(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0050846
(43) 공개일자 2022년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61P 11/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0035276(분할)
(22) 출원일자 2022년03월22일
심사청구일자 2022년03월22일
(62) 원출원 특허 10-2020-0134042
원출원일자 2020년10월16일
심사청구일자 2020년10월16일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
김종엽
대전시 유성구 엑스포로 339번길 320, 싸이언스빌 3동 403호
유재성
대전시 유성구 송림로 20 송림마을 2단지 201동 101호
(74) 대리인
특허법인비엘티

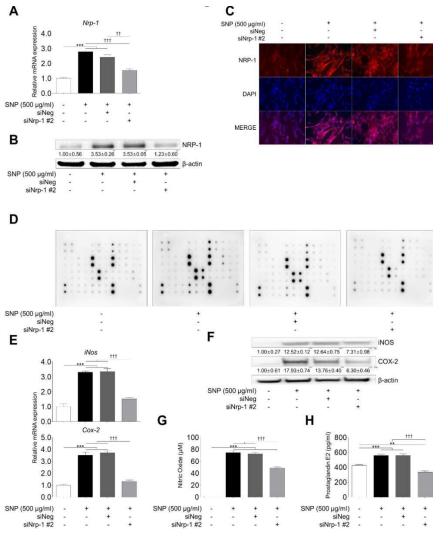
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **NRP-1의 발현 또는 활성 억제제를 유효 성분으로 포함하는 만성 비부비동염 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 NRP-1의 발현 또는 활성 억제제를 유효 성분으로 포함하는 만성 비부비동염 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 비강 용종, 만성 비부비동염의 치료 또는 예방제로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61P 11/02 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711143642
과제번호 2020R1C1C1005165
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 난치성 비용 치료를 위한 신약 후보물질 탐색
기 여 율 1/1
과제수행기관명 건양대학교병원
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

NRP-1의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 비부비동염 예방 또는 치료용 약학 조성물로서, 상기 NRP-1 발현 또는 활성 억제제는 서열번호 1과 2의 쌍, 서열번호 3과 4의 쌍 또는 서열번호 5와 6의 쌍으로 이루어진 siRNA (small interfering RNA)인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 siRNA는 10 내지 40 뉴클레오티드 길이의 이중가닥 RNA인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 siRNA의 말단 구조는 평활 (blunt) 말단 또는 점착 (cohesive) 말단인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 siRNA의 말단의 돌출 부분에 dTdT, UU 또는 NRP-1 mRNA와 일치하는 또는 상보적인 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 siRNA는 화학적 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 화학적 변형은 상기 siRNA 분자에 포함되는 적어도 1종의 뉴클레오티드의 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 수소 원자, 할로겐 원자, -O-알킬기, -O-아실기 및 아미노기로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나로 치환된 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 화학적 변형은 상기 siRNA 분자에 포함되는 적어도 1종의 뉴클레오티드의 포스페이트 백본이 포스포로티오에이트 (phosphorothioate form), 포스포로디티오에이트 (phosphorodithioate form), 알킬포스포네이트 (alkylphosphonate form), 포스포로아미데이트 (phosphoroamidate form) 및 보라노포스페이트 (boranophosphate form)로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나로 치환된 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은 만성 비부비동염 세포의 염증 반응을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 조성물은 만성 비부비동염 세포의 iNOS, COX, NO 및 PGE_2 로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 조성물은 만성 비부비동염 세포의 VEGFR2 인산화, JNK, AKT, P38 MAPK 및 NF-κB으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 만성 비부비동염은 비용종을 동반한 만성 비부동염인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 비용종을 동반한 만성 비부비동염은 비 호산구형 비강 용종을 동반한 비부비동염 또는 호산구형 비강 용종을 동반한 비부비동염인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 NRP-1의 발현 또는 활성 억제제를 유효 성분으로 포함하는 만성 비부비동염 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 만성 비부비동염(CRS, chronic rhinosinusitis)은 비강(sinonasal) 점막에 발생하는 가장 흔한 만성 염증성 질환 중 하나이며, 세계적으로 높은 감염률을 나타내고, 환자의 삶의 질의 저하로 사회경제적인 부담을 초래하는 질병이다. 만성 비부비동염(CRS)은 일반적으로 두 가지 특수 형태인 비강 용종이 없는 CRS(CRSsNP) 및 비강 용종이 있는 CRS(CRSwNP)로 분류된다. 비록 CRSsNP가 우세하지만 CRSwNP는 모든 CRS 사례의 약 20% 내지 33%를 차지하며, CRSwNP는 2개의 특수형인 비 호산구형 CRSwNP(NE-CRSwNP)와 비강 용종에서 조직 내 호산구 침윤 보급률이 전체 염증 세포의 10%를 초과하는 호산구형 CRSwNP(E-CRSwNP)로 분류된다. CRSwNP는 종종 천식, 진균성 비부비동염 및 아스피린 과민성 호흡기 질환을 동반하며 표준 의료 요법 및 내시경 부비동 수술 후에 치료 결과가 좋지 않다. 여러 연구를 통해 CRSwNP 형성과 특정 사이토카인, 케모카인의 관련성을 확인하였지만 현재까지 CRSwNP의 구체적인 병리학적 기작은 여전히 불분명하다.

[0003] 뉴로필린-1(Neuropilin-1, NRP-1)은 비 티로신 키나제 막횡단 당단백질로, 다양한 포유류 조직에서 면역학적 반응의 필수 성분이다. NRP-1은 혈관 내피 성장 인자(VEGF)에 대한 보조 수용체(co-receptor)로 VEGF와 VEGF 수용체(VEGFR) 사이의 상호 작용을 강화한다. VEGFRs는 내피 세포에 위치하지만 많은 비 내피세포에서도 혈관 형성(vasculogenesis) 및 혈관 신생(angiogenesis)에 중요한 역할을 하며, 혈관 투과성을 자극하여 VEGFs과 함께 염증을 조절한다. VEGF의 억제는 각종 암 및 염증성 질환의 치료에서 기능적으로 혈관 신생 차단을 주도하고 있다. 그러나, NRP-1에 대한 기존 연구는 주로 혈관 신생 및 면역 억제의 유도에 한정되어 있다(Chen, H. et al., Neuron 1997, 19, 547-559; Mey, L. et al., Neurobiol Dis 2013, 59, 111-125).

[0004] 본 발명자들은 NRP-1의 발현 또는 활성을 억제하여 인간 만성 부비동염 세포에서 염증 관련 인자들의 감소를 확인하여, NRP-1의 발현 또는 활성 억제제가 만성 부비동염 예방 또는 치료에 효과적으로 이용될 수 있음을 확인하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 일본공개특허 2015-533127호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 만성 부비동염 치료에 효과적인 NRP-1 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물을 제공하고자 한다.

