(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0027005
(43) 공개일자 2025년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/517 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 31/5377 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/517 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0108215
(22) 출원일자 2023년08월18일
심사청구일자 2023년08월18일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
동국대학교 산학협력단
서울특별시 중구 필동로1길 30, 동국대학교 내(필동3가)
(72) 발명자
이재선
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 22동 106호 (서초동,삼풍아파트)
황현정
경기도 부천시 부광로41번길 64, 101동 209호 (괴안동, 태송팰리채아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

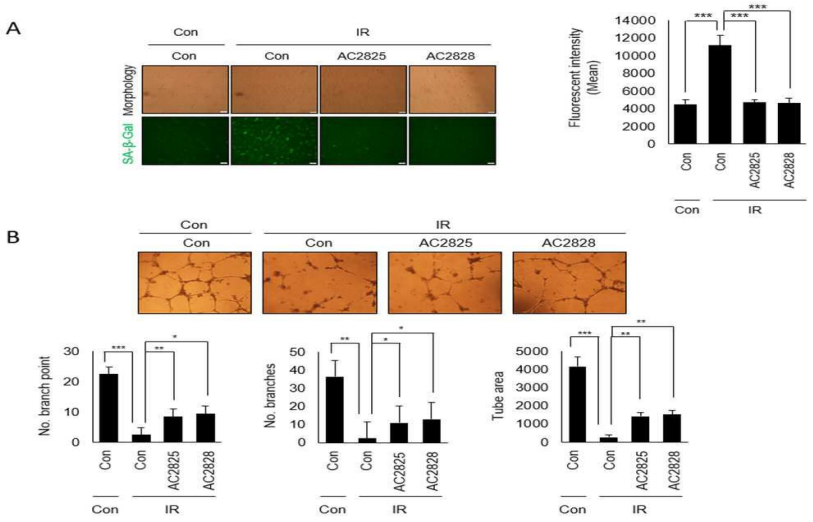
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **ITGB4 억제 활성을 나타내는 화합물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 ITGB4(Integrin beta 4) 억제 활성을 나타내는 화합물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, ITGB4(Integrin beta 4) 억제 활성을 나타내고, 혈관내피세포의 세포노화를 억제하는 화합물을 확인함으로써, 심혈관계 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물로써 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 31/5377 (2013.01)
A61P 9/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자
백유림
인천광역시 부평구 장제로 150, 유진마젤란주상복합 아파트A동 1208호 (부평동)
강동희
대전광역시 유성구 도안대로 560, 110동 504호 (봉명동, 도안마을1단지)
이경
경기도 고양시 일산동구 동국로 32, 약학관 614호 (식사동)
호쌈
경기도 고양시 일산동구 위시티로 47, 201호 (식사동)
김성도
경기도 안성시 공도읍 용머리안길 15-9

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711192325
과제번호 2023R1A2C2003673
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 RNA 및 단백질 품질관리 조절에 의한 암노화 제어 연구
기 여 율 30/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711183279
과제번호 2021R1A5A2031612
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 세포교신 제어 연구센터
기 여 율 30/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711180746
과제번호 2018R1A5A2023127
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 암 관해 표적제어 혁신의약품 연구센터
기 여 율 20/100
과제수행기관명 동국대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711181189
과제번호 2023R1A2C3004599
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 IL-6와 IL-11 동시 저해를 통한 자가면역성 간질성폐 질환 혁신신약 선도물질 개발 및 기전 연구
기 여 율 20/100
과제수행기관명 동국대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

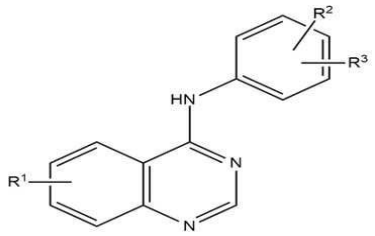
명 세 서

청구범위

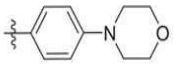
청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 용매화물 및 이의 입체이성질체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

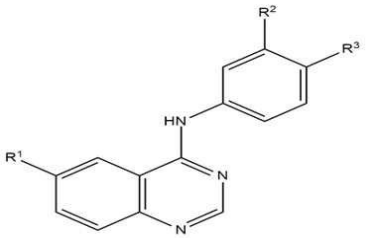
R^1은 할로겐 또는  이고,

R^2 및 R^3는 각각 같거나 다를 수 있으며, 수소 또는 $-SO_2NH_2$임.

