



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0016930
(43) 공개일자 2024년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/136 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/136 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0098637
(22) 출원일자 2023년07월28일
심사청구일자 2023년07월28일
(30) 우선권주장
1020220094603 2022년07월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호
임화선
경기도 수원시 장안구 화산로 85, 124동 901호
박하현
경기도 수원시 장안구 서부로2106번길 26-92, 201호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 7 항

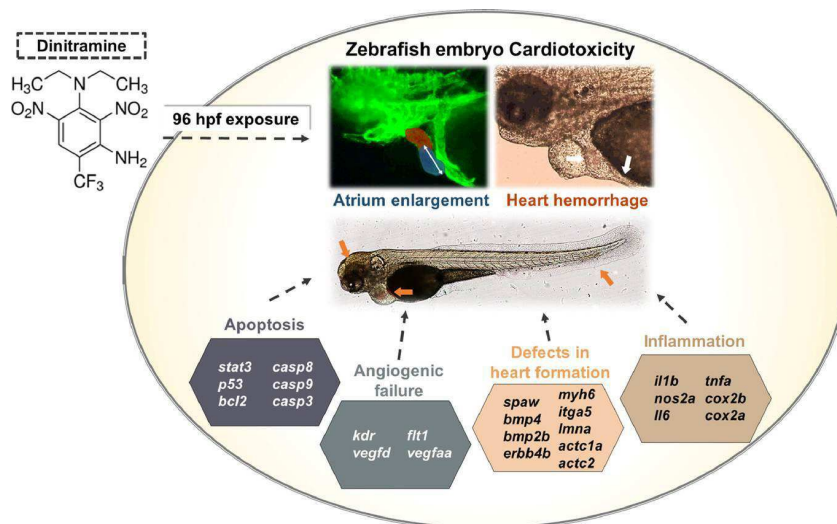
(54) 발명의 명칭 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 디니트라민(dinitramine)을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물은 혈관 형성을 매개하는 인자들의 발현을 조절하고, 혈관내피세포의 증식을 억제하고, 혈관 튜브 형성을 억제하는 효과를 가지며, 혈관신생 억제제 및 과도한 혈관형성으로 인해 유발될 수 있는 다양한 질환들의 예방 및 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157986
과제번호	2021R1A2C2005841
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	멜라토닌을 이용한 모돈-태아 간 상호작용 증진 기술 개발 및 번식능력 예측 조기
지표 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711155899
과제번호	2021R1C1C1009807
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	멜라토닌에 의한 엑소좀 유래 운반 RNA 소편 기반 자궁내막증 개선 메커니즘 규명
기 여 율	1/2
과제수행기관명	성균관대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