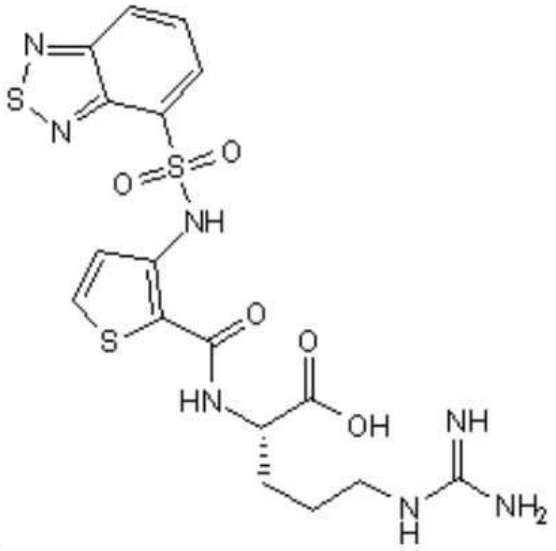
과제의 해결 수단

[0007] 상기 상술한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 NRP-1 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명자들은 DNA 메틸화 수준이 CRSwNP에서 변경됨을 확인하고, 대조군과 비교하여 E-CRSwNP 또는 NE-CRSwNP의 메틸화 프로파일을 확인하여 E-CRSwNP와 NE-CRSwNP에서 각각 총 399 및 208개의 유전자에서 저메틸화(hypomethylated)를 확인한 후, 저메틸화된 E-CRSwNP 및 NE-CRSwNP에 존재하는 163개 유전자를 스크리닝 하던 중 염증이 유발된 인간 비강 폴립 유래 섬유아세포(hNPDFs)에서 NRP-1의 발현 또는 활성 억제제에 의해 염증관련 인자의 감소 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 만성 비부비동염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] <화학식 1>



[0011]

[0012] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 *N*2-[[3-[(2,1,3-벤조티아디아졸-4-일설포닐)아미노]-2-티에닐]카르보닐]-L-아르기닌이다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 NRP-1의 발현 또는 활성을 억제한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 만성 비부비동염 세포의 염증 반응을 억제한다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 만성 비부비동염 세포는 만성 비부비동염이 있는 환자로부터 유래된 hNPDFs를 사용하였다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 만성 비부비동염 세포의 iNOS, COX, NO 및/또는 PGE_2를 억제한다.

[0016] iNOS는 인터페론-γ(INF-γ), 리포폴리사카라이드(LPS) 및 각종 염증성 사이토카인에 의해 발현된다. COX-2는 염증 반응 동안 사이토카인의 자극에 의해 크게 증가되며, iNOS 및 COX-2는 염증 과정에서 NO 및 PGE_2와 같은 다량의 전 염증 매개자를 유도한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 만성 비부비동염 세포의 VEGFR2 인산화, JNK, AKT, P38 MAPK 및 NF-$_{\kappa}$B를 감소시킨다.

[0018] 본 발명의 상기 화합물은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.

[0019] 약학적으로 허용 가능한 염으로는 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동일한 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0020] 이 때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아 세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산(propionic acid),

구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 카본산, 바닐릭산 및 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.

[0021] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비 용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0022] 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 하이드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포 네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조 방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 만성 비부비동염은 비용종을 동반한 만성 비부동염이다.

[0024] 비용종은 T 세포, 비만 세포(mast cell), 상피 세포 및 섬유아세포와 같은 다양한 세포 유형으로 구성된다. 특히, 섬유아세포는 조직 리모델링 및 염증에 중요한 역할을 하며, 사이토카인 및 케모카인과 같은 다양한 전 염증성 매개자를 분비한다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 비용종을 동반한 만성 비부비동염은 비 호산구형 비강 용종을 동반한 비부비동염(NE-CRSwNP) 또는 호산구형 비강 용종을 동반한 비부비동염(E-CRSwNP) 이다.

[0026] 본 발명의 만성 비부비동염 예방 또는 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다.

[0027] 본 발명의 화합물을 포함하는 약학조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일 리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록 시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0029] 본 발명의 화합물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 및 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0031] 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 및 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 및 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물 및 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리 에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름 및 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지 및 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은

0.0001 ~ 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 ~ 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 조성물에서 본 발명의 화합물은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 ~ 50 중량%의 함량으로 배합될 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식 은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 및 뇌혈관내(intracere broventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0034] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 상기 NRP-1 발현 또는 활성 억제제는 siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA), miRNA (micro RNA), 리보자임 (ribozyme), DNAzyme, PNA (peptide nucleic acids), 안티센스 뉴클레오티드, 펩타이드, 항체, 및 압타머로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 siRNA는 서열번호 1과 2의 쌍, 서열번호 3과 4의 쌍 또는 서열번호 5와 6의 쌍 중에서 선택되는 것인 만성 비부비동염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 NRP-1의 발현 또는 활성을 억제한다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 만성 비부비동염 세포의 염증 반응을 억제한다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 만성 비부비동염 세포의 iNOS, COX, NO 및/또는 PGE_2를 억제한다.

[0039] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 만성 비부비동염 세포의 VEGFR2 인산화, JNK, AKT, P38 MAPK 및 NF- $_K$B를 감소시킨다.

[0040] 본 발명자들은 만성 부비동염 환자에서 채취한 비강 폴립 유래 섬유아세포(hNPDFs)에서 NRP-1 유전자를 타겟하는 서열번호 1과 2의 쌍, 서열번호 3과 4의 쌍 또는 서열번호 5와 6의 쌍 중에서 선택되는 siRNA를 포함하는 만성 비부비동염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 일 실시예에서, siRNA에 의해 NRP-1의 발현 또는 활성이 감소됨을 확인하고, 염증 관련 인자인 iNOS, COX의 발현이 감소됨을 확인하고, NO 및 PGE_2의 생산이 감소됨을 확인하여 만성 비부비동염 예방 또는 치료에 대한 효과를 확인하였다.

[0041] 상기 siRNA는 표적 mRNA와 완전히 상보적 결합을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보 적이지 않음) 또는 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다.

[0042] 상기 siRNA를 이루는 뉴클레오티드 길이는 NRP-1의 활성 또는 발현을 방해할 수 있는, 10 내지 40 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 15 내지 30 뉴클레오티드 길이, 보다 바람직하게는 18 내지 20 뉴클레오티드 길이의 이중가닥 RNA일 수 있다. siRNA의 길이는 뉴클레오티드가 이중가닥(페어링)을 이루는 길이를 말한다.

[0043] 상기 siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단이 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 쪽이 돌출(overhang)한 구조와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조가 모두 가능하다. 돌출되는 뉴클레오티드 수는 한정되지 않으나, 예를 들어 1 내지 8 뉴클레오티드, 바람직하게는 1 내지 4 뉴클레오티드일 수 있다.

[0044] 상기 siRNA는 표적 유전자의 발현 억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서, 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 dTdT, UU, 또는 이중가닥 형성부에서 계속해서 NRP-1 mRNA와 일치하는 또는 상보적인 서열 등을 포함할 수 있다.

[0045] 상기 siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

[0046] 상기 siRNA는 생체 내 핵산 분해효소에 의한 빠른 분해를 막고 생체 내 안정성을 높이기 위해 당업계에 알려진 일반적인 방법으로 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, siRNA에 포함되는 적어도 하나의 뉴클레오티드의 당(ribose ring)의 2'-위치의 수산기가 수소 원자, 할로겐 원자, -O-알킬기, -O-아실기 또는 아미노기, 구체적으로는 H, OR, R, R'OR, SH, SR, NH2, NHR, NR2, N3, CN, F, Cl, Br, I 등으로 치환되거나(이 때 R은 알킬 또는 아릴, 바람직하게는 탄소수 1~6의 알킬기, R'은 알킬렌, 바람직하게는 탄소수 1~6의 알킬렌일 수 있다), 인산 백본(backbone)이 포스포로티오에이트, 포스포로디티 오에이트, 알킬포스포네이트, 포스포로아미데이트, 또는

보라노포스페이트 등으로 치환될 수 있다.

