



등록특허 10-2268883



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월28일
(11) 등록번호 10-2268883
(24) 등록일자 2021년06월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *A61K 31/496* (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01) *A61K 38/08* (2019.01)
A61K 38/10 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *C07K 7/08* (2006.01)

- (52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 31/496 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7025554
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월17일
심사청구일자 2019년03월15일
- (85) 번역문제출일자 2015년09월17일
- (65) 공개번호 10-2015-0128731
- (43) 공개일자 2015년11월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/030147
- (87) 국제공개번호 WO 2014/145389
국제공개일자 2014년09월18일

- (30) 우선권주장
61/800,117 2013년03월15일 미국(US)

- (56) 선행기술조사문헌
US20090075875 A1*
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 9 항

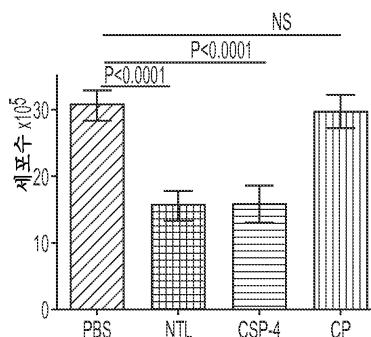
심사관 : 노은주

- (54) 발명의 명칭 누트린-3a 및 웨პ티드에 의한 폐 섬유증의 저해

(57) 요 약

섬유증 폐 섬유모세포에서, p53 단백질 (및 miR-34a)의 기저 수준은 상당히 억제되며, 이는 uPA 및 uPAR의 p53-매개된 저해의 감소, 또는 동시에 PAI-1의 유도로 이어진다. 이러한 변화는 과도한 FL-섬유모세포 증식과 세포외 매트릭스 (ECM)의 생 산의 원인이 되고, 따라서, 폐 섬유증에 기여한다. 이러한 과정은 이들 세포 및 특발성 폐 섬유증 (IPF)을 앓고 있는 개체를 작은 유기 분자 누트린-3a (NTL) 또는 웨პ티드, CSP-4 (서열 번호:1), 또는 이 웨პ티드의 변이체들 또는 유도체 또는 다양체로 처리하면 역전되는데, 이는 p53 단백질의 MDM2-매개된 분해를 저해시킴으로써 p53 수준이 증가된다. 이들 화합물은 FL-섬유모세포에서 p53 발현 및 uPA-섬유소용해성 체계에서 p53-매개된 변화를 복원시키고, ECM의 생산 및 침착을 제한시키기 때문에 IPF 치료의 새로운 접근방법으로 기여한다.

대 표 도 - 도8b



(52) CPC특허분류

A61K 31/497 (2013.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61K 38/10 (2013.01)

A61K 38/177 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/007 (2013.01)

C07K 7/08 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20090227515 A1*

WO2001011038 A2

WO2009111625 A2

Bilchemistry, Vol. 39, No. 33, pp. 10330-10339(2000)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) FTTFTVT (서열 번호: 1)의 서열로 이루어진 운반가능한 웨티드 또는 폴리웨티드; 및
(b) 약학적으로 수용가능한 운반체 또는 부형제

를 포함하는, 섬유증 병태를 치료하는데 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 주사 또는 폐 점적주입용으로 제형화된, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 폐 점적주입용으로 제형화된, 약학 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

◆청구항 5은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, 상기 운반가능한 웨티드 또는 폴리웨티드가 FTTFTVT (서열 번호: 1)의 서열 및 한쪽 말단 또는 양쪽 말단의 1 내지 5개의 추가적 아미노산으로 이루어진, 약학 조성물.

청구항 6

◆청구항 6은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, 상기 운반가능한 웨티드 또는 폴리웨티드가 FTTFTVT (서열 번호: 1)의 서열 및 양쪽 말단의 1 내지 5개의 추가적 아미노산으로 이루어진, 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 섬유증 병태는 폐 섬유증을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 섬유증 병태는 특발성 폐 섬유증을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 운반가능한 웨티드 또는 폴리웨티드가 L-아미노산으로 구성된, 약학 조성물.

청구항 10

◆청구항 10은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, 상기 운반가능한 웨티드 또는 폴리웨티드가 이의 N 말단 및 C 말단 둘 다에 캡(cap)을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

◆ 청구항 12은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, 상기 운반가능한 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드가 이의 N 말단에 캡을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 13

◆ 청구항 13은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, 상기 운반가능한 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드가 이의 C 말단에 캡을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

◆ 청구항 15은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제10항, 제12항 및 제13항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 캡이 아실 또는 아미도 그룹을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 16

◆ 청구항 16은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제10항, 제12항 및 제13항 중의 어느 한 항, 상기 캡이 포르밀, 10개 이하의 탄소 원자를 보유한 알카노일, 10개 이하의 탄소 원자를 보유한 알케노일, 10개 이하의 탄소 원자를 보유한 알키노일, 아로일, 헤테로아로일, 알킬술포닐, 아릴술포닐, 헤테로아릴술포닐, 10개 이하의 탄소 원자를 보유한 치환된 알카노일, 10개 이하의 탄소 원자를 보유한 치환된 알케노일, 10개 이하의 탄소 원자를 보유한 치환된 알키노일, 치환된 아로일, 치환된 헤테로아로일, 치환된 알킬술포닐, 치환된 아릴술포닐, 치환된 헤테로아릴술포닐, 카프바모일, 티오카프바모일, 치환된 카프바모일 ($R'-NH-CO$) 또는 치환된 티오카프바모일 ($R'-NH-CS$) (여기서, R' 은 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 10개 이하의 탄소 원자를 보유한 치환된 알킬, 10개 이하의 탄소 원자를 보유한 치환된 알케닐, 10개 이하의 탄소 원자를 보유한 치환된 알키닐, 10개 이하의 탄소 원자를 보유한 치환된 아릴, 또는 10개 이하의 탄소 원자를 보유한 치환된 헤테로아릴이다)을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 17

◆ 청구항 17은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제16항에 있어서, 상기 캡이 아세틸, 프로피오닐, 부티릴, 헥스-3-에노일, 헥스-5-이노일, 벤조일, 1-나프토일, 3-피롤일, 4-퀴놀로일, 메탄술포닐, 벤젠술포닐, 술파닐일, 피리딘-4-술포닐, 4-아미노부티릴, 6-히드록시-헥스-3-에노일, 3-히드록시-헥스-5-이노일, 4-클로로벤조일, 8-히드록시-나프트-2-오일, 2,4-디옥소-1,2,3,4-테트라히드로-3-메틸-퀴나졸린-6-오일, 2-아미노에탄술포닐, 5-디메틸아미노-1-나프탈렌술포닐, 또는 1-메톡시-6-이소퀴놀린술포닐을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 운반가능한 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드가 적어도 하나의 D-아미노산을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 운반가능한 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드가 세포 내화(internalization) 서열을 추가로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 운반가능한 웹티드 또는 폴리웹티드가 환형화된, 약학 조성물.

청구항 22

◆ 청구항 22은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, 상기 운반가능한 웹티드 또는 폴리웹티드가 1개 초과의 FTTFTVT (서열 번호: 1)의 반복 단위를 포함하는 다량체 폴리웹티드인, 약학 조성물.

청구항 23

◆ 청구항 23은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제22항에 있어서, 상기 운반가능한 웹티드 또는 폴리웹티드가 2 내지 5개의 FTTFTVT (서열 번호: 1)의 반복 단위를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 24

◆ 청구항 24은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제23항에 있어서, 상기 운반가능한 웹티드 또는 폴리웹티드가 하나 이상의 상기 반복 단위 사이에 스페이서 (spacer) 폴리웹티드를 추가로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 25

◆ 청구항 25은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제24항에 있어서, 상기 스페이서가 글리신의 반복 단위를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 발명의 배경

[0002] 발명의 분야

[0003] 생화학 및 의학 분야에서 본 발명은 섬유증 폐 (FL) 섬유모세포에서 p53 단백질 수준을 증가시키고, uPA 및 uPAR을 감소시키고, 그리고 PAI-1 발현을 증가시키며, 그리고 이들의 증식을 감소시키는 방법 및 조성물, 그리고 누트린(nutlin)-3a 및 웨티드를 이용하여 특발성 폐 섬유증 (IPF)을 치료하는 방법 및 조성물에 관계한다.

배경 기술

[0004] 특발성 폐 섬유증 (IPF)은 폐 이식 이외에는 현재 치료법이 없는, 이해도가 낮은 치명적인 진행성 폐 질환이다 (Mason DP *et al*, *Ann Thorac Surg* 84:1121-8, 2007). 진단 후 5년의 중간 생존 기간(Median survival)은 20% 미만이다. 간질성 폐 질환의 대부분 형태와 다른 형태의 폐 섬유증은 섬유증 병소, 폐포(alveolar) 구조의 점진적 비틀림 그리고 과도한 세포외 매트릭스 (ECM) 침착을 가진 섬유증 또는 반흔 조직으로 대체되는 특징이 있다 (American Thoracic Society, *Am J Respir Crit Care Med* 161:646-664, 2000; Noble PW *et al*, *Clin Chest Med* 25:749-758, 2004; Selman M *et al*, *Ann Intern Med* 134:136-151, 2001). 이는 진행성 호흡곤란과 폐 기능 상실을 초래한다. 특징적인 형태학적 병소는 미세한 벌집형태의 완전하게 만들어진 섬유증 영역과 활발하게 증식되고, "섬유증 병소(foci)"으로 불리는, 콜라겐-생산하는 섬유모세포/근섬유모세포가 포함된 섬유증을 전개시키는 영역이 인접한 정상 폐 영역에 바로 공간적 그리고 일시적으로 이질성(heterogeneity)으로 통합된 것이다.

[0005] IPF는 병인 불명의 가장 흔한 만성, 진행성 그리고 치명적 간질성 폐 질환으로, 미국민 100,000명당 40-50건의 발병 사례를 가지는 것으로 예측하고 있다. 증가된 섬유성 폐("FL") 섬유모세포 (또는 근섬유모세포) 생존력, 활성, ECM의 생산 및 침착은 IPF 폐의 전형적 특징이다 (Selman M *et al*, *Expert Opin Emerg Drugs* 16:341-62, 2011; Shetty, S *et al* *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:78-87, 1996; Zhu S *et al*, *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol* 297: L97-108, 2009; Suganuma H *et al*, *Thorax* 50:984-9, 1995; American Thoracic Society, 상기; Noble PW *et al*, 상기).

[0006] 본 발명자들(및 기타 다른 분들)의 기존 작업에서 IPF 환자의 폐의 FL-섬유모세포가 포함된 폐 섬유모세포는 유로카니제-유형 플라스미노겐 활성제 (uPA), uPA 수용체, (uPAR) 그리고 플라스미노겐 활성제 저해제-1 (PAI-1)를 발현시키는 것으로 나타났다 (Shetty *et al*, 1996, 상기-, Shetty S and Idell S, *Am J Physiol* 274:L871-L882, 1998; Chang W *et al*, *J Biol Chem* 285:8196-206, 2010). uPA는 정상적인 폐 (NL) 및 FL-섬유모세포 모두에 있어서 유사분열촉진 물질이며(mitogenic), 그리고 이 과정은 uPA 성장 인자 도메인을 통하여 uPAR에 uPA의 결합과 관련된다 (Tkachuk V *et al* *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:759-65, 1996; Padro T *et al*, *J Cell Sci* 115:1961-71, 2002; Shetty S *et al*, *Am J Physiol* 268: L972-L982, 1995; Shetty S *et al*, *Antisense Res Dev* 5:307-314, 1995). 또한, uPA는 uPAR 발현을 증가시킨다 (Shetty S *et al*, *J Biol Chem* 276:24549-56, 2001; Shetty S *et al*, *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:69-75, 2004). 몇 년 전 본 발명자들은 IPF 폐의 FL-섬유모세포는 상 당히 더 많은 uPA 및 uPAR을 발현시키고, NL-섬유모세포보다 기저 및 uPA-매개된 증식율이 더 높다는 것을 보고한 바 있다 (Shetty *et al*, 1996, 상기; 1998, 상기). 다른 보고에 따르면, IPF 환자의 FL-섬유모세포에 의한 uPAR 발현 증가는 이동(migratory) 거동에 기여한다는 것이 확인되었다 (Mace KA *et al*, *J Cell Sci* 118:2567-77, 2005; Basire A *et al*, *Thromb Haemost* 95:678-88, 2006; Zhu, S. *et al*, 2009, 상기).

[0007] 본 발명자 및 동료들에 의한 연구에서, uPA는 p53의 조절을 통한 상피 세포 자가사멸/생존을 조절하는데 (Shetty S *et al*, 2005, 상기), 상기 조절은 uPA (Shetty P *et al*, *Am J Resp Cell Mol Biol*, 39:364-72, 2008), 이의 수용체 uPAR (Shetty S *et al* *Mol Cell Biol* 27:5607-18, 2007) 그리고 이의 주요 저해제 PAI-1 (Shetty S *et al* *J Biol Chem* 283:19570-80, 2008)의 발현을 전사후 수준에서 제어하고, 그리고 uPA, uPAR, 카베올린-1 ("Cav-1") 및 β 1- 인테그린 (Shetty S *et al*, 2005, 상기) 사이에 신규한 세포 표면 신호생 성 상호작용에 관련된다. 전술한 내용에 근거하여 본 발명자들은 ALI의 치료 및 이의 결과적인 재형성 반응을 위한 새로운 조정물 및 방법들을 구상하였다.

[0008] 폐(lung) 섬유증 ("폐(pulmonary)" 섬유증과 호환됨) 동안, 주로 종양 억제제 단백질로 알려진 전사 인자 p53은 섬유증 섬유모세포에서 심각하게 억제되고, 이로 인하여 uPA 및 uPAR의 발현이 유도되고, 한편 PAI-1 발현은 상당히 저해된다. 섬유증 섬유모세포에서 p53 발현의 저해 결과로써 PAI-1 발현의 억제와 동시에 uPA 및 uPAR 발현의 유도는 섬유모세포 증식 및 ECM 침착의 원인이 되어, 가령, 섬유증이 야기된다. p53과 mdm2의 상호작용 증가와 후속적으로 p53의 유비퀴틴화(ubiquitination)는 섬유증 섬유모세포에서 p53의 억제 원인이 된다.

[0009] p53과 NF- κ B의 활성간에 상호 상관 관계가 암세포에 설명되었지만, 염증 과정에서 p53과 NF- κ B 간의 상호작용에 관련된 정보는 거의 없다. Liu G *et al*. (*J Immunol* 182:5063-71(2009))는 p53이 부족한 ($p53^{(-/-)}$) 호중구

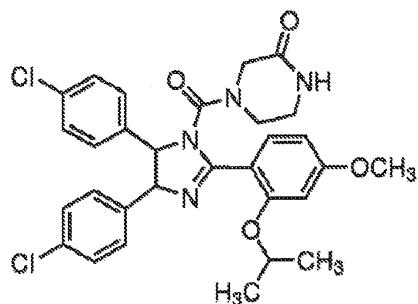
와 대식세포는 p53^(+/+) 세포들보다 세균성 리포폴리사카라이드(LPS)의 자극에 더 큰 반응을 나타내며, TNF-α, IL-6, 및 MIP-2가 포함된 더 많은 양의 전염증성(proinflammatory) 사이토킨을 생산하고, 강화된 NF-κB DNA-결합 활성을 설명한다는 것을 발견하였다. p53^(-/-) 마우스는 LPS-유도된 급성 폐 손상(ALI)에 있어서 p53^(+/+) 마우스보다 더 민감하다. LPS에 대한 p53^(-/-) 세포들의 강화된 반응은 톨-유사 수용체 TLR4 관계와 연합된 세포 내 신호생성 사건들(이를 테면, MAP 키나제의 활성화, IκB-α 또는 NF-κB의 p65 소단위의 포스포릴화, 또는 IκB-α의 분해)에서 변화와 관련되지 않는다. LPS-자극된 호중구와 대식세포를 누트린-3a와 함께 항온처리하면 NF-κB DNA-결합 활성과 전염증성 사이토킨 생산이 감소되었다. 마우스를 누트린-3a로 처리하면 LPS-유도된 ALI의 심각성이 감소되었다. p53은 염증 세포에서 NF-κB 활성을 조절한다고 저자는 결론을 내렸고, p53의 조절에 의해 ALI와 같은 급성 염증 상에서 잠재적 치료 효과를 가질 수 있다고 제안하였다.

[0010]

누트린 (또는 누트린-3a) (약어로 NTL)

[0011]

유기 분자 4-(2-(4,5-디히드로-1H-이미다졸-1-피페라진-2-온)(C₃₀H₃₀C₁₂N₄O₄)(또한 누트린 또는 누트린-3a로도 명명됨)의 화학 구조는 아래에 나타낸다.



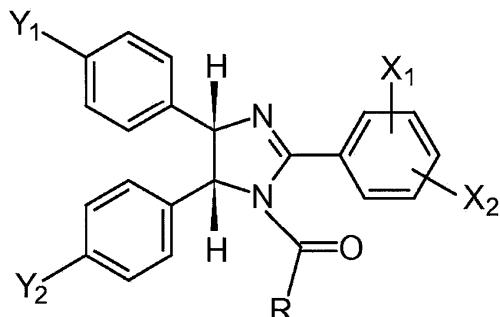
화학식 1

[0012]

NTL은 p53 활성제 및 자가사멸 유도제인 MDM2의 길항제다. MDM2는 p53 종양 억제제 단백질의 결합 및 이의 전사 활성 및 안정성의 음성적 조절에 의해 작용한다. MDM-p53 상호작용 저해로 p53의 안정화, 세포 주기 정지 및 자가사멸이 초래된다. 누트린-3은 암 세포에서 p53 경로의 활성화에 의해 암 치료 가능성을 보여주었다. (Tovar, C. et al., Proc Natl Acad Sci USA 103:1888-1893 (2006); Vassilev, L.T. et al. Science 303 844-848 (2004); El-Deiry, W.S. Cancer J 11:229-236(1998)).

[0014]

미국 특허 7,893,278 (Haley et al.)에서는 일반적으로 그리고 특별하게 키랄 누트린-3을 공개한다. 미국 특허 6,734,302는 라셈체 누트린-3을 설명한다. 상기 '278 특허는 하기 화학식의 화합물을 교시한다.



화학식 2

[0015]

상기 특허 모두 Mdm2-p53 상호작용의 저해제로써 그리고 암 치료에 용도를 논의한다.

[0016]

미국 특허 공개 2011/0301142 (Hutchinson et al.)는 포유류의 특발성 폐 섬유증을 치료하는 방법을 교시하는데, 이 방법은 치료요법적 효과량의 LPA1 수용체 길항제를 상기 포유류에게 투여하는 것을 포함한다. 상기 길항제는 특정 이미다졸 유도체일 수 있지만, NTL와 같은 이미다졸인 유형 화합물들은 아니다.

[0018]

미국 특허 6,596,744 (Wagle et al.)는 특정 섬유증 질환을 헤테로고리 화합물로 치료 또는 개선시키는 방법을 공개하는데, 이들 화합물은 모두 NTL과는 명확히 상이하다. 공개된 질환은 폐 조직의 섬유증성 비대 또는 섬유증 현시를 가지는 섬유증 폐 질환을 포함한다. 이들 질환은 폐 섬유증(또는 간질성 폐 질환 또는 간질성 폐

섬유증), 특발성 폐 섬유증, 폐먼지증(pn eumoconiosis)의 섬유증 요소, 폐 유육종증, 섬유성 폐포염, 낭성 섬유증의 섬유증 또는 비대 요소, 만성 폐 색성 폐 질환, 성인호흡곤란증후군 그리고 폐기종을 포함한다.

[0019] Dey *et al.* *Cell Cycle* 6:2178-85 (2007)에서 누트린은 p53-MDM2 상호작용을 저해시키는 잠재적 그리고 특이적 소분자의 첫 Mdm2 길항체로 확인되었다고 설명하고 있다.

[0020] 전술한 문헌들중 IPF를 누트린-3a로 치료하는 내용을 공개한 문헌은 없었다.

카베올린-1-유도된 웹티드

[0022] 카베올 린-1 (Cav-1; 서열 번호:3, 아래 나타냄)의 스캐폴딩 도메인인 20개 잔기 웹티드 DGIWKASFTTFTVTKYWF YR, 서열 번호:2)는 생체내 그리고 시험관에서 블레오마이신 ("BLM")-유도된 자가사멸로부터 폐 상피 세포 (LECs)를 보호하였고, 폐 상피 손상을 감쇠시킴으로써, 후속 폐 섬유증을 막아내었다는 것이 본 발명자 들에 의해 발견되었다(Shetty *et al.*, 미국 특히 출원 12/398,757은 U.S. 2009-0227515A1 (Sept. 10, 2009)로 공개되었으며, 본 명세서에 이의 전문이 참고자료에 편입된다. PP-2로 명명되는 17개 잔기 웹티드 NYHYLESSMTALYTGLH (서열 번호:4)는 시험관 및 생체내에서 BLM-유도된 자가사멸로부터 LECs를 또한 보호하였고, 폐 상피 손상을 감쇠시킴으로써, 후속 폐 섬유증을 막아내었다는 것이 본 발명자들에 의해 발견되었다.

[0023] Shetty *et al.*, 2009 (상기)에서 이들 웹티드의 생물학적으로 활성 치환, 추가, 결손 변이체들 뿐만 아니라 상기 웹티드가 포함된 웹티드 다량체(multimers) 그리고 운반가능한 폴리웹티드, 그리고 전술한 웹티드, 변이체들 및 다량체들이 포함된 약학 조성물을 또한 설명한다. 이들 조성물은 손상된 또는 파괴된 폐 상피 세포의 자가사멸을 억제하고, 급성 폐 손상 및 결과적인 폐 섬유증/IPF를 치료한다.

[0024] 전술한 문헌은 FTTFTVT (서열 번호: 1)의 서열을 보유하고, CSP의 생물학적 활성을 가지며, 본 발명의 주제중 일부가 되는(본 발명의 일부분으로 하기에서 공개된) CSP-4로 명명된 CSP의 특정 단편을 확인하지는 못하였다.

[0025] IPF에 대한 나쁜 예후 및 치료요법적 접근의 부재 견지에서, 상기 질환의 역전 또는 최소한 진행을 늦추기 위한 새로운 중재적 시술이 시급하다. 이러한 치료요법적으로 중요한 공백이 본 발명에 의해 해결된다.

[0026] 본 발명은 발명자의 앞선 발견으로 구성되고, 연장된다 (S. Shetty *et al.*, 2007, 2008 & 2009, 상기). 하기 단락들에서 설명되는 바와 같이, p53은 uPA, uPAR 및 PAI-1의 발현을 조절한다. 이 과정은 p53 mRNA에 영향을 주지 않고, 전사 후 수준에서 p53 단백질의 발현을 MDM2-매개된 조절과 관련된다. 이러한 관찰에서 섬유증 복구에 있어서 p53 발현과 uPA-섬유용해성 체계 간에 인과적인 연계가 설명된다.

발명의 요약

[0028] NTL을 이용한 MDM2와 p53 단백질의 상호작용 저해는 p53 및 PAI-1 을 증가시키는 한편, uPA 및 uPAR은 억제된다. 이러한 변화는 IPF 환자의 폐 뿐만 아니라 BLM-유도된 가속화 된 폐 섬유증을 가진 마우스의 폐로부터 단리된 섬유증 섬유모세포의 자가사멸과 섬유증 섬유모세포의 증식 억제를 야기한다.

