



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0129722
(43) 공개일자 2023년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 36/605 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2023.05)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2022-0026666

(22) 출원일자 2022년03월02일

심사청구일자 2022년03월02일

(71) 출원인

충북대학교 산학협력단

충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

윤재석

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 152,
804동 101호

이미경

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 152,
808동 1601호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인더웨이브

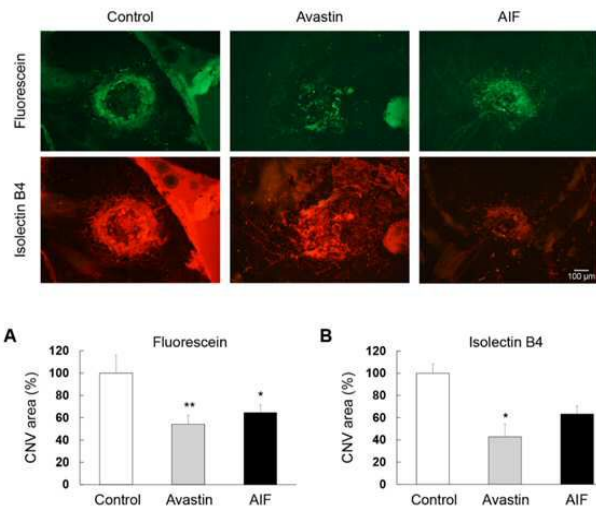
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone)을 유효성분으로 하는 황반변성 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone)을 유효성분으로 하는 황반변성 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 일양상에 따른 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 맥락막혈관신생에 의하여 형성되는 습성 황반변성을 우수하게 억제할 수 있으므로, 안전하고 효과적인 황반변성 치료에 널리 활용될 수 있는 유용한 효과가 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 36/605 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자

민정기

울산광역시 남구 문수로314번길 11, 103동 906호

유은혜

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 31,
101동 1516호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345329680
과제번호	2020대학혁신-147
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대학혁신지원(R&D)
연구과제명	(충북지역혁신플랫폼)충북대학교
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충북대학교 산학협력단
연구기간	2020.08.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

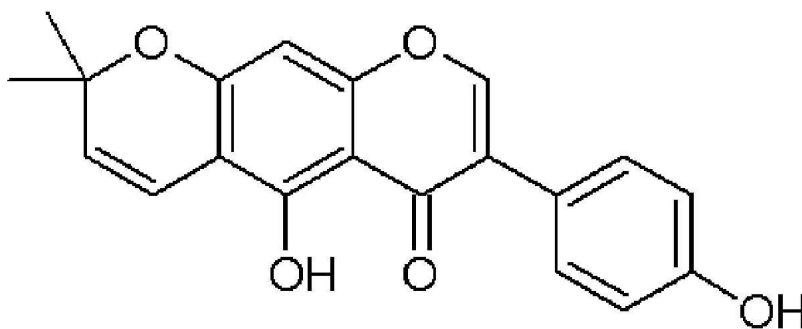
청구항 1

알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

상기 알피눔이소플라본은 하기 화학식 1로 표시되는 것인 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물;

[화학식 1]



청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 꾸지뽕(*M. tricuspidata*) 열매 추출물로부터 용출하여 제조된 것인 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 또는 alpha-SMA(alpha-Smooth Muscle Actin)의 발현 또는 활성을 억제하는 것인 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 약학적 조성물은 안구내, 안구주위, 안구뒤, 망막하(subretinal), 망막중심(central retinal), 중심와(fovea) 외부, 결막하(subconjunctival), 유리체내(intravitreal), 전방내(intracameral) 또는 맥락막위(suprachoroidal)에 투여되는 것인 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 황반변성은 연령관련 황반변성(AMD; age-related macular degeneration) 또는 신생혈관성 연령관련 황반변성(Neovascular age-related macular degeneration; Neovascular AMD)인 것인 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신생혈관성 안질환(neovascular ocular disease) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 신생혈관성 안질환은 각막혈관신생(corneal neovascularization), 망막 혈관신생

(retinal neovascularization), 맥락막 혈관신생(choroidal neovascularization), 안구내 혈관신생(intraocular neovascularization), 신생혈관성 녹내장(neovascular glaucoma), 증식성 당뇨병성 망막증(proliferative diabetic retinopathy) 또는 미숙아 망막병증(retinopathy of prematurity)인 것인 신생혈관성 안질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증(subretinal fibrosis) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 망막하 섬유증은 황반변성에 의한 것인 망막하 섬유증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 황반변성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 꾸지뽕 열매 추출물로부터 용출하여 제조된 것인 황반변성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 상기 황반변성은 연령관련 황반변성(AMD; age-related macular degeneration) 또는 신생혈관성 연령관련 황반변성(Neovascular age-related macular degeneration; Neovascular AMD)인 것인 황반변성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 14

알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신생혈관성 안질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 꾸지뽕 열매 추출물로부터 용출하여 제조된 것인 신생혈관성 안질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 신생혈관성 안질환은 각막혈관신생(corneal neovascularization), 망막 혈관신생(retinal neovascularization), 맥락막 혈관신생(choroidal neovascularization), 안구내 혈관신생(intraocular neovascularization), 신생혈관성 녹내장(neovascular glaucoma), 증식성 당뇨병성 망막증(proliferative diabetic retinopathy) 또는 미숙아 망막병증(retinopathy of prematurity)인 것인 신생혈관성 안질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 17

알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 꾸지뽕 열매 추출물로부터 용출하여 제조된 것인 망막하 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 상기 망막하 섬유증은 황반변성에 의한 것인 망막하 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone)을 유효성분으로 하는 황반변성 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 황반변성 (macular degeneration)은 선진국에서 발생하는 성인 실명 원인 1위인 질병이다. 전 세계적으로 3천만 명 정도가 이 병으로 고통받고 있고, 매년 50만명의 환자가 이 질병으로 인해 시력을 잃고 있다. 서구에서는 65세 이상의 등록 시각장애인의 40% 정도가 이 질병으로 고통받고 있다. 우리나라에서도 녹내장, 당뇨병망막 병증과 함께 3대 실명을 야기하는 병으로, 고령인구의 증가로 유병률이 점차 증가하고 있다. 발병 시기 또한 60대에서 4,50대의 중장년층으로 낮아지고 있는 추세이고, 발병률 또한 최근 수년 동안 급증하고 있다.

[0003] 시각에 있어서 매우 중요한 황반부에 나이가 들면서 여러 가지로 변화가 발생하여 생기는 안구의 질환으로 특히 이 질환은 50세 이상의 노년층에서 주로 발생하며 나이와 더불어 점점 진행하여 결국에는 실명도 할 수 있는 안 질환이다. 노인 인구가 증가 추세에 있음으로 그 발생빈도도 더욱 증가할 것으로 예상된다.

[0004] 연령관련 황반변성(AMD; age-related macular degeneration)의 개시는 맥락막 신혈관형성(CNV; Choroidal neovascularization)이라고 칭하는 프로세스와 관련이 있다. CNV 유래의 누출은 황반 부종 및 시력 손실을 초래하는 황반 하의 유체 수집을 야기한다. 황반 내의 유체는 중증의 시력 손실 또는 시력 상실을 야기할 수 있다. 또한, 망막은 시력 손실 및 보다 심각한 합병증을 추가로 야기할 수 있는 새로운 부적절한 혈관의 성장을 초래하는 허혈성이 될 수 있다. 혈관 내피 성장 인자(VEGF; Vascular endothelial growth factor)의 방출은 눈의 증가된 혈관 투과성 및 부적절한 새로운 혈관 성장에 기여한다. 따라서, VEGF의 혈관신생-촉진 특성을 억제하는 것은 혈관신생 눈 장애를 치료하기 위한 효과적인 전략인 것으로 밝혀진다.

[0005] 망막하 섬유증(subretinal fibrosis)은 망막주변에 섬유조직이 증식하는 현상으로 황반부종과 박리(macular edema and detachment)를 유도하여 시력을 영구적으로 훼손한다. 습성황반변성 (exudative/neovascular AMD), 당뇨병성망막병증 (diabetic retinopathy), 중심망막혈관폐색증 (central retinal vein occlusion), 시신경신경병증 (optic neuropathy) 등 주요 만성 망막 질환들의 대부분에서 공통적으로 망막 섬유화가 발생하고 있다.

