



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0048426
(43) 공개일자 2017년05월08일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 31/575 (2006.01) A61K 31/573 (2006.01)
 A61K 47/40 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 A61K 31/575 (2013.01)
 A61K 31/573 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7007882</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2015년08월24일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년03월22일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2015/046453</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/029199
 국제공개일자 2016년02월25일</p> <p>(30) 우선권주장
 62/040,721 2014년08월22일 미국(US)
 62/194,120 2015년07월17일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 광저우 캉루이 바이오로지컬 파마슈티컬 테크놀로지 씨오., 엘티디.
 중국, 110000, 선양, 푸지양유안, 허난 디스트릭트 샵17
 더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
 미국 캘리포니아주 94607-5200 오크랜드 플로어 12 프랭클린 스트리트 1111</p> <p>(72) 발명자
 장 캉
 미국 92130 캘리포니아주 샌 디에고 샌 디에귀토 로드 14329
 호우 루이
 중국 110000 선양 푸지양유안 허난 디스트릭트 #17
 카이 후이민
 중국 선양 훈난 디스트릭트 푸지양 가든 #1-5-1</p> <p>(74) 대리인
 김진희, 김태홍</p> |
|--|--|

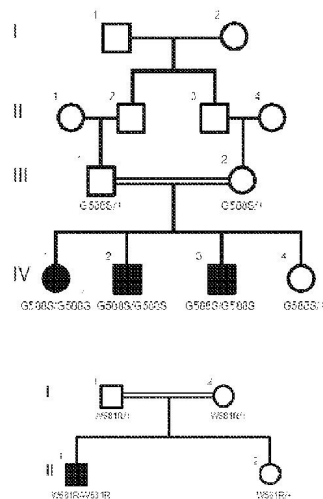
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **시각 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 스테롤 및 시각 장애를 치료하기 위한 그의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서는, 약학적 유효량의 라노스테롤을 포함하는 조성물이 대상자에서 시각 장애를 치료 및/또는 예방하는데 사용된다. 또 다른 실시양태에서는, 약학적 유효량의 라노스테롤을 포함하는 조성물이 대상자에서 백내장 또는 실명/손상된 시력을 치료하는데 사용된다. 또 다른 실시양태에서는, 라노스테롤을 포함하는 조성물이 크리스탈린 단백질의 아밀로이드 유사 피브릴을 용해시키는데 사용된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 47/40 (2013.01)

A61K 9/0014 (2013.01)

A61K 9/0048 (2013.01)

Y10S 514/912 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상자에서 시각 장애를 치료 및/또는 예방하는 약제의 제조를 위한 조성물의 용도로서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 안과용 담체 및 약학적 유효량의 라노스테롤을 포함하는 것인 용도.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대상자는 안 내의 수정체의 정상 구조에 영향을 미치는 시각 장애를 갖고 있거나, 또는 그 시각 장애에 걸릴 위험이 있는 것인 용도.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 시각 장애는 백내장, 선천성 백내장, 피질 혼탁(cortical opacities), 후방 수정체 피막하 백내장, 노안, 핵경화증, 망막 퇴행성 질환, 레프숨병(Refsum disease), 스미스-렘리-오피츠 증후군(Smith-Lemli-Opitz syndrome), 슈나이더 결정 각막 이영양증(Schnyder crystalline corneal dystrophy), 초자소구병, 노인성 황반 변성 및 당뇨병성 망막증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 라노스테롤은 크리스탈린 단백질 응집을 억제하는 것인 용도.

청구항 5

대상자에서 백내장 또는 실명/손상된 시력을 치료하는 약제의 제조를 위한 조성물의 용도로서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 안과용 담체 및 약학적 유효량의 라노스테롤을 포함하고, 상기 라노스테롤은 상기 대상자의 안 내의 수정체 크리스탈린 단백질 응집물(들)을 용해시키는 것인 용도.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 수정체 크리스탈린 단백질은 α -크리스탈린, β -크리스탈린 또는 γ -크리스탈린 중 임의의 것인 용도.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 안과용 액제, 안과용 연고제, 안과용 세정제, 안구내 주입 용액제, 전방(anterior chamber)용 세정제, 내복약, 주사제, 또는 적출된 각막용 보존제로서 제제화되는 것인 용도.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상자는 양서류, 파충류, 조류 및 포유류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 포유류는 설치류, 고양이, 개, 돼지, 말 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 10

크리스탈린 단백질의 아밀로이드 유사 피브릴을 용해시키기 위한 방법으로서, 크리스탈린 단백질의 아밀로이드 유사 피브릴을 용해시키기에 충분한 시간 및 지속시간으로 그 아밀로이드 유사 피브릴을 라노스테롤과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 방법은 동일계에서(in situ), 시험관내에서(in vitro) 또는 생체내에서(in vivo) 수행되는 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 방법은 임의 대상자에 대해 수행되는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 대상자는 인간인 방법.

청구항 14

대상자에서 눈의 정상 구조에 영향을 미치는 시각 장애를 치료 및/또는 예방하기 위한 키트로서, 약학적 유효량의 라노스테롤의 제제, 약학적으로 허용가능한 담체 및 상기 제제의 투여가 상기 시각 장애를 치료 및/또는 예방하도록 상기 제제를 투여하기 위한 사용설명서를 포함하는 것인 키트.

청구항 15

대상자에서 시각 장애를 치료 및/또는 예방하기 위한 안과용 약학 조성물로서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 안과용 담체 및 약학적 유효량의 라노스테롤을 포함하는 것인 안과용 약학 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 조성물은 안과용 액제, 안과용 연고제, 안과용 세정제, 안구내 주입 용액제, 전방용 세정제, 내복약, 주사제, 또는 적출된 각막용 보존제로서 제제화되는 것인 안과용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2014년 8월 22일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/040,721호 및 2015년 7월 17일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/194,120호의 우선권의 이익을 주장하며, 이들의 내용은 그 전체가 본원에 참조로서 포함된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 시각 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

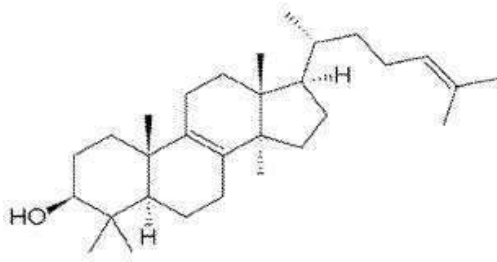
[0005] 본 발명은 일반적으로 안 내의 수정체의 정상 구조에 영향을 미치는 시각 장애를 가지고 있거나, 해당 시각 장애에 걸릴 위험이 있는 대상자에서 이러한 시각 장애를 치료하기 위한 스테롤 및 이의 용도에 관한 것이다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 시각 장애를 치료 또는 예방하는 방법으로서, 유효량의 라노스테롤; 및 이의 프로드러그 또는 약학적으로 허용가능한 염을, 그러한 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 시각 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 안과용 담체와 하기 화학식 I의 구조를 갖는 라노스테롤 및 이의 프로드러그 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 안과용 약학 조성물을 제공한다:

[0008] [화학식 I]



[0009]

[0010] 본 방법의 다양한 양태에서, 시각 장애는 눈의 수정체의 기능, 선명도 및/또는 구조에 영향을 주는 안질환이다. 이러한 안질환은, 이에 제한되지는 않지만, 눈의 백내장, 눈의 노안, 및 눈 수정체의 핵경화증을 포함한다. 또한, 시각 장애는 망막 변성, 예컨대 레프숨병(Refsum disease), 스미스-렘리-오피츠 증후군(Smith-Lemli-Opitz syndrome, SLOS)과 슈나이더 결정 각막 이영양증(Schnyder crystalline corneal dystrophy, SCCD), 무베타지질 단백혈증 및 가족성 저베타지질단백혈증을 언급한 것이다.

[0011]

한 실시양태에서, 본 발명은 치료적 또는 예방학적 유효량의 화학식 I의 스테롤을 대상자에게 투여함으로써 시각 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 경감시키는 방법을 제공한다. 본 방법의 다양한 양태에서, 해당 조성물은 국소, 결막하, 안구후, 안구 주위, 망막하, 맥락막위, 또는 안구내 투여된다. 본 발명의 스테롤을 투여받는 대상자로는, 이에 제한되지는 않지만, 포유류, 조류, 양서류, 파충류 및 기타 척추동물들이 포함된다. 한 실시양태에서, 해당 대상자는 말, 돼지, 개, 고양이, 설치류 및/또는 기타 애완동물이다. 또 다른 실시양태에서, 해당 대상자는 인간이다.

[0012]

한 실시양태에서, 본 발명은 안과용의 약학적으로 허용가능한 담체 중에 본 발명의 스테롤을 포함하는 안과용 약학 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 해당 약학 조성물은 안과용의 약학적으로 허용가능한 담체 중에 라노스테롤 또는 이의 유도체를 포함한다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 해당 약학적으로 허용가능한 담체는 물, 버퍼 또는 염화나트륨 용액이다. 일부 실시양태에서, 해당 약학적으로 허용가능한 담체는 무균 상태이다. 다른 실시양태에서, 해당 약학적으로 허용가능한 담체는 연고이다. 또 다른 실시양태에서, 해당 약학적으로 허용가능한 담체는 겔이다. 겔은 당업자에게 잘 알려진 겔 제형화 재료, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 고점도 카복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 산화폴리에틸렌 및 카보머를 사용하여 제제화될 수 있다. 해당 조성물의 일부 양태에서는, 해당 약학적으로 허용가능한 안과용 담체는 사이클로텍스트린이다. 한 실시양태에서, 해당 사이클로텍스트린은 (2-하이드록시프로필)- β -사이클로텍스트린이다.

[0013]

또한, 본 발명의 특정 실시양태는 시각 장애와 관련된 증상을 치료 및/또는 예방하는데 유용한 성분들을 포함하는 키트도 고려하고 있다. 이러한 키트는 약학적으로 허용가능한 담체 중에 본 발명의 스테롤을 포함하는 용기 및 해당 시각 장애와 관련된 하나 이상의 증상이 경감 또는 예방되도록 본 발명의 스테롤을 투여하기 위한 사용 설명서를 포함한다. 이러한 시각 장애로는, 이에 제한되지는 않지만, 백내장, 노안 및 눈 수정체의 핵경화증이 포함된다. 또한, 시각 장애는 망막의 변성, 예컨대 레프숨병, 스미스-렘리-오피츠 증후군(SLOS)과 슈나이더 결정 각막 이영양증(SCCD), 무베타지질단백혈증 및 가족성 저베타지질단백혈증을 언급한 것이다. 본원에서 고려되는 일부 키트에 포함되는 용기는 점안액의 투여를 위한 점적기이다. 다른 실시양태에서, 해당 용기는 연고 또는 겔을 분배하기 위한 튜브이다. 또 다른 실시양태에서, 해당 용기는 약물 전달을 위한 임의 적절한 용기, 예컨대, 이에 제한되지는 않지만, 주사기, 또는 약물의 안과적 전달 또는 약물의 국소적 도포를 위해 적절한 용기이다.

[0014]

다른 양태에서, 본 발명은 단백질 응집의 억제 또는 예방 방법을 제공한다. 본 방법의 다양한 양태에서, 해당 단백질은 아밀로이드 형성 단백질 또는 기능손실 질병의 근원이 되는 단백질이다. 임의의 양태에서는, 해당 아밀로이드 형성 단백질은 Hsp27, α A-크리스탈린, α B-크리스탈린, β B2-크리스탈린, β B1-크리스탈린, γ D-크리스탈린, Hsp22, Hsp20, 타우, 알파-시누클레인, IAPP, 베타-아밀로이드, PrP, 헌팅틴, 칼시토닌, 심방 나트륨 이노인자, 아포지질단백질 AI, 혈청 아밀로이드 A, 메딘, 프로락틴, 트랜스티레틴, 리소자임, 베타 2 마이크로글로불린, 겔슬린, 케라토피텔린, 시스타틴, 면역글로불린 경쇄 AL 및 S-IBM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 양태에서, 기능손실 질병의 근원이 되는 단백질은 돌연변이 β -글루코시다아제, 낭포성 섬유증 막관통 수용체, 핵소사미니다아제 A, 핵소사미니다아제 B, β -갈락토시다아제 및 알파-글루코시다아제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0015] 본 개시내용의 다른 특징들 및 이점들은 후술하는 상세한 설명으로부터 명백히 이해할 수 있을 것이다. 그러나, 해당 상세한 설명과 구체적인 실시예는, 본 개시내용의 특정한 실시양태를 나타내는 것이기는 하지만, 이러한 상세한 설명으로부터 당업자에게는 본 개시내용의 기술적 사상 및 영역 내에서 다양한 변화에 및 변형예가 명백히 이해될 수 있으므로, 단지 예로서만 제공되는 것임을 이해하여야 한다. 해당 전체 문헌은 하나의 통합된 개시내용으로서 관련되는 것으로 의도되며, 본원에 개시된 특징들의 모든 조합은, 이 특징들의 조합이 해당 문헌의 동일한 문장, 또는 단락, 또는 섹션에서 함께 발견되지 않는다 하더라도, 고려되고 있는 것으로 이해해야 한다. 전술한 것 이외에도, 본 발명은 추가의 양태로서, 위에서 구체적으로 언급된 변형예보다 어쨌든 범위가 더 좁은 본 발명의 모든 실시양태를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 양태가 하나의 특징을 "포함하는"(comprising) 것으로 기술되는 경우, 실시양태는 해당 특징으로 "이루어지는"(consisting of) 또는 "필수적으로 이루어지는"(consisting essentially of) 것도 포함한다.
- [0016] 한 실시양태에서, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 안과용 담체 및 약학적 유효량의 라노스테롤을 포함하는, 대상자에서 시각 장애를 치료 및/또는 예방하기 위한 약제 제조용 조성물의 용도를 개시한다. 상기 대상자는 안 내의 수정체의 정상 구조에 영향을 미치는 시각 장애를 가지고 있거나, 또는 해당 시각 장애에 걸릴 위험이 있다. 상기 대상자는 양서류, 파충류, 조류 및 포유류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며; 여기서, 상기 포유류는 설치류, 고양이, 개, 돼지, 말 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 상기 시각 장애는 백내장, 선천성 백내장, 피질 혼탁(cortical opacities), 후방 수정체 피막하 백내장, 노안, 핵경화증, 망막 퇴행성 질환, 레프숨병, 스미스-렘리-오피츠 증후군, 슈나이더 결정 각막 이형양증, 초차소구병, 노인성 황반 변성 및 당뇨병성 망막증으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 라노스테롤은 크리스탈린 단백질 응집을 억제한다.
- [0017] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 안과용 담체 및 약학적 유효량의 라노스테롤을 포함하는, 대상자에서 백내장 또는 실명/손상된 시력을 치료하기 위한 약제 제조용 조성물의 용도를 개시하는데, 여기서 상기 라노스테롤은 해당 대상자의 안 내의 수정체 크리스탈린 단백질 응집물(들)을 용해시키며, 이때 상기 수정체 크리스탈린 단백질은 α -크리스탈린, β -크리스탈린 또는 α -크리스탈린 중 하나이다. 상기 언급한 조성물은 안과용 액제, 안과용 연고제, 안과용 세정제, 안구내 주입 용액제, 전방(anterior chamber)용 세정제, 내복약, 주사제, 또는 적출된 각막용 보존제로서 제제화될 수 있다.
- [0018] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 크리스탈린 단백질의 아밀로이드 유사 피브릴을 용해시키기에 충분한 양 및 지속시간으로 해당 아밀로이드 유사 피브릴과 라노스테롤을 접촉시키는 단계를 포함하는, 크리스탈린 단백질의 아밀로이드 유사 피브릴을 용해시키는 방법을 개시하는데, 여기서 상기 방법은 동일계에서(in situ), 시험관내에서(in vitro) 또는 생체내에서(in vivo) 수행된다. 해당 방법은 양서류, 파충류, 조류 및 포유류로 이루어진 군으로부터 선택되는 대상자 상에서 수행될 수 있으며, 여기서 상기 포유류는 설치류, 고양이, 개, 돼지, 말 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0019] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상자에서 눈의 정상 구조에 영향을 주는 시각 장애를 치료 및/또는 예방하기 위한 키트로서, 약학적 유효량의 라노스테롤 제제, 약학적으로 허용가능한 담체 및 상기 제제의 투여가 해당 시각 장애를 치료 및/또는 예방할 수 있도록 해당 제제를 투여하기 위한 사용설명서를 포함하는 것인, 키트를 개시한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 안과용 담체 및 약학적 유효량의 라노스테롤을 포함하는, 대상자에서 시각 장애를 치료 및/또는 예방하기 위한 안과용 약학 조성물을 개시하는데; 여기서, 상기 조성물은 안과용 액제, 안과용 연고제, 안과용 세정제, 안구내 주입 용액제, 전방용 세정제, 내복약, 주사제, 또는 적출된 각막용 보존제로서 제제화될 수 있다.
- [0020] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 안 내에서 수정체 크리스탈린 단백질 응집물(들)의 형성과 관련된 백내장 또는 실명/손상된 시력이 생길 위험에 처한 대상자를 확인 및/또는 치료하는 방법을 개시하는데, 상기 방법은 a) 대상자에서 라노스테롤 합성효소 활성의 양을 분석하는 단계; b) 라노스테롤 합성효소 활성의 양이 백내장 또는 실명/손상된 시력이 없는 대조군 집단의 라노스테롤 합성효소 활성의 양보다 적은지를 측정하는 단계로서, 여기서, 대조군 집단보다 적은 라노스테롤 합성효소 활성의 양은 수정체 크리스탈린 단백질 응집물(들)의 형성과 관련된 백내장 또는 실명/손상된 시력이 생길 위험이 보다 높음을 의미하는 것인 단계; 및 c) 대상자의 눈 내에서 수정체 크리스탈린 단백질 응집물(들)의 형성을 방지 또는 역전하기에 효과적인 양과 시간으로 해당 대상자를 라노스테롤로 처리함으로써, 해당 대상자의 안 내에서 수정체 크리스탈린 단백질 응집물(들)의 형성과 관련된 백내장 또는 실명/손상된 시력이 생길 위험에 처한 대상자를 확인 및 치료하는 단계를 포함한다.
- [0021] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상자의 안 내에서 수정체 크리스탈린 단백질 응집물(들)의 형성과 관련된

백내장 또는 실명/손상된 시력이 생길 위험에 처한 대상자를 확인 및/또는 치료하는 방법을 개시하는데, 상기 방법은 a) 라노스테롤 합성효소 유전자의 두 대립형질이 모두 라노스테롤 합성효소 발현 또는 활성을 감소시키는 돌연변이에 영향을 받았는지를 측정하는 단계로서, 여기서 해당 라노스테롤 합성효소의 두 대립형질 내의 돌연변이의 존재가 대상자의 안 내의 수정체 크리스탈린 단백질 응집물(들)의 형성과 관련된 백내장 또는 실명/손상된 시력이 생길 위험을 증가시키는 것인 단계; 및 b) 대상자의 안 내에서 수정체 크리스탈린 단백질 응집물(들)의 형성을 방지 또는 역전하기에 효과적인 양과 시간으로 해당 대상자를 라노스테롤로 처리함으로써, 해당 대상자의 안 내에서 수정체 크리스탈린 단백질 응집물(들)의 형성과 관련된 백내장 또는 실명/손상된 시력이 생길 위험에 처한 대상자를 확인 및 치료하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 라노스테롤 합성효소 유전자에서의 돌연변이는 트립토판(W)을 아르기닌(R)으로 변화시키는 코돈 581에 존재하거나, 또는 글리신(G)을 세린(S)으로 변화시키는 코돈 588에 존재한다.

도면의 간단한 설명

[0022]

도 1은 선천성 백내장을 유발하는 LSS에서 돌연변이를 확인하는 것을 나타낸 것이다. 도 1a는 질병에 걸린 (이환) 가족들의 가계도 및 백내장 표현형을 나타낸다. 사각형 및 원형은 각각 남성과 여성을 가리킨다. 1은 야생형 대립형질이고; W581R과 G588S는 두 돌연변이이다. 도 1b에서, 상측 패널은 질병에 걸리지 않은 개체와 동형접합성 W581R 돌연변이를 갖는 질병에 걸린 아이(II-1)의 DNA 시퀀싱 데이터이고; 하측 패널은 질병에 걸리지 않은 개체와 동형접합성 G588S 돌연변이를 갖는 질병에 걸린 아이(IV-1)의 DNA 시퀀싱 데이터이다. 밑줄친 서열은 핵산이 변화된 부분을 가리킨다. 도 1c에서, 좌측은 완전백내장에 걸린 제1 가계도(IV-1) 중에서 환자 1의 우측 눈에 대한 컬러 사진이며; 백내장에 걸린 동일한 가계도(IV-3) 중에서 환자 2의 우측 눈에 대한 컬러 사진이다.

도 2는 LSS 돌연변이가 사이클라아제의 효소적 기능을 제거하였음을 보여주는 것이다. 도 2a는 수개의 종들: 호모 사피엔스(Homo sapiens), 팬 트로글로다이트스(Pan troglodytes), 보스 타우루스(Bos taurus), 무스 무스쿨루스(Mus musculus), 라투스 노르베기쿠스(Rattus norvegicus), 갈루스 갈루스(Gallus gallus), 및 다니오 레리오(Danio rerio)에 걸쳐 LSS에서 W581R 및 G588이 보존되고 있음을 나타낸 것이다. 도 2b는 LSS 구조 및 LSS W581R과 G588S 돌연변이의 영향을 컴퓨터로 모델링하여 나타낸 것이다. 컴퓨터 모델링 분석으로 C584에서 출발하여 E578에서 끝나는 루프로서, 해당 루프의 끝단에 핵심적인 W581의 측쇄를 가져 스테롤을 안정시키는 루프가 확인된다. 해당 루프는 S-S 가교 및 E578-R639 염가교에 의해 고정된다. G588의 아마이드 질소 N은 이전 나선형 턴의 C584과 상호작용을 하며, G588의 Ca 수소는 중요한 E578과 아주 근접하여 있어서, 동일한 지지 나선의 R639와 강한 염가교를 형성하게 된다. 해당 돌연변이 G588S는 세린의 측쇄가 해당 루프의 E578 잔기로 충돌함을 유발시키기 때문에 해당 구조와는 맞지 않다. 화살표는 돌연변이 측쇄의 위치를 가리키는 것이다. 도 2c는 스테롤 함량에 대한 야생형 단백질(WT LSS) 및 LSS 돌연변이의 조작된 발현의 효과를 나타낸 것이다. 야생형 LSS는 라노스테롤 생성을 현저하게 증가시켰던 반면, W581R 돌연변이나 G588S 돌연변이 그 어느 것도 사이클라아제 활성을 나타내지 않았다. 각 그룹에서 n=3이고; ***P<0.001임.

