(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0166531
(43) 공개일자 2023년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A23L 33/17* (2016.01)
A61K 45/00 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0066621
(22) 출원일자 2022년05월31일
심사청구일자 2022년05월31일

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

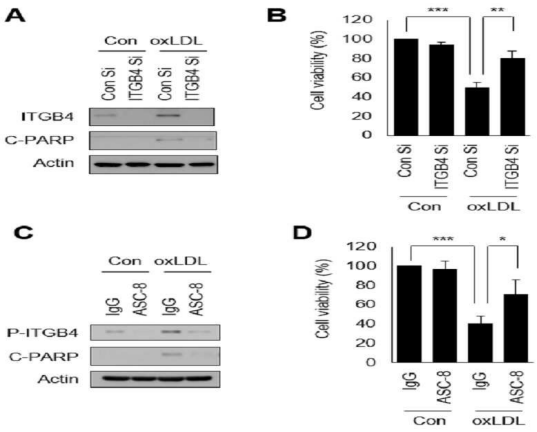
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **ITGB4의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, ITGB4의 발현 또는 활성 억제 시, 동맥경화에 의한 세포 수 감소, 세포사멸 증가, 세포 이동성 감소 및 혈관 형성능 감소에 대해 개선 효과가 나타나는 것을 확인함으로써, 동맥경화 예방, 치료 또는 개선용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 45/00 (2013.01)
A61P 9/10 (2018.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/326 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711155499
과제번호 2021R1A5A2031612
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 세포교신 제어 연구센터
기 여 율 50/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711165545
과제번호 2020R1A2B5B02002375
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 세포사멸/세포증식과 차별화되는 암세포 노화에서의 p53과 AKT의 기능 연구
기 여 율 50/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 ITGB4의 발현 또는 활성 억제제는 동맥경화에 의한 세포 수 감소, 세포사멸 증가, 세포 이동성 감소 또는 혈관 형성능 감소에 대한 개선 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 발현 억제제는 ITGB4의 mRNA에 특이적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 활성 억제제는 ITGB4의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

인간으로부터 분리된 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

상기 후보물질 처리 전후의 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및

상기 후보물질 처리 전과 비교하여 처리 후 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성이 억제되는 물질을 확인하는 단계를 포함하는 동맥경화 치료제 스크리닝 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 시료는 혈관내피세포인 것을 특징으로 하는 동맥경화 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 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 성

인병 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. 대한민국 공개특허 제10-2020-0028320호(2020.03.16. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 인간으로부터 분리된 시료에 후보물질을 처리하는 단계, 상기 후보물질 처리 전후의 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성을 측정하는 단계 및 상기 후보물질 처리 전과 비교하여 처리 후 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성이 억제되는 물질을 확인하는 단계를 포함하는 동맥경화 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성 억제 시, 동맥경화에 의한 세포 수 감소, 세포사멸 증가, 세포 이동성 감소 및 혈관 형성능 감소에 대해 개선 효과가 나타나는 것을 확인함으로써, 동맥경화 예방, 치료 또는 개선용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 동맥경화를 mimic한 혈관내피세포에서 ITGB4 활성을 분석한 결과이다.

도 2는 동맥경화를 mimic한 혈관내피세포에서 ITGB4 억제를 통한 세포사멸 변화를 분석한 결과이다.

도 3은 동맥경화를 mimic한 혈관내피세포에서 ITGB4 억제를 통한 세포이동성 변화를 분석한 결과이다.

