



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0073533
(43) 공개일자 2023년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/258 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61K 31/704 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/258 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0160012

(22) 출원일자 2021년11월19일

심사청구일자 2021년11월19일

(71) 출원인

충북대학교 산학협력단

충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

윤재석

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 152, 804동 101호(오송힐데스하임아파트)

민정기

울산광역시 남구 문수로314번길 11, 103동 906호 (옥동, 옥동서광아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인더웨이브

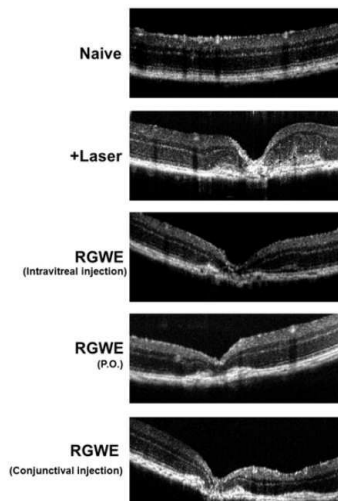
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 홍삼 사포닌 추출물을 포함하는 연령관련 황반변성 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

홍삼 사포닌 추출물의 연령관련 황반변성 및 망막하 섬유증 예방 또는 치료 효과에 관한 것으로, 일 양상에 따른 홍삼 사포닌 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 VEGF 및 α -SMA의 발현 또는 활성을 억제하여, 연령관련 황반변성 및 망막하 섬유증 예방 또는 치료에 효과적으로 사용할 수 있다. 무엇보다 기존의 안구에 직접 약물을 주입하는 치료법과는 달리 경구 투여 또는 점안을 통해 뛰어난 효능을 보여, 환자들의 기호도 및 약물투여의 용이성을 증대하였다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 31/704 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/2124 (2013.01)

(72) 발명자

유은혜

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 31,
101동 1516호

송윤정

세종특별자치시 나리1로 15, 308동 315호(한솔동,
첫마을3단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345329680
과제번호	2020대학혁신-147
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대학혁신지원(R&D)
연구과제명	(충북지역혁신플랫폼)충북대학교
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(충북지역혁신플랫폼)충북대학교
연구기간	2021.04.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

홍삼 사포닌 추출물을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증(subretinal fibrosis) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 홍삼 추출물로부터 사포닌 성분을 용출하여 제조된 것인 망막하 섬유증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 사포닌은 진세노사이드 Rb1, 진세노사이드 Rc, 진세노사이드 Re, 진세노사이드 Rg1, 진세노사이드 Rg2, 진세노사이드 Rg3 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 망막하 섬유증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 망막하 섬유증은 연령관련 황반변성(AMD; age-related macular degeneration)에 의한 것인 망막하 섬유증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 연령관련 황반변성은 신생혈관성 연령관련 황반변성(Neovascular Age-related Macular Degeneration)인 것인 망막하 섬유증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 10 내지 100mg/kg의 용량으로 경구투여되는 것인 망막하 섬유증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 0.1 내지 10 mg의 용량으로 안구 내 투여되는 것인 망막하 섬유증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 또는 α -SMA(α -Smooth Muscle Actin) 발현 또는 활성을 억제하는 것인 망막하 섬유증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

홍삼 사포닌 추출물을 유효성분으로 포함하는 연령관련 황반변성(AMD; age-related macular degeneration) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 사포닌은 진세노사이드 Rb1, 진세노사이드 Rc, 진세노사이드 Re, 진세노사이드 Rg1, 진세노사이드 Rg2, 진세노사이드 Rg3 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 연령관련 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 10 내지 100mg/kg의 용량으로 경구투여되는 것인 연령관련 황반

변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 0.1 내지 10 mg의 용량으로 안구내 투여되는 것인 연령관련 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 연령관련 황반변성은 신생혈관성 연령관련 황반변성인 것인 연령관련 황반변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

홍삼 사포닌 추출물을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증(subretinal fibrosis) 예방 또는 개선용 건강기능성식품.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 사포닌은 진세노사이드 Rb1, 진세노사이드 Rc, 진세노사이드 Re, 진세노사이드 Rg1, 진세노사이드 Rg2, 진세노사이드 Rg3 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 망막하 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능성식품.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 망막하 섬유증은 연령관련 황반변성에 의한 것인 망막하 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능성식품.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 연령관련 황반변성은 신생혈관성 연령관련 황반변성인 것인 망막하 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능성식품.

청구항 18

청구항 14에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 10 내지 100mg/kg의 용량으로 포함된 것인 망막하 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능성식품.

청구항 19

홍삼 사포닌 추출물을 유효성분으로 포함하는 연령관련 황반변성(AMD; age-related macular degeneration) 예방 또는 개선용 건강기능성식품.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 사포닌은 진세노사이드 Rb1, 진세노사이드 Rc, 진세노사이드 Re, 진세노사이드 Rg1, 진세노사이드 Rg2, 진세노사이드 Rg3 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 연령관련 황반변성 예방 또는 개선용 건강기능성식품.

청구항 21

청구항 19에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 10 내지 100mg/kg의 용량으로 경구투여되는 것인 연령관련 황반변성 예방 또는 개선용 건강기능성식품.

청구항 22

청구항 19에 있어서, 상기 연령관련 황반변성은 신생혈관성 연령관련 황반변성인 것인 연령관련 황반변성 예방 또는 개선용 건강기능성식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 홍삼 사포닌 추출물의 연령관련 황반변성 예방 또는 치료 효과에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인삼은 중국, 한국, 일본 등의 아시아 국가에서 전통적으로 각종 질병의 치료에 사용되어 온 약재 중 하나이다. 이러한 인삼의 주요 활성 성분인 인삼 사포닌(saponin)(진세노사이드)은 항노화, 항염증, 중추 신경계와 심혈관계 및 면역계에서의 항산화 활성(Wu JY, et al., J. Immunol., 148:1519-25, 1992; Lee FC., Facts about ginseng, the elixir of life. Hollyn International. New Jersey, 1992; Huang KC., The pharmacology of Chinese herbs. CRC Press. Florida, 1999), 항당뇨 활성(Chang HM., Pharmacology and application of Chinese material medica. Vol1. World Scientific. Singapore, 1986) 및 항종양 활성(Sato K, et al., Biol. Pharm. Bull. 17:635-9, 1994; Mochizuki M, et al., Biol. Pharm. Bull. 18:1197-1202, 1995) 등과 같은 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 현재까지 30여 종이 넘는 진세노사이드가 인삼 사포닌으로부터 분리동정되었으며, 담마란(dammarane) 골격을 가진 아글리콘(aglycone)을 포함하는 글리코사이드(glycoside)인 진세노사이드에는 프로토파낙사디올(protopanaxadiol)계 사포닌에 속하는 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd와 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol)계 사포닌에 속하는 진세노사이드 Re와 Rg1이 대부분을 차지하고 있다.

[0003] 황반 변성 (macular degeneration)은 선진국에서 발생하는 성인 실명 원인 1위인 질병이다. 전 세계적으로 3천 만명 정도가 이 병으로 고통받고 있고, 매년 50만명의 환자가 이 질병으로 인해 시력을 잃고 있다. 서구에서는 65세 이상의 등록 시각장애인의 40% 정도가 이 질병으로 고통받고 있다. 우리나라에서도 녹내장, 당뇨망막 병증과 함께 3대 실명을 야기하는 병으로, 고령인구의 증가로 유병률이 점차 증가하고 있다. 발병 시기 또한 60대에서 4,50대의 중장년층으로 낮아지고 있는 추세이고, 발병을 또한 최근 수년 동안 급증하고 있다.