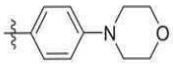
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[화학식 2]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화학식 1에서, R^1은 브롬 또는  이고, R^2 및 R^3는 각각 다르며, 수소 또는 $-SO_2NH_2$인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화합물은 3-((6-브로모퀴나졸린-4-일)아미노)벤젠설포나마이드[3-((6-Bromoquinazolin-4-yl)amino)benzenesulfonamide] 또는 4-((6-(4-몰포리노페닐)퀴나졸린-4-일)아미노)벤젠설포나마이드[4-((6-(4-morpholinophenyl)quinazolin-4-yl)amino)benzenesulfonamide]인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 동맥경화증, 고혈압, 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 급성 심근경색, 정맥 폐색증, 말초 동맥폐색증 및 심부전으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 혈관내피세포 노화에 의해 발생하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

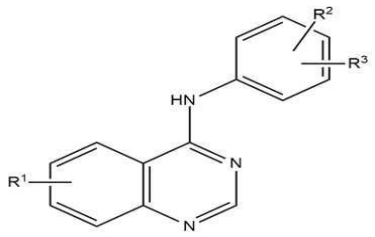
청구항 7

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 ITGB4(Integrin beta 4) 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

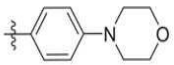
청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 식품학적으로 허용 가능한 염, 이의 용매화물 및 이의 입체이성질체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

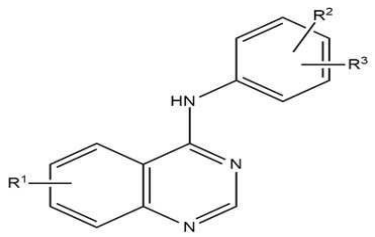
R^1은 할로겐 또는  이고,

R^2 및 R^3는 각각 같거나 다를 수 있으며, 수소 또는 $-SO_2NH_2$임.

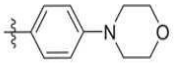
청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 용매화물 및 이의 입체이성질체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 ITGB4(Integrin beta 4) 발현 억제용 시약 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R^1은 할로겐 또는  이고,

R^2 및 R^3는 각각 같거나 다를 수 있으며, 수소 또는 $-SO_2NH_2$임.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 ITGB4(Integrin beta 4) 억제 활성을 나타내는 화합물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 동맥경화는 오랜 기간에 걸쳐 혈관의 내막(벽)에 콜레스테롤, 인지질, 칼슘 등을 함유하는 지방성 물질이 축적되어 혈관 내막이 두꺼워지는 질환으로, 지방성 물질이 축적됨에 따라 동맥이 단단해져 탄력성을 잃고 좁아져 혈액공급이 저해되거나 동맥 압력이 높아지고 심한 경우 동맥 파열, 박리 등이 발생하게 된다. 구체적으로 지방성 물질, 높은 압력 등으로 인해 혈관 내면을 구성하는 혈관내피세포가 먼저 손상되고, 점차 혈관 내막 내 지방성 물질 축적에 의해 세포 침윤 및 염증 반응이 발생하며 그 결과 혈관 내막이 두꺼워져 혈액 흐름이 원활하지 못하게 된다.

[0003] 현대사회로 발전하면서 식생활 양식 변화, 운동부족, 내외부적 스트레스 등으로 인해 발생이 증가하고 있는 성인병 중 하나이고, 주요 원인으로 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, 고혈압, 흡연 등이 있다. 또한, 심근경색, 뇌졸중 등 다양한 합병증을 유발할 수 있기 때문에 치료 및 관리가 매우 중요하다.

