



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0123036
(43) 공개일자 2017년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/50 (2017.01) A23L 1/305 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/5008 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0052168

(22) 출원일자 2016년04월28일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

사단법인 분자설계연구소

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 연세공학원 B138A호 (신촌동)

(72) 발명자

조인호

충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동 2001호 (두정동, 이안더센트럴)

박정현

서울특별시 서대문구 성산로14길 27-4 (연희동)

김영훈

경기도 용인시 기흥구 기흥로116번길 77, 602동 204호 (신갈동, 산양마을푸르지오아파트)

(74) 대리인

안소영

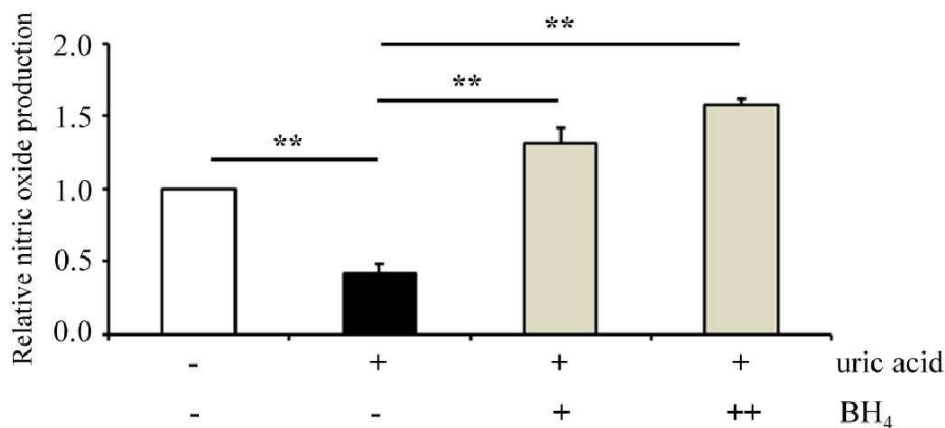
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제를 스크리닝하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제를 스크리닝하는 방법 및 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 예방 또는 치료용 건강기능식품 조성물에 대한 것이다. 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하면 다수의 후보물질 중 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제를 효과적으로 스크리닝할 수 있으므로, 약물 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 본 발명의 조성물은 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료 효과가 우수하다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 38/18 (2013.01)

G01N 33/573 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/326 (2013.01)

G01N 2500/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

후보 물질이 내피세포 NO 합성효소(endothelial NO synthase, eNOS)의 446번째 내지 448번째 알라닌(Alanine) 및 447 내지 449번째 트립토판(Tryptophan)의 측쇄에 결합하고, 449 내지 451번째 발린(Valine)에 결합하지 않는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법은 3D 구조 모델링 기법을 이용하여 인 실리코(in silico)로 수행되는 방법.

청구항 3

후보 물질이 요산과 내피세포 NO 합성효소의 결합을 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 방법은 시험관내(in vitro)에서 또는 3D 구조 모델링 기법을 이용하여 인 실리코(in silico)로 수행되는 방법.

청구항 5

BH4를 유효성분으로 포함하는, 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 예방 또는 치료용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제를 스크리닝하는 방법 및 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 예방 또는 치료용 건강기능식품 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 고요산혈증(hyperuricemia)은 혈중 요산 수준(level)이 높은 경우를 의미하는데, 일반적으로 혈장(또는 혈청) 요산 농도가 6.8 mg/dL을 초과하는 경우 고요산혈증으로 정의한다. 고요산혈증은 요산의 생산이 증가하거나 배설이 감소하여 발생한다. 고요산혈증에 의해 발생하는 질병은 크게 요산 결정의 침전에 의해 일어나는 질병과 요산의 병리적 효과와 관련된 질병으로 나누어진다. 요산 결정의 침전에 의해 일어나는 대표적 질병으로는 통풍성 관절염(Gouty arthritis)이 있다. 요산의 병리적 효과와 관련된 질환으로는 심혈관 질환(cardiovascular disease)이 대표적이다.

