



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년09월25일
(11) 등록번호 10-1555356
(24) 등록일자 2015년09월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 471/04 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0103388
(22) 출원일자 2013년08월29일
심사청구일자 2013년08월29일
(65) 공개번호 10-2015-0025615
(43) 공개일자 2015년03월11일
(56) 선행기술조사문헌
Chemistry of Heterocyclic Compounds.
Vol.33(8), p.997*
Chemical communications. Vol.49(2),
pp.190-192
Advanced Synthesis & Catalysis. vol.354(8),
pp.1579-1584
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
안진희
대전 유성구 유성대로 1741, 109동 804호 (전민동, 세종아파트)
한서정
서울 강남구 삼성로71길 39, 302호 (대치동)
배명애
대전 유성구 장대로71번길 34, 101동 401호 (장대동, 장대푸르지오)
(74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 10 항

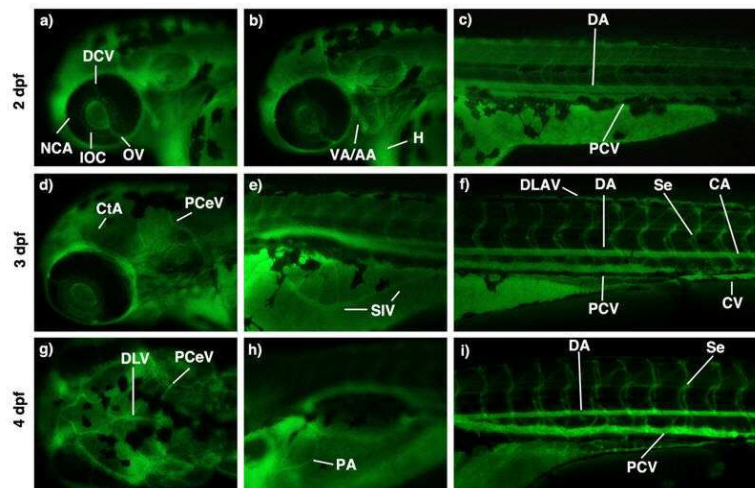
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **혈관 이미징용 형광 프로브 및 그의 용도**

(57) 요약

본 발명은 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체에 관한 것으로서, 살아있는(live) 동물의 혈관을 염색하는 신규한 혈관 이미징 화합물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 종래 혈관에 직접 주입하여 혈관 이미징에 사용되던 로다민-텍스트란 및 베를린-블루 다이와 달리, 혈관 이미징제의 혈관주입 없이도 살아있는 동물의 전신 혈관을 특이적으로 염색하는 혈관 이미징용 조성물을 개발하였다. 또한, 혈관 이미징용 조성물의 혈관염색 여부로써 신규한 혈관신생 억제제를 스크리닝할 수 있으므로, 혈관 신생과 관련된 다양한 질병의 의약 스크리닝에 이용될 수 있다. 따라서 본 발명의 화합물 및 혈관 이미징용 조성물은 살아 있는 동물에 있어 신규한 혈관이미징 염료로서 이용할 수 있으며, 신약 스크리닝 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110019331
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 미래기반기술개발사업
연구과제명 지질대사 및 베타세포 연관 당뇨/비만 치료제 개발
기여율 1/5
주관기관 한국화학연구원
연구기간 2011.06.30 ~ 2012.06.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-1203-B0
부처명 산업기술연구회
연구관리전문기관 산업기술연구회
연구사업명 기관고유사업
연구과제명 대사증후군 치료제 개발 연구
기여율 4/5
주관기관 한국화학연구원
연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

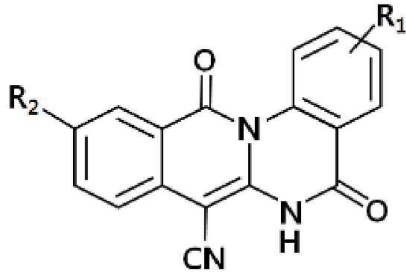
명세서

청구범위

청구항 1

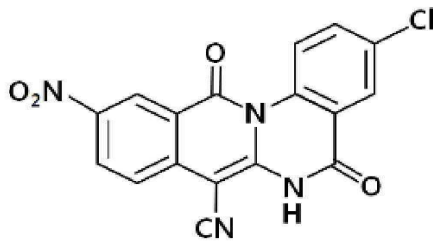
다음 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체:

화학식 1

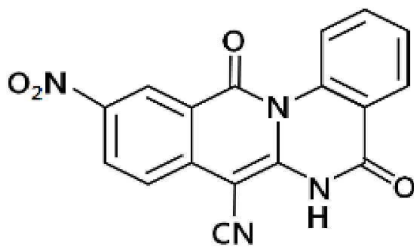


상기 화학식 1에서, R₁은 H, 할로, C₁-C₆ 알킬 또는 OCA₃(상기 A는 할로)이고, R₂는 NO₂ 또는 NH₂이며, 상기 화학식 1은 하기 화학식 2 및 화학식 3이 아니다.

화학식 2



화학식 3



청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 R₁에서의 할로는 Cl인 것을 특징으로 하는 유도체.

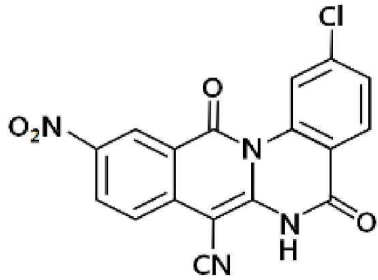
청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 OCA₃는 OCF₃인 것을 특징으로 하는 유도체.

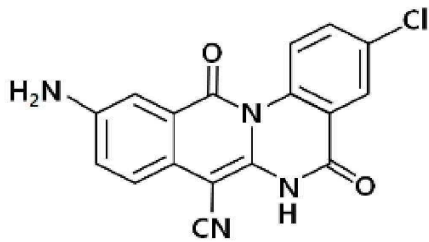
청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 유도체는 다음 화학식 4 내지 화학식 7로 구성된 군으로부터 선택되는 화학식으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 유도체:

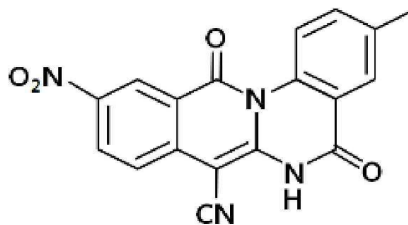
화학식 4



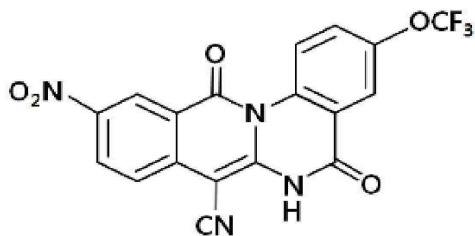
화학식 5



화학식 6



화학식 7



청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체를 포함하는 혈관 이미징용 조

성물.

청구항 6

제 5 항의 혈관 이미징용 조성물을 생물학적 시료에 접촉시키는 단계를 포함하는 인간을 제외한 동물의 혈관 이미징 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 동물 개체, 수정란, 배아, 안구 또는 조직인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 동물은 살아있는(live) 동물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

다음 단계를 포함하는 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법:

- (a) 스크리닝 하고자 하는 시험물질을 인간을 제외한 동물의 생물학적 시료에 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 생물학적 시료에 상기 제 5 항의 혈관 이미징용 조성물을 접촉시켜 상기 생물학적 시료 내의 혈관을 염색하여 혈관에 대한 이미지를 얻는 단계.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 수정란, 배아, 안구 또는 조직인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 혈관 이미징용 형광 프로브 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 형광 소분자 프로브는 많은 관심을 받아왔고, 그의 다양성과 민감성, 살아있는 동물/인간에게 적용가능한 점 때문에 바이오이미징에 폭 넓게 이용되고 있다^[1, 2]. 다양한 생물학적 현상 및 과정을 시각화하기 위해 다양한 형광 프로브가 개발되었으나, 적합한 이미징 프로브가 없었기 때문에 살아있는 동물의 혈관 이미징은 한계가 있었다. 동물모델에서 형광 단백질을 유전적으로 변형시키거나^[3] 또는 혈류의 혈관조영도가 있으나^[4], 직접적인 혈관 염색 프로브는 소수성 막 염색제, 예컨대 dil^[5]을 이용하여 국소적 부위에만 한정되어 적용되고 있다. 따라서 본 발명에서는 진신 혈관 염색을 위한 소분자 형광 프로브를 최초로 제시하고, 살아 있는 동물에서 항-혈관신생 의약 스크리닝에서의 응용을 제시한다.

