



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0107394
(43) 공개일자 2021년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7056 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) C11D 3/00 (2006.01)
C11D 3/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7056 (2013.01)
A61K 9/0048 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0022341
(22) 출원일자 2020년02월24일
심사청구일자 2020년02월24일

(71) 출원인
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
김선웅
서울특별시 강남구 삼성로51길 37 래미안대치팰리스 109동 2303호
셀리캠 아블라 뉴웜맥배
강원도 원주시 동진골2길 41, 101호
(74) 대리인
구현서

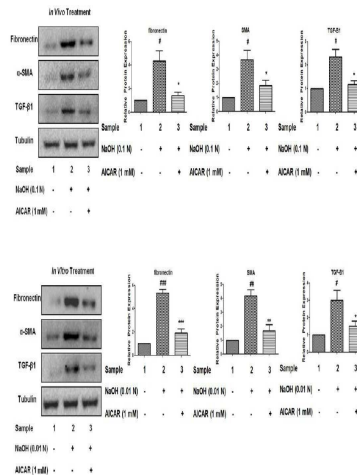
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β-D-리보푸라노사이드를 유효성분으로 함유하는 각막 손상 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β-D-리보푸라노사이드 (AICAR)를 유효성분으로 포함하는 각막 손상의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, AICAR에 의한 AMPK 활성화는 생체 내 및 시험 관내에서 TGF-β1 및 ECM 단백질 발현을 유의하게 억제 하였으며, AICAR의 항 섬유화 효과는 AMPK 억제제, 컴파운드 C의 처리로 상쇄되는 것으로 볼 때 AMPK 의존적이어서, AICAR에 의한 AMPK 활성화는 각막 섬유 아세포에서 알칼리 손상 후 발생하는 근섬유아세포 분화 및 ECM 합성을 억제한다는 것을 알 수 있어서 각막 손상 후의 섬유화 억제 용도로 AICAR의 사용 가능성을 시사한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 27/02 (2018.01)

C11D 3/0078 (2021.01)

C11D 3/28 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019-51-0079
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인기초연구지원사업
연구과제명	각막화상 치료를 위한 항섬유화 치료법 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교(원주의대)
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)를 유효성분으로 포함하는 각막 손상의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 각막 손상은 화학물질, 열손상 또는 방사선에 의한 것임을 특징으로 하는 각막 손상의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 화학물질은 알카리인 것을 특징으로 하는 각막 손상의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 각막 손상은 스티븐슨-존슨 증후군, 쇼그렌 증후군, 안구건조 증후군, 외상, 안구 수술에 의한 안구 외상, 포도막염(감염성 또는 비감염성), 각막 이식수술 후 면역거부반응 또는 하드 콘택츠 렌즈 착용으로 유발되는 외인성질환에 의한 각결막 상피 장애에 의한 것임을 특징으로 하는 각막 손상의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)를 유효성분으로 함유하는 각막 손상의 예방 또는 치료용 점안제 조성물.

청구항 6

5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)를 유효성분으로 함유하는 콘택트 렌즈의 세정 또는 보존용 조성물.

청구항 7

5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)를 유효성분으로 함유하는 망막변성 및 망막부종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)를 유효성분으로 함유하는 각막 섬유화 억제용 조성물.

청구항 9

5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)를 각막 손상 후의 각막 섬유아세포에 처리하여 각막 섬유아세포에서 각막 손상 후 발생하는 근섬유아세포 분화 및 ECM 합성을 억제하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β-D-리보푸라노사이드를 유효성분으로 함유하는 각막 손상 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 안구 표면은 결막 상피세포와 각막 상피세포로 구성된 특수한 신체표면으로, 이들 세포들은 주눈물샘과 뺨눈물샘으로부터 분비되는 눈물과 함께 건강한 안구 표면을 구성하고, 이러한 건강한 안구 표면은 안구의 최적 기능을 위해 필수적이다.
- [0003] 이 중 각막은 앞쪽 안구 표면의 1/6 부분을 차지하고 있는 투명하고 혈관이 없는 조직으로, 눈을 외부로부터 보호할 뿐만 아니라, 빛의 굴절과 전달에 주요한 기능을 하며 신경이 발달되어 있다. 각막은 각막상피, 보우만막, 각막실질, 데스메막, 각막내피와 같은 5개의 층으로 구성되어 있는데, 각막상피세포는 전체 각막의 두께의 약 10%를 차지하며 결막의 상피와 이어져 있으며, 5~7층의 세포로 이루어져 있는데, 가장 아래층의 바닥세포가 증식하여 바깥쪽으로 밀려와 7~14일 후 탈락한다.
- [0004] 각막의 여러 특징 중 하나인 무혈관 구조는 시력보존을 위하여 항상 투명성을 유지해야 한다. 그러나 각막은 중심부 두께가 0.5mm 정도인 얇은 조직으로 심한 충격에 쉽게 파열될 수 있다.
- [0005] 특히 안구의 각막 조직이 손상되는 증상인 각막 손상의 경우, 다양한 원인 중 각막 화상이 가장 잘 알려져 있다. 각막 화상은 전체 안 외상의 약 11 내지 21%를 차지하고 화학물질, 열손상, 방사선 노출 등 다양한 원인에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으나, 대개 산업현장에서의 근무 도중 예측하지 못한 상황에서 안구표면에 화상을 입는 경우가 대부분이다.
- [0006] 이 경우 각막이 그 자체를 맑게 유지하는 능력에 장애가 생겨 투명성을 잃고 하얗게 변할 수 있다. 이뿐만 아니라 각막 화상은 광범위한 조직 손상과 시력의 저하를 일으켜 심각한 삶의 질의 저하를 가져오게 된다. 또한, 각막 화상 초기에 염증을 조절하는 것이 필수적이더라도 후기에 생기는 각막의 혼탁과 신생 혈관은 궤양 및 간질 부종의 유발뿐만 아니라 차후 시력을 감소시키고 면역세포 순환을 유도하여 각막의 면역 회피 및 각막 이식술 이후 이식 생존율을 감소시키기도 하며 심한경우 영구적인 시력저하까지 이어질 수도 있다.
- [0007] 각막 화상의 실질적인 치료 과정에 있어서 가장 문제가 되는 것이 각막 화상에 의해 유발된 각막의 손상에 이은 염증반응이다. 각막 손상에 의해 유도된 염증은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 염증성 캐스케이드(cascade)반응을 증가시켜 각막 상피의 회복을 방해하여 통증을 지속시키고, 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 염기성 섬유모세포 성장인자(basic fibroblast growth factor: bFGF), 매트릭스 메탈로 단백질효소(matrix metalloproteinases; MMPs)의 합성을 유도함으로써 각막 조직 내 콜라겐 구조에 이상을 주며 신생 혈관의 생성을 유발하여 각막의 깊은 혼탁을 유발한다.
- [0008] 따라서 상기 기술한 바와 같이 각막 손상 및 이에 따른 염증반응으로 인한 시력 손실은 전 세계적으로 문제가 되고 있는 대표적인 질환으로, 각막 손상 질환에 대하여 효과적이고 안전한 치료제 개발의 필요성이 요구된다.
- [0009] AMPK는 세포 에너지 항상성(homeostasis)의 센서 및 조절인자로서 잘 알려져 있다(Hardie, D G and Hawley, S A, "AMP- activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited", Bioassays, 23, 1112, (2001), Kemp, B E et al, "AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator", Biochem Soc Transactions, 31, 162 (2003)).
- [0010] AMP 수준 상승으로 인한 이러한 키나아제의 알로스테릭 활성화(allosteric activation)는 세포 에너지 고갈 상태에서 일어난다. 얻어지는 표적 효소의 세린/트레오닌 포스포릴화를 통해, 세포 물질대사는 저 에너지 상태로 적합화된(adaptation). AMPK 활성화 유도된 변화의 최종 효과(net effect)는 ATP 소모 과정(process)의 저해 및 ATP 생성 경로의 활성화, 그리고 따라서 ATP 저장소의 재생이다. AMPK 기질의 예에는 아세틸-CoA-카르복실라아제(ACC) 및 HMG-CoA-리덕타아제가 포함된다(Carling D et al., "A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis", FEBS Letters, 223, 217 (1987)) ACC의 포스포릴화 그리고 이에 따른 저해를 통해, 지방산 합성이 감소되고(ATP-소비) 그리고 동시에 지방산 산화가 증가된다(ATP-생성) HMG-CoA 리덕타아제의 포스포릴화 및 얻어지는 저해를 통해 콜레스테롤 합성이 감소된다. AMPK의 다른 기질에는 호르몬 민감성(sensitive) 리파아제(Garton, A J et al, "Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase A possible antilipolytic mechanism", Eur J Biochem, 179, 249, (1989)), 글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라아제(Muoio D M et al., "AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle:evidence that sn-glycerol-3- phosphate acyltransferase is a novel target", Biochem J, 338, 783, (1999)), 말로닐-CoA 디카르복실라아제(malonyl-CoA decarboxylase)(Saha A K et al, "Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase

activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside", J Biol. Chem, 275, 24279, (2000)), 및 간세포 핵 인자-4 α (Leclerc I et al, "Hepatocyte nuclear factor-4 α involved in type-1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase", Diabetes, 50, 1515, (2001))가 포함되며, 이 중 일부는 대사 증후군의 구성요소에 대한 잠재적인 약물 표적이다. AMPK 활성화를 통해 조절되는 것으로 생각되지만, 정확한 AMPK 기질은 확인되지 않은 부가적인 과정에는, 골격근에서의 글루코오스 수송 자극 및 지방산에서의 중요 유전자(key gene)의 발현 조절 및 간에서의 글루코오스 대사가 포함된다(Hardie D G and Hawley S A, "AMP- activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited", Bioassays, 23, 1112, (2001), Kemp B E et al, "AMP-activated protein kinase, supermetabolic regulator", Biochem Soc Transactions, 31, 162, (2003), Musi N and Goodyear L J, "Targeting the AMP-activated protein kinase for the treatment of type 2 diabetes", Current Drug Targets-Immune, Endocrine and Metabolic Disorders, 2, 119, (2002)) AMPK 자극을 따라, 예를 들어, 글루코오스-6-포스포타아제(Lochhead P A et al, "5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase", Diabetes, 49, 896, (2000)), 간 글루코오스 생산에서의 중요한 효소, 및 SREBP-1c(Zhou G et al, "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action", The J of Clin Invest, 108, 1167, (2001)), 중요한 지방생성 전사 인자(key lipogenic transcription factor)의 발현이 감소되는 것으로 밝혀졌다.

