



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0098064
(43) 공개일자 2012년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/35 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0017757

(22) 출원일자 2011년02월28일

심사청구일자 2011년02월28일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김찬화

서울특별시 용산구 이촌로87길 21, 이촌코오롱아파트 103동 402호 (이촌동)

김상훈

서울특별시 중랑구 용마산로125길 92, 101동 1209호 (신내동, 석탑아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김선애

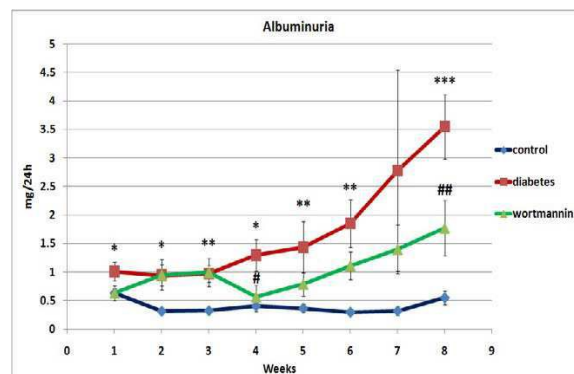
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 워트마닌 또는 그 유사체를 유효성분으로 함유하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 화학식 1로 표시되는 워트마닌(wortmannin), 유사체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상술한 본 발명에 의하면 PI3K 억제제를 통한 신보호 효과에 의해, 알부민뇨 및 알부민-크레아티닌 비를 현저하게 감소시킬 수 있고, 당뇨병성 신증에서 나타나는 사구체의 조직병리학적 회복을 유도하여 당뇨병성 신증을 효율적으로 개선 및 치료할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

장영우

경기도 남양주시 미금로 24, 롯데낙천대아파트
801동 502호 (도농동)

김현정

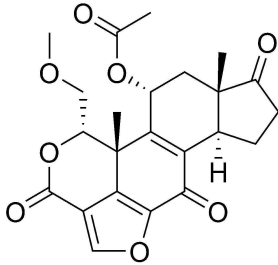
서울특별시 노원구 월계3동 미성아파트 15-1110

특허청구의 범위

청구항 1

화학식 1로 표시되는 워트마닌(wortmannin), 유사체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물.

(화학식 1)



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 당뇨병성 신증 초기 미세 알부민뇨 단계에서 알부민뇨를 감소시키는 것을 특징으로 하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 당뇨병성 신증 초기 미세 알부민뇨 단계에서 알부민-크레아티닌 비를 감소시키는 것을 특징으로 하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 당뇨병성 신증에서 나타나는 사구체의 조직병리학적 회복을 유도하는 것을 특징으로 하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 당뇨병성 신증 단백질성 마커의 변화를 유도하는 것을 특징으로 하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