[0003] 상승된 체내 요산 수준은 내피세포 NO 합성효소(endothelial NO synthase, 이하 eNOS) 활성을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 그 결과 NO 생산이 감소하여 혈관 확장이 적절히 이루어지지 않아 다양한 심혈관 질환을 유발하는 것이다.

[0004] 고요산혈증을 개선 또는 치료하기 위해 다양한 약물이 개발되어 있는데, 크게 3가지로 분류된다. 첫 번째는 잔틴(xanthine)으로부터 요산 생성을 감소시키는 잔틴 옥시다제 억제제인데, 알로푸리놀(allopurinol) 및 페북소스타트(febuxostat)가 여기에 속한다. 두 번째는 요산 운반체 1(URAT1)을 억제하여 세포 내로 분비된 요산의 재흡수를 억제시키는 요산 배설촉진제인데, 설파피라존(sulfinpyrazone), 프로베네시드(probenecid), 벤즈브로마론(benzbromarone) 및 로살탄(losartan)이 여기에 속한다. 세 번째로, 요산 분해효소(uricase)가 있다. 그러나 기존 약물들은 종종 중대한 부작용을 초래하는 것으로 보고되어 있다. 알로푸리놀의 경우 유럽에서 매년 적어도 100명의 스티븐-존슨/독성 표피 괴사-용해(Stevens-Johnson toxic epidermal necrolysis) 환자와 약 30명의 사망자를 야기한 것으로 보고된 바 있다(Halvey et al., J Am Acad Dermatol. 58(1):25-32, 2008). 벤즈

브로마론은 간부전(liver failure) 부작용이 있어 다수의 국가에서 시판이 금지되어 있다.

[0005] BH4(tetrahydrobiopterin, (6R)-2-Amino-6-[(1R,2S)-1,2-dihydroxypropyl]-5,6,7,8-tetrahydropteridin-4(1H)-one)은 페닐알라닌의 분해 및 세로토닌, 멜라토닌, 도파민, 노르에피네프린, 에피네프린과 같은 신경전달 인자의 생합성에 관여하는 보조인자(cofactor)로 알려져 있으며, 내피세포 NO 합성효소에 의한 NO 생합성에 대한 보조인자이기도 한 것으로 알려져 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 후보 물질이 내피세포 NO 합성효소(endothelial NO synthase, eNOS)의 447 내지 449번째 트립토판(tryptophan)의 측쇄에 결합하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0007] 본 발명은 후보 물질이 요산과 내피세포 NO 합성효소의 결합을 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0008] 본 발명은 BH4를 유효성분으로 포함하는, 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 예방 또는 치료용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명은

[0010] 후보 물질이 내피세포 NO 합성효소(endothelial NO synthase, eNOS)의 446번째 내지 448번째 알라닌(Alanine) 및 447 내지 449번째 트립토판(Tryptophan)의 측쇄에 결합하고, 449 내지 451번째 발린(Valine)에 결합하지 않는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명자들은 인간의 내피세포 NO 합성효소(eNOS)에서, eNOS의 조효소인 BH4는 Ala 448 및 Trp 449의 측쇄에 결합하여 도 3에 모식도로 나타낸 바와 같이 안정한 결합 구조를 이루나, eNOS의 활성을 억제하는 물질인 요산은 Ala 448 및 Trp 449의 측쇄 뿐 아니라 eNOS의 Val 451과도 강력한 수소결합을 이루어, 요산의 ring과 eNOS의 ring이 서로 중첩적으로 상호작용하는 결합 구조를 이루는 것으로 확인하였다. BH4와 같이 결합을 이루는 경우 Heme에 전자를 전달할 수 있어 eNOS에 대한 조효소로서 작용할 수 있으나, 요산과 같이 결합을 이루는 경우 eNOS에 대한 조효소로서 작용할 수 없으면서 BH4의 작용을 경쟁적으로 억제하여 결과적으로 eNOS의 활성을 억제하므로, 이를 이용하여 고요산혈증을 수반하는 심혈관질환 치료제의 스크리닝 방법을 개발하게 되었다.

