



등록특허 10-2341446



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월21일
(11) 등록번호 10-2341446
(24) 등록일자 2021년12월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/165 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) *A61P 27/06* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/165 (2013.01)
A61K 9/0048 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7009679
- (22) 출원일자(국제) 2017년09월29일
심사청구일자 2019년04월04일
- (85) 번역문제출일자 2019년04월04일
- (65) 공개번호 10-2019-0045304
- (43) 공개일자 2019년05월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2017/104345
- (87) 국제공개번호 WO 2018/059543
국제공개일자 2018년04월05일

(30) 우선권주장
62/401,725 2016년09월29일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

H. Yang et al., PLOS ONE (2013) Vol.8, No.11, e81592

(뒷면에 계속)

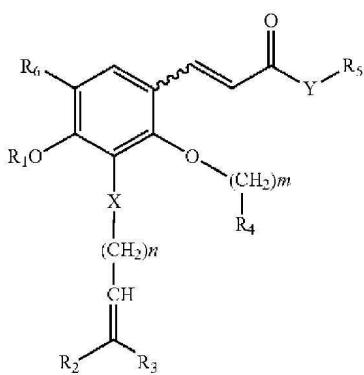
전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 안구 질병을 치료하는 방법

(57) 요약

본 발명은 대상체에서 안구 질병, 특히, 당뇨병 관련 안구 질병을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 하기 화학식 A1의 구조를 갖는 화합물의 용도로서, 안구 질병은 증식 유리체망막병증(PVR), 포도막염, 녹내장 및 연령 관련 황반변성(AMD)으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 당뇨병 관련 안구 질병은 당뇨병성 망막증(DR) 및 당뇨병성 황반 부종(DME)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 용도에 관한 것이다:



(52) CPC특허분류

A61K 9/0053 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

A61P 27/06 (2018.01)

(56) 선행기술조사문헌

CA2946086 A1*

T.J. Chen et al. CELLULAR PHYSIOLOGY AND
BIOCHEMISTRY (2015) Vol.36, No.3, pp.893-906

JP2011020999 A

US07994357 B2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

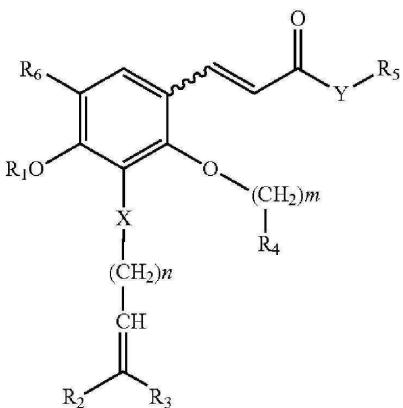
명세서

청구범위

청구항 1

망막 색소 상피(retinal pigment epithelium; RPE) 세포의 손상을 역전시키고 안구 혈류를 향상시킴을 통해서 안구 질병(ocular disease)의 치료를 하기 위한, 유효량의 하기 화학식 A1의 구조를 갖는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 입체이성질체, 또는 거울상 이성질체를 포함하는 약제로서,

안구 질병이 증식 유리체망막병증(proliferative vitreoretinopathy; PVR), 포도막염(uveitis), 연령 관련 황반변성(age related macular degeneration; AMD)의 초기 시간, 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy; DR), 및 당뇨병성 황반 부종(diabetic macular edema; DME)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제:



상기 식에서,

R^1 은 수소, 알킬, 알케닐, C_5-C_6 시클로알킬, 5원 또는 6원 불포화된 카보사이클 또는 5원 또는 6원 헤테로사이클; $(CH_2)_m R^4$ 이며;

X는 C, -O-, -N- 또는 -S-이며;

Y는 -O-, -NH 또는 -O-C₁-C₄ 알킬이며;

n은 0 내지 10의 정수이며;

m은 0 내지 5의 정수이며;

R^2 및 R^3 은 독립적으로, C_1-C_6 알킬이며;

R^4 는 할로겐, -CF₃, -OR⁷ 또는 -NR⁷R⁸로 치환될 수 있는, C_5-C_6 시클로알킬 또는 5원 또는 6원 불포화된 카보사이클 또는 헤�테로사이클이며, 여기서, R⁷ 및 R⁸은 독립적으로, 수소 또는 C₁-C₆ 알킬이며;

R^5 는 OH, NH₂ 또는 C_5-C_6 시클로알킬, 5원 또는 6원 불포화된 카보사이클 또는 헤�테로사이클이며, 여기서, 시클로알킬, 카보사이클 및 헤�테로사이클은 할로겐, NH₂, NO₂, C₁-C₆ 알콕시, C₁₋₆ 알킬티오, OR⁷"", NR⁷R⁸ 또는 CF₃으로 선택적으로 치환될 수 있으며;

R^6 은 H, 히드록시 또는 C₂-C₁₀ 알케닐에 의해 치환될 있는 C₁-C₁₀ 알킬이거나, R¹과 함께, -C₂H₂-이다.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 화합물이 대상체의 안구에 국소 투여되거나, 대상체에 경구 투여되는 약제.

청구항 6

제1항에 있어서, 화합물이 안연고(eye ointment), 아이겔(eye gel), 아이크림(eye cream), 또는 점안액으로 제형화되는 약제.

청구항 7

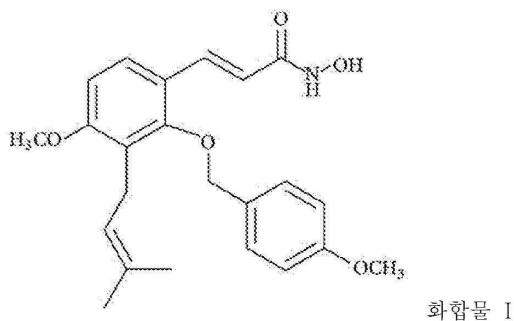
제5항에 있어서, 화합물이 국소 투여되는 약제.

청구항 8

제5항에 있어서, 화합물이 경구 투여되는 약제.

청구항 9

제1항에 있어서, 화합물이 하기 화합물 I인 약제:



화합물 I

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 안구 질병(ocular disease)을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy; DR) 및 당뇨병성 황반 부종(diabetic macular edema; DME)은 성인 실명의 주요 원인이고, 당뇨병의 가장 흔한 합병증이다[Aiello LP et al. Diabetic retinopathy. Diabetes Care 21:143-156, 1998]. 이는 당뇨병을 갖는 사람 중 30% 이상에게 영향을 미치고, 궁극적으로, 다수의 환자에서 망막 부종(retinal edema), 혈관신생, 및 시력 상실을 초래한다. 혈액-망막 장벽(blood-retinal barrier: BRB)의 파괴, 모세혈관 기저막(capillary basement membrane)의 비대(thickening), 및 혈관주위세포 수의 감소 및 무세포 모세혈관 수의 증가를 포함하는 혈관 변화는 DR에서 광범위하게 기록되었다[Yang LP et al. Baicalein reduces inflammatory process in a rodent model of diabetic retinopathy. Inv. Ophthalmol. Vis. Sci 50:2319-2327, 2009]. 모세혈관 세포는 당뇨병에서 아폽토스성 치사(apoptotic death)를 겪는 유일한 망막 세포가 아니다. 신혈관 세포의 정상 빈도 보다 더 높은 빈도가 당뇨병에 걸린 인간 및 동물의 망막에서 TUNEL(BrdU-Red DNA 단편화)-양성인 것으로 보고되었다. 망막 혈관구조가 당뇨병성 망막증의 발달에 중추적이지만, 종종 명시적인 혈관 변화 이전에, 신경망막 기능성이 질병 동안 또한 손상된다는 증거가 축적되고 있다[Barbe AJ et al. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. J. Clin Invest. 102:783-791, 1998].

[0003] 예를 들어, 시각 기능의 결손, 예를 들어, 색각, 대비 민감도의 상실, 및 망막전위도의 이상은 당뇨병 진단 직후 및 임상적으로 명백한 혈관성 망막증(vascular retinopathy)의 검출 전에 환자에서 기록되었다[Phipps JA et al. Paired-fflash identification of rod and cone dysfunction in the diabetic rat. Inv Ophthalmol Vis Sci 45:4592-4600, 2004]. 조기 뉴런 변화는 또한, 인간 당뇨병에서 기술된 것과 유사한 신경생리학적 결함(neurophysiological defect)을 포함하는, 당뇨병의 실험적 설치류 모델의 망막에서 명백하다. 신경망막 변화(neuroretinal change)가 질병 과정의 초기 단계에서 일어나기 때문에, 이러한 것이 당뇨병성 망막증과 관련된 혈관 병리(vascular pathology)의 발병 및 진행에서 원인적 또는 기여적 역할을 할 수 있다는 것이 제안되었다[Ward MM et al. Glutamate uptake in retinal glial cells during diabetes. Diabetologia 48:351-360, 2005].

[0004] 종래 연구 조사에서, 축적된 증거들은 소교세포 및 성상 교세포의 활성화에 의해 특징되는, 망막의 염증이 DR의 발병 기전에 관여된다는 개념을 확인하였다. DR은 만성의 저-등급 염증 질병이다[Fan JW et al. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1 plays a protective role in diabetic retinopathy in rats. Inv Ophthalmol Vis. Sci. 53: 6541-6556, 2012]. 당뇨병 질환은 소교세포를 활성화시키는, 망막 내에서 전염증성 시토카인 발현의 상승을 야기시킨다. 활성화 자극에 반응하여, 휴지기의 소교세포는 일련의 정형화된 모풀로지, 표현형, 및 기능성 변화를 겪는다. 이에 의해, 활성화된 소교세포는 백혈구를 모집하는 염증 사이클을 자극하고, 혈관 파괴를 야기시키고, 세포독성 물질의 방출을 통해 교세포 기능장애 및 뉴런 세포사를 직접적으로 유도한다[Steinle JJ et al. Intra-ophthalmic artery chemotherapy triggers vascular toxicity through endothelial cell inflammation and leukosisis. Inv Ophthalmol Vis Sci 53: 2439-2445, 2012]. 뮀러 세포(mueller cell)는 망막의 주 교세포(principal glia)이다. 이러한 것은 내부 제한 맴브레인에서 광수용기 층까지의 망막의 전체 두

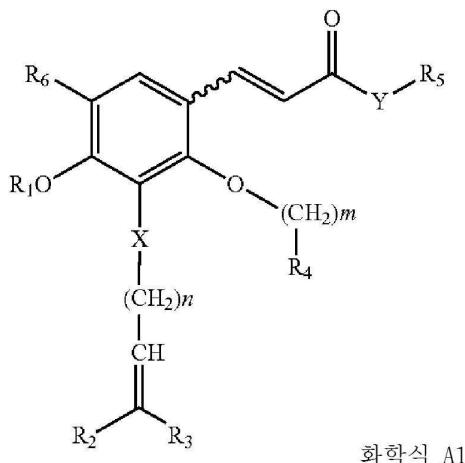
께에 걸쳐져 있으며, 이러한 과정은 대부분의 뉴런 세포와 접촉한다[Bringmann A & Wiedemann P. Mueller glial cells in retinal disease. Ophthalmologica 227:1-19, 2012]. 이러한 것은 또한, 내부 및 외부 망막 혈관층(retinal vessels bed)에서 큰 혈관 및 모세혈관 둘 모두 상에 종말단추(end feet)를 형성한다[Distler C and Dreher Z. Glia cells of the monkey retina-II. Mueller cells. Vision Res 36:2381-2394, 2012]. 뮐러 교세포는 망막에서 정상적인 뉴런 및 혈관 기능을 유지하는 데 필수적이다. 지난 20년 동안의 여러 연구에서는, 뮐러 교세포가 당뇨병의 과정에서 초기에 부정적으로 영향을 미친다는 증거를 제공하였다. 인간 및 실험 당뇨병 둘 모두에서의 뮐러 교세포는 세포 과다형성 및 신경교 섬유질 산성 단백질(glial fibrillary acidic protein; GFAP)의 상향 조절에 의해 특징된 반응성 표현형을 얻는다[Yong, PH et al. Evidence supporting a role for N'-(d-formyl-3,4-dehydropiperidino) lysine accumulation in Mueller glia dysfunction and death in diabetic retinopathy. Molecular Vision 16:2524-2538, 2010]. 당뇨병 동물에서, 이러한 생물학적 변화(biotic change)는 세포의 공간에서 칼륨 및 글루타메이트를 조절하는 이의 능력 변화, γ -아미노부티르산의 축적, 전염증성 시토카인의 상향조절, 및 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor; VEGF)와 같은 혈관형성 성장 인자(angiogenic growth factor)의 발현 증가를 포함하는, 여러 가지 기능장애 반응(dysfunctional response)을 동반한다[Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 29:789-791, 2009].

[0005] 그러나, 안구 질병을 치료하기 위한 몇몇 새로운 방법을 발견하는 것이 여전히 요구되고 있다.

발명의 내용

[0006] 본 발명에서, 예상치 못하게, 몇몇 신규한 화합물들이 강력한 항산화제 및 안구 혈류 촉진제로서, 이는 당뇨병 성 황반 부종에 의해 유도된 혈액 안구 장벽의 파괴 및 당뇨병성 망막증으로 인한 VGEF 및 GFAP의 생성을 방지하는 데 효과적이라는 것이 확인되었다. 예상치 못한 발견은 안구 질병, 특히, 연령 관련 황반 변성(age-related macular degeneration; AMD) 및 당뇨병 관련 안구 질병, 예를 들어, 당뇨병성 망막증(DR), 당뇨병성 황반 부종(DME) 또는 녹내장의 치료를 위한 강력한 약물로서의 이러한 화합물을 유도한다.

