(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0084799
(43) 공개일자 2011년07월26일

(51) Int. Cl.
A61K 31/52 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) *A61P 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0004540
(22) 출원일자 2010년01월18일
심사청구일자 2010년01월18일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김재홍
경기도 고양시 일산동구 마두동 백마마을 극동삼환아파트 211-102
유연규
서울특별시 노원구 하계동 209번지 이코아빌 203호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

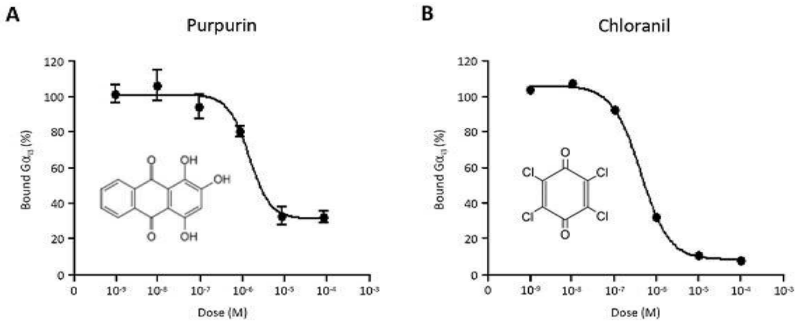
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) BLT2-Gαi3의 상호작용을 차단하기 위한 신규 저해제

(57) 요 약

본 발명은 BLT2-$G\alpha_{i3}$의 상호작용을 차단하기 위한 신규 저해제를 제공한다. 본 발명을 통해 BLT2-$G\alpha_{i3}$의 상호작용을 차단하기 위한 신규 저해제로서 스크리닝된 퍼퓨린과 클로라닐은 BLT2의 세번째 세포내 루프 영역($BLT2_{iL3}$)에 특이적으로 결합함으로써 BLT2-$G\alpha_{i3}$의 상호작용을 차단하고, 이를 통해 LTB_4-BLT2-매개된 신호전달을 차단하므로, 천식이나 암을 포함한 BLT2-연관 면역성 질환의 예방 또는 치료를 위해 효과적으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

김주영

서울특별시 구로구 개봉본동 90-63호

이원규

경기도 고양시 덕양구 벽제동 푸른마을 406동 102호

특허청구의 범위

청구항 1

퍼퓨린 및 클로라닐로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 포함하는 면역성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 퍼퓨린 또는 클로라닐이 BLT2에 결합함으로써 BLT2의 세포내 신호전달을 저해하는 것인 면역성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 면역성 질환이 천식, 죽상경화증, 암, 피부가려움증, 류마티스 관절염 또는 염증성 장 질환인 면역성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 암은 방광암, 전립선암, 췌장암, 유방암, 뇌종양, 피부암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 암은 암세포의 세포사멸 유도, 암세포의 전이 저해 또는 종양의 혈관신생을 저해함으로써 예방 또는 치료되는 것인 면역성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 면역성 질환의 예방 또는 치료를 위한 다른 유효성분과 함께 순차적으로 또는 동시에 투여되는 것인 면역성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 다른 유효성분은 항암제 또는 천식 치료제인 면역성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 의약 조성물 또는 식품 조성물인 면역성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 BLT2-$G\alpha_{i3}$의 상호작용을 차단하기 위한 신규 저해제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아라키돈산(AA)의 지질 대사체인 류코트리엔 B_4 (LTB_4)는 백혈구의 보충(recruitment)에 대한 가장 강력한 주화성 매개자 중 하나이다 [Yokomizo T, et al., Nature 1997;387:620-4.; Woo CH, et al., J Biol Chem 2002;277:8572-8.]. LTB_4-매개된 백혈구 보충이 다양한 병원체에 대해 보호적인 역할을 갖고 있음에도 불구하고 [Chen XS, et al., Nature 1994;372:179-82.], 그것은 또한 기관지 천식[Turner CR, et al., J Clin Invest 1996;97:381-7.], 류마티스 관절염[Griffiths RJ, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:517-21.], 죽상경화증[Sanchez-Galan E, et al., Cardiovasc Res 2009;81:216-25.], 및 염증성 장 질환[Sharon P, et al., Gastroenterology 1984;86:453-60.]과 같은 면역 질환의 발병기전과도 관련되어 있다. 그러므로, LTB_4 수용체에 대한 길항제는 최근 강력한 항-면역성 의약으로서 최근 개발되고 있다.

[0003] LTB_4는 두 개의 G-단백질 결합 수용체(GPCRs), BLT1 및 BLT2를 통해 생물학적 영향을 미친다 [Yokomizo T, et al., Nature 1997;387:620-4.; Yokomizo T, et al., J Exp Med 2000;192:421-32.]. LTB_4 수용체의 대부분의 연구는 현재까지 백혈구와 같은 면역 세포에서 전적으로 발현되며 면역 과정에서 중요한 역할을 하는, 고-친화성 수용체 BLT1에 집중되어 있다 [Yokomizo T, et al., Nature 1997;387:620-4.; Kim ND, et al., J Exp Med 2006;203:829-35.].

[0004] 반면, LTB_4에 대한 저-친화성 수용체인 BLT2는 매우 다양한 조직에서 발현됨에도 불구하고, 아직까지 명확한 생리학적 기능이 밝혀진 바가 없지만 [Yokomizo T, et al., J Exp Med 2000;192:421-32.; Kamohara M, et al., J Biol Chem 2000;275:27000-4.], 최근 연구들에 의하면 그것이 천식 [Cho KJ, et al., Am J Respir Cell Mol Biol 2009.], 죽상경화증 [Sanchez-Galan E, et al., Cardiovasc Res 2009;81:216-25.], 피부가려움증 [Kim HJ, et al., Br J Pharmarcol. 2008;154:1073-8], 및 암 진행 [Hennig R, et al., Br J Cancer 2008;99:1064-73.; Kim GY, et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29:915-20.]과 같은 다양한 면역성 장애와 관련되어 있음을 증명한 바 있다. 또한 세포 내에서 BLT2가 LTB_4 자극 하에서 세포에서의 칼슘 동원(calcium mobilization)과 주화성 이동(chemotactic migration)에 연관되어 있음은 잘 알려져 있다. 더욱이, LTB_4와 더불어 BLT2의 특이적 작용제인 Compound A [4'-pentanoyl(phenyl)amino methyl-1,1'-biphenyl-2-carboxylic acid]는 일차 마우스 각질세포에서 BLT2를 통하여 주화성 이동을 유도함이 보고되어져 있다 [Iizuka Y, et al., J Biol Chem 2005;280:24816-23.]. 또한, Shin 등은 최근 LTB_4-유도 수지상 세포 (DC) 주화성이 Akt 경로를 통해 BLT2-의존적 방식으로 매개되어 있으며, 백일해 독소(pertussis toxin, PTX)로의 선처리에 의해 완전히 저해될 수 있음을 보고하였는데 [Shin EH, et al., Biochem Biophys Res Commun 2006;348:606-11.], 이는 $G\alpha_i$ 또는 $G\alpha_{io}$ 단백질 서브유닛이 BLT2-매개된 주화성 반응에 연관되어 있을지 모른다는 것을 제시한다.