[0006] 기존의 치료법은 안구에 직접적으로 약물을 주사투여, 잦은 투여 주기에 따른 환자의 거부감, 시술 부작용 등의 미충족 수요(unmet-medical needs)가 있다. 상기 미충족 수요를 해결하기 위하여 결막에서 흡수가 가능한 small molecule 치료제 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신생혈관성 안질환(neovascular ocular disease) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증(subretinal fibrosis) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또 다른 양상은 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 황반변성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 양상은 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신생혈관성 안질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증

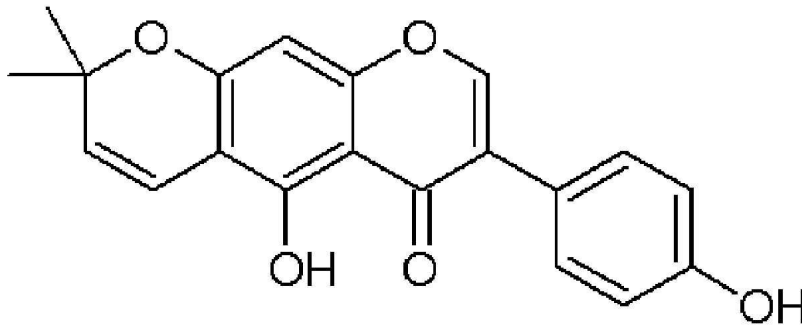
예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 일 양상은 알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 일 구체예에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 하기 화학식 1로 표시되는 것일 수 있다.

[0015] [화학식 1]



[0016]

[0017] 본 명세서에서 "약학적으로 허용 가능한 염"은 약학적으로 허용 가능하고 모 화합물(parent compound)의 바람직한 약리 활성을 갖는 본 명세서의 일 관점에 따른 염을 의미한다. 상기 염은 (1) 염산, 브롬화수소산, 황산, 일수소황산, 질산, 인산, 일수소인산, 요오드화수소 또는 아인산 및 그 유도체 등과 같은 무기산으로 형성되거나; 또는 아세트산, 프로피온산, 헥사노산, 시클로헥테인프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 락트산, 말론산, 숙신산, 말산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 3-(4-히드록시벤조일) 벤조산, 신남산, 만델산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 1,2-에탄-디술폰산, 2-히드록시에탄술폰산, 벤젠술폰산, 4-클로로벤젠술폰산, 2-나프탈렌술폰산, 4-톨루엔술폰산, 캄페르술폰산, 4-메틸비시클로 [2,2,2]-oct-2-엔-1-카르복실산, 글루코헵톤산, 3-페닐프로피온산, 트리메틸아세트산, tert-부틸아세트산, 라우릴 황산, 글루콘산, 글루탐산, 히드록시나프토산, 살리실산, 스테아르산, 묶은산과 같은 유기산으로 형성되는 산 부가염(acid addition salt); 또는 (2) 모 화합물에 존재하는 산성 프로톤이 치환될 때 형성되는 염을 포함할 수 있다. 또한 염산염, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 마그네슘염, 암모늄염 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0018] 본 명세서에서 "예방"은 상기 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 투여함으로써 황반변성, 신생혈관성 안질환 또는 망막하 섬유증을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 말하며, "치료"는 상기 약학 조성물의 투여로 황반변성, 신생혈관성 안질환 또는 망막하 섬유증이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0019] 일 구체예에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 꾸지뽕나무(*M. tricuspidata*)의 줄기, 잎, 뿌리, 나무껍질 또는 열매 추출물로부터 용출하여 제조된 것일 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 "추출물"은 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온 또는 가온상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분 또는 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미할 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 회석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물 및 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다.

[0021] 상기 용매로는 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜, 액상 회석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미세결정 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 아가 또는 트라가칸트, 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세라이드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 오일, 리놀린 유도체, 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 추출용매는 극성용매, 비극성용매 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 극성용

매로는 물, 탄소수 1 내지 6의 무수 또는 함수 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올 또는 2-부톡시에탄올 등) 또는 알코올성 화합물(에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 부틸렌글리콜 등), 아세트산, DMF(dimethyl-formamide), DMSO(dimethyl sulfoxide) 또는 이들의 조합일 수 있고, 비극성 용매로는 헥산, 오로알칸, 펜탄, 헥산, 에틸아세테이트, 메틸아세테이트, 부틸아세테이트, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 아세톤, 1-클로로펜탄, o-자일렌, 디이소프로필 에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 디에틸에테르, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸설파이드, 클로로포름, 디클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르, 사염화탄소, THF 또는 이들의 조합일 수 있다. 본 명세서에서 상기 추출물은 특별히 이에 제한되지 않으며, 상기 용매뿐만 아니라 다른 용매를 이용하여 제조한 실질적으로 동일한 효과를 나타내는 추출물을 포함하는 것일 수 있다.

[0022] 상기 용매를 이용하여 추출하는 방법은 당업계에서 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다. 예컨대, 추출 대상을 상기 용매에 침지하고, 10 내지 25℃의 상온에서 추출하는 냉침추출법, 40 내지 100℃로 가열하여 추출하는 가열추출법, 환류냉각기를 이용한 환류추출법, 초음파기기를 이용한 초음파 추출법 및 고주파 기기를 이용한 고주파 추출법 등의 방법을 통하여 수행할 수 있다.

[0023] 일 구체예에 있어서, 상기 알파눔이소플라본은 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 또는 alpha-SMA(alpha-Smooth Muscle Actin)의 발현 또는 활성을 억제할 수 있다.

[0024] 일 구체예에 있어서, 상기 알파눔이소플라본은 절단된 형태의 CRYAB와 p-CRYAB 발현을 감소시킬 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 "연령관련 황반변성"은 노화 또는 염증으로 인해 중심시력을 담당하는 황반부의 망막 색소 상피세포에 변성이 생기는 질환을 의미할 수 있다. 상기 질환은 "비삼출성(건성)"과 "삼출성(습성)"의 두가지 형태가 있다. 비삼출성 형태는 연령의 증가에 따른 망막의 노화로 인해 시세포 노폐물이 망막과 맥락막 사이에 쌓인 '드루젠'이 생기는 상태이며, 드루젠의 정도 (크기 및 수)에 부분적으로 기초하여 초기 (early), 중기 (intermediate), 및 후기 (late)의 3 단계로 진행될 수 있다. 삼출성 형태는 망막 아래쪽의 맥락막 혈관층에서 신생혈관이 생겨 출혈이나 삼출물을 일으키는 형태이다. "삼출성 연령관련 황반변성"은 "신생혈관성 연령관련 황반변성"이라고도 하며, 두 용어는 동일한 의미로 상호교환되어 사용될 수 있다. 비삼출성은 대개 증상이 없지만, 시간이 지나면서 삼출성으로 진행할 수 있다. 삼출성 황반변성은 맥락막 신생혈관에 의해 망막하액, 망막하출혈, 섬유혈관조직의 증식 등이 발생하게 되며, 이로 인한 시신경층과 망막색소상피세포의 손상으로 인해 심각한 시력 저하를 유발할 수 있다. 황반 바로 아래에 출혈이 생기면 중심시력이 소실되며, 황반 주위에 출혈이 생기면 주변부 시야에 암점이 발생할 수 있다. 또한 망막하 출혈 및 삼출물로 인해 망막이 붓게 되고 이로 인해 물체가 찌그러져 보이는 증상 (변형시)이 발생할 수 있다.

[0026] 일 구체예에 있어서, 상기 황반변성은 연령관련 황반변성(AMD; age-related macular degeneration)일 수 있으며, 초기 연령관련 황반변성 (early age-related macular degeneration; early AMD), 중기 연령관련 황반변성 (intermediate age-related macular degeneration; Intermediate AMD) 또는 후기 연령관련 황반변성 (late age-related macular degeneration; late AMD)일 수 있다.

[0027] 일 구체예에 있어서, 상기 황반변성은 신생혈관성 연령관련 황반변성(Neovascular age-related macular degeneration; Neovascular AMD) 또는 비-신생혈관성 연령관련 황반변성 (Non-neovascular age-related macular degeneration; Non-neovascular AMD)일 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 사용된 용어 "투여"는 당업계에 알려진 방법에 의하여 투여될 수 있다. 투여는 구강 투여(또는 경구 투여), 비경구 투여 또는 국소투여하는 것일 수 있다.