[0029] 본 발명에 따르면, NTL은 섬유증 섬유모세포에서 p53의 발현을 유도 또는 증가시킴으로써 확립된 진행성 폐 섬유증을 저해한다. 따라서, 이 화합물을 치료를 요하는 개체의 폐 섬유증 치료에 유용하다.

[0030] FL-섬유모세포에서 uPA-섬유소용해성 체계의 p53-매개된 조절의 파괴가 IPF의 표적화된 치료 법의 기초라고 본 발명자들은 생각했다. FL-섬유모세포에서 p53 및 microRNA-34a (miR-34a)의 기저 발현은 상당히 억제된 반면, ECM 단백질, 이를 테면, 콜라겐-I (Col-I) 및 α -평활근 액틴 (α -SMA)의 수준은 증가 된다. mdm2 저해 화합물인 누트린-3a 또는 CSP-4를 이용한 FL-섬유모세포의 처리는 uPA 및 uPAR의 상호 저해 와 함께, p53 및 PAI-1 발현을 증가시킨다. FL-섬유모세포를 누트린-3a 또는 CSP-4로 처리하면 또한 ECM의 생산이 저해된다. 본 발명자 및 이들 동료의 앞선 예비 발견 및 최근 공개는 FL-섬유모세포에서 왜곡되고, 폐 섬유증으로 이어지는 p53과 uPA-섬유소용해성 체계 사이의 크로스stalk(crosstalk)를 복귀시키기 위한 중재적 방법을 정당화시킨다. p53은 uPA-섬유소용해성 체계²의 제어를 능가하는 다면발현성 효과를 가진다. 그러나, PAI-1은 섬유모세포 및 기타 세포에서 p53의 하류 효과인자(downstream effector)다.

[0031] 중요한 것은, FL-섬유모세포에서 p53의 복원으로 uPA, uPAR 및 PAI-1의 발현, 세포의 생존력 그리고 ECM의 생산이 조절된다. FL-섬유모세포에서 p53-uPA 섬유소용해성 체계-표적화된 방법은 도 1에 서 설명된다. p53은 miR-34a 전사를 유도하는 반면, miR-34a는 히스톤 탈아세틸라제 시르투인 1 (SIR T1)의 저해를 통하여 p53의 아세틸화를 증가시킨다. 이로써 mdm2에 의해 매개된 p53 단백질의 분해가 저해되 기 때문에, 이 단백질은 안정화된다. 그러나, FL-섬유모세포에서 p53 단백질과 miR-34a의 기저 수준은 카베 올린-1의 낮은 기선 발현으로 인하여

mdm2에 의한 p53 단백질의 유비퀴틴화가 증가되어 상당히 억제된다. 이로써 uPA 및 uPAR의 p53-매개된 저해가 감소되며, 또는 PAI-1의 동시 유도가 감소된다. 이러한 변화는 과도 한 FL-섬유모세포 증식과 ECM의 생산의 원인이 되며, 그리고 CSP-4 및 누트린-3a에 의해 역전된다. CSP-4 및 누트린-3a는 p53 단백질의 mdm2-매개된 분해를 저해시킴으로써, p53 수준을 증가시킨다. FL-섬유모세포의 uPA-섬유소용해성 체계에서 p53 발현 및 p53-매개된 변화의 복귀는 생존력의 감쇠로 이어지고, ECM의 생산 및 침착을 제한한다. 확고히 자리잡은 폐 섬유증이 있는 BLM-공격을 받은 마우스에서 섬유증은 FL-섬유모세포에서 p53 수준의 회복을 통하여 저해되며, 이는 다시 uPA 및 uPAR의 증식 신호를 억제시키고, 이를 세포에 대한 사전-자가사멸 신호; PAI-1가 유도된다.

[0032] uPA-섬유소용해성 체계의 p53-매개된 변화가 폐 섬유증의 병인에 중심이 되는 폐 섬유모세포의 사전-섬유증 반응을 조절하고, 이 경로는 치료요법적 이익을 위하여 표적화될 수 있음을 발명자들이 처음으로 보여준다. 조직 학적으로 "정상적인" 폐의 NL-섬유모세포 와는 달리, 섬유증 폐 조직의 섬유모세포/근섬유모세포가 포함된 FL-섬유모세포는 p53, miR-34a 및 카베올린 -1을 매우 낮은 기선 수준으로 발현시키는 한편, uPA 및 uPAR 발현은 높다. FL-섬유모세포를 CSP-4, 또는 저 분자량 화합물 누트린-3a로 처리하면 p53과 miR-34a의 발현이 회복되며, 그리고 PAI-1이 유도된다. 이러한 변화로 uPA 및 uPAR 발현이 억제되며, ECM 침착이 저해된다. 이를 물질은 BLM-유도된 폐 섬유증을 또한 역전 시키고, 폐 상피를 보호하는데, 이는 p53과 섬유소용해성 체계의 조절 간에 크로스토크(crosstalk)을 설명하는 것과 유사하다. 따라서, 폐 섬유증의 CSP-4-매개된 또는 누트린-3a-매개된 완화는 신규한 치료요법적 접근법이다.

[0033] 폐 섬유증을 역전시키는데 효과적인 치료법은 현재 없다. 본 발명은 이러한 중요한 공백을 해 결하고, FL-섬유모세포를 표적으로 하고, 섬유증 폐 질환을 효과적으로 치료하기 위하여 p53과 uPA-섬유소용해성 체계 간의 크로스토크를 표적으로 하는 신규한 화합물 및 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명은 문제의 조성 물에 또한 관계한다. 한 구체예에서, 상기 조성물은 FL 섬유모세포에서 p53 단백질 수준을 증가시키고, uPA 를 감소시키고, 그리고 PAI-1 발현을 증가시키며, 바람직하게는 다음의 것들로 구성된 군에서 선택된 웹티드 화합물이다:

[0035] (a) FTTFTVT (서열 번호: 1)의 서열을 가진, CSP-4로 명명된 웹티드;

[0036] (b) 길이가 최대 약 20개 아미노산이며, 서열 번호:3의 서열을 가진 카베올린-1 (Cav-1)의 스카폴딩 도메인 (CSP)이 아닌, CSP-4 웹티드의 추가 변이체;

[0037] (c) (a)의 CSP-4 웹티드의 공유적으로-변형된 화학 유도체,

[0038] (d) (b)의 변이체의 공유적으로-변형된 화학 유도체,

[0039] 이들 변이체 또는 화학 유도체는 시험관내 또는 생체내 분석에서 CSP-4 웹티드의 생물학적 또는 생화학적 활성의 최소한 20%를 보유한다. 상기 또는 하기에서 설명된 웹티드 변이체, 화학 유도체 또는 다량체는 활성 CSP-4 와 비교하여 바람직하게 다음 활성을 가진다: 최소한 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 약 95%, 97%, 99%, 그리고 이들 범위에서 유도가능한 임의의 범위, 이를 테면, 예를 들면, 약 70% 내지 약 80%, 그리고 더 옥 바람직하게는 약 81% 내지 약 90%; 또는 더 더욱 바람직하게는, 약 91% 내지 약 99%. 상기 웹티드 변이체 화학 유도체 또는 다량체는 CSP-4의 활성의 100% 또는 그 이상을 보유할 수 있다. 이러한 상대 활성은 이러한 활성을 평가하기 위하여 본 명세서에서 공개된 또는 당분야에 공지된 임의의 방법에 근거할 수 있다.

[0040] 선호되는 화합물은 CSP-4, FTTFTVT (서열 번호:1)의 CSP-4로 지정된 헵타웹티드다.

[0041] 선호되는 웹티드 다량체는 최소한 2개 단량체를 포함하며, 각 단량체는 CSP-4 웹티드, 상기 변이체 또는 화학 유도체 일 수 있으며, 이의 다량체는:

[0042] (a) 화학식 P_n^1 을 가지며 이때

[0043] (i) P^1 은 상기에서 정의된 바의 웹티드, 변이체 또는 화학

[0044] 유도체이며, 그리고

[0045] (ii) $n=2-5$ 이며, 또는

[0046] (b) 화학식 $(P_n^1 - X_m) - P^2$ 을 가지며, 이때

- [0047] (i) 각 P^1 및 P^2 는 독립적으로, 상기에서 정의된 바의 펩티드,
- [0048] 화학 유도체의 변이체이며,
- [0049] (ii) 각 P^1 및 P^2 는 동일한 또는 상이한 펩티드, 변이체 또는
- [0050] 유도체이고,
- [0051] (iii) X는 C_1-C_5 알킬, C_1-C_5 알케닐, C_1-C_5 알키닐, 최대 4개의
- [0052] 산소 원자가 포함된 C_1-C_5 폴리에테르이며;
- [0053] (iv) $m = 0$ 또는 1이며; 그리고
- [0054] (v) $n = 1-7$ 이고,
- [0055] (c) 화학식 $(P^1-Gly_z)_n-P^2$ 를 가지며 이때:
- [0056] (i) 각 P^1 및 P^2 는 독립적으로, 상기 펩티드, 변이체 또는
- [0057] 유도체이며,
- [0058] (ii) 각 P^1 및 P^2 는 동일한 또는 상이한 펩티드 또는 변이체
- [0059] 또는 유도체이며;
- [0060] (iii) $z = 0-6$ 이고; 그리고
- [0061] (iv) $n = 1-25$ 이며,
- [0062] 이 때 상기 펩티드 다량체는 시험관내 또는 생체내 분석에서 CSP-4 펩티드의 생물학적 또는 생화학적 활성의 최소한 20%를 보유한다.
- [0063] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 다음이 포함된 운반가능한 펩티드, 또는 폴리펩티드 또는 펩티드 다량체 조성물에 관한 것이다:
- [0064] (a) 상기 펩티드, 변이체, 유도체, 폴리펩티드, 또는 다량체,
- [0065] 그리고
- [0066] (b) 이에 결합된 또는 연합된 또는 혼합된 전달 또는
- [0067] 전위(translocation)-분자 또는 모이어티.
- [0068] 선호되는 전위 분자들 또는 모이어티들은 하기에서 설명된다.
- [0069] 다음이 포함된 항-섬유증 약학 조성물이 또한 제공된다:
- [0070] (a) 약학적으로 수용가능한 운반체 또는 부형제 그리고,
- [0071] (b) 활성 성분으로써, MDM2-p53 상호작용을 저해시키는 누트린-
- [0072] 3a (NTL) 또는 NTL의 키랄 cis-아미다졸 린 유사체가 포함된
- [0073] 약학 조성물과 임의선택적으로 조합된, 상기 펩티드, 펩티드
- [0074] 변이체, 화학 유도체, 폴리 펩티드 또는 펩티드 다량체, 이때
- [0075] NTL 유사체는 시험관내 또는 생체내 분석에서 NTL의
- [0076] 생물학적 또는 생화학적 활성의 최소한 20%를 보유한다.
- [0077] 주사 또는 폐 점적주입용(instillation)으로 제형화된 상기 펩티드-관련된 약학 조성물이 가장 선호되며, 한편, 상기 임의선택적으로 복합된 NTL 또는 NTL 유사체는 주사 또는 경구 투여용으로 바람직하게 제형화된다.
- [0078] 본 발명은 섬유증 폐 (FL) 섬유모세포에서 p53 단백 질 수준을 증가시키고, uPA 및 uPAR를 감소시키고, PAI-1

발현을 증가시키는 방법에 관계하여, 이 방법은 p 53 단백질과 MDM2 상호작용을 저해하고, p53의 MDM2-매개된 분해를 저해시키는 화합물의 유효량을 제공하는 것을 포함하며, 이때 상기 화합물은 다음과 같다:

[0079] (a) MDM2-p53 상호작용을 저해시키는 NTL 또는 NTL의 키랄 cis-

[0080] 이미다졸린유사체;

[0081] (b) 다음으로 구성된 집단에서 선택된 펩티드:

[0082] (i) FTTFT VT(서열 번호: 1)의 서열을 가진, CSP-4;

[0083] (ii) 길이가 20개 아미노산을 넘지 않는 CSP-4 펩티드의

[0084] 추가 변이체;

[0085] (iii) CSP-4 펩티드의 공유적으로 변형된 화학 유도체, 또는

[0086] (b) 펩티드 다량체는 최소한 2개 단량체를 포함하며, 각

[0087] 단량체는 CSP-4 펩티드, (b)의 변이체 또는 화학 유도체이며, 또는

[0088] (d) (a) - (c)중 임의의 조합,

[0089] 이때 상기 NTL 유사체, 상기 펩티드 변이체, 상기 펩티드 화학 유도체 또는 상기 펩티드 다량체는 시험관내 또는 생체내 분석에서 NTL 또는 CSP-4 펩티드의 생물학적 또는 생화학적 활성의 최소한 20%를 보유한다.

[0090] 상기 또는 하기에서 설명된 상기 NTL 유사체는 NTL과 비교하여 바람직하게 다음 활성을 가진다: 최소한 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 7 5%, 80%, 85%, 90%, 약 95%, 97%, 99%, 그리고 이를 범위에서 유도 가능한 임의의 범위, 이를 테면, 예를 들면, 20 내지 약 70% 내지 약 80%, 그리고 더욱 바람직하게는 약 81% 내지 약 90%; 또는 더 더욱 바람직하게는, 약 91% 내지 약 99%. 상기 NTL 유사체는 NTL 활성의 100% 또는 그 이상을 보유할 수 있다. 이러한 상태 활성은 이러한 활성을 평가하기 위하여 본 명세서에서 공개된 또는 당분야에 공지된 임의의 방법에 근거할 수 있다.

[0091] 상기 방법의 선호되는 구체예에서, 상기 방법에서 상기 화합물은 NTL이다. 또 다른 구체예에서, 상기 화합물은 서열 번호:1의 CSP-4 펩티드다. 상기 방법의 또 다른 구체예에서, 상기 화합물은 상기 펩티드 다량체이며, 바람직하게는 CSP-4 펩티드 (서열 번호:1)의 단량체가 포함된 다량체다.

[0092] 바람직하게는, 상기 방법이 펩티드 다량체를 이용할 때:

[0093] (a) 상기 펩티드 다량체는 화학식 P_1^n 을 가지며, 이때

[0094] (i) P_1^1 은 상기 펩티드, 변이체 또는 화학 유도체이며,

[0095] 그리고

[0096] (ii) $n=2-5$ 이며, 또는

[0097] (b) 상기 펩티드 다량체는 화학식 $(P_1^1-X_m)_n-P_2^2$ 를 가지며,

[0098] 이때

[0099] (i) 각 P_1^1 및 P_2^2 는 독립적으로, 상기 펩티드, 변이체

[0100] 또는 화학 유도체이며;

[0101] (ii) 각 P_1^1 및 P_2^2 는 동일한 또는 상이한 펩티드, 변이체

[0102] 또는 유도체이며;

[0103] (iii) X는 C₁-C₅ 알킬, C₁-C₅ 알케닐, C₁-C₅ 알키닐, 최대

[0104] 4개의 산소 원자가 포함된 C₁-C₅ 폴리에테르이며;

- [0105] (iv) $m = 0$ 또는 1이며; 그리고
- [0106] (v) $n = 1\text{--}7^{\circ}$ 고, 또는
- [0107] (c) 상기 펩티드 다량체는 화학식 $(P^1\text{--Gly }_z)_n\text{--}P^2$ 를 가지며, 이때:
- [0108] (i) 각 P^1 및 P^2 는 독립적으로, 상기 펩티드, 변이체 또는 유도체이며,
- [0109] 또는 유도체이며,
- [0110] (ii) 각 P^1 및 P^2 는 동일한 또는 상이한 펩티드 또는,
- [0111] 변이체 또는 유도체이며;
- [0112] (iii) $z = 0\text{--}6$ 이며; 그리고
- [0113] (iv) $n = 1\text{--}25$ 이다.
- [0114] 바람직하게는 상기 다량체는 시험관내 또는 생체내 분석에서 CSP-4 펩티드의 생물학적 또는 생화학적 활성의 최소한 20%를 보유한다.
- [0115] 폐 섬유증 (가령, IPF)에 의해 특징화된 질환 또는 상태를 가진 포유류 개체, 바람직하게는 인간을 치료하는 방법이 또한 제시되는데, 이 방법은 상기 개체에게 FL 섬유모세포에서 p53 단백질의 MDM2-매개된 분해를 저해시키고, p53 단백질 수준을 증가시키고, uPA 및 uPAR 수준을 감소시키고, 그리고 PAI-1 발현을 증가시키는 화합물 또는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 이 방법의 선호되는 구체예에서, 상기 화합물 또는 조성물은 다음과 같다:
- [0116] (a) MDM2-p53 상호작용을 저해시키는 누트린-3a (NTL) 또는
- [0117] 이의 키랄 cis-아미다졸린 유사체;
- [0118] (b) 다음으로 구성된 집단에서 선택된 펩티드:
- [0119] (i) FTTFTVT (서열 번호: 1)의 서열을 가진, CSP-4, 가장 선호되는 펩티드 구체예;
- [0120] (ii) 길이가 20개 아미노산을 넘지 않는 CSP-4 펩티드의 추가 변이체;
- [0121] (iv) CSP-4 펩티드의 공유적으로 변형된 화학 유도체,
- [0122] 또는
- [0123] (c) 펩티드 다량체는 최소한 2개 단량체를 포함하며, 각 단량체는 CSP-4 펩티드, (b)의 변이체 또는 화학 유도체이며,
- [0124] 가장 바람직하게는 CSP-4의 다량체,
- [0125] (d) 상기 운반가능한 펩티드, 또는 폴리펩티드 또는 펩티드 다량체 조성물,
- [0126] 또는
- [0127] (e) (a) - (d)중 임의의 조합, 이때 상기 NTL 유사체, 또는 상기 펩티드 변이체, 상기 펩티드 유도체 또는 상기 펩티드 다량체는 시험관내 또는 생체내 분석에서 각각 NTL 또는 CSP-4 펩티드의 생물학적 또는 생화학적 활성의 최소한 20%를 보유한다.
- [0128] 이 방법에서, 상기 화합물은 바람직하게는 약학적으로 수용가능한 운반체 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물 안에 있다. 상기 화합물은 상기 NTL의 약학적으로 수용가능한 염, NTL 유사체 또는 펩티드 화합물일 수 있다.

이 방법의 선호되는 구체예에서, 상기 화합물은 NTL이다. 이 방법의 또 다른 구체예에서, 상기 화합물은 상기 펩티드 다량체이며, 가장 바람직한 다량체는 CSP-4 펩티드 FFTFTVT (서열 번호: 1)의 단량체가 포함된 다량체다.

[0136] 본 발명은

[0137] (a) FL 섬유모세포에서 p53 단백질 수준을 증가시키고, uPA를 감소시키고 그리고 PAI-1 발현을 증가시키기 위한, 또는

[0138] (b) 폐 섬유증으로 특징화되는 질환 또는 상태를 치료하기 위한, NTL, NTL 유사체, 이 펩티드, 변이체, 화학 유도체 또는 다량체의 용도에 또한 관계한다.

[0139] 폐 섬유증을 특징으로 하는 질환 또는 상태를 보유한 개체의 치료에 이용되는 약물의 제조용으로, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 NTL, NTL 유사체, 이 펩티드, 변이체, 화학 유도체 또는 펩티드 다량체의 용도를 또한 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0140] 도 1은 섬유증 폐(FL)-섬유모세포에서 p53의 낮은 기선 발현과 uPA-섬유소용해성 체계의 p53-매개된 제어 난조는 섬유증으로 이어진다는 것을 설명하는 도식이다. IPF에서 관련된 작용 기전 및 경로 그리고 본 발명의 방법 및 조성물에 의한 치료를 개략적으로 나타낸다.

도 2a-2i. IPF 폐에서 섬유증 병소는 FL-섬유모세포 p53 발현이 감소됨을 설명한다. IPF 환자와 대조군 "정상적인" 개체의 폐 단면은 H&E (도 2a), 비멘틴 (도 2b), 트리크롬 (도 2c), p53 (도 2d), PAI-1 (도 2e), Ki-67 (도 2f)로 착색되었으며, PAI-1과 SP-C (도 2g) 또는 p53과 SP-C (도 2h) 또는 p53과 PAI-1 (도 2i)의 면역형광 사진이다. 하나의 대표 실시예를 나타낸다 (n=5개의 IPF 폐 검체).

도 3a-3b. IPF 폐의 FL(IPF)-섬유모세포에서 카베올린-1, p53 및 PAI는 감소되며, col-I의 증가 및 miR-34a의 저해가 연합된다. (도 3a) 정상적인 폐(NL)-섬유 모세포와 FL-섬유모세포의 세포 용해물은 이를 단백질에서 변화를 위하여 면역블랏팅되었다. 이 도면에서 NL-섬유모세포 (n=10개 세포 계통)와 FL-섬유모세포 (n=18개 세포 계통)의 전형적인 결과가 설명된다. (도 3b) NL-섬유모세포(n=3)와 FL-섬유모세포(n=4)의 총 RNA는 실시간 PCR에 의해 miR-34a 발현에 대하여 테스트 되었다. miR-34a의 ³²P-라벨된 안티센스 프로브와 로딩/loading 대조군 snRNA (U6)을 이용하여 대표 시료에서 RNA의 노던 블랏팅은 하부 막대로 나타낸다.

도 4a-4b. IPF 와 "정상적인" 폐의 섬유모세포에서 uPA, uPAR 및 PAI-1 mRNAs의 이질적인 발현. "정상적인" 개체와 환자의 폐 조직 (도 4a) 또는 NL-섬유모세포 (n=6)와 FL-섬유모세포 (n=8) (도 4b)에서 단리된 총 RNA는 정량적 실시간 PCR ((RT-PCR)에 의해 uPA, PAI-1 및 col-I mRNA에 대하여 테스트되었고, β-액틴 mRNA의 대응 수준으로 표준화되었다.

도 5a-5d. 마우스의 FL-섬유모세포 대(vs) NL-섬유모세포에 의한 uPA와 PAI-1의 차등 발현. BLM

손상후 21일 차에 마우스의 폐에서 단리된 FL-섬유모세포 또는 대조군 마우스의 NL-섬유모세포는 설명된 바와 같이(Bandhary et al., 2012, 상기) 비강 내 염에 노출되었다. NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포의 용해물은 p53, uPA, PAI-1 및 col-I 단백질의 발현 변화에 대하여 면역블랏팅되었다 (도 5a). 마우스 폐 조직 (도 5b) 또는 BLM-유도된 섬유증을 가진 마우스 또는 대조군 (염수) 마우스의 폐 조직으로부터 단리된 NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포 (n=6) (도 5c)로부터 추출된 총 RNA는 정량적 실시간 PCR에 의해 uPA, PAI-1 및 콜라겐-I (Col-I) mRNA에 대하여 테스트되었다. 마우스의 NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포는 12웰 플레이트에서 DMEM 배지에서 배양되었다. 3일 후, 섬유모세포를 카운트하여 증식율을 결정하였다 (도 5d).