[0011] 보다 최근에는, 세포뿐 아니라 전신 에너지 대사의 조절에 AMPK가 관여하는 것이 명백해졌다. 지방세포(adipocyte)-유도 호르몬 렙틴이 AMPK를 자극하고 그리고 이에 따라 골격근에서 지방산 산화를 증가시키는 것으로 나타났다(Minokoshi Y et al., "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase", Nature, 415, 339, (2002)) 아디포넥틴(adiponectin), 탄수화물 및 지질 대사를 개선시키는 다른 지방세포 유래 호르몬이 간 및 골격근에서 AMPK를 자극하는 것으로 증명되었다(Yamauchi T et al, "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase", Nature Medicine, 8, 1288, (2002), Tomas E et al, "Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: Acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP- activated protein kinase activation", PNAS, 99, 16309, (2002)) 이러한 환경에서의 AMPK의 활성화는 세포 AMP 수준 증가와는 무관하고, 오히려 하나 이상의, 앞으로 상류 키나아제(upstream kinase)로서 확인되는 것에 의한 포스포릴화에 기인하는 것으로 보인다.

[0012] 상기된 AMPK 활성화의 결과에 대한 지식에 기초하여, AMPK의 생체 내 활성화로부터 매우 유리한 효과가 기대된다. 간에서, 글루코신생합성 효소(gluconeogenic enzyme)의 발현 감소로, 간 글루코오스 생산량이 감소되고 전체 글루코오스 항상성이 개선되며, 그리고 지질 대사의 중요 효소의 직접 저해 및/또는 발현 감소로, 지방산 및 콜레스테롤 합성이 감소하고 지방산 산화가 증가될 것이다. 골격근에서의 AMPK 자극으로, 글루코오스 흡수 및 지방산 산화가 증가되고, 근세포-내(intra-myocyte) 트리글리세라이드 축적 감소 및 인슐린 작용의 증진으로, 결과적으로 글루코오스 항상성이 개선될 것이다. 마지막으로, 에너지 소비 증가로, 체중이 감소될 것이다. 대사 증후군에서의 이러한 효과의 조합으로, 심혈관 질환 발생의 위험이 크게 감소될 것으로 기대될 것이다.

[0013] 설치류에서의 일부 연구는 이러한 가설을 지지한다(Bergeron R et al, "Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1(β)-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose metabolism in lean and obese Zucker rats", Diabetes, 50, 1076, (2001), Song S M et al, "5-Aminoimidazole- 4- dicarboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin-resistant diabeted (ob/ob) mice", Diabetologia, 45, 56, (2002), Halseth A E et al, "Acute and chronic treatment of ob/ob and db/db mice with AICAR decreases blood glucose concentrations", Biochem and Biophys Res Comm, 294, 798, (2002), Buhl E S et al., "Long-term AICAR administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in rats displaying feature of the insulin resistance syndrome", Diabetes, 51, 2199, (2002)) 최근까지 대부분의 생체 내 연구는 AMPK 활성인자 AICAR, ZMP의 세포 투과성 전구체에 의존하였다.

[0014] ZMP는 세포내 AMP 유사체(mimic)로서 작용하고, 그리고 고도의 충분한 수준으로 축적되는 경우, AMPK 활성을 자극할 수 있다(Corton J M et al, "5-Aminoimidazole-4- carboxamide ribonucleoside, a specific method for activating AMP- activated protein kinase in intact cells?", Eur J Biochem., 229, 558, (1995))

[0015] 그러나, ZMP는 또한 다른 효소의 조절에서 AMP 유사체로서 작용하고, 그리고 이에 따라 특이적인 AMPK 활성인자가 아니다(Musi N and Goodyear L J, "Targeting the AMP-activated protein kinase for the treatment of type 2 diabetes", Current Drug Targets- Immune, Endocrine and Metabolic Disorders, 2, 119 (2002)) 일부

생체 내 연구를 통해, 비만 및 2형 당뇨병 설치류 모델에서 단기(acute) 및 장기(chronic) AICAR 투여 모두의 유리한 효과가 증명되었다 (Bergeron R et al., "Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1 β -D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose metabolism in lean and obese Zucker rats", Diabetes, 50, 1076, (2001), Song S M et al., "5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin-resistant diabetic (ob/ob) mice", Diabetologia, 45, 56, (2002), Halseth A E et al., "Acute and chronic treatment of ob/ob and db/db mice with AICAR decreases blood glucose concentrations", Biochem and Biophys Res Comm, 294, 798, (2002), Buhl E S et al., "Long-term AICAR administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in rats displaying feature of the insulin resistance syndrome", Diabetes, 51, 2199, (2002)) 예를 들어, 비만 Zucker (fa/fa) 래트에 7주 AICAR 투여하면, 혈장 트리글리세라이드 및 유리 지방산이 감소하고, HDL 콜레스테롤이 증가하고, 그리고 경구 글루코오스 부하 시험(oral glucose tolerance test)으로 평가되는 바와 같이 글루코오스 대사가 정상화된다(Minokoshi Y et al., "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase", Nature, 415, 339, (2002)) ob/ob 및 db/db 마우스 모두에서, 8일 AICAR 투여로 혈당이 35% 까지 감소한다(Halseth A E et al., "Acute and chronic treatment of ob/ob and db/db mice with AICAR decreases blood glucose concentrations", Biochem and Biophys Res Comm, 294, 798, (2002)) AICAR에 추가로, 보다 최근에는, 메트포르민의 항당뇨 작용이 이 활성화에 어느 정도까지 의존하는지가 결정되어야 한다고 할지라도, 당뇨병 약물 메트포르민이 고농도에서 AMPK를 생체 내 활성화할 수 있는 것으로 밝혀졌다(Zhou G et al., "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action", The J of Clin Invest, 108, 1167, (2001), Musi N et al., "Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes", Diabetes, 51, 2074, (2002)) 렙틴 및 아디포넥틴의 경우에서와 같이, 메트포르민의 자극 효과(stimulatory effect)는 상류 키나아제의 활성화를 통해 간접적이다 (Zhou G et al., "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action", The J of Clin Invest, 108, 1167, (2001)) 약리학적 개입(pharmacologic intervention)에 추가하여, 몇가지 유전자전환 마우스(transgenic mouse) 모델이 지난 수년간 개발되었고, 그리고 초반의 결과는 이용가능하게 되었다. 유전자전환 마우스의 골격근에서 우성(dominant) 음성 AMPK의 발현으로, 글루코오스 수송자극에 미치는 AICAR 효과는 AMPK 활성화에 좌우되고(Mu J et al., "A role for AMP-activated protein kinase in contraction and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle", Molecular Cell, 7, 1085, (2001)), 그리고 따라서 아마도 비-특이적 ZMP 효과에 기인하는 않는 것으로 증명되었다. 다른 조직에서의 유사한 연구가 AMPK 활성화의 결과를 더욱 명확히 하도록 돕는다. AMPK의 약리학적 활성화는 글루코오스 및 지질 대사를 개선하고 체중을 감소시키면서 대사 증후군에서 유익할 것으로 기대된다. 환자를 대사 증후군으로 진단하기(qualify) 위해서는, 다섯 가지 다음 기준 중 세 가지가 충족되어야 한다: 130/85 mmHg보다 높은 상승혈압, 110 mg/dl보다 높은 절식 혈당(fasting blood glucose), 허리 둘레 40"(남성) 또는 35"(여성)를 넘는 복부 비만, 및 150 mg/dl를 초과하는 트리글리세라이드 증가 또는 40 mg/dl(남성) 또는 50 mg/dl(여성) 미만의 HDL 콜레스테롤 감소에 의해 정의되는 바와 같은 혈액 지질 변화. 따라서, 대사 증후군으로 진단된 환자에서 AMPK 활성화를 통해 달성될 수 있는 조합된 효과로, 이러한 타겟의 이익이 상승될 것이다.

[0016] AMPK의 자극은 골격근에서 커플링되지 않은(uncoupling) 단백질 3(UCP3)의 발현을 자극하는 것으로 나타났으며 (Zhou M et al., "UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase", Am J Physiol Endocrinol Metab, 279, E622, (2000)) 그리고 따라서 반응성산소 종으로부터의 손상을 방지할 방법이 될 수 있다. 내피 NO 신타아제(Endothelial NO synthase)(eNOS)는 AMPK 매개 포스포릴화를 통해 활성화되는 것으로 나타났으며(Chen Z-P, et al., "AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase", FEBS Letters, 443, 285, (1999)), 따라서 AMPK 활성화가 국부 순환계를 개선하기 위해 사용될 수 있다.

[0018] [선행 특허 문헌]

[0019] 대한민국 특허공개번호 제10-2008-0034491호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 각막 손상 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드(AICAR)를 유효성분으로 포함하는 각막 손상의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 각막 손상은 화학물질, 열손상 또는 방사선에 의한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하며, 상기 화학물질은 알칼리인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0024] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 각막 손상은 스티븐슨-존슨 증후군, 쇼그렌 증후군, 안구건조 증후군, 외상, 안구 수술에 의한 안구 외상, 포도막염(감염성 또는 비감염성), 각막 이식수술 후 면역 거부반응 또는 하드 콘택츠 렌즈 착용으로 유발되는 외인성질환에 의한 각결막 상피 장애에 의한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0025] 따라서, 본 발명의 5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드(이하, 'AICAR'라 함)을 유효성분으로 함유하는 조성물은 각막 손상의 치료용 조성물, 각막 손상의 치료용 점안제 조성물, 콘택트렌즈의 세정 또는 보존용 조성물, 인공수정체 보존용 조성물 또는 녹내장, 시신경 질환, 황반변성, 망막변성 및 망막부종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 질환의 치료용 약학적 조성물을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 AICAR뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매 화물, 수화물, 라세이체 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.

[0027] 본 발명은 상기 AICAR 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸이도에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 숙시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0028] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 상기 AICAR 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동량의 상기 화합물, 및 산수용액 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0029] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조 시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0030] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0031] 경구 투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는

하나 이상의 본 발명의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0032] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다.

[0033] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 81, 카카오지, 타우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0035] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.01 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.05 mg 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.

[0037] 또 본 발명은 5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)를 유효성분으로 함유하는 각막 손상의 예방 또는 치료용 점안제 조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명의 AICAR 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 점안제로 제형화할 수 있다. 점안제 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보존제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0039] 통상 점안제 조성물에는 히알루론산 및 카르복시메틸셀룰로오스와 같은 음이온성 중합체나 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염이 점안액에서 보습작용과 윤활작용을 하는 것으로 알려져 왔으며, 이들 성분 외에 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체로는 등장화제, 완충제, 안정제, pH 조절제 및 용제 등을 들 수 있다. 등장화제는 점안제의 등장성을 조절하는 역할을 하며, 대표적으로 염화나트륨 또는 염화칼륨 등을 선택할 수 있다. 완충제는 점안제의 산도 또는 알칼리도를 조정하는 기능을 수행한다. 통상 점안제 제조에 사용되는 완충제는 아미노카프론산, 인산일수소나트륨 및 인산이수소나트륨 등을 들 수 있다. 안정제는 점안제를 안정화시키는 역할을 수행하며, 통상 안정제로서 에데트산 나트륨 및/또는 과불산나트륨을 이용할 수 있다. pH 조절제는 점안제 조성물의 pH를 조절하며, 예컨대 염산 및/또는 수산화나트륨을 들 수 있다.

