



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0136599  
(43) 공개일자 2020년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/4965 (2006.01) A61P 27/16 (2006.01)  
A61P 43/00 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 31/4965 (2013.01)  
A61P 27/16 (2018.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0062327  
(22) 출원일자 2019년05월28일  
심사청구일자 2019년05월28일

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
이민구  
서울특별시 은평구 연서로44길 7, 416동 302호(진관동, 은평뉴타운 폭포동)  
박학  
서울특별시 서대문구 연세로2라길 33, 204호(창천동)  
(74) 대리인  
특허법인충현

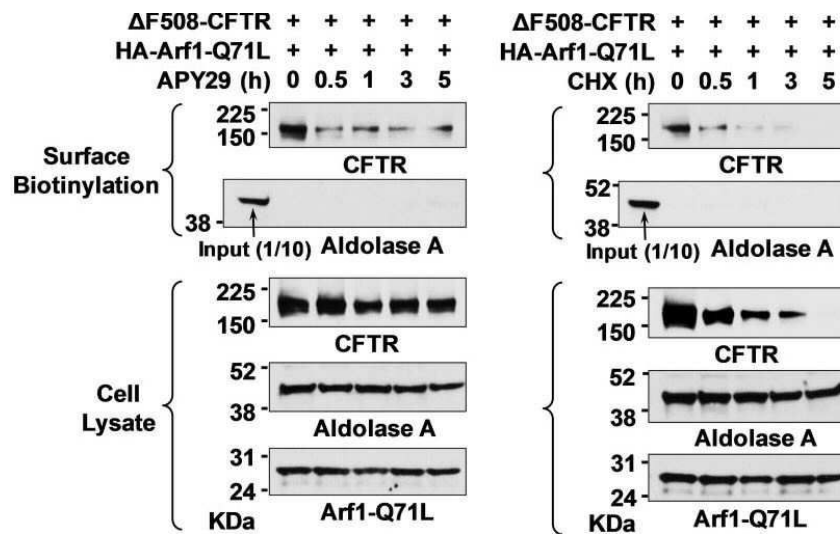
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 IRE1 $\alpha$  키나아제 활성화제를 유효성분으로 포함하는 단백질 형태 이상 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 단백질 형태 이상 질환(protein conformational disorder)의 예방 또는 치료용 조성물, 이의 스크리닝 방법 및 비전형적 단백질 분비(UPS) 경로의 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 변이 단백질의 폴딩 이동 결함을 원인으로 하는 다양한 단백질 형태 이상 질환에 대한 효율적인 치료제 조성물로 유용하게 이용될 수 있을 뿐 아니라, 치료제 개발을 위한 신뢰도 높은 신규 타겟을 제공한다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

**A61P 43/00** (2018.01)

**G01N 33/5023** (2013.01)

**G01N 2333/912** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| 과제고유번호      | 2013R1A3A2042197        |
| 부처명         | 과학기술정보통신부               |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                  |
| 연구사업명       | 기초연구사업 리더연구자지원사업        |
| 연구과제명       | 세포 막수송 분자조절 연구단         |
| 기 여 율       | 1/1                     |
| 과제수행기관명     | 연세대학교산학협력단              |
| 연구기간        | 2019.03.01 ~ 2020.02.29 |

---

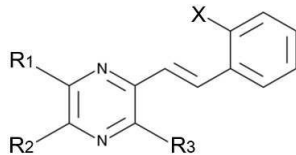
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 일반식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 단백질 형태 이상 질환(protein conformational disorder)의 예방 또는 치료용 조성물:

#### 일반식 1



상기 일반식에서, R<sub>1</sub> 내지 R<sub>3</sub>는 각각 독립적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이고, X는 할로젠이다.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 일반식 1의 R<sub>1</sub> 내지 R<sub>3</sub>는 C<sub>1</sub> 알킬인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 일반식 1의 X는 Cl인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단백질 형태 이상 질환은 아미노산 변이로 인한 단백질의 미접힘(unfold) 또는 잘못 접힘(misfold)에 의한 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 단백질은 낭포성 섬유증 막전도 조절자(CFTR), 펜드린(pendrin) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 단백질 형태 이상 질환은 낭포성 섬유증 또는 선천성 청각장애인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 7

다음의 단계를 포함하는 단백질 형태 이상 질환(protein conformational disorder)의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법:

(1) IRE1 $\alpha$  키나아제를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

(2) 상기 시료 내 IRE1 $\alpha$  키나아제의 활성 또는 발현을 측정하는 단계,

상기 IRE1 $\alpha$  kinase의 활성 또는 발현이 증가한 경우, 상기 후보물질은 단백질 형태 이상 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 단백질 형태 이상 질환은 아미노산 변이로 인한 단백질의 미접힘(unfold) 또는 잘못 접힘(misfold)에 의한 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 단백질은 낭포성 섬유증 막전도 조절자(CFTR), 펜드린(pendrin) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 단백질 형태 이상 질환은 낭포성 섬유증 또는 선천성 청각장애인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 11

IRE1 $\alpha$  키나아제의 억제제를 유효성분으로 포함하는 비전형적 단백질 분비(UPS) 억제용 조성물.

#### 청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 IRE1 $\alpha$  키나아제의 억제제는 APY29인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 IRE1 $\alpha$  키나아제 활성화제, 예를 들어 CSTMP를 유효성분으로 포함하는 단백질 형태 이상 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0003] 단백질 폴딩 및 이동의 결핍은 생명체의 항상성을 저해하는 흔한 발병 메카니즘으로, 다양한 인간 질환에 원인을 제공한다(1-3). 진핵생물에서 막관통 단백질을 포함하는 분비 단백질은 리보솜에서 합성된 후 소포체(ER)로 이동한다. ER은 다양한 샤페론 및 폴딩 촉매를 함유하고 있어 단백질이 제대로 폴딩되도록 한다(4). 소포체의 질적 관리(ER quality control) 메카니즘을 가능하도록 하는 분비 단백질은 소포체(ER)에서 나와 골지(Golgi)로 이동하며, 종국적으로 원형질막이나 세포외 배지로 보내진다. 이와 달리 불완전하게 폴딩된 단백질은 이들이 ER에서 빠져나왔을 때 발생하는 비정상 단백질에 의한 위험 발생을 막기 위해 ER에 남아 선택적으로 소포관련 분해기전(ERAD, ER-associated degradation)으로 타겟팅된다(5). 낭포성 섬유증 막전도 조절자(CFTR, *ABCC7*) 및 펜드린(pendrin, *SLC26A4*)의 많은 질환유발 돌연변이는 단백질 폴딩 결함을 유발한다. 결론적으로, 미스폴딩된 단백질은 정상적인 골지-매개 단백질 분비경로로 진입할 수 없어 궁극적으로 낭포성 섬유증(CF) 및 선천성 청각손실을 각각 유발한다.

- [0004] 음이온 채널 활성을 가지는 CFTR는 cyclic AMP-조절 수송단백질로서 기도, 췌장, 소장, 및 외분비선을 포함하는 분비기관 내 상피세포의 첨부표면(첨단부 표면)에서  $\text{Cl}^-$  및  $\text{HCO}_3^-$ 를 전도한다(6). CFTR는 ER의 질적 관리 시스템의 하나로서 ER(밴드 B)에서 초기에 코어 글리코실화되어 ER 렉틴 사페론과의 상호작용을 매개하는 2개의 N-결합 글리코실화 부위를 가진다(7). 골지로 이동한 뒤, 이들 글리코실화 부위는 복합체-글리코실화되고(밴드 C), 복합체-글리코실화된 CFTR는 상피조직의 첨부 표면으로 보내진다(8). 2,000여개의 동정된 변이중에서, 508 번째 페닐알라닌 잔기가 삭제된 돌연변이( $\Delta\text{F508}$ )는 가장 흔한 질환 유발 CFTR 돌연변이로서(9), 단백질 미스폴딩, ER 정체 및 ERAD에 의한 분해(10)를 유발한다. 결론적으로  $\Delta\text{F508}$ -CFTR 단백질은 ER 내에서 코어-글리코실화된 형태로 남아 소량만이 원형질막 표면에서 발현된다(11).
- [0005] 펜드린은 내이(inner ear) 및 갑상선 여포에서  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{I}^-$  또는  $\text{HCO}_3^-$ 와 같은 음이온을 수송하는 막관통 단백질이다(12). 유전자 변이로 인한 펜드린의 기능 상실은 비증후군성 전정수도관 확장 관련 청각소실(deafness with an enlarged vestibular aqueduct, DFNB4) 및 펜드리드 증후군(PDS)의 원인이 될 수 있다. 펜드린의 가장 흔한 질환유발 변이인 p.H723R (His723Arg)은  $\Delta\text{F508}$ -CFTR 단백질과 마찬가지로 단백질 미스폴딩, ER 정체 및 ERAD에 의한 분해를 유발한다(13).
- [0006] 대부분의 분비 단백질은 ER에서 원형질막으로 이동할 때 전형적인 골지-매개 분비 경로를 이용한다. 이러한 전통적인 분비경로 외에 ‘비전형적 단백질 분비(UPS)’로 불리는 새로운 메카니즘이 막관통 단백질을 포함하는 세포내 분비 단백질의 수송을 매개한다(14). 이전의 연구는 ER-골지의 수송로가 차단되거나 ER의 스트레스 상황에서 미성숙 상태의 코어-글리코실화된 CFTR 및 펜드린이 골지-비의존성 UPS 경로를 경유하여 원형질막에 도달할 수 있음을 밝힌 바 있다(15, 16). 일단 세포 표면에 도달하면, 코어-글리코실화된 CFTR 및 펜드린은 다소 감소하기는 하였을지언정 음이온 수소능력을 가진다(15, 16). 따라서, 유의한 세포 스트레스 유발없이 UPS를 선택적으로 활성화할 수 있다면 막단백질의 폴딩 및 세포표면으로의 이동에 결함이 있어 발생하는 질환에 대한 유망한 치료수단으로 이용될 수 있다. 그러나, CFTR 및 펜드린의 UPS를 활성화시키는 종래의 방법(예를 들어  $\Delta\text{F508}$ -CFTR에 있어서 GRASP55의 과발현 및 p.H723R-펜드린에 있어서 MVB12B의 과발현)(15, 16)은 CF, DFNB4, 또는 펜드리드 증후군을 가지는 인간 환자를 치료하기에는 임상적으로 부적합하다.
- [0007] 최근의 연구를 통해 막 단백질의 UPS에 관여하는 몇몇 핵심 분자가 동정되었으나, UPS 조절 메카니즘의 전체적인 그림은 아직 알려지지 않았다. 일반적으로, 대부분의 UPS는 구조적인 것이 아니라 스트레스에 의해 유도된다(19). 예를 들어, ER-골지 수송의 차단은 막 단백질의 UPS에 관하여는 스트레스 관련 신호를 유도한다. ER에서 골지로의 전형적인 단백질 분비의 차단으로 인해 폴딩되지 않은 단백질을 ER 내강에 축적시켜 ER 스트레스 및 UPR(미접합 protein response)라고 불리는 적응성 세포 반응을 유도한다(20). 진핵세포에는 크게 다음 세 종류의 UPR 센서가 존재한다: 이노시톨-요망 효소인  $1\alpha$  (IRE1 $\alpha$ )과 IRE1 $\beta$ ; 단백질 키나아제인 RNA-유사 ER 키나아제(PERK); 그리고 ER 막에 존재하여 ER 스트레스 신호를 전송하는 활성화 전사인자  $6\alpha$  (ATF6 $\alpha$ ) 및 ATF6 $\beta$ . 흥미롭게도, 진화적으로 가장 보존적인 형태의 UPR 신호인 IRE1 $\alpha$ 가 막 단백질의 ER 스트레스-유도된 UPS에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. IRE1 $\alpha$ 이 결핍되면 ER-골지 경로 차단에 따른 CFTR 및 펜드린의 UPS가 유도되지 않는다(16, 21). 그럼에도, IRE1 $\alpha$ 에 의한 UPS 조절의 명확한 메카니즘은 알려져있지 않다.
- [0008] IRE1는 ER 스트레스 동안 폴딩되지 않은 단백질의 센서 역할을 하는 ER-내강 도메인과, 엔도리보뉴클레아제 도메인 및 Ser/Thr 단백질 키나아제 도메인을 포함하는 세포기질 도메인으로 이루어진 I형 ER 막관통 단백질이다. 활성화된 포유류의 IRE1 $\alpha$  단백질은 전사인자 XBP1(X-box-binding protein 1)의 mRNA를 절단함으로써 ER 스트레스 신호를 전송하며, 이에 따라 활성화된 XBP1(스플라이싱된 XBP1)는 단백질 폴딩, 단백질 질적 조절 및 ERAD(22)에 관여하는 UPR-관련 유전자를 증가시킨다. 이러한 메카니즘을 이용하여, ER 내의 폴딩되지 않은 단백질에 의한 부담이 경감되고 ER은 항상성을 되찾는다. IRE1-의존성 붕괴(RIDD) 과정 역시 다양한 단백질의 mRNA를 분해시킴으로써 ER 로딩을 감소시키는 보완적 메카니즘으로 인식된다(23). 뿐만 아니라, IRE1 단백질 키나아제의 활성화는 TRAF2(TNF receptor-associated factor 2)와 같은 어댑터 단백질을 이용하여 ‘알람 스트레스 경로’를 촉발하여 ASK1(세포사멸 신호-regulating kinase 1) 및 이의 다운스트림 이펙터인 JNK(JUN N-terminal kinase)의 활성화에 이르게 된다(24).
- [0009] 본 발명자들은 각각의 신호 arm을 분석함으로써 UPS에서 IRE1 $\alpha$ 의 역할을 조사하였다. 본 발명자들의 조사결과 는 CFTR 및 펜드린의 UPS가 IRE1 $\alpha$  RNase 활성을 요구하는 XBP1-및 RIDD-의존성 경로에 의해서가 아니라, IRE1 $\alpha$  키나아제-매개 신호 캐스케이드를 통해 인 비/보 및 인 비/트로에서 활성화됨을 보였다. IRE1 $\alpha$  키나아제 경로는 단백질 폴딩 및 이동 결함을 원인으로 하는 질환의 치료제 개발을 위한 신규한 타겟을 제공할 수 있다.

[0011] 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 내용이 보다 명확하게 설명된다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 한국 등록특허공보 제10-1403862호

### 비특허문헌

[0014] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. Zhang J et al. Biomed Pharmacother. 82:281-289 (2016)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0015] 본 발명자들은 단백질의 비정상적 3차원 구조를 원인으로 하는 다양한 단백질 형태 이상 질환에 대한 신뢰도 높은 치료 타겟을 새로이 발굴하고, 이를 기반으로 효율적인 신규 치료제 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1의 화합물을 투여할 경우 세포 사멸 유발 없이 ‘비전형적 단백질 분비(Unconventional Protein Secretion, UPS)’가 활성화되면서 돌연변이 등으로 인해 폴딩 및 이동성 결함을 가지는 분비 단백질의 세포 표면의 발현이 극적으로 회복됨을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0016] 따라서 본 발명의 목적은 단백질 형태 이상 질환(protein conformational disorder)의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 단백질 형태 이상 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

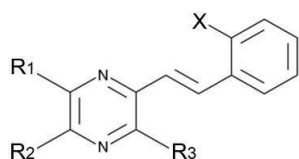
[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 비전형적 단백질 분비(UPS) 억제용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0020] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

### 과제의 해결 수단

[0022] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 일반식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 단백질 형태 이상 질환(protein conformational disorder)의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다:

[0023] 일반식 1



[0024]

[0025] 상기 일반식에서, R<sub>1</sub> 내지 R<sub>3</sub>는 각각 독립적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이고, X는 할로젠이다.

- [0026] 본 발명자들은 단백질의 비정상적 3차원 구조를 원인으로 하는 다양한 단백질 형태 이상 질환에 대한 신뢰도 높은 치료 타겟을 새로이 발굴하고, 이를 기반으로 효율적인 신규 치료제 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1의 화합물을 투여할 경우 세포 사멸 유발 없이 ‘비전형적 단백질 분비(Unconventional Protein Secretion, UPS)’가 활성화되면서 돌연변이 등으로 인해 폴딩 및 이동성 결함을 가지는 분비 단백질의 세포 표면의 발현이 극적으로 회복됨을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0027] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 단백질 형태 이상 질환은 아미노산 변이로 인한 단백질의 미접힘(unfold) 또는 잘못 접힘(misfold)에 의한 질환이다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 “단백질”은 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 일련의 고분자(macromolecule)를 의미한다. 단백질은 아미노산 유닛들의 연속적인 결합으로 이루어진 선형의 분자이나, 전체적인 크기, 전체 또는 각 구성 잔기의 전하 및 소수성, 공유·비공유 결합 형성여부 등에 의해 3차원 형태 및 상태 변화 경향이 영향을 받으며, 이러한 형태 및 경향이 비정상적일 경우 다양한 PCD(protein conformational disease) 질환의 원인이 될 수 있다.
- [0029] 구체적으로는, 상기 단백질은 분비 단백질(secretory protein)이다. 막관통 단백질을 비롯한 분비 단백질은 소포체(ER)로부터 골지(Golgi)로 이동 후 종국적으로 원형질막이나 세포 외로 보내지는데, 폴딩 결함을 가지는 단백질은 정상적인 골지-매개 단백질 분비경로로 진입하지 못하고 소포관련 분해기전(ERAD, ER-associated degradation)으로 보내짐으로써 세포 표면 발현이 이루어지지 않아 다양한 질환을 유발한다.
- [0030] 본 명세서에서 용어 “폴딩 결함(folding defect)”은 단백질이 고유의 기능 및 활성을 가지는 3차원 구조를 획득하도록 폴리펩타이드가 정상적으로 폴딩 되지 못하는 것을 의미한다. 따라서, 용어 “폴딩 결함”은 “잘못 접힘(misfolding)”과 “미접힘(unfolding)”을 포함하는 의미이다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a)질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b)질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c)질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 방법을 통해 발굴된 치료 조성물은 PCD 질환, 보다 구체적으로는 분비 단백질의 변이로 인한 폴딩 및 이동결함을 원인으로 질환에 걸린 개체에서 비전형적 단백질 분비를 활성화시킴으로써 분비 단백질의 세포 표면 발현 저해에 의해 유발되었던 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 PCD의 치료 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0032] 본 명세서에서, 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0033] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다. 조성물의 “치료적 유효량”은 조성물을 투여하고자 하는 대상체에게 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 추출물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다. 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 일반식 1의 R<sub>1</sub> 내지 R<sub>3</sub>는 C<sub>1</sub> 알킬이다.
- [0036] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 일반식 1의 X는 Cl이다.
- [0037] R<sub>1</sub> 내지 R<sub>3</sub>가 C<sub>1</sub> 알킬(메틸)이고 X가 Cl인 화학식 1 화합물은 (E)-2-(2-클로로스티릴)-3,5,6-트리메틸-피라진(CSTMP)으로, CSTMP는 IRE1 $\alpha$  키나아제를 활성화시킨다. 하기 실시예에서 구체적으로 기재한 바와 같이, 본 발명자들은 UPS를 활성화시켜 폴딩/이동 결함을 가지는 분비 단백질의 표면 발현을 회복시키기 위해서는 IRE1 $\alpha$  키나아제를 활성화시켜야 한다는 사실을 다각적인 실험을 통해 최초로 확인하였다. 이는 IRE1 $\alpha$  엔도뉴클레아제 활성화를 통한 XBP1의 스플라이싱(활성화) 유도가 UPS 촉진을 위한 핵심 타겟이라 제안하던 당업계의 상식을 뒤집으면서, PCD 질환을 치료하기 위한 가장 효율적이고 직접적인 타겟을 제안하는 것이다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1 화합물의 농도는 5  $\mu$ M-50  $\mu$ M이며, 보다 구체적으로는



5  $\mu$ M-30  $\mu$ M이고, 가장 구체적으로는 10  $\mu$ M-20이다.