[0029] 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 컴파운드 K 및 루테인을 포함하는 조성물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔,

마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등을 사용할 수 있다.

[0030] 본 명세서에서 "안구내 투여"는 직접적으로 안구내 투여되거나, 안구주위, 안구뒤, 망막하(subretinal), 망막중심(central retinal), 중심와(fovea) 외부, 결막하(subconjunctival), 유리체내(intravitreal), 전방내(intracameral), 또는 맥락막위(suprachoroidal) 등에 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0031] 일 구체예에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 0.1 내지 10 mg, 0.2 내지 10 mg, 0.3 내지 10 mg, 0.4 내지 10 mg, 0.5 내지 10 mg, 0.6 내지 10 mg, 0.7 내지 10 mg, 0.8 내지 10 mg, 0.9 내지 10 mg, 1 내지 10 mg, 1.1 내지 10 mg, 1.2 내지 10 mg, 1.3 내지 10 mg, 1.4 내지 10 mg, 1.5 내지 10 mg, 1.6 내지 10 mg, 1.7 내지 10 mg, 1.8 내지 10 mg, 1.9 내지 10 mg, 2 내지 10 mg, 2.1 내지 10 mg, 2.2 내지 10 mg, 2.3 내지 10 mg, 2.4 내지 10 mg, 2.5 내지 10 mg, 2.6 내지 10 mg, 2.7 내지 10 mg, 2.8 내지 10 mg, 2.9 내지 10 mg, 3 내지 10 mg, 3.1 내지 10 mg, 3.2 내지 10 mg, 3.3 내지 10 mg, 3.4 내지 10 mg, 3.5 내지 10 mg, 3.6 내지 10 mg, 3.7 내지 10 mg, 3.8 내지 10 mg, 3.9 내지 10 mg, 4 내지 10 mg, 0.1 내지 8 mg, 0.2 내지 8 mg, 0.3 내지 8 mg, 0.4 내지 8 mg, 0.5 내지 8 mg, 0.6 내지 8 mg, 0.7 내지 8 mg, 0.8 내지 8 mg, 0.9 내지 8 mg, 1 내지 8 mg, 1.1 내지 8 mg, 1.2 내지 8 mg, 1.3 내지 8 mg, 1.4 내지 8 mg, 1.5 내지 8 mg, 1.6 내지 8 mg, 1.7 내지 8 mg, 1.8 내지 8 mg, 1.9 내지 8 mg, 2 내지 8 mg, 2.1 내지 8 mg, 2.2 내지 8 mg, 2.3 내지 8 mg, 2.4 내지 8 mg, 2.5 내지 8 mg, 2.6 내지 8 mg, 2.7 내지 8 mg, 2.8 내지 8 mg, 2.9 내지 8 mg, 3 내지 8 mg, 3.1 내지 8 mg, 3.2 내지 8 mg, 3.3 내지 8 mg, 3.4 내지 8 mg, 3.5 내지 8 mg, 3.6 내지 8 mg, 3.7 내지 8 mg, 3.8 내지 8 mg, 3.9 내지 8 mg, 4 내지 8 mg, 0.1 내지 6 mg, 0.2 내지 6 mg, 0.3 내지 6 mg, 0.4 내지 6 mg, 0.5 내지 6 mg, 0.6 내지 6 mg, 0.7 내지 6 mg, 0.8 내지 6 mg, 0.9 내지 6 mg, 1 내지 6 mg, 1.1 내지 6 mg, 1.2 내지 6 mg, 1.3 내지 6 mg, 1.4 내지 6 mg, 1.5 내지 6 mg, 1.6 내지 6 mg, 1.7 내지 6 mg, 1.8 내지 6 mg, 1.9 내지 6 mg, 2 내지 6 mg, 2.1 내지 6 mg, 2.2 내지 6 mg, 2.3 내지 6 mg, 2.4 내지 6 mg, 2.5 내지 6 mg, 2.6 내지 6 mg, 2.7 내지 6 mg, 2.8 내지 6 mg, 2.9 내지 6 mg, 3 내지 6 mg, 3.1 내지 6 mg, 3.2 내지 6 mg, 3.3 내지 6 mg, 3.4 내지 6 mg, 3.5 내지 6 mg, 3.6 내지 6 mg, 3.7 내지 6 mg, 3.8 내지 6 mg, 3.9 내지 6 mg, 4 내지 6 mg, 0.1 내지 4 mg, 0.2 내지 4 mg, 0.3 내지 4 mg, 0.4 내지 4 mg, 0.5 내지 4 mg, 0.6 내지 4 mg, 0.7 내지 4 mg, 0.8 내지 4 mg, 0.9 내지 4 mg, 1 내지 4 mg, 1.1 내지 4 mg, 1.2 내지 4 mg, 1.3 내지 4 mg, 1.4 내지 4 mg, 1.5 내지 4 mg, 1.6 내지 4 mg, 1.7 내지 4 mg, 1.8 내지 4 mg, 1.9 내지 4 mg, 2 내지 4 mg, 2.1 내지 4 mg, 2.2 내지 4 mg, 2.3 내지 4 mg, 2.4 내지 4 mg, 2.5 내지 4 mg, 2.6 내지 4 mg, 2.7 내지 4 mg, 2.8 내지 4 mg, 2.9 내지 4 mg, 3 내지 4 mg, 3.1 내지 4 mg, 3.2 내지 4 mg, 3.3 내지 4 mg, 3.4 내지 4 mg, 3.5 내지 4 mg, 3.6 내지 4 mg, 3.7 내지 4 mg, 3.8 내지 4 mg, 3.9 내지 4 mg, 0.1 내지 2 mg, 0.2 내지 2 mg, 0.3 내지 2 mg, 0.4 내지 2 mg, 0.5 내지 2 mg, 0.6 내지 2 mg, 0.7 내지 2 mg, 0.8 내지 2 mg, 0.9 내지 2 mg, 1 내지 2 mg, 1.1 내지 2 mg, 1.2 내지 2 mg, 1.3 내지 2 mg, 1.4 내지 2 mg, 1.5 내지 2 mg, 1.6 내지 2 mg, 1.7 내지 2 mg, 1.8 내지 2 mg, 1mg, 1.25mg 또는 6.25mg 용량으로 안구내 투여될 수 있다. 다만, 증정도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 투여 용량은 조절될 수 있다.

[0032] 일 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 안구내, 안구주위, 안구뒤, 망막하(subretinal), 망막중심(central retinal), 중심와(fovea) 외부, 결막하(subconjunctival), 유리체내(intravitreal), 전방내(intracameral) 또는 맥락막위(suprachoroidal)에 투여될 수 있다.

[0033] 본 명세서의 약학적 조성물은 황반변성, 신생혈관성 안질환 또는 망막하 섬유증의 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 인간이 아닌 동물, 인간, 조류 및 어류 등 어느 것에 사용가능하다.

[0034] 다른 양상은 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신생혈관성 안질환(neovascular ocular disease) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0035] 상기 신생혈관성 안질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상술한 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 동일한 유효성분인 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0036] 본 명세서에서 "신생혈관성 안질환(neovascular ocular disease)"은 안구에서 발생하는 병리학적 혈관신생관련 질환을 의미할 수 있다.

