



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0004346
(43) 공개일자 2023년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/137 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/137 (2013.01)
A61P 43/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0080891
(22) 출원일자 2022년06월30일
심사청구일자 2022년06월30일
(30) 우선권주장
1020210086142 2021년06월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
이범희
서울특별시 송파구 올림픽로 525, 104동 1605호(풍납동, 현대아파트)
도효상
서울특별시 강동구 진랑도로25길 14, 903호(천호동, 더결블레스)
허선희
서울특별시 송파구 풍성로15길 10, 101동 406호(풍납동, 대동아파트)
(74) 대리인
이명진

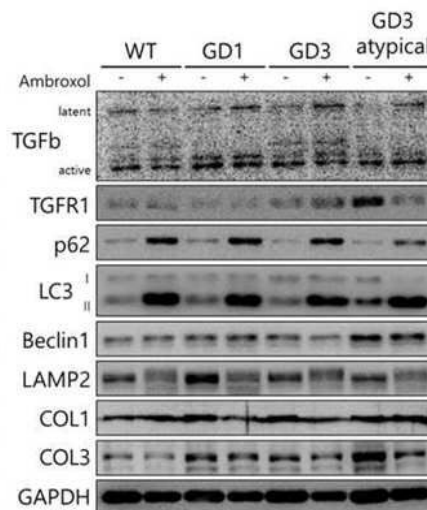
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 고서병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 암브록솔(Ambroxol)을 유효성분으로 포함하는 고서병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 이의 투여 대상이 되는 환자군을 선별하는 방법 등에 관한 것으로, 효소대체요법 비반응성 고서병 환자에게 암브록솔을 고용량으로 처리할 경우, 효소대체요법 비반응성 고서병 환자에서 특이적으로 증가되어 있는 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있는바, 종래의 효소대체요법에도 불구하고 치료 효과를 기대하지 못했던 고서병 환자의 염증, 섬유증 및 이로 인한 합병증의 효과적인 치료제로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105758
과제번호	2018M3A9H1078335
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	희귀유전질환의 치료적 한계 극복을 위한 생화학적 및 임상적 분석 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2018.10.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465034392
과제번호	HR21C0198030021
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성(R&D)
연구과제명	치료표적 발굴 특화 인공지능 기반의 개방형 신약개발 지원
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2021.07.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

암브록솔(Ambroxol)을 유효성분으로 포함하는 고서병 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,
효소대체요법 비반응성 고서병 환자군을 투여 대상으로 하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 암브록솔은 1일 투여용량 27 내지 150 mg/kg으로 포함되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 암브록솔의 1회 투여용량은 9 내지 50 mg/kg인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 암브록솔은 성인 인간에서 1,600 내지 9,000 mg/일 범위의 용량으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 암브록솔은 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 암브록솔은 염증 또는 섬유증을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 고서병은 비전형적(atypical) 3형 고서병인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 환자군은 암브록솔 투여 시 GCase 활성 비반응성인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 환자군은 다음 단계를 포함하여 선정되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물:

(S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

(S2) 상기 측정된 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 피검체를 대상 환자군으로 선정하는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 복수, 소변, 및 미세침흡인 검체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 대조군은 정상인 또는 전형적(typical) 고셔병 환자인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏팅(western blotting), ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS, 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 mRNA 발현 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법, 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 14

제1항의 약학적 조성물의 투여 대상이 되는 환자군을 선별하는 방법으로서,

(S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

(S2) 상기 측정된 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 피검체를 대상 환자군으로 판정하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암브록솔(Ambroxol)을 유효성분으로 포함하는 고셔병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 이의 투여 대상이 되는 환자군을 선별하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 고셔병(Gaucher Diseases)은 글루코세레브로시다제 유전자(GBA)의 돌연변이에 의해 발생하는 상염색체 열성 리소좀 축적 질환으로, 효소 GCase를 인코딩하는 유전자 GBA의 돌연변이에 의한 효소 GCase의 유전적 결핍에 의해 글루코실세라마이드(glucocerebroside)가 분해되지 못하고 대식세포의 리소좀에 축적되어 간과 비장, 골수 등에 이상을 일으키며, 혈액 이상(빈혈, 혈소판 감소, 백혈구 감소), 간비종, 골파괴, 중추신경손상 등을 유발한다.

[0004] 임상학적으로, 고셔병의 두가지 주요 카테고리는 비-신경병증형(nonneuropathic) 및 신경병증형(neuropathic) 고셔병이며, 이는 다시 3가지 유형으로 세분화될 수 있다. 제1형 고셔병은 가장 흔한 형태의 질병이고 비-신경병증형 고셔병을 포함한다. 제2형 및 제3형 고셔병은 급성 및 만성 신경병증형 고셔병을 포함한다. 신경병증형 고셔병 환자의 경우 글루코실세라마이드의 독성 효과에 의해 신경계에서 신경이 괴사되고 신경이 떨어져나가는 증상을 보인다. 하지만, 이러한 신경 괴사에 이르는 분자적인 반응에 대해서는 밝혀진 바가 거의 없다.

[0005] 한편, 효소대체요법(Enzyme replacement therapy)은 고셔병 치료에 효과가 입증된 전형적인 치료법으로, 특히 신경계 침투형 및 만성 신경계 침투형 고셔병에서 간비장비대, 혈액학적 소견에 크게 도움이 되는 것으로 알려져 있으나, 이러한 효소 치료에도 불구하고 이들 효소치료제(이미글루세라제(imiglucerase), 베라글루세라제(velaglucerase), 유플라이소(uplyso))는 뇌-혈관장벽을 통과하지 못하기 때문에 일부 환자에서 고셔병의 대표적인 대사 물질인 Lyso-GB1이 정상화되지 않으며, 골 병변이 완전히 회복되지 않는 등 치료 효과가 제한적인 것으로 알려져 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 샤페론(chaperone)인 암브록솔(Ambroxol)을 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자에게 고용량으로 처리할 경우, 증가되어 있는 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)의 발현 또는 활성이 감소한 것을 확인함으로써, 암브록솔이 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자에서 염증 및 섬유증을 예방, 개선, 또는 치료하는데 이용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1716767호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자에게 암브록솔을 고용량으로 처리할 경우, 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자의 염증 및 섬유증이 예방, 개선 또는 치료되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 암브록솔(Ambroxol)을 유효성분으로 포함하는 고셔병 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자군을 투여 대상으로 하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 대상이 되는 환자군을 선별하는 방법으로서,
- [0012] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0013] (S2) 상기 측정된 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 피검체를 대상 환자군으로 판정하는 단계를 포함하는, 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 암브록솔(Ambroxol)을 유효성분으로 포함하는 고셔병 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자군을 투여 대상으로 하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 암브록솔은 1일 투여용량 27 내지 150 mg/kg으로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 암브록솔의 1회 투여용량은 9 내지 50 mg/kg일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 암브록솔은 성인 인간에서 1,600 내지 9,000 mg/일 범위의 용량으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 암브록솔은 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 암브록솔은 염증 또는 섬유증을 억제할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 고셔병은 비전형적(atypical) 3형 고셔병일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 환자군은 암브록솔 투여시 GCase 활성 비반응성일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 환자군은 다음 단계를 포함하여 선정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [0025] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0026] (S2) 상기 측정된 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 피

검체를 대상 환자군으로 선정하는 단계.

- [0027] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 복수, 소변, 및 미세침흡인 검체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 대조군은 정상인 또는 전형적(typical) 고셔병 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏팅(western blotting), ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로켓 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 대상이 되는 환자군을 선별하는 방법으로서,
- [0032] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0033] (S2) 상기 측정된 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 피검체를 대상 환자군으로 판정하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 암브록솔을 유효성분으로 하는 조성물을 효소대체요법 비반응성 고셔병 개체에 투여하는 단계를 포함하는 고셔병의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 암브록솔을 유효성분으로 포함하는 조성물의 효소대체요법 비반응성 고셔병의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 암브록솔의 효소대체요법 비반응성 고셔병의 치료에 이용되는 약제를 제조하기 위한 용도를 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 암브록솔을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물로서, 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자군을 투여 대상으로 하는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물을 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명은 암브록솔을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물로서, 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자군을 투여 대상으로 하는 것을 특징으로 하는, 항염증용 조성물을 제공한다.
- [0039] 또한, 본 발명은 암브록솔을 유효성분으로 포함하는 섬유증 억제용 조성물로서, 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자군을 투여 대상으로 하는 것을 특징으로 하는, 섬유증 억제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명은 암브록솔(Ambroxol)을 유효성분으로 포함하는 고셔병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자에게 암브록솔을 고용량으로 처리할 경우, 증가되어 있는 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있는바, 종래의 효소대체요법에도 불구하고 치료 효과를 기대하지 못했던 고셔병 환자의 염증, 섬유증 및 이로 인한 합병증의 효과적인 치료제로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0043]

도 1은 1형 고셔병(GD1), 3형 고셔병(GD3_T), 비전형적 3형 고셔병(GD3_AT) 환자의 섬유아세포에 Lyso-GB1 처리 후 신호전달체계의 변화를 웨스턴 블랏을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 1형 고셔병(GD1), 3형 고셔병(GD3_T), 비전형적 3형 고셔병(GD3_AT) 환자의 섬유아세포에 고용량 암브록솔 처리 후 신호전달체계의 변화를 웨스턴 블랏을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 1형 고셔병(GD1), 3형 고셔병(GD3_T), 비전형적 3형 고셔병(GD3_AT) 환자의 암브록솔에 의한 GCase 활성 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 비전형적 3형 고셔병(GD3_AT) 환자의 섬유아세포에 고용량 암브록솔을 처리한 후 TGF- β 1의 농도를 측정 한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 비전형적 고셔 세포와 전형적 고셔 세포를 H&E(Haematoxylin and Eosin) 염색법으로 비교한 결과를 나타 낸 도면이다. 구체적으로, a는 비전형적 3형 고셔병 환자의 조직을 나타낸 도면, b는 a의 b 사각형 부분을 확대 한 도면, c는 a의 c 사각형 부분을 확대한 도면으로 전형적 고셔 세포를 나타낸 도면, d는 a의 d 사각형 부분을 확대한 도면으로 비전형적 고셔 세포를 나타낸 도면임.

도 6은 비전형적 고셔 세포와 전형적 고셔 세포를 PAS(Periodic acid-Schiff) 염색법(상단) 및 MT(Masson trichrome) 염색법(하단)으로 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 전형적 고셔 세포 및 비전형적 고셔 세포에서 Lyso-GB1의 축적을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 전형적 고셔 세포와 비교하여 비전형적 고셔 세포에서 보체계의 활성화로 C1q, C4b, C3a, C5a 및 C5a receptor 단백질의 발현이 증가되어 있음을 확인한 결과를 나타낸 도면이다. 구체적으로, 각 단백질 도면의 우 측 상단은 전형적 고셔 세포, 우측 하단은 비전형적 고셔 세포를 나타낸 도면임.

도 9는 전형적 고셔 세포에 비해 비전형적 고셔 세포에서 TGF- β , TGF- β receptor 1, TGF- β receptor 2, 및 Thrombospondin-1(THBS) 단백질의 발현이 증가되어 있음을 면역조직화학염색법(immunohistochemistry)으로 확 인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 비전형적 고셔병의 GBA 돌연변이 유전자형을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 11은 비전형적 고셔병인 GBA 돌연변이 유전자형에 고용량 암브록솔 처리 후, GBA 활성을 확인한 결과를 나타 낸 도면이다.

도 12는 비전형적 고셔병인 GBA 돌연변이 유전자형에 고용량 암브록솔 처리 후, ECM(Collagen 1), 및 EMT 마커 (TWIST) 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13a는 1형 고셔병(GD1), 3형 고셔병(GD3_T), 비전형적 3형 고셔병(GD3_AT) 환자에 대한 단백질체 분석 결과 를 나타낸 도면이다.

도 13b는 1형 고셔병(GD1), 3형 고셔병(GD3_T), 비전형적 3형 고셔병(GD3_AT) 환자에서 발현 프로파일이 다른 8 개의 별개의 단백질 클러스터를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13c는 1형 고셔병(GD1), 3형 고셔병(GD3_T), 비전형적 3형 고셔병(GD3_AT) 환자에 대한 단백질체 분석 데이 터의 히트맵 및 계층적 클러스터링을 나타낸 도면이다.

