



등록특허 10-2368159



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월03일

(11) 등록번호 10-2368159

(24) 등록일자 2022년02월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/08 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 7/08 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7028390

(22) 출원일자(국제) 2018년02월28일

심사청구일자 2019년10월16일

(85) 번역문제출일자 2019년09월26일

(65) 공개번호 10-2019-0125373

(43) 공개일자 2019년11월06일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2018/077492

(87) 국제공개번호 WO 2018/157807

국제공개일자 2018년09월07일

(30) 우선권주장

201710115604.4 2017년03월01일 중국(CN)

201710677602.4 2017년08월09일 중국(CN)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130087585 A

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 그의 유도체, 및 그의 적용

(57) 요 약

본 발명에 개시된 것은 폴리펩티드 단편, 폴리펩티드 단편의 유도체, 및 섬유증 질환을 예방 및 치료하기 위한 약물의 제조에서의 폴리펩티드의 유도체의 적용이다.

(52) CPC특허분류

A61P 11/00 (2018.01)

A61P 19/02 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

C07K 7/06 (2013.01)

(72) 발명자

리, 샤오메이

중국, 쓰촨 610000, 청두, 88 사우스 키안 로드,
타이푸 라이프 사이언스 파크 B6-402

위, 웬

중국, 쓰촨 610000, 청두, 88 사우스 키안 로드,
타이푸 라이프 사이언스 파크 B6-402

첸, 샤오홍

중국, 쓰촨 610000, 청두, 88 사우스 키안 로드,
타이푸 라이프 사이언스 파크 B6-402

샤오, 링

중국, 쓰촨 610000, 청두, 88 사우스 키안 로드,
타이푸 라이프 사이언스 파크 B6-402

첸, 루이

중국, 쓰촨 610000, 청두, 88 사우스 키안 로드,
타이푸 라이프 사이언스 파크 B6-402

첸, 맹

중국, 쓰촨 610000, 청두, 88 사우스 키안 로드,
타이푸 라이프 사이언스 파크 B6-402

(56) 선행기술조사문헌

WO1996036349 A1

WO2009043525 A2

Biochim. Biophys. Acta., Vol. 1852, No. 7, pp.
1323-1333(2015.07.)

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., Vol. 23, No.
2, pp. 204-212(2000.08.01.)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53 및 서열번호 54로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 폴리펩티드는 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8 중 어느 하나의 서열을 가지는 것인 폴리펩티드.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 폴리펩티드 서열은 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 또는 서열번호 27인 것인 폴리펩티드.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 폴리펩티드는 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 12, 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 군에서 선택된 것인 폴리펩티드.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 폴리펩티드는 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군에서 선택된 것인 폴리펩티드.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 폴리펩티드는 서열번호 7, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 25 및 서열번호 26의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군에서 선택된 것인 폴리펩티드.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 폴리펩티드는 서열번호 3, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53 및 서열번호 54의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군에서 선택된 것인 폴리펩티드.

청구항 8

청구항 1에 따른 폴리펩티드 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 섬유증 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 섬유증 질환은 TGF- β 사이토카인 및 그의 신호전달 경로의 과다 활성화에 의해 유발된 질병인 것이며,

상기 질환은 류머티즘성 관절염, 폐섬유증, 간섬유증, 경변증, 신장섬유증, 골수섬유증, 심근섬유증, 사르코이드증, 전신경화증, 켈로이드, 화상으로 유도된 비후성 반흔, 증식성 망막증, 녹내장, 백내장, 후낭흔탁, 혈관성 형술, 혈관 수술 또는 혈관 손상 후 혈관 재협착, 낭포성섬유증 및 마르판 증후군으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 약학 조성물.

청구항 10

청구항 8에 있어서,

상기 폴리펩티드는 단일 성분으로 사용되거나, 또는 둘 이상의 폴리펩티드가 조합으로 사용될 수 있는 것인 약학 조성물.

청구항 11

청구항 8에 있어서,

상기 약학적으로 허용가능한 담체는 희석제, 충전제, 부형제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 기포제, 계면활성제, 흡수 강화제, 윤활제, 흡착 담체, 지속적 방출 마이크로스피어, 이식제, 인 시투 형성 미세입자(*in situ forming microparticle*), 리포좀, 마이크로에멀젼, 인 시투 히드로겔(*in situ hydrogel*), 나노입자, 프로테아제 억제제, 생물 접착제, 융합 단백질, 항체 및 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된 것인 약학 조성물.

청구항 12

청구항 8에 있어서,

상기 조성물은 정제, 주사제, 캡슐, 과립, 안제, 흡입제, 연고, 크림, 스프레이, 에어로졸, 젤, 파우더, 안료, 이식물 및 로션으로 이루어진 군에서 선택된 제형인 것인 약학 조성물.

청구항 13

청구항 8에 있어서,

상기 조성물은 경구 투여, 폐 투여, 비강 투여, 경피 투여, 안구 투여, 정맥내 점적(*intravenous drip*), 복강내 주사, 피하 주사 및 근육내 주사로 이루어진 군에서 선택된 투여 경로에 의해 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

본 출원은 2017년 3월 1일에 중국 특허청에 제출된 "폴리펩티드, 그의 유도체, 및 그의 섬유증 질환의 예방 및 치료에서의 적용"이라는 명칭의 중국 특허 출원 제201710115604.4호의 우선권, 및 2017년 8월 9일에 중국 특허청에 제출된 "폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 그의 유도체, 및 그의 섬유증 질환의 예방 및 치료에서의 적용"이라는 명칭의 중국 특허 출원 제201710677602.4호의 우선권을 주장하고, 이들의 개시는 참조에 의해 본 명세서에 포함한다.

[0003] 분야

본 발명은 의학 기술의 분야에 속하며, 섬유증 질환의 예방 및 치료의 분야에 관한 것이고, 구체적으로, 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 그의 유도체, 및 섬유증 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 약제의 제조에서의 적용에 관한 것이다.

배경 기술

단백질은 유기체의 중요한 기반이며, 성장, 발달, 면역 조절, 및 대사와 같은 생리적인 과정을 포함한 생명 활동의 주요 전달자(bearer)이다. 단백질 및 그가 관여된 신호 전달 이상은 질병의 발생 및 발달의 근본 원인이다. 질병을 제어하기 위해 신체의 자체 조절의 이용은 생물의학의 본질적인 사상이다. 그러므로, 단백질은 약물 표적의 원천이고 생물의약품의 중요한 분류(class)이며, 단백질의 기능성 단편은 정밀 약물 사용에 대한 보장을 제공한다. 폴리펩티드는 기능 단백질의 활성 단편이다. 폴리펩티드 단편의 활성이 질병과 관련이 있다는 것이 연구에서 밝혀지면, 이러한 활성 폴리펩티드는 임상 적용 가치를 갖는 약물을 개발하는데 사용될 수 있다. 단백질의 기능성 단편의 연구는 질병의 치료에 대한 이론적인 근거를 제공하고, 단백질의 기능성 단편에 근거한 폴리펩티드 약물의 개발을 위한 더 넓은 영역도 제공한다.