[0004] 시각에 있어서 매우 중요한 황반부에 나이가 들면서 여러 가지로 변화가 발생하여 생기는 안구의 질환으로 특히 이 질환은 50세 이상의 노년층에서 주로 발생하며 나이가 더붙어 점점 진행하여 결국에는 실명도 할 수 있는 안 질환이다. 노인 인구가 증가 추세에 있음으로 그 발생빈도도 더욱 증가할 것으로 예상된다.

[0005] 연령관련 황반변성(AMD; age-related macular degeneration)의 개시는 맥락막 신혈관형성(CNV; Choroidal neovascularization)이라고 칭하는 프로세스와 관련이 있다. CNV 유래의 누출은 황반 부종 및 시력 손실을 초래하는 황반 하의 유체 수집을 야기한다. 황반 내의 유체는 중증의 시력 손실 또는 시력 상실을 야기할 수 있다. 또한, 망막은 시력 손실 및 보다 심각한 합병증을 추가로 야기할 수 있는 새로운 부적절한 혈관의 성장을 초래하는 허혈성이 될 수 있다. 혈관 내피 성장 인자(VEGF; Vascular endothelial growth factor)의 방출은 눈의 증가된 혈관 투과성 및 부적절한 새로운 혈관 성장에 기여한다. 따라서, VEGF의 혈관신생-촉진 특성을 억제하는 것은 혈관신생 눈 장애를 치료하기 위한 효과적인 전략인 것으로 밝혀진다.

[0006] 신생혈관생성 억제를 기전으로 하는 일반적인 황반변성 치료제는 아바스틴이다. 당초 항암제로 개발되었으나, 황반변성에도 임상적인 효과가 입증되면서 계속 off-label(허가받은 적응증 이외의 용도)로 사용되고 있다.

[0007] 망막하 섬유증(subretinal fibrosis)은 망막주변에 섬유조직이 증식하는 현상으로 황반부종과 박리(macular edema and detachment)를 유도하여 시력을 영구적으로 훼손한다. 습성황반변성 (exudative/neovascular AMD), 당뇨병성망막병증 (diabetic retinopathy), 중심망막혈관폐색증 (central retinal vein occlusion), 시신경신경병증 (optic neuropathy) 등 주요 만성 망막 질환들의 대부분에서 공통적으로 망막 섬유화가 발생하고 있다.

[0008] 상기 질환들, 특히 황반변성에 대한 치료제는 유리체 내로 주입하는 눈 속 주사를 주기적으로 투여해야 하므로, 환자나 의사입장에서 부담일 수 밖에 없다. 따라서, 눈 속 주사를 대체할 수 있는 점안제 및 경구용 약물에 대한 개발이 시급한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 일 양상은 홍삼 사포닌 추출물 또는 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증(subretinal fibrosis) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 다른 양상은 홍삼 사포닌 추출물 또는 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 연령관련 황반변성(AMD; age-

related macular degeneration) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 양상은 홍삼 사포닌 추출물 또는 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증(subretinal fibrosis) 예방 또는 개선용 건강기능성식품을 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 홍삼 사포닌 추출물 또는 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 연령관련 황반변성(AMD; age-related macular degeneration) 예방 또는 개선용 건강기능성식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 일 양상은 홍삼 사포닌 추출물 또는 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증(subretinal fibrosis) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 다른 양상은 홍삼 사포닌 추출물 또는 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 연령관련 황반변성(AMD; age-related macular degeneration) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 본 명세서에서 "추출물"은 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온 또는 가온상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분 또는 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미할 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 희석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물 및 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다.

[0016] 상기 용매로는 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜, 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미세결정 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 아가 또는 트라가칸트, 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세라이드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 오일, 리놀린 유도체, 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 추출용매는 극성용매, 비극성용매 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 극성용매로는 물, 탄소수 1 내지 6의 무수 또는 함수 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올 또는 2-부톡시에탄올 등) 또는 알코올성 화합물(에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 부틸렌글리콜 등), 아세트산, DMF(dimethyl-formamide), DMSO(dimethyl sulfoxide) 또는 이들의 조합일 수 있고, 비극성 용매로는 헥산, 오로알칸, 펜탄, 헥산, 에틸아세테이트, 메틸아세테이트, 부틸아세테이트, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 아세톤, 1-클로로펜탄, o-자일렌, 디이소프로필 에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 디에틸에테르, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸설파이드, 클로로포름, 디클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르, 사염화탄소, THF 또는 이들의 조합일 수 있다. 본 명세서에서 상기 추출물은 특별히 이에 제한되지 않으며, 상기 용매뿐만 아니라 다른 용매를 이용하여 제조한 실질적으로 동일한 효과를 나타내는 추출물을 포함하는 것일 수 있다.

[0017] 상기 용매를 이용하여 추출하는 방법은 당업계에서 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다. 예컨대, 추출 대상을 상기 용매에 침지하고, 10 내지 25℃의 상온에서 추출하는 냉침추출법, 40 내지 100℃로 가열하여 추출하는 가열추출법, 환류냉각기를 이용한 환류추출법, 초음파기기를 이용한 초음파 추출법 및 고주파 기기를 이용한 고주파 추출법 등의 방법을 통하여 수행할 수 있다.

[0018] 본 명세서에 "홍삼 추출물"은 홍삼을 용매(예를 들면, 물 또는 에탄올)에 침지한 다음, 상온 또는 가온상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분 또는 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미할 수 있다. "홍삼 사포닌 추출물"은 홍삼으로부터 사포닌 성분을 추출하고 추출액 중의 비사포닌 성분을 제거하여 홍삼 추출물에 사포닌 성분이 고함량으로 함유되도록 하는 추출물 일 수 있다.

[0019] 일 구체예에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 홍삼 추출물로부터 사포닌 성분을 용출하여 제조된 것일 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 "예방"은 상기 홍삼 사포닌 추출물을 포함하는 약학 조성물을 투여함으로써 연령관련 황반변성을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 말하며, "치료"는 상기 약학 조성물의 투여로 연령관련 황반변성이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

