



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년08월31일
(11) 등록번호 10-0979276
(24) 등록일자 2010년08월25일

(51) Int. Cl.
A61K 31/4375 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7010948
(22) 출원일자(국제출원일자) 2004년11월05일
심사청구일자 2009년08월17일
(85) 번역문제출일자 2006년06월02일
(65) 공개번호 10-2006-0130058
(43) 공개일자 2006년12월18일
(86) 국제출원번호 PCT/FR2004/002858
(87) 국제공개번호 WO 2005/046672
국제공개일자 2005년05월26일
(30) 우선권주장
0313134 2003년11월07일 프랑스(FR)
(56) 선행기술조사문헌
Glycobiology 13(10), pp. 93R-104R(2003. 10. 31)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
상프르 나쇼날 드 라 리쉴르쉬 샹띠피끄 (제엔알 에스)
프랑스, 에프-75794 파리, 세텍스 16, 튀 미셀-앙즈 3
유니베르시테 드 포이티르
프랑스 에프-86034 포이티르 세데 튀 드 르호텔 드 15
(72) 발명자
백 프레드릭
프랑스 에프-86280 포이티르 루트 드 리귀제 86
노레즈 캐롤라인
프랑스 에프-69800 세인트 프레스트 튀 헥토르 베를리로즈 24
(74) 대리인
이은선, 최규팔

전체 청구항 수 : 총 4 항

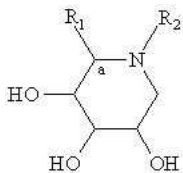
심사관 : 김용

(54) 글루코시다제 억제제를 포함하는 양성 섬유증 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 뮤코비시도시스를 치료하는데 사용된 의학의 제조를 위한, 화학식 (I)의 화합물 중에서 선택된 글루코시다제 억제제의 용도에 관한 것이다:

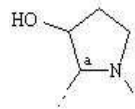
[화학식 I]



상기 식에서,

R₁ 은 CH₃, 또는 CH₂OH 그룹을 나타내며,

R₂ 는 H 또는 탄소 원자 1 내지 5개인 알킬 그룹을 나타내거나,

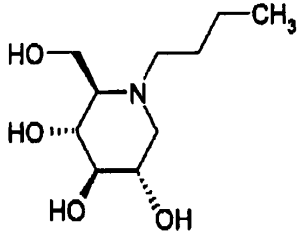


R₁ 및 R₂ 는 위치(a)의 탄소와 상기 화학식(I)의 질소와 함께 의 그룹을 형성한다.

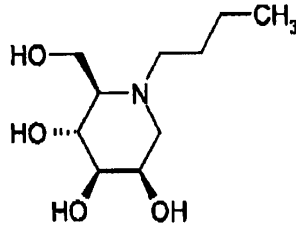
특허청구의 범위

청구항 1

다음 화학식 중에서 선택되는 구조를 갖는 글루코시다제 억제제를 포함하는 낭성 섬유증 치료용 약제학적 조성물:



NB-DNJ (N-부틸-테옥시노지리마이신)



NB-DMJ (N-부틸-테옥시만노지리마이신)

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 글루코시다제 억제제가 NB-DNJ 화합물인 약제학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 글루코시다제 억제제가 시럽, 현탁액, 젤라틴 캡슐, 정제, 분말 또는 과립의 투여형으로 경구 투여, 좌제의 투여형으로 직장 투여, 또는 흡입에 의한 에어로졸 또는 드롭스의 투여형으로 비강 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 글루코시다제 억제제가 성인에 대해 1일 활성 성분 1 mg 내지 2 g, 또는 어린이 및 유아에 대해 활성 성분 1일 1 mg 내지 1 g의 비율로 1회 이상의 용량으로 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 뮤코비시도시스의 치료를 위한 의약 제조용으로 글루코시다제 억제제의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 뮤코비시도시스(CF: 낭성 섬유증)은 유럽인과 북미인 중에 가장 널리 퍼진 치명적인, 상염색체 퇴행성 유전 질환이다. CF 유전자(locus 7q31)는 CFTR(낭성 섬유증 막통과 전도도 조절제)이라 칭하는 막통과 단백질을 코딩한다(Tsui et al., 1985; Riordan et al., 1989). CF 유전자의 변이는 폐, 땀샘, 창자 및 외분비 땀샘과 같은 다양한 기관의 세포막을 통한 물과 전해질의 비정상적인 이동을 야기한다. 1000개 이상의 CFTR 단백질 변이체가 존재하지만, 가장 빈번한 변이체(환자의 70%)는 위치 508에서 NBF1 도메인 내 페닐알라닌의 결핍(delF508)이다. CF 환자 사망의 주요 원인은 이러한 결핍에 연관되어 있으며 감염 또는 점액 점도의 증가에 의해 야기된 폐 기능 부족을 유발한다. 이러한 점도는 기도의 폐색을 유발하고 기회 박테리아에 의한 감염 위험을 증가시킨다. 더구나 소화 시스템과 특정 땀샘 시스템에서 악화가 알려져 있다(땀샘 기능저하 환자). CFTR 단백질은 ABC 막 전달체 슈퍼패밀리에 속한, 1480 아미노산의 당단백질이다. CFTR은 건강한 개인의 폐 상피 세포의 정단(apical) 플라즈믹 막에 위치한 염화물 채널이다. CFTR은 물과 전해질의 상피 통과 이동 원인이며 건강한 개인에서 폐 기도의 수화를 가능하게 한다. CF 환자에서, 이 단백질은 세포질 세망(ER)에 보유되어 있는 단백질의 부정확한 어드레싱(addressing) 때문에 플라즈믹 막으로부터 결핍되어 있다. 폐 기도의 수화는 이 경우에 더 이상 작용하지 않는다. delF508 결핍은 NBF1 도메인의 폴딩(folding)을 상하게 하여 단백질의 완전한 성숙을 막고 따라서 그의 생합성 중에 매우 일찍 분해된다. 그러나, delF508 단백질이 막에 도달하면, 이 단백질은 염화물 채널로서 작용한다. 따라서 이 질환의 치료에 대한 키 중 하나는 delF508의 세포막 쪽으로 재어드레싱(re-addressing)이다. 막에서 일단, delF508 이동 활성화는 내생적 또는 외생적 생리학적 작용제에 의해 자극될 수 있다.