폴리펩티드 약물은 약물 연구 및 개발의 분야에서 분명한 이점을 갖는다: 일반 유기 소분자 약물과 비교하여, 폴리펩티드 약물은 높은 활성, 낮은 용량, 및 낮은 독성 및 부작용과 같은 뛰어난 이점을 갖는다; 반면 단백질 약물과 비교하여, 작은 폴리펩티드는 상대적으로 면역원성이 더 낮고, 높은 순도 및 조절 가능한 품질로 화학적으로 합성될 수 있다. 대부분의 현재 폴리펩티드 약물은 내인성 펩티드 또는 다른 천연 펩티드로부터 유래하거나 그를 모방한다. 구조가 명확하고 작용의 기전(mechanism)이 확실하고, 대사물이 체내에 축적되지 않는 아미노산이며, 독성 및 부작용이 낮다. 현재, 폴리펩티드 합성 기술의 발달로, 폴리펩티드의 생산, 공정 및 순도 문제가 효과적으로 해결되었다. 게다가, 활성 폴리펩티드의 구조-활성 관계를 더 연구함으로써, 폴리펩티드의 생물학적 활성에 필요한 가장 짧은 단편이 발견되어 더 짧은 폴리펩티드가 대체물로서 사용될 수 있다; 또는 아미노산 치환(substitution)은 그의 생물 활성을 증가시키거나 그의 임상적 유해 반응(adverse reaction)을 변화시키는데 사용될 수 있어, 폴리펩티드의 작은 단편이 더 우수한 생체적합성을 가지며, 임상적 유해 반응을 감소시키고, 펩티드 사슬에서 쉽게 소화되는 아미노산을 대체함으로써 효소 가수분해의 속도를 저연시킬 수 있어, 폴리펩티드 약물의 반감기가 효과적으로 연장된다.

그러나, 폴리펩티드 자체는 여전히 폴리펩티드가 효소에 의해 쉽게 가수분해되고, 반감기가 짧고, 생체이용률이 낮다는 것과 같은 일부 단점을 갖는다. 약물의 제조(preparation)에서 폴리펩티드 적용의 문제를 해결하기 위해, 폴리펩티드 약물의 투여 경로를 변화시키는 것 외에, 화학 변형(modification)은 폴리펩티드 약물의 연구 및 개발에서 매우 중요한 연구 방향이 되었으며, 이는 지속 작용(long-acting) 효과를 실현하고 단백질 폴리펩티드 분자의 반감기를 연장하는데 중요한 기술적 수단(mean) 중 하나이다. 폴리펩티드 약물의 특징에 따라, 다양한 수단이 폴리펩티드 약물의 분자 구조를 변형시켜 구조적 디자인 및 화학 변형을 수행하는데 사용되어, 단백질 폴리펩티드 약물의 주사슬(main chain) 구조 또는 결사슬 기(side chain group)를 화학적으로 변형시키는데 적절한 변형 방법 및 변형제(modifier)를 사용하는 것이 그의 분자 크기뿐만 아니라 전하 및 수용체 결합력을 변화시키고, 지방 용해성을 향상시킬 수 있다. 그리고 동시에 변형된 기(group)에 의해 형성된 입체 장해(steric hindrance)는 단백질분해 효소(proteolytic enzymes)에 의해 공격받을 것 같은 부위를 보호하고, 활성 단백질의 분해(degradation)를 저연시키고, 약물의 안정성을 향상시키며, 마지막으로 폴리펩티드의 물리화학적 특성 및 약물동태(pharmacokinetics)를 변화시키고, 폴리펩티드 약물의 장점을 충분히 이용하며, 그의 단점을 극복하거나 심지어 회피한다.

[0008] 현재 공지된 폴리펩티드 변형 방법은 아세틸화 변형, 아미드화 변형(amidation modification), 글리코실화

변형, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 변형, 지방산 변형, 인산화 변형 등을 포함한다. 폴리펩티드 약물에서 주로 사용되는 주사술 말단 변형 방법은 아미노(N) 말단 아세틸화 및 카르복시(C) 말단 아미드화 변형으로, 웨პ티드 사슬의 말단에서 아미노기 및 카르복시기를 각각 보호한다. 기본 원리는 폴리펩티드 분자의 상대적인 분자량 및 입체 장해를 증가시키고, 폴리펩티드 단백질분해 효소의 작용을 유지하거나 억제하고, 폴리펩티드 약물의 안정성을 향상시키고 사구체의 여과 효과를 감소시키는 것이다. 글리코실화 변형은 폴리펩티드 사슬에서의 특정 특수 아미노산의 결사슬 상의 관능기(functional group)로의 단당, 올리고당 또는 다당 구조의 결합이고, 예를 들면, N-글리코실화는 아스파라긴에 의한 결사슬의 아미드 질소의 결합이며, O-글리코실화는 세린 또는 트레오닌 잔기에서 산소에 대한 결합이다. 글리코실화는 결사슬의 입체 장해를 증가시키고 효소에 대한 폴리펩티드의 안정성을 증가시킬 수 있다. 예를 들면, 에리트로포이에틴(erythropoietin; EPO)은 만성 신부전 및 빈혈증을 치료하는데 사용되며, 글리코실화-변형 EPO의 사용 빈도는 주 2 내지 3회에서 주 1회 또는 2주마다 1회로 줄일 수 있다. PEG 변형은 폴리펩티드 주사술 또는 결사슬의 아미노기 또는 카르복시기, 결사슬의 이미다졸릴기(imidazolyl group), 설프히드릴기(sulphydryl group) 또는 히드록시기와 같은 관능기에 다른 PEG 변형제(PEG modifier)를 공유 결합함으로써 변형 산물을 얻는 것이다. PEG 자체는 에틸렌 옥사이드(ethylene oxide)에 의해 중합된 고분자 중합체(macromolecular polymers)로, 다른 구조 및 다른 분자량을 가지며 생체내(*in vivo*)에서 분해될 수 있다. 이는 무독성, 비항원성이며, 상대적으로 높은 소수성 및 생체적합성 및 광범위한 상대 분자 선택(relative molecule choice)의 장점을 갖는다. PEG-변형 폴리펩티드 약물의 용해성이 유의성 있게 증가하고, 생체내 방출이 느리며, 반감기가 연장되고, 입체 장해가 형성될 수 있으며, 면역 반응이 감소되고, 단백질분해(proteolysis)가 억제된다. PEG는 현재 가장 흔히 사용되는 변형제이다. 연구 또는 시장에서 PEG-변형 단백질 또는 폴리펩티드 약물이 다른 변형 방법 대비 더 많다. 세계 최초 PEG-변형 단백질 약물인 PEG-아데노신 탈아미노효소(adenosine deaminase)는 1991년에 FDA에 의해 승인이 되었고, PEG-변형 아스파라기나제(asparaginase), 콜로니-자극 성장 인자, 인터페론 알파 등이 있다. 지방산 변형은 단백질 폴리펩티드 분자에서 특정 특수 관능기에 지방산 구조를 공유 결합하는 변형으로, 아미노기, 카르복시기, 설프히드릴기, 히드록시기 등의 변형을 포함한다. 지방산은 세포막 인지질과 인체 지방 및 지질을 구성하는 성분이다. 그러므로, 지방산 변형은 효과적으로 폴리펩티드 약물의 지용성(liposolubility) 및 흡수를 개선시키고, 폴리펩티드 분자가 효소에 의해 분해될 것 같은 부위를 차단하고, 단백질분해를 저연하거나 억제시킬 수 있다; 지방산은 또한 혈장 일부분에 대한 폴리펩티드 약물의 결합을 강화하여, 체내 약물의 체류 시간을 연장시키는 상대적으로 큰 복합체를 형성한다. 예를 들면, 2형 당뇨병을 치료하는데 사용되며 시판 중인 지방산 변형 폴리펩티드 약물 중 하나인 리라글루ти드(Liraglutide) (Novo Nordisk)는 인간 GLP-1의 위치 34에서 라이신(Lys)을 아르기닌(Arg)으로 치환하고(replace) 위치 36의 라이신에 글루탐산(Glu)-매개 16-탄소 팔미트산 결사슬을 도입하여 그의 생물학적 활성을 완전히 유지하면서 GLP-1의 유해 반응을 유의성 있게 감소시킨다.