[0005] 본 발명자들은 BLT2의 상이한 세포내 도메인을 이용하여 BLT2와 $G\alpha_i$의 다양한 서브유닛간의 상호작용을 확인한 결과, BLT2의 세번째 세포내 루프 영역($BLT2_{iL3}$)이 $G\alpha_{i3}$ 서브유닛과 특이적으로 상호작용함을 밝힌 바 있다 [Vukoti KM, et al., Bulletin of the Korean Chemical Society 2007;28:1005-9.]. 또한, PCT/KR2008/001649호 및 PCT/KR2008/001650호를 통해 류코트리엔 B4 수용체인 BLT2를 저해하면 암이나 천식을 치료할 수 있음을 밝힌 바 있다. 그러므로, BLT2와 $G\alpha_{i3}$ 간의 상호작용을 효과적으로 차단하는 특이적 저해제를 스크리닝해낸다면 LTB_4-BLT2-매개된 신호전달(예컨대, 주화성)을 저해함으로써 암이나 천식을 포함한 BLT2-연관된 면역성 질환을 완화시킬 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 BLT2와 $G\alpha_{i3}$ 간의 상호작용을 차단하는 신규 저해제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 $BLT2_{iL3}$와 $G\alpha_{i3}$ 간의 상호작용을 방해할 수 있는 특이적 저해제를 스크리닝하기 위해, 1040 개의 FDA-승인된 약물과 생체활성 화합물로 구성된 NINDS 화합물 라이브러리를 이용하여 인비트로 시스템상에서 $BLT2_{iL3}$와 $G\alpha_{i3}$ 간의 상호작용을 측정하는 방식으로 분석하였다. 그 결과, 퍼퓨린과 클로라닐이 BLT2의 세번째 세포내 루프영역 ($BLT2_{iL3}$)에 특이적으로 결합하여 BLT2-$G\alpha_{i3}$ 간의 상호작용을 차단함을 밝혔다. 앞서 언급한 바와 같이, BLT2와 $G\alpha_{i3}$ 간의 상호작용을 차단하는 특이적 저해제는 LTB_4-BLT2-매개된 신호전달을 저해하고 BLT2-연관된 면역성 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0008] 따라서, 본 발명은 면역성 질환의 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 퍼퓨린 또는 클로라닐의 용도, 퍼퓨린 및 클로라닐로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 포함하는 면역성 질환의 예방 또는 치료용 의약 또는 식품 조성물, 치료상 유효량의 퍼퓨린 및 클로라닐로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 면역성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0009] 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 퍼퓨린 또는 클로라닐은 BLT2에 결합함으로써 BLT2의 세포내 신호전달을 저해하며, 이를 통해 면역성 질환의 예방 또는 치료할 수 있게 된다. 보다 구체적으로, 퍼퓨린 또는 클로라닐은 BLT2에 결합함으로써 Akt 인산화를 저해하며, LTB_4-유도된 ROS의 생성을 저해하고, 결과적으로 LTB_4-유도된 주화성을 저해하는 것으로 밝혀졌다.

[0010] 본 발명에 있어서, '저해'는 유전자의 전사, mRNA 프로세싱, 번역, 전좌 및 성숙 중 임의의 단계를 저해하거나, 단백질과 단백질간의 결합, 단백질의 활성화 또는 이를 통한 신호전달의 저해를 포함하는 것으로 해석된다.

[0011] 한 구체예에서, 퍼퓨린 또는 클로라닐을 이용하여 예방 또는 치료할 수 있는 면역성 질환으로는 천식, 죽상경화증, 암, 피부 가려움증, 류마티스 관절염 또는 염증성 장 질환 등을 포함한다.

[0012] 본 명세서에서 예시한 상기 질환 외에도, 당업계에 알려져 있는 BLT2-연관된 면역성 질환은 모두 퍼퓨린 또는 클로라닐로 예방 또는 치료할 수 있는 면역성 질환에 포함되는 것으로 본다. 본 발명에서 퍼퓨린 또는 클로라닐이 BLT2의 세번째 세포내 루프영역 ($BLT2_{iL3}$)에 특이적으로 결합하여 BLT2-$G\alpha_{i3}$ 간의 상호작용을 차단함으로써 LTB_4-BLT2-매개된 신호전달을 저해함을 밝힌 이상 당업자는 BLT2-연관된 면역성 질환의 예방 또는 치료를 위해 퍼퓨린 또는 클로라닐을 사용할 수 있을 것이다.

[0013] 한 구체예에서, 상기 암은 BLT2 또는 종양 유전자 Ras의 과발현에 의해 유발된 임의의 암일 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 암은 방광암, 전립선암, 췌장암, 유방암, 뇌종양, 피부암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 본 발명자들은 PCT/KR2008/001649호를 통해 BLT2가 상기 암들에서 과발현되며, BLT2 저해제를 이용하여 암을 치료할 수 있음을 보인 바 있다. BLT2 저해제를 투여하는 경우 암세포의 세포사멸 유도, 암세포의 전이 저해 또는 종양의 혈관신생을 저해함으로써 암을 예방 또는 치료될 수 있게 된다.

[0014] 한 구체예에서, 상기 조성물은 면역성 질환의 예방 또는 치료를 위한 다른 유효성분과 함께 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 다른 유효성분과의 병용치료는 면역성 질환을 각기 동일하거나 상이한 기전을 통해 억제할 수 있으므로 상승적인 치료 효과를 제공할 수 있을 것이다.

[0015] 예를 들어, 상기 다른 유효성분은 항암제 또는 천식 치료제일 수 있다. 본 발명자들은 PCT/KR2008/001649호를 통해 BLT2 길항제인 LY255283과 항암화학요법제인 에피루비신을 병용사용함으로써 유방암에 대해 현저한 상승효과가 나타남을 확인한 바 있다.

[0016] 본 발명의 면역성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 의약 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.

[0017] 본 발명의 면역성 질환의 예방 또는 치료용 의약 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

[0018] 본 발명의 면역성 질환의 예방 또는 치료용 의약 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0019] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0020] 본 발명의 의약 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

[0021] 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0022] 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료, 또는 뼈 성장 유도 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 퍼퓨린 또는 클로라닐은 1일 1회 내지 수회 투여시 0.1㎍/kg~1g/kg 의 용량으로 투여할 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, '대상체'는 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명에 따른 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 드링크와 같은 음료수, 티 타입의 과립, 스틱 타입의 다이어트 바, 츄어블 정제 타입의 비타민제, 캔디, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.

[0025] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 이용될 때, 본 발명의 조성물은 아미노산, 비타민, 미네랄, 감미제 및 식이섬유로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 추가로 포함할 수 있다. 이들 성분은 상기 식품 조성물의 맛과 영양을 향상시킬 수 있다.

[0026]

발명의 효과

[0027] 본 발명을 통해 BLT2-Gα_{i3}의 상호작용을 차단하기 위한 신규 저해제로서 퍼퓨린과 클로라닐이 스크리닝되었다. 퍼퓨린과 클로라닐은 BLT2의 세번째 세포내 루프영역 ($BLT2_{iL3}$)에 특이적으로 결합함으로써 BLT2-Gα_{i3}의 상호작용을 차단하고, 이를 통해 LTB_4-BLT2-매개된 신호전달을 차단하므로, 천식이나 암을 포함한 BLT2-연관 면역성 질환의 예방 또는 치료를 위해 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 인간 BLT2, GST-$BLT2_{iL3}$, 및 His-Gα_{i3}의 모식도를 보여준다.

도 2는 GST-$BLT2_{iL3}$, FITC-His-Gα_{i3}, 및 글루타치온 코팅된 플레이트를 이용한 인비트로 스크리닝 시스템의 모

식도를 보여준다.

도 3은 퍼퓨린 및 클로라닐의 저해 활성 및 화학 구조를 보여준다.

도 4는 퍼퓨린과 클로라닐의 $BLT2_{iL3}$ 또는 $G\alpha_{i3}$에 대한 SPR 분석 결과를 보여준다.