당뇨병성 신증 개선 및 치료용 시험 화합물을 생물학적 시료에 처리하는 단계; 및

상기 시험 화합물이 단백질성 진단 마커인 네프린(nephryn), 포도신(podocin) 및 데스민(desmin)으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1 이상의 생리학적 활성을 촉진 또는 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 당뇨병성 신증 치료제의 스크리닝 방법.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 워트마닌 또는 그 유사체를 유효성분으로 함유하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게 본 발명은 PI3K 억제제인 워트마닌을 이용하여 신보호 효과에 의한 당뇨병성 신증을 효율적으로 개선 및 치료할 수 있는 워트마닌 또는 그 유사체를 유효성분으로 함유하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등의 대사질환의 일종으로, 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며, 고혈당으로 인하여 여러 증상 및 징후를 일으키고 소변에서 포도당을 배출하게 된다. 당뇨병은 혈중 포도당 농도가 비정상적으로 상승된 상태로 장기간 지속되는 것을 특징으로 하는 일련의 대사 이상을 지칭하는 것으로, 혈중 포도당 농도를 조절하는 가장 중요한 호르몬인 인슐린의 절대적 또는 상대적 생산 결핍의 결과이거나 인슐린이 작용하는 표적장기에서의 인슐린의 작용저하(인슐린 저항성)의 결과에 의한 것이다. 인슐린이라는 호르몬은 췌장의 베타세포에서 생성되어 탄수화물이 소화 흡수되어 만들어지는 포도당의 대사에 중추적인 역할을 수행하며, 고혈당이 되지 않도록 포도당 농도를 일정 범위 내로 유지시켜 준다. 이러한 중요한 역할을 하는 인슐린을 분비하는 췌장의 베타세포가 파괴되어 인슐린이 부족하거나, 인슐린이 분비된다고 해도 효과적으로 기능을 수행할 수 없다면, 혈당은 지속적인 상승 상태를 보이고 체내의 포도당 대사를 포함한 신진대사 기능이 원활하게 이루어질 수 없게 된다. 이러한 일련의 병적인 변화를 일컬어 당뇨병이라고 한다.
- [0003] 당뇨병은 제1형과 제2형으로 구분되는데, 제1형 당뇨병은 '소아당뇨'라고도 불리며, 인슐린을 전혀 생산하지 못하는 것이 원인이 되어 발생하는 질환이다. 인슐린이 상대적으로 부족한 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성(insulin resistance; 혈당을 낮추는 인슐린 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 것)을 특징으로 한다. 제2형 당뇨는 식생활의 서구화에 따른 고열량, 고지방, 고단백의 식단, 운동 부족, 스트레스 등 환경적인 요인이 크게 작용하는 것으로 보이지만, 이 외에 특정 유전자의 결합에 의해서도 당뇨병이 생길 수 있으며, 췌장 수술, 감염, 약제에 의해서도 생길 수 있다.
- [0004] 약한 고혈당에서는 대부분의 환자들이 증상을 느끼지 못하거나 모호해서 당뇨병이라고 생각하기 어렵다. 혈당이 많이 올라가면 갈증이 나서 물을 많이 마시게 되고, 소변량이 늘어 화장실을 자주 가게 된다. 또한 체중이 빠지게 된다. 오랜 기간 고혈당 상태가 유지되면 신체에서 여러 합병증이 발생하는데, 대표적인 것이 망막병증(설명할 수 있음), 신기능장애(신기능 저하로 심할 경우 투석이 필요함), 신경병증(저림, 통증)이고, 심혈관계 질환의 위험이 높아지게 된다.
- [0005] 당뇨병이 오랫동안 지속되면 신체의 작은 혈관들이 손상된다. 신장의 혈관이 손상되는 경우에는 신장의 구성하는 기관 중 혈액 여과를 담당하고 있는 사구체가 손상되면서 단백뇨가 나타나고, 이로 인해 신장 기능이 저하되는데, 이를 당뇨병성 신증이라고 한다.
- [0006] 당뇨병성 신증은 새로 투석을 시작하는 환자들의 원인 질환 중 가장 많은 부분을 차지하고 있으며, 일반적으로 아래와 같은 5단계를 걸쳐 진행된다고 알려져 있다. 그러나 당뇨 발병 시점이 분명하지 않은 대부분의 성인 환자에게는 이와 같은 질병 양상이 반드시 일치하지는 않으며, 개개인의 혈당 조절, 혈압 조절 등 관리에 따라 병이 진행되는 속도는 변할 수 있다.
- [0007] - 1단계: 초기(당뇨병력 0년)
- [0008] - 2단계: 잠복기(당뇨병력 3년)
- [0009] - 3단계: 미세알부민뇨기(당뇨병력 6년), 1~3단계에서는 철저한 혈당 조절과 혈압 조절 등을 통해 신장질환의 진행을 막을 수 있다. 미세알부민뇨가 발생하면 심혈관계의 위험 및 신부전의 위험이 증가한다.
- [0010] - 4단계: 단백뇨기(당뇨병력 12~24년), 고혈압 및 신장 기능의 지속적인 감소가 나타난다.
- [0011] - 5단계: 말기 신부전기(당뇨병력 14~26년), 투석이나 이식 치료가 필요하게 된다.
- [0012] 당뇨병성 신증의 병인은 아직 정확하게 밝혀지지는 않았으나, 신장 내의 혈액역학적인 변화(intrarenal hemodynamic alterations), 사구체 단백질의 포도당화(glycosylation of glomerular proteins), 솔비톨(sorbitol)의 축적 등 복합적 요인들이 당뇨병성 신증의 병인과 관련이 있는 것으로 여겨진다. 구심성 세동맥 저항(afferent arteriolar resistance)으로 인한 신장내의 혈액역학적인 변화, 그로 인한 혈압과 과여과는 당뇨병성 신증의 시작 및 진행에 중요한 역할을 하게 된다. 선택적인 구심성 혈관확장은 고혈당, 인슐린 부족, 지나친 단백질 섭취, 체액팽창, 내인성 혈관확장인자(예: angiotensin II, endothelin)의 상승작용, 사구체 비후, 그리고 그 외에 다른 밝혀지지 않은 요인들로 인해 야기될 수 있다. 또한 고혈당으로 인한 단백질의 포도당화가 일어날 수 있는데, 교원질(collagen), 사구체기저막(glomerular basement membrane) 등과 같은 단백질의 경우 AGEs(advanced glycosylated end-products)로 알려진 비가역적인 부가물을 형성한다. AGEs는 조직에 축적되어 단백질간의 교차결합 및 당뇨병성 합병증의 발병에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그리고 포도당은 알도오스(aldose) 환원효소에 의해서 솔비톨로 전환되는데 고혈당이 지속되면 지나친 솔비톨의 축적이 야기될 수 있다. 솔비톨은 polyol dehydrogenase에 의해 과당(fructose)으로 산화되는데, 이 솔비톨과 과당의 세포내

축적으로 인해서 미오이노시톨(myoinositol)의 고갈을 일으킨다. 알도오스 환원효소에 의한 솔비톨의 축적 외에도 단백질 키나아제 C(protein kinase C)의 활성의 증가 등도 나타나는데, 이러한 polyol pathway 내의 생화학적 이상으로 인하여 당뇨병성 신증이 야기될 수 있다.

[0013] 당뇨병성 신증 초기에는 대부분 증상이 없다. 따라서 정기적인 소변 검사로 미세알부민뇨에 대해 측정하는 것이 중요하다. 당뇨병성 신장질환이 진행될수록 소변 검사에서 단백뇨가 나타나고, 단백뇨의 양이 많아지면 소변에 거품이 나며, 하지 부종 등이 나타날 수 있다. 초기에는 소변량이 정상이거나 오히려 다소 증가하는 경우도 있다. 신장질환이 진행된 뒤에는 신장 기능이 감소하기 시작하여 혈액 내에 노폐물이 쌓이고, 혈액검사에서 요독 수치 및 크레아티닌 수치가 증가한다. 이 경우 환자에 따라 기운 없음, 쉽게 피로함, 빈혈, 메스꺼움, 구토, 소변량 감소 등의 증상이 나타날 수 있고, 일부 환자에서는 약물이 신장으로 잘 배설되지 않아 저혈당 증상이 나타나기도 한다.

[0014] 당뇨병성 신증에서는 신기능 이상 뿐만 아니라 세포외기질(ECM: extracellular matrix)의 축적도 중요한 역할을 한다. 경화증전(presclerotic) 사이토카인인 TGF- β (transforming growth factor- β)는 당(glucose), AGE, 혈관작용성 호르몬(예: angiotensin II, endothelin) 등에 의해서 자극되는 것으로 나타났는데, 이 TGF- β 가 당뇨병성 신증의 발달에 주축적인 역할을 한다. TGF- β 는 신증을 일으키는 대사성 인자와 혈액학적 인자 사이의 상호작용을 매개함으로써 당뇨병성 신증에서 ECM의 축적을 야기시키는 것으로 나타났다. TGF- β 외에도 다른 사이토카인(예: vascular endothelial growth factor)들이 신증을 일으키는 역할에 대한 연구가 진행 중이다. 제1형 당뇨병 환자의 경우 약 40%가 말기신질환(ESRD: end-stage renal disease)으로 진행되는 심각한 신증증세를 나타낸다. 당뇨병성 신증으로 진단된 당시에 신장이 비대하거나, 사구체여과율(GFR)이 상승되어 있는 경우가 있으며, 과여과(hyperfiltration)가 나타나는 경우 예후가 나쁘나 인슐린으로 치료하면 GFR과 신장의 크기는 정상화된다.

