

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호  
**WO 2012/060607 A2**

(43) 국제공개일  
2012년 5월 10일 (10.05.2012)

PCT

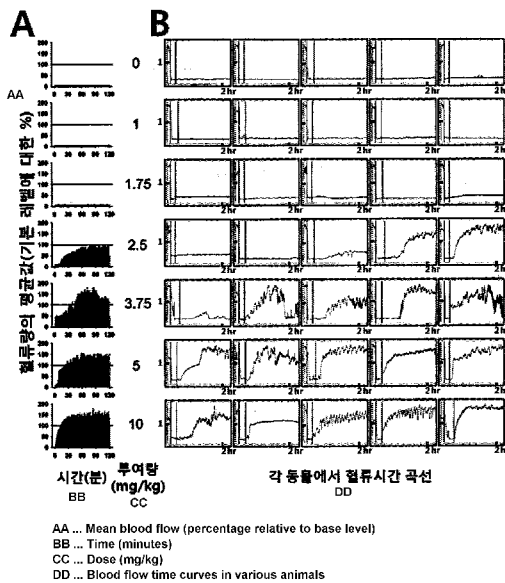
- (51) 국제특허분류: A61K 38/06 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)  
A61P 9/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/008248
- (22) 국제출원일: 2011년 11월 1일 (01.11.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2010-0107760 2010년 11월 1일 (01.11.2010) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교, 120-749 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 곁
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 허지희 (HEO, Ji Hoe) [KR/KR]; 서울특별시 양천구 신정동 목동신시가지아파트 1331동 1503호, 158-070 Seoul (KR). 권일 (KWON, Il) [KR/KR]; 경기도 화성시 정남면 덕절리 303-1번지, 445-964 Gyeonggi-do (KR). 김영대 (KIM, Young Dae) [KR/KR]; 서울특별시 광진구 광장동 극동아파트 7동 1001호, 143-751 Seoul (KR). 홍성유 (HONG, Sung Yu) [KR/KR]; 서울특별시 동대문구 청량리동 60번지 한신아파트 106동 1504호, 130-010 Seoul (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, 151-832 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR DISSOLVING THROMBI, AND A PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING STENOTIC OR OCCLUSIVE VASCULAR DISEASES WHICH COMPRISES THE SAME

(54) 발명의 명칭 : 혈전 용해용 조성물 및 이를 포함하는 혈관 협착 또는 폐색성 질환의 치료용 약제학적 조성물

Fig. 5



(57) Abstract: The present invention relates to: a composition for dissolving thrombi comprising a peptide comprising the Arg-Gly-Asp motif; a pharmaceutical composition for treating stenotic or occlusive vascular diseases which comprises the same; and a thrombus dissolving method and a method for treating stenotic or occlusive vascular diseases, comprising the step of administering the same. The compositions and methods of the present invention have the advantage that they effectively break down already formed thrombi by adopting the principle of targeting integrin within the thrombus such as platelet surface GPIIb-IIIa, which is not the same as the existing principle of plasminogen activation. Also, the compositions and methods of the present invention have a nerve-protecting function as they effectively open as far as the microvasculature, without the occurrence of restenosis after penetration.

(57) 요약서: 본 발명은 Arg-Gly-Asp 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드를 포함하는 혈전 용해용 조성물, 이를 포함하는 혈관 협착 또는 폐색성 질환의 치료용 약제학적 조성물, 그리고 이를 투여하는 단계를 포함하는 혈전 용해방법 및 혈관 협착 또는 폐색성 질환의 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물 및 방법은 기존의 플라스미노겐 활성화 원리가 아닌 혈소판 표면 GPIIb-IIIa와 같은 혈전 내 인테그린 타겟 원리를 채택하여 이미 생성된 혈전을 효과적으로 분해하는 장점이 있다. 또한, 본 발명의 조성물 및 방법은 관동 후 재협착도 일으키지 않고, 미세혈관까지 효과적으로 개방시키며 신경 보호 효능이 있다.

WO 2012/060607 A2



**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를  
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

5 혈전 용해용 조성물 및 이를 포함하는 혈관 협착 또는 폐색성 질환의  
치료용 약제학적 조성물

## 【기술 분야】

본 발명은 혈전 용해용 조성물 및 이를 포함하는 혈관 협착 또는  
폐색성 질환의 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

10

## 【배경 기술】

대부분의 뇌졸중은 주 또는 더 작은 뇌내 동맥의  
혈전색전성폐색(thromboembolic occlusion)에 의해 야기된다(Wardlaw,  
Murray *et al.*, 2009). 허혈성 뇌졸중의 경우, 빠른 혈전용해만이  
15 불가피한 완전한 경색의 발병을 억제하기 위한 유일하게 확립된  
치료방법이다(1995; 및 Choi, Bateman *et al.*, 2006). 재조합 조직  
플라스미노겐 활성인자(recombinant tissue plasminogen activator, rt-  
PA)의 정맥내 투여에 의한 치료법은 허혈성 뇌졸중의 발병(onset) 후 3 시간  
내에 행할 수 있는 현재 유일하게 승인된 허혈성 뇌졸중에 대한  
20 치료법이다(Caplan, Mohr *et al.*, 1997; 및 Lopez-Yunez, Bruno *et al.*,  
2001). 하지만, 절반 이상의 환자들이 혈전용해 치료 후 성공적인  
재관통(recanalization)을 이루는데 실패한다(Rha and Saver, 2007; 및 Lee  
*et al.*, Stroke, 2007; 38: 192-193). 비록 폐색된 동맥이 혈전용해  
치료법에 의해 성공적으로 재관통된다 할지라도 이러한 회복(benefits)은  
25 재관류 손상(Hallenbeck and Dutka, 1990), 뇌출혈(Adams *et al.*, 2005) 및  
재폐색(Heo, Lee *et al.*, 2003)의 위험에 의해 다시 약화된다. 또한, rt-  
PA 는 신경독성을 가지는 것으로 보고되었다(Chen and Strickl, 1997; Wang,  
Tsirka *et al.*, 1998; Nicole, Docagne *et al.*, 2001; Yepes, Sandkvist *et al.*,  
2002; 및 Matys and Strickl, 2003).

30 재관통 전략은 그 효능이 증명되었지만, 적용가능성의 한계 및  
잠재적인 부작용 때문에, rt-PA 보다 더 효능이 좋은 신규한 혈전용해

제제(agents)를 개발하기 위한 많은 시도(efforts)가 있었다. 이러한 시도들은 t-PA 의 변이체들, 동물 소스로부터 유래한 플라스미노겐 활성화인자들 및 마이크로플라스민을 포함한다. 상술한 약물들(drugs)은 다음과 같은 목적을 지닌다: (a) 피브린 특이성의 증대; (b) 혈장 내 반감기의 연장; (c) 플라스미노겐 활성화인자 억제제-1 에 의한 억제능 감소; 및 (d) 신경독성의 회피. 여러 가지 약물들은 임상 실험을 완료하였으며, 몇몇 약물들은 현재 효능을 연구하고 있는 상태이다. 이러한 약물들은 혈전 내 피브린을 타겟으로 한다. 하지만, 혈전은 혈소판-피브리노겐 상호작용에 의해 형성된다. 또한, 트롬빈, 백혈구 및 적혈구세포도 혈전의 구성성분들이다. 피브린을 타겟으로 하는 혈전용해 제제들에 대한 혈전의 저항성은 뇌졸중 환자들에서 보여지는 낮은 재개통율(recanalization rates)의 주된 이유들 중 하나이고, 이러한 현상은 혈소판-풍부 혈전에 의한 폐색에서 보다 더 일반적으로 일어날 수 있다. 이러한 측면에서, 혈소판을 타겟으로 하는 치료법이 개선된 혈전용해 효능을 위해 피브린을 타겟팅하는 치료법에 대한 선택적인 또는 추가적인 방법일 수 있다.

인테그린 패밀리의 멤버인 혈소판 당단백질(Platelet glycoprotein, GP) IIb/IIIa 는 고밀도로 혈소판 막 표면에 존재한다(Shattil and Ginsberg, 1997). GPIIb/IIIa 수용체는 피브리노겐에 특이적으로 결합함으로써 혈소판 응집 경로의 최종 단계를 매개한다(Phillips, Charo *et al.*, 1988). 따라서, 혈소판 GPIIb/IIIa 수용체를 타겟팅하는 것은 혈소판에 작용하는 약물 개발에 있어서 중요하다. 많은 혈소판 GPIIb/IIIa 길항제들이 개발되어 졌는데, 이들은 GPIIb/IIIa 에 대한 인간-마우스 키메릭 항체의 Fab 단편(abciximab), 비-펩타이드 유사체들(티로피반 및 라미피반) 및 KGD 모티프를 포함하는 원형 헵타펩타이드 디스인테그린(eptifibatide)을 포함한다(Seitz, Meisel *et al.*, 2004; Abou-Chebl, Bajzer *et al.*, 2005; 및 Eckert, Koch *et al.*, 2005). 상술한 GPIIb/IIIa 길항제들은 불안정성 협심증, 급성 심근경색, 그리고 경피적 관상동맥 성형술(percutaneous transfemoral coronary angioplasty, PTCA) 및 스텐트시술을 받은 환자들에게 효과적이었다. 뇌졸중의 경우, 압식시맙(abciximab)은 증상이 발병한 지 5 시간 내지 6 시간이 지나고 처리된 환자들에서 그 효능을

나타내지 못했다(Adams, Efron *et al.*, 2008). 하지만, GPIIb/IIIa 길항제들은 재폐색된 뇌졸중 환자들에서 혈전을 용해시키고 선택된 환자들에 효과적이다(Heo, Lee *et al.*, 2003; Seitz, Hamzavi *et al.*, 2003; Seitz, Meisel *et al.*, 2004; Eckert, Koch *et al.*, 2005; 및 Chen, Mo *et al.*, 2007). 또한, GPIIb/IIIa 억제제들은 동물 뇌졸중에서 미세혈관 개방을 유지하는데 유익하며 신경보호 효능을 가진다(Choudhri, Hoh *et al.*, 1998; 및 Abumiya, Fitridge *et al.*, 2000).

한국 뱀독으로부터 정제되고 클로닝된 신규한 디스인테그린인 삭사틸린(Saxatilin)은 트리펩타이드 서열인 Arg-Gly-Asp(RGD)를 가지는데, 이 서열은 혈소판 GPIIb/IIIa 수용체에 대한 디스인테그린의 인지 부위(recognition site)이다(Hong, Koh *et al.*, 2002; 및 Hong, Sohn *et al.*, 2002). 삭사틸린은 혈소판 응집(Hong, Koh *et al.*, 2002) 및 혈소판 활성화(Jang, Jeon *et al.*, 2007) 상에 강력한 억제효능을 가져서, 혈전 생성을 방해하는 것으로 알려져 있다.

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

#### 【발명의 상세한 설명】

본 발명자들은 이미 생성된 혈전을 용해하여 폐색되거나 좁아진 혈관으로 인한 질병을 치료할 수 있는 혈전 용해제를 개발하고자 노력하였고 그 결과, Arg-Gly-Asp 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드가 혈관 내에 이미 생성된 혈전을 효과적으로 용해하는 활성을 가진다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 혈전 용해용 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 혈전 용해용 조성물을 포함하는 혈관 협착 또는 폐색성 질환의 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

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

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) Arg-Gly-Asp  
5 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 혈전 용해용 조성물을 제공한다.