도 5는 세포생존율 및 LTB_4-유도된 Akt 활성화에 대한 퍼퓨린과 클로라닐의 영향을 보여준다.

도 6은 LTB_4-유도된 주화성에 대한 퍼퓨린과 클로라닐의 저해 효과를 보여준다.

도 7은 CHO-BLT1 안정 세포에서의 LTB_4-유도된 주화성에 대해 퍼퓨린과 클로라닐이 저해 효과가 없음을 보여준다.

도 8은 퍼퓨린과 클로라닐이 LTB_4-유도된 Rac1 활성화를 저해함을 보여준다.

도 9는 퍼퓨린과 클로라닐이 LTB_4-유도된 ROS 생성을 저해함을 보여준다.

도 10은 BLT2 저해제로서의 퍼퓨린과 클로라닐의 역할을 모여주는 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0030] **[실시예]**

[0031] **실시예 1. $BLT2_{iL3}$와 $G\alpha_{i3}$ 간의 상호작용을 방해할 수 있는 저해제의 스크리닝**

[0032] $BLT2_{iL3}$와 $G\alpha_{i3}$ 간의 상호작용을 방해할 수 있는 저해제를 스크리닝하기 위해, 1040 개의 FDA-승인된 약물과 생체활성 화합물로 구성된 NINDS 화합물 라이브러리[NINDS Custom Collection II (MicroSource Discovery System, Gaylordsville, CT)]를 이용하여 인비트로 시스템 상에서 $BLT2_{iL3}$와 $G\alpha_{i3}$ 간의 상호작용을 측정하는 방식으로 분석하였다.

[0033] 1-1. GST-$BLT2_{iL3}$ 및 His-$G\alpha_{i3}$의 제조

[0034] $BLT2_{iL3}$와 $G\alpha_{i3}$ 간의 상호작용을 측정하는 인 비트로 시스템의 구축을 위해 먼저 GST-$BLT2_{iL3}$ 및 His-$G\alpha_{i3}$를 제조하였다. 도 1은 인간 BLT2, GST-$BLT2_{iL3}$, 및 His-$G\alpha_{i3}$의 모식도를 보여준다. 도 1(A)는 도식적인 토폴로지를 보여주는 인간 BLT2(GenBank accession no.NM019839; UniProtKB/Swiss-Prot accession no. Q9NPC1)의 다이어그램을 보여주고, 도 1(B)는 N-말단에 GST-태그를 포함하는 BLT2의 iL3 영역(BLT2 의 237-256번째 아미노산, 박스 표시)인 GST-$BLT2_{iL3}$를 보여주며, 도 1(C)는 N-말단에 6X-His 태그를 포함하는 $G\alpha_{i3}$인 His-$G\alpha_{i3}$을 보여준다.

[0035] 구체적으로, GST-$BLT2_{iL3}$ 및 His-$G\alpha_{i3}$는 Vukoti KM, et al. Bulletin of the Korean Chemical Society 2007;28:1005-9. 에 기술된 바와 같이 제조하였다. $BLT2_{iL3}$ 및 $G\alpha_{i3}$을 제조하기 위한 발현벡터들은 상기 문헌에 기술되어 있다. pGST-$BLT2_{iL3}$ 플라스미드는 pET22b에서 GST의 C-말단에서 $BLT2_{iL3}$(BLT2의 237-256 아미노산)를 함유하며, pHis-$G\alpha_{i3}$는 그의 N-말단에 6X-His 태그를 함유하는 $G\alpha_{i3}$의 발현을 위해 사용되었다(도 1B 및 C). GST-$BLT2_{iL3}$ 또는 His-$G\alpha_{i3}$ 발현 플라스미드를 포함하는 *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) 세포를 LB 배지 중에서 600nm에서의 광학 밀도(O.D.)가 0.7이 되도록 키웠다. 37℃, 50 ㎍/mL 암피실린을 함유하는 LB 배지 중에

서 1 mM의 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드 (IPTG)를 가함으로써 GST-BLT2$_{iL3}$ 또는 His-Gα$_{i3}$의 발현을 각각 4시간 또는 16시간 동안 유도했다. 글루타치온 친화성 수지 컬럼 (Peptron Inc, Korea)을 이용한 친화성 정제 또는 Ni-NTA 를 이용한 고정화 금속 킬레이팅 크로마토그래피(immobilized metal chelating chromatography)(IMAC) (Qiagen, Germany)에 의해 세포 분해물로부터 GST-BLT2$_{iL3}$ 및 His-Gα$_{i3}$를 각각 분리하였다. 정제된 단백질 샘플 중의 글루타치온 및 이미다졸을 desalting columns (GE Healthcare, WI)으로 제거하고, 추후 분석 때까지 단백질들을 -80 ℃에서 보관했다.

[0036]

[0037] 1-2. GST-BLT2$_{iL3}$과 FITC-His-Gα$_{i3}$ 간의 상호작용 측정

[0038] BLT2$_{iL3}$와 Gα$_{i3}$ 간의 상호작용은 Vukoti KM, et al. Bulletin of the Korean Chemical Society 2007;28:1005-9. 에 기술된 바와 같이, 글루타치온 플레이트(Pierce) 상에 고정된 GST-BLT2$_{iL3}$에 결합된 FITC-His-Gα$_{i3}$의 양을 측정함으로써 분석하였다. 도 2는 GST-BLT2$_{iL3}$, FITC-His-Gα$_{i3}$, 및 글루타치온 코팅된 플레이트를 이용한 인비트로 스크리닝 시스템의 모식도를 보여준다.

[0039] 먼저, 제조자(Sigma-Aldrich)의 지시에 따라 His-Gα$_{i3}$을 플루오세린 이소티오시아네이트 (FITC)로 레이블링 했다. PBS (50 mM 소듐 포스페이트, pH 7.4, 200 mM NaCl) 중의 1 μM의 GST-BLT2$_{iL3}$ 단백질을 글루타치온 플레이트 상에 고정하고, 플레이트를 FITC-레이블된 His-Gα$_{i3}$(웰 당 100 ㎕)와 함께 배양하였다. 특이적으로 결합된 FITC-레이블된 His-Gα$_{i3}$ 단백질을 8 M 우레아로 용리시키고, 용리된 FITC-His-Gα$_{i3}$로부터의 형광 강도를 각각 495 및 525 nm의 여기 및 방출 파장에서 TRIAD 마이크로플레이트 리더 (Dynex Technologies, VA)를 이용하여 측정하였다. 저해율은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

[0040] $$(Ao-A) / Ao \times 100 (\%)$$

[0041] 상기 식에서, A 및 Ao 는 각각 화학적 화합물을 갖거나 갖지 않는 반응 혼합물의 495 nm에서의 흡광도를 말한다. GST-BLT2$_{iL3}$와 His-Gα$_{i3}$간의 상호작용을 방해할 수 있는 (NINDS 화합물 라이브러리로부터의) 화합물들의 스크리닝을 위해, 50 μM의 각각의 화합물을 측정 동안 FITC-레이블된 His-Gα$_{i3}$와 함께 배양하였다.

