



등록특허 10-2260923



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월04일

(11) 등록번호 10-2260923

(24) 등록일자 2021년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01) C07D 471/04 (2006.01)

G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/027 (2013.01)

C07D 471/04 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0134477

(22) 출원일자 2018년11월05일

심사청구일자 2018년11월05일

(65) 공개번호 10-2020-0051296

(43) 공개일자 2020년05월13일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020150025615 A*

KR1020180091486 A

Inflamm Bowel Dis, Vol.16, No.7,
pp1162-1172(2010.02.02. 온라인 공개)*

Minerva Gastroenterol Dietol, Vol.61, No.4,
pp261-265(2015.10.07. 온라인 공개)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

박승우

서울특별시 강남구 학동로77길 27, 104동 201호(청담동, 대림아파트)

김동희

서울특별시 영등포구 도림로110길 12-1, 2층(도림동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 2 항

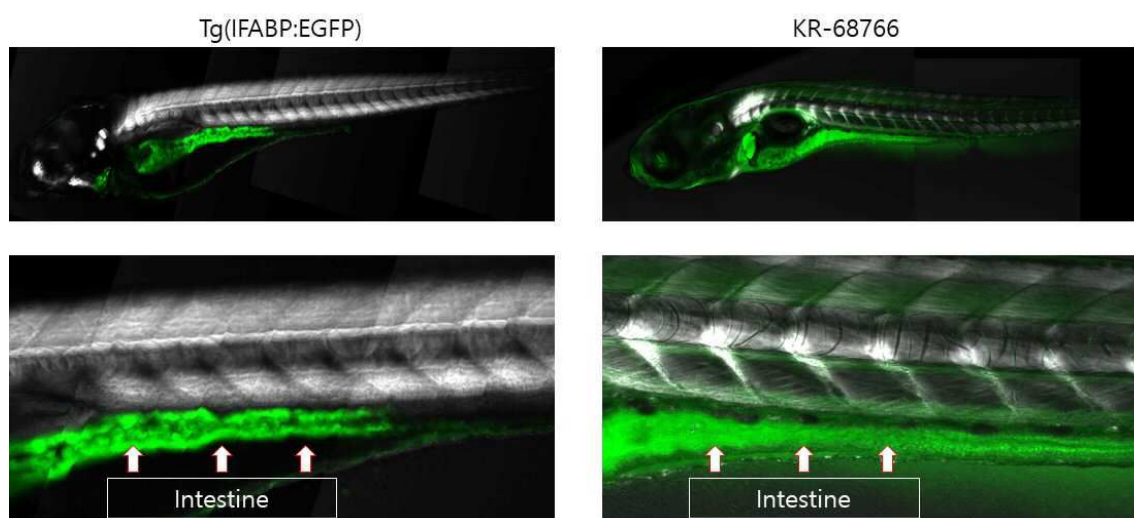
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 신규한 단백질 소실성 장질환 모델 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 단백질 소실성 장질환 모델 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 단백질 소실성 장질환 동물 모델의 제작 방법을 통해 제작된 단백질 소실성 장질환 동물 모델은 인 vivo에서 단백질 소실성 장질환을 연구하기 위한 우수한 동물 모델로서, 단백질 소실성 장질환의 효과적인 진단 및 치료제의 개발을 위한 효과적인 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/5088 (2013.01)

A01K 2207/20 (2013.01)

A01K 2267/03 (2013.01)

(72) 발명자

정인혜

서울특별시 송파구 잠실로 88, 114동 204호(
잠실동, 레이크팰리스)

김도희

경기도 화성시 효행로 229-11, 107동 1303호(기안
동, 광도와이드빌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1D1A1A09060230

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원

연구과제명 제브라피쉬에서 녹아웃과 형질전환에 의한 소화기 발암 모델의 개발과 기전 규명(후
속연구)

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10063396

부처명 산업통상자원부

과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원

연구사업명 바이오산업핵심기술개발

연구과제명 제브라피쉬 기반 유효성 · 안전성 · 약물성 평가 서비스

기 여 율 1/2

과제수행기관명 한국화학연구원

연구기간 2016.05.01 ~ 2021.04.30

명세서

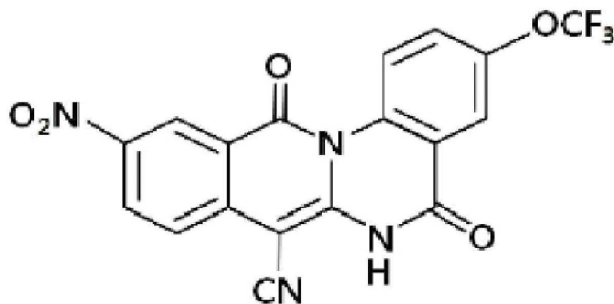
청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는, 단백질 소실성 장질환(protein losing enteropathy) 제브라피쉬 모델을 이용하는, 단백질 소실성 장질환의 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법:

(a) 제브라피쉬 배아에, 하기 화학식 1로 표시되는 10-니트로-5,12-디옥소-3-(트리플루오로메톡시)-6,12-디히드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴을 처리하는 단계,

[화학식 1]



;

(b) 상기 화학식 1로 표시되는 10-니트로-5,12-디옥소-3-(트리플루오로메톡시)-6,12-디히드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴로 처리된 제브라피쉬의 배아에 인도메타신(indomethacin)을 투여하여 단백질 소실성 장질환을 유발시키는 단계로서,

상기 화학식 1로 표시되는 10-니트로-5,12-디옥소-3-(트리플루오로메톡시)-6,12-디히드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴은 상기 단백질 소실성 장질환이 유발된 제브라피쉬 배아의 장내 알부민과 결합하고;

(c) 상기 단백질 소실성 장질환이 유발된 제브라피쉬에 피검물질을 처리하는 단계;

(d) 상기 (c) 단계의 단백질 소실성 장질환이 유발된 제브라피쉬에서 알부민과 결합한 화학식 1로 표시되는 10-니트로-5,12-디옥소-3-(트리플루오로메톡시)-6,12-디히드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴의 GFP 형광 흡광도 수준을 측정하는 단계; 및