도 13d는 1형 고셔병(GD1), 3형 고셔병(GD3_T), 비전형적 3형 고셔병(GD3_AT) 환자의 유전자 온톨로지를 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13e는 1형 고셔병(GD1), 3형 고셔병(GD3_T), 비전형적 3형 고셔병(GD3_AT) 환자에서 TGF- β 및 THBS1 발현을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13f는 3형 고셔병(GD3_T), 비전형적 3형 고셔병(GD3_AT) 환자 유래 섬유아세포에 Lyso-Gb1 처리 후, TGF- β , ECM 리모델링 단백질(collagen 1 및 3) 및 섬유증 마커(SNAIL)의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도면이 다.

도 14a 및 도 14b는 비전형적 3형 고셔병에 대한 고용량 암브록솔의 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044]

본 발명자들은 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자를 치료하기 위해 연구 노력한 결과, 암브록솔을 고용량으로

처리할 경우 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자의 섬유아세포에서 비정상적으로 발현이 증가되어 있는 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)의 발현 또는 활성이 감소함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

- [0045] 본 발명의 일 실시예에서는 Lyso-GB1 처리 후, 비전형적 3형 고셔병 환자의 섬유아세포에서 TGF- β , TGF- β receptor, 및 Beclin 1의 발현이 정상, 1형 고셔병, 및 3형 고셔병 환자의 섬유아세포에 비해 높게 발현되어 있는 것을 확인하였다 (실시예 1 참조).
- [0046] 본 발명의 다른 실시예에서는 비전형적 3형 고셔병 환자의 섬유아세포에서 TGF- β receptor, Beclin 1, 및 Collagen 3의 발현이 정상, 1형 고셔병, 및 3형 고셔병 환자의 섬유아세포에 비해 증가되어 있었으나, 고용량 암브록솔 처리 후 감소한 것을 확인하였다 (실시예 2 참조).
- [0047] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 비전형적 3형 고셔병 환자가 암브록솔에 의한 GCase 활성 비반응성을 나타내는 것을 확인하였다 (실시예 3 참조).
- [0048] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 비전형적 3형 고셔병 환자의 섬유아세포에서 TGF- β 1의 농도가 정상, 1형 고셔병, 및 3형 고셔병 환자의 섬유아세포에 비해 높게 발현되어 있었으나, 암브록솔 농도 의존적으로 발현이 감소되는 것을 확인하였다 (실시예 4 참조).
- [0049] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 비전형적 3형 고셔병 환자에서 발견되는 비전형적 고셔 세포와 이의 특징을 확인하였다 (실시예 5 참조).
- [0050] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 비전형적 고셔병인 GBA 돌연변이 유전자형을 확인하였으며, 비전형적 고셔병에 고용량 암브록솔을 처리할 경우 GBA 활성이 증가하고 Collagen 1(ECM), 및 TWIST(EMT 마커) 발현이 감소하는 것을 확인하였다 (실시예 6 참조).
- [0051] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 비전형적 3형 고셔병의 특징을 단백질체 분석을 통해 확인하였으며, 고용량 암브록솔 처리로 TGF- β receptor, Collagen 1, Collagen 3의 발현이 하향 조절되는 것을 확인하였다 (실시예 7 참조).
- [0053] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0055] 본 발명은 "암브록솔(Ambroxol)"을 유효성분으로 포함하는 고셔병 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,
- [0056] 효소대체요법 비반응성 고셔병 환자군을 투여 대상으로 하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물을 제공한다.
- [0057] 본 발명에서 사용하는 용어 암브록솔(Ambroxol)은 점착성 또는 과도한 점액 분비 및 장애와 관련된 급성 또는 만성 호흡기 질환의 치료를 위해 사용되는 진해거담제의 하나로 이하에서 별도의 설명이 없는 한, 본 발명에 따른 암브록솔은 화합물 그 자체, 약학적으로 허용되는 그것의 염, 수화물, 용매화물, 이성질체 및 프로드럭을 모두 포함하는 개념으로 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명은 또한, 암브록솔의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.
- [0059] 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 글루콘산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.
- [0060] 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이 때, 금속염으로서 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응

시켜 얻을 수 있다.

- [0061] 본 발명에서 상기 암브록솔은 1일 투여 용량 27 내지 150 mg/kg, 30 내지 150 mg/kg, 33 내지 150 mg/kg, 36 내지 150 mg/kg, 39 내지 150 mg/kg, 40 내지 150 mg/kg, 42 내지 150 mg/kg, 27 내지 145 mg/kg, 30 내지 145 mg/kg, 33 내지 145 mg/kg, 36 내지 145 mg/kg, 39 내지 145 mg/kg, 40 내지 145 mg/kg, 42 내지 145 mg/kg, 27 내지 140 mg/kg, 30 내지 140 mg/kg, 33 내지 140 mg/kg, 36 내지 140 mg/kg, 39 내지 140 mg/kg, 40 내지 140 mg/kg, 42 내지 140 mg/kg, 27 내지 135 mg/kg, 30 내지 135 mg/kg, 33 내지 135 mg/kg, 36 내지 135 mg/kg, 39 내지 135 mg/kg, 40 내지 135 mg/kg, 42 내지 135 mg/kg, 27 내지 130 mg/kg, 30 내지 130 mg/kg, 33 내지 130 mg/kg, 36 내지 130 mg/kg, 39 내지 130 mg/kg, 40 내지 130 mg/kg, 42 내지 130 mg/kg, 27 내지 125 mg/kg, 30 내지 125 mg/kg, 33 내지 125 mg/kg, 36 내지 125 mg/kg, 39 내지 125 mg/kg, 40 내지 125 mg/kg, 42 내지 125 mg/kg, 27 내지 120 mg/kg, 30 내지 120 mg/kg, 33 내지 120 mg/kg, 36 내지 120 mg/kg, 39 내지 120 mg/kg, 40 내지 120 mg/kg, 42 내지 120 mg/kg, 27 내지 115 mg/kg, 30 내지 115 mg/kg, 33 내지 115 mg/kg, 36 내지 115 mg/kg, 39 내지 115 mg/kg, 40 내지 115 mg/kg, 42 내지 115 mg/kg, 27 내지 110 mg/kg, 30 내지 110 mg/kg, 33 내지 110 mg/kg, 36 내지 110 mg/kg, 39 내지 110 mg/kg, 40 내지 110 mg/kg, 42 내지 110 mg/kg, 27 내지 105 mg/kg, 30 내지 105 mg/kg, 33 내지 105 mg/kg, 36 내지 105 mg/kg, 39 내지 105 mg/kg, 40 내지 105 mg/kg, 42 내지 105 mg/kg, 27 내지 100 mg/kg, 30 내지 100 mg/kg, 33 내지 100 mg/kg, 36 내지 100 mg/kg, 39 내지 100 mg/kg, 40 내지 100 mg/kg, 42 내지 100 mg/kg, 27 내지 95 mg/kg, 30 내지 95 mg/kg, 33 내지 95 mg/kg, 36 내지 95 mg/kg, 39 내지 95 mg/kg, 40 내지 95 mg/kg, 또는 42 내지 95 mg/kg으로 포함될 수 있으며, 이는 단일 또는 수회로 나누어 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 1일 투여용량의 범위는 시중에 판매되고 있는 암브록솔 정제(대한민국 식품의약품 안전청에 개시되어 있는 용량(1회 30 mg 1일 3회))의 1일 투여용량의 100배 이상에 해당하는 고용량으로, 총 투여용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비용, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0062] 본 발명에 있어서, 상기 암브록솔의 1회 투여용량은 9 내지 50 mg/kg, 9 내지 40 mg/kg, 9 내지 30 mg/kg, 9 내지 20 mg/kg, 9 내지 15 mg/kg, 9 내지 10 mg/kg, 20 내지 30 mg/kg, 20 내지 40 mg/kg, 20 내지 50 mg/kg, 30 내지 40 mg/kg, 40 내지 50 mg/kg, 또는 45 내지 50 mg/kg일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 암브록솔은 성인 인간에서(60 kg 기준) 1,600 내지 9,000 mg/일, 2,000 내지 9,000 mg/일, 3,000 내지 9,000 mg/일, 4,000 내지 9,000 mg/일, 5,000 내지 9,000 mg/일, 6,000 내지 9,000 mg/일, 7,000 내지 9,000 mg/일, 또는 8,000 내지 9,000 mg/일의 용량으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 본 발명에서 사용하는 용어 "고셔병(Gaucher Diseases; GD)"은 글루코세레브로시다제 유전자(GBA)의 돌연변이에 의해 몸속의 낡은 세포들을 없애는데 도움을 주는 GCCase가 결핍되어 발생하는 상염색체 열성 리소좀 축적 질환을 의미하는 것으로, 임상학적으로, 1형 고셔병, 2형 고셔병, 3형 고셔병으로 구분된다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에서 고셔병은 비전형적(atypical) 3형 고셔병일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 비전형적 3형 고셔병 뿐만 아니라 효소대체요법 비반응성이며 암브록솔에 의한 GCCase 활성 비반응성을 나타내는 고셔병 환자라면 모두 포함될 수 있다.
- [0065] 본 발명에서 사용하는 용어 "비전형적 3형 고셔병"은 만성 신경병증형인 3형 고셔병에서 발견되는 특이적 고셔병을 의미하는 것으로, 효소대체요법 및 암브록솔에 의한 GCCase 활성 비반응성을 나타내며, 비전형적 고셔 세포가 관찰되는 고셔병을 의미한다.
- [0066] 상기 비전형적 3형 고셔병은 섬유아세포에서 자가포식 신호 전달(autophagy signaling)과 관련된 LC3와 Beclin 1의 발현이 정상 섬유아세포, 1형 및 3형 고셔병 환자의 섬유아세포에 비해 현저하게 증가되어 있고, 리소좀 신호 전달(lysosome signaling)에 중요한 LAMP2가 정상 섬유아세포, 1형 및 3형 고셔병 환자의 섬유아세포에 비해 낮게 발현되어 있다. 또한, 섬유증 마커인 SNAIL이 Lyso-GB1의 농도가 증가함에 따라 증가하고, 섬유증의 원인 중 하나인 TGF- β 와 이의 수용체인 TGF- β receptor 및 섬유증 마커로 사용될 수 있는 Collagen 1 및 Collagen 3가 정상 섬유아세포, 1형 및 3형 고셔병 환자의 섬유아세포에 비해 증가되어 있으며, EMT 마커인 TWIST가 정상 섬유아세포와 비교하여 증가되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [0067] 본 발명에서 "효소대체요법 비반응성"은 고셔병의 대표적인 치료법인 효소대체요법에 따라 효소치료를 투여했음에도 고셔병의 진행이 예방, 개선 또는 치료되지 않거나 그 효과가 미미한 것을 의미한다.