[0007] 이에 따라, 일 양태에서, 본 발명은 안구 질병을 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에 유효량의 하기 화학식 A1의 구조를 갖는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 입체이성질체, 거울상 이성질체, 전구약물 또는 용매화물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 특징으로 한다:



[0008]

[0009] 상기 식에서,

[0010] R^1 은 수소, 알킬, 알케닐, C_5-C_6 시클로알킬, 5원 또는 6원 불포화된 카보사이클 또는 5원 또는 6원 헤테로사이클, 또는 $(CH_2)_mR^4$ 이며;

[0011] X 는 C , $-O-$, $-N-$ 또는 $-S-$ 이며;

[0012] Y 는 $-O-$, $-NH$ 또는 $-O-C_1-C_4$ 알킬이며;

- [0013] n은 0 내지 10의 정수이며;
- [0014] m은 0 내지 5의 정수이며;
- [0015] R² 및 R³은 독립적으로, C₁-C₆ 알킬이며;
- [0016] R⁴는 할로겐, -CF₃, -OR⁷ 또는 -NR⁷R⁸로 치환될 수 있는 C₅-C₆ 시클로알킬 또는 5원 또는 6원 불포화된 카보사이클 또는 헤테로사이클이며, 여기서, R⁷ 및 R⁸은 독립적으로, 수소 또는 C₁-C₆ 알킬이며;
- [0017] R⁵는 OH, NH₂ 또는 C₅-C₆ 시클로알킬, 5원 또는 6원 불포화된 카보사이클 또는 헤�테로사이클이며, 여기서, 시클로알킬, 카보사이클 및 헤�테로사이클은 할로겐, NH₂, NO₂, C₁-C₆ 알콕시, C₁₋₆ 알킬티오, OR⁷R⁸ 또는 CF₃으로 선택적으로 치환될 수 있으며;
- [0018] R⁶은 H, 히드록시 또는 C₂-C₁₀ 알케닐에 의해 치환될 수 있는 C₁-C₁₀ 알킬이거나, R¹과 함께 -C₂H₂-이다.
- [0019] 다른 양태에서, 본 발명은 안구 질병, 특히, 당뇨병 관련 안구 질병의 치료에서의 약제를 제조하기 위한, 화학식 IA의 구조를 갖는 화합물의 용도를 제공한다.
- [0020] 추가 일 양태에서, 본 발명은 화학식 A1의 구조를 갖는 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 안구 질병, 특히, 당뇨병 관련 안구 질병을 치료하는 데 사용하기 위한 약제 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 질병은 증식 유리체망막병증(PVR), 포도막염, 녹내장 또는 연령 관련 황반변성(AMD)이다.
- [0022] 본 발명의 하나의 특정 구현예에서, 당뇨병 관련 안구 질병은 당뇨병성 망막증(DR) 또는 당뇨병성 황반 부종(DME)이다.
- [0023] 상기 일반적인 설명 및 하기 상세한 설명 둘 모두가 단지 예시적이고 설명하기 위한 것으로서, 본 발명을 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- 도 1a는 ARPE-19 세포의 증식에 대한 화합물 I(하기에서 "BMX"로서 불리워짐)의 효과를 도시한 것이다. ARPE-19 세포는 72시간 동안 BMX와 함께 인큐베이션되었다.
- 도 1b는 HUVEC의 증식에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. HUVEC는 72시간 동안 BMX와 함께 인큐베이션되었다. 데이터는 각 그룹에서 n=6인 경우 평균 ± SEM로서 표현되었다. **, P<0.01 BMX 그룹 대 비히를 대조군.
- 도 2a는 ARPE-19 세포에서 저산소증-유발 손상에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. ARPE-19 세포는 72시간 동안 BMX와 함께 인큐베이션되었다.
- 도 2b는 HUVEC에서 저산소증-유발 손상에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. HUVEC는 72시간 동안 BMX와 함께 인큐베이션되었다. 대조군은 저산소 조건(1% O₂, 5% CO₂ 및 94% N₂) 하에서 72시간 동안 비히클로 처리되었다. 데이터는 평균 ± SEM로서 표현되었다. 각 그룹에서 n=6; *, P<0.05 및 **, P<0.01 대 대조군.
- 도 3a는 ARPE-19 세포에서 NaIO₃-유발 손상에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. ARPE-19 세포는 72시간 동안 BMX 및 NaIO₃과 함께 인큐베이션되었다.
- 도 3b는 HUVEC에서 NaIO₃-유발 손상에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. HUVEC는 72시간 동안 BMX 및 NaIO₃과 함께 인큐베이션되었다. 데이터는 평균 ± SEM으로서 표현되었다. 각 그룹에서 n=6; *, P<0.05 및 **, P<0.01 대 NaIO₃ 그룹.
- 도 4a는 ARPE-19 세포에서 H₂O₂-유발 손상에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. ARPE-19 세포는 24시간 동안 BMX 및 H₂O₂와 함께 인큐베이션되었다.

도 4b는 HUVEC에서 H_2O_2 -유발 손상에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. HUVEC는 24시간 동안 BMX 및 H_2O_2 와 함께 인큐베이션되었다. 데이터는 평균 ± SEM으로서 표현되었다. 각 그룹에서 n=6; *, P<0.05 및 **, P<0.01 대 H_2O_2 그룹.

도 5a는 ARPE-19 세포에서 NaN_3 -유발 손상에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. ARPE-19 세포는 72시간 동안 BMX 및 NaN_3 과 함께 인큐베이션되었다.

도 5b는 HUVEC에서 NaN_3 -유발 손상에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. HUVEC는 72시간 동안 BMX 및 NaN_3 과 함께 인큐베이션되었다. 데이터는 평균 ± SEM으로서 표현되었다. 각 그룹에서 n=6; *, P<0.05 및 **, P<0.01 대 NaN_3 그룹.

도 6a는 ARPE-19 세포에서 t-BHP-유발 손상에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. ARPE-19 세포는 12시간 동안 BMX 및 t-BHP와 함께 인큐베이션되었다.

도 6b는 HUVEC에서 t-BHP-유발 손상에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. HUVEC는 12시간 동안 BMX 및 t-BHP와 함께 인큐베이션되었다. 데이터는 평균 ± SEM으로서 표현되었다. 각 그룹에서 n=6; *, P<0.05 및 **, P<0.01 대 t-BHP 그룹.

도 7은 실험적 고안압(Experimental Ocular Hypertension)을 갖는 토끼에서 안구 혈류에 대한 1% BMX의 효과를 도시한 것이다. 데이터는 평균 ± SEM으로서 표현되었다. 각 그룹에서 n=6; *, P <0.05 및 **, P<0.05 대 대조군.

도 8은 정상 동물과 비교한 스트렙토조토신(streptozotocin) 주사 후 체중 변화를 도시한 것이다. 데이터는 평균 ± SEM으로서 표현되었으며, **, 대조군과 비교하여 P<0.01이다.

도 9는 정상 동물과 비교한 스트렙토조토신 주사 후 혈당 수준의 변화를 도시한 것이다. 데이터는 평균 ± SEM으로서 표현되었으며, **, 대조군과 비교하여 P<0.01이다.

도 10은 스트렙토조토신-유발 당뇨병성 부종에 대한 0.5% BMX의 효과를 도시한 것이다. 0.5% BMX는 당뇨병 동물의 예반스 블루 누출(100%)을 68% (P<0.01)까지 크게 억제하였으며, 이는 54% 수준에서의 정상 동물과 더욱 가까웠다. 데이터는 0.5% BMX 그룹에서 n=18 및 당뇨병 그룹에서 n=26의 경우 평균 ± SD로서 표현되었다. *, 정상 그룹과 비교하여 P<0.01, **, DR 그룹과 비교하여 P<0.01, 및 ##, 정상 그룹과 비교하여 P<0.01.

도 11은 스트렙토조토신-유발 당뇨병성 황반 부종에 대한 1.0% BMX의 효과를 도시한 것이다. BMX는 용량-반응 관계로 당뇨병 동물의 예반스 블루 누출을 크게 억제하였다. 1% BMX는 예반스 블루 누출(56%)을 정상 동물의 수준(56%)까지 완전히 억제하였다. 데이터는 1% BMX 그룹에서 n=16 및 당뇨병 그룹에서 n=26의 경우에서 평균 ± SD로서 표현되었다. *, 정상 그룹과 비교하여 P<0.01, **, 당뇨병 동물과 비교하여 P<0.01, 및 ##, 정상 대조 동물과 비교하여 P>0.05.

도 12는 웨스턴 블롯 실험을 이용하여 스트렙토조토신-유발 당뇨병성 망막증(DR)에서 GFAP 수준에 대한 0.5% BMX의 효과를 도시한 것으로서, 이는 0.5% BMX에 의한 DR에서의 GFAP 상향-조절이 용량 관련 방식임을 나타낸다. DR 동물에서 GFAP의 상향-조절(100%로서)은 0.5% BMX에 의해 70% 수준까지 크게 억제되었고, DR 동물의 53%에서 정상 동물에서의 GFAP 수준에 더욱 가까웠다. 데이터는 모든 그룹에서 n=6의 경우에 평균 ± SD로서 표현되었다. *, 정상 그룹과 비교하여 p<0.01, **, DR 그룹과 비교하여 P<0.01, 및 ##, 정상 그룹과 비교하여 P<0.01.

도 13은 웨스턴 블롯 실험으로, 스트렙토조토신-유발 당뇨병성 망막증(DR)에서 GFAP 수준에 대한 1.0% BMX의 효과를 도시한 것으로서, 이는 1.0% BMX에 의한 DR에서의 GFAP 상향 조절이 용량 관련 방식인 것을 나타낸다. DR 랫트에서 GFAP의 상향 조절(100%로서)은 1.0% BMX에 의해 46% 수준까지 크게 억제되었고, 41%에서 정상 랫트에 매우 가까웠다. 데이터는 모든 그룹에서 n=5의 경우에 평균 ± SD로 표현되었다. *, 정상 그룹과 비교하여 p<0.01, **, 당뇨병 그룹과 비교하여 P<0.01, 및 ##, 정상 그룹 동물과 비교하여 P>0.05.

도 14는 웨스턴 블롯 실험을 이용한 스트렙토조토신-유발 당뇨병성 망막증(DR)에서 VEGF 수준에 대한 0.5% BMX의 효과를 도시한 것으로서, 이는 0.5% BMX에 의한 DR에서의 VEGF 상향 조절이 용량 관련 방식으로 이루어짐을 나타낸다. DR 동물에서 VEGF의 상향-조절(100%로서)은 0.5% BMX에 의해 77% 수준까지 크게 억제되었고, DR 동물의 50%에서 정상 동물에서 VEGF 수준에 더욱 가까웠다. 데이터는 모든 그룹에서 n=6을 갖는 경우에 평균 ± SD

로서 표현되었다. *, 정상 그룹과 비교하여 $p<0.01$, **, DR 그룹과 비교하여 $P<0.01$, 및 ##, 정상 그룹과 비교하여 $P<0.01$.

도 15는 웨스턴 블로트 실험을 이용하여 스트렙토조토신-유발 당뇨병성 망막증(DR)에서의 VEGF 수준에 대한 1.0% BMX의 효과를 도시한 것으로서, 이는 DR에서 1.0% BMX까지의 VEGF 상향 조절이 용량 관련 방식임을 나타낸다. DR 랙트에서 VEGF의 상향-조절(100%로서)은 1.0% BMX에 의해 50% 수준까지 크게 억제되었고, 34%에서 정상 랙트에 매우 가까웠다. 데이터는 모든 그룹에서 $n=3$ 의 경우에서의 평균 ± SD로 표현되었다. *, 정상 그룹과 비교하여 $p<0.01$, **, 당뇨병 그룹과 비교하여 $P<0.01$, 및 ##, 정상 그룹 동물과 비교하여 $P<0.05$.

도 16은 PCR 분석을 이용한 스트렙토조토신 유발 당뇨병성 망막증(DR)에서 GFAP의 유전자 발현에 대한 BMX의 효과를 도시한 것이다. GFAP의 mRNA 발현은 DR 동물에서의 정상 대조 수준(100%로서)의 3.0배까지 크게 증가되었으며, 이는 0.5% BMX 및 1% BMX에 의해 각각 60% 및 51%까지 억제되었다. 정상 동물의 GFAP는 DR 랙트의 34%이었다. 이러한 결과는 BMX가 용량-반응 방식으로 DR에서의 GFAP의 mRNA 발현을 유의미하게 억제할 수 있음을 나타낸다. 데이터는 정상 그룹에서 $n=9$, 당뇨병 그룹에서 $n=9$, 0.5% BMX 그룹에서 $n=7$, 및 1% BMX 그룹에서 $n=5$ 의 경우에서 평균 ± SD로 표현되었다. *, 정상 그룹과 비교하여 $p<0.01$, #, $P<0.05$ 및 ##, DR 동물과 비교하여 $P<0.01$ 및 **, $P<0.01$ 및 ##, 정상 그룹과 비교하여 $p<0.05$.

도 17a는 비히를 그룹과 BMX 그룹 간의 누출 면적(leaky area)의 비교를 도시한 것이다.

도 17b는 7일에 마우스 망막의 광간섭성 단층촬영기술(optical coherence tomography; OCT) 이미지를 도시한 것이다. 화살표: 레이저 손상 구역.

도 18a는 28일에 마우스의 안저촬영(fundus photography; FP) 및 형광 안저 조영술(fundus fluorescein angiography; FFA) 이미지를 도시한 것이다.

