



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월19일
(11) 등록번호 10-1967868
(24) 등록일자 2019년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/10 (2017.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7001156
(22) 출원일자(국제) 2011년06월17일
심사청구일자 2016년06월17일
(85) 번역문제출일자 2013년01월16일
(65) 공개번호 10-2013-0121813
(43) 공개일자 2013년11월06일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2011/063910
(87) 국제공개번호 WO 2011/158933
국제공개일자 2011년12월22일
(30) 우선권주장
JP-P-2010-138070 2010년06월17일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
W02009036368 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
닛토덴코 가부시카가이사
일본국 오사카후 이바라키시 시모호즈미 1-1-2
(72) 발명자
나이츠 요시로
0640823 일본국 홋카이도 삿포로시 추오구 기타
3조 니시 30초메 2-1-901
카지와라 케이코
5678680 일본국 오사카후 이바라키시 시모호즈미
1초메 1반 2고 닛토덴코 가부시카가이사내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 9 항

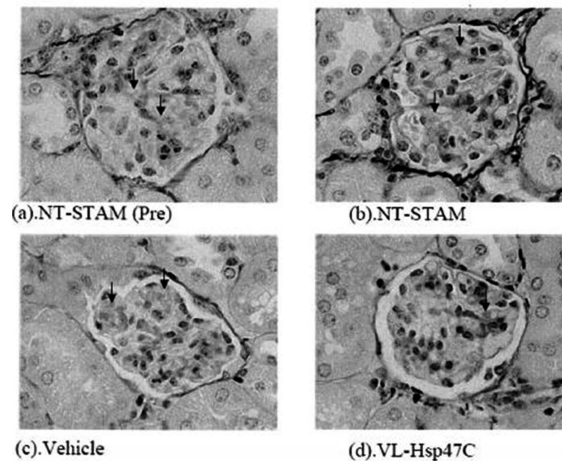
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 신장 섬유증 치료 물질

(57) 요약

본 발명은 레치노이드(retinoid)를 표적화제로서 포함하는 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포용의 물질 전달 담체, 상기 담체를 이용한 신장 섬유증치료제, 이의 제조 방법, 제조 키트 및 상기 신장 섬유증치료제를 이용한 신장 섬유증의 치료법 등에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

다나카 야스노부

5678680 일본국 오사카후 이바라키시 시모호즈미
1쵸메 1반 2고 닛토텐코 가부시키키가이사내

미야자키 미요노

0640914 일본국 홋카이도 삿포로시 추오구
미나미14조 니시 11쵸메 3반 23-301

명세서

청구범위

청구항 1

4개의 이소프레노이드(isoprenoid) 단위가 헤드 투 테일(head to Tail)식으로 연결한 골격을 가지는 레티노이드(retinoid)를 포함하는 조성물로서, 리포솜의 형태를 가지는, 신장에 있어서 세포 외 매트릭스 생산 세포에의 물질 송달용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 레티노이드는 레티놀을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 지방질을 더 포함하며, 레티노이드와 지방질의 물비가 8:1 ~ 1:4인 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항의 약학적 조성물 및 약물을 포함하는 신장섬유증 치료용 약학적 조성물로서,

상기 약물이 세포외 매트릭스 구성분자 또는 상기 세포외 매트릭스 구성분자의 생산 또는 분비에 관여하는 분자의 적어도 1개를 표적으로 하는 siRNA, 리보자임, 안티센스 핵산, 및 DNA/RNA 키메라 폴리뉴클레오타이드, 및 이들을 발현하는 벡터로부터 이루어지는 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, siRNA, 리보자임, 안티센스 핵산, 및 DNA/RNA 키메라 폴리뉴클레오타이드는 HSP47(Heat shock protein 47)를 표적으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제 4항 또는 제 5항에 있어서, 사용시 조제 가능한 형태로 제공되는 약학적 조성물.

청구항 7

약물, 및 4개의 이소프레노이드 단위가 헤드 투 테일식으로 연결한 골격을 가지는 레티노이드를 포함하는, 제 4항 또는 제 5항의 약학적 조성물의 제조용 키트로서,

상기 약물이 세포외 매트릭스 구성분자 또는 상기 세포외 매트릭스 구성분자의 생산 또는 분비에 관여하는 분자의 적어도 1개를 표적으로 하는 siRNA, 리보자임, 안티센스 핵산, 및 DNA/RNA 키메라 폴리뉴클레오타이드, 및 이들을 발현하는 벡터로부터 이루어지는 군으로부터 선택되는, 제 4항 또는 제 5항의 약학적 조성물의 제조용 키트.

청구항 8

4개의 이소프레노이드 단위가 헤드 투 테일식으로 연결한 골격을 가지는 레티노이드를 배합하는 공정을 포함하는, 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 9

4개의 이소프레노이드 단위가 헤드 투 테일식으로 연결한 골격을 가지는 레티노이드 및 약물을 각각 배합하는 공정을 포함하는, 제 4항 또는 제 5항의 약학적 조성물의 제조 방법으로서,

약물이 세포외 매트릭스 구성분자 또는 상기 세포외 매트릭스 구성분자의 생산 또는 분비에 관여하는 분자의 적어도 1개를 표적으로 하는 siRNA, 리보자임, 안티센스 핵산, 및 DNA/RNA 키메라 폴리뉴클레오타이드, 및 이들을 발현하는 벡터로부터 이루어지는 군으로부터 선택되는, 제 4항 또는 제 5항의 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포를 표적으로 하는 물질 전달용 담체 및 이것을 이용한 신장 섬유증 치료용 조성물 및 신장 섬유증의 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 식생활을 중심으로 한 생활 습관의 큰 변화에 의해, 고혈압이나 당뇨병 등의 생활 습관 질병 발생률이 증가하고, 그에 따라 신장 질환, 나아가 신부전의 위험이 증가하고 있다.

[0003] 신장은 노폐물의 배설, 체액, 전해질 및 산 염기 평형의 조절 등을 통해 내부 환경의 항상성을 유지하는데 중요한 장기이다. 신장은 수소, 나트륨, 칼륨 및 규소 등의 혈액에 있는 다양한 화합물의 농도를 제어하고 노폐물을 소변으로 배출한다. 신장 기능 저하는 어떠한 것이든, 혈액에서 대사 산물을 충분히 제거하는 신체 능력을 방해할 수 있으며, 신체의 전해질 평형을 파괴할 가능성이 있다. 신장 기능의 저하 또는 부전은 가장 심각한 형태로 치명적이라는 것이다.

[0004] 또한, 신장은 이러한 역할 외에도 세포성 면역, 내분비, 대사 등의 기능이 있다. 내분비 기관으로서 신장은, 활성형 비타민 D3인 1, 25 디하이드록시 비타민(dihydroxy vitamin) D3, 적혈구 생산을 조절하는 에리트로포이에틴(erythropoietin)의 생산, 혈압 조절 인자인 레닌(renin)의 분비와 에리트로포이에틴의 분비, 키닌, 칼리크레인(kallikrein), 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생산 등을 지휘하고 있다.

[0005] 만성 신부전이란, 이러한 신장 기능이 단방향(불가역성)으로 점차 감소하고, 생체의 항상성 유지하지 못하는 상태이다. 만성 신부전, 당뇨병성 신부전, 만성 사구체신염, 악성신장 경화증, 다발성낭포신 등을 원인으로 생기는 것으로 알려져 있다. 모든 신장 질환은 신장의 섬유화를 수반하며 결국 말기 신부전에 이른다. 특히 만성적인 신장 기능 저하는 신장 섬유화의 진행과 깊게 관련되고 있기 때문에, 섬유화의 진행 억제, 만성 신부전의 진행 억제로 이어질 수 있다고 생각된다.

[0006] 일반적으로, 신장 섬유증은 내피 세포 장애에 의한 염증 반응을 수반하여, 결국 과잉 생산된 세포외 매트릭스(Extracellular matrix;ECM)는 섬유화가 발생하여 일어나는 것이다. 예를 들면, 사구체 경화증에서, 원사구체 내피 세포 장애에 의해 발생되며, 케모카인(chemokine) 증식 인자 등의 사이토카인을 분비하며 단구 세포나 마크로파지(macrophage)가 유주(遊走)하여 염증반응을 진행한다. 이어서, 메산쥬(mesangial) 세포의 활성화, 증식, 형질 전환이 일어나고 메산쥬(mesangial) 세포 등의 세포외 매트릭스 생산 세포에서 과다한 양의 세포외 매트릭스가 생산되어 섬유화가 발생하여 사구체 경화증에 이른다.

[0007] 특히 당뇨병성 신부전은, 만성 신부전에 이르는 가장 큰 원인이며, 당뇨병 심각한 합병증의 하나이다. 당뇨병

성 신부전의 특징은 사구체 메산쥬(mesangial)의 증생 및 확대이고, 이것은 주로 I형 및 IV 형 콜라겐, 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin) 등의 ECM 단백질의 축적 증가에 의한 것이다.

