



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월21일

(11) 등록번호 10-1817912

(24) 등록일자 2018년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/18 (2006.01) *A61K 31/185* (2017.01)*C07C 311/51* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/18 (2013.01)*A61K 31/185* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7015626(분할)

(22) 출원일자(국제) 2010년10월06일

심사청구일자 2017년06월08일

(85) 번역문제출일자 2017년06월08일

(65) 공개번호 10-2017-0068625

(43) 공개일자 2017년06월19일

(62) 원출원 특허 10-2012-7010732

원출원일자(국제) 2010년10월06일

심사청구일자 2015년10월02일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/064921

(87) 국제공개번호 WO 2011/042466

국제공개일자 2011년04월14일

(30) 우선권주장

09172364.3 2009년10월06일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020030074725 A

WO2009117710 A2

(73) 특허권자

돕페 파르마씨티씨 에스.피.에이.

이탈리아, 아이-20122 밀라노, 비아 산 마르티노
델라 바타글리아, 12

(72) 발명자

피에몬티, 로렌조

이탈리아, 밀라노 20132, 비아 올게띠나 60, 산
라파엘 사이언티픽 인스티튜트, 다이아베이츠 리
서치 인스티튜트(에이치에스알-디알아이)

다폰치오, 루이사

이탈리아, 라퀼라 에이큐 아이-67100, 로칼리타
캄포 디 필레 에스엔씨, 씨/오 돔페 에스. 피. 에
이.

알레그레티, 마르셀로

이탈리아, 라퀼라 에이큐 아이-67100, 로칼리타
캄포 디 필레, 씨/오 돔페 에스. 피. 에이.

(74) 대리인

강명구, 이경민

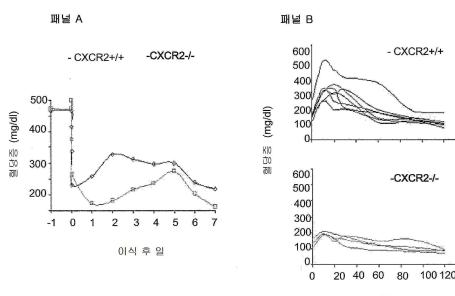
전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 박제현

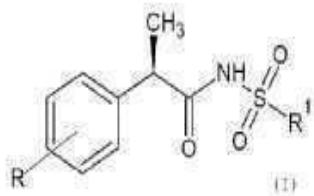
(54) 발명의 명칭 이자섬 이식에서 보조제로서 CXCR1/2의 역제제

(57) 요약

본 발명은 제 1형 당뇨병 환자에게 이자섬의 이식에서 보조제로서 이용하기 위한 약물의 제조에 관한 CXCR1 및/
(뒷면에 계속)

대 표 도

또는 CXCR2 억제제와 관련된 것이다. 특히, 본 발명에 따라서 이용될 수 있는 화합물은 다음의 화학식 (I)(R과 R¹은 상기 설명에서와 같이 정의된다)을 갖는다.



(52) CPC특허분류

C07C 311/51 (2013.01)

명세서

청구범위

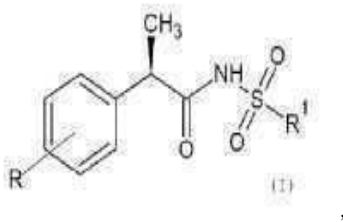
청구항 1

삭제

청구항 2

CXCR1 및 CXCR2 중 최소한 한가지의 억제제를 포함하는, 제 1형 당뇨병 환자에 대한 이자섬 이식용 보조약물의 제조를 위한 제약학적 조성물로서,

억제제는 다음 화학식 I의 화합물, 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염이며:



여기서 R은 선형 또는 분지형 4-(C₁-C₆)알킬, 4-트리플루오르메탄설폰닐옥시 및 3-벤조일에서부터 선택되고 R¹은 선형 또는 분지형 (C₁-C₆)알킬이고, 그리고

여기서 상기 억제제는 R(-)-2-[(4-이소부틸페닐)프로피오닐]-메탄설폰아마이드 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염이 아닌, 제약학적 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 제약학적으로 허용되는 염은 라이신 및 나트륨 염에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 제약학적 조성물은 이자섬 세포의 이식 및 초기 이식편 기능을 향상시키는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 5

청구항 2에 있어서, 상기 제약학적 조성물은 이식된 이자섬의 기능부전의 발생을 감소시키는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 제약학적 조성물은 이자섬 세포 이식 거부반응의 발생 및 시간을 감소시키는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 제약학적 조성물은 장기간 이식편 생존을 향상시키는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 8

청구항 2에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물은 R(-)-2-[(4'-트리플루오르메탄설포닐옥시)페닐]프로피오닐-메탄설폰아마이드에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 제 1형 당뇨병 환자에게 이자섬 이식에서 보조제로 유용한 화합물과 관련된 것이다.

배경 기술

[0002]

분리된 이자섬 또는 전체 이자 형태의 이자 조직의 이식은 제 1형 인슐린-의존 당뇨병의 치료에서 임상 선택이 되어 왔다.

[0003]

이자섬 이식은 전체 이자 이식과 비교했을 때 침습성이 덜한 대안이고, 심각한 합병증의 위험성이 훨씬 낮은 것과 관련이 있기 때문에 특히 관심을 끌고 있다; 하지만 이러한 절차는 낮은 유효성으로 인해 여전히 제한되고 있다.

[0004]

이자섬의 이식 초기 전략은, 고령 기관(organ)의 이식에서 성공적인 것으로 증명된 바 있고 아자티오프린(azathioprine), 사이클로스포린(cyclosporine) 그리고 코르티코스테로이드(corticosteroid)와 같은 면역억제제의 투여를 포함하는 프로토콜(protocol)에 기초되었다. 이러한 전략은 특정한 경우의 이자섬 이식에서 효과적 이지 않은 것으로 밝혀졌고, 이식 후 1년 내에 대부분의 이식편들이 부전되는 매우 불량한 결과를 제공하였다(Sulaiman 및 Shapiro, 당뇨병, 비만 그리고 물질대사, 8, 2006, 15-25).

[0005]

최근에, 새로운 특이적인 면역억제제 요법과 이자섬 조직표본 기술을 도입한 에드먼턴 프로토콜(Edmonton protocol)의 개발은 이자섬 이식의 임상적 결과를 극적으로 향상시켰다.

[0006]

에드먼턴 프로토콜(Edmonton protocol)에 의하면, 이자섬은 뇌사 기증자의 이자에서부터 분리되고, 정제되고, 그 다음 카테터(catheter)를 이용하여 상복부를 통해 간문맥 내부에 배치되어 수혜자에게 이식되며; 간 속으로 투입되자마자, 이를 세포는 인슐린을 방출하기 시작한다. 거부반응을 예방하기 위해, 면역억제제(다시 말해 시로리무스(sirolimus)와 타크로리무스(tacrolimus))와 CD25 단일 항체인 다클리주맙(Daclizumab)의 조합의 이용이 요구되는 새로운 면역억제제 요법이 사용된다(Saphiro et al. N Engl. J Med, 2000, 343 (4) :230-238).

[0007]

불행하게도, 이 절차에는 해결되지 않은 이자섬 이식의 몇 가지 결함이 여전히 존재하여 제 1형 당뇨병을 앓는 환자를 위한 표준 치료가 되지 못하고 있다.

[0008]

에드먼턴 프로토콜(Edmonton protocol)은 성공률 면에서 상당히 증가했음에도 불구하고, 이자섬 이식에 관련하여 첫 번째 결함은 IBMIP, 염증성 세포의 집합 및 비특이성 면역과 같은 일련의 복잡한 현상으로 인해 높은 백분율의 초기 이식편 부전이 여전히 존재한다는 것이다. 사실상, 인간에게 간내 이자섬(intrahepatic islet) 투입은 즉각적인 혈액-매개 염증반응, 혈전증, 그리고 혈중 간 효소의 증가로 인한 간 조직 허혈과 관련이 있다(Barshes NR et al, J Am Coll Surg, 2005, 200(3): 353-361; Barshes NR et al, J Leukoc Biol, 2005, 77(5): 587-97; Bertuzzi et al, J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(11): 5724-8; Bhargava R et al Diabetes, 2004, 53(5): 1311-7; Contreras et al, 2004, 53(11): 2894-14; Johansson et al, Diabetes, 2005, 54(6): 1755-62). 간내 생착되는 동안 이자섬의 50-75% 만큼의 손실(contreras et al. 상기 참고)은 정상혈당에 도달하기 위해 많은 수의 이자섬을 필요로 하게 되는 주요인임이 제시되었다(Barshes et al. 상기 참고).

[0009]

계다가, 이식이 초기에는 성공적이고 수혜자의 인슐린 비의존성을 유도할지라도, 이식된 이자섬은 시간이 지남에 따라 기능을 하는 능력을 잃게되는 것으로 보인다. 이 결과는 이식받은 환자에게서 장기-지속적인 인슐린 비의존성을 구현할 가능성을 제한하는데, 환자의 경우 14%만이 이식으로부터 2년 후 인슐린 비의존성을 나타낸다 [Meloche RM World J Gastroenterol 2007; 13(47) : 6347-6355].

[0010]

또다른 결함은 에드먼턴 프로토콜(Edmonton protocol)이 면역억제제 조합의 이용을 요구한다는 것이다; 시로리무스(sirolimus)와 타크로리무스(tacrolimus)는 평생 또는 이식된 이자섬이 기능을 지속하는 한 복용되어야 한다. 하지만 이를 약은 상당한 부작용을 가지므로 감소시키는 것이 바람직하다. 면역억제요법에서 과생된 합병증은 이 유형의 이식에서 보고되는, 가장 공통된 제2의 심각한 결과이다.

[0011]

따라서, 이식편의 기능과 장기간 생존력을 향상시켜 시간이 지남에 따라 글루코오스 조절을 유지하고 면역억제요법을 감소시킬 수 있는 또다른 개발 필요성이 여전히 존재한다.

[0012]

CXCL8은 염증 매개자에 의해 유도될 수 있는 케모카인(chemokine)으로서, 이 케모카인은 조직 회복의 초기단계

에 관련되고 주화성의 유도, 내피세포의 생존 및 증식을 통해 혈관형성(Li et al, J Immunol, 2003, 170: 3369-3376)을 증진시키며 중성구 유인물질로서 활동함이 입증되어 왔다. 이는 동족 G-단백질 결합 수용체 CXCR1 및 CXCR2에 결합함으로써 작용을 한다.