[0040] 용제로는 멸균 정제수 또는 주사용 증류수를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 점안제는 액제 제형인 것이 바람직하다. 상기 점안제 조성물에는 필요에 따라 보존제, 방부제 등을 부가할 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 점안제 조성물의 권장량 및 사용 횟수는 1회 1~3적, 1일 5~6회 점안하되 증상에 따라 적절히 증감할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여횟수, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0042] 또 본 발명은 5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)를 유효성분으로 함유하는 콘택트 렌즈의 세정 또는 보존용 조성물을 제공한다.

[0043] 콘택트 렌즈의 세정용 조성물의 경우, 주된 성분으로 AICAR 이외에 계면활성제를 포함할 수 있다. 세정 작용을

가지는 계면활성제는 음이온성, 양이온성, 비이온성 및 양쪽성 계면활성제를 비롯하여 당업계에 공지된 다양한 계면활성제를 주된 세정제로서 포함할 수 있다. 또한, 습윤제, 향균제, 안정화제, 등장화제, 용해 보조제, 점도 조절제 또는 완충액을 추가로 포함할 수 있다.

- [0044] 콘택트 렌즈 보존용 조성물의 경우, AICAR 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 외에, 콘택트 렌즈를 저장하기 위한 수용액으로서 일반적으로 염수, 기타 완충 용액 또는 탈이온수를 포함할 수 있고, 바람직하게는, 붕산, 붕사 등의 붕소계 완충제, 아세트산, 아세트산 나트륨, 아세트산 칼륨 등의 아세트산계 완충제, 인산수소 나트륨, 인산이수소나트륨, 인산이수소칼륨 등의 인산계 완충제, 탄산 나트륨, 탄산 수소나트륨 등의 탄산계 완충제, 구연산, 구연산 나트륨 등의 구연산계 완충제, 또는 트로메타몰 완충제를 포함할 수 있다.
- [0045] 보다 바람직하게는, 염화나트륨, 붕산나트륨, 인산나트륨, 인산수소나트륨, 인산이수소나트륨 또는 이의 상응하는 칼륨염을 포함하는 염 함유 염수를 포함할 수 있다. 또한, 습윤제, 계면활성제, 안정화제, 점도 조절제, 등장화제, 용해보조제, 향산화제, 방부제, 청량화제, 킬레이트화제 또는 연화제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0046] 또한 본 발명은 5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)를 유효성분으로 함유하는 망막변성 및 망막부종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0047] 또한 본 발명은 5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)를 유효성분으로 함유하는 각막 섬유화 억제용 조성물을 제공한다.
- [0048] 또 본 발명은 5-아미노-4-이미다졸 카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)를 각막 손상 후의 각막 섬유아세포에 처리하여 각막 섬유아세포에서 각막 손상 후 발생하는 근섬유아세포 분화 및 ECM 합성을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0049] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0050] 각막 알칼리 손상 후 증가된 TGF-β 합성은 각막 섬유증에 연루되어 케라토사이트의 근섬유아세포로의 분화를 촉진시킨다. 5-아미노-4-이미다졸카르복사미드 리보사이드-1-β 리보푸라노사이드 (AICAR)에 의한 5 '아데노신 모노포스페이트-활성화 단백질 키나제 (AMPK)의 활성화가 알칼리 손상 후 각막 섬유아세포에서 섬유화 효과를 억제하는지를 조사하였다.
- [0051] 또한 본 발명은 각막에서의 AICAR의 항 섬유화 효과와 관련된 분자 메커니즘에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0054] 본 발명에서 알 수 있는 바와 같이, 알칼리 손상은 TGF-β 발현의 상향 조절을 유도하고 시험관내 및 생체 내에서 α-SMA 및 피브로넥틴 합성을 증가시켰고, AICAR에 의한 AMPK 활성화는 생체 내 및 시험 관내에서 TGF-β 및 ECM 단백질 발현을 유의하게 억제 하였으며, AICAR의 항 섬유화 효과는 AMPK 억제제, 컴파운드 C 의 처리로 상쇄되는 것으로 보아 AMPK 의존적이었다. 따라서, AICAR에 의한 AMPK 활성화는 각막 섬유 아세포에서 알칼리 손상 후 발생하는 근섬유아세포 분화 및 ECM 합성을 억제한다는 것을 알 수 있어서 각막 손상 후의 섬유화 억제 용도로 AICAR의 사용 가능성을 시사한다.

도면의 간단한 설명

- [0056] 도 1은 알칼리 손상 유발 TGF-β 합성의 시간 경과 결과를 나타낸 그림으로, 대표적인 웨스턴 블롯 및 이의 정량적 분석은 0.01 N NaOH로 처리한지 18 시간 후 TGF-β 단백질 합성의 유의한 증가를 나타내었고, 48 시간 시험 기간 동안 지속되는 결과를 나타냈고(**는 비히클 처리 된 대조 세포와 비교하여 P < 0.01을 나타냄).
- 도 2는 생체 내 및 시험 관내에서 알칼리 화상 유도된 ECM 단백질 및 TGF-β 발현에 대한 AICAR의 효과를 나타낸 그림으로,

대표적인 웨스턴 블롯 및 이들의 정량적 분석은 TGF- β 피브로넥틴 및 α -SMA의 알칼리 노출에 의해 유도된 발현을 나타내고, AICAR 처리 (1mM)는 그림으로부터 알 수 있는 바(#, ##, ###은 비히클 처리된 대조 세포와 비교하여 각각 P <0.05, 0.01, 0.001을 나타냄; *, **, ***는 단지 NaOH만 처리된 세포에 비해 각각 P <0.05, 0.01, 0.001을 나타냄)와 같이 이들 단백질의 발현이 감소되었음,

도 3은 TGF- β 유도된 ECM 단백질 발현 및 근섬유아세포 분화에 대한 AICAR의 효과를 나타낸 그림으로,

대표적인 웨스턴 블롯 및 이들의 정량 분석은 각막 섬유아세포에서 α -SMA, EDA-피브로넥틴 및 피브로넥틴 단백질의 TGF- β 유도된 발현에 대한 AICAR의 유의한 항-섬유화 효과를 나타내고, 분석 mRNA 전사 수준은 또한 α -SMA, 피브로넥틴, 콜라겐 및 EDA-피브로넥틴의 TGF- β 유도된 전사에 대한 AICAR의 유의한 항-섬유화 효과를 보여준다(##, ###은 비히클 처리된 대조군 세포와 비교하여 각각 P <0.01, 0.001을 나타내고, *, **, ***는 단지 TGF- β 처리된 세포와 비교하여 각각 P <0.05, 0.01, 0.001을 나타냄).

도 4는 콜라겐 젤 매트릭스 수축 이미지를 나타낸 그림으로,

(A) 대표적인 젤 이미지 및 (B) 젤 면적 백분율의 정량 분석은 시험 기간 동안 비히클-처리된 대조군 세포 및 TGF- β AICAR (1 mM) 처리된 세포 사이의 젤 수축에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 비히클 처리된 대조 세포 및 TGF- β 만 처리된 세포는 시험 2 일로부터 젤 수축에 유의한 차이를 나타냈다 (*, **, ***는 비히클 처리된 대조군 세포와 비교하여 각각 P <0.05, 0.01, 0.001을 나타냄),

도 5는 AICAR의 항-섬유화 효과가 AMPK 신호 억제 효과를 통해 나타난 것임을 보여준 그림으로,

대표적인 웨스턴 블롯 및 이들의 정량적 분석은 AICAR 처리 후 AMPK 활성화의 현저한 증가를 보여주고(A, C), 블롯은 또한 AICAR 처리가 NaOH 또는 TGF- β 유도된 α -SMA 및 피브로넥틴의 발현을 현저하게 감소시켰으며, 그것은 컴파운드 C 처리에 의해 반대되어, 차후 AMPK 수준의 현저한 감소를 야기(B, D)함. (#, ##은 비히클 처리된 대조군 세포와 비교하여 각각 P <0.05, 0.01을 나타냄; *, **, ***는 단지 NaOH 또는 TGF- β 처리된 세포와 비교하여 각각 P <0.05, 0.01, 0.001을 나타냄),

도 6은 mTOR 신호에 대한 AICAR의 영향을 나타낸 그림으로,

p-mTOR 및 p-p70-S6K의 대표적인 웨스턴 블롯 및 그들의 정량 분석은 0.01 N NaOH(A) 및 5 ng/mL TGF- β 로 처리한 후 그들의 신호 경로에 대한 AICAR의 억제 효과를 나타냄(#, ###은 비히클 처리된 대조군 세포와 비교하여 각각 P <0.05, 0.001을 나타내고; *, **, ***는 단지 NaOH 또는 TGF- β 처리된 세포에 비해 각각 P <0.05, 0.01, 0.001을 나타냄),

도 7은 쥐 각막의 빛 간섭 단층 (OCT) 촬영 이미지를 나타낸 그림으로,

알칼리 손상 후, OCT 이미지는 증가된 간질 불투명도 (각막혼탁)와 각막상피손상과 신생혈관침투를 시사하는 불규칙한 각막 두께를 보여주고 있으며, AICAR 또는 스테로이드로 처리된 생쥐는 각막 혼탁이 있으나 비교적 매끄러운 각막 표면을 보여 주었으며, AICAR과 스테로이드의 병용 치료 후 각막상피 손상이 없으며, 일정한 두께의 각막을 보여주고, 각막혼탁이 매우 줄어든 모습을 보여줌.

도 8은 생쥐 각막의 면역 조직 화학 이미지를 나타낸 그림으로, 미처리 그룹과 비교하여 AICAR로 처리된 그룹에서 알칼리 손상 후 3 주에 피브로넥틴 및 α -SMA의 발현이 현저하게 감소된 마우스 각막 조직의 조직 병리학적 분석을 나타내며, 배율은 200 배임.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0058] 본 발명은 연세대학교 원주 의과 대학이 동물 연구를 승인(YWC-170410-1)했습. 모든 실험은 연세대학교 원주 의과 대학 동물 보호 윤리위원회에서 발간한 지침에 따라 헬싱키 선언의 조항에 따라 진행되었으며 안과 및 비전 연구 동물의 연구의 용도에 대한 ARVO 지침을 준수하여 수행되었다.