[0009] 실제 임상 적용에서, 위에서 설명된 바와 같이 화학적으로 변형된 폴리펩티드 약물은 폴리펩티드 약물의 반감기를 유의성 있게 연장시키고, 약물의 효능을 향상시키며, 투여 빈도를 줄이고, 그에 따라 우수한 치료 순응도(therapeutic compliance)를 가져올 수 있는, 상당한 장점을 갖는 것으로 확인되었다. 폴리펩티드 변형 유형 및 변형 방법은 지속적으로 개발될 것이며, 궁극적인 목표는 폴리펩티드 약물이 실험실 연구에서 안전하고 효과적인 임상 적용으로 진행될 수 있게 하는 것이다.

[0010] 본 개시는 생물의학 분야에서 폴리펩티드 약물 기술의 개발에 근거하며, 복잡한 기전을 가지며 치료가 어려운 섬유증(fibrosis) 질환의 예방 및 치료에서의 약제의 제조에서 화학적으로 변형된 폴리펩티드의 유도체의 용도를 제공한다.

[0011] 섬유증은 손상 또는 염증성 병변의 부위 및 주변 영역에서 콜라겐 및 피브로넥틴(fibronectin)과 같은 세포외기질에서의 증가에 의해 유발되는 섬유 결합 조직의 과다 침착(deposition) 및 리모델링(remodeling) 장애로, 영구적 흉터(scar), 장기 기능장애 및 심지어 사망까지 일으킨다. 섬유증은 다양한 질병의 발생과 밀접한 관련이 있다. 이 일반적인 임상 병리학적 변화는 흔한 만성 염증성 질환의 최종 병리학적 결과물이며, 또한 만성 자가면역 질환의 주요 병리학적 증상이다. 이는 종양 침습 및 전이 및 만성 이식 거부에 영향을 미칠 수 있다. 섬유증은 다양한 조직 및 기관, 특히 중요 기능 기관(간, 폐, 신장 및 심장)에서 발생할 수 있고, 종종 회복 불가능하게 점진적으로 악화시키며, 장기 구조를 심각하게 파괴하고, 궁극적으로 장기 기능장애 및 부전을 초래하여 이에 따라 환자의 삶의 질을 크게 저하시키고 인간 건강을 심각하게 위협할 수 있다. 통계는 다양한 질병으로 사망하는 사람의 45%가 섬유증에 의한 것일 수 있다는 것을 보여준다.

[0012] 섬유증 질환의 높은 발병률 및 사망률에도 불구하고, 현재는 주로 예방 및 장기 이식과 같은 비-약리학적(non-pharmacological) 치료에 초점을 맞추고 있으며, 다른 약물은 보조 요법 및 심지어 임시(palliative) 치료로 사

용된다. 섬유증 질병의 치료에 대한 특별한 약물이 거의 없어, 임상적으로 효과적이고 안전한 니즈(needs)를 충족시키기에 거리가 멀다. 예를 들면, 유전적 결합 조직 질환인 마르판 증후군은 당단백질 마이크로피브린(FBN 1)을 암호화하는 상염색체 유전자(autosomal gene)에서 돌연변이에 의해 유발된다. 환자의 팔다리가 가늘고 고르지 못하며, 심혈관계와, 뼈, 신경계, 피부 및 눈과 같은 중요 조직 및 기관 관련의 이상이 동반된다. 대부분의 환자는 대동맥류 파열 및 심부전으로 사망하고 중년까지만 생존할 수 있으나, 현재 마르판 증후군의 치료를 위해 전세계적으로 이용 가능한 약이 없다.

[0013] 심장, 폐, 신장, 소화관 및 다른 내부 장기를 포함하는 국소화되거나 확산되는 피부 비후화(thickening) 및 섬유증을 특징으로 하는 결합 조직 질환의 다른 유형은 전신경화증(systemic sclerosis; SSc)이라 불린다. 관련 통계에 따르면, 전세계에 전신경화증 환자가 약 200만 명이 있는데, 주로 천천히 발병하지만 나쁜 예후를 갖는다. 환자의 90%가 다른 정도의 폐 흉터를 가질 수 있으며, 사망의 약 35%를 차지한다. 현재 전세계에 치료를 위한 약물이 단 한 가지만 있다: 2016년 유럽 위원회(European Commission) 및 FDA의 희귀 의약품 인증 패스트 트랙에 의해 승인된 닌테다닙(nintedanib) (Boehringer Ingelheim). 닌테다닙은 전신경화증 관련 간질성 폐 질환(SSc-ILD)의 대중요법(symptomatic treatment)에 불과하고, 시판 후 그의 임상 효능은 평가되어야 한다. 그러나, 전신경화증은 닌테다닙의 개발에서 새로운 적응증(indication)이다. 초기에, 닌테다닙은 가장 심각한 폐섬유증 질환 중 하나인 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)을 치료하기 위해 사용된 약물이었다.

[0014] 특발성 폐섬유증은 만성, 진행성, 원인을 알 수 없는 섬유증 간질성 폐질환(fibrotic interstitial lung disease)이고, 종양유사 질환(tumor-like disease)이라고도 불린다. 이는 종종 급성 악화를 동반한다. 진단 후 평균 생존은 단 2.8년이며, 사망률은 폐암을 제외한 모든 종양 질환에 비해 더 높다. 현재, 전세계적으로 특발성 폐섬유증의 치료를 위한 약물은 피르페니돈(pirfenidone) (Roche)과 닌테다닙으로, 2014년에 FDA 신속 승인 채널을 통해 시장에 진입된 희귀 의약품이며, 또한 미국 흉부 학회/유럽 호흡기 학회/일본 호흡기 학회/라틴 아메리카 흉부 협회에 의해 발간된 임상 진료 지침: 특발성 폐섬유증의 치료(the Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis)에서 가장 높은 추천 (조건적 추천)을 받은 두 가지 유형의 약물이다. 피르페니돈은 항섬유증, 항염증 및 항산화 화합물로, 정확한 작용의 기전이 아직 완전히 파악되지 않았다. 닌테다닙은 섬유증 신호전달 경로(fibrotic signaling pathway)를 조절하는 세 가지 중요한 사이토카인 수용체에 작용하는 다중 티로신 키나아제(multi-tyrosine kinase) 억제제이다: 섬유아세포 성장 인자 수용체(fibroblast growth factor receptor; FGFR), 혈소판 유래 성장 인자 수용체(platelet-derived growth factor receptor; PDGFR), 및 혈관 내피 성장 인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor; VEGFR). 닌테다닙은 수용체 상의 ATP 결합 부위에 특이적으로 결합할 수 있어, 수용체의 인산화의 활성화를 방지하고 이에 따라 매개되는 신호전달 경로 전달을 차단한다. 피르페니돈 및 닌테다닙의 등장은 폐섬유증 치료의 분야에서의 공백을 채웠다. 그러나, 글로벌 데이터 분석(Global Data analysis) (2016)은 이러한 두 가지 약물이 환자의 폐 기능의 감소를 자연시키는 데만 사용되며, 폐 질환의 진행을 중단시키기 위한 효과적인 약물이 아니라고 믿는다. 임상 연구에서도 사망률에서의 유의성 있는 개선이 없으며 폐섬유증 치료의 필요성을 충족시키기에는 거리가 먼 것으로 나타났다. 게다가, 두 약물은 소분자 화합물로, 임산부 또는 간 질환 환자에게 적합하지 않고, 효과적인 폐 약물 농도를 달성하기 위해 높은 경구 투여량이 요구되며, 상당한 유해한 위장 반응이 있다. 피르페니돈은 또한 심한 광선과민증 및 발진을 일으키며, 임상적 사용에서 환자 순응도가 좋지 않다.