디니트라민을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 혈관신생에 의해 유발되는 질환을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 질환은 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 습식 황반변성, 긴선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 캐스크래치 질환, 폐양, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증 및 신사구체병증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 디니트라민은 혈관내피세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 디니트라민은 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 수용체의 발현을 변화시키는 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 디니트라민은 면역 반응 관련 인자의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 디니트라민은 혈관내피세포의 세포 분화에 의한 혈관 튜브 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 디니트라민(dinitramine)을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 혈관신생(angiogenesis)은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 과정을 말하며, 상처치유와 염증반응과 같은 정상적인 인체 방어 및 생리적 현상과 초기 발생과정에 있어서 아주 중요한 역할을 한다. 이러한 혈관신생은 단백질 분해효소에 의한 혈관 기저막의 분해, 혈관벽을 형성하는 혈관내피세포의 이동, 증식 및 혈관내피세포 분화에 의한 맥관의 형성으로 혈관이 재구성되어 새로운 모세혈관이 생성되는 단계를 포함하는 일련의 순차적인 단계를 통해 일어난다.
- [0003] 또한 혈관이 신생되는 과정은 다양한 음성 및 양성 조절인자들에 의해 엄격히 조절되고 있는데 (Folkman and Cotran, Int Rev Exp Pathol, 16, 207~248, 1976), 이러한 혈관신생이 정상적으로 조절되지 못하면 암, 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막증 등 여러 가지 질환들이 야기된다. 특히, 비정상적인 혈관신생은 종양의 성장과 전이에 매우 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있는데, 첫째로는 종양의 성장과 증식에 필요한 영양과 산소를 공급하는 역할을 하며, 둘째로는 종양까지 침투한 신생 모세혈관들은 전이하는 암세포가 혈액순환계로 들어갈 수 있는 기회를 제공하여 암세포가 온 몸에 퍼져 전이가 되도록 하는 역할을 한다.
- [0004] 따라서 혈관신생의 기전에 대한 연구 및 이를 억제할 수 있는 물질의 개발은 암을 포함하는 여러 질환의 예방 및 치료에 있어서 중요한 관심의 초점이 되고 있으며, 최근에는 동물의 암 모델과 인간의 임상실험에서 종양의 혈관신생 저해는 종양의 성장과 발달을 효과적으로 저해할 수 있고 환자의 생명을 연장할 수 있다는 사실이 증명되면서 혈관신생 억제제의 개발에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다.
- [0005] 또한, 이러한 혈관신생 억제제는 항암 치료법에 있어서 특히 각광을 받고 있는데 이러한 이유로는 첫째, 혈관신생 억제제는 모든 고형성 종양에서 공통적으로 사용할 수 있는 가능성이 있고, 둘째, 기존의 항암 화학요법은 암 세포가 빠르게 성장하는 특징을 이용하여 치료하기 때문에 비교적 세포주기가 빠른 골수세포 및 위장관계 세포에 독성 작용을 나타내는 반면, 혈관신생 억제제는 장기 투여하여도 비교적 부작용이 적다는 장점이 있고, 셋째, 하나의 혈관세포는 수백 개의 암세포에 영양분과 산소를 공급하기 때문에 하나의 혈관세포 억제를 통해 많은 암세포를 억제할 수 있으며, 넷째, 기존의 항암 요법의 경우에는 항암제가 혈관 밖으로 유출되어 암세포에 영향을 나타내는 반면, 혈관신생 억제제는 직접적으로 혈관 내피세포에 접촉하여 작용함으로써 약물 전달을 용이하게 할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문이다.
- [0006] 한편, 현재까지 개발된 혈관신생 억제제로는 약 200 여종이 보고되어 있는데, 이러한 혈관신생 억제제로는 특정 혈관 형성촉진인자의 활성을 감소시키는 기전, 혈관내피세포의 성장억제 또는 고사를 유도하는 기전, 혈관형성 촉진인자나 내피세포 생존인자를 조절하는 간접인자들의 작용을 억제하는 기전 및 체내에 존재하는 혈관신생 억제제들의 활성을 증가시키는 기전에 역할을 하는 4가지로 크게 분류할 수 있고, 특히 안지오스타틴(angiotatin), 엔도스타틴(endostatin), PK5, 프로트롬빈 크링글 2(prothrombin kringle 2)과 같은 혈관형성 억제제들이 잘 알려져 있다(O'Reilly, MS 등 Cell, 79, 315~328, 1994; Lee TH, Biol Che, 273, 28805~28812, 1998).
- [0007] 그러나 종래 기술에서 개발된 혈관신생 억제용 조성물의 경우, 혈관신생 억제효과가 미비한 문제점과, 항혈관신생-성장인자 관련 억제제에 대하여, 저항성이 있는 혈관신생 적응증에서는 효과가 없어, 새로운 혈관신생 억제용 조성물의 개발이 필요한 실정이다.
- [0008] 한편, 디니트라민(dinitramine)은 식물의 막을 구성하는 단백질들을 비활성화시켜 작물의 성장을 억제하는 성분으로 알려져 있으나, 현재까지 혈관신생 억제 효과에 대해서는 보고된 바 없다.
- [0009] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 혈관신생 억제 효과를 가지는 물질을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 디니트라민이 vegfd, flt1, kdr, vegfaa와 같은 혈관생성에 관여하는 인자의 발현을 변화시키고 염증 반응을 유도하여 혈관 생성을 현저하게 억제시키는 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 혈관내피세포의 증식을 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 혈관내

피세포의 세포 분화에 의한 혈관 튜브 형성을 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 혈관내피세포의 증식을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 혈관내피세포의 세포 분화에 의한 혈관 튜브 형성을 억제하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물은 혈관 형성을 매개하는 인자들의 발현을 조절하고, 혈관내피세포의 증식을 억제하고, 혈관 튜브 형성을 억제하는 효과를 가지며, 혈관신생 억제제 및 과도한 혈관형성으로 인해 유발될 수 있는 다양한 질환들의 예방 및 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 디니트라민이 제브라피쉬 치어의 생존력 및 필수 발달 과정에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 디니트라민의 세포자멸사 유도 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 디니트라민의 혈관신생 억제 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 디니트라민의 혈관신생 연관 심장 발달 및 기능 저해 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 디니트라민의 작용 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0020] 본 발명에서는 디니트라민에 의한 혈관 신생 억제 기전을 밝혔다(도 5).
- [0021] 본 발명은 일 관점에서 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 혈관 신생 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물은 혈관신생에 의해 유발되는 질환을 개선, 예방 또는 치료할 수 있으며, 본 발명의 조성물에 의한 개선, 예방 또는 치료 대상 질병인 "혈관신생 관련 질환" 또는 "혈관신생에 의해 유발되는 질환"은 신생혈관 형성이 비정상적으로 진행되어 야기되는 질환을 의미한다. 본 명세서 내에서 "혈관신생 관련 질환"과 "혈관신생에 의해 유발되는 질환"은 상호 호환적으로 기재할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 혈관신생 관련 질환은 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 습식 황반변성, 건선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 캐츠크래치 질환, 궤양, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증 및 신사구체병증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

