



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월19일  
(11) 등록번호 10-1810381  
(24) 등록일자 2017년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 31/07* (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7019972

(22) 출원일자(국제) 2009년02월10일  
심사청구일자 2014년02월10일

(85) 번역문제출일자 2010년09월07일

(65) 공개번호 10-2010-0126358

(43) 공개일자 2010년12월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/000824

(87) 국제공개번호 WO 2009/102418  
국제공개일자 2009년08월20일

(30) 우선권주장  
61/027,625 2008년02월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현  
WO2006002097 A2\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문현

(73) 특허권자  
유니버시티 오브 워싱턴 스루 이츠 센터 포 커머셜리제이션  
미국 워싱턴 98105-4608 시애틀 캠퍼스 박스 354990 스위트 500 노우스이스트 11 애비뉴 4311

(72) 발명자  
**마에다 다다오**  
미국 오하이오주 44124 메이菲尔드 하이츠 알세스터 로드 1729

**사퍼스테인 테이비드**  
미국 워싱턴주 98105 시애틀 47쓰 애비뉴 노쓰이스트 3410

**팔체보스키 크르지츠토프**  
미국 오하이오주 44140 베이 빌리지 레이크 로드 29720

(74) 대리인  
**차후**

전체 청구항 수 : 총 23 항

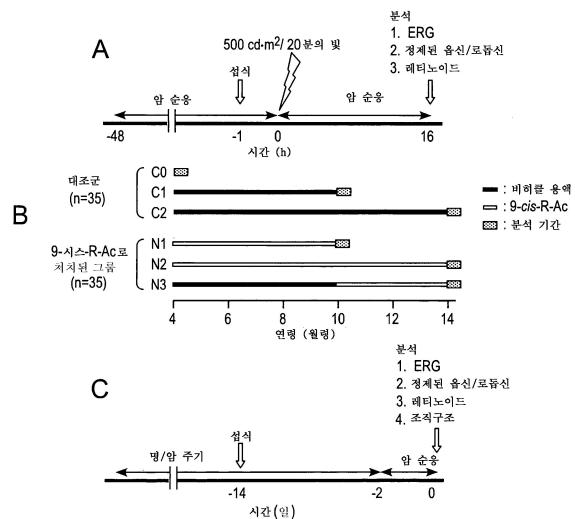
심사관 : 강덕희

#### (54) 발명의 명칭 연령-관련 망막 기능장애의 치료 및 예방 방법

(57) 요약

본 발명은 약제학적 유효량의 합성 레티날 유도체를 적어도 약 3개월 동안 반복해서 환자에게 투여함을 포함하여 연령-관련 망막 기능장애를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 효과적인 합성 레티날 유도체는 9-시스-레티닐 에스테르, 11-시스-레티닐 에스테르, 이의 유도체와 동종체 및 이들의 배합물을 포함한다. 적합한 에스테르 치환기는  $C_1-C_{10}$  도노카복실산 및  $C_2-C_{22}$  폴리카복실산의 카복실레이트를 포함한다.

대 표 도



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

삭제

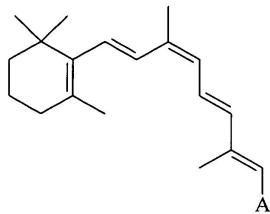
#### 청구항 2

사람 대상체에서 광 노출 후의 간상세포-매개된 암(dark) 순응의 손상에 의해 나타나는 연령-관련 망막 기능장애를 치료 또는 예방하기 위한, 유효량의 합성 레티날 유도체를 포함하는, 약제학적 조성물로서,

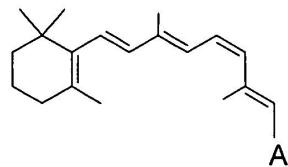
상기 약제학적 조성물은 4개월 이상 동안 격일로 1회씩 내지 한 달에 1회씩의 장기간 투여 요법으로 경구 투여하기 위한 것이고,

상기 합성 레티날 유도체는 화학식 1 또는 화학식 2의 9-시스-레티닐 에스테르 또는 11-시스-레티닐 에스테르인, 약제학적 조성물.

#### 화학식 1



#### 화학식 2



상기 화학식 1 및 2에서,

A는  $\text{CH}_2\text{OR}$ 이고, 여기서 R은 (i) 레티닐 에스테르를 형성하는  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{24}$  칙쇄 또는 측쇄 알데히드성 그룹; 또는 (ii)  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{10}$  모노카복실산 또는  $\text{C}_2\text{-}\text{C}_{22}$  폴리카복실산을 형성하는 에스테르이다.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 합성 레티날 유도체를 상기 대상체에 적어도 4개월 동안 한 달에 1회씩 투여하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 합성 레티날 유도체를 적어도 4개월 동안 1주에 2-4회씩 내지 한 달에 1회씩 투여하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 5

제2항에 있어서, 상기 투여를 적어도 6개월 동안 하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 투여를 적어도 6개월 동안 2주에 1회씩 하는, 약제학적 조성물.

### 청구항 7

제5항에 있어서, 상기 투여를 6개월 내지 10개월 동안 한 달에 1회씩으로 하는, 약제학적 조성물.

### 청구항 8

삭제

### 청구항 9

제2항에 있어서,

- (a) 상기 합성 레티날 유도체가 9-시스-레티닐 에스테르이고,
- (b) 상기 합성 레티날 유도체의 에스테르 치환기가 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 모노카복실산 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub> 폴리카복실산의 카복실레이트 라디칼을 포함하는, 약제학적 조성물.

### 청구항 10

제2항에 있어서,

- (a) 상기 합성 레티날 유도체가 11-시스-레티닐 에스테르이고,
- (b) 상기 합성 레티날 유도체의 에스테르 치환기가 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 모노카복실산 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub> 폴리카복실산의 카복실레이트 라디칼을 포함하는, 약제학적 조성물.

### 청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 에스테르 치환기가 C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> 폴리카복실산의 카복실레이트 라디칼을 포함하는, 약제학적 조성물.

### 청구항 12

제9항에 있어서, 상기 합성 레티날 유도체가 9-시스-레티닐 아세테이트, 9-시스-레티닐 석시네이트, 9-시스-레티닐 시트레이트, 9-시스-레티닐 케토글루타레이트, 9-시스-레티닐 푸마레이트, 9-시스-레티닐 말레이트 및 9-시스-레티닐 옥살로아세테이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 합성 레티날 유도체가 9-시스-레티닐 아세테이트인, 약제학적 조성물.

### 청구항 14

제10항에 있어서, 상기 합성 레티날 유도체가 11-시스-레티닐 아세테이트, 11-시스-레티닐 석시네이트, 11-시스-레티닐 시트레이트, 11-시스-레티닐 케토글루타레이트, 11-시스-레티닐 푸마레이트, 11-시스-레티닐 말레이트 및 11-시스-레티닐 옥살로아세테이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 합성 레티날 유도체가 11-시스-레티닐 아세테이트인, 약제학적 조성물.

### 청구항 16

삭제

### 청구항 17

삭제

### 청구항 18

삭제

**청구항 19**

제2항에 있어서, 상기 사람 대상체가 45세 이상의 연령 사람 대상체인, 약제학적 조성물.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 사람 대상체가 50세 이상의 연령 사람 대상체인, 약제학적 조성물.

**청구항 21**

제19항에 있어서, 상기 사람 대상체가 60세 이상의 연령 사람 대상체인, 약제학적 조성물.

**청구항 22**

제19항에 있어서, 상기 사람 대상체가 65세 이상의 연령 사람 대상체인, 약제학적 조성물.

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

제2항에 있어서, 상기 투여가 정제, 환제, 사제 또는 캡슐로 행해지는, 약제학적 조성물.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 캡슐이 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐인, 약제학적 조성물.

**청구항 28**

제2항에 있어서, 상기 경구 투여가 레티날 유도체 0.1 내지 1000mg의 용량으로 행해지는, 약제학적 조성물.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 상기 경구 투여가 레티날 유도체 1.0 내지 300mg의 용량으로 행해지는, 약제학적 조성물.

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

청구항 35

제2항에 있어서, 상기 조성물이 1일 1회 미만으로 투여되고, 1회 투여량이 1일 유효량 초과인, 약제학적 조성물.

청구항 36

제2항에 있어서, 상기 조성물이 격일로 1회씩; 1주일에 4회씩, 1주일에 3회씩 또는 1주일에 2회씩; 또는 2주, 3주 또는 4주에 1회씩 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

- [0001] 연방 정부에 의해 후원된 연구 또는 개발 하에서 이루어진 발명의 권리에 대한 선언서
- [0002] 본 연구는 국립 보건원(National Institutes of Health; NIH)으로부터 공중보건서비스인가(Grant) 제EY08061호에 의해 지원되었다. 정부는 본 발명에 일정한 권리를 갖는다.
- [0003] 본 출원은 2007년 2월 11일자로 미국 특허청에 출원된 미국 가특허원 제61/027625호를 우선권으로 주장한다.

## 배경 기술

- [0004] 시력 감퇴나 시력 상실은 눈의 앞부분 및/또는 뒷부분의 조직 또는 구조의 기능장애에 의해 유발된 다수의 눈 질환 또는 장애로부터 발생할 수 있다. 사람 시력이 나이에 따라 쇠퇴하는 이유를 이해하기 위해, 여러 연구들은 빛을 전기 신호로 전환시키는 간상세포(rod)와 원추세포(cone) 광수용기 세포의 층인 망막에 초점을 맞추었다. 마우스에서의 연구는 망막 간상세포 기능에 있어서의 연령-관련된 감소가 간상세포 손실, 비정상적인 망막 형성성(retinal plasticity) 또는 망막 질환의 징후에 의해 설명될 수 없음을 보여주었다[문헌 참조; Jackson, G.R., Owsley, C. & McGwin, G., Jr. *Vision research* 39, 3975-3982 (1999); Gao, H. & Hollyfield, J.G. *Investigative ophthalmology & visual science* 33, 1-17 (1992); Jackson, G.R., Owsley, C., Cordle, E.P. & Finley, CD. *Vision research* 38, 3655-3662 (1998)]. 실제로, 잭슨과 동료들은 로돕신의 지연된 재생과 관련된 사람 노화와 연관된 광 노출 후의 간상세포-매개된 암 순응(rod-mediated dark adaptation)의 극적인 지연을 보고하였다[문헌 참조; Jackson, G.R., Owsley, C. & McGwin, G., Jr. *Vision research* 39, 3975-3982 (1999)].
- [0005] 연령 관련 황반 변성(age related macular degeneration; AMD)은 안구 앞부분과 연관된 특수한 질병 중의 하나이고 노인들의 시력 상실의 주요 요인이다. AMD는 망막의 중심에 있는 작은 원형 영역인 황반에 손상을 야기한다. 작은 부분까지 세세하게 구별하고 독서를 하거나 운전을 할 수 있게 하는 부분이기 때문에 이것의 기능 저하는 시력 감퇴 및 심지어 시력 상실을 초래한다. 망막은 빛을 전기 신호로 변화시키는 두 가지 형태의 광수용기 세포인 간상세포(rod)와 원추세포(cone)를 함유한다. 그후, 뇌는 이러한 전기 신호들을 영상(image)으로 전환한다. 황반은 원추세포에 풍부하여 중심부 시력(central vision)을 제공한다. AMD 환자는 중심부 시력 저하로 고통받지만 통상적으로 주변부 시야는 유지한다.
- [0006] 비타민 A에서 시각 발색단(visual chromophore), 11-시스-레티날로의 부적절한 이용가능성 및/또는 가공은 척추동물 로돕신 재생 및 시각 변환에 불리한 영향을 미칠 수 있다[문헌 참조; McBee, J.K., Palczewski, K., Baehr, W. & Pepperberg, D.R. *Prog Retin Eye Res* 20, 469-529 (2001); Lamb, T.D. & Pugh, E.N., Jr. *Prog Retin Eye Res* 23, 307-380 (2004); 및 Travis, G.H., Golczak, M., Moise, A.R. & Palczewski, K. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2006)]. 나이가 들에 따라, 광 노출 후 로돕신 재생은 식이 결핍 또는 부적당한 장내 흡수로 인해 비타민 A가 부족한 사람 및 마우스에서 더욱 지연된다[문헌 참조; Lamb, T.D. & Pugh, E.N., Jr. *Prog Retin Eye Res* 23, 307-380 (2004)]. 더욱이, 비타민 A 및 이의 유도체로의 치료는 노화(문헌 참조; Jacobson, S. G., et al. *Nat Genet* 11, 27-32 (1995)) 및 망막 질환, 예를 들면, 소스비의 망막 이상증(Sorbsby's fundus dystrophy)(문헌 참조; Jacobson, S.G., et al. *Nat Genet* 11, 27-32 (1995)) 및 색소성 망막염(문헌 참조; Berson, E.L., et al. *Arch Ophthalmol* 111, 761-772 (1993))에 유익한 효과를 가질 수 있다.
- [0007] 레시틴:레티놀 아실트랜스퍼라제(lecithin:retinol acyltransferase; LRAT)가 부족한 마우스에서는 망막 색소의 표백 후의 레티노이드 흡수, 저장 및 재순환이 손상되며(문헌 참조; Imanishi, Y., Batten, M.L., Piston, D.W., Baehr, W. & Palczewski, K. *J Cell Biol* 164, 373-383 (2004); Batten, M.L., et al. *PLoS medicine* 2, e333 (2005); Batten, M.L., et al. *J Biol Chem* 279, 10422-10432 (2004); O'Byrne, S.M., et al. *J Biol Chem* 280, 35647-35657 (2005)), 사람 LRAT 유전자에 있어서의 전결실 돌연변이(null mutation)는 조기-개시 간상세포-원추세포 이영양증(문헌 참조; Thompson, D.A., et al. *Nat Genet* 28, 123-124 (2001))을 야기한다. 후자는 사람 레베르 선천 흑암시(Leber's congenital amaurosis; LCA)의 한 가지 형태와 유사한데, 여기서, 망막 색소 상피-특이적 65kDa(RPE65) 유전자의 돌연변이를 무능화시키는 것이 또한 심한 간상세포와 원추세포 광수용기 기능장애를 야기한다[문헌 참조; Thompson, D.A., et al. *Nat Genet* 28, 123-124 (2001)]. LRAT 및 RPE65 유전자 둘 다에 있어서의 돌연변이를 갖는 LCA 환자는, Lrat/- 및 Rpe65/- 유전자결핍 마우스와 같이, 11-시스-레티날 및 로돕신이 결핍되고, RPE 세포내의 올-트랜스(all-trans)-레티날 에스테르 수준에 있어서의 비정상을 가지며, 간상세포와 원추세포 광수용기 기능의 심한 손상을 나타내고, 망막 변성을 나타낼 수 있다[문

현 참조; Imanishi, Y., Batten, M.L., Piston, D.W., Baehr, W. & Palczewski, K. J Cell Biol 164, 373-383 (2004); Batten, M.L., et al. PLoS medicine 2, e333 (2005); Redmond, T.M., et al. Nat Genet 20, 344-351 (1998); Van Hooser, J.P., et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 8623-8628 (2000); Van Hooser, J.P., et al. J Biol Chem 277, 19173-19182 (2002)].

[0008] Lrat-/- 및 Rpe65-/- 유전자결핍 마우스에서 LCA-유사 증상을 야기하는 생화학적 결함은 9-시스-레티날의 경구 영양법(oral gavage)에 의해 우회될 수 있다. 이러한 치료는 단세포 기록 및 ERG 측정에 의해 평가되는 바와 같이 보존된 망막 형태 및 정상적인 간상세포 기능의 회복을 초래한다[문현 참조; Batten, M. L., et al. PLoS medicine 2, e333 (2005); Van Hooser, J.P., et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 8623-8628 (2000); Van Hooser, J.P., et al. J Biol Chem 277, 19173-19182 (2002)]. 9-시스-레티날은 광활성 이소로돕신을 형성하며, 이것은 표백되는 경우, 11-시스-레티날로부터 자연적으로 재생되는 로돕신이 그러한 바와 같이 동일한 광합성물을 통해 형태학적 변화를 겪는다[문현 참조; Yoshizawa, T. & Wald, G. Nature 214, 566-571 (1967)]. 또한, 복강내 주사에 의해 제공된 11-시스-레티날은 또한 Rpe65-/- 마우스에서 시력을 향상시킨다[문현 참조; Ablonczy, Z., et al. J Biol Chem 277, 40491-40498 (2002)]. 추가로, 9-시스- 또는 11-시스-레티날보다 더 화학적으로 안정한 화합물, 즉, 9-시스-레티닐 아세테이트(9-시스-R-Ac)를 사용한 위관 영양법(gastric gavage)은 Lrat-/- 마우스에서 9-시스-레티날과 동일한 유익한 효과를 초래한다[문현 참조; Batten, M.X., et al. PLoS medicine 2, e333 (2005)]. 광수용기 기능을 회복 및/또는 안정화시키는데 사용될 수 있는 또 다른 합성 레티날 유도체가, 예를 들면, 국제 공개공보 제WO 2006/002097 A2호에 기재되어 있다.