[0047] siRNA의 화학적 변형의 일례로, siRNA 센스 또는 안티센스 가닥의 포스포디에스테르 결합을 보라노포스페이트(boranophosphate) 또는 포스포로티오에이트(phosphorothioate)로 치환하여 핵산 분해에 대한 저항성을 높일 수 있다. 일례로, siRNA 센스 또는 안티센스 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단 또는 양 말단, 바람직하게는 RNA의 종결 위치, 예컨대, 3' 말단 돌출부(예컨대 (dT)n, n=1-5, 바람직하게는 2-4의 정수)에만 도입할 수 있다.

[0048] 다른 일례로, siRNA 센스(sense) 또는 안티센스(anti-sense) 가닥의 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에 ENA(Ethylene bridge nucleic acid) 혹은 LNA(Locked nucleic acid)를 도입하는 방법이 있으며, 바람직하게는 siRNA 센스(sense) 가닥의 5' 말단에 도입할 수 있다. 이를 통해 RNAi 능력에 영향을 미치지 않고 siRNA 안정성을 증가시키고 면역 반응 및 비특이적 억제 효과를 줄일 수 있다.

[0049] 상기 siRNA는 이의 활성을 저하시키지 않는 변화를 갖는 기능적 등가물인, 하나 이상의 치환, 삽입, 결실 및 이들의 조합을 갖는 변형체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 제작된 siRNA는 각 해당 서열번호의 siRNA와 80% 이상의 상동성을 나타낼 수 있으며, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 나타내는 것을 포함할 수 있다. 이러한 상동성은 당 분야에 널리 공지된 컴퓨터 알고리즘, 예를 들어 Align 또는 BLAST 알고리즘을 이용하여 뉴클레오티드의 서열을 표적 유전자의 상응하는 부분과 비교하여 용이하게 결정할 수 있다.

[0050] siRNA를 제조하는 방법으로, 직접 화학적으로 합성하는 방법 (Sui G et al., Proc Natl Acad Sci USA, 99:5515-5520, 2002), 인 비트로(*in vitro*) 전사를 이용하여 합성하는 방법(Brummelkamp TR et al., Science, 296:550-553, 2002), 인 비트로 전사에 의해 합성된 긴 이중-가닥 RNA를 RNaseIII 패밀리 효소를 이용하여 절단하는 방법(Paul CP et al., Nature Biotechnology, 20:505-508, 2002) 등 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 합성할 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명은 NRP-1의 발현 또는 활성 억제제를 함유하는 약학 조성물을 제공한다. 상기 NRP-1 발현 또는 활성 억제제는 만성 비부비동염의 치료 또는 예방제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 hNPDFs에서 SNP 자극에 의한 염증 유도 및 NPR-1의 발현 증가를 나타낸 결과이다. (A) hNPDFs에서 SNP의 자극에 의한 염증 항체 분석 결과. (B) SNP로 자극된 hNPDFs에서 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현 결과. (C) SNP로 자극된 hNPDFs에서 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현 결과. (D) 및 (E) SNP로 자극된 hNPDFs에서 NO 및 PGE_2 생산 결과. (F) SNP로 자극된 hNPDFs에서 NRP-1 mRNA 발현 결과. (G), (H) SNP로 자극된 hNPDFs에서 NRP-1 단백질 발현 결과.

도 2는 SNP 자극된 hNPDFs에서 NRP-1 녹다운에 의한 염증 반응의 변화를 나타낸 결과이다. hNPDFs는 NRP-1에 대한 siRNA(siNrp-1 #2)로 형질전환된 후 SNP 자극으로 염증이 유도되었다. (A) NRP-1 녹다운된 hNPDF에서 SNP 자극 후 NRP-1 mRNA 발현 결과. (B) NRP-1 녹다운된 hNPDF에서 SNP 자극 후 NRP-1 단백질 발현 결과. (D) NRP-1 녹다운된 hNPDFs에서 SNP 자극 후 수행된 염증 항체 분석 결과. (E) NRP-1 녹다운된 hNPDF에서 SNP 자극 후 iNOS 및 COX-2 mRNA 발현 결과. (F) NRP-1 녹다운된 hNPDF에서 SNP 자극 후 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 결과. (G) NRP-1 녹다운된 hNPDF에서 SNP 자극 후, NO 및 PGE_2 생산 결과.

도 3은 SNP 자극된 hNPDFs에서 화학식 1 화합물의 효과를 나타낸다. (A) SNP 자극된 hNPDF에서 화학식 1의 화합물 처리 유무에 따른 NRP-1의 mRNA 발현 결과. (B) SNP 자극된 hNPDF에서 화학식 1의 화합물 처리 유무에 따른 NRP-1의 단백질 발현 결과. (D) SNP 자극된 hNPDF에서 화학식 1의 화합물 처리 유무에 따른 염증 항체 분석 결과. (E) SNP 자극된 hNPDF에서 화학식 1의 화합물 처리 유무에 따른 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현 결과. (F) SNP 자극된 hNPDF에서 화학식 1의 화합물 처리 유무에 따른 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 결과. (G) 및 (H) SNP로 자극된 hNPDFs에서 화학식 1의 화합물 처리 유무에 따른 NO 및 PGE_2 생산 결과.

도 4는 SNP 자극된 hNPDFs에서 화학식 1의 화합물의 VEGFR2, JNK1/2, AKT, P38 MAPK 및 NF-$_{\kappa}$B 활성화에 대한 효과를 나타낸다. 웨스턴 블롯에 의해 VEGFR2, JNK1/2, AKT, P38 MAPK 및 NF-$_{\kappa}$B의 활성화(인산화)를 분석하였다.

도 5는 hNPDF에 대한 SNP의 IC_{50} 곡선을 나타낸다.

도 6은 SNP 자극된 hNPDFs에서 사이토카인 및 케모카인의 증가를 나타낸다.

도 7은 hNPDFs에 형질전환된 siNRP-1의 효과를 나타낸다.

도 8은 염증 유도 조건에서 NRP-1 녹다운에 대한 사이토카인 및 케모카인 감소 수준을 나타낸다.

도 9는 화학식 1의 화합물이 다양한 농도(100 pM ~ 100 M)로 처리된 hNPDFs에서 세포 생존율을 CCK-8 분석으로 나타낸다.

도 10은 화학식 1의 화합물이 처리된 hNPDFs에서 사이토카인 및 케모카인 발현의 감소를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 실시 예를 통해서 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하지만, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] **[실시예 1] 실험 준비 및 실험 방법**

[0056] 1-1. 세포 배양

[0057] 비강 용종 조직은 건양대학교 병원 이비인후과에서 모집된 비강 용종이 있는 만성 비부비동염(CRSwNP) 환자 6명으로부터 채취하였다. 환자들은 알레르기, 천식, 또는 아스피린 민감성의 병력이 없었고, 적어도 2 개월 동안 경구 항 알레르기제로 치료된 바 없었다. 비강 용종 생검은 냉각 PBS로 세척한 후 IV형 콜라게나아제(1 mg/ml, ThermoFisher Scientific)로 옮겨졌다. 생검은 수술용 가위로 잘게 자른 후 1 시간 동안 37 ℃에서 배양하였다. 생검은 세척한 후 10% 우태아혈청(FBS; Corning, Corning, NY, USA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(P/S, ThermoFisher Scientific)이 배양 접시에 보충된 pre-warmed RPMI1640(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

[0059] 1-2. 염증 항체 분석(Inflammation antibody array)

