



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0099749

(43) 공개일자

2014년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/185 (2006.01) C07C 323/20 (2006.01)

C07C 323/22 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2013-0012539

(22) 출원일자

2013년02월04일

심사청구일자

2013년02월04일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

최원재

경기도 광명시 오리로 801, 204동 2303호 (하안동, e편한세상센트레빌아파트)

(74) 대리인

유수미

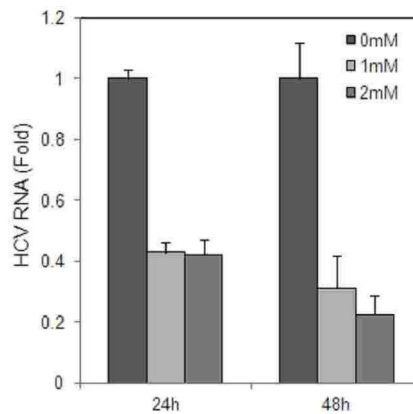
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 4-페닐부티르산을 포함하는 C형 간염의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 4-페닐부티르산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 C형 간염의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 HCV 억제 효과가 우수하고 독성이 낮을 뿐만 아니라 인터페론 내성 환자에도 적용될 수 있어 C형 간염의 치료 또는 예방에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

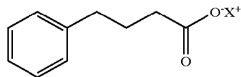
청구항 1

4-페닐부티르산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 C형 간염의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 4-페닐부티르산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염이 하기 화학식 1의 화합물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물:

[화학식 1]



상기 식에서, X는 수소, 알칼리금속, 암모늄 또는 치환된 암모늄이다.

청구항 3

제2항에 있어서, X가 나트륨인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 인터페론을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인터페론 내성이 생긴 HCV 감염 환자에 적용되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 4-페닐부티르산 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 C형 간염의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것으로, 우수한 C형 간염 바이러스 억제 효과를 가지며 부작용이 적은 C형 간염의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] C형 간염 바이러스(Hepatitis C Virus: HCV)는 RNA 바이러스의 일종으로 세계 인구의 3-5%가 감염되어 있는 것으로 알려져 있다. 감염된 환자의 대부분은 만성 간경변으로 발전되며 병의 진행에 따라 간암으로 발전하는 것으로 알려져 있다. 현재 HCV의 치료를 위해서는 인터페론(Interferon)과 리바비린(Ribavirin)을 함께 처방하는 방법이 사용되고 있으나, 약에 반응 환자의 수가 극도로 적고 부작용 또한 심해 새로운 HCV 치료제의 개발이 시급한 상황이다.

[0003] HCV의 감염이 만성으로 지속되면 지속적인 염증 반응과 세포 손상 및 재생이 반복 되게 되며, 이로 인해 간 조직의 형질 전환이 유도되어 섬유질화(Fibrosis)가 진행되고 간암으로 발전되게 된다. B형 간염 환자의 경우 백신 개발과 지속적인 치료제 개발을 통해 발병률이 감소하는 추세이지만, C형 간염 바이러스 치료제에 대한 연구는 아직 미비한 상황이며, 이로 인한 간암 발병 역시 계속 증가하는 추세이다. 인터페론을 치료제로 사용하고 있긴 하지만 치료효과를 보이는 환자가 매우 적으며 바이러스 단백질들에 의한 인터페론 저항성이 점차 증가하고 있다.

[0004] 4-페닐부티르산(4-Phenylbutyric acid: 4-PBA)는 작은 분자량을 가진 지방산으로 요소 대사 이상, 척수근위축 등의 질병의 치료제로 사용 중인 물질이다. 4-PBA는 화학 샤페론(Chemical chaperone)으로 작용하여 단백질의 잘못된 3차 구조 형성으로 인한 소포체 스트레스(ER stress)를 감소시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 4-PBA의 화학 샤페론으로의 역할에 대해서는 많은 질병에서 연구가 진행되고 있으며, 최근 가장 활발한 연구가 진행 중인 질병은 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease)과 간 손상(liver injury)이다. 신경세포에서 소포체 스트레스에 의해 유도된 세포사멸이 PBA 처리에 의해 감소되었으며, 알츠하이머나 파킨슨병에서 흔히 발견되는 단백질 응집(aggregation)에 의한 소포체 스트레스 역시 PBA에 의해 감소되었다. 또한 간 허혈 재관류 손상(Liver ischemia reperfusion injury)에 의해 유도된 소포체 스트레스 역시 PBA 전 처리에 의해 현저하게 감소되며, 이로 인해 야기되는 세포사멸 역시 감소시킨다는 보고가 발표된 바 있다. 그러나 현재까지 4-PBA의 HCV 억제 효과에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 효과가 우수하고 부작용이 적은 C형 간염 치료제를 개발하고자 예의 연구 검토한 결과, 4-페닐부티르산이 HCV 복제 억제 효과가 우수하고 독성이 낮을 뿐만 아니라 인터페론 내성 환자에도 적용될 수 있음을 알아내고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 4-페닐부티르산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 C형 간염의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

