



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월14일
 (11) 등록번호 10-1394594
 (24) 등록일자 2014년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/165 (2006.01) **A61P 19/10** (2006.01)
A61K 31/4535 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2009-7017146
 (22) 출원일자(국제) 2008년02월15일
 심사청구일자 2012년04월23일
 (85) 번역문제출일자 2009년08월17일
 (65) 공개번호 10-2009-0111335
 (43) 공개일자 2009년10월26일
 (86) 국제출원번호 PCT/CA2008/000312
 (87) 국제공개번호 WO 2008/098379
 국제공개일자 2008년08월21일
 (30) 우선권주장
 60/890,100 2007년02월15일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
 (56) 선행기술조사문헌
 US05071875 A
 US05151446 A
 전체 청구항 수 : 총 8 항

(73) 특허권자
슈 생-쥐스맹
 캐나다 퀘벡 에이치3티 1썸5 몬트리올 코트-스테
 -가트린느 3175
 (72) 발명자
모로 알랭
 캐나다 퀘벡 에이치1에이 5티5 몬트리올 줄스-오
 뜨 3489
마일로 쥬느비에브
 캐나다 퀘벡 에이치2브이 3엑스9 오프레몽 #16 듀
 로셰 5205
 (74) 대리인
박장원

심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 **골 재흡수 및 골 형성 간의 불균형을 보정하는 방법 및 이를 위한 키트 및 조성물**

(57) 요약

4-페닐-2-프로피온아미도테트라린 (4-P-PDOT) 및 그의 유사체, 유도체, 전구약물, 전구체 및 그의 염을 사용하는 것에 기초한, 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 치료하기 위한 화합물, 방법, 용도, 조성물, 키트 및 패키지가 제공된다.

(30) 우선권주장

60/912,267 2007년04월17일 미국(US)

60/915,196 2007년05월01일 미국(US)

60/938,025 2007년05월15일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

(a) (i) 4-P-PDOT; 및 (ii) (i)의 약학적으로 허용가능한 염 중에서 선택된 1종 이상의 화합물; 및
 (b) 골다공증, 파제트병, 골용해성 골암 또는 파골세포를 유도하는 염증성 시토카인이 존재함을 특징으로 하는 관절염에서 뼈의 무기질화 침착 결손을 보정하거나 예방하기 위하여 대상자에게 상기 화합물을 투여하기 위한 지침서를 포함하는 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 비스포스포네이트, 랄록시펜, 경비용 칼시토닌 및 테리파라타이드로 이루어진 군 중에서 선택되는 약제를 추가로 포함하는 것인 키트.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 대상자는 인간인 것인 키트.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

골 재흡수와 골 형성 간의 불균형이 존재하는 골다공증, 파제트병, 골용해성 골암 또는 파골세포를 유도하는 염증성 시토카인의 존재를 특징으로 하는 관절염에서, 대상자의 상기 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 보정하기 위한 (a) (i) 4-P-PDOT; (ii) (i)의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 (iii) (i) 및 (ii)의 배합물을 포함하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기한 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형의 보정은 골 재흡수의 억제; 파골세포 분화의 억제; 골 미네랄 밀도 (BMD: bone mineral density)의 증가; 골 미네랄 함량 (BMC: bone mineral content)의 증가; 순수한 피질골 밀도의 증가; 총골의 평균 밀도의 증가; 피질 두께의 증가; 골피질이 되도록 할당된 순수한 피질 면적의 증가; 경골 간부의 총 골면적의 증가; 미네랄화 부착 속도의 증가; 골 형성 속도/골 표면의 증가; 내피질 표면 또는 골막 표면에 있어서 미네랄화 표면의 증가; 혈청의 알칼라인 포스파타제의 감소; 저미네랄화 유골의 피질내 영역의 감소; 유골 두께의 감소 및 유골 축합의 감소 중 적어도 한가지를 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서, 비스포스포네이트, 랄록시펜, 경비용 칼시토닌 및 테리파라타이드로 이루어진 군 중에서 선택되는 약제를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 대상자는 인간인 것인 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

명세서

기술분야

관련 출원에 대한 상호 참조 사항

[0001]

[0002] [0001] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 조문에 의거, 2007년 2월 15일자 미국 가특허출원 제60/890,100호, 2007년 4월 17일자 미국 가특허출원 제60/912,267호, 2007년 5월 1일자 미국 가특허출원 제60/915,196호, 및 2007년 5월 15일자 미국 가특허출원 제60/938,025호에 기초한 우선권 주장 출원이다. 전술한 우선권 기초 출원의 내용은 그 전부가 본 발명에 참고로 병합되어 있다.

배경 기술

[0003] [0002] 본 발명은 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 보정하기 위한 방법 및 이를 위한 키트와 조성물에 관한 것이다.

[0004] [0003] 뼈는 오래된 뼈를 파괴하고 새로운 뼈를 다시 만드는 리모델링 과정을 끊임없이 수행한다. 뼈의 이와 같은 재흡수 (파골세포에 의함)와 형성 (조골세포에 의함)은 거의 비슷한 속도로 일어나기 때문에 전체적인 골격의 강도가 유지된다. 뼈의 리모델링은 뼈 조직을 일신해주며, 몇가지 호르몬과 성장 인자에 의해 영향을 받는다. 멜라토닌은 조골세포에 작용하여 골 형성을 자극하는 것으로 알려져 있다.

[0005] [0004] 골다공증은 세계보건기구 (WHO)에 의하면 여성에 있어서, 이중 에너지 방사선 흡수계측법 (DXA:dual energy X-ray absorptiometry)에 의하여 측정할 경우, 최대 골 질량 (20세의 성별이 일치되는 건강한 사람 평균)보다 뼈의 미네랄 밀도가 2.5 표준 편차 미만인 것으로 정의된다; "확립된 골다공증 (established osteoporosis)"라 함은 취약 골질의 존재를 포괄하는 용어이다.

[0006] [0005] 골다공증에는 다음과 같은 두가지 유형이 있다, 즉: (1) 일차 골다공증 - 일반적인 노화 과정의 결과로서 발생하며, 폐경 여성에 가장 흔한 뼈 손실 및 (2) 이차 골다공증 - 만성 질환, 영양 결핍 또는 특정 종류의 약물과 같은 다른 원인의 결과로서 일어나는 뼈 손실.

[0007] [0006] 현재, 미국의 경우 몇가지 약물이 식품의약안전청 (FDA)에 의해 골다공증의 예방 및 치료에 사용가능한 것으로 승인되었는데, 이 약물들은 제1세대 약물로 여겨지고 있다. 이 약물들에는 비스포스포네이트류, 랄록시펜, 경비용 칼시토닌 및 테리파라타이드가 포함된다.

[0008] [0007] 치료 요법도 점차 가능해지고는 있으나 (예컨대 비스포스포네이트의 경우), 골질을 감소시키는데는 아직까지는 예방이 가장 효과적인 것으로 여겨지고 있다.

[0009] [0008] 따라서, 골다공증과 같은 골 질환을 예방 및/또는 치료하기 위한 새로운 방법이 필요한 실정이다.

[0010] [0009] 본 발명에는 몇가지 문헌들이 인용되었으며, 이들 문헌의 내용은 그 전체가 본 발명에 참조로 병합되었다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

[0012] [0010] 본 발명은 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 보정하는 방법 및 이를 위한 키트와 조성물에 관한 것이다.

[0013] [0011] 더욱 구체적으로, 본 발명에 따라, (a) 골 재흡수와 골 형성 간에 불균형을 겪고 있는 대상자를 동정하는 단계; 및 (b) 상기 대상자에게 치료적 유효량의 (i) 4-페닐-2-프로피온아미도테트라린 (4-P-PDOT); (ii) 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 컨쥬게이트 또는 전구약물, (iii) (i) 또는 (ii)의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 (iv) (i) 내지 (iii)에 기재된 것들의 여하한 배합물을 투여하는 단계를 포함함으로써 상기 대상자에 있어서 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 보정하는 방법이 제공된다.

[0014] [0012] 일 구체예에서, 전술한 방법은 상기 대상자에게 유효량의 (i) 4-P-PDOT; (ii) 4-P-PDOT의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 (iii) (i)과 (ii)의 여하한 배합물을 투여하는 것을 포함하여 이루어진다.

[0015] [0013] 일 구체예에서, 전술한 투여 방법은 단일 볼러스(single bolus) 투여이다. 또 다른 구체예에서, 전술한 투여 방법은 매일 투여하는 것이다.

[0016] [0014] 일 구체예에서, 전술한 치료적 유효량은 1일 체중 1 kg 당 약 0.001 내지 약 500 mg/kg의 양을 가리킨다.

[0017] [0015] 일 구체예에서, 전술한 방법은 MT2 멜라토닌 수용체 특이적 길항제, 비스포스포네이트, 랄록시펜, 경비용 칼시토닌 및 테리파라타이드로 이루어진 군 중에서 선택되는 또 다른 약제를 투여하는 것을 추가로

포함한다.

- [0018] [0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) (i) 4-P-PDOT; (ii) 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 킨주게이트 또는 전구약물; 및 (iii) (i) 또는 (ii)의 약학적으로 허용가능한 염 중에서 선택된 1종 이상의 화합물; 및 (b) 뼈의 무기질화침착 결손을 보정하거나 예방하기 위하여 대상자에게 상기 화합물을 투여하기 위한 지침서를 포함하는 키트 또는 패키지를 제공한다.
- [0019] [0017] 일 구체예에서, 전술한 키트나 패키지는 (i) 4-P-PDOT, (ii) 4-P-PDOT의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 (iii) (i)과 (ii)의 여하한 배합물을 포함한다.
- [0020] [0018] 일 구체예에서, 전술한 지침서는 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 보정하기 위하여, 상기 화합물을 상기 대상자에게 투여하도록 하는 지시사항이다.
- [0021] [0019] 또 다른 구체예에서, 전술한 키트 또는 패키지는 MT2 멜라토닌 수용체 특이적 길항제, 비스포스포네이트, 랄록시펜, 경비용 칼시토닌 및 테리파라타이드로 이루어진 군 중에서 선택된 또 다른 약제를 포함한다.
- [0022] [0020] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) (i) 4-P-PDOT; (ii) 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 킨주게이트 또는 전구약물; (iii) (i) 또는 (ii)의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 (iv) (i) 내지 (iii)의 여하한 배합물; 및 (b) MT2 멜라토닌 수용체 특이적 길항제, 비스포스포네이트, 랄록시펜, 경비용 칼시토닌 및 테리파라타이드로 이루어진 군 중에서 선택된 또 다른 약제의 치료 유효량을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0023] [0021] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (i) 4-P-PDOT; (ii) 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 킨주게이트 또는 전구약물; (iii) (i) 또는 (ii)의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 (iv) (i) 내지 (iii)의 여하한 배합물; 및 (b) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 대상자의 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 보정하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0024] [0022] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (i) 4-P-PDOT; (ii) 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 킨주게이트 또는 전구약물; (iii) (i) 또는 (ii)의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 (iv) (i) 내지 (iii)의 여하한 배합물; 및 (b) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 뼈를 표적으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0025] [0023] 일 구체예에서, 전술한 조성물은 (i) 4-P-PDOT; (ii) 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 킨주게이트 또는 전구약물; (iii) (i) 또는 (ii)의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 (iv) (i) 내지 (iii)의 여하한 배합물; 및 (b) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것이다.
- [0026] [0024] 또 다른 측면에서, 본 발명은 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 치료하기 위한 약제를 제조하는데 있어서의, (i) 4-P-PDOT; (ii) 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 킨주게이트 또는 전구약물; (iii) (i) 또는 (ii)의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 (iv) (i) 내지 (iii)의 여하한 배합물의 치료 유효량의 용도에 관한 것이다.
- [0027] [0025] 또 다른 측면에서, 본 발명은 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 치료하는데 있어서의 (i) 4-P-PDOT; (ii) 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 킨주게이트 또는 전구약물; (iii) (i) 또는 (ii)의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 (iv) (i) 내지 (iii)의 여하한 배합물의 치료 유효량의 용도에 관한 것이다.
- [0028] [0026] 일 구체예에서, 전술한 용도는 (i) 4-P-PDOT; (ii) 4-P-PDOT의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 (iii) (i)과 (iii)의 배합물의 용도이다.
- [0029] [0027] 일 구체예에서, 전술한 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형의 보정은: 골 재흡수의 억제; 파골세포 분화의 억제; 골 미네랄 밀도 (BMD: bone mineral density)의 증가; 골 미네랄 함량 (BMC: bone mineral content)의 증가; 순수한 피질골 밀도의 증가; 총골의 평균 밀도의 증가; 피질 두께의 증가; 피질이 되도록 할당된 순수한 피질 면적의 증가; 경골 간부의 총 골면적의 증가; 미네랄화 부착 속도의 증가; 골 형성 속도/골 표면 레퍼턴트의 증가; 내피질 표면 또는 골막 표면에 있어서 미네랄화 표면의 증가; 혈청의 알칼라인 포스파타제의 감소; 저미네랄화 유골의 피질내 영역의 감소; 유골 두께의 감소 및 유골 축합의 감소 중 적어도 한가지 방법에 의해 수행된다.
- [0030] [0028] 또 다른 구체예에서, 전술한 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형의 보정은 골 재흡수를 억제하는 것을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 전술한 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형의 보정은 파골세포의 분화를 억제하는 것을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 전술한 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형의 보정은 골 미네랄 밀도를 증가시키는 것을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 전술한 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형의 보정은 골 미네랄 함량

의 증가를 포함한다.

- [0031] [0029] 일 구체예에서, 전술한 용도는 MT2 멜라토닌 수용체 특이적 길항제, 비스포스포네이트, 칼록시펜, 경비용 칼시토닌 및 테리파라타이드로 이루어진 군 중에서 선택된 또 다른 약제의 용도를 추가로 포함한다.
- [0032] [0030] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 골 재흡수와 골 형성 간에 불균형을 겪고 있는 대상자를 동정하고; (b) 상기 대상자에게 1종 이상의 MT2 멜라토닌 수용체 특이적 길항제를 치료 유효량으로 상기 대상자에게 투여함으로써 상기 대상자의 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 보정하는 방법을 제공한다.
- [0033] [0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 치료하기 위한 약제를 제조하는데 있어서 1종 이상의 MT2 멜라토닌 수용체 특이적 길항제의 치료 유효량의 용도를 제공한다.
- [0034] [0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 치료하는데 있어서의 1종 이상의 MT2 멜라토닌 수용체 특이적 길항제의 치료 유효량의 용도를 제공한다.
- [0035] [0033] 본 발명은 또한 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 치료하기 위한 조성물 역시도 제공하는데, 상기 조성물은 1종 이상의 MT2 멜라토닌 수용체 특이적 길항제와 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하여 이루어진다.
- [0036] [0034] 본 발명은 또한, 1종 이상의 MT2 멜라토닌 수용체 특이적 길항제 및 지침서를 포함하여 이루어지는 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 치료하기 위한 키트 또는 패키지 역시도 제공한다.
- [0037] [0035] 일 구체예에서, 상기 대상자는 골다공증을 앓고 있다. 또 다른 구체예에서, 상기 대상자는 파제트병에 걸려 있다. 또 다른 구체예에서, 상기 대상자는 골용해성 암에 걸려 있다. 또 다른 구체예에서, 상기 대상자는 파골세포를 유도하는 염증성 시토카인이 존재한다는 특징을 갖는 관절염을 앓고 있다.
- [0038] [0036] 일 구체예에서, 상기 대상자는 포유 동물이다. 또 다른 구체예에서, 상기 대상자는 인간이다.
- [0039] [0037] 본 발명에서 "대상자"라 함은 인간, 마우스, 래트, 개, 고양이, 돼지, 원숭이, 말 등을 비롯한 포유 동물을 가리킨다. 특정 구체예에서, 대상자는 인간을 가리킨다.
- [0040] [0038] 관사 "a", "an" 및 "the"는 문법적으로 지칭 대상을 한개 또는 복수개 (즉 적어도 한개) 가리키는 것이다.
- [0041] [0039] "비롯하다"와 "포함하다"라는 용어는 "...를 포함하나 이에 한정되지 않는..."이라는 표현과 호환적으로 사용된다.
- [0042] [0040] "..와 같은"이라는 표현은 "...와 같으나 이에 한정되지 않는..."이라는 표현과 호환적으로 사용된다.
- [0043] [0041] "작용제 (agonist)"라는 표현은 그 리간드가 그 리간드의 부재시 존재하는 어떠한 베이스라인 수준보다도 리간드-의존성 수용체 특이적 활성을 자극함을 의미한다. "길항제 (antagonist)"라는 표현은 그 리간드가 수용체에 결합하여 수용체-특이적인 작용제 활성의 경쟁적 또는 비경쟁적 저해제로서 기능함을 의미한다. "역작용제 (inverse agonist)" 또는 "전도형 작용제 (reverse agonist)"는 그 리간드가 문체의 수용체에 결합하여 수용체 리간드가 부재할 경우 관찰되는 활성 수준보다 수용체 활성 수준을 더 낮추도록 수용체의 억압을 일으킴을 의미한다. 본 발명에서 "MT2 멜라토닌 수용체 특이적 길항제"라는 표현은 루진돌(luzindole)과 같은 다른 멜라토닌 수용체에 결합하는 여타의 길항제와 달리, MT2 수용체에 특이적으로 결합하는 길항제를 의미한다.
- [0044] [0042] 본 명세서에서 "파골세포 전구체"라 함은 파골세포로 성숙화될 수 있는 세포를 가리킨다. 이러한 세포에는 RAW264.7, 비장 세포, CD14⁺ 단핵세포 및 파골세포로 성숙할 수 있는 조혈 세포가 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] [0043] 파골세포 전구체의 파골세포로의 분화를 유발하는 것으로 알려진 물질이 몇가지 있다. 이러한 물질로는 핵 인자 카파 B 리간드 (RANKL: nuclear Factor Kappa B Ligand), 대식세포 집락 자극 인자 (M-CSF: macrophage-colony stimulatingn factor), 중앙 피사 인자-알파 (TNF- α)와 같은 염증성 시토카인 및 파골세포의 활성을 자극할 수 있는 다양한 인터류킨을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0046] [0044] 시판되는 재흡수가 가능한 골 유사체로는 BioCoatTM이 있으나 이에 한정되지 않는다. 그 밖의 재흡수가 가능한 골 유사체로는 상아질 단편과 히드록시아파타이트를 들 수 있다.
- [0047] [0045] 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형에 관한 동물 모델이 몇가지 알려져 있으며 여기에는 골 미네랄 밀도 (BMD)가 매우 낮은 것으로 알려진 C57BI/6j 마우스 및 골다공증 동물 모델이 있다.

