

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 8 월 27 일 (27.08.2020) **WIPO | PCT**

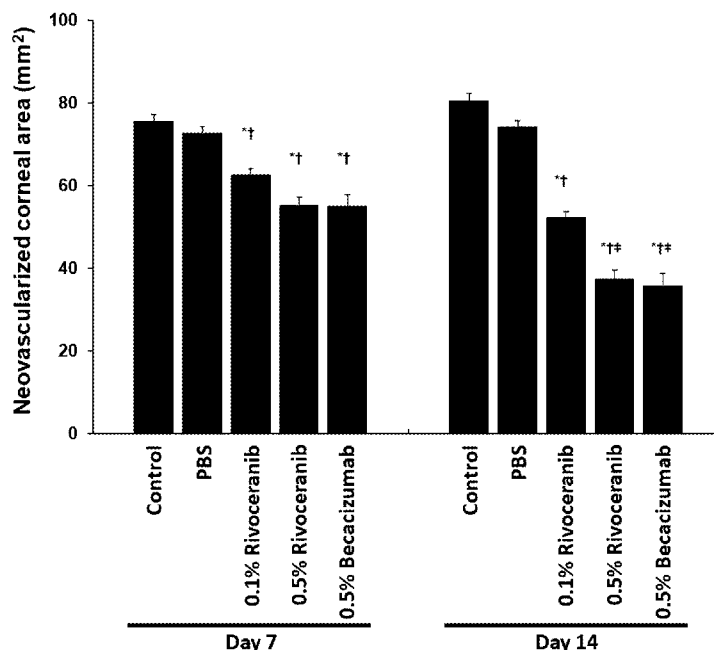


(10) 국제공개번호
WO 2020/171374 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 31/444* (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01) san (KR). 김낙성 (**KIM, Nacksung**); 62068 광주시 서구 풍암순환로 135-1 204-302, Gwangju (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/000155 (74) 대리인: 윤대웅 (**YOON, Dae Woong**); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 603호, Seoul (KR).
- (22) 국제출원일: 2020 년 1 월 6 일 (06.01.2020)
- (25) 출원언어: 한국어 (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0019442 2019 년 2 월 19 일 (19.02.2019) KR
- (71) 출원인: 전남대학교산학협력단 (**INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY**) [KR/KR]; 61186 광주시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 윤경철 (**YOON, Kyung Chul**); 61412 광주시 동구 무등로 374 109-1304, Gwangju (KR). 우제문 (**WOO, Je Moon**); 44667 울산시 남구 대공원로 207 105-602, U-
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING RIVOCERANIB FOR INHIBITION OF OCULAR NEOVASCULARIZATION AND METHOD FOR INHIBITING OCULAR NEOVASCULARIZATION BY USING SAME

(54) 발명의 명칭: 리보세라닙을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물 및 이를 이용한 안구 신생혈관 억제 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising rivoceranib for inhibition of ocular neovascularization and a method for inhibiting ocular neovascularization by using same. An eye drop comprising rivoceranib as an active ingredient reduces a neovascularized corneal area and vascularity index in an animal model and the number and area of vessels and lymphatic ducts in corneal tissues and as such, can be effectively used for inhibiting corneal neovascularization.



WO 2020/171374 A1

ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 리보세라닙 (rivoceranib) 을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물 및 이를 이용한 안구 신생혈관 억제 방법에 관한 것으로서, 상기 리보세라닙을 유효성분으로 하는 점안액이 동물모델에서 각막 신생혈관 면적과 신생혈관 지수를 감소시키고, 각막 조직에서 혈관 및 림프관의 수와 면적을 감소시키므로, 이를 효과적으로 각막 신생혈관 억제에 이용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 리보세라닙을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물 및 이를 이용한 안구 신생혈관 억제 방법

기술분야

- [1] 본 특허출원은 2019년 02월 19일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2019-0019442호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [2] 본 발명은 리보세라닙 (rivoceranib), 과거 명칭 아파티닙 (Apatinib)을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물 및 이를 이용한 안구 신생혈관 억제 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 각막에 점안 투여되어 신생혈관을 억제하고 관련 안질환을 예방 및 치료할 수 있는, 리보세라닙을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 각막은 인체에서 유일한 무혈관 조직으로 눈의 투명도를 유지함에 있어 혈관이 없는 상태로 유지되어야 한다. 정상시에는 각막의 혈관형성 인자와 혈관형성 억제인자가 균형을 이루고 있으나, 혈관형성 인자들이 증가하면 혈관이 자라나게 된다. 특히 각막의 감염, 염증 및 면역반응, 부종, 윤부 세포 결핍증 등의 여러 가지 원인에 의해 각막 신생혈관이 발생하게 되면, 심각한 시력장애가 발생할 뿐 아니라, 이차적인 각막 이식수술의 예후 또한 불량하게 된다.
- [4] 혈관형성 인자들에는 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 염기성 섬유모세포 성장인자 (basic fibroblast growth factor), 기질 금속단백분해효소 (matrix metalloproteinase), 인슐린-유사 성장 인자 (insulin-like growth factor) 등이 있으나, 이중 가장 중요한 인자가 혈관내피형성인자인 VEGF이다. 특히 VEGFR-2는 각막 신생혈관에서 VEGF에 대한 대부분의 세포반응을 매개하는 가장 핵심적인 수용체로 알려져 있다.
- [5] 지금까지 각막 혈관을 억제하기 위해 많은 종류의 치료법이 연구되어 왔고, 엔지오스타틴 (angiostatin), 엔도스타틴 (endostatin), 기질 금속단백분해효소, 트롬보스폰딘 (thrombospondin) 및 CD36, 네트린-4 (netrin-4), 기질 P (substance P) 등의 혈관형성 억제제와 더불어 레이저 광응고 또는 광역학치료 등의 시술이 시도되어 왔으나, 아직까지 확실하게 입증되어 사용화되지는 못했다.
- [6] 최근 눈의 황반변성에서 신생혈관을 억제할 수 있는 VEGF 억제제가 보편적으로 사용되면서, 각막 신생혈관의 치료에도 응용되어 왔다. 대표적으로 동물실험과 임상실험에서 베마시주맵 (Bevacizumab; 아바스틴 (Avastin)), 라니시주맵(Ranicezumab; 루센티스 (Lucentis)), 아플리버셉트 (Aflibercept; 아이리야 (Eylea))의 점안액 또는 결막하 주사를 통한 국소 투여가 각막 신생혈관을 효과적으로 억제할 수 있다고 보고되어 왔다.

