

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025년 1월 2일 (02.01.2025)



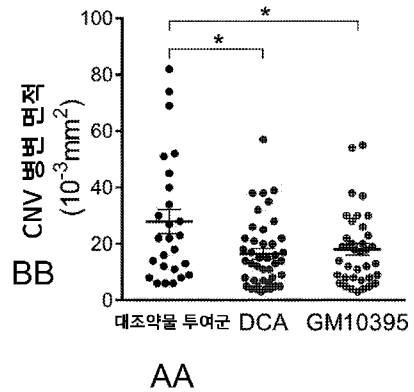
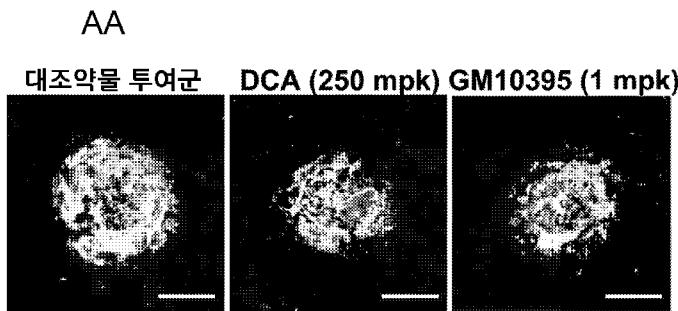
(10) 국제공개번호
WO 2025/005691 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/401 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 27/02 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/009001
- (22) 국제출원일: 2024년 6월 27일 (27.06.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2023-0085045 2023년 6월 30일 (30.06.2023) KR
- (71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 14566 대구광역시 북구 대학로 80, Daegu (KR). 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 박동호 (PARK, Dong Ho); 41944 대구광역시 중구 동덕로 130번지, 1동 2층, Daegu (KR). 이인규 (LEE, In-Kyu); 42107 대구광역시 수성구 청호로

- 365, 305동 301호, Daegu (KR). 안진희 (AHN, Jin Hee); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, 광주과학기술원 화학과 515호, Gwangju (KR). 파기레하우스하바우 시바지 (PAGIRE, Haushabhau Shivaji); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, 광주과학기술원 화학과 508호, Gwangju (KR). 파기레수바나 하우스하바우 (PAGIRE, Suvarna Haushabhau); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, 광주과학기술원 화학과 508호, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 에스알비 (SRB IP & LAW FIRM); 06130 서울특별시 강남구 강남대로94길 53, 4층, Seoul (KR).
- (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING MACULAR DEGENERATION COMPRISING PYRUVATE DEHYDROGENASE KINASE INHIBITOR

(54) 발명의 명칭: 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제를 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 조성물



AA ... Control drug administration group
BB ... CNV lesion area

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for alleviating, inhibiting, treating or preventing macular degeneration. The composition according to the present invention has excellent effects of reducing angiogenesis due to macular degeneration and inhibiting vascular leakage, and thus can be used as a therapeutic agent for alleviating or treating macular degeneration, particularly age-related macular degeneration (AMD).

(57) 요약서: 본 발명은 황반변성의 완화, 억제, 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 황반변성으로 인한 신생혈관을 감소시키고, 혈관 누출을 억제하는 효과가 우수한 바, 황반변성, 특히, 나이관련 황반변성 (age-related macular degeneration, AMD)을 완화 또는 치료하는 치료제로 활용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2025/005691 A1

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.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, 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,
ME, 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))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제를 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 과학기술정보통신부의 지원 하에서 과제번호 RS-2024-00334982에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 "개인기초연구", 연구과제명은 "망막상피세포와 시세포간의 메타볼릭 디커플링 제어를 통한 망막변성의 신규 치료기전 연구", 주관기관은 경북대학교 산학협력단, 연구기간은 2024.05.01 ~ 2029.04.30 이다.
- [2] 또한 본 발명은 과학기술정보통신부의 지원 하에서 과제번호 2019R1A2C1084371에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 "개인기초연구", 연구과제명은 "면역세포의 미토콘드리아 에너지 대사 리프로그래밍 및 염증 활성화 제어를 통한 신생혈관성 연령관련 황반변성 신규 치료기전 연구", 주관기관은 경북대학, 연구기간은 2019.09.01 ~ 2024.02.29 이다.
- [3] 또한 본 발명은 과학기술정보통신부의 지원 하에서 과제번호 2020-0-01808-002에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 정보통신기획평가원, 연구사업명은 "정보통신방송혁신인재양성", 연구과제명은 "복합정보 기반 예측지능 혁신 기술 연구", 주관기관은 경북대학교 산학협력단, 연구기간은 2024.01.01 ~ 2024.12.31 이다.
- [4] 또한 본 발명은 과학기술정보통신부, 보건복지부, 산업통상자원부의 지원 하에서 과제번호 HN21C0923000021에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 국가신약개발재단, 연구사업명은 "신약기반 확충연구", 연구과제명은 "연령관련 황반변성 경구용 치료제 유효/선도물질 발굴", 주관기관은 경북대학, 연구기간은 2021.11.01 ~ 2024.10.31 이다.
- [5] 또한 본 발명은 보건복지부의 지원 하에서 과제번호 HR22C1832010023에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국보건산업진흥원, 연구사업명은 "연구중심병원 육성 R&D", 연구과제명은 "글로벌 경쟁력 확보를 위한 K-Leading Tech 기반 세계 최초 의료기술 사업화 플랫폼 구축", 주관기관은 경북대학교병원, 연구기간은 2024.01.01 ~ 2024.12.31 이다.
- [6] 본 특허출원은 2023년 06월 30일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2023-0085045호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [7] 본 발명은 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제를 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명은 피루브산 탈수소효

소 키나아제 (pyruvate dehydrogenase kinase; PDK) 저해제를 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [8] 황반변성 (macular degeneration)은 황반 부분에 변성이 일어나 시력장애를 일으키는 안구 질환으로, 발병원인은 연령증가, 가족력, 인종, 흡연과 관련이 있다고 알려져 있다. 발병 초기에는 시야가 흐려지고 가까운 곳의 시력이 뒤틀려서 보이다가 나중에는 실명에 이르게 된다.
- [9] 나이관련 황반변성 (age-related macular degeneration, AMD)은 중증의 비가역적인 시력상실을 야기하며 50세 이상 인구에서 실명의 주요 원인으로 알려져 있다. 역학 연구에서 유병률은 미국 내 52~64세 인구의 1.2%인 것으로 보고되었으며, 75세 이상에서는 그 비율이 20-37%로서 더욱 높은 것으로 보고되어, 평균연령이 증가될수록 유병률은 점차 증가될 것으로 생각된다.
- [10] 나이관련 황반변성에는 두 가지 유형이 있다. 첫 번째는 비-신생혈관성 나이관련 황반변성으로, 가장 흔하며 전체 나이관련 황반변성 사례의 85%를 차지한다. 이러한 건성 유형은 망막 색소 상피의 기름찌꺼기와 위축성 변화를 특징으로 한다. 두 번째는 신생혈관성 나이관련 황반변성으로, 맥락막 신생혈관을 특징으로 한다. 맥락막 신생혈관은 새롭게 형성된 혈관으로 혈액과 체액을 유출시키는 경향이 있다. 이는, 망막조직에 섬유조직이 증식하고 광수용체가 소실된 병변의 형성을 유도하며, 지속적으로 진행하여 중증이며 비가역적인 시력상실을 야기한다.
- [11] 특히, 2010년 발표된 국내 나이관련 황반변성에 대한 기초역학조사에 따르면, 나이관련 황반변성의 유병률은 초기변성이 2.92%, 후기변성이 0.19%이지만, 후기 황반변성 중 비-신생혈관성 황반변성은 3.9%이며, 나머지는 모두 신생혈관성으로 관찰되어, 신생혈관성 황반변성의 빈도가 외국의 경우에 비해 매우 높음을 알 수 있다.
- [12] 신생혈관성 나이관련 황반변성 치료법에는 광역학요법과 혈관내피성장인자를 차단하기 위한 약물을 안구 안으로 주사하는 방법이 있다. 그러나, 여러 대규모 다기관 임상연구들을 통해 광역학요법보다 유리체강내 항혈관내피성장인자 (anti-vascular endothelial growth factor, anti-VEGF) 주사술을 시행하는 것이 더 나은 결과를 보여주었다.
- [13] 이에 따라 신생혈관성 나이관련 황반변성의 치료로 다양한 항혈관내피성장인자 약물들이 개발되었는데, 그 중 대표적인 약제가 라니비주맙 (Ranibizumab, Lucentis®)으로, 세포 밖의 혈관내피성장인자와 결합하여 활성을 억제시킨다. 라니비주맙은 다양한 임상연구를 통해 신생혈관성 나이관련 황반변성 환자에서 효과적이고 안전한 치료임이 보고되어 전세계적으로 널리 사용되고 있으나, 병변이 자주 재발함에 따라 주사횟수가 많아져 환자에게 상당한 부담을 준다. 일부 환자에서 주사술에도 불구하고 병변이 호전되지 않는 경우도 있다.

- [14] 한편, 혈관내피성장인자 (VEGF)는 강력한 혈관확장제 역할을 하기 때문에 심장의 관상동맥의 이완과 혈액 순환을 유지시키는 역할을 한다. 나이관련 황반변성 환자들이 고령이고 심혈관 질환의 위험이 높은 군들이므로, 항혈관내피성장인자 주사술은 심각한 부작용의 위험성도 있다.
- [15] 이에 본 발명에서는 부작용의 위험성을 줄이고 황반변성에 대해 효율적 치료효과를 가져오는 새로운 치료조성물을 제안하고자 한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [16] 본 발명자들은 부작용의 위험성이 감소된 황반변성 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 피루브산 탈수소효소 키나아제 (pyruvate dehydrogenase kinase; PDK) 저해제가 황반변성으로 인한 신생혈관을 감소시키고, 혈관 누출을 억제함을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [17] 이에, 본 발명의 목적은 황반변성 (macular degeneration)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 다른 목적은 황반변성의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 신생혈관성 안질환 (neovascular ocular disease)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 또 다른 목적은 신생혈관성 안질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 또 다른 목적은 황반변성 치료방법을 제공하는 것이다.
- [22] 본 발명의 또 다른 목적은 신생혈관성 안질환 치료방법을 제공하는 것이다.
- [23] 본 발명의 또 다른 목적은 PDK 저해제의 신규한 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [24] 본 발명은 피루브산 탈수소효소 키나아제 (pyruvate dehydrogenase kinase; PDK) 저해제를 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 황반변성으로 인한 신생혈관을 감소시키고, 혈관 누출을 억제함으로써, 황반변성 및 신생혈관성 안질환을 부작용의 위험성을 최소화하면서 효율적으로 치료 및 예방할 수 있다.
- [25] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [26]
- [27] 본 발명의 일 양태는, 피루브산 탈수소효소 키나아제 (pyruvate dehydrogenase kinase; PDK) 저해제를 포함하는, 황반변성 (macular degeneration)의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이다.
- [28] 본 명세서 상의 용어 "피루브산 탈수소효소 키나아제"는 PDK로도 명명되며, 피루브산 탈수소효소를 인산화함으로써 피루브산 탈수소효소의 활성을 억제하는 단백질을 의미한다.

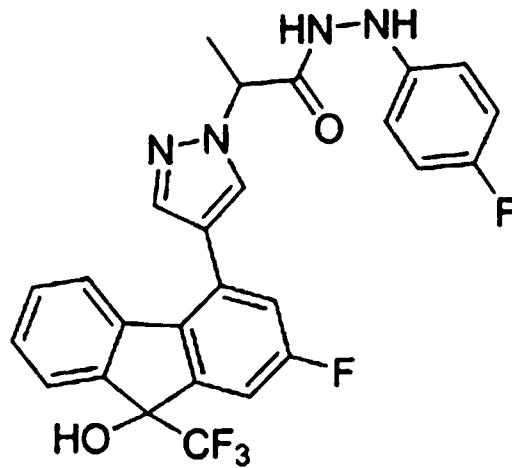
- [29] 본 명세서 상의 용어 "피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제"는 PDK의 발현 또는 활성을 저해하는 물질로, PDK 유전자 또는 단백질에 직접적으로 작용하거나 그의 리간드에 간접적으로 작용하는 등의 방식을 통해 PDK의 발현을 전사 수준에서 감소시키거나 단백질로 번역 후 분해를 촉진시키는 방식으로 발현을 저해하는 물질, 또는 그 활성을 방해함으로써 PDK의 활성을 감소시키는 모든 물질을 포함할 수 있다.
- [30] 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제는 PDK를 표적으로 하여 PDK의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 화합물, 핵산, 펩타이드, 바이러스 또는 핵산을 포함하는 벡터일 수 있다. 예를 들어, 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제는 PDK의 mRNA의 발현을 저해하는 올리고 뉴클레오티드, PDK 단백질의 활성을 억제하는 항체, 앵타머 또는 화합물 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [31] 본 명세서 상의 용어 "올리고 뉴클레오티드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA, 또는 이들의 유도체를 의미하는 것으로서 mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다.
- [32] 본 발명에 따른 PDK 저해제는 올리고 뉴클레오티드일 수 있고, PDK 저해제는 PDK mRNA에 상보적인 서열을 갖는 DNA 또는 RNA, 또는 이들의 유도체로서, mRNA에 결합하여 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위 (translocation), 성숙 (maturation) 등을 방해하거나 또는 mRNA의 그 밖의 다른 모든 생물학적 기능 또는 활성을 저해할 수 있다.
- [33] 본 명세서 상의 용어 "앵타머"란, 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 앵타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 본 발명에 따른 앵타머는 PDK의 mRNA를 표적으로 하여 상기 mRNA에 결합함으로써 해당 mRNA의 생물학적 기능 또는 활성을 저해하여 PDK의 발현 또는 활성을 억제할 수 있다.
- [34] 본 명세서 상의 용어 "siRNA"는 RNA 간섭 (interference) 또는 유전자 사일런싱 (silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각을 의미한다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 저해할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 (knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용될 수 있다. 이중 가닥의 RNA가 다이서 (dicer)에 의해 절단되어 생성될 수 있는 상기 siRNA는 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 해당 mRNA의 발현을 억제할 수 있다.
- [35] 본 발명에 따른 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제는 siRNA일 수 있고, 상기 siRNA는 PDK의 mRNA에 특이적으로 결합하여 해당 mRNA의 발현을 억제함으로써, PDK의 발현 또는 활성을 억제할 수 있다.
- [36] 본 명세서 상의 용어 "항체"는, 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미한다. 항체는 각 유전자를 통상적인

방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 항체의 단편 또는 재조합 항체 등 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함된다. 본 발명에 있어서 항체에는 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있을 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함될 수 있다. 아울러, 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 될 수 있다.

[37] 본 발명에 따른 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제는 화합물일 수 있다. 예를 들어, 화합물은 디클로로아세테이트 (Dichloroacetate; DCA), 또는 하기 화학식 1로 표현되는 GM10395 또는 이의 염 (salts)일 수 있다.

[38] [화학식 1]

[39]



[40] 염은 유리산 (free acid)에 의하여 형성된 산 부가염일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[41] 유리산은 유기산 및/또는 무기산인 것일 수 있다.

[42] 유기산은 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탄산 및 아스파르트산 등인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[43] 무기산은 염산, 브롬산, 황산 및 인산 등인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[44] 본 발명의 일 구현예에서 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제는 피루브산 탈수소효소 키나아제 4 저해제인 것일 수 있다.

- [45] 본 명세서 상의 용어 "피루브산 탈수소효소 키나아제 4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4; PDK4)"는 PDK4로도 명명되며, PDK/BCKDK 단백질 키나아제 패밀리의 하나로, 히스티딘 키나아제 도메인을 가진 미토콘드리아 단백질을 코딩하는 단백질이다. PDK4는 미토콘드리아의 기질에 위치하고 피루브산 탈수소효소의 서브유닛 (subunit) 중 하나를 인산화하여 피루브산 탈수소효소 복합체를 억제하고, 포도당과 아미노산의 산화에서 생성되는 피루브산의 아세틸-CoA의 전환을 감소시켜 포도당 대사의 조절에 기여하는 것으로 알려져 있다.
- [46] 본 명세서 상의 용어 "황반변성"은 연령증가, 가족력, 인종, 흡연 등의 발병원인으로 황반부에 변성이 발생하는 질환으로, 주로 연령증가에 의해 발생한다. 황반변성은 발생 시, 망막 색소 상피와 맥락막 사이의 황반 (망막의 일부)에 드루젠 (drusen, 세포 외 단백질과 지질의 축적)이라는 황색 침전물이 점진적으로 축적되는 안구 질환을 의미한다.
- [47] 본 발명의 일 구현예에서, 황반 변성은 나이관련 황반변성 (age-related macular degeneration; AMD)일 수 있다.
- [48] 본 명세서 상의 용어 "나이관련 황반변성"은 연령증가를 원인으로 발생하는 황반변성 질환으로, 드루젠의 정도 (크기 및 수)에 부분적으로 기초하여 초기 (early), 중기 (intermediate), 및 후기 (late)의 3 단계로 진행되며, 시력 상실의 원인이 될 수 있는 질환을 의미한다.
- [49] 본 발명의 일 구현예에서, 나이관련 황반변성은 초기 나이관련 황반변성 (early age-related macular degeneration; early AMD), 중기 나이관련 황반변성 (intermediate age-related macular degeneration; Intermediate AMD) 또는 후기 나이관련 황반변성 (late age-related macular degeneration; late AMD)일 수 있다.
- [50] 본 발명의 일 구현예에서, 나이관련 황반변성은 후기 나이관련 황반변성일 수 있다.
- [51] 본 명세서 상의 용어 "후기 나이관련 황반변성"은 황반 손상으로 인한 시력 손실을 특징으로 하는 황반변성 질환을 의미한다. 후기 나이관련 황반변성은 손상 유형에 따라 건식 AMD와 습식 AMD로 구분된다. 건식 AMD는 지도상 위축증 (Geographic atrophy)을 특징으로 하는 비-신생혈관성 나이관련 황반변성이며, 습식 나이관련 황반변성은 맥락막 신생혈관이 나타나는 신생혈관성 나이관련 황반변성이다.
- [52] 본 발명의 일 구현예에서, 나이관련 황반변성은 신생혈관성 나이관련 황반변성 (Neovascular age-related macular degeneration; Neovascular AMD) 또는 비-신생혈관성 나이관련 황반변성 (Non-neovascular age-related macular degeneration; Non-neovascular AMD)일 수 있다.
- [53] 본 발명의 일 구현예에서, 나이관련 황반변성은 신생혈관성 나이관련 황반변성일 수 있다.
- [54] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 피루브산 탈수소효소 키나아제를 유효량으로 0.0001 내지 10,000 mg/kg, 0.001 내지 1,000 mg/kg, 0.05 내지 500 mg/kg, 0.01

내지 300 mg/kg, 0.05 내지 200 mg/kg, 0.1 내지 100 mg/kg, 1 내지 100 mg/kg을 포함할 수 있고, 예를 들어, 0.1 내지 100 mg/kg 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [55] 본 발명에 있어서 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연고제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 경피제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [56] 본 발명의 일 구현예에서, 조성물은 혼합 추출물 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제 등의 보조제를 추가로 함유하는 것일 수 있다.
- [57] 본 발명에 있어서 담체, 부형제 및 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [58] 제제화할 경우에는 당업계에서 일반적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [59] 경구를 위한 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 연고제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [60] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제, 경피제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [61] 좌제의 제제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로콜, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [62] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 안구 투여 또는 안구 국소 투여 등으로 투여될 수 있다.
- [63] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 국소 투여는 안구내, 안구주위, 안구뒤, 망막하 (subretinal), 망막중심 (central retinal), 중심와 (fovea) 외부, 결막하

(subconjunctival), 유리체내 (intravitreal), 전방내 (intracameral) 또는 맥락막위 (suprachoroidal)에 투여되는 것일 수 있다.