(e) 상기 (d) 단계에서 측정된, 알부민과 결합한 화학식 1로 표시되는 10-니트로-5,12-디옥소-3-(트리플루오로메톡시)-6,12-디히드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴의 GFP 형광 흡광도 수준이, 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 단백질 소실성 장질환의 치료제로 선별하는 단계.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 피검물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균, 이의 대사산물 및 생활성 분자로부터 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 단백질 소실성 장질환 모델 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 단백질 소실성 장질환은 위장관내로 과도하게 단백질이 소실되어 다양한 소화기계, 비소화기계 증상을 일으키는 질환이다. 1959년 Gordon에 의해 "exudative enteropathy"로 처음 명명된 이후 Waldmann에 의해 "gastrointestinal protein loss"로 서술되었고, 최근에 "protein losing enteropathy"로 불리어지고 있다. 저알부민혈증과 함께 복통, 설사, 부종, 복수 등의 증상으로 나타난다. 단백질 소실성 장질환의 진단 방법으로는 ¹³¹I-labeled polyvinyl pyrrolidone, ¹³¹I- albumin, ⁵¹Cr-labeled albumin 등의 방사성 동위원소를 정맥 내로 주입 후 대변을 모아 배설된 방사성 동위원소를 정량검사하는 방법이 사용되어졌으나, 고가의 비용과 방사선 노출, 6~10일간 대변을 모아야하는 제한점으로 인해 최근에는 24시간 대변의 α1-안티트립신(antitrypsin) 청소율과 ^{99m}Tc 인혈청알부민 스캔이 많이 사용되고 있다. α1-안티트립신은 분자량이 약 50,000 달톤으로 알부민과 유사하고, 장관내 단백 분해 효소에 의해 분해되지 않고 대변으로 배설되는 특징이 있어 대변으로 배설되는 α1-안티트립신 양과 혈중 농도를 이용하여 α1-안티트립신 청소율을 구할 수 있다. 그러나, α1-안티트립신 청소율의 경우 24시간 이상 대변을 모아야 하고, pH3 이하의 산성환경에서 펩신에 의해 α1-안티트립신이 분해되므로 단백질 소실을 진단하는 데 제한이 있다. ^{99m}Tc 인혈청알부민 스캔(^{99m}Tc-Human Serum Albumin Scan)은 방사성 노출이 적고, 검사가 간편한 반면, 대변의 영향을 받을 수 있고, 방사성 물질이 장의 연동 운동에 의한 움직임으로 인해 해석이 어려운 경우가 있다.

[0004] 이러한 고가의 비용과 방사선 노출, 6~10일간 대변 수집, 해석 불가 등의 문제들로 인하여 단백질 소실성 장질환과 관련된 연구들이 많은 제한을 받고 있으며, 관련 진단 방법 개발도 지연되고 있다.

[0005] 한편, 제브라피쉬(*Danio rerio*)는 3년생 열대담수어로, 25쌍의 염색체를 지니며, 진화상으로 3억년 전에 인류의 공통 조상에서 분리되었음에도 유전자가 보존되어 있어 인간이 가지는 거의 모든 유전자를 보유하고 있다. 이러한 특징으로 인해 제브라피쉬는 1980년대 발생생물학 모델로 이용되기 시작하였고, 2000년대부터 종양생물학 모델로서의 가치가 부각되었다.

[0006] 제브라피쉬는 다른 동물 모델에 비해 적은 비용이 들고, 척추동물로서 유전적으로 초파리나 선형 동물에 비해 인간에 매우 가깝다. 또한 다수의 수정란을 생산하여 고효율적인 연구가 가능하며, 배아가 투명하고 48 시간의 짧은 발생기간을 가져 실시간 관찰이 가능하다. 특히, 기관 특이적으로 형광단백질과 같은 생물표지자를 발현시

키면 생체에서 실시간으로 특정기관의 관찰이 가능하고 배아 단계에서는 세포 수준의 추적이 가능한 장점이 있다. 더불어, 체외수정을 하기 때문에 수정란의 난황으로 손쉽게 유전 물질을 주입하여 유전자를 조작하는 것이 용이하다.

[0007] 이러한 제브라피쉬의 생물학적 특징을 이용하여 제브라피쉬를 실험 모델로 많이 활용하고 있으며, 2000년 이후부터 생물학 관련 논문이 다수 발표되고 있다.

[0008] 그러나, 상기 단백질 소실성 장질환을 진단하거나, 치료에 이용하기 위하여 실용적 약물 스크리닝을 위한 도구로서 제브라피쉬 모델에 대한 연구는 현재까지 이루어지지 않고 있다.

[0009] 따라서, 보다 효율적인 단백질 소실성 장질환 모델을 확립하여 종래의 진단방법을 실질적으로 대체하고, 저비용/고효율의 제브라피쉬 특성을 이용하여 새로운 진단 또는 치료제 개발을 위한 제브라피쉬 모델의 확립이 중요한 과제로 떠오르고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 단백질 소실성 장질환(Protein losing enteropathy) 진단 및 치료제 스크리닝 용도에 사용하기 위한 동물 모델로서, 종래 포유류 동물모델을 대체하는 보다 효율적이고 경제적인 동물모델을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 알부민에 특이적으로 결합하여 GFP 과장에서 형광을 나타내는 형광단 신물질인 KR-68766을 제브라피쉬 배아에 처리하여 염색시킴으로써, 알부민이 풍부한 혈관, 간, 위장관 등에서 특별한 제제나 추가 단계 없이 형광을 묘출할 수 있는 제브라피쉬 모델을 제작하였고, 상기 제브라피쉬 모델에 약물로 장질환을 유도한 뒤, 장손상으로 인해 유출된 알부민에 결합하는 KR-68766의 형광을 측정할 경우, 기존의 진단법에 비해 쉽고 빠르게 진단할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0012] 따라서, 본 발명의 일 목적은 단백질 소실성 장질환 동물 모델의 제작 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 단백질 소실성 장질환 동물 모델을 제공하는 데 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 단백질 소실성 장질환의 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 단백질 소실성 장질환의 진단 방법을 제공하는 데 있다.