도 4는 동맥경화를 mimic한 혈관내피세포에서 ITGB4 억제를 통한 혈관 형성능 변화를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0014] 본 발명은 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 ITGB4의 발현 또는 활성 억제제는 동맥경화에 의한 세포 수 감소, 세포사멸 증가, 세포 이동성 감소 또는 혈관 형성능 감소에 대한 개선 효과를 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0016] 상기 발현 억제제는 ITGB4의 mRNA에 특이적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 상기 활성 억제제는 ITGB4의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 화합물인 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명에서 용어, "ITGB4의 발현 또는 활성 억제제"는 "ITGB4 억제제"와 동일한 의미로서 ITGB4의 mRNA 발현 또는 단백질 활성을 감소시키는 물질을 통칭한다. 보다 구체적으로는 ITGB4에 직접적으로 작용하거나 그의 수용체에 간접적으로 작용하는 등의 방식을 통해 ITGB4의 발현 또는 활성을 감소시키는 모든 물질을 포함할 수 있다. 상기 ITGB4 발현을 저해하는 물질은 ITGB4를 표적으로 하여 ITGB4의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 화합물, 핵산, 펩타이드, 바이러스 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터 등 그 형태에 제한 없이 사용 가능하다. ITGB4 발현을 저해하는 물질의 예로, ITGB4의 mRNA에 특이적으로 결합하여 ITGB4 mRNA의 발현을 저해하는 siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임(ribozyme), DNAzyme, PNA(peptide nucleic acids) 등이 포함되며, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, ITGB4 활성을 저해하는 물질의 예로, ITGB4의 단백질에 특이적으로 결합하여 ITGB4 단백질의 활성을 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 앱타머, 화합물 등이 포함되며, 바람직하게는 항체 또는 화합물이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명에서 용어, "siRNA(small interference RNA)"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각을 의미한다. 본 발명의 siRNA는 센스 가닥(mRNA서열에 상응하는(corresponding) 서열)과 안티센스 가닥(mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 자기-상보성 (self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. 본 발명의 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다.

[0020] 본 발명에서 용어, "shRNA(short hairpin RNA)"는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 Ⅲ의 프로모터로부터 아데노바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시키는 방식을 이용한다. 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase Ⅲ)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함이 널리 알려져 있다.

[0021] 본 발명에서 용어, "miRNA(microRNA)"는 21-25 뉴클레오타이드의 단일 가닥 RNA 분자로써, 타겟 mRNA의 파쇄 또는 해독단계에서의 억제를 통하여 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 조절물질이다. 이러한 miRNA는 두 단계의 프로세싱으로 이루어진다. 최초의 miRNA 전사체(primary miRNA)가 핵 안에서 Drosha라는 RNaseⅢ 타입효소에 의해 70~90 염기 정도의 스템-루프 구조, 즉 pre-miRNA로 만들어지고, 이후 세포질로 이동하여 다이서(Dicer)라는 효소에 의해 절단되어 21~25 염기의 성숙한 miRNA로 만들어진다. 이렇게 생성된 miRNA는 표적 mRNA에 상보적으로 결합하여 전사 후 유전자 억압자(post-transcriptional gene suppressor)로써 작용하며, 번역 억제와 mRNA 불안정화를 유도한다. miRNAs는 다양한 생리학적 현상 및 질환에 관여한다.

[0022] 본 발명에서 용어, "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하는데, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 효과를 나타낸다.

[0023] 본 발명에서 용어, "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 ITGB4에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수항체도 포함된다. 본 발명에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 있다.

[0024] 본 발명에서 용어, "앱타머"는 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 상기 앱타머

는 RNA, DNA, 수식(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있는데, SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득되는 물질이다. 상기 앱타머는 표적에 특이적으로 결합하고 표적의 활성을 조정할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적이 기능한 능력을 차단할 수 있다.

[0025] 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.

[0026] 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.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[0028] 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.

[0029] 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.

[0030] 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.

[0031] 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.

[0032] 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.

[0034] 또한, 본 발명은 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능 식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기

능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0037] 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.

[0038] 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.

[0039] 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 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합하고 젤라틴 등 캡슐기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0040] 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.

[0041] 본 발명에서 용어 “예방”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 "개선"이란 본 발명의 조성물을 개체에 투여하거나 섭취시켜 질환의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 의미한다.

[0043] 또한, 본 발명은 인간으로부터 분리된 시료에 후보물질을 처리하는 단계, 상기 후보물질 처리 전후의 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성을 측정하는 단계 및 상기 후보물질 처리 전과 비교하여 처리 후 ITGB4(integrin beta 4)의 발현 또는 활성이 억제되는 물질을 확인하는 단계를 포함하는 동맥경화 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0044] 상기 시료는 혈관내피세포인 것을 특징으로 한다.