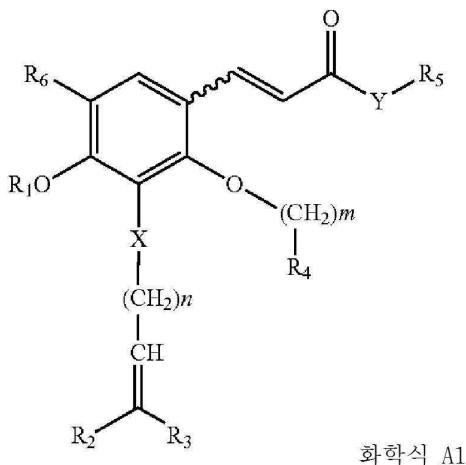
도 18b는 28일에 마우스 망막의 OCT 이미지를 도시한 것이다. 화살표: 레이저 손상 구역.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 달리 규정하지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0026] 본원에서 사용되는 단수 형태("a", "an", 및 "the")는 문맥이 달리 명백하게 명시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 이에 따라, 예를 들어, "샘플(a sample)"에 대한 언급은 복수의 이러한 샘플 및 당업자에게 공지된 이의 균등물을 포함한다.

[0027] 본 발명에 따르면, 안구 질병을 치료하는 신규한 방법이 제공된다. 본 발명에서 사용되는 화합물은 미국특허 제7,994,357호에 개시되어 있으며, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 화합물은 하기 화학식 A1의 구조를 갖는다:



[0028]

[0029] 상기 식에서,

[0030] R^1 은 수소, 알킬, 알케닐, C_5-C_6 시클로알킬, 5원 또는 6원 불포화된 카보사이클 또는 5원 또는 6원 헤테로사이클, 또는 $(CH_2)_mR^4$ 이며;

[0031] X는 C, -O-, -N- 또는 -S-이며;

[0032] Y는 -O-, -NH 또는 -O-C₁-C₄ 알킬이며;

[0033] n은 0 내지 10의 정수이며;

[0034] m은 0 내지 5의 정수이며;

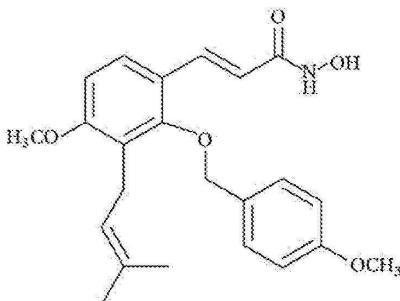
[0035] R^2 및 R^3 은 독립적으로, C_1-C_6 알킬이며;

[0036] R^4 는 할로겐, -CF₃, -OR⁷ 또는 -NR⁷R⁸로 치환될 수 있는 C_5-C_6 시클로알킬 또는 5원 또는 6원 불포화된 카보사이클 또는 헤�테로사이클이며, 여기서, R^7 및 R^8 은 독립적으로, 수소 또는 C_1-C_6 알킬이며;

[0037] R^5 는 OH, NH₂ 또는 C_5-C_6 시클로알킬, 5원 또는 6원 불포화된 카보사이클 또는 헤�테로사이클이며, 여기서, 시클로알킬, 카보사이클 및 헤�테로사이클은 할로겐, NH₂, NO₂, C₁-C₆ 알콕시, C₁₋₆ 알킬티오, OR⁷, NR⁷R⁸ 또는 CF₃으로 선택적으로 치환될 수 있으며;

[0038] R^6 은 H, 히드록시 또는 C₂-C₁₀ 알케닐에 의해 치환될 수 있는 C₁-C₁₀ 알킬이거나, R^1 과 함께 -C₂H₂-이다.

[0039] 본 발명의 하나의 특정 구현예에서, 화합물은 오스톨(osthole)의 반-합성으로부터 유도되었고 문헌[Yang YC et al. Evid. Based Complement Alternat. Med. 2013; Article ID. 514908 (18 pages), 2013.]에서 보고된 바와 같이 학습 및 기억에서 새로운 역할을 하는, 화합물 I(또한, "BMX"로 불리워짐)이다:



화합물 I

[0040]

[0041] 본원에서 사용되는 용어 "안구 질병(ocular disease)"은 중식 유리체망막병증(PVR), 포도막염, 녹내장 및 연령 관련 황반변성(AMD)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는, 안구 혈류 감소와 관련된 질병 또는 장애를 지칭한다.

[0042]

[0042] 본원에서 사용되는 용어 "당뇨병 관련 안구 질병(diabetes related ocular disease)"은 안구, 또는 보다 특히, 망막 색소 상피(retinal pigment epithelium; RPE)에 대한 산화성 스트레스 및/또는 저산소증-유도 손상과 관련될 수 있는, 당뇨병성 망막증(DR), 및 당뇨병성 황반 부종(DME)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는, 당뇨병과 관련되거나, 당뇨병에 의해 야기되거나, 당뇨병으로부터 형성된, 질병 또는 장애를 지칭한다.

[0043]

[0043] 본원에서 사용되는 용어 "유효량(effective amount)"은 요망되는 치료 효과, 또는 특정 타입의 반응의 유도를 제공하기 위한 일반 화학식 A의 화합물의 충분한 양을 지칭한다. 요망되는 유효량은 대상체의 질병 상태, 신체 조건, 연령, 성별, 종, 및 체중, 등에 따라, 대상체 간에 다르다. 그러나, 적절한 유효량은 단지 일상적인 실험을 이용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 일반 화학식 A1의 화합물은 대상체에 하루에 1회 내지 3회 경구 투여될 수 있다. 각 경구 투여를 위하여, 일반 화학식 A1의 화합물의 양은 0.5 내지 50 mg, 바람직하게, 2 내지 25 mg일 수 있다. 일반 화학식 A1의 화합물은 또한, 대상체에 안과적 투여(ophthalmological administration)를 통해 하루에 1회 내지 10회 투여될 수 있다. 예를 들어, 하루에 3회, 매회 일반 화학식 A1의 화합물을 포함하는 1 방울의 제제가 사용될 수 있다. 국소 안과적 투여를 위하여, 0.01 내지 10%의 일반 화학식

A1의 화합물이 사용될 수 있으며, 바람직하게, 0.1 내지 1.0%의 일반 화학식 A1의 화합물이 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 약제 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 보편적으로 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"는 임의의 표준 약제학적 담체를 포함한다. 이러한 담체는 염수, 완충된 염수, 텍스트로오스, 물, 글리세롤, 에탄올, 프로필렌 글리콜, 크레모포어(cremophor), 나노입자, 리포솜, 폴리머, 및 이들의 조합을 포함할 수 있지만, 이로 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명의 약제 조성물은 선택된 투여 모드에 대해 적합한 임의의 형태로 구성될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여를 위해 적합한 조성물은 고체 형태, 예를 들어, 환제, 캡슐, 과립, 정제, 및 분말, 및 액체 형태, 예를 들어, 용액, 시럽, 엘릭시르, 및 혼탁액을 포함한다. 국소 투여를 위해 유용한 형태는 크림, 연고, 젤, 혼탁액, 드롭(drops), 에멀젼, 피부 패치를 포함한다.

[0046] 표준 담체 이외에, 본 발명의 경구 약제 조성물에는 경구 제형에서 일반적으로 사용되는 하나 이상의 부형제, 예를 들어, 계면활성제, 흡입제, 가용화제, 안정화제, 에멀젼제, 증점제, 착색제, 감미제, 착향제, 및 보존제가 보충될 수 있다. 이러한 부형제는 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0047] 본 발명에 따르면, 약제 조성물은 대상체에 임의의 경로, 예를 들어, 경구 투여, 비경구 주사, 안구 주사(예를 들어, 유리체내 주사), 피부 패치, 또는 안구 상의 국소 투여를 통해 투여될 수 있다. 안구 상의 국소 투여를 위한 약제 조성물은 안연고, 아이겔, 아이크림 또는 점안액의 형태로 제형화될 수 있다.

[0048] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이러한 실시예는 제한적이기 보다는 설명의 목적을 위해 제공되는 것이다.

0049] 실시예

0050] 실시예 1: 산화에 대한 효과

[0051] RPE의 기능장애 또는 세포사의 메커니즘은 산화 손상, 부르크 막(Bruch's membrane)에서의 퇴행성 변화(degenerative change) 및 맥락막의 혈관구조(choroidal vasculature)에 대한 손상과 같은, 다양한 인자를 수반할 수 있다. 상이한 타입의 산화성 스트레스는 RPE 세포에서 단백질에 대한 산화 손상의 상이한 패턴 및 생존력의 손실의 상이한 패턴을 야기시킨다.

[0052] 망막 색소 상피(RPE)는 망막 광수용기와 맥락막 혈관 사이에 위치된 단일층 세포이며, 이는 광수용기의 기계적 및 대사 지지에서 중요한 역할을 한다. 또한, RPE 세포는 일부 안구 질병, 예를 들어, 증식 유리체망막병증(PVR), 포도막염 및 연령 관련 황반변성(AMD)의 주요 구성요소이다. AMD 및 다른 질병, 예를 들어, 당뇨병성 망막증(DR)은 아마도, 광 또는 대사 반응으로부터 유도된 산소 라디칼의 영향과 관련될 수 있다. 상피(epithelium)가 산소 분압(oxygen tension) 및 산소 라디칼-관련 스트레스의 변화에 매우 취약하기 때문에, 허혈성-관련 질병 동안 RPE에서 형성된 반응성 산소 종(reactive oxygen species: ROS)은 RPE 세포에 해로울 수 있다. AMD의 중요한 "초기" 시간은 산화 손상으로 인한 RPE 세포의 손실이다. 산화성 스트레스는 암, 당뇨병, 신경퇴행성 및 심혈관 질병과 같은 여러 연령 관련 만성 질병의 병인(etiology)에 관여하는 것으로 인식되었다.

0053] 1.1 물질

[0054] 티아졸릴 블루 테트라졸륨 브로마이드(MTT, 순도 $\geq 97.5\%$), 둘베코 포스페이트 완충 염수(Dulbecco's phosphate buffered saline; DPBS), 과산화수소(H_2O_2 , 수중 50 중량% 용액), 3차-부틸 하이드로페온사이드(t-BHP, 수중 70 중량%), 나트륨 요오데이트($NaIO_3$, 순도 $\geq 99.5\%$), 나트륨 아지드(NaN_3 , 순도 $\geq 99.5\%$) 및 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)/햄(Ham's) F12(DMEM /F12, 1:1) 모두는 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구매된 것이다. 인간 망막 색소 상피(ARPE-19) 세포, 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC), 우태아혈청(FBS), 혈관 세포 기초 배지 및 내피 세포 성장 키트는 ATCC(Manassas, VA, USA)로부터 구매된 것이다.

0055] 1.2 세포 배양

[0056] ARPE-19 세포를 10% FBS, 100 단위/ml 페니실린 G, 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 DMEM/F12 배지에서 성장시켰다. HUVEC를 내피 세포 성장 키트가 보충된 혈관 세포 기초 배지에서 성장시켰다. 세포를 5% CO_2 및 95% 공기 하, 37°C에서 가습 인큐베이터(humidified incubator)에서 인큐베이션하였다.

[0057] 1.3 ARPE-19 세포 및 HUVEC의 생존력에 대한 BMX의 효과

[0058] ARPE-19 세포 및 HUVEC의 생존력을 측정하기 위해 MTT 검정을 이용하였다. 2×10^5 ARPE-19 세포 또는 5×10^4 HUVEC를 96-웰 플레이트($100 \mu\text{l}$ /웰)에 시딩하였고, 밤새 성장시켰다. 세포 없이 $100 \mu\text{l}$ 배지를 첨가함으로써 음성 대조군을 제조하였다. 이후에, 세포를 12, 24 또는 72시간 동안 화합물 I($0.03, 0.1, 0.3, 1, 3$ 및 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$) 및/또는 산화제($\text{NaIO}_3, \text{H}_2\text{O}_2, \text{t-BHP}$ 및 NaN_3)를 갖는 새로운 배지로 처리하였다($200 \mu\text{l}$ /웰). 비히클 대조군을 비히클로 처리하였다. $20 \mu\text{l}$ MTT(5 mg/mL)를 웰에 첨가하였고, 다른 4시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 배지를 폐기하고, $100 \mu\text{l}$ DMSO를 첨가하여, 생존 세포에 의해 MTT로부터 형성된 포르마잔을 용해시켰다. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기(Bio-Rad Laboratories, Inc., CA)를 이용하여 570 nm 에서 측정하였다. 세포 생존력을 하기 식에 따라 계산하였다: 세포의 생존력(%) = (시험된 샘플의 흡광도 - 음성 대조군의 흡광도)/(비히클 대조군의 흡광도 - 음성 대조군의 흡광도) × 100%.

[0059] 1.4 저산소증 치료

[0060] 세포를 밤새 부착시키고, 이후에, 72시간 동안 저산소 조건 하에서 화합물 I 또는 비히클에 노출시켰다. N_2 및 CO_2 가스 공급원과 함께 O_2 및 CO_2 제어기(Proox Model 110 및 Pro CO2 model 120, Biospherix Ltd., Redfield, NY, USA)에 의한 온도 및 습도 제어 환경 C-챔버를 이용하여 저산소 조건($1\% \text{ O}_2, 5\% \text{ CO}_2$ 및 $94\% \text{ N}_2$)을 유지하였다.

[0061] 1.5 통계 분석

[0062] 모든 데이터는 평균 ± S.E.M으로서 표현되었다. 통계 분석은 스튜던트 t-테스트(Student's t-test)를 이용하여 수행되었다. $P < 0.05$ 의 값은 통계학적으로 유의미한 것으로서 간주되었다.

[0063] 1.6 결과

[0064] 1.6.1 ARPE-19 세포 및 HUVEC에서 화합물 I의 세포독성

[0065] 이러한 결과는, $0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BMX가 ARPE-19 세포 및 HUVEC에서 세포 성장에 영향을 미치지 않음을 나타내었다. 그러나, 화합물 I은 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 ARPE-19 세포 및 HUVEC의 증식을 각각 36% 및 47%까지 유의미하게 억제하였다($P < 0.01$, 도 1a 및 도 1b).