- [0068] 상기 “효소대체요법”이란 고셔병 환자에게 부족한 글루코세레브로시데이즈(glucocerebrosidase)를 투여해 당 지질 축적을 억제함으로써 고셔병의 진행을 예방, 개선, 또는 치료하는 고셔병의 대표적인 치료법을 의미하며, 당업계에서 상기 글루코세레브로시데이즈 효소로서, 이미글루세라제(imiglucerase), 베라글루세라제(velaglucerase), 유플라이소(uplyso) 등이 사용되고있다.
- [0069] 상기 "암브록솔에 의한 GCase 활성 비반응성"은 암브록솔 투여 시 전형적(typical) 고셔병 환자들에 비해 GCase 활성 증가가 낮은 수준으로 나타나거나 나타나지 않는 것을 의미한다. 구체적으로, 상기 암브록솔 투여는 암브록솔이 저용량(식품의약품 안전청에 따른 투여 용량(30mg))으로 투여된 경우를 의미하고, 본 발명에서, 상기 암브록솔에 의한 GCase 활성 비반응성 고셔병은 저용량(대한민국 식품의약품 안전청에 개시되어 정제 기준 30 mg)의 암브록솔에 대하여 GCase 활성이 거의 나타나지 않으나, 고용량의 암브록솔에 대하여 GCase 활성이 나타난다.
- [0070] 본 발명에서 "고셔 세포"는 전형적 고셔 세포를 의미하는 것으로, 분해되지 못한 글루코세레브로시다제를 다량으로 함유하여 비대해진 대식세포를 의미하며, 몸에 축적되어 염증 및 섬유증을 유발하여 세포와 조직을 손상시킨다.
- [0071] 본 발명에서 "비전형적 고셔 세포"는 전형적 고셔 세포보다 크기가 더 크고 다핵화가 진행되어 있으며, Lyso-GB1이 더 많이 축적되어 있는 고셔 세포를 의미하는 것으로, 전형적 고셔 세포와 달리 보체계 관련된 신호들의 활성화로 C1q, C4b, C3a, C5a 및 C5a receptor 단백질의 발현이 증가되어 있으며, TGF- β 관련된 신호전달 체계 단백질인 TGF- β , TGF- β receptor 1, TGF- β receptor 2, 및 Thrombospondin-1의 증가 관찰된다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 상기 암브록솔은 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제할 수 있으므로, 염증 및/또는 섬유증을 억제할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0073] 본 발명에서 용어, "섬유증"은 장기 또는 조직에서 과량의 섬유성 결합 조직이 형성되는 것을 의미한다. 이는 장기 또는 조직에서 정상적 구성요소로서의 섬유성 조직과는 구별될 수 있다. 섬유아세포에 의한 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐(collagen) 등의 세포 외 기질(extracellular matrix)의 과량 축적으로 인해, 섬유증은 종국적으로 장기 손상을 일으키는 치명적인 질병으로 이행될 수 있다.
- [0074] 상기 “TGF- β ”는 세포의 성장, 사멸, 분화, 면역, 염증, 전이 또는 세포의 기질 축적과 같은 다수의 세포생물학적 과정을 조절하는 다기능 사이토카인으로 거의 모든 세포에서 발현되는 단백질을 의미하는 것으로, TGF- β 단백질 중 하나인 TGF- β 1 신호 전달 단백질은 세포막에 있는 TGF- β receptor 1과 결합하여 신호 전달을 매개하며, 과발현된 TGF- β 는 섬유증, 심혈관 질환 등을 포함하는 다양한 질병 발병에 중요한 역할을 한다.
- [0075] 상기 “TGF- β receptor”는 세포막에 존재하는 TGF- β 수용체 패밀리에 속하는 세린/트레오닌 수용체를 의미한다.
- [0076] 상기 "Thrombospondin-1"은 트롬보스폰딘 패밀리의 일원으로 THBS1 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 의미한다. Thrombospondin-1은 이황화결합된 호모트라이머 단백질로 세포간 또는 세포 대 매트릭스 상호작용을 매개하는 부착성 글리코단백질로서, 적어도 12개의 세포부착 수용체와 상호작용을 하는 것으로 알려져 있으며, TGF- β 의 합성을 증가시키거나 활성화시키며, 혈소판 응집, 혈관 생성, 및 종양형성에 관여한다.
- [0077] 상기 "Beclin 1"은 자가포식 시 발현이 증가하는 단백질로 BECN1 유전자에 의하여 암호화되는 단백질을 의미한다. 자가포식은 면역세포의 활성, 염증반응 등 면역반응조절에 핵심적 기능을 하기 때문에 Beclin 1은 다양한 염증성 질환 발병의 주요한 인자로 역할을 한다.
- [0078] 상기 "Collagen 3"는 세포의 분화, 부착, 이동에 중추적인 역할을 하는 체내에 존재하는 단백질인 Collagen 중 하나로, 눈의 망막 섬유, 장기, 피부를 구성하며, 섬유증 또는 경화증이 진행된 경우 체내에서 발현이 증가한다.
- [0079] 본 발명에서 용어 "EMT(epithelial to mesenchymal transition)"는 상피 세포가 간엽 세포로 전환되는 현상을 말하며, 배아 발생, 기관 발달, 상처 치유 및 줄기세포 거동 등과 관련되고, 기관 섬유화 및 암 발달에 병리학적으로 기여하는 것으로 알려져 있다. 섬유아세포는 (1) 체류 폐 섬유아세포(resident lung fibroblast)의 증식 및 분화, (2) AEC (alveolar epithelial cell)에서 (근)섬유아세포로 전환되는 EMT, 및 (3) 골수 전구세포의 분화와 같이 다양한 유래를 갖는 것으로 보고되었는데, 현재까지 보고된 결과들은 EMT가 IPF(idiopathic pulmonary fibrosis)와 같은 섬유증 발병에서 주요 현상임을 시사한다. 따라서, EMT를 억제함으로써 섬유증을

예방, 개선, 또는 치료할 수 있다. 상기 EMT의 조절인자로는 Twist, Snail, Slug, E-cadherin, vimentin, Collagen 1 $\alpha 1$ 등 약 수백여 개가 알려져 있으며, 본 발명에서 비전형적 고서병에서 증가되어 있던 Twist의 발현이 암브록솔 처리로 감소하였으므로, 상기 암브록솔은 비전형적 고서병 환자의 섬유증을 예방, 개선, 또는 치료할 수 있다.

[0080] 본 발명에서 “약학적 조성물”은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다.

[0081] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0082] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0084] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0085] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀라, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 젤화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리코유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜 지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0086] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

- [0087] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.
- [0088] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.
- [0089] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.
- [0090] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비취발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정팅산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 아황산수소나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐옴비설과이드 0.1%, 소듐옴알데히드설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비설과이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.
- [0091] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텟솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스팬, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.
- [0092] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 진분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0093] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0094] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0095] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [0096] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [0097] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0098] 또한, 본 발명은 암브록솔을 유효성분으로 하는 조성물을 효소대체요법 비반응성 개체에 투여하는 단계를 포함하는 고서병의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0099] 또한, 본 발명은 암브록솔을 유효성분으로 포함하는 조성물의 효소대체요법 비반응성 고서병의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0100] 또한, 본 발명은 암브록솔의 효소대체요법 비반응성 고서병의 치료에 이용되는 약제를 제조하기 위한 용도를 제공한다.
- [0101] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0102] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0103] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0104] 본 발명에 있어서, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 대상이 되는 환자군은 암브록솔 투여시 GCase 활성 비반응성일 수 있으며, GCase 활성 비반응성이란 전술한 바와 같이, 저용량 암브록솔 투여시 GCase 활성 증가가 극히 낮게 나타나거나 나타나지 않는 것을 의미한다.
- [0105] 상기 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 대상이 되는 환자군은 다음 단계를 포함하여 선정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [0106] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0107] (S2) 상기 측정된 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 피검체를 대상 환자군으로 선정하는 단계.
- [0108] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 대상이 되는 환자군을 선별하는 방법으로서,
- [0109] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST(twist family bHLH transcription factor 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0110] (S2) 상기 측정된 TGF- β , TGF- β receptor, Beclin 1, Collagen 1, Collagen 3, 및 TWIST로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 피검체를 대상 환자군으로 판정하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다.
- [0111] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 효소대체요법 비반응성 고서병 환자군은 p.G232W(Mitsui (2009) Arch Neurol 66, 571), p.W417G(Beutler (1994) Mol Med 1, 82), p.F252I(NCBI GenBank 등록번호 VCV000004301.7), p.R159W(NCBI GenBank 등록번호 VCV000065570.5), p.G241R(NCBI GenBank 등록번호 VCV000093459.8), p.N409S(NCBI GenBank 등록번호 VCV000004290.28), p.V230G(NCBI GenBank 등록번호 VCV0000928835.1), p.R296Q(NCBI GenBank 등록번호 VCV000004328.8), p.D438N(NCBI GenBank 등록번호 VCV000496081.3), p.D448H(NCBI GenBank 등록번호 VCV000004293.22), p.G416S(NCBI GenBank 등록번호 VCV000004327.6), p.L29Afs*18(NCBI GenBank 등록번호 VCV000004302.10), p.D448H(NCBI GenBank 등록번호 VCV000004293.22),

p.L483P(NCBI GenBank 등록번호 VCV000004288.21), p.V211fs(NCBI GenBank 등록번호 VCV000496084.1), 및 p.N227S(NCBI GenBank 등록번호 VCV000004314.6)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 GBA 돌연변이 유전자를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 p.D448H는 1형 고셔병(GD1), 상기 p.V211fs 및 p.N227S는 전형적 3형 고셔병(GD3_T) 상기 p.L483P는 비전형적 3형 고셔병(GD3_AT) 환자에서 발견되는 GBA 돌연변이 유전자형일 수 있다.

[0112] 본 발명에서 피검체는 비전형적 3형 고셔병을 앓거나 앓는 것으로 의심되는 환자를 의미할 수 있으나, 이에 한정되지 않고 효소대체요법 및 암브록솔에 의한 GCase 활성 비반응성을 나타내거나 나타낼 것으로 의심되는 고셔병 환자라면 포함될 수 있다.

[0113] 본 발명에서, 생물학적 시료는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 대상이 되는 환자군으로 선별하기 위한 피검체에서 채취된 것이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 생검 등으로 얻어진 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 복수, 소변, 및 미세침흡인 검체 또한 포함될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 혈장 또는 섬유아세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0114] 상기 생물학적 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 환자로부터 수득한 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.

[0115] 본 발명에서 대조군은 정상인 또는 전형적(Typical) 고셔병 환자를 의미할 수 있다.

[0116] 상기 "정상인"은 고셔병에 걸린 적이 없거나 건강한 사람을 의미하고, "전형적 고셔병 환자"는 당업계에서 통상적으로 이용되는 고셔병 치료 방법으로 치료 효과를 기대할 수 있는 고셔병 환자를 의미하는 것으로, 바람직하게는, 효소대체요법 또는 저용량 암브록솔에 의해 GCase 활성이 증가하여 고셔병 증상이 개선되거나 치료되는 고셔병 환자를 의미한다.

[0117] 상기 "효소대체요법 반응성"이란 효소대체요법을 이용한 치료에서 증상이 개선되거나 치료되는 것을 의미하며, 상기 암브록솔에 의한 GCase 활성 반응성이란 암브록솔 투여시 GCase 활성이 증가하여 증상이 개선되거나 치료되는 것을 의미한다.

[0118] 본 발명에서 사용되는 단백질은 "폴리펩타이드(polypeptide)" 또는 "펩타이드(peptide)"와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다. "mRNA"는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자로부터 아미노산 서열을 특정하게 되는 리보솜으로 유전 정보(유전자 특이적 염기 서열)를 전달하는 RNA를 의미한다.

[0119] 본 명세서에서 사용된 용어, "발현(expression)"은 세포에서 단백질 또는 핵산이 생성되는 것을 의미한다.

[0120] 본 명세서에서 사용된 용어, "측정"은 목적하는 물질(본 발명에서의 마커 단백질)의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 즉, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것(즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 상기 단백질의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 단백질 수준의 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적인 단백질 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서 상기 목적 단백질 검출은 TGF-beta, TGF-beta receptor, Beclin 1, 및 Collagen 3 단백질 존재 여부를 검출, 또는 상기 단백질 발현량의 증가(상향 조절) 또는 감소(하향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.

[0121] 상기 단백질 발현 수준 측정은 당업계에 공지된 단백질 발현 측정 방법에 의한 것이라면 측정 방법이 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 웨스턴 블랏팅(western blotting, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS, 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0122] 상기 mRNA 발현 수준 측정은 당업계에 공지된 유전자 발현 측정 방법에 의한 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 사우던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법, 및 DNA 칩으로 이루어진 군으

로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [0124] 또한, 본 발명은 암브록솔을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물로서, 효소대체요법 비반응성 고서병 환자군을 투여 대상으로 하는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물을 제공한다.
- [0125] 본 발명은 또한, 암브록솔의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, “식품학적으로 허용 가능한 염”이란 식품학적으로 허용되는 유기산, 무기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.
- [0126] 본 발명의 암브록솔을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 암브록솔을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예 방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 암브록솔은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0127] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0128] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 텍스트린 및 시클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 0.01-0.20g, 또는 약 0.04-0.10 g이다.
- [0129] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0130] 본 발명에 있어서, 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0131] 본 명세서에 있어서, “건강기능식품”이란 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 비만의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [0132] 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어날 수 있다.
- [0133] 본 명세서에서 사용된 용어, “분석”은 바람직하게는 “측정”을 의미하는 것일 수 있고, 상기 정성분석은 목적하는 물질의 존재 여부를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있으며, 상기 정량분석은 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준) 또는 양의 변화를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있다. 본 발명에서 분석 또는 측정은 정성적인 방법과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한없이 수행될 수 있으며, 바람직하게는 정량적인 측정이 수행되는 것일 수 있다.
- [0134] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지

는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0135] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 포함 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.