[0046] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0048] **[실험예 1] 웨스턴 블로팅(Western blotting)**

[0049] 배양된 혈관내피세포(human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)를 PBS로 세척하고 스크래퍼로 세포를 수확하였다. 수확한 세포에 RIPA buffer(5M NaCl, 10% NP-40, Deoxycholic Acid, 10% SDS, 1.5M Tris-HCl(pH 8.0), 0.5M EDTA 및 H_2O)를 넣고 세포를 깨어 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 BCA Protein Assay Kit(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 정량한 후 SDS-PAGE 겔로 분리하였다. 분리된 단백질을 니트로셀룰로오스 유소막(nitrocellulose memebrane)에 이동시키고, 각 단백질에 특이적인 1차 항체와 2차 항체를 순서대로 붙였다. TBST로 세척 후, ECL 시약(Thermo Scientific)으로 단백질의 발현을 확인하였다.

[0051] **[실험예 2] 면역형광염색법**

[0052] 커버 글래스에 배양된 혈관내피세포를 PBS로 세척 후 3.7% 포름알데하이드로 15분 고정하였다. 0.1%의 TritonX-100으로 15분 처리하여 투과(permeabilization)시킨 후 1시간 동안 3% BSA로 블로킹(blocking) 하였다. 1차 항체를 1시간 동안 상온에서 인큐베이션 시킨 뒤 PBS로 세 번 세척 후 2차 항체를 1시간 상온에서 인큐베이션 시키고 DAPI(1:10000)를 15분간 처리해 핵을 염색하였다. 다시 PBS고 세 번 세척 후 마운팅(mounting)하여 공초점

형광현미경(LSM 510 META, ZEISS)으로 형광을 확인하였다.

[0054] **[실험예 3] 세포 수 측정**

[0055] 배양된 혈관내피세포를 PBS로 세척하고 PBS를 제거한 후 1 × Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 떼어내었다. 세포 부유액을 1.5ml 튜브에 옮겨 원심분리기로 세포를 모았다. 모은 세포를 100㎕ PBS에 넣고 재부유 시킨 후 세포부유액(10㎕)과 Trypan-blue(10㎕)를 섞었다. 그 중 10㎕의 혼합액을 hemocytometer를 이용하여 현미경으로 세포 수를 확인하였다.

[0057] **[실험예 4] 세포 이동성 측정**

[0058] 1 × 10^5개의 혈관내피세포를 200㎕가 되게 한 후 transwell upper chamber (Costar)에 분주하고, bottom chamber에는 배양액을 600㎕씩 준비하였다. 37℃ 인큐베이터에 24시간 키운 후 upper chamber 아랫면에 부착된 세포를 3.7% 포름알데하이드로 15분 고정하였고 0.1% crystalviolet으로 15분 염색하였다. 3차 증류수로 염색된 세포를 세척하고 공기로 건조(airdry)한 후 광학현미경(Olympus CKX41)으로 이미지를 촬영하였다.

[0060] **[실험예 5] 혈관 형성능 측정**

[0061] Matrigel(BD Bioscience)를 48-well plate에 200㎕씩 넣고 37℃ 인큐베이터에 30분 동안 중합(polymerization)시켰다. 트립신으로 떼어낸 HUVEC(4 × 10^4개)을 배양액 200㎕에 넣고 경화된 matrigel에 분주하였다. 37℃ 인큐베이터에 16시간 키운 후 형성된 튜브를 광학현미경으로 촬영하였고 튜브 면적은 Fuji Multi Gauge V2.3 software(Fuji)로 측정하였다.

[0063] **[실시예 1] 동맥경화 억제 관련 타겟분자 활성 변화 확인**

[0064] 노화된 혈관내피세포에서 Integrin beta 4(이하 ITGB4라 함)가 활성화되는 사실을 기반으로, 동맥경화(atherosclerosis)를 mimic한 혈관내피세포에서도 ITGB4의 활성이 증가하였는지 확인하였다. 동맥경화를 mimic하기 위해 혈관내피세포에 oxidized LDL(100㎍/ml)을 처리한 후 2일 뒤 웨스턴 블로팅 및 면역형광염색방법으로 ITGB4의 발현 및 인산화(tyrosine-1510)가 증가하는 것을 확인하였다(도 1).