[0003] CFTR 단백질을 어드레싱하는 메카니즘은 다음과 같이 실행된다. CFTR 단백질의 네오신서시스(neosynthesis) 후에, 이 단백질은 글리코실 트랜스퍼라제에 의해 다양한 글리코실화 반응을 수행하는 ER 루멘에서 발견된다. 이 단백질은 특히 3 N-연결 글루코스 및 1 N-연결 만노스와 함께 발견된다. 2개의 글루코스를 글루코시다제 I 및 II에 의해 제거한다. 종속 칼슘 샤프론(chaperon)인, 칼넥신 또는 칼레티쿨린은 모노글루코실화 단백질을 인식하여 N-연결 글루코스에 의해 후자에 결합한다. 이들 샤프론은 ER에 존재한 서로 다른 CFTR 단백질이 함께 응집되는 것을 방지하여 ER_p57과 같은 다른 샤프론의 결합을 가능하게 한다. 이와 같이 형성된 CFTR/칼넥신/ER_p57 복합체는 CFTR의 폴딩을 가능하게 한다. 그 후, 글루코시다제 II는 잔류 글루코스를 제거하며, 따라서 CFTR을 샤프론으로부터 유리한다. 폴딩이 부정확하면, 글루코실-트랜스퍼라제는 글루코스를 CFTR에 가하며 이 CFTR은 일단 그것이 잘 폴딩될 때까지 1 회 이상의 사이클을 다시 수행할 수 있다. 폴딩이 아직도 부정확한 경우, 만노시다제는 N-연결 만노스를 제거하며, 이 단백질은 그후 시토솔(cytosol)로 트랜스로콘(translocon) 채널 복합체에 의해 이동될 것이며, 여기서 분해될 수 있다(Ellagrd & Helenius, 2003). 이러한 현상은 CFTR-WT의 80% 및 delF508-CFTR의 99% 관찰된다. 일단 시토솔에서, 단백질은 Hsp70, Hsp90 또는 Hdj-2와 같은 다른 샤프론에 의해 도움을 받는다. 이들 샤프론은 유비퀴틴(ubiquitin)이 CFTR에 결합되게 한다. 이와 같이 표지되어, CFTR은 ATP-의존성인 26S 프로테아솜(proteasome) 복합체에 의해 인식되고 분해된다(Gelman et al., 2002). CFTR의 폴딩이 세망 조절 메카니즘에 의해 정확하다고 생각되면, 단백질이 골지체에 도달할 수 있다. 이것은 만노스에 의해 CFTR에 결합하는 "카argo"(cargo) 단백질 ERGIC-53(레시틴류에 속함)에 의해 도움을 받는다. ERGIC의 통과는 인자 COPI에 의해 형성된 소낭에 의해 일어난다(Ellagrd & Helenius, 2003). 단백질이 좋지 않게 폴딩되면, 골지체의 엔도글루코시다제 H에 과민하며(Cheng et al., 1990) 그 후 단백질이 분해되는 세망으로 되돌아가는 것 같다. 다른 한편, 엔도글루코시다제 H에 내성이 있는, 빠르게 폴딩된 단백질은 인자 VIP 36(ERGIC-53의 동족체)에 의해 도움을 받고 정단 막에 전달된다(Fiedler & Simons, 1995).

[0004] 글루코시다제 억제제, 카스타노스퍼민이 폐 상피 세포의 표면에서 delF508의 존재 재생에 효과가 있다고 이미

관찰되었지만(Wei et al., 1996), 다른 한편 이 화합물이 delF508의 막 어드레싱을 복원할 뿐만 아니라, delF508이 이온 전달체로서 작용하게 할 수 있었다. 따라서 이 논문의 저자는 낭성 섬유증의 치료 체계 내에서 이 화합물의 가능한 용도에 대한 가설을 체계적으로 세우지 않았다.

[0005] 본 발명자들은 글루코시다제 억제제가 delF508의 정확하고 특이한 어드레싱을 모두 보장하나 그의 이온 이동 활성 또는 세포 생활력에 영향을 끼치지 않을 수 있었는지 측정하기 위해 이들 억제제를 예의 연구하였다.

[0006] N-부틸-데옥시노지리마이신(NB-DNJ)은 세포질 세망의 글루코시다제 I 및 II 억제제이며, 이것은 처음에 인간을 위한 항바이러스 분자로서 개발되었다. 이들 효소의 억제는 HIV 바이러스(인간 면역결핍 바이러스)의 엔빌롭(envelope)의 당단백질의 폴딩을 바꾸며 그 결과, 바이러스 사이클이 차단된다고 알려졌다(Platt et al., 2001). NB-DNJ를 사용한 치료는 후천성 면역결핍 증후군에 걸린 환자에 대해 평가되었고; 이 분자는 내성이 좋고 심지어 고농도(2 mM)에서 배양체 내 조직상에 세포독성이 없다. 더구나, 이들 임상 시험은 NB-DNJ가 또한 글루코실트란스퍼라제에 대해 억제 효과가 있었다는 것을 나타냈다. 이것이 또한 OGT 918로 명명된, 이 분자가 고체 질환의 치료에서 연구한 이유이다(Dwek et al., 2000, Cox et al., 2000). 이 유전자 질환은 리포솜 효소, β -글루코세레브로시다제의 결함에 의해 야기되며, 이 효소는 글루코세레브로시드(효소 기질)의 축적을 유발한다. NB-DNJ, 글루코세레브로시드의 생합성에 연관된 글루코실트란스퍼라제 억제제는 따라서 이들의 합성과 축적을 방지한다(Dwek et al., 2000, Cox et al., 2000). NB-DNJ는 2002년에 Zavesca®의 상품명 하에 고체 질환용 의약으로서 시판 허가되었다.

[0007] 본 발명은 NB-DNJ, 및 다른 글루코시다제 억제제가 일반적으로 다른 염화물 채널을 변경하지 않고 delF508의 막 어드레싱을 복구할 수 있으며, delF508이이온 전달체로서 작용하게 한다는 사실에 대한 본 발명자들에 의한 논증으로부터 얻는다.

발명의 상세한 설명

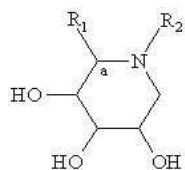
[0008] 본 발명의 과제는 낭성 섬유증의 치료를 위한 의약의 제조용으로 글루코시다제 억제 화합물의 용도이다.

[0009] "글루코시다제 억제제"란 특히 문헌[Platt et al., 1994]에 기재된 방법에 따라 글루코시다제의 억제가 측정될 수 있는, 글루코시다제 I 및/또는 II 억제제를 의미한다.

[0010] 더 구체적으로, 본 발명의 과제는 글루코시다제-억제 화합물의 상기에 언급된 용도이며, 이 화합물은 다른 염화물 채널을 변경하지 않고 delF508의 막 어드레싱을 복구할 수 있으며, delF508이 특히 결실 delF508에 대한 인간의 동종접합 폐 상피 CF15 세포에 수행된 이후 설명된 실험의 체계 내에서, 이온 전달체로서 작용하게 하는 화합물들 중에서 선택된다.