[0009] 현재, 레티노이드 결핍에 대한 치료법은 거의 없다. 한가지 치료법인 항산화 비타민과 아연의 배합물을 AMD의 진행을 지연시킴으로써 단지 작은 회복 효과를 야기한다. 따라서, 노인 대상체에서 광수용기 기능을 회복시키거나 안정화시키는 방법이 요구된다. 본 발명은 합성 레티노이드 유도체로의 장기간 치료가 광수용기 기능의 연령-관련 악화를 상당히 개선시킨다는 놀라운 발견에 관한 것이다.

### 발명의 내용

[0010] 본 발명은 하나 이상의 합성 레티날 유도체를 장기간 투여함을 포함하여, 연령-관련 시각 장애(age-related visual impairment)를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0011] 하나의 양태에서, 본 발명은 약제학적 유효량의 합성 레티날 유도체를 적어도 3개월의 기간 동안 대상체에게 투여함을 포함하여, 대상체에서 연령-관련 망막 기능장애(retinal dysfunction)를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0012] 하나의 양태에서, 합성 레티날 유도체는 적어도 3개월의 기간 동안 약 2주에 1회 내지 약 6주에 1회 대상체에게 투여한다.

[0013] 또 다른 양태에서, 레티날 유도체는 약 6개월 내지 약 10개월의 기간 동안 약 한달에 1회 대상체에게 투여한다.

[0014] 또 다른 양태에서, 연령-관련 망막 기능장애는 다음의 임상 상태 중의 하나 이상에 의해 나타난다: 광 노출 후의 간상세포-매개된 암 순응의 손상, 야간 시력의 손상, 대비 감도(contrast sensitivity)의 손상 및 연령-관련 황반 변성(AMD).

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 약제학적 유효량의 합성 레티날 유도체를 적어도 3개월의 기간 동안 포유동물에게 투여함을 포함하여, 포유동물에서 로돕신 재생비(rhodopsin regeneration ratio)를 개선시키는 방법을 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1. 9-시스-R-Ac를 사용한 10월령 마우스의 단일 용량 처치에 대한 실험 타임라인 및 장기간 치료를 위한 실험 프로토콜. (A) 완전히 암-순응된(48시간) 10월령 마우스에게 9-시스-R-Ac(약 80mg/체중kg) 또는 대조 비허클 용액을 섭식시켰다. 섭식한지 1시간 후, 마우스를  $500\text{cd} \cdot \text{m}^{-2}$ 에서 20분 동안 연속적인 강한 빛에 노출(약 90% 로돕신 표백됨)시킨 다음 16시간 동안 암 순응시켰다. 이어서, 마우스를 ERG로 실험하고, 로돕신 및 레티노이드 함량에 대해 분석하였다. ERG는 또한 9-시스-R-Ac 처치 전에 기록하였다. 각각의 분석에 사용되는 마우스의 수가 표 1에 나타내어져 있다. (B) 마우스에게 본원 명세서의 하기 소제목 "방법" 하에 기재되어 있는

바와 같이 6개월 또는 10개월 동안 한달에 1회 9-시스-R-Ac(약 80mg/체중kg) 또는 비히를 용액(식물유)를 섭식시켰다. (C) 마우스의 그룹을 ERG에 의해 또는 로돕신 및 레티노이드 함량 및 레티날 형태에 대해 마지막 섭식처치한지 2주 후에 시험하였다. 각각의 분석에 사용되는 마우스의 수가 표 1에 나타내어져 있다.

도 2. 9-시스-R-Ac 처치된 마우스 및 대조 마우스로부터의 정제된 로돕신/옵신의 확인. 동시-용출된 로돕신 및 옵신을 도 1에 기재된 바와 같이 처치한 마우스로부터 하기 소제목 "방법" 하에 기재된 바와 같이 정제하였다. 로돕신의 재생 수준을 498nm(발색단을 갖는 옵신)/280nm(전체 옵신)에서의 흡광도의 비로부터 계산하였다. 위. 10월령의 9-시스-R-Ac 처치된 마우스(a) 및 대조 마우스(b)로부터의 정제된 로돕신의 대표적인 흡광도 스펙트럼이 도시되어 있다. 막대는 0.02AU를 나타낸다. 아래. 9-시스-R-Ac 처치군의 재생비는 대조군보다 약간 더 높으며, 이는 처치군이 보다 낮은 수준의 리간드가 없는(유리) 옵신(a)을 가짐을 나타낸다. 평균±S.D.가 나타내어져 있다.

도 3. 강렬한 빛에 이어 완전 암-순응에 노출시킨 9-시스-R-Ac 섭식된 마우스로부터의 눈에서의 레티노이드 수준. (A) 9-시스-R-Ac 처치된 마우스 및 대조 마우스로부터의 레티노이드의 HPLC 분리. 지방산 올-트랜스(all-trans)-레티닐 에스테르가 먼저 용출된 다음(피크 1), syn-11-시스-레티날 옥심(2), syn-올-트랜스-레티날 옥심(3), syn-9-시스-레티날 옥심(4) 및 올-트랜스-레티놀(5)이 용출된다. syn-레티날 옥심은 크로마토그램 상의 부 피크이며, \*는 용매 변화에 관한 스파이크를 나타낸다. 삽입(a), 크로마토그램의 확장된 스케일은 syn-올-트랜스-레티날 및 syn-9-시스-레티날 옥심의 수준에 상응하는 피크 3 및 4를 나타낸다. 이러한 옥심의 온-라인 스펙트럼이 아래에 도시되어 있다(3 및 4). 처치된 마우스 및 대조 마우스로부터의 눈에서의 레티노이드 수준(도 1A)을 HPLC로 분석하였다. 하이드록실아민을 사용한 추출 과정 및 유도체화가 레티날의 회복을 개선시킨다는 것이 하기 소제목 "방법" 하에 기재되어 있다. (B 및 C) 레티날 및 에스테르의 정량. 11-시스-레티날 및 올-트랜스-레티닐 에스테르의 양은 처치된 마우스 및 대조 마우스의 눈에서 유사하였지만, 9-시스-레티날 및 9-시스-레티닐 에스테르는 9-시스-R-Ac 처치된 마우스의 눈에서만 검출되었다( $n = 3$ ,  $P < 0.0001$ ). 다른 비극성 레티노이드의 수준은 9-시스-R-Ac 처치 마우스 및 비처치 마우스 간에 유사하였다. 상당량의 9-시스-레티날(피크 4)이 처치된 마우스로부터의 샘플에서 검출되었다. 평균±S.D.가 나타내어져 있다.

도 4. 대조 마우스 및 장기간 9-시스-R-Ac 처치된 마우스의 ERG 분석. (A) 10월령 마우스의 암순응 및 명순응 ERG 반응(scotopic and photopic ERG response). 9-시스-R-Ac 처치된 마우스의 반응은 명순응 조건하에서의 a-파 진폭(바닥 좌측 패널)을 제외하고는 암순응 및 명순응 조건하에서 상당히 증가하였다( $P < 0.01$ ). (B) 두 가지 상이한 요법에 의한 9-시스-R-Ac로 처치된 14월령 마우스의 암순응 및 명순응 ERG 반응. 암순응 또는 명순응 조건하에서 14월령 마우스의 처치군 및 비처치군 간의 상당한 차이는 관찰되지 않았다. 마우스는 ERG 전에 48시간 동안 암-순응시켰다(도 1C). 암순응(상부 패널) 및 명순응(하부 패널) ERG는 하기 소제목 "방법" 하에 기재된 바와 같이 기록하였다. a-파 및 b-파 진폭은 광 강도의 함수로서 플롯팅하였다. 오차 막대가 나타내어져 있다( $n = 10$ ).

도 5. 강력한 광 표백 후의 대조 마우스 및 장기간 9-시스-R-Ac 처치된 마우스에서의 암 순응의 회복. (A) 강력한 레티날 표백으로부터의 10월령 마우스의 회복. 48시간 암-순응된 마우스의 상이한 그룹을 강한 일정한 조명( $500\text{cd} \cdot \text{m}^{-2}$ )으로 3분 동안 표백하고, a-파 진폭 회복(a-wave amplitude recovery)을 60분의 암 순응 기간의 과정에 걸쳐 단일-플래쉬 ERG( $-0.2 \log \text{cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ )를 기록함으로써 모니터링하였다. 회복률은 10월령에서 대조 마우스(C1)에서보다 처치된 마우스(N1)에서 상당히 더 높았다. 더욱이, 9-시스-R-Ac로의 처치는 4월령 마우스에서 보여지는 수준으로 회복률을 복구하였다. (B) 강력한 레티날 표백으로부터의 14월령 마우스의 회복. 비처치 마우스(C2)에 비해 처치된 마우스(N2 및 N3)에서 상당히 더 높은 회복률이 발생하였다(\*,  $n=5$ ; 각각  $P < 0.01$  및  $P < 0.0001$ ). 다시, 처치된 마우스는 어린 4월령 마우스에서와 동일한 반응을 나타내었다. 오차 막대가 나타내어져 있다( $n = 5$ )

도 6. 대조 마우스 및 장기간 9-시스-R-Ac 처치된 마우스의 눈에서의 A2E 측적. (A) A2E 및 이소-A2E의 크로마토그래피 분리 및 스펙트럼이 도시되어 있다. N1 마우스의 그룹으로부터의 용출된 A2E 및 이소-A2E의 대표적인 HPLC 크로마토그램이 도시되어 있다(A에서 좌측 패널). 삽입. A2E 및 이소-A2E의 확대된 용출 영역이 강조되어 있다. 이러한 피크(I 및 II)의 스펙트럼은 각각 A2E 및 이소-A2E를 나타낸다(상단 우측). (B) 상이한 실험군으로부터의 A2E(검정색 막대) 및 이소-A2E(회색 막대)의 양이 도시되어 있다. A2E의 양은 N3을 제외하고는 모든 그룹에서 상당한 차이가 없었으며, N3의 경우에는 약간 더 낮았다( $P < 0.05$ ). 이소-A2E 수준은 모든 그룹에서 유사하였다. 어린 비처치된 마우스(C0)에서는 어떠한 화합물도 상당한 수준으로 검출되지 않았다. 평균±S.D.가 나타내어져 있다.

도 7. 9-시스-R-Ac 섭식된 마우스에서의 레티날 형태. (A) 4월령의 비처치 마우스(C0)의 대표적인 단면도가 도시되어 있다. RPE, 망막 색소 상피(retinal pigment epithelium); PR, 광수용기(photoreceptor), ROS, 간상세포 외부 구획(rod outer segment); IS, 내부 구획(inner segment); ONL, 외부 핵 층(outer nuclear layer); OPL, 외부 플렉시폼 층(outer plexiform layer); INL, 내부 핵 층(inner nuclear layer); IPL, 내부 플렉시폼 층(inner plexiform layer); 및 GCL, 신경절 세포 층(ganglion cell layer). (B) 10월령 및 14월령에서 대조 마우스 및 처치된 마우스의 ROS 및 IS 두께 및 ONL 핵 수가 도시되어 있다. 데이터 포인트는 시신경두(optic nerve head; ONH)로부터의 거리의 함수로서 플롯팅되어 있다. 어린 대조 마우스(C0)의 ROS 및 IS 길이는 모든 다른 그룹에서보다 상당히 더 커다(\*, n=5; P<0.01). 다른 유의적인 차이는 검출되지 않았다. 평균±S.D.가 나타내어져 있다.

도 8. 대조 마우스 및 장기간 9-시스-R-Ac 처치된 마우스의 RNA 어레이 분석. 마우스의 두 개 그룹인 C2 및 N2의 눈, 간 및 신장으로부터의 37,364개 유전자의 발현 수준을 cDNA 어레이(님블레겐(Nimblegen)에 의해 제공됨)로 실험하였다. 두 개의 독립적인 RNA 샘플을マイ크로어레이 하이브리드화(microarray hybridization)를 위해 제조하였다. mRNA 발현의 정규화된 값을 Sigma Plot v9.0를 사용하여 (대조군 대 각각의 9-시스-R-Ac 처치군, 방법) 산점도(scatter plot)로서 플롯팅하였다. 2.0배 이상 및 0.5배 미만으로 발현된 유전자가 각각 적색 및 청색으로 나타내어져 있다. 부가적인 정보는 추가의 표 S1 및 S2로부터 이용 가능하다. 마우스의 상이한 그룹으로부터의 눈 추출물의 면역블롯(immunoblot)을 하기 소제목 "방법" 하에 기재된 바와 같은 항체로 프로빙하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

본 발명의 방법은 약제학적 유효량의 합성 레티날 유도체의 장기간 투여를 통해 대상체에서 연령-관련 망막 기능장애를 치료 또는 예방하는 것에 관한 것이다.

[0018]

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "연령-관련 망막 기능장애"는 레티날 광수용기 기능에 있어서의 연령-관련 저하를 나타낸다. 상기 용어는 나이든 동물 및 사람 연구 둘 다에서 관찰되는 망막전도 결함(electroretinogram deficit) 및 광수용기 세포사 및 구조 이상과 관련된 연령-관련 손상을 포함하는 것으로 의도된다. 하나의 측면에서, 연령-관련 망막 기능장애는 광 노출 후의 간상세포-매개된 암 순응의 지연, 야간 시력의 저하 및/또는 대비 감도의 저하를 포함한다. 또 다른 측면에서, 연령-관련 망막 기능장애는 연령-관련 황반 변성(AMD)을 포함한다. AMD는 습식 또는 건식 형태일 수 있다.

[0019]

용어 "치료하는", "치료" 등은 일반적으로 목적하는 약리학적 및 생리학적 효과를 수득함을 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 보다 구체적으로, 연령-관련 망막 기능장애를 가진 대상체를 치료하는데 사용되는 본원에 기재된 합성 레티날 유도체는 일반적으로 합성 레티날 유도체를 공급받지 못한 필적하는 시각 시스템과 비교하여 노인 대상체의 시각 시스템에서 연령-관련 망막 기능장애의 개선, 연령-관련 망막 기능장애의 발병 억제를 달성하기 위한 치료학적 유효량으로 제공된다. 연령-관련 망막 기능장애에 있어서의 개선은 합성 레티날 유도체를 공급받지 못한 필적하는 시각 시스템과 비교하여 시각 시스템에 있어서의 광수용기 기능의 장기간(예를 들면, 주 또는 개월로 측정되는 바와 같은) 개선 또는 회복을 포함한다. 개선은 또한 합성 레티날 유도체를 공급받지 못한 필적하는 척추동물 시각 시스템과 비교하여 척추동물 시각 시스템의 안정화 또는 추가의 퇴행의 최소화를 포함한다.

[0020]

용어 "예방하는", "예방" 등은 일반적으로 합성 레티날 유도체를 공급받지 못한 필적하는 시각 시스템과 비교하여 노인 대상체의 시각 시스템의 악화 또는 추가의 악화를 예방하거나 억제함을 의미하는데 사용된다.

[0021]

본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 유효한"은 특정 치료 또는 예방 요법의 유효성을 나타낸다. 약제학적 효능은, 예를 들면, 암-순응의 증가된 또는 안정화된 속도, 보다 높은 또는 안정화된 로돕신/옵신 비, 보다 높은 또는 안정화된 로돕신 재생비 또는 기타의 망막전위도(electrotretinographic; ERG) 반응의 개선과 같은 이러한 특징들을 기초로 하여 측정할 수 있다.

[0022]

본 발명의 방법에서, 합성 레티날 유도체가 대상체에게 투여된다. 본원에서 사용되는 용어 "대상체" 또는 "환자"는 척추동물, 예를 들면, 사람과 같은 포유동물을 나타낸다. 하나의 양태에서, 대상체는 연령-관련 망막 기능장애를 앓고 있는 노화 대상체, 예를 들면, 사람이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 노인 대상체는 전형적으로 45세 이상 또는 50세 이상 또는 60세 이상 또는 65세 이상이다. 대상체는 연령-관련 망막 기능장애를 가짐을 특징으로 하는 노안(aging eye)을 갖는다. 연령-관련 망막 기능장애는 다음의 임상 상태 중의 하나 이상에 의해 나타날 수 있다: 광 노출 후의 간상세포-매개된 암 순응의 손상, 야간 시력의 손상, 대비 감도의 손상

및 연령-관련 황반 변성(AMD).