[0137] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0139] [실시예]

[0140] 실시예 1. Lyso-GB1 처리에 따른 섬유아세포에서의 신호전달체계의 변화 확인

[0141] 1-1. 실험방법

[0142] 정상(WT), 1형 고서병(GD1), 3형 고서병(GD3 또는 GD3_T), 및 비전형적 3형 고서병(GD3_atypical 또는 GD3_AT) 환자의 섬유아세포를 공여받아 DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin-Streptomycin의 배지에 계대 배양한 뒤, serum starvation 미디어(DMEM)에 고서병의 대표적인 대사물질인 Lyso-GB1을 각각 2 μ M, 4 μ M, 및 8 μ M 처리한 군으로 나누어 단백질의 발현을 확인하였다.

[0143] 각 sample의 세포를 깨주기 위해 Proprep solution을 처리한 후 4 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 13,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 획득하였다. 획득한 상등액을 샘플링(sampling)하여 아크릴아마이드 겔(acrylamide gel)을 사용하여 단백질을 전기영동(electrophoresis) 시켰다. 로딩(loading)한 단백질을 nitrocellulose 막에 전이(transfer)시킨 후, 4% 탈지유(skim milk)를 이용하여 막을 블로킹(blocking)하였다. 블로킹이 끝난 막을 확인하고 싶은 항체(antibody)를 사용하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 반응시킨 후 TBST로 3회 워싱(washing)하였다.

[0145] 1-2. 신호전달체계의 변화 분석 결과

[0146] 워싱이 끝난 막을 확인한 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 자가포식 신호전달(autophagy signaling)과 관련된 LC3와 Beclin1의 발현량이 WT, GD1, GD3의 섬유아세포에서 비해 GD3_AT의 섬유아세포에서 현저히 증가되어 있음을 확인하였다.

[0147] 또한, 리소좀 신호전달(lysosome signaling)의 중요한 지표인 LAMP2는 WT, GD1, GD3에 비해 GD3_AT의 섬유아세포에서 낮게 발현되어 있고, 섬유증(fibrosis) 마커인 SNAIL의 발현량이 Lyso-GB1 농도 의존적으로 증가하며, 섬유증의 원인으로 볼 수 있는 TGF-beta와 이의 수용체인 TGF-beta receptor의 발현량이 WT, GD1, GD3의 섬유아세포에 비해 GD3_AT의 섬유아세포에서 증가되어 있음을 확인하였다.

[0149] 실시예 2. 암브록솔(Ambroxol) 처리에 따른 신호전달체계의 변화 확인

[0150] 2-1. 실험방법

[0151] 정상(WT), 1형 고서병(GD1), 3형 고서병(GD3 또는 GD3_T), 비전형적 3형 고서병(GD3_atypical 또는 GD3_AT) 환자의 섬유아세포를 공여받아 DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin-Streptomycin의 배지에 계대 배양한 뒤, 60 μ M 암브록솔을 5일 동안 처리하여 단백질의 발현 변화를 확인하였다.

[0152] 각 sample의 세포를 깨주기 위해 Proprep solution을 처리한 후 4 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 13,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 획득하였다. 획득한 상등액을 샘플링(sampling)하여 아크릴아마이드 겔(acrylamide gel)을 사용하여 단백질을 전기영동(electrophoresis)시켰다. 로딩(loading)한 단백질을 nitrocellulose 막에 전이(transfer)시킨 후, 4% 탈지유(skim milk)를 이용하여 막을 블로킹(blocking)하였다. 블로킹이 끝난 막을 확인하고 싶은 항체(antibody)를 사용하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 반응시킨 후 TBST로 3회 워싱(washing)하였다.

[0154] **2-2. 암브록솔 처리에 따른 신호전달 체계의 변화 분석 결과**

[0155] 위상이 끝난 막을 확인한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 비전형적 3형 고서병(GD3_atypical)에서 높게 발현되어 있던 TGF-beta receptor(TGFR1) 및 Beclin1과 섬유화의 바이오마커로 사용될 수 있는 Collagen 3(COL 3)가 암브록솔 처리 후 감소함을 확인할 수 있었다.

[0157] **실시예 3. 암브록솔 처리에 따른 섬유아세포에서의 GCCase 활성 변화 확인**

[0158] **3-1. 실험방법**

[0159] GCCase 활성(GCCase activity) 측정을 위해 말초혈액으로부터 수득한 백혈구 세포 또는 배양된 섬유아세포를 사용하였다. 음파처리(sonication)로 분쇄된 sample의 세포부유물은 원심분리 후 브래드퍼드 단백질 정량법(Bradford assay)을 이용하여 단백질을 정량하여 사용하였다. 10 mM 4-MU-β-D-glucopyranoside 기질(4-methylumbelliferyl이 부착된 4-MU-β-D-glucopyranoside 기질을 pH 5.4인 완충용액에 희석하여 10 mM 농도로 제조)과 단백질 10 μg을 혼합하여 37 °C에서 섬유아세포는 10분, 백혈구 세포는 30분간 반응시킨 후, 0.17 M glycine-carbonate(pH 9.8) 완충용액으로 효소반응을 중지시키고 형광분광측정기(fluorescence spectrophotometer)로 형광을 측정하여 GCCase 활성을 확인하였으며, 세포 내에 잔존해 있는 글루코세레브로사이드(glucocerebroside)에 의해 GCCase 활성이 정상치에 비해 낮아지는 것을 방지하기 위하여 글루코세레브로사이드와 응집(aggregation)되는 올레산(oleic acid)을 첨가하여 GCCase 활성 측정의 정확도를 높였다.

[0160] 상기의 형광광도법은 형광강도를 측정하는 것으로, GCCase 활성이 있으면, 기질로 사용된 4-MU-β-D-glucopyranoside가 GCCase에 의해 분해되어 4-MU가 형광을 나타내므로 높은 형광강도를 보이고, GCCase가 결핍되어 있으면, 4-MU가 분해되지 못해 형광을 나타내지 않으므로 이를 이용하여 GCCase 활성을 확인할 수 있다.

[0162] **3-2. GCCase 활성 변화 분석 결과**

[0163] 형광광도법을 실시한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, WT, GD3의 섬유아세포에서는 암브록솔 용량 의존적으로 높은 GCCase 활성 증가를 나타냈으나, GD3_AT의 섬유아세포에서는 암브록솔에 의한 GCCase 활성 증가가 현저하게 낮음을 확인할 수 있었다.

[0165] **실시예 4. 섬유아세포에서 TGF-beta 측정**

[0166] **4-1. 실험방법**

[0167] 섬유아세포에서 분비된 TGF-beta 1의 면역 활성도를 측정하기 위하여 효소 결합 면역흡착 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 중 Sandwich ELISA 방법을 이용하는 ELISA kit(SEA124Hu, Cloud-Clone Corp.)를 사용하였다.

[0168] 정상(WT), 1형 고서병(GD1), 3형 고서병(GD3 또는 GD3_T), 비전형적 3형 고서병(GD3_atypical 또는 GD3_AT) 환자로부터 공여받은 섬유아세포를 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양하다가 아무것도 첨가하지 않은 DMEM 배지로 바꿔준 뒤 3일 동안 37 °C, CO₂ 조건 하에서 인큐베이션(incubation)하였다. 3일 후 배지를 걷어 3,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 상등액을 획득하였다. latent TGF-beta 1을 활성화시키기 위하여 1 M HCl로 산성화한 뒤 1.2 M NaOH/0.5 M HEPES로 중성화하였다. 활성화된 각 sample과 standard 100 μl는 TGF-beta 1 항원이 코팅되어 있는 96-well microplate에 결합시킨 뒤, 결합하지 않은 항원은 세척하여 제거하였다. 효소가 부착된 sample의 항체를 위에 뿌려 붙게 하고, TMA 기질 용액을 첨가하여 효소 발색반응을 유도하였다. 30분 내에 정지액을 각 웰(well)에 투여하고, 흡광분석기를 이용하여 450 nm에서 OD값을 측정하여 포획 항체에 붙은 항원을 정량화하였다.

[0170] **4-2. TGF-beta 측정 결과**

[0171] 도 4에 나타난 바와 같이, GD1 및 GD3 섬유아세포에서 분비된 TGF-beta 1의 농도는 WT 섬유아세포에서 분비된 TGF-beta 1 농도와 유사했으나, GD3_AT의 섬유아세포에서 분비된 TGF-beta 1 농도는 WT에 비해 높게 측정되었으

며, 암브록솔 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

[0173] **실시예 5. 비전형적 고서 세포의 확인**

[0174] **5-1. 실험방법**

[0175] 비전형적 3형 고서병 환자의 조직 절편은 10% 포르말린(formalin)을 이용해 고정하고, 파라핀(Paraffin)으로 포매(Embedding)시킨 후, 각각의 절편은 4 μ m 두께로 section하여, H&E 염색(Haematoxylin and Eosin), PAS 염색(Periodic acid-Schiff;), Masson's trichrome 염색, 및 면역조직화학염색(immunohistochemistry)을 진행하였으며, 비전형적 고서 세포에서의 Lyso-GB1 축적을 확인하기 위하여 Anti-GLCSPH 염색을 진행하였다.

[0177] **5-2. 비전형적 고서 세포**

[0178] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 비전형적 3형 고서병 환자에게서 나타나는 비전형적 고서 세포는 전형적 고서 세포와 밀접해 있으며, 섬유화 캡슐에 둘러 쌓여 있고, 전형적 고서 세포보다 크고 다핵화되어 있으며, 섬유 조직으로 둘러 쌓여 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0179] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, 비전형적 고서 세포는 세포외기질(extracellular matrix; ECM)의 축적으로 인하여 섬유화(fibrosis)가 증가되어 있으며, 도 7에 나타난 바와 같이, 전형적 고서 세포에 비해 Lyso-GB1이 현저히 증가되어 있어 더 진하게 염색된 것을 확인할 수 있었으며, 도 8에 나타난 바와 같이, 보체계가 활성화되어 있어, C1q, C4b, C3a, C5a, C5a receptor가 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 9에 나타난 바와 같이, TGF- β 1, TGF- β receptor I, TGF- β receptor II, 및 Thrombospondin-1(THBS)도 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0181] **실시예 6. 비전형적 고서병 환자의 GBA 돌연변이형 확인**

[0182] 비전형적 고서병 환자의 GBA 돌연변이형을 확인하기 위하여 pCDNA3.1+ vector에 GBA_{WT}를 삽입한 vector를 제작한 후, 이 vector에 site directed mutagenesis를 도입하여 GBA mutation vector를 제작하였다. 13개의 GBA mutation vector를 추가한 후, site directed mutagenesis가 도입되었는지 확인하기 위하여, sanger sequencing을 실시한 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, GBA에 돌연변이가 유발된 것을 확인할 수 있었다.

[0183] 상기 GBA mutation vector를 COS7 세포주에 Effectene Transfection Reagent KIT(QIAGEN)를 이용하여 transfection하고 Geneticin(G418)을 이용하여 selection을 진행하여 stable cell line을 제작하였다. 만들어진 cell line에 각각 암브록솔 60 μ M을 처리하여 세포주에서 GBA의 activity가 증가하는지 확인하였다. 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 고용량의 암브록솔 처리 후, 모든 GBA 돌연변이형 세포주에서 GBA의 activity가 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0184] 나아가, 각각의 GBA 돌연변이형 세포주에서 암브록솔에 따른 항섬유화 효과를 확인하기 위하여 western blot을 실시하여 ECM(extracellular matrix)및 EMT(epithelial-mesenchymal transition)의 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, ECM인 Collagen1(COL1)과 EMT 마커인 TWIST의 발현양이 정상(WT) 세포주와 비교하여 GBA mutant vector를 도입한 세포주에서 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 암브록솔 60 μ M을 처리할 경우, 두 단백질의 발현양이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0186] **실시예 7. 비전형적 3형 고서병의 특징 확인**

[0187] **7-1. 실험방법**

[0188] **포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; FFPE) 조직 준비**

[0189] 단백질체 분석을 위해 FFPE 조직 블록을 사용하였다. 특히, 비전형적 3형 고서병 조직의 분석을 위해, FFPE 조직 블록의 H&E 염색 슬라이드를 직접 현미경으로 가시화하여 전형적인 고서 세포 형태와 비전형적인 고서 세포 형태 영역을 해부하였다.