- [64] 본 발명의 다른 양태는, 피루브산 탈수소효소 키나아제 (pyruvate dehydrogenase kinase; PDK) 저해제를 포함하는, 황반변성 (macular degeneration) 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물이다.
- [65] 본 발명의 황반변성의 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물은 상술한 본 발명의 황반변성 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물과 동일하게 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제를 포함하므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [66] 본 발명에 따른 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [67] 본 발명에 따른 식품 조성물에 포함될 수 있는 탄수화물로는 포도당 과당 등의 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스, 올리고당 등의 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 폴리사카라이드 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [68] 본 발명에 따른 식품 조성물에 포함될 수 있는 향미제는 타우마틴, 스테비아 추출물 등의 천연 향미제 및 사카린, 아스파탐 등의 합성 향미제를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [69] 본 발명의 또 다른 양태는, 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제를 포함하는, 신생혈관성 안질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이다.
- [70] 본 발명의 또 다른 양태는, 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제를 포함하는, 신생혈관성 안질환의 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물이다.
- [71] 본 발명의 신생혈관성 안질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 신생혈관성 안질환의 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물은 상술한 본 발명의 황반변성 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물과 동일한 유효성분인 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제를 포함하므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [72] 본 명세서에서 용어 "신생혈관성 안질환"은 안구에서 발생하는 병리학적 혈관 신생관련 질환을 의미한다.
- [73] 본 발명의 일 구현예에서, 신생혈관성 안질환은 각막혈관신생 (corneal neovascularization), 망막 혈관신생 (retinal neovascularization), 맥락막 혈관신생 (choroidal neovascularization), 안구내 혈관신생 (intraocular neovascularization), 신생혈관성 녹내장 (neovascular glaucoma), 증식성 당뇨병성 망막증 (proliferative diabetic retinopathy), 신생혈관성 황반변성 (neovascular macular degeneration), 및 미숙아 망막병증 (retinopathy of prematurity)을 포함할 수 있다.

- [74] 본 발명의 또 다른 양태는, 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제를 포함하는 약제학적 조성물을, 대상 (subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 황반변성 치료 또는 완화방법에 관한 것이다.
- [75] 본 발명의 또 다른 양태는 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제를 포함하는 약제학적 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 신생혈관성 안질환 치료 또는 완화 방법에 관한 것이다.
- [76] 본 명세서에서 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.
- [77] 본 명세서에서 용어 "대상"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 예를 들어, 인간일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [78] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 단독으로 투여될 수 있으나, 일반적으로 투여방식과 표준 약제학적 관행 (standard pharmaceutical practice)을 고려하여 선택된 약제학적 담체와 혼합되어 투여될 수 있다.
- [79] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 용량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.
- [80] 예를 들어, 유효성분 함량을 기준으로 1일 투여량이 1 내지 1000 ug/mL 일 수 있으나, 이는 평균적인 경우를 예시한 것으로서 개인적인 차이에 따라 그 투여량이 높거나 낮을 수 있다.
- [81] 본 발명의 일 구현예에서, 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제는 피루브산 탈수소효소 키나아제 4 저해제인 것일 수 있다.
- [82] 본 발명의 일 구현예에서, 피루브산 탈수소효소 키나아제 4 저해제는 GM10395 또는 이의 염 (salts)을 포함하는 것일 수 있다.
- [83] 본 발명의 또 다른 양태는 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제의 황반변성의 완화, 억제, 치료 또는 예방을 위한 용도이다.
- [84] 본 발명의 또 다른 양태는 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제의 신생혈관성 안질환의 완화, 억제, 치료 또는 예방을 위한 용도이다.

발명의 효과

- [85] 본 발명은 황반변성의 완화, 억제, 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 황반변성으로 인한 신생혈관을 감소시키고, 혈관 누출을 억제하는 효과가 우수한 바, 황반변성, 특히, 나이관련 황반변성 (age-related macular degeneration, AMD)을 완화 또는 치료하는 치료제로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [86] 도 1은 맥락막 혈관신생 (CNV; choroidal neovascularization) 마우스와 대조군 마우스의 망막색소상피 (RPE; retinal pigment epithelium) 및 맥락막에서의 PDK 동형 단백질들 (PDK1 내지 PDK4)의 발현량을 비교한 그래프이다.
- [87] 도 2는 CNV 마우스와 대조군 마우스의 RPE 및 맥락막에서의 인산화된 PDHE1 α (p-PDHE1 α) 단백질의 발현량을 비교한 그래프이다.
- [88] 도 3은 CNV 마우스와 대조군 마우스의 안구 조직에서의 PDK4 단백질의 발현량을 비교한 사진이다. 도 3의 스케일 바의 크기는 100 μ m이다.
- [89] 도 4는 CNV 마우스와 대조군 마우스의 안구 조직에서의 p-PDHE1 α 단백질의 발현량을 비교한 사진이다. 도 4의 스케일 바의 크기는 100 μ m이다.
- [90] 도 5는 CNV 마우스와 대조군 마우스의 망막에서의 PDK 동형 단백질들 (PDK1 내지 PDK4)의 발현량을 비교한 그래프이다.
- [91] 도 6은 *Pdk4* 유전자가 야생형이거나 녹아웃된 CNV 마우스의 CNV 병변 등급 (0 내지 2B)을 평가한 결과를 나타낸 도면이다.
- [92] 도 7은 *Pdk4* 유전자가 야생형이거나 녹아웃된 CNV 마우스의 CNV 병변 면적을 비교한 결과를 나타낸 도면이다. 도 7의 스케일 바의 크기는 100 μ m이다.
- [93] 도 8은 염증성 사이토카인 혼합물 (ICM; inflammatory cytokine mixture)에 의해 산소소비량 (OCR; oxygen consumption rate)이 하향 조절된 1차 인간 RPE에 *Pdk* 동형 유전자들 (*Pdk1* 내지 *Pdk4*)에 대한 siRNA를 형질주입함으로써 각 유전자를 녹다운시킨 후, 각 그룹의 기초 OCR, 최대 OCR 및 예비 OCR을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [94] 도 9는 ICM이 처리된 1차 인간 RPE 세포에 *Pdk4*에 대한 siRNA를 형질주입 하였을 때의 1차 인간 RPE 세포 내 *Pdk4* mRNA 수준을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.
- [95] 도 10은 ICM이 처리된 1차 인간 RPE 세포에 *Pdk4*에 대한 siRNA를 형질주입 하여 *Pdk4*가 녹다운 된 1차 인간 RPE 세포 내 *Il-1 β* , *Il-6*, *Il-8* 및 *Mcp-1*의 mRNA 수준을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.
- [96] 도 11은 ICM이 처리된 1차 인간 RPE 세포에 DCA 또는 GM10395를 농도별로 처리하였을 때의 1차 인간 RPE 세포 내 *Il-1 β* 및 *Il-6*의 mRNA 수준을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [97] 도 12는 ICM이 처리된 1차 인간 RPE 세포에 DCA를 농도별로 처리하였을 때의 p-PDHE1 α 단백질 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [98] 도 13은 ICM이 처리된 1차 인간 RPE 세포에 GM10395를 농도별로 처리하였을 때의 p-PDHE1 α 단백질 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [99] 도 14는 ICM이 처리된 1차 인간 RPE 세포에 DCA 또는 GM10395를 농도별로 처리하였을 때의 1차 인간 RPE 세포의 OCR을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

- [100] 도 15는 ICM이 처리된 1차 인간 RPE 세포에 DCA (10 μ M) 또는 GM10395 (1 μ M)를 처리하였을 때의 1차 인간 RPE 세포 내 미토콘드리아 과산화물을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 15의 스케일 바의 크기는 50 μ m이다.
- [101] 도 16은 ICM이 처리된 1차 인간 RPE 세포에 DCA (10 μ M) 또는 GM10395 (1 μ M)를 처리하였을 때의 1차 인간 RPE 세포 내 미토콘드리아 면적을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 16의 스케일 바의 크기는 20 μ m이다.
- [102] 도 17은 ICM이 처리된 1차 인간 RPE 세포에 DCA 또는 GM10395를 농도별로 처리하였을 때의 1차 인간 RPE 세포 내 *Il-1 β* , *Il-6*, *Il-8* 및 *Mcp-1*의 mRNA 수준을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [103] 도 18은 ICM이 처리된 1차 인간 RPE 세포에 DCA 또는 GM10395를 농도별로 처리하였을 때 1차 인간 RPE 세포 내 전염증성 사이토카인 IL-6, IL-8 및 MCP-1의 발현량을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [104] 도 19는 DCA (250 mpk) 또는 GM10395 (1 mpk)가 경구투여된 CNV 마우스의 CNV 병변 등급 (0 내지 2B)을 평가한 결과를 나타낸 도면이다.
- [105] 도 20은 DCA (250 mpk) 또는 GM10395 (1 mpk)가 경구투여된 CNV 마우스의 CNV 병변 면적을 비교한 결과를 나타낸 도면이다. 도 20의 스케일 바의 크기는 100 μ m이다.
- [106] 도 21은 대조약물 (생리식염수)과 GM10395 (1 mpk)가 경구투여된 CNV 마우스로부터 수득된 RPE/맥락막 조직의 p-PDHE1 α 단백질 발현량을 비교한 결과를 나타낸 도면이다.
- [107] 도 22는 대조약물 (생리식염수)과 GM10395 (1 mpk)가 경구투여된 CNV 마우스로부터 수득된 RPE/맥락막 조직의 *Il-1 β* , *Il-6* 및 *Mcp-1*의 mRNA 수준을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [108] 피루브산 탈수소효소 키나아제 (pyruvate dehydrogenase kinase; PDK) 저해제를 포함하는, 황반변성 (macular degeneration)의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

발명의 실시를 위한 형태

- [109] 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.
- [110] 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.
- [111] 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 성분, 반응 조건, 성분의 함량을 표현하는 모든 숫자, 값 및/또는 표현은, 이러한 숫자들이 본질적으로 다른 것들

중에서 이러한 값을 얻는 데 발생하는 측정의 다양한 불확실성이 반영된 근사치들이므로, 모든 경우 "약"이라는 용어에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다.

[112] 또한, 본 명세서에서 수치범위가 개시되는 경우, 이러한 범위는 연속적이며, 달리 명시되지 않는 한 이러한 범위의 최소값으로부터 최대값이 포함된 최대값까지의 모든 값을 포함한다.

[113] 그리고, 본 명세서 상의 용어 "또는"은 배타적 "또는"이 아니라 내포적 "또는"을 의미하는 것으로 의도된다. 즉, 구성 간의 결합 또는 이용이 달리 특정되지 않거나 문맥상 명확하지 않은 경우, 즉, X가 A를 포함하거나; X가 B를 포함하거나; 또는 X가 A 및 B 모두를 포함하는 경우, "X는 A 또는 B를 포함한다"가 이들 경우들 어느 것으로도 적용될 수 있다.

[114]

[115] 실시예 1. 결과

[116] 레이저-유도 맥락막 혈관신생 (CNV) 모델에서 망막색소상피세포 (RPE) 내 PDK4가 과발현되었다

[117] 신생혈관성 AMD에서, 미토콘드리아 대사의 핵심 조절 효소인 PDK를 평가하기 위해, 레이저-유도 CNV 마우스에서의 PDK 및 p-PDHE1 α 발현량 변화를 평가하였다. CNV 유도로부터 1일 후, PDK4 및 p-PDHE1 α 의 발현량은 대조군에 비해 CNV 마우스에서 현저히 증가하였다 (도 1, 표 1 및 도 2, 표 2). 반면, PDK1, PDK2 및 PDK3는 RPE/맥락막에서 증가하지 않았다. 나아가, 면역형광 기법 평가에서, 특히 RPE에서, PDK4 및 p-PDHE1 α 는 대조군 마우스에 비해 CNV 마우스에서 과발현되었다 (도 3 및 도 4). 대조적으로, 망막 조직에서는 어떠한 PDK 동형 (PDK isoform)도 증가하지 않았다 (도 5 및 표 3). 도 1, 도 2 및 도 5의 그래프의 구체적인 수치를 표 1 내지 표 3에 각각 나타내었다.

[118] [표1]

상대적 단백질 발현량	대조군		CNV		P 값 (P value)
	평균	$\pm$ 평균표준오차	평균	$\pm$ 평균표준오차	
PDK1	1.000	0.03	0.959	0.022	0.3035
PDK2	1.000	0.079	0.747	0.053	0.0289
PDK3	1.000	0.031	0.815	0.043	0.0084
PDK4	1.000	0.057	9.727	0.703	< 0.0001

[119] [표2]

상대적 발현량	대조군		CNV		P 값 (P value)
	평균	$\pm$ 평균표준오차	평균	$\pm$ 평균표준오차	

pPDHE1 α (S293) / HSP90	1.000	0.127	2.510	0.265	0.0002
--------------------------------	-------	-------	-------	-------	--------

[120] [표3]

상대적 단백질 발현량	대조군		CNV		P 값 (P value)
	평균	±평균표준오차	평균	±평균표준오차	
PDK1	1.000	0.121	1.141	0.062	0.331
PDK2	1.000	0.058	1.002	0.055	0.983
PDK3	1.000	0.143	0.86	0.068	0.402
PDK4	1.000	0.017	1.1	0.079	0.253

[121] 이러한 데이터는 RPE의 미토콘드리아 대사가 CNV 유도에 대응하여 변화한다는 것을 나타낸다. 나아가, 동형들 중 PDK4만이 대사 전환에 관여하였다. 망막에서의 PDK4 단백질 수준이 변화하지 않았다는 점이 흥미로웠으며, 이는 신경망막의 에너지 대사가 원래 당분해 (glycolysis)에 의존한다는 종래 연구와 일치하였다.

[122]

[123] *Pdk4* 결핍은 CNV로부터 보호효과를 나타내었다.

[124] 신생혈관성 AMD에서 *Pdk4*의 역할을 평가하기 위해, 야생형 (*Pdk4*^{+/+}) 및 *Pdk4* 녹아웃 (*Pdk4*^{-/-}) 마우스의 신생혈관성 표현형을 비교하였다. CNV 유도로부터 7일 후, 임상적으로 심각한 혈관 누출을 보이는 것으로 정의되는 2B 등급 병변의 비율은 야생형 마우스에 비해 *Pdk4* 녹아웃 마우스에서 현저히 감소하였다 (도 6 및 표 4). 또한, 맥락막 플랫 마운트 기법 평가에서, 야생형에 비해 *Pdk4* 녹아웃 마우스에서 CNV 병변 크기가 감소하였다 (도 7 및 표 5). 도 6 및 도 7의 그래프의 구체적인 수치를 표 4 및 표 5에 각각 나타내었다.

[125] [표4]

병변 등급	0	1	2A	2B
대조군	0	24	30	46
PDK4 녹아웃 그룹	24	49	22	5

[126] [표5]

CNV 병변	야생형 마우스		<i>Pdk4</i> 녹아웃 마우스		P 값 (P value)
	평균	±평균표준오차	평균	±평균표준오차	
	21.88	3.338	11.32	1.221	0.0041

면 적				
--------	--	--	--	--

[127] 이러한 결과는 RPE 내 *Pdk4*의 유전적 결실이 CNV 마우스에서 신생혈관 작용을 완화하였음을 나타낸다.

[128]

[129] 동형들 중 *Pdk4*만이 ICM-유도 OCR 하향조절에 영향을 미쳤다

[130] 미토콘드리아 호흡에서의 PDK4의 역할을 뒷받침하기 위해, 일시적으로 48시간 동안 siRNA (*siPdk1*, *siPdk2*, *siPdk3* 및 *siPdk4*)로 형질주입되고 대조약물 (PBS) 또는 염증성 사이토카인 혼합물 (ICM)로 후속 처리된 1차 인간 RPE (primary hRPE)에서의 산소소비량 (OCR)을 비교하였다. 흥미롭게도, *Pdk* 동형들 중에서, *Pdk4* 녹다운 그룹만이 기초 (basal), 최대 (maximal) 및 예비 (spare) 산소소비량의 ICM-유도 하향조절에 의해 영향받지 않았다. 나아가, *Pdk4* 녹다운 그룹만이 다른 *Pdk* 동형과 비교하여 기초, 최대 및 예비 산소소비량의 현저한 상향조절을 보였다 (도 8 및 표 6). 도 8의 그래프의 구체적인 수치를 표 6에 나타내었다.

[131] [표6]

	기초 OCR		최대 OCR		예비 용량	
	평균	±평균표준오차	평균	±평균표준오차	평균	±평균표준오차
대조군	56.38	1.573	111.7	4.891	55.34	3.738
ICM	47.41	0.841	62.45	1.627	15.04	1.778
<i>siPDK1</i> + ICM	46.6	2.243	49.67	3.397	3.072	1.904
<i>siPDK2</i> + ICM	42.34	3.157	66.08	4.716	23.74	2.534
<i>siPDK3</i> + ICM	45.13	1.863	71.32	2.712	26.19	2.481
<i>siPDK4</i> + ICM	61.23	0.438	121.7	3.022	60.51	2.905

[132] 이러한 결과는 *Pdk* 동형들 중 *Pdk4*만이 세포호흡에 영향을 미치는 미토콘드리아 역학 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

[133] IL-1 β 및 MCP-1을 포함하는 염증성 사이토카인은 인간 CNV 조직 및 레이저-유도 CNV 마우스 모델에서 과발현된다. RPE는 풍부한 미토콘드리아에 의해 에너지를 공급받으며 높은 산소 소모가 요구되는, 대사적으로 요구량이 높은 조직이다. 손상된 에너지 대사 및 염증성 조건의 RPE 기능 장애는 AMD의 발달과 진행에 일조할 수 있다. 따라서, ICM-유도 1차 hRPE 세포에서 siRNA (*siPdk4*)를 이용

한 *Pdk4*의 일시적 녹다운 이후 *Pdk4*, *Il-1 β* , *Il-6*, *Il-8* 및 *Mcp-1*의 mRNA 수준을 측정하였다. *siPdk4*는 *siControl*에 비해 *Pdk4*, *Il-1 β* , *Il-6*, *Il-8* 및 *Mcp-1*의 ICM-유도 상향조절을 억제하였다 (도 9, 표 7 및 도 10, 표 8). 도 9 및 도 10의 그래프의 구체적인 수치를 각각 표 7 및 표 8에 나타내었다.

[134] [표7]

<i>Pdk4</i>	평균	$\pm$ 평균표준오차
<i>siControl</i>	1.000	0.111
<i>siControl</i> + ICM	0.574	0.062
<i>siPDK4</i>	12.682	0.794
<i>siPDK4</i> + ICM	3.570	0.324

[135] [표8]

		<i>siControl</i>	<i>siPDK4</i>	<i>siControl</i> +ICM	<i>siPDK4</i> +ICM
<i>Il-1β</i>	평균	1.00	1.17	256.5	133.5
	$\pm$ 평균표준오차	0.26	0.05	7.62	7.25
<i>Il-6</i>	평균	1.00	1.8	283.6	247.0
	$\pm$ 평균표준오차	0.04	0.12	12.56	3.5
<i>Il-8</i>	평균	1.00	1.02	2761	2162
	$\pm$ 평균표준오차	0.02	0.11	76.21	55.81
<i>Mcp-1</i>	평균	1.000	0.6013	9.723	7.658
	$\pm$ 평균표준오차	0.025	0.024	0.080	0.101

[136]

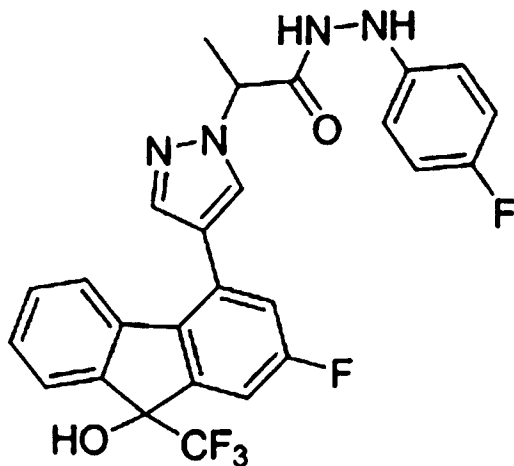
[137] *PDK4*를 타겟팅하는 소분자인 *GM10395*는 ICM-유도 1차 hRPE에서 OXPHOS를 향한 대사 전환을 역전시켰다

[138] 디클로로아세트레이트 (dichloroacetate, DCA)나 KPLH130과 같은, 범-PDK (pan-PDK) 타겟팅 ATP 결합 포켓의 약리학적 억제는 미토콘드리아 기능장애와 연관된 당뇨병 및 동맥경화증과 같은 다수의 대사 질환에서 조사되었다. 기술적 발달을 기반으로, 히트 안트라퀴논 (hit anthraquinone)의 구조적 변형은 리포아미드 결합 부위에 최적화된 새로운 일련의 알로스테릭 PDK4 억제제의 식별이 가능하도

록 하였다. 나아가, 본 발명에서는 잠재적 알로스테릭 PDK4 억제제로서 하기 화학식 1의 구조를 가지는 GM10395를 개발했다.