[0004] 현재 동맥경화 치료제로 HMG-CoA reductase 저해제인 다양한 스타틴(statin)류 등이 개발되고 있고, 보다 효과적인 치료제 개발이 활발히 진행 중인 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. 국제 공개특허 WO 2007-117607(2007.10.18. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 ITGB4(Integrin beta 4) 억제 활성을 나타내는 화합물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

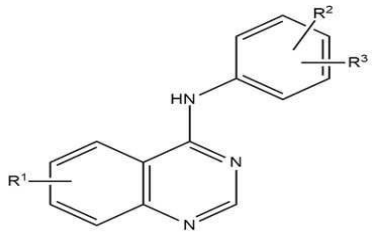
[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 ITGB4(Integrin beta 4) 발현 억제용 시약 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

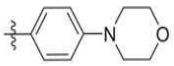
[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 용매화물 및 이의 입체이성질체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 상기 화학식 1에서,

[0013] R^1은 할로겐 또는  이고,

[0014] R^2 및 R^3는 각각 같거나 다를 수 있으며, 수소 또는 $-SO_2NH_2$임.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 화합물, 이의 식품학적으로 허용 가능한 염, 이의 용매화물 및 이의 입체이성질체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 용매화물 및 이의 입체이성질체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 ITGB4(Integrin beta 4) 발현 억제용 시약 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따르면, ITGB4(Integrin beta 4) 억제 활성을 나타내고, 혈관내피세포의 세포 노화를 억제하는 화합물을 확인함으로써, 심혈관계 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물로써 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 방사선 조사가 세포(혈관내피세포) 노화(A~B) 및 ITGB4 활성(C~D)에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 2는 3-((6-브로모퀴나졸린-4-일)아미노)벤젠설포나마이드[3-((6-Bromoquinazolin-4-yl)amino)benzenesulfonamide](이하 AC2825라 함) 및 4-((6-(4-몰포리노페닐)퀴나졸린-4-일)아미노)벤젠설포나마이드[4-((6-(4-morpholinophenyl)quinazolin-4-yl)amino)benzenesulfonamide](이하 AC2828이라 함)의 혈관내피세포에 대한 세포 독성을 분석한 결과이다. #; not significant, *; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$.

도 3은 AC2825 및 AC2828의 혈관내피세포 노화 억제 활성을 확인하기 위해, 베타-갈락토시다아제(β-galactosidase) 활성(A) 및 혈관 형성능(B)을 분석한 결과이다. #; not significant, *; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$.

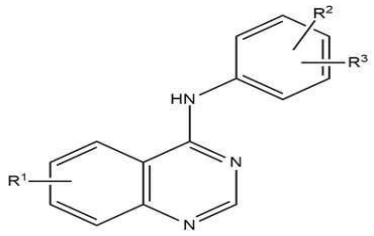
도 4는 AC2825 및 AC2828의 혈관내피세포 노화 억제 활성을 확인하기 위해, BrdU incorporation(A) 및 노화 마커(p53 및 p21)(B) 발현을 분석한 결과이다. #; not significant, *; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

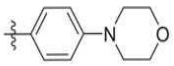
[0021] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 용매화물 및 이의 입체이성질체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0022] [화학식 1]



[0023]

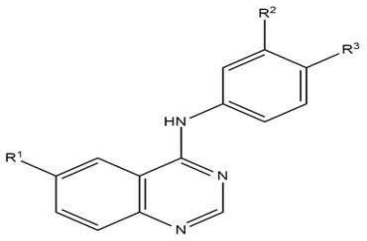
[0024] 상기 화학식 1에서,

[0025] R^1은 할로겐 또는  이고,

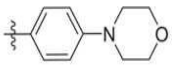
[0026] R^2 및 R^3는 각각 같거나 다를 수 있으며, 수소 또는 $-SO_2NH_2$임.