[0015] 전술된 세 가지 적응증에 추가로, 섬유증 질환도 간, 신장, 심장 및 눈과 같은 다른 중요 기관을 포함한다. 섬유증 질환 환자는 종종 장기 및 조직 관련을 갖는다. 섬유성 병변의 진행을 효과적으로 자연시키거나 차단하는 약이 없는 경우, 궁극적인 치료 선택은 기증자의 어려움, 비교적 높은 위험 및 비용이 있는 장기 이식에 제한되어, 매우 큰 사회적 및 경제적 부담을 가져온다. 그러나, 이용 가능한 약물의 임상치료 효과 및 안전성은 치료 요구를 충족시킬 수 있으며, 섬유증 질환의 확진 건수는 미래에 여전히 증가할 것이다. 그러므로, 섬유증 질환의 작용의 기전을 더 연구하며, 혁신적인 의학 발전 트렌드를 충분히 통합하고, 섬유증 질환을 효과적으로 차단 할 수 있고 임상적 사용에 안전한 새로운 치료 약물을 개발하는 것이 시급하다.

[0016] 섬유증은 반복적 또는 비교적으로 심각한 손상에 의해 유발된 염증에서 섬유증으로 점차 진행하는 병적 과정이며, 일반적으로 발병(pathogenesis)을 세 단계로 나눌 수 있다. 첫 번째 단계는 손상 단계 및 지혈 단계이다. 감염, 독소, 약물, 외상 등에 의해 유발된 상피 또는 내피 세포 손상은 응고 반응을 작동시킨다. 순환하는 혈액 내 혈소판이 손상된 혈관에 노출된 콜라겐 섬유와 접촉함으로써 활성화되며, 혈소판 인자를 방출하고 신속한 지혈을 보장하기 위해 피브린 덩이(fibrin clot)를 형성한다. 활성화된 혈소판은 혈소판 유래 성장 인자(platelet-derived growth factor; PDGF), 케모카인, 및 TGF-beta(transforming growth factor beta)와 같은

다양한 사이토카인을 동시에 방출한다. 두 번째 단계는 염증 및 증식 단계, 즉 재생의 단계이다. 케모카인에 의해 매개되어, 염증 세포가 화학주성(chemotaxis)으로 손상의 부위에 모이고, 골수줄기세포가 대식세포 및 호중구와 같은 염증 세포로 활성화되며, 면역 복구(immune repair) 및 염증을 촉진하는 다양한 사이토카인 (예를 들면, IL-13, IL-17, TGF- β)을 분비한다. 상피 및 선천 면역 세포 유래 사이토카인은 염증 및 면역 복구를 더 촉진시키는 특이 면역 반응을 활성화시킬 수 있다. 염증 및 면역 매개체 (사이토카인, 케모카인, 자유 라디칼 등)는 휴지(resting) 섬유아세포를 활성화시키고, 세포외 기질 내 콜라겐 합성을 자극하며, 그들의 근섬유아세포로의 분화를 촉진시킨다. 세 번째 단계는 성숙 단계, 즉 조직 리모델링 또는 섬유증이다. 정상적인 상태는 최종 혈관신생, 상처 수축, 조직 재생이다. 그러나, 유해한 자극이 지속될 때, 염증 반응 및 만성 치유 반응이 강화되고, 조직 손상-복구-재생 반응이 반복되며, 근섬유아세포가 지속적으로 활성화되고, 더 많은 세포외 기질이 분비되고, 침착이 일어나, 결국 조직의 비후화, 리모델링 장애, 및 섬유증 형성으로 이어진다.

[0017]

섬유증 발생의 기전은 복잡하며, 염증 반응, 산화 스트레스, 면역 반응, 및 섬유증 발생 관련 다양한 사이토카인 및 이에 의해 매개되는 신호전달 경로가 포함된다. 주요 역할을 수행하는 사이토카인은 IL-1 β , TNF- α , IL-13, PDGF 및 TGF- β 를 포함한다. 여기서 IL-1 β 는 TGF- β 전구체를 활성화하기 위해 세포외 기질에 결합함으로써 세포외 콜라겐 합성을 간접적으로 촉진하거나 직접 조절할 수 있으며, 섬유아세포의 근섬유아세포로의 분화를 촉진하고, 또한 FAK/rac1/NOX/ROS 신호전달 경로를 통해 섬유아세포에서 세포외 기질 합성을 조절할 수 있으며, 결합 조직 성장 인자 CCN2와 결합함으로써 섬유증 발생을 촉진한다. 두 TNF- α 및 IL-1 β 는 염증 촉진 조절자로, 실질세포(parenchymal cell) 손상을 악화시켜 TGF- β 신호전달 경로를 통해 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition) 및 근섬유아세포 활성화를 유도할 수 있다. TNF- α 와 IL-1 β 는 또한 섬유아세포에서 자가분비 성장 인자 IL-6의 활성화를 촉진할 수 있다. IL-13은 2형 헬퍼 T 세포(type 2 helper T cell; Th2 세포)에 의해 분비되는 사이토카인으로, 인테그린 β 1, IL-6 및 케모카인 MCP-1을 통해 섬유아세포 증식을 촉진할 수 있다. IL-13을 발현하는 Th2 세포는 또한 대식세포에 의해 TGF- β 전구체의 분비를 자극할 수 있어, IL-13이 메탈로프로테아제(metalloproteinase) 및 카텝신(cathepsin)과 같은 관련 단백질분해 경로를 통해 TGF- β 를 활성화시킨다. PDGF는 섬유아세포 증식, 이동, 및 형질전환(transformation)을 자극함으로써 더 많은 근섬유아세포를 생성하며, 동시에 콜라겐 합성을 자극하는 섬유아세포 미토겐(mitogen)이다. TGF- β 는 섬유아세포의 근섬유아세포로의 분화를 직접 유도하고, 콜라겐 발현 및 침착을 촉진할 수 있는 반면, 세포외 기질을 분비하는 근섬유아세포가 모든 섬유증 질환의 최종 결과이다.

[0018]

전술된 사이토카인은 다양한 유형의 세포에 의해 분비될 수 있거나, 또는 섬유증 발생을 촉진하는 TGF- β 신호전달 경로를 염증 반응 및 면역 반응을 통해 간접적으로 조절하거나 또는 직접 활성화시킬 수 있다. 그러므로, TGF- β 는 섬유증의 조절에서 가장 중요한 사이토카인인 것으로 여겨진다. 다수의 보고에서 섬유증 질환이 사이토카인 TGF- β 의 비정상적인 조절 및 그의 하류(downstream) 신호전달 경로와 밀접한 관련이 있다는 것이 확인되었다. TGF- β 신호전달 경로와 관련된 공개적으로 보고된 섬유증 질환은 류마티즘성 관절염, 폐섬유증, 간섬유증, 경변증, 신장섬유증, 골수섬유증, 낭포성섬유증, 심근섬유증, 폐부경화증, 사르코이드증, 켈로이드, 화상으로 유도된 비후성 반흔, 증식성 망막증, 녹내장, 백내장, 후낭흔탁, 혈관성형술, 혈관 수술 또는 혈관 손상 후 혈관 재협착, 마르판 증후군 등을 포함한다. 연구에서는 TGF- β 신호전달 경로의 억제가 다중 질병의 동물 모델에서 섬유증의 진행을 지연시킬 수 있다는 것을 보여주었다.

[0019]

섬유증 발생에 관련된 복수 사이토카인 및 그들의 활성화된 세포내 신호전달 경로의 문자 기전에 기초한 지난 30년 동안의 섬유증 질환과 관련된 기전의 심층 연구에서, 이러한 경로의 주요 노드(node)가 전반적인 규모로 섬유증 예방 및 치료를 위한 약물에 대한 주요 표적이 되었다. 섬유증은 많은 사이토카인을 포함하고 있기 때문에, 가장 효과적인 표적 인자를 찾는 것이 섬유증 질환의 치료의 핵심이다. 섬유증 질환에서 TGF- β 신호전달 경로의 중요한 역할에 비추어, 약물 표적으로 TGF- β 신호전달 경로를 이용하는 것은 섬유증 질환을 차단하기 위한 이상적인 약물이 될 것으로 예상된다.