- [0008] 일단 중증의 만성 신부전에 빠질 경우 회복은 불가능하게 되어, 투석 등의 치료를 받지 않으면 요독증(尿毒症)이 된다. 만성 신부전의 치료법으로는, 우선, 낮은 단백질 음식, 염분 제한 등의 식이 요법과 사구체에 부하를 걸지 않기 위한 강압제의 투여 등이 시행된다.
- [0009] 또한, 만성 신부전에는, 필요에 따라, 신장의 분비하는 1, 25 디하이드록시 비타민 D3와 에리트로포이에틴(erythropoietin)를 보충하는 치료와 신장의 중요한 기능인 혈압 조절을 적절하게 유지하는 치료가 수행된다.
- [0010] 화학요법으로는 신부전의 진행을 억제하기 위해 엔지오텐신(angiotensin) 전환 효소 억제제 또는 엔지오텐신 II 수용체 길항제가 이용한다. 이것들은 사구체 혈압을 낮추고 신부전의 진행을 억제하는 것 외에도, 그 자체적으로 신장 보호 작용이 있을 것으로 생각되고 있다. 그러나 사구체 혈압을 너무 낮추는 것이 이번에는 반대로 사구체 혈류량이 감소하여 전신성 신부전이 되므로 신중하게 투여할 필요가 있다.
- [0011] 엔지오텐신 전환 효소 억제제로서는, 카프틸(Captopril), 에나라프릴(Enalapril), 데라프릴(Delapril), 이미다프릴(imidapril), 키나프릴(quinapril), 테모카프릴(temocapril), 페린도프릴 터트-부틸라민(perindopril tert-butylamine), 리시노프릴(lisinopril)등이 있어, 안지오텐신 II 수용체 길항제로서는, 로사르탄(lasartan), 바르사르탄(valsartan), 칸데사르탄시레키세틸(candesartan), 텔미사르탄(telmisatan), 오르메사르탄 메독시소밀(Olmesartan medoxomil), 이르베사르탄(irbesartan) 등이 있다.
- [0012] 그 외에는, 요독증의 증상을 개선해서, 투석 도입을 조금 늦추기 위한 장내의 유해 물질을 흡착하는 흡착탄으로서 쿠레메진(KREMEZIN)이 이용된다. 또한, 혈중 칼륨의 상승에 의한 호흡곤란, 손발의 저림, 부정맥등을 막기 위해서, 장내에서 칼륨분을 흡착해 대변과 함께 배출시키는 이온교환 수지로서 폴리스티렌 설푼산 칼슘이 이용된다.
- [0013] 골격근 유래의 대사 산물인 크레아티닌(creatinine)의 혈청중 농도가 5 ~ 7 mg/dl 이상이 되면, 복막 투석, 혈액여과, 혈액 투석 등의 인공투석 요법 또는 신장이식이 검토된다. 그러나, 혈액 투석을 위해서는 주 3회 통원을 하고, 1회 4 ~ 5시간 구속되는 등 생활에 부담이 크고, 신장 이식에서는 신장의 기증자가 적기 때문에 신장이식을 받을 수 있는 환자는 희망자 중에 극히 적다. 게다가 투석 시작 후의 신부전 환자의 평균 수명은 일반 인구의 절반 정도에 머문다.
- [0014] 이러한 상황 아래에서, 신장 섬유증 치료제의 개발에 많은 연구 노력을 쏟아 왔다. 그 결과, 예를 들면, 엔지오텐신 전환 효소 억제제, AT1 엔지오텐신(angiotensin) II 수용체 길항제, 알도스테론(aldosterone) 길항제, 레닌(renin) 억제제 등의 레닌-엔지오텐신-알도스테론(aldosterone)계에 작용하는 약제, 엔도셀린(endothelin) 수용체 길항제, 차단약, 차단약, 면역 억제제, 세포외 매트릭스 대사 억제제, 보체계 억제제, 케모카인 억제제, 포스포에스테라제(phosphodiesterase) 5 억제제 등의 일산화 질소계에 작용하는 약제, NFB 억제제, Rho 억제제, p38MAPK 억제제, PI3K 억제제, 혈관내 상피 세포 증식 인자(VEGF) 억제제, 카리크레인(kallikrein), 릴락신(relaxin), 인터루킨(interleukin) 1 수용체 길항제, 뼈형성 인자-7(BMP-7), 항-종양괴사인자 항체(Anti-TNF antibody), 항-혈소판유래성장인자-D 항체(Anti-PDGF-D antibody)등의 약물이 신장 섬유증모델 동물 또는 임상 시험에 대해 어느 정도의 성과를 거둔 것으로 보고되고 있다(비특허 문헌 1).
- [0015] 또한, 많은 특허 출원도 이루어지고 있으며, 예를 들면, 엔지오텐신(angiotensin) 전환 효소 저해제(특허 문헌 1), 엔지오텐신 II 수용체 길항제(특허 문헌 2), 트란스포밍 증식 인자-(TGF-) 억제제(특허 문헌 3), 플라스미노젠 액티베이터 억제제(plasminogen activator inhibitor)-1(PAI-1) 생산 억제제(특허 문헌 4), 프로스타글란딘(prostaglandin) 수용체 4 선택적 아고니스트(agonist)(특허 문헌 5), I 형 콜라겐 합성 억제제(특허 문헌 6), 콘드로이친(chondroitin) 황산 프로테오그리칸(proteoglycan) 황산 전이 효소 억제제(특허 문헌 7), 비타민 K 에폭시드(epoxide) 환원 효소 억제제(특허 문헌 8), 당화 최종 산물 형성 저해제(특허 문헌 9), A2A 아데노신 리셉터 2 A 아고니스트(agonist)(특허 문헌 10), 엔도셀린(endothelin) 수용체 길항제(특허 문헌 11), VEGF 억제제(특허 문헌 12) 등이 신장 섬유증치료약으로서 출원되고 있다. 그러나, 어느 약제도 아직도 만족할 수 있는 것이 아니고, 새로운 신장 섬유증치료제의 개발이 요구되고 있었다.

특허문헌

- [0016] (특허문헌 0001) [특허 문헌 1] 미국 특허 제 5238924호 공보
 (특허문헌 0002) [특허 문헌 2] 특개평07-002667호 공보
 (특허문헌 0003) [특허 문헌 3] 특개2004-043459호 공보
 (특허문헌 0004) [특허 문헌 4] 특개2009-007258호 공보
 (특허문헌 0005) [특허 문헌 5] 특개2001-233792호 공보
 (특허문헌 0006) [특허 문헌 6] 특표2004-534760호 공보
 (특허문헌 0007) [특허 문헌 7] 특개2009-292725호 공보
 (특허문헌 0008) [특허 문헌 8] 특개2010-077101호 공보
 (특허문헌 0009) [특허 문헌 9] 특개2009-029750호 공보
 (특허문헌 0010) [특허 문헌 10] 특표2007-536241호 공보
 (특허문헌 0011) [특허 문헌 11] 특표2006-519817호 공보
 (특허문헌 0012) [특허 문헌 12] 특개2007-099641호 공보
 (특허문헌 0013) [특허 문헌 13] 국제 공개2006/068232호 팜플렛
 (특허문헌 0014) [특허 문헌 14] 특개2009-221164호 공보
 (특허문헌 0015) [특허 문헌 15] 특개2010-59124호 공보

비특허문헌

- [0017] (비특허문헌 0001) [비 특허 문헌 1] Nephrology, dialysis transplantation, 2007; 22 (12): 3391-407

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 본 발명은, 신장에 있어서 세포의 매트릭스 생산 세포에 특이적으로 약물 등의 물질을 전달할 수 있는 담체, 이것을 이용한 신장 섬유증 치료제 및 신장 섬유증의 치료 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명자들은, 새로운 신장 섬유증 치료제를 탐구하는 가운데, 레티노이드(retinoid)를 표적화제로서 포함한 담체에 세포의 매트릭스 생산 억제제를 담지시킨 조성물의 투여에 의해, 신장 섬유증을 효과적으로 치료할 수 있는 것을 찾아 본 발명을 완성하였다.
- [0020] 비타민 A를 포함한 담체가, 비타민 A를 저장하는 별세포에 약물을 전달하는 것(특허 문헌 13)이나, 동담체에 HSP47에 대한 siRNA를 담지시킨 조성물이 간섬유증(특허 문헌 13), 폐선유증(특허 문헌 14) 및 골수 섬유증(특허 문헌 15)을 개선시키는 것은 알려져 있었지만, 신장 섬유증, 신장의 사이질조직, 메산썸(mesangial)과의 관계에 대해서는 지금까지 전혀 알려지지 않았었다.
- [0021] 즉, 본 발명은, 이하에 관한 것이다.
- [0022] (1) 레티노이드(retinoid)를 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포에의 표적화제로서 포함하는 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포에의 물질 전달용 담체.

- [0023] (2) 레티노이드가 레티놀(retinol)을 포함하는 상기(1)의 담체.
- [0024] (3) 리포솜의 형태를 가지며 레티노이드와 리포솜에 포함되는 지방질과의 물비가 8:1 ~ 1:4인 상기(1) 또는 (2)의 담체.
- [0025] (4) 상기 (1) 내지 (3)의 몇개의 담체와 신장에 있어서의 세포외 매트릭스생산 세포의 활성 또는 증식을 제어하는 약물을 포함하는 신장 섬유증 치료용 약학적 조성물.
- [0026] (5) 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포의 활성 또는 증식을 제어하는 약물이, PAI1의 활성 또는 생산 저해제, 세포 활성 억제제, 증식 저해제, 세포사멸(apoptosis) 유도제, 및, 세포외 매트릭스 구성분자 또는 헤 세포외 매트릭스 구성분자의 산 생혹은 분비에 관여하는 분자의 적어도 1개를 표적으로 하는 RNAi 분자, 리보자 임, 안티센스 핵산, DNA/RNA 키메라 폴리뉴클레오타이드(Chimera polynucleotide) 및 이것들을 발현하는 벡터로부터 되는 군으로부터 선택된 상기(4)의 약학적 조성물.
- [0027] (6) 세포외 매트릭스 생산 세포의 활성 또는 증식을 조절하는 약물, HSP47의 억제제인 상기 (4)의 약학적 조성 물.
- [0028] (7) 약물과 담체를, 의료의 현장 또는 그 근방에서 혼합된 상기 (4) 내지 (6)의 몇개의 약학적 조성물.
- [0029] (8) 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포의 활성 또는 증식을 조절는 약물, 레티노이드(retinoid) 및 필 요에 따라서 레티노이드 이외의 담체 구성물질을 단독으로 또는 조합해 포함한 1개 또는 그 이상의 용기를 포함 한 상기(4) 내지 (7)의 몇개의 약학적 조성물의 제조 키트.
- [0030] (9) 레티노이드를 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포에의 표적화제로서 배합하는 공정을 포함하는 신 장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포에의 물질 전달용 담체의 제조 방법.
- [0031] (10) 레티노이드를 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포에의 표적화제로서 신장에 있어서의 세포외 매트 릅스 생산 세포의 활성 또는 증식을 제어하는 약물을 유효 성분으로서 각각 배합하는 공정을 포함하는 신장 섬 유증 치료용 약학적 조성물의 제조 방법.