- [0021] 일 구체예에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 올레오놀산(Oleanolic acid.OA)계 파낙사디올(Panaxa Diol.PD)계, 파낙사트리올(Panaxa Triol.PT)계 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 올레오놀산계는 진세노사이드 Ro일 수 있다. 파낙사디올계는 진세노사이드 Ra1, 진세노사이드 Ra2, 진세노사이드 Ra3, 진세노사이드 Rb1, 진세노사이드 Rb2, 진세노사이드 Rb3, 진세노사이드 Rc, 진세노사이드 Rd, 진세노사이드 Rh2, 진세노사이드 Rg3 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 파낙사트리올계는 진세노사이드 Re, 진세노사이드 Rf, 진세노사이드 Rg1, 진세노사이드 Rg2 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0022] 일 구체예에 있어서, 상기 사포닌은 진세노사이드 Rb1, 진세노사이드 Rc, 진세노사이드 Re, 진세노사이드 Rg1, 진세노사이드 Rg2, 진세노사이드 Rg3 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0023] 일 구체예에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 VEGF(Vascular endothelial growth factor)또는 α -SMA(α -Smooth Muscle Actin)의 발현 또는 활성을 억제하는 것일 수 있다.
- [0024] 일 구체예에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 10 내지 100 mg/kg, 10 내지 90 mg/kg, 10 내지 80 mg/kg, 10 내지 70 mg/kg, 10 내지 60 mg/kg, 10 내지 50 mg/kg, 10 내지 40 mg/kg, 10 내지 30 mg/kg, 10 내지 20 mg/kg, 15 내지 100 mg/kg, 15 내지 90 mg/kg, 15 내지 80 mg/kg, 15 내지 70 mg/kg, 15 내지 60 mg/kg, 15 내지 50 mg/kg, 15 내지 40 mg/kg, 15 내지 30 mg/kg, 15 내지 20 mg/kg, 15 내지 100 mg/kg, 15 내지 90 mg/kg, 15 내지 80 mg/kg, 15 내지 70 mg/kg, 15 내지 60 mg/kg, 15 내지 50 mg/kg, 15 내지 40 mg/kg, 15 내지 30 mg/kg, 15 내지 20 mg/kg, 20 내지 100 mg/kg, 20 내지 90 mg/kg, 20 내지 80 mg/kg, 20 내지 70 mg/kg, 20 내지 60 mg/kg, 20 내지 50 mg/kg, 20 내지 40 mg/kg, 20 내지 30 mg/kg, 25 내지 100 mg/kg, 25 내지 90 mg/kg, 25 내지 80 mg/kg, 25 내지 70 mg/kg, 25 내지 60 mg/kg, 25 내지 50 mg/kg, 25 내지 40 mg/kg, 25 내지 30 mg/kg, 25 내지 20 mg/kg, 25 내지 100 mg/kg, 25 내지 90 mg/kg, 25 내지 80 mg/kg, 25 내지 70 mg/kg, 25 내지 60 mg/kg, 25 내지 50 mg/kg, 25 내지 40 mg/kg, 25 내지 30 mg/kg, 30 내지 100 mg/kg, 30 내지 90 mg/kg, 30 내지 80 mg/kg, 30 내지 70 mg/kg, 30 내지 60 mg/kg, 30 내지 50 mg/kg, 30 내지 40 mg/kg, 또는 25 mg/kg의 용량으로 경구 투여될 수 있다. 다만, 증증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 투여 용량은 조절될 수 있다.
- [0025] 일 구체예에 있어서, 상기 홍삼 사포닌 추출물은 0.1 내지 10 mg, 0.2 내지 10 mg, 0.3 내지 10 mg, 0.4 내지 10 mg, 0.5 내지 10 mg, 0.6 내지 10 mg, 0.7 내지 10 mg, 0.8 내지 10 mg, 0.9 내지 10 mg, 1 내지 10 mg, 1.1 내지 10 mg, 1.2 내지 10 mg, 1.3 내지 10 mg, 1.4 내지 10 mg, 1.5 내지 10 mg, 1.6 내지 10 mg, 1.7 내지 10 mg, 1.8 내지 10 mg, 1.9 내지 10 mg, 2 내지 10 mg, 2.1 내지 10 mg, 2.2 내지 10 mg, 2.3 내지 10 mg, 2.4 내지 10 mg, 2.5 내지 10 mg, 2.6 내지 10 mg, 2.7 내지 10 mg, 2.8 내지 10 mg, 2.9 내지 10 mg, 3 내지 10 mg, 3.1 내지 10 mg, 3.2 내지 10 mg, 3.3 내지 10 mg, 3.4 내지 10 mg, 3.5 내지 10 mg, 3.6 내지 10 mg, 3.7 내지 10 mg, 3.8 내지 10 mg, 3.9 내지 10 mg, 4 내지 10 mg, 0.1 내지 8 mg, 0.2 내지 8 mg, 0.3 내지 8 mg, 0.4 내지 8 mg, 0.5 내지 8 mg, 0.6 내지 8 mg, 0.7 내지 8 mg, 0.8 내지 8 mg, 0.9 내지 8 mg, 1 내지 8 mg, 1.1 내지 8 mg, 1.2 내지 8 mg, 1.3 내지 8 mg, 1.4 내지 8 mg, 1.5 내지 8 mg, 1.6 내지 8 mg, 1.7 내지 8 mg, 1.8 내지 8 mg, 1.9 내지 8 mg, 2 내지 8 mg, 2.1 내지 8 mg, 2.2 내지 8 mg, 2.3 내지 8 mg, 2.4 내지 8 mg, 2.5 내지 8 mg, 2.6 내지 8 mg, 2.7 내지 8 mg, 2.8 내지 8 mg, 2.9 내지 8 mg, 3 내지 8 mg, 3.1 내지 8 mg, 3.2 내지 8 mg, 3.3 내지 8 mg, 3.4 내지 8 mg, 3.5 내지 8 mg, 3.6 내지 8 mg, 3.7 내지 8 mg, 3.8 내지 8 mg, 3.9 내지 8 mg, 4 내지 8 mg, 0.1 내지 6 mg, 0.2 내지 6 mg, 0.3 내지 6 mg, 0.4 내지 6 mg, 0.5 내지 6 mg, 0.6 내지 6 mg, 0.7 내지 6 mg, 0.8 내지 6 mg, 0.9 내지 6 mg, 1 내지 6 mg, 1.1 내지 6 mg, 1.2 내지 6 mg, 1.3 내지 6 mg, 1.4 내지 6 mg, 1.5 내지 6 mg, 1.6 내지 6 mg, 1.7 내지 6 mg, 1.8 내지 6 mg, 1.9 내지 6 mg, 2 내지 6 mg, 2.1 내지 6 mg, 2.2 내지 6 mg, 2.3 내지 6 mg, 2.4 내지 6 mg, 2.5 내지 6 mg, 2.6 내지 6 mg, 2.7 내지 6 mg, 2.8 내지 6 mg, 2.9 내지 6 mg, 3 내지 6 mg, 3.1 내지 6 mg, 3.2 내지 6 mg, 3.3 내지 6 mg, 3.4 내지 6 mg, 3.5 내지 6 mg, 3.6 내지 6 mg, 3.7 내지 6 mg, 3.8 내지 6 mg, 3.9 내지 6 mg, 4 내지 6 mg, 0.1 내지 4 mg, 0.2 내지 4 mg, 0.3 내지 4 mg, 0.4 내지 4 mg, 0.5 내지 4 mg, 0.6 내지 4 mg, 0.7 내지 4 mg, 0.8 내지 4 mg, 0.9 내지 4 mg, 1 내지 4 mg, 1.1 내지 4 mg, 1.2 내지 4 mg, 1.3 내지 4 mg, 1.4 내지 4 mg, 1.5 내지 4 mg, 1.6 내지 4 mg, 1.7 내지 4 mg, 1.8 내지 4 mg, 1.9 내지 4 mg, 2 내지 4 mg, 2.1 내지 4 mg, 2.2 내지 4 mg, 2.3 내지 4 mg, 2.4 내지 4 mg, 2.5 내지 4 mg, 2.6 내지 4 mg, 2.7 내지 4 mg, 2.8 내지 4 mg, 2.9 내지 4 mg, 3 내지 4 mg, 3.1 내지 4 mg, 3.2 내지 4 mg, 3.3 내지 4 mg, 3.4 내지 4 mg, 3.5 내지 4 mg, 3.6 내지 4 mg, 3.7 내지 4 mg, 3.8 내지 4 mg, 3.9 내지 4 mg, 0.1 내지 2 mg, 0.2 내지 2 mg, 0.3 내지 2 mg, 0.4 내지 2 mg, 0.5 내지 2 mg, 0.6 내지 2 mg, 0.7 내지 2 mg, 0.8 내지 2 mg, 0.9 내지 2 mg, 1 내지 2 mg, 1.1 내지 2 mg, 1.2 내지 2 mg, 1.3 내지 2 mg, 1.4 내지 2 mg, 1.5 내지 2 mg, 1.6 내지 2 mg, 1.7 내지 2 mg, 1.8 내지 2 mg, 1.9 내지 2 mg, 2 내지 2 mg, 2.1 내지 2 mg, 2.2 내지 2 mg, 2.3 내지 2 mg, 2.4 내지 2 mg, 2.5 내지 2 mg, 2.6 내지 2 mg, 2.7 내지 2 mg, 2.8 내지 2 mg, 2.9 내지 2 mg, 3 내지 2 mg, 3.1 내지 2 mg, 3.2 내지 2 mg, 3.3 내지 2 mg, 3.4 내지 2 mg, 3.5 내지 2 mg, 3.6 내지 2 mg, 3.7 내지 2 mg, 3.8 내지 2 mg, 3.9 내지 2 mg, 4 내지 2 mg.