[0003] 혈관신생이란 새로운 혈관을 생성하는 것으로서, 다양한 치료법에 있어 중요성을 인정받아 최근 주목을 받고 있다. 혈관형성 치료법은 허혈성 조직을 복구 또는 재생시키기 위해 새로운 혈관을 유도하여 질병을 치료하기 위한 것으로 처음으로 시도되었다. 상기 혈관형성 치료법은 혈관생성에 의존하는 병리학적 과정, 특히 종양 성장에 있어서 혈관 형성을 억제하는 연구를 포함한다^[6, 7]. 살아 있는 동물 모델에서 혈관을 감지 할 수 있는

형광 소분자 이미징제의 개발은 상기 연구분야에 있어 상당한 진전을 초래할 수 있다. 종래 미세혈관조영술에 의한 혈관 이미징 방법들이 발표되었고, 이는 로다민-텍스트란^[8] 및 베를린-블루 다이^[4]와 같은 형광염료를 주입하여 실시하였다. 이러한 시스템들은 혈류에서 형광염료의 순환으로 인한 혈관의 구조를 볼 수 있게 해주지만, 직접적으로 혈관에만 특이적이지도 않고 전문적인 기술 및 장치가 필요하다. 따라서 본 발명에서는 주입 없이 혈관을 직접 염색할 수 있는 염료를 제시하여 의학연구에 있어서 우수한 도구를 제공하고자 한다. 이러한 목적으로 한국 화합물은행 라이브러리를 스크리닝 하고, 6H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-5,12-디온 골격을 선도 골격(hit scaffold)으로 규명하였다. 상기 선도 골격을 최적화하여, Blood-Vessel-Green(BVG)을 살아있는 제브라피쉬 시스템에서 신규한 혈관 이미징제로 동정하였다.

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 살아있는 동물의 혈관을 염색하는 신규한 혈관이미징 물질을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 종래 혈관에 직접 주입하여 혈관 이미징에 사용되던 로다민-텍스트란 및 베를린-블루 다이와 달리, 혈관주입 없이도 살아있는 동물의 혈관을 특이적으로 이미징할 수 있는 화합물을 합성하였다. 이 화합물들은 내피세포를 포함한 혈관벽을 특이적으로 염색하고, 생체 시료와의 접촉만으로도 혈관이미징이 가능하며, 전문적인 기술 및 장치가 필요하지 않다. 또한 혈관의 국소부위만이 아닌 전신 혈관을 이미징할 수 있어 의학연구에 있어 신규한 혈관이미징 염료로서 사용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 따라서 본 발명의 목적은 신규한 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체를 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 혈관 이미징용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 인간을 제외한 동물의 혈관 이미징 방법을 제공하는 데 있다.

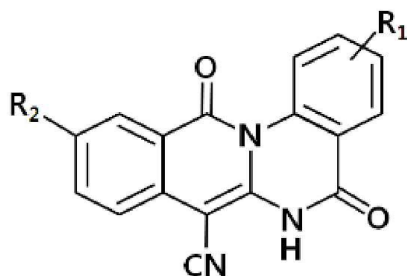
[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 화학식 1로 표시되는 신규한 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체를 제공한다:

[0012] **화학식 1**



[0013]

- [0014] 상기 화학식 1에서, R₁은 H, 할로, C₁-C₅ 알킬 또는 OCA₃(상기 A는 할로)이고, R₂는 NO₂ 또는 NH₂이다.
- [0015] 본 발명자들은 살아있는 동물의 혈관을 염색하는 신규한 혈관이미징 물질을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 종래 혈관에 직접 주입하여 혈관 이미징에 사용되던 로다민-텍스트란 및 베를린-블루다이와 달리, 혈관주입 없이도 살아있는 동물의 혈관을 특이적으로 이미징할 수 있는 화합물을 합성하였다. 이 화합물들은 혈관을 염색하고, 생체 시료와의 접촉만으로도 혈관이미징이 가능하며, 전문적인 기술 및 장치가 필요하지 않다. 또한 혈관의 국소부위만이 아닌 전신 혈관을 이미징할 수 있어 의학연구에 있어 신규한 혈관 이미징 염료로서 사용할 수 있음을 확인하였다.
- [0016] 화학식 1로 표시되는 본 발명의 화합물은 살아있는 동물의 혈관을 이미징하는 것으로, 본 발명자들이 한국 화합물은행 라이브러리에서 스크리닝한 6H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-5,12-디온 구조를 선도골격으로 하여 화학적으로 합성된다. 종래 혈관이미징 염료는 국소부위의 혈관염색에만 이용되고 전신 혈관 염색에는 사용할 수 없었고, 혈관주입이 필요하며, 혈관만을 특이적으로 염색하지 않았다. 이러한 문제점을 해결하고 보다 개선된 특이성(Specificity)을 보이는 물질을 개발하고자 노력하였고, 그 결과 본 발명의 화합물이 분자설계 되고 합성되었다.
- [0017] 본 명세서에서, 화학식 1의 6H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-5,12-디온 유도체를 정의하기 위하여 사용되는 용어 “할로”는 할로젠족 원소를 나타내며, 예컨대, 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오드를 포함한다. 상기 화학식 1에서, R₁ 위치의 할로는 바람직하게는 클로로이다.
- [0018] 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 비치환 또는 치환된 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 운데실, 트리데실, 펜타데실 및 헵타데실 등을 포함한다. C₁₋₅ 알킬은 탄소수 1 내지 5의 알킬 유니트를 가지는 알킬기를 의미하며, C₁₋₅ 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다. 화학식 1에서, R₁ 위치의 C₁₋₅ 알킬은 바람직하게는 C₁₋₃ 알킬이고, 보다 바람직하게는 C₁₋₂ 알킬이며, 가장 바람직하게는 메틸이다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체의 R₁이 OCA₃인 경우, 상기 A는 할로, 예컨대 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오드이고, 보다 바람직하게는 플루오로이다.
- [0020] 아래에서 이와 같은 본 발명에 따른 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체 제조과정에 대하여 구체적으로 설명한다:
- [0021] 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체의 제조과정 (4a, 4b, 4c, 4e, 4f)
- [0022] 단계 (1): α-시아노티오아세트아마이드를 적합한 용액, 예컨대 에탄올 내 소듐 용액에 첨가하고 교반, 가열한 후, 메틸 요오드를 상기 용액에 첨가한다.
- [0023] 단계 (2): 상기 반응 혼합물을 교반하고, 상기 혼합물에 2-아미노-5-(트리플루오로메톡시)벤조산을 첨가한 후 100-200℃에서 12-36시간 교반한 다음 냉각한다.
- [0024] 단계 (3): 냉각한 고형물을 결정화 하여 2-(4-옥소-6-(트리플루오로메톡시)-3,4-디하이드로퀴나졸린-2-일)아세트니트릴을 수득한다.
- [0025] 단계 (4): 2-(4-옥소-6-(트리플루오로메톡시)-3,4-디하이드로퀴나졸린-2-일)아세트니트릴, K₂CO₃ 및 다이메틸폼아마이드의 혼합물에 메틸 2-클로로-5-니트로벤조에이트를 첨가한 후 100-200℃에서 12-36시간 교반한다.
- [0026] 단계 (5): 상기 단계 (4)의 결과물의 유기층을 제거하고, 잔류물을 정제하여 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체(4a, 4b, 4c, 4e, 4f)를 수득한다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (2)의 결과물을 필터링하고 에탄올로 세척하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 단계 (4)의 결과물을 실온까지 냉각시키고, 추출용매로 추출하는 단계를 추

가적으로 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 상기 추출용매는 에틸아세테이트와 브린을 이용할 수 있고, 상기 유기층은 황산마그네슘에 의하여 제거될 수 있으며, 상기 정제는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 수행할 수 있다.

[0029] 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체 제조과정 (4d)

[0030] 단계 (1): 에탄올 및 H₂O 내, 10-니트로-3-클로로-5,12-디옥소-6,12-디하이드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카보닐리트 및 암모늄클로라이드의 환류 용액에 철 금속을 몇 회에 걸쳐 첨가한다.

