

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2010/067980 A2

PCT

(43) 국제공개일
2010년 6월 17일 (17.06.2010)

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/16 (2006.01) *A61P 31/18* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/007162
- (22) 국제출원일: 2009년 12월 2일 (02.12.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
61/121,901 2008년 12월 11일 (11.12.2008) US
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **대한민국(관리부서 질병관리본부장) (KOREA CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION)** [KR/KR]; 서울특별시 은평구 녹번동 통일로 194번지, 122-701 Seoul (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **홍기종 (HONG, Kee Jong)** [KR/KR]; 서울특별시 동작구 신대방동 동작성원상떼빌아파트 102동 905호, 156-010 Seoul (KR). **최병선 (CHOI, Byeong Sun)** [KR/KR]; 경기도 광명시 하안동 하안주공아파트 406동 205호, 423-060 Gyeonggi-do (KR). **김성순 (KIM, Sung Soon)** [KR/KR]; 서울특별시 은평구 대조동 231 삼성타운아파트 102동 1805호, 122-768 Seoul (KR). **이학성 (LEE, Hak Sung)** [KR/KR]; 서울특별시 강서구 염창

동 304번지 이너스내안에 5차 동진아파트 501동 203호, 157-040 Seoul (KR). **노성구 (RO, Sung Gu)** [KR/KR]; 경기도 남양주시 와부읍 덕소리 554-1 현대아파트 105-1006, 472-731 Gyeonggi-do (KR). **현영란 (HYUN, Young Lan)** [KR/KR]; 서울특별시 마포구 성산동 시영아파트 27-802, 121-250 Seoul (KR).

(74) 대리인: **김문재 (KIM, Moon Jae)** 등; 서울특별시 중구 서소문동 41-3 대한항공빌딩 3층, 100-813 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

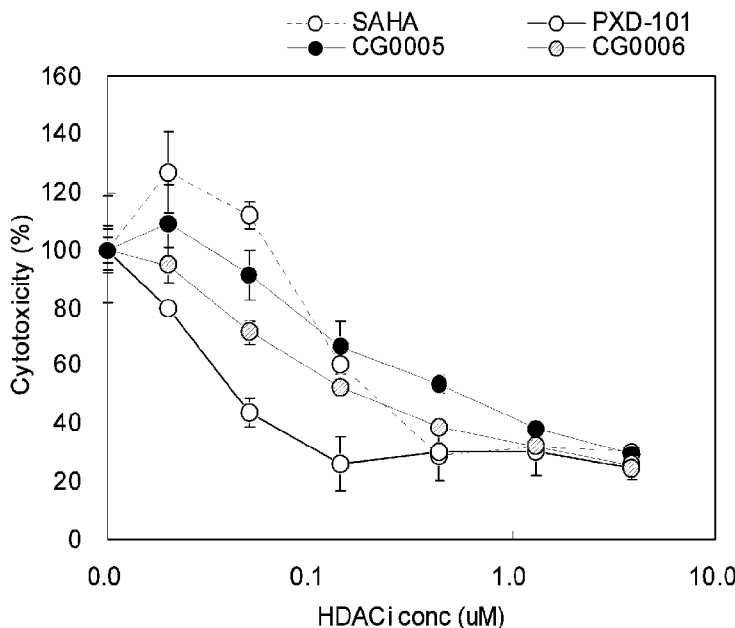
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR THAT REACTIVATES HIV-1 PROVIRUSES FROM LATENTLY HIV-INFECTED CELLS

(54) 발명의 명칭 : 잠복성 H I V 감염 세포에서 H I V -1 프로바이러스를 재활성화시키는 히스톤 디아세틸라제 억제제

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a histone deacetylase (HDAC) inhibitor represented by chemical formula 1 that enables reactivation of HIV-1 proviruses from latently HIV-infected cells, and a method for reactivating HIV-1 provirus from latently HIV-infected cells using the inhibitor. The HDAC inhibitor exhibits low cytotoxicity and high stability, and thus can effectively reactivate latent HIV-1 proviruses from a CD4+ T cell reservoir. Accordingly, the HDAC inhibitor is processed together with an HAART cocktail therapeutic drug such as a reverse transcriptase inhibitor AZT, thereby efficiently reducing or removing the latent HIV reservoir.

(57) 요약서: 본원 발명은 잠복성 HIV 감염 세포로부터 HIV-1 프로바이러스(HIV-1 provirus)를 재활성화시킬 수 있는 화학식 1의 히스톤 디아세틸라제(HDAC) 억제제 및 이 억제제를 사용하여 잠복성 HIV 감염 세포로부터 HIV-1 프로바이러스를 재활성화시키는 방법에 관한 것이다. 상기 HDAC 억제제는 낮은 세포 독성 및 높은 안정성을 나타내어, CD4+ T 세포 병원소로부터 잠복성 HIV-1 프로바이러스를 보다 효과적으로 재활성시킬 수 있는 것을 특징으로 한다. 이에 따라, 상기 HDAC 억제제를

역전사 효소 억제제인 AZT와 같은 HAART 카테일 치료약물과 함께 처리하여, 잠복성 HIV 병원소를 효율적으로 감소 또는 제거시킬 수 있다.



GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

잠복성 H I V 감염 세포에서 H I V-1 프로바이러스를 재활성화시키는 히스톤 디아세틸라제 억제제

기술분야

- [1] 본원 발명은 잠복성 HIV 감염 세포에서 HIV-1 프로바이러스를 효율적으로 재활성화시킬 수 있는 HDAC 억제제 및 이 억제제를 사용하여 잠복성 HIV 감염 세포로부터 HIV-1 프로바이러스를 재활성화시키는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 히스톤은 염색질을 구성하는 중심 단백질로, DNA가 감기는 축 역할을 하여 DNA의 응축을 도우며 유전자 발현 조절에 중요한 역할을 한다 (Strahl *et al*, 2000, Nature 403: 41-45; Shahbazian *et al*, 2007, Annu Rev Biochem 76:75-100). 또한, 히스톤은 아세틸화, 메틸화 등에 의한 유전자 발현을 조절하는 크로마틴 구조 변형(chromatin modification)이 일어나기 쉬우며, 이에 따른 유전자 발현의 변화는 HIV의 잠복성과도 관련되어 있다(Khorasanizadeh, 2004, Cell 116:259-272).
- [4] HIV(Human Immunodeficiency Virus) 감염자 및 AIDS환자를 치료하기 위해 여러 가지 방법이 시도되었지만, 이는 비활성 상태 즉, HIV-1 프로바이러스가 완전하게 삽입되어 있으나 바이러스 유전자 전사가 억제된 상태로 HIV-1 바이러스가 잠복 감염된 CD4+ T 기억세포의 존재로 인해 치료효과를 크게 얻지는 못하였다. HAART(Highly Active AntiRetroviral Therapy) 등의 다중 약물 처리(multidrug therapy)에 의해 혈중 내 HIV-1 바이러스 복제활성을 검출농도 이하 수준까지 감소시킬 수 있었지만, HIV-1 잠복감염 병원소를 제거하지는 못하였고, 이들을 효과적으로 제거하기 위해서는 60년 이상이 소요될 것으로 보고되고 있다(Finzi *et al*, 1997; Science 278:1295-1300; Siliciano *et al*, 2003; Journal of Virology 77:4938-4949). 따라서, HIV-1 프로바이러스 잠복감염상태인 비활성상태의 CD4+ T 세포에 활성을 부여하여, HIV-1 프로바이러스 생성을 유도하는 활발한 전사 활동을 유도한 후에야 효과적으로 잠복감염된 HIV-1 바이러스 치료가 가능하다.
- [5] 히스톤 디아세틸라제(HDAC)는 HIV-1 잠복감염 병원소인 기억 CD4+ T 세포로부터 HIV-1 유전자가 발현되는 것을 억제한다(Ylisastigui *et al*, 2005, Journal of Infectious Diseases, 190:1429-1437). 즉, HDAC는 HIV-1 LTR 프로모터에 결합하여 HIV-1 바이러스 복제를 억제함으로써 HIV-1 병원소(HIV-1 reservoir)로서의 잠복성 HIV-1 감염세포 생성을 가능하게 한다. 그러므로, HIV감염자와 AIDS환자로부터 비활성 HIV-1 잠복감염 기억 T 세포까지 효과적으로 제거하기 위해서는 HDAC 활성을 억제시켜야 한다. 숙주내

존재하는 HIV-1 병원소 제거를 위하여 몇몇 HDAC 억제제(HDACi: HDAC inhibitor)들이 이미 고려되었으나, 이들을 사용한 치료에는 여러가지 한계가 있었다. 예를 들어, 발프로산(Valporic Acid) 또는 SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid)는 상대적으로 낮은 세포 독성으로 안정성이 우수한 반면 HIV-1 프로바이러스의 재활성화에는 효과적이지 못하였고, Trichostatin A나 PXD-101은 우수한 HIV-1 프로바이러스 재활성 능력에 비해 너무 높은 세포 독성을 유발시킴으로써 이들을 바이러스 치료제로 사용하는 것은 적합하지 않다고 판단하였다. 이에 따라, 만성HIV감염자 및 AIDS환자를 치료하기 위해 보다 높은 효율성 및 안정성이 확보된 새로운 HDAC 억제제 개발의 필요성이 요구되었다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

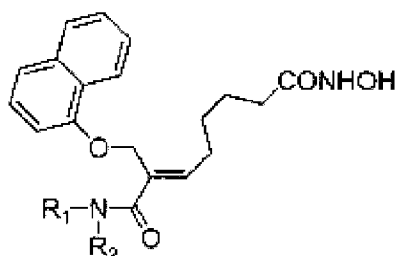
[7] 본원 발명은 잠복성 HIV 감염 세포에서 HIV-1 프로바이러스를 효율적으로 재활성화시킬 수 있는 HDAC 억제제 및 이를 이용한 HIV-1 프로바이러스의 재활성화 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 이에 따라, 상기 HDAC 억제제를 역전사 효소 억제제, 예를 들어 AZT 등을 포함한 HARRT의 각테일 요법 치료 약물 또는 그 밖의 에이즈 치료제와 함께 처리하여, 잠복성 HIV 병원소를 효율적으로 감소 또는 제거시키는 것을 가능하도록 하였다.

