	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2007-0114436 (43) 공개일자 2007년12월04일
(51) Int. Cl. <i>A61K 35/44</i> (2006.01) <i>A61P 17/06</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2006-0047963 (22) 출원일자 2006년05월29일 심사청구일자 2006년05월29일	(71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교 (72) 발명자 권 영 근 서울특별시 강남구 도곡동 527 도곡텍슬아파트 101-102 맹용선 강원 평창군 대화면 상안미 2리 3반 388번지 (74) 대리인 신동인	

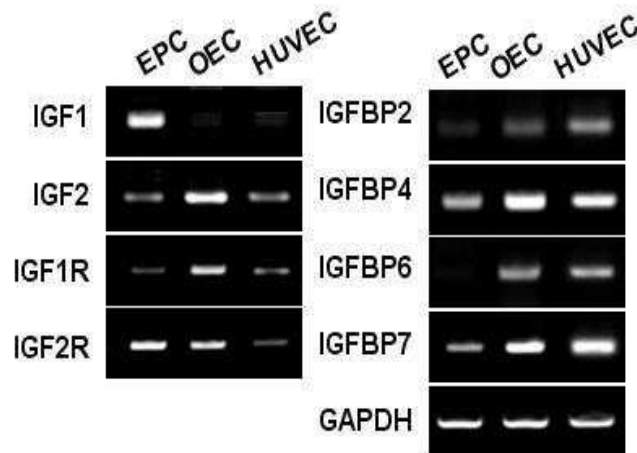
전체 청구항 수 : 총 10 항

#### (54) IGF2 및 IGF2 수용체를 이용한 혈관신생 제어방법

##### (57) 요약

본 발명은 혈관신생 지역에서 분비되는 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 혈관 신생지역으로의 이동을 조절하는 방법에 관한 것으로, 혈관내피 전구세포에서 높게 발현되는 유전자로 IGF2에 의하여 활성화되는 IGF2수용체의 기능을 억제하는 단계 및 포유동물의 조직에 IGF2 및 IGF2수용체 단백질을 처리하거나 유전자를 도입시키는 단계를 포함한다. 본 발명의 IGF2 및 IGF2수용체의 제어는 혈관내피 전구세포에 의한 혈관신생을 조절할 수 있으므로, 혈관신생과 관련된 질환의 예방 및 치료를 위한 치료제 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

사람의 제대혈에서 분리한 혈관내피 전구세포(Endothelial progenitor cell, EPC)에 IGF2를 처리하여 혈관내피 전구세포의 이동(chemotaxis), 부착(adhesion) 및 침투(invasion)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 혈관신생 촉진 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 IGF2를 1 내지 200ng 처리하는 것을 특징으로 하는 혈관신생 촉진 방법.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 IGF2는 주사용 조성물과 혼합하여 인간을 제외한 포유동물의 혈관신생을 유도하고자 하는 부위에 주사형태로 투여하는 것을 특징으로 하는 혈관신생 촉진 방법.

### 청구항 4

IGF2에 의해 촉진된 혈관내피 전구세포의 이동, 부착 및 침투효과가 IGF2수용체 길항제 및 세포내 신호전달 물질인 Gi(inhibitory G protein of adenylyl cyclase), PLC(phospho lipase C),  $Ca^{2+}$  저해제에 의해 억제되는 것을 특징하는 혈관신생 억제 방법.

### 청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 IGF2 수용체 길항제는 M6P(mannose-6-phosphate)인것을 특징으로 하는 혈관신생 억제 방법.

### 청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 Gi(inhibitory G protein of adenylyl cyclase)는 PTX(pertussis toxin), PLC(phospho lipase C)는 U73122,  $Ca^{2+}$  저해제는 BAPTA-AM(an intracellular  $Ca^{2+}$  chelator)인 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제 방법.

### 청구항 7

혈관신생 촉진 효과를 갖는 IGF2를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 허혈성 질환은 화상, 건선, 궤양, 허혈, 심근경색, 협심증 또는 뇌혈관성 질환인 약학조성물.