[0012] 본 발명에 있어서, "고요산혈증"은 혈중 요산 수준(level)이 비정상적으로 높은 경우를 의미하는데, 일반적으로 혈장(또는 혈청) 요산 농도가 6.8 mg/dL을 초과하는 경우 고요산혈증으로 정의된다. "고요산혈증에 수반되는 심혈관질환"이란 고요산혈증에 수반되어 발병하는 심장과 주요 혈관에 발생하는 질환을 의미하며, 고혈압, 허혈성 심장 질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 죽상경화증, 뇌혈관 질환, 뇌졸중, 부정맥을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 고요산혈증 상태에서는 혈관 확장 조절에 문제가 발생하여 다양한 심혈관질환이 발병하는 것으로 보고되어 있다. 그러나 본 발명 이전에는 고요산혈증과 심혈관질환 간의 관계에 대해 명확히 규명되지 않아, 개별적으로 고요산혈증 치료제 또는 심혈관질환 치료제 투여만이 이루어졌다.

[0013] 본 발명의 "내피세포 NO 합성효소"는 임의의 포유류의 혈관 내피세포 NO 합성효소가 될 수 있으며, 예를 들어 마우스, 햄스터, 랫트, 페렛, 기니피그, 토끼, 개, 영장류, 돼지 등이 있으며, 바람직하게는 사람 또는 소가 될 수 있다. 본 발명의 일 구현예로서, 내피세포 NO 합성효소가 사람 내피세포 NO 합성효소인 경우, 후보 물질이 상기 내피세포 NO 합성효소의 449번째 아미노산인 트립토판의 측쇄에 결합하는지 여부가 확인될 수 있다. 본 발명의 다른 구현예로서, 내피세포 NO 합성효소가 소 내피세포 NO 합성효소인 경우, 후보 물질이 상기 내피세포 NO 합성효소의 447번째 아미노산인 트립토판의 측쇄에 결합하는지 여부가 확인될 수 있다. 즉, 내피세포 NO 합성효소가 유래된 동물에 따라 구체적인 eNOS에서의 결합 위치는 약간씩 달라질 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은 3D 구조 모델링 기법을 이용하여 인 실리코(in silico)로 수행될 수 있다. 그러나 상기 방법은 그 외에도 당업계에 알려진 다양한 기기 또는 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다.