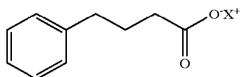
과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 4-페닐부티르산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 C형 간염의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0008] 본 발명에서 약제학적으로 허용되는 염은 무독성 무기염 및 유기염이 모두 포함될 수 있으며, 예를 들어 리튬, 나트륨, 칼륨, 마그네슘 및 칼슘과 같은 알칼리금속 또는 알칼리토금속 염, 암모늄 염, 테트라메틸암모늄과 같은 4차 암모늄 염 및 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민 및 에틸아민과 같은 아민 염을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0009] 한 실시형태로, 본 발명은 하기 화학식 1의 4-페닐부티르산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 C형 간염의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다:

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 상기 식에서, X는 수소, 리튬, 나트륨 및 칼륨과 같은 알칼리금속, 암모늄 또는 치환된 암모늄, 가장 바람직하게는 나트륨이다.

[0013] 상기 4-페닐부티르산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 상업적으로 입수하거나 당업계에 공지된 방법에 의해 용이하게 제조할 수 있다[참고문헌: 한국 특허공개 제2003-7014983호].

[0014] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 4-페닐부티르산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 이외에 또 다른 C형 간염 치료제를 함께 포함할 수 있다.

[0015] 특히, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 4-페닐부티르산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 함께 인터페론을 포함할 수 있으며, 4-페닐부티르산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 인터페론과 함께 사용할 경우 인터페론을 단독으로 사용하였을 때보다 낮은 농도에서 HCV 억제 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0016] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 경구적으로(예를 들면, 복용 또는 흡입) 또는 비경구적으로(예를 들면,

주사, 침착, 이식, 좌약) 투여될 수 있으며, 주사는 예를 들면, 정맥주사, 피하주사, 근육내주사 또는 복강내주사일 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 투여 경로에 따라, 정제, 캡슐제, 과립제, 파인 서브틸라(fine subtilae), 분제, 설하 정제, 좌약, 연고, 주사제, 유탁액제, 현탁액제, 시럽제, 분무제 등으로 제형화될 수 있다. 상기 여러 가지 형태의 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 각 제형에 통상적으로 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체(carrier)를 사용하는 공지기술에 의해 제조될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예는 부형제, 결합제, 붕해제(disintegrating agent), 유회제, 방부제, 향산화제, 등장제(isotonic agent), 완충제, 피막제, 감미제, 용해제, 기제(base), 분산제, 습윤제, 현탁화제, 안정제, 착색제 등을 포함한다.

[0017] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약제의 형태에 따라 다르지만, 4-페닐부티르산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 0.01 내지 99 중량%로 포함한다.

[0018] 본 발명의 약제학적 조성물의 구체적인 투여량은 치료되는 사람을 포함한 포유동물의 종류, 체중, 성별, 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 다를 수 있다. 바람직하게는, 경구투여의 경우에는 하루에 체중 1kg 당 활성성분 0.01 내지 50mg이 투여되고, 비경구투여의 경우에는 하루에 체중 1kg 당 활성성분 0.01 내지 10mg이 투여된다. 상기 총 일일 투여량은 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 한번에 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 HCV 복제 억제 효과가 우수하며, 세포독성이 낮으므로 치료 시 발생할 수 있는 부작용이 낮을 것으로 예상된다. 아울러, 인터페론 내성이 생긴 HCV 감염 환자의 치료에도 적용할 수 있으며, 인터페론과 함께 사용할 경우 인터페론의 유효농도를 낮춰줌으로써 치료비 절감 및 부작용 억제 효과를 가질 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 C형 간염의 치료 또는 예방에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1a는 4-PBA에 의한 HCV RNA 복제 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
 도 1b는 4-PBA에 의한 HCV 단백질 발현 감소 효과를 나타낸 면역블롯 분석 결과이다.
 도 1c는 4-PBA에 의한 HCV 단백질 발현 감소 효과를 나타낸 면역형광 분석 결과이다.
 도 1d는 4-PBA가 LDH 방출에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
 도 2a는 PD98059가 4-PBA에 의한 HCV RNA 복제 억제에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
 도 2b는 PD98059가 4-PBA에 의한 HCV 단백질 발현 감소에 미치는 영향을 나타낸 면역블롯 분석 결과이다.
 도 2c는 PD98059가 4-PBA에 의한 HCV 단백질 발현 감소에 미치는 영향을 나타낸 면역형광 분석 결과이다.
 도 3a는 4-PBA가 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
 도 3b는 4-PBA가 AP-1의 활성화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
 도 3c는 PD98059가 4-PBA에 의한 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
 도 3d는 4-PBA에 의한 p65 서브유닛의 핵으로의 이동 증가 효과를 나타낸 면역블롯 분석 결과이다.
 도 4a는 4-PBA에 의한 IFN- α 의 mRNA 발현 증가 효과를 나타낸 그래프이다.
 도 4b는 4-PBA에 의한 ISRE 활성 증가 효과를 나타낸 그래프이다.
 도 4c는 PD98059가 4-PBA에 의한 IFN- α 의 mRNA 발현 증가에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
 도 5a는 4-PBA에 의한 NS5A의 ISGylation 감소 효과를 나타낸 면역침강 분석 결과이다.
 도 5b는 4-PBA에 의한 NS5A 발현 감소 효과를 나타낸 면역침강 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0022] 세포주 및 배양조건