[0060] 염증 반응을 유도하기 위해 hNPDFs를 24 시간 동안 SNP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 500 μg/ml으로 처리하였다. hNPDFs는 염증 조직으로부터 분리가 되었지만, 체외 배양 과정 동안 염증반응 관련 인자들의 결핍으로 인해 염증 반응이 일어나지 않기 때문에 추가적으로 염증 반응 유도 물질인 SNP를 처리하였다. 24 시간 후, Human Inflammation Array C3 kit (RayBiotech, Norcross, GA, USA)를 제조업체의 프로토콜에 따라 배양 배지에 사용하였다. 멤브레인을 30분 동안 블로킹하고, 배양 배지를 적재한 후 4 ℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 멤브레인을 세척 완충제로 세척하고 4 ℃에서 하룻밤 동안 biotinylated cocktail에서 배양하였다. 멤브레인을 세척 완충제로 세척한 후 실온에서 2 시간 동안 horseradish peroxidase-streptavidin cocktail과 함께 배양하였다. 검출 솔루션과 LuminoGraph2 이미지 시스템(ATTO, Tokyo, Japan)을 사용하여 점들을 감지하였다. 이미지는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석하였고, 염증성 단백질 수준은 기저 수준에 대해 상대적으로 표현하였다.

[0062] 1-3. 총 RNA 추출 및 실시간 중합효소 연쇄 반응

[0063] 총 RNA는 제조업체의 프로토콜에 따라 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 정제하였다. 역전사는 제조사의 프로토콜에 따라 gDNA remover (Toyobo, Osaka, Japan)와 함께 ReverTraAce qPCR RT mater mix를 사용하여 수행하였다. 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)에 유전자 특이적 프라이머를 장착한 Fast SYBR ® Green Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 사용하여 Quantitative real-time PCR을 수행하였다. 사용된 프라이머 서열 목록은 하기 표 1에 나타냈다.

표 1

유전자	서열		서열번호
Nrp-1	Forward	AACCCTCACTTCGATTTGGA	7
	Reverse	AATGGCCCTGAAGACACAAC	8
iNos	Forward	AGGGACAAGCCTACCCCTC	9
	Reverse	CTCATCTCCCGTCAGTTGGT	10
Cox-2	Forward	ATGCTGACTATGGCTACAAAAGC	11
	Reverse	TCGGGCAATCATCAGGCAC	12
β-actin	Forward	TCCTCTCCCAAGTCCACACAGG	13
	Reverse	GGGCACGAAGGCTCATCATTC	14

[0064]

[0066] 1-4. 웨스턴 블롯(Western Blot)

[0067] 염증 유발 hNPDFs는 프로테아제 억제제 칵테일(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)을 함유하는 RIPA 버퍼(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 얼음 위에서 30 분 동안 용해한 후 4 ℃에서 30 분 동안 20,000 xg에서 원심분리하였다. 단백질 농도는 BCA 단백질 분석 키트(ThermoFisher Scientific)를 사용하여 결정하였다. 총 단백질(30 μg)은 Bolt™ 4-12% Bis-Tris Mini Protein Gel(ThermoFisher Scientific)을 통해 분리하고 iBlot2 Transfer Device (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 PVDF 멤브레인(ThermoFisher Scientific)으로 운반하였다. 멤브레인은 RT에서 2 시간 동안 5% skim milk (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에서 블로킹한 후 4 에서 하룻밤 동안 관찰하고자 하는 각각의 단백질에 특이적 1차 항체와 함께 배양하였다. 멤브레인은 0.1% Tween-20을 포함하는 TBS로 세척한 다음 HRP-컨쥬게이드 이차 항체(ThermoFisher Scientific)로 probe하였다. 밴드는 SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) 및 LuminoGraph2 이미지 시스템(ATTO)을 사용하여 검출하였다. 실험에 사용된 항체는 표 2에 나타냈다.

표 2

항체	회사	카탈로그 번호	희석
anti-NRP-1	Abcam	ab81321	1:1,000
anti-iNOS	CST	#39898	1:1,000
anti-COX-2	CST	#12282	1:1,000
anti-NF-κB p65	CST	#3039	1:1,000
anti-phospho-AKT	CST	#4060	1:1,000
anti-AKT	CST	#4691	1:1,000
anti-phospho-SAPK/JNK	CST	#4668	1:1,000
anti-SAPK/JNK	CST	#9252	1:1,000
anti-phospho-p38 MAPK	CST	#4511	1:1,000
anti-p38 MAPK	CST	#8690	1:1,000
anti-phospho-VEGFP2 (Tyr1175)	CST	#3770	1:1,000
anti-VEGFP2	CST	#9698	1:1,000
anti-β-Actin	Sigma Aldrich	A5441	1:5,000
anti-Mouse-HRP	ThermoFisher	G-21040	1:10,000
anti-Rabbit-HRP	ThermoFisher	G-21234	1:10,000
anti-Rabbit-Alexa647	Abcam	ab150079	1:200

[0068]

[0069] 1-5. 면역 세포 화학 염색(Immunocytochemistry)

[0070] 염증 유발 hNPDFs 세포는 RT, 15 분 동안 PBS에서 4% 파라포름알데히드(PFA)으로 고정하고, 상온에서 15 분 동안 0.25% Triton X-100에서 투과하였다. 세포는 4% 소혈청알부민(BSA; RMBIO, Missoula, MT, USA) / PBS에서 RT, 1 시간 동안 블로킹된 후 항 NRP-1 항체(Abcam, Cambridge, MA, USA)로 4 ℃에서 하룻밤 배양했다. 배양 후, 세포는 PBS에서 0.05% Tween-20(Sigma-Aldrich)로 세척한 후, RT/DAPI 시약(ThermoFisher Scientific)으로 1 시간 동안 Alexa Fluor 647 컨쥬게이트된 이차 항체(Abcam)와 함께 배양하였다. 형광 이미지는 EVOS M7000 Image System (ThermoFisher Scientific)로 확인하였다.

[0071]

[0072] 1-6. NRP-1 녹다운

[0073] hNPDFs는 제조사의 프로토콜에 따라 Lipofectamin RNAiMAX Reagent (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 NRP-1에 대한 siNRP-1(Bioneer, Daejeon, Korea)로 형질감염시켰다. 본 연구에서 사용된 siRNA 서열 목록은 표 3에 나타냈다.

표 3

[0074]

유전자	카탈로그 번호	siRNA 서열	서열번호
siNrp-1 #1	8829-1	CUG AUG UUG GCC CUC ACA U=tt (1-AS)	1
		AUG UGA GGG CCA ACA UCA G=tt (1-AA)	2
siNrp-1 #2	8829-2	GAG AGU GGA UAC AGG UAG A=tt (1-AS)	3
		UCU ACC UGU AUC CAC UCU C=tt (1-AA)	4
siNrp-1 #3	8829-3	GGA GCC UGA CUC AAA UCC U=tt (1-AS)	5
		AGG AUU UGA GUC AGG CUC C=tt (1-AA)	6

[0075] 1-7. 산화 질소(NO) 분비 분석

[0076] NO 분비를 측정하기 위해, 50 μl의 배양 배지를 각 세포 그룹으로부터 수집하고 제조업체의 프로토콜에 따라 산화 질소 분석 키트(R&D System, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 정량화하였다. 배양 배지는 Griess 시약 I와 II와 혼합하였고 RT에서 10분 동안 배양하였다. 흡수도는 SpectraMax iD3 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

[0078] 1-8. 프로스타글란딘 E_2 (PGE_2) 분비 분석

[0079] PGE_2를 측정하기 위해, 100μl의 배양 배지를 각 군으로부터 채취 및 제조업체 프로토콜에 따라 Prostaglandin E_2 효소 결합 면역 분석 키트(Abcam)를 사용하여 정량화하였다. 배양 배지는 PGE_2 Alkaline Phosphatase Conjugate와 PGE_2 항체를 혼합하고, ~500 rpm에서 2 시간 동안 플레이트 쉐이커에 배양하였다. 배양 후, 샘플은 총 3개의 세척을 위해 세척 버퍼로 세척한 다음 RT에서 pNpp 기질 용액으로 45 분 동안 배양하였다. 배양 후 스톱 솔루션으로 처리한 다음 SpectraMax iD3 마이크로 플레이트 리더(Molecular Devices)를 사용하여 405 nm에서 즉시 측정하였다.