[0066] 1.6.2 ARPE-19 세포 및 HUVEC에서 저산소증-유도 손상에 대한 화합물 I의 효과

[0067] $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 을 제외하고, 화합물 I(BMX)은 ARPE-19 세포의 생존력을 22%까지 증가시켰으며, $0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 화합물 I은 저산소 조건에서 ARPE-19 세포에 어떠한 효과도 나타내지 않았다($P < 0.05$, 도 2a). $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서, 화합물 I은 저산소 조건에서의 HUVEC의 생존력을 98%까지 유의미하게 감소시켰다($P < 0.01$, 도 2b).

[0068] 1.6.3 ARPE-19 세포 및 HUVEC에서 NaIO_3 -유발 손상에 대한 화합물 I의 효과

[0069] $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서, 화합물 I은 ARPE-19 세포 및 HUVEC 둘 모두에서 NaIO_3 -유발 손상의 생존력을 유의미하게 향상시켰다($P < 0.01$, 도 3a 및 도 3b). 그러나, $0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 화합물 I은 HUVEC에서 $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ NaIO_3 -유발 손상을 역전시켰다($P < 0.01$, 도 3b).

[0070] 1.6.4 ARPE-19 세포 및 HUVEC에서 H_2O_2 -유발 손상에 대한 화합물 I의 효과

[0071] $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 및 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서, 화합물 I은 ARPE-19 세포에서 $400 \mu\text{M}$ 및 $600 \mu\text{M}$ H_2O_2 -유발 손상을 역전시켰다($P < 0.01$, 도 4a). 그러나, $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 화합물 I은 HUVEC에서 $200 \mu\text{M}$ 및 $400 \mu\text{M}$ H_2O_2 -유발 손상을 각각 41% 및 10%까지 향상시켰다(도 4b).

[0072] 1.6.5 ARPE-19 세포 및 HUVEC에서 NaN_3 -유발 손상에 대한 화합물 I의 효과

[0073] 화합물 I은 ARPE-19 세포에서 NaN_3 -유발 손상을 유의미하게 역전시켰다(도 5a). 그러나, $0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로부터, 화합물 I은 HIVEC에서 NaN_3 -유발 손상에 영향을 미치지 않았다. $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 화합물 I은 HUVEC에서 $0.3, 1$ 및 3 mM NaN_3 -유발 손상을 각각 65%, 52% 및 72%까지 향상시켰다($P < 0.01$, 도 5b).

[0074] 1.6.6 ARPE-19 세포 및 HUVEC에서 t-BHP-유발 손상에 대한 화합물 I의 효과

[0075] 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지, 화합물 I은 ARPE-19 세포에서 200 μM t-BHP-유발 손상을 역전시켰다(도 6a). 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서, 화합물 I은 HUVEC에서 200 μM t-BHP-유발 손상을 각각 26% 및 28%까지 역전시켰다($P<0.01$, 도 6a). 그러나, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 화합물 I은 HUVEC에서 50, 100 및 200 μM t-BHP-유발 손상을 각각 40%, 20% 및 51%까지 향상시켰다($P<0.01$, 도 6b).

[0076] BMX가 BMX에 의해 향상된, NaIO_3 을 제외하고 저산소, H_2O_2 , NaN_3 및 t-BHP를 포함하는, 모든 산화제에 의해 야기된 RPE 세포의 산화 손상을 역전시켰다고 결론을 내었다. 반대로, 고농도(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서의 BMX는 HUVEC 상에서 NaIO_3 을 제외한 저산소, H_2O_2 , NaN_3 및 t-BHP를 포함하는 모든 것에 의해 유발된 산화 손상을 향상시켰다. 저농도의 BMX는 HUVEC 세포 상에서 NaIO_3 을 포함하는, 모든 산화제에 의해 유발된 산화 손상의 영향을 나타내지 않거나 약간의 역전을 나타낸다. 이러한 결과는, BMX가 RPE 세포 상에서의 NaIO_3 을 제외한 모든 산화제에 대한 강력한 항산화제임을 나타낸다. 반대로, HUVEC 상에서 산화제에 의해 유발된 및 심지어 고농도(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서의 산화 손상을 향상시킨 손상을 역전시키기에 덜 효과적이거나 효과적이지 않다.

[0077] 요약하면, BMX는 비-안구 특정 HUVEC 세포가 아닌, 안구 RPE 세포에 대한 강력한 항산화제인데, 이는 BMX가 당뇨병성 망막증 및 당뇨병성 황반 부종과 같은 안구 관련 질병을 치료하기 위해 사용되는 우수한 제제임을 나타낸다.

[0078] 실시예 2: 안구 혈류(Ocular Blood Flow: OBF)의 향상

[0079] 안구 혈류의 개선은, 가장 요구되는 영양소 및 산소의 공급이 결과적으로 정상 수준에서 유지되거나 정상 수준에 가까워질 수 있기 때문에, 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 황반 부종, 녹내장, 및 허혈성 안구 질병에서 필수적이다. 관상 동맥의 혈류가 2 내지 8 $\text{mL}/\text{분}/\text{g}$ 조직으로 매우 높지만, 맥락막의 혈류는 13 $\text{mL}/\text{분}/\text{g}$ 조직으로 훨씬 더 높다. 안구 혈류에서의 만성적인 감소는 시야 및 시신경 헤드의 퇴화를 초래할 수 있으며, 45분 이상 동안의 급성 허혈증은 비가역적 실명을 야기시킬 수 있다.

[0080] 안구 혈류는 녹내장, 허혈성 망막병증, 당뇨병성 망막증 및 연령 관련 황반 변성(AMD)을 포함하는, 여러 안구 질병과 밀접하게 관련이 있다. 이에 따라, 정상 안구 혈류의 유지는 상술된 안구 질병을 예방/치료하는 데 필수적이다.

[0081] 2.1 물질

[0082] 0.5% 알카인(alcaine)을 상업적으로 구입하였다. 20% 멸균된 고장식염수 용액을 실험실에서 제조하였다. 착색된 미소구체를 E-Z Trac(Los Angeles, CA)로부터 구매하였다. 미소구체가 함께 달라 붙는 것을 방지하기 위해 착색된 미소구체를 0.01%(v/v)의 Tween 80을 함유한 염수로 희석하였다. 각 시점에서 0.4 mL의 2백만개의 미소구체를 주사하였다.

[0083] 체중이 2. 내지 3.0 kg인 암컷 뉴질랜드 백토끼를 상업적으로 구매하였다. 동물 보호 및 치료는 기관 지침에 따랐다.

[0084] 2.2 방법

[0085] 토끼를 35 mg/kg 케타민 및 5 mg/kg 발란진(Balanzine)(10% 자일라진)으로 근육내 주사에 의해 마취시켰다. 이후에, 초기 용량의 절반을 1시간마다 제공하였다. 좌심실을 착색된 미소구체의 주사를 위해 오른쪽 경동맥을 통해 삽관하고, 대퇴동맥을 혈액 샘플의 채혈을 위해 삽관하였다. 좌측 안구를 1방울의 프로파라케인 하이드로클로라이드 안과 용액(Bausch & Lomb, Inc., Tampa, FL, USA)으로 치료하였다. 바늘을 좌측 안구의 전방(anterior chamber) 내로 직접적으로 삽입하였으며, 이는 40 mmHg 염수 압력계에 연결되었다. 고안압 모델은 안구 혈류를 정상 값의 대략 1/3까지 감소하였다. 50 μl 의 10 g/l 화합물 I 또는 비히클(30% HP- β -CD 용액)을 고안압 모델을 만든 후 30분에 좌측 안구에 국소적으로 주입하였다. 안구 혈류를 화합물 I 또는 비히클로 처리 후 0, 30, 60 및 120분에 착색된 미소구체에 의해 측정하였다. 각 시점에, 2백만개의 미소구체를 기준물로서 주입하였으며, 혈액 샘플을 미소구체의 주입 후 정확하게 1분 동안 대퇴동맥으로부터 채혈하였다. 혈액 샘플을 헤파린처리된 튜브에서 채혈하였으며, 부피를 기록하였다. 토끼를 마지막 혈액 샘플링 후 100 mg/kg 펜토바르비탈나트륨(pentobarbital sodium)의 주사로 안락사시켰다. 좌측 안구에서 핵을 제거하고, 홍채, 섬모체, 망막 및 맥락막으로 해부하였다. 모든 조직을 계량하였다.

[0086] 샘플 처리 및 미소구체 카운팅의 세부사항을 E-Z Trac(Los Angeles, CA, USA)에 의해 제공하였다. 간단하게, 혈

액 용혈 시약을 혈액 샘플을 갖는 마이크로퓨지 투브(microfuge tube)에 첨가하고, 이후에, 와류시키고, 6000 rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 이후에, 조직/혈액 소화 시약 I 및 II를 첨가하였다. 투브를 캡핑하고, 와류시키고, 30분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 카운팅 시약을 첨가하고, 완류시키고, 15분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 미소구체를 정확한 부피의 카운팅 시약에 재현탁하였다. 미소구체의 수를 현미경 하에서 혈구계에 의해 카운팅하였다. 조직/혈액 소화 시약 I을 조직 샘플을 갖는 마이크로퓨지 투브에 첨가하고, 시일링하고, 95°C에서 15분 동안 가열하였다. 이후에, 투브를 30초 동안 와류시키고, 재가열하고, 모든 조직 샘플이 용해될 때까지 다시 와류시켰다. 조직 샘플이 여전히 고온인 동안에 조직/혈액 소화 시약 II을 첨가하하고, 이후에, 투브를 캡핑하고, 와류시키고, 30분 동안 원심분리하였다. 이후 프로토콜은 혈액 샘플을 처리하기 위해 사용되는 것과 동일하였으며, 미소구체를 카운팅하였다.

[0087] 특정 시점에 각 조직의 혈류를 하기 방정식에 따라 계산하였다: $Q_m = (C_m \times Q_t)/Cr$. Q_m 은 $\mu\text{l}/\text{분}/\text{mg}$ 의 조직의 혈류이며, C_m 은 조직의 미소구체 넘버링(numbering)이며, Q_t 은 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 혈액 샘플의 유량이며, Cr 은 기준 혈액 샘플에서의 미소구체 수이다.

[0088] 2.3 결과

[0089] 모든 조직에서의 혈류는 약물 주입 후 120분에 1% 화합물 I에 의해 유의미하게 증가되었다(도 7). 그러나, 섬모체 및 맥락막에서의 혈류는 또한, 약물 주입 후 30분 및 60분에 크게 증가되었다(도 7).

[0090] 특히, 맥락막, 망막 및 홍채에서, 안구 혈류의 감소에 의해 야기된 여러 안구 질병이 존재한다. 이러한 것은 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 황반 부종, 녹내장, 연령 관련 황반변성, 허혈성 망막병증, 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 이에 따라, 안구 혈류의 향상은 DR 및 DME에 유익하다. 이러한 연구는 BMX에 의한 안구 혈류의 강력한 향상을 나타내었으며, 이는 DR 또는 DME를 효과적으로 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0091] 실시예 3: 스트렙토조토신-유발 당뇨병성 황반 부종에서 혈액-망막 장벽 파괴에 대한 화합물 I의 효과

[0092] 당뇨병성 황반 부종(DME)은 선진국에서 50세 이상의 사람에서 시력 상실의 가장 흔한 원인이다. 무증상 염증(subclinical inflammation)을 통한, DME의 원인인 진성 당뇨병은 전세계의 발병률 및 유병률이 증가하면서, 선진국뿐만 아니라 저개발국에서도 전염되고 있다. 이러한 합병증은 주로 DR로 인하여, 시력을 손상시키는 질환이 이미 발생하였을 때, 일어나는것 보다 이후에 자주 진단되고 치료되는 당뇨병의 혈관 합병증을 발생시킨다. DR은 망막 혈관신생 및 황반 부종을 통해 시력을 파괴시킨다. DME의 병리생리학은 확장된 모세혈관, 망막 미세동맥류 및 혈관주위세포의 손실을 수반하였으며, 최종적으로 혈액-망막 장벽(BRB)을 손상시킨다. BRB의 파괴는 세포외 공간 내로의 유체 누출을 야기시키며, 이는 세포 수준에서 황반 구조 및 기능을 방해한다.

[0093] 인터류킨-1 차단 화합물은 IL-1 유발 염증을 억제하는 데 효과적이고, 또한, 안과 상처 치유를 억제하는 데 효과적이다. 다양한 염증 매개체가 DME를 증진시키는 역할을 하는 것으로 보이는 것을 고려하면, 본 발명자는, 항-염증 성질을 갖는 화합물 I이 당뇨병-유발 DME를 차단하는 능력을 발휘할 수 있다고 추측한다.

[0094] 3.1 물질 및 방법

[0095] 16시간 금식 후, 체중이 200 내지 220 g인 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 랫트는 10 mM 나트륨 시트레이트 완충제(pH 4.5; Sigma-Aldrich, St. Louis, MD) 중 스트렙토조토신(STZ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MD)의 단일 60 mg/kg 복막내 주사를 수용하였다. 대조군 랫트를 금식시키고, 완충제만을 수용하였다. STZ를 수용한 후 7일에 375 mg/dL보다 더 높은 혈당 수준을 갖는 랫트는 당뇨병인 것으로 여겨졌다. 체중 및 혈당을 매주 검출하였다. 모든 실험을 실험실 동물의 관리 및 취급을 위한 안내서(Guide for the Care and Handling of Laboratory Animals)(NIH Publication no. 85-23)에 의해 특정된 규제에 따라 수행하였다. 치료를 위하여, 랫트에 0.5% 및 1% 화합물 I 접안액을 주입하였다. 모든 랫트의 양쪽 안구에 당뇨병 형성 후 6주 동안 하루에 3회 1방울의 안구 용액을 주입하였다. 랫트를 혈당 결정 후 4주 동안 하루에 3회 0.5% 및 1% 화합물 I 또는 비히를 용액으로 치료하였다. 동물 보호 및 치료는 기관 지침에 따랐다.