[8]

기술적 해결방법

[9] 본원발명은 잠복성 HIV 감염 세포로부터 HIV-1 프로바이러스를 재활성화시키기 위한 화학식 1의 히스톤 디아세틸라제 억제제에 관한 것이다.

[10] 화학식 1



[11] 상기 화학식 1에서,

[12] R_1 은 각각 독립적으로 C_{1-3} 알킬, 하이드록시 C_{1-2} 알킬, 할로 C_{1-2} 알킬, 피페리디닐, 몰포리닐, 사이아노메틸, 피페라지닐, 다이 C_{1-2} 알킬아미노 C_{1-2} 알킬, 다이 C_{1-2} 알킬아미노 C_{1-2} 알킬, 피페리디닐 C_{1-2} 알킬, 몰포리노 C_{1-2} 알킬, 피페라지노 C_{1-2} 알킬, 피롤리디닐, C_{1-2} 알킬피롤리디닐로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-2} 알킬이고,

[13] R_2 는 수소 또는 메틸이다.

- [14] 바람직하게는, 상기 잠복성 HIV 감염 세포가 ACH2 세포 또는 J1.1 세포이다.
- [15] 보다 바람직하게는, 상기 잠복성 HIV 감염 세포가 ACH2 세포이다.
- [16] 또한, 바람직하게는, 상기 화학식 1의 화합물이
- [17] (E)-N8-하이드록시-N1,N1-다이메틸-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
- [18] (E)-N1-(2-(다이메틸아미노)에틸)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
- [19] (E)-N1-(2-(다이메틸아미노)에틸)-N8-하이드록시-N1-메틸-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
- [20] (E)-N1-(2-(다이에틸아미노)에틸)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
- [21] (E)-N1-(2-(다이에틸아미노)에틸)-N8-하이드록시-N1-메틸-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
- [22] (E)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)-N1-(2-(피롤리딘-1-일)에틸)옥텐다이아마이드,
- [23] (E)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)-N1-(2-(피페리딘-1-일)에틸)옥텐다이아마이드,
- [24] (E)-N8-하이드록시-N1-(2-몰포리노에틸)-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
- [25] (E)-N-하이드록시-8-(4-메틸피페라진-1-일)-7-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)-8-옥소옥텐아마이드,
- [26] (E)-N8-하이드록시-N1-(2-(4-메틸피페라진-1-일)에틸)-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
- [27] (E)-N1-(시아노메틸)-N8-하이드록시-N1-메틸-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
- [28] (E)-N8-하이드록시-N1-(2-하이드록시에틸)-N1-메틸-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
- [29] (E)-N8-하이드록시-N1-메틸-N1-(1-메틸피롤리딘-3-일)-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
- [30] (E)-N1-(3-(다이메틸아미노)프로필)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)옥텐다이아마이드, 및
- [31] (E)-N-하이드록시-8-몰포리노-7-((나프탈렌-1-일
옥시)메틸)-8-옥소옥텐다이아마이드 유도체로 이루어진 군에서 선택된다.
- [32] 또한, 본원발명은 상기 히스톤 디아세틸라제 억제제를 사용하여 잠복성 HIV
감염 세포로부터 HIV-1 프로바이러스를 재활성화시키는 방법에 관한 것이다.
- [33]

유리한 효과

- [34] 본원발명의 HDAC 억제제는 종래의 HDAC 억제제들이 높은 안정성에 비해 실효성이 낮은 HIV-1 프로바이러스 재활성 능력을 보이거나, 높은 재활성 능력을 보이지만 높은 세포 독성으로 인해 HIV 치료에 있어서 안정성과 효용성을 동시에 확보하지 못하는 데 비하여, 상대적으로 낮은 세포 독성 및 높은 HIV-1 프로바이러스 재활성을 나타냄으로써, HIV-1 만성감염 병원소인 CD4+ T 세포로부터 잠복성 HIV-1 바이러스를 보다 효과적으로 재활성화시킬 수 있다. 이에 따라, 상기 HDAC 억제제를 현재 사용되고 있는 HIV 치료제, 역전사효소 억제제 및 단백질분해효소 억제제와 병합처리하여 세포외 공간이나 세포질로 배출된 바이러스를 억제함으로써 잠복성 HIV 감염세포의 바이러스 병원소를 효율적으로 제거할 수 있도록 하였다.

[35]

도면의 간단한 설명

- [36] 도 1은 48시간의 HDAC 억제제 처리 후의 세포 독성 (세포 생존능력)을 나타낸다 (n=6).
- [37] 도 2는 만성감염세포로부터 HIV-1 프로바이러스의 재활성화에 의한 HIV-1 p24 항원 생성 능력을 도시한다 (n=6).
- [38] 도 3은 SAHA에 대한 ACH2 세포에서의 세포 생존능력 및 HIV-1 p24 항원 생성 능력을 도시한다.
- [39] 도 4는 PXD-101에 대한 ACH2 세포에서의 세포 생존능력 및 HIV-1 p24 항원 생성 능력을 도시한다.
- [40] 도 5는 CG0005에 대한 ACH2 세포에서의 세포 생존능력 및 HIV-1 p24 항원 생성 능력을 도시한다.
- [41] 도 6은 CG0006에 대한 ACH2 세포에서의 세포 생존능력 및 HIV-1 p24 항원 생성 능력을 도시한다.
- [42] 도 7은 0.14 μ M 단일 치료 농도로 HDAC 억제제를 처리한 후 측정된 세포 생존능력을 도시한다.
- [43] 도 8은 0.14 μ M 단일 치료 농도로 HDAC 억제제를 처리한 후 측정된 HIV-1 p24 항원 생성 능력을 도시한다.
- [44] 도 9는 SAHA에 대한 J 1.1 세포에서의 세포 생존능력 및 HIV-1 p24 항원 생성 능력을 도시한다.
- [45] 도 10은 PXD-101에 대한 J 1.1 세포에서의 세포 생존능력 및 HIV-1 p24 항원 생성 능력을 도시한다.
- [46] 도 11은 CG0005에 대한 J 1.1 세포에서의 세포 생존능력 및 HIV-1 p24 항원 생성 능력을 도시한다.
- [47] 도 12는 CG0006에 대한 J 1.1 세포에서의 세포 생존능력 및 HIV-1 p24 항원 생성 능력을 도시한다.
- [48] 도 13은 HDAC 억제제 처리 후 ACH2 세포 내부에서의 HIV-1 p24 항원의

변화를 도시한다.

- [49] 도 14는 HDAC 억제제 처리 후 면역세포 활성화 표지인자인 CD28의 발현변화를 도시한다.
- [50] 도 15는 HDAC 억제제 처리 후 ACH2 세포 내부에서의 반응과 관련된 생리신호 전달에 관련된 신호물질(RANTES)의 발현변화를 도시한다.
- [51] 도 16은 HDAC 억제제 처리 후 ACH2 세포 내부에서의 반응과 관련된 생리신호 전달에 관련된 신호물질(PD-1 수용체 및 PD-L1 리간드)의 발현변화를 도시한다.
- [52] 도 17은 HDAC 억제제의 처리 후, ELISA 방법으로 측정한 히스톤 H3 단백질의 아세틸화를 도시한다.
- [53] 도 18은 HDAC 억제제의 처리 후, Western Blot으로 나타낸 히스톤 H3 단백질 각 부분에서의 아세틸화 및 메틸화를 도시한다.
- [54] 도 19는 HDAC 억제제의 처리 후, HIV-1 프로바이러스의 발현과 관련이 있는 NFkB 전사인자의 인산화에 있어서의 변화를 도시한다.