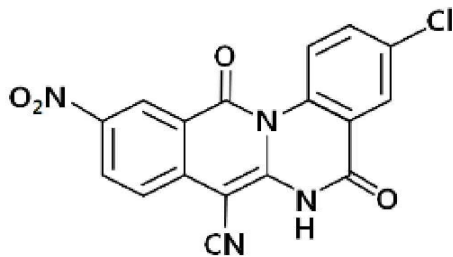
[0031] 단계 (2): 상기 반응 혼합물을 다시 환류시킨 다음 실온까지 냉각한다. 단계 (3): 상기 혼합물의 유기층을 제거하고, 잔류물을 정제하여 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체(4d)를 수득한다.

[0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (2)의 혼합물을 필터링하여 산화철을 제거하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있으며, 또한, 산화철을 제거한 혼합물을 에틸아세테이트/H₂O로 농축하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 상기 농축용매는 에틸아세테이트/H₂O를 이용할 수 있고, 상기 유기층은 황산마그네슘에 의하여 제거될 수 있으며, 상기 정제는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 수행할 수 있다.

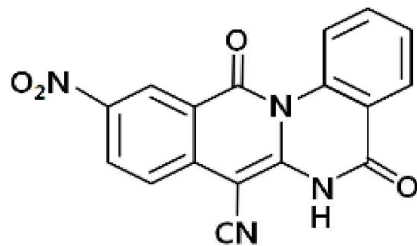
[0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체는 다음 화학식 2 내지 화학식 7로 구성된 군으로부터 선택되는 화학식으로 표시되는 화합물이다:

[0035] **화학식 2**



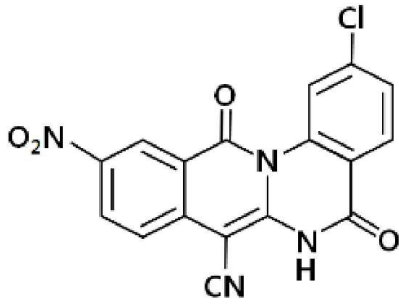
[0036]

[0037] **화학식 3**



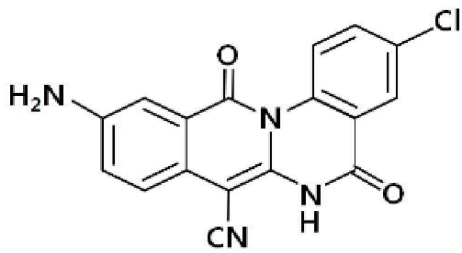
[0038]

[0039] **화학식 4**



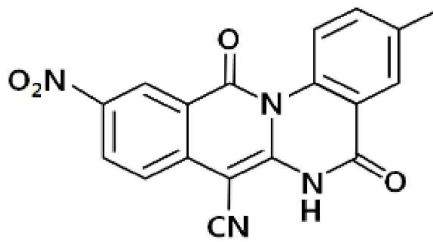
[0040]

[0041] 화학식 5



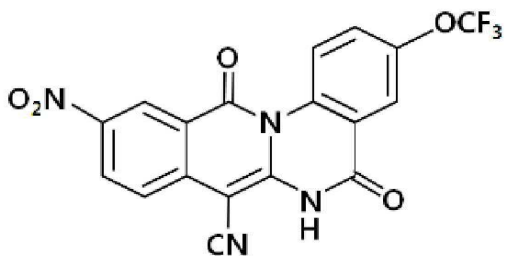
[0042]

[0043] 화학식 6



[0044]

[0045] 화학식 7



[0046]

[0047] 보다 바람직하게는, 본 발명의 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체는 화학식 4-7의 화합물이고, 보다 더 바람직하게는 화학식 6 및 7의 화합물이고, 가장 바람직하게는 화학식 7의 화합물이다.

[0048] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체를 포함하는 혈관 이미징용 조성물을 제공한다.

[0049] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 혈관 이미징용 조성물을 생물학적 시료에 접촉시키는 단계를

포함하는 인간을 제외한 동물의 혈관 이미징 방법을 제공한다.

- [0050] 상기에서 사용된 용어 "생물학적 시료"는 살아있는 동물 개체, 수정란, 배아, 안구 또는 진단하고자 하는 대상으로부터 분리한 조직을 의미한다. 상기 생물학적 시료는 바람직하게는, 동물 개체, 수정란, 배아, 안구 또는 조직이다.
- [0051] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 상기 배아는 제브라피쉬 배아이고, 상기 안구는 래트의 안구이다.
- [0052] 본 발명의 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체는 살아있는 동물의 혈관을 특이적으로 염색하는데 매우 유효하다. 본 발명의 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체는 살아있는 동물에 형광염료를 주입하지 않고, 동물 시료와의 접촉만으로도 혈관의 염색이 가능하다. 예를 들어, 본 발명의 혈관 이미징용 조성물이 발생연구에 사용되는 경우, 살아있는 배아에 주입(injection)없이, 직접 배아의 표면에 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체를 처리할 수 있다. 또한 본 발명의 이소퀴놀리노 퀴나졸린-5,12-디온 유도체는 혈관의 국소 부위만을 염색하는 것이 아니라, 전신 혈관을 염색할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 혈관 이미징용 조성물은 살아있는 동물개체 수정란, 배아, 안구 또는 조직의 혈관 구조 및 목적하는 생체 시료의 혈관 분포, 위치 등을 시각화할 수 있도록 주변과 대비되는 특이적인 영상시그널, 예컨대 형광시그널을 발생시키는 조성물을 지칭한다.
- [0054] 상기 혈관 이미징용 조성물은 추가적으로, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 혈관 이미징용 조성물에 이용되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 구산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0055] 상기 본 발명에 따른 혈관 이미징용 조성물을 살아있는 동물 개체, 수정란, 배아, 안구 또는 조직에 투여하고, 상기 시료로부터 혈관에 결합된 형광물질이 발산하는 신호를 감지하여 이미지를 획득할 수 있다. 이를 통해 원하는 특정 부위의 형광 여부를 통해 종양의 혈관 신생, 배아의 발생연구의 이미징 용도로 이용 가능할 것이며, 혈관 신생과 관련된 각종 질병, 예컨대 맥락막 신혈관형성(CNV), 습성 연령 관련 황반 변성(AMD) 및 당뇨병성 망막증의 비정상적인 혈관 마커로 작용할 수 있어 항-혈관신생 의약의 탐색 등 의약 스크리닝 분야에 폭넓게 이용할 수 있다.
- [0056] 상기 혈관 이미징 방법에 있어서, 본 발명의 화합물이 발산하는 시그널은 형광시그널을 감지할 수 있는 형광현미경, 공초점 형광 현미경, 분광광도계, 형광측정기, CCD 카메라, 실시간 생체 세포 관찰용 현미경(Delta Vision), 라이카 형광실체현미경(Leica MZ10F), 라이카 도립현미경(Leica DMI3000B), 형광입체현미경, 플루오르세인 현미경 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된 장비에 의해서 감지될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0058] (a) 스크리닝 하고자 하는 시험물질을 인간을 제외한 동물의 생물학적 시료에 접촉시키는 단계; 및
- [0059] (b) 상기 생물학적 시료에 상기 혈관 이미징용 조성물을 접촉시켜 상기 생물학적 시료 내의 혈관을 염색하여 혈관에 대한 이미지를 얻는 단계.
- [0060] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 스크리닝 하고자 하는 시험물질을 인간을 제외한 동물의 생물학적 시료에 접촉시킨다.
- [0061] 상기 생물학적 시료는 바람직하게는, 동물 개체, 수정란, 배아, 안구 또는 조직이다.
- [0062] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 생물학적 시료에서 혈관의 신생을 억제하지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화학물질, 항

체, 단백질, 펩타이드, 핵산 분자 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 시험물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 또한, 한국 화합물은 행 라이브러리에서 합성 화합물 및 천연 화합물 라이브러리를 검색할 수 있다. 상기 시험물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레사블 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨블루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

[0063] 이어, 상기 생물학적 시료에 본 발명의 혈관 이미징용 조성물을 접촉시켜 생물학적 시료 내의 혈관을 염색하여 혈관에 대한 영상 시그널을 측정한다. 측정 결과, 대조군 대비 혈관이 형광 시그널이 감소되면, 상기 시험물질은 혈관신생 억제제로 판정된다.