[0096] 전신 마취의 유도 후에, 우측 경정맥 및 우측 장골 동맥에 혜파린처리된 염수(50 IU 혜파린/ml 염수)가 채워진, 0.28 mm 및 0.58 mm 내부 직경 폴리에틸렌 배관을 각각 삽관하였다. 에반스 블루(Sigma-Aldrich, St. Louis, MD)를 10초에 걸쳐 45 mg/kg의 투여량으로 경정맥을 통해 주사하였다. 에반스 블루 유입 직후에, 랫트는 시각적으로 청색으로 변하였으며, 이는 염료의 흡수 및 분포를 확인하였다. 후속하여, 15분 간격으로, 0.1 ml 혈액을 2시간 동안 장골 동맥으로부터 채혈하여 시간-평균처리된 혈장 에반스 블루 농도를 얻었다. 염료를 120분 동안 순환시킨 후에, 흉강을 열고, 랫트를 좌심실을 통해 37°C에서 2분 동안 0.05 M, pH 3.5, 시트레이트-완충 파라포름알데하이드(Sigma-Aldrich, St. Louis, MD)로 관류시켰다. 일부만에 대한 에반스 블루의 결합을 최적화하기

위해 3.5의 pH를 사용하였으며, 혈관 수축을 방지하기 위해 관류 용액을 37°C까지 가온시켰다.

[0097] 관류 직후에, 양쪽 안구에서 핵을 제거하고, 적도에서 절개하였다. 망막을 수술용 현미경 하에서 조심스럽게 절개하였고, 진공 장비에서 5시간 동안 철저히 건조시켰다. 에반스 블루 누출의 정량화를 정규화하기 위해 건조 중량을 이용하였다. 70°C에서 18시간 동안 150 ml 포름아미드(Sigma-Aldrich, St. Louis, MD) 중에서 각 망막을 인큐베이션함으로써 에반스 블루를 추출하였다. 상청액을 1시간 동안 6000 rpm에서 필터를 구비한 원심분리 튜브를 통해 원심분리하였으며, 100 µl의 여액을 3회 분광광도계 측정(SmartSpec, Bio-Rad)을 위해 사용하였다. 각 측정은 5초 간격으로 수행하였으며, 모든 측정 세트에는 공지된 표준물이 선행되었다. 포름아미드 중 에반스 블루에 대한 최대 흡광도인 620 nm 및 최소 흡광도인 740 nm 둘 모두에서 각 샘플을 측정함으로써 백그라운드-차감된 흡광도를 결정하였다.

[0098] 추출물에서 염료의 농도를 포름아미드 중 에반스 블루의 표준 곡선으로부터 계산하였다. BRB 파괴를 하기 방정식을 이용하여 계산하였으며, 결과는 BRB 파괴의 억제(%)로 표현되었다: [비히를 대조군에서의 농도) - (비-당뇨병 또는 화합물 I 치료 그룹에서의 농도)] / (비히를 대조군에서의 농도) × 100%.

3.2 결과

[0100] 비-당뇨병 랫트의 체중은 3주 기간에 걸쳐 꾸준히 증가한 반면, 당뇨병 랫트의 체중은 약물 치료와는 무관하게 점진적으로 감소하였다(도 8). 혈당 수준과 관련하여, 당뇨병 랫트는 약물 치료와는 무관하게 꾸준히 증가하였다(도 9). 반면, 비-당뇨병의 혈당은 100 mg%에서 낮게 유지되었다.

[0101] 정상 비-당뇨병 그룹 및 0.5% 화합물 I 및 1% 화합물 I 치료 그룹에서 에반스 블루 누출의 백분율은 100%로서의 당뇨병 비히를 대조군과 비교하여 각각 54%, 68% 및 56%이었다(도 10 및 도 11). 당뇨병 비히를 대조군과 모든 다른 그룹 간에 유의미한 차이가 존재하였다(도 10 및 도 11), 그러나, 비-당뇨병 대조군과 1% 화합물 I 치료 그룹 간에 차이가 존재하지 않았다(도 10 및 도 11).

[0102] 이러한 결과는 DME의 에반스 블루 누출이 1% 화합물 I에 의해 완전히 및 0.5% 화합물에 의해 부분적으로 차단될 수 있음을 나타내며, 이는 양호한 용량 반응 관계를 나타내는 것이다(도 10 및 도 11).

[0103] BRB 파괴는 당뇨병의 초기 합병증 및 DME의 주요 원인인 혈관 투과성 또는 혈관 누출을 야기시킨다. BRB는 2가지 구성요소를 갖는다: 외부 장벽 및 내부 장벽. 외부 장벽은 망막 색소 상피(RPE) 세포들 간의 치밀 이음(tight junction)에 의해 형성되고, 폐쇄 소대(zonula occludens) 및 데소모솜(desmosome)을 포함한다. 내부 장벽은 망막 혈관 내피 세포와 잘 분화된 신경 교세포(성상 세포 및 물려 세포)의 네트워크 간에 치밀 이음 복합물에 의해 형성된다. 여러 임상 연구는, 내부 장벽이 DME를 야기시키는 혈관 누출의 주요 부위임을 시사한다. BRB 파괴의 메커니즘은 다중요인으로서, 치밀 이음, 혈관주위세포 및 내피 세포 손실, 망막 혈관 확장 및 백혈구율혈 및 유리체-망막 토우트(vitreo-retinal taut) 및 견인(traction)의 변화에 대해 2차적이다. 망막 혈관 치밀 이음은 혈관이 누출되는 것을 보호하지만, 지속 과혈당증은 치밀 이음을 손상시킬 수 있으며, 혈관은 누출될 수 있어서, 유체 또는 혈액이 망막으로 스며들 수 있고, 이에 따라, 망막 팽창을 야기시킨다. BRB 무결성을 당뇨병 유발 후 6주에, 에반스 블루 누출 방법에 의해 분석하였다. 당뇨병 동물의 에반스 블루 누출은 비-당뇨병 동물보다 훨씬 더 높았는데, 이는 당뇨병 그룹과 비-당뇨병 그룹 간에 유의미한 차이를 입증하는 것이다(도 10 및 도 11). 이전의 본 실험실에서 수행된 실험에서, 오스톨은, 실험적으로 유발된 안구 염증에서 혈관 투과성을 감소시키고 랫트 안구에서 IL-1-유발 포도막염을 억제하는 효능을 나타내었다. 본 연구는, BMX가 STZ-유발 당뇨병 동물 모델에서 혈관 투과성을 유의미하게 감소시켰음을 나타내었다. 또한, 1% BMX는 비-당뇨병 수준으로 당뇨병 BRB 파괴를 완전히 회복시켰다(도 11).

실시예 4: 스트렙토조토신-유발 당뇨병성 망막증에 대한 화합물 I의 효과

[0105] 신경교 섬유질 산성 단백질(GFAP)은 망막 스트레스의 확립된 지시제이다. 정상 포유류 망막에서, GFAP는 물려 세포에서 아주 미미하게 검출 가능하다. 스트레스 하에 있을 때, 활성화된 물려 세포가 높은 수준의 GFAP를 발현시킨다. 현 연구에서, 증가된 GFAP 발현은 물려 세포에서 입증되었으며, 이는 물려 세포 기능장애가 STZ-유발 당뇨병성 망막증에 관여되었음을 나타내는데, 이는 이전 연구와 일치한다. 물려 세포 기능장애는 뉴런 세포에 대해 독성인 글루타메이트 수송 이상을 유발한다. 당뇨병성 망막에서 뉴런 기능이상 또는 세포 손실은 부분적으로 물려 세포 기능이상에 기인할 수 있다.

[0106] 당뇨병성 망막증으로부터의 시력 상실 및 실명은 대개 혈관 누출 또는 허혈증의 결과이다. 혈관 누출은 출혈 또는 경질 삼출물의 형성을 수반한다. 국소 재관류에서 혈관 손상 및 봉괴로부터의 허혈증은 혈관형성 및 혈관신생을 초래한다. 형성된 새로운 혈관은 손상되거나 쉽고 출혈하기 용이하며, 이는 시력을 손상시켜, 궁극적으로 실

명을 유발할 수 있다. VEGF는 혈관 형성 및 기능의 주요 조절이다. 이는 내피 세포에서의 여러 과정, 예를 들어, 증식, 생존, 및 이동을 조절한다. 망막 VEGF 발현은 동물 및 인간에서 당뇨병성 혈액-망막 장벽 파괴 및 허혈증 관련 혈관신생과 관련이 있다. 본 연구에서, 물리 세포에서 VEGF 발현은 당뇨병성 망막에서 유의미하게 상향 조절되었으며, 이는 VEGF 과발현이 STZ-유발 당뇨병에서 망막 혈관 이상에서 중요한 역할을 함을 나타낸다. 이러한 연구에서, 본 발명자는 당뇨병에 의한 GFAP 및 VEGF 상향-조절이 화합물 I에 의해 억제될 수 있는지를 조사하고자 하였다.

[0107] 4.1 방법

[0108] 4.1.1 동물

[0109] 체중에 200 내지 220 g인 16시간 금식한 스프라그-풀리 암컷 랫트는 10 mM 나트륨 시트레이트 완충제(pH 4.5; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 중 스트렙토조토신(STZ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)의 단일 60 mg/kg 복막 내 주사를 수용하였다. 대조군 랫트를 금식시키고, 완충제 용액만을 수용하게 하였다. STZ를 수용한 후 7일에 375 mg/dL보다 더 높은 혈당 수준을 갖는 랫트는 당뇨병인 것으로 간주되었다. 당뇨병 랫트를 6주 동안 1% 화합물, 0.5% 화합물 또는 비히클 접안액으로 하루 3회 치료하였다.

[0110] 4.1.2 웨스턴 블로트 검정

[0111] 랫트를 마지막 섹션에서 기술된 바와 같이 희생시킨 후에, 안구에서 핵을 제거하고 양분하였다. 망막을 세안컵(eyecup)으로부터 박리시키고, 바로 1 μ l 프로테이나아제 억제제 칵테일(STZ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 포함한, 0.3 ml 얼음-냉각 용해 완충제(STZ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)로 균질화하였다. 불용성 물질을 20분 동안 12,000 g으로의 원심분리에 의해 제거하였다. 최종 단백질 농도를 제조업체 사양에 따라 단백질 검정 키트(BCA, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 이용하여 측정하였다. 균질액(80 μ g)을 NuPAGE Bis-Tris Mini Gels(Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY)에 의해 분리하고, iBlot Gel 이송 장치(Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY)에 의해 니트로셀룰로오스 막으로 이동시켰다. 니트로셀룰로오스 막을 WesternBreeze® 발색 키트-항-토끼(Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY)의 지시에 따라 BenchPro 4100 Card Processing Station(Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY)에 의해 처리하였다. 사용된 1차 항체는 각각 항-GFAP(1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 및 글리세알데히드-3-포스페이트 테하이드로게나아제(GAPDH)(1:100)이었다. 항-토끼 IgG, AP-연결 항체는 2차 항체로서 사용되었다. 웨스턴 블로트 연구의 정량적 평가를 위하여, 니트로셀룰로오스 막을 스캐닝하였으며, 광학 밀도를 분석 소프트웨어(Pro-gel Analyzer software, Media Cybernetics, Rockville, MD)로 정량화하였다.

[0112] 4.1.3 정량적 실시간 PCR

[0113] 랫트를 상기에 기술된 바와 같이 희생시킨 후에, 안구에서 핵을 제거하고 양분하였으며, 망막을 세안컵으로부터 박리시키고, 바로, RNA 단리제(RNeasy®Plus Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA)에서 균질화하였다. 제1 가닥 cDNA를 제조업체 프로토콜(대용량 역전사 키트, AB life technologies, Austin, TX)에 따라 상업적으로 키트를 이용함으로써 mRNA로부터 제조하였다. 프라이머의 서열은 표 1에 나열되어 있다. 실시간 PCR을 실시간 검출 시스템(iCycler, Bio-Rad)에서 형광 검출 염료(SYBR® Green PCR Master Mix, AB life technologies, Austin, TX)와 함께 표준 프로토콜을 이용하여 96-웰 플레이트에서 수행하였다. 모든 PCR 반응은 형광 염료/PCR 믹스, 최종 농도 0.2 μ M 포워드 및 리버스 프라이머, 및 1 ng의 cDNA로 이루어진 20 μ l의 최종 부피였다. PCR 사이클 파라미터는 하기와 같다: 90°C에서 15분 동안 폴리머라아제 활성화, 15초 동안 95°C, 30초 동안 60°C, 및 1분 동안 72°C의 40회 사이클 하기 식에 따라, 동일한 샘플에서 β -액틴 하우스키핑 유전자의 CT를 정규화함으로써 mRNA의 양을 계산하였다: 평균 β -액틴 CT(각각의 다중 PCR은 3회 수행됨)를 평균 타겟 유전자 CT로부터 차감하였으며, 결과는 Δ CT로 나타낸다. 이러한 Δ CT는 특정되고, 교정 샘플의 Δ CT와 비교될 수 있다. 타겟 유전자의 Δ CT에서 대조군 Δ CT의 차(subtraction)는 $\Delta\Delta$ CT로서 지칭된다. 타겟 유전자의 발현의 상대적 정량화(대조군과 비교하여)는 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 를 이용하여 결정되었다.

