

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 12월 17일 (17.12.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/190875 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/02 (2006.01) A61P 27/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/005952
- (22) 국제출원일: 2015년 6월 12일 (12.06.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0071960 2014년 6월 13일 (13.06.2014) KR
- (71) 출원인: 정우창 (JUNG, Woo Chang) [KR/KR]; 130-730 서울시 동대문구 천장산로 11길 17 삼성래미안아파트 204동 1503호, Seoul (KR). 주식회사 제이크리에이션 (JCREATION) [KR/KR]; 695-982 제주도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-33, Jeju-do (KR).
- (72) 발명자: 정세영 (CHOUNG, Se Young); 130-730 서울시 동대문구 천장산로 11길 17, 삼성래미안아파트 204동 1503호, Seoul (KR). 김동준 (KIM, Dong Joon); 695-982 제주도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-33, Jeju-do (KR). 양승원 (YANG, Seung Won); 448-130 경기도 용인시 수지구 광교마을로 2 광교경남아너스빌 4306동

1001호, Gyeonggi-do (KR). 최상호 (CHOI, Sang Ho); 441-865 경기도 수원시 권선구 세원로 85번길 73, 한양맨션 102호, Gyeonggi-do (KR). 강도형 (KANG, Do Hyung); 426-744 경기도 안산시 상록구 해안로 787, Gyeonggi-do (KR). 허수진 (HEO, Soo Jin); 426-906 경기도 안산시 상록구 해양 1로 11 622동 1801호, Gyeonggi-do (KR).

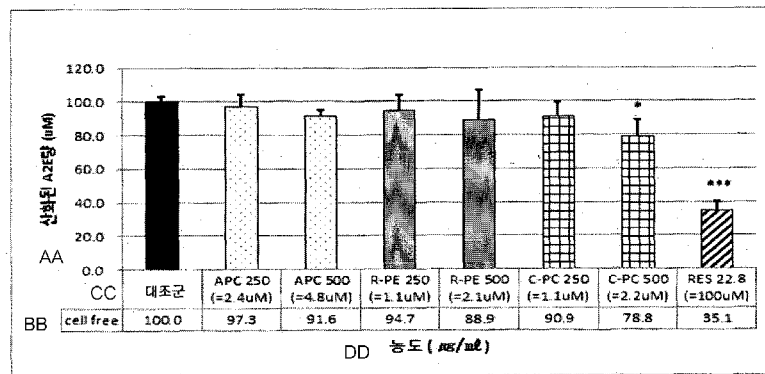
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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, ST, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SPIRULINA MAXIMA EXTRACT AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTING AND TREATING RETINAL DISEASES

(54) 발명의 명칭: 스피루리나 추출물을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

[도 1]



AA ... Amount of oxidized A2E (μM)
BB ... Cell free
CC ... Control group
DD ... Concentration (μg/ml)

(57) Abstract: A *Spirulina maxima* extract of the present invention and Allophycocyanin (APC), R-phycoerythrin (R-PE), and C-phycoerythrin (C-PC), which are components of the *Spirulina maxima* extract, show an effect of inhibiting cell death and A2E (pyridinium bis-retinoid), which is oxidized with a blue light, so that the present invention can be usefully applied as an active ingredient in a composition for preventing and treating retinal diseases.

(57) 요약서: 본 발명의 스피루리나(*Spirulina maxima*) 추출물 및 이의 성분인 알로피코시아닌(Allophycocyanin, APC), 알-피코에리스린(R-phycoerythrin, R-PE), 씨-피코시아닌(C-phycoerythrin, C-PC)은 청색광에 의해 산화된 A2E(pyridinium bis-retinoid) 및 세포사멸을 억제하는 효과를 나타내므로, 망막질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2015/190875 A1



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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

【명세서】

【발명의 명칭】

스피루리나 추출물을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

5

【기술분야】

본 발명은 스피루리나(*Spirulina maxima*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

10 【배경기술】

시각 문화의 홍수 속에서 생활 정보의 8~90% 이상을 눈으로 얻고 있는 현대 사회에서는 환경적 영향으로 시력 저하율이 지속적으로 상승하고 있다. 현대인들은 대부분의 시간을 컴퓨터, 스마트폰 등 다양한 디지털 스크린 앞에서 보내고 있는데 문제는 이러한 스마트 기기 화면에 LED가 자주 사용됨으로써 청색광으로 인해 눈 건강이 악화되고 있는 것이다. 청색광은 15 가지광선 중에서 400~500nm영역의 푸른색을 띄는 빛으로 디지털기기나 스마트폰에서 나오는 빛을 말한다. 야간에 디지털 기기를 켜 때 하얀색임에도 불구하고 전체적으로 푸르스름한 빛으로 느끼는 이유는 대표적인 청색광이 나오는 예라고 할 수 있다. 이러한 청색광에 오랜시간 노출될 경우 20 눈의 시신경을 자극하게 되어 피로함과 각종 안질환의 원인이 된다.

청색광은 에너지가 크고 투과력도 높기 때문에 눈에 그대로 들어오게 될 경우 망막에 초점을 불투명하게 맺히게 하여 선명도를 떨어뜨리고 만성적으로 노출되는 경우에는 망막의 노화와 퇴화의 원인이 된다. 청색광이 인체에 미치는 영향으로는 안구 건조 및 눈 피로, 시력감퇴 및 각종 안질환, 25 시세포(망막) 노화 촉진, 황반변성 및 멜라토닌 생성억제로 인한 불면증 등이 있다(Ganka Gakkai Zasshi. 2001 Oct;105(10):687-95; Archives of Ophthalmology 1992; 110:99-104; Review of Ophthalmology Oct 15 2003; 10(10)).

망막은 안구 벽의 가장 안쪽에 위치하여 안구 속 유리체(vitreous body)와 접하고 있는 투명하고 얇은 막으로서, 사물의 광학적 정보를 전기적 신호로 변환하여 시각신경을 통해 뇌의 중추 시각영역으로 영상을 전달하는 일차 시각정보기관의 역할을 한다. 망막에는 1억 개가 넘는

5 빛감지세포(광수용체세포, light-sensitive photoreceptor cells)와 1백만 개가 넘는 시각신경세포인 신경절세포(ganglion cells), 그리고 이들을 연결하는 전선 역할을 하는 수많은 신경세포로 이루어져 있으며, 따라서 우리 몸에서 가장 정교한 조직이다. 색깔과 사물을 구별하고 시력을 나타내는 망막의 중심부분인 황반부(macula lutea)는 원뿔세포로 구성된 광수용체세포층과

10 신경절세포층으로 이루어져 있어 망막의 두께가 얇으며, 밝은 빛 상태에서 영상의 전기적 신호가 화학적 신호로 전환되어 신경절세포의 축삭인 시각신경(optic nerve)을 타고 뇌로 전달되고, 황반부 이외의 망막은 주변부를 알아보고 어두울 때 주 역할을 담당한다. 우리 뇌세포 중 약 30%가 망막이 보내는 시각정보를 처리하는데 사용되지만, 노화 또는 외부적인 요인으로

15 망막에 이상이 발생되면서 서서히 시력과 시야에 문제가 생기는 시각장애와 함께 실명에 이른다. 망막 질환은 망막 주변 조직에 이상이 유발되어 신경망막이 색소 상피세포층으로부터 떨어지면 망막이 안구 후면으로 분리되어 시력 장애를 유발하는 망막박리(retinal detachment), 망막주변 조직에 이상을 일으키는 주변부 망막 변성 및 황반부에 이상이 생기는 황반변성(macular

20 degeneration)의 세 가지로 크게 분류되는데, 일단 망막이 색소상피층과 분리되면 영상에 대한 광학적 정보를 전달받을 수 없고, 또한 맥락막으로부터의 영양 공급이 이루어지지 못하므로 신경세포가 기능을 못하게 되며 이런 상태를 방치하면 영구적인 망막 위축이 발생하여 실명에 이르게 된다. 실명(blindness)의 주된 원인인 시각장애는 망막 질환이 그 원인으로

25 주로 나이가 들면서 나타나는 질환으로서 유전적 혹은 고도근시, 외상 등의 원인으로 야기될 수 있으며 백내장 다음으로 흔한 안과 질환이다. 실명을 야기하는 3대 안과 질환으로는 당뇨병성 망막증, 황반 변성 및 녹내장이다. 망막질환은 사망에 이르는 치명적인 질환은 아니지만 노인 인구의 증가와 함께

산업화 및 식생활의 변화에 따라 최근 급격하게 증가되고 있으므로, 수술적인 방법 이외에 인위적인 방법으로 합성된 치료제의 형태가 아닌 종래에 우리가 섭취하고 있는 생약재 등의 형태로 공급할 수 있는 망막질환 치료용 조성물이 개발될 필요가 있다고 할 수 있다.

5

스피루리나(*Spirulina maxima*)는 염분과 알칼리성이 높은 열대지방, 예를 들면, 아프리카의 차드 호수 및 멕시코의 텍스코코 호수에서 번식하는 미세조류의 일종이며, 그 세포 속에는 다량의 클로로필과 피코시아닌이 들어있어서 태양광선을 흡수하여 탄소동화작용을 활발하게 수행하여 자라고
10 있다. 이러한 색소들이 들어있어서 청남색을 띠고 있으므로 옛날부터 남조류(blue-green algae)로 분류했었다.