[0190] FFPE 조직 섹션을 1.5 mL 튜브에 수집하고 500 μ L의 헵테인(heptane)을 튜브에 첨가한 뒤, 탈파라핀화를 위해

실온에서 1시간 동안 인큐베이션(incubation) 하였다. 메탄올 25 μL 을 첨가한 후, 9000 $\times g$ 에서 2분 동안 원심 분리하여 펠렛(pellet)을 수집하였다. β -mercapto-ethanol 6 μL 가 포함된 Qproteome FFPE tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)에 있는 추출 완충액(buffer) EXB를 펠렛에 첨가하였다. 그런 다음, 샘플을 열 혼합 기에서 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분 동안, 80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 튜브를 1분 동안 얼음 위에 놓고 4 $^{\circ}\text{C}$, 14,000 $\times g$ 에서 15분 동안 원심 분리하였다. 추출된 단백질을 포함하는 상층액을 새 튜브로 옮긴 뒤, 차가운 아세톤을 사용하여 침전시킨 후, 상층액을 제거하고 BCA 분석을 통한 단백질 정량화를 위해 펠렛을 100 μL 의 8 M 요소와 혼합하였다.

[0192] 용액 내 분해 방법을 사용한 효소 분해

[0193] FFPE 프로테오메(proteome) 분석을 위한 샘플 준비는 이전 분석(Kim EN, Yu J, Lim JS, Jeong H, Kim CJ, et al. (2021))에서 설명된 대로 수행하였다. 파라핀 블록 물질의 염색되지 않은 슬라이드에서 5개의 절편을 1.5 ml Eppendorf®LoBind microcentrifuge tubes (Sigma-Aldrich)에 수집하였다. Qproteome FFPE tissue kit는 탈파라핀화 및 단백질 추출에 사용하였으며, 프로토콜은 수율을 향상시키기 위해 수정하였다.

[0194] FFPE 조직 절편으로부터 추출된 단백질 혼합물을 실온에서 1시간 동안 5 mM tris(2-carboxyethyl) phosphine을 사용하여 환원시킨 다음, 암(dark) 조건에서 1시간 동안 50 mM NH_4HCO_3 에서 15 mM iodoacetamide로 시스테인(cysteine)을 알킬화(alkylation) 하였다. 마지막으로, 각 샘플을 50 mM NH_4HCO_3 완충액에서 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 sequencing grade modified trypsin/Lys-C mixture(Promega)로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 처리하였다. 0.1% 포름산(formic acid)을 첨가하여 분해 반응을 중단시키고 생성된 펩티드 혼합물을 Sep-Pak reverse phase cartridges(Waters)를 사용하여 탈염하고 건조시켰다.

[0196] 질량 분석 분석을 위한 펩티드화

[0197] 추출된 단백질을 실온에서 1시간 동안 20 mM dithiothreitol로 환원시키고, 1시간 동안 암실에서 최종 농도 40 mM으로 iodoacetamide를 사용하여 알킬화(alkylation) 하였다. 각 샘플을 제조사의 지침에 따라 S-Trap mini spin column(Protifi, NY, USA)에 로딩하고 trypsin/LysC(1:25 trypsin/protein)로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 동안 분해하였다. 분해된 펩티드는 i) 50 mM triethylammonium bicarbonate, ii) 0.2% 포름산, iii) 50% acetonitrile/0.2% 포름산으로 순차적으로 용리하였다. 결합된 용출액은 speed vacuum을 사용하여 건조하고, LC-MS 분석을 위해 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

[0199] nano-LC-ESI-MS/MS 분석

[0200] Dionex UltiMate 3000 RSLCnano system (Thermo-Fisher Scientific)을 사용하여 펩티드 분리를 수행하였다. 건조된 펩티드를 0.1% 포름산으로 희석하고 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 0.1% 포름산으로 0 ~ 45% acetonitrile 구배를 사용하여 300 nl/min의 유속으로 120분에 걸쳐 Acclaim pepMap™ RSLC column(50 cm $\times$ 75 μm , Thermo Scientific)에 주입하였다. LC는 nano-ESI source(Thermo-Fisher Scientific)가 있는 Q Exactive mass spectrometer에 연결하였다. 전체 스캔(m/z 350-1800)과 20개의 데이터-중속 MS/MS 스캔 간의 자동 전환을 통해 데이터-중속 모드에서 질량 스펙트럼을 획득하였다. 전체 스캔 MS 스펙트럼의 목표 값은 m/z 400에서 최대 주입 시간이 100 ms이고 분해능이 70,000인 3,000,000이다. MS/MS에 대한 이온 목표 값은 정규화된 collision energy(27%)로 m/z 400에서 최대 주입 시간이 50 ms이고 분해능이 17,500인 1,000,000으로 설정하였다. 반복되는 펩티드의 동적 배제는 20 초 동안 적용하였다.

[0202] 식별 및 라벨 없는 정량을 위한 서열 데이터베이스 검색

[0203] 획득한 MS/MS 스펙트럼은 SwissProt human database (May 2017)에 대해 Proteome Discoverer (version 2.2, Thermo Fisher Scientific, USA)에서 SequestHT를 사용하여 검색하였다. 간략하게, 전구체 질량 허용 오차는 $\pm 10\text{ppm}$ 으로 설정하였고, MS/MS 허용 오차는 0.02 Da로 설정하였다. 검색 매개변수는 고정 변형(fixed modification)으로 cysteine carbamidomethylation, N-말단 아세틸화, 2개의 오분할(miscleavage)이 있는 가변 변형(variable modification)으로 메티오닌 산화를 포함하는 기본값으로 설정하였다. FDR(False Discovery

Rate)은 "Percolator"를 사용하여 각 분석에 대해 1%로 설정하였다. SEQUEST 검색 출력에서 펩티드 신뢰도, 펩티드 순위, 점수 대 전하 상태 및 검색 엔진 순위가 proteome discoverer의 기본값인 펩티드 필터이다. 그리고 LFQ(label free quantitation)는 각 단백질의 고유한 razor 펩티드 및 메티오닌 산화를 포함하는 제외 펩티드에 대한 피크(peak) 강도를 사용하여 수행하였다.

[0205] **프로테오메(proteome) 데이터에 대한 통계 분석**

[0206] 프로테오메 데이터에 대한 통계 분석은 이전 분석(Kim EN, Yu J, Lim JS, Jeong H, Kim CJ, et al. (2021))에서 설명된 대로 수행하였다. Perseus software(version 1.6.8.0)는 샘플 간의 상대적인 단백질 풍부도에 대한 통계 분석에 사용하였다. 정규화된 단백질 풍부도의 값은 log2 척도로 변환하였다. 각 샘플의 3개의 기술 복제물을 그룹화하고, 3개의 샘플 세트 중 적어도 3개의 빈도를 갖는 단백질을 유효한 값으로 취하였다. 펩티드의 겹침값 대치는 정규 분포에서 수행하였다. Student's t-test는 volcano plot에 대한 순열-기반 FDR(0.01 컷오프)을 사용하여 수행하였다. 계층적 클러스터링은 z-score 정규화 후 수행하였다. 유전자 온톨로지 분석은 g:Profiler(<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) 및 Enrichr (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>)를 포함한 웹-기반 도구를 사용하여 수행하였다.

[0208] **웨스턴 블랏**

[0209] 전체 단백질을 분리하기 위해 PRO-PRETM (Intron Biotechnology)에서 세포를 용해하였다. 상등액의 단백질 농도는 Bradford protein assay (Bio-Rad Hercules, CA, USA)로 정량하였다. 총 단백질(20 µg)을 SDS-PAGE에 로딩한 다음 nitrocellulose membrane(Bio-Rad)으로 옮겼다. 막을 0.1% Tween 20을 함유하는 Tris-Buffered saline(TBS)에서 4% 탈지유로 1시간 동안 차단하였다. 막을 일차 항체와 함께 4 °C에서 밤새 인큐베이션한 다음 TBST로 세척하였다. 막을 차단 용액에서 HRP-접합된 이차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. TBST로 세척한 후, 제조사의 프로토콜에 따라 Ez-Capture MG (ATTO CORPORATION, Tokyo, Japan)를 사용하여 막의 특정 밴드를 분석하였다.

[0211] **7-2. 비전형적 3형 고셔병의 특징**

[0212] 비전형적 3형 고셔병 조직의 전체 단백질체(Proteomic) 프로파일을 평가하기 위해 GD1(p.D448H), GD3_T(p.V211fs/p.N227S) 및 GD3_AT(p.L483P)의 세 가지 샘플을 사용하여 단백질체 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 13a에 나타난 바와 같이, 주성분 분석은 세 가지 샘플이 현저하게 다른 특성을 가짐을 나타내었다. 또한, 도 13b 및 도 13c에 나타난 바와 같이, cluster_1(580개 단백질) 및 cluster_6(156개 단백질)을 포함하여 GD1 및 GD3_T와 비교하여 GD3_AT에서 차등 발현을 나타내는 8개의 단백질 클러스터를 확인할 수 있었다. 특히, 도 13d에 나타난 바와 같이, GD1 및 GD3_T와 비교하여 GD3_AT에서 차등 발현을 나타내는 단백질의 발현은 생물학적 처리, 세포 성분, 분자 기능 및 KEGG 경로에서 달랐으며, 이 중 세포외 기질(ECM) 리모델링과 관련된 MMP19, TIMP3, THBS2 및 EGFL은 GD3_AT의 조직에서 상위 10개의 상향 조절된 단백질 및 상위 10개의 하향 조절된 단백질에 포함되는 것을 확인할 수 있었다. 단백질체 분석은 MMP, TIMP, EndMT(endothelial-to-mesenchymal transition) 및 EMT(Epithelial-mesenchymal transition)가 비전형 3형 고셔병 조직에서 증가함을 나타냈으며, 중요하게도, 도 13e에 나타난 바와 같이, TGF-β 및 THBS1도 GD3_AT 조직에서 고도로 과발현된 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과는, GD3_AT에서 ECM 리모델링으로 EndMT 과정이 변경됨을 의미한다.

[0213] 또한, 환자 유래 섬유아세포를 배양하여 Lyso-Gb1 처리했을 때 도 13f에 나타난 바와 같이, TGF-β, ECM 리모델링 단백질(collagen 1 및 3) 및 섬유증 마커(SNAI1)의 수준은 GD3_AT에서 증가한 반면, GD3_T에서는 증가하지 않은 것을 확인할 수 있었다.

[0215] **7-3. 비전형적 3형 고셔병에 대한 암브록솔의 효과**

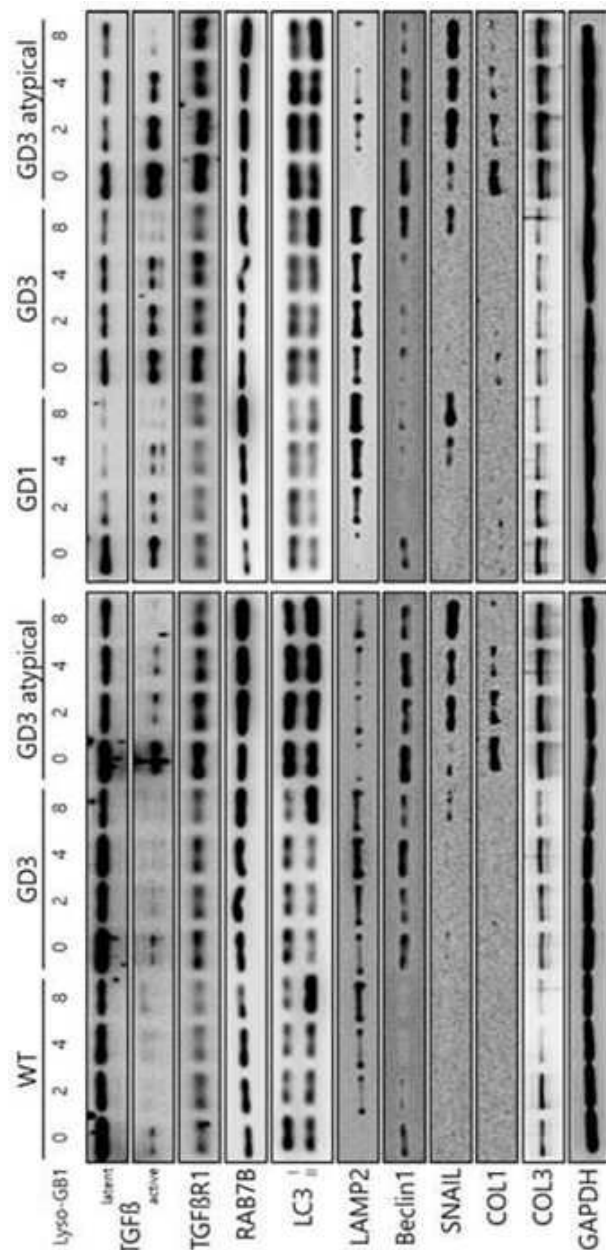
[0216] 도 14a에 나타난 바와 같이, 60 µM 암브록솔 처리는 GD3_AT 섬유아세포에서 TGFR1(TGF-β receptor 1), Collagen 1(COL 1) 및 Collagen 3(COL 3)을 하향 조절하였으며, WT, GD3_T, 및 GD3_AT 섬유아세포에서 LC3-II를 상향 조절하였다.