- [0048] [0046] 난소절제된 마우스 및 래트를 비롯한 여러가지 골다공증 동물 모델이 알려져 있다.
- [0049] [0047] 본 발명의 범위에 속하는 것으로는 본 발명에서 설명된 바와 같이 대상자의 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 치료할 수 있는 능력을 갖는 4-페닐-2-프로피온아미도테트라린 (4-P-PDOT)의 유도체, 유사체, 컨쥬게이트, 또는 전구약물 및 이들의 염을 들 수 있다. 본 발명에서 언급된 염(들)에는 약학적으로 허용가능한 염(들)이 포함된다. 4-P-PDOT의 다양한 유사체, 유도체, 컨쥬게이트 및 전구약물이 알려져 있으며, 예컨대 미국 특허 5,071,875호에 설명된, 8-메톡시-2-프로피온아미도-테트라린; 2-클로로아세트아미도-테트라린; 8-메톡시-2-n-부티르아미도-테트라린; 8-메톡시-2-시클로프로판카르보닐아미도-테트라린; 8-메톡시-2-클로로아세트아미도-테트라린; 4-페닐-2-아세트아미도-테트라린 (4-P-ADOT); 4-벤질-2-아세트아미도테트라린; 4-페닐-2-클로로아세트아미도-테트라린 (4-P-CADOT); 및 4-벤질-2-프로피온아미도-테트라린을 들 수 있다. 일 구체예에서, 전술한 유도체는 4-P-ADOT 또는 4-P-CADOT이다.
- [0050] 키트
- [0051] [0048] 본 발명은 또한 골 재흡수 및 골 형성 간의 불균형을 치료/예방하기 위한 (예컨대, 골 재흡수 또는 파골세포 성숙/분화를 억제하기 위한) 키트 또는 패키지에 관한 것으로, (i) 4-페닐-2-프로피온아미도테트라린 (4-P-PDOT); (ii) 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 컨쥬게이트 또는 전구약물, (iii) (i) 또는 (ii)의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 화합물; 및 골 재흡수나 또는 파골세포의 성숙/분화를 억제하기 위하여 상기 화합물을 대상자에게 투여하기 위한 지침서를 포함하여 이루어진 키트 또는 패키지에 관한 것이다. 이러한 키트는 또한 1종 이상의 전술한 화합물과 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하여 이루어지는 조성물 (예컨대, 약학적 조성물)도 포함할 수 있다. 이러한 키트는 골 재흡수 또는 파골세포의 성숙/분화를 억제할 수 있는 1종 이상의 다른 활성 물질을 추가로 포함할 수 있다. 골다공증을 앓고 있는 대상자에 있어서 골 재흡수 또는 파골세포의 성숙/분화를 억제하기 위하여 이 키트를 사용할 경우, 이 키트는 골다공증의 여타의 유해한 증상을 예방하거나 보정할 수 있는 1종 이상의 다른 활성 물질을 추가로 함유할 수 있다. 이러한 물질로는 비스포스포네이트, 탈록시펜, 경비용 칼시톤_R 및 테리파라타이드를 들 수 있으나 이들로 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에 따라 구획화된 키트의 예로는 별도의 용기에 시약들이 함유되어 있는 키트는 어느 것이든 포함된다. 이러한 용기들로는 소형 유리제 용기, 플라스틱제 용기 또는 플라스틱 스트립 또는 종이 스트립을 들 수 있다. 이러한 용기는 시료와 시약이 상호간에 오염되지 않고, 각각의 용기의 약제나 용액이 용기마다 정량적으로 첨가될 수 있도록, 하나의 용기에서 다른 용기로 시약들을 효율적으로 전달할 수 있도록 해 준다.
- [0052] [0049] 본 발명에서 "골 재흡수와 골 형성 간의 불균형"이라는 용어는 파골세포의 성숙 또는 분화 속도가 증가함으로써 해서, 보다 많은 파골세포가 생성될 뿐만 아니라 성숙한 파골세포에 의해 재흡수 활성이 증가되는 것을 가리킨다.
- [0053] [0050] 본 발명에서 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 보정한다는 표현에서의 "보정한다"라는 용어는 골 재흡수와 골 형성 간의 불균형을 부분적으로 또는 완전하게 개선시키는 것을 의미한다. 이러한 보정은 골 재흡수의 억제, 파골세포의 분화의 억제, 골 미네랄 밀도 (BMD) 및 골 미네랄 함량 (BMC)의 증가; 순수한 피질골 밀도의 증가; 총골의 평균 밀도의 증가; 피질 두께의 증가; 피질이 되도록 할당된 순수한 피질 면적의 증가; 경골 간부의 총 골면적의 증가; 미네랄화 부착 속도의 증가; 골 형성 속도/골 표면 레퍼런트의 증가; 내피질 표면 또는 골막 표면에 있어서 미네랄화 표면의 증가; 혈청의 알칼라인 포스파타제의 감소; 저미네랄화 유골의 피질내 영역의 감소; 유골 두께의 감소 및 유골 축합의 감소 중 적어도 한가지 방법에 의해 수행된다.
- [0054] 투여 경로
- [0055] [0051] 본 발명의 약학적 조성물은 경구, 경비, 정맥내, 근육내, 피하, 설하, 경막내, 또는 피내 경로로 투여될 수 있다. 투여 경로는 환경 및 치료 목적과 같은 다양한 인자에 따라 변할 수 있다.
- [0056] [0052] 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물은 액상, 용액, 현탁액, 알약, 캡슐, 정제, 젤캡, 분말, 겔, 연고, 크림, 분무제(nabulae), 미스트(mist), 분무 증기(atomized vapor), 에어로졸, 피토솜(phytosome)의 형태를 취할 수 있다. 경구 투여의 경우, 정제나 캡슐은 결합제, 충전제, 윤활제, 붕괴제 또는 습윤제와 같은 약학적으로 허용가능한 부형제와 함께 상법에 따라 제조될 수 있다. 정제는 기술 분야에 알려진 방법에 의해 피복될 수 있다. 경구 투여용 액상 제제는 예를 들어, 용액, 시럽 또는 현탁액의 형태를 취할 수 있으며, 또는 이들은 타액이나 기타 적절한 액상 비히클과 함께 사용전에 제조성될 수 있는 건조물의 형태일 수도 있다. 본 발명의 식이 보강제는 현탁제, 유화제, 비수성 비히클, 방부제, 완충염, 향료, 색소 및 감미료와 같은 약학적으로 허용가능한 첨가제를 적절히 함유할 수도 있다. 경구 투여용 제제는 또한 활성 성분을 조절적으로 방출할 수 있도록 적

절히 조절될 수 있다.

[0057] 투약량

[0058] [0053] 일정량의 약학적 조성물을 대상자에게 투여할 수 있다. 투약량은 투여 방식과 대상자의 연령을 비롯한 많은 인자에 따라 달라진다. 젊은 사람들의 경우 뼈가 성장함에 따라 뼈의 교체가 왕성하게 일어난다. 일반적으로, 일회 투여분에 함유되는 본 발명의 화합물 또는 제제 (예컨대, 4-P-PDOP, 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 컨쥬게이트 또는 전구약물; 이들의 약학적으로 허용가능한 염)의 양은 이를 필요로 하는 대상자에 있어서 골 재흡수를 효과적으로 방지, 지연 또는 보정시키면서 심각한 독성을 유발하지 않는 양이다. 본 발명에서 "치료적으로 유효한 양"이라 함은 소망되는 치료 효과를 달성하는데 유효한 양을 가리킨다. 치료적 유효량은 또한 그 화합물의 있을 수 있는 여하한 부작용이 그 치료적으로 유익한 효과에 의해 상쇄되는 양이기도 하다. 일반적으로, 본 발명의 화합물 또는 제제 (예컨대, 4-P-PDOP, 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 컨쥬게이트 또는 전구약물; 이들의 약학적으로 허용가능한 염)는 대상자에게 0.001 내지 500 mg/kg/1일의 투여량 범위, 더욱 특수한 구체예의 경우 1 mg 내지 5 mg/kg/1일의 투여량 범위로 투여될 수 있다. 마흐뭇(Mahmood) 등의 이상진화 스케일링법 (allometric scaling method: J. Clin. Pharmacol. 2003, 43(7):692-7)을 이용하여 마우스에 대한 투약량으로부터 인간에 대한 투약량을 외삽하여 산정할 수 있다. 본 발명의 약학적으로 허용가능한 제제 및 소형 분자들은 본 발명의 범주에 포괄되며 기술 분야에 잘 알려져 있다 (Remington's Pharmaceutical Science, 16판, Mack Ed.). 투약량은 질병의 위중도와 대상자별 여러가지 변수와 같은 통상적인 인자들을 감안하여 임상이가 적절히 조정한다.

[0059] [0054] 본 발명의 화합물 또는 약제 (예컨대, 4-P-PDOT, 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 컨쥬게이트 또는 전구약물; 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염)의 치료적 유효량 역시도 직접 측정할 수 있다. 이 유효량을 매일 또는 일주일 단위로 또는 수차례로 나누어 투여할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 체중 1 kg 당 1일 약 0.001 mg 내지 약 500 mg의 양으로 투여될 수 있다 (예컨대, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 또는 250 mg). 투여량은 일회 또는 복수회 투여 요법에 따라 제공될 수 있다. 예를 들면, 몇가지 구체예에서, 유효량은 1일 약 1 mg 내지 약 25 그램의 약제, 1일 약 50 mg 내지 약 10 그램의 약제, 1일 약 100 mg 내지 약 5 그램의 약제, 1일 약 1 그램의 약제, 1주일에 약 1 mg 내지 약 25 그램의 약제, 1주일에 약 50 mg 내지 약 10 그램의 약제, 하루 걸러 약 100 mg 내지 약 5 그램의 약제, 1주일에 약 1 그램의 약제일 수 있다.

[0060] [0055] 실제 투약량은 신중하게 결정되어야 하고 각각의 대상자마다 특이적인 임상 인자에 기초하여 임상이가 적절히 조정해야하는 것이기 때문에 상기 내용은 어디까지나 단순한 가이드라인이다. 최적인 1일 투여량은 기술 분야에 알려진 방법에 의해 결정되며 상기한 바와 같이 대상자의 연령이나 기타 임상적으로 관련이 있는 인자 등에 의해 영향을 받게 될 것이다. 또한, 대상자들은 다른 질환이나 증상을 치료하기 위한 의료 처치를 받을 수도 있다. 다른 의료 처치는 본 발명의 약제가 대상자에게 주어지는 동안 지속될 수도 있으나, 특히 부작용이 나타날 경우에는 적은 투여량으로부터 투약하는 것이 특히 바람직하다.

[0061] 담체/비히클

[0062] [0056] 본 발명의 화합물 또는 약제 (예컨대, 4-P-PDOT, 4-P-PDOT의 유도체, 유사체, 컨쥬게이트 또는 전구약물; 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염)는 예를 들어 탈크, 아라비아검, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 코코아 버터, 수성 또는 비수성 용매, 오일, 파라핀 유도체 또는 글리콜과 같이 약학적 제제에서 널리 사용되는 비히클과 함께 병용되어 제형화될 수 있다. 미국특허 제 5,434,183호에 설명된 것들과 같은 에멀전, 즉 식물성 오일 (예컨대 대두유 또는 홍화씨유) 유화제 (예컨대 난황 인지질) 및 물이 글리세롤과 결합되어 있는 에멀전 역시도 사용가능하다. 본 발명의 약학적 제제에 사용될 수 있는 약학적으로 허용가능한 물질의 추가적인 예로는 흡수 촉진제, pH 조절제 및 완충액, 삼투압 조절제, 방부제, 안정화제, 향산화제, 계면활성제, 농후제, 에몰리언트, 분산제, 풍미제, 착색제 및 습윤제를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 적절한 포몰레이션 제조하는 방법은 기술 분야에 잘 알려져 있다 (예컨대 Reminton's Pharmaceutical Sciences, 16판, 1980, A. Oslo Ed., Easton, Pa).

[0063] [0057] 투여 경로로서 비경구 투여가 선택될 경우, 본 발명의 물질을 함유하는 제제를 약학적으로 허용되는 멸균 수성 또는 비수성 용매, 현탁액 또는 에멀전과 병용하여 대상자에게 투약할 수 있다. 비수성 용매의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 어유 및 주사가 가능한 유기 에스테르를 들 수 있다. 수성 담체에는 물, 물-알코올 용액, 에멀전 또는 현탁액을 들 수 있으며, 여기에는 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스 용액, 텍스트로스 플러스 염화나트륨 용액, 락토스를 함유하는 링거 용액 또는 비휘발성 오일 (fixed oils)을

비롯한 완충된 의료용 비경구용 비히클 및 염류가 포함된다. 정맥내 비히클에는 링거 텍스트로스 등에 기초한 것들과 같은 플루이드와 영양 공급제, 전해질 공급제가 포함될 수 있다.

[0064] [0058] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 조절 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 폴리락트산, 폴리오르토에스테르, 가교형 양쪽성 블록 코폴리머 및 하이드로젤, 폴리히드록시 부티르산 및 폴리디히드록피란을 비롯한 폴리머 물질을 사용할 수 있고 (참조: Smolen 및 Ball의 Controlled Drug Bioavailability, Drug product design and performance, 1984, John Wiley & Sons; Ranade and Hollinger, Drug Delivery Systems, pharmacology and toxicology series, 2003, 2판, CRRC Press), 또 다른 구체예에서는, 펌프를 이용할 수 있다 (Saudek 외, 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). 본 발명의 화합물은 또한 본 발명의 제제가 커플링/병합되는 개별적 담체로서 표적 분자 및/또는 모이어티 (예컨대, 모노클로날 항체, 펩타이드)를 사용함으로써 전달시킬 수도 있다. 일 구체예에서, 전술한 표적 분자/모이어티는 본 발명의 제제를 뼈에 전달하는 것을 증가시키고/증가시키거나 용이하게 해준다 (즉, 골-표적화 분자/모이어티). 본 발명은 또한 폐길화(pegylation)된 화합물과 같이, 용해도 및/또는 순환시간을 증가시키기 위하여 변형된 화합물들도 포괄한다.