[55]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [56] 이하,본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[57]

[58] 실시예 1. 세포의 배양 및 HDAC 억제제의 세포 독성 측정

- [59] 잠복성 HIV-1 감염 세포주 J1.1 및 ACH2 세포에 HDAC 억제제를 처리하여, HIV-1 병원소의 바이러스 복제를 재활성화시켰다.
- [60] A3.01 세포 및 Jurkat 세포로부터 유도된, 만성적으로 HIV-1 바이러스에 감염된 CD4+ T 세포주인 ACH-2 및 J1.1 세포를 미국국립보건원 AIDS 연구 및 레퍼런스 리에이션트 프로그램(National Institute of Health AIDS Research Reagent Program)을 통해 구입하였다. 상기 세포에 본 발명의 HDAC 억제제인 2-(아릴옥시메틸)-옥트-2-에디오익 산 8-하이드록시아미드 1-[(1-알킬-피페리딘-4-일)-아미드](2-(aryloxymethyl)-oct-2-enedioic acid 8-hydroxyamide 1-[(1-alkyl-piperidin-4-yl)-amide])(이하, 'CG0005' 및 'CG0006', 크리스탈 제노믹스사, 서울, 한국)를 처리하였다.
- [61] 세포에 HDAC 억제제를 처리하고, 48시간 후 MTT 측정법(MTT assay, Roche)을 사용하여 세포의 독성을 측정하였다. 그 결과, CG0006은 SAHA(CD₅₀: 0.3μM) 또는 PXD-101(CD₅₀: 0.1 ~ 0.3 μM)에 비해 낮은 세포독성(CD₅₀: 0.1 ~ 0.3 μM)을 나타내었다. CG0005 및 CG0006의 안정성을 SAHA, PXD-101과 비교하여 보여주는 세포 독성 실험 결과를 도 1에 나타내었다.

[62]

[63] 실시예 2. HDAC 억제제의 처리에 의한 HIV-1 프로바이러스 재활성화

[64] <HDAC 억제제 처리를 통한 HIV-1 프로바이러스 활성화의 측정>

[65] HDAC 억제제에 의한 HIV-1 프로바이러스 재활성화를 측정하기 위하여 세포에 HDAC 억제제를 처리한 후, 세포 배양액에 생성된 HIV-1 p24 항원량을 Vironostika HIV-1 Antigen MicroELISA 키트(BioMerieux)를 사용하여 측정하였다(HIV-1 Gag p24 항원 ELISA). 이때, CG0005 및 CG0006을 처리한 J1.1 세포주 및 ACH2 세포주는 양성 대조로서 SAHA 및 PXD-101을 처리한 양성대조군에 비해 낮은 농도에서 보다 많은 HIV-1 p24 항원이 생성되었다. ED₅₀은 CG0005의 경우, 약 0.1 μ M, CG0006의 경우 약 0.05 μ M이었다.

[66] 도 2는 HIV-1 프로바이러스 재활성에 따라 세포 배양액으로 배출된 HIV-1 p24 항원량을 ELISA 방법으로 측정한 결과이다. 도 3에서 도 6에는, 도 1 및 도 2의 결과를 토대로 각각의 HDAC 억제제에 대한 ACH2 세포에서의 세포 생존능력 및 HIV-1 p24 항원 생성 능력을 CD₅₀ (Cytotoxic dose 50)와 ED₅₀ (Effective dose 50)로 나타낸 것이다. CG0005 및 CG0006의 경우, SAHA나 PXD-101에 비해 높은 농도(2 μ M)까지 50% 이상의 세포가 생존하였으며, 이보다 훨씬 낮은 농도(0.05 - 0.1 μ M)에서 SAHA 또는 PXD-101과 비교하여 높은 HIV-1 프로바이러스 재활성 능력을 나타내었다(도 5, 6). 도 7과 도 8은 CG0005와 CG0006의 안정성과 재활성화 효과를 고려하여 정한 0.14 μ M의 단일 처리 농도에서 세포독성과 HIV p24 항원 생산량을 비교한 결과이다.

[67] 또 다른 종류의 T 면역세포주인 J1.1 세포를 이용한 세포독성 및 HIV-1 프로바이러스 재활성화 측정에서도 CG0005와 CG0006은 ACH2 세포주 실험의 결과와 유사한 양상을 보였다. SAHA와 PXD-101에 비해 보다 우수한 ED₅₀을 보였으며 (0.1 μ M), 재활성화시의 HIV-1 p24 항원량도 PXD-101이나 SAHA보다 우수한 것으로 나타났다 (도 9 내지 도 12).

[68] 다음으로, HDAC 억제제 처리에 의한 세포내 HIV-1 프로바이러스 재활성 능력을 측정하기 위하여 HDAC 억제제를 24-48 시간동안 처리한 후 유세포 분석방법으로 세포내 HIV-1 p24 항원이 발현된 세포 비율을 측정하였다. HDAC 억제제 처리 후 배양한 세포를 15분간 Perm/Fix 시약(BD Sciences)으로 전처리 한 다음, 다시 20분 동안 KC57 (p24)-RD1 항체(Beckman Coulter)로 염색한 후, FC500 유세포 분석기(FC500 Flow cytometer, Beckman Coulter)를 이용하여 세포를 측정하였다. 24 시간 처리후, CG0005와 CG0006를 처리한 세포군에서 세포내 HIV-1 p24항원이 발현되는 세포 비율이 급격히 증가하였으며, 48시간 후에도 24시간 처리시 보다는 HIV-1 p24항원을 발현하는 세포 비율은 다소 줄어들었지만 대조군이나 SAHA 및 PXD-101 억제제를 처리한 세포에 비하여 높은 수준을 그대로 유지하였다.

[69] 도 13에서, 원으로 표시된 부분은 HIV-1 만성감염 세포(HIV-1 프로바이러스에 감염되었지만 HIV-1 바이러스가 복제되지 않은 세포)를, 화살표는 HDAC 억제제에 의하여 재활성화된 세포내 HIV-1 p24 항원을 발현하는 세포 그룹으로 진행되는 과정을 나타낸다. CG0005와 CG0006의 경우 SAHA 또는 PXD-101과

비교하여, 24시간 처리 후 현저하게 세포내 HIV-1 프로바이러스가 재활성화 되는 양상을 나타내었다.

[70] HDAC 억제제 처리에 의해 면역세포 활성화가 유발되는지를 알아보기 위하여 유세포 분석 방법으로 면역세포 표면의 활성화 표지인자인 CD28 발현 양상을 측정하였다. 약물 처리 후 배양한 세포를 전처리 과정 없이 20분 동안 CD28-ECD 항체(Beckman Coulter)로 염색한 후, FC500 유세포 분석기(FC500 Flow cytometer, Beckman Coulter)를 이용하여 분석하였다.

[71] 도 14는 각각의 HDAC 억제제 처리에 의하여 면역세포 표면 활성화 표지인자인 CD28 발현이 증가하는 정도를 나타낸다. 회색 부분은 HDAC 억제제를 처리하지 않은 대조세포에서의 CD28 발현양상을 나타내며, 흰색 부분은 HDAC 억제제를 처리한 세포에서의 CD28 발현양상을 보여주었다. HDAC 억제제 처리후 CD28 발현이 증가하였으며, CG0005와 CG0006를 처리한 세포에서 CD28 발현이 현저히 높았다. 이러한 경향은 처리 후 48시간까지도 일정하게 나타났다.

[72]

[73] **실시예 3. RANTES 생성 측정 및 PD-1, PD-L1 측정**

[74] 24시간 약물을 처리한 후 HIV-1 보조수용체 CCR5의 리간드인 케모카인 RANTES의 세포내 생성량 및 세포 사멸과 관련된 세포 표면 표지인 PD-1 및 이의 리간드인 PD-L1의 발현량 변화를 측정하였다. 약물 처리 후 배양한 세포를 각각 두개의 플라스틱 시험관에 나누어서 15분간 Perm/Fix 시약(BD Sciences)으로 전처리 한 다음, 다시 20분 동안 시험관 1은 RANTES-PE (BD Sciences)로, 시험관 2는 CD279(PD-1)-PE과 CD274(PD-L1)-FITC (BD Sciences)의 혼합물로 염색한 후, FC500 유세포 분석기(FC500 Flow cytometer, Beckman Coulter)를 이용하여 분석하였다.

[75] 실험결과 세포내 RANTES 생성은 SAHA에 비하여 PXD-101, CG0006를 처리한 세포에서 상대적으로 증가하는 경향을 보였다. 또한, HIV-1 비감염 세포와 비교하여 HIV-1 만성감염 세포주인 ACH2 세포에서 세포사멸 표지인자인 PD-1 receptor (Programmed Death receptor 1)와 PD-L1 리간드 (Programmed Death Receptor 1 ligand)의 발현이 변화되는 양상과 이러한 변화가 HDAC 억제제 처리에 의하여 회복되는 양상이 측정되었다.

[76] 도 15에서 회색으로 표시된 피크는 약물을 처리하지 않은 만성감염 세포주 인 ACH2 세포에서의 세포내 RANTES 발현량을 나타내며, 흰색으로 표시된 부분은 HDAC 억제제에 의하여 증가된 세포내 RANTES 발현량을 나타낸다. CG0005와 CG0006은 SAHA에 비하여 현저히 증가된 RANTES 발현량을 보여주었다.

[77] 도 16은 PD-1(각각의 다이어그램 오른쪽 하단의 노란색으로 표시된 부분)과 PD-L1(다이어그램의 왼쪽 상단에 빨간색으로 표시된 부분)의 분포양상을 보여주고 있는데, 비감염 세포주인 A3.01세포에 비하여 만성 감염 세포주인 ACH2세포에서 상대적으로 높은 PD-L1 리간드 발현세포 비율과 절반정도 낮은

PD-1 리셉터 발현 세포 비율을 나타내는데 비하여, HDAC 억제제를 처리한 경우, 만성 감염에 의해 생겼던 이러한 변화가 PD-1 리셉터 발현세포 비율은 높아지고, PD-L1 발현세포 비율은 다소 낮아지는, 즉, 반대 방향으로의 회복 양상을 보여주었다.