[0042] 라이브러리의 스크리닝 결과, 퍼퓨린과 클로라닐이 FITC-His-Gα$_{i3}$와 고정된 GST-BLT2$_{iL3}$ 간의 상호작용을 방해하는 특이적 약물로서 동정되었다. 도 3은 퍼퓨린 및 클로라닐의 저해 활성 및 화학 구조를 보여준다. 추가적으로 FITC-His-Gα$_{i3}$와 고정된 GST-BLT2$_{iL3}$ 간의 상호작용에 대한 이들 화합물들의 저해 활성을 다양한 농도에서 분석하였다. 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 이들 화합물 모두 마이크로몰 농도 범위에서 FITC-His-Gα$_{i3}$과 GST-BLT2$_{iL3}$ 간의 상호작용을 방해한다. 퍼퓨린 및 클로라닐의 IC_{50} 값은 각각 1.6 및 0.42 μM로 측정되었다. 이들 결과는, 퍼퓨린과 클로라닐이 BLT2와 Gα$_{i3}$간의 상호작용을 특이적으로 방해할 수 있으며, 더 나아가 BLT2-의존적인 세포내 신호전달 체계를 방해할 가능성을 제시한다.

[0043] **실시예 2. 퍼퓨린과 클로라닐의 BLT2$_{iL3}$와 Gα$_{i3}$ 간의 상호작용 저해 기전의 확인**

[0044] 퍼퓨린과 클로라닐에 의한 GST-BLT2$_{iL3}$와 His-Gα$_{i3}$ 간의 상호작용의 효과적인 차단은 이들 화합물들이 BLT2$_{iL3}$ 또는 Gα$_{i3}$ 중 어느 하나에 직접적으로 결합할지도 모른다는 것을 제시한다. 퍼퓨린 및 클로라닐의 결합하는 작용을 시험하기 위해, 고정된 GST, GST-BLT2$_{iL3}$, 및 His-Gα$_{i3}$에 대한 이들 화합물의 결합 역동학을 SPR 이미징 기기 (SPRι; K-MAC, Korea)를 이용한 표면 플라즈마 공명(SPR) 분석을 통해 시험하였다. PBS 버퍼 중에서 약 1 μM의 단백질을 4 ℃에서 3h 동안 인큐베이션하여 BK7 센서 칩 상에 고정하였다. 그런 다음, PBS 버퍼 중의 다양한 농도의 화합물들을 분당 30 μL의 유속으로 센서 칩에 적용하고, PBS 버퍼로 세척하였다. 공명 단위 (RU)는 결합 및 세척 기간 동안 측정하였으며, 결합 역동 분석은 SigmaPlot(Systat Software, CA)을 이용하여 수행되었다.

[0045] 퍼퓨린을 GST-BLT2$_{iL3}$에 처리하였을 때, 유의한 결합 sensorgram이 관찰되었으며(도 4A, solid lines), 결합 능

력은 퍼퓨린의 농도에 따라 증가하였다 (도 4C). 대조적으로, 퍼퓨린은 GST 대조군(dotted line) 또는 His-Gα_{i3}(dashed lines)에 대해서는 유의한 결합 sensorgram을 나타내지 않았다(도 4A). 이들 결과들은 퍼퓨린이 Gα_{i3} 보다는 BLT2의 세번째 세포내 루프 영역 (BLT2$_{iL3}$)에 특이적으로 결합함을 제시한다.

[0046] 클로라닐의 경우, sensorgram은 그것을 GST-BLT2$_{iL3}$에 처리하였을 때 유의하게 감소하였으며 (도 4B, solid line), 또한 클로라닐의 농도가 증가함에 따라 감소하였다 (도 4D). 이러한 감소된 반사율(reflectivity)은 아마도 GSTBLT2$_{iL3}$에 대한 클로라닐의 mass uptake에 기인하는 것일 것이다 [Hook F, et al., Anal Chem 2001;73:5796-804.]. 퍼퓨린과 유사하게, 클로라닐은 GST 또는 His-Gα_{i3}에 대해서는 유의한 결합 sensorgram을 나타내지 않았다 (도 4B, dotted and dashed lines). 이들 결과는 클로라닐 또한 Gα_{i3}이 아닌, BLT2의 세번째 세포내 루프 영역에 특이적으로 결합함을 나타낸다. 퍼퓨린 및 클로라닐의 KD 값은 각각 3.8 및 1.9 μM로 측정되었다. 종합하면, 이들 결과는 퍼퓨린과 클로라닐이 BLT2$_{iL3}$에 특이적으로 결합함으로써 Gα_{i3} 단백질과 BLT2$_{iL3}$ 간의 상호작용을 방해함을 제시한다.

[0047] **실시예 3. 퍼퓨린과 클로라닐의 세포 독성 평가**

[0048] 퍼퓨린과 클로라닐의 세포독성을 CHO 세포에서 평가하였다.

[0049] CHO 세포는 한국세포주은행 (KCLB, 10061)으로부터 얻었으며, 이를 10% FBS(Invitrogen), 페니실린 (50 units/mL), 및 스트렙토마이신 (50 μg/mL)이 보충된 RPMI 배지(Invitrogen) 중에서 37 ℃에서 대기와 CO_2가 95% 및 5% (v/v)로 혼합된 습윤한 조건 하에서 키웠다. 안정한 세포 (CHO-vector, CHO-BLT1, 및 CHO-BLT2)를 제조하고, 0.5 mg/mL G418을 포함하는 배지 중에서 유지시켰다.

[0050] 세포 생존율은 테트라졸륨 염을 보라색의 포마잔으로 전환시키는 살아있는 세포의 활성에 기초한 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT) 어세이를 이용하여 측정하였다.

[0051] 구체적으로, 2 × 10^4 세포를 96-웰 플레이트에서 키우고, 지시된 농도에서 퍼퓨린과 클로라닐과 함께 48시간 동안 인큐베이션했다. 20 μL의 MTT 스톡 용액(5 mg/mL, Sigma-Aldrich)을 각 웰에 가하고 습한 CO_2 인큐베이터에서 37 ℃ 에서 4시간 동안 인큐베이션했다. 그 후, 상청액을 제거하고, 200 μL의 DMSO를 각웰에 가해 불용성 보라색 포마잔 결정을 용해시켰다. 550 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 리더 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 측정하였다. 모든 측정은 3회 수행되었다.

[0052] 도 5A에서 볼 수 있는 바와 같이, 퍼퓨린 또는 클로라닐의 농도를 증가시키는 것은 (10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 및 10^{-5} M) 0.5% 혈청 조건 하에서 CHO 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다. 추가적으로, 퍼퓨린과 클로라닐의 IC_{50}의 2배 초과 투여량으로 처리된(각각 3.2 μM 또는 0.84 μM) CHO 세포의 생존율은 처리 48시간까지 영향을 미치치 않았다(도 5B).

[0053]

[0054] **실시예 4. 세포 내 BLT2 신호전달에 대한 퍼퓨린과 클로라닐의 영향 평가**

[0055] 다음으로, 본 발명자들은 세포 내에서의 BLT2 신호전달에 대한 퍼퓨린과 클로라닐의 영향을 평가했다. 이전에, 뮤린 골수-유래 비만 세포(mBMMCs)에서의 LTB_4 처리가 Akt 인산화를 일시적으로 유도하며, 또한 LTB_4-유도된 Akt 인산화는 인간 단핵구-유래 DCs에서 BLT2-의존적임이 보고된 바 있다 [Shin EH, et al., Biochem Biophys Res Commun 2006;348:606-11.; Lundeen KA, et al., J Immunol 2006;177:3439-47. 26]. 그러므로 본 발명자들은 LTB_4-유도된 Akt 활성화가 CHO-BLT2 안정 세포주에서 퍼퓨린과 클로라닐에 의해 저해되는지를 이뮤노블롯을 통해 시험하였다. 먼저, 2 ×10^5 세포를 60-mm 디쉬에서 키우고, FBS가 보충된 RPMI 1640 배지 중에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 배양된 세포에 LTB4 (300 nM)를 5분 동안 자극한 후 용해 버퍼 (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 20 mM Tris-Cl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.5 % Sodium deoxycholate, 10 mM NaF, 10 μg/ml Leupeptin, 5 μg/ml Aprotinin, 2 μg/ml Pepstatin, 100 μg/ml Phenylmethylsulfonyl fluoride, 및 1 mM Na_2VO_3)로 세포용해물을 제조하여 단백질 샘플을 수거한다. 이후, 단백질 샘플을 95 ℃에서 5분 동안 가열한 다