- [7] 한편, 리보세라닙 (rivoceranib) YN968D1은 선택적으로 혈관내피성장인자-2 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-2)를 타겟으로 하는 티로신 인산화효소 (tyrosine kinase) 억제제로서, 경구투여가 가능하고 암세포에서 VEGF 매개 내피세포 이동과 증식을 억제하여 신생혈관의 형성을 억제할 수 있다고 보고되었고, 현재 다양한 인체 암을 치료하기 위한 항암제로서 임상시험 중에 있다. 그러나 눈의 신생혈관에서 리보세라닙의 억제 역할에 대해서는 거의 알려진 바 없으며, 리보세라닙을 유효성분으로 하는 약제를 안과적 치료 목적으로 각막에 적용한 결과에 대한 문헌 또한 보고된 바도 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 이에 본 발명자들은 각막 신생혈관을 억제 또는 치료하는 새로운 물질을 개발하고자 연구하던 중, 리보세라닙 (rivoceranib)을 유효성분으로 하는 점안액이 동물모델에서 각막 신생혈관 면적과 신생혈관 지수를 감소시키고, 각막 조직에서 혈관 및 림프관의 수와 면적을 감소시킬 수 있다는 사실을 확인하였다.
- [9] 이에, 본 발명의 목적은 리보세라닙을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 리보세라닙을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물을 인간을 제외한 개체의 안구에 투여하는 단계를 포함하는, 안구 신생혈관 억제 방법을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 리보세라닙의 안구 신생혈관 억제 용도에 관한 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 본 발명은 리보세라닙 (rivoceranib)을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 약학 조성물은 각막의 신생혈관을 억제하는 효과를 나타낸다.
- [13] 본 발명자들은 리보세라닙을 유효성분으로 하는 점안액이 동물모델에서 각막신생혈관 면적과 신생혈관 지수를 감소시키고, 각막 조직에서 혈관 및 림프관의 수와 면적을 감소시킬 수 있다는 사실을 확인하였다.
- [14] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [15] 본 발명의 일 양태는 리보세라닙을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물이다.
- [16] 상기 신생혈관 억제는 신생혈관 면적 감소, 신생혈관화 지수 감소, 혈관 면적 감소 또는 림프관 면적 감소를 통해 달성되는 것일 수 있다.
- [17] 본 명세서상의 용어 "신생혈관 면적"은 특정 면적 범위 내에서 신생혈관이 해당하는 면적을 백분율로 나타낸 값을 의미한다.
- [18] 본 명세서상의 용어 "신생혈관화 지수"는 특정 범위 내에서 혈관화를 길이

정도에 따라 점수화하여 나타낸 값을 의미한다.

- [19] 본 명세서상의 용어 "혈관 면적"은 혈관 마커 항체를 이용한 면역조직화학염색을 통해 측정할 수 있다. 혈관 마커 항체로는 항-CD31을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [20] 본 명세서상의 용어 "림프관 면적"은 림프관 마커 항체를 이용한 면역조직화학염색을 통해 측정할 수 있다. 림프관 마커 항체로는 항-LYVE-1을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [21] 상기 안구는 각막, 공막 및 망막으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 예를 들어, 각막일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [22] 상기 조성물은 당뇨병성 망막증, 황반 변성 (macular degeneration), 미숙아 망막증 (retinopathy of prematurity), 각막 이식 거부 (corneal graft rejection), 후수정체 섬유증식증 (retrolental fibroplasia), 녹내장, 망막정맥 폐쇄증, 허혈성 망막증 및 저산소증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환을 예방 또는 치료하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [23] 상기 조성물은 점안제, 주사제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 젤, 시럽, 현탁제, 유제, 점적제 및 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형인 것일 수 있고, 예를 들어, 점안제일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [24] 상기 조성물은 리보세라닙을 0.01 내지 2.00%(w/v), 0.01 내지 1.80%(w/v), 0.01 내지 1.60%(w/v), 0.01 내지 1.40%(w/v), 0.01 내지 1.20%(w/v), 0.01 내지 1.00%(w/v), 0.01 내지 0.80%(w/v), 0.01 내지 0.60%(w/v), 0.05 내지 2.00%(w/v), 0.05 내지 1.80%(w/v), 0.05 내지 1.60%(w/v), 0.05 내지 1.40%(w/v), 0.05 내지 1.20%(w/v), 0.05 내지 1.00%(w/v), 0.05 내지 0.80%(w/v), 0.05 내지 0.60%(w/v), 0.10 내지 2.00%(w/v), 0.10 내지 1.80%(w/v), 0.10 내지 1.60%(w/v), 0.10 내지 1.40%(w/v), 0.10 내지 1.20%(w/v), 0.10 내지 1.00%(w/v), 0.10 내지 0.80%(w/v), 0.10 내지 0.60%(w/v), 0.20 내지 2.00%(w/v), 0.20 내지 1.80%(w/v), 0.20 내지 1.60%(w/v), 0.20 내지 1.40%(w/v), 0.20 내지 1.20%(w/v), 0.20 내지 1.00%(w/v), 0.20 내지 0.80%(w/v), 0.20 내지 0.60%(w/v), 0.40 내지 2.00%(w/v), 0.40 내지 1.80%(w/v), 0.40 내지 1.60%(w/v), 0.40 내지 1.40%(w/v), 0.40 내지 1.20%(w/v), 0.40 내지 1.00%(w/v) 또는 0.40 내지 0.80%(w/v), 예를 들어, 0.40 내지 0.60%(w/v) 함유하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [25] 본 발명의 약학 조성물은 리보세라닙의 약학적 유효량 및/또는 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물로 이용될 수 있다.
- [26] 본 명세서에서 용어 "약학적 유효량"은 상술한 리보세라닙의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [27] 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 약학으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스,

메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [28] 본 발명에 따른 약학 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구, 피부, 정맥, 근육, 피하 등의 경로로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 비경구로 투여될 수 있다.
- [29] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약학 조성물의 1일 투여량은 1 내지 20 ul, 1 내지 18 ul, 1 내지 16 ul, 1 내지 14 ul, 1 내지 12 ul, 1 내지 10 ul, 2 내지 20 ul, 2 내지 18 ul, 2 내지 16 ul, 2 내지 14 ul, 2 내지 12 ul, 2 내지 10 ul, 5 내지 20 ul, 5 내지 18 ul, 5 내지 16 ul, 5 내지 14 ul, 5 내지 12 ul 또는 5 내지 10 ul, 예를 들어, 8 ul일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [30] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 캡슐제 또는 젤(예컨대, 하이드로젤) 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [31] 본 발명의 다른 양태는 리보세라닙을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물을 인간을 제외한 동물의 안구에 투여하는 단계를 포함하는, 안구 신생혈관 억제 방법이다.
- [32] 상기 신생혈관 억제는 신생혈관 면적 감소, 혈관화 지수 감소, 각막혈관화 지수 감소, 혈관 수 감소 또는 림프관 수 감소를 통해 달성되는 것일 수 있다.
- [33] 상기 안구는 각막, 공막 및 망막으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 예를 들어, 각막일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [34] 상기 방법은 당뇨병성 망막증, 황반 변성, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 후수정체 섬유증식증, 녹내장, 망막정맥 폐쇄증, 허혈성 망막증 및 저산소증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환을 예방 또는 치료하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [35] 상기 조성물은 점안제, 주사제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 젤, 시럽, 현탁제, 유제, 점적제 및 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형인 것일 수 있고, 예를 들어, 점안제일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [36] 상기 조성물은 리보세라닙을 0.01 내지 2.00%(w/v), 0.01 내지 1.80%(w/v), 0.01 내지 1.60%(w/v), 0.01 내지 1.40%(w/v), 0.01 내지 1.20%(w/v), 0.01 내지 1.00%(w/v), 0.01 내지 0.80%(w/v), 0.01 내지 0.60%(w/v), 0.05 내지 2.00%(w/v), 0.05 내지 1.80%(w/v), 0.05 내지 1.60%(w/v), 0.05 내지 1.40%(w/v), 0.05 내지 1.20%(w/v), 0.05 내지 1.00%(w/v), 0.05 내지 0.80%(w/v), 0.05 내지 0.60%(w/v), 0.10 내지 2.00%(w/v), 0.10 내지 1.80%(w/v), 0.10 내지 1.60%(w/v), 0.10 내지 1.40%(w/v), 0.10 내지 1.20%(w/v), 0.10 내지 1.00%(w/v), 0.10 내지 0.80%(w/v), 0.10 내지 0.60%(w/v), 0.20 내지 2.00%(w/v), 0.20 내지 1.80%(w/v), 0.20 내지 1.60%(w/v), 0.20 내지 1.40%(w/v), 0.20 내지 1.20%(w/v), 0.20 내지 1.00%(w/v), 0.20 내지 0.80%(w/v), 0.20 내지 0.60%(w/v), 0.40 내지 2.00%(w/v), 0.40 내지 1.80%(w/v), 0.40 내지 1.60%(w/v), 0.40 내지 1.40%(w/v), 0.40 내지 1.20%(w/v), 0.40 내지 1.00%(w/v) 또는 0.40 내지 0.80%(w/v), 예를 들어, 0.40 내지 0.60%(w/v) 함유하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [37] 본 발명은 리보세라닙 (rivoceranib)을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물 및 이를 이용한 안구 신생혈관 억제 방법에 관한 것으로서, 상기 리보세라닙을 유효성분으로 하는 점안액이 동물모델에서 각막 신생혈관 면적과 신생혈관 지수를 감소시키고, 각막 조직에서 혈관 및 림프관의 수와 면적을 감소시키므로, 이를 효과적으로 각막 신생혈관 억제에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [38] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 각막 신생혈관 유도 후 점안액 투여군의 각막 혈관면적의 감소 효과를 나타낸 그래프이다.
- [39] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 각막 신생혈관 유도 후 점안액 투여군의 각막 신생혈관 억제 효과를 나타낸 사진이다.
- [40] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 각막 신생혈관 유도 후 점안액 투여군의 혈관화 지수의 감소 효과를 나타낸 그래프이다.
- [41] 도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따라 각막 신생혈관 유도 후 각막 조직의 플랫 마운트 (flat mount)에서 혈관 마커 항체를 처리하는 면역조직화학염색을 이용하여 점안액 투여군의 혈관 억제를 나타낸 사진이다.
- [42] 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따라 각막 신생혈관 유도 후 각막 조직의 플랫 마운트 (flat mount)에서 혈관 마커 항체를 처리하는 면역조직화학염색을 이용하여 점안액 투여군의 혈관 억제를 나타낸 그래프이다.
- [43] 도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따라 각막 신생혈관 유도 후 각막 조직의 플랫 마운트에서 림프관 마커 항체를 처리하는 면역조직화학염색을 이용하여 점안액 투여군의 림프관 억제를 나타낸 사진이다.
- [44] 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따라 각막 신생혈관 유도 후 각막 조직의 플랫 마운트에서 림프관 마커 항체를 처리하는 면역조직화학염색을 이용하여 점안액