전자현미경의 발달로 미생물의 세포구조가 자세히 밝혀지면서 녹조류나 갈조류의 구조는 고등 식물의 구조와 다른 점을 발견하였다. 즉 녹조류의 구조는 고등식물의 구조와 동일하게 진핵 세포(eukaryote)구조를 가지고 있는
15 반면에, 남조류는 세균의 구조와 비슷한 원핵세포(prokaryote)구조를 가진 것이 밝혀짐에 따라, 1960년대 초부터 일부 미생물학자들이 남조류는 조류보다는 세균에 가까우므로, 세균류에 포함시켜야 한다는 주장이 나오게 되었다. 현재는 이 주장을 받아들여 청 남세 균류(blue-green bacteria)로 분류하고 있다. 그러나 산업계에서는 옛날 관행대로 미세조류(micro-algae)라
20 부르고 있다.

스피루리나는 형상이 스프링처럼 나선(Spiral)모양을 하고 있는데서 붙여진 이름으로 DNA가 2중 나선형인 점을 고려할 때 그 형태가 원시적이고 식물과 동물의 중간 성질을 가지고 있는 시아노박테리아(cyanobacteria)에 속하는 나선형의 세균이다. 스피루리나는 사람이 먹을 수 있는 미생물로
25 단백질이 55-70%, 지방이 6-9%, 탄수화물이 15-20% 함유되어 있고 다량의 무기질, 비타민, 섬유질 및 색소 성분을 함유하고 있다. 스피루리나는 단백질의 함량이 높을 뿐 아니라 8가지 필수아미노산을 포함하고 있으며 지방성분 중에는 지방산(free-fatty acid)가 70-80%에 달하고 리놀레산(linoleic acid),

γ -리놀렌산(γ -linolenic acid)등의 지방산이 큰 비중을 차지하고 있다. 스피루리나의 탄수화물 함유량은 적지만 주로 람노스와 글리코겐으로 구성되어 있어 인슐린의 도움없이 흡수되어 당뇨환자의 에너지원으로 이용될 수 있다. 현지인들은 오랫동안 이 미세조류를 채취하여, 식용으로 사용해 왔고 영양학적

 5 연구결과 단백질의 높은 함량과 아미노산을 비롯한 각종 영양소 성분조성이 인체의 건강에 매우 유익한 성분들로 되어있음을 알았다. 상기 스피루리나의 유익한 성분에는 알로피코시아닌(Allophycocyanin), 알-피코에리스린(R-phycoerythrin) 및 씨-피코시아닌(C-phycoerythrin)이 포함되어 있음이 알려져 있다(Nanni B. *et al.*, *Microbiol Res.*

 10 2001;156(3):259-66; 한글동의보감 <http://donguibogam.co.kr>).

이에, 본 발명자들은 망막질환 예방 및 치료를 위한 조성물을 개발하기 위해 노력한 결과, 스피루리나 추출물이 청색광에 의해 산화된 A2E(pyridinium bis-retinoid) 및 세포사멸을 억제하는 효과를 나타냄을 확인함으로써, 상기

 15 스피루리나 추출물 및 이의 성분인 알로피코시아닌(Allophycocyanin), 알-피코에리스린(R-phycoerythrin) 및 씨-피코시아닌(C-phycoerythrin)이 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

20 【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 스피루리나(*Spirulina maxima*) 추출물 및 알로피코시아닌(allophycocyanin), 알-피코에리스린(R-phycoerythrin), 또는 씨-피코시아닌(C-phycoerythrin)을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및

 25 치료용 약학적 조성물, 및 개선용 건강식품을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스피루리나 추출물을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 스피루리나 추출물을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

5 또한, 본 발명은 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 또는 씨-피코시아닌을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

아울러, 본 발명은 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 또는 씨-피코시아닌을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

10

【유리한 효과】

본 발명의 스피루리나(*Spirulina maxima*) 추출물 및 이의 성분인 알로피코시아닌(Allophycocyanin, APC), 알-피코에리스린(R-phycoerythrin, R-PE), 씨-피코시아닌(C-phycoerythrin, C-PC)은 청색광에 의해 산화된 A2E(pyridinium bis-retinoid) 및 세포사멸을 억제하는 효과를 나타내므로, 망막질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

15

【도면의 간단한 설명】

도 1은 알로피코시아닌(allophycocyanin; APC), 알-피코에리스린(R-phycoerythrin; R-PE), 및 씨-피코시아닌(C-phycoerythrin; C-PC)의 산화된 A2E(pyridinium bis-retinoid)에 대한 억제효과를 나타낸 그래프이다.

20

도2 는 A2E가 축적된 ARPE-19 세포에서 알로피코시아닌, 알-피코에리스린, 및 씨-피코시아닌의 청색광에 의한 세포사멸에 대한 보호효과를 나타낸 그래프이다(샘플 후처리).

25

A2E: A2E 축적 후 청색광을 조사하지 않은 세포

A2E BL: A2E 축적 후 청색광을 조사한 세포(음성 대조군)

APC: 25 $\mu\text{g/ml}$

R-PE: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$

C-PC: 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

도 3a는 ARPE-19 세포에서 알로피코시아닌, 알-피코에리스린, 및
 씨-피코시아닌의 청색광에 의한 세포사멸에 대한 보호효과를 나타낸
 5 그래프이다(도 3b를 위한 예비실험).

APC: 12.5, 25 및 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

R-PE: 12.5, 25 및 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

C-PC: 12.5, 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

도 3b는 ARPE-19 세포에서 알로피코시아닌, 알-피코에리스린, 및
 10 씨-피코시아닌의 청색광에 의한 세포사멸에 대한 보호효과를 나타낸
 그래프이다(샘플 전처리).

APC: 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

R-PE: 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

C-PC: 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

도 4는 A2E가 축적된 ARPE-19 세포에서 세포사멸에 대한 스피루리나
 15 추출물(미얀마산, 하와이산 및 KIOST산)의 세포보호 효과를 나타낸
 그래프이다(샘플 후처리).

도 5a는 ARPE-19 세포에서 세포사멸에 대한 스피루리나 추출물(미얀마산,
 하와이산 및 KIOST산)의 세포보호 효과를 나타낸 그래프이다(도 5b를 위한
 20 예비실험).

미얀마산: 125, 250, 500, 750 및 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

하와이산: 250, 500 및 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

KIOST산: 250, 500 및 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

도 5b는 ARPE-19 세포에서 청색광에 의한 세포사멸에 대한 스피루리나
 25 추출물(KIOST산)의 세포보호 효과를 나타낸 그래프이다(샘플 전처리).

KIOST산: 62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 스피루리나(*Spirulina maxima*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

5 상기 스피루리나 추출물은 알로피코시아닌(allophycocyanin; APC), 알-피코에리스틴(R-phycoerythrin; R-PE), 및 씨-피코시아닌(C-phycoerythrin; C-PC)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것이 바람직하다.

10 상기 스피루리나 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다:

- 1) 스피루리나에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및
- 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축한 후 건조하는 단계.

15 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 스피루리나는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한없이 사용할 수 있다.

20 상기 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C₁ 내지 C₂ 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 감압고온추출, 열탕추출, 환류추출, 열수추출, 냉침추출, 상온추출, 초음파추출, 원심분리추출 또는 증기추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 스피루리나 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출온도는 30 내지 100°C인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 2 내지 48시간인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 회수는 2 내지 5회인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

25 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한,

건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

상기 스피루리나 추출물은 청색광에 의해 산화된 피리디늄 비스-레티노이드(A2E)에 대한 억제능이 있고 망막 세포사멸을 억제한다.

상기 망막질환은 황반변성, 녹내장, 어서 증후군, 스타가트병(Stargardt disease), 바렛-비들 증후군, 베스트병, 맥락막 결여, 맥락망막 위축(gyrate-atrophy), 망막색소변성증, 망막 황반성 퇴화증, 레베르선천성흑내장(Leber Congenital Amaurosis; Leber's Hereditary Optic Neuropathy), BCM(Blue-cone monochromacy), 망막층간 분리, ML(Malattia Leventinese), 오구치병(Oguchi disease) 및 레프섬병(Refsum disease)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 A2E가 축적된 ARPE-19 세포에서 청색광에 의해 망막 세포 사멸에 대한 스피루리나 추출물(미얀마산, 하와이산, KIOST산)의 세포 보호능을 측정한 결과, 하와이산 및 KIOST산 스피루리나 추출물은 농도 의존적으로 세포보호 효과가 증가함을 나타냈으나, 미얀마산 추출물은 세포보호 효과에 대하여 통계적 유의성을 나타내지 않음을 확인하였다(도 4 참조). 또한, ARPE-19 세포에서 망막 세포 사멸에 대한 도 5a로부터 얻은 선별된 KIOST산 추출물 농도를 이용하여 A2E 축적 및 광산화 억제에 따른 세포 보호능을 측정한 결과, KIOST산 스피루리나 추출물을 62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 세포의 생존율은 각각 0%, 10.8%, 7.0%, 및 11.9% 씩 증가함을 확인하였다(도 5b 참조).

따라서, 스피루리나 추출물(하와이산, KIOST산)은 청색광에 의한 세포사멸에 대한 보호효과가 있고 광산화 억제에 따른 세포 보호능의 효과가 뛰어나므로, 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 추출물을 함유하는 약학적 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

즉, 본 발명의 약학적 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 율활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 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, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propyleneglycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 본 발명의 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg이며, 하루 1 ~ 6회 투여될 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 망막질환 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

또한, 본 발명은 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 및 씨-피코시아닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 또는 씨-피코시아닌은 청색광에 의해 산화된 피리디늄 비스-레티노이드(A2E)에 대한 억제능이 있고 망막 세포사멸을 억제한다.