### 청구항 9

혈관신생 억제효과를 갖는 IGF2수용체 길항제 및 세포내 신호전달 물질인 Gi(inhibitory G protein of adenylyl cyclase), PLC(phospho lipase C),  $Ca^{2+}$  저해제를 유효성분으로 포함하는 IGF2에 의해 활성화된 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

### 청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 혈관신생으로 인한 질환은 혈관신생에 의해 매개되는 혈관종, 혈관섬유종, 혈관기형, 동맥경화, 혈관유착, 부종성 경화증, 각막이식성 혈관신생, 신생혈관성 녹내장, 당뇨병성 망막증, 신생혈관에 의한 각막질환, 반점의 변성, 익상편, 망막변성, 후수정체 섬유 증식증, 과립성 결막염, 퇴화반, 조숙아의 망막증, 관절염, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 알츠하이머 질환, 비만, 지루성 피부염, 여드름 및 고혈압을 포함하는 암 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료용

약학조성물.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <12> 본 발명은 성장인자로 알려진 IGF2 및 IGF2수용체를 이용하여 혈관신생을 제어하는 방법에 관한 것이다.
- <13> 혈관신생 (angiogenesis)이란 새로운 혈관이 생성되는 과정을 말하며, 정상적인 생체 조건에서는 드물게 일어나지만, 배발생, 황체 형성 또는 상처치유 과정에서는 반드시 수반되는 과정이다. 특히, 혈관신생은 종양이 다른 부위로 전이하는 경우 중요하게 작용함이 알려져 있다(Folkman J and Klagsburn M, *Science*, 235(4787), pp 442-447, 1987).
- <14> 혈관이 생성되는 과정은 크게 두 가지 경로로 de novo 혈관형성 (vasculogenesis) 과정과 혈관신생 (angiogenesis) 과정으로 볼 수 있다 (Hanahan D, et al. *Cell*, 86, pp 353-364, 1996). 혈관형성과정은 주로 발생단계에서 일어나며, 태아에서 생성되는 혈관전구세포인 혈관모세포(angioblast)가 분열과 분화를 거쳐 심혈관계를 형성하거나 내배엽성 기관에 혈관을 분포시키는 역할을 한다 (Bussolino F, et al. *Trends Biochem Sci* 22, pp 251-256, 1997). 이와는 달리 혈관신생과정은 기존의 혈관으로부터 발아가 일어나서 새로운 모세혈관이 생성되는 것을 의미하며, 발생단계에서 외배엽 및 간엽기관에 모세혈관을 분포시키는데 필수적인 과정이기도 하지만, 출생 후에도 자궁내막의 증식이나 상처치유와 같은 생리적과정과 류마티스성 관절염, 건선, 악성암, 동맥경화증, 당뇨병성 망막증 등 다양한 인체질환의 병리적 과정에서 왕성하게 일어나는 현상이다(Carmeliet P. *Nat Med* 6, pp 389-395, 2000).
- <15> 새로운 혈관을 구축하는데 가장 핵심적인 세포는 혈관의 내막을 구성하여 혈액과 직접 접하고 있는 혈관내피세포로 다양한 생리활성 물질을 분비하여 혈관의 확장, 혈전의 저해, 혈관벽의 선택적인 대사산물들의 투과 및 이동을 조절하고, 세포표면에 다양한 세포막 단백질을 발현하여 혈액의 흐름 및 백혈구와 혈소판의 부착을 조절하는 중요한 역할을 한다. 그러나 최근에 혈관을 구축하는데 있어서 혈관내피세포뿐만 아니라 혈관내피 전구세포(endothelial progenitor cell, EPC)가 관여하는 것으로 보고되고 있다. 혈관내피 전구세포는 혈관내피세포로 분화할 수 있는 전구세포를 말하는 것으로 혈관을 순환하던 혈관내피 전구세포가 신생혈관으로 안착되어 혈관신생을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 그러나 혈관내피 전구세포의 신생혈관지역으로 이동 및 분화에 관한 연구는 초기 수준으로 최근에서야 SDF-1(stromal cell derived factor-1)와 그 수용체 (CXCR4), 그리고 카텝신(cathepsin) L과 같은 유전자들이 혈관내피 전구세포의 이동과 분화과정에 관여한다는 연구결과가 보고되고 있다. 따라서 생체의 특정 생리적 및 병리적 환경 하에서 일어나는 혈관 신생과정에 혈관내피 전구세포의 이동 및 분화의 조절은 매우 중요한 기술로서 심층적이 연구가 요구된다.
- <16> IGF2는 중요한 성장인자의 하나로서 6.7kDa의 폴리펩티드로 IGF1과 70%, 인슐린과 50%의 유사성을 가지고 있다. IGF2의 생물학적 활성은 그 수용체인 IGF2R를 통하여 매개되며 여러 가지 세포에서 성장, 이동, 분화에 관련된 것으로 알려져 있다. IGF2와 IGF2R 유전자는 태아 발생과정이나 성장 조절에 중요한 역할을 하며 최근에는 혈관신생과정 및 림프관 신생과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Herr F, et al. *J Clin Endocrinol Metab.*, 88, pp 4811-4817, 2003).
- <17> 이에, 본 발명자들은 신생혈관지역으로 혈관내피 전구세포의 이동 및 분화과정을 조절하는 유전자를 발굴하고 기능을 규명하여 안전하면서도 효과적으로 혈관신생을 조절할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, IGF2수용체 유전자가 혈관내피 전구세포에서 높은 발현을 보이는 것을 확인하였으며, IGF2는 종양(tumor)과 국소빈혈(ischemia)같은 허혈성 질환에서 높은 발현을 보이는것을 확인하였다. 따라서 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 이동성을 확인해본 결과 IGF2에 의해 혈관내피 전구세포의 이동뿐만 아니라 부착 및 침투 능력이 증가하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <18> 본 발명의 목적은 IGF2와 IGF2 수용체를 이용하여 신생혈관으로 혈관내피 전구세포의 안착을 조절하는