투여군의 림프관 억제를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [45] 리보세라닙 (rivoceranib)을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물.

발명의 실시를 위한 형태

- [46] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

- [47] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[48]

- [49] 실시예 1. 리보세라닙 국소제제의 제조

- [50] 리보세라닙 점안액은 상품화된 분말 (과거명 아파티닙, Apatinib mesylate, Selleckchem.com)을 이용하여 제조하였다. 희석은 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose)를 사용하여 0.1% (1 mg/ml, w/v)와 0.5% (5 mg/ml, w/v) 리보세라닙 점안액 제제를 제조하였다.

[51]

- [52] 실시예 2. 각막 신생혈관 억제 효과에 대한 실험

- [53] 2-1. 각막 신생혈관 모델(Corneal neovascularization) 제작

- [54] 동물의 마취를 위해 케타민 하이드로클로라이드 (ketamine hydrochloride) 50 mg/kg와 자일라진 (xylazine) 10 mg/kg을 근육주사하고 눈에 프로파라케인 (proparacaine) 안약을 점안하였다.

- [55] 8주령 C57BL/6 마우스 (대한바이오링크, 충북 음성, 대한민국)의 오른쪽 눈의 각막 표면에 0.1 N NaOH가 적혀진 2 mm 직경의 종이에 10초 동안 접촉하여 각막 화상에 의한 신생혈관을 유도하였다. 10초 후 15 ml 멸균식염수로 각막 표면을 세척하였다.

- [56] 그 다음 각막 나이프를 이용하여 각막 윤부와 평행하게 회전시키면서 각막과 각막 윤부의 상피를 제거하였다. 각막 상피 제거 후 모시플록사신 (moxifloxacin, Vigamox, Alcon, US) 안약을 즉시 점안하였다.

[57]

- [58] 2-2. 동물실험 방법 및 실험군

- [59] 실험기간 동안에 동물의 행동, 음식 및 물 섭취는 제한되지 않았다. 마우스는 각막 신생혈관 유도 후 1주일째, 점안 치료방법에 따라 다음 6개 그룹으로 분배하였다: 점안액 미투여 대조군; 생리식염수(PBS) 점안액 투여군; 0.1%(w/v) 리보세라닙 (rivoceranib) 점안액 투여군; 0.5%(w/v) 리보세라닙 점안액 투여군; 및 0.5% (5 mg/ml, w/v) 베바시주맵 (bevacizumab) 점안액 투여군.

- [60] 이때, 리보세라닙과 베바시주맵 점안액은 카르복시메틸셀룰로오스

(carboxymethylcellulose)에 희석하여 제조된 것을 사용하였다. 각막 신생혈관을 유도한 마우스에 하루 3차례 2 ul의 점안액을 투여하였다.

[61] 결과는 표준오차($\pm$ SEM)로 나타냈으며, 실험 그룹간 차이에 대한 통계학적 유의성은 맨-휘트니 U (Mann-Whitney U) 검정, 터키 사후 검정, SPSS 18.0 소프트웨어 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 결정하였다. 0.05 이하의 P 값은 통계학적 유의성을 갖는 것으로 판단하였다.

[62]

[63] **2-3. 각막 신생혈관 면적 분석**

[64] 마우스에서 각막 신생혈관 유도 후 치료 7 및 14 일째에 대조군, PBS 투여군, 0.1%(w/v) 리보세라닙 점안액 투여군, 0.5%(w/v) 리보세라닙 점안액 투여군 및 0.5%(w/v) 베바시주맵 점안액 투여군의 각막 혈관면적을 분석하였다.

[65] 구체적으로, 생체현미경검사는 각막 신생혈관 유도 후 치료 7 일째 (DAY 7), 치료 후 14 일째 (DAY 14)에 각각 10 마리의 마우스에서 표준화된 10 배의 배율로 사진 촬영하여 수행하였다. 케타민 하이드로클로라이드와 자일라진으로 마취 후 세극등 생체현미경 (F-801s, Nikon, Japan)에 부착된 카메라를 이용하여 각막 신생혈관의 사진을 촬영하였다. 사진은 624 X 480 화소의 해상도로 하여 파일 (tagged information file format)로 전환하였다. 각막 신생혈관의 정량분석은 본 실험에 참여하지 않은 제3자가 차폐된 상태에서 시행하였으며, 신생혈관 면적의 측정은 하기의 로버트 모델 계산식을 이용하여 계산하여, 그 결과를 도 1 내지 도 2 및 표 1에 나타내었다.

[66] [계산식]

[67]
$$S = C/12 \times 3.1416 \times (R^2 - (R - L)^2)$$

[68] C = 각막 두께.

[69] R = 각막 직경.

[70] L = 각막 윤부에서 각막 중심방향의 신생혈관 길이.

[71] [표1]

%	대조군	PBS	0.1% 리보세라닙	0.5% 리보세라닙	0.5% 베바시주맵
DAY 7	75.53 $\div$ 4.70	72.65 $\div$ 4.18	62.67 $\div$ 4.11	55.18 $\div$ 5.79	54.98 $\div$ 5.29
DAY 14	80.48 $\div$ 2.87	74.13 $\div$ 4.43	52.28 $\div$ 4.45	37.48 $\div$ 5.32	35.86 $\div$ 7.65

[72] 도 1 내지 도 2 및 표 1에서 확인할 수 있듯이, 치료 7 일째 (DAY 7) 0.1%(w/v) 리보세라닙과 0.5%(w/v) 리보세라닙 투여군에서 0.5%(w/v) 베바시주맵 투여군과 동등하게 대조군과 PBS 투여군 대비 유의하게 각막 신생혈관의 면적을 억제시키는 것으로 나타났다. 치료 14 일째 (DAY 14)에는 대조군과 PBS

투여군 및 0.1%(w/v) 리보세라닙 군에 비해 0.5%(w/v) 리보세라닙 투여군에서 0.5%(w/v) 베바시주맵 투여군과 동등하게 각막 신생혈관 면적을 유의하게 억제시켰다.