[0064] 상술한 바와 같이, 본 발명의 스크리닝 방법은 스크리닝 하고자 하는 시험물질을 생물학적 시료에 접촉시킨 다음 혈관이미징용 조성물을 접촉시키는 것으로 표현되어 있으나, 이는 기재의 편의를 위한 것이며, 본 발명의 스크리닝 방법은 상기 과정을 반대로 하는 경우, 즉 생물학적 시료를 상기 혈관이미징용 조성물과 접촉시키는 단계를 우선적으로 수행하고 이어 시험물질을 생물학적 시료에 처리하는 것을 배제하는 것은 아니다.

[0065] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 스크리닝 방법에 의해 스크리닝된 혈관신생 억제제는 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 아테롬성 동맥경화, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경변증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화중, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증 또는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방에 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0066] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0067] (a) 본 발명은 살아있는(live) 동물의 혈관을 염색하는 신규한 혈관 이미징 화합물에 관한 것이다.
- [0068] (b) 상기 화합물은 종래 혈관에 직접 주입하여 혈관 이미징에 사용되던 로다민-텍스트란 및 베를린-블루 다이아달리, 혈관주입 없이 생체 시료와의 접촉만으로도 염색이 가능하며, 전문적인 기술 및 장치가 필요하지 않다. 또한 혈관의 국소부위가 아닌 전신 혈관을 염색할 수 있어 살아있는 동물의 혈관을 특이적으로 염색하는 혈관 이미징용 조성물로서 이용될 수 있다.
- [0069] (c) 또한, 혈관 이미징용 조성물의 혈관염색 여부로써 신규한 혈관신생 억제제를 스크리닝할 수 있으므로, 혈관신생과 관련된 다양한 질병의 의약 스크리닝에 이용될 수 있다.
- [0070] (d) 따라서 본 발명의 화합물 및 혈관 이미징용 조성물은 살아 있는 동물에 있어 신규한 혈관이미징 염료로서 이용할 수 있으며, 신약 스크리닝 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 용량 및 시간에 따른 혈관구조의 염색을 나타낸 것이다. 52 hpf 제브라피쉬 배아에 BVG를 1 μM (a, b, c), 5 μM (d, e, f) 및 10 μM (g, h, i)로, 15분(a, d, g), 30분(b, e, h) 및 60(c, f, I)분간 처리한 후, 배아의 표현형적 변화를 관찰하여 촬영하였으며, 10 μM이상, 15분 이상 처리 시에는 배아에 독성을 나타내

었다.

도 2 은 BVG로 염색된 제브라피쉬의 혈관구조이다. 제브라피쉬 배아를 5 μ M BVG로 60분 동안 처리하였으며, 각각은 dpf 2(a, b, c), dpf 3(d, e, f), dpf 4(g, h, i)의 배아를 나타낸 것이다. 제브라피쉬의 주요 동맥(DA, CA)과 주요 정맥(PCV, CV)이 BVG에 의해 가장 먼저 관찰되었다. BVG로 염색된 혈관은 눈(a) 및 인두구(b)에서 관찰되었다. 동맥과 정맥은 지속적으로 dpf 2(c)부터 dpf 4(f, i, e)까지 관찰되었다. dpf 2에, 장하정맥에서 쿼비에관이 생성되었다. 그 이후 24시간동안 장하정맥의 양쪽에서 난황의 배측면을 가로질러 혈관 망상조직이 형성되었다. 발생 중인 뇌혈관(d, g) 및 가슴지느러미(h)는 BVG로 염색되었다.

도 3은 살아있는 제브라피쉬 배아에 BVG를 처리하고, dpf 3 에 혈관조영도로 제브라피쉬의 혈관구조를 나타낸 것이다. 머리의 측면에서 보았을 때, 장하정맥과 혈관줄기가 관찰되었다. 녹색형광 양성 혈관은 BVG로 염색된 것이다(a, b). 적색형광 양성 혈관은 로다민-텍스트란으로 염색한 혈관조영도이다(c, d). 로다민-텍스트란(적색형광) 양성 혈관은 BVG(녹색형광) 양성 혈관과 완벽히 같은 위치에 존재했다(e, f).

도 4는 BVG를 이용한 제브라피쉬의 염색을 나타낸 것이다. 3 dpf 제브라피쉬 배아로부터 채취한 혈액세포를 BVG로 염색하였고, 혈액세포의 핵은 hoechst 33342로 염색하였다. a) 현미경으로 관찰 시, 밝은 부분이 혈액세포이다. 혈액세포는 BVG-염색된 살아있는 배아로부터 채취하였다. b) 혈액세포의 핵은 hoechst 33342로 염색하였다. c) BVG는 채취된 혈액세포에서는 관찰되지 않았다. 화살표는 제브라피쉬의 혈액세포를 나타낸다.

도 5은 제브라피쉬 배아의 부분 혈관을 비교한 것이다. a) 4 dpf 형질전환 제브라피쉬의(Tg[*flk*:GFP]) 배아를 나타낸 것이다. b) 야생형 제브라피쉬 배아를 5 μ M BVG에 노출시켰다. 화살표는 부분 혈관을 나타낸 것이다.

도 6는 살아있는 제브라피쉬 배아에 PTK787/ZK222584를 처리했을 때, PTK787/ZK222584가 특이적으로 혈관생성을 억제함을 나타낸 것이다. 제브라피쉬 배아에 1 μ M의 PTK787/ZK222584를 dpf 2 부터 dpf 3 까지 처리하였으며, 같은 단계의 대조군 배아와 비교하였다. 그 다음 상기 배아들을 5 μ M BVG로 1시간동안 처리하였다. 대조군은 dpf 3 에 정상적인 장하정맥이 관찰되었다. PTK787/ZK222584를 처리한 배아에서는 dpf 3 에 장하정맥의 성장이 완전히 억제되었다(별표).

도 7는 BVG를 주입하고 난 후의 래트의 망막 혈관을 나타낸 것이다. 망막 혈관은 망막 표면(a) 및 망막 내부(b)에서 잘 관찰되었다. 모든 망막 혈관은 BVG로 염색되었으며, 비특이적으로 염색된 곳은 없었다. (d)는 (c)의 상자부분 이미지를 높은 배율로 나타낸 것이다. (d)에서 망막 모세혈관(화살표)들이 잘 관찰되었다. (배율; a, b, c: 100X, d: 200X)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 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.

[0073] **실시예**

[0074] **실험재료 및 실험방법**

[0075] **1. 개괄**

[0076] 모든 수득물들은 컬럼 크로마토그래피 또는 결정화 과정 후에 단리된 수득물이다. ¹H-NMR 스펙트럼은 Bruker사의 AVANCE-300 을 사용하여 얻었으며, 내부표준물질로서 테트라메틸실레인(TMS)를 사용하였다. 고해상 질량 스펙트럼은 오토스펙 자기 섹터 질량분석기(Micromass, Manchester, UK)를 사용하여 얻었다.

[0077] **2. 합성과정**

[0078] **Blood-Vessel-Green(4f)**

[0079] α -시아노티오아세트아마이드(200 mg, 2.0 mmol)를 에탄올(4 mL) 내 소듐 용액(46 mg, 2.0 mmol)에 첨가하고 교반하였으며, 메틸 요오드(312 mg, 2.2 mmol)를 상기 용액에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 24시간 동안

실온에서 교반하였다. 상기 혼합물에 2-아미노-5-(트리플루오로메톡시)벤조산(442 mg, 2.0 mmol)를 첨가한 후 150°C에서 24시간 교반한 다음 실온까지 냉각하였다. 고형물을 필터링하고 에탄올로 세척한 후 에탄올로부터 결정화 하여 2-(4-옥소-6-(트리플루오로메톡시)-3,4-디하이드로퀴나졸린-2-일)아세트니트릴(146 mg, 27 중량%)을 수득하였다. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.7(s, 1H), 7.95(s, br, 1H), 7.84(s, br, 2H), 4.21(s, 2H); HRMS (C₁₁H₆F₃N₃O₂) calcd, 269.0412; found, 269.0407

[0080] 2-(4-옥소-6-(트리플루오로메톡시)-3,4-디하이드로퀴나졸린-2-일)아세트니트릴(130 mg, 0.5 mmol), K₂CO₃ (66 mg, 0.48 mmol) 및 다이메틸폼아마이드 (2 mL)의 혼합물에 메틸 2-클로로-5-니트로벤조에이트(115 mg, 0.5 mmol)를 첨가한 후 150°C에서 24시간 교반하였다. 이후 실온까지 냉각시키고, 에틸아세테이트와 브린으로 추출하였으며, 유기층은 MgSO₄로 제거하였다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 10-니트로-5,12-디옥소-3-(트리플루오로메톡시)-6,12-디하이드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴 (4f, 66 mg, 33 중량%)을 수득하였다. $^1\text{H NMR}$ (500MHz, DMSO- d_6) δ 9.22(d, J=9.5Hz, 1H), 8.87(d, J=2.5Hz, 1H), 8.36(dd, J=9.1Hz, J=2.5Hz, 1H), 7.94(dd, J=3.0Hz, J=1.0Hz, 1H), 7.71(dd, J=9.5Hz, J=3.1Hz, 1H), 7.51(d, J=9.0Hz, 1H); HRMS(C₁₈H₇F₃N₄O₅) calcd, 416.0369; found, 416.0373.