[0020]

포유동물 TGF- β 는 세가지 서브타입(subtype)으로, 각각 TGF- β 1, TGF- β 2 및 TGF- β 3을 포함한다. 여기서 TGF- β 1은 조직에서 가장 풍부하고 널리 분포된 서브타입이며, 또한 조직 섬유증을 촉진하는 가장 중요한 인자이다. TGF- β 1은 불활성 전구체 단백질 (Pre-pro-TGF- β 1)로 생체내에서 생산되며, 일련의 효소 및 입체형태(conformational) 변화 후 생물학적 활성 TGF- β 1만을 방출할 수 있으며, 주로 Smad 패밀리 단백질의 하류 신호전달 경로를 활성화함으로써 섬유증 발생을 촉진한다. 그의 신호 활성화 및 전달(transduction) 기전에 기초하여, TGF- β 1 분비, 활성화 및 신호 전달을 차단하기 위해 TGF- β 1가 기능하기 위해 요구되는 핵심 서열을 제조하거나 모방하는 웹타이드 합성 기술을 사용하는 것은 핵심 노드로부터 가장 중요한 섬유증 조절 신호전달 경로를 억제할 수 있어, 이에 따라 섬유증 병리학적 과정의 발생 및 발전을 효과적으로 억제한다.

[0021] 연구들은 실험 조건에서 웨티드 KRFK, CSVTCG, YRVRFLAKENVTQDAEDN 및 CNLAVAAASHIYQNQFVQ가 TGF- β 신호전달 경로의 전달을 억제할 수 있어, 이에 따라 섬유증의 진행을 지연시킨다는 것을 보여주었다. 그러나, 실제 적용 과정에서, 폴리웨티드는 낮은 용해성 및 낮은 안정성의 문제를 가져 폴리웨티드의 약물가능성(druggability)에 큰 영향을 미치며, 섬유증 질환의 예방과 치료를 위한 약물의 제조에서 그의 물리화학적 특성에서의 더 높은 개선에 대한 요구가 여전히 있다. 본 개시는 전술한 바에 기초하여, 가장 효과적인 활성 단편을 발굴하기 위해 폴리웨티드 서열 중 하나에 기초한 아미노산 결실, 치환 및 첨가를 수행하고, 약물가능성 폴리웨티드를 개선시키기 위해 폴리웨티드의 용해성을 향상시키며, 폴리웨티드의 안정성을 증가시키고 및 그의 반감기를 연장시키고, 생물학적 활성을 향상시키고, 독성 부작용을 감소시키며, 궁극적으로 섬유증 질환의 예방 및 치료를 위한 임상적으로 안전하고 효과적인 약물의 제조에 적용하기 위해 전술한 바에 기초하여 화학 변형을 수행한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0022] 현재 섬유증 질환의 예방 및 치료를 위한 임상적으로 효과적이고 안전한 약물의 부재의 관점에서, 본 개시는 폴리웨티드, 폴리웨티드 단편, 폴리웨티드 단편 유도체, 폴리웨티드 유도체, 및 섬유증 질환의 예방 또는 치료에서의 약제의 제조를 위해 전술된 폴리웨티드, 폴리웨티드 단편 및 그의 유도체에서 화학 변형을 갖는 폴리웨티드 유도체의 용도를 제공한다.
- [0023] 본 개시의 폴리웨티드는 웨티드 결합에 의해 연결된 아미노산으로 구성된 화합물이고, 아미노산의 개수가 제한되지 않는 산물이다.
- [0024] 본 개시의 서열번호 1의 폴리웨티드는 TGF- β 신호전달 경로의 전달을 억제하고, 염증성 세포의 침습을 감소시키며 세포와 기질 단백질의 합성을 감소시켜, 섬유증 질환을 예방 및 치료하는 목적을 달성하기 위해 염증 및 섬유증 반응을 억제한다.
- [0025] 본 개시의 서열번호 1의 폴리웨티드에서 아미노산 결실, 첨가, 치환 또는 변형을 수행하는 것은 섬유증 질환의 예방 또는 치료에서의 약제의 제조를 위한 용도에 적합하게 해준다.
- [0026] 본 개시에 의해 제공되는 폴리웨티드는 서열번호 1의 폴리웨티드 서열에서 아미노산 결실, 치환, 첨가 및/또는 변형을 갖는 폴리웨티드이다. 이는 서열번호 1의 폴리웨티드 서열에서 아미노산 결실, 치환, 첨가 또는 변형을 갖는 폴리웨티드일 수 있다. 이는 서열번호 1의 폴리웨티드 서열에서 결실, 치환, 첨가 또는 변형 중 2개 이상을 동시에 갖는 폴리웨티드, 예를 들면, 결실 및 치환을 동시에 갖는, 결실 및 첨가를 동시에 갖는, 결실 및 변형을 동시에 갖는, 치환 및 첨가를 동시에 갖는, 치환 및 변형을 동시에 갖는, 첨가 및 변형을 동시에 갖는, 결실, 치환 및 변형을 동시에 갖는, 결실, 첨가 및 변형을 동시에 갖는, 치환, 첨가 및 변형을 동시에 갖는 폴리웨티드일 수 있다. 이는 또한 결실, 치환, 첨가 및 변형을 동시에 갖는 폴리웨티드일 수 있다.
- [0027] 일부 구체예에서, 폴리웨티드는 서열번호 1의 폴리웨티드 서열에서 하나 이상의 아미노산의 결실, 치환 또는 첨가를 각각 갖는다.
- [0028] 일부 구체예에서, 폴리웨티드는 서열번호 1의 폴리웨티드 서열에서 하나 이상의 아미노산의 결실, 치환 또는 첨가를 동시에 갖는다.
- [0029] 본 개시의 결실의 아미노산의 개수는 7개를 포함하며, 7개 이내이다. 이는, 결실의 아미노산의 개수는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개이다.
- [0030] 본 개시의 치환의 아미노산의 개수는 11개를 포함하며, 11개를 초과하지 않는다. 이는, 치환의 아미노산의 개수는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 11개이다.
- [0031] 본 개시의 첨가의 아미노산의 개수는 8개를 포함하며, 8개를 초과하지 않는다. 이는, 결실의 아미노산의 개수는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개이다.
- [0032] 일부 구체예에서, 폴리웨티드는 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8의 폴리웨티드로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0033] 일부 구체예에서, 폴리웨티드는 서열번호 1의 폴리웨티드 서열에서 변형을 갖는다.
- [0034] 여기서 변형은 폴리에틸렌 글리콜 변형, 지방산 변형, 글리코실화 변형, 아세틸화 변형, 아미드화 변형, 인산화

변형 및 다른 공지된 폴리펩티드 변형을 포함한다.

[0035] 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 카르복시 말단에 폴리에틸렌 글리콜 변형을 가지며, 그의 서열은 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 또는 서열번호 27이다.

[0036] 본 개시에 의해 제공되는 폴리펩티드 단편은 서열번호 1의 폴리펩티드 서열에서 아미노산 결실을 갖는다. 이는 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단, 카르복시 말단 또는 내부에 아미노산 결실을 각각 가질 수 있다; 이는 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 결실을 동시에 가질 수 있다; 이는 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단 및 내부에 아미노산 결실을 동시에 가질 수 있다; 이는 서열번호 1의 아미노산 서열의 카르복시 말단 및 내부에 아미노산 결실을 동시에 가질 수 있다; 이는 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단, 카르복시 말단 및 내부에 아미노산 결실을 동시에 가질 수 있다.

[0037] 본 개시의 결실의 아미노산의 개수는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개 또는 12개를 결실하는 것과 같이, 12개를 포함하며, 12개를 초과하지 않는다.

[0038] 일부 구체예에서, 본 개시의 결실의 아미노산의 개수는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 또는 7개를 결실하는 것과 같이, 7개를 포함하며, 7개를 초과하지 않는다.