[73]

[74] **2-4. 각막 신생혈관화 지수 분석**

[75] 마우스에서 각막 신생혈관 유도 후 치료 7 일째 (DAY 7), 치료 후 14 일째(DAY 14)에, 생리식염수(PBS) 투여군, 0.1%(w/v) 리보세라닙 점안액 투여군, 0.5%(w/v) 리보세라닙 점안액 투여군, 0.5%(w/v) 베바시주맵 점안액 투여군의 각막 신생혈관화 지수를 분석하였다.

[76] 각막 신생혈관 유도 7일 후 치료 직전 및 7일째에 각각 10마리의 마우스에서 상기 실시예 2-3의 각막 신생혈관 면적 분석과 같은 방법으로 사진을 촬영하였다. 각막을 4등분하여, 각막윤부에서 각막 중심부까지의 혈관화 길이 정도에 따라 각막윤부에만 혈관이 있는 경우인 0점부터 각막중심부까지 혈관이 있는 경우인 1점까지로 점수화하였다. 전체 각막면적 대비 각막 신생혈관 면적의 비율을 백분율 변화로 계산하여, 그 결과를 도 3 및 표 2에 나타내었다.

[77] [표2]

점수	대조군	PBS	0.1% 리보세라닙	0.5% 리보세라닙	0.5% 베바시주맵
DAY 7	0.74 ÷ 0.08	0.69 ÷ 0.08	0.53 ÷ 0.09	0.42 ÷ 0.10	0.41 ÷ 0.06
DAY 14	0.81 ÷ 0.09	0.74 ÷ 0.07	0.49 ÷ 0.09	0.32 ÷ 0.10	0.28 ÷ 0.07

[78] 도 3 및 표 2에서 확인할 수 있듯이, 0.1%(w/v) 리보세라닙과 0.5%(w/v) 리보세라닙 투여군에서는 0.5%(w/v) 베바시주맵 투여군과 동등하게, 대조군과 PBS 투여군 대비 유의하게 각막 신생혈관화 지수를 감소시키는 것으로 나타났다.

[79]

[80] **2-5. 면역조직화학염색을 통한 혈관 분석**

[81] 마우스에서 각막 신생혈관 치료 14일째 (DAY 14) 대조군, PBS 투여군, 0.1%(w/v) 리보세라닙 점안액 투여군, 0.5%(w/v) 리보세라닙 점안액 투여군, 0.5%(w/v) 베바시주맵 점안액 투여군의 각막조직에서 혈관의 면적을 비교 분석하였다.

[82] 각막 신생혈관을 유도한 후 점안액을 처리한 마우스의 안구 조직을 10% 포르말린에 고정하고 파라핀 포매한 후, 4 μ m 두께로 박절하여 슬라이드 글라스 위에 고정하였다. 그 다음 상기 슬라이드 글라스를 에탄올에 침수시킨 후 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin, Normal horse serum, Vector, Burlingame, CA,

USA)로 블로킹(blocking)시킨 후 혈관 마커 항체 (No: sc-18916, FITC-conjugated rat anti-CD31, Santa Cruz, Dallas, TX, USA)를 상온에서 3시간 동안 처리하였다. 그 다음 PBS로 세척한 후, 마운팅 용액 (No: S3023, Dako Fluorescein Mounting Medium, Santa Clara, CA USA)으로 마운트한 후 디지털 카메라 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany)가 장착된 현미경으로 관찰하여, 그 결과를 도 4a에 나타내었다. 또한, CD31 염색 결과 면역조직화학염색을 통해 전체 각막 면적 대비 각막 혈관 신생혈관화 면적의 비율을 이미지제이 소프트웨어 (ImageJ software version 1.8.0)을 이용하여 지표 (Blood neovascularization index)로 계산하여, 그 결과를 도 4b 및 표 3에 나타내었다.

[83] [표3]

	대조군	PBS	0.1% 리보세라닙	0.5% 리보세라닙	0.5% 베바시주맵
DAY 14	0.65 $\div$ 0.05	0.63 $\div$ 0.06	0.57 $\div$ 0.08	0.48 $\div$ 0.03	0.43 $\div$ 0.03

[84] 도 4a 내지 4b 및 표 3에서 확인할 수 있듯이, 0.1%(w/v) 리보세라닙과 0.5%(w/v) 리보세라닙 투여군에서 0.5%(w/v) 베바시주맵 투여군과 동등하게, 대조군과 PBS 투여군 대비 유의하게 각막조직에서 혈관의 면적을 감소시키는 것으로 나타났다.

[85]

[86] **2-6. 면역조직화학염색을 통한 림프관 분석**

[87] 마우스에서 각막 신생혈관 유도 후 치료 7일째 (DAY 7) 대조군, PBS 투여군, 0.1%(w/v) 리보세라닙 점안액 투여군, 0.5%(w/v) 리보세라닙 점안액 투여군, 0.5%(w/v) 베바시주맵 점안액 투여군의 각막조직에서 림프관의 면적을 상기 실시예 2-5와 동일한 방법을 이용하되 림프관 마커 항체 (No: 11-034, rabbit anti-LYVE-1, Angio Bio, San Diego, CA, USA) 및 Cy3가 결합된 2차 항체 (No: 111-165-144, Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA USA)를 사용하여 비교 분석하였다. LYVE-1 염색 결과 면역조직화학염색을 통해 전체 각막 면적 대비 각막 림프관 신생혈관화 면적의 비율을 지표 (Lymphatic neovascularization index)로 계산하였다.

[88] [표4]

	대조군	PBS	0.1% 리보세라닙	0.5% 리보세라닙	0.5% 베바시주맵
DAY 7	0.77 $\div$ 0.03	0.73 $\div$ 0.03	0.53 $\div$ 0.06	0.48 $\div$ 0.08	0.45 $\div$ 0.05

[89] 도 5a 내지 5b 및 표 4에서 확인할 수 있듯이, 0.1%(w/v) 리보세라닙과 0.5%(w/v) 리보세라닙 투여군에서 0.5%(w/v) 베바시주맵 투여군과 동등하게 대조군과 PBS

투여군 대비 유의하게 각막조직에서 림프관의 면적을 감소시키는 것으로 나타났다.