[139] [화학식 1]

[140]



[141] 대사 과정에서 DCA의 역할을 살펴보기 위해, 상대적으로 고용량 범위 (0.5 내지 10 mM)의 DCA가 HepG2, C2C12, HEK293, 1차 간세포 (primary hepatocyte) 및 1차 대식세포 (primary macrophage)를 비롯한 다양한 세포주에 사용되었다. 반면, 본 발명에서는 ICM-유도 1차 hRPE 세포에서 1 내지 50 μ M 범위의 DCA 유효량을 확인하였다. 상기 데이터는 TGF β -유도 ARPE 세포를 이용한 종래의 연구와 유사했다. 흥미롭게도, 1차 hRPE 세포에서의 0.5 내지 5 μ M의 GM10395 유효량은 DCA보다 낮았으며, 이러한 결과는 CD4+ T세포를 비롯한 다른 세포에서도 유사했다 (도 11 및 표 9).

[142] 다음으로, hRPE 세포의 ICM-유도 염증 조건에서 p-PDHE1 α 가 DCA 또는 GM10395에 의해 용량 의존적인 방식으로 감소하였는지 확인하였다. 흥미롭게도, 특이적인 PDK4 억제제로서의 0.5 μ M의 GM10395의 억제적 효과는 범-PDK 억제제로서의 10 μ M의 DCA (20배 높음)와 비슷할 수 있었다 (도 12, 표 10 및 도 13, 표 11).

[143] 도 11 내지 도 13의 그래프의 구체적인 수치를 각각 표 9 내지 표 11에 나타내었다.

[144] [표9]

	<i>IL-1β</i>		<i>IL-6</i>	
	평균	$\pm$ 평균표준오차	평균	$\pm$ 평균표준오차
대조군	1.0	0.3	1.0	0.1
ICM 5 ng/mL	888.9	61.0	454.6	31.7
ICM + DCA	626.6	57.3	369.9	4.9

1 uM				
ICM + DCA 10 uM	589.5	12.9	291.1	9.2
ICM + DCA 50 uM	607.5	29.8	304.1	18.1
ICM + DCA 1,000 uM	892.3	41.0	439.7	15.8
ICM + G M10395 0.5 uM	586.4	24.2	272.8	7.0
ICM + G M10395 1 uM	619.6	54.2	248.8	22.2
ICM + G M10395 5 uM	524.8	24.7	246.2	5.0

[145] [표 10]

pPDHE1 α /HSP90	평균	$\pm$ 평균표준오차
대조군	1.000	0.269
ICM 5 ng/mL	3.017	0.618
ICM + DCA 1 uM	2.278	0.385
ICM + DCA 10 uM	0.403	0.064

[146] [표 11]

pPDHE1 α /HSP90	평균	$\pm$ 평균표준오차
대조군	1.000	0.251
ICM 5 ng/mL	2.336	0.182
ICM + GM10395 0.5 uM	0.244	0.026
ICM + GM10395 1 uM	0.111	0.003

[147]

[148] CNV 병변에서의 신생혈관 표현형은 염증 자극에 의해 활성화되었을 때 PDK4를 통한 RPE의 미토콘드리아 대사에 의해 지배되는 것으로 보인다. 따라서, 염증 조건 하의 대사 재프로그래밍에서의 GM10395의 효과를 평가하기 위해, ICM-유도 1차 hRPE 세포의 OCR이 측정되었다. DCA와 GM10395는 모두 최대 호흡을

증가시켰다. 흥미롭게도, DCA에서 예비 호흡 용량이 증가하지 않은 것에 비해 GM10395에서 용량 의존적으로 예비 호흡 용량이 현저히 증가하였다 (도 14 및 표 12). 도 14의 그래프의 구체적인 수치를 표 12에 나타내었다.

[149] [표12]

	기초 OCR		최대 OCR		예비 용량	
	평균	±평균표준오차	평균	±평균표준오차	평균	±평균표준오차
대조군	12.540	1.349	15.230	0.661	2.692	1.126
ICM	10.260	0.507	9.690	0.113	-0.573	0.607
ICM + DCA 1 uM	15.710	0.776	14.930	1.098	-0.778	0.966
ICM + DCA 10 uM	20.640	1.618	20.050	0.236	-0.592	1.496
ICM + G M10395 0.5 uM	15.270	1.294	16.100	0.865	0.840	0.730
ICM + G M10395 1 uM	14.900	1.112	19.790	0.141	4.896	1.097

[150]

[151] 다음으로, 미토콘드리아 산화 스트레스에 대한 약물의 효과를 측정하기 위해, ICM-유도 1차 hRPE 세포에서의 미토콘드리아 과산화물이 평가되었다. 앞선 데이터와 일치하게, ICM에 의한 염증 조건은 미토콘드리아 과산화물을 증가시켰으며, 이는 DCA 및 GM10395에 의해 완화되었다 (도 15 및 표 13). 도 15의 구체적인 수치를 표 13에 나타내었다.

[152] [표13]

평균 형광 강도	평균	±평균표준오차
대조군	337.8	1.38
ICM 5 ng/mL	403.6	2.41
ICM + DCA 10 uM	383.4	2.21
ICM + GM10395 1 uM	384.5	1.94

[153] 추가적으로, 미토콘드리아 외막 마커인 TOM20을 이용한 염색을 통해 형태학적 미토콘드리아 변화가 평가되었다. 앞선 데이터와 일치하게, ICM에 의한 염증 조건은 1차 hRPE 세포에서 미토콘드리아 질량을 감소시켰으며, 이는 DCA 및 GM10395에 의해 완화되었다 (도 16 및 표 14). 도 16의 구체적인 수치를 표 14에 나타내었다.

[154] [표14]

세포당 미토콘드리아 면적 (μm^2)	평균	$\pm$ 평균표준오차
대조군	332.1	8.741
ICM 5 ng/mL	159.0	5.320
ICM + DCA 10 μM	237.6	9.198
ICM + GM10395 1 μM	272.9	10.750

[155] 그리고, GM10395의 항염증 효과를 평가하기 위해, ICM-유도 1차 hRPE 세포에서 DCA 및 GM10395 처리 후의 전염증성 사이토카인의 mRNA 및 단백질 수준을 측정하였다. DCA는 *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8* 및 *Mcp-1*의 ICM-유도 상향조절을 억제하였다 (도 17 및 표 15). 나아가, GM10395는 *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8* 및 *Mcp-1*의 ICM-유도 상향조절을 억제하였다. 추가적으로, DCA 및 GM10395는 IL-6, IL-8 및 MCP-1 단백질 수준의 ICM-유도 상향조절을 억제하였다 (도 18 및 표 16). 도 17 및 도 18의 그래프의 구체적인 수치를 각각 표 15 및 표 16에 나타내었다.

[156] [표15]

		대조군	ICM 5 ng/mL	ICM + DCA 1 μM	ICM + DCA 10 μM	ICM + GM1039 5 0.5 μM	ICM + G M1039 5 1 μM
<i>IL-1β</i>	평균	1.00	930.9	813.9	613.9	631.9	595.5
	$\pm$ 평균표준오차	0.12	32.99	30.09	71.62	18.21	60.10
<i>IL-6</i>	평균	1.00	454.6	369.9	291.1	272.8	248.8
	$\pm$ 평균표준오차	0.07	31.66	4.88	9.16	7.01	22.24
<i>IL-8</i>	평균	1.00	6293	5653	4491	4967	4347
	$\pm$ 평균표준오차	0.07	375.8	439.1	307.2	102.9	51.22
<i>Mcp-1</i>	평균	1.00	19.35	17.87	13.85	14.84	13.09

	±평균표 준오차	0.04	0.27	0.43	0.87	0.42	0.45
--	-------------	------	------	------	------	------	------

[157] [표16]

		대조군	ICM 5 ng/mL	ICM + DCA 1 uM	ICM + DCA 10 uM	ICM + GM1039 5 0.5 uM	ICM + G M1039 5 1 uM
IL-6	평균	149	36600	32990	32038	26637	25830
	±평균표 준오차	1.753	362.1	329.8	370.8	471.9	505.6
IL-8	평균	27.83	65139	56166	53800	53478	51547
	±평균표 준오차	3.983	1439	1483	561.3	554.8	640.6
MC P-1	평균	4177	66791	48817	49874	36939	29811
	±평균표 준오차	67.66	927.7	2458	2239	3227	689.9

[158]

[159] *PDK4* 억제제인 GM10395는 레이저-유도 CNV 모델에서 CNV를 완화하였다

[160] 다음으로, PDK 억제제가 RPE에서의 대사 재프로그래밍에 의해 유발되는 염증성 변화를 감소시킴으로써 CNV를 완화하는지 평가하였다. CNV에서의 항-혈관 신생 효과를 평가하기 위해, 대조약물, DCA (250 mpk) 및 GM10395 (1 mpk)가 경구투여된 CNV 마우스의 신생혈관 표현형을 비교하였다. CNV 유도로부터 7일 후, 대조약물에 그룹에 비해 DCA 및 GM10395 그룹에서 2B 등급 병변의 비율이 현저히 감소하였다 (도 19 및 표 17). 또한, 맥락막 플랫 마운트 기법 평가에서, 대조 그룹에 비해 DCA 및 GM10395 투여 마우스의 CNV 병변 크기가 감소하였다 (도 20 및 표 18). 도 19 및 도 20의 그래프의 구체적인 수치를 각각 표 17 및 표 18에 나타내었다.

[161] [표17]

병변 등급	0	1	2A	2B
대조약물 투여 그룹	0	2.4	26.2	71.4
DCA 투 여 그룹	1.9	48.1	40.7	9.3
GM10395 투여 그룹	0	59	35.9	5.1

[162] [표18]

CNV 병변 면적	평균	±평균표준오차
대조약물 투여 그룹	27.92	4.33
DCA 투여 그룹	16.50	1.87
GM10395 투여 그룹	18.03	2.13

[163] DCA 및 GM10395가 유사한 항-혈관신생 효과를 보일 때, GM10395의 양은 DCA의 250분의 1이었으며, 이는 GM10395의 더 높은 효능을 나타낸다.

[164] 그 후, GM10395의 경구투여 이후 p-PDHE1 α 의 변화를 평가하였으며, 이는 CNV 마우스로부터 수득된 RPE/맥락막 조직의 면역 블로팅 기법으로 평가되었다. p-PDHE1 α 의 발현은 GM10395 처리에 의해 감소하였고 (도 21 및 표 19), 이는 도 13의 ICM-유도 1차 hRPE 세포에서 GM10395에 의해 p-PDHE1 α 를 탈인산화시킨 결과와 유사하다. 도 21의 구체적인 수치를 표 19에 나타내었다.

[165] [표19]

pPDHE1 α /HSP90	평균	±평균표준오차
대조약물 투여 그룹	1.00	0.15
GM10395 투여 그룹	0.32	0.04

[166] 추가적으로, RPE/맥락막 조직에서 GM10395 처리 후의 항염증 변화를 평가하기 위해, 레이저-유도 CNV 마우스에서 *Il-1 β* , *Il-6* 및 *Mcp-1*의 mRNA 수준을 측정하였다. GM10395 처리 그룹은 CNV 유도로부터 3일 후에 *Il-1 β* , *Il-6* 및 *Mcp-1*의 CNV-유도 상향조절을 감소시켰다 (도 22 및 표 20). 도 22의 구체적인 수치를 표 20에 나타내었다.

[167] [표20]

	<i>Il-1β</i>		<i>Il-6</i>		<i>Mcp-1</i>	
	평균	±평균표준오차	평균	±평균표준오차	평균	±평균표준오차
대조약물 투여 그룹	1.000	0.015	1.000	0.228	1.000	0.113
DCA 투여 그룹	3.000	0.303	11.250	0.818	6.858	0.125
GM10395 투여 그룹	1.729	0.141	8.635	0.376	4.816	0.150

[168] 실시예 2. 논의

[169] 에너지원으로, RPE는 미토콘드리아 OXPHOS (oxidative phosphorylation)에 거의 전적으로 의존하며, 이는 광수용체가 RPE를 통해 맥락막으로부터 운반된 포

도당을 사용할 수 있도록 한다. 이 과정은 RPE에서 당분해의 억제를 통해 고도로 조절되며, 이에 따라 포도당을 광수용체를 위한 에너지원으로 보존한다. 그러나, AMD는 이러한 대사 생태계를 파괴하며, RPE가 에너지 요구량을 유지하기 위해 당분해에 의존하도록 하고, 이는 대사 재프로그래밍으로 지칭된다. 미토콘드리아의 이러한 대사 전환은 AMD의 신생혈관 표현형을 더욱 악화시키는 RPE의 전염증성 환경을 유발한다.

[170] 후근신경절에서의 PDK-매개 당분해 대사 전환은 고통스러운 당뇨병성 신경병증을 유발하는 전염증성 사이토카인의 과발현으로 이어진다. 나아가, DCA를 통한 약리학적 억제 및 Pdk2/4 결핍은 전염증성 사이토카인 발현을 완화하여 척수의 신경염증을 감소시켰다.

[171] 유사하게, RPE 미토콘드리아의 대사 전환은 AMD의 신생혈관 표현형을 악화시키는 전염증성 환경을 야기한다. 그러나, 인간 RPE에서의 대사 재프로그래밍과 CNV의 신생혈관 표현형 사이의 연관성은 아직 연구되지 않았다. 따라서, 본 발명에서는 유전적 제거 및 소분자를 이용하여 연관성을 평가하였고 PDK4 억제제가 미토콘드리아 역학 조절에서의 치료적 타겟임을 확인하였다.

[172] PDK 동형들 중, 면역 블로팅 기법에서 오직 PDK4만이 RPE에서 과발현된 반면 다른 PDK 동형들이 증가되지 않은 것으로 나타났다. 1차 hRPE 세포를 이용한 *in vitro* 실험은 오직 *Pdk4* 녹다운만이 OCR 및 전염증성 사이토카인의 ICM-유도 방향조절에 영향을 미치는 반면 다른 *Pdk* 동형들은 영향을 미치지 않았다는 점을 보여주었다.

[173] 피루브산의 구조적 유사체이며 PDK 억제제인 DCA는 신경퇴행성 질환뿐만 아니라 신경교종, 허혈성 뇌질환을 포함하는 다양한 신경질환에 대한 보호 효과를 나타내었다. 그러나, DCA는 말초신경병증의 심각한 전신 부작용을 가지는 것으로 알려져 있으며, 이는 특히 주로 PDK4를 타겟팅하는 대안적인 PDK 억제제의 발견을 요구한다. 따라서, 본 발명에서는 새로운 소분자 GM10395의 효과를 평가하였으며, 이는 미토콘드리아 역학 조절의 측면에서 훨씬 작은 농도로 작용한다.

[174] PDK4를 타겟팅하는 소분자 GM10395는 최대 호흡 및 예비 호흡을 증가시켰다. 흥미롭게, 예비 호흡 용량은 용량 의존적으로 GM10395에 의해 현저히 증가한 반면, DCA에서는 그러한 효과가 나타나지 않았다. 게다가, GM10395는 MitoSOX 염색을 통해 확인된 것과 같이 산화 스트레스를 완화하였고 또한 염증성 조건에 의해 유도되는 미토콘드리아 분열을 완화하였다. 나아가, 미토콘드리아 활성의 강화는 RPE가 산화 손상에 대해 더 잘 회복하도록 하였으며, 이는 RPE 미토콘드리아의 중요한 역할을 뒷받침한다. 종합하면, 본 발명의 데이터는 GM10395가 OXPHOS에서 호기성 당분해로의 대사 재프로그래밍으로부터 RPE를 보호한다는 것을 시사한다.

[175] RPE의 염증성 활성화는 미토콘드리아 역학 및 수반되는 전염증성 사이토카인의 과발현을 변화시킨다. Palsson-McDermott 등은 LPS-유도 대사 재프로그래밍의 억제가 염증성 사이토카인 분비를 완화하였음을 보고하였다. 유사하게, 본 발

명에서 GM10395는 용량 의존적으로 전염증성 사이토카인 생산을 억제하였다. 앞선 데이터들은 GM10395가 PDK4를 통한 미토콘드리아 대사를 역전시킴으로써 RPE에서의 염증반응을 완화하였음을 나타내었다.

[176] 다음으로, 본 발명에서는 신경염증의 *in vivo* 패러다임에서의 GM10395의 효과를 살펴보았으며 GM10395가 면역 조절성 RPE 표현형 및 신생혈관 표현형과 관련된 유전자의 발현을 감소시켰음을 확인하였다. 따라서 대사 재프로그래밍을 통한 RPE 표현형의 조절은 반응성 RPE의 직접적인 신경독성 잠재력을 감소시킴으로써 CNV의 임상적 결과를 개선하기 위해 사용될 수 있다.

[177] 결론적으로, 본 발명에서는 CNV가 PDK4 및 인산화-PDH (p-PDH)의 발현을 증가시키며, CNV 병변에서의 염증과 함께 당분해 대사 전환을 유발한다는 것을 확인하였다. PDK4의 유전적 제거 및 PDK4 억제제 소분자는 CNV-유도 신경염증을 완화하였다. 종합하면, 이러한 발견들로부터 PDK4 조절을 통한 RPE 대사 조절이 신생혈관성 AMD를 위한 신규 치료 방법으로 활용될 수 있다는 점을 유추할 수 있다.

[178]

[179] 실시예 3. 방법

[180] 동물 실험

[181] 모든 실험에서 수컷 C57BL/6J 마우스가 사용되었다. *Pdk4* 녹아웃 마우스 (*Pdk4*^{-/-}) 개체군은 *in-house* 동물 시설에서 확립되었다. 모든 마우스는 일정한 온도 (22 °C), 12시간 명암 주기 및식이 (chow diet)와 식수에 대한 비제한적 접근의 무균 플랫폼에 보관되었다. 7주령의 마우스는 CNV 유도 (0일차) 이전의 -7일차부터 CNV 유도 이후의 +7일차까지 하루에 한 번 경구투여로 디클로로아세테이트 (DCA 250 mg/kg; Sigma-Aldrich, 347795) 또는 GM10395 (1 mg/kg; 1% DMSO/생리식염수 용액에 10 mg/mL의 농도로 희석), 또는 생리식염수가 투여되었다.

[182]

[183] 레이저-유도 CNV 모델

[184] 모든 실험에서 8주령의 수컷 C57BL/6J 마우스가 사용되었다. 슬릿 램프에 부착된 532-nm OcuLight GLx Laser System (IRIDEX Corporation)이 CNV 병변을 생성하기 위해 사용되었다. 종래 연구에 기술된 방법에 따라, 다음의 레이저 파라미터를 이용하여 4 내지 10개의 병변이 생성되었다: 100 mW 출력, 100 μ m 스팟 크기 및 0.1초의 펄스 지속시간. 광응고 부위의 기포 출현이 브루크막 (Bruch's membrane)의 성공적인 파괴를 의미하였다. RNA 분리 또는 맥락막 플랫 마운트 기법을 위해 망막 및 맥락막 조직이 다양한 시점에서 수집되었다. 마우스는 CNV 유도 (0일차) 이전의 -7일차부터 CNV 유도 이후의 +7일차까지 하루에 한 번 경구투여로 생리식염수, DCA (250 mg/kg), GM10395 (1 mg/kg) 또는 생리식염수가 투여되었다.

