



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0030566  
(43) 공개일자 2008년04월04일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7029227

(22) 출원일자 2007년12월13일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2007년12월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/022865

국제출원일자 2006년06월13일

(87) 국제공개번호 WO 2006/138238

국제공개일자 2006년12월28일

(30) 우선권주장

60/689,810 2005년06월13일 미국(US)

(71) 출원인

클리브랜드 바이오랩스, 아이엔씨.

미국 뉴욕주 14203, 버팔로, 73 하이 스트리트

클리블랜드 클리닉 파운데이션

미국 오하이오 44195 클리블랜드 유클리드 애브뉴 9500

(72) 발명자

샤코프, 알렉산더, 엔.

미국 오하이오 44026, 체스터 랜드, 12835 킹스웨이 드라이브

구드코프, 안드레이

미국 오하이오 44040, 게이즈 밀즈, 7800 블랙베리 레인

(74) 대리인

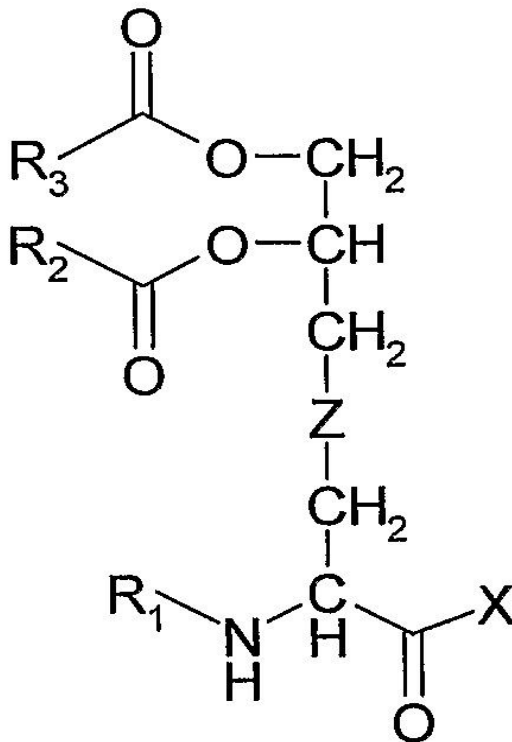
신관호

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 리포펩티드를 사용하여 아픔토시스에 대항하는 보호방법

### (57) 요약

여기에서 아픔토시스를 유발하는 하나 또는 그 이상의 조건 또는 치료로부터 포유류를 보호하는 방법이 제공된다. 포유류는 하기 화학식의 화합물의 약학적으로 수용할 수 있는 양을 포함하는 조성물이 투여될 수 있다.



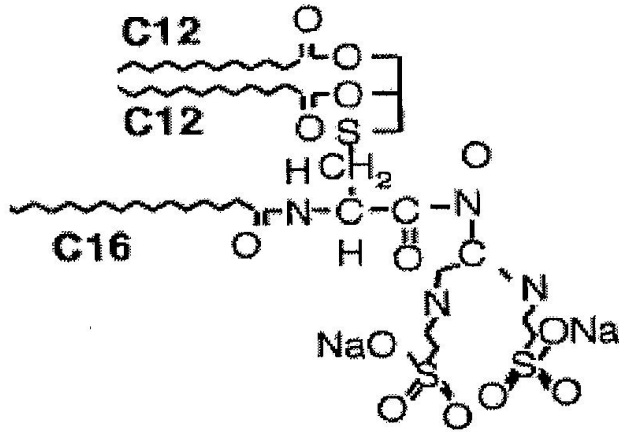
상기 화학식에서 R<sub>1</sub>은 H 또는 -CO-R<sub>4</sub>를 나타내고,

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>는 독립적으로 H 또는 선택적으로 치환된 C<sub>8</sub>-C<sub>16</sub> 지방족을 나타낸다.

X는 펩티드이고,

Z는 S 또는 CH<sub>2</sub>이다.

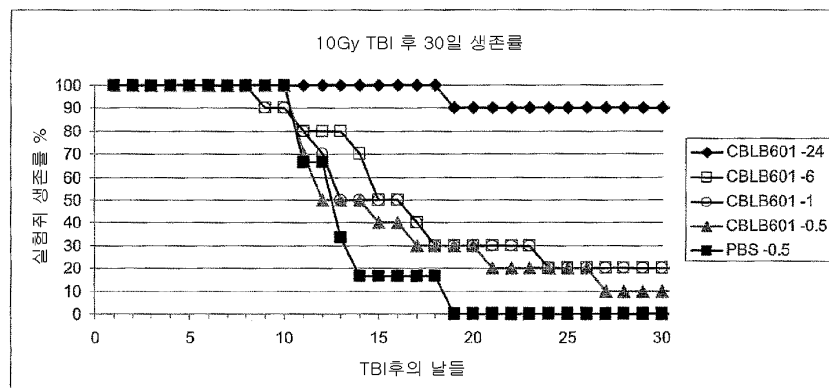
펩티드는 SEQ ID NOs: 1-52에 서열 배치를 포함할 수 있다. 펩티드의 첫번째 다섯개의 아미노산은 표 2에 언급된 위치에서 아미노산으로부터 선택된다. 그 화합물은 RR 또는 RS 스테레오이소머(stereoisomer), 그들의 혼합물일 수 있다. 그 화합물은 또한 다음의 화학식으로 표현될 수 있다.



아포토시스를 유발하는 상태는 방사, 상처, 중독, 감염 또는 온도 충격일 수 있다. 아포토시스를 유발하는 치료는 암 치료일 수 있다. 암치료는 화학치료요법 또는 방사선 치료법일 수 있다. 상기 조직에 있어서 아포토시스는 비장, 흉선, GI 트랙트, 폐, 신장, 간, 심혈관계, 혈관 내피, 중추 및 말초신경계, 조혈 전구세포(골수), 면역계, 모낭 및 생식계로 구성되는 그룹으로부터 선택된 조직에서 유발된다.

화합물은 방사능 방호물(radioprotectant)와 결합되어 투여될 수 있다. 방사능 방호물은 아미포스틴 또는 비타민 E와 같은 항산화제 일 수 있다. 방사능 방호물은 줄기세포 인자와 같은 사이토카인일 수 있다. 그 방사능 방호물은 플라젤린, 잠복TGF β 또는 TLR 활성제일 수 있다.

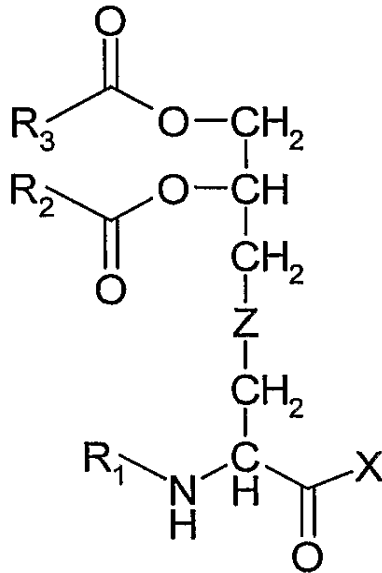
## 대표도



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

아토피시스를 유발하는 하나 또는 그 이상의 치료 또는 조건의 영향으로부터 포유류를 보호하는 방법에 있어서, 상기 방법은 하기 화학식의 화합물의 약학적 유효량을 포함하는 조성물을 상기 포유류에 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.



상기 화학식에서

R<sub>1</sub>는 H 또는 -CO-R<sub>4</sub>를 나타내고,

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>는 독립적으로 H 또는 선택적으로 치환된 C<sub>8</sub>-C<sub>16</sub> 지방족이며;

X는 펩티드이고;

Z는 S 또는 CH<sub>2</sub>이다.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 조건은 방사(radiation), 상처, 중독, 감염, 열충격(temperature shock)을 포함하는 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 조건은 방사(radiation)인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 치료는 암치료인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 치료는 화학 치료요법(chemotherapy) 또는 방사선 치료(radiation therapy)인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 SEQ ID NO: 21인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 SEQ ID NOS: 1-52의 어떤 하나의 서열을 포함하는 펩티드인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 펩티드의 첫번째 다섯개의 아미노산은 표 2에 언급된 위치에서 아미노산들로부터 선택하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 SEQ ID NOS: 8, 16, 17, 18, 20, 및 21, 및 그것의 치환체(substitution)들로 구성되는 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는 펩티드인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 R<sub>1</sub>은 H이고, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>는 C<sub>16</sub> 지방족 또는 그것의 치환체인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 11

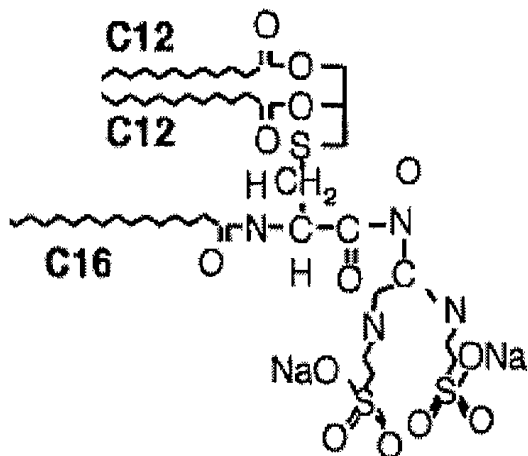
제 1항에 있어서,

상기 화합물은 RR 또는 RS 스테레오아이소머(stereoisomer) 또는 그것의 혼합물인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식의 화합물인 것을 특징으로 하는 방법.



### 청구항 13

제 3항에 있어서,

상기 조성물은 방사능 방호물(radioprotectant)과 결합하여 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 방사능 방호물은 항산화제인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 항산화제는 아미포스틴(amifostine) 및 비타민 E로 구성되는 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 16

제 13항에 있어서,

상기 방사능 방호물은 사이토카인(cytokine)인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 사이토카인은 줄기세포 인자인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 18

제 13항에 있어서,

상기 방사능 방호물은 플라젤린(flagellin)인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 19

제 13항에 있어서,

상기 방사능 방호물은 잠복(latent) TGF $\beta$ 인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 20

제 13항에 있어서,

상기 방사능 방호물은 TLR의 활성제인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 21

제 1항에 있어서,

상기 아포토시스는 비장, 흉선, 위장관(GI 트랙트), 폐, 신장, 간, 심혈관계, 혈관 내피, 중추 및 말초신경계, 조혈 전구세포(골수), 면역계, 모낭 및 생식계로 구성되는 그룹으로부터 선택된 조직에서 유발되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 명세서

### 기술분야

<1> 본 발명은 아포토시스의 영향으로부터 포유류를 보호하기 위한 NF- $\kappa$ B의 유도인자(inducers)의 사용과 관련된다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 방사(radiation)와 암치료와 같은 스트레스에 노출로부터 포유류를 보호하기 위한 NF- $\kappa$ B의 유도인자(inducers)의 사용과 관련된다.

## 배경 기술

- <2> 일반세포에서 종양세포로의 진화는 성장억제 자극에 대한 저항과 성장인자 및 호르몬에 대한 의존성의 결핍을 포함하여, 성장조절의 음성적 메커니즘의 손실과 관련되어 있다. 방사(radiation) 또는 세포독성약물(cytotoxic drug)에 근거한 전통적인 암 치료법은 보통 및 종양 세포의 성장제어에서 차이점에 의존한다. 전통적인 암치료는 세포에 심각한 유전독성 스트레스를 준다. 이러한 상태에서 일반 세포들의 대다수는 정지되거나 저장되고, 반면, 종양세포는 계속해서 분할되거나 사멸한다.
- <3> 그러나, 전통적인 암 치료 전략의 본질은 일반적인 급속 분화 또는 아포토시스-복와위(apoptosis-prone) 조직이 위험에 처하게 하는 것과 같다. 이러한 일반적인 급속 분화 세포는 암치료의 부작용을 야기하는 것으로 잘 알려져 있다(민감한 조직, 조혈(hematopoiesis), 소장, 모낭). 그러한 조직의 자연스러운 민감도는 암세포가 종종 자살(아포토틱;apoptotic) 기구(machinery)에서 결점을 가지거나, 일반 민감 조직에서 사멸을 야기하는 치료적 과정이 암세포에는 효과가 없는 경우와 같은 사실에 의하여 복잡해진다. 암 치료의 부작용을 최소화하기 위한 종래의 시도는 (a)종양세포를 치료에 더욱 민감하게 만드는 것, (b) 암치료가 종양세포에 대하여 더 특이적으로 만드는것, (c) 치료(예를 들면, 에리트로포에틴, GM-CSF, 및 KGF)후에 일반 조직의 재생을 증진시키는 것에 근거한다. 그러나, 이들 각각은 효과가 제한된다. 결과적으로 암치료에 있어서 화학치료요법과 방사선 치료법과 관련된 부작용을 완화하는 치료 약물이 계속적으로 요구되고 있다. 본 발명은 이러한 요구를 충족시키고 다른 관련된 유익함을 제공한다.

## 발명의 상세한 설명

- <4> 여기에서는 다양한 스트레스로부터 야기되는 아포토시스로부터 일반 세포와 조직들을 보호하는 방법을 제공한다. 일반적으로 아포토시스는 상처받거나 또는 유전적으로 손상받은 세포로부터 조직을 "청결히(clean)"하는 기능을 하는 반면에, 사이토카인(cytokines)은 스트레스로부터 생물 방어 체계를 결집시킨다. 그러나, 심각한 손상의 조건하에서 스트레스 반응 메커니즘은 스스로 사멸을 야기시킬 수 있다. 예를 들면 방사로부터의 치사율은 헤마토포에틱(hematopoietic), 면역 및 소화계에서 발생하는 대량의 아포토시스에 기인한다.
- <5> 세포에는 아포토시스를 제어하는 두 가지 주요한 메커니즘이 있다 ;p53(프로-아포토틱(pro-apoptotic)) 및 NF-κB 경로이다(안티-아포토틱(anti-apoptotic)). 모든 경로는 종종 종양에서 규제될 수 없다; p53이 손실될 수 있고, 반면에 NF-κB는 계속적으로 활성화될 수 있다. 따라서, 일반세포에서 p53의 저해 및/또는 NF-κB의 활성화는 스트레스로부터 야기되는 사멸로부터 그들을 보호할 수 있다. 암치료에 있어서 그러한 접근은 치료에 더욱 저항하는 종양 세포를 더 만들지 않는다. 왜냐하면 그들은 이미 제어 메커니즘이 규제될 수 없기 때문이다. 이것은 각각 활성화와 억제(repression)를 위한 타겟으로써 여겨지는 p53 및 NF-κB에 대한 종래의 관점과는 모순된다.
- <6> 여기에서 설명되는 것으로서, NF-κB활성은 아포토시스로부터 일반 세포를 보호하는 것을 유도할 수 있다. 포유류에서 NF-κB활성을 유도함으로써, 일반 세포들은 아포토시스가 세포적 스트레스(cellular stress)를 주는 것으로부터 보호될 수 있다. 일단 일반 세포들이 스트레스로부터 회복되면, NF-κB활성은 정상 수치로 회복될 수 있다. 일시적으로 NF-κB활성을 유도함으로써, 세포들은 다양한 스트레스로부터 보호될 수 있다. 이것은 손상된 조직 및 기관으로부터의 염증반응 및 세포의 생존-사멸의 결정 모두에 대한 제어를 제공할 수 있다.
- <7> NF-κB 보호적인 역할은 다음의 멀티플 유전자 코딩의 전사적 활성화에 의하여 매개될 수 있다. a)모든 주요 아포토틱 경로를 차단하는 안티-아포토틱 단백질, b) 헤마토포에틱 및 다른 배아세포들의 생존 및 증식을 유도하기 위한 사이토카인 및 성장인자, c) MnSOD (SOD-2)와 같은 포이텐트(potent) ROS-제거 항산화 단백질이다. 또한, 예를 들면, 방사방어에 대한 NF-κB의 일시적인 활성화에 의해서, 동시 면역자극 효과 때문에 암 환자의 아포토시스의 억제 뿐만 아니라, 2차 암 발생의 비율을 감소시키는 능력이 성취될 수 있다. 그리고 그것은 NF-κB의 활성화가 톨(Toll)-같은 리셉터에 의해서 매개된다면 성취될 수 있다.
- <8> 타겟으로써 NF-κB 경로의 다른 흥미로운 특성은 많은 자연적인 인자에 의한 그것의 활성화이다. 이들 사이에 멀티플 병원균-관련 분자 패턴(PAMPs)이 있다. PAMPs는 오직 미생물에만 존재하고, 숙주 생물에서는 발견되지 않으며, 대형 병원균 그룹에 대하여 특징화되며, 쉽게 변이될 수 없다. 그들은 톨-같은 리셉터(TLRs), 선천적인 면역의 키 센서 요소에 의하여 인식된다. TLRs는 직접적으로 면역 세포 또는 사이토카인 방출을 통한 이동 및 활성을 유도함으로써 면역체계의 메커니즘을 최초로 경고하는 역할을 한다. TLRs는 호모(homo)- 및 헤테로다이머(heterodimer)로서 역할을 하는 것으로 알려진 타입 I 막단백질이다. 리간드 바인딩하면서,

TLRs은 MyD88, 대부분의 TLRs의 필수적인 시그널링 어댑터(signaling adaptor)를 동원한다. 상기 시그널링 캐스케이드(cascade)는 다음과 같은 효과를 발생시킨다. (i) NF- $\kappa$ B 경로의 활성화 및 (ii) Jun N-말단 카이네이즈(JNK)를 포함한 MAPKs의 활성화. 사이토카인과 달리 많은 PAMPs는 거의 효과가 없다. 또한, 활성화 TLRs은 부작용을 거의 발생시키지 않는다. 게다가, 수많은 TLTs (TLR1-TLR10)는 인간에 존재한다. 이뮤노사이트(imniunocyte) 활성화의 기능과 일치하는 모든 TLRs는 다른 림포이드(lymphoid) 기관 및 백혈구 아집단에서 발현된 더 많은 TLR-특이적 패턴과 함께 비장과 말초 혈액 백혈구에서 발현된다. TLRs의 모두는 피부의 내피 및 점막상피세포, 호흡기, 장, 및 비뇨생식관에서 발현된다.

## <9> 1. 정의

- <10> 여기에서 사용되는 용어는 특정 실시예만을 설명하기 위한 목적이고, 이를 제한할 의도는 아니다. 명세서와 첨부된 청구항에 사용되는 것으로서, "하나(a, an)" 및 "그(the)" 각각의 형태는 만일 본문에 명확하게 지정되지 않았다면 복수의 지시대상을 포함하는 사실은 주지되어 있다.
- <11> NF- $\kappa$ B 활성을 유도하는 약물의 복용량을 설명하기 위해 사용될 때, "투여하다"라는 용어는, 약물의 일회 복용량 또는 복수의 복용량을 의미한다.
- <12> 여기에서 사용된 "지방족(aliphatic)"이라는 용어는 잔기가 없는, 잔기가 있는, 또는 싸이클릭(cyclic) 탄화수소그룹을 의미하고, 그것은 치환된 또는 치환되지 않은 것 일수 있고, 포화된 또는 포화되지 않은 것일 수 있으나, 방향족은 아니다. 또한, 지방족이라는 용어는 지방족 그룹을 포함하고, 그것은 산소, 질소, 황 또는 인 산원자들이 탄화수소 골격의 하나 또는 그 이상의 탄소를 치환한 것을 포함한다.
- <13> 여기에서 단독 또는 결합되어 사용된 "알킬(alkyl)"이라는 용어는 잔기가 있는 또는 잔기가 없는, 포화된 지방족 그룹을 의미한다. 알킬그룹의 대표적인 예는, 제한되지는 않으나, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, 옥틸, 데실, 테트라데실, 헥사데실, 에이코실, 테트라코실 등을 포함한다.
- <14> 여기에서 단독 또는 결합되어 사용된 "알케닐(alkenyl)"이라는 용어는 잔기가 있는 또는 잔기가 없는, 체인을 따라 어떤 안정점에서 발생할 수 있는 적어도 하나의 탄소-탄소 이중결합을 포함하는 포화된 지방족 그룹을 의미한다. 알케닐 그룹의 대표적인 예는, 제한되지는 않으나, 에테닐, E- 및 Z-펜테닐, 데세닐 등을 포함한다.
- <15> 여기에서 단독 또는 결합되어 사용된 "알키닐(alkynyl)"이라는 용어는 잔기가 있는 또는 잔기가 없는, 체인을 따라 어떤 안정점에서 발생할 수 있는 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 포함하는 포화된 지방족 그룹을 의미한다. 알카이닐 그룹의 대표적인 예는, 제한되지는 않으나, 에티닐, 프로피닐, 프로파길, 부티닐, 헥시닐, 데시닐 등을 포함한다.
- <16> "아날로그(analog)"라는 용어가 펩티드 또는 폴리펩티드에 대하여 본문에서 사용된 경우, 하나 또는 그 이상의 비-표준 아미노산 또는 아미노산의 컨벤셔널 세트로부터의 다른 구조적 변화를 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다.
- <17> 여기에서 사용된 "항체"라는 용어는 IgG, IgM, IgA, IgD or IgE 클래스들 또는 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd 및 단일사슬 항체, 디아바디(diabodies), 이중특성(bispecific)의 항체들, 이중기능의 항체 및 그들의 유도체를 포함한 단편 또는 그들의 유도체를 의미한다. 항체는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 흡착 정제(affinity purification)된 항체 또는 그들의 혼합물일 수 있다. 그들은 그들로부터 유래한 서열 또는 바람직한 에피토프(epitope)에 충분한 바인딩 특성을 나타낸다. 항체는 당업자에게 알려진 하나 또는 그 이상의 화학물질, 펩티드 또는 폴리펩티드 모이어티(moiety)의 부착에 의해서 유도된다. 항체는 화학적 모이어티로 접합될 수 있다.
- <18> 여기에서 사용된 "아포토시스(apoptosis)"라는 용어는 세포질 기관의 통합의 보존과 관련된 세포 부피의 진행성 수축; 전자 현미경 또는 빛에 의한 관찰로서 크로마틴의 응축(예를 들면, 핵의 응축); 및/또는 원심분리정량에 의해 결정된 뉴클레오솜-크기의 단편으로 DNA절단을 포함하는 아포토시스의 형태를 의미한다. 세포사멸은 식 세포에 의해서 온전한 세포 단편("아포토틱 바디")의 포식으로 세포의 막 통합(integrity)이 손상될 때(예를 들면, 막의 수포형성) 발생된다.
- <19> 여기에서 사용된 "암"이라는 용어는 아포토틱 자극에 대한 저항에 의해서 특성화된 어떠한 상태를 의미한다.
- <20> 여기에서 사용된 "암치료"라는 용어는 제한되지는 않으나 화학요법 및 방사요법을 포함하여 당업자에 알려진 어



떠한 암치료방법을 의미한다.