발명의 효과

- [0032] 본 발명의 신장 섬유증 치료용 조성물의 정확한 작용 기작은 아직도 완전하게는 해명되어 있지 않지만, 레티노 이드(retinoid)가, 섬유아세포나 줄기 섬유아세포등의 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포에의 표적화 제로서 기능을 하며, 유효 성분, 예를 들면 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포의 활성 또는 증식을 조 절하는 약물등을 동세포에 전달하는 것으로써, 항신섬유증효과를 달성하는 것이라고 생각할 수 있다.
- [0033] 따라서, 본 발명의 담체에 의해, 유효 성분을 작용 부위, 또 표적 세포에 효율적으로 전달할 수 있기 위해, 신 장 섬유증, 특히 지금까지 치료가 곤란한 당뇨병성 신장염등의 치료, 진행의 억제 또는 발병 예방이 가능하며, 인간 의학 및 수의학에 대한 기여은 대단히 크다.
- [0034] 또한, 본 발명의 담체는 임의의 약제(예를 들면, 기존의 신장 섬유증치료 약물)와 조합하여 그 작용 효율을 높 일 수 있어서 제제적인 응용범위가 넓고, 효과적인 치료제의 제조를 간편하게 실시할 수 있다고 하는 장점도 있 다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 각 군의 마우스의 신장 피질의 절편의 시리우스/레드 염색에 의한 사구체의 대표적인 세균 검사상이다. 유침렌즈를 이용해 배율 800배로 촬영했다.
- 도 2는 시리우스/레드 염색에 의해서 정량한, 신장 피질의 섬유화 영역의 비율을 나타낸 그래프이다. 마우스 1 개체에 대해 신장 피질 영역 20 시야를 무작위로 촬영하여 섬유화 영역의 비율(Fibrosis area(%))를 계산했다 (*P<0.05, **P<0.01).
- 도 3은 마우스 신장 세포외 매트릭스 생산 세포에 있어서의 siRNA 함유 VA결합 리포솜에 의한 유전자 억다운을 나타낸 그래프이다. 마우스 신장보다 회수한 세포외 매트릭스 생산 세포중의 HSP47 유전자 발현량을, 내부 컨

트를 유전자의 GAPDH 발현량으로 보정하여 미처리(No treatment)를 100%로 했을 때의 비율(HSP47 gene expression (%))를 그래프화했다. VA-lip는 VA-liposome-siRNA Hsp47C, lip는 liposome-siRNA Hsp47C, VA+siRNA는 VA+siRNA Hsp47C, NT는 미처리(No treatment)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 본 발명에 있어서, 신장에서의 세포의 매트릭스 생산 세포는 신장에 존재하는 세포의 매트릭스 생산능을 가지는 세포이면 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 신장에 존재하는 메산쥔(mesangial) 세포, 모세관간질세포, 주피세포, 섬유아세포, 섬유아세포의 전구 세포인 피브로 사이트(fibro sight) 및 줄기 섬유아세포를 포함한다. 신장에 존재하는 매트릭스생산 세포는, 신장에 존재하는 세포에 유래하는 것뿐만 아니라, 순환 혈액 중의 피브로사이트(fibrocyte)에 유래하는 것이나, 내피간엽분화 전환에 의해 내피세포로부터 전환된 것도 포함할 수 있다. 줄기 섬유아세포는 SMA(평활근 액틴)의 발현을 특징으로 하고 있다. 본 발명에 있어서의 줄기 섬유아세포는, 검출 가능하게 표지 된 항SMA 항체를 이용한 면역 염색등에 의해서 분류되는 것이다. 또한, 섬유아세포는 간엽계 세포에 특징적인 비멘틴(vimentin)을 발현하지만, SMA를 발현하고 있지 않기 때문에, 비멘틴과 SMA와의 이중 염색 등에 의해 분류할 수 있다. 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포는 또한, 신장 조직을 콜라게나제(collagenase) 및 프로테아제(protease)로 처리한 후, 이것을 밀도 구배 원심법(예를 들면, 최종농도 8%의 Nycodenz^(R))로 분리하여 얻을 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서의 레티노이드는 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포에의 표적화제(타게팅제)로서 기능하고, 해당 세포에 특이적인 물질 전달을 촉진하는 것이다. 레티노이드에 의한 물질 전달 촉진의 기작은 아직도 완전하게는 해명되어 있지 않지만, 예를 들면, RBP(retinol binding protein)와 특이적으로 결합한 레티노이드가 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포의 세포 표면에 위치하는 어떤 종류의 리셉터(receptor)를 개입시켜 동세포에 집어 넣어지는 것을 생각할 수 있다.
- [0038] 레티노이드는, 4개의 이소프레노이드(isoprenoid) 단위가 헤드 투 테일(head to Tail)식에 연결한 골격을 가지는 화합물의 군의 1원이며(G. P. Moss, Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2nd Ed. Portland Press, pp. 247-251 (1992)(을)를 참조), 비타민 A는, 레티놀(retinol)의 생물학적 활성을 정성적으로 나타내 보이는 레티노이드의 일반적인 설명이다. 본 발명에서 사용될 수 있는 레티노이드로서는, 특히 한정되지 않고, 예를 들면 레티놀(올 트랜스 레티놀(all trans retinol)을 포함한), 레티날(retinal), 레티노산(retinoic acid)(트레티노인(tretinoin)을 포함), 레티놀과 지방산과의 에스테르, 지방족알코올과 레티노인산과의 에스테르, 에트레티네이트(etretinate), 이소트레티노인(isotretinoin), 아다파렌(adapalene), 아시트레틴(acitretin), 타자로텐(tazarotene), 팔미틴산레티놀(palmitate retinol)등의 레티노이드 유도체, 및 펜레치니드(fenretinide)(4 HPR), 베키사로텐(bexarotene)등의 비타민 A 아날로그를 들 수 있다.
- [0039] 이 가운데, 레티놀, 레티날, 레티노인산, 레티놀과 지방산과의 에스테르(예를 들면 레티닐 아세테이트(retinyl acetate), 레티닐 팔미테이트(retinyl palmitate), 레티닐 스테아레이트(retinyl stearate) 및 레티닐 라우레이트(retinyl laurate)등) 및 지방족알코올과 레티노인산과의 에스테르(예를 들면 에스테르 레티노에이트(ester retinoate)등)는 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포에의 특이적인 물질의 전달의 효율면에서 바람직하다.
- [0040] 레티노이드의 시스-트랜스를 포함한 이성질체 모두는 본 발명의 범위내에 들어간다. 또한, 레티노이드는 1 또는 2개 이상의 치환기로 치환되기도 한다. 본 발명에 있어서의 레티노이드는 단 떼어 놓아진 상태의 것은 물론, 이것을 용해 또는 보관 유지할 수 있는 매체에 용해 또는 혼합한 상태의 레티노이드도 포함한다.
- [0041] 본 발명의 담체는, 이러한 레티노이드 자체로 구성해도 바람직하고, 레티노이드를 이것과는 다른 담체 구성 성분에 결합 또는 포함시키는 것으로 구성해도 바람직하다. 따라서, 본 발명의 담체는 레티노이드 이외의 담체 구성 성분을 포함하고 있어도 바람직하다. 해당되는 성분으로서는, 특히 한정되지 않고, 의약 및 약학의 분야로 알려진 임의의 것을 이용할 수 있지만, 레티노이드를 포함할 수 있거나 이것과 결합할 수 있는 것이 바람직하다.
- [0042] 이러한 성분으로서는, 지질, 예를 들면, 글리세로인지질(glycerophospholipid) 등의 인지질, 스핀고미에린(sphingomyelin) 등의 스핀고지방질, 콜레스테롤(cholesterol)등의 스테롤, 콩기름, 양귀비유 등의 식물성유, 광유, 노른자 레시틴등의 레시틴류, 폴리머등을 들 수 있지만, 이것들로 한정되지 않는다. 이 중에서, 리포솜(liposome)을 구성할 수 있는 것, 예를 들면, 레시틴등의 천연 인지질, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)(DMPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-

Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)(DPPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)(DSPC)등의 반합성 인지질, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올라민(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)(DOPE), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine)(DLPC), 콜레스테롤등이 바람직하다.

[0043] 특히 바람직한 성분으로서는, 세망 내피계에 의한 포착을 회피할 수 있는 성분, 예를 들면, N-(α -트리메틸암모니오아세틸)-디도데실-D-글루타메이트 클로라이드(N-(α -trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride)(TMAG), N, N, N, N-테트라 메틸-N, N, N, N-테트라팔미틸스페르민(N, N, N, N-tetramethyl-tetrapalmitylspermine)(TMTPS), 2, 3-디올레옥시-N-2(스페르민카복사마이드) 에틸-N, N-디메틸-1-프로판암모니움트리플루오르아세트레이트(2,3-Dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamide)ethyl]-N, N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate)(DOSPA), N-1-(2, 3-디올레옥시) 프로필-N, N, N-트리메틸암모늄 클로라이드(N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium Chloride)(DOTMA), 디메틸디옥타데실암모니움 클로라이드(Dimethyldioctadecylammoniumchloride)(DODAC), 디도데실암모니움브로마이드(Didodecyltrimethylammoniumbromide)(DDAB), 1, 2-디올레옥시-3-트리메틸암모니움프로판(1,2-dioleyloxy-3-trimethylammonio propane)(DOTAP), 3-N(N, N-디메틸아미노 에탄) 카르바모일콜레스테롤([dimethylaminoethan)carbonyl]cholesterol)(DC-Chol), 1, 2-디미리스틸옥시프로필-3-디메틸 하이드록시에틸암모늄 브로마이드(1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethylaminium)(DMRIE), 0, 0-디테트라데카노일-N-(α -트리메틸암모니오아세틸) 디에탄올아민클로라이드(ditetradecanoyl-N-(α -trimethylammonioacetyl)diethanolaminechloride)(DC-6-14)등의 양이온성 지질을 들 수 있다.

[0044] 본 발명에 있어서의 담체는 특정의 3 차원 구조를 가져도 괜찮다. 해당 구조로서는, 한정되지 않고, 직쇄상 또는 분기상의 선상 구조, 필름상 구조, 구상 구조등을 들 수 있다. 따라서, 담체는, 한정되지 않고, 미셀, 리포솜, 에멀전, 미소구, 나노소구 등의 임의의 3 차원 형태를 가져도 괜찮다.

[0045] 본 발명의 담체에 레티노이드의 결합 또는 포함은 화학적 및/또는 물리적인 방법에 따라 레티노이드를 담체의 다른 구성 성분에 결합시키든가 또는 포함시키는 것도 가능하다. 또는, 본 발명의 담체에 레티노이드의 결합 또는 포함해서 담체의 제작시에, 레티노이드와 그 이외의 담체 구성 성분을 혼합하는 것에 의해도 가능해진다. 본 발명의 담체에 있어서 레티노이드의 양은, 예를 들면, 0.01 ~ 1000 nmol/l, 바람직하게는 0.1 ~ 100 nmol/l로 하는 것이 가능하다. 담체에 레티노이드의 결합 또는 포함해서 담체에 약물등을 담지시키기 전에 가도 괜찮고, 담체, 레티노이드 및 약물 등을 동시에 혼합하는 것 등에 의해 가도 괜찮고, 또는, 약물등을 이미 담지한 상태의 담체와 레티노이드를 혼합하는 것 등에 의해 가도 괜찮다. 따라서, 본 발명은 또, 기존의 임의의 약물 결합 담체나 약물 봉입 담체, 예를 들면, DaunoXome^(R), Doxil, Caelyx^(R), Myocet^(R) 등의 리포솜 제제에 레티노이드를 결합시키는 공정을 포함하는 신장에 있어서 세포의 매트릭스 생산 세포에 특이적인 제제의 제조 방법에 관한 것이다.