음, 12% 아크릴아마이드 겔 상에서 수행된 소듐 도데실 설페이트(SDS) 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(PAGE)에 의해 분석했다. 그런 다음, Hoefer wet transfer unit을 이용하여 90 V 에서 70 분 동안 폴리비닐리덴 디플로라이드 (PVDF) 막으로 이동시켰다. ECL kit (Amersham Pharmacia, NJ)를 이용하기 전에 0.05% (v/v) Tween 20 및 5% (w/v) 무지방 분유를 함유하는 Tris-완충 식염수로 막을 1시간 동안 블로킹하고, 블로킹 용액 중의 1차 항체 (phospho-Akt에 대해 1:1000 희석)로 1시간 동안 먼저 인큐베이션하고, 호오스래디쉬 퍼옥시다아제 (HRP)-컨쥬게이트된 2차 항체로 1시간 동안 인큐베이션하였다. 혼성화된 이뮤노블롯을 자기방사법에 의해 분석하였다.

[0056] CHO 세포는 [3H]LTB_4 결합 분석에 의해 이전에 증명된 바와 같이[Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. Nature 1997;387:620-4.; Yokomizo T, et al., J Biol Chem 2001;276:12454-9], 이 세포 유형은 LTB_4에 대한 어떠한 내재적 수용체도 발현하지 않으므로 본 연구에 유용하였다. 이뮤노블롯 분석 결과, 도 5C에서 볼 수 있는 바와 같이, LTB_4는 CHO-BLT2 세포주에서 유의하게 향상된 (약 3배) Akt 인산화를 이끌어냈으나, 대조군 CHO 세포주에서는 그렇지 않았다. 그러나, CHO-BLT2 세포주에서의 향상된 Akt 인산화는 퍼퓨린 또는 클로라닐에 의해 현저하게 약화되었다. 양성 대조군으로서, LY294002 (PI-3-키나아제의 저해제)(Sigma-Aldrich) 및 PTX ($G\alpha_i$ 패밀리의 저해제)[Calbiochem (San Diego, CA)]가 사용되었으며, 이들 저해제로의 선처리는 LTB_4-유도된 Akt 인산화를 현저하게 감소시켰다(도 5C). 이들 결과는 퍼퓨린 및 클로라닐이 BLT2-발현 세포에서 LTB_4-유도된 Akt 활성화를 저해함을 제시한다.

[0057] **실시예 5. 퍼퓨린과 클로라닐의 LTB_4-유도된 BLT2-의존적 주화성 저해 확인**

[0058] Akt는 백혈구에서의 주화성 이동을 포함한 다양한 세포적 반응에서 핵심적인 역할을 하는 것으로 보고되어 있다[Shin EH, et al., Biochem Biophys Res Commun 2006;348:606-11.; Puri KD, et al., Blood 2005;106:150-7.; Hannigan M, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:3603-8.]. 유사하게, BLT2의 세포적 기능은 LTB_4의 자극 하에서 주화성을 매개하는 것으로 알려져 있다[Yokomizo T, et al., J Exp Med 2000;192:421-32.]. 따라서, 본 발명자들은 다음으로, 퍼퓨린과 클로라닐이 CHO-BLT2 세포에서 LTB_4-유도된 주화성을 저해하는지를 시험하였다.

[0059] 주화성 운동성(Chemotactic motility)은 6.5-mm-직경의 폴리카보네이트 필터 (8-㎛ 의 공극 크기, Corning Costar)를 구비한 Transwell 챔버를 이용하여 Woo CH, et al., J Biol Chem 2002;277:8572-8.에 기술된 바와 같이 분석하였다. 요약하면, 필터의 아래쪽 표면을 37 ℃에서 1시간 동안 무혈청 RPMI 1640 배지 중의 10 ㎍/mL 파이브로넥틴으로 코팅하였다. 다양한 양의 LTB_4를 포함한 RPMI 1640 배지와 함께 건조, 코팅된 필터를 Transwell 챔버의 아래쪽 웰에 두고, 무혈청 RPMI 1640 배지에 BLT1 및 BLT2를 안정적으로 발현하는 CHO 세포를 최종적으로 2×10^4 cells/100㎕로 윗쪽 웰에 로딩시켜 실험하였다. 저해제들의 효과를 평가할 때, 세포들은 시딩 전 30분 동안 각각의 저해제로 선처리하였다. 37 ℃, 5% CO_2에서 3시간 동안 인큐베이션한 후, 필터들을 메탄올로 3분 동안 고정시키고, 헤마토실린 및 에오신으로 10분 동안 염색했다. 주화성은 광학 현미경 하에서(배율, ×200), 필터의 아래쪽 측면 상의 세포를 계수함으로써 정량하였다. 각 분석에서 6개의 필드를 계수했다. 각각의 샘플은 2회씩 분석하였으며, 분석은 2회씩 반복하였다. 데이터는 평균 ± 표준편차로서 표시하였다. 실험군 간의 통계적인 비교는 Student's *t*-test를 이용하여 수행되었다. $p<0.01$ 값을 통계적으로 유의한 것으로 고려하였다. $p<0.01$, $p<0.001$, 및 $p<0.0001$의 값은 각각 *, **, 및 ***으로 표시하였다.

[0060] 도 6A에서 볼 수 있는 바와 같이, CHO-BLT2 안정 세포에서 주화성 이동 활성은 LTB_4 자극에 대해 종 모양의 투여량 반응 곡선을 갖는 것으로 나타났으나, 대조군 CHO 세포에서는 그렇지 않았다. 또한, 이러한 주화성 이동은 CHO-BLT2 안정 세포에서 퍼퓨린 또는 클로라닐로의 선처리에 의해 현저히 저해되었다(도 6B). 유사하게, LTB_4-유도된 주화성은 CHO-BLT2 안정 세포에서 LY294002 또는 PTX 처리에 의해 저해되었다(도 6C). 그러나, 퍼퓨린 및 클로라닐은 CHO-BLT1 세포의 주화성에 대해 어떠한 저해 효과도 나타내지 않았다 (도 7). 사실, BLT1와 BLT2의 세번째 세포내 루프 영역의 아미노산 서열은 서로 꽤 다르며[Yokomizo T, et al., J Exp Med 2000;192:421-32.], 이는 이들 소분자들의 작용이 BLT2에 대해 꽤 특이적임을 제시한다. 종합하면, 이들 결과는 LTB_4에 의해 유도된 BLT2-의존적 주화성 이동은 퍼퓨린과 클로라닐에 의해 저해되며, 또한 LTB_4-유도된 주화성은 Akt 활성을

필요로 한다는 것을 보여준다.

