

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.⁷
A61K 31/352

(45) 공고일자 2005년04월27일
(11) 등록번호 10-0485271
(24) 등록일자 2005년04월15일

(21) 출원번호 10-2002-0002573
(22) 출원일자 2002년01월16일

(65) 공개번호 10-2003-0062137
(43) 공개일자 2003년07월23일

(73) 특허권자 메타볼랩(주)
서울특별시 종로구 연건동 28-22 서울대학교 의과대학부속 암연구소 6층

(72) 발명자 최정연
서울특별시서초구방배동2189번지

장윤석
서울특별시종로구연건동28번지서울대학교병원내과

김윤근
서울특별시종로구연건동28번지서울대학교병원내과

민경업
서울특별시종로구연건동28번지서울대학교병원내과

조상헌
서울특별시종로구연건동28번지서울대학교병원내과

김인규
인천광역시부평구산곡동307현대아파트104동1406호

전주홍
서울특별시종로구이화동9-257번지

박상철
서울특별시서초구반포4동612-31번지동광빌라101호

강훈수
서울특별시강남구도곡동삼익아파트2동501호

(74) 대리인 특허법인세신

심사관 : 임혜준

(54) 전사인자 c - m a f 의 전사 활성 억제제로서의 니발레놀 및 그를 포함하는 억제학적 조성물

요약

본 발명은 전사 인자 c-maf의 전사 활성 억제제로서의 니발레놀 및 그를 포함하는 억제학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 억제학적 조성물은 업스트림 단계, 즉 전사 단계에서 c-maf 전사 인자의 활성을 억제함으로써, Th2 세포에 의해 생성되는 사이토카인에 의해 유발되는 질환을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있다.

대표도

도 1

색인어

니발레놀, c-maf, 천식

명세서

도면의 간단한 설명

- 도 1은 본 발명의 조성물에 의해 기도 과민성이 억제됨을 보여 주는 그래프;
- 도 2는 기관지 폐포 세척액에서 호산구의 비율에 미치는 본 발명의 조성물의 영향을 확인하는 실험의 결과 그래프;
- 도 3a는 본 발명의 조성물에 의해 혈청 항원 특이 IgE가 감소됨을 보여 주는 그래프;
- 도 3b는 본 발명의 조성물에 의해 혈청 항원 특이 IgG1이 감소됨을 보여 주는 그래프;
- 도 3c는 본 발명의 조성물에 의해 혈청 항원 특이 IgG2a의 농도에 미치는 영향을 나타내는 그래프;
- 도 4a는 본 발명의 조성물에 의해 비장 세포의 IL-4가 감소됨을 보여 주는 그래프;
- 도 4b는 본 발명의 조성물에 의해 비장 세포의 IL-5가 감소됨을 보여 주는 그래프;
- 도 5a-5b는 본 발명의 조성물이 Th2 세포주에 대해서만 특이적으로 작용한다는 것을 보여 주는 그래프;
- 도 6a는 본 발명의 조성물이 Th2 세포주인 D10G4.1 세포주에서 IL-5의 생성을 억제하는 것을 보여 주는 그래프;
- 도 6b는 본 발명의 조성물이 Th2 세포주인 D10G4.1 세포주에서 IL-6의 생성에 미치는 영향을 나타내는 그래프;
- 도 7은 본 발명의 조성물이 IL-4의 프로모터의 전사 활성을 감소시키는 것을 보여 주는 그래프;
- 도 8은 본 발명의 조성물이 전사 인자인 c-maf의 작용을 억제하는 것을 보여 주는 그래프; 및
- 도 9는 본 발명의 조성물의 세포 독성 여부를 확인한 실험 결과 그래프.

발명의 상세한 설명

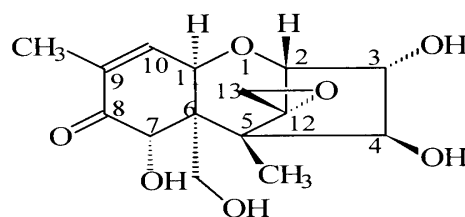
발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 니발레놀의 신규한 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 전사인자 c-maf의 전사 활성 억제제로서의 니발레놀 및 그를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

니발레놀 (nivalenol)은 푸사리움 종 (*Fusarium spp.*)에서 생성되는 트리코테신 진균 독소 (trichothecene mycotoxin)의 일종인 저분자 물질로서, 다음 화학식 1의 구조를 갖는다.

화학식 1



니발레놀은 단백질 합성의 저해제로 작용하며 주로 쌀, 보리 등의 곡류에 오염되는 독소의 일종으로, 골수 기능을 억제하며 비특이적으로 IgA의 생성을 증가시킨다고 알려져 있다 (Hinoshita, F. et al., *Nephron*, 75:469-478(1997)).

한편, c-maf는 루이신 지퍼 구조를 갖는 전사인자로서, 인터루킨-4 (IL-4)의 발현에 특이적으로 관여하며 IL-4의 생성을 결정하는 초기에 관여하기 보다는, 특히 IL-4의 생성을 크게 증대시키는 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (I-Cheng Ho et al. *Cell*, 85:973-983(1996)).

한편, Th2 타입 면역 반응을 변화시킴으로써 이와 관련된 질환을 치료하려는 시도가 있었으며, 예컨대, 미합중국 특허 제 6,086,898 호는 리스테리아 (*Listeria*) 아주번트를 이용한 Th2 타입 면역 반응의 Th1 타입으로의 전환 방법을 개시하고 있으며, 미합중국 특허 제 5,958,671 호는 maf 패밀리의 단백질을 이용한 T 세포 아군을 조절하는 물질의 동정 방법을 개시하고 있다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 요지가 보다 명확하게 설명된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 Th 2 세포가 관련된 질환을 효율적으로 치료할 수 있는 물질을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 니발레놀이 c-maf 전사 인자의 활성을 억제하여 Th 2 세포 면역 반응을 매우 효과적으로 억제하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 c-maf 전사 인자의 전사 활성 억제제로서의 니발레놀을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 유효 성분으로서의 니발레놀을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 c-maf 전사 인자의 전사 활성 억제제로서의 니발레놀 (nivalenol)의 신규한 용도에 관한 것이다.

약리학의 시조인 파라셀수스 (Paracelsus)는 "독성이 없는 물질은 존재하지 않으며 모든 물질은 곧 독물이다. 다만 용량에 따라 어떤 물질이 독물로 간주될 뿐이다"라고 약물과 독물을 정의하였다. 즉, 모든 약물은 그것을 적절히 사용하면 좋은 약물이 되나 그렇지 않으면 독물이 될 수 있으므로 약물과 독물은 궁극적으로 동일한 물질이라고 할 수 있다. 의학의 역사를 볼 때에도 이전에는 치명적인 독물로만 알고 있던 물질이 현재는 유용한 치료 약제로 사용되는 경우도 많이 볼 수 있다.

본 발명자들은 약물과 독물에 대한 상술한 정의에 입각하여, 종래에 진균 독소로 공지된 니발레놀에 대한 c-maf 전사 인자의 전사 활성 억제제로서의 신규한 약리학적 용도를 규명하였다.