[0217] 또한, 도 14b에 나타난 바와 같이, GD3_AT 섬유아세포는 더 높은 수준의 p-SMAD3를 생성했으며, 이는 고용량 암 브록솔 처리에 의해 감소한 것을 확인할 수 있었다.

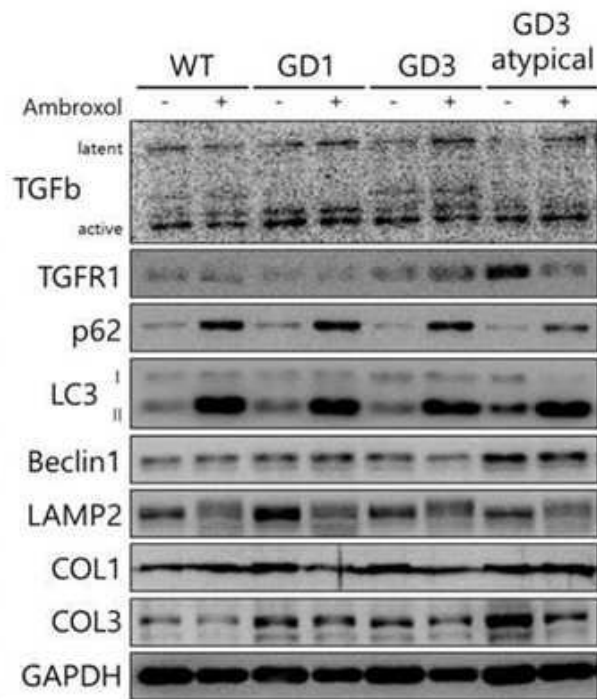
[0219] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