방법을 이용하여 혈관신생을 제어하는 방법을 제공하는 것이다.

### 발명의 구성 및 작용

- <19> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 IGF2와 IGF2 수용체를 이용하여 신생혈관으로 혈관내피 전구 세포의 안착을 조절하는 방법을 이용하여 혈관신생을 제어 방법을 제공한다.
- <20> 구체적으로 본 발명은 혈관내피 전구세포에서 발현되는 IGF2 수용체의 기능을 억제하는 단계 및 포유동물의 조직에 IGF2 및 IGF2수용체 단백질을 처리하거나 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는 혈관신생 제어방법을 제공한다.
- <21> 보다 상세하게, 본 발명은 사람의 제대혈에서 분리한 혈관내피 전구세포(Endothelial progenitor cell, EPC)에 IGF2를 처리하여 혈관내피 전구세포의 이동(chemotaxis), 부착(adhesion) 및 침투(invasion)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 혈관신생 촉진방법을 제공한다.
- <22> 본 발명은 상기 IGF2를 1 내지 200ng, 바람직하게는 1 내지 100ng을 처리하는 것을 특징으로 하는 혈관신생 촉진방법을 제공한다.
- <23> 본 발명은 상기 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 이동, 부착 및 침투효과가 IGF2수용체 길항제 및 세포내 신호전달 물질인 Gi(inhibitory G protein of adenylyl cyclase), PLC (phospho lipase C),  $Ca^{2+}$  저해제에 의해 억제되는 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제 방법을 제공한다.
- <24> 본 발명의 IGF2는 주사용 조성물과 혼합하여 인간을 제외한 포유동물의 혈관신생을 유도하고자하는 부위에 주사형태로 투여하는 것을 특징으로 한다.
- <25> 또한 본 발명은 혈관신생 촉진 효과를 갖는 IGF2를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.
- <26> 본 발명은 혈관신생 억제효과를 갖는 IGF2수용체 길항제 세포내 신호전달 물질인 Gi(inhibitory G protein of adenylyl cyclase), PLC (phospho lipase C),  $Ca^{2+}$  저해제를 유효성분으로 포함하는 IGF2에 의해 활성화된 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- <27> 상기 IGF2 수용체 길항제는 M6P(mannose-6-phosphate)인것을 특징으로 한다.
- <28> 상기 Gi는 PTX(pertussis toxin, SIGMA), PLC는 U73122(Biomol),  $Ca^{2+}$  저해제는 BAPTA-AM(an intracellular  $Ca^{2+}$  chelator, Biomol)인것을 특징으로 한다.
- <29> 본원에서 정의된 허혈성 질환은 화상, 건선, 궤양, 허혈, 심근경색, 협심증 또는 뇌혈관성 질환을 포함한다.
- <30> 본원에서 정의된 혈관신생으로 인한 질환은 혈관신생에 의해 매개되는 혈관종, 혈관섬유종, 혈관기형, 동맥경화, 혈관유착, 부종성 경화증, 각막이식성 혈관신생, 신생혈관성 녹내장, 당뇨병성 망막증, 신생혈관에 의한 각막질환, 반점의 변성, 익상편, 망막변성, 후수정체 섬유 증식증, 과립성 결막염, 퇴화반, 조숙아의 망막증, 류마티스 관절염, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 알츠하이머 질환, 비만, 지루성 피부염, 여드름 및 고형암을 포함하는 암 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혈관신생으로 인한 질환, 바람직하게는 동맥경화, 류마티스 관절염, 건선, 당뇨병성 망막증임을 특징으로 한다.
- <31> 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- <32> 본 발명의 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 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 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출액에 적어도 하나 이상의 부형