[0015] 또한 본 발명은 후보 물질이 요산과 내피세포 NO 합성효소의 결합을 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0016] 본 발명자들은 요산과 내피세포 NO 합성효소가 직접 결합한다는 것을 최초로 규명하였고, 상기 결합 위치가 기존에 내피세포 NO 합성효소에 대한 보조인자로 알려진 물질인 BH4가 내피세포 NO 합성효소와 결합하는 위치를 포함한다는 것을 밝혔다. 또한 본 발명자들은 요산이 BH4가 내피세포 NO 합성효소에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제한다는 것을 밝혔다. 이에 후보 물질이 요산과 내피세포 NO 합성효소의 직접적 결합을 억제하는 경우 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제가 될 수 있음을 규명하였다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은 시험관내(in vitro)에서 또는 3D 구조 모델링 기법을 이용하여 인 실리코(in silico)로 수행될 수 있다. 그러나 상기 방법은 그 외에도 당업계에 알려진 다양한 실험 기법, 기기 또는 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0018] 신약 개발은 통상적으로 5000~2만개의 신약 후보물질을 탐색한 후 그 중 250~10개의 물질을 선별하여 비임상 시험을 거치고, 거기서 다시 10개 미만의 물질을 선별하여 1상, 2상, 3상 임상 시험을 거쳐 최종적으로 1개의 물질을 신약으로 개발하여 신약판매허가를 받고 시판하는 과정으로 이루어진다. 이 과정에서 10년 내지 15년의 시간이 소요되고 많은 인력과 비용이 투입된다. 신약 후보물질은 컴퓨터상에서 후보물질의 구조를 확인하여 탐색하기도 하고(in-silico), 세포에 후보물질을 처리하여 효과를 확인하여 탐색하기도 한다(in-vitro). 본 발명의 방법을 이용하여 이러한 후보물질의 스크리닝을 효과적으로 할 수 있다면 막대한 비용과 긴 시간이 소요되는 신약 개발 과정이 보다 수월하게 이루어질 수 있을 것이다.
- [0019] 본 발명은 BH4를 유효성분으로 포함하는, 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 BH4를 유효성분으로 포함하는, 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 예방 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0021] BH4는 내피세포 NO 합성효소의 보조인자로 알려진 물질이다. 본 발명자들은 BH4가 요산과 eNOS의 결합을 경쟁적으로 억제함으로써 특히 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환의 예방 또는 치료 효과를 나타냄을 규명하였다.
- [0022] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 유효성분의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 경우에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물은 체중 1 kg 당 0.0001 내지 100 mg/kg의 투여량으로 투여할 수 있다. 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0023] 상기 약학적 조성물은 상기 BH4를 유효성분으로 함유하고, 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있다. 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 조성물은 경구로 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로는 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 건강기능식품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.
- [0027] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0028] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고당색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0029] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 환 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다. 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태일 수 있다.

[0030] 본 발명의 건강기능식품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.

[0031] 본 발명은 치료학적으로 유효한 양의 BH4를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 치료가 필요한 대상체에게 투여하여 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 "치료가 필요한 대상체"는 인간을 위시한 포유동물을 의미하고, "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미한다. "치료학적으로 유효한 양"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상의로 인해 생각되는 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.

[0032] 본 발명은 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환의 치료를 위한 약제학적 제제를 제조하는 데 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 사용하는 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하면 다수의 후보물질 중 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환 치료제를 효과적으로 스크리닝할 수 있으므로, 약물 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 본 발명의 조성물은 고요산혈증에 수반되는 심혈관질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 SPR 기기로 요산과 eNOS의 결합을 확인한 도이다.
 도 2는 3D 구조 모델링 기법을 이용하여 요산과 eNOS의 결합 위치 및 상호작용을 확인한 도이다.
 도 3은 3D 구조 모델링 기법을 이용하여 BH4와 eNOS의 결합 위치 및 상호작용을 확인한 도이다.
 도 4는 eNOS, BH4, 및 Heme의 결합 위치 및 상호작용(좌측), eNOS, 요산, 및 Heme의 결합 위치 및 상호작용(우측)을 나타낸 모식도이다.
 도 5는 혈관 내피세포에서 요산에 의해 감소되었던 eNOS의 활성이 BH4를 첨가하였을 때 회복됨을 확인한 도이다.
 도 6은 in vitro에서 요산에 의해 감소되었던 eNOS의 활성이 BH4를 첨가하였을 때 회복됨을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0036] 실시예 1. 요산과 eNOS의 결합 여부 확인

[0037] 내피세포 NO 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, 이하 "eNOS") 단백질을 CM5 센서 칩(GE healthcare life sciences, USA)에 고정시키고, SPR(Surface Plasmon Resonance) 기기인 Biacore t200(GE healthcare life sciences, USA)에 장착하였다. 요산(uric acid)을 running buffer (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% v/v Surfactant P20 SPR)에 도 1에 표시한 바와 같이 3, 6, 12, 또는 24 mg/dL의 농도로 녹인 후, 상기 SPR 기기를 이용하여 요산이 eNOS에 직접 결합함을 확인하였다(도 1).