[78]

[79] 실시예 4. 히스톤 H3 단백질의 아세틸화 측정 및 EMSA(electrophoretic mobility shift assay)

[80] HIV-1 만성감염세포로부터 HIV-1 프로바이러스 재활성화에 관여할 것으로 알려지고 있는 히스톤 H3 단백질의 아세틸화(acetylation) 정도를 Cell Signaling사의 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다. CG0005와 CG0006의 처리에 의해 히스톤 H3의 아세틸화가 현저하게 증가되었고(도 17), 이와 같은 아세틸화의 변화에 상응하여 15와 같이 HIV-1 p24 항원량도 증가하였다. 세포배양액에서의 HIV-1 p24 항원은 앞에서 기술하였던 Vironostika HIV-1 Antigen MicroELISA 키트(BioMerieux)를 사용하여 측정되었다.

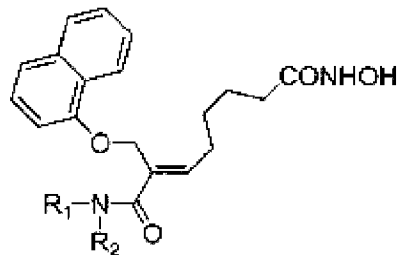
[81] HIV-1 프로바이러스 활성화와 관련하여 히스톤 H3 단백질의 아세틸화 변화를 알아보기 위하여 1차 항체인 Acetyl-Histone H3 (Lys9)(#9671, Cell signaling Technology), Acetyl-Histone H3 (Lys27) (#07-360, Upstate)와 각각의 1차 항체에 상응하는 Santa Cruz사의 2차 항체를 사용한 Immunoblot를 수행하였으며, Loading Control로 Santa Cruz사의 b-actin (#sc-1616)을 사용하였다. 분석 결과, 2개의 라이신 자리(K9 및 K27)에서 히스톤 H3의 아세틸화가 일어났다. HDAC 억제제의 처리에 따라 히스톤 단백질 H3의 아세틸화가 현저하게 증가하였다(도 18).

[82] Panomics사의 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) 키트를 이용한 NFkB (nuclear factor kappa B) 측정 실험 결과, NFkB p65의 세린 276 잔기에서의 인산화(p65-S²⁷⁶) 정도가 증가하였고, NFkB 복합체의 총량 또한 증가하였다(도 19). NFkB는 숙주 게놈에 숨어있는 HIV 바이러스의 재발현 전사 과정에 관여하는 역할을 하는 것으로, 억제제의 처리에 따라 NFkB의 발현과 NFkB 전사인자의 276번 세린 인산화가 증가되는 양상이 나타났다. 본 발명의 CG0005와 CG0006를 처리한 경우, 다른 억제제들을 처리한 경우보다 NFkB 복합체 총량이 현저히 증가하였다.

[83] 이와 같이, 본 발명의 CG0005 및 CG0006은 종래의 다른 억제제와 비교하여, 히스톤 H3 단백질의 아세틸화 촉진 및 HIV 재활성화 전사 활성의 증가에 관여하는 NFkB의 활성화를 유도하여, 잠복성 HIV감염 세포로부터 HIV-1 프로바이러스를 재활성화 시키는 능력을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

청구범위

- [1] 잠복성 HIV 감염 세포로부터 HIV-1 프로바이러스를 재활성화시키기 위한 화학식 1의 히스톤 디아세틸라제 억제제:
화학식 1



상기 화학식 1에서,

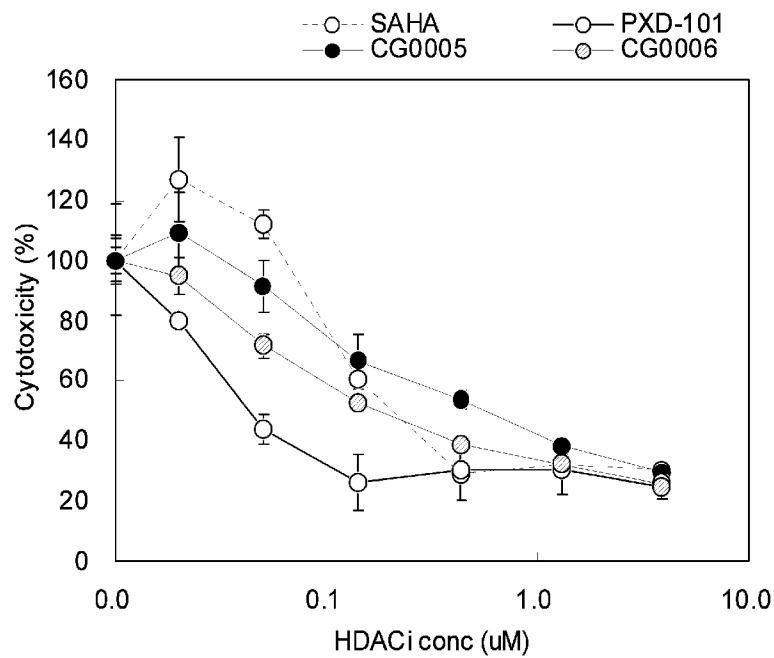
R_1 은 각각 독립적으로 C_{1-3} 알킬, 하이드록시 C_{1-2} 알킬, 할로 C_{1-2} 알킬, 피페리디닐, 몰포리닐, 사이아노메틸, 피페라지닐, 다이 C_{1-2} 알킬아미노 C_{1-2} 알킬, 다이 C_{1-2} 알킬아미노 C_{1-2} 알킬, 피페리디닐 C_{1-2} 알킬, 몰포리노 C_{1-2} 알킬, 피페라지노 C_{1-2} 알킬, 피롤리디닐, C_{1-2} 알킬피롤리디닐로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-2} 알킬이고, R_2 는 수소 또는 메틸이다.

- [2] 제1항에 있어서,
잠복성 HIV 감염 세포가 ACH2 세포 또는 J1.1 세포인 것을 특징으로 하는 히스톤 디아세틸라제 억제제.
- [3] 제2항에 있어서,
잠복성 HIV 감염 세포가 ACH2 세포인 것을 특징으로 하는 히스톤 디아세틸라제 억제제.
- [4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
화학식 1의 화합물이
(E)-N8-하이드록시-N1,N1-다이메틸-2-((나프탈렌-1-일 옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
(E)-N1-(2-(다이메틸아미노)에틸)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일 옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
(E)-N1-(2-(다이메틸아미노)에틸)-N8-하이드록시-N1-메틸-2-((나프탈렌-1-일 옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
(E)-N1-(2-(다이에틸아미노)에틸)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일 옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
(E)-N1-(2-(다이에틸아미노)에틸)-N8-하이드록시-N1-메틸-2-((나프탈렌-1-일 옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
(E)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일 옥시)메틸)-N1-(2-(피롤리딘-1-일)에틸)옥텐다이아마이드,

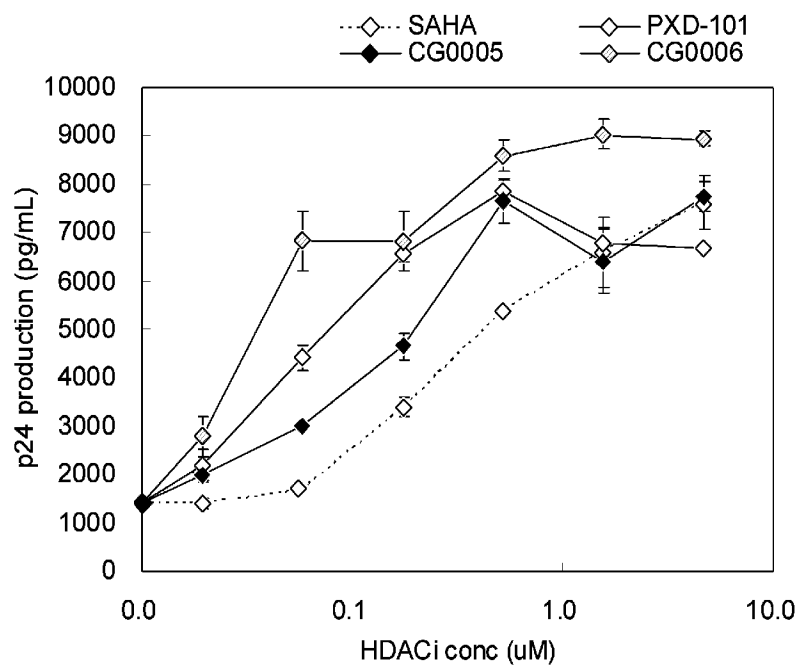
(E)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일
 옥시)메틸)-N1-(2-(피페리딘-1-일)에틸)옥텐다이아마이드,
 (E)-N8-하이드록시-N1-(2-몰포리노에틸)-2-((나프탈렌-1-일
 옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
 (E)-N-하이드록시-8-(4-메틸피페라진-1-일)-7-((나프탈렌-1-일
 옥시)메틸)-8-옥소옥텐아마이드,
 (E)-N8-하이드록시-N1-(2-(4-메틸피페라진-1-일)에틸)-2-((나프탈렌-1-일
 옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
 (E)-N1-(사이아노메틸)-N8-하이드록시-N1-메틸-2-((나프탈렌-1-일
 옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
 (E)-N8-하이드록시-N1-(2-하이드록시에틸)-N1-메틸-2-((나프탈렌-1-일
 옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
 (E)-N8-하이드록시-N1-메틸-N1-(1-메틸피롤리딘-3-일)-2-((나프탈렌-1-일
 옥시)메틸)옥텐다이아마이드,
 (E)-N1-(3-(다이메틸아미노)프로필)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일
 옥시)메틸)옥텐다이아마이드, 및
 (E)-N-하이드록시-8-몰포리노-7-((나프탈렌-1-일
 옥시)메틸)-8-옥소옥텐다이아마이드 유도체로 이루어진 군에서 선택되는
 것을 특징으로 하는, 히스톤 디아세틸라제 억제제.