[0114] 표: 프라이머로서 사용되는 올리고뉴클레오티드의 서열

타겟 유전자		서열 (5'-3')
GFAP	센스	CCGTTCTCTGGAAGACACTGAAAC
	안티 센스	TTGGAAGGATGGTGTGGATTG
β -액틴	센스	AGGCCAACGGTGAAAAGATG
	안티 센스	ACCAGAGGCATACAGGGACAA

[0115]

4.1.4 통계 분석

[0116] 모든 데이터를 평균 \pm SD로서 표현하였다. 2 그룹에서 정상 분포 데이터를 스튜던트 t-테스트(Student's t-test)로 분석하였다. 쌍별 비교(pairwise comparison)를 위하여, 쌍별 t-테스트를 2 그룹 간에서 이용하였다. P < 0.05의 값은 통계학적으로 유의미한 것으로 간주되었다.

4.2 결과

4.2.1 웨스턴 블로트 검정

[0119] STZ의 복막내 주사 후 7주에, 당뇨병 대조군의 망막에서 GFAP의 단백질 발현을 비-당뇨병 그룹과 비교하여 유의미하게 증가하였다(P<0.05). 당뇨병 랫트를 6주 동안 1% 화합물 I 및 0.5% 화합물 I로 하루에 3회(tid.) 주입한 후에 망막에서 GFAP 단백질의 발현은 당뇨병 대조군과 비교하여 유의미하게 저해되었다(P<0.05, 도 12 및 도 13).

[0120] 이러한 결과는 당뇨병성 망막증이 화합물 I에 의해 용량-의존 방식으로 치료될 수 있다는 것을 명확하게 나타내었다(도 12 및 도 13).

[0121] VEGF는 대조 정상 안구와 비교하여 당뇨병 안구에서 VEGF의 유의미한 증가를 알 수 있는 바와 같이, 당뇨병성 망막증에서 크게 증가되는 다른 바이오마커이다(도 14 및 도 15). 당뇨병 안구에서 VEGF 수준은 0.5% 화합물 I 및 1% 화합물 I에 의해 크게 저해되었으며(도 14 및 도 15), 이는 당뇨병성 망막증이 용량 의존 방식으로 효과적으로 치료될 수 있음을 나타낸다(도 14 및 도 15).

4.2.2 정량적 실시간 PCR

[0122] GFAP의 유전자 발현을 정량적 실시간 PCR에 의해 검출하였다. 결과는, 비-당뇨병 망막이 낮은 수준의 GFAP를 나타냄을 명시하였다(도 16). 당뇨병 발병 후 6주에, GFAP의 유전자 발현을 유의미하게 상향-조절하였다. GFAP 발현을 당뇨병 대조군과 비교하여 0.5% 및 1% 화합물 I로의 치료에 의해 유의미하게 하향-조절하였다(도 16).

[0123] 이러한 결과는 이전 섹션에서 제시된 웨스턴 블로트으로 얻어진 결과(도 12 및 도 13)과 유사하였다. 크게 상향 조절된 GFAP 발현은 0.5% 화합물 I 및 1% 화합물 I에 의해 용량 의존 방식으로 유의미하게 억제되었고, 대조군 수준에 더 가까웠다(도 16).

[0124] 이러한 결과는, 화합물 I이 당뇨병성 망막증의 치료를 위해 사용될 수 있다는 것을 명확하게 나타낸다.

실시예 5: CNV의 마우스 모델에서 화합물 I(BMX)의 생체내 효능

5.1 물질 및 방법

5.1.1 동물

[0125] 수컷 C57BL/6J 마우스(BioLASCO Taiwan Co.)를 대만 의과 대학(Taipei Medical University; TMU)의 동물 센터 내에서 유지시켰으며, CNV 연구를 ARVO 서술에 따라 수행하였으며, 실험 프로토콜은 TMU의 기관 동물 보호 및 사용 위원회(LAC-2017-0130)에 의해 승인된 것이다. CNV를 만들기 위하여, 마우스를 발란진(10% 자일라진)(10 mg/kg) 및 케타민(80 mg/kg)의 주사에 의해 마취하였다. 브루크 막-맥락막의 파열을 레이저 광응고(laser photocoagulation)(Micron III system, Phoenix Research Laboratories, Pleasanton, CA)에 의해 광섬유에서 대략 2 디스크-직경 떨어진 4개의 스폿(spot)의 CNV 레이저 연소(0.1초 기간, 250 mV)를 이용하여 달성하였다. 마우스를 3 그룹으로 무작위로 할당하였다: (1) 비히클만으로의 치료를 수용한 마우스; (2) CNV 레이저 연소 및 비히클만으로의 치료를 수용한 마우스; (3) CNV 레이저 연소 및 경구 투여를 통해 전신적으로 전달되는 7 또는

28일 동안 25 mg/kg/d의 BMX로의 치료를 수용한 마우스. -7일, 7일 및 28일에, 안저촬영(FP) 및 형광 안저 조영술(FFA)을 마취 하의 마우스 상에서 수행하여 하기에 기술된 바와 같이 나트륨 플루오레세인의 복막내 주사 직후에 망막 혈관촬영 데이터를 얻었다.

[0131] 5.1.2 안저촬영(FP) 및 형광 안저 조영술(FFA)

[0132] Micron III 망막 이미징 현미경(Phoenix Research Laboratories, Pleasanton, CA)을 이용하여 C57BL/6 마우스의 기저부(fundus)에서 형태학적 및 병리학적 변화를 모니터링하였다. 간단하게, 마우스를 케타민(80 mg/kg) 및 자일라진(10 mg/kg)의 IP 주사에 의해 마취시키고, 안구를 0.125% 아트로핀으로 확장시켰다. 각 마우스를 현미경 플랫폼 상에 이의 측면을 고정시키고, 우측 안구를 2% Methocel 젤(OmniVision, SA, Neuhausen, Switzerland)로 세정하였다. 칼라 FP를 수행한 후에, 플루오레세인(10%; 0.05 mL)을 IP 주사를 통한 FFA 시험을 위해 사용하였다. 이후에, 일련의 이미지를 SteamPix 5™ 소프트웨어를 이용하여 수집하였다.

[0133] 5.1.3 광간섭성 단층촬영기술(OCT) 이미징 및 두께 분석

[0134] 망막층으로부터의 이미지를 얻기 위하여 Micron III 망막 이미징 OCT 모듈(Phoenix Research Laboratories, Pleasanton, CA)을 이용하였다. 동일한 수직 축을 따라 5개의 개별 b-스캔을 평균처리하고 공간적으로 정렬함으로써 망막 단면(우측 안구)의 고해상도 b-스캔을 얻었다. 망막층을 추가 분석을 위해 InSight XL(Phoenix Research Laboratories, San Ramon, CA, SA)을 이용하여 세그먼트화하였다. 3개의 망막층을 본 연구에 포함된 C57BL/6 마우스에서 규정하고 측정하였다: 망막 신경 섬유층(retinal nerve fiber layer; RNFL), 신경절 세포층(ganglion cell layer; GCL) 및 내부 총상층(inner plexiform layer; IPL)을 포함하는 내부층; 내부 핵층(inner nuclear layer; INL), 외부 총상층(outer plexiform layer; OPL), 외부 핵층(outer nuclear layer; ONL) 및 외부 제한막(outer limiting membrane; OLM)을 포함하는 중간층; 및 광수용기의 내부 및 외부 세그먼트(IS/OS) 및 망막 색소 상피를 포함하는 외부층.

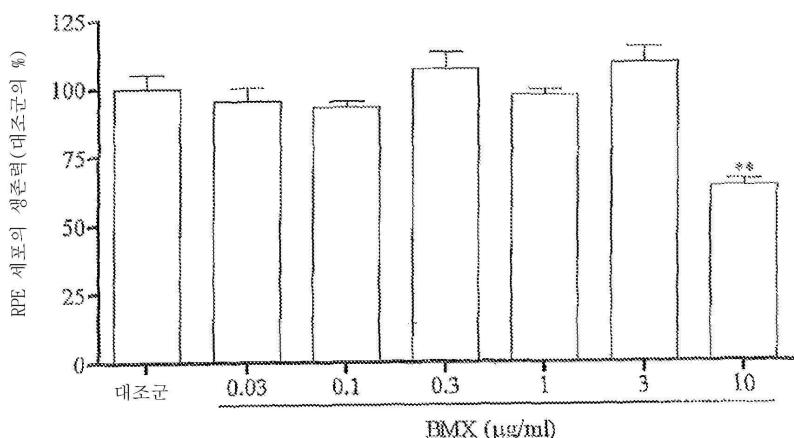
[0135] 5.2 결과

[0136] 결과는 도 17a 내지 도 18b에 도시되어 있다. BMX 그룹에서의 누출 면적은 유의미하게 감소되었다(도 17a 및 도 18a). 또한, FP 및 FFA 이미지에 따르면, 레이저 손상으로부터 형성된 조직 파괴성은 BMX 그룹에서 개선되었다(도 17b(7일) 및 도 18b(28일)).

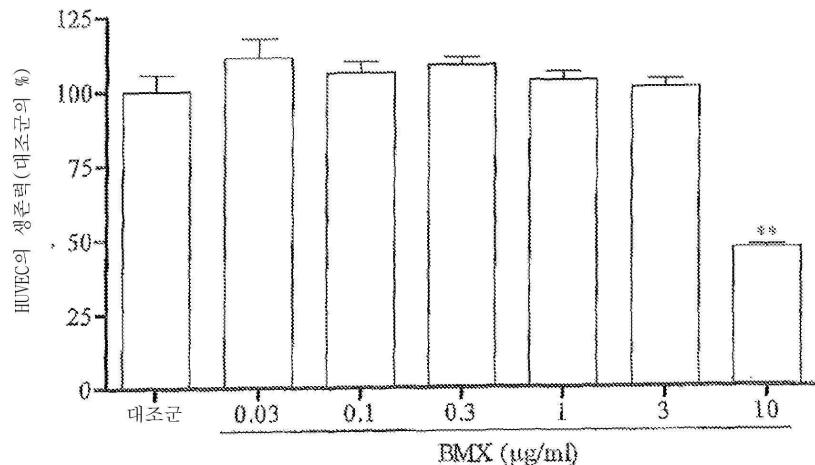
[0137] 당업자에 의해, 본 발명의 넓은 개념을 벗어나지 않고 상술된 구체예에 대한 변화가 이루어질 수 있다는 것이 인식될 것이다. 이에 따라, 본 발명이 개시된 특정 구체예로 제한되지 않는 것으로 이해되지만, 첨부된 청구범위에 의해 규정된 바와 같은 본 발명의 사상 및 범위 내의 변경을 포함하도록 의도된다.