[0038] 실시예 2. 요산과 eNOS의 결합 위치 확인

[0039] 컴퓨터를 이용한 분자설계 방법(in silico)을 이용하여 eNOS 단백질과 요산의 상호작용 모의실험을 통한 작용기 전 예측 모델을 구축하였다. 분자모델링에 사용된 eNOS 단백질은 단백질의 3차원 구조 데이터베이스를 제공하는 RCSB 사이트로부터 PDB ID: 4uh7 단백질을 이용하였다. 제공되는 X-ray구조에서는 수소원자의 위치가 정해져 있

지 않기 때문에, 정확한 작용기전 예측을 위하여 3차원 모델결정 계산을 수행하고 단백질을 구성하는 각 원자에 전하량을 할당하였다. 사용된 힘장 함수는 생체분자를 가장 잘 묘사하는 CHARMM 힘장을 사용하여 아미노산 전체에 적용하였다. 각 원자의 전하량은 Momany-Rone 그룹에서 개발된 부분 전하량 모델을 이용한 후 최종적으로 각 아미노산에 대한 수소위치를 결정하였다.

[0040] eNOS 단백질은 약리활성을 나타내는 촉매역할 부위에서 산소와 아미노산을 매개로 BH4(terahydrobiopterin), Heme 분자와의 상호작용을 통하여 일산화질소를 생성하게 된다. 요산으로 인한 eNOS 단백질의 활성변화를 예측하기 위하여 eNOS 단백질에 대하여 분자 도킹 시뮬레이션 계산을 수행하였다. Molsoft사의 ICM-Pro 도킹 시뮬레이션 프로그램을 사용하여 약리활성부위에서 요산의 결합부위를 예측하였다. 계산 결과 요산은 eNOS에서 경쟁적으로 BH4 분자가 결합되어진 결합부위에서 안정한 결합구조를 갖게 됨을 확인하였다. 조효소(cofactor)인 BH4는 eNOS 단백질의 Ala 448, Trp 449와 안정한 결합구조를 유지하고 있으며 요산은 BH4가 상호작용하고 있는 Ala 448, Trp 449와 추가적으로 Val 451 아미노산과 강한 수소결합과 Trp 449와 Ring-Ring 중첩 상호작용으로 안정되게 결합을 이루고 있음을 확인하였다. 도 2는 BH4와 eNOS의 상호작용을 나타낸 모식도이고, 도 3은 요산과 eNOS의 상호작용을 나타낸 모식도이며, 도 4는 eNOS, BH4, 및 Heme의 상호작용(좌측), eNOS, 요산, 및 Heme의 상호작용(우측)을 나타낸 모식도이다.

[0041] **실시예 3. 요산과 BH4의 관계 확인**

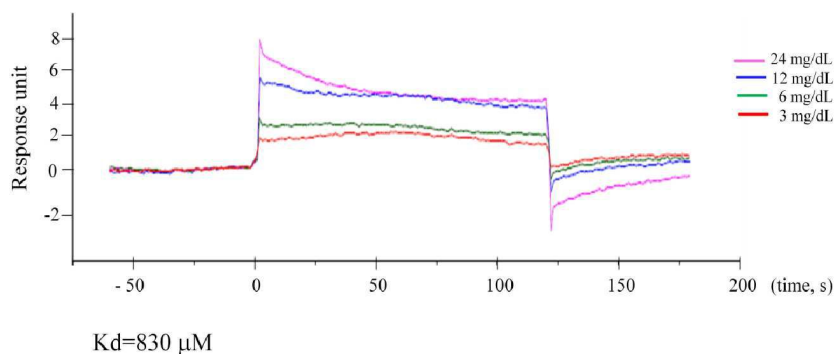
[0042] 실시예 2에서 요산이 BH4와 경쟁적으로 eNOS에 결합하는 것을 확인했으므로, eNOS의 활성이 요산에 의해 감소된 경우 BH4 처리에 의해 회복될 수 있는지 여부를 이하에서 확인하였다.