[0065] [0059] 본 발명에서 "대상자", 또는 "...를 필요로 하는 대상자"라는 표현은 골 재흡수 질환의 예방, 지연화 또는 치료가 요망되는 인간과 같은 동물을 가리킨다. 특정 구체예에서, 골다공증, 파제트병 및 골용해성 골암과 같은 질환이나 증상을 겪는 대상자들은 본 발명의 화합물, 조성물, 방법 및 사용에 의해 그 병상이 호전될 수 있다.

[0066] [0060] 본 발명의 그 밖의 목적, 장점 및 특성은 특정 구체예를 대상으로 하여, 첨부된 도면을 참조로 오직 예시 목적을 위하여 제공된 다음의 비제한적인 설명에 따라 더욱 명확히 이해될 수 있을 것이다.

실시예

[0089] [0083] 본 발명을 다음의 비제한적인 실시예를 들어 더욱 상세히 설명한다.

[0090] [0084] **세포 모델 RAW264.7** (마우스의 대식세포주, ATCC RAW264.7 TIB-71). 이 세포들은 핵 인자-카파 B 리간드 (RANKL)의 수용체 활성화제를 첨가하면 파골세포 유사 세포에서 분화한다. 세포 분화는 대개 2일 이내에 일어난다. RANKL 첨가 후 2.5일 (초기 단계), 6일 및 10일 (후기 단계)에 세포들을 연구하였다.

[0091] [0085] **실험 처리:** 몇가지 구체예에서, RANKL을 첨가와 동시에 4-P-PDOT를 10^{-6} M의 농도로 첨가하였다. 오직 RANKL과만 배양된 세포를 대조군으로 삼았다.

실시예 1

RAW264.7 세포 상에서의 멜라토닌 수용체의 유전자 및 단백질 발현

[0094] [0086] RAW 264.7 세포 상에 멜라토닌 수용체가 존재하는지 여부를 측정하기 위하여, 유전자 및 단백질 발현을 시험하였다. RAW264.7 세포를 RANKL 존재 또는 부재 하에 6일 동안 배양하였다. 제조사의 지침에 따라 Trizol™ 시약을 이용하여 RNA를 추출하였다. Thermoscript™ RT-PCR 시스템 (Invitrogen)을 이용하여 총 RNA 2 µg을 역전사 시켰다. 인트론 스패닝 프라이머를 이용하여 멜라토닌 수용체 1a (MT1) 및 1b (MT2)에 대한 PCR 반응을 확립시켰다. **MT2** 정방향: 5'-GCAGGTAATTTGTTGTGGT-3'(SEQ ID NO: 1); **MT2** 역방향: 5'-AGATGCGTGATCATACTCT-3'(SEQ ID NO: 2); **MT1** 정방향: 5'-TGTACCGCAACAAGAAGCTCAGGA-3'(SEQ ID NO: 3); **MT1** 역방향: 5'-TGGCGATGAGTGTCAGCATCCATA-3'(SEQ ID NO: 4). RAW264.7 샘플을 두가지 모두의 수용체에 대해 양성을 나타낸 뇌 조직 샘플과 비교하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다. MT2는 검출된 반면 MT1은 검출되지 않았다.

[0095] [0087] 이어서 면역형광법에 의해 MT2 수용체의 편재화 연구하였다. RAW 264.7 세포를 LabTek™ 챔버 중에서 RANKL 존재 또는 부재 하에 3일간 배양하였다. 세포들을 3.7%의 파라포름알데히드로 고정시키고 0.1% Triton™ X-100을 이용하여 침투가능하게 하였다. 이어서 세포들을 37°C에서 1% 소의 알부민이 첨가된 PBS (PBSA) 중 항멜라토닌 1b의 1:25 희석액과 함께 2시간 동안 인큐베이션시키기에 앞서, 1% 소의 알부민이 첨가된 PBS (PBSA)에서 30분간 인큐베이션시켰다. 음성 대조군을 PBSA 단독과 함께 인큐베이션시켰다. PBS에서 4회 행군 다음, 37°C에서 세포를 1시간 동안 Alexa™ 594 플루오로크롬에 컨쥬게이트된 당나귀 항염소 1:500 희석액과 함께 인큐베이션시켰다. 세포들을 마운트시킨 다음 형광이 장착된 현미경을 이용하여 40배율로 영상화시켰다. 각각의 색상 에 대한 노출 시간은 모든 조건에서 동일하였다. 결과를 도 2에 나타내었다.

[0096]

실시에 2

[0097]

타르타르산염 내성 산 포스파타제 (TRAP) 활성에 의해 측정되는,

[0098]

파골세포 분화에 미치는 4-P-PDOT의 효과

[0099]

[0088] 파골세포 생성을 평가하기 위하여, RAW264.7 세포를 RANKL과 함께 2.5일 또는 6일 동안 10^{-6} M의 4-P-PDOT의 존재 하 또는 부재 하에 배양하였다. RAW264.7 세포를 파라포름알데히드로 고정시킨 다음 분화 2.5일 및 6일에 TRAP 활성 (활성 파골세포의 마커) 측정을 위해 염색하였다. 핵이 3개 보다 많은 양성-염색된 세포들을 8개의 서로 다른 현미경 사진으로 4번 계수하였다. 각각 2.5일 또는 6일의 실험에 대한 결과를 도 3A와 3B에 도시하였다. 이 데이터는 RAW264.7 세포가 분화하는 동안 4-P-PDOT를 첨가할 경우 TRAP+ 세포가 감소함을 보여준다.

[0100]

실시에 3

[0101]

파골세포 기능: 골 재흡수 평가

[0102]

[0089] 재흡수가능한 골 유사체 (BioCoat™ Osteologic™ 디스크, BD Biosciences)를 이용하여 파골세포 활성을 측정하였다. RAW 264.7 세포를 이 유사체 코팅된 16-웰 플레이트 상에 도말하였다. 도말한지 24시간 후, 세포들을 RANKL 단독 또는 RANKL + 10^{-6} M의 4-PPDOT로 10일간 처리하였다. 또 다른 실험 세트에서는 보다 성숙한 세포에 대한 4-P-PDOT의 효과를 검사하기 위하여, RANKL과 함께 배양한지 6일 후에 10^{-6} M의 4-P-PDOT를 첨가하고 세포를 다시 4일간 배양하였다. 재흡수된 뼈 부분 (재흡수 피트)의 존재 여부를 밝히기 위하여 제조사의 지침에 따라 배양 말기에, 표백제와 5% 질산은으로 염색된 골 유사체를 이용하여 세포를 탈리시켰다. 피트의 수와 재흡수된 골면적을 Bioquant™ 소프트웨어를 이용하여 8개의 현미경 사진에 대해 이중으로 정량하였다. 결과를 도 4에 나타내었다. 부가적인 결과들을 도 8에 나타내었다.

[0103]

실시에 4

[0104]

멜라토닌과 4-P-PDOT에 있어서 파골세포의 분화 및 기능에 미치는 효과 비교

[0105]

[0090] RANKL에 더해 10^{-9} M의 멜라토닌 존재 하에 세포를 배양한 것을 제외하고 전술한 실시예 2 및 3에 설명된 것과 동일한 방법으로 파골세포 형성 및 파골세포 기능에 미치는 멜라토닌의 효과를 평가하였다. 어떤 실험에서는 멜라토닌을 10^{-6} M의 4-P-PDOT와 함께 첨가하였다. RANKL만으로 처리된 세포를 대조군으로 삼았다. 멜라토닌 첨가는 파골세포 생성에 유의적인 효과를 미치지 않았으나 (도 5A 및 5B 및 도 6), 골 재흡수는 유의적으로 감소시켰다 (도 7).

[0106]

실시에 5

[0107]

멜라토닌 및 4-P-PDOT에 의해 유발된 cAMP 생산의 비교

[0108]

[0091] 컨플루언스에 도달할 때까지 (7일) RAW264.7 세포를 배양배지에서 RANKL 부재하에 배양시켰다. 이어서 다양한 농도의 멜라토닌 (도 9, 패널 A), 4-P-PDOT (도 9, 패널 B) 또는 두가지 모두 (도 9, 패널 C)의 존재 하에 세포들을 10^{-4} M의 포스콜린과 함께 인큐베이션시켰다. 농도 범위는 멜라토닌은 10^{-11} 내지 10^{-5} M 였고 4-P-PDOT는 10^{-10} 내지 10^{-4} M였다. 이중처리군의 경우, 세포를 멜라토닌의 농도를 증가시켜가면서 (10^{-11} 부터 10^{-5} M) 처리하는 한편 10^{-6} M의 4-P-PDOT를 첨가하였다. 37°C에서 인큐베이션한지 30분 후, 4°C에서, 세포들을 프로테아제와 포스포다이에스테라제 억제제가 보강된 TRIS-EDTA 완충액에서 용해시켰다. 효소면역측정 키트를 이용하여 상등액 200 μ l 분취액 중 cAMP 함량을 2회 측정하였다.

[0109]

[0092] 도 10은 멜라토닌, 4-P-PDOT 또는 멜라토닌 + 4-P-PDOT으로 처리된 RAW 264.7 세포에 있어서, 정규화된 cAMP 활성 값을 도시한 것으로서, 패널 A, B 및 C에서, 투약 1은 1 포스콜린 단독에 대한 cAMP값에 대응하고; 투약 2는 10^{-11} 의 멜라토닌, 10^{-10} 4-P-PDOT, 또는 10^{-11} 의 멜라토닌과 10^{-6} 4-P-PDOT와의 조합에 대응하며; 투약 3은 10^{-9} 의 멜라토닌, 10^{-8} 4-P-PDOT, 또는 10^{-9} 의 멜라토닌과 10^{-6} 4-P-PDOT와의 조합에 각각 대응한다; 투약 4는 10^{-7} 의 멜라토닌, 10^{-6} 4-P-PDOT, 또는 10^{-7} 의 멜라토닌과 10^{-6} 4-P-PDOT에 각각 대응하고; 투약 5는 10^{-5} 의 멜라

토닌, 10^{-4} 4-P-PDOT, 또는 10^{-5} 의 멜라토닌과 10^{-6} 4-P-PDOT와의 조합에 각각 대응한다. Bradford 단백질 검정법을 이용하여 측정된 총단백질 농도에 대하여 cAMP 값을 정규화시켰다.

[0110] [0093] 도 9 및 10으로부터 알 수 있는 바와 같이, cAMP 생산에 대한 측정 결과 이들 세포들이 멜라토닌과 4-P-PDOT에 대하여 다르게 응답하는 것으로 나타났다. 4-P-PDOT의 투약량을 증가시킬 경우, cAMP 생산량이 증가하는 반면, 이것의 생산은 멜라토닌 투약량의 증가에 따라 억제되었다.

[0111] [0094] 이어서 RAW 264.7 세포를 6일간 LabTek™ 챔버에서 RANKL 단독과 또는 RANKL과 멜라토닌 (10^{-9} M), 멜라토닌 (10^{-9} M) 및 4-P-PDOT (10^{-6} M) 또는 4-P-PDOT (10^{-6} M) 단독과 함께 배양하였다. 세포들을 3.7%의 파라포름알데히드 중에 고정시키고 0.1% Triton™ X-100으로 침투 가능하게 만들었다. 이어서 세포를 1% 소의 알부민이 보강된 PBS (PBSA) 중에서 30분간 인큐베이션시킨 다음 37°C에서 PBSA 중에 희석된 1:40 항팔로이딘과 함께 30분간 인큐베이션시켰다. PBS로 4회 행군 후, 세포들을 DAPI가 함유된 매질로 마운트시키고 형광이 구비된 현미경을 이용하여 63x 배율로 영상화시켰다. 10개의 독립적인 현미경 필드로부터 이미지를 취해서 다핵 세포 (핵이 2개를 초과함)에서 핵을 계수하였다. 도 13은 핵의 빈도수를 총다핵 세포의 %로서 나타낸 것이다.

[0112] **실시예 6**

[0113] **Comparison 처리군 세포와 미처리군 세포에 있어서 세포자멸사의 비교**

[0114] [0095] RAW264.7 세포를 10^{-6} M의 4-P-PDOT의 존재 또는 부재 하에 RANKL과 함께 배양 배지에서 6일간 배양시켰다. 세포들을 3/7%의 파라포름알데히드 중에서 고정시키고 0.2% Triton™ X-100으로 침투 가능하게 만들었다. 세포들의 서브세트를 DNase로 10분간 실온에서 처리한 다음 이를 양성 대조군으로 하였다. 세포의 세포자멸사를 DeadEnd™ 형광계측 TUNEL 시스템을 이용하여 측정하였다. 이 방법은 형광 표지된 d-UTP의 인코포레이션을 통하여, 단편화된 DNA를 측정하는 기술이다. 침투가능하게된 세포를 뉴클레오타이드 믹스 및 37°C에서 1시간 동안 반응을 촉매하는 효소와 함께 평형 완충액 중에서 인큐베이션시켰다. 음성 대조군을 효소 없이 인큐베이션시켰다. SSC 및 PBS 중에서 수차례 행군 다음, 세포들을 마운트시키고 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0115] **실시예 7**

[0116] **처리군 및 미처리군 세포에 있어서 세포 분화의 비교**

[0117] [0096] 24시간 부착 후, RAW264.7 세포들에게 밤새도록 혈청 공급을 중단한 다음 RANKL 및 멜라토닌 (10^{-7} 또는 10^{-9} M), 또는 멜라토닌 (10^{-9} M) 및 멜라토닌 수용체 비특이적 길항제, 루진돌 (10^{-8} M), 또는 멜라토닌 (10^{-9} M) 및 4-P-PDOT (10^{-6} M), 또는 루진돌 (10^{-6} M), 또는 4-P-PDOT (10^{-6} M) 단독을 함유하는 배양 배지에서 2.5일간 배양시켰다. 세포를 수확하기 8시간 전, 배지에 0.02 μ Ci/ μ L의 삼중수소 티미딘을 첨가함으로써 티미딘 인코포레이션을 평가하였다. 이어서 세포를 빙냉시킨 PBS로 2회 세척하고 차가운 5% 트리클로로아세트산으로 3회 세척하였다. 세포들을 0.5N NaOH 및 0.5% SDS의 혼합물에 용해시키고 이들 용해물의 방사능을 베타-카운터를 이용하여 측정하였다. 결과를 도 12에 나타내었다.

[0118] [0097] 도 11과 도 12는 파골세포 기능/골 재흡수에 미치는 4-P-PDOT의 효과가 세포자멸사의 증가 또는 세포 분화의 감소에 의해 설명되는 것은 아님을 보여주는데, 이들 이들 변수들이 4-P-PDOT로 처리된 세포 대 처리되지 않은 세포 간에 필적하였기 때문이다.

[0119] **실시예 8**

[0120] **파골세포 세포 마커의 발현**

[0121] [0098] 파골세포의 분화 및 활성화와 관련된 여러가지 유전자의 발현에 미치는 멜라토닌 및 4-P-PDOT의 효과를 처리 6일 후 RT-PCR에 의해 평가하였다. 도 14는 멜라토닌과 4-P-PDOT가 RAW264.7 세포-유도된 파골세포에 대한 RANK' 발현의 커다란 감소를 유발함을 보여준다.