[0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0019] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0021] 이때, 본 발명에 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가진다.

[0022] 또한, 종래와 동일한 기술적 구성 및 작용에 대한 반복되는 설명은 생략하기로 한다.

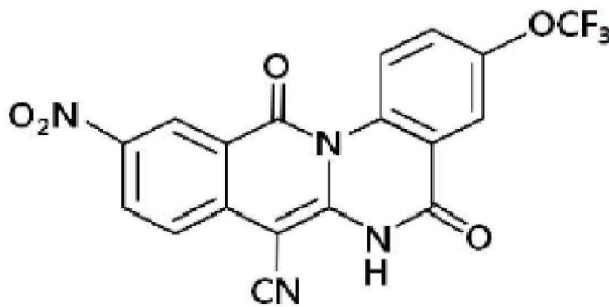
[0024] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 단백질 소실성 장질환(protein losing enteropathy) 동물 모델의 제작 방법 및 이에 의해 제작된 동물 모델을 제공한다:

[0025] (a) 인간을 제외한 동물의 배아에 화합물 KR-68766을 처리하는 단계; 및

[0026] (b) 상기 화합물 KR-68766으로 처리된 동물의 배아에 장 손상을 유발시키는 단계.

[0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 단백질 소실성 장질환 제작에 이용되는 물질인 KR-68766은 하기 화학식 1로 표시되는 신규한 화합물로서, 10-니트로-5,12-디옥소-3-(트리플루오로메톡시)-6,12-디히드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴[10-nitro-5,12-dioxo-3-(trifluoromethoxy)-6,12-dihydro-5H-isoquinolino[2,3-a]quinazoline-7-carbonitrile]이고, 분자량이 416.27이며, 알부민에 특이적으로 결합하여 GFP 과장에서 형광을 나타내는 물질로, 이에 따라 알부민이 풍부한 혈관, 간 및 위장관을 묘출한다.

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] 목적의 효과인 장손상을 달성할 수 있는 한, 장손상을 유발하는 물질 또는 방법은 제한되지 않으나, 바람직하게는 인도메타신(indomethacin), 덱스트란 설페이트 소듐(Dextran Sulfate Sodium) 및 트리니트로벤젠 설포닉 산(Trinitrobenzene Sulfonic Acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 투여하여 실시될 수 있으며, 본 발명에서는 인도메타신(indomethacin)을 투여함으로써 장손상을 유발한다.

[0031] 즉, 본 발명은 동물의 배아에 화합물 KR-68766을 처리하여 염색시킨 후 알부민과의 결합을 통하여 GFP 형광을 묘출할 수 있도록 제작한 후 인도메타신을 처리하여 단백질 소실성 장질환이 발생하는 모델을 제조할 수 있는 방법을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0032] 바람직하게는, 상기 인간을 제외한 동물은 제브라피쉬, 마우스, 랫트, 기니피그, 토끼, 고양이, 개, 양, 돼지, 소, 원숭이, 비비 및 침팬지로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이며, 보다 바람직하게는 제브라피쉬, 마우스 또는 랫트이며, 가장 바람직하게는 제브라피쉬이다.

[0033] 따라서, 본 발명의 일 구현예에서는, 본 발명의 방법의 (a) 단계는 제브라피쉬 배아의 배지에 화합물 KR-68766을 첨가함으로써 수행되고, (b) 단계는 상기 제브라피쉬의 배아에 인도메타신을 처리함으로써 수행되며, 이에 따라 구현된 단백질 소실성 장질환 제브라피쉬 모델을 제공한다.

[0034] 본 발명에 있어서 "제브라피쉬 모델" 또는 "동물 모델"이란 인간의 질병과 아주 유사한 형태의 질병을 가진 동물, 즉, 제브라피쉬를 말한다. 인간의 질병 연구에 있어 질환모델 동물이 의미를 갖는 것은 사람과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의한다. 질병 연구에 있어 생체의학 질환모델 동물은 질병의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공해주며, 질환모델 동물의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내어, 이들 유전자들 간의 상호작용을 이해할 수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 단백질 소실성 장질환(protein losing enteropathy)의 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0037] (a) 상술한 단백질 소실성 장질환 동물 모델에 피검물질을 처리하는 단계;

[0038] (b) 상기 (a) 단계의 단백질 소실성 장질환 동물 모델의 세포에서 화합물 KR-68766의 GFP 형광 흡광도 수준을 측정하는 단계; 및

[0039] (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 세포에서의 화합물 KR-68766의 GFP 형광 흡광도 수준이 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계.

[0040] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 피검물질은 단백질 소실성 장질환의 치료에 효과가 있는지 여부를 확인하기 위해 처리하는 물질로서, 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균, 이의 대사산물 및 생활성 분자로부터 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나이나, 이에, 제한되지 않으며, 목적의 효과로서 단백질 소실성 장질환의 치료, 즉, GFP 형광 흡광도 수준이 피검물질을 처리하지 않은 대조군 대비 감소가 달성되는 한, 임의의 피검물질을 포함할 수 있다.

[0041] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 (b) 단계의 세포에서 KR-68766의 GFP 형광 흡광도 수준을 측정하는 것은, 동물 모델의 세포에서 인도메타신에 의하여 손상된 장을 통하여 유출된 알부민과 KR-68766이 특이적으로 결합되었는지를 분석하는 것이다.