[0043] 혈관내피세포를 준비하고, 12 mg/dl의 요산 및 20 mM (+) 혹은 40 mM (++)의 BH4를 함께 24시간 동안 처리한 후 eNOS의 활성 변화를 분석하였다. Kreb's solution (pH 7.4; 1.5 ml/60-mm dish, 118 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 27.2 mM NaHCO₃, 1.2 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, and 11.1 mM glucose)을 37°C 세포 배양기에서 1 시간 동안 세포에 처리하고 각 처리 군에서 200 µL를 획득하여 100 µL의 Griess reagent (50 µL of 1% sulfanilamide containing 5% phosphoric acid and 50 µL of 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine)와 실온상태에서 10분간 반응시킨 다음, 520 nm의 파장으로 microplate reader 기를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 eNOS의 활성을 분석하였다. 그 결과, 혈관내피세포에서 요산에 의해 감소되었던 eNOS의 활성이 BH4를 첨가하였을 때 회복되는 것이 관찰되었다(도 5). in vitro에서도 마찬가지로 결과가 관찰되었다(도 6).

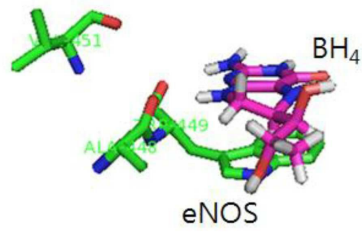
[0044] 상기 결과로부터, 요산과 BH4가 eNOS에 서로 경쟁적으로 결합하여 길항적으로 작용함을 알 수 있었다.

도면

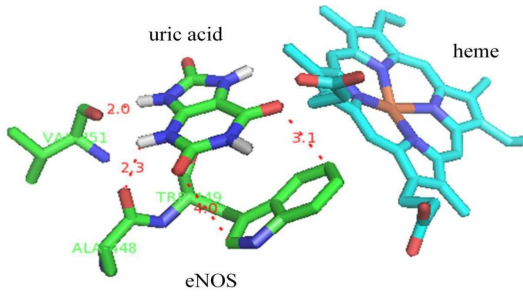
도면1



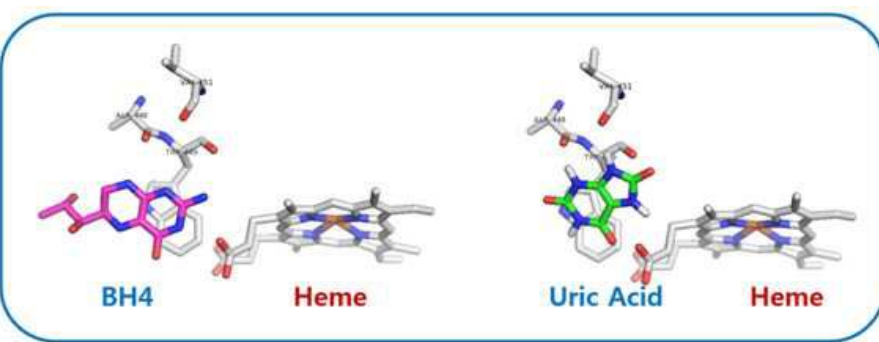
도면2



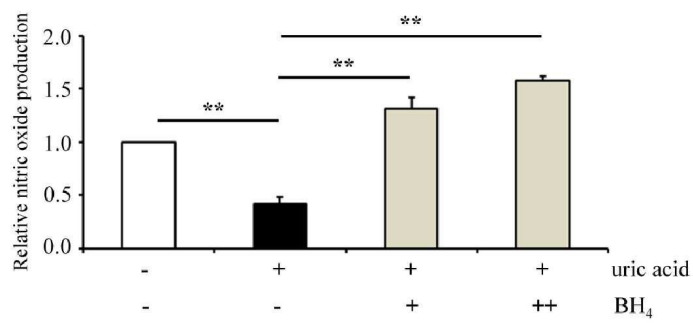
도면3



도면4



도면5



도면6