[0013] 최근 논문에서는 CXCL8이 이식된 조직의 혈관재생의 유도를 통해 생착을 개선시킬 수도 있다는 가설이 제기되고 있다(Movahedi et al, Diabetes, 2008, 57: 2128-36).

[0014] EP 1 123 276은 CXCL-8에 의해 유도되는 중성구 주화성과 탈파립화의 억제제로서 사용하기 위한, 특히 건선, 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염, 급성 호흡 부전증(ARDS), 특발성 섬유증, 그리고 사구체 신염과 같은 병리의 치료에서 사용하기 위한 N-(2-아릴-프로피오닐)-설폰아마이드, 그 중 R(-)-2-[(4-이소부틸페닐)프로피오닐]-메탄설폰아마이드 (I) 및 이의 제약적으로 허용되는 염을 나타낸다.

[0015] EP 1 355 641은 공여자로부터 회수되고 이식 전에 저장될 필요가 있는 고형 기관, 특히 신장의 이식 후 거부 반응으로부터 생기는 기능적 손상 및 이식된 기관의 허혈/재판류 손상의 예방 및 치료에서, R(-)-2-[(4-이소부틸페닐)프로피오닐]-메탄설폰아마이드 및 제약적으로 허용되는 그것의 염, 특히 그것의 라이신 염(lysine salt)의 용도를 나타낸다. 이러한 손상은 신장 이식의 경우 투석을 필요하게 하는 자연되는 이식편 기능의 원인이 되는 것으로 간주된다.

[0016] EP 1 579 859는 척수 손상의 치료를 위한 약물의 조제를 위한 N-(2-아릴-프로피오닐)-설폰아마이드, 그 중 R(-)-2-[(4-이소부틸페닐)프로피오닐]-메탄설폰아마이드 및 그것의 라이신 염(lysine salt)의 용도를 나타낸다.

발명의 내용

[0017] 본 발명자는 놀랍게도 선행 기술 교시로부터 예상된 것과 반대로, CXCR1 및/또는 CXCR2의 작용제가 이자섬 이식 후 이자섬의 생존에 유해하다는 것을 밝혀냈다. 다음 실시예에서 설명되는 바와 같이, 이자섬은 CXCR2가 뉴아웃(knock out)된 BALB/C 쥐에 이식되면, 야생형(wild type) 쥐와 비교했을 때, 향상된 기능과 생존을 보여주고, 대조군 쥐보다 일관되게 보다 우수한 글루코오스 내성 및 보다 낮은 글루코오스 농도를 보인다.

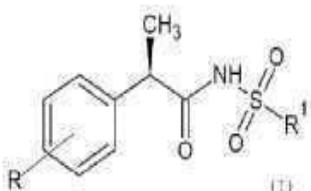
[0018] 게다가, 본 발명자에 의해 수행된 실험은 CXCR1 및/또는 CXCR2 신호전달을 억제시키는 화합물이 이자섬 이식 후, 이식편 생존 및 기능을 효과적으로 향상시킬 수 있다는 것을 명백하게 입증하였다.

[0019] 따라서, 본 출원의 첫 번째 목적은 제 1형 당뇨병 환자에서의 이자섬 이식에서 보조제로서 CXCR1 및/또는 CXCR2의 억제제의 용도이다.

[0020] 본 발명에 따른 "CXCR1 및/또는 CXCR2의 억제제"는 CXCR1 및/또는 CXCR2 활성화에서 유래된 CXCL8-생물학적 활성을 저해할 수 있는 화합물을 의미한다.

[0021] 이러한 화합물은 수용체의 경쟁적인 길항제 또는 알로스테릭(allosteric) 억제제 일 수 있다.

[0022] 본 발명의 선호되는 화합물은 화학식 I의 화합물, 또는 이의 제약적으로 허용되는 염이며:



[0023]

[0024] 여기서 R은 선형 또는 분지형 4-(C₁-C₆) 알킬, 4-트리플루오르메탄설포닐옥시 또는 3-벤조일에서부터 선택되고 R¹은 선형 또는 분지형 (C₁-C₆)알킬이다. 본 발명에 따르면, 특히 선호되는 화합물은 R(-)-2-[(4-이소부틸페닐)프로피오닐]-메탄설폰아마이드 (주로, 레퍼타신(Repertaxin) 또는 레파리신(Reparixin)으로 알려져 있고, 이하 레파리신(Reparixin)으로 언급) 그리고 R(-)-2-[(4'-트리플루오르메탄설포닐옥시)페닐]프로피오닐-메탄설폰아마이드 (주로, 머락신(Meraxin)으로 알려져 있고, 이하 머락신(Meraxin)으로 언급)이다.

[0025] 본 발명의 화합물의 선호되는 염은 라이신(lysine) 및 나트륨 염(sodium salt)이다. 본 발명의 화합물의 특히 선호되는 염은 레파리신(Reparixin)의 라이신 염 및 머락신(Meraxin)의 나트륨 염이다.

[0026] 하기 설명되는 바와 같이, 동물 모델에서 화학식 I의 화합물은 이자섬 이식 후 이식편 생존 및 기능을 효과적으

로 향상시킬 수 있다.

[0027] 상세하게, 이자섬 이식 실험모델에서 얻은 데이터는 이식된 β -세포의 활성손실 및/또는 저하로부터의 보호에 있어서, R(-)-2-[4-(이소부틸페닐)프로페오닐]-메탄설폰아마이드로 나타내어지는 상기 화합물의 명백한 효과를 입증한다.

[0028] 본 발명의 선호되는 실시양태에 따르면, 화학식 I의 상기 화합물은 레파릭신(Reparixin)이다. 더 선호되는 실시양태에 따르면, 화학식 I의 상기 화합물은 머락신(Meraxin)이다.

[0029] 본 발명의 화합물은 제 1형 당뇨병에서 이식된 이자섬 세포의 생착을 보조함에 있어 효과적이다.

[0030] 사실상, 하기 실험 부분에서 더 명확해지는 바와 같이, 동계(syngenic) 또는 동종 이계(allogeneic)의 이자섬 이식 후 -1일부터 +6일까지 동물모델에서의 레파릭신(Reparixin) 정맥 투여는 대조군과 비교하였을 때 혈당중의 정상레벨(250 mg/ml보다 낮은 비-금식 혈중 글루코오스 레벨)에 도달할 가능성을 더 높이고 도달하는데 걸리는 시간의 중앙값을 감소시킨다.

[0031] 따라서, 본 발명의 추가 목적은 제 1형 당뇨병 환자에서 이자섬의 이식 후, 생착과 초기 이식편 기능을 향상시키기 위한, 그리고, 초기 이식편 부전 발생을 감소시키기 위한 CXCR1 및/또는 CXCR2의 억제제의 용도, 바람직하게는 화학식 I의 화합물의 용도, 더 바람직하게는 레파릭신(Reparixin) 또는 머락신(Meraxin)의 용도이다.

[0032] 상기 이식은 바람직하게는 환자의 골수 또는 간에서 수행된다.

[0033] 동종 이계(allogeneic)의 이자섬 이식의 실험은 CXCR1/CXCR2 억제제인 레파릭신(Reparixin)의 투여가 이식 후 주요기능을 달성한 쥐에서 거부반응의 발생을 상당히 감소시켰다는 것을 입증하였다.

[0034] 게다가, 상기 결과는 이식편 기능이 대조군과 비교하였을 때, 생존 시간 중앙값이 증가하면서 장시간 동안 유지된다는 것을 입증한다.

[0035] 이식편 기능 및 생존을 향상시키는 레파릭신(Reparixin)의 효능은 간과 골수 모두에서의 이자섬 이식에서 나타나고 있다.

[0036] 따라서, 본 발명의 추가 목적은 이식 거부반응의 감소 및 장기간 이식편 생존의 향상을 위한, CXCR1 및/또는 CXCR2의 억제제의 용도, 바람직하게는 화학식 I의 화합물의 용도, 더 바람직하게는 레파릭신(Reparixin)의 용도이다.

[0037] 본 발명의 화합물은 이런 목표에 단독으로 또는 하나 또는 그 이상의 면역억제제, 바람직하게는 시로리무스(Sirolimus)(또한, 라파마이신(Rapamycin)으로 알려져있다) 및 타크로리무스(Tacrolimus)에서부터 선택된 면역억제제와의 복합 요법에서 이용될 수 있다.

[0038] 하지만 실험 부분에서 기록되는 수득 데이터는 본 발명의 화합물의 단독 사용이 이식거부반응을 억제하는데 충분할 수 있다는 것을 또한 제시한다. 사실상, 실험 부분에 나타나는 바와 같이, 레파릭신(Reparixin)에 의한 CXCR1/2 수용체의 차단은 이식 후 주요기능을 달성한 쥐에서 거부반응의 시간을 상당히 증가시킨 반면에 라파마이신(Rapamycin)에 의해서는 현저하게 변화되지는 않았다. 게다가, 레파릭신(Reparixin) 단독 투여는 라파마이신(Rapamycin)과 레파릭신(Reparixin)의 조합으로 투여한 결과에서 얻은 것과 비슷한 결과를 제공하였다.

[0039] 이러한 데이터는 면역억제요법의 필요성을 감소시키면서 또는 면역억제요법을 필요로하지 않으면서, 레파릭신(Reparixin) 단독 투여가 이식 거부반응을 줄이는데 충분할 수 있음을 강하게 제시하고, 이는 독성과 관련하여 주목할만한 장점이다.

[0040] 본 발명의 화합물의 합성은 당업계에서 잘 알려진 절차에 따라서 수행될 수 있다. 예를 들어, 레파릭신(Reparixin)은 EP 1 123 276의 실시예 1 및 EP 1 355 641의 실시예 1에 나타난 바와 같이 제조될 수 있고, 라이신 염은 전술한 각각의 특허의 실시예 7 및 실시예 2에 나타난 바와 같이 제조될 수 있다. 예를 들어, 머락신(Meraxin)은 EP 1776336의 실시예 1에 따라서 제조될 수 있다.