본 발명의 니발레놀의 주 타겟인 c-maf는 루이신 지퍼 (leucine zipper)구조를 갖는 전사인자로서, IL-4의 발현에 특이적으로 관여하며 IL-4의 생성을 결정하는 초기에 관여하기 보다는, 특히 IL-4의 생성을 크게 증대시키는 전사인자로서 알려진 것이다

본 발명자들은 Th2 세포 (helper T cell type 2)-관련 사이토카인 (cytokine)에 의해 유발되는 질환을 보다 효과적으로 치료하기 위하여, 업스트림 단계에서 작용하는 약물을 스크리닝 하였고, 그 결과 진균 독소로 공지된 니발레놀이 업스트림 단계에 해당하는 전사 단계에서 c-maf의 작용을 억제하여 결과적으로 Th2 세포에 의한 사이토카인의 생성을 억제한다는 것을 발견 하였다.

따라서, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) c-maf 전사 인자의 전사 활성 억제제로서의 니발레놀의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 Th2 세포-관련 사이토카인에 의해 유발되는 질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 약제학적 조성물에 유효 성분으로 포함되는 니발레놀은 c-maf 전사 인자의 전사 활성을 억제하며, 이러한 억제는 Th2 세포에서 생성되는 IL (interleukin)-4의 생성을 억제하게 된다. 결국, Th2 세포에 의해 생성되는 사이토카인과 관련된 질환 또는 질병의 치료 또는 예방을 하게 된다. 보다 상세하게는 니발레놀은 c-maf 전사 인자가 IL-4 유전자의 프로모터에 결합하는 것을 억제한다.

본 명세서에서 용어 "Th2 세포-관련 사이토카인"은 Th2 세포에서 특이적으로 생성되는 사이토카인, 즉 IL-4, IL-5, IL-10 및 IL-13을 의미하며, 보다 바람직하게는 IL-4 및 IL-5를 의미하며, 가장 바람직하게는 IL-4를 의미한다.

본 발명의 니발레놀은 하기의 실시예에서 명확히 확인할 수 있듯이, Th2의 분화에는 작용하지 않고, 완전히 분화된 Th2 세포에 작용하며 IL-4의 생성을 억제한다. 따라서, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 니발레놀은 분화된 Th2 세포에서 작용하는 IL-4의 생성 억제제로서의 용도를 갖는다.

상기 Th2 세포-관련 사이토카인과 관련된 질환은 알레르기성 질환, 암 또는 감염성 질환이 있다.

우선, 본 발명의 약제학적 조성물에 의해 치료 또는 예방되는 알레르기성 질환은 IgE에 의해 중재되는 것으로 일반적으로 공지되어 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 Th2 세포-관련 사이토카인의 일종인 IL-4의 전사 인자인 c-maf가 IL-4 유전자 프로모터에 결합하는 방해함으로써 IL-4의 생성을 억제하게 되고, 이는 Th2 세포에서 IgE 항체가 생성되는 것을 억제하게 된다. 결국, 알레르기성 질환이 치료 또는 예방된다.

본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물은 특히, 기관지 천식 (asthma)에 효능이 우수하다.

천식은 비만 세포 (mast cell), 호산구 (eosinophil), T 림프구, 대식 세포, 중성구 (neutrophil) 및 표피 세포가 있는 기도의 만성적 염증성 질환으로 정의된다 (참조: www.nhlbi.nih.gov/nhlbi/lung/asthma/prof/ashgdn.pdf). 천식에 대한 대한민국의 유병률은 소아의 경우, 1981년 5.6%, 1990년 10.1%, 그리고 1997년에는 15%로 증가하고 있는 추세이다. 본 명세서에서, 용어 "천식" 및 "기관지 천식"은 동일한 의미로 사용된다. 기관지 천식은 만성 알레르기성 염증성 질환으로, 이때 발생하는 기도의 염증 반응은 CD4+ T-세포의 조절을 받으며, 원인 알레르겐 (allergen)에 노출 시에 Th2 면역 반응은 항진되고 Th1 면역 반응은 억제되며 호산구의 침윤을 특징으로 하는 기도의 만성 염증이 발생한다.

기관지 천식의 치료방법으로 원인 알레르겐에 대한 회피 요법과 탈감작 요법, 스테로이드제를 중심으로 한 약물 요법이 시도되고 있다. 현재까지 회피 요법과 탈감작 요법에는 한계가 있으며 약물 요법이 치료의 근간을 이루고 있다. 최근 기관지 천식의 병인 기전에 대한 이해와 이에 따른 강력한 항염증제제의 사용에도 불구하고, 기관지 천식에 의한 사망률과 중증도는 큰 변화가 없는 상태이다. 또한, 천식 환자의 약 10%에 해당하는 스테로이드 의존성 중증 천식의 유병률도 감소하지 않았다. 천식 발작으로 인해 중환자실에서 기계 호흡을 받았던 환자들이 여기에 속하며, 천식 발작이 없는 경우에도 지속적인 천식 증상으로 삶의 질이 매우 저하되어 있고, 장기간의 스테로이드제를 복용하여야 하기 때문에 약물에 의한 심각한 부작용이 문제가 되고 있다. 따라서, 기관지 천식에 대한 새로운 치료법 개발이 절실히 요구되는 상황이다.

한편, 천식과 관련된 특허문헌으로서, 미합중국 특허 제 5,871,734 호는 VLA-4 (Very Late Antigen-4)를 인식하는 항체를 이용한 천식 치료 방법을 개시하고 있고, 미합중국 특허 제 5,767,065 호는 인터루킨-4 수용체를 이용한 천식의 치료 방법을 개시하고 있다. 또한, 미합중국 특허 제 6,086,898 호는 리스테리아 (Listeria) 아주번트를 이용한 천식의 치료 방법을 개시하고 있다.

한편, Th2 세포-관련 사이토카인의 발현이 암 환자에서 상승된다는 보고가 있으며 (참조: Yamamura, M. et al., *J. Clin. Invest.*, 91:1005-1010(1993); Pisa, P. et al., *P.N.A.S. USA.*, 89:7708-7712(1992)), 악성 종양은 일반적으로 Th1 타입 면역 반응이 Th2 타입 면역 반응으로의 전환을 수반한다. 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물에 의해 치료 또는 예방 가능한 질환은 암을 포함한다.

또한, 다양한 감염성 질환에서 Th2 세포-관련 사이토카인의 발현이 증가되며, 이러한 감염성 질환은 HIV 감염증, 결핵, 레이슈마니아증, 주혈흡충증 및 네마토드 감염증을 포함하며 (Shearer, G. M. et al., *Prog. Chem. Immunol.* 54:21-43(1992); Clerici, M. et al., *Immunology Today* 14:107-111(1993); Fauci, A. S. *Science* 239:617623(1988); Locksley, R. M. et al., *Immunoparasitology Today* 1:A58-A61(1992); Pearce, E. J., et al. *J. Exp. Med.* 173:159-166(1991); Grzych, J-M., et al. *J. Immunol.* 141:1322-1327(1991); Kullberg, M. C., et al. *J. Immunol.* 148:3264-3270(1992); Bancroft, A. J., et al. *J. Immunol.* 150:1395-1402(1993); Pearlman, E., et al. *Infect. Immun.* 61:1105-1112(1993); 및 Else, K. J., et al. *J. Exp. Med.* 179:347-351(1994)), 이러한 감염성 질환에서는 일반적으로 Th1 타입 면역 반응이 Th2 타입 면역 반응으로의 전환을 수반한다. 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물에 의해 치료 또는 예방 가능한 질환은 감염성 질환을 포함한다.