지 2 mg, 1 내지 2 mg, 1.1 내지 2 mg, 1.2 내지 2 mg, 1.3 내지 2 mg, 1.4 내지 2 mg, 1.5 내지 2 mg, 1.6 내지 2 mg, 1.7 내지 2 mg, 1.8 내지 2 mg, 1mg, 1.25mg 또는 6.25mg 용량으로 안구내 투여될 수 있다. 다만, 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 투여 용량은 조절될 수 있다.

[0026] 상기 안구내 투여는 직접적으로 안구내 투여되거나, 안구주위, 안구뒤, 망막하(subretinal), 망막중심(central retinal), 중심와(fovea) 외부, 결막하(subconjunctival), 유리체내(intravitreal), 전방내(intracameral), 또는 맥락막위(suprachoroidal) 등에 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0027] 상기 안구내 투여는 주사, 점안 또는 도포 등 약물이 질병부위에 투입 및 전달되어 작용할 수 있는 모든 방법으로 투여될 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 "연령관련 황반변성"은 노화 또는 염증으로 인해 중심시력을 담당하는 황반부의 망막 색소 상피세포에 변성이 생기는 질환을 의미할 수 있다. 상기 질환은 "비삼출성(건성)"과 "삼출성(습성)"의 두가지 형태가 있다. 비삼출성 형태는 연령의 증가에 따른 망막의 노화로 인해 시세포 노폐물이 망막과 맥락막 사이에 쌓인 '드루젠'이 생기는 형태이며, 삼출성 형태는 망막 아래쪽의 맥락막 혈관층에서 신생혈관이 생겨 출혈이나 삼출물을 일으키는 형태이다. "삼출성 연령관련 황반변성"은 "신생혈관성 연령관련 황반변성"이라고도 하며, 두 용어는 동일한 의미로 상호교환되어 사용될 수 있다. 비삼출성은 대개 증상이 없지만, 시간이 지나면서 삼출성으로 진행할 수 있다. 삼출성 황반변성은 맥락막 신생혈관에 의해 망막하액, 망막하출혈, 섬유혈관조직의 증식 등이 발생하게 되며, 이로 인한 시신경층과 망막색소상피세포의 손상으로 인해 심각한 시력 저하를 유발할 수 있다. 황반 바로 아래에 출혈이 생기면 중심시력이 소실되며, 황반 주위에 출혈이 생기면 주변부 시야에 암점이 발생할 수 있다. 또한 망막하 출혈 및 삼출물로 인해 망막이 붓게 되고 이로 인해 물체가 찌그러져 보이는 증상(변형시)이 발생할 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 "망막하 섬유증"은 망막주변에 섬유조직이 증식하는 질환을 의미할 수 있으며, 황반부종과 박리를 유도하여 시력을 영구적으로 훼손할 수 있다. 상기 섬유조직은 수복 또는 반응과정에서 조직에 과량의 세포외 기질이 형성되어 증식할 수 있다. 상기 망막하 섬유증은 상기 신생혈관성 황반변성 진행과정 중 신생혈관 생성 및 국소적 파괴로 발생할 수 있다.

[0030] 본 명세서의 약학적 조성물은 연령관련 황반변성의 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 인간이 아닌 동물, 인간, 조류 및 어류 등 어느 것에 사용가능하다.

[0031] 일 구체예에 있어서, 상기 망막하 섬유증은 그레이브스 눈병증, 당뇨병, 녹내장, 백내장, 지도모양위축, 안과수술 또는 연령관련 황반변성에 의한 것일 수 있다.

[0032] 본 명세서의 조성물은 구강으로 투여될 수 있으며, 구강은 연하(swallowing)를 포함하는 개념이다. 구강 투여에 의하여 본 명세서의 조성물이 위장관(gastrointestinal tract)에 들어가거나, 예를 들어, 구강(buccal) 또는 설하(sublingual) 투여와 같이, 입으로부터 혈류로 직접적으로 흡수될 수 있다.

[0033] 구강 투여를 위한 적합한 조성물은 고형상, 액상, 겔(gel), 또는 파우더 형상일 수 있으며, 정제(tablet), 로젠지(lozenge), 캡슐(capsule), 과립제, 산제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0034] 구강 투여를 위한 조성물은 선택적으로 장용 코팅(enteric coating)될 수 있으며, 장용 코팅을 통하여 지연된(delayed) 또는 지속된(sustained) 방출을 나타낼 수 있다. 즉, 본 명세서에 따른 구강 투여를 위한 조성물은 즉시 또는 변형된(modified) 방출 패턴을 가진 제형일 수 있다.

[0035] 액체 제형은 용액, 시럽 및 현탁액을 포함할 수 있으며, 이러한 액상 조성물은 연질 또는 경질 캡슐 내에 함유된 형태일 수 있다. 이러한 제형은 약학적으로 허용 가능한 담체, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리에틸렌글리콜, 셀룰로오스, 또는 오일(oil)을 포함할 수 있다. 상기 제형은 또한 하나 이상의 유화제 및/또는 현탁제를 포함할 수 있다.

[0036] 정제(tablet) 제형에서, 활성 성분인 약물의 양은 정제 총 중량 대비 약 0.05 중량% 내지 약 95 중량%, 더욱 일반적으로 제형의 약 2 중량% 내지 약 50 중량%로 존재할 수 있다. 또한, 정제는 약 0.5 중량% 내지 약 35 중량%, 더욱 일반적으로 제형의 약 2 중량% 내지 약 25 중량%를 포함하는 붕해제를 함유할 수 있다. 붕해제의 예로는 유당, 전분, 소디움스타치글리콜레이트, 크로스포비돈, 크로스카멜로스소디움(croscarmellose sodium), 말토

텍스트린 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0037] 정제로 제조하기 위해 포함되는 적합한 활택제는 약 0.1 중량% 내지 약 5 중량% 양으로 존재할 수 있고, 탈크(talc), 이산화규소, 스테아린산, 칼슘, 아연 또는 마그네슘 스테아레이트, 소듐 스테아릴 푸마레이트 등이 활택제로 사용될 수 있으나, 본 명세서에서는 이러한 첨가제들의 종류에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 정제로 제조하기 위한 결합제(binder)로는 젤라틴, 폴리에틸렌글리콜, 당(sugar), 검(gum), 녹말(starch), 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등이 사용될 수 있으며, 정제로 제조하기 위한 적합한 희석제로는 만니톨, 자일리톨, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 녹말(starch), 미결정셀룰로오스 등이 사용될 수 있으나, 본 명세서에서는 이러한 첨가제들의 종류에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 선택적으로 정제에 포함될 수 있는 가용화제는 정제 총 중량 대비 약 0.1 중량% 내지 약 3 중량% 양이 사용될 수 있고, 예를 들어, 폴리소르베이트, 소듐 라우릴설페이트, 소듐 도데실설페이트, 프로필렌 카보네이트, 디에틸렌글리콜모노에틸에테르, 디메틸이소소르비드, 폴리옥시에틸렌글리콜화된 천연 또는 수소화 피마자유, HCORTM(Nikkol), 올레일에스테르, 젤루시어(GelucireTM), 카프릴릭/카프릴산 모노/디글리세리드, 소르비탄지방산 에스테르, 솔루톨HSTM등이 본 명세서에 따른 약학 조성물에 사용될 수 있으나, 본 명세서에서는 이러한 가용화제의 구체적 종류에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 약학 조성물을 주사제로 제형화하는 경우는 보존제, 등장화제, 무통화제, 가용화제, 완충제, 및 안정화제 등을 약학적으로 허용 가능한 희석제로 혼합하여, 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.
- [0041] 다른 양상은 홍삼 사포닌 추출물 또는 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유증(subretinal fibrosis) 예방 또는 개선용 건강기능성식품을 제공한다.
- [0042] 다른 양상은 홍삼 사포닌 추출물 또는 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 연령관련 황반변성(AMD; age-related macular degeneration) 예방 또는 개선용 건강기능성식품을 제공한다.
- [0043] 본 명세서에서 "개선"은 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들어, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0044] 본 명세서에서 "건강기능식품"은 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 '기능(성)'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [0045] 상기 건강기능식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 상기 건강기능식품은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나므로, 연령관련 황반변성 예방 또는 개선 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0046] 상기 건강기능식품은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 건강기능식품은 산제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 현탁액, 유제, 시럽제, 침제, 액제, 엑스제 등의 일반적인 제형으로 제조될 수도 있고, 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 젤리, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등의 임의의 건강식품 형태로 제조될 수도 있다.
- [0047] 상기 건강기능식품의 제제화를 위해 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 사용할 수 있으며, 제조하고자 하는 제형의 제조에 당해 기술분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다.
- [0048] 상기 건강기능식품은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 건강기능식품은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분