제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 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. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<33> 본 발명의 조성물의 투여 형태는 주사제에서 통상적으로 사용되는 어떠한 기제라도 사용 가능하다. 예를 들어, 기제는 증류수, 염화나트륨 염 용액, 염화나트륨 및 무기물염의 혼합물 또는 그와 유사한 혼합물, 만니톨, 락토스, 텍스트란, 글루코스 등의 용액, 글리신, 아르기닌 같은 아미노산 용액, 유기산 용액 또는 염 용액 및 글루코스 용액의 혼합 및 이와 유사한 용액 등을 포함한다. 또한, 주사제는 통상의 방법으로 삼투압 조절제, pH 조절제, 착기름이나 콩기름과 같은 식물성 기름, 또는 레시틴, 비이온성 표면활성제와 같은 표면활성제를 상기한 기제에 첨가하여 용액, 현탁액 또는 콜로이드 용액 등으로 제조할 수 있다. 이러한 주사제는 분말형, 동결건조형 등으로 제조하여 사용하기 바로 전에 용해하여 쓸 수도 있다.

<34> 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 혈관신생에 의해 유발되는 질환 부위에 국부적으로 0.0001 내지 1000 mg/kg의 양을 1주에 1회 내지 수회 투여하거나, 수술 이후에 카테터(catheter)와 같은 것을 통해 일 회 투여하여 목표 지점에서 흡수되도록 할 수 있다. 그 투여량은 투여경로, 질환의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<35> 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 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.

<36> 이하, 본 발명을 하기의 참고예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<38> 단, 하기 참고예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<39> **참고예 1. 혈관내피 전구세포 및 혈관내피세포에서 IGF2 및 IGF수용체의 유전자 발현 분석실험.**

<40> 분만 후 적어도 2시간 이내 사람의 제대혈(human umbilical cord blood)에서 피콜-경사법(ficoll-gradient method)을 이용하여 EPC를 분리한다(Bahlmann F,H, et al. *Blood*, 103, pp 921-926, 2004). 분리한 EPC를 EGM (growth factor supplementary medium)배지가 담겨진 파이버넥틴 코팅된 6 웰 플레이트(Fibronectin coated 6 well plate)에 접종한 후, 37℃의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한다. 배양3일후에 배지를 교체하여 부착되지 않은 세포(nonadherent cell)들은 제거하고 부착된 세포(adherent cell)만을 선택하여 배양한다. 이후 매 2일 마다 배지를 교체하여 7일이 지나면서 광학 현미경(light microscopy)을 통해 관찰하여 형태분화 활성을 관찰한다. EPC를 배양하면서 분화이전의 초기단계(day7) EPC, 내피세포형태로 분화된단계의 OEC, HUVEC의 각각 세포주(cell line)들로부터 RNA를 분리하여 역전사 및 증폭시킨 후 IGF2, IGF2R, 관련 유전자의 mRNA 전사양상을 확인 하였다(도 1 참고).

<41> **실험예 1. IGF2에 의한 혈관내피전구세포의 이동 및 억제효과실험.**

<42> 1-1. IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 이동효과

<43> IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 이동성을 알아보기 위해 세포배양판(Transwell)을 이용한 세포 유주 활성 측정(chemotaxis assay)을 수행하였다(Walter DH, *Circ Res*. 97, pp 1142-1151, 2005). 혈관내피 전구세포세포(day7)(1x10<sup>5</sup>/100ul)를 젤라틴(gelatin)으로 프리코팅(precoating)한 상부챔버(upper chamber)에 도말하고 하부챔버(lower chamber)에 IGF2를 농도별로(1, 10, 50, 100ng/웰)처리한다. 24시간 후에 상부챔버를 들어내어 파라포름 알데하이드로 세포를 고정하고 헤마토실린, 에오신(Curtin Matheson Scientific Inc)으로



염색한다. 현미경으로 사진을 찍은 후 이동한 세포의 수를 확인해 본 결과 IGF2에 의해 농도 의존적으로 혈관내피 전구세포의 이동성이 증가하는 것을 확인하였다(도 2a 참고).

<44> 1-2. IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 이동 증가에 대한 IGF2수용체 길항제(mannose-6-phosphate, M6P)의 효과

<45> 혈관내피 전구세포(day7)( $1 \times 10^5$ /100ul)에 IGF2수용체 길항제(mannose-6 phosphate, M6P)를 30분 전처리 한다. 이후 혈관내피 전구세포를 젤라틴으로 프리코팅한 상부챔버에 도말하고 하부챔버에 IGF2(50ng/웰)를 처리한다. 24시간 후에 상부챔버를 들어내어 파라포름 알데하이드로 세포를 고정하고 헤마토실린, 에오신(Curtin Matheson Scientific Inc)으로 염색한다. 현미경으로 사진을 찍은 후 이동한 세포의 수를 확인해 본 결과 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 이동성증가가 IGF2수용체 길항제에 의해 감소되는 것을 확인하였다(도 2b 참고).