본 명세서에서, 용어 "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 동물에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 용어 "치료"는 (a) 질환 또는 질병의 발전의 억제; (b) 질환 또는 질병의 경감; 및 (c) 질환 또는 질환의 제거를 의미한다.

본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입 등으로 투여할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물을 경구 투여하는 경우, 적합한 투여량은 성인 기준으로 1일 1회 1 mg/kg이다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

이와 같은 본 발명을 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속한 기술 분야에서 통상의 지식을 지닌 사람에게 있어서 자명할 것이다.

실시에 I : 마우스 기관지 천식 모델에서 니발레놀의 기관지 천식 발생 억제 효능 평가

실시에 I-1: 마우스 기관지 천식 모델의 구축

본 실시예에서 이용된 마우스는 6-7 주령의 BALB/c계 자성 마우스이었고, 각 군 당 6-8 마리의 마우스를 사용하였으며, SPF (specific pathogen free) 동물을 (주)대한바이오링크 (대한민국)로부터 구매하고 SPF 조건에서 사육하였다. 우선, 난알부민 (ovalbumin) 20 μ l 및 알룸 (alum) 2 mg을 200 μ l PBS에 혼합하여 2주 간격으로 복강 내 2회 투여하여 감작시키고, 실험 개시 21일, 22일 및 23일째에 1% 난알부민을 30분간 흡입시켜 기관지 천식 마우스 모델을 제작하였다.

실시에 I-2: 니발레놀의 투여

니발레놀 (Sigma, 미합중국)은 경구로 투여하였으며, 감작 시작부터 유발 전(실험 개시 1일-20일째)까지 니발레놀을 투여한 군과 투여하지 않은 군으로 나누어 기관지 천식의 지표인 기도 과민성, 기도의 호산구성 염증, 혈청 특이 항체 농도를 비교하였다.

실시에 I-3: 메타콜린 기관지 유발 시험

메타콜린에 대한 기도 반응성은 한국형 동물용 체용적 변동기록기 ((주)올메디쿠스, 대한민국)를 이용하여 Penh (enhanced pause)를 측정하여 평가하였다.

폐 기능을 측정하는 동안 주실 내의 동물이 저산소증에 빠지는 것을 방지하기 위해, 바이어스-플로우 (bias-flow)로 산소가 공급되며 호흡기류계(pneumotachograph)는 주실과 외부로 연결하여 먼지, 소음, 온도 등 외부 환경의 변화를 보상하는 역할을 하도록 하였다. 기도 수축반응 시 PEP (peak expiratory pressure)와 PIP (peak inspiratory pressure)가 모두 증가하나, PEP가 상대적으로 더 많이 증가하며, 호기 시간도 RT (relaxation time) 보다는 Te-RT (expiratory time - relation time)이 길어지므로 포즈 (pause)가 증가하게 된다. 따라서, PEP와 포즈를 모두 반영하는 Penh (enhanced pause)가 기도 수축의 정도를 가장 잘 나타내는 지표가 된다.

마지막 난알부민 유발 24시간 후에, 마우스를 동물용 체용적 변동기록기에 넣고 안정되기를 기다린 후, 기저값 Penh를 3분간 측정하였다. 이어, 메타콜린 (Sigma)을 2.5, 6.25, 12.5, 25 및 50 mg/dl의 농도로 각각 3분간 흡입시킨 후 3분 동안의 펜 값을 구하여 평균을 구한 뒤 기저값 Penh의 평균에 대한 백분을 증가로 값을 나타내었다 (참조: 도 1). 도 1에서, "AW"는 니발레놀 대신에 물을 투여한 천식 마우스 모델에 대한 것이고, "AN"은 니발레놀을 투여한 천식 마우스 모델에 대한 것이며, "물"로 표시된 것은 물을 투여한 정상 마우스에 대한 것이다.

도 1에서, PC200은 기저 Penh 값을 200% 증가시키는 데 필요한 메타콜린의 농도로서, PC200의 농도가 낮을수록 기도 과민성이 증가하였음을 나타낸다. 도 1에서 알 수 있듯이, 기도 과민성은 니발레놀을 투여한 군에서 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$).

실시에 I-4: 기관지 폐포 세척

메타콜린 기관지 유발 시험을 실시한 다음, 24시간 후 (즉, 마지막 난알부민 유발 48시간 후) 마우스를 케타민 (케타라 50 mg/ml, (주)유한양행, 대한민국)으로 0.15 ml씩 복강 내 투여하고 마취시켰다. 이어, 마우스를 해부대에 고정하고 알코올을 분무한 뒤, 복부를 절개하고 하대 정맥에서 500 ml 정도 채혈한 후, 개흉하였다. 그런 다음, 기관을 노출시켜 24 게이지 메디켓으로 카테터를 삽입한 후, 결찰하여 무균성 생리식염수로 0.5 ml 정도씩 주입하며 기관지 폐포 세척을 실시하였다.

그리고 나서, 기관지 폐포 세척액을 4°C에서 1000 rpm으로 5분간 원심분리한 다음, 상층액을 버리고 10% FBS-IMDM 2 ml을 넣어서 부유시키고 세포수를 측정하였다. 이어, 사이토스핀 (cytospin)을 실시하고, 슬라이드에 도말한 다음, 디프 퀵 (Diff Quick) 염색을 한 후, 광학현미경 (x 1000)에서 최소한 300개 이상의 염증세포를 관찰하여 호산구, 대식세포, 중성구 및 림프구를 분류하였다 (참조: 도 2). 도 2에서, "AW"는 니발레놀 대신에 물을 투여한 천식 마우스 모델에 대한 것이고, "AN"은 니발레놀을 투여한 천식 마우스 모델에 대한 것이며, "물"로 표시된 것은 물을 투여한 정상 마우스에 대한 것이다.

도 2에서 볼 수 있듯이, 니발레놀을 투여한 군에서 호산구의 평균 개수는 감소하였으나, 투여하지 않은 군과 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ($p > 0.05$).

실시에 I-5: 혈청 항난알부민 특이 항체의 측정

항난알부민 특이 IgE 항체는 ELISA법을 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 우선, 난알부민을 탄산염 완충액 (Sigma, C-3041)에 20 mg/ml로 희석하여 96-웰 플레이트 (NUNC, 442404)에 100 ml/웰로 코팅하여 4°C에서 하룻밤 동안 항온처리 하였다. 이어, 0.05% Tween-20-PBS (Showa Chemicals INC.)로 3-5회 세척하고, 비특이적 결합을 막기 위해 0.05% Tween-20-PBS로 만든 3% BSA (Sigma, A-2153)를 200 ml/웰로 37°C에서 1-2시간 블로킹 한 다음, 0.05% Tween-20-PBS로 3-5회 세척하였다.