[0122] **실시예 9**

[0123] **골 재흡수와 골 형성 간의 불균형에 대한 동물 모델에 미치는 4-P-PDOT의 효과**

- [0124] [0099] 멜라토닌 생산을 제한하는 자연적인 돌연변이로 인해, 골 미네랄 밀도 (BMD)가 매우 낮은 것으로 알려져 있는 3주령의 수컷 C57Bl/6j 마우스들에게 10 mg/kg의 4-P-PDOT를 1주일에 3회씩 1개월간 복강 주사하였다. 이와 병행하여, 대조군 동물에게는 물과 에탄올 (20%)로 만들어진 용액을 주사하였다.
- [0125] [00100] 이 기간 동안 PixiMus™ II 골밀도측정계를 이용하여 동물들에 대해 매주 골밀도 측정(BMD 및 골미네랄 함량 (BMC))를 측정하고, 혈액과 뇨를 수집하였다. 개개의 척추와 긴 뼈 (대퇴골)을 스캔하였다. 경골, 요골 및 하악골도 스캔하였다.
- [0126] [00101] 골 형성을 모니터하기 위해, 제10일과 제20일에 25 mg/kg의 테트라사이클린 염산염을 주사한 다음 주입을 개시하였다. 골 형성 및 재흡수의 정적 및 동적 변수에 대한 골 조직형태학 역시도 측정하였다. 사용된 생화학적 마커는 골 형성에 있어서는 알칼리 포스파타제이고 골 재흡수의 경우에는 뇨의 테옥시피리디놀린이었다.
- [0127] [00102] 비히클이 주사된 동물에 비해 처리군 마우스에 있어서는 실험한지 처음 35일 안에 체중이 증가하였고 척추에서의 골 미네랄 유착이 증가하였으며 전혈 수준이 증가한 것으로 나타났다 (도 16-18).
- [0128] [00103] 분석을 12개월간 지속하였다. 6개월 또는 12개월 후, 마우스들을 희생시켜 개개의 뼈와 척추를 microCT™(SkyScan CT analyzer)으로 스캔한 다음 이어서 메틸메타크릴레이트 수지에 고정 및 임베딩시켜 조직 형태학 분석 (여기에는 뼈 세포: 오스토이드, 조골세포, 골세포, 파골세포의 표면과 부피, 피질 및 골주의 두께가 포함된다)을 행하였다.
- [0129] [00104] 이유기 후 4주령의 수컷 C57BL/6 세포를 이용하여, 골 형성에 미치는 4-P-PDOT의 효과 역시도 시험하였다. 1주일에 3회씩 10 mg/kg의 4-P-PDOT를 4주일 (28일)간 마우스에게 복강 주사하였다. 이 기간 후, 타르타르산염-내성 산성 포스파타제- (TRAP-) 양성 파골세포 (즉, "활성" 파골세포)를 정량하기 위해 대퇴골 부분을 염색하였다. 도 19는 4-P-PDOT로 처리된 마우스들의 경우 대조군 마우스에 비해 활성 파골세포 수가 현저히 감소하였음을 보여준다. 총 파골세포수를 정량하기 위해 대퇴골 부분에 Goldner 염색 역시도 수행하였다. 도 20에 도시된 바와 같이, 4-P-PDOT 처리 역시 총파골세포와 해면골의 수를 증가시키는 결과를 초래한다. 또한, 도 21에 제시된 결과는 4-P-PDOT로 처리된 마우스에서는 비히클-처리된 마우스에 비해 생체내에서 활성 파골세포의 상대적인 수가 (비록 총 파골세포의 상대적인 숫자는 증가하였으나) 현저히 감소 (약 3배)하였음을 보여준다.
- [0130] [00105] 비록 이제까지 특정 구체예를 들어 본 발명을 설명하였으나, 본 발명의 정신과 본질을 벗어남이 없이 첨부된 특허청구범위 내에서 본 발명을 변형시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

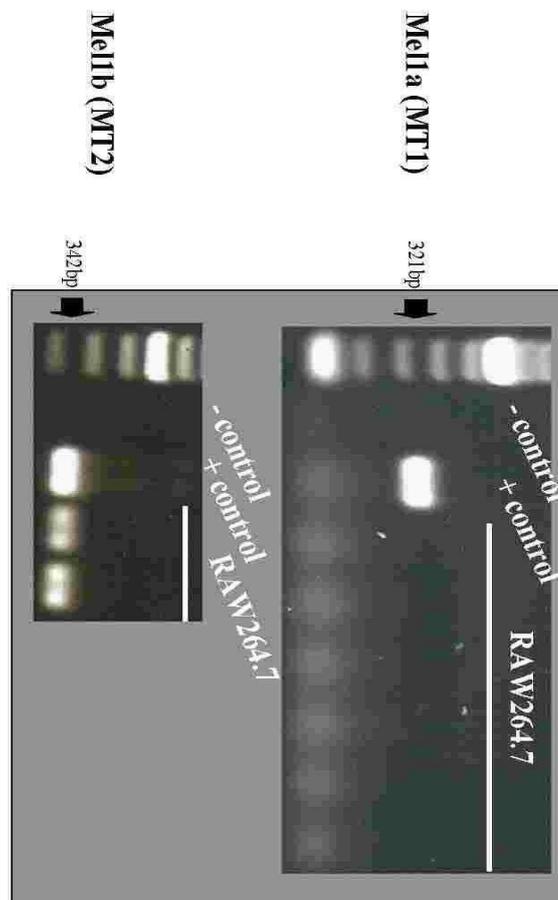
- [0067] [0061] 첨부된 도면에 관한 설명을 이하에 제시한다.
- [0068] [0062] 도 1은 RT-PCR 결과를 도시한 것으로 RAW264.7 세포에서 오직 Me11b(MT2)만이 발현된 것으로 나타났다. 뇌조직을 양성 대조군 (+ 대조군)으로서 사용하였다.
- [0069] [0063] 도 2는 MT2 수용체에 대해 양성 염색한 분화된 RAW264.7 세포를 나타낸다. 패널 A: 일차 항체 없는 음성 대조군. 패널 C: MT2 항체로 염색된 세포로서 단백질의 막 편재화가 보인다. 패널 B 및 D: 음성 대조군과 MT2 양성 세포 모두의 DAPI 핵 염색. 패널 E 및 F: 각각 음성 대조군 (항체 및 MT2 수용체와의 경쟁에 의해 인식되는 펩타이드의 존재 하에 인큐베이션) 및 이 음성 대조군의 DAPI 핵 염색을 도시한 것이다;
- [0070] [0064] 도 3은 몇몇 TRAP-양성 RAW264.7 세포들을 도시한 것이다. 세포를 4-P-PDOT 10^{-6} M의 존재 (흰색 막대) 및 부재 (검은색 막대) 하에 2.5일 (패널 A) 또는 6일 (패널 B) 동안 RANKL과 함께 배양시켰다. 로우 카운트 (상부 패널)과 대조군 세포의 % (하부 패널)을 도시하였다. 이 결과들은 3가지 독립적인 실험 결과의 평균값이다.
- [0071] [0065] 도 4는 골 재흡수 결과를 나타낸 것이다. 패널 A는 재흡수 피트 수를 나타내고, 패널 B는 재흡수 면적 ($\mu\text{m}^2 * 1000$)을 나타내며, 패널 C는 총 재흡수 면적 (피트의 수 x 재흡수 면적($\mu\text{m}^2 * 1000$))을 나타낸다. 4-P-PDOT의 부재 하에 10일간 (검은색 막대), 또는 10^{-6} M의 4-P-DOT의 존재 하에 4일간 (흰색 막대), 또는 10^{-6} M의 4-P-DOT의 존재 하에 10일간 (빛금친 막대), RAW264.7 세포를 RANKL과 함께 배양하였다. 8개의 현미경 결과를 두번씩 계수하여 나타낸 결과이다. 결과는 2가지 독립적인 실험 결과를 요약한 것이다.

- [0072] [0066] 도 5는 파골세포의 분화에 미치는 멜라토닌의 영향력을 도시한 것이다. 멜라토닌 부재시 (검은색 막대), 10^{-9} M의 멜라토닌 존재 하에 (흰색 막대) 및 멜라토닌 + 10^{-6} M 4-PDOT 존재 하에 (회색 막대), RAW264.7 세포를 RANKL과 함께 2.5일간 (패널 A) 또는 6일간 (패널 B) 배양하였다. 로우 카운트 (상부 패널) 및 대조군 세포 % (하부 패널)를 도시하였다. 이 결과들은 4개의 독립적인 실험 결과의 평균값이다.
- [0073] [0067] 도 6은 RAW264.7 세포를 RANKL과 함께 6일간 10^{-9} M 멜라토닌, 10^{-9} M 멜라토닌+ 10^{-6} M 4-PDOT, 또는 10^{-6} M 4-PDOT와 함께 배양시 상기 세포의 분화 정도를, 대조군 (세포를 RANKL 만으로 처리함)에 대한 TRAP-양성 세포의 백분율 관점에서 비교한 도면이다. 상부 패널은 현미경 사진으로서 각각의 처리 후의 세포를 도시한 것이다. 이 결과들은 3 내지 6회의 독립적인 실험 결과의 평균값이다.
- [0074] [0068] 도 7은 파골세포의 기능에 미치는 멜라토닌의 효과를 도시한 것이다. RAW264.7 세포를 RANKL과 함께 10일간 멜라토닌 부재 하 (검은색 막대), 10^{-9} M의 멜라토닌과 함께 (흰색 막대), 또는 10^{-9} M의 멜라토닌 + 10^{-6} M의 4-PDOT (회색 막대)와 함께 4일 또는 10일간 배양하였다. 8가지 현미경 사진의 재흡수 피트의 수 (패널 A), 재흡수 면적 ($\mu\text{m}^2 \times 1000$) (패널 B) 및 총 재흡수 면적(피트의 수 X 재흡수 면적($\mu\text{m}^2 \times 1000$)) (패널 C)을 두번씩 계수하여 도시하였다. 이들 결과는 2회의 독립적인 실험 결과를 요약한 것이다.
- [0075] [0069] 도 8은 RANKL과 함께 배양시의 RAW264.7 세포의 분화를 10^{-9} M의 멜라토닌, 10^{-9} M 멜라토닌 + 10^{-6} M 4-PDOT, 또는 10^{-6} M 4-PDOT와 함께 배양한 경우를 비교 도시한 것으로서, 대조군 (세포를 RANKL만으로 처리함)에 대하여 재흡수 피트의 수의 백분율 (중앙 패널) 또는 총 재흡수 면적 (하부 패널)으로서 나타낸 결과이다. 상부 패널은 각각의 처리 후의 세포의 현미경 사진 결과를 나타낸 것이다. 이들 결과들은 2회의 독립적인 실험 결과를 요약한 것이다.
- [0076] [0070] 도 9는 포스폴린-자극된 RAW 264.7 세포의 아데닐릴 사이클라제 활성화에 미치는 멜라토닌 (패널 A), 4-PDOT (패널 B) 또는 두가지 모두 (패널 C)의 영향을 도시한 것이다.
- [0077] [0071] 도 10은 멜라토닌 (상부 패널, A), 4-P-PDOT (중앙 패널, B) 또는 두가지 모두 (하부 패널, C)의 농도 증가에 기인하는 포스폴린-자극된 RAW 264.7 세포의 정상화된 cAMP 값을 보여준다.
- [0078] [0072] 도 11은 분화된 RAW 264.7에 있어서 세포 자멸사를 비교한 도면이다. 일차 항체가 없는 음성 대조군 (패널 A). 세포자멸사용 양성 대조군으로서 DNase-처리된 세포 (패널 B). RANKL 만으로 처리된 세포(패널 C), 4-P-PDOT 10^{-6} M으로 처리된 세포 (패널 D), 멜라토닌 10^{-9} M으로 처리된 세포(패널 E) 및 멜라토닌 10^{-9} M + 4-P-PDOT 10^{-6} M으로 처리된 세포 (패널 F)를 나타낸다;
- [0079] [0073] 도 12는 RANKL 단독으로, 10^{-7} M (+mel-7) 또는 10^{-9} M (+mel-9) 멜라토닌, 10^{-6} M 루진돌 (Luz-6), 10^{-6} M 4-P-PDOT (PP-6), 10^{-9} M 멜라토닌 + 10^{-8} M 루진돌(+mel-9 + Luz-8) 또는 10^{-9} M 멜라토닌 + 10^{-6} M 4-P-PDOT (+mel-9 + PP-6)로 처리된 RAW264.7 세포에 있어서 삼중수소-티미딘의 결합을 도시한 것이다.
- [0080] [0074] 도 13은 RANKL 단독, 10^{-9} M 멜라토닌 (mel-9), 10^{-6} M 4-P-PDOT (PP-6), 또는 10^{-9} M 멜라토닌 + 10^{-6} M 4-P-PDOT (+mel-9 + PP-6)으로 처리된 RAW264.7 핵의 빈도수를 나타낸 것이다;
- [0081] [0075] 도 14는 10^{-9} M 멜라토닌, 10^{-9} M 멜라토닌 + 10^{-6} M 4-P-PDOT, 또는 10^{-6} M 4-P-PDOT로 처리되어 RANKL과 함께 10일간 배양된 RAW264.7 세포에 대한 RANK cDNA 발현을 나타낸 도면으로, 대조군 (하부 패널)에 대한 발현 백분율 (β -액틴 발현에 대해 정규화됨)로 표현하였다. 상부 패널은 분화 처리에 이어 세포에서 아가로스 겔 상에서의 RANK cDNA 발현을 도시한 것이다. 이들 결과는 3회의 독립적인 실험결과를 요약한 것이다.
- [0082] [0076] 도 15는 대조군과 처리군 마우스에 있어서 제0일부터 제35일까지의 체중 증가변량 (weight gain variations)을 도시한 도면이다.
- [0083] [0077] 도 16은 대조군과 처리군 마우스의 전혈에 있어서 제0일부터 제35일까지의 골 미네랄 함량 (BMC), 골면적 및 골 미네랄 밀도 (BMD) 변량을 도시한 도면이다.
- [0084] [0078] 도 17은 대조군과 처리군 마우스의 척추에 있어서 제0일부터 제35일까지의 BMC, 골면적 및 BMD의 변량을 도시한 도면이다.

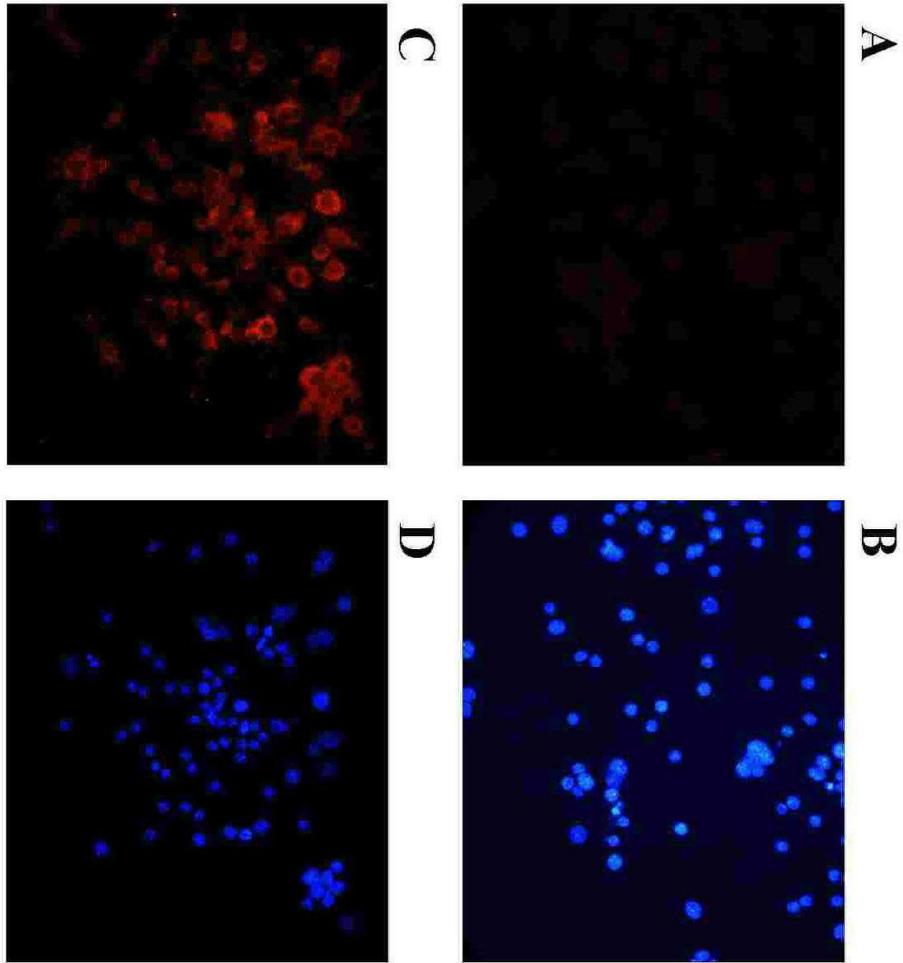
- [0085] [0079] 도 18은 대조군과 처리군 마우스의 좌우측 대퇴골에 있어서 제0일부터 제35일까지의 BMC, 골면적 및 BMD의 변량을 도시한 도면이다.
- [0086] [0080] 도 19는 수컷 C57B16/j 마우스의 우측 대퇴골 부위의 TRAP 염색을 도시한 것이다. 패널 **A**는 대조군(미처리) 마우스의 우측 대퇴골 부위의 염색 결과이다. 패널 **B**는 체중 1 kg 당 10 mg의 4-P-PDOT로 처리된 마우스의 우측 대퇴골 부위를 도시한 것이다. 4-P-PDOT로 처리된 마우스의 파골세포수는 현저하게 감소된 것으로 나타났다. 20x 배율임.
- [0087] [0081] 도 20은 수컷 C57B1/6j 마우스의 우측 대퇴골 부위의 Goldner 염색 결과를 도시한 것이다. 상부 패널 (**A**, **B** 및 **C**)은 미처리 마우스 (n =3, 대조군)의 조직학적 색션을 나타내는 것이고, 하부 패널 (**D**, **E** 및 **F**)은 4-P-PDOT (n=3)로 처리된 마우스의 조직학적 색션을 도시한 것이다. 4-P-PDOT (1주일에 3회 IP 주사로 체중 1 kg 당 10 mg/kg의 양)로 처리된 동물에서 해면골이 증가하였다.
- [0088] [0082] 도 21은 총 파골세포의 수 대 활성 파골세포의 수에 미치는 4-P-PDOT의 효과를 도시한 도면이다. 총 파골세포 수는 Goldner 염색된 색션에 대해 측정하였고 활성 파골세포 수는 TRAP⁺ 세포에 기초하여 산출하였다.