[0046] 본 발명의 담체의 형태는 원하는 물질 또는 물체를 표적으로 하는 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포에 운반할 수 있으면 어느 형태로도 좋고, 예를 들면, 한정하는 것은 아니지만, 고분자 미셀(micelle), 리포솜, 에멀전, 미소구, 나노소구등의 어느 형태를 취할 수도 있다. 본 발명에 있어서, 전달 효율을 높이는 전달할 수 있는 물질의 선택의 폭이나 제제의 용이성 등의 측면에서, 이 중 리포솜의 형태가 바람직하고, 안에서도 양이온성 지질을 포함한 양이온성 리포솜이 특히 바람직하다. 담체가 리포솜의 형태인 경우, 레티노이드와 이외의 리포솜 구성 지질과의 몰비는 레티노이드의 담체에의 결합 또는 포함의 효율성을 고려하면, 바람직하게는 8:1 ~ 1:4, 보다 바람직하게는 4:1 ~ 1:2이다.

[0047] 본 발명의 담체는 이것에 포함되는 레티노이드가 표적화제로서 기능하는 모양으로 존재하고 있으면, 운반물을 내부에 포함해도, 운반물의 외부에 부착해 존재해도, 또한, 운반물과 혼합되고 있어도 괜찮다. 여기서, 표적화제로서 기능한다는 것은 레티노이드를 포함한 담체가 이것을 포함하지 않는 담체보다 신속 및/또는 대량으로, 표적 세포인 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포에 도달 및/또는 받아들여지는 것을 의미한다. 이것은, 예를 들면, 표지된 또는 표지를 포함한 담체를 표적 세포의 배양물에 첨가하여, 일정 시간 후에 표지의 존재 부위를 분석하는 것으로 용이하게 확인할 수 있다. 구조적으로는, 예를 들면, 레티노이드가, 늦어도 표적 세포에 도달하기까지, 담체를 포함한 제제의 외부에 적어도 부분적으로 노출하고 있으면, 상기 요건을 충족할 수 있다. 여기서, 제제란, 아래의 본 발명의 조성물을 포함하여 또한 형태도 가지는 개념이다. 레티노이드가, 제제의 외부에 노출하고 있는지 아닌지는 제제를 레티노이드와 특이적으로 결합하는 물질, 예를 들면, 레티놀 결합 단백질(RBP)등과 접촉시켜 제제에의 결합을 조사하는 것으로서 평가할 수 있다.

- [0048] 레티노이드를, 늦어도 표적 세포에 도달하기까지, 제제의 외부에 적어도 부분적으로 노출시키는 것은, 예를 들면, 레티노이드와 레티노이드 이외의 담체 구성 성분과의 배합 비율을 조절하는 것 등에 의해 달성할 수 있다. 또한, 담체가 리포솜 등의 지질 구조체의 형태를 가지는 경우에는, 예를 들면, 레티노이드 이외의 담체 구성 성분과 레티노이드를 복합체화할 때에, 최초로 레티노이드 이외의 담체 구성 성분으로부터 되는 지질 구조체를 수성 용액중에 희석한 다음 이것을, 레티노이드와 접촉, 혼합하는 등의 수법을 이용할 수 있다. 이 경우, 레티노이드는, 용제, 예를 들면, DMSO 등의 유기용제에 용해한 상태여도 괜찮다. 여기서, 지질 구조체란, 임의의 3 차원 구조, 예를 들면, 선상, 필름상, 구상 등의 형상을 가지는, 지방질을 구성 성분으로서 포함한 구조체를 의미하며, 한정되지 않고, 리포솜, 미셀, 지방질 미소구, 지방질 나노소구, 지방질 에멀전 등을 포함한다. 리포솜을 표적화한 것과 같은 표적화제를 다른 약물 담체에도 적용할 수 있는 것은, 예를 들면 Zhao and Lee, Adv Drug Deliv Rev. 2004;56(8):1193-204, Temming et al., Drug Resist Updat. 2005;8(6):381-402 등에 기재되어 있다.
- [0049] 지질 구조체는, 예를 들면, 소금이나, 자당, 포도당, 말토스(maltose) 등의 당류, 글리세린, 프로필렌 글리콜 등의 다가 알코올 등, 바람직하게는 자당이나 포도당의 침투압 조정제를 이용해 침투압을 조정하는 것으로, 안정화시킬 수 있다. 또한, 적당의 소금이나 완충액 등의 pH 조정제를 더하는 일에 의해 pH를 조정해도 괜찮다. 따라서, 지질 구조체의 제조, 보존등을, 이러한 물질을 포함한 매체중에서 실시할 수 있다. 이 경우, 삼투압 조정제의 농도는, 혈액과 등장이 되도록 조정하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 자당의 경우, 매체중의 농도는, 한정되지 않고, 3 ~ 15 중량%, 바람직하게는 5 ~ 12 중량%, 보다 바람직하게는 8 ~ 10 중량%, 특히 9 중량%여도 좋고, 포도당의 경우는, 매체중의 농도는, 한정되지 않고, 1 ~ 10 중량%, 바람직하게는 3 ~ 8 중량%, 보다 바람직하게는 4 ~ 6 중량%, 특히 5 중량%여도 괜찮다.
- [0050] 또한, 본 발명은 레티노이드를 신장에 있어서의 세포와 매트릭스 생산 세포에의 표적화제를 배합하는 과정을 포함하며, 신장에 있어서의 세포와 매트릭스 생산 세포에의 물질 전달용 담체의 제조 방법에 관한 것이다. 레티노이드의 배합 방법은, 레티노이드가, 배합된 담체에 대해 신장에 있어서의 세포와 매트릭스 생산 세포에의 표적화제로서 기능할 수 있으면 특히 한정되지 않지만, 예를 들면, 본 명세서에 기재의 여러 가지의 수법을 이용할 수 있다. 따라서, 레티노이드의 배합은, 화학적 및/또는 물리적인 방법에 따라 레티노이드를 담체의 다른 구성 성분에 결합시키거나 또는 포함시킬 수도 있고, 담체의 제작시에, 레티노이드와 그 이외의 담체 구성 성분을 혼합하는 것 등에 의해 실시할 수 있다. 레티노이드의 배합량은 본 발명의 담체에 대해 이미 언급한 대로이다.
- [0051] 본 담체가 전달하는 물질이나 물체는 특히 제한되지 않지만, 투여 부위로부터 표적 세포가 존재하는 병변 부위에, 생물의 체내를 물리적으로 이동할 수 있는 크기인 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 담체는, 원자, 분자, 화합물, 단백질, 핵산 등의 물질은 물론, 벡터, 바이러스 입자, 세포, 하나 이상의 요소로 구성된 약물 방출 시스템, 마이크로 머신 등의 물체를 운반할 수 있다. 상기 물질 또는 물체는, 바람직하게는 표적 세포에 어떠한 영향을 주는 성질을 가지고, 예를 들면, 표적 세포를 표지하거나 표적 세포의 활성 또는 증식을 제어하는 (예를 들면, 이것을 증강 또는 억제하는) 것을 포함한다.
- [0052] 따라서, 본 발명의 한 구현에 대해서는 담체가 전달하는 것은 신장에 있어서의 세포와 매트릭스 생산 세포의 활성 또는 증식을 조절하는 약물이다. 여기서, 신장에 있어서의 세포와 매트릭스 생산 세포의 활성이란, 신장에 있어서의 세포와 매트릭스 생산 세포가 나타내 보이는 분비, 수중에 넣어, 유주 등의 여러 가지의 활성을 가리키지만, 본 발명에 대해서는, 전형적으로, 이 가운데 특히 신장 섬유증의 발병, 진행 및/또는 재발 등에 관여하는 활성을 의미한다. 해당 활성으로서는, 예를 들면, 한정하는 일 없이, PAI-1 등의 생리 활성 물질, 콜라겐(collagen), 프로테오글리칸(proteoglycan), 테네이신(tenascin), 피브로넥틴(fibronectin), 트롬보스포딘(thrombospondin), 오스테오펀틴(osteopontin), 오스테오넥틴(osteonectin), 엘라스틴(elastin) 등의 세포와 매트릭스 성분 등의 생산분비 및 이러한 세포와 매트릭스 성분의 분해활성의 억제 등을 들 수 있다.
- [0053] 따라서, 본 명세서에 대하여, 신장에 있어서의 세포와 매트릭스 생산 세포의 활성 또는 증식을 조절하는 약물이란 신장 섬유증의 발병, 진행 및/또는 재발에 관계하는 동세포의 물리적, 화학적 및/또는 생리적인 작용등을 직접 또는 간접에 억제하는 어느 쪽의 약물이어도 좋고, 한정되지 않고, 상기 생리 활성 물질의 활성 혹은 생산을 저해하는 약물, 및 전기 생리 활성 물질을 중화하는 항체 및 항체 단편, 전기 생리 활성 물질의 발현을 억제하는 RNAi 분자(예를 들면, siRNA, shRNA, ddRNA, miRNA, piRNA, rasiRNA 등), 리보자임, 안티센스 핵산(RNA, DNA, PNA, 또는 이러한 복합물을 포함한다) 등의 물질, 혹은 도미넌트 네가티브 변이체등의 도미넌트 네가티브 효과를 가지는 물질, 또는 이것들을 발현하는 벡터, 상기 세포의 매트릭스 성분등의 생산분비를 저해하는 약물, 예를 들면, 세포와 매트릭스 성분의 발현을 억제하는, RNAi 분자(예를 들면, siRNA, shRNA, ddRNA, miRNA,

piRNA, rasiRNA 등), 리보자임, 안티센스 핵산(RNA, DNA, PNA, 또는 이러한 복합물을 포함한다)등의 물질, 혹은 도미넌트 네가티브 변이체등의 도미넌트 네가티브 효과를 가지는 물질, 또는 이것들을 발현하는 벡터, 나트륨 채널 억제제등의 세포 활성 억제제, 알킬화제(예를 들면, 이포스포미드(ifosfamide), 님머스틴(nimustine), 사이클로포스포미드(cyclophosphamide), 다카르바진(dacarbazine), 메르파란(melphalan), 라니머스틴(ranimustine) 등), 항종양성 항생 물질(예를 들면, 이다루비신(idarubicin), 에피루비신(epirubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 피라루비신(pirarubicin), 블레오마이신(bleomycin), 페플로마이신(peplomycin), 미토산트론(mitoxantrone), 마이토마이신 C(mitomycinC) 등), 대사 길항제(예를 들면, 겐시타빈(gemcitabine), 에노시타빈(enocitabine), 사이타라빈(cytarabine), 테가푸르-우라실(tegafururacil), 테가후르-기메라실-오테라시르카리움(t-gimeracil-oteracil potassium) 배합제, 독시플루리딘(doxifluridine), 하이드록시카르바미드(hydroxycarbamide), 플루오르우라실(fluorouracil), 메소트레세이트(methotrexate), 메르캅토푸린(mercaptapurine) 등), 에토포사이드(etoposide), 이리노테칸(irinotecan), 비노렐빈(vinorelbine), 도세탁셀(docetaxel), 파크리탁셀(paclitaxel), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 빈브라스틴(vinblastine) 등의 알칼로이드(alkaloid) 및 카르보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 네다플라틴(nedaplatin) 등의 백금 착체등의 세포 증식 억제제 및 사이클로스포린(cyclosporin) 등의 세포사멸(apoptosis) 유도제를 포함한다.