도면

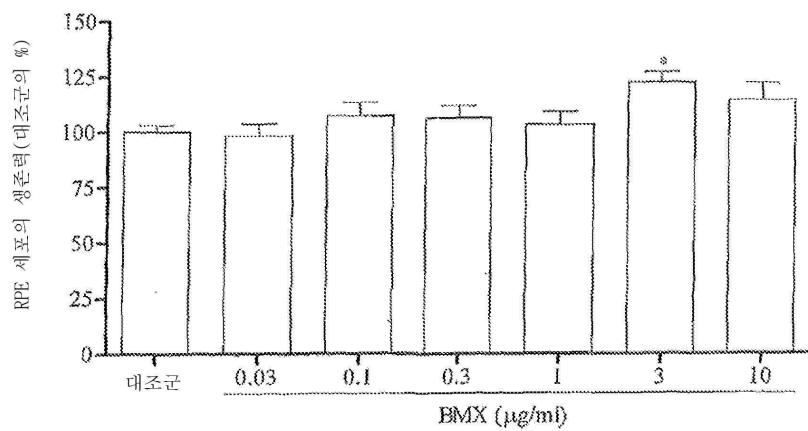
도면 1a



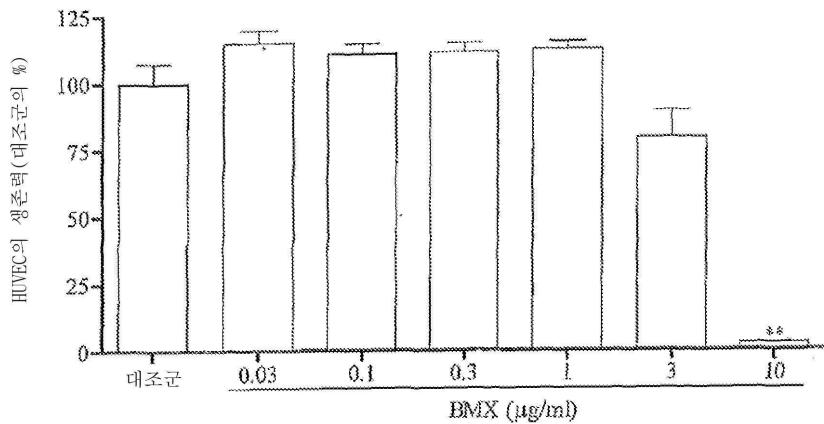
도면 1b



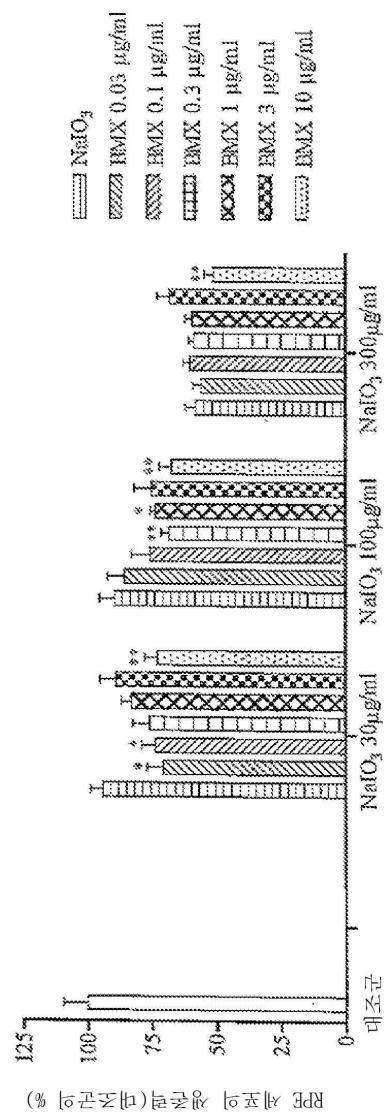
도면 2a



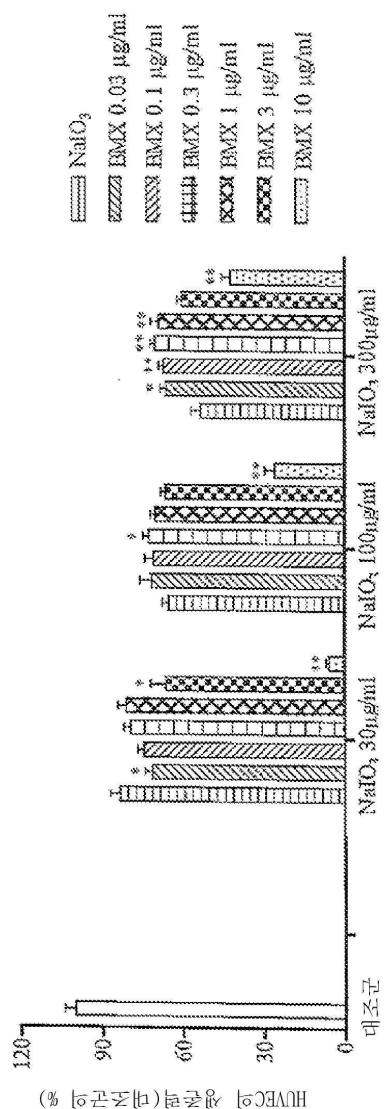
도면 2b



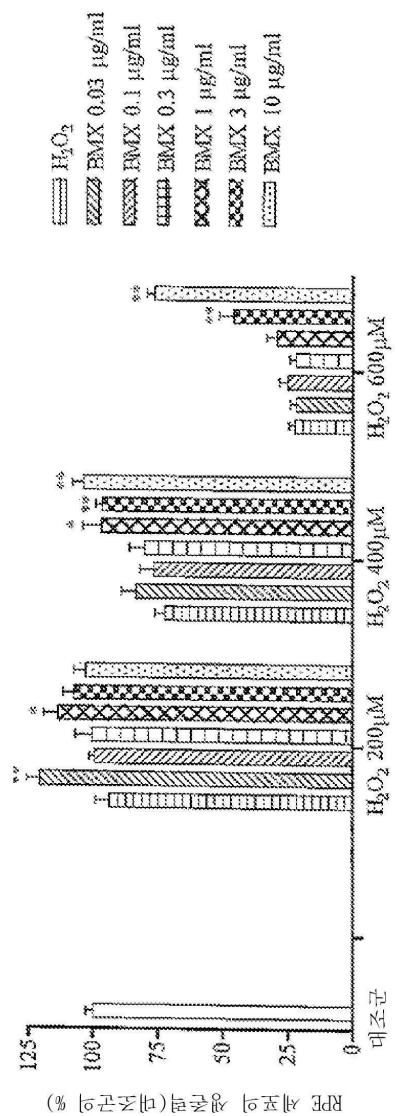
도면 3a



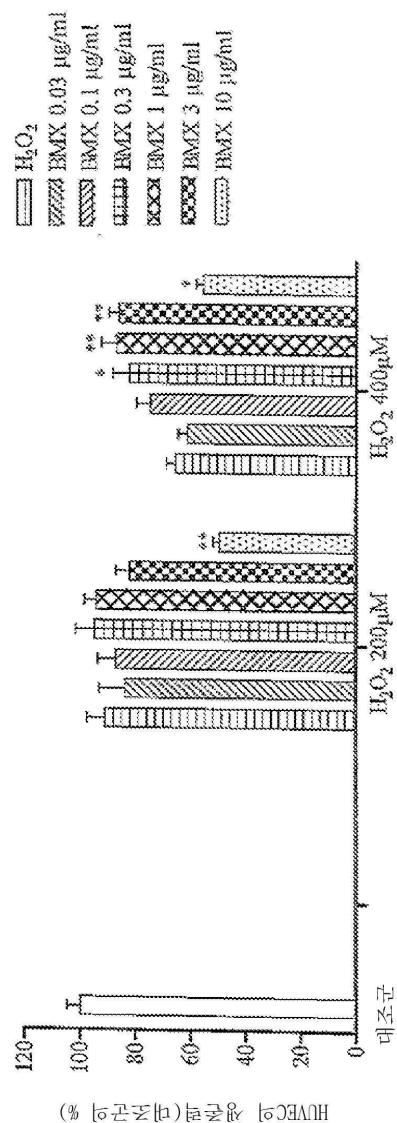
도면 3b



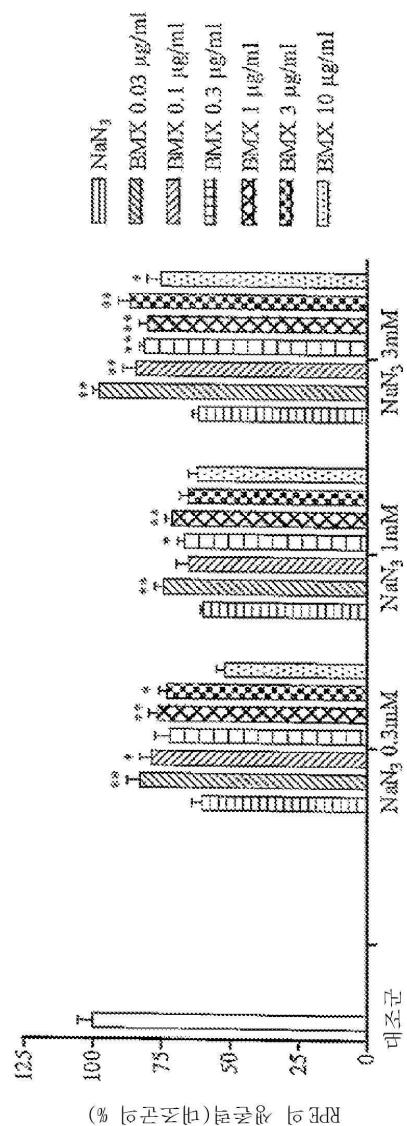
도면 4a



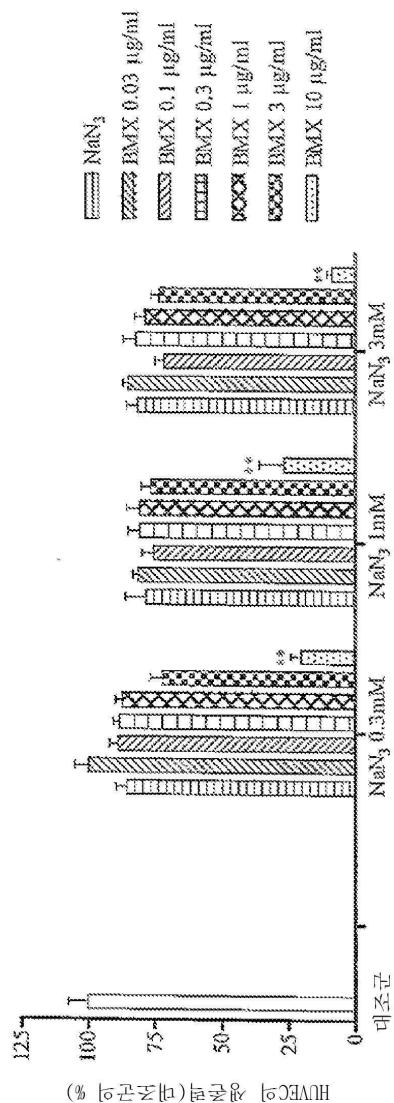
도면4b



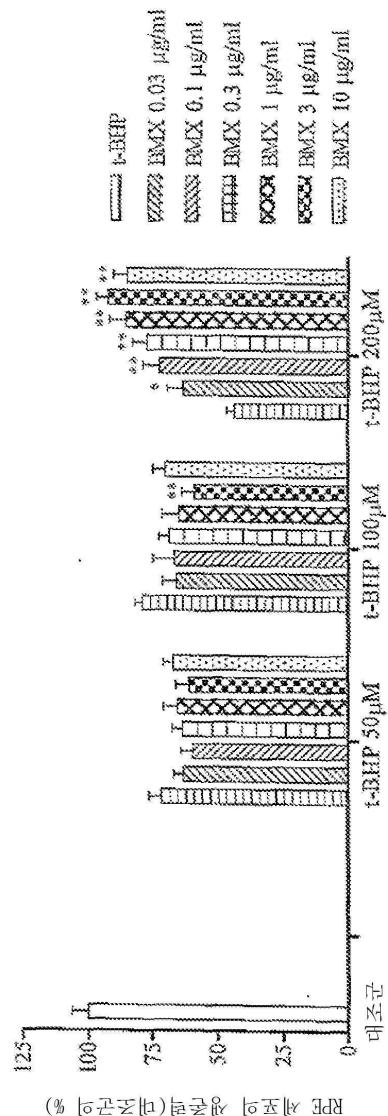
도면 5a



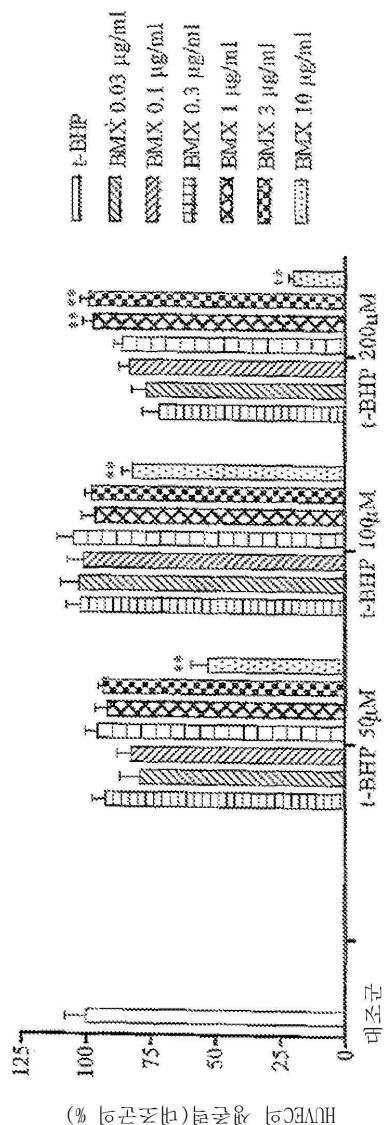
도면 5b



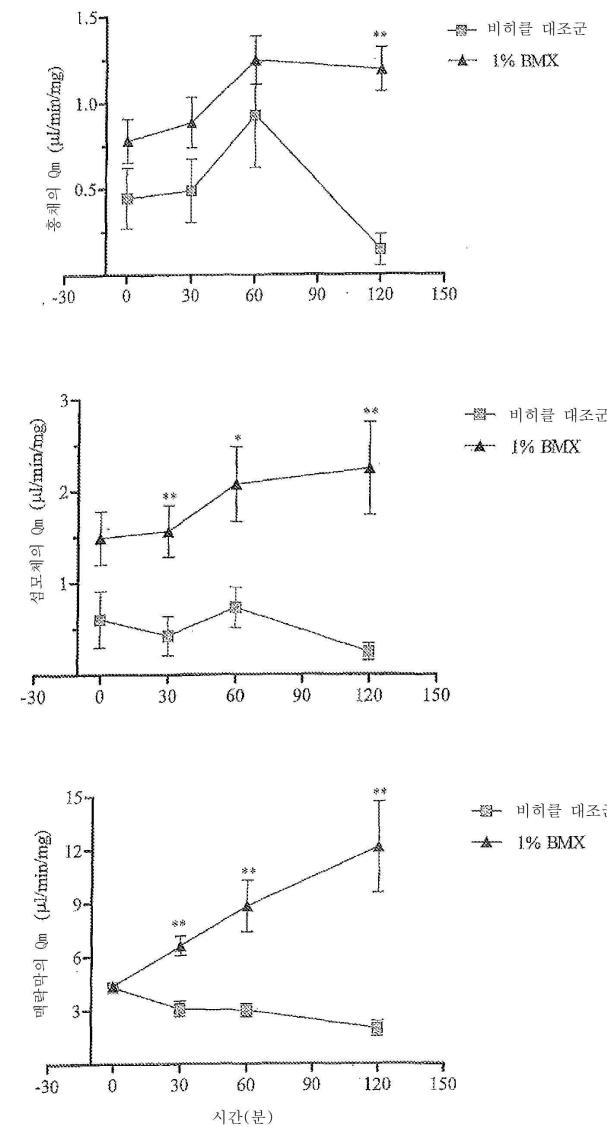
도면 6a