- [0039] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 단백질은 낭포성 섬유증 막전도 조절자(CFTR), 펜드린(pendrin) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0040] 보다 구체적으로, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 단백질 형태 이상 질환은 낭포성 섬유증 또는 선천성 청각장애이다.
- [0041] CFTR는 소포체의 질적 관리 시스템을 이루는 단백질로서 골지로 이동한 뒤 복합체-글리코실화된 후 상피조직의 첨부 표면으로 보내지는데, 돌연변이, 예를 들어 508번째 페닐알라닌 잔기가 삭제된  $\Delta$ F508-CFTR는 미스폴딩되어 원형질막 표면에서 발현되지 못한 채 ERAD에 의해 분해됨으로써 낭포성 섬유증을 유발한다.
- [0042] 펜드린은 내이(inner ear)와 갑상선 여포의 음이온을 수송 막관통 단백질로, 역시 변이로 인한 단백질 미스폴딩, ER 정체 및 ERAD에 이르는 일련의 과정은 선천성 청각장애를 유발한다. 구체적으로는, 상기 청각장애는 비증후군성 전정수도관 확장 관련 청각소실(deafness with an enlarged vestibular aqueduct, DFNB4) 또는 펜드리드 증후군(PDS)이다.
- [0043] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 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, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0044] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 비경구 방식으로 투여된다.
- [0045] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.
- [0046] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 단백질 형태 이상 질환(protein conformational disorder)의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0048] (1) IRE1 $\alpha$  키나아제를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0049] (2) 상기 시료 내 IRE1 $\alpha$  키나아제의 활성 또는 발현을 측정하는 단계,
- [0050] 상기 IRE1 $\alpha$  kinase의 활성 또는 발현이 증가한 경우, 상기 후보물질은 단백질 형태 이상 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.
- [0051] 본 발명에서 지시하는 단백질 형태 이상 질환에 대해서는 이미 상술하였으므로 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0052] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, IRE1 $\alpha$ 를 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 IRE1 $\alpha$ 를 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 IRE1 $\alpha$  키나아제의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 IRE1 $\alpha$  키나아제의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현량 및 활성 측정방법에 의해 수행될 수 있다. 측정 결과,



IRE1 $\alpha$  키나아제의 발현량 또는 활성이 증가하는 경우 상기 시험물질은 단백질 형태 이상 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정될 수 있다.

[0054] 본 명세서에서 용어 “발현의 증가”는 폴딩/이동 결함을 가지는 변이 단백질의 UPS가 촉진되어 단백질 형태 이상 질환의 증상이 경감 또는 개선되거나 혹은 그 위험이 감소할 정도로 IRE1 $\alpha$  키나아제의 발현량이 증가하는 것을 의미한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 증가한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 증가한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 증가한 상태를 의미할 수 있다.

[0055] 본 명세서에서 용어 “활성의 증가”란 대조군에 비하여 단백질의 생체내 고유한 기능이 측정 가능할 정도로 유의하게 증가하는 것을 말하며, 구체적으로는 폴딩/이동 결함을 가지는 변이단백질의 UPS가 촉진되어 단백질 형태 이상 질환의 증상이 경감 또는 개선되거나 혹은 그 위험이 감소할 정도로 IRE1 $\alpha$  키나아제의 활성이 증가하는 것을 말한다. 활성(activity)의 증가는 단순한 기능(function)의 증가 뿐 아니라 안정성(stability)의 증가로 기인한 궁극적인 활성 증가를 포함한다.

[0057] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 IRE1 $\alpha$  키나아제의 억제제를 유효성분으로 포함하는 비전형적 단백질 분비(UPS) 억제용 조성물을 제공한다.

[0058] 본 명세서에서 용어 “억제제”는 IRE1 $\alpha$  키나아제의 활성 또는 발현의 저하를 야기시키는 물질을 의미하며, 이에 의해 IRE1 $\alpha$  키나아제의 활성 또는 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐 아니라, IRE1 $\alpha$  키나아제에 의해 유도되는 UPS 경로가 유의하게 저하될 수 있을 정도로 IRE1 $\alpha$  키나아제의 활성 또는 발현을 저하시키는 물질을 의미한다.

[0059] IRE1 $\alpha$  키나아제의 억제제는 예를 들어 당업계에서 이미 그 서열 및 구조가 공지된 효소인 IRE1 $\alpha$  키나아제의 발현을 유전자 수준에서 억제하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와, 단백질 수준에서 억제하는 항체 또는 앵타머 뿐 아니라, IRE1 $\alpha$  키나아제의 활성을 억제하는 화합물, 펩타이드 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 명세서에서 용어 “비전형적 단백질 분비(UPS) 억제”는 IRE1 $\alpha$ 에 의해 유도되는 UPS 경로를 유의하게 저해함으로써, 궁극적으로 폴딩 결함을 가지는 이상 단백질이 원형질막으로 이동하거나 세포 외부로 분비되는 것을 억제하는 것을 의미한다. 따라서, 용어 “비전형적 단백질 분비(UPS) 억제”는 “폴딩 결함을 가지는 단백질의 과도한 분비로 인한 질환의 예방 또는 치료”와 동일한 의미를 가진다.

[0061] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 IRE1 $\alpha$  키나아제의 억제제는 APY29이다.

## 발명의 효과

[0063] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0064] (a) 본 발명은 단백질 형태 이상 질환(protein conformational disorder)의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0065] (b) 본 발명은 또한 비전형적 단백질 분비(UPS) 경로의 억제용 조성물을 제공한다.

[0066] (c) 본 발명은 변이 단백질의 폴딩 및 이동 결함을 원인으로 하는 다양한 단백질 형태 이상 질환에 대한 효율적인 치료제 조성물로 유용하게 이용될 수 있을 뿐 아니라, 치료제 개발을 위한 신뢰도 높은 신규 타겟을 제공한다.

## 도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 XBP1 스플라이싱 및 IRE1 $\alpha$  엔도뉴클라아제 활성이  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS와 무관함을 보여주는 그림이다. Arf1-Q71L-유도된 소포체-골지(ER-to-Golgi) 차단으로 인해 ASK1 인산화가 활성화되나, XBP1 스플라이싱은 활성화되지 않는다. HEK293 세포를 Arf1-Q71L 플라스미드로 48시간 동안 형질전환하거나 타프시가진(thapsigargin) 5 $\mu$ M를 12시간 동안 처리하여 소포체 스트레스(ER stress)를 유도하였다. 대표적으로 IRE1 $\alpha$ , 인산-IRE1 $\alpha$ , 인산-ASK1 및 스플라이싱된 XBP1의 면역블롯 결과는 도 1a에 나타내고, 복수회 실험결과에 대한

정량화 결과는 도 1b에 요약하였다(n=3). XBP1가 아닌 IRE1 $\alpha$ 가 Arf1-Q71L-유도된  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS에 필요하다. 도 1c는 플라스미드 및/또는 siRNA로 형질전환된 HEK293 세포에 대한 표면 바이오틴화 분석 결과를 면역블롯으로 보여주는 그림이며, 복수회 실험에 대한 결과는 도 1d에 요약하였다(n=4). 단백질의 세포 표면-특이적 표지는 바이오틴화된 절편에서 세포질 단백질 알돌레이즈 A가 존재하지 않음을 통해 확인하였다. 상술한 방법으로 XBP1 siRNA 대신 STF-083010(60  $\mu$ M, 12 h)를 처리하여 표면 바이오틴화 분석을 수행하였다. 대표적인 결과는 도 1e에 나타내었으며 복수회 실험에 대한 결과는 도 1f에 요약하였다(n=4). 막대그래프 데이터는 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다. \*\* $P$  < 0.01, n.s. 유의성 없음. 데이터는 일원분산분석 후 Tukey 다중비교검정을 수행하였다.

도 2는  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS 유도에 IRE1 $\alpha$  키나아제 활성이 필요함을 보여주는 그림이다. HEK293 세포에서 Arf1-Q71L로  $\Delta$ F508-CFTR UPS를 유도한 뒤 APY29(100  $\mu$ M) 또는 단백질 합성 억제제인 사이클로헥시마이드(0.1 mg/mL)를 처리하고 표면 바이오틴화 분석을 수행함으로써 IRE1 $\alpha$  키나아제 억제제인 APY29가  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS에 미치는 영향을 조사하였다. 대표적인 면역블롯 결과는 도 2a에 나타내었으며, 복수회 실험에 대한 결과는 도 2b에 요약하였다(n=5). APY29는 전체 단백질 수준에 영향을 미치지 않으면서 표면  $\Delta$ F508-CFTR를 선택적으로 감소시킨다. HeLa 세포를 Arf1-Q71L의 존재 및 부재 하에서 각각  $\Delta$ F508-CFTR 발현 플라스미드로 형질전환하고 APY29(100  $\mu$ M)를 일정기간 동안 배지에 첨가하였다. 항-M3A7 CFTR 항체(녹색)로 CFTR을 면역염색하고 IRE1 $\alpha$ 는 항-IRE1 $\alpha$  항체(붉은색)로 표지하였다. 대표적인 면역형광 이미지는 도 2c에 나타냈으며 표면 CFTR 강도에 대한 정량화 결과는 도 2d에 요약하였다(n=5-14). 화살표는 세포 표면에서 발현되는  $\Delta$ F508-CFTR을 나타낸다. 스케일바: 10  $\mu$ m. 그래프 데이터는 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다. \*\* $P$  < 0.01. 데이터는 일원분산분석 후 Tukey 다중비교검정을 수행하였다.

도 3은 ASK1이 코어-글리코실화된 CFTR의 UPS에 필요함을 보여주는 그림이다. ASK1 억제제인 MSC2032964A(ASK1-Inh)은 Arf1-Q71L-유도된 CFTR의 UPS를 억제한다. WT-CFTR,  $\Delta$ F508-CFTR 및/또는 Arf1-Q71L를 발현하는 플라스미드로 형질전환된 HEK293 세포에서 표면 바이오틴화 분석을 수행하였다. 몇몇 세포에 일정한 시간 동안 MSC2032964A(10  $\mu$ M)를 처리하였다. WT-CFTR 및  $\Delta$ F508-CFTR에 대한 대표적인 표면 바이오틴화 결과를 도 3a 및 3b에 각각 표시하였다. 복수회 실험에 대한 결과는 도 3c의 그래프에 요약하였다(n=6). MSC2032964A의 ASK1 활성억제 효과는 감소된 인산화를 통해 확인할 수 있었다. \*\* $P$  < 0.01, Arf1-Q71L, 0h과 비교. 표면 바이오틴화 분석을 ASK1-특이적 siRNA(100 nM)를 공-형질전환하여 상술한 방법대로 수행하였다. WT-CFTR 및  $\Delta$ F508-CFTR의 대표적인 표면 바이오틴화 결과는 도 3d 및 도 3f에 각각 표시하였다. 복수회 실험에 대한 결과는 도 3e 및 3g에 요약하였다(모두 n=3). b, 코어-글리코실화된 CFTR. c, complex-글리코실화된 CFTR. 그래프 데이터는 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다. \*\* $P$  < 0.01. 데이터는 일원분산분석 후 Tukey 다중비교검정 또는 양측(two-sided) 스튜던트 t-검정을 수행하였다.

도 4는 CSTMP에 의한 IRE1 $\alpha$  키나아제 활성화가  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS를 유도함을 보여주는 그림이다. HEK293 세포에 48시간 동안 3~100  $\mu$ M의 CSTMP를 처리하였다. 세포사멸 신호의 활성화를 PARP 및 카스파아제 3 절단을 통해 분석하였다(화살표). 대표적인 면역블롯 결과는 도 4a에 나타내었으며, 복수회 실험에 대한 결과는 도 4b에 요약하였다(n=5). 10  $\mu$ M 농도의 CSTMP는 ASK1을 활성화시켰으나, 세포사멸 신호를 활성화시키지는 않았다(붉은 화살표).  $\Delta$ F508-CFTR를 발현하는 HEK293 세포에서 표면 바이오틴화 분석을 수행하였다. 몇몇 세포에 CSTMP(10  $\mu$ M)를 일정시간 동안 처리하였다. 대표적인 결과는 도 4c에 나타냈으며, 복수회 실험결과의 요약은 도 4d에 나타내었다(n=6). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, 비처리군(첫 번째 레인)과 비교. ## $P$  < 0.01, GRASP55-Myc만 처리한 군과 비교(네 번째 레인). HeLa 세포를 세포외 HA-tagged  $\Delta$ F508-CFTR를 인코딩하는 플라스미드로 형질전환하였다. 몇몇 세포를 고정 전 12시간 또는 24시간 동안 CSTMP(10  $\mu$ M)와 함께 배양하였다. 막 투과 전 세포 표면의 CFTR를 항-HA 항체로 면역염색하고(녹색), 투과 후 전체 CFTR을 항-R4 CFTR 항체로 염색하였다(붉은색). 화살표는 표면 CFTR을 나타낸다. 표면 CFTR 강도에 대한 형태계측 정량화는 도 4f에 나타내었다(n=5). 스케일바: 10  $\mu$ m. \*\* $P$  < 0.01, 비처리군(첫 번째 레인)과 비교. 데이터는 일원분산분석 후 Tukey 다중비교검정을 수행하였다.

도 5는 CSTMP(10  $\mu$ M) 처리가 세포독성을 유발하지 않음을 보여주는 그림이다. 도 5a 및 5b는 이소성 Arf1-Q71L가  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS, ASK1의 활성화 및 카스파아제 3 절단에 미치는 영향을 시간에 따라 보여준다. 대표적인 면역블롯 결과는 도 5a에 나타내고, 복수회 실험에 대한 결과는 도 5b에 요약하였다(n=6). Arf1-Q71L를 인코딩하는 플라스미드로 72시간 동안 형질전환하자 카스파아제 3가 절단되었다(화살표). 도 5c 및 5d는 CSTMP(10  $\mu$ M)가  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS, ASK1의 활성화 및 카스파아제 3 절단에 미치는 영향을 시간에 따라 보여준다. 대표적인 면역블롯 결과를 도 5c에 나타내었으며, 복수회 실험에 대한 결과는 도 5d에 요약하였다(n=6). CSTMP(10

$\mu\text{M}$ )는 72시간까지 카스파아제 3의 절단을 유발하지 않았다. 캠포테신( $2\ \mu\text{M}$ , 12h)을 카스파아제 3의 절단을 유도하기 위한 양성 대조군으로 사용하였다(화살표). 그래프 데이터는 평균  $\pm$  표준오차로 나타냈다.

도 6은 CSTMP에 의해  $\Delta\text{F508-CFTR}$ 의  $\text{Cl}^-$  채널기능이 회복됨을 보여주는 그림이다. 정해진 플라스미드로 형질전환된 HEK293 세포로부터 전체세포 전류를 기록하였다.  $-100\ \text{mV}$ 에서  $+100\ \text{mV}$ 까지( $0.8\ \text{mV/ms}$ , 고정전압  $0\ \text{mV}$ )의 램프 펄스를 10초 간격으로 가함으로써 전류를 유발하였다. CFTR  $\text{Cl}^-$  전류는 cAMP(포스포클린  $5\ \mu\text{M}$  + IBMX  $100\ \mu\text{M}$ )에 의해 활성화되고 CFTR<sub>inh</sub>-172( $5\ \mu\text{M}$ )에 의해 억제되었다. 도 6a는  $-80\ \text{mV}$ 에서 측정된 전류 밀도를 보여주는 그림이다. 복제수(n)는 각 라인마다 표시하였다. 도 6b 내지 6f는 모크(mock), WT-CFTR 또는  $\Delta\text{F508-CFTR}$  플라스미드로 형질전환된 세포에서 48시간 동안의 대표적인 전체세포 전류를 나타낸다. 몇몇 세포에 CSTMP( $10\ \mu\text{M}$ )를 24시간 동안 처리하였으며, 이에 의해  $\Delta\text{F508-CFTR}$ 를 발현하는 세포 내에서 명확한 CFTR 전류가 유도되었다. 막대그래프 데이터는 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다.  $**P < 0.01$ . 데이터는 쌍을 이루지 않은 스튜던트  $t$ -검정으로 분석하였다.