도 3은 라노스테롤이 여러 가지 크리스탈린 돌연변이 단백질들의 세포내 응집을 감소시켰음을 보여준다. 도 3a는 사람 수정체 간세포 내의 크리스탈린 단백질 응집물의 공초점 이미지를 나타낸 것이다. 백내장을 유발하는 αA-크리스탈린의 Y118D 돌연변이는 p62 양성인 세포내 봉입체, 즉 아그레솜을 형성시켰다. 녹색은 eGFP-크리스탈린 단백질이고; 적색은 p62이며; 청색은 핵이다. peGFP-N1로 감염된 세포를 대조군으로 사용하였다. 도 3b는 크리스탈린 응집물에 대한 LSS의 억제 효과에 대한 공초점 이미지를 나타낸 것이다. 도 3c는 돌연변이 LSS 또는 콜레스테롤이 아닌, 야생형 LSS(WT LSS)와 라노스테롤에 의한 크리스탈린 돌연변이 응집의 억제를 나타낸 것이다. 도 3d는 LSS 돌연변이가 아닌, 야생형 LSS의 공동 발현에 의해 가용성인 αA-크리스탈린(Y118D) 돌연변이 단백질이 증가함을 보여주고 있다(pcDNA3.1-N-Flag와 공동 발현된 Y118D를 대조군으로 사용하였음). 세포 용해물의 상청액 또는 불용성 분획의 웨스턴 블롯 분석에 의한 크리스탈린 단백질의 농도계측을 이용하여 정성 분석을 수행하였다. 각 그룹에서 n=3이었고; 대표적인 웨스턴 블롯 분석은 도 9c에 나타나 있으며; *P<0.05, **P<0.01임. 도 3e는 이미 형성된 크리스탈린 응집물이 라노스테롤에 의해 재용해되는 것에 대한 공초점 이미지를 나타낸 것이다. 도 3f는 여러 가지 백내장을 유발하는 돌연변이 크리스탈린 단백질에 의한 세포내 응집을 라노스테롤이 농도 의존성 방식으로 현저하게 감소시켰음을 보여주는 것이다(n=3, P<1×10⁻⁴). 콜레스테롤은 세포내 응집을 감소시키지 않았다(n=3, P>0.1). 도 3g는 라노스테롤이 사람의 수정체 간세포 내의 여러 가지 크리스탈린 돌연변이의 가용성 분획을 증가시켰음을 보여주는 것이다. n=3이고; P<0.001임. 도 3h는 사람의 수정체 간세포 내의 αA-크리스탈린 Y118D 응집물에 대한 DMSO, 콜레스테롤 또는 라노스테롤의 효과를 살아있는 세포에

대한 연속된 영상으로 나타낸 것이다. 도 3i는 시간에 따른 세포내 크리스탈린 응집물의 용해에 대한 라노스테롤의 효과에 대해 나타낸 것이다(3개의 생물학적 복제물로부터 $n=22$ 임). 평균 \pm SD 값은 검정색 기호로 나타내었다. 데이터는 단일 지수 감소 과정에 의해 최적화되었다(적색선).

도 4는 라노스테롤이 이미 형성된 크리스탈린 단백질의 아밀로이드 유사 피브릴을 재용해시켰음을 보여주는 것이다. 도 4a는 리포솜 중에 콜레스테롤 또는 라노스테롤이 이입된 리포솜 비히클로 처리시킨 α A-크리스탈린 돌연변이 단백질의 응집물에 대해 음성으로 염색된 TEM 사진을 나타낸 것이다. 라노스테롤 그룹 중에서 우측 컬럼의 이미지는 좌측의 이미지를 5배 확대하여 나타낸 것이다. 도 4b는 크리스탈린 응집물의 재용해에 대한 라노스테롤의 효과를 ThT 형광에 의해 나타낸 것이다($n=3$). 도 4b(i)는 β/γ -크리스탈린 돌연변이에 관한 것이고; 도 4b(ii)는 α -크리스탈린 돌연변이에 대한 것이다. 각 막대 그래프는 3개의 독립된 샘플의 결과이다.

도 5는 라노스테롤이 백내장 중증도를 감소시켜 선명도를 증가시켰음을 나타낸 것이다. 도 5a는 라노스테롤로 치료한 백내장에 걸린 래빗의 수정체에서 수정체 선명도가 증가되었음을 보여주는 사진이다. 좌측의 도 5a(i)는 치료 전 사진이고; 우측의 도 5a(ii)는 치료 후의 사진이다. 도 5b는 라노스테롤의 치료 효과를 정량화한 상자그림이다($n=13$). 도 5c는 라노스테롤로 치료한 백내장에 걸린 개의 수정체에서 수정체 선명도가 증가되었음을 보여주는 사진이다. 좌측의 도 5c(i)는 치료 전 사진이고; 우측의 도 5c(ii)는 치료 후의 사진이다. 도 5d는 라노스테롤의 치료 효과를 정량화한 상자그림이다($n=7$). 범위, 중앙값(수평선) 및 평균값(원)을 제시하였다. \times 표시는 측정된 백내장의 최대 및 최소 등급을 가리킨다. 수염(박스과 점을 연결한 선)은 표준 편차를 나타내며, 박스는 40% 신뢰 구간을 포함한다.

도 6a는 동형접합성 맵퍼가 막대 차트와 같이 전장 게놈 동형접합성을 플롯팅한 것을 보여주고 있다. 관심 영역을 강조하기 위해, 이 프로젝트에서 도달했던 최대 점수의 80%보다 높은 임의의 점수를 적색으로 색칠하였다. 도 6b는 동형접합성 점수를 LSS 유전자를 포함하고 있는 21번 염색체에 대한 물리적 위치에 대하여 플롯팅하였음을 보여주고 있다. 적색 막대들은 가장 높은 점수를 갖는 영역을 가리킨다. 염색체의 우측은 LSS 유전자가 위치하고 있는, 연속된 긴 동형접합성 영역을 포함하고 있다.

도 7은 Flag-LSS와 eGFP로 공동 감염된 세포의 대표적인 공초점 이미지를 나타낸 것이다. 사람의 수정체 간세포를 야생형 또는 돌연변이된 LSS 유전자 및 eGFP 유전자로 4시간 동안 공동 감염시키고, 신선한 배양 배지 중에서 16시간 동안 배양하였다. 이후, 항-Flag 항체(자주색)를 사용하여 LSS의 세포 분포를 시각화하였다. eGFP(녹색)의 분포를 대조군으로 사용하였다. 핵을 Hoechst 33342(청색)으로 염색하여 시각화하였다.

도 8은 LSS 및 여러 가지 백내장을 유발하는 크리스탈린 돌연변이로 공동 감염된 세포의 예시적인 공초점 이미지를 나타낸 것이다. 도 8a는 α A-크리스탈린의 R116C 돌연변이이다. 도 8b는 α B-크리스탈린의 R120G 돌연변이이다. 도 8c는 β B2-크리스탈린의 V187E 돌연변이이다. 도 8d는 γ C-크리스탈린의 G129C 돌연변이이다. 도 8e는 γ D-크리스탈린의 W43R 돌연변이이다. 야생형 또는 돌연변이된 Flag-LSS 유전자 및 돌연변이된 GFP-크리스탈린 유전자를 사용하여 사람의 수정체 간세포를 4시간 동안 공동 감염시키고, 신선한 배양 배지 중에서 16시간 동안 배양하였다. 모든 크리스탈린 돌연변이는 돌연변이 크리스탈린과 p62의 공동 편재화로 나타난 것과 같은 p62 양성인 응집물을 형성시켰다. GFP-크리스탈린과 pcDNA3.1-N-Flag로 공동 감염된 세포들을 대조군으로 사용하였다. 여러 가지 크리스탈린 단백질의 세포내 응집물의 형성을 GFP(녹색)의 형광에 의해 시각화하였다. 야생형 또는 돌연변이된 LSS를 항-Flag 항체(적색)로 검출하였고, p62는 항-p62 항체를 사용하여 염색하였던 반면에, 핵은 Hoechst 33342 염색(청색)으로 염색하여 시각화하였다. 응집물을 갖는 세포의 정량 분석을 도 3c에 요약하였다.

도 9는 HLEB-3 세포(도 9a) 또는 HeLa 세포(도 9b)에서 야생형 LSS와 라노스테롤에 의해 크리스탈린 돌연변이 응집이 억제됨을 보여주고 있다. LSS와 크리스탈린 돌연변이 자체물로 공동 감염된 세포들을 응집물에 대해 분석하기 전에 24시간 동안 배양하였다. 40 μ M의 스테롤(라노스테롤 또는 콜레스테롤)을 세포 배양 배지에 첨가하여 2시간 동안 구조 실험을 수행한 후, 스테롤 배지를 신선한 배양 배지로 대체하고 세포들을 추가로 12시간 동안 더 배양하였다. 크리스탈린 응집물을 갖는 세포의 백분율을 10개의 무작위로 선택된 시계(viewing field)로부터 산출하였다. 야생형 LSS 그룹, 돌연변이 그룹, 또는 돌연변이 + 라노스테롤 그룹의 값을 산출하였다. 응집물은 대조군에 비해 야생형 LSS와 라노스테롤 그룹에서 현저하게 더 적었던 한편($P < 1 \times 10^{-4}$), 돌연변이 LSS 또는 콜레스테롤 그룹에서의 응집물은 대조군과 차이가 없었다($P > 0.1$). 도 9c에서는, 사람의 수정체 간세포를 야생형 또는 돌연변이 LSS + α A-크리스탈린(Y118D)을 사용하여 공동 감염시켰다. pcDNA3.1-N-Flag로 공동 감염된 α A-크리스탈린(Y118D)을 대조군으로 사용하였다. 4시간 동안의 감염 및 신선한 배양 배지 중에서의 추가로 24시간 동안의 항은 배양 후, 해당 세포들을 용해시키고 원심분리하여 상청액과 불용성 분획을 분리하였다. LSS와 크리스탈린 융합 단백질을 각각 Flag와 GFP에 대한 항체로 검출하였다. 적색 화살표는 WT-LSS를 포함하고 있는

세포 중에 불용성 분획의 크리스탈린 함량에 비해 가용성 분획의 크리스탈린 함량이 더 높은 것을 가리킨다. 데이터는 3개의 독립적인 실험으로부터 정량하여 도 3d에 요약하였다.

도 10은 HLEB-3 또는 HeLa 세포에서 분석하는 경우, 라노스테롤이 여러 가지 백내장을 유발하는 돌연변이 크리스탈린 단백질에 의해 유발된 세포내 응집을 농도 의존적 방식으로 현저하게 감소시켰음을 나타내고 있다. 도 10a는 여러 가지 백내장을 유발하는 크리스탈린 돌연변이로 감염된 HLEB-3 세포의 예시적인 공초점 이미지를 나타낸 것이다. 도 10b는 여러 가지 백내장을 유발하는 크리스탈린 돌연변이로 감염된 HeLa 세포의 예시적인 공초점 이미지를 나타낸 것이다. 세포들을 여러 가지 크리스탈린 작제물을 사용하여 4시간 동안 감염시키고, 신선한 배양 배지 중에서 추가로 24시간 동안 더 배양하였다. 이후, 세포들을 1%(HLEB-3 세포) 또는 2%의 DMSO(HeLa 세포) 중에서 10, 20 및 40 μ M의 라노스테롤을 사용하여 2시간 동안 처리하고 추가로 12시간 동안 더 배양하였다. 1%(HLEB-3 세포) 또는 2% DMSO(HeLa 세포)를 사용하여 처리한 세포들을 대조군으로 사용하였다. 여러 가지 크리스탈린 단백질의 세포내 응집물의 형성을 GFP(녹색)의 형광으로 시각화하고, 핵은 Hoechst 33342 (청색)으로 염색하였다. 전형적인 세포내 응집물을 화살표로 표시하였다. 도 10c는 HLEB-3 세포 중에서 분석하는 경우에 있어서, 라노스테롤의 응집물 용해 효과의 농도 의존성을 나타내고 있다. 도 10d는 HeLa 세포 중에서 분석하는 경우에 있어서, 라노스테롤의 응집물 용해 효과의 농도 의존성을 나타내고 있다.

도 11은 콜레스테롤이 아닌 라노스테롤에 의한 처리가, 대조군 또는 돌연변이 LSS 그룹과 비교하였을 때, 가용성 분획의 백내장을 유발하는 돌연변이 크리스탈린을 증가시켰음을 나타내는 것이다. 도 11a에서는 사람의 수정체 간세포를 돌연변이 크리스탈린 유전자로 4시간 동안 감염시킨 후, 신선한 배양 배지 중에서 추가로 24시간 동안 더 항온 배양하였다. 세포들을 수확하여 용해시켰다. 상청액과 불용성 분획을 원심분리로 분리시키고 웨스턴 블롯 분석으로 분석하였다. LSS와 크리스탈린 융합 단백질을 각각 Flag와 GFP 태그에 대한 항체로 동정하였다. 라노스테롤로 처리한 그룹은 적색 박스로 강조되어 있다. 1%의 DMSO로 처리된 세포들을 대조군으로 사용하였다. β -액틴을 총 세포 용해물(TCL)의 내부 단백질 로딩 대조군으로 사용하였다. S는 상청액을 나타내고; P는 불용성 분획을 나타낸다. 도 11b는 살아있는 세포의 영상 촬영 중의 단일 입자 추적에 의해 평가된, 사람의 수정체 간세포에서 α A-크리스탈린(Y118D) 응집물의 크기 변화에 대한 DMSO($n=4$) 및 콜레스테롤($n=7$)의 영향을 나타낸 것이다. 도 11c는 크리스탈린 응집물의 용해에 대한 라노스테롤의 효과를 혼탁도에 의해 평가한 것을 나타낸 것이다. 5 mg/ml의 단백질 용액을 1 M의 구아니딘 염화물의 존재 하에 60°C에서 2시간 동안 (α -크리스탈린) 또는 37°C에서 48시간 동안 (β - 및 α -크리스탈린) 항온 배양하여 크리스탈린 응집물을 형성시켰다. 이미 형성된 응집물을 최종 단백질 농도를 0.2 mg/ml로 하여 PBS 중에 재현탁시키고, 500 μ M의 DPPC 리포솜 중의 500 μ M 스테롤을 사용하여 처리하여 37°C에서 24시간 동안 항온 배양하였다. 500 μ M의 DPPC 리포솜만으로 처리한 응집물을 대조군으로 사용하였다. 도 11d는 ThT 형광에 의해 평가된, α A-크리스탈린 돌연변이에 의한 아밀로이드 유사 피브릴의 재용해에 있어서 라노스테롤의 농도 의존적 영향을 나타낸 것이다. 500 μ M의 DPPC 리포솜만으로 처리한 응집물을 대조군으로 사용하였다.

도 12는 백내장에 걸린 수정체의 등급 체계를 나타낸 것이다. 도 12a: 수정체를 격자판 위에 놓고 촬영하였다. 투명도의 정도를, 투명한 수정체로서 혼탁도가 없는 경우 0(격자선이 분명하게 보임, a'); 흐릿한 수정체로서 혼탁도가 아주 조금 있는 경우 1(격자선이 아주 조금은 흐리지만, 여전히 격자선이 보이기는 함, b'); 혼탁한 수정체로서 거의 수정체 전체에 걸쳐 혼탁도가 퍼져 있는 경우 2(격자선이 중간 정도로 혼탁하여, 주된 격자선 정도만 보임, c'); 또는 불투명한 수정체로서 수정체 전체에 걸쳐 광범위하게 진한 혼탁도가 퍼져 있는 경우 3(격자선이 모두 흐릿하고, 전혀 격자선이 보이지 않음, d')으로 점수화하였다. 도 12b는 라노스테롤이 백내장 중증도를 감소시키고 백내장에 걸린 래빗의 분리된 수정체에서 선명도를 증가시켰음을 나타낸 것이다. 래빗의 수정체($n=13$)를 절개하고 라노스테롤과 함께 6일간 항온 배양한 후, 수정체의 선명도와 투명도에 대해 평가하였다. 백내장에 걸린 래빗의 처리 전과 후의 각각의 수정체 사진 한쌍을 그 아래 점수와 함께 나타내었다. 도 12c는 개에 있어서 라노스테롤이 백내장 중증도를 감소시키고 수정체의 선명도를 증가시켰음을 나타낸 것이다. 백내장에 걸린 개의 눈($n=7$)을 라노스테롤로 6주간 처리한 후, 수정체의 선명도와 투명도에 대해 평가하였다. 각 연구 대상 눈의 처리 전과 후의 사진 한쌍을 그 아래 점수와 함께 나타내었다. 비히클로만 처리한 3개의 대조군 눈들도 제시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

이제, 본 발명을 실시하기 위하여 본 발명자들에 의해 고려된 최적의 양태를 비롯한 본 발명의 구체적인 실시양태들을 상세하게 언급할 것이다. 이들 구체적인 실시양태의 예들은 첨부되는 도면에 예시되어 있다. 본 발명을

이들 구체적인 실시양태와 관련하여 기술하지만, 이는 본 발명을 기술하는 실시양태들로 한정하려는 것이 아님을 이해해야 할 것이다. 오히려 반대로, 이러한 설명은 첨부되는 특허청구범위에 의해 규정되는 것과 같은 본 발명의 개념 및 범위 내에 포함될 수 있는 대안물, 변형물 및 등가물을 포괄하려는 것이다. 아래의 설명에서는, 본 발명의 완전한 이해를 제공하기 위해, 구체적이고 상세한 사항들을 기재할 것이다. 본 발명은 이들 구체적이고 상세한 사항들의 일부 또는 전부가 없이도 수행될 수 있다. 또한, 잘 알려진 특징들은, 본 발명을 불필요하게 모호하게 하는 것을 피하기 위하여 상세하게 기술하지 않았다.

[0025] 본 발명은 약학적으로 허용가능한 담체 및 약학적 유효량의 화학식 I의 스테롤을 포함하는 조성물을, 대상자에서 눈의 정상 구조에 영향을 주는 시각 장애를 갖거나, 또는 이러한 시각 장애에 걸릴 위험이 있는 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상자에서 상기 시각 장애를 치료 또는 예방하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명의 대표적인 화합물로 안과용 약학적 유효량의 라노스테롤(3β -하이드록시-8,24-라노스타디엔; 8,24-라노스타디엔- 3β -올)을 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0026] 다른 실시양태에서, 본 발명은 스테롤 및 스테롤을 이용하는 방법을 기술한다. 예를 들어, 화학식 I의 스테롤은 크리스탈린 단백질 응집을 억제하기 위한, 약학적으로 허용가능한 안과용 담체를 포함하는 안과용의 약학 조성물로 제조된다. 다른 특정 실시양태에서, 본 발명은 크리스탈린 단백질 응집을 억제하기 위해 화학식 I의 스테롤을 이용하는 방법에 대해 기술한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 크리스탈린 단백질의 응집을 역전시키고 추가로 크리스탈린 단백질의 응집을 억제할 수 있다.

[0027] 시각 장애를 치료 또는 예방하는 방법

[0028] 본 발명은 안과용의 약학 조성물, 및 안 내의 수정체의 정상 구조에 영향을 미치는 시각 장애를 갖거나 또는 이러한 시각 장애에 걸릴 위험이 있는 대상자에서 이러한 시각 장애를 예방 및/또는 치료하는데 있어서 본 발명을 이용하는 방법을 제공한다. 본원에서, 안 내의 수정체의 정상 구조에 영향을 미치는 시각 장애(본원에서 "시각 장애"라는 말로 지칭함)는 안 내의 수정체의 선명도 또는 강성도에 대한 변화와 같은 시각 기능 장애를 유발하는 것과 관련된 수정체의 구조에 영향을 주는 질환을 일컫는다. 이러한 질환으로는, 백내장, 노안 및 핵경화증이 포함된다. 또한, 시각 장애는 망막의 변성, 예컨대 레프숨병, 스미스-렘리-오피츠 증후군(SLOS)과 슈나이더 결정 각막 이영양증(SCCD), 무베타지질단백혈증 및 가족성 저베타지질단백혈증을 의미한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 크리스탈린 단백질 응집을 완화시키거나 역전시키기 위한 조성물 및 이의 이용 방법을 제공한다. 대안적인 실시양태에서, 수정체 투명도 및 굴절율에 필수적인 매크로 구조를 형성하는 단백질간 또는 단백질내 상호작용의 중단을 억제, 예방 및/또는 치료하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

[0029] 본 발명에서 언급된 "백내장"이라는 용어는 수정체의 표면 및/또는 내부에 흐림 또는 혼탁성을 야기하거나, 또는 수정체의 팽윤을 유발하는 증상을 나타내는 질병 또는 질환을 의미하며, 선천성 백내장과 후천성 백내장 모두를 포함한다(참고: PDR Staff, "PDR of Ophthalmic Medicines 2013", PDR Network, 2012). 일부 실시양태에서, 백내장은 노인성 백내장, 당뇨병성 백내장, 외과 수술과 관련된 백내장, 방사선 노출로 유발된 백내장, 유전병으로 야기된 백내장, 감염으로 인한 백내장, 또는 약제로 유발된 백내장이다. 일부 실시양태에서, 개체는 조기 발병 백내장의 유전형을 가지고 있다. 이의 구체적인 예로는 선천성 백내장, 예컨대 선천성 유사 백내장, 선천성 막상 백내장, 선천성 관상 백내장, 선천성 층판 백내장, 선천성 점상 백내장, 및 선천성 사상 백내장; 및 후천성 백내장, 예컨대 노인성 백내장, 2차성 백내장, 갈색 백내장, 합병 백내장, 당뇨 백내장, 외상성 백내장, 및 쇼크, 방사선, 초음파, 약물, 전신성 질환 및 영양 장애로 유발가능한 기타의 백내장을 들 수 있다. 후천성 백내장으로는, 백내장을 치료하기 위해 삽입된 수정체를 둘러싸고 있는 후방 부에서 흐림을 유발하는 증상을 갖는 수술 후 백내장을 추가로 포함한다.

[0030] 핵경화증은 일반적으로 나이가 동물에 있어서 수정체의 혼탁도를 유사하게 유발하는 질환을 일컫는다. 이는 새로운 섬유가 형성됨으로 인하여 핵 내에서 오래된 수정체 섬유가 압축되어 유발되는 크리스탈린 수정체 핵의 밀도에서의 노인성 변화이다.

[0031] 노안은 눈의 결정 수정체가 신축성을 잃어서 근접한 물체에 대한 초점을 맞추기 힘들게 되는 시각 질환을 가리킨다.