[0054] 세포외 매트릭스 성분의 생산분비를 억제하는 약물로서는, 한정되지 않고, 예를 들면, 여러가지 타입의 콜라겐의 합성 과정에서 공통되는 세포내 수송 및 분자 성숙화에 필수인 콜라겐 특이적 분자 샤프론(chaperone)인 HSP47 억제제 등을 들 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명에 있어서 신장에서의 세포외 매트릭스 생산 세포의 활성 또는 증식을 조절하는 약물은, 신장 섬유증의 발병, 진행 및/또는 재발의 억제에 직접 또는 간접에 관계된 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포의 물리적, 화학적 및/또는 생리적인 작용 등, 예를 들면, MMP(MMP1, MMP2등을 포함한다), 플라스미노겐 활성화제(plasminogen activator;PA) 등의 생산분비를 직접 또는 간접에 촉진하는 어느 쪽의 약물이어도 괜찮다. 해당 약물로서는, 한정하는 것 없이, 예를 들면, 이러한 물질의 활성화제나 발현 증강제 등을 들 수 있다. 본 발명의 담체는 상기 약물의 1종 또는 2종 이상을 전달할 수 있다.

[0056] 본 발명에 사용되는 siRNA(small interfering RNA)에는, 혐의의 siRNA 외에, miRNA(micro RNA), shRNA(short hairpin RNA), piRNA(Piwi-interacting RNA), rasiRNA(repeat associated siRNA)등의 이중가닥 RNA 및 이러한 개변체도 포함된다. 광의의 기능성소분자 RNA로서의 siRNA 및 siRNA를 발현하는 벡터, 예를 들면 일반적인 텍스트(실험 의학 별책 개정 RNAi 실험 프로토콜2004년 양토사, RNAi 실험 관련 QA2006년 양토사)의 교시에 따라서 사용할 수 있다.

[0057] 이러한 siRNA 설계는, 당업자이면, 표적으로 하는 유전자의 메신저 RNA 배열 및 기존의 siRNA의 배열을 참조하여서, 일반적인 텍스트(실험 의학 별책 개정 RNAi 실험 프로토콜2004년 양토사, RNAi 실험 관련 QA2006년 양토사)의 교시에 따라서 적절하게 수행할 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명의 담체의 전달물로서, 한정되지 않고, 신장 섬유증의 발병, 진행 및/또는 재발을 억제하는 상기 이외의 약물, 예를 들면, 한정하는 것 없이, 안지오텐신(angiotensin) 효소 저해제, AT1 안지오텐신 II 수용체 길항제, 알도스테론(aldoosterone) 길항제, 엔도셀린(endothelin) 수용체 길항제, 차단약, 차단약, 면역 억제제, 세포외 매트릭스 대사 억제제, 보체제 억제제, 케모카인(chemokine) 억제제, TGF- 저해제, 포스포디에스테라제(phosphodiesterase) 5 억제제등의 일산화 질소계에 작용하는 약제, NFB 억제제, Rho 억제제, p38MAPK 억제제, PI3K 억제제, 칼리크레인(kallikrein), 인터루킨(interleukin) 1 수용체 길항제, BMP-7, 항종양괴사 인자 항체(Anti-TNF antibody), 항혈소관 유래 성장 인자 D 항체(Anti-PDGF-D antibody), 플라스미노겐 활성화제(plasminogen activator inhibitor)-1 생산 억제제, 프로스타글란딘(prostaglandin) 수용체 4 선택적 아고니스트, I 형 콜라겐 합성 억제제, 콘드로이틴(chondroitin) 황산 프로테오글리칸(proteoglycan) 황산 전이 효소 억제제, 비타민 K 에폭사이드(epoxide) 환원 효소 억제제, 당화 최종 산물 형성 억제제, A2A아데노신 리셉터 2 A 아고니스트, 엔도셀린 수용체 길항제, VEGF 억제제, ADAM(디신테그린 및 메탈로프로테아제 도메인(a disintegrin and metalloprotease domain)) 프로테아제(protease)의 활성화제 혹은 발현 증강제, ADAMTS(트롬보스포딘 모티프를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로테아제(a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs)) 프로테아제의 활성화제 혹은 발현 증강제, 릴렉신(relaxin) 혹은 그 발현 증강제등을 들 수 있다. 본 명세서에 대해서 발현 증강제는, 한정되지 않고, 예를 들면, 발현 증강의 대상이 되는 단백질을 코딩하는 핵산을 포함한 벡터 등의 유전자 치료제 등을 포함한다. 또한, 이러한 약물은 후술의 본 발명의 조성물과 병용할 수도 있다. 여기서, 병용이란, 본 발명의 조성물이라고 상기 약물을 실질적으로 동시에 투여

하는 것, 및, 같은 치료 기간 내에 시간적으로 간격을 두고 투여하는 것을 포함한다. 후자의 경우, 본 발명의 조성물은 상기 약물의 전에 투여해도, 후에 투여해도 좋다.

[0059] 본 발명의 한 구현에 있어서, 신장에 있어서의 세포의 매트릭스생산 세포의 활성화 또는 증식을 조절하는 약물로서는, HSP47의 저해제, 예를 들면, 이들 각각에 대한 siRNA등을 들 수 있다.

[0060] 본 발명의 담체가 전달하는 물질이나 물체는 표지되어 있거나 않아도 좋다. 표지화에 의해, 표적 세포에의 전달의 성공 여부나, 표적 세포의 증감 등을 모니터링 하는 것이 가능해서, 특히 시험연구 수준뿐만 아니라, 임상 수준에 있어서 유용하다. 표지는, 당업자에게 공지된 임의의 것, 예를 들면, 임의의 방사성 동위체, 자성체, 표지 화합물에 결합하는 물질(예를 들면 항체 등), 형광 물질, 플루오로포어(fluorophore), 화학 발광 물질, 및 효소 등에서 선택할 수 있다. 또한, 표지는 담체 구성 성분에 포함해도 좋고, 독립적인 전달물로서 담체에 담지 시켜도 좋다.

[0061] 본 발명에 대해 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포용 또는 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포 전달용이란, 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포를 표적 세포로서 사용하는데 적합하는 것을 의미한다. 이것은 예를 들면, 동세포에, 다른 세포, 예를 들면 정상세포보다 신속, 고효율 한편/또는 대량으로 물질을 전달할 수 있는 것을 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 담체는, 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포에, 다른 세포에 비해, 1.1배 이상, 1.2배 이상, 1.3배 이상, 1.5배 이상, 2배 이상, 또한 3배 이상의 속도 및/또는 효율로 물질을 전달할 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명은 앞서 설명한 담체 및 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포의 활성화 또는 증식을 조절하는 약물을 포함한, 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포의 활성화 또는 증식을 제어하기 위해, 또는 신장 섬유증을 치료하기 위한 조성물 및 상기 담체의 이러한 조성물의 제조에 사용에 관한 것이다.

[0063] 본 발명에 있어서의 신장 섬유증은 임의의 사이질성 신장염, 예를 들면, 렌사 구균 신장염, 포도상구균 신장염, 폐렴 구균 신장염, 작은마마, B형 간염, C형 간염, HIV 등에 수반하는 바이러스성 신장염, 말라리아등의 기생충 감염에 의한 신장염, 진균류성 신장염, 마이코플라스마(mycoplasma) 신장염 등에 수반하는 감염성간질성 신장염, 전신성 에리테마토시스(erythematosus)(루프스(lupus) 신장염), 전신성강피증(교원병 신장), 시그렌(Sjgren) 증후군 등의 교원병에 수반하는 동안질성 신장염, 자반병성 신장염, 다발성 동맥염, 급속 진행성 사구체신염등의 혈관의 면역 질환에 수반하는 신장염, 방사선 방사능 노출에 수반하는 동안질성 신장염, 금 제제, NSAIDs, 페니실라민(penicillamine), 블레오마이신(bleomycin)등의 항암제, 항생 물질, 파라코트(paraquat) 등에 의한 약제성간질성 신장염, 곤충의 자상, 화분, 옷과의 식물등에 의한 알레르기성 신장염, 아밀로이드시스(amyloidosis) 신장염, 당뇨병성 신부전, 만성 사구체신염, 악성신장 경화증, 다발성낭포신부전 등에 수반하는 신장염, 요세관간질성 신장염, 임신 중독증이나 암에 수반하는 신장염, 막성 증식성 사구체신염, IgA 신부전, 혼합형 클리오글로불린혈증(cryoglobulinemia) 신장염, 굿패스차(Goodpasture's)-증후군 신장염, 베게나 육아종 증신장염, 급성간질성 신장염등의 특발성간질성 신장염 등에 기인 할 수 있다. 따라서, 이러한 간질성 신장염이 만성화된 것을 포함한다. 본 발명에 있어서 신장 섬유증은, 바람직하게는 당뇨병성 신장염, 약제성 간질성 신장염 및 특발성 간질성 신장염이 만성화한 것을 포함한다.