- <21> 여기에서 사용된 " ~와의 결합"이라는 용어는 NF- $\kappa$ B활성 유도 및 추가적인 치료의 약물의 투여를 설명하는데 사용될 때 그 약물이 전에, 함께 또는 추가적인 치료 후에 또는 그것들의 결합하여 투여될 수 있는 약물을 의미한다.
- <22> "유도체"라는 용어는 본문에서 펩티드 또는 펩티드에 대하여 사용될 때, 일차 구조(아미노산 및 아미노산 아날로그들)이외에 다른 펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 예시에 의해서, 유도체들은 글리코실레이티드(glycosylated) 됨으로써, 전-번역 수정(post-translational modification)의 하나의 형태로 달라질 수 있다. 예를 들면, 펩티드 또는 폴리펩티드는 이종유래(heterologous) 시스템에서의 발현에 기인하여 글리코실레이션 패턴(glycosylation pattern)을 나타낸다. 다른 유도체들은, 제한되지는 않으나 공유적으로 수정된 N- 또는 C-말단을 가진 퓨전 펩티드 또는 퓨전 폴리펩티드, 페길레이티드(pegylated) 펩티드 또는 폴리펩티드, 지질 모이어티와 관련된 펩티드 또는 폴리펩티드, 알킬레이티드 펩티드 또는 폴리펩티드, 다른 펩티드와 아미노산 사이드 사슬 기능기를 통하여 링크된 펩티드와 폴리펩티드, 폴리펩티드 또는 화합물질, 그리고 당업자에게 이해될 수 있는 추가적인 변형체들을 포함한다.
- <23> "단편"이라는 용어는 본문에서 펩티드 또는 폴리펩티드에 대하여 사용될 때, 약 6에서 약 10 아미노산 길이의 펩티드를 의미할 수 있다. 단편은 6, 7, 8, 9 또는 10 아미노산 길이 일 수 있다.
- <24> "호몰로그(homolog)"라는 용어는 본문에서 펩티드 또는 폴리펩티드에 대하여 사용될 때, 일반적인 진화 조상을 공유한 펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다.
- <25> 여기에서 "포화된"이라는 용어는 골격원자의 모든 이용가능한 원자가 결합이 다른 원자에 부착된 그룹을 의미한다.
- <26> 여기에서 "치환된"이라는 용어는 탄소로부터 제거되거나 추가적인 그룹으로 교체된 하나 또는 그 이상의 수소 또는 다른 원자들을 의미한다. 여기에서 치환된 그룹은 1 에서 5로 치환되거나 또는 1 에서 3까지 치환될 수 있다. 이러한 치환체의 대표적인 예는 제한되지는 않으나, 지방족 그룹, 방향족 그룹, 알킬, 알케닐, 알키닐, 알릴, 알콕시, 할로, 알릴로시, 카보닐, 아크릴, 시아노, 아미노, 니트로, 인-포함 그룹, 황-포함 그룹, 하이드록실, 알킬카르보닐옥시, 알릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르복실, 알킬아미노카르복실, 디알킬아미노카르복실, 알킬티오카르복실, 아실아미노, 아미노, 이미노, 알킬티오, 알릴티오, 티오카르복실레이트, 알킬설퍼닐, 트리플루오르메틸, 아지도, 헤테로사이클릴, 세미카르브아지도, 티오세미카르프아지도, 마레니미도, 오스이미노, 이미데이트, 사이클로알킬, 사이클로알킬카르보닐, 디알킬아미노, 알릴사이클로알킬, 알릴카르보닐, 알릴알킬카르보닐, 알릴사이클로알킬카르보닐, 알릴포스포닐, 알릴알킬포스포닐, 알릴사이클로알킬포스포닐, 알릴포스포닐, 알릴알킬포스포닐, 알릴사이클로알킬포스포닐, 알릴슬포닐, 알릴알킬슬포닐, 알릴사이클로알킬슬포닐, 그들의 결합 및 그들의 치환체를 포함한다.
- <27> "치료"라는 용어는 일정 상태로부터 포유류의 보호를 위해 언급될 때 예방, 억제, 진압, 또는 그 상태의 제거를 의미한다. 그 상태를 예방하는 것은 그 상태의 개시 이전 그 상태를 억제(suppressing)하는 것은 그것의 임상적인 발현 전이 아니라, 상태의 유도 후에 포유류에 본 발명의 조성물을 투여하는 것과 관련된다. 그 상태를 진압(repressing)하는 것은 그 상태의 감소 또는 유지되는 것과 같이 그 상태의 임상적인 발현 후에 포유류에 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 그 상태의 제거(Elimination)는 포유류가 그 상태로 더 이상 고통을 겪을 수 없게 되는 경우와 같이 그 상태의 임상적인 발현 이후에 포유류에게 본 발명의 조성물을 투여하는 것과 관련된다.
- <28> 여기에서 사용된 "종양세포"라는 용어는 아폽토틱 자극에 저항함으로써 특징화되는 어떠한 세포를 의미한다.
- <29> 여기에서 사용된 "불포화"라는 용어는 두 개의 인접한 골격 원자의 적어도 하나의 이용가능한 원자가 결합이 다른 원자에 부착되지 않은 그룹을 의미한다.
- <30> 여기에서 사용된 "치환되지 않은"이라는 용어는 그들에 추가적인 그룹을 가지지 않거나 또는 치환되지 않은 그룹을 의미한다.
- <31> "다른(variant)"이라는 용어가 펩티드 또는 폴리펩티드에 대해 본문에서 사용될 때, 삽입, 제거, 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 달라졌으나, 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 펩티드 또는 폴리펩티드 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서 "생물학적 활성"은 제한되지는 않으나, 특정 항체에 의해 부착될 수 있는 능력을 포함한다. 아미노산의 보존적 치환은 예를 들면 아미노산을 유사한 특성의 다른 아미노산(예를 들면,

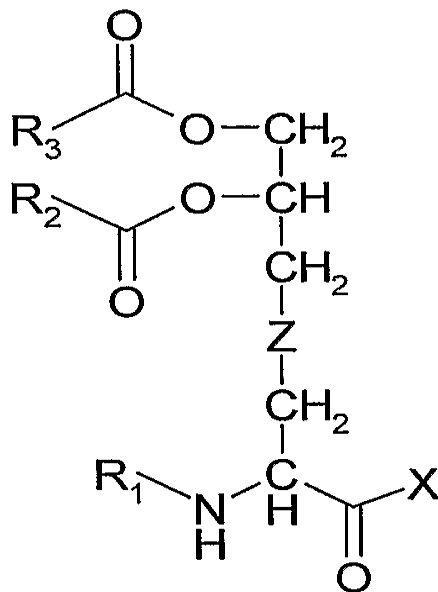


친수성, 대전된 부분의 정도나 분포)으로 치환하는 것은 전형적인 작은 변화를 포함하여 당업자에게 알려져 있다. 이러한 작은 변화는 당업자에게 이해될 수 있는 것으로서 아미노산의 하이드로파틱 인덱스(hydrophobic index)로서 고려됨으로써 부분적으로 동정될 수 있다(Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132, 1982). 아미노산의 하이드로파틱 인덱스는 그것의 소수성과 전하의 고려에 근거한다. 유사한 하이드로파틱 인덱스의 아미노산은 치환되거나 단백질 기능을 보유한다는 것이 당업자에게 알려져 있다. 첫번째 관점에서  $\pm 2$ 의 하이드로파틱 인덱스를 가진 아미노산은 치환되었다. 아미노산의 친수성은 생물학적 기능을 보유하는 단백질을 야기하는 치환을 나타내는데 사용될 수 있다. 본문에서 펩티드에 대한 아미노산의 친수성의 고려는 참조에 의하여 여기에 포함된 항원성과 면역원성 U.S. Patent No. 4,554,101과 관련하여 보고된 유용한 측정, 펩티드의 최대의 지역 평균 친수성의 계산을 가능하게 한다. 유사한 친수성 수치를 가진 아미노산의 치환은 예를 들면 당업자에게 알려진 면역원성과 같은 생물학적 활성을 보유하는 펩티드를 발생시킬 수 있다. 첫번째 관점에서, 치환은 서로  $\pm 2$  이내의 친수성 수치를 가진 아미노산으로 수행되었다. 아미노산의 소수성 인덱스와 친수성 수치 모두 아미노산의 특정한 사이드 체인에 의하여 영향을 받는다. 그 관찰과 일치하여 생물학적 기능과 양립할 수 있는 아미노산 치환은 아미노산, 그리고 특히 소수성, 친수성, 전하, 크기 및 다른 특성에 의하여 나타낸 것으로서 그 아미노산의 특정 사이트 체인의 관계적 유사성에 의존하여 이해된다.

## 2. 리포펩티드(Lipopeptides)

리포펩티드는 NF- $\kappa$ B 활성을 촉진하기 위해 약물로서 사용될 수 있다. 리포펩티드는 그람 음성균(Gram-negative bacteria), 그람 양성균(Gram-positive bacteria) 및 마이코플라스마(mycoplasma)의 외막(outer membrane)의 일부이다. 박테리아의 리포펩티드는 시퀀스 상동(homology)이 공유되지 않지만, 2개 혹은 3개의 지방산(fatty acid)에 의해 아실레이팅된 색다른 N-말단 아미노산(S-(2,3-dihydroxypropyl)-L-cysteine)에 의해 특징된다. 박테리아의 리포펩티드는, TLR2-TLR1 혹은 RLR2-TLR6 이형이합체(heterodimer)를 통해 신호표시하고 NF- $\kappa$ B 및 사이토카인(cytokine) 생성물의 활성을 유도함으로써 전염 후 숙주 반응(host response)을 초기에 활성화하는 강한 면역성의 조절체이다. 자연의 리포펩티드의 N-말단 리포펩티드의 합성의 유사 화합물은, 생체 내 및 생체 외 면역보조제(immunoadjuvant) 뿐만 아니라, TLRs 및 NF- $\kappa$ B의 능력있는 활성체이다.

리포펩티드는 다음 식의 화합물일 수 있다.



상기에서  $R_1$ 은 H 또는  $-\text{CO}-R_4$ 를 나타내고,

$R_2$ ,  $R_3$  및  $R_4$ 은 H 또는 임의로 치환된 지방족 화합물과 별개이고,

X는 H 혹은 펩티드이고,

Z는 S 혹은  $\text{CH}_2$ 이다.

리포펩티드는 2개 혹은 3개의 지방산을 포함하여도 좋다.  $R_2$ ,  $R_3$  및  $R_4$ 의 지방족의 치환물은 6 내지 20 카본

원자를 포함하여도 좋다.  $R_2$ ,  $R_3$  및  $R_4$ 는  $C_6$ - $C_{20}$ 알킬(alkyl),  $C_6$ - $C_{20}$ 알케닐(alkenyl) 또는  $C_6$ - $C_{20}$ 알키닐(alkynyl)이어도 괜찮다.  $R_2$ ,  $R_3$  및  $R_4$ 에서의 알킬 치환물의 대표적인 예는  $C_6$ ,  $C_8$ ,  $C_9$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{14}$  및  $C_{16}$ 을 포함한다.  $R_2$ ,  $R_3$  및  $R_4$ 에서의 알케닐 치환물의 대표적인 예는  $C_{10:1}^{D1Trans}$ ,  $C_{18:1}^{D9}$  및  $C_{18:2}^{D9, 12}$ 를 포함한다.

<41> 펩티드는 적어도 4 또는 5의 아미노산과 단지 20, 30 혹은 40 아미노산의 사이를 포함하여도 좋다. 펩티드 부분은 활성에 필수 불가결하고 리포펩티드의 활성은 아미노산 시퀀스에 의해 조절되어도 좋지만, 생물학적 활성은 대부분의 펩티드 시퀀스(Spohn et al., Vaccine, 22(19):2494-9, 2004)에 영향을 받지 않는다. 펩티드는 다음의 표1에 설정된 시퀀스와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일한 시퀀스, 또는 아날로그, 유도체(derivative), 단편(fragment), 동족체(homolog), 이형(variant) 또는 치환물을 포함한다. 펩티드는 네트 음전하(net negative charge)를 운반한다.

<42> [표 1]

Table 1

Sequence	Length	SEQ ID NO
SNNA	4	1
GSSHH	5	2
KQNV	5	3
NNSGK	5	4
QPDY	5	5
RPDY	5	6
SEEE	5	7
SKKKK	5	8
SNNNA	5	9
SPPPP	5	10
GQHMM	5	11
GQHMM	5	12
SSHMM	5	13
GSHMM	5	14
SQMHH	5	15
GETDK	5	16
GEESN	5	17
GEEDD	5	18
TENVKE	6	19
QGEESNDK	8	20
VQGEESNDK	9	21
FEPPATTT	9	22
GDKYFKETE	9	23
GDPKHPKSF	9	24
GGQEKSAAAG	9	25
GPCPGCPPC	9	26
PPCPGCPPC	9	27
DNEEKPTPEQD	11	28
GNGGAPAQPKG	11	29
FEPPATTTKSK	12	30
GNNDESNISFKEK	13	31

<43>

GDPKHPKSFTGWVA	14	32
AQNPNKTNNSLDSSK	15	33
NKDNEAEPVTEGNAT	15	34
SKEGNPDPDNAAKS	15	35
GDKTPSTKSAGKVENK	16	36
GETDKEGKIIRIFDNSF	17	37
SSTSENNNGNGNGGGTD	17	38
GNNDESNISFKEKSEEEE	18	39
GNNDESNISFKEKSKKKK	18	40
GNNDESNISFKEKSPPPP	18	41
SSNKSTTGSGETTTAAGT	18	42
CGNNDESNISFKEKSKKKK	19	43
GSPLSFESSVQLIVSDNSS	19	44
SNYAKKVVKQKNHVYTPVY	19	45
ADVIKIVEIVKGLIDQFTQK	21	46
GAASSLTYESSVQLVVSDNSS	21	47
GGEPAQAQAPAETPAAAAEAAS	21	48
GQTDNNSSQSQQPGSGTTNT	21	49
SGALAATSDDDVKKAAATVAIVA	22	50
SIVSTIIEVVKTIVDIVKKFKK	22	51
SSGGGGVAADIGAGLADALTAP	22	52

<44>

<45>

리포펩티드의 펩티드 부분의 제 1의 4 내지 5 아미노산은 표 2에서 각 위치에 대해 리스트된 것으로부터 선택된다. 이 표는 Spoho et al., Vaccine, 22(19):2494-9, 2004 및 Reutter et al., J. Peptide Res., 65, 375-382, 2005에 근거한다.

<46>

[표 2]

1	2	3	4	5
D	D	A	D	D
E	E	D	E	E
F	G	E	H	H
G	K	G	N	K
K	P	H	R	M
Q	Q	M	S	N
R	R	R	T	R
S	S	S		S
	T	T		

<47>

<48>

리포펩티드는 N-말단 리포아미노산의 스테레오케미스트리(stereochemistry)와 관련한 RR- 또는 RS-스테레오이소머(stereoisomer), 혹은 그것의 혼합체이어도 좋다. 리포펩티드는 물에 용해되는 것이어도 좋다.

<49>

### 3. 스트레스의 치료

<50>

NF-kB 활성을 일으키는 약물은 세포적 스트레스(cellular stress), 그것에 의해 아포토시스를 유발하는 조건 혹은 치료로부터 일반 세포를 보호하도록 사용되어도 좋다. 조건 혹은 치료의 대표적인 예는 암(cancer) 치료, 예를 들면, 방사선 치료 혹은 화학요법; 열충격(temperature shock); 방사선의 해로운 양의 노출, 예를 들면, 원자력 공장, 방어 산업 혹은 방사성 의약품의 생성에서의 노동자, 군인; 세포 노화; 부상; 중독 및 전염을 포

함한다.

- <51> 약물은 다른 치료와 함께 일제히 혹은 규칙적으로 관리되어도 좋다. 여기서 사용된 "동시의(simultaneous)" 혹은 "동시에(simultaneously)"의 어구는, 약물 및 다른 치료의 각각이 48시간 이내, 바람직하게는 24시간, 좀 더 바람직하게는 12시간, 더더욱 바람직하게는 6시간, 그리고 가장 바람직하게는 3시간 미만으로 관리되는 것을 의미한다. 여기서 사용된 "규칙적으로(metromomically)"의 어구는 다른 치료와는 다른 시간 및 반복 관리와 관련한 어떠한 주파수에서의 약물의 관리를 의미한다.
- <52> 약물은 노출되기 전 약 48hr, 46hr, 44hr, 42hr, 40hr, 40hr, 38hr, 36hr, 34hr, 32hr, 30hr, 28hr, 26hr, 24hr, 22hr, 20hr, 18hr, 16hr, 14hr, 12hr, 10hr, 8hr, 6hr, 4hr, 3hr, 2hr, 1hr을 포함하는 스트레스에 대해 노출 전의 어느 포인트에서 관리되어도 좋지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 약물은 노출 후 약 1hr, 2hr, 3hr, 4hr, 6hr, 8hr, 10hr, 12hr, 14hr, 16hr, 18hr, 20hr, 22hr, 24hr, 26hr, 28hr, 30hr, 32hr, 34hr, 36hr, 38hr, 40hr, 42hr, 44hr, 46hr, 48hr을 포함하는 스트레스에 대해 노출 후 어느 포인트에서 관리되어도 좋지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <53> **a. 구조적으로 활성인 NF-kB 압**
- <54> 조건(condition)은 구조적으로 활성인 NF-kB 압이어도 좋다. NF-kB 활성을 일으키는 약물은 화학요법 혹은 방사선 치료와 같은 암 치료와 공동하여 관리되어도 좋다.
- <55> 암 치료는 세포독성(cytotoxic) 약물 혹은 시토스테틱(cytostatic) 약물, 또는 그것의 조합의 관리를 포함하여도 좋다. 세포독성 약물은 (1)DNA를 복제하는 세포의 능력을 간섭하고 (2) 암 세포에서 세포 죽음 및/또는 아포토시스를 일으킴을 증식하는 것으로부터 암 세포를 예방한다. 시토스테틱(cytostatic) 약물은 세포 증식을 조절하는 셀룰러 신호 변환의 처리를 조절, 간섭 또는 방해할 매개로 하여 활동한다.
- <56> 세포독성 약물로 사용된 합성물의 종류는, 다음과 같이, 알킬레이팅 약물(alkylating agent)(니트로젠 머스타드, 에틸렌 이미 유도체(ethylemine derivative), 알킬 설퍼네이트(alkyl sulfonate), 니트로소우레(nitrosoureas) 및 트리아젠(triazenes)의 제한 없이 포함; 우라실(uracil) 머스타드, 클로로메틴(cholrmethine), 시클로포스포미드(cyclophosphamide)(Cytoxan®), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 피포브로만(pipobroman), 트리에틸렌-멜라민(triethylene-melamine), 트리에틸렌에티오포스포라민(triethylenethiophosphoramine), 부숴판(busulfan), 카머스틴(carmustine), 로머스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin), 다카바진(dacabazine) 및 테모졸로미드(temozolomede); 안티메타볼리트(antimetabolites)(폴산 안타고니스트(folic acid antagonists), 피리미딘 아날로그(pyrimidine analogs), 퓨린 아날로그(purine analogs) 및 아데노신 디아미나아제 저해물(adenosine deaminase inhibitor s)의 제한 없이 포함; 메토틱렉사트(methotrexate), 5-플루로우라실(5-fluorouracil), 시타라빈(cytarabine), 6-메캅토푸린(6-mercaptopurine), 6-치아구아닌(6-thioguanine), 플루다라빈 인산염(fludarabine phosphate), 펜토스테틴(pentostatine) 및 겐시타빈(gemcitabine); 자연 생성물 및 그들의 유도체(예를 들면, 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids), 항 종양성의 항생물질(antitumor antibiotic), 효소(enzymes), 림포카인(lymphokines) 및 에피도도필로톡신(epidodophyllotoxins)); 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 블레오마이신(bleomycin), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 아라-c(ara-c), 파클리탁셀(paclitaxel) (파클리탁셀은 일반적으로 탁솔(Taxol®)로서 이용가능함), 미트라마이신(mithramycin), 데옥시코-포마이신(deoxyco-formycin), 미토마이신-c(mitomycin-c), 1-아프파라기나아제(1-asparaginase), 인터페론(interferons)(바람직하게는 IFN- $\alpha$ ), 에토포사이드(etoposide) 및 테니포사이드(teniposide)를 포함한다.
- <57> 다른 증식의 세포독성 약물은 나벨빈(navelbene), CPT-11, 아나스트라졸(anastrozole), 레트라졸(letrazole), 카페시타빈(capecitabine), 렐록사파인(reloxafine), 시클로포스포미드(cyclophosphamide), 이포사미드(ifosamide) 및 드롤록사파인(droloxfine)이다.
- <58> 약물에 영향을 주는 미세소관(microtubule)은 세포질의 유사분열을 방해하고 그들의 세포독성 활성에 대해 기술에 잘 알려져 있다. 사용되는 약물에 영향을 주는 미세소관은 알로콜치신(allocholchicine)(NSC 406042), 할리콘드린 B(halichondrin B)(NSC 609395), 콜치신(colchicine)(NSC 757), 콜치신 유도체(예를 들면, NSC 33410), 돌라스테틴 10(dolastatin 10)(NSC 376128), 마이탄신(maytansine)(NSC 153858), 리족신(rhizoxin)(NSC 332598), 파클리탁셀(paclitaxel)(Taxol®, NSC 125973), Taxol® 유도체(예를 들면, 유도체(예를 들면, NSC 608832), 치오콜치신(thiocolchicine) NSC 361792), 트리틸 시스테인(trityl cysteine)(NSC

83265), 빈블라스틴 설페이트(vinblastine sulfate)(NSC 49842), 빈크리스틴 설페이트(vincristine sulfate)(NSC 67574), 에포칠론 A(epothilone A), 에포칠론 B 및 디스코더몰리드(discodermolide)(Service, (1996) Science, 274:2009 참조) 에스트라머스틴(estramustine), 노코다졸(nocodazole), MAP4 등을 포함하지만 제한되지 않는 자연스럽고 종합적인 에포칠론을 포함하지만, 이것에 제한되지는 않는다. 이러한 약물의 예는, 또한, Bulinski(1997) J. Cell Sci. 110:3055-3064; Panda(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10560-10564; Muhlar(1997) Cancer Res. 57:3344-3346; Nicolaou(1997) Nature 387:268-272; Vasquez(1997) Mol. Biol. Cell. 8:973-985 및 Panda(1996) J. Biol. Chem 271:29807-29812에 기재되어 있다.