[0032] 일부 실시양태에서, 본 발명은 구조식 I을 갖는 화합물을 포함하는 유효량의 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 시각 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 해당 화합물은 구조식 I을 갖는 스테롤이다.

[0033] 본 발명에 따른 치료를 "필요로 하는" 개체는 안 내의 수정체의 정상 기능에 영향을 미치는 시각 장애로 시달리

고 있는 개체이다. 예를 들어, 해당 개체는 노인성 백내장 또는 백내장에 걸렸거나, 또는 노인성 백내장 또는 백내장에 걸릴 위험이 있을 수 있다. 백내장에 걸릴 위험이 있는 개체로는, 이에 제한되지는 않지만, 백내장에 걸린 가족력이 있는 개체, 백내장과 연관된 돌연변이를 갖는 개체, 방사선, 당뇨 등에 노출된 개체를 포함한다. 예를 들어, 한 양태에 있어서, 해당 개체가 한쪽 눈이 백내장으로 진단받았으면, 반대쪽 눈에 백내장 형성을 예방 또는 늦추기 위해 해당 화합물을 투여한다. 이와 마찬가지로, 본 발명에 따른 치료를 "필요로 하는" 개체는 노안이 왔거나 노안에 걸릴 위험이 있을 수 있는 개체이다. 이와 마찬가지로, 본 발명에 따른 치료를 "필요로 하는" 개체는 핵경화증이 왔거나 핵경화증을 일으킬 위험이 있는 개체이다. 바람직하게는, 해당 개체는 인간이지만, 안질환으로 시달리거나 안질환에 걸릴 위험이 있는 동물(치료를 필요로 하는 동물)도 당업자에게 동정될 수 있다. 치료를 필요로 하는 포유류, 예컨대 고양이, 개, 돼지, 말, 소 및 설치류도 동정될 수 있다. 추가로, 치료를 필요로 하는 조류, 파충류, 양서류 및 어류와 같은 동물도 동정될 수 있다.

[0034] 시각 장애의 "치료"는 시각 장애의 100%의 제거 또는 역전을 요구하지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따른 시각 장애의 "치료"는, 본 발명의 조성물 또는 방법의 부재 하에 (예를 들어, 본 발명의 조성물 또는 본 발명의 방법의 화합물에 노출되지 않은 생물학적으로 맞춰진 대조군 대상자 또는 시험편에서) 관찰되는 수준과 비교하였을 때, 수정체의 기능 장애, 예컨대 수정체의 혼탁 또는 불요성을 예를 들어, 약 5% 이상, 약 10% 이상 또는 약 20% 이상까지 완화, 억제, 예방 및/또는 역전시킨다. 일부 실시양태에서, 기능 장애(예컨대, 수정체 상 또는 수정체 내부에 백내장 형성, 혼탁 또는 크리스탈린 응집)는, 본 발명의 방법의 화합물의 부재 하의 수정체 기능 장애와 비교하였을 때, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 또는 그 이상(약 100%)까지 치료된다. 수정체 기능 장애, 예컨대 혼탁 또는 흐림 또는 백내장은 일반적으로 임의의 여러 가지의 광학 시험, 예컨대, 이에 제한되지는 않지만, 시력 검사, 검안경 검사, 세극등 검사, 각막곡률측정, 안압측정, 대비 시험, 눈부심 감도, 파면 매핑(wavefront mapping)을 사용하여 검출된다.

[0035] 이와 마찬가지로, "예방"은 시각 장애를 100% 억제 또는 저지를 요구하는 것은 아니다. 예를 들어, 흐림과 혼탁이 어느 정도 감소된다는지, 또는 백내장 진행이 감소되는 것도 대상자에서 유의한 생물학적 효과를 구성한다. 또한 예로서, 눈 수정체 내의 크리스탈린 응집이 어느 정도 감소한 것도 유의한 생물학적 효과를 이룬다. 이와 관련하여, 본 발명은 해당 시각 장애를, 본 발명의 조성물 또는 방법의 부재 하에 (예를 들어, 본 발명의 방법의 화합물에 노출되지 않은 생물학적으로 맞춰진 대조군 대상자 또는 시험편에서) 관찰되는 수준과 비교하였을 때, 예를 들어, 약 5% 이상, 약 10% 이상 또는 약 20% 이상 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 해당 시각 장애는 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 또는 그 이상(약 100%)까지 감소된다.

[0036] 기능 장애의 억제, 예방 또는 역전은 100%의 억제, 예방 또는 역전을 요구하는 것은 아니다. 예를 들어, 응집을 어느 정도 억제하는 것도 대상자에서 유의한 생물학적 효과를 이룬다. 이와 관련하여, 본 발명은 대상자에서 눈의 수정체의 정상 기능에 영향을 미치는 시각 장애를, 본 발명의 조성물 또는 방법의 부재 하에 (예를 들어, 본 발명의 방법의 화합물에 노출되지 않은 생물학적으로 맞춰진 대조군 대상자 또는 시험편에서) 관찰되는 수준과 비교하였을 때, 예를 들어, 약 5% 이상, 약 10% 이상 또는 약 20% 이상 억제시킨다. 일부 실시양태에서, 해당 시각 장애는 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상까지 억제, 예방 및/또는 역전된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 해당 본 발명의 방법의 화합물의 부재 하에서의 아밀로이드 형성과 비교하였을 때, 아밀로이드 형성을 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 또는 그 이상(약 100%)까지 억제한다.

[0037] 화학식 I의 화합물을 포함하는 "유효량"의 안과용 약학 조성물은 개체에서 수정체의 기능 장애를 억제, 예방 또는 역전시키는 양이다. 본 발명의 안과용 약학 조성물은 해당 시각 장애를 치료하기 위해 이를 필요로 하는 대상자에게 유효량으로 투여된다. 본원에서, "치료적 유효량"이라는 말은 시각 장애의 징후, 증상, 또는 원인 중 하나 이상을 완화하거나, 또는 생물학적 시스템에 있어 임의의 기타 소정의 변형을 완화시키는 용량을 의미한다. 예방적 적용에 있어서, "예방적 유효량"이라는 용어는 특정 질병에 걸리기 쉽거나, 그렇지 않으면 특정 질병의 위험이 있는 환자에게 투여되는 용량을 의미하며, 이는 치료적 유효량과 동일하거나 상이한 용량일 수 있다. 특정 개체를 위한 유효량의 조성물은 해당 개체, 해당 개체 질환의 중증도, 적용되는 제제의 유형, 투여의 빈도 및 치료의 지속시간에 따라 다를 수 있다. 본 발명에 따르면, 예를 들어, 심지어는 액적 중에 상대적으로 낮은 농도, 예를 들어, 10^{-9} M 이상, 0.5 내지 1×10^{-8} M 이상, 0.5 내지 1×10^{-7} M 이상, 0.5 내지 1×10^{-6} M 이상, 0.5 내지 1×10^{-5} M 이상, 0.5 내지 1×10^{-4} M 이상, 또는 0.5 내지 1×10^{-3} M 이상, 또는 이들 수치간의 범위에 포함되는 임의의 농도(예를 들어, 10^{-9} M 내지 10^{-3} M)의 라노스테롤과 같은 본 발명의 안과용 약학 제제

의 투여는, 단 1회, 2회, 3회 또는 다회로 매일 투여하여 매우 신속하게 이러한 시각 장애를 역전시킬 수 있다.

[0038] 투여 경로

[0039] 당업자라면 누구나 이해할 수 있는 것과 같이, 대상자에게 화합물을 투여하는 가장 적절한 방법은 다수의 요인들에 의존한다. 다양한 실시양태에서, 본 발명에 따른 화합물은 안에 국부적으로, 예를 들어, 국소, 결막하, 안구후, 안구 주위, 망막하, 맥락막상, 또는 안구내로 투여된다.

[0040] 눈에 직접적으로 투여하기에 특히 유용한 약학 조성물로는, 안과용 액제, 안과용 연고제, 안과용 세정제, 안구내 주입 용액제, 전방용 세정제, 내복약, 주사제, 또는 적출된 각막용 보존제인, 수용액, 및/또는 점안액 및 점증 용액으로서 제제화된 현탁액, 및/또는 안과용 겔(겔 형성 용액 포함) 또는 연고로서 제제화된 현탁액을 포함한다. 안과용 약물 전달을 위한 기타 제형(dosage form)으로는 눈 삽입물, 유리체내 주입물 및 이식물을 포함한다. 주사액은 미세 바늘을 사용하여 각막, 결정 수정체 및 유리체 또는 이들과 근접한 조직들 내로 직접 주입될 수 있다. 또한, 해당 조성물은 안구내 관류액으로 투여될 수도 있다.

[0041] 추가로 고려되는 투여 경로로는, 이에 제한되지는 않지만, 경구(예를 들어, 정제, 캡슐, 또는 소화가능한 용액으로서), 점막(예를 들어, 비강 스프레이 또는 흡입용 에어로졸로서), 코, 비경구(예를 들어, 주사 형태로서), 위장, 척수내, 복강내, 근육내, 정맥내, 자궁내, 진피내, 두개내, 기관내, 질내, 뇌실내, 뇌내, 피하, 경피, 직장, 구강, 경막의 및 설하 중 하나 이상을 포함한다.

[0042] 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물을 눈에 전달하기 위한 방식은 콘택트 렌즈를 통해서 이루어진다. 해당 렌즈는 사전에 원하는 화합물로 처리되어 제공될 수 있다. 다르게는, 렌즈는 조제용 냉동건조 분말로서 또는 농축 용액 또는 즉시사용가능한 용액으로서 제공되는, 코팅된 렌즈를 제조하기 위한 성분들과 함께 키트 내에 제공된다. 해당 조성물은 1회용 또는 다회용 키트로서 제공될 수 있다.

[0043] 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물을 눈에 전달하기 위한 방식은 안과용 로드(rod)를 통해 이루어진다(Gwon et al., Ophthalmology. 1986 September; 93(9 Suppl):82-5). 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물을 눈에 전달하기 위한 방식은 안구내 수정체-하이드로겔 어셈블리를 통해 이루어진다(Garty et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011 Aug. 3; 52(9):6109-16).

[0044] 투여량

[0045] 해당 화합물을 포함하는 조성물은 의학적으로 허용가능한 수준의 독성으로 목적하는 생물학적 효과를 달성하는 치료적 유효량으로 제공된다. 조성물의 투여량은 투여 경로 및 질병의 중증도에 따라 달라질 수 있다. 또한, 투여량은 치료될 각 환자의 체중, 연령, 성별 및/또는 증상의 정도에 따라 조절될 수도 있다. 정확한 용량 및 투여 경로는 결국 담당 주치의 또는 수의사의 재량에 의할 것이다. 환자의 연령과 체중 및 치료될 질환의 중증도에 따라 투여량에 통상적인 변형을 주는 것도 필요할 수 있다. 투여의 빈도는 제제 및 상기 언급한 파라미터에 따라 다르다. 예를 들어, 하루에 1회 이상, 예컨대 하루에 2회, 3회, 4회 또는 5회로 점안액을 넣는 것이 바람직할 수 있다.

[0046] 당업자라면 최적 투여량, 투여 방법 및 반복 빈도를 쉽게 결정할 수 있다. 최적 투여량은 특정 약학 조성물 및 투여 방법의 상대적 효능에 따라 달라질 수 있다. 허용가능한 투여량은 일반적으로 시험관내 및 생체내 동물 모델에서 효과적인 것으로 판명된 EC50(시험 그룹의 50%에 효과적인 농도)을 기준으로 추산될 수 있다. 일반적으로, 투여량은 체중 1 kg 당 0.01 μg 내지 100 g이고, 매일, 매주, 매월 또는 매년마다 1회 이상, 또는 심지어 매 2년 내지 20년마다 1회로 투여될 수 있다. 당업자라면 체액 또는 조직 중에서 약물에 대해 측정된 체류 시간 및 농도를 기준으로 투약 반복 빈도를 쉽게 추산할 수 있다. 성공적이었던 치료에 따라서, 질병 상태의 재발을 방지하기 위해서라도 환자가 유지 요법을 수행하게 하는 것이 바람직할 수 있으며, 이 경우, 본원에 기술된 치료 조성물은 체중 1 kg 당 0.01 μg 내지 100 g 범위의 유지 용량으로, 매일 1회 이상에서 매 20년 마다 1회까지 투여된다. 침투성 경로를 통하여 (약 70 kg 체중의) 인간에게 투여하기 위한 화합물의 예시적인 용량은 단위 용량당 화합물이 0.1 mg 내지 5 g, 예를 들어, 1 mg 내지 2.5 g이다.

[0047] 화학식 I의 화합물의 바람직한 농도 범위는 약 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이고, 예를 들어, 약 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 180 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 약 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 약 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다. 억제제가 다른 약학적 활성제와 함께 제공될 수 있다.

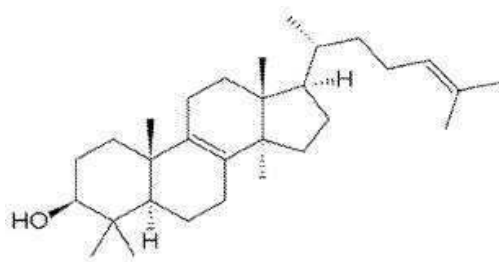
[0048] 본원에 기술된 약학 조성물은 1회 용량 또는 복수의 용량으로 투여될 수 있고; 개별적인 치료제로서 또는 다른 치료제들과 병용하여 투여될 수 있으며; 연속적으로 또는 동시에 투여될 수 있는 통상적인 요법들과도 조합될 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 및/또는 동물 요법에서 본 발명의 안과용 제제의 1일 투여량은 약 1 방울/눈, 약 2 방울/눈, 약 3 방울/눈, 약 4 방울/눈, 약 5 방울/눈, 약 6 방울/눈, 약 7 방울/눈, 약 8 방울/눈, 약 9 방울/눈, 약 10 방울/눈, 약 11 방울/눈, 약 12 방울/눈 또는 약 12 방울/눈 이상이다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 인간 및/또는 동물 요법에서 본 발명의 안과용 제제를 위한 일일 투여 스케줄은 약 1 회/일, 약 2 회/일, 약 3 회/일, 약 4 회/일, 약 5 회/일, 약 6 회/일, 약 7 회/일, 약 8 회/일, 약 9 회/일, 약 10 회/일, 약 11 회/일, 약 12 회/일 또는 약 12 회 이상/일이다. 투여량은 예컨대 수직으로 세웠을 때 25℃에서 0.9 내지 1.1 g의 총 중량을 갖는 20 방울의 물을 배출하는 3 mm의 외부 직경을 갖는 표준 약전의 의약 점적기를 사용하여 표준화될 수 있다.

[0049] 상기 기술된 투여량 스케줄에 따라 투여되는 경우, 인간 및/또는 동물에서의 해당 치료 요법은 무기한으로 지속되거나, 또는 더 이상 향상되지 않음이 관찰될 때까지 지속될 수 있다. 다르게는, 해당 치료 요법은 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 30일, 31일, 32일, 33일, 34일, 35일, 36일, 37일, 38일, 39일, 40일, 41일, 42일, 43일, 44일, 45일, 46일, 47일, 48일, 49일, 50일, 60일, 70일, 80일, 90일, 100일, 150일, 200일, 250일, 300일, 400일, 500일, 750일, 1000일 동안, 또는 1000일 이상 지속될 수 있다.

[0050] 백내장을 치료 또는 예방하는데 효과적인 화합물

[0051] 다양한 실시양태에서, 본 발명의 방법의 화합물 또는 조성물은 하기 화학식 I의 화합물을 갖는 라노스테롤 또는 이의 프로드러그 또는 약학적으로 허용가능한 염이다:

[0052] [화학식 I]



[0053]

[0054] 예를 들어, 본 발명의 방법의 화합물 또는 조성물은 라노스테롤; 이의 프로드러그 또는 약학적으로 허용가능한 염이다. 한 실시양태에서, 해당 화합물은 라노스테롤이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 화합물의 임의의 프로드러그 또는 약학적으로 허용가능한 염도 본 발명의 범위 내인 것으로 고려된다.

[0055] 약학 조성물

[0056] 본 발명의 일부 실시양태에서, 1종 이상의 치료 화합물의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 중에 이들 1종 이상의 치료 화합물을 제제화함으로써 제조될 수 있다. 본원에서, "약학적으로 또는 치료적으로 허용가능한 담체"라는 말은 활성 성분들의 생물학적 활성의 효능을 방해하지 않으며, 숙주 또는 환자에게는 독성이 없는 담체 매질을 일컫는다. 약학 제제에 사용되는 담체의 유형은 해당 치료 화합물이 투여되는 방법에 따라 달라질 것이다. 다양한 투여 경로를 위한 약학 조성물의 여러 가지 제조 방법들은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0057] 본원에서, "약학적으로 허용가능한 안과용 담체"라는 용어는 구조식 I의 화합물을 안 상에 또는 안 주위에 직접 또는 간접적으로 전달하기 위한 약학적으로 허용가능한 부형제, 담체, 결합제 및/또는 희석제를 의미한다. 따라서, 본 발명은 구조식 I의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 안과용 담체를 포함하는 조성물을 추가로 포함한다.

[0058] 선택적으로, 해당 조성물은 구조식 I의 화합물의 유리 산, 유리 염기, 염(예를 들어, 산 또는 염기 부가염), 수화물 또는 프로드러그를 포함한다. 본원에서 사용된 "약학적으로 허용가능한 염" 또는 "약학적으로 허용가능한 산"이라는 말은 각각 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용가능한 유기 또는 무기 염, 또는 산을 가리킨다. 반대 이온은 모화합물 상의 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 또한, 약학적으로 허용가능한 염(또는 산)은 그 구조 내에 하나 이상의 하전된 원자를 가질 수 있다. 여러 개의 하전된 원자들이 해당 약학적으로 허용가능한 염(또는 산)의 일부인 경우에는 여러 개의 반대 이온들을 가질 수 있다. 이런 이유

로, 약학적으로 허용가능한 염(산)은 하나 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 이상의 반대 이온을 가질 수 있다.

- [0059] 대표적인 염으로는, 이에 제한되지는 않지만, 황산염, 시트르산염, 아세트산염, 옥살산염, 염화물, 브롬화물, 요오드화물, 질산염, 중황산염, 인산염, 산 인산염, 아이소니코틴산염, 유산염, 살리실산염, 산 시트르산염, 타르타르산염, 올레산염, 타닌산염, 판토텐산염, 중타르타르산염, 아스코르브산염, 숙신산염, 말레인산염, 겐티신산염, 푸마르산염, 글루콘산염, 글루쿠론산염, 당산염, 포름산염, 벤조산염, 글루타민산염, 메탄설폰산염, 에탄설폰산염, 벤젠설폰산염, p-톨루엔설폰산염 및 파모산염(즉, 1,1'-메틸렌-비스-(2-하이드록시-3-나프토에이트))을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 염은 또 다른 분자, 예컨대 아세트산염 이온, 숙신산염 이온 또는 기타 반대 이온의 포함을 수반할 수도 있다.
- [0060] 프로드러그는 담체 모이어티에 공유 결합된 구조식 I의 화합물을 포함하는 물질이다. 담체 모이어티는 시험관내에서 또는 생체내에서 구조식 I의 화합물로부터 방출되어 구조식 I의 화합물을 생성한다. 프로드러그의 형태는 문헌[Sloan, K. B., Prodrugs, M. Dekker, New York, 1992]; 및 문헌[Testa, B. and Mayer, J. M., Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: chemistry, biochemistry, and enzymology, Wiley-VCH, Zurich, 2003]에 예시되어 있는 것과 같이 당업계에서 잘 알려져 있다.
- [0061] 본 발명의 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 적절한 용매 중에 본 발명의 조성물을 용해시킴으로써 제조된다. 적절한 용매로는, 이에 제한되지는 않지만, 물, 식염수(예를 들어, NaCl), 완충액, 연고, 젤 또는 기타 용매를 포함한다. 특정 실시양태에서, 용매는 멸균 상태이다.
- [0062] 점안액의 제조에 사용되는 현탁액을 위한 수용액 및 희석제로는, 증류수, 생리 식염수 등을 포함할 수 있다. 이들 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 해당 화합물을 임의로는 적절한 약학적 첨가제, 예컨대 부형제, 붕해제, 결합제, 활제, 희석제, 버퍼, 방부제, 습윤제, 유화제, 분산제, 안정화제 및 용해 보조제와 함께 혼합, 희석 또는 용해시키고, 통상적인 방식에 따라 보조제를 용해시키고 제형에 따라 통상적인 방식으로 제제화함으로써 제조될 수 있다. 현탁액을 위한 비수용액 및 희석제로는, 식용유(예. 식물성), 유동 파라핀, 광유, 프로필렌 글리콜, p-옥틸도데칸올, 폴리소르베이트, 마크로글, 모노스테아린산 알루미늄 및 이와 유사한 용매를 포함할 수 있다.
- [0063] 다양한 첨가제들이 필요에 따라 점안액, 안과용 젤 및/또는 안과용 연고 내에 포함될 수 있다. 이들은 과도한 독성, 불화합성, 불안정성, 자극, 알러지 반응 등이 없이 눈 위에 또는 눈 주위에 접촉하여 사용하기에 적절한 첨가의 성분들, 첨가제 또는 담체를 포함할 수 있다. 첨가제, 예컨대 용매, 염기, 용액 아주반트, 현탁제, 점증제, 유화제, 안정화제, 완충제, 등장성 조절제, pH 조절제, 킬레이트제, 진정제, 보존제, 교정제, 향미제, 착색제, 부형제, 결합제, 활제, 계면활성제, 흡수 촉진제, 분산제, 보존제, 가용화제 등이 적절하게 제제에 첨가될 수 있다.
- [0064] 예를 들어, 점안액은 계면활성제가 녹아있는 멸균수 중에 화합물을 용해시키고, 임의로 적절한 약학적 첨가제, 예컨대 보존제, 안정화제, 버퍼, 산화방지제 및 점도 개선제를 첨가함으로써 제조될 수 있다.
- [0065] 예를 들어, 완충제는 pH를 일정하게 유지하기 위해 첨가되며, 약학적으로 허용가능한 완충제, 예컨대 붕산염 버퍼, 시트르산염 버퍼, 타르타르산염 버퍼, 인산염 버퍼, 아세트산염 버퍼, 또는 (트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 및 HCl을 포함하는) 트리스-HCl 버퍼를 포함할 수 있다. 예를 들어, 7.4의 pH를 갖는 트리스-HCl 버퍼는 3 g/l의 트리스-(하이드록시메틸)-아미노메탄 및 0.76 g/l의 HCl을 포함한다. 또 다른 양태에서, 해당 버퍼는 10×인산염 완충 생리식염수("PBS") 또는 5×PBS 용액이다. 완충제는 예상된 생리적 조건에 대해 충분한 완충능을 제공하는 양으로 포함된다.
- [0066] 기타 버퍼로는, 이에 제한되지는 않지만, HEPES(N-(2-하이드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄설폰산))(pK_a: 25°C에서 7.5, pH: 약 6.8-8.2 범위); BES(N,N-비스(2-하이드록시에틸)2-아미노에탄설폰산)(pK_a: 25°C에서 7.1, pH: 약 6.4-7.8 범위); MOPS(3-(N-모르폴리노)프로판설폰산)(pK_a: 25°C에서 7.2, pH: 약 6.5-7.9 범위); TES(N-트리스(하이드록시메틸)-메틸-2-아미노에탄설폰산)(pK_a: 25°C에서 7.4, pH: 약 6.8-8.2 범위); MOBS(4-(N-모르폴리노)부탄설폰산)(pK_a: 25°C에서 7.6, pH: 약 6.9-8.3 범위); DIPSO(3-(N,N-비스(2-하이드록시에틸)아미노)-2-하이드록시프로판)(pK_a: 25°C에서 7.52, pH: 약 7-8.2 범위); TAPS((2-하이드록시-3-(트리스(하이드록시메틸)메틸아미노)-1-프로판설폰산))(pK_a: 25°C에서 7.61, pH: 약 7-8.2 범위); TAPS((2-하이드록시-1,1-비스(하이드록시메틸)에틸)아미노)-1-프로판설폰산))(pK_a: 25°C에서 8.4, pH: 약 7.7-9.1 범위); TABS(N-트리스(하이드

록시메틸)메틸-4-아미노부탄설향산)(pK_a : 25℃에서 8.9, pH: 약 8.2-9.6 범위); AMPSO(N-(1,1-디메틸-2-하이드록시에틸)-3-아미노-2-하이드록시프로판설향산)(pK_a : 25℃에서 9.0, pH: 약 8.3-9.7 범위); CHES(2-사이클로헥실아미노)에탄설향산)(pK_a : 25℃에서 9.5, pH: 약 8.6-10.0 범위); CAPSO(3-(사이클로헥실아미노)-2-하이드록시-1-프로판설향산)(pK_a : 25℃에서 9.6, pH: 약 8.9-10.3 범위); 및 CAPS(3-(사이클로헥실아미노)-1-프로판설향산)(pK_a : 25℃에서 10.4, pH: 약 9.7-11.1 범위)를 기반으로 한 버퍼들을 포함한다.

