



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0031653
(43) 공개일자 2017년03월21일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>A61K 31/365</i> (2006.01) <i>A61K 31/215</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>A61K 31/365</i> (2013.01)
<i>A61K 31/215</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-7032127</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2015년04월14일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2016년11월17일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2015/025821</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2015/160851
국제공개일자 2015년10월22일</p> <p>(30) 우선권주장
61/981,473 2014년04월18일 미국(US)
61/987,360 2014년05월01일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
뉴로트롭 바이오사이언스 인크.
미국 10017 뉴욕주 뉴욕 이스트 42 스트리트 205
16 플로어
이칸 스쿨 오브 메디슨 옛 마운트 시나이
미국 뉴욕주 10029 뉴욕 원 구스타브 엘 레비 플
레이스</p> <p>(72) 발명자
이오안노우 이안니스 에이
미국 10128 뉴욕주 뉴욕 이스트 87번가 245
엘트스틸 로렌스
미국 06378 커네티컷주 스톤닝톤 워터 스트리트
31
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
김진희, 김태홍</p> |
|--|---|

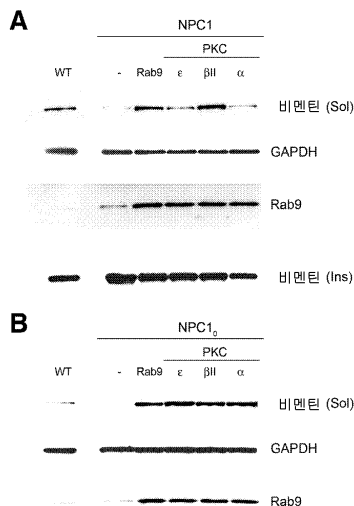
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 지질 축적 장애의 치료를 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

지질 축적 장애를 가진 피험체를 PKC 활성화제, 예컨대 브리오스타틴, 브리올로그, 및 다불포화 지방산을 포함하는 조성물을 이용한 치료가 개시된다. 따라서, 본 개시는 지질 축적 장애, 예컨대 니만 피크병을 앓고있는 인간 피험체를, PKC 활성화제를 투여함으로써 치료하는 방법을 제공한다. 본 개시는 특정 실시양태들에 따르면, C형 니만 피크병에 걸린 피험체에 약학적 유효량의 브리오스타틴 1을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

크룩포드 데이비드 알

미국 01950 매사추세츠주 뉴버리포트 켄트 스트리트 62

콩사무트 사타파나

미국 07940 뉴저지주 매디슨 코슨 웨이 14

명세서

청구범위

청구항 1

C형 니만 피크병의 치료에 사용하기 위한 약학적 유효량의 브리오스타틴(bryostat in) 1.

청구항 2

C형 니만 피크병 또는 지질 축적 장애의 치료에 사용하기 위한, 약학적 유효량의 브리오스타틴 1-20, 브리올로그(bryolog), 다불포화 지방산, 또는 이들의 조합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 약학적 유효량이 용량 당 약 0.0000001 mg/kg 내지 약 250 mg/kg인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 약학적 유효량이 용량 당 약 0.00001 mg/kg 내지 약 5.0 mg/kg인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 약학적 유효량의 브리오스타틴 1이 0.01-25 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ IV의 용량으로 제공되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

우선권 주장

[0002]

본 출원은 2014년 4월 18일에 출원된 미국 가특허 출원 제61/981,473호 및 2014년 5월 1일에 출원된 미국 가특허 출원 제61/987,360호에 대한 우선권을 주장하며, 그 내용은 명시적으로 인용에 의해 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 발명은 지질 축적 장애의 치료를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

본원에서 인용되는 모든 참고문헌은 명시적으로 인용에 의해 포함된다.

[0006]

지질 축적 장애(또는 지질대사장애)는 체내 세포 및 조직의 일부에 유해한 양의 지질이 축적되는 일 군의 선천성 대사 장애이다. 이러한 장애를 가진 사람은 일반적으로 지질을 대사하는데 필요한 효소들 중 하나를 충분히 생산하지 못하거나 또는 적절하게 기능하지 못하는 효소를 생산한다. 시간이 갈수록, 지방의 이러한 과잉 저장장은 영구적인 세포 및 조직 손상을 야기할 수 있다.

[0007]

많은 지질 축적 장애는 치료를 위한 적절한 치료법이 없다. 이러한 장애는 예를 들면, 니만 피크병 A형, B형 및 C형, 고셔병 II형, 파브리병(효소 보충이 이용가능함에 주목하기 바람), 강글리오시드증, 예컨대 테이-삭스병, 샌드호프병, 크라베병, 이염백색질장애, 및 콜레스테릴에스테르 축적병(볼만병)을 포함한다.

[0008]

니만 피크병은 세포 예컨대 대식세포 및 뉴런의 리소좀에서 스핑고미엘린의 과잉 축적을 특징으로 하는 선천성 상염색체 열성 지질 축적 장애로서, 정상 세포 기능을 손상시킨다. A형 니만 피크병은 산 스핑고미엘리아제의 결핍으로 인한 것이며 빠른 진행형의 신경퇴행성 질환이다. 이는 전형적으로 2세 내지 3세에 죽음에 이른다. B형 니만 피크병은 간과 비장의 확대, 및 호흡 곤란을 야기하며 일반적으로 성인 초기에 사망에 이르는 보다 가벼운 형태이다. 이러한 두가지 형태의 니만 피크병은 둘다 산 스핑고미엘리아제(ASM) 결핍과 연관되며 본원에서 통틀어 니만 피크병 또는 ASM 결핍증(ASMD)으로 지칭된다. 니만 피크병의 다른 타입, 예를 들어, C형은 ASM 유전자에서 돌연변이를 수반하지 않고 ASM의 기능에 직접적인 원인이 있지 않다. A 및 B 서브타입의 주목할 만한 임상적 이질성의 기초가 되는 생화학적 및 분자적 결함의 성질은 알려져 있지 않다. 비록 두 서브타입을 가

진 환자가 잔여 ASM 활성(정상의 약 1 내지 10%)을 갖더라도, 생화학적 분석은 상기 2개의 표현형을 신뢰성있게 구별할 수 없다. 게다가, B형 NPD의 임상 경과에는 매우 가변적이며, 현재 질병의 심각성을 잔여 ASM 활성의 수준과 연관지을 수 없다.

[0009] 니만 피크 C형은 NPC1 및 NPC2 유전자에서의 돌연변이의 결과이다. 니만 피크 C형에서, 주요 돌연변이된 유전자 NPC1의 단백질 생성물은 효소가 아니며 엔도솜-리소좀 시스템에서 트랜스포터로서 기능하는 것으로 보이며, 이는 세포를 통해 대형 수-불용성 분자를 옮긴다. NPC2 유전자에 의해 코딩되는 단백질은 리소좀 루멘에 존재하는 소형 콜레스테롤-결합 단백질인 것으로 드러났다. 이러한 수송 시스템의 붕괴는 리소좀 내에 콜레스테롤과 글리코리피드의 축적을 일으킨다.

[0010] 니만 피크병뿐만 아니라, 다른 지질 축적 장애는 치료를 위한 치료법에 대한 압도적인 필요성이 여전한 질환이다. 현재 미국에서 니만 피크병에 대해 FDA 승인된 요법이 없으며; 이 질환에 대한 치료는 A형을 앓고 있는 늦어도 18개월쯤에 사망하는 대부분의 사람들에게 한정되며, B형 또는 C형에 걸린 사람들은 빈번하게 침대에 생존한다.

발명의 내용

[0011] 효소의 단백질 키나제 C (PKC) 패밀리는 신호 전달 캐스케이드를 매개로 단백질을 조절하는 효소의 능력을 통한 다수의 세포 과정을 담당한다. 이러한 키나제 패밀리의 멤버는 구조적으로 그리고 기능적으로 유사하고 통상적인(α , β I, β II, 및 γ), 신규의(δ , ϵ , η , 및 θ), 및 변칙적인 동형(isoforms)(ζ 및 λ)으로 분류된다. 이러한 동형은 다양한 질환 및 병리학적 상태와 밀접하게 결부되어있다.

[0012] 본 개시는 부분적으로는 지질 축적 장애 예컨대 니만 피크 C형 (NPC1) 질환에서 PKC에 대해 이전에 인정받지 못한 역할에 기초한다. 본 발명자들은 중간 필라멘트, 비멘틴이 야생형 (WT) 세포에 비해 NPC1 세포에서 하이포인산화되고 이러한 하이포인산화는 감소된 활성에 기인하는 것을 확인했다 [5]. 비멘틴은 소포 막 수송[6,7], 신호 전달[8,9] 및 세포 운동성[10]을 포함한 다양한 세포 과정에 수반된다. NPC1 세포와 마찬가지로, 비멘틴이 결여된 세포는 LDL-유래 콜레스테롤을 자신의 리소좀으로부터 에스테르화를 위해 소포체로 수송할 수 없다 [11]. NPC1 세포에서 감소된 비멘틴 인산화는 가용성 비멘틴의 풀(pool)을 감소시켜, 수송이 일어나는데 필요한 비멘틴 사이클을 파괴하는 것 같다 [12,13]. 비멘틴은 PKC[14] 및 특히 α [15], ϵ [10] 및 β II[16,17] 동형을 포함한 여러 단백질에 의해 인산화되는 것으로 나타났다.

[0013] 따라서, 본 개시는 지질 축적 장애, 예컨대 니만 피크병을 앓고있는 인간 피험체를, PKC 활성제를 투여함으로써 치료하는 방법을 제공한다.

[0014] 본 개시는 특정 실시양태들에 따르면, 지질 축적 장애를 가진 피험체에 약학적 유효량의 PKC 활성제를 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 개시는 특정 실시양태들에 따르면, C형 니만 피크병을 가진 피험체에 약학적 유효량의 브리오스타틴 1을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 개시의 특징 및 이점은 이하의 실시양태들의 상세한 설명을 숙지함으로써 당업자에게 용이하게 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0017] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 내포한다. 컬러 도면(들)을 갖는 이러한 특허 또는 특허 출원 공보의 카피본은 요청시 필요한 요금을 지불할 경우 해당 관청으로부터 제공될 것이다.

본 개시의 몇몇 구체적인 실시양태들은 부분적으로는, 하기 상세한 설명과 첨부 도면을 참조하여 이해될 수 있다.

도 1A 및 1B는 인간 NPC1 세포에서 비멘틴 가용화에 대한 일시적인 PKC 발현의 효과를 도시한 웨스턴 블롯이다. PKC ϵ , β , 또는 α 로 형질감염된 인간 NPC1 3123 (A) 및 인간 nullNPC1o (B) 세포에서 가용성 및 불용성 비멘틴 수준의 대표적인 웨스턴 블롯 분석은 이러한 세가지 동형이 형질감염되지 않은 세포(-)에 비해 가용성 비멘틴과 Rab9의 수준을 증가시키면서 동시에 불용성 비멘틴을 감소시키는 것을 보여준다. 가용화된 비멘틴의 수준은 Rab9를 발현하는 세포(Rab9)에서 보여지는 것과 유사하다. 도시된 블롯은 적어도 3회 독립된 실험을 대표한다.

도 2는 NPC1 세포 용해물의 불용성 비멘틴 분획으로부터 Rab9 방출을 도시킨 웨스턴 블롯이다. NPC1 세포 용해물로부터의 불용성 비멘틴 분획은 다양한 PKC 동형과 인큐베이트되었다. 시험된 모든 동형은 불용성 비멘틴 분획으로부터의 Rab9 방출에 어느 정도 영향을 미칠 수 있으며, PKC α 가 가장 최대로 효과적이고 PKC γ 가 가장 최적으로 효과적이다. 도식된 블롯은 적어도 3회 독립된 실험을 대표한다.

도 3은 M12 NPC1 CHO 세포에서 콜레스테롤 에스테르화에 대한 PKC 및 지방산의 효과를 도식한 그래프이다. M12 세포는 2일간 50 $\mu\text{g/ml}$ 지방산으로 처리된 다음 지시한 PKC 동형으로 형질감염되었다. 형질감염 이후에, 콜레스테롤 수송을 에스테르화 어세이에 의해 평가했다. 유리 지방산 및 PKC 둘다 NPC1 세포의 콜레스테롤 수송 결함을 완화시키며 이들의 효과는 상가적인 것으로 보인다.

도 4는 NPC1 표현형에 대한 일시적인 PKC 발현의 효과를 도식한 이미지이다. M12 세포를 48시간 동안 PKC 동형 또는 Rab9로 형질감염시킨 다음 콜레스테롤 저장에 대해 필리핀 착색(filipin staining)에 의해 분석했다. 형질감염에 대해 양성인 세포는 GFP에 대해 양성으로 착색되고 (좌측 패널) 주변의 형질감염되지 않은 세포에 비해 감소된 필리핀 착색(윤곽이 그려진 세포, 우측 패널)을 보여주며, 이는 NPC1 엔도솜으로부터 저장된 콜레스테롤을 이동시키는데 있어 PKC의 역할을 확인시켜준다. 막대(바), 20 μm .

도 5는 비멘틴 가용화 및 NPC1 표현형에 대한 지방산의 효과를 도식한다. (A) 인간 NPC1 3123 세포가 24시간 동안 50 $\mu\text{g/ml}$ 리놀레산 또는 올레산으로 처리되고, 이후 가용성 비멘틴의 수준을 웨스턴 블롯팅으로 분석했다. NPC1 CHO (B) 또는 인간 3123 (C) 세포에서 콜레스테롤 저장을 필리핀 착색으로 분석했다. 각 샘플에 대해 적어도 150개 세포에서 형광 강도를 정량했다. 막대 그래프는 3회 독립된 실험으로부터의 평균값 \pm SEM을 나타낸다. * 및 ***은 스튜던트 t-검정에 의해 결정시 각각 $P<0.05$ 및 $P<0.0001$ 로, 처리된 세포와 비처리된 세포 간의 통계학적 유의한 차이를 의미한다.