<59> 또한, 에피도필로톡신; 안티네오플라스트릭 효소; 토포이소머레이즈(topoisomerase) 저해물; 프로카바진(procabazine); 미톡산트론(mitoxantrone); 시스-플라틴 및 카보플라틴과 같은 백금 배위 복합체; 생물학적 반응 조절제; 성장 저해물; 안티호르몬의 치료의 약물; 레우코보린(leucovorin); 테가푸(tegafur); 및 헤마토포이에틱(haematopoietic) 성장 성분과 같은 세포독성 약물이 적합하다.

<60> 사용된 시토스테틱 약물은 호르몬과 스테로이드(종합적인 아날로그 포함); 17 $\alpha$ -에티닐에스트라디올(ethinylestradiol), 디에틸stil베스트롤(diethylstilbestrol), 테스토스테론(testosterone), 프레드니손(prednisone), 플록시메스테론(flucymesterone), 드로모스타논 프로피오네이트(dromostanolone propionate), 테스토락톤(testolactone), 메게스트롤라세테이트(megestrolacetate), 메틸프레드니솔론(methylprednisolone), 메틸-테스토스테론(methyl-testosterone), 프레드니솔론(prednisolone), 트리암시놀론(triamcinolone), hlorotrianisene, 히드록시프로게스테론(hydroxyprogesterone), 아미노글루테치미드(aminoglutethimide), 에스트라머스틴(estramustine), 메드록시프로게스테론엑시테이트(medroxyprogesteroneacetate), 레오프롤리드(leuprolide), 플루타미드, 토레미펜(toremifene) 및 졸라덱스(zoladex)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

<61> 다른 시토스테틱 약물은 매트릭스 메탈로프로테이나아제(metalloproteinase) 저해물과 같은 안티안기오제닉스(antiangiogenics)이고, 안티-VEGF 항체와 같은 다른 VEGF 저해물과 ZD6474 및 SU6668과 같은 작은 분자도 포함된다. Genentech로부터 안티-Her2 항체도 활용된다. 적절한 EGFR 저해물은 EKB-569(결정적인 저해물)이다. 또한, EGFR에 대한 임플론 항체 C225 면역특성과 src 저해물이 포함된다.

<62> 또한, 시토스테틱 약물에 대한 적절한 사용은 증식하지 않는 안드로젠-종자 악성종양을 표현하는 카소덱스(Casodex®)(bicalutamide, Astra Zeneca)이다. 시토스테틱 약물의 다른 예는 에스트로젠 종자 유방암의 증식 또는 성장을 방해하는 안티에스트로젠 Tamoxifen®이다. 세포의 증식의 신호의 변환의 방해는 시토스테틱 약물이다. 대표적인 예는 표피의 성장 성분 저해물, Her-2 저해물, MEK-1 키나아제 저해물, MAPK 키나아제 저해물, PI3 저해물, Src 키나아제 저해물 및 PDGF 저해물을 포함한다.

<63> 암 치료는 방사선 치료를 포함한다. 방사선 치료는 컴퓨터가 종양의 형태를 매치하도록 방사선의 빔 형태가 사용된, 외부 빔 방사, 내부 방사 치료, 또는 투영 방사 치료이다. 방사 치료에 사용된 방사선은 X-선, 전자 빔, 또는 감마 선을 포함하는 소스의 변화로부터 도달되어도 좋다. 방사 치료 동안의 방사선의 관리의 양 및 타이밍은 암의 위치 및 크기에 따라 변화할 수 있다. NF- $\kappa$ B 활성을 일으키는 약물은, 상술한 바와 같이, 방사선 치료와 조합하여 방사선 방호의 약물(섹션 3d 참조)로 관리되어도 좋다.

<64> 처리되어지는 암은, 다음과 같이, 방광의 악성종양(가속화되고 메타스테틱(metastatic)한 방광 암 포함), 가슴, 대장(콜로렉탈(colorectal) 암 포함), 신장, 간, 폐(작거나 작지 않은 세포 폐암 폐 선암종 포함), 난소, 전립선, 고환, 용 생식로, 림프 시스템, 후두, 췌장(외분비선의 췌장 암 포함), 구강, 인두, 식도, 위, 소장, 대장, 직장, 담낭 방광(gall bladder), 자궁 경부, 갑상선 및 피부(편평상피 암 포함); 백혈병, 급성 림프시틱(lymphocytic) 백혈병, 급성 림프블라스트릭(lymphoblastic) 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, Hodgkins 림프종, non-Hodgkins 림프종, 헤리 세포 림프종, 히스티오시틱(histiocytic) 림프종 및 Burketts 림프종을 포함하는 림프구 계통의 헤마토포에틱 종양; 급성 및 만성 미엘로제노스(myelogenous) 림프종, 미엘로디스플라스틱 신드롬(myelodysplastic syndrome), 미엘로이드(myeloid) 림프종 및 프로미엘로시틱 림프종을 포함하는 미엘로이드 계통의 헤마토포에틱 종양; 아스트로시토마(astrocytoma), 신경아 종(neuroblastoma), 신경교종 및 슈와노마스(schwannomas)를 포함하는 신경 시스템의 중심 및 주위의 종양; 피프로사르코마(fibrosarcoma), 라브도미오사르코마(rhabdomyosarcoma) 및 오스테오사르코마(osteosarcoma)를 포함하는 메센치말 오리진(mesenchymal origin)의 종양; 및 멜라노마(melanoma), 제노더마 피그멘토섬(xenoderma pigmentosum), 케라토악탄토마(keratoactanthoma), 세미노마(seminoma), 티로이드 폴리큘라 암(thyroid follicular cancer) 및 테라토카시노마(teratocarcinoma)를 포함하는 다른 종양을 포함하지만, 이것에 제한되지는 않는다.



<65> **b. 암 치료로부터 사이드 효과의 치료**

<66> 조건 또한 구조적으로 활성인 NF- $\kappa$ B 암의 치료에 기인하는 보통 세포에 위험할 수도 있다. NF- $\kappa$ B 활성을 일으키는 약물은 상술한 바와 같이 암 치료와 공동하여 관리되어도 좋다.

<67> **c. 세포 노화의 조절**

<68> 조건은 또한 세포 노화이어도 좋다.

<69> **d. 방사**

<70> 조건은 또한 방사 노출이어도 좋다. 이온화 방사(IR)에 대한 노출은, 신체 전체 혹은 국부적으로, 짧거나 긴 기간이어도 괜찮고, 1회에 혹은 다수 회에 적용될 수 있다. 따라서, 원자력의 사고 혹은 군사 공격이 신체 전체의 방사 단일의 높은 양의 노출에 영향을 미친다(때때로 방사성 동위원소로 오랜 기간 중독되는 것에 따른다). 마찬가지로, 호스트 혈액 선구 세포로부터 그들을 "클리닝"함으로써 도너의 뼈 골수에 대한 호스트의 헤마토포에틱 기관을 준비할 필요가 있는 경우, 방사 단일 양이 뼈 골수 이식 환자의 사전치료(pretreatment)를 위해 일반적으로 이용된다.

<71> 분자 및 세포질 레벨에서, 방사 미립자는 DNA 및 DNA 사이의 크로스-링크(cross-linking), 단백질, 세포 막 및 다른 고분자 구조의 파손을 일으킬 수도 있다. 이온화 방사는 또한, 자유 라디칼의 상승과 반응성 산소 종류(ROS)를 줌으로써 세포질 성분에 대해 제 2의 위험을 일으킬 수도 있다. 다중 회복 시스템은, DNA의 성질 및 충실을 반환하는 몇몇 DNA 회복 경로 및 자유 라디칼 및 ROS를 제거하고 산화된 단백질 및 지질을 감소시키는 항산화 화학제품 및 효소와 같이, 이 위험을 중화시킨다. 세포 체크포인트 시스템(cellular checkpoint system)은 DNA 결함(defect)을 검출하고 손상이 복구되거나 세포가 성장을 억제하도록 결정 또는 프로그래밍된 세포 사멸(cell death)에 도달할 때까지 세포주기 진행(cell cycle progression)을 지연시키기 위해 제공되는 것이다.

<72> 유기체 레벨(organism level)에서, 낮고 절제된(low and moderate) 레벨의 방사능(radiation)의 즉각적 영향은 대개 세포 죽음에 의해 발생되고, 방사 유도 발화(radiation-induced inflammation)로 이어진다. 더 높은 방사능 레벨에서는, 소위 헤마토포에틱(hematopoietic) 및 위장관 증후군(gastrointestinal syndrom)이 단기 방사 유도 죽음(short-term radiation-induced death)으로 이어진다. 헤마토포에틱 신드롬은 헤마토포에틱 셀과 그 원종(progenitor)의 손실에 의하여 특징되며, 그것에 의해 혈액 및 림프계의 재생(regenerate)을 불가능하게 한다. 죽음은 일반적으로 감염(면역억제(immunosuppression)로 인한), 출혈(hemorrhage) 및/또는 빈혈(anemia)의 영향으로서 발생한다. 위장관증후군은 소장(small intestine)에서 현저한, 장벽(intestinal wall)의 붕괴(disintegration)로 이어지는 장 상피세포(intestinal epithelium)에서의 대량의 세포 사멸(massive cell death)과 세균(bacteremia) 및 패혈증(sepsis)으로 인한 사멸로 특징된다. 헤마토포에틱 신드롬은 낮은 방사능의 방사량(dose)에서 자신을 드러내고 위장관증후군보다 더 지연된 죽음으로 이어진다. 매우 높은 방사능의 방사량은 신경 퇴화(neuronal degeneration)를 유도함으로써 거의 즉각적인 죽음을 일으킬 수 있다.

<73> 방사능의 심각한 독성의 기간을 생존한 유기체는 방사 유도 발암(radiation-induced carcinogenesis)을 포함하는 장기 영향(long-term consequence) 및 방사후 몇 달 및 몇 년간 노출된 기관(exposed organ)(예를 들면, 신장(kidney), 간(liver), 폐(lungs))에서 발달하는 섬유형성(fibrosis)을 겪는다.

<74> NF- $\kappa$ B의 유도물질(inducer)은 세포 레벨에서 강한 사전 생존활성(pro-survival activity)을 가지며 자연 방사능(natural radiation event), 낮은 방사능 방사량, 암 치료(cancer therapy)의 일부로서의 방사능 관리(radiation administer), 또는 핵 재해(nuclear accident)의 영향을 치료하는데 사용될 수 있다. 더욱이, NF- $\kappa$ B의 유도물질은 현재 알려진 모든 방사선 방호물(radioprotectant)과 다른 메커니즘을 통해 작용하므로, 다른 방사선 방호물과 조합하여 사용될 수 있고, 그것에 의해 이온화 방사능(ionizing radiation)으로부터의 보호범위(scale of protection)를 극적으로 증가시킨다.

<75> 역사적으로, 방사선 방호물은 통상 항산화제(antioxidant) 및 무방사능(free radical) -합성 및 천연의- 스캐빈저였다. 보다 최근에는, 사이토카인(cytokine) 및 성장인자(growth factor)가 방호물 리스트에 추가되었고; 그들이 방호 메커니즘은 그들의 민감한 조직(sensitive tissue)의 재생(regeneration)에 대한 촉진효과(facilitating effect)에 기인한 것으로 생각되었다. 두 방사선 방호물 그룹 사이의 명확한 기능적 구분은 없으나, 일부 사이토카인은 세포 산화방지 단백질(cellular antioxidant protein)의 발현을 유도하므로,

MnSOD(manganese superoxide dismutase) 및 메탈로티오닌(metallothionein)과 같이, 그들의 사용이 유리할 수 있다.

<76> 방사선 방호물은 항산화제, 무방사능 스캐빈저, 사이토카인, 플라겔린(flagellin) 및 잠재(latent) TGF $\beta$ 를 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 방사능 노출의 영향을 치료하는 약품(agent)일 수 있다. 항산화제 및 무방사능 스캐빈저는, 시스테인(cystein), 글루타시온(glutathione) 및 빌리루빈(bilirubin)과 같은, 황(thiol); 아미포스틴(amifostine)(WR-2721); 비타민 A; 비타민 C; 비타민 E; 및 인디안 홀리 바실(Indian holy basil)(Ocimum sanctum), 오리엔틴(orientin) 및 비세닌(vicenin)과 같은 플라보노이드(flavonoid)를 포함하여, 그러나 여기에 한정되지 않고, 사용될 수 있다. 사이토카인 및 성장인자는 방사능에 민감한 줄기 세포(stem cell) 개체수를 보충(replenishing) 및/또는 보호(protecting)함으로써 방사선 방호를 제공한다. 사용될 수 있는 사이토카인은 줄기세포 인자(SCF, c-kit ligand), Flt-3 리간드(ligand), 인터루킨(interleukin)-1 단편(fragment) IL-1 $\beta$ -rd 및 케라티노사이트(keratinocyte) 성장인자(KGF)를 포함한다. 천연 사이토카인이 아닌, 몇몇 다른 인자는, 면역세포(immunocyte)의 증식(proliferation)을 자극함으로(stimulate), 사용될 수 있다. 이들은 5-AED(5-androstenediol)을 포함하고, 이는 사이토카인의 발현을 자극하는 스테로이드이며, 암모니움(ammonium) 트라이클로로(tri-chloro)(dioxoethylene-0, 0'-) 텔루레이트(tellurate)(AS-101)와 같은 합성 화합물(synthetic compound)이다. 잠재 TGF $\beta$ , 플라겔린(flagellin) 및 플라겔린 유도체(flagellin derivatives)는, 국제특허문헌 Nos. PCT/US2004/040656호 및 PCT/US2004/040753호 및 미국특허문헌 No. 6,069,826호와, 참조로서 여기에 포함된 내용에 나타낸 바와 같이, NF- $\kappa$ B 작용의 강한 유도물질이다.

#### <77> 4. 조성(Composition)

<78> 본 내용은 NF- $\kappa$ B의 유도물질의 치료적으로 효과적인 양을 포함하는 조성을 나타낸다. 상기 조성은 약학적 조성(pharmaceutical composition)이 될 수 있으며, 이는 기존에 알려진 종래기술의 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 상기한 바와 같이, NF- $\kappa$ B의 유도물질을 포함하는 조성은 방사능에의 노출, 암 치료의 부작용, 스트레스 및 세포노화를 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 아포토시스(apoptosis)와 관련된 상태 치료를 위해 포유동물에 적용될 수 있다. 상기 조성은 방사선 방호물 또는 화학적 치료약을포함하나, 여기에 한정되지 않는, 부가적인 약품을 포함할 수도 있다.

#### <79> a. 투여(Administration)

<80> 여기에 제공된 조성은 경구(oral), 비경구(parenterally), 혀 밑(sublingually), 피부(transdermally), 직장(rectally), 트랜스무코설(transmucosally), 국소(topically), 흡입(via inhalation), 구강투여(via buccal administration) 또는 그들의 조합을 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 어떠한 방법으로도 투여될 수 있다. 비경구 투여는, 정맥주사(intravenous), 동맥주사(intraarterial), 동맥내 주사(intraperitoneal), 피하주사(subcutaneous), 근육주사(intramuscular), 인트라테칼(intrathecal) 및 관절주사(intraarticular)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는다. 수의학적 사용(veterinary use)에 대하여는, 상기 조성은 일반적인 수의학 관습(practice)에 따라 적합하게 적용 가능한 형식으로서 투여될 수 있다. 수의사는 개별의 동물에 대하여 가장 적합한 투여량과 투여경로를 즉시 결정할 수 있다.

#### <81> b. 형식화(Formulation)

<82> 여기에 제공되는 조성은 종래의 방법에서 형식화된 알약(tablet)이나 정제(logenzes)의 형태일 수 있다. 예를 들면, 경구 투여를 위한 알약 및 캡슐은, 결합제(binding agent), 필러(filler), 윤활제(lubricants), 붕괴제(disintegrant) 및 웨팅제(wetting agent)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 종래의 엑시펜트(excipients)를 포함할 수 있다. 결합제는 시럽(syrup), 아카시아(accacia), 젤라틴(gelatin), 솔비톨(sorbitol), 트래거캔스(tragacanth), 녹말폴(mucilage of starch) 및 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone)을 포함하나, 여기에 한정되지 않는다. 필러는 락토즈(lactose), 설탕(sugar), 마이크로크리스탈린 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 옥수수풀(maize starch), 칼슘 포스페이트(calcium phosphate) 및 솔비톨(sorbitol)을 포함하나, 여기에 한정되지 않는다. 윤활제는 마그네슘 스테아레이트(magnesium stearate), 스테아릭산(stearic acid), 활석(talc), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 및 실리카(silica)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는다. 붕괴제는 감자폴(potato starch) 및 소듐 스타크 글리콜레이트(sodium starch glycolate)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는다. 웨팅제는 소듐 로릴 설페이트(sodium lauryl sulfate)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는다. 알약은 종래기술에서 잘 알려진 방법에 따라 코팅될 수 있다.



- <83> 여기에 제공된 조성은 수양액(aqueous) 또는 기름 현탁액(oily suspensions), 용액(solutions), 에멀전(emulsions), 시럽(syrups) 및 엘릭서(elixirs)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 액체 형식이 될 수도 있다. 상기 조성은 또한 사용 전에 물이나 다른 적합한 운반체와 함께 구성되는 건조물(dry product)로서 형성될 수도 있다. 그러한 액체 조제(liquid preparation)는, 멈춤제(suspending agent), 유화제(emulsifying agent), 비수양액 운반체(nonaqueous vehicle) 및 보존제(preservatives)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 첨가제(additive)를 포함한다. 멈춤제는 솔비톨 시럽, 메틸 셀룰로즈, 글루코스/설탕 시럽, 젤라틴, 수산화에틸셀룰로즈(hydroxyethylcellulose), 탄산화메틸셀룰로즈(carboxymethylcellulose), 알루미늄 스테레이트 겔(aluminum stearate gel) 및 수소화 식용지방(hydrogenated edible fat)을 포함하나, 여기에 한정되지 않는다. 유화제는 레시틴(lecithin), 솔비탄 모노올레이트(sorbitan monooleate) 및 마카시아(acacia)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는다. 비수양액 운반체는 식용 기름(edible oil), 아몬드 기름(almond oil), 분별 코코넛 오일(fractionated coconut oil), 유성 에스테르(oily esters), 프로필렌 글리콜(propylene glycol) 및 에틸알콜(ethyl alcohol)을 포함하나, 여기에 한정되지 않는다. 보존제는 메틸(methyl) 또는 프로필(propyl) p-수산화벤조네이트(hydroxybenzoate) 및 소르빅산(sorbic acid)을 포함하나, 여기에 한정되지 않는다.
- <84> 여기에 제공되는 조성은 또한 서포지토리(suppository)로서 형성될 수 있고, 이는 코코아 버터(cocoa butter)나 글리세리드(glyceride)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는 것에 근거하는 서포지토리를 포함할 수 있다. 여기에 제공되는 조성은 또한 흡입을 위하여 형성될 수도 있고, 이는 다이클로로디플루오르메탄(dichlorodifluoromethane)이나 트라이클로로플루오르메탄(trichlorofluoromethane)과 같이, 프로펠런트(propellant)를 사용하는 에어졸(aerosol)의 형태나 가루약(dry powder)으로 투여되는 용액(solution), 서스펜션(suspension) 또는 에멀전(emulsion)을 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 형태일 수 있다. 여기에 제공되는 조성은 또한, 크림(cream), 연고(ointment), 로션(lotion), 파스(pastes), 반창고(medicated plaster), 패치(patch) 또는 막(membrane)을 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 수양액 또는 비수양액 운반체를 포함하는 트랜스더말 형태(transdermal formulation)로서 형성될 수도 있다.
- <85> 여기에 제공되는 조성은 또한 주사(injection) 또는 연속 주입(continuous infusion)을 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 비경구 투여를 위해 형성될 수도 있다. 주사를 위한 형성은 유성 또는 수양액 운반체에서의 서스펜션, 솔루션, 또는 에멀전의 형태일 수 있고, 멈춤, 안정(stabilizing) 및 분산제(dispersing agent)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 형성제(formulation agent)를 포함할 수 있다. 상기 조성은 또한 무균(sterile), 무열수(pyrogen-free water)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 적합한 운반체(vehicle)와 함께 재구성을 위한 분말 형태(powder form)로 제공될 수도 있다.
- <86> 여기에 제공되는 조성은 또한 저장 조제(depot preparation)로서 형성될 수도 있고, 이는 이식(implantation) 또는 근육주사(intramuscular injection)에 의해 투여될 수 있다. 상기 조성은 적합한 중합체(polymeric) 또는 소수성 물질(hydrophobic material)(예를 들면, 적용가능한 오일의 에멀전으로서), 이온교환수지(ion exchange resin), 또는 스파링리 솔루블(sparingly soluble) 유도체(derivative)로서(예를 들면, 스파링리 솔루블 염(sparingly soluble salt)) 형성될 수 있다.
- <87> **c. 조제(Dosage)**
- <88> 치료에 사용하기 위해 요구되는 약제의 치료적으로 유효한 양은 치료받는 환경의 특징, NF-κB 작용의 유도물질이 요구되는 기간, 환자의 나이와 상태에 따라 변화하며, 궁극적으로는 담당의사에 의해 결정된다. 그러나 일반적으로, 성인의 치료에 대하여 전형적으로 채용되는 투여량은 하루에 0.001mg/kg에서 200mg/kg의 범위이다. 투여량은 하루에 약 1μg/kg에서 약 100μg/kg일 수 있다. 원하는 투여량은 편리하게 한 번의 투여로 투여되거나, 예를 들면, 하루에 2회, 3회, 4회 또는 그 이상의 투여로서 적절한 간격을 두고 여러 번 투여될 수 있다. 일단 약제가 더 이상 투여되지 않으면 일반 세포 내에서 NF-κB 활성이 감소하므로, 다중투여가 바람직하거나 요구된다.
- <89> NF-κB 유도물질의 투여량은 약 1μg/kg, 25μg/kg, 50μg/kg, 75μg/kg, 100μg/kg, 125μg/kg, 150μg/kg, 175μg/kg, 200μg/kg, 225μg/kg, 250μg/kg, 275μg/kg, 300μg/kg, 325μg/kg, 350μg/kg, 375μg/kg, 400μg/kg, 425μg/kg, 450μg/kg, 475μg/kg, 500μg/kg, 525μg/kg, 550μg/kg, 575μg/kg, 600μg/kg, 625μg/kg, 650μg/kg, 675μg/kg, 700μg/kg, 725μg/kg, 750μg/kg, 775μg/kg, 800μg/kg, 825μg/kg, 850μg/kg, 875μg/kg, 900μg/kg, 925μg/kg, 950μg/kg, 975μg/kg 또는 1mg/kg을 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 투여량이 될 수 있다.
- <90> **5. 스크린 방법(screening method)**