[0067] 버퍼 이외에, 등장화제를 점안액에 첨가하여 해당 제제를 눈물과 등장성이 되도록 할 수 있다. 등장화제로는, 이에 제한되지는 않지만, 당류, 예컨대 텍스트로스, 글루코스, 수크로스 및 프럭토스; 당 알콜, 예컨대 만니톨 및 소르비톨; 다가 알콜, 예컨대 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜; 및 염, 예컨대 염화나트륨, 시트르산나트륨, 염화벤즈알코늄, 염화페드린, 염화칼륨, 염화프로카인, 클로람페니콜 및 숙신산나트륨을 포함한다. 등장화제는 점안액의 삼투압이 눈물과 같아지도록 하는 양으로 첨가된다.

[0068] 보존제는 점안액 및/또는 안과용 연고의 온전함을 유지하기 위하여 첨가될 수 있다. 보존제의 예로서는, 이에 제한되지는 않지만, 소르브산, 염화벤즈알코늄, 브롬화벤조도데시늄, 파라벤, 클로로부탄올, 벤질 알콜, 페닐에틸 알콜, 에데트산나트륨, 소르브산, 폴리쿼터늄-1, 또는 기타 당업자에게 공지된 제제들을 포함한다.

[0069] 일부 실시양태에서, 점증제는 안과용 제제, 예컨대 점안액, 안과용 겔 및/또는 안과용 연고의 점도를 증가시키는데 사용된다. 사용될 수 있는 점증제로는, 이에 제한되지는 않지만, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 카복시메틸 셀룰로오스 및 카복시비닐 중합체를 포함한다.

[0070] 상기한 것들 이외에도, 일부 실시양태에서, 이에 제한되지는 않지만, 안정화제, 예컨대 아황산나트륨, 탄산나트륨, 및 프로필렌 글리콜; 산화방지제, 예컨대 아스코르브산, 아스코르브산나트륨, 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 토크페롤, 티오황산나트륨; 및/또는 킬레이트제, 예컨대 에틸렌-디아민-테트라-아세트산(EDTA), 에틸렌 글리콜-비스-(2-아미노에틸)-N,N,N,N-테트라아세트산(EGTA) 및 시트르산나트륨을 포함하는 추가의 제제들을 사용하는 것도 바람직하다.

[0071] 점안액, 안과용 겔 및/또는 안과용 연고제는 무균성 조작에 의하거나, 또는 다르게는 적절한 제조 단계에서 멸균화를 수행함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 무균 약학 조성물은 멸균 성분들을 살균 혼합함으로써 제조될 수 있다. 다르게는, 무균 약학 조성물은 먼저 성분들을 혼합한 후 최종 제제를 멸균시킴으로써 제조될 수 있다. 멸균화 방법은, 이에 제한되지는 않지만, 가열 살균, 방사 및 여과를 포함한다.

[0072] 안과용 연고제(안연고)는 안연고의 제조를 위해 사용되는 베이스 내에 활성 성분을 혼합하여 넣은 후, 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 이를 약학적 제제로 조제함으로써 무균 제조될 수 있다. 통상적인 안연고용 베이스의 예로서는, 바셀린, 젤렌 50, 플라스틱베이스 및 마크로골을 들 수 있다. 또한, 친수성을 증가시키기 위해 계면활성제가 첨가될 수 있다.

[0073] 활성 제제의 방출 조절을 위한 다수의 유효한 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Wagh V. D., Inamdar B., Samanta M. K., Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems]을 참조한다. 문헌[Asian J Pharm 2, 2008, 12-17]과 여기에 언급된 참조 문헌들은 그 내용이 본원에 참조로 포함된다. 중합체(예를 들어, 셀룰로오스 유도체, 예컨대 하이드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC) 및 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC), 폴리(아크릴산)(PAA), 폴리(아크릴레이트), 사이클로덱스트린 및 천연 검, 폴리옥사에스테르(POE) 및 점막부착성 중합체); 반고체, 예컨대 겔, 막 기타 삽입물; 수지, 예컨대 이온 교환 수지; 이온영동 전달; 및 콜로이드 입자, 예컨대 미소구체 및 나노입자의 사용도 특히 고려된다.

[0074] 본 발명의 화합물은 다른 치료제들과 함께 제공될 수도 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 다른 활성 제제, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 항감염제, 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 항원충제, 항염증 약물, 항알러지제, 예컨대 항히스타민, 인공 눈물, 혈관수축제, 혈관확장제, 국소 마취제, 진통제, 안압 저하제, 면역조절제, 항산화제, 비타민과 미네랄, 효소 억제제 또는 다르게는, 프로테아제와 펩티다아제, 사이토카인 억제제 등과 함께 제조될 수 있다.

[0075] 다양한 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 아큐라(Acular)(케토로락 트로메타민 안과용 용액) 0.5%, 아큐베일(Acuveil)(케토로락 트로메타민), AK-Con-A(나파졸린 안과용), 악텐(Akten)(염산 리도카인), 알라마스트(Alamast), 알파간(Alphagan)(브리모니딘), 알렉스(Alrex), 아스테프로(Astepro)(염산 아젤라스틴 비강 스프레이), 아자사이트(AzaSite)(아지트로마이신), 비프리브(Bepreve)(베실산베포타스틴 안과용 용액), 베시반스

(Besivance)(베시플록사신 안과용 현탁액), 베탉손(Betaxon), BSS 멸균 세척액, 코썽(Cosopt), 듀레졸(Durezol)(디플루프레드네이트), 아일리아(Eylea)(아플리버셉트), 로테맥스(Lotemax), 루센티스(Lucentis)(라니비주맵), 루미간(Lumigan)(비마토프로스트 안과용 용액), 마큐젠(Macugen)(페가프타닙), 오큐프록스(Ocuflox)(오픈플록사신 안과용 용액) 0.3%, 오큐히스트(OcuHist), 오저텍스(Ozurdex)(덱사메타손), 퀵신(Quixin)(레보플록사신), 레스쿨라(Rescula)(우노프로스톤 이소프로필 안과용 용액) 0.15%, 레스타시스(Restasis)(사이클로스포린 안과용의 에멀전), 살라겐정(Salagen Tablets), 트라바탄(Travatan)(트라보프로스트 안과용 용액), 발싸이트(Valcyte)(발간시클로버 HCl), 비롭틱(Viroptic), 비스티드(Vistide)(시도포비르), 비쥬다인(Visudyne)(주사용 베르테포르핀), 비트라세르트 임플란트(Vitraserit Implant), 비트라빈 주사액(Vitravene Injection), 제디터(ZADITOR), 지옵탄(Zioptan)(타플루프로스트 안과용 용액), 지르간(Zirgan)(간시클로비르 안과용 겔), 자이막시드(Zymaxid)(가티플록사신 안과용 용액), 아트로핀(Atropine), 플루르비프로펜(Flurbiprofen), 파이소스티그민(Physostigmine), 아썩트(Azopt), 겐타마이신(Gentamicin), 필로카르핀(Pilocarpine), 바시트라신(Bacitracin), 고니오솔(Goniosol), 폴리마이신 B(Polymyxin B), 베타딘(Betadine), 그라미시딘(Gramicidin), 프레드니솔론(Prednisolone), 베탉솔롤(Betaxolol), 후모르솔(Humorsol), 프로파라카인(Proparacaine), 베틀틱(Betoptic), 하이라르틴(Hylartin), 푸로파인(Propine), 브린졸아미드(Brinzolamide), 고장성 NaCl, 푸랄루브(Puralube), BSS, 인도시아닌 그린(Indocyanine Green), 로즈 벵갈(Rose Bengal), 카바콜(Carbachol), 이트라코나졸(Itraconazole), 히알uron산나트륨(Sodium Hyaluronate), 세파졸린(Cefazolin), 라타노프로스트(Latanoprost), 수프로펜(Suprofen), 셀루비스크(Celluvisc), 만니톨, 테라마이신, 클로람페니콜, 메타졸라마이드(Methazolamide), 티모롤(Timolol), 실록산(Ciloxan), 미코나졸(Miconazole), 토브라마이신(Tobramycin), 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 마이오스타트(Miostat), 트리아시놀론(Triamcinolone), 코썽(Cosopt), 뮈로 128(Muro 128), 트리플루리딘(Trifluridine), 데메카리움(Demecarium), 네오마이신, 트로픽아미드(Tropicamide), 덱사메타손(Dexamethasone), 넵타잔(Neptazane), 트루썽(Trusopt), 디피베프린(Dipivefrin), 오큐프록스(Ocuflox), 비다라빈(Vidarabine), 도졸라미드(Dorzolamide), 오픈플록사신(Ofloxacin), 비라-A(Vira-A), 에피네프린(Epinephrine), 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline), 비롭틱(Viroptic), 플루오레세인(Fluorescein), 페닐레프린(Phenylephrine) 및 잘라탄(Xalatan)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 안과용 치료제와 함께 제공될 수도 있다.

[0076] 키트

[0077] 본 발명의 일부 실시양태는 눈 질병과 관련된 하나 이상의 증상을 예방 및/또는 개선하기 위한 키트에 관한 것이다. 해당 키트는 본원에 기술된 하나 이상의 치료 화합물을 포함하는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 해당 화합물은 제조된 약학 조성물로서 용기 내에 존재할 수 있거나, 또는 다르게는 해당 화합물은 제형화되지 않을 수도 있다. 이러한 실시양태에 있어서, 해당 키트는 해당 약학적으로 허용가능한 담체와는 분리된 용기 내에 제형화되지 않은 화합물을 포함할 수 있다. 사용하기 전, 해당 화합물을 희석하거나, 그렇지 않으면 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 혼합한다.

[0078] 본원에서 제공되는 키트의 일부 실시양태는 이에 제한되지는 않지만, 망막의 변성, 노안, 백내장 및/또는 눈의 수정체의 핵경화증을 포함하는 눈 질병과 관련된 하나 이상의 증상이 경감 또는 예방되도록 하는 방법으로 해당 약학 조성물을 투여하는 방법을 기술하는 사용설명서도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 해당 사용설명서는 키트 내에 포함되어 있는 치료 화합물과 안과용의 약학적으로 허용가능한 담체를 혼합하는 절차도 기술하고 있다.

[0079] 본 발명의 일부 실시양태에서, 본원에 기술한 치료 화합물을 포함하고 있는 해당 용기는 눈에 투여하기 위해 사용되는 용기이다. 특정 실시양태에서, 해당 용기는 점안액을 투여하기 위한 점적기이다. 다른 실시양태에서, 해당 용기는 안과용 겔 또는 안연고제를 투여하기 위한 튜브이다.

[0080] 본 발명의 일부 실시양태를 하기의 실시예로 추가로 예시하지만, 이러한 예로서 본 발명을 한정을 하려는 것은 아니다. 당업자라면, 뒤따르는 실시예에 개시된 기법들은 본원에 기술된 본 발명의 실시양태를 잘 수행하도록 발명자들에 의해 발견된 기법들을 대표하는 것이며, 따라서 이러한 실시양태를 수행하기 위한 바람직한 양태를 구성하는 것으로 여겨야 함을 알 수 있을 것이다. 그러나, 당업자라면, 본 발명의 내용에 비추어, 본 발명의 개념과 범위를 벗어나지 않으면서 본원에 개시된 구체적인 실시양태들에 다양한 변화를 주어도 같거나 유사한 결과를 얻을 수 있다는 점도 알 수 있을 것이다.

[0081] 장치

[0082] 본 발명의 일부 실시양태는 대상자에게 본 발명의 스테플을 투여하기 위한 장치에 관한 것이다. 일부 실시양태

에서, 해당 장치는 내부, 공동 또는 약학적으로 허용가능한 담체 중에 제제화된 본 발명의 스테롤을 함유하는 저장소를 포함한다. 이러한 실시양태에 있어서, 해당 약학적 담체로는, 이에 제한되지는 않지만, 용액, 겔 및 연고를 포함한다. 특정 실시양태에서, 내부, 공동 또는 저장소는 본원에 기술된 본 발명의 스테롤 함유 약학 제제를 하나 이상 포함한다.

[0083] 일부 실시양태에서, 본원에서 고려되는 장치는 해당 장치의 내부, 공동 또는 저장소와 연결되어 있는 어플리케이션이터도 포함할 수 있다. 해당 어플리케이션이터는 원통형, 원뿔형 또는 본 발명의 스테롤 함유 약학 제제를 내부, 공동 또는 저장소로부터 눈으로 전달할 수 있는 임의의 다른 형태일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 해당 어플리케이션이터는 넓은 끝단이 내부, 공동 또는 저장소와 연결되어 있고, 좁은 끝단이 본 발명의 스테롤 함유 약학 제제가 통과하여 눈으로 나아가게 하는 개구부를 형성하고 있는 테이퍼형(tapered) 원통이다.

[0084] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 과학 기술 용어들은 본 발명이 속하는 당업자에게 통상적으로 이해되는 바와 같은 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동일한 방법, 장치 및 재료들은 어느 것이라도 본 발명의 실시 및 시험에 사용될 수 있으나, 지금은 바람직한 방법, 장치 및 재료들에 대해서 기술할 것이다.

[0085] 본원에 언급한 모든 간행물들은 현재 기술된 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 해당 간행물들에 기술된 방법들을 기술하고 개시할 목적으로 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 위에서 거론하거나 명세서 전반에 걸쳐 언급된 간행물들은 본 출원의 출원일 이전에 개시된 것에 한해서만 제공된다. 본원에 그 어떤 내용도, 선행 발명으로 인해 본 발명자들이 이러한 개시내용을 선행할 권한이 없다고 시인하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0086] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이지만, 명시적으로나 암묵적으로도 어떠한 방식, 형상 또는 형태로도 본 발명을 한정하려는 것이 아니다. 이들은 통상적으로 이용될 수 있는 것들이나, 당업자들에게 공지된 다른 절차, 방법 또는 기법들이 대안으로 사용될 수도 있다.

[0087] 실시예 1

[0088] 사람의 수정체는, 수정체의 투명도와 굴절율에 필수적인 고도로 체계화된 상호작용성 매크로 구조 내에 조립된 크리스탈린 단백질로 대부분 이루어져 있다. 단백질간 또는 단백질내 상호작용이 조금이라도 방해될 경우, 이러한 섬세한 구조는 변형되어 소수성 표면이 드러나서, 결국 단백질이 응집되고 백내장이 형성된다. 백내장은 전세계적으로 실명의 가장 흔한 원인으로, 수천만 명에게 발병하며¹, 현재 유일한 치료법은 백내장에 걸린 수정체를 외과적 수술로 제거하는 것이다. 수정체 단백질이 응집을 방지하고 수정체 투명도를 유지하는 것 모두에 대한 정확한 메커니즘은 대부분 알려져 있지 않다. 라노스테롤은 수정체 내에 풍부한 양친매성 분자이다. 이것은 콜레스테롤 합성 경로의 중요한 순환 반응 내의 라노스테롤 합성효소(LSS)에 의해 합성된다. 여기서, 우리는 광범위한 선천성 백내장에 걸린 두 가족에 있어서 2개의 독특한 동형접합성 LSS 미스센스 돌연변이(W581R 및 G588S)를 확인하였다. 이들 돌연변이는 모두 고도로 보존된 아미노산 잔기에 영향을 주고, LSS의 중요한 촉매 작용에도 손상을 준다. 돌연변이가 아닌 야생형 LSS의 조작된 발현은 여러 가지 백내장을 유발하는 돌연변이 크리스탈린의 세포내 단백질 응집을 방지한다. 콜레스테롤이 아닌 라노스테롤의 처리는 시험관내 및 세포내 감염 실험 모두에서 이미 형성된 단백질 응집물을 현저하게 감소시켰다. 우리는 라노스테롤의 처리가 시험관 내에서 백내장 중증도를 감소시켜 해부된 래빗의 백내장에 걸린 수정체의 투명도를 증가시킬 수 있었고, 개의 생체 내에서 백내장 중증도를 감소시킬 수 있었음을 추가로 증명하였다. 우리의 연구는 수정체 단백질 응집의 예방에 있어서 라노스테롤이 중요한 분자임을 확인하여, 백내장 예방과 치료를 위한 새로운 전략에 대해 열어보았다.

[0089] 백내장은 전세계적으로 모든 경우의 실명에 있어서 절반 이상을 차지하고 있으며, 확립된 유일한 치료는 혼탁한 수정체를 외과적으로 제거하는 것이다. 개발도상국에서는, 백내장 수술은 노인 인구들 사이에서 해당 질병이 급속히 확산되고 있기 때문에 의료비의 상당한 부분을 차지하고 있다. 또한, 외과적 수술에 대한 접근이 한정적인 개발도상국에서는 백내장과 관련하여 심각한 발병률을 나타내고 있다.

[0090] 수정체 섬유 내에 고농도의 크리스탈린 단백질은 수정체의 투명도와 굴절 특성에 기여하고 있다². 크리스탈린 superfamily)는 인간의 체내에 가장 고도로 농축된 세포내 단백질 중의 일부인 a-, b- 및 c-크리스탈린으로 이루어져 있다. 단백질 응집은 백내장 형성에 있어서 가장 중요한 요인이다³. 단백질 응집을 초래하는 요인들로는, 선천성 백내장을 유발하는 것으로 알려진 크리스탈린 단백질 중의 돌연변이, 또는 결국에는 노인성 백내장의 원인이 되는 산화적 스트레스를 포함한다. 그러나, 수정체 단백질이 투명도를 유지하거나, 또는 혼탁도를 야기하는 정확한 메커니즘에 대해서는 아직 완전하게 이해하지 못하고 있다.

[0091] 라노스테롤 합성효소(2,3-옥시도스쿠알렌-라노스테롤 사이클라아제, LSS; EC 5.4.99.7)는 LSS 유전자에 의해 암

호화된다. LSS 단백질은 콜레스테롤, 스테로이드 호르몬 및 비타민 D의 생합성에서 중요한 초기 속도 제한 단계인 (S)-2,3-옥시도스쿠알렌의 라노스테롤로의 전환 단계를 촉진한다(참고문헌 4). LSS는 수정체에서 발견되는 것으로 확인되었다⁵. LSS와 FDFT1(파르네실 이인산염 파르네실 트랜스퍼라아제 1)에 대한 기능저하 돌연변이(hypomorphic mutation)의 특정 조합이 수정체 내의 콜레스테롤 수준을 감소시켜 슈미야(Shumiya) 백내장 랫트(SCR)에서 백내장을 유발할 수 있다는 사실은 이미 보고된 바 있다⁶. 본원에서 우리는 같은 혈족인 두 가족에 있어서 LSS 유전자 내의 새로운 동형접합성 돌연변이를 확인하여 단백질 응집과 백내장 형성을 완화시키는 라노스테롤의 역할을 조사하였다.

[0092]

코가서스인 혈통의 동족 가족으로부터 중증인 선천성 백내장을 앓고 있는 3명의 아이들(도 1a)을 확인하였다. 원인이 되는 돌연변이를 확인하기 위하여, 표적 영역에 대하여 평균 55 미만의 폴드 커버리지 폭(fold depth coverage)(표 1a)로 전장 엑솜 시퀀싱을 수행하였다. 평균적으로, 60,800-80,800개의 SNP가 각 엑솜에서 검출되었다(표 1b). 동족 열성 모델, dbSNP 및 1000 게놈 프로젝트를 비롯한 공용 데이터베이스에서 통상적인 변이체(소수의 대립형질 빈도 0.5%)에 대한 필터링, 및(SIFT⁷, Polyphen2⁸, PhyloP⁹ 및 뮤테이션테스터(Mutationtaster)¹⁰에 의해 예측된) 돌연변이 기능 예측을 사용하여, 우리는 잠재적인 후보 유전자 변이체들을 좁혀나가서 가장 그럴듯한 후보자로서 21번 염색체 상의 LSS에서 변이체(G588S)를 확인하였다(표 1c). 3명의 발병한 아이들은 LSS에서 GRA 전이(G588S)에 대해 동형접합성이었던 반면(GRch37/hg19: chr21:47615645; NM_001001438.2:c.1762G.A, NM_001001438.1: p.G588S), 아직 발병되지 않은 아버지, 어머니 및 나머지 아이들은 해당 변화에 대해 이형접합성이었다(도 1a, 1b). 호모자이그서티맵퍼(HomozygosityMapper)에 의해 전장 게놈 SNP 유전자형 분석으로 이 가족에서 3개의 길게 연속된 동형접합성 영역을 확인하였다¹¹(chr2:q22.1-q24.1, chr2:q31.1-q32.1 및 chr21:q22.3; 도 6a 및 표 1d). LSS 유전자는 21번 염색체 상의 동형접합성 영역들 한 곳에 위치하고 있었다(도 6b). 또한, 우리는 같은 혈족인 제2의 가족에 있어서, 선천성 백내장이 있는 154명의 가족들에서 LSS 유전자의 돌연변이에 대하여 스크리닝하여 또 다른 동형접합성 돌연변이인 W581R(GRch37/hg19: chr21:47615666; NM_001001438.2:c.1741T.C, NM_001001438.1: p.W581R)을 확인하였다(도 1a, 1b, 1c). 이들 두 돌연변이는 11,000개의 대조군 염색체 내에는 존재하지 않았다.