[0027] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0028] [화학식 2]



[0029]

[0030] 상기 화학식 1에서, R^1은 브롬 또는  이고, R^2 및 R^3는 각각 다르며, 수소 또는 $-SO_2NH_2$일 수 있다.

[0031] 상기 화합물은 3-((6-브로모퀴나졸린-4-일)아미노)벤젠설포나마이드[3-((6-Bromoquinazolin-4-yl)amino)benzenesulfonamide] 또는 4-((6-(4-몰포리노페닐)퀴나졸린-4-일)아미노)벤젠설포나마이드[4-((6-(4-morpholinophenyl)quinazolin-4-yl)amino)benzenesulfonamide]일 수 있다.

[0032] 상기 심혈관계 질환은 동맥경화증, 고혈압, 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 급성 심근경색, 정맥 폐색증, 말초 동맥폐색증 및 심부전으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 또한, 상기 심혈관계 질환은 혈관내피세포 노화에 의해 발생하는 것일 수 있다.

[0034] 상기 약학 조성물은 ITGB4(Integrin beta 4) 활성을 억제할 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0036] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[0038] 상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 피부 외용제 형태로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 윤활제, 포비돈 및 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

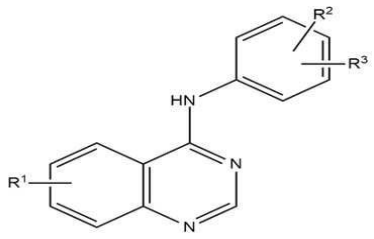
[0040] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽, 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.

[0042] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량 및 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간, 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.

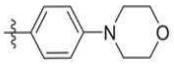
[0044] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 식품학적으로 허용 가능한 염, 이의 용매화물 및 이의 입체이성질체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0045] [화학식 1]



[0046]

[0047] 상기 화학식 1에서,

[0048] R^1은 할로겐 또는  이고,

[0049] R^2 및 R^3는 각각 같거나 다를 수 있으며, 수소 또는 $-SO_2NH_2$임.

[0050] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.

[0051] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 “건강기능식품”이라 함은 건강기능 식품

에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0052] 상기 건강기능식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 “식품 첨가물”로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0053] 상기 “식품 첨가물 공전”에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0054] 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다. 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능 식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합 및 충진 하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합하고 젤라틴 등 캡슐기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제 는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0055] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강 기능식품을 모두 포함한다.

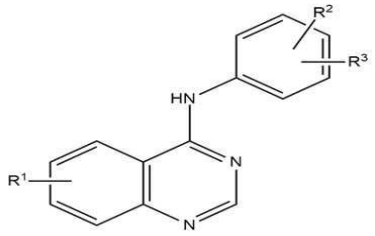
[0056] 본 발명에서 용어 “예방”은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 심혈관계 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0057] 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 심혈관계 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.

[0058] 본 발명에서 용어 “개선”은 본 발명의 조성물을 개체에 투여하거나 섭취시켜 심혈관계 질환의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 의미한다.

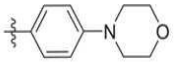
[0060] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 용매화물 및 이의 입체이성질체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 ITGB4(Integrin beta 4) 발현 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0061] [화학식 1]



[0062]

[0063] 상기 화학식 1에서,

[0064] R^1은 할로겐 또는  이고,

[0065] R^2 및 R^3는 각각 같거나 다를 수 있으며, 수소 또는 $-SO_2NH_2$임.

[0067] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예

등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0069] **[실험예 1] 실험 준비**

[0070] 1-1. 세포

[0071] 혈관내피세포는 LONZA(Walkersville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 혈관내피세포는 LONZA 제품의 EBM-2 배지에 FBS(fetal bovine serum), hFGF-B(human basic fibroblast growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), R3 IGF-1(R3 insulin like growth factor-1), hEGF(human epidermal growth factor), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 아스코르브산(ascorbic acid), 헤파린(heparin), 겐타마이신(gentamicin) 및 암포테리신 B(amphotericin B)를 추가하여 배양하였다.