[0015] 당뇨병성 신증 발병 후 5~10년 내에 미세알부민뇨(microalbuminuria)가 나타난다. 미세알부민뇨는 뇨 중에 1일 30~300 mg의 알부민이 배출되는 상태로서 제1형 당뇨병 환자의 신증의 민감한 지표가 된다. 뇨 중의 알부민양은 시간이 지남에 따라 증가하게 되고, 몇 년 후에는 뇨 중에 1일 300 mg 이상의 알부민이 배출되는 명백한 알부민뇨(overt albuminuria)가 나타나게 된다. 미세알부민뇨 시기 동안에 혈압이 상승되고, 때로는 고혈압으로 진행되게 된다. 명백한 알부민뇨가 나타나는 동안 GFR은 대략 1 ml/min/month의 속도로 점점 감소하며, 일단 명백한 알부민뇨가 나타나면 당뇨병성 신증은 비가역적이 되며, 약 50%의 환자가 7년 내에 투석을 필요로 하게 되는 말기신부전증이 나타나게 된다. 제2형 당뇨병 환자의 경우 신증은 서서히 발현되고, 임상 경과는 제1형 당뇨병 환자와 비슷하게 진행된다. 제1형 당뇨병에서는 약 50%의 환자에서, 제2형 당뇨병에서는 약 30%의 환자에서 당뇨병성 신증에 의한 신기능의 소실을 가져올 수 있다.

[0016] 그리고 소변내의 미세 알부민을 검사하여 미세 알부민뇨를 보이는 환자를 진단한 뒤 집중적인 혈당 치료 및 고혈압에 대한 철저한 치료 등의 수단 등을 통해 당뇨병성 신증의 진행에 의한 말기신부전으로의 진행을 완화시키는 것이 현재의 방법이다. 따라서 당뇨병성 신증에 의해 가장 먼저 손상되어지는 부분인 사구체의 손상을 줄일 수 있는 방법을 이용할 경우 진행 속도의 완화가 아닌 치료를 할 수 있을 것이다.

[0017] 또한, 철저한 혈당 조절과 혈압 조절(목표혈압 130/80mmHg)이 중요하다. 특히 안지오텐신 수용체 차단제(ARB; angiotensin receptor blocker)나 안지오텐신 전환효소 억제제(ACE 억제제, ACEI; angiotensin converting enzyme inhibitor)는 혈압을 조절할 뿐만 아니라 단백뇨의 양을 줄이고 신장질환의 진행 속도를 늦추는 데 있어서도 효과적이다. 고지혈증의 치료에도 도움이 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, PI3K 억제제를 이용하여 제1형 당뇨병성 신증 모델군과 PI3K 억제제를 투여한 군 간의 알부민뇨, 알부민-크레아티닌 비, 사구체의 병리조직학적 관찰, 제1형 당뇨병성 신증과 관련된 단백질 발현 등의 변화를 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

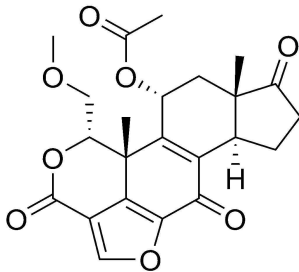
[0019] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 화학식 1로 표시되는 워트만닌(wortmannin), 유사체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

- [0020] 본 발명의 다른 목적은, 당뇨병성 신증 초기 미세 알부민뇨 단계에서 알부민뇨를 감소시키는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 목적은, 당뇨병성 신증 초기 미세 알부민뇨 단계에서 알부민-크레아티닌 비를 감소시키는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 목적은, 당뇨병성 신증에서 나타나는 사구체의 조직병리학적 회복을 유도하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 목적은, 당뇨병성 신증 진단 단백질성 마커의 변화를 유도하는 물질을 포함하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 목적은, 상기 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 시험 화합물을 생물학적 시료에 처리하는 단계, 및 시험 화합물이 상기 단백질성 진단 마커의 생리학적 활성을 촉진 또는 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 당뇨병성 신증 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0026] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 워트마닌(wortmannin), 유사체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

화학식 1



- [0027]
- [0028] 본 발명자들은 당뇨병성 신증 모델 군과 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군 간의 여러 가지 당뇨병성 신증 진단 마커들의 변화를 확인하는 연구를 통해 워트만(wortmannin)이라는 PI3K 억제제 화합물인 워트마닌이 당뇨병성 신증의 개선 및 치료에 사용될 수 있다는 것을 발견하였다.
- [0029] 본 발명에서 사용된 PI3K 억제제인 워트마닌(wortmannin)이라는 화합물질은 일반적으로 DNA 수선, 수용체 매개 세포내 섭취 그리고 세포 증식을 억제하기 위한 세포 생물학적 물질이다. 본 발명에서는 기존에 밝혀져 있었던 상기 워트마닌(wortmannin)의 효과가 아닌 당뇨병성 신증의 개선 및 치료 효과를 제공한다.
- [0030] 본 발명에 사용된 워트마닌 및 그 유사체들은 상업적으로 정제된 화합물을 구입하거나 합성하여 사용할 수도 있으나, 예를 들어 탈라토마이세스 워트마닌(Talaromyces wortmannin) 등의 다양한 미생물 중의 하나를 발효하여 생합성할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 워트마닌은 $C_{23}H_{24}O_8$ 의 화학식을 가지며, 그 분자량이 428.43186 [g/mol]이고, 녹는점이 238-242 °C이며, [(1 α ,11 α)-11-(acetyloxy)-1-(methoxymethyl)-2-oxaandrosta-5,8-dieno(6,5,4-bc)furan-3,7,17-trione] 로 표시된다.
- [0032] 상기 워트마닌의 유사체는 당 분야에서 알려진 기능적 PI3K를 억제하는 유사체를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니나 예를 들어 11-데스아세톡시 워트마닌, 9,11-디하이드로데스 아세톡시 워트마닌, 워트마닌의 열린

A-고리산, 워트마닌의 열린 A-고리 메틸 에스테르 등이 있다.