- [0026] 한편, 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"은 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 혈관신생 관련 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0027] 또한, 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 혈관신생 관련 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 담체는 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 완충 물질, 물, 염, 전해질, 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국부 투여용으로 제형화하는 것을 특징으로 할 수 있고, 완충제, 항균성 보존제, 계면활성제, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 및 점도 개질제로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0031] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 갈슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 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 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0034] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 100 내지 500 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에 따르면, 상기 디니트라민은 혈관내피세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명에 따르면, 상기 디니트라민은 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 및 그 수용체의 발현을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다. 이때, 상기 VEGF는 vegfd 또는 vegfaa일 수 있고, 수용체는 flt1 또는 kdr일 수 있다.

- [0038] 또한, 본 발명에 따르면, 상기 디니트라민은 세포자멸사와 연관된 Caspase cascade 연쇄 반응의 발현을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명에 따르면, 상기 디니트라민은 면역 반응 관련 인자의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다. 이때, 상기 면역 반응 관련 인자는 *il1 β* , *nos2a*, *il6*, *tnf α* , *cox2b* 및 *cox2a*로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명에 따르면, 상기 디니트라민은 혈관내피세포 분화에 의한 혈관 튜브 형성을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명은 또 다른 관점에서, 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 혈관내피세포의 증식을 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명은 또 다른 관점에서, 디니트라민을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 혈관내피세포의 세포 분화에 의한 혈관 튜브 형성을 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0045] [실시예]
- [0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0048] <실험 방법>
- [0049] 제브라피쉬 사육 및 실험
- [0050] 실험에 사용된 제브라피쉬는 wild type 제브라피쉬와 *fli1* 유전자 관련 형질전환 모델이며, 이들은 평균 수온 28.5℃의 UV 살균된 수질 환경과 14시간의 광주기 환경에서 사육하였다. 성체 암수 한 쌍에 의해 12시간의 광주기와 빛자극 조건하에 수정된 알은 약 6시간 후 깨어난 배아 성장 배지에서 선별하여 24 well plate (10 embryos/well)에 모아 0.003% 페닐티오우레아 (phenylthiourea)에 녹인 디니트라민 1.5 ml을 농도별로 처리하여 96시간 동안 28.5℃ 온도 조건에서 배양하였다. 24시간을 주기로 각 농도에 노출된 제브라피쉬 치어의 생존율을 측정하였으며, 동시에 새로운 디니트라민 함유 배지로 교체해주었다. 디니트라민 노출에 의한 형태학적인 기관의 발달 변화는 정립 현미경 (LEICA DM 2500, Germany)를 통해 촬영하였다. 또한, 제브라피쉬 치어 내 디니트라민에 의한 세포자멸사 유도 양상과 *Fli1* 형질전환 제브라피쉬를 이용한 신생 혈관 생성 변화는 형광 정립 현미경 (M1 Zeiss Axio Imager, Germany)을 통해 촬영하였다. 촬영된 이미지는 Image J 프로그램을 통해 수치화하여 분석하였다.
- [0052] 실험 재료
- [0053] 디니트라민은 Sigma-Aldrich에서 구매하여 사용하였으며, 유전자 발현 확인 실험에 사용된 프라이머 *p53* (Forward: 5' -GCTTGTACAGGGGTCATTT-3' , Reverse: 5' -ACAAAGGTCCCAGTGGAGTG-3'), *bc12* (Forward: 5' -AGGAAATGGAGGTGGGATG-3' , Reverse: 5' -TGTTAGGTATGAAAACGGGTGGA-3'), *casp8* (Forward: 5' -AGAGAAGGGCACAGTTTT GG-3' , Reverse: 5' -CCTGGTTCTCATCTCCTTGG-3'), *casp9* (Forward: 5' -ACTGAGGCAAGCCATAATCG-3' , Reverse: 5' -GACAGTTCTGGCCATTGAGG-3'), *casp3* (Forward: 5' -AAAGGATCCCAGTGGAGGCAGATT-3' , Reverse: 5' -TGGTCATGATCTGCAAGAGCTCCA-3'), *kdr* (Forward: 5' -CTTGGCAGCCAGAAATATCC-3' , Reverse: 5' -GACGAGCATCTCCTTTACGG-3'), *vegfaa* (Forward: 5' -AAAAGAGTGCCTGCAAGACC-3' , Reverse: 5' -GAGCGCTCATC ATTACAGC-3'), *flt1* (Forward: 5' -CTGGTTATTCTGGGATGTTGC-3' , Reverse: 5' -TTTGGGGCTTCACATTTACC-3'), *vegfd* (Forward: 5' -TCTGATGTTGACCGAATACCC-3' , Reverse: 5' -GGTGTCATATCGAGTTGACC-3'), *il1b* (Forward: 5' -AGATGGTGGAGATGGACAGG-3' , Reverse: 5' -TCTCGTCTTTGGATGGAAGC-3'), *nos2a* (Forward: 5' -