[0023] HCV 유전형 1b 레플리콘(genotype 1b replicon)을 발현하는 Huh7 세포주를 비필수 아미노산, 우태아혈청(fetal bovine serum) 및 0.5 mg/ml 제네티신(Geneticin)을 포함한 DMEM에서 37°C, 5% CO₂의 환경에서 배양하였다.

[0024] 실시간 PCR(Real-time PCR)

[0025] 실시간 PCR은 SYBR Green PCR Master Mix(Fermentas, USA)와 ABI Prism 7300 real-time PCR system(Applied Biosystems)을 이용하여 제조회사의 사용방법에 따라 실험을 진행하였으며, 결과 계산은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법에 의하여 도출하였다. 결과는 Fold로 전환하여 비교하였으며, β -액틴을 기준으로 정량하여 도출하였다. 실험에 사용한 프라이머는 하기 표 1에 기술하였다.

[0026] [표 1]

번호	이름	시퀀스	크기
1	HCV IRES-F	GTC TAG CCA TGG CGT TAG TAT GAG	24
2	HCV IRES-R	CTT GTG GTA CTG CCT GAT AGG GT	23
3	MxA-F	AAC AAC CTG TGC AGC CAG TA	20
4	MxA-R	AAG GGC AAC TCC TGA GAG TG	20
7	IFNa-F	TTT CTC CTG CCT GAA GGA CAG	21
8	IFNa-R	GCT CAT GAT TTC TGC TCT GAC A	22
5	B-actin-F	CAT CGA GCA CGG CAT CGT CA	20
6	B actin-R	TCG AAG TCC AGG GCG ACA TA	20

[0027]

[0028] 면역블롯 분석(Immunoblot Assay)

[0029] 세포를 용해 완충액(lysis buffer) (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40)을 이용하여 용해시킨 다음, 용해물(lysate) 전부를 10-12% SDS-PAGE 겔로 전기영동하여 니트로셀룰로스 멤브레인으로 옮겼다. 그런 다음, 멤브레인을 5% BSA로 1시간 동안 블로킹하였으며, 4° C에서 하룻밤 동안 1차 항체와 반응시켰다. 그 후 45분간 2차 항체와 반응시킨 후, 단백질 발현 양상을 웨스턴 블로팅 루미놀 시약(Western Blotting Luminol Reagent; Santa Cruz)로 확인하였다.

[0030]

[0031] 면역형광 분석(Immunofluorescence Assay)

[0032] 세포를 커버 글라스 위에서 키운 후 실험에 맞는 시약처리를 진행하였다. 그런 다음, 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후, 4% 포름알데히드를 20분간 처리하여 고정하였다. 1x PBS로 세척한 후 0.2% Triton X-100을 처리하여 투과화(permeabilization)하고 1% BSA로 블로킹하였다. 1차 항체와 4° C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후, PBS로 세척하고 2차 항체와 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, DAPI로 핵 대조 염색을 해주고 슬라이드 글라스에 고정하여 공초점 현미경으로 염색을 확인하였다.