도 6a-6d. CSP (CSP4)는 FL(IPF)-섬유모세포에서 miR-34a의 유도를 통하여 p53 발현을 증가시킨다. (도 6a) NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포 (n=3)는 PBS, CSP-4(CSP) 또는 대조군 펩티드 (CP)로 테스트되었다. 실시간 PCR에 의해 miR-34a에 대하여 RNA가 분석되었다. (도 6b) FL-섬유모세포는 miR-34a 안티센스 (miR-34a-AS) 또는 pre-miR-34a 또는 대조군 miRNA (Ctr-miR) 존부하에, PBS 또는 CSP 또는 CP로 처리되었다. 조건화 배지(CM)는 PAI-1 및 p53 및 β-액틴의 용해물(CL)에 대해 면역블랏팅되었다. (도 6c). FL-섬유모세포는 miR-34a-AS, pre-miR-34a 또는 Ctr-miR 존부하에 PBS 또는 CSP 또는 CP로 처리되었다. 실시간 PCR에 의해 miR-34a의 변화에 대하여 RNA가 분석되었다. (도 6d). 일련의 중첩되는 결손을 CSP에서 만들었으며, 이를 펩티드는 FL-섬유모세포를 처리하는데 이용되었다. p53, uPA, PAI-1 및 col-I에서 변화는 CSP 효과에 요구되는 최저 아미노산을

확인하기 위 하여 추후 평가되었다.

도 7a-7b. FL(IPF)-섬유모세포에서 p53의 단백질의 MDM2-매개된 분해 증가. (도 7a). NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포 (n=3)의 용해물은 p53, mdm2 및 β -액틴에 대해 면역블랏팅되었다. (도 7b). NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포의 용해물은 항-mdm 2 항체로 면역침전되었고(IP), 연합된 p53 단백질에 대해 면역블랏팅(IB)되었다.

도 8a-8c. FL(IPF)-섬유모세포에서 col-I 발현의 누트린-3a (NTL) 또는 CSP-4-매개된 저해에서 p53-섬유소용 해성 체계의 크로스토크 역할. (도 8a) FL-섬유모세포는 48시간 동안 PBS, 누트린-3a ($10 \mu M$), CSP-4 ($10 nM$) 또는 대조군 웨პ티드 (CP)에 노출되었다. 이들 세포 용해물은 Col-I, PAI-1, p53, uPA 및 β -액틴의 발현에 대하여 면역블랏팅되었다. (도 8b) 12 웰 플레이트에서 DMEM 배지에서 배양된 FL-섬유모세포는 비이를 (PBS) 또는 누트린-3a, CSP-4 또는 CP에 노출되었다. 3 d 후, 세포를 떼어내고, 카운트하였다. (도 8c) FL-섬유모세포는 비어있는 아데노바이러스 벡터 단독 (Ad-EV) 또는 p53 (Ad-p53), PAI-1 (Ad-PAI-1) 또는 카베올린-1 (Ad-Cav-1)을 발현시키는 Ad-벡터로 형질도입되었다. 48h 후, 세포 용해물은 Col-I, PAI-1, p53, uPA 및 β -액틴에 대하여 면역블랏팅되었다.

도 9 a-9b. NL-섬유모세포에서 col-I 발현 유도에서 p53-섬유소용해성 체계의 크로스토크 역할. 조직학 적으로 "정상적인" 인간 폐로부터 단리된 NL-섬유모세포는 이 세포에서 p53의 기선 발현을 저해시키기 위하여 렌티바이러스 벡터에서 p53 shRNA로 처리되었다. 대조군 세포들은 비-특이적 (Ctr) shRNA로 처리되었다. (도 9a): 조건화된 배지 시료는 PAI-1, uPA, 및 가용성 col-I에 대하여 면역블랏팅되었고, 한편 세포 용해물은 p53, α -SMA 및 β -액틴에 대하여 테스트되었다. (도 8b): 대조군 또는 p53 shRNA로 처리된 NL-섬유모세포로부터 단리된 총 RNA는 정량적 실시간 PCR에 의해 uPA, PAI-1, col-I 및 β -액틴 mRNA 발현에서 변화에 대하여 분석되었다.

도 10a-10d. 누트린-3a (NTL)은 BLM-처리된 마우스에서 폐 섬유증을 저해시킨다. 마우스에서 폐 섬유증을 유도하기 위하여 마우스를 BLM에 14d 동안 노출시켰다. 염수 처리된 마우스는 섬유증 대조군으로 이용되었다. 14 d 후, 정착된 폐 섬유증을 누트린-3a가 저해시키는지를 판단하기 위하여 BLM에 노출된 마우스의 IV로 비이를 또는 누트린-3a ($10 mg/kg$ 체 중)가 주사되었다(Zhang F et al. Drug Metab Dispos 39:15-21, 2011). BLM 손상 후 21일 시점에서, 섬유증 정도를 평가하기 위하여 마우스를 CT 스캐닝하였다 (도 10a). 하나의 대표 실시례를 나타낸다. (n=9). (도 10b) 폐 Flexivent 시스템을 이용하여 동일한 마우스에서 폐 순응 및 저항을 측정함으로써 누트린-3a 처리 (n=9) 후 폐 기능 개선이 평가되었다. (도 10c) 폐 단편은 트리크롬 착색되어 폐 구조 및 폐 섬유증의 증표가 되는 콜라겐 침착을 평가하였다. (도 10d) 전체 폐 균질물(homogenates)은 총 콜라겐 (히드록시프롤린) 및 ECM 변화에서 독립적으로 평가되는 데스모신 함량에 대하여 분석되었다.

도 11a-11d. CSP-4는 정착된 폐 섬유증을 저해시키고, 폐 기능을 개선시킨다. 마우스를 BLM에 노출시켜 폐 섬유증을 유도하였다. 14 d 후, 상기 마우스에게 비이를 또는 체중 kg 당 $1.5 mg$ 의 혼성된 서열의 CSP-4 또는 대조군 웨პ티드 ("CP")가 IV로 주사되었다. BLM 손상 후 21일 시점에 정착된 폐 섬유증의 CSP-4 저해를 검사하기 위하여 마우스를 CT 스캐닝하였다 (도 11a). 하나의 대표 실시례를 나타낸다 (n=9). (도 11b): 정량적 CT 해석 (renditions)을 이용하여 동일한 마우스(n = 9)에서 폐 용적이 측정되었다. (도 11c): 폐 단편은 트리크롬 및 H&E 착색 (나타 내지 않음) 착색되어 폐 섬유증의 증표가 되는 콜라겐 침착을 평가하였다. (도 11d) 총 히드록시프롤린 함량에 대하여 전체 폐 균질물의 분석.

도 12a-12c. CSP-4 또는 누트린-3a (NTL)는 FL-섬유모세포의 증식을 저해시킨다. 마우스에서 폐 섬유증을 유도하기 위하여 마우스를 BLM에 14d 동안 노출시키거나, 또는 염수 (섬유증 대조군)에 노출시켰다. 14 d 후, BLM에 노출된 마우스는 CSP-4 또는 CP, 또는 누트린-3a로 처리되었다 (도 10a-d/11a-d 참고). (도 12a): 폐 단편 (BLM 손상 후 21일 차)은 증식을 평가하기 위하여 Ki-67에 대하여 면역조직화학(IHC)을 거쳤다. 하나의 대표 실시례를 나타낸다 (n=9). 섬유모세포는 염수, BLM 또는 BLM+누트린-3a (도 11a에서 설명된 것과 같이)에 노출된 마우스의 폐에서 단리되어, 웨스턴 블랏팅을 이용한 col-I, p53 및 하류 uPA와 PAI-1 단백질의 발현 변화 (도 12b):, 그리고 정량적 RT-PCR를 이용한 mRNA의 변화(도 12c)에 대하여 테스트되었다.

도 13. WT 마우스 폐 조직을 CSP-4 또는 누트린-3a (NTL)로 생체외 처리함으로써 BLM-유도된 폐 섬유증의 저해. 마우스에서 폐 섬유증을 유도하기 위하여 마우스를 비강내 BLM에 21d 동안 노출시켰다. 이들 마우스 (n=3)를 회생시키고, 폐를 잘라내고, 작은 조각으로 잘게 부수고, 10% 태아 소 혈청이 포함된 DMEM 배지가 담긴 배양 접시에 두었다. 이 조직 시료는 추후 CSP-4 ($10 nM$), 대조군 웨პ티드 (CP) 및 누트린-3a (NTL) ($10 \mu M$)로 72h 동안 처리되었다. 조건화된 배지 및 조직 용해물이 준비되었고, 웨스턴 블랏팅에 의해 col-I, α -SMA 및 β -액틴의 변화에 대하여 분석되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0141]

"종양 억제제" 단백질, p53과 플라스미노겐 활성제 저해제 -1 (PAI-1)의 기저 발현이 IPF 환자의 폐에서 획득된 FL-섬유모세포에서 상당히 감소된다는 것을 본 발명자들은 발견하였다. 이러한 사실은 인간 IPF의 모델로 수용된 BLM-유도된 가속화된 폐 섬유증을 가진 마우스에 있어서도 적용되었다. p53은 uPA-섬유소용해성 체계의 주요 성분들(uPA, uPAR 및 PAI-1)의 발현을 조절한다. 그러나, 이들 단백질 수준의 변화가 폐 섬유증의 병인에 어떻게 기여하는지에 대해서는 명확하지 않으며, p53-uPA 섬유소용해성 체계 크로스토크가 정상적인 방식으로 복원되면 폐 섬유증이 완화되는지에 대해서도 명확하지 않다.

[0142]

본 발명에 따르면, FL-섬유모세포에서 uPA 및 uPAR 발현의 증가, 그리고 p53 발현 감소로 인한 PAI-1의 동시 저해는 폐 섬유증의 발달에 주요하다. FL-섬유모세포에서 p53 발현의 유도, uPA의 p53-매개된 감소를 통하여 p53-uPA-섬유소용해성 체계 크로스토크의 복원, 그리고 PAI-1 발현의 동시 증가로 IPF가 완화되며, 이는 NTL을 이용하여 이 질환의 치료에 기초가 된다.

[0143]

정상적인 폐 ("NL") 섬유 모세포와는 달리, IPF 환자의 폐에서 획득된 섬유모세포 ("FL"-섬유모세포) 또는 BLM-유도된 폐 섬유증을 가진 마우스로부터 획득된 섬유모세포는 p53을 최소한으로 발현시킨다. 더욱이, FL-섬유모세포는 낮은 수준의 PAI-1을 생산하지만, uPA 및 uPAR의 발현은 상당히 상승된다.

[0144]

본 발명은 전반적이며, 조직화된 방식으로 uPA-섬유소용해성 체계의 3가지 주요 성분들(uPA, uPAR 및 PAI-1) 모두를 표적으로 한다. FL-섬유모세포에서 p53 발현의 복귀를 통하여 uPA-섬유소용해성 체계의 3가지 주요 성분들 모두를 동시에 표적화함으로써, 섬유증은 완화된다.

[0145]

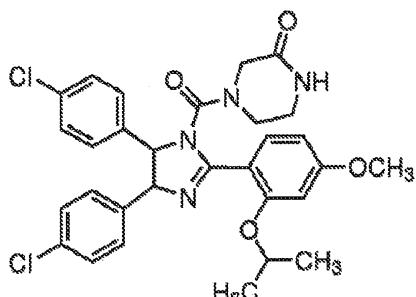
따라서, 이러한 처리는 IPF 환자로부터 단리된 FL-섬유모세포와 폐 조직에게 생체외, 그리고 생체내에서 영향을 준다. 이러한 변화는 정착된 폐 섬유증을 가진 마우스 모델에서 관찰되는데, 이때 누트린-3a은 유익한 효과를 가진 중재적인 그리고 하류 조절 물질로 특정된다.

[0146]

누트린-3a

[0147]

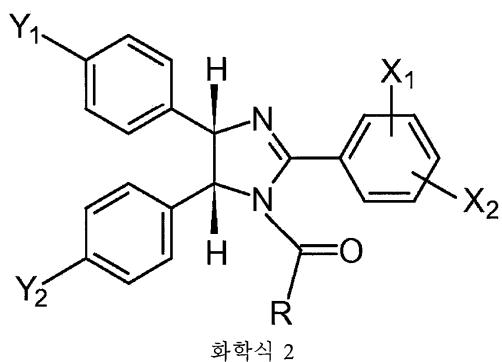
본 발명의 방법에 유용한 화합물은 누트린-3a (누트린 및 NTL로도 불린다, 4-2-4 ,5-디히드로-1H-이미다졸-1-페페라진-2-온($C_{30}H_{30}Cl_2N_4 O_4$)을 포함한다.



화학식 1

[0148]

이 화합물은 미국 특허 7,893,278 (Haley et al)에서 설명되며, 이 특허는 전문이 참고자료에 편입된다. MD M2-p53 상호작용을 저해하는 성질을 공유하는 NTL의 광범위한 키랄 cis-이미다졸린유사체 또한 본 발명에서 유용하다. NTL의 유사체는 상기 '278 특허에 공개된 그리고 하기 화학식 2에 의해 특징화되는 분자들 속(genus)으로 의도된다.



[0150]

이 때,

[0152]

R은 최소한 하나의 이형 원자가 포함된 포화된 그리고 불포화된 5- 및 6-원(membered) 고리이며; 상기 이형 원자는 S, N 또는 O일 수 있다. 상기 고리는 저가 알킬기로 치환될 수 있으며, 이때 알킬은 $-C=O-R_1$, $-SO_2CH_3$, 또는 $-CH_2C=OCH_3$ 중 최소한 하나로 더 치환될 수 있으며,

[0153]

R_1 은 H, $-NH_2$, $-N-$ 저가 알킬, 히드록시 치환된 저가 알킬, $-NH_2$ 으로 치환된 저가 알킬, 그리고 최소한 하나의 이형 원자 (S, N 또는 O)가 포함된 5- 및 6-원(membered) 고리로 구성된 군에서 선택되며;

[0154]

X_1 및 X_2 는 H, 저가 알콕시, $-CH_2OCH_3$, $-CH_2OCH_2CH_3$, $-OCH_2CF_3$ 및 $-OCH_2CH_2F$ 로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며,

[0155]

Y_1 및 Y_2 는 $-Cl$, $-Br$, $-NO_2$, $-C=N$, 그리고 $-C=CH$ 로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 그리고

[0156]

상기 이미다졸린 고리의 4번 위치와 5번 위치에 서 절대 입체화학은 차례로 S와 R이다.

[0157]

NTL의 유사체로 간주되는 다른 화합물은 화학식 2의 화합물이며, 이 때 R은 저가 알킬, 시클로알킬, $C=OR_1$, 히드록시로 치환된 저가 알킬, $-NH_2$ 로 치환된 저가 알킬, $-C=OR_1$ 로 치환된 저가 알킬, $N-$ 저가 알킬, $-SO_2CH_3$, $=O$, $-CH_2C=OCH_3$ 에서 선택된 최소한 하나의 기로 치환된 피페라지닐, 또는 C1-C3 알킬, -C1-C2 알콕시, $-C=OCH_3$, $-SO_2CH_3-C=O$, $-OH$, $-CH_2NH_2$, $-C=OCH_2NH_2$, $-C=OCH_2OH$, $-C=OCH(OH)CH_2OH$, $-CH_2CH(OH)CH_2OH$, $-C=ON(CH_2)_2$, $-C=ONH_2$, 및 $-C=ON(CH_3)CH_3$, $-N(CH_3)CH_3$ 로 부터 선택된 최소한 하나의 기로 치환된 피레리디닐, 피롤리디닐 그리고 피페라디닐이다.

[0158]

화학식 2, 이 때 오르소 위치의 X_1 기는 저가 알콕시, $-OCH_2CF_3$ 그리고 $-OCH_2C(H_2F)$ 에서 선택되며, 그리고 파라 위치의 X_2 기는 저가 알콕시인, 화합물이 또한 바람직하다. 화합물, 이 때 오르소 위치의 X_1 기는 에톡시, 이소프로록시, $-OCH_2CF_3$ 그리고 $-OCH_2CH_2F$ 에서 선택되며, 그리고 파라 위치의 X_2 기는 메톡시 및 에톡시에서 선택되는 화합물 또한 여전히 바람직하다.

[0159]

화학식 2, 이 때 R은 피페라지닐 및 치환된 피페라지닐에서 선택된 화합물이 더욱 선호된다. 이러한 화합물들의 예를 들면 다음과 같다: 1-{4-[$(4S,5R)-4,5$ -비스-(4-클로로-페닐)-2-(2-이소프로록시-4-메톡시-페닐)-4,5-디히드로-이미다졸-1-카르보닐]-피페라진-1-일}-에타논; 4-[$(4S,5R)-4,5$ -비스-(4-클로로-페닐)-2-(2-이소프로록시-4-메톡시-페닐)-4,5-디히드로-이미다졸-1-카르보닐]피페라진-2-온; [($(4S,5R)-4,5$ -비스-(4-클로로-페닐)-2-(2-이소프로록시-4-메톡시-페닐)-4,5-디히드로-이미다졸-1-카르보닐)-4-메톡시-4-5-메톡시-페닐]-4,5-디히드로-이미다졸-1-카르보닐]-피페라진-2-온; 4-[$(4S,5R)-4,5$ -비스-(4-클로로-페닐)-2-(2-이소프로록시-4-메톡시-페닐)-4,5-디히드로-이미다졸-1-카르보닐]-4-메톡시-4-5-메톡시-페닐]-4,5-디히드로-이미다졸-1-카르보닐]-피페라진-2-온; 1-{4-[$(4S,5R)-4,5$ -비스-(4-클로로-페닐)-2-(2-이소프로록시-4-메톡시-페닐)-4,5-디히드로-이미다졸-1-카르보닐]-피페라진-1-일}-1-몰포린-4-일-에타논; [($(4S,5R)-4,5$ -비스-(4-클로로-페닐)-2-(2-이소프로록시-4-메톡시-페닐)-4,5-디히드로-이미다졸-1-카르보닐)-4-메톡시-4-5-메톡시-페닐]-4,5-디히드로-이미다졸-1-카르보닐]-피페라진-1-일}-1-몰포린-4-일-에타논; 그리고 [($(4S,5R)-4,5$ -비스-(4-클로로-페닐)-2-(2-이소프로록시-4-메톡시-페닐)-4,5-디히드로-이미다졸-1-카르보닐)-4-메톡시-4-5-메톡시-페닐]-4,5-디히드로-이미다졸-1-카르보닐]-피페라진-1-일)-4-메틸-피페라진-1-일]-메타논.

[0160]

이들 모든 분자의 합성은 당분야에 공지되어 있으며, 이들중 일부는 '278 특허에서 설명된다.

[0161] Cav-1 서열에 근거된 웨티드

[0162] 카베올린-1 (Cav-1) 스카폴딩 도메인 또는 웨티드 (CSD 또는 CSP로도 또한 불린다)는 하기에서 더욱 상세하게 논의되는 바와 같이, Src 키나제와 Cav-1의 상호작용을 간섭하고, uPA와 항- β -인테그린 항체의 복합 효과를 모방한다. 고유한 인간 Cav-1은 178개 아미노산 길이와 22 kDa의 분자량을 가진다. Cav-1의 아미노산은 하기에 나타낸 것과 같다(서열 번호:3).

[0163] 1 MSGGKYVDSE GHLYTVPIRE QGNIYKP NNK AMAELSEKQ VYDAHTKEID LVNRDPKHLN

[0164] 61 DDVVKIDFED VIAEPEGTHS FDGIWKASFT TFTVTKYWFY R LLSALFGIP MALIWGIYFA

[0165] 121 ILSFLHIWAV VPCIKSFLIE IQCISRVYSI YVHTVCDPLF EAVGKIFSNV RINLQKEI

[0166] CSP는 위에서 밑줄친 20개 잔기 웨티드이며, 서열 GIWKASFTTFTVTKYWFRY (서열 번호:2)을 가진다. CSP-4로 명시된 본 발명의 선호되는 웨티드는 CSP의 단편 FTTFTVT (서열 번호:1)이며, Cav-1 서열 안에 두 줄로 밑줄쳐져 있다. CSP-4는 실시예들과 하기 도면에서 나타낸 활성을 보유하며, p53은 uPA, uPAR (상향) 그리고 PAI-1 발현 (하향)의 조직적 조절을 통하여 LEC 생존력을 조절하는데 영향을 주며, 그리고 추정된 기전에 의해, 자가사멸로부터 생체내에서 LECs 또는 폐 상피를 보호하고 그리고 ALI로 인한 섬유증을 차단시킨다.

[0167] 본 명세서에서 공개된 연구에서, "CP"로 명명된 CSP-4에 대한 대조군 웨티드는 더 큰 CSP (서열 번호:2)와 동일한 아미노산 조성물을 가지지만, 상이한 서열: WGIDKAFFTTSTVTVKWFYR (서열 번호:5)을 가진 스크램블된 웨티드다. CSP-4의 구조에 변형 및 변화가 만들어질 수 있으며, 유사한 또는 그렇지 않으면 바람직한 특징들을 가진 분자들을 만들기 위하여 변형 및 변화가 만들어질 수 있다. 이러한 기능적 유도체 또는 생물학적으로 활성 유도체 (이들 용어는 호환된다)는 본 발명 안에 포함된다.

[0168] 선호되는 기능적 유도체는 추가 변이체들 그리고 웨티드 올리고머/다량체, 그리고 이와 유사한 것들이다.

[0169] 이들 유도체들은 합성에 의해 생성될 수 있지만, 재조합 생산에 의해 만들어 질 수 있으며, CSP-4의 결합 성질 또는 생물학적 활성을 대하여 테스트될 수 있다. 변이체의 활성을 측정하는 바람직한 방법은 경쟁적 결합 분석이며, 이때 상기 웨티드 변이체가 가용성 카베올린, 이를 테면 탐지가 능하도록 라벨된 가용성 카베올린의 가용성 uPAR ("suPAR")에 결합과 경쟁한다.

[0170] CSP-4의 별개 유도체와 CSP-4가 포함된 더 긴 폴리웨티드는 본 발명에 따라 화학적 (합성) 방법 또는 재조합 수단 (더 긴 폴리웨티드의 경우 선호됨)에 의해 용이하게 만들어질 수 있는 것으로 이해된다.

[0171] CSP-4의 기능적 변이체의 정의에는 한 쪽 말단 또는 양쪽 말단 모두에 바람직하게는 1-5개의 추가 아미노산이 포함된 것들이 또한 포함된다. 다른 구체예들에서 (하기에서 논의되는 웨티드 다량체와는 구별되는), 최대 약 20개의 잔기가 추가 잔기로 부가될 수 있다. CSP-4의 추가 변이체에서, 서열 번호:1 (CSP-4 코어 웨티드)의 N-말단 및/또는 C-말 단의 추가 잔기는 Cav-1 (서열 번호:4의 고유 서열에서 발생되는 순서로 된 것들의 일부를 포함할 수 있다. 그러나, 상기 추가 변이체는 서열 번호:3일 수는 없다. 대안으로, 추가 변이체는 CSP-4의 생물학적 활성과 결합 활성을 유지되는 (하기에서 제시된 바와 같이 활성의 최소한 20%, 또는 바람직하게는 그 이상) 것으로 이해되는, 서열 번호: 1의 어느 한쪽 말단에 다른 아미노산이 추가될 수 있다.