트리펩타이드 서열인 Arg-Gly-Asp(RGD)은 디스인테그린의 인지  
부위(recognition site)이며(Hong, Koh *et al.*, 2002; 및 Hong, Sohn *et al.*, 2002), Arg-Gly-Asp 모티프를 포함하는 펩타이드를 포함하는 대표적인  
10 예가 디스인테그린이다. 디스인테그린이 혈소판의 응집을 억제하여 혈전 생성을 방해한다는 사실은 기존에 알려져 왔다. 그러나, 생체 내에서 이미 응집되어 생성되어 있는 혈전에 용해효과가 있는지는 전혀 알려져 있지 않았다. 본 발명자는 디스인테그린과 같은 Arg-Gly-Asp 모티프를  
15 포함하는 펩타이드가 혈관 내에 이미 생성된 혈전을 효과적으로 용해하는 활성을 가진다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

본 명세서에서 용어 “Arg-Gly-Asp 모티프를 포함하는 펩타이드”는 혈전 내 존재하는 인테그린에 결합하여 혈전을 용해해 낼 수 있는 아미노산 기반 분자를 포괄하는 개념으로서 펩타이드의 길이, 변형(modification)  
20 여부, 전기적 특성 등을 불문하고 인테그린 인식 부위인 Arg-Gly-Asp 모티프를 포함하는 것이라면 제한 없이 사용될 수 있다.

본 발명의 혈전 용해용 조성물의 유효성분으로 사용되는 Arg-Gly-Asp 모티프를 포함하는 펩타이드는 혈전 내 존재하는 인테그린, 바람직하게는 혈전을 구성하는 혈소판 표면의 GP(glycoprotein)IIb-IIIa 에  
25 경쟁결합(competition binding)의 원리로 결합하여 혈소판 등을 피브리노겐 등 혈전의 구성 성분으로부터 떼어 내는 원리로 혈전을 효율적으로 분해한다.

일 구현예에서, 본 발명의 Arg-Gly-Asp 모티프를 포함하는 펩타이드는 서열목록 제 1 서열 내지 제 11 서열로 구성된 군으로부터  
30 선택되는 어느 하나의 서열로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이다.



없이도 단독으로 이미 형성된 혈전을 매우 효과적으로 용해해내며, 재폐색이나 출혈 등의 부작용도 거의 발생시키지 않는다.

일 구현예에서, 본 발명의 혈전 용해용 조성물은 플라스미노겐 활성화제(Plasminogen activator)를 포함하지 않는 것을 특징으로 한다.

5 다른 구현예에서, 본 발명의 혈전 용해용 조성물의 혈전 용해 유효성분은 Arg-Gly-Asp 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드만으로 이루어진 것을 특징으로 한다.

본 발명의 혈전 용해용 조성물은 상기 유효성분으로 사용되는 Arg-Gly-Asp 모티프를 포함하는 펩타이드 이외에도 약제학적으로 허용되는  
10 담체를 더 포함할 수 있다.

본 발명의 혈전 용해용 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,  
15 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*  
20 *Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 혈전 용해용 조성물을 포함하는 혈관 협착 또는 폐색성 질환의 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

25 본 발명의 혈관 협착 또는 폐색성 질환의 치료용 약제학적 조성물은 상기에서 상세히 설명한 혈전 용해용 조성물을 이용하여 혈전을 용해하여 치료할 수 있는 대상 질병을 치료하는 약제학적 조성물이기 때문에, 상기 혈전 용해용 조성물과의 관계에서 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

30 본 발명의 약제학적 조성물은 이미 생성되어 덩어리진 혈전을 효과적으로 용해하여 상기 다양한 혈관 협착 또는 폐색성 질환을 치료하는

데 그 특징이 있다. 즉, 본 발명의 약제학적 조성물은 단순히 혈전 생성을 예방하여 혈관 협착 또는 폐색성 질환을 치료하는 것이 아니라, 이미 생긴 혈전을 녹여내어 혈관을 효과적으로 뚫는 원리로 혈관 협착 또는 폐색성 질환을 치료한다.

5        본 명세서의 용어 “폐색(occlusion)”은 혈관이 완전히 막히거나 또는 부분적으로 막혀 혈관이 좁아져 있는 상태를 포괄하는 용어이다. 본 발명에서 언급된 폐색의 정도는 측정된 혈류량에 기초하여 판단될 수 있다. 즉, 폐색의 정도는 부분적 폐색(partial occlusion) 또는 완전 폐색(complete occlusion)으로 분류되며, 부분적 폐색은 정상  
10        혈류량(baseline blood flow)의 50-60% 수준으로 감소된 경우를 의미하며, 완전 폐색은 90-100% 수준으로 감소된 경우를 의미한다(참고: 도 2).

      본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분으로 포함되는 상기 혈전 용해용 조성물 이외에도 약제학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있으며, 이때 사용될 수 있는 담체는 상기에서 상세히 설명하였다.

15        본 발명의 약제학적 조성물은 정맥내 주입, 동맥내 주입, 국소 주입, 뇌실내 주입, 척수강 주입, 피하 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며 바람직하게는 혈관 내로 직접 주입되는 방식으로 투여될 수 있다. 혈관 내로 직접 투입되는 방식이란 동맥, 정맥, 모세혈관을 포함하는 혈관, 예컨대 대동맥, 경동맥, 쇄골하동맥, 복강동맥,  
20        장간막동맥(mesenteric arteries), 신동맥, 장골동맥, 소동맥, 모세혈관, 소정맥을 포함하는 혈관 내로 투여되는 것을 의미하며 혈전이 생긴 혈관 부위에 따라 적절하게 그 투여방법을 선택할 수 있다.

      본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로,  
25        배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-1000 mg/kg 이다.

      본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서  
30        통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써

단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

5 Arg-Gly-Asp 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드를 혈전 용해 유효 성분으로 함유하는 본 발명의 약제학적 조성물은 플라스미노겐 활성화제와 같은 기존의 알려진 혈전 용해제와 함께 사용될 수도 있으나, 기존에 알려진 다른 혈전 용해제 없이도 단독으로 이미 형성된 혈전을 매우 효과적으로 용해해내며, 재폐색이나 출혈 등의 부작용도 거의 발생시키지  
10 않는다.

일 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 플라스미노겐 활성화제(Plasminogen activator)를 포함하지 않는 것을 특징으로 한다.

다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 혈전 용해 유효성분은 Arg-Gly-Asp 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드만으로  
15 이루어진 것을 특징으로 한다.

본 발명의 약제학적 조성물에 의해 치료될 수 있는 질환은 다양한 혈관 협착 또는 폐색성 질환을 포함하며, 예컨대 뇌혈관질환(cerebrovascular disease, CVD), 심혈관질환(cardiovascular disease), 동맥경화성 혈관질환(arteriovascular disease),  
20 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD), 말초혈관질환(peripheral artery disease, PAD) 등이 있으며, 바람직하게는 뇌졸중, 뇌경색, 뇌혈전증, 뇌색전증, 열공성 뇌경색, 급성 관동맥 증후군, 협심증, 대동맥 협착증, 심근경색증, 각차단, 뇌허혈, 급성 허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event), 혈전성 정맥염, 정맥혈전색전증,  
25 심부정맥혈전증(deep vein thrombosis), 폐색전증(pulmonary embolism), 말초혈관질환, 아테롬성 동맥경화증, 혈관경련, 재협착증, 기구 혈관형성술 이후 재협착증 및 혈관염에 의한 혈관 폐색증이고, 가장 바람직하게는 뇌졸중, 뇌경색, 뇌혈전증, 뇌색전증, 심근경색증이다.

본 명세서의 용어 “뇌혈관질환(cerebrovascular disease, CVD)”은  
30 산소-풍부 혈액을 안면 및 뇌에 공급하는 혈관에서 일어나는 동맥경화성 혈관질환으로, 일반적으로 CAD 및/또는 PAD(peripheral artery disease)와

함께 발생하는 동반질환(comorbid disease) 뿐 아니라, 허혈성 질환 또는 혈류량의 부족을 야기하는 질환도 포함한다. 예를 들어, CVD 는 허혈성 뇌혈관질환, 급성 뇌경색, 뇌졸중, 허혈성 뇌졸중, 출혈성 뇌졸중, 정맥류, 경증인지장애(mild cognitive impairment, MCI) 또는 일과성 허혈발작(transient ischemic attacks, TIA)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 명세서의 용어 “심혈관질환(cardiovascular disease)” 또는 “동맥경화성 혈관질환(arteriosclerotic vascular disease)” 은 심장, 심장 판막, 혈액 및 몸의 혈관구조(vasculature)에 영향을 미치는 수많은 상태를 분류하는데 이용되는 일반적인 용어로, 심장 또는 혈관에 영향을 미치는 질병들을 포함한다. 바람직하게는, 대사증후군, 증후군 X, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 대동맥 협착증 또는 대동맥류 같은 대동맥 질환, 뇌혈관질환, 말초혈관질환 또는 급성 허혈성 동맥경화성 이벤트를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 일반적으로, 본 명세서의 용어 “동맥경화성 혈관질환(arteriosclerotic vascular disease)” 는 비-허혈성 질환보다는 허혈성 질환 또는 허혈유발성(proischemic) 질환을 의미한다.

본 명세서의 용어 “관상동맥질환(coronary artery disease, CAD)” 은 심근에 혈액을 공급하는 동맥(관상동맥)이 죽상경화(atherosclerotic), 칼슘 침전에 의한 경화 및/또는 좁아져서 발생하는 동맥경화성 혈관질환을 의미한다. CAD 는 심근으로의 혈류량 감소를 초래하며 이에 따라 심근이 충분한 양의 산소를 공급받지 못하고 궁극적으로 괴사(necrosis)를 야기한다. CAD 는 급성 관상동맥증후군, 심근경색(심장마비), 협심증(안정 및 불안정) 또는 심장으로 혈액을 공급하는 혈관에서 발생하는 아테롬성 동맥경화증 및 죽상혈전증을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 명세서의 용어 “말초혈관질환(peripheral artery disease, PAD)” 은 심장 및 뇌 이외의 곳에서 발생하는 아테롬성 동맥경화증 및 죽상혈전증 같은 질환으로 일반적으로 CAD 와 함께 발생하는 동반질환(comorbid disease)을 포함한다.

본 발명의 약제학적 조성물은 단순히 혈전 생성을 예방하는 원리로 상기 질병들을 예방 또는 치료하는 것이 아니라, 이미 생긴 혈전을 녹여내어 혈관을 효과적으로 뚫는 원리로서 상기 혈관 협착 또는 폐색성 질환을 치료하는 데 그 특징이 있다.

5           예컨대 뇌경색의 경우, 혈전 생성을 예방하는 방식의 약제학적 조성물(예컨대, 아스피린)은 이미 잘 알려져 있다. 그러나, 일단 혈전이 생성되고 뇌혈관을 폐색시켜 뇌경색이 발병한 이상 이를 효과적으로 치료할 수 있는 약제학적 조성물은 거의 없는 실정이며, 플라스미노겐 활성인자(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)의 정맥내  
10           투여에 의한 치료법은 뇌경색 발병 후 3 시간 내에 행할 수 있는 현재 유일하게 승인된 뇌경색 치료법이다. 하지만, 플라스미노겐 활성인자를 이용한 치료법의 경우 상기와 같은 시간적 제한을 받을 뿐만 아니라, 절반 이상의 환자들이 혈전용해 치료 후 성공적인 재관통(recanalization)을 이루는데 실패하는 현실에서, 이미 생성된 혈전을 효과적으로 용해해 낼 수  
15           있는 본 발명의 약제학적 조성물은 일단 발병한 혈관 협착 또는 폐색성 질환의 치료에 있어 매우 현실적이고 획기적인 방안이라 할 것이다. 그 뿐만 아니라, 본 발명의 혈관 협착 또는 폐색성 질환의 치료용 약제학적 조성물은 미세 혈관의 폐색도 효과적으로 치료하며 또한 재협착도 일으키지 않는다는 점에서 그 가치가 크다고 할 것이다.

20

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 3 서열 내지 제 11 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 혈전 용해 활성을 갖는 펩타이드를 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Arg-Gly-Asp  
25           모티프(motif)를 포함하는 펩타이드를 혈관에 투여하는 단계를 포함하는 혈전 용해방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Arg-Gly-Asp  
                  모티프(motif)를 포함하는 펩타이드를 혈관에 투여하는 단계를 포함하는 혈관의 협착 또는 폐색성 질환의 치료방법을 제공한다.