도면

도면1



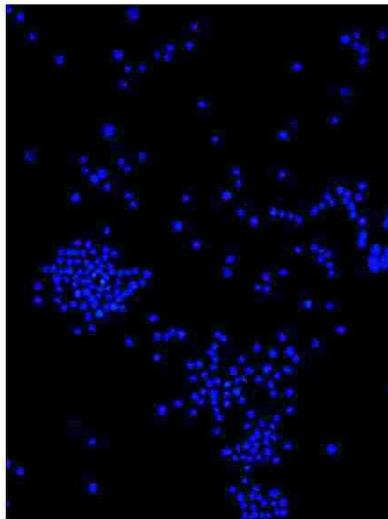
도면2a



도면2b



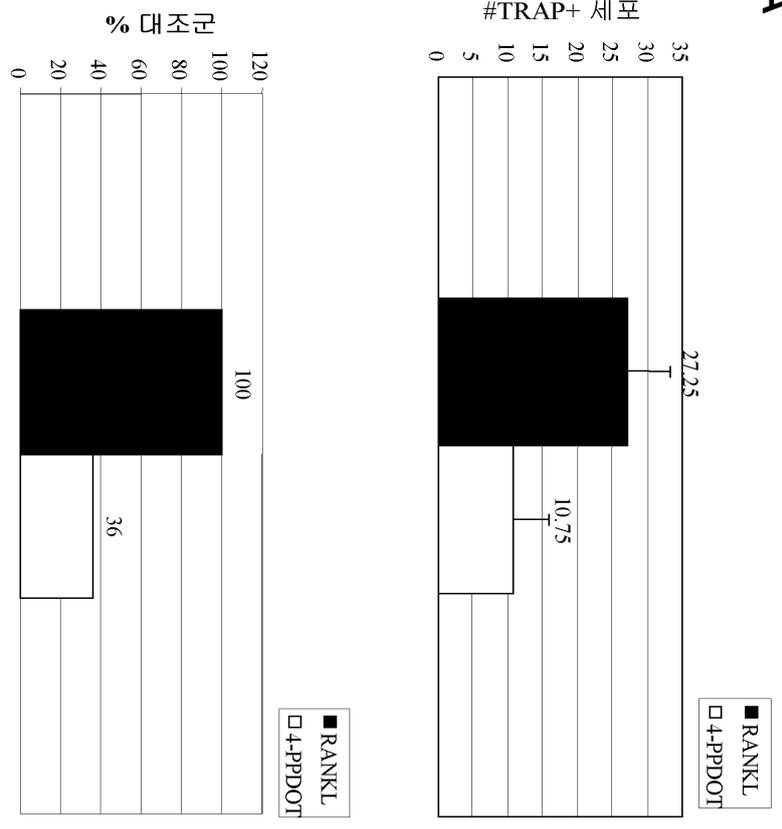
㉓



㉔

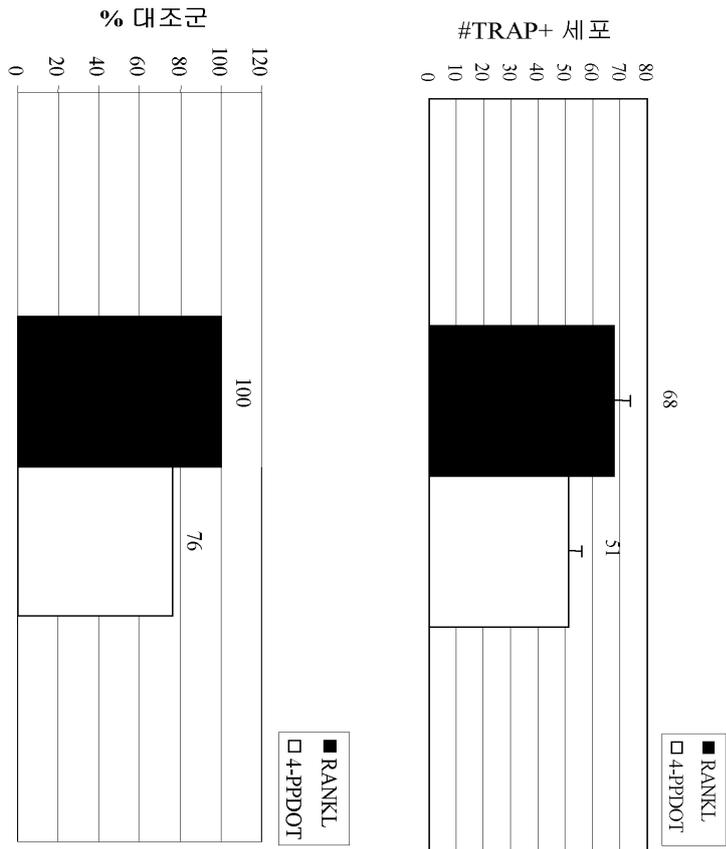
도면3a

A

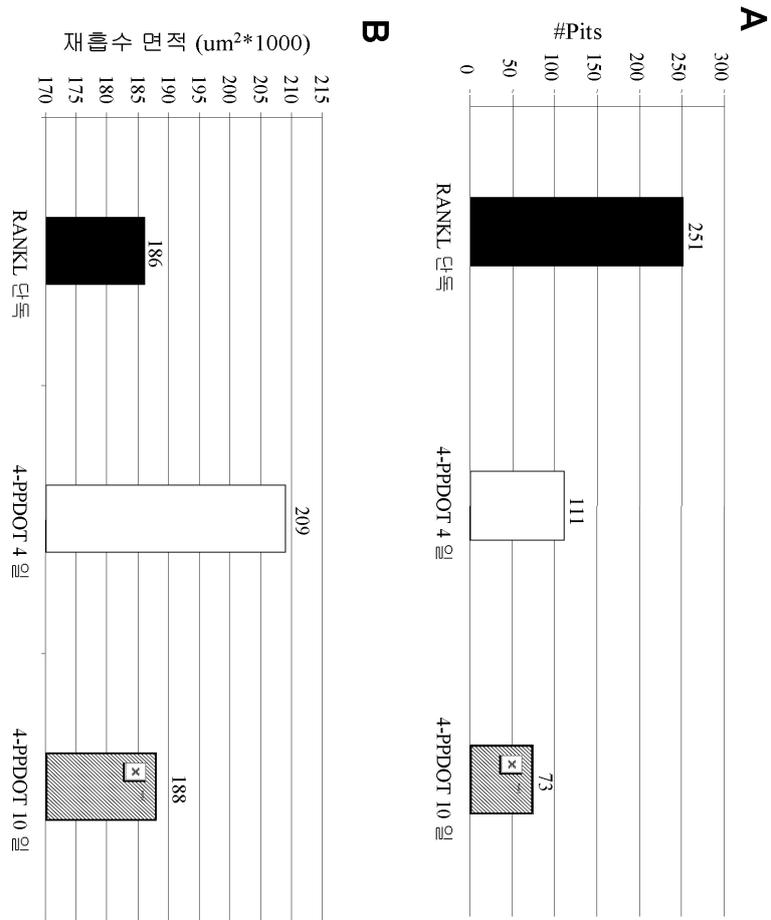


도면3b

B

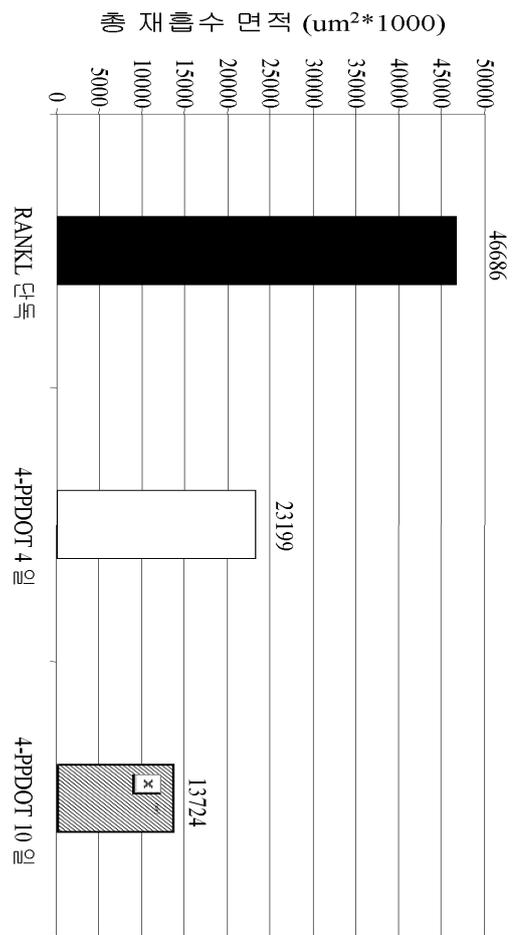


도면4a



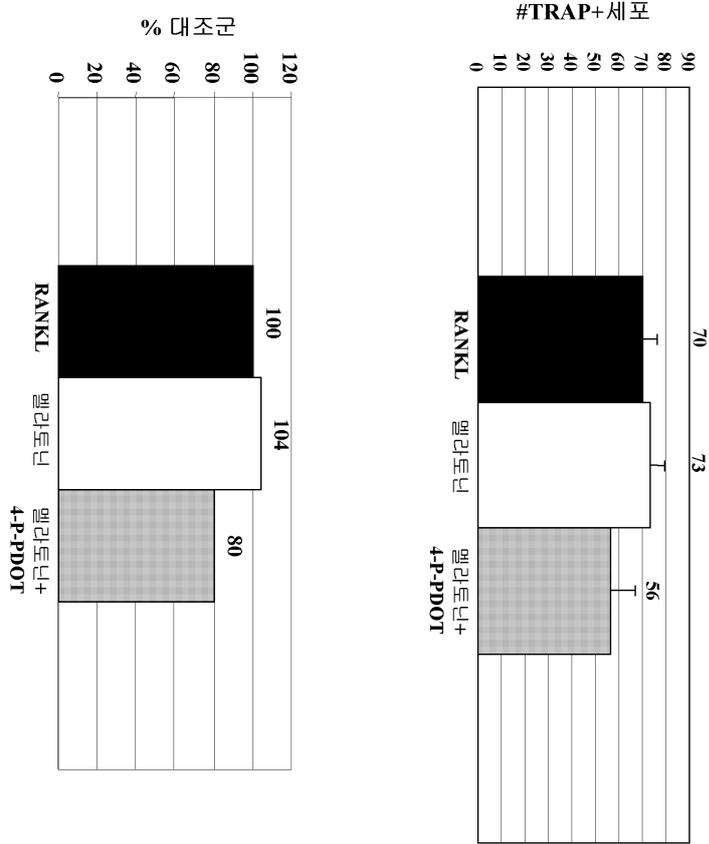
도면4b

C



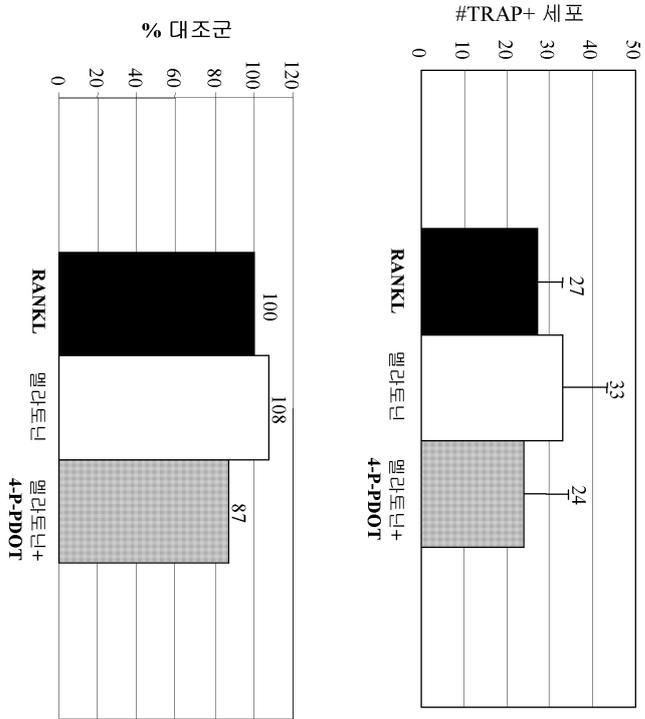