[0059] 실시예 1: 일차 인간 각막 섬유 아세포의 분리 및 배양

[0060] 1 차 인간 각막 섬유 아세포는 각막 이식을 위해 중앙 각막 버튼을 제거한 후 각막 림버스로부터 얻어졌다. 각막 상피 및 데시메트 (Descemet) 막을 포함한 과량의 조직을 제거한 후, 기질 조직을 37 °C에서 진탕하면서 3 시간 DMEM/F12(대한민국 경산 웰진) 배지에서 제조된 0.5 mg / mL 히알루로니다 제 (Sigma-Aldrich) 및 2

mg/mL 콜라게나제 및 0.5 mg/mL 히알루로니다제 (Sigma-Aldrich)로 처리하였다.

[0061] 처리 후, 단리된 세포를 원심 분리($12000 \times g$ 5 분간)에 의해 수집하고, 10 % FBS 및 1 % 항생제/항진균제 (Gibco Life technologies)가 보충된 DMEM/F12 배지에 재현탁시키고 37 °C 및 가습 인큐베이터의 5 % CO₂에서 배양하였다. 그 세포를 0.25 % 트립신으로 계대시키고 10 % FBS 및 1 % 항생제/항진균제로 보충된 DMEM (한국 경산 웰진)에서 배양하였다. 배양 배지는 80 % 함유로 계대할 때까지 2-3 일마다 교체되었다. 계대 3-10의 세포를 후속 사용을 위해 -80 °C에서 보관하였다.

[0063] 실시예 2: 체외 알칼리 손상 및 웨스턴 블로팅

[0064] 시험관내 단백질 분석을 위해, 1 차 인간 각막 섬유 모세포를 배양 플레이트에 시딩하고 부착시켰다. 이미 확립된 바(Hyun Sun Jeon, Kayoung Yi, Tae Young Chung, Joon Young Hyon, Won Ryang Wee, Young Joo Shin. *Chemically injured keratocytes induce cytokine release by human peripheral mononuclear cells. Cytokine*. 2012; 59 (2): 280-285.)와 같이 세포를 무혈청 DMEM 중 0.01N NaOH로 처리하여 알칼리 화상 각막 손상의 시험관내 모델을 생성하고 1 시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 배지의 교환없이 DMSO에 용해된 0.5mM 및 1mM AICAR (Abcam)으로 처리하거나 처리하지 않고 ECM 단백질 합성에 대한 효과를 측정하기 위해 48 시간 동안 그리고 신호 단백질에 대한 그의 효과를 결정하기 위해 24 시간 동안 배양하였다.

[0065] TGF- β 로 각막 섬유아세포를 직접 자극함으로써 확인 시험관내 실험을 수행하였다. 섬유아세포를 2 내지 3 시간 동안 0.5 mM 및 1 mM AICAR로 전처리한 후 5 ng/mL TGF- β (PeproTech, Seoul, Korea)을 처리하고, 인큐베이션 하였다. 관찰된 효과가 AMPK 의존성인지를 결정하기 위해, 세포를 2.5 μ M 및 5 μ M AMPK 길항제인 컴파운드 C (Merck, Darmstadt, Germany)로 2시간 동안 전처리하고, 이어서 1 mM AICAR로 2 시간 동안 및 이어서 5 ng/mL TGF- β 로 처리하였다. 세포를 신호 단백질의 검출을 위해 8 시간 동안 및 ECM 단백질의 검출을 위해 48 시간 동안 인큐베이션하였다.

[0066] 프로테아제 및 포스파타제 억제제 (미국 미주리 주 세인트 루이스 소재의 시그마-알드리치 코퍼레이션)와 함께 RIPA 완충제(Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)를 사용하여 총 단백질을 추출하였다. 동일한 양의 단백질을 10 % 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에서 분리하고 폴리 비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막(밀리포어, 이탈리아 밀라노 소재)으로 옮겼다. 단백질 블롯을 Pierce TM강화 화학 발광(ECL) 웨스턴 블로팅 기질(Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)로 분석하였다. 이미지는 UVP Bio-Spectrum 600 이미징 시스템 (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, UK)에 의해 캡처되었다. 표적 단백질의 상대 발현을 ImageJ 소프트웨어 (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>)를 사용하여 밀도 측정법에 의해 평가하였다. 항체 정보는 표 1에 제공된다.

표 1

Antibody	Company	Species	Dilution
Tubulin	Cell Signaling Technology	Mouse	1:2000
α -SMA	Sigma Aldrich	Mouse	1:2000
Fibronectin	Santa Cruz Biotechnology	Mouse	1:2000
EDA-Fibronectin	Santa Cruz Biotechnology	Mouse	1:2000
p-AMPK	Cell Signaling Technologies	Rabbit	1:2000
AMPK	Cell signaling Technologies	Rabbit	1:2000
p-mTOR	Cell Signaling Technologies	Rabbit	1:2000
mTOR	Cell Signaling Technologies	Rabbit	1:2000
p-p70-S6K	Cell Signaling Technologies	Rabbit	1:2000
p70-S6K	Cell Signaling Technologies	Rabbit	1:2000
TGF- β 1	Cell Signaling Technology	Rabbit	1:500

[0068]

[0069]

실시에 3:RNA 분리 및 정량적 실시간 중합 효소 연쇄 반응

[0070]

정량적 실시간 PCR 분석을 위해, 섬유아세포를 시딩하고 AICAR 및 TGF- β 로 처리하였다. 24 시간 인큐베이션 후, 세포를 수확하고 제조사의 프로토콜에 따라 RNA이지 미니 추출 키트(Qiagen, Germany)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. RNA 추출물의 품질 및 양을 분광 광도법에 의해 평가하였다. RNA는 제조사의 프로토콜에 따라 LaboPass™ cDNA 합성 키트(Cosmo Genetech, Seoul, Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사되었다. 표 2에 열거된 표적 유전자의 프라이머 쌍을 사용하여 Q-PCR을 수행 하였다. 반응을 SYBR 녹색 PCR 믹스(Applied Biosystems 라이프 테크놀로지, 포스터 시티, 캘리포니아)와 함께 10 μ L 반응 부피로 수행하였다.

표 2

Gene	Sequence	Amplicon size
α -SMA	F: 5'-CGT TAC TAC TGC TGA GCG TGA-3' R: 5'-AAC GTT CAT TTC CGA TGG TG-3'	164 bp
Fibronectin	F: 5'-ACT GAG ACT CCG AGT CAG CC-3' R: 5'-TTC CAA CGG CCT ACA GAA TT-3'	116 bp
EDA-Fibronectin	F: 5'-TCC AAG CGG AGA GAG T-3' E: 5'-GTG GGT GTG ACC TGA G-3'	360 bp
Collagen I	F: 5'-TTC TGC AAC ATG GAG ACT GG-3' R: 5'-CGC CAT ACT CGA ACT GGA ATC-3'	151 bp
18S RNA	F: 5'-AAC CCG TTG AAC CCC ATT-3' R: 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'	149 bp

[0072]

[0073]

실시예 4: 콜라겐 젤 매트릭스 수축 분석

[0074]

세포를 1.5×10^5 세포/mL의 농도로 무 혈청 DMEM에 재현탁시켰다. 400 μ L의 세포 현탁액을 래트 테일 힘줄 용액(Gibco Life Technologies)으로부터 유래한 200 μ L의 타입 I 콜라겐과 혼합하였다. 5 N의 1 N NaOH를 첨가하여 혼합물을 중화시켰다. 젤 용액을 24 웰 플레이트 (웰당 600 μ L)에 첨가하고 중합을 위해 37 °C에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 비히클, 5 ng/mL TGF- β 5 ng/mL TGF- β + 1 과 혼합된 600 μ L의 DMEM을 젤에 첨가하였다. 젤을 웰로부터 분리하고 가슴 인큐베이터에서 37 °C 및 5 % CO₂에서 인큐베이션하였다. 고정된 거리에서 디지털 카메라를 사용하여 상이한 시점에서 젤의 수축 이미지를 포착하였다. 수축 정도는 Image J 소프트웨어를 사용하여 표면적을 측정함으로써 정량화되었다. 각 처리 그룹에 대해 실험을 3 회 수행하였다.

[0075]

실시예 5: 동물 실험

[0076]

본 발명에 사용된 건강한 8 주령 수컷 BALB/C 마우스를 표준 동물 방 조건 (온도, 24 ± 1 ° C; 습도, 50 ± 5 %)에서 1 주 동안 유지하여 적응시켰다. 순응 후, 다음 프로토콜을 사용하여 마우스의 오른쪽 눈에 알칼리 화상을 입혔다: 첫째, 마우스를 6 마리의 4 개 그룹으로 무작위로 나누었다. 이어서, 이소플루란으로 마취시키고 이어서 2 μ L의 0.1N NaOH 용액을 2 μ L의 0.1N NaOH 용액에 30 초 동안 침지시켜 등급 I-II 화상을 유발시켰다. 눈을 멸균된 생리식염수로 철저히 세척하였다. 마우스를 12 시간/12 시간의 낮과 밤 주기로 정상적인식을 공급 받은 플라스틱 케이지에 넣었다. 약물의 국소 적용은 매일 4 회 수행되었다. 그룹 1 마우스는 양성 대조군으로 작용하여 시험 약물로 처리되지 않았다. 그룹 2 마우스를 1 mM AICAR로 처리 하였다. 그룹 3 마우스는 스테로이

드 (0.1 % Flumetholone, Santen). 그룹 4 마우스를 1 mM AICAR 및 스테로이드로 처리하였다.