[0081] **[실시예 2] SNP 자극된 hNPDFs의 염증 및 NRP-1 발현 분석**

[0083] hNPDFs에 염증 유도를 위해, 24 시간 동안 hNPDFs에 다양한 농도의 SNP를 처리하여, 적절한 SNP 농도(500 μg/ml)를 확립하였다(도 5). SNP에 의한 염증 유도 여부, 염증 항체 분석을 사용하여 염증 반응을 분석하였다. 그 결과 모든 SNP 치료에 의해 사이토카인과 케모카인 발현 증가를 확인하였다. 실험군은 대조군에 비해 최대 4.29 배의 발현 증가를 확인하였다(도 1A, 도 6).

[0084] SNP 자극된 hNPDFs에서, 염증에서 중요한 역할을 하는 iNOS 및 COX-2의 mRNA 및 단백질의 발현이 대조군에 비해 현저히 증가함을 확인하였다. SNP 자극된 hNPDFs에서 대조군에 비해 *iNOS* mRNA는 2.92 ± 0.92 배, *Cox-2* mRNA는 3.31 ± 0.91 배 증가하였다(도 1B). SNP 자극된 hNPDFs에서 대조군에 비해 iNOS 단백질은 3.17 ± 0.13 배 Cox-2 단백질은 5.11 ± 0.06 배 증가하였다(도 1C).

[0085] SNP 자극된 hNPDFs에서 NO의 생산(도 1D, 대조군: 1.18 ± 0.20 μM, SNP 처리군: 65.85 ± 7.29 μM) 및 PGE_2의 생산(도 1E, 대조군: 365.22 ± 80.31 pg/ml, SNP 처리군: 462.27 ± 18.11 pg/ml)이 각각 대조군에 비해 크게 증가함을 확인하였다.

[0086] SNP 자극된 hNPDFs에서 NRP-1 발현은 mRNA 수준에서 대조군과 비교하여 2.60 ± 0.44 배 증가하였으며(도 1F), 단백질 수준에서 대조군과 비교하여 3.54 ± 0.02 배 증가하였다(도 1G, 도 1H).

[0087] 그 결과, hNPDFs에 SNP를 처리함으로써 염증 관련 사이토카인 및 케모카인이 증가되어 염증이 유도됨을 확인하

고, iNOS 및 COX-2 발현이 증가되었으며, NO 및 PGE_2의 생산이 증가하고, NRP-1 발현이 증가함을 확인하였다.

[0089] **[실시예 3] NRP-1 발현과 염증 반응 간 상관관계 분석**

[0091] 염증에 대한 NRP-1의 직접적 효력을 확인하고, NRP-1 발현 또는 활성 억제제를 이용하여 염증 반응이 감소되는지 확인하기 위하여, hNPDFs에 대해 NRP-1 유전자를 타겟하는 siRNAs(표 3)로 형질전환하여 NRP-1 유전자를 녹다운시켰다(도 7 A, B). siNRP-1#2로 형질전환된 hNPDFs에서 형질전환 48시간 후 NRP-1 mRNA 및 단백질 발현이 효과적으로 녹다운 된 것을 관찰하였다(도 7 A, B). NRP-1 녹다운 된(siNRP-1#2) hNPDFs는 SNP 처리에 의해 염증성 조건에서도 NRP-1 mRNA는 SNP 처리군에 비해 0.55 ± 0.01배 감소되었으며(도 2A), NRP-1 단백질 발현은 SNP 처리군에 비해 0.35 ± 0.15배 감소되었다(도 2B, C).

[0092] NRP-1 녹다운된 hNPDFs에서 염증성 반응이 완화됨을 확인하였다(SNP 처리군에 비해 0.41 ~ 0.88 배, 도 2D, 도 8). *iNos* 및 *Cox-2* mRNA(SNP 처리군에 비해 *iNos* 0.46 ± 0.06 배, *Cox-2* 0.38 ± 0.01 배, 도 2E) 및 단백질 발현(SNP 처리군에 비해 *iNOS*, 0.58 ± 0.08 배, COX-2: 0.35 ± 0.01 배, 도 2F)이 감소되었다. 또한, NO의 생산(SNP 처리군 : 74.75 ± 8.84 μM; siNRP-1 #2 처리군: 48.78 ± 5.89 μM, 도 2G) 및 PGE_2 생산(SNP 처리군: 558.16 ± 52.41 pg/ml, siNRP-1#2 처리군: 336.54 ± 46.54 pg/ml, 도 2H)이 감소되었다.

[0093] 그 결과, NRP-1 발현이 염증 반응과 직접적으로 상관관계가 있음을 입증하였다.

[0095] **[실시예 4] NRP-1 발현 또는 활성 억제제를 이용한 염증 반응 개선 효과 분석**

[0097] NRP-1 발현 또는 활성 억제제를 이용하여 염증 반응이 감소되는지 확인하기 위해 NRP-1의 선택적 억제제인 화합물 EG00229(화학식 1)를 SNP에 의해 자극된 염증 조건에 투여하였다. 화합물 EG00229의 독성을 확인하기 위해 hNPDFs는 다양한 농도의 EG00229에서 배양한 결과, 세포 독성을 나타내지 않았으며, 10μM EG00229를 처리하는 경우 세포 증식이 현저히 증가됨을 확인하였다(도 9). EG00229 처리시 NRP-1 단백질(SNP 처리군과 비교하여 0.72 ± 0.03 배, 도 3B, 도 3C) 및 *NRP-1* mRNA(SNP 처리군과 비교하여 0.57 ± 0.14 배, 도 3A)를 감소시켰다.

[0098] EG00229를 처리하는 경우 NRP-1이 억제되어 염증 반응이 감소하였으며(SNP 처리군과 비교하여 0.63~0.89 배, 도 3D, 도 10), *iNos 및 Cox-2*의 mRNA가 감소하였으며(SNP 처리군과 비교하여 *iNos*, 0.57 ± 0.13 배; *Cox-2*, 0.57 ± 0.14 배, 도 3E), iNos 및 Cox-2의 단백질 발현이 감소하였다(SNP 처리군과 비교하여 iNOS, 0.53 ± 0.06 배; COX-2, 0.62 ± 0.01 배, 도 3F).

[0099] EG00229를 처리하는 경우 NO의 생산이 감소되고(SNP 처리군: 54.73 ± 5.00 μM; siNRP-1#2 처리군: 48.11 ± 3.60 μM, 도 3G) 및 PGE_2 생산이 감소되었다(SNP 처리군: 309.96 ± 42.29 pg/ml, siNRP-1 #2 처리군: 240.42 ± 53.19 pg/ml, 도 3H).