[0172] CSP-4의 선호되는 치환 변이체들은 보존적 치환인데, 이때 1, 2 또는 3개 잔기들이 상이한 잔기에 의해 치환되었다. 단백질 화학 및 구조에 대한 상세한 설명은 Schultz G.E. et al., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York, 1979, 그리고 Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, 2nd ed., W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1993을 참고하며, 이들은 본 명세서의 참고자료에 편입된다. 보존적 치환은 다음의 집단중 하나에 속하는 것으로 교환되는 것으로 정의된다:

[0173] Phe은 큰 방향족 잔기: Tyr, Trp에 의해 치환될 수 있다.

[0174] Thr는 작은 지방족, 비극성 또는 약한 극성 잔기들: 이를 테면, Ala, Ser, 또는 Gly에 의해 치환될 수 있다.

[0175] Val은 큰 지방족, 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Cys에 의해 치환될 수 있다.

[0176] 치환의 정확한 효과를 미리 예측하기 어려울 때 조차도, 당업자는 통상적인 스크리닝 분석, 바람직하게는 본 명세서에서 설명된 생물학적 그리고 생화학 분석에 의해 상기 효과가 평가될 수 있음을 인지할 것이다. 바람직한 특징에 대한 적절한 스크리닝 분석에서 세포 용해물 또는 정제된 폴리웨티드 또는 웨티드 변이체의 활성이 선별된다.

- [0177] 20개의 "표준" L-아미노산에 추가하여, 당업계에서 잘 정의된 D-아미노산 또는 비-표준, 변형된 또는 비통상적 아미노산 또한 본 발명의 이용에 고려된다. 이런 아미노산에는 예를 들면, β -알라닌 (β -Ala) 및 기타 ω -아미노산 이를 테면 3-아미노프로파온산, 2,3-디아미노프로파온산 (Dpr), 4-아미노부틸산 및 기타 등등; α -아미노이소부틸 산 (Aib); ε -아미노헥사논산 (Aha); δ -아미노발레산 (Ava); N-메틸글리신 또는 사르코신 (MeGly); 오르니 틴 (Orn); 시트룰린 (Cit); t-부틸알라닌 (t-BuA); t-부틸글리신 (t-BuG); N-메틸이소류신 (MeIle); 폐닐글 리신 (Phg); 노르류신 (Nle); 4-클로로페닐알라닌 (Phe(4-Cl)); 2-플루오르페닐알라닌 (Phe(2-F)); 3-플루오 르페닐알라닌 (Phe(3-F)); 4-플루오르페닐알라닌 (Phe(4-F)); 폐니실라민 (Pen); 1,2,3,4-테트라하이드로이소 퀴놀린-3-카르복실산 (Tic); 호모아르기닌 (hArg); N-아세틸 리신 (AcLys); 2,4-디아미노부틸산 (Dbu); 2,4-디아미노부틸산 (Dab); p-아미노페닐알라닌 (Phe(pNH₂)); N-메틸 발린 (MeVal); 호모시스테인 (hCys), 호모페닐알라닌 (hPhe) 그리고 호모세린 (hSer); 히드록시프롤린 (Hyp), 호모프롤린 (hPro), N-메틸 화된 아미노산 및 켙토이드 (N-치환된 글리신)이 포함된다.
- [0178] CSP-4와 유사한 방식으로 기능을 하는 합당 한 약물 기획에 의해 다른 화합물들이 기획될 수 있다. 합당한 약물 기획의 목적은 생물학적으로 활성 화합 물의 구조적 유사체를 만드는 것이다. 이러한 유사체들의 창조에 의해 자연 문자(가령, 웨티드)보다 활성이 더 크거나 더 안정한, 기능에 영향을 주는 변형에 덜 민감한 약물을 생산하는 것이 가능하다. 한 가지 방법은 예를 들면, NMR 또는 X-선 결정, 컴퓨터 모델링 또는 이의 조합에 의해 CSP-4의 3차원 구조를 만드는 것이다. 또다른 방법은 CSP-4 서열 안에 무작위로 기능기를 대체시키고, 이 기능에 있어서 영향을 측정 하는 것이다.
- [0179] 더욱이, 생물학적으로 활성 유도체는 결합 또는 생물학적 활성의 생체내 또는 시험관내 분석, 이를 테면 본 명세서에서 설명된 분석에서 CSP-4의 활성을 가진다. 바람직하게는, 상기 폴리웨티드는 CSP-4 활성의 최소한 약 20%, 또는 최소한 약 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 약 95%, 97%, 99%, 그리고 이들 범위에서 유도가능한 임의의 범위, 이를 테면, 예를 들면, 약 70% 내지 약 80%, 그리고 더욱 바람직하게는 약 81% 내지 약 90%; 또는 더 더욱 바람직하게는, 약 91% 내지 약 99%의 활성으로 시험관내 또는 생체내에서 BLM에 의해 유도된 LECs의 자가사멸을 저해 또는 막는다. 상기 유도체는 CSP-4 활성의 100% 또는 그 이상의 활성을 보유할 수 있다.
- [0180] 상기 웨티드는 아실 (졸임말로 "Ac") -및 아미노 (졸임 말로 "Am")기로 각각 N 및 C 말단을 캡핑(capped)될 수 있는데, 예를 들면 N 말단은 아세틸 ($\text{CH}_3\text{CO}-$), 그리고 C-말단은 아미도 ($-\text{NH}_2$)로 캡핑될 수 있다. N-말단 캡핑기, 바람직하게는 말단 아미노기에 연계되는 광범위한 캡핑기가 고려되는데, 예를 들면: 포르밀;
- [0181] 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 알카노일, 이를 테면 아세틸, 프로파오닐, 부티릴;
- [0182] 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 알케노일, 이를 테면 헥스-3-에노일;
- [0183] 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 알키노일, 이를 테면 헥스-5-이노일;
- [0184] 아로일, 이를 테면 벤조일 또는 1-나프토일;
- [0185] 혜테로아로일, 이를 테면 3-피롤일 또는 4-퀴놀로일;
- [0186] 알킬술포닐, 이를 테면 메탄술포닐;
- [0187] 아릴술포닐, 이를 테면 벤젠술포닐 또는 술파닐일;
- [0188] 혜테로아릴술포닐, 이를 테면 피리딘-4-술포닐;
- [0189] 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 치환된 알카노일, 이를 테면 4-아미노부티릴;
- [0190] 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 치환된 알케노일, 이를 테면 6-히드록시-헥스-3-에노일;
- [0191] 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 치환된 알키노일, 이를 테면 3-히드록시-헥스-5-이노일;
- [0192] 치환된 아로일, 이를 테면 4-클로로벤조일 또는 8-히드록시-나프트-2-오일;
- [0193] 치환된 혜테로아로일, 이를 테면 2,4-디옥소-1,2,3,4-테트라하이드로-3-메틸-퀴나졸린-6-오일;
- [0194] 치환된 알킬술포닐, 이를 테면 2-아미노에탄술포닐;
- [0195] 치환된 아릴술포닐, 이를 테면 5-디메틸아미노-1-나프탈렌술포닐;

- [0196] 치환된 헤테로아 럴슬포닐, 이를 테면 1-메톡시-6-이소퀴놀린슬포닐;
- [0197] 카프바모일 또는 티오카프바모일; 치환된 카프바모 일 ($R'-NH-CO$) 또는 치환된 티오카프바모일 ($R'-NH-CS$) 이때 R' 은 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤�테로아릴, 치환된 알킬, 치환된 알케닐, 치환된 알키닐, 치환된 아릴, 또는 치환된 헤�테로아릴이며;
- [0198] 치환된 카프바모일 ($R'-NH-CO$) 그리고 치환된 티오카프바모일 ($R'-NH-CS$) 이때 R' 은 알카노일, 알케노일, 알키노일, 아로일, 헤�테로아로일, 치환된 알카노일, 치환된 알케노일, 치환된 알키노일, 치환된 아로일, 또는 치환된 헤�테로아로일이며, 이들 모두 상기에서 정의된 바와 같다.
- [0199] C-말단 캡핑 기능기는 말단 카르복실과 함께 아미드 또는 에스테르 결합일 수 있다. 아미드 결합을 제공하는 캡핑 기능기는 NR^1R^2 로 명시되는데 이때 R^1 및 R^2 는 다음 집단에서 독립적으로 끌어올 수 있다: 수소;
- [0200] 알킬, 바람직하게는 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 알킬, 이를 테면 메틸, 에틸, 이 소프로필;
- [0201] 알케닐, 바람직하게는 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 알케일, 이를 테면 프로프-2-에닐;
- [0202] 알키닐, 바람직하게는 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 알키닐, 이를 테면 프로프-2-이닐;
- [0203] 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 치환된 알킬, 이를 테면 히드록시알킬, 알콕시알킬, 멀캡토알킬, 알킬티오알킬, 할로게노알킬, 시아노알킬, 아미노알킬, 알킬아미노알킬, 디알킬아미노알킬, 알카노일알킬, 카르복시알킬, 카프바 모일알킬;
- [0204] 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 치환된 알케닐, 이를 테면 히드록시알케닐, 알콕시알케닐, 멀캡토알케닐, 알킬티오알케닐, 할로게노알케닐, 시아노알케닐, 아미노알케닐, 알킬아미노알케닐, 디알킬아미노알케닐, 알카노일알케닐, 카르복시알케닐, 카프바모일알케닐;
- [0205] 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 치환된 알키닐, 이를 테면 히드록시알키닐, 알콕시알키닐, 멀캡토알키닐, 알킬티오알키닐, 할로게노알키닐, 시아노알키닐, 아미노알키닐, 알킬아미노알키닐, 디알킬아미노알키닐, 알카노일알키닐, 카르복시알키닐, 카프바모일알키닐;
- [0206] 최대 10개 탄소 원자를 보유한 아로일알킬, 이를 테면 펜아실 또는 2-벤조일에틸;
- [0207] 아릴, 이를 테면 폐닐 또는 1-나프틸;
- [0208] 헤�테로아릴, 이를 테면 4-퀴놀일; 1 내지 10개 탄소 원자를 보유한 알카노일, 이를 테면 아세틸 또는 부티릴;
- [0209] 아로일, 이를 테면 벤조일;
- [0210] 헤�테로아로일, 이를 테면 3-퀴놀로일;
- [0211] OR' 또는 $NR'R''$ 이때, R' 및 R'' 은 독립적으로 수소, 알킬, 아릴, 헤�테로아릴, 아실, 아로일, 술포닐, 술피닐, 또는 SO_2R''' 또는 $SO-R'''$ 이며, 이때 R''' 은 치환된 또는 치환안된 알킬, 아릴, 헤�테로아릴, 알케닐, 또는 알키닐이다.
- [0212] 에스테르 결합을 제공하는 캡핑 기능기는 OR 로 명시되며, 이때 R 은 알콕시; 아릴옥시; 헤�테로아릴옥시; 아랄킬옥시; 헤테로아랄킬옥시; 치환된 알콕시; 치환된 아릴 옥시; 치환된 헤�테로아릴옥시; 치환된 아랄킬옥시; 또는 치환된 헤�테로아랄킬옥시일 수 있다.
- [0213] N-말단 또는 C-말단 캡핑 기능기, 또는 이 두 말단 모두의 캡핑 기능기는 캡핑된 문자가 부모 약물보다 더 개선된 전 달 성질을 보유한 활성 약물을 방출시키기 위하여 신체 안에서 자발적 또는 효소적 변형을 겪는 프로드럭(부모 약물 문자의 약학적으로 비활성 유도체)으로 기능을 하게 하는 그러한 구조일 수 있다(Bundgaard H, Ed: *Design of Prodrugs*, Elsevier, Amsterdam, 1985).
- [0214] 캡핑기의 적절한 선택으로 상기 웹티드에 다른 활성의 추가가 허용된다. 예를 들면, N- 또는 C-말단 캡에 연계된 술프히드릴기의 존재로 다른 문자에 유도화된 웹티드의 접합이 허용될 것이다.
- [0215] **CSP-4의 화학 유도체**
- [0216] CSP-4의 "화학 유도체"로 간주되는 상기에서 설명된 캡핑 기에 추가하여, CSP-4의 선호되는 화학 유도체는 본 명세서에서 설명된 화학 유도체를 구성하기 위하여 공지된 수단에 의해 CSP-4 또는 CSP-4의 추가 변이체로 도입될 수 있는 단백질 또는 웹티드의 정상적인 일부분이 아닌 화학 모이어티를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기

펩티드의 공유적 변형이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이러한 유도화된 모이어티들은 용해도, 흡수, 생물학적 반감기, 그리고 이와 유사한 것들을 개선시킬 수 있다. 이러한 효과를 중재시킬 수 있는 모이어티들은 예를 들면, Gennaro, AR, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 21st Ed, 2005 (또는 최근 판)에서 설명된다.

[0217] 이러한 변형은 상기 펩티드의 표적화된 아미노산과 선택된 측쇄 또는 말단 잔기들과 반응할 수 있는 유기 유도화제를 반응 시킴으로써, 상기 분자 안으로 도입될 수 있다. 또다른 변형은 상기 펩티드의 고리화(cyclization)인데 - 고리화는 이황화결합을 통하여 결합되어 시클릭펩티드를 만들 수 있는 말단 Cys 잔기를 추가하여 일반적으로 이루어진다. 대안으로, 가교가능한 Lys (K)가 한 말단에 추가되며, 다른 말단에는 Glu (E)가 추가된다.

[0218] 시스테이닐 잔기 (이를 테면, 고리화 목적으로 추가된)는 가장 흔히 α-알로아세테이트 (및 상응하는 아민)와 반응하여, 카르복시메틸 또는 카르복시아미도메틸 유도체를 제공한다. 시스테이닐 잔기는 브로모트리플루오르 아세톤, α-브로모-β-(5-이미다조일) 프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬 말레이미드, 3-니트로-2-페리딜 디슬퍼드, 메틸 2-페리딜 디슬퍼드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머 큐리-4-니트로-페놀, 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과 반응하여 또한 유도된다. 추가된 리신일 잔기 (이를 테면, 고리화를 위한)와 아미노 말단 잔기는 숙신 또는 다른 카르복실산 무수물을 유도화될 수 있다. 환형 카르복실 무수물에 의한 유도화는 리신일 잔기들의 전하를 역전시키는 효과를 가진다. 아미노-보유 잔기들을 유도화시키는데 적합한 기타 물질들은 이미도에스테르들, 예를 들면 메틸 피콜린이미데이트; 피리독살 포스페이트; 피리독살; 클로로보로하이드라이드; 트리니트로벤젠술폰산; 0-메틸이소우레아; 2,4-펜탄디온; 그리고 글리옥실레이트와 함께 트란스아미나제-촉매된 반응을 포함한다.

[0219] 이기능적 물질에 의한 유도화는 물-불용성 지지물 매트릭스 또는 다른 거대분자 캐리어에 상기 펩티드 또는 올리고머 또는 다량체의 가교에 유용하다. 흔히 이용되는 가교체는 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타알데히드, N-히드록시숙시니미드 에스테르, 4-아지도살리실산을 가진 에스테르, 디숙시니미딜 에스테르 이를 테면 3,3'-디티오비스(숙시니미딜프로피오네이트), 그리고 이중기능성 말레이미드 이를 테면 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄이 포함된 동종이중기능성 이미도에스테르를 포함한다. 유도화제, 이를 테면 메틸-3-[p-아지도페닐] 디티오]프로피오이미데이트는 빛 존재하에 가교를 형성할 수 있는 광활성화가능한 중간생성물을 만든다. 대안으로, 반응성 물-불용성 매트릭스, 이를 테면 시아노겐 브롬화물-활성화된 탄수화물과 미국 특허 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; 및 4,330,440에서 설명된 반응성 기질이 단백 질 고정에 이용된다.

[0220] 다른 변형에는 히드록실화 리신, 트레오닐 잔기의 히드록실기의 포스포릴화, (추가 된) 리신 잔기 쇄의 측쇄 α-아미노기의 메틸화 (Creighton, 상기), N-말단 아민의 아세틸화, 그리고 일부 경우에 있어서, C-말단 카르복실기의 아미드화를 포함한다. 하나 또는 그 이상의 L-아미노산을 대신하여 하나 또는 그 이상의 D-아미노산이 있는 펩티드 또한 포함된다.

다량체 또는 올리고머 펩티드

[0222] 본 발명은 CSP-4의 항-자가사멸 및 보호 활성을 보유한 CSP-4의 반복 단위 또는 이의 기능적 유도체로부터 구축된 더 긴 펩티드를 또한 포함한다. 이러한 다량체의 선호되는 펩티드 단위는 FTTFTVT (서열 번호: 1)이다. 이 펩티드의 추가 변이체들은 다량체의 단위("unit"), 바람직하게는 1-4개의 추가 아미노산을 포함한다.

[0223] 펩티드 다량체는 상이한 조합의 펩티드 단량체를 포함할 수 있다 (서열 번호: 1 또는 이의 추가 변이체들 또는 상기 펩티드의 화학적으로 유도화된 형태중 하나 또는 모두 포함할 수 있다. 이러한 올리고머 또는 다량체 펩티드는 본 명세서에서 논의된 바와 같이 화학 합성 또는 재조합 DNA 기술에 의해 만들어질 수 있다. 화학 합성에 의해 만들어질 경우, 상기 올리고머는 바람직하게는 2-5개의 코어 펩티드 서열 반복을 가지며, 다량체에서 전체 아미노산 수는 약 160개 잔기, 바람직하게는 100개 이상의 잔기(또는 링커 또는 스페이스가 포함될 경우 이의 등가체)를 초과하지 않아야 한다.

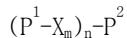
[0224] 선호되는 합성 화학 펩티드 다량체는 다음 화학식을 가진다:

[0225] P¹_n

[0226] 이때 코어 펩티드 P¹은 서열 번호: 1이며, 이때 n=2-5이며, 그리고 이때 코어 펩티드 단독 또는 올리고 또는

다량체 형태에서 코어 펩티드는 본 명세서에서 논의된 바와 같이, 활성의 시험관내 또는 생체내 생물 분석에서 CSP-4의 생물학적 활성을 보유한다.

[0227] 또 다른 구체예에서, 선호되는 합성 화학 펩티드 다량체는 다음 화학식을 가진다:



[0229] P^1 과 P^2 는 상기에서 설명된 추가 변형체가 포함된 코어 펩티드이며, 이때

[0230] (a) P^1 과 P^2 는 동일하거나 또는 상이할 수 있고; 더욱이,

[0231] 다량체에서 P^1 의 각 경우는 상이한 펩티드 (또는 변이체)일 수 있으며;

[0232] (b) X는 다음을 포함하는 또는 구성된 스페이스이다:

[0233] (i) 짧은 유기 사슬, 바람직하게는 C₁-C₅ 알킬, C₁-C₅

[0234] 알케닐, C₁-C₅ 알키닐, 최대 4개의 산소 원자가

[0235] 포함된 C₁-C₅ 폴리에테르이며; 이때 m = 0 또는 1이고,

[0236] n = 1-7이며; 또는

[0237] (ii) Gly_z 이때, z = 1-6이며,

[0238] 그리고 이때, 코어 펩티드 단독 또는 다량체 형태에서 코어

[0239] 펩티드는 본 명세서에서 논의된 바와 같이, 활성의

[0240] 시험관내 또는 생체내 분석에서 CSP-4의 생물학적 활성을

[0241] 보유한다.

[0242] 재조합에 의해 만들어질 때, 상기에서 논의된 바와 같이 선호되는 스페이스는 Gly_z이며, 여기에서 z=1-6이며, 다량체는 발현 체계가 허용하는 만큼의 많은 코어 펩티드 서열, 예를 들면 2 내지 약 25개 반복의 코어 펩티드 서열을 보유할 수 있다. 재조합에 의해 생산되는 선호되는 펩티드 다량체는 다음 화학식을 가진다:



[0244] 이 때:

[0245] (a) P^1 과 P^2 는 독립적으로, 서열 번호: 1 또는 3 또는 이의 추가

[0246] 변이체 또는 유도화된 형태이며, 이때 P^1 과 P^2 는 동일하거나 또는 상이할 수 있으며; 더욱 이 각 다량체에서 P^1 의 각 경우는 상이한 펩티드(또는 변이체)일 수 있고;

[0247] 이 때

[0248] n = 1-25 그리고 z = 0-6이며; (n의 선호되는 범위는 n=1-5, 1-10, 1-15, 또는 1-20이 포함되며) 그리고 이때 코어 펩티드 단독 또는 다량체 형태에서 코어 펩티드는 본 명세서에서 논의된 바와 같이, 활성의 시험관내 또는 생체내 생물분석에서 CSP-4의 생물학적 활성을 보유한다.

[0249] 본 펩티드 다량체에서, P^1 또는 P^2 는 바람직하게는 서열 번호: 1 또는 이의 추가 변이체 또는 화학 유도체다. 상기 다량체는 임의선택적으로 캡핑된다. 이러한 다량체는 본 명세서에서 설명된 임의의 상기 펩티드 또는 변이체들로부터 구축될 수 있는 것으로 이해된다. 상기 펩티드 다량체는 서열 번호:3 (가령, 고유 한 인간 Cav-1이 아니고, 바람직하게는 고유한 포유류 Cav-1 유사체가 아니다)과는 상이해야 하는 것으로 또 한 이해된다.

펩티도모방체(Peptidomimetics)

[0251] CSP-4의 생물학적 효과를 모방 하는 펩티도모방체 화합물 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 펩티도모방체는

CSP-4의 결합 활성 및 생물학적 활성을 보유하도록 CSP-4의 결합 요소들의 입체공간적 성질을 재현시키는 비자연적 펩티드 또는 비-펩티드 물질이다. 생물학적으로 활성 CSP-4 펩티드, 펩티드 다양체와 유사하게, 펩티도모방체는 결합 면(face) (CS P-4가 결합하는 임의의 리간드와 상호작용하는)과 비-결합 면을 가질 것이다. 다시, CSP-4와 유사하게, 펩티도모방체의 비-결합 면은 기능기를 포함할 것이며, 이들 기능기는 펩티도모방체의 결합 면을 변형시키지 않고, 다양한 치료요법적 모이어티들의 결합에 의해 변형될 수 있다. 펩티도모방체의 선호되는 구체예는 상기 분자의 비-결합 면에 아닐린을 포함할 것이다. 아닐린의 NH_2 -기는 $\text{pK}_a \sim 4.5$ 를 가지며, 따라서 이 펩티도모방체의 결합 면상에 임의의 NH_2 기능기의 변형없이, 임의의 NH_2 -선택성 물질에 의해 변형될 수 있다. 다른 펩티도모방체는 이들의 결합 면상에 임의의 NH_2 기능기를 보유하지 않을 수 있고, 따라서, pK_a 에 대한 고려없이 임의의 NH_2 는 접합 부위로써 비-결합 면에 도시될 수 있다. 또한 다른 변형가능한 기능기, 이를테면 -SH 및 -COOH가 접합 부위로 펩티도모방체의 비-결합 면에 혼입될 수 있다. 치료요법적 모이어티는 펩티도모방체의 합성 동안 적 접적으로 또한 혼합될 수 있고, 바람직하게 이 분자의 비-결합 면에 도시될 수 있다.

[0252]

본 발명은 또한 부 분적 펩티드 특징을 유지하는 화합물들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 펩티드 내에 임의의 단백질 분해적으로 불안정한 결합은 비-펩티드 요소, 이를테면 동배체(isostere)(N-메틸화; D-아미노산) 또는 환원 된 펩티드 결합에 의해 선택적으로 대체될 수 있으며, 한편 이 분자의 나머지는 이의 펩티드 성질을 유지하고 있다.