[0093]

LSS에서의 아미노산 잔기 W581과 G588은 고도로 보존되어 있다(도 2a). 우리는 컴퓨터를 사용한 모델링 분석을 수행하여 LSS의 3D 구조와 기능에 대한 W581R 및 G588S 돌연변이의 영향을 조사하였다. 581번 위치의 아미노산 트립토판은 사이클라아제 활성의 촉매 부위에 기여하는 것으로 보고된 바 있다¹². G588S 돌연변이는 제자리 치환(in-place replacement) 후 측쇄 정밀화에 의해 모델링하였다. S588 측쇄 정밀화는 R639와의 중요한 염가교를 형성하는 E578의 세린 측쇄와 백본 카보닐 간의 반데르 발스 충돌을 해결할 수 없었다. E579:C584 루프의 방향이 해당 돌연변이를 수용하기 위해 뒤틀릴 필요가 있었다. 돌연변이 S588의 측쇄는 인접하고 있는 루프와 충돌하였는데, 이는 해당 돌연변이가 LSS의 정상적인 효소적 구조와 기능과 공존할 수 없음을 시사하는 것이다(도 2b). 상기와 같은 가상환경에서의 결과를 뒷받침하는 것으로, 세포 감염 실험에서 야생형 LSS의 발현은 사이클라아제 활성을 나타내어 HeLa 세포의 지질 분획 내에서의 라노스테롤 생성량을 급격히 증가시켰던 반면에, W581R 또는 G588S 돌연변이 단백질 그 어느 것도 사이클라아제 활성을 나타내지 않았다(도 2c). 이와는 대조적으로, 콜레스테롤 수준은 야생형 또는 돌연변이 LSS의 발현에 의해 영향을 받지 않았는데, 이는 콜레스테롤 항상성을 위한 대안적인 경로가 존재할 수 있음을 시사하는 것이다. W581R 및 G588S 돌연변이는 야생형 LSS와 비교했을 때, LSS 단백질의 세포내 위치를 변형시키거나 응집을 야기하지 않았는데, 이는 백내장 표현형이 돌연변이 LSS 단백질 자체에 의한 광산란 입자의 형성에 기인하는 것이 아님을 시사하는 것이다(도 7). 수정체 내의 주요 구조 단백질인 크리스탈린의 응집은 다양한 유형의 백내장의 주된 원인이다³. 백내장에 걸린 수정체 내의 단백질 응집을 최소화하기 위해, 6개의 공지된 백내장을 유발하는 돌연변이 크리스탈린 단백질을 사람의 수정체 간세포, 사람의 수정체 상피세포주 B-3(HLEB-3) 또는 HeLa 세포 중에서 발현시켰다. 이들 돌연변이 크리스탈린들은 3개의 감염된 모든 세포주에서 p62 양성인 봉입체/아그레솜을 형성하였는데, 이는 응집이 돌연변이 크리스탈린의 고유의 특성임을 시사하는 것이다(도 3a 및 도 8 및 9)¹³. 야생형 LSS와 백내장을 유발하는 돌연변이 크리스탈린 단백질의 공동 발현은 세포내 크리스탈린 응집물의 수와 크기 모두를 현저하게 감소시켰던 반면에, LSS 돌연변이는 단독으로 그렇게 하지 못했다(도 3b, 3c 및 도 8 및 9). 웨스턴 블롯 분석은 αA-크리스탈린의 Y118D 돌연변이가 세포내 응집물로부터 방출되어, 야생형 LSS와 함께 보다 가용성이 되었음을 보여주었다(도 3d 및 도 9c). 또한, LSS 돌연변이와 돌연변이 크리스탈린을 공동으로 발현하는 세포의 배양 배지 중에 콜레스테롤이 아닌 라노스테롤의 첨가는 크리스탈린 응집을 성공적으로 감소시켰다(도 3c 및 도 8 및 9). 이 결과는 콜레

스테롤이 아닌 라노스테롤이, 돌연변이 크리스탈린 단백질을 응집물로부터 방출시키는 효과적인 제제일 수 있음을 나타낸 것이다.

[0094] 이 가설을 뒷받침하듯, 라노스테롤은 야생형 및 돌연변이된 크리스탈린 단백질 모두의 아그레솜 형성을 농도 의존적 방식으로 현저하게 억제시켰던 반면, 콜레스테롤은 아무런 효과도 없었다(도 3e, 3f 및 도 10). 콜레스테롤이 아닌 라노스테롤이, 세포 용해물의 가용성 분획 중의 돌연변이 크리스탈린의 양을 증가시켰다(도 3g 및 도 11a). 우리는 α A-크리스탈린의 GFP-융합된 Y118D 돌연변이를 발현하는 세포에 대한 연속된 살아있는 세포의 영상 촬영을 이용하여, 라노스테롤의 첨가는 22268 분의 반감기로 크리스탈린 응집물을 효과적으로 제거할 수 있었던 반면(도 3h), DMSO 또는 콜레스테롤의 첨가는 아그레솜 형성을 감소시키지 못했음을 보여주었다(도 11b). 살아있는 세포에 있어서 단일 입자 추적은 라노스테롤이 이미 형성된 세포내 단백질 응집물의 용해에 중요한 역할을 한다는 점을 명백하게 보여주었다.

[0095] 라노스테롤이 응집된 단백질의 용해에 직접적인 영향을 가지는지에 대해 조사하기 위해, 1M 구아니딘 염화물의 존재 하에 야생형 및 돌연변이된 크리스탈린을 가열하여 5개의 야생형 및 9개의 돌연변이 크리스탈린의 응집물을 수득하였다. 이러한 조건 하에, 티오플라빈 T(ThT) 형광의 강화, 음성 염색된 투과 전자 현미경(TEM) 하의 피브릴 구조, 및 낮은 혼탁도 수치를 통해 드러나는 바와 같이, 모든 크리스탈린 단백질들은 아밀로이드 유사 피브릴을 형성하였다(도 4 및 도 11c). 여기에서 수득된 해당 아밀로이드 유사 피브릴의 형태는 이전에 보고된 바 있는 크리스탈린 단백질의 형태와 유사하였다¹⁴. 디팔미토일 포스파디딜콜린(DPPC)에 의해 형성된 리포솜을 함유하는 PBS를 사용하여, 스테롤 화합물의 가용성을 증가시키고 세포막 내의 스테롤의 조건을 모방하였다. 음성 염색된 TEM 사진에서 피브릴 구조가 사라졌던 것과 ThT 형광 강도가 감소된 것에서 알 수 있는 바와 같이, 콜레스테롤이 아닌 라노스테롤이, 응집된 크리스탈린 단백질을 농도 의존적 방식으로 해당 아밀로이드 유사 피브릴로부터 성공적으로 재용해시켰다(도 4 및 도 11d). 예로서, 재용해된 α A-크리스탈린은 음성 염색된 TEM 사진에서 확인될 수 있었고, 대략 15 nm 크기였다(도 4a)¹⁵.

[0096] 수정체 조직 내에서 백내장 감소에 대한 라노스테롤의 영향을 평가하기 위해, 래빗의 자연 발생 백내장 수정체를 분리하여 25 mM의 라노스테롤 용액 중에서 이들을 6일간 항온 배양하고, 라노스테롤로 처리하기 전과 후의 수정체 선명도를 비교하였다. 수정체 선명도의 증가에서 입증되는 바와 같이, 강한 백내장 증증도의 감소 추세가 관찰되었다($P < 0.003$, 윌콕슨 시험, 도 5a, 5b, 표 2a 및 도 12a, 12b), 우리는 추가로 개의 생체내에서 백내장을 역전시키는 라노스테롤의 영향에 대해서도 조사하였다. 라노스테롤 처리는 백내장 증증도를 현저히 감소시켰고, 수정체 선명도를 증가시켰다($P < 0.009$, 윌콕슨 시험, 도 5c, 5d; 표 2b 및 도 12c).

[0097] LSS의 촉매적 기능에 영향을 주는 동형접합성 돌연변이는 심각한 시력 손상을 주는 광범위한 선천성 백내장을 유발한다. 백내장 예방에 있어서 라노스테롤의 중요한 역할은, 합성된 LSS 돌연변이를 품은 랫트 종족이 인간의 백내장 질병의 표현형을 그대로 되풀이 하고 있다는 관찰에 의해 뒷받침된다⁶. 이러한 견해와 일관되게, LSS 억제제(옥시도스쿠알렌 사이클라아제 억제제로도 알려짐)인 U18666A에 의한 LSS의 억제가 백내장을 유발하는 것으로 밝혀졌다¹⁶. 또한, 라노스테롤의 처리가 세포 배양물에서는 돌연변이 크리스탈린 단백질에 의해 야기된 단백질 응집을 현저하게 감소시켰던 한편, 동물 모델에서는 이미 형성된 백내장의 증증도를 감소시키고, 수정체의 선명도를 증가시켰다. 라노스테롤의 양친매성 특징으로 인해, 라노스테롤이 큰 단백질 응집물 내로 끼워들어가 해당 응집물의 소수성 코어 영역을 코팅함으로써, 효과적으로 이러한 응집물들이 다시 점진적으로 수용성이 되게 한 것이라고 생각해 볼 수 있다.

[0098] 요약하면, 라노스테롤은 수정체 단백질의 응집을 억제하고 백내장 형성을 감소시키는데 중요한 역할은 하는데, 이는 백내장의 예방과 치료를 위한 새로운 전략을 시사하는 것이다. 백내장은 실명의 주요 원인으로 매년 백만 명의 환자들이 백내장 수술을 받아 혼탁된 수정체를 제거하고 있다. 수술은 아주 성공적이라 하더라도, 그래도 아직 이는 합병증 및 사망율과 관련이 있다. 따라서, 백내장을 역전시키는 약물학적 치료가 건강 및 경제적 효과가 클 것이다. 또한, 우리의 결과들은 본원에서 입증된 것과 같은 소분자 접근법에 대한 연구를 장려함으로써, 전체적으로 노인 인구에 있어서 질병과 사망의 중요한 원인이 되는 단백질 응집성 질병들, 예컨대 신경퇴행성 질병 및 당뇨병의 치료를 위해 보다 더 광범위한 영향을 줄 수 있다.

[0099] 방법

[0100] 연구 참가자: 모든 참가자들은 표준 종합 안과 검사 및 영상 검사를 받았다. 인구 통계학적 자료, 위험 인자 및 혈액 샘플을 방문 초기에 수집하였다. 우리는 성인 2명과 어린이 4명으로 이루어진 같은 혈족인 가족을 모집하

였다. 부모는 사촌간이었고, 이들의 4명의 아이들 중 3명이 망막 변성과 백내장으로 진단을 받았다(도 1a). 우리는 추가의 154명의 선천성 백내장 가계도에서 LSS 돌연변이에 대해 스크리닝하였고, 동형접합성 W581R 돌연변이를 갖는 또 다른 가족을 확인하였다.

[0101] 엑솜 포획 및 시퀀싱: 엑솜 포획은 제조업자의 프로토콜에 따라 아질런트 슈어셀렉트 휴먼 올 엑손 키트(Agilent SureSelect Human All 엑손 Kit)(용액 중)를 사용하여 수행하였다. 요약하면, 게놈 DNA 샘플을 코바리스(Covaris)로 무작위로 단편화하여 생성된 단편들이 150-200 bp의 염기쌍 피크를 갖도록 하였고, 어댑터를 해당 단편들의 양 끝단에 결합시켰다. 어댑터가 결합된 주형들을 아젠코트(Agencourt) AMPure SPRI 비드를 사용하여 정제하였고, ~250 bp의 삽입 크기를 갖는 단편들은 제거하였다. 추출된 DNA를 풍부하게 하기 위하여 결합 매개형 PCR로 증폭하고, 정제하여 슈어셀렉트 바이오티닐화 RNA 라이브러리(BAITS)에 하이브리드화하였다. 하이브리드화 단편들이 스트렙타비딘 비드에 결합되었던 한편, 하이브리드화되지 않은 단편들은 24시간 후에 세척하여 제거하였다. 포획된 결합 매개형 PCR 산물들을 아질런트(Agilent)의 2100 생분석기에 넣어 풍부한 정도를 추산하였다. 이후, 포획된 각 라이브러리를 일루미나(Illumina)의 게놈 분석기 II 플랫폼 상에 로딩하고, 각 샘플에 대하여 50×이상의 평균 커버리지 폭을 제공하였던 90 bp의 리드(read) 길이를 사용하여 페어드-엔드(paired-end) 시퀀싱을 수행하였다. 원본 영상 파일을 일루미나의 염기 확정(base-calling) 소프트웨어를 사용하여 디폴트 파라미터로 가공 처리하였다.

[0102] 리드(Read) 맵핑 및 변이체 검출: 각 개체에 있어서 서열 리드들을 BWA¹⁷(버전 0.5.9-r16)를 사용하여 인간의 표준 게놈(NCBI build 37, hg19)에 정렬하였다. 이후, BWA에 의해 생성된 BAM 파일을 재정렬 및 변이(SNV 및 indel) 검출을 위한 게놈 분석 툴킷(버전 GATK 2.8)를 사용하는 GATK¹⁸ 최적의 방법 루트를 이용하여 가공 처리하였다. VQSR 필터링 기준을 통과한 변이체들은 차후 분석을 위해 추출하였다.

[0103] 표적 영역에서의 컨센서스 유전자형은 권고된 파라미터를 이용한 SOAPsnp(v1.03) 및 BWA(버전 0.5.9-r16)에 의해 확정되었다. 20 이상의 프레드(Phred)와 같은 품질 및 4×이상의 커버리지 폭을 갖는 컨센서스 유전자형을 높은 신뢰성을 갖는 유전자형으로 간주하였다. 표준형과 상이한 유전자형들을 후보 SNP로서 추출하였고, SNP 결과들을 하기와 같이 필터링하였다: >20의 프레드와 같은 SNP 품질, 4× 내지 200×의 전체 폭, <2의 복제수 추산치 및 5 bp 미만의 인접한 두 SNP 간의 거리.

[0104] 유전자 변이체의 기능에 대한 분석(annotation, 주석 달기). ANNOVAR를 사용해 변이체들의 기능에 대하여 분석하여 미스센스, 넌센스, 리드-쓰루(read-through) 및 스플라이스 부위(splice-site) 돌연변이의 범주로 나누었는데, 이들은 유사 및 비암호화 돌연변이에 비하여 해로울 개연성이 있다. 이러한 분석에 기초하여, 변이체들을 먼저 스플라이스 수용체 부위 및 공여체 부위에 대하여 필터링한 후, 이용가능한 공용 데이터베이스(dbSNP129 및 1000 게놈 변이체 데이터베이스)에 대해서 필터링하였다. 3명의 발병된 대상자에서는 동형접합성 돌연변이로, 보인자(부모)에서는 이형접합성 돌연변이로 판명되었으나, 공용 데이터베이스에는 존재하지 않는 변이체들은 원인 변이체의 후보자로 간주하였다.

[0105] LSS 및 유전자의 돌연변이 스크리닝: 생어(Sanger) DNA 시퀀싱을 수행하여 LSS 내의 G588S 돌연변이를 확인하였다. LSS 유전자의 22개의 엑손을 PCR로 증폭하고, 유전자 분석기 3130(어플라이드 바이오시스템즈) 상에서 시퀀싱하였다. LSS 내의 엑손을 증폭하는데 사용된 프라이머를 표 3A에 나타내었다. 우리는 같은 혈족인 제2의 가족에 있어서, 선천성 백내장이 있는 154명의 가족들에서 LSS 유전자 내의 돌연변이에 대하여 스크리닝하여 또 다른 동형접합성 돌연변이인 W581R을 확인하였다. 이들 두 돌연변이는 병에 걸리지 않은 샌디에고의 대조군 집단의 2,000개의 염색체와 1,000개의 게놈 프로젝트, 및 워싱턴 대학의 엑솜 시퀀싱 데이터베이스의 8,000개의 염색체를 포함하는 11,000개의 대조군 염색체 내에는 존재하지 않았다. FDFT1 돌연변이가 백내장 표현형을 변형시켰다는 이전의 보고가 있었기 때문에, 우리는 FDFT1 유전자 내의 변이체를 스크리닝하여, 단 하나의 흔한 비유사 변이체인 rs4731(GRCh37/hg19: chr8:11666337; NM_001287742.1: c.134A.G,NM_001274671.1:p.K45R)을 확인하였다. 이 변이체는 원인 돌연변이로서 배제시켰는데, 이는 병에 걸리지 않은 딸이 이와 동일한 동형접합성 변화를 보유하고 있었고, 일반 대중들 중에서도 상대적으로 높은 빈도로 이 변이체를 보유하고 있기 때문이었다(1,000개의 게놈 프로젝트 데이터 중에 소수의 대립형질 빈도 4%)(표 1E).

[0106] G588S 돌연변이의 3D 모델링: 러프(Ruf) 등¹⁹에 의해 결정된 두 구조로부터 G588S 돌연변이의 모델을 구축하고, 항목 1W6K 및 1W6J¹²로서 단백질 데이터뱅크에 기탁하였다. X선 좌표를 사용하여 해당 효소의 전체적인 원자 모델을 구축하고, 이를 내부 좌표 역학(Internal Coordinate Mechanics, ICM) 프로그램 및 이의 PDB 전환 프로토

콜을 사용하여 정밀화하였다²¹. 라노스테롤 결합에 대한 G588S-돌연변이로 유발된 충돌의 영향을 분석하기 위하여, 우리는 1W6K 구조를 사용하여 라노스테롤과 상호작용하는 효소의 주머니에 관여하는 모든 측쇄들을 분석하였다. 접촉 면적은 라노스테롤을 사용한 것과 사용하지 않은 각 잔기의 용매 접근 가능 면적의 차이로서 산출하였고, ICM 프로그램을 사용하여 크기별로 분류하였다.²²

[0107] 플라스미드 작제물 및 부위 특이적 돌연변이 유도: LSS cDNA를 함유하는 클론을 써모 사이언티픽 인코포레이티드사(Thermo Scientific Inc.)로부터 구매하였다. 야생형 LSS의 암호화 서열을 클로닝하여 pcDNA3.1-N-Flag 플라스미드(인비트로젠) 내에 삽입하였다. 해당 돌연변이를 PCR을 이용한 증첩 신장에 의한 부위 특이적 돌연변이 유도를 통해 작제하였다. 공통 PCR 프라이머는 아래와 같았다: NdeI 정방향, 59-CATATGACGG AGGGCACGTGTCT-39 및 XhoI 역방향, 59-CTCAGTCAGGGGTGGCCA GCAAG-39. W581R 및 G588S 돌연변이를 작제하기 위한 프라이머는 아래와 같았다: W581R 정방향, 59-TGGGAAGGCTCCCGGGGAGTTTGCT-39; 역방향, 59-GTGAAGCAAACCTCCCGGGAGCCTTC-39; G588S 정방향, 59-GCTTCACCTACAGCACCTGGTTTG-39; G588S 역방향, 59-CCAAACCAGGTGCTGTAGGTGAAG-39. 야생형 또는 돌연변이된 LSS 유전자를 함유하고 있는 재조합 pcDNA3.1-N-Flag 플라스미드를 E. 콜라이 DH5a 세포 내로 형질 전환시켰다. aA-, aB-, bB2-, cC- 및 cD-크리스탈린의 cDNA를 이전에 기술되었던 바와 같이 사람의 수정체의 총 cDNA로부터 클로닝하였다²³⁻²⁶. 해당 돌연변이들을 표 3B에 열거된 프라이머를 이용하여 부위 특이적 돌연변이 유도에 의해 작제하였다. 증폭된 단편들을 XhoI 및 BamHI에 의해 절단시킨 후, 진핵성 발현 벡터인 peGFP-N1 또는 원핵성 발현 벡터 pET28a 내로 삽입하였다. 플라스미드 맥시프렙(Maxiprep) 키트(강하게 흔들어주는 조건)를 사용하여 플라스미드를 수득하고 DNA 시퀀싱으로 확인하였다. 크리스탈린 유전자 작제물은 C-말단 eGFP 융합 단백질로 제조하였던 반면, LSS는 N-말단 Flag-태그된 단백질로 제조하였다.

[0108] 세포 배양 및 감염: HeLa 세포 및 사람의 수정체 상피 B-3 세포(HLEB-3)를 ATCC로부터 수득하였다. 사람의 수정체 간세포를 사람 태아의 눈으로부터 분리하였다²⁷. HeLa 세포를 10% FBS(김코)를 함유하는 DMEM 배지 중에서 배양하였다. HLEB-3 세포를 20% FBS를 함유하는 F12 배지 중에서 배양했던 반면, 사람의 수정체 간세포는 20% FBS 및 10 mg/ml의 FGF(김코)를 함유하는 MEM 배지 중에서 배양하였다. 모든 세포들은 37°C, 5% CO₂의 항온 배양기 중에서 배양하였다. 세포들은 마이코플라스마 오염에 대해 의뢰 음성 반응을 나타내었다.

[0109] 스테롤 함량에 따른 LSS 발현의 영향을 평가하기 위해, 암호화 영역의 N-말단에 Flag 태그와 융합된 야생형 LSS 또는 LSS 돌연변이로 HeLa 세포를 감염시켰다. 감염시키고 24시간 후에 세포를 수확하고, LC-MS 분석을 위해 지질 분획을 추출하였다. 벡터 pcDNA3.1-N-Flag 플라스미드로 감염된 세포들을 대조군으로 사용하였다. 야생형 및 돌연변이 LSS의 발현 수준을 마우스 항-Flag(F1804; 시그마-알드리치) 및 마우스 항-액틴 항체(BS6007M ; 바이오월드 테크놀로지)를 사용하는 웨스턴 블롯 분석에 의해 정규화하였다.