- <91> 여기에 제공되는 방법은 또한 NF- $\kappa$ B 활성 유도하는 약제를 식별하는 방법에 관한 것이다. NF- $\kappa$ B 활성을 유도하는 약제는, NF- $\kappa$ B 활성의 유도물질을 NF- $\kappa$ B 활성화된 발현 시스템에 더하는 단계와, 제어를 위해 NF- $\kappa$ B 활성화된 발현을 비교하고, 그것에 의해 NF- $\kappa$ B 활성의 유도물질이 NF- $\kappa$ B 활성화된 발현 시스템의 레벨을 증가시키는 능력에 의해 확인되는 방법에 의해 확인될 수 있다.
- <92> 후보 약제(candidate agent)가 라이브러리(예를 들면, 화합물(compound)의 모음(collection)) 내에 제공될 수 있다. 그러한 약제는, 예를 들면, 발현 라이브러리 내의 DNA 분자(molecule)로 부호화된다. 후보 약제는 양호한 중막(conditioned media) 또는 세포추출(cell extract)로 제공될 수 있다. 다른 그러한 약제는 종래 기술에서 “작은 분자(small molecule)”로 알려진 화합물을 포함하고, 이는 105 dalton보다 적은, 적합하게는 104 dalton보다 적은 분자무게(molecule weight)를 가지고, 더 적합하게는 103 dalton보다 적은 분자무게를 가진다. 그러한 후보약제는 결합 라이브러리의 멤버로서 제공될 수 있고, 다중의 소정의 화학반응에 따라 제조된 합성 약제(예를 들면, 펩티드(peptides))를 포함한다. 당업자라면 그러한 라이브러리가 공지된 절차에 따라 제조될 수 있고, 후보 약제의 라이브러리의 멤버는 동시에 또는 순차적으로 여기에 기재된 바와 같이 가려진다는(screened) 것을 알 수 있을 것이다.
- <93> 스크린법은 시험관(in vitro), 세포 기반(cell-based), 생체 내(in vivo) 분석을 포함하는, 다양한 형식으로 수행될 수 있다. 바람직하게는, 포유류 세포를 포함하는 세포가 사용될 수 있고, 더 바람직하게는 인간 또는 비인간 영장류 세포가 사용될 수 있다. 셀 기반 스크리닝(cell-based screening)은 NF- $\kappa$ B의 활성에 대하여 대리 표시(surrogate marker)를 나타내는 유전적으로 수정된 종양세포(tumor cell)를 사용하여 수행될 수 있다. 그러한 표시는 박테리얼  $\beta$ -갈락토시다제(bacterial  $\beta$ -galactosidase), 루시페라아제(luciferase) 및 증대 녹색 형광 단백질 enhanced green fluorescent protein(EGFP)을 포함하나, 여기에 한정되지 않는다. 대리 표시의 표현량은 색도계(colorimetry), 광도(luminometry) 및 플루오르화(fluorimetry)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 종래기술에서 표준된 기술을 사용하여 측정될 수 있다.
- <94> 의심되는 조절체(modulator)가 세포에 부가된 상태는, 믹싱 등에 의해, 본질적으로 아포토시스 또는 시그널링을 막을 다른 어떤 화합물이 존재하지 않으면 아포토시스 또는 시그널링을 받을 수 있는 상태이다. 유효 조건은, 적절한 배지(medium), 온도, pH 및 세포 성장을 허가하는 산소 조건을 포함하나, 이것에 한정되는 것은 아니다. 적합한 매개체는 일반적으로 성장인자 및 동화 카본(assimilable carbon), 질소(nitrogen) 및 인산염(phosphate) 소스뿐만 아니라, 적합한 염(salt), 미네랄(mineral), 금속 및 비타민과 같은 다른 영양소(neutrient)를 포함하고, 세포가 아포토시스 또는 시그널링을 나타낼 수 있도록 배양될 수 있는 유효 배지를 포함하는 고체 또는 액체 배지이다. 예를 들면, 포유류 세포에 대하여, 배지(media)는 10% 송아지 태아 혈청(fetal calf serum)을 함유하는 Dulbecco의 수정된 독수리 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)을 포함할 수 있다.
- <95> 세포는, 조작배양 플라스크, 테스트 튜브, 마이크로티터 접시(microtiter dish) 및 페트리 플레이트(petri plate)를 포함하나, 여기에 한정되지 않는, 다양한 컨테이너에서 배양될 수 있다. 배양은 세포에 적합한 온도, pH 및 이산화탄소 농도에서 수행된다. 그러한 배양조건 또한 종래기술의 범위 내이다.
- <96> 의심되는 조절체를 세포에 부가하는 방법은 일렉트로포레이션(electroporation), 마이크로인젝션(microinjection), 세포 발현(cellular expression)(즉, 노출된 핵산 분자(naked nucleic acid molecule), 재조합형 바이러스(recombinant virus), 레트로바이러스 발현벡터(retrovirus expression vector) 및 아데노바이러스 발현(adenovirus expression)를 포함하는 발현시스템을 사용), 이온결합제(ion pairing agent)의 사용 및 세포 퍼미어빌리제이션(cell permeabilization)을 포함한다.
- <97> 본 발명은 이하의 한정되지 않는 예에 나타난 바와 같이, 다양한 형태를 가진다.

## 실시예

<98> 예 1

<99> 쥐에서 p53 결핍의 GI 신드롬 성장 가속

<100> 포유류의 이온화 방사능(ionizing radiation; IR)으로 인한 죽음의 주된 원인은 방사선 양에 의존한다. 9-10Gy까지의 방사량에서, 쥐는 12-20일 후에 죽었고, 근본적으로 치명적인 골수 고갈, 즉, 헤마토포에틱 신드롬이 원인이었다. 이 방사량에서, 방사된 쥐는 골수 이식에 의해 치명상으로부터 구조될 수 있었다. 13-15Gy를 받은 동물은 치료 후(헤마토포에틱 신드롬으로 죽기 전에) 7-12일 사이에 소장의 손상의 합병증, 즉, 위

장관증후군(GI)으로 죽었다. 소장의 상피세포의 세포증식은 줄기세포와 조기 증식 원종이 위치하는 소낭(crypts)으로 제한된다는 것은 잘 알려져 있다. 몇 번의 세포분할 후, 소낭 줄기세포의 이미 분화된 후손은 융모 끝(villar tip)에서 떨어지도록 융모로 올라간다. 쥐의 소장에서는, 세포의 전체 “트립(trip)” (즉, 분열하는 구역에서 융모의 끝까지)은 일반적으로 3일에서 5일 걸린다. 감마선 방사를 위해 소장의 반응이 형태학적 레벨(pathomorphological level)에서 잘 검진되어 있었으나, GI 치사성의 정확한 원인은, 주요한 이벤트를 포함하여, 아직 불명으로 남아있다. 유동체(fluid) 및 전해질 불균형(electrolyte imbalance), 균혈증(bacteremia) 및 균체내 독소(endotoxemia)로 연결되는 융모의 노출에 의해 이어지는, 상피 소낭 세포의 손상의 직접적인 결과로서 죽음이 발생한다. 염증(inflammation) 및 스트로말 응답(stromal response)에 더하여, 내피종 기능장애(endothelial dysfunctions)가 치명성에 기여하는 중요한 인자로 나타난다.

<101> HP와 GI 증후군의 모두에서는, 치명적인 조직 손상이 대량의 p53 의존 아포토시스로부터 발생된다. 게다가, p53 의존 모발 손상(알로페시아)은 실험적인 화학요법 또는 방사능에 의해 발생된다. 그러므로, p53은 유전 독성 스트레스(genotoxic stress)에 세포들을 민감하게 하는 경우에 중요한 역할을 한다.

<102> 방사능에 의한 사망의 경우 p53의 역할을 검사하기 위해서, 쥐에 p53의 작은 분자 억제제와 감마 방사가 이루어지기 바로 이전의 피피스린-알파(pifithrin-alpha)(PFTα)(Komarov et al., Science 285:1733-7, 1999)가 투여되었다. C57B1/6J로 처리된 쥐(별다른 지시가 없는 한, 6-8주가 지난 쥐들이 여기에서 그리고 다음에 사용되었다.)에 PFTα의 10mg/kg가 투여되었으며, 분당 4Gy의 투여량으로 셰퍼드(Shepherd) 4000 Ci<sup>137</sup>를 이용하여 방사되었다. PFTα는 쥐를 감마 방사능의 단일한 9Gy 투여량 또는 12.5 Gy(5\*2.5 Gy)의 작은 부분이 누적된 방사능 투여량으로부터 보호한다. 반대로, PFTα는 단일한 높은 투여량, 즉 IR의 12.5 또는 25Gy로 처리된 쥐의 생존에 아무런 영향을 끼치지 않는다.

<103> GI 증후군에서 p53의 역할을 검사하기 위해, 야생형과 p53 결핍 쥐가 감마 방사능의 낮은 투여량(10 Gy)과 높은 투여량(15 Gy)에 노출되도록 하였다. 도 1b에 도시된 바와 같이, p53 결핍 쥐(deficient mice)는 HP 증후군을 통해 사망을 가져오는 낮은 방사능 투여량에는 저항성을 나타내지만, GI 증후군을 통해 사망을 가져오는 더 높은 방사능 투여량에는 더욱 더 민감하게 나타났다. 15 Gy의 감마 방사능 투여량 이후에 0, 24, 48, 72와 96 시간 후에 야생형과 p53이 없는 쥐로부터 소장(small intestinal)중에서 헤머톡실린-이오신으로 염색된 파라핀 부분들이 도 1d에 도시되어 있다. p53 결핍 쥐는 가속화된 상피 세포 손상을 나타내었다. 소장내에서 TUNEL 염색을 통해 야생형에서는 아포토시스가 분명히 나타났지만, p53 결핍 쥐에서는 나타나지 않았다. 이것을 더욱 방사하기 위해, 야생형의 쥐들의 몸에 전체 방사능 중 11 Gy에 노출시켰으며, 그 후에 야생형 또는 p53이 없는 선천적인(syngeneic) C57B1/6J로부터 추출한  $1.5 \times 10^7$  개의 골수 세포를 투여시켰다.(이러한 방사능 투여는 재복원되지(nonreconstituted) 않는 대조군 쥐에서는 100% 치명상을 입히게 된다.) 두 달 후에, 헤마토포에시스의 완전한 회복 후에, 두 그룹들의 동물들이 15 Gy의 감마 방사능으로 처리되었다. 도 1c에 도시된 바와 같이, 골수의 p53 상태에서 서로 다른 두 그룹의 쥐들간의 사망율에는 차이가 없었다(두 그룹들은 야생형의 내장 세포를 가지고 있다.).

<104> 세포 증식과 세포 생존의 원리들은 야생형과 p53이 없는 쥐의 소장내에서 더욱 검사되었다. 4주가 지난 야생형(wild type)과 p53이 없는 쥐들에게 <sup>14</sup>C-티미딘이 복막 내부로 투여되었다(동물마다 10 μCi). 그리고 각 그룹의 반을 15 Gy의 감마 방사능에 노출시켰다. 전체 몸의 방사선 사진들은 24 시간 후에, p53 결핍 쥐의 내장 소낭 내의 세포들이 증식을 계속하고, 반면에 야생형의 쥐의 세포들은 그대로 있었다는 것을 보여주었다(도 2a, 좌측). 4주가 지난 야생형과 p53이 없는 쥐들을 15 Gy의 감마 방사능에 노출시켰다. 그리고, 그들이 희생되기 2시간 전에, 그들에게 BrdU(50mg/kg)를 투여하였으며, 내장들은 면역성이 있다는 것으로 표시되었다. 방사후 24시간 후에, p53이 없는 쥐들에서는 세포 증식이 있었지만, 야생형의 쥐에서는 없었다. 반대로, 96시간 후에는, p53이 없는 쥐들에서는 미미한 세포 증식이 있었지만, 야생형의 쥐에서는 좀 더 많은 표시된 세포들이 나타났다.

<105> 이러한 것을 특징으로 하기 위해, BrdU 포지티브 세포의 수가 15 Gy의 감마 방사능의 방사후에 서로 다른 세 위치에서 야생형과 p53이 없는 쥐들의 소장 내에서 카운트되었다. 이러한 동물들은 각각의 시간 때에서 분석되었으며, 5개의 장골(ilial)의 단면부들이 각 동물들로부터 준비되었으며, 소낭(crypt)과 돌기(villi)의 수를 계산하기 위해 현미경으로 분석되었다. 소장 내에서 BrdU 포지티브 세포의 수는 200배의 증배(100-300 소낭)를 통해 5개의 무작위 필드내에서 카운트 되었으며, BrdU 포지티브 세포의 평균 수가 도시되어 있다(도 2b). p53이 없는 쥐에서 BrdU 포지티브 세포의 수는 10시간 후에 가장 많았으며, 그 후에는 감소되었다. 반면에, 야생형의 쥐에서는 BrdU 포지티브 세포의 수가 최초의 20 시간 동안에는 감소되었으며, 그 후에는 증가

되었다. BrdU로 표시된 세포들의 위치는, 15 Gy의 감마 방사능의 방사후에 서로 다른 시간 위치에서 야생형과 p53이 없는 쥐들의 소장 내에서 추적되었다. 방사능 방사후에 BrdU가 30분 투여되었으며, 쥐들은 0, 48, 72와 96시간에서 희생되었다. p53이 없는 쥐에서는, 소장에서 돌기까지 BrdU로 표시된 세포들의 가속화된 이동이 있었으며(48시간에서 야생형과 p53이 없는 쥐들과 비교하자), 그 후에는 p53이 없는 쥐들에서 표시된 세포들의 급속한 제거가 발생하였다(도 2c).

<106> 그러므로, 방사된 p53 결핍 상피의 소장내에서의 연속적인 세포 증식은 소장의 손상된 세포들의 가속화된 사망과 돌기의 급속한 파괴와 상관 관계가 있다. 그러나, 야생형의 쥐에서는, 소장의 소장내에서 성장을 억제 시킴으로써, p53이 더욱 오래 생존하였다. 그러므로, 내장을 그대로 보존할 수 있었다. 그러므로, p53의 프로아포프토틱(proapoptotic) 기능은 헤마토포에틱(hematopoietic) 증후군을 증진시키며, 성장 억제 기능은 위장 증후군의 발전을 지연시킨다. 그러므로, p53의 약리학적인 억제는 GI 증후군에 대해 (유해하지는 않지만) 아무 소용이 없다. 그러므로, 다른 메커니즘, 예를 들면, NF- $\kappa$ B의 활성 그리고 이후의 세포 사망의 억제에 의존하는, 소장의 상피를 대한 방사능으로부터 보호할 수 있는 다른 방법을 개발시키는 것이 필요하다.

## <107> 예 2

### <108> 전체 몸체 방사된 감마 방사능에 의한 리포펩티드 지연 쥐의 사망

<109> 리포펩티드는 아포토시스 사망의 억제제로 작용하는 NF- $\kappa$ B의 유력한 활성인자이다. 리포펩티드가 방사능 보호제로 기능한지를 판단하기 위해, 초기에는 여러가지 리포펩티드가 최대 허용 가능치(MTD)를 결정하기 위해 시험되었다. 여러가지 리포펩티드는 총 10 Gy 또는 13-15 Gy의 감마 방사능에 노출된 후에 치명적인 헤마토포에틱 또는 nd 위장 증후군에 대한 NIH 스위스 쥐에서의 보호 효과를 측정하기 위해 시험되었다. 리포펩티드 (0.3-10  $\mu$ g/한 마리의 쥐)는 방사30분 이전에 피하 조직으로 투여되었다. 리포펩티드 시험을 통해 제공된 방사능 보호기능은 표 3과 같이 표시된다.

<110> [표 3]

Peptide Sequence	SEQ ID NO	Peptide Length	N-acylation
SKKKK	8	5	R-Pam2
SKKKK	8	5	R-Pam3
FEPPATTT	22	9	Pam2
GNDESNISFKEK	31	13	Pam2
GDPKHPKSF	24	9	Pam2
GETDKEGKIIRIFDNSF	37	17	Pam2

<111> R-PAM<sub>2</sub>-SKKKK(SEQ ID NO:8)(이 후에는 이러한 화합물을 CBLB601이라고 부른다.)를 이용하는 대표적인 실험의 결과들이 도 3에 도시되어 있다. 기대한 바와 같이, 10 Gy가 방사된 대조군 쥐들은 처리 후 11일과 15일 사이에 사망하였으며, CBLB601을 투여한 모든 동물들은 처리 후 35일 이상 살아남았다. 이와 같이, 13 Gy가 방사된 대조군 쥐들은 처리 후 6일과 10일 사이에 사망하였으며, CBLB601을 투여한 모든 동물들은 처리 후 35일 이상 살아남았다. CBLB601의 방사능 보호 기능은 비장의 크기에 대한 방사능의 효과를 측정함으로써 더욱 심도있게 분석되었다. 도 4에 도시된 바와 같이, CBLB601로 처리된 쥐들은 비장의 크기가 줄어드는 것이 거의 없었다. CBLB601은 또한 흉선(thymus)을 방사능으로부터 보호한다(데이터는 표시 안됨). 스플리노사이트(splenocyte)를 효과적으로 보호하고, 흉선의 신속한 회복을 지원하며, GI 트랙트(tract)를 방사능 손상으로부터 보호하는 CBLB601의 기능은 리포펩티드가 방사능 보호제로서 사용될 수 있다는 것을 입증하고 있다.

## <113> 예 3

### <114> 전체 몸체 방사된 감마 방사능에 대한 CBLB601의 다양한 투여의 방사능 보호 효과

<115> CBLB601은 C-SKKKK(SEQ ID NO: 8)로 구성된 펩티드 일부분을 가지는 R-Pam<sub>2</sub>-리포펩티드가, 더욱 상세한 특징을 위해, NF- $\kappa$ B를 활성화시키는 기능과, NIH-SWISS 쥐에서의 방사능 보호기능에 대한 생체 예비 데이터에 근거하여 방사능 보호제로서 선택되었다(보기 2참조). 이러한 연구의 목적은 적절한 투여량과, 투여 경로 및 보호제로 작용하는 CBLB601의 투여 시간을 결정하기 위한 것이었다. 10-15주가 지난 ICR 암컷 쥐가 사용되었으며, 그룹 또는 조건마다 10-15 개의 동물들이 사용되었다.

<116> NOAEL(No Obvious Adverse Effects Level)의 투여량은 ICR 쥐에 CBLB601을 증가시키면서(0.3, 1, 3, 10, 30,



60, 100  $\mu$ g/한 마리 쥐)복막 내부에 투여(i.p)함으로써 결정되었다. 대조군 쥐는 PBS가 투여되었다. 쥐들은 2주 동안 관찰되었다. 최초의 1주 동안에는, 쥐들의 무게가 날마다 측정되었다. CBLB601로 처리된 쥐와 대조군 쥐들 사이에는 무게 차이가 없었다. 그러나, 60  $\mu$ g의 투여량에서는, 처리 후 3-4일 정도에, 쥐들이 낮은 행동과 더러운 털의 발생과 같은 병적 상태를 나타내고 있었다. 30  $\mu$ g의 투여량에서는, 처리된 쥐와 대조군 쥐 사이에서는 현저한 차이가 없었다. 그러므로, CBLB601에 대한 NOAEL은 30  $\mu$ g/한 마리 쥐로 결정되었다.

<117> CBLB601에 대한 최적 복막 내부 투여량은 방사선 방사 전에 다른 시간 때에서 화합물을 투여함으로써 결정되었다. 이전에, CBLB601은 10 Gy에 대해서는 보호적인 기능을 나타내고 있으나, 더 많은 방사능 투여량에 대해서는 그러한 기능을 나타내지 않았다(보기 2참조). 그러므로, 모든 최적화 실험들은 전체 신체 방사(TBI)의 10 Gy에 의해 실행되었다. CBLB601/한 마리 쥐에 대해 3  $\mu$ g의 투여량(1/10 NOAEL)은 개시 투여량으로 선택되었다. 그러므로, (보기 1에 기술된 바와 같이) CBLB601의 3  $\mu$ g의 투여량은, 10 Gy의 TBI 이전에 0.5h, 1h, 6h와 24h 또는 1h, 24h, 48, 72h, 96h에서 ICR 쥐에 복막 내부로 투여되었다. 방사후에는, 쥐들이 30일간 관찰되었다. 그리고, 그들의 생존이 기록되었다. 이러한 실험들의 결과들은 도 5에 요약되어 있다. 방사(irradiation) 24 시간 이전에, CBLB601의 투여는 가장 우수한 방사능 보호 기능을 명확하게 나타내었다(90-100%가 30일 생존). 화합물이 방사48시간 이전에 투여되었다면, 방사능 보호는 30%가 되었다. 방사1시간 전에 CBLB601의 투여는, 한 실험의 80% 보호로부터 다른 실험의 보호 기능 거의 없음(20%)까지 일관적이지 않는 결과를 나타내고 있다(도 5a). 방사능 보호가 없다는 것은 TBI이전에 0.5h(10%), 6h(20%), 72h와 96h에서 약이 투여되었을 때에 관찰되었다.

<118> CBLB601의 최적 방사능 보호 투여량을 결정하기 위해서, 투여 시간과 방사레벨이 일정하게 유지되었으며, CBLB601의 투여량은 변화되었다. ICR 쥐에게는 1, 3, 10, 20 또는 30  $\mu$ g의 CBLB601이 쥐마다 복막 내부로 투여되거나, 0.1, 0.3, 10, 또는 15의 CBLB601이 쥐마다 방사24시간 이전에 투여되었다(TBI의 10 Gy). 그리고, 그들의 생존이 30일 동안 감시되었다. 가장 우수한 보호 투여량은 한 마리의 쥐에 대해서 3  $\mu$ g가 되었으며, 100%의 생존률을 지원하였다(도 6a와 도 6b). 거의 유사한 효과가 1과 10  $\mu$ g 투여량에서도 나타났으며, (한 실험에서) 쥐의 90%를 구하게 되었다. 반대로, PBS가 투여된 대조군 쥐와 비교하면, 방사와 함께 투여될 때에는, CBLB601의 더 높은 투여량(한 마리당 20과 30  $\mu$ g)에 의해 사망이 가속화되었다. 이러한 결합된 유독성의 몇 가지 현상들이 이미 10  $\mu$ g 투여량에서 발견될 수 있었다. 그러므로, CBLB601의 최적 보호 투여량은 쥐마다 3  $\mu$ g로 결정되었다. 그러므로, CBLB601 NOAEL보다 10-30배 낮은 투여량에서는 방사능 보호기능을 제공하며, 방사와 함께 CBLB601이 투여되면 CBLB601의 안전성이 현저하게 줄어들었다.