30           본 발명의 혈전 용해 방법 및 혈관 협착 또는 폐색성 질환의 치료방법은 상기에서 상세히 설명한 펩타이드를 이용하여 혈전을 용해하는

방법이기 때문에, 상기 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

본 발명의 펩타이드는 삭사틸린의 아미노산 서열(서열목록 제 12 서열)에 기반한 삭사틸린 유도체(즉, 결실 돌연변이체(deletion mutant))로 삭사틸린의 활성, 즉 형성된 혈전에 대한 용해능을 보다  
5 효율적으로 나타낼 수 있는 서열을 예측하여 최적화된 아미노산 서열로 제조된다.

본 발명에서 제공되는 삭사틸린 유도체는 full-length 삭사틸린보다 약제학적으로 우수한 특성을 갖는다.

10 우선, 본 발명에서 제공되는 삭사틸린 유도체는 full-length 야생형 삭사틸린과 비교하여 길이가 짧지만, 혈전 용해능이 유사하다(참조: 도 7 및 도 8).

둘째, 본 발명에서 제공되는 삭사틸린 유도체는 full-length 야생형 삭사틸린과 비교하여 면역원성이 감소되어 면역반응을 덜 유도하기 때문에,  
15 full-length 야생형 삭사틸린과 비교하여 안전성(safety)이 우수하다.

세 번째, 본 발명에서 제공되는 삭사틸린 유도체는 full-length 야생형 삭사틸린과 비교하여 혈전용해치료에서 재관통 이후의 재폐색 빈도 및 혈류량 증감의 정도가 현저히 감소되어 안정적으로 정상혈류량을 유지하는 경향을 나타낸다(참조: 도 7 및 도 8). 이와 같은 삭사틸린  
20 유도체의 혈전 용해 패턴은, 야생형 삭사틸린과 비교하여 치료학적으로 효능의 증대 및 부작용의 감소를 초래한다.

본 명세서에서 용어 “펩타이드”는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다.

본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques)에 따라 제조될 수  
25 있다(Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-54(1963); Stewart, et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)).

본 발명의 펩타이드는 그 자체로서 천연의 삭사틸린보다 안정성이  
30 우수하지만, 아미노산의 변형에 의해 안정성이 더욱 향상될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 펩타이드의 C-말단은 히드록시기(-

OH) 또는 아미노기(-NH<sub>2</sub>)로 변형될 수 있으며, 상기 펩타이드의 N-말단은 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 구성된 군으로부터 선택되는 보호기가 결합될 수 있다.

5 상술한 아미노산의 변형은 본 발명의 펩타이드의 안정성을 크게 개선하는 작용을 한다. 본 명세서에서 용어 “안정성”은 인 *비보* 안정성 뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미한다. 상술한 보호기는 생체 내의 단백질 절단효소의 공격으로부터 본 발명의 펩타이드를 보호하는 작용을 한다.

10 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 Arg-Gly-Asp 모티프를 포함하는 펩타이드는 SX1(서열목록 제 3 서열), SX2(서열목록 제 4 서열), SX3(서열목록 제 5 서열), XL1(서열목록 제 6 서열), XL2(서열목록 제 7 서열), XL3(서열목록 제 11 서열), LS1(서열목록 제 8 서열), LS2(서열목록 제 9 서열) 및 LS3(서열목록 제 10 서열)을  
15 포함하고, 보다 더 바람직하게는 SX1, SX2, SX3 및 XL2 을 포함하며, 보다 더욱 더 바람직하게는 SX1 및 SX3 을 포함하고, 가장 바람직하게는 SX1 을 포함한다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 방법은 형성된 혈전에 의한 혈관의 치료에 매우 효과적으로 적용될 수 있다. 즉, 본 발명의 Arg-Gly-Asp  
20 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드는 혈전 형성을 억제할 수 있을 뿐 아니라, 이미 형성된 혈전을 효과적으로 용해할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 혈관 폐색(부분 또는 완전 폐색)이 발생한 환자(예컨대, 뇌경색 환자)에게 적용되어 이미 형성된 혈전을 용해시킴으로써 매우 효율적으로 치료에 적용될 수 있다.

25 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 Arg-Gly-Asp 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드의 처리 농도는 1-100 mg/kg 이고, 보다 더 바람직하게는 5-70 mg/kg 이며, 가장 바람직하게는 10-40 mg/kg 이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 동물은 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 포유동물이고, 보다  
30 바람직하게는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양,

개 또는 고양이를 포함하며, 보다 더 바람직하게는 인간 또는 마우스를 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 동물 혈관은 동맥, 정맥, 모세혈관을 포함하고, 보다 바람직하게는 대동맥, 경동맥, 쇄골하 동맥, 복강동맥, 장간막동맥(mesenteric arteries), 신동맥, 장골동맥, 소동맥, 모세혈관, 소정맥을 포함하며, 가장 바람직하게는 대동맥 또는 경동맥을 포함한다.

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

10 (i) 본 발명은 Arg-Gly-Asp 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드를 포함하는 혈전 용해용 조성물, 이를 포함하는 혈관 협착 또는 폐색성 질환의 치료용 약제학적 조성물, 그리고 이를 투여하는 단계를 포함하는 혈전 용해방법 및 혈관 협착 또는 폐색성 질환의 치료방법에 관한 것이다.

15 (ii) 본 발명의 조성물 및 방법은 기존의 플라스미노겐 활성화 원리가 아닌 혈소판 표면 GPIIb-IIIa 와 같은 혈전 내 인테그린 타겟 원리를 채택하여, 이미 생성된 혈전을 효과적으로 분해하는 장점이 있다.

(iii) 또한, 본 발명의 조성물 및 방법은 관통 후 재협착도 일으키지 않고, 미세혈관까지 효과적으로 개방시키며 신경보호 효능이 있다.

20 **【도면의 간단한 설명】**

도 1a 는 FeCl<sub>3</sub>-처리에 따른 폐색 패턴을 보여주는 결과로, FeCl<sub>3</sub>-처리 후 혈류량이 감소하다가 혈관이 완전히 폐색되어 유지되었다.

25 도 1b 는 실제 혈관에 생성된 혈전을 검출하기 위한 H&E 염색 결과로, 다섯 마리의 마우스에서 생성된 혈전의 크기를 측정한 결과, 균일한 크기의 혈전이 생성되어 혈전용해제에 의한 효과를 검증하기에 적합한 모델로 판단되었다.

도 2 는 정상 혈관 및 폐색된 정도가 상이한 혈관에서 측정된 혈류량, 그리고 이의 혈관에 형성된 혈전을 검출한 결과이다.

30 도 3 은 실시예에서 사용한 재조합 삭사틸린의 투여량에 따른 혈류량의 변화를 측정한 그래프이다. 삭사틸린의 투여량이 증가함에 따라

혈류량(혈류시간 곡선 아래의 면적)이 거의 기본 레벨(baseline)로 회복되었다(5 mg/kg 과 10 mg/kg 의 삭사틸린 투여군).

도 4 는 실시예에서 사용한 삭사틸린의 투여방법에 따른 혈전용해 효능을 비교한 결과이다. 패널 A 의 파란색 화살표는 재폐색이 일어나는 시점을 나타낸다. 패널 A 의 B 는 볼루스 주입(bolus injection)을 의미하며, I 는 연속적인 정맥 내(intravenous) 주입을 나타낸다.

도 5 는 실시예에서 사용한 삭사틸린의 투여량에 따른 혈전용해 효능을 측정한 결과이다. FeCl<sub>3</sub>-유도된 동물에 지시된 농도의 삭사틸린을 투여하여 2 시간 동안 혈류량을 연속적으로 모니터링하였다.

도 6 은 삭사틸린과 삭사틸린 유도체(SX1 및 SX3)의 혈소판 응집 억제 정도를 측정한 결과이다.

도 7 은 40 mg/kg 의 삭사틸린과 삭사틸린 유도체(SX1 및 SX3)의 처리를 통한 혈류량의 변화를 측정한 결과이다.

도 8 은 20 mg/kg 의 삭사틸린과 삭사틸린 유도체(SX1 및 SX3)의 처리를 통한 혈류량의 변화를 측정한 결과이다.

**【실시예】**

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

**실시예**

**25 실험방법**

**실험 동물 및 FeCl<sub>3</sub>에 의한 혈전생성모델**

8 주령의 수컷 ICR(Institute of Cancer Research) 마우스(주 오리엔트 바이오)를 이용하였다. 실험실 동물의 관리 및 이용은 이에 대한 NIH 의 지침에 합당한 제도적으로 승인된 프로토콜에 따라 실시하였다. 수술 과정을 살펴보면, 동물은 70% N<sub>2</sub>O 및 30% O<sub>2</sub> 의 혼합물 내 5% 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취는 2% 이소플루란으로

유지시켰다. 수술 과정 동안, 동물의 체온은 직장용 프로브로 지속적으로 모니터링하였으며, 항온피복 조절 유니트(Homeothermic blanket control unit) 및 히팅 패드(Harvard Apparatus, Holliston, MA)를 이용하여  $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. 삭사틸린의 인 비보 혈전용해 활성을 테스트하기 위해  $\text{FeCl}_3$ (Sigma Aldrich, USA)으로 유도된 경동맥 혈전 모델을 이용하였다. 5 경부 정중절개(midline cervical incision)를 실시하여 좌측 총경동맥을 수술 현미경하에서 조심스럽게 해부하였다. 초음파 도플러 유속프로브(ultrasonic Doppler flow probe; Transonic MA0.7PSB)를 총경동맥(CCA)의 중앙부위에 위치시켰다. 경동맥 혈류량은 초음파 TS420 10 혈류량계(Transonic Instruments, Ithaca, NY) 및 iWorx IX-304T 데이터 획득 시스템(iWorx Systems, Inc., Dover, NH)을 이용하여 측정하였다. 대조군으로서 CCA 의 기본 혈류량을 5 분 동안 측정하였다. 대조군 기본 혈류량의 결정 후, 프로브를 제거하였다. 노출된 CCA 중앙지점의 바깥쪽 표면(adventitial surface)에 50%  $\text{FeCl}_3$  로 포화된 여과지( $700 \times 500 \mu\text{m}$ )를 15 5 분 동안 접촉시킴으로써 화학적 스트레스에 의한 산화적 혈관 손상이 유도되었다. 여과지를 제거한 후, CCA 를 생리식염수로 세척하고 이의 혈류량을 측정하였다. 혈류량의 감소를 통해 혈전 형성 및 동맥 폐색을 결정하였으며, 완전 폐색(complete occlusion)은 혈류가 10 분 동안 부재한 경우로 정의되었다.

20

#### 혈전의 조직학적 분석 및 크기 측정

혈전 형성 및 크기에서 모델의 일치성(consistency)을 평가하였다. 완전 폐색 10 분 후, 손상된 CCA 절편들을 적출하여 4% 파라포름알데하이드에 담가 고정시키고 조직학적 분석을 위해 파라핀에 25 임베드시켰다. 파라핀 블록을  $3 \mu\text{m}$ -두께로 수직방향으로 연속적으로 절단하였다. 절단된 슬라이스들을 유리 슬라이드에 마운팅하여 헤마톡실린(Dako, Denmark) 및 에오신(Sigma Aldrich, USA)으로 염색하였다. 각 동물에서 혈전의 크기(수직 길이 및 영역)는 가장 큰 혈전 크기를 보이는 슬라이스에서 Scion 이미지 분석 소프트웨어(Scion Co., Frederick, 30 MA, USA)를 이용함으로써 측정하였다.

### 혈전용해 제제로 사용한 재조합 삭사틸린

본 실시예에서 혈전용해 제제로 사용한 삭사틸린(recombinant saxatilin)은 대한민국 공개특허 제 2002-0064787 호에 기재된 방법에 따라 분리 정제한 재조합 삭사틸린 단백질을 사용하였으며 그 아미노산 서열은  
5 서열목록 제 12 서열에 나타내었다.