[0110] 크리스탈린 응집에 대한 라노스테롤의 영향을 평가하기 위해, 사람의 수정체 간세포를 LSS 및 여러 가지 크리스탈린 작제물로 4시간 동안 공동 감염시켰다. 크리스탈린 돌연변이 및 pcDNA3.1-N-Flag로 공동 감염된 세포를 대조군으로 사용하였다. LSS 및 크리스탈린 돌연변이 작제물로 공동 감염된 사람의 수정체 간세포를 응집에 대하여 분석하기 전에 12시간 동안 배양하였다. 16시간 후, 40 mM의 스테롤(라노스테롤 또는 콜레스테롤, 시그마-알드리치)을 2시간 동안 세포 배양 배지에 첨가하여 구조 실험을 수행하였고, 이후, 상기 배지를 신선한 배양 배지로 대체하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. 크리스탈린 응집물을 갖는 세포의 백분율을 10개의 무작위로 선택된 시계로부터 산출하였다. 야생형 LSS 그룹, 돌연변이 그룹, 또는 돌연변이 + 라노스테롤 그룹의 값을 산출하였다. 1%의 DMSO로 처리된 세포를 대조군으로 사용하였다.

[0111] 세포내 크리스탈린 응집에 대한 LSS와 라노스테롤의 효과를 단순 맹검 관찰자 연구에서 평가하였다. 실험은 3회 이상 반복하였다. P 값을 스튜던트 t-검정을 사용하여 계산하였다. 형광 현미경. 동량의 사람의 수정체 간세포, HLEB-3 세포 또는 HeLa 세포를 TC(솔라바이오)로 미리 처리한 유리 커버슬립 상에 시딩하였다. 90%의 포화도에 도달할 때까지 24시간 동안 배양시킨 후, 세포를 여러 가지 LSS 또는 크리스탈린 유전자를 함유하는 플라스미드로 감염시키거나, 또는 특정 크리스탈린 유전자를 함유하는 플라스미드 및 야생형 또는 돌연변이된 LSS 유전자를 함유하는 플라스미드로 공동 감염시켰다. 대조군은 peGFP-N1 및/또는 pcDNA3.1-N-Flag를 함유하고 있는 플라스미드로 감염된 세포로 하였다. 감염과 공동 감염 모두 제조업자의 사용설명서에 따라 리포펙타민 3000(인비트로젠)을 사용하여 수행하였다.

[0112] 여러 가지 백내장을 유발하는 크리스탈린 돌연변이의 세포내 응집에 대한 야생형 또는 돌연변이된 LSS의 영향을 사람의 수정체 간세포, HLEB-3 세포 또는 HeLa 세포에서의 Flag-LSS 및 크리스탈린-GFP의 공동 발현에 의해 평가하였다. 단백질의 세포내 분포를 GFP 또는 Flag에 대한 항체를 사용하여 시각화하였다. 4시간 동안의 공동 감

염 후, 세포를 신선한 배지에서 24시간 동안 배양한 후 현미경으로 분석하였다.

- [0113] 여러 가지 크리스탈린 유전자를 함유하고 있는 플라스미드를 사용하여 세포를 감염시켜, 여러 가지 크리스탈린의 아르레슘 형성에 대한 라노스테롤 또는 콜레스테롤의 효과를 연구하였다. 세포를 24시간 동안 배양시켜 효율적인 단백질 발현 및 아르레슘 형성이 이루어지도록 하였다. 이후, 세포를 1%(사람의 수정체 간세포용) 또는 2%(HeLa 세포용)의 DMSO 중의 0-40 mM의 스테롤로 처리하였다. 1% 또는 2%의 DMSO로 처리된 세포들을 대조군으로 사용하였다. 2시간 동안의 처리 후, 배지를 신선한 배지로 대체하였다. 12시간 후, 현미경 분석을 위해 세포를 사용하였다.
- [0114] 인산염 완충 생리식염수(PBS)를 사용하여 슬립을 3회 세척하여 현미경 샘플을 준비하였다. 세포를 4%의 파라포름알데히드로 40분간 고정시킨 후 PBS로 3회 더 세척하였다. 세포를 PBS 중의 0.1%의 트리톤 X-100(시그마)을 사용하여 10분간 투과시키고, 37℃에서 1시간 동안 PBS 중의 5%의 정상 염소 혈청을 사용하여 차폐시켰다. 5%의 정상 염소 혈청을 함유하는 PBS 버퍼 중에 마우스 항-Flag 항체(1:500) 또는 마우스 항-p62 항체(1:200, ab56416; 에이비캠)를 첨가하여 면역염색을 수행하고, 37℃에서 1시간 동안 항온 배양하였다. 이후, 슬립을 PBS로 3회 세척하고, 알렉사(Alexa) 649-콘쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG(1:250)를 사용하여 주위 온도에서 1시간 동안 추가로 항온 배양하였다. Hoechst 33342(인비트로젠)를 사용하여 핵을 대비 염색하였다. 장착 고정시킨 세포를 칼 자이스 LSM 710 공초점 현미경을 사용하여 분석하였다.
- [0115] 살아있는 세포의 영상 촬영: αA-크리스탈린(Y118D) 돌연변이를 함유하는 플라스미드를 사용하여 사람의 수정체 간세포를 감염시켰다. 24시간 동안의 감염 시간 후, αA-크리스탈린(Y118D) 돌연변이의 안정한 발현을 보이는 세포를 0.8 mg/ml의 G418을 함유하는 배양 배지 중에서 7일간 항온 배양하여 스크리닝하였다. 이후, 수득된 세포들을 유리 바닥(glass bottom) 세포 배양 접시(인비트로 사이언티픽) 상에 씨앗하고, 1% DMSO, 1% DMSO 중의 40mM의 콜레스테롤, 또는 1% DMSO 중의 40 mM의 라노스테롤로 4시간 동안 처리하였다. 신선한 배양 배지를 첨가하고, 연속된 살아있는 세포의 영상으로 세포를 분석하였다. 살아있는 세포의 영상은 올림푸스 IX81 현미경을 통해 관찰하였고, 셀센스 디멘전(CellSens Dimension) 소프트웨어(올림푸스)를 사용하여 캡처하였다. 살아있는 세포 영상 촬영에서 단일 입자 추적을 이용하여 p62 양성인 응집물의 형광 강도를 측정함으로써 해당 응집물의 크기에 대한 정량 분석을 수행하였다. 살아있는 세포 영상 촬영은 3개의 생물학적 복제물을 이용하여 수행하였고, 각각 1-8번 반복하였다.
- [0116] 세포의 지질 추출: 지질의 추출은 블라이(Bligh)와 다이어(Dyer) 방법을 사용하여 수행하였다.²⁸ 요약하면, $\sim 1 \times 10^6$ - 10^7 개의 HeLa 세포를 PBS로 3-5회 세척한 후, 400 ml의 아주 찬 메탄올 중에서 스크래핑하여 200 ml의 클로로포름을 첨가하면서 1.5 ml의 에펜도르프 시험관으로 옮겼다. 샘플을 1분간 볼텍스 교반 후, 300 ml의 1M KCl과 혼합하였다. 유기 및 수성 상을 4℃에서 5분간 20,817×g에서의 미세 원심분리에 의해 분리하였다. 분리 후, 하부의 유기상을 수집하였다. 이후, 잔류 수성상을 300 ml의 클로로포름을 사용하여 2회 재추출하였다. 해당 수집된 유기상을 진공 하에 SpeedVac 샘플 농축기를 사용하여 건조시켰다. 건조된 샘플은 추가의 LC-MS 분석을 위해 280℃로 저장하였다.
- [0117] LC-MS 분석: 건조된 지질 추출물을 100 ml의 메탄올 중에 재현탁시켰다. 샘플을 10분간 볼텍스 교반하고, 80 W의 초음파로 30분간 분해 처리하여, 20,817×g로 10분간 미세 원심분리한 후, 상청액을 새 에펜도르프 시험관에 옮겼다. 미세 원심분리 처리는 3회 반복하였다. 유도된 샘플을 대기압 화학적 이온화(APCI) 공급원을 사용하는 아질런트 1290/6460 트리플 사중극자 LC/MS로 분석하였다. 지질은 아질런트 SB-C18 컬럼을 이용하여 분리하였다. 전자 이온화 모드를 사용하여 선택적 이온 모니터링을 수행하였다. 고순도의 라노스테롤과 콜레스테롤을 대조군으로 사용하였다. MS 측정은 350℃의 기체 온도, 41 min⁻¹의 기체 유속, 60 p.s.i.의 분무기, 350℃의 증발기, 3,500 V의 모세관 및 4 mA의 코로나 전류를 사용하여 수행하였다. 감도와 특이성을 최적화하기 위하여, 각 화합물의 MS 분석에 대해 2개의 검증 이온을 선택하였다(콜레스테롤을 위한 369.3/161.1과 369.3/147, 및 라노스테롤을 위한 409.2/191.3과 409.2/109). 웨스턴 블롯팅. 세포 용해물을 50 mM의 트리스(pH 8.0), 150 mM의 NaCl, 1%의 트리톤 X-100, 1 mM의 EDTA, 0.5%의 디옥시콜산나트륨 및 0.1%의 SDS를 함유하는 RIPA 버퍼 중에 준비하여 두었다. 상청액과 침전 분획물을 원심분리로 분리하였다. 단백질을 12.5%의 SDS-PAGE로 분리하여 PVDF 막(GE 헬스케어)으로 옮겼다. Flag(F1804; 시그마-알드리치) 또는 GFP(MB2005; 바이오월드 테크놀로지)에 대한 마우스 항체를 사용하여 과발현된 LSS와 크리스탈린 단백질을 각각 확인하였다. GELPRO(미디어 사이버네틱스, Media Cybernetics) 소프트웨어를 사용하여 웨스턴 블롯 밴드의 정량을 달성하였다. 제시된 정량적 데이터는 3개의 독립된 실험으로부터 계산하였다.

- [0118] 단백질 발현 및 정제: 재조합 His-태그된, 야생형 및 돌연변이 b- 및 c-크리스탈린 단백질을 에세리키아 콜라이 중에서 과발현시키고, Ni-NTA 친화성 컬럼을 사용한 후 다른 곳에서 기술된 것과 동일한 프로토콜을 사용하는 겔 투과 크로마토그래피에 의해 정제하였다^{23,24,26,29}. 태그되지 않은 αA- 및 αB-크리스탈린의 과발현과 정제는 이전에 기술되었던 바와 같이 수행하였다³⁰. 해당 단백질의 순도는, 12.5%의 SDS-PAGE, 10%의 네이티브-PAGE 상에서 하나의 단일 밴드 및 크기 배제 크로마토그래피 프로파일에서의 단일 피크로 평가된 바와 같이, 95% 초과인 것으로 추산된다. BSA를 표준으로 사용하는 브래드포드 방법(Bradford method)에 따라 단백질 농도를 측정하였다³¹. 모든 단백질 샘플들은 150 mM의 NaCl, 1 mM의 EDTA 및 1 mM의 DTT를 함유하는 20 mM의 PBS 버퍼 중에 준비하여 두었다.
- [0119] 단백질 응집 및 응집 용해: 5 mg/ml의 농도로 1M 구아니딘 염화물(초고순도, 시그마-알드리치)을 함유하는 단백질 용액을 60℃에서 2시간 동안 가열하여, 야생형 및 돌연변이 αA- 및 αB-크리스탈린 단백질의 응집물을 수득하였다. 야생형 및 돌연변이 b- 및 c-크리스탈린의 응집물은 1M 구아니딘 염화물을 함유하는 단백질 용액을 37℃에서 48시간 동안 가열하여 제조하였다. 응집물의 형성은 ThT 형광, 혼탁도(400 nm에서 흡광도) 및 투과 전자 현미경(TEM) 관찰에 의해 확인하였다. 이미 형성된 응집물을 0.2 mg/ml(약 10 mM)의 최종 농도로 20 mM의 PBS 중에 재현탁시켰다. 상기 재현탁된 응집물을 37℃에서 500 mM DPPC(시그마-알드리치)에 의해 형성된 리포솜 중의 500 mM의 라노스테롤 또는 콜레스테롤로 처리하였다. 500 mM의 DPPC 리포솜으로 처리된 응집물을 음성 대조군으로 사용하였다. 처리하고 24시간 후, 해당 단백질 용액을 ThT 형광, 혼탁도 및 음성 염색된 TEM 관찰을 위해 사용하였다. TEM 샘플은 새로운 글로우 방전된 카본 코팅 구리 격자 상에 단백질 용액을 증착시켜 제조하였다. 1.25%의 아세트산우라닐로 상기 격자를 30초간 염색하여 음성 염색 샘플을 수득하였다. 상기 음성 염색된 TEM 사진은 120 kV의 전압 및 48,000배의 배율을 갖는 히타치 H-7650B 투과 전자 현미경 상에서 수득하였다.
- [0120] 백내장에 걸린 래빗의 수정체의 치료: 래빗을 CO₂ 흡입으로 안락사시키고, 수정체를 즉시 해부하여 비히클 또는 비히클 중에 용해된 라노스테롤로 처리하여 25 mM의 용액을 제조하였다. 수정체 조직을 실온의 암실에서 이 용액 중에 6일간 항온 배양시켰다. 백내장을 현미경으로 검사하여 사진 촬영하였다. 백내장의 정도를 이전에 기술된 바 있는 하기에 나타난 혼탁도 등급 체계^{32,33}를 사용하여 눈을 가린 검사관에 의해 평가하였다. 수정체의 선명도와 투명도에 있어서의 개선을 시각적 검사와 등급화로 정량화하였다. 수정체의 선명도는 빛의 투과, 수정체 아래의 격자 이미지의 선명도(도 12), 및 수정체의 전반적인 선명도에 있어서의 개선 또는 퍼질 백내장의 편재화 영역의 선명도에 있어서의 개선에 의해 점수화하였다. 윌콕슨 시험을 사용하여 치료 효과를 평가하였다.
- [0121] 백내장 등급 체계: 등급 0: 혼탁도 없음(격자선이 분명하게 보임); N 등급 1: 혼탁도가 아주 조금 있음(격자선이 아주 조금은 흐리지만, 여전히 격자선이 보이기는 함); N 등급 2: 거의 수정체 전체에 걸쳐 혼탁도가 퍼져 있음(격자선이 중간 정도로 혼탁하여, 주된 격자선 정도만 보임); N 등급 3: 수정체 전체에 걸쳐 광범위하게 진한 혼탁도가 퍼져 있음(격자선이 모두 흐릿하고, 전혀 격자선이 보이지 않음)
- [0122] 약물 로딩된 나노입자의 제조: 라노스테롤을 개조된 나노침전법³⁴을 통해 지질 중합체 하이브리드 나노입자로 로딩하였다. 요약하면, 원하는 농도의 라노스테롤을 아세트오니트릴 중에 용해된 폴리카프로락톤(PCL) 중합체와 혼합하였다. 레시틴과 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-카복시(폴리에틸렌 글리콜) 2000(DSPE-PEG-COOH)을 PCL 중합체 중량의 20%로 4%의 에탄올 수용액 중에 용해시키고 60℃ 이상으로 가열하였다. 이후, 라노스테롤/PCL 용액을 천천히 교반한 후 3분간의 격한 볼텍싱 하에 미리 가열한 지질 용액 내에 첨가하였다. 이후, 혼합물 용액을 2시간 동안 교반하여 나노입자들을 형성시키고 아세트오니트릴이 증발되도록 하였다. 다음으로, 나노입자 용액을 10 kDa의 분자량 컷오프를 갖는 아미콘 울트라-4(Amicon Ultra-4) 원심 여과기(밀리포어)를 사용해 3회 세척하여 남아있는 유기 용매와 유리 분자들을 제거하였다. 이후, 생성된 나노입자를 차후에 사용하기 위해 PBS 버퍼 중에 재현탁시켰다. 약물이 로딩된 나노입자의 크기, 크기 분포 및 표면 제타 전위(surface zeta potential)를 동적 광산란법으로 특성화하였다. 라노스테롤의 로딩량을 고성능 액체 크로마토그래피로 정량하였다.
- [0123] 백내장에 걸린 개의 수정체 치료: 살아있는 동물에서 백내장에 대한 라노스테롤 치료의 효과를 평가하기 위해, 개에게 아세프로마진과 부토르판올을 근육내 주사하여 미리 약물을 투여하였다. 20분 후, 정맥내 프로포폴을 주입하여 마취 유도를 수행하였다. 이후, 개에게 즉시 삽관하고 산소 및 2% 이소푸루란을 분당 21로 유지하였다. 라노스테롤(100mg)이 로딩된 나노입자를 처음에는 28-게이지 바늘을 사용하여 시험 눈 내의 유리체 공동으로 주사한 후, 실험 기간 동안 매 3일 간격으로 투여하였다. 치료군 눈 또는 삼(sham) 눈은 무작위로 하였다. 대조군

눈은 음성 대조군으로서 빈 나노입자 담체로 주사하였다. 치료군 눈은 국소 점안액 중의 라노스테롤로 처리하였다(하기에 점안액 제형에 대해 참조). 50 ml의 한 방울의 라노스테롤을 6주간에 걸쳐서 시험 눈에 매일 3회 투여하였다. 세극등으로 백내장 중증도를 검사하여 6주간의 치료 기간의 시작과 종료 시점에 사진을 촬영하였다. 검사를 하기 전에, 1%의 트로픽아미드와 10%의 페닐레프린으로 동공을 확장시켰다. 백내장 중증도를 눈을 가린 검사관이 평가하여 하기 나타난 개의 백내장 단계를 기준으로 점수화하였다³⁵. 수정체의 선명도와 투명도에 있어서의 개선도 정량화하였다. 윌콕슨 시험을 사용하여 치료 효과를 평가하였다.

[0124] 개 백내장의 등급 체계: 등급 0: 혼탁도 없음(백내장 없음); N 등급 1: 혼탁도가 아주 조금 있음(초기 단계); N 등급 2: 거의 수정체 전체에 걸쳐 혼탁도가 퍼져 있음(발달 단계); N 등급 3: 수정체 전체에 걸쳐 광범위하게 진한 혼탁도가 퍼져 있음(성숙 단계). 국소 비히클 용액. 0.055 g의 염화알킬디메틸벤질암모늄과 혼합된 1.1 g의 (EDTA)₂Na에 재증류한 H₂O를 최종 부피 1.1 L(pH 5.66)가 될 때까지 첨가하였다. 국소 비히클 용액 중의 25 mM의 라노스테롤. 12.5 g의 라노스테롤, 1.1 g의 (EDTA)₂Na, 0.055 g의 염화알킬디메틸벤질암모늄 및 200 ml의 EtOH의 혼합물에 재증류한 H₂O를 첨가하여 최종 부피 1.1 L이 되도록 하였다.

[0125] 한 실시양태에서, 라노스테롤 점안액의 제제는 하기와 같다:

[0126] 처방

[0127] 비히클만 포함된 용액:

[0128] 하이드록시프로필-β-사이클로텍스트린 165 g

[0129] 폴리소르베이트 80 1 g

[0130] EDTA₂Na 1.1 g

[0131] 염화알킬디메틸벤질암모늄 0.055 g

[0132] EtOH 200 ml

[0133] 이어서, 최종 부피가 1.1L(PH 5.66)가 될 때까지 ddH₂O가 첨가됨.

[0134] 비히클 용액 중의 5mM의 라노스테롤:

[0135] 라노스테롤 2.5 g

[0136] 하이드록시프로필-β-사이클로텍스트린 165 g

[0137] 폴리소르베이트 80 1 g

[0138] EDTA₂Na 1.1 g

[0139] 염화알킬디메틸벤질암모늄 0.055 g

[0140] EtOH 200 ml

[0141] 이어서, 최종 부피가 1.1L(PH 5.66)가 될 때까지 ddH₂O가 첨가됨.

표 1: 엑솜 시퀀싱 및 변이체

표 1a. 엑솜 시퀀싱 데이터 생성의 요약						
샘플	총 유효 수율 (Mb)	평균 시퀀싱 폭	미스매치 비율	표적 영역의 커버리지	커버된 표적의 비율 >= 4x	커버된 표적의 비율 >= 10x
IV-1	3,409.20	60.16	0.20%	99.60%	99.10%	97.60%
IV-2	3,314.58	58.62	0.20%	99.60%	99.20%	97.80%
IV-3	3,327.63	57.24	0.20%	99.80%	99.20%	97.40%
III-2	3,029.40	51.89	0.21%	99.80%	99.30%	97.70%
III-1	6,877.08	54.24	0.29%	96.30%	89.40%	81.80%
IV-4	6,331.78	44.12	0.29%	96.50%	88.80%	79.80%

표 1b. 검출된 변이체의 요약										
샘플	총계	이형접합체	동형접합체	미스센스	넌센스	리드쓰루	유사	스플라이싱	유전자간	인트론
IV-1	61,189	35,571	25,618	6,105	69	39	7,296	32	5,371	36,598
IV-2	60,829	34,698	26,131	6,074	62	41	7,211	38	5,178	36,572
IV-3	61,078	35,238	25,840	6,221	78	43	7,265	38	5,099	36,544
III-2	62,753	39,001	23,752	6,393	64	38	7,588	34	5,764	36,924
III-1	80,067	49,694	30,373	7,247	93	49	8,166	47	15,063	41,391
IV-4	80,893	48,211	32,682	7,252	85	50	8,184	50	14,547	42,414

표 1c. 엑솜 시퀀싱 후 변이체의 우선순위 결정 파이프라인							
필터	III-1 (보인자 부)	III-2 (보인자 모)	IV-1 (이환자 딸)	IV-2 (이환자 아들)	IV-3 (이환자 아들)	IV-4 (비이환자 딸)	조합
총 변이체 수	80,067	62,753	61,189	60,829	61,078	80,893	-
미스센스, 넌센스, 스플라이싱	7,389	6,495	6,213	6,177	6,342	7,387	-
이환자: 1/1; 보인자: 0/1; 비이환자: 0/1 또는 0/0 *	5,792	4,661	3,127	3,123	3,085	5,638	9
dbSNP 중에 없음	3,724	2,969	1,954	1,929	1,928	3,589	5
1000 개놈 프로젝트 중에 없음	1,032	767	227	264	245	1,059	1
예측된 손상	267	269	31	45	41	264	1

*이환자 어린이에는 동형접합성 돌연변이가 있고, 보인자에는 이형접합성 돌연변이가 있고, 비이환자 어린이에는 동형접합성 돌연변이가 없음.