<119> CBLB601에 의해 보호되는 방사능 레벨을 결정하기 위해, 증가하는 TBL 레벨에 방사능 보호제로 처리된 쥐와 대조군 쥐가 노출되었다. ICR 쥐의 그룹들은 3  $\mu$ g CBLB601 또는 PBS로 처리되었으며, 24시간 후에, 10, 11, 12, 13, 14와 15 Gy의 TBI 투여량을 받아들였다. 30일 이상 생존이 기록되었다. 도 7a는 PBS가 투여된 쥐가 방사능 방사에 의해 사망하는 비율을 나타내고 있다. 10-11 Gy TBI로 방사된 모든 쥐들은 방사후 12-14일 사이에 사망하였으며, 이것은 헤마토포에틱에 의한 사망과 관련된 대표적인 현상이었다. 14-15 Gy의 TRI를 받은 모든 쥐들은 방사후 7-9일 사이에 사망하였으며, 이것은 방사능으로 인한 내장 손상을 통해 사망하는 대표적인 현상이었다. 12-13 Gy의 TBI로 방사된 쥐들은 중간 시점에서 사망하였으며, 이것은 방사능에 의한 사망과 관련된 복잡한 병인학(etiology)의 대표적인 것이다. 도 7b는 CBLB601로 미리 처리된 쥐의 방사능 투여에 의한 사망율을 나타내고 있다. 방사(irradiation) 24시간 이전에 CBLB601 3  $\mu$ g가 투여된 쥐들은, 기대한 바와 같이, 완전히 10 Gy의 TBI로부터 보호되었다. 대조군 쥐와 처리된 쥐의 생존률의 명백한 차이에도 불구하고, CBLB601의 보호 효과들은 이러한 환경하에서 통계학적인 중요성에 도달하지는 않았다. 대조군 쥐와 CBLB601로 처리된 쥐 사이에서 통계학적으로 중요한 10%의 차이를 달성하기 위해, 적어도 50개의 쥐들의 실험 그룹들이 이용되어야만 한다. CBLB601이 10 Gy의 TBI로부터 쥐를 100% 구했지만, 11 Gy의 TBI에서의 보호 기능은 단지 20%가 되었다. 11 Gy보다 더 높은 레벨에서 방사로부터 보호가 이루어지지 않았다는 것은, CBLB601이 위장의 방사능 유해 성분으로부터 동물들을 구할 수 없다는 것을 의미하고 있다. 게다가, 11, 12와 13 Gy의 방사투여량에서는, CBLB601로 처리된 쥐들이 가속화된 역학 즉, PBS가 투여된 대조군 쥐와 비교할 때에, 14-15 Gy의 투여량을 받은 쥐와 같이 사망하였다. 이것은 약물과 방사의 결합된 유해성을 나타내고 있다. 그러므로, 더욱 높은 방사레벨에서는, CBLB601이 보호기능을 제공하지 않으며, 더욱 독성을 가지게 된다는 것을 알 수 있다.

<120> (특히, 인간에 대해서는 선호되는 투여 경로가 되므로) CBLB601은 이러한 화합물의 투여 경로를 결정하기 위해 근육 내부로 투여되었다. 도 8은 방사선 방사 전에, 1, 3, 또는 10  $\mu$ g의 CBLB601을 근육 내부로 투여한 쥐의

생존률을 나타내고 있다. CBLB601의 모든 다른 투여량은 방사능 보호기능을 제공하였다. 그리고, 10 µg의 복막 내부 투여의 경우(도 6)와 같이, 10 µg의 근육 내부투여에서는 결합된 유해성이 나타나지 않았다. 다른 실험에서는, 근육 내부로 CBLB601을 증가시키면서 10, 11과 13 Gy의 HBI에 투여하여 실험을 행하였다(도 9). 10 Gy의 TBI에 노출시키기 전에 CBLB601의 더 높은 투여량(10, 30 µg)으로 투여된 쥐의 사망율이 증가하는 상태로 이동한다는 중요한 통계학적인 현상은 없었다. 24 Gy의 TBI가 근육 내부 또는 복막 내부로 투여된 CBLB601이 가지는 약물에 대한 방사능 보호에 대한 요약은 도 10에 도시되어 있다. 이러한 데이터로부터, 근육 내부의 투여 경로는 복막 내부의 투여 경로와 같이 효과적이며 최적의 투여량(쥐마다 3 µg)은 두 가지의 투여 경로에 대해서도 동일하였다. 게다가, 근육 내부로의 전달은 더 높은 치유 인덱스(유해 투여량/효과 투여량)를 가지므로, 즉, 복막 내부 투여에 대한 10-30(도 6 : 10 µg/쥐/1-3 µg/쥐)에 대해 근육 내부 투여에 대해서는 10-30(도 8과 도 9: 30 µg/쥐/1-2 µg/쥐)을 가지고 있으므로, 더욱 안전하다. 게다가, 몸의 무게마다 효과적인 투여량의 재계산은 근육 내부 전달에 비해 복막 내부 전달에 대해서 더욱 작은 원도우를 나타내고 있다. 예를 들면, 복막 내부 전달에 대해서는 90-110 µg/kg, 그리고 근육 내부 전달에 대해서는 60-115 µg/kg를 나타내고 있다(도 11).

<121> CBLB601의 근육 내부 투여의 최적 시간은 약물 전달과 방사사이의 시간을 변화시킴으로써 결정되었다. ICR 쥐에는, TBI 투여의 48h, 36h, 24h, 12h와 6h 뿐만 아니라, TBI 투여의 24h, 6h, 3h, 1h 이전과, TBI 투여 후 +1h, +3h시에 CBLB601의 3 µg가 투여되었다(도 12b). 이러한 실험들은 복막 내부의 전달 경로와 같이, CBLB601의 근육 내부 전달에 대한 최적 시간이 10 Gy의 TBI 투여의 24시간 이전이 된다는 것을 나타내고 있다. 10Gy의 TBI 투여 후(1h와 3h)에 CBLB601의 3 µg를 근육 내부로 투여하는 것은 보호 효과를 나타내지 않는다(도 12a). 또한, TBI의 10Gy이후에 i.m.1h가 주입된 CBLB601(10 및 30 µg/mouse)의 고복용은 결합독성(도 13c)의 레벨을 증가시킨다. 이들 데이터는 도 13에 요약되어 있다.

<122> DMF(복용량 수정요소)를 결정하기 위해, CBLB601/mouse의 3 µg는 방사에 i.m.24시간 앞서 주입되었고, 대조실험 쥐는 PBS가 주입되었다. 약물이 주입된 그룹과 대조그룹은 선택된 시간 간격(위장중후군 치사율에 대한 7일과 헤미토포에틱 중후군 치사율에 대한 30일)내에서 10-90%의 치사율을 이끄는 복용 범위를 커버하는 TBI의 단일 복용량을 투여받았다. 퍼센트 치사 방사량 그래프는 LD<sub>50/7</sub>과 LD<sub>50/30</sub>(7일과 30일 각각에서 LD<sub>50</sub>)으로 형성되었고, 프로빗 또는 로지트 전락분석(logit statistical analysis)을 이용하여 산출되었다. DMF(복용량 감소 요소로서 또한, DRF로 알려져 있다.)는 CBLB601치료군에 대한 방사LD<sub>50</sub>과 선택된 생존시간점, 7일 또는 30일 동안 실험쥐의 매개치료그룹에 대한 비율로서 산출된다. DMF<sub>30</sub>을 산출하기 위해, PBS 또는 CBLB601의 3 µg에 의해 치료된 실험쥐에 대한 30일 동안 전방사, 방사LD<sub>50/30</sub> 값이 결정된다. 이를 위해, PBS주입군은 TBI의 6, 6.5, 7 및 7.7Gy의 복용량으로 방사되었고, CBLB601주입군은 TBI의 10, 10.5, 11, 11.5 및 12Gy의 복용량으로 방사되었고, CBLB601에 대한 LD<sub>50/30</sub>는 프로빗분석을 이용하여 산출되었고, ~11.32Gy 평균(도 14참조)과 함께, 11.07-11.61Gy의 범위내에서 산정될 수 있다. 그러나, 대조실험쥐에서 일부 방사량(6.5Gy가 30일간 60%의 치사율을 야기하기 때문에 7Gy는 비독성으로 나타난다)의 반응상의 불일치는 CBLB601에 대한 DMF<sub>30</sub>의 정확한 산출에서 배제되었다. 그럼에도 불구하고, ICR에 대한 LD<sub>50/30</sub>는 7Gy[다수의 실험쥐스트레인(strain)의 평균; Monobe et al., Radiother Oncology 73 Suppl 2: S12709, 2004)]주위에 있다고 생각된다. 이와 같이, CBLB601에 대한 DMF<sub>30</sub>의 값은 대략 ~ 1.6으로 산정된다.

<123> 예 4

<124> CBLB601에 의한 TBI의 치사량으로부터 구제된 실험쥐의 면역상태

<125> CBLB601의 투여에 의해 TBI의 10Gy로부터 구제된 실험쥐는 손상된 면역체계를 가질 수 있다. 그러므로, 정상적인 생활을 할 수 없을지도 모른다. 이들의 면역체계에 대한 상태를 검사하기 위해, ICR실험쥐는 CBLB601/mouse의 3 µg 또는 PBS를 (i.m.)주사하고 24시간 후 TBI의 치사량(10Gy) 또는 비치사량(6Gy)에 노출되었다. 각각의 조건으로 5개의 실험쥐군은 3일간 심하게 희생되었고, 그들의 비장과 흉선이 제거되어 무게가 늘어났다. 비장의 무게는 대응하는 동물의 몸무게로 정상화되었고, 그 결과는 도 15에 도시된다. 6Gy방사에 노출된 PBS치료실험쥐는 그들의 비장이 정상무게로 회복하는 데 13-14정도 걸렸다. 그러므로, 6Gy방사에 노출된 CBLB601치료실험쥐는 8일까지 정상 비장무게를 가졌다. PBS주입동물은 TBI의 10Gy에서 생존하지 못했다. 그러므로, CBLB601주입실험쥐는 방사의 치사량에서도 생존했을 뿐만 아니라 13-14일의 전방사에 의해 그들의 비장무게를 완전히 회복하였다. 흉선이 정상 무게(미도시)로 회복하는데 장기간의 시간(~30일)이

걸렸다.

<126> 대조 및 CBLB601주입 실험쥐에서 비장과 흉선은 방사 3, 10 및 30일 후에 형태학상의 변화가 극히 작게 검사되었다. 3일의 전방사에서, 대조 및 CBLB601주입실험쥐의 10Gy로 방사된 비장과 흉선의 전체는 중간 또는 심각한 림프의 결핍 및 비장의 심각한 레드 펄프 위축(red pulp atrophy)을 포함하는 방사유발손상이 나타났다. 10일의 전방사에서, CBLB601치료동물은 비장의 심각한 레드 펄프 위축으로부터 회복하는 대조동물보다 개선되어 보였다. 모든 CBLB601치료동물은 EMH가 표시된 제어(controls)가 없었기 때문에 멀티포컬 엑스트라메둘러리 헤메토포이시스(multifocal extramedullary hematopoiesis)(EMH)에 적당하도록 유연하게 보였다. 10일 동안 각 군에서 비장의 화이트 펄프 결핍의 회복에 대한 징후는 없었다. 흉선에서 대표적인 림프 이상증식은 CBLB601치료실험쥐의 제어보다 약간 더 앞선 재생성과 함께 10일에서 2개의 군에서 명백하였다. 10일 동안 전방사에서, 모든 동물이 정상 비장레드펄프를 가졌으며, 대부분의 동물들은 림프요소가 거의 완전히 회복하였음을 보여주었고, 모든 동물들이 실질적으로 정상적이 흉선을 갖게 되었다.

<127> CBLB601에 의한 감마방사(TBI의 10Gy)의 치사량에서 구제된 실험쥐의 면역반응을 실험하기 위해, 이러한 여러 군의 실험쥐는 강한 항원(Salmonella flagellin)을 가진 면역성이 부여되었다. 이 실험쥐는 각각 8, 25 및 33주의 연령에서 방사8, 18 또는 20 주후에 최초로 면역성이 주어졌다. 29주의 연령인 비방사비실험쥐는 면역반응을 위해 양성대조군으로서 이용되었다. 이 실험쥐는 최초로 면역성을 가지고 일주일 후 플라젤린(flagellin)의 촉진(boost)을 받았다. 다른 실험쥐는 2번째 촉진 3주 후에 촉진받았다; 안티 플라젤린 항체 농도는 쥐 혈청에서 측정되었다. 제 2면역반응을 실험하기 위해, 항체농도의 감소를 확인하기 위해 한 달 후에 다시 실험쥐를 채혈하였다. 이것은 항원 주입 및 10일후의 안티 플라젤린 항체 농도의 측정에 대한 3번째 촉진에 의해 계속된다. 3번째 촉진기간에서, 방사실험쥐는 38, 39 및 23주의 연령이었고, 대조실험쥐는 34주 연령이었다.

<128> 최초의 면역성부여(최초의 촉진 3주후)한 달 후 면역반응은 도 16a에 도시된다. CBLN601치료방사실험쥐는 비대조 실험쥐와 구별할 수 없는 플라젤린에 대한 강한 체액면역 반응이 부여되었다. 면역 반응의 레벨은 모든 군들이 좋은 반응 표시했기 때문에 방사후 경과된 시간에 의존하지 않는 것으로 나타났다. 20주의 전방사군에서 일부 개별적인 변경이 있는 동안, 면역반응은 더 연령이 높은 동물들의 건강을 해칠 수 있다는 것은 잘 알려져 있다. 항체농도는 최초의 채혈 한 달후 에 다시 검사하였다. 면역성부여 7주후 항체농도는 향상되었다.(도 16b참조) 제 2면역반응은 최초의 반응보다 더 강하였다.(도 16a참조) 이들 데이터는 CBLB601이 치명적인 TBI로부터 실험쥐를 구제할 뿐만 아니라 기능적인 면역체계를 완전히 회복하도록 하는 것을 강하게 나타내는 것이다.

<129> 예 5

<130> 다른 림프에 의해 제공된 NF- $\kappa$ B 및 방사보호의 활성화

<131> 부가적인 리프펩티드는 NF- $\kappa$ B의 활성화 및 방사의 치사량으로부터 실험쥐를 보호하기 위한 능력을 위해서 합성되고 테스트 된다. 표 4에 도시된 바와 같이, 화합물의 이름과 그들의 주요 성분들은 표 4에 도시되어 있다. 이 화합물들의 일부에 대하여 대응 프리 펩티드가 합성되고 테스트되었다.



[표 4]

Compound Name	N-acylation	Peptide Sequence	SEQ ID NO
CBLB602	Pam2	GQHHH	12
CBLB603	Pam2	GQHMM	11
CBLB604	Pam2	GSHMM	14
CBLB605	Pam2	SQMHH	15
CBLB606	R-Pam2	GDPKHPKSF	24
CBLB607	Pam2	GDPKHPKSFTGWVA	32
CBLB608	Pam2	FEPPPATTTKSK	30
CBLB611	Pam2	GETDKEGKIIRIFDNSF	37
CBLB612	R-Pam2	VQGEESNDK	21
CBLB613	R-Pam2	GETDK	16
CBLB614	R-Pam2	QGEESNDK	20
CBLB615	R-Pam2	GEESN	17
CBLB616	R-Pam2	TENVKE	19
CBLB617	R-Pam2	GEEDD	18

NF- $\kappa$ B의존 리포터 활성은 TLR2/YLR6 헥트로디머(hetrodimer)로 표현되는293셀에서 측정되었다. CBLB613에 의한 NF- $\kappa$ B의 인비트로 활성은 CBLN601의 NF- $\kappa$ B의 인비트로 활성과 비교할 수 있다. (도 17) CBLB614와 CBLB615의 화합물은 CBLB612의 펩티드의 유도체를 계속적으로 감소한다.(표 4참고) 모두 3개의 화합물은 NF- $\kappa$ B 리포터가 활성화되었고, 모두 CBLB601보다 저 좋은 활성자가 되었다.(도 18a, b) CBLB617의 펩티드 화합물은 (-4)charge을 가지며, 음으로 대전된 세포 표면마커와 함께 상호작용하여 음으로 대전된 세포 표면마커를 방지한다. CBLB617의 NF- $\kappa$ B활성은 CBLB601의 NF- $\kappa$ B활성과 비교할 수 있다.(도 19) 표 5는 인비트로 활성 및 모든 화합물의 용해도를 요약한다.

[표 5]

Coumpound	Solubility	NF- $\kappa$ B activation
CBLB601	Excellent	100
CBLB602	Poor	0
CBLB603	Poor	0
CBLB604	Poor	0
CBLB605	Poor	2
CBLB606	Poor	100
CBLB607	Poor	2
CBLB608	Excellent	2
CBLB611	Insoluble	0
CBLB612	Excellent	200
CBLB613	Soluble	200
CBLB614	Soluble	200
CBLB615	Soluble	200
CBLB616	Not tested	Not tested
CBLB617	Soluble	100

일부 화합물의 인비트로 방사보호활성도 시험되었다. ICR실험쥐는 실험화합물로서 여러 가지 투여량을 가지고 근육 내로 주입되었다. 그 후, 24시간 뒤에 실험쥐는 TBI의 10Gy에 노출되었다. 생존은 30일 동안 관측되었다. 도 20은 CBLB613의 보호활성을 나타낸다. CBLB601/mouse의 10, 30 및 82.5  $\mu$ g의 복용은 100% 보호가 제공되었고, 방사와 공동하여 비독성이었다. 관련된 화합물, CBLB612, CBLB614 및 CBLB615는 TBI의 10Gy에 대해 방사보호활동을 위해 실험되었다. 1, 3, 10 및 30  $\mu$ g/mouse(CBLB612는 60  $\mu$ g/mouse에서 시험되었다)의 복용량은 i.m.에서 방사24시간전에 ICR실험쥐로 주입되었다. 도 21에 도시된 바와 같이, 모두 3개의

화합물은 복용량이 높아질때 90-100% 방사보호가 제공되었다. 방사보호는 방사와 공동하여 독성이 없고, 복용량 의존을 명확하게 하였다. 화합물의 효능은 CBLB612> CBLB614> CBLB615이다. CBLB617의 방사보호 활성은 최근에 표준절차를 이용하여 평가중에 있다. 13일 후, 고복용량(87.5  $\mu$ g/mouse)에서 눈에 보이는 독성은 없었고, 한편, 10-87.5  $\mu$ g/mouse의 복용량에서 각각 7-90%생존률을 보였다. 요약하면, CBLB612와 CBLB613은 CBLB601보다 월등한 방사보호제이며, 높은 치료적 징후(CBLB612와 CBLB613 대한 ~20 vs CBLB601에 대한 3)를 가지고 있다.

<138> 낮은 복용량 방사손상의 완화제로서 작용하는 CBLB612의 능력도 실험되었다. 이를 위해, CBLB612/mouse의 50  $\mu$ g 이 TBI의 8.5, 9 또는 10Gy에 노출 1시간후 근육으로 주입되었다. CBLB612의 치료는 방사의 모든 복용량에서 생존률을 증가시켰다.(도 22). 예를 들면, 8.5Gy에서 CBLB612치료실험쥐의 90% 및 PBS치료실험쥐의 50%가 27 일(p=0.0006)생존하였고, 낮은 제어 실험쥐 생존률 때문에 더 낮은 방사복용량에서는 CBLB612치료 실험쥐 및 대조군 사이의 차이가 관측되지 않았다. 이 데이터들은 CBLB612가 방사보호제인 동시에 완화제로서 작용할 수 있다는 것을 나타낸다.

### 산업상 이용 가능성

<161> 본 발명은 방사(radiation)와 암치료와 같은 스트레스에 노출로부터 포유류를 보호하기 위한 NF- $\kappa$ B의 유도인자(inducers)의 사용과 관련된다. NF- $\kappa$ B활성은 아포토시스로부터 일반 세포를 보호하는 것을 유도할 수 있다. 포유류에서 NF- $\kappa$ B활성을 유도함으로써, 일반 세포들은 아포토시스가 세포적 스트레스(cellular stress)를 주는 것으로부터 보호될 수 있다. 일단 일반 세포들이 스트레스로부터 회복되면, NF- $\kappa$ B활성은 정상 수치로 회복될 수 있다. 일시적으로 NF- $\kappa$ B활성을 유도함으로써, 세포들은 다양한 스트레스로부터 보호될 수 있다. 이것은 손상된 조직 및 기관으로부터의 염증반응 및 세포의 생존-사멸의 결정 모두에 대한 제어를 제공할 수 있다.

<162> NF- $\kappa$ B 보호적인 역할은 다음의 멀티플 유전자 코딩의 전사적 활성화에 의하여 매개될 수 있다. a)모든 주요 아포토틱 경로를 차단하는 안티-아포토틱 단백질, b) 헤마토포에틱 및 다른 배아세포들의 생존 및 증식을 유도하기 위한 사이토카인 및 성장인자, c) MnSOD (SOD-2)와 같은 포인틴트(potent) ROS-제거 항산화 단백질이다. 또한, 예를 들면, 방사방어에 대한 NF- $\kappa$ B의 일시적인 활성화에 의해서, 동시 면역자극 효과 때문에 암 환자의 아포토시스의 억제 뿐만 아니라, 2차 암 발생의 비율을 감소시키는 능력이 성취될 수 있다. 그리고 그것은 NF- $\kappa$ B의 활성이 톨(Toll)-같은 리셉터에 의해서 매개된다면 성취될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

<139> 도 1은, p53 결핍은 쥐내에서 방사능에 의한 가속화된 위장 증후군 발생을 가속화시킨다는 것을 나타내고 있다. 패널 A는, p53의 억제제와 피피스린-알파(pifithrin-alpha)(PFT $\alpha$ ) 또는 DMSO(제어)로 처리한 후에 9, 12.5, 25 또는 5 x 2.5 Gy의 몸 전체에 대한 감마 방사에 노출된 쥐의 생존률 그래프이다. p53이 없는 쥐는 12.5 Gy(5 x 2.5 Gy)의 미세한 누적된 방사능 투여량에도 노출되었다. 패널 B는, 몸 전체에 대한 감마 방사의 낮은(10 Gy) 또는 높은 (15 Gy) 투여량 후에 야생형과 p53이 없는 쥐의 생존률 그래프이다. 패널 C는 야생형과 p53이 없는 쥐로부터 골수(BM)를 가지고 재복원을 한 후에, 몸 전체에 대한 감마 방사의 15 Gy에 노출된 쥐의 생존률 그래프이다. 패널 D는 15 Gy의 감마(gamma) 방사 후에 지시된 시간대에서 p53이 없는 쥐와 야생형의 쥐로부터 헤마톡실린-이오신으로 염색된 파라핀 부분들을 도시하고 있다. 24시간에서의 그림은 소낭 부분의 TUNEL 염색을 나타내고 있다.