그런 다음, 측정하고자 하는 시료를 적절한 비율로 희석하여 (희석용 완충액: 0.1%BSA in 0.05% Tween-20-PBS) 각 웰에 50-100 ml씩 분주하여 37°C에서 2시간 또는 4°C에서 하룻밤 동안 항온처리 하고, 0.05% Tween-20-PBS로 3-5회 세척하였다. 그리고 나서, 비오틴화 항-마우스 IgE Ab (Pharmingen, 02122D)를 희석용 완충액으로 2 mg/ml로 희석하여

100 ml/웰씩 분주한 후 37°C에서 1시간 동안 방치한 후, 0.05% Tween-20-PBS로 6회 세척하였다. 이어, SaV-HRP (Pharmingen, 13047E)를 희석용 완충액으로 1:1000으로 희석한 후 100 ml/웰씩 분주한 후 37°C에서 30분간 방치하고, 0.05% Tween-20-PBS로 6회 세척하였다.

그런 다음, OPD 1T (Sigma, P-6912), 포스페이트 시트레이트 완충액 (Sigma, P-4809) 14.7 ml 및 H₂O₂ (Sigma, H-1009) 7.35 ml (차광) 용액을 각 웰당 100 ml씩 분주한 후 30분간 반응시켰다. 그리고 나서, 12.5% 황산 (Matsumoen Chemicals LTD.)을 50 ml/웰씩 분주하여 반응을 중지시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(Microplate Reader: Molecular Devices, THERMO max). 표준 시료로는 별도로 기관지 천식 모델로 제작한 마우스 6마리의 혈청을 혼합하여 표준 혈청을 만들어 항나알부민 특이 IgE의 농도가 100 U라 가정하고, 혈청을 희석하여 표준 농도 곡선을 얻은 다음 상대적인 단위(U)를 구하였다. IgG 아형 항체는 항-마우스 IgE 대신 IgG1, IgG2a를 이용하여 상기한 방법으로 측정하였다(참조: 도 3a-3c). 도 3a-3c에서, "AW"는 니발레놀 대신에 물을 투여한 천식 마우스 모델에 대한 것이고, "AN"은 니발레놀을 투여한 천식 마우스 모델에 대한 것이며, "물"로 표시된 것은 물을 투여한 정상 마우스에 대한 것이다.

도 3a-3c에서 알 수 있듯이, Th2 면역 반응의 지배를 받는 혈청 항원 특이 IgE 및 항원 특이 IgG1은 니발레놀을 투여한 군에서 유의하게 감소하였으나 (p < 0.05), 혈청 항원 특이 IgG2a는 니발레놀을 투여한 군과 투여하지 않은 군에서 유의한 차이가 없었다 (p > 0.05).

실시예 I-7: 비장 세포에서의 사이토카인 분석

상기한 마우스에서 비장 세포를 분리한 다음, 난알부민 또는 난알부민과 니발레놀을 함께 투여하여 2일간 배양한 후, 인터페론- γ , IL-4, 및 IL-5의 분비 패턴을 상기 실시예 I-5와 같이 분석하였다(참조: 도 4a 및 4b). 도 4a 및 4b에서, "AW"는 니발레놀 대신에 물을 투여한 천식 마우스 모델로부터 분리된 비장 세포에 대한 것이고, "AN"은 니발레놀을 투여한 천식 마우스 모델로부터 분리된 비장 세포에 대한 것이다.

도 4a 및 4b에서 보는 바와 같이, IL-4의 생산이 니발레놀을 투여한 군에서 완전히 억제되었으며, IL-5의 생산도 니발레놀의 투여량이 증가함에 따라 어느 정도 억제되었다.

실시예 2: 니발레놀의 Th2 세포주에 대한 특이적 작용

니발레놀이 Th2 세포주에 대해서만 특이적으로 작용한다는 것을 확인하기 위하여, 대조군으로 Th2의 특이적인 특성이 나타나지 않는 T 세포주인 EL4 세포주 및 Th2의 특이적인 특성을 갖는 D10G4.1 세포주를 이용하여 1차적(primary) 세포 배양을 실시하였다. EL4 세포주 및 D10G4.1 세포주를 α CD3 단일클론 항체 (Pharmingen)로 자극한 후 각각 0, 30, 60, 120 및 250 ng/ml의 니발레놀을 처리하였다. 이어, 세포 배양액을 24시간 후에 취하였다. IL-4의 양을 측정하기 위해 우선 IL-4에 대한 단일클론 항체 (Pharmingen)를 플레이트에 코팅하고 3% 우혈청 알부민으로 블로킹 한 후 세포 배양액 10 μ l를 넣고 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그런 다음, IL-4에 대한 다클론항체 (Pharmingen)를 다시 넣고 알칼린 포스파타아제가 결합된 2차 항체 (Pierce)를 넣어 발색을 유도한 다음, 발색 정도를 마이크로플레이트 분광측정기 (Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다.

도 5a 및 5b에서 확인할 수 있듯이, EL4 세포주의 경우, α CD3 단일클론 항체 자극에 의해 IL-4가 다량 생성되었으나, 니발레놀을 처리해도 IL-4의 생성에는 변화가 거의 없었다. 한편, D10G4.1 세포주의 경우, α CD3 단일클론 항체 자극에 의해 IL-4가 다량 생성되었으나, 니발레놀을 처리하면 IL-4의 생성이 검출 가능한 농도 이하로 억제되었다.

또한, 도 6a 및 도 6b에서 알 수 있듯이, D10G4.1 세포주의 경우, α CD3 단일클론 항체 자극에 의해 IL-5가 다량 생성되었으나, 니발레놀의 투여량을 증가시키면 따라 투여량에 의존적으로 IL-5의 생성이 억제되었다. 한편, D10G4.1 세포주의 경우, α CD3 단일클론 항체 자극에 의해 IL-6가 다량 생성되었으나, 니발레놀을 처리하여도 IL-6의 생성에는 변화가 없었다.

실시예 3: 니발레놀이 IL-4의 전사에 미치는 영향 평가

D10G4.1 세포주에 전기적 충격(참조: Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982))을 이용하여 IL-4의 프로모터에 리포터 분자인 루시페라아제가 결합된 벡터를 도입하고, IL-4의 프로모터의 활성을 루시페라아제 활성으로 파악하였다. 루시페라아제 활성은 세포를 용해시킨 후 Promega사의 루시페라아제 활성 측정 키트를 사용하여 측정하였다. 또한, IL-4의 프로모터를 형질전환시킨 D10G4.1 세포주에 니발레놀을 처리한 다음, 상기 방법과 동일하게 루시페라아제 활성을 측정하였다.

첨부 도 7에서 볼 수 있듯이, IL-4의 프로모터를 형질전환시킨 D10G4.1 세포주에서는 루시페라아제 활성이 대조군에 비해 약 30배 정도 증가하였으나, 니발레놀을 처리한 형질전환 세포주에서는 루시페라아제 활성이 대조군 수준까지 억제되었다. 따라서, 니발레놀은 IL-4의 프로모터 서열의 전사 활성을 크게 감소시킨다는 것을 알 수 있다.