과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(돌신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0050] 일 양상에 따른 홍삼 사포닌 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 VEGF 및 α -SMA의 발현 또는 활성을 억제하여, 연령관련 황반변성 및 망막하 섬유증 예방 또는 치료에 효과적으로 사용할 수 있다. 무엇보다 기존의 안구에 직접 약물을 주입하는 치료법과는 달리 경구 투여 또는 점안을 통해 뛰어난 효능을 보여, 환자들의 기호도 및 약물투여의 용이성을 증대하였다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 *In vitro* 실험에서 홍삼 사포닌 추출물의 VEGF발현 억제 효과를 보여주는 닷블롯(Dot blot)결과 그래프이다.

도 2는 *In vitro* 실험에서 홍삼 물 추출물의 α -SMA발현 억제 효과를 보여주는 웨스턴블롯(Western blot) 결과 그래프이다.

도 3은 *In vivo* 실험에서 홍삼 사포닌 추출물의 VEGF 및 α -SMA발현 억제 효과를 보여주는 웨스턴블롯(Western blot) 결과 그래프이다.

도 4는 홍삼 사포닌의 CNV 억제 효과보여주는 면역염색법(immunohistochemistry) 결과 이미지이다.

도 5는 홍삼 물 추출물의 섬유증 억제 효과보여주는 면역염색법(immunohistochemistry) 결과 이미지이다.

도 6은 홍삼 물 추출물의 투여방법에 따른 α -SMA발현 억제 효과를 보여주는 웨스턴블롯(Western blot) 결과 그래프이다.

도 7은 정상 마우스, CNV유도 마우스, CNV유도 후 홍삼 물 추출물을 투여 투여한 마우스들의 안구를 OCT(Optical coherence tomography)장비로 촬영한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 실시예 1. 홍삼 사포닌 추출물의 제조

[0054] 홍삼 분말시료 약 10g에 10 배량(v/w)의 70% MeOH을 가하여 환류냉각 장치를 이용하여 75 내지 80℃에서 3시간씩 3회 반복하여 추출한 다음 추출물을 모아 여과하여 70℃이하에서 감압 농축시킨 후 소량의 증류수로 용해하였다. 이를 Diaion HP-20 수지가 충전된 칼럼에 부은 후 칼럼수지에 물과 25% MeOH를 약 5배량(v/v) 가하여 시료에 함유된 수용성 성분 및 일부 비수용성 성분을 제거하였다. 최종적으로 100% MeOH로 비수용성 성분을 용출하고 감압농축한 후 이를 조사포닌으로 하였다. 농축된 조사포닌은 10% 용액(v/w)이 되도록 MeOH에 용해시켜 시료액으로 하였다.

[0055] 사포닌의 분석은 TLC 및 HPLC를 이용하여 실시하였다. TLC 분석은 silica gel TCL 관에 시료를 약 5 μ l씩 점적하고 chloroform/methanol/water(65:35:10, lower phase)로 전개한 후 30% H₂SO₄ 시약을 분무하여 110℃에서 5분간 발색시켜 사포닌을 확인하였다. 또한 HPLC를 이용한 사포닌성분의 정량은 protopanaxatriol(PPT) 사포닌과 protopanaxadiol(PPD) 사포닌으로 구분하였고 각각의 표준품으로 작성된 검량곡선의 피크 면적에 의하여 환산하여 사포닌의 함량을 계산하였다. HPLC 분석을 위하여 조사포닌 시료에 methanol를 10%(v/w, final volume)가 되도록 용해하여 0.45 μ m 필터로 여과한 후 총 사포닌 함량과 사포닌 조성 분석을 위한 시료로 사용하였다. 분석은 Lichrosorb-NH2 column(Merck, 10 μ m, ID 0.46cm X 25cm)에 acetonitrile/water/n-butanol(80:20:10)을 이동상으로 하였다.

[0057] **참조예 1. ARPE cell 배양**

[0058] 망막세포인 ARPE19(Adult Retinal Pigment Epithelial cell line-19) 세포를 10% FBS, 1% antibiotic을 넣은 DMEM 배지를 이용하여 배양을 하였다. Cell culture dish에서 배양되고 있는 ARPE19 세포의 계대배양(subculture)를 위해 37℃ 항온 수조(water bath)에서 데워진 PBS를 이용하여 10ml씩 3번 세척(wash)한 후, 0.5% trypsin-EDTA를 2ml 넣어주고, 37℃의 cell incubator에서 2분 incubation시켰다. 그 후, FBS가 포함된 complete DMEM 배지 10 ml을 첨가하여 세포를 수확(harvest)하고 3000rpm에서 3분간 원심분리(centrifugation)를 수행하였다. 상층액을 제거하고, 모아진 cell pellet에 DMEM 배지를 1ml 넣고 풀어준 후, cell counting을 하여 96 well plate에 각각 1×10^4 cell/well으로 분주(plating) 하였다.

[0060] **참조예 2. 신생혈관성 황반변성 마우스 모델**

[0061] C57BL6/N 8주령 수컷 마우스의 망막에 350mW의 강도, 100ms 지속시간으로 다이오드 레이저를 조사하여 망막과 맥락막층 사이의 부르크막을 파괴시켜 맥락막 신생혈관형성 (CNV; Choroidal neovascularization)를 유도하였다.

[0063] **참조예 3. 닷 블롯(Dot blot)**

[0064] 96 well plate에 1×10^4 cell/well으로 plating된 ARPE19 세포에 이틀째 되는 날, 홍삼 사포닌 추출물(이하 홍삼 사포닌) 100 μ g/ml를 세포에 처리하여 획득한 상층액을 2 μ l씩 inactivated PVDF membrane에 분주하고, UV에서 1시간동안 건조하였다. 그 후, 5% BSA로 1시간 blocking을 하고, 1차 항체인 anti-VEGF, anti-Cryab를 1:1000으로 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날 TBS로 5분씩 3번 세척한 후, 2차 항체를 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 이를 다시 TBS로 5분씩 3번 세척해 준 후, ECL solution으로 1분 반응시키고, 밴드(band)를 감지(detection)하였다.