[0073] 1-2. 화합물

[0074] AC2825(3-((6-Bromoquinazolin-4-yl)amino)benzenesulfonamide) 및 AC2828(4-((6-(4-morpholinophenyl)quinazolin-4-yl)amino)benzenesulfonamide) 화합물은 동국대 약학대학 이경 교수님 연구실에서 제공받아 사용하였다.

[0076] **[실험예 2] ITGB4(Integrin beta 4) 억제 활성 분석**

[0077] 2-1. 면역형광염색법

[0078] 방사선 조사가 혈관내피세포의 ITGB4 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 면역형광염색법을 수행하였다. 커버슬라이드(Cover slide)에 배양된 혈관내피세포를 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하고, 3.7% 포름알데하이드(formaldehyde)로 15분 고정하였다. 0.1%의 TritonX-100으로 15분 처리하여 permeabilization한 후, 1시간 동안 3% BSA(bovine serum albumin)로 블로킹(blocking)하였다. 1차 항체를 1시간 동안 상온에서 배양하고, PBS로 3번 세척 후, 2차 항체를 1시간 상온에서 배양하고, DAPI(4',6-Diamidino-2-Phenylindole)(1:10000)를 15분간 처리해 핵을 염색하였다. 다시 PBS고 3번 세척하고, 마운팅(mounting)하여 공초점 형광 현미경(LSM 510 META, ZEISS)으로 형광을 확인하였다.

[0080] 2-2. 웨스턴 블롯

[0081] 방사선 조사가 혈관내피세포의 ITGB4 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하였다. 배양된 혈관내피세포를 PBS로 세척하고, 스크래퍼로 세포를 수확하였다. 수확된 세포에 RIPA buffer[5M NaCl, 10% NP-40, 디옥시콜산(deoxycholic acid), 10% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1.5M Tris-HCl(pH 8.0), 0.5M EDTA(ethylene-diamine-tetraacetic acid) 및 H_2O 함유]를 넣고 세포를 깨어 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 BCA Protein Assay Kit(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 정량한 후 SDS-PAGE 겔(gel)로 분리하였다. 분리된 단백질을 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 이동시키고, 각 단백질에 특이적인 1차 항체와 2차 항체를 순서대로 붙였다. TBST로 세척 후, ECL reagents (Thermo Scientific)로 단백질의 발현을 확인하였다.

[0083] **[실험예 3] 세포 독성 분석**

[0084] 혈관내피세포에서 AC2825 및 AC2828의 세포 독성을 확인하기 위해, 배양된 혈관내피세포를 PBS로 세척하였다. PBS를 제거한 후, 1x Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 떼어내었다. 세포 부유액을 1.5ml 튜브에 옮겨 원심분리기로 세포를 모으고, 모은 세포를 100㎕ PBS에 넣고 재부유시킨 후 세포부유액(10㎕)과 Trypan-blue(10㎕)를 섞어주었다. 그 중에서 10㎕의 혼합액을 혈구계(hemocytometer)를 이용하여 현미경으로 세포 수를 측정하였다.

[0086] **[실험예 4] 혈관내피세포 노화 억제 활성 분석**

[0087] 4-1. 노화 연관 베타-갈락토시다아제 염색법

[0088] AC2825 및 AC2828의 혈관내피세포 노화 억제 활성을 확인하기 위해, 노화 연관 베타-갈락토시다아제(Senescence-associated beta-galactosidase; 이하 SA-β-Gal이라 함) 염색법을 수행하였다. 혈관내피세포에서 세포 노화 정도를 Enzolifescience 제품의 Cellular Senescence Live Cell Analysis Assay Kit를 사용하여 측정하였다. 60mm 배양접시에 세포를 배양하였고, 배양액을 제거한 후, 1X 세포 전처리 용액을 2ml 넣고 37℃에서 2시간 배양하였다. 그 후, 200X SA-β-Gal 기질 용액 10μl를 추가로 넣고, 37℃에서 4시간 배양하였다. 그리고 PBS 3ml로 3번 세척 후 형광현미경을 이용하여 초록색으로 염색된 노화된 세포를 이미지 촬영하였다.