도면5a

A

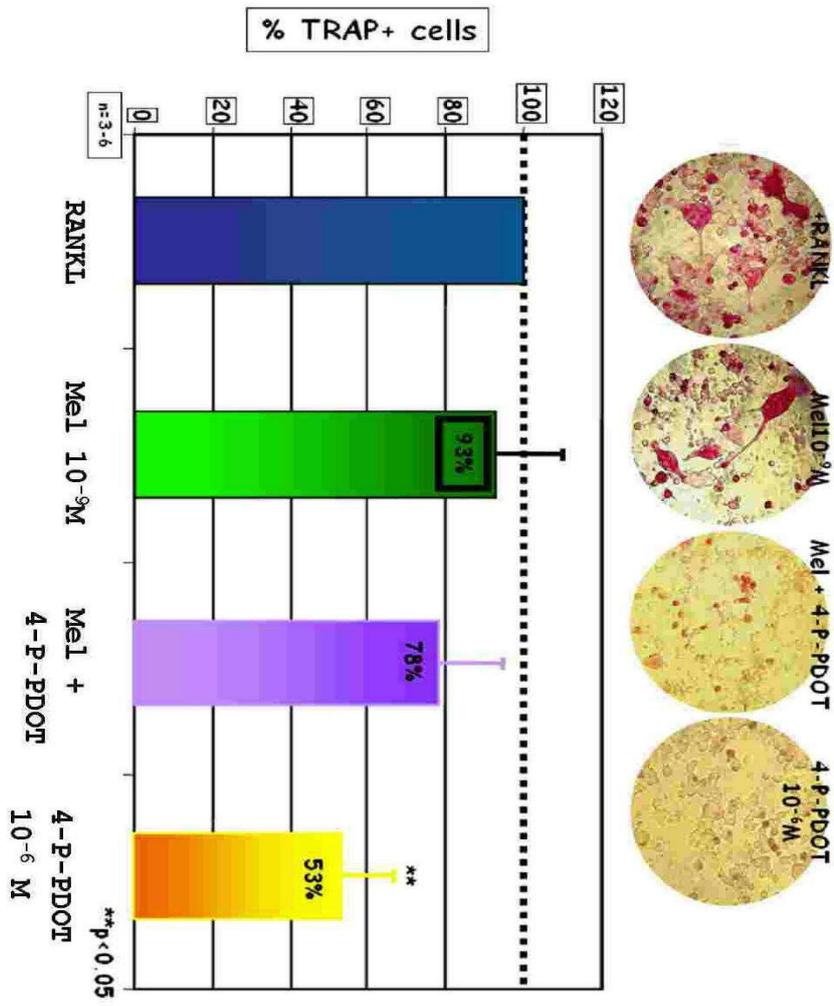


도면5b

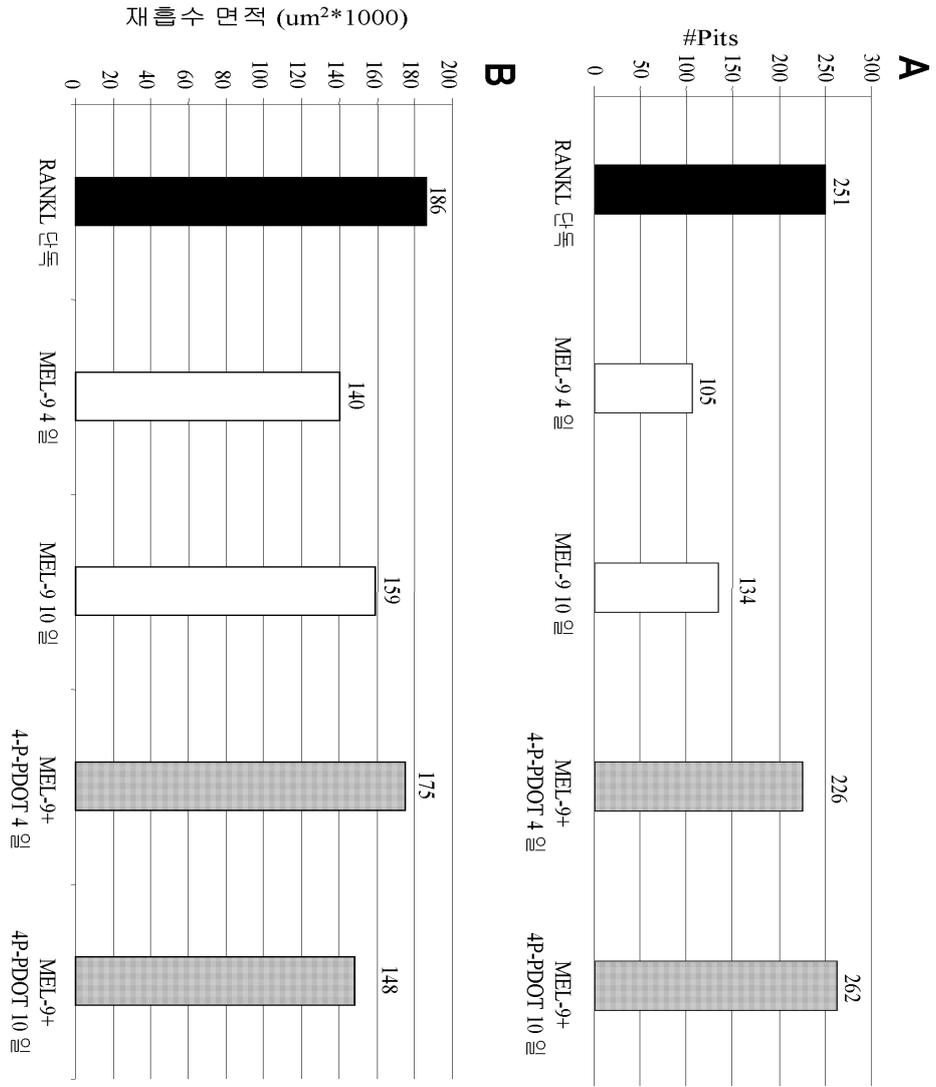
B



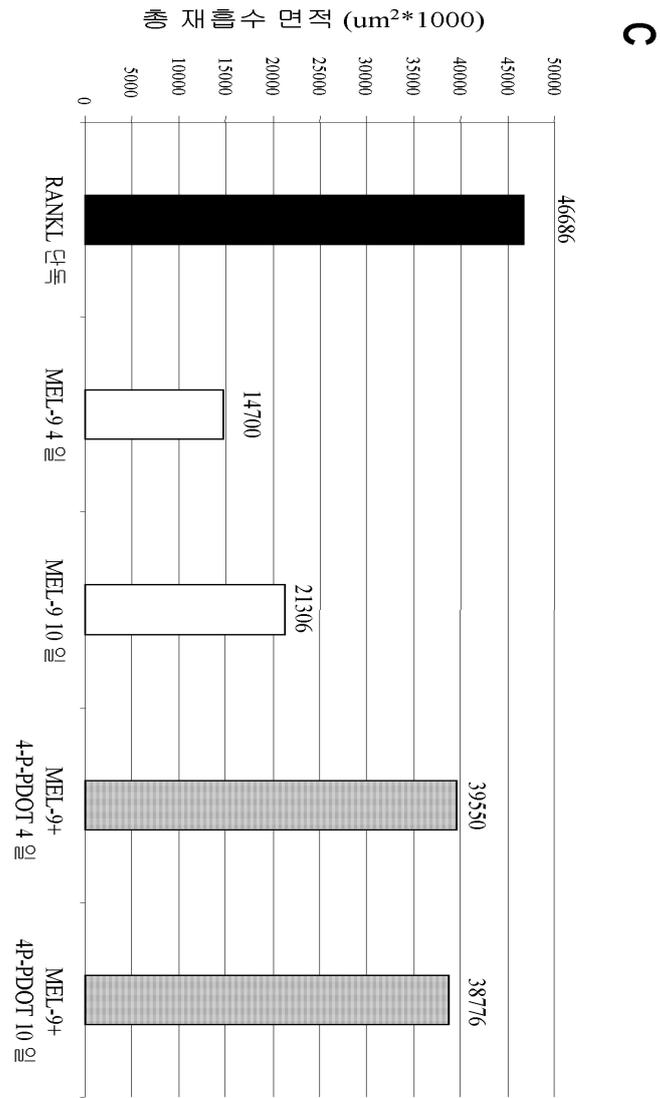
도면6



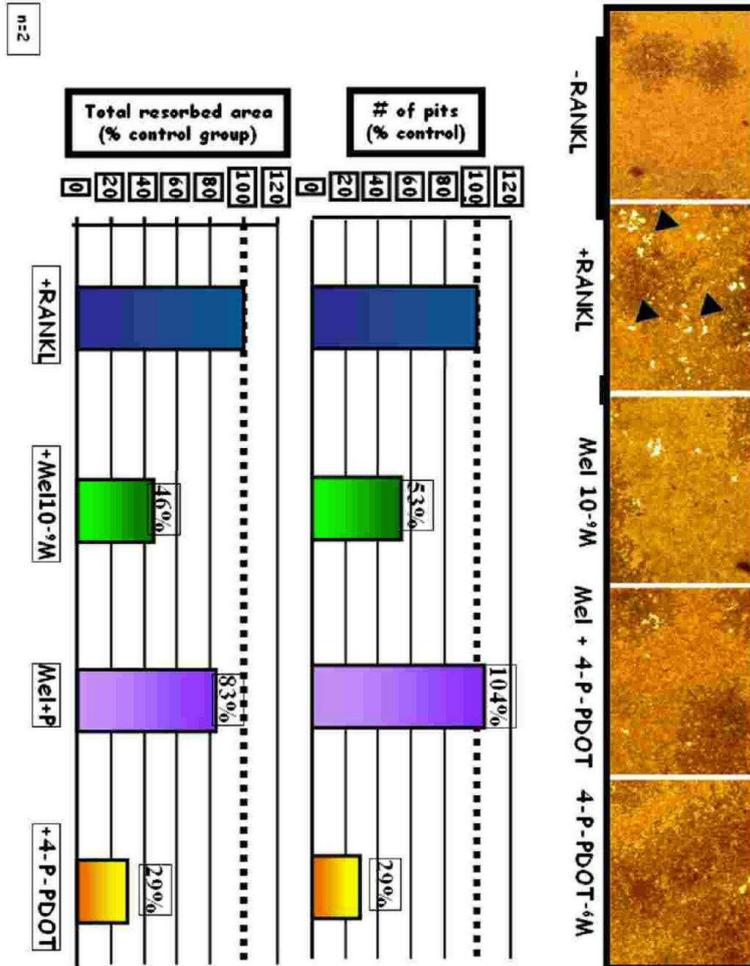
도면7a



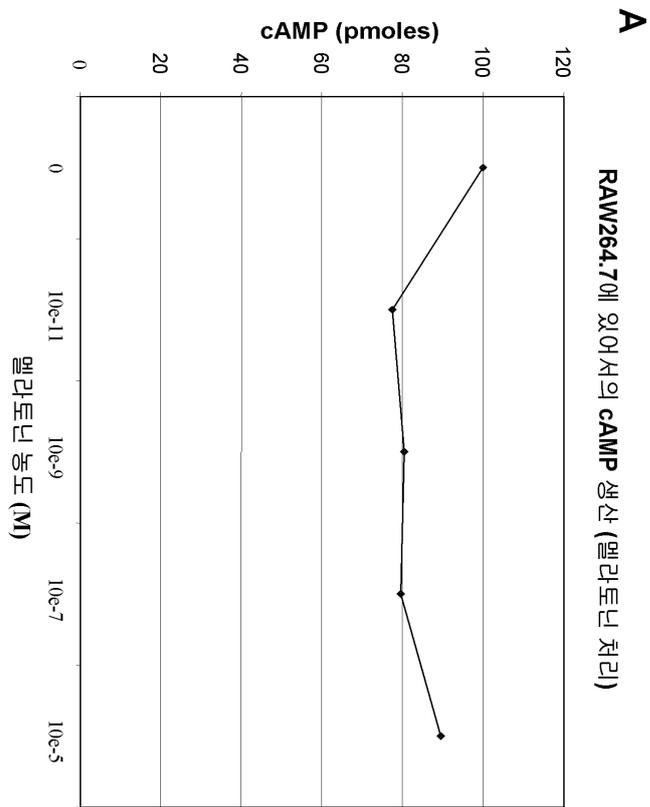
도면7b



도면8

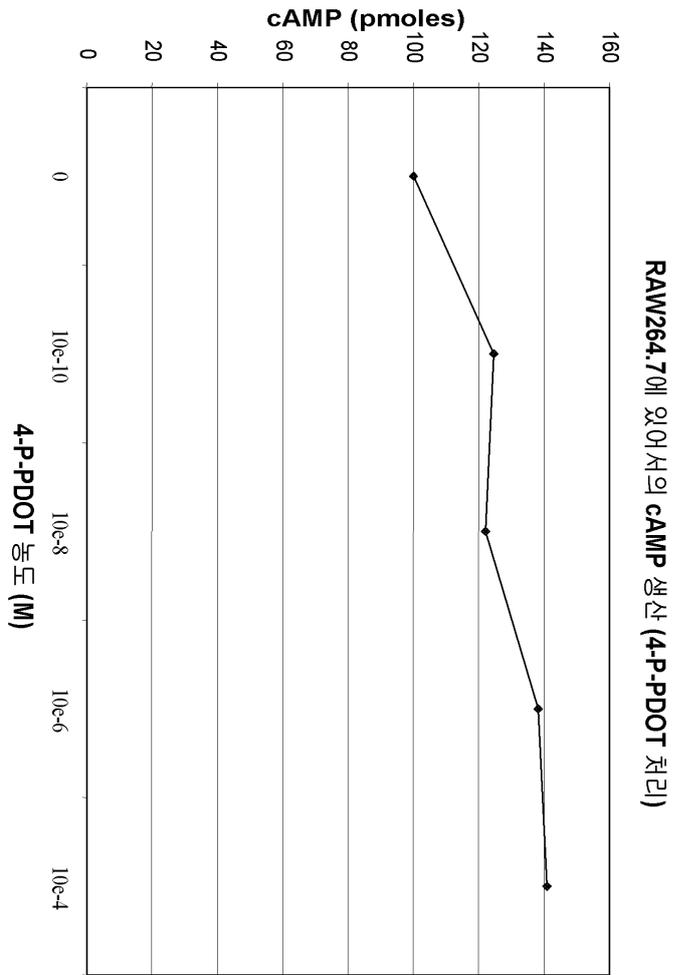


도면9a

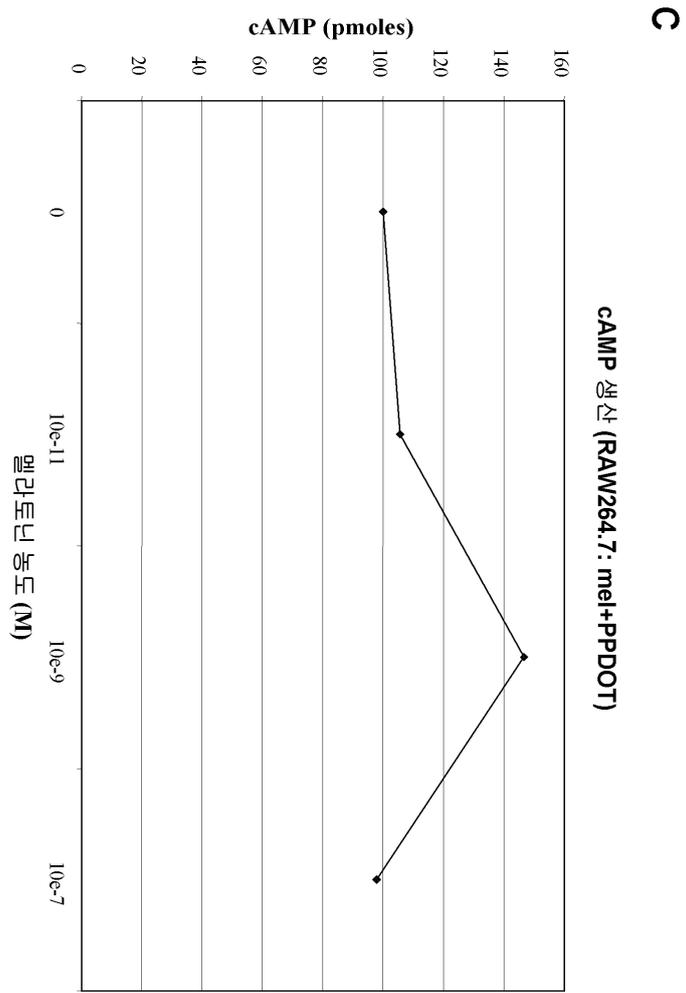