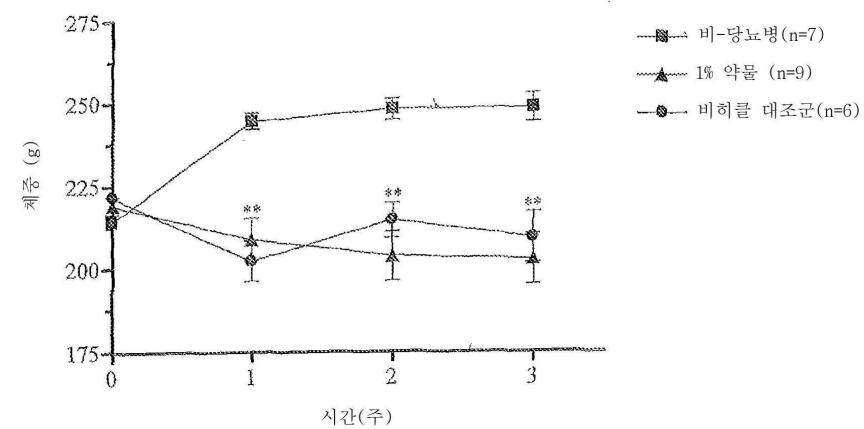
도면 6b



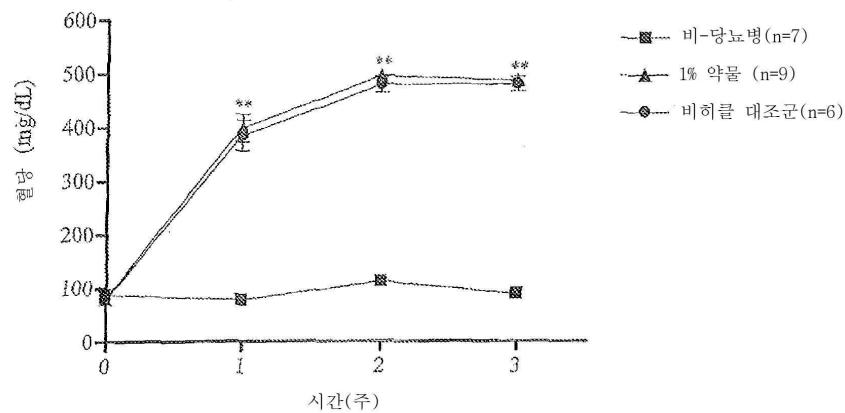
도면7



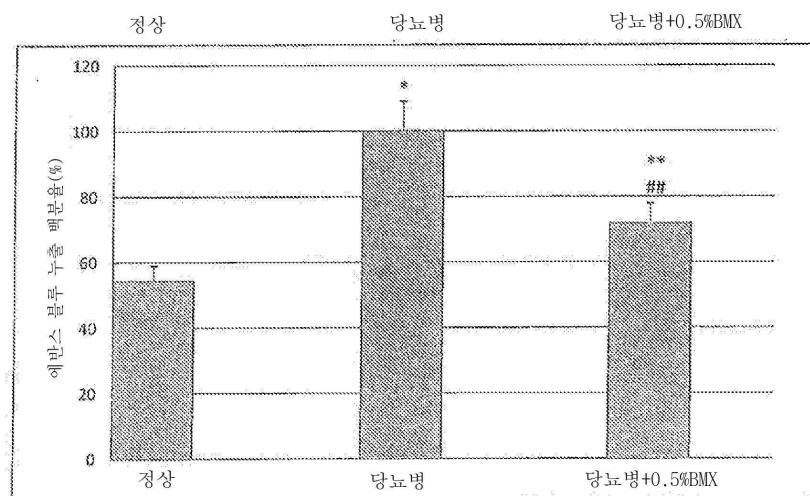
도면8



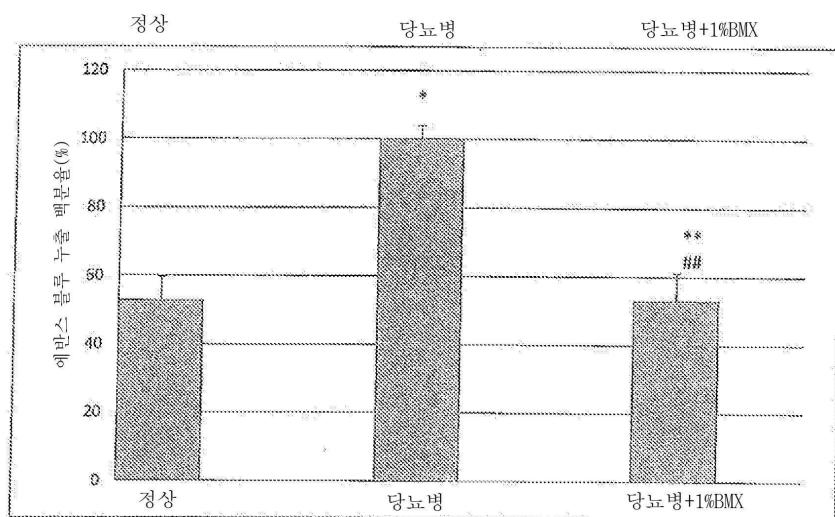
도면9



도면10



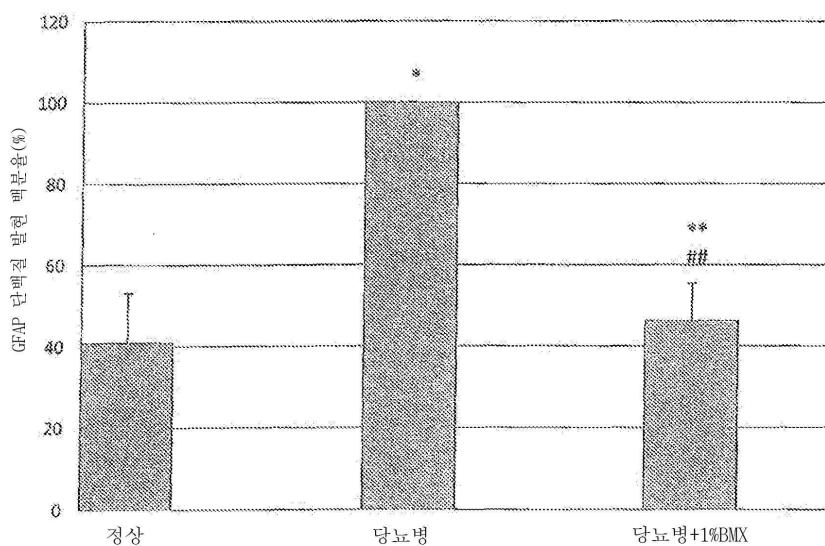
도면11



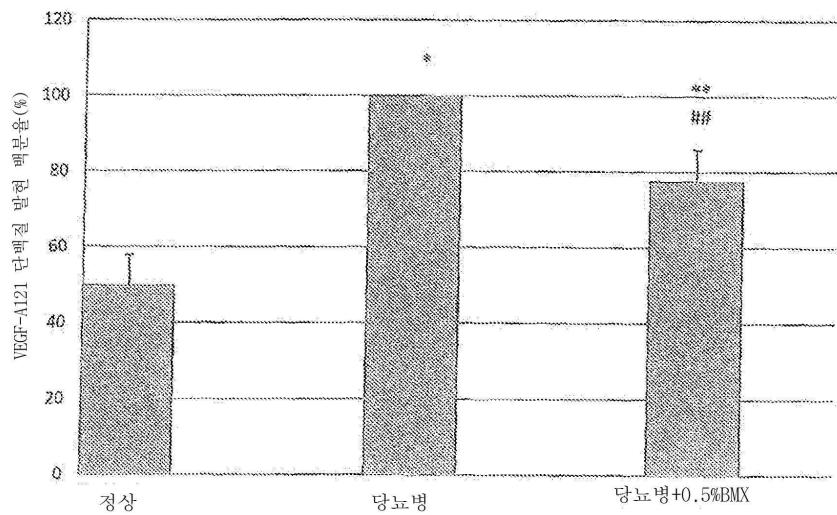
도면12



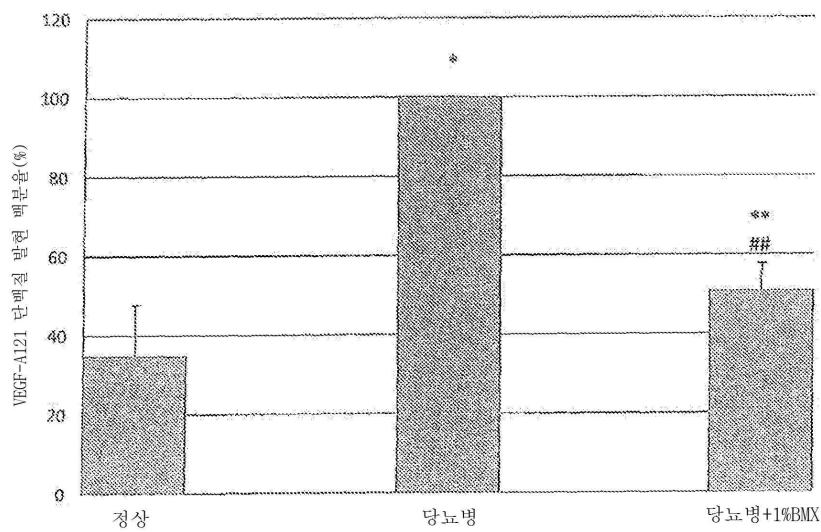
도면13



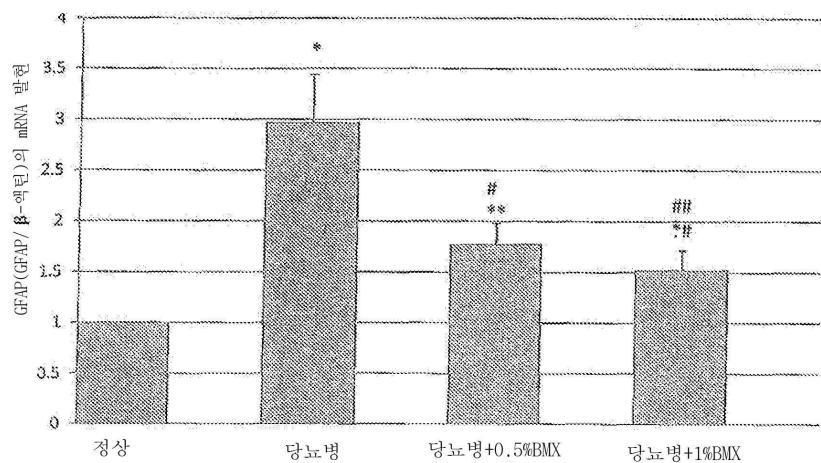
도면14



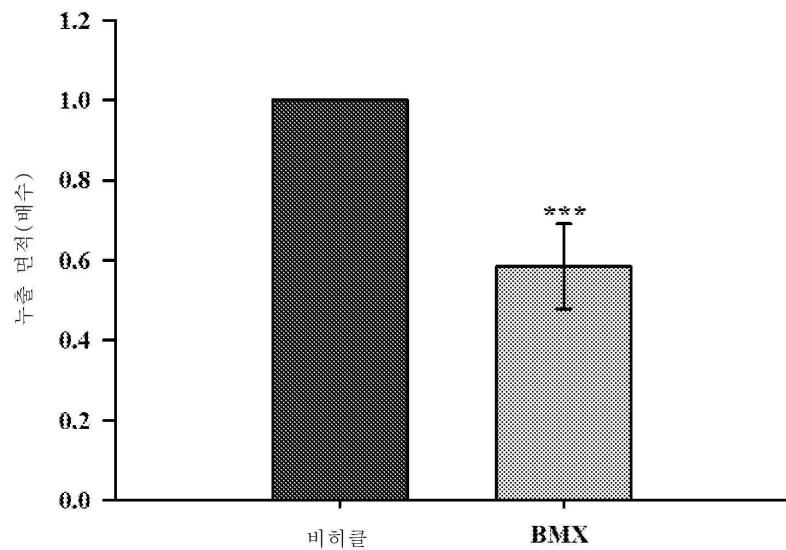
도면15



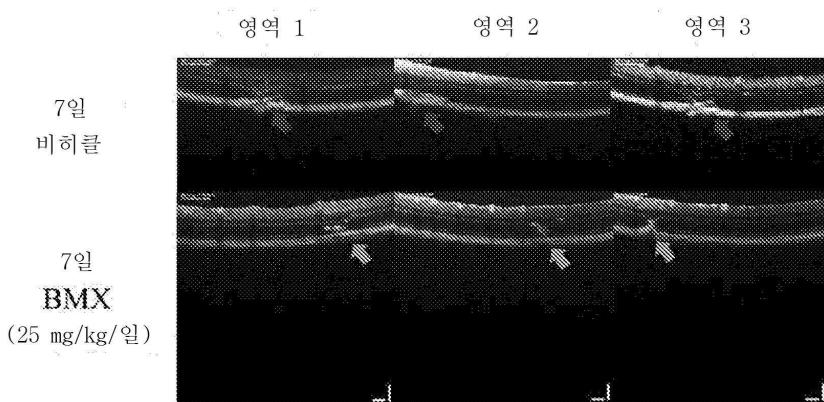
도면16



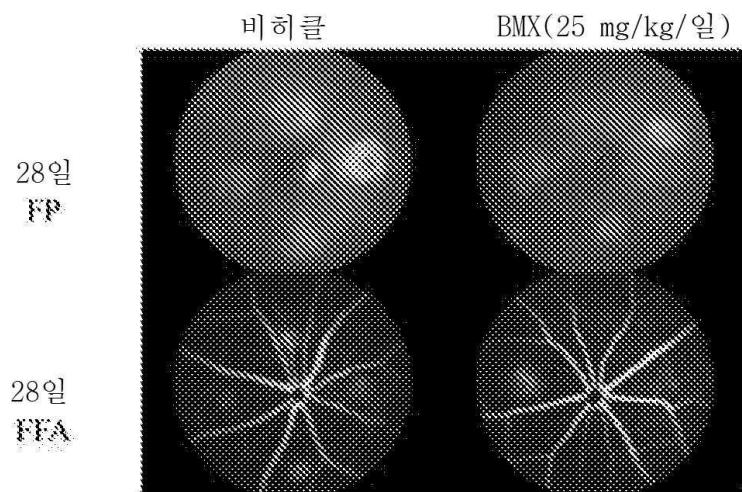
도면17a



도면17b



도면18a



도면 18b

