



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월21일

(11) 등록번호 10-2501677

(24) 등록일자 2023년02월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0139128(분할)
(22) 출원일자 2022년10월26일
심사청구일자 2022년10월26일
- (65) 공개번호 10-2022-0150857
(43) 공개일자 2022년11월11일
(62) 원출원 특허 10-2019-0150679
원출원일자 2019년11월21일
심사청구일자 2019년11월21일
- (56) 선행기술조사문헌
International Journal of Oncology, 49,
pp.2549-2557(2016) 1부.*
US20100330599 A1
US20090304769 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
권영근
서울특별시 용산구 대사관로11길 11, 402호 (한남동)
노민영
서울특별시 도봉구 마들로 646, 104동 703호 (방학동, 방학동 삼성래미안)
장혜영
서울특별시 서대문구 연희로8길 5-13, 404호 (연희동)
- (74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 강태현

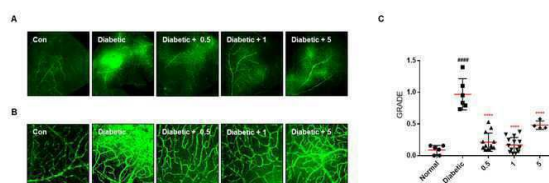
(54) 발명의 명칭 프리마퀸 디포스페이트와 그 타겟으로 USP1의 혈관누수차단 효과

(57) 요약

본 발명은 USP1 억제제를 포함하는 혈관누출 질환 예방 또는 치료용 조성물 및 USP1 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, USP1 억제제 및 프로마퀸 디포스페이트가 혈관내피세포의 사멸을 억제하고, VEGF에 의해 유도된 액틴 스트레스 파이버의 형성을 억제하며 외피 액틴 링 구조를 증가시켜 혈관누출을 억제하는 것을 확인하였다.

따라서, USP1 억제제를 포함하는 본 발명에 의한 조성물은 혈관누출 및 혈관누출에 의해 야기되는 다양한 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711093107
과제번호	2015M3A9B6066967
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	(1세부)뇌혈관 투과성/항상성 조절 생체 분자 규명 및 신규 물질 개발(2/3, 2단계)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2019.04.01 ~ 2020.01.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711091550
과제번호	2019R1A2C3007142
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	혈관 패터닝과 변이 연구(1/3)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

USP1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 siRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 USP1 억제제를 포함하되, 상기 USP1 억제제는 VEGF의 활성을 억제하는 것인, 당뇨병성 망막증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 USP1 억제제를 포함하는 혈관누출 질환 예방 또는 치료용 조성물 및 USP1 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 혈관벽의 단면은 내피세포(endothelium)로 구성된 내층(tunica intima), 엘라스틴, 콜라겐 섬유 등으로 구성된 결합조직(connective tissue), 민무늬근으로 구성된 중간막(tunica media) 및 콜라겐 섬유층으로 구성된 혈관외막(tunica adventitia)으로 구성된 비대칭적인 구조를 나타내는데, 이러한 혈관의 비대칭적 구조는 혈정의 생성을 억제하고, 혈관누출을 방지하며, 혈관의 유동성을 부여한다고 알려져 있다. 특히, 혈관의 내피세포로 구성된 내층은 당성분의 고분자들이 표면에 축적되어 당질 피질층을 형성하는데, 상기 당질 피질층은 혈류의 흐름을 직접적으로 조절하고, 혈액과 내피세포가 직접적으로 접촉하는 것을 방지하여, 혈액내 성분이 내피세포로 유입되는 것을 억제하는 역할을 수행한다. 뿐만 아니라, 혈관 탄력 조절, 혈액과 조직간 유지 및 용질 교환, 백혈구 이동, 지혈 및 혈액응고, 염증 반응 등의 다양한 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 이러한 당질 피질층이 손상되면, 일차적으로 혈관의 기능이 손상되고, 이차적으로는 혈관과 관련된 생리활성 기능이 저해되는 것으로 알려져 있다. 당질 피질층의 손상으로 인하여 가장 크게 영향을 받는 것은 혈관의 기능 손상인데, 상처, 수술 등의 기계적 자극에 의하여 당질 피질층이 손상되며, 혈액내 성분이 내피세포를 통해 혈관 외부로 이탈할 수 있다. 이러한 혈액 내 성분이 혈관외부로 이탈하는 증상을 혈관누출(vascular leakage)이라고 한다.

[0005] 또한, 혈관누출이 빈번하게 나타나는 당뇨병 환자를 대상으로 연구를 수행한 결과, 혈관누출은 혈관내피세포 성장인자(VEGF; Vascular endothelial growth factor)의 과발현에 의해 유발되는 것으로 규명되었다. 즉, 당뇨병의 발병시에 유발되는 VEGF의 과발현은 내피세포의 부착연접에서 내피세포간의 결합을 유지하는데 중요한 역할을 수행하는 VE-카드헤린(cadherin)을 분해하여, 내피세포간의 결합 감소 및 당질 피질층의 손상을 유발하고, 이로 인하여 혈관누출이 발생하는 것으로 알려져 있다. 또한, VEGF는 밀착연접(tight junction)의 완전성을 변화시키고 내피세포의 세포골격을 구조화 함으로써 혈관-망막 장벽의 파쇄에서 중요한 역할을 하며, 이는 당뇨병성 망막증의 발병 동안 혈관 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

[0006] 따라서, 혈관누출로 인해 발병되는 질병의 초기 및 가역적 단계를 타겟으로 하는 치료법에 대한 요구가 대두되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Chemistry & Biology 18, 1390-1400, November 23, 2011, "Selective and Cell-Active Inhibitors of the USP1/ UAF1 Deubiquitinase Complex Reverse Cisplatin Resistance in Non-small Cell Lung Cancer Cells", Junjun Chen, 외.

(비특허문헌 0002) Frontiers in Pharmacology, September 2018, Vol.9, Article 1080, "Inhibition of Ubiquitin-Specific Proteases as a Novel Anticancer Therapeutic Strategy", Tao Yuan, 외.

(비특허문헌 0003) Villamil, M. A., 외., "Serine phosphorylation is critical for the activation of ubiquitin-specific protease 1 and its interaction with WD40-repeat protein UAF1." Biochem. 51, 9112-9113 (2012)