도 7은 CSTMP가 미스폴딩된 펜드린의 표면발현을 회복시킴을 보여주는 그림이다. p.H723R-펜드린을 안정적으로 발현하는 PANC-1 세포에 Arf1-Q71L를 인코딩하는 플라스미드를 형질감염시키고 CSTMP( $10\ \mu\text{M}$  또는  $30\ \mu\text{M}$ )와 함께 48시간 동안 인큐베이션하였다. 대표적 표면 바이오틴화 분석결과를 도 7a에 나타내고, 복수회 실험에 대한 결과는 도 7b에 요약하였다( $n=5$ ).  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , 비처리군(첫 번째 라인)과 비교.  $##P < 0.01$ , Arf1-Q71L만 도입한 군과 비교(두 번째 라인).  $\text{pH}_i$ 를 기록함으로써  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  교환 활성을 측정하였으며, 대표적인 음이온 교환측정 결과는 도 7c에, 복수회 실험값에 대한 정량화는 도 7d에 표시하였다( $n=7-8$ ). CSTMP( $30\ \mu\text{M}$ )는 p.H723R-펜드린 발현세포에서  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  교환 활성을 유의적으로 증가시켰다. 막대그래프 데이터는 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다.  $**P < 0.01$ , p.H723R-펜드린만 처리한 군과 비교. 데이터는 일원분산분석 후 Tukey 다중비교검정을 수행하였다.

도 8a는 대장 점막에서 채취한 상피 세포를 이용하여 표면 바이오틴화 분석을 수행한 결과를 보여준다. HEK293 세포의 단백질 시료를 대조군으로 사용하였다. 야생형(Cftr<sup>WT</sup>) 또는  $\Delta\text{F508-CFTR}$ (Cftr<sup>F508del</sup>)의 6주령 마우스에 비이클 또는 CSTMP( $2.59\ \text{mg/kg}$ , per os, 하루 한번)를 각각 5일간 투여하였다. 대표적인 표면 바이오틴화 분석결과를 도 8a에 나타냈으며 복수회 실험의 결과는 도 8b에 요약하였다( $n=4$ ). 도 8c는 CFTR의 면역조직화학을 보여준다. 마우스 대장 조직의 종/횡 단면을 항-CFTR R4 래빗 다클론 항체로 면역 염색하였다. 화살표는 대장 침단막에서의 CFTR 발현을 나타낸다. CSTMP 처리는 Cftr<sup>F508del</sup> 마우스 대장에서 CFTR의 세포 표면 발현을 유도하였다. 스케일바:  $10\ \mu\text{m}$ . 도 8d 및 도 8e는 마우스 대장에서의 단락전류( $I_{sc}$ ) 측정결과를 보여준다. 마우스 대장 침단부에 아밀로라이드( $100\ \mu\text{M}$ )를 처리하여 상피  $\text{Na}^+$  채널을 차단하였다. 아데닐일 사이클라제 활성화제인 포스포클린( $10\ \mu\text{M}$ )을 침단부에 투여하자 내강-음성  $I_{sc}$ 가 유발되었는데, 이는 기저부로 전달된  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  공수송체 억제제인 부메타니드( $100\ \mu\text{M}$ )에 의해 완전히 억제되었다. Cftr<sup>F508del</sup> 마우스 대장에서 CSTMP 처리는 CFTR의 존성  $I_{sc}$ 를 유도하였다. 대표적인  $I_{sc}$  측정 결과는 도 8d에, 복수회 실험에 대한 결과는 도 8e에 요약하였다( $n=6-9$ ). b, 코어-글리코실화된 CFTR. c, complex-글리코실화된 CFTR. 막대그래프 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타냈다. n.s. 유의성 없음.  $**P < 0.01$ . 데이터는 일원분산분석 후 Tukey 다중비교검정을 수행하였다.

도 9는 도 1의 대조군 실험결과를 나타내는 그림이다. HEK293 세포를 Arf1-Q71L를 인코딩하는 플라스미드로 48시간 동안 형질전환하거나 12시간 동안 타프시가진( $5\ \mu\text{M}$ )을 처리하여 ER 스트레스를 유도하고, 교차 결합 시약 EGS( $500\ \mu\text{M}$ )와 함께 30분 간 배양하였다(도 9a). 화살표머리는 교차 결합된 IRE1 $\alpha$  중합체(상부 밴드) 및 단량체(하부 밴드) 형태를 각각 나타낸다. 대표적인 면역블롯 결과는 왼쪽 패널에 나타내고, 복수회 실험결과에 대한 정량화 결과는 오른쪽 패널에 요약하였다( $n=3$ ). 도 9b는 qPCR로 XBP1의 mRNA를 정량화한 결과를 보여주는 그림이다. RNA 시료는 HEK293 세포에 XBP1-특이적 siRNA를 형질전환한 후 48시간 뒤에 제작하였다. 세포를 Arf1-Q71L를 인코딩하는 플라스미드로 48시간 동안 형질전환하거나 12시간 동안 타프시가진( $5\ \mu\text{M}$ )을 처리하고, 복수회 실험결과에 대한 정량화 결과를 요약하였다( $n=3$ ). Arf1-Q71L가 아닌 타프시가진만이 XBP1에 대한 siRNA에 의해 사일런싱된 XBP1 mRNA 수준을 증가시켰다. 도 9c는 IRE1 $\alpha$ -및 XBP1-특이적 siRNA가 XBP1 스플라이싱에 미치는 효과를 보여주는 그림이다. HEK293 세포에 타프시가진( $5\ \mu\text{M}$ )을 12시간 동안 처리하거나 또는 정해진 siRNA(48시간)로 형질전환하였다. 타프시가진은 IRE1 $\alpha$  또는 XBP1에 대한 siRNA에 의해 감소된 스플라이싱된

XBP1(XBP1s)의 단백질 수준을 증가시켰다. 대표적인 면역블롯 결과는 왼쪽 패널에 나타내고, 복수회 실험의 정량화 결과는 오른쪽 패널에 요약하였다(n=3). 도 9d는 STF-083010가 IRE1 $\alpha$ 의 RNase 활성을 감소시킴을 보여주는 그림이다. HEK293 세포를 타프시가진(5  $\mu$ M, 12시간) 및/또는 STF-083010(60  $\mu$ M, 12h)로 처리한 뒤, XBP1 단백질에 대한 면역블롯 분석을 수행하였다. 대표적인 면역블롯 결과는 왼쪽 패널에 나타내고, 복수회 실험결과에 대한 정량화 결과는 오른쪽 패널에 요약하였다(n=3). 막대 그래프 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었다. \*\* $P$  < 0.01. 데이터는 일원분산분석 후 Tukey 다중비교검정을 통해 분석하였다.

도 10은 도 2의 대조군 실험결과를 보여주는 그림이다. 도 10a 및 10b는 APY29가 IRE1 $\alpha$  및 ASK1의 인산화를 용량 의존적으로 억제함을 보여주는 그림이다. Arf1-Q71L 플라스미드로 48시간 동안 형질전환함으로써 IRE1 $\alpha$  및 ASK1의 인산화를 유도하였다. 대표적인 면역블롯은 도 10a에 나타내고, 복수회 실험결과는 도 10b에 요약하였다(n=3). ASK1 인산화에 대한 APY29의 IC<sub>50</sub>값은 6.4  $\mu$ M이다. 도 10c 내지 10f는 단백질 합성 억제제인 사이클로헥시마이드로 처리한 HEK293 세포에서 WT- 및  $\Delta$ F508-CFTR의 단백질 안정성을 분석한 결과를 나타낸다. 세포를 WT-또는  $\Delta$ F508-CFTR를 인코딩하는 플라스미드로 48시간 동안 형질전환하였다. 몇몇 세포는 UPS를 유도하기 위해 Arf1-Q71L 플라스미드와 공-형질전환하였다. 사이클로헥시마이드(0.1 mg/mL)와 함께 정해진 시간동안 배양한 후 표면 바이오틴화 분석을 수행하였다. WT-CFTR 및  $\Delta$ F508-CFTR의 대표적인 결과를 도 10c 및 10d에 각각 표시하였다. 대조군 및 Arf1-Q71L-형질전환된 세포-표면에서의 CFTR 수준 및 전체 세포 용해물을 도 10e 및 10f에 각각 요약하였다(n=3).  $\Delta$ F508-CFTR의 단백질 안정성은 WT-CFTR보다 모든 조건에서 낮았다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타냈다. \*\* $P$  < 0.01, WT-CFTR 대비. 데이터는 일원분산분석 후 Tukey 다중비교검정을 통해 분석하였다.

도 11은 IRE1 $\alpha$ 의 과발현이  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS를 활성화시킴을 보여주는 그림이다. IRE1 $\alpha$  과발현만으로  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS가 활성화되며 타프시가진의 효과를 강화하였다. HEK293 세포에  $\Delta$ F508-CFTR 및/또는 IRE1 $\alpha$  (0.5 또는 1  $\mu$ g/mL, 48시간)를 인코딩하는 플라스미드를 공-형질전환하였다. 몇몇 세포에 타프시가진(5  $\mu$ M, 12시간)을 처리하였다. 대표적인 표면 바이오틴화 분석결과는 도 11a에, 복수회 실험결과(n=3)에 대한 요약은 도 11b에 각각 표시하였다. HEK293 세포를 정해진 플라스미드로 48시간 동안 형질전환하였다. 대표적인 표면 바이오틴화 분석결과는 도 11c에, 복수회 실험결과(n=5)에 대한 요약은 도 11d에 각각 표시하였다. 막대 그래프 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었다. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, 미처리군 대비(1st 라인). # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01, IRE1 $\alpha$ 만 처리한 군 대비(3번째 또는 4번째 라인). 데이터는 일원분산분석 후 Tukey 다중비교검정을 통해 분석하였다.

도 12는 CSTMP가 Arf1-Q71L-유도된  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS를 더욱 증가시킴을 보여주는 그림이다. 정해진 플라스미드로 48시간 동안 형질전환한 HEK293에서 표면 바이오틴화 분석을 수행하였다. 일부 세포에 CSTMP(10  $\mu$ M)를 24시간 및 48시간 동안 처리하였다. 대표적인 결과는 도 12a에, 복수회 실험결과(n=3)에 대한 요약은 도 12b에 각각 표시하였다. \*\* $P$  < 0.01, 미처리 대조군 대비(첫번째 라인). # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01, Arf1-Q71L만 처리한 군 대비(두번째 라인). 데이터는 일원분산분석 후 Tukey 다중비교검정을 통해 분석하였다.

도 13은 Arf1-Q71L 과발현이 연장될 경우 세포사멸이 유도됨을 보여주는 그림이다. HeLa 세포에  $\Delta$ F508-CFTR 플라스미드만을 형질전환하거나(도 13a의 A) 또는 Arf1-Q71L 플라스미드를 함께 24시간(도 13a의 B), 48시간(도 13b의 C) 또는 72시간(도 13b의 D) 동안 공-형질전환하였다. 고정 전에, 세포사멸 마커인 아넥신 V를 살아있는 세포에 표시하였다. 고정 및 투과처리 후, 세포를 항-CFTR(M3A7) 항체로 염색하였다. Arf1-Q71L 플라스미드로 72시간 동안 형질전환하자 세포사멸이 유도되었다. 세 번의 독립적인 실험에서 유사한 결과가 나타났다. 스케일 바: 10  $\mu$ m.

도 14는 CSTMP(10  $\mu$ M)가 세포사멸 유발 없이 CFTR의 UPS를 활성화시킴을 보여주는 그림이다. HeLa 세포를  $\Delta$ F508-CFTR로 형질전환하고 10  $\mu$ M CSTMP와 함께 0시간(도 14a의 A), 24시간(도 14a의 B), 48시간(도 14b의 C) 또는 72시간(도 14b의 D) 동안 배양하였다. 고정 전에, 세포사멸 마커인 아넥신 V를 살아있는 세포에 표시하였다. 고정 및 투과처리 후, 세포를 항-CFTR(M3A7) 항체로 염색하였다. CSTMP 처리로 인해 24시간째에  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS가 개시되었으나, 72시간째까지도 세포사멸은 유도되지 않았다. 화살표 머리는 세포-표면에 발현된 CFTR를 나타낸다. 세 번의 독립적인 실험에서 유사한 결과가 나타났다. 스케일 바: 10  $\mu$ m.

도 15는 마우스에 경구 투여된 CSTMP의 LD<sub>50</sub> 값을 보여주는 그림이다. 4마리 마우스(12 주령)로 구성된 4개 군에 비이클(식염수) 또는 CSTMP를 2.59 mg/kg(10  $\mu$ M에 해당, CSTMP가 전신에 고루 분포된다는 가정 하에), 25.9 mg/kg(100  $\mu$ M에 해당), 또는 259 mg/kg(1,000  $\mu$ M에 해당)로 5일간 1일 1회 경구투여하였다. LD<sub>50</sub> 값은 25.9

mg/kg/day로 나타났다. 2.59 mg/kg/day 투약 스케줄에서 사망한 마우스는 없었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0069] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0071] 실시예
- [0072] 실험방법
- [0073] 세포 배양, 플라스미드, siRNA 및 마우스.
- [0074] HEK293, HeLa 및 PANC-1 세포는 10% FBS(Fetal Bovine Serum) 및 1% 100X 항생/항진균제(100 units/mL 페니실린, 100 units/mL 스트렙토마이신 및 250 ng/mL 암포테리신 B)(Gibco #15240062)가 보충된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium-high 글루코스, Gibco #11995-065, Carlsbad, CA) 배지에서 유지하였다. 세포를 37°C 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 인간 IRE1α-pcDNA3.EGFP를 인코딩하는 포유류 발현 플라스미드는 Addgene(유전자 ID: 2081)에서 구입하였다. 인간 pCMV-ΔF508-CFTR, pCMV-WT-CFTR(pCMVNot6.2), pCMV-GRASP55-Myc와, 세포의 태그된 HA-ΔF508-CFTR 및 pcDNA3-HA-Arf1-Q71L를 인코딩하는 플라스미드는 종래 문헌에 상술되어 있다(15, 29). ON-TARGETplus 인간 ERN1 siRNA(IRE1α, 유전자 ID: 2081) 및 인간 XBP1 siRNA(유전자 ID: 7494)는 SMARTpool(Dharmacon, Lafayette, CO, USA)에서 구입하였다. 플라스미드 DNA 및 siRNA의 HEK293 또는 HeLa 세포에의 형질감염은 TransIT-X2 Dynamic Delivery System (Mirus Bio LLC, Madison, WI)을 이용하여 제조자의 설명서에 따라 수행하였다. CfrF508del 마우스는 Dr. K.R. Thomas (University of Utah, Salt Lake City, UT)(33)로부터 종래에 보고된 방법으로 획득하였다(15). 마우스는 교배한 뒤 연세의료원 동물연구 규정에 따라 관리하였다.
- [0076] 화합물 및 항체.
- [0077] 타프시자진(Sigma Aldrich, T9033), STF-083010(TOCRIS, 4509), APY29(TOCRIS, 4865), MSC 2032964A(TOCRIS, 5641) 및 사이클로헥시마이드(Sigma Aldrich, C4859)는 상업적으로 구입하였다. CSTMP는 Cayman chemical(Michigan, USA)(CAS 등록번호 1000672-89-8)에서 합성하였다. 다음의 항체는 상업적으로 구입하였다: 항-CFTR M3A7(Millipore, Billerica, MA), 항-IRE1α(세포 신호Technology, 3294), 항-인산 S724 IRE1α(Abcam, ab48187), 항-XBP1(Abcam, ab198999), 항-ASK1(Cell Signaling Technology, 3762), 항-인산 Thr845 ASK1(Cell Signaling Technology, 3765), 항-BiP(Cell Signaling Technology, 3177), 항-CHOP(Cell Signaling Technology, 2895), 항-pro/p17-카스파아제 3, 항-절단된 PARP1 (Abcam, ab136812), 항-HA(Cell Signaling Technology, 2367), 항-Myc(Cell Signaling Technology, 2276), 항-알돌라아제 A(Abcam, ab78339), 항-β-액틴(Santa Cruz, sc47778) 및 항-펜드린(Santa Cruz, sc23779). 항-R4 다클론 항체는 종래에 보고된 바와 같이 인간 CFTR의 아미노산 1458-1471에 해당하는 펩타이드를 항원으로 하여 획득하였다(15).
- [0079] 정량적 PCR 분석(qPCR).
- [0080] Tri-RNA 시약(Favorgen Biotech Corp, Taiwan)을 이용하여 제조자의 설명서에 따라 총 RNA를 HEK293 세포로부터 추출하였다. RNA를 cDNA로 역전사하기 위하여, 정제된 RNA 시료를 cDNA EcoDry Premix(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)와 조합하고 혼합물을 42°C에서 1시간 동안 배양한 후 70°C에서 10분간 배양하였다.
- [0081] qPCR은 StepOne system(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 실시간 PCR 반응은 이중가닥 DNA와 형광 SYBR Green dye의 결합을 검출함으로써 측정하였다. PCR 증폭을 위해 100ng cDNA, 2 μL 프라이머 세트, 10 μL 2x SYBR premix Ex Taq 및 0.4 μL 50× ROX 기준염료(Takara, RR420L)와 혼합한 뒤 무-RNase 물을 이용하여 총 반응 부피를 20 μL로 조절하였다. 증폭은 다음의 사이클 조건으로 수행하였다: 95°C 15분, 이후 95°C 15초로 40 사이클, 및 60°C 40초. 분석은 각 cDNA에 대해 3 번 수행하였다. 상대적인 mRNA 발현수준은 비교 역가 순환(comparative threshold cycle, Ct) 방법을 이용하여 유전자 발현을 하우스키

평 유전자인 *GAPDH*에 대해 표준화함으로써 계산하였고  $\Delta Ct$  값은 다음과 같이 계산하였다:  $\Delta Ct = Ct(GAPDH) - Ct(\text{타겟 유전자})$ . 각 실험조건에서 평균  $\Delta Ct$ 를 빼서  $\Delta \Delta Ct$  값을 얻었다. 유전자 발현의 배수 변화는 *GAPDH* 및에 대해 표준화하고 대조군 시료에 대한 상대적인 값을  $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 로 계산하였다. qPCR 분석을 위해 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다: hIRE1 $\alpha$ , 정"넙\* 프라이머 5' -CGG GAG AAC ATC ACT GTC CC-3', 역"넙\* 프라이머 5' -CCC GGT AGT GGT GCT TCT TA-3'; hXBP1, 정"넙\* 프라이머 5' -TTG TCA CCC CTC CAG AAC ATC-3', 역"넙\* 프라이머 5' -TCC AGA ATG CCC AAC AGG AT-3'; hXBP1(스플라이싱된), 정"넙\* 프라이머 5' -TGC TGA GTC CGC AGC AGG TG-3', 역"넙\* 프라이머 5' -GCT GGC AGG CTC TGG GGA AG-3'; GAPDH, 정"넙\* 프라이머 5' -AAT CCC ATC ACC ATC TTC CA-3', 역"넙\* 프라이머 5' -TGG ACT CCA CGA CGT ACT CA-3'.