- [0077] 박테리아 감염을 예방하기 위해, 모든 손상된 눈을 국소 항생제 (0.5 % 레보플록사신, 산텐)로 처리하였다. 손상되지 않은 좌안 각막을 음성 대조군으로 사용 하였다. 이소플루란으로 마취 후 경부 탈구에 의해 21 일 후 마우스를 안락사시켰다. 3.0 mm2 이상의 중앙 각막을 cirrus OCT (Carl Zeiss Meditec, AG, Jena, Germany)를 사용하여 전방 세그먼트 5 라인 라스터 방법으로 스캔하였다.
- [0078] 각막을 수확하고 웨스턴 블롯팅을 위해 단백질을 추출하였다. 요약하면, 조직을 절제하고 이전 연구(Patel N, Solanki E, Picciani R, Cavett V, Caldwell-Busby JA Bhattacharya SK Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics. *Proteomics*. 2008; 8:1055-1070)에 나타난 최적 단백질 추출을 위하여 적합한 용해 완충제(125 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.1 % Triton X-100, 0.1 % Tween 20, 100 mM NaCl, 0.1 % 소듐 도데실 설페이트) 내 Tissue Lyser II (Qiagen, MD, USA)를 사용하여 균질화하였다. 호모게네이트를 4 °C에서 5 분 동안 10,000 × g에서 원심 분리하고, 추출된 단백질을 갖는 상청액을 수집하고 -20 °C에서 저장하였다. 수확된 각막 조직을 조직 병리학적 분석을 위해 10 % 인산염 완충 포르말린에 고정시켰다.
- [0079] 실시예 6:면역 조직 화학
- [0080] 각막 조직의 파라핀 섹션에서 파라핀을 제거하고, 재수화시키고, α-SMA (1:500) 및 피브로넥틴(1:500)에 대한 모노클로날 항체를 사용하여 4 °C에서 밤새 인큐베이션 하고 면역 조직 화학에 의해 분석하였다.
- [0081] 비오틴화된 이차 항체 및 스트렙타비딘-비오틴-퍼옥시 다제 (1:200, 37 °C에서 1 시간 동안 배양)를 사용하여 표적 단백질을 검출하였다. 절편을 헤마톡실린으로 대조 염색하고 탈수시키고 장착하였다.
- [0082] 본 발명의 데이터는 프리즘 5.0 소프트웨어를 사용하여 분석되었다. ANOVA를 사용하여 통계적 비교를 수행하고, 시험 후 분석을 Tukey의 다중 비교를 사용하여 수행 하였다. 통계적 유의성은 모든 경우에 $P < 0.05$ 로 정의되었다.
- [0083] 상기 실시예의 결과는 하기와 같다.
- [0084] AICAR은 알칼리 손상 후 각막 섬유아세포에서 TGF-β 및 ECM 단백질 축적을 억제
- [0085] AICAR의 항 섬유화 효과에 관여 할 수 있는 가능한 메커니즘을 조사하기 위해 먼저 알칼리 화상에 대한 반응으로 TGF-β 단백질 합성을 살펴 보았다. 알칼리 손상 후 TGF-β 합성의 시간 경과를 결정하고 섬유증 반응에서 그 역할을 확인하기 위해, 본 발명자들은 6 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간 및 48 시간 동안 0.01 N NaOH로 세포를 배양하였다. 인큐베이션으로 18 시간 동안 상당한 TGF-β 단백질 합성이 관찰되었으며, 이는 도시된 바와 같이 나머지 시험 기간 동안 지속되었다(도 1) ($P = 0.0005$).
- [0086] 전술한 바와 같이 배양된 세포를 0.01 N NaOH에 노출시켜 생성된 1 차 인간 각막 섬유아세포의 시험관내 알칼리 화상 모델을 AICAR로 처리하거나 처리하지 않고 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. AICAR로 처리하거나 처리하지 않은 알칼리 화상의 마우스 모델의 각막 조직 및 손상되지 않은 대조군 각막 조직을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 결과는 생체 내 및 시험관내 알칼리 손상 둘 다 TGF-β 단백질 합성의 상당한 증가를 야기하였다. 그러나 AICAR로 처리하면 생체 내 ($P = 0.0091$) 및 시험관 내 ($P = 0.0178$)에서 TGF-β 단백질 합성이 크게 감소했다 (도 2).
- [0087] 마우스 각막의 OCT 이미지는 불규칙한 상피 및 높은 초반사율로 증가된 기질 두께를 나타내었고, 처리되지 않은 그룹에서 과도한 신생 혈관 형성 및 섬유증을 나타냈다. 반대로, AICAR로 처리된 마우스는 ECM 단백질 합성 감소를 나타내는 보다 균질하고, 고 반사율이 적고, 규칙적인 각막 두께를 보였으며, 이는 AICAR 처리로 인한 섬유화 억제 효과를 보인 웨스턴 블롯팅 결과와 일치하는 소견이다(도 7).
- [0088] 마우스 각막 조직의 면역 조직 화학 이미지는 처리되지 않은 그룹과 비교하여 AICAR로 처리 된 그룹에서 피브로넥틴 및 α-SMA의 발현이 크게 감소하였다(도 8).
- [0089] 시험관내 TGF-β에 의한 섬유증의 유도는 또한 비히클-처리된 대조군 세포와 비교하여 α-SMA, 피브로넥틴 및 EDA- 피브로넥틴의 발현이 현저하게 증가되었다. AICAR은 이들 단백질의 발현을 유의하게 억제하였다(α-SMA의 경우 $P = 0.024$, 피브로넥틴 및 EDA- 피브로넥틴의 경우 $P < 0.0001$). 웨스턴 블롯 결과는 실시간 PCR 결과에 의해 확인되었으며, 이는 또한 콜라겐 1뿐만 아니라 이들 단백질의 상대적 mRNA 전사가 상당히 감소된 것으로 나타났다 (α-SMA의 경우 $P = 0.0025$, 및 피브로넥틴의 경우 $P < 0.0001$, EDA-피브로넥틴의 경우 $P = 0.0368$, 콜라겐 1의 경우 $P = 0.0014$)(도 3).

[0090] AICAR는 섬유아세포 수축을 억제

[0091] 콜라겐 수축성은 활성화된 섬유 아세포의 특징이다. 활성화된 섬유아세포와 그에 따른 근섬유아세포 분화에 대한 AICAR의 효과를 확인하기 위해 콜라겐 겔 매트릭스 수축 분석을 사용하였다. 일차적 인간의 각막 섬유아세포를 사용한 본 발명의 결과는 TGF- β 만으로 처리된 것과 비교하여 AICAR로 처리된 겔의 수축은 현저히 감소하였으며, 이는 TGF- β 를 처리하지 않은 대조군과 비슷한 수준이었다. 즉, AICAR가 TGF- β 에 의한 섬유아세포 활성화- 콜라겐 겔의 수축을 효과적으로 억제하였다 (도 4).

[0092] AICAR의 항 섬유화 효과는 AMPK 신호에 의존

[0093] 각막 섬유증의 억제에서 AICAR의 분자 메커니즘을 조사하기 위해, 본 발명자들은 AMPK- 특이적 신호 전달 억제제인 컴파운드 C와 함께 1 차 인간 각막 섬유아세포를 예비 배양하였다. 먼저, AICAR에 의한 AMPK 신호의 활성화를 확인하였다. 그 결과는 0.01 N NaOH 처리(P = 0.0031) 및 TGF- β 처리(P = 0.0007) 모두에서 일차 인간 각막 섬유아세포에서 p-AMPK 단백질 합성에서 유의미한 증가를 보여 주었다.

[0094] 본 발명의 결과에 나타난 바와 같이, 컴파운드 C 처리는 NaOH 처리(α -SMA : P = 0.0499; 피브로넥틴 : P = 0.0027) 및 TGF- β 처리(α -SMA : P = 0.0003; 피브로넥틴 : P = 0.0041) 군 둘 다에서 AICAR의 항 섬유화 효과를 유의하게 차단하였으며, NaOH 처리 군 (P = 0.0031) 및 TGF- β 자극 세포 (P < 0.0001)에서 AMPK 신호 전달을 유의하게 억제 하였다. 즉 이는 AICAR의 효과가 AMPK 신호전달에 의존하고 있음을 시사하는 결과이다(도 5).

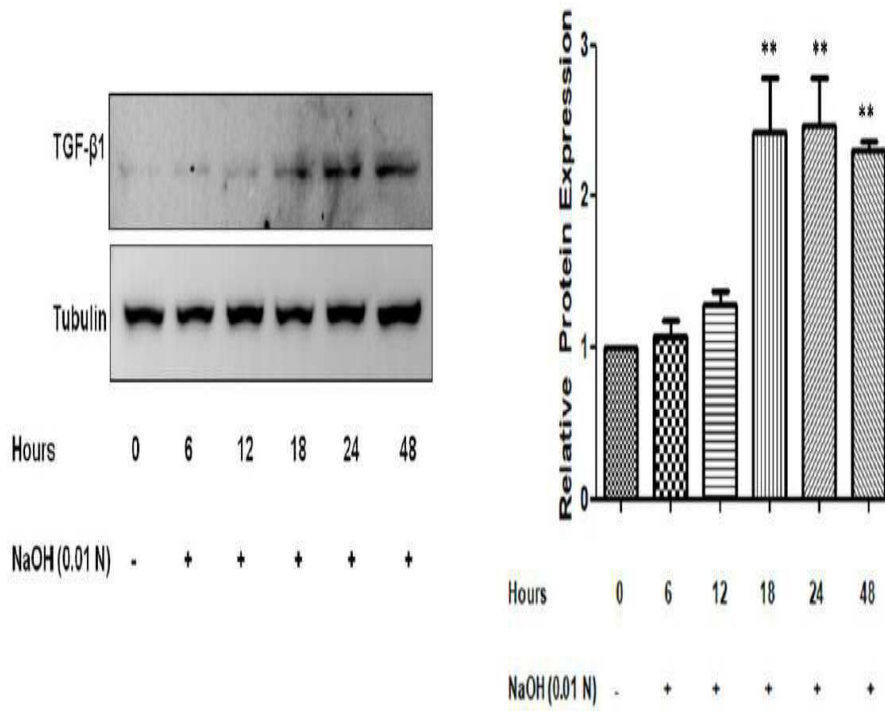
[0095] AICAR는 mTOR 신호를 억제

[0096] AMPK 활성화는 mTOR 신호 전달을 억제하여 세포에서 단백질 합성을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 각막 섬유아세포에서 mTOR 경로에 대한 AICAR의 효과를 연구하였다.