(비특허문헌 0004) Zhang X.-Y., 외., "The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression." Mol. Cell 29:102-111(2008)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 혈관의 완전성(integrity)의 손상에 의한 혈관누출에 의해 야기되는 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 찾고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 현재 말라리아 치료제 사용 중인 약물인 프리마퀸 디포스페이트(primaquine diphosphate) 및 유비퀴틴 특이적 펩티다제(ubiquitin specific peptidase 1, USP1) 억제제(inhibitor)가 혈관내피세포의 사멸을 억제하고, VEGF에 의해 유도된 액틴 스트레스 파이버의 형성을 억제하고 외피 액틴링(cortical actin ring)의 구조를 증가시켜 혈관누출 관련 질환을 예방 또는 치료할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 USP1 억제제를 포함하며, 상기 USP1 억제제는 USP1 단백질에 대한 항체, USP1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 및 프리마퀸 디포스페이트(primaquine diphosphate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 혈관누출(vascular leakage) 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 USP1 단백질에 대한 항체, USP1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 및 프리마퀸 디포스페이트(primaquine diphosphate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 USP1 억제제를 포함하며, 혈관누출로 인한 암세포의 전이 방지용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 USP1 단백질 또는 USP1 유전자를 후보물질과 접촉시키고, 그에 따른 USP1 단백질의 활성 또는 USP1 유전자의 발현 변화를 분석하는 것을 포함하는, USP1 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 목적하는 개체로부터 분리된 시료의 USP1 단백질 또는 USP1 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 USP1 단백질 또는 USP1 유전자의 발현 수준을 대조군 시료의 USP1 단백질 또는 USP1 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계; 및 상기 대조군에 비해 USP1 단백질 또는 USP1 유전자의 발현 수준이 증가하는 경우 혈관누출 질환의 발명 위험성이 높은 것으로 나타내는 것을 포함하는 혈관누출 질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 USP1 억제제를 포함하며, 상기 USP1 억제제는 USP1 단백질에 대한 항체, USP1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 및 프리마퀸 디포스페이트(primaquine diphosphate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 혈관누출(vascular leakage) 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명에서 사용되는 용어 "혈관누출 또는 혈관누수(vascular leakage)"는 상호 호환적으로 사용될 수 있으며, 당질 피질층의 손상으로 인하여 혈액내 성분이 내피세포를 통해 혈관 외부로 이탈하는 증상을 의미한다.
- [0017] 상기 혈관누출 또는 혈관누수 질환은 당뇨병, 염증, 망막증, 당뇨병성 망막증, 황반변성, 녹내장, 협착, 재협착, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 뇌부종, 관절염, 관절병증, 포도막염, 염증성 장질환, 황반부종, 고지혈증, 허혈성질환, 당뇨병성 족부궤양, 폐성고혈압, 급성 폐손상, 심근허혈, 심부전, 급성하지허혈, 심근경색, 뇌졸중, 허혈 또는 재관류 손상, 혈관누출 증후군, 부종, 이식거부, 화상, 급성 또는 성인 호흡곤란 증후군, 폐혈증 또는 자가면역질환 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 디포스페이트, siUSP1 및 USP1 억제제가 혈관내피세포의 사멸을 억제하고(도 1, 6 및 9), 세포 투과성을 억제하며(도 2, 7 및 10), 세포 골격 변화에 미치는 영향을 확인하였고(도 3, 8 및

11), 동물수준(도 4 및 5)에서 VEGF을 처리하여 유발된 혈관누출의 수준을 억제하는 효과를 나타냄을 확인하였다.

- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, USP1 단백질에 대한 항체, USP1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 및 프리마퀸 디포스페이트(primaquine diphosphate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 USP1 억제제를 포함하는 혈관누출로 인한 암세포의 전이 방지용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명에서 상기 조성물은 항암제와 병용투여되는 경우 암세포의 전이 방지 및 암 세포의 성장 억제 및 세포사멸을 유도하는 데 시너지 효과를 부여할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 약학 조성물에서 상기 조성물과 함께 병용투여되는 항암제의 종류는 종래에 암 치료를 위하여 일반적으로 사용되던 항암제라면 제한 없이 사용할 수 있다. 이러한 항암제의 예로는 화학항암제로서 알킬화제, 미세소관 저해제, 대사길항제, 토포아이스머라아제 억제제가 포함될 수 있고, 표적항암제로서 단일클론항체, 신호전달억제제가 포함될 수 있으며, 면역항암제로서 면역관문 억제제, 면역세포 치료제(CAR-T), 항체-약물접합체(ADC), 이중항체, 항암 바이러스 및 항암백신이 포함될 수 있고, 호르몬성 항암제로서 남성호르몬 억제제 및 여성호르몬 억제제가 포함될 수 있다.
- [0022] 상기 알킬화제의 성분은 메클로르에타민(mechlorethamine), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 클로람부실(chlorambucil), 티오테파(thiotepa), 알트레타민(altrretamine), 프로카바진(procarbazine), 부설판(busulfan), 스트렙토조신(streptozocin), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 다카바진(dacabazine), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)을 포함한다.
- [0023] 상기 미세소관 저해제의 성분은 탁소테르(taxotere), 벨반(velban), 온코빈(ovcovin) 및 나벨빈(navelbine)을 포함하고, 상기 대사길항제의 성분은 플루오로우라실(fluorouracil), 카페시타빈(capecitabine), 사이타라빈(cytarabine), 겐시타빈(gemcitabine), 플루다라빈(fludarabine), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉시드(pemetrexed) 및 메르캅토포린(mercaptapurin)을 포함한다.
- [0024] 상기 토포아이스머라아제의 성분은 하이캄틴(hycamtin), 캄토사(camptosar), 베페시드(vepesid), 탁솔(taxol), 블레오세인(blenoxane), 아드리아마이신(adriamycin) 및 세루비딘(cerubidine)을 포함한다.
- [0025] 상기 단일클론항체의 성분은 EGFR을 표적으로 하는 트라스투주맙(trastuzumab), 퍼투주맙(pertuzumab), 파니투주맙(panitumumab) 및 세투시맙(cetuximab); VEGFR을 표적으로 하는 베바시주맙(bevacizumab), 라무시주맙(ramucirumab) 및 애플리버셉트(aflibercept); CD20을 표적으로 하는 리툽시맙(rituximab) 및 오비누투주맙(obinutuzumab); CD38을 표적으로 하는 다라투무맙(daratumumab); RNAK-L을 표적으로 하는 데노수맙(denosumab)을 포함한다.
- [0026] 상기 신호전달억제제의 성분은 BTK를 표적으로 하는 이브루티닙(ibrutinib)을 포함하고, Bcr-abl을 표적으로 하는 다사티닙(dasatinib), 닐로티닙(nilotinib), 이마티닙(imatinib) 및 보수티닙(bosutinib); EGFR을 표적으로 하는 오시머티닙(osimertinib), 엘로티닙(erlotinib) 및 기피티닙(gefitinib); PDGFR, VEGFR 및 FGFR 계열을 표적으로 하는 닌테다닙(nintedanib), 수니티닙(sunitinib), 소라페닙(sorafenib), 카보잔티닙(cabozantinib), 레바티닙(lenvatinib), 레고라페닙(regorafenib), 엑시티닙(axitinib), 파조파닙(pazopanib) 및 카보잔티닙(cabozantinib); MEK/RAF를 표적으로 하는 트라메티닙(trametinib) 및 다브라페닙(dabrafenib), CDK를 표적으로 하는 아베마시클립(abemaciclib) 및 팔보시클립(palbociclib), 유비퀴틴을 표적으로 하는 레날리도마이드(lenalidomide), JAK를 표적으로 하는 룩소리티닙(ruxolitinib), ALK를 표적으로 하는 알렉티닙(alectinib) 및 크리조티닙(crizotinib), PARP를 표적으로 하는 올라파립(olaparib), 프로테아좀을 표적으로 하는 익사조립(ixaomib), Bcl-2를 표적으로 하는 베네토클락스(venetoclax)를 포함한다.
- [0027] 상기 면역관문 억제제의 성분은 이필리무맙(ipilimumab), 펌브롤리주맙(pembrolizumab), 니볼루맙(nivolumab), 세미플리맙(cemiplimab), 아테졸리주맙(atezolizumab), 아벨루맙(avelumab) 및 더발루맙(duralumab)을 포함하고, 상기 면역세포 치료제의 성분은 티사젠렉류셀(tisagenlecleucel) 및 액시카브타젠 실루셀(axicabtagene ciloleucel)을 포함한다.
- [0028] 상기 ADC의 성분은 겐투주맙-오조가마이신(gemtuzumab-ozogamicin), 브렌투시맙 베도틴(brentuximab vedotin), 트라스투주맙 엠탄신(trastuzumab emtansine), 이노투주맙 오조가마이신(inotuzumab ozogamicin) 및 에리불린 메실레이트(eribulin mesylate)를 포함한다.
- [0029] 상기 이중항체의 성분은 블리나투모맙(blinatumomab)을 포함하고, 상기 항암 바이러스의 성분은 타리모젠 라헤

르프레프백(talimogene laherparepvec)을 포함하며, 상기 항암백신의 성분은 시푸류셀-T(sipuleucel-T)를 포함하고, 상기 남성호르몬 억제제의 성분은 비칼루타미드(bicalutamide) 및 엔잘루타미드(enzalutamide)를 포함한다.