[0081] 3-클로로-10-니트로-5,12-디옥소-6,12-디하이드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴 (4a)

[0082] 본 화합물을 “Blood-Vessel-Green (4f)” 에 기재된 방법에 따라 제조하였다. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 9.11 (d, J =9.3 Hz, 1H), 8.83 (d, J =2.3 Hz, 1H), 8.31 (dd, J=9.0 Hz, J =2.2 Hz, 1H), 8.02 (d, J =2.7 Hz, 1H), 7.73 (dd, J =9.3 Hz, J =2.6 Hz, 1H), 7.48 (d, J =9.1 Hz, 1H) ; HRMS(C₁₇H₇C₁N₄O₄) calcd, 366.0156; found, 366.0139.

[0083] 10-니트로-5,12-디옥소-6,12-디하이드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴 (4b)

[0084] 본 화합물을 “Blood-Vessel-Green (4f)” 에 기재된 방법에 따라 제조하였다. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.96 (d, J =2.5 Hz, 1H), 8.94 (d, J =8.0 Hz, 1H), 8.58 (dd, J =9.0 Hz, J = 2.5 Hz, 1H), 8.20 (dd, J =8.0 Hz, J =2.0 Hz, 1H), 7.95 (m, 1H), 7.78 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.65 (t, J =8.0 Hz, 1H) ; HRMS(C₁₇H₈N₄O₄) calcd, 332.0546; found, 332.0539.

[0085] 2-클로로-10-니트로-5,12-디옥소-6,12-디하이드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴 (4c)

[0086] 본 화합물을 “Blood-Vessel-Green (4f)” 에 기재된 방법에 따라 제조하였다. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.98 (d, J =8.7 Hz, 1H), 8.49 (dd, J =9.0 Hz, J =2.4 Hz, 1H), 8.16 (d, J =7.8 Hz, 1H), 7.82 (t, 1H), 7.68-7.58 (m, 2H); HRMS(C₁₇H₇C₁N₄O₄) calcd, 366.0156; found, 366.0150.

[0087] 10-아미노-3-클로로-6-메틸-5,12-디옥소-6,12-디하이드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴 (4d)

[0088] 에탄올(2 mL) 및 H₂O(1 mL) 내, 10-니트로-3-클로로-5,12-디옥소-6,12-디하이드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴 (61 mg, 0.2 mmol) 및 암모니움클로라이드(105 mg, 2.0 mmol)의 환류 용액에 철 금속(33 mg, 0.6 mmol)을 1시간에 동안 다섯 번에 걸쳐 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 다시 30분간 환류시킨 다음 실온까지 냉각하였다. 그 후, 혼합물을 에탄올로 필터링하여 산화철을 제거하였다. 상기 혼합물을 증발건조시키고, 에틸아세테이트/H₂O로 농축하였으며, 유기층은 MgSO₄로 제거하였다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 10-아미노-3-클로로-5,12-디옥소-6,12-디하이드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보니트릴(4d, 17 mg, 25 중량%)을 수득하였다. $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO) δ 9.03(d, J=9.3Hz, 1H), 8.89(d, J=2.4Hz, 1H), 8.45(dd, J=9.1Hz, J=2.4Hz, 1H).8.07(d, J=2.8Hz, 1H), 7.87(d, J=2.6Hz, 1H), 7.65(d, J=8.8Hz, 1H),

7.55(dd, J=8.9Hz, J=2.7Hz, 1H)); HRMS(C₁₇H₉C₁N₄O₂) calcd, 336.0414; found, 366.0405.

[0089] 3-메틸-10-니트로-5,12-디옥소-6,12-디하이드로-5H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-7-카르보닐트릴 (4e)

[0090] 본 화합물을 “Blood-Vessel-Green (4f)” 에 기재된 방법에 따라 제조하였다. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.99 (d, J =8.8 Hz, 1H), 8.86 (d, J =2.5 Hz, 1H), 8.30 (dd, J =9.1 Hz, J =2.6 Hz, 1H), 7.92 (s, br, 1H), 7.52-7.46 (m, 2H) ; HRMS(C₁₈H₁₀N₄O₄) calcd, 346.0702; found, 346.0699.

[0091] 3. 약어

[0092] DCV, dorsal ciliary vein(등섬모정맥); NCA, nasal ciliary artery(비섬모동맥); IOC, inner optic circle(내시각고리); OV, optic vein(시정맥); VA, ventral aorta(복부대동맥); AA, branchial arch(아가미활); H, heart(심장); CtA, central artery(중심동맥); PCeV, posterior cerebral vein(뒤대뇌정맥); SIV, subintestinal vein(장하정맥); DLAV, dorsal longitudinal anastomotic vessel(등세로문합혈관); DA, dorsal aorta(등대동맥); Se, intersegmental vessel(체절관혈관); CA, caudal artery(미동맥); PCV, posterior cardinal vein(뒤주정맥); DLV, dorsal longitudinal vein(등세로정맥); CV, caudal vein(미정맥); PA, pectoral artery(가슴동맥); e, eye(눈).

[0093]

[0094] 4. 제브라피쉬의 사육

[0095] 야생형 제브라피쉬와 형질전환 제브라피쉬(Tg[*flk*:GFP])^[3]는 표준 실험실 환경에서 사육되었다. 번식을 위한 제브라피쉬는 28.5°C에서 14시간 점등/10시간 소등의 주기로 사육되었다. 배아를 자연산란을 통해 얻고, “zebrafish book”^[15]에 따라 24시간까지 스테이지-업 하고, 이 시점 이후, 배아단계는 hpf(hours post fertilization) 및 dpf(days post fertilization)로 표시하였다.

[0096]

[0097] 5. BVG(blood-vessel-green)와 화합물의 처리 및 이미징

[0098] DMSO로 희석된 BVG 및 화합물들로 제브라피쉬 배아를 처리하였다. 암 조건에서 제브라피쉬를 5 μM BVG로 1시간동안 처리하였다. BVG로 처리한 후, 제브라피쉬를 1시간동안 난수(egg water)로 세척하였다. 세척 후에는 라이카 형광실체현미경(Leica MZ10F)으로 촬영하였다.

[0099]

[0100] 6. 미세혈관조영술 (Microangiography)

[0101] 미세혈관조영술을 공지된 방법에 따라 수행하였다^[12]. 분자량 2000 kDa인 로다민-텍스트란(Invitrogen, Molecular Probes, USA)을 미세혈관조영술에 사용하였다. 로다민-텍스트란을 다니유(Danieau) 용액에 용해시키고, 이 용액을 마취된 수정 후 3일째 배아의 부비동 정맥 또는 주정맥에 주입하였다.

[0102]

[0103] 7. 제브라피쉬 배아의 VEGF 수용체 타이로신 키나아제 억제제 처리

[0104] VEGF (Vascular endothelial growth factor) 수용체 타이로신 키나아제 억제제인 PTK787/ZK222584 (Selleck Chemicals사, USA)를 DMSO에 1 mM의 스톱농도로 용해하고, 이를 난수(egg water)에 희석한 후, 표시된 스테이지에서 살아있는 제브라피쉬 배아에 첨가하였다. 2 dpf에서 배아를 탈난막 하고, 2 dpf에서 장하정맥(SIV)이 자라기 시작하는 3 dpf까지 1 μM PTK787/ZK222584로 처리하였다. 대조군 배아에는 동일한 양의 DMSO 용액을 처리하였다.

[0105]

[0106] 8. 혈액세포의 분리 및 Hoechst 33342 DNA염색

[0107] 트리카인 용액 내에서 마취된 blood-vessel-green-염색된 배아에서 뒤주혈관 천자를 이용하여 혈액세포를 채취 하였다^[16]. 제브라피쉬의 적혈구는 Hoechst 33342(1 µg/ml, Invitrogen, Molecular Probes, USA)를 이용하여 암실에서 5분간 실온 염색하였다. 제브라피쉬의 적혈구 염색 후, 적혈구를 라이카 도립현미경(Leica DMI3000B)으로 촬영하였다.