[0090] 4-2. 혈관 형성능 분석

[0091] AC2825 및 AC2828의 혈관내피세포 노화 억제 활성을 확인하기 위해, 혈관 형성능을 측정하였다. 마트리겔(Matrigel)(BD Bioscience)을 48-웰 플레이트에 200μL씩 넣고 37℃ 배양기에 30분 동안 중합(polymerization)시켰다. 트립신(trypsin)으로 떼어낸 혈관내피세포(4×10^4개)를 배양액 200μl에 넣고, 경화된 마트리겔에 분주(seeding)하였다. 그 후, 37℃ 배양기에 16시간 배양한 후, 형성된 튜브를 광학현미경으로 촬영하며, 튜브 면적은 Fuji Multi Gauge V2.3 software(Fuji)로 측정하였다.

[0093] 4-3. BrdU incorporation assay

[0094] AC2825 및 AC2828의 혈관내피세포 노화 억제 활성을 확인하기 위해, BrdU incorporation assay를 수행하였다. 96-웰 플레이트에 분주한 혈관내피세포의 세포 분열은 Roche 제품의 BrdU(5-bromo-20 -deoxy-uridine) Cell Proliferation Assay Kit(Cat# 11 647 229 001)를 사용하였고, 제품 프로토콜에 따라 실험을 수행하였다. BrdU incorporation은 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0096] 4-4. 노화 마커 발현 분석

[0097] AC2825 및 AC2828의 혈관내피세포 노화 억제 활성을 확인하기 위해, 상기 실험예 2-2에 기재된 방식으로 웨스턴 블롯을 수행하여 노화 마커(p53 및 p21) 발현을 측정하였다.

[0099] **[실시예 1] 방사선 조사가 세포 노화 및 ITGB4 활성에 미치는 영향 분석**

[0100] 혈관내피세포에서 방사선 조사가 세포 노화에 미치는 영향을 확인하기 위해, 혈관내피세포에 방사선 조사(6Gy) 후, SA-β-Gal 활성 및 혈관형성능을 분석한 결과, 도 1A~1B와 같이, 대조군(방사선 미처리군; Con) 대비 방사선 조사군(IR)에서 SA-β-Gal 활성이 증가하고, 혈관형성능이 감소하였다. 또한, 실험예 2에 따라 방사선 조사가 ITGB4 활성에 미치는 영향을 분석한 결과, 도 1C~1D와 같이, 대조군 대비 방사선 조사군에서 ITGB4 활성이 증가하였다.

[0101] 상기 결과에 따라, IGBB4 억제 활성을 나타내는 AC2825 및 AC2828을 발굴하고, IGBB4 억제가 세포 노화에 미치는 영향을 확인하기 위한 추가 실험을 진행하였다.

[0103] **[실시예 2] 세포 독성 분석**

[0104] 상기 실험예 3에 따라, 혈관내피세포에 AC2825 및 AC2828을 농도별로(5 및 10μM) 처리하고, 1일 후 trypan-blue 염색을 통해 죽은 세포 개수/총 세포 개수×100(%)를 측정하였다. 그 결과, 도 2와 같이, 10μM 농도까지 세포 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다.

[0106] **[실시예 3] 혈관내피세포 노화 억제 활성 분석**

[0107] 상기 실험예 4에 따라, 혈관내피세포에 방사선 6Gy를 조사하여 세포 노화를 유도하고, 1일 후에 AC2825 및 AC2828(10μM)를 각각 처리한 후, 2일 후에 SA-β-Gal 활성, 혈관 형성능, BrdU incorporation 및 노화 마커