[0083] 표면 바이오틴화, 교차 결합 분석 및 면역블롯분석.

[0084] 바이오틴화를 위하여, 6-웰 플레이트( $1 \times 10^6$ )에서 자란 HEK293 세포를 5분간 4℃에서 배양하고 냉장 PBS(phosphate 완충액ed saline)로 3 번 세척하였다. 마우스 대장 점막에서의 바이오틴화를 위해, 대장조직을 세로로 절개하고 연결조직 및 근육을 벗겨냈다. 배양된 세포 또는 대장 점막의 원형질막 내 막관통 단백질을 1mL 바이오틴 용액(냉장 PBS 내 0.3 mg/mL Sulfo-NHS-SS-바이오틴, Thermo Pierce, 21331)과 함께 4℃에서 30 분 동안 암(dark) 조건에서 부드럽게 교반배양하면서 바이오틴화 하였다. 세포 또는 대장 조직을 PBS에서 0.5% BSA(bovine serum albumin)을 포함하는 퀀칭 버퍼와 함께 10분간 4℃에서 배양하여 과량의 바이오틴을 제거한 뒤 PBS로 3회 세척하였다. 다음으로 표면-바이오틴화된 세포를 25 mM Tris(pH 7.4), 1% (v/v)NP40, 150 mM NaCl, 10% 글리세롤 및 1 mM EDTA- $Na^2$ 를 포함하고 프로테아제 억제제 카테일(Roche, Germany)이 보충된 용해 완충액에서 수집하였다. 세포 용해물을 초음파로 20초 동안(1s 펄스) 균질화한 뒤 16,000 g로 20분간 4℃에서 원심분리하였다. 400  $\mu$ g의 총 단백질을 포함하는 상층액을 200  $\mu$ L 10% 스트렙타비딘 아가로스(Thermo Pierce, 20347)과 함께 배양하였다. 스트렙타비딘-결합된, 바이오틴화된 단백질을 원심분리하고 용해 완충액으로 5회 세척하였다. 바이오틴화된 단백질은 DTT(0.02 g/mL)가 보충된 2×SDS 시료 완충액에서 용출하고 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 옮기고 5% 탈지유에서 적절한 일차 및 이차 항체로 블롯팅하였다. 단백질 밴드를 화학발광으로 검출하였으며, 각 단백질 밴드의 밀도는 이미징 소프트웨어(Multi Gauge ver. 3.0; Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 정량화하였다.

[0085] 종래에 보고된 방법으로 교차 결합 분석을 수행하였다(29). HEK293 세포를 PBS로 3 회 세척 후 500  $\mu$ M 에틸렌 글리콜 숙시니미딜숙시네이트 (EGS; Thermo Scientific, 21565)와 함께 PBS(pH 8.2)에서 30분 동안 37℃에서 배양하였다. 교차 결합 후, 세포를 순차적으로 20 mM Tris(pH 7.4)에서 10분간 배양하여 EGS를 퀀칭함으로써 반응이 종료되도록 하였다. 세포를 용해하고, 균질화한 뒤, 2×SDS 샘플 완충액에서 시료로 만들어 항-IRE1 $\alpha$  항체를 이용하여 면역블롯팅을 수행하였다.

[0087] 면역세포화학, 면역조직화학, 및 형태계측 분석.

[0088] 종래 보고된 방법(15, 18)을 조금 변형하여 면역형광 염색을 수행하였다. 대장 점막에서의 면역조직화학을 위해 마우스의 조직을 최적 절개 온도(OCT) 컴파운드(Miles, Elkhart, IN, USA)에서 포매하고 액체질소에서 냉각시킨 후 4- $\mu$ m 절편으로 잘랐다. 이후, 마우스 대장 절편을 고정하고 차가운 메탄올과 함께 -20℃에서 5분간 배양함으로써 투과처리하였다. 면역세포화학 분석을 위해, HeLa 세포를 18-mm 둥근 커버슬립에서 배양하고 3.7% 포름알데히드로 상온에서 6분간 고정하였다. 이후 세포를 PBS에서 0.1% Triton X-100으로 상온에서 5분간 투과처리하였다. 글라스 슬라이드 상의 조직 단면 또는 커버슬립에서 자란 세포를 PBS로 3번 세척하고 1% BSA 및 적절한 종의 5% 혈청(말/당나귀/염소 혈청)을 포함하는 PBS에서 1시간 동안 상온에서 배양하여 비특이적 결합부위를 블로킹하였다. 블로킹 후, 조직 단면 또는 세포를 적절한 일차항체와 배양함으로써 염색하고, 형광단(fluorophore)-접합 2차 항체로 염색하였다. CFTR의 표면-특이적 표지를 위해, 고정 후 투과처리 하지 않은 세포를 블로킹 용액과 함께 배양하고 항-HA 항체로 염색하여 CFTR의 세포의 HA-에피토프를 검출하고자 하였다. 커버슬립 상의 세포는 형광 마운팅 배지와 함께 슬라이드 글래스로 마운트하였다(Dako, S3025, US). 형광 이미지는 63 x 1.4 개구수 오일 대물렌즈를 가지는 레이저스캐닝 공초점 현미경(LSM 780; Carl Zeiss, Berlin, Germany)으로 캡처하였다.

[0089] 캡처된 공초점 이미지의 형태계측 분석은 MetaMorph 현미경 분석 소프트웨어(version 7.1; Molecular Devices,



Sunnyvale, USA)를 이용하여 종래 보고된 방법대로 수행하였다(18). 각 단일세포의 농도 프로파일을 전체 구역에 대한 평균농도의 표준편차로 표시하였다.

[0091]  $Cl^-$  채널 활성 및 단락전류( $I_{sc}$ )의 측정.

[0092] 전체 세포 기록은 recordings were performed on CFTR 형질전환된 HEK293 세포에서 종래 보고된 방법에 따라 수행하였다(15). 세포를 전도 현미경(Ti2, Nikon)의 스테이지에 마운트된 배스로 이동시키고 기가 옴( $\Omega$ ) 실링 후 막을 찢음으로써 전체-세포 패치를 얻었다. 배스 용액은 5 mL/min로 관류시켰다. 전압 및 전류 기록은 상온(22-25°C)에서 수행하였다. 2-4 M $\Omega$  저항의 패치 피펫을 패치 클램프 증폭기(Axopatch-200B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)의 헤드 스테이지에 연결하였다. 배스 용액에는 140 mM N-메틸-D-글루카민 클로라이드(NMDG-Cl), 1 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM 글루코스 및 10 mM HEPES(pH 7.4)가 포함되어 있다. 피펫 용액에는 140 mM N-메틸-D-글루카민 클로라이드, 5 mM EGTA, 1 mM  $MgCl_2$ , 3 mM MgATP 및 10 mM HEPES(pH 7.2)가 포함되어 있다. 전류-전압(I/V) 관계를 조사하기 위해, -100에서 100 mV의 램프 펄스(0.8 mV/ms, 고정전압 0 mV)를 가함으로써 전압 클램프 모드 및 I/V 곡선을 획득하였다. CFTR 전류는 cAMP(5  $\mu$ M 포스포로린 및 100  $\mu$ M 3-이소부틸-1-메틸잔틴[IBMX])에 의해 활성화되었다. CFTR에 의해 발생한 전류는 CFTR 억제제인 CFTR<sub>inh</sub>-172 (10  $\mu$ M)를 가함으로써 확인하였다. 데이터를 얻고 커맨드 펄스를 가하기 위해 pClamp 10.2 및 Digidata 1550B(Molecular Devices)를 사용하였다. 전압 및 전류 흐름은 pClamp 10.2 및 Origin 8.0(OriginLab Corp., Northampton, MA, USA)에 저장하여 분석되었다. 전류는 5 kHz에서 여과하여 1 kHz에서 샘플링하였다. 모든 데이터는 전체-세포 전기용량(pF)에 대해 표준화하였다.

[0093] 종래 보고된 방법(15)을 조금 변형하여 마우스 대장  $I_{sc}$ 를 측정하였다(15). CO<sub>2</sub>로 마취시킨 뒤 희생시킨 마우스의 맹장에서 직장까지의 대장 표본을 회수하고 장간막 경계를 따라 개방하였다. 관내 내용물을 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>완충된 용액으로 세척하고 표본을 노출 표면적이 12.6 mm<sup>2</sup>가 되도록 Ussing 챔버(World Precision Instruments, Stevenage, UK)에 마운트하였다. 조직을 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 10 mM D-글루코스, 5 mM HEPES 및 25 mM NaHCO<sub>3</sub>(pH 7.4)를 포함하는 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>완충된 용액 10 mL와 함께 각 슬라이드에서 37°C, 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배치(batch)하였다. 조직을 EVC- 4000 전압 클램프(World Precision Instruments)를 이용하여 전압 고정하고 PowerLab 데이터 획득 시스템(AD Instruments, Castle Hill, Australia)을 이용하여  $I_{sc}$ 를 계속적으로 기록하였다.

[0095]  $Cl^-/HCO_3^-$  교환 활성의 측정.

[0096] PANC-1 세포에서 pH<sub>i</sub>의 측정은 pH-민감성 형광 프로브인 2',7'-비스-(2-카복시에틸)-5-(및-6)-카복시 플루오레세인 (BCECF)을 이용하여 종래 보고된 방법으로 수행하였다(16). BCECF 형광은 490 nm 및 440 nm의 여기파장에서 2/sec의 해상도로 기록하였다(Delta Ram; PTI Inc., Edison, New Jersey, USA).  $Cl^-/HCO_3^-$  교환 활성은 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>함유 완충액(25 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-with 5% CO<sub>2</sub>)에서  $Cl^-$ 을 제거하여 발생하는 초기 pH<sub>i</sub> 증가의 증가율로부터 추정하였다. pH<sub>i</sub> 계측은 150 mM KCl 및 5  $\mu$ M 니제리신을 포함하는 표준 pH 용액으로 수행하였다. 고유 완충액 용량( $\beta_i$ )은 무 Na<sup>+</sup> 용액에서의 5-40 mM NH<sub>4</sub>Cl 펄스에 대응한  $\Delta$ pH<sub>i</sub>를 측정함으로써 계산하였다.  $\beta_i$  값은 WT-펜드린 또는 H723R-펜드린을 인코딩하는 플라스미드의 형질전환에 의해 유의한 영향을 받지 않기 때문에,  $Cl^-/HCO_3^-$  교환 활성은 완충액 용량을 보상하지 않고  $\Delta$ pH unit/min로 표현하였다.

[0098] 통계적 분석

[0099] 복수회 실험에 대한 결과는 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다. 통계적 분석은 GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)를 이용하여 양측 스튜던트 *t*-검정 또는 일원분산분석 후 Tukey 다중비교검정을

통해 수행하였다.  $P < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

[0101] 연구 승인.

[0102] 모든 동물 실험은 ILAR(Institutional Laboratory Animal Resources) 및 연세의생명연구원 동물실험위원회의 승인 하에 수행되었다(승인번호 2018-0139).

[0104] 실험결과

[0105] IRE1  $\alpha$ 의 엔도리보뉴클레아제 활성은 CFTR의 UPS에 필수적이지 않다

[0106] 포유류 IRE1  $\alpha$ 는 ER 샤페론 단백질 BiP와 결합함으로써 불활성의 단량체로 유지된다(도 9a). IRE1 단량체의 올리고머화는 IRE1 활성화의 가장 첫 단계에서 미접힘(unfolded) 단백질의 ER 누적에 대한 반응으로써 일어난다(25). Arf1 GTPase의 우세한 억제 형태에 의해 ER에서 골지로의 수송을 저해하면 Arf1-Q71L는 ER 내강에 분비 단백질이 누적됨에 따라 ER 스트레스를 유발한다(15). ER 스트레스는 ER 내강에서 칼슘을 고갈시키는  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 억제제인 타프시가진(thapsigargin)을 처리하여 유도될 수도 있다(26). ER 스트레스를 유발하는 이러한 메카니즘과 마찬가지로, HEK293에서의 교차 결합 분석에서 IRE1  $\alpha$ 는 Arf1-Q71L 발현(48h) 또는 타프시가진 처리(12h) 후 응집하여 올리고머가 된다(도 9a).

[0107] IRE1  $\alpha$ 의 올리고머화는 opens the 키나아제 도메인을 개방하여 활성화되기 시작하고 RNase 도메인을 활성화한다(25). Arf1-Q71L 및 타프시가진 모두 HEK293 세포에서 IRE1  $\alpha$  키나아제 활성을 촉발시켜 IRE1  $\alpha$  자가인산화 및 다운스트림의 ASK1 인산화를 유도한다(도 1a 및 1b). 흥미롭게도, ER 스트레스를 신속(12h)하게 유발하는 타프시가진 처리는 XBP1 스플라이싱을 유발하는 반면 Arf1-Q71L 과발현(48 h)으로 유도된 ER 스트레스는 그렇지 않았다(도 1a 및 1b). Arf1-Q71L 및 타프시가진이 모두 막 단백질의 UPS를 유도하므로(15, 16), 이는 IRE1  $\alpha$  RNase 기질인 XBP1이 아니라 IRE1  $\alpha$  키나아제-매개 신호가 ER 스트레스-관련 UPS에 주로 관여되어 있음을 암시한다. XBP1이 아닌 IRE1  $\alpha$ 의 고갈을 보여주는 표면 바이오티나 실험은 ER 스트레스-관련 UPS는 XBP1과 무관하다는 가정을 추가적으로 뒷받침한다(도 1c 및 1d). IRE1  $\alpha$  및 XBP1에 대한 면역블롯분석과 mRNA 정량을 통해 사용된 각 유전자의 녹다운이 확인되었다(도 1c, 도 9b 및 9c).

[0108]  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS가 XBP1 스플라이싱과 무관하다는 의외의 발견 때문에, 본 발명자들은 IRE1  $\alpha$ 가 RNase 활성이 없는 상황 하에서 UPS를 매개할 수 있는지 조사하였다. STF-083010은 IRE1  $\alpha$  RNase 도메인의 촉매 코어를 타겟팅하는 화합물로, 키나아제 활성이나 전체적인 올리고머화 단계에 영향을 주지 않으면서 IRE1  $\alpha$  엔도뉴클레아제 활성을 억제한다(27). STF-083010(60  $\mu$ M)를 12시간 동안 처리하자, 타프시가진-유도 XBP1 생성이 중단되었다(도 9d). 그러나, STF-083010는  $\Delta$ F508-CFTR의 Arf1-Q71L-유도 UPS에 영향을 미치지 않았다(도 1e 및 1f). 이러한 결과는 IRE1  $\alpha$ 의 RNase 활성이  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS에 필수적이지 않음을 보여준다.

[0110]  $\Delta$ F508-CFTR의 UPS를 위해 IRE1  $\alpha$  키나아제-ASK1 경로가 필요하다.

[0111] 본 발명자들은 막 단백질의 UPS에서 IRE1  $\alpha$  키나아제-매개 신호에 초점을 맞추었다. I형 키나아제 억제제인 APY29는 IRE1  $\alpha$ 의 ATP-결합 포켓을 경쟁적으로 점유함으로써 IRE1  $\alpha$ 의 자가인산전을 저해한다(28). HEK293 세포에서, ASK1 인산화에 대한 APY29의  $\text{IC}_{50}$  값은 약 6.4  $\mu$ M로 계산되었으며, 100  $\mu$ M APY29를 12시간 처리하자 IRE1  $\alpha$  및 ASK1에 대한 Arf1-Q71L-유도 인산화는 거의 완전히 억제되었다(도 10a 및 10aB). 중요하게도, APY29(100  $\mu$ M)에 의해 Arf1-Q71L의 이소성 발현으로 유도된  $\Delta$ F508-CFTR 표면 타겟팅이 소멸되었다(도 2a 및 2b).  $\Delta$ F508-CFTR의 안정성이 야생형(WT)-CFTR보다 낮기 때문에(도 10c-f), 단백질 합성결합 역시 세포 표면의  $\Delta$ F508-CFTR 양이 빠르게 감소하는 원인이 되었을 수 있다. 실제로, 단백질 합성 억제제인 사이클로헥시마이드(0.1 mg/mL)를 처리하자 세포 표면의  $\Delta$ F508-CFTR 수준이 급격히 감소하였다(도 10c-f). 그러나, 사이클로헥시마이드가 세포-표면 및 전체 세포  $\Delta$ F508-CFTR 수준의 빠른 감소를 가져온 반면, APY29는 전체 단백질 수준에 영향을 미치지 않으면서 세포 표면  $\Delta$ F508-CFTR만 감소시켰다(도 2a 및 2b). 이러한 데이터로부터 APY29가  $\Delta$ F508-CFTR의 세포 표면에서의 회복을 선택적으로 억제하고 단백질 합성에는 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

[0112] CFTR의 세포표면 발현에 대한 APY29의 억제효과를 면역형광분석을 통해 추가적으로 확인하였다. HEK293 세포 대신 커버슬립에 더 잘 흡착하고 세포손실에 덜 취약한 HeLa 세포를 이용하여 형태학적 분석을 수행하였다 (18,

29). 대조군 세포에서,  $\Delta F508$ -CFTR 단백질은 ER 내에만 머물렀다. ER-골지 이동을 Arf1-Q71L으로 차단하자, 종래 보고된 바대로 상당량의  $\Delta F508$ -CFTR가 세포 표면에 도달하였다(화살표, 도 2c)(15). 주목할만한 점은 APY29 처리가 Arf1-Q71L-유도된  $\Delta F508$ -CFTR의 세포표면 발현을 크게 감소시켰다는 것이다(도 2c 및 2d).