[0039] 본 개시의 폴리펩티드 단편의 아미노산의 개수는 6개 및 17개를 포함하며, 6개 내지 17개 중 어느 하나일 수 있다.

[0040] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열의 카르복시 말단에 2개의 아미노산 결실을 가지며, 그 서열은 서열번호 2이다.

[0041] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 결실을 동시에 가지며, 여기서 아미노 말단 및 카르복시 말단에 각각 아미노산 3개의 결실이 있고, 그 서열은 서열번호 4이다.

[0042] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단에 아미노산 3개의 결실을 가지며, 그 서열은 서열번호 5이다.

[0043] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열의 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실을 가지며, 그 서열은 서열번호 6이다.

[0044] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열의 내부 및 카르복시 말단에 아미노산 결실을 동시에 가지며, 여기서 아미노산 서열의 내부에 아미노산 3개의 결실 및 아미노산 서열의 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실이 있고, 그 서열은 서열번호 8이다.

[0045] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 결실을 동시에 가지며, 여기서 아미노 말단 및 카르복시 말단에 각각 아미노산 2개의 결실이 있고, 그 서열은 서열번호 12이다.

[0046] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 결실을 동시에 가지며, 여기서 아미노 말단 및 카르복시 말단에 각각 아미노산 5개의 결실이 있고, 그 서열은 서열번호 13이다.

[0047] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단에 아미노산 5개의 결실을 가지며, 그 서열은 서열번호 14이다.

[0048] 본 개시의 폴리펩티드 단편 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드의 아미노산 서열에 아미노산 치환 또는/및 첨가를 갖는 유도체, 즉 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산 결실을 갖는 폴리펩티드 단편의 아미노산 서열에 아미노산 치환 또는/및 첨가를 갖는 유도체이다.

[0049] 일부 구체예에서, 본 개시의 폴리펩티드 단편 유도체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산 결실을 갖는 폴리펩티드 단편에 아미노산 결실을 갖는 유도체이다.

[0050] 일부 구체예에서, 본 개시의 폴리펩티드 단편 유도체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산 결실을 갖는 폴리펩티드 단편에 아미노산 치환을 갖는 유도체이다.

[0051] 일부 구체예에서, 본 개시의 폴리펩티드 단편 유도체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산 결실을 갖는

폴리펩티드 단편에 아미노산 첨가 및 치환을 동시에 갖는 유도체이다.

[0052] 폴리펩티드 단편 유도체에 대해, 아미노산 첨가는 폴리펩티드 단편의 아미노산 서열의 아미노 말단, 카르복시 말단 및 내부의 위치에 아미노산 첨가이다.

[0053] 폴리펩티드 단편 유도체에 대해, 아미노산 치환은 폴리펩티드 단편의 아미노산 서열의 아미노 말단, 카르복시 말단 및 내부의 위치에 아미노산의 치환이다.

[0054] 폴리펩티드 단편 유도체에 대해, 동시 첨가 및 치환은 폴리펩티드 단편의 아미노산 서열의 카르복시 말단, 아미노 말단 및 내부의 위치에 아미노산의 첨가 및 치환이다.

[0055] 폴리펩티드 단편 유도체에서, 아미노산 치환을 갖는 유도체에 대해, 치환의 아미노산의 개수는 6개를 포함하며, 6개 이내이고; 아미노산 첨가를 갖는 유도체에 대해, 첨가의 아미노산의 개수는 6개를 포함하며, 6개 이내이다.

[0056] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실을 각각 갖는 것에 의해 얻어진 폴리펩티드 단편의 카르복시 말단에 아미노산 2개의 첨가를 가지며, 폴리펩티드 단편 유도체의 서열은 서열번호 19이다.

[0057] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 카르복시 말단에 아미노산 2개의 결실을 갖는 것에 의해 얻어진 폴리펩티드 단편의 아미노 말단에 아미노산 1개의 첨가를 가지며, 그 서열은 서열번호 20이다.

[0058] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실을 각각 갖는 것에 의해 얻어진 폴리펩티드 단편의 아미노 말단에 아미노산 1개의 첨가를 가지며, 그 서열은 서열번호 21이다.

[0059] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 아미노산 3개의 결실 및 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실을 갖는 것에 의해 얻어진 폴리펩티드 단편의 아미노산 내부에 아미노산 1개의 치환을 가지며, 그 서열은 서열번호 22이다.

[0060] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부에 아미노산 1개의 결실 및 카르복시 말단에 아미노산 2개의 결실을 갖는 것에 의해 얻어진 폴리펩티드 단편의 내부에 아미노산 1개의 치환을 가지며, 그 서열은 서열번호 23이다.

[0061] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 단편 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 2개의 결실을 각각 갖는 것에 의해 얻어진 폴리펩티드 단편의 내부에 아미노산 1개의 치환을 가지며, 그 서열은 서열번호 24이다.

[0062] 본 개시의 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 치환 또는/및 첨가를 갖는 폴리펩티드 유도체이다.

[0063] 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 첨가를 갖는 유도체이다.

[0064] 나아가, 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 1개 내지 3개의 첨가를 갖는 유도체이다.

[0065] 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 치환을 갖는 유도체이다.

[0066] 나아가, 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 1개 내지 3개의 치환을 갖는 유도체이다.

[0067] 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 첨가 및 치환을 동시에 갖는 유도체이다.

[0068] 나아가, 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 1개 내지 3개의 첨가 및 아미노산 1개 내지 3개의 치환을 동시에 갖는 유도체이다.

[0069] 본 개시의 폴리펩티드 유도체에 대해, 첨가는 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단, 카르복시 말단 및 내부 위치에 아미노산 첨가이다.

[0070] 본 개시의 폴리펩티드 유도체에 대해, 치환은 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단, 카르복시 말단 및 내부 위치에 아미노산 치환이다.