[0066] **참조예 4. 웨스턴 블롯(Western blot)**

[0067] **참조예 4-1. In vitro**

[0068] 상기 참조예1에서 배양된 ARPE19 세포를 96 well plate에 각각 1×10^4 cell/well으로 plating해주고, 이틀째 되는 날, 홍삼 사포닌을 세포에 24시간동안 처리한 후, 차가운 PBS로 3번 세척하였다. 5 x sample buffer를 30 μ l씩 각 well에 넣어서 cell pellet을 획득하고, 100℃의 heat block에서 10분동안 반응시켰다. 그 후 얼음에서 식혀준 후, 20 μ l씩 12% SDS-PAGE에 loading 하여 80volt에서 40분, 120volt에서 1시간 정도를 전기영동을 진행하였다. MeOH로 activation시킨 PVDF membrane을 이용하여 100volt에서 2시간 transfer를 수행하였다. 그 후, 5% skim milk로 상온에서 1시간 blocking을 진행하고, 1차 항체인 Alpha-SMA(1:1000)을 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, TBST로 10분씩 3번 wash한 후, 2차 항체를 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 이를 TBST로 10분씩 3번 wash한 후, ECL solution을 반응시킨 후, chemidak을 이용하여 밴드를 감지하였다.

[0069] **참조예 4-2. In vivo**

[0070] 상기 참조예2를 통해 CNV가 유도된 마우스들의 안구를 -70℃에 보관한 뒤, EP tube에 옮겨 lysis buffer 300 μ l를 넣고, 초음파분산(sonication)을 수행하였다. 13000rpm, 4℃에서 25분 원심분리를 진행 후 상층액을 획득한 후, 단백질 정량법(protein assay)를 통해 단백질을 정량하였다. Protein 20 μ g을 10~12% SDS-PAGE에 loading 하여 80volt에서 40분, 120volt에서 1시간 정도 전기영동을 진행하였다. MeOH로 activation시킨 PVDF membrane을 이용하여 100volt에서 2시간 transfer를 수행하였다. 그 후, 5% skim milk로 상온에서 1시간 blocking을 진행하고, 1차 항체인 VEGF(1:1000), Alpha-SMA(1:1000)을 각각 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, TBST로 10분씩 3번 세척한 후, 2차 항체를 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 이를 TBST로 10분씩 3번 세척한 후, ECL solution을 반응시킨 후, chemidak을 이용하여 밴드를 감지하였다.

[0072] **실험예 1. ARPE 세포에서 홍삼 물 추출물의 VEGF 및 fibrosis marker 발현 억제 효과 평가**

[0073] VEGF 및 fibrosis marker(α -SMA)는 황반변성 및 망막하섬유증에 관련된 인자이다. 홍삼 물 추출물의 상기 적응 증에 대한 예방 및 치료효과를 확인하기 위해, 홍삼 물 추출물의 투여가 상기 인자들의 억제에 대한 효과를 나타내는지 시험하였다.

[0074] 참조예 1에서 배양한 ARPE19세포를 이틀째 되는 날, 홍삼 사포닌 100 μ g/ml를 처리하고 24시간동안 인큐베이션한 뒤, 닷블롯(참조예 3)을 실시하였다. 한편, ARPE19세포에 홍삼 물 추출물 10 μ g/ml를 처리하고 24시간동안 인큐베이션한 뒤, 웨스턴 블롯(참조예 4-1)을 수행하였다.

[0075] 상기 실험에 대한 결과는 도 1 및 도 2에 나타내었다. 닷블롯 결과에 ARPE 19 cell에 홍삼 사포닌(GTS) 주입시, VEGF 발현량은 대조군과 비교하여 약 50% 수준으로 나타났다(도 1). 또한 웨스턴 블롯 결과에 따르면 홍삼 물 추출물 10 μ g/ml를 처리한 군에서는 α -SMA의 발현량이 대조군(무처리군)과 비교하여 60% 수준으로 나타났다(도 2).

[0076] 이를 통해, 홍삼 사포닌은 *In vitro* 실험에서 VEGF 및 α -SMA의 발현량을 현저히 억제하여, 황반변성 및 망막하섬유증을 예방 또는 치료에 효과를 보일 수 있음을 확인하였다.

[0079] **실험예 2. 동물모델에서 홍삼 사포닌 추출물의 VEGF 및 fibrosis marker(α -SMA) 발현 억제 효과 평가**

[0080] 상기 실험예 1에서는 홍삼 사포닌의 VEGF 및 α -SMA 발현을 억제하는 효과를 *in vitro* 실험에서 확인하였다. 이에 확장하여 *In vivo*에서의 효과를 확인하고자 하였다.

[0081] 참조예 2를 통해 CNV를 유도한 마우스에게 홍삼 사포닌을 25 μ g/ μ l씩 안구 내에 주입하였다. 주입 후 1주 뒤, 안구를 적출하여 웨스턴 블롯(참조예 4-2)을 수행하였다.

[0082] 상기 실험에 대한 결과는 도 3에 나타내었다. 홍삼 사포닌 투여군에서, VEGF는 대조군과 비교하여 40% 수준으로 발현되었고, α -SMA는 대조군과 비교하여 50% 수준으로 발현되었다.

[0083] 이를 통해, *In vivo*에서도 홍삼 사포닌은 VEGF 및 α -SMA의 발현 억제에 현저한 효과를 보임을 확인하였다.

[0085] **실험예 3. 홍삼 사포닌 추출물의 CNV 억제 효과**

[0086] 맥락막에서의 비정상적으로 과다한 새로운 혈관생성(CNV)은, 출혈, 부종, 병변 및 섬유화를 초래할 수 있다. 신생혈관성 연관관련 황반변성의 주요원인인 CNV형성을 억제하는 효과를 비교하기 위해, 홍삼 사포닌 추출물과 VEGF중화항체인 Avastin(bevacizumab)을 투여 후, CNV 면적 변화를 측정하였다.

[0087] 레이저를 이용하여 마우스의 안구에 CNV를 유도한 뒤(참조예 2) 약물(무처리, Avastin 25 μ g, 홍삼 사포닌 25 μ g)를 바로 투여 하였다. 약물 투여 일주일 후 안구를 적출하였다. 적출한 안구는 PBS에 넣어 세척한 후, PBS가 담긴 petri dish에서 각막(cornea), 홍채(iris), 수정체(lens), 유리체(vitreous)를 각각 제거하고, 시신경 유두(OH; Optic nerve head) 방향으로 4부위로 절개(dissection)하였다. 감각신경망막층(Neurosensory retina)을 각각 제거하여, 깨끗하게 분리된 RPE-choroid-sclera만 200 μ l 5% goat-serum이 담긴 96 well에 넣어서 상온에서 1시간 blocking을 진행하였다. 그 후, Alexa Fluor 594-conjugated Griffonia simplicifolia isolectin B4 (1:100), fluorescein(1:100) 항체를 4 $^{\circ}$ C에서 overnight incubation을 수행하였다. 다음날, PBS로 10분씩 3번 wash한 후, 슬라이드 글라스(slide glass)에 조직을 올리고, DPX mountant를 이용하여 조직을 마운팅(mounting)하여 cover slide로 덮어준 후, 10 X 배율에서 형광현미경을 통해 각각 사진을 찍었다.

[0088] Fluorescein를 이용한 CNV area 염색에서 Avastin 투여군의 CNV area는 무처리 대조군과 비교하여 40% 감소되었고, 홍삼 사포닌 투여군의 CNV area는 무처리 대조군과 비교하여 45% 감소되었다. Isolectin B4를 이용한 CNV area 염색에서 Avastin군의 CNV area는 무처리 대조군과 비교하여 50% 감소되었고, 홍삼 사포닌 투여군의 CNV area는 무처리 대조군과 비교하여 50% 감소되었다. (도 4).

[0089] 이를 통해 홍삼 사포닌은 VEGF중화항체인 Avastin와 유사한 정도의 CNV 억제 효과를 보임을 확인하였다.