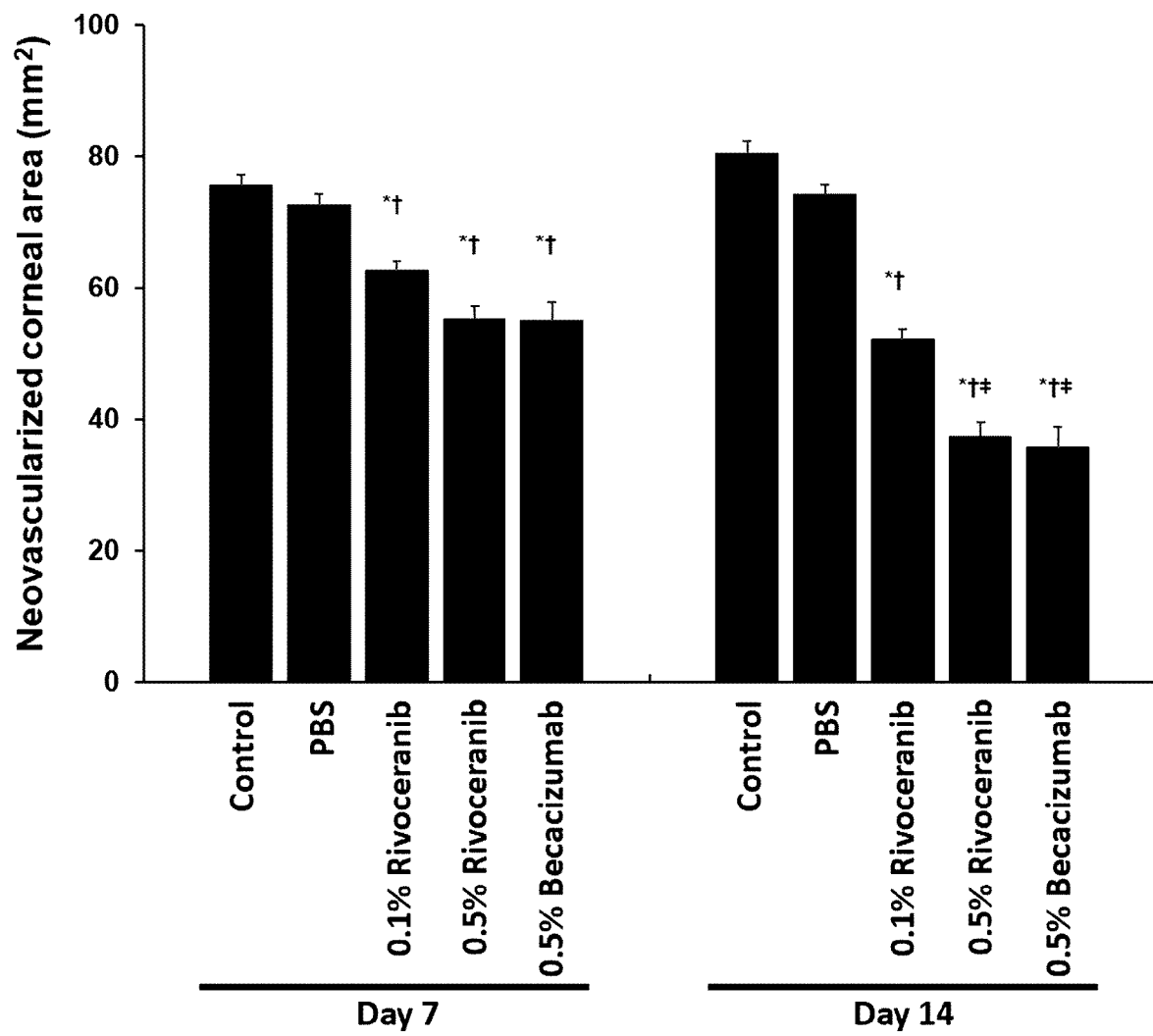
산업상 이용가능성

- [90] 본 발명은 리보세라닙 (rivoceranib)을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물 및 이를 이용한 안구 신생혈관 억제 방법에 관한 것으로서, 상기 리보세라닙을 유효성분으로 하는 점안액이 동물모델에서 각막 신생혈관 면적과 신생혈관 지수를 감소시키고, 각막 조직에서 혈관 및 림프관의 수와 면적을 감소시키므로, 이를 효과적으로 각막 신생혈관 억제에 이용할 수 있다.

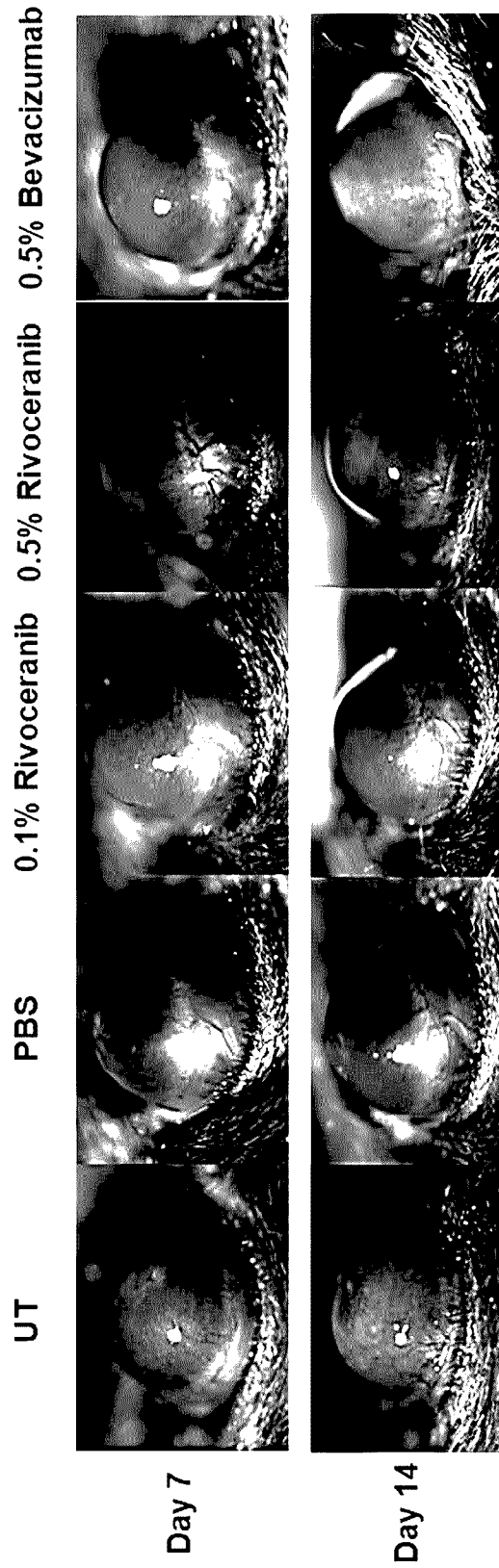
청구범위

- [청구항 1] 리보세라닙 (rivoceranib)을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 신생혈관 억제는 신생혈관 면적 감소, 혈관화 지수 감소, 각막혈관화 지수 감소, 혈관 수 감소 또는 림프관 수 감소를 통해 달성되는 것인, 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 안구는 각막, 공막 및 망막으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 당뇨병성 망막증, 황반 변성 (macular degeneration), 미숙아 망막증 (retinopathy of prematurity), 각막 이식 거부 (corneal graft rejection), 후수정체 섬유증식증 (retrolental fibroplasia), 녹내장, 망막정맥 폐쇄증, 허혈성 망막증 및 저산소증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환을 예방 또는 치료하는 것인, 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 점안제, 주사제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 겔, 시럽, 현탁제, 유제, 점적제 및 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형인 것인, 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 리보세라닙을 0.01 내지 2.00 % (w/v) 함유하는 것인, 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물.
- [청구항 7] 리보세라닙 (rivoceranib)을 포함하는 안구 신생혈관 억제용 약학 조성물을 인간을 제외한 동물의 안구에 투여하는 단계를 포함하는, 안구 신생혈관 억제 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 신생혈관 억제는 신생혈관 면적 감소, 혈관화 지수 감소, 각막혈관화 지수 감소, 혈관 수 감소 또는 림프관 수 감소를 통해 달성되는 것인, 안구 신생혈관 억제 방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 안구는 각막, 공막 및 망막으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 안구 신생혈관 억제 방법.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 방법은 당뇨병성 망막증, 황반 변성 (macular degeneration), 미숙아 망막증 (retinopathy of prematurity), 각막 이식 거부 (corneal graft rejection), 후수정체 섬유증식증 (retrolental fibroplasia), 녹내장, 망막정맥 폐쇄증, 허혈성 망막증 및 저산소증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환을 예방 또는 치료하는 것인, 안구 신생혈관 억제 방법.
- [청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 조성물은 점안제, 주사제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 겔, 시럽, 현탁제, 유제, 점적제 및 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형인 것인, 안구 신생혈관 억제 방법.
- [청구항 12] 제7항에 있어서, 상기 조성물은 리보세라닙을 0.01 내지 2.00 % (w/v) 함유하는 것인, 안구 신생혈관 억제 방법.