[0064] 본 발명의 조성물에 대해서는, 담체에 포함되는 레티노이드가 표적화제로서 기능하는 형태로 존재하는 하는 담체는, 전달물을 그 내부에 포함해도, 전달물의 외부에 부착해 존재해도, 또한, 전달물과 혼합되고 있어도 괜찮다. 따라서, 투여 경로나 약물 방출 양식 등에 따라, 상기 조성물을, 적절한 재료, 예를 들면, 장용성의 코팅이나, 시한 붕괴성의 재료로 코팅해도 좋고, 또, 적절한 약물 방출 시스템에 통합되어도 괜찮다. 게다가, 본 발명의 조성물은 레티노이드가 결합한 리포솜과 유효성분과의 복합체, 즉 리포플렉스(lipoplex)의 형태를 매우 좋다. 또한, 담체가 레티노이드만으로 구성되는 경우에는, 본 발명의 조성물은 신장에 있어서의 세포의 매트릭스생산 세포의 활성화 또는 증식을 조절하는 약물과 레티노이드와의 복합체의 형태가 매우 좋다.

[0065] 본 발명의 조성물은 의약으로서 사용할 수 있다(즉 약학적 조성물), 경구 및 비경구의 양쪽 모두를 포함하는 여러 가지의 경로, 예를 들면, 한정하는 일 없이, 경구, 정맥내, 근육내, 피하, 국소, 폐내, 기도내, 기관내, 기관지내, 경비, 직장내, 동맥내, 문맥내, 심실내, 골수내, 림프관내, 임파관내, 뇌내, 골수액강내, 뇌실내, 경점막, 경피, 비내, 복강내 및 자궁내등의 경로에서 투여해도 좋고, 각 투여 경로에 적절한 제형에 제재해도 괜찮다. 해당 제형 및 제재 방법은 임의의 공지의 것을 적합하게 채용할 수 있다(예를 들면, 표준 약제마나부, 와 타나베회 테루등편, 난코우당, 2003년등을 참조).

[0066] 예를 들면, 경구투여에 적절한 제형으로서는, 한정하는 일 없이, 가루약, 과립제, 정제, 캡슐제, 물약, 현탁제,

유제, 겔제, 시럽제등을 들 수 있어 또 비경구투여에 적절한 제형으로서는, 용액성 주사제, 현탁성 주사제, 유탁성 주사제, 용시 조제형 주사제등의 주사제를 들 수 있다. 비경구투여용 제제는, 수성 또는 비수성의 등 장성 무균 용액 또는 현탁액의 형태일 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명은 레티노이드를 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포에의 표적화제로서 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포의 활성 또는 증식을 조절하는 약물을 유효성분으로서 각각 배합하는 공정을 포함한 신장 섬유증 치료용 약학적 조성물의 제조방법에 관한 레티노이드의 배합 방법은 배합된 조성물에 대해 레티노이드가 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포에의 표적화제로서 기능할 수 있으면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 본 명세서에 있어서 여러 가지의 수법을 이용할 수 있다. 또한, 유효성분의 배합 방법도, 유효성분이 소정의 효과를 상주할 수 있으면 특별히 한정되지 않고 임의의 공지의 수법을 이용할 수 있다. 유효성분의 배합은 레티노이드와 동시에 가도 괜찮고 레티노이드를 배합하기 전 또는 배합한 뒤에 가도 괜찮다. 예를 들면, 조성물이 레티노이드 이외의 담체 구성 성분을 포함한 경우, 유효성분의 배합은, 레티노이드가 표적화제로서 이미 배합된 담체와 유효성분을 혼합하는 것 등에 의해 가도 괜찮고, 레티노이드, 레티노이드 이외의 담체 구성 성분 및 유효성분을 동시에 혼합하는 것 등에 의해 가도 괜찮고, 또는, 유효성분을 레티노이드 이외의 담체 구성 성분에 배합한 후에, 이것과 레티노이드를 혼합하는 것 등에 의해 가도 괜찮다.

[0068] 레티노이드의 배합량등은, 본 발명의 담체에 대해 이미 언급한 대로이다. 또한, 유효성분의 배합량은 조성물로 투여된 경우, 신장 섬유증의 발병과 재발을 억제하고 병의 증상 개선하고 증상을 경감 또는 진행을 지연 혹은 정지할 수 있는 양, 바람직하게는, 신장 섬유증의 발병 및 재발을 예방하고 또는 이것을 치유 할 수 있는 양이어도 괜찮다. 또한, 투여에 의한 이익을 넘는 부작용이 생기지 않는 양이 바람직하다. 해당 양은 공지되고, 배양 세포등을 이용했다 *in vitro* 시험이나, 마우스, 래트, 개 또는 돼지등의 모델 동물에 있어서의 시험에 의해 적당 결정할 수 있어 이러한 시험법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 신장 섬유증의 모델 동물로서는, 예를 들면, 특개 2009-178143에 기재의 것을 들 수 있다. 유효성분의 배합량은, 조성물의 투약 모양에 의해서 변화할 수 있다. 예를 들면, 1회의 투여에 복수의 단위의 조성물을 이용하는 경우, 조성물 1단위에 배합하는 유효성분의 양은 1회의 투여에 필요한 유효성분의 양의 복수 분의 1으로 할 수 있다. 해당 배합량의 조정은 당업자가 적절하게 실시할 수 있다.

[0069] 본 발명의 담체 또는 조성물은 어느 형태로 공급되어도 괜찮지만, 보존 안정성의 관점에서에서 바람직하게는 용시 조제 가능한 형태, 예를 들면, 의료의 현장 혹은 그 근방에 있고 의사 및/또는 약제사, 간호사, 혹은 그 외의 응급처치(paramedical)등에 의해서 조제될 수 있는 형태로 제공할 수 있다. 이 경우, 본 발명의 담체 또는 조성물은 이것들에 필수 구성요소의 적어도 1개를 포함한 1개 또는 2개 이상의 용기로서 제공되며 사용 전, 예를 들면, 24시간전 이내, 바람직하게는 3시간전 이내, 그리고, 보다 바람직하게는 사용의 직전에 조제된다. 조제에 즈음해서는, 조제하는 장소에 있어 통상 입수 가능한 시약, 용매, 조제 기구등을 적절하게 사용할 수 있다.

[0070] 따라서, 또한, 본 발명은 레티노이드, 및/또는 전달물, 및/또는 레티노이드 이외의 담체 구성물질, 단독으로 혹은 조합해 포함한 1개 또는 2개 이상의 용기를 포함한 담체 혹은 조성물의 제조 및 그러한 것의 형태로 제공되는 담체 또는 조성물의 필요 구성요소에도 관한 것이다. 본 발명의 kit은 상기의, 본 발명의 담체 및 조성물의 조제 방법이나 투여 방법 등에 관한 지시, 예를 들면 설명서나, CD, DVD등의 전자 기록 매체 등을 포함하고 있어도 괜찮다. 또한, 본 발명의 kit은 본 발명의 담체 또는 조성물을 완성하기 위한 구성요소의 모두를 포함하고 있어도 괜찮지만, 반드시 모든 구성요소를 포함하지 않아도 좋다. 따라서, 본 발명의 kit은 의료 현장이나 실험 시설 등에서 통상 입수 가능한 시약이나 용매, 예를 들면, 무균수나, 생리 식염수, 포도당용액 등을 포함하지 않아도 좋다.

[0071] 게다가, 본 발명은 상기 조성물의 유효량을, 그것을 필요로 하는 대상으로 투여하는 것을 포함하며 신장에 있어서의 세포의 매트릭스 생산 세포의 활성 또는 증식을 조절하기 위한 또는 신장 섬유증을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 여기서, 유효량이란, 예를 들면, 후자에 대해서는 신장 섬유증의 발병이나 재발을 억제하고 병의 용태를 개선하고 증상을 경감 또는 진행을 지연 혹은 정지하는 양이며, 바람직하게는, 신장 섬유증의 발병 및 재발을 예방 또는 이것을 치유하는 양이다. 또한, 투여에 의한 이익을 넘는 부작용이 생기지 않는 양이 바람직하다. 해당 양은 배양 세포등을 이용한 *in vitro* 시험이나, 마우스, 래트, 개 또는 돼지등의 모델 동물에 있어서의 시험에 의해 적절히 결정할 수 있어 이러한 시험법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 또한, 담체에 포함되는 레티노이드, 및 본 발명의 방법으로 이용하는 약물의 용량은 당업자에게 공지인지, 또는, 상기의 시험 등에 의해 적당하게 결정할 수 있다. 신장 섬유증의 모델 동물로서는, 예를 들면, 특개 2009-178143에 기재의 것을 들

수 있다.