[185]

[186] 플루오레세인 혈관조영술

- [187] Micron IV Retinal Imaging Microscope (Phoenix Technology Group, Pleasanton, CA, USA)가 플루오레세인 이미지 촬영에 사용되었다. 마취 및 동공 확장 이후, 0.1 mL 용량의 2% 플루오레세인 나트륨 (Akorn, Lake Forest, IL, USA)을 복강내 주사하고, 3 내지 5분 및 7 내지 10분 후에 StreamPix 소프트웨어를 사용하여 이미지가 획득되었다. 병변의 등급화를 위해 종래에 기술되었던 스킴 (scheme)이 사용되었다: 누출 없이 희미하거나 얼룩덜룩한 형광은 0으로 평가되었고; 크기 또는 강도의 증가가 없는 과형광 (hyperfluorescence)은 1로 평가되었고 (약한 누출); 일정한 크기를 지니지만 강도가 증가하는 과형광은 2A로 평가되었고 (중간 누출); 및 크기와 강도가 모두 증가하는 과형광은 2B로 평가되었다 (임상적으로 심각한 누출).
- [188]
- [189] 맥락막 플랫 마운트 기법
- [190] CNV 유도 이후 7일차에 (+7일차), 안구가 적출되었고 4% 파라포름알데히드로 30분동안 고정되었다. 맥락막 플랫 마운트를 생성하기 위해 하부 맥락막 및 공막으로부터 망막이 제거되었다. 4 °C에서 밤새 아이컵 (eyecup)을 염색하기 위해 Alexa Fluor 488-conjugated to isolectin B4 (1:100, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, I21411)가 사용되었다. 그후 PermaFluor aqueous mount (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)가 맥락막이 위를 향하고 공막이 아래를 향하는 아이컵을 플랫 마운트하기 위해 사용되었다. 플랫 마운트 이미지는 LSM 800 with Airyscan detector (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)를 사용하여 촬영되었다. CNV 병변 크기 측정에 ImageJ 소프트웨어가 사용되었고 종래 연구에 기술된 방법에 따라 분석이 이루어졌다.
- [191]
- [192] 면역조직화 염색
- [193] CNV 유도 이후 1일차에, 적출된 마우스 안구가 실온에서 1시간동안 4% 파라포름알데히드로 고정되었고, 밤새 4 °C에 30% 수크로스 용액으로 동결보호되었고, OCT 컴파운드에 포매되었다. 안구는 15 μ m 두께로 동결절편되었다. 면역형광 기법을 위해, 절편들은 블로킹 버퍼 (PBS 내 0.5% 트리톤, 0.2% BSA 및 5% 당나귀 혈청)로 실온에서 1시간동안 블로킹되었고 그후 4 °C에서 밤새 1차 항체로 인큐베이션되었다. 세척 후, 시료는 실온에서 1시간동안 2차 항체로 인큐베이션되었다. 토끼 항-p-PDHE11 α (1:100; MilliporeSigma, Burlington, MA, USA, AP1062), 토끼 항-PDK4 (1:200; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, HPA056731)가 1차 항체로 사용되었고, Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit antibody (1:500; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, A21206)가 2차 항체로 사용되었다.
- [194]
- [195] 세포 배양
- [196] 본 발명에서는 5 내지 6계대의 1차 인간 RPE (hRPE) 세포 (Lonza, Walkersville, MD, USA)가 사용되었다. 1차 hRPE 세포는 보충물 (RtEGM Bulletkit;

Lonza)을 함유하는 기초 배지에서 배양되었다. 계대배양을 위해 Trypsin/EDTA(CC-5012), Trypsin Neutralizing Solution(CC-5002) 및 HEPES Buffered Saline Solution(CC5022)을 포함한 ReagentPack™ Subculture Reagents(Lonza, CC-5034)를 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. 1차 hRPE 세포는 보충제(RtEGM BulletKit; Lonza, 00195409)가 포함된 기본 배지에서 37 °C 5% CO2 가습 배양기에서 배양되었다. 1차 hRPE 세포를 각 배양 플레이트에 2% FBS/RtEGM 배지로 접종하고 배지를 24시간 후에 무혈청 RtEGM 배지로 교체하였다. 컨플루언트 1차 hRPE 세포를 세척하고 IL-1β (5 ng/mL), TNF-α (5 ng/mL) 및 IFN-γ (5 ng/mL)를 함유하는 염증성 사이토카인 혼합물 (ICM)을 무혈청 RtEGM 배지에 희석하여 24시간 동안 처리하였다. 인간 재조합 IL-1β (201-LB-010/CF), TNF-α (210-TA-100/CF) 및 IFN-γ (285-IF-100/CF)는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구매하였다.

[197]

[198] siRNA 형질주입

[199] 인간 *Pdk1* (5163-1), *Pdk2* (5164-1), *Pdk3* (5165-1), *Pdk4* (5166-2)를 타겟팅하는 사전설계된 siRNA와 siControl (SN-1003)은 바이오니아 (대전, 대한민국)에서 구매되었다. siRNA 형질주입을 위해 사용된 특이적 siRNA의 서열을 표 21에 나타내었다.

[200] [표21]

서열번호	명칭	서열목록 (5'→ 3')
1	Human siPDK1_Sense	GUGUAGAUUAGAGGGAUGU
2	Human siPDK1_Antisense	ACAUCCCUCUAAUCUACAC
3	Human siPDK2_Sense	GGAAAGGAGUUACACCCGU
4	Human siPDK2_Antisense	ACGGGUGUAAACUCCUUUCC
5	Human siPDK3_Sense	CUAAACACAUAGGAAGUAU
6	Human siPDK3_Antisense	AUACUUCCUAUGUGUUUAG
7	Human siPDK4_Sense	CUCUUCAGUGCAAUUGGU
8	Human siPDK4_Antisense	AACCAAUUGCACUGAAGAG

[201] siRNA 형질주입은 Lipofectamine RNAiMax 및 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행되었다. 간략하게, 1차 인간 RPE (hRPE) 세포가 12-웰 플레이트에서 배양되었고 60 내지 70% 컨플루언스에서 인간 PDK 동형 (si*Pdk1-4*) 및 음성 대조군 (siControl)을 이용하여 형질주입되었다. 이튿날, siRNA-형질주입 1차 hRPE 세포는 24시간동안 ICM으로 처리되었고 그 후 qPCR 및 산소소비량 (OCR) 분석을 위해 수확되었다.

[202]

[203] 정량적 실시간 중합 연쇄 반응 (qPCR)

[204] 제조사의 지침에 따라, QIAzol lysis reagent (Qiagen, Waltham, MA, USA)를 이용하여 총 RNA가 마우스 조직 또는 1차 hRPE 세포로부터 추출되었다. 총 RNA는 cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용한 cDNA 합성에 사용되었다. qPCR 분석은 Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)를 사용하여 ViiA7 real-time PCR system (Applied Biosystems, Hammon, NJ, USA)로 수행되었다. 실시간 PCR을 위해 사용된 특이적 프라이머의 서열을 표 22에 나타내었다.

[205] [표22]

서열번호	명칭	서열목록 (5'→3')
9	Mouse IL-1 β _Forward Primer	AGTTGACGGACCCCAAAAGAT
10	Mouse IL-1 β _Reverse Primer	GTTGATGTGCTGCTGCGAGA
11	Mouse IL-6_F Forward Primer	AAGTCGGAGGCT TAATTACACATGT
12	Mouse IL-6_R Reverse Primer	CCATTGCACAACCTCTTTTCTCATT
13	Mouse MCP-1_F Forward Primer	GCATCCACGTGTTGGCTCA
14	Mouse MCP-1_R Reverse Primer	CTCCAGCCTACTCATTGGGATCA
15	Mouse 36B4_F Forward Primer	ACCTCCTTCTTCCAGGCTTT
16	Mouse 36B4_R Reverse Primer	CTCCAGTCTTTATCAGCTGC
17	Human IL-1 β _Forward Primer	ATGCACCTGTACGATCACTG
18	Human IL-1 β _Reverse Primer	ACAAAGGACATGGAGAACACC
19	Human IL-6_F Forward Primer	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC
20	Human IL-6_R Reverse Primer	CAGGGGTGGTTATTGCATCT
21	Human IL-8_F Forward Primer	GACATACTCCAAACCTTTCCACCC

22	Human IL-8_R everse Primer	CCAGACAGAGCTCTCTTCCATCAG
23	Human MCP-1_ Forward Primer	CTCATAGCAGCCACCTTCATTC
24	Human MCP-1_ Reverse Primer	TCACAGCTTCTTTGGGACACTT
25	Human PDK4_ Forward Primer	GTATGTTCTCCTCACCTCCATCA
26	Human PDK4_ Reverse Primer	TGTTGCCCCGCATTGCAT
27	Human 36B4_ Forward Primer	CAACCCAGCTCTGGAGAAAC
28	Human 36B4_ Reverse Primer	GTGAGGTCCTCCTTGGTGAA

[206] 웨스턴 블롯 분석

[207] 마우스 조직 또는 1차 hRPE 세포는 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 함유하는 RIPA Buffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 용해되었다. 단백질 농도는 BCA protein assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 통해 측정되었다. 용해물은 Nupage 4-12% Bis-Tris Mini Protein Gel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 통해 분리되었고, 용해된 단백질은 PVDF 막 (polyvinylidene difluoride membrane; EMD Millipore, Billerica, MA, USA)으로 옮겨졌다. PVDF 막은 다음의 1차 항체로 면역 블로팅되었다: 항-PDK1 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA, ADI-KAP-PK112), 항-PDK2 (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab68164), 항-PDK3 (Abnova, Taipei, Taiwan, PAB4563), 항-PDK4 (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab110336), 항-p-PDHE1 α (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA, AP1062), 항-피루브산 탈수소효소 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, 2784), 항-열충격단백질 90 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, 4874) 및 항- β -액틴 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, A5441). 항-열충격단백질 90은 로딩 컨트롤로 사용되었다.

[208]

[209] 사이토카인 효소면역분석법 (ELISA)

[210] 제조사의 지침에 따라, ELISA 키트를 사용하여 세포 배양 배지 내의 인간 IL-6, IL-8 및 MCP-1의 분비 수준이 측정되었다. 인간 IL-6 (88-7066-76) 및 MCP-1 (88-7399-76) 비코팅 ELISA 키트는 Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구매되었다. 인간 IL-8 코팅 ELISA 키트 (D8000C)는 R&D System (Minneapolis, MN, USA)에서 구매되었다. 결과는 시료의 pg/mL로 표현되었다.

[211]

[212] 산소소비량 측정

[213] OCR은 XFe96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Biosciences, Billerica, MA, USA)를 이용하여 측정되었다. 1차 hRPE 세포는 세포 배양 플레이트 (6-웰)에 1.4×10^5 세포/웰의 밀도로 시딩되었다. 3일차에, 세포는 DCA 및 GM10395를 포함하거나 포함하지 않는 새로운 무혈청 배지에 희석된 ICM으로 24시간동안 처리되었다 이후, 세포는 분석 배지가 담긴 XFe96 세포 배양 플레이트 (96-웰)로 옮겨졌고, 분석 플레이트는 37 °C 5% CO₂에서 5시간동안 인큐베이션되었다. 분석 배지는 Seahorse XF 1.0 M Glucose Solution (25 mM), Seahorse XF 100 mM Pyruvate Solution (1 mM) 및 Seahorse XF 200 mM Glutamine Solution (2 mM)으로 보충된 XF DMEM medium pH 7.4 (Agilent TECHNOLOGIES, Santa Clara, CA, USA)로 구성되었다. 억제제 및 짝폴립체는 다음의 농도로 사용되었다: 올리고마이신 A (1 uM, Sigma-Aldrich), FCCP (carbonyl cyanide 4-(trifluoro-methoxy) phenylhydrazone, 1uM, Sigma-Aldrich) 및 로테논 (1 uM, Sigma-Aldrich). DAPI 염색된 세포는 세포 수로 정규화하기 위해 ImageXpress Micro Confocal Microscopy (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 자동 계수되었다.

[214]

[215] 세포 과산화물 검출

[216] DCA (10 uM) 또는 GM10395 (1 uM)를 포함하거나 포함하지 않는 ICM을 24 시간 동안 처리한 1차 hRPE 세포에서의 미토콘드리아 과산화물 형성을 감지하기 위해 MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, M36008)가 사용되었다. 1차 hRPE 세포는 black wall/clear bottom 96-well plate (Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria)에 2×10^4 세포/웰의 밀도로 시딩되었다. 실험 말미에, 1차 hRPE 세포는 MitoSOX (5 uM) 및 NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent (Hoechst 33342) 용액 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, R376505)을 함유하는 PBS에서 37 °C에서 10분간 인큐베이션되었다. 미토콘드리아 과산화물 이미지는 공초점 모드 (60 um 핀홀 스톱)에서 ImageXpress Micro Confocal High-Content Imaging System (Molecular Devices) 및 10X Plan Fluor objective를 사용하여 획득되었다. 이미지 평면은 DAPI 및 TRITC를 이용하여 수득되었다. 평균형광강도는 ImageXpress Micro Confocal Microscopy (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 통해 자동 정량화되었다.

[217]

[218] 미토콘드리아 형태의 면역형광 기법

[219] 1차 hRPE 세포는 black wall/clear bottom 96-well plate (Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria)에 6×10^3 세포/웰의 밀도로 시딩되었다. 실험 말미에, 1차 hRPE 세포는 4% 파라포름알데히드로 고정되었고 이후 0.1% Triton X-100 및 0.1 M 글리신을 포함하는 PBS에서 투과화 (permeabilization)되었다. PBS로 세척 후,

세포는 4 °C에서 밤새 TOM20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20)에 대한 1차 항체 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-11415)로 인큐베이션되었다. Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-rabbit antibody (1:100; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, A21207)가 2차 항체로 사용되었고 실온에서 2시간동안 인큐베이션되었다. 핵은 DAPI 용액 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA, 62248)으로 염색되었다. 1차 hRPE 세포의 이미지는 공초점 모드 (60 um 핀홀 스피닝)에서 ImageXpress Micro Confocal High-Content Imaging System (Molecular Devices) 및 60X Plan Fluor objective를 사용하여 획득되었다. DAPI 및 Texas Red를 이용하여 이미지 평면간 0.4 mm인 2.4 mm z-스택이 획득되었다. 최대 강도를 나타내기 위해 2차원 투영 (2-dimensional projection)이 생성되었고 MetaXpress (Molecular Devices)를 사용하여 명확한 미토콘드리아 구조를 제공하기 위해 "Flatten Background" 기능을 사용하여 처리되었다. 각 세포의 미토콘드리아 면적은 ImageJ 소프트웨어에 Fiji plugin (NIH)을 사용하여 정량화되었다. 총 미토콘드리아 면적 윤곽은 로우패스 필터링된 이미지 (low-pass filtered image)의 임계값을 지정 (thresholding)함으로써 결정되었다. 세포 수준에서 형광 강도를 분석하기 위해 이미지 처리 소프트웨어를 사용하여 개별 세포에 ROI (관심 영역)를 적용하여 형광 픽셀을 정량화하였다. 각 이미지에서 얻은 전체 형광 강도의 합계를 해당 이미지의 세포 수로 나누어 평균 세포 형광 강도를 얻었다. 통계 분석을 위해, 각 이미지에서 분석된 세포 수에 따라 세포당 형광 강도 값이 복제되고 이러한 값들을 기반으로 평균과 평균 표준 오차(SEM)를 계산하였다.

[220]

[221] 통계

[222] 데이터는 Prism v. 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하여 제시되었고, 통계적 분석은 IBM SPSS Statistics v. 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행되었다. 결과들은 평균 $\pm$ 평균의 표준오차 (mean $\pm$ SEM)로 표현된다. 두 그룹을 비교하기 위해 2-표본 t-검정이 사용되었다. 다중그룹 비교는 터키 다중 비교 (Tukey's multiple comparison)가 수반되는 일원 분산 분석 (one-way ANOVA) 또는 이원 분산 분석 (two-way ANOVA)을 통해 수행되었다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 정의되었다.

[223]

[224] 연구 승인

[225] 모든 마우스 실험은 미국안과학회 (the Association for Research in Vision and Ophthalmology)의 눈과 시력연구에서의 동물사용에 관한 원칙 (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)의 가이드라인을 준수하였으며 경북대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인되었다 (승인번호 2019-0104-1).

[226]

[227] 이상에서 대표적인 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명하였으나, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 상술한 실시예에 대하여 본

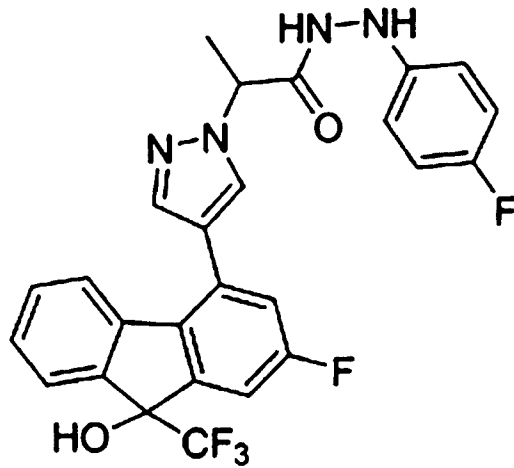
발명의 범주에서 벗어나지 않는 한도 내에서 다양한 변형이 가능함을 이해할 것이다. 그러므로 본 발명의 권리 범위는 설명한 실시예에 국한되어 정해져서는 안 되며, 후술하는 특허청구범위뿐만 아니라 특허청구범위와 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태에 의하여 정해져야 한다.

산업상 이용가능성

- [228] 본 발명의 목적은 황반변성 (macular degeneration)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [229] 본 발명의 다른 목적은 황반변성의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [230] 본 발명의 또 다른 목적은 신생혈관성 안질환 (neovascular ocular disease)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [231] 본 발명의 또 다른 목적은 신생혈관성 안질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [232] 본 발명의 또 다른 목적은 황반변성 치료방법을 제공하는 것이다.
- [233] 본 발명의 또 다른 목적은 신생혈관성 안질환 치료방법을 제공하는 것이다.
- [234] 본 발명의 또 다른 목적은 PDK 저해제의 신규한 용도를 제공하는 것이다.

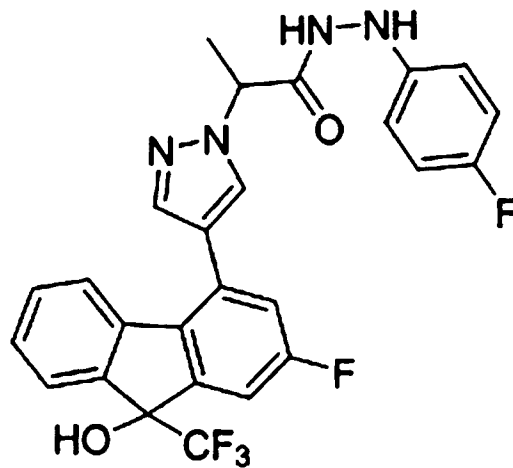
청구범위

- [청구항 1] 피루브산 탈수소효소 키나아제 (pyruvate dehydrogenase kinase; PDK) 저해제를 포함하는, 황반변성 (macular degeneration)의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제는 피루브산 탈수소효소 키나아제 4 (PDK4) 저해제인 것인, 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 피루브산 탈수소효소 키나아제 4 저해제는 하기 화학식 1로 표현되는 GM10395 또는 이의 염 (salts)을 포함하는 것인, 조성물:
- [화학식 1]



- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 황반변성은 나이관련 황반변성 (age-related macular degeneration; AMD)인 것인, 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 나이관련 황반변성은 후기 나이관련 황반변성 (late age-related macular degeneration; late AMD)인 것인, 조성물.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 나이관련 황반변성은 신생혈관성 나이관련 황반변성 (Neovascular age-related macular degeneration; Neovascular AMD)인 것인, 약제학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 안구내, 안구주위, 안구뒤, 망막하 (subretinal), 망막중심 (central retinal), 중심와 (fovea) 외부, 결막하 (subconjunctival), 유리체내 (intravitreal), 전방내 (intracameral) 또는 맥락막 위 (suprachoroidal)에 투여되는 것인, 약제학적 조성물.
- [청구항 8] 피루브산 탈수소효소 키나아제 (pyruvate dehydrogenase kinase; PDK) 저해제를 포함하는, 황반변성 (macular degeneration)의 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물.