- [0042] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 흡광도 측정 방법은, 효소면역분석법(ELISA)을 통해 측정하였으나, 흡광도를 측정할 수 있는 한, 이에 한정되지 않고 당업계에 공지된 방법들을 이용할 수 있다.
- [0043] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 (c) 단계의 선별 단계는 상기 (b) 단계의 측정 결과를 정량적 또는 정성적으로 분석하여 피검물질을 처리한 동물 모델과 피검물질을 처리하지 않은 대조군의 세포의 흡광도 정도 비교를 통해 대조군에 비해 흡광도 정도가 감소한 피검물질을 선별하는 것이다.
- [0044] 즉, 이는 손상된 장에 치료제 후보 물질로서 피검물질을 처리했을 때 상기 피검물질이 치료 효과가 발휘되는 경우, KR-68766의 GFP 형광 흡광도 값은 피검물질을 처리하지 않은 대조군의 흡광도값과 비교하여 감소하고, 치료제로서 가능성이 있음을 제시한다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 다음 단계를 포함하는 단백질 소실성 장질환(protein losing enteropathy)의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다:
- [0047] (a) 대상 동물 또는 상기 동물로부터 분리한 생물학적 시료에 화합물 KR-68766을 처리하는 단계;
- [0048] (b) 상기 시료에서 화합물 KR-68766의 GFP 형광 흡광도를 측정하는 단계; 및
- [0049] (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 화합물 KR-68766의 GFP 형광 흡광도 수준이 정상 대조군에 비해 증가한 경우 단백질 소실성 장질환이 발생한 것으로 판단하는 단계.
- [0050] 즉, 장손상으로 인해 유출된 알부민이 시료 내 정상 수준 이상으로 존재하고, 화합물 KR-68766은 특이적으로 알부민과 결합하는 특성이 있어, 이를 통해 발생하는 형광 강도를 측정하여 광학적 방법으로 시료 내 알부민의 양을 확인함으로써, 단백질 소실성 장질환의 발생 여부를 진단할 수 있다.
- [0051] 상기 생물학적 시료는 세포, 조직, 혈액, 혈청, 타액 및 소변으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 이 방법은 수술이나 조직의 추출 없이도 가능하므로, 실험용 동물의 불필요한 희생을 막을 수 있다.
- [0053] 본 발명의 방법은 상술한 화합물 KR-68766의 GFP 형광 흡광도를 이용하므로, 이와 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0055] 본 발명의 방법을 이용하여 수립된 KR-68766-염색 단백질 소실성 장질환 동물 모델은 인 비보에서 단백질 소실성 장질환 발생 여부 및 정도를 시각적으로 관찰할 수 있으므로, 본 발명의 KR-68766-염색 단백질 소실성 장질환 동물 모델은 단백질 소실성 장질환 진단 및 약물 스크리닝 뿐만 아니라, 단백질 소실성 장질환의 발생을 예방하거나 발생된 단백질 소실성 장질환의 진행 시기에 따른 형광 정도를 정량함으로써 메커니즘을 밝히는 연구에 유용하게 적용될 수 있다.
- [0056] 또한, 이러한 동물 모델의 안정적인 확보는 제브라피쉬에 적용함으로써, 향후 저비용/고효율의 제브라피쉬 특성을 이용하여 새로운 진단 또는 치료제 개발을 위한 전임상 모델로 활용할 수 있다.
- [0057] 즉, 본 발명의 KR-68766-염색 단백질 소실성 장질환 제브라피쉬 모델은 단백질 소실성 장질환을 연구하기 위한 우수한 동물 모델 또는 단백질 소실성 장질환 치료제의 효율적인 스크리닝 수단으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

- [0059] 본 발명의 단백질 소실성 장질환 동물 모델의 제작 방법을 통해 제작된 단백질 소실성 장질환 동물 모델은 인 비보에서 단백질 소실성 장질환을 연구하기 위한 우수한 동물 모델로서, 단백질 소실성 장질환의 효과적인 진단 및 치료제의 개발을 위한 효과적인 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 도 1은 신물질인 KR-68766의 분자 구조식이다. 분자량은 416.27이고 GFP 과장에서 녹색 형광을 나타낸다.
- 도 2는 KR-68766으로 염색한 제브라피쉬와 *IFABP:EGFP* 형질전환 제브라피쉬를 비교한 사진이다. KR-68766은 알부민과 특이적으로 결합하여 형광을 나타내기 때문에 알부민이 풍부한 위장관, 간, 혈관 등을 묘출할 수 있다. KR-68766 제브라피쉬와 *IFABP:EGFP* 형질전환 제브라피쉬에서 유사하게 위장관이 묘출되는 것이 확인되었다.
- 도 3은 인도메타신(indomethacin)에 의한 장 손상을 보여주는 그림이다. 자연형에 비해 인도메타신에 의해 장이 손상되어 있는 것을 확인하였다.

도 4는 성체에서 인도메타신에 의한 장 손상과 보호물질에 의한 손상 억제를 확인한 결과를 보여주는 그림이다. 제브라피쉬 모델을 통하여 인도메타신에 의한 장 손상과 보호물질에 의한 손상 억제효과를 확인 할 수 있음을 확인하였다.

도 5a는 배지로 유출된 KR-68766의 흡광도 값을 보여주는 표이다. 인도메타신에 의하여 손상된 장을 통하여 알부민이 유출되고, 알부민과 결합한 KR-68766의 흡광도 값 측정을 통하여 인도메타신에 의한 장 손상 모델에서는 흡광도가 증가하였고, 보호물질인 N-아세틸시스테인(N-acetylcystein), 셀레늄(Selenium)을 처리하면 흡광도가 감소하였다. 도 5b는 흡광도를 측정한 값과 ELSIA를 통한 알부민 정량값을 비교한 표이다. 측정된 흡광도 값과 알부민 정량값이 유사하게 증가 또는 감소하였다. 도 5c는 염증 유전자 발현의 변화를 확인한 결과를 보여주는 표이다. 대조군에서는 염증 유전자의 발현이 증가하였고, 실험군에서는 염증 유전자의 발현이 감소하였다.