- [0030] 상기 여성호르몬 억제제의 성분은 타목시펜(tamoxifen), 아나스트로졸(anastrozole), 레트로졸(letrozole), 엑스메스탄(exemestane) 및 풀베스트란트(fulvestrant)를 포함할 수 있다.
- [0031] 이외에도 암세포의 비정상적인 분화를 억제하는 비타민 A 및 그 대사체 계열의 트레티노인(tretinoin) 및 알리 트레티노인(alitretinoin)을 포함하고, 종양괴사인자- α 조절과 관련된 탈리도마이드(thalidomide) 및 레날리도 마이드(lenalidomide)가 포함될 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 방사 요법은 X-선 조사 및 γ -선 조사 등이다.
- [0033] 따라서, 상기 항암제는 골육종(osteosarcoma), 흑색종(melanoma), 자궁경부암(uterine cervical cancer), 위암(gastric cancer) 및 교모세포종(glioblastoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암종에 대한 암세포의 증식억제 또는 세포사멸을 증진시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 USP1와 관련된 USP1/UAF1 억제제는 시스플라틴-내성 비소 세포 폐암(NSCLC)의 세포 증식을 억제하는데 시스플라틴과 상승적으로 작용한다(Chemistry & Biology 18, 1390-1400, November 23, 2011, "*Selective and Cell-Active Inhibitors of the USP1/ UAF1 Deubiquitinase Complex Reverse Cisplatin Resistance in Non-small Cell Lung Cancer Cells*", Junjun Chen, 외.). 또한, Oncomine Research Edition 데이터베이스의 종양 마이크로 어레이 발현 데이터에 대한 조사에 따르면 USP1 mRNA 발현 수준은 골육종, 흑색 종, 위암 등을 포함한 여러 악성 종양에서 현저하게 변화한다. USP1은 골육종뿐만 아니라 위암 또는 자궁 경부암, 흑색 종 및 육종에서 비정상적으로 과발현된다. 다양한 종양에서 USP1의 빈번한 과발현 및 DNA 손상 반응에서 USP1의 중요한 역할을 고려하여, USP1 억제는 신규한 항암 요법일 수 있다(Frontiers in Pharmacology, September 2018, Vol.9, Article 1080, "*Inhibition of Ubiquitin-Specific Proteases as a Novel Anticancer Therapeutic Strategy*", Tao Yuan, 외.).
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어 "병용투여"란, 치료요법의 개별성분들을 동시, 순차적으로, 또는 개별적으로 투여하는 방식으로 이를 수 있다. 2 이상의 약물을 동시에 또는 순차적으로 투여하거나, 또는 일정한 또는 정해지지 않은 간격으로 교대로 투여하는 등의 방법으로 병용 치료 효과를 얻는 것으로, 병용 치료법은 이에 한정되지 아니하지만, 예를 들어 반응 정도, 반응 속도, 질병 진행까지의 기간 또는 생존 기간을 통해 측정된 효능이 병용 치료법의 성분 중 하나 또는 나머지를 통상적인 용량으로 투약하여 얻을 수 있는 효능보다 치료학적으로 우수하면서 상승효과를 제공할 수 있는 것으로 정의될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 1일 투여량은 마우스 대비 사람으로 환산하였을 때, 예컨대 0.05 내지 100 mg/kg이다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유효액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0040] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 프리마퀸 디포스페이트를 타겟 예측 사이트 (<http://carlsbad.health.unm.edu/tomcat/carlsbad/carlsbadone>, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6135> 및 https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL43128/)에 넣었을 때, 후보 유전자들이 도출되었고 그 중에서 내피세포에서 발현이 높은 유전자를 확인하던 중 USP1이 영향을 받는 것을 확인하였다. 이 후 siUSP 및 USP1 억제제의 혈관누출 억제 효과를 확인하였다.
- [0041] 사람에는 약 100개의 탈유비퀴틴화 효소(deubiquitinating enzyme, DUB)가 존재하는 것으로 보고되었는데, 탈유비퀴틴화 효소는 크게 UCH(Ub C-terminal hydrolase), USP(Ub-specific processing protease), Otubain(OTU-domain Ub-aldehyde-binding protein), MJD(Machado-Joseph disease) 그리고 JAMM(Jab1/Pad1/MPN domain metallo-enzyme) 계(family)의 5개 그룹으로 나눌 수 있는데 이 중 유비퀴틴 특이적 펩티다아제(ubiquitin specific peptidase, USP)가 가장 큰 그룹을 형성한다. USP의 경우는 주로 350 아미노산으로 구성된 활성-도메인을 가지고 있으며 단백질 분해 효소(Cysteine protease)들이다. 이들 USP 활성 도메인의 아미노산 보존 정도는 전반적으로 그리 높지 않은 편이지만, 활성 시스테인(Cysteine)과 히스티딘(Histidine) 잔기를 둘러싼 부위, 즉 시스테인 박스(Cysteine box) & 히스티딘 박스(Histidine box)는 잘 보존되어있다. USP의 경우 이런 활성-도메인 외에 아직 그 기능이 밝혀지지 않은 도메인들을 다수 포함하고 있는데, 아마도 기질 인식, 세포 내 위치조절 및 단백질-단백질 상호작용 등에 관여하는 것으로 여겨진다.
- [0042] 상기한 USP의 구성 및 역할은 그 종류에 따라 상이하다. 유비퀴틴(Ubiquitin) 자체는 7개의 라이신(Lys) 잔기를 함유하며, 이들 모두는 유비퀴틴화 될 수 있고 상이한 연결의 폴리 유비퀴틴 사슬을 초래한다. 이와 같이 다르게 연결된 유비퀴틴 사슬에 따라 세포는 각각의 기능을 하는데, 프로테아좀 관련 DUB에 의한 폴리 유비퀴틴화 단백질의 가공, 히스톤 탈 유비퀴틴 화, RNAi가 세포주기 조절 및 DNA 복구에서 DUB의 역할을 밝힘, DUB는 신호 전달 경로의 Kinase cascades를 조절 및 세포 내 이입 등의 기능을 한다. 대표적으로 USP1(NCBI Gene ID: 7398)은 인간에서 USP1 유전자에 의해 암호화되는 효소이다. 상기 유전자는 히스티딘(His) 및 시스테인(Cys) 도메인을 갖는 탈 유비퀴틴화 효소(DUB)인 유비퀴틴-특이적 처리(UBP) 프로테아제 패밀리의 구성원을 암호화한다. 상기 단백질은 세포질에 위치하며 유비퀴틴 용합 전구체 및 유비퀴틴화 된 단백질로부터 유비퀴틴 모이어티(moiety)를 절단한다. 단백질은 구체적으로 판코니 빈혈(PA) DNA 수복 경로에서 단백질을 탈 유비퀴틴화시킨다. 대체 전사 스플라이스 변형이 특징화되었다. 또한, 상기 USP1은 Cys90, His593 및 Asp751로 구성된 촉매성 트리아드를 포함하는 785-아미노산으로 구성된다(Villamil, M. A., 외., "Serine phosphorylation is critical for the activation of ubiquitin-specific protease 1 and its interaction with WD40-repeat protein UAF1." *Biochem.* 51, 9112-9113 (2012)). 아울러 상기 USP1은 그 스스로는 상대적으로 불활성이고, 완전한 효소 활성은 USP12 및 USP46에 결합되어 활성화되고 그 활성을 조절하는 보조인자인 UAF1을 가진 헤테로이량체성 복합체에 화합되었을 때만 달성된다. USP22(NCBI Gene ID: 23323)는 Cys185 및 His479를 포함하는 520-아미노산으로 구성된다. 또한, 상기 USP22는 인간에서 염색체 17의 USP22 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. 상기 USP22는 전사 조절 히스톤 아세틸화 복합체 SAGA의 히스톤 DUB 성분으로, 히스톤 H2A 및 H2B의 탈유비퀴틴을 촉매하는 역할을 한다(Zhang X.-Y., 외., "The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression." *Mol. Cell* 29:102-111(2008)).
- [0043] 본 발명의 일 구체예에 따르면, USP1 억제제를 포함하며, 상기 USP1 억제제는 USP1 단백질에 대한 항체, USP1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 프리마퀸 디포스페이트(primaquine diphosphate)가 혈관내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 활성을 억제하는 것을 확인하였다(도 1 내지 11).
- [0044] 본 발명은 USP1 단백질 또는 USP1 유전자를 후보물질과 접촉시키고, 그에 따른 USP1 단백질의 활성 또는 USP1 유전자의 발현 변화를 분석하는 것을 포함하는, 혈관누출차단제(vascular leakage inhibitor)의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0045] 아울러, 상기 후보물질이 USP1 단백질의 활성을 저해하거나 USP1 유전자의 발현을 억제하면 혈관누출차단제로 선별하는 것을 포함하는 혈관누출차단제의 스크리닝 방법을 제공하며, 상기 후보물질이 VEGF의 활성을 억제하는지 여부를 분석하는 것을 추가로 포함하는 혈관누출차단제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0046] 본 발명은 목적하는 개체로부터 분리된 시료의 USP1 단백질 또는 USP1 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 USP1 단백질 또는 USP1 유전자의 발현 수준을 대조군 시료의 USP1 단백질 또는 USP1 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계; 및 상기 대조군에 비해 USP1 단백질 또는 USP1 유전자의 발현 수준이 증가하는 경우 혈관누출