[0033]

[0034] 루시페라아제 리포터 유전자 분석(Luciferase reporter gene Assay)

[0035] 세포를 200ul의 용해 완충액(lysis buffer) (1% Triton X-100, 25 mM GLY-GLY, 50 mM MgSO₄, 10 mM EGTA)로 용해시킨 후, 14000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 루시페라아제 활성값 측정을 위하여 10-15ug 용해물(lysate)과 분석 완충액(1M KH₂PO₄, 0.5M MgCl₂, 0.1M ATP, 1 mM 루시페린)을 1:1 비율로 혼합하여 마이크로 루미노미터(micro luminometer)로 발광도를 측정하였다. Brad-ford 단백질 정량을 기준으로 정량하여 값을 도출하였다.

[0036]

[0037] 핵 단백질 분리

[0038] 세포를 용해 완충액 트립신-EDTA 처리하여 원심분리한 후 차가운 PBA로 세척하였다. 원심분리를 통하여 얻은 세포 펠릿에 완충액 A(10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF)를 처리하고 보텍싱한 후, 얼음에서 10분간 방치하였다. 그런 다음, 10% NP-40을 첨가하고 보텍싱한 후 14000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 이때 상층액은 세포질 부분으로 새 튜브에 옮겨 둔 다음, 펠릿에 완충액 B(20 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1% NP-40)를 처리하고 10분간 보텍싱하였다. 그런 다음, 14000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다.

[0039] 면역침강 분석(Immunoprecipitation Assay)

[0040] 세포를 용해 완충액(lysis buffer) (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40)을 이용하여 용해시킨 다음, 원심분리하여 용해액(lysate)을 얻었다. 용해액에 항체와 아가로스 A-G 비드(agarose A-G Bead)를 함께 첨가하여 24시간 동안 반응시킨 후, SDS 샘플 완충액(sample buffer) 30ul를 첨가한 후 5분간 끓여 항원-항체 복합체와 비드를 분리시켰다. 그런 다음, 원심분리를 통하여 상층액만 취해 12% SDS-PAGE 겔로 전기영동하여 니트로셀룰로스 멤브레인으로 옮겼다. 그런 다음, 멤브레인을 5% BSA로 1시간 동안 블로킹하였으며, 4° C에서 하룻밤 동안 1차 항체와 반응시켰다. 그 후 45분간 2차 항체와 반응 시킨 후, 단백질 발현 양상을 웨스턴 블로팅 루미놀 시약(Western Blotting Luminol Reagent; Santa Cruz)로 확인하였다.

[0041] **실시예 1: HCV 복제 억제 효과**

[0042] 4-PBA의 HCV 억제 효과를 확인하기 위하여, HCV 유전형 1b 레플리콘이 발현되는 Con1 세포주를 이용하여 4-PBA를 농도별로 24시간, 48시간 동안 처리 한 후, RNA를 추출하여 실시간 PCR을 수행하였다. 그 결과, HCV RNA의 양이 농도 및 시간에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 1a).

[0043] 면역블롯과 면역형광 방법을 이용하여 바이러스 단백질인 NS5A의 발현양의 변화를 확인해 본 결과, 발현양이 4-PBA 처리에 의하여 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 1b 및 도 1c).

[0044] 아울러 이러한 HCV의 억제 효과가 세포 사멸과는 상관관계가 없음을 LDH 방출 분석(release assay)를 통하여 확인하였다(도 1d).

[0045]

[0046] **실시예 2: 4-PBA의 HCV 억제 효과에 관여하는 세포신호전달체계 분석**

[0047] 4-PBA의 HCV 억제 효과에 관여하는 숙주 세포의 신호전달체계를 분석하였다. 그동안에 보고된 여러 연구에 따르면, HCV 복제 진행에 의하여 세포의 MAPK 신호전달체계가 억제되는 현상이 알려져 있다. 특히 ERK 신호전달체계 억제 시 HCV 복제가 오히려 증가되는 것이 알려진 바 있어, ERK 신호전달체계와 4-PBA의 억제 효과와의 상관관계를 확인하였다.

[0048] ERK 저해제인 PD98059(Sigma-Aldrich) 처리에 의하여 HCV RNA의 양이 증가되며, 4-PBA와 함께 처리하였을 시 4-PBA의 억제 효과가 사라지는 것을 확인하였다(도 2a). 이러한 내용을 면역블롯과 면역형광 방법을 이용하여 단백질 수준에서 확인해 본 결과, 4-PBA 처리에 의해 ERK의 활성화가 증가되며, PD98059에 의한 ERK 활성화 억제 시 4-PBA의 억제 효과가 감소되는 것을 확인하였다(도 2b 및 도 2c).