실시예 4: 니발레놀이 c-maf에 미치는 영향 평가

NIH3T3 세포주 (한국 세포주은행)에 IL-4의 프로모터가 있는 실시예 3의 벡터를 Invitrogen사의 Lipofectamine을 이용하여 형질전환시켰다. 또한, 형질전환된 NIH3T3 세포주에 c-maf를 Lipofectamine 방법 (Invitrogen 사의 매뉴얼에 따라)으로 과발현시켰다. 이어, 리포터 분자인 루시페라아제 활성을 측정하였다. 또한, IL-4의 프로모터가 형질전환되고 c-maf가 과발현된 NIH3T3 세포주에 니발레놀을 처리한 다음 상기 방법과 동일하게 루시페라아제 활성을 측정하였다.

첨부 도 8에 나타나 있듯이, IL-4 프로모터만을 형질전환시킨 대조군에 비해, c-maf를 과발현시킨 세포에서 루시퍼라아제 활성이 3배 정도 증가하였다. 한편, 니발레놀을 처리한 세포주에서는 루시퍼라아제 활성이 대조군 수준까지 감소하였다.

따라서, 니발레놀은 전사 인자인 c-maf의 작용을 억제하여 IL-4의 전사를 억제함으로써, 결국 IL-4의 생성을 감소시킨다는 것을 알 수 있다.

실시예 5 : 니발레놀에 대한 독성 검사

NIH3T3 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM (Invitrogen) 배양액이 있는 24-웰 플레이트에서 배양하고, 도 9에 기재된 농도별로 니발레놀을 처리하여 48 시간이 경과한 다음, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl) 시약을 넣고 3시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 색깔의 변화는 마이크로플레이트 분광측정기 (Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다. 도 9에서 볼 수 있듯이, 니발레놀이 c-maf의 전사 활성화에 대한 억제 효과를 나타내는 농도에서의 MTT 활성은 니발레놀을 첨가하지 않은 대조군과 거의 동일하였다. 따라서, 니발레놀의 유효 농도에서는 생체 세포에 대하여 독성을 거의 나타내지 않음을 알 수 있고, 니발레놀에 의한 c-maf의 전사 활성화의 억제는 니발레놀 처리에 따른 세포 독성의 결과가 아님을 확인할 수 있다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하였듯이, 본 발명은 c-maf 전사 인자의 전사 활성 억제제로서의 니발레놀 및 그를 포함하는 Th2 세포-관련 사이토카인에 의해 유발되는 질환의 치료 또는 예방용 억제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 억제학적 조성물은 업스트림 단계, 즉 전사 단계에서 c-maf 전사 인자의 활성을 억제함으로써, Th2 세포에 의해 생성되는 사이토카인에 의해 유발되는 질환을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
삭제

청구항 2.
삭제

청구항 3.
삭제

청구항 4.
삭제

청구항 5.

(a) c-maf 전사 인자의 전사 활성 억제제로서의 니발레놀의 억제학적 유효량; 및

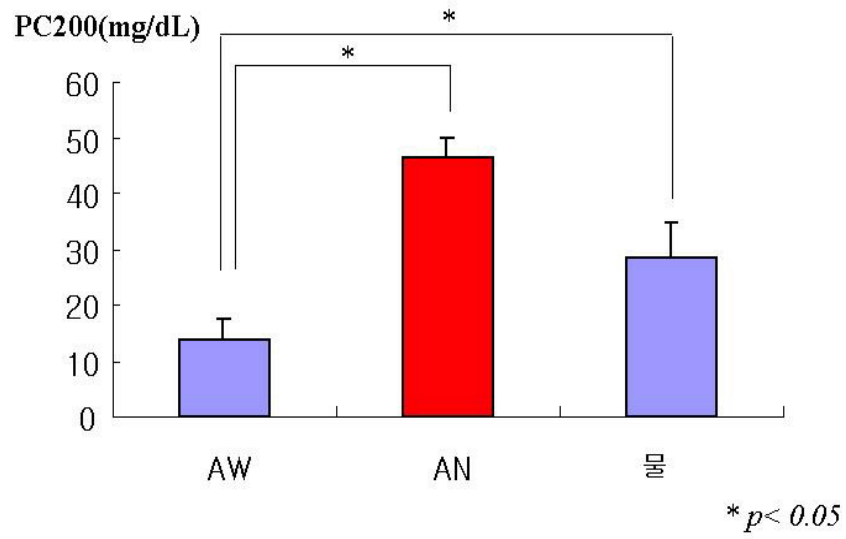
(b) 억제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 천식의 치료 또는 예방용 억제학적 조성물.