- [0023] 합성 레티날 유도체는 장기간 (만성) 투여 요법을 사용하여 투여된다. 하나의 양태에서, 합성 레티날 유도체는 3개월 이상 동안, 또 다른 양태에서, 6개월 이상 동안 간헐적으로 투여된다. 합성 레티날 유도체는, 예를 들면, 약 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 12개월 또는 그 이상의 기간 동안 투여될 수 있다. 합성 레티날 유도체는 약 하루에 1회 내지 약 2달에 1회 대상체에게 간헐적으로 투여될 수 있다. 간헐적 투여는 약 2일에 1회; 약 1주일에 4회, 1주일에 3회 및 1주일에 2회; 약 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주 및 9주에 1회; 및 1달에 1회 대상체에게 투여함을 포함한다. 하나의 양태에서, 합성 레티날 유도체는 약 3개월 이상의 기간 동안 약 3주 내지 6주에 1회 투여되고; 또 다른 양태에서, 약 6 내지 10개월 동안 한달에 1회 투여된다.
- [0024] 용량당 투여되는 합성 레티날 유도체의 양은 투여 사이의 기간이 증가함에 따라 증가할 수 있다. 예를 들면, 합성 레티날 유도체가 1일 1회 미만으로 투여되는 경우, 투여당 용량은 1일 유효량보다 클 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "1일 유효량(effective daily dose)"은 목적하는 약리학적 및 생리학적 효과를 수득하는데 효과적인 1일 용량(즉, 상기한 바와 같은 대상체에서 연령 관련 망막 기능장애를 "치료" 및/또는 "예방"하는데 효과적인 1일 용량)을 나타낸다.
- [0025] 또한, 합성 레티날 유도체는 연장된 기간 동안, 예를 들면, 약 3개월 이상의 기간 동안; 또는 약 6개월 이상의 기간 동안 제어된 약물 전달 제형 및/또는 장치로부터 만성적으로 방출될 수 있다. 펌프, 패치, 정제, 임플란트, 마이크로칩 및 중합체 시스템을 포함한 제어 방출을 위한 광범위한 방법들이 개발되고 당해 기술분야의 숙련가들에게 공지되어 있다.
- [0026] 합성 레티날 유도체의 적합한 용량은 임상적 상태, 환자의 상태 및 연령, 활성제, 제형 및 투여 형태, 투여 빈도 등에 따라 좌우될 것이다. 다수의 경우에, 적당한 용량의 선택은 의사 또는 간호사와 같은 적합한 건강관리사의 재량내에 있을 것이다. 점안제의 경우, 합성 레티날 유도체는, 예를 들면, 단일 용량당 약 0.01mg, 약 0.1mg 또는 약 1mg 내지 약 25mg, 약 50mg 또는 약 90mg 투여할 수 있다. 주사의 경우, 적당한 용량은 합성 레티날 유도체 약 0.0001mg, 약 0.001mg, 약 0.01mg 또는 약 0.1mg 내지 약 10mg, 약 25mg, 약 50mg 또는 약 500mg이다. 적합한 경구 용량은 합성 레티날 유도체 약 0.1 내지 약 1000mg에 이른다. 또 다른 양태에서, 용량당 약 1.0 내지 약 300mg의 합성 레티날 유도체가 투여될 수 있다.
- [0027] 특정 양태에서, 용량은 약 0.01 내지 약 10mg/체중kg; 약 0.05 내지 약 7.5mg/체중kg; 약 0.1 내지 약 5mg/체중kg; 또는 약 0.5 내지 약 2.5mg/체중kg의 경구 용량이다. 예를 들면, 합성 레티날 유도체는 약 6.4mg/체중kg(즉, 약 240mg/m<sup>2</sup> 체표면적)의 경구 용량으로 투여될 수 있다. 또 다른 양태에서, 용량은 약 0.1 내지 약 1mg/체중kg의 1일 경구 용량, 예를 들면, 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1mg/체중kg의 1일 경구 용량이다.
- [0028] 본 발명의 방법에 적합한 합성 레티날 유도체가 국제 공개공보 제WO 2004/082622 A2호와 제WO 2006/002097 A2호 및 미국 특허 제2004/0242704 A1호에 기재되어 있다.
- [0029] 본 발명의 방법에 적합한 합성 레티날 유도체는 폴리엔 쇄의 알데히드 그룹이 개질되어 있는 9-시스-레티날 또는 11-시스-레티날의 유도체이다. 합성 레티날 유도체는 레티날 또는 합성 레티날 유사체로 직접 또는 간접적으로 전환될 수 있다. 따라서, 몇몇 측면에서, 본 발명에 따르는 화합물을 프로드럭으로 기재할 수 있으며, 이는 대사적 변형시 9-시스-레티날, 11-시스-레티날 또는 이의 합성 레티날 유사체로 전환된다. 대사적 변형은, 예를 들면, 산 가수분해, 에스테라제 활성, 아세틸트랜스퍼라제 활성, 데하이드로게나제 활성 등에 의해 일어날 수 있다.
- [0030] 합성 레티날 유도체는 내인성 레티노이드의 수준을 보충하는 레티노이드 대체물일 수 있다. 몇몇 양태에서, 합성 레티날은 읍신에 결합되어 읍신 효능제로서 기능할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "효능제"는 읍신에 결합하여 읍신/합성 레티날 복합체가 빛에 반응하는 능력을 촉진시키는 합성 레티날을 나타낸다. 읍신 효능제로서, 합성 레티날은 내인성 레티노이드(예를 들면, 11-시스-레티날)에 대한 필요를 면하게 할 수 있다. 합성 레티날은 또한 읍신에 결합하여 기능적인 읍신/합성 레티날 복합체를 형성하여 읍신/합성 레티날 복합체가 간상세포 또는 원추세포 막의 일부의 경우에 광자에 반응할 수 있도록 함으로써 읍신에 대한 기능(예를 들면, 광수용)을 회복시키거나 개선시킬 수 있다.
- [0031] 합성 레티날 유도체는 광수용기 기능을 회복 또는 안정화시키고/시키거나 레티노이드 수준의 부족의 효과를 개선하기 위해 투여될 수 있다. 광수용기 기능은, 예를 들면, 합성 레티날 유도체를 11-시스-레티노이드 대체물

및/또는 옵신 효능제로서 제공함으로써 회복되거나 안정화될 수 있다. 합성 레티날 유도체는 또한 척추동물 시각 시스템에 있어서의 레티노이드 부족의 효과를 개선시킬 수 있다. 합성 레티날 유도체는 척추동물에게 예방학적으로 또는 치료학적으로 투여될 수 있다. 적합한 척추동물은, 예를 들면, 사람 및 비-사람 척추동물을 포함한다. 적합한 비-사람 척추동물은, 예를 들면, 개, 고양이, 말 및 기타의 가축과 같은 포유동물을 포함한다.

[0032] 본 발명의 하나의 측면에서, 합성 레티날 유도체는, 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 폴리엔 쇄의 알데히드 그룹이 에스테르, 에테르, 알콜, 헤미-아세탈, 아세탈 또는 옥심으로 전환된 9-시스-레티날 또는 11-시스-레티날의 유도체이다. 이러한 합성 레티날 유도체는, 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 9-시스-레티닐 에스테르, 9-시스-레티닐 에테르, 9-시스-레티놀, 9-시스-레티날 옥심, 9-시스-레티닐 아세탈, 9-시스-레티닐 헤미아세탈, 11-시스-레티닐 에스테르, 11-시스-레티닐 에테르, 11-시스-레티놀, 11-시스-레티날 옥심, 11-시스-레티닐 아세탈 및 11-시스-레티닐 헤미아세탈을 포함한다. 합성 레티날 유도체는 대사되어 천연 또는 합성 레티날, 예를 들면, 본원 및 국제 공개공보 제WO 2004/082622 A2호 및 제WO 2006/002097 A2호에 기재된 바와 같은 9-시스-레티날, 11-시스-레티날 또는 이의 합성 레티날 유사체를 방출할 수 있다.

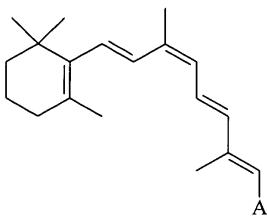
[0033] 하나의 국면에서, 합성 레티날 유도체는 레티닐 에스테르이다. 몇몇 양태에서, 레티닐 에스테르는 a를 갖는 9-시스-레티닐 에스테르 또는 11-시스-레티닐 에스테르이다. 에스테르 치환기는, 예를 들면, 모노- 또는 폴리카복실산과 같은 카복실산일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "폴리카복실산"은 2차, 3차 또는 고차 카복실산이다. 몇몇 양태에서, 카복실산은 C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>22</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> 또는 C<sub>4</sub> 모노카복실산 또는 폴리카복실산이다.

[0034] 적합한 카복실산 그룹은, 예를 들면, 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산, 카프로산, 카프릴산, 펠라르곤산, 카프르산, 라우르산, 올레산, 스테아르산, 팔미트산, 미리스트산 또는 리놀레산을 포함한다. 카복실산은 또한, 예를 들면, 옥살산(에탄디오산), 말론산(프로판디오산), 석신산(부탄디오산), 푸마르산(부텐디오산), 말산(2-하이드록시부텐디오산), 글루타르산(펜탄디오산), 아디프산(헥산디오산), 피멜산(헵탄디오산), 수베르산(옥탄디오산), 아젤라산(노난디오산), 세박산(데칸디오산), 시트르산, 옥살로아세트산, 케토글루타르산 등일 수 있다.

[0035] 예시적인 양태에서, 레티닐 에스테르는 C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> 폴리카복실산 치환기를 포함하는 9-시스-레티닐 에스테르 또는 11-시스-레티닐 에스테르이다. (이러한 문맥에서, 용어 "치환기" 또는 "그룹"은 폴리엔 쇄의 말단 산소에 공유 결합되는 라디칼을 나타낸다.) 또 다른 예시적인 양태에서, 레티닐 에스테르는 C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub> 또는 C<sub>3</sub>-C<sub>22</sub> 폴리카복실산 치환기를 포함하는 9-시스-레티닐 에스테르 또는 11-시스-레티닐 에스테르이다. 폴리카복실산 치환기는, 예를 들면, 석시네이트, 시트레이트, 케토글루타레이트, 푸마레이트, 말레이트 또는 옥살로아세테이트일 수 있다. 또 다른 예시적인 양태에서, 레티닐 에스테르는 C<sub>3</sub>-C<sub>22</sub> 디-카복실산(이산) 치환기를 포함하는 9-시스-레티닐 에스테르 또는 11-시스-레티닐 에스테르이다. 몇몇 양태에서, 폴리카복실산은 9-시스-레티닐 타르타레이트 또는 11-시스-레티닐 타르타레이트가 아니다. 몇몇 양태에서, 레티닐 에스테르는 눈에서 통상적으로 발견되는 천연 레티닐 에스테르가 아니다. 몇몇 양태에서, 레티닐 에스테르는 분리된 레티닐 에스테르이다. 본원에서 사용되는 "분리된"은 이의 천연 환경으로부터 떨어져 존재하므로 천연 생성물이 아닌 분자를 나타낸다. 분리된 분자는 정제된 형태로 존재할 수 있거나 비-천연 환경에서 존재할 수 있다.

[0036] 또 다른 측면에서, 레티날 유도체는 화학식 I의 9-시스-레티닐 에스테르 또는 에테르일 수 있다:

[화학식 I]



[0038] 몇몇 양태에서, A는 CH<sub>2</sub>OR이고, 여기서, R은 레티닐 에스테르를 형성하는 알데히드성 그룹일 수 있다. 적합한 알데히드성 그룹은 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>24</sub> 직쇄 또는 측쇄 알데히드성 그룹이다. 알데히드성 그룹은 또한 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>14</sub> 직쇄

[0039] 몇몇 양태에서, A는 CH<sub>2</sub>OR이고, 여기서, R은 레티닐 에스테르를 형성하는 알데히드성 그룹일 수 있다. 적합한 알데히드성 그룹은 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>24</sub> 직쇄 또는 측쇄 알데히드성 그룹이다. 알데히드성 그룹은 또한 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>14</sub> 직쇄

또는 측쇄 알데히드성 그룹일 수 있다. 알데히드성 그룹 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>12</sub> 직쇄 또는 측쇄 알데히드성 그룹, 예를 들면, 아세트알데히드, 프로피온알데히드, 부티르알데히드, 발레르알데히드, 헥사날, 헵타날, 옥타날, 노나날, 테카날, 운데카날, 도데카날일 수 있다. R은 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 직쇄 또는 측쇄 알데히드성 그룹, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>8</sub> 직쇄 또는 측쇄 알데히드성 그룹 또는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 직쇄 또는 측쇄 알데히드성 그룹일 수 있다.

[0040] R은 추가로 레티닐 에스테르(이의 일부를 레티노일 에스테르라고도 함)를 형성하는 디카복실산 또는 다른 카복실산(예를 들면, 하이드록실 산)의 카복실레이트 그룹일 수 있다. 카복실산은, 예를 들면, 옥살산(에탄디오산), 말론산(프로판디올 산), 석신산(부탄디오산), 푸마르산(부텐디오산), 말산(2-하이드록시부텐디오산), 글루타르산(펜탄디오산), 아디프산(헥산디오산), 피멘산(헵탄디오산), 수베르산(옥탄디오산), 아젤라산(노난디오산), 세박산(데칸디오산), 시트르산, 옥살로아세트산, 케토글루타르산 등일 수 있다.

[0041] R은 또한 레티닐 알칸 에테르를 형성하는 알칸 그룹일 수 있다. 적합한 알칸 그룹은, 예를 들면, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>24</sub> 직쇄 또는 측쇄 알킬, 예를 들면, 메탄, 에탄, 부탄, 이소부탄, 펜탄, 이소펜탄, 헥산, 헵탄, 옥탄 등을 포함한다. 예를 들면, 알칸 그룹은 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub>에 이르는 직쇄, 이소-, 2급-, 3급- 또는 기타의 측쇄 저급 알킬일 수 있다. 알칸 그룹은 또한 C<sub>8</sub> 내지 C<sub>14</sub>에 이르는 직쇄, 이소-, 2급-, 3급- 또는 기타의 측쇄 중쇄 길이 알킬일 수 있다. 알칸 그룹은 또한 C<sub>16</sub> 내지 C<sub>24</sub>에 이르는 직쇄, 이소-, 2급-, 3급- 또는 기타의 측쇄 장쇄 길이 알킬일 수 있다.

[0042] R은 추가로 레티닐 알콜 에테르를 형성하는 알콜 그룹일 수 있다. 적합한 알콜 그룹은 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub>에 이르는 직쇄, 이소-, 2급-, 3급- 또는 기타의 측쇄 저급 알콜, C<sub>8</sub> 내지 C<sub>14</sub>에 이르는 직쇄, 이소-, 2급-, 3급- 또는 기타의 측쇄 중쇄 길이 알콜 또는 C<sub>16</sub> 내지 C<sub>24</sub>에 이르는 직쇄, 이소-, 2급-, 3급- 또는 기타의 측쇄 장쇄 길이 알콜일 수 있다. 알콜 그룹은, 예를 들면, 메탄올, 에탄올, 부탄올, 이소부탄올, 펜탄올, 헥산올, 헵탄올, 옥탄올 등일 수 있다.

[0043] R은 또한 레티닐 카복실산 에테르를 형성하는 카복실산일 수 있다. 적합한 카복실산 그룹은 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub>에 이르는 직쇄, 이소-, 2급-, 3급- 또는 기타의 측쇄 저급 카복실산, C<sub>8</sub> 내지 C<sub>14</sub>에 이르는 직쇄, 이소-, 2급-, 3급- 또는 기타의 측쇄 중쇄 길이 카복실산 또는 C<sub>16</sub> 내지 C<sub>24</sub>에 이르는 직쇄, 이소-, 2급-, 3급- 또는 기타의 측쇄 장쇄 길이 카복실산일 수 있다. 적합한 카복실산 그룹은, 예를 들면, 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산, 카프로산, 카프릴산, 펠라르곤산, 카프르산, 라우르산, 올레산, 스테아르산, 팔미트산, 미리스트산, 리놀레산, 석신산, 푸마르산 등을 포함한다.

[0044] 레티닐 유도체는 레티닐 헤미아세탈일 수 있으며, 여기서, A는 CH(OH)OR이다. R은 화학식 I에서 위에 기재된 R 그룹일 수 있다. R은 전형적으로 본원에 기재된 바와 같은 저급 알칸, 예를 들면, 메틸 또는 에틸 그룹, 또는 헤테로원자를 갖거나 갖지 않는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>7</sub> 포화 또는 불포화, 사이클릭 또는 비사이클릭 알칸이다.

[0045] 레티닐 유도체는 레티닐 아세탈일 수 있으며, 여기서, A는 CH(OR<sub>a</sub>)OR<sub>b</sub>이다. 각각의 R<sub>a</sub> 및 R<sub>b</sub>는 화학식 I에서 위에 기재된 R 그룹으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. R<sub>a</sub> 및 R<sub>b</sub>는 전형적으로 본원에 기재된 바와 같은 헤테로원자를 갖거나 갖지 않는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>7</sub> 포화 또는 불포화, 사이클릭 또는 비사이클릭 알칸이다.

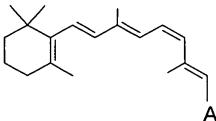
[0046] 레티닐 유도체는 또한 레티닐 옥심일 수 있으며, 여기서, A는 CH:NOH 또는 CH:NOR이다. R은 화학식 I에서 위에 기재된 R 그룹일 수 있다. R은 전형적으로 수소 또는 알칸이다.

[0047] 적합한 합성 레티닐 유도체의 예는, 예를 들면, 9-시스-레티닐 아세테이트, 9-시스-레티닐 포르메이트, 9-시스-레티닐 석시네이트, 9-시스-레티닐 시트레이트, 9-시스-레티닐 케토글루타레이트, 9-시스-레티닐 푸마레이트, 9-시스-레티닐 말레이트, 9-시스-레티닐 옥살로아세테이트, 9-시스-레티닐 옥심, 9-시스-레티닐 0-메틸 옥심, 9-시스-레티닐 0-에틸 옥심 및 9-시스-레티닐 메틸 아세탈 및 헤미아세탈, 9-시스-레티닐 메틸 에테르, 9-시스-레티닐 에틸 에테르 및 9-시스-레티닐 폐닐 에테르를 포함한다.