[0041] 본 발명에 따라 사용되는 화합물은, 바람직하게는 조절된 방출 제형의 형태로 경구 투약으로 사용하기에 적합한 제약학적 조성물로, 가령, 정제, 캡슐, 시럽으로, 또는, 바람직하게는 정맥내 또는 근육내 투여에 적합한 무균 용액의 형태로 비경구 투약으로 사용하기에 적합한 제약학적 조성물로 제형화된다. 제약학적 형태는 관습적인 방법에 따라서, 예를 들어 레밍턴(Remington), "약국의 과학 및 실습", 21st ed.(Lippincott Williams 및 Wilkins)에 나타난 바와 같이 제조될 수 있다. 바람직하게는, 상기에서 언급된 각각의 투약 형태에서 레파릭신

(Reparixin) 또는 이의 제약적으로 허용되는 염의 양은 체중 1kg 당 2 내지 15 mg 화합물을 제공하기 위한 양과 같을 것이고, 반면에 머락신(Meraxin) 또는 이의 제약적으로 허용되는 염의 양은 체중 1kg 당 10 내지 20 mg 화합물을 제공하는 양이 될 것이다. 어떠한 경우에도, 투여되는 약물의 섭생 및 양은 환자의 필요사항에 따라 의사에 의해 결정될 것이다.

[0042] 본 발명은 이제 다음 실험 부분에서 좀 더 자세하게 더 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1: 패널 A는 녹아웃(knock out, 흐린 선) 쥐 및 야생형(wild type, 검은 선) 쥐에 400개의 이자섬 동종조직 이식 후 -1일부터 +7일까지 측정된 비-금식 혈당증(mg/dl로)을 나타낸다. 패널 B는 경구 글루코오스 내성 검사(Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)의 결과를 나타낸다. 혈당증(mg/dl으로)은 글루코오스의 투여 직전과 글루코오스의 경구 투여 후 10, 20, 30, 60 및 90분 후에 측정되었다. 혈중 글루코오스의 곡선은 각 동물별로 표시된다.

도 2: 패널 A는 레파릭신-처리된(Reparixin-treated, 실선) 쥐 또는 대조군(control, 점선) 쥐에 이식 후 상이한 시간 경과에서의 혈당증을 나타낸다. 패널 B는 콕스 회귀 다변수 분석(Cox regression multivariate analysis)을 나타낸다.

도 3a 및 3b는 레파릭신(Reparixin)의 존재 또는 부재에서 동일한 분리로부터의 이자섬이 이식된 쥐에서, 경구 글루코오스 내성 검사(Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)로 얻은 산포도에서의 평균값(도 3a) 및 정맥내 글루코오스 내성 검사(Intravenous Glucose Tolerance Test, IGTT)로 얻은 산포도에서의 평균값(도 3b)을 알려준다. 라벨은 분리의 개수를 식별시킨다. 정사각형 및 원은 각각 250 또는 150 IE로 이식된 쥐를 나타낸다. 상위 및 하위 패널은 각각 이식하고 1개월 및 3개월 후의 데이터를 알려준다. 실선은 식별선(identity line)이다: 식별선 위의 원은 비이클-처리된(Vehicle-treated) 집단($\Delta+$)에서보다 레파릭신(Reparixin) 집단에서 더 높은 값을 갖는 관찰을 나타낸다.

도 4는 150(패널 A) 또는 250 IE(패널 B)로 이식된 레파릭신-(Reparixin-) 및 비이클-처리된(Vehicle-treated) 동물에서, 이식하고 24시간 및 48시간 후 알라닌 아미노기전이효소(alanine aminotransferase, ALT)의 순환 레벨을 나타낸다.

도 5: 패널 A는 레파릭신(Reparixin), 라파마이신(Rapamycin), 레파릭신 + 라파마이신(Reparixin + Rapamycin) 또는 비이클(Vehicle)로 처리된 쥐에 이식 후 상이한 시간에서의 혈당증을 나타낸다. 패널 B는 콕스 회귀 다변수 분석(Cox regression multivariate analysis)을 나타낸다.

도 6: 비이클(Vehicle, A), 레파릭신(Reparixin, B), 라파마이신(Rapamycin, C) 또는 레파릭신 + 라파마이신(Reparixin + Rapamycin, D)으로 처리된 쥐에 이식하고 24시간 및 48시간 후 알라닌 아미노기전이효소(alanine aminotransferase, ALT)의 순환 레벨을 나타낸다.

도 7: 패널 A는 레파릭신(Reparixin), 라파마이신(Rapamycin), 또는 레파릭신 + 라파마이신(Reparixin + Rapamycin) 또는 비이클(Vehicle)으로 처리된 쥐에 이식 후 시간이 지남에 따른 이식 생존 백분율을 나타낸다. 패널 B는 콕스 회귀 다변수 분석(Cox regression multivariate analysis)을 나타낸다.

도 8은 대조군(굵은 선) 또는 레파릭신(Reparixin)으로 처리된 쥐(가는 선)에 이자섬 이식 후 시간(일)이 지남에 따른 간에서 추출한 PMN의 수(간 조직의 mg 당 세포로 표현)를 보여준다.

도 9는 대조군(굵은 선) 또는 레파릭신(Reparixin)으로 처리된 쥐(가는 선)에 이자섬 이식 후 시간(일)이 지남에 따른 간에서 추출한 NK 세포의 수(간 조직의 mg 당 세포로 표현)를 보여준다.

도 10은 동종 이계 이자섬 이식 5일 후 간에서 추출한 다른 백혈구 아개체군에서 CXCR2+ 세포의 백분율을 나타낸다. 가로좌표에서 번호 1-11은 다음을 의미한다:

1: PMN ($Gr1^+ CD11b^+ CD11c^-$)

2: PMN ($Gr1^+ CD11b^+ Ly6c^-$)

3: 대식세포 ($CD11b^+ CD11c^- Gr1^-$)

4: 수지상세포 ($CD11c^+$ $CD11b^+$ $Gr1^-$)

5: 램프구 ($CD3^+$ $CD4^+$)

6: 램프구 ($CD3^+$ $CD8^+$)

7: B 램프구 ($CD19^+$)

8: NKT 세포 ($NK1.1^+$ $CD3^+$)

9: NKT 세포 ($NK1.1^+$ $CD3^-$)

10: 램프구 ($CD4^+$ $TCRb^+$)

11: 램프구 ($CD8^+$ $TCRb^+$)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045]

1. 녹아웃(knock out) 쥐에서의 동계 이자섬 이식(syngeneic islet transplantation)

[0046]

이자섬 생존에서 CXCR1 및 CXCR2를 통한 CXCL8 신호전달 경로 활성화의 역할을 시험하기 위해서 동계 이자섬 간내 이식(syngeneic islet intrahepatic transplant) 후 이자섬 기능이 Balb/c CXCR2/-/- 쥐 및 CXCR2+/+/- 쥐에서 평가되었다. CXCR1은 쥐에서 발현되지 않고, 따라서 CXCR2의 녹아웃은 CXCL8에 의해 유도되는 신호전달을 완전히 제거한다.

[0047]

이식 후 첫 주 동안의 비 금식 혈당증과 이식하고 4주 후 경구 글루코오스 내성을 기능성의 지표로 간주되었다. 도 1에서 보고되는 바와 같이, 이식된 CXCR2 녹아웃(knock out) 쥐는 전체 평가기간 동안 글루코오스 순환 농도의 상당한 감소에 의해 입증된 바와 같이, 대조군인 야생형(wild type) 쥐보다 일관되게 보다 우수한 글루코오스 내성을 명백하게 보여주었다.

[0048]

경구 글루코오스 내성 검사(oral glucose tolerance test)는 아래의 섹션 2에서 설명되는 바와 같이 수행되었다.

[0049]

2. 쥐에서의 동계 이자섬 이식(syngeneic islet transplantation)

[0050]

12주의 C57 쥐에서 얻은 이자섬이 당뇨가 있는 C57 쥐(알록산(alloxan)으로 당뇨병을 유도하였다, 혈당증 > 450 mg/dl)의 간에 이식되었다. 서로 다른 두 가지의 가장자리 이자섬 질량 모델, 150 IE(Islet Equivalents) 및 250 IE가 이용되었다. 레파릭신(Reparixin)은 8 mg/kg/h의 용량으로 이자섬 이식 후 -1일부터 시작하여 6일 또는 13일까지 연속적인 피하주사(s.c) 주입에 의해 투여되었다. 대조군 동물은 연속적인 피하주사(s.c)로 비이를(Vehicle)을 수여받았다. 이자섬 이식 후 두 번의 연이은 측정 동안 200 mg/dl 보다 적은 비-금식 혈중 글루코오스 레벨에 도달하는 능력이 처음 평가되었다. 도 2에서 보여지는 바와 같이 정상혈당(euglycaemia)(<200 mg/dl)에 도달하는 가능성 및 시간 중앙값은 비이(Vehicle)로 처리된 쥐(로그 순위 p<0.012)에서 35.1% 및 50 일과 비교하였을 때, 레파릭신(Reparixin)으로 처리된 쥐에서 50% 및 7일이었다.

[0051]

레파릭신(Reparixin) 처리, 처리기간, 이식된 이자섬의 수 그리고 수혜자의 이식 전 혈당증이 공변량으로 포함되는 쿠스 회귀 다변수 분석은 상기 결과가 레파릭신(Reparixin)(오즈비(Odds ratio): 2.6; 95% CI: 1.1-6.1; p<0.021)에 의해 유의하게 향상되었다는 것을 증명하였다. 예상한 바와 같이, 250 IE의 이식은 향상된 이식(오즈비(Odds ratio): 1.6, 95% CI: 0.6-4.3; p < 0.28)을 야기시켰고 반면에, 이식 전 혈당증은 상기결과에 부정적으로 영향을 미쳤다(오즈비(Odds ratio): 0.6, 95% CI: 0.3-1.1; p = 0.12).

[0052]

이식된 이자섬의 기능성을 평가하기 위해 정맥내 글루코오스 내성 검사(Intravenous Glucose Tolerance Test, IVGTT) 및 경구 글루코오스 내성 검사(Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)가 이식하고 1개월 및 3개월 후에 수행되었다. IVGTT는 16시간 동안 금식 후 시작되었다; 쥐는 꼬리정맥 주사로 글루코오스(0.5 g/kg)를 받았다. 주사하고 0, 1, 5, 15, 20, 30 및 60분 후에 혈액샘플이 얻어졌고, 이들은 글루코오스 농도를 결정하는데 이용되었다.