- [5] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 히스톤 디아세틸라제 억제제를 사용하여
 잠복성 HIV 감염 세포로부터 HIV-1 프로바이러스를 재활성화시키는 방법.

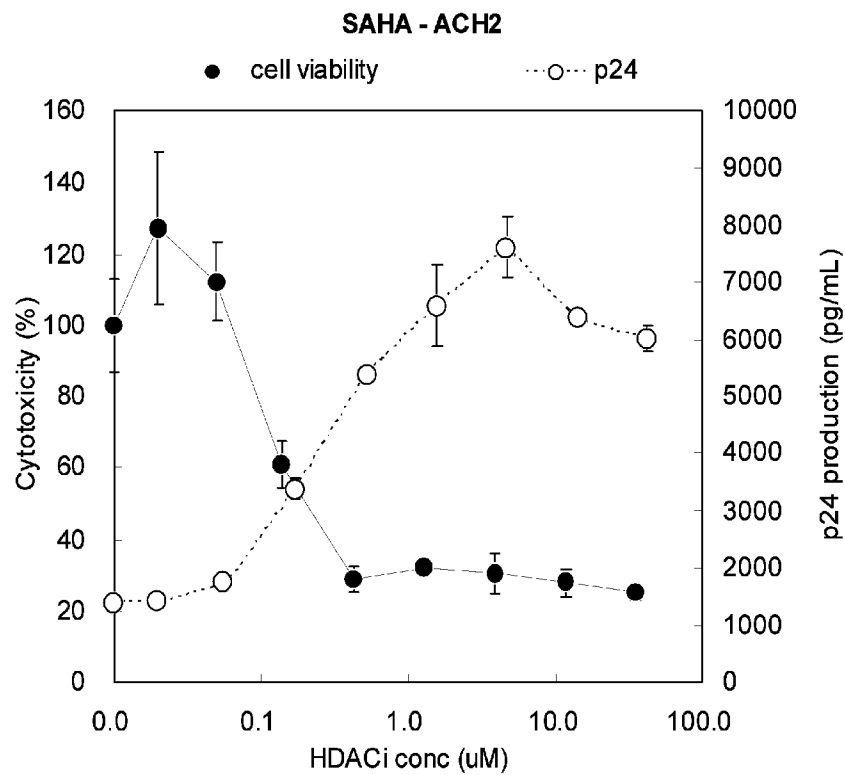
[Fig. 1]



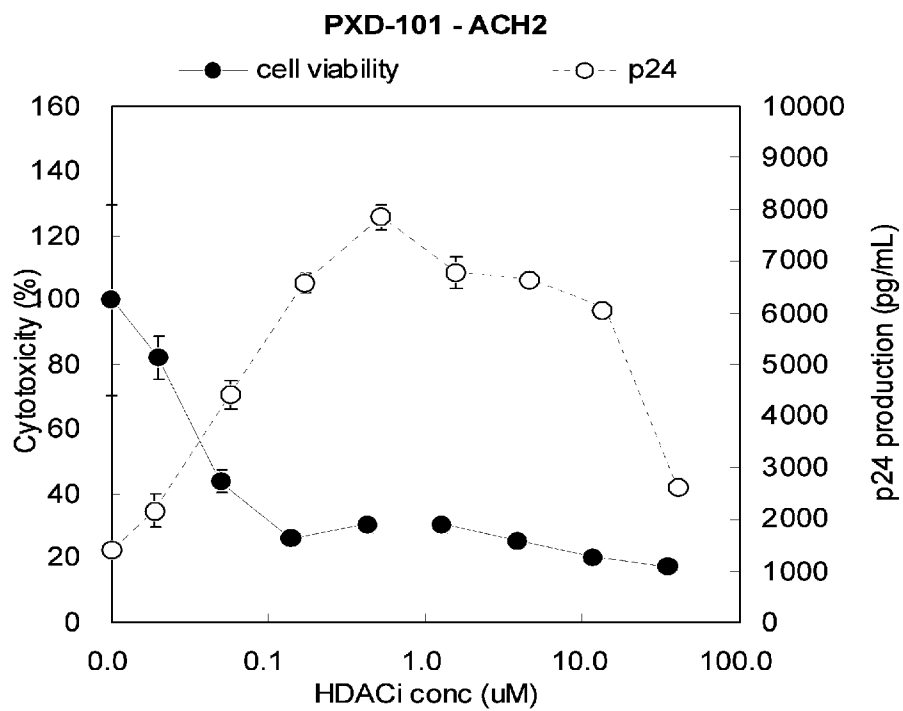
[Fig. 2]



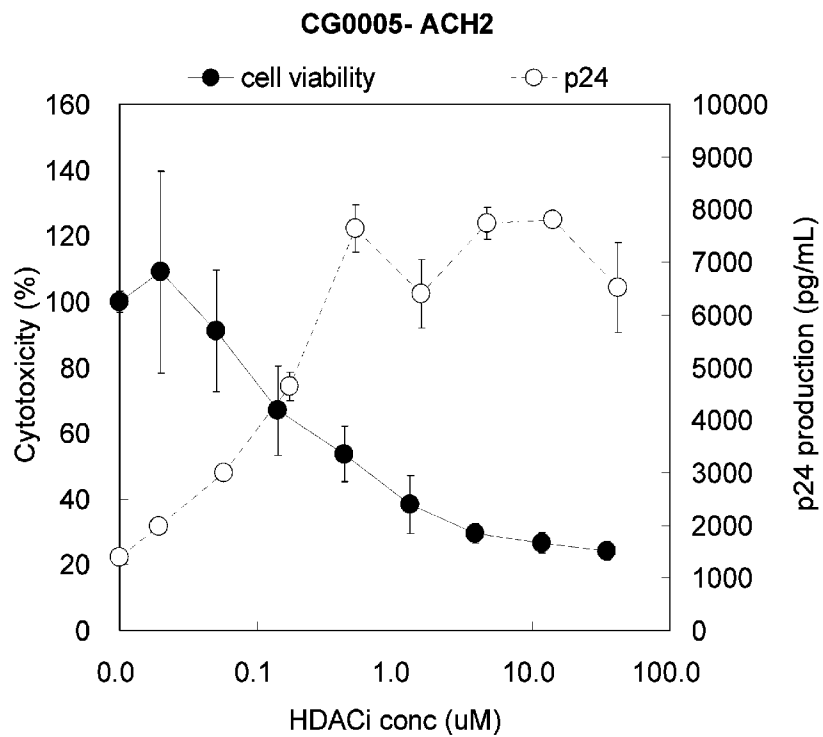
[Fig. 3]



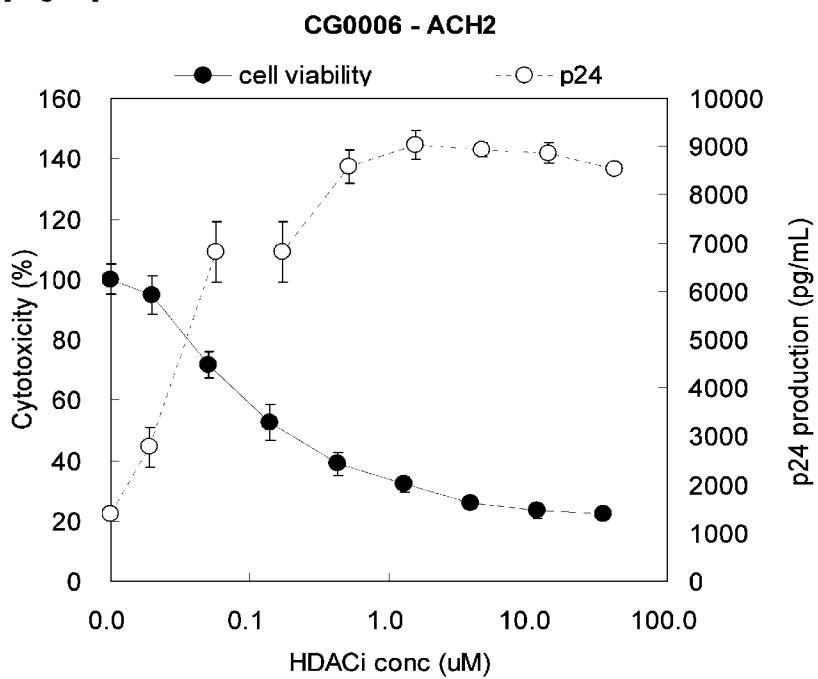
[Fig. 4]