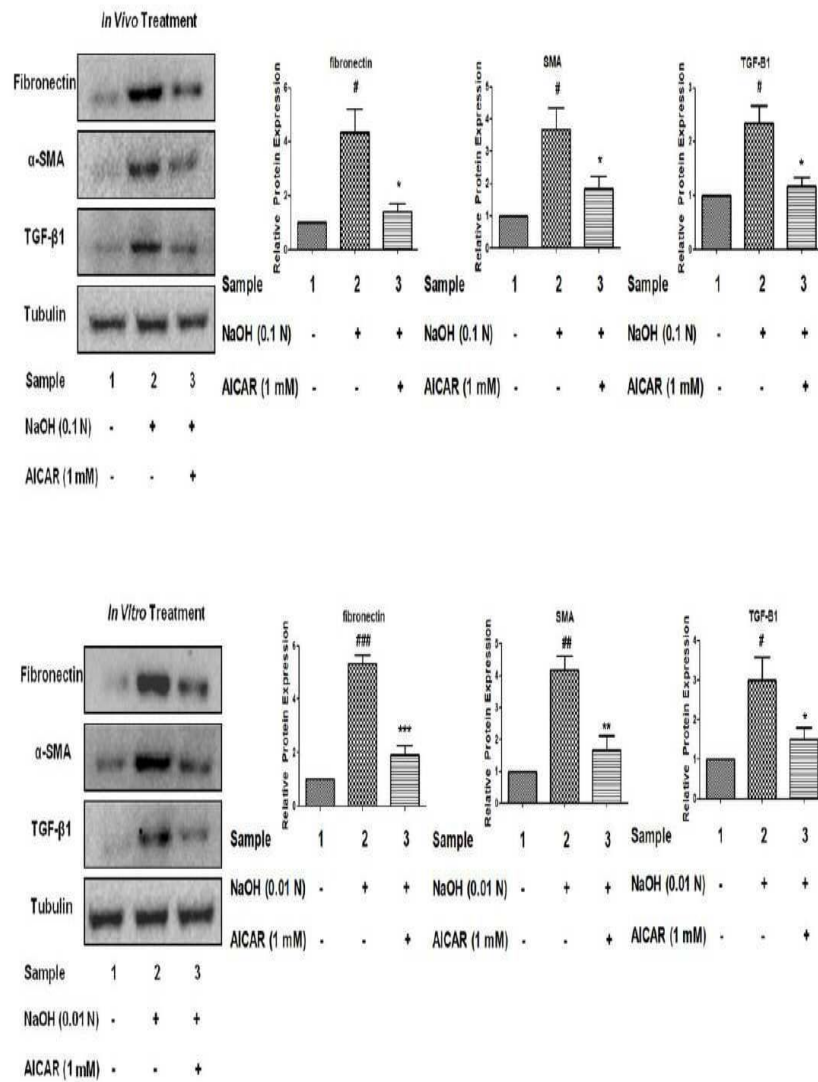
[0097] 결과는 AICAR에 의한 AMPK 활성화는 단지 NaOH 처리된 세포와 비교하여 p-mTOR (P = 0.0192) 및 p70-S6K 단백질(P = 0.0075) 발현의 현저한 감소를 야기하였다. 섬유증을 유도하기 위한 TGF- β 를 사용한 결과는 또한 TGF- β 처리 군과 비교하여 AICAR 처리군에서 p-mTOR(P = 0.0004) 및 p-p70-S6K (P = 0.0001) 발현의 감소를 나타냈다.(도 6)