[0053]

IVGTT로부터, 글루코오스 내성은 글루코오스 제거상수(KG; 분 당 글루코오스의 제거 백분율로 표현된다)로부터

정량화되었으며, 이 제거상수는 개별 혈장 글루코오스 값을 대수변환 한 후에 정맥내 투여후 1 내지 15분(KG_{1-15}) 간의 순환 글루코오스 감소와 같다. 유사한 평가가 전체 1분 내지 60분의 글루코오스 소실률(KG_{1-60})에 대하여 수행되었다. 이 매개 변수는 전체 시험 동안 글루코오스 소실률을 나타낸다. OGTT는 4시간 동안 금식 후 시작되었다; 쥐는 경구 위관영양법(oral gavage)으로 글루코오스를 받았다. 글루코오스를 투여하고 0, 10, 20, 30, 60, 90 및 120분 후 혈액샘플이 얻어졌고, 이들은 글루코오스 농도를 결정하는데 이용되었다. OGTT 동안 글루코오스에 대한 곡선 아래의 면적(AUC)은 트레피조이드 법(trapezoidal method, 기저선 = 0분)을 이용하여 산출되었다. IVGTT 및 OGTT 후 글루코오스 내성에 대한 이자섬 이식의 효능은 도 3에서 설명되어있다. 데이터는 산포도로 보고 된다. 각 점은 레파릭신(Reparixin)의 존재 또는 부재에서 동일한 분리로부터의 이자섬이 이식된 쥐에서 측정된 매개변수의 평균값을 나타낸다; 라벨은 분리의 개수를 식별시키고 정사각형 및 원은 각각 250 또는 150 IE로 이식된 쥐를 나타낸다. 상위 및 하위 패널은 각각 이식하고 1개월 및 3개월 후의 데이터를 알려준다. 실선은 식별선이다: 식별선 보다 위에 있는 원은 비이클-처리된(Vehicle-treated) 집단($\Delta+$)에서보다 레파릭신(Reparixin) 집단에서 더 높은 값을 갖는 관찰을 나타낸다. 이식하고 1개월 및 3개월 후 OGTT는 레파릭신(Reparixin)으로 처리된 쥐에서 글루코오스에 대한 AUC가 대조군 쥐에서의 AUC보다 더 낮게 유지됨을 보여준다. 이러한 데이터를 따르면, 1 내지 15분(KG_{1-15}) 및 1 내지 60분(KG_{1-60})의 글루코오스 제거 상수는 대조군 쥐와 비교하였을 때, 레파릭신-처리된(Reparixin-treated) 쥐에서 상당히 증가하였다. 급성 간 손상은 이식하고 24시간 또는 48시간 후 알라닌 아미노기전이효소(Alanine aminotransferase, ALT)의 순환 레벨에 의해 수량화되었다. ALT 레벨은 150 또는 250 IE로 이식된 쥐 둘 모두에서 레파릭신(Reparixin) 처리에 의해 영향을 받지 않았다(도 4). 마찬가지로, 백혈구 세포, 적혈구 세포 그리고 혈소판의 순환 레벨에서 차이가 없음이 명백하였다.

3. 쥐에서의 동종 이자섬 이식(allogeneic islet transplantation)

[0054] 12주령 Balb/c 쥐에서 얻은 이자섬이 당뇨병이 있는 C57 쥐(알록산(alloxan), 혈당증 > 450 mg/dl)의 간에 이식되었다. 몇몇 실험에서, 12주령 C57BL/6(B6) 쥐에서 얻은 이자섬은 임의의 자가 면역반응의 존재를 평가하기 위해서 당뇨병이 있는 암컷 NOD/LtJ (NOD) 쥐의 간에 이식되었다.

[0055] NOD 쥐는 350 mg/dl 보다 높은 최소 3회의 비-금식 혈중 글루코오스가 판독된 후 이자섬 이식의 수혜자로 이용되었다. 둘 모두의 경우에서, 400 IE가 이식되었다. 이들 동물은 레파릭신(Reparixin) 단독(이식 후 -1일에서부터 시작하여 7일까지 5.28 mg/kg/h의 연속적인 피하주사(s.c)로 주입), 라파마이신(Rapamycin) 단독(0일에 0.3 mg/kg의 유도용량으로 시작하여 뒤이어, 14일까지 0.15 mg/kg의 유지용량으로 일일 복강주사 주입), 레파릭신 + 라파마이신(Reparixin + Rapamycin) 또는 비이클(Vehicle)로 처리되었다.

[0056] 이자섬 이식 후 2회 연속 측정에서 250 mg/dl 보다 적은 비-금식 혈중 글루코오스 레벨로 정의되는 주기능(primary function)에 도달하는 능력과, 300 mg/dl 보다 큰 2회의 연속적인 비-금식 혈중 글루코오스 판독으로 정의되는 거부반응까지의 시간이 먼저 평가되었다.

[0057] 동종 면역 셋팅(alloimmune setting)으로 이식된 모든 쥐를 고려하면, 주기능(혈당증 <250 mg/dl)에 도달할 확률 및 시간 중앙값은 레파릭신(Reparixin) 단독으로 처리된 쥐에서 72% 및 1일, 라파마이신(Rapamycin) 단독으로 처리된 쥐에서 73% 및 1일, 레파릭신 + 라파마이신(Reparixin + Rapamycin)으로 처리된 쥐에서 69% 및 1일, 비이클(Vehicle)로 처리된 쥐에서 44% 및 2일이었다(도 5, 로그 순위 $p < 0.041$). 레파릭신(Reparixin) 처리, 라파마이신(Rapamycin) 처리 및 수혜자의 이식 전 혈당증이 공변량으로 포함되는 콕스 회귀 다변수 분석은 레파릭신(Reparixin) 처리(오즈비(Odds ratio): 2.5; 95% CI: 0.79-2.99; $p < 0.202$)에 의해 향상된 결과를 증명하였다.

[0058] 라파마이신(Rapamycin)으로의 처리(오즈비(Odds ratio): 1.1; 95% CI: 0.62-2.15; $p < 0.62$) 및 이식 전 혈당증(오즈비(Odds ratio): 1.03; 95% CI: 0.68-1.59; $p < 0.88$)은 거의 관련이 없었다.

[0059] 이식하고 24시간 및 48시간 후 측정된 ALT의 순환 레벨은 라파마이신(Rapamycin)의 존재 및 부재 모두에서 레파릭신(Reparixin)에 의해 영향을 받지 않았다.(도 6)

[0060] 계다가, 레파릭신(Reparixin)으로의 처리는 쥐에서 이식 후 주기능에 도달하는 거부반응까지의 시간을 상당히 증가시켰다(도 7). 라파마이신(Rapamycin)의 부재에서 생존시간 중앙값은 레파릭신-(Reparixin-) 및 비이클-처리된(Vehicle-treated) 쥐에 대해 각각 12 ± 0.6 일 ($n=13$) 및 8 ± 0.5 일 ($n=7$)이었다. 라파마이신(Rapamycin)의 존재에서 생존시간 중앙값은 레파릭신(Reparixin) 및 대조군 쥐에 대해 각각 12 ± 2 일 ($n=11$) 및 8 ± 0.6 일 ($n=11$)이었다. 이러한 데이터는 레파릭신(Reparixin) 처리, 라파마이신(Rapamycin) 처리 및 수혜자의 이식 전

혈당증을 공변량으로 포함하는 콕스 회귀 다변수 분석에 의해 확인되었다.

[0062] 레파릭신(Reparixin)으로의 처리는 이식편 생존(오즈비)(odds ratio): 0.252; 95% 신뢰구간: 0.099-0.64; p = 0.004)의 손실에 있어 유의한 독립적인 보호요인으로 확인되었고, 반면에 라파마이신(Rapamycin) 처리(오즈비)(odds ratio): 1.173; 95% 신뢰구간: 0.562-2.45; p = 0.67) 및 이식 전 혈당증(오즈비(odds ratio): 1.002; 95% 신뢰구간: 0.604-1.661; p = 0.99)에서는 유의하지 않았다.

[0063] 4. 동종 이자섬 이식(allogeneic islet transplantation) 후 레파릭신(Reparixin)에 의한 CXCR1/2 차단은 간 염증 상태를 조절한다.

[0064] 간내 백혈구 개체군은 쥐에 동종 이계(allogeneic)의 간내 이자섬 이식 후 레파릭신(Reparixin) 처리의 존재 또는 부재에서 분석되었다. 12주령 Balb/c 쥐에서 얻은 이자섬(400 EI)은 비이클(Vehicle)의 존재하에 또는 8 mg/h/kg의 용량으로 -1일에서부터 시작하여 7일 동안 레파릭신(Reparixin) 피하주사(s.c) 연속 주입의 존재하에 당뇨병이 있는 C57 쥐(알록산(alloxan)이 유도하였다, 혈당증 >450 mg/dl)의 간에 이식되었다. 쥐는 이자섬 이식을 하고 0, +1, +3, +5, +7, +10, +14일 후에 치사시키고, 같은 부검시점에서 계량되었다. 공지된 중량의 2개의 간엽으로부터 단일세포 혼탁액이 준비되었고 간내 백혈구(IHL) 개체군의 분석은 유동세포 분석법(flow cytometry)에 의해 수행되었다. Gr-1⁺/CD11b⁺/CD11c⁻ 세포(주로 PMN), CD4⁺/TCR⁺ (주로 보조 T세포), CD8⁺/TCR⁺ 세포(주로 CTL), NK1.1⁺/CD3⁻ 세포(NK 세포), NK1.1⁺/CD3⁺ 세포(NKT 세포) 그리고 Gr-1⁻/CD11b⁺/CD11c⁻(주로 대식 세포), CD115⁺/CD11b⁺/Cd11c⁻(주로 단핵구), CD11c⁺/CD11b⁺/Gr1⁻(주로 수지상 세포), CD19(주로 B 림프구)의 탐지를 위해 이러한 세포는 플루오레세인 이소티오시안산염(FITC)-, 피코에리트린(PE)- 또는 알로피코시아닌(APC)-표지된 항-CD4, 항-CD8, 항-CD3, 항-CD19, 항-TCR, 항-NK1.1, 항-CD11, 항-Gr-1, 항-CD11b, 및 항-CD11c 항체(Ab)(PharMingen, San Diego, CA)로 표면염색되었다. 샘플은 FACSCaliber 유동세포 분석법에서 획득되었고 그 데이터는 CELLQuest 소프트웨어(Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA)를 이용하여 분석되었다.