상기 망막질환은 황반 변성, 녹내장, 어서 증후군, 스타가트병(Stargardt disease), 바렛-비들 증후군, 베스트병, 맥락막 결여, 맥락망막 위축(gyrate-atrophy), 망막색소변성증, 망막 황반성 퇴화증, 레베르선천성흑내장(Leber Congenital Amaurosis; Leber's Hereditary Optic Neuropathy), BCM(Blue-cone monochromacy), 망막층간 분리, ML(Malattia Leventinese), 오구치병(Oguchi disease) 및 레프섬병(Refsum disease)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 청색광에 의해 산화된

피리디늄 비스-레티노이드(A2E))에 대한 알로피코시아닌(APC), 알-피코에리스틴(R-PE) 및 씨-피코시아닌(C-PC)의 산화억제능을 측정한 결과, C-PC가 A2E에 대한 산화억제능에 대해 통계적 유의성을 나타냄을 확인하였고 특히, C-PC > R-PE > APC 순으로 A2E 산화억제능을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 5 1 참조). 또한, A2E가 축적된 ARPE-19 세포에서 망막 세포 사멸에 대한 APC, R-PE 및 C-PC의 세포 보호능을 측정한 결과, C-PC를 처리한 군에서 농도별로 각각 6.7%, 8.1%, 17.8%, 23.9%, 및 27.6%씩 증가하였으나, APC 및 R-PE 처리 군에서는 세포독성이 관찰되지 않음을 확인하였다(도 2 참조).

도 3a로부터 선별된 C-PC의 농도를 이용하여 APC(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), R-PE(25 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 및 C-PC(6.25, 12.5, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 ARPE-19 세포에 전처리하고, A2E를 축적한 후 청색광을 조사하여 세포 생존율을 측정한 결과, C-PC 처리군은 농도 의존적으로 세포 생존율을 증가시킴을 확인하였으나, APC 및 R-PE를 처리한 군은 세포 보호효과에 대하여 통계적 유의성을 나타내지 않음을 확인하였다(도 3b 참조).

15 따라서, APC, R-PE, 또는 C-PC는 청색광에 의한 세포사멸에 대한 보호효과가 있고 광산화 억제에 따른 세포 보호능의 효과가 뛰어나므로, 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 스피루리나 추출물을 유효성분으로 포함하는 망막질환 20 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

상기 스피루리나 추출물은 청색광에 의해 산화된 피리디늄 비스-레티노이드(A2E)에 대한 억제능이 있고 망막 세포사멸을 억제한다.

상기 망막질환은 황반 변성, 녹내장, 어서 증후군, 스타가트병(Stargardt disease), 바렛-비들 증후군, 베스트병, 맥락막 결여, 맥락망막 위축(gyrate-atrophy), 망막색소변성증, 망막 황반성 퇴화증, 25 레베르선천성흑내장(Leber Congenital Amaurosis; Leber's Hereditary Optic Neuropathy), BCM(Blue-cone monochromacy), 망막층간 분리, ML(Malattia Leventinese), 오구치병(Oguchi disease) 및 레프섬병(Refsum disease)으로

구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것이 바람직하다.

따라서, 스피루리나 추출물은 청색광에 의한 세포사멸에 대한 보호효과가 있고 광산화 억제에 따른 세포 보호능의 효과가 뛰어나므로, 망막질환 예방 및 개선용 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

5

아울러, 본 발명은 유효한 양의 스피루리나 추출물을 망막질환에 걸린 개체 또는 정상 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막질환 치료 또는 예방방법을 제공한다.

망막질환 예방 및 치료를 위한 약제에 사용하거나 또는 망막질환 예방
10 및 개선을 위한 건강기능식품에 사용하기 위한 스피루리나 추출물을 제공한다.

또한, 본 발명은 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 및 씨-피코시아닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 두개 이상을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

15 상기 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 또는 씨-피코시아닌은 청색광에 의해 산화된 피리디늄 비스-레티노이드(A2E)에 대한 억제능이 있고 망막 세포사멸을 억제한다.

따라서, APC, R-PE, 또는 C-PC은 청색광에 의한 세포사멸에 대한 보호효과가 있고 광산화 억제에 따른 세포 보호능의 효과가 뛰어나므로,
20 망막질환 예방 및 개선용 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

아울러, 본 발명은 유효한 양의 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 및 씨-피코시아닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 두개 이상을 망막질환에 걸린 개체 또는 정상 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막질환
25 치료 또는 예방방법을 제공한다.

망막질환 예방 및 치료를 위한 약제에 사용하거나 또는 망막질환 예방 및 개선을 위한 건강기능식품에 사용하기 위한 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 및 씨-피코시아닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나

또는 두개 이상을 제공한다.

이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의
5 내용이 하기의 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 스피루리나(*Spirulina maxima*) 추출물의 제조

스피루리나(*Spirulina maxima*, 한국해양미세조류은행
등록번호:KMMCC-1057)는 부경대학교 해양바이오신소재학과 한국해양
10 미세조류은행에서 분양받아 사용하였다.

구체적으로, 배양된 스피루리나를 다량 냉장 원심분리기(Multi-tube
carrier Refrigerated Centrifuge)(Vision Scientific CO. Ltd)로 3,000 rpm에서
25분간 원심분리하고 분리된 균체에 1.0% NaCl 용액으로 간단하게 세척한 다음
다시 원심분리하여 균체를 얻었고, 얻어진 균체는 동결건조하여 피코시아닌
15 추출용 시료로 하였다. 추출방법은 동결건조한 시료 40 mg에 0.1M 인산염
버퍼(phosphate buffer(pH 7.0))를 10 ml가한 다음 15분간 볼텍스(vortex)하고
원심분리(3,500 rpm, 5 분)한 다음 상층액을 취하여 스피루리나 추출물을
제조하였다.

20 <실시예 2> 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 또는 씨-피코시아닌의 준비
알로피코시아닌(A7472), 알-피코에리스린(P6161), 및
씨-피코시아닌(P2172)은 시그마 알드리치(Sigma-Aldrich)에서 구입하였으며
각각의 농도는 4 mg/ml, 10 mg/ml, 및 1 mg/ml였다.

25 <실시예 3> 세포배양 방법

본 발명의 실험 및 분석에 사용된 인간 성인 ARPE 세포(ARPE-19; catalog
no. CRL-2302)는 카톨릭 의과대학 시과학 연구소로부터 분양받아 사용하였다.
상기 ARPE 세포는 10% 소태아혈청(FBS), 100 U/ml 페니실린, 및 100 mg/ml

스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가한 DMEM배지에서 배양하여 실험에 사용하였으며, 배양기 조건은 5% CO₂, 37°C로 하였다. 세포를 실험에 사용시 5x10⁴ 개의 세포수로 6 웰 플레이트에 접종하여 실험에 사용하였다.

5 <실시에 4> A2E 합성 방법

본 발명의 실험 및 분석에 이용된 A2E(pyridinium bis-retinoid)의 합성 방법은, 에탄올에 녹인 all-트랜스-레티날과 에탄올 아민(2:1 몰비)의 혼합물을 암실 조건에서 아세트산을 첨가하여 2일 동안 반응시킨 다음, 상기 혼합물을 40°C에서 진공 농축한 후 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여
10 합성하였다. 합성된 A2E는 20 mM의 스탁 농도로 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)에 녹여 실험시까지 -20°C로 보관하였다.

<실험예 1> 청색광에 의해 산화된 피리디늄 비스-레티노이드(A2E)에 대한 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 및 씨-피코시아닌의 산화억제능 실험

15 망막 A2E 산화에 대한 알로피코시아닌(Allophycocyanin; APC), 알-피코에리스린(R-phycoerythrin; R-PE) 및 씨-피코시아닌(C-phycoerythrin; C-PC)의 산화 억제능을 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

구체적으로, A2E(100 μM 최종농도) 20 μl를 0.01% DMSO가 첨가된 PBS (phosphate buffered saline) 160 μl에 용해시킨 후 96-웰 플레이트에 각각
20 180μl씩 첨가한 다음, 상기 플레이트의 용액에 대조군(control) 또는 스피루리나 추출물로부터 얻은 각각의 APC, R-PE 및 C-PC의 농도 (각각 250, 500 μg/ml 최종농도)로 희석된 시료를 20μl씩 첨가하였다. ELISA 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 430 nm 파장(A2E 흡광 파장)에서 흡광도를 측정
25 후, 청색광을 2.01 J/cm²의 에너지 세기로 10분간 조사하고 앞에서와 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 A2E 표준곡선을 이용하여 농도를 환산하였고, 산화된 A2E의 농도를 청색광 조사 전과 후의

농도차에 의해 계산하였다.