도면

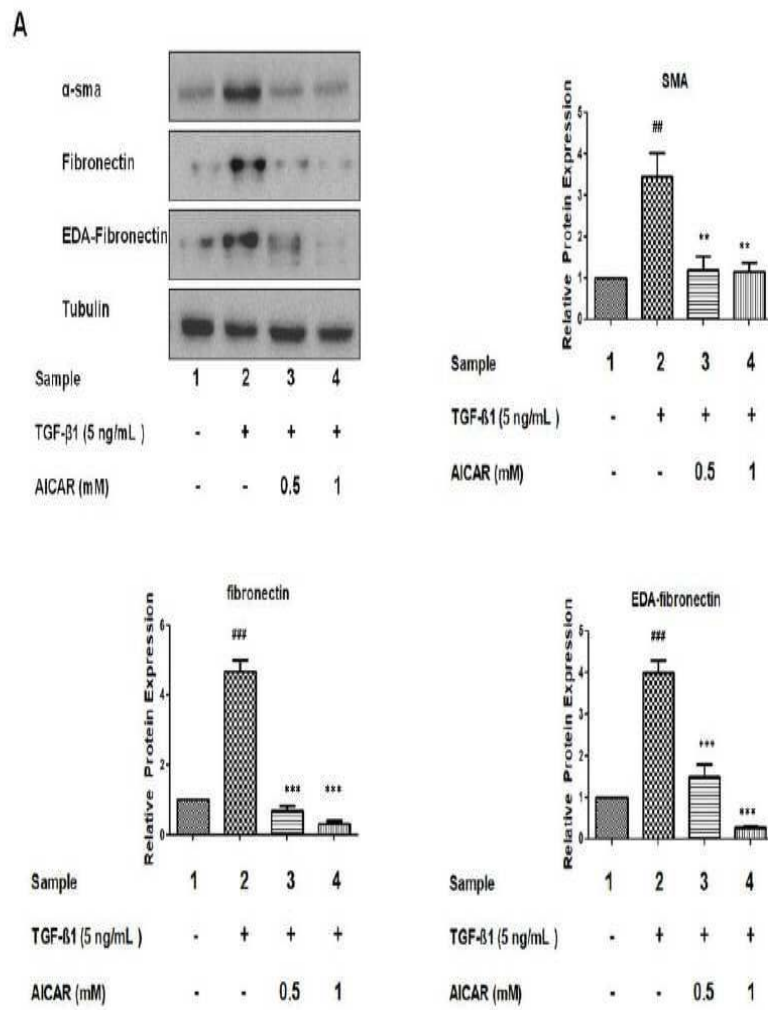
도면1



도면2

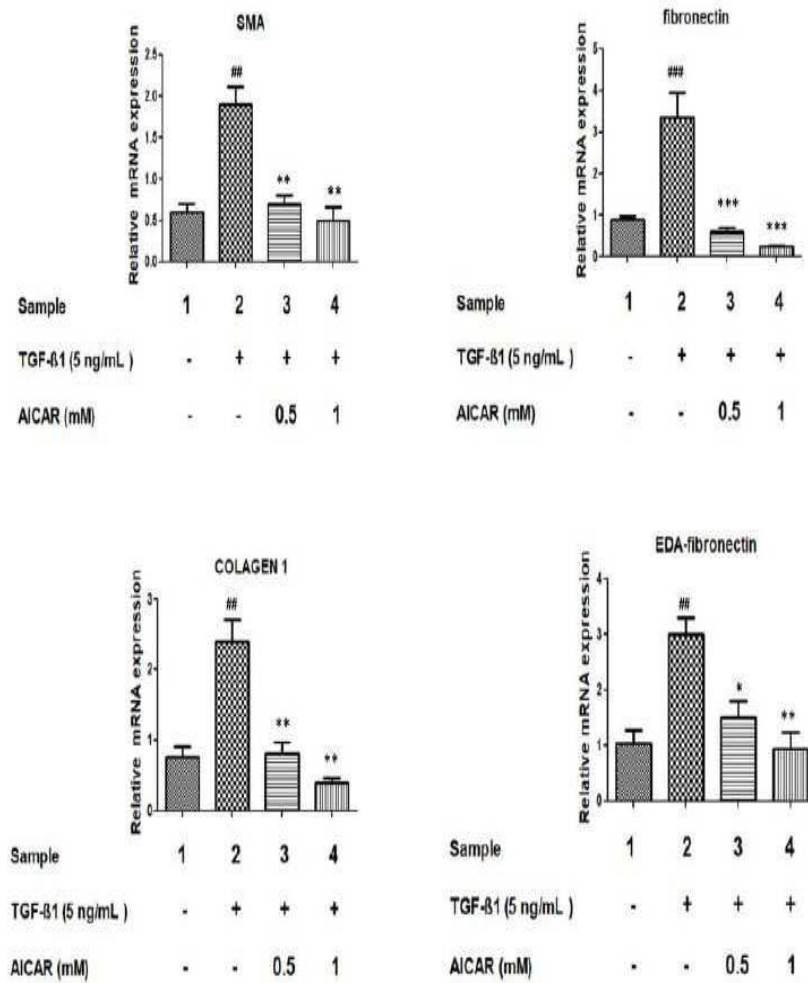


도면3a



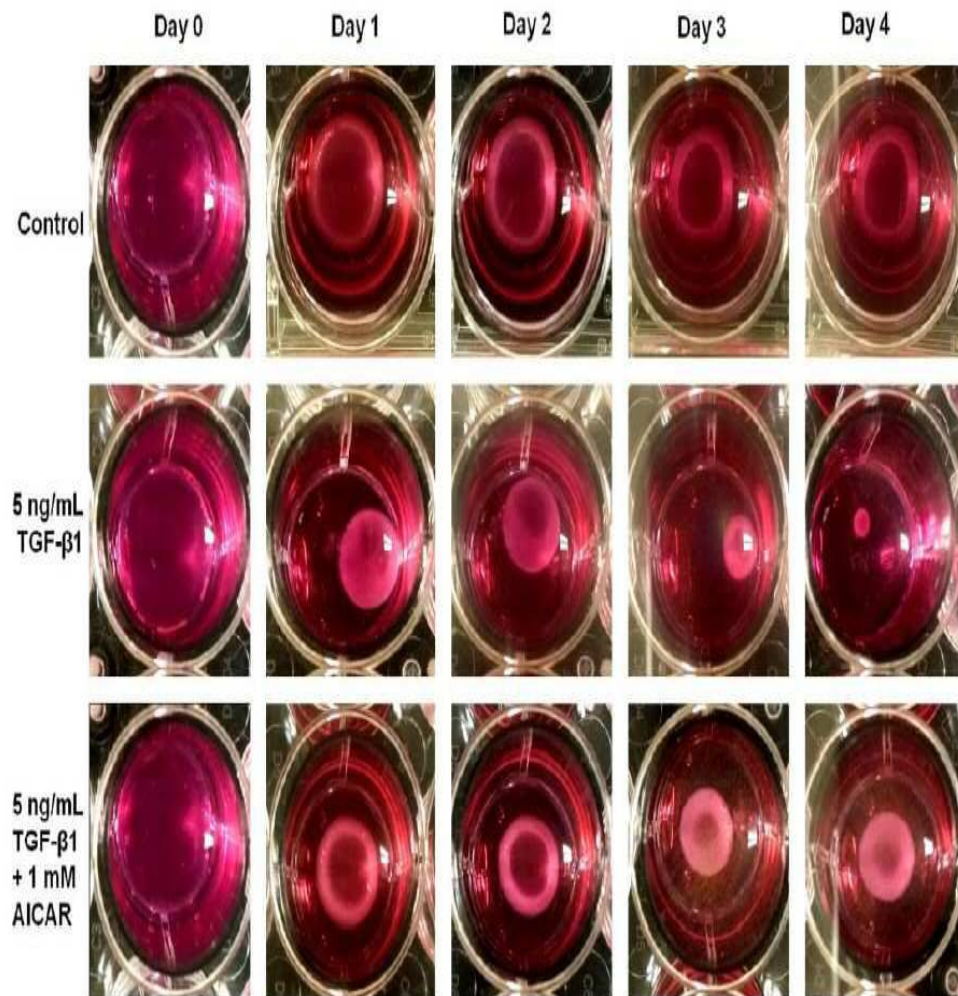
도면3b

B

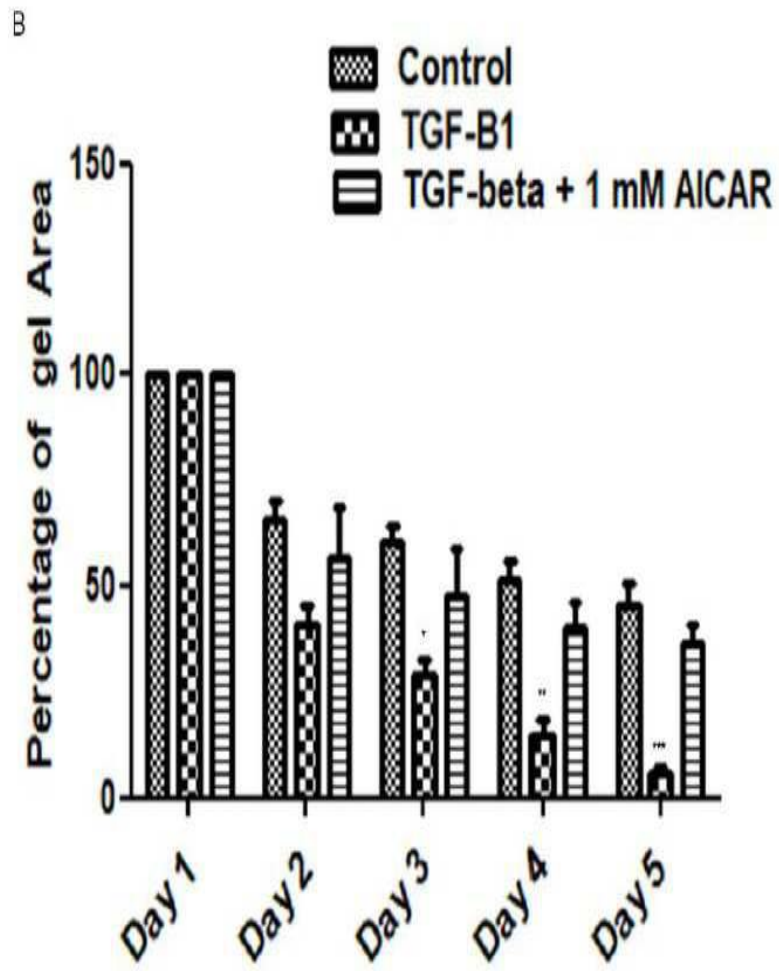


도면4a

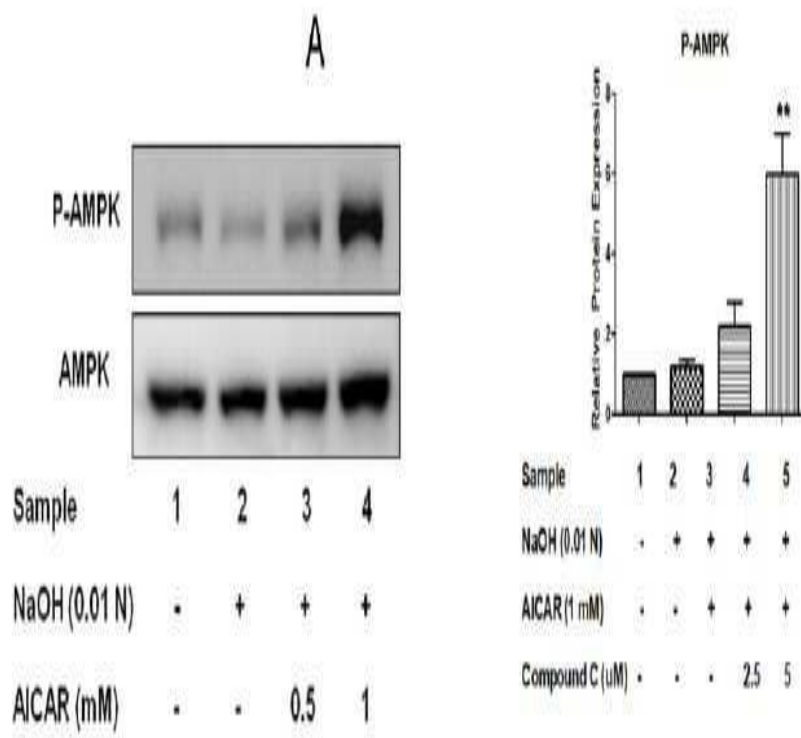
A



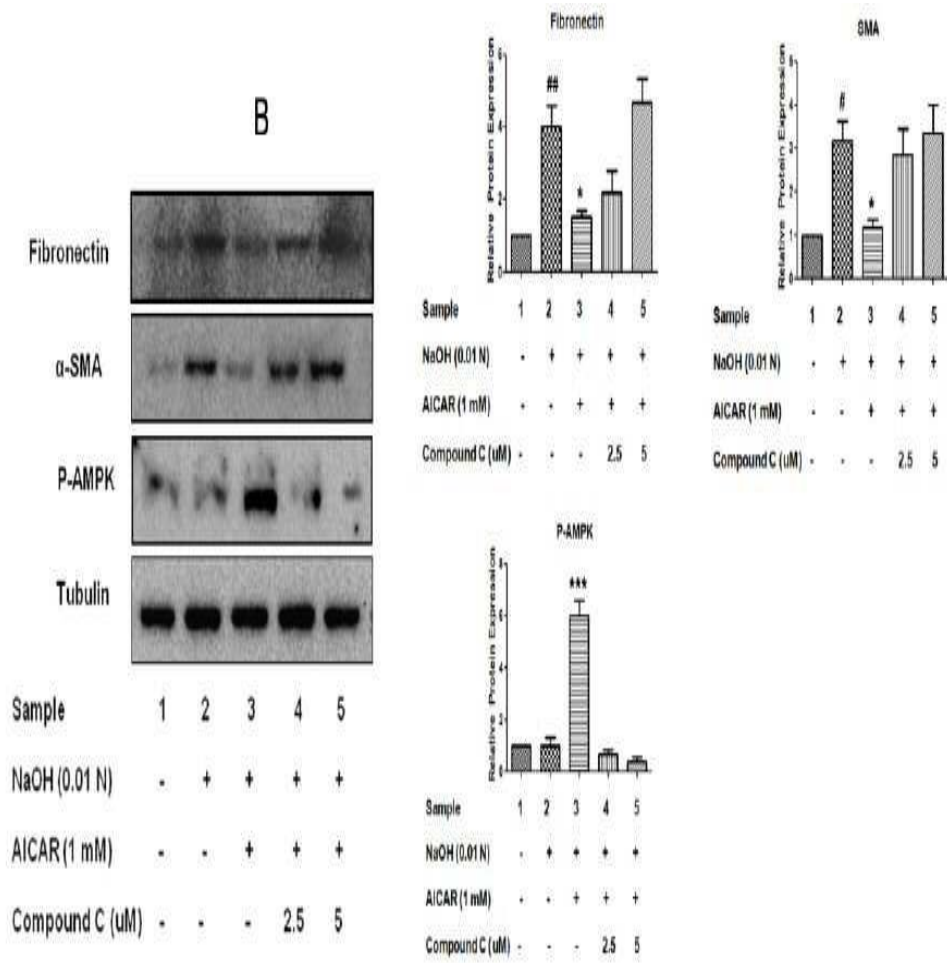
도면4b



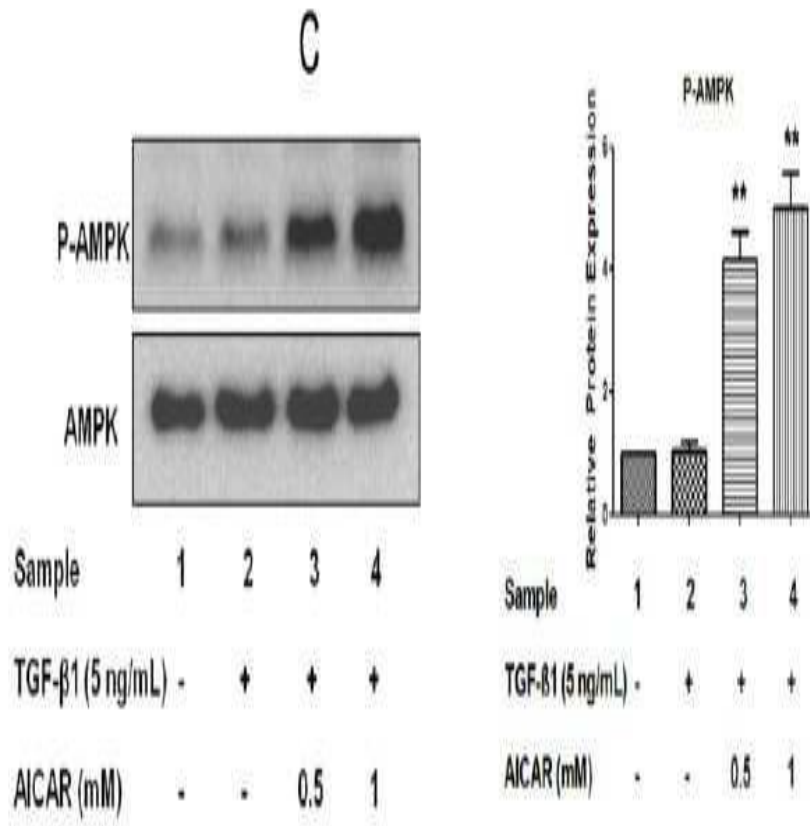
도면5a



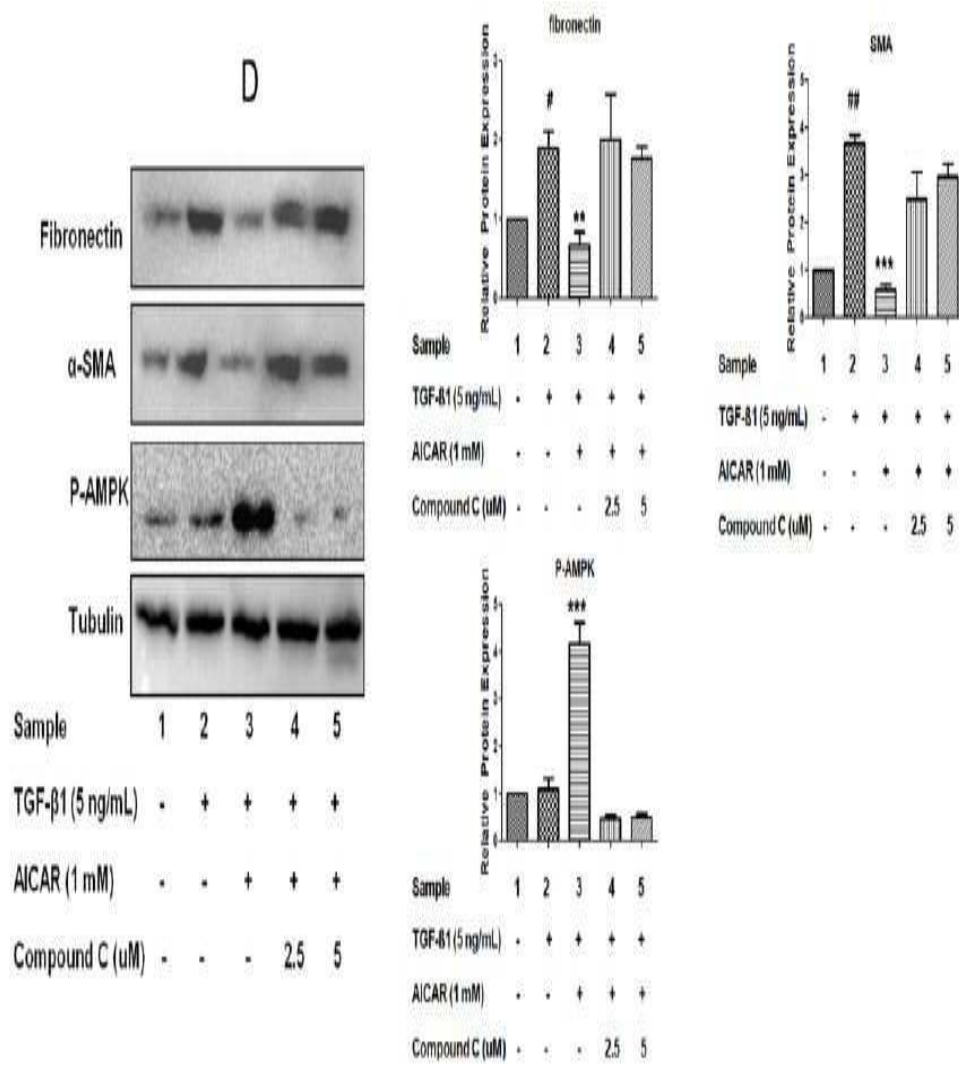
도면5b



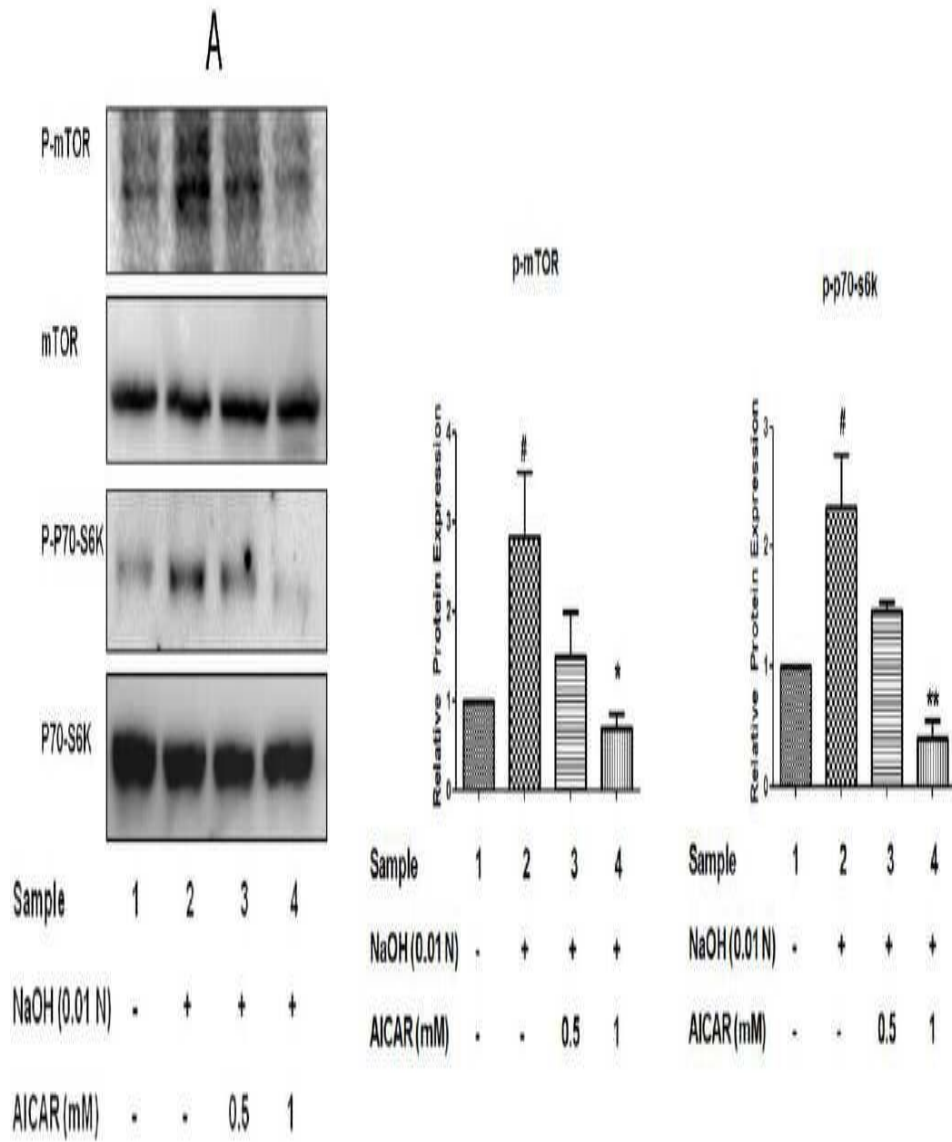
도면5c