[0091] **실험예 4. 홍삼 물 추출물(RGWE)의 망막하 섬유증(fibrosis) 억제 효과**

[0092] 홍삼 물 추출물의 섬유증 억제 효과를 확인하기 위해 CNS유도 안구에 홍삼 물 추출물을 주입한 뒤 면역화학염색법(Immunohistochemistry)을 통해 α -SMA 발현을 시각화 하였다.

[0093] 상기 참조예2의 CNV유도 마우스에 홍삼 물 추출물을 25 μ g을 안구에 주입하였다. 일주일 후, 안구를 적출한 뒤, 4% paraformaldehyde로 4℃에서 밤새 인큐베이션하여 고정하였다. 안구를 10%, 20% sucrose에 차례로 담가 가라앉을 때까지 4℃에서 인큐베이션하였다. 가라앉은 안구는 30% sucrose에 담가 가라앉을 때까지 4℃에서 인큐베이션하여 조직에 있는 수분을 제거하였다. 그 후 OCT compound를 이용해 블록(block)을 만들어 -70℃에 보관하였다. 그 후 Microtome을 이용해 조직 section 후 상온에서 밤새 완전히 말렸다. 그 후, 0.3% Triton X-100 and 0.3% hydrogen peroxide을 상온에서 1시간 처리하였다. 그 후, 5% BSA로 상온에서 1시간 blocking을 진행하고, 1차 항체인 Alpha-SMA(1:1000)를 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, PBS로 10분씩 3번 세척한 후, 2차 항체를 상온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 DAPI로 20분간 염색을 진행하였다. 조직을 F/R mounting medium로 마운팅(mounting)하여 커버 글라스(cover slide)로 덮어준 후, 차광하여 상온에서 overnight 시켜 말렸다. 5 X 및 10 X 배율에서 형광현미경을 통해 각각 사진을 찍었다.

[0094] 상기 실험에 대한 결과는 도 5에 나타내었다.

[0095] 도 5에 나타난 바와 같이, 홍삼 물 추출물을 투여한 군은 병변부위의 α -SMA 발현이 억제되어 섬유증억제에 현저한 효과를 보임을 확인하였다. (* 표시부위 : α -SMA 발현부위임).

[0097] **실험예 5. 홍삼 물 추출물(RGWE)의 안구내 투입 및 경구투여 효능비교**

[0098] 기존의 알려진 연령관련 황반변성의 치료는 안구에 직접 주사로 약물을 투입하여 환자들이 치료에 대한 부담감을 가져왔다. 눈 속 주사를 대체할 수 있는 점안제 및 경구용 약물에 대한 효과를 확인하기 위해, 홍삼 물 추출물을 결막하 주사 및 경구투여하여 투여방법에 따른 α -SMA 억제 효과를 확인해 보았다.

[0099] **실험예5-1. 웨스턴 블롯**

[0100] 정상(Naive) 마우스군, CNV유도 마우스(참조예 2) 무처리군, CNV유도 마우스 홍삼 물 추출물 투여군을 대상으로 웨스턴 블롯(참조예 4-2)을 실시하였다. 또한, 상기 홍삼 물 추출물 투여군은 결막하 주사군 및 경구투여군으로 나누어 실험을 실시하였다. 결막하 주사 투여군은 홍삼물추출물을 125 μ g(4 μ l) 결막 하에 주입한 뒤 1주일 뒤 웨스턴 블롯을 수행하였다. 경구투여군은 홍삼 물 추출물 300mg/kg를 1주일 간 경구 투여한 뒤, 마지막 홍삼 물 추출물 투여 24시간 후, 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0101] 상기 실험에 대한 결과는 도 6에 나타내었다.

[0102] 도 6에 나타난 바와 같이, CNV 유도 마우스 무처리군은 정상 마우스군과 비교하여 5배 높은 α -SMA 발현량을 보였다. 반면에 홍삼 물 추출물 투여군은 결막하 주사군 및 경구투여군 모두 α -SMA 발현량이 현저히 감소하였음을 확인하였다.

[0104] **실험예5-2. 빛 간섭 단층 촬영(OCT, Optical coherence tomography)**

[0105] 상기 실험예 4-1에서 실험과정과 동일한 과정을 수행하였다. 다만, 웨스터 블롯 대신 광 간섭 단층 촬영을 수행하였다.

[0106] 상기 참조예2의 CNV유도 마우스에 홍삼 물 추출물을 25 μ g을 안구 내에 주입하였다. 일주일 후, OCT(Eyemera OCT, IISCIENCE, San Jose, CA, USA) 장비를 사용하여 망막과 맥락막의 변화를 마우스가 살아있는 상태에서 검사를 시행하였다.

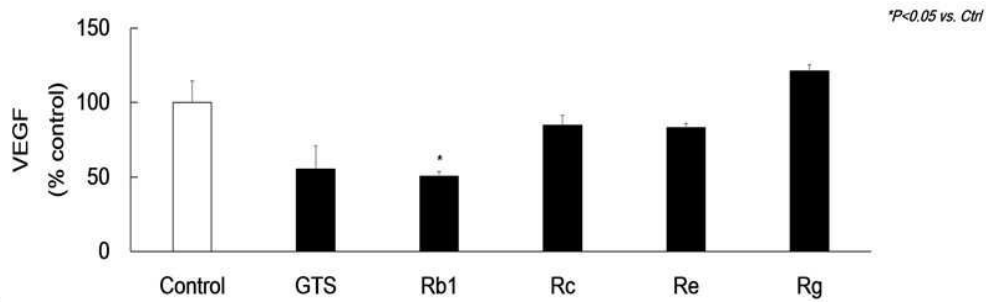
[0107] 상기 실험에 대한 결과는 도 7에 나타내었다.

[0108] 도 7의 OCT사진을 보면 레이저유발 CNV마우스에서는 연령관련 황반변성환자에서 보이는 망막내 고반사 침착물의 증가, 망막하 침착 및 섬유화의 증가, 망막내 미세부종등의 전형적인 모습을 확인할 수 있었다. 하지만 홍삼추출물을 다양한 경로에서 투여한 군에서는 위의 소견과 다르게 뚜렷한 감소를 보여주고 있다.

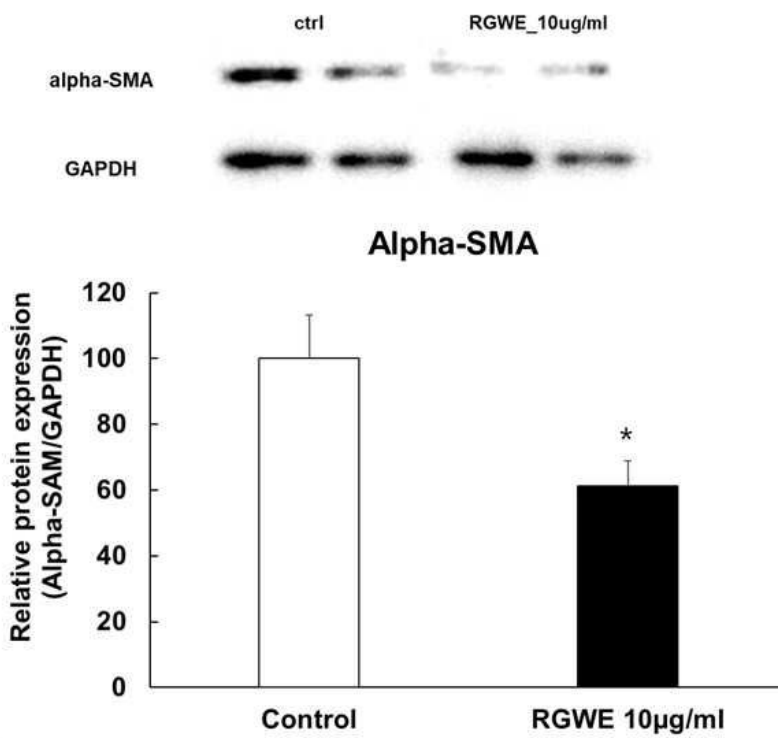
[0110] 상기 실험에 5-1 및 실험에 5-2를 통해, 홍삼 물 추출물의 뛰어난 α -SMA 억제 효과 및 망막보호작용을 보였다. 무엇보다도 경구투여 및 결막하 투여의 효과가 안구 내 직접주사의 효과와 비슷한 억제효과를 보여, 안구내 주사를 대체할 수 있는 점안제 및 경구용 약물에 대한 효과를 확인하였다.