<140> 도 2는, 야생형과 p53이 없는 쥐의 소장 내에서 세포 증식과 생존의 원리를 도시하고 있다. 패널 A(좌측)는 15 Gy의 감마 방사선으로 처리되거나 또는 처리되지 않은 <sup>14</sup>C 티미딘이 투여된 야생형과 p53이 없는 쥐의 전체 몸의 자동 방사능 그래프를 도시하고 있다. 화살표들은 내장을 나타낸다. 패널 A(우측)는 15 Gy의 감마 방사후에 다른 시점에서 야생형과 p53이 없는 쥐의 소장 내에서의 BrdU 합성의 광학 미세 그래프이다. 96개의 영상 부분들이 더 큰 확대 비율로 도시되어 있다. 패널 B는 15 Gy의 감마 방사 후에 다른 시점에서 야생형과 p53이 없는 쥐의 소장내에서 BrdU 포지티브 세포/소낭들의 수를 나타내는 그래프이다. 패널 C는 15 Gy의 감마 방사 후에 다른 시점에서 야생형과 p53이 없는 쥐의 소장 내에서 BrdU 표시된 세포들의 광학 미세 그래프이다. BrdU는 방사선 방사 전에 30 분 투여되었으며, 지시된 시간에서 쥐들이 희생되었다.

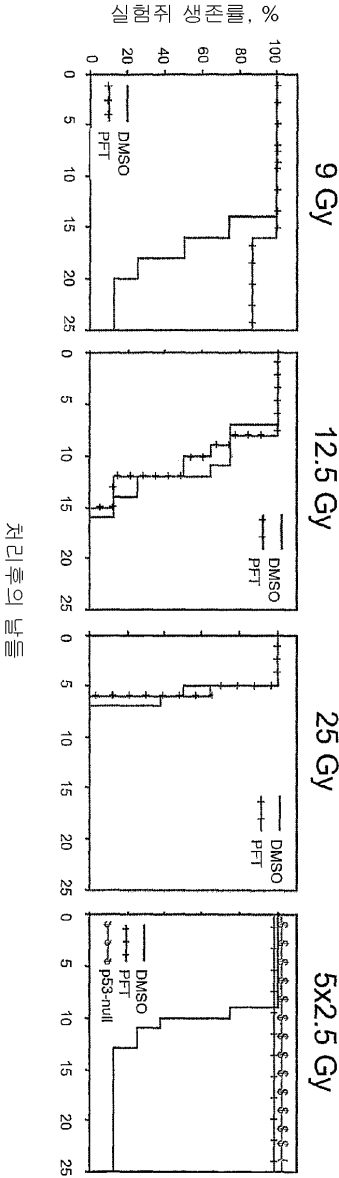
<141> 도 3은, 화합물 CBLB601의 방사능 보호 효과를 나타내고 있다. 9, 12.5, 25 또는 5 x 2.5 Gy의 몸 전체에 대한 감마 방사에 노출되고 CBLB601 또는 PBS로 처리된 쥐의 생존률 그래프가 도시되어 있다.

- <142> 도 4는, 13 Gy의 몸 전체에 대한 감마 방사에 노출되고 CBLB601 또는 PBS로 처리 후에 비장 크기의 변경을 나타내고 있다. 좌측에는, PSB와 CBLB601로 처리된 쥐의 비장 무게를 나타내며, 우측에는 대조군 쥐 또는 처리된 쥐의 비장 모습이 도시되어 있다.
- <143> 도 5는, CBLB601의 복막 내부 투여에 대한 최적 시간 결정을 도시하고 있다. 패널 A는 방사의 24, 6, 1 또는 0.5시간 이전에, CBLB601 또는 PBS의 복막 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 몸 전체에 대한 방사(TBI)에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다. 패널 B는 방사의 96, 72, 48, 24 또는 1시간 이전에, CBLB601 또는 PBS의 복막 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 몸 전체에 대한 방사(TBI)에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <144> 도 6은, CBLB601의 최적 투여량의 결정을 도시하고 있다. 패널 A는 방사의 24시간 이전에, CBLB601의 1, 3, 10, 20, 30  $\mu$ g 또는 PBS의 복막 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다. 패널 B는 방사의 24시간 이전에, CBLB601의 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 15  $\mu$ g 또는 PBS의 복막 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <145> 도 7은, CBLB601에 의해 보호되는 방사능 투여량의 결정을 도시하고 있다. 패널 A는 방사의 24시간 이전에, PBS의 복막 내부 투여가 이루어지고, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다. 패널 B는 방사의 24시간 이전에, CBLB601의 3  $\mu$ g의 복막 내부 투여가 이루어지고, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <146> 도 8은, CBLB601의 근육 내부 투여의 방사능 보호 효과를 도시하고 있다. 방사의 24시간 이전에, CBLB601의 1, 3, 또는 10  $\mu$ g의 근육 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <147> 도 9는, CBLB601의 다른 투여량과 다른 방사능 투여량 후의 생존을 나타내고 있다. 방사의 24시간 이전에, CBLB601의 0.3, 1, 3, 10 또는 30  $\mu$ g의 근육 내부 투여가 이루어지고, 10, 11 또는 12 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <148> 도 10은, CBLB601의 다른 투여량이 다른 투여 경로를 통해 투여된 후에 생존률을 비교하는 것을 나타내고 있다. 방사의 24시간 이전에, CBLB601의 다른 투여량의 복근 내부 또는 근육 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <149> 도 11은,  $\mu$ g/kg로 표시된 CBLB601의 다른 투여량이 다른 투여 경로를 통해 투여된 후에 생존률을 비교하는 것을 나타내고 있다. 방사의 24시간 이전에, CBLB601의 다른 투여량의 복근 내부 또는 근육 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <150> 도 12는, CBLB601의 근육 내부 투여에 대한 최적 시간 결정을 도시하고 있다. 패널 A는 방사의 1 또는 3시간 후에, 또는 방사의 24, 6, 3 또는 1시간 이전에, CBLB601의 3  $\mu$ g 또는 PBS의 근육 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다. 패널 B는 방사의 48, 36, 24, 12, 또는 6시간 이전에, CBLB601의 3  $\mu$ g 또는 PBS의 근육 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다. 패널 C는 방사가후에, CBLB601의 1, 3, 10 또는 30  $\mu$ g 또는 PBS의 근육 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <151> 도 13은, 생존률을 CBLB601의 투여 경로와 투여 시간과의 함수로서 비교하는 것을 나타내고 있다. 방사가전의 여러 시간대에서 CBLB601의 근육 내부 또는 복근 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <152> 도 14는, 최적의 방사능 보호 조건하에서 CBLB601에 대한 30일째(CMF<sub>30</sub>)에서의 투여량 수정 인자의 결정을 나타내고 있다. 방사선 방사 전에 CBLB601의 3  $\mu$ g 또는 PBS의 근육 내부 투여가 이루어지고, 방사능의 여러 투여량에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <153> 도 15는, 방사된 대조군 쥐와 CBLB601로 처리된 쥐의 비장의 평균 무게를 나타내는 그래프이다. 방사가전에 CBLB601의 3  $\mu$ g 또는 PBS의 근육 내부 투여가 이루어지고, 0, 6 또는 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <154> 도 16은, 방사후에 8, 18, 또는 20 주에서 플라젤린으로 면역된 CBLB601로 처리된 쥐의 면역 응답성을 도시하고 있다. 패널 A는 초기 면역후 한 달만에 다른 그룹들의 면역 응답성을 나타내고 있다. 패널 B는 초기 출혈 후 한 달만에 다른 그룹들의 면역 응답성을 나타내고 있다.

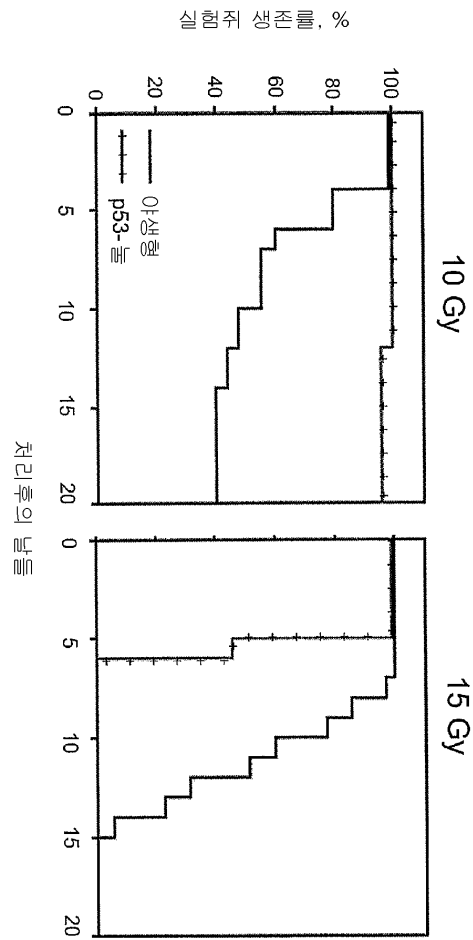
- <155> 도 17은, TLR2/TLR6 헤테로다имер를 나타내는 293개의 세포들내에서 CBLB613과 CBLB601의 여러가지 투여량에 의한 NF- $\kappa$ B 리포터의 활성화를 나타내는 그래프이다.
- <156> 도 18은, TLR2/TLR6 헤테로다имер를 나타내는 293개의 세포들 내에서 여러가지 CBLB 화합물들에 의한 NF- $\kappa$ B 리포터의 활성화를 나타내는 그래프이다. 패널 A는 CBLB601, CBLB612, CBLB614 또는 CBLB615의 여러 가지 투여량에 의한 NF- $\kappa$ B 리포터의 활성화를 나타내는 그래프이다. 패널 B는 CBLB601, CBLB612, CBLB614 또는 CBLB615의 여러 가지 투여량에 의한 NF- $\kappa$ B 리포터의 활성화와, 대응하는 유리 펩티드에 의한 무활성화(no activation)를 나타내는 그래프이다.
- <157> 도 19는, TLR2/TLR6 헤테로다имер를 나타내는 293개의 세포들 내에서 CBLB617과 CBLB601의 여러 가지 투여량에 의한 NF- $\kappa$ B 리포터의 활성화를 나타내는 그래프이다.
- <158> 도 20은, CBLB613의 방사능 보호 기능을 나타내는 그래프이다. 방사가전에 CBLB601의 0.3, 1, 3, 10, 30 또는 82.5  $\mu$ g 또는 PBS의 근육 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <159> 도 21은, CBLB612, CBLB614와 CBLB615의 방사능 보호 기능을 나타내는 그래프이다. 방사가전에 CBLB612, CBLB614와 CBLB615의 여러 투여량 또는 PBS의 근육 내부 투여가 이루어지고, 10 Gy의 TBI에 노출된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.
- <160> 도 22는, CBLB612의 방사능 보호 기능을 나타내는 그래프이다. 8.5, 9 또는 10 Gy의 TBI에 노출된 후에 CBLB612의 50  $\mu$ g 또는 PBS로 처리된 쥐의 생존률 그래프를 나타내고 있다.