### 재조합 삭사틸린에 의한 정맥내 혈전용해

CCA 폐색 10 분 후, PE-10 튜빙과 연결된 주입펌프(KD Scientific Inc., USA)을 이용하여 좌측 대퇴부 정맥을 통해 삭사틸린을  
10 정맥내투여하였다. 경동맥 혈류량을 주입 개시시간부터 2 시간동안 연속적으로 모니터링하였다.

### 삭사틸린의 용량-반응(dose response)

삭사틸린의 용량-반응을 조사하기 위해, 동물을 임의적으로 7 개의  
15 군(각 군은 5 마리의 마우스를 포함)으로 나누었다: 생리식염수(대조군), 1, 1.75, 2.5, 3.75, 5.0 및 10.0 mg/kg 의 삭사틸린이 투여된 군. 투여량(dose)의 10% 정도는 볼루스(bolus)로 정맥 내 투여하고 나머지는 60 분 동안 연속적으로 주입되었다.

### 20 삭사틸린의 투여방법

혈전용해에 있어서 삭사틸린의 효과는 투여방법에 따라 평가되었다. 본 실험을 위해, 각 동물에서 5 mg/kg 의 삭사틸린의 총 투여량을 이용하였고 동물을 임의적으로 4 개의 군(각 군은 5 마리의 마우스를 포함)으로 나누었다: (a) 총 투여량(5 mg/kg)의 볼루스 주입; (b) 폐색  
25 후 10 분 쯤에 삭사틸린 투여량의 반(2.5 mg/kg)을 주입하고 첫 번째 볼루스 주입 후 60 분 쯤에 삭사틸린 투여량의 반을 주입하는 이중 볼루스 주입; (c) 폐색 후 10 분 쯤에 삭사틸린 투여량의 반(2.5 mg/kg)을 주입하고 나머지 투여량을 60 분 동안 연속적으로 주입; 및 (d) 폐색 후 10 분 쯤에 삭사틸린 투여량의 10%(0.5 mg/kg)를 주입하고 나머지(4.5 mg/kg)를 60 분  
30 동안 연속적으로 주입.

### 재관통의 확인

혈류량을 측정함으로써 재관통 여부 및 그 정도를 측정하였다. 기본 혈류량에 대한 데이터 및 CCA 폐색 후 2 시간동안 지속적으로 모니터링된 혈류량에 대한 데이터가 iWorx Labscribe2 데이터 획득 소프트웨어(version 2.045000)를 이용하여 얻어졌다. 혈류량 모니터링 후 2 시간째에 모든 마우스에서 CCA 를 얻어 4% 파라포름알데하이드 용액으로 고정하고 조직학적 조사를 위해 파라핀에 임베드시켰다. 파라핀 블록을 3  $\mu\text{m}$ -두께로 가로방향으로 연속적으로 절단하고 유리 슬라이드에 마운팅하여 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다.

10

### 삭사틸린의 용량-반응(dose response)

혈류시간(flow-time) 곡선 아래의 면적에 의해 경동맥 혈류량을 분석하였다. 동물들 간의 생리학적 조건의 변이에 따라 야기되는 오차(differences)를 피하기 위해, 모든 측정된 수치들은 각 동물의 최소 혈류에 의해 표준화시켰다. 혈전용해 효과를 아래와 같이 계산하고 정상 혈류량의 평균값에 대한 백분율로 표시하였다: (삭사틸린 투여 후 2 시간동안의 평균 혈류량/정상 혈류량의 평균값)  $\times$  100(%). 용량-반응 연구에서 각 군의 평균값이 계산되고 이를 용량반응곡선으로 나타냈다(평균값 $\pm$ 표준편차).

20

### 혈전용해 효과의 시간-패턴(Time-pattern)

각 동물에서 매 1 분 동안 혈류량의 평균을 계산하였고, 삭사틸린의 투여량 및 투여방법에 대해 각각 대표적인 패턴을 시간-의존적으로 보여줬다. 각 군에서 모든 동물의 평균값을 계산하였으며 시간에 따른 변화를 연속적인 막대그래프로 보여줬다(평균값 $\pm$ 표준편차).

25

### 재관통 시간

효과적인 재관통(effective recanalization)을 위한 삭사틸린의 투여 시기가 조사되었다. 효과적인 재관통은 정상 레벨의 50%의 혈류량이 회복되어 적어도 30 분 이상 지속되는 것으로 정의되었다.

30

## 멤독-유래 삭사틸린 유도체의 발현 시스템 확립

### 서열 최적화된 삭사틸린 유도체의 클로닝 및 pPIC9 벡터의 제작

삭사틸린 유도체의 발현 시스템으로 *Pichia* 발현 시스템을 이용하였으며, 이를 위한 벡터를 제작하였다.

- 5 먼저, 펩타이드 서열 최적화 단백질을 제작하기 위해, 삭사틸린 유전자가 *Pichia* 숙주세포 내에서 발현될 때 *Pichia* 코돈 선호도(codon usage frequency)에 적합하도록 코돈 최적화(codon optimization)를 수행하여 최적화된 유전자 뉴클레오타이드 서열로 변환하였다(서열목록 제 13 서열 내지 서열목록 제 21 서열). 상기 최적화된 유전자
- 10 뉴클레오타이드 서열은 *Pichia* 숙주세포(GS115, His<sup>-</sup>;쑤아이진)에서 발현시키기에 적합한 pPIC9 벡터(Invitrogen)에 클로닝하도록 고안하였다. 보다 상세하게는, 삭사틸린 유도체 유전자의 5' -부위에 *XhoI* 제한효소 위치를 포함시키고, 3' -부위에는 *EcoRI* 제한효소 위치를 포함시켰다. *Pichia* 숙주세포(GS115) 발현용 벡터인 pPIC9 벡터의 MCS(multicloning
- 15 site)에 위치한 *XhoI* 과 *EcoRI* 제한효소 사이에 유전자를 삽입시켰다. 상기 pPIC9 벡터에 클로닝된 삭사틸린 유전자는 N-말단 부위에 효모  $\alpha$ -factor 와 결합된 융합 단백질 형태로 발현되도록 제작하였다. 이때, 상기 효모  $\alpha$ -factor 는 단백질을 세포 외부로 분비하기 위한 시그널 서열로 기능하면서 세포 외부로 분비될 때 절단되어 제거되었다. 상기 합성된
- 20 삭사틸린은 배양액으로 분비되므로 회수한 배양액을 정제하여 유효활성 분석용 삭사틸린 시료로 이용하였다.

### 삭사틸린 유도체 발현 벡터 보존용 균주 제작

- 25 발현 벡터의 분리/정제 및 보존을 위하여 대장균(*DH5a*)에 형질전환 시켜 보존용 균주(Glycerol stock, -70°C 보관)를 제작하였다. *Pichia pastoris* 형질전환을 위하여, *Pichia* 숙주세포(GS115)의 형질전환 과정에서는 대장균 형질전환에 비하여 많은 양의 발현 벡터를 이용하였다. 상기 삭사틸린 유전자의 염색체 삽입 과정인 위치-특이적 재조합(site specific recombination)의 유도하기 위하여 발현 벡터의 특정 유전자
- 30 부위(*HIS4* locus) 절단을 통해 플라스미드 선형화시켰다(즉, pPIC9 벡터의

경우 *Sa*I 또는 *Stu*I 사용하여 절단). GS115 컴피턴트 세포에 10-50  $\mu$ g 의 선형화된 발현 벡터 플라스미드와 40  $\mu$ g 의 운반(carrier) DNA(salmon sperm DNA)를 혼합하여 형질전환시켰다. 이후, 성장이 양호한 단일 콜로니를 선별하였다. 형질전환으로 세포 내 도입된 삭사틸린 유전자가 *Pichia*(GS115) 염색체 상의 *his4* 유전자 사이에 삽입 되었는지를  
5 게놈 DNA 를 추출하여 PCR 방법으로 확인하였다.

### 삭사틸린 유도체의 발현 검증

유전자의 삽입이 확인된 *Pichia* 균주 중 일부를 선별하여 재조합 단백질의 발현을 확인하였다. 후보(candidate) 균주를 플라스크 규모로 배양하고 SDS-PAGE 방법으로 분석하였다.  
10

### 삭사틸린 유도체의 발현 및 정제

#### 활성 분석용 삭사틸린 유도체 시료 제작

삭사틸린 유도체 단백질 시료의 제조를 위하여, 상기 선별된 균주를 대량으로 플라스크 배양하였다. 배양 조건은 메탄올 투입량과 대사에 사용될 산소 공급을 증가시킨다는 점을 제외하고는 상기 균주 배양 조건과 동일하였다. 간략하게는, 상기 균주를 이용한 발효는 발효기 Fed-batch(KF7; (주)KBT)를 이용하여 30℃에서 실시하였다. 상기 발효기  
20 시스템은 7 리터(실제, 5 리터로 실시)이며, 제어 시스템은 온도/rpm/Air/O<sub>2</sub>/pH/DO 이고, 운전모드는 Batch & Fed-batch, 반-연속(Semi-continuous)모드였다. 우선, 상기 균주를 YNB 배지(1 리터 당 Yeast Nitrogen Base 1.7 g, 암모니움 설페이트 5.0 g, 포타슘 포스페이트(monobasic) 11.5 g, 포타슘 포스페이트(dibasic) 2.85 g, 글라이세롤 10 g)에서 하루 동안 배양하고, 얻어진 상기 배양액을 batch 배양(pH 5.0; Start-up Medium, 2 리터 당 인산 54 ml, 칼슘 설페이트(무수) 1.8 g, 포타슘 설페이트 36 g, 마그네슘 설페이트(7H<sub>2</sub>O) 30 g, 포타슘 하이드록사이드 8.26 g, 글라이세롤 80 g, TMS(Trace metal solution) 8.8 ml)로 하루 동안 배양시켰다. 상기 TMS 용액(실은 보관)은 적량의  
25 증류수에 CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O 6.0 g, MnSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O 4.28 g, ZnCl<sub>2</sub> 20.0 g, FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 65.0 g, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 ml, NaI 0.08 g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.2 g, Boric acid 0.02 g,  
30

CoCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.92 g, Biotin 0.2 g 을 순서대로 첨가하여 잘 녹인 후, 1 리터로 부피를 맞추고 0.2 μm 필터로 멸균하여 제작하였다. 상기 batch 배양액을 8-10 시간 동안 Glycerol Fed-batch 배양(GFBM, pH 5.0; 0.5 리터의 글라이세롤을 0.5 리터의 증류수와 혼합하여 스티프 멸균시키고  
5 실온으로 냉각시킨 다음 GFBM 1 리터 당 12 ml 의 TMS 를 첨가하여 제작하였다)을 실시하였다. 상기 배양액에 메탄올(MeOH)을 3 시간 동안 처리하여 단백질 유도를 시킨 후, 3 일 동안 MeOH Fed-batch 배양(MFBM, pH 5.0; 99.9% 공업용 메탄올 1 리터 당 TMS 12 ml 를 혼합하여 제작하였으며, 별도의 멸균처리없이 즉시 사용하였고, 용기 및 배관은 스티프 멸균하여  
10 사용하였다)을 실시하였다. 상기 배양은 필요에 따라 MeOH 반-연속 배양으로 실시하였다. 이때, MeOH 처리율(feed rate)은 DO-STAT(DO set pt., min. 6ppm)을 이용하여 1 일째에는 6-15 ml/liter/hr 이고, 2-3 일째에는 15-20 ml/liter/hr 였다. 한편, 산소는 GFBM 배양부터 공급하였으며, 순수 산소의 공급량은 0.2-0.4 vvm 이었다.

15

#### 삭사틸린 유도체의 분리 정제 프로토콜

삭사틸린 유도체들(SX1, SX2, SX3, XL1, XL2, XL3, LS1, LS2 및 LS3)의 분리 정제는 다음과 같이 실시하였다.