GGAGATGCAAGGTCAGCTTC-3' , Reverse: 5' -GGCAAAGCTCAGTGAAGTCC-3'), *il6* (Forward: 5' -GGTGAGAGACGGAGAGATGGAT-3' , Reverse: 5' -CACGCTGGAGAAGTTGAACAG-3'), *tnfa* (Forward: 5' -GCGCTTTTCTGAATCCTACG-3' , Reverse: 5' -CCCAGTCTGTCTCCTTCTCG-3'), *cox2a* (Forward: 5' -ACTACCCCTGAGCTTCTCACA-3' , Reverse: 5' -GATGCTGTTGATGATATCCCAGATTG-3'), *cox2b* (Forward: 5' -GGCTCATCTTATTTGGTGAAGTAT-3' , Reverse: 5' -TCGGGATCAAACTTGAGCTTAAATA-3'), *spaw* (Forward: 5' -CCAGCCAGTTTATCCAAGG-3' , Reverse: 5' -TGTGCAATCAAGCTCAGGAC-3'), *bmp4* (Forward: 5' -GAGACATGCGCTGTATGTGG-3' , Reverse: 5' -TGGTGGAGTTGAGATGATCG-3'), *bmp2b* (Forward: 5' -GCCTGAAAGGAAAAACAACG-3' , Reverse: 5' -AATTCTGTGGAAGCCACTCG-3'), *erbb4b* (Forward: 5' -CATCAAGGCCGACTTAAAGG-3' , Reverse: 5' -TCCGGGTTGTGAAGAGTAGC-3'), *myh6* (Forward: 5' -GACGCTGAGCAAAAGAGAGG-3' , Reverse: 5' -TAGCCAAATTCTGCGATCC-3'), *itga5* (Forward: 5' -TCGCTCTGATGTCATTCTGC-3' , Reverse: 5' -TCACCAGCTCGTAAGTGTGC-3'), *lma* (Forward: 5' -CTCCAGGTCAGAAACGAAGC-3' , Reverse: 5' -TCCAGAGAGCGAACCTTATC-3'), *actc1a* (Forward: 5' -TGATGAGACTACCGCACTCG-3' , Reverse: 5' -GGGTCTGCCAACAATAGAGG-3'), *actc2* (Forward: 5' -GCGGCTACTCTTTGTGACC-3' , Reverse: 5' -AGAAGAGGAAGCAGCAGTGG-3'), *gapdh* (Forward: 5' -TGCTGGTATTGCTCTCAACG-3' , Reverse: 5' -GCCATCAGGTCACATACAG-3'), 는 Bioneer에서 구입하였다. 세포자멸사 측정을 위한 시약은 Invitrogen의 Acridine Orange를 구매하여 사용하였다.

[0055] Acridine staining을 이용한 세포자멸사 분석

[0056] 디니트라민의 세포자멸사 유도 효과를 확인하기 위하여 24 well plate에 형태학적인 변화가 관찰된 농도의 디니트라민이 녹여진 배지를 분주하고 평균 10마리의 제브라피쉬 치어를 노출시켰다. 96시간의 노출 후, 제브라피쉬 치어는 기본 배양 배지를 이용하여 씻어주고, 5 µg/ml 농도의 acridine orange 시약을 노출시켜주었다. 이후 28 °C에서 1시간 인큐베이션한 후 마찬가지로 기본 배양 배지로 acridine orange 시약을 깨끗하게 씻어주고 세포자멸사가 일어난 세포를 형광현미경에서 촬영 후 분석하였다. 형광현미경 조건하에 녹색으로 표시된 부분은 세포자멸사가 발생된 세포를 나타낸다. 대조군과 비교하여 정량화된 흡광도 값을 비교하여 세포자멸사 발생 효과를 분석하였다.

[0058] 혈관내피세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs)를 활용한 혈관신생조절 효과 확인

[0059] 혈관내피세포의 분화도 및 튜브 형성 분석을 통한 전반적인 혈관 네트워크 생성에 관련된 효과를 확인하기 위하여 HUVEC 세포를 활용하였다. HUVEC 세포는 Lonza Life Science 사에서 구매하여 사용하였다. 이후 Lonza사에서 제공한 세포 배양 지침서에 따라 EGM™ BulletKit™ Medium 으로 세포 배양을 진행하였다. 마트릭셀이 코팅된 96웰 플레이트에 웰 당 40,000개를 기준으로 하여 Vehicle인 동량의 DMSO와 디니트라민 6.4mg/L이 처리된 HUVEC 세포를 키워준 후 형성되는 Tube의 구조, 수, 길이, Branching points를 분석하였다. 형성된 tube number를 수치화하여 vehicle 처리군의 tube number와 비교하여 결과를 제시하였다.