[0108]

[0109] 9. 망막 혈관의 염색

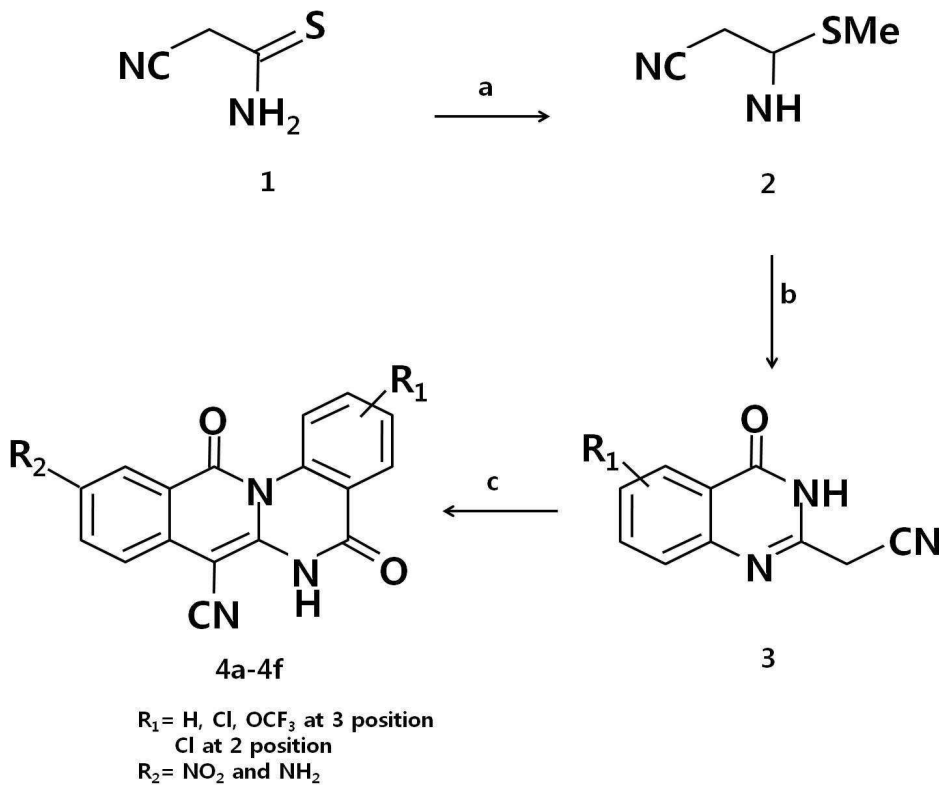
[0110] 본 연구에서는 성숙한 웅성 래트(8주령, 체중 250 g)를 사용하였다. 동물들은 대한민국 서울 가톨릭대학교의 가톨릭 윤리위원회 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침(NIH 출판, 넘버. 80-23, 1996 개정)의 규정에 따라 취급되었다. 래트의 망막 혈관을 염색하기 위해, 졸레틸(40 mg/kg) 및 자일라신(8 mg/kg)을 복강내주사하여 마취하였다. 마취 후에 BMG(4 mg/kg)를 래트의 좌심실에 주입하였다. 5분 경과 후, 깊게 마취된 래트의 눈을 적출하였다. 고정과정 없이 눈의 각막과 수정체를 제거한 후, 망막 조직을 슬라이드 글라스 위에 올려 플루오르세인 현미경(Zeiss axiovert)으로 관찰하였다. 망막혈관의 이미지는 자이스 엑시오캠(Axiovision ver. 3.0)으로 촬영하였다.

[0111] 실험결과

[0112] 6H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-5,12-디온 유도체를 반응식 1과 같이 합성하였다. 알코올 내 메틸요오드의 존재 하에서, α-시아노티오아세트아마이드(α-cyanothioacetamide) (1)를 메틸-2-시아토에타니미도티오에이트(2)로 전환하고, 이어 고리화 반응으로 화합물 3을 생성하였다. 포타슘 카보네이트의 존재 하에서, 시아노메틸퀴놀리온 (3)을 메틸 2-클로로-5-니트로벤조에이트와 반응시켜 최종적으로 6H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-5,12-디온 유도체(4)를 생성하였다.

[0113] [반응식 1]

[0114] 6H-이소퀴놀리노[2,3-a]퀴나졸린-5,12-디온 유도체의 합성 과정



[0115]

[0116] (시약 및 조건: a)소듐, 에탄올 및 메틸요오드, 실온, 12시간; b) 2-아미노-5-(트리플루오로메톡시)벤조산 및 에탄올, 환류, 10시간; c) 메틸 2-클로로-5-니트로벤조에이트, K₂CO₃ 및 다이메틸폼아마이드, 환류, 12시간)

[0117] 제브라피쉬 모델에서 상기 합성된 화합물들의 인 비보 혈관염색을 평가하였다. 제브라피쉬는 체외수정 시부터 성체 초반 시까지 육안 상 투명하며, 또한 혈관계가 잘 밝혀져 있고, 많은 항-혈관신생 의약들이 포유류 혈관계에서의 반응과 유사한 반응을 유도한다^[4, 9]. 따라서 제브라피쉬 모델은 인 비보 혈관 모니터링 또는 연구를 함에 있어 탁월한 기회를 제공한다. 최근 본 발명자들은 제브라피쉬 모델에서 소분자 스크리닝의 가능성을 입증하였으며 지방 소립(lipid droplet)의 염색에 관하여 언급하였다^[10]. 이 연구에서는 특이적으로 제브라피쉬의 혈관을 보여주는 소분자를 탐색하였다. 제브라피쉬 배아를 여러 농도의 화합물에 노출시키고 그의 영향을 형광입체현미경으로 기록하였으며, 그 결과를 표 1에 나타내었다. Blood Vessel Green (BVG)로 명명된 화합물 4f는 그의 시리즈 화합물들 중에서 가장 우수한 콘트라스트 혈관 이미지를 나타내었다.

표 1

화합물	구조	이미징 강도
화합물 4a		+++
화합물 4b		약함
화합물 4c		약함
화합물 4d		약함
화합물 4e		++++ (독성)
화합물 4f		++++

[0119] 상기 표 1에서 확인할 수 있듯이, Blood Vessel Green (BVG)로 명명된 화합물 4f는 시리즈 화합물들 중에서 가장 우수한 콘트라스트 혈관 이미지를 나타내었다. 또한, 화합물 4a 및 4e도 우수한 혈관 이미지를 생성하였

으며, 화합물 4e는 배아에 독성이 있는 것으로 분석되었다. 한편, 화합물 4b, 4c 및 4d도 혈관 이미지를 생성 하였으나, 화합물 4f 보다는 열악한 이미지를 생성하였다.