<46> 1-3. IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 이동증가에 대한 Gi, PLC 및  $Ca^{2+}$ 억제제의 효과

<47> 혈관내피 전구세포(day7)( $1 \times 10^5$ /100ul)에 Gi(PTX: 6시간), PLC(U73122: 30분) 및  $Ca^{2+}$ (BAPTA-AM:30분) 억제제를 각각 전처리한다. 이후 상기 실험예 1-3에 기재된 방법과 같이 수행한 결과, IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 이동성증가가 Gi, PLC 및  $Ca^{2+}$  억제제에 의해 감소되는 것을 확인하였다(도 2c 참고).

<48> 실험예 2. IGF2에 의한 혈관내피전구세포의 부착 및 억제효과실험.

<49> 2-1. IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 부착효과

<50> 파이브로넥틴(0.1mg/ml) 을 96웰 플레이트에 코팅하여 4℃에서 밤새 둔다. 다음날 혈관내피 전구세포(day7)( $1 \times 10^5$ /100ul)에 IGF2을 농도별로(1, 10, 50, 100ng/웰) 처리하고 96웰에 넣은 후 30분 동안 37℃에서 배양한다. 이후 PBS로 세척하여 부착하지 않은 세포를 제거하고 파라포름 알데하이드로 부착한 세포를 고정하고 헤마토실린, 에오신으로 염색한다. 현미경으로 사진을 찍은 후 부착한 세포 수를 확인해본 결과 IGF2에 의해 농도의존적으로 혈관내피 전구세포의 부착이 증가하는 것을 확인하였다(도 3a 참고).

<51> 2-2. IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 부착 증가에 대한 IGF2수용체 길항제(mannose-6-phosphate, M6P)의 효과

<52> 파이브로넥틴(0.1mg/ml) 을 96웰 플레이트에 코팅하여 4℃에서 밤새둔다. 다음날 혈관내피 전구세포(day7)( $1 \times 10^5$ /100ul)에 IGF2수용체 길항제(mannose-6 phosphate, M6P) 을 30분 전처리 한다. IGF2수용체 길항제가 처리된 혈관내피 전구세포에 IGF2을 (50ng/웰) 처리하고 96웰에 넣은 후 30분 동안 37℃에서 배양한다. 이후 PBS로 세척하여 부착하지 않은 세포를 제거하고 파라포름 알데하이드로 부착한 세포를 고정하고 헤마토실린, 에오신으로 염색한다. 현미경으로 사진을 찍은 후 부착한 세포 수를 확인해본 결과 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 부착 증가가 IGF2수용체 길항제에 의해 감소되는 것을 확인하였다(도 3b 참고).

<53> 2-3. IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 부착증가에 대한 Gi, PLC 및  $Ca^{2+}$ 억제제의 효과

<54> 파이브로넥틴(0.1mg/ml) 을 96웰 플레이트에 코팅하여 4℃에서 밤새둔다. 다음날 혈관내피 전구세포(day7)( $1 \times 10^5$ /100ul)에 Gi(PTX: 6시간), PLC(U73122: 30분),  $Ca^{2+}$ (BAPTA-AM:30분) 억제제를 각각 전처리 한 후 상기 실험예 2-2에 기재된 바와 같이 수행한 결과, IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 부착 증가가 Gi, PLC 및  $Ca^{2+}$  억제제에 의해 감소되는 것을 확인하였다(도 3c 참고).

<55> 실험예 3, IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 침투와 이에 대한 Gi, PLC 및  $Ca^{2+}$ 억제제의 효과

<56> IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 침투촉진 효과를 알아보기 위해 보이든 챔버(boyden chamber, Costar Transwell assay, 6.5 mm, 5um pore size; Corning, NY)를 이용 하였다. 상부챔버의 아랫 표면을 젤라틴 10μg으로 코팅하고, 필터의 윗부분은 매트릭셀(Matrigel: Collaborative Research, Inc., Waltham, MA) 25 μg으로 코팅한다.

<57> 상기 실험예 1-3에 기재된 바와 같이 수행한 결과, IGF2에 의해 혈관내피 전구세포의 침투가 증가하는 것을 확인하였으면 이러한 효과는 Gi, PLC 및  $Ca^{2+}$  억제제에 의해 감소되는 것을 확인하였다(도 4 참고).

<58> 실험예 4, IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 영향

<59> 4-1, IGF2에 의한 MMPs 유전자의 발현 변화

<60> 혈관내피 전구세포(day7)( $3 \times 10^5$ )에 IGF2(50ng/ml)를 처리하여 6시간 동안 37℃에서 배양한다. RNA를 분리하여 역전사 및 증폭시킨 후 MMPs 유전자의 mRNA 전사 양상을 확인한 결과 MMP9, 12 및 14가 IGF2에 증가하는 것을 확인하였다(도 5a 참고).