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, C-PC(250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도)를
 처리하였을 때, 산화된 A2E는 대조군(CTL) 100%에 비해 각각 9.1%, 21.2% 줄어든
 양으로 나타났고, 이로부터 C-PC가 농도 의존적으로 A2E에 대한 산화억제능에
 5 대해 통계적 유의성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 반면, APC(250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 농도)를 처리하였을 때 산화된 A2E가 대조군에 비해 각각 2.7%, 8.4% 적게
 나타났고, 또한, R-PE(250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도)를 처리하였을 때 대조군에 비해
 각각 5.3%, 11.1% 낮게 나타났으며, 이로부터 APC 및 R-PE도 A2E 산화억제능을
 나타냈으나 C-PC보다는 크게 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서, C-PC
 10 > R-PE > APC 순으로 A2E 산화억제능을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 1).

<실험예 2> A2E 축적된 ARPE-19 세포에서 망막 세포 사멸에 대한 APC, R-PE 및 C-PC의 세포 보호능 실험(샘플 후처리계)

망막 A2E 산화에 대한 알로피코시아닌(Allophycocyanin; APC),
 15 알-피코에리스틴(R-phycoerythrin; R-PE) 및 씨-피코시아닌(C-phycoerythrin;
 C-PC)의 세포 보호능을 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

구체적으로, 24-웰 플레이트에 웰 당 ARPE-19 세포를 2×10^4 개씩 분주한
 후 20 μl A2E를 7일 동안 축적시켰다(10 μM 최종 농도, 3회 처리). 이 후, 도
 1의 결과에 따라서, 3 가지 물질을 각각 APC는 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, R-PE는 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 및
 20 C-PC는 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 최종 농도로 3일간 2회 처리하고
 청색광(4.02 J/cm^2)을 조사한 후, 24시간 동안 배양하였다. 이 후, MTT
 분석법을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. MTT 분석법은 살아있는 세포
 내에서 노란색의 테트라졸리움염(tetrazolium salt(MTT))가 미토콘드리아의
 환원효소와 반응하여 보라색의 포르마잔 결정(formazan crystals)이 형성되는
 25 원리를 이용한 분석법으로, 즉 살아있는 세포가 많을수록 포르마잔 결정의
 생성이 증가하여 흡광도가 높게 측정된다.

MTT 분석법에 따라 0.5 mg/ml 의 MTT가 포함된 DMEM 배지를 첨가한 후

빛을 차단하고 배양기에서 37°C로 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 1ml의 DMSO로 세포를 충분히 녹인 다음, ELISA 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 540nm에서의 흡광도를 측정된 후 A2E를 측정하되 청색광을 조사하지 않은 세포군(정상 대조군; A2E)에 대한 퍼센트(%)로 세포의 생존율을 나타냈다.

그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, A2E를 측정하되 청색광을 조사하지 않은 세포군(A2E)과 A2E를 측정하되 청색광을 조사한 세포군(음성 대조군; A2E BL) 사이에는 유의적인 차이가 나타남을 확인하였다. 또한, 3 가지 물질, APC 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, R-PE는 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C-PC는 6.25, 12.5, 25, 50, 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 각각 처리한 세포의 생존율이 음성대조군인 A2E의 세포 생존율(100%)을 기준으로 비교하였을 때 C-PC를 처리한 군에서 농도별로 각각 6.7%, 8.1%, 17.8%, 23.9%, 및 27.6%씩 증가하였다. 반면, APC 처리군 및 R-PE 처리군에서는 세포독성이 관찰되지 않는 최고농도인 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포보호효과가 통계적 유의성을 보이지 않았다(도 2).

<실험예 3> 망막 세포 사멸에 대한 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 및 씨-피코시아닌의 A2E 축적 및 광산화 억제에 따른 세포 보호능(샘플 전처리계)

망막 A2E 산화에 대한 알로피코시아닌(Allophycocyanin; APC), 알-피코에리스린(R-phycoerythrin; R-PE) 및 씨-피코시아닌(C-phycoerythrin; C-PC)의 A2E 축적 및 세포 보호능을 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

예비실험(도 3a)에서 0 내지 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 APC 또는 R-PE, 및 0 내지 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 C-PC를 처리하였을 때 세포독성에 대해 효과를 나타낸 농도를 선별하였다.

구체적으로, 24-웰 플레이트에 웰 당 ARPE-19 세포를 2×10^4 개씩 분주한 후, 3 가지 물질을 각각(APC: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, R-PE: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C-PC: 6.25, 12.5, 25

- 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 최종 농도) 1일째, 4일째 및 7일째에 걸쳐 3회 처리하였다. 또한, A2E를 세포에 축적시키기 위해, A2E를 7일 동안 10 μM 최종농도로 2일째, 5일째, 8일째에 걸쳐 3회 처리하여 축적시키고 청색광(4.02 J/cm²)을 조사한 후, 24시간 동안 배양하였다. 이 후, MTT 분석법을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. MTT 분석법에 따라 0.5 mg/ml MTT를 포함한 DMEM 배지를 첨가한 후 빛을 차단하고 배양기에서 37°C로 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 DMSO를 이용하여 1ml로 세포를 충분히 녹인 다음, ELISA 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정한 후 A2E를 축적하고 청색광을 조사하지 않은 세포군에 대한 퍼센트(%)로 세포의 생존율을 나타냈다.
- 10 그 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이, A2E를 축적한 후 청색광을 조사하지 않은 세포군(A2E)과 A2E 축적 후 청색광을 조사한 세포군(음성 대조군; A2E BL) 사이에는 유의적인 차이가 나타남을 확인하였다. 또한, C-PC를 12.5, 25, 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 세포 생존율은 음성 대조군인 A2E BL의 세포 생존율과 비교하여 각각 26.9%, 43.4%, 및 44.8%씩 증가하였다. 반면, APC 및 R-PE를
- 15 처리한 군에서는 세포독성이 관찰되지 않는 최고 농도인 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포보호효과가 통계적 유의성을 나타내지 않았다(도 3b).

<실험예 4> A2E 축적된 ARPE-19 세포에서 망막 세포 사멸에 대한 원산지에 따른 스피루리나 추출물의 세포 보호능 (샘플 후처리계)

- 20 망막 A2E 산화에 대한 원산지가 각각 다른 스피루리나 추출물(미얀마산, 하와이산, KIOST산)로부터 세포 보호능을 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

- 구체적으로, 24-웰 플레이트에 웰 당 ARPE-19 세포를 2×10^4 개씩 분주한 후 상기 <실험예 3>과 동일한 방법으로 A2E를 7일 동안 축적시켰다(10 μM 최종농도, 3회 처리). 이 후 3가지 물질을 각각 미얀마산은 15.625, 31.25, 62.5, 125, 및 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 최종농도, 하와이산은 31.25, 62.5, 125, 및 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 최종농도, KIOST산은 62.5, 125, 250, 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 최종농도로 처리하고,
- 25

청색광(4.02 J/cm²)을 조사한 후 24시간 동안 배양하였다. MTT 분석법에 따라 0.5 mg/ml MTT를 포함한 DMEM 배지를 첨가한 후 빛을 차단하고 배양기에서 37°C로 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 DMSO 1ml를 이용하여 세포를 충분히 녹인 다음, ELISA 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하고 A2E를 축적하고 청색광을 조사하지 않은 세포에 대한 퍼센티지(%)로 세포의 생존율을 나타냈다.

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, A2E를 축적 후 청색광을 조사하지 않은 세포군(A2E)과 A2E 축적 후 청색광을 조사한 세포군(음성 대조군; A2E BL) 사이에는 유의적인 차이가 나타남을 확인하였다. 또한, 3가지 물질을 각각 미얀마산은 15.625, 31.25, 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/ml}$, 하와이산은 31.25, 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/ml}$, 및 KIOST산은 62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 세포의 생존율이 음성대조군의 세포 생존율(100%)을 기준으로 계산하였다. 하와이산 스피루리나 추출물을 처리한 군은 농도별로 각각 1.0%, 2.0%, 7.9% 및 10.6% 증가하였고, KIOST산을 처리한 군은 농도별로 각각 3.8%, 8.9%, 8.4% 및 12.4% 증가하였다. 따라서, 하와이산 및 KIOST산 스피루리나 추출물은 거의 동등한 세포보호 효과를 나타냈다. 반면, 미얀마산 추출물을 처리한 군에서는 모든 농도범위에서 세포보호 효과가 통계적 유의성을 나타내지 않았다(도 4).

<실험예 5> ARPE-19 세포에서 망막 세포 사멸에 대한 KIOST산 스피루리나 추출물의 A2E 축적 및 광산화 억제에 따른 세포 보호능(샘플 전처리제)

망막 A2E 산화에 대한 KIOST산 스피루리나 추출물의 A2E 축적 및 세포 보호능을 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

예비실험(도 5a)에서 1 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 KIOST산 추출물을 처리하였을 때 세포독성에 대해 효과를 나타낸 농도를 선별하였다. 구체적으로, 24-웰 플레이트에 웰 당 ARPE-19 세포를 2×10^4 개씩 분주한 후, 상기 도 5a에서 선별된 62.5, 125, 250, 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 최종농도로 각각 1일째, 4일째, 7일째에 3회 처리하였고, 또한 A2E를 세포에 축적시키기 위해 10 μM 최종농도로 7일

동안 2일째, 5일째, 8일째에 3회 처리하여 축적시키고 청색광(4.02 J/cm²)을 조사한 후, 24시간 동안 배양하였다. MTT 분석법에 따라 0.5 mg/ml MTT를 포함한 DMEM 배지를 첨가한 후 빛을 차단하고 배양기에서 37°C로 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 DMSO 1ml로 세포를 충분히 녹인 다음, ELISA 5 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정된 후 A2E를 축적하고 청색광을 조사하지 않은 세포군에 대한 퍼센트(%)로 세포의 생존율을 나타내었다.