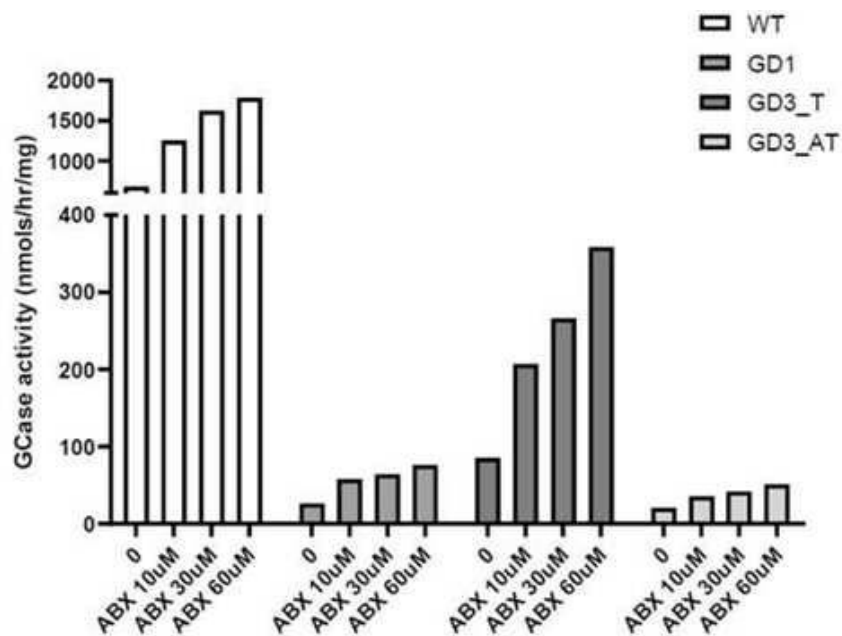
도면1



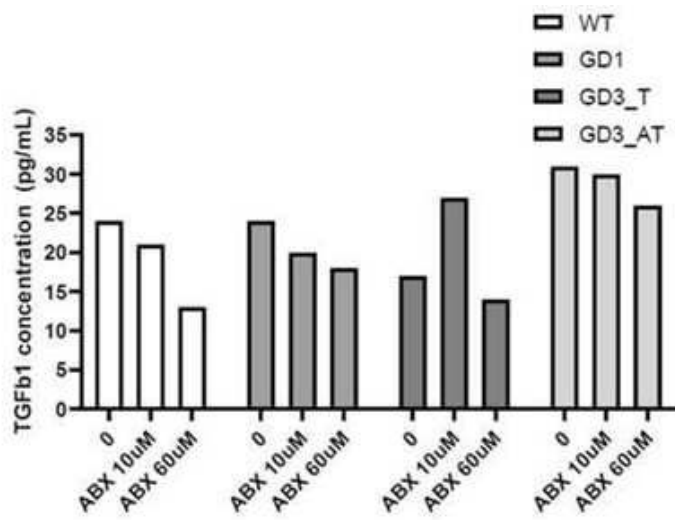
도면2



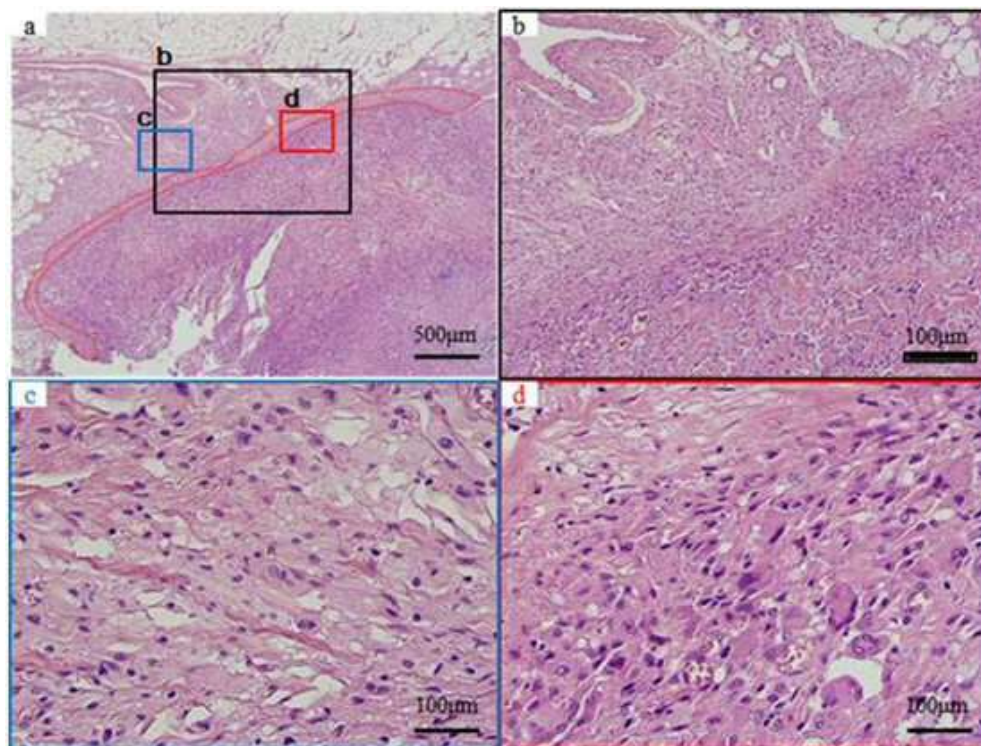
도면3



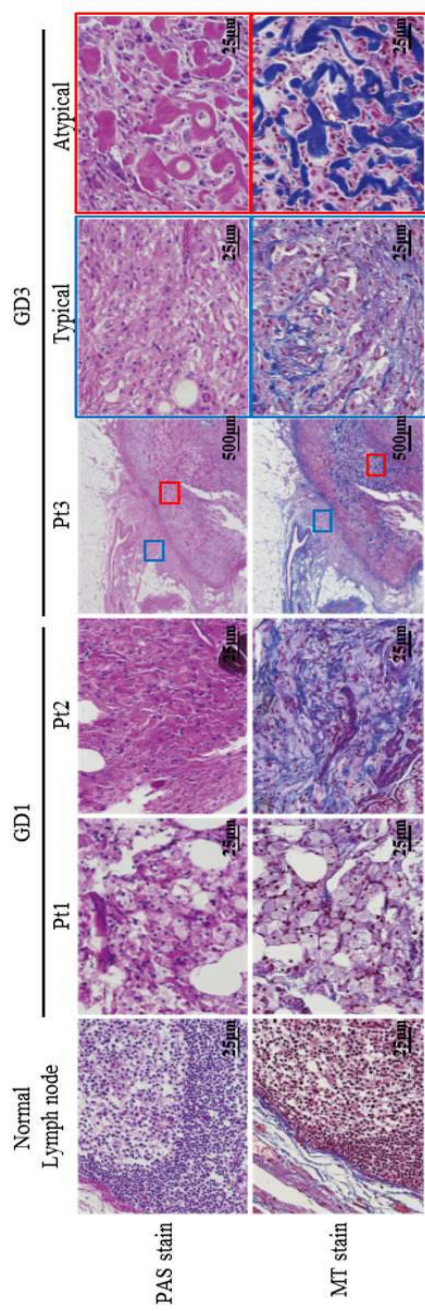
도면4



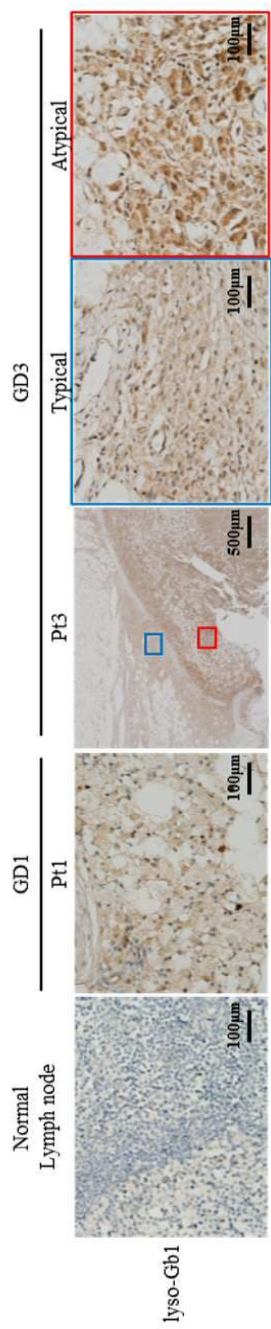
도면5



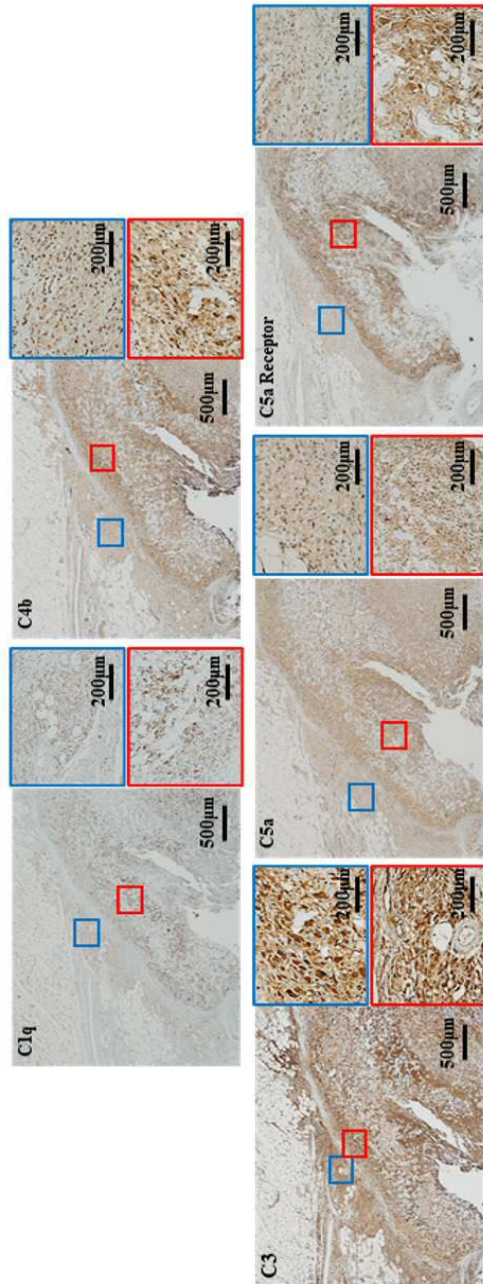
도면6



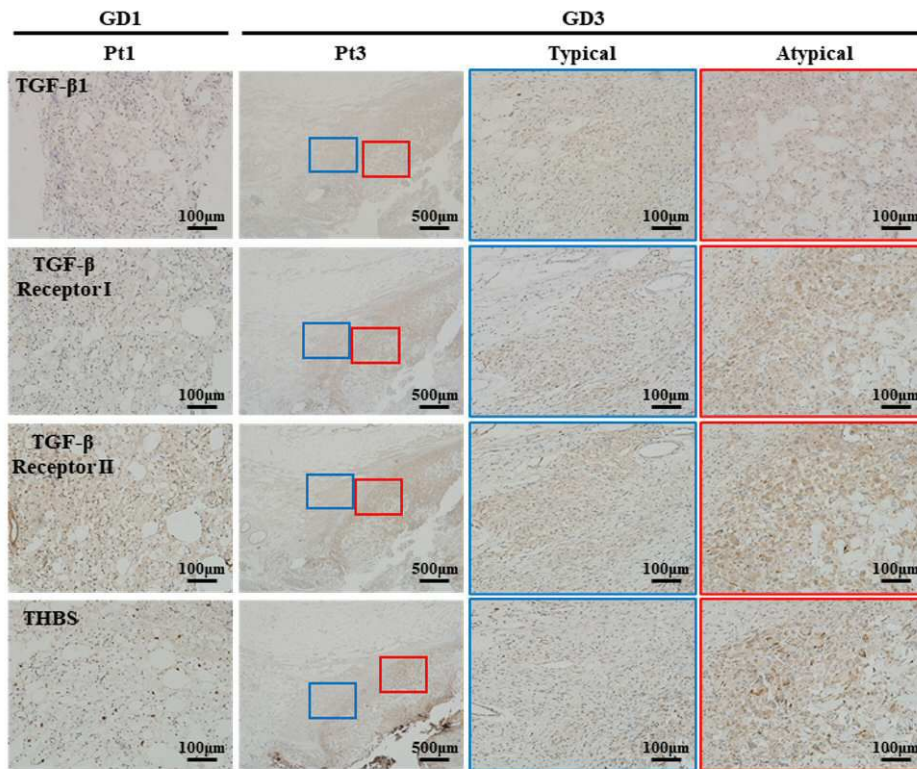
도면7



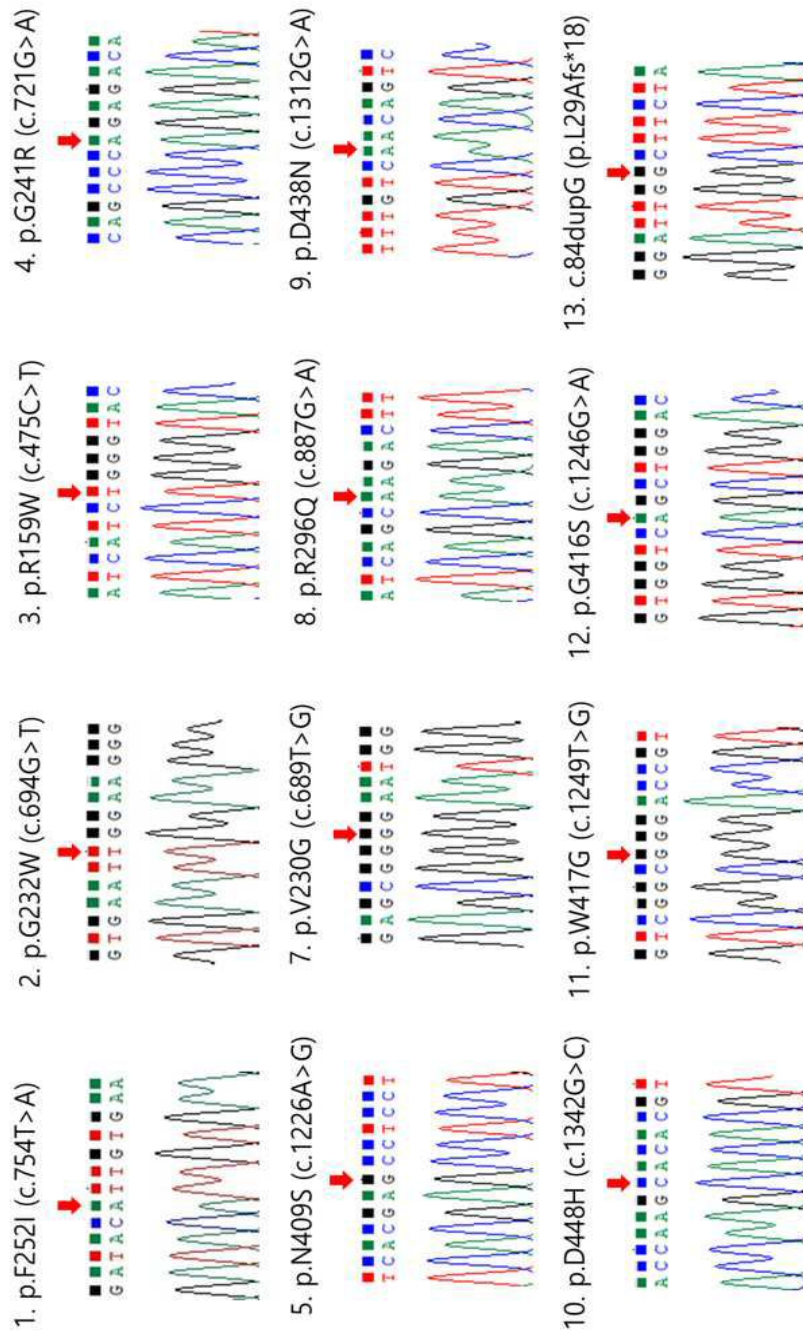
도면8