도 6은 NPC1 표현형에 대한 PKC 활성화의 효과를 도식한다. NPC1 CHO 세포(B 내지 F)는 100 μM DCP-LA (C), 10 μM DHA (D), 또는 100 μM 디아족사이드 (E)로 처리되었고 콜레스테롤 저장을 필리핀 형광으로 정량했다. WT CHO 세포는 (A)에 도식된다. 필리핀 강도는 각 샘플에 대해 적어도 150개 세포에서 정량되었다. 막대 그래프는 3회 독립된 실험으로부터의 평균값 \pm SEM을 나타낸다. *, **, 및 ***은 스튜던트 t-검정에 의해 결정시 각각 $P<0.05$, $P<0.01$ 및 $P<0.0001$ 로, 처리된 세포와 비처리된 세포 간의 통계학적 유의한 차이를 의미한다.

도 7은 스펅고리피드 수송에 대한 PKC 활성화의 효과를 도식한 이미지이다. BODIPY-LacCer 착색을 수행하기 이전에 인간 NPC1 3123 세포를 (B) 20 μM DCP-LA, (C) 2 $\mu\text{g/ml}$ 올레산, (D) 2 $\mu\text{g/ml}$ 리놀레산, 또는 (F) 100 nM PMA로 48시간 동안 처리했다. 비처리된 세포(A)에서는, 트랜스-골지망(trans-Golgi network; TGN)으로 지질의 수송이 저해되고 착색은 오직 점 모양의 세포내(endocytic) 소포에서만 보인다. 이에 반해, 처리된 세포에서는 지질이 처리된 세포 내 TGN(화살표)에서 확인할 수 있는데, 이는 NPC1을 특징짓는 수송 차단 해방을 나타낸다.

도 8은 DCPLA, 디아족사이드 및 브리오스타틴 1의, 48시간째 NPC3-SV 세포에서 저장되는 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위한 능력을 도식한 그래프이다.

도 9는 DCPLA 및 브리오스타틴 1의, 72시간째 NPC3-SV 세포에서 저장되는 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위한 능력을 도식한 그래프이다.

도 10은 베로독소 B(VTB)를 프로브 착색제로서 사용하여 72시간째 NPC3-SV 세포에서 저장되는 글리코스핑고리피드 수준을 감소시키는 DCPLA 및 브리오스타틴 1의 능력을 도식한 그래프이다.

도 11은 NPC24-SV 세포주를 사용하여 필리핀 축적을 감소시키는 DCPLA 및 브리오스타틴 1의 능력을 도식한 그래프이다.

도 12는 NPC3SV 세포에서 강글리오시드 수송 차단을 해방시키는 DCPLA 및 브리오스타틴 1의 능력을 도식한 현미경사진이다.

도 13은 인간 NPC24-SV 세포에서 콜레스테롤 축적을 감소시키는 브리오스타틴 1(0.1-100 nM)의 능력을 도식한 그래프이다.

도 14는 인간 NPC24-SV 세포에서 글리코스핑고리피드 축적을 감소시키는 브리오스타틴 1(0.1-100 nM)의 능력을 도식한 그래프이다.

도 15는 도 13-14에 도식된 분석에 사용된 처리된 세포의 대표적인 필드를 도식한 이미지이다.

도 16은 저장되는 다양한 지질의 여정을 도시한 NPC1 세포의 그래픽 표현이다.

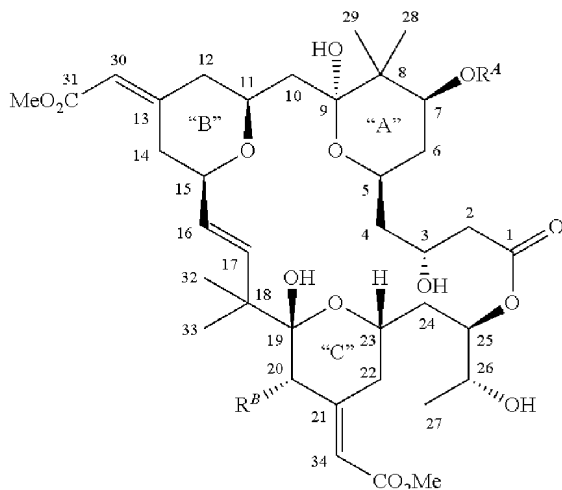
도 17은 비처리된 C57 NPC1 마우스를 도시하는 그래프이다. 수명의 대략 70-72일까지 체중 증가가 관찰되고 이후에 빠른 체중 감량이 관찰된다.

본 개시는 다양한 변경 및 대체 형태를 허용하지만, 특정의 예시적인 실시양태들이 도면에 도시되었고 본원에서 보다 상세히 설명되고 있다. 그러나, 특정의 예시적인 실시양태들의 기재는 개시된 특정 형태에 본 발명을 제한하고자 하는 의도가 아니며, 이러한 개시는 부분적으로는 첨부된 청구범위에 의해 설명되는 것에 대한 모든 변형과 모든 등가물을 커버하는 것으로 이해되어야 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 일반적으로, 본 개시는 PKC 활성제를 사용하여 지질 축적 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용시, "단백질 키나제 C 활성제" 또는 "PKC 활성제"는 단백질 키나제 C에 의해 촉진되는 반응의 속도를 증가시키거나, PKC의 발현을 상향조절하거나(예를 들어, PKC α , PKC β II, PKC γ 및/또는 PKC ϵ 의 발현을 상향조절), 또는 PKC의 활성화를 촉진하는 물질을 지칭한다.
- [0019] 특정 실시양태들에서, 본 개시는 지질 축적 장애를 가진 인간 피험체에 약학적 유효량의 PKC 활성제를 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. PKC 활성제는 인간 피험체에 투여하기 적합한 조성물의 일부로서 투여될 수 있다.
- [0020] 특정 실시양태들에서, PKC 활성제는 브리오스타틴(bryostatin) 1-20, 브리올로그(bryolog), 네리스타틴(neristatin), 다불포화 지방산, 또는 이들의 조합 중 임의의 것일 수 있다.
- [0021] 브리오스타틴이 본 개시의 방법에 사용될 수 있다. 브리오스타틴은 본래 해양 이끼벌레류에서 단리된 천연 발생 마크로시클릭 화합물의 패밀리이다. 현재, 약 20종의 공지된 천연 브리오스타틴이 존재하며 이들은 A, B 및 C로 명명된 3개의 6원 고리를 공유하며, C7 (OR^A) 및 C20 (R^B)에서 이들의 치환기의 성질에 있어 주로 차이가 있다.

식 A



- [0022]
- [0023] 브리오스타틴 1 및 브리오스타틴 1의 유도체가 미국 특허 제4,560,774호(본원에 인용에 의해 도입됨)에 기재되어 있다. 본 개시의 방법에 사용될 수 있는 적합한 브리오스타틴의 예는 브리오스타틴 1, 브리오스타틴 2, 브리오스타틴 3, 브리오스타틴 4, 브리오스타틴 5, 브리오스타틴 6, 브리오스타틴 7, 브리오스타틴 8, 브리오스타틴 9, 브리오스타틴 10, 브리오스타틴 11, 브리오스타틴 12, 브리오스타틴 13, 브리오스타틴 14, 브리오스타틴 15, 브리오스타틴 16, 브리오스타틴 17, 브리오스타틴 18, 브리오스타틴 19, 및 브리오스타틴 20을 포함한다.
- [0024] 흔히 브리올로그로서 지칭되는 브리오스타틴의 유사체가 또한 본 개시의 방법에 사용될 수 있다. 브리올로그는 브리오스타틴의 구조적 유사체이다. 브리오스타틴이 2개의 피란 고리 및 하나의 6원 시클릭 아세탈을 가지지만, 대부분의 브리올로그에서는 브리오스타틴의 피란 중 하나가 제2의 6원 아세탈 고리로 대체된다. 이러한 변형은 예를 들면, 강한 산 또는 염기 둘다에서, 브리오스타틴에 비해 브리올로그의 안정성을 감소시키지

만 생리적 pH에서는 의미가 거의 없다. 브리올로그는 또한 브리오스타틴(988)에 비해 더 낮은 분자량(약 600 내지 755 범위)을 가지며, 이러한 성질은 혈뇌 장벽을 가로지르는 수송을 촉진할 수 있다. 적합한 브리올로그의 예는 브리오스타틴의 유사체 및 유도체 예컨대 미국 특허 제6,624,189호, 제7,256,286호 및 제8,497,385호(개시 내용은 본원에 인용에 의해 포함됨)에 개시된 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0025] 특정 실시양태들에서는, 다불포화 지방산 에스테르(PUFA 또는 폴리엔 지방산)가 지질 축적 장애의 치료를 위해 본 개시의 방법에 사용될 수 있다. PUFA는 하나 초과와 이중 결합을 함유하는 지방산이다. 세 부류의 PUFA, 오메가-3 PUFA, 오메가-6 PUFA, 및 오메가-9 PUFA가 존재한다. 오메가-3 PUFA에서, 첫번째 이중 결합은 쇠 내 마지막 탄소(오메가 탄소)로부터 3개 탄소만큼 떨어진 것으로 확인된다. 오메가-6 PUFA에서 첫번째 이중 결합은 쇠로부터 6개 탄소 떨어진 것으로 확인되고 오메가-9 PUFA에서 첫번째 이중 결합은 오메가 탄소로부터 9개 탄소에 있다. 본원에서 사용시, 용어 PUFA는 천연 및 합성 지방산 둘다를 포함한다. PUFA에 대한 주요 공급원은 해양 어류 및 오일 시드 작물에서 유래한 식물성 오일로부터이다. 본 개시의 방법에 사용하기 적합한 PUFA의 예는 8-[2-(2-펜틸-시클로프로필메틸)시클로프로필]-옥탄산의 에스테르(DCPA)뿐만 아니라, 미국 특허 제8,163,800호 및 PCT 공보 WO 2010014585 A1에 기재된 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0026] 적합한 PKC 활성제의 또 다른 예는 칼륨 채널 활성제 예컨대, 예를 들면, 디아족사이드(diazoxide)를 포함한다.

[0027] 특정 실시양태들에서는, 네리스타틴, 예컨대 네리스타틴 1이 지질 축적 장애의 치료를 위해 본 개시의 방법에 사용될 수 있다.

[0028] 다른 적합한 PKC 활성제는 포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트(PMA), 오카다산, 1 α ,25-디히드록시비타민 D3, 12-데옥시포르볼-13-아세테이트(프로스트라틴), 1,2-디옥타노일-sn-글리세롤(DOG), 1-올레오일-2-아세틸-sn-글리세롤(OAG), (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(트리플루오로메틸)페닐)-2,4-펜타디에노일아미노)벤조락탐(α -아밀로이드 전구체 단백질 조절인자), 시스-9-옥타데센산(올레산), 인게놀 3-안젤레이트, 레시니페라톡신(resiniferatoxin), L- α -포스파티딜-D-미오-이노시톨-4,5-비스포스페이트, 트리암모늄염(PIP2), 포르볼-12,13-디부티레이트, 8(S-히드록시-(5Z, 9E, 11Z, 14Z)-에이코사테트라엔산(8(S)-HETE), 12 β -(E,E)-5-페닐-2,4-펜타디에노일옥시]다프네톡신(메르제레인), 클로미펜 시트레이트, 소듐 올리에이트, 포르볼 12,13-디아세테이트, 포르볼-12,13-디데카노에이트, 1,2-디팔미토일-sn-글리세롤, 1-스테아로일-2-리놀레오일-sn-글리세롤, 포르볼-12,13-디데카노에이트, 1,2-디팔미토일-sn-글리세롤, 1-스테아로일-2-리놀레오일-sn-글리세롤, 포르볼 12,13-디헥사노에이트, 프로스트라틴 및 이의 유사체, 레시니페로놀 9,13,14-오르토-페닐아세테이트, C-8 세라마이드, 1,6-비스(시클로헥실옥시미노카르보닐아미노)헥산; 1,6-디(0-(카바모일)시클로헥산-옥심)헥산(RHC-80267), (+/-)-1-올레오일-2-아세틸글리세롤, 5(S),6(R),15(S)-TriHETE(리폭신 A4), (-)-인도라락탐 V, SC-9, SC-10, 줄레드론산 모노하이드레이트, 12-데옥시포르볼 13-안젤레이트 20-아세테이트, 6-(N-테실아미노)-4-히드록시메틸인돌, 4 α -포르볼 12,13-디부티레이트, 1,2-디헥사노일-sn-글리세롤, 줄레드론산 디소듐염 테트라하이드레이트, 아라키돈산 메틸 에스테르, 아라키돈산-d8을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0029] 본원에서 사용시, "약학적 유효량"은 지질 축적 장애에 대해 치료적 관련 효과를 가진 약학적 화합물 또는 조성물의 양이다. 치료적 관련 효과는 특정 지질 수송 장애의 원인들 중 임의의 것(예를 들어, 비멘틴 용해도, 콜레스테롤 에스테르화, 콜레스테롤 축적 및 수송, 글리코스핑고리피드 축적 및 수송)과 관련된 세포적, 생리적 또는 생화학적 파라미터에 있어 변화 또는 생체역학적 프로세스(예를 들어, 걸음걸이(gait), 팔다리 사용, 등)에 있어 어떠한 개선과 관련된다.

[0030] 특정 실시양태들에서, 브리오스타틴 및 브리올로그에 대한 약학적 유효량은 약 0.0000001 내지 약 500 mg/kg 호스트 체중/일(day)일 수 있으며, 단회 또는 복수 용량으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복용량 수준은 하기와 같을 수 있다: 약 0.0000001 mg/kg 내지 약 250 mg/kg/일; 약 0.0000005 mg/kg 내지 약 100 mg/kg/일; 적어도 약 0.0000001 mg/kg 내지 약 250 mg/kg/일; 적어도 약 0.0000005 mg/kg 내지 약 100 mg/kg/일; 적어도 약 0.000001 mg/kg 내지 약 50 mg/kg/일; 또는 약 0.00001 mg/kg 내지 약 5.0 mg/kg/용량. 다른 실시양태들에서, 복용량은 약 0.00000001 mg/kg 내지 약 0.00005 mg/kg; 0.00005 mg/kg 내지 약 0.05 mg/kg; 약 0.0005 mg/kg 내지 약 5.0 mg/kg/일; 약 0.0001 mg/kg 내지 약 0.5 mg/kg/용량; 또는 0.001 내지 0.25 mg/kg/용량일 수 있다.