- [0033] 본 발명의 구체적인 양태에 따르면, 당뇨병성 신증 초기 미세 알부민뇨 단계에서 알부민뇨를 감소시키는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 알부민뇨는 당뇨병성 신증 진단 마커로서, 뇨에 알부민이 다량 포함된 것을 의미한다. 본 발명에 의한 조성물을 투여하는 경우, 알부민뇨 수치가 현저하게 감소하는 효과가 있다.
- [0034] 당뇨병성 신증 진단용 마커에서, 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴의 특이적인 검출은 생물학적 시료 내에 본 발명의 당뇨병성 신증 진단용 단백질성 마커가 존재하는지 여부 및 그 양과 패턴을 확인하는 과정을 의미하며, 예를 들어, 상기 단백질성 마커에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 그 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 확인하는 과정이 활용될 수 있다. 본 명세서에서 “생물학적 시료”란 당뇨병성 신증 진단용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴이나, 이 단백질성 마커에 관한 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 검출할 수 있는 세포나 조직 등을 의미한다. 또한, 본 명세서에서 “항체”란 항원의 항원결정기(epitope)에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 의미하며, 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함하는 개념이다.
- [0035] 상기 항체를 이용하여 단백질의 존재 여부, 활성 촉진 여부와 그 양 또는 패턴을 측정하는 방법으로는, 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역분석(Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테를로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역 전기영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 이 분석 방법들을 통하여, 당뇨병성 신증 모델 군의 생물학적 시료에서의 알부민뇨 양과 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군의 생물학적 시료에서의 알부민뇨 양을 비교할 수 있고, 이로부터 본 발명의 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 화합물질의 효과를 판단할 수 있으며, 궁극적으로 당뇨병성 신증이 의심되는 환자의 발병 여부를 조기에 진단하고 개선 및 치료할 수 있게 된다.
- [0037] 본 발명의 다른 구체적인 양태에 따르면, 당뇨병성 신증 초기 미세 알부민뇨 단계에서 알부민-크레아티닌 비를 감소시키는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 알부민-크레아티닌 비(Albumin to creatinine ratio, ACR)는 당뇨병성 신증을 진단할 수 있는 마커 중의 하나로, 상기 ELISA 방법을 통해서 당뇨병성 신증 모델 군의 생물학적 시료에서의 알부민-크레아티닌 비와, PI3K 억제제인 워트마닌 또는 그 유사체를 투여한 군의 생물학적 시료에서의 알부민-크레아티닌 비를 비교한 결과 현저하게 감소하는 것이 확인되었다.
- [0038] 본 발명의 다른 구체적인 양태에 따르면, 당뇨병성 신증에서 나타나는 사구체의 병리조직학적 회복을 유도하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. PAS 염색(PAS staining)을 통해 당뇨병성 신증 모델 군에서의 사구체와, PI3K 억제제인 워트마닌 또는 그 유사체를 투여한 군에서의 사구체를 비교한 결과 사구체 비대(glomerular hypertrophy), 메산쥬 영역 확장(mesangial matrix expansion) 및 사구체 기저막 비후(glomerular basement membrane thickening) 등의 증상이 현저하게 감소하는 것이 확인되었다.
- [0039] 본 발명의 다른 구체적인 양태에 따르면, 당뇨병성 신증 진단 단백질성 마커의 변화를 유도하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에서 당뇨병성 신증을 진단하는데 사용된 단백질성 마커는 네프린(nephrin), 포도신(podocin), 데스민(desmin)으로 당뇨병성 신증 모델 군과 PI3K 억제제를 투여한 군에서 발현 여부와 그 발현량이 현저하게 증가 또는 감소한다. 웨스턴 블롯팅(Western blotting)과 면역형광 염색법(Immunofluorescence)을 통해 네프린(nephrin), 포도신(podocin) 및 데스민(desmin)의 항체로 항원-항체 복합체 발현 여부와 그 발현량이 현저하게 증가 또는 감소하는 것을 당뇨병성 신증 모델 군과 PI3K 억제제를 투여한 군에서 확인하고 이를 포함하는 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0040] 여기서 “항원-항체 복합체”란 당뇨병성 신증 진단용 단백질성 마커와 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량이나 형성 패턴은 통상 2차 항체에 연계된 검출 라벨(detection label)의 시

그늘의 크기 및 패턴을 검출함으로써 측정이 가능하다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자, 레독스 분자, 방사성 동위원소 등을 예로 들 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제, 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 형광물이 사용되는 경우 이용 가능한 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 리간드가 사용되는 경우 이용 가능한 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 발광물이 사용되는 경우 이용 가능한 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 미소입자가 사용되는 경우 이용 가능한 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 레독스 분자가 사용되는 경우 이용 가능한 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[Mo(CN)_8]^{4-}$ 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 방사성 동위원소가 사용되는 경우 이용 가능한 방사성 동위원소에는 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I 또는 ^{186}Re 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0041] 또한, 본 발명의 워트마닌 및 그 유사체는 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 무독성염 및 용매화물로 제조될 수 있다. 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. 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0042] 본 발명의 워트마닌 및 그 유사체의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 워트마닌에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염이 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0043] 본 발명의 조성물에서, 바람직하게는 조성물 총중량에 대하여 상기 워트마닌 및 그 유사체를 0.0001 내지 90 중량%로 포함할 수 있다.