[0048] 관련 측면에서, 레티닐 유도체는 화학식 II의 11-시스-레티닐 에스테르 또는 에테르일 수 있다:

[0049]

[화학식 II]



[0050]

A는 화학식 I에서 위에 기재된 그룹일 수 있다.

[0052]

적합한 합성 레티날 유도체의 예는, 예를 들면, 11-시스-레티닐 아세테이트, 11-시스-레티닐 포르메이트, 11-시스-레티닐 석시네이트, 11-시스-레티닐 시트레이트, 11-시스-레티닐 캐토글루타레이트, 11-시스-레티닐 푸마레이트, 11-시스-레티닐 말레이트, 11-시스-레티닐 옥심, 11-시스-레티닐 0-메틸 옥심, 11-시스-레티닐 0-에틸 옥심 및 11-시스-레티닐 메틸 아세탈 및 헤미아세탈, 11-시스-레티닐 메틸 에테르, 11-시스-레티닐 에틸 에테르를 포함한다.

[0053]

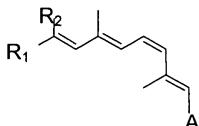
추가의 측면에서, 합성 레티날 유도체는, 예를 들면, 9-시스-레티닐 에스테르, 9-시스-레티닐 에테르, 11-시스-레티닐 에스테르 또는 11-시스-레티닐 에테르의 유도체, 예를 들면, 비사이클릭 레티닐 에스테르 또는 에테르, 개질된 폴리엔 쇄 길이를 갖는 레티닐 에스테르 또는 에테르, 예를 들면, 트리엔산 또는 테트라엔산 레티닐 에스테르 또는 에테르; 치환된 폴리엔 쇄, 예를 들면, 알킬, 할로겐 또는 헤테로원자-치환된 폴리엔 쇄를 갖는 레티닐 에스테르 또는 에테르; 개질된 폴리엔 쇄, 예를 들면, 트랜스- 또는 시스-고정된(locked) 폴리엔 쇄를 갖거나, 예를 들면, 알렌 또는 알킨 개질을 갖는 레티닐 에스테르 또는 에테르; 및 환 개질(들), 예를 들면, 헤테로사이클릭, 헤테로방향족 또는 치환된 사이클로알кан 또는 사이클로알켄 환을 갖는 레티닐 에스테르 또는 에테르일 수 있다.

[0054]

합성 레티날 유도체는 화학식 III의 레티닐 에스테르 또는 에테르일 수 있다:

[0055]

[화학식 III]



[0056]

A는 화학식 I에서 위에 기재된 그룹일 수 있다. R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 직쇄, 이소-, 2급-, 3급- 및 기타의 측쇄 알킬 그룹 뿐만 아니라 치환된 알킬 그룹, 치환된 측쇄 알킬, 하이드록실, 하이드로알킬, 아민, 아미드 등으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 독립적으로 저급 알킬일 수 있으며, 이것은 1 내지 6개의 탄소원자(들)를 갖는 직쇄 또는 측쇄 알킬, 예를 들면, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 3급-부틸, 펜틸, 헥실 등을 의미한다. 적합한 치환된 알킬 및 치환된 측쇄 알킬은, 예를 들면, 산소, 하이드록실, 질소, 아미드, 아민, 할로겐, 헤테로원자 또는 기타의 그룹으로 치환된 알킬, 측쇄 알킬 및 사이클로-알킬을 포함한다. 적합한 헤테로원자는, 예를 들면, 황, 규소 및 플루오로- 또는 브로모-치환을 포함한다.

[0058]

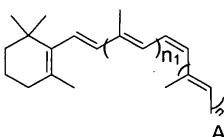
R<sub>1</sub> 또는 R<sub>2</sub>는 또한 사이클로-알킬, 예를 들면, 헥산, 사이클로헥센, 벤젠 뿐만 아니라 치환된 사이클로-알킬일 수 있다. 적합한 치환된 사이클로-알킬은, 예를 들면, 산소, 하이드록실, 질소, 아미드, 아민, 할로겐, 헤테로원자 및/또는 기타의 그룹으로 치환된 사이클로-알킬을 포함한다. 적합한 헤테로원자는, 예를 들면, 황, 규소 및 플루오로- 또는 브로모-치환을 포함한다.

[0059]

합성 레티날 유도체는 또한 화학식 IV와 같은 개질된 폴리엔 쇄 길이를 가질 수 있다:

[0060]

[화학식 IV]



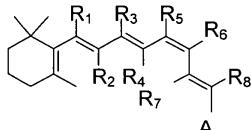
[0061]

A는 화학식 I에서 위에 기재된 그룹일 수 있다. 폴리엔 쇄 길이는 1, 2 또는 3개의 알킬, 알켄 또는 알킬렌 그

룹에 의해 연장될 수 있다. 화학식 IV에 따르면, 각각의  $n$  및  $n_1$ 은 1, 2 또는 3개의 알킬, 알켄 또는 알킬렌 그룹으로부터 독립적으로 선택될 수 있고, 단  $n$  및  $n_1$ 의 합계는 적어도 1이다.

[0063] 합성 레티날 유도체는 또한 화학식 V의 치환된 폴리엔 쇄를 가질 수 있다:

[화학식 V]



[0065]

A는 화학식 I에서 위에 기재된 그룹일 수 있다. 각각의  $R_1$  내지  $R_8$ 은 수소, 알킬, 측쇄 알킬, 사이클로-알킬, 할로겐, 헤테로원자 등으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 적합한 알킬은, 예를 들면, 메틸, 에틸, 프로필, 치환된 알킬(예를 들면, 하이드록실, 하이드로알킬, 아민, 아미드를 갖는 알킬) 등을 포함한다. 적합한 측쇄 알킬은, 예를 들면, 이소프로필, 이소부틸, 치환된 측쇄 알킬 등일 수 있다. 적합한 사이클로-알킬은, 예를 들면, 사이클로헥산, 사이클로헵탄 및 기타의 사이클릭 알칸 뿐만 아니라 치환된 사이클릭 알칸, 예를 들면, 치환된 사이클로헥산 또는 치환된 사이클로헵탄을 포함할 수 있다. 적합한 할로겐은, 예를 들면, 브롬, 염소, 불소 등을 포함한다. 적합한 헤테로원자는, 예를 들면, 황, 규소 및 플루오로- 또는 브로모-치환을 포함한다. 적합한 치환된 알킬, 치환된 측쇄 알킬 및 치환된 사이클로-알킬은, 예를 들면, 산소, 하이드록실, 질소, 아미드, 아민, 할로겐, 헤테로원자 또는 기타의 그룹으로 치환된 알킬, 측쇄 알킬 및 사이클로-알킬을 포함한다.

[0067]

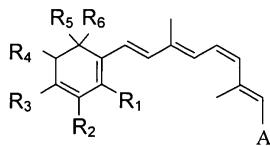
예를 들면, 합성 레티날 유도체는 다음으로부터 선택될 수 있다: 9-에틸-11-시스-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 7-메틸-11-시스-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 13-데스메틸-11-시스-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 11-시스-10-F-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 11-시스-10-C1-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 11-시스-10-메틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 11-시스-10-에틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-10-F-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-10-메틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-10-C1-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-10-에틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 11-시스-12-C1-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 11-시스-12-F-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-12-메틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-12-에틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-12-C1-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-12-F-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-12-메틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 11-시스-14-메틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 11-시스-14-에틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-14-F-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 11-시스-14-에틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-14-메틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-14-에틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-14-메틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈; 9-시스-14-에틸-레티닐 에스테르, 에테르, 옥심, 아세탈 또는 헤미아세탈 등.

[0068]

합성 레티날 유도체는 개질된 환 구조를 추가로 가질 수 있다. 적합한 예는, 예를 들면, 각각 화학식 VI, VII 및 VIII의 환 개질을 함유하는 유도체, 방향족 유사체 및 헤테로방향족 유사체를 포함한다.

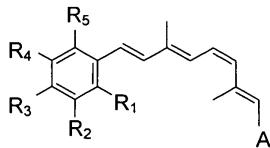
[0069]

[화학식 VI]

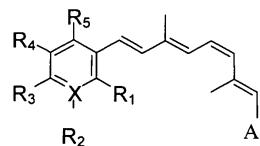


[0070]

[0071] [화학식 VII]



[0073] [화학식 VIII]



[0072]

[0074]

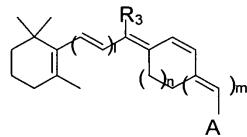
[0075] A는 화학식 I에서 위에 기재된 그룹일 수 있다. 각각의 R<sub>1</sub> 내지 R<sub>6</sub>은, 적용될 수 있는 바와 같이, 수소, 알킬, 치환된 알킬, 하이드록실, 하이드로알킬, 아민, 아미드, 할로겐, 헤테로원자 등으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 적합한 알킬은, 예를 들면, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸 등을 포함한다. 적합한 할로겐은, 예를 들면, 브롬, 염소, 불소 등을 포함한다. 적합한 헤테로원자는, 예를 들면, 황, 규소 또는 질소를 포함한다. 화학식 VII에서, X는, 예를 들면, 황, 규소, 질소, 플루오로- 또는 브로모-치환일 수 있다. 유사하게, 화학식 VI, VII 및 VIII에 도시된 것의 환 개질을 함유하는 9-시스 합성 레티날 유도체, 방향족 유사체 및 헤테로방향족 유사체가 고려된다.

[0076]

합성 레티날 유도체는 또한 개질된 폴리엔 쇄를 가질 수 있다. 적합한 유도체는, 예를 들면, 트랜스/시스 고정 배위를 갖는 것, 6s-고정된 유사체 뿐만 아니라 폴리엔 쇄에서의 개질된 알렌, 알켄, 알린 또는 알킬렌 그룹을 포함한다. 하나의 예에서, 유도체는 화학식 IX의 11-시스-고정된 유사체이다:

[0077]

[화학식 IX]



[0078]

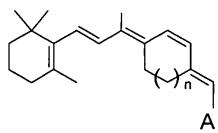
[0079] A는 화학식 I에서 위에 기재된 그룹일 수 있다. R<sub>3</sub>은, 예를 들면, 수소, 메틸 또는 기타의 저급 알칸 또는 측쇄 알칸일 수 있다. n은 0 내지 4일 수 있다. m + 1은 1, 2 또는 3이다.

[0080]

하나의 양태에서, 합성 레티날 유도체는 화학식 X의 11-시스-고정된 유사체일 수 있다:

[0081]

[화학식 X]



[0082]

[0083] n은 1 내지 4일 수 있다. A는 화학식 I에서 위에 기재된 그룹일 수 있다.

[0084]

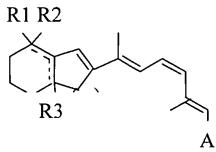
합성 레티날 유도체는 9,11,13-트리-시스-7-환 레티닐 에스테르 또는 에테르, 11,13-디-시스-7-환 레티닐 에스테르 또는 에테르, 11-시스-7-환 레티닐 에스테르 또는 에테르 또는 9,11-디-시스-7-환 레티닐 에스테르 또는 에테르이다.

[0085]

또 다른 예에서, 합성 레티날 유도체는 화학식 XI의 6s-고정된 유사체이다. A는 화학식 I에서 위에 기재된 그룹일 수 있다. R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 수소, 메틸 및 기타의 저급 알킬 및 치환된 저급 알킬로부터 독립적으로 선택될 수 있다. R<sub>3</sub>은 나타낸 위치 중의 어느 하나에서 알켄 그룹으로부터 독립적으로 선택될 수 있다.

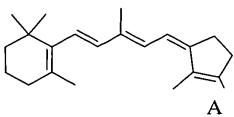
[0086]

[화학식 XI]



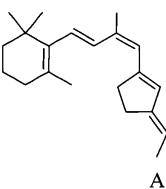
[0087]

[화학식 XII]



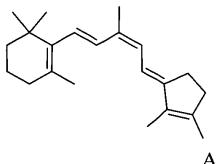
[0089]

[화학식 XIII]



[0091]

[화학식 XIV]



[0093]

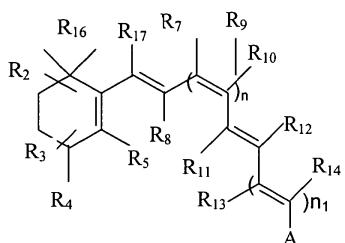
[0094] 합성 레티날 유도체는 9-시스-환-응합된 유도체, 예를 들면, 화학식 XII 내지 XIV에 도시된 것일 수 있다. A는 화학식 I에서 위에 기재된 그룹일 수 있다.

[0095]

[0095] 합성 레티날 유도체는 또한 화학식 XV 또는 화학식 XVI의 화합물일 수 있다.

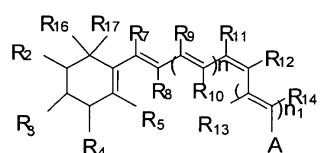
[0096]

[화학식 XV]



[0097]

[화학식 XVI]



[0099]

[0100] A는 화학식 I에서 위에 기재된 그룹일 수 있다. 각각의 R<sub>2</sub> 내지 R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub> 내지 R<sub>14</sub>, R<sub>16</sub> 및 R<sub>17</sub>은 부재하거나, 수소, 알킬, 측쇄 알킬, 할로겐, 하이드록실, 하이드로알킬, 아민, 아미드, 헤테로원자 등으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 적합한 알킬은, 예를 들면, 메틸, 에틸, 프로필, 치환된 알킬(예를 들면, 하이드록실, 하이드로알킬, 아민, 아미드를 갖는 알킬) 등을 포함한다. 적합한 측쇄 알킬은, 예를 들면, 이소프로필, 이소부틸, 치환된 측쇄 알킬 등을 있다. 적합한 할로겐은, 예를 들면, 브롬, 염소, 불소 등을 포함한다. 적합한 헤테로원자는, 예를 들면, 황, 규소 및 플루오로- 또는 브로모-치환을 포함한다. 적합한 치환된 알킬 및 치환된 측

쇄 알킬은, 예를 들면, 산소, 하이드록실, 질소, 아미드, 아민, 할로젠, 헤테로원자 또는 기타의 그룹으로 치환된 알킬 및 측쇄 알킬을 포함한다. 각각의  $n$  및  $n_1$ 은 1, 2 또는 3개의 알킬, 알켄 또는 알킬렌 그룹으로부터 독립적으로 선택될 수 있으며, 단  $n$  및  $n_1$ 의 합계는 적어도 1이다. 또한,  $R_3-R_4$  및/또는  $R_2-R_{16}$ 은 사이클릭 탄소 환에 알켄 그룹을 포함할 수 있으며, 이 경우  $R_{17}$ 은 부재한다.  $R_{10}$  및  $R_{13}$ 은 함께 사이클로-알킬, 예를 들면, 5 원, 6원, 7원 또는 8원 사이클로-알킬 또는 치환된 사이클로-알킬, 예를 들면, 화학식 IX, X, XII, XIII 및 XIV에 도시된 것을 형성할 수 있다.

[0101]

합성 레티날 및 유도체의 제조방법은, 예를 들면, 다음의 참고문헌에 기재되어 있다: Anal. Biochem. 272:232-42 (1999); Angew. Chem. 36:2089-93 (1997); Biochemistry 14:3933-41 (1975); Biochemistry 21:384-93 (1982); Biochemistry 28:2732-39 (1989); Biochemistry 33:408-16 (1994); Biochemistry 35:6257-62 (1996); Bioorganic Chemistry 27:372-82 (1999); Biophys. Chem. 56:31-39 (1995); Biophys. J. 56:1259-65 (1989); Biophys. J. 83:3460-69 (2002); Chemistry 7:4198-204 (2001); Chemistry (Europe) 5:1172-75 (1999); FEBS 158:1 (1983); J. Am. Chem. Soc. 104:3214-16 (1982); J. Am. Chem. Soc. 108:6077-78 (1986); J. Am. Chem. Soc. 109:6163 (1987); J. Am. Chem. Soc. 112:7779-82 (1990); J. Am. Chem. Soc. 119:5758-59 (1997); J. Am. Chem. Soc. 121:5803-04 (1999); J. American Chem. Soc. 123:10024-29 (2001); J. American Chem. Soc. 124:7294-302 (2002); J. Biol. Chem. 276:26148-53 (2001); J. Biol. Chem. 277:42315-24 (2004); J. Chem. Soc. - Perkin T. 1:1773-77 (1997); J. Chem. Soc. - Perkin T. 1:2430-39 (2001); J. Org. Chem. 49:649-52 (1984); J. Org. Chem. 58:3533-37 (1993); J. Physical Chemistry B 102:2787-806 (1998); Lipids 8:558-65; Photochem. Photobiol. 13:259-83 (1986); Photochem. Photobiol. 44:803-07 (1986); Photochem. Photobiol. 54:969-76 (1991); Photochem. Photobiol. 60:64-68 (1994); Photochem. Photobiol. 65:1047-55 (1991); Photochem. Photobiol. 70: 111-15 (2002); Photochem. Photobiol. 76:606-615 (2002); Proc. Natl Acad. Sci. USA 88:9412-16 (1991); Proc. Natl Acad. Sci. USA 90:4072-76 (1993); Proc. Natl Acad. Sci. USA 94:13442-47 (1997); 및 Proc. R. Soc. Lond. Series B, Biol. Sci. 233(1270): 55-76 1988)(이의 기재내용은 본원에 참고로 인용되어 있다).