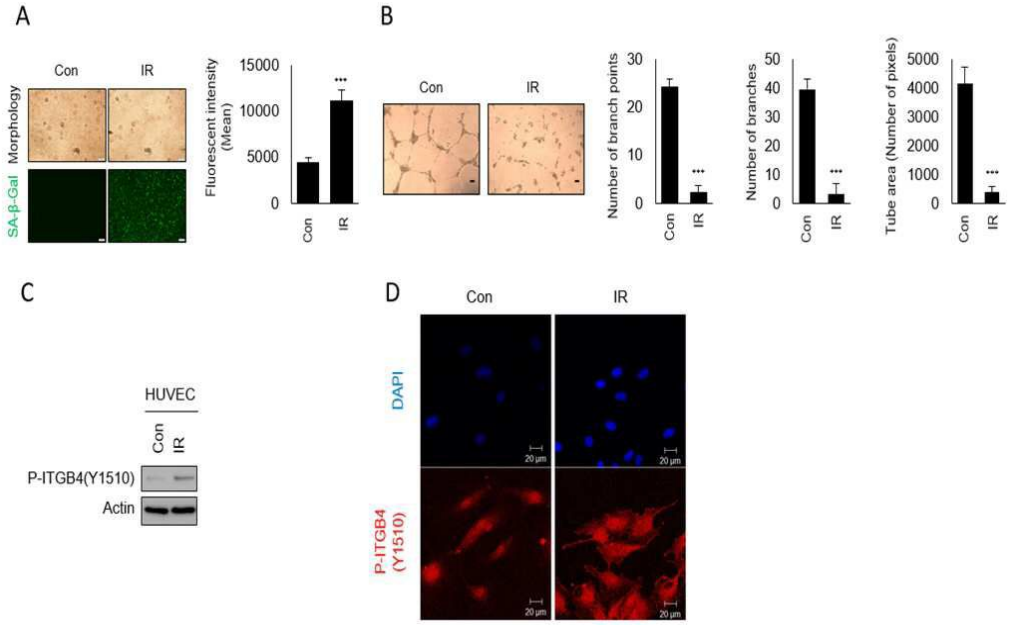
(p53 및 p21) 발현을 측정하였다. 그 결과, 도 3과 같이, 방사선 조사군에서 대조군(방사선 미조사군) 대비 세포 노화가 유도되어 SA-β-Gal 활성이 증가하고, 혈관 형성능이 감소하였다. 반면, AC2825 및 AC2828 처리군에서 방사선 조사군 대비 SA-β-Gal 활성이 감소하고, 혈관 형성능이 증가하였다. 또한, 도 4와 같이, 방사선 조사군에서 대조군(방사선 미조사군) 대비 세포 노화가 유도되어 BrdU incorporation이 감소하였고, 전체 ITGB4의 양은 일정하지만 ITGB4의 인산화가 증가하였으므로 ITGB4의 활성이 증가하였고, 노화 마커인 p53 및 p21 발현이 증가하였다. 반면, AC2825 및 AC2828 처리군에서 방사선 조사군 대비 BrdU incorporation이 증가하였고, ITGB4의 활성과 p53 및 p21 발현이 감소하였다. 상기 결과로부터, AC2825 및 AC2828이 혈관내피세포 노화 억제 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0108]

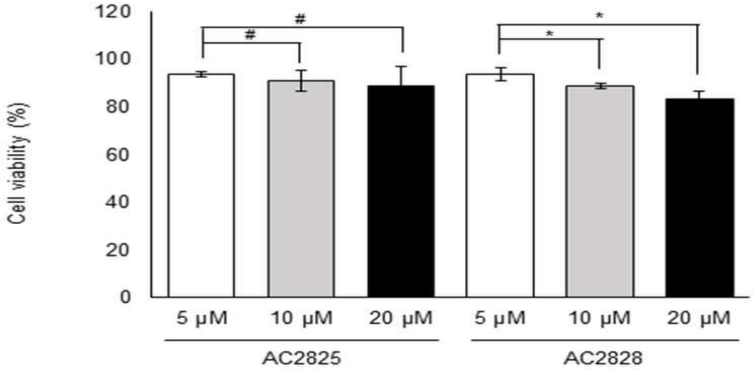
[0109] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