[0031] 지질 축적 장애가 니만 피크병인 특성의 구체적인 실시양태들에서, 약학적 유효량의 PKC 활성제는 비멘틴을 가용화시키고/거나 갖힌 Rab9를 방출하기에 충분한 양일 수 있다.

[0032] 특정 실시양태들에서, 투약은 약 1 μ g/kg(3-25 μ g/m²) 내지 120 μ g/kg(360-3000 μ g/m²)이다. 다른 실시양태들에

서, 투약은 약 0.04-0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$) 내지 약 1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (25 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)이다. 다른 실시양태들에서, 투약은 약 0.01 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 25 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 이다. 다른 실시양태들에서, 투약은 약 0.0002-0.0004 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 0.05-1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이다.

[0033] 특정 실시양태들에서, PKC 활성제는 약 0.001 내지 100 mg/kg; 0.01 내지 약 50 mg/kg; 약 0.1 내지 약 10 mg/kg의 복용량으로 투여되는 PUFA이다.

[0034] 특정 실시양태들에서, 본 개시의 방법에 사용되는 조성물에 존재하는 PKC 활성제는 브리오스타틴 또는 브리올로그이고, 브리오스타틴 또는 브리올로그는 약 0.0001 내지 약 1000 밀리그램의 양으로 사용된다. 일부 실시양태들에서, 브리오스타틴 또는 브리올로그는 적어도 약 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008, 0.009, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 750.0, 800.0, 900.0, 또는 약 1000.0 밀리그램의 양으로 사용된다.

[0035] 본 개시의 방법에 사용되는 조성물은 임의의 적합한 루트를 통해; 예를 들면, 경구, 복강내, 피하, 코내, 협측, 경피, 근육내, 직장내, 정맥내, 및 경구 흡입에 의해 투여될 수 있다.

[0036] 본 개시의 방법에 사용되는 조성물은 1 내지 4회/일의 섭생(regimen)으로 투여될 수 있고, 일부 실시양태들에서, 조성물은 환자의 요구에 따라 주 2회, 주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 6주마다 1회, 8주마다 1회 또는 심지어 보다 적은 빈도로 투여된다.

[0037] 본 개시의 방법에 사용되는 조성물은 약 1 내지 약 30일; 약 1 내지 약 90일; 약 1 내지 약 120일; 약 1 내지 약 180일; 약 1 내지 365일; 1년; 2년; 3년; 또는 환자의 수명동안 지속되는 치료 과정의 일부로서 투여될 수 있다.

[0038] 그러나, 임의의 특정 호스트에 대해 특정 용량 수준 및 투여 빈도가 달라질 수 있고 이용되는 특정 화합물의 활성, 그러한 화합물의 대사 안정성 및 작용 기간, 연령, 체중, 일반 건강, 성별, 식이, 투여 방식 및 시간, 배설물, 약물 조합, 장애의 성질, 특정 장애의 중증도, 및 호스트 치료 요법을 포함한 다양한 인자에 좌우될 것임을 이해할 것이다.

[0039] 본 발명의 보다 나은 이해를 보장하기 위해, 특정 실시양태들의 하기 실시예들이 제공된다. 어떠한 형태로든 하기 실시예들은 본 발명의 전 범위를 제한하거나 한정하지 않는다.

[0040] 실시예

[0041] 실시예 1

[0042] 재료 및 방법

[0043] 돌베코 수정 이글 배지(DMEM), 트립신, L-글루타민, 겐타마이신, 및 NuPage 겔 및 완충제를 Invitrogen(캘리포니아주 칼스배드)으로부터 얻고 FBS를 Hyclone, Thermo Scientific(일리노이주 록포드)로부터 얻었다. 모노클로날 항-비멘틴(V9)(항-마우스-IgG 및 항-토끼-IgG 항체 접합됨)을 Santa Cruz Biotechnologies, Inc.(캘리포니아주 산타 크루즈)로부터 얻었다. 항-GAPDH 항체는 Millipore(매사추세츠주 빌레리카)로부터 얻어졌고 항-Rab9 폴리클로날 항체는 다른 곳에 기재되어 있다[27]. 필리핀(Filipin)은 Polysciences, Inc.(펜실베이니아주 워링턴)로부터 얻어졌다. Lumilight Plus 기질 및 FuGENETM 6 형질감염 시약은 둘다 Roche Diagnostics(인디애나주 인디애나폴리스)로부터 얻어졌다. [9,10-³H(N)] 올레산 산(15 Ci/mmol)은 NEN Life Science Products(매사추세츠주 보스턴)에서 얻어졌고 LDL은 EMD Biosciences Inc.(캘리포니아주 라즐라)로부터 얻어졌다. 모든 다른 케미컬은 Sigma-Aldrich(미주리주 세인트루이스)에서 얻어졌다.

[0044] 세포 배양 및 형질감염

[0045] 인간 야생형 섬유아세포(GM05387), NPC1o 섬유아세포(GM09341), 및 NPC1 섬유아세포(GM03123) 세포주는 Coriell Cell Repositories(뉴저지주 캄덴)에서 얻어졌다. M12 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포주 및 이의 야생형 모 세포주를 얻어 배양했다. 섬유아세포 세포주를 DMEM에서 배양하고, CHO 세포를 5% CO₂를 갖는 가습 인큐베이터에서 37°C에서 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 겐타마이신이 보충된 DMEM/F12 (50:50) 배지에서 배양했다.

[0046] PKC α 를 위한 cDNA를, 성공적인 형질감염을 모니터링하기 위해 GFP를 함유하는 비시스트론 벡터 pIRES(Stratagene) 내로 클로닝했다. PKC β II, 및 PKC ε 에 대한 cDNA(ATCC)를, 핵-표적화된 RFP(Ioannou, 비

공개)를 발현하는 벡터 pYDual로 클로닝했다. Rab9-YFP 융합 구축물([5]에 기재됨)을 Rab9 발현을 위해 사용했다. 제조사의 제안에 따라 FuGENETM 6 시약(Roche Diagnostics)을 사용하여 세포를 70% 컨플루언스로 형질감염시켜 일시적인 과발현을 달성했다.

[0047] 단백질 분석

[0048] 형질감염된 세포를 형질감염 후 2일째 2 mM EDTA 함유 PBS를 이용하여 수확했다. 가용성 및 불용성 세포 분획을 앞서 기재된 바와 같이 준비했다[5]. 간단히 설명하면, 가용성/세포질 분획을 얻기 위해, 세포를 콜드 "포스포" 완충제[150 mM NaCl, 20 mM NaF, 100 μ M Na₃VO₄, 20 mM Hepes, pH 7.5), 1% (v/v) Igepal, 10% (v/v) 글리세롤, 및 1 μ L/20 mg 프로테아제 억제제 칵테일 조직]에서 30분간 아이스 상에서 인큐베이트한 다음 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하고; 맑은 상청액을 1 μ g/ μ L의 농도의 분취량으로 냉동시켰다. 펠릿(불용성 분획)을 2 mM EDTA 함유 아이스-콜드 PBS에서 3회 세척한 다음 "포스포" 완충제와 동등한 "트리톤" 완충제[PBS, 1% (w/v) SDS, 및 0.1% (v/v) 트리톤 X-100]의 부피에서 재현탁했다. 이 용액을 10분간 보일링하고 용액이 맑아질 때까지 초음파 처리했다. 이 분획의 단백질 농도를 가용성/세포질 분획에 대해 결정된 단백질 농도에 따라 1 μ g/ μ L로 조절했다. 단백질 농도를 [36]에 기재된 바와 같이 플루오레스카민법을 사용하여 결정했다. 이후 4-12% Bis-Tris 프리캐스트 겔(Invitrogen, 캘리포니아주 칼스배드)를 제조사의 지시에 따라 XCell II 장치(Invitrogen, 캘리포니아주 칼스배드)를 사용하여 Protran 막 상으로 옮겼다. 블롯을 앞서 기재된 바와 같이 프로세싱했다 [27].

[0049] Rab9 해리 연구를 위해, 1.0 x 10⁷ NPC1 3123 세포를 아이스-콜드 PBS에서 수집하고 각 10초간 4회 초음파 처리에 의해 용해시켰다. 용해물을 14,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 불용성 분획으로부터 가용성 분획을 분리하고 총 단백질 농도를 변형된 Bradford 어세이(Bio-Rad, 캘리포니아주 헤르쿨레스)를 사용하여 결정했다. 동일한 양의 각 불용성 분획을 PKC 동질효소 패널(Sigma, 미주리주 세인트루이스)로부터의 각 정제된 PKC 동형과 혼합하고 37°C에서 60분간 인큐베이트했다. 동일한 부피의 각 샘플을 4-12% Bis-Tris 프리캐스트 겔을 통해 분해하고, 막으로 옮겨, 상술한 바와 같이 프로세싱했다.

[0050] 콜레스테롤 에스테르화

[0051] [³H] 올리에이트 기질의 제조 및 에스테르화 어세이를 앞서 기재된 바와 같이 실시했다 [5]. 세포를 50 μ g/ml 지방산으로 2일간 처리한 다음 에스테르화 어세이 이전에 24시간 동안 PKE α 또는 PKC ϵ 로 형질감염시켰다. 총 세포 단백질에 대해 모든 값들을 삼중으로 생성하고 표준화했다.

[0052] 면역형광 현미경검사

[0053] 형질감염된 세포에서 필리핀 착색을 위해, 세포를 제조사의 권고에 따라 Eugene 6을 사용하여 PKC 또는 Rab9로 형질감염시켰다. 48시간 후, 세포를 앞서 기재된 바와 같이 필리핀으로 착색했다 [37]. 세포를 Fluoromount-G(SouthernBiotech, 알리바마주 버밍햄)을 사용하여 슬라이드 상에 마운팅하고 전하-결합-소자 카메라(Nikon, 뉴욕주 멜빌)가 피팅된 Nikon Eclipse 현미경을 사용하여 분석했다. 이미지를 MetaVue 소프트웨어를 사용하여 얻은 다음 AutoQuant Imaging, Inc(뉴욕주 트로이)의 AutoDeblur 소프트웨어를 사용하여 디콘볼브시켰다. 필리핀 형광의 정량을 위해, 세포를 6-웰 디쉬에서 3 x 10⁵ 세포/웰로 시딩하고 밤새 정치시켰으며, 이후에 배지를 10% 지단백질 결핍 혈청(LPDS)을 함유한 배지로 4일간 교체했다. 세포를, 앞서 기재한 바와 같이 고정화 및 필리핀을 이용한 착색 이전에, 올레산/리놀레산과 함께 48시간, DCPLA/DHA와 함께 24시간, 또는 디아족사이드와 함께 72시간 인큐베이트했다. 모든 샘플에 대해 동일한 노출 시간을 이용하여 이미지를 얻었다. MetaVue 소프트웨어의 통합형 강도 기능을 사용하여 형광 강도를 결정했고; 각 샘플에 대해 적어도 150개 세포를 정량하고 각 실험을 3회 반복했다. 스펙고리피드 수송의 분석을 위해, 세포를 앞서 기재한 바와 같이[30] BODIPY-LacCer 착색을 실시하기 이전에 올레산/리놀레산, DCP-LA, 또는 PMA와 함께 48시간 인큐베이트했다.

[0054] PKC 발현은 NPC1 세포에서 가용성 비멘틴의 수준을 증가시킨다

[0055] 미스센스 또는 널(NPC1o) 돌연변이를 갖는 NPC1 세포는 WT 세포에 비해 가용성 인산화된 비멘틴의 감소된 또는 실제로 검출불가능한 수준을 각각 함유한다 [5]. 나아가, NPC1 세포에 존재하는 비멘틴은 원형질 막 가까이에서 대형 해체된 필라멘트(탈인산화된 상태)로서 존재한다. 이에, NPC1 세포는 본질적으로 비멘틴-널 세포로서 거동하며, NPC1 세포와 마찬가지로, LDL-유래 콜레스테롤을 에스테르화할 수 없다 [11]. 이러한 연구를 확장함에 있어, 감소된 비멘틴 인산화는 NPC1 세포에서 단백질 키나제 C(PKC) 억제의 결과인 것으로 가정되었다. 이에 대한 지지로서, PKC 활성화제 포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트(PMA)를 이용한 NPC 세포의 처리가 가용성 비

멘틴의 수준을 증가시키고 NPC 지질 저장 표현형을 완화시킨 반면, PKC 억제제를 이용한 WT 세포의 처리는 그러한 세포에서 가용성 비멘틴의 소실을 일으키는 것을 해당 연구에서 관찰되었다. 이들 결과는 PKC를 세포에서 가용성 비멘틴 풀의 유지에 그리고 확장하여 정상 리소좀 콜레스테롤 유출에 강하게 연루시킨다. 상이한 PKC 동형 및 NPC 세포에서 가용성 비멘틴 수준에 대한 이들의 효과를 평가함으로써 이러한 연구를 확장한 결과, PKC 동형 α , β II, 및 ε 이 비멘틴 인산화에 연루되어 있음을 확인할 수 있고 [10, 17, 18]; 이에 따라, 이들 동형에 초점이 모아졌다. 이들은 인간 NPC1 세포에서 일시적으로 발현되었고 가용성 비멘틴 수준에 대한 이들의 효과를 특징규명했다. PKC β II의 발현은 가용성 비멘틴 수준에 있어 상당한 증가를 야기했고 (형질감염되지 않은 NPC1 세포보다 대략 38배 더 높음), 이는 WT 세포에서 보여진 수준(NPC1 세포보다 대략 20배 더 높음)보다 더 높은 반면, PKC α 또는 ε 의 발현은 가용성 비멘틴 수준에 있어 더 작은 증가를 야기했지만 여전히 상당한 증가를 야기했다 (각각, 대략 3배 및 대략 7배) (도 1). 대조군으로서, 이들 세포에서 Rab9의 발현이 또한 가용성 비멘틴에 있어 상당한 증가(대략 30배)를 야기했으며, 이는 앞서 보고된 것과 일치한다 [5]. 주목할 점은 세가지의 동형 모두 가용성 Rab9 수준의 유사한 정도로의 증가를 유도했다 (형질감염되지 않은 NPC1 세포보다 대략 2500배 더 높음). 나아가, 불용성 비멘틴 수준은 PKC 발현 세포에서 가용성 비멘틴 수준이 증가함에 따라 감소했으며, 이는 가용성 비멘틴에 있어 증가가 불용성 비멘틴의 가용화(인산화)에 기인한다는 것을 시사한다 (도 1A).