- [0037] 일 구체예에 있어서, 상기 신생혈관성 안질환은 각막혈관신생(corneal neovascularization), 망막 혈관신생(retinal neovascularization), 맥락막 혈관신생(choroidal neovascularization), 안구내 혈관신생(intraocular neovascularization), 신생혈관성 녹내장(neovascular glaucoma), 증식성 당뇨병성 망막증(proliferative diabetic retinopathy), 신생혈관성 연령관련 황반변성(Neovascular age-related macular degeneration; Neovascular AMD) 또는 미숙아 망막병증(retinopathy of prematurity)일 수 있다.
- [0038] 다른 양상은 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증(subretinal fibrosis) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0039] 상기 망막하 섬유증 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상술한 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 동일한 유효성분인 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0040] 본 명세서에서 "망막하 섬유증"은 망막주변에 섬유조직이 증식하는 질환을 의미할 수 있으며, 황반부종과 박리를 유도하여 시력을 영구적으로 훼손할 수 있다. 상기 섬유조직은 수복 또는 반응과정에서 조직에 과량의 세포 외 기질이 형성되어 증식할 수 있다. 상기 망막하 섬유증은 습성 황반변성 진행과정 중 신생 혈관 생성 및 국소적 파괴로 발생할 수 있다.
- [0041] 일 구체예에 있어서, 상기 망막하 섬유증은 그레이브스 눈병증, 당뇨병, 녹내장, 백내장, 지도모양위축, 안과수술 또는 황반변성에 의한 것일 수 있다.
- [0042] 다른 양상은 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 황반변성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0043] 상기 황반변성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 상술한 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 동일한 유효성분인 알피눔이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0044] 본 명세서에서 "개선"은 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들어, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0045] 본 명세서에서 "건강기능식품"은 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 '기능(성)'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [0046] 상기 건강기능식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 상기 건강기능식품은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나므로, 노인성 황반변성 또는 망막하 섬유증 예방 또는 개선 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0047] 상기 건강기능식품은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 건강기능식품은 산제, 과립제, 정제, 환제, 캡셀제, 현탁액, 유제, 시럽제, 침제, 액제, 엑스제 등의 일반적인 제형으로 제조될 수도 있고, 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 젤리, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등의 임의의 건강식품 형태로 제조될 수도 있다.
- [0048] 상기 건강기능식품의 제제화를 위해 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 사용할 수 있으며, 제조하고자 하는 제형의 제조에 당해 기술분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다.
- [0049] 상기 건강기능식품은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0050] 상기 건강기능식품은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니솔(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아조산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(효료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

[0051] 다른 양상은 알피늄이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신생혈관성 안질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0052] 상기 신생혈관성 안질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 상술한 신생혈관성 안질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 황반변성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물과 동일한 유효성분인 알피늄이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하므로, 이들 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0053] 다른 양상은 알피늄이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0054] 상기 망막하 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 상술한 망막하 섬유증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 황반변성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물과 동일한 유효성분인 알피늄이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하므로, 이들 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0055] 일 양상에 따른 알피늄이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 맥락막혈관신생에 의하여 형성되는 습성 황반변성을 우수하게 억제할 수 있으므로, 안전하고 효과적인 황반변성 치료에 널리 활용될 수 있는 유용한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 Laser-induced CNV 동물 모델에 대한 모식도이다.
 도 2는 ARPE-19 세포에서 알피늄이소플라본의 H_2O_2 에 의해 증가된 VEGFA의 발현억제효과를 보여주는 그래프이다.
 도 3은 ARPE-19 세포에서 알피늄이소플라본의 THP-1 조정 배지에 의해 증가된 VEGFA의 발현억제효과를 보여주는 그래프이다.
 도 4는 ARPE-19 세포에서 알피늄이소플라본의 α -SMA 발현 억제 효과를 보여주는 그래프이다.
 도 5는 ARPE-19 세포에서 알피늄이소플라본의 Collagen I 발현 억제 효과를 보여주는 그래프이다.
 도 6은 황반변성 마우스 모델에서 알피늄이소플라본의 CNV area 감소 효과를 보여주는 면역형광염색 이미지 및 그래프이다.
 도 7은 황반변성 마우스 모델에서 알피늄이소플라본의 α -SMA 및 VEGFA 발현 억제 효과를 보여주는 웨스턴 블롯 결과 이미지 및 그래프이다.
 도 8는 황반변성 마우스 모델에서 알피늄이소플라본 처리에 따른 절단된 형태의 CRYAB와 p-CRYAB 발현 감소 효과를 보여주는 웨스턴 블롯 결과 이미지 및 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0058] 실시예 1. 꾸지뽕 열매(*M. tricuspidata*)로부터 Alpinumisoflavone(이하 AIF) 추출

[0059] 설익은 꾸지뽕 열매(556.0g)를 100% 메탄올(MeOH)로 추출하여 메탄올 추출물을 얻었다. 이 메탄올 추출물을 증

류수에 현탁하고 n-hexane, methylene chloride (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (n-BuOH)로 차례로 분액하였다. CH₂Cl₂ 추출물은 MeOH로 용출된 Sephadex LH-20 컬럼을 사용하여 4종의 분획(CTUM1-CTUM4)으로 나누었다. AIF는 아세토니트릴(MeCN)/증류수(57:43)를 사용한 반분취 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 CTUM3에서 정제되었다. AIF는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해되어 실험에 사용하였다.

[0061] **참조예 1. 세포 배양**

[0062] ARPE-19 세포(ATCC, Rockville, MD, USA)를 10 % FBS 및 antibiotic-antimycotic(100 units/ml, Gibco, Waltham, MA, USA)를 넣은 Dulbecco 변형 Eagle's 배지(DMEM, Gibco, Waltham, MA, USA)를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건의 습윤한 인큐베이터에서 배양하였다. 배지는 일주일에 세 번 바뀌었다. 계대배양(subculture)을 위해 0.5 % trypsin-EDTA(Gibco, Waltham, MA, USA)를 1ml 넣어주고, 37℃에서 3분 incubation시켰다. 그후, 3000 rpm에서 3분간의 원심분리(centrifugation)를 통해 세포를 수확하기 위해, complete DMEM 배지 10 ml을 첨가하였다. 원심분리 후, 상층액을 제거하고, 모아진 cell pellet에 DMEM 배지를 1 ml 넣고 풀어준 후, cell counting을 하여 96 well plate에 각각 1x10⁴ cell/well으로 시드(seed) 하였다.

[0063] **참조예 2. 황반변성 마우스 모델**

[0064] 57BL6/N 8 주령 male 마우스를 ketamine과 xylazine을 섞은 마취제로 마취를 시키고, 안구 하나 당 각각 3 곳에 LIO laser(350 mW, 100 msec, 95 % white bubble(78 D lens))를 쏘아 CNV를 생성시켰다.

[0065] **참조예 3. Immunocytochemistry/immunofluorescence (ICC/IF)**

[0066] ARPE-19 세포는 실온에서 20분 동안 4% 파라포름알데하이드에 고정되었고, PBS(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에서 0.1% Triton X-100으로 15분 동안 투과되었다. 상온에서 염소혈청 5% 및 Triton X-100 0.1%를 함유하는 PBS로 1시간 동안 차단한 후, 고정된 세포 및 VEGFA (Abcam, Cambridge, UK, ab46154, 1:400)를 염소혈청 5% 및 Triton X-100 0.1%를 함유하는 PBS에 넣고, 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 염색된 세포들은 1% 염소혈청 및 0.1% Tween 20을 함유하는 PBS로 세척한뒤, 2차 항체(corresponding conjugated donkey anti-mouse IgG (H+L), highly cross-adsorbed (1:1000, Biotium, Fremont, CA, USA) secondary antibody)와 함께 실온에서 염소혈청 5% 및 Triton X-100 0.1%를 함유하는 PBS에서 상온의 암실에서 2시간동안 인큐베이션하였다. 2차 항체로 인큐베이션 후, 실온의 암실에서 10분간 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1% 염소 혈청에서 300ng/ml로 희석)로 착색하였다. 세포는 암실에서 PBS로 5분동안, 3회 세척하였다. 샘플은 커버슬립에 장착하여 덮은 후, 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0067] **참조예 4. CNV 병변부위의 Isolectin B4 염색**

[0068] 마우스에게 레이저 광응고(photocoagulation)실시 7일 후, 마우스를 안락사하였다. 적출 30분전에 복강내로 2.5% fluorescein sodium (Novartis, Basel, Switzerland) 0.5 ml를 주입하여, 잔류 지방, 근육, 공막외막(episcleral membrane), 또는 시신경 조직을 부드럽게 제거하였다. 각막 및 앞공막(anterior sclera)은 현미해부 가위를 이용해 앞에서 적도방향으로(Anterior to equator) 절개를 통해 해부하였고, 수정체와 홍채, 유리체(vitreous) 및 감각신경망막(neurosensory retina)을 제거하였다. 뒤공막컵(posterior scleral cup)의 평탄화는 적도에서 시작하여 시신경두 중심에서 약 1mm 후 공막 중앙에서 끝나는 5개의 자오선(meridian) 절개를 만들어 시신경유두주위 공막(peripapillary sclera)에 손상을 입히지 않았다. RPE, 맥락막 및 공막만 분리하여 96 well plate 넣었다. 샘플은 실온에서 1시간 동안 PBS에서 4% 파라포름알데히드(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 즉시 고정되었다. 플랫폼을 위해, RPE, 맥락막 및 공막으로 구성된 posterior eye cups을 PBS내 0.1% Triton X-100(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 실온에서 1시간동안 투과하였다. CNV 병변을 Alexa Fluor 594-conjugated Griffonia simplicifolia isolectin B4(1:100 희석, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 플루오레세인(fluorescein)으로 실온에서 밤새 염색하였다. PBS로 3회(각각 15분) 세척한 후, posterior eye cups은 SlowFade anti-fade mounting medium (Life Technologies)에서 공막부분이 아래로 향하도록 슬라이드 (Thermo Scientific)에 플랫폼되었다. 그후, 형광 현미경으로 형광 이미지를 촬영하였다.