[0102]

레티닐 에스테르는 당업계에 공지된 방법에 의해, 예를 들면, 카복실산을 사용한 레티놀의 산-촉매된 에스테르화, 아실 할라이드와 레티놀과의 반응, 카복실산을 사용한 레티닐 에스테르의 에스테르 교환 반응, 1급 할라이드와 레티노산의 카복실레이트 염의 반응, 무수물과 레티놀과의 산-촉매된 반응 등에 의해 형성될 수 있다. 하나의 예에서, 레티닐 에스테르는 카복실산, 예를 들면, 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산, 카프로산, 카프릴산, 펠라르곤산, 카프르산, 라우르산, 올레산, 스테아르산, 팔미트산, 미리스트산, 리놀레산, 석신산, 푸마르산 등을 사용한 레티놀의 산-촉매된 에스테르화에 의해 형성될 수 있다. 또 다른 예에서, 레티닐 에스테르는 아실 할라이드와 레티놀과의 반응에 의해 형성될 수 있다[문헌 참조; Van Hooser et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:8623-28 (2000)]. 적합한 아실 할라이드는, 예를 들면, 아세틸 클로라이드, 팔미토일 클로라이드 등을 포함한다.

[0103]

레티닐 에테르는 당업계에 공지된 방법, 예를 들면, 레티놀과 1급 알킬 할라이드와의 반응에 의해 형성될 수 있다.

[0104]

트랜스-레티노이드는 UV 광에 노출시킴으로써 시스-레티노이드로 이성체화될 수 있다. 예를 들면, 올-트랜스-레티날, 올-트랜스-레티놀, 올-트랜스-레티닐 에스테르 또는 올-트랜스-레티노산은 각각 9-시스-레티날, 9-시스-레티놀, 9-시스-레티닐 에스테르 또는 9-시스-레티노산으로 이성체화될 수 있다. 트랜스-레티노이드는, 예를 들면, 약 365nm의 파장을 갖고 본원에 추가로 기재된 바와 같이 시스-레티노이드의 분해를 야기하는 보다 짧은 파장이 실질적으로 없는 UV 광에 노출시킴으로써 9-시스-레티노이드로 이성체화될 수 있다.

[0105]

레티닐 아세탈 및 헤미아세탈은, 예를 들면, 9-시스- 및 11-시스-레티날을 산 촉매의 존재하에서 알콜로 쳐치함으로써 제조할 수 있다. 반응 동안 형성된 물은, 예를 들면, 분자체의  $Al_2O_3$ 에 의해 제거된다.

[0106]

레티닐 옥심은, 예를 들면, 레티날과 하이드록실아민, 0-메틸- 또는 0-에틸하이드록실 아민 등과의 반응에 의해 제조할 수 있다.

[0107]

합성 레티날 유도체는 약 5% 미만 또는 약 1% 미만 또는 약 0.1% 미만의 다른 레티노이드를 함유한다는 점에서 실질적으로 순수할 수 있다. 합성 레티날 유도체의 배합물을 투여할 수 있다.

[0108]

합성 레티날 유도체는, 예를 들면, 경구, 정맥내, 근육내 또는 국소 투여를 포함한 모든 적합한 수단에 의해 눈

에 전달될 수 있다. 국소 투여모드는, 예를 들면, 점안제, 안구내 주사 또는 안구주위 주사(periocular injection) 또는 제어 방출 약물 전달 제형 및/또는 장치를 통한 전달을 포함할 수 있다. 안구주위 주사는 전형적으로 합성 레티날 유도체를 결막 또는 테논(tenon)(눈 위에 있는 섬유성 조직)으로 주사함을 포함한다. 안구내 주사는 전형적으로 합성 레티날 유도체를 유리체로 주사함을 포함한다. 투여는, 예를 들면, 점안제 또는 경구 투여 형태에 의해 비침습적(noninvasive)일 수 있다.

[0109] 합성 레티날 유도체는, 예를 들면, 눈으로의 국소 투여용 및/또는 정맥내, 근육내 또는 경구 투여용 약제학적 조성물로서 제형화될 수 있다.

[0110] 합성 레티날 유도체는 약제학적으로 허용되는 비히클 뿐만 아니라 당업계에서 통상적으로 사용되는 기술을 사용하여 투여를 위해 제형화할 수 있다. 비히클은 합성 레티날 유도체의 용해도에 따라 선택할 수 있다. 적합한 약제학적 조성물은, 예를 들면, 점안제, 주사 등에 의해 눈에 국소적으로 투여되는 것들을 포함한다. 점안제의 경우에, 제형은 또한, 예를 들면, 안과적으로 상용성인 제제, 예를 들면, 염화나트륨, 진한 글리세린 등과 같은 등장화제; 인산나트륨, 아세트산나트륨 등과 같은 완충제; 폴리옥시에틸렌 소르비탄-모노-올레아이트(폴리소르베이트 80이라고도 함), 폴리옥실 스테아레이트 40, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유 등과 같은 계면활성제; 시트르산나트륨, 에데트산나트륨 등과 같은 안정화제; 벤즈알코늄 클로라이드, 파라벤 등과 같은 방부제; 및 기타의 성분을 임의로 포함할 수 있다. 방부제는, 예를 들면, 약 0.001 내지 약 1.0% 중량/용적의 수준으로 사용될 수 있다. 제형의 pH는 통상적으로 안과 제형에 허용 가능한 범위내, 예를 들면, 약 pH 4 내지 8의 범위내이다.

[0111] 적합한 약제학적 조성물은 또한 주사용으로 제형화된 것들을 포함한다. 예를 들면, 합성 레티날 유도체는 주사 등급 식염수, 주사 가능한 리포솜 용액 또는 기타의 담체 또는 비히클 형태로 제공될 수 있다. 안구내 및 안구주위 주사는 당업계의 숙련가들에게 공지되어 있으며, 예를 들면, 문헌[Ophthalmic Surgery: Principles of Practice, Ed., G. L. Spaeth, W. B. Sanders Co., Philadelphia, Pa., U.S.A., pages 85-87 (1990)]을 포함한 다수의 공보에 기재되어 있다.

[0112] 합성 레티날 유도체는 또한 지속 방출(time release) 제형 및/또는 장치로, 예를 들면, 서방출 중합체를 포함하는 조성물로 투여될 수 있다. 합성 레티날 유도체는 속방성(rapid release)으로부터 화합물을 보호하는 담체(들), 예를 들면, 임플란트 및 미세캡슐화 전달 시스템을 포함한 제어 방출 제형으로 제조할 수 있다. 에틸렌비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 폴리락트산, 폴리글리콜산 공중합체(polylactic, polyglycolic copolymer; PLG)와 같은 생분해성의 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 이러한 제형을 제조하기 위한 다수의 방법이 당업계의 숙련가들에게 공지되어 있다.

[0113] 적합한 경구 투여 형태는, 예를 들면, 정제, 환제, 사제제, 또는 경질 또는 연질 젤라틴, 메틸셀룰로즈 또는 소화관에서 용이하게 용해되는 기타의 적합한 물질의 캡슐을 포함한다. 예를 들면, 약제학적 등급의 만니톨, 락토즈, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 텔콤, 셀룰로즈, 글루코즈, 수크로즈, 마그네슘 카보네이트 등을 포함한 적합한 비독성 고체 담체가 사용될 수 있다[문헌 참조; Remington "Pharmaceutical Sciences", 17 Ed., Gennaro (ed.), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1985)].

[0114] 하기 실시예가 단지 본 발명의 다양한 측면의 예시로서 제공되어 있으며, 어떠한 방식으로든 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0115] 6. 실시예

[0116] 결과

[0117] 서론

[0118] 9-시스-R-Ac의 단일 용량 및 장기간 1달에 1회 용량 요법 둘 다를 사용하여 마우스의 시작 기능에 미치는 인공발색단 증가의 효과를 평가하였다. 사용되는 발색단은, 9-시스-레티날로 대사되고 전환되어 이소로돕신을 형성하는 프로드럭인 9-시스-R-Ac이었다[문헌 참조; Batten, M. L., et al. PLoS medicine 2, e333 (2005)]. 단일 용량 실험(도 1A, 표 1)에는 20마리의 마우스를 사용하는 반면, 장기간 한달에 1회 처치(도 1A, 1B, 표 1)시에는 210마리를 사용하였다. 마우스에게 올-트랜스-R-Ac( $n = 10$ )를 또한 섭식시키고, 이의 장기간 효과를 선택된 분석법으로 평가하였다.

[0119] 약어

[0120] 9-시스-R-Ac, 9-시스-레티닐 아세테이트; A2E, N-레티닐리덴-N-레티닐 에탄올아민; ERG, 망막전도; LRAT, 레시틴:레티놀 아실트랜스퍼라제; ROS, 간상세포 외부 구획; RPE, 망막 색소 상피; RPE65, RPE-특이적 65kDa 단백질.

[0121] 실시예 1. 9-시스-R-Ac로의 C57BL/6 암컷 마우스의 단일 용량 처치

[0122] 48시간 암-순응된 10월령 마우스에게 단일 용량(약 80mg/체중kg)의 9-시스-R-Ac 또는 대조 비히클을 섭식시키고, 20분 동안 강한 조명에 노출시켰다(약 90% 로돕신을 표백시키는  $500\text{cd} \cdot \text{m}^{-2}$ ). 그후, 마우스를 16시간 동안 암-순응시킨 다음 각종 분석을 수행하였다(도 1A). 처치된 마우스 및 비처치된 마우스에서 수행된 단일-플래쉬 ERG 결과, 처치된 마우스의 기능적 a- 및 b-파 진폭이, 대조 마우스에서의 진폭에 비해 약간 증가한 것으로 나타났다(a-파,  $P<0.01$ ; 데이터는 나타나 있지 않음). 9-시스-레티날이 이소로돕신을 형성하는데 사용되었는지를 조사하고, 마우스 눈에 리간드가 없는 옵신이 얼마나 많이 존재하는지를 평가하기 위해, 로돕신, 이소로돕신 및 옵신을 마우스의 처치군 및 대조군으로부터 면역친화 크로마토그래피(immunoaffinity chromatography)로 정제하였다. 로돕신의 재생비는 각 분획에서 정제된 단백질(280nm에서의 흡광도)에 대한 로돕신 및 이소로돕신(498nm에서의 흡광도)의 비에 의해 계산되며, 대조 마우스로부터의 눈에서보다 처치된 마우스로부터의 눈에서 상당히 더 높은 반면, 정제된 단백질의 총량은 상당한 차이가 없었다(도 2). 레티노이드를 정제된 단백질로부터 추출하여 결합된 발색단을 확인하는 경우, 상당량의 9-시스-레티날이 처치된 마우스로부터의 샘플에서 검출되는데, 이것은 9-시스-레티날이 옵신을 재생하여 이소로돕신을 형성하는데 사용되었음을 시사한다(데이터는 나타나 있지 않음). 강렬한 빛에 노출된 처치된 마우스의 눈에서는 상당량의 9-시스-레티날이 검출되는 반면(도 3A 및 3B), 11-시스-레티날 및 올-트랜스-레티닐 에스테르의 양은 모든 그룹의 마우스에서 상당한 영향을 미치지 않았다(도 3B 및 3C). 이러한 강렬한 빛에 노출된 처치된 마우스에서는, RPE는 또한 레티날의 전구체인 상당량의 9-시스-레티닐 에스테르를 저장하였다(도 3C). 대조 마우스 눈 및 비표백 처치된 마우스 눈에서는 단지 미량의 9-시스-레티날이 검출되었다(도 3B 및 C). 이러한 결과는 9-시스-R-Ac가 야생형 C57BL/6 암컷 마우스에서 이의 에스테르로 대사되어 기능성 9-시스-레티날을 형성함을 명확히 입증한다. 표백 후, 9-시스-레티날은 11-시스-레티날을 생성하여 로돕신을 재생시키는 기능성 레티노이드 사이클의 존재하에서도 옵신에 결합된다. 비-표백되거나 표백된 및 암-순응된 비처치된 마우스로부터의 눈은 소량의 유리 옵신을 함유하였다.

[0123] 실시예 2. 9-시스-R-Ac로의 C57BL/6 암컷 마우스의 장기간 처치

[0124] 장기간 연구를 위해(도 1B 및 1C), C57BL6 암컷 마우스에게 9-시스-R-Ac, 올-트랜스-R-Ac 또는 대조 비히클을 6개월 또는 10개월 동안 한달에 1회 섭식시켰다.

[0125] 실시예 3. 단일 플래쉬 ERG 분석

[0126] 장기간 9-시스-R-Ac 처치 후의 간상세포- 및 원추세포-매개된 광 반응의 효과를 평가하기 위해, 마우스를 비침습성 ERG 방법으로 실험하였다. 제1 세트의 분석은 4월령 및 10월령에서 수행하였다. 암순응 조건 하에서, a-파의 진폭은 특히 높은 플래쉬 강도에서 연령에 따라 감소하는 반면(C1 대 C0 그룹, 도 4A, 좌측 상부 패널), b-파의 변화는 덜 분명하였다(도 4A, 우측 상부 패널). 명순응 조건 하에서, a-파 또는 b-파에 대한 차이는 관찰되지 않았다(도 4A, 하부 패널). 처치군 및 비처치군을 비교하는 경우(N1 대 C1), 명순응 조건 하에서의 a-파를 제외하고는 명순응 및 암순응 조건 둘 다 하에서 높은 플래쉬 강도에서 a-파 또는 b-파에 대해 N1 그룹에서 약간의 개선이 관찰되었다( $p < 0.01$ , 일원배치 ANOVA)(도 4A, 좌측 하부 패널).

[0127] 제2 세트의 분석은 14월령에서 수행하였다. 암순응 또는 명순응 조건 하에서 마우스의 대조군(C2) 및 처치군(N2 및 N3) 간의 a-파 및 b-파 진폭에 있어서 상당한 차이는 발견되지 않았다(도 4B). 암-순응된 마우스에서의 a-파 최대 반응으로부터, 감도 및 최대 a-파 진폭을 추정하였으며, 이러한 파라미터는 상당한 차이가 없는 것으로 나타났다(데이터는 나타나 있지 않음).

[0128] 실시예 4. 암 순응에 있어서의 변화

[0129] 표백 후의 ERG 반응(암 순응)의 회복은 강한 일정한 조명( $500\text{cd} \cdot \text{m}^{-2}$ , 약 90% 표백된 로돕신)에 3분 동안 레티날을 노출시킨 후의 a-파의 진폭을 모니터링함으로써 측정하였다. 반응의 회복은 10월령(N1 대 C1, 도 5A) 및 14월령(N2 및 N3 대 C2, 도 5B) 둘 다에서 대조군의 마우스와 비교하여 9-시스-R-Ac 처치군에서 상당히 더 빨랐다 ( $p < 0.001$ , 일원배치 ANOVA). 각 그룹의 눈에서의 레티노이드 동력학은 4개의 연속적인 암 순응 시점(0분, 10분, 30분 및 60분)에서 3분의 표백 후 60분의 암 순응 동안 정량적으로 평가하였다. 10월령에서, 처치군(N1)에서의 11-시스-레티날의 재생 수준은 표백한지 60분 후 대조군(C1)에서보다 상당히 더 높았다( $p < 0.01$ ). 그러나, 이를 그룹 간에 그리고 14월령의 처치된 마우스 및 비처치된 마우스 간에 올-트랜스-레티날 및 올-트랜스-레티닐-에스테르의 동력학에 있어서는 상당한 차이가 없었다. 9-시스-레티날 및 9-시스-레티닐 에스테르는 비처치군으로부터의 눈에서는 발견되지 않았다(데이터는 나타나 있지 않음).

[0130] 실시예 5. 시각 기능에 미치는 올-트랜스-R-Ac의 장기간 투여의 효과

[0131] 추가의 대조 실험에서, 마우스에게 불활성 이성체, 올-트랜스-R-Ac( $n = 10$ )를 10개월 동안 섭식시켜 14월령에서 평가하였다. ERG 실험 결과, 단일 플래쉬 ERG a-파 및 b-파 분석 또는 암 순응 회복에 있어서 대조군(C2)과 비교하여 상당한 차이를 나타내지는 않았다( $n = 3$ ). 이러한 결과는 ERG 효과가 9-시스 이성체에 대해 특이적임을 보여주었다.

[0132] 실시예 6. 대조 마우스 및 9-시스-R-Ac 처치된 마우스에서의 로돕신, A2E 및 레티노이드 산의 분석

[0133] 재생비(로돕신/옵신) 및 정제된 로돕신의 총량은 10월령 및 14월령 둘 다에서 대조군 및 처치군 마우스 간에 상당한 차이를 나타내지 않았다. 14월령의 처치군(N2 및 N3)으로부터 회수된 정제된 단백질의 양은 대조 마우스(C2)로부터의 것보다 상당히 낮은 반면, 10월령의 처치된 마우스에서는 양이 단지 약간 감소하였다(N1 대 C1) (데이터는 나타나 있지 않음).