질환의 발명 위험성이 높은 것으로 나타내는 것을 포함하는 혈관누출 질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0047] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "후보물질"은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 USP1 단백질에 대한 항체, USP1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 프리마퀸 디포스페이트(primaquine diphosphate)로부터 선택되는 USP1 억제제를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 따라서, 본 발명은 상기 USP1 억제제가 VEGF의 활성을 억제하는 것인 약학적 조성물 및 스크리닝 방법을 제공한다.

[0050] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

발명의 효과

[0052] 본 발명에 따른 USP1 억제제를 포함하며, 상기 USP1 억제제는 USP1 단백질에 대한 항체, USP1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 또는 프리마퀸 디포스페이트(primaquine diphosphate)는 혈관누출 질환의 예방 또는 치료 용도를 위해 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 프리마퀸 디포스페이트의 혈관내피세포 사멸 및 증식을 확인한 결과를 보여준다.

도 2는 TEER assay(도 2A) 및 FITC-Dextran Permeability assay(도 2B)를 통한 프리마퀸 디포스페이트의 세포 투과성 억제 효과를 확인한 결과를 보여준다.

도 3은 프로마퀸 디포스페이트의 VE-카드헤린의 안정성을 향상시키는 효과(도 3A) 및 프로마퀸 디포스페이트가 VEGF에 의해 유도되는 액틴 스트레스 파이버의 형성을 억제시키고 외피 액틴링 구조를 증가시키는 효과(도 3B)를 확인한 결과를 보여준다.

도 4는 프로마퀸 디포스페이트의 *in vivo*에서 혈관누출이 억제되는 효과를 확인하기 위하여, 면도된 마우스 등(도 4A)에 VEGF에 의한 프로마퀸 디포스페이트의 혈관누출 차단 효과(도 4B), 히스타민에 의한 혈관누출 차단 효과(도 4C) 및 정량값(도 4D)을 확인한 결과를 보여준다.

도 5는 프로마퀸 디포스페이트를 경구 투여한 군이 당뇨병 마우스 모델에서 유도된 망막 혈관 투과성을 저해하는 효과(도 5A 및 5B)와 망막 혈관에서 발견되는 누수량과 누수 개수의 곱으로 표현된 정량값(GRADE)을 통해 프로마퀸 디포스페이트가 당뇨병성 망막증의 혈관 투과성에 미치는 영향을 *in vivo*에서 분석한 결과를 보여준다.

도 6은 USP1을 녹다운(knockdown) 하였을 때, MTT assay를 통해 세포 사멸 및 증식을 확인한 결과를 보여준다.

도 7은 TEER assay(도 7A) 및 FITC-Dextran Permeability assay(도 7B)를 통한 siUSP1의 세포 투과성 억제 효과를 확인한 결과를 보여준다.

도 8은 siUSP1의 VE-카드헤린의 안정성을 향상시키는 효과(도 8A) 및 siUSP1가 VEGF에 의해 유도되는 액틴 스트레스 파이버의 형성을 억제시키고 외피 액틴링 구조를 증가시키는 효과(도 8B)를 확인한 결과를 보여준다.

도 9는 USP1의 억제제인 ML-323의 세포 사멸 및 증식 확인(도 9A) 및 SJB2-043(B)의 세포 사멸 및 증식 확인(도 9B) 결과를 보여준다.

도 10은 TEER assay(도 10A 및 10B) 및 FITC-Dextran Permeability assay(도 10C 및 10D)를 통한 ML-323 및 SJB2-043의 세포 투과성 억제 효과를 확인한 결과를 보여준다.