먼저, 삭사틸린 유도체가 형질전환된 효모 균주는 고밀도 세포배양된  
20 후, 발효 상층액(supernatant)을 회수하였다. 레진 흡착을 위해 상기 상층액에 암모늄 설페이트(A/S)를 2 M 의 농도까지 전처리하고, 캡처 크로마토그래피(Capturing chromatography)를 실시하였다. 페닐 세파로오스 6FF 레진을 75 ml 의 Phenyl Sepharose FF(GE Healthcare) 컬럼에 패킹한 후, 상기 상층액을 로딩하였다. 보다 규모가 큰(scale-up)  
25 개선 프로토콜에 따라 발효상층액을 흡착시키고 5 배의 컬럼 용량(5 CV)의 평형화 완충액(2.0 M A/S in PBS) 및 4 배의 컬럼 용량(4 CV)의 세척 완충액(1.5 M A/S in x0.5 PBS)으로 세척한 후, 1.0 M, 0.8 M, 0.7 M, 0.5 M A/S 농도로 활성 풀(active pool)을 용출한 결과, 'x0.5 PBS 완충액 + 0.8 M A/S' 의 용출 완충액을 이용하여 용출한 결과가 품질과 수율 면에서  
30 가장 우수하였다. 컬럼의 재활성화(Regeneration)는 3 배의 컬럼 용량(3 CV)의 1 N NaOH 및 5 배의 컬럼 용량(5 CV)의 증류수로 실시하였다.

둘째로, 상기 얻어진 용출 완충액을 이용하여 연마성 크로마토그래피를 실시하였다. 상기와 동일한 조건의 전처리 후, 레진을 215 ml 의 SOURCE30 RPC/FINELINE Pilot35(GE Healthcare) 컬럼에 패킹한 후, 상기 용출 완충액을 로딩하여 흡착시켰다. 5 배의 컬럼 용량(5 CV)의 평형화 완충액(0.1% TFA in DDW) 및 5 배의 컬럼 용량(5 CV)의 세척 완충액(0.1% TFA in 10% Acetonitrile(ACN))으로 세척한 후, 활성 풀을 3 배의 컬럼 용량(3 CV)의 용출 완충액(0.1% TFA in 30% ACN)으로 용출하였다. 이후, 컬럼의 재활성화는 3 배의 컬럼 용량(3 CV)의 0.1 N NaOH(in 40% ACN)로 실시하였다.

세 번째로, Sephadex LH20 크로마토그래피(GE Healthcare)를 실시하였다. 우선, RPC 로부터 얻어진 활성 풀은 정제품으로 적용하기 위해 최종 보관용 완충액으로 교환하였다. 이를 위해, MWCO 5KDa UF 를 사용하였는데, 삭사틸린 분자량이 7.7 kDa 이라서 다소간 수율 감소가 예상되었으며, 최종 결과에서도 10% 이상의 감소를 나타냈다. 특히, RPC 활성 풀에는 유기용매인 아세토니트릴이 약 30% 정도 포함되어 있기 때문에 유기용매를 사용할 수 있는 UF 막을 사용하였다. 한편, UF 범 대안으로 젤 여과(Gel Filtration)를 사용할 수 있는데, Sephadex LH20 은 유기용매를 사용할 수 있는 레진으로서 삭사틸린 탈염에 매우 적합하고, 이를 실시하여 최종 삭사틸린 유도체를 얻었다.

얻어진 삭사틸린 유도체를 0.2  $\mu\text{m}$  의 필터를 이용하여 멸균한 후, 순도를 측정하였다. 이후, 고순도의 삭사틸린 유도체를 동결 건조하고 멸균 패킹하여 투여 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

이후, 삭사틸린 유도체에 의한 정맥내 혈전용해 및 용량-반응은 상술한 제조합 삭사틸린의 방법과 동일하게 실시하였다(도 7 및 도 8).

## 실험 결과

### 동물 모델의 일치성

$\text{FeCl}_3$  를 5 분 동안 처리한 후, CCA 의 혈류량은 조사된 모든 동물에서 거의 제로까지 빠르고 지속적으로 감소하였다(도 1a). CCA 의 혈전성 폐색을 조직학적 분석으로 확인하였다(도 1b). 혈전의 크기는 동물들 간에 유사하였다(길이,  $1.139 \pm 0.091$  mm; 면적,  $0.799 \pm 0.139$  mm<sup>2</sup>).

5 삭사틸린 처리군의 혈관을 조직학적으로 분석한 결과, 혈류량이 완전히 회복된 마우스의 경동맥 내부에서는 혈전이 거의 모두 소실된 것이 관찰되었으나 부분적으로 회복된 마우스에서는 혈전이 일부 남아있었으며, 혈류량이 전혀 회복되지 않은 경우에는 혈관이 혈전에 의해 여전히 폐색되어있는 것을 확인하였다(도 2).

**삭사틸린의 투여량-의존적 혈전용해 효과**

r-삭사틸린의 투여량-의존적 효과는 혈류시간(flow-time) 곡선 아래의 면적에 대한 데이터를 이용하여 평가하였다(도 3). 생리식염수 10 처리군( $2.47 \pm 1.07\%$ )과 비교하여 삭사틸린 처리군은 1 mg/kg( $2.36 \pm 0.78\%$ ) 또는 1.75 mg/kg( $4.97 \pm 3.94\%$ )의 투여량에서 눈에 띄는 변화를 야기하지 않았다. 혈류량의 회복은 2.5 mg/kg( $32.50 \pm 33.70\%$ )의 투여량에서부터 관찰되었으며, 투여량-의존적으로 증가하였다. 혈류는 5 mg/kg 의 삭사틸린의 투여로 거의 정상 수준( $94.50 \pm 20.47\%$ )까지 15 회복되었다. 5 mg/kg 과 10 mg/kg 의 삭사틸린 투여군 간에 뚜렷한 차이가 없었다.

**투여방법에 따른 삭사틸린의 효과**

최적화된 삭사틸린의 정맥 내 투여방법은 용량-반응 연구에서 충분한 20 효과를 나타낸 5 mg/kg 의 총 투여량을 이용하여 결정하였다. 정상 혈류량과 비교하여 투여군들에서의 혈류량의 평균백분율은 다음과 같다: (a) 총 투여량(5 mg/kg)의 볼루스 주입군,  $77.01 \pm 46.11\%$ ; (b) 투여량의 반을 각각 이용한 이중 볼루스 주입군,  $85.23 \pm 29.95\%$ ; (c) 투여량의 반을 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 군,  $80.72 \pm 30.13\%$ ; 및 25 (d) 총 투여량의 10%를 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 군,  $94.50 \pm 20.47\%$ .

혈전용해 효과의 감소는 투여방법에 따라 다른 시점(time points)에서 관찰되었다. 갑작스런 재폐색은 다음과 같은 시점에 관찰되었다: (a) 이중 볼루스 주입된 마우스에서 첫 번째 주입 후 약 30 50 분 쯤; (b) 총 투여량의 볼루스 주입 후 약 100 분 쯤; 및 (c) 투여량의 절반이 볼루스 주입되고 나머지가 연속적으로 주입된 후 약 110 분 쯤(도 4).

총 투여량의 10%를 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 마우스에서는 어떠한 재폐색도 관찰되지 않았다.

#### 삭사틸린에 의한 재관통 시간

- 5 생리식염수가 투여된 마우스 및 1 mg/kg 또는 1.75 mg/kg 의 삭사틸린이 투여된 마우스에서는 효과적인 재관통이 관찰되지 않았다. 2.5 mg/kg 의 삭사틸린이 투여된 다섯 마리의 마우스 중 두 마리, 및 3.75 mg/kg 의 r-삭사틸린이 투여된 다섯 마리의 마우스 중 세 마리에서만 효과적인 재관통이 일어났다.
- 10 효과적인 재관통은 정상 혈류량의 50% 이상이 회복되어 적어도 30 분 이상 지속되는 것으로 정의되었다(도 5). 5 mg/kg 또는 10 mg/kg 의 r-삭사틸린이 투여된 모든 마우스에서 효과적인 재관통이 관찰되었다(도 5). 효과적인 재관통 시간은 투여량에 따라 다음과 같다: (a) 2.5 mg/kg 의 r-삭사틸린이 투여된 마우스, 32.92±23.52 분; (b) 3.75 mg/kg 의 삭사틸린이 투여된 마우스, 21.75±21.62 분; (c) 5 mg/kg 의 삭사틸린이 투여된 마우스, 13.92±6.02 분; 및 (d) 10 mg/kg 의 삭사틸린이 투여된 마우스, 19.46±19.75 분. 또한, 효과적인 재관통은 삭사틸린의 투여방법에 따라 평가하였다. 총 투여량의 볼루스 주입으로 처리된 두 마리의 마우스를 제외하고 5 mg/kg 의 삭사틸린이 처리된 모든 마우스는 효과적인 재관통을 나타냈다. 효과적인 재관통 시간은 다음과 같다: (a) 총 투여량의 볼루스 주입군, 2.86±0.22 분; (b) 이중 볼루스 주입군, 13.44±26.31 분; (c) 투여량의 반을 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 군, 19.48±25.94 분; 및 (d) 총 투여량의 10%를 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 군, 13.92±6.02 분. 효과적인 재관통 시간은 총 투여량의 10%를 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 군보다 총 투여량의 볼루스 주입군에서 더 짧았다( $p = 0.004$ ).

#### 삭사틸린 처리 후 사망률 및 출혈

- 총 51 마리의 동물을 삭사틸린의 혈전용해효과의 검증에 이용하였다. 이들 중, 5 mg/kg 의 삭사틸린의 볼루스 주입 후 약 90 분 쯤에 경부절개

위치에서의 출혈로 인해 한 마리의 동물이 사망하였으며, 다른 한 마리는 사망하지는 않았지만 동일한 부위에서의 출혈을 보였다.

삭사틸린 유도체의 활성 측정

5 인 비트로 혈소판 응집 어세이

마우스 PRP(platelet rich plasma)에 삭사틸린 유도체 및 ADP 를 투여하여 응집측정기(Aggregometer; CHRONO-LOG, USA)를 이용하여 응집 정도를 측정하여 본 발명의 삭사틸린 유도체의 활성을 평가하였다(표 1).

10 표 1. 재조합 삭사틸린 및 삭사틸린 유도체들의 인 비트로 활성

억제제	IC <sub>50</sub> (nM)
삭사틸린	176
SX1	349
SX2	991
SX3	918
XL1	1,007
XL2	986
XL3	1,064
LS1	1,117
LS2	1,009
LS3	1,003

표 1 및 도 6 에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 삭사틸린 유도체인 SX1(349) 및 SX3(918)의 활성이 가장 높았으며, 삭사틸린과 유사한 혈소판 억제 패턴을 확인할 수 있었다.

15 종합해 보면, 상기 모든 삭사틸린 및 삭사틸린 유도체의 효과 간에 약간의 차이가 존재할 지라도, 처리 농도의 범위에 따른 응집 억제의 정도를 비교한 경우에, 본 발명의 삭사틸린 유도체의 처리(예컨대, SX1, 1 μM; SX3, 4 μM)가 상기 삭사틸린(약 0.7 μM)의 효과와 유사함을 알 수 있었다(도 6).

삭사틸린 유도체의 혈전용해 효과

삭사틸린과 삭사틸린 유도체(SX1, SX3)의 혈전용해효과는 상기 실험들과 동일하게 혈류시간(flow-time) 곡선 아래의 면적에 대한 데이터를 이용하여 평가하였다(도 7 및 도 8). 삭사틸린 및 삭사틸린 유도체의

5 투여용량은 동일하게 처리하였다. 20 mg/kg 을 처리한 경우, 삭사틸린 투여군은 60.92 ± 39.52%의 혈류량을 회복하였고, SX1 투여군은 78.56 ± 16.24%, SX3 투여군은 69.15 ± 14.89%의 혈류량을 회복하였다. 40 mg/kg 의 용량을 투여했을 때에는 삭사틸린과 삭사틸린 유도체(SX1, SX3) 투여군 모두 정상혈류량까지 회복하여 재폐색 없이 유지되었다. 재폐색은

10 없었지만, 20 mg/kg 의 용량을 투여했을 때와 마찬가지로 기존 삭사틸린에 비해 삭사틸린 유도체(SX1, SX3)를 투여했을 때 혈류량 증감의 정도가 적어 혈류량이 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다(도 7). 20 mg/kg 의 투여용량에서는 혈류량이 회복된 정도에 큰 차이를 보이지 않았지만, 기존 삭사틸린에 비해 삭사틸린 유도체(SX1)에 의한 혈전용해치료에서 재관통

15 이후의 재폐색 빈도 및 혈류량 증감의 정도가 현저히 줄어 안정적으로 정상 혈류량을 유지하는 경향을 확인하였다(도 8).