[0011] 더 구체적으로, 본 발명의 과제는 하기 화학식(I)의 화합물로부터 선택된 글루코시다제 억제 화합물의 상기 언급된 용도이다:

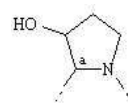
[0012] [화학식 I]



[0013] 상기 식에서,
[0014]

[0015] R₁ 은 CH₃, 또는 CH₂OH 그룹을 나타내며,

[0016] R₂ 는 H 또는 탄소 원자 1 내지 5개인 알킬 그룹을 나타내거나,



[0017] R₁ 및 R₂ 는 위치(a)의 탄소와 상기 화학식(I)의 질소와 함께 의 그룹을 형성한다.

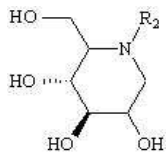
[0018] 더 구체적으로, 본 발명은 다음 화학식(I)의 화합물의 상기에 언급된 용도에 관한 것이다:

[0019]

DNJ(데옥시노지리마이신)	DFJ(데옥시푸코노지리마이신)	DMJ(데옥시만노지리마이신)
DGJ(데옥시갈락토노지리마이신)	NB-DNJ(N-부틸-데옥시노지리마이신)	
NB-DGJ(N-부틸-데옥시갈락토노지리마이신)	카스타노스페민	

[0020] 더 구체적으로, 본 발명은 하기 화학식(II)의 화합물 중에서 선택된 글루코시다제 억제제의 상기에 언급된 용도에 관한 것이다:

[0021] [화학식 II]



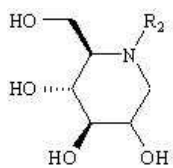
[0022]

상기 식에서,

[0024] R₂ 는 H 또는 탄소 원자 1 내지 5개인 알킬 그룹을 나타낸다.

[0025] 더 구체적으로, 본 발명의 과제는 다음 화학식(IIa)의 화합물 중에서 선택된, 상기 정의된 글루코시다제 억제제의 상기에 언급된 용도이다:

[0026] [화학식 IIa]

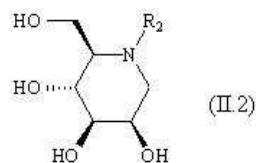
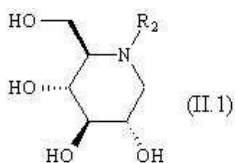


[0027]

상기 식에서,

[0029] R₂ 는 H 또는 탄소 원자 1 내지 5개인 알킬 그룹을 나타낸다.

[0030] 본 발명의 과제는 또한 다음 화학식 (II.1) 또는 (II.2)의 화합물 중에서 선택된, 특허청구범위 제 1 내지 4 항 중 하나에 따른 글루코시다제 억제제의 상기에 언급된 용도이다:



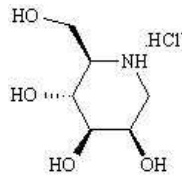
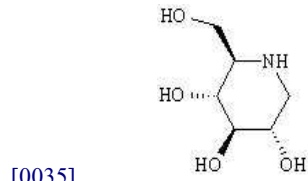
[0031]

상기 식에서,

[0032]

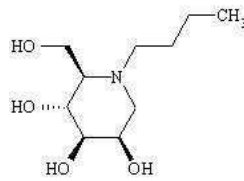
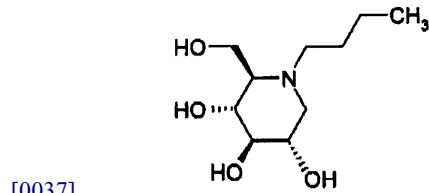
[0033] R₂ 는 H 또는 탄소 원자 1 내지 5개인 알킬 그룹을 나타낸다.

[0034] 더 구체적으로 본 발명은 R₂ 가 H 또는 다음 N-부틸 그룹을 나타내는 상기에 정의한 화학식 (II.1) 또는 (II.2)의 화합물의 상기 언급된 용도에 관한 것이다:



[0036] DNJ(데옥시노지리마이신)

DMJ(데옥시만노지리마이신)



[0038] NB-DNJ(N-부틸-데옥시노지리마이신) NB-DMJ(N-부틸-데옥시만노지리마이신)

[0039] 바람직하게는, 본 발명의 체계 내에서 사용된 화합물은 NB-DNJ와 NB-DMJ이다.

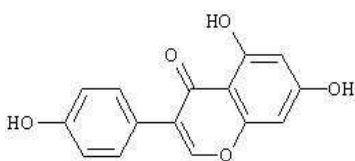
[0040] 바람직하게는, 또한 본 발명의 체계 내에서 사용된 화합물은 NB-DNJ이다.

[0041] 본 발명의 과제는 또한 경구(시럽, 현탁액, 젤라틴 캡슐, 정제, 분말 또는 과립), 직장(좌제), 비강 경로(흡입에 의한 에어로졸, 또는 드롭스)에 의해, 특히 성인에 대해 1일당 활성 성분 약 1 mg 내지 2 g, 또는 어린이 및 유아에 대해 1일당 1 mg 내지 1 g의 비율로 1회 이상의 용량으로 투여될 수 있는 의약의 제조를 위한, 상기에 정의한 글루코시다제 억제 화합물의 상기 언급된 용도이다.

[0042] 본 발명은 또한 CFTR 채널 활성화 화합물과 조합하여 상기에 정의한 글루코시다제 억제 화합물의 상기 언급된 용도에 관한 것이다.

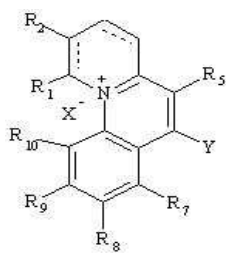
[0043] 따라서 본 발명의 과제는 더 구체적으로 다음 화합물 중에서 선택된 CFTR 채널 활성화 화합물과 조합하여 상기에 정의한 글루코시다제 억제 화합물의 상기 언급된 용도이다:

[0044] - 다음 식의 케니스타인:



[0045]

[0046] - 또는 다음 화학식(II)의 벤조[c] 퀴놀리지늄의 유도체:



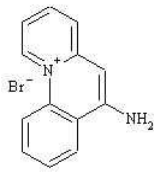
[0047] (II)

[0048] 상기 식에서,

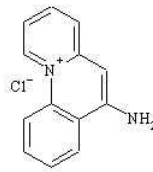
[0049] - R₁ 및 R₂ 는 수소 원자를 나타내거나, C₁ 및 C₂ 와 조합하여 탄소 원자 6개인 방향족 환을 형성하며,

