BDP가 A2E와 청색광 조사에 의하여 약 25% 정도의 세포사멸이 유도됨을 확인할 수 있었다(도 5).
- [0086] **실험예 3: 루테인의 A2E 축적 억제능 측정**
- [0087] **3-1: 루테인의 A2E 축적 억제능 측정 방법**
- [0088] 본 발명의 A2E-BDP를 이용하여 건성 황반변성의 예방 및 치료효과가 보고된 루테인의 A2E 축적 억제 정도를 측정하였다.
- [0089] 구체적으로 ARPE-19 세포에 3.12 μ M, 6.25 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M 및 50 μ M 농도의 루테인을 처리하고 16시간 뒤 A2E 또는 A2E-BDP를 각각 10 μ M 농도로 축적시키고 24시간 동안 배양하였다. A2E 또는 A2E-BDP가 처리된 ARPE-19 세포를 PBS 완충액(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4)으로 수회 세척 후 100 μ L의 RIPA 완충액(25 mM Tris·HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.01% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)으로 세포를 용해하고 각 웰의 형광강도를 fluorescence microplate reader (VICTOR™ X3, PerkinElmer, USA)를 이용하여 측정하였다.
- [0091] **3-2: 루테인(Lutein)의 A2E 축적 억제능 측정 결과**
- [0092] ARPE-19 세포에 루테인을 3.12 μ M, 6.25 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M 및 50 μ M 농도로 각각 처리하고 16시간 뒤 10 μ M의 A2E-BDP를 처리하여 루테인에 의한 세포내 A2E 축적 억제 효과를 확인하였다.
- [0093] 그 결과, 루테인 처리에 의하여 농도 의존적으로 세포내 A2E 축적이 억제되는 것이 확인되었다(도 6). 또한, 루테인에 의한 세포내 A2E 축적 억제효과는 형광현미경으로도 쉽게 관찰되었다(도 7). 도 7에서 확인할 수 있듯이 ARPE-19 세포에 축적된 A2E-BDP의 양은 루테인 50 μ M 처리에 의하여 현저하게 감소되었다. 이러한 결과는 본 발명의 A2E-BDP가 A2E 축적 억제 물질 스크리닝에 활용될 수 있음을 의미한다.

도면

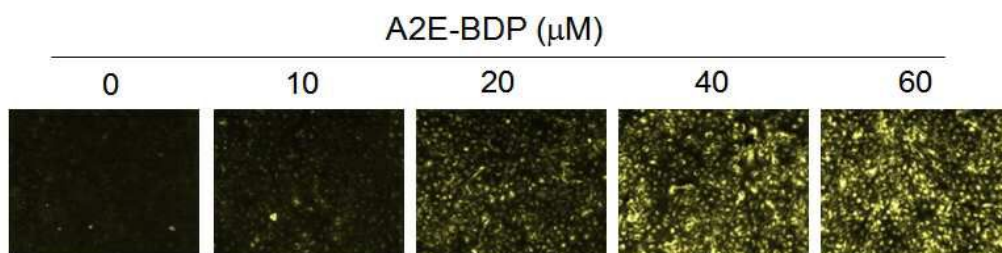
도면1



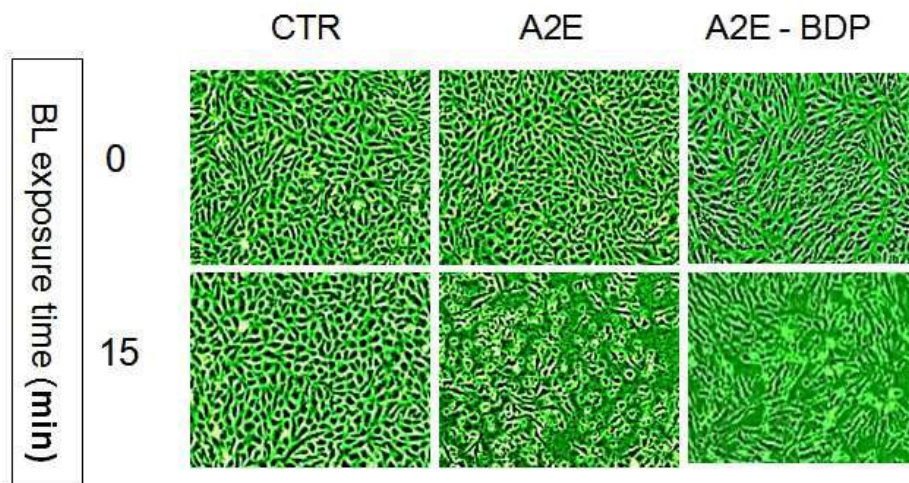
도면2



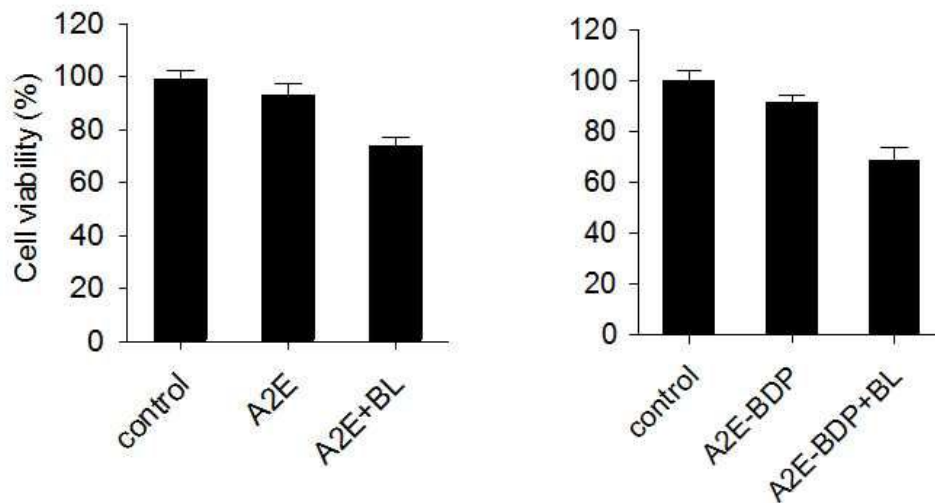
도면3



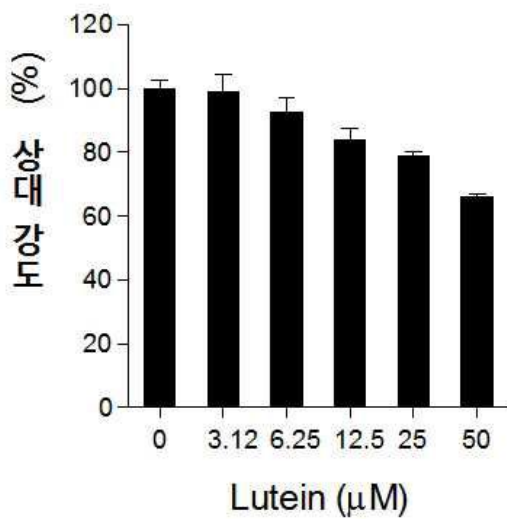
도면4



도면5



도면6



도면7