도 11은 ML-323 및 SJB2-043의 VE-카드헤린의 안정성을 향상시키는 효과(도 11A) 및 ML-323 및 SJB2-043가 VEGF에 의해 유도되는 액틴 스트레스 파이버의 형성을 억제시키고 외피 액틴링 구조를 증가시키는 효과(도 11B)를 확인한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] **실험예**
- [0058] **배양예: 혈관내피세포 배양**
- [0059] 인간 망막혈관내피세포(Human Retinal endothelial cell, HREC)를 셀-시스템즈(cell-[0389] systems, USA)에서 구입하여 20 % (w/v) 우태아혈청(FBS, HyClone, Canada), 100 units/ml의 페니실린(penicillin, Invitrogen, USA), 100 μ g/ml의 스트렙토마이신(streptomycin, Invitrogen, USA), 3 ng/ml의 섬유아세포성장인자(bFGF; basic fibroblast growth factor, USPtate Biotechnology, USA) 및 5 units/ml의 헤파린을 함유한 EGM 배지 (Life Technologies, USA)가 담겨진 100 mm의 배양디쉬(dish)에 접종한 후, 37 °C의 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다.
- [0061] **실험예 1: 프리마퀸 디포스페이트의 세포 사멸 및 증식 확인**
- [0062] 프리마퀸 디포스페이트의 세포 사멸 및 증식을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 혈관내피세포를 콜라겐이 코팅된 24 웰 플레이트에 $(3.0 \pm 0.2) \times 10^4$ cells/well로 FBS가 포함된 20 % M199를 이용해 24시간 배양하였다. 세포의 포화(confluency)가 70 % 가량이 되면 프리마퀸 디포스페이트를 SFM에 1, 5, 10, 20 μ M 농도로 처리 한 뒤 2일간 배양하였다. 2일 후 MTT 용액(solution)에 4시간 배양 한 뒤 세포 사멸도를 측정해주었다.
- [0063] 그 결과, 5, 10 μ M로 처리한 군에서 유의하게 세포가 증식함을 확인할 수 있었다(도 1). ($P < 0.0001$)
- [0065] **실험예 2: 프리마퀸 디포스페이트의 세포 투과성 억제 효과 확인**
- [0066] 프리마퀸 디포스페이트의 세포 투과성 억제효과를 확인하기 위해 TEER assay 와 FITC-dextran permeability assay 방법으로 투과성 분석(permeability assay)을 수행하였다. TEER은 막에 의한 전기저항을 나타내는 값으로 세포의 밀착연접(tight junction)에 의해 형성된 저항을 측정하는데 활용할 수 있는 방법이고, FITC-dextran permeability assay는 상부 챔버(upper chamber)에 40kda FITC-dextran을 떨어뜨려 FITC의 누수량으로 세포 투과를 알아 볼 수 있는 실험이다. 콜라겐으로 코팅된 트랜스웰(transwell)에 혈관내피세포를 $(5.5 \pm 0.5) \times 10^4$ cells/well로 10 % EGM을 이용하여 2일간 배양하여 포화된 단분자층(confluent monolayer)을 만들었다. SFM를 이용해 2시간 기아(starvation) 시켜 준 뒤, 프리마퀸 디포스페이트 5 μ M를 처리하고 30분 간 전-배양(pre-incubation) 후에, HUVEC 단분자층의 투과성을 유도하기 위해 VEGF 30 ng/ml 를 30분 간 처리하였다.
- [0067] 그 결과, 대조군에 비하여 VEGF를 처리하였을 때 세포벽의 투과성이 증가하였기 때문에 전기저항 값이 감소한 반면, VEGF와 프리마퀸 디포스페이트를 함께 처리하였을 때는 VEGF만 처리한 군에 비하여 전기저항 값이 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다(도 2A). ($P < 0.05$)
- [0068] 또한, 대조군에 비하여 VEGF를 처리하였을 때 FITC의 누수량이 증가한 반면, VEGF와 프리마퀸 디포스페이트를 함께 처리하였을 때는 VEGF만 처리한 군에 비하여 FITC 누수량이 감소함을 확인할 수 있었다(도면 2B). ($P < 0.05$)
- [0070] **실험예 3: 프리마퀸 디포스페이트이 세포 골격 변화에 미치는 영향 확인**
- [0071] 혈관투과성은 혈관세포 간 부착 연접(anchoring junction)의 안정성에 영향을 받는다고 알려져 있다. HUVECs(human umbilical vein endothelial cells)을 10 % EGM을 이용해 35mm 디쉬(dish)에 2일간 포화상태(confluent)가 되도록 배양하였다. SFM로 2시간 기아 시켜 준 뒤, 프리마퀸 디포스페이트 5 μ M를 처리하고 30분 간 전-배양 후에, 세포 투과성을 유도하기 위해 VEGF 50 ng/ml를 30분 간 처리하였다. 이어, 세포를 4% PFA로 20분 동안 실온에서 고정화 시키고 0.1% Triton X-100 / PBS에서 투과화시켰다. 그 후, 세포를 VE-카드헤린(cadherin) (SC-9989) 항체와 2시간 동안 반응시켰다.
- [0072] 그 결과, 프리마퀸 디포스페이트는 VEGF에 의해 VE-카드헤린이 불안정해지는 것을 막을 뿐 아니라, 그 자체가 세포 간 VE-카드헤린의 안정성을 향상시키는 역할을 하는 것도 확인되었다.
- [0073] 또한, 세포 골격을 이루는 액틴의 구조 변화가 혈관내피세포의 투과성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다. 혈관내피세포의 투과성이 증가할 경우 액틴 스트레스 파이버의 형성이 증가하고 외피 액틴 링 구조는 감소한다(도

3A).

[0074] 이를 이용하여 프리마퀸 디포스페이트의 혈관내피투과성 억제 효과를 알아보았다. 포화상태 HUVECs에 프리마퀸 디포스페이트 5 μ M를 처리하고 30분간 전-배양 후에, 세포 투과성을 유도하기 위해 VEGF 50 ng/ml 를 30분 간 처리하였다. 이어, 세포를 4% PFA로 20분 동안 실온에서 고정화 시키고 PBS (pH 7.4)로 3회 세척하였다. 이어, 세포를 0.1% Triton X-100/PBS에서 투과시키고 F-액틴(actin) (invitrogen R415) 로 30분 동안 반응시켰다. 이어, 공초점 현미경 (Carl Zeiss)하에서 세포를 관찰하였다.

[0075] 그 결과, 프리마퀸 디포스페이트가 VEGF에 의해 유도되는 액틴 스트레스 파이버의 형성을 억제시키고 외피 액틴 링 구조를 증가시키는 결과를 확인하였다(도 3B).

[0077] **실험예 4: *in vivo*에서 프리마퀸 디포스페이트의 혈관누출 억제 효과 확인**

[0078] *in vivo*에서 프리마퀸 디포스페이트의 혈관누출억제 효능을 알아보기 위하여, Miles assay를 이용해 실험하였다. 실험 2 내지 3일 전, BALB/C 마우스의 등을 면도해준다. 그 다음 2.5 % 아베르틴(vertin)으로 마취를 시켜준 뒤 에반스 블루(evans blue) (in PBS)을 100 μ l IV 을 주입(injection)한다. 10분이 지난 후, 면도된 마우스의 등에 대조군, VEGF 및 VEGF 와 프리마퀸 디포스페이트를 함께 처리한 군, 프리마퀸 디포스페이트만 처리한 군을 피내주입(intradermal injection) 해주었다. 30 분이 지난 후 포르마이드(formide)에 피부조각을 녹여 정량하였다. 같은 방법으로 VEGF 뿐만 아니라 혈관누출 유도를 일으키는 히스타민(histamine)으로도 실험을 하였다.

[0079] 피내 주입을 한 뒤 전체 등의 모습을 보았으며(도 4-A), 피부 표피를 벗겨준 뒤 확인하였다(도 4B 및 4C).