표 1d. 전장 게놈 유전자형 분석 데이터 요약			
샘플	총 유전자자리	포획	SNP
IV-1	4,641,218	4,440,318	559,832
IV-2	4,641,218	4,446,992	605,499
IV-3	4,641,218	4,445,267	526,794
III-2	4,641,218	4,448,054	537,925
III-1	4,641,218	4,446,581	574,880
IV-4	4,641,218	4,450,657	584,347

표 1e. 유전자 FDFT1에 대해 검출된 코딩 변이체										
위치 (GRch37/hg19)	refSNP	REF	ALT	가능	III-1 (보인자 부)	III-2 (보인자 모)	IV-1 (이환자 딸)	IV-2 (이환자 아들)	IV-3 (이환자 아들)	IV-4 (비이환자 딸)
chr8:11666337	rs4731	A	G	비유사	A/G	A/G	G/G	A/G	G/G	G/G
chr8:11683653	rs904011	T	C	유사	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C

[0142]

표 2. 래빗 백내장 수정체 및 도그 백내장에서의 라노스테롤의 치료 효과

표 2a. 래빗 백내장 수정체에서의 라노스테롤의 치료 효과

샘플 번호	치료 전	치료 후
1	3	1
2	2	0
3	2	1
4	2	0
5	3	1
6	2	1
7	2	1
8	2	0
9	1	1
10	1	0
11	2	1
12	1	1
13	2	1

표 2b. 도그 백내장에서의 라노스테롤의 치료 효과

연구 안구	치료군		대조군	
	전	후	전	후
1	2	1	1	1
2	1	0	2	2
3	2	1	1	1
4	3	1		
5	1	0		
6	2	0		
7	2	1		

[0143]

표 3. 인간 LSS 유전자 내의 각 엑손의 시퀀싱 및 크리스탈린 돌연변이의 작제에 사용된 프라이머

표 3a. 인간 LSS 유전자 내의 각 엑손의 PCR 증폭 및 시퀀싱에 사용된 프라이머

샘플리온	서열 (5'-3')
LSS-엑손 1-F	GCCTGAGCGCCTGCCGAGGCCT
LSS-엑손 1-R	GACACCTGAGGACCAACCGGCAT
LSS-엑손 2-F	GTGGTCTCTAGGTGCTGAGGAGA
LSS-엑손 2-R	CGTGCTCCTCAGGCTCACCCT
LSS-엑손 3-F	CTTGGGCTGTATGTGAAGAGGGT
LSS-엑손 3-R	CCTAGACCAGGCTGGGCCAGGAT
LSS-엑손 4-F	GTTGGAGTGAGGTGCTCAGGAGGA
LSS-엑손 4-R	GCAAGCTGCTGGAAACCAAGCAT
LSS-엑손 5-F	GCATTCTTAGTTTTCTGAGGAACTC
LSS-엑손 5-R	CCACTGTTTCAGCTGCAAGTGCT
LSS-엑손 6-F	CAGAGGGTGAAGCTTCCAGCT
LSS-엑손 6-R	GCTGTACAGCCTGCACCTGAC
LSS-엑손 7-F	GAAAGGGCCCAAGGTATGGATGCT
LSS-엑손 7-R	GTGAGTGGACAGGTGTGGTTAGAT
LSS-엑손 8-F	GAGCCAGGCCTACCAAGTGCT
LSS-엑손 8-R	GCAGGGATGAGTGCTGAAT
LSS-엑손 9-F	GCAGTGCTATGGAGTCCAGGCT
LSS-엑손 9-R	CCAGGAAACCCCACTCCAGCT
LSS-엑손 10-F	GTGGATCTGGACGAGACCTTGT
LSS-엑손 10-R	CACTGGGATGCACTGGGGCT
LSS-엑손 11-F	GTGCAGGGTCTGGGTAGCAGCT
LSS-엑손 11-R	GACATGATTGCAAGGAAGCAT
LSS-엑손 12-F	CTGGAGGCAGTGGCTGGGAGT
LSS-엑손 12-R	GCAAGTGTGTGGCCAGCAGTCT
LSS-엑손 13-F	GGCAGGATGTGGCCAGGACAT
LSS-엑손 13-R	GCACCTTCTGCTGCAGGAGCT
LSS-엑손 14-F	CCAGTCTGTCTCAGCGATGT
LSS-엑손 14-R	CCAAAAACGCCAAGGGAGGAT
LSS-엑손 15-F	CTGGCTGCACCCACACCTTTGGT
LSS-엑손 15-R	GCTCATCTGCAGGACACAGGT
LSS-엑손 16-F	GTTGTACAGCCCTAGTGTTCCT
LSS-엑손 16-R	CAGGTTTGTGTACACAGTGCT
LSS-엑손 17-F	GAGCTGCAGAGCTGGGCAGCCA
LSS-엑손 17-R	CCGTGTACAGAATGATCGT
LSS-엑손 18-F	GAATTGGGATAGGTAACCTGCT
LSS-엑손 18-R	CGCAGTGTGTGAGAGCAGAAACCT
LSS-엑손 19-F	CTTAATGCTGAGGCACTGGAGT
LSS-엑손 19-R	CACTCATGACAGAGCAATTGGGT
LSS-엑손 20-F	CAAGGCAGCCTGCTGGGGTGA
LSS-엑손 20-R	CACCGGCTCACAGCTGAGTGT
LSS-엑손 21-F	CTCACTGCAGCATTCCAGGGTT
LSS-엑손 21-R	GTGGAACAGCCATGCACGCT
LSS-엑손 22-F	GCCAAACAGCCAGGCTCCAGTT
LSS-엑손 22-R	GGTTGGAGCCCAAGACAGGGT

표 3b. 크리스탈린 돌연변이의 작제에 사용된 프라이머

유전자	프라이머 (5'-3')
<i>αA-R116C-For</i>	TTCCCGTGAGTTCCTACTGCGCTACCGCTGCCGTGCTGC
<i>αA-R116C-Rev</i>	CGGCAGGCGGTAGCGGCAGTGGAACTCACGGG
<i>αA-R116H-For</i>	TTCCCGTGAGTTCCTACCACCGCTACCGCTGCCGTGCGCAC
<i>αA-R116H-Rev</i>	CGGCAGGCGGTAGCGGTGGTGAACCTCACGGG
<i>αA-Y118D-For</i>	GAGTTCACCGCCGCGACCGCTGCCGTCCAACTTACGAC
<i>αA-Y118D-Rev</i>	CGTTGACGCGCAGGCGGTGCGCGCGGTGGAAC
<i>αB-R120G-For</i>	CAGGGAGTTCACGGGAAATACCGGATAGGGGG
<i>αB-R120G-Rev</i>	GGATCCGGTATTTCCCGTGGAACTCCCT
<i>βB2-V187E-For</i>	AGGTGCAGTCCGAGCGCGTATGTGGAG
<i>βB2-V187E-Rev</i>	ATACGGCGCTCGGACTGCACCT
<i>βB2-V187M-For</i>	AGGTGCAGTCCATGCGCGTATGTGATG
<i>βB2-V187M-Rev</i>	ATACGGCGCTCGGACTGCACCT
<i>βB2-R188H-For</i>	TGCAGTCCGTGCACCGTATCCCGCCAC
<i>βB2-R188H-Rev</i>	GGATACGGTGACCGGACTGCA
<i>γC-G129C-For</i>	CACGTGCTGGAGTGCTGCTGGGCTGC
<i>γC-G129C-Rev</i>	CAGCAGCACTCCAGCACGTG
<i>γD-W43R-For</i>	GTGGACAGCGGCTGCCGATGCTCTATGAGCTGGCGG
<i>γD-W43R-Rev</i>	GCTCATAGAGCATCGGCAGCGCTGTCCAC

[0144]

References

- 1 Pascolini, D. & Mariotti, S. P. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol* 96, 614-618, doi:10.1136/bjophthalmol-2011-300539 (2012).
- 2 Bloemendal, H. et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 86, 407-485 (2004).
- 3 Moreau, K. L. & King, J. A. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends Mol Med* 18, 273-282, doi:S1471-4914(12)00039-1 [pii] 10.1016/j.molmed.2012.03.005 (2012).
- 4 Huff, M. W. & Telford, D. E. Lord of the rings--the mechanism for oxidosqualene:lanosterol cyclase becomes crystal clear. *Trends Pharmacol Sci* 26, 335-340, doi:S0165-6147(05)00127-6 [pii] 10.1016/j.tips.2005.05.004 (2005).
- 5 Diehn, J. J., Diehn, M., Marmor, M. F. & Brown, P. O. Differential gene expression in anatomical compartments of the human eye. *Genome Biol* 6, R74, doi:gb-2005-6-9-r74 [pii] 10.1186/gb-2005-6-9-r74 (2005).
- 6 Mori, M. et al. Lanosterol synthase mutations cause cholesterol deficiency-associated cataracts in the Shumiya cataract rat. *J. Clin. Invest.* 116, 395 - 404 (2006).
- 7 Ng, P. C. & Henikoff, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11, 863-874, doi:10.1101/gr.176601 (2001).
- 8 Adzhubei, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 7, 248 - 249 (2010).
- 9 Pollard, K. S., Hubisz, M. J., Rosenbloom, K. R. & Siepel, A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* 20, 110 - 121 (2010).
- 10 Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M. & Seelow, D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods* 11, 361 - 362 (2014).
- 11 Seelow, D., Schuelke, M., Hildebrandt, F. & Nurnberg, P. HomozygosityMapper - an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res.* 37, W593 - W599 (2009)
- 12 Thoma, R. et al. Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. *Nature* 432, 118-122, doi:10.1038/nature02993 (2004).
- 13 Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884-890 (2003).
- 14 Ecroyd, H. & Carver, J. A. Crystallin proteins and amyloid fibrils. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 62 - 81 (2009).

[0145]

15. Braun, N. et al. Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone α B-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 20491–20496 (2011)
16. Cenedella, R. J. et al. Direct perturbation of lens membrane structure may contribute to cataracts caused by U18666A, an oxidosqualene cyclase inhibitor. *J Lipid Res* 45, 1232–1241, doi:10.1194/jlr.M300469-JLR200 M300469-JLR200 [pii] (2004).
17. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 26, 589–595 (2010).
18. DePristo, M. A. et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genet.* 43, 491–498 (2011).
19. Ruf, A. et al. The monotopic membrane protein human oxidosqualene cyclase is active as monomer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 247–254 (2004).
20. Cardozo, T., Totrov, M. & Abagyan, R. Homology modeling by the ICM method. *Proteins* 23, 403–414 (1995).
21. Abagyan, R. & Argos, P. Optimal protocol and trajectory visualization for conformational searches of peptides and proteins. *J. Mol. Biol.* 225, 519–532 (1992).
22. Xu, J. et al. The congenital cataract-linked A2V mutation impairs tetramer formation and promotes aggregation of hB2-crystallin. *PLoS ONE* 7, e51200 (2012).
23. Wang, B. et al. A novel CRYGD mutation (p.Trp43Arg) causing autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family. *Hum. Mutat.* 32, E1939–E1947 (2011).
24. Gu, F. et al. A novel mutation in α A-crystallin (CRYAA) caused autosomal dominant congenital cataract in a large Chinese family. *Hum. Mutat.* 29, 769 (2008).
25. Li, X.-Q. et al. A novel mutation impairing the tertiary structure and stability of α C-crystallin (CRYGC) leads to cataract formation in humans and zebrafish lens. *Hum. Mutat.* 33, 391–401 (2012).
26. Nagineni, C. N. & Bhat, S. P. Human fetal lens epithelial cells in culture: an in vitro model for the study of crystallin expression and lens differentiation. *Curr. Eye Res.* 8, 285–291 (1989).
27. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917 (1959).
28. Wang, S., Leng, X.-Y. & Yan, Y.-B. The benefits of being β -crystallin heteromers: β B1-crystallin protects β A3-crystallin against aggregation during co-refolding. *Biochemistry* 50, 10451–10461 (2011).
29. Sun, T.-X., Das, B. K. & Liang, J. J. N. Conformational and functional differences between

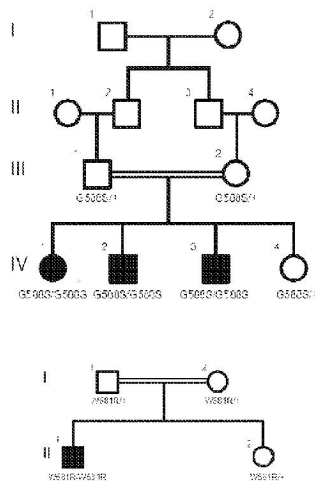
[0146]

- recombinant human lens aA- and aB-crystallin. J. Biol. Chem. 272, 6220–6225 (1997).
30. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254 (1976).
 31. Geraldine, P. et al. Prevention of selenite-induced cataractogenesis by acetyl-L-carnitine: an experimental study. Exp. Eye Res. 83, 1340–1349 (2006).
 32. Makri, O. E., Ferlemi, A. V., Lamari, F. N. & Georgakopoulos, C. D. Saffron administration prevents selenite-induced cataractogenesis. Mol. Vis. 19, 1188–1197 (2013).
 33. Zhang, L. et al. Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform. ACS Nano 2, 1696–1702 (2008). La Croix, N. Cataracts: When to refer. Top. Companion Anim. Med. 23, 46–50 (2008).
 34. La Croix, N. Cataracts: When to refer. Top. Companion Anim. Med. 23, 46–50 (2008).

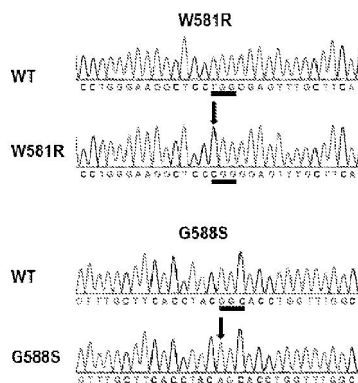
[0147]

도면

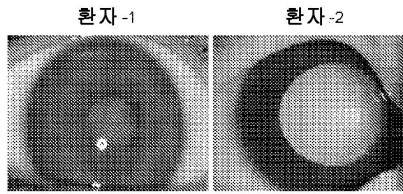
도면1a



도면1b



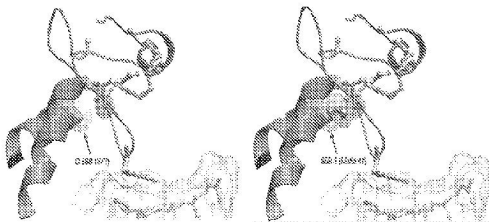
도면1c



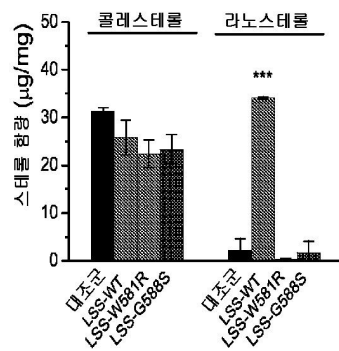
도면2a

	W581R	G588S
LSS_H. 사피엔스	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	
LSS_P. 트로글로다이테스	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	
LSS_B. 티우루스	DGSWEGSWGVCFTYGAWFGLEAFACM	
LSS_M. 무스쿨루스	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	
LSS_R. 노브베지쿠스	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	
LSS_G. 갈루스	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	
LSS_D. 레리오	DGSWEGSWGVCFTYGAWFGLEAFACM	

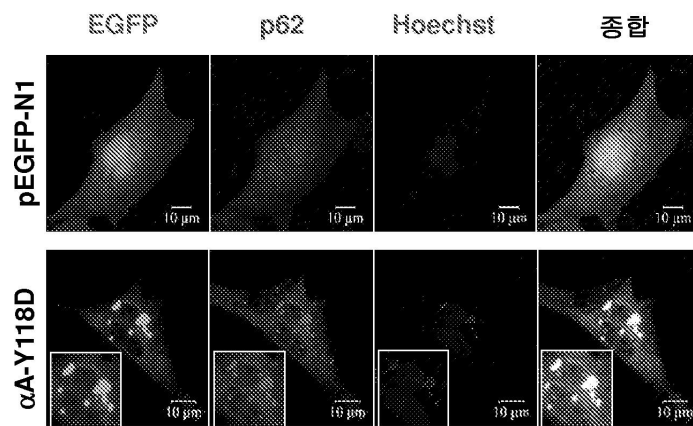
도면2b



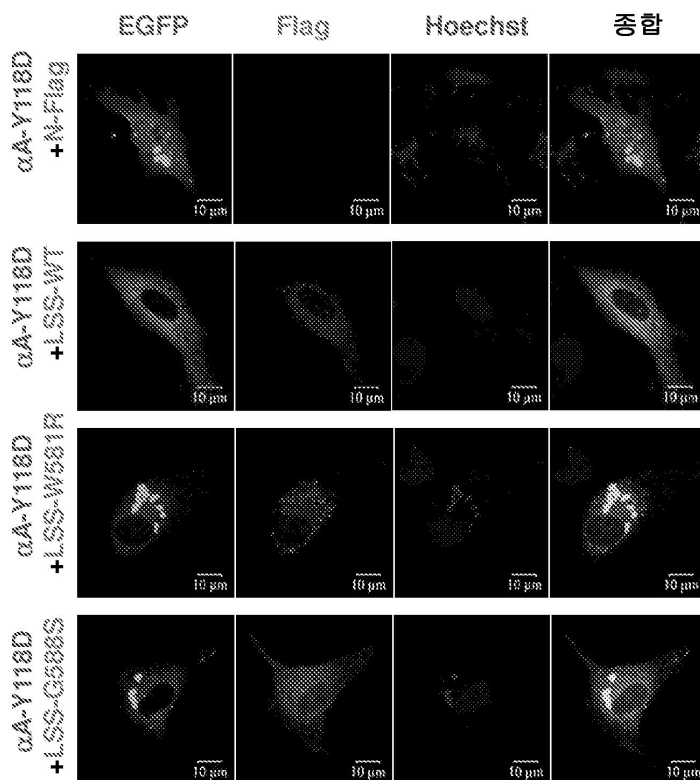
도면2c



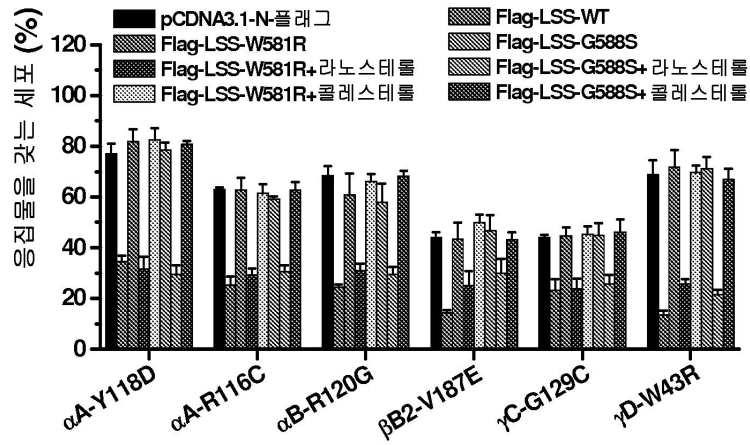
도면3a



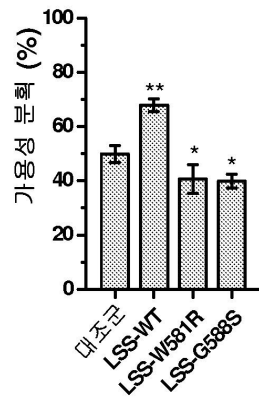
도면3b



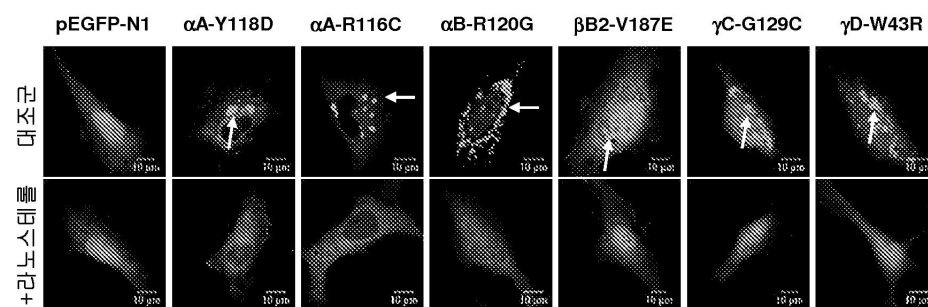
도면3c



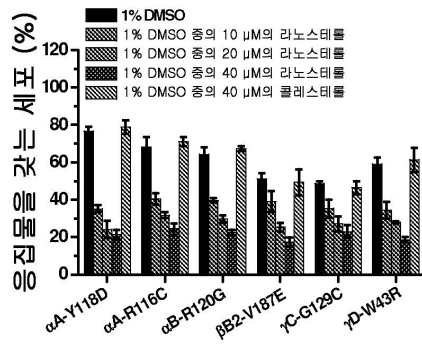
도면3d



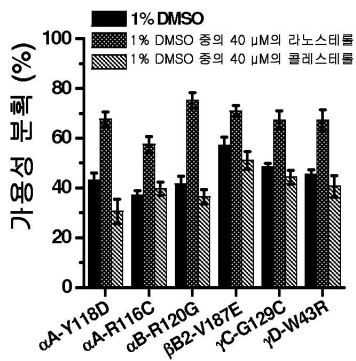
도면3e



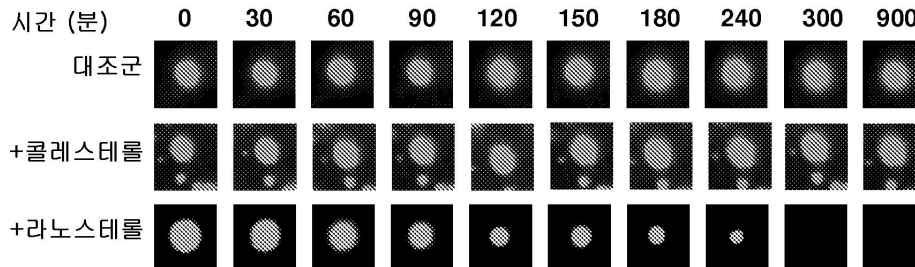
도면3f



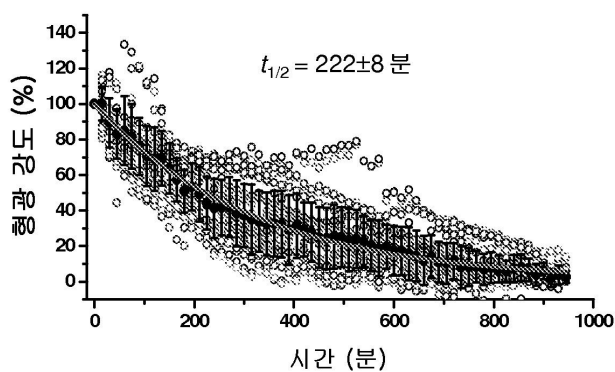
도면3g



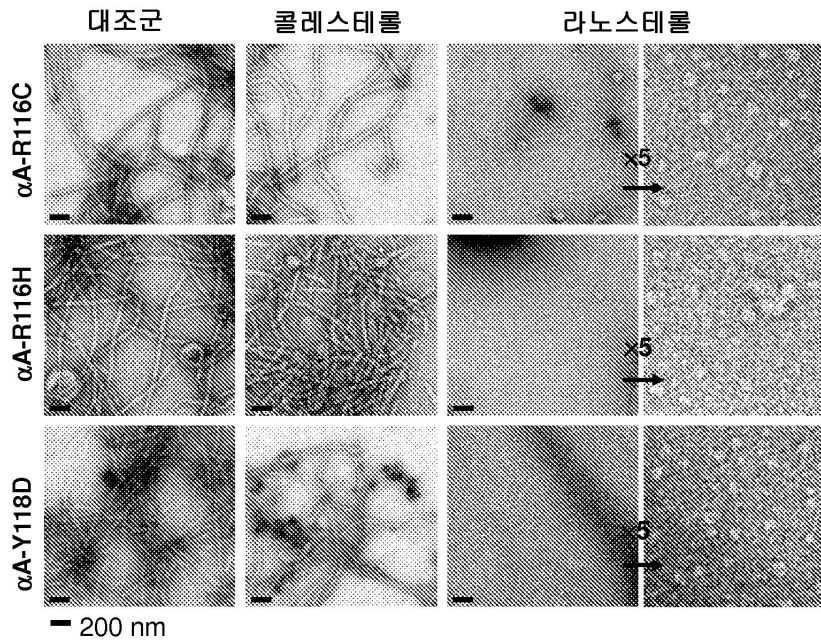
도면3h



도면3i

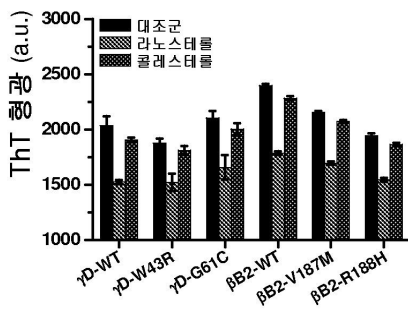


도면4a

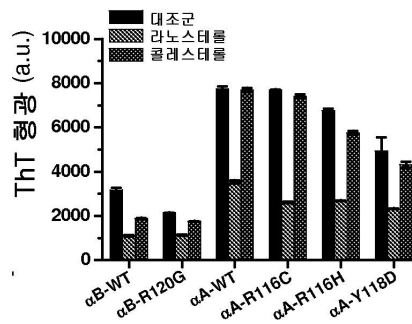


도면4b

도 4b(i)