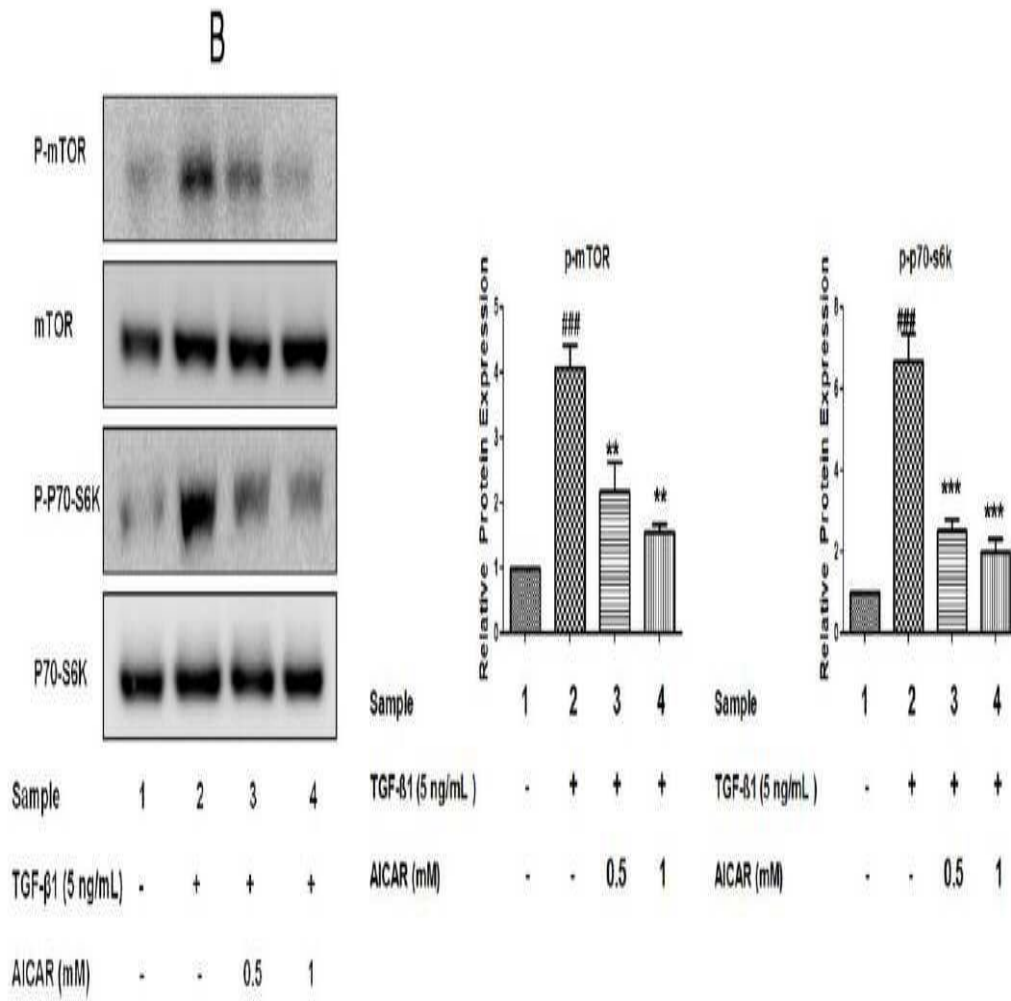
도면5d



도면6a

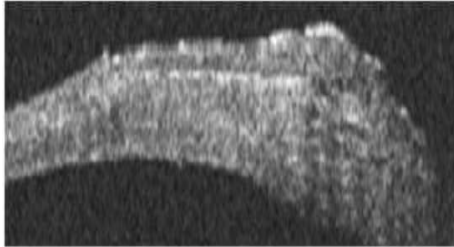


도면6b

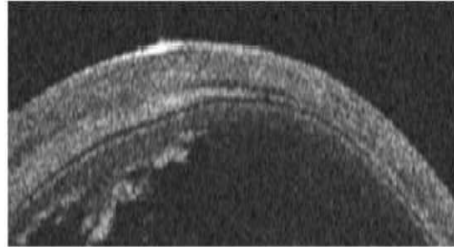


도면7

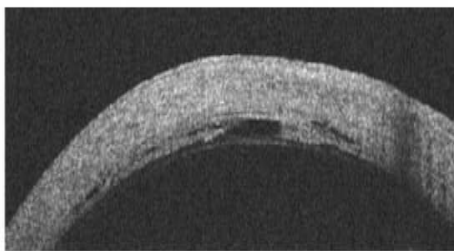
ALKALI INJURED CORNEA
WITH NO AICAR
TREATMENT



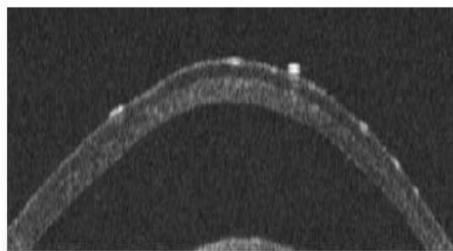
ALKALI INJURED CORNEA
WITH 1 mM AICAR
TREATMENT



ALKALI INJURED CORNEA
WITH
STERIOD TREATMENT



ALKALI INJURED CORNEA
WITH 1 mM AICAR AND
STERIOD TREATMENT



도면8