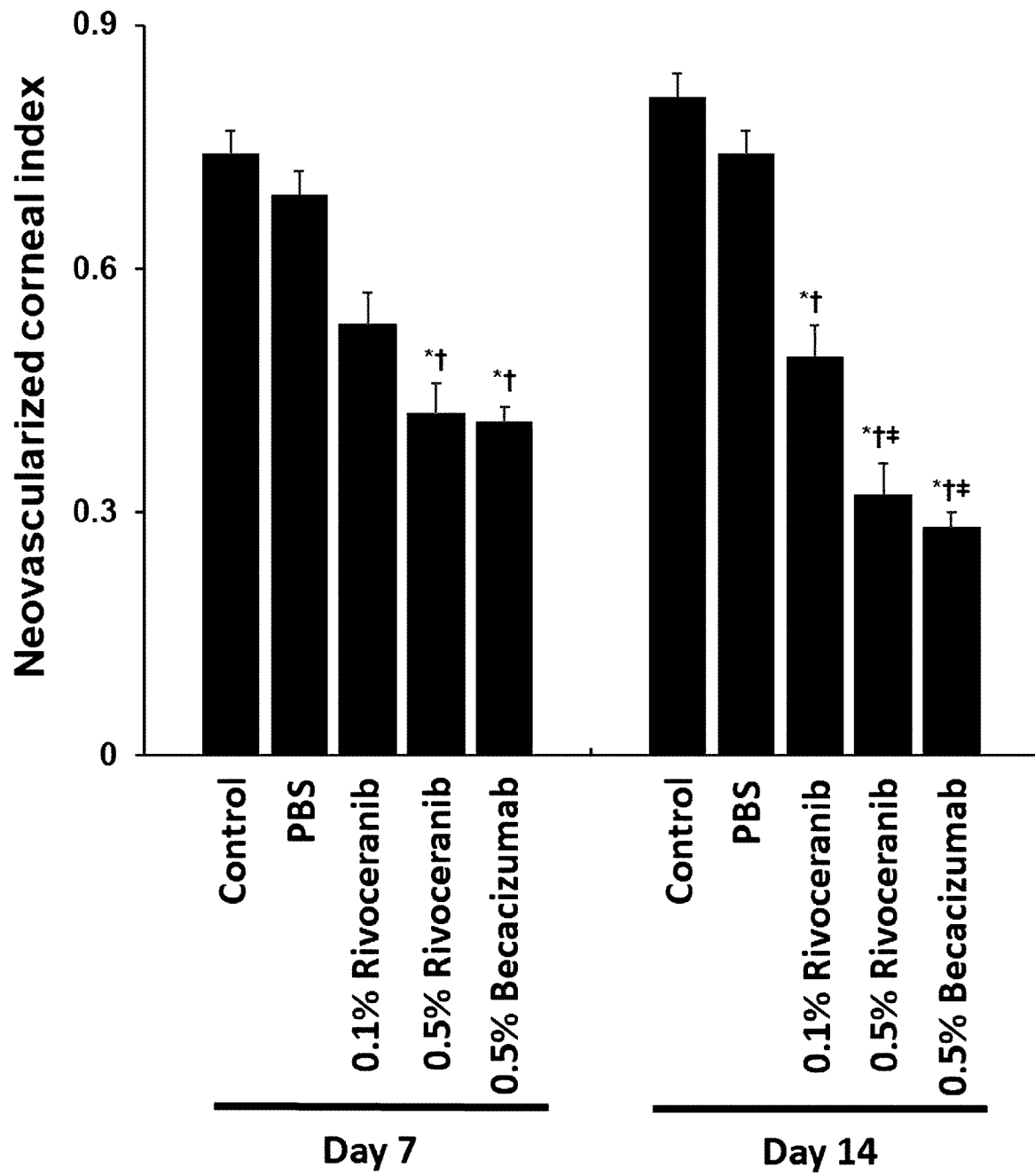
[도 1]



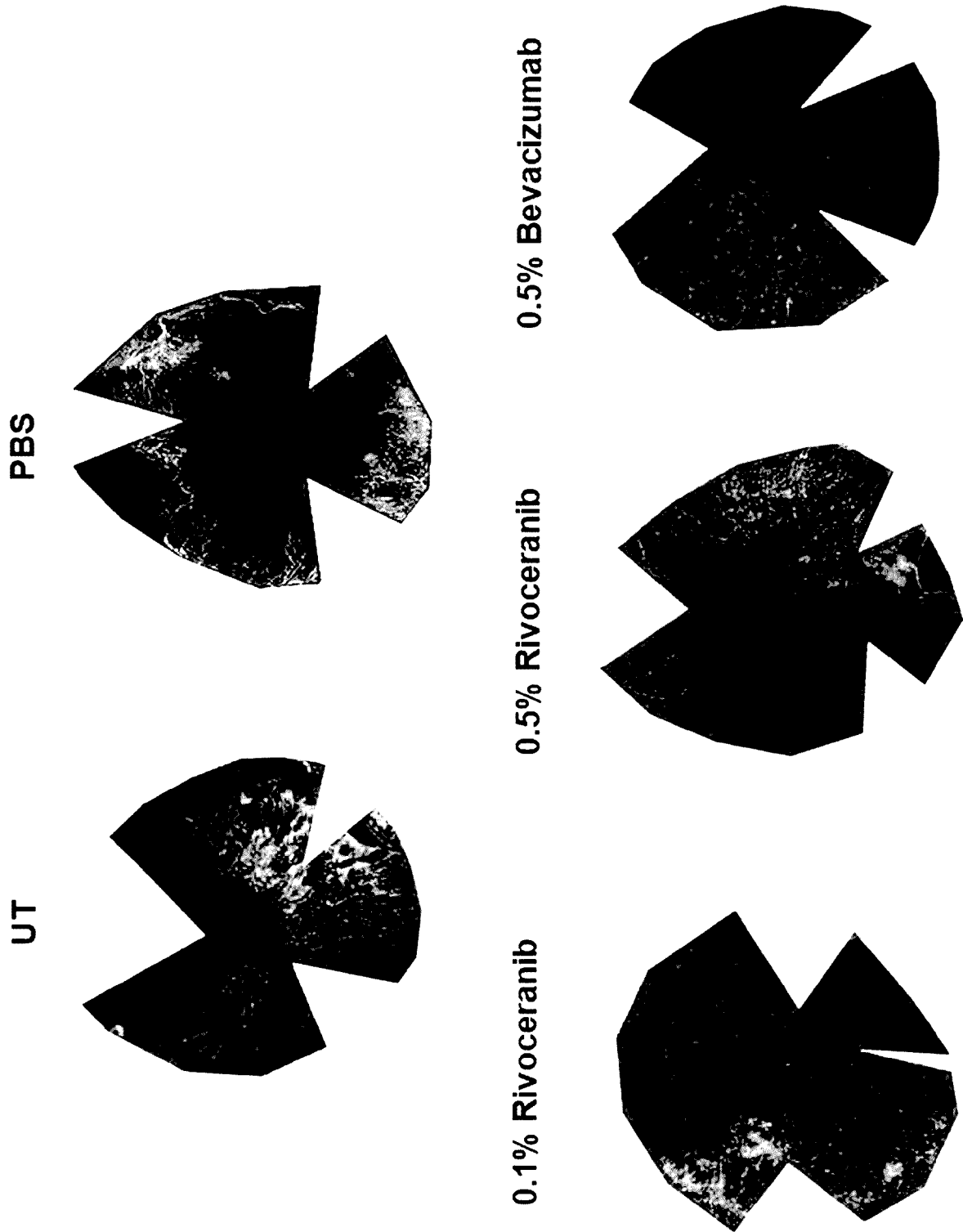
[도2]