[0061] 실시간중합효소연쇄반응 (qRT-PCR)을 이용한 유전자 발현 분석

[0062] 96시간의 디니트라민 처리시간 동안 동량의 용매를 처리한 대조군과 1.6 mg/L, 3.2 mg/L, 6.4 mg/L의 디니트라민을 처리한 실험군으로 나눈 후, 각각 그룹에서 RNA를 확보하였다. 해당 RNA로부터 합성된 cDNA를 이용하여 원하는 유전자의 primer sequence가 포함된 PCR reaction 용액을 분주하고 StepOnePlus Real-Time PCR System (95°C 3분, 40 cycles at 95°C 30초, 60°C 30초 및 72°C 30초)에서 발현을 분석하였다. 대조군의 세포 유지 유전자 (*gapdh*)의 발현에 대비한 각 유전자의 발현은 standard curve와 C_T 값을 이용하여 분석 및 정량화하였다.

[0064] 통계분석

[0065] 각 농도별 디니트라민에 노출된 제브라피쉬 치어는 최소 30마리이며, 실험 결과를 나타낸 그래프를 정량화하기 위하여 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램의 Shapiro-Wilk normality test 기반 일원배치분산분석 (one-way analysis of variance)을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였다. P < 0.05 수준에서 유의성 검

정을 실시하였다.

[0067] <결과 및 고찰>

[0068] 제브라피쉬 치어에 디니트라민이 미치는 영향 확인

[0069] 디니트라민이 제브라피쉬 치어에 미치는 영향을 확인하기 위하여 농도구배에 따른 디니트라민을 치어 성장 배지에 첨가하였고, 전체 배아의 50%가 사멸에 이르는 농도 (LC50)를 측정하여 추후 디니트라민의 효과를 확인하기 위한 지표로 활용하였다 (도 1A). 선별된 농도 조건의 디니트라민에 노출된 치어들은 96시간의 노출 시간 후 몸 길이의 감소, 비대한 난황낭, 심장 크기의 변화를 포함한 형태학적인 변화를 유도하였을 뿐만 아니라 (도 1B), 디니트라민의 농도 구배에 의존하여 6.4 mg/L의 디니트라민에서는 약 5%의 개체만이 스스로 부화하는 완전한 부화 능력의 감소 양상과 (도 1C), 6.4 mg/L 디니트라민에서는 약 37%의 눈 크기 감소 양상을 보였고 (도 1D), 특히 심장 비대와 관련하여서는 6.4 mg/L 디니트라민에서 약 335% 증가 (도 1E) 양상을 보였다. 이러한 6.4 mg/L의 디니트라민 노출 농도에서는 $P<0.001$ 의 유의성을 보였다. 이를 통해 디니트라민이 제브라피쉬의 생존력을 포함하여 정상적인 개체 발달에 큰 영향을 미치는 것을 확인하였다.

[0071] 디니트라민의 세포자멸사 유도 및 caspase cascade 반응 활성화

[0072] 디니트라민의 세포자멸사 유도 효과 및 관련 인자 조절 양상을 확인하기 위하여 형태학적인 결함을 보인 유의적인 농도를 처리하여 세포자멸사 유도 효과를 확인하였다 (도 2A). 그 결과, 디니트라민에 노출된 제브라피쉬 치어의 뇌부분에서는 약 6.5배 증가, 눈부분에서는 약 4.8배 증가, 꼬리 부분에서는 약 2.7배 증가하는 유의적인 ($P<0.01$, $P<0.001$) 세포자멸사에 의한 세포 사멸을 확인할 수 있었다 (도 2B). 또한, 농도 구배 조건의 디니트라민은 세포자멸사를 유도하는 caspase cascade 관련 인자인 *p53*, *bcl2*, *casp8*, *casp9*, *casp3*의 발현을 유의적으로 변화시켰으며, 6.4 mg/L의 디니트라민에서는 각각 약 1.2배 증가, 0.6배 감소, 1.5배 증가, 1.8배 증가, 1.3배 증가 양상을 보였다. 특히 연쇄적인 세포 사멸에 관여하는 caspases 코딩 유전자들이 높은 농도의 디니트라민에서 유의적인 감소 ($P<0.001$)가 발생함을 확인하였다 (도 2C).