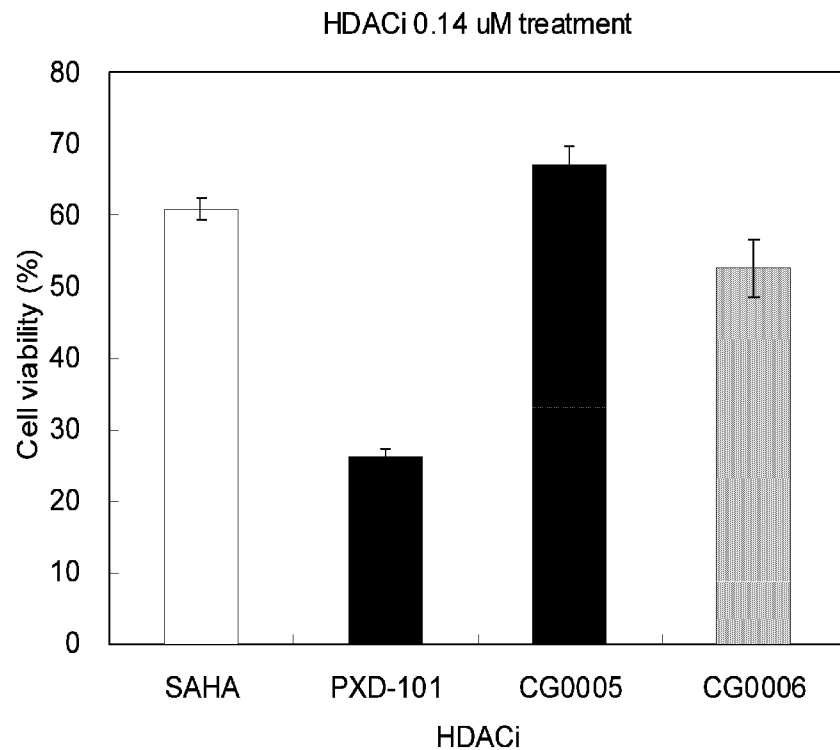
[Fig. 5]



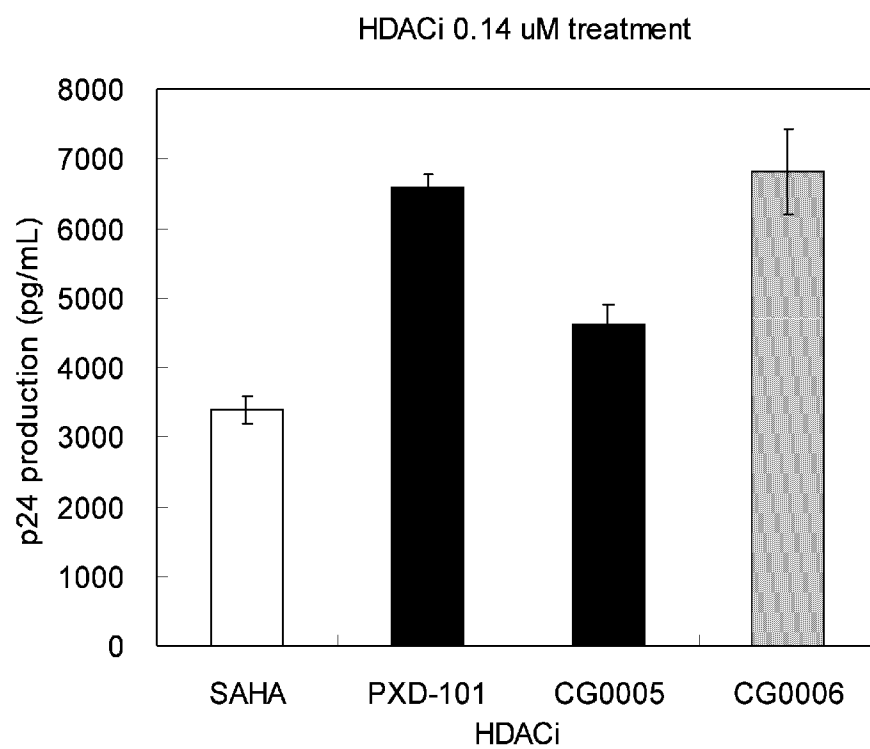
[Fig. 6]



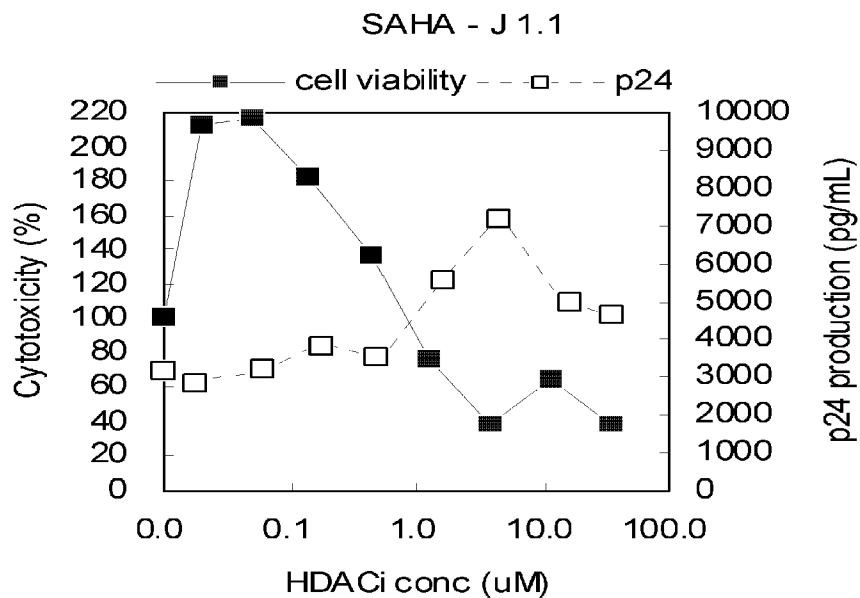
[Fig. 7]



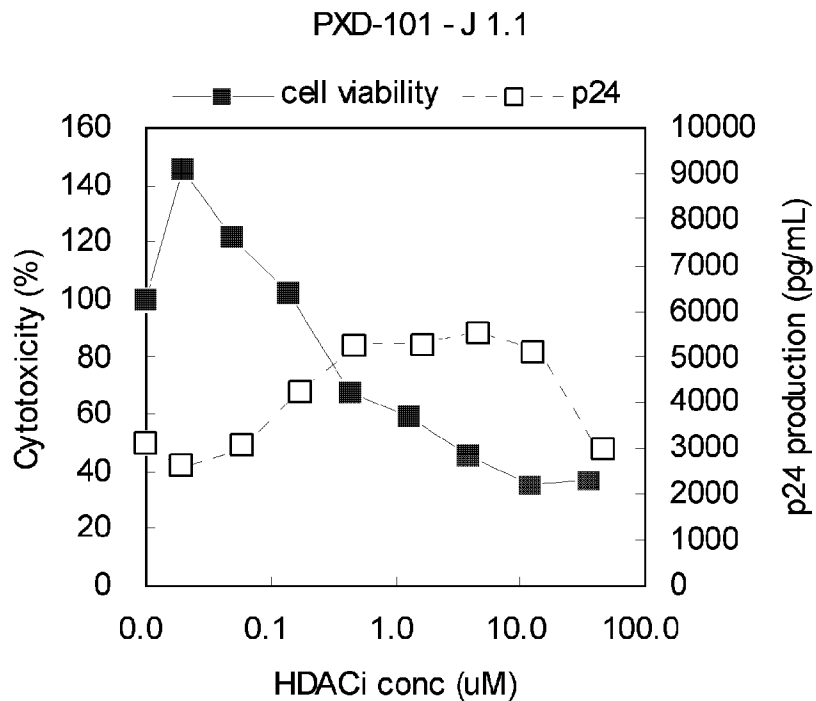
[Fig. 8]