[0134] 9-시스-R-Ac의 장기간 투여의 안전성을 평가하기 위해, A2E 축적을 평가하였는데(도 6A), 그 이유는 레티날이 자발적으로 이 화합물로 응축되기 때문이다[문헌 참조; Mata, N.L., Weng, J. & Travis, G.H. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 7154-7159 (2000); Parish, C. A., Hashimoto, M., Nakanishi, K., Dillon, J. & Sparrow, J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 14609-14613 (1998)]. A2E 및 이소-A2E는 10월령 및 14월령 둘 다에서 처치된 마우스 및 대조 마우스에서 유사한 수준으로 검출되었다(도 6B). 전처치 대조군(C0, 4월령)에서, A2E 축적은 검출 가능한 수준 이하였다(도 6B). 레티닐 에스테르로의 장기간 처치가 간에서 증가된 수준의 유사분열촉진(mitogenic) 레티노산을 생성할 수 있지만, 간 레티노이드-산 수준은 모든 그룹에서 검출 가능한 수준 이하였다(데이터는 나타나 있지 않음).

[0135] 실시예 7. 9-시스-R-Ac 처치된 마우스로부터의 망막의 허스밴드리(husbandry) 및 형태학

[0136] 동물을 활동 및 외피 및 피부 외관에 있어서의 변화에 대해 1주일에 1회 평가하였다. 자연 노화로 인한 기간을 제외한 시험 기간 동안 이러한 파라미터에 있어서의 변화는 관찰되지 않았다. 처치전, 10개월째 및 14개월째에 평가한 마우스의 체중은 대조군(C1-2) 및 처치군(N1-3) 간에 상당한 차이를 보이지 않았다(데이터는 나타나 있지 않음).

[0137] 광학 현미경 검사 결과, 10월령 및 14월령의 비히클, 9-시스-R-Ac 또는 올-트랜스-R-Ac( $n = 2$ ) 처치된 마우스의 망막 및 이러한 두 개의 9-시스-R-Ac 처치군으로부터의 망막에 있어서의 주요 이상을 분간하기 어려운 것으로 나타났다. 간상세포 외부 구획(ROS)의 길이는 10월령 및 14월령에서 대조군 및 처치군에서 유사하였지만(도 7B;  $n = 5$ ), 도 7A에 조직구조가 도시되어 있는 4월령 마우스(C0)의 ROS 길이와 비교해서는 상당히 감소하였다. 망막에 있어서의 각각의 주요 층의 두께 또한 대조군과 처치군 간에 유사하였다. 외부 망막 및 RPE 층의 EM 분석 결과, 대조 마우스와 처치된 마우스 간에 총체적인 차이가 없는 것으로 나타났다. RPE 및 ROS 간의 계면의 높은 해상도 또한 이상이 없는 것으로 나타났다(데이터는 나타나 있지 않음).

[0138]

실시예 8. 9-시스-R-Ac 투여에 의한 DNA 발현 프로파일에 있어서의 변화

[0139]

DNA 마이크로어레이 분석을 사용하여 9-시스-R-Ac로 장기간 처치한 후의 유전자 발현 프로파일에 있어서의 가능한 변화를 증명하였다. 눈, 간 및 신장에서의 mRNA의 발현 수준을 측정하고, 님블레겐 시스템 인코포레이티드 (NimbleGen System Inc.)에 의해 제공된 37,364개 유전자 어레이를 사용하여 처치군(N2) 및 대조군(C2) 간을 비교하였다. 눈에서, 9-시스-R-Ac 처치는 290개 유전자의 발현을 2배 이상으로 상승시키고, 1057개 유전자의 발현을 0.5배 이하로 감소시켰다(도 8; 표 S1). 처치된 마우스의 간에서, 단지 7개의 유전자의 발현이 2배 이상으로 증가하고, 단지 20개의 유전자의 발현이 0.5배 이하로 억제되었다(도 8; 표 S2). 처치된 마우스의 신장에서, 90개의 유전자는 2배 이상으로 발현이 증가하고, 3개의 유전자는 0.5배 이하로 발현이 억제되었다(도 8; 표 S2). 발현이 눈에서 영향을 받은 광전도(phototransduction)-특이적 레티노이드 프로세싱 및 기능-분류된 유전자가 표 S2에 열거되어 있다. 트랜스듀신(transducin)(Gt), 로돕신 키나제, 구아닐레이트 사이클라제-활성화 단백질 1 및 구아닐레이트 사이클라제-활성화 단백질 2, 구아닐레이트 사이클라제 1, 레티놀 데하이드로제나제 12 및 LRAT의 단백질 수준은 면역블롯에 의해 평가되는 바와 같이 모든 그룹의 마우스에서 영향을 받지 않았다(데이터는 나타나 있지 않음).

### 표 1

[0140]

9-시스-R-Ac 처치의 단일 및 장기간 투여 연구에서 실험 분석에 사용되는 마우스의 수

연구 유형	ERG	레티노이드 분석	로돕신 확인	A2E 분석 <sup>a</sup>	mRNA 분석	조직구조 <sup>a,b</sup>
단일 투여 처치	4	3	3	-	-	-
장기간 처치	10	15	5	5	4	5

<sup>a</sup> 마우스는 이러한 실험을 위해 ERG 시험 후에 사용되었다.  
<sup>b</sup> 마우스로부터의 한쪽 눈은 광학 현미경 검사에 사용되고, 다른쪽 눈은 전자 현미경 검사에 사용되었다.

### 고찰

[0141]

이러한 연구에서 보여지는 바와 같이, 마우스에서 암 순응의 연령-관련 악화는 인공 시스-레티노이드 처치에 의해 감소된다. 이러한 관찰사항은 지연된 로돕신 재생에 직접적으로 기인하는 간상세포-매개된 암 순응의 극적인 지연에 의해 나타나는 사람 시력에 있어서의 연령-관련 감퇴와 유사하다[문헌 참조; Jackson, G.R., Owsley, C. & McGwin, G., Jr. Vision Research 39, 3975-3982 (1999)]. 두 가지 상이한 유형의 연구가 수행되었다. 단일 용량 연구에서는 9-시스-레티노이드가 눈에 들어갈 수 있는 것으로 나타났고, 제2 세트의 실험에서는 9-시스-R-Ac의 장기간 투여가 나이든 마우스에서 레티날 기능의 저하를 상당히 개선시키는 것으로 나타났다.

[0143]

### 단일 용량 실험

[0144]

당해 실험은 9-시스-레티노이드가 10월령 마우스의 눈에 들어가서 시각 기능을 개선시키는지를 시험하기 위해 계획되었다. ERG 반응은 연령에 따라 측정가능하게 하락하였으며, 작지만 측정 가능한 양의 유리 옵신이 이러한 나이든 마우스에서 존재하였다. 이러한 처치된 마우스를 강렬한 빛에 노출시키고 18시간 후에 시험하는 경우 9-시스-레티날이 눈에 들어갔다. 9-시스-레티날의 전구체인 9-시스-레티닐 에스테르는 이러한 마우스의 눈에서 쉽게 검출 가능하며, 로돕신/옵신 비도 마찬가지로 개선되었다.

[0145]

### 9-시스-R-Ac로의 마우스의 장기간 처치

[0146]

단일 광 플래쉬에 대한 ERG 반응은 오일-처치된 대조군과 비교하여 9-시스-R-Ac로 6개월 동안 처치한 10월령 마우스에서 상당히 개선되었다(도 4A). 이러한 치료학적 효과는, 가능하게는 보다 나이든 마우스에서의 쇠약의 차폐 효과로 인해, 10개월 동안 처치한 14월령 마우스에서 대부분 소멸하였다(도 4B). 그러나, 이러한 보다 나이든 마우스는 암 순응을 수반하는 상당한 효과를 나타내지 않았다(도 5B, N2 및 N3 그룹). 단지 시스-형의 발색단단이 옵신과 조합될 수 있기 때문에 14월령 마우스에게 올-트랜스-R-Ac의 장기간 섭식이 측정된 ERG 파라미터에 대해 영향을 미치지 않는다는 것은 놀랍지 않다[문헌 참조; Palczewski, K. Annual review of

biochemistry 75, 743-767 (2006); Filipek, S., Stenkamp, R.E., Teller, D.C. & Palczewski, K. Annu Rev Physiol 65, 851-879 (2003)]. 따라서, 올-트랜스-레티노이드는 단지 이성체화 반응을 위한 기질을 부가하지만, 이성체화가 감소되는 경우 활성 발색단을 보충하지는 않는다. 중요하게는, 감금되어 있는 마우스는 고 비타민 A 식이를 유지하므로, 관찰된 시스-레티노이드의 효과는 이미 올-트랜스-레티노이드 보충에 더한 것이다.

[0147] 장기간 처치(6개월 내지 10개월)는 C57BL/6 암컷 마우스에 의해 충분히 허용된다. 망막에 있어서의 연령-관련 검출 가능한 형태학적 변화는 처치된 마우스 둘 다에서 관찰되었고, 대조 마우스는 처치에 의해 영향을 받지 않았다. 레티노이드 처치의 잠재적인 독성 부산물인 A2E 및 레티노산은 이러한 마우스에서 축적되지 않았다. 당해 연구에서, 9-시스-R-Ac가 망막내 유리-옵신으로 혼입되어 간상세포 색소의 증가된 재생비를 야기하였다. 그러나, 생리학적 광 조건(physiological light condition)에 의해 유도된 올-트랜스-레티날의 양은 간상세포 색소의 양 및 재생비와 무관하게 일정하다. 따라서, A2E 수준이 9-시스-R-Ac 투여에 의해 영향을 받지 않았다는 것은 놀랍지 않다. 따라서, 시스-레티노이드 보충의 이로운 효과는 레티노이드에 일반적으로 기인하는 항-산화 특성보다 이러한 관점으로부터 더 유리한 것으로 보인다[문헌 참조; Maxwell, S. & Greig, L. Expert opinion on pharmacotherapy 2, 1737-1750 (2001)].

[0148] 본 발명자들은 레티노산의 축적을 검출하지 못했다. 더욱이, 유전자 발현 변화는 간 및 신장에서는 최소인 반면, 몇몇 단백질은 눈에서 조절되지 않았다. 본 발명자들의 이러한 유전자의 상세한 분석은 특정한 발현 패턴을 나타내지 않았다.

#### 9-시스-레티노이드의 예방학적 사용

[0150] 사람은 30대 내지 40대에서 시작하여 암순응 능력을 상실하기 시작한다[문헌 참조; Jackson, G.R., McGwin, G., Jr., Phillips, J.M., Klein, R. & Owsley, C. Vision research 46, 1422-1431 (2006)]. 시작 가능한 쇠퇴는 야간 운전 및 어두운 환경에서의 독서와 같은 활동을 수행하는 능력의 감소에 의해 기능적으로 나타난다[문헌 참조; Schilling, O.K. & Wahl, H. W. Psychology and aging 21, 703-714 (2006)]. 이러한 증상은 연령에 따라 더욱 쇠약해지며, 노인에서 감소된 자립성 및 활동을 야기할 수 있다. 사람이 더 오래 살게 되면서 문제는 더욱 심각해지고 있다. 본 발명자들의 실험 결과는 경구 9-시스-레티노이드가 장기간 예방제로서 및 치료학적 화합물로서 유용함을 입증한다.

[0151] 9-시스-레티노이드의 이로운 효과 및 상대적 안전성은 미국 및 유럽에서 법적 시력 상실(legal blindness)의 주요 원인인 연령-관련 황반 변성으로 확대된다[문헌 참조; Zack, D.J., et al. Mol Vis 5, 30 (1999)]. 여기서, 본 발명자들은 연령에 따라 발생하는 시각 사이클에 있어서의 생화학적 변화, 즉, 유리 옵신 및 옵신/로돕신 비의 증가가 있음을 보여 주었다. 이러한 생화학적 변화가 과도한 경우, 이들은 LCA에서 보여지는 바와 같이 레티날 변성을 야기할 수 있다[문헌 참조; Fan, J., Woodruff, M.X., Cilluffo, M.C., Crouch, R.K. & Fain, G.L. J Physiol 568, 83-95 (2005)]. 또한, 유리 옵신은 간상세포 광수용기에서의 시각적 캐스캐이드의 자발적 개시를 야기한다[문헌 참조; Lisman, J. & Fain, G. Nat Med 1, 1254-1255 (1995); Fain, G.L., Matthews, H.R., Cornwall, M.C. & Koutalos, Y. Physiol Rev 81, 117-151 (2001); Surya, A., Foster, K. W. & Knox, B.E. J Biol Chem 270, 5024-5031 (1995); Hofmann, K.P., Pulvermuller, A., Buczylko, J., Van Hooser, P. & Palczewski, K. J Biol Chem 267, 15701-15706 (1992); Palczewski, K., et al. Biochemistry 33, 13741-13750 (1994); Jager, S., Palczewski, K. & Hofmann, K.P. Biochemistry 35, 2901-2908 (1996)]. 이것은 시각 시스템에서의 감소된 신호-대-잡음 비(signal-to-noise ratio), RPE에서의 증가된 대사적 과부하를 초래하여, 보다 많은 폐기물, 유리 라디칼 및 마침내 드루센(drusen)의 형성을 야기한다. 따라서, 9-시스-레티노이드 치료법으로 유리 옵신은 감소시키는 것은, AMD를 개시하는 것으로 여겨지는 전구체의 감소를 야기할 것이다.

#### 방법

#### 동물

[0154] 찰스 리버 라보라토리즈(Charles River Laboratories)로부터 입수한 착색된 연령-매치된 C57BL/6 암컷 마우스를 완전 암흑에서 정상 식이에 유지시키거나 12시간 명/암 주기로 유지시켰다. 모든 동물 실험은 워싱턴 대학교 (University of Washington) 및 케이스 웨스턴 리저브 대학교 동물 관리 위원회(Case Western Reserve

University Animal Care Committee)에 의해 승인된 과정을 사용하였으며, 안락사에 대한 AVMAP(American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia) 및 시력 및 안과학에 대한 연구 협회(Association of Research for Vision and Ophthalmology)의 권장책에 따랐다.

#### [0155] 9-시스-R-Ac에 의한 마우스의 단일 용량 및 장기간 처치

9-시스-R-Ac는 이전에 기재된 바와 같이 제조하였다[문헌 참조; Batten, M.L., et al. PLoS medicine 2, e333 (2005); Batten, M.L., et al. J Biol Chem 279, 10422-10432(2004)]. 식물성 오일 150 $\mu$ l 중의 9-시스-R-Ac 약 80mg/체중kg의 용량을 위관 영양법(gavage)을 통해 각각의 처치된 동물에게 투여하였다. 단일 용량 실험(도 1A, 표 1) 전에, 10월령 마우스를 48시간 이상 동안 암-순응시키고, 표백하기 1시간 전에 9-시스-R-Ac 또는 비히클 대조 용액을 섭식시키며, 20분 동안 500cd · m<sup>-2</sup>에서 광 노출시키고, 분석하기 전 16시간 동안 암-순응시켰다.

장기간 연구(도 1B 및 1C, 표 1)를 위해, 마우스는 3월령을 입수하고 실험을 개시하기 전 4월령이 될 때까지 길렀다. 이어서, 마우스에게 상이한 지속 시간 동안 1달에 1회 9-시스-R-Ac 또는 비히클 용액을 섭식시켰다. 여섯 그룹의 마우스를 연구하였다(도 1B). 처음 3개의 그룹(C0, C1 및 C2, 각 그룹에 대해 총 n=35)을 대조군으로서 처치하고 4월령, 10월령 및 14월령에서 시험하였다. 나머지 3개의 그룹(N1, N2 및 N3, n=35)에게 9-시스-R-Ac를 섭식시켰다. 그룹 N1에게는 6개월 동안 섭식시키고, 10월령에서 시험하였다. 그룹 N2는 10개월 동안 9-시스-R-Ac를 섭식시키고, 14월령에서 시험하였다. 그룹 N3은 10월령이 될 때까지 비히클을 섭식시킨 다음 14월령에서 시험할 때까지 1달에 1회 9-시스-R-Ac를 제공하였다. 도 1B에 도시되지 않은 또 다른 대조 그룹에서는, 10마리의 마우스에게 약 80mg/체중kg의 올-트랜스-R-Ac(제조원; Sigma-Aldrich, Corp.)를 10개월 동안 섭식시키고, 14월령에서 시험하였다.

9-시스-R-Ac, 올-트랜스-R-Ac 또는 비히클로 마지막 섭식시킨지 2주 후에, 48시간 암-순응된 마우스의 그룹을 광 노출 후의 암 순응의 회복, 눈에서의 정제된 로돕신/옵신 및 레티노이드 및 레티날 형태(도 1C; 방법)에 대해 분석하였다. 마우스를 로돕신의 약 90%를 표백시키는 강도 500cd · m<sup>-2</sup>의 광에 노출시키고, 1시간 동안 ERG로 모니터링하여 암 순응의 회복을 평가하였다. 로돕신을 정제하고, 로돕신/옵신 비를 측정하였다. 레티노이드 분석은 동일한 양의 광에 노출시킨지 0분, 10분, 30분 및 60분째에 제거한 절개된 눈에서 수행하였다. 레티날 형태를 평가하기 위해 사용된 마우스는 분석 전에 광표백에 노출시키지 않았다.