그 결과, 도 5b에 나타낸 바와 같이, A2E를 축적 후 청색광을 조사하지 않은 세포군(A2E)과 A2E 축적 후 청색광을 조사한 세포군(음성 대조군; A2E BL) 10 사이에는 유의적인 차이가 나타남을 확인하였고, KIOST산 스피루리나 추출물을 62.5, 125, 250 및 500 µg/ml 농도로 처리한 세포의 생존율이 A2E BL의 세포 생존율(100%)을 기준으로 KIOST산 스피루리나 추출물을 처리한 군에서는 농도별로 각각 0%, 10.8%, 7.0%, 및 11.9% 씩 증가하였다(도 5b).

【청구의 범위】

【청구항 1】

스피루리나(*Spirulina maxima*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

5

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 스피루리나 추출물은 알로피코시아닌(allophycocyanin; APC), 알-피코에리스틴(R-phycoerythrin; R-PE), 및 씨-피코시아닌(C-phycoocyanin; C-PC)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

10

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 스피루리나 추출물은 원심분리 추출법, 용매 추출법 또는 초음파 추출법을 이용하여 추출하는 것을 특징으로 하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

15

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 스피루리나 추출물은 청색광에 의해 산화된 피리디늄 비스-레티노이드(A2E)에 대한 억제능을 갖는 것을 특징으로 하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

20

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 망막질환은 황반변성, 녹내장, 어서 증후군, 스타가트병(Stargardt disease), 바렛-비들 증후군, 베스트병, 맥락막 결여, 맥락막 위축(gyrate-atrophy), 망막색소변성증, 망막 황반성 퇴화증, 레베르선천성흑내장(Leber Congenital Amaurosis; Leber's Hereditary Optic Neuropathy), BCM(Blue-cone monochromacy), 망막층간 분리, ML(Malattia

25

Leventinese), 오구치병(Oguchi disease) 및 레프섬병(Refsum disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

5 **【청구항 6】**

제1항에 있어서, 상기 스피루리나 추출물은 망막 세포사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 7】

10 스피루리나 추출물을 유효성분으로 포함하는 망막질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

【청구항 8】

15 제7항에 있어서, 상기 스피루리나 추출물은 원심분리 추출법, 용매 추출법 또는 초음파 추출법을 이용하여 추출하는 것을 특징으로 하는 망막질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

【청구항 9】

20 유효한 양의 스피루리나 추출물을 망막질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막질환 치료방법.

【청구항 10】

 유효한 양의 스피루리나 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막질환 예방방법.

25

【청구항 11】

 망막질환 예방 및 치료를 위한 약제에 사용하기 위한 스피루리나 추출물.

【청구항 12】

망막질환 예방 및 개선을 위한 건강기능식품에 사용하기 위한 스피루리나 추출물.

5 【청구항 13】

알로피코시아닌(allophycocyanin; APC), 알-피코에리스린(R-phycoerythrin; R-PE), 및 씨-피코시아닌(C-phycoerythrin; C-PC)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 두개 이상을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

10

【청구항 14】

제 13항에 있어서, 상기 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 또는 씨-피코시아닌은 청색광에 의해 산화된 피리디늄 비스-레티노이드(A2E)에 대한 억제능을 갖는 것을 특징으로 하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

15

【청구항 15】

제 13항에 있어서, 상기 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 또는 씨-피코시아닌은 망막 세포사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 망막질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

20

【청구항 16】

알로피코시아닌, 알-피코에리스린 및 씨-피코시아닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 두개 이상을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

25

【청구항 17】

유효한 양의 알로피코시아닌, 알-피코에리스린 및 씨-피코시아닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 두개 이상을 망막질환에 걸린

개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막질환 치료방법.

【청구항 18】

- 유효한 양의 알로피코시아닌, 알-피코에리스틴 및 씨-피코시아닌으로
5 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 두개 이상을 개체에 투여하는
단계를 포함하는 망막질환 예방방법.

【청구항 19】

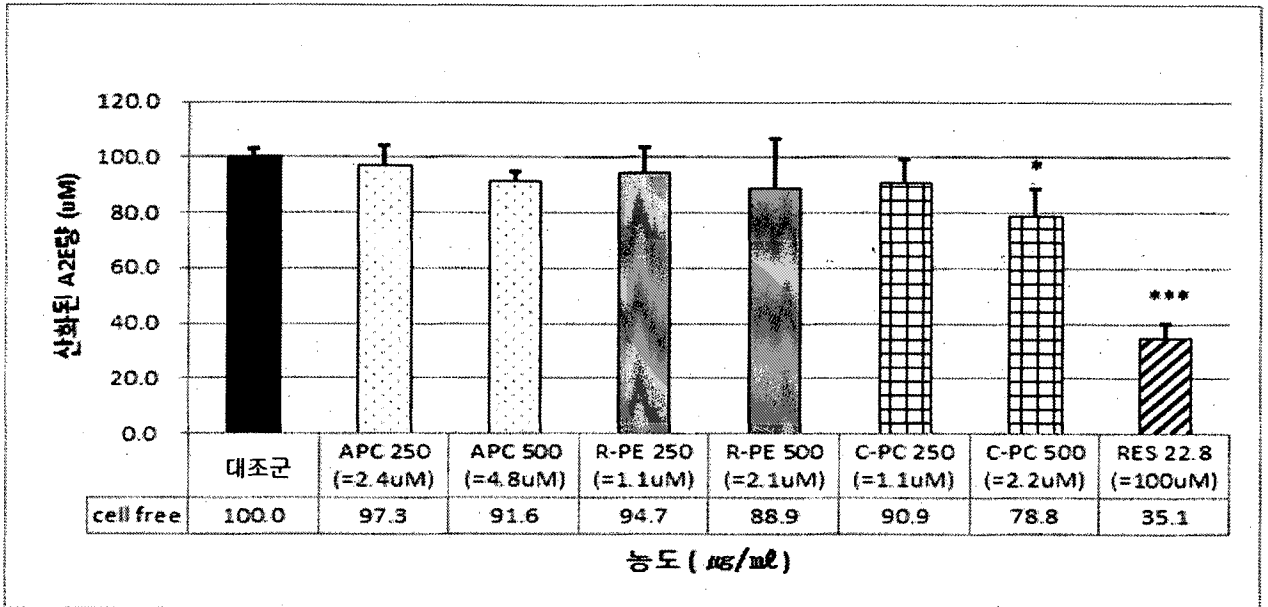
- 망막질환 예방 및 치료를 위한 약제에 사용하기 위한 알로피코시아닌.
10 알-피코에리스틴 및 씨-피코시아닌.

【청구항 20】

망막질환 예방 및 개선을 위한 건강기능식품에 사용하기 위한
알로피코시아닌, 알-피코에리스틴 및 씨-피코시아닌.

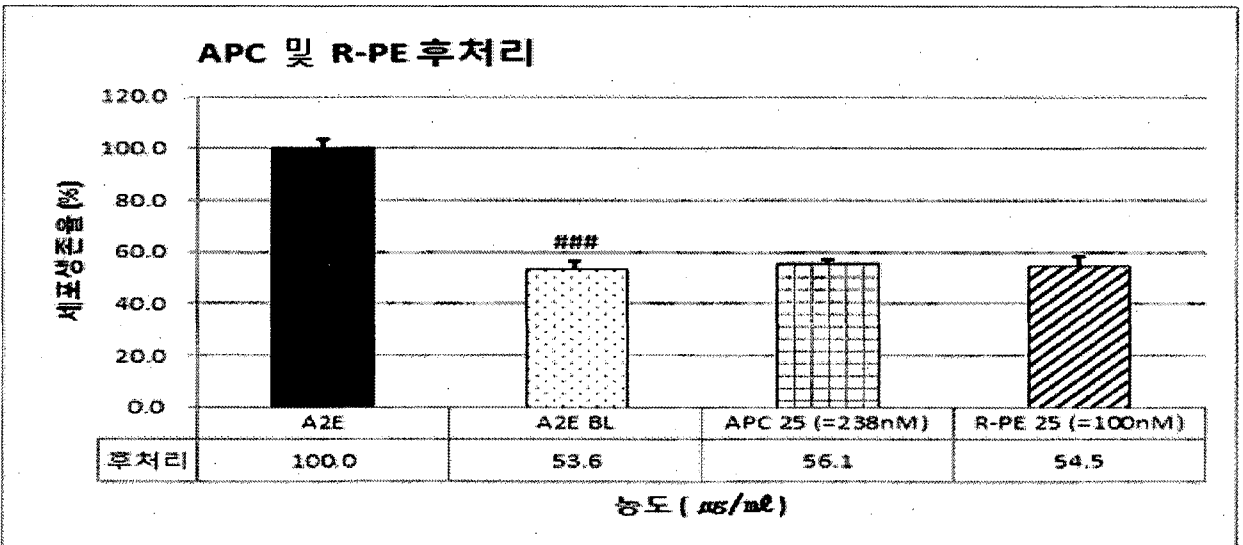
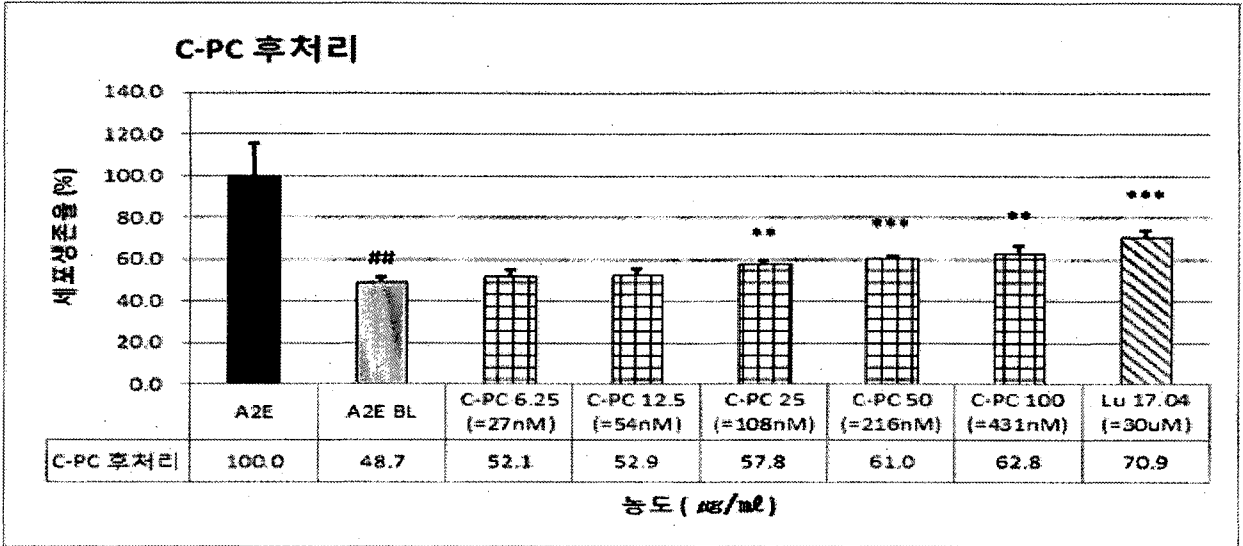
1/7