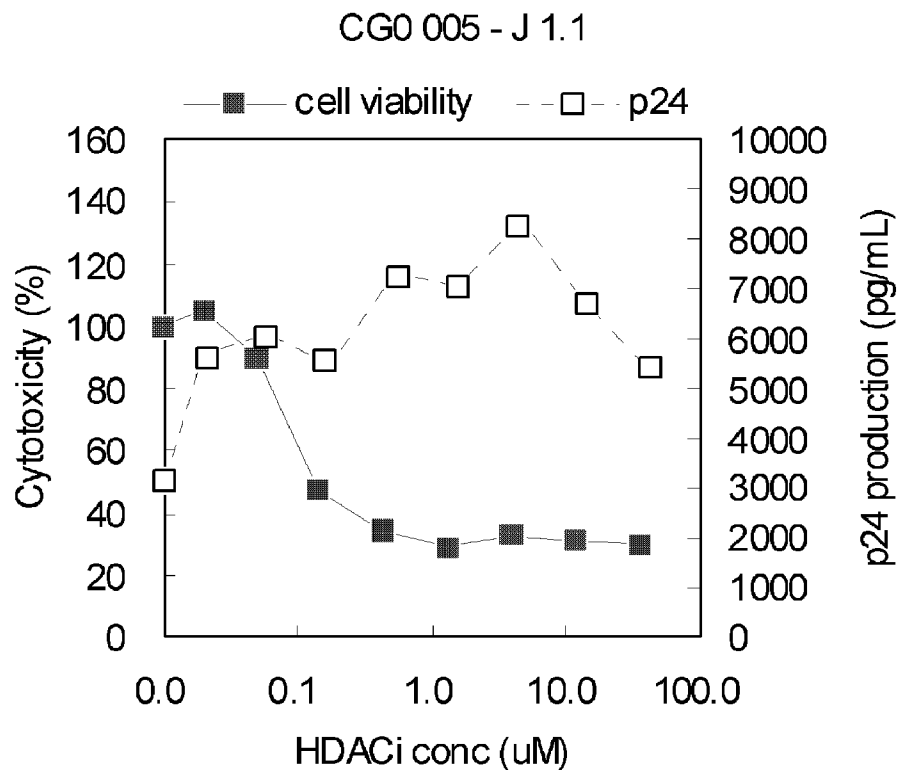
[Fig. 9]



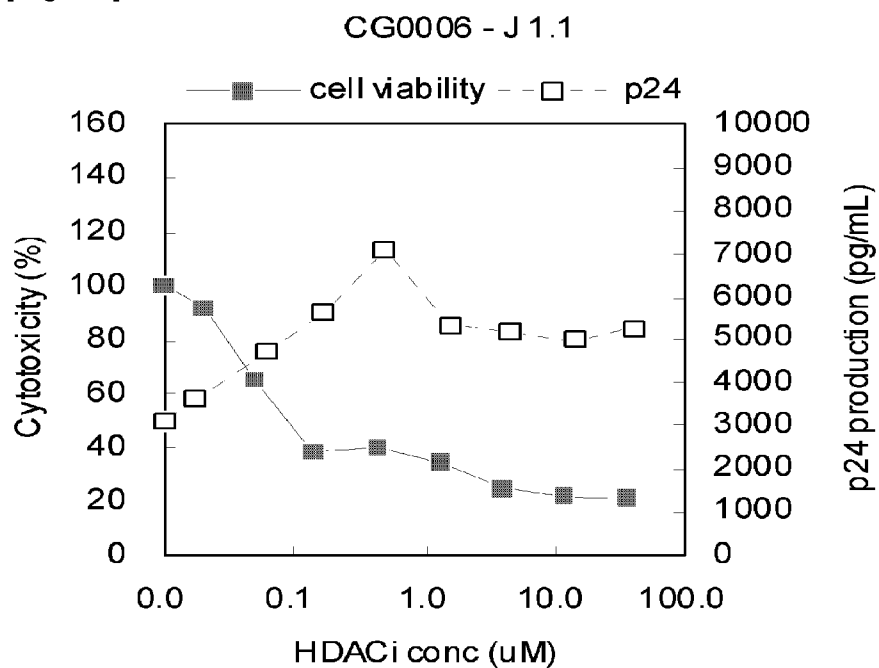
[Fig. 10]



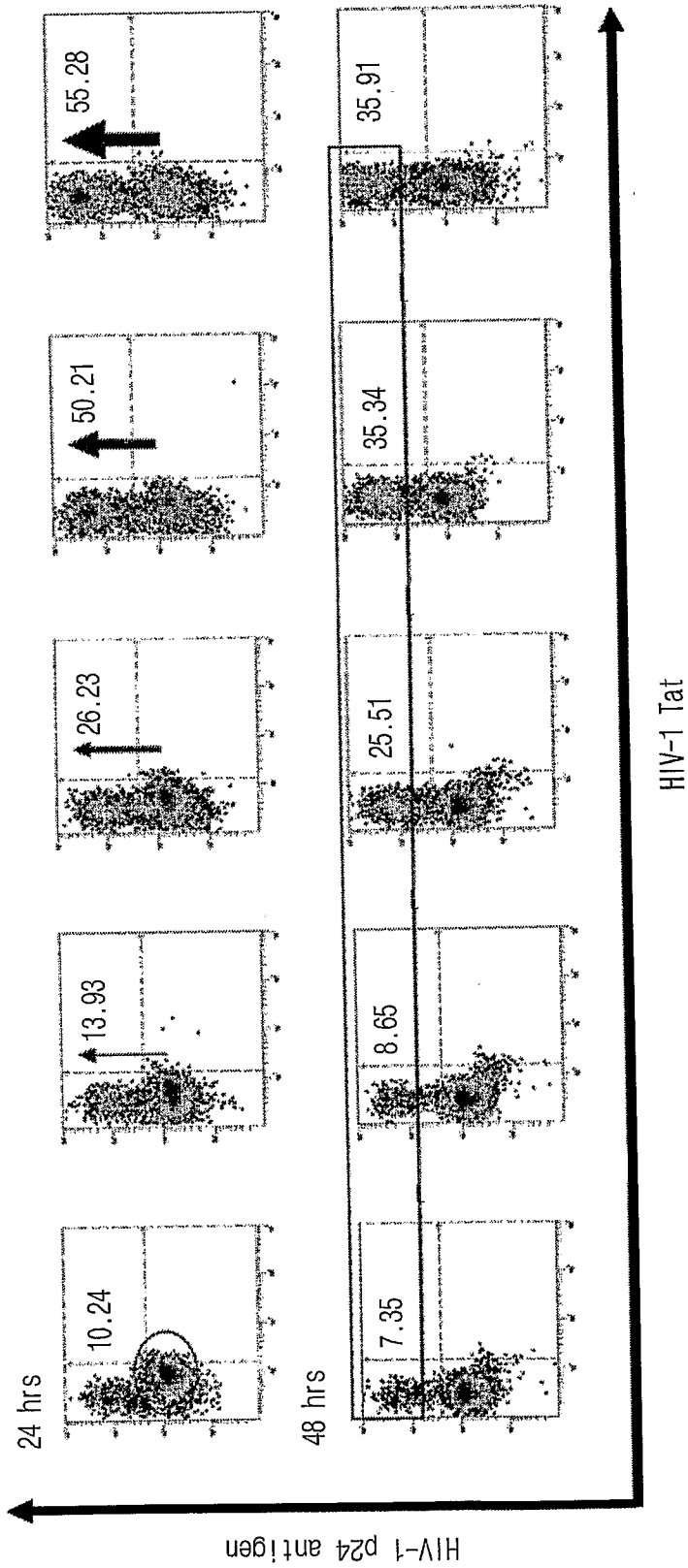
[Fig. 11]



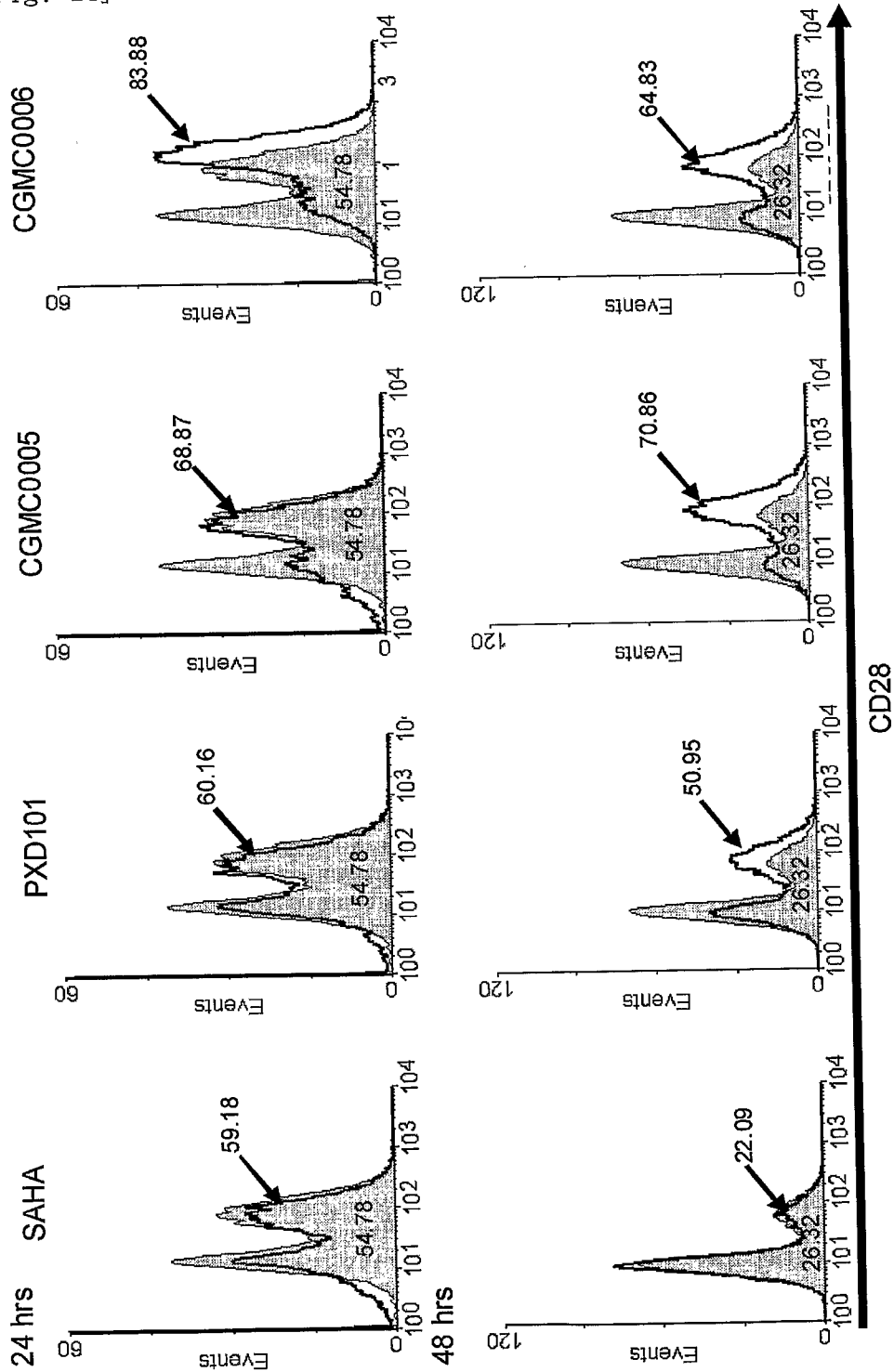
[Fig. 12]