[0056] 마찬가지로, 일반적으로 거의 어떠한 검출가능한 가용성 비멘틴을 가지지 않는 심각하게 영향을 받은 NPC1o 세포에서, 세가지 PKC 동형 중 임의의 동형의 발현은 가용성 비멘틴의 수준을 증가시켰다 (도 1B). 비멘틴 가용화에 대해, 세가지 동형 모두 NPC1 세포에서와 대조적으로 NPC1o 세포에서 동일하게 잘 작용하며, β II 동형은 비멘틴 가용화에 있어 가장 효과적인 것으로 보인다. 나아가, 가용성 Rab9 수준이 또한 PKC 발현의 결과로 인해 유사한 수준으로 증가했으며 (도 1B), 결과가 또한 PKC-발현 NPC1 세포에서 확인된다 (도 1A).

[0057] **PKC 발현은 비멘틴으로부터 Rab9 해리를 유도한다**

[0058] 작은 GTPase Rab9가 NPC1 세포에서 비멘틴 필라멘트 내에 갇히게 되고 [5] Rab9 과발현이 NPC1 표현형을 수정한다는 [19] 관찰은 Rab9 유효성(availability)이 NPC1 세포에서 감소됨을 강하게 시사한다. 질환 세포는 Rab9 단백질 발현을 상향조절함으로써 이러한 부족을 보상하려는 시도를 할 수 있다. 이러한 아이디어는 NPC1 세포가 WT 세포보다 더 많은 Rab9 단백질을 함유한다는 사실에 의해 뒷받침된다 (도 1A 및 [19]). 앞서 기재된 바와 같이, PKC 발현은 가용성 비멘틴 수준을 증가시킬 뿐만 아니라 가용성 Rab9 수준을 상당히 증가시켰다 (도 1A 및 1B). PKC -발현 세포에서 증가된 Rab9 수준이 인산화 이후에 불용성 비멘틴으로부터 Rab9 방출의 결과인지 여부를 확인하기 위해, PKC 어세이를, NPC1 세포 용해물의 불용성 비멘틴 분획을 PKC 기질로서 사용하여 9가지의 정제된 PKC 동형을 사용하여 시험관내에서 실시했다. 모든 동형은 불용성 비멘틴으로부터 Rab9 방출을 다양한 정도로 행할 수 있었으며 (도 2), 이는 적어도 시험관내에서, 대부분의 PKC 동형이 비멘틴 인산화 및 Rab9 방출을 촉진할 수 있음을 시사한다. 흥미롭게도, PKC α 는 Rab9 방출에 있어 가장 큰 증가를 야기한 반면, PKC β II 및 ε 는 덜 효과적이었으며 PKC γ 는 거의 효과가 없었다. 이들 결과는 일시적으로 형질감염된 PKC-발현 세포의 결과와 상이한데, 이는 PKC β II가 PKC α 및 ε 보다 가용성 비멘틴 수준을 증가시키는데 있어 더 효과적임을 시사한다 (도 1A). 동형 효과성에 있어 불일치는 어세이의 성질, 각 동형의 고유 활성, 또는 상이한 동형들의 생체내 아세포 위치 및 비멘틴으로의 이들의 접근으로 인한 것일 수 있지만 [10,16,17,20]; PKC가 비멘틴을 가용화시킬 수 있고 그렇게 함에 있어 갇힌 Rab9를 방출할 수 있다는 것은 명백하다.

[0059] **PKC의 과발현이 NPC1 표현형의 부분 수정을 유도한다**

[0060] 상기 데이터 및 Rab9 과발현이 증가된 가용성 비멘틴 및 NPC1 표현형의 수정을 유도한다는 관찰에 기초하여 [5], PKC 과발현에 의해 야기된 증가된 비멘틴 용해도가 또한 NPC1 표현형의 수정을 유도하는지를 확인했다. NPC1 유전자좌의 결핍을 함유하는 NPC1 CHO(M12) 세포에 [21] PKC α 또는 PKC ε 로 형질감염시키고 E/L 시스템에서 아실-CoA: 콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(ACAT)에 의한 에스테르화를 위해 ER로 수송된 LDL-유래 유리 콜레스테롤의 양을 측정했다 [22]. M12 세포에 대한 에스테르화 수준은 모 WT CHO 세포의 에스테르화 활성의 10% 미만이었으며 (도 3), 이는 E/L 시스템 밖으로 콜레스테롤 수송의 차단과 일치한다. PKC α 또는 PKC ε 의 발현은 콜레스테롤 수송 차단을 완화시켰으며, 이는 형질감염되지 않은 M12 세포의 것보다 각각 대략 4-배 및 6.5-배로 M12 세포 에스테르화 수준을 증가시킨다 (도 3, +PKC α , +PKC ε). 이들 결과는 PKC의 발현에 의해 매개되는 비멘틴의 가용화가 NPC1 지질 수송 차단을 부분적으로 해방시킬 수 있음을 나타낸다.

[0061] PKC-형질감염된 세포에서 콜레스테롤 저장은, 유리 콜레스테롤에 결합하는 형광 프로브인 필리핀으로 착색함으로써 정성적으로 결정되었다 [23]. 이러한 분석은 도 3에 도시된 에스테르화 연구와 유사한 결과를 도출했다.

PKC α , PKC ϵ , 또는 PKC β II에 대해 양성인 세포(GFP 공-발현으로 확인됨)는 주변 형질감염되지 않은 세포보다 상당히 더 약한 필리핀 착색을 보여주었다 (도 4). 이들 결과는 Rab9 과발현 세포에서 확인된 것과 유사했으며 (도 4, Rab9), 이는 NPC1 콜레스테롤 저장 표현형을 수정하는 것으로 이전에 확인된 바 있다 [19].

[0062] 지방산에의 노출이 NPC1 세포에서 가용성 비멘틴 수준을 증가시킨다

[0063] 지방산 및 특히 올레산은 PKC 활성을 유도하는 것으로 나타난 반면 [24], 리놀레산의 하류 대사물질, DCP-LA(8-[2-(2-펜틸-시클로프로필메틸)-시클로프로필]-옥탄산)은 PKC ϵ 를 강력하게 활성화시키는 것으로 나타났다 [25,26]. 나아가, NPC1 엔도솜이 다량의 지방산을 저장하는 것으로 이전에 확인되었으며 [27], 이는 PKC 활성화 및 다른 프로세스를 위해 세포에 이용가능한 유리 지방산의 양을 잠재적으로 제한할 수 있다.

[0064] 외부적으로 첨가된 지방산이 NPC1 세포에서 비멘틴 가용화를 증가시킬 수 있는지를 확인하기 위해, 인간 NPC1 섬유아세포를 올레산 또는 리놀레산으로 48시간 처리하고 세포 용해물에서 가용성 비멘틴의 수준을 분석했다. NPC1 섬유아세포는 아주 적은 가용성 비멘틴을 함유한다 (도 5A 및 [5]). 올레산 또는 리놀레산을 이용한 처리는 가용성 비멘틴의 양을 상당히 증가시키며, 올레산이 약간 더 효과적이다. 이들 결과는 외부적으로 첨가된 지방산이 아마도 PKC를 활성화시킴으로써, NPC1 세포에서 비멘틴 가용화를 유도할 수 있음을 시사한다.

[0065] 지방산에의 노출은 NPC1 표현형의 수정을 유도한다

[0066] 지방산이 NPC1 세포에서 비멘틴의 가용화를 증가시키기 때문에, 이들은 또한 NPC1 표현형을 개선할 것이다. M12 CHO 세포(도 5B) 및 인간 NPC1 섬유아세포(도 5C)를 각 지방산으로 처리한 다음 필리핀으로 착색했다. WT 세포 (도 5B/C, 1)는 필리핀으로 매우 약하게 착색되는 반면, NPC1(도 5B/C, 2) 세포는 밝은, 점 모양의 착색을 함유하는데 이는 세포내 소포에서 유리 콜레스테롤을 나타낸다. 두 종으로부터의 NPC1 세포에서 필리핀 형광은 지방산에 노출 후 상당히 감소했다 (도 5B/C, 3 및 4). 통합형 형태계측에 의한 필리핀 형광 수준의 정량 후, 두 지방산은 두 NPC1 세포주에서 콜레스테롤 축적 수준을 극적으로 감소시키는 것으로 확인되었으며, 이는 필리핀 형광을 비처리된 세포에서의 수준의 대략 75%까지 감소시킨다 (도 5B/C, 그래프). 인간 섬유아세포는 CHO 또는 마우스 NPC1 세포주보다 더 많은 이질성 필리핀 착색 패턴을 나타내며, 이는 비처리된 3123 세포에서 보다 높은 표준 편차에 반영된다 (도 5C, 그래프). M12 세포에서 콜레스테롤 에스테르화에 대한 지방산의 효과를 또한 평가했다. 리놀레산은 비처리된 M12 세포에 비해 2배를 초과하여 콜레스테롤 에스테르화를 증가시켰다 (도 3, $+Lin$). 올레산 또는 리놀레산으로 처리 후 PKC ϵ 의 발현이 이루어진 M12 세포에서, NPC1 표현형의 수정이 더욱 현저했으며, 이때 에스테르화 수준이 비처리된 세포보다 대략 3.5배였다 (도 3, $+PKC \epsilon$ /올레산 및 $+PKC \epsilon$ /리놀레산). 이들 결과는 지방산 및 PKC 발현이 NPC1 콜레스테롤 수송 차단에 수정에 대해 상가적 효과를 가짐을 시사한다.

[0067] NPC 표현형에 대한 지방산의 효과를 더욱 특징규명하기 위해, 도코사헥산산(DHA) 및 리놀레산의 대사산물, DCP-LA의 능력을 M12 CHO 세포에서 콜레스테롤 저장을 감소시키는 이들의 능력에 대해 시험했다. 두 지방산은 PKC ϵ 를 강력하게 활성화시키는 것으로 나타났다 [24,28]. 이들 화합물을 이용한 M12 CHO 세포의 밤새 처리는 비처리된 세포에 비해(도 6B) 감소된 콜레스테롤 저장(도 6C/D)을 유도했다. DCP-LA(도 6C)는 DHA(도 6D)보다 약간 더 효과적이었다. 이들 세포에서 필리핀 강도의 정량은 두 화합물이 M12 CHO 세포에서 콜레스테롤 저장을 대략 50% 감소시켰음을 보여주었으며 (도 6G), 아마도 PKC ϵ 의 활성화를 통한 NPC 질환 표현형에 대한 유리 지방산의 양성적 효과에 대한 추가적 지지를 제공한다.

[0068] NPC 구조에서 PKC의 역할에 대한 추가 지지를 제공하기 위해, M12 세포를, PKC ϵ 를 활성화시키는 것으로 확인된 디아족사이드로 처리했다 [29]. 이러한 처리는 비처리된 세포에 비해(도 6E) M12 CHO 세포에서(도 6F) 감소된 콜레스테롤 축적을 유도했다. 이들 세포에서 필리핀 강도의 정량은 유리 지방산을 이용하여 확인된 결과와 마찬가지로 (도 6G) 디아족사이드가 콜레스테롤 저장을 대략 50% 감소시켰음을 보여주었다.

[0069] NPC1 표현형에 대한 DCP-LA 및 지방산의 양성적 효과를 추가로 확인하기 위해, 인간 NPC1 세포를 DCP-LA, 지방산, 또는 PMA로 처리하여 PKC를 활성화시켰다. 이후 세포를, 세포내 경로의 동적 보기를 제공하는 것으로 이전에 확인된 BODIPY-LacCer로 표지했다 [30]. 원형질 막으로의 흡수 이후에, LacCer 스펅고리피드가 엔도시토시스를 통해 정상 세포로 진입하고 결국 트랜스-골지망에 도달한다(TGN; [30]). 그러나 NPC1 세포에서 지질 수송 차단으로 인해, 이러한 스펅고리피드는 엔도솜 내에 갇히게 되고 TGN으로의 이의 표적화가 극적으로 억제된다 [30]. 도 7에 나타난 바와 같이 처리된 인간 NPC1 세포는, 단지 점 모양의, 엔도솜 형광을 보여주는 비처리된 세포에 비해 (도 7A) TGN에 효과적으로 도달하는 BODIPY-LacCer을 이용한 지질 수송에 있어 극적 개선을 보여준다 (도 7; 화살표). 이들 결과는 이들 작용제가 NPC1 지질 차단을 해제할 수 있다는 것에 대한 추가적인 지지를

제공한다.

[0070] 종합해 보면, 이들 결과는 PKC ϵ 를 활성화시킴으로써 작용할 수 있는 유리 지방산에의 노출이 NPC 콜레스테롤 저장 표현형에 대한 양성적 효과를 가짐을 나타낸다.

[0071] 검토

[0072] NPC1 세포에서 Rab9 발현은 E/L 시스템으로부터 지질 수송을 회복시키고 콜레스테롤 에스테르화를 표준화시켰으며 [19] 결국 Rab9가 NPC1 세포에서 불용성 비멘틴 필라멘트 내에 갇혀 있었음을 보여주었다 [5]. 결과적으로, NPC1 세포에서 축적된 지질, 예컨대 스펅고신[31, 32]이 다양한 PKC 동형에 대해 억제 효과를 일으키고, 그 결과 비멘틴 인산화/탈인산화 사이클의 파괴를 야기한다 [19].