[0065] 두 번째 실험세트에서 IHL 개체군 상에서의 CXCR2 및 CXCR1 발현은 백혈구 침윤이 가장 높은 침윤성을 얻는 시점에서 평가되었다.

[0066] 여기서 얻어진 결과는 레파릭신(Reparixin)으로의 처리가 동종 이계(allogeneic) 이식 후 간에서 백혈구의 모집 및 침윤을 감소시킨다는 것을 확인하게 한다. 특히, CXCR2를 발현하는 백혈구의 아개체군인 PMN(도 8) 및 NKT 세포(도 9)는 상당히 영향을 받으며, 이는 도 10에서도 또한 볼 수 있다.

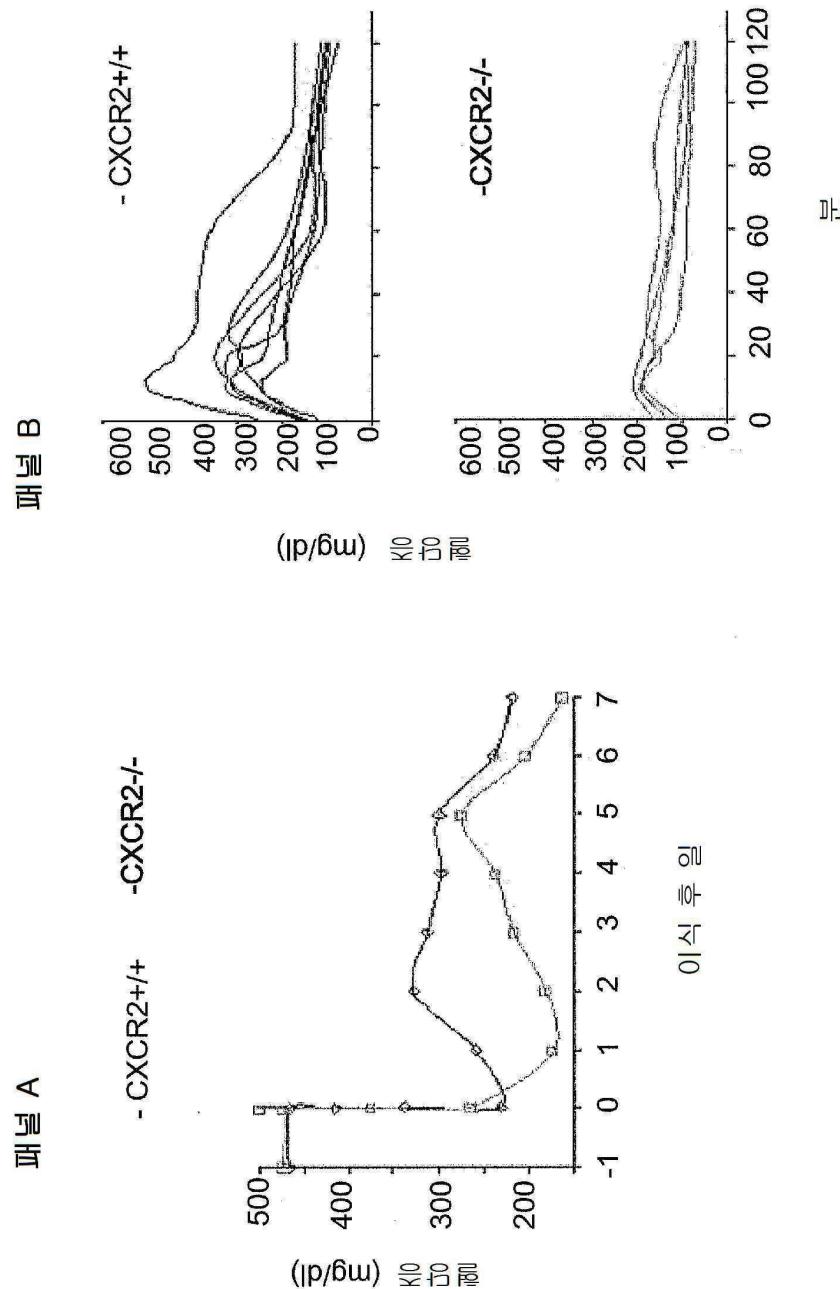
[0067] 5. 레파릭신(Reparixin)에 의한 CXCR1/2 차단은 골수에서 이자섬 이식 후 동종 이계 이자섬 이식(allogeneic islet transplantation)의 결과에 영향을 준다.

[0068] 12주령 Balb/c 쥐에서 얻은 이자섬(400EI)은 8 mg/h/kg의 용량으로 -1일에서부터 시작하여 7일 동안 레파릭신(Reparixin) 피하주사(s.c) 연속 주입의 존재에서 당뇨병이 있는 C57 쥐(알록산(alloxan)이 유도하였다, >450 mg/dl)의 골수에 이식되었다. 대조군 집단의 쥐는 비이클(Vehicle)로 처리되었다. 실험의 주평가변수는 이자섬 이식 후 2회의 연속적인 측정에서 250 mg/dl 보다 적은 비-금식 혈중 글루코오스 레벨로 정의되는 주기능에 도달하는 능력 및 350 mg/dl 보다 큰 2회의 연속적인 비-금식 혈중 글루코오스로 판독으로 정의되는 거부반응까지의 시간이었다.

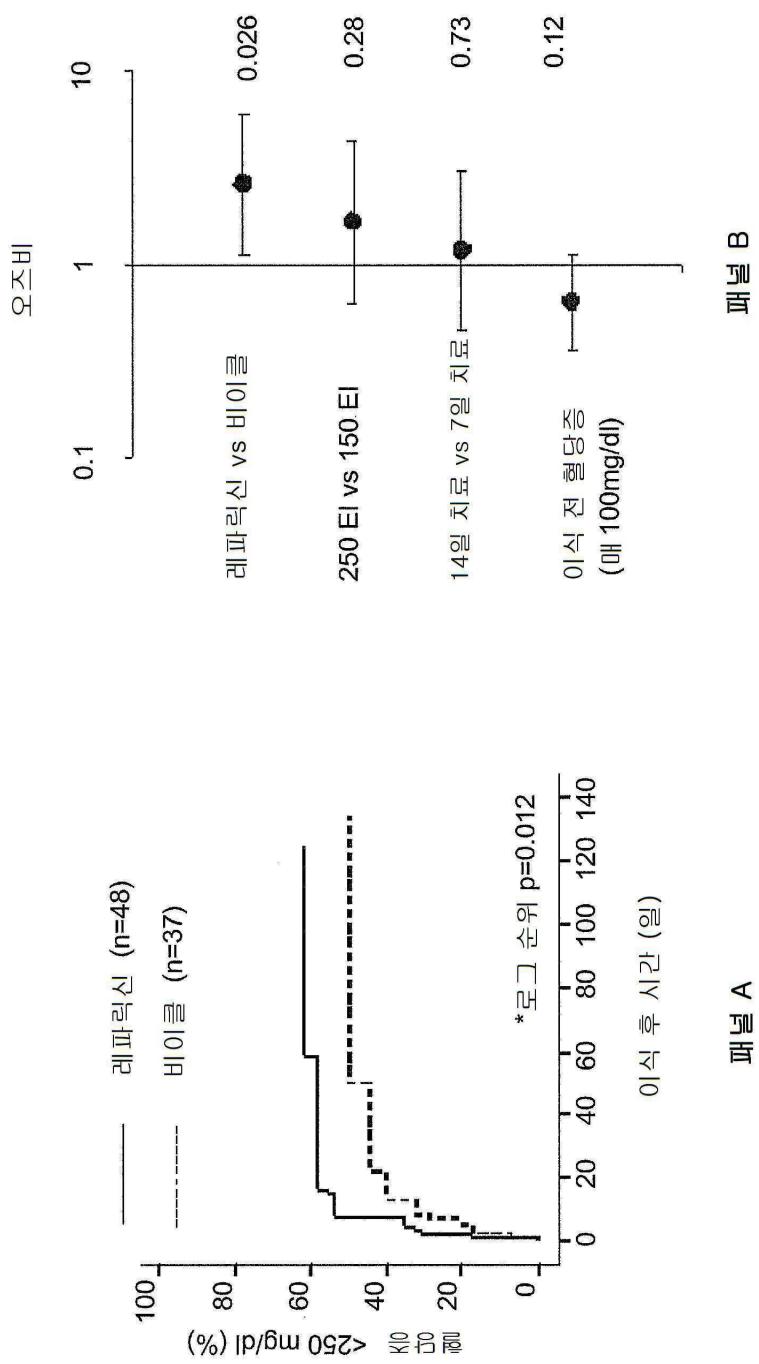
[0069] 여기서 얻어진 결과는 상기 결과가 레파릭신(Reparixin)의 처리에 의해 향상되었다는 것을 확인해주었다.