#### [0159] 망막전위도 검사(Electroretinography; ERG)

마취된 마우스의 ERG를 이전에 보고된<sup>24, 39</sup> 바와 같이 기록하였다.

#### [0161] 로돕신의 정제

로돕신 정제는 이전에 기재된 바와 같이 희미한 적색 광(dim red light) 하에서 수행하였다[문헌 참조; Zhu, L., et al. J Biol Chem 279, 53828-53839 (2004)]. 정제된 항-로돕신 C 말단 항체 1D4(문헌 참조; MacKenzie, D., Arendt, A., Hargrave, P., McDowell, J.H. & Molday, R.S. Biochemistry 23, 6544-6549 (1984))를 CNBr-활성화 세파로즈 4B 상에 고정시키고 4.6 x 12-mm 컬럼을 2mg의 1D4 항체/세파로즈 비드 ml로 충전하였다. 마우스 전체 눈을 유리-유리 균질화기(glass-to-glass homogenizer)를 사용하여 137mM NaCl, 5.4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7mM KCl 및 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.5) 속에서 균질화시켰다. 14,000 x g에서 5분 동안 원심분리하여 상청액 중의 가용성 단백질을 제거하고, 펠렛을 500mM NaCl을 함유하는 10mM Bis-Tris 프로판(pH 7.5) 중의 1% 도데실-β-말토사이드를 함유하는 완충액에 가용화시켰다. 125,000 x g에서 20분 동안 원심분리하여 상청액을 투명하게 하고 항체 1D4-충전된 면역친화 컬럼에 로딩한 다음 500mM NaCl 및 0.1% 도데실-β-말토사이드를 함유하는 10mM Bis-Tris 프로판(pH 7.5)으로 0.5ml/분의 유량에서 철저히 세척하였다. 정제된 마우스 로돕신을 실온에서 500mM NaCl 및 0.1% 도데실-β-말토사이드를 함유하는 10mM Bis-Tris 프로판(pH 7.5) 중의 100 μM 노나펩타이드(TETSQVAPA)로 용출시켰다. 휴렛-팩커드(Hewlett-Packard) 8452A UV-가시광선 분광광도계를 사용하여 정제된 로돕신 농도는 500nm에서, 옵신 및 로돕신의 총량은 280nm에서 측정하였다[문헌 참조; Palczewski, K., Carruth, M.E., Adamus, G., McDowell, J.H. & Hargrave, P.A. Vision research 30, 1129-

1137 (1990)].

#### [0163] 레티노이드의 분석

[0164] 레티노이드의 추출, 유도체화 및 분리에 관한 모든 실험적 과정은 이전에 기재된 바와 같이 코닥(Kodak) 넘버 1 세이프라이트 필터(safelight filter)(투과도 > 560nm)에 의해 제공된 희미한 적색 광 하에서 수행하였다[문헌 참조; Van Hooser, J.P., et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 8623-8628 (2000); Van Hooser, J.P., et al. J Biol Chem 277, 19173-19182 (2002); Maeda, A., et al. J Biol Chem 280, 18822-18832 (2005); Van Hooser, J.P., Garwin, G.G. & Saari, J.C. Methods Enzymol 316, 565-575 (2000)]. 6마리 마우스 눈으로부터 정제된 로돕신의 용출된 분획을 합하고(총 3.0ml), 동량의 100% 메탄올과 혼합하였다. 혼합물을 볼테징하고, 15분 동안 냉장에서 항온처리하였다. 레티노이드를 동량의 100% 헥산(총 6ml)으로 2회 추출하였다. 합한 추출물을 아르곤하에서 건조시키고, 레티노이드를 1.4ml/분의 유량에서 10% 에틸 아세테이트 및 90% 헥산을 사용하여 정상(normal phase) HPLC(Beckman, Ultrasphere-Si, 5 $\mu$ m, 4.6 x 250mm)에 의해 분리하고, 다이오드 어레이 검출기 및 HP 캡스테이션(Chemstation) A.03.03 소프트웨어를 사용하여 HP1100 HPLC로 325nm에서 검출하였다. A2E는 이전에 기재된 바와 같이 분석하였다[문헌 참조; Maeda, A., et al. J Biol Chem 280, 18822-18832 (2005)].

[0165] 간에서의 레티노산의 분석은 두 개의 직렬 정상 컬럼: 베리언 마이크로소브(Varian Microsorb) 실리카 3 $\mu$ m, 4.6 x 100mm(제조원; Varian, Palo Alto, CA) 및 울트라스피어(Ultrasphere)-Si, 5 $\mu$ m, 4.6 x 250mm 컬럼을 갖는 어질런트(Agilent) 1100 HPLC에 의해 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다[문헌 참조; Batten, M.L., et al. PLoS medicine 2, e333 (2005)]. 1000:4.3:0.675 헥산:2-프로판올:빙초산(v/v)의 등용매 조성의 용매 시스템을 355nm에서의 검출로 20°C에서 1ml/분의 유량에서 사용하였다. 시그마-알드리치로부터 구입한 올-트랜스-RA 및 9-시스-RA의 표준물질을 사용하여 검량을 수행하였다.

#### [0166] 면역블롯팅

[0167] 면역블롯팅은 단백질을 흡착시키는 임모빌론(Immobilon)-P(폴리비닐리덴 디플루오라이드; 제조원; Millipore Corp.)를 사용하여 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 모노클로날 항-로돕신 항체(1D4)는 몰데이 알. 박사(Dr. R. Molday)에 의해 제공되었다. 항-LRAT(mAb)(문헌 참조; Moise, A.R., Golczak, M., Imanishi, Y. & Palczewski, K. J Biol Chem (2006)), 항-트랜스듀신(Gt)(mAb)(공개되지 않음), 항-구아닐레이트 사이클라제 1(1S4, mAb)(문헌 참조; Haire, S. E., et al. Investigative ophthalmology & visual science 47, 3745-3753 (2006)), 항-구아닐레이트 사이클라제-활성화 단백질 1(UW14 pAb)(문헌 참조; Gorczyca, W.A., et al. J Biol Chem 270, 22029-22036 (1995)), 항-구아닐레이트 사이클라제-활성화 단백질 2(UW50 pAb)(문헌 참조; Otto-Bruc, A., et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 4727-4732 (1997)), 항-로돕신 키나제(문헌 참조; Zhao, X., Huang, J., Khani, S.C. & Palczewski, K. J Biol Chem 273, 5124-5131 (1998)) 및 항-레티놀 데하이드로게나제 12(pAb)(문헌 참조; Maeda, A., et al. J Biol Chem 281, 37697-37704 (2006))는 본 발명자들의 실험실에서 생성하였다. 알칼리성 포스파타제-접합된 염소 항-마우스 IgG 또는 염소 항-래빗 IgG(제조원; Promega)을 이차 항체로서 사용하였다. 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트/니트로 블루 테트라졸륨 발색 기질(제조원; Promega)로 단백질 랜드를 가시화시켰다. 단백질(각 웨일당 30 $\mu$ g)은 12.5% SDS-PAGE에 의해 분리하였다.

#### [0168] 레티날 형태학

[0169] 광학 현미경 검사를 위해, 마우스 아이컵(eyecup)을 실온에서 약 1시간에 이어 4°C에서 23시간 동안 2% 수크로즈를 함유하는 0.08M 1,4-페페란진디에탄설포네이트 완충액(PIPES)(pH 7.4) 중의 2.5% 글루타르알데히드 및 1.6% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 이어서, 아이컵을 0.13M 인산나트륨 완충액(pH 7.3)으로 세척하고, CH<sub>3</sub>OH 시리즈를 통해 탈수시키고, JB4 글리콜 메타크릴레이트에 매봉시켰다. 젤편(6 $\mu$ m)을 실온에서 1.5 내지 2분 동안 5% 리차드슨 염료(Richardson's stain) 속에 침지시켜 염색하고, 레티날 층이 광학 현미경에 의해 눈에 보일 때까지(약 8 내지 15분) 0.13M 인산나트륨(pH 7.3) 속에서 탈염색시켰다. 투과 전자 현미경 검사를 위해, 마우스 아이컵을 이전에 기재된 바와 같이 분석하였다[문헌 참조; Maeda, A., et al. J Biol Chem 280, 18822-

18832 (2005); Maeda, T., Lem, J., Palczewski, K. & Haeseleer, F. Investigative ophthalmology & visual science 46, 4320-4327 (2005)].

[0170] DNA 마이크로어레이 분석

RNA를 리보퓨어 키트(RiboPure Kit, 제조원; Ambion, Austin, TX)를 사용하여 그룹 C2 및 N2 마우스(도 1B)로부터 10개의 눈, 100mg의 간 또는 100mg의 신장으로부터 분리하였다. 제제의 품질을 RNA 아가로즈 젤 전기영동 및 어질런트 바이오분석기(Agilent Bioanalyzer)에 의해 확인하였다. 상이한 조직으로부터 및 각종 처리를 받은 마우스로부터 분리한 총 RNA의 분취량을 검출-표지하고, 위스콘신주 메디슨에 소재하는 님블레겐 시스템 인코포레이티드에 의해 제공된 서비스를 사용하여 마우스 게놈 마이크로어레이(genomic microarray) 상에서 하이브리드화시켰다. 마이크로어레이에는 유전자당 최소 11개의 프로브를 사용하여 캘리포니아 대학, 산타크루즈 데이터베이스(Santa Cruz database)(빌드 HG 17)에 의해 나타내어지는 바와 같은 전체 마우스 전사체(transcriptome)를 커버하여 37,364개 유전자를 함유하였다. 유전자 발현을 프로브 신호에 따라 표준화시키고, 각 유전자에 대한 평균 신호를 각각의 샘플 레플리케이트에 대해 표준화하였다.

[0172] 전체 연구에 걸친 샘플의 어레이 분석은, 게놈 데이터의 분석 및 이해를 위한 바이오컨더터 공개 소스(Bioconductor open source) 및 공개 개발 소프트웨어 프로젝트(open development software project)에 포함된 데이터 분석 패키지의 로버스트 멀티칩 분석 특징을 사용하는 위스콘신주 메디슨에 소재하는 님블레겐 시스템스 인코포레이티드에 의해 표준화시켰다. 로버스트 멀티칩 분석 결과의 프로젝트-와이드 스프레드시트(project-wide spreadsheet)를 MICROSOFT® EXCEL®에 이출하고, 발현 수준 비를 하나의 대조 샘플 및 하나의 처리 샘플을 포함하는 모든 가능한 쌍대 비교(pair-wise comparison)를 위해 계산하였다. 이러한 쌍대 비를 마이크로소프트 액세스(Microsoft Access)에 이입하고, 유전자 발현에 있어서의 신뢰할만한 배가(credible-fold) 변화에 대해 측정하였다. 2배 이상 증가 또는 0.5배 이하 감소 변화는 유의적인 것으로 간주하였다. 그후, 차등적으로 발현된 유전자를 엑셀 파일로서 액세스로부터 이출하고, 루시딕스 LLC(Lucidyx LLC)에 의한 LUCIDYX SEARCHER™에 의해 기능적 주석(functional annotation)을 할당하였다.

[0173] 통계학적 분석

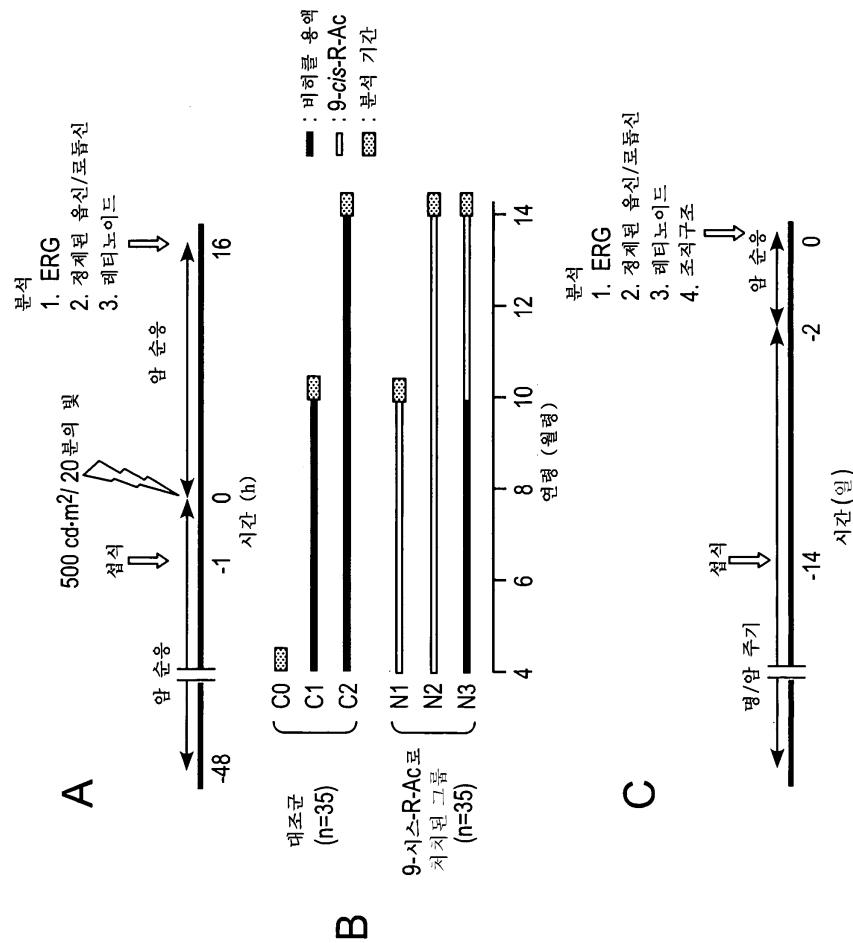
[0174] 통계학적 분석은 일원배치(one-way) 분산분석(analysis of variance; ANOVA)에 의해 수행하였다.

[0175] 상기 실시예들은 청구된 발명을 예시하기 위해 제공된 것이지 청구된 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니다. 본 발명의 다른 변형들이 당해 기술분야의 통상의 숙련가들에게 용이하게 자명할 것이며, 첨부된 특허 청구범위에 의해 포함된다.

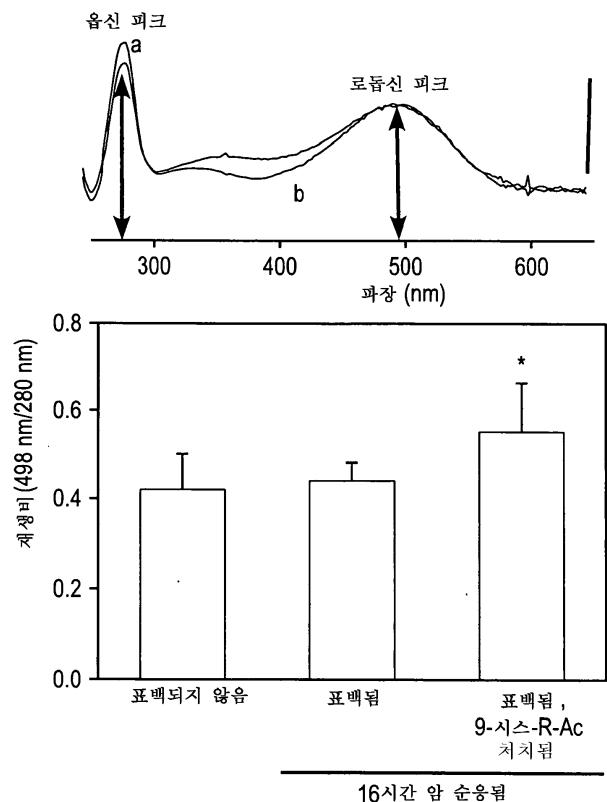
[0176] 본원에 인용된 모든 공보, 특히, 특히 출원 및 기타 참고 문헌은 본원에 참고로 인용된다.