[0044] 상기 워트마닌 및 그 유사체를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 제형 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 워트마닌 및 그 유사체를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0046] 또한, 상기 워트마닌 및 그 유사체를 유효성분으로 함유하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액

상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0047] 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 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 화합물은 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0049] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 시험 화합물을 생물학적 시료에 처리하는 단계, 및 시험 화합물이 단백질성 진단 마커인 네프린(nephtrin), 포도신(podocin) 및 데스민(desmin)으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1 이상의 생리학적 활성을 촉진 또는 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 당뇨병성 신증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명에 사용된 PI3K 억제제는 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 의해 용해되어 쥐에 복강으로 투여되었으며, 투여량은 1 mg/kg, 투여기간은 8주 동안 매일 투여하였다. 또한 이렇게 투여된 PI3K 억제제에 의해 당뇨병성 신증과 관련된 단백질성 마커들의 발현량의 차이를 보아, PI3K 억제제가 당뇨병성 신증을 개선 및 치료하는데 효과가 있다고 판단할 수 있고, 이를 통해 당뇨병성 신증 개선 및 치료용 시험 화합물을 처리하는 단계, 및 시험 화합물이 상기 단백질성 진단 마커의 생리학적 활성을 촉진 또는 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 당뇨병성 신증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0050] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 PI3K 억제제인 워트마닌을 이용하여 신보호 효과에 의한 당뇨병성 신증을 효율적으로 개선 및 치료할 수 있다. 특히 제1형 당뇨병성 신증 환자에게 투여 시 초기 미세 알부민뇨 단계에서 알부민뇨 및 알부민-크레아티닌 비를 현저하게 감소시킬 수 있고, 당뇨병성 신증에서 나타나는 사구체의 조직병리학적인 회복을 유도할 수 있는 효과가 있다.

[0051] 또한, 본 발명에 의하면 당뇨병성 신증 치료제를 용이하고 효율적으로 스크리닝할 수 있고, 당뇨병성 신증이 의심되는 환자의 발병 여부를 조기에 진단하고 개선 및 치료할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 정상군, STZ를 이용하여 제1형 당뇨를 유발시킨 군 및 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군에서 8주 동안 알부민뇨(albuminuria)를 측정된 결과를 나타내는 그래프이고,

도 2는 정상군, STZ를 이용하여 제1형 당뇨를 유발시킨 군 및 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군에서 8주 동안 뇨 내의 알부민-크레아티닌 비를 측정된 결과를 나타내는 그래프이고,

도 3a는 정상군의 사구체를 PAS 염색(PAS staining)을 한 후에 현미경 200 배율로 관찰한 이미지이고,

도 3b는 제1형 당뇨병성 신증 모델 군의 사구체를 PAS 염색(PAS staining)을 한 후에 현미경 200 배율로 관찰한 이미지이고,

도 3c는 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군의 사구체를 PAS 염색(PAS staining)을 한 후에 현미경 200 배율로 관찰한 이미지이고,

도 3d는 정상군의 사구체를 PAS 염색(PAS staining)을 한 후에 현미경 400 배율로 관찰한 이미지이고,

도 3e는 제1형 당뇨병성 신증 모델 군의 사구체를 PAS 염색(PAS staining)을 한 후에 현미경 400 배율로 관찰한 이미지이고,

도 3f는 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군의 사구체를 PAS 염색(PAS staining)을 한 후에 현미경 400 배율로 관찰한 이미지이고,

도 4a는 네프린(nephrin) 단백질이 정상군, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군 및 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군의 사구체에서 발현량이 증가 또는 감소한 것을 보여주는 웨스턴 블롯 이미지이고,

도 4b는 포도신(podocin) 단백질이 정상군, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군 및 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군의 사구체에서 발현량이 증가 또는 감소한 것을 보여주는 웨스턴 블롯 이미지이고,

도 4c는 Rac1/Cdc42 단백질이 정상군, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군 및 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군의 사구체에서 발현량이 증가 또는 감소한 것을 보여주는 웨스턴 블롯 이미지이고,

도 4d는 네프린(nephrin) 단백질이 정상군, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군 및 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군의 사구체에서 발현량이 증가 또는 감소한 것을 통계 프로그램을 이용하여 보여주는 그래프이고,

도 4e는 포도신(podocin) 단백질이 정상군, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군 및 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군의 사구체에서 발현량이 증가 또는 감소한 것을 통계 프로그램을 이용하여 보여주는 그래프이고,

도 4f는 Rac1/Cdc42 단백질이 정상군, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군 및 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군의 사구체에서 발현량이 증가 또는 감소한 것을 통계 프로그램을 이용하여 보여주는 그래프이고,

도 5a는 네프린(nephrin) 단백질이 정상군, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군 및 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군의 사구체에서 발현량이 증가 또는 감소한 것을 면역형광염색법을 통해 보여주는 이미지이고,

도 5b는 포도신(podocin) 단백질이 정상군, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군 및 PI3K 억제제 워트마닌을 투여한 군의 사구체에서 발현량이 증가 또는 감소한 것을 면역형광염색법을 통해 보여주는 이미지이고,

도 5c는 데스민(desmin) 단백질이 정상군, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군 및 PI3K 억제제 워트만을 투여한 군의 사구체에서 발현량이 증가 또는 감소한 것을 면역형광염색법을 통해 보여주는 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0054] 재료 및 방법

[0055] 1. 동물

[0056] 모든 동물 실험은 고려대학교 동물 윤리위원회의 지침서에 따라 진행되었다. 30마리의 쥐가 이번 연구에 사용되었다. 모든 쥐는 입고 후 7일 동안 실험실 조건에서 길러지고 사료와 물은 자유롭게 이용할 수 있게 제공하였다. 모든 쥐는 12시간 낮밤 주기, $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도, $50 \pm 10\%$ 의 습도에서 유지되었다. 쥐는 임의적으로 정상군, 당뇨병성 신증군, 워트마닌(wortmannin)을 투여한 군 이렇게 세 군으로 나누어졌다. 제1형 당뇨병성 신증은 스트렙토조신(streptozocin, STZ) 65 mg/kg을 0.1 mol/l sodium citrate buffer pH 4.5에 녹여서 복강 주사로 유발시켰다. 정상군 쥐에도 같은 버퍼를 동일한 양을 넣어서 버퍼에 의한 영향을 최소화하였다. STZ 투여 3일 후에 혈당 수치가 300 mg/dl 이상이면 당뇨병군에 포함시키고 모든 쥐는 워트마닌(wortmannin) 투여 8주 후에 부검하였다.

[0057] 2. 워트마닌(wortmannin)의 투여

[0058] 워트마닌(wortmannin)은 디메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide)에 녹여 8주 동안 매일 복강 주사하였다. 정상군과 당뇨병성 신증군도 동일한 양의 DMSO를 처리하여 DMSO에 의한 영향을 배제하였다.