<61> 4-2, IGF2에 의한 혈관내피 전구세포내의  $Ca^{2+}$  수치의 변화

<62> 혈관내피 전구세포에 fluo-4(Molecular Probes, Eugene, OR, USA, 최종농도 2uM)를 처리하여 37℃에서 30분 동안 배양한다. EBM 배지(media)로 세척한 후에 IGF2(50ng/ml)를 처리하고 즉시 실시간 형광 현미경을 통해서 형광을 측정하여 세포내 칼슘 수치의 변화를 관찰한다. 실험 결과 IGF2에 의해 혈관내피 전구세포내 칼슘 수치가 증가하는 것을 확인하였다(도 5b 참고).

<63> 4-3, IGF2에 의한 혈관내피 전구세포내 p125<sup>PAK</sup> 활성화 분석

<64> 혈관내피 전구세포(day7)( $3 \times 10^5$ )에 IGF2(50ng/ml)를 처리하고 25분 후에 RIPA 완충용액으로 세포를 용해(lysis)한다. p125<sup>PAK</sup> 항체로 면역침전을 한 후 SDS-PAGE를 수행하고 PY20과 p125<sup>PAK</sup>로 웨스턴 블롯을 실행하였다. 실험 결과 IGF2에 의해서 혈관내피 전구세포의 p125<sup>PAK</sup>이 활성화되는 것을 확인하였다(도 5c 참고).

**발명의 효과**

<65> 상기에 나타난 바와 같이, 본 발명은 IGF2 및 IGF2 수용체를 이용하여 혈관신생을 조절하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로 본 발명은 IGF2수용체의 기능을 억제하는 단계 및 포유동물의 조직에 IGF2를 처리하거나 유전자를 도입시켜 발현시키는 단계를 포함하여 혈관신생과 관련된 질환의 예방 및 치료를 위한 치료제 개발에 유용하게 이용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

<1> 도 1은 혈관내피 전구세포와 혈관내피세포에서 발현되는 IGF2 및 IGF2수용체 유전자와 관련 유전자의 발현 양상을 나타낸 도이며,

<2> 도 2a는 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 이동성을 나타낸 도이고,

<3> 도 2b는 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 이동성이 IGF2수용체 길항제(IGF2R antagonist)에 의해 억제되는 것을 나타낸 도이며,

<4> 도 2c는 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 이동성이 Gi, PLC 및  $Ca^{2+}$  억제제에 의해 억제되는 것을 나타낸 도이고,

<5> 도 3a는 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 부착성을 나타낸 도이며,

<6> 도 3b는 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 부착성이 IGF2수용체 길항제에 의해 억제되는 것을 나타낸 도이고,

<7> 도 3c는 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 부착성이 Gi, PLC,  $Ca^{2+}$  억제제에 의해 억제되는 것을 나타낸 도이며,

<8> 도 4는 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 침투성 증가가 Gi, PLC,  $Ca^{2+}$  억제제에 의해 억제되는 것을 나타낸 도이고,

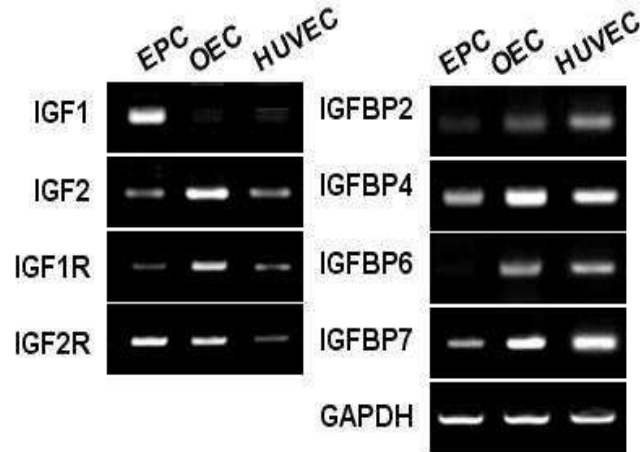
<9> 도 5a는 IGF2에 의해 혈관내피 전구세포에서 MMP9, MMP12 및 MMP14 유전자의 발현이 증가함을 나타낸 도이며,