[0069] **참조예 5. Quantitative Real-Time PCR (qPCR)**

[0070] QIAGEN RNA 키트(QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여, ARPE-19 세포에서 RNA를 추출하였고, 고용량 cDNA 역전사 키트(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 1μg 총 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 증폭 반

응은 StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)을 이용하여, 12.5 μ l 2 X SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems), 1 μ g cDNA, 및 forward and reverse primers (100 μ M each)으로 수행하였다. 사이클링 파라미터는 50℃에서 2분 및 95℃에서 10분; 95℃에서 30초 동안 초기 단계 및 55℃에서 30초 동안 최종 단계 후, 95℃에서 15초 동안 1주기 및 60℃에서 2분 동안 40주기였다. 사용된 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

프라이머	방향	서열 (5'→3')	서열번호
alpha-SMA	Forward	AAAAGACAGCTACCTTGGGTGA	1
	Reverse	GCCATGTTCTATCGGGTACTTC	2
N-Cadherin	Forward	TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT	3
	Reverse	ATGCACATCCTTCGATAAGACTG	4
Collagen I	Forward	TTGTGCGATGACGTGATCTGT	5
	Reverse	TTGGTCGGTGGGTGACTCTG	6
GAPDH	Forward	TGTCAAGCTCATTTCTGGTATGA	7
	Reverse	TCTTACTCCTTGGAGGCCATGTAG	8

참조예 6. Immunohistochemistry (IHC)

레이저 광응고술을 시행한 마우스는 7일뒤에 안락사하였다. 눈은 4℃에서 PBS 중 4% PFA로 밤새 후-고정(post-fixed)한 후, Leica CM1850 microtome(15 μ m thick sections)으로 관상절단하였다. 절편은 0.3% Triton X-100 및 0.3% 과산화수소가 포함된 PBS에서 투과하고, 실온에서 1시간 동안 5% 소혈청 알부민(BSA, 1% 염소 혈청 포함)에서 차단(block)하였다. 그런 다음, 절편을 토끼 알파-SMA(Abcam, ab5694, 1:200)를 사용하여 4℃에서 5% BSA에 희석된 1차 항체와 함께 밤새 인큐베이션하였다. PBS에서 세 번 헹군 후, 절편을 5% BSA에 희석된 해당 Alexa Fluor-conjugated 이차 항체와 함께 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하고 마지막으로 DAPI(5% BSA에서 300nM, Sigma-Aldrich)로 20분 동안 염색하였다. 그후, 절편들은 mounting medium (Vector Laboratories, Inc, San Francisco, CA, USA)으로 유리슬라이드(Matsunami, Osaka, Japan)에 마운팅하였다. 각 절편에 대해 공초점 현미경(LSM-880, ZEISS, Oberkochen, Germany)을 사용하여 5배 대물렌즈로 이미지를 촬영하였다.

참조예 7. 닷 블롯(Dot blot) 분석

자극된 ARPE-19 세포 배지를 3,500rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 진공 및 Bio-Dot Apparatus(Bio-rad)에 의해 니트로셀룰로오스 막에 블로팅한 다음, 5% 탈지유를 함유하는 TBS에서 1시간 동안 차단하였다. 차단 후, 막을 항-VEGFA 항체(Abcam, ab46154, 1:1000)와 함께 실온에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. TBST로 세척(5분 x 3회)을 수행 후, 멤브레인을 염소 항토끼 IgG-HRP(Cell signaling, 7074S, 1:5000) 2차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 멤브레인을 다시 세척하고 ECL 기질(Millipore, Billerica, MA) 및 FU-SION Solo S 화학발광 검출 시스템(Vilber Lourmat, Collégien, France)을 사용하여 시각화하였다.

참조예 8. 웨스턴 블롯(Western blot) 분석

마우스 망막, RPE 및 맥락막을 용해 완충액(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)에서 초음파 처리를 통해 분리하고 4℃에서 13,000 rpm으로 25분 동안 원심분리 하였다. ARPE-19 세포를 용해 완충액(iNtRON Biotechnology)으로 균질화하고 4℃에서 13,000rpm으로 25분간 원심분리하였다. 상층액을 총 단백질을 추출물로 얻었다. 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 동일한 양의 총 단백질을 분리(resolve)하여 gel 전기영동을 수행하였다. 이송(transfer)된 PVDF 막을 alpha-SMA (Abcam, ab5694, 1:1000), VEGFA (Abcam, ab46154, 1:1000) CRYAB (Abcam, ab13496, 1:2500), phospho-CRYAB (Ser59) (Invitrogen, PA1-012, 1:2500) 및 GAPDH (Cell Signaling Technology, 2118S, 1:5000) 항체들과 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 그후, 블롯(blot)은 상응하는 접합된 염소 항-토끼(Cell signaling, 7074S, 1:5000) 또는 말 항-마우스 IgG-HRP(Cell signaling, 7076S, 1:5000) 2차 항체와 함께 인큐베이션되었다. ECL 기질(Millipore)로 면역반응성 단백질을 검출하고 FUSION Solo S 화학발광 검출 시스템(Vilber Lourmat, Collégien, France)을 사용하여 시각화하였다.

참조예 9. Co-immunoprecipitation (Co-IP) assay

Co-IP 분석은 제조업체의 지침에 따라 Pierce Classic Magnetic IP/Co-IP 키트(Thermo Scientific)를 사용하여

수행하였다. 요약하면, 500 μ g 총 단백질을 함유하는 조직 용해물을 4℃에서 밤새 IP용 CRYAB 항체 2 μ g과 함께 인큐베이션하였다. 그 후, 항원/항체 복합체를 실온에서 1시간 동안 25 μ l Pierce Protein A/G 자기비드(magnetic bead)와 함께 인큐베이션하였다. 그 후, 비드를 IP Lysis/Wash Buffer로 2회, 증류수로 1회 세척한 후, 100℃에서 5분간 가열하여 비드로부터 항원/항체 복합체를 용출하였다. 마지막으로 CRYAB는 Western blotting으로 측정하였다.

[0080] **참조예 10. 통계분석**

[0081] 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차(S.E.)를 나타내었다. 데이터는 SigmaPlot 14 소프트웨어(Systat Software, San Jose, CA, USA)를 사용한 Holm-Sidak 사후 t-검정에 이어 Student's t-test, 일원 분산 분석(ANOVA)으로 분석되었다.

[0083] **실험예 1. ARPE-19 세포에서 AIF의 VEGF 억제효과**

[0084] VEGF의 작용억제는 황반변성치료에 가장 효과적인 방법으로 알려져 있다. 망막세포인 ARPE-19 세포에서 외부요인으로 증가된 VEGFA의 발현을 AIF가 억제할 수 있는지 확인하였다.

[0085] **실험예 1-1 AIF의 H₂O₂에 의해 증가된 VEGFA의 발현억제효과**

[0086] 산화 스트레스는 연령관련 황반변성 발병의 주요원인 중 하나로 VEGFA의 발현을 증가시킬 수 있다. 따라서 H₂O₂를 사용하여 ARPE-19 세포에서 산화 스트레스를 유도하였다.

[0087] 상기 참조예 1에서 배양한 ARPE-19 세포를 100 μ M의 H₂O₂ 또는 5 μ M AIF로 24시간동안 처리하였다. 그후, 닛블롯(참조예 7) 및 통계분석(참조예 10)을 통해 분석하였다. 아무처리 하지않은 세포는 대조군으로 사용되었다.

[0088] 대조군과 비교하여 H₂O₂만 처리한 세포에서는 VEGFA의 발현이 30% 증가하였으나, H₂O₂ 및 AIF를 함께 처리한 세포에서는 VEGFA의 발현이 20% 감소하였다(도 2). H₂O₂만 처리한 세포에서의 VEGFA의 발현과 비교하였을 때 약 40%의 발현감소를 확인하였다.