3. 몸무게 및 혈당 측정(Measurement of body weight and blood glucose level)

몸무게와 혈당은 실험이 진행되는 동안 매주 한 번씩 측정하여 변화를 관찰하였고, 혈당은 혈당측정기(glucometer)에 의해 측정되었다.

실시예 1. 시료준비 (Sample preparation)

오리엔트 바이오에서 래트(Sprague Dawley rat)를 구입하여 STZ(Streptozotocin)를 이용하여 제1형 당뇨병을 유발시킨 후, 매주 체중, 혈당 및 알부민뇨를 측정하고 당뇨병성 신증에 걸린 것과 PI3K 억제제에 의한 당뇨병성 신증 개선 효과를 확인하였다 (도 1). PI3K 억제제는 복강투여로 1 mg/kg을 8주 동안 매일 투여하였고, PI3K 억제제 투여 8주 후에 각 군의 쥐들을 부검하여 사구체를 분리하였다. 이때 각 그룹의 개체의 수는 10마리이다. 분리한 사구체를 리파버퍼(RIPA buffer)에 넣고 차가운 상태를 유지하며 초음파(sonicator)를 이용하여 세포를 부수주었다, 4℃에서 1시간 동안 흔들어주며 보관하였다. 4℃에서 침전된 불순물은 원심분리기(Union-55R centrifuge, 한일과학, Korea)로 4℃, 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하고 상등액을 취하였다. 이러한 상등액은 단백질 정량을 하여 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

실시예 2. 알부민뇨(albuminuria) 및 알부민-크레아티닌 비(ACR) 측정

알부민뇨는 8주 동안 매주 측정하였다. 뇨 샘플을 채취하기 위해 각각의 쥐는 각각의 대사볼릭 케이지(metabolic cage)에서 24시간 동안 보관되었다. 뇨의 양을 측정한 후에, 4℃, 2,000rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상등액을 취하여 효소결합면역흡착검사(ELISA, Bethyl laboratories INC., Montgomery, TX, USA)를 통해 뇨 속의 알부민의 양을 측정하였다. 또한 알부민-크레아티닌 비(albumin to creatinine ratio, ACR)는 뇨 속의 크레아티닌 양을 효소결합면역흡착검사 방법을 통해 측정한 후, 이미 측정된 알부민뇨와의 비를 계산하여 측정되었다.

그 결과 도 1에 나타난 바와 같이, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군의 알부민뇨 수치(3.0-4.2 mg/dL)는 8주 동안 계속해서 증가하였지만, 이에 비해 PI3K 억제제를 투여한 군의 알부민뇨 수치(1.2-2.3 mg/dL)가 현저하게 감소한 것으로 나타났다. 알부민-크레아티닌 비 또한, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군의 수치(42-53 albumin mg/creatinine g)는 미세 알부민뇨 단계였지만, 이에 비해 PI3K 억제제를 투여한 군의 알부민-크레아티닌 비(20-26 mg albumin/creatinine g)가 뚜렷하게 감소한 것으로 나타났다(도 2 참조). 결과에서 보는 바와 같이, PI3K 억제제의 투여에 의해 알부민뇨와 알부민-크레아티닌 비가 제1형 당뇨병성 신증 모델에 비해 감소하는 것으로 나타났다. 이것으로 보아 PI3K 억제제 워트마닌은 당뇨병성 신증 개선 및 치료에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

실시예 3. 파옥소산시프염색법(PAS staining)을 이용한 신장의 병리조직학적 변화 관찰

PI3K 억제제를 투여하고 8주 후에 쥐들을 부검할 때, 신장을 단면으로 절단하여 파라핀 블록(paraffin block)에 넣고 10% 포르말린(formalin)에 고정시킨다. 4μm 두께의 신장 단면은 periodic acid-Schiff's(PAS)로 염색하고 현미경(OLYMPUS, CK2, Japan)으로 조직병리학적인 차이를 관찰하였다.

상기와 같이 제1형 당뇨병성 신증 모델 군의 사구체를 PAS 염색(PAS staining)을 통해 관찰한 결과, 사구체 비대(glomerular hypertrophy), 메산쥬 영역 확장(mesangial matrix expansion) 및 사구체 기저막 비후(glomerular basement membrane thickening)등의 증상이 관찰된 반면에, PI3K 억제제를 투여한 군의 사구체에서는 이러한 증상들이 정상군의 수준으로 회복된 것을 관찰하였고, 이를 도 3a 내지 도 3f에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이, PI3K 억제제 워트마닌의 투여에 의해 제1형 당뇨병성 신증에서 나타나는 사구체 비대, 메산쥬 영역 확장 및 사구체 기저막 비후 등의 이상 징후가 회복되는 것으로 나타났다. 이것으로 보아 PI3K 억제제는 당뇨병성 신증 개선 및 치료에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

실시예 4. 웨스턴 블로팅(Western blotting)을 이용한 단백질성 진단 마커 변화 측정

워트마닌(wortmannin) 투여 8주 후에, 세 군의 모든 쥐들을 부검하였다. 단백질 샘플은 신장 피질 부분을 단백질 분해효소 저해제 혼합물(protease inhibitor cocktail)을 포함한 RIPA 버퍼에서 초음파분쇄에 의해 분리

하였다. 단백질의 농도는 브래드포드 방법에 의해 측정되었다.

[0071] 4-1. SDS-PAGE 전기영동

[0072] 정상군, 당뇨병성 신증 군 및 PI3K 억제제 투여 군 쥐들의 사구체 단백질 20(nephrin), 40(podocin) 및 50(Rac1/Cdc42) μ g을 12% SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. 혈청 시료 30 μ l 에 SDS-PAGE loading 완충액 (60 mM Tris-Cl, 2% SDS, 25% Glycerol, 14.4 mM 2-Mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue, pH 6.8) 7.5 μ l 을 섞어 mini gel (6×8 cm)에서 분자량별(separating gel)상에서 100 V로 로딩)로 분리하였다. 이때 사용한 running 완충액의 조성은 0.025 M Tris-Cl, 0.192 M Glycine, 1% SDS(pH 8.3)이다.