- [0050] - R₅ 는 수소 원자, 또는 탄소 원자 1 내지 10개인 직쇄 또는 치환된 알킬 그룹, 특히 부틸 그룹, 또는 식 COOR'의 에스테르를 나타내고, 여기서 R'은 탄소 원자 1 내지 10개인 직쇄 또는 치환된 알킬 그룹, 특히 에틸 그룹을 나타내며,
- [0051] - Y는 -OH, -SH, -NH₂, 또는 -NHC(=O)CH₃ 그룹을 나타내고,
- [0052] - R₇, R₈, R₉ 및 R₁₀ 은 수소 원자를 나타내거나, 적어도 하나의 R₇, R₈, R₉ 또는 R₁₀ 은 할로젠 원자, 특히, 염소, 브롬 또는 불소 원자를 나타내며,
- [0053] - X는 음이온 형태의 할로젠, 특히 브롬 Br⁻, 또는 염소 Cl⁻ 원자, 또는 음이온 형태의 원자의 그룹을 나타낸다.
- [0054] 더 구체적으로, 본 발명의 과제는 다음 화합물 중에서 선택된 화학식 (II)의 벤조[c] 퀴놀리진륨의 유도체와 조합하여 상기에 정의한 글루코시다제 억제 화합물의 상기 언급된 용도이다:

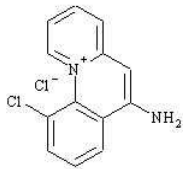
화합물 13 (MPB-01)



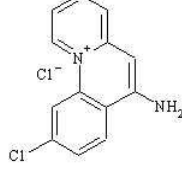
화합물 11 (MPB-26)



화합물 14 (MPB-02)

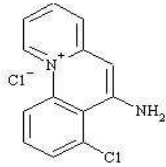


화합물 15 (MPB-03)

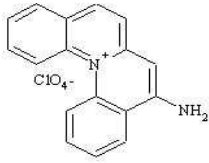


[0055]

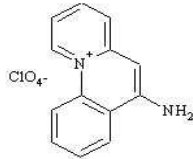
화합물 16



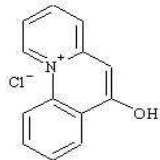
화합물 22



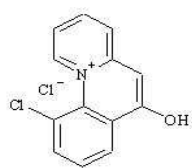
화합물 24



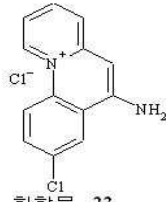
화합물 12 (MPB-05)



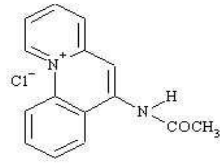
화합물 19 (MPB-07)



화합물 17



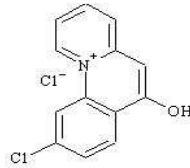
화합물 23



화합물 18 (MPB-06)

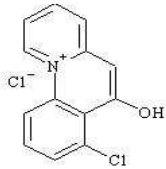


화합물 20 (MPB-08)

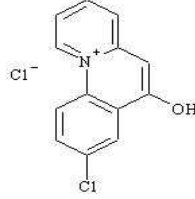


[0056]

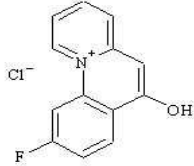
화합물 21 (MPB-27)



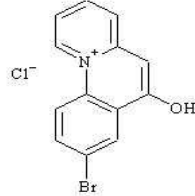
화합물 125 (MPB-30)



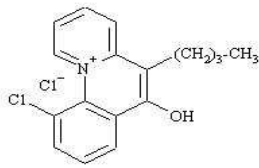
화합물 26 (MPB-29)



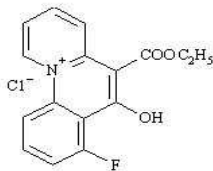
화합물 127 (MPB-32)



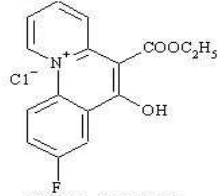
화합물 MPB-91



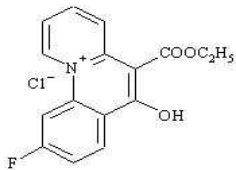
화합물 MPB 73



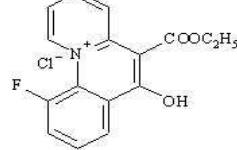
화합물 MPB 75



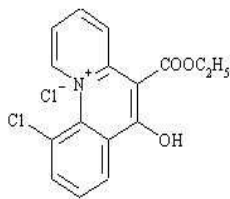
화합물 MPB 86



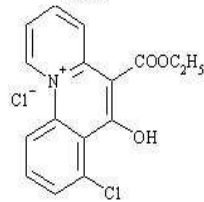
화합물 MPB 77



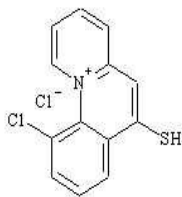
화합물 MPB 87



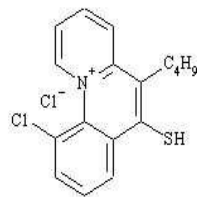
화합물 MPB 88



화합물 MPB 102



화합물 MPB 103



[0057]

[0058]

[0059]

본 발명의 과제는 또한 낭성 섬유증 치료에서 동시 또는 분리 사용 또는 경시 확산용(use spread over time)을 위한 배합 제품으로서, 적어도 하나의 글루코시다제 억제 화합물, 특히 상기에 정의한 화학식 (I) 또는 (II)의

화합물, 및 상기에 정의한 적어도 하나의 CFTR 채널 활성화 화합물을 포함하는 제품이다.

[0060] 본 발명은 NB-DNJ에 의한 de1F508의 정확하고 특이한 어드레싱의 효과에 대한 실험적인 논증에 따르는 상세한 설명에 의해 추가로 예시되나, 후자는 그의 이온 이동 활성 또는 세포 생활력에 영향이 없다.

실시예

[0073] I) 물질 및 방법

[0074] M1. 세포 배양

[0075] CHO-WT 세포: CHO(중국산 햄스터 난소) 세포는 야생형 CFTR 유전자(CFTR-WT)로 형질전환된 섬유모세포이다. 따라서 이들 세포는 CFTR 단백질을 과도 발현할 것이다.

[0076] 배양 배지: MEM 알파 배지(GIBCO) + 7% 소태아 혈청 + 0.5% 페니실린/스트렙토마이신 + 100 μM의 메토프렉세이트(Amethopterin, Sigma)

[0077] CF15 세포: CF15 세포는 ΔF508-CFTR 유전자를 발현하는 코 기원의 인간 상피 세포이다.