- [0120] 이어 의약 스크리닝을 위한 BVG의 혈관염색 능력을 측정하였다.
- [0121] BVG의 인 비보 이미징 능력을 완벽히 입증하기 위하여, 제브라피쉬 배아의 혈관구조를 시각화하였다. 제브라 피쉬의 혈관생성은 중배엽으로부터의 혈관모세포 분화를 포함하고, 그 다음 분화과정인 혈관시원세포 (angioblasts)와 내피세포의 분화도 포함한다^[11]. hpf 24까지, 단순 혈액순환 고리는 등대동맥(DA)과 축정맥 (AV)으로 구성되며, 혈액은 난황낭을 순환한다. 여러 단계의 발달과정에서 BVG (10 μ M)를 15분간 처리한 후 세척하였다. BVG 혈관염색은 dpf 2에서 했을 때 가장 선명하게 염색되었으나, hpf 36 또는 더 이른 시간에 염 색시에는 표시가 명확하지 않았다. BVG의 용량 및 시간을 정하기 위하여, hpf 52 제브라피쉬 배아의 난수(egg water)에서 제브라피쉬 배아를 BVG에 1, 5 및 10 μ M의 농도에 노출시켰다. BVG에 노출시키고 15, 30 및 60분 이 경과한 후, 이어 60분간 배아를 세척하였으며, BVG 5 μ M을 60분간 노출시킨 배아에서 육안으로 높은 형광 시그널이 감지되었다. BVG는 10 μ M까지는 15분동안 노출시 무독성을 나타냈으며(도 1), 제브라피쉬 배아에서 적어도 24시간 동안은 혈관유사구조가 관찰되었다(데이터 미기재).
- [0122] 제브라피쉬에 대한 상세한 고찰을 위해 dpf 2, dpf 3, dpf 4의 배아를 사용해 5 μ M BVG로 60분간 염색하였다 (도 2). BVG로 가장 먼저 염색된 혈관은 dpf 2 배아의 꼬리정맥, 등대동맥(DA), 눈 및 아치혈관(arch vessels)이었다(도 2a-c). dpf 3의 배아에서 새롭게 나타난 BVG 양성 혈관은 뒤뇌정맥(PCeV) 및 장하정맥 (SIV)이었다(도 2d-e). dpf 2에서 dpf 3까지, 발생중인 뇌와 가슴지느러미의 여러 혈관이 BVG로 염색되었다. 이러한 결과들에 기초하여, 본 발명자들은 BVG가 혈뇌장벽(Blood-brain barrier)의 발생유지 연구에 있어 유용 함을 제시한다.
- [0123] 본 발명자들은 BVG 염색을 기존의 미세혈관조영술과 비교하였다. 제브라피쉬 배아의 투명도는 현미경을 이용 한 실시간 혈류의 분석을 가능케한다. 미세혈관조영술은 혈관 구조 분석을 위해 형광 염료를 혈류 속에 주입 하여 실시한다^[12]. 그러나 앞서 지적한 바와 같이 혈관조영술은 전문지식과 장치를 필요로 한다. 제브라피쉬 의 한 가지 유용한 점은, 작은 가용성 분자가 배아의 중막내에 들어갈 수 있고, 현미경으로 표현형적 효과를 분석할 수 있다는 데 있다. 상기 BVG로 염색한 혈관 및 로다민-텍스트란으로 염색한 혈관의 구조를 혈관촬영도 로 비교하였다. dpf 3에는, BVG 염색은 정맥 (뒤주정맥 및 미정맥), 동맥 (등대동맥, 미동맥), 장하정맥 및 체절관혈관에서 관찰되었다. 도 3에서 보이는 바와 같이, 로다민-텍스트란 양성 혈관과 BVG 양성 혈관은 완벽 히 같은 위치에 존재했다.
- [0124] BVG 작용에 대한 통찰을 위해 본 발명자들은 두 가지 혈관계 세포종에서 시험을 실시하였다. 첫 번째로, 제브 라피쉬 배아에서 적혈구를 추출하고, 적혈구를 BVG로 염색하였다. 적혈구는 BVG로 염색되지 않았다 (도 4). 두 번째로, 미분화된 HUVEC 세포 및 분화된 HUVEC 세포에 BVG를 다양한 농도 및 시간으로 처리하였다. 이미 징 결과는, BVG는 두 가지 상태의 HUVEC 세포 모두 염색하지 않은 것으로 나타났다 (데이터 미기재). 또한, 형질전환 제브라피쉬 배아와 비교했을 때, BVG-양성 시그널은 내피세포를 포함한 혈관벽의 내부에서 관찰되었다 (도 5). BVG는 살아있는 제브라피쉬에서 유효하게 염색이 되었지만, 정확한 메커니즘은 아직 명백하게 밝혀지 지 않았고, 현재 연구가 진행 중이다.
- [0125] 많은 제브라피쉬 혈관은 혈관신생 스프라우팅으로부터 생성되었고, 포유류에서 혈관성장 시 필요한 단백질과 같 은 단백질을 필요로 하는 것으로 나타났다^[13]. 항-혈관신생 의약 탐색에서 BVG의 잠재성을 평가하기 위해, 항- VEGF 의약의 인 비보 스크리닝을 수행하였다. 이를 실시하기 위해, 대표적인 혈관내피 성장인자 수용체 (VEGFR) 억제제인 PTK787/ZK222584를 선택하였다. 장하정맥은 dpf 2와 dpf 3 사이에, 배아의 양쪽에 있는 난 황 배측면의 표면에 형성되었다. 상기 스크리닝을 위하여, “항 혈관신생 효과”란 신생혈관의 완전한 부재 또는 장하정맥의 측면 또는 배면 혈관의 손실로 정하였다^[14]. 제브라피쉬 배아를 1 μ M PTK787/ZK222584에 dpf 2부터 dpf 3까지 노출시켰다. 예상한 바와 같이, PTK787/ZK222584는 완벽히 장하정맥의 형성을 방해하였 고, 따라서 PTK787/ZK222584를 처리하지 않은 대조군과 비교했을 때 BVG로 표시되지 않았다(도 6).
- [0126] 상기 결과를 포유동물의 혈관에 적용시키기 위해, 래트의 망막 혈관 염색을 실시하였다. 래트를 마취시킨 후, BVG 4 mg/kg을 좌심실에 주입하였다. 5분 경과 후, 깊게 마취된 래트의 눈을 적출하였다. 망막 조직은 고정 과정 없이 각막과 수정체를 제거한 후 플루오르세인 현미경에서 관찰하였다. BVG에 의해 양성 형광 시그널이

나타나는 망막 혈관이, 양쪽 망막표면(도 7a)과 망막내부(도 7b)에서 확연히 관찰되었으며, 다른 세포 및 조직 염색은 관찰되지 않았다. 또한 BVG 양성 혈관은 흥미롭게도 작은 망막혈관 예컨대, 망막 모세혈관에서 발견되었다(도 7c, 도 7d). 이러한 결과들에 기초하여, 본 발명자들은 BVG가 맥락막 신혈관형성(CNV), 습성 연령 관련 황반 변성(AMD) 및 당뇨병성 망막증의 의약 스크리닝에 있어 비정상적인 혈관 마커의 연구에 유용할 것이라 제안한다.

[0127] 결론적으로, 본 발명자들은 혈관 이미징을 위해 새로운 소분자 프로브를 동정하였다. 상기 신규한 프로브를 BVG 라 명했으며, BVG는 포유동물 뿐 아니라 살아있는 제브라피쉬의 혈관을 염색하였다. 또한 BVG는, 예컨대 VEGFR 억제제를 의약 스크리닝의 마커로 이용하는 경우와 같이, 의약 스크리닝에 있어 혈관신생 마커로서 사용될 수 있다.

[0128] **참조문헌**

[0129] [1] T. Terai, T. Nagano, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 515-521.

[0130] [2] M. Vendrell, J.-S. Lee, Y.-T. Chang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 383-389.

[0131] [3] J. Choi, L. Dong, J. Ahn, D. Dao, M. Hammerschmidt, J. N. Chen, *Dev. Biol.* **2007**, *304*, 735744.

[0132] [4] S. Isogai, M. Horiguchi, B. M. Weinstein, *Dev. Biol.* **2001**, *230*, 278-301.

[0133] [5] Y. Li, Y. Song, L. Zhao, G. Gaidosh, A. M. Laties, R. Wen, *Nature Protocols* **2008**, *3*, 1703-1708.

[0134] [6] M. S. O' Reilly, T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W. S. Lane, E. Flynn, J. R. Birkhead, B. R. Olsen, J. Folkman, *Cell* **1997**, *88*, 277285.

[0135] [7] B. R. Zetter, *Annu. Rev. Med.* **1998**, *49*, 407-424.

[0136] [8] M. Montero-Balaguer, K. Swirsding, F. Orsenigo, F. Cotelli, M. Mione, E. Dejana, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5772.

[0137] [9] U. Langheinrich, *Bio Essays* **2003**, *25*, 904-912.

[0138] [10] J. H. Lee, J.-H. So, J. H. Jeon, E. B. Choi, Y.-R. Lee, Y.-T. Chang, C.-H. Kim, M. A. Bae, J. H. Ahn, *Chem. Comm.* **2011**, 47,7500.

[0139] [11] B. Fouquet, B. M. Weinstein, F. C. Serluca, M. C. Fishman, *Dev. Biol.* **1997**, *183*, 37-48.

[0140] [12] B. M. Weinstein, D. L. Stemple, W. Driever, M. C. Fishman, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1143-1147.

[0141] [13] J. Chan, P. E. Bayliss, J. M. Wood, T. M. Roberts, *Cancer Cell* **2002**, *1*, 257267.

[0142] [14] G. N. Serbedzija, E. Flynn, C. E. Willett, *Angiogenesis* **1999**, *3*, 353359.