[0073] NPC1 세포에서 PKC 억제 및 비멘틴 하이포인산화의 성질을 특징규명하기 위해, NPC1 세포에서 다수의 PKC 동형 (α , β II 및 ϵ)을 발현시키고 비멘틴 가용화 및 NPC1 표현형의 수정에 대한 이들의 효과를 특징규명했다. 세 가지 동형 모두 비멘틴 가용화에 대한 양성적 효과를 다양한 정도로 가졌다 (도 1).

[0074] 또한, PKC-유도된 비멘틴 가용화는 갇힌 Rab9의 방출을 동반했다 (도 1). 어떤 PKC 동형이 비멘틴 인산화 및 Rab9 방출에 있어 보다 효과적이지를 추가로 확인하기 위해, 8가지의 상이한 PKC 동형을 시험관내 어세이에서 시험했다. 대부분의 동형은 비멘틴으로부터 Rab9를 다양한 정도로 방출할 수 있었으며 (도 2), 생체내에서인 경우에는 그렇지 않을 수 있다. 이러한 불일치는 아마도 PKC 동형들의 상이한 생체내 아세포 위치 및 비멘틴 필라멘트로의 이들의 접근에 기인하는 것 같다 [16, 20]. 그러나, 비멘틴의 PKC ϵ -제어된 인산화와 관련하여 확인된 바와 같이, 비멘틴은 특정 PKC에 대한 직접적인 기질이 아닐 수 있다는 것이 또한 가능하다 [10]. 이 연구에서, PKC ϵ 매개된 비멘틴 인산화는 세포를 통한 적절한 인테그린 리사이클링에 중요한 것으로 확인되었다. 이러한 연구는 NPC1 세포에서 PKC 동형의 발현이 NPC1 질환 표현형, 즉, 엔도솜/리소솜 시스템에서 콜레스테롤 축적의 부분적 수정을 유도하는 것을 암시한다.

[0075] 또한, 다수의 연구는 장쇄 지방산 예컨대 올레산 및 리놀레산이, 하류 대사산물 예컨대 DCP-LA와 함께, 비멘틴 필라멘트를 인산화하는 것으로 확인된 동형인 [10] PKC ϵ 를 활성화시킬 수 있음을 보여준다 [24, 25]. 유리 지방산의 유효성이 NPC1 세포에 제한될 수 있다는 이전 보고가 있기 때문에 [27,33], 외부적으로 첨가된 지방산은 아마도 PKC ϵ 를 활성화시키고 비멘틴의 인산화 및 Rab9 방출을 유도함으로써, NPC1 표현형에 대한 양성적 효과를 갖는 것으로 여겨졌다. 예상한 바와 같이, 올레산, 리놀레산, 또는 DCP-LA의 첨가는 NPC1 세포에서 가용성 비멘틴의 증가를 유도했다 (도 5). 또한, 지방산 첨가가 NPC1 세포에 의한 콜레스테롤 에스테르화에 있어 상당한 개선을 유도했으며 (도 3), 이는 E/L 시스템으로부터 지질 수송이 회복되었음을 의미한다. PKC ϵ 의 공지의 활성화제인 디아족사이드에 대해 [29] NPC1 표현형을 수정하는 능력을 시험하여, NPC1 병인에 기여함에 있어 비멘틴의 불충분한 PKC 인산화의 수반에 대한 추가 지지를 제공한다. 여기서 제시된 결과와 일치하여, 디아족사이드는 NPC1 세포에서 콜레스테롤 축적을 50% 감소시킬 수 있었다 (도 6). 복수 PKC ϵ 활성화제를 이용한 결과가, PKC ϵ 이 NPC 세포 내에서 이러한 변화를 매개한다는 것을 강하게 시사하고는 있으나, 이들 작용제가 PKC 이외의 몇몇 다른 경로 또는 단백질을 통해 작용할 수 있을 가능성이 배제될 수 없다.

[0076] 이들 데이터는 NPC 마우스 간에서 비정상적 PKC 발현의 이전의 관찰과 일치한다 [34]. 그러한 연구에서는 PKC α , δ , ϵ , 및 ζ 의 발현을 면역블롯에 의해 평가했다. PKC α 및 δ 은 WT 간에 비해 NPC1 간에서 약 3-배 더 높았지만, PKC ϵ 는 크게 증가하지 않았고 PKC ζ 는 이형접합 간에서만 더 높았다. PKC ϵ 이 자체로 상향조절이 가능하지 않고 예를 들면 지방산에 의해 활성화될 수 있으며, 이러한 활성화는 NPC1 세포에 유익한 결과를 제공할 수 있다고 가정하는 것이 흥미롭다. PKC ϵ 이 비멘틴의 인산화를 담당하고, 다시, 다양한 리간드 예컨대 인테그린의 소포 수송을 제어한다는 강력한 증거가 존재한다 [10]. 신경병리를 갖는 질환 예컨대 NPC1에서 상당히 증폭되는 단백질을 치료제로서 전달하는 어려움을 고려할 때, 중요한 조절인자 예컨대 PKC ϵ 의 작은 지질 활성화제가 굉장히 유리할 것이다. 이러한 결과는 비멘틴 인산화를 담당하는 PKC 동형(들)의 확인이 C형 니만 피크병뿐만 아니라, E/L 지질 축적을 유도하는 다른 리소솜 축적 장애의 치료를 위한 신규의 치료 타겟을 제공할 수 있음을 시사한다 [35].

[0077] 실시예 2

[0078] 본 발명자들은 또한 48-72시간 동안 인간 NPC1 세포의 치료 후, 유리 콜레스테롤에 대한 프로브(필리핀)를 이용한 C형 니만 피크병의 표현형, 글리코스핑고리피드 수준(VTB) 및 강글리오시드 이동(CTB)에 대한 PKC 활성화제 브리오스타틴 1 및 DCPLA의 효과를 연구했다.

[0079] 재료 및 방법

표 1

[0080]

인간 NPC1 세포주	
NPC3---SV:	SV40 라지 T 불멸화됨
종:	인간
공급원:	Mount Sinai-소유
NPC 유전자형:	V1165M 및 3741-44delACTC
NPC24---SV:	SV40 라지 T 불멸화됨
종:	인간
공급원:	Mount Sinai-소유
NPC 유전자형:	p.I1061T/p.I1061T

표 2

[0081]

시약	
PKC 활성화제:	브리오스타틴 1, DCPLA, 디아족사이드
공급원:	Santa Cruz Biotech, Sigma-Aldrich
착색 시약:	필리핀, 콜레라 독소 B, 베로독소 B
공급원	Polysciences, Sigma-Aldrich, MS 소유

[0082] 일반 방법론

[0083] 세포를 6-웰 디쉬에 플레이팅하고 48시간 동안 매일 정해진 용량으로 적절한 화합물(DMSO에 용해됨)로 처리한다. 대조군 세포는 DMSO를 제공받는다. 48시간 후 세포를 새로운 화합물을 갖는 커버 슬립으로 옮겨 추가 24시간 동안 성장시킨다. 커버 슬립을 모아 현미경검사를 위해 프로세싱한다.

[0084] 어세이 프로토콜

[0085] **필리핀**: 리소솜에서 비에스테르화된 콜레스테롤의 검출을 위해, 세포를 4°C에서 포르말린에서 30분간 고정시키고, 0.9% NaCl에서 2회, 5분간 세척하고, 실온에서 PBS 중 0.01% 필리핀과 함께 45분간 인큐베이트한 후, 2회, 5분간 세척했다. CCD 카메라가 장착된 Nikon Eclipse 형광 현미경(Nikon, 뉴욕주 멜빌)을 사용하여 형광을 관찰했다. Nikon의 이미징 및 정량 소프트웨어 패키지 NIS 엘리먼트, v.3.22를 사용하여 형광 신호를 정량했다.

[0086] **베로독소 B (VTB)**: VTB 착색을 위해 (글리코스핑고리피드 검출) 세포를 PBS로 세척하고 4°C에서 포르말린에서 30분간 고정시킨다. 실온에서 0.9% 염화나트륨을 사용하여, 2회, 5분간 세척한 후, 세포를 1.5 ml PBS에서 디기토닌 50 µg/웰을 사용하여 투과성하도록 한다. 세포를 PBS로 세척하고, 알렉사-표지된 VTB를 1 ml PBS에 0.5 µg/웰로 첨가한다. 세포를 어두운 데에서 셰이커 상에서 실온에서 45분간 인큐베이트하고, 실온에서 0.9% 염화나트륨으로, 2회, 5분간 세척하고, 가시화를 위해 마운팅한다.

[0087] **콜레라 독소 B (CTB)**: CTB 표지를 위해 (강글리오시드 이동) 세포를 PBS로 세척하고, 0.5 µg/웰 CTB를 1.5 ml Opti-MEM/웰에 첨가한다. 세포를 37°C 인큐베이터에서 1시간 동안 인큐베이트한다. FBS 배지를 갖는 완전 DMEM을 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션을 지속한다. 세포를 PBS로 세척하고 4°C에서 포르말린으로 15분간 고정시킨다. 세포를 실온에서 0.9% 염화나트륨으로, 2회, 5분간 세척하고 가시화를 위해 마운팅한다.

[0088] 분석, 결과 및 결론

[0089] 니만 피크 C1 (NPC1) 세포는 결함있는 NPC1 단백질을 가지며 다양한 엔도솜 소포 내에 다수의 지질 예컨대 콜레스테롤, 스펅고리피드 및 강글리오시드의 과도한 축적을 특징으로 한다 (도 2). 다양한 환자로부터의 NPC1 세포의 특징규명 및 이 질환을 치료하는데 유익할 수 있는 잠재적 화합물의 평가에서 다양한 NPC1-특이적 지질의 클리어런스 및/또는 이동을 측정하는 다수의 다양한 어세이가 실시되었다. 예를 들면 필리핀은 저장된 콜레스테롤의 수준을 검출하는데 사용된 반면 (어세이 프로토콜) 베로독소 B (VTB)는 콜레스테롤을 함유하는 것들과 구분되는 엔도솜에 종종 저장되는 글리코스핑고리피드의 수준의 평가를 허락한다 (어세이 프로토콜). 이외에, 다른

프로브, 콜레라 독소를 사용함으로써 원형질 막으로부터 강글리오시드의 이동을 모니터링할 수 있다 (어세이 프로토콜).

[0090] 이들 연구는 세가지 모든 PKC 활성화제, 브리오스타틴 1, DCPLA 및 디아족사이드가 NPC1 세포로부터 콜레스테롤의 클리어런스를 다양한 정도로 그리고 상이한 약물 농도에서 유도할 수 있음을 암시한다 (도 8). 그러나, 브리오스타틴 1은 나노몰 농도 범위에서 활성을 보이는 가장 활성적인 화합물인 것으로 여겨진다 (도 9). 10 nM에서 브리오스타틴 1은 또한 NPC1 세포의 글리코스핑고리피드 축적을 감소시키는데 있어 통계적으로 유의한 효과성을 보여준다 (도 10).

[0091] 브리오스타틴 1의 효과가 앞선 실험들에서 사용된 NPC1 세포의 유전자형(즉, 특정 환자가 보유하는 특이적 NPC1 유전자 돌연변이)에 의존하는 지를 확인하기 위해 완전히 구분되는 NPC1 유전자형을 갖는 다른 환자 세포주를 사용했다. 브리오스타틴 1은 10 nM 농도에서 이들 세포로부터 콜레스테롤 클리어런스를 여전히 행할 수 있었으며, 이는 브리오스타틴 1의 활성이 NPC1 유전자형에 독립적임을 암시한다 (도 11).

[0092] 브리오스타틴 1은 또한 원형질 막으로부터 엔도솜을 통해 골지망으로 지질의 이동을 모니터링하는 동적 어세이에 효과적이었다. 10 nM에서 브리오스타틴 1은 NPC1 세포로부터 엔도솜-갖힌 콜레라 독소(CTB)를 청소할 수 있었다 (도 12).

[0093] 이러한 결과를 확인하기 위해 브리오스타틴 1을 0.1 nM 내지 100 nM의 범위로 사용하고 콜레스테롤 및 스펅고리피드 어세이 둘다에서 평가했다 (도 13). 0.1 nM에서 브리오스타틴은 두 어세이에서 효과를 가지지 않는다. 효과는 1 nM에서 통계적으로 유의하며 브리오스타틴 1 농도가 증가할수록 증가한다.

[0094] 따라서, 브리오스타틴 1은 10-100 nM의 농도에서 인간 NPC1 질환 세포에 대해 양성적 치료 효과를 보여주었다.

[0095] 실시예 3

[0096] C형 니만 피크병은 신경퇴행 및 유아기 사망을 야기하는 심각한 선천성 지방증이다. 신경퇴행을 야기하는 생화학적 및 세포적 이벤트는 현재 이해가 부족한 상태이다. 그러나, PKC ϵ 활성화가 차단된 지질 수송 경로를 회복시킬 수 있고 NPC 엔도솜/리소좀에서 저장된 지질 재료의 감소를 유도하는 것으로 나타났다. 이에, PKC의 천연 산물 활성화제인 브리오스타틴 1을 이용한 NPC1 마우스의 치료는 이 동물 모델에서 질환 진행의 개선을 유도한다.

[0097] 총 30마리의 C57B16 NPC1 마우스(암수 혼합)를 사용했다. 이들 마우스를 5개 그룹(각 5마리), 그룹 1-5로 나눴다.