[0113] IRE1 $\alpha$ 이 ER 외막에서 IRE1-TRAF2-ASK1 복합체를 형성함으로써 ASK1을 활성화시켜 ER 스트레스 신호를 ASK1-JNK 신호 경로로 연결하므로(24, 30), 본 발명자들은 비전형적 CFTR 분비에서 ASK1의 역할을 조사하였다. MSC2032964A는 LPS-유도된 ASK1 인산화를 차단하는 강력하고 선택적인 ASK1 억제제이다(31). The results in 도 3A-3C에서 보는 바와 같이 MSC2032964A (10  $\mu$ M) 처리를 통한 ASK1 인산화 억제는 Arf1-Q71L-유도된 WT- 및  $\Delta F508$ -CFTR 모두의 UPS를 시간-의존적으로 감소시킨다. 나아가, 특정 siRNA를 이용하여 ASK1을 억제하면 Arf1-Q71L-유도된 WT- 및  $\Delta F508$ -CFTR의 UPSrk 소멸된다(도 3d-3g). 이를 종합하면, IRE1 $\alpha$ 의 키나아제 활성화 및 ASK1가 코어-글리코실화된 CFTR의 UPS에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

[0115] IRE1 $\alpha$  키나아제의 활성화가  $\Delta F508$ -CFTR의 UPS를 유도한다.

[0116] 다음으로, IRE1 키나아제 활성화증가가 F508-CFTR 변이에 의해 발생한 단백질 이동 결함에 미치는 효과를 조사하였다. 명백하게도, IRE1 $\alpha$ 의 과발현만으로  $\Delta F508$ -CFTR의 표면발현이 일어났으며(도 11), 이를 통해 IRE1 $\alpha$  증가가  $\Delta F508$ -CFTR의 이동 결함을 회복시킬 수 있다는 가설을 뒷받침했다. 나아가, IRE1 $\alpha$  과발현은 Arf1-Q71L 또는 타프시가진과 함께 사용될 경우  $\Delta F508$ -CFTR의 UPS 유도에 상승효과를 보였다(도 11).

[0117] 저분자 치료는 단백질 폴딩 및 이동 결함과 관련된 질환에 걸린 인간 환자를 치료함에 있어서 유전자 과발현 방법보다 바람직하다. 테트라메틸피라진 유도체인 (E)-2-(2-클로로스티릴)-3,5,6-트리메틸-피라진(CSTMP)는 IRE1 $\alpha$ -TRAF2-ASK1 복합체를 활성화시키는 것으로 보고되었다(32). 그러나, CSTMP는 JNK 활성화 및 미토콘드리아 기능장애 유발을 통해 인간 비소세포폐암 A549 세포의 사멸을 유도한다고 보고되었기 때문에, 고농도(>50  $\mu$ M)에서 세포독성을 유발할 수도 있다(32). HEK293 세포를 다양한 농도의 CSTMP로 48시간 동안 처리한 결과, 저농도의 CSTMP(10  $\mu$ M)도 세포사멸 신호의 촉발 없이 충분히 ASK1을 활성화시킬 수 있음을 확인한 반면, 높은 농도(100  $\mu$ M)의 CSTMP는 세포사멸 마커 단백질인 PARP 및 카스파아제 3를 절단하였다(도 4a 및 4b). 따라서, 본 발명자들은 세포에 10  $\mu$ M CSTMP를 처리하고  $\Delta F508$ -CFTR의 이동 결함이 회복되는지를 조사하였다. 그 결과, 10  $\mu$ M CSTMP는  $\Delta F508$ -CFTR의 세포 표면 발현을 유도하는 데에 충분하였으며(도 4c 및 4d), GRASP55(도 4c 및 4d) 또는 Arf1-Q71L(도 12)의 과발현과 조합될 경우 상승효과를 보였다.

[0118] 다음으로, 10  $\mu$ M CSTMP와 Arf1-Q71L 과발현에 의한 각각의 세포독성을 비교하였다. 도 5a 및 5b에서 보는 바와 같이, Arf1-Q71L-발현 플라스미드로 형질전환한 경우  $\Delta F508$ -CFTR의 세포 표면 발현이 회복되었으며 48시간째에 정점에 달했다. 주목할만한 것은, Arf1-Q71L-발현 플라스미드로 72시간 형질전환한 경우 ER-골지 차단을 연장시키면서 카스파아제 3 절단을 유발한다는 점이다(도 5a 및 5b). 반면, 시간에 따른(0, 6, 12, 24, 48 및 72시간) CSTMP(10  $\mu$ M) 처리는 세포사멸신호의 촉발 없이  $\Delta F508$ -CFTR의 표면 발현을 지속적으로 회복시켰다(도 5c 및 5d). 세포사멸 마커인 아넥신 V로 면역염색한 결과, 연장된 이소성 Arf1-Q71L 발현(72시간)이 세포독성을 유도하였으나, CSTMP(10  $\mu$ M)는 그렇지 않음을 추가적으로 확인하였다(도 13 및 14).

[0120] HEK293 세포에서 IRE1 $\alpha$  키나아제 활성화제인 CSTMP에 의해  $\Delta F508$ -CFTR의 기능이 회복된다.

[0121] CSTMP에 의해 세포표면 발현이 유도된  $\Delta F508$ -CFTR가 기능적인 활성화도 유지하는지를 조사하기 위해, WT- 또는  $\Delta F508$ -CFTR를 발현하는 HEK293 세포를 CSTMP(10  $\mu$ M)와 함께 48시간 동안 배양하고 CFTR-매개  $Cl^-$  전류를 측정하였다. 세포내 cAMP를 증가시키는 포스콜린(포스콜린) 및 3-이소부틸-1-메틸잔틴 (IBMX)을 처리해도 형질전환 시약만 처리한 대조군 HEK293 세포에서  $Cl^-$  전류를 유발하지 않는다(도 6a 및 6b). 램프 펄스(-100 to +100 mV, 0.8mV/ms)를 가한 후, WT-CFTR를 발현하는 세포는 exhibited 전형적인 CFTR  $Cl^-$  전류를 보였는데, 이는 (1) cAMP 처리에 의해 활성화되고(포스콜린 및 IBMX), (2) CFTR 억제제인 CFTRinh-172에 의해 억제되며, (3) 선형의 I-V 관계를 가진다(도 6c). CSTMP(10  $\mu$ M)를 48시간 동안 처리해도 WT-CFTR 전류는 크게 바뀌지 않았다(도 6d). 다음으로, CSTMP가  $\Delta F508$ -CFTR 발현세포에 미치는 영향을 조사하였다. 도 6e에서 보는 바와 같이,  $\Delta F508$ -CFTR를 발현하는 세포는 정상적인 조건 하에서 cAMP에 의해 활성화된 CFTR 전류를 명확히 보이지 않았다. CSTMP(10  $\mu$ M)를 48시간 동안 처리한 후  $\Delta F508$ -CFTR를 발현하는 세포에서 전형적인 CFTR 전류를 측정 한 결과,  $\Delta F508$ -CFTR 세포의 전류 크기는 야생형 세포에서 측정한 값의 32%였다(도 6a 및 6f).

[0123] CSTMP는 p.H723R-펜드린을 생화학적 및 기능적으로 회복시킨다 .

[0124] IRE1 $\alpha$ 가 ER 스트레스-유도된 펜드린의 UPS에 관여하기 때문에(16), 본 발명자들은 IRE1 $\alpha$  키나아제 활성화제인 CSTMP가 p.H723R-펜드린 변이에 의해 유발된 세포표면 이동 결함의 회복에 미치는 영향을 조사하였다. 펜드린의 세포 표면 발현을 조사하기 위해 체장관 유래 PANC-1를 사용하였다(16). 먼저, 표면 바이오틴화 분석을 통해 p.H723R-펜드린의 표면발현을 조사하였다. 도 7a 및 7b에서 보는 바와 같이, p.H723R-펜드린은 대조군 세포의 원형질막에서 거의 검출되지 않는다. 이에 비해, CSTMP(30  $\mu$ M)을 처리하자 p.H723R-펜드린이 세포 표면에서 강하게 발현하였다. 나아가, CSTMP 처리는 p.H723R-펜드린 발현세포에서 펜드린-매개  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  교환의 활성화를 유발하였고, WT-펜드린 발현세포의 수송기능의 약 35%가 회복되었는데, 이는 Arf1-Q71L 과발현에 의한 효과와 유사한 수준이다(도 7c 및 7d). 이러한 결과는 IRE1 $\alpha$  키나아제 활성화가 CFTR의 이동 결함 돌연변이 뿐 아니라 p.H723R-펜드린을 포함하는 다른 막단백질에 의해서 유발되는 질환에도 치료효과를 발휘한다는 점을 보여준다.

[0126] CSTMP의 인 비보 처리는 CfrF<sup>F508del</sup> 마우스 대장에서 CFTR의 세포 표면 발현 및 CFTR-매개 음이온 수송을 회복시킨다.

[0127] 마지막으로, CSTMP의 인 비보 투여가 마우스에서의  $\Delta$ F508-CFTR 돌연변이에 의해 유발된 상피수송 결함을 회복시키는지 여부를 조사하였다. 기능상실  $\Delta$ F508-CFTR 돌연변이는 장내 이온 및 체액 수송에 주로 영향을 주는 결함을 유발하여 종국적으로 마우스에서 장폐색을 일으킨다(33). CSTMP의 생체 내 영향을 분석하기 위하여, 마우스에서 CSTMP의 반수 치사량(LD<sub>50</sub>)을 측정함으로써 독성을 평가하였다. 마우스에 5일간 10-1,000  $\mu$ M에 해당하는 3가지 상이한 투여량의 CSTMP를 경구투여하였다(CSTMP가 전신에 고루 분포된다는 가정 하에). 마우스의 The LD<sub>50</sub> 값은 25.9 mg/kg/day(100  $\mu$ M에 해당)로 계산되었다(도 15). 이후, WT-CFTR(Cfr<sup>WT</sup>) 또는  $\Delta$ F508-CFTR(Cfr<sup>F508del</sup>)에 대해 동형접합인 6주령 마우스에 CSTMP LD<sub>50</sub>의 10분의 1(2.59 mg/kg/day, 하루 한번 10  $\mu$ M에 해당)을 5일간 처리하였다. LD<sub>50</sub> 평가실험 동안 이정도 투여량에서 사망하는 마우스는 없었다(도 15).

[0128] 주목할만한 것은, 마우스 대장점막에서 채취한 시료를 이용한 표면 바이오틴화 실험 결과 CSTMP가 코어-글리코실화된  $\Delta$ F508-CFTR의 세포 표면 발현을 회복시킴을 확인하였다(도 8a 및 8b). 면역조직화학 분석을 통해 Cfr<sup>F508del</sup> 마우스에서의 CSTMP 회복효과를 다시 확인하였다(도 8c). Cfr<sup>WT</sup> 마우스에서, CFTR는 대장 음와(crypt) 세포의 첨단부 막에서 발현하였으며, CSTMP 처리로 인해 WT-CFTR의 분포는 영향을 받지 않았다. 앞서 보고된 바와 마찬가지로(15, 34),  $\Delta$ F508-CFTR의 첨단부 발현이 Cfr<sup>F508del</sup> 마우스의 대장 선와에서는 관찰되지 않았다. 특히, Cfr<sup>F508del</sup> 마우스에서 CSTMP의 경구 투여가 대장 음와세포의 첨단부에서  $\Delta$ F508-CFTR 발현을 회복시켰다(도 8c). 나아가, CSTMP 처리는 Cfr<sup>F508del</sup> 마우스 대장에서 CFTR-매개 음이온 수송의 기능적 회복을 가져왔다. 포스콜린 처리로 인해 증가된 세포내 cAMP 수준은 Cfr<sup>WT</sup> 마우스 대장에서 전형적인 CFTR-의존성 단락전류(short-circuit current, I<sub>sc</sub>)를 유발하였는데, 이는 (1) 내강-음성이고, (2)  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 공수송체 억제제인 부메타니드(bumetanide)를 이용한 기저측  $\text{Cl}^-$  흡수 차단에 의해 억제되며, (3) Cfr<sup>F508del</sup> 마우스 대장에는 존재하지 않는다(도 8d 및 8e). 명백하게, CSTMP 처리는 Cfr<sup>WT</sup> 마우스에서 측정된 수준의 89%에 이르는 전류 크기로 포스콜린으로 활성화되고, 내강-음성이며 부메타니드로 억제 가능한 I<sub>sc</sub>를 유발한다(도 8d 및 8e). 이를 종합하면, 이러한 결과는 CSTMP가 이동-결함 CFTR 돌연변이에 대한 유효한 치료제가 될 수 있다는 인 비보 증거를 제공한다.

[0130] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.



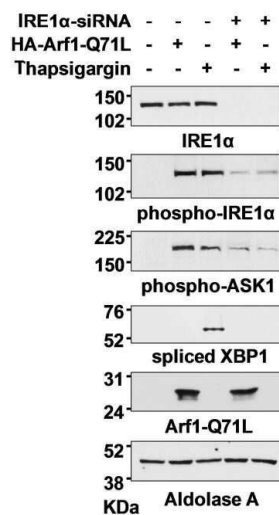
[0132] **참고문헌**

- [0133] 1.Thomas PJ et al. *Trends Biochem Sci.*1995;20(11):456-9.
- [0134] 2.Park HJ et al. *J Med Genet.*2003;40(4):242-8.
- [0135] 3.Bullock AN, and Fersht AR. *Nat Rev Cancer.*2001;1(1):68-76.
- [0136] 4.Hammond C, and Helenius A. *Curr Opin Cell Biol.*1995;7(4):523-9.
- [0137] 5.Meusser B et al. *Nat Cell Biol.*2005;7(8):766-72.
- [0138] 6.Lee MG et al. *Physiol Rev.*2012;92(1):39-74.
- [0139] 7.Chang XB et al. *J Cell Sci.*2008;121(Pt 17):2814-23.
- [0140] 8.Amaral MD. *J Mol Neurosci.*2004;23(1-2):41-8.
- [0141] 9.Meng X et al. *Cell Mol Life Sci.*2017;74(1):23-38.
- [0142] 10.Ward CL et al. *Cell.*1995;83(1):121-7.
- [0143] 11.Cheng SH et al. *Cell.*1990;63(4):827-34.
- [0144] 12.Alper SL, and Sharma AK. *Mol Aspects Med.*2013;34(2-3):494-515.
- [0145] 13.Yoon JS et al. *J Med Genet.*2008;45(7):411-9.
- [0146] 14.Gee HY et al. *Semin Cell Dev Biol.*2018;83(59-66).
- [0147] 15.Gee HY et al. *Cell.* 2011;146(5):746-60.
- [0148] 16.Jung J et al. *Nat Commun.*2016;7(11386).
- [0149] 17.Noh SH et al. *Autophagy.* 2018;14(10):1761-78.
- [0150] 18.Piao H et al. *Sci Rep.*2017;7(39887).
- [0151] 19.Giuliani F et al. *Curr Opin Cell Biol.*2011;23(4):498-504.
- [0152] 20.Hetz C, and Papa FR. *Mol Cell.*2018;69(2):169-81.
- [0153] 21.Gee HeonY et al. *Cell.*2011;146(5):746-60.
- [0154] 22.Calfon M et al. *Nature.*2002;415(6867):92-6.
- [0155] 23.Hollien J, and Weissman JS. *Science.*2006;313(5783):104-7.
- [0156] 24.Nishitoh H et al. *Genes Dev.*2002;16(11):1345-55.
- [0157] 25.Korennykh AV et al. *Nature.*2009;457(7230):687-93.
- [0158] 26.Pahl HL. *Physiol Rev.*1999;79(3):683-701.
- [0159] 27.Hetz C et al. *T Nat Rev Drug Discov.*2013;12(9):703-19.
- [0160] 28.Wang L et al. *Nat Chem Biol.*2012;8(12):982-9.
- [0161] 29.Kim J et al. *Traffic.*2016;17(7):733-53.
- [0162] 30.Urano F et al. *Science.* 2000;287(5453): 664-6.
- [0163] 31.Guo X et al. *EMBO Mol Med.*2010;2(12):504-15.
- [0164] 32.Zhang J et al. *Biomed Pharmacother.*2016;82(281-9).
- [0165] 33.Zeiher BG et al. A mouse model for the delta F508 allele of cystic fibrosis. *J Clin Invest.*1995;96(4):2051-64.

- [0166] 34.Namkung W et al. *Gastroenterology*. 2005;129(6):1979-90.
- [0167] 35.Rabouille C. *Trends Cell Biol*.2017;27(3):230-40.
- [0168] 36.Kim J et al. Unconventional protein secretion -new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases. 2018;131(12).
- [0169] 37.Xu Y et al. *Cell Discov*.2018;4(11).
- [0170] 38.Shamu CE, and Walter P. *Embo j*.1996;15(12):3028-39.
- [0171] 39.Karagoz GE et al. IRE1. 2017;6
- [0172] 40.Hetz C, and Glimcher LH. *Mol Cell*.2009;35(5):551-61.
- [0173] 41.Pattingre S et al. *J Biol Chem*.2009;284(5):2719-28.
- [0174] 42.Barrett KE, and Keely SJ. *Annu Rev Physiol*.2000;62(535-72).