[0073] 4-2. 블롯팅(Blotting)

[0074] SDS-PAGE가 끝난 뒤 젤의 단백질을 Semi-dry 형태의 transfer kit(Bio-rad)을 이용하여 니트로셀룰로오스(NitroCellulose) 막으로 옮겼다. 젤 한 장 당 50 mA에서 1시간 30분 동안 실시하였다.

[0075] 4-3. 항체반응

[0076] 네프린(nephrin), 포도신(podocin) 및 Rac1/Cdc42을 대상으로 하여 실시하였다. 막(membrane)을 5% w/v nonfat dry milk로 실온에서 1시간 동안 블로킹(blocking)시켰다. Nephrin, podocin 및 Rac1/Cdc42의 측정을 위해, 일차 항체로는 다클론항체(Polyclonal antibody)인 네프린(nephrin), 포도신(podocin) 및 Rac1/Cdc42을 사용하였으며, 네프린(nephrin), 포도신(podocin) 및 Rac1/Cdc42의 항체(antibody)를 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 일차항체의 희석농도는 1/2,000(nephrin), 1/500(podocin), 1/1,000(Rac1/Cdc42)으로 한다. TBS/T(0.1%, Tris-buffered saline-tween 20)로 10분씩 3번 세척한 후에 이차 항체로 실온에서 1시간 반응시켰다. 이차항체는 anti-rabbit을 사용하였고, 희석농도는 1/2,000이었다. 이차항체 반응 후에 15분씩 3번 TBS/T로 세척하고 난 뒤, ECL (Pierce Biotechnology, Inc., USA)로 가시화시켰다.

[0077] 제1형 당뇨병성 신증 모델 군에서 발현이 감소하지만, PI3K 억제제의 투여에 의해 정상적으로 증가하는 단백질인 네프린(nephrin), 포도신(podocin) 및 Rac1/Cdc42를 웨스턴 블롯팅 실험결과를 도 4a 내지 도 4c에 나타내고, 그 상대적인 강도를 도 4d 내지 도 4f에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군에 비해서 PI3K 억제제를 투여한 군에서의 네프린(nephrin), 포도신(podocin) 및 Rac1/Cdc42의 발현양이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이것으로 보아 네프린(nephrin), 포도신(podocin) 및 Rac1/Cdc42는 당뇨병성 신증의 진단, 개선 및 치료에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

[0078] 실시예 5. 면역형광염색방법(Immunofluorescence)을 이용한 단백질성 진단 마커의 변화 측정

[0079] 네프린(nephrin), 포도신(podocin) 및 데스민(desmin)의 면역형광염색을 위해 웨스턴 블롯팅에 사용되었던 다클론항체(polyclonal antibody)를 사용하였다. 신장의 단면은 자일렌(xylene)으로 탈파라핀화 하였고, 정제된 에탄올(ethanol)로 다시 수화시켰다. 내생의 과산화효소 활성도는 0.3% 과산화수소(H_2O_2)에 20분 동안 반응시켜서 억제하였다. 샘플은 5% BSA(Bovine serum albumin)으로 1시간 동안 반응시켜서 블로킹하였고, 일차항체를 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 이차항체는 anti-rabbit을 사용하였고, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 바로, 4',6 diamidino-2-phenylindole(DAPI, sigma, St.Louis, MO, USA)를 처리하여 가시화 하였다. 각 샘플은 공초점레이저현미경(confocal laser scanning microscope, Carl-Zeiss, LSM 5 Exciter, Germany)으로 관찰하였다.

[0080] 제1형 당뇨병성 신증 모델 군에서 발현이 감소하지만, PI3K 억제제 워트마닌의 투여에 의해 정상적으로 증가하는 단백질인 네프린(nephrin)과 포도신(podocin)을 면역형광염색한 실험결과를 도 5a 와 도 5b에 나타내고, 반대로, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군에서 증가하지만, PI3K 억제제의 투여에 의해 정상적으로 감소하는 단백질인 데스민(desmin)을 면역형광염색한 실험결과를 도 5c에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이, 제1형 당

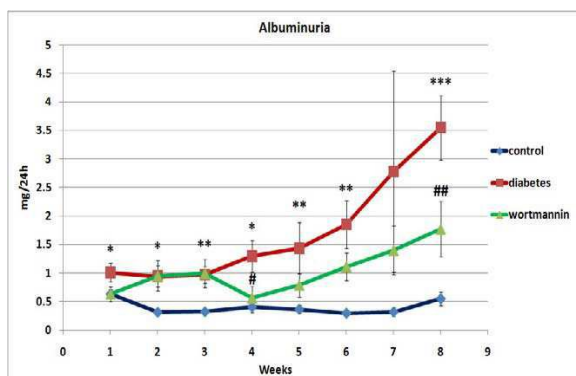
노병성 신증 모델 군에 비해서 PI3K 억제제를 투여한 군에서의 네프린(nephrin)과 포도신(podocin)의 발현양이 증가하고, 사구체 내에서 위치하는 것이 정상적으로 회복되었고, 이와 반대로, 제1형 당뇨병성 신증 모델 군에 비해서 PI3K 억제제를 투여한 군에서의 데스민(desmin)의 발현양이 감소하고, 사구체 내에서 위치하는 것이 정상적으로 회복된 것으로 나타났다. 이것으로 보아 네프린(nephrin), 포도신(podocin) 및 데스민(desmin)은 당뇨병성 신증의 진단, 개선 및 치료에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

[0081]

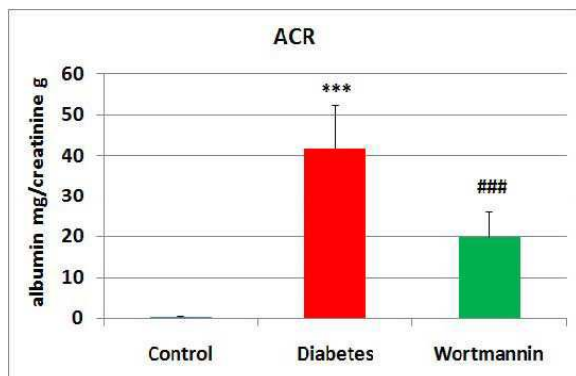
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