[0098] 연구 약물

[0099] Aphios(매사추세츠주 우번)의 브리오스타틴 1(순도 $\geq 95\%$), 1 바이알 2 mg을, 5% DMSO, 20% 솔루톨(Solutol) 및 75% 식염수에 가용화시키고 연구 약물로서 사용했다. 음성(비히클) 대조군은 5% DMSO, 20% 솔루톨 및 75% 식염수이다. Sigma-Aldrich의 DCP-LA: 5 mg 오일/바이알을 추가의 시험관내 활성 화합물로서 사용했다. 브리오스타틴 1(API)을 -20°C 이하에 보관하고 필요시 제제화했다. 제제화된 브리오스타틴 1을 2°C 내지 8°C 에서 24 시간(들) 미만 동안 보관했다. DCP-LA 및 비히클 대조군을 2°C - 8°C 에서 보관했다.

[0100] 브리오스타틴 1의 스톱 용액은 DMSO 중 10 mg/ml이며, 분취량으로 -80°C 에서 유지된다. 투약 제제는 스톱을 우선 DMSO에 희석시킨 다음, 솔루톨, 및 마지막으로 식염을 첨가함으로써 제조되고 - 보다 많은 불용성 화합물을 가짐, 약물 스톱을 완전 비히클에 첨가하면 화합물이 용액 밖으로 나올 것이므로, 이에 본 발명자들은 단계적으로 제제를 만든다. 투약 부피는 항상 100 μl 이다. 마우스 체중은 대략 20 g이다.

[0101] 투약 및 빈도

[0102] 연구 작용제를 표 3에 나타난 바와 같이 복강내(IP) 투여한다. 30일째 출발하여 최대 150일간 주 2회(월요일 및 목요일) 마우스에 투여한다.

표 3

[0103]

투약 계획		
그룹	작용제	투약량
그룹 1:	비히클 대조군(mL)	
그룹 2:	브리오스타틴-1	[BHD-1] 40 $\mu\text{g/kg}$ (120 $\mu\text{g/m}^2$)
그룹 3:	브리오스타틴-1	[BHD-2] 30 $\mu\text{g/kg}$ (90 $\mu\text{g/m}^2$)
그룹 4:	브리오스타틴-1	[BHD-3] 20 $\mu\text{g/kg}$ (60 $\mu\text{g/m}^2$)

그룹 5:	브리오스타틴-1	[BHD-4] 10 μ g/kg (30 μ g/m ³)
그룹 6:	브리오스타틴-1	[BHD-5] 5 μ g/kg (15 μ g/m ³)
그룹 7:	활성	(DCP-LA 3 mg 오일/kg)

[0104] 연구 기간

[0105] C57 NPC1 마우스는 대략 110일의 평균 수명을 갖는다. 70일까지 마우스는 평균 체중 18-22 그램에 도달한다. 비처리된 NPC1 마우스는 운동 실조를 나타내며 대략 70일째 체중을 상실하기 시작할 것이다 (도 17 참조). 운동 실조(또는 자발적 근육 제어 결여)는 NPC1 마우스의 임상적 특징이며, 웨이킹으로서 기재될 수 있다. 치료는 평균 NPC 마우스 체중 10 g인, 생후 대략 30일째에 개시될 것이다. 약물이 효과가 있다면 주입은 70-80일을 넘어 계속될 것이다. 약 20-30%의 수명의 연장은 동물이 최대 130-150일간 치료될 필요가 있을 것임을 의미할 것이다.

[0106] 데이터 수집

[0107] 초기에 마우스를 칭량할 것이고 체중은 각 주입 이전에 기록될 것이다. 마우스를 주기적으로 로타로드(rotarod)에서 시험할 수 있고 로타로드에서의 시간을 기록할 것이다.

[0108] 콜레스테롤 저장 및 퍼킨제 세포 생존의 평가를 위해 안락사하면서 혈액을 수집하고 뇌를 냉동시켜 보관한다. 이외에, 이들 마우스로부터 간과 비장을 추출하고, 조직학을 위해 준비하며 주변 장기 지질 축적에 대한 브리오스타틴 1 치료의 효과를 확인하기 위한 옵션을 위해 냉동 보관한다.

[0109] 데이터 분석

[0110] 주요 결과는 연구 과정 전반에 걸쳐 투약일에 수집된 (2회/주) 체중일 것이다. 동물이 조직학적으로 체중 상실을 경험하는 경우, 특히 생후 70일 후에, 비히클 대조군과 상이한 용량의 브리오스타틴 1 간의 차이를 조사할 것이다.

[0111] 부차적인 결과는 하기를 포함한다: (1) 간과 비장에서 지질 축적, 및 (2) 소뇌 퍼킨제 세포 생존 및 콜레스테롤 축적 (주요 결과가 양성인 경우에만 수행될 수 있음).

[0112] 결과

[0113] 용량 그룹 30, 20 및 10 μ g/kg의 마우스가 생후 100일을 넘어 생존했다.

[0114] 당업자는 본원에서의 실시예들이 제한적인 의도가 아님을 인지할 것이고, 당업자는 지질 축적 장애를 치료하는데 본원의 교시를 용이하게 적용할 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명은 본원에 고유한 것들뿐만 아니라 언급된 목적 및 이점을 달성하도록 올바르게 채택된다. 당업자에 의해 무수한 변화가 이루어질 수 있으며, 이러한 변화는 부분적으로 청구 범위에 기재된 바와 같은 본 발명의 취지 내에 포함되어진다.

참고문헌

1. Mellor H, Parker PJ (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 332(2): 281-292. PubMed: 9601053.
2. Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C (1992) The protein kinase C family. *Eur J Biochem* 208: 547-557. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17219.x. PubMed: 1396661.
3. Cloud-Heflin BA, McMasters RA, Osborn MT, Chambers TC (1996) Expression, subcellular distribution and response to phorbol esters of protein kinase C (PKC) isozymes in drug-sensitive and multidrugresistant KB cells evidence for altered regulation of PKC-alpha. *Eur J Biochem* 239: 796-804. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0796u.x. PubMed: 8774728.
4. Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV (2012) Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 11: 937-957. doi: 10.1038/nrd3871. PubMed: 23197040.
5. Walter M, Chen FW, Tamari F, Wang R, Ioannou YA (2009) Endosomal lipid accumulation in NPC1 leads to inhibition of PKC, hypophosphorylation of vimentin and Rab9 entrapment. *Biol Cell* 101: 141-152. doi:10.1042/BC20070171. PubMed: 18681838.
6. Shen WJ, Zaidi SK, Patel S, Cortez Y, Ueno M et al. (2012) Ablation of vimentin results in defective steroidogenesis. *Endocrinology* 153: 3249-3257. doi:10.1210/en.2012-1048. PubMed: 22535769.
7. Styers ML, Kowalczyk AP, Faundez V (2005) Intermediate filaments and vesicular membrane traffic: the odd couple's first dance? *Traffic* 6: 359-365. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00286.x. PubMed: 15813746.
8. Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Scger R et al. (2005) Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 45: 715-726. doi:10.1016/j.neuron. 2005.01.023. PubMed: 15748847.

[0115]

9. Toda M, Kuo CH, Borman SK, Richardson RM, Inoko A et al. (2012) Evidence that formation of vimentin mitogen-activated protein kinase (MAPK) complex mediates mast cell activation following FcεRI/CC chemokine receptor 1 cross-talk. *J Biol Chem* 287: 24516-24524. doi:10.1074/jbc.M111.319624. PubMed: 22613718.
10. Ivaska J, Vuoriluoto K, Huovinen T, Izawa I, Inagaki M et al. (2005) PKCε-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J* 24: 3834-3845. doi:10.1038/sj.emboj.7600847. PubMed: 16270034.
11. Sarria AJ, Panini SR, Evans RM (1992) A functional role for vimentin intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol in human SW-13 cells. *J Biol Chem* 267: 19455-19463. PubMed: 1527066.
12. Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Härmälä-Braskén AS, Hellman J et al. (2004) Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci* 117: 919-932. doi:10.1242/jcs.00906. PubMed: 14762106.
13. Klymkowsky MW (1995) Intermediate filament organization, reorganization, and function in the clawed frog *Xenopus*. *Curr Top Dev Biol* 31: 455-486. PubMed: 8746673.
14. Mor-Vaknin N, Punturieri A, Sitwala K, Markovitz DM (2003) Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol* 5: 59-63. PubMed: 12483219.
15. Mangoura D, Sogos V, Dawson G (1995) Phorbol esters and PKC signaling regulate proliferation, vimentin cytoskeleton assembly and glutamine synthetase activity of chick embryo cerebrum astrocytes in culture. *Brain Res Dev Brain Res* 87: 1-11. doi: 10.1016/0165-3806(95)00046-G. PubMed: 7554227.
16. Spudich A, Meyers T, Stryer L (1992) Association of the beta isoform of protein kinase C with vimentin filaments. *Cell Motil Cytoskeleton* 22: 250-256. doi:10.1002/cm.970220405. PubMed: 1516148.
17. Szalay J, Bruno P, Bhati R, Adjodha J, Schueler D et al. (2001) Associations of PKC isoforms with the cytoskeleton of B16F10 melanoma cells. *J Histochem Cytochem* 49:

[0116]

49-66. doi: 10.1177/002215540104900106. PubMed: 11118478.

18. Bertrand F, Veissiere D, Hermelin B, Paul A, Capeau J et al. (1994) Phosphorylation of vimentin is an intermediate step in protein kinase C-mediated glycoconjugate secretion. *Am J Physiol* 266: C611-C621. PubMed: 7513122.

19. Walter M, Davies JP, Ioannou YA (2003) Telomerase immortalization upregulates Rab9 expression and restores LDL cholesterol egress from Niemann-Pick C1 late endosomes. *J Lipid Res* 44: 243-253. doi: 10.1194/jlr.M200230-JLR200. PubMed: 12576506.

20. Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D (1994) Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res* 210: 287-297. doi:10.1006/excr.1994.1041. PubMed: 8299726.

21. Millard EE, Srivastava K, Traub LM, Schaffer JE, Ory DS (2000) Niemann-pick type C1 (NPC1) overexpression alters cellular cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 275: 38445-38451. doi:10.1074/jbc.M003180200. PubMed: 10964915.

22. Pentchev PG, Boothe AD, Kruth HS, Weintraub H, Stivers J et al. (1984) A genetic storage disorder in BALB/C mice with a metabolic block in esterification of exogenous cholesterol. *J Biol Chem* 259: 5784-5791. PubMed: 6325448.

23. Bolard J (1986) How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta* 864: 257-304. doi:10.1016/0304-4157(86)90002-X. PubMed: 3539192.

24. Khan WA, Blobe G, Halpern A, Taylor W, Wetsel WC et al. (1993) Selective regulation of protein kinase C isoenzymes by oleic acid in human platelets. *J Biol Chem* 268: 5063-5068. PubMed: 8444883.

25. Kanno T, Yamamoto H, Yaguchi T, Hi R, Mukasa T et al. (2006) The linoleic acid derivative DCP-LA selectively activates PKC-epsilon, possibly binding to the phosphatidylserine binding site. *J Lipid Res* 47:1146-1156. doi:10.1194/jlr.M500329-JLR200. PubMed: 16520488.

[0117]

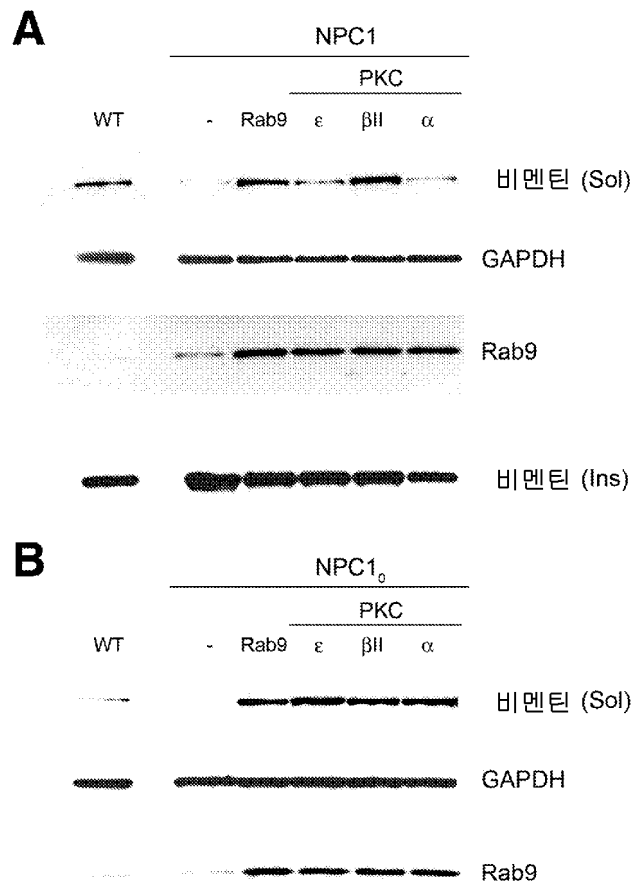
26. Tanaka A, Nishizaki T (2003) The newly synthesized linoleic acid derivative FR236924 induces a long-lasting facilitation of hippocampal neurotransmission by targeting nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 1037-1040. doi:10.1016/S0960-894X(03)00089-1 PubMed: 12643906
27. Chen FW, Gordon RE, Ioannou YA (2005) NPC1 late endosomes contain elevated levels of non-esterified ('free') fatty acids and an abnormally glycosylated form of the NPC2 protein. *Biochem J* 390: 549-561. doi:10.1042/BJ20050236. PubMed: 15896196.
28. Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614. doi:10.1126/science.1411571. PubMed: 1411571.
29. Kim MY, Kim MJ, Yoon IS, Ahn JH, Lee SH et al. (2006) Diazoxide acts more as a PKC-epsilon activator, and indirectly activates the mitochondrial K(ATP) channel conferring cardioprotection against hypoxic injury. *Br J Pharmacol* 149: 1059-1070. PubMed: 17043673.
30. Puri V, Watanabe R, Dominguez M, Sun X, Wheatley CL et al. (1999) Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nat Cell Biol* 1: 386-388. doi: 10.1038/14084. PubMed: 10559968.
31. Goldin E, Roff CF, Miller SP, Rodriguez-Lafrasse C, Vanier MT et al. (1992) Type C Niemann-Pick disease: a murine model of the lysosomal cholesterol lipidosis accumulates sphingosine and sphinganine in liver. *Biochim Biophys Acta* 1127: 303-311. doi: 10.1016/0005-2760(92)90236-O. PubMed: 1324734.
32. Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R, Valla S, Antignac P, Louisot P et al. (1997) Modulation of protein kinase C by endogenous sphingosine: inhibition of phorbol dibutyrate binding in Niemann-Pick C fibroblasts. *Biochem J* 325(3): 787-791. PubMed: 9271101.
33. Leventhal AR, Leslie CC, Tabas I (2004) Suppression of macrophage eicosanoid synthesis by atherogenic lipoproteins is profoundly affected by cholesterol-fatty acyl esterification and the Niemann-Pick C pathway of lipid trafficking. *J Biol Chem* 279: 8084-8092. PubMed: 14638686.
34. Garver WS, Hossain GS, Winscott MM, Heidenreich RA (1999) The Npc1 mutation causes an altered expression of caveolin-1, annexin II and protein kinases and phosphorylation of caveolin-1 and annexin II in murine livers. *Biochim Biophys Acta* 1453: 193-206. doi:10.1016/S0925-4439(98)00101-X. PubMed: 10036317.
35. Ioannou YA (2004) Defects in transmembrane proteins. In: SUW, FM Platt. *Lysosomal disorders of the brain*. New York: Oxford University Press. pp. 206-228.
36. Ioannou YA, Zaidner KM, Gordon RE, Desnick RJ (2001) Fabry disease: preclinical studies demonstrate the effectiveness of alpha-galactosidase A replacement in enzyme-deficient mice. *Am J Hum Genet* 68: 14-25. doi:10.1086/316953. PubMed: 11115376.
37. Higgins ME, Davies JP, Chen FW, Ioannou YA (1999) Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol Genet Metab* 68: 1-13. doi: 10.1006/mgme.1999.2882. PubMed: 10479477.