도 6a는 프로바이오틱스를 처리 한 후 KR-68766의 흡광도값을 보여주는 표이다. 대조군인 E.coli를 처리하면 흡광도가 증가하지만, 프로바이오틱스를 처리하면 흡광도가 감소하는 것을 확인하였다. 도 6b는 흡광도를 측정한 값과 ELSIA를 통한 알부민 정량값을 비교한 표이다. 대조군에서는 흡광도와 알부민 정량값이 모두 증가한 반면에 프로바이오틱스를 처리한 군에서는 흡광도와 알부민 정량값이 모두 감소하였다. 도 6c는 염증 유전자 발현의 변화를 확인한 결과를 보여주는 표이다. 프로바이오틱스를 처리하면 염증 유전자의 발현이 감소하여 장 손상 억제효과가 있음을 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0064] 실시예

[0065] 실험방법

[0066] 제브라피쉬 사육 및 교배

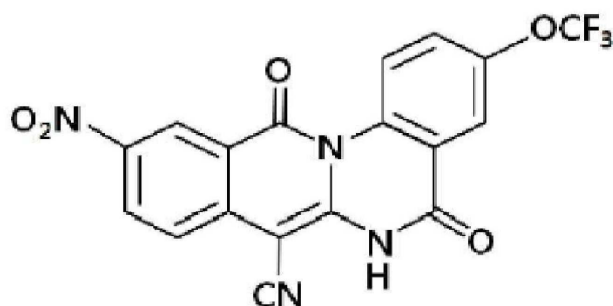
[0067] 제브라피쉬는 인도원산으로 길이 3-4 cm 정도의 잉어과의 소형 열대관상어이다. 실험에 사용된 제브라피쉬는 28.5℃ 온도와 30-70%의 습도를 유지하는 폐쇄순환 여과 시스템을 갖춘 수조에서 사육하였다. 하루 14시간은 명, 10시간은 암처리를 하여 주광주기를 맞추주었다. 성숙 제브라피쉬는 Freshwater Aquarium Flakefood(Tetra Werke, Melle, Germany)와 살아있는 브라인 슈림프(San Francisco Bay Brand, Inc., Newark, CA, USA)를 섞어서 하루에 2번 급여하였다. 약 2-3달이 되면 교배를 할 수 있는 성체가 되고, 교배 전날 오후에 암컷과 수컷을 전용 교미 상자(mating cage)에 넣고, 다음날 아침의 산란을 유도하기 위해 빛을 주었다. 그 후, 수컷과 암컷이 교미를 하여 암컷이 수백 개의 수정란을 산란하였다. 수집된 수정란을 링거 용액(Ringer's solution)(116 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.2)으로 씻어 펠트리디쉬에 옮기고 28.5℃의 배양기에서 발생시켰다. 해부현미경을 이용하여 각 발생단계의 수정란을 시간별, 형태학적 변화에 따라 선별하여 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정하였다.

[0068]

[0069] 신물질 KR-68766

[0070] KR-68766은 하기 화학식 1로 표시되는 신규한 화합물로서, 10-니트로-5,12-디옥소-3-(트리플루오로메톡시)-6,12-디히드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴[10-nitro-5,12-dioxo-3-(trifluoromethoxy)-6,12-dihydro-5H-isoquinolino[2,3-a]quinazoline-7-carbonitrile]이고, 분자량이 416.27이며, 알부민과 결합하여 GFP 과장에서 형광을 나타내는 물질이다. 분말형태의 시료를 DMSO에 5 mM 농도로 녹여서 원액(stock solution)을 만들어 사용하였다.

[0071] [화학적 1]



[0072]

[0074] 단백질 소실성 장질환 모델 제작

[0075] 수정 후 5일째인 배아를 6-웰 플레이트 또는 12-웰 플레이트로 옮긴 뒤 배지에 KR-68766을 7.5 μ M 농도로 60 분 동안 처리한 후, 다시 60 분 동안 세척하였다. KR-68766으로 염색된 배아에 인도메타신을 7.5 μ M 농도로 처리하여 단백질 소실성 장질환을 유도하였다.

[0076]

[0077] 이미징을 통한 위장관 묘출 확인

[0078] KR-68766을 통해 위장관 묘출을 비교 확인하기 위한 대조군으로서, 위장관에서 특이적으로 발현하는 유전자인 IFABP에 GFP가 결합된 유전자를 지닌 종래 형질전환 제브라피쉬를 이용하였고, 상기 종래 형질전환 제브라피쉬 및 본 발명의 KR-68766으로 염색된 제브라피쉬를 형광현미경을 통하여 형광 발현을 확인하였다.

[0079]

[0080] KR-68766을 통한 단백질 소실성 장질환 치료제 스크리닝 실험

[0081] 상기 제작된 제브라피쉬 모델에 인도메타신(Indomethacin, INN)을 처리하여 장 손상을 유발하였다. 이를 이용하여 단백질 소실성 장질환 치료제를 스크리닝하는 것은 형광을 측정하여 평가하였다.

[0082]

이때, 음성 대조군으로 5-FU(Fluorouracil), tBOOH(t-butyl hydroperoxide), 대장균(E.coli)를 이용하였고, 치료제 후보 물질로 NAC(N-acetyl cysteine), 셀레늄(Selenium), LGA1(Lactobacillus gasseri), LR5(Lactobacillus rhamnosus)를 이용하였다. 5-FU, tBOOH, NAC, 셀레늄, E.coli, LR, LGA를 각각 수정 후 4일 된 배아에 전처리한 후 5 일째에 KR-68766으로 염색한 뒤 인도메타신과 함께 각 약물을 처리하였다. 24 시간 후에 형광을 측정하였다.

[0084] Albumin ELISA 분석

[0085] 유출된 알부민의 정량적 분석을 위해 알부민(Albumin) ELISA를 실시하였다. FISH 알부민 ELISA 키트(Mybiosource, USA)를 사용하여, 각 군에서 분리한 상층액에 HRP-콘주게이트 용액을 넣고 37°C에서 60분간 반응시킨 후, 세척액으로 4회 세척하였다. 크로모젠 용액 A와 B를 각각 처리한 후 정지 용액을 처리하고 ELISA 리더기로 O.D(optical density) 450nm에서 측정하였다.