도면

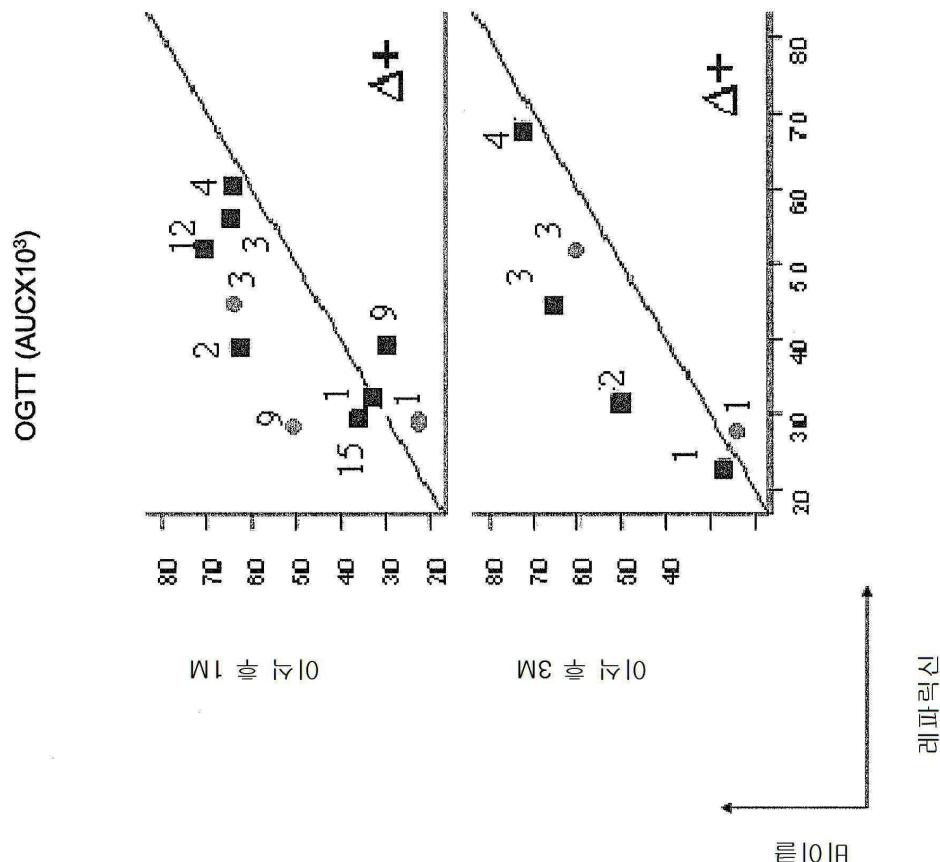
도면1



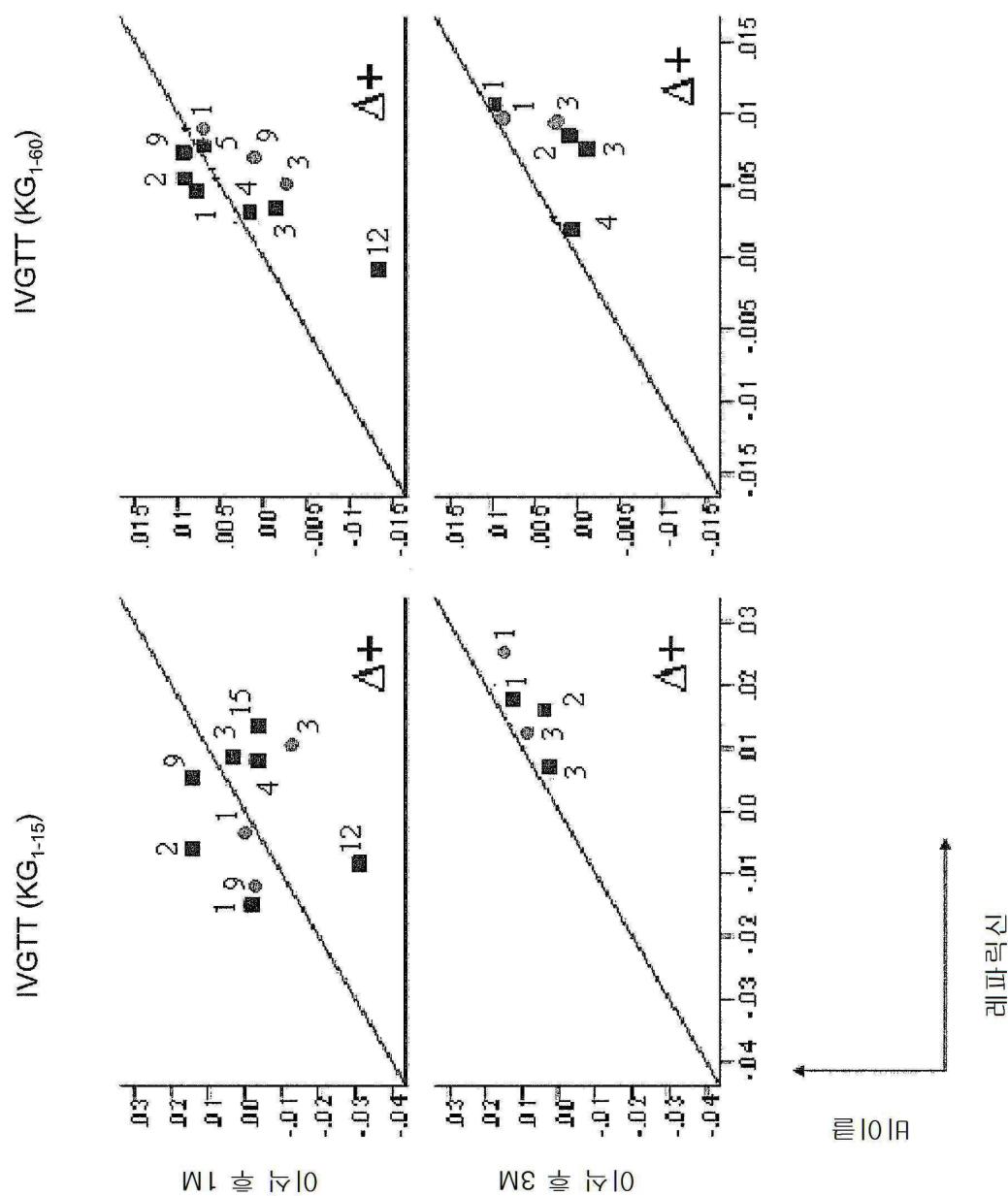
도면2



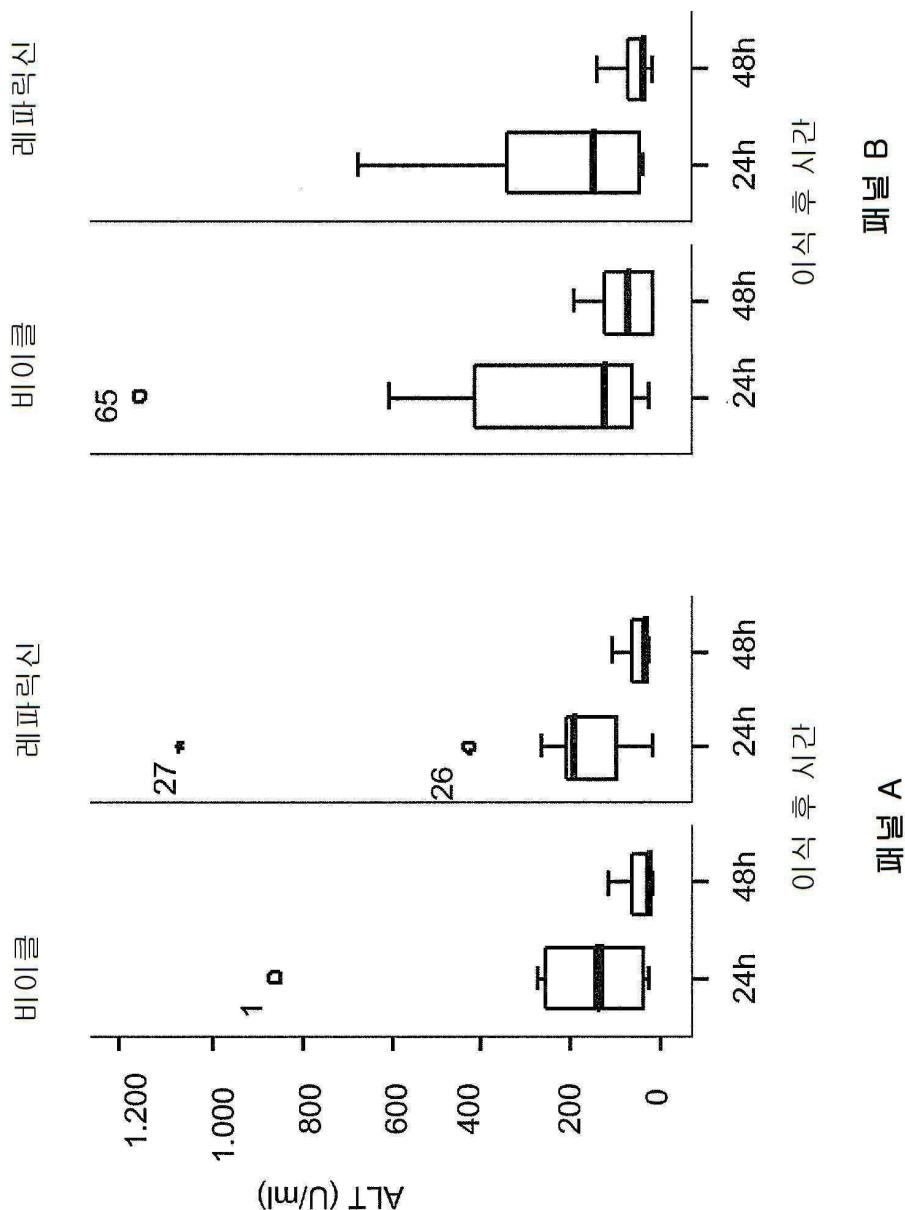
도면3a



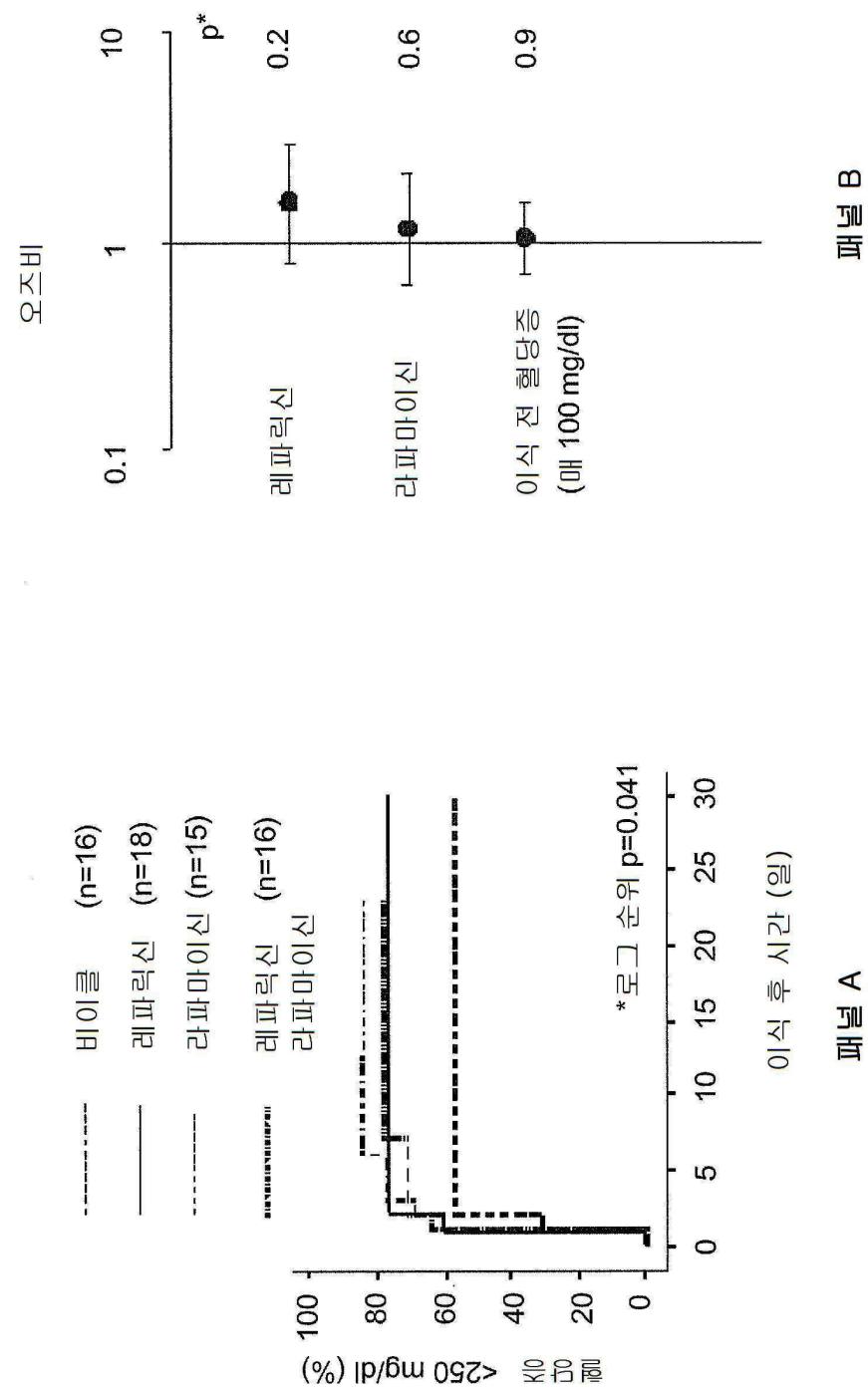
도면3b