[0049] 따라서 4-PBA의 HCV 억제 효과에 ERK 신호전달체계가 관여한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0050]

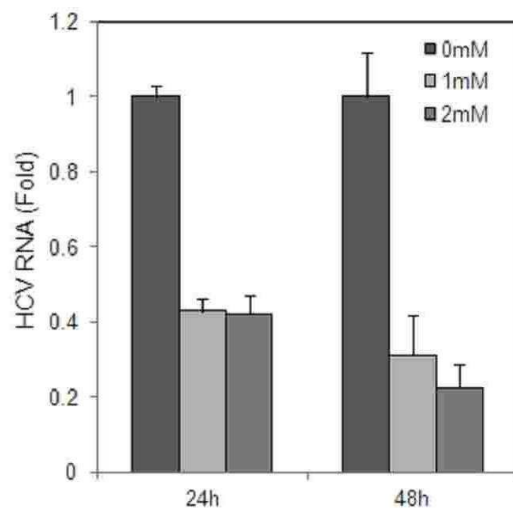
[0051] **실시예 3: 4-PBA에 의한 HCV 억제 효과와 관련 유전자 발현인자 분석**

[0052] 4-PBA에 의한 HCV 억제 효과 기전 연구를 위하여 ERK 신호전달체계 활성화에 따른 유전자 발현인자(transcription factor) 분석을 수행하였다. ERK 활성화에 의해 조절되는 대표적인 항바이러스성 유전자 조절인자인 NF-κB와 AP-1의 활성화를 루시퍼라아제 리포터 유전자 분석(Luciferase reporter gene assay) 방법으로 확인하였다.

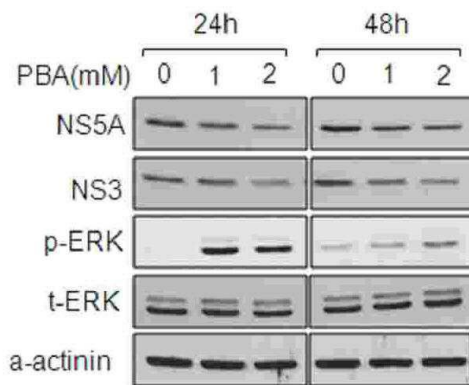
- [0053] 실험 결과, 4-PBA를 처리한 군에서 NF- κ B의 활성이 약 6배 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 3a). 그러나 AP-1의 활성은 변화가 없었다(도 3b).
- [0054] 이러한 NF- κ B의 활성화 촉진에 ERK 세포신호전달체계가 관여하는지 확인하기 위하여, ERK 저해제인 PD98059를 처리한 후 활성화를 측정하였다. 도 3c에서 볼 수 있는 것처럼, 4-PBA에 의해 촉진되는 NF- κ B의 활성화가 ERK 신호를 저해함에 따라 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0055] 다음으로 NF- κ B의 활성화를 면역블롯 방법을 통하여 확인하였다. NF- κ B는 활성화 p65 서브유닛이 세포질에서 핵으로 위치를 이동하게 되며, 핵으로 이동한 p65 서브유닛은 DNA의 프로모터 부분에 결합하여 타겟 유전자를 전사하게 된다. 이처럼 핵으로 이동한 NF- κ B p65 서브유닛을 확인하기 위하여 단백질을 세포질과 핵으로 분리하여 측정된 결과, 4-PBA 처리에 의해 p65 서브유닛의 핵으로의 이동이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 3d).
- [0056] 따라서 4-PBA에 의해 활성화된 ERK 신호체계는 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 촉진하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0057]
- [0058] **실시예 4: 4-PBA에 의해 활성화된 전사인자의 타겟 유전자 확인**
- [0059] 4-PBA에 의해 활성화된 NF- κ B의 타겟 유전자를 확인하기 위하여, 관련된 유전자들의 발현 변화를 실시간 PCR로 확인하였다. 그 결과, IFN- α 의 mRNA 발현이 4-PBA 처리에 의하여 증가되는 것을 확인하였다(도 4a). 또한 IFN- α 에 의하여 활성화되는 ISRE(Interferon Stimulated Response Element)도 활성화가 증가되는 것을 확인하였다(도 4b). 이러한 발현 증가는 ERK 저해제 처리에 의하여 모두 억제되는 것을 확인함으로써, 앞에서 확인한 일련의 신호전달체계와 IFN- α 의 발현 증가가 연관되어 있음을 확인할 수 있었다(도 4c).
- [0060] **실시예 5: 세포독성 시험(LDH 방출 분석)**
- [0061] 4-PBA를 농도별로 세포에 처리한 후, 24시간 및 48시간 후에 배양액을 채취하여 원심분리를 통해 세포 잔여물을 제거하고 배양액과 LDH의 기질을 1:1의 비율로 암막에서 30분간 반응시킨 후 흡광도 측정기를 통하여 490nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 1d에 나타내었다.
- [0062] 도 1d로부터 4-PBA는 세포독성이 낮음을 확인할 수 있었다.
- [0063] **실시예 6: 인터페론(INF) 내성 감소 효과 시험**
- [0064] PBA의 IFN 내성 감소 효과를 확인하기 위하여 IFN 내성을 유도한다고 알려진 ISGylation을 면역침강 방법을 이용하여 분석하였다. ISGylation의 타겟 단백질로 알려진 NS5A의 ISGylation을 확인해 본 결과, PBA를 처리하지 않은 군(도 5a, 3번 레인)에 비해, PBA를 처리한 군(도 5a, 5번 레인)에서 ISGylation이 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0065] 또한 트랜스펙션(transfection)한 NS5A의 발현양 역시 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 5b, 5번 레인).
- [0066] 따라서 PBA 처리에 의해서 ISGylation이 감소하며, 이는 HCV 억제 효과를 촉진하는 것을 확인할 수 있다.