[0253]

다수의 생물활성 펩티드/폴리펩티드 이를테면 아편유사체(opioid) 펩티드, VIP, 트롬빈, HIV 프로테아제, 등등에 대한 항진제, 기질 또는 저해제인 펩티도모방체 화합물이 설명되어왔다. 펩티도모방체 화합물을 기획하고, 제조하는 방법들은 당업계에 공지되어 있다(Hruby, VJ, *Biopolymer s* 33:1073-1082 (1993); Wiley, RA et al., *Med. Res. Rev.* 13:327-384 (1993); Moore et al., *Adv. in Pharmacol* 33:91-141 (1995); Giannis et al., *Adv. in Drug Res.* 29:1-78 (1997). 2차 구조를 모방하는 특정 모방체는 Johnson et al., In: *Biotechnology and Pharmacy*, Pezzuto et al., Chapman and Hall (Eds.), NY, 1993에서 설명된다. CSP-4 펩티드의 결합 능력 및 특이성을 보유한, 그리고 바람직하게는 생물학적 활성을 또한 보유한 펩티도모방체를 만들기 위하여 이들 방법이 이용된다. 이러한 화합물을 기획하고 합성하기 위하여, 본 명세서의 기술 관점에서 당분야의 당업자가 이용가능한 펩티드 화학 및 일반 유기 화학의 지식이면 충분 하다.

[0254]

예를 들면, 이러한 펩티도모방체는 자유형 또는 리간드 (이를테면, 가용성 uP AR 또는 이의 단편)와 복합 결합된 본 발명의 펩티드의 3-차원 구조의 관찰에 의해 확인될 수 있다. 대안으로, 이의 리간드에 결합된 본 발명의 펩티드 구조는 핵 자기 공명 분광학의 기술에 의해 획득될 수 있다. 상기 펩티드와 이의 리간드 또는 수용체의 상호작용의 입체 화학에 관한 더 많은 지식에 의해 이러한 펩티드모방체의 합당한 기획이 허용될 것이다. 리간드 없이, 본 발명의 펩티드 또는 폴리펩티드의 구조는 모방체 분자의 기획을 위한 스캐폴드(scaffold)를 또한 제공할 수 있다.

[0255]

운반가능한 펩티드 및 펩티드 다양체

[0256]

본 발명의 한 구체예는 본 발명의 펩티드를 동물 세포, 이를테면 인간 세포 안으로 도입시키는 방법을 포함한다. "운반가능한" 또는 "세포-운반가능한" 또는 "세포-표적화된" 펩티드 또는 폴리펩티드로 지칭되는 이 방법에 유용한 조성물은 본 발명에 따른 생물학적으로 활성 펩티드, 바람직하게는 CSP-4, 또는 이의 기능적 유도체, 또는 이의 펩티드 다양체는 "내화(internalization) 서열" 또는 세포의 전달 체계로 작용하는 추가 성분에 연합되거나 이에 부착된다. 용어 "~와 연합된(associated with)"이란 공유 결합 또는 다른 결합 또는 힘(forces)에 의해 화학적으로 결합되거나 또는 연결된, 또는 혼합물 안에 복합된 것을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 이용된 바와 같이, "전달(delivery)"은 세포 안에서 펩티드/폴리펩티드를 내화시키는 것을 지칭한다. 본 명세서에서 고려되는 전달 분자들은 세포 진입을 수행하기 위하여 이용되는 펩티드/폴리펩티드를 포함한다. 예를 들면, Morris et al., *Nature Biotechnology*, 19: 1173-6, 2001)를 참고한다. 선호되는 전략은 다음과 같다: 본 발명의 자가사멸-저해 ("생물학적으로 활성") 펩티드는 세포, 바람직하게는 인간 세포 안으로 진입을 용이하게 하는 특별히 기획된 펩티드에 결합되거나, 또는 이와 혼합된다. 이 전달 체계는 생물학적으로 활성 펩티드 또는 폴리펩티드에 융합되거나 또는 화학적으로 결합된 전달 펩티드를 요구하지 않고 (비록 이것이 바람직하지만), 생물학적으로 활성 펩티드 또는 폴리펩티드는 전달 또는 내화 과정에 앞서 변형되지 않아도 된다. 초기 전달 체계의 단점은 전달에 앞서 "페이로드(payload)" 단백질의 변성이 요구되며, 후속적으로 세포내 복원된다. 이들 구체예는 세포 안으로 단백질의 전위를 촉진시키는 공지의 방법에 근거된다.

[0257]

전위/내화를 촉진시키는 "전달" 펩티드/폴리펩티드의 한 가지 유형은 HIV-TAT 단백질(Frankel, AD et al., *Cell*

55:1189-93 (1998)과 안테나페디아(*Antennapedia*) 동종도메인의 제3 α -나선 (Derossi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:10444-50 (1994); Lindgren, M *et al.*, *Trends Pharm. Sci.* 21:99-103 (2000) ; Lindgren *et al.*, *Bioconjug Chem.* (2000); Maniti O *et al.*, *PLoS ONE* 5:e15819 (2010)를 포함한다. "페네트라틴(penetratin)"으로 또한 알려진 후자 웨티드는 야생형 서열 RQIKIWFQNRRMKWKK (서열 번호:6)을 가진 16개-아미노산 웨티드 또는 2개 유사체/변이체들 W48F (RQIKIWFQNRRMKWKK, 서열 번호:7) 및 W56F (RQIKIWFQNRRMKFKK, 서열 번호:8)로 지정된 2개의 유사체/변이체들이다(Christiaens B *et al.*, *Eur J Biochem* 2002, 269:2918-2926). 상기 돌연변이 모두를 가진 또 다른 변이체는 RQIKIF FQNRRMKFKK (서열 번호:9)이다. 세포-침투 웨티드인 트란스포르탄(transportan)은 마스토파란(mast oparan)의 서열에 추가된 Lys 잔기에 의해 연계된 신경웨티드 갈라닌의 N-말단의 12개 기능 아미노산이 포함 된 27개 아미노산 길이의 웨티드이다(Pooga, M *et al.*, *FASEB J.* 12:67-77 (1998)). 트란스 포르탄의 서열은 GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (서열 번호: 10)이다. 페네트라틴과 트란스포르탄 유사체들은 Lindgren *et al.*, *Bioconjug Chem.* 2000에 의해 설명된다.

[0258] 또 다른 단백질 (페밀리)은 두드러진 세포내 운반 성질을 보유하고, 많은 주변 세포들에게 단백질을 분배하는 단순 헤르페스 바이러스, VP22를 포함한다. (Elliott, G *et al.*, 1997, *Cel1 88*: 223-33; O'Hare *et al.*, 미국 특허 6,017,735). 예를 들면, p53에 연계된 VP22 (Phelan, A . *et al.*, 1998, *Nat Biotechnol* 16:440-3) 또는 티미딘 키나제에 연계된 VP22(Dilber, MS *et al.*, 1999, *Gene Ther* 6:12-21)는 시험관 내에서 연계된 단백질을 주변 세포로의 퍼짐을 용이하게 한다. 다른 포진 바이러스내 VP22 상동체, 이를 테면 조류 Marek 질환 바이러스 (MDV) 단백질 UL49는 HSV-1 VP22와 상동성을 공유하며 (Koptidesova *et al.*, 1995, *Arch Virol.* 140 :355-62) 그리고 외생적 적용 후 세포내 운송을 할 수 있는 것으로 나타났다 (Dorange *et al.*, 2000, *J Gen Virol.* 81:2219) . 이들 단백질 모두 본 발명의 웨티드, 변이체들, 및 다양체의 세포내 취입을 강화시키기 위한 접근법을 제 공하는 세포내 퍼짐 성질을 공유한다.

[0259] 세포내 퍼짐(spreading) 또는 "전달", "전달" 또는 "내화" 단백질 및 웨티드 이를 테면 HIV-TAT 또는 VP22의 "기능적 유도체"는 상동성 아미노산 치환 변이체들, 단편들 또는 화학 유도체이 또한 포함되며, 본 명세서에서 이 용어들은 생물학적으로 활성 웨티드를 위한 것이다. 기능적 유도체는 바람직한 폴리웨티드의 진입을 촉진시키는 측정가능한 전위 또는 세포내 퍼짐(VP22-유사) 활성을 유지하여, 본 발명의 생물학적으로 활성 웨티드의 유용성 이를 테면, 치료용도를 촉진시킨다. "기능적 유도체"는 이 용어가 접속적(conjunctive) 또는 대안적(alternative)으로 이용된 것과는 무관하게 변이체들 (바람직하게는 보존적 치환 변이체들) 및 단편들을 포함한다.

[0260] 상기 운송 단백질은 이들이 운반하는 웨티드, 이를 테면 CSP-4 또는 이의 변이체 또는 다양체에 접합되거나 그렇지 않으면 결합될 때 최상의 작용을 하는 것으로 알려져 있기 때문에, 이를 이용함에 있어서 단점이 많다. 생물학적으로 활성 웨티드와 혼합될 수 있고, 이의 작용을 위하여 화학적으로 결합을 요구하지 않는 더 효과적인 전달 폴리웨티드가 Morris *et al.*, 상기에서, "Pep-1"으로 설명되는데, 이 웨티드는 양친매성 아미노산 서열 KETWWETWWTEWSQPKKRKV (서열 번호: 11)을 보유한다 . Pep-1은 3개 도메인으로 구성된다:

(1) 5개의 Trp 잔기가 포함된 소수성 Trp-풍부한 모티프

[0262] KETWWETWWTEW (상기 서열 번호: 11의 잔기 1-12). 이 모티프는 세포 막의 효과적인 표적과 단백질과의 소수성 상호작용에 진입하는데 바람직하거나 또는 요구되며;

[0263] (2) 친수성 Lys-풍부 도메인 K KKRKV (서열 번호: 11의 6개 C-말단 잔기), 이것은 SV40 바이러스 큰 T 항원의 핵 국소화 서열로부터 유도되며, 세포내 전달 및 웨티드 용해도를 개선시키고; 그리고

[0264] (3) 스페이스 "도메인" SQP (서열 번호: 12의 3개 내부 잔기), 이는 상기 2개 활성 도메인을 분리시키고, 친수성 및 소수성 도메인 모두의 유연성 및 통합성을 개선시키는 Pro를 포함한다.

[0265] 따라서, 본 발명의 또 다른 구체에는 상기에서 설명된 CSP-4 또는 이의 기능적 유도체, 그리고 이에 결합된 또는 이들과 연합된 전달 또는 전위-분자 또는 모이어티가 포함된 운반가능한 웨티드 또는 폴리웨티드이다. 상기 전달 분자는 다음의 웨티드 또는 폴리웨티드일 수 있는데, 이를 테면,

[0266] (a) HIV-TAT 단백질 또는 이의 전위적으로 활성 유도체,

[0267] (b) 서열 RQIKIWFQNRRMKWKK (서열 번호:8)을 보유하는 페네트라틴,

[0268] (c) 서열 RQIKIFFQNRRMKWKK (서열 번호:7)을 보유하는 페네트라틴

- [0269] 변이체 W48F,
- [0270] (d) 서열 **RQIKIWFQNRRMKFKK**, 서열 번호: 13)의 서열을 보유하는 페네트라틴 변이체 W56F,
- [0271] (e) 서열 **RQIKIWFQNRRMKFKK**, 서열 번호: 16)을 보유하는 페네트라틴
- [0272] 변이체
- [0273] (f) 서열 **GWTLNSAGYLLGKINLKALAALA KKIL** (서열 번호: 10)의 서열을 보유하는 트란스포르탄,
- [0274] (g) 단순 헤르페스 바이러스 단백질 VP22 또는 상이한 페르페스 바이러스로부터 유도된 이의 전위적으로-활성 상동체, 이를 테면 MDV 단백질 UL49; 또는
- [0275] (h) 서열 **KETWWETWWTEWSQP KKKRKV** (서열 번호:9)의 서열을 보유한 Pep-1.
- [0276] 상기에서 논의된 전달 모이어티, 이를 테면 상기 웨티드 및 단백질이 본 발명의 생물학적으로 활성 웨티드에 접합되거나 또는 융합될 때, 상기 전달 모이어티는 생물학적으로 활성 웨티드의 N-말단에 있는 것이 바람직하다.
- [0277] **조성물의 시험관내 테스트**
- [0278] 본 발명의 화합물은 이들의 생물학적 활성, 이를 테면, 항-섬유증 활성, uPA, uPAR 및 PAI-1 mRNAs의 발현에 영향을 주는 이들의 능력, 폐 섬유모세포의 증식을 저해시키는 능력, 등등에 대하여, 본 명세서에서 설명되거나 및/또는 구체화된 임의의 하나의 분석 또는 당분야에 공지된 다른 분석을 이용하여 테스트된다.
- [0279] **조성물의 생체내 테스트**
- [0280] BLM-처리된 마우스에서 폐 섬유증을 저해하는 화합물 (이를 테면 NTL 유사체 또는 CSP-4 변이체들 또는 유도체 또는 웨티드 다량체의 능력은 상기 화합물의 기능 활성을 평가하기 위한 선호되는 테스트다. 동일한 유형의 활성을 측정하는 당분야에 공지된 기타 테스트 또한 이용될 수 있다.
- [0281] **폐 손상과 섬유증을 방지 또는 치료하는 방법**
- [0282] 본 명세서에서 설명된 화합물 및 조성물은 시험관내 또는 생체내 p53 단백질과 MDM2의 상호작용을 저해하는 방법, 그리고 ALI 및 폐 섬유증/IPF와 연합된 질환 또는 상태를 치료하는 방법에 이용된다.
- [0283] **약학적 그리고 치료요법적 조성물과 이들의 투여**
- [0284] 본 발명의 약학 조성물에 이용될 수 있는 화합물은 NTL, 그리고 상기에서 설명된 모든 상기 웨티드 화합물, 뿐만 아니라 이들 화합물의 약학적으로 수용가능한 염을 포함한다. "약학적으로 수용가능한 염"이란 본 발명의 화합물의 생물학적 효과 및 성질을 유지하는 통상적인 산-추가 염 또는 염기-추가염을 말하며, 적절한 비-독성 유기 또는 무기 산 또는 유기 또는 무기 염기로부터 형성된다. 예시적인 산-추가 염은 무기 산, 이를 테면 염산, 브롬산, 황산, 술팜산, 인산, 그리고 질산으로부터 유도된 것들과, 유기 산, 이를 테면 p-톨루엔솔폰산, 살리실산, 메탄솔폰산, 옥살산, 숙신산, 구연산, 말산, 퓨마르산, 그리고 이와 유사한 것들로 부터 유도된 것들을 포함한다. 예시적인 염기-추가 염은 수산화 암모늄, 수산화 칼륨, 수산화 나트륨 및 4가 수산화 암모늄, 이를 테면 예를 들면, 수산화 테트라메틸암모늄으로부터 유도된 것들을 포함한다. 약학 화합물 (가령, 약물)의 염으로의 화학적 변형은 화합물의 개선된 물리적 그리고 화학적 안정성, 흡습성, 유동성 및 용해도를 획득하기 위하여 약학 화학자들에게 잘 공지된 기술이다. 이를 테면, H. Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (6th Ed. 1995), pp. 196 및 1456-1457 참고.
- [0285] 상기에서 언급된 바와 같이, 본 발명의 화합물은 p53 단백질과 MDM2의 상호작용을 저해하는 능력을 보유하고, 급성 폐 손상, 특히 폐 섬유증의 치료에 이용된다.
- [0286] 본 발명의 상기 화합물, 뿐만 아니라 이의 약학적으로 수용가능한 염은 통상적인 투약형, 이를 테면 캡슐, 침지형(imregnated) 웨이퍼(wafers), 테블릿 또는 바람직하게는, 주사가능한 조제물에 통합될 수 있다. 고형 또는 액체 약학적으로 수용가능한 운반체가 이용될 수 있다. "약학적으로 수용가능한", 이를 테면 약학적으로 수용가능한 운반체, 부형제, 등은 특정 화합물이 투여되는 개체에게 약물학적으로 수용가능한 그리고 실질적으로 비-독성이라는 것을 의미한다.
- [0287] 고체 운반체들 전분, 락토오스, 황산칼슘 이수화물, 백토(terra alba), 슈크로스, 활석, 젤라틴, 한천, 퀘틴, 아카시아, 마그네슘 스테아레이트, 그리고 스테아르 산을 포함한다. 액체 운반체는 시럽, 땅콩유, 올리브 유,

염수, 물, 텍스트로즈, 글리세롤 그리고 이와 유사한 것들을 포함한다. 유사하게, 운반체 또는 희석제는 임의의 연장된 방출 물질, 이를 테면 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트, 단독으로 또는 밀랍과 혼합된 것들이 포함될 수 있다. 액체 운반체가 이용될 때, 조제물은 시럽, 엘류시르, 에멀젼, 연질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사액(이를 테면, 용액), 이를 테면 앰플, 또는 수성 또는 비 수성 액체 혼탁액의 형태일 수 있다. 이러한 약학 조성물의 요약은 예를 들면, Gennaro, AR, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 21st Ed, 2005(또는 최근판)에서 찾아볼 수 있다.

[0288] 상기 약학 조제물은 테블릿 형태가 필수적인 경우 혼합, 과립화 및 압착과 같은 단계가 관련된 약학 화학의 통상적인 기술, 또는 경구, 비경구, 국소, 경피, 질내, 음경내, 비강내, 기관지내, 두개내, 안구내, 귀안 및 직장 투여를 위한 바람직한 산물을 제공하기 위하여 적절하게 성분을 혼합, 충전 및 용해시키는 단계가 관련된 약학 화학의 통상적인 기술에 따라 만들어 진다. 상기 약학 조성물은 소량의 비독성 보조 물질, 이를 테면 가습제 또는 유화제, pH 완충제, 및 기타 등 등을 또한 포함할 수 있다.

[0289] 본 발명은 다수의 동물 속 및 종의 치료에 이용될 수 있으며, 인간 또는 수의학적 분야에 대등하게 적용가능하다. 따라서, 상기 약학 조성물은 새가 포함된 가축 및 상업적 동물, 더욱 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0290] 용어 "전신 투여"는 본 명세서에서 설명된 조성물 또는 물질 이를 테면 NTL 또는 상기 펩티드가 개체의 순환계 안으로 도입되거나 또는 이를 테면, 정맥(i.v.) 주사 및 주입을 통하여 신체로 확산되는 것이 허용되는 방식으로 투여되는 것을 지칭한다. "지역적(Regional)" 투여는 특정한 그리고 다소 해부학적으로 더욱 제한된 공간, 이를 테면 바람직한 경로로써 폐 안으로 점적주입, 또는 늑막안으로, 복막 안으로, 척추강내, 경막하, 또는 특정 장기에 투여되는 것을 말한다. 다른 예로는 폐에 접적 주입되는 것에 대응하는 비강내, 기관지내, 귀안, 또는 안구내, 기타 중등의 것들이 포함된다. 용어 "국소 투여"는 제한된 또는 국한된 해부학적 공간으로 조성물 또는 약물의 투여를 말하는데, 이를 테면 피하(s.c.) 주사, 근육내(i.m.) 주사가 된다. 당업자는 국소 투여 또는 지역적 투여에 의해 흔히 조성물이 순환계 안으로 진입되는 결과를 야기하고, 가령, s.c. 또는 i.m. 또한 전신 투여를 위한 경로가 된다는 것을 인지할 것이다. 점적가능한(Instillable), 주사가능한 또는 주입가능한 조제물은 용액 또는 혼탁액, 주사 또는 주입전 액체 안에 용액 또는 혼탁액으로 적합한 고형, 또는 에멀젼의 형태로 조제될 수 있다. 선호되는 지역적 투여 경로는 폐 안으로 투여되는 경로이지만, 상기 약학 조성물은 전신으로, 또는 국소적으로, 별개의 형태로, 또는 동시에 경피를 통하여, 폐안으로 점적 주입에 의해 투여될 수 있다.

[0291] 본 발명의 조성물의 기타 약학적으로 수용가능한 운반체는 리포좀인데, 활성 폴리펩티드가 포함된 약학 조성물은 지질 층에 접한 수성 동심 층으로 구성된 소체에 분산되거나 또는 다양하게 존재한다. 상기 활성 폴리펩티드는 바람직하게는 수성 층 안, 그리고 지질 층의 내부 또는 외부에 존재하거나, 또는 임의의 경우, 리포좀 혼탁액으로 일반적으로 공지된 비-균질성 시스템에 존재한다. 소수성 층, 또는 지질층은 일반적으로 인지질, 이를 테면 레시틴 및 스팅고미엘린, 스테로이드, 이를 테면, 콜레스테롤, 다소 더 많은 또는 더 적은 이온성 계면 활성 물질, 이를 테면, 디세틸포스페이트, 스테아릴아민 또는 포스파티딘산, 및 또는 소수성 성질의 다른 물질을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 당업자는 본 리포좀 제제의 다른 적절한 구체예들을 인지할 것이다.

[0292] 투여되는 치료요법적 투약량은 당업자에게 공지된 또는 용이하게 확인가능한 치료요법적으로 효과적인 양이다. 이 투여분량은 수령자의 연령, 건강, 및 체중, 현재 치료 유형(존재할 경우), 치료 빈도, 그리고 원하는 효과의 성질에 따라 또한 달라진다.

치료요법적 방법

[0294] 본 발명의 방법들은 폐 섬유증 또는 IPF의 치료를 요하는 개체에서 이를 치료하는데 이용될 수 있다. 용어 "치료하는"이란 최소한 다음의 것을 포함하는 것으로 광범위하게 정의된다: 치료되거나 예방되어야 할 질환 또는 상태의 증상의 심각성 또는 재발되는 빈도 및/또는 재발까지의 시간이 포함된, 질환 또는 상태의 발생 또는 재발을 저해시키고, 감소시키고, 개선시키고, 방지하고, 줄인다. 이는 상피 세포 사멸을 저해시키고, 섬유모세포 증식을 저해시키고, IPF와 연합된 또는 이의 원인이 되는 것으로 본 명세서에서 공개된 기타 생물학적 또는 생화학 기전중 임의의 것을 저해시킨 결과로 발생될 수 있다.

[0295] 상기 NTL, NTL 유사체, 또는 펩티드 또는 펩티드 유도체 또는 이의 약학적으로 수용가능한 염은 상기에서 설명한 것과 같이 바람직하게는 약학 조성물의 형태로 투여된다.

[0296] 상기 화합물의 투여분량(doses)은 바람직하게는 상기 NTL 또는 펩티드의 효과량이 포함된 약학적 투여 단위를

포함한다. 투여량 단위형은 포유류 개체에 있어서 단일 투여분량으로 적합한 물리적인 별개의 단위를 지칭하는데; 각 단위에는 필요한 약학 운반체와 연합되어, 원하는 치료요법적 효과를 생산하기 위하여 산출된 활성 물질의 예정된 양이 포함된다. 본 발명의 투약형 단위형에 대한 처방서는 (a) 활성 물질의 독특한 특징과 획득하고자 하는 특정 치료요법적 효과, 그리고 (b) 개체의 치료와 민감성에 대하여 이러한 활성 화합물을 조제하는 분야에서 고유한 제약에 따라야 하며, 그리고 직접적으로 의존적이 된다.