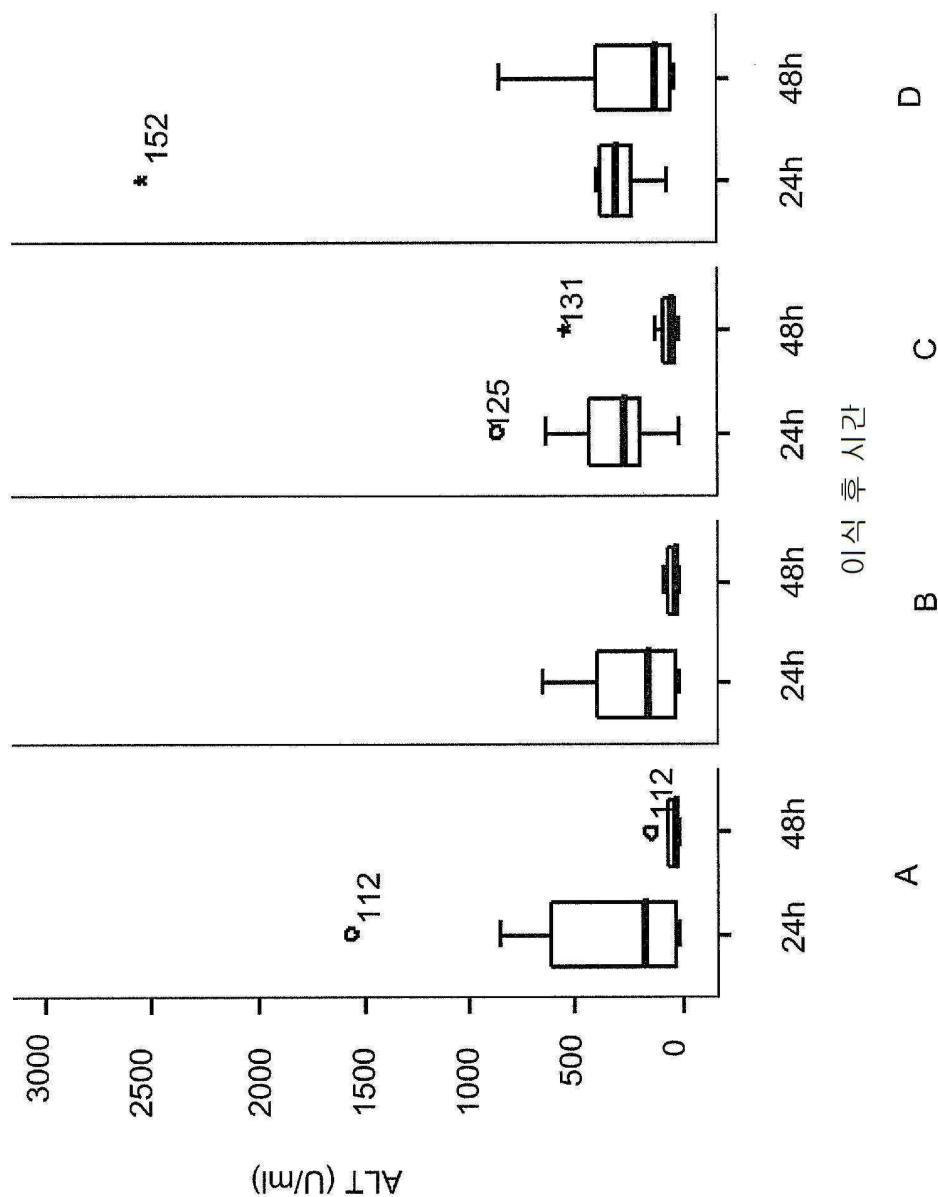
도면4



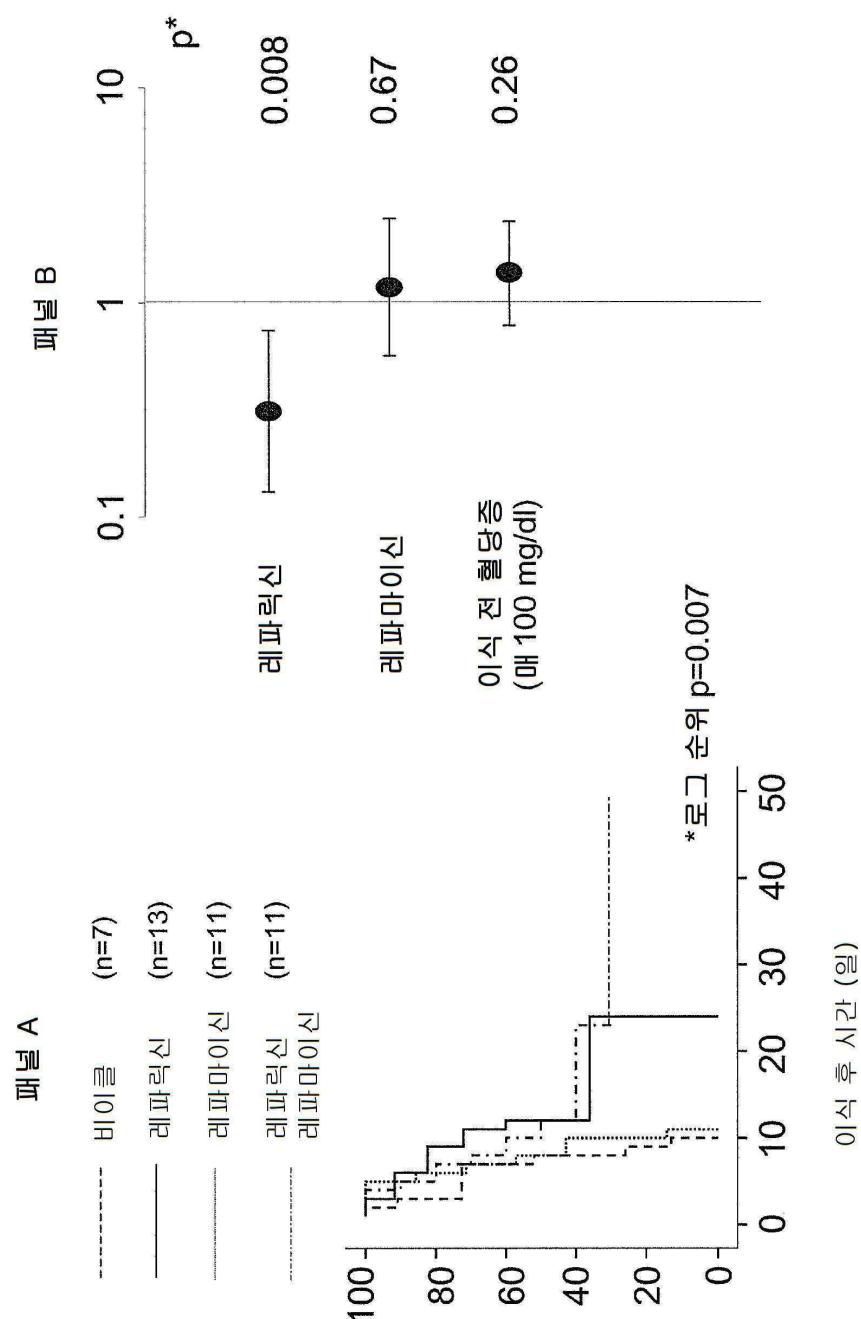
도면5



도면6

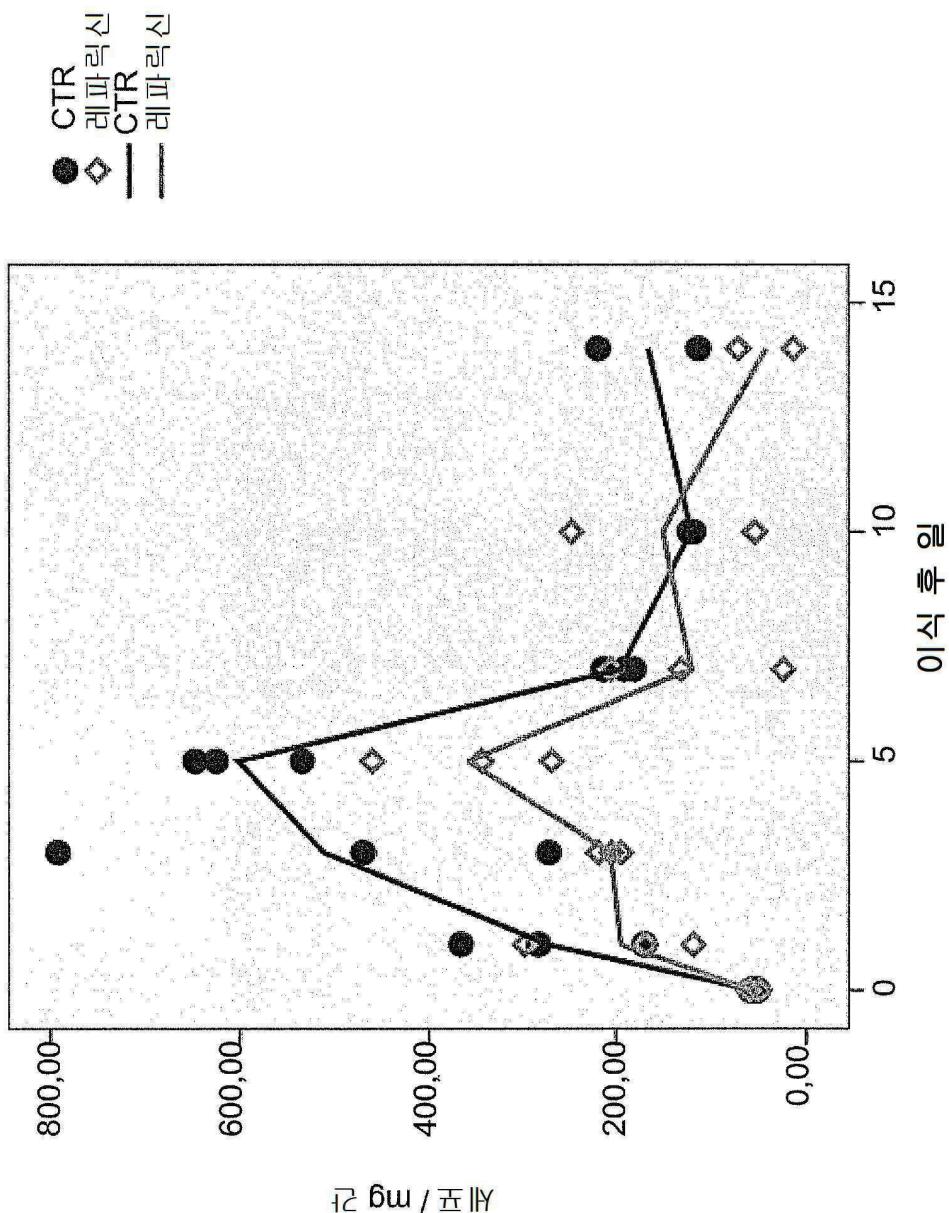


도면7



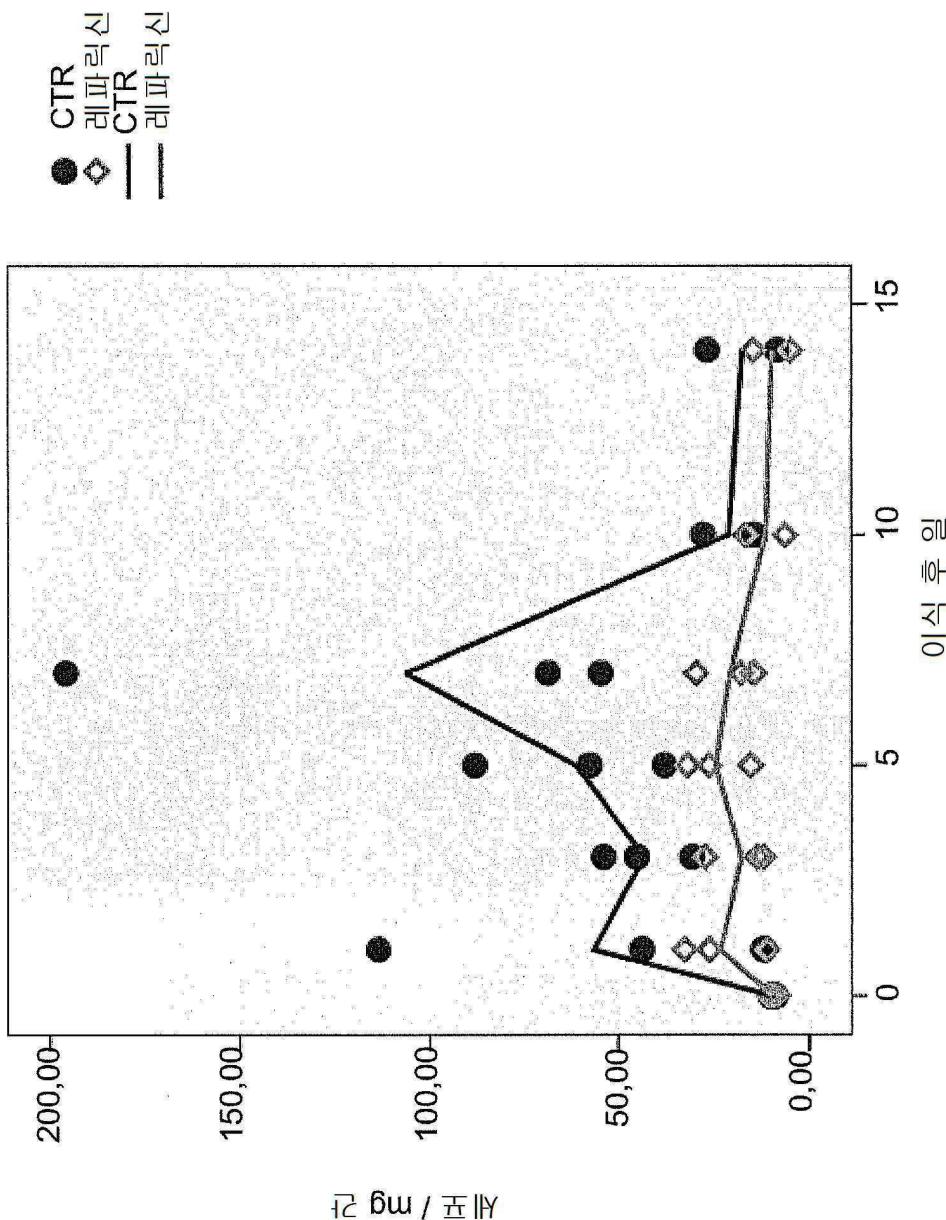
도면8