[0080] 그 결과, VEGF와 히스타민을 처리 한 군에서는 혈관누출이 유도된 반면 프리마퀸 디포스페이트를 함께 처리한 군에서는 혈관누출이 억제됨을 확인 할 수 있었다. 정량한 값에서도 유의한 차이를 얻을 수 있었다(도 4D). (P<0.001)

[0082] **실험예 5: 프리마퀸 디포스페이트가 당뇨병성 망막병증의 혈관투과성에 미치는 효과 확인**

[0083] 프리마퀸 디포스페이트가 당뇨병성 망막병증의 혈관투과성에 미치는 영향을 *in vivo*에서 분석하기 위해 Streptozotocin을 이용하여 C57BL/6J 마우스에서 고혈당을 유도하여 당뇨병 마우스 모델(DM)을 만들었다. 이 마우스에 프리마퀸 디포스페이트 0.5, 1, 5 mpk를 10일 동안 경구 투여 하였다. 마지막 경구 투여 24시간 후, 70 kDa FITC-텍스트란(Sigma(30mg/ml in FDW))을 좌심실에 주입하였다. FITC-텍스트란이 약 5분 정도 순환되도록 하고 이어 눈을 적출하여 4% PFA에 즉시 고정화시켰다. 그런 다음, 망막을 적출하고 평편 마운팅(flat mounting)을 하여 형광현미경을 통해 관찰하였다.

[0084] 그 결과, 프리마퀸 디포스페이트를 1mpk로 경구 투여한 군이 DM에서 유도된 망막혈관투과성을 매우 효과적으로 저해함을 확인 할 수 있었다(도 5A).

[0085] 정량한 값에서도 이와 같음을 확인할 수 있었다(도 5B). (P<0.01) 정량값(Grade)은 망막 혈관에서 발견되는 누수량과 누수 개수의 곱으로 표현하였다.

[0087] **실험예 6: 녀다운 USP1의 세포 사멸 및 증식 확인**

[0088] 타겟 예측 사이트에서 프리마퀸 디포스페이트를 넣고 예측해보았을 때, 후보 유전자 몇 개가 도출 되었고, 그 중 내피세포에서 발현이 높은 유전자를 확인하던 중 USP1(Ubiquitin specific peptidase 1)이 영향을 받는 것을 확인하였다. USP1을 녀다운(knockdown) 하였을 때 세포 사멸 및 증식을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 대조군인 혈관내피세포와 USP1을 녀다운한 혈관내피세포를 콜라겐이 코팅된 24 웰 플레이트에 (3.2 \pm 0.2) $\times 10^4$ cells/well 로 FBS가 포함된 20 % M199를 이용해 24시간 배양하였다. 세포의 포화가 70 % 가량이 되면 아무것도 처리하지 않은 군, 프리마퀸 디포스페이트를 SFM에 5 μ M로 처리 한 군, VEGF를 처리한 군으로 나눠 2 일 간 배양하였다. 2일 후 MTT solution에 4시간 배양 한 뒤 세포 사멸도를 측정해주었다.

[0089] 그 결과, 대조군 혈관내피세포에 비해 USP1을 녀다운한 혈관내피세포에서 세포가 증식함을 확인 할 수 있었고, VEGF를 처리한 군에서는 대조군 혈관내피세포에 비해 USP1을 녀다운한 혈관내피세포에서 VEGF의 역할을 막음을 확인할 수 있었다(도 6). (**P<0.01, ***P<0.0001)

[0091] **실험예 7: siUSP1의 세포 투과성 억제 효과 확인**

[0092] 짧은 간섭 USP1(small interfering USP1, siUSP1)의 세포 투과성 억제 효과를 확인하기 위해 TEER assay 와

FITC-dextran permeability assay 방법으로 permeability assay를 수행하였다. 콜라겐이 코팅된 트랜스웰에 대조 혈관 내피세포와 USP1을 녹다운한 혈관내피세포를 $(6.0 \pm 0.5) \times 10^4$ cells/well로 10 % EGM을 이용하여 2일간 배양하여 포화된 단분자층을 만들었다. SFM를 이용해 2시간 기아시켜 준 뒤, HUVEC 단분자층의 투과성을 유도하기 위해 VEGF 30 ng/ml 를 30분 간 처리하였다.

[0093] 그 결과, 대조군에 비하여 VEGF를 처리하였을 때 세포벽의 투과성이 증가하였기 때문에 전기저항 값이 감소한 반면, USP1이 녹다운된 혈관내피세포에 VEGF를 처리하였을 때 VEGF를 처리하지 않은 혈관내피세포에 비해 전기저항 값이 증가함을 확인 할 수 있었다(도 7A). (*P<0.05, ***P<0.001)

[0094] 또한, 대조군 혈관내피세포에 비하여 USP1을 녹다운 하였을 때 FITC의 누수량이 증가한 반면, USP1이 녹다운된 혈관내피세포에 VEGF를 처리하였을 때는 VEGF를 처리하지 않은 혈관내피세포에 비해 FITC 누수량이 감소함을 확인할 수 있었다(도 7B). (*P<0.05, ****P<0.0001)

[0096] **실험예 8: siUSP1이 세포 골격 변화에 미치는 영향 확인**

[0097] 혈관 투과성은 혈관세포 간 부착연접의 안정성에 영향을 받는다고 알려져 있다. siCON HUVECs과 siUSP1 HUVECs을 10 % EGM을 이용해 35mm Dish에 2일간 포화되게 배양하였다. SFM로 2시간 기아시켜 준 뒤 세포 투과성을 유도하기 위해 VEGF 50 ng/ml 를 30분 간 처리하였다.

[0098] 그 결과, siUSP1은 VEGF에 의해 VE-카드헤린이 불안정해지는 것을 막을 뿐 아니라, 그 자체가 세포 간 VE-카드헤린의 안정성을 향상시키는 역할을 하였다(도 8A).

[0099] 또한, siUSP1의 세포 골격을 이루는 액틴의 구조 변화에 대해 알아보았다.

[0100] 그 결과, siUSP1이 VEGF에 의해 유도되는 액틴 스트레스 파이버의 형성을 억제시키고 외피 액틴 링 구조를 증가시키는 결과를 확인하였다(도 8B).

[0102] **실험예 9: USP1 억제제의 혈관누출 차단 효과**

[0103] 앞서 siUSP1의 혈관누수차단효과를 확인하였기 때문에 USP1을 녹다운 시켰을 때 뿐만 아니라, USP1의 억제제 사용시에도 같은 효과를 보이는지 알아보기 위하여 실험을 진행하였다. USP1 억제제인 ML-323과 SJB2-043의 세포 사멸 및 증식을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 혈관내피세포를 콜라겐이 코팅된 24 웰 플레이트에 $(3.0 \pm 0.2) \times 10^4$ cells/well 로 FBS가 포함된 20 % M199를 이용해 24시간 배양하였다. 세포의 포화가 70 % 가량이 되면 ML-323과 SJB2-043를 SFM에 1, 5, 10, 20 μ M로 처리 한 뒤 2일 간 배양하였다. 2일 후 MTT 용액에 4시간 배양 한 뒤 세포 사멸도를 측정해주었다.

[0104] 그 결과, 상기 두 USP1 억제제 모두 1 μ M로 처리한 군에서 유의하게 세포가 증식함을 확인할 수 있었다(도 9). (P<0.0001)

[0106] **실험예 10: USP1 억제제의 세포 투과성 억제효과 확인**

[0107] SJB2-043 및 ML-323의 세포 투과성 억제효과를 확인하기 위해 TEER assay 와 FITC-dextran permeability assay 방법으로 permeability assay를 수행하였다. 콜라겐이 코팅된 트랜스웰에 혈관내피세포를 $(5.5 \pm 0.5) \times 10^4$ cells/well로 10 % EGM을 이용하여 2일간 배양하여 포화된 단분자층을 만들었다. SFM를 이용해 2시간 기아시켜 준 뒤, 프리마퀸 디포스페이트를 5 μ M 처리하고 30분 간 전-배양 후에, HUVEC 단분자층의 투과성을 유도하기 위해 VEGF 30 ng/ml 를 30분 간 처리하였다.