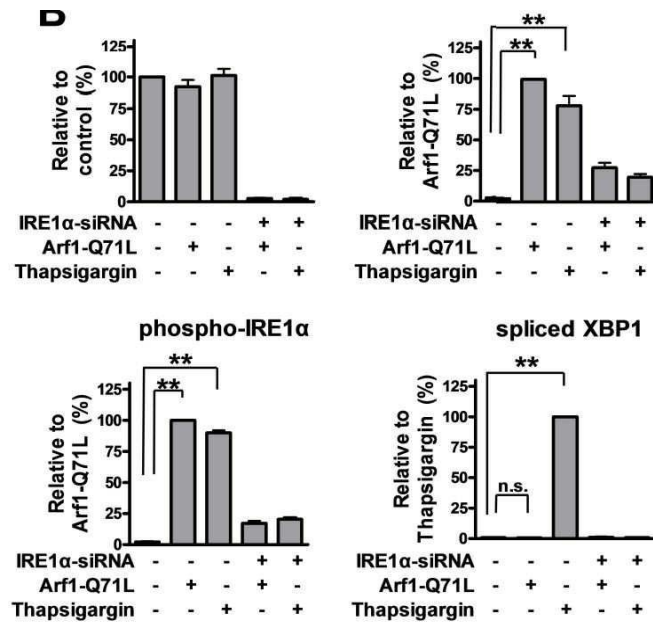
## 도면

### 도면1a

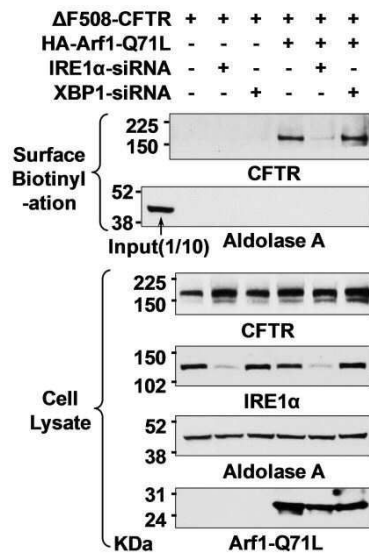




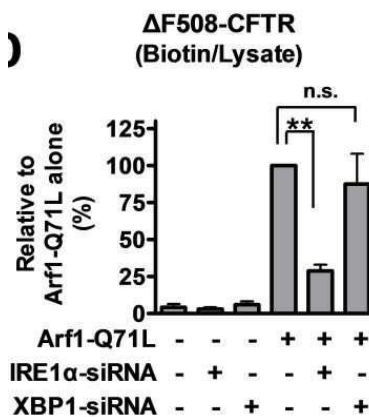
도면1b



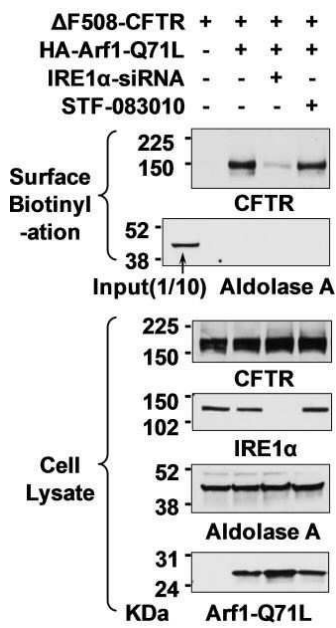
도면1c



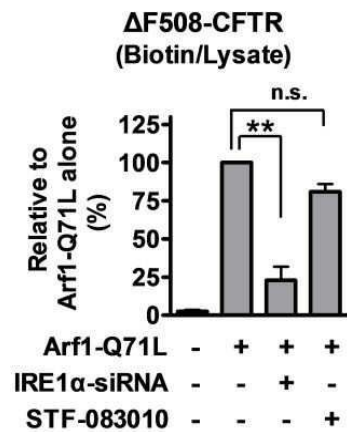
도면1d



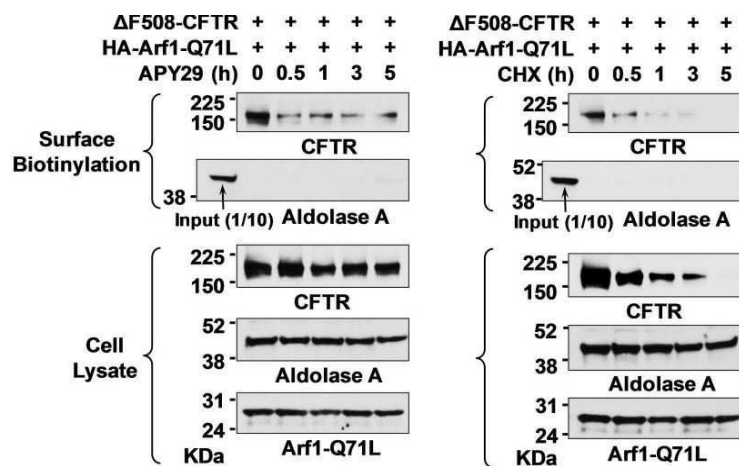
도면1e



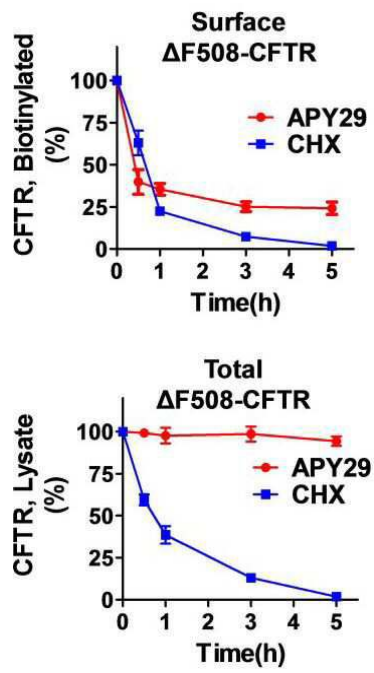
도면1f



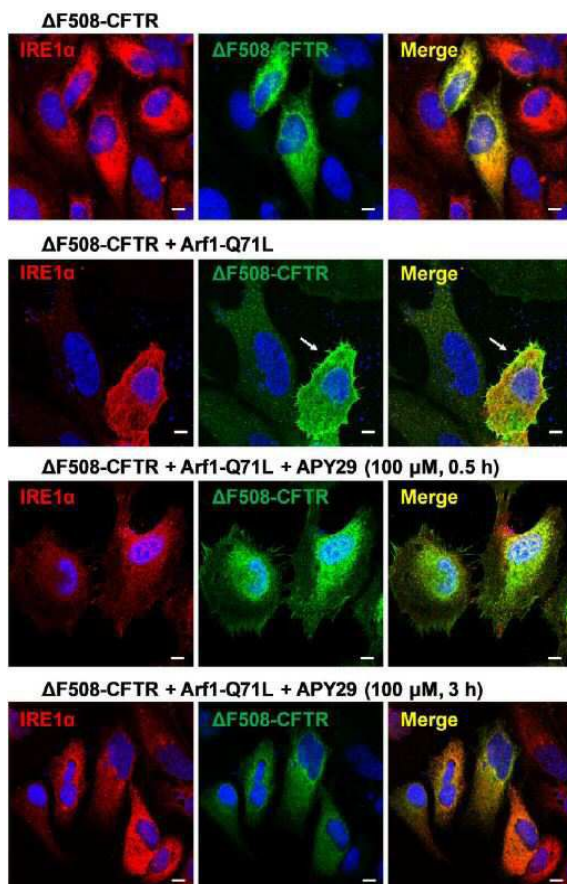
도면2a



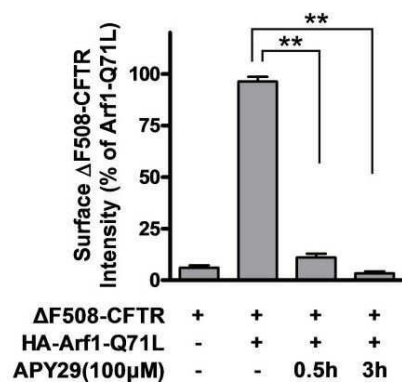
도면2b



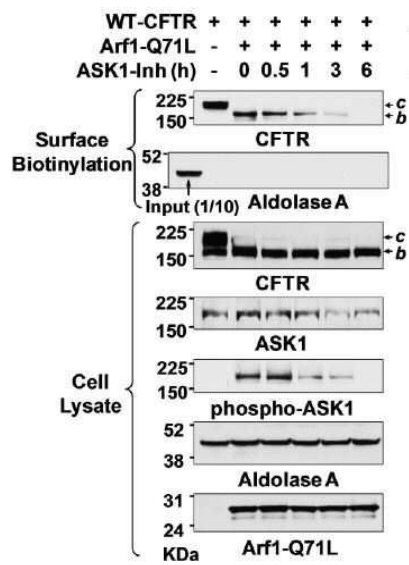
도면2c



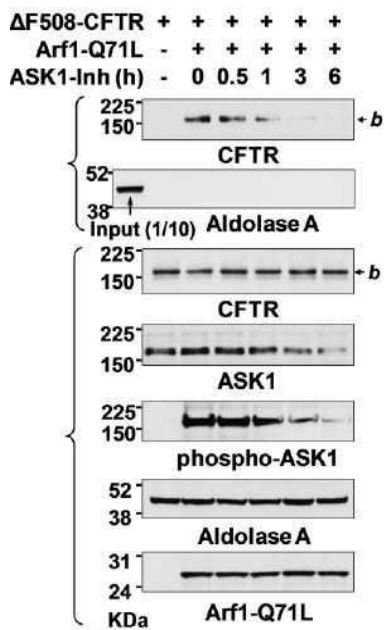
도면2d



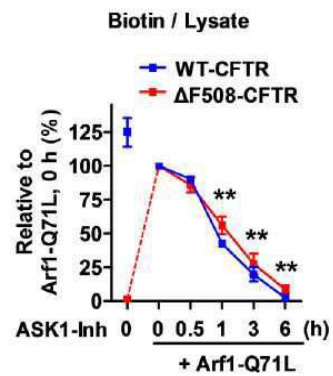
도면3a



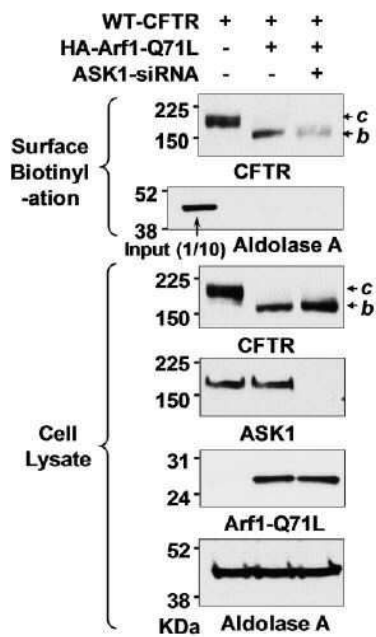
도면3b



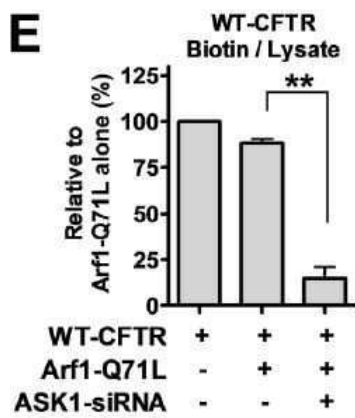
도면3c



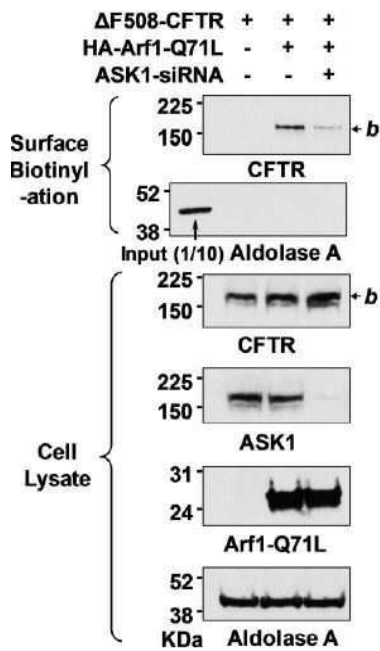
도면3d



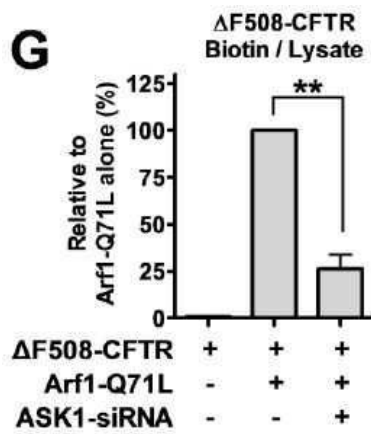
도면3e



도면3f

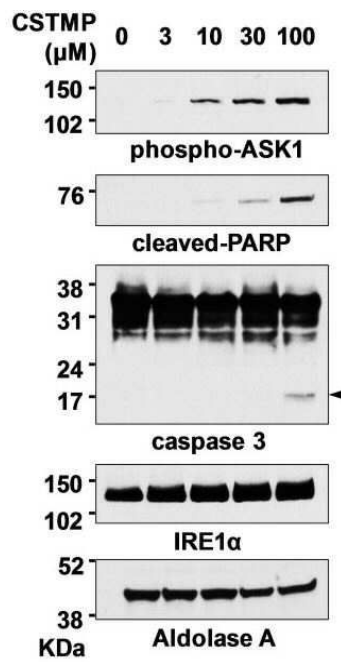


도면3g

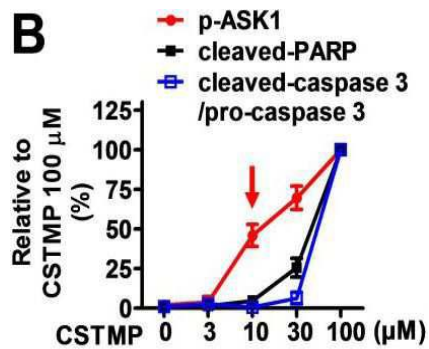




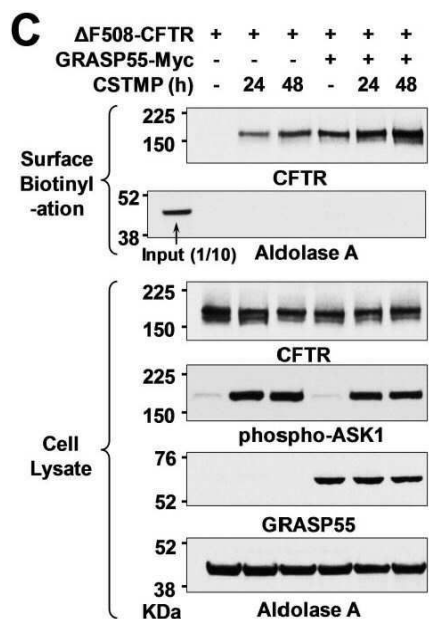
도면4a



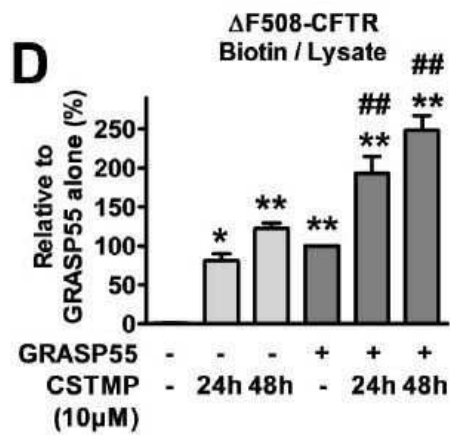
도면4b



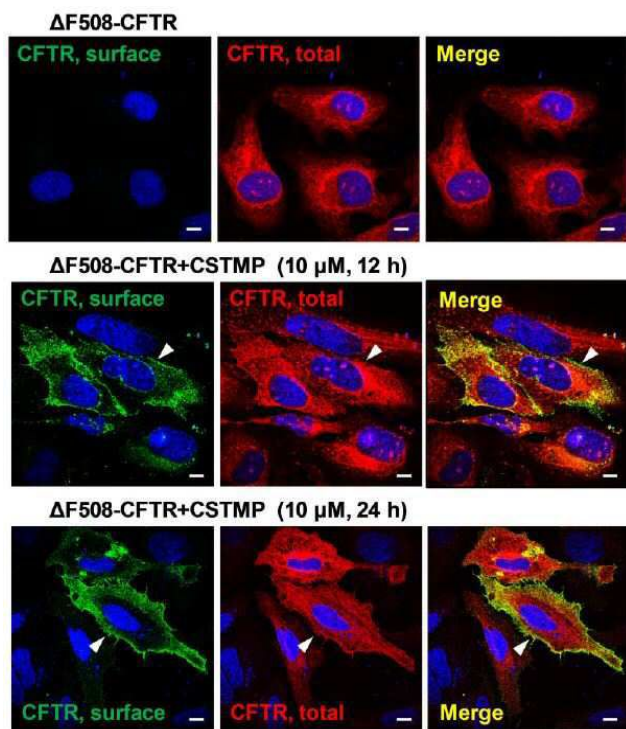
도면4c



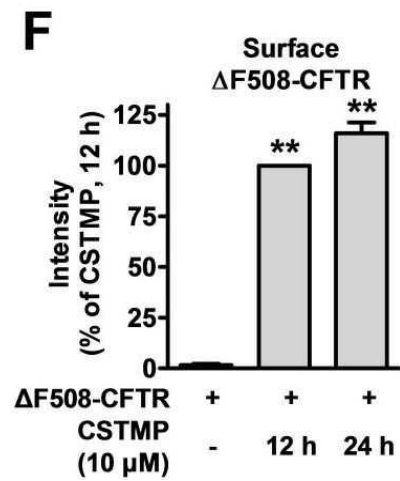
도면4d



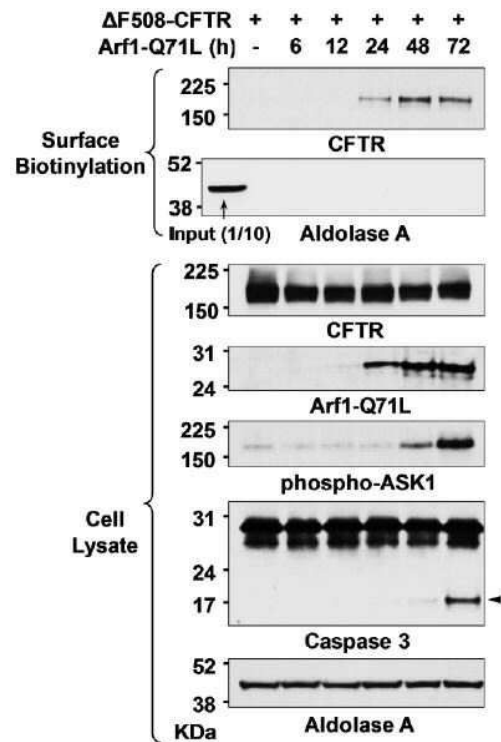
도면4e



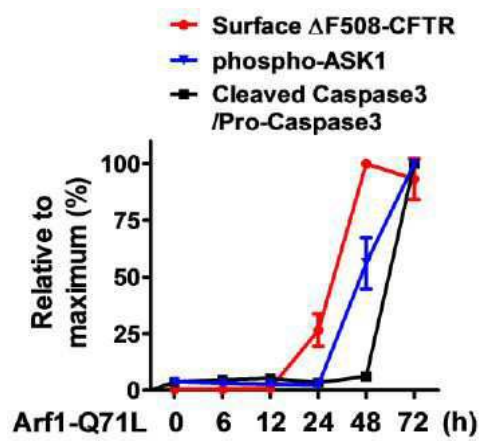
도면4f



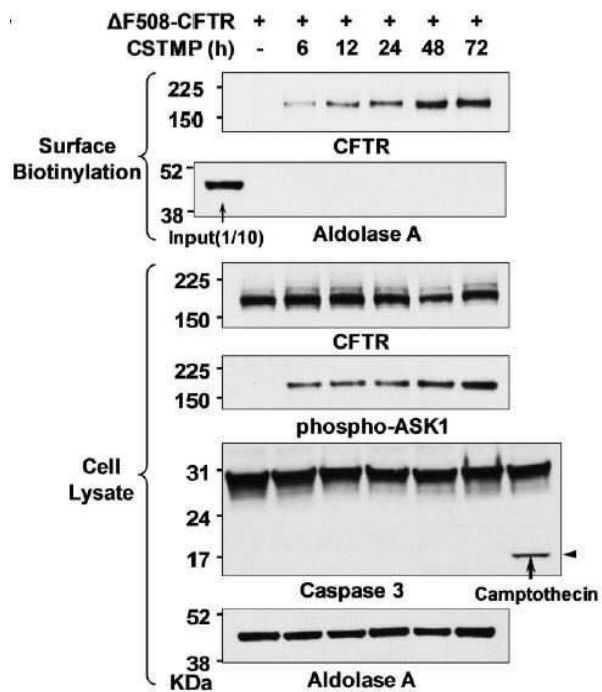
도면5a



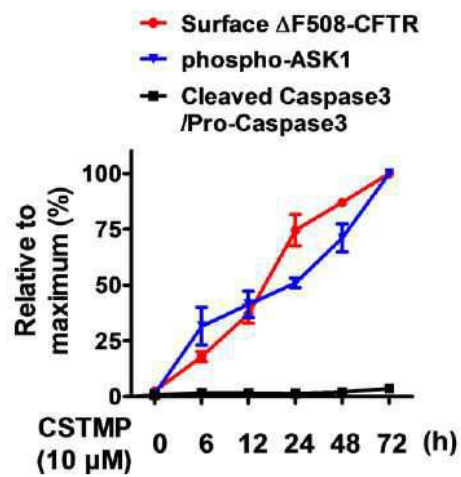
도면5b



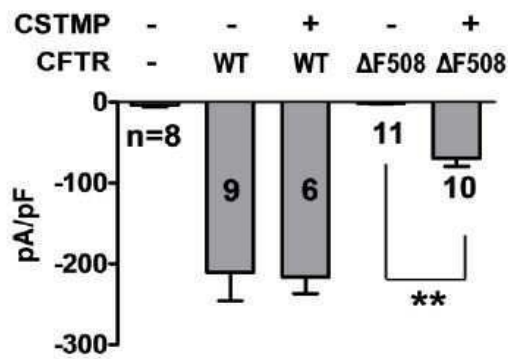
도면5c



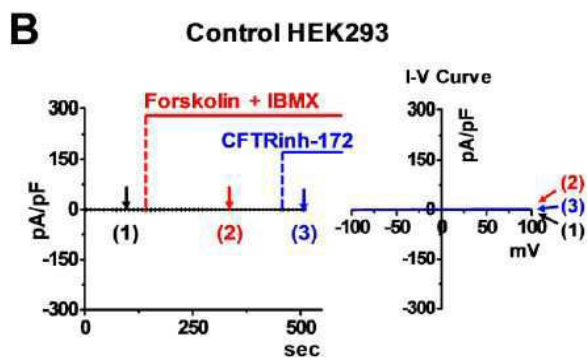
도면5d



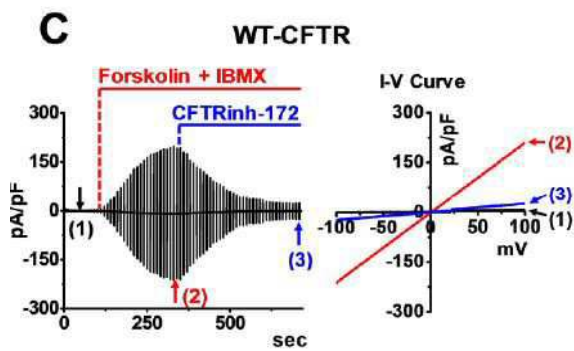
도면6a



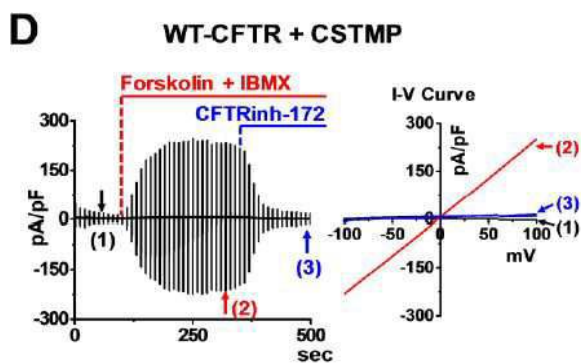
도면6b



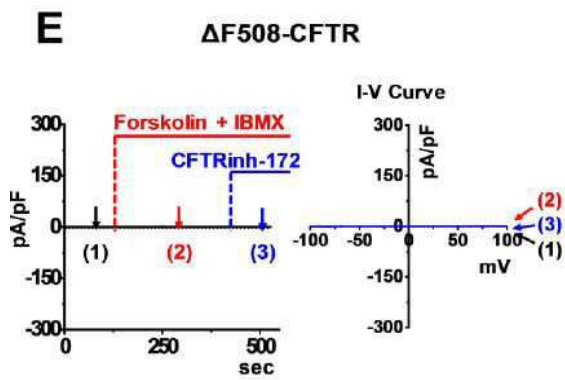
도면6c



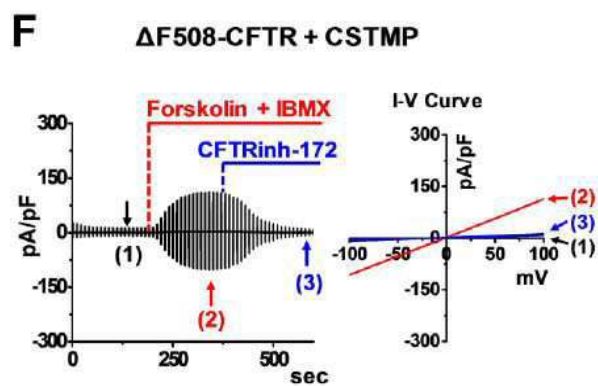
도면6d



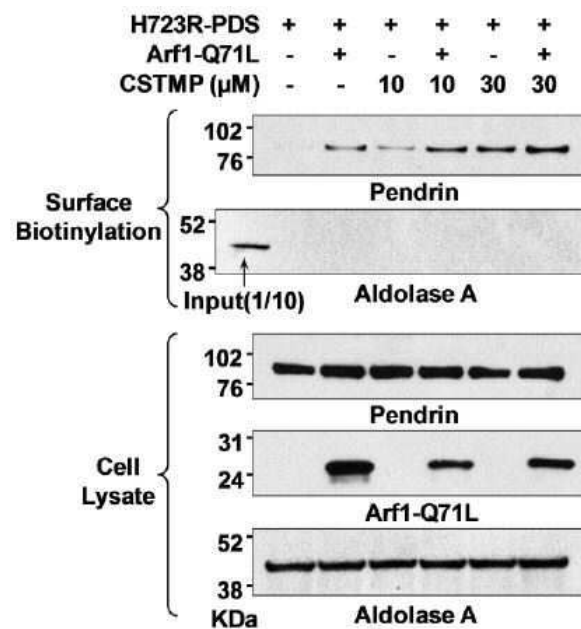
도면6e



도면6f

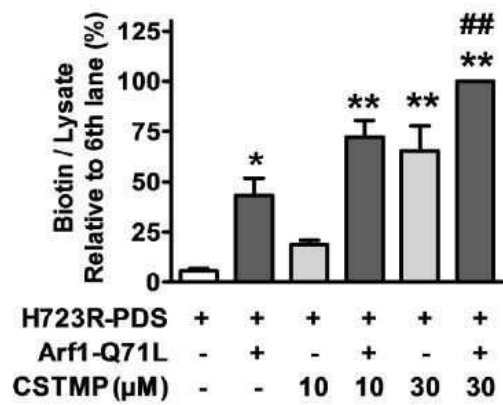


도면7a

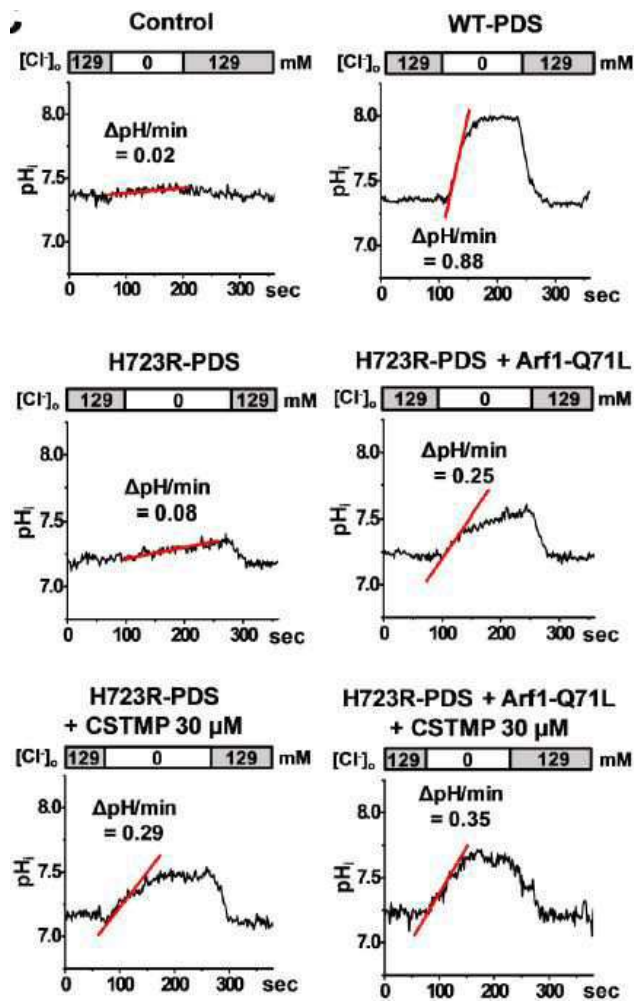




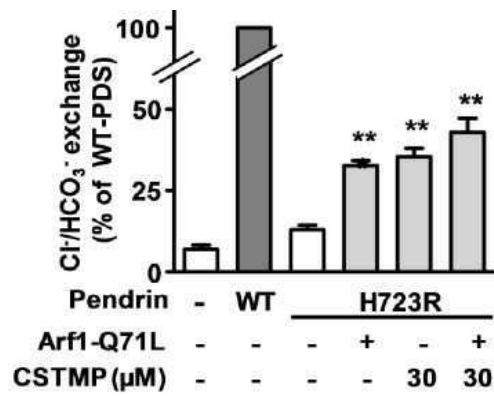
도면7b



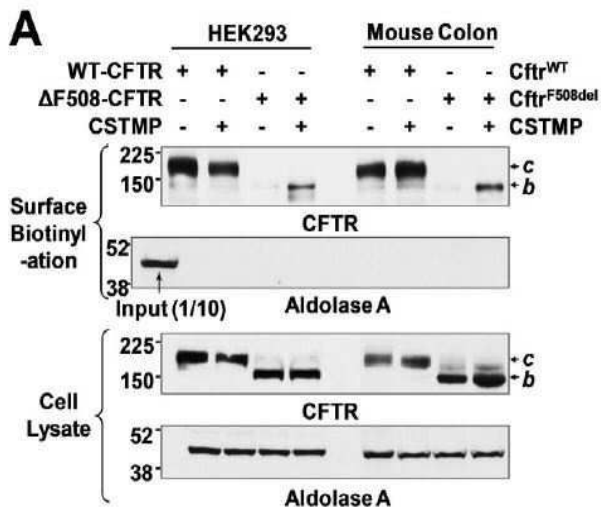
도면7c



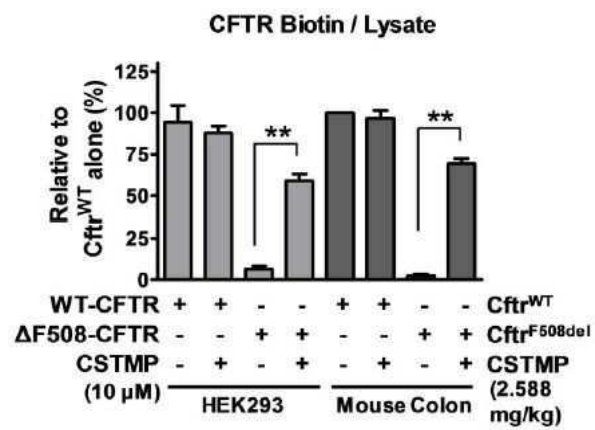
도면7d



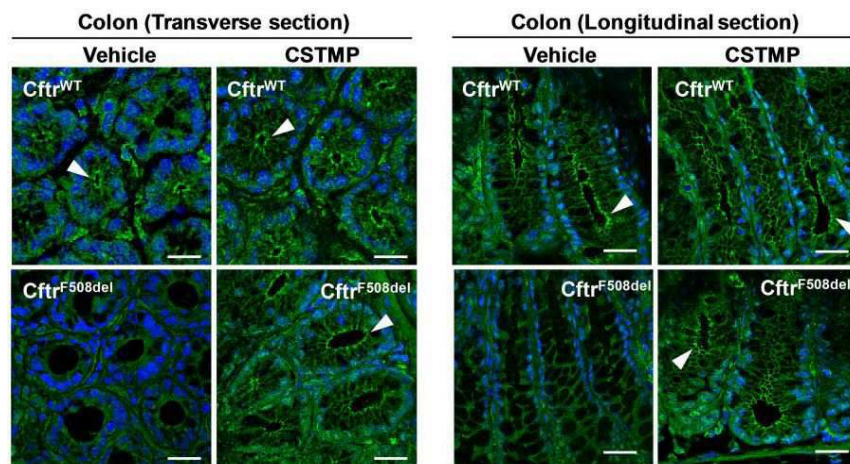
도면8a



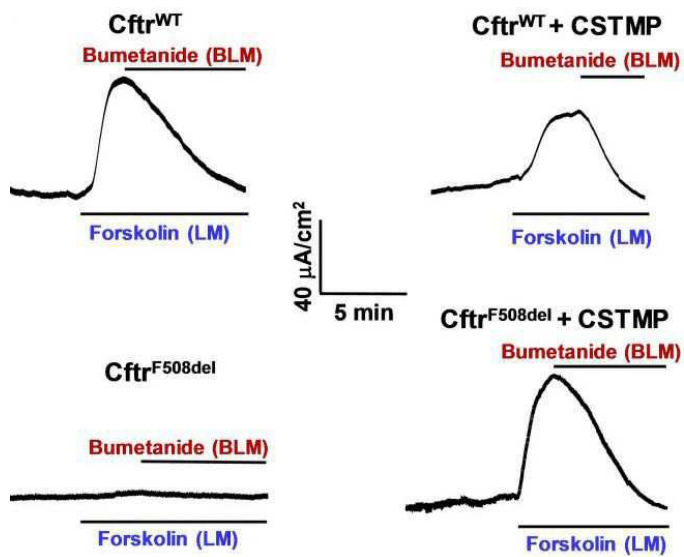
도면8b



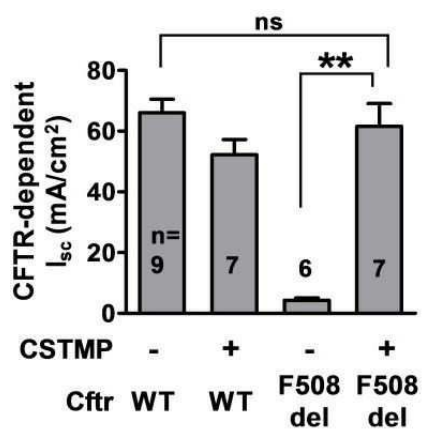