도면

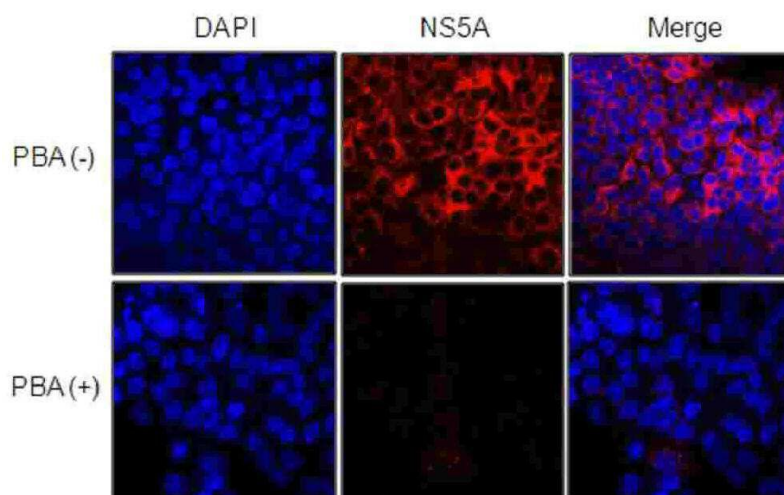
도면1a



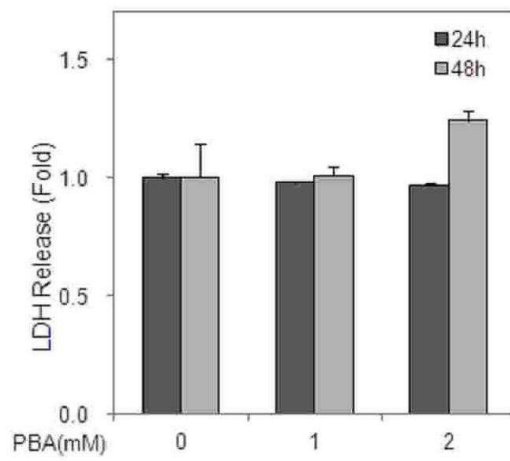
도면1b



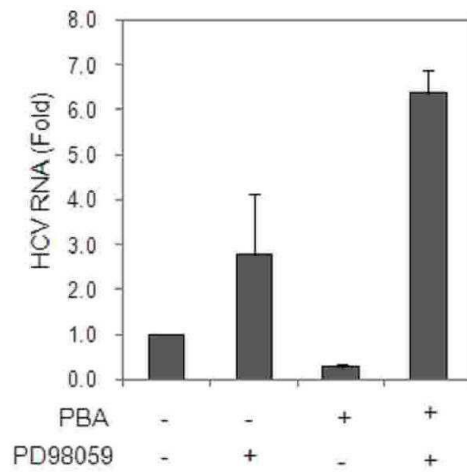
도면1c



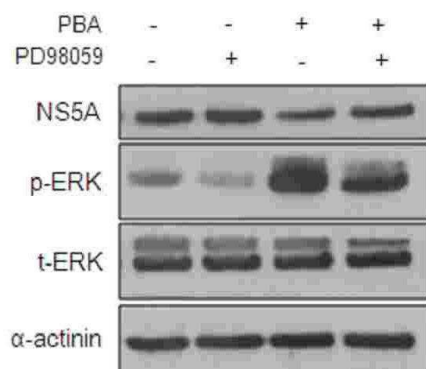
도면1d



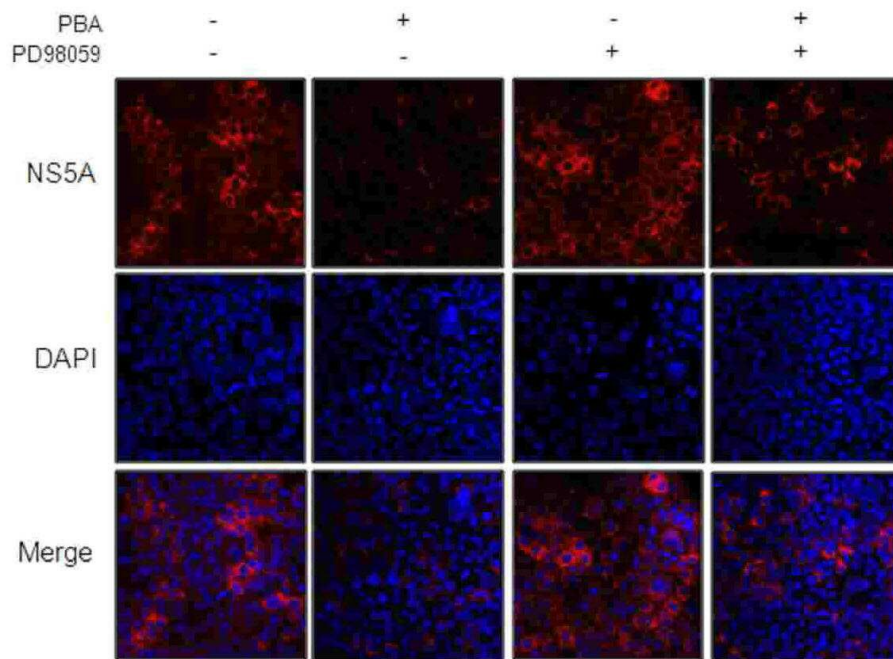