- [0071] 본 개시의 폴리펩티드 유도체에 대해, 동시 첨가 및 치환은 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노 말단, 카르복시 말단 및 내부 위치에 아미노산의 동시 첨가 및 치환이다.
- [0072] 본 개시의 폴리펩티드 유도체에서, 아미노산 치환을 갖는 유도체에 대해, 치환의 아미노산의 개수는 11개를 포함하며, 11개 이내이다. 나아가, 개수는 6개를 포함하며, 6개 이내로, 아미노산 첨가를 갖는 유도체에 대해, 첨가의 아미노산의 개수는 6개를 포함하며, 6개 이내이다.
- [0073] 본 개시의 폴리펩티드 유도체에서, 아미노산 첨가를 갖는 유도체에 대해, 첨가의 아미노산의 개수는 8개를 포함하며, 8개 이내이다. 나아가, 개수는 6개를 포함하며, 6개 이내이다.
- [0074] 특정 구체예에서, 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 15에 아미노산 1개의 치환을 갖는 폴리펩티드 유도체이고, 그 서열은 서열번호 7이다.
- [0075] 특정 구체예에서, 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 18에서 아미노산 1개의 치환을 갖는 폴리펩티드 유도체이고, 그 서열은 서열번호 15이다.
- [0076] 특정 구체예에서, 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 7에 아미노산 1개의 치환을 갖는 폴리펩티드 유도체이고, 그 서열은 서열번호 16이다.
- [0077] 특정 구체예에서, 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 카르복시 말단에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 유도체이고, 그 서열은 서열번호 17이다.
- [0078] 특정 구체예에서, 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 유도체이고, 그 서열은 서열번호 18이다.
- [0079] 특정 구체예에서, 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 18에 아미노산 1개의 치환을 가지며, 카르복시 말단에 아미노산 1개의 첨가를 동시에 갖는 폴리펩티드 유도체이고, 그 서열은 서열번호 25이다.
- [0080] 특정 구체예에서, 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 아미노산 1개의 첨가를 가지며, 내부에 아미노산 1개의 치환을 동시에 갖는 폴리펩티드 유도체이고, 그 서열은 서열번호 26이다.
- [0081] 본 개시의 아미노산 치환은 또 다른 형태(conformation) 또는 다른 아미노산의 유형을 이용한 서열번호 1의 폴리펩티드 단편 또는 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노산의 대체물(replacement)이다.
- [0082] 본 개시의 아미노산 첨가는 서열번호 1의 아미노산 서열의 폴리펩티드 단편 또는 서열번호 1의 아미노산 서열의 임의의 위치로의 아미노산의 첨가이다.
- [0083] 본 개시의 아미노산 치환 및 아미노산 첨가는 동시에 또는 각각 수행될 수 있다. 이는 동일한 아미노산 위치 또는 다른 아미노산 위치에서 수행될 수 있다.
- [0084] 본 개시의 아미노산 위치는 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 아미노 말단에서 카르복시 말단까지의 순서로 배열된 아미노산의 위치의 번호이다. 그러나, 아미노산 위치는 상대적이다. 아미노산 결실 또는 첨가가 수행될 때, 아미노산의 위치는 변경될 수 있고, 변경은 당업계 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다.
- [0085] 본 개시의 치환 또는/및 첨가를 위한 아미노산은 천연 아미노산 및 비천연 아미노산을 포함하며, 천연 아미노산은 자연에 존재하는 아미노산이고, 비천연 아미노산은 D-유형 아미노산 및 다른 인공적으로 합성된 아미노산을 포함한다.
- [0086] 본 개시에 의해 제공되는 유도체는 폴리펩티드의 변이체(variant)이다. 본 개시에서, 이는 폴리펩티드 서열에 아미노산 치환 또는 첨가를 갖는 산물, 또는 변형 위치에 화학 변형을 갖는 산물, 예를 들면, 주사슬 또는 결사슬의 말단에 아미노기, 카르복시기, 설프히드릴기, 폐놀릭히드록시기, 이미다졸기, 구아니딘기, 인돌기, 메틸티오기(methylthio group)를 갖는 산물일 수 있다.
- [0087] 본 개시의 화학 변형은 변형된 폴리펩티드 약물이 향상된 용해성, 증가된 안정성 및 연장된 반감기를 갖도록 하기 위해 폴리펩티드의 수준에서 적절한 변형 방법 및 변형제를 사용한 화학 변형이고, 자세한 사항은 당업계 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다.
- [0088] 본 개시의 폴리펩티드 유도체는 본 개시의 폴리펩티드 단편 또는 본 개시의 폴리펩티드 단편 유도체에 화학 변형을 갖는 유도체일 수 있다.
- [0089] 나아가, 폴리펩티드 유도체는 또한 본 개시의 폴리펩티드 유도체에서 화학 변형을 갖는 유도체일 수 있으며,

즉, 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 첨가를 갖는 유도체, 또는 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 치환을 갖는 유도체, 또는 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 첨가 및 치환을 동시에 갖는 유도체에서 화학 변형을 갖는 유도체이다.

- [0090] 화학 변형은 케프티드 사슬의 주사슬 구조 또는 결사슬 기를 변화시킬 수 있고, 아세틸화, 아미드화, 글리코실화, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 변형, 지방산 변형, 및 당업계에 공지된 다른 폴리펩티드 변형 기술을 포함한다.
- [0091] 본 개시의 아세틸화 및 아미드화는 폴리펩티드의 주사슬의 말단을 변형하기 위해 일반적으로 사용되는 방법이고, 보통 폴리펩티드의 주사슬의 N-말단을 아세틸화시키고, 폴리펩티드의 주사슬의 C-말단을 아미드화시킨다.
- [0092] 본 개시의 글리코실화 변형은 N-글리코실화, O-글리코실화, S-글리코실화, C-글리코실화, 글리코실포스파티딜이노시톨 변형 등을 포함하는 공유 결합을 사용하여 단백질 폴리펩티드 분자의 특정 특수 관능기에 당(saccharide) 구조를 결합하는 것이다. N-글리코실화는 아스파라긴에 의한 결사슬의 아미드 질소로의 결합이고; O-글리코실화는 세린 또는 트레오닌 잔기 상의 산소로의 결합이다. 당 구조는 다양한 단당류, 올리고당류 및 다당류를 포함한다.
- [0093] 본 개시의 PEG 변형은 폴리펩티드 주사슬 아미노기, 결사슬 아미노기, 주사슬 카르복시기, 결사슬 카르복시기, 이미다졸기, 설프히드릴기 및 히드록시기 등의 관능기와 같은 위치에 PEG의 해당 유형을 사용한 변형이다. PEG는 에틸렌 옥사이드에 의해 중합된 고분자 폴리머로, 구조 또는 분자량이 제한되지 않는다. PEG 변형 유형은 선형 PEG, 분지형 PEG, 동종 이관능성(homobifunctional) PEG 유도체, 이종 관능성(heterofunctional) 이치환 PEG 유도체, 및 다중-암(multi-arm) 관능성 PEG 유도체를 포함한다.
- [0094] 본 개시의 지방산 변형은 공유 결합을 사용하여 단백질 폴리펩티드 분자에서 아미노기, 카르복시기, 설프히드릴기, 히드록시기 등을 포함한 특정 특수 관능기에 지방산 구조를 결합시키는 것이다. 지방산 변형은 불포화 지방산 변형 및 포화 지방산 변형으로 나눌 수 있다. 포화 지방산 변형은 주로 미리스트산 및 팔미트산을 이용한 변형이다; 불포화 지방산 변형은 주로 올레산, 리놀레산 등을 이용한 변형이다.
- [0095] 본 개시의 폴리펩티드 변형은 당업계에서 통상자의 기술자에게 잘 알려진 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 본 개시의 변형의 목적은 폴리펩티드 서열의 물리화학적 특성을 변화시키고 약물가능성을 향상시키는 것이나, 변형된 폴리펩티드는 여전히 TGF- β 신호 전달을 억제할 수 있다.
- [0096] 본 개시의 TGF- β 신호전달 경로 전달의 억제는 TGF- β 활성화, 수용체 인산화, TGF- β 신호전달 경로에서의 제한되지 않은 형태의 단백질 활성화, 및 하류 조절 유전자의 전사 및 발현을 억제하기 위해 TGF- β 신호전달 경로가 억제되는 조건에서 본 개시의 폴리펩티드 단편, 폴리펩티드 단편 유도체, 폴리펩티드 유도체, 및 전술한 단편 또는 그의 유도체의 화학 변형을 통한 폴리펩티드 유도체를 이용하는 것을 의미한다.
- [0097] 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 본 개시의 폴리펩티드 단편에 화학 변형을 갖는 유도체이다.
- [0098] 나아가, 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열에서 아미노산 1개 내지 10개의 결실을 갖는 폴리펩티드 단편에 PEG 변형을 갖는 유도체이다.
- [0099] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 카르복시 말단에 아미노산 2개의 결실을 갖는 폴리펩티드 단편의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 3이다.
- [0100] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실을 갖는 폴리펩티드 단편의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 9이다.
- [0101] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 3개의 결실을 각각 갖는 폴리펩티드 단편의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 10이다.
- [0102] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 3개의 결실을 각각 갖는 폴리펩티드 단편의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 11이다.
- [0103] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 2개의 결실을 각각 갖는 폴리펩티드 단편의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 28이다.