[0078] 배양 배지: DMEM 배지 + HAM F12 + 10% FCS + 0.6% 페니실린/스트렙토마이신 + 성장 인자(인슐린 5 μg/ml, 트란스페린 5 μg/ml, 에피네프린 5.5 μM, 아데닌 0.18 mM, EGF 10 ng/ml, T3 2 nM, 히드로코르티손 1.1 μM)

[0079] Calu-3 세포: Calu-3 세포는 야생형 CFTR 유전자를 발현하는 폐 기원의 인간 상피 세포이다.

[0080] 배양 배지: DMEM 배지/글루타맥스와 F12 + 7% 소태아 혈청 + 1% 페니실린/스트렙토마이신

[0081] M2. 면역표지

[0082] 면역표지로 Cy3 형광단으로 표지된 항-CFTR 일차 항체(Ab) 그 후 일차 항-항체 이차 항체에 의해 CFTR 단백질의 세포 위치를 시각화할 수 있다. 세포를 미리 적합한 배양 배지에서 층 위에 접종한다. TBS(NaCl: 157 mM, 트리스 베이스: 20 μM, pH 7.4)로서 3회 세척을 각각 5분간 수행한다. 그 후 TBS-파라포름알데히드(3%)를 20분에 걸쳐 첨가하여 세포를 고정한다. TBS로서 3회 세척(5분)한 후, 세포막에 흡을 형성하게 하는, 0.1% TBS-트리톤(10분)과 함께 세포를 배양한 다음, 세포를 0.5% TBS-BSA-0.05% 사포닌과 함께 1 시간 접합하기(bringing) 전에, TBS에 의한 3회 세척을 다시 한번 수행한다. 그 후 세포를 CFTR 항-C 말단 일차 항체(2 μg/ml)에 의해 1 시간 배양한다. CAM-cy3 이차 항체(1/400)에 의해 1 시간 배양하기 전에 TBS-BSA-사포닌에 의한 3회 세척을 각각 5 분간 수행한다. TBS에 의해 2회 5분간 세척에 이어서, Topro3(1/1000)에 의해 5분간 배양하여 핵을 표지한다. 끝으로, TBS에 의한 3회의 최종 5분 세척 후 슬라이드상에 층을 고정할 수 있다. 적합한 파장에서 레이저에 의한 여기에 의해 공초점 현미경(Bio-Rad)으로 슬라이드를 관찰한다. Cy3과 Topro3을 식별하기 위해 Topro3의 형광색 표지를 청색(핵의 색상)으로 변경하였다.

[0083] M3. 방사성 추적자 유출물

[0084] 세포에서 염화 이온 이동은 방사활성 요오드화 유출물 기술을 이용하여 측정하였다(Becq et al., 1999; Dormer et al., 2001). 추적자(¹²⁵I)를 세포 내 배지로 혼합한다. 그 후, 다른 약리제를 첨가한 후 세포를 나오는 방사성 추적자의 양을 계수한다. 염화 이온 이동의 추적자로서 요오드화물을 사용한다. 염화물 채널의 활성을 측정하기 위한 대등물로서 2개의 방사성 추적자 ¹²⁵I 및 ³⁶Cl이 생각될 수 있음이 밝혀졌다(Venglarick et al., 1990). 더구나 ¹²⁵I는 ³⁵Cl의 수명과 비교하여 짧은 수명을 가진다는 장점이 있다(각각 반감기: 30 일 및 300,000 년). 세포를 적합한 배지에서 24-웰 플레이트 상에 배양한다. 무질서 방식으로 방사능을 방출하는 죽은 세포를 제거하기 위해 유출물 배지(NaCl: 136.6 mM, KCl: 5.4 mM, KH₂PO₄: 0.3 mM, NaH₂PO₄: 0.3 mM, NaHCO₃: 4.2 mM, CaCl₂: 1.3 mM, MgCl₂: 0.5 mM, MgSO₄: 0.4 mM, HEPES: 10 mM, D-글루코스: 5.6 mM)에 의해 2회 린스한다. 그 후, 500 μl의 충전(1 μCi/ml ¹²⁵Ina)에 의해 CHO-WT에 대해 30분간 또는 CF15와 Calu-3에 대해 1 시간 세포를 배양한다. 요오드화물은 세포막의 양면 상에 평형 상태로 있다. 로봇(MultiPROBE, Packard)으로 다음 단계를 수행한다: 세포의 방사능을 제거하기 위해 유출물 배지에 의해 충전 배지를 린스한다. 상등액을 매분 마다 용혈 튜브에 모으고 배지를 동일 부피(500 μl)로 대체한다. 처음 3 분 후 취한 샘플에 약물을 첨가하지 않고, 이들은 안정한 베이스 라인을 얻게 할 수 있으며, 이는 I⁻ 이온의 수동 퇴출(passive exit)을 특성으로 한다. 다음 7개 샘플을 시험 분자의 존재하에 얻는다. 실험 종료시에, 500 μl의 NaOH(0.1 N)/0.1% SDS(30

분)를 첨가하여 세포를 용해시키며, 따라서 세포 내에 남아 있는 방사능을 측정할 수 있다. 감마 카운터(Cobra II, Packard)를 이용하여 용혈 튜브에 존재한 방사능을 1분당 카운트(cpm)로 계수한다. cpm의 결과를 다음 식에 따라 방사성 요오드화물의 퇴출 속도(R)의 형태로 표시한다:

[0085]
$$R(\text{분}^{-1}) = [\ln(^{125}\text{I } t_1) - \ln(^{125}\text{I } t_2)] / (t_1 - t_2)$$

[0086] 여기서, $^{125}\text{I } t_1$: 시간 t_1 에서 cpm; $^{125}\text{I } t_2$: 시간 t_2 에서 cpm

[0087] 이 요오드화물 플로우의 곡선 형태로 표시된다. 시험 분자의 투여로 인한 요오드화물의 퇴출을 정량화하기 위해, 베이스 플로우를 뺄 수 있게 한 다음 상대 플로우를 계산한다: 상대 속도(분⁻¹) = R_{peak} - R_{basal}. 끝으로, 서로 다른 약물의 효과를 비교할 수 있도록 이들 결과를 표준화한다. 결과를 평균 +/- SEM의 형태로 나타낸다. 대조군과 약물의 효과를 비교하기 위해 스튜던츠 통계 시험(Student's statistical test)을 사용한다(P<0.01에 상응하는 값은 통계적으로 중요한 것으로 생각함).