[0118]

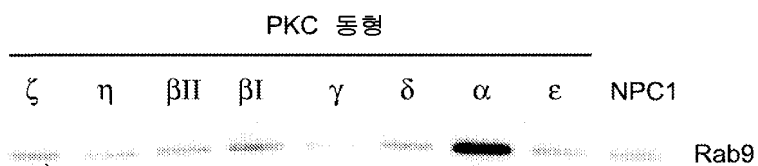
[0119]

도면

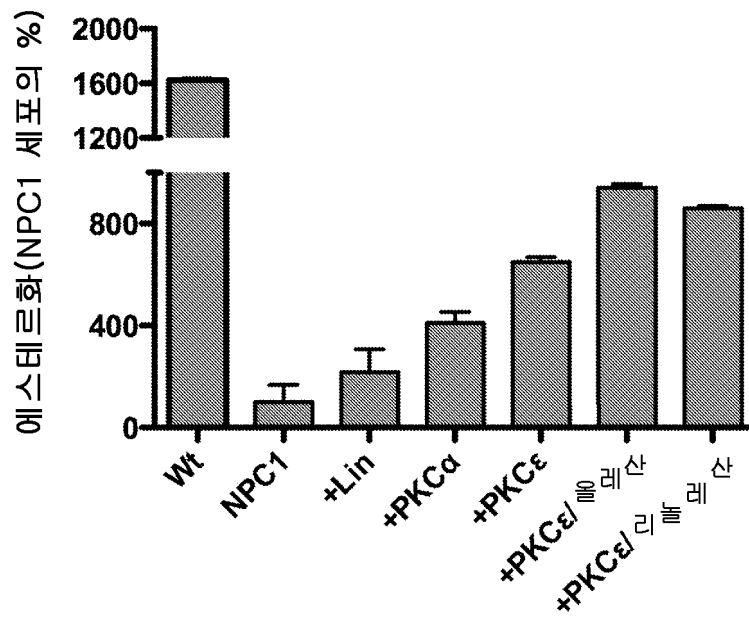
도면1



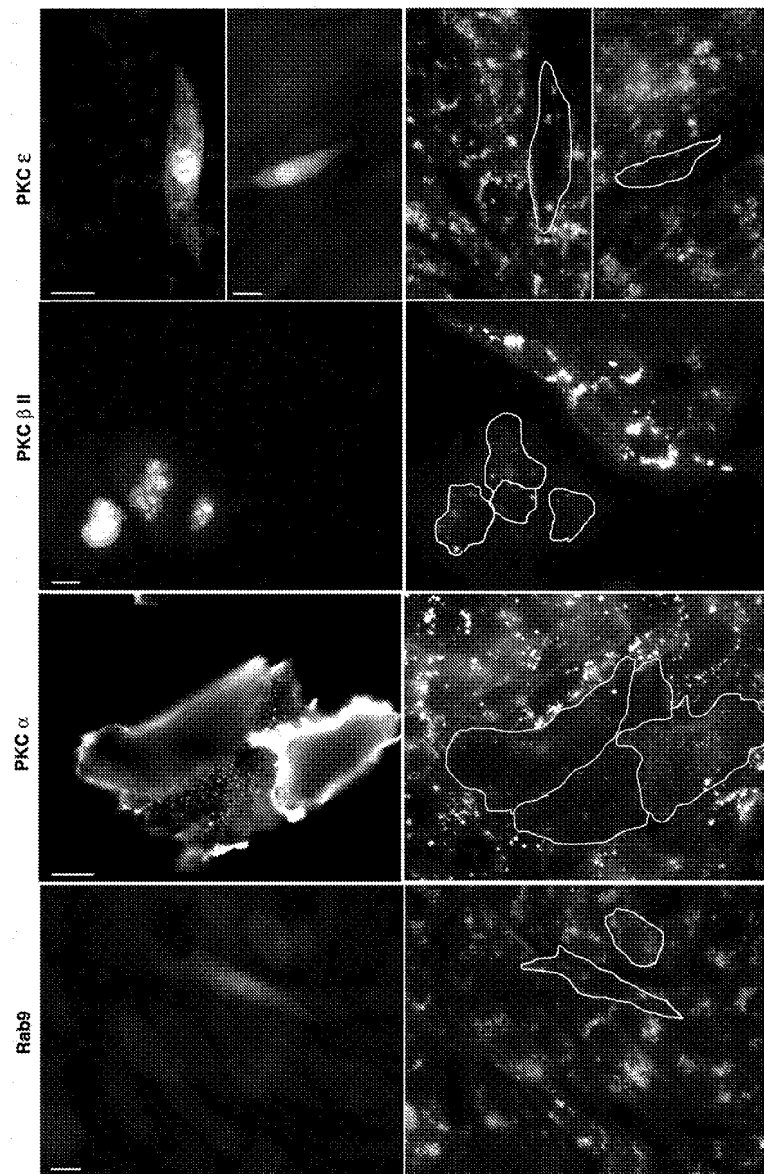
도면2



도면3

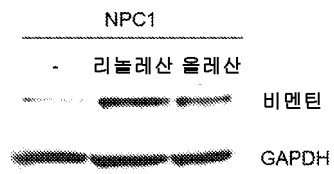


도면4

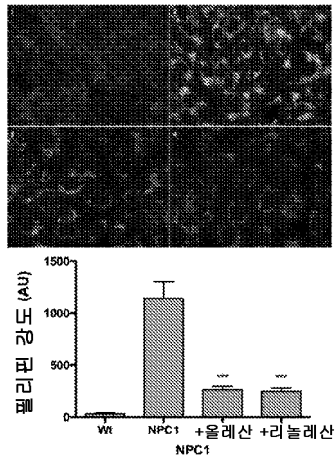


도면5

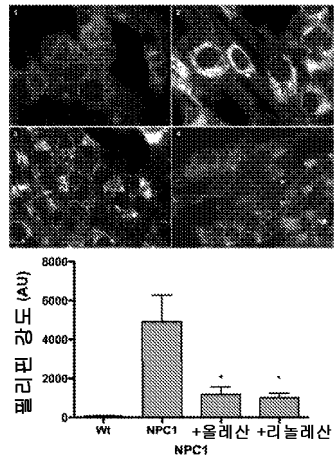
A



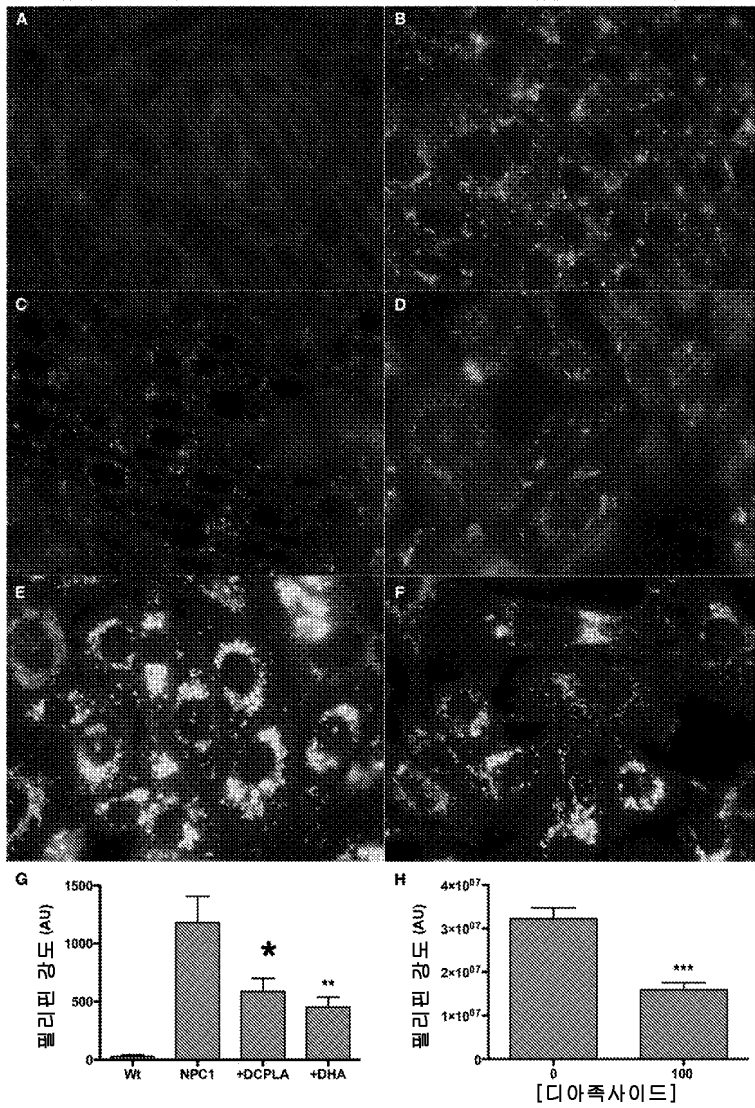
B



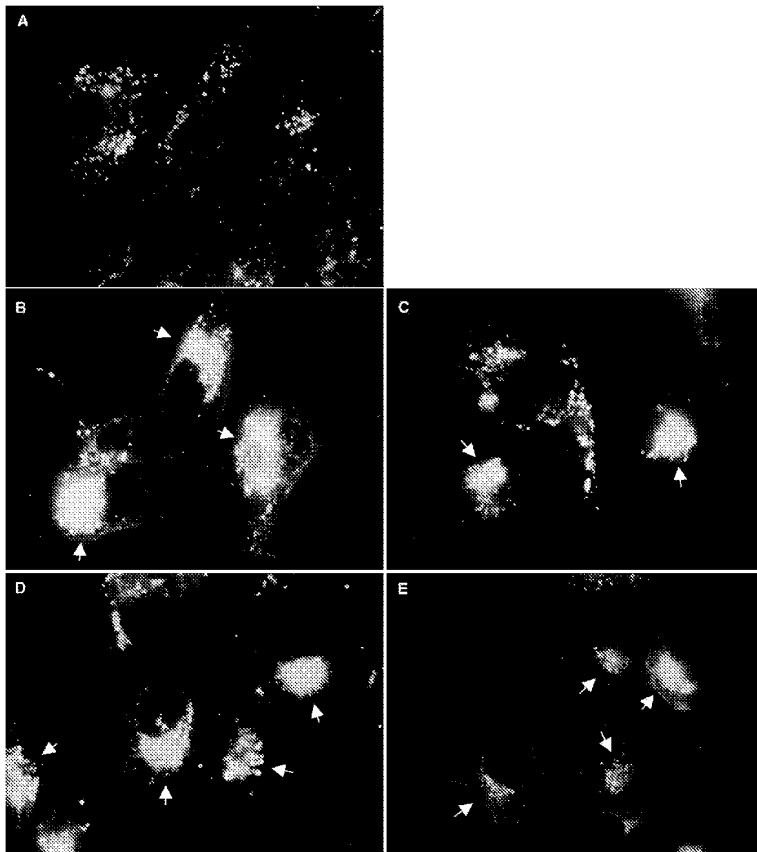
C



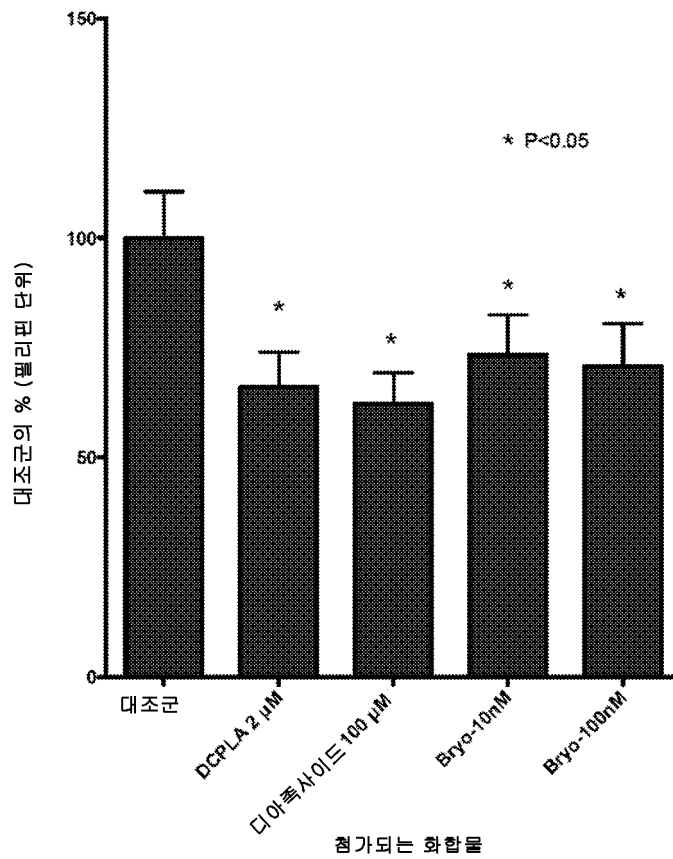