[0089] **실험예 1-2 AIF의 THP-1 조정 배지(이하 TCM)에 의해 증가된 VEGFA의 발현억제효과**

[0090] 대식세포 또한 연령관련 황반변성에 연관이 있고, 대식세포 염증반응시 VEGFA의 발현을 증가시킬 수 있다. 따라서 THP-1 조정 배지(THP-1 conditioned media;TCM)로 ARPE-19 세포를 자극하여 대식세포 염증 반응을 유도하였다.

[0091] 상기 참조예 1에서 배양한 ARPE-19 세포를 RPMI 1640 complete media 내 0.1 % DMSO(대조군) 또는 TCM내 AIF(0, 1, 5, or 10 μ M)로 3시간 동안 처리하였다. 그후, 닛블롯(참조예 7) 및 통계분석(참조예 10)을 통해 분석하였다.

[0092] 대조군과 비교하여 TCM 처리만 한 세포에서는 VEGFA의 발현이 증가하였으나, AIF를 함께 처리한 세포에서는 VEGFA의 발현이 감소하였다(도 3)

[0093] 상기 실험예 1-1 및 1-2를 통해, ARPE-19 세포에서 다양한 외부요인에 따른 VEGFA의 발현증가를 AIF가 우수하게 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0095] **실험예 2. ARPE-19 세포에서 AIF의 fibrosis marker (alpha-SMA, Collagen I)발현 억제 효과**

[0096] 연령관련 황반변성 환자들에게 조직흉터 및 실명을 유발하는 섬유증(fibrosis)억제 효과를 확인을 위해, AIF투여에 따른 fibrosis marker (alpha-SMA, Collagen I) 발현정도를 확인하였다.

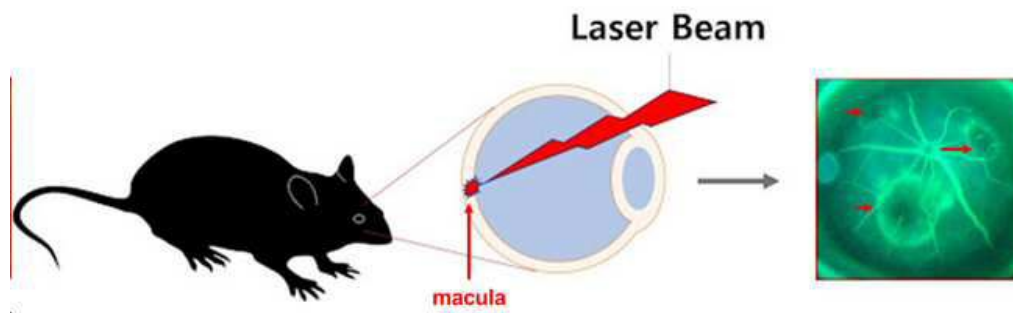
[0097] 상기 참조예 1에서 배양한 ARPE-19 세포에 AIF 5 μ M (10 mg/ml)을 처리 또는 무처리후, 24시간 동안 인큐베이션하였다. 그후, qPCR(참조예 5) 및 통계분석(참조예 10)을 통해 분석하였다. 이때, 무처리한 ARPE-19 세포는 대조군이다.

[0098] 각 유전자의 정량화된 mRNA를 상응하는 GAPDH mRNA 수준으로 정규화하였다. 그 결과, AIF는 alpha-SMA의 발현수준을 40% 감소시켰고(도 4), collagen I의 발현 수준을 60% 감소시켰다(도 5)

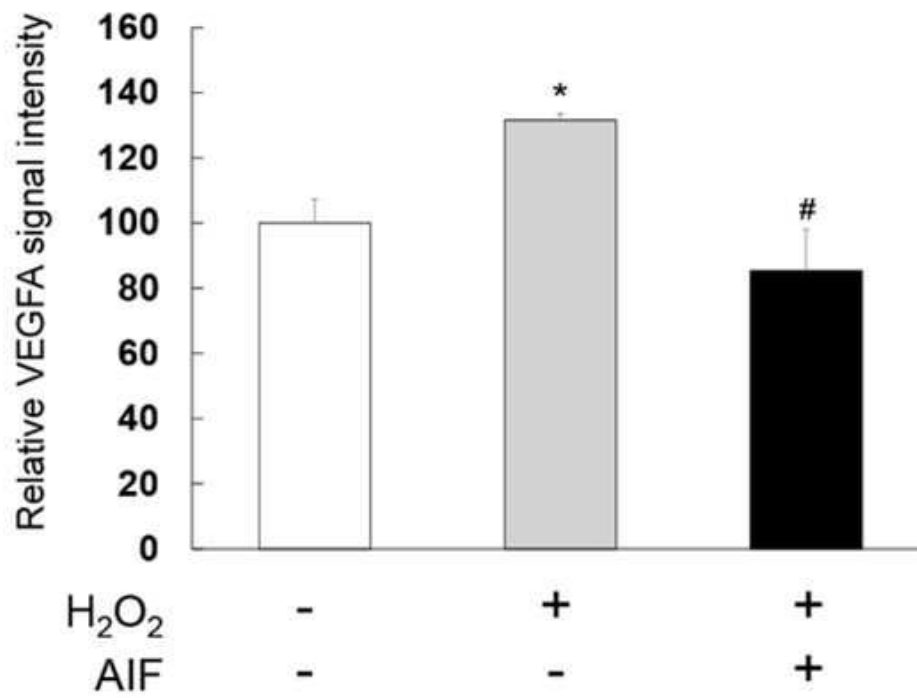
- [0099] 이를 통해, *in vitro* model에서 AIF의 fibrosis marker(alpha-SMA, Collagen I)발현 억제 효과를 확인하였다.
- [0101] **실험예 3. 황반변성 마우스 모델에서 AIF의 CNV area 감소 효과**
- [0102] AIF 처리에 따른 CNV area 감소 효과를 확인하기 위해 면역염색을 수행하였다.
- [0103] 마우스에게 레이저 광응고술을 시행(참조예 2)한 직후, Avastin(bevacizumab)(1 μ l) 또는 AIF(25 μ g) 유리체강 내 주입하거나, 아무것도 주입하지 않았다. 일주일 후, CNV 병변은 fluorescein으로 마우스를 관류시키고 isolectin B4로 맥락막(choroidal) 혈관구조 (vasculature)을 염색함으로써 시각화하고, 형광 강도 측정을 통해 분석하였다(참조예 4).
- [0104] 상기 실험결과는 도 6에 나타내었다.
- [0105] AIF 또는 Avastin을 주입한 마우스 모델에서는 아무것도 주입하지 않은 마우스 모델보다 CNV 병변의 면적이 감소하였다. 이를 통해, AIF는 안구에서의 신혈관 형성(neovascularization)을 억제함을 확인하였다.
- [0107] **실험예 4. 황반변성 마우스 모델에서 AIF의 alpha-SMA, VEGFA 발현 억제 효과**
- [0108] 레이저에 노출된 마우스의 눈에서 VEGFA 및 alpha-SMA의 발현을 분석하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.
- [0109] 마우스에게 레이저 광응고술을 시행(참조예 2)한 직후, 25mg/ml AIF를 유리체강 내 주입하거나, 아무것도 주입하지 않았다. 일주일 후, 마우스의 안구를 제거하고, 단백질을 추출하였다. GAPDH를 내부 로딩 대조군으로 하여 VEGFA 및 alpha-SMA의 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다(참조예 8). 대조군으로서 레이저 광응고술을 시행하지 않고, AIF를 주입하지 않은 마우스에 대해서도 상기과 같은 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.
- [0110] 상기 실험결과는 도 7에 나타내었다.
- [0111] 레이저 광응고술을 시행한 마우스의 안구에서, VEGFA의 발현량은 대조군과 비교하여 4배 증가하였고, alpha-SMA의 발현량은 대조군과 비교하여 1.6배 증가하였다. 반면, 레이저 광응고술을 시행한 후, AIF를 투여한 마우스의 안구에서, VEGFA의 발현량은 대조군과 비슷한 정도로 억제되었고, alpha-SMA의 발현량은 대조군보다 감소된 수준을 억제되었다.
- [0112] 이를 통해 AIF의 우수한 alpha-SMA, VEGFA 발현 억제 효과를 확인하였다.
- [0114] **실험예 5. 황반변성 마우스 모델에서 AIF의 절단된 형태의 CRYAB와 p-CRYAB 발현 감소 효과**
- [0115] CRYAB(Alpha-crystallin B chain)은 VEGF 안정화 및 섬유증과 관련된 샤페론(chaperone)으로, 절단된 형태에서 VEGF 및 섬유증의 병태적인 변화를 더 유발시킨다. 따라서, AIF 처리에 따른 절단형태의 CRYAB와 p-CRYAB의 발현량을 확인하였다.
- [0116] 마우스에게 레이저 광응고술을 시행(참조예 2)한 직후, 25mg/ml AIF를 유리체강 내 주입하거나, 아무것도 주입하지 않았다. 일주일 후, 마우스의 안구를 제거하고, 단백질을 추출하였다. GAPDH를 내부 로딩 대조군으로 하여 CRYAB(alpha-crystallin B) 및 p-CRYAB의 절단된 형태에 대한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다(참조예 8). 대조군으로서 레이저 광응고술을 시행하지 않고, AIF를 주입하지 않은 마우스에 대해서도 상기과 같은 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.
- [0117] 상기 실험결과는 도 8에 나타내었다.
- [0118] 레이저 광응고술을 시행한 마우스의 안구에서, CRYAB(alpha-crystallin B) 및 p-CRYAB의 절단된 형태의 비율은 대조군과 비교하여 현저히 증가한 반면, 레이저 광응고술을 시행한 후, AIF를 투여한 마우스의 안구에서, CRYAB(alpha-crystallin B) 및 p-CRYAB의 절단된 형태의 비율은 대조군과 비슷한 정도로 억제되었다.
- [0119] 이를 통해 AIF의 우수한 CRYAB(alpha-crystallin B) 및 p-CRYAB의 절단 억제 효과를 확인하였다.