[0074] 제브라피쉬 치어의 혈관증식 억제 및 혈관신생 관여 인자의 발현에 디니트라민이 미치는 영향 분석

[0075] 디니트라민의 신생 혈관 형성 억제 효능을 확인하기 위하여 혈관내피세포의 특이적인 유전자 마커인 *fli1*에 초록색 형광 단백질을 부착한 형질전환 제브라피쉬 (*fli1:eGFP*)를 도입하였다. 세포자멸사 유도 효과를 보인 농도의 디니트라민에 96시간 노출된 *fli1:eGFP* 제브라피쉬 치어는 낮은 농도의 디니트라민 처리군에 비하여 생성된 혈관이 비정상적인 형태를 가지며 혈관 형성 자체가 감소한 양상을 보였다. 이때, 감소된 혈관은 ISVs (Intersegmental vessels, 등쪽 마디 사이 동맥), DLAV (Dorsal longitudinal anastomotic vessel, 등쪽 세로 문합 혈관), CA (Caudal artery, 미동맥), CV (Caudal vein, 미정맥), DA (Dorsal aorta, 등대정맥)를 포함한다 (도면 3A). 특히, 미정맥 부분의 구조 형성은 6.4 mg/L 디니트라민에서 약 81%까지 감소하였고, 이를 구성하는 세포와 관련해서는 6.4 mg/L의 디니트라민에서 약 75%까지 감소하는 세포 변화가 뚜렷하게 나타났다 (도면 3B-C). 동일한 농도 구배의 디니트라민은 신생 혈관 생성에 주요한 기능을 하는 인자들의 발현 변화를 유도하였다 (도 3D). 또한, 디니트라민을 처리하지 않은 그룹의 발현값을 1로 기준하였을 때 혈관 생성 저해와 함께 면역 반응 활성화 관련 인자인 *il1 β* 는 약 39배, *nos2a*는 약 2.5배, *il6*는 약 2.9배, *tnf α* 는 약 9배, *cox2b*는 약 4.1배, *cox2a*는 약 46배 발현을 증가시켰다 (도 3E). 이러한 결과를 통해, 디니트라민이 혈관 생성을 현저하게 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0077] 디니트라민에 의한 혈관내피세포의 튜브 형성 억제 효과 분석

[0078] 디니트라민이 혈관신생에 미치는 효과를 확인하기 위하여 HUVEC 세포를 이용한 Tube formation assay를 진행하였으며, 그 결과를 하기 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 대조군(vehicle 처리군) 대비 6.4 mg/L의 디니트라민에 노출된 세포의 형성된 tube 개수가 약 47% 감소하였다 ($P<0.01$, 도 3F-G). 이를 통해, 디니트라민이 혈관내피세포의 세포 분화에 의한 혈관 튜브 형성을 현저하게 억제함으로써 결과적으로 혈관신생 억제 및 과도한 혈관형성으로 인해 유발될 수 있는 다양한 질환들에 예방 및 치료 효과가 있음을 확인하였다.