[0297] 효과량은 생체내에서 합당한 농도 또는 항정 상태(steady state) 농도를 얻고, 이로 인하여 질환의 임의의 관련 매개변수에서 측정가능한 감소를 야기하는데 충분한 양을 말한다.

[0298] 투여되는 활성 화합물의 양은 상기 NTL, NTL 유도체, 선택된 이의 펩티드 또는 이의 유도체, 정화한 질환 또는 상태, 투여 경로, 수령자의 건강 및 체중, 기타 병행 치료가 있다면 이 병행 치료의 존재, 치료 빈도, 원하는 효과의 성질, 그리고 전문의의 판단에 따라 달라진다.

[0299] IPF에 걸린 또는 걸릴 가능성이 있는 개체, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간을 치료하기 위하여 일일 1회 제공될 경우 선호되는 단일 투여분량은 예를 들면, 점적주입(흡입에 의해)을 통하여 약 0.2 mg/kg 내지 약 250 mg/kg, 바람직하게는 약 10 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이 된다. 이러한 투여분량은 약 3일 내지 1주 또는 그 이상 동안 임의의 부위에 매일 투여될 수 있다. 상기 투여분량은 당업계에서 잘 인지되는 바와 같이 하향 조절될 필요가 있을 수 있지만, 장기 투여 또한 가능하다. 그러나, 전술한 범위는 의견이며, 개인별 치료 섭생에서 변수들이 크기 때고, 이를 선호되는 값으로부터 상당한 이탈도 예상된다.

[0300] 이를 테면, 펌프 시스템 이를 테면 하기에서 설명된 일부 실험에서 이용된 삼투 펌프에 의한 연속 투여의 경우, 약 1-2 주의 일정 동안 전체 투여분량은 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg, 바람직하게는 20-300 mg/kg, 더욱 바람직하게는 50-200 mg/kg 범위가 된다. 이러한 연속 투여분량 섭생 후, 활성 화합물의 전체 농도는 바람직하게는 약 0.5 내지 약 50 μM, 바람직하게는 약 1 내지 약 10 μM 범위가 된다.

[0301] 시험관내에서 자가사멸을 저해 또는 방지하기 위한 상기 활성 화합물의 효과적인 농도 범위는 약 0.5 nM 내지 약 100 nM, 더욱 바람직하게는 약 2 nM 내지 약 20 nM이다. 효과적인 투여분량 및 최정의 투약분량 범위는 본 명세서에서 설명된 방법을 이용하여 시험관내에서 결정될 수 있다.

[0302] 본 발명은 지금 일반적으로 설명되지만, 본 발명은 설명을 위하여 제시되고, 다른 언급이 없는 한, 본 발명을 이에 한정시키고자 하는 의도가 아닌 다음의 실시예를 참고하여 더욱 용이하게 이해될 것이다. 실시예는 본 발명의 선호되는 구체예들을 설명하기 위하여 포함된다. 당업자는 실시예에서 공개된 기술은 본 발명의 실시에서 잘 기능한다고 발명자들이 발견한 기술이며, 따라서 이의 실시를 위한 바람직한 방식을 구성하는 것으로 안주 된다는 것을 인지 해야 한다. 그러나, 당업자는 본 공개 내용에 근거하여, 공개된 특정 구체예에서 많은 변화가 있을 수 있으며, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고, 여전히 유사한 또는 비슷한 결과를 얻을 수 있음을 인지해야 한다.

실시예 I

IPF 폐의 섬유증 병소에서 FL-섬유모세포 p53 발현 감소

[0304] 면역조직화학 (IHC)이 포함된 다양한 시약으로 착색시킨 (도 2a-2i 참고) IPF 환자와 대조군 "정상적인" 개체로부터 폐 단편에서 IPF 조직은 ECM이 밀집된 섬유증 병소를 나타내는 것으로 드러났다. 비멘틴-풍부한 병소에 분산된 FL-섬유모세포는 p53 및 PAI-1 항원에 대해 최소 착색을 나타내었다. 그러나, SP-C, PAI-1, p53 및 활성 카스파제-3 (나타내지 않음)에 대한 면역형광 착색에서 섬유증 병소 주변 폐포 유형 II(ATII) 세포는 p53 및 PAI-1 항원에 대하여 상승된 착색을 나타내며, 활성 카스파제-3에 대해서 양성이며, 이는 둘러싸인 ATII 세포들의 자가사멸을 나타낸다. IHC 결과에서, p53 및 PAI-1의 증가된 발현으로 인하여 섬유증 병소를 감싸는 ATII 세포는 지속적으로 사멸하는 것으로 나타났다. 이를 상처는 최소 기저 p53 및 PAI-1을 보여주는 활성화된 섬유모세포에 의해 대체되고, ki-67 착색의 증가는 p53 및 PAI-1 발현의 억제로 인한 증식을 나타낸다.

실시예 II

IPF 폐의 인간 FL-섬유모세포에서 카베올린-1, p53 및 PAI의 감소와 uPA의 증가

[0305] NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포의 세포 용해물을 면역블랏팅하여, 단백질과 miRNA에서 변화가 나타났다. 도 3a-3b 참고. miR-34a 기저 발현은 FL-섬유모세포에서 상당히 낮았고, 이는 감소된 p53 발현과 p53-uPA 섬유 소용해 성 체계 크로스토크에서 후속적인 변화는 섬유증에 기여한다는 것을 나타낸다. 이러한 변화는 증가된 col-I과 miR-34a의 저해와 연합된다. 이를 결과는 p53-유도된 miR-34a 전사의 증가 또는 miR-34a에 의해 매개된 인간

FL-섬유모세포에서 p53의 안정화는 폐 섬유증을 완화시킨다는 것을 더 보여주었다.

[0309] 실시예 III

[0310] IPF 및 "정상적인" 폐로부터 섬유모세포에 의한 uPA, PAI-1 및 col-I mRNAs의 이질적인 발현

"정상적인" 개체와 IPF 환자 폐조직 또는 NL-으로부터 단리된 전체 RNA는 정량적 RT-PCR를 통하여 uPA, PAI-1 및 col-I mRNA에 대하여 테스트되었으며, 그리고 β -액틴 mRNA의 상응하는 수준으로 표준화되었다. 결과는 도 4a-4b에 나타낸다.

col-I 및 PAI-1 mRNA의 발현은 IPF 폐 조직에서 상당히 증가된 반면, uPA mRNA는 감소되었다. 흥미로운 것은, IPF 폐 조직과는 달리, NL-섬유모세포와 비교하였을 때 FL-섬유모세포에서 col-I 및 uPA mRNA 그리고 PAI-1 mRNA의 더 낮은 수준의 발현이 발견되었다. uPAR 단백질 및 mRNA는 FL-섬유모세포에서 또한 상승된다. 폐 조직에서 상승된 PAI-1은 FL(IPF)-섬유모세포보다 폐 상피 세포 또는 대식 세포에 의한 PAI-1의 발현 증가의 원인이 된다. 이는 IPF 폐의 FL-섬유모세포에서 col-I, uPA 및 uPAR의 증가된 발현과 PAI-1 단백질의 감소와 일치된다 (도 3a 참고).

[0313] 실시예 IV

[0314] 마우스의 FL-섬유모세포 vs. NL-섬유모세포에 의한 uPA 및 PAI-1 차등 발현

BLM 손상후 21일 차에 마우스의 폐에서 단리된 FL-섬유모세포 또는 대조군 마우스의 NL-섬유모세포는 명세서 도체에서 설명된 바와 같이비강내 염에 노출되었다²⁶. NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포의 용 해물은 면역블랏팅되었다. p53, uPA, PAI-1 및 col-I 단백질 발현에서 변화는 NL-섬유모세포 및 FL-섬유모세포의 세포 용해물의 면역블랏팅에 의해 탐지되었다. (도 5a-5d). BLM-유도된 섬유 증을 가진 마우스의 폐 조직의 NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포 또는 대조군 (염수-처리된)에서 총 RNA가 추출되었고, uPA, PAI-1 및 Col-I mRNA에 대해 테스트되었다. 마우스의 NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포의 증식 속도가 비교되었다. IPF 폐의 FL(IPF)-섬유모세포와 일관되게², 뮤린 FL(BLM)-섬유모세포 증식의 기선 속도는 NL-섬유모세포 (염수-처리된 마우스)의 것보다 상당히 더 높았다. p53은 uPA 유전자 전사를 저해시켰고, 동시에 PAI-1 프로모터에 결합되어 PAI-1 mRNA 전사를 증가시켰다³³⁻³⁴. p53은 이들 전사체의 탈안정화를 통하여 uPA 및 uPAR의 발현을 또한 저해하였으며, 한편, PAI-1 전사체는 안정화시켰다²³⁻²⁵. 끝으로, uPA 또는 uPAR의 저해는 p53 발현을 증가시켰고, 하류 PAI-1의 p53-매개된 유도를 증가시켰고, 이로 인하여 세포의 노화와 자가사멸이 증가되었다. 전사 및 전사 후 수준에서 uPA-섬유소용해성 체계의 p53-매개된 조절은 p53 발현 부족으로 인하여 FL-섬유모세포에서 절충된 것으로 결론내렸다. 이로 인하여 이들 세포에서 uPA 및 uPAR는 증가되고, PAI-1은 저해된다.

[0316] 실시예 V

[0317] CSP는 FL(IPF)-섬유모세포에서 miR-34a의 유도를 통하여 p53 발현을 증가시킨다.

NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포는 PBS, CSP 또는 CP로 처리되었고, RNA는 실시간 PCR에 의해 miR-34a에 대해 분석되었다. 또한, FL-섬유모세포는 miR-34a 앤티센스 (miR-34a-AS) 또는 pre-miR-34a (대조군 miRNA와 함께 또는 없이, PBS 또는 CSP 또는 CP 존재하에 배양되었다. 이들 배양물의 조건화된 배지 (CM)는 PAI-1에 대해 면역블랏팅되었고, 세포 용해물(CL)은 p53에 대해 면역블랏팅되었다. 한 실험에서, FL-섬유모세포는 miR-34a-AS, pre-miR-34a 또는 대조군 miR 존부하에 PBS 또는 CSP 또는 CP로 처리되었다. 실시간 PCR에 의해 miR-34a의 변화에 대하여 RNA가 분석되었다. 결과는 도 6a-6c에 나타낸다.

일련의 중첩되는 결손을 CSP에서 만들었으며, 이들 웨티드 단편들은 p53, uPA, PAI-1 및 col-I에서 변화에 대하여 FL-섬유모세포에서 테스트 되었다(도 6d).

CSP는 FL-섬유모세포에서 miR-34a 및 p53 발현을 상당히 증가시켰으나, NL-섬유모세포에서는 아니다. CSP에 의한 p53 유도는 pre-miR-34a 단독의 발현에 의해 모방되었지만, miR-34a-AS에 의한 miR-34a의 저해에 의해 없어졌다. 이는 p53의 유도가 miR-34a-매개된 안정화를 통하여 발생한다는 것을 나타낸다.

CSP 20mer의 결손 분석에서 CSP-4로 명명되며, 서열 FTTFTVT (서열 번호: 1)을 보유한 내부 7개 아미노산 단편은 전장 웨티드의 활성을 보유하는 것으로 나타났다. 이것은 FL-섬유모세포 또는 정착된 폐 섬유증을 가진 마우스에서 CSP-4의 유익한 효과 (도 11a-11d 참고)는 p53과 miR-34a 발현의 조절과 관련된다는 결론을 뒷받침한다.

[0322] 실시예 VI

FL (TPF)-섬유모세포에서 p53 단백질의 Mdm2 매개된 분해 증가.

NL-섬유모세포와 FL-섬유모세포의 용해물은 p53, 및 mdm2에 대하여 면역블랏팅되거나 또는 항-mdm2 항체로 면역침전되고, 연합된 p53 단백질에 대해 면역블랏팅(IB)되었다. 결과에서 FL-섬유모세포에서 mdm2 수준이 상승되었음에도 불구하고, FL-섬유모세포에 존재하지 않는 mdm2-p53 상호작용은 NL-섬유모세포에서 활발한 것으로 나타났다(도 7a-7b 참고). 따라서, p53의 단백질의 MDM2-매개된 분해 증가는 FL-섬유모세포에서 기선 p53 수준의 눈에 띄는 억제의 원인이 되며, mdm2와 p53의 상호작용을 표적으로 하는 본 명세서에서 공개된 치료요법적 중재의 용도를 뒷받침한다.

[0325] 실시예 VI I

FL(IPF)-섬유모세포에서 col-I 발현의 누트린-3 a- (NTL) 또는 CSP-4-매개된 저해: p53-섬유 소용해성 체계 크로스토크의 역할

FL-섬유모세포는 PBS (대조군), 누트린-3a (10 μ M), CSP-4 (10 nM) 또는 Cp에 48hrs 동안 노출되었다. 용해물은 Col-I, PAI-1, p53, 및 uPA의 발현에 대하여 면역블랏팅되었다. 결과는 도 8a-8b에 나타낸다. 배양된 FL-은 비이클 (PBS) 또는 누트린-3a, CSP-4 또는 CP에 노출되었고, 카운트하여 증식을 평가하였다. 결과에서 누트린-3a와 CSP-4는 모두 col-I 발현 및 FL-섬유모세포의 증식을 저해시키는 것으로 나타났다. 이 과정은 p53 및 PAI-1 발현의 유도, 그리고 uPA의 동시 저해와 관련된다.

또다른 실험에서(결과는 도 8c에), FL-섬유모세포는 p53, PAI-1 또는 카베올린-1를 발현시키는 아데노바이러스 벡터 또는 적절한 벡터 대조군으로 형질유도되었고, 그리고 2일간 배양되었으며, 이때 세포 용해물은 Col-I, p53, PAI-1, 및 uPA에 대하여 면역블랏팅되었다. IPF 폐의 FL-섬유모세포를 Ad-Cav-1로 형질유도시키면 p53 및 PAI-1은 유도되었지만, 한편 uPA 및 col-I 발현의 저해되었다. FL-섬유모세포에서 누트린-3a 또는 CSP-4의 효과는 p53 또는 PAI-1 또는 카베올린-1 만을 발현시킴으로써 모방되었다. 따라서, PAI-1의 p53 매개된 저해와 uPA 발현 저해는 col-I의 저해 원인이 된다. 흥미로운 것은, IPF 환자의 폐 또는 BLM-처리된 마우스의 FL-섬유모세포를 재조합 PAI-1 단백질로 처리하면 자가사멸 또는 노화를 유도하지 못하였고(나타내지 않음) 한편 상승된 외생 PAI-1은 시험관 및 생체내 모두에서 ATII 세포 자가사멸을 유도하였다. 외생 PAI-1에 대한 FL-섬유모세포의 저항성은 이들 세포가 IPF 또는 BLM-손상된 폐의 PAI-1 단백질이 풍부한 환경에서 번창할 수 있게 할 것이다.

[0329] 실시예 VIII

NL-섬유모세포에서 col-I 발현 유도에 있어서 p53-섬유소용해성 체계의 크로스토크 역할.

조직학적으로 "정상적인" 인간 폐로부터 단리된 NL-섬유모세포² (S. Shetty et al., 1996, 상기)는 기선 p53 발현을 저해시키기 위하여 p53 shRNA를 가지는 렌티바이러스 벡터로 형질감염되었다. 대조군 세포들은 비-특이적 shRNA를 이용하여 유사하게 처리되었다. 배양물의 조건화된 배지는 PAI-1, uPA, 및 가용성 col-I에 대해 면역블랏팅되었고, 세포 용해물은 p53 및 α -SMA에 대해 테스트되었다. 이들 섬유모세포로부터 단리된 전체 RNA는 정량적 RT-PCR에 의해 uPA, PAI-1 및 col-I mRNA 발현에서 변화에 대하여 분석되었다. 이 결과 (도 9a-9b 참고)는 NL-섬유모세포에서 p53 발현 저해는 uPA, col-I 및 α -SMA를 증가시켰지만, PAI-1은 저해시켰다는 것을 보여준다. 이는 uPA 체계에서 p53-매개된 변화와 섬유증 사이에 본 명세서에서 설명된 연계를 뒷받침한다.

[0332] 실시예 IX

누트린-3a는 BLM-처리된 마우스에서 폐 섬유증을 저해한다.

폐 섬유증을 유도하기 위하여 14d 동안 BLM (또는 대조군에서 염수)에 노출된 마우스에게 누트린-3a (10 mg/kg 체중) (Zhang et al., 상기) 또는 비이클 대조군을 IV 주사하여, 정착된 폐 섬유증에서 효과를 결정하였다. 섬유증은 CT 스캐닝에 의해 평가되었고, Flexivent 시스템을 이용하여 폐기능(순응도 및 저항성)이 측정되었다. 폐 단편은 트리크롬 착색 및 H & E 착색(후자는 나타내지 않음)되어 폐 구조 및 폐 섬유증의 증표가 되는 콜라겐 침착을 평가하였다. 끝으로, 온전한 폐 균질물은 전체 콜라겐 (히드록시프롤린) 및 ECM의 독립적인 평가로써 데스모신 함량에 대해 분석되었다 (Bhandary YP et al., Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol 302:L463-73, 2012; Bhandary YP et al., Am J Pathol, 183: 131-43 2013). 상기 테스트의 결과 (도 10-10d)에서 폐 섬유증에 있어서 누트린-3a의 유익한 효과를 나타낸다. BLM 손상 후 14일에 누트린-3a의 경구 투여는 유사하게 마우

스에서 폐 섬유증을 저해하였다.

[0335] 실시예 X

CSP-4 웨პ티드는 정착된 폐 섬유증을 저해하며, 폐 기능을 개선시킨다.

마우스는 BLM에 노출되어, 폐 섬유증이 유도되었다. 14 d후, 마우스에게 비이클 또는 체중 kg 당 1.5 mg의 CSP-4 (서열 번호:1)를 IV로 주사하였거나, 또는 체중 kg 당 1.5 mg의 대조군 웨პ티드 (동일한 아미노산, CP 의 혼성된 서열; 서열 번호:5)) 또는 비이클은 BLM에 노출된 마우스에게 14d 일찍 IV로 주사하였다. 1주일 후, 폐 섬유증을 평가하기 위하여 CT 스캐닝에 의해 마우스를 테스트하였다. CT 해석(renditions)을 이용하여 동일한 마우스에서 폐 용적이 측정되었다. 폐 단편은 착색되어(트리크롬 및 H&E 착색) 폐 섬유증의 증표가 되는 콜라겐 침착을 평가하였다. 온전한 폐 균질물은 총 히드록시프롤린과 테스모신 함량에 대해 분석되었다 (후자 결과는 나타내지 않음). 결과는 도 11a-11d에 나타낸다. 모든 테스트에서 CSP - 4는 BLM-유도된 폐 섬유증을 저해하였던 것으로 나타났다. 폐의 FL-섬유모세포에서 CSP 및 CSP-4의 시험관 내 효과와 일관되게 (도 6d 참고), CSP-4는 전장 웨პ티드, CSP (서열 번호:3)의 유익한 효과를 모방한, 정착된 폐 섬유증에 대하여 생체내에서 유익한 효과를 발휘하였다.

[0338] 실시예 XI

CSP-4 웨პ티드와 누트린-3a는 FL-섬유모세포의 증식을 저해한다.

14일 일찍 BLM에 노출된 마우스는 CSP-4 또는 이의 대조군 (CP) 또는 누트린-3a IV (실시예 IX와 X에서와 같이)로 처리되었다. 7일 후 폐 단편을 수거한 후, 세포 증식을 평가하기 위하여 Ki-67에 대한 IHC를 하였다 (도 12a 참고). 섬유증 마우스의 폐 단편에서 관찰된 ki-67 항원의 증가된 착색은 누트린-3a 또는 CSP-4의 처리에 의해 상당히 감소되었다. 이를 동물의 폐로부터 단리된 섬유모세포(실시예 X에서 설명된 것과 같이)는 col-I, p53 및 후속 uPA 및 PAI- 1 단백질의 발현에 있어서의 변화를 웨스턴 블랏팅(Western blotting)에 의해 테스트되었고, 정량적 RT-PCR에 의해 mRNA 변화가 테스트되었다 (도 12b-12c 참고). 정착된 BLM-유도된 섬유증을 가진 마우스의 FL-섬유모세포는 폐 손상 없는 마우스의 NL-섬유모세포와 비교하였을 때, uPA 및 col-I mRNA 그리고 단백질 발현을 증가시킨 것으로 나타났다. 이를 세포는 또한 최소한의 p53 및 PAI-1 발현을 보여주었다. 그러나, 누트린-3a로 처리된 마우스의 섬유모세포에서, uPA 및 col-I 단백질 그리고 mRNA 발 현은 상당히 억제되었다. 이러한 변화는 p53 단백질, 및 PAI-1 단백질과 mRNA 발현의 눈에 띄는 유도와 연합 되었으며, p53-섬유 소용해성 체계 크로스토크의 복원이 섬유증을 완화시킨다는 것을 나타낸다.

[0341] 실시예 XII

CSP-4 또는 누트린-3a의 생체외 처리에 의해 섬유증 변화 저해

마우스에서 폐 섬유증을 유도하기 위하여 마우스를 비강내 BLM에 21d 동안 노출시켰고, 마우스를 회생시킨후 , 이를 폐를 잘라내어, 작은 단편을 잘게 부순 후, 배양 배지 안에 넣었다. 이를 조직 시료는 10nM CSP-4 웨პ티드, 대조군 웨პ티드 (CP) 또는 누트린-3a으로 72h 동안 처리되었다. 조건화된 배지 및 조직 용해물은 col- I 및 α -SMA의 변화에 있어서 웨스턴 블랏팅으로 분석되었다. 결과(도 13)에서 섬유증 폐 조직 체외이식편을 CSP-4 또는 누트린-3a로 처리하면, 생체외에서 섬유증이 저해된다는 것을 보여주었다. 전장의 CSP 웨პ티드는 col-I 및 α -SMA (결과 나타내지 않음)의 유사한 저해를 만들었다. 누트린-3a 및 CSP-4는 생체외에서 인간 IPF 폐 조직에게 영향을 주기 위하여 유사하게 작용하는 것으로 예상된다. 본 명세서에서 제공되는 본 발명자의 결과 및 최근 보고 (이를 테면, Bhandary *et al.*, 2012, 2013, 상기)는 uPA 및 PAI-1에서 p53-매개된 하류 변화는 FL-섬유모세포의 생존력을 조절한다는 개념을 강력하게 뒷받침한다.

[0344] 실시예 XIII

FL-섬유모세포에서 p53 발현과 uPA-섬유소용해성 체계의 하류 역전은 생체내 폐 섬유증 을 완화시킨다.