[0108] 그 결과, 대조군에 비하여 VEGF만 처리하였을 때 세포벽의 투과성이 증가하였기 때문에 전기저항 값이 감소한 반면, VEGF와 SJB2-043를 함께 처리하였을 때는 VEGF만 처리한 군에 비하여 전기저항 값이 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다(도 10A). (P<0.05)

[0109] 또한, ML-323도 같은 결과를 보였다(도 10B). (P<0.005)

[0110] 또한, 대조군에 비하여 VEGF만 처리하였을 때 FITC의 누수량이 증가한 반면, VEGF와 SJB2-043 및 ML-323을 함께 처리하였을 때는 VEGF만 처리한 군에 비하여 FITC 누수량이 감소함을 확인할 수 있었다(도 10C 및 10D). (****P<0.0001, *P<0.05)

[0112] **실험예 11: USP1 억제제가 세포 골격 변화에 미치는 영향 확인**

[0113] 혈관투과성은 혈관세포 간 부착 연접(AJ)의 안정성에 영향을 받는다고 알려져 있다. HUVECs을 10 % EGM을 이용

해 35mm Dish에 2일간 포화되게 배양하였다. SFM로 2시간 기아시켜 준 뒤, ML-323 및 SJB2-043를 1 μ M로 처리하고 30분 간 전-배양 후에, 세포 투과성을 유도하기 위해 VEGF 50 ng/ml 를 30분 간 처리하였다.

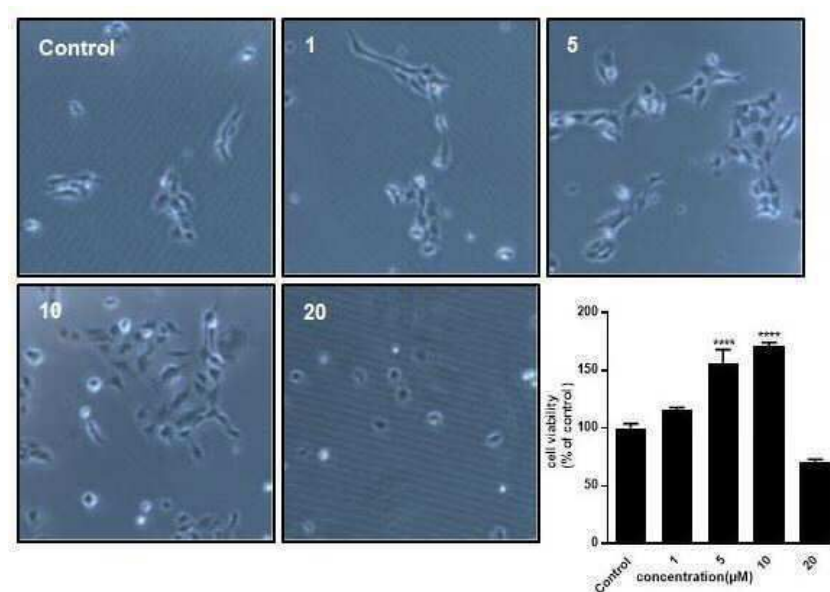
[0114] 그 결과, 상기 두 USP1 억제제는 VEGF에 의해 VE-카드헤린이 불안정해지는 것을 막을 뿐 아니라, 그 자체가 세포 간 VE-카드헤린의 안정성을 향상시키는 역할을 하는 것도 확인되었다(도 11A).

[0115] 또한, 세포 골격을 이루는 액틴의 구조 변화가 혈관내피세포의 투과성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다. 혈관내피세포의 투과성이 증가할 경우 액틴 스트레스 파이버의 형성이 증가하고 외피 액틴 링 구조는 감소한다. 포화된 HUVECs를 ML-323 및 SJB2-043를 1 μ M로 처리하고 30분 간 전-배양 후에, 세포 투과성을 유도하기 위해 VEGF 50 ng/ml 를 30분 간 처리하였다. 이어, 공초점 현미경(Carl Zeiss)하에서 세포를 관찰하였다.

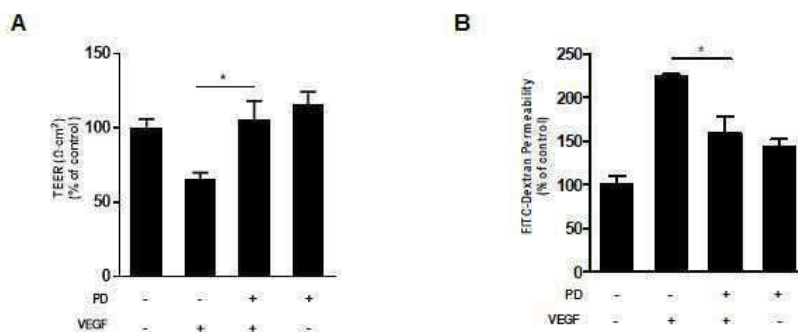
[0116] 그 결과, USP1 억제제 ML-323 및 SJB2-043가 VEGF에 의해 유도되는 액틴 스트레스 파이버의 형성을 억제시키고 외피 액틴 링 구조를 증가시키는 결과를 확인하였다(도 11B).