도면8c



도면8d

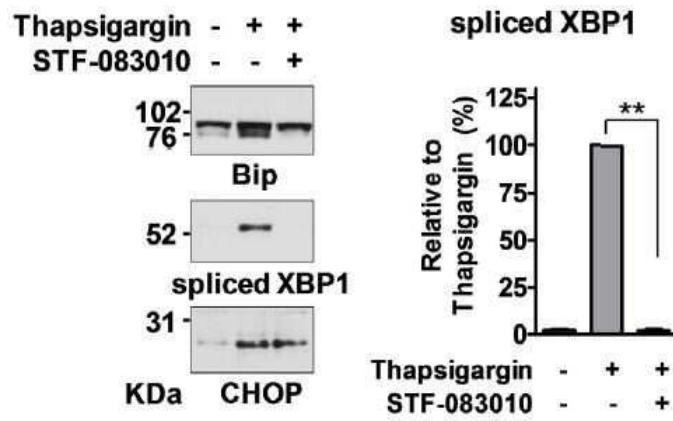


도면8e

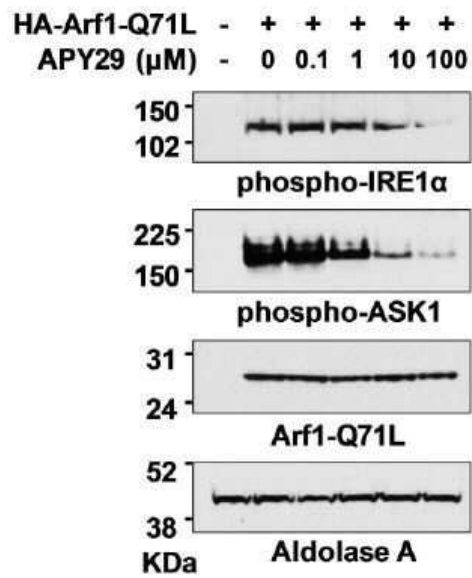




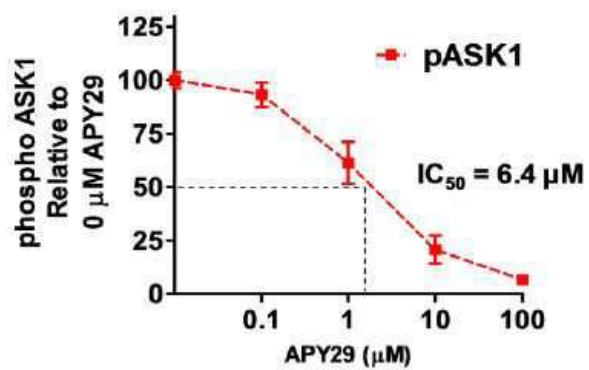
도면9d



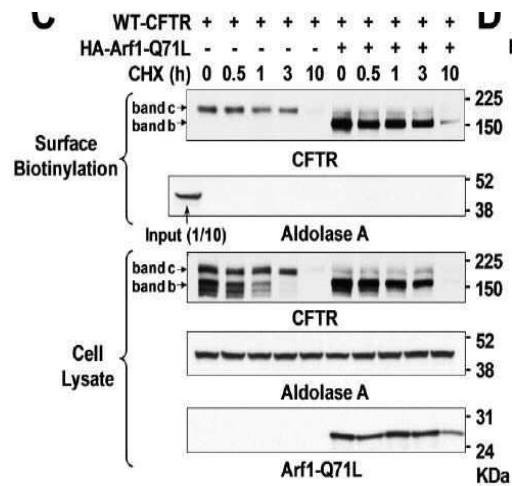
도면10a



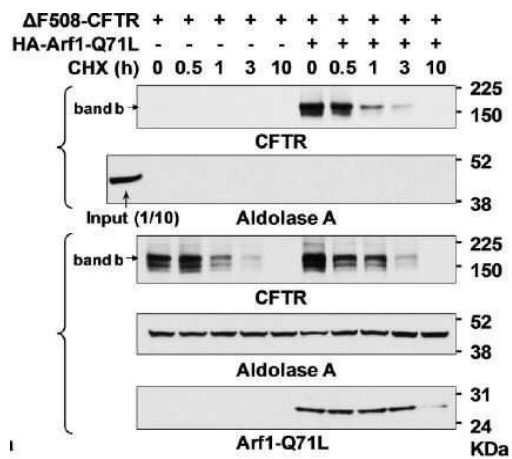
도면10b



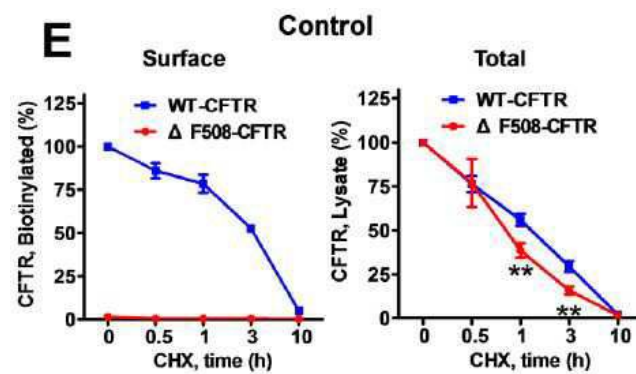
도면10c



도면10d

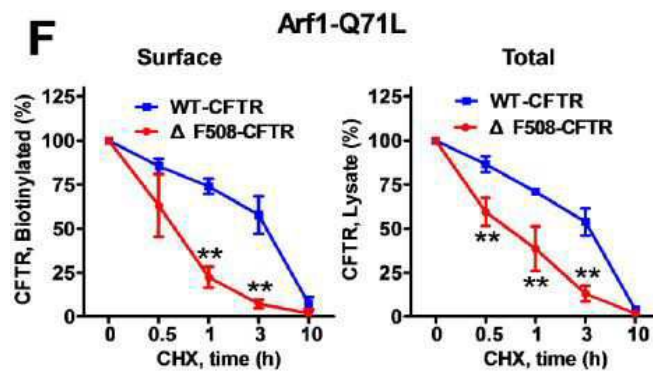


도면10e

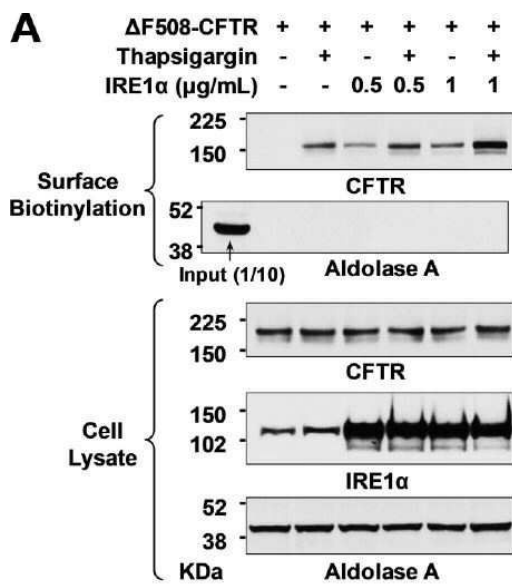




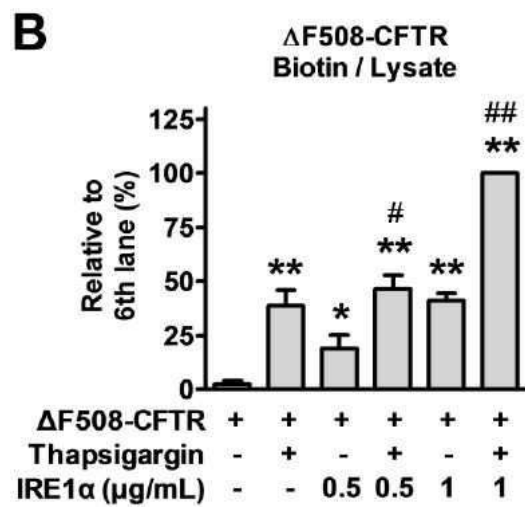
도면10f



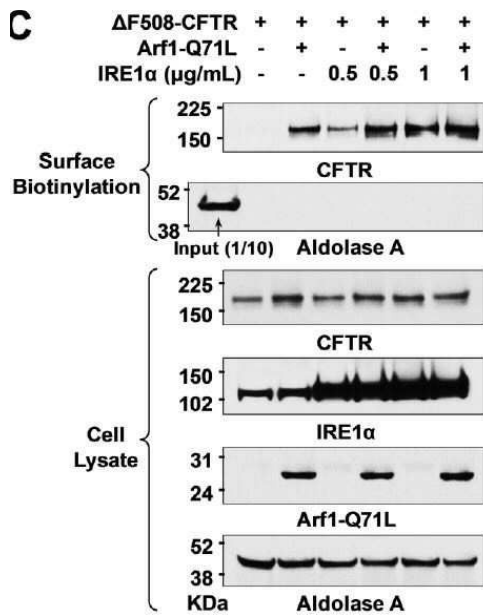
도면11a



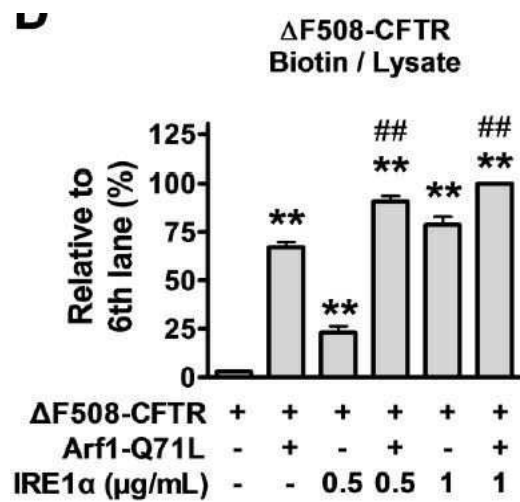
도면11b



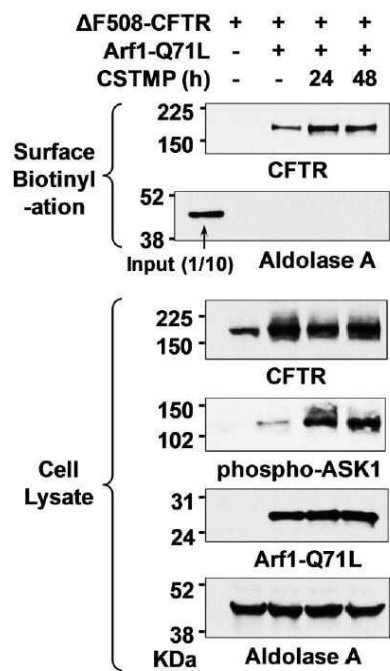
도면11c



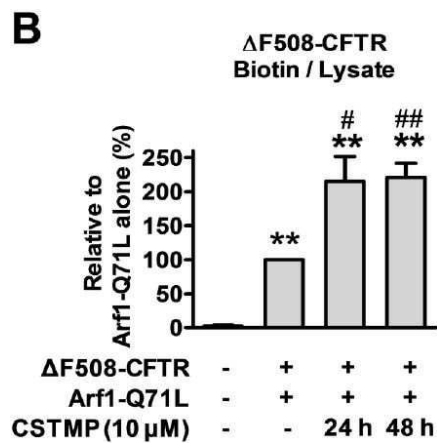
도면11d



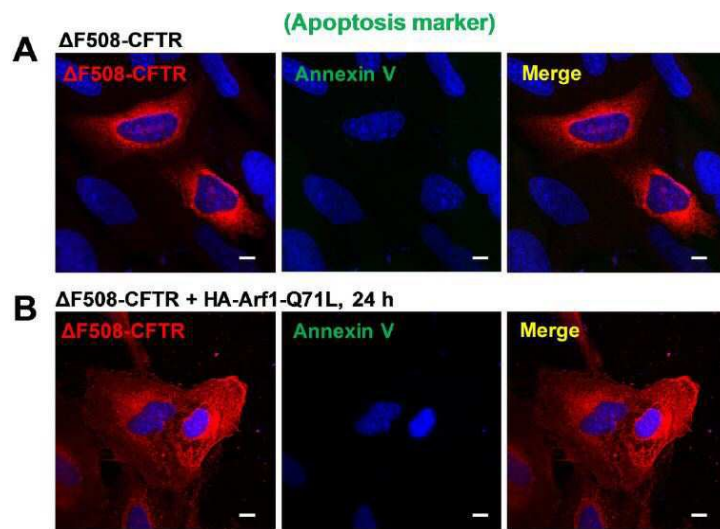
도면12a



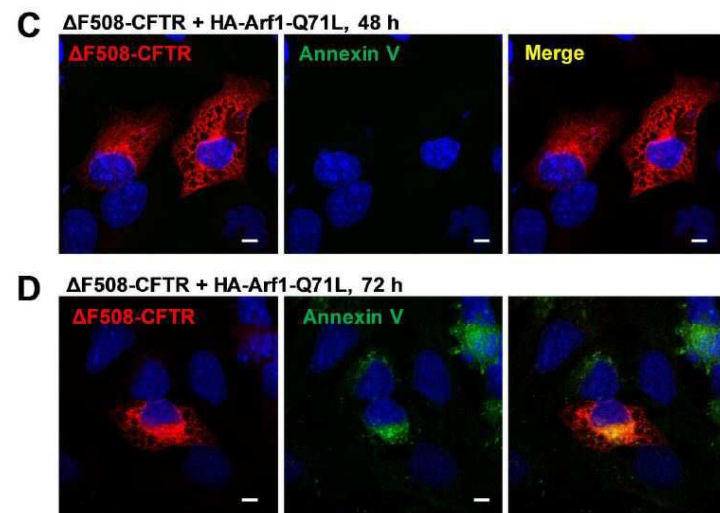
도면12b



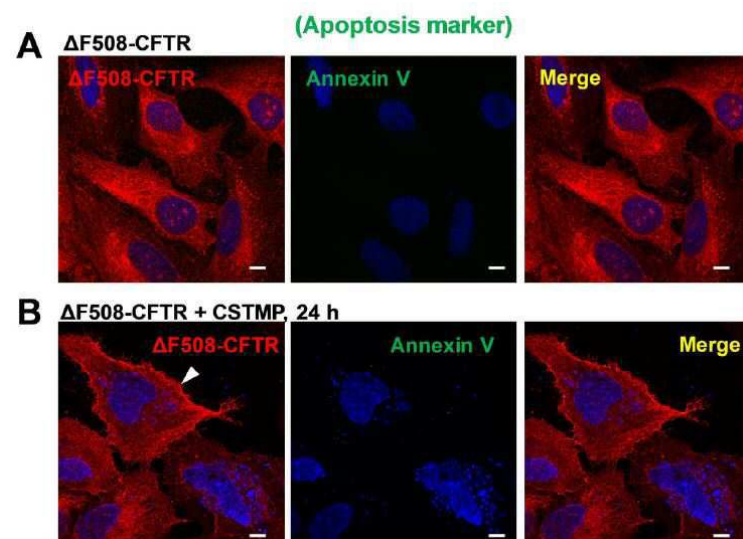
도면13a



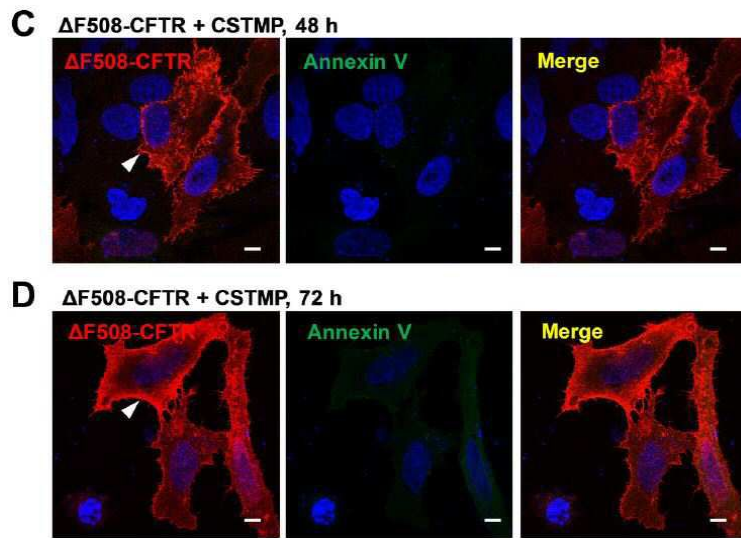
도면13b



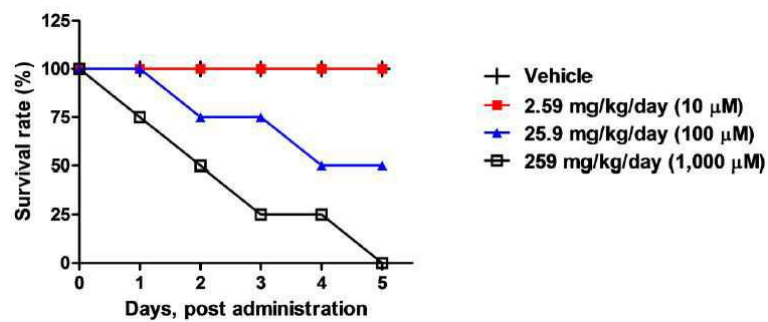
도면14a



도면14b



도면15



## 서열 목록

- <110> Industry-academic cooperation foundation yonsei university
  - <120> A Composition for Preventing or Treating a Protein Conformational Disease Comprising an IRE1 alpha Kinase Activator as an Active Ingredient
  - <130> HPC8614
  - <160> 8
  - <170> KoPatentIn 3.0
  - <210> 1
  - <211> 20
  - <212> DNA
  - <213> Artificial Sequence
  - <220><223> hIRE1 alpha F primer
  - <400> 1
- cgggagaaca tcactgtccc

|            |                         |    |
|------------|-------------------------|----|
| <210>      | 2                       |    |
| <211>      | 20                      |    |
| <212>      | DNA                     |    |
| <213>      | Artificial Sequence     |    |
| <220><223> | hIRE1 alpha R primer    |    |
| <400>      | 2                       |    |
|            | cccgtagtg gtgcttctta    | 20 |
| <210>      | 3                       |    |
| <211>      | 21                      |    |
| <212>      | DNA                     |    |
| <213>      | Artificial Sequence     |    |
| <220><223> | hXBP1 F primer          |    |