[0088] M4. 세포 독성 시험

[0089] MTT 독성 시험은 MTT(황색 테트라졸륨 염)을 포르마잔(자주색)으로 대사작용하는 미토콘드리아 데히드로게나제의 능력을 기준으로 한 비색 시험이다. 그 후, 전환 염료의 농도에 비례하는, 흡광도를 분광 광도계에 의해 측정할 수 있다. 시험 시약의 존재하에 96-웰 플레이트상에 세포를 2 시간 배양한다. 3개의 대조군으로 수행한다: 100% 생존 세포: 시약 없는 세포; 0% 생존 세포: 개방 공기에 방치된 세포; 블랭크: 세포 없는 배지. 세포를 페놀 레드 없이 RPMI 배지로 린스하여 배지의 색상이 흡광도 측정으로 간섭되지 않는다. 그 후 이들을 4 시간 동안 MTT(0.5 mg/ml)로 보충된, 100 μl의 RPMI 용액으로 배양한다. 그 후 배지를 제거하고, 100 μl의 DMSO를 첨가하여 전환 염료(포르마잔)를 용해시킬 수 있게 한다. 570 nm(자주색); 630 nm(바탕 잡음)에서 분광 광도계에 의해 흡광도를 측정한다. 바탕 잡음을 제거하기 위해, 다음 계산을 수행한다: OD_{real} = OD_{570nm} - OD_{630nm}. 그 후, 결과를 대조군(100% 및 0% 생존 세포)에 관해 표준화하고 평균 +/- SEM의 형태로 나타낸다.

[0090] II) 결과

[0091] R1. CF15 세포에서 de1F508의 어드레싱에 대한 NB-DNJ의 효과

[0092] 결실 de1F508을 위해 동종접합 폐 인간 상피 CF15 세포에 대한 약리학, 세포 영상화, 생화학 및 전기생리학적 시험의 연구를 조합하여 실험실에서 de1F508-CFTR 단백질의 어드레싱 연구를 수행한다. CFTR의 어드레싱에 연관된 일정한 인자와 간섭할 수 있는 다른 분자가 존재한다. 이것은 글루코시다제 I 및 II 억제제이며 시험되었던 N-부틸-데옥시노지리마이신(NB-DNJ)에 의한 경우이다.

[0093] 각 실험에 대해, 각테일(포르스콜린 10 μM, 게니스타인 30 μM)을 첨가하면 CFTR의 활성화가 후자가 막 상에 있을 때 가능하게 된다. 따라서, de1F508의 어드레싱이 보존되면 요오드화 유출물을 관찰할 수 있다. 막대 그래프의 형태로 표시된, 결과를 기준 처리(2 시간에 걸쳐 250 μM MPB-91에 의한 세포의 처리)에 관해 표준화하였다. 왜냐하면 100% CFTR 활성이 존재하는지 고려하기 위해서이다. 37°C에서 2 시간에 걸쳐 CF15 세포에 대한 글루코시다제 억제제, N-부틸-데옥시노지리마이신(NB-DNJ)(구조는 하기에 제시함)로 처리하면 de1F508 단백질의 어드레싱을 보존하며 후자가 이온 전달체로서 작용하게 한다(도 1).

[0094] 세포 처리가 없으면, de1F508 단백질은 막을 형성하지 않으며 각테일(포르스콜린 10 μM, 게니스타인 30 μM)에 의해 자극된 요오드화 유출물이 없다. NB-DNJ의 EC₅₀(최대 유효도의 50%를 나타내는 분자의 농도)를 123 마이크로몰에서 측정하였다(도 2). 세포 영상화에 의해 NB-DNJ에 의한 처리 후 본 발명자들은 de1F508 단백질을 플라즈마 막 구획에 지정하였다.

[0095] R2. Calu-3 세포에서 CFTR의 활성화에 대한 NB-DNJ의 효과

[0096] NB-DNJ의 효과가 de1F508의 어드레싱에 특이하고 다른 염화물 채널을 변경하지 않는다는 것을 나타내기 위해, Calu-3 세포 상에 강력한 활성화제로서 NB-DNJ를 시험하였다. 도 3에 나타낸 결과를 Calu-3 세포 상에 요오드화 유출물에서 얻었다. 대조군은 포르스콜린(5 μM, n=8)과 MPB-91(250 μM, n=8)이다. NB-DNJ(기준)이 있거나 없는 경우의 효과에 중요한 차이가 없으므로 NB-DNJ(n=8)는 야생형 CFTR이나 이들 세포의 다른 음이온 이동의

활성제가 아니다.

- [0097] R3. Calu-3 세포에서 CFTR의 어드레싱에 대한 NB-DNJ의 효과
- [0098] NB-DNJ의 효과가 deIF508의 어드레싱에 대해 특이하다는 것을 나타내기 위해, Calu-3 세포 상에 야생형 CFTR의 어드레싱의 조절제로서 NB-DNJ를 시험하였다. 도 4에 제시된 결과를 NB-DNJ(500 μ M)에 의해 2 시간 처리한 Calu-3 세포 상의 요오드화 유출물로 얻었다. 도 4에서, 기준은 MPB-91에 의해 처리되지 않고 자극이 없는 세포에 상응한다. 요오드화 유출물은 자극되지 않는다. 제 2 대조군은 250 μ M의 MPB-91에 의한 처리는 없지만 자극된 세포에 상응한다. 이 경우 CFTR을 활성화 하고 요오드화 유출물을 측정한다. 제 3 대조군은 37°C에서 2 시간 MPB-91에 의해 처리한 후 250 μ M MPB-91에 의해 자극된 세포에 상응한다. 이 실험 조건하에 CFTR 활성화는 2개의 다른 실험 상황과 비교하여 상당히 다른 것은 아니다. 끝으로, Calu-3 세포를 37°C에서 2 시간 500 μ M NB-DNJ에 의해 처리하고 250 μ M MPB-91에 의해 자극할 때, CFTR 활성화 수준은 영향이 없다. 이들 결과는 NB-DNJ가 야생형 CFTR 어드레싱 경로 또는 다른 염화물 채널에 영향이 없거나, 이것이 인간 비-CF 폐 상피 세포에서 CFTR 활성을 변경하지 않는다는 것을 나타낸다.
- [0099] R4. 어드레싱 경로에 대해 다른 억제제의 세포 독성
- [0100] NB-DNJ의 세포 독성을 시험할 목적으로, MTT에 의한 세포 생활력 시험하기 전에 CHO-WT 세포를 서로 다른 농도의 억제제에 의해 2 시간 배양하였다. 도 5에서는 이 결과의 요약을 나타낸다. 이 결과는 세포가 모든 농도의 NB-DNJ에 대해 생활력이 있다는 것을 나타낸다. 따라서 이 분자는 세포 독성을 나타내지 않는다.
- [0101] R5. CF15 세포에서 deIF508에 대한 NB-DNJ 유사체의 효과
- [0102] N-부틸-테옥시노지리마이신류(NB-DNJ 또는 nB-DNJ)의 다른 화합물의 효과를 비교하였다. 제품을 도 6에 제시한다. 각 실험에 대해, 각테일(포르스콜린 10 μ M, 게니스타인 30 μ M)을 첨가하여 CFTR의 활성화가 후자가 막 상에 있을 때 가능하게 한다. 도 7에 제시된 결과는 37°C에서 2 시간 100 μ M의 DNJ, nB-DMJ 또는 DMJ에 의한 CF15의 처리는 deIF508 단백질의 어드레싱을 보존하며 후자가 이온 전달체로서 작용하게 한다는 것을 보여준다(도 7). 화합물을 비교할 때, DGJ, nB-DGJ, DFJ 및 nB-DFJ는 deIF508의 어드레싱에 대해 중요한 효과가 없다(도 7). 각 화합물(DNJ, DMJ 및 nB-DMJ)에 대해, EC₅₀(최대 유효도의 50%를 나타내는 분자의 농도)를 각각 >250 μ M, 134 μ M 및 113 μ M에서 측정하였다.
- [0103] III) 결론
- [0104] 유출물 시험에서는 세포질 세망에 deIF508의 축적을 야기하는 NB-DNJ가 이 단백질의 막성 재배치를 가능하게 하며 따라서 인간 폐 상피 세포에서 deIF508의 재어드레싱의 중요한 약리적 수단을 나타낸다는 것을 제시하였다. NB-DNJ는 이 단백질의 이온 이동 활성화에 영향이 없이 deIF508의 특이 막 어드레싱을 가능하게 하며, 다른 염화물 채널이나, 세포 생활력에 대해 작용하지 않는다.
- [0105] 관련서적 목록
- [0106] BECQ et al. (1999) Journal of Biological Chemistry 274, 27415-27425.
- [0107] CHENG et al. (1990) Cell 63, 827-834.
- [0108] COX et al. (2000) The Lancet 355, 1481-1485.
- [0109] DORMER et al. (2001) Journal of Cell Science 114, 4073-4081.
- [0110] DWEK et al. (2000) Patent WO 00/62779
- [0111] ELLGAARD & HELENIUS (2003). Molecular Cell Biology, 4, 181-191.