[0086]

[0087] Q-RT(Quantitative reverse transcription) PCR

[0088] 유전자 발현을 분석하기 위하여 Q-RT PCR을 실시하였다. Trizol 시약을 사용하여 RNA를 추출하였다. 각 군의 추출한 RNA를 oligo(dT) 프라이머(Invitrogen, USA), 10mM dNTP, SuperScriptTMII RNase H 역전사 효소(Reverse Transcriptase)(Invitrogen, USA)를 사용하여 42°C에서 1시간동안 반응하여 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR은 Maxima SYBR Green/ROX qPCR Mater Mix(Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 ABI 7300 실시간(Real time) PCR 시스템(Applied Biosystems, Foster city, USA)으로 분석하였다.

[0089]

PCR 프로그램은 50°C에서 2분간의 전처리 단계와 95°C에서 10분간의 개시단계, 95°C 15초, 55°C 30초, 72°C 30초로 이루어지는 PCR 40단계로 구성되었다.

[0090] 실험에 사용한 각각의 프라이머 서열은 다음과 같다:

[0091] F1- β -actin 5'-ATGGATGAGGAAATCGCTGC-3';

[0092] R1- β -actin 5'-CTTCTGTCCCATGCCAACC-3';

[0093] F1-IL1b 5'-CATGCGGGCAATATGAAGTC-3';

[0094] R1-IL1b 5'-CATTTTGTGCTGCGAAGTCC-3';

[0095] F1-IL6 5'-ATGCCATCCGCTCAGAAAACAG-3';

[0096] R1-IL6 5'-CCAAGGAGACTCTTTACGTCCA-3';

[0097] F1-IL8 5'-ATGACCAGCAAAATCATTTTCAGTGTG-3';

[0098] R1-IL8 5'-AAATCTTTACAGTGTGGGCTTG-3';

[0099] F1-TNF- α 5'-ATGAAGCTTGAGAGTCGGGC-3';

[0100] R1-TNF- α 5'-TGTTGATTGCCCTGGGTCTT-3';

[0101] F1-TGF- β 1a 5'-GTTGGTTTGCTTGGTGCTGA-3';

[0102] R1-TGF- β 1a 5'-ATCTTCTGTCCGTCGTCGTC-3';

[0103] F1-TGF- β 2 5'-TGAACCTGTACGCTTGAGC-3'; 및

[0104] R1-TGF- β 2 5'-GATCTCAGGAGGACTGCTCA-3'.

[0106] 조직표본의 분석

[0107] 제브라피쉬 성체에서의 장 손상을 분석 관찰하기 위해 Tris-buffered tricaine (3-아미노벤조익 애시드 에틸에스터, pH 7.0; Sigma), 20X으로 안락사시킨 후 조직학적 변화 스크리닝 연구를 위하여 전 장기를 4% 파라포름알데하이드에 24시간 고정하였다. 알콜/자일레에 프로세싱 한 후, 파라핀 포매하여 4 μ m의 슬라이드 절편을 만들어 H&E 염색을 하였고 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0108]

[0109] **실시예 1. 본 발명의 단백질 손실성 장질환 모델 수립**

[0110] 본 발명자들은 단백질 소실성 장질환 진단 및 치료법을 개발에 이용하기 위한 플랫폼 모델로서, 알부민 결핍시 형광을 나타내는 신물질인 KR-68766으로 염색된 제브라피쉬 모델을 제작하였고, 상기 KR-68766으로 염색된 제브라피쉬 배아에 인도메타신을 처리하여 장 손상을 유발함으로써, 단백질 손실성 장질환 제브라피쉬 모델을 수립한 후, 공초점 현미경을 통하여 이미지를 분석하였다.

[0111] 이때, 대조군으로서, 이미지를 통해 형광 묘출을 확인할 수 있는, 당업계에서 공지된 형광 모델인 IFABP:EGFP 형질전환 제브라피쉬 모델을 이용하여 비교하였다.

[0112] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 상기 본 발명의 KR-68766 제브라피쉬 모델은 종래 IFABP:EGFP 형질전환 제브라피쉬 모델과 유사한 수준으로 위장관이 묘출되는 것을 확인하였다. 이미지 비교를 통해 본 발명의 KR-68766 제브라피쉬 모델의 위장관이 IFABP:EGFP 형질전환 제브라피쉬 모델의 위장관과 차이가 없을 뿐만 아니라 간, 혈관 등도 묘출이 되는 것을 확인하였다.

[0113] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 조직 표본 분석을 실시했을 때, 2 개월령 제브라피쉬에 인도메타신을 처리하여 약물에 의한 장 손상이 발생하는 것을 확인하였다.

[0115] **실시예 2. 본 발명의 단백질 손실성 장질환 모델을 이용한 약물 스크리닝 검증**

[0116] **2-1. 조직학적 분석**

[0117] 본 발명자들은 본 발명의 단백질 손실성 장질환 제브라피쉬 모델을 이용한 약물 스크리닝 여부를 확인하기 위해, 조직 표본을 분석하였다.

[0118] 본 발명의 단백질 손실성 장질환 제브라피쉬 모델에 손상 억제 효과가 있을 것으로 예상되는 치료제 후보 물질로서 손상 억제 효과가 있을 것으로 예상되는 프로바이오틱스로서 LGA1 및 LR5를 처리한 후, 해당 조직을 해부

하여 H&E 염색으로 조직에서의 보호 효과를 확인하였다.

[0119] 이 때, 음성 대조군으로 5-플루오로우라실(Fluorouracil) 및 대장균(*Escherichia coli*), 양성 대조군으로 NAC(N-acetyl cysteine), 셀레늄(Selenium)을 이용하였다.

[0120] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 인도메타신-단독 처리군에 비해 음성 대조군에서는 장 손상이 증가하였고, 보호 약물인 NAC(N-acetyl cysteine) 및 프로바이오틱스인 LGA1(*Lactobacillus gasseri*) 및 LR5(*Lactobacillus rhamnosus*)을 처리한 그룹에서는 장 손상이 감소하는 것을 확인하였다.

[0121]

[0122] 2-2. 형광흡광도 측정 및 알부민 정량

[0123] 본 발명자들은 본 발명의 단백질 손실성 장질환 제브라피쉬 모델에서의 모출을 정량하기 위하여, 형광흡광도 및 알부민 수준을 분석하였다.