본 명세서에서 보고된 결과 및 기타 보고 (Bhandary YP *et al.*, 2012, 상기) Shetty SK *et al.*, *Am J Respir Cell Mol Biol* 47:474-83, 2012)에서 야생형 (WT) 마우스에게 BLM 이후 14d에 시작되는 CSP 또는 CSP-4의 IP 또는 IV 투여(도 11a-11d) 또는 누트린-3a의 IV 또는 경구투여(도 10a-10d)는 정착된 폐 섬유증을 완화시킨다는 것을 보여준다. 따라서, p53 단백질의 mdm2-매개된 분해와 하류 p53-uPA 체계 크로스토크 상실은 생체내에서 FL-섬유모세포 생존력과 ECM의 생산을 증가시켜, 폐 구조의 파괴와 폐 기능 상실로 이어진다. 환자는 대개 진전된 단계의 IPF (최초 진단 시점에서)에 있기 때문에 , 누트린-3a 및 CSP-4가 정착된 폐 섬유증을 저해시키는 기전이 평가되며, 누트린-3a와 CSP-4의 하류 표적이 확인된다. 이를 연구는 IPF 환자와 BLM 폐 손상으로 인하여

진행된 폐 섬유증을 가진 마우스의 폐 조직을 이 용한다. uPA-, uPAR-, PAI-1- 및 p53-결핍된 마우스를 이용하여 p53-uPA 체계 크로스토크의 기여 및 특이성이 확인된다.

A. 생체외 FL(IPF)-조직을 이용하여 섬 유증에서 누트린-3a 및 CSP-4 처리 효과의 측정

IPF 환자의 새로 절개된 FL-폐 조직은 3 내지 7일간 누트린-3a (10 μ M) 또는 CSP-4 (10 nM)으로 처리된다 (도 13 참고). 폐 조직은 균질화되고, ECM (히드록시프롤린과 테스모신)의 변화에 대하여 테스트되었다. 대조 군은 비이를 또는 대조군 웨티드, CP로 처리된 IPF 환자의 섬유증 폐(FL)-조직 또는 배양 배지에 유지된 순수 (naive) 폐 조직을 포함한다. 다른 대조군은 조직학적으로 "정상적인" 폐로부터 절단된 NL-조직을 포함한다. 이식용으로 적합하지 않는 그리고 의료 연구용으로 기부된 악명의 환자("정상적인" 및 IPF) 폐는 HAM (Edison, NJ) 및 NDRI (Philadelphia, PA)로부터 구하였고, 생체외 연구용으로 이용되었다. 섬유모세포는 이들 조직으로부터 단리되고, p53, uPA, uPAR 및 PAI-1 발현, ECM의 생산의 변화 및 생존력에 대하여 분석되었다. ECM 합성 속도의 변화 또는 측정된다. IPF 환자의 FL-조직 체외이식편은 대조군 개체의 NL-조직 절편에서 발현 수준과 비교하였을 때 ECM의 상승된 합성을 가진다. 그러나, 누트린-3a 또는 CSP-4으로 처리된 FL-폐 체외이식편은 처리안된 또는 비이를 단독 또는 CP에 노출된 것과 비교하여 상당히 감소된 ECM 합성 속도를 보인다. 누트린-3a 또는 CSP-4 처리된 IPF 체외이식편으로부터 단리된 섬유모세포는 상승된 수준의 p53, miR-34a 및 PAI-1, 그리고 감소된 uPA 및 uPAR 발현을 보인다. Akt의 포스포릴화 및 PDGFR- β mRNA과 단 백질의 발현은 누트린-3a 또는 CSP-4로 처리된 IPF 체외이식편의 섬유모세포에서 또한 감소된다. 이들 섬유 모세포의 증식 속도 및 ECM 생산 속도는 처리안된 또는 비이클- 또는 CP-처리된 대조군의 FL-섬유모세포와 비교하였을 때 상당히 더 낮았지만, NL-조직에서 단리된 섬유모세포의 것과는 필적된다.

B. 폐 섬유증 조절에서 p53과 miR-34a의 역할.

상기 결과에 근거하여, FL-섬유모세포에 의한 p53 및 miR-34a 발현 결핍이 폐 섬유증의 원인이 되며, miR-34a 유도를 통하여 누트린-3a 또는 CSP-4에 의한 기선 p53 발현의 복원은 폐 섬유증을 경감시키는 것으로 예측된다. 최대 폐섬유증은 BLM 손상 후 14-28일 사이에 발생하기 때문에(Bhandary YP *et al.*, 2012, 상기 Bhandary YP *et al.*, 2013, 상기 그리고 본 명세서에서 제시된 데이터), BLM 폐 손상후 14일 및 21일차 시점에서 pre-miR-34a 와 함께 pro α 2(I) 콜라겐 프로모터가 포함된 렌티바이러스(LV)를 IV 주사하면 마우스 폐 섬유모세포에서 pre-miR-34a가 발현된다. 폐 섬유증은 28일 후 평가된다. 누트린-3a- 또는 CSP-4-매개된 폐 섬유증 완화에서 miR-34a의 역할은 섬유증 폐에서 pro α 2(I) 프로모터를 이용하여 섬유모세포에서 miR-34a-AS의 LV 발현에 의해 확인된다.

폐 섬유증에 대항하는 유익한 효과에서 p53의 역할은 miR-34a의 저해와 함께 또는 저해 없이 콜라겐 프로모터가 포함된 LV 또는 Ad-p53을 이용하여 정착된 섬유증을 가진 마우스의 폐 섬유모세포에서 p53의 발현에 의해 직접적으로 확인된다. 폐 섬유증 및 miR-34a 발현은 이를 테면, BLM 손상 이후 28일차에 평가된다. 대안으로 또는 추가적으로, p53 발현은 BLM-유도된 폐 섬유증을 가진 WT 마우스에서 LV shRNA를 이용하거나 또는 정착된 폐 섬유증을 가진 p53-결핍된 마우스를 이용하여 저해되었다 (D'avis DW *et al.*, *J Exp Med* 192:857-869, 2000). 그 다음 이들 마우스는 이를 테면, BLM 손상후 14일 및 21일차에 누트린-3a 또는 CSP-4에 노출된다. 폐 섬유증을 가진 대조군 마우스는 비-특이적 sh RNA 또는 순수 WT 마우스에 노출되고, 누트린-3a 또는 CSP-4로 처리된다. 이 마우스는 BLM 손상 개시 후, 이를 테면 28d 시점에 폐 섬유증 및 miR-34a 발현에 대하여 테스트된다. p53-uPA 체계 크로스토크의 원인은 WT, p53-, uPA-, uPAR- 및 PAI-1-결핍 마우스를 BLM에 14-21 d 동안 노출시켜, 폐 섬유증을 유도하고, 상기에서 설명한 바와 같이 섬유모세포에서 miR-34a 발현을 변경시키고, BLM 손상이후 예를 들면 28일 시점에 섬 유증에 대한 이들 효과를 테스트함으로써 확인된다.

C. 누트린-3a 또는 CSP-4에 의한 p53 발현 및 하류 p53-uPA 섬유소용해성 체계 크로스토크 복원으로 폐 섬유 증이 저해된다.

마우스에서 누트린-3a 및 CSP-4에 의해 폐 섬유증 완화에 있어서 p53-uPA 섬유소용해성 체계의 원인은 BML 손상 후, 이를 테면 28d 이후 이들 마우스의 섬유모세포를 단리함으로써 확인된다. 이들 세포는 p53, uPA, uPAR 및 PAI-1 발현 및 ECM의 생산에 서의 변화에 대하여 테스트된다. 우리는 BLM 손상을 가진 마우스 폐로부터 단리된 FL-섬유모세포는 상승된 uPA 및 uPAR, 생존력과 ECM의 생산을 보일 것으로 기대한다. 이들 FL-섬유모세포는 손상안된 폐의 NL-섬유모 세포와 비교하였을 때 최소 p53 및 PAI-1 발현을 보인다. 그러나, BLM-유도된 섬유증을 가진 마우스의 폐로부터 얻은 누트린-3a 또는 CSP-4에 노출된 섬유모세포는 상승된 p53을 보여준다. 이들 세포는 ECM 최저 생산으로 증식성이 덜하다. BLM 손상된 마우스에서 얻은 FL-섬유모세포와 비교하였을 때 uPA 및 uPAR 발현은 감소된 반면, PAI-1은 증가된다. BLM+누트린-3a 또는 BLM+CSP-4 처리된 마우스의 폐 섬유모세포에

서 uPA, u PAR 및 PAI-1 수준은 손상안된 마우스로부터 단리된 NL-섬유모세포와 필적한다.

[0354] p53-uPA 체계 크로스토크의 관련성을 확인하기 위하여, BLM 손상된 마우스 폐로부터 추출된 FL-섬유모세포는 Ad-p53로 형질유도된다. 누트린-3a 또는 CSP-4에 노출된 BLM 손상된 폐의 섬유모세포는 양성 대조군이며, 한편 CP 또는 Ad-EV에 노출된 것은 음성 대조군이다. 이들 세포는 uPA, uPAR 및 PAI-1의 변화에 대하여 테스트 된다.

[0355] Ad-p53의 형질유도 또는 누트린-3a 또는 CSP-4으로 처리는 PAI-1을 증가시키고, uPA 및 uPAR 발현을 저해시킨다. 이들 세포는 CP 또는 Ad-EV에 노출된 FL-섬유모세포와 비교하였을 때, ECM 생산 및 증식율을 억제 한다. BLM 마우스의 FL-섬유모세포는 상당히 낮은 수준으로 카베올린-1을 발현시키고, 카베올린-1의 발현은 과도한 ECM 생산을 경감시킨다. 따라서, FL-섬유모세포에 Ad-Cav-1을 형질도입시켜, uPA 섬유소용해 성 체계에서 p53 및 p53-매개된 하류 변화, ECM 및 세포의 생존력이 Ad-EV 처리된 것들과 비교하였을 때 감소되었는지를 확인한다.

D. 폐 섬유증 완화에서 Akt 포스포릴화 저해에 있어서 누트린-3a- 또는 CSP-4-매개 역할

[0357] FL-섬유모세포는 상승된 Akt의 포스포릴화와 생존 신호를 제공하는 PDGFR- β 의 발현을 나타낸다(Stambolic V et al. Mol Cell 8:317-25, 2001; Li J et al. J Environ Pathol Toxicol Oncol 23:253-66, 2004; Hoyle GW et al. Am J Pathol 154:1763-75, 1999; Meinecke AK et al. Blood 14:119 :5931-42, 2012). 더욱이, p53는 PTEN 발현을 증가시키고 (Stambolic et al., 상기; Mayo LD, et al. J Biol Chem 277:5484-89, 2002) PDG FR- β 를 저해하고(Widau RC et al., Mol Cell Biol 32:4270-82, 2012; Thornton JD et al, Cell Cycle 4: 1316-9, 2005) 한편 PAI-1은 Akt 포스포릴화를 저해한다 (Shetty SK et al., 2012, 상기; Stambolic et al., 상기, Malinowsky K et al. Transl Oncol 5:98-104, 2012). FL-섬유모세포에 Ad-Cav-1의 형질유도는 증가된 PTEN 활성을 통하여 Akt 포스포릴화를 저해시킨다 (Tourkina E et al. Open Rheumatol J. 6:116-22, 2012; Wang XM et al. J Exp Med 203:2895-906, 2006; Xia H et al. Am J Pathol 176:2626-37, 2010).

[0358] 본 명세서에서 제공된 결과에서 누트린-3a와 CSP-4는 FL-섬유모세포에서 p53을 증가시키고, ECM의 생산을 억제하며, 그리고 BLM-유도된 폐 섬유증을 완화시킨다는 것을 보여준다. 따라서, 본 발명자들은 p53의 유도 및 p53-uPA 섬유소용해성 체계 크로스토크에서 변화로 인하여, FL-섬유모세포에서 Akt 저해와 PDGFR- β 생존 신호의 저해는 섬유증을 완화시킨다고 생각하였다. 이를 테스트하기 위하여, BLM 손상된 마우스 폐의 FL-섬유모세포는 Akt의 포스포릴화 및 PDGFR- β 의 발현에 대하여 테스트된다. 반응은 BLM 손상 후 누트린-3a 또는 CSP-4 또는 CP로 처리된 마우스에서 추출된 섬유모세포와 비교한다. BLM 손상된 마우스의 FL-섬유모세포는 최저 기선 p53 발현과 Akt의 상승된 포스포릴화를 가질 것으로 예상된다. PDGFR- β 발현은 FL-섬유모세포에서 증가되는 것으로 예측된다. 누트린-3a 또는 CSP-4로 처리된 마우스의 섬유모세포에서 p53은 증가되어, Akt 포스포릴화 및 PDGFR- β 발현이 저해된다. BLM 손상된 마우스의 FL-섬유아세포는 더 많은 uPA 및 uPAR을 발현시키기 때문에, 이를 섬유모세포는 BLM + 누트린-3a 또는 CSP-4로 처리된 마우스의 섬유모세포와 비교하였을 때 증가된 생존력과 ECM을 나타낼 것이다. 그러나, BLM 마우스의 FL-섬유모세포를 Ad-p53 또는 Ad-Cav-1로 형질유도시키면 Ad-EV 처리된 대조군 세포와 비교하였을 때, Akt 및 PTEN의 포스포릴화, PDGFR- β 발현, 세포 생존력 및 ECM의 생산은 감소될 것이다. shRNA를 이용한 p53 저해는 ECM 생산, PDGFR- β 발현 그리고 Ad-Cav-1 또는 누트린-3a 또는 CSP-4에 노출된 FL-섬유모세포의 생존력을 저해할 것이다. 대조군 shRNA 존재하에, Ad-Cav-1 또는 누트린-3a 또는 CSP-4로 형질유도된 FL-섬유모세포와 비교하였을 때, 이들 세포는 상승된 uPA 및 uPAR와 함께 최저 PAI-1을 보일 것이다.

[0359] 본 발명에 따르면, IPF 환자는 대개 진단시점에서 진행된 섬유증 질환을 가지기 때문에, FL-섬유모세포를 표적으로 하는 것은 ATII 세포 자가사멸 또는 상피 간엽 전이의 방지에 있어서 임상적 장점을 가진다. 누트린-3a 및 CSP-4는 손상된 폐에서 NL-섬유모세포 또는 ATII 세포와 비교하였을 때, FL-섬유모세포에서 눈에 띠는 감소된 기선 p53과 상승된 mdm2 발현을 위하여 FL-섬유모세포에서 오직 p53만을 효과적으로 유도한다. 이것은 ATII 세포 카베올린-1 및 p53 발현에서 특히 적용되는데, 이는 IPF 환자 또는 BLM 폐 손상된 마우스의 폐에서 상당히 증가된다. 이러한 경험에 근거하여, BLM 또는 IPF 폐에서 상승된 기저 수준으로 인하여 누트린-3a 또는 CSP-4에 반응하여 ATII 세포에서 p53 추가 유도는 기대되지 않는다. 게다가, 본 발명자들 및 동료들은 카베올린-1과 경쟁함으로써 p53의 ATM-매개된 세린-15 포스포릴화를 차단시킴으로써, CSP 또는 CSP-4가 BLM- 또는 담배연기-유도된 ATII 세포 p53 발현 및 자가사멸을 저해한 것을 발견하였는데(Bhandary et al., 2012, 2013, 상기; Shetty SK et al., Am J Respir Cell Mol Biol 47 :474-83, 2012), 만약 그렇지 않으면 단백질 포스파타제 2A-C에 대한 BLM 손상으로 인하여 ATII 세포에서 유도된다 (Volonte D et al., J Biol Chem 284:5462-66, 2009). 또한, 호중구과 대식세포에서 누트린-3a 작용은 NF- κ B DNA 결합 활성의 p53-매개된 저해 및 전염증성

사이토킨을 통하여 염증에 대항한 유익한 효과를 가질 것이다 (Liu G et al., *J Immunol* 182 :5063-71, 2009).

[0360] 따라서, 누트린-3a 및 CSP-4 종재의 유익함은 임의 잠재적 유해한 또는 표적을 벗어난 효과를 능가한다. FL-섬유모세포에 의한 과도한 증식 및 pro α (I) 콜라겐 생산으로 BLM-유도된 폐 섬유증 마우스에서 BLM-유도된 폐 섬유증에서 LV를 이용하여 FL-섬유모세포에서 pre-miR-34a 및 miR-34a 앤티센스의 효과적인 발현이 이어져야만 한다(Liu X et al., *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol* 298:L819-29, 2010; Merkel O et al., *Cell Cycle* 9:2764-8, 2010).

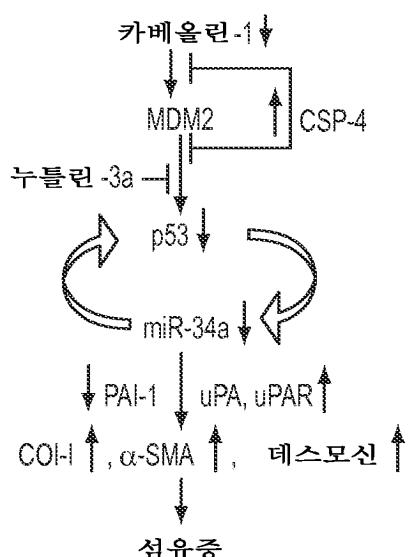
[0361] BLM-손상된 폐를 Ad-cav-1로 형질유도하면 (Wang XM et al. *J Exp Med* 203:2895-906, 2006) BLM 손상 동안 ATII 세포에 의한 카베올린-1 발현의 증가에 도 불구하고 섬유증은 저해된다. 이것은 이들이 정착된 폐 섬유증을 가진 마우스의 NL-섬유모세포 뿐만 아니라 FL-섬유모세포를 형질유도하더라도 p53, pre-miR-34 및 miR-34a 앤티센스의 발현은 여전히 효과적이라는 것을 암시한다.

[0362] 상기 언급된 문헌들은 이들이 특별히 통합되거나 되지 않더라도 본 명세서에 참고자료에 모두 편입된다.

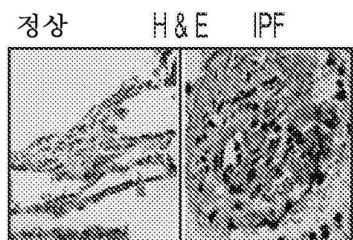
[0363] 본 발명이 지금 충분히 설명되었고, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고, 과도한 실험없이, 대등한 매개 변수, 농도 및 조건 범위에서 본 발명이 실행될 수 있음을 당업자는 인지할 것이다.