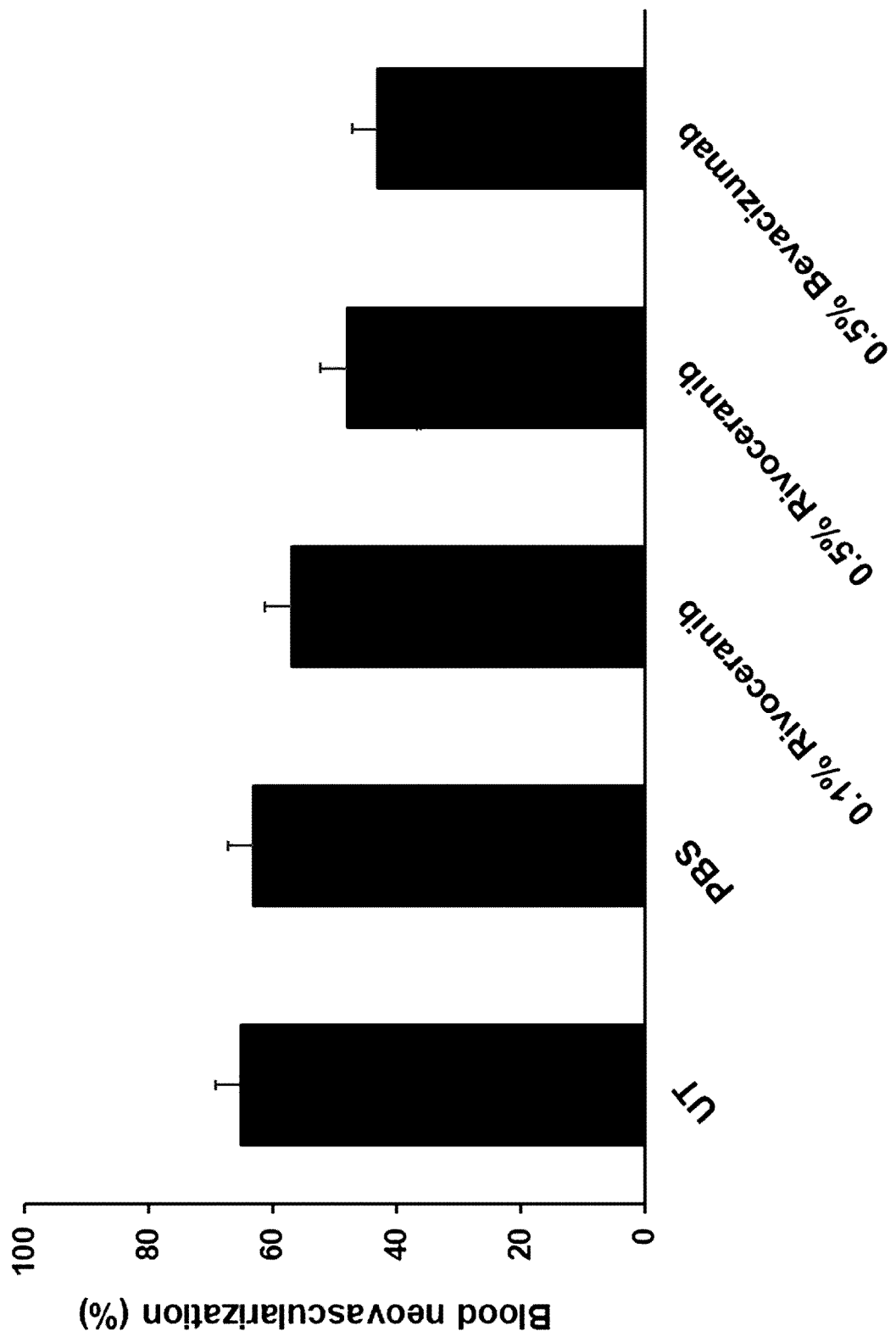
[도3]



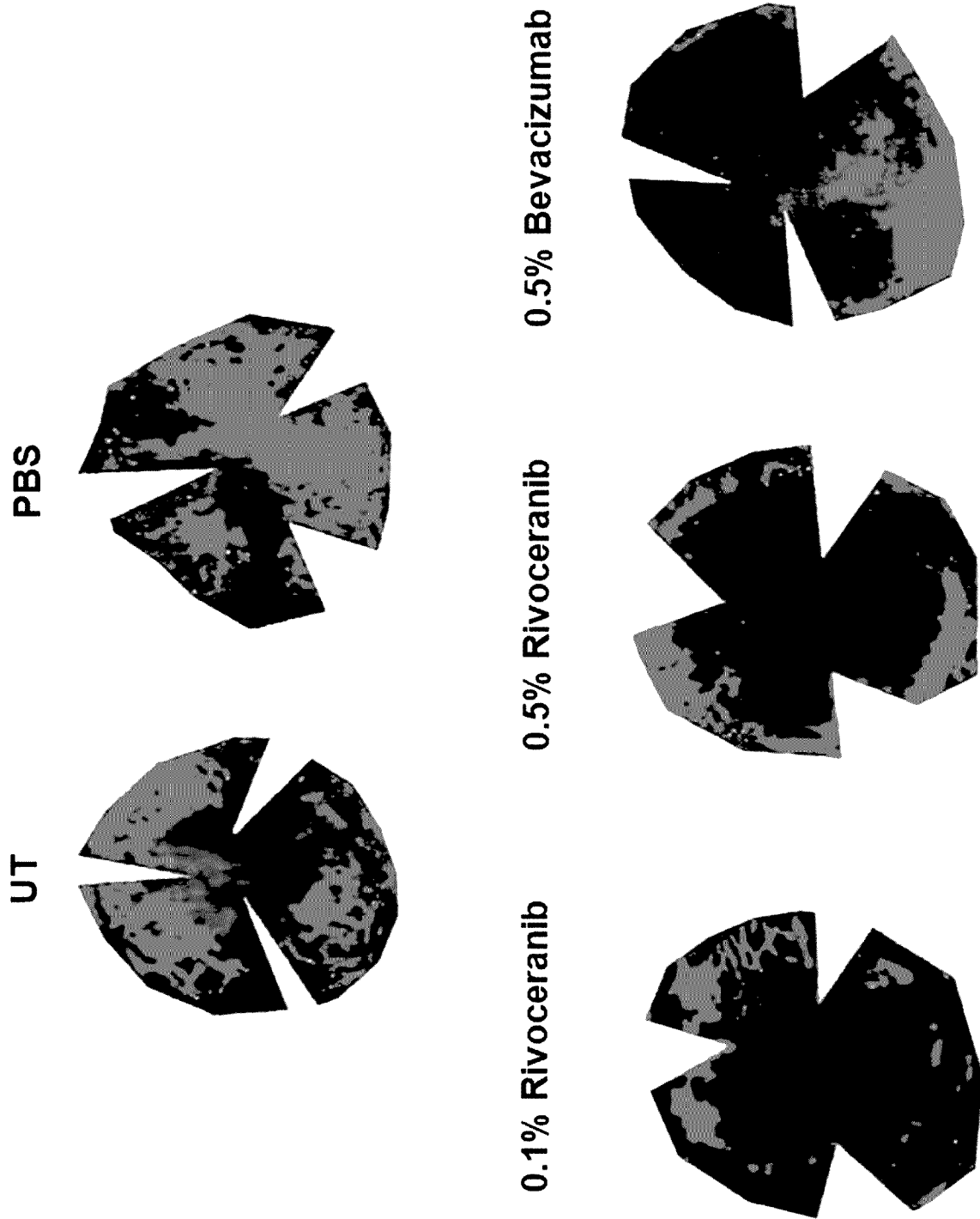
[도4a]