<10> 도 5b는 IGF2에 의해 혈관내피 전구세포내의  $Ca^{2+}$  수치의 증가를 나타낸 도이고,

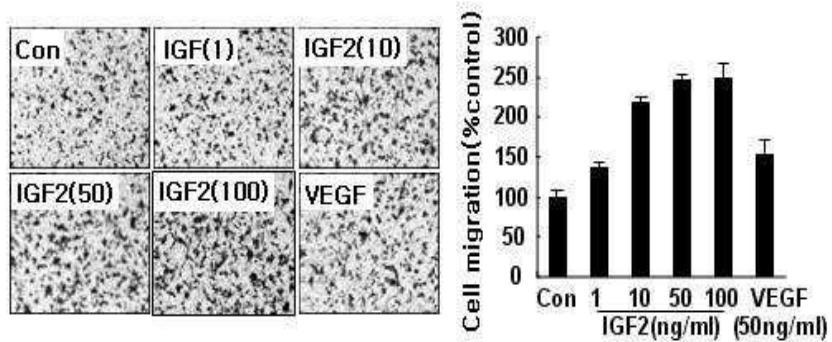
<11> 도 5c는 IGF2에 의한 혈관내피 전구세포의 p125<sup>EAK</sup> 활성화를 나타낸 도이다.