[0124] 이 때, KR-68766은 GFP 과장에서 형광을 나타내기 때문에 GFP 과장에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 손상된 장을 통하여 알부민이 유출되고, 유출된 알부민은 KR-68766과 결합하기 때문에 흡광도 측정을 통하여 유출된 알부민을 측정할 수 있다.

[0125] 그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이, 배지로 유출된 KR-68766의 흡광도 값을 확인했을 때, 인도메타신에 의하여 손상된 장을 통하여 알부민이 유출되고, 알부민과 결합한 KR-68766의 흡광도 값 측정을 통하여 인도메타신에 의한 장 손상 모델에서는 흡광도가 증가하였고, 보호물질인 NAC, 셀레늄을 처리하면 흡광도가 감소하였다.

[0126] 따라서, ELISA를 통하여 유출된 알부민의 정량값과 흡광도 측정값이 유사하므로, 흡광도 측정을 통하여 유출되는 알부민을 정량화할 수 있다.

[0127] 그 결과, 도 5b에 나타난 바와 같이, 실제 흡광도의 증감과 알부민 정량값의 증감이 유사하게 측정되는 것을 확인하였다.

[0128]

[0129] 2-3. 염증 유전자의 발현 수준 변화

[0130] 본 발명자들은 본 발명의 단백질 손실성 장질환 제브라피쉬 모델에 치료제 후보 물질을 처리했을 때 치료 효과를 확인하기 위하여, 염증 유전자의 발현 수준 변화를 RT-PCR로 확인하였다.

[0131] 그 결과, 도 5c에 나타난 바와 같이, 인도메타신을 처리한 군과 대조군에서는 염증 유전자의 발현이 증가하였고, 실험군에서는 염증 유전자의 발현이 감소하는 것이 확인되었다.

[0133] 2-4. 유산균의 효능 검사

[0134] 본 발명자들은 본 발명의 단백질 손실성 장질환 제브라피쉬 모델에 치료제 후보로서 프로바이오틱스 2종(*Lactobacillus gasseri*(LGA1), *Lactobacillus rhamnosus*(LR5))을 처리했을 때 효능을 확인하기 위하여, 흡광도를 측정하였다.

[0135] 이 때, 대조군으로는 대장균을 이용하였다.

[0136] 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이, 대장균을 처리하면 흡광도가 증가한 반면, 프로바이오틱스를 처리하면 흡광도가 감소하는 것을 확인하였다.

[0137] 또한, 도 6b에 나타난 바와 같이, 알부민 ELISA에서도 유사한 양상을 보이는 것을 확인하였다.

[0138] 또한, 도 6c에 나타난 바와 같이, RT-PCR을 통한 염증 유전자의 발현을 확인했을 때, 프로바이오틱스를 처리하면 염증 유전자의 발현이 감소하였다.

[0139] 따라서, KR-68766을 통하여 단백질 장손실성 장질환 진단이 가능할 뿐만 아니라 치료제 개발을 위한 약물 스크리닝이 가능함을 보여준다.

[0140]

[0141] 결론적으로, 본 발명에 따른 제브라피쉬에서 KR-68766을 이용한 단백질 소실성 장질환 모델은 다른 동물 모델과 비교하여, 간단한 흡광도 비교만으로도 쉽고 빠르게 효과적으로 단백질 소실성 장질환을 진단할 수 있다. 또한, 단백질 소실성 장질환 치료제 후보 물질을 스크리닝을 수행할 수 있으며, 이를 통해 인 비보에서의 장질환 연구

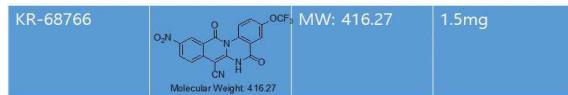
가 보다 효율적으로 이루어질 수 있다.

[0142]

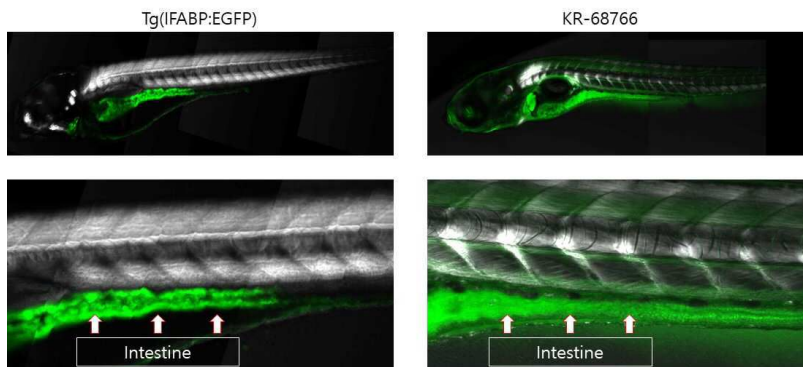
[0143] 이상으로 본 발명의 특징한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