도면

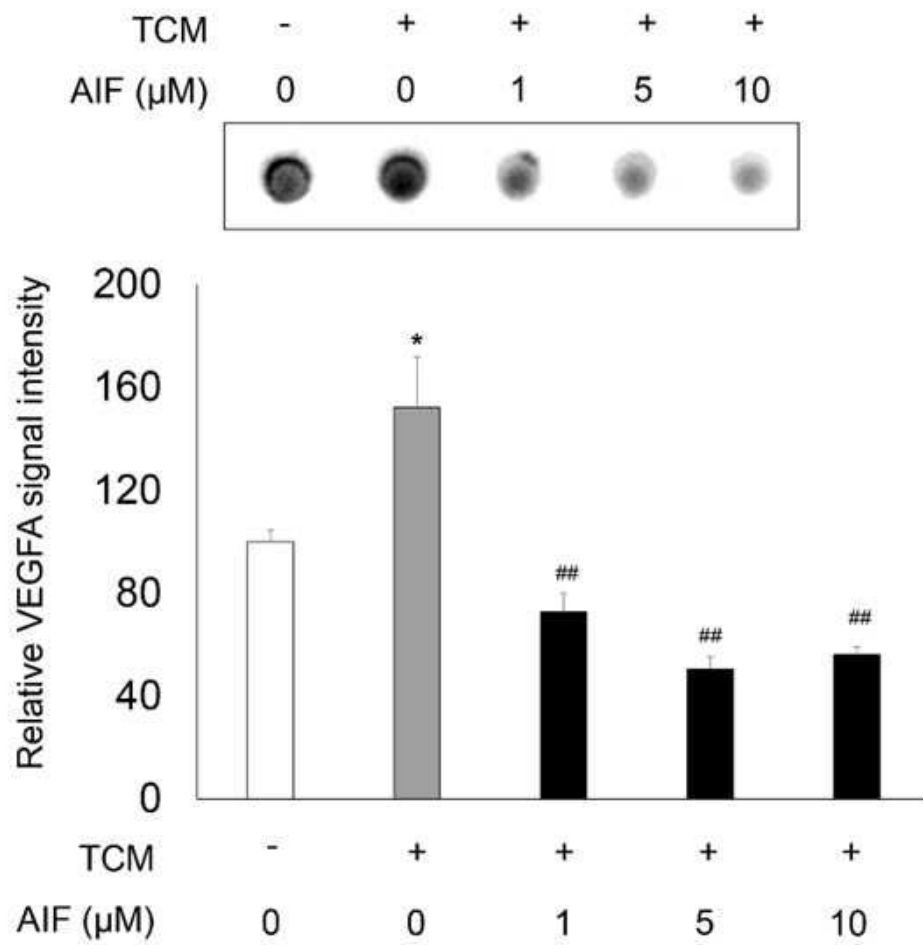
도면1



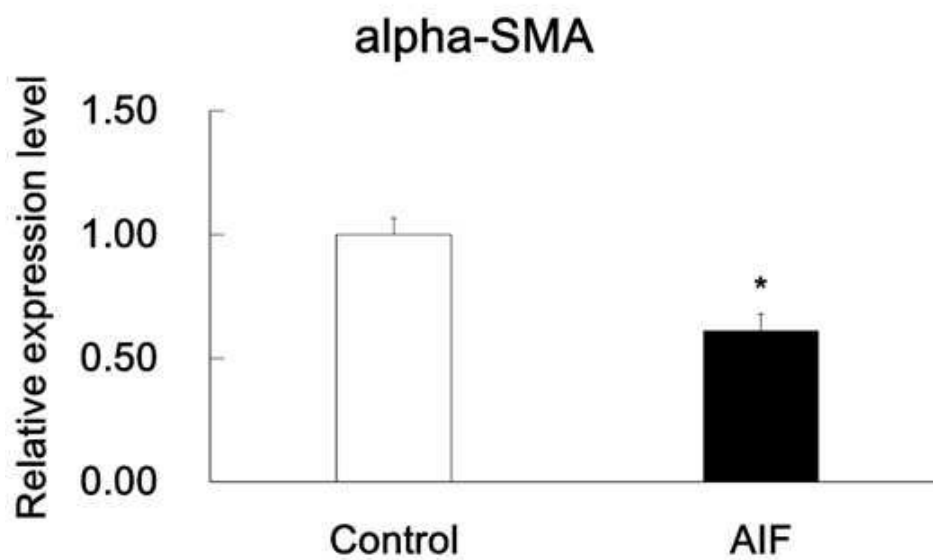
도면2



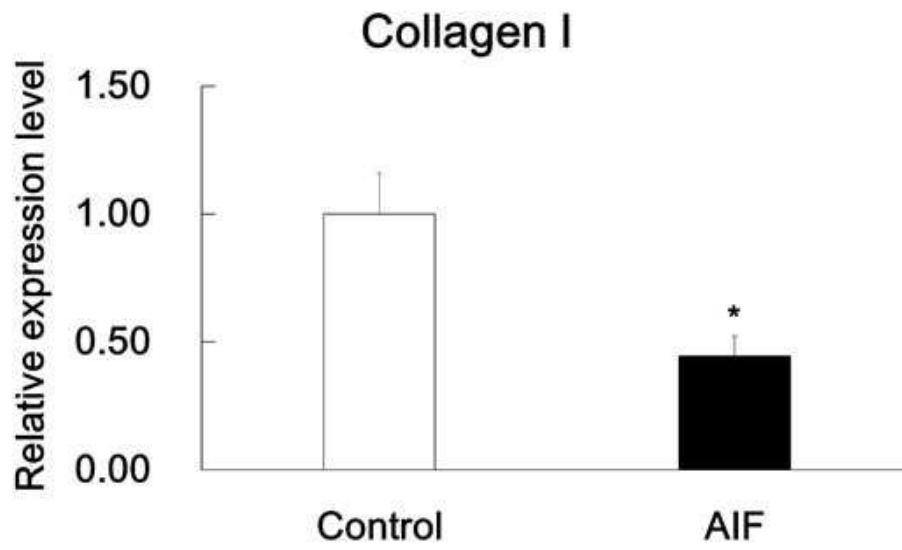
도면3



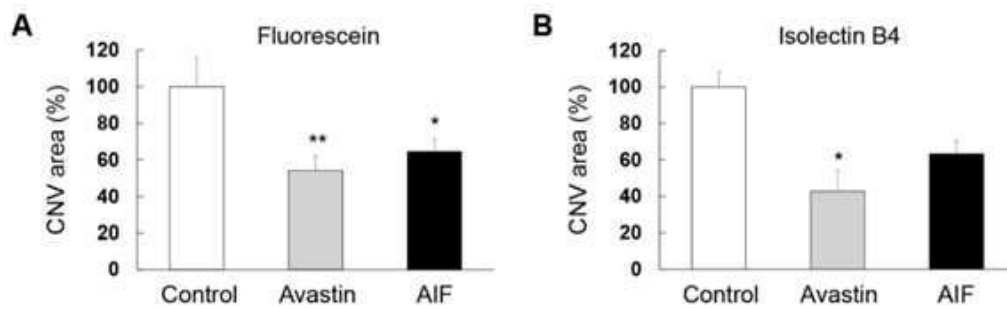
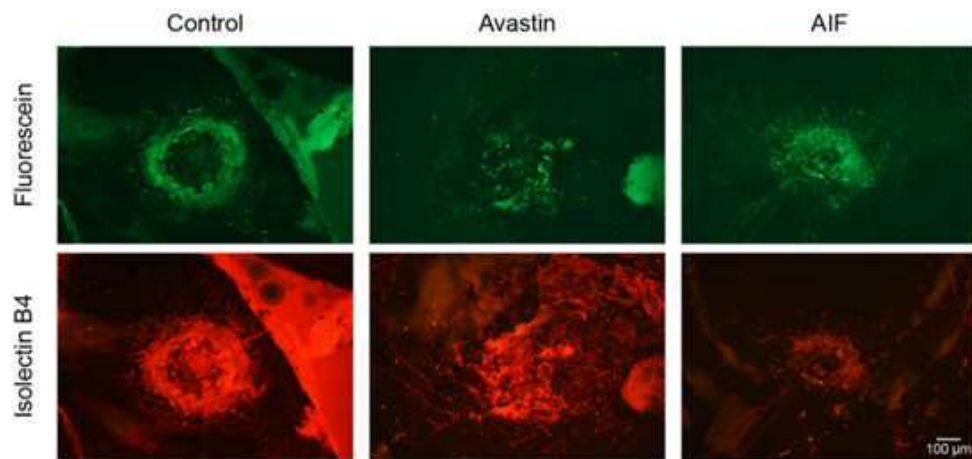
도면4



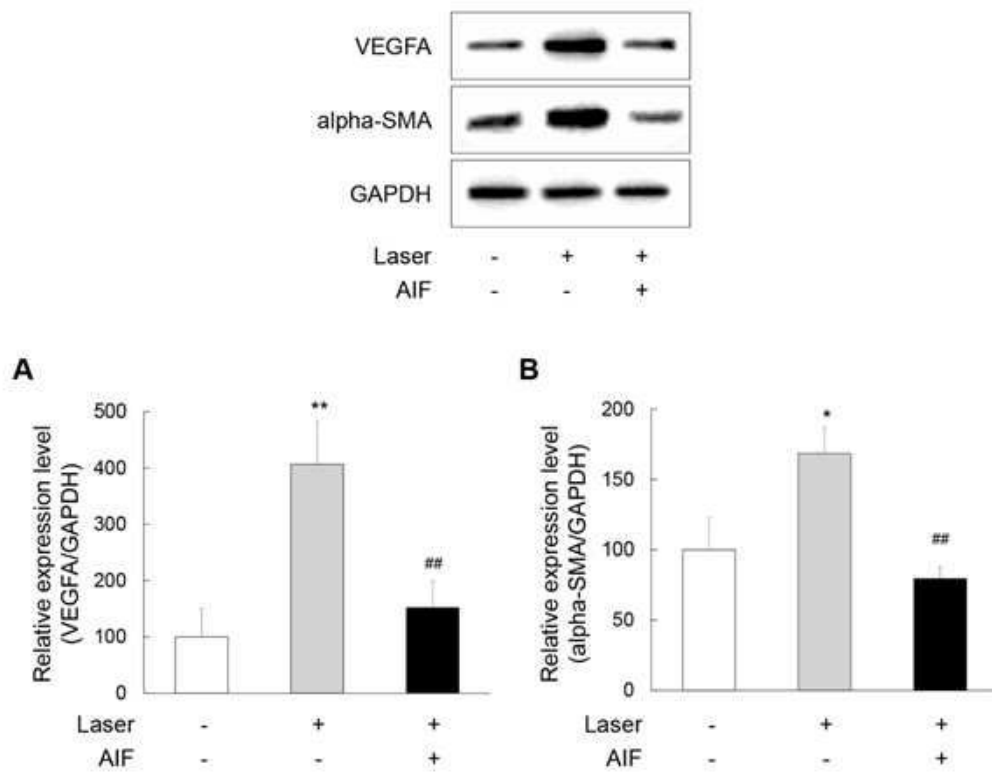
도면5



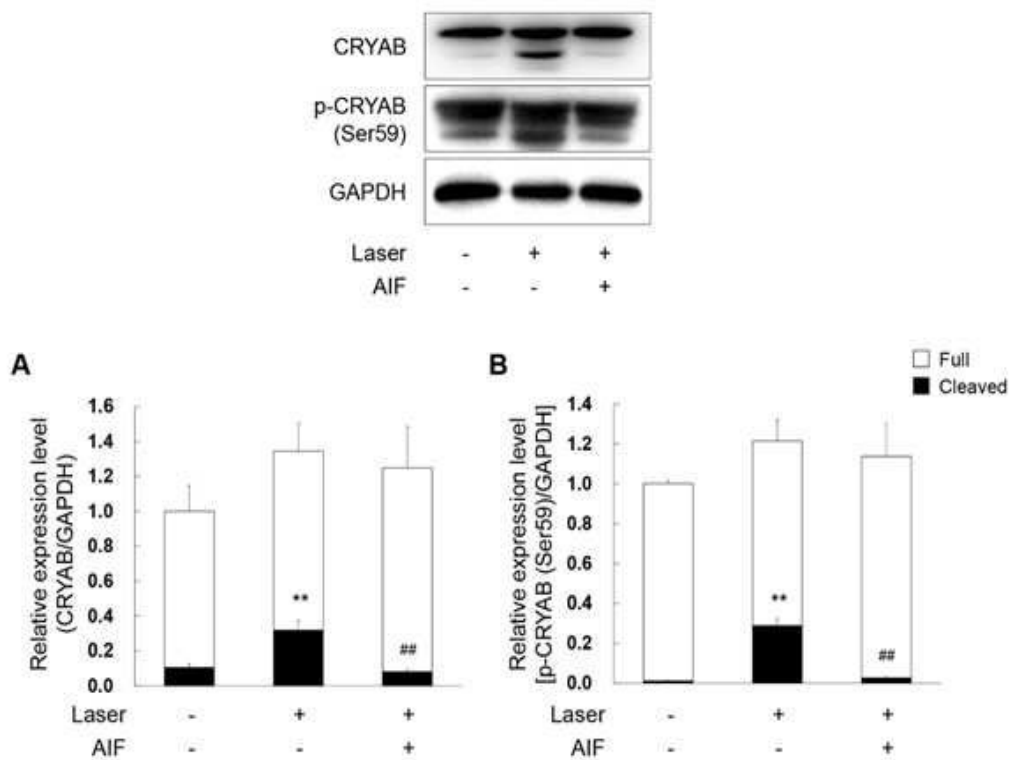
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> CHUNGBUK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION

<120> Composition for treating or preventing age-related macular
degeneration comprising alpinumisoflavone

<130> PN211305KR

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> alpha-SMA sense

<400> 1

aaaagacagc taccttgggt ga 22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> alpha-SMA primer(reverse)

<400> 2

gccatgttct atcgggtact tc 22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-Cadherin primer(forward)

<400> 3

tcaggcgtct gtagaggctt 20

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-Cadherin primer(Reverse)

<400>	4	
atgcacatcc ttcgataaga ctg		23
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Collagen I primer(Forward)	
<400>	5	
ttgtgcgatg acgtgatctg t		21
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Collagen I primer(Reverse)	
<400>	6	
ttggtcgggtg ggtgactctg		20
<210>		
7		
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH primer(Forward)	
<400>	7	
tgtcaagctc atttcctggt atga		24
<210>	8	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH primer(Reverse)	
<400>	8	
tcttactcct tggaggccat gtag		24