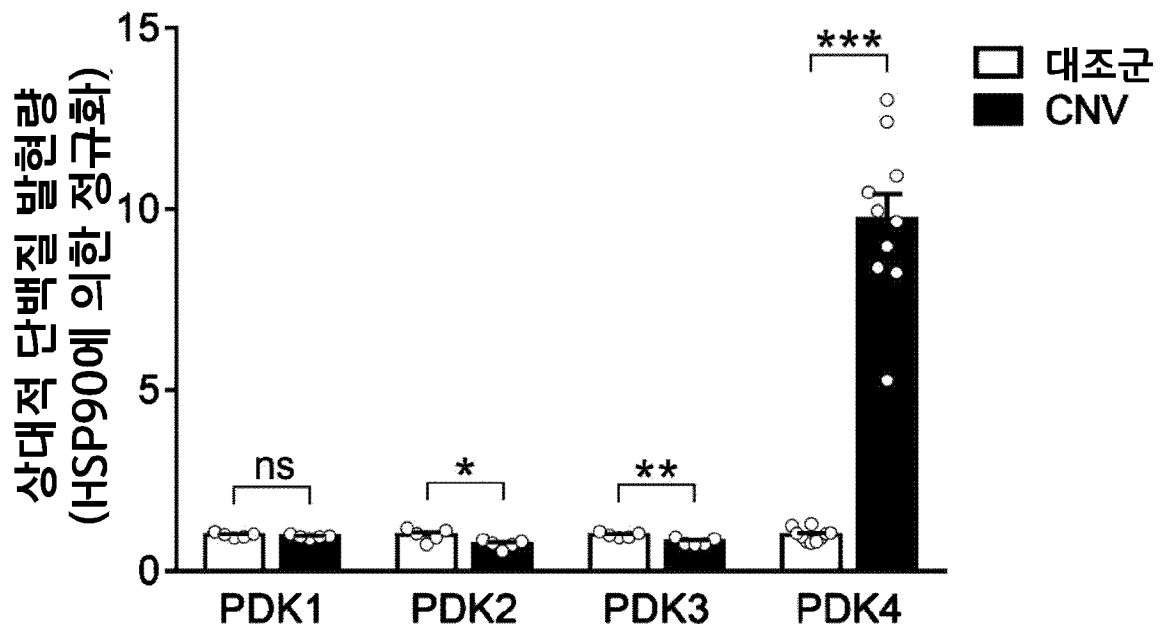
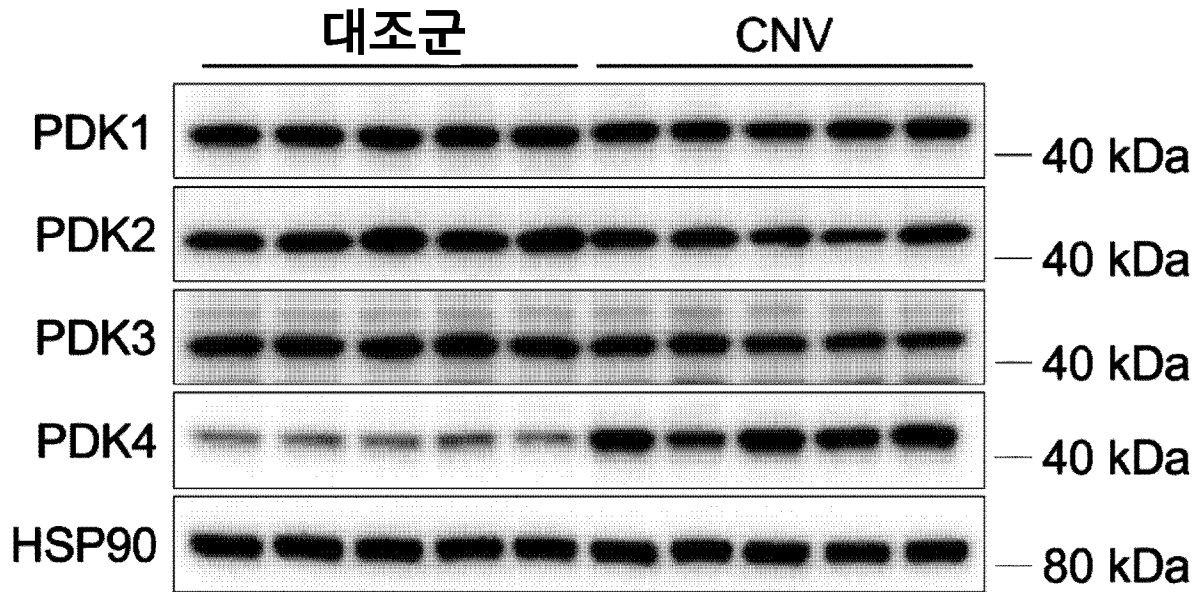
- [청구항 9] 피루브산 탈수소효소 키나아제 (pyruvate dehydrogenase kinase; PDK) 저해제를 포함하는, 신생혈관성 안질환 (neovascular ocular disease)의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 피루브산 탈수소효소 키나아제 저해제는 피루브산 탈수소효소 키나아제 4 (PDK4) 저해제인 것인, 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 피루브산 탈수소효소 키나아제 4 저해제는 하기 화학식 1로 표현되는 GM10395 또는 이의 염 (salts)을 포함하는 것인, 조성물:
- [화학식 1]



- [청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 신생혈관성 안질환은 각막혈관신생 (corneal neovascularization), 망막 혈관신생 (retinal neovascularization), 맥락막 혈관신생 (choroidal neovascularization), 안구내 혈관신생 (intraocular neovascularization), 신생혈관성 녹내장 (neovascular glaucoma), 증식성 당뇨병성 망막증 (proliferative diabetic retinopathy), 신생혈관성 황반변성 (neovascular macular degeneration) 또는 미숙아 망막병증 (retinopathy of prematurity)인 것인, 조성물.
- [청구항 13] 피루브산 탈수소효소 키나아제 (pyruvate dehydrogenase kinase; PDK) 저해제를 포함하는, 신생혈관성 안질환 (neovascular ocular disease)의 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물.

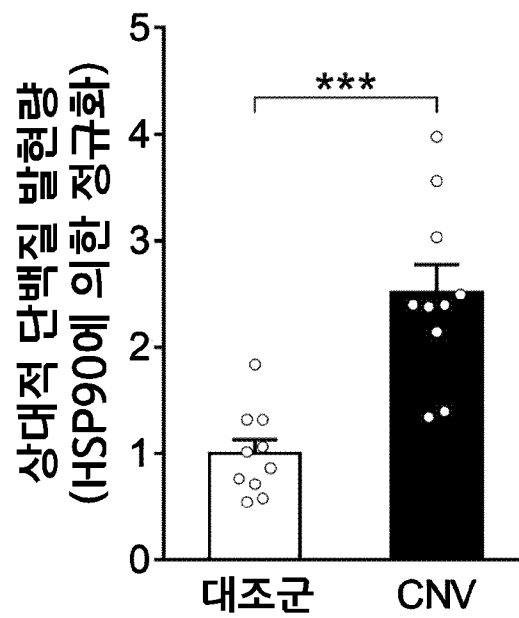
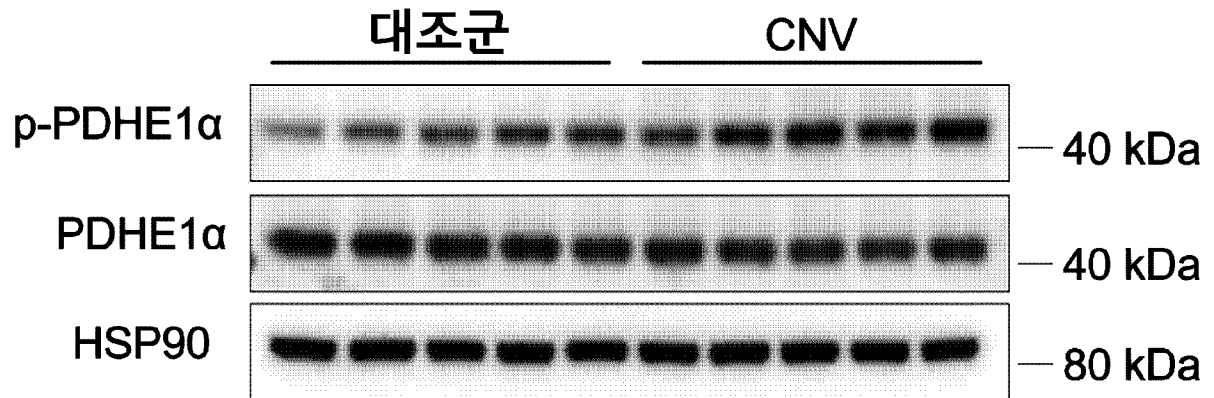
[도1]

RPE/맥락막

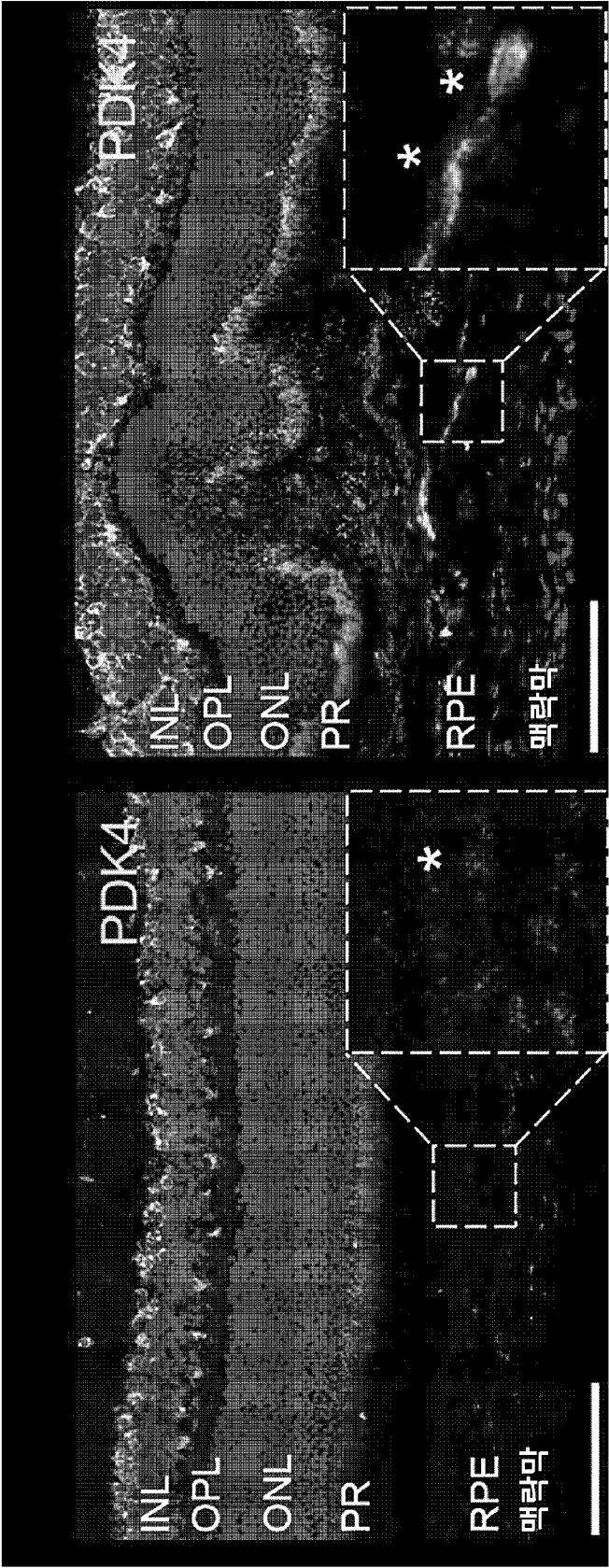


[도2]

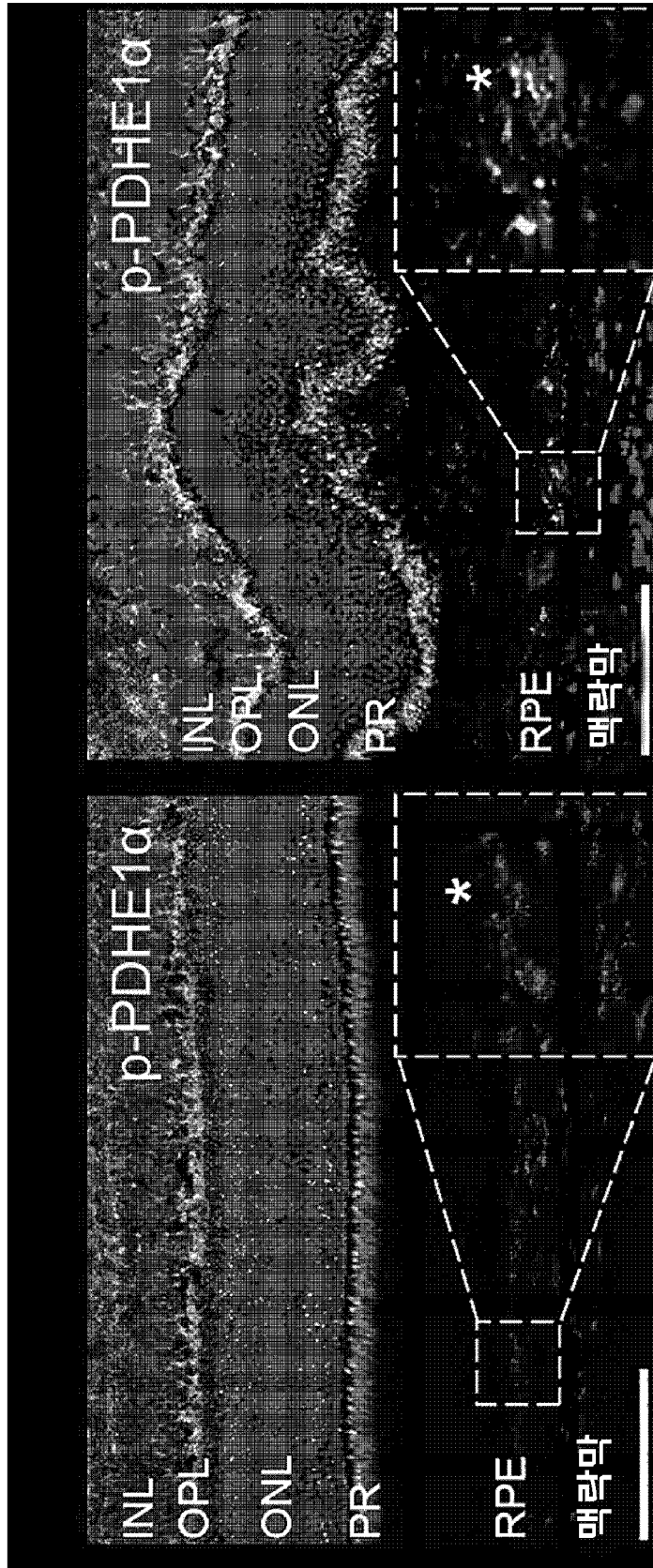
RPE/맥락막



[도3]

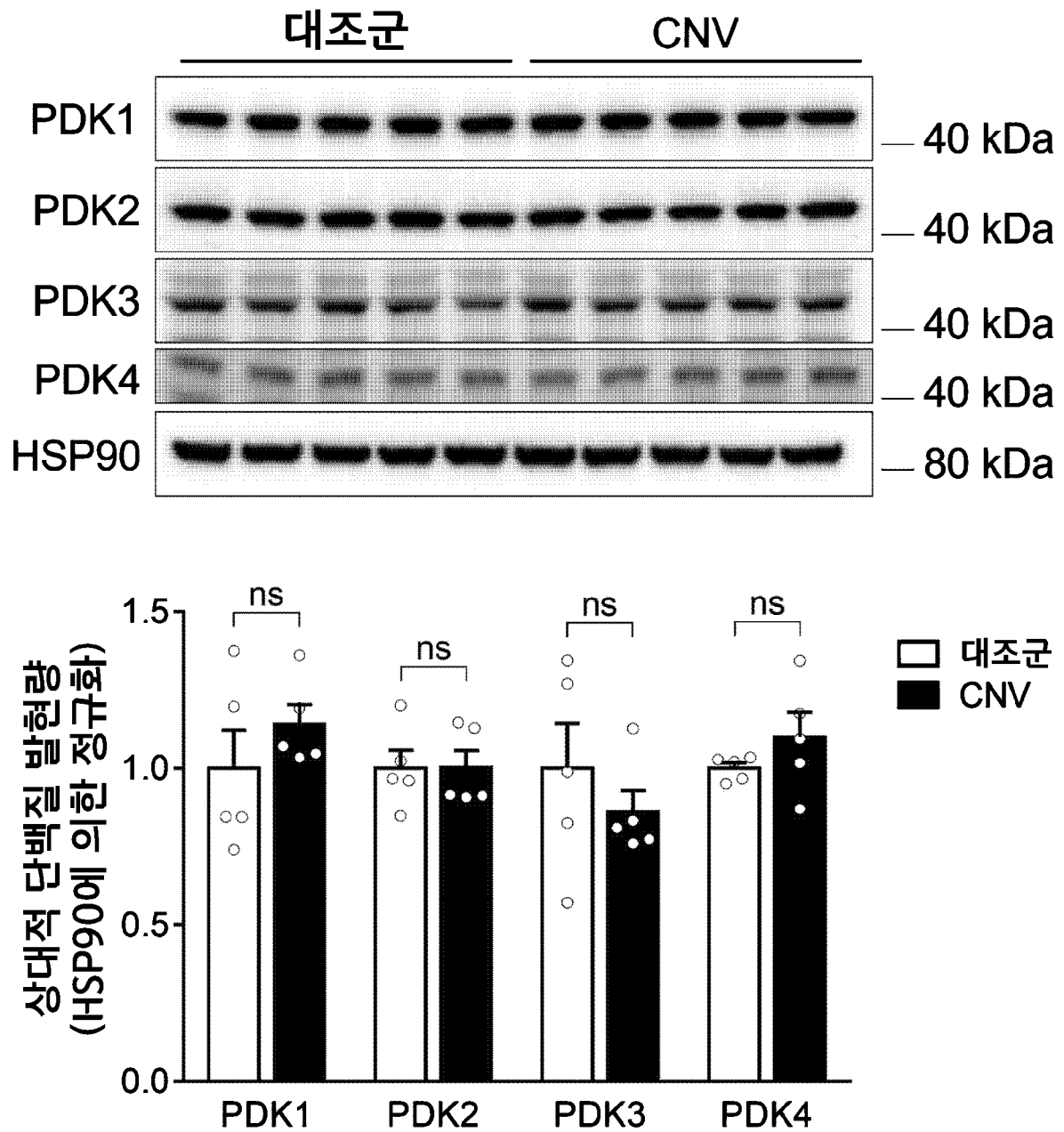


[도4]