[0061] **실시예 6. LTB_4-유도된 Rac1 활성화에 대한 퍼퓨린과 클로라닐의 효과 확인**

[0062] 이전에 본 발명자들은 LTB_4-유도된 ROS 생성이 Rat-2 섬유아세포에서의 주화성에 관련되어 있으며[Woo CH, et al., J Biol Chem 2002;277:8572-8.], 또한 ROS 생성이 BLT2-의존적 경로를 통한 것임[Choi JA, et al., Free Radic Biol Med 2008;44:624-34.]을 보고한 바 있다. 또한, Rac1이 세포에서의 ROS 생성에서 핵심적인 조정 역할을 함이 보고된 바 있다 [Woo CH, et al., J Biol Chem 2002;277:8572-8.; Woo CH, et al., J Biol Chem 2000;275:32357-62; Sundaresan M, et al., Biochem J 1996;318 (Pt 2):379-82.; Woo CH, et al., Biochem J 2000;348 Pt 3:525-30.]. 그러므로 본 발명자들은 CHO-BLT2 세포에서 LTB_4-유도된 Rac1 활성화 및 ROS 생성에 대한 퍼퓨린 및 클로라닐의 효과를 시험하였다.

[0063] Rac1이 LTB_4 주화성 신호전달과 연관되어 있는지를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 CHO-BLT2 세포와 우세적인 음성 Rac1 돌연변이를 발현하는 CHO-BLT2-Rac^{N17} 세포[Kim BC, et al., Mol Cells 1998;8:90-5.]에서의 LTB_4의 주화성 효과를 비교하였다. 도 8A에서 볼 수 있는 바와 같이, Rac^{N17}을 발현하는 CHO-BLT2 안정 세포의 LTB_4-유도된 주화성 이동은 CHO-BLT2 세포와 비교할 때 유의하게 약화되었다.

[0064] 위 결과는 CHO-BLT2 세포에서 LTB_4 자극이 세포내 Rac1 활성에 영향을 미치는지 시험해 보도록 이끌었다. Rac1 활성은 GTP 결합된, 활성화된 Rac1과 결합하는 GST-PAK-PBD 융합 단백질을 이용하여 이전에 기술된 바와 같이 측정하였다 [Woo CH, et al., J Biol Chem 2002;277:8572-8.; Akasaki T, et al., J Biol Chem 1999;274:18055-9.]. 요약하면, 상기 융합 단백질은 pGEX-4T3 플라스미드로 형질전환된 *E. coli* BL21에서 IPTG에 의해 유도되어 발현되었으며, 글루타치온-세파로즈-4B를 이용하여 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 세포들을 24시간 동안 혈청 차단한 후, LTB_4로 5분 동안 자극하기 전에 30분 동안 각각의 저해제로 선처리하였다. 그런 다음, 용해 버퍼 (50 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM NaF, 75 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 및 1 mM Na_2VO_3)로 세포용해물을 제조하고, 12000 ×*g*로 30분 동안 원심분리하였으며, 상청액을 GST-PAK-PBD 융합 단백질과 함께 3분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하고, 이를 글루타치온 아가로스 비드와 결합시켰다. 비드에 결합된 단백질들을 원심분리에 의해 회수하고, 용해 버퍼로 3회 세척하였으며, 동일한 버퍼 중에 재현탁시켰다. 단백질들을 15% SDS-PAGE에 의해 분리하고, PVDF막으로 이동시켰다. 그런 다음, 막을 항-Rac1 항체(1:1000 희석)로 표지하고, HRP-컨쥬게이트된 2차 항체 및 ECL 탐지 키트(Amersham Pharmacia)를 이용하여 탐지하였다.

[0065] 실험 결과, Rac1 활성은 CHO-BLT2 세포에서의 LTB_4 자극에 의해 실질적으로 증가되었지만(약 2배), LY294002 및 PTX에 의해서는 저해되었다(도 8B). 기대했던 바와 같이, CHO-BLT2 세포에서의 LTB_4-유도된 Rac1 활성화 또한 퍼퓨린 또는 클로라닐으로의 선처리에 의해 저해되었다 (도 8C).

[0066] 다음으로, 본 발명자들은 CHO-BLT2 세포에서 LTB_4 주화성 신호전달에서의 ROS 생성의 가능한 연관성을 조사하였다. 도 9A에서 볼 수 있는 바와 같이, LTB_4-유도된 주화성 이동은 CHO-BLT2 세포에서 자유 라디칼 스캐빈저인 NAC(Sigma-Aldrich)로의 처리에 의해 유의하게 감소하였다.

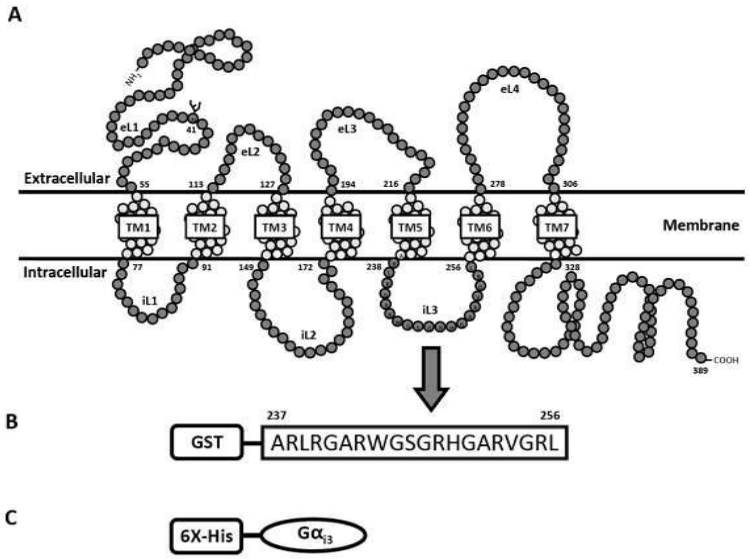
[0067] 본 발명자들은 그 다음으로 LTB_4 처리가 BLT2 경로를 통한 ROS의 증가된 생성을 유도하는지를 조사하였다. 세포내 H_2O_2를 DCF 형광의 함수로서 Choi JA, et al., Free Radic Biol Med 2008;44:624-34. 에 기술된 과정을 이용하여 측정하였다. 요약하면, ROS의 측정 전 2×10^5 세포를 60-mm 디쉬에서 키우고, FBS가 보충된 RPMI 1640 배지 중에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 인큐베이션된 시간 동안 아고니스트에 노출 전에 적어도 2시간 동안 페놀 레드가 없는 RPMI 1640 중에서 세포들을 안정화시켰다. 저해제들의 효과를 평가하기 위해, 세포들을 각각의 저해제로 30분 동안 처리하였다. 세포내 H_2O_2를 측정하기 위해, 세포들을 H_2O_2-민감성 형광물질인 H_2DCFDA[Molecular Probes (Eugene, OR)](20 μM)와 함께 37 ℃의 어둡고 습한 CO_2 인큐베이터 내에서 40분 동안 인큐베이션하였다. H_2DCFDA 는 세포 내에서 DCF로 가수분해되며, 이는 세포 내에 갇히게 된다. H_2DCFDA 자체

는 형광성이 아니지만, H_2O_2의 존재 하에서 높은 형광의 DCF로 산화된다. 탐지기에 로딩시, 세포들을 트립신-EDTA를 이용하여 수확하고 페놀레드가 함유되어 있지 않은 무혈청 RPMI 1640 중에 재현탁시켰다. DCF 형광도는 FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, NJ)를 이용하여 각각 488 및 530 nm의 여기 및 방출 파장으로 측정하였다. 측정된 값은 독립적인 실험으로부터의 DCF 형광도의 평균 ± S.D.를 나타낸다.