[0066] **[실시예 2] 타겟 ITGB4 활성 억제에 의한 동맥경화 억제 기능 확인**

[0067] ITGB4의 활성 억제를 통한 oxidized LDL를 처리하여 동맥경화를 mimic한 혈관내피세포의 phenotype(cell viability, 세포사멸, 세포 이동성 및 혈관 형성능) 변화를 실험을 통해 확인하였다.

[0068] 혈관내피세포에 대조군(C-PARP) 또는 ITGB4 siRNA(5´-3´, GACUUCGUGUGCGGACAGU)를 transfection하고 하루 경과 후 oxdized LDL(100㎍/ml)을 처리하고 2일 후 세포사멸, 세포이동성 및 혈관 형성능을 확인하였다.

[0069] 혈관내피세포에 대조군(immunoglobulin G; IgG) 또는 ITGB4 특이적 중화항체인 ASC-8을 처리하고 하루 경과 후 oxdized LDL(100㎍/ml)을 처리하고 2일 후 세포사멸, 세포이동성 및 혈관 형성능을 확인하였다.

[0070] 그 결과, ITGB4 활성 억제에 의해 oxdized LDL에 의한 세포사멸이 감소한 것을 웨스턴 블랏 및 세포 수 측정을 통해 확인하였고(도 2), oxidized LDL에 의해 감소한 세포 이동성 및 혈관 형성능이 회복되는 것을 확인하였다(도 3 및 도 4).

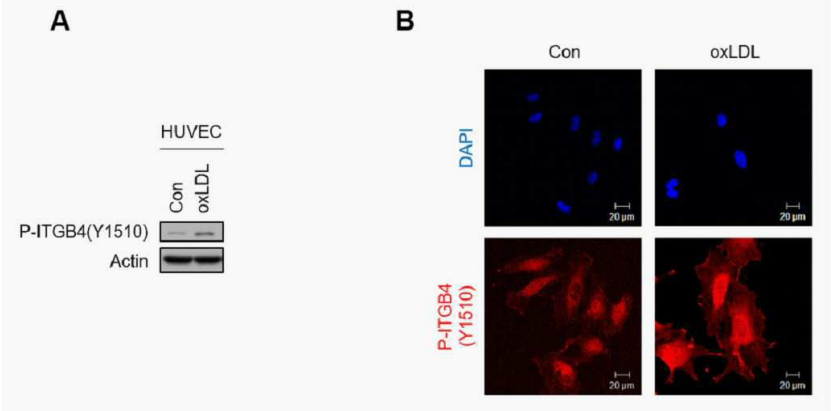
[0072] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0073] 본 발명의 범위는 후술하는 특허 청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균

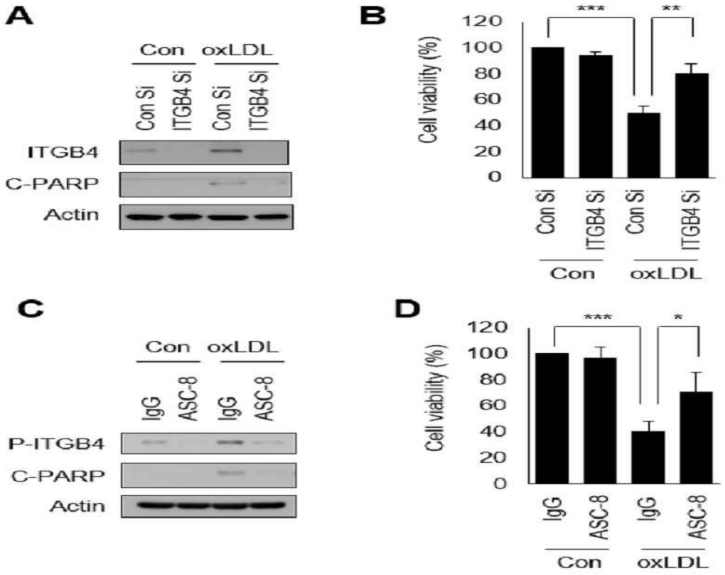
등개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