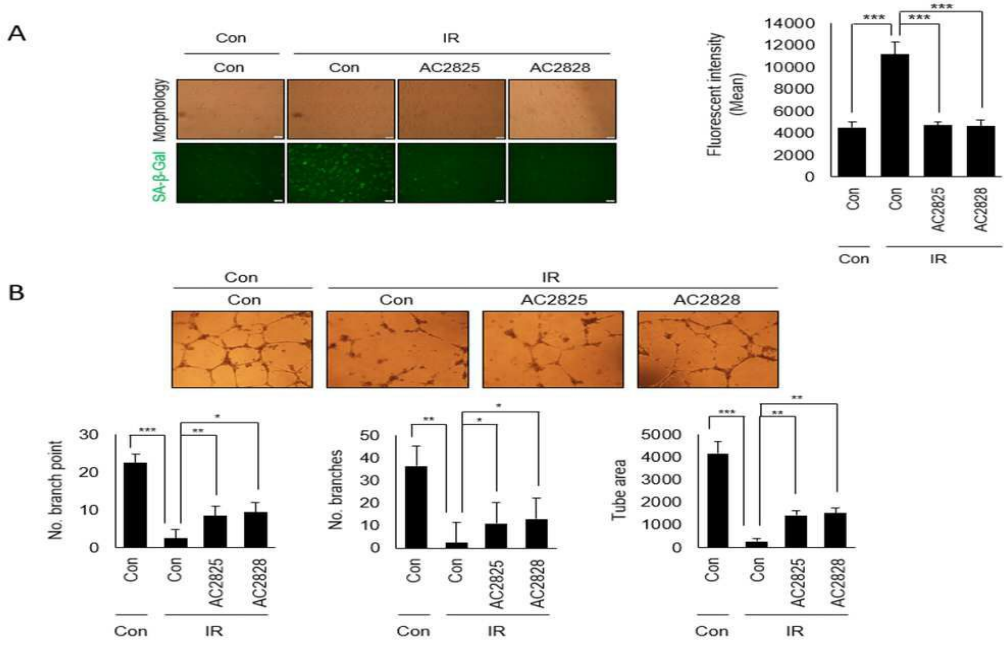
도면1



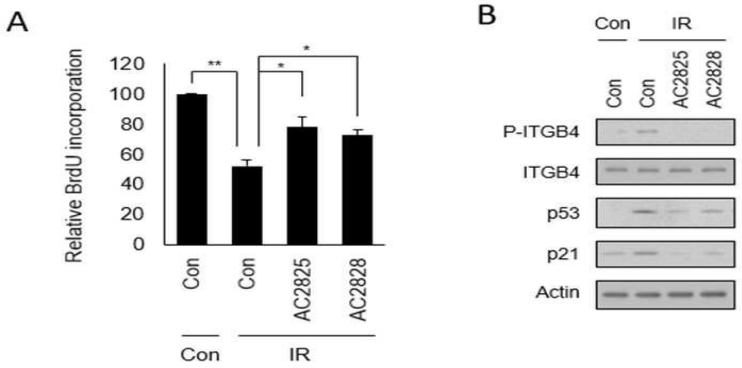
도면2



도면3


A
Con
IR
Con
Con
AC2825
AC2828
Morphology
SA-β-Gal
Fluorescent intensity (Mean)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
***
***
***
Con
Con
AC2825
AC2828
Con
IR
B
Con
IR
Con
Con
AC2825
AC2828
No. branch point
30
20
10
0
No. branches
50
40
30
20
10
0
Tube area
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
**
***
Con
Con
AC2825
AC2828
Con
IR

도면4


A
Relative BrdU incorporation
120
100
80
60
40
20
0
*
**
Con
Con
AC2825
AC2828
Con
IR
B
Con
IR
Con
Con
AC2825
AC2828
P-ITGB4
ITGB4
p53
p21
Actin