[도 1]



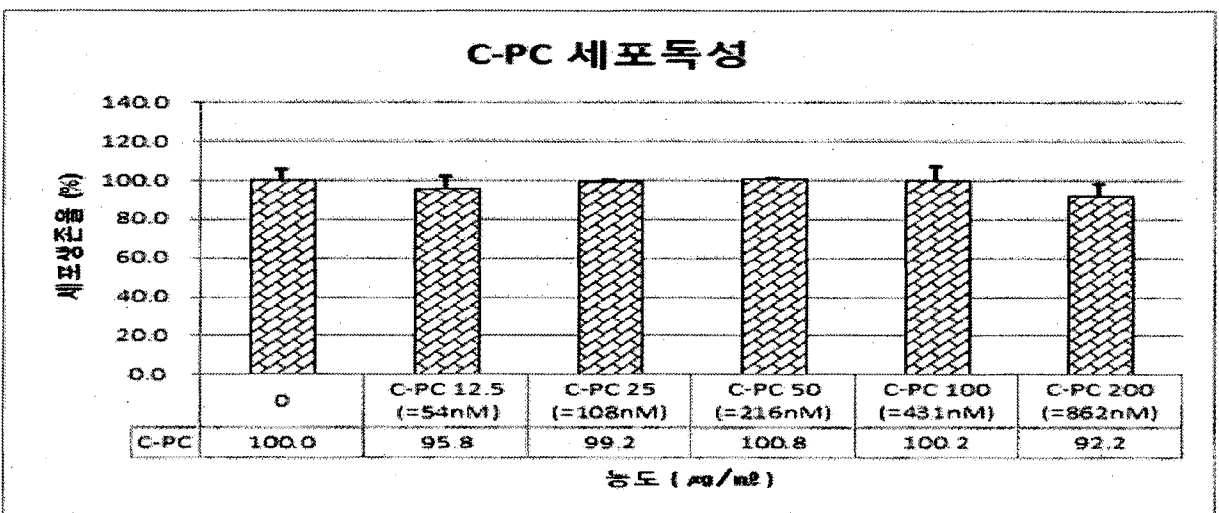
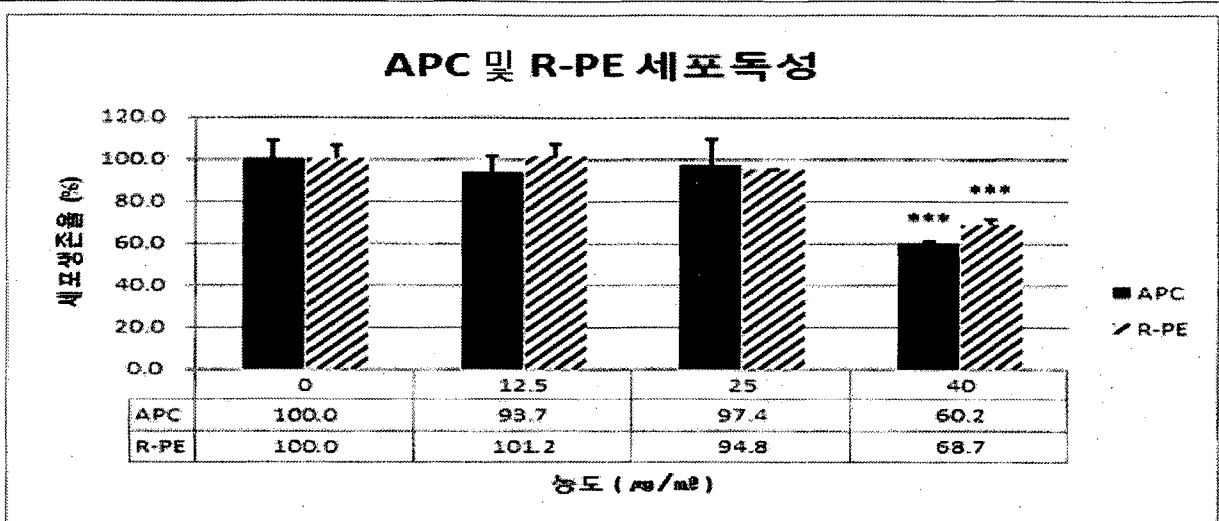
2/7

[도 2]



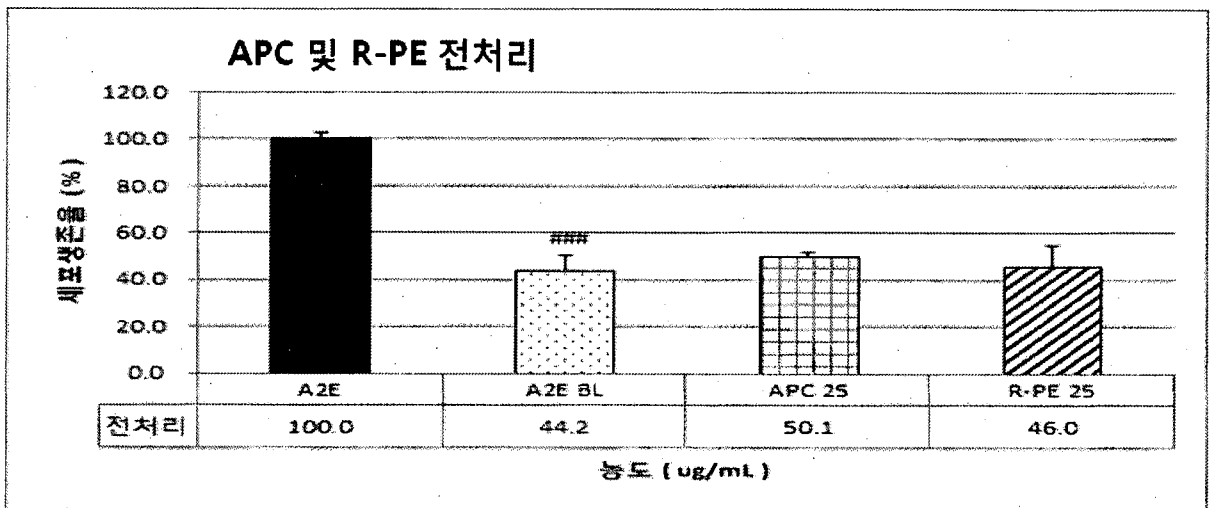
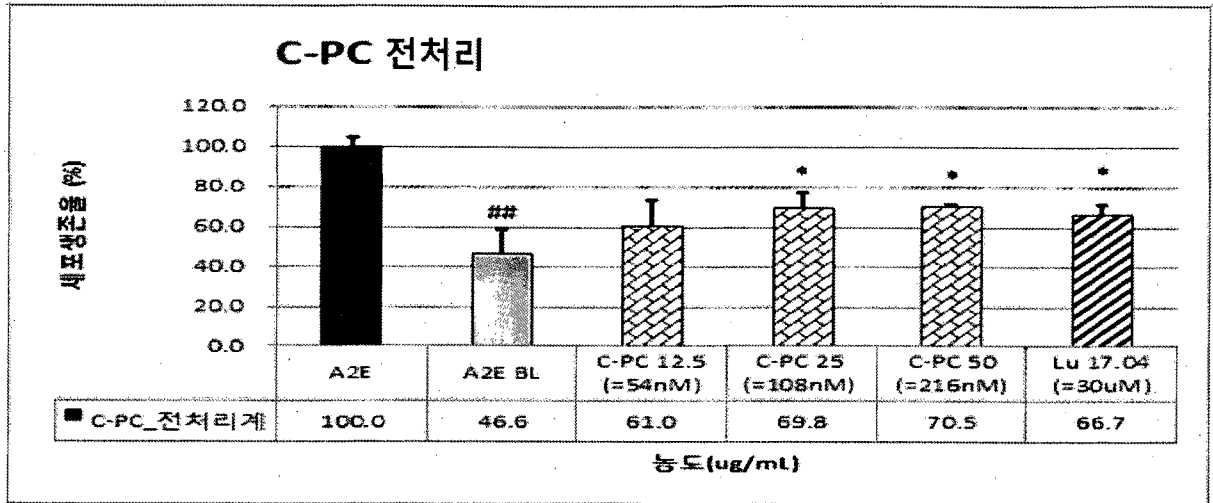
3/7