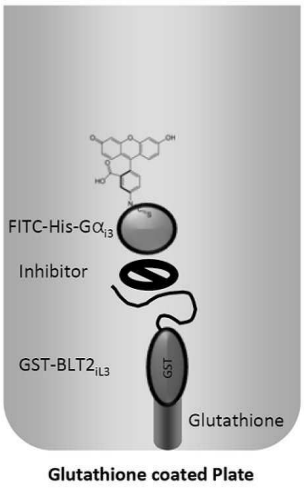
[0068] 결과적인 ROS 생성은 유세포측정기를 이용하여 DCF 형광성에 의해 관찰하였으며, CHO-BLT2 세포에서의 ROS 생성 수준은 LTB_4 자극에 의해 약 2배 정도 증가하였다 (도 9B). 이 효과는 퍼퓨린 또는 클로라닐로 CHO-BLT2 안정 세포를 선처리함으로써 현저하게 저해되었다(도 9C). 유사하게, 본 발명자들은 LTB_4-유도된 ROS 생성이 LY294002 또는 PTX 처리에 의해(도 9D), 그리고 CHO-BLT2 세포에서의 Rac^{N17}에 의해(도 9E) 저해됨을 관찰하였다. 종합하면, 이러한 결과는 퍼퓨린과 클로라닐이 LTB_4 신호전달에 의한 Rac1 활성화와 BLT2-의존적 경로를 통한 계속적인 ROS 생성을 저해함을 나타낸다. 또한 그들은 Rac1-ROS 연관된 케스케이드가 LTB_4-BLT2-유도된 주화성 경로에서의 중요한 역할을 함을 제시한다.

도면

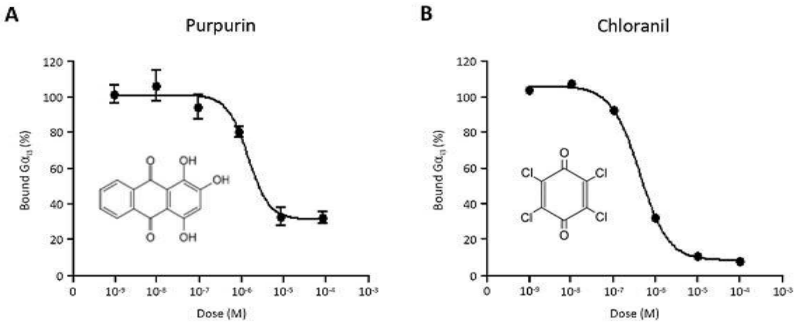
도면1



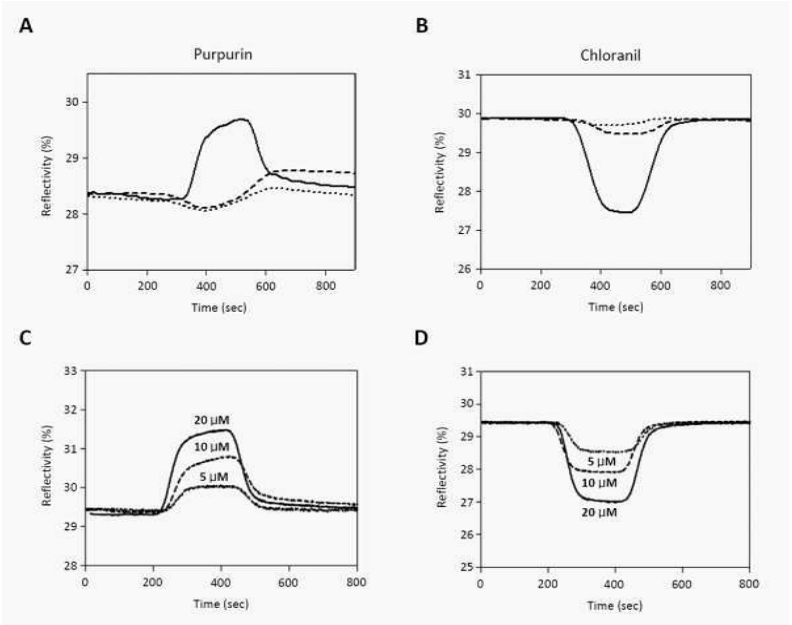
도면2


FITC-His-Gαi3
Inhibitor
GST-BLT2iL3
GST
Glutathione
Glutathione coated Plate

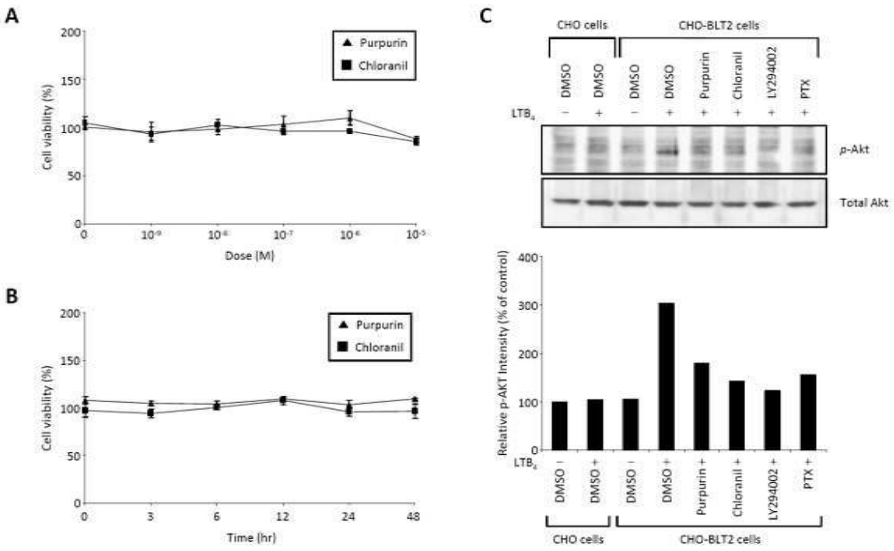
도면3


A
Purpurin
B
Chloranil
Bound Gαi3 (%)
Dose (M)