도면

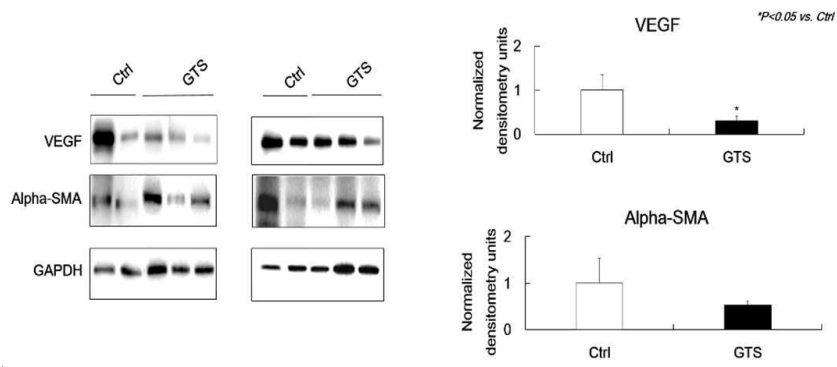
도면1



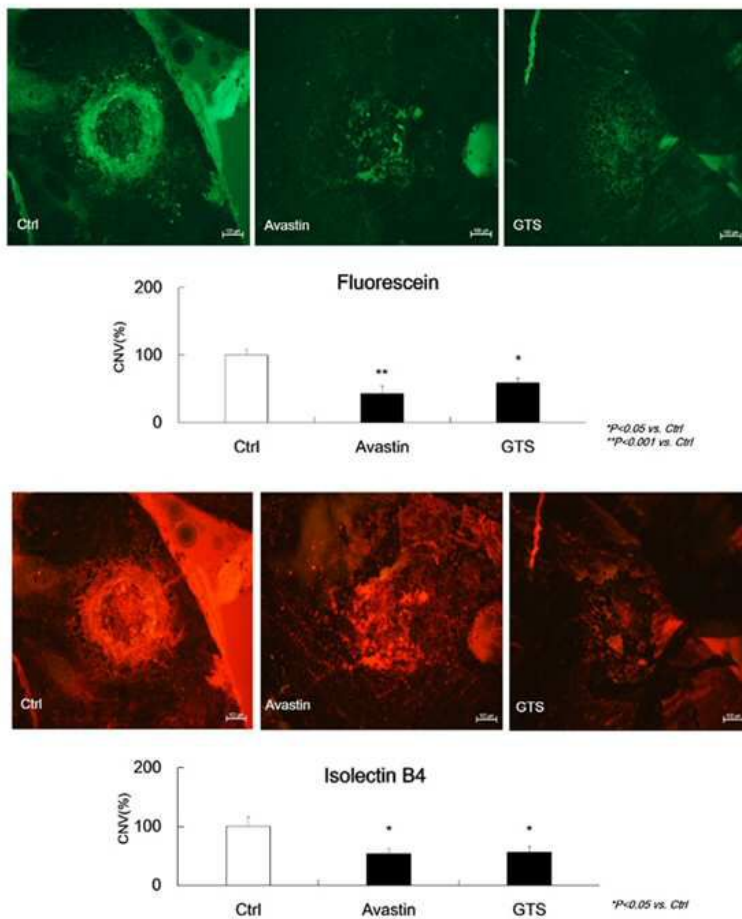
도면2



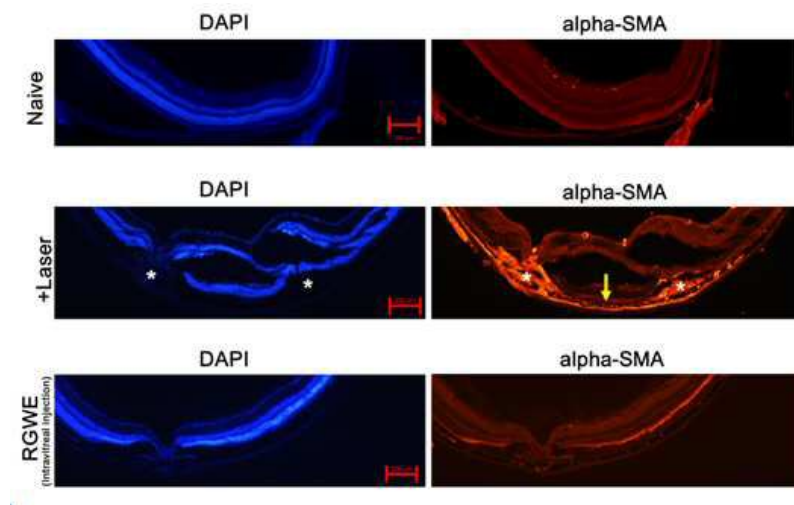
도면3



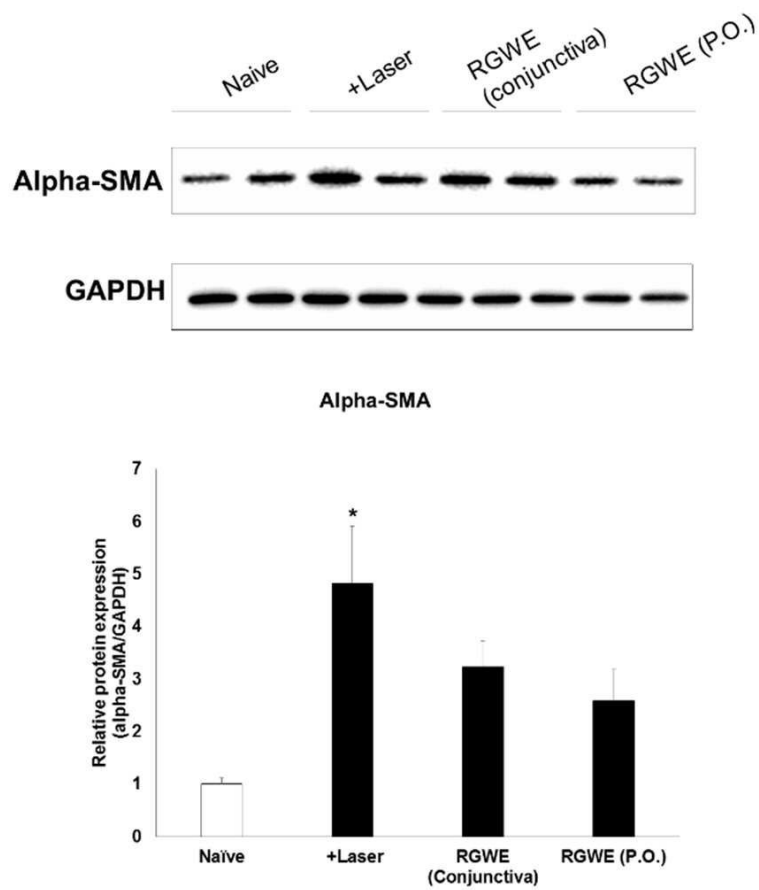
도면4



도면5



도면6



도면7