청구항 6.
삭제

도면

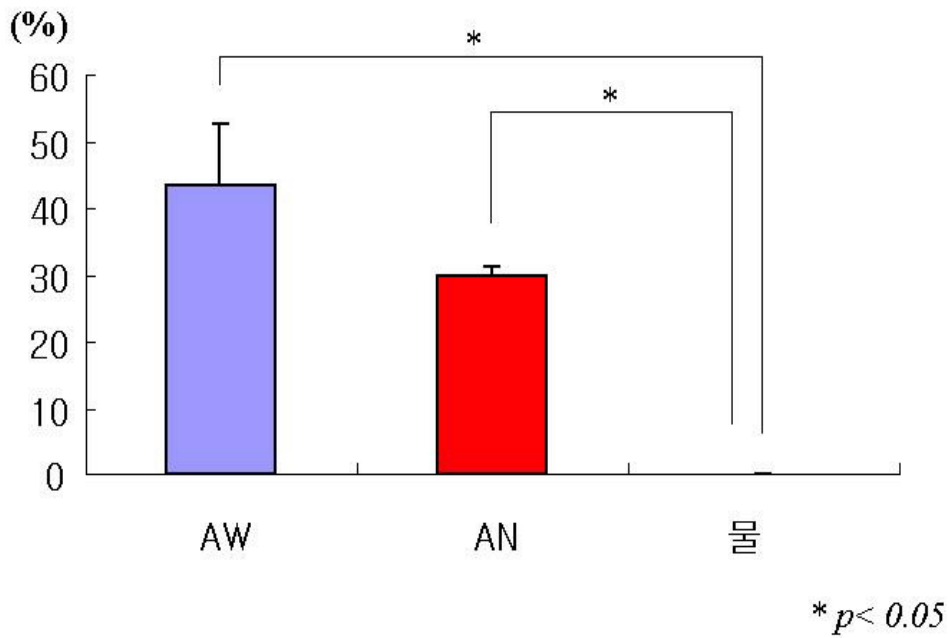
도면1

기도 과민성

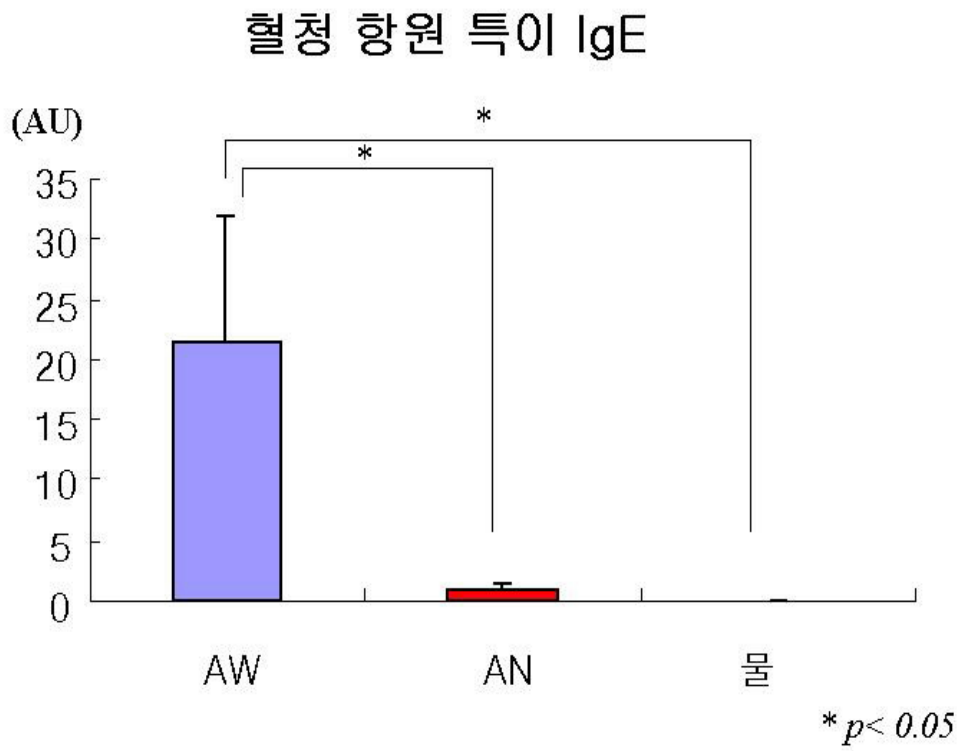


도면2

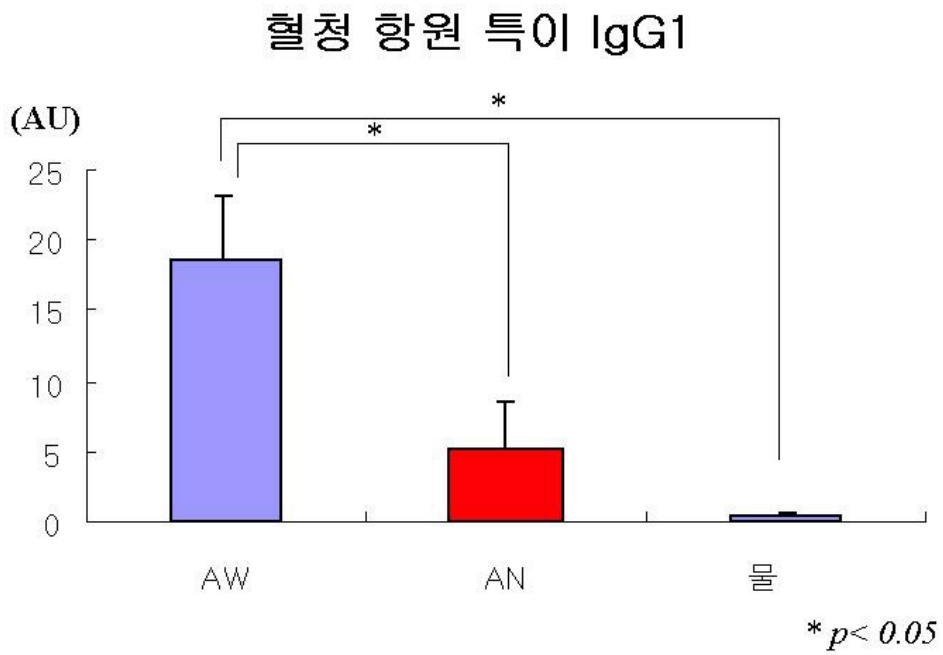
폐포 세척액에서의 호산구 비율



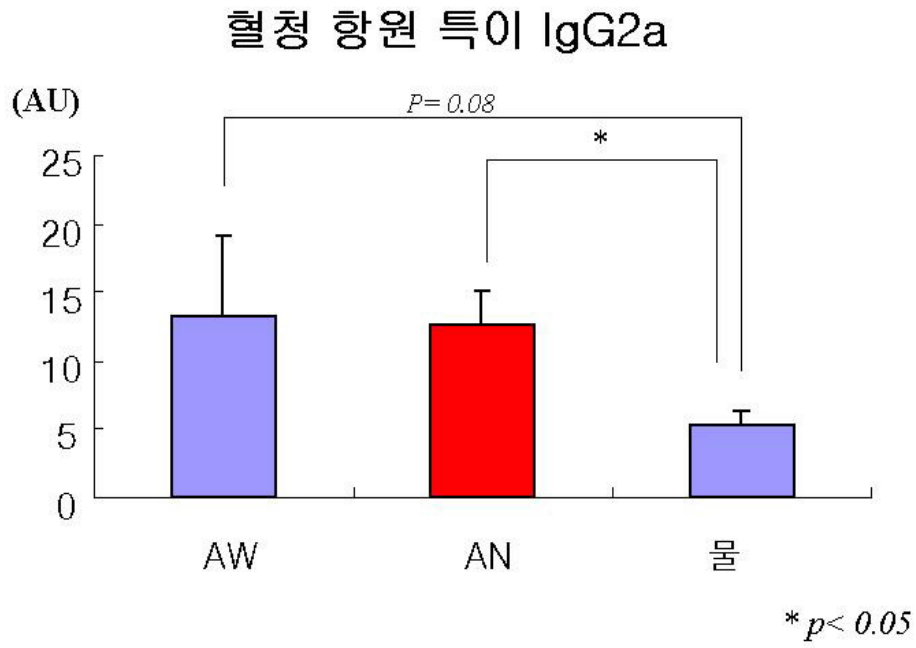