도면9b

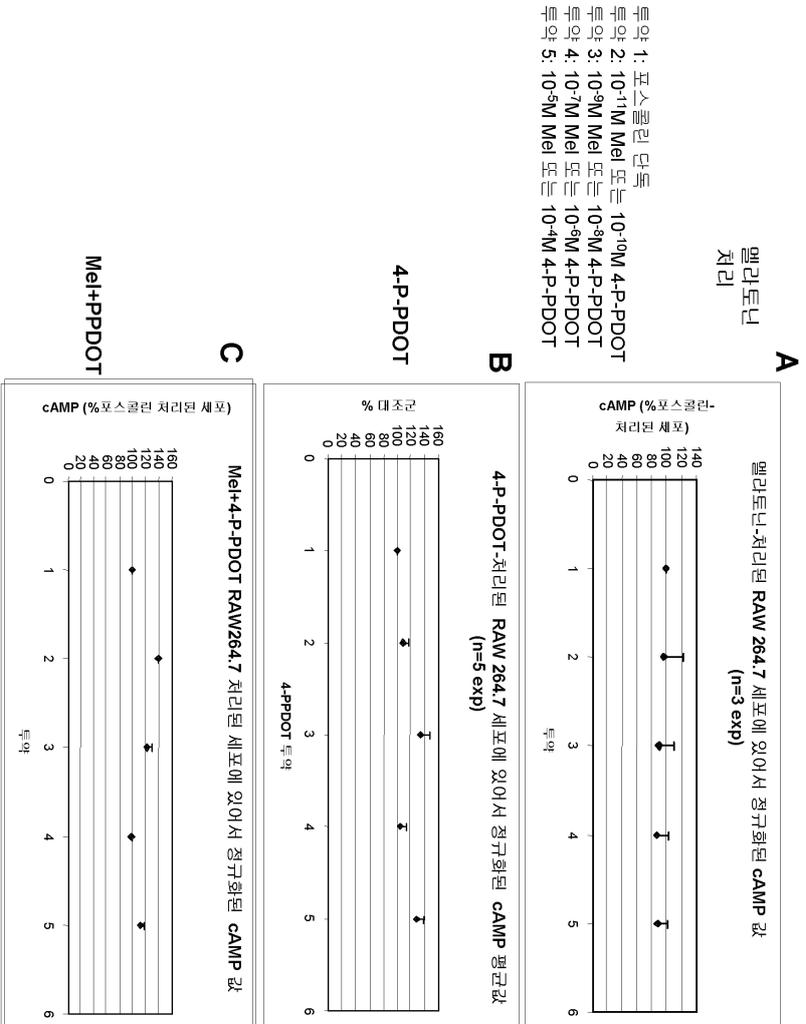
B



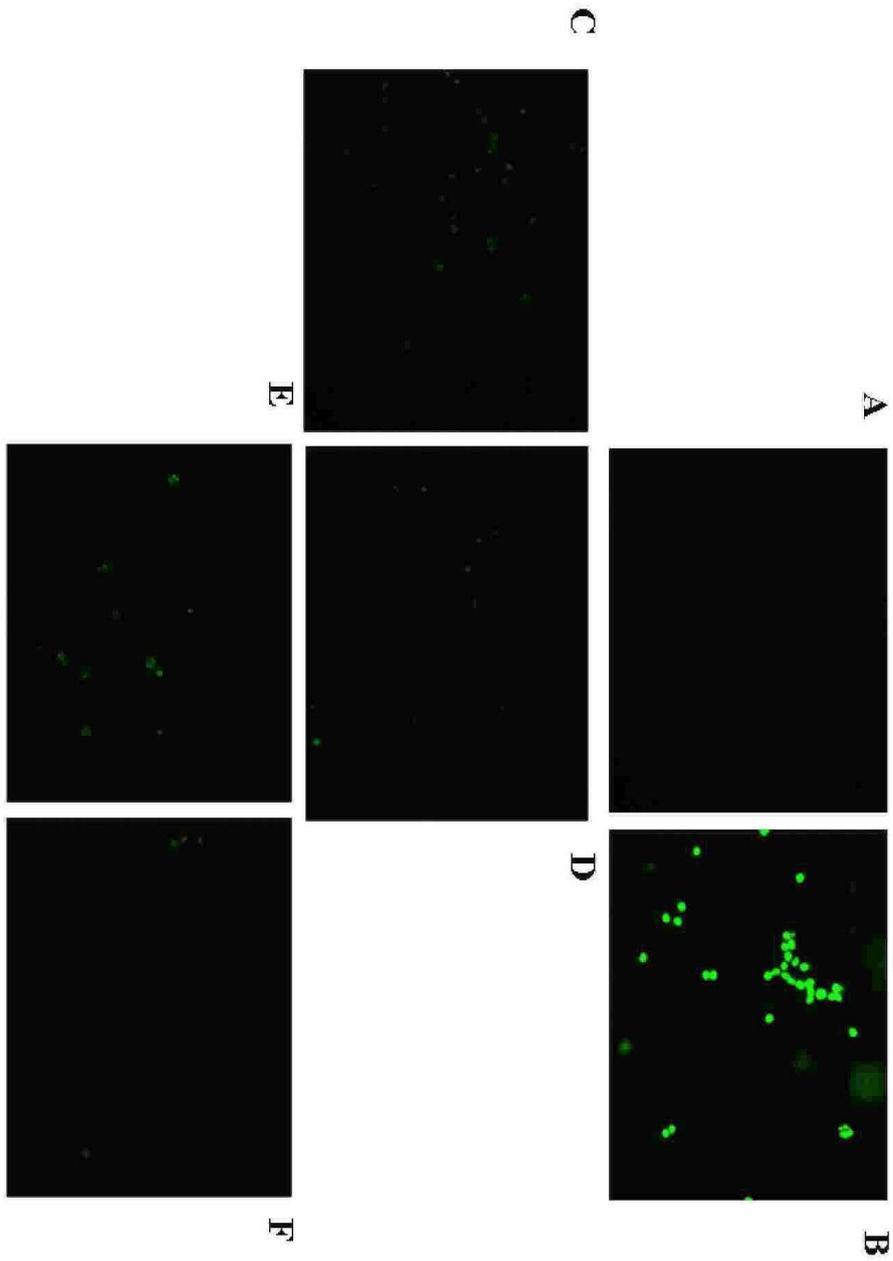
도면9c



도면10

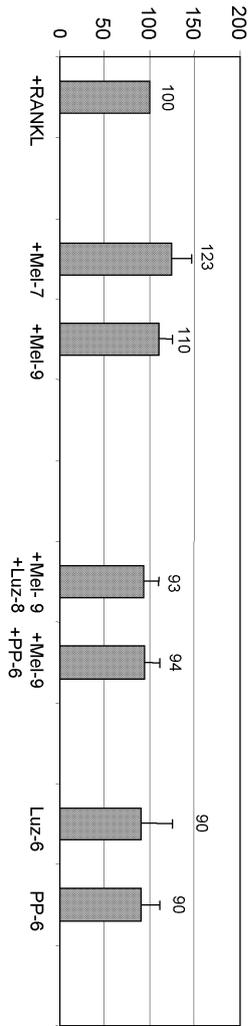


도면11

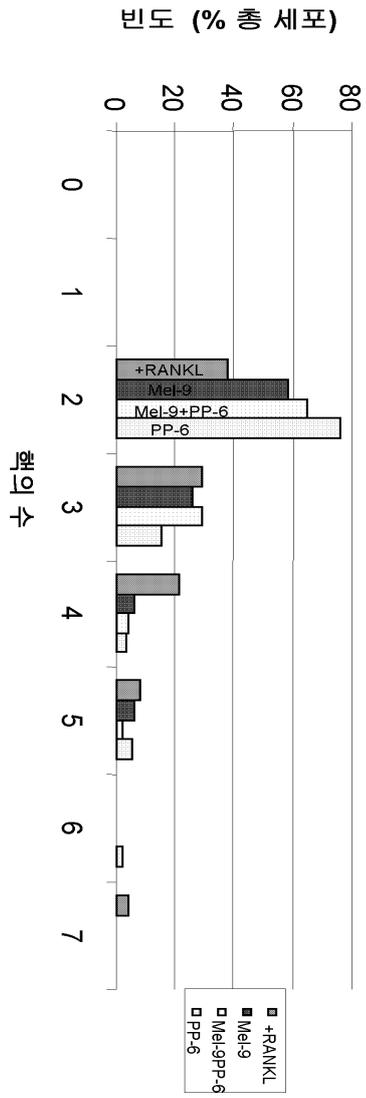


도면12

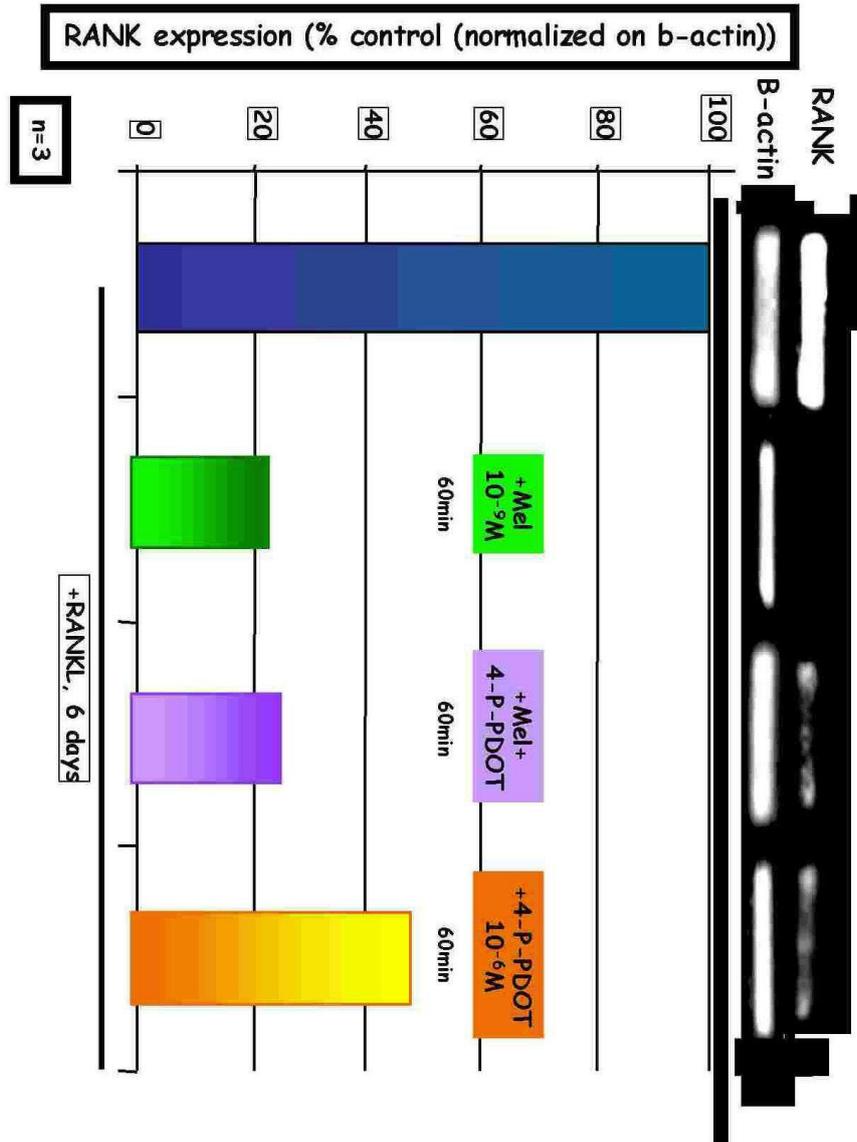
멜라토닌, 루진롤 또는 4-P-PDOT로 처리된 RAW264.7 세포에 있어서의
 티미딘 인코포레이션
 (미처리군 세포 %, n=3회 실험)