[도 3a]

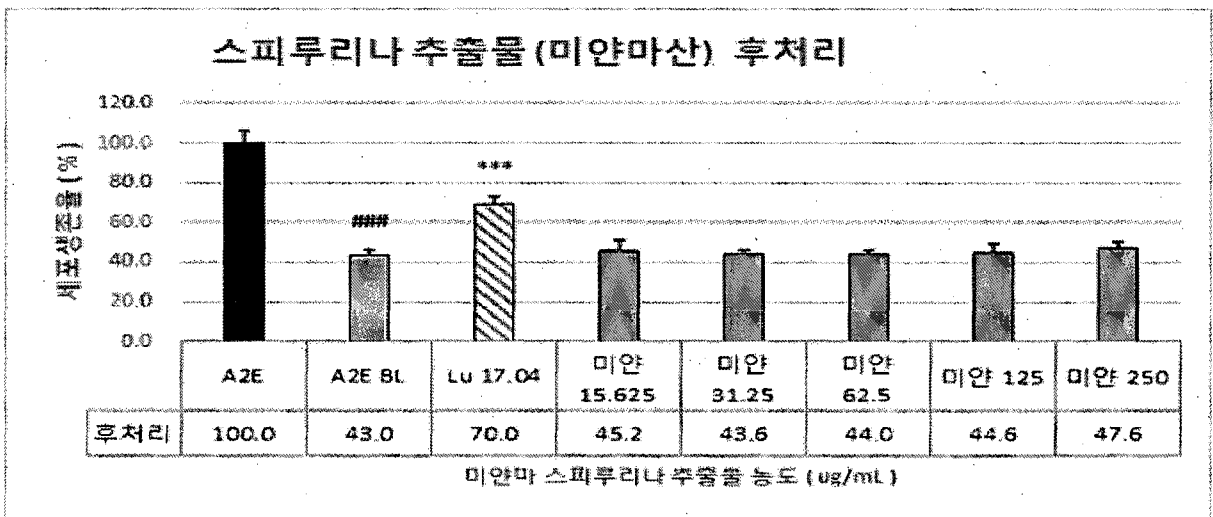
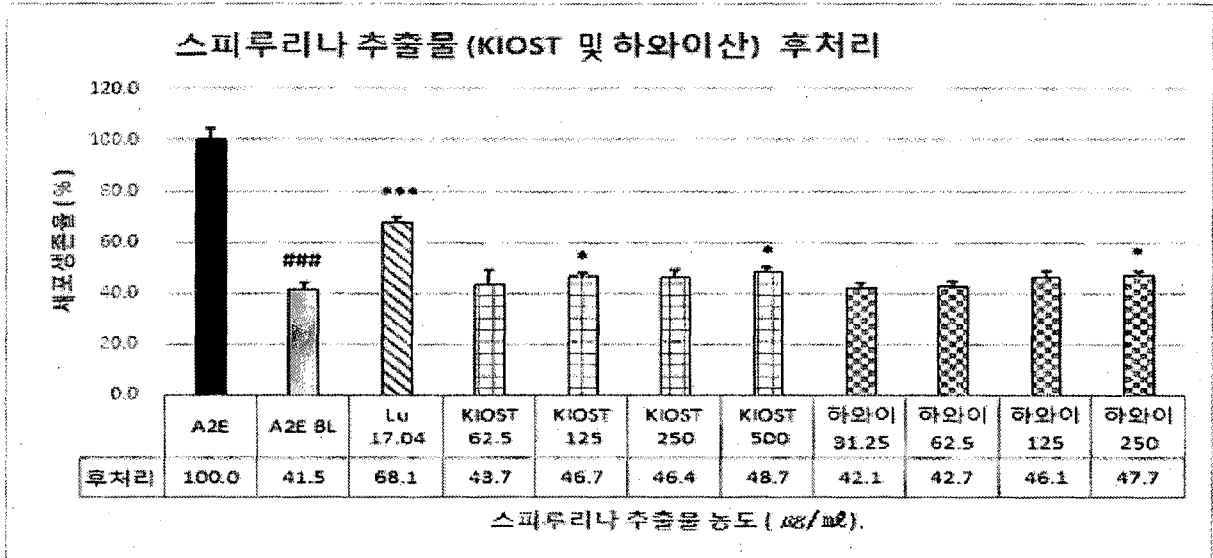


4/7

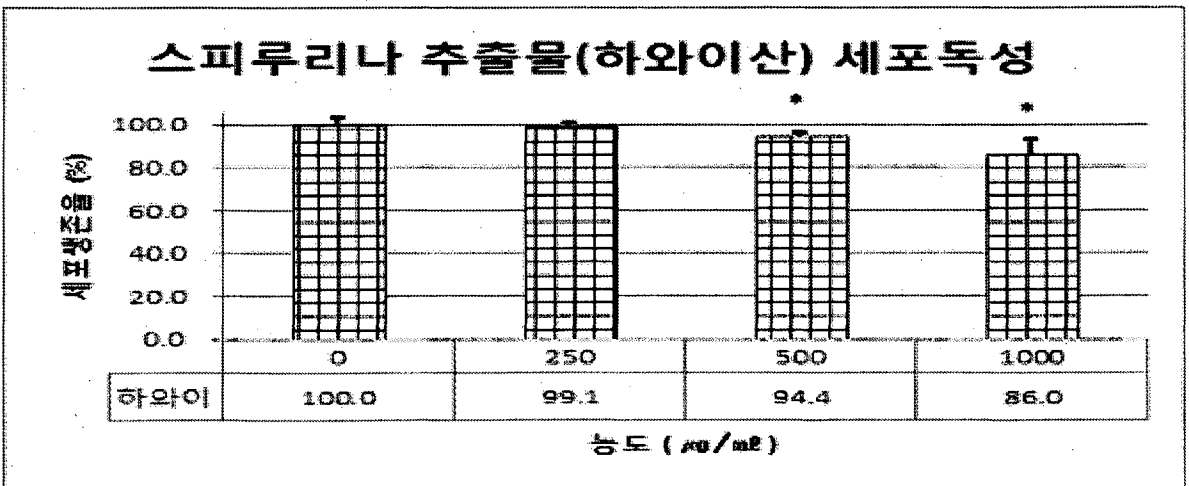
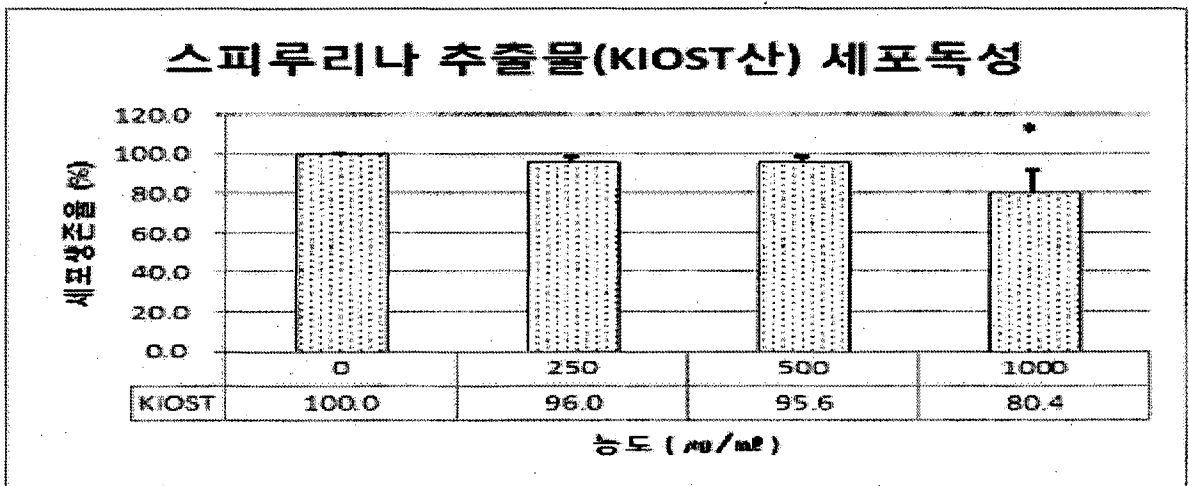
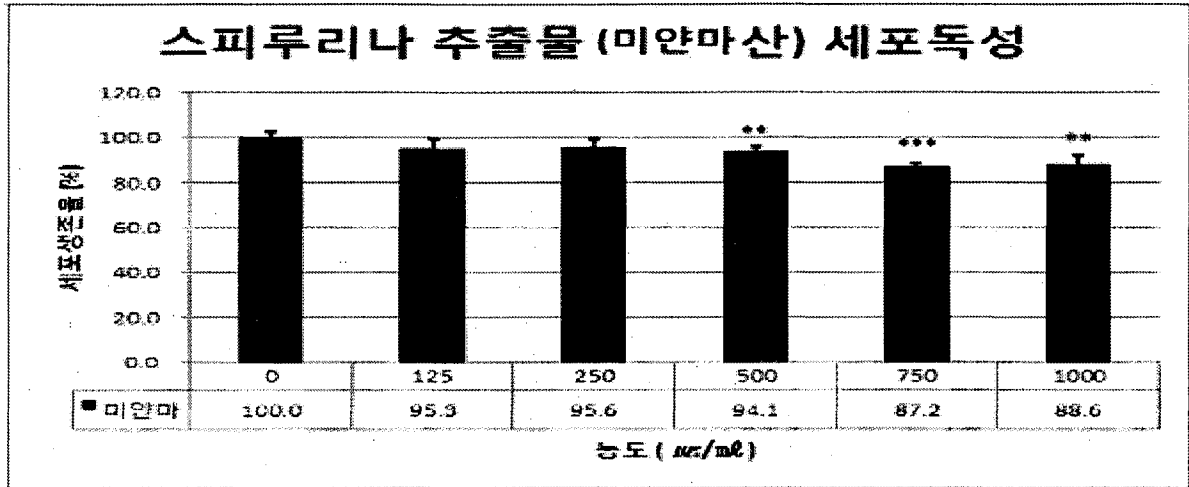
[도 3b]