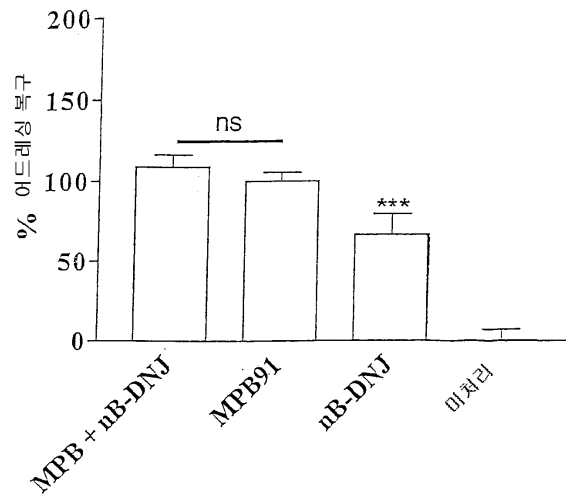
- [0112] FIEDLER & SIMONS K. (1995) Journal of Cell Science 109, 271-276.
- [0113] GELMAN et al. (2002) The Journal of Biological Chemistry 277, 11709-11714.
- [0114] PLATT et al. (1994) The Journal of Biological Chemistry 269, 27108-27114.
- [0115] PLATT et al. (2001) J. Inherit. Metab. Dis. 24, 275-290.
- [0116] RIORDAN et al. (1989) Science 245, 1066-1073
- [0117] TSUI et al. (1985) Science 230, 1054-1057.
- [0118] WEI et al., (1996) Journal of Cellular Physiology, 168, 373-384.

도면의 간단한 설명

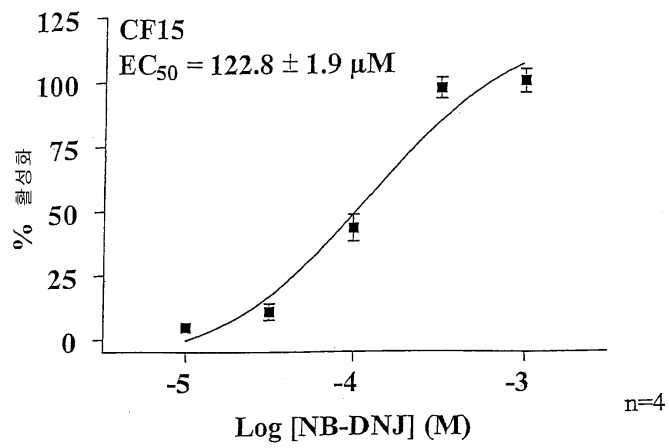
- [0061] 도 1: de1F508의 어드레싱에 대한 NB-DNJ의 효과.
- [0062] CF15 세포를 NB-DNJ(500 μ M)로 2 시간 동안 예비처리하였다. MPB-91(260 μ M)의 효과는 이 시험에서 100%를 나타내는 것으로 생각된다. CFTR 활성을 fsk 10 μ M + Gst 30 μ M에 의한 자극 후 요오드화 유출물(iodide efflux)(각 조건에 대해 n=8)으로 측정한다. Ns: 중요한 차이 없음. ***: 중요한 차이 P<0.001
- [0063] 도 2: de1F508의 어드레싱에 대한 NB-DNJ의 효과를 보여주는 그래프.
- [0064] CF15 세포를 NB-DNJ에 의해 로 다른 농도에서 2 시간 동안 예비처리하였다. CFTR 활성을 fsk 10 μ M + Gst 30 μ M에 의한 자극 후 요오드화 유출물(각 농도에 대해 n=4)로 측정한다.
- [0065] 도 3: Calu-3 세포의 음이온 이동에 대한 NB-DNJ의 효과.
- [0066] CFTR 활성을 포르스콜린(fsk) 5 μ M, MPB-91 250 μ M, NB-DNJ 500 μ M에 의한 자극 후 요오드화 유출물(각 조건에 대해 n=8)으로 측정한다. fsk와 화합물 MPB-91은 이 세포에서 요오드화 유출물을 활성화하지만, NB-DNJ는 아니며, 효과가 없다는 사실에 주목한다. Ns: 중요한 차이 없음. ***: 중요한 차이 P<0.001
- [0067] 도 4: Calu-3 세포의 NB-DNJ에 의한 처리의 효과.
- [0068] Calu-3 세포를 37° 에서 MPB-91 250 μ M과 함께, 500 μ M NB-DNJ에 의해 2 시간 동안 예비배양한다. 처리하지 않은 세포: 미처리. 기준(basal)은 세포가 처리되지 않거나 자극되지 않는다는 것을 나타낸다. CFTR 활성을 MPB-91 250 μ M에 의한 자극 후 요오드화 유출물(각 조건에 대해 n=8)으로 측정한다. NB-DNJ에 의한 처리는 유출량의 자극 수준이 3 조건에 대해 동일하므로 효과가 없다는 사실에 주목한다. Ns: 중요한 차이 없음.
- [0069] 도 5: CHO 세포의 세포 독성에 대한 NB-DNJ의 효과.
- [0070] 5 및 50 μ M에서 세포 독성이 측정될 수 없다는 사실에 주목한다. 500 μ M에서 낮은 독성이 있든 것 같다. 세포의 처리 2 시간. Ns: 중요한 차이 없음. ***: 중요한 차이 P<0.001
- [0071] 도 6: N-부틸-테옥시노지리마이신(NB-DNJ 또는 nB-DNJ) 및 NB-DNJ류의 다른 화합물의 구조.
- [0072] 도 7: CF15 세포에서 de1F508의 어드레싱에 대한 NB-DNJ 및 NB-DNJ 유사체의 효과.