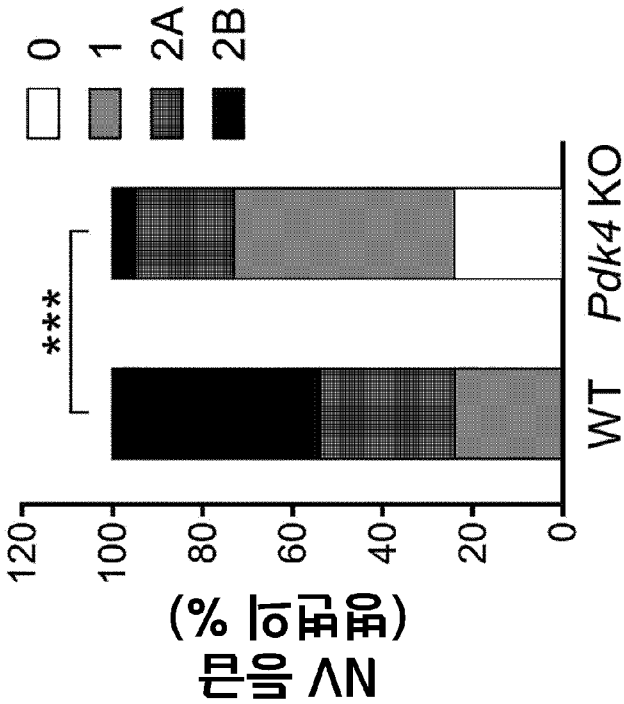
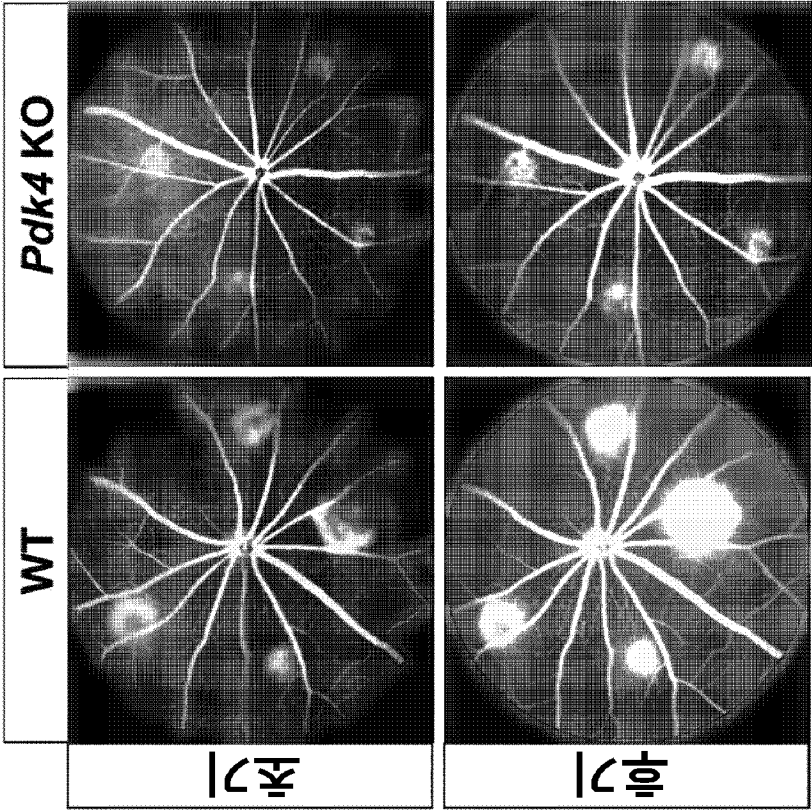


[도5]

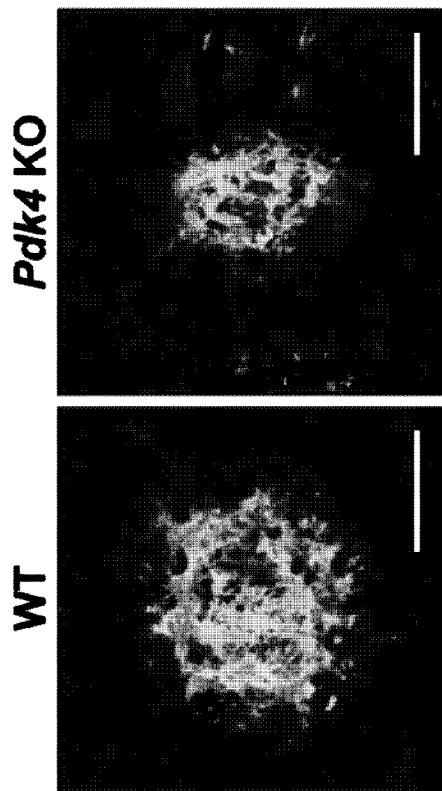
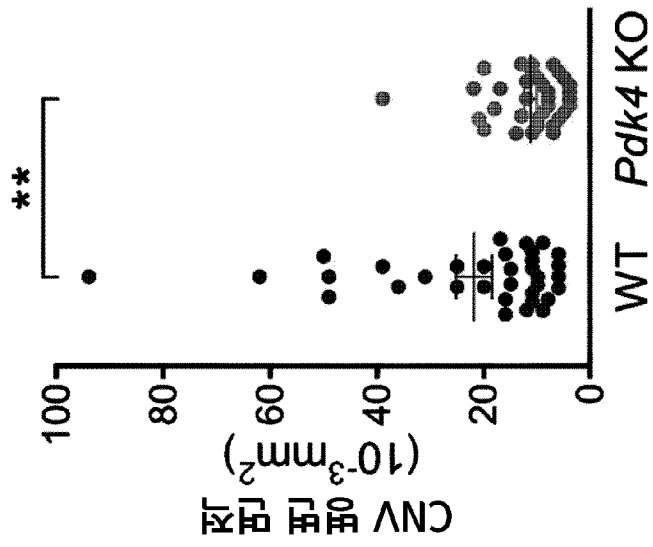
망막



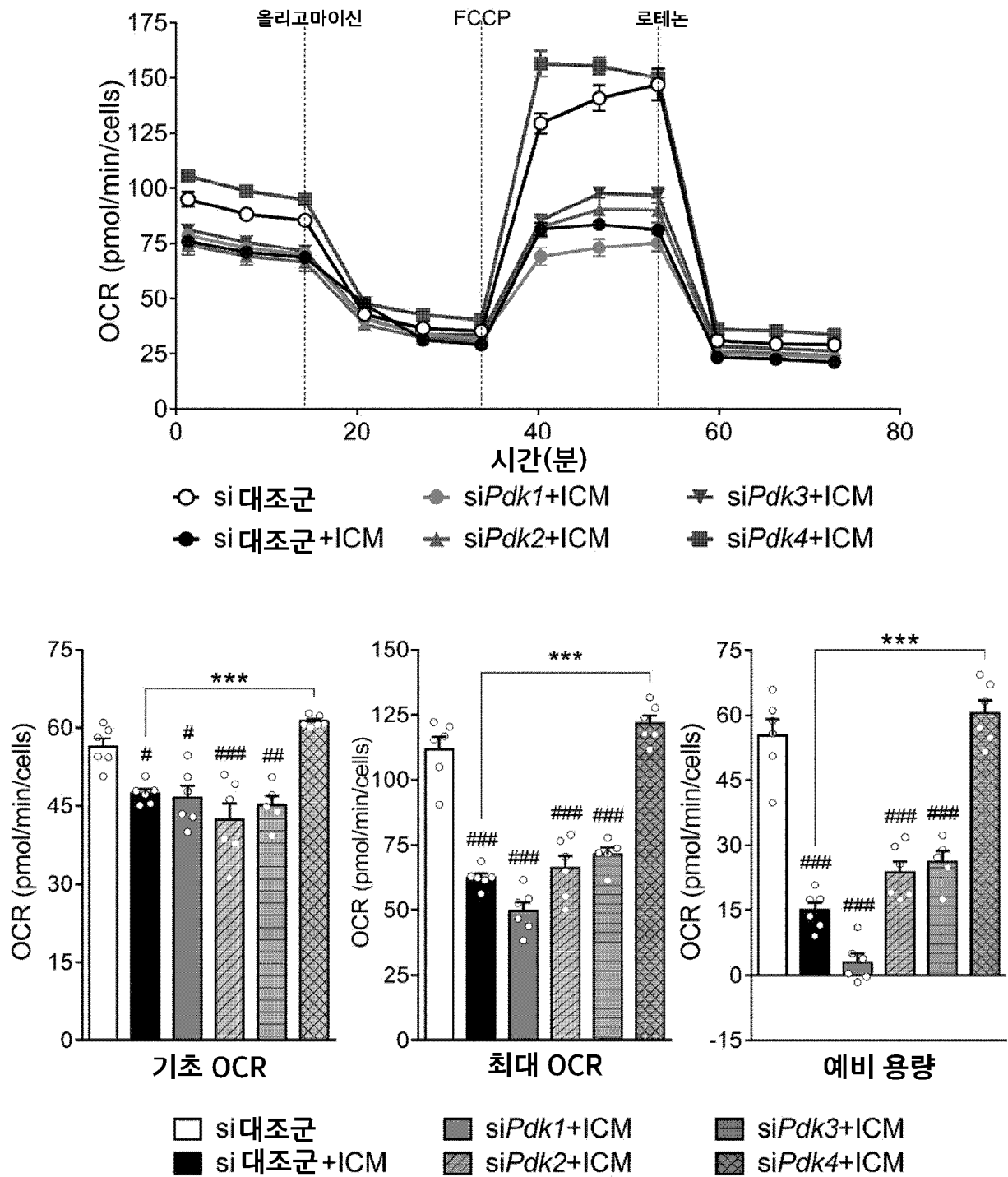
[도6]



[도7]

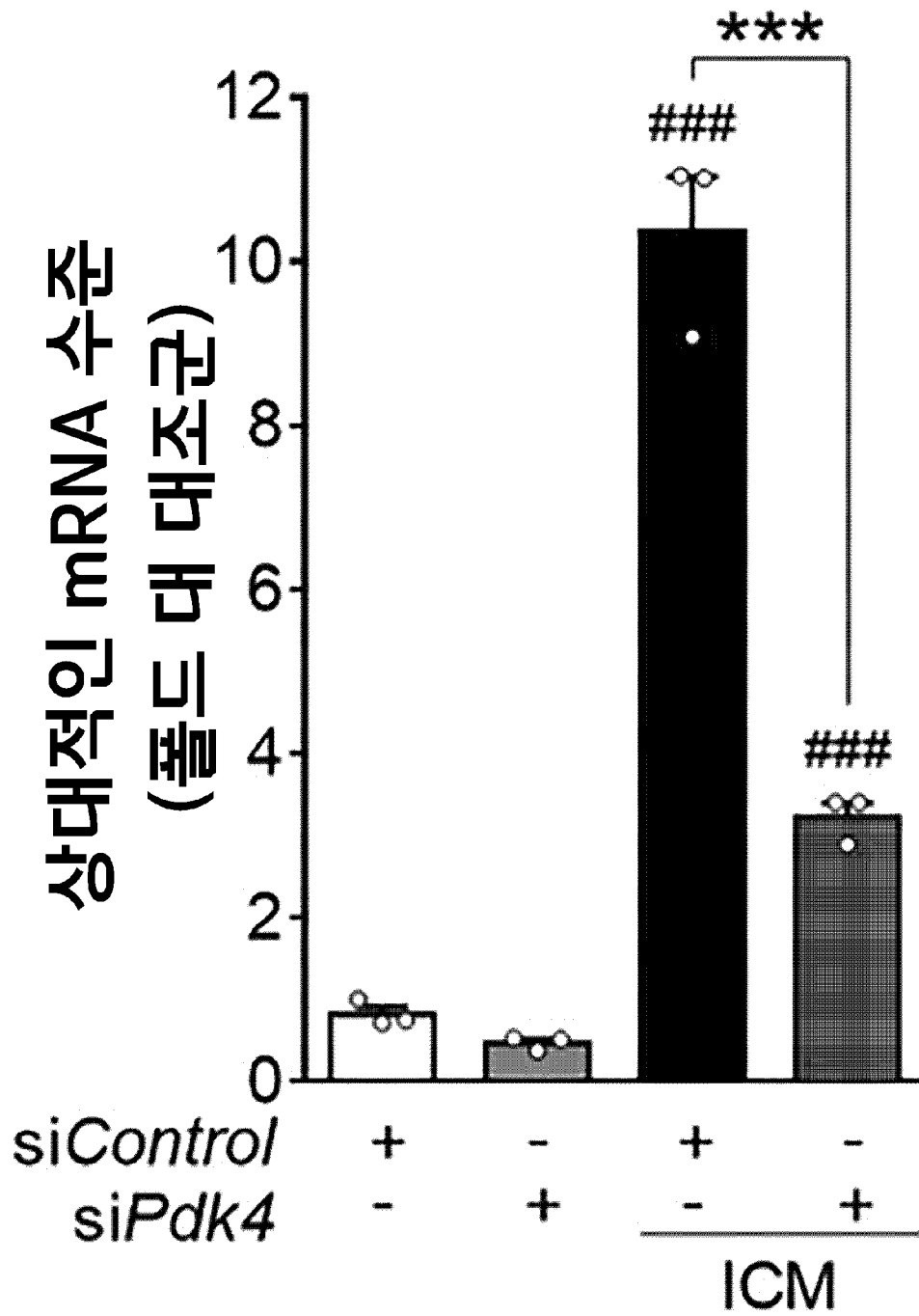


[도8]

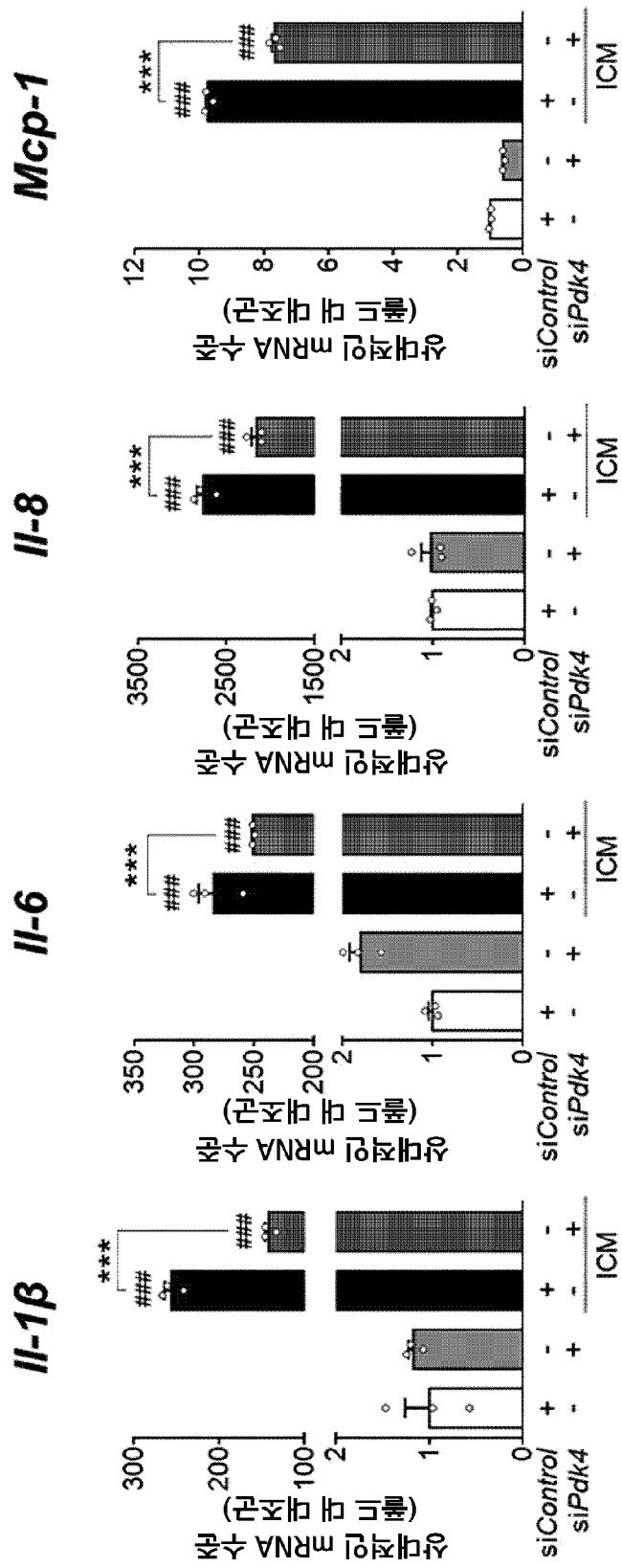


[도9]

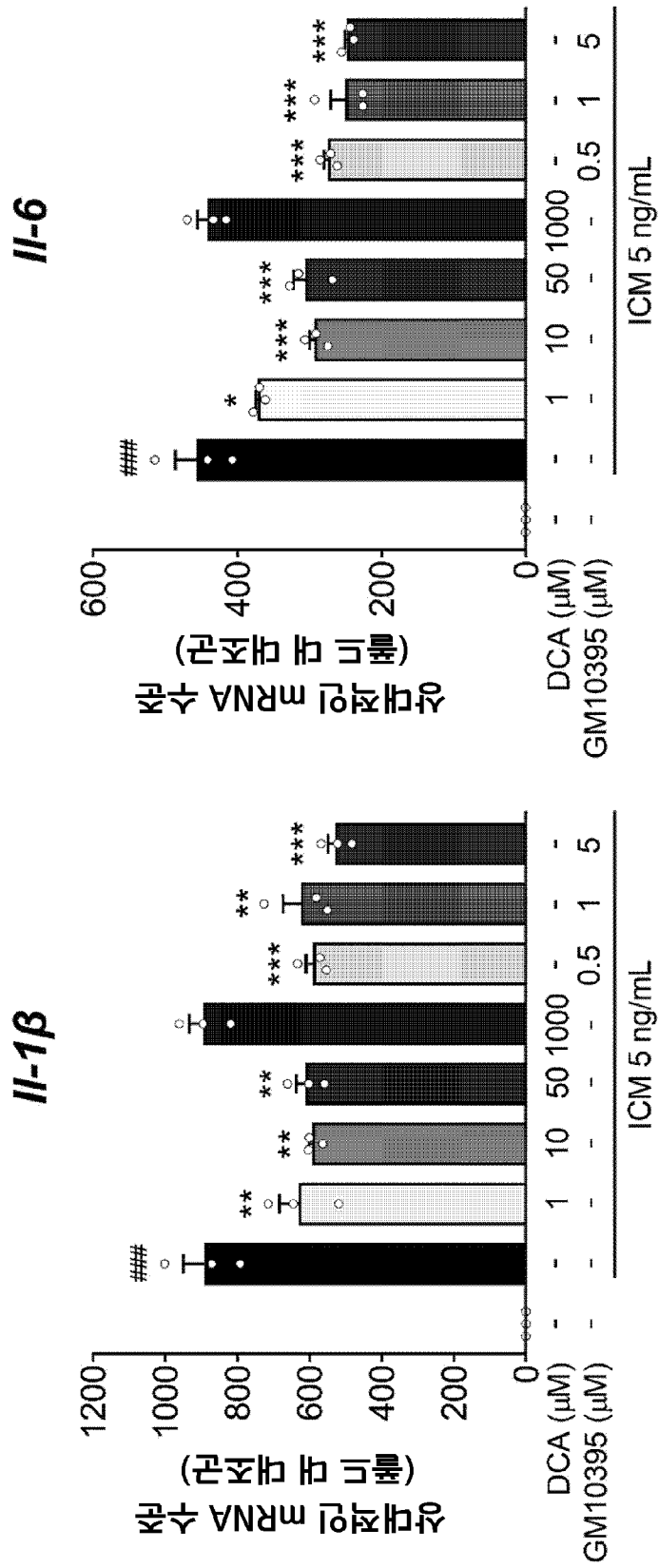
Pdk4



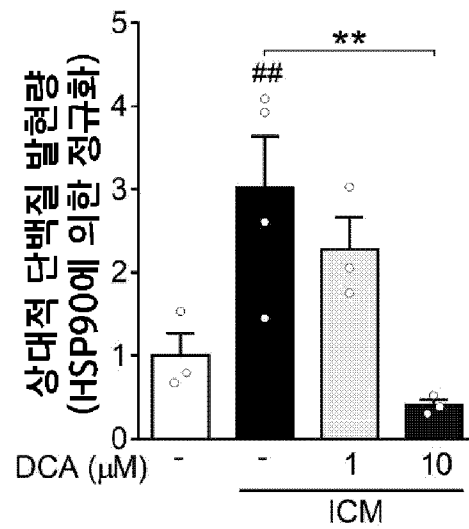
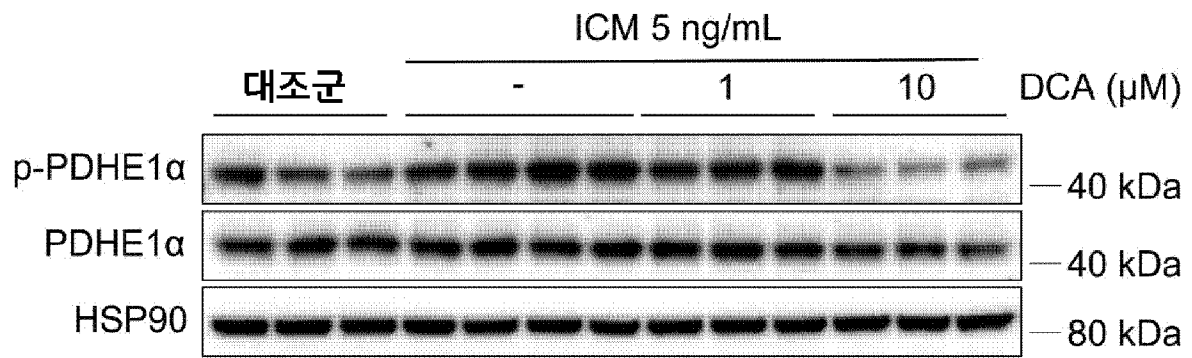
[도10]