도면

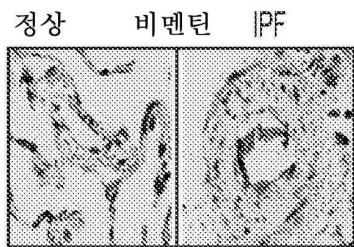
도면1



도면2a



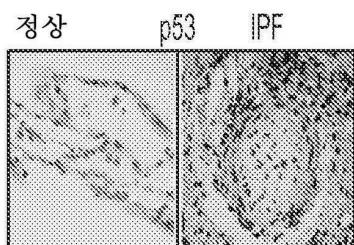
도면2b



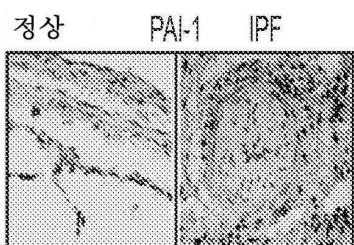
도면2c



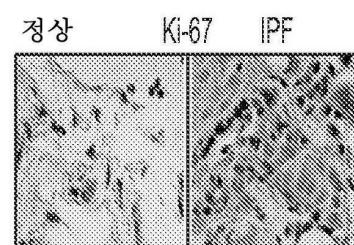
도면2d



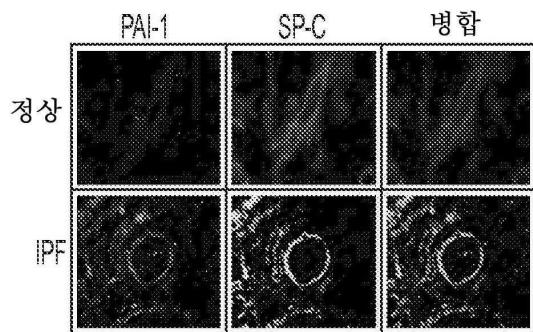
도면2e



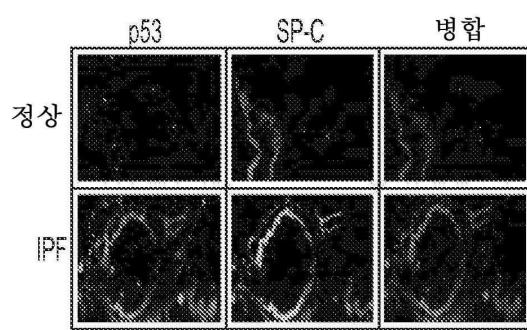
도면2f



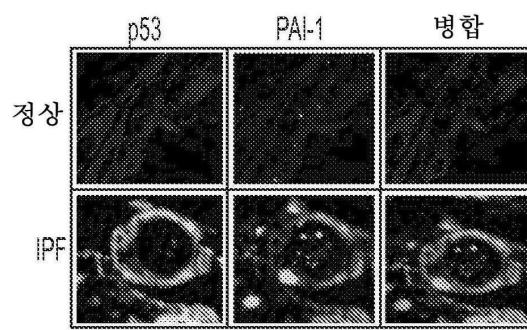
도면2g



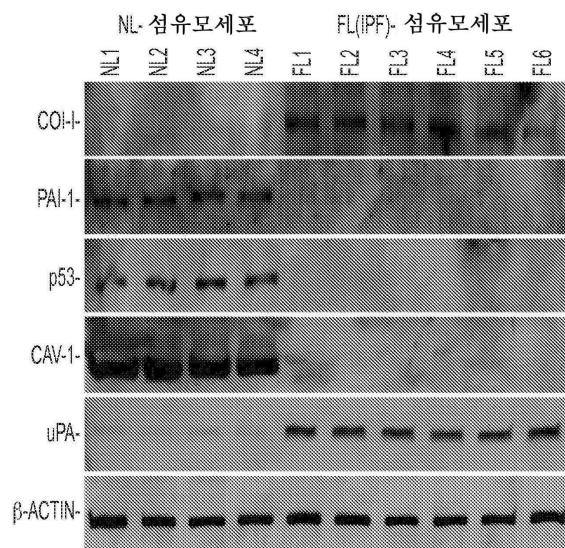
도면2h



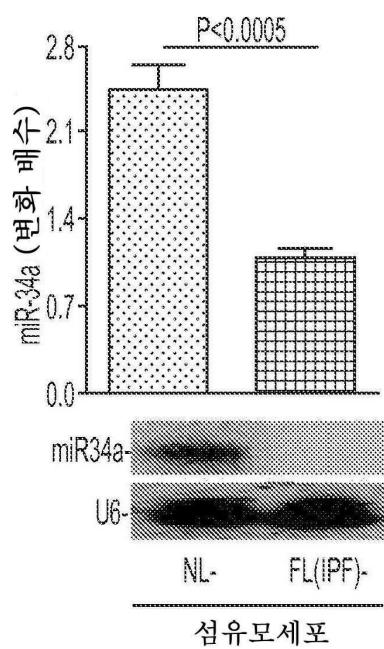
도면2i



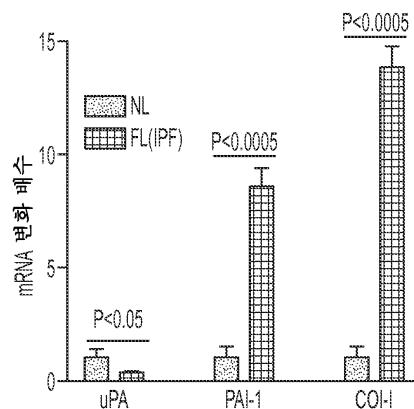
도면3a



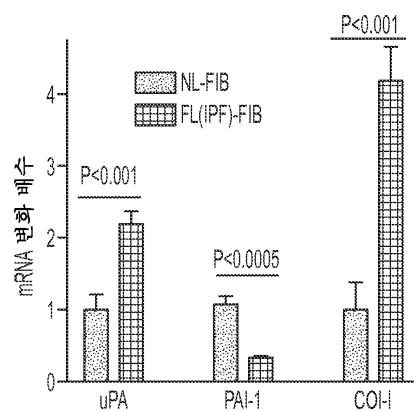
도면3b



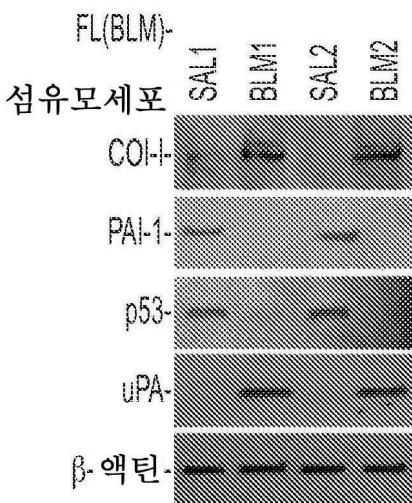
도면4a



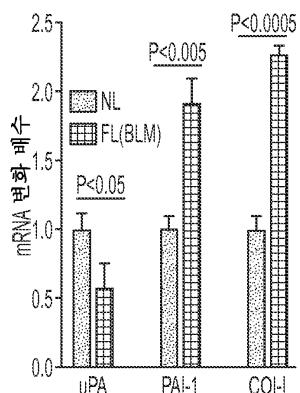
도면4b



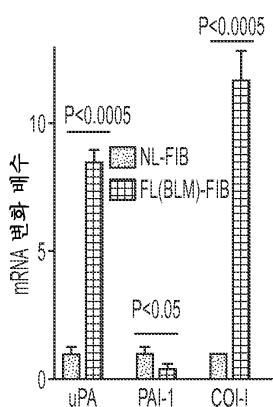
도면5a



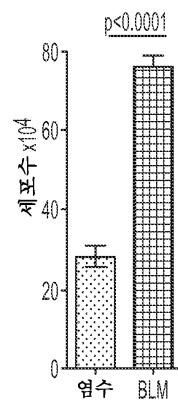
도면5b



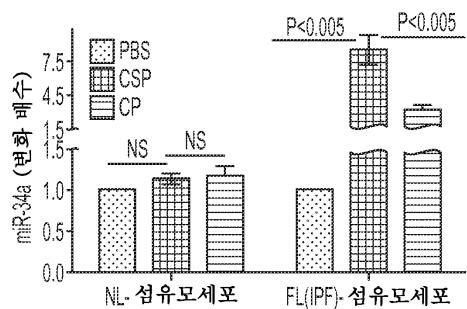
도면5c



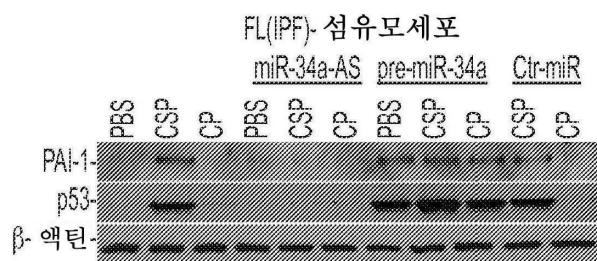
도면5d



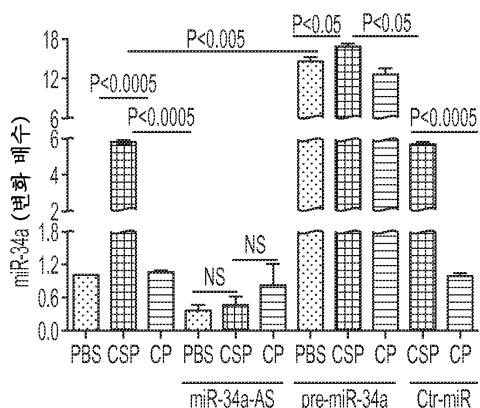
도면6a



도면6b

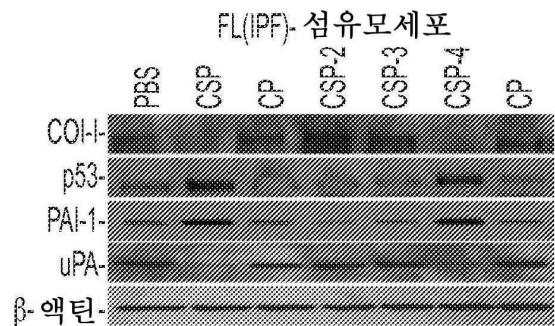


도면6c

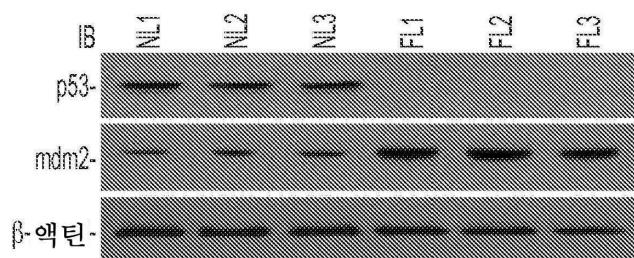


도면6d

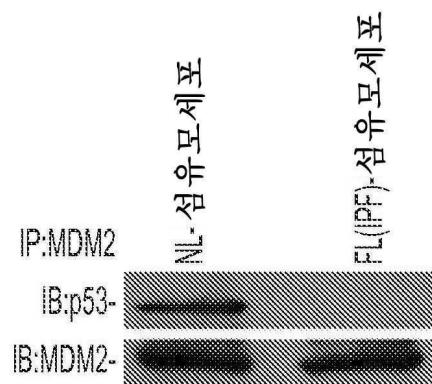
CSP: NH₂-DGIWKASFTTFTVTKYWFYR-COOH
 CSP-2: DGIWKASFTTFTVTKYWFYR
 CSP-3: KYWFYR
 CSP-4: FTTFVTKYWFYR
 CP: NH₂-WGIDKAFFTTSTVTVKWFYR-COOH



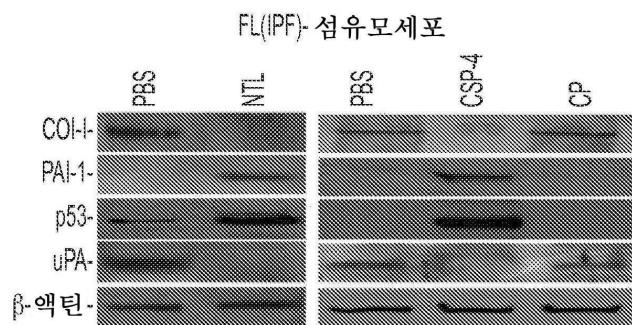
도면7a



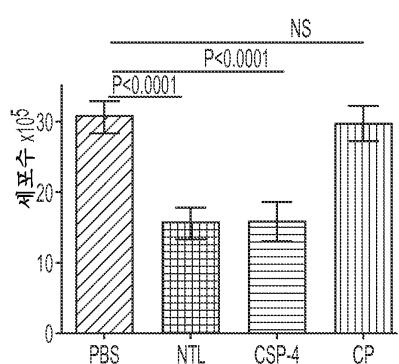
도면7b



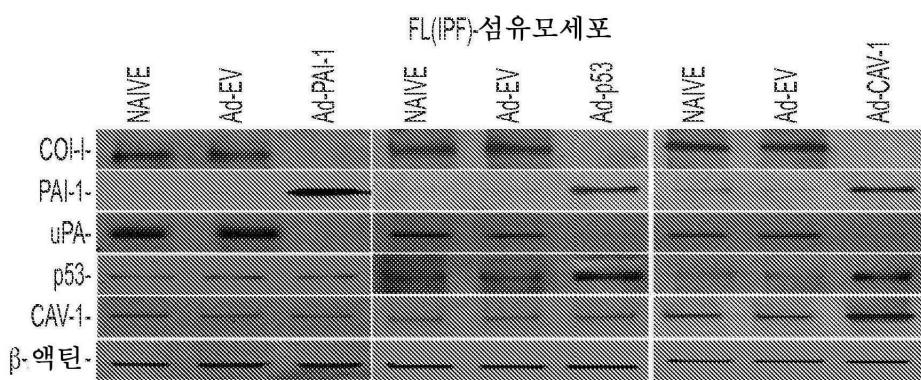
도면8a



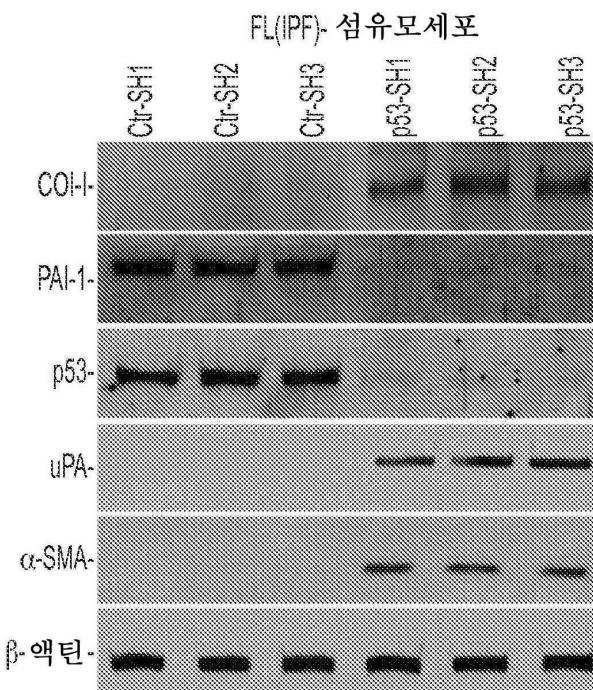
도면8b



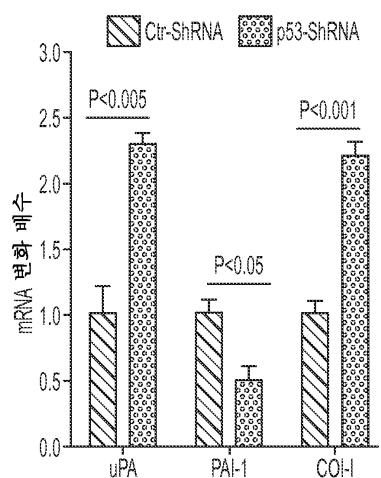
도면8c



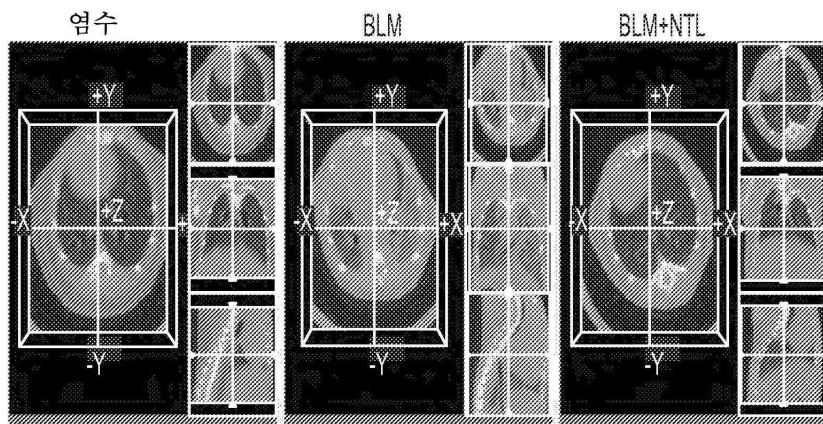
도면9a



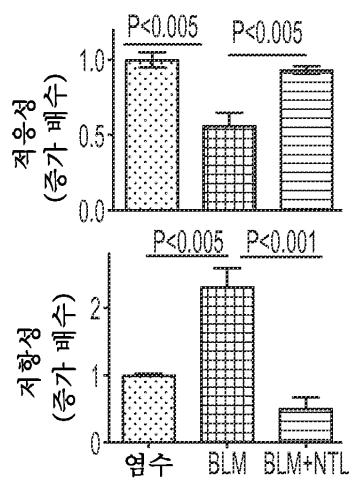
도면9b



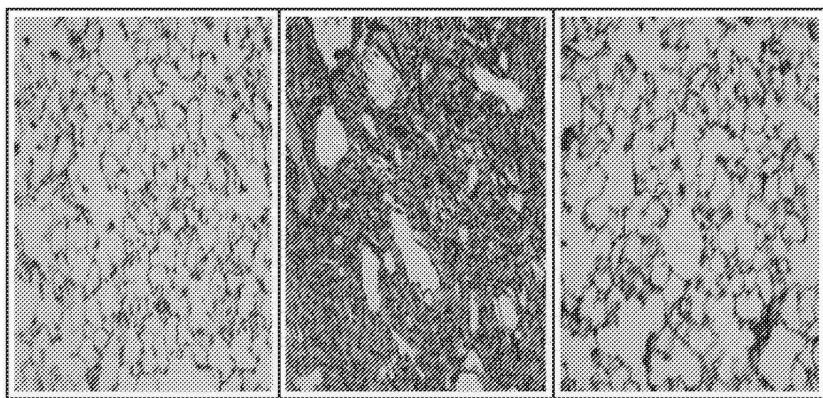
도면 10a



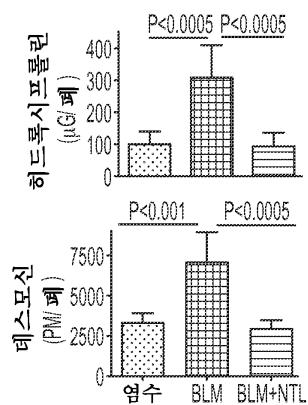
도면 10b



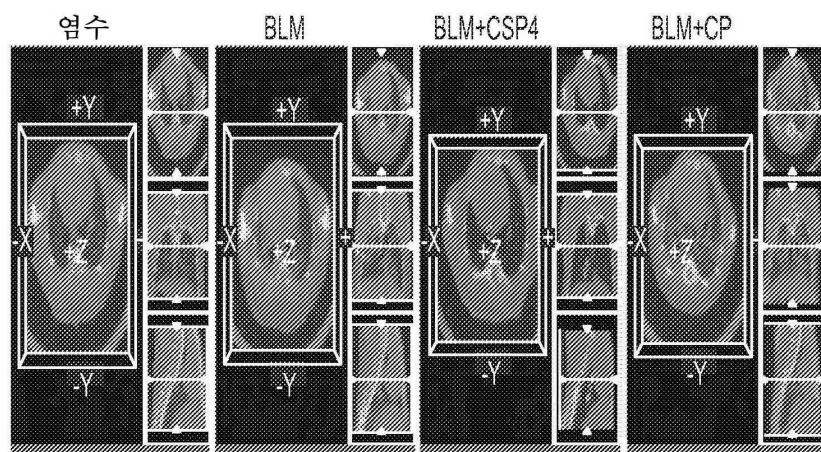
도면 10c



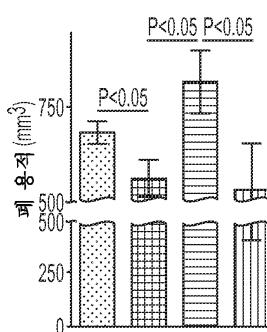
도면 10d



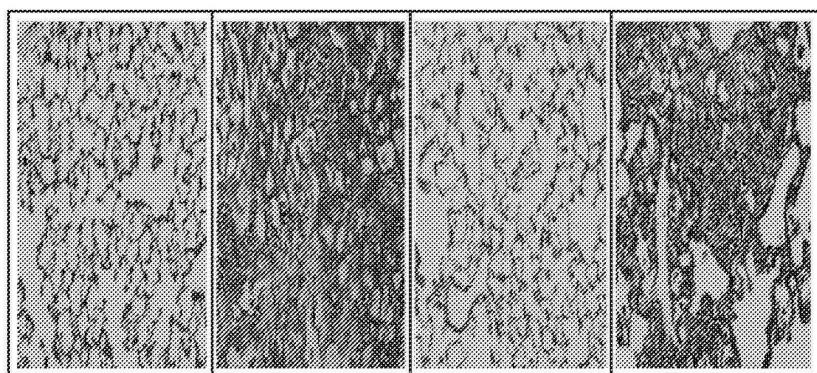
도면 11a



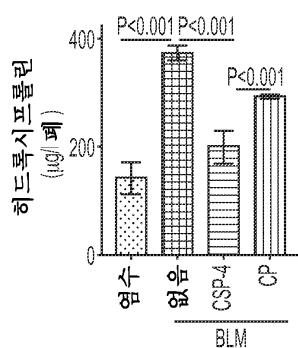
도면 11b



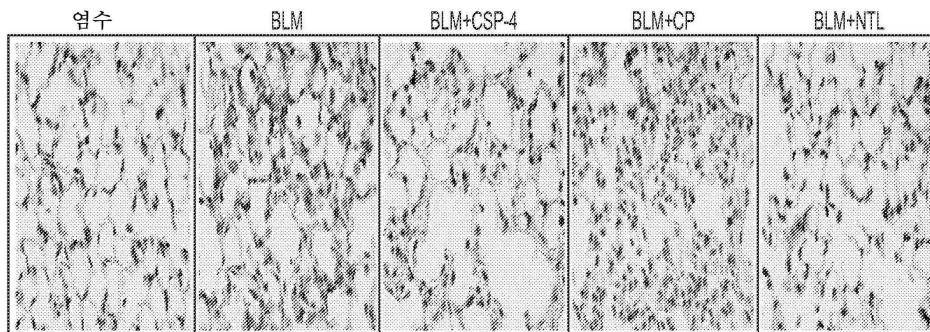
도면 11c



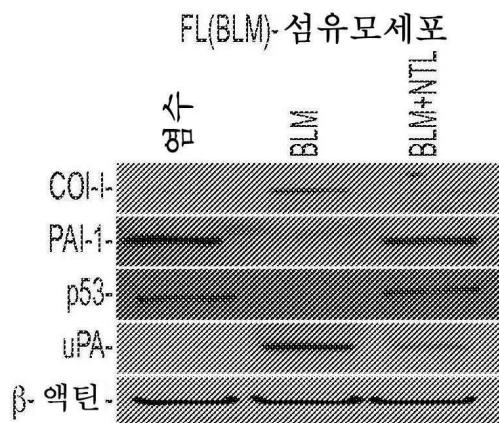
도면 11d



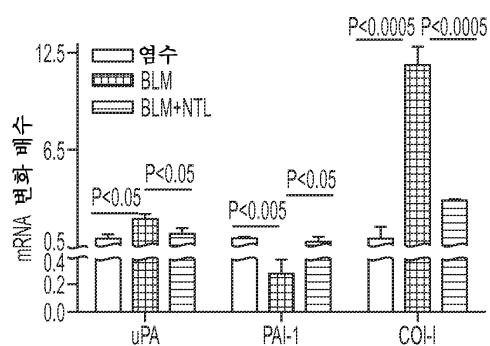
도면 12a



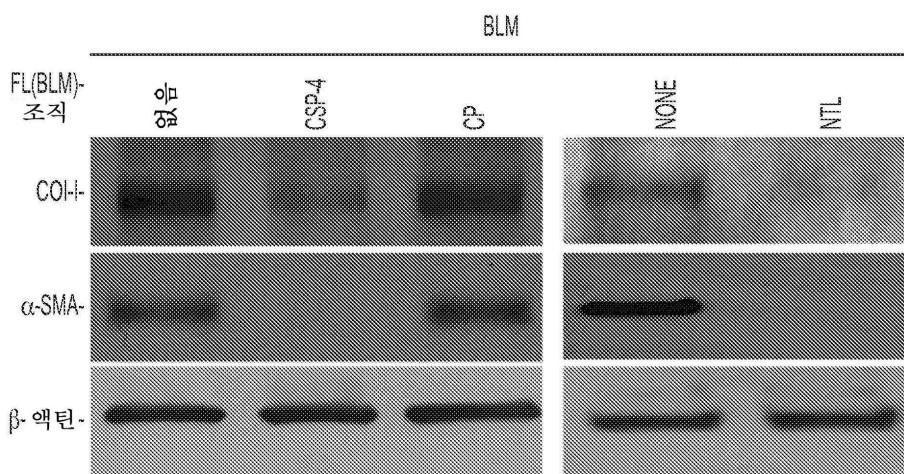
도면12b



도면12c



도면13



서 열 목록

<110> Board of Regents, The University of Texas System

<120> INHIBITION OF PULMONARY FIBROSIS WITH NUTLIN-3A AND PEPTIDES

<130> SHETTY-2A/PCT

<150> US 61/800,117

<151> 2013-03-15

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 1

Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr

1 5

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide - Scaffolding domain of human caveolin-1

<400> 2

Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Tyr

1 5 10 15

Trp Phe Tyr Arg

20

<210> 3

<211> 178

<212> PRT

<213> human Caveolin-1

<400> 3

Met Ser Gly Gly Lys Tyr Val Asp Ser Glu Gly His Leu Tyr Thr Val

1 5 10 15

Pro Ile Arg Glu Gln Gly Asn Ile Tyr Lys Pro Asn Asn Lys Ala Met

20 25 30

Ala Asp Glu Leu Ser Glu Lys Gln Val Tyr Asp Ala His Thr Lys Glu

35 40 45

Ile Asp Leu Val Asn Arg Asp Pro Lys His Leu Asn Asp Asp Val Val

50 55 60

Lys Ile Asp Phe Glu Asp Val Ile Ala Glu Pro Glu Gly Thr His Ser

65 70 75 80

Phe Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys

85 90 95

Tyr Trp Phe Tyr Arg Leu Leu Ser Ala Leu Phe Gly Ile Pro Met Ala

100 105 110

Leu Ile Trp Gly Ile Tyr Phe Ala Ile Leu Ser Phe Leu His Ile Trp

115 120 125

Ala Val Val Pro Cys Ile Lys Ser Phe Leu Ile Glu Ile Gln Cys Ile

130 135 140

Ser Arg Val Tyr Ser Ile Tyr Val His Thr Val Cys Asp Pro Leu Phe

145 150 155 160

Glu Ala Val Gly Lys Ile Phe Ser Asn Val Arg Ile Asn Leu Gln Lys

165 170 175

Glu Ile

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 4

Asn Tyr His Tyr Leu Glu Ser Ser Met Thr Ala Leu Tyr Thr Leu Gly

1 5 10 15

His

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 5

Trp Gly Ile Asp Lys Ala Phe Phe Thr Thr Ser Thr Val Thr Tyr Lys

1 5 10 15

Trp Phe Arg Tyr

20

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide -- Penetratin derived from the
third alpha helix of Antennapedia homeodomain

<400> 6

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 7

Arg Gln Ile Lys Ile Phe Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 8

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Phe Lys Lys

1

5

10

15

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 9

Arg Gln Ile Lys Ile Phe Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Phe Lys Lys

1

5

10

15

<210> 10

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide - Transportan

<400> 10

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu

1

5

10

15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

20

25

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 11

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1

5

10

15

Lys Lys Arg Lys Val

20