- [0072] 본 발명의 방법에 대해 투여하는 조성물의 구체적인 용량은, 치료를 필요로 하는 대상에 관한 여러 가지의 조건, 예를 들면, 증상의 시계아즈도, 대상의 일반 건강 상태, 연령, 체중, 대상의 성별, 식사, 투여 경로, 투여 시기 및 빈도, 병용하고 있는 약물 치료에의 반응 및 치료에 대한 적합성(compliance) 등을 고려해 결정될 수 있다.
- [0073] 투여 경로로서는, 경구 및 비경구의 양쪽 모두를 포함하는 여러 가지의 경로, 예를 들면, 경구, 정맥내, 근육내, 피하, 국소, 폐내, 기도내, 기관내, 기관지내, 경비, 직장내, 동맥내, 문맥내, 심실내, 골수내, 림파절내, 임파관내, 뇌내, 골수액강내, 뇌실내, 경점막, 경피, 비내, 복강내 및 자궁내등의 경로가 포함된다.
- [0074] 투여 빈도는 이용하는 조성물의 성질과 상태나 상기와 같은 대상의 조건에 따라서 다르지만, 예를 들면, 1일 여러번(즉 1일 2, 3, 4회 또는 5회 이상), 1일 1회, 몇일마다(즉 2, 3, 4, 5, 6, 7일 마다 등), 1주간에 몇차례(예를 들면, 1주간에 2, 3, 4회 등), 1주간마다, 수주간마다(즉 2, 3, 4주간마다등)여도 괜찮다.
- [0075] 본 발명의 방법에 있어서 용어 적용 대상은 임의의 생물 개체를 의미하며 바람직하게는 동물, 더욱 바람직하게는 포유동물, 조금 더 바람직하게는 사람의 개체이다. 본 발명에 있어서, 대상은 좋아도, 어떠한 질환에 이환하고 있어도 괜찮은 것으로 하지만, 신장 섬유증의 치료가 시도되는 경우에는, 전형적으로는 당뇨병성 신장염 또는 신장 섬유증에 이환하고 있는지, 이환하는 리스크를 가지는 대상을 의미한다. 예를 들면, 신장 섬유증의 예방이 의도되는 경우는, 한정하는 일 없이, 당뇨병성 신장염, 특히 II 형 당뇨병에 의한 당뇨병성 신장염에 이환한 대상이 전형예가 된다.
- [0076] 또한, 용어 치료는, 질환의 치유, 일시적 관해 또는 예방 등을 목적으로 하는 의학적으로 허용되는 모든 종류의 예방적 및/또는 치료적 개입을 포함하는 것으로 한다. 예를 들면, 치료의 용어는 신장 섬유증의 진행의 지연 또는 정지, 병변의 퇴축 또는 소실, 신장 섬유증발증의 예방 또는 재발의 방지등을 포함한 여러 가지의 목적의 의학적으로 적절한 개입을 포함한다.
- [0077] 또한, 본 발명은 상기 담체를 이용한 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포에의 약물 전달 방법에 관한 이 방법은 한정되지 않고, 예를 들면, 상기 담체에 전달물을 담지시키는 공정과 전달물을 담지한 담체를 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포를 포함한 생물이나 매체, 예를 들면 배양 배양지 등에 투여 또는 첨가하는 공정을 포함한다. 이러한 공정은 공지된 임의의 방법이나, 본 명세서에 기재된 방법 등에 따라서 적절하게 달성될 수 있다. 또한, 상기 전달 방법은 다른 전달 방법, 예를 들면, 신장을 표적으로 하는 다른 전달 방법등과 조합될 수도 있다. 또한, 상기 방법은 *in vitro*로 이루어지는 모양도 체내의 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포를 표적으로 하는 모양도 포함한다.
- [0078] **실시예**
- [0079] 본 발명을 이하의 예로 한층 더 상세하게 설명하지만, 이것들은 예시에 지나지 않고, 본 발명을 결코 한정하는 것은 아니다.
- [0080] **<실시예 1> siRNA 함유 VA결합 리포솜(liposome)의 제작**
- [0081] siRNA로서 다음과 같은 서열을 가지는 것을 이용했다.
- [0082] 서열명 Hsp47-C
- [0083] 5'-GGACAGGCCUGUACAACUA-dTdT-3'(센스, 서열 번호 1)
- [0084] 5'-UAGUUGUACAGGCCUGUCC-dTdT-3'(안티센스, 서열 번호 2)
- [0085] 혼합 전 용액으로서 10 mM의 비타민 A(레티놀, Sigma. 이하 VA라고도 적는다. 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide;DMSO)에 용해), 1 mM의 Lipotrust SR(훗카이도 시스템사이언스 주식회사). 이하, 리포솜 또는 리포솜 구성 지방질이라고도 적는다. 뉴클레아제 프리수(DNase RNase free water)에 용해) 및 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 siRNA(Hsp47-C(을)를 뉴클레아제 프리수에 용해)를 준비했다. 그 다음에, 상기로 조제한 뉴클레아제 프리수(DNase RNase free water)중의 Lipotrust SR에 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide;DMSO)에 용해한 VA를

11(mol/mol)의 비율로 첨가하여 교반기(vortex)에서 15초간 교반 후, 차광 상태로 5분간 실온 방치해 복합체를 형성시켰다. 이 복합체에 siRNA를 첨가해 혼합하여 투여액 VA Liposome-siRNA Hsp47C(을)를 얻었다. 이 투여액은 100 μ l 맞아, 75 nmol의 VA, 75 nmol의 리포솜 구성 지질, siRNA 112.5 μ g를 포함하며 이것은 3.00 μ mol/kg체중의 VA, 3.00 μ mol/kg체중의 리포솜 구성 지질, siRNA 4.5 mg/kg체중의 siRNA에 상당한다. 덧붙여 VA는 리포솜 표면에 노출하고 있었다.

[0086] <실시예 2> 신장 섬유증모델 마우스에 있어서의 치료 효과의 검토

[0087] (1) 신장 섬유증모델 동물의 제작

[0088] 신장 섬유증모델 마우스를 주식회사 스텔릭(Stelic) 재생 의과 학연 연구소에 의뢰해 제작했다. 구체적으로는, 출생 후 2일령의 C57BL6J/JcL마우스 수컷(일본 쿠레아(clea) 사)에게 N-아세틸(acetyl)--D-글루코사미니다제(glucosaminidase) 억제제를 주어 4주령까지 사료 CE-2(일본 쿠레아 사제) 및 멸균수를 주어 사육하고, 만 4주령으로 이윽 후, 결점 지방 함량이 통상식보다 높은 High Fat Diet32(일본 쿠레아사) 및 멸균수를 주어 12주령까지 사육하여, STAM마우스를 제작했다. 본 모델 마우스는, 당뇨병성 신장염을 발병하는 것이 알려져 있어(특개 2009-178143참조), 당뇨병성 신장염에 의한 신장 섬유증을 관찰할 수 있다.

[0089] 상기 모델 마우스를, 12주 3일령에 10 마리씩 이하의 4군으로 분류했다.

[0090] (제 1군) No treatment-STAM 마우스, 처치전 대조군(이하, NT-STAM (Pre) 군)

[0091] (제 2군) No treatment-STAM 마우스군(이하, NT-STAM군)

[0092] (제 3군) 5% 글루코오스(glucose) 투여군(이하, Vehicle군)

[0093] (제 4군) VA Liposome-siRNA Hsp47C투여군(이하, VL-Hsp47C군)

[0094] (2) 투여액의 투여

[0095] NT-STAM (Pre)군에 대해서는, 군 분류 후 치료 개시전에 마우스를 안락사시켜, 병의 용태 확인을 실시했다. NT-STAM군을 제외한 상기 2군에 대하여, 해당하는 투여액을, 12주 5일령부터 1일 간격으로 합계 10회의 꼬리 정맥주사에 의한 투여를 실시했다.

[0096] (제 3군) 용매 대조로서 누클레아제후리수 0.75 ml/kg체중과 5% 글루코오스 (오오츠카 제약 주식회사) 3.250 ml/kg 체중을 혼합한 투여액(5% 글루코오스 또는 Vehicle)(을)를 이용했다.

[0097] (제 4군) 투여액 100 μ l 당 VA를 75 nmol, 리포솜 구성 지질을 75 nmol, siRNA를 112.5 μ g가 되도록 혼합해, 5% 글루코오스로 최종 조정한 투여액(VA Liposome-siRNA Hsp47C 또는 VL-Hsp47C)을 이용했다.

[0098] 각 투여액은, 투여 개시일의 체중을 기준 체중으로 해, 투여일의 체중 변화율이 기준 체중의 20 %이내의 경우, 4 ml/kg체중을 꼬리 정맥을 통해 투여했다. 20 %를 넘었을 경우는, 이후 그 체중을 새로운 기준 체중으로서 투여량을 재설정했다.

[0099] (3) 신장 섬유증에 대한 개선 효과의 검토

[0100] 최종 투여 종료후 2일째(15주 4일령)에 디에틸 에테르(diethyl ether) 마취하에서 심장 채혈하고, 마우스를 안락사시키고 신장을 적출했다.

[0101] 적출된 신장은 4% 파라포름알데하이드-인산(Paraformaldehyde-Phosphate) 완충액에서 고정 후, 파라핀 포매하여 박절표본을 제작했다. 신장 섬유증에 대한 치료 효과를 검토하기 위해, 시리우스레드 염색(콜라겐을 특이적으로 적염하는 섬유염색)을 실시하고, 올인원 형광 현미경 BZ-9000(주식회사 키엔스(KEYENCE))을 이용하고, 80배에서 촬영했다. 분석은 신장 피질 영역으로부터 무작위로 20 시야를 촬영하고, BZ-9000 부속의 분석 소프트웨어를 이용해 정량화했다.

[0102] 도 1에 각 투여군에 있어서의 신장 피질 영역의 대표적인 사구체의 세균 검사상을 나타냈다. 시리우스레드 염색은 콜라겐 특이적인 섬유 염색이며, 섬유화 부위는 빨강~분홍색으로 물든다. 세균 검사의 결과, 사구체 기저

막의 비후는 전군에 차이를 인정하지 않지만, 메산쥬(mesangial) 영역(간질) 및 요세관 세포 주위의 섬유화는 VL-Hsp47C투여군에 대해 다른 3군보다 섬유화의 정도가 경도에 머물러, 신장 섬유화의 개선이 인정되었다(메산쥬 영역의 증대 부분은, 화살표에서 나타내 보였다). 또한, 마우스 1 개체에 대해 신장 피질 영역의 20 시야를 무작위로 촬영하여 섬유화 영역의 비율을 산출했다. 도 2에 나타난 결과와 같이, VL-Hsp47C 투여군에 대하여 NT-STAM 및 Vehicle의 2군보다 시리우스레드 양성 영역의 비율이 의미가 있게 낮고, 신장 섬유화의 개선이 인정되었다. 아울러, 통계학적 유의적 차이의 평가에는 t-검정을 이용했다.

[0103] 이상의 결과로부터, VL-Hsp47C 투여군에 대해 섬유화의 개선 경향이 인정되었다. siRNA가 기본적으로 세포질 내에서 작용하는 것을 고려하면, 이러한 결과는, 레티노이드가 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포에의 표적화제로서 기능하여 동세포에 효율적으로 약물을 전달하는 것으로써, 신장 섬유증의 진행을 억제할 수 있는 것을 나타내는 것이다.

[0104] <실시예 3> siRNA 함유 VA결합 리포솜을 통한 신장 세포 외 매트릭스 생산 세포의 유전자 억다운(Knockdown)

[0105] (1) 세포의 분리 및 회수

[0106] 간성세포에 유사한 성질과 상태를 나타내는 신장에 있어서의 세포외 매트릭스 생산 세포를 이하와 같이 분리회수했다.

[0107] 우선, 사전에 이하의 5종의 용액의 조제를 실시했다. 모든 용액은 4℃에서 보존했다.

[0108] EGTA액 HBSS(Invitrogen 14170) 500 ml에 대해, HEPES 1.19 g와 EGTA 0.1 g를 더해 혼합했다.

[0109] 0.02% 콜라게네이즈(Collagenase)액 HBSS(Invitrogen 24020) 500 ml에 대해, HEPES 1.19 g, CaCl₂ 2H₂O 0.235 g와 콜라게네이즈(Collagenase)(Yakult YK-102) 0.1 g를 더해 혼합했다.

[0110] 0.02% 콜라게네이즈(Collagenase) 0.1% 프로테아제(Protease)액 0.02% 콜라게네이즈(Collagenase) 40 ml에 대해, 프로테아제(Sigma P6911-1G) 40 mg를 더해 혼합했다.

[0111] Hanks액 HBSS (Invitrogen 24020) 500 ml에 대해, MgSO₄ 0.05 g를 더해 혼합했다.

[0112] 10% Nycodenz(R)액(Axis-Shield Prod. No 1114542-1)증류수 500 ml에 대해, 50 g Nycodenz(R)(을)를 더해 혼합용해했다.