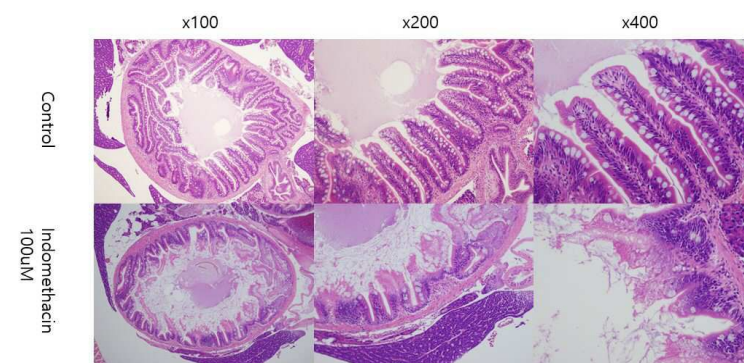
도면1



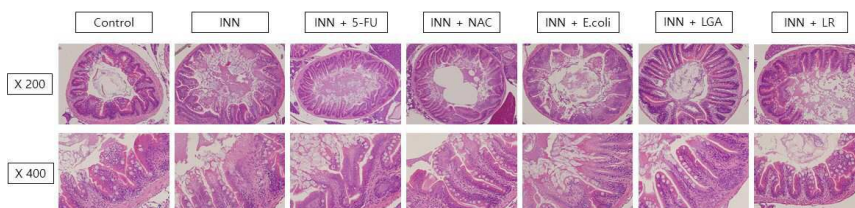
도면2



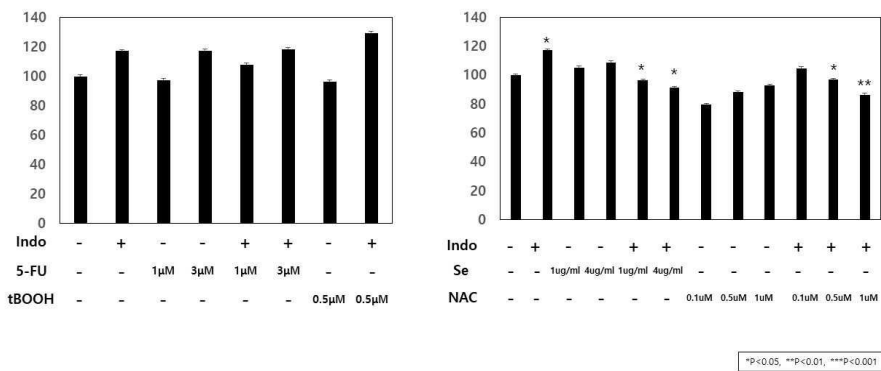
도면3



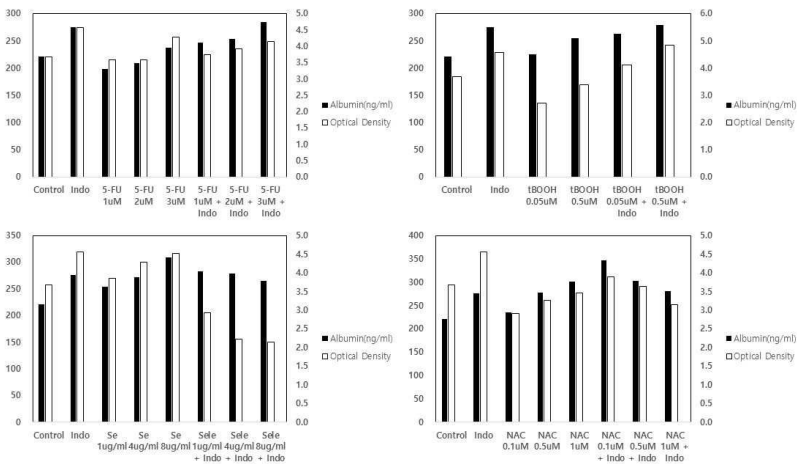
도면4



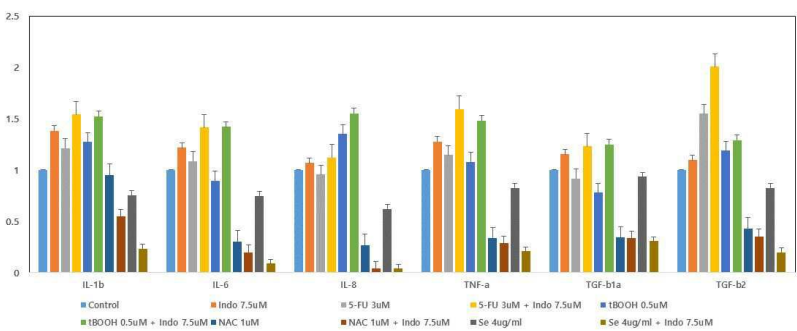
도면5a



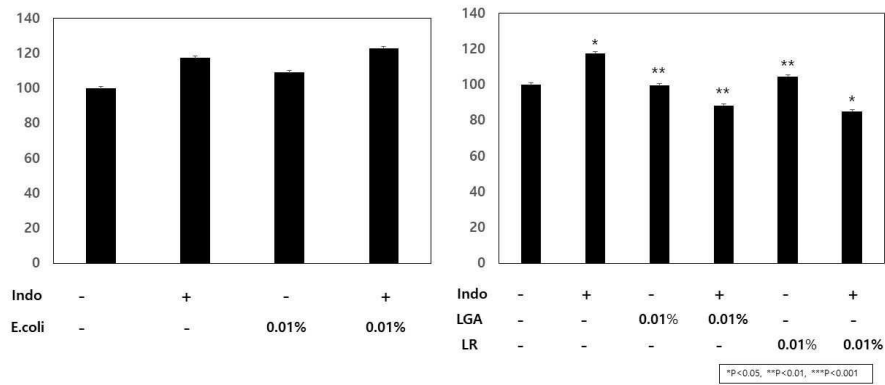
도면5b



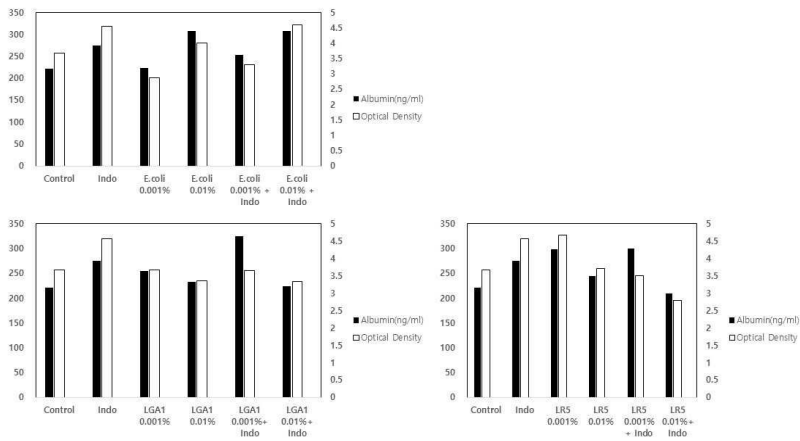
도면5c



도면6a



도면6b



도면6c