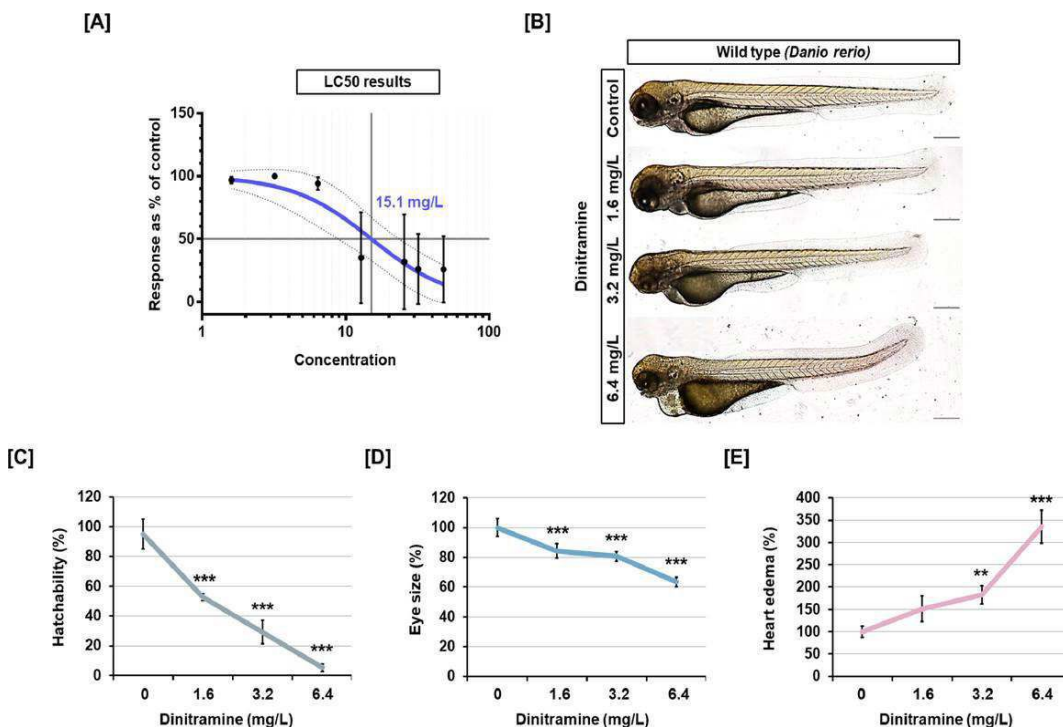
[0080] 디니트라민의 심장 발달 및 기능 저해 효과

[0081] 디니트라민의 혈관 생성 억제 효과와 관련하여 혈관계와 밀접한 상호작용으로 발달하는 순환계, 그 중에서도 특히 심장 형성 및 기능과 관련된 기전을 확인하기 위하여 유의적인 농도 조건의 디니트라민을 처리하여 심장 발달에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 디니트라민에 노출된 치어의 경우 확인한 심장 비대가 관찰되었다 (도 4A). 1분당 심박수도 디니트라민 노출 농도가 증가함에 따라 감소하는 양상을 보이며 6.4 mg/L 디니트라민에서는 약 44%까지 심박수가 감소하였고 (도 4B), 제브라피쉬 치어의 심장구조에서 심방 크기의 비대가 두드러지게 나타나며 6.4 mg/L 디니트라민에서는 약 2.6배 증가하는 양상을 확인하였다 (도 4C). 이와 관련하여 심혈관계의 발달에 역할을 하는 인자들의 발현을 확인해보았고, *spaw*, *bmp4*, *bmp2b*, *erbb4b*, *myh6*, *itga5*의 유전자 발현이 디니트라민이 처리된 치어의 경우 유의적인 감소 양상($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)을 보임을 확인하였다. 디니트라민을 처리하지 않은 그룹의 발현값을 1로 기준하였을때 6.4 mg/L 디니트라민에서 각각 0.8배, 0.9배, 0.7배, 0.6배, 0.7배, 0.5배 감소하였다 (도 4D). 이를 통해 디니트라민이 혈관신생 억제 및 과도한 혈관형성으로 인해 유발될 수 있는 다양한 질환들에 예방 및 치료 효과가 있음을 확인하였다.

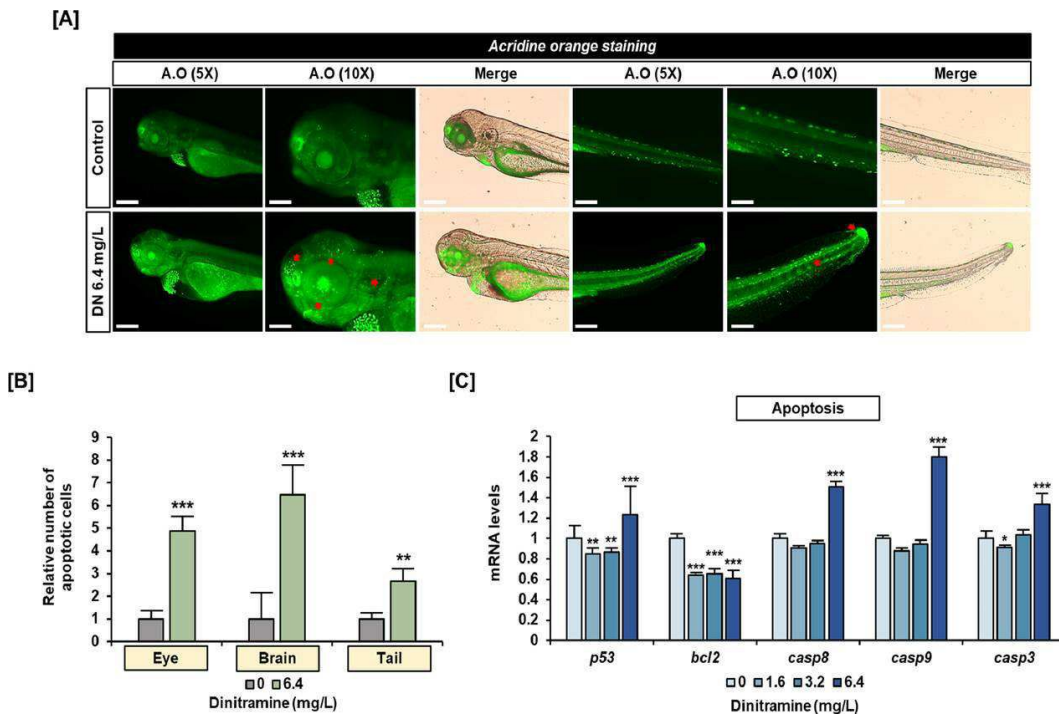
[0083] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