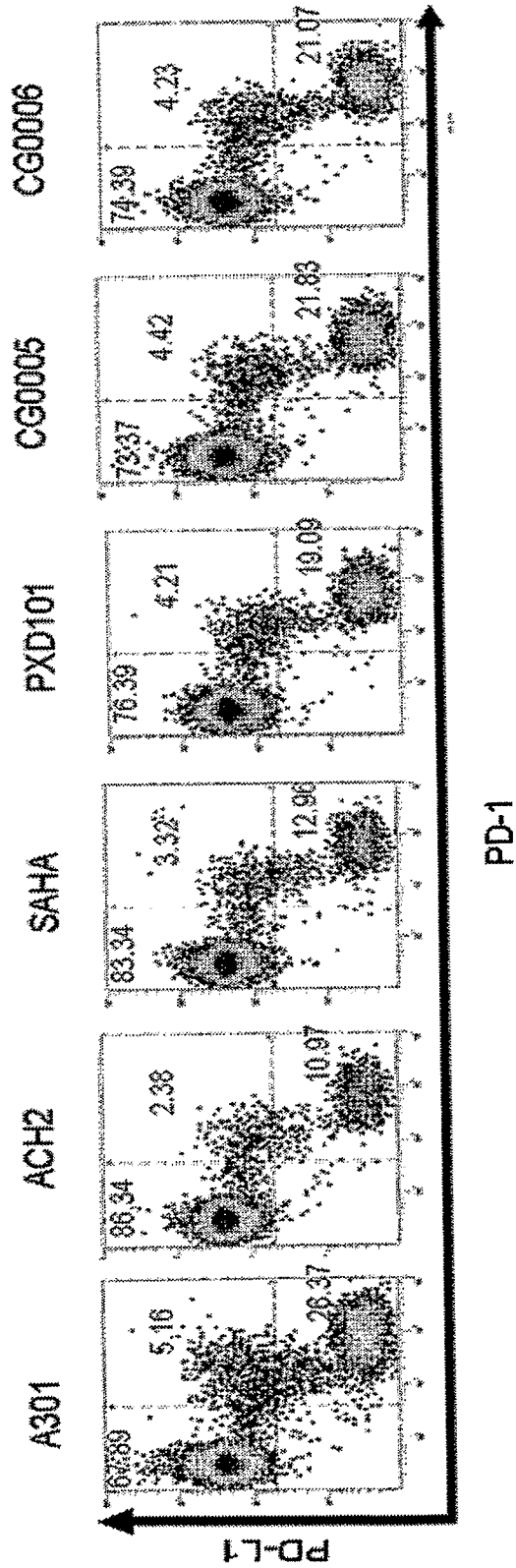
[Fig. 13]



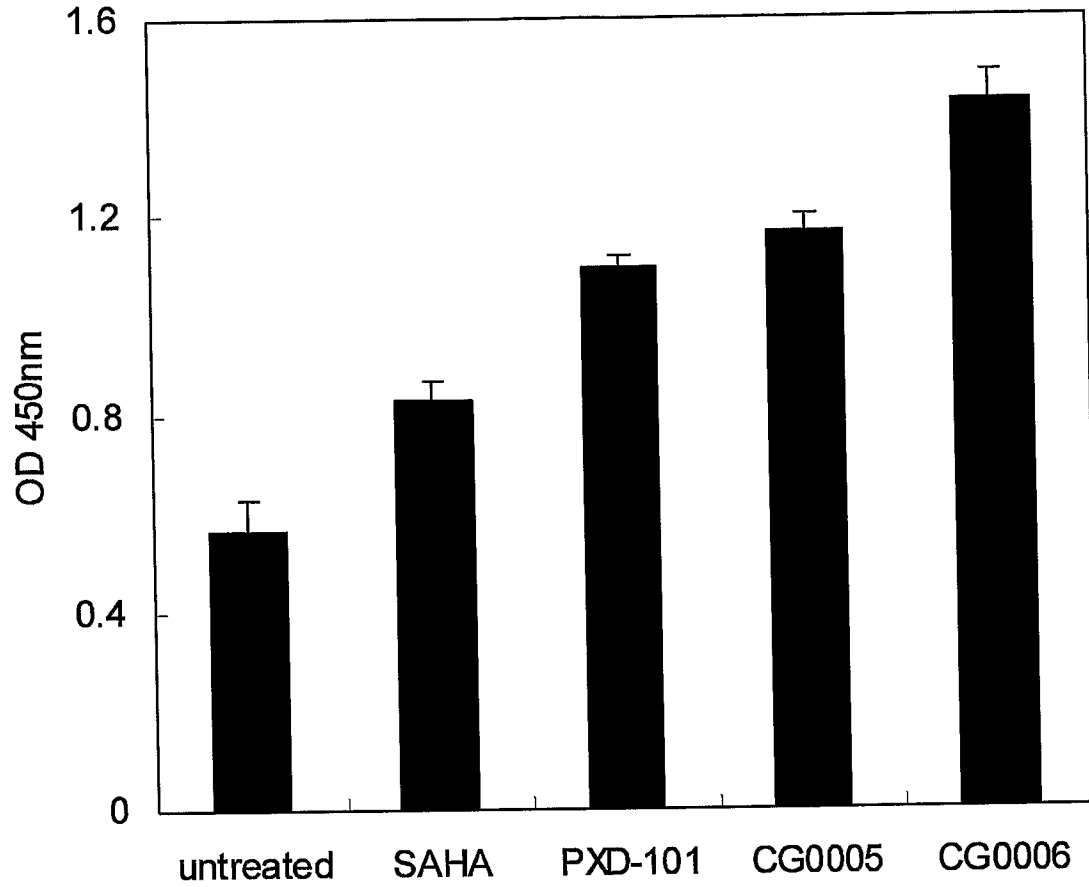
[Fig. 14]



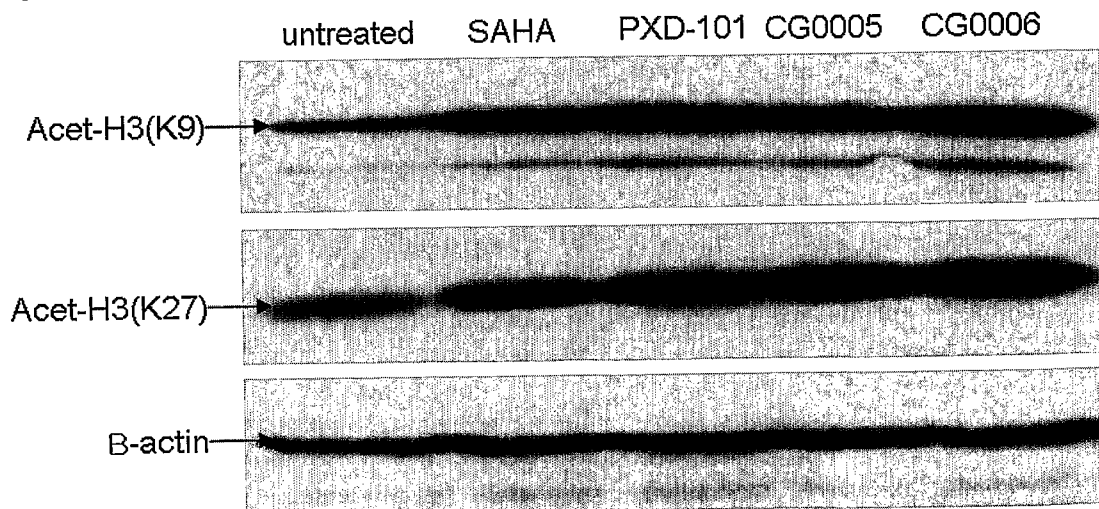
[Fig. 16]



[Fig. 17]



[Fig. 18]



[Fig. 19]