| <400>      | 3                       |    |
|            | ttgtcacccc tccagaacat c | 21 |
| <210>      | 4                       |    |
| <211>      | 20                      |    |
| <212>      | DNA                     |    |
| <213>      | Artificial Sequence     |    |
| <220><223> | hXBP1 R primer          |    |
| <400>      | 4                       |    |
|            | tccagaatgc ccaacaggat   | 20 |
| <210>      | 5                       |    |
| <211>      | 20                      |    |
| <212>      | DNA                     |    |
| <213>      | Artificial Sequence     |    |
| <220><223> | spliced hXBP1 F primer  |    |
| <400>      | 5                       |    |
|            | tgctgagtcc gcagcaggtg   | 20 |
| <210>      | 6                       |    |
| <211>      | 18                      |    |
| <212>      | DNA                     |    |
| <213>      | Artificial Sequence     |    |
| <220><223> | spliced hXBP1 R primer  |    |



|                       |                     |    |
|-----------------------|---------------------|----|
| <400>                 | 6                   |    |
| gctggcaggc tctgggga   |                     | 18 |
| <210>                 | 7                   |    |
| <211>                 | 20                  |    |
| <212>                 | DNA                 |    |
| <213>                 | Artificial Sequence |    |
| <220><223>            | GAPDH F primer      |    |
| <                     |                     |    |
| 400>                  | 7                   |    |
| aatcccatca ccattttcca |                     | 20 |
| <210>                 | 8                   |    |
| <211>                 | 20                  |    |
| <212>                 | DNA                 |    |
| <213>                 | Artificial Sequence |    |
| <220><223>            | GAPDH R primer      |    |
| <400>                 | 8                   |    |
| tggactccac gacgtactca |                     | 20 |