[도 4]

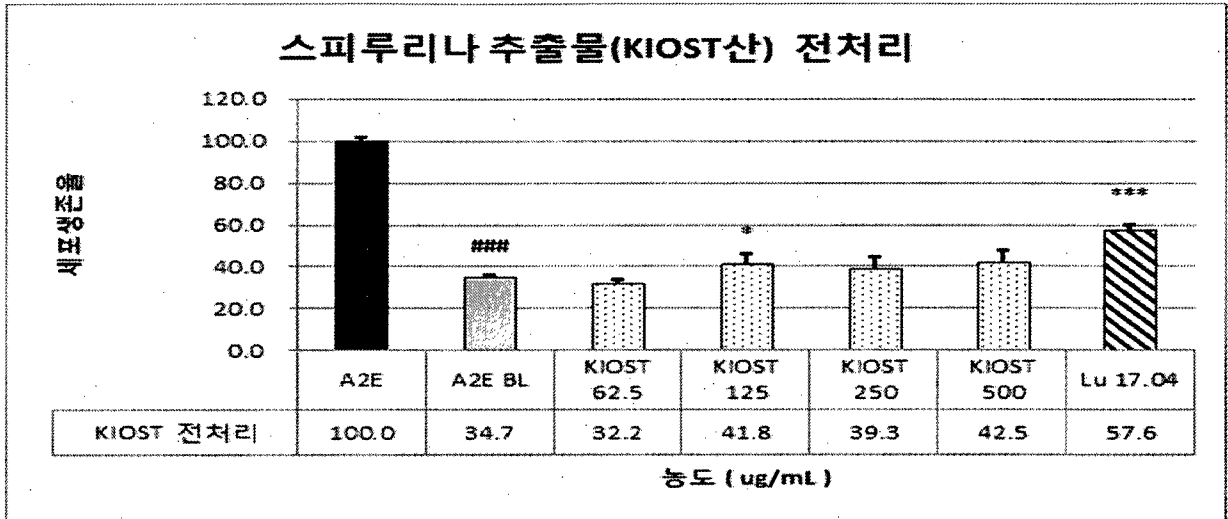


[도 5a]



7/7

[도 5b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/005952

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/02(2006.01)i, A61P 27/02(2006.01)i, A61P 27/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/02; A61P 27/02; A61P 27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Spirulina maxima(Spirulina maxima), retinal, allophycocyanin, phycoerythrin, phycocyanin, macular degeneration

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YU, B. et al., "Spirulina is an effective dietary source of zeaxanthin to humans", British Journal of Nutrition, 2012, vol. 108, pages 611-619 See abstract and pages 611-613.	1-8,11,12
X	ZHANG, H. et al., "Selenium-containing allophycocyanin purified from selenium-enriched Spirulina platensis attenuates AAPH-induced oxidative stress in human erythrocytes through inhibition of ROS generation", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, vol. 59, pages 8683-8690 See abstract, pages 8683, 8686-8689.	19,20
A		13-16
A	SONI, B. et al., "Purified c-phycoerythrin: safety studies in rats and protective role against permanganate-mediated fibroblast-DNA damage", Journal of Applied Toxicology, 2010, vol. 30, pages 542-550 See abstract and conclusion.	13-16,19,20
X	SAKAI, S. et al., "Inhibition of mast cell degranulation by phycoerythrin and its pigment moiety phycoerythrobilin, prepared from Porphyra yezoensis", Food Sci. Technol. Res., 2011, vol. 17, no. 2, pages 171-177 See abstract, page 172, figures 2 to 4.	19,20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 OCTOBER 2015 (30.10.2015)

Date of mailing of the international search report

30 OCTOBER 2015 (30.10.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/005952

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **9, 10, 17, 18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9, 10, 17 and 18 pertain to a method for treatment of the human body by a therapeutic agent, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of group 1: claims 1-8, 11 and 12 pertain to a *Spirulina maxima* extract.

The invention of group 2: claims 13-16, 19 and 20 (a part) pertain to allophycocyanin.

The invention of group 3: claims 13-16, 19 and 20 (a part) pertain to R-phycoerythrin.

The invention of group 4: claims 13-16, 19 and 20 (a part) pertain to C-phycoerythrin.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/005952


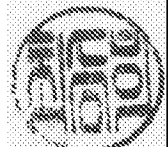
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A		13-16
X	MARIN-PRIDA, J. et al., "C-Phycocyanin protects SH-SY5Y cells from oxidative injury, rat retina from transient ischemia and rat brain mitochondria from Ca ²⁺ /phosphate-induced impairment", Brain Research Bulletin, 2012, vol. 89, pages 159-167 See abstract, conclusion and page 164.	13-16,19,20
X	KUMARI, R. P. et al., "Protective role of C-phycocyanin against secondary changes during sodium selenite mediated cataractogenesis", Nat. Prod. Bioprospect., 02 April 2014 (Published online), vol. 4, pages 81-89 See abstract and page 86.	19,20
A		13-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/005952

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/02(2006.01)i, A61P 27/02(2006.01)i, A61P 27/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/02; A61P 27/02; A61P 27/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 스피루리나(Spirulina maxima), 망막, allophycocyanin, phycoerythrin, phycocyanin, macular degeneration		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	YU, B. 등, "Spirulina is an effective dietary source of zeaxanthin to humans", British Journal of Nutrition, 2012, 108권, 페이지 611-619 요약 및 페이지 611-613 참조.	1-8,11,12
X	ZHANG, H. 등, "Selenium-containing allophycocyanin purified from selenium-enriched Spirulina platensis attenuates AAPH-induced oxidative stress in human erythrocytes through inhibition of ROS generation", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59권, 페이지 8683-8690 요약, 페이지 8683, 8686-8689 참조.	19,20
A		13-16
A	SONI, B. 등, "Purified c-phycoerythrin: safety studies in rats and protective role against permanganate-mediated fibroblast-DNA damage", Journal of Applied Toxicology, 2010, 30권, 페이지 542-550 요약 및 결과 참조.	13-16,19,20
X	SAKAI, S. 등, "Inhibition of mast cell degranulation by phycoerythrin and its pigment moiety phycoerythrobilin, prepared from Porphyra yezoensis", Food Sci. Technol. Res., 2011, 17권, 2호, 페이지 171-177 요약, 페이지 172, 도 2 내지 4 참조.	19,20
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2015년 10월 30일 (30.10.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 10월 30일 (30.10.2015)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 최승희 전화번호 +82-42-481-8738	

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A		13-16
X	MARIN-PRIDA, J. 등, "C-Phycocyanin protects SH-SY5Y cells from oxidative injury, rat retina from transient ischemia and rat brain mitochondria from Ca ²⁺ /phosphate-induced impairment", Brain Research Bulletin, 2012, 89권, 페이지 159-167 요약, 결과 및 페이지 164 참조.	13-16, 19, 20
X	KUMARI, R. P. 등, "Protective role of C-phycocyanin against secondary changes during sodium selenite mediated cataractogenesis", Nat. Prod. Bioprospect., 2014.4.2.(온라인 공개), 4권, 페이지 81-89 요약 및 페이지 86 참조.	19, 20
A		13-16

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1. 청구항: 9, 10, 17, 18
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 제9항, 제10항, 제17항 및 제18항은 치료제에 의한 사람의 치료방법에 해당하는 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

제1군 발명: 청구항 제1항 내지 제8항, 제11항 및 제12항은 스피루리나 추출물에 관한 것이고,
 제2군 발명: 청구항 제13항 내지 제16항, 제19항 및 제20항(일부)은 알로피코시아닌에 관한 것이며,
 제3군 발명: 청구항 제13항 내지 제16항, 제19항 및 제20항(일부)은 알-피코에리스틴에 관한 것이고,
 제4군 발명: 청구항 제13항 내지 제16항, 제19항 및 제20항(일부)은 씨-피코시아닌에 관한 것입니다.

- 1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음