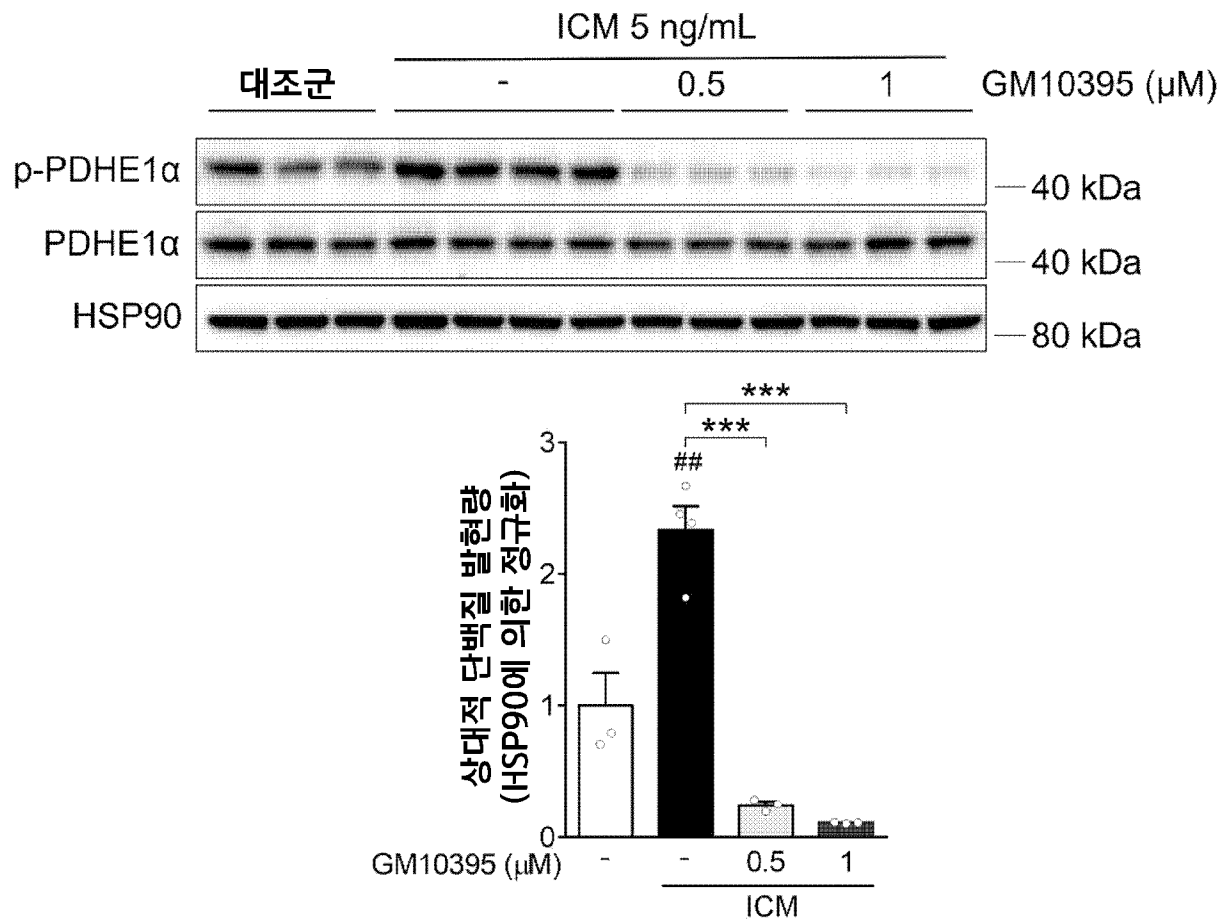
[도 11]



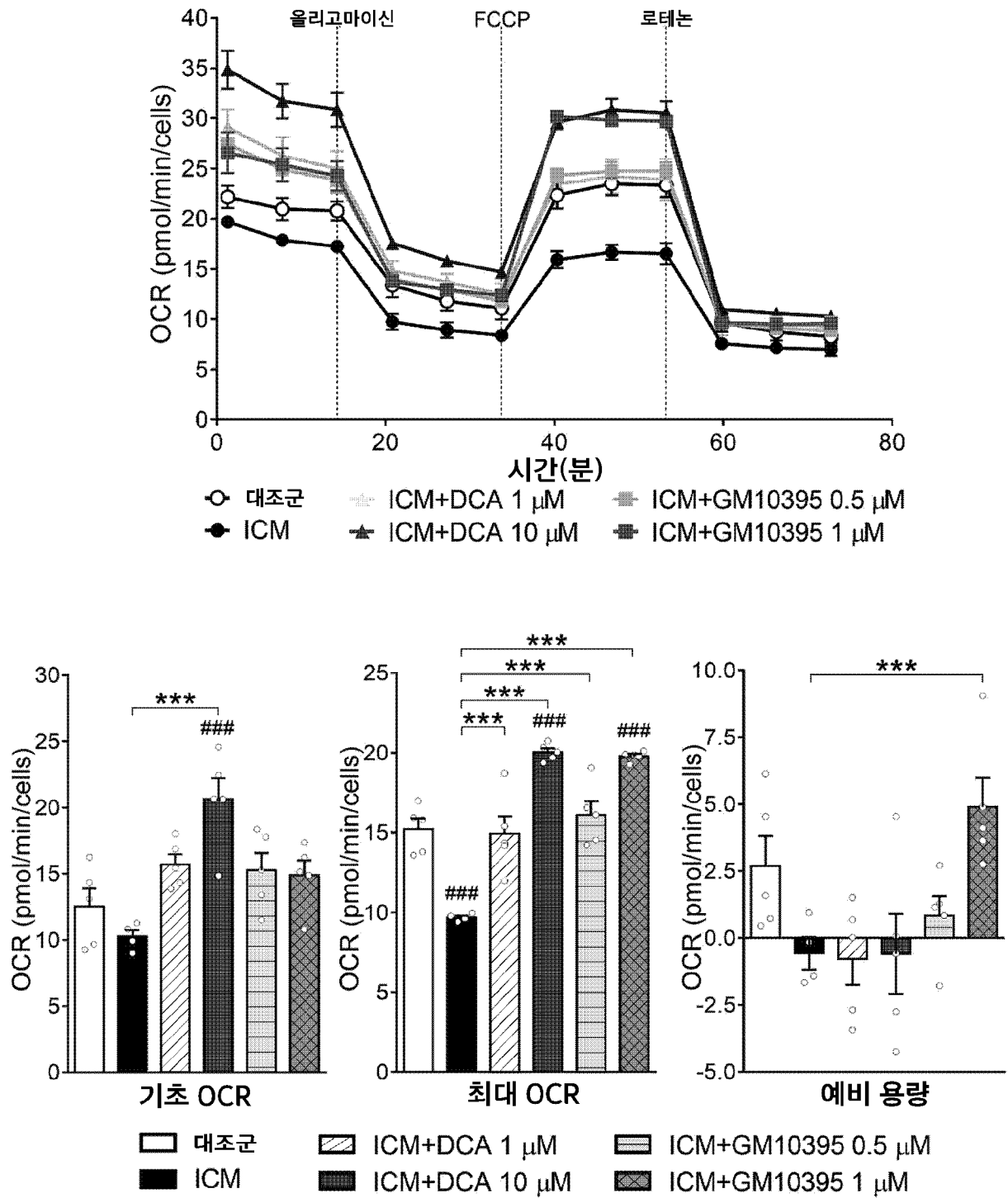
[도12]



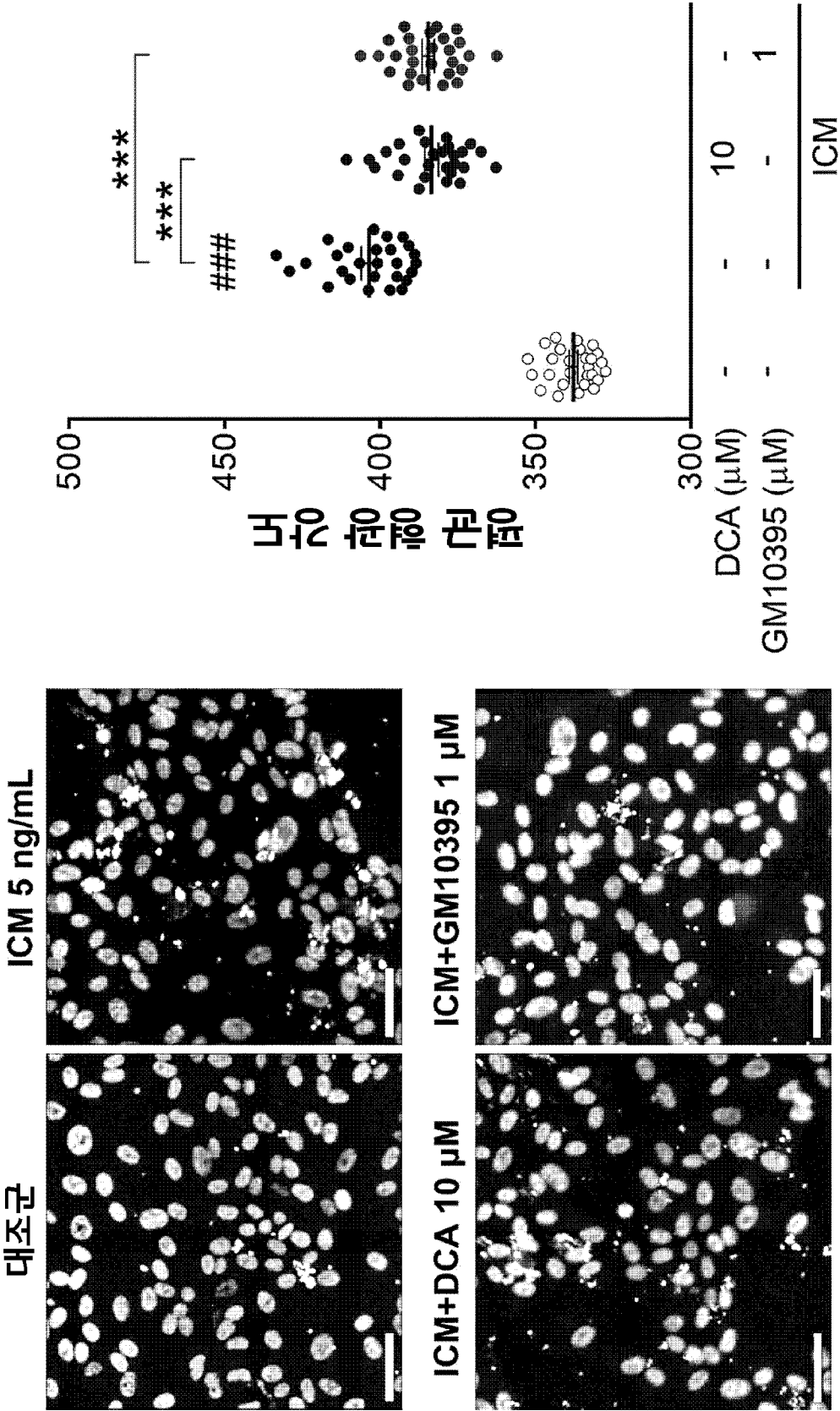
[도13]



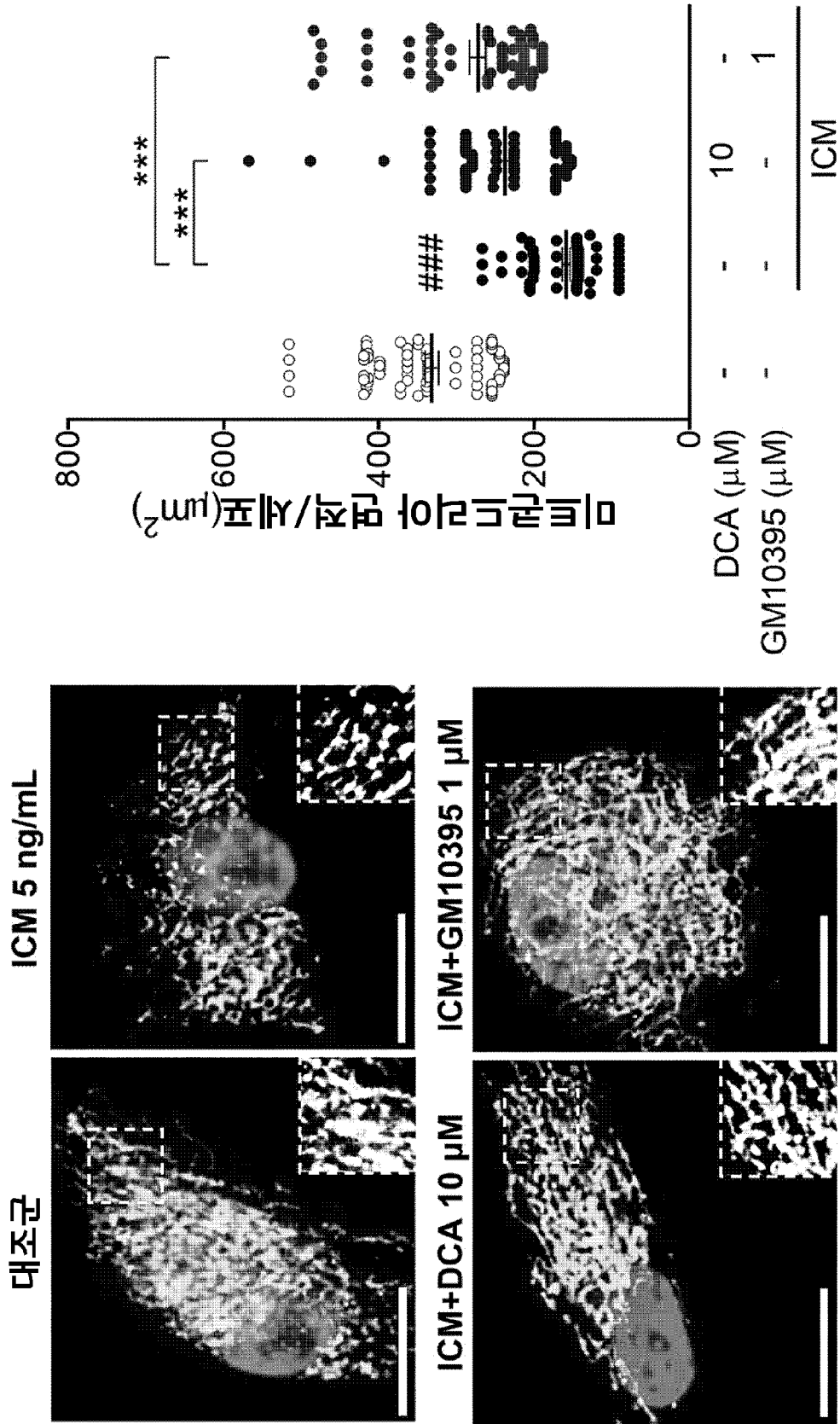
[도14]



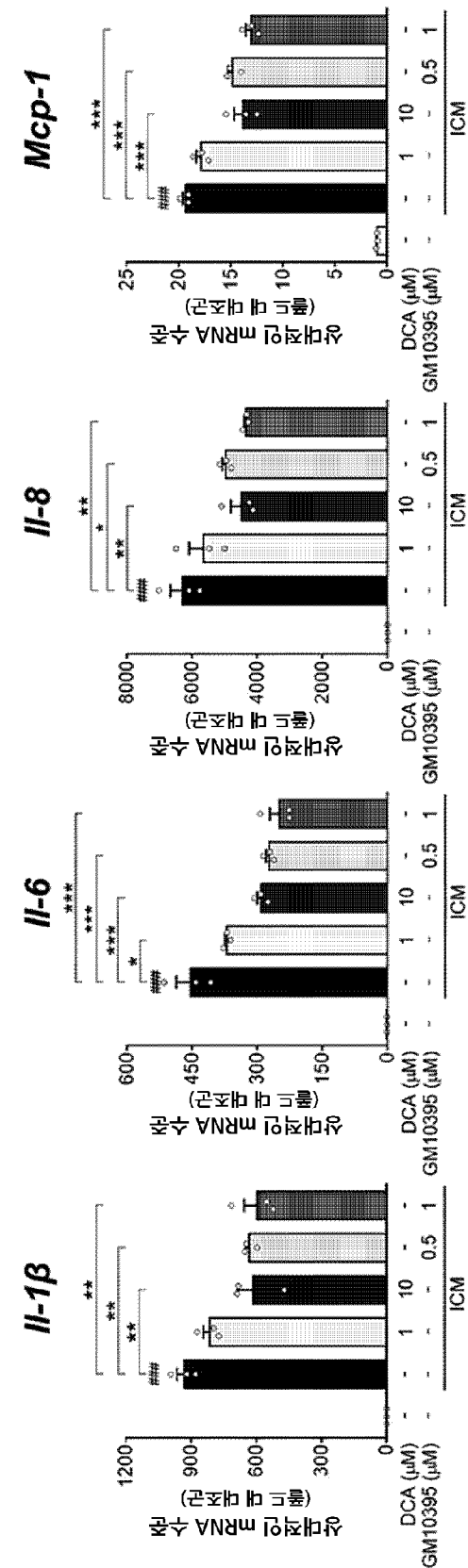
[도15]