## 도면

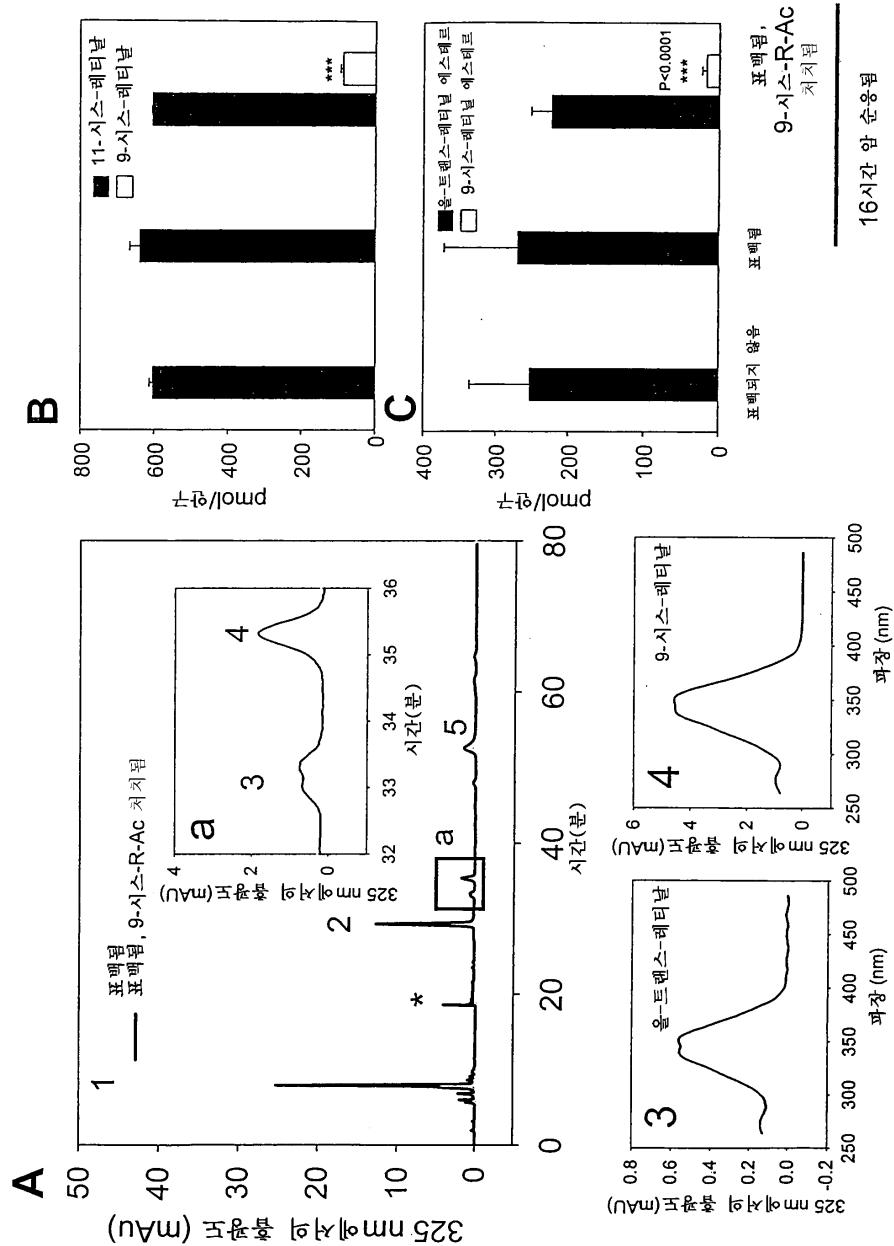
## 도면1



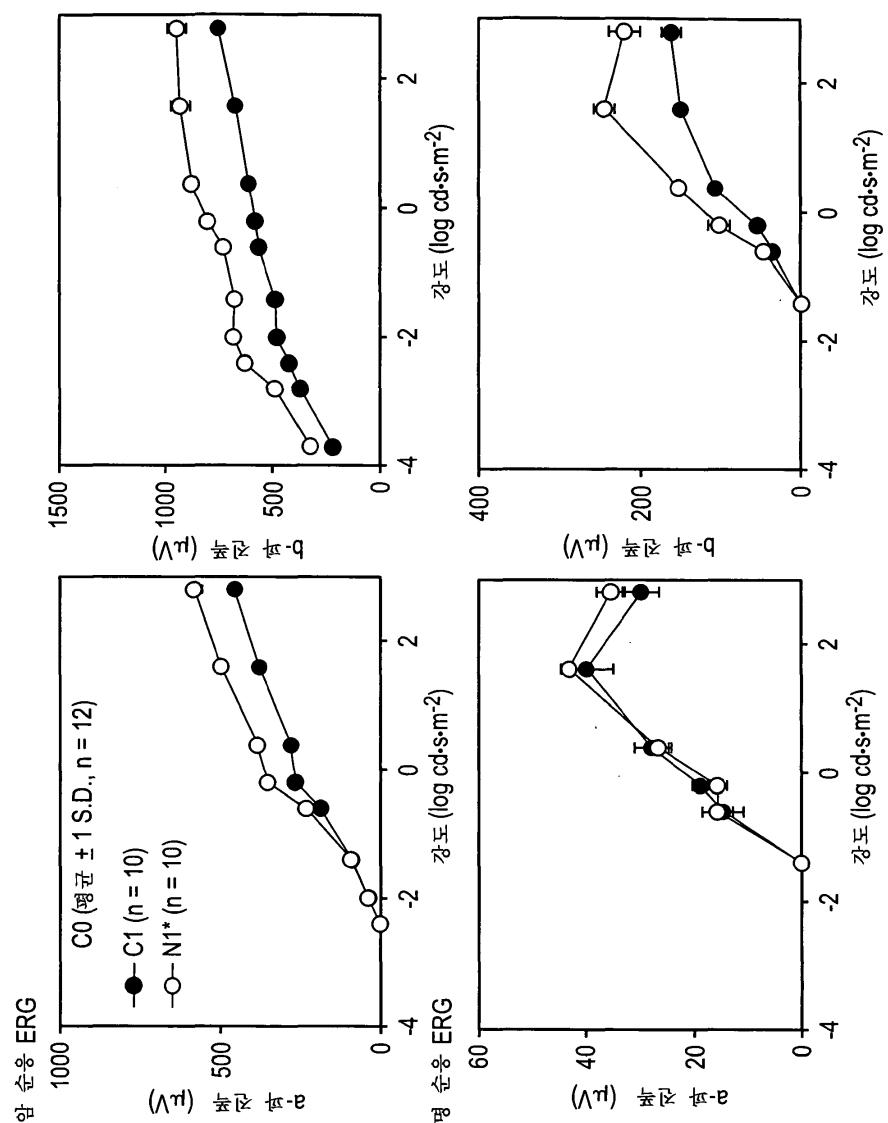
## 도면2



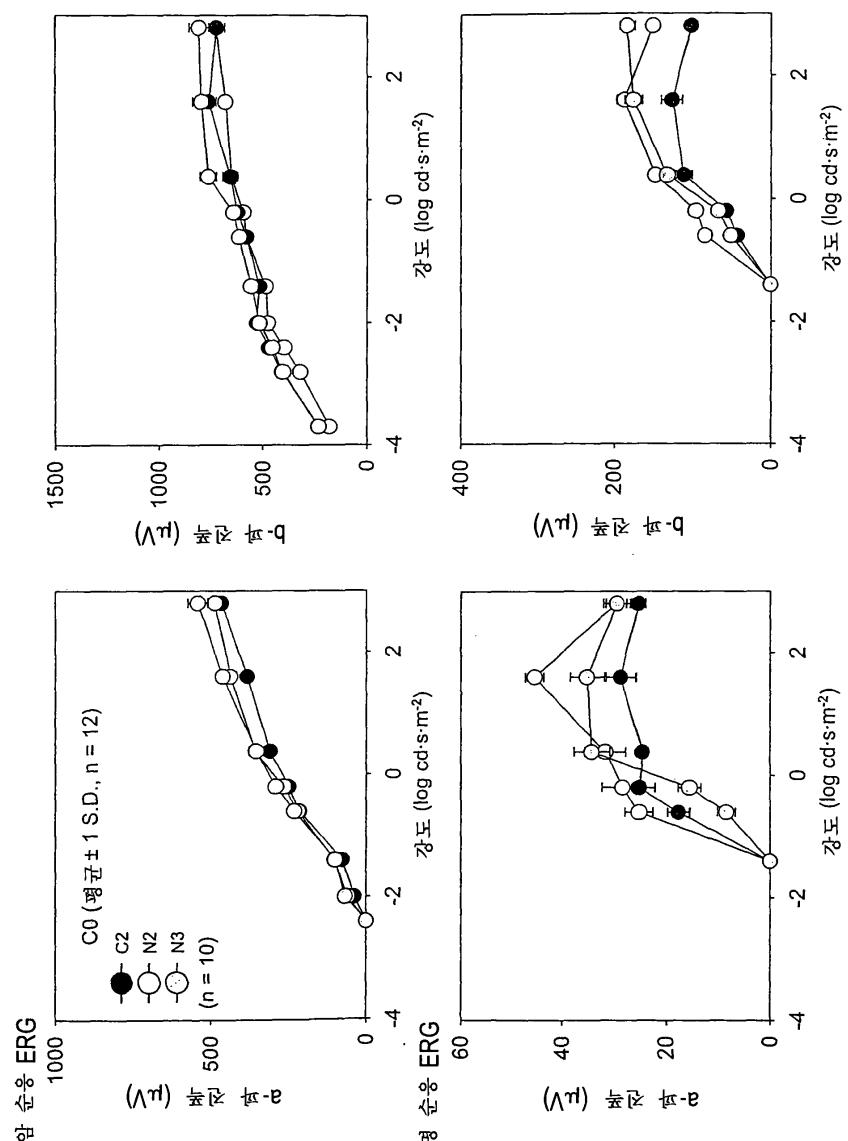
도면3



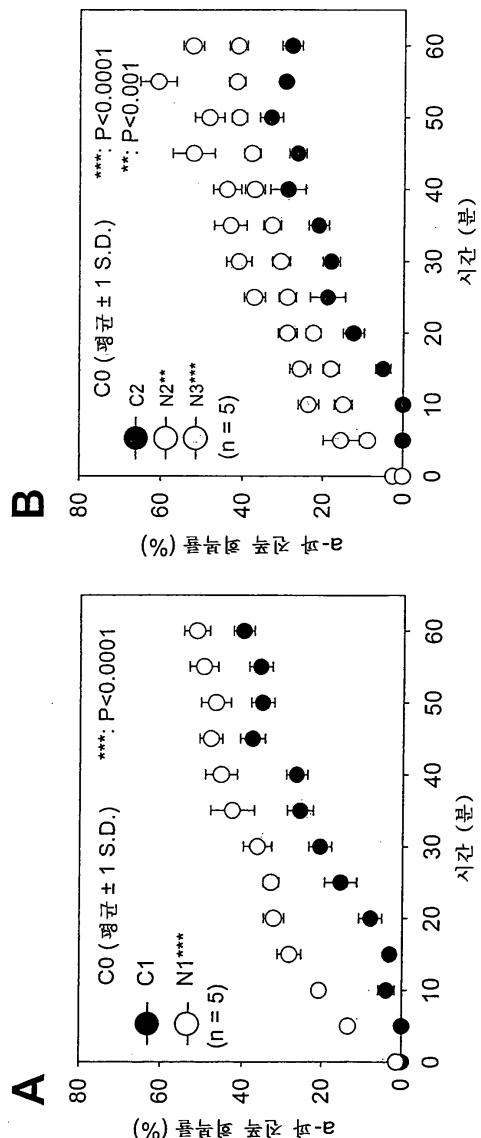
도면4a



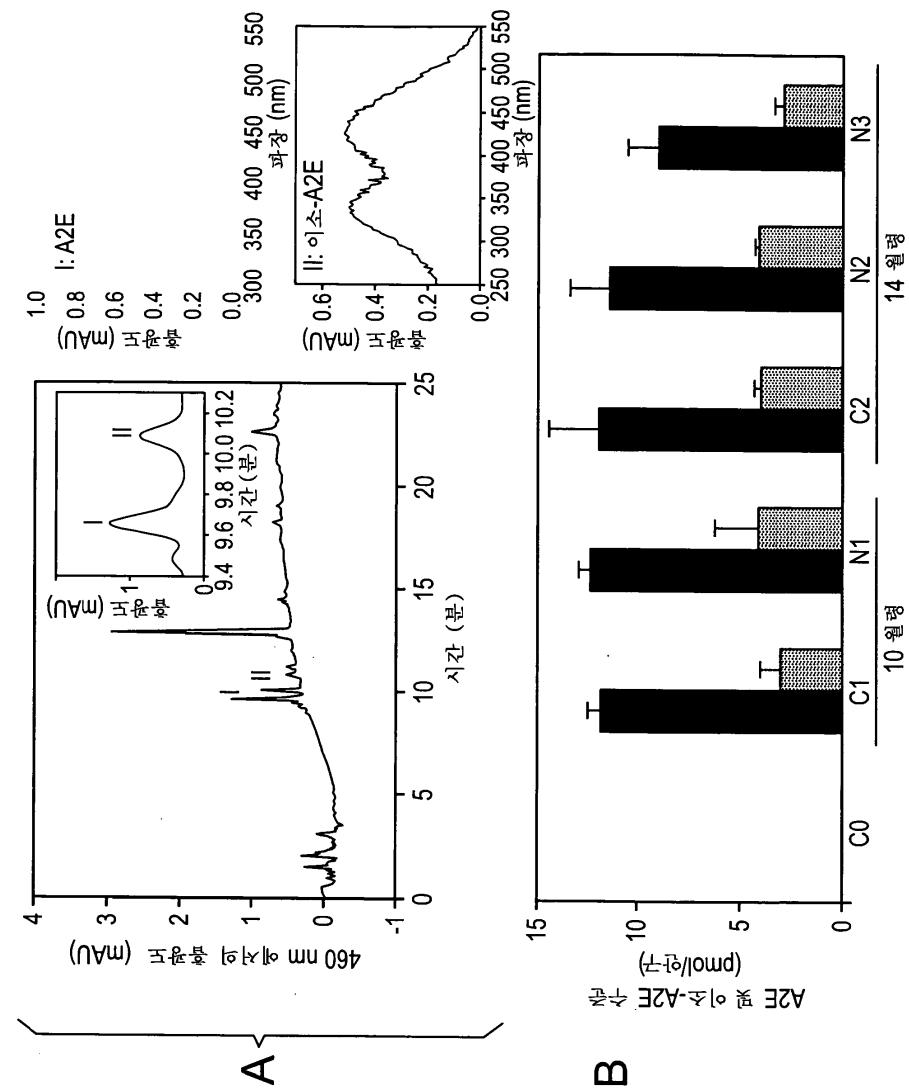
도면4b



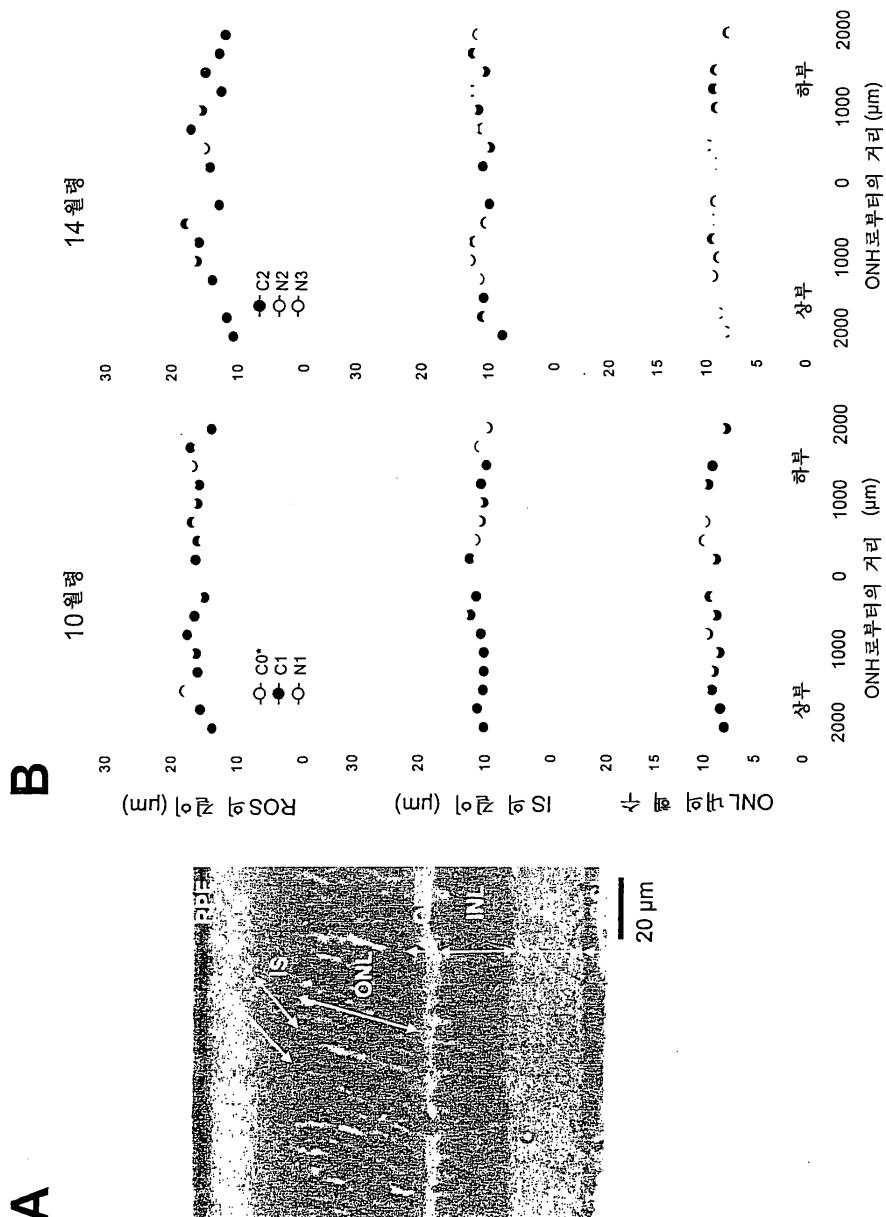
## 도면5



## 도면6



도면7



## 도면8