## 도면

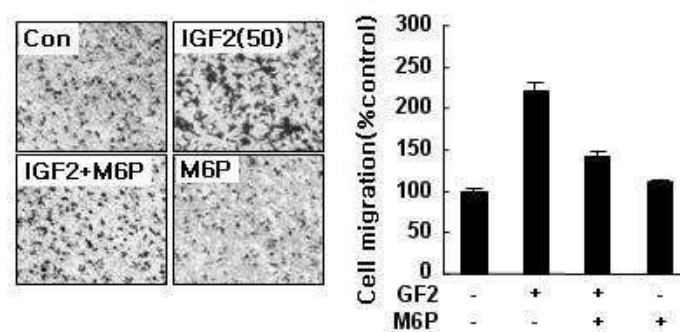
### 도면1



### 도면2a

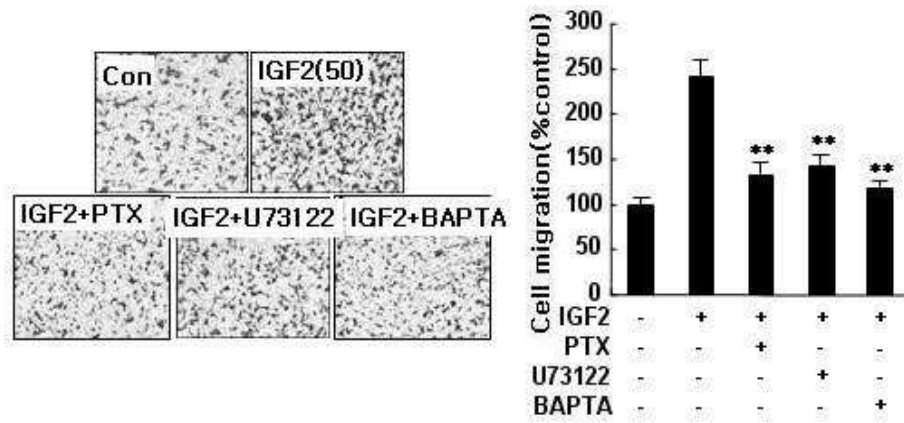


### 도면2b

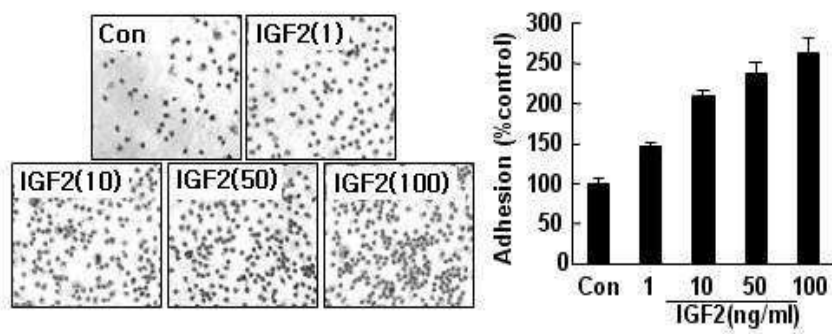




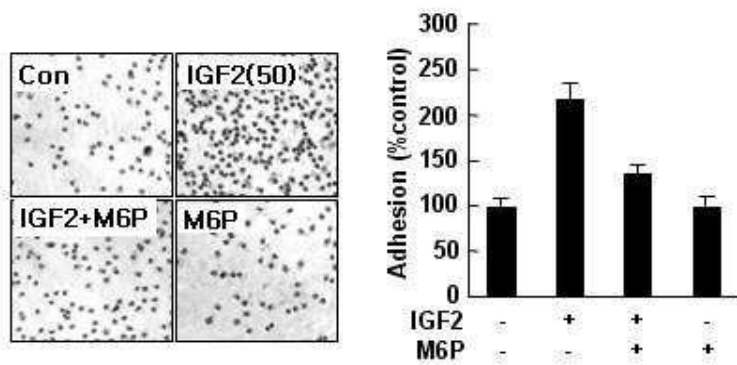
도면2c



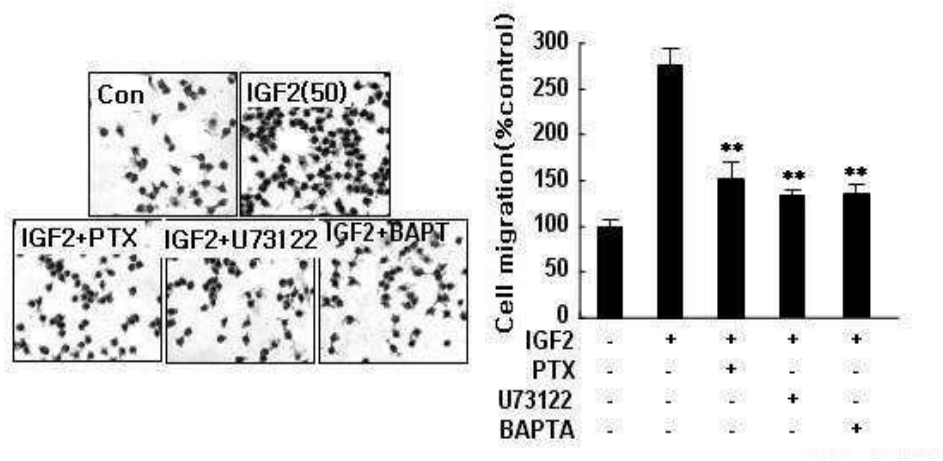
도면3a



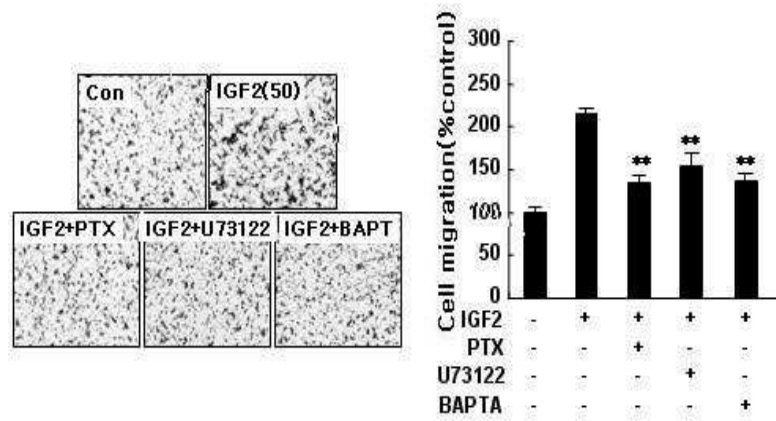
도면3b



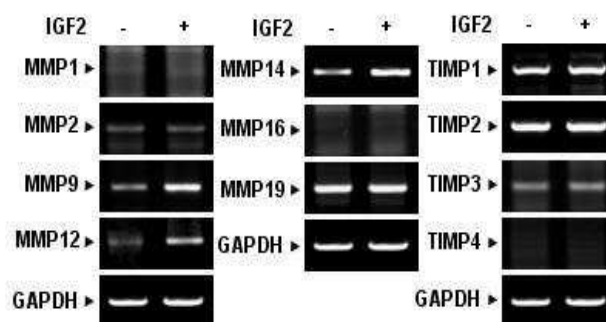
도면3c



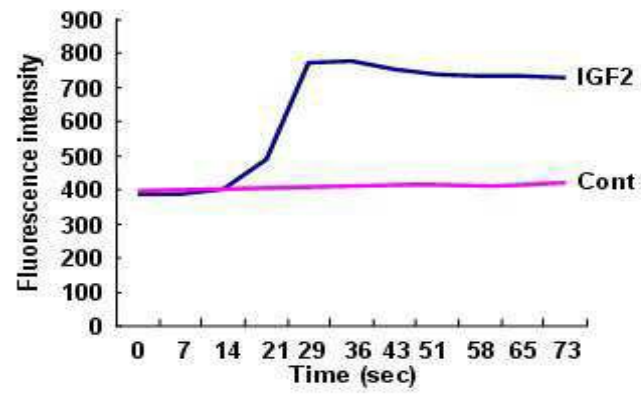
도면4



도면5a



도면5b



도면5c