도면

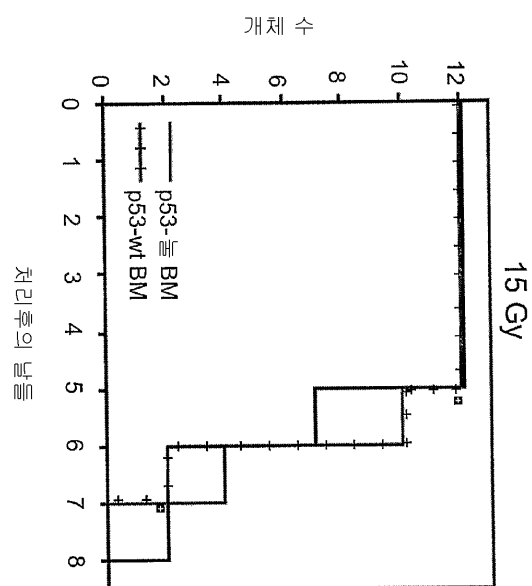
도면1a



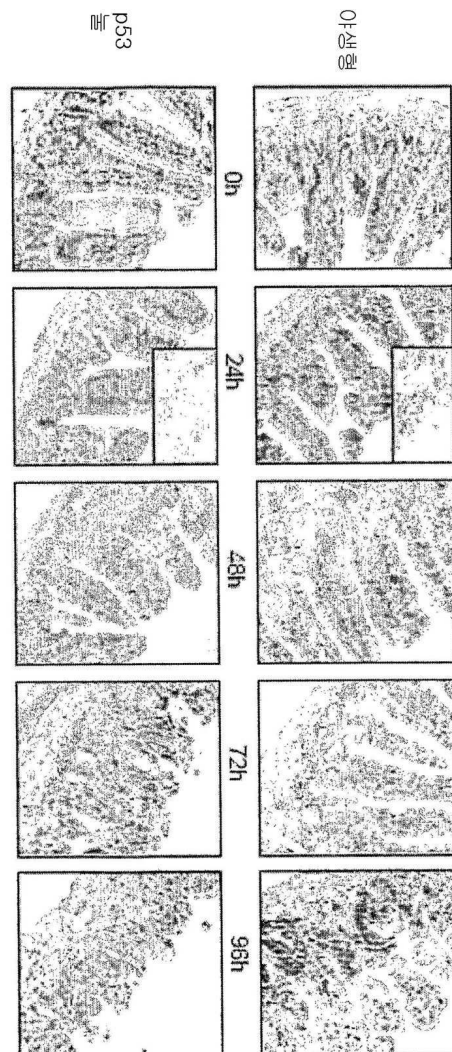
도면1b



도면1c

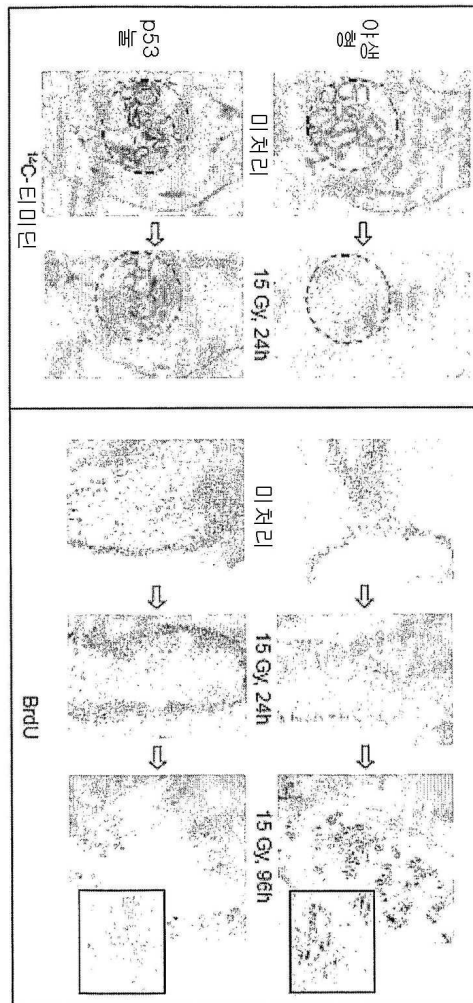


도면1d

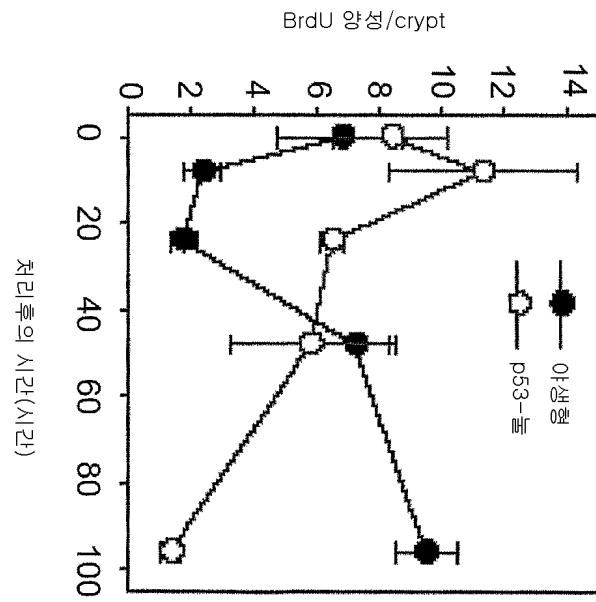




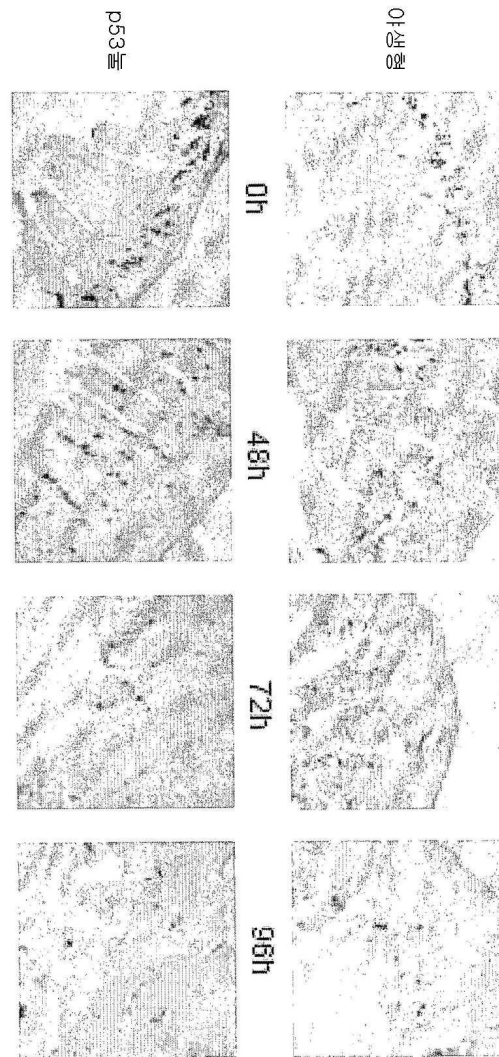
도면2a



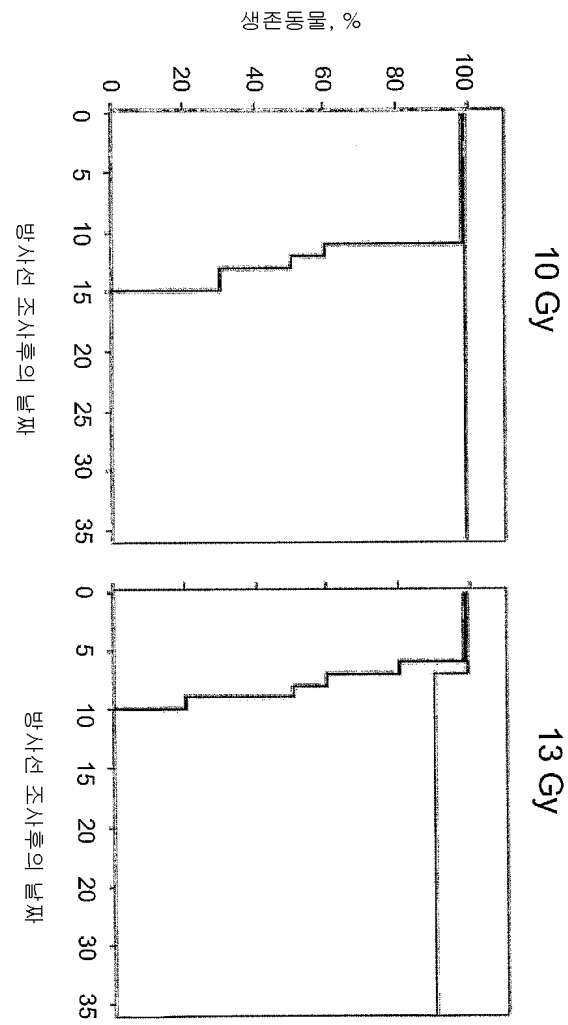
도면2b



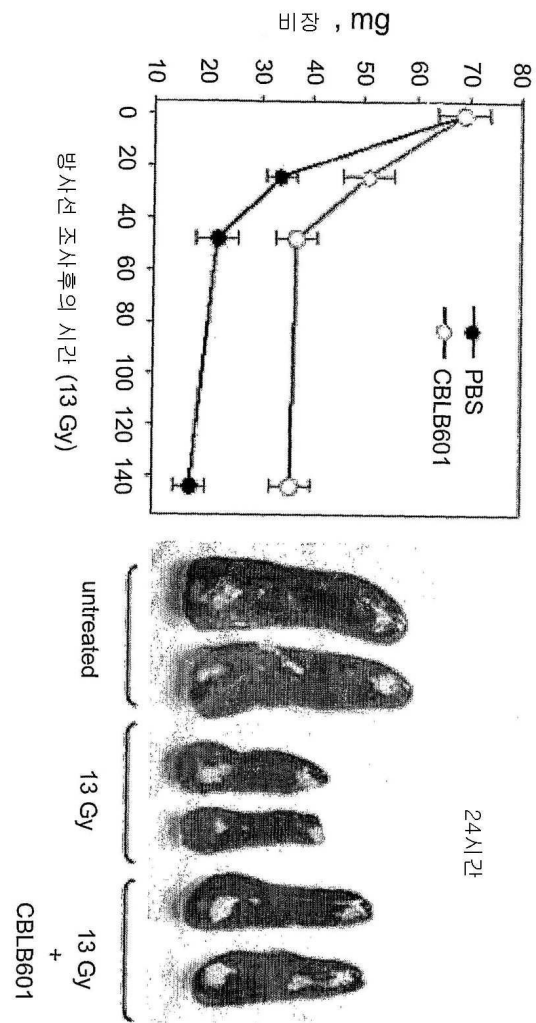
도면2c



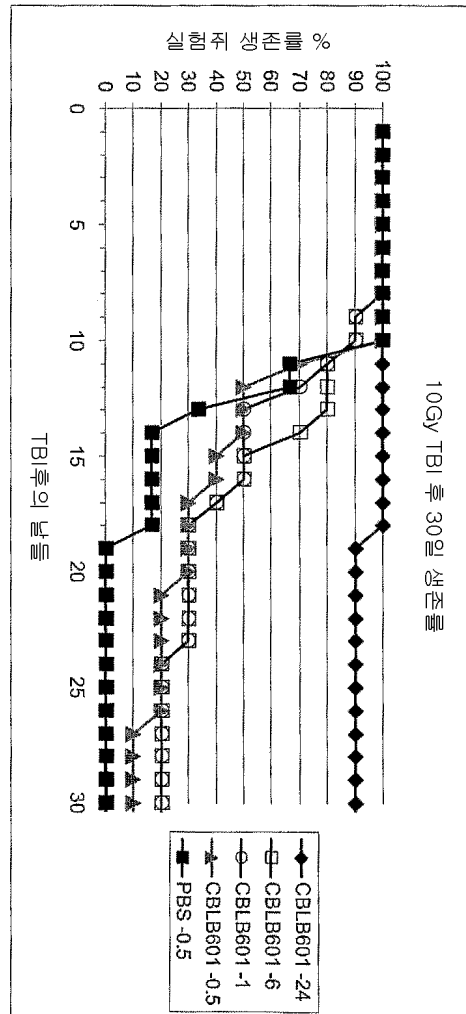
도면3



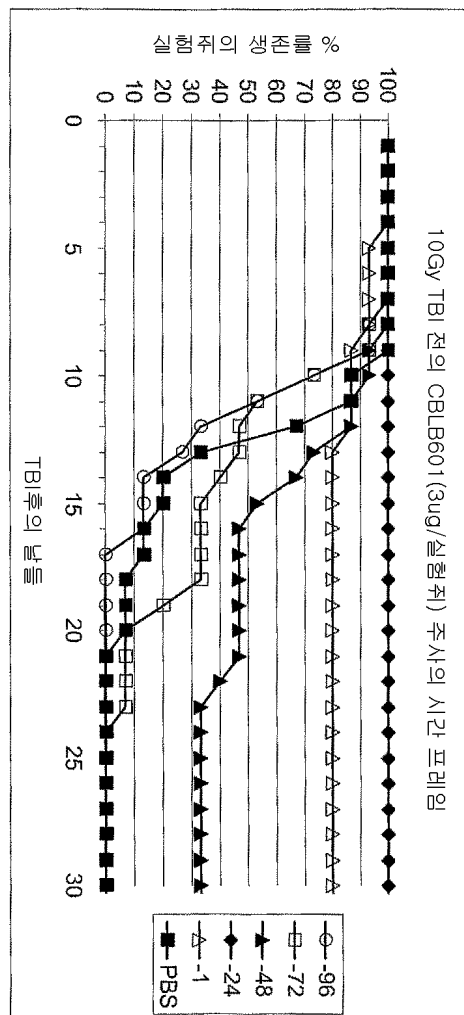
도면4



도면5a

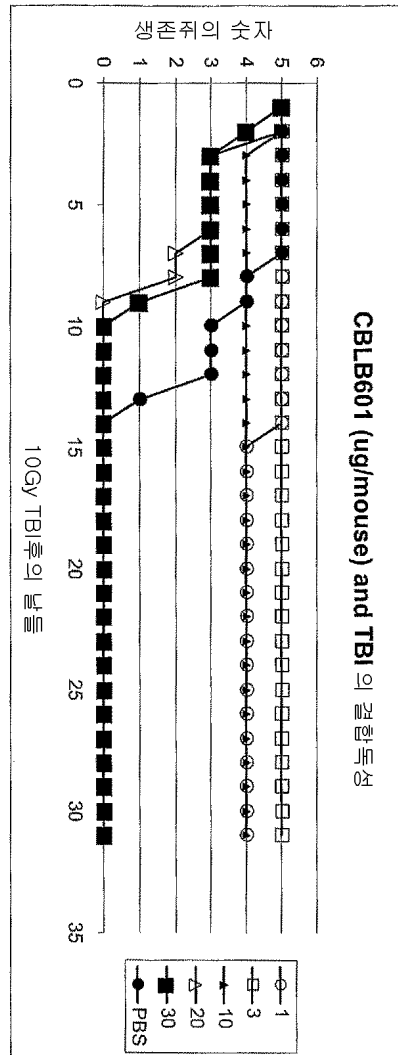


도면5b

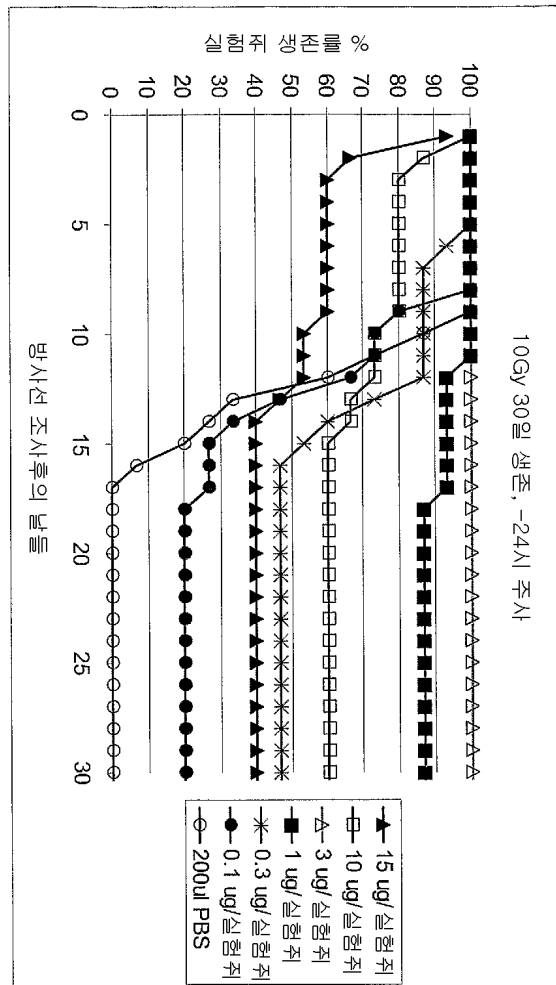




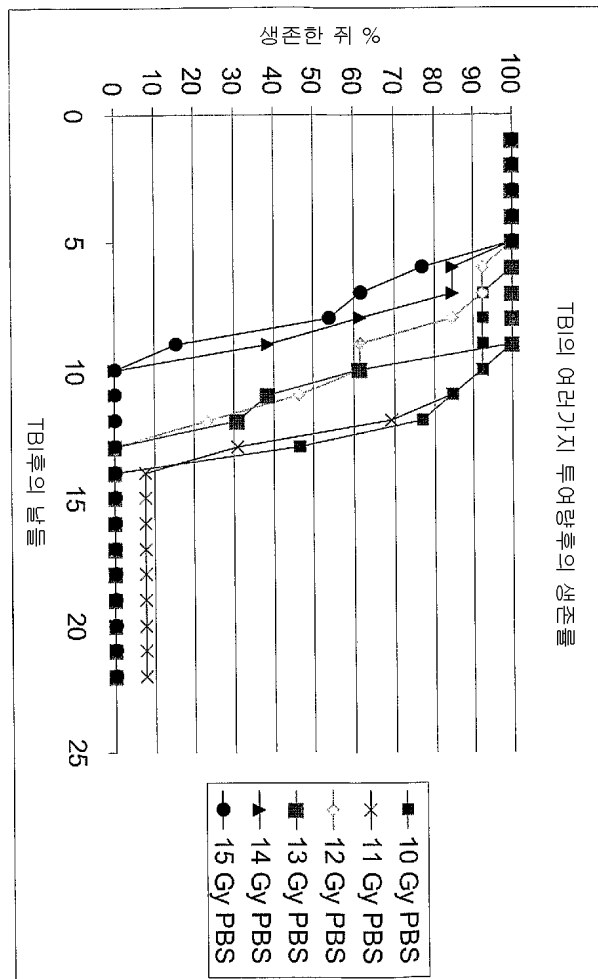
도면6a



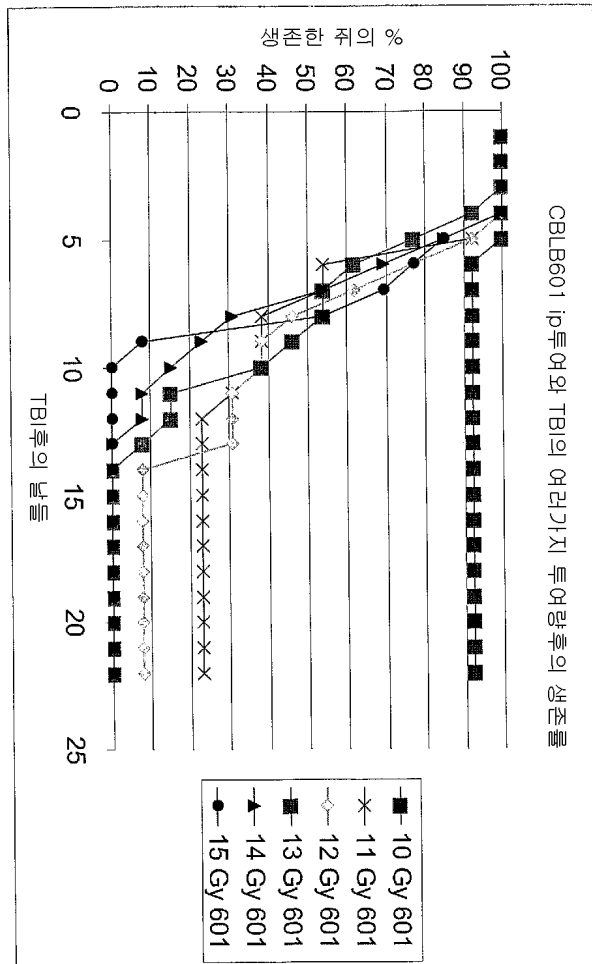
도면6b



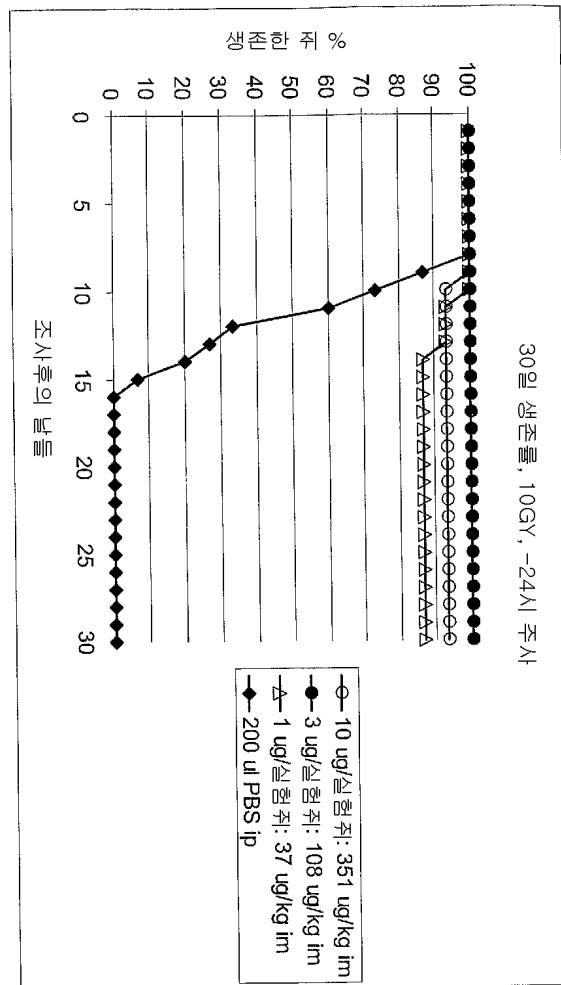
도면7a



도면7b

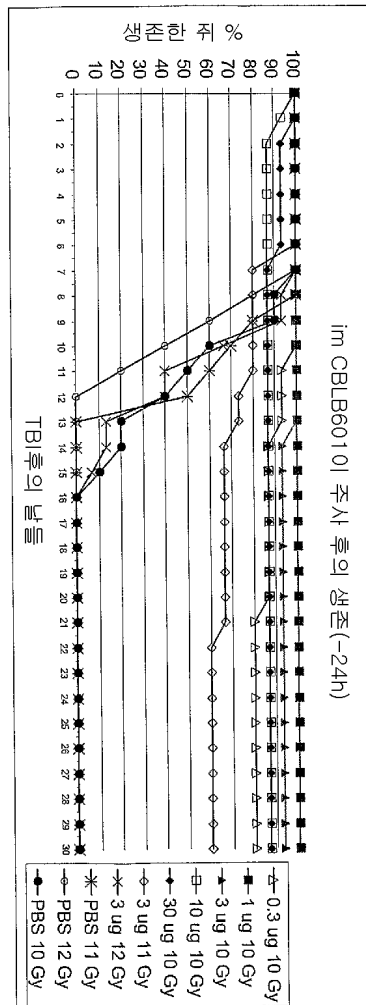


도면8

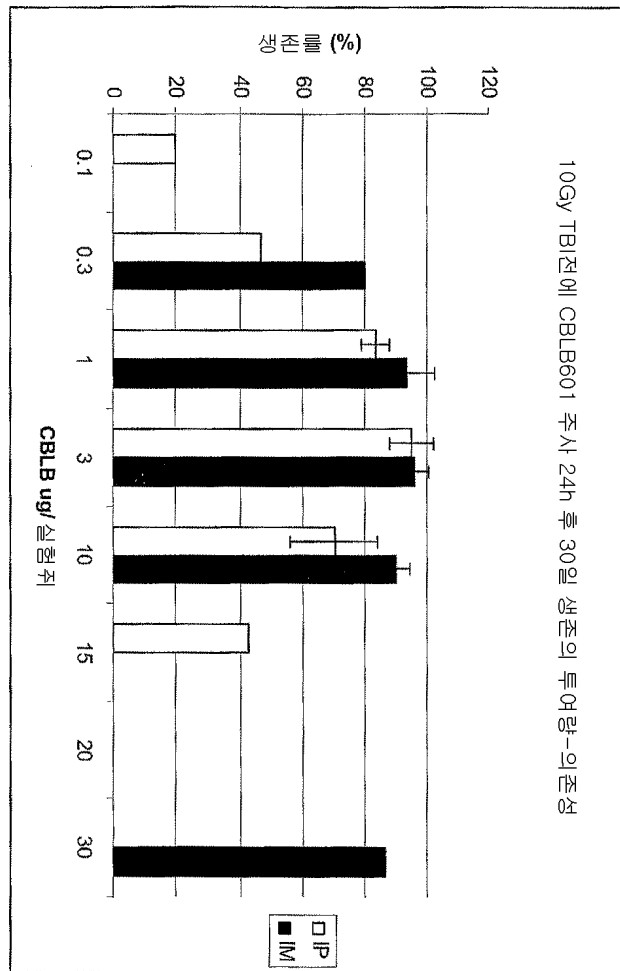




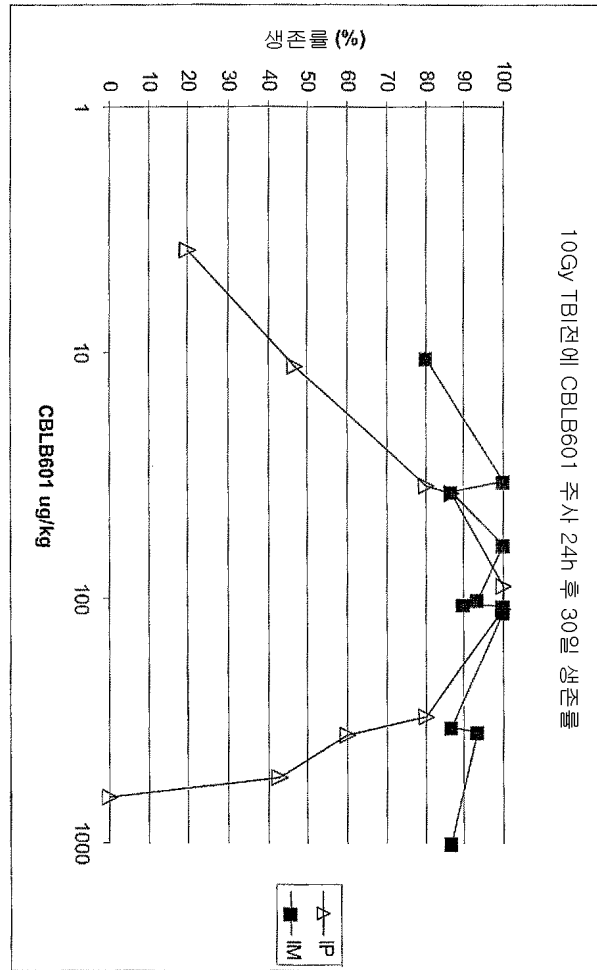
도면9