도면2a



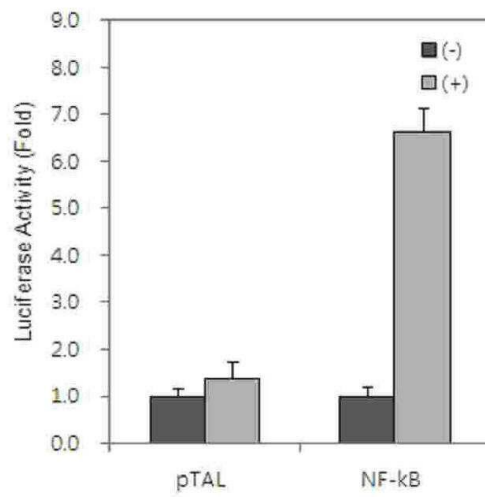
도면2b



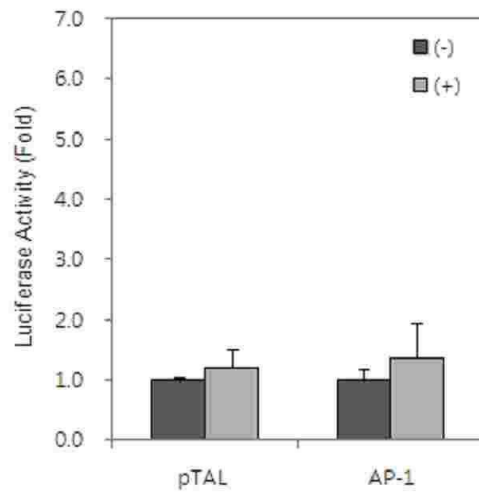
도면2c



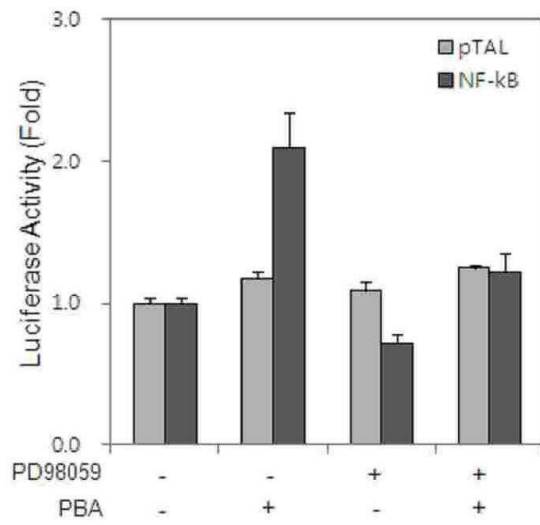
도면3a



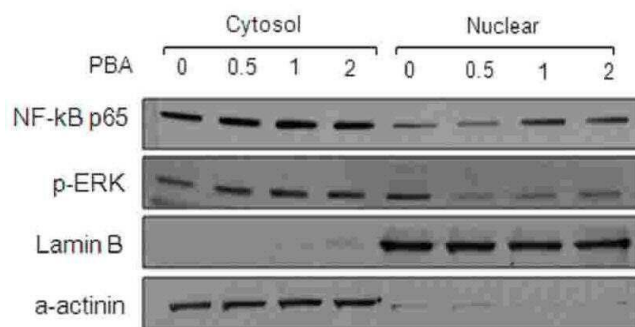
도면3b