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한

20 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 본 발명 의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참고문헌

25 (1995). "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group." N Engl J Med 333(24): 1581-1587.

Abou-Chebl, A., C. T. Bajzer, et al. (2005). "Multimodal therapy for the treatment of severe ischemic stroke combining GPIIb/IIIa antagonists and angioplasty after failure of thrombolysis." Stroke

30 36(10): 2286-2288.

- Abumiya, T., R. Fitridge, et al. (2000). "Integrin alpha(IIb)beta(3) inhibitor preserves microvascular patency in experimental acute focal cerebral ischemia." *Stroke* 31(6): 1402-1409; discussion 1409-1410.
- Adams, H., R. Adams, et al. (2005). "Guidelines for the early  
5 management of patients with ischemic stroke: 2005 guidelines update a scientific statement from the Stroke Council of the American Heart Association/American Stroke Association." *Stroke* 36(4): 916-923.
- Adams, H. P., Jr., M. B. Effron, et al. (2008). "Emergency  
10 administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II)." *Stroke* 39(1): 87-99.
- Alexandrov, A. V. and J. C. Grotta (2002). "Arterial reocclusion in  
15 stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator." *Neurology* 59(6): 862-867.
- Caplan, L. R., J. P. Mohr, et al. (1997). "Should thrombolytic therapy be the first-line treatment for acute ischemic stroke? Thrombolysis--not a panacea for ischemic stroke." *N Engl J Med* 337(18): 1309-1310; discussion 1313.
- 20 Chen, H., W. Mo, et al. (2007). "Characterization of a novel bifunctional mutant of staphylokinase with platelet-targeted thrombolysis and antiplatelet aggregation activities." *BMC Mol Biol* 8: 88.
- Chen, Z. L. and S. Strickland (1997). "Neuronal death in the  
25 hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin." *Cell* 91(7): 917-925.
- Choi, J. H., B. T. Bateman, et al. (2006). "Endovascular recanalization therapy in acute ischemic stroke." *Stroke* 37(2): 419-424.
- 30 Choudhri, T. F., B. L. Hoh, et al. (1998). "Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting

GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation." *J Clin Invest* 102(7): 1301-1310.

Cicccone, A., I. Abraha, et al. (2007). "Glycoprotein IIb-IIIa Inhibitors for Acute Ischemic Stroke." *Stroke*.

5 Eckert, B., C. Koch, et al. (2005). "Aggressive therapy with intravenous abciximab and intra-arterial rtPA and additional PTA/stenting improves clinical outcome in acute vertebrobasilar occlusion: combined local fibrinolysis and intravenous abciximab in acute vertebrobasilar stroke treatment (FAST): results of a  
10 multicenter study." *Stroke* 36(6): 1160-1165.

Hallenbeck, J. M. and A. J. Dutka (1990). "Background review and current concepts of reperfusion injury." *Arch Neurol* 47(11): 1245-1254.

Heo, J. H., K. Y. Lee, et al. (2003). "Immediate reocclusion following a successful thrombolysis in acute stroke: a pilot study." *Neurology*  
15 60(10): 1684-1687.

Hong, S. Y., Y. S. Koh, et al. (2002). "Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration." *Thromb Res* 105(1): 79-86.

20 Hong, S. Y., Y. D. Sohn, et al. (2002). "Structural and functional significance of disulfide bonds in saxatilin, a 7.7 kDa disintegrin." *Biochem Biophys Res Commun* 293(1): 530-536.

Hussain, M. S., R. Lin, et al. (2010). "Symptomatic delayed reocclusion after initial successful revascularization in acute  
25 ischemic stroke." *J Stroke Cerebrovasc Dis* 19(1): 36-39.

Jang, Y. J., O. H. Jeon, et al. (2007). "Saxatilin, a snake venom disintegrin, regulates platelet activation associated with human vascular endothelial cell migration and invasion." *J Vasc Res* 44(2): 129-137.

- Konstantinides, S., K. Schafer, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice." *Circulation* 103(4): 576-583.
- Kurz, K. D., B. W. Main, et al. (1990). "Rat model of arterial  
5 thrombosis induced by ferric chloride." *Thromb Res* 60(4): 269-280.
- Lopez-Yunez, A. M., A. Bruno, et al. (2001). "Protocol violations in community-based rTPA stroke treatment are associated with symptomatic intracerebral hemorrhage." *Stroke* 32(1): 12-16.
- Matys, T. and S. Strickland (2003). "Tissue plasminogen activator and  
10 NMDA receptor cleavage." *Nat Med* 9(4): 371-372; author reply 372-373.
- Nicole, O., F. Docagne, et al. (2001). "The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling." *Nat Med* 7(1): 59-64.
- Phillips, D. R., I. F. Charo, et al. (1988). "The platelet membrane  
15 glycoprotein IIb-IIIa complex." *Blood* 71(4): 831-843.
- Qureshi, A. I., A. M. Siddiqui, et al. (2004). "Reocclusion of recanalized arteries during intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke." *AJNR Am J Neuroradiol* 25(2): 322-328.
- Rha, J. H. and J. L. Saver (2007). "The impact of recanalization on  
20 ischemic stroke outcome: a meta-analysis." *Stroke* 38(3): 967-973.
- Seitz, R. J., M. Hamzavi, et al. (2003). "Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in stroke: preliminary observations." *Stroke* 34(8): 1932-1935.
- Seitz, R. J., S. Meisel, et al. (2004). "The effect of combined  
25 thrombolysis with rtPA and tirofiban on ischemic brain lesions." *Neurology* 62(11): 2110-2112.
- Shattil, S. J. and M. H. Ginsberg (1997). "Integrin signaling in vascular biology." *J Clin Invest* 100(11 Suppl): S91-95.
- Sohn, Y. D., S. Y. Hong, et al. (2008). "Acute and repeated dose  
30 toxicity studies of recombinant saxatilin, a disintegrin from the Korean snake (*Gloydius saxatilis*)." *Toxicon* 51(3): 406-417.

Wang, Y. F., S. E. Tsirka, et al. (1998). "Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice." *Nat Med* 4(2): 228-231.

5 Wardlaw, J. M., V. Murray, et al. (2009). "Thrombolysis for acute ischaemic stroke." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD000213.

Yepes, M., M. Sandkvist, et al. (2002). "Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent." *J Clin Invest* 109(12): 1571-1578.

【청구의 범위】

【청구항 1】

다음을 포함하는 혈전 용해용 조성물:

- 5 (a) Arg-Gly-Asp 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드의 약제학적 유효량; 및
- (b) 약제학적으로 허용되는 담체.

【청구항 2】

- 10 제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열목록 제1서열 내지 제11서열로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 서열로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 하는 혈전 용해용 조성물.

【청구항 3】

- 15 제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 디스인테그린(disintegrin) 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

- 20 제 3 항에 있어서, 상기 디스인테그린은 삭사틸린(saxatilin), 로도스토민(rhodostomin), 알보라브린(albolabrin), 아플라긴(applagin), 바실리신(basilicin), 바트록소스타틴(batroxostatin), 비티스타틴(bitistatin), 바부린(barbourin), 세레베린(cereberin), 세라스틴(cecastin), 크로타트록신(crotatroxin), 두리신(durissin),
- 25 에키스타틴(echistatin), 엘레간틴(elegantin), 에리스티코핀(eristicophin), 플라보리딘(flavoridin), 플라보스타틴(flavostatin), 할리신(halysin), 자라라신(jararacin), 자라스타틴(jarastatin), 자라린(jararin), 라체신(lachesin), 루토신(lutosin), 몰로신(molossin), 살모신(salmosin),
- 30 테르게미닌(tergeminin), 트리그라민(trigramin), 트리메스타틴(trimestatin), 트리무크린(trimucrin),

트리무타제(trimutase), 우슈리스타틴(ussuristatin) 및 비리딘(viridin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

5 【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 디스인테그린은 삭사틸린인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

10 제 5 항에 있어서, 상기 삭사틸린은 서열목록 제12서열의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

15 제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 혈전 내 존재하는 인테그린(integrin)에 결합하여 혈전을 분해하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 8】

20 제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 혈전을 구성하는 혈소판 표면의 GP(glycoprotein)IIb-IIIa에 결합하여 혈전을 분해하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 9】

25 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 플라스미노겐 활성화제(Plasminogen activator)를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

30 제 1 항에 있어서, 상기 조성물의 혈전 용해 유효성분은 Arg-Gly-Asp 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드만으로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 11】

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 혈관의 협착 또는 폐색성 질환의 치료용 약제학적 조성물.

5 【청구항 12】

제 11 항에 있어서, 상기 혈관의 협착 또는 폐색성 질환은 뇌졸중, 뇌경색, 뇌혈전증, 뇌색전증, 열공성 뇌경색, 급성 관동맥 증후군, 협심증, 대동맥 협착증, 심근경색증, 편두통, 각차단, 뇌허혈, 급성 허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event), 혈전성 정맥염, 10 정맥혈전색전증, 심부정맥혈전증(deep vein thrombosis), 폐색전증(pulmonary embolism), 말초혈관질환, 혈관성 두통, 아테롬성 동맥경화증, 혈관경련, 재협착증, 기구 혈관형성술 이후 재협착증 및 혈관염에 의한 혈관 폐색증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

15

【청구항 13】

제 12 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 혈관 내로 직접 주입되는 방식으로 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

20 【청구항 14】

제 12 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 혈전에 의해 혈관이 폐색된 환자에 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 15】

25 제 12 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 플라스미노겐 활성화제(Plasminogen activator)를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 16】

30 서열목록 제3서열 내지 제11서열로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 혈전 용해 활성을 갖는 펩타이드.

【청구항 17】

Arg-Gly-Asp 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드를 혈관에 투여하는  
5 단계를 포함하는 혈전 용해방법.

【청구항 18】

제 17 항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열목록 제1서열 내지  
제11서열로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 서열로 표시되는  
10 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 하는 혈전 용해방법.

【청구항 19】

제 17 항에 있어서, 상기 펩타이드는 디스인테그린(disintegrin)  
활성을 가지는 것을 특징으로 하는 혈전 용해방법.  
15

【청구항 20】

제 19 항에 있어서, 상기 디스인테그린은 삭사틸린(saxatilin),  
로도스토민(rhodostomin), 알보라브린(albolabrin), 아플라긴(aplugin),  
바실리신(basilicin), 바트록소스타틴(batroxostatin),  
20 비티스타틴(bitistatin), 바부린(barbourin), 세레베린(cereberin),  
세라스틴(cecastin), 크로타트록신(crotatroxin), 두리신(durissin),  
에키스타틴(echistatin), 엘레간틴(elegantin),  
에리스티코핀(eristicophin), 플라보리딘(flavoridin),  
플라보스타틴(flavostatin), 할리신(halysin), 자라라신(jararacin),  
25 자라스타틴(jarastatin), 자라린(jararin), 라체신(lachesin),  
루토신(lutosin), 몰로신(molossin), 살모신(salmosin),  
테르게미닌(tergeminin), 트리그라민(trigramin),  
트리메스타틴(trimestatin), 트리무크린(trimucrin),  
트리무타제(trimutase), 우슈리스타틴(ussuristatin) 및  
30 비리딘(viridin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 혈전  
용해방법.