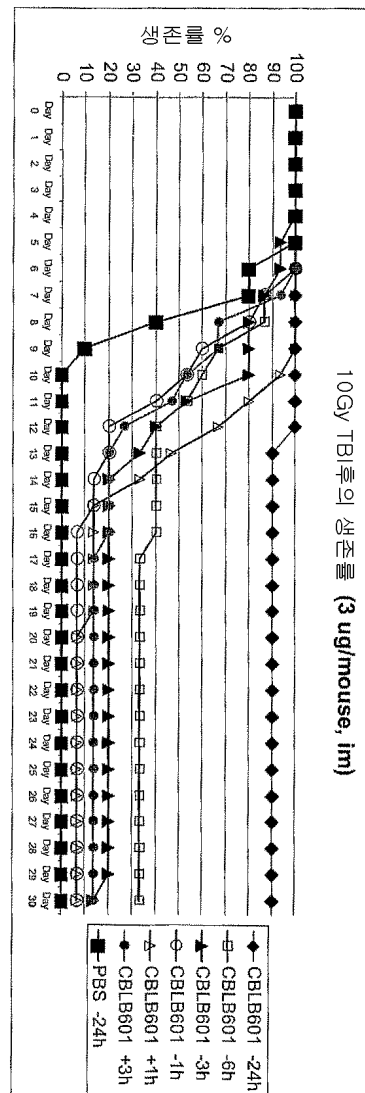
도면10



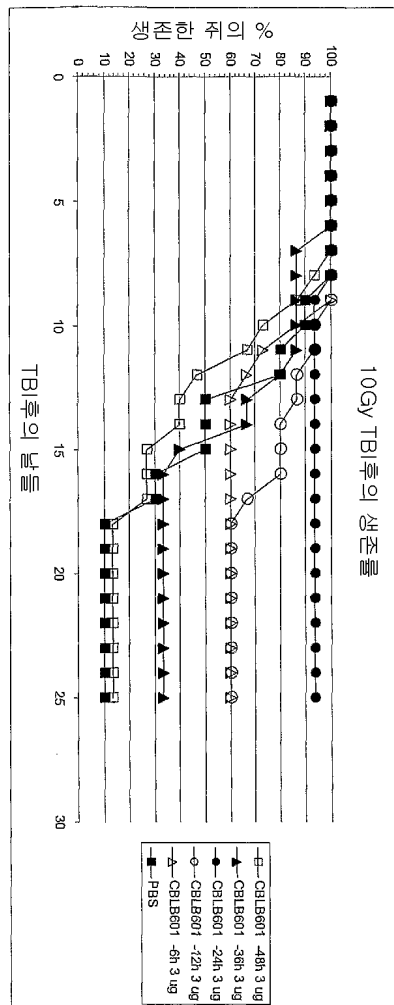
도면11



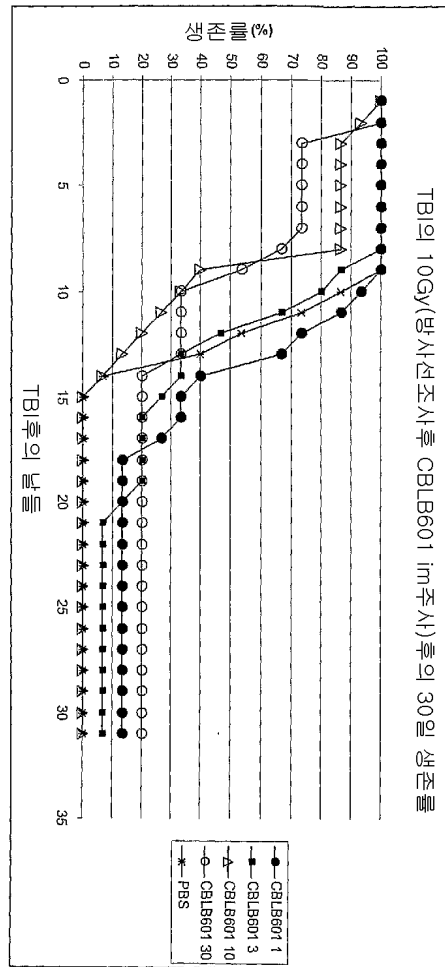
도면12a



도면12b

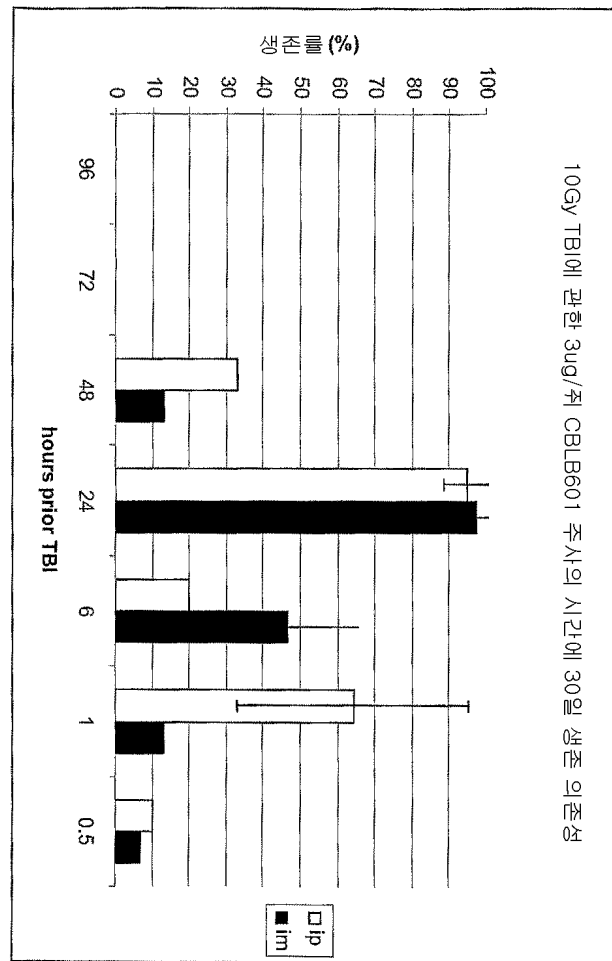


도면12c

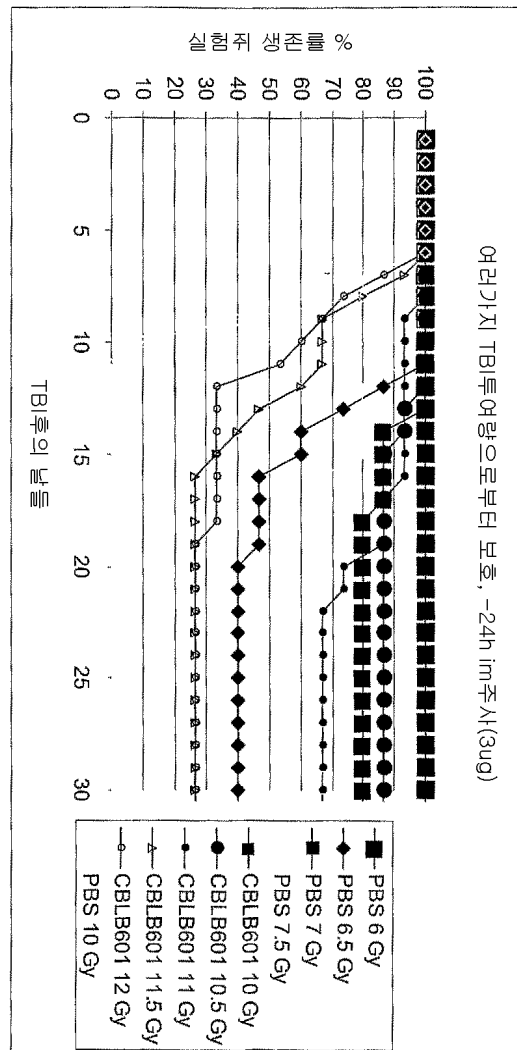




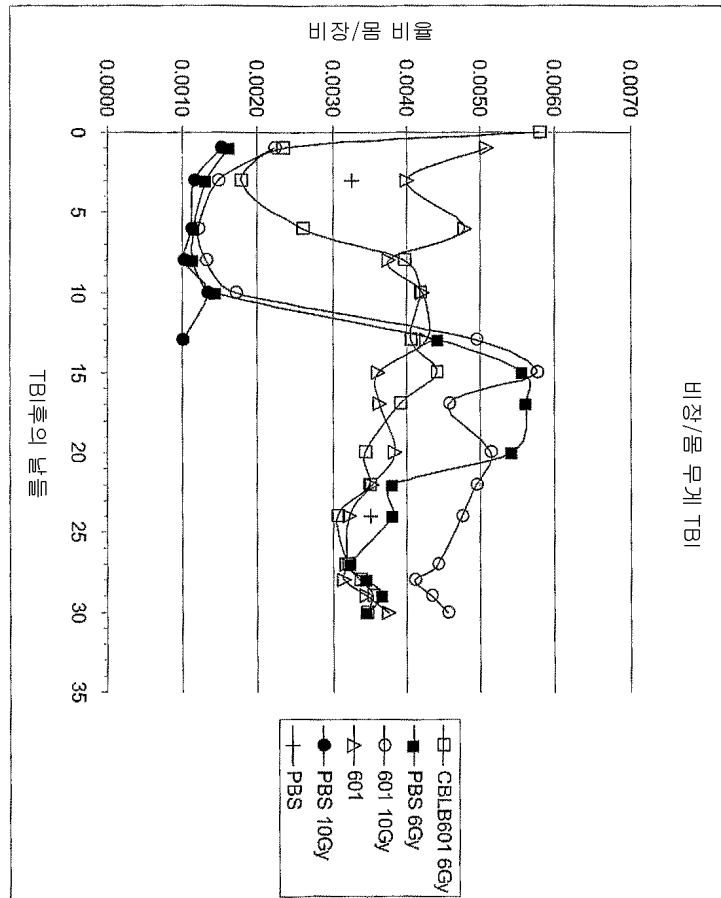
도면13



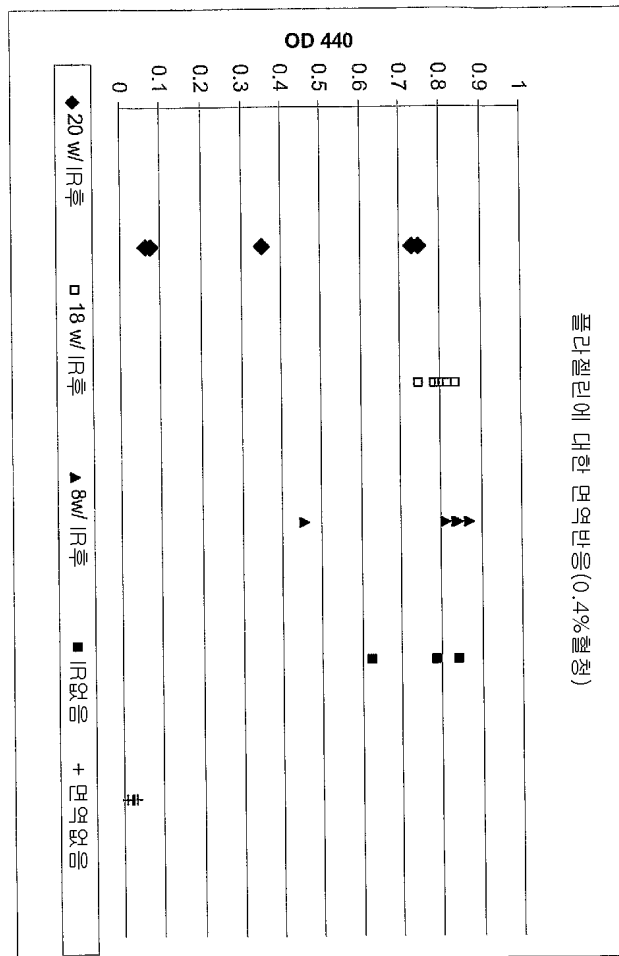
도면14



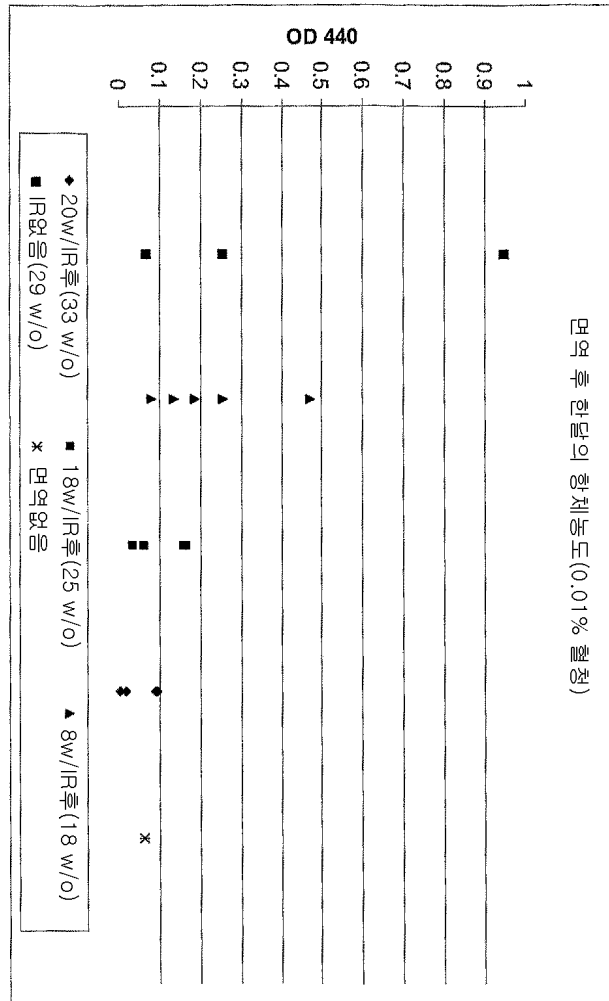
도면15



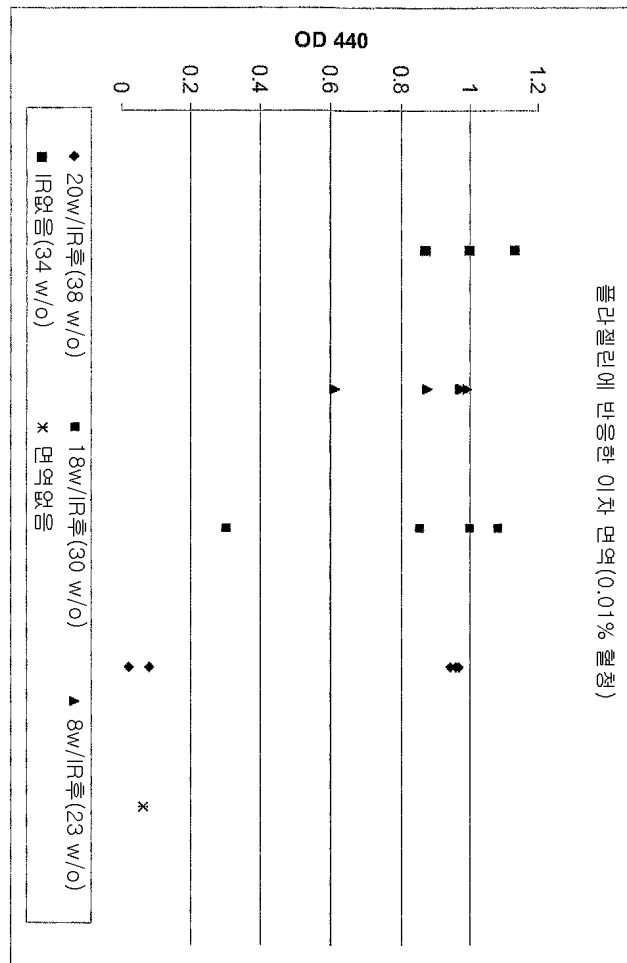
도면16a



도면16b

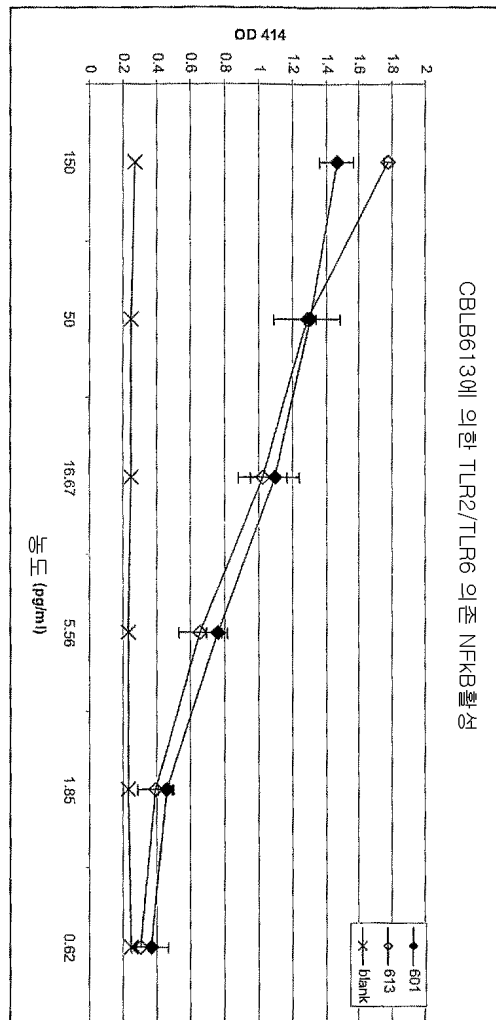


도면16c

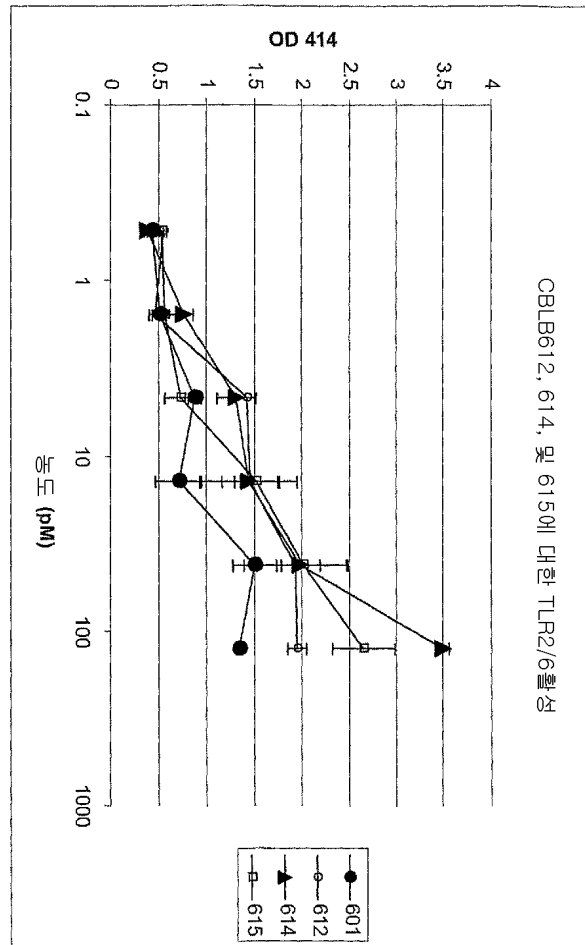




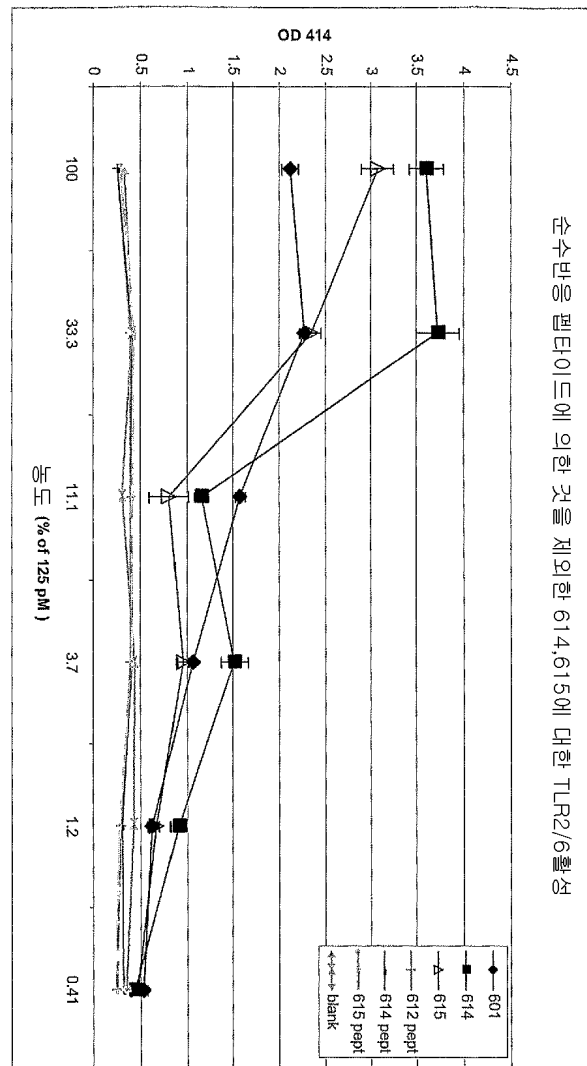
도면17



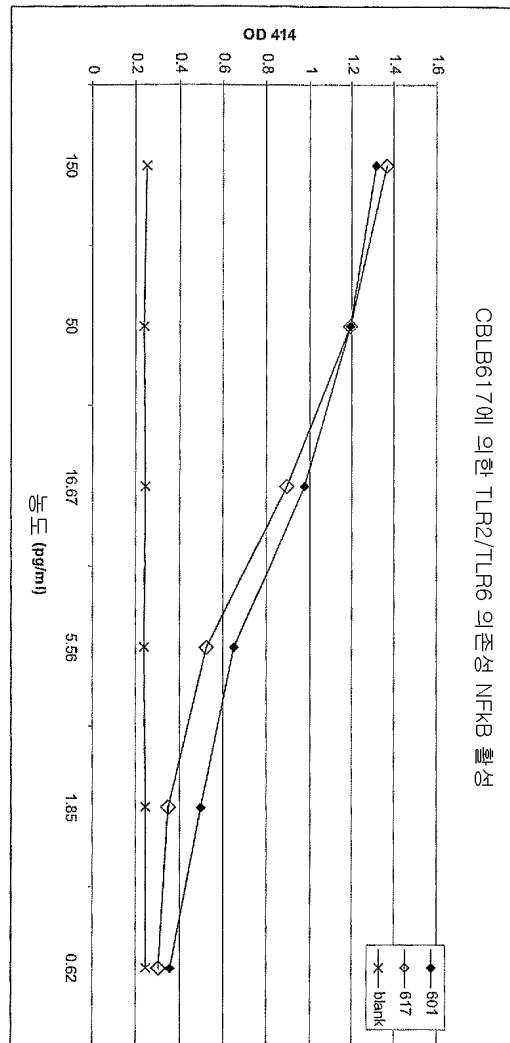
도면18a



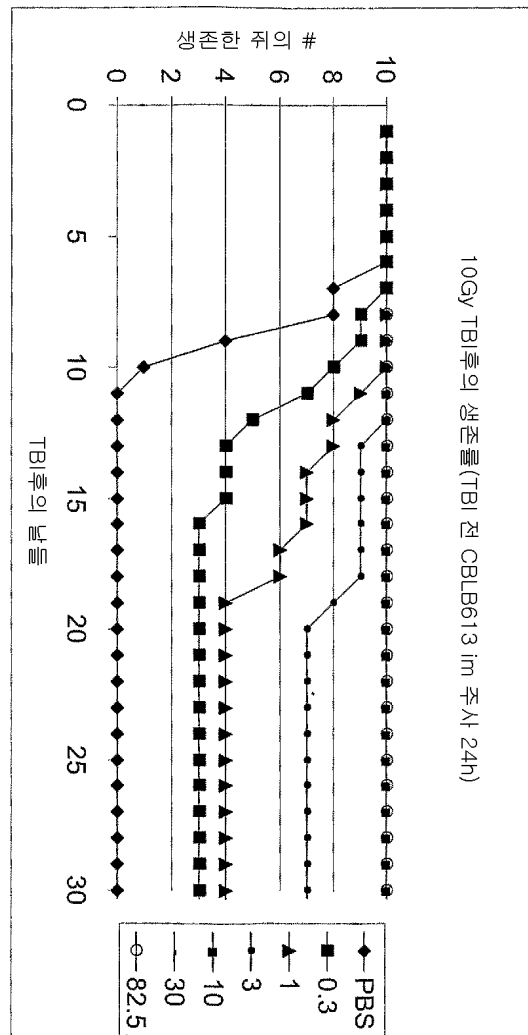
도면18b



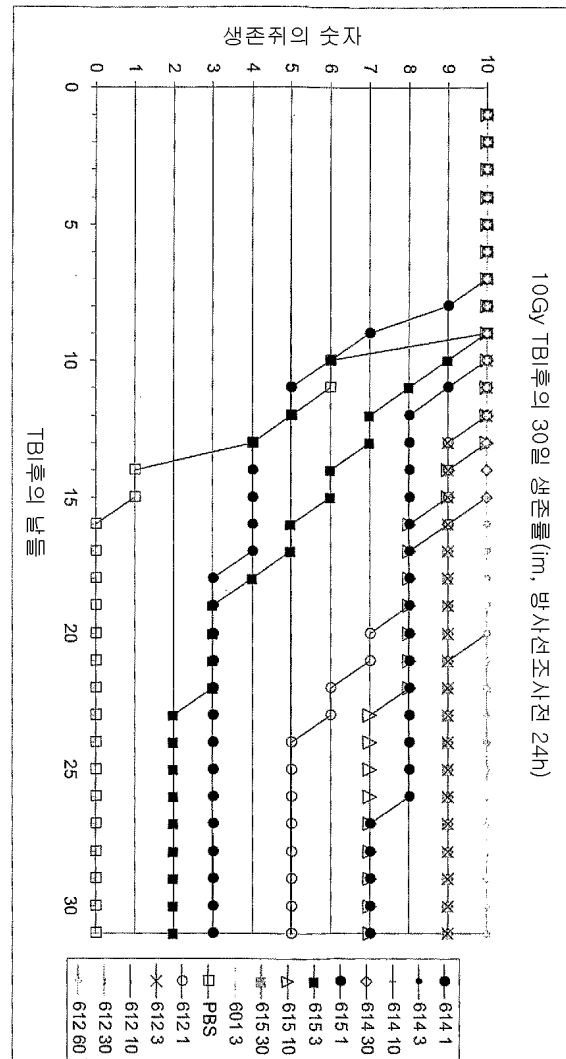
도면19



도면20

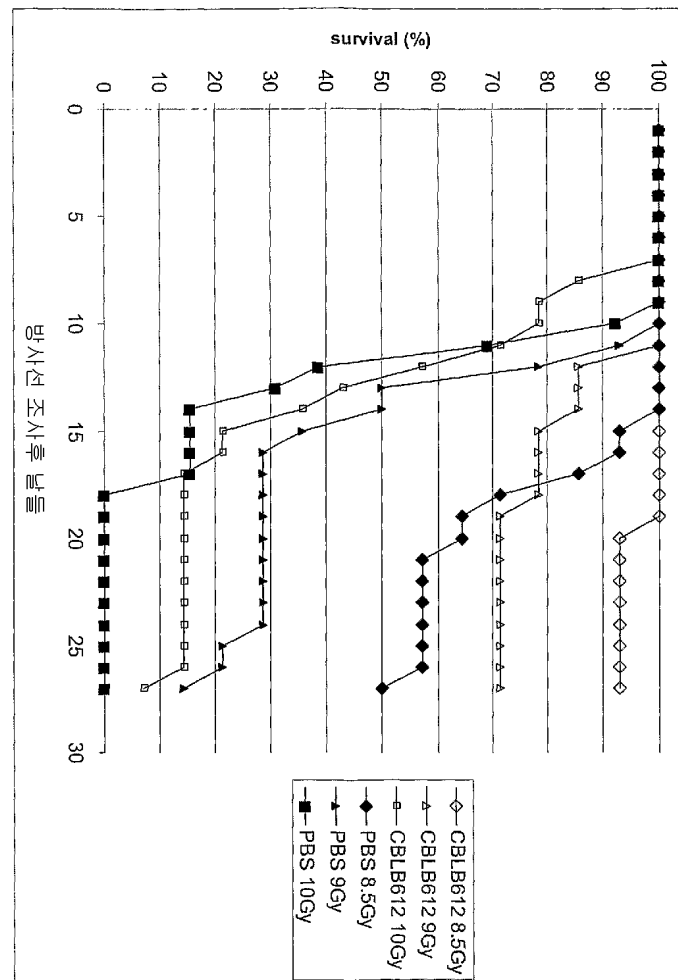


도면21





도면22



서열목록

서열목록제출서에 첨부하여 제출