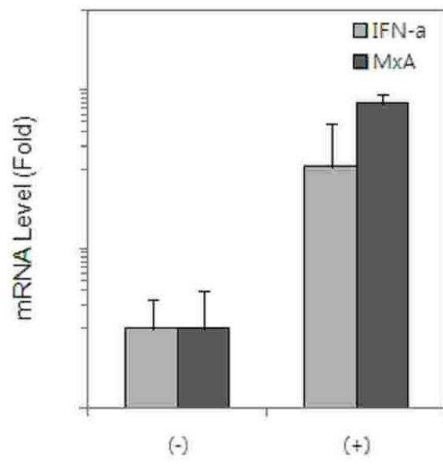
도면3c



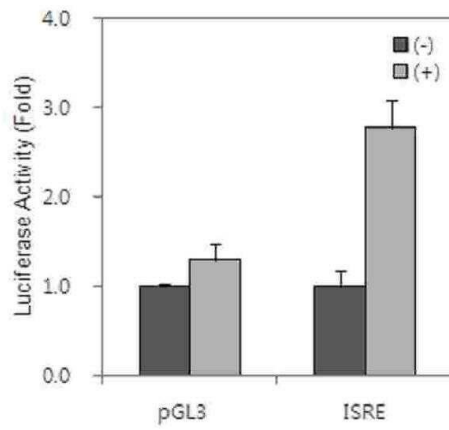
도면3d



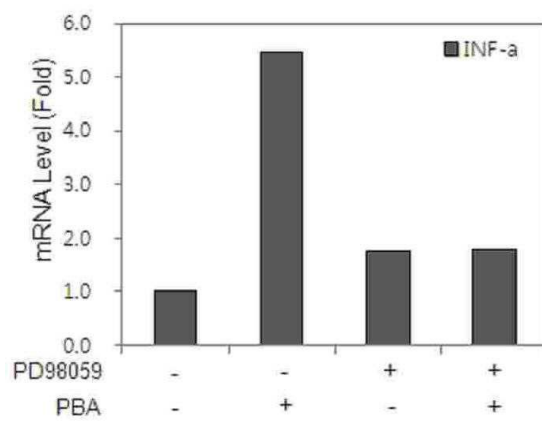
도면4a



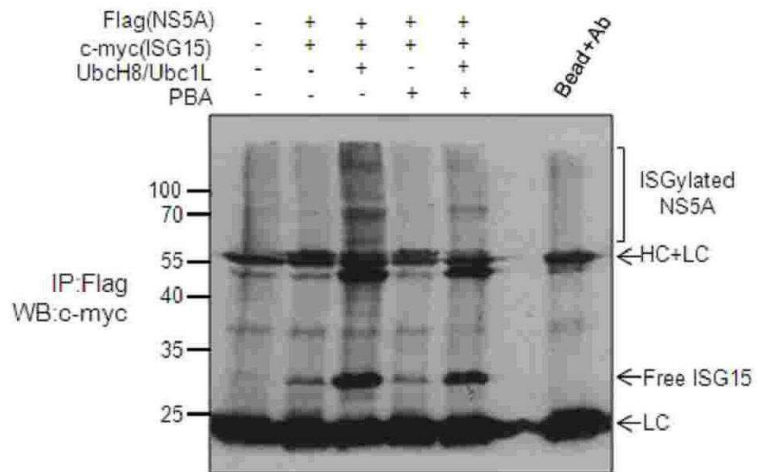
도면4b



도면4c



도면5a



도면5b