【청구항 21】

제 20 항에 있어서, 상기 디스인테그린은 삭사틸린인 것을 특징으로 하는 혈전 용해방법.

5

【청구항 22】

제 21 항에 있어서, 상기 삭사틸린은 서열목록 제12서열의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 혈전 용해방법.

10 【청구항 23】

제 17 항에 있어서, 상기 펩타이드는 혈전 내 존재하는 인테그린(integrin)에 결합하여 혈전을 분해하는 것을 특징으로 하는 혈전 용해방법.

15 【청구항 24】

제 17 항에 있어서, 상기 펩타이드는 혈전을 구성하는 혈소판 표면의 GP(glycoprotein)IIb-IIIa에 결합하여 혈전을 분해하는 것을 특징으로 하는 혈전 용해방법.

20 【청구항 25】

제 17 항에 있어서, 상기 방법은 혈전에 의해 혈관이 폐색된 환자에 적용되는 것을 특징으로 하는 혈전 용해방법.

【청구항 26】

25 Arg-Gly-Asp 모티프(motif)를 포함하는 펩타이드를 혈관에 투여하는 단계를 포함하는 혈관의 협착 또는 폐색성 질환의 치료방법.

【청구항 27】

30 제 26 항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열목록 제1서열 내지 제11서열로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 서열로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 하는 혈관의 협착

또는 폐색성 질환의 치료방법.

【청구항 28】

제 26 항에 있어서, 상기 펩타이드는 디스인테그린(disintegrin)  
5 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 혈관의 협착 또는 폐색성 질환의  
치료방법.

【청구항 29】

제 28 항에 있어서, 상기 디스인테그린은 삭사틸린(saxatilin),  
10 로도스토민(rhodostomin), 알보라브린(albolabrin), 아플라긴(aplugin),  
바실리신(basilicin), 바트록소스타틴(batroxostatatin),  
비티스타틴(bitistatin), 바부린(barbourin), 세레베린(cereberin),  
세라스틴(cerastin), 크로타트록신(crotatroxin), 두리신(durissin),  
에키스타틴(echistatin), 엘레간틴(elegantin),  
15 에리스티코핀(eristicophin), 플라보리딘(flavoridin),  
플라보스타틴(flavostatin), 할리신(halysin), 자라라신(jararacin),  
자라스타틴(jarastatin), 자라린(jararin), 라체신(lachesin),  
루토신(lutosin), 몰로신(molossin), 살모신(salmosin),  
테르게미닌(tergeminin), 트리그라민(trigramin),  
20 트리메스타틴(trimestatin), 트리무크린(trimucrin),  
트리무타제(trimutase), 우슈리스타틴(ussuristatin) 및  
비리딘(viridin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는  
혈관의 협착 또는 폐색성 질환의 치료방법.

25 【청구항 30】

제 29 항에 있어서, 상기 디스인테그린은 삭사틸린인 것을 특징으로  
하는 혈관의 협착 또는 폐색성 질환의 치료방법.

【청구항 31】

30 제 30 항에 있어서, 상기 삭사틸린은 서열목록 제12서열의 아미노산  
서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 혈관의 협착 또는 폐색성 질환의

치료방법.

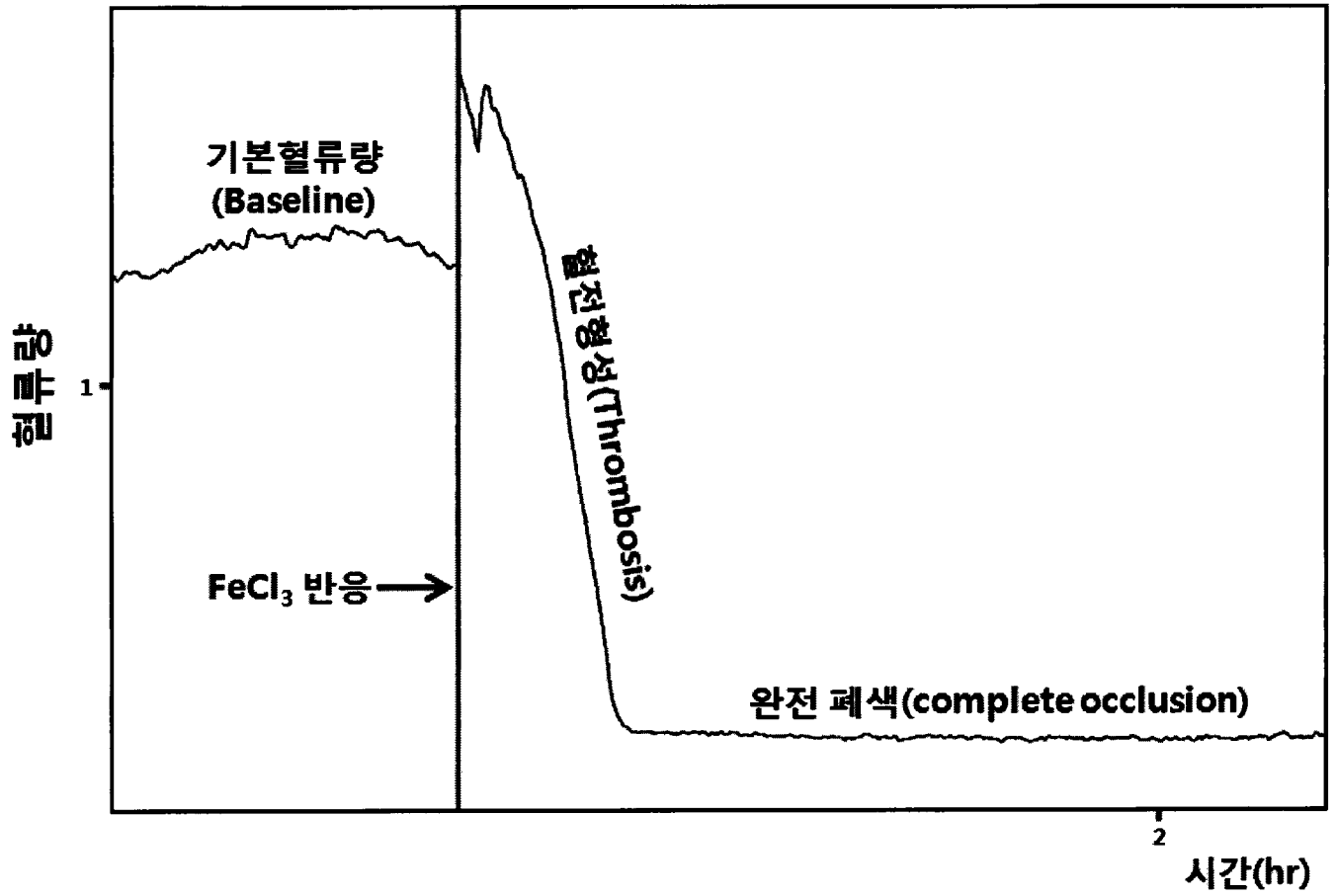
【청구항 32】

제 26 항에 있어서, 상기 펩타이드는 혈전 내 존재하는  
5 인테그린(integrin)에 결합하여 혈전을 분해하는 것을 특징으로 하는  
혈관의 협착 또는 폐색성 질환의 치료방법.

【청구항 33】

제 26 항에 있어서, 상기 펩타이드는 혈전을 구성하는 혈소판 표면의  
10 GP(glycoprotein)IIb-IIIa에 결합하여 혈전을 분해하는 것을 특징으로 하는  
혈관의 협착 또는 폐색성 질환의 치료방법.