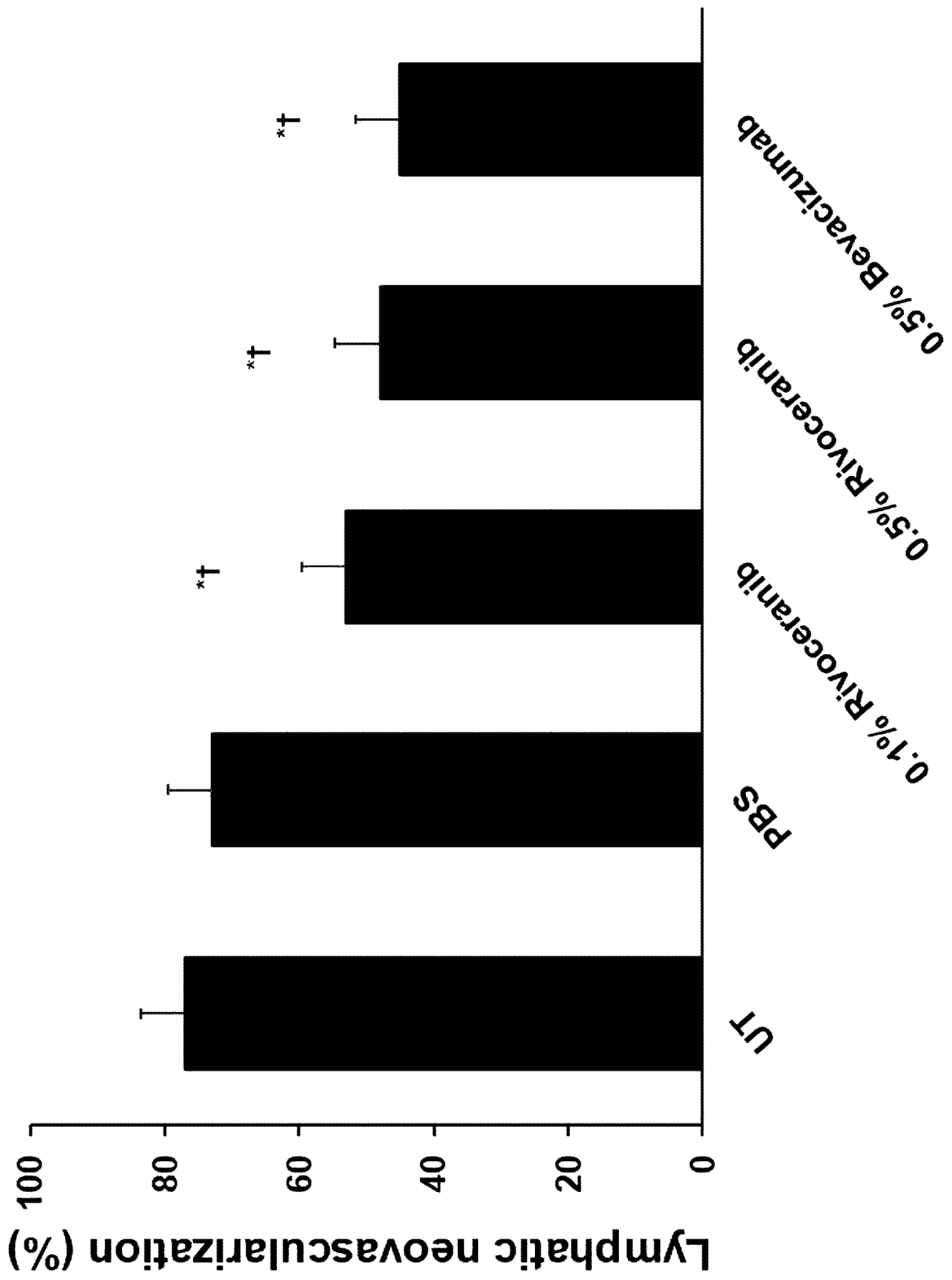
[도4b]



[도5a]



[도5b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/000155

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/444(2006.01)i, A61P 27/02(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/444; A61K 31/196; A61K 31/405; A61K 39/395; A61P 27/02

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: rivoceranib, apatinib, ocular, angiogenesis, cornea, retina

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, K. L. et al. Apatinib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor 2, suppresses pathologic ocular neovascularization in mice. Investigative ophthalmology & visual science. 2017, vol. 58, no. 9, pages 3592-3599 See abstract; page 3593; figures 3, 4.	1-12
X	LEE, J. E. et al. Apatinib-loaded nanoparticles suppress vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and experimental corneal neovascularization. International journal of nanomedicine. 2017, vol. 12, pages 4813-4822 See abstract; page 4820; figure 6.	1-12
A	JEONG, J. H. et al. Therapeutic effect of apatinib-loaded nanoparticles on diabetes-induced retinal vascular leakage. International journal of nanomedicine. 2016, vol. 11, pages 3101-3109 See the entire document.	1-12
A	WO 2017-120601 A1 (CLEARSIDE BIOMEDICAL, INC.) 13 July 2017 See the entire document.	1-12
A	WO 2016-166761 A1 (TILTAN PHARMA, LTD.) 20 October 2016 See the entire document.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 MAY 2020 (07.05.2020)

Date of mailing of the international search report

07 MAY 2020 (07.05.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/000155

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2017-120601 A1	13/07/2017	AU 2017-206114 A1 BR 112018013805 A2 CA 3010862 A1 CN 108778330 A EP 3400014 A1 JP 2019-501200 A KR 10-2018-0101488 A MX 2018008469 A	02/08/2018 11/12/2018 13/07/2017 09/11/2018 14/11/2018 17/01/2019 12/09/2018 09/11/2018
WO 2016-166761 A1	20/10/2016	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/444(2006.01)i, A61P 27/02(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/444; A61K 31/196; A61K 31/405; A61K 39/395; A61P 27/02

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 리보세라닙 (rivoceranib), 아파티니브 (apatinib), 안구 (ocular), 신생혈관 (angiogenesis), 각막 (cornea), 망막 (retina)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, K. L. 등, 'Apatinib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor 2, suppresses pathologic ocular neovascularization in mice', Investigative ophthalmology & visual science, 2017, 58권, 9호, 페이지 3592-3599 초록; 페이지 3593; 그림 3, 4	1-12
X	LEE, J. E. 등, 'Apatinib-loaded nanoparticles suppress vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and experimental corneal neovascularization', International journal of nanomedicine, 2017, 12권, 페이지 4813-4822 초록; 페이지 4820; 도면 6	1-12
A	JEONG, J. H. 등, 'Therapeutic effect of apatinib-loaded nanoparticles on diabetes-induced retinal vascular leakage', International journal of nanomedicine, 2016, 11권, 페이지 3101-3109 전체 문헌	1-12
A	WO 2017-120601 A1 (CLEAR SIDE BIOMEDICAL, INC.) 2017.07.13 전체 문헌	1-12
A	WO 2016-166761 A1 (TILTAN PHARMA. LTD.) 2016.10.20 전체 문헌	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X"에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 05월 07일 (07.05.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 05월 07일 (07.05.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



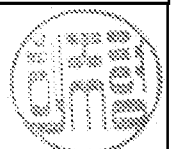
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2017-120601 A1

2017/07/13

AU 2017-206114 A1

2018/08/02

BR 112018013805 A2

2018/12/11

CA 3010862 A1

2017/07/13

CN 108778330 A

2018/11/09

EP 3400014 A1

2018/11/14

JP 2019-501200 A

2019/01/17

KR 10-2018-0101488 A

2018/09/12

MX 2018008469 A

2018/11/09

WO 2016-166761 A1

2016/10/20

없음