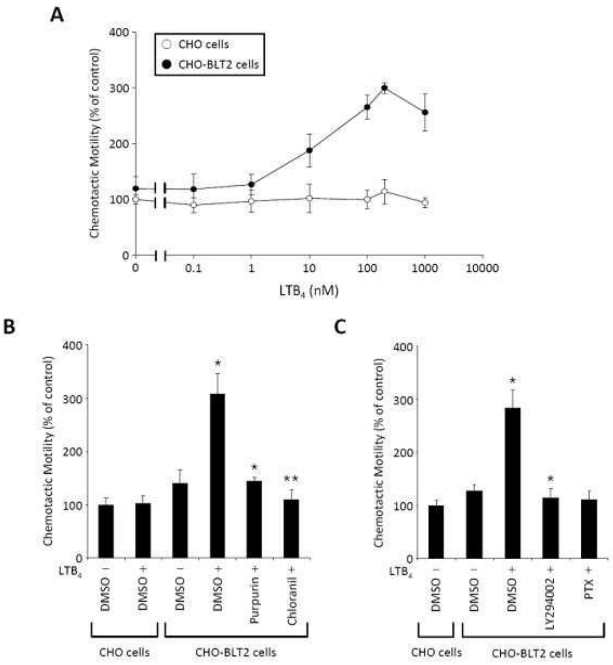
도면4


A
Purpurin
B
Chloranil
C
D
Reflectivity (%)
Time (sec)
20 μM
10 μM
5 μM

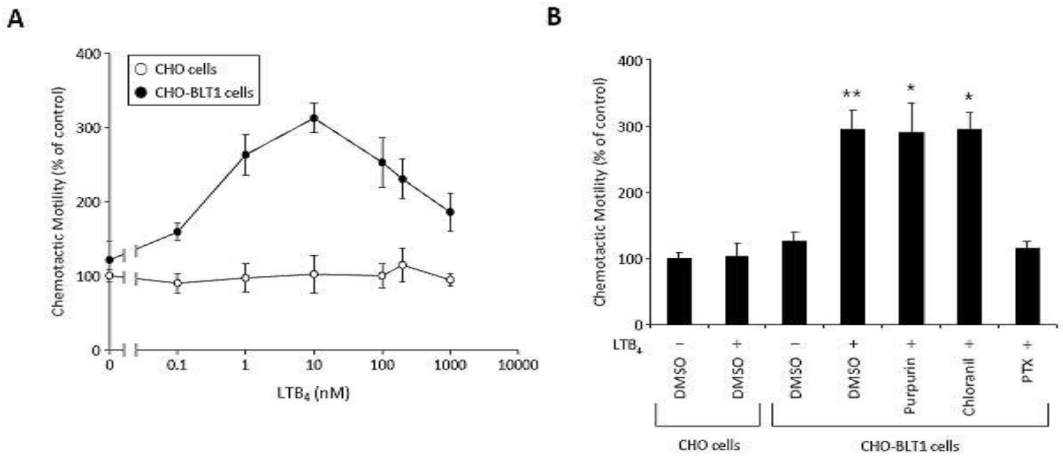
도면5


A
Purpurin
Chloranil
Cell viability (%)
Dose (M)
B
Time (hr)
C
CHO cells
CHO-BLT2 cells
DMSO
Purpurin
Chloranil
LY294002
PTX
LTB4
p-Akt
Total Akt
Relative p-AKT Intensity (% of control)

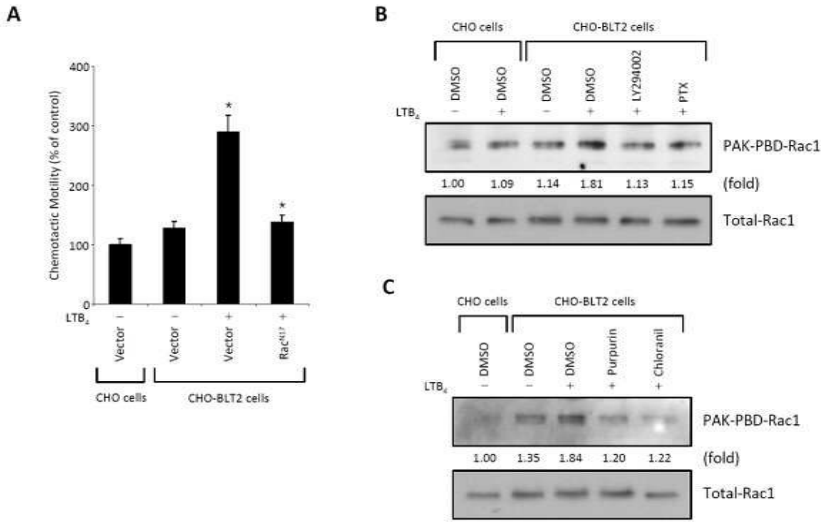
도면6


A
CHO cells
CHO-BLT2 cells
Chemotactic Motility (% of control)
LTB4 (nM)
B
C
DMSO
Purpurin
Chloranil
LY294002
PTX
LTB4

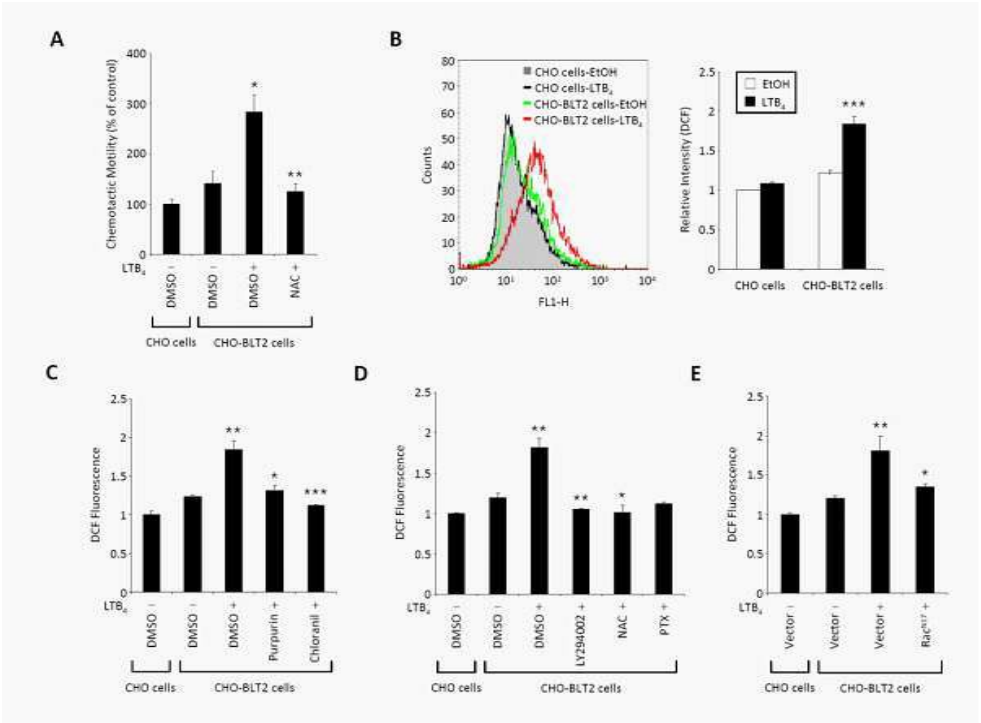
도면7


A
CHO cells
CHO-BLT1 cells
Chemotactic Motility (% of control)
LTB4 (nM)
B
Chemotactic Motility (% of control)
LTB4
DMSO
DMSO
DMSO
DMSO
Purpurin
Chloranil
PTX
CHO cells
CHO-BLT1 cells

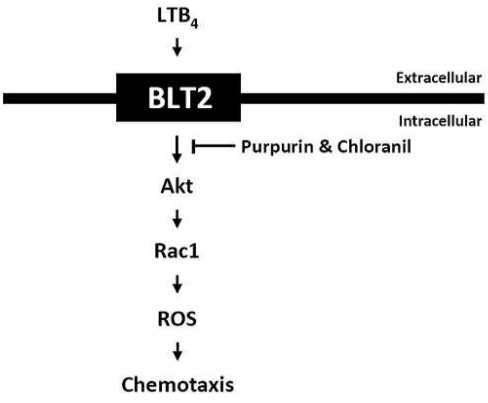
도면8


A
Chemotactic Motility (% of control)
LTB4
Vector
Vector
Vector
CHO cells
CHO-BLT2 cells
B
CHO cells
CHO-BLT2 cells
DMSO
DMSO
DMSO
DMSO
LY294002
PTX
LTB4
PAK-PBD-Rac1
1.00
1.09
1.14
1.81
1.13
1.15
(fold)
Total-Rac1
C
CHO cells
CHO-BLT2 cells
DMSO
DMSO
DMSO
Purpurin
Chloranil
LTB4
PAK-PBD-Rac1
1.00
1.35
1.84
1.20
1.22
(fold)
Total-Rac1

도면9


A
Chemotactic Motility (% of control)
LTB4
DMSO
NAC
CHO cells
CHO-BLT2 cells
B
CHO cells-EtOH
CHO cells-LTB4
CHO-BLT2 cells-EtOH
CHO-BLT2 cells-LTB4
Counts
FL1-H
EtOH
LTB4
Relative Intensity (DCF)
C
DCF Fluorescence
Purpurin
Chloranil
D
LY294002
PTX
E
Vector
Rac

도면10


LTB4
BLT2
Extracellular
Intracellular
Purpurin & Chloranil
Akt
Rac1
ROS
Chemotaxis