도면

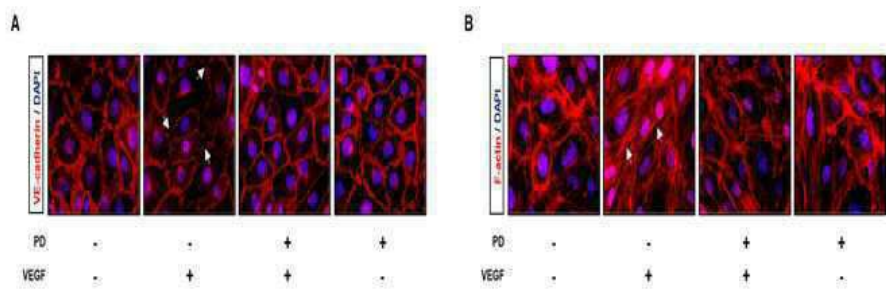
도면1



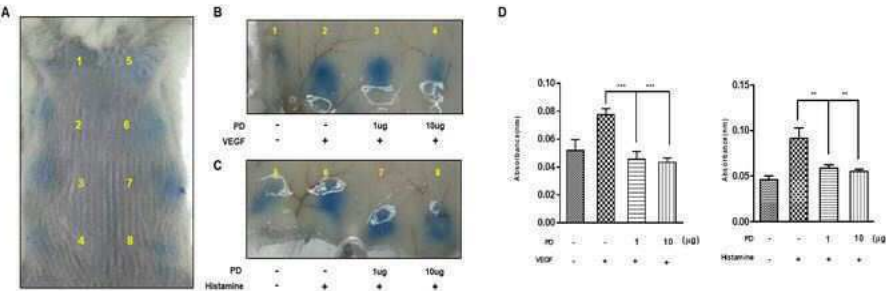
도면2



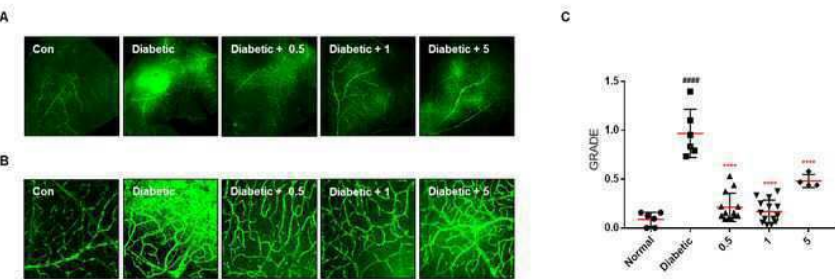
도면3



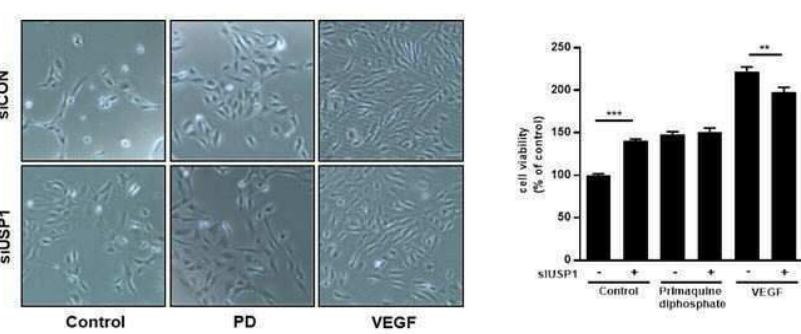
도면4



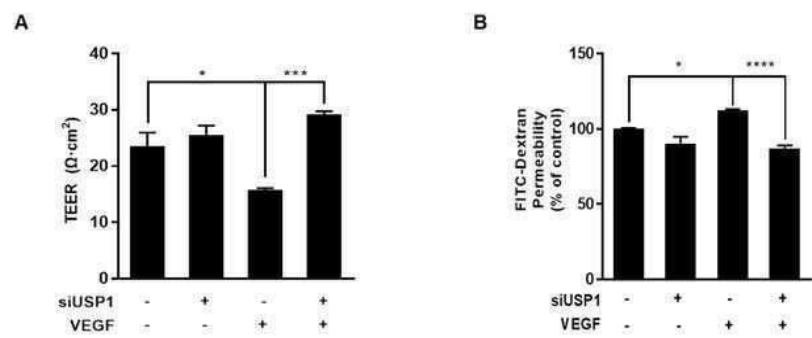
도면5



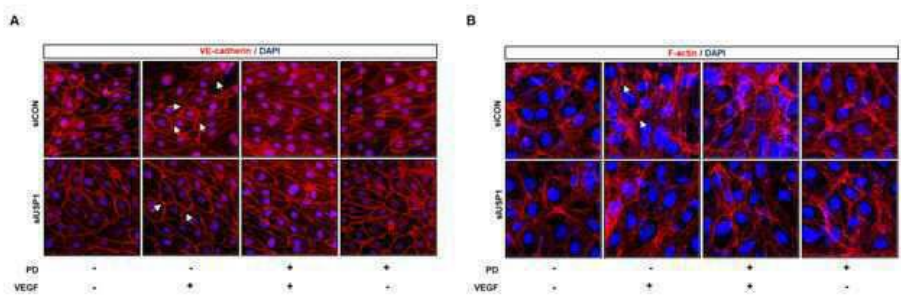
도면6



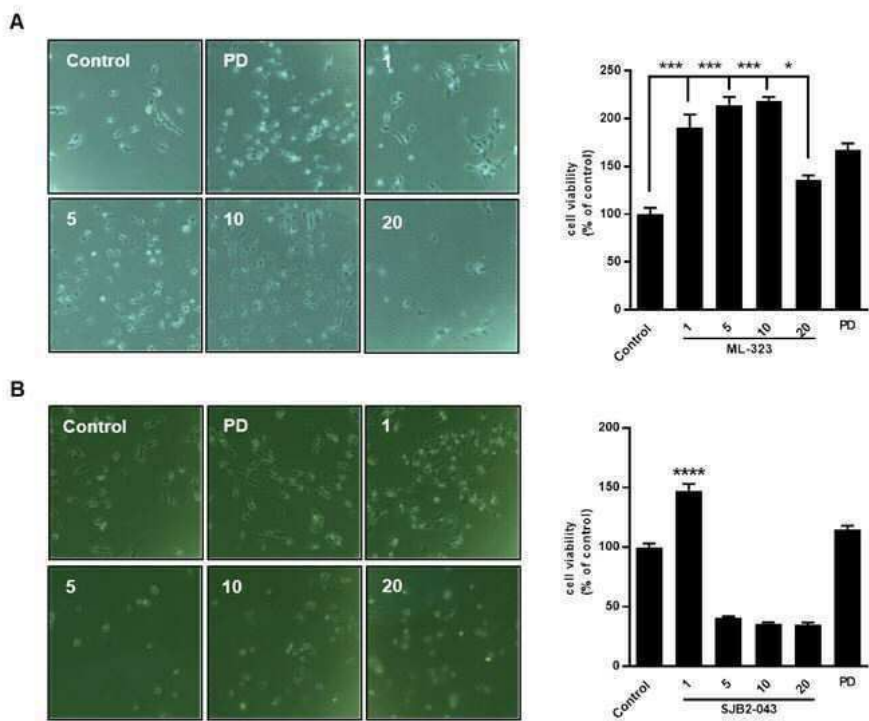
도면7



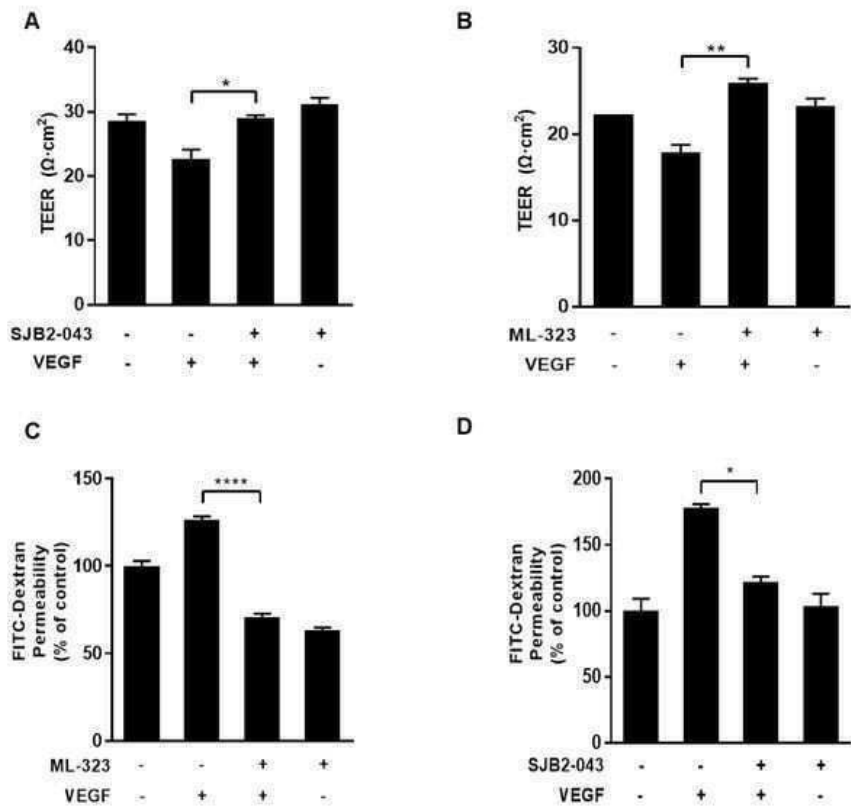
도면8



도면9



도면10



도면11