도면6



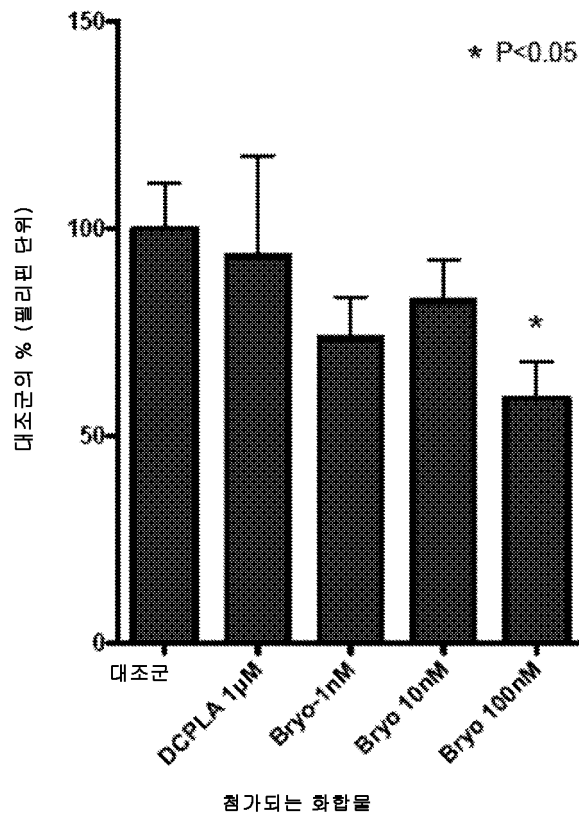
도면7



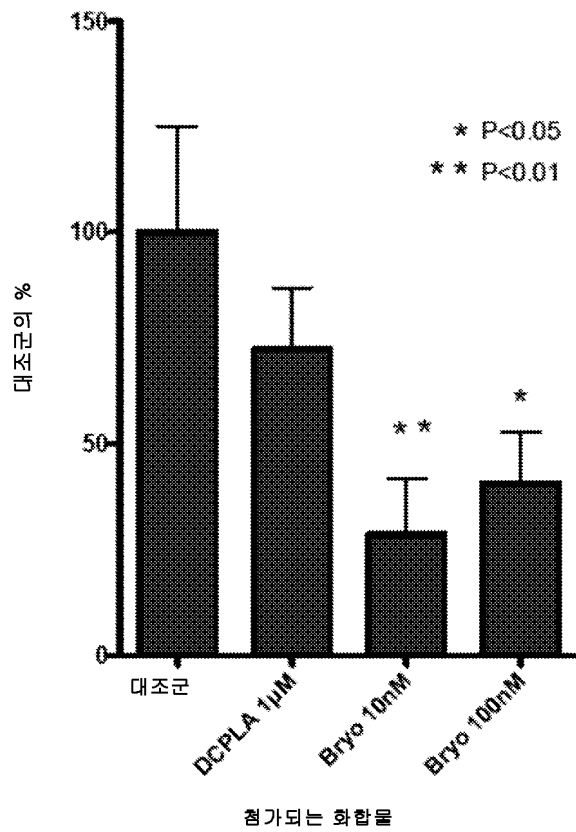
도면8



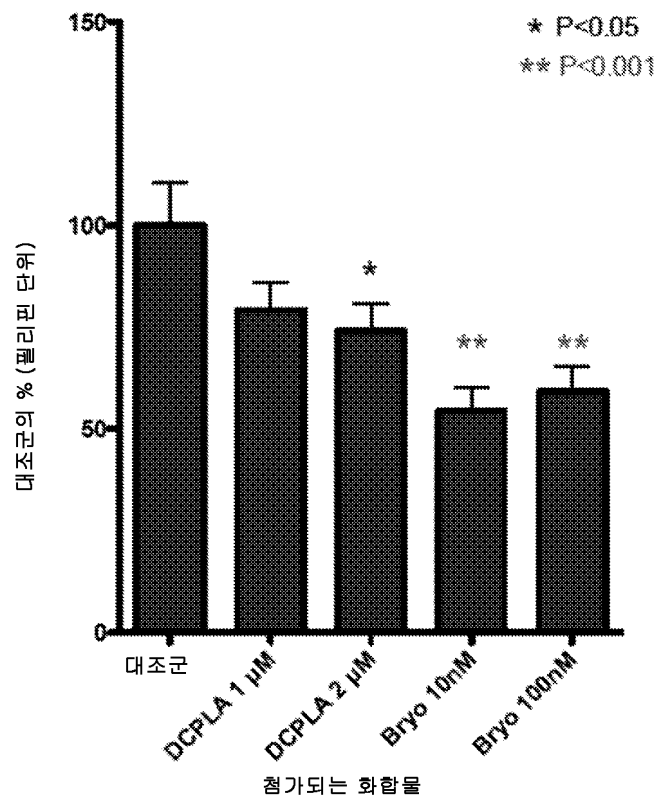
도면9



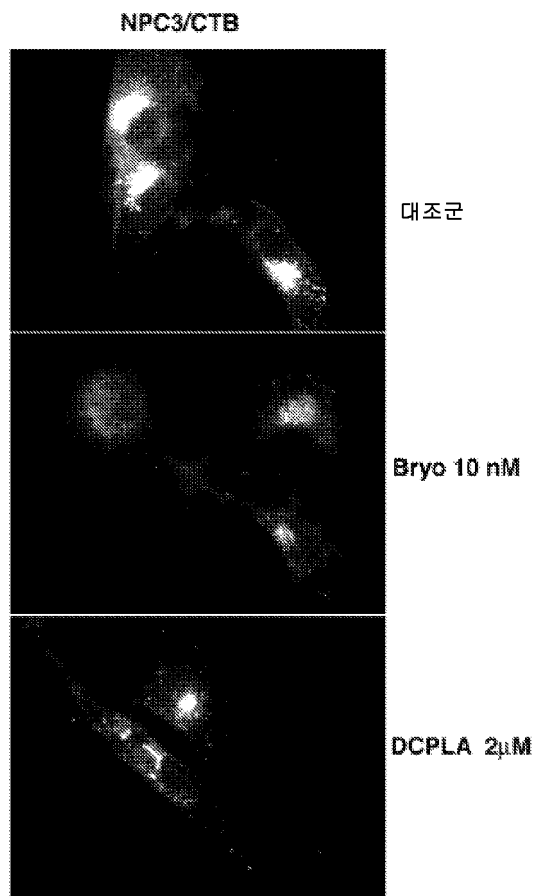
도면10



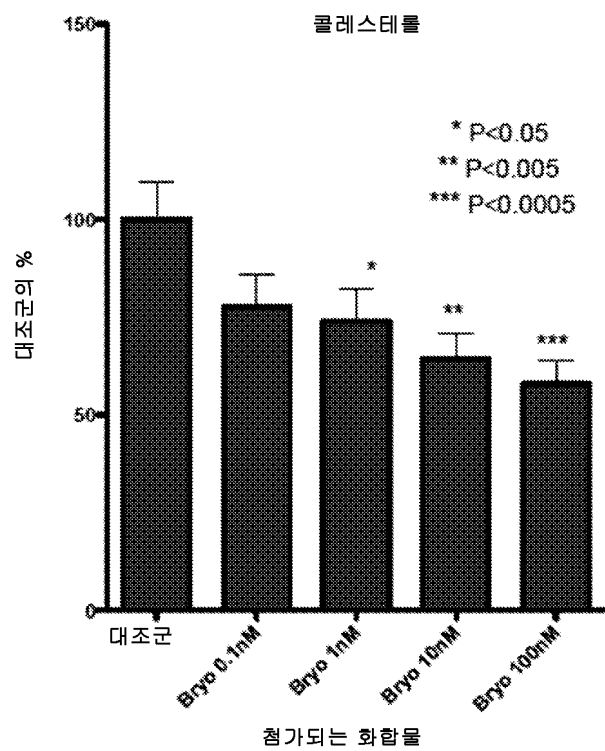
도면11



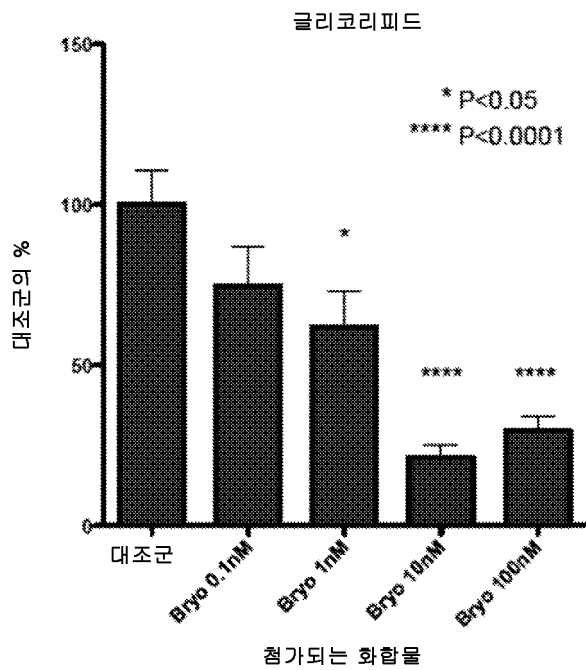
도면12



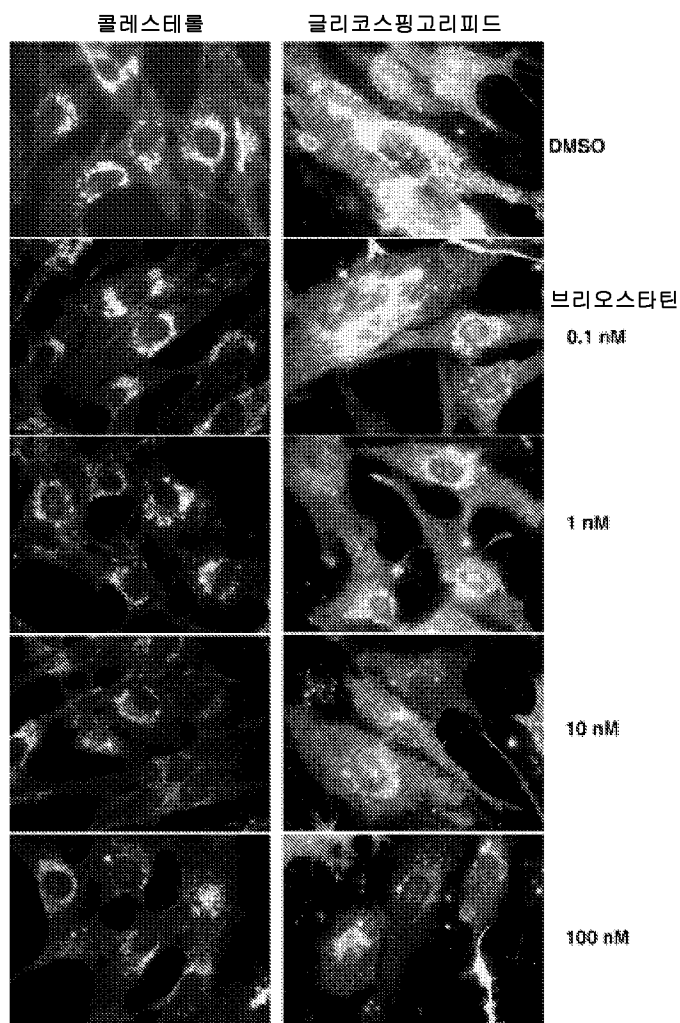
도면13



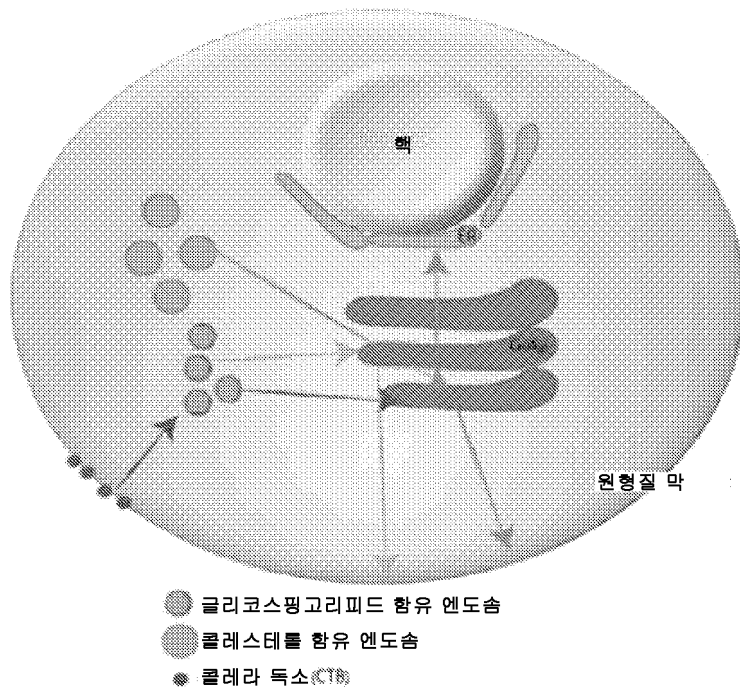
도면14



도면15



도면16



도면17