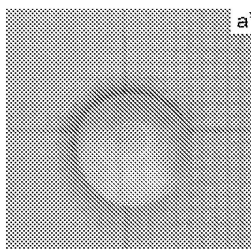


도 4b(ii)

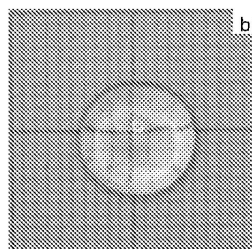


도면5a

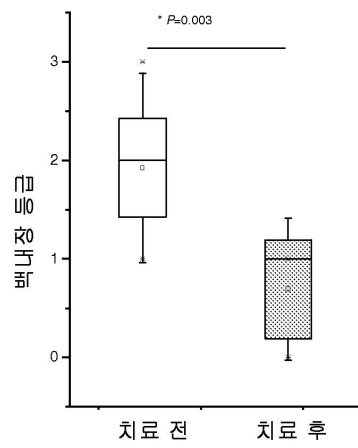
도 5a(i)



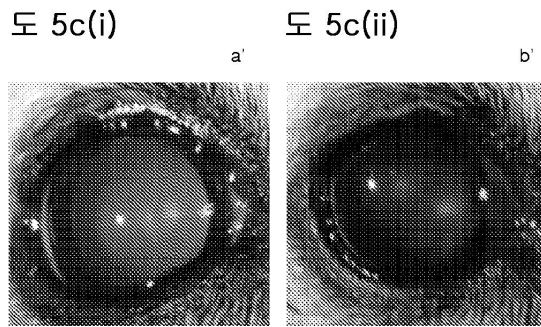
도 5a(ii)



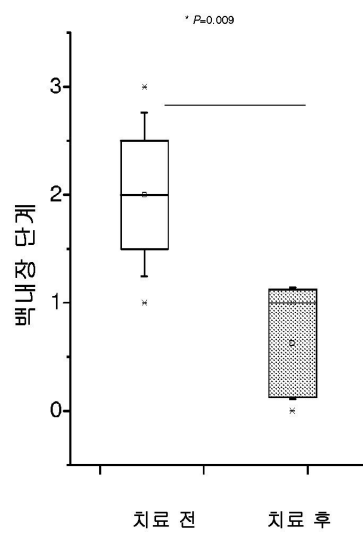
도면5b



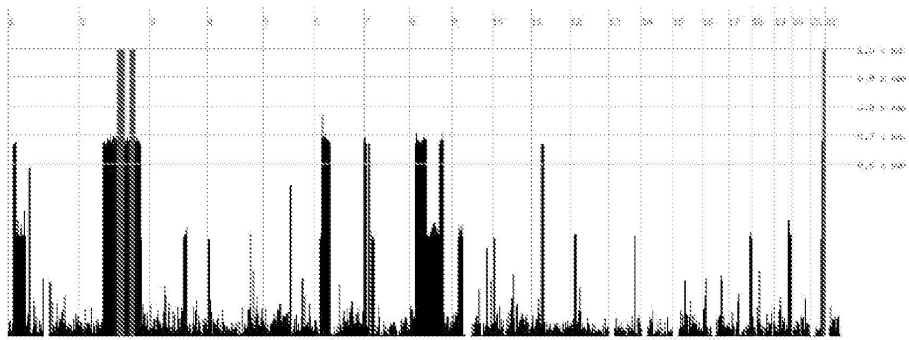
도면5c



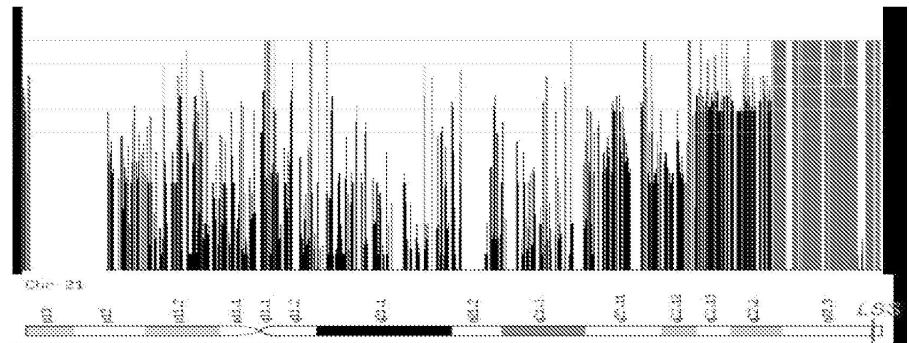
도면5d



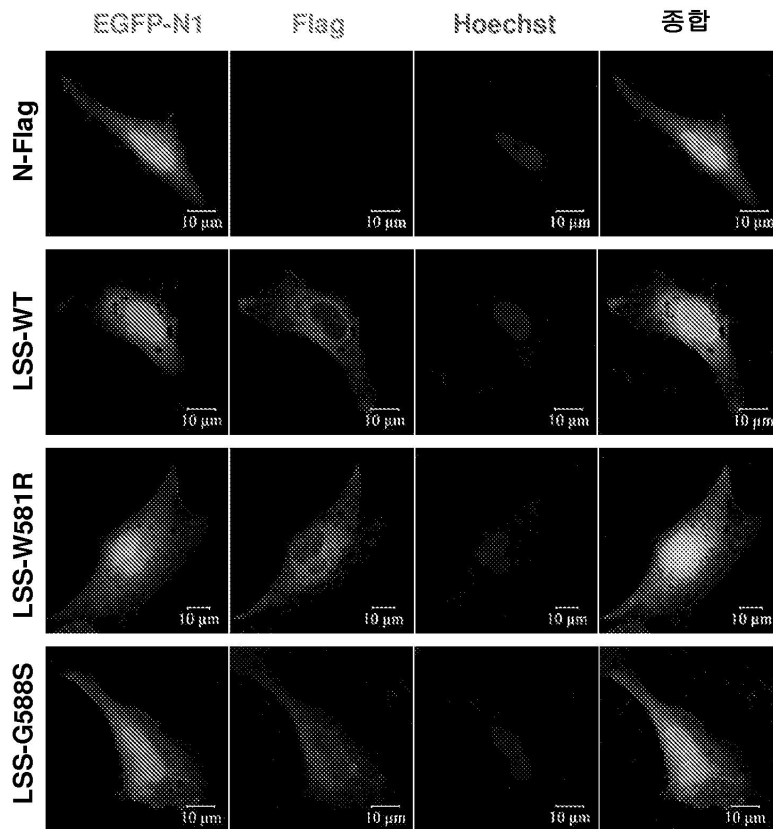
도면6a



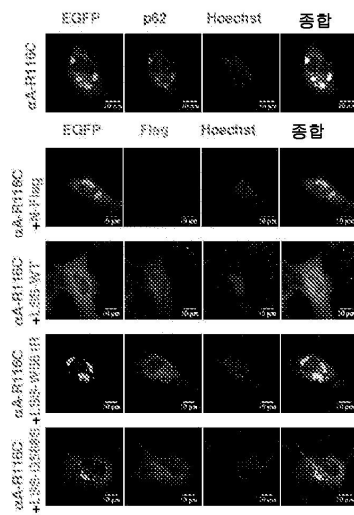
도면6b



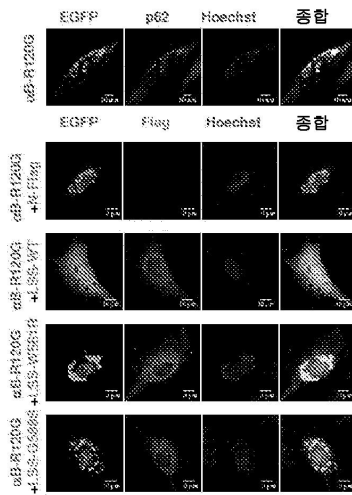
도면7



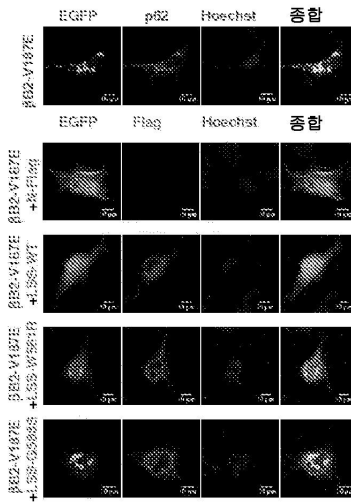
도면8a



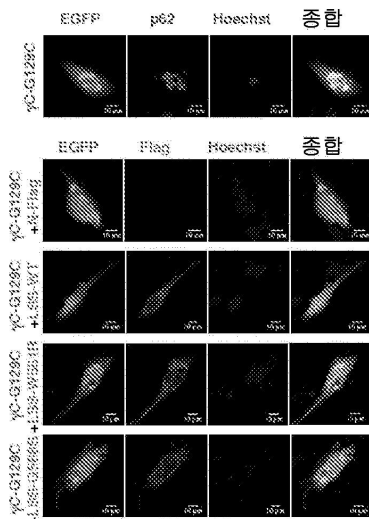
도면8b



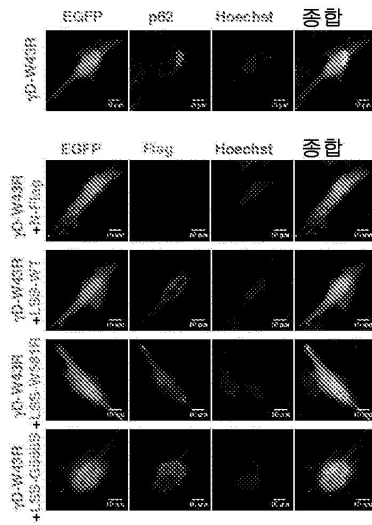
도면8c



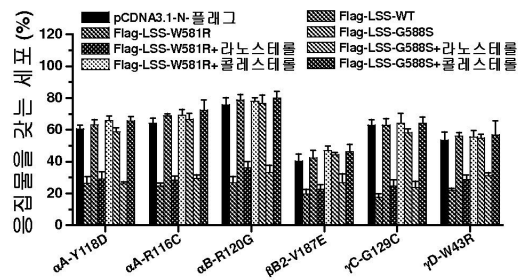
도면8d



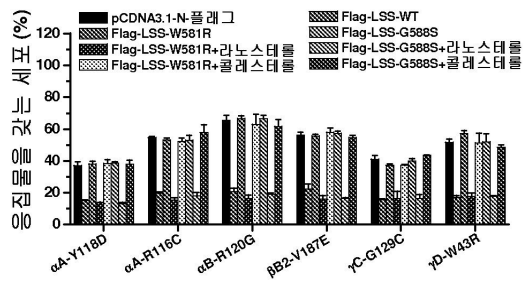
도면8e



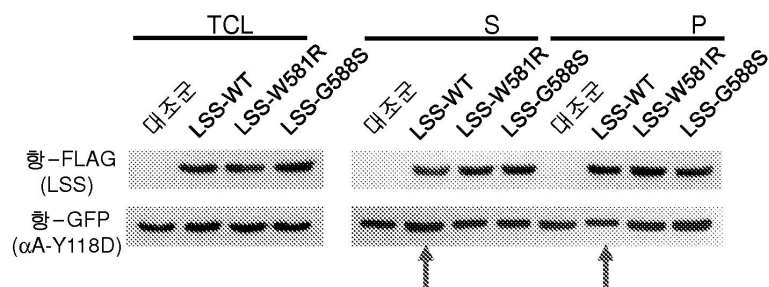
도면9a



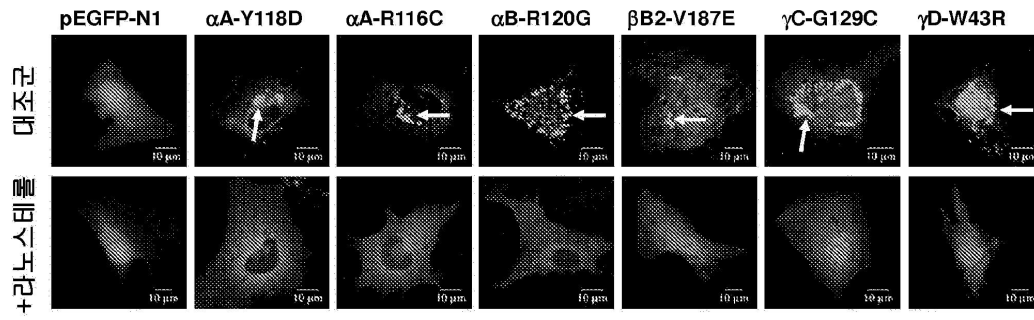
도면9b



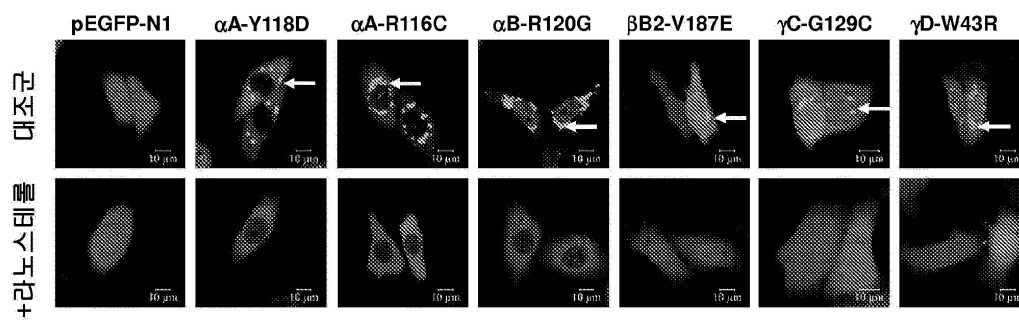
도면9c



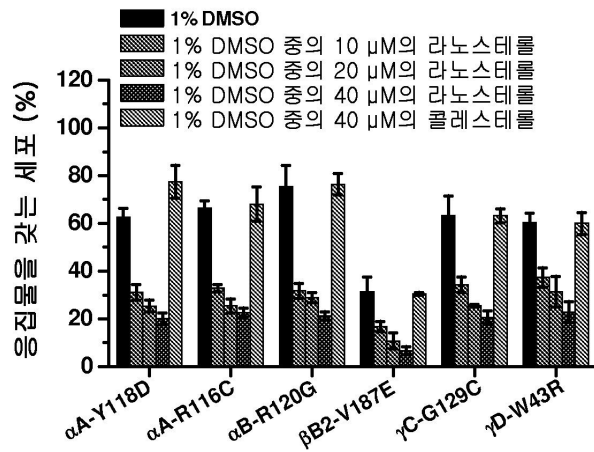
도면10a



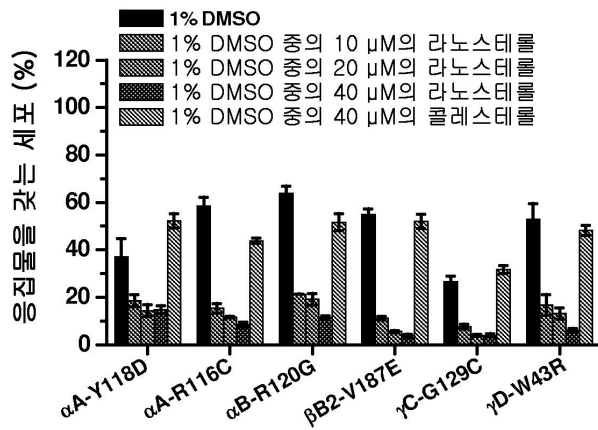
도면10b



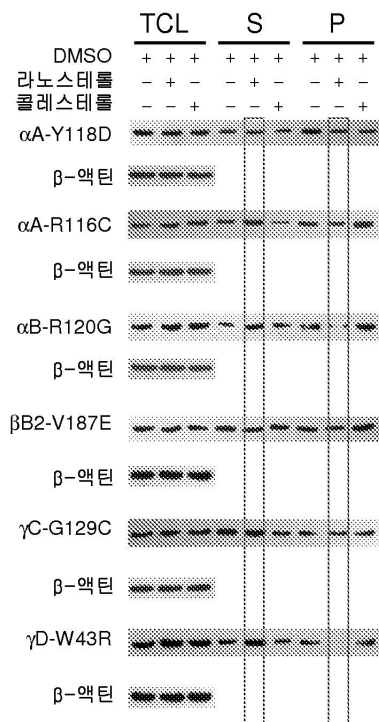
도면10c



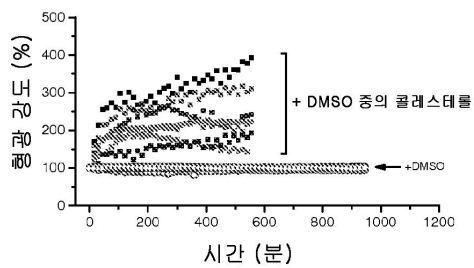
도면10d



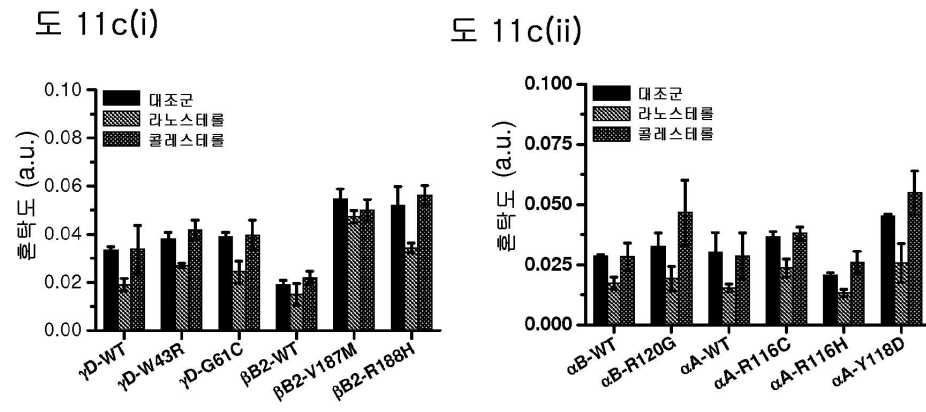
도면11a



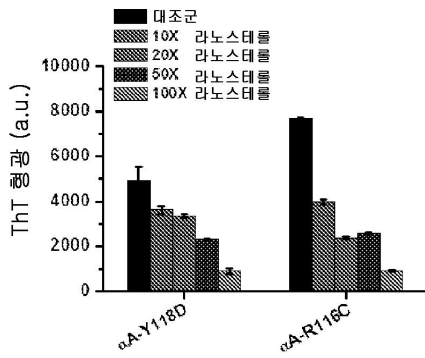
도면11b



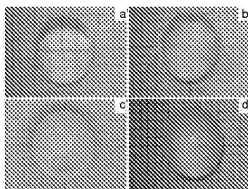
도면11c



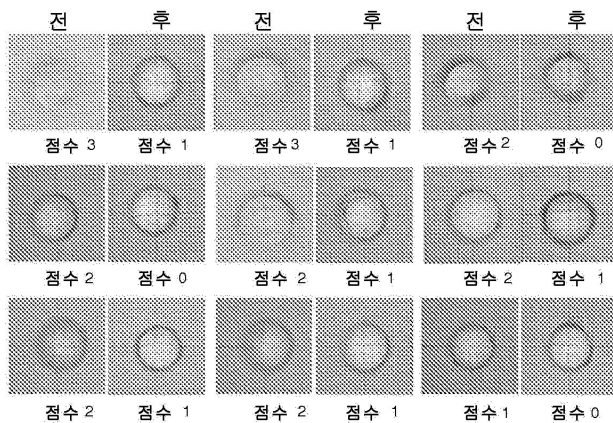
도면11d



도면12a



도면12b



도면12c