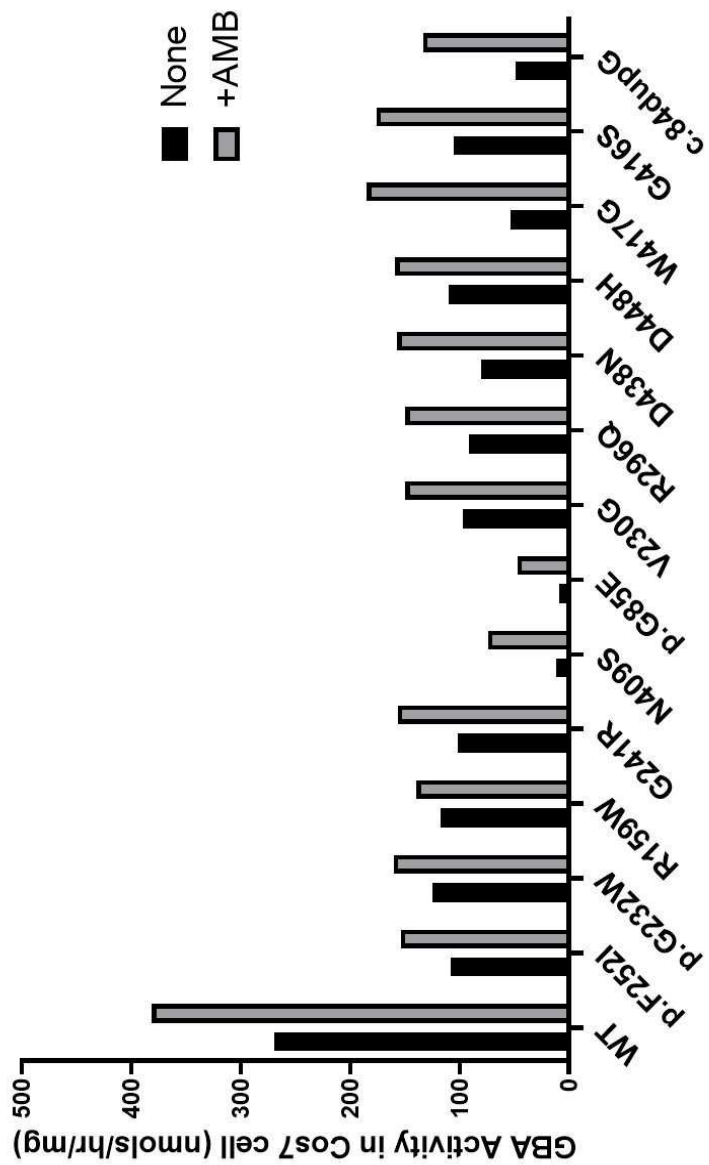
도면9



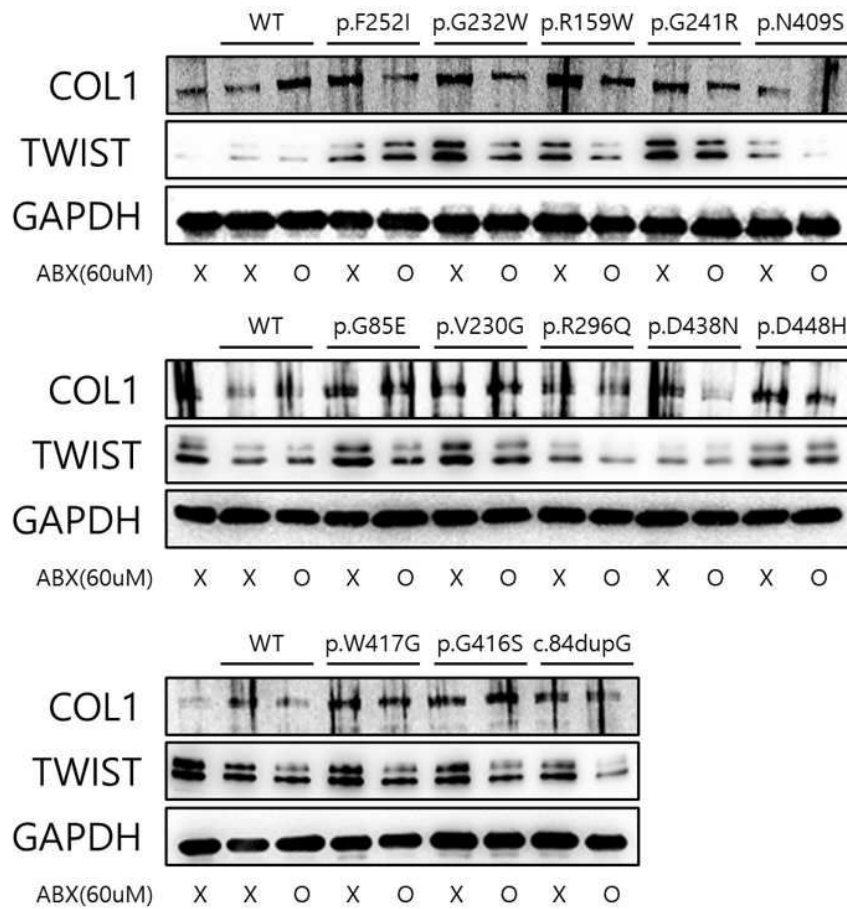
도면10



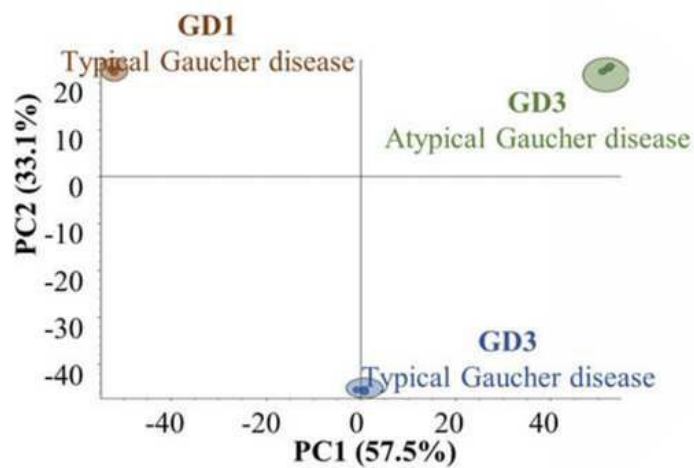
도면11



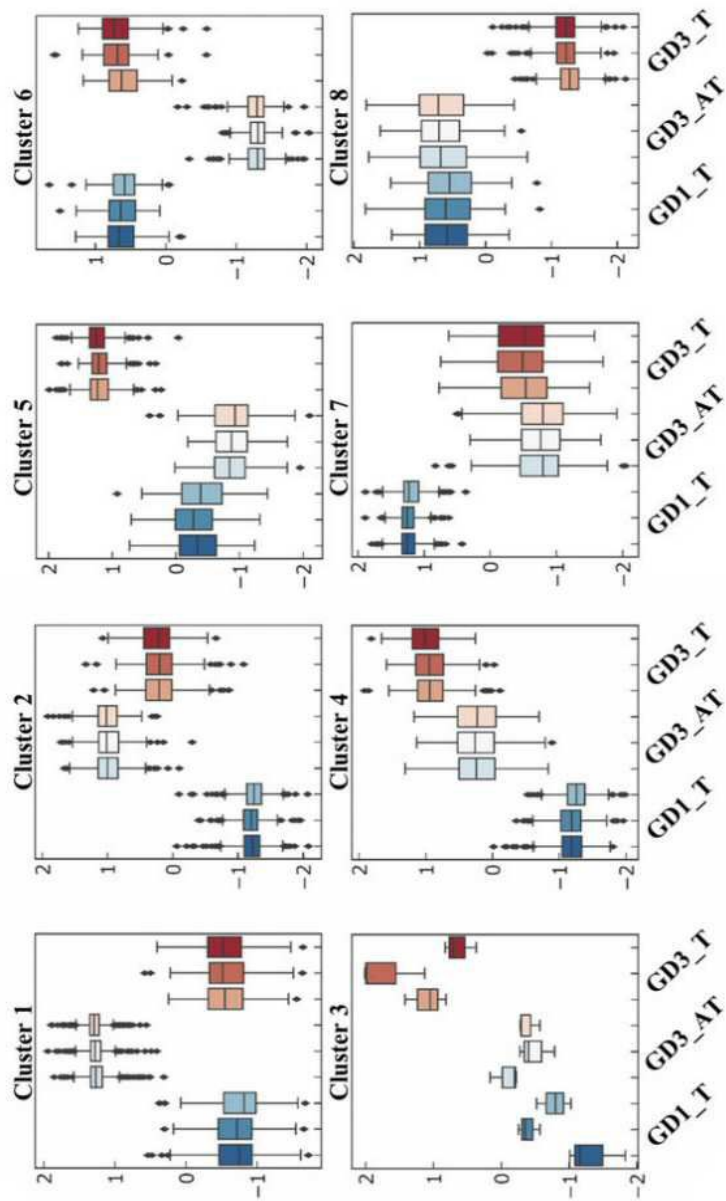
도면12



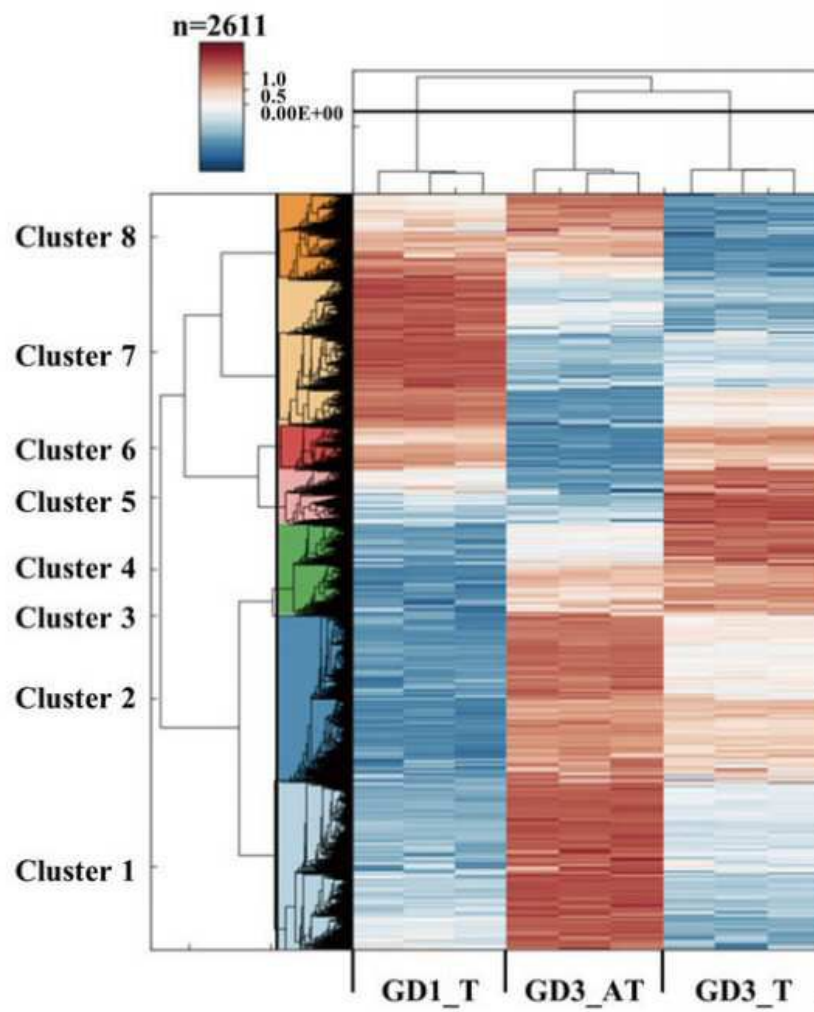
도면13a



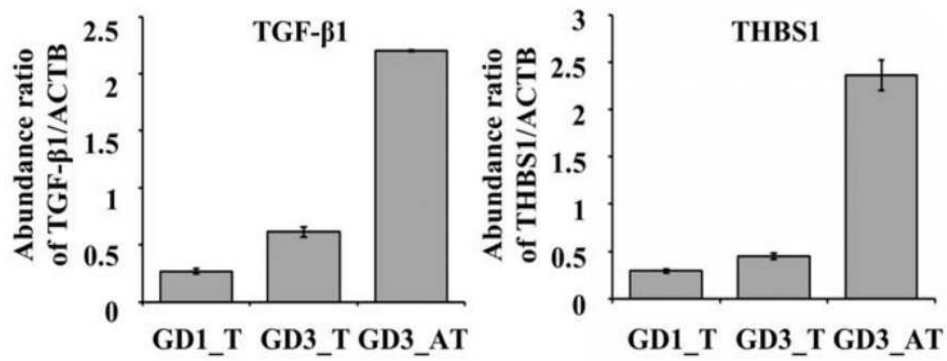
도면13b



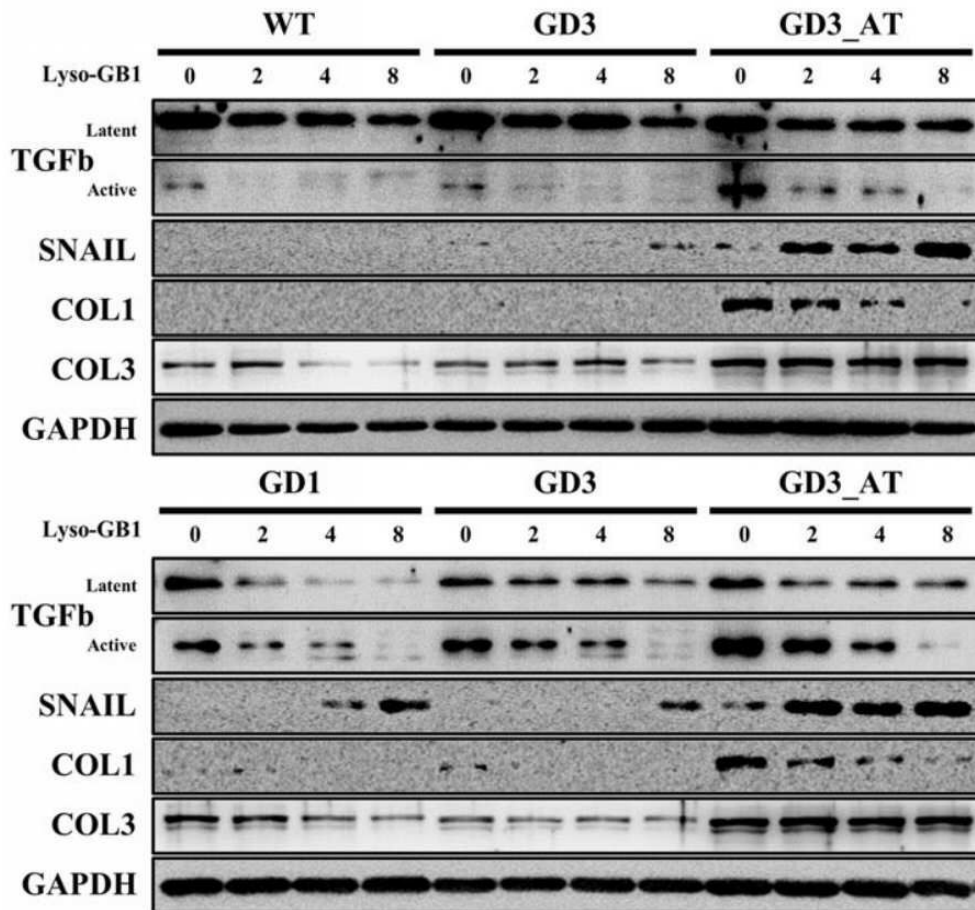
도면13c



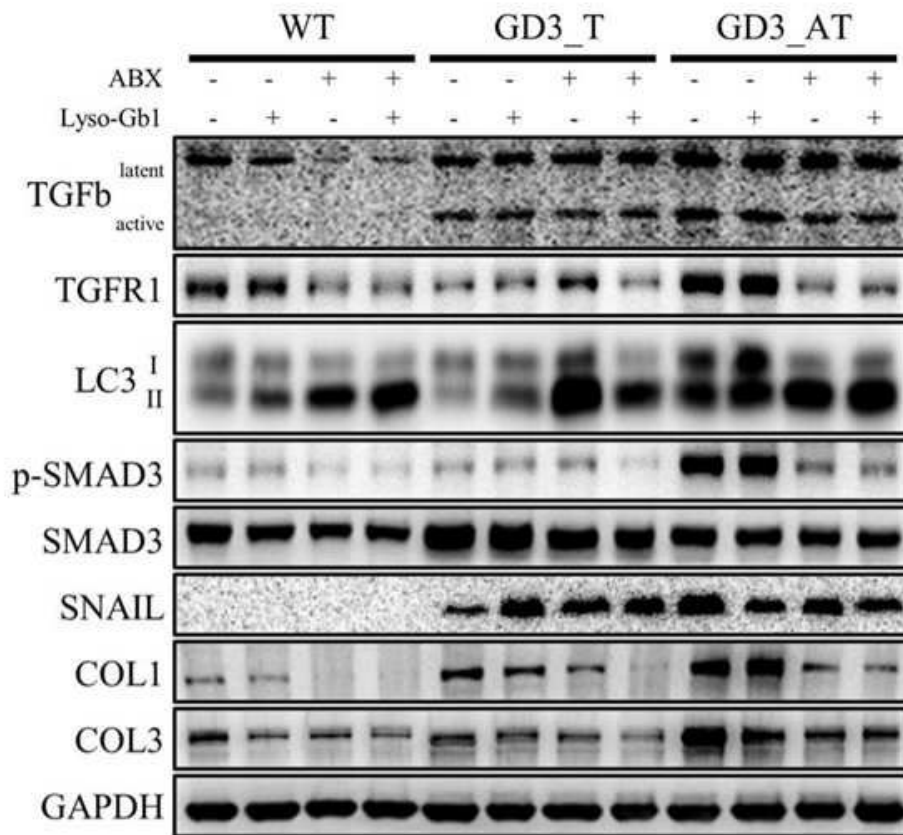
도면13e



도면13f



도면14a



도면14b