도면

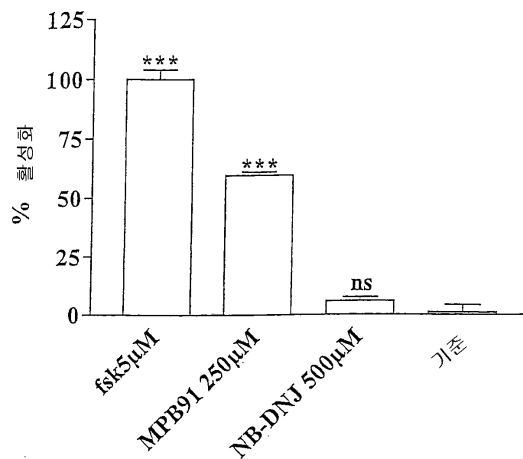
도면1



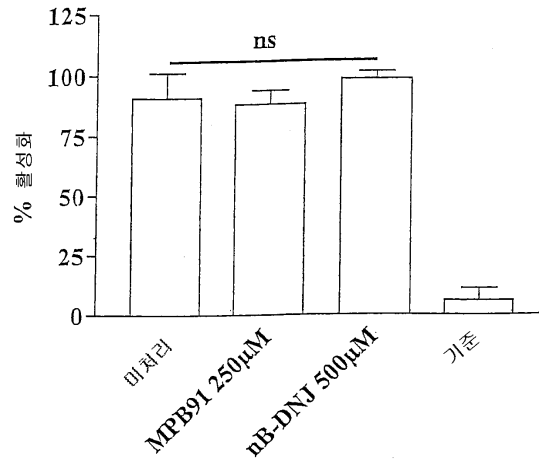
도면2



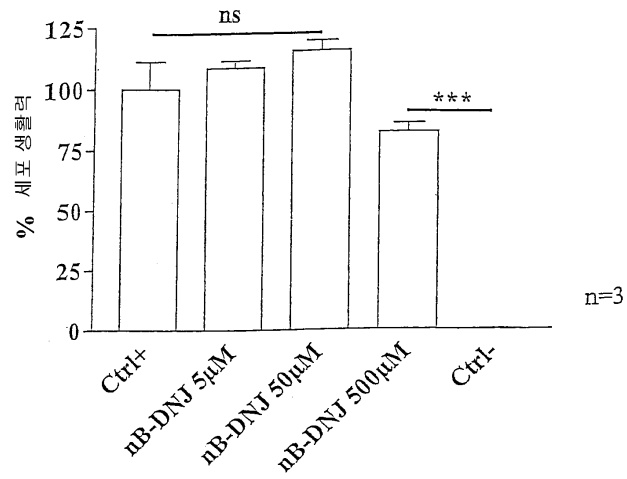
도면3



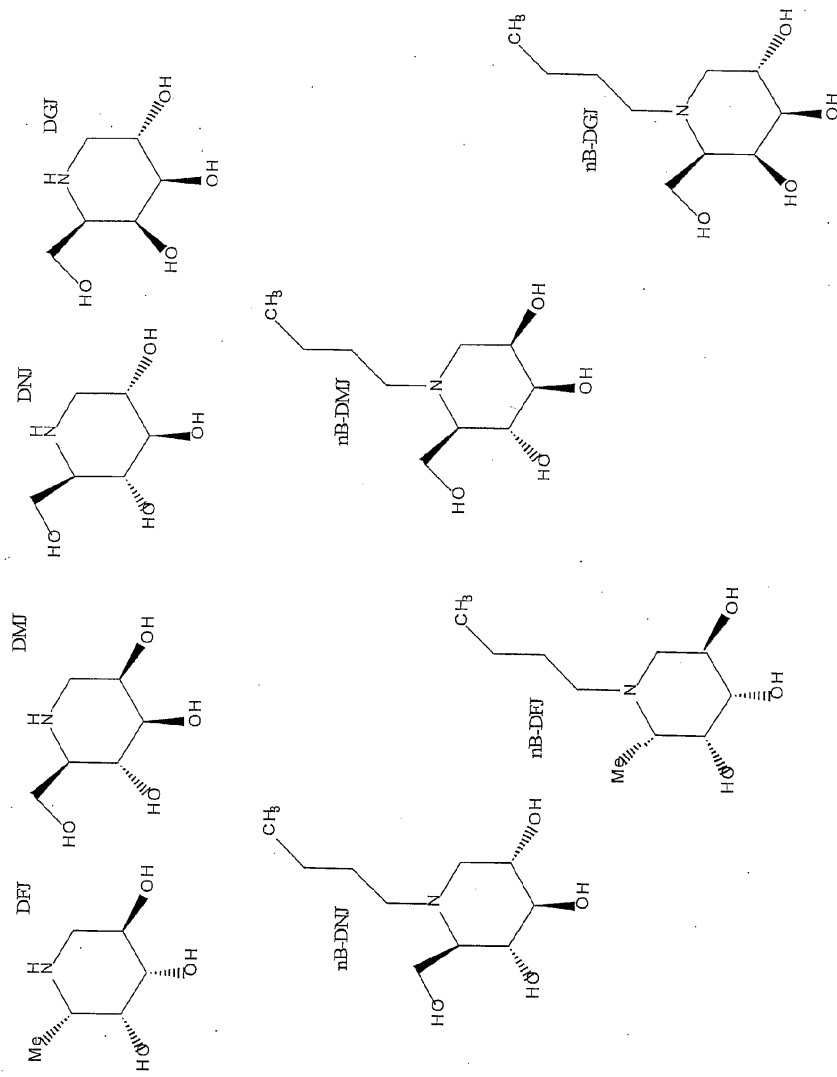
도면4



도면5



도면6



도면7