[0113] 마우스(수컷 C57BL6/J, 20~30 g, 6~8주령)에 마취를 걸어 복부를 체모 후, 정중선에 따라 개복해서 신장을 꺼냈다. 꺼낸 신장을 30 ml의 EGTA액으로 3회 정도 씻어 노란내 없애기를 실시했다. 5 ml의 EGTA액에 신장을 넣어 가위로 세세하게 잘게 잘랐다. 잘게 자른 신장에 EGTA액을 더해 전량을 30 ml로, 1300 rpm에서 5분간 원심했다. 원심 후 상청을 없애, 0.02% Collagenase + 0.1% Protease액 30 ml를 더하고 삼각 플라스크로 옮겨 37℃에서 20분간 교반했다. Cell Strainer(Falcon 352360)로 교반액을 여과해서 액을 1300 rpm로 5분간, 원심을 실시했다. 침전을 Hanks액에 녹여, Hanks액에 최종농도 8% Nycodenz(R)되도록(듯이) 10% Nycodenz(R)액을 혼합했다. 혼합액을 1400 g에서, 20분간 원심 했다. 상청을 회수해, 또다시 1300 rpm에서 5분간 원심을 했다. 상청을 없애고 10% FBS DMEM(Sigma D6546)에 다시 현탁하여 T-75플라스크(BD 353136)에 파종했다.

[0114] (2) 유전자 억제 실험

[0115] 1.siRNA 함유 VA 결합 리포솜의 제작

[0116] siRNA로서 이하의 서열을 가지는 것을 이용했다.

[0117] 배열명Hsp47-C

[0118] 5'-GGACAGGCCUGUACAACUA-dTdT-3'(센스, 서열 번호 1)

[0119] 5'-UAGUUGUACAGGCCUGUCC-dTdT-3'(안티센스, 서열 번호 2)

[0120] 혼합 전 용액으로서 10 mM의 비타민 A(레티놀, Sigma R7632, 이하 VA와 약기. DMSO에 용해), 1 mM의 Lipotrust

SR(훗카이도 시스템사이언스 주식회사 N301.이하, 리포솜 또는 리포솜 구성 지방질이라고도 적는다. 뉴클레아제 프리수에서 용해) 및 10 mg/ml의 siRNA(Hsp47-C(을)를 뉴클레아제 프리수에 용해)를 준비했다. 그 다음에, 상기로 조제한 뉴클레아제 프리수중의 Lipotrust SR에, 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide;DMSO)에 용해한 VA를 11(molmol)의 비율에서 첨가 후, vortex에서 15초간 교반하여 차광 상태로 5분간 실온 방치해 복합체를 형성시켰다. 이 복합체에 10 mg/ml의 siRNA를 첨가해 혼합하여 VA Liposome-siRNA Hsp47C(을)를 얻었다. VA없음의 경우에는 VA 대신에 DMSO를 같은 량을 더했다. 세포에 트랜스펙션(transfection)시에 최종농도 lipotrust SR/VA 7.7M, siRNA를 869 nM가 되도록 조제를 실시했다.

[0121] 2. 트랜스펙션(transfection) 실험

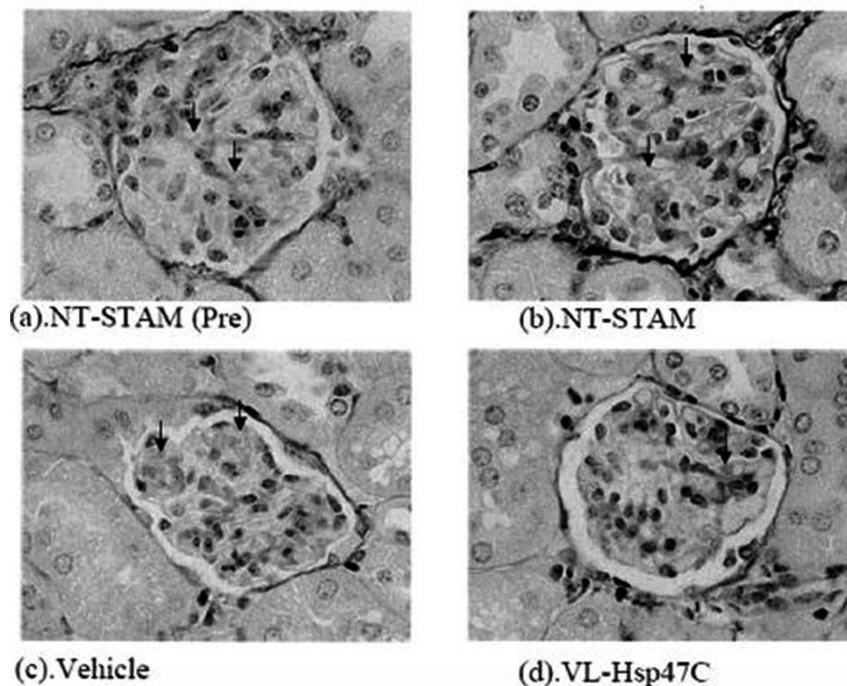
[0122] 사전에 실험용 세포로서 상기 회수 방법을 마우스 신장에서 회수한 세포의 매트릭스 생산 세포를, 세포수 0.2×10^5 개/웰에서 6-웰 플레이트에 파종하여 2일간, 37℃, 10% FBS DMEM에서 배양했다. 배양 2일 후, 트랜스펙션 전에 각 웰의 10% FBS DMEM을 모두 없애고 900 μ l의 신선한 10% FBS DMEM(을)를 더해 15분 정도 37℃으로 배양했다.

[0123] 상기 [1.]에서 제작된 VA Liposome-siRNA Hsp47C 또는 Liposome-siRNA Hsp47C 100 μ l를 각 웰에 완만하게 더해 30분간, 37℃에서 인큐베이트(incubate)한 후, 각 웰의 배양 상청을 모두 없애고 신선한 10% FBS DMEM 2 ml를 더해 2일간 37℃에서 배양했다. 2일 후, RNeasy Mini Kit(QIAGEN 74104)(을)를 이용해 세포 RNA를 수득하고 High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix(Applied Biosystems 4390779)에서 RT-PCR를 실시해 cDNA를 얻었다. 얻을 수 있는 cDNA를 이용해 Power SYBR(R) Green PCR Master Mix(Applied Biosystems 4368708)에서 정량 PCR를 실시해, 유전자 억제 효과의 효과를 검증했다. 그 결과를 도 3에 나타낸다.

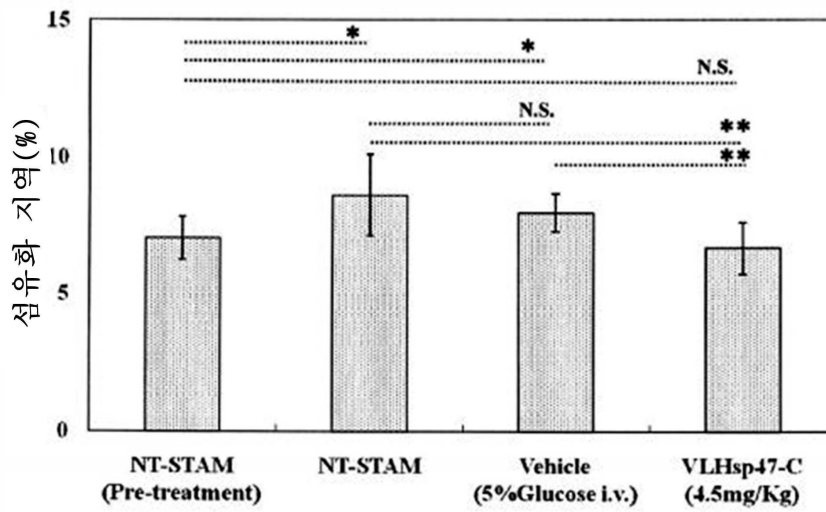
[0124] 이상의 결과는, 예 2로 이용한 HSP47 유전자에 대한 siRNA가 신장의 세포의 매트릭스 생산 세포에 대해 HSP47 유전자의 발현을 억제하는 것을 나타내는 것으로 본 발명의 치료제에 포함되는 siRNA가 신장의 세포의 매트릭스 생산 세포 특이적으로 받아들여져 동일 세포 내에서 표적 유전자의 발현을 억제함으로써 신장 섬유증의 진행의 억제를 가져온 것을 제안한다.

도면

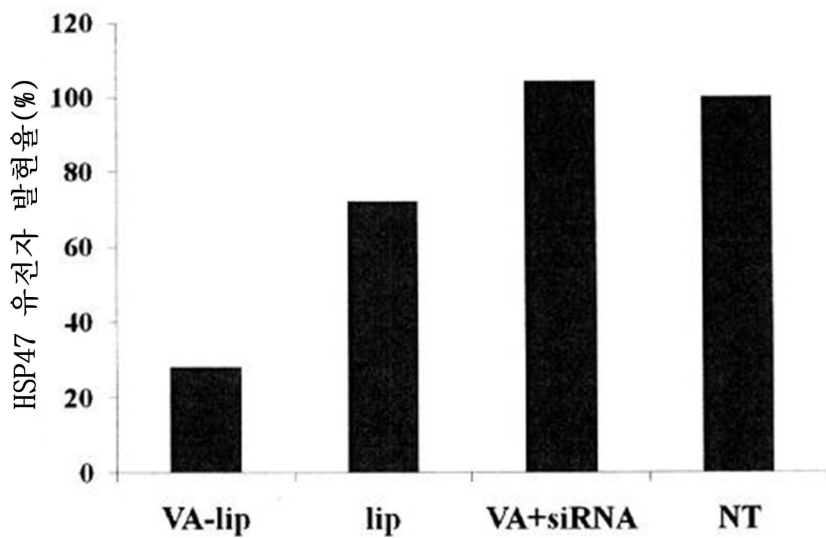
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> NITTO DENKO CORPORATION
- <120> AGENT FOR TREATING RENAL FIBROSIS
- <130> 12fpi-10-04
- <150> PCT/JP2010-138070
- <151> 2010-06-17
- <160> 2
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hsp47-C sense strand

<220><223> Hsp47-C sense strand

<400> 1

ggacaggccu guacaacuat t 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Hsp47-C antisense strand

<220><223> Hsp47-C antisense strand

<400> 2

uaguuguaca ggccugucct t 21

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 9

【변경전】

제4항 및 제5항의 약학적 조성물의 제조 방법으로서,

【변경후】

제4항 또는 제5항의 약학적 조성물의 제조 방법으로서,