[0100] 그 결과, NRP-1의 억제가 염증 반응을 완화할 수 있음을 확인하였으며, NRP-1의 억제제인 EG00229가 인간 만성 부비동염 세포의 염증 반응을 완화시킴을 확인할 수 있었다.

[0102] **[실시예 5] NRP-1 발현 또는 활성 억제제의 VEGFR2를 통한 염증 관련 전사 인자의 활성 분석**

[0104] NRP-1은, 혈관신생에서 중요한 역할을 하며 염증 반응을 일으키는 수용체 티로신 키나아제인 VEGFR2에 결합하여 이를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 염증의 유도는 JNK, AKT 및 P38 MAPK 신호 경로의 활성화를 자극하며, 이러한 신호 경로는 $NF-_KB$와 같은 전사 인자를 활성화한다.

[0105] SNP 처리로 VEGFR2 인산화(티로신 1175)가 증가됨을 확인하였지만 NRP-1 발현 또는 활성 억제제인 EG00229 치료를 통해 VEGFR2 인산화(티로신 1175)가 감소된 것으로 확인하였다(SNP 처리군에 비해, 0.67 ± 0.02 배, 도 4).

[0106] JNK, AKT 및 P38 MAPK와 같은 염증 신호가 SNP 처리로 증가하고 EG00229 치료에 의해 상대적으로 감소되었다(SNP 처리군에 비해, JNK: 0.93 ± 0.07 배, AKT: 0.71 ± 0.04 배, P38 MAPK: 0.55 ± 0.07 배, 도 4).

[0107] 상대적인 염증 전사인자인 NF-$_K$B 발현은 SNP 처리에 의해 염증 상태에서 현저히 증가하였으나 EG00229 치료 시 감소하였다(SNP 처리군에 비해, 0.13±0.01배 도 4).

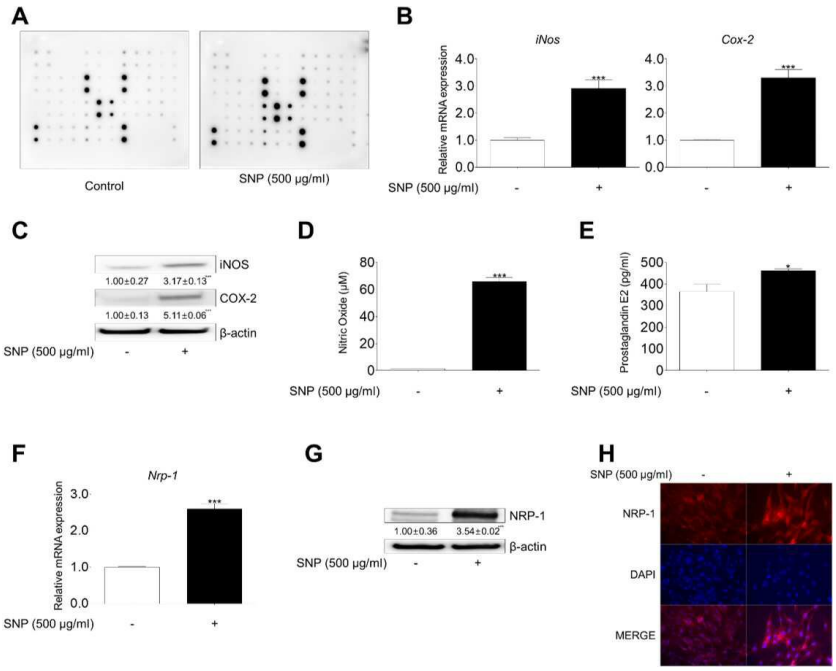
[0108] 그 결과 SNP에 의해 염증이 유도되었을 때 VEGFR2의 인산화를 통해 JNK, AKT, P38 MAPK 및 NF-$_K$B의 활성화를 나타내며, NRP-1 발현 또는 활성 억제제의 투여로 VEGFR2를 통한 염증 관련 신호 경로 및 전사 인자의 활성이 감소됨을 확인하였다.

[0109] 결론적으로 이들 결과를 종합하면, 본 발명의 NRP-1 발현 또는 활성 억제제는 인간 만성 부비동염 세포에서 염증 반응 개선 효과를 나타내고, 염증 관련 전사인자의 활성을 감소시킴을 확인하였다. 이러한 결과들은 본 발명의 NRP-1 발현 및 활성 억제제가 만성 비부비동염 치료에 역할을 할 수 있음을 시사한다.

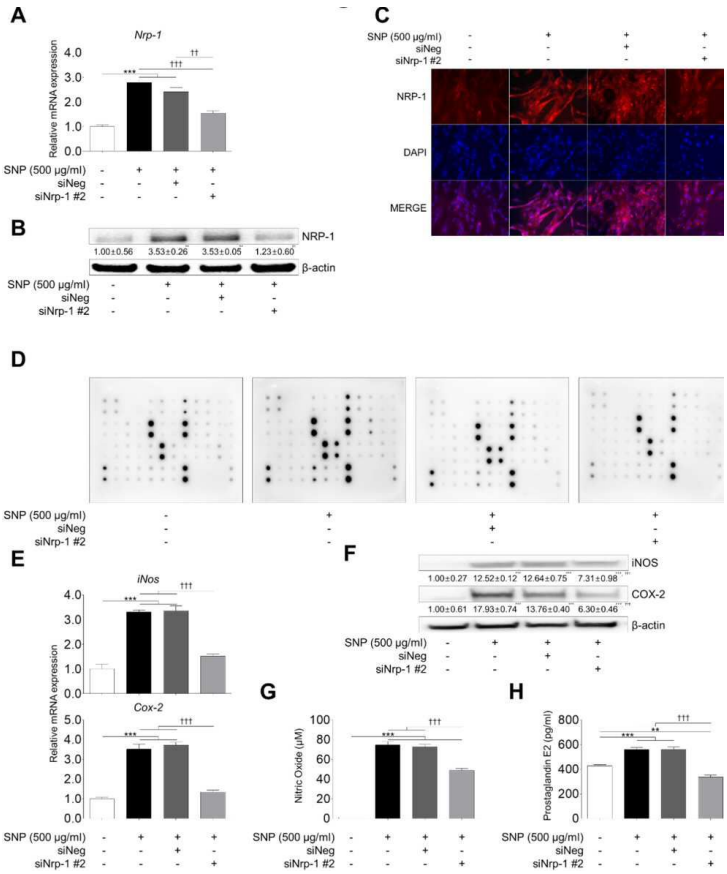
[0110] 이상에서, 출원인은 본 발명의 바람직한 실시 예들을 설명하였지만, 이와 같은 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 일 실시예일 뿐이며 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 한 어떠한 변경예 또는 수정예도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