Fig. 1a



**Fig. 1b**

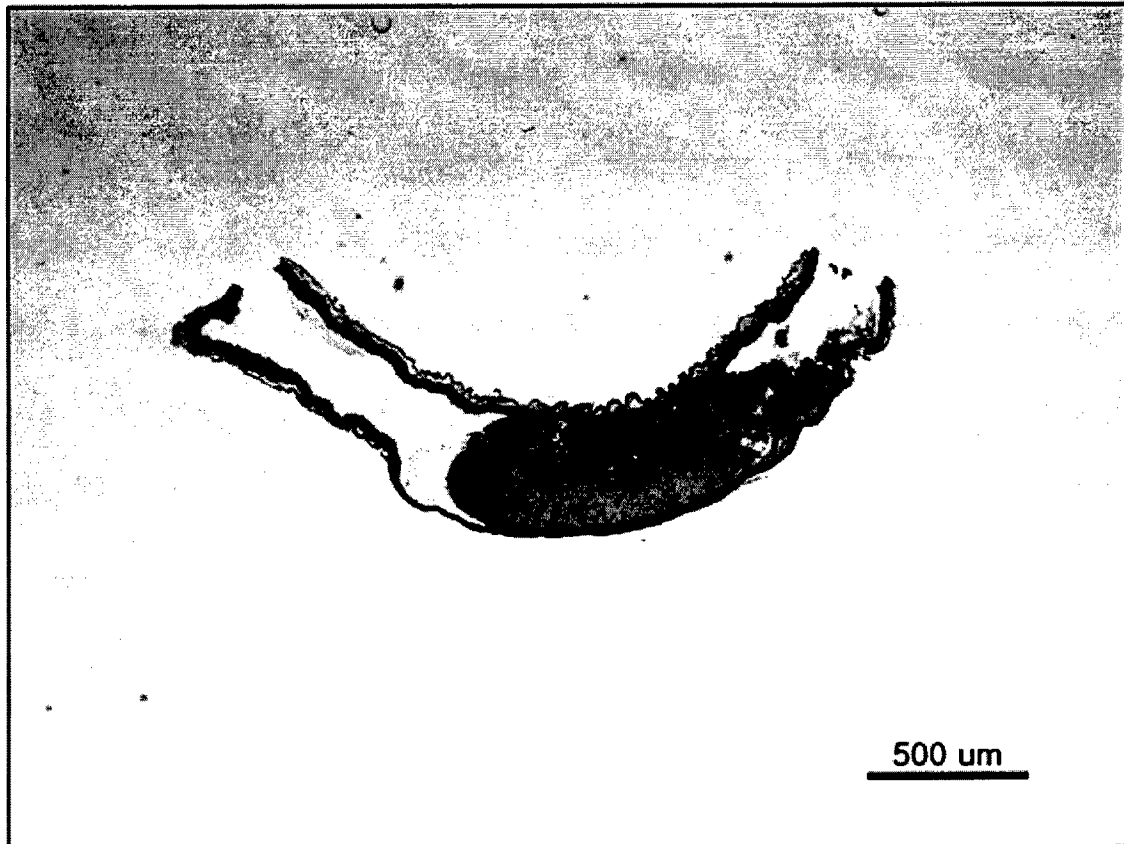


Fig. 2

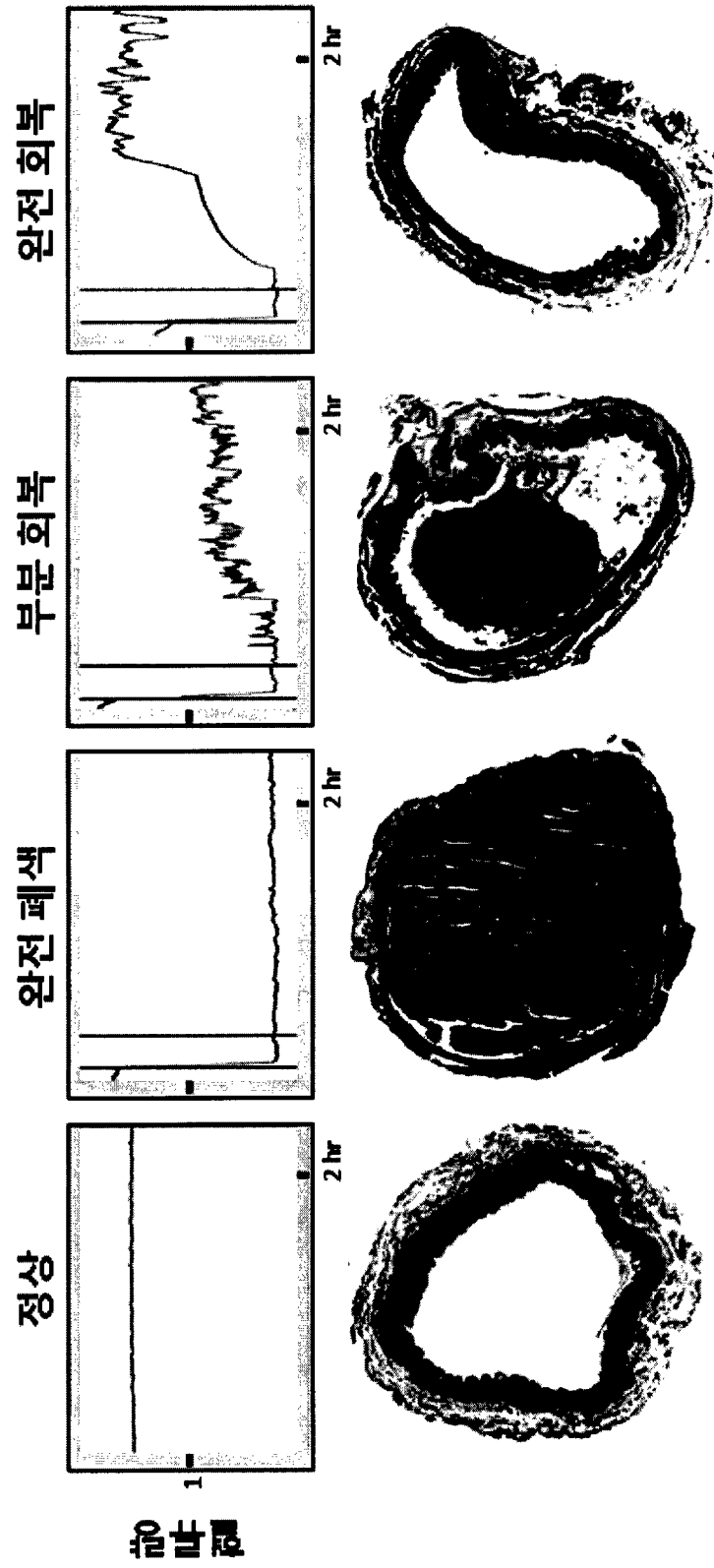


Fig. 3

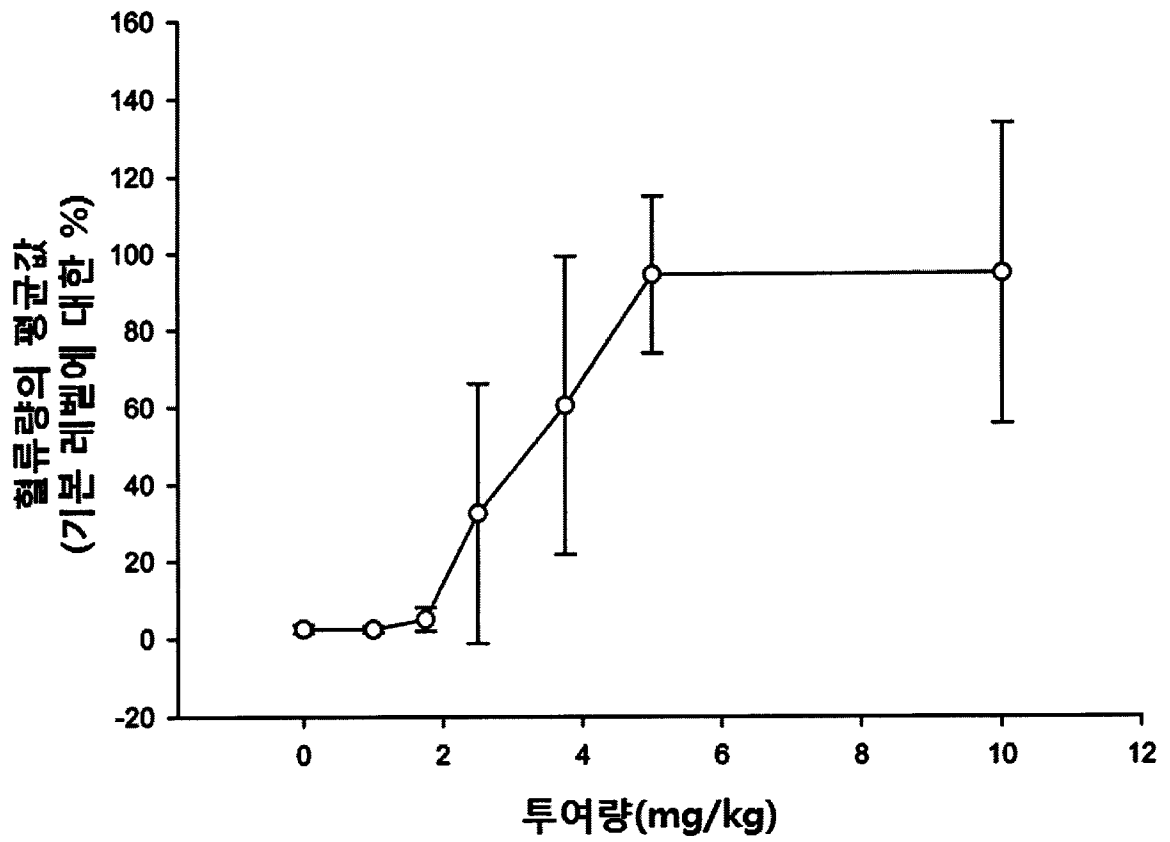






Fig. 6

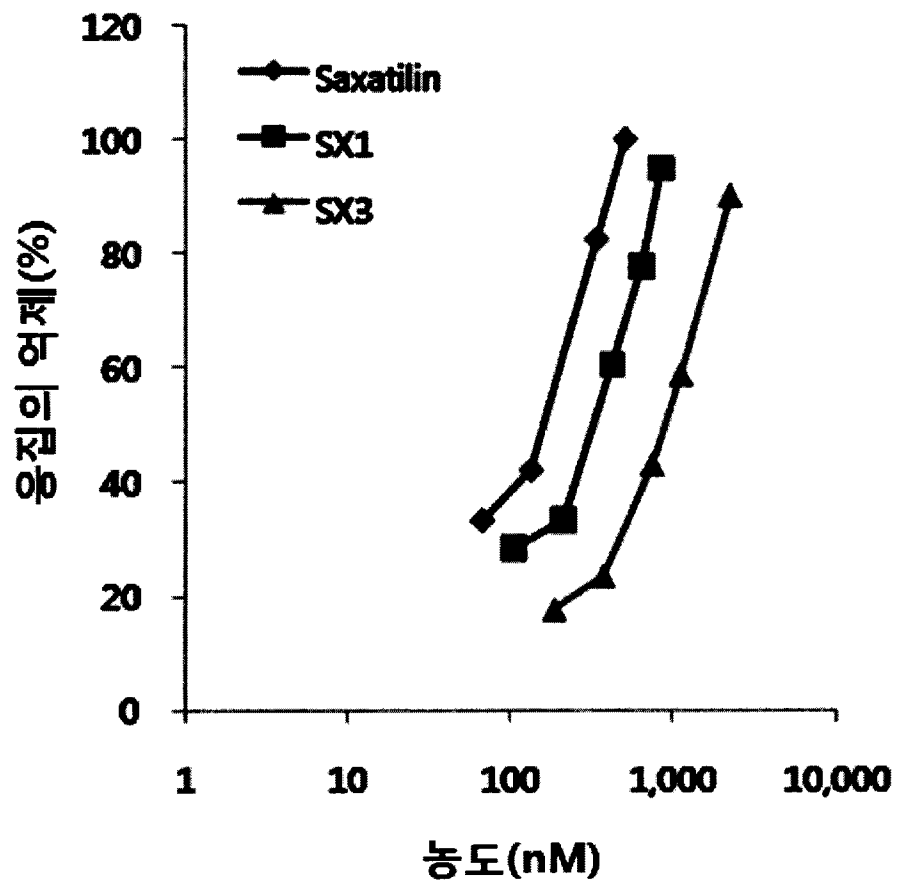


Fig. 7

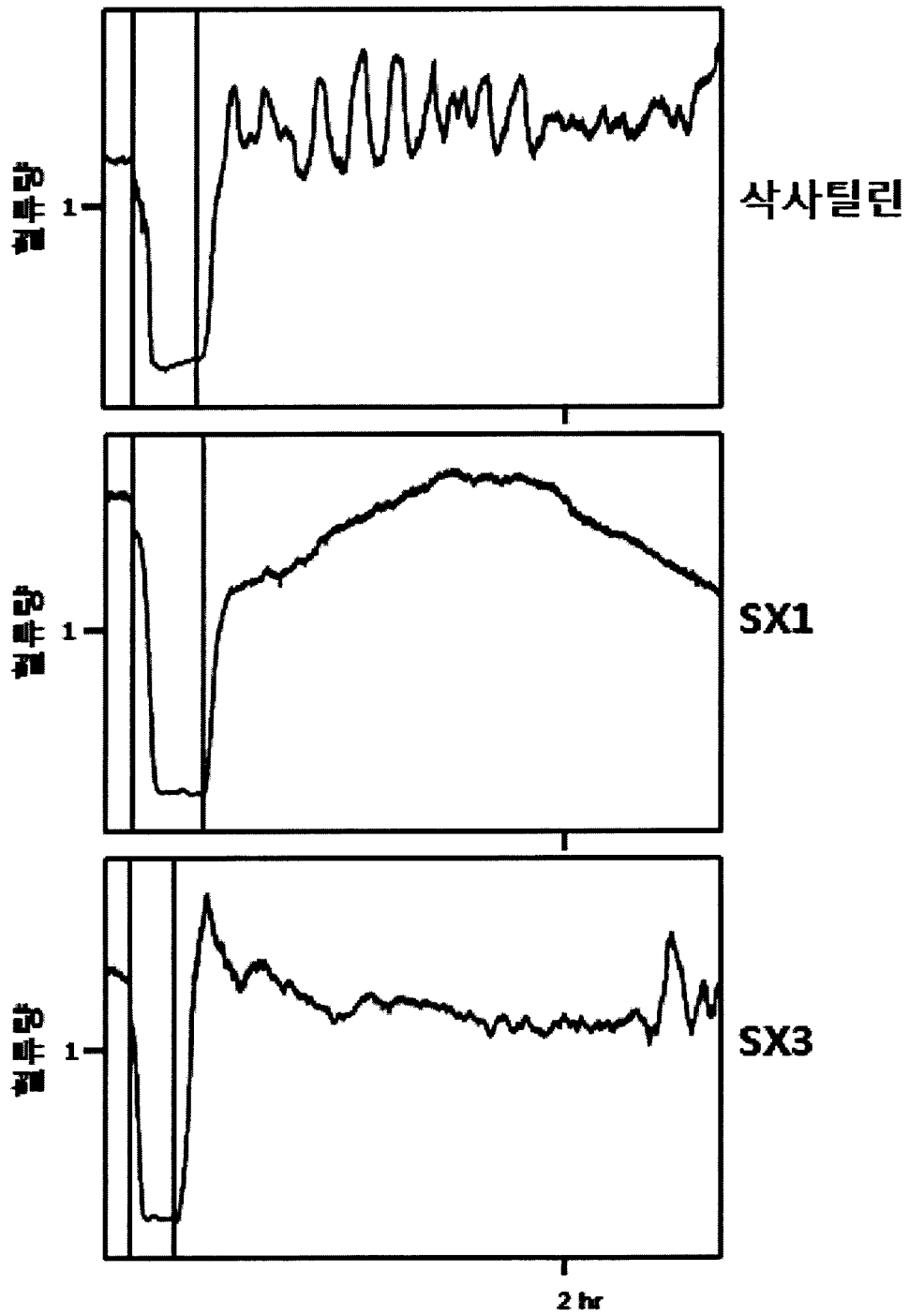


Fig. 8