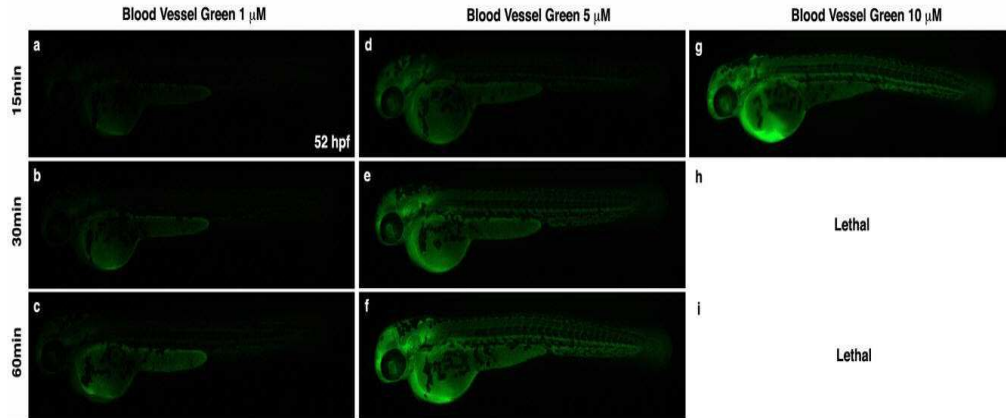
[0143] [15] M. Westerfield, *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish*, Inst Of NeuroScience, 1994.

[0144] [16] D. G. Ransom, P. Haffter, J. Odenthal, A. Brownlie, E. Vogelsang, R. N. Kelsh, M. Brand, F. Van Eeden, M. Furutani-Seiki, M. Granato, et al., *Development* **1996**, *123*, 311.

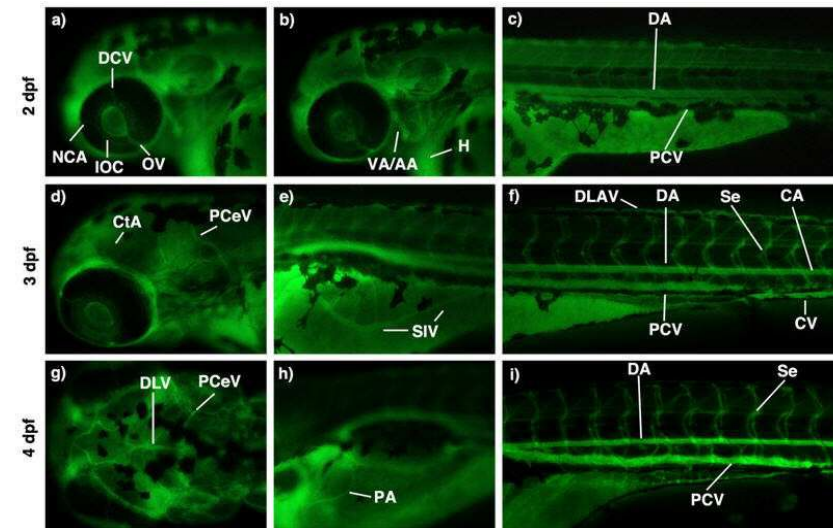
[0145] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

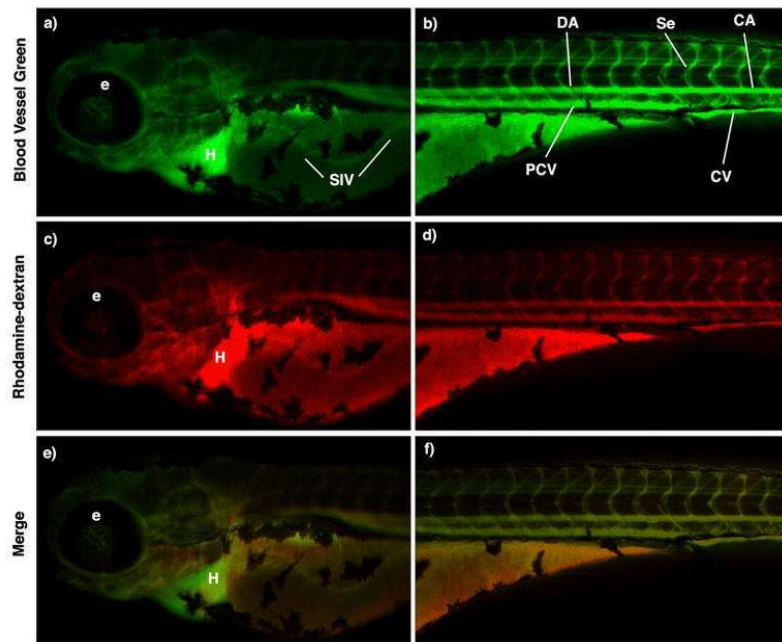
도면1



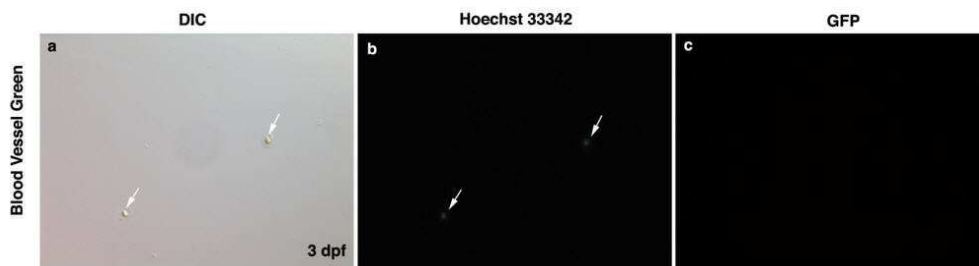
도면2



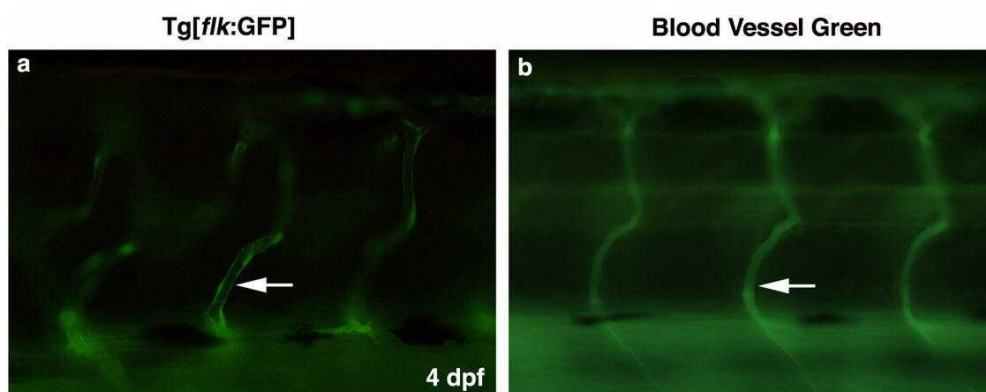
도면3



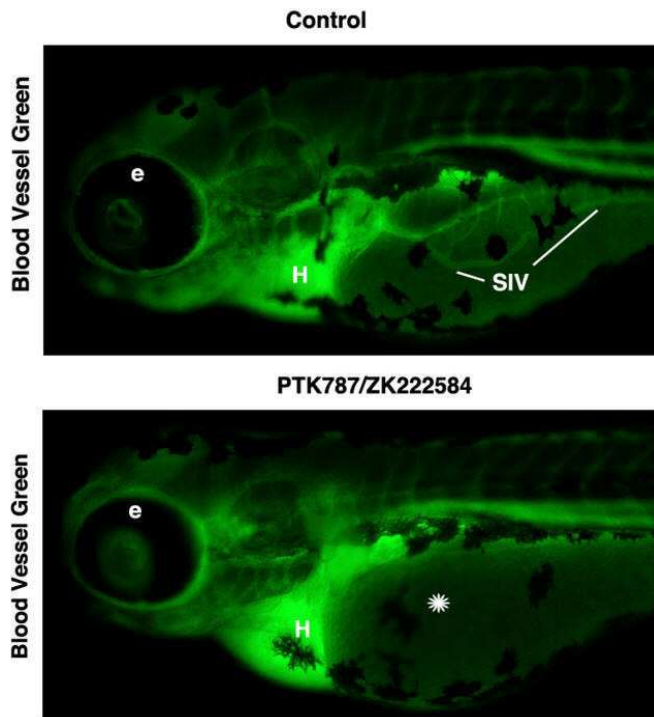
도면4



도면5



도면6



도면7