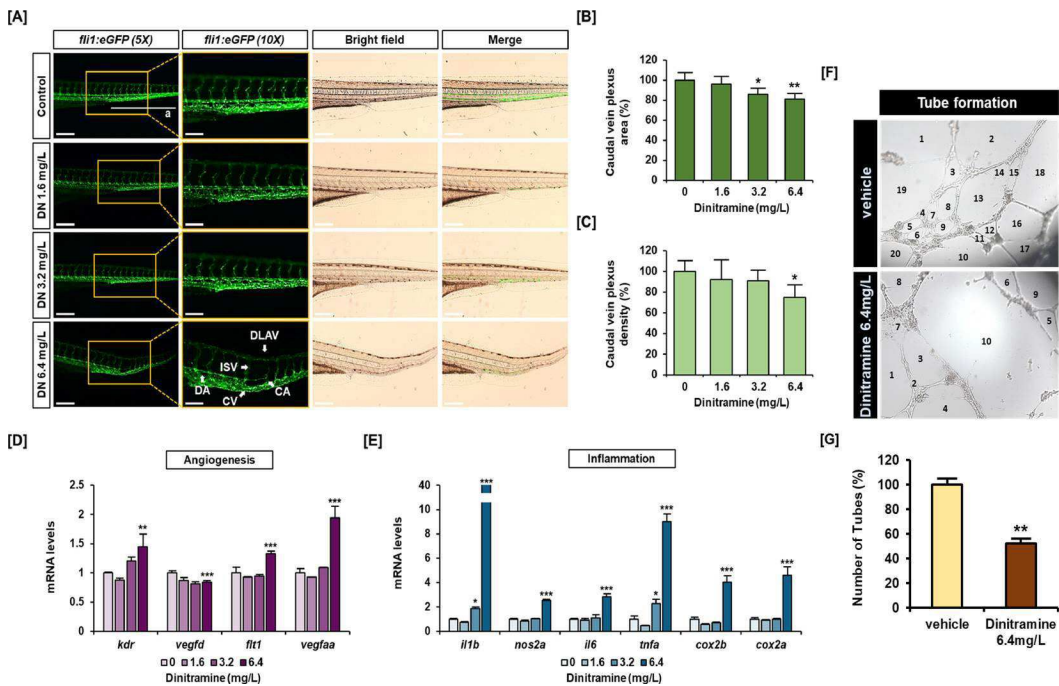
도면1



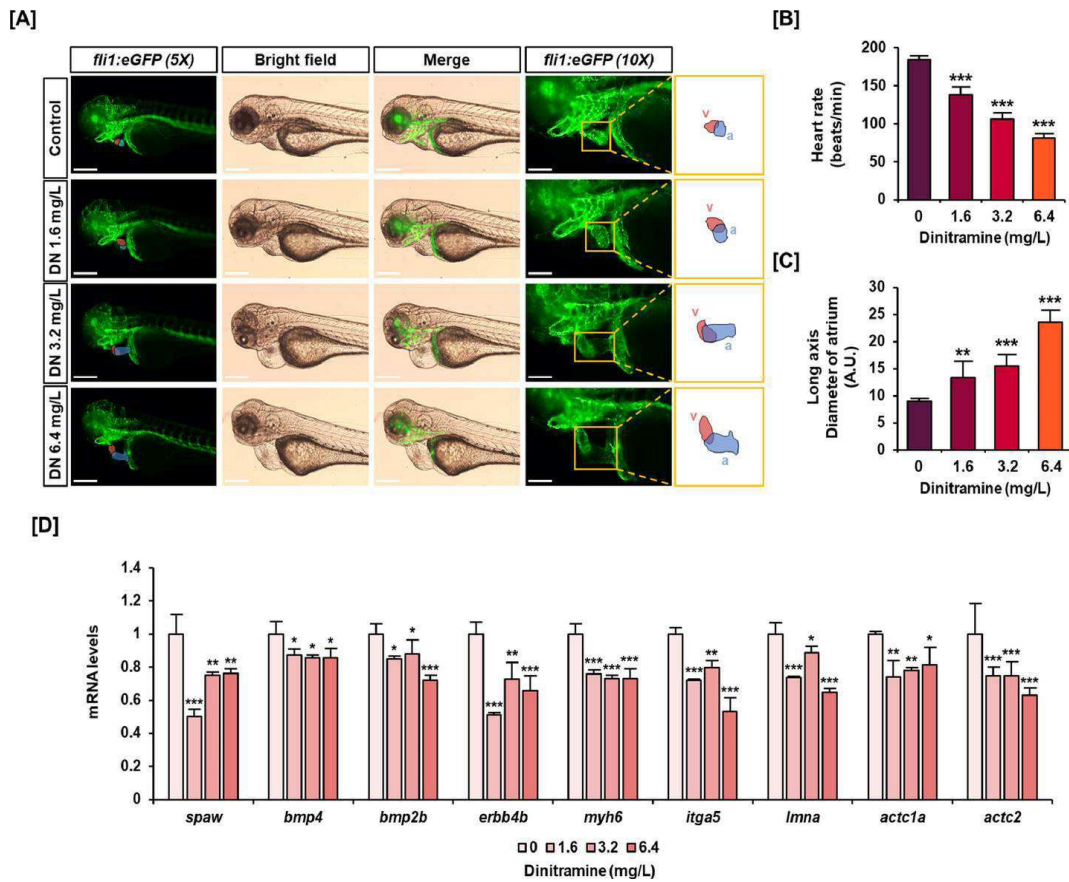
도면2



도면3



도면4



도면5