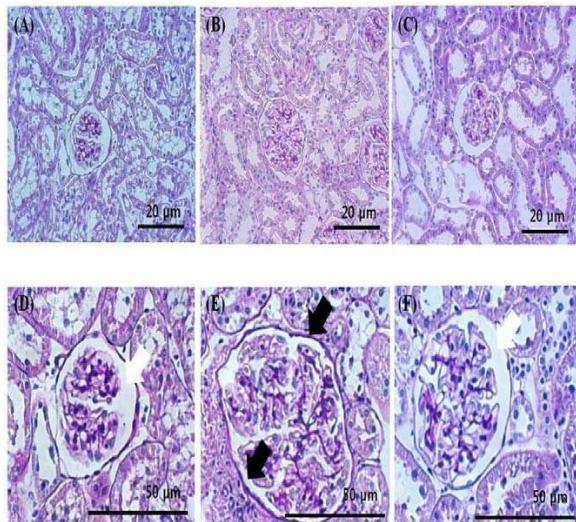
도면1



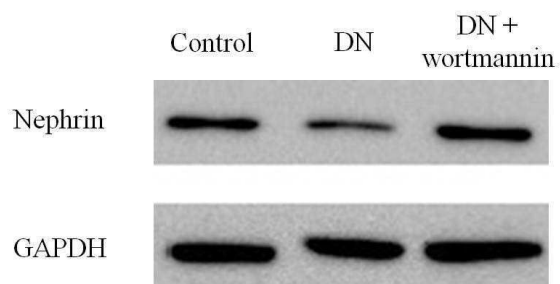
도면2



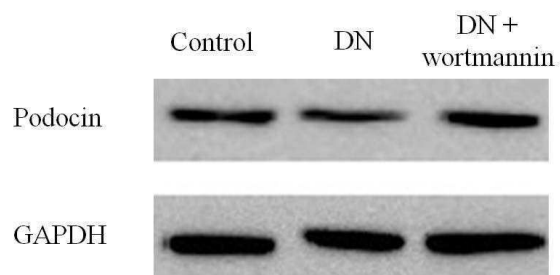
도면3



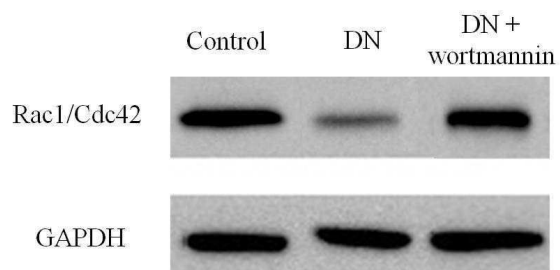
도면4a



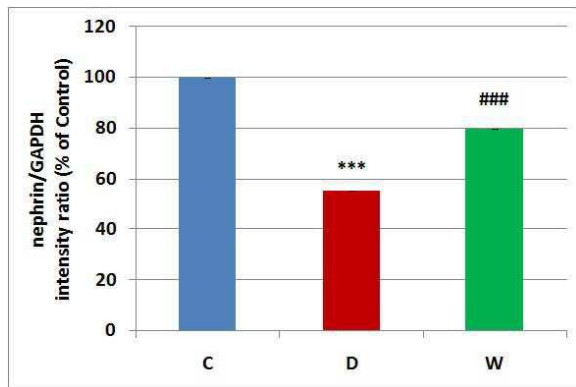
도면4b



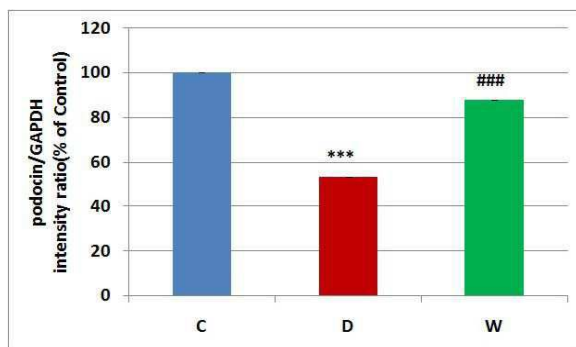
도면4c



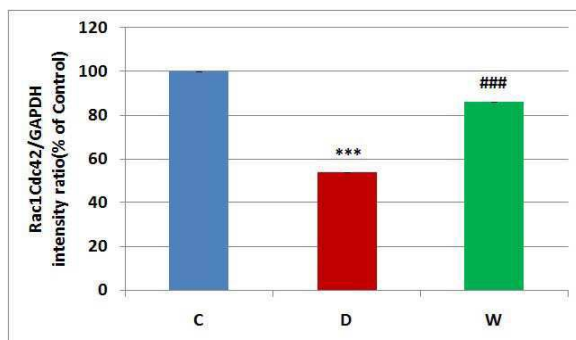
도면4d



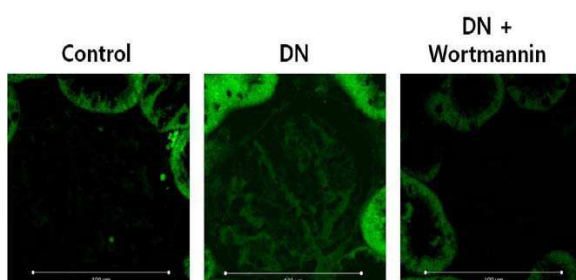
도면4e



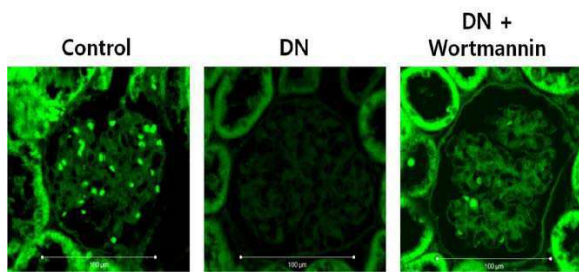
도면4f



도면5a



도면5b



도면5c