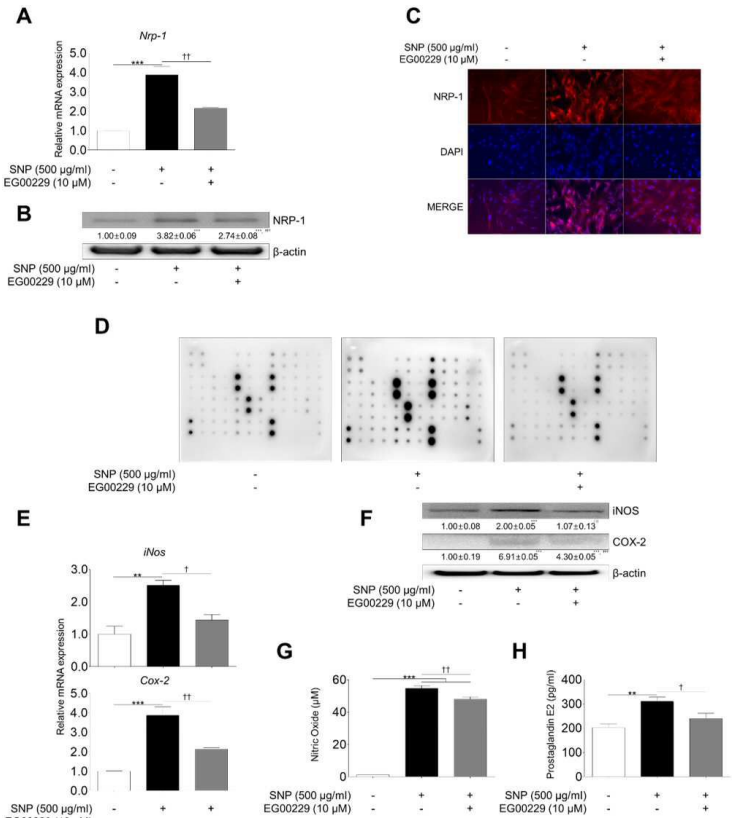
도면1



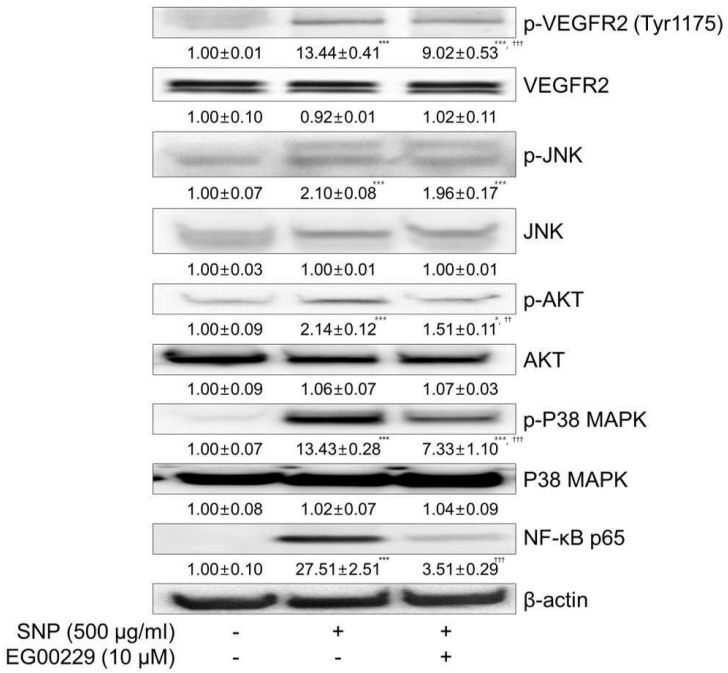
도면2


A
Nrp-1
Relative mRNA expression
SNP (500 μg/ml)
siNeg
siNrp-1 #2
B
NRP-1
β-actin
1.00±0.56
3.53±0.26
3.53±0.05
1.23±0.60
C
NRP-1
DAPI
MERGE
D
E
iNos
Cox-2
F
iNOS
COX-2
β-actin
1.00±0.27
12.52±0.12
12.64±0.75
7.31±0.98
1.00±0.61
17.93±0.74
13.76±0.40
6.30±0.46
G
Nitric Oxide (μM)
H
Prostaglandin E2 (pg/ml)

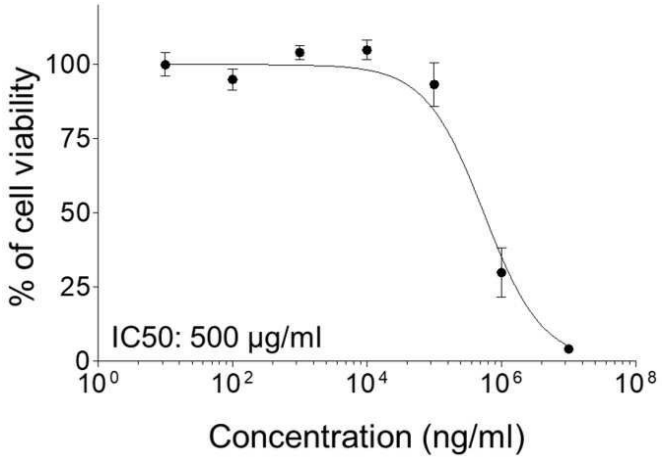
도면3


A
Nrp-1
Relative mRNA expression
SNP (500 μg/ml)
EG00229 (10 μM)
B
NRP-1
β-actin
1.00±0.09
3.82±0.06
2.74±0.08
C
NRP-1
DAPI
MERGE
D
E
iNos
Cox-2
F
iNOS
COX-2
β-actin
1.00±0.08
2.00±0.05
1.07±0.13
1.00±0.19
6.91±0.05
4.30±0.05
G
Nitric Oxide (μM)
H
Prostaglandin E2 (pg/ml)

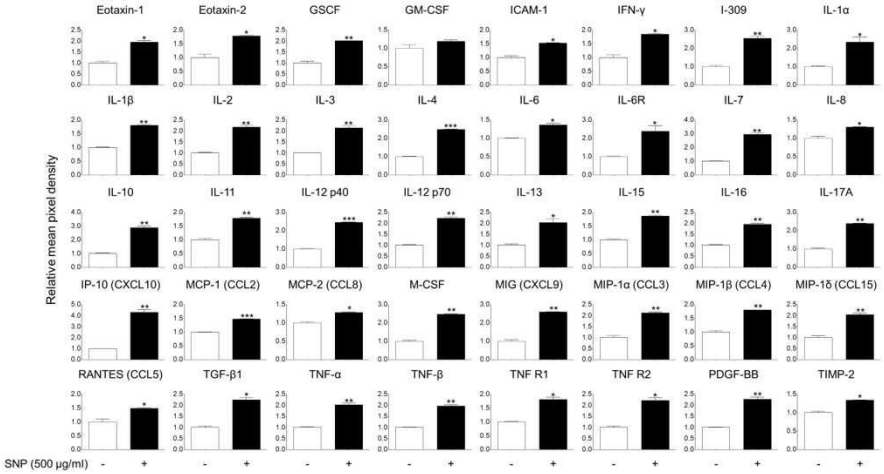
도면4


p-VEGFR2 (Tyr1175)
1.00±0.01
13.44±0.41
9.02±0.53
VEGFR2
1.00±0.10
0.92±0.01
1.02±0.11
p-JNK
1.00±0.07
2.10±0.08
1.96±0.17
JNK
1.00±0.03
1.00±0.01
1.00±0.01
p-AKT
1.00±0.09
2.14±0.12
1.51±0.11
AKT
1.00±0.09
1.06±0.07
1.07±0.03
p-P38 MAPK
1.00±0.07
13.43±0.28
7.33±1.10
P38 MAPK
1.00±0.08
1.02±0.07
1.04±0.09
NF-κB p65
1.00±0.10
27.51±2.51
3.51±0.29
β-actin
SNP (500 μg/ml) - + +
EG00229 (10 μM) - - +