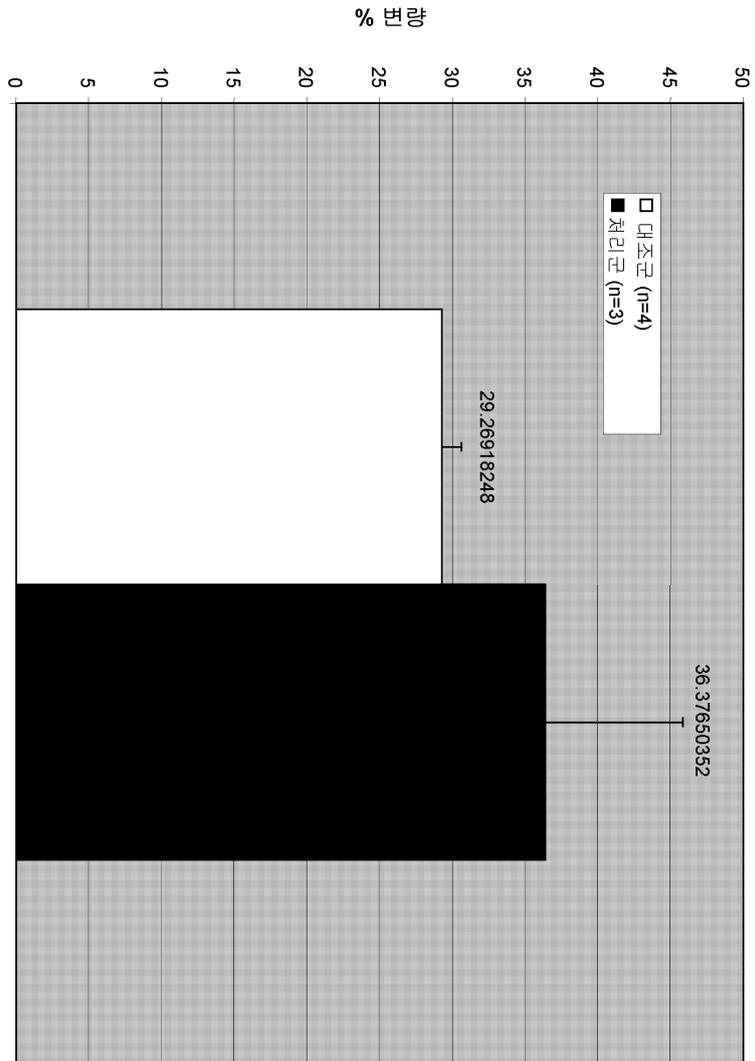
도면13



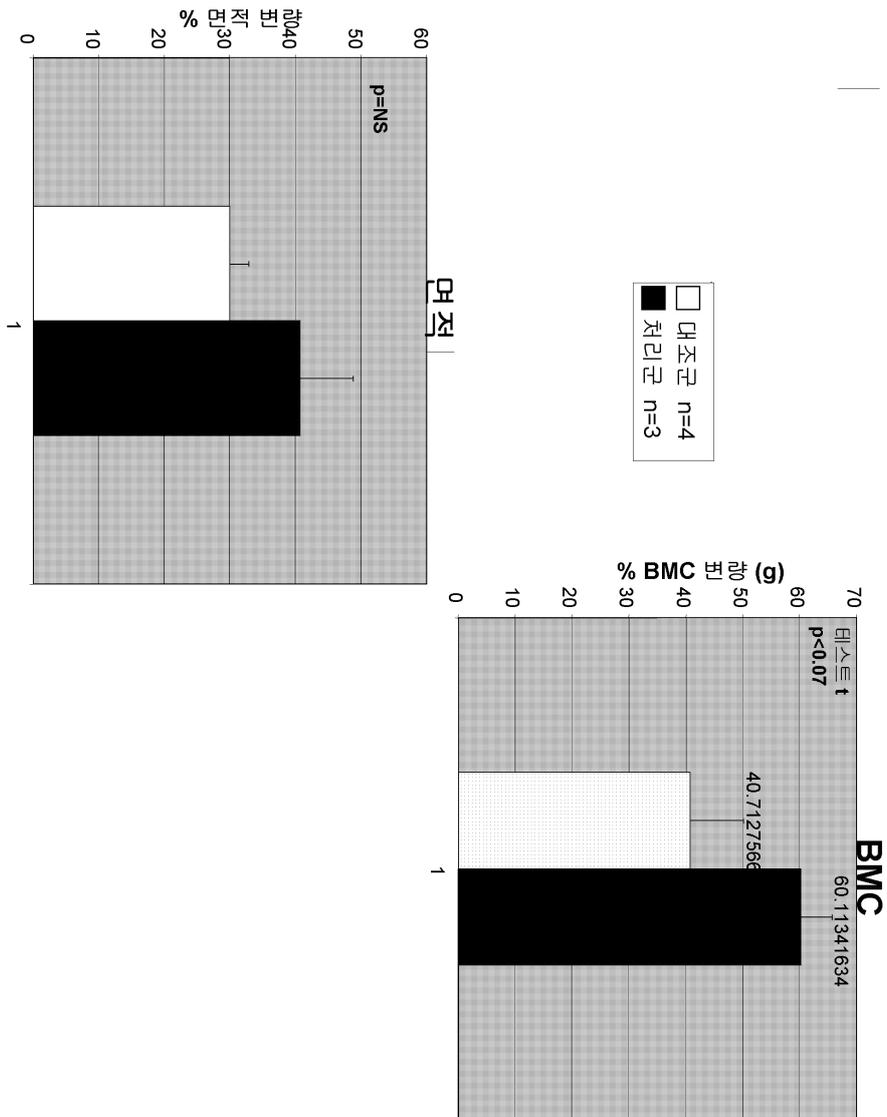
도면14



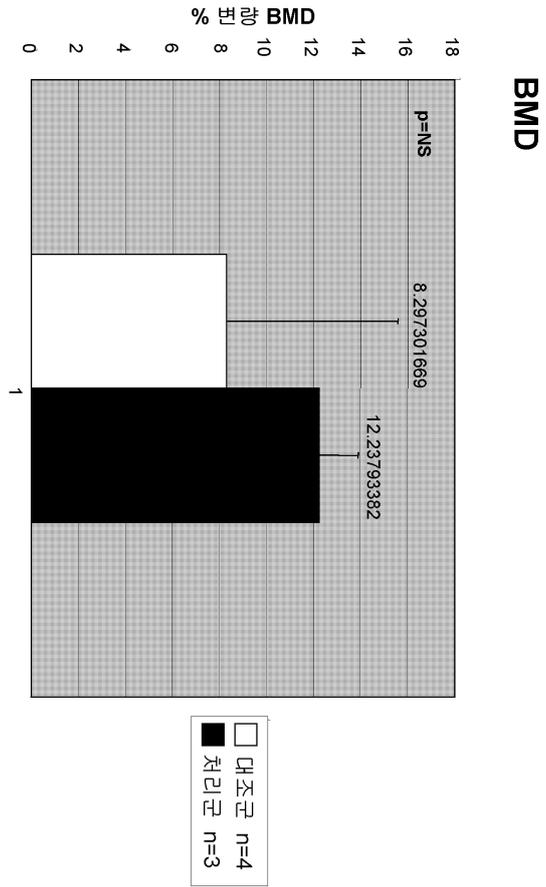
도면15



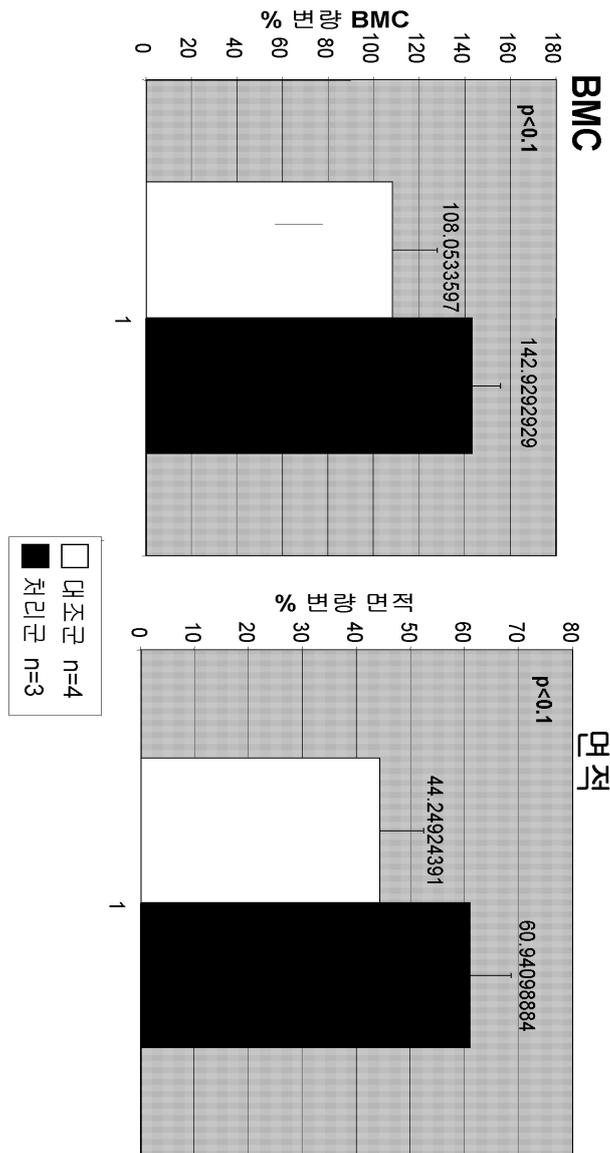
도면16a



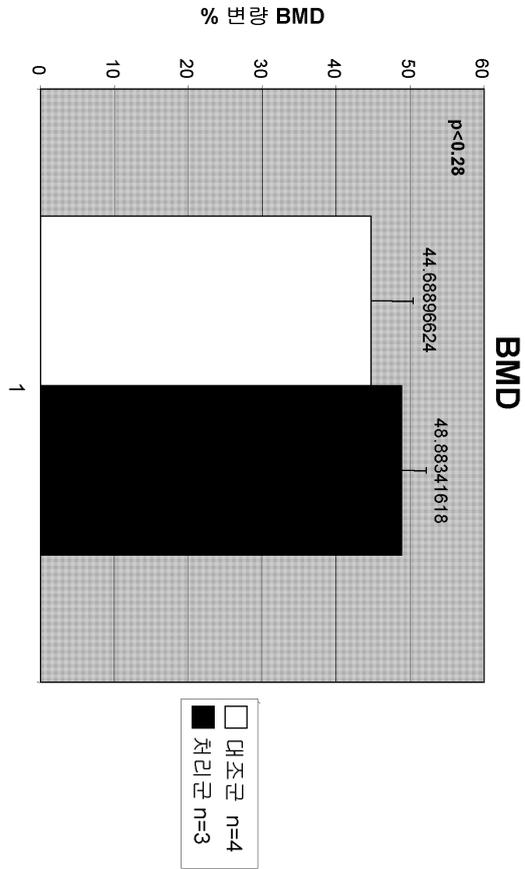
도면16b



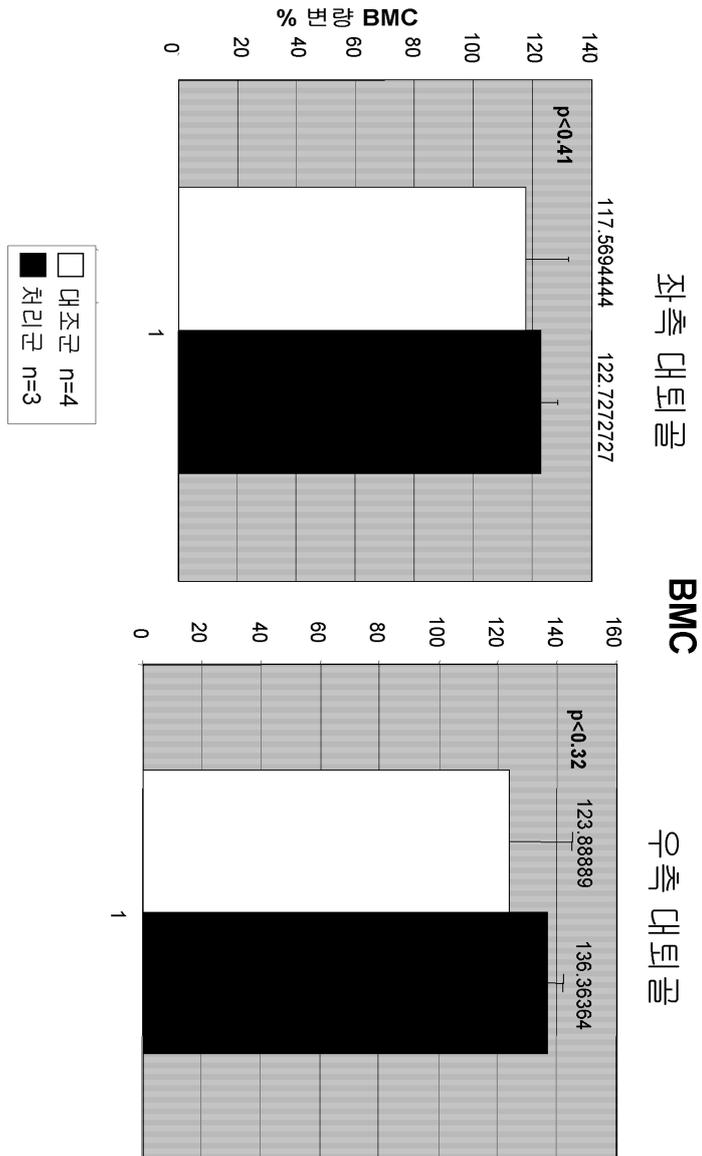
도면17a



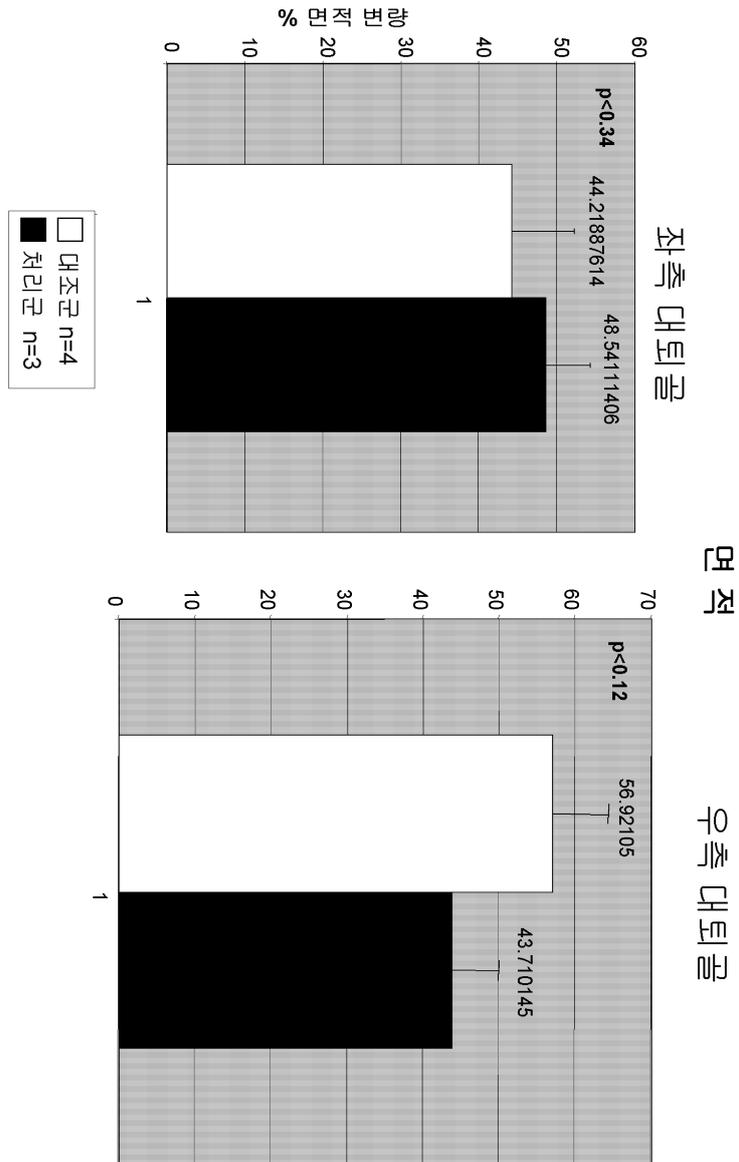
도면17b



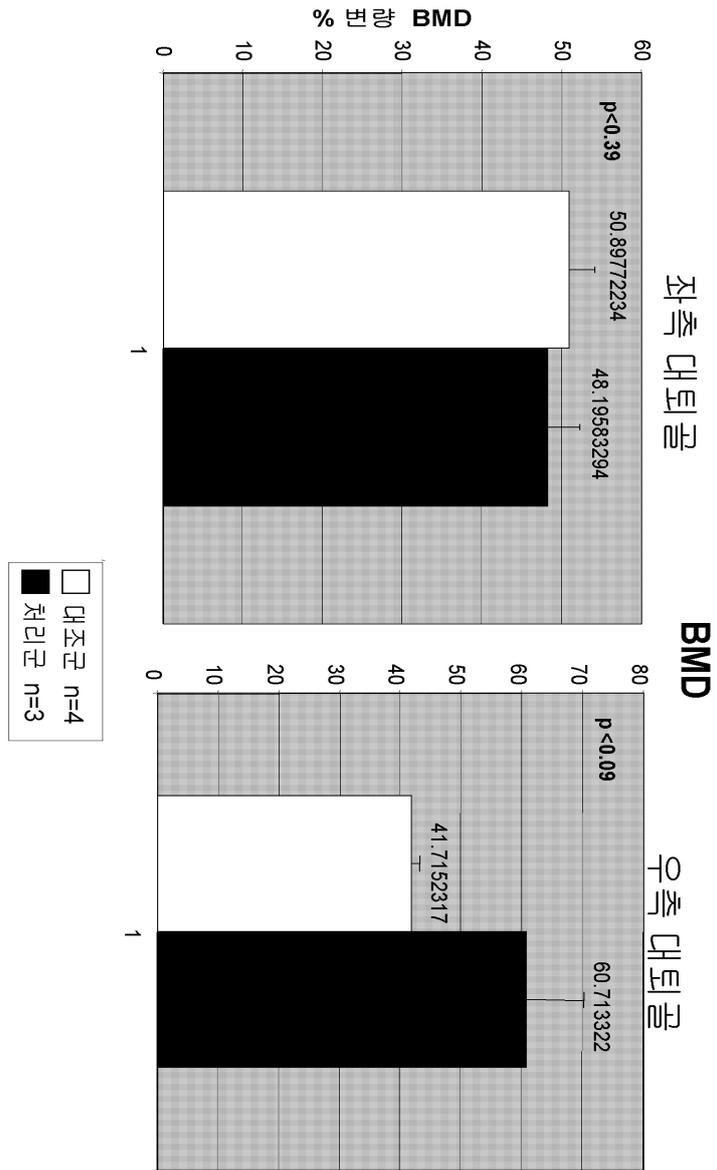
도면18a



도면18b



도면18c



도면19

A.

미처리 대조군

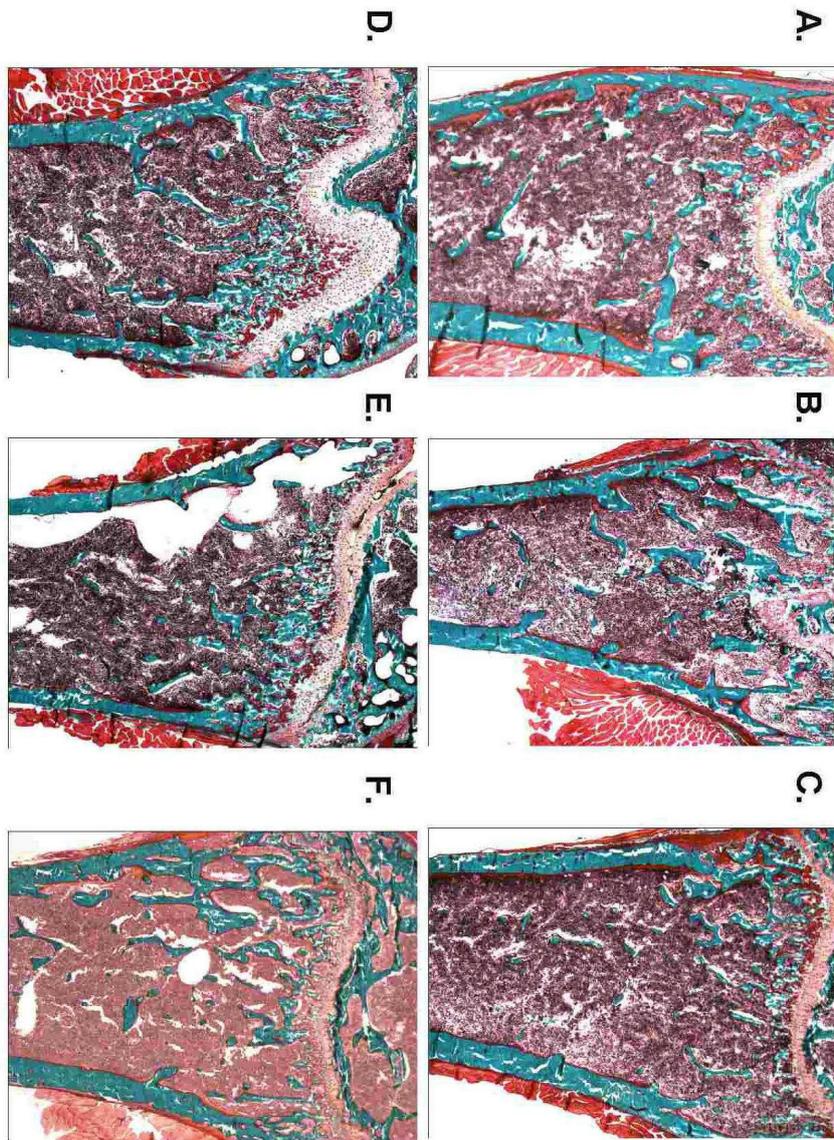


B.

4-P-PDOT 처리군



도면20



도면21

		마우스 583 우측 대퇴골		마우스 590 우측 대퇴골		
		처리: 4PPDOT		처리: 비히클		
	A-253-Goldner	A-253-TRAP	A-283-Goldner	A-283-TRAP		유닛
% 골 부피/ 조직 부피	BV/TV	18,2	15,4	8,8	10,1	%
해면골 두께	Tb.Th	44	32	25	30	mcm
해면골 수	Tb.N	4,1	4,8	3,5	3,4	/mm
		총 파골세포	활성 파골세포	총 파골세포	활성 파골세포	
% 파골세포 표면 / 골 표면	Oc.S/BS N.Oc/B.P	11,3	1,8	9,4	5,4	%
mm B.Pm 당 파골세포	m	4,9	0,9	2,3	2,6	/mm

서열목록

<110> CHU SAINTE-JUSTINE

<120> METHODS OF CORRECTING IMBALANCE BETWEEN BONE RESORPTION AND BONE FORMATION AND KITS AND COMPOSITIONS THEREFOR

<130> KP-CH-098813

<150> US 60/890,100

<151> 2007-02-15

<150> US 60/912,267

<151> 2007-04-17

<150> US 60/915,196

<151> 2007-05-01

<150> US 60/938,025

<151> 2007-05-15

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 1

gcaggttaatt tgtttgtggt

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 2

agatgcgtgg atcactct

20

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 3

tgtaccgcaa caagaagctc agga

24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 4

tggcgatgag tgcagcatc cata

24