도면3a



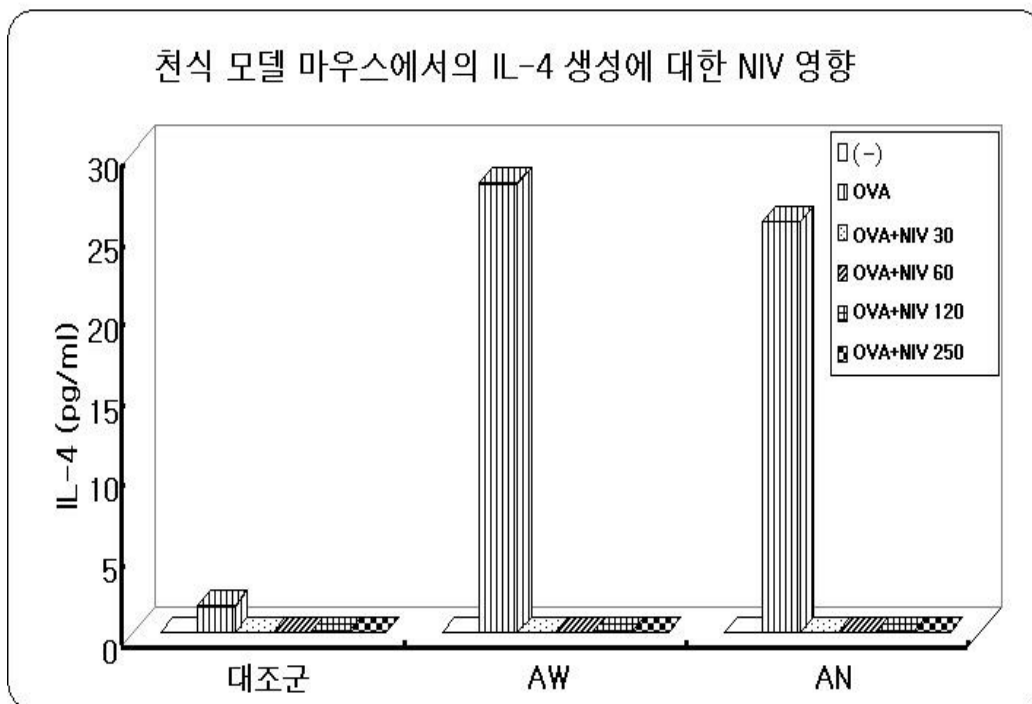
도면3b



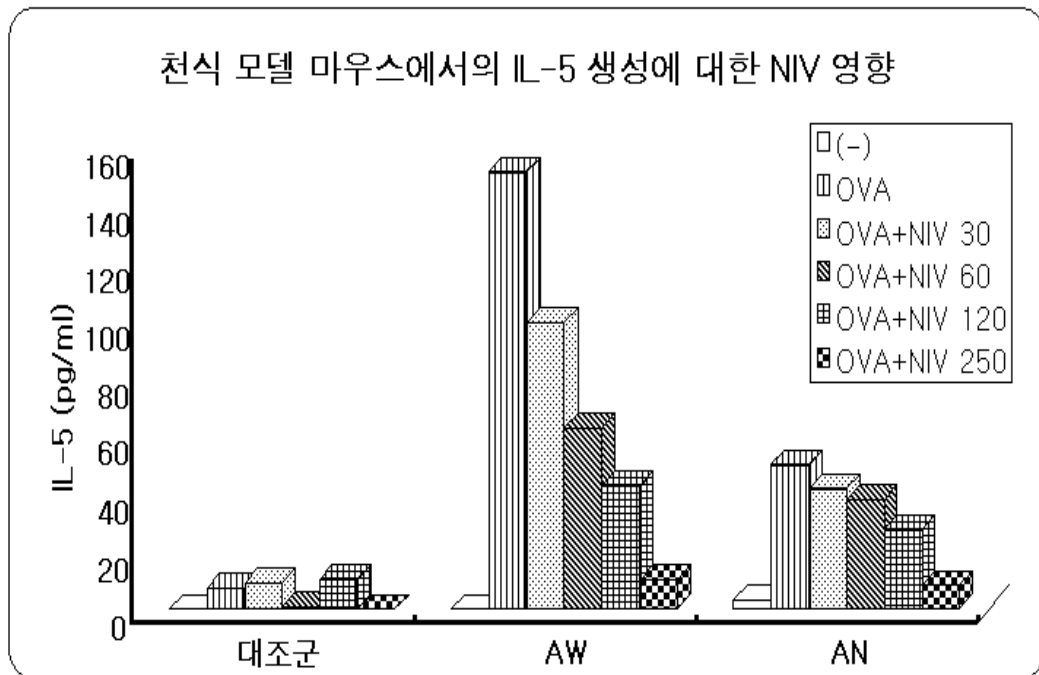
도면3c



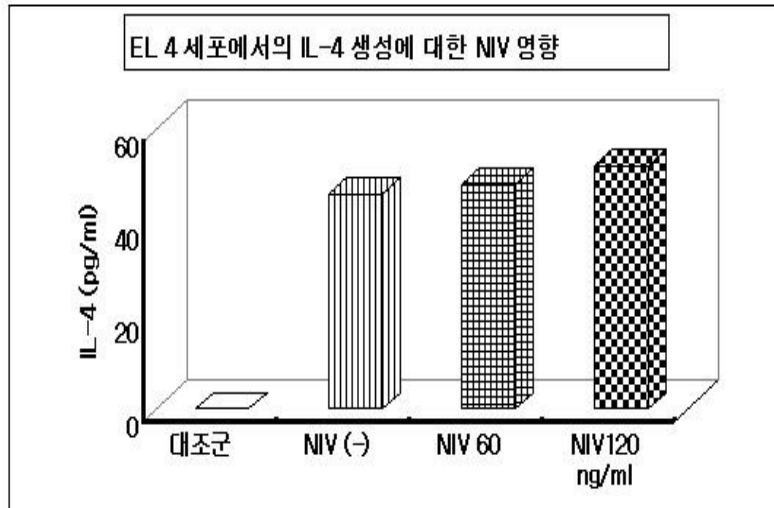
도면4a



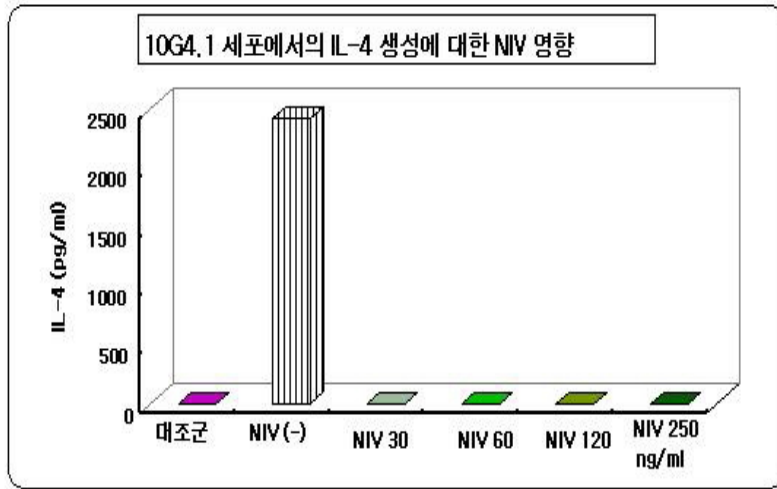
도면4b