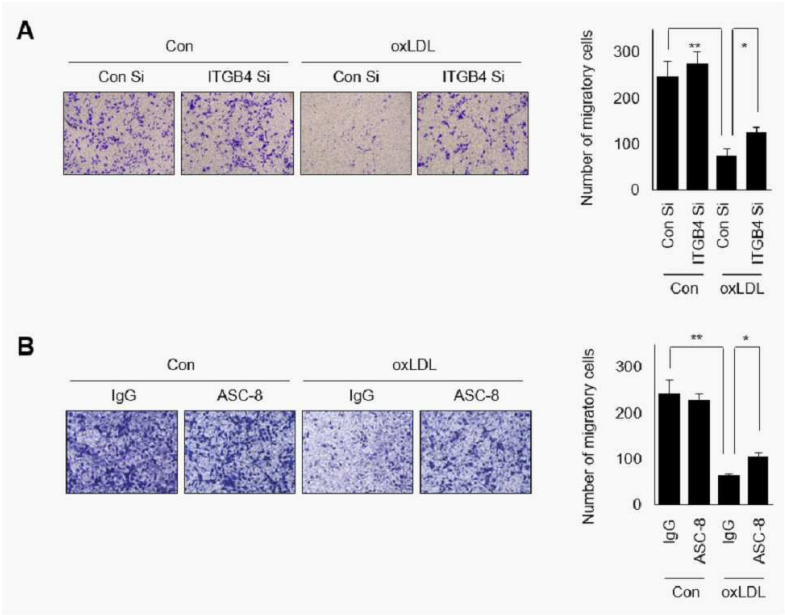
도면1



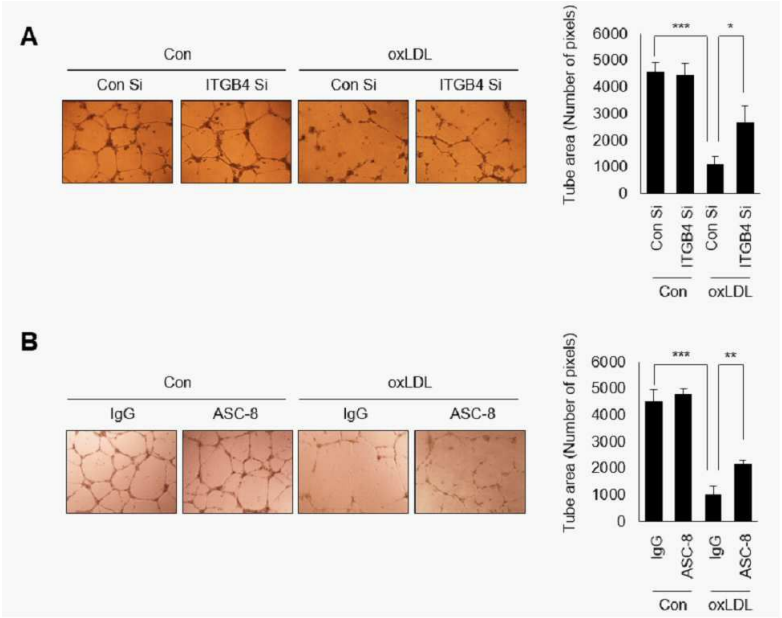
도면2



도면3


A
Con
oxLDL
Con Si
ITGB4 Si
Con Si
ITGB4 Si
Number of migratory cells
300
200
100
0
**
*
Con Si
ITGB4 Si
Con Si
ITGB4 Si
Con
oxLDL
B
Con
oxLDL
IgG
ASC-8
IgG
ASC-8
Number of migratory cells
300
200
100
0
**
*
IgG
ASC-8
IgG
ASC-8
Con
oxLDL

도면4


A
Con
oxLDL
Con Si
ITGB4 Si
Con Si
ITGB4 Si
Tube area (Number of pixels)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
***
*
Con Si
ITGB4 Si
Con Si
ITGB4 Si
Con
oxLDL
B
Con
oxLDL
IgG
ASC-8
IgG
ASC-8
Tube area (Number of pixels)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
***
**
IgG
ASC-8
IgG
ASC-8
Con
oxLDL