PMN (Gr1+CD11b+Ly6C-)

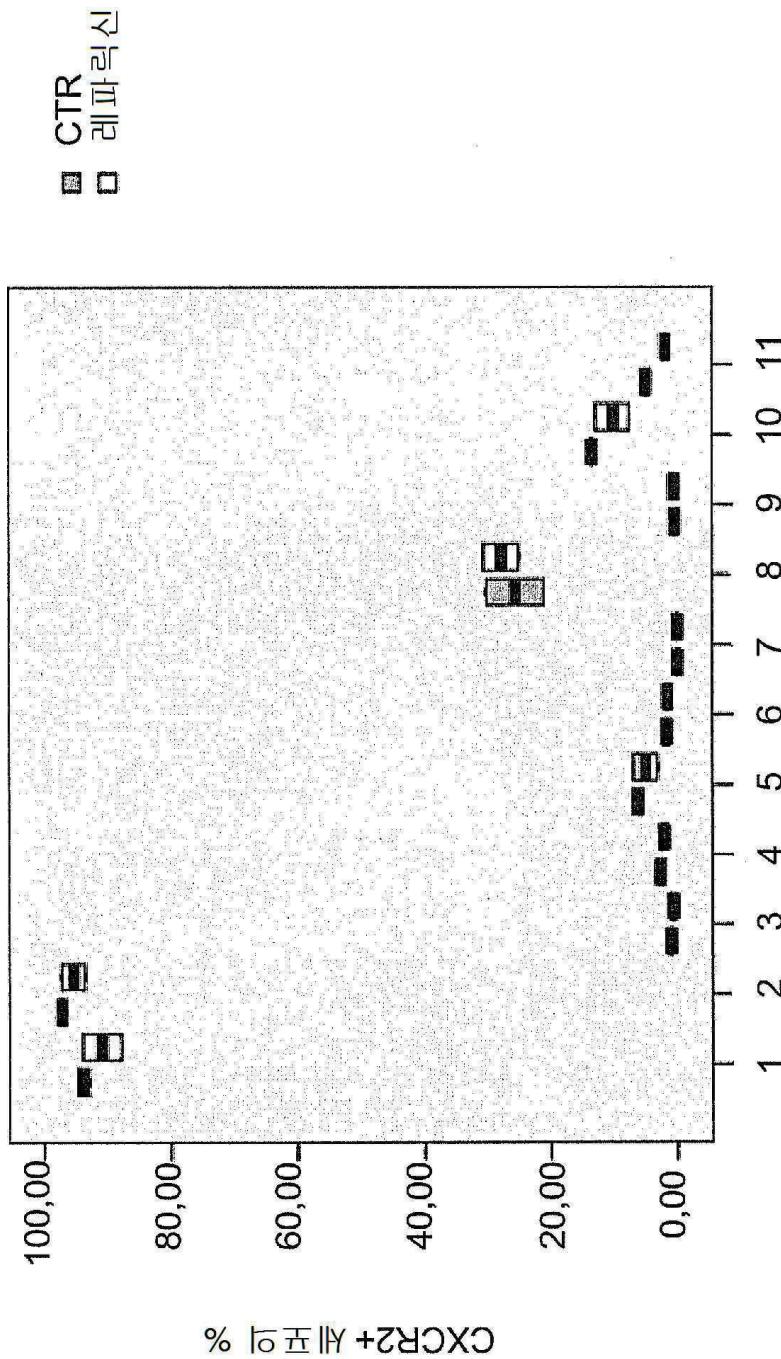


도면9

NKT 세포 (NK1.1+CD3+)



도면10



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 4 내지 7

【변경전】

상기 약물

【변경후】

상기 제약학적 조성물