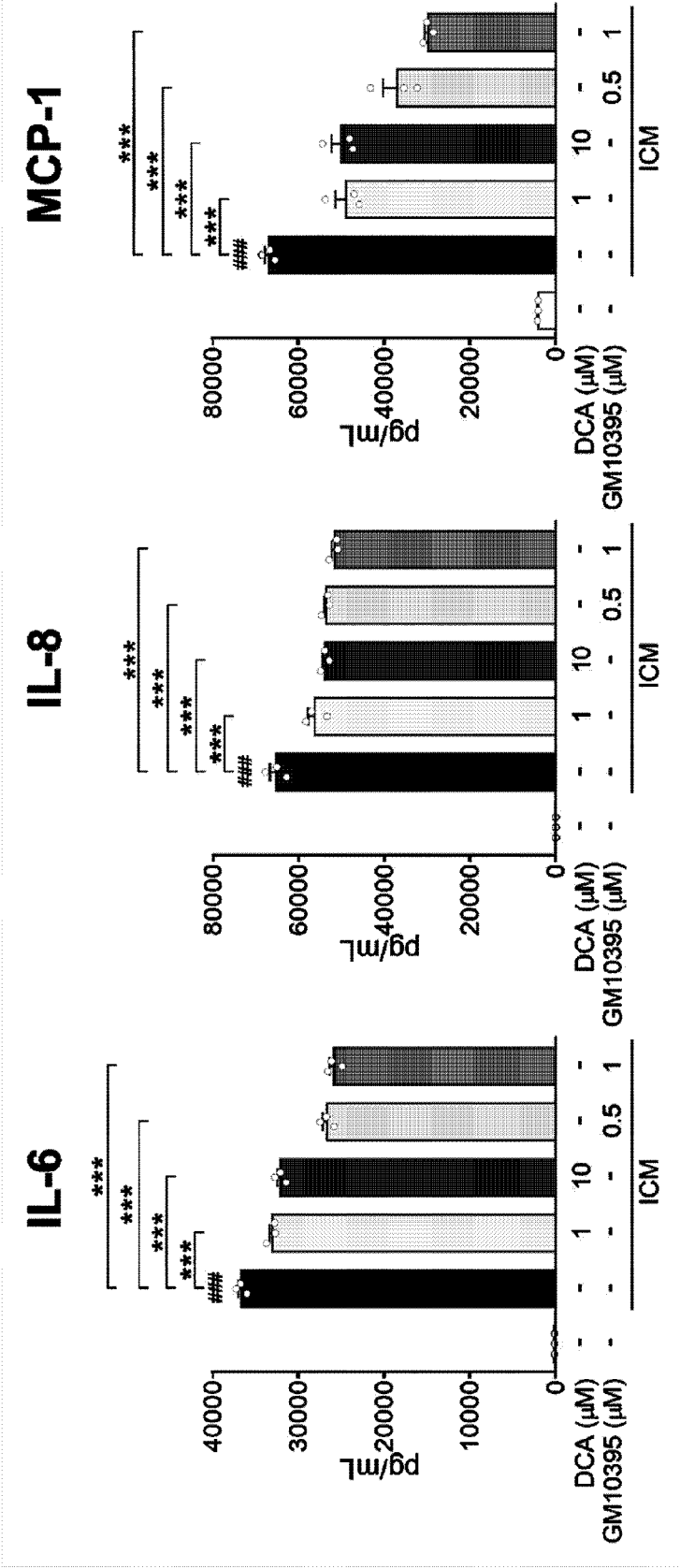
[도16]



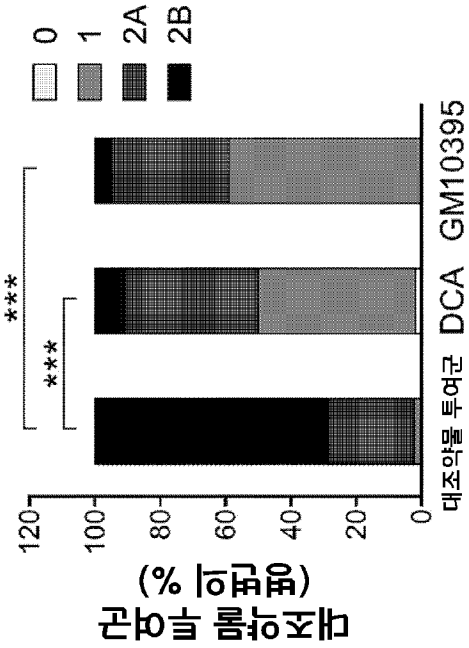
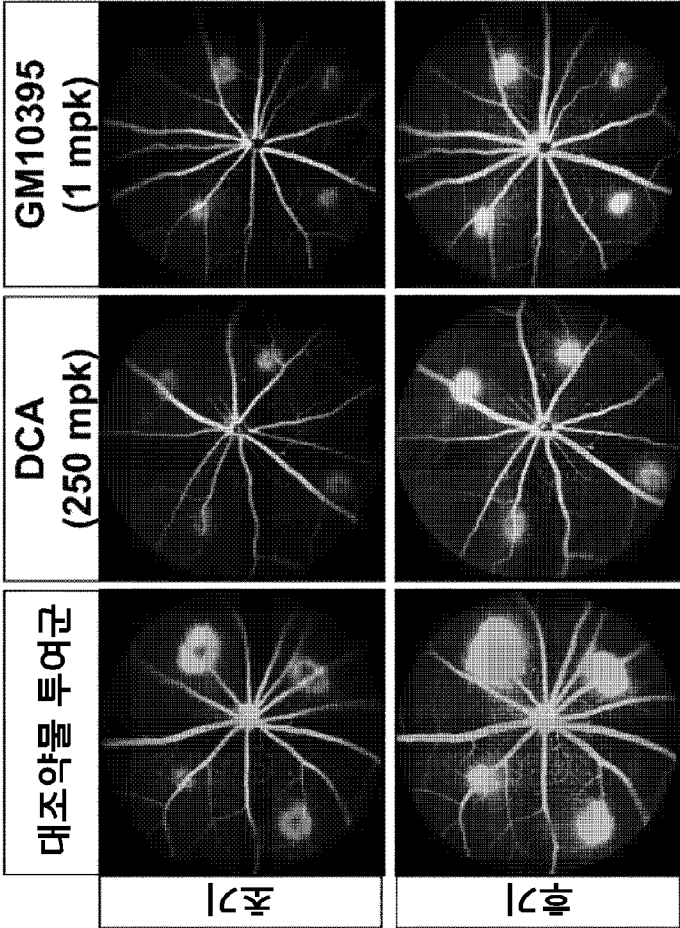
[도17]



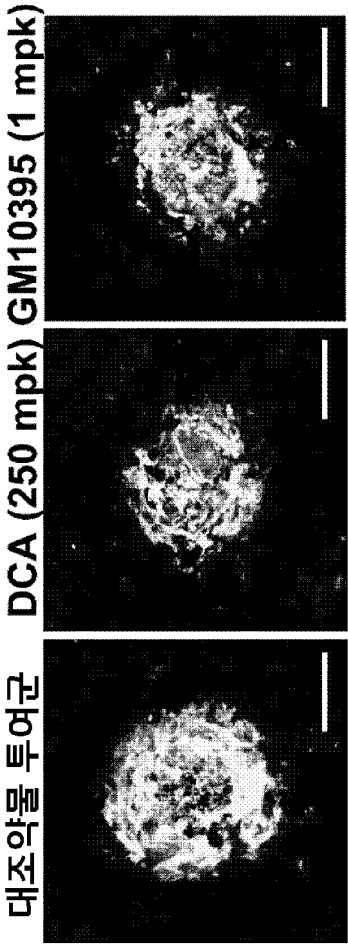
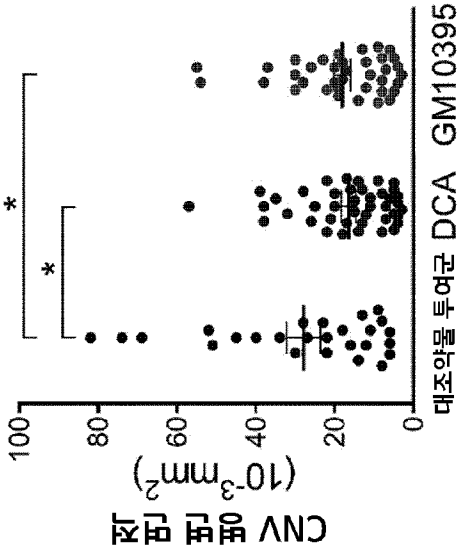
[도18]



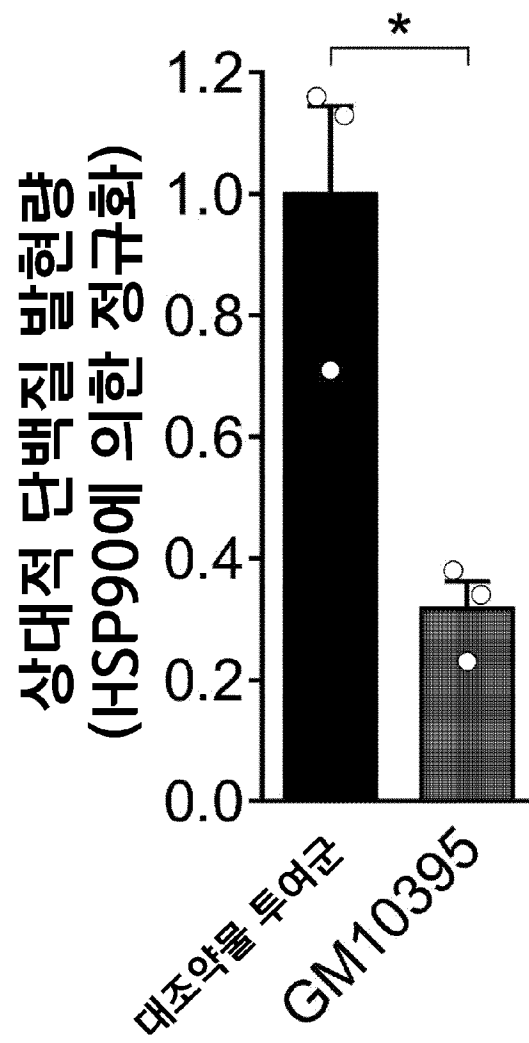
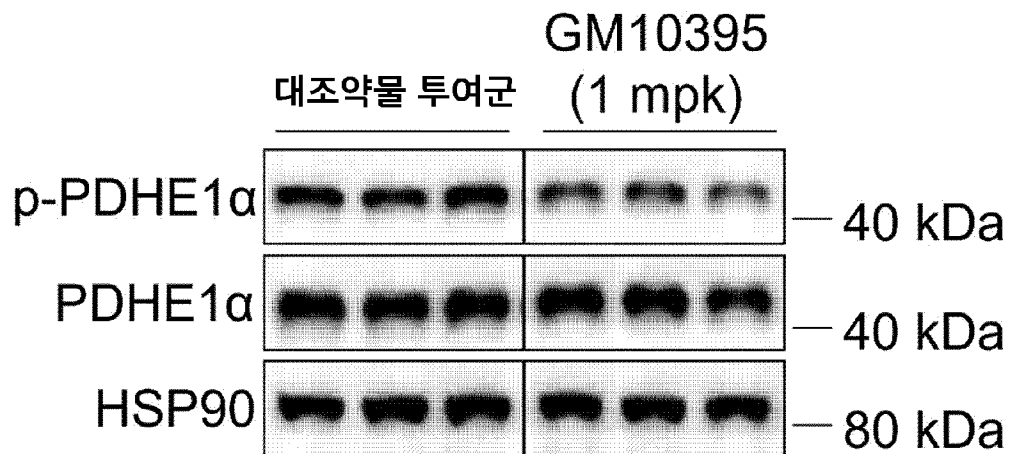
[도 19]



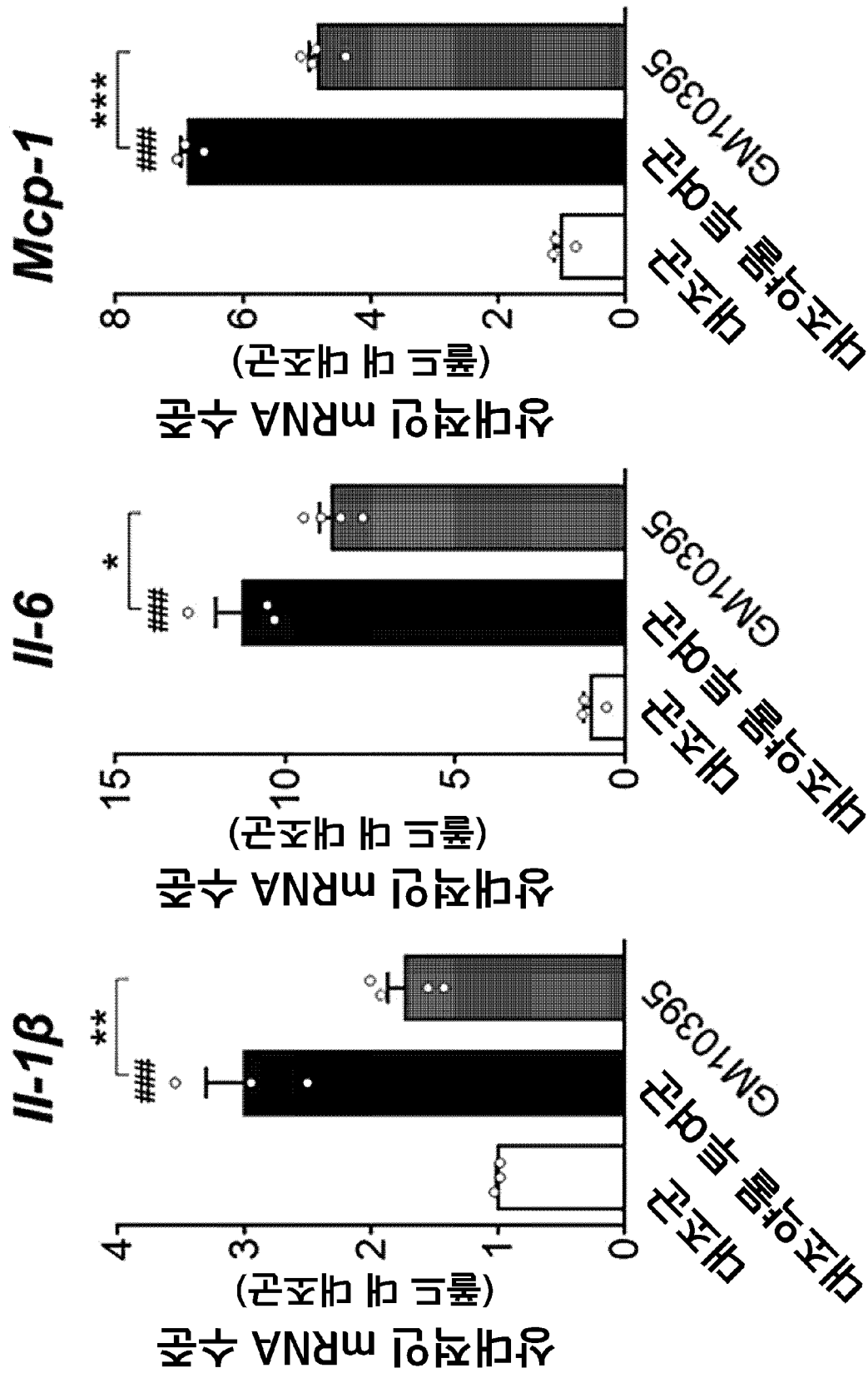
[도20]



[도21]



[도22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**A61K 31/401(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)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 31/401(2006.01); A61K 31/045(2006.01); A61K 31/415(2006.01); A61K 31/4196(2006.01); A61P 27/02(2006.01); C07C 35/52(2006.01); C07D 231/12(2006.01); C07D 249/08(2006.01); C12Q 1/68(2006.01)

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), STN (Registry, Caplus) & keywords: 피루브산 탈수소효소 키나아제(pyruvate dehydrogenase kinase; PDK), 황반변성(macular degeneration), 신생혈관성 안질환(neovascular ocular disease)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	LAMBERT, V. et al. Pyruvate dehydrogenase kinase/lactate axis: A therapeutic target for neovascular age-related macular degeneration identified by metabolomics. Journal of molecular medicine. 2020, vol. 98, pp. 1737-1751. See abstract; and pages 1738 and 1746-1748.	1,2,4-10,12,13 3,11
X	KR 10-1749380 B1 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 21 June 2017 (2017-06-21) See claim 1; and paragraphs [0017], [0049] and [0065].	1,2,4-10,12,13
A	KR 10-1711732 B1 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 02 March 2017 (2017-03-02) See claims 3, 5, 6 and 8.	1-13
A	WO 2010-041748 A1 (JAPAN TOBACCO INC. et al.) 15 April 2010 (2010-04-15) See claims 1-35.	1-13



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

14 October 2024

Date of mailing of the international search report

15 October 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

**Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208**

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009001

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014-142291 A1 (JAPAN TOBACCO INC.) 18 September 2014 (2014-09-18) See claims 1-10.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009001

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/009001

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
KR	10-1749380	B1	21 June 2017	KR 10-2015-0143190	A	23 December 2015
KR	10-1711732	B1	02 March 2017	KR 10-2015-0125596	A	09 November 2015
				WO 2015-167211	A1	05 November 2015
WO	2010-041748	A1	15 April 2010	AR 074797	A1	16 February 2011
				EP 2345629	A1	20 July 2011
				EP 2345629	A4	13 June 2012
				EP 2345629	B1	03 June 2015
				ES 2543094	T3	14 August 2015
				JP 2011-079801	A	21 April 2011
				JP 2014-185159	A	02 October 2014
				JP 2016-053055	A	14 April 2016
				JP 5550880	B2	16 July 2014
				TW 201018663	A	16 May 2010
				US 2010-0240634	A1	23 September 2010
				US 2013-0274240	A1	17 October 2013
				US 2015-0329491	A1	19 November 2015
				US 2019-0177271	A1	13 June 2019
				US 2020-0308109	A1	01 October 2020
				US 8343994	B2	01 January 2013
				US 8871934	B2	28 October 2014
WO	2014-142291	A1	18 September 2014	AR 095346	A1	07 October 2015
				JP 2014-198712	A	23 October 2014
				TW 201506015	A	16 February 2015
				US 2014-0296316	A1	02 October 2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/401(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/401(2006.01); A61K 31/045(2006.01); A61K 31/415(2006.01); A61K 31/4196(2006.01); A61P 27/02(2006.01); C07C 35/52(2006.01); C07D 231/12(2006.01); C07D 249/08(2006.01); C12Q 1/68(2006.01)

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), STN(Registry, Caplus) & 키워드: 피루브산 탈수소효소 키나아제(pyruvate dehydrogenase kinase; PDK), 황반변성(macular degeneration), 신생혈관성 안질환(neovascular ocular disease)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	LAMBERT, V. 등, "Pyruvate dehydrogenase kinase/lactate axis: A therapeutic target for neovascular age-related macular degeneration identified by metabolomics", Journal of molecular medicine, 2020, 제 98권, 페이지 1737-1751 초록; 페이지 1738, 1746-1748	1,2,4-10,12,13 3,11
X	KR 10-1749380 B1 (경북대학교 산학협력단) 2017.06.21 청구항 1; 단락 [0017], [0049], [0065]	1,2,4-10,12,13
A	KR 10-1711732 B1 (경북대학교 산학협력단 등) 2017.03.02 청구항 3, 5, 6, 8	1-13
A	WO 2010-041748 A1 (JAPAN TOBACCO INC. 등) 2010.04.15 청구항 1-35	1-13
A	WO 2014-142291 A1 (JAPAN TOBACCO INC.) 2014.09.18 청구항 1-10	1-13

☐ 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 이후에 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

2024년10월14일(14.10.2024)

국제조사보고서 발송일

2024년10월15일(15.10.2024)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1749380 B1	2017/06/21	KR 10-2015-0143190 A	2015/12/23
KR 10-1711732 B1	2017/03/02	KR 10-2015-0125596 A	2015/11/09
		WO 2015-167211 A1	2015/11/05
WO 2010-041748 A1	2010/04/15	AR 074797 A1	2011/02/16
		EP 2345629 A1	2011/07/20
		EP 2345629 A4	2012/06/13
		EP 2345629 B1	2015/06/03
		ES 2543094 T3	2015/08/14
		JP 2011-079801 A	2011/04/21
		JP 2014-185159 A	2014/10/02
		JP 2016-053055 A	2016/04/14
		JP 5550880 B2	2014/07/16
		TW 201018663 A	2010/05/16
		US 2010-0240634 A1	2010/09/23
		US 2013-0274240 A1	2013/10/17
		US 2015-0329491 A1	2015/11/19
		US 2019-0177271 A1	2019/06/13
		US 2020-0308109 A1	2020/10/01
		US 8343994 B2	2013/01/01
		US 8871934 B2	2014/10/28
WO 2014-142291 A1	2014/09/18	AR 095346 A1	2015/10/07
		JP 2014-198712 A	2014/10/23
		TW 201506015 A	2015/02/16
		US 2014-0296316 A1	2014/10/02