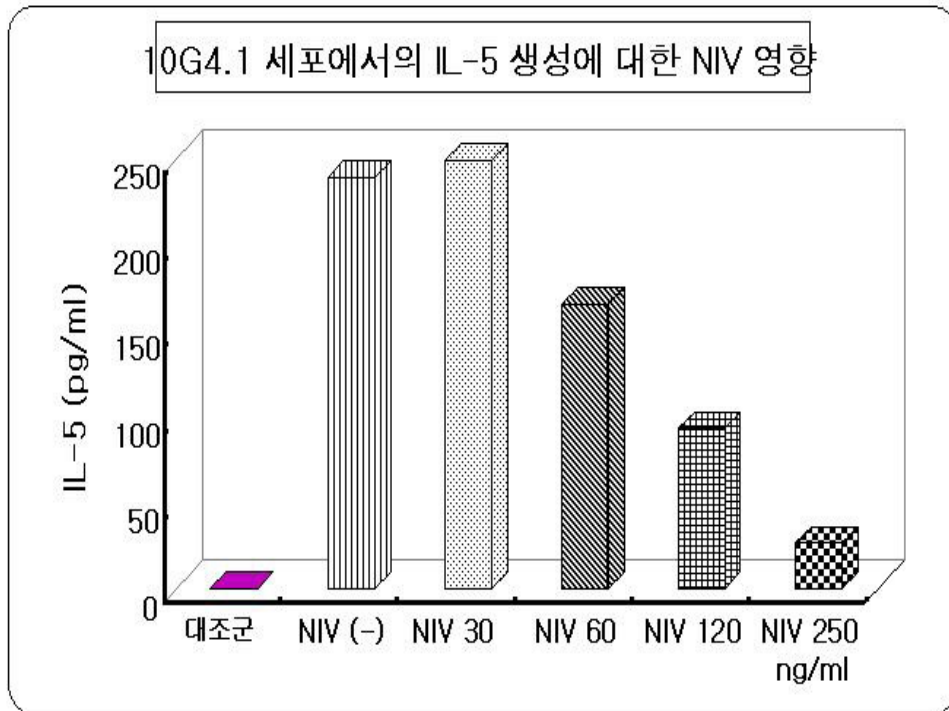
도면5a



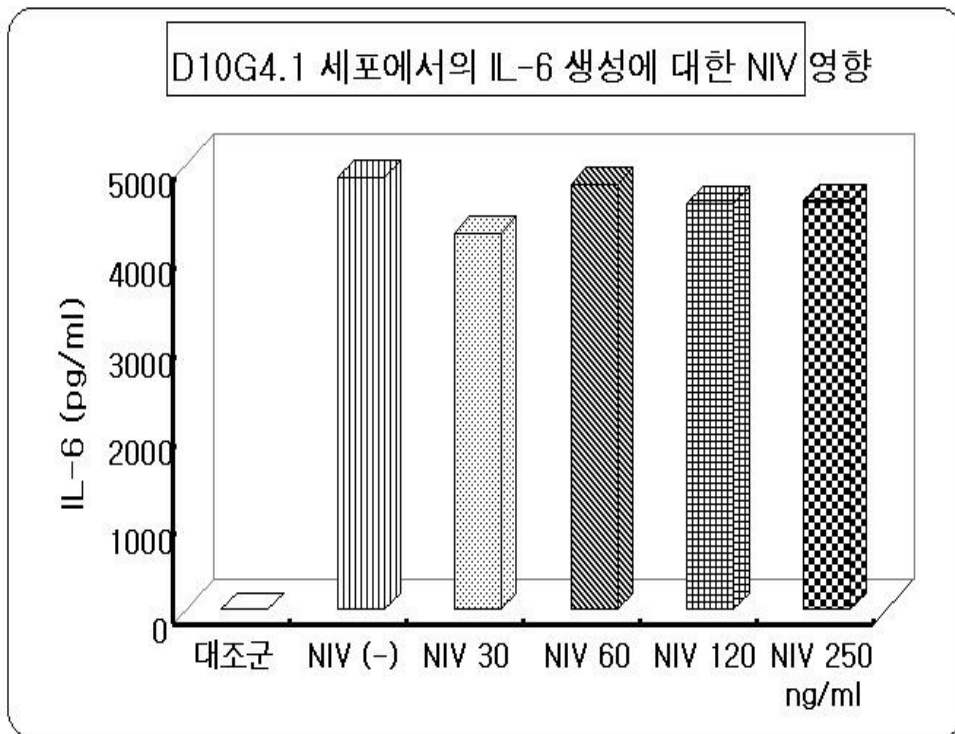
도면5b



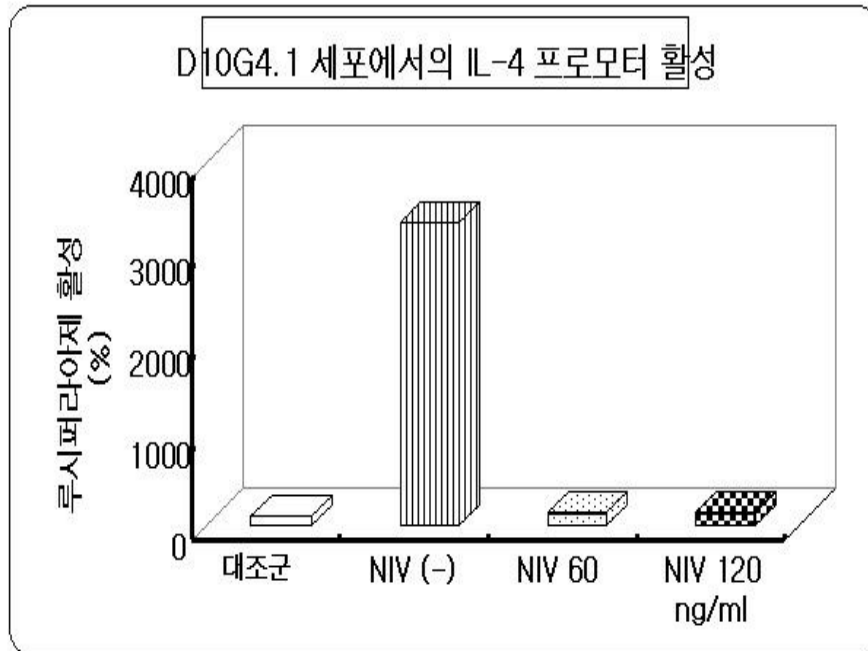
도면6a



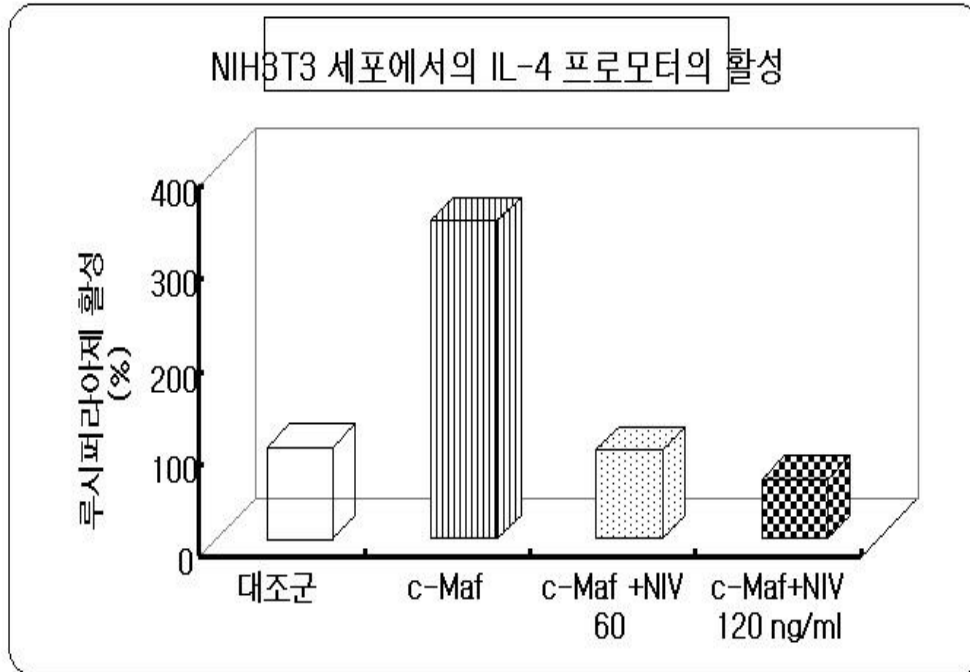
도면6b



도면7



도면8



도면9