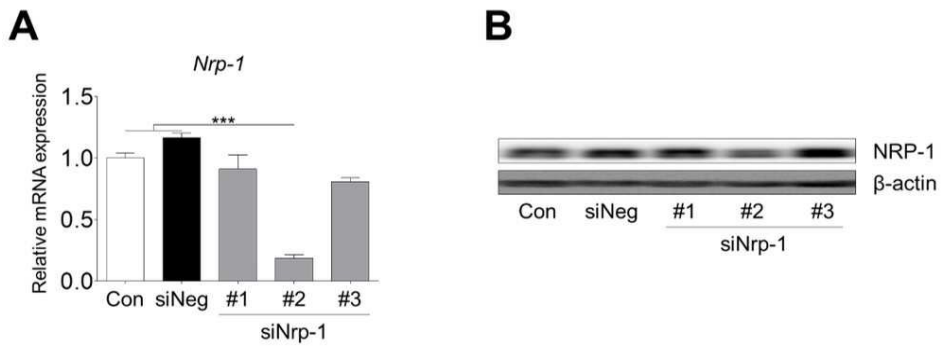
도면5


% of cell viability
100
75
50
25
0
IC50: 500 μg/ml
10^0
10^2
10^4
10^6
10^8
Concentration (ng/ml)

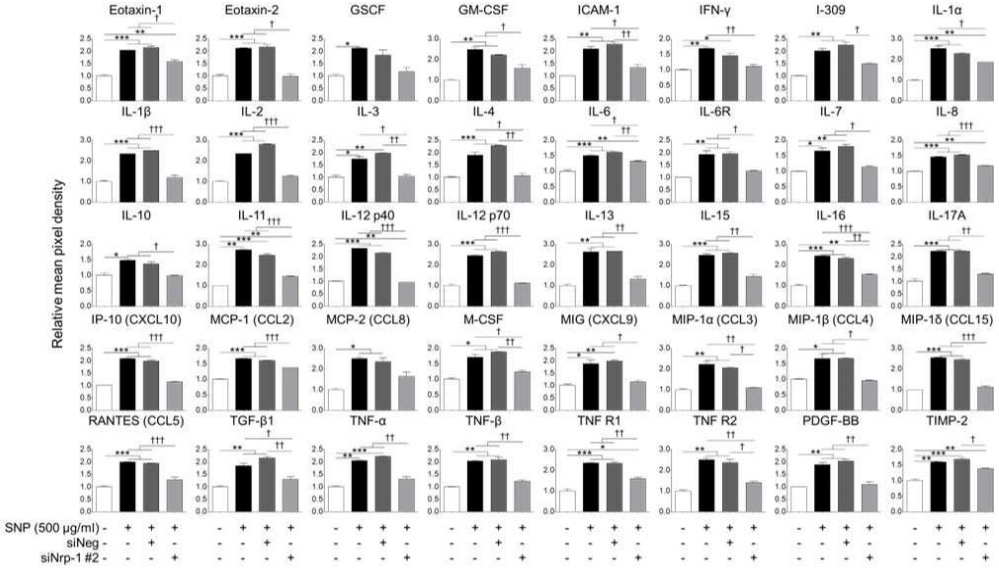
도면6


Eotaxin-1
Eotaxin-2
GSCF
GM-CSF
ICAM-1
IFN-γ
I-309
IL-1α
IL-1β
IL-2
IL-3
IL-4
IL-6
IL-6R
IL-7
IL-8
IL-10
IL-11
IL-12 p40
IL-12 p70
IL-13
IL-15
IL-16
IL-17A
IP-10 (CXCL10)
MCP-1 (CCL2)
MCP-2 (CCL8)
M-CSF
MIG (CXCL9)
MIP-1α (CCL3)
MIP-1β (CCL4)
MIP-1δ (CCL15)
RANTES (CCL5)
TGF-β1
TNF-α
TNF-β
TNF R1
TNF R2
PDGF-BB
TIMP-2
Relative mean pixel density
SNP (500 μg/ml) - + - + - + - + - + - + - + - +

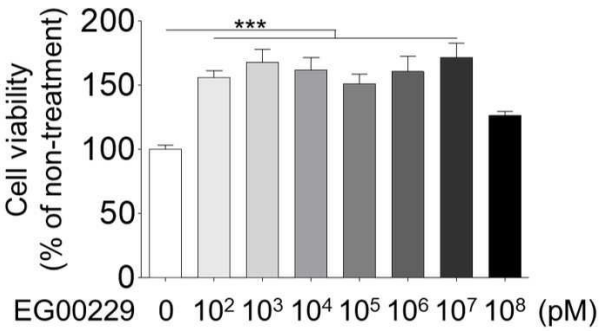
도면7


A
Nrp-1
Relative mRNA expression
1.5
1.0
0.5
0.0
***
Con
siNeg
#1
#2
#3
siNrp-1
B
NRP-1
β-actin
Con
siNeg
#1
#2
#3
siNrp-1

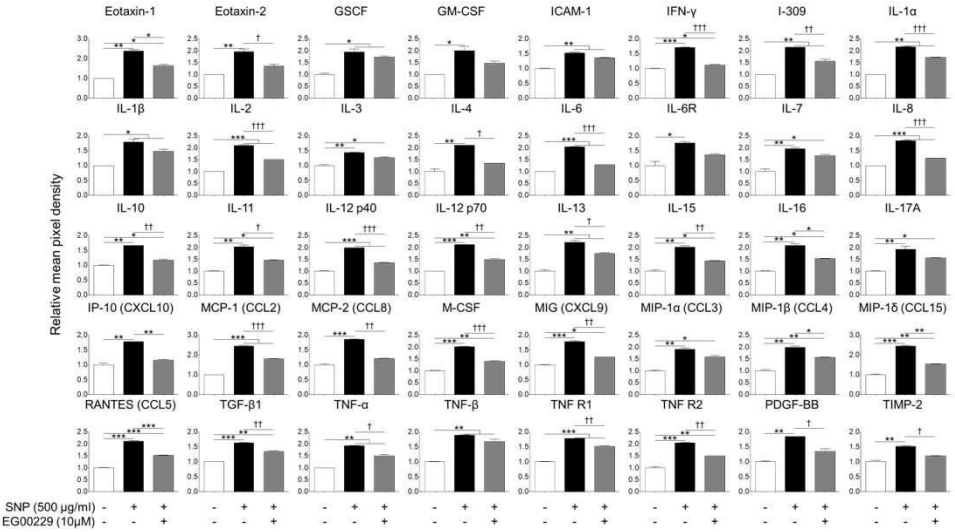
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록

<110> KONYANG UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION GROUP

<120> Pharmaceutical composition comprising inhibitor of neuropilin-1

expression or activity for preventing or treating chronic rhinosinusitis

<130> APP2020-0480KRD1

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 1

cugauguugg cccucacau 19

<210> 2

<211> 19

<212

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 2

augugagggc caacaucag 19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> si RNA

<400> 3

gagaguggau acagguaga 19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 4

ucuaccugua uccacucuc 19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 5

ggagccugac ucaaauccu 19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 6

aggauuugag ucaggcucc 19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRP-1 primer

<400> 7

aaccctcact tcgatttgga 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRP-1 primer

<400> 8

aatggccctg aagacacaac 20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iNOS primer

<400> 9

agggacaagc ctacccctc 19

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iNOS primer

<400> 10

ctcatctccc gtcagttggt 20

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 primer

<400> 11

atgctgacta tggctacaaa agc 23

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 primer

<400> 12

tcgggcaatc atcaggcac 19

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-actin primer

<400> 13

tcctctccca agtccacaca gg 22

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-actin primer

<400> 14

gggcacgaag gctcatcatt c 21