- [0104] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실을 각각 갖는 폴리펩티드 단편의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 29이다.
- [0105] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실을 각각 갖는 폴리펩티드 단편의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 30이다.
- [0106] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부에 3개 아미노산의 결실 및 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실을 각각 갖는 폴리펩티드 단편의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 31이다.
- [0107] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 아미노산 3개의 결실을 갖는 폴리펩티드 단편의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 32이다.
- [0108] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실을 각각 갖는 폴리펩티드 단편의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 33이다.
- [0109] 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 본 개시의 폴리펩티드 단편 유도체에서 화학 변형을 갖는 유도체이다.
- [0110] 나아가, 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열에서 아미노산 1개 내지 10개의 결실, 아미노산 1 내지 3개의 첨가 또는 아미노산 1개 내지 3개의 치환을 갖는 폴리펩티드 단편 유도체에서 PEG 변형을 갖는 유도체이다.
- [0111] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실, 및 카르복시 말단에 아미노산 2개의 첨가를 각각 갖는 폴리펩티드 단편 유도체의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 40이다.
- [0112] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 카르복시 말단에 아미노산 2개의 결실, 및 아미노 말단에 아미노산 2개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 단편 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 41이다.
- [0113] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 5개의 결실, 및 카르복시 말단에 아미노산 1개의 첨가를 각각 갖는 폴리펩티드 단편 유도체의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 42이다.
- [0114] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 카르복시 말단에 아미노산 2개의 결실, 및 아미노 말단에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 단편 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 43이다.
- [0115] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 카르복시 말단에 아미노산 2개의 결실, 및 내부에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 단편 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 44이다.
- [0116] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 각각 아미노산 5개의 결실, 및 내부에 아미노산 1개의 치환을 각각 갖는 폴리펩티드 단편 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 45이다.
- [0117] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부에 아미노산 1개의 결실, 카르복시 말단에 아미노산 2개의 결실, 및 내부에 아미노산 1개의 치환을 갖는 폴리펩티드 단편 유도체의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 46이다.
- [0118] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 아미노산 2개의 결실, 및 내부에 아미노산 1개의 치환을 갖는 폴리펩티드 단편 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 47이다.
- [0119] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부에 아미노산 1개의 결실, 카르복시 말단에 아미노산 2개의 결실, 및 내부에 아미노산 1개의 치환을 갖는 폴리펩티드 단편 유도체의 카르복시 말단

에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 48이다.

[0120] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 아미노산 2개의 결실, 및 내부에 아미노산 1개의 치환을 각각 갖는 폴리펩티드 단편 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 49이다.

[0121] 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 폴리펩티드 유도체에서 PEG 변형을 갖는 유도체로, 즉, 본 개시의 서열 번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 1 내지 2개의 첨가를 갖는 유도체이다.

[0122] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 카르복시 말단에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 유도체의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 37이다.

[0123] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 38이다.

[0124] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 39이다.

[0125] 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 폴리펩티드 유도체에서 PEG 변형을 갖는 유도체로, 즉, 본 개시의 서열 번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 1개 내지 2개의 치환을 갖는 유도체이다.

[0126] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 15에 아미노산 1개의 치환을 갖는 폴리펩티드 유도체의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 34이다.

[0127] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 15에 아미노산 1개의 치환을 갖는 폴리펩티드 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 35이다.

[0128] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 7에 아미노산 1개의 치환을 갖는 폴리펩티드 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 36이다.

[0129] 일부 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 폴리펩티드 유도체에서 PEG 변형을 갖는 유도체, 즉, 본 개시의 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 1개 내지 3개의 첨가 및 아미노산 1 내지 3개의 치환을 동시에 갖는 유도체이다.

[0130] 나아가, 폴리펩티드 유도체는 폴리펩티드 유도체에 PEG 변형을 갖는 유도체, 즉, 본 개시의 서열번호 1의 아미노산 서열에 아미노산 1개의 첨가 및 아미노산 1개의 치환을 동시에 갖는 유도체이다.

[0131] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 18에 아미노산 1개의 치환 및 카르복시 말단에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 유도체의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 50이다.

[0132] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 15에 아미노산 1개의 치환 및 아미노 말단에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 유도체의 아미노 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 51이다.

[0133] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 18에 아미노산 1개의 치환 및 카르복시 말단에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 52이다.

[0134] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 15에 아미노산 1개의 치환 및 아미노 말단에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 53이다.

[0135] 특정 구체예에서, 폴리펩티드 유도체는 서열번호 1의 폴리펩티드 서열의 내부 위치 7에 아미노산 1개의 치환 및 내부에 아미노산 1개의 첨가를 갖는 폴리펩티드 유도체의 카르복시 말단에 PEG 변형을 갖는 유도체로, 그 서열은 서열번호 54이다.

[0136] 본 개시의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 폴리펩티드 단편 유도체, 폴리펩티드 유도체, 및 전술된 단편 및 그의 유도체를 제조하는 방법은 추출, 효소 가수분해, 발효, 재조합 유전자 발현, 및 화학 합성을 포함한다.

[0137] 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 폴리펩티드 단편 유도체, 폴리펩티드 유도체, 및 전술된 단편의 폴리펩티드 유도

체 및 본 개시의 화학 변형을 통한 그의 유도체는 섬유증 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조를 위한 활성 성분으로 사용될 수 있으며, 여기서 섬유증 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제는 예방 또는 치료를 위한 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 폴리펩티드 단편 유도체, 폴리펩티드 유도체, 및 전술된 단편 및 본 개시의 화학 변형을 통한 그의 유도체의 폴리펩티드 중 하나 이상의 안전하고 효과적인 용량(dosage)을 포함한다.

[0138] 예방 또는 치료를 위한 안전한 유효량은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 충분한 효과가 있지만 심각한 부작용을 피할 수 있는 필요한 대상에 투여되는 활성 성분의 양이다. 안전한 유효량은 다음과 같은 요인에 따라 다르지만, 당업계의 통상의 기술자에 의한 전통적인 방법에서 결정될 수 있다: 선택된 폴리펩티드 (즉, 폴리펩티드의 구조, 안정성, 및 반감기를 고려함); 선택된 투여 경로; 치료대상 질환 및 질환의 중증도; 치료 대상 개체의 연령, 체형, 체중 및 신체 상태; 치료 대상 개체의 병력; 치료 기간; 예상된 치료 결과 및 유사 요인.

[0139] 본 개시의 예방은 가능한 전섬유생성 인자(pro-fibrogenic factor)가 나타날 때 섬유증의 발달을 예방하거나 감소시키는 것이다. 본 개시의 치료는 섬유증의 정도를 감소시키거나, 또는 그를 정상화시키기 위해 치유하거나, 또는 섬유증의 진행을 늦추는 것이다.

[0140] 본 개시에서 개시된 섬유증 질환은 TGF- β 사이토카인 및 그의 신호전달 경로 과다 활성화에 의해 유발된다. 당해 분야에서 인정되는 섬유증 질환은 류머티즘성 관절염, 폐섬유증, 간섬유증, 경변증, 신장섬유증, 골수섬유증, 낭포성섬유증, 심근섬유증, 피부경화증, 사르코이드증, 켈로이드, 화상으로 유도된 비후성 반흔, 증식성 망막증, 녹내장, 백내장, 후낭흔탁, 혈관성형술, 혈관 수술 또는 혈관 손상 후 혈관 재협착, 및 마르판증후군을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0141] 본 개시의 폐섬유증은 섬유아세포 증식 및 염증성 손상 및 조직 구조의 파괴에 의해 수반되는 다양한 세포외 기질 응집을 특징으로 하는 광범위한 폐 질환의 말기 변화(end-stage change)이다. 폐 조직에서 폐포(alveolar) 대식세포, 호중구, 폐포 상피세포 및 섬유아세포는 TGF- β 전구체를 광범위하게 발현한다. 상피세포 손상 후, TGF- β 활성화는 폐포 대식세포 및 섬유아세포의 증식을 촉진하여 근섬유아세포로 전환시키고, 동시에 상피-증간엽 전이를 유도하여, 결국 비정상적으로 증가된 세포외 기질과 침착을 유발한다. 폐섬유증은 정상 폐포 조직이 손상된 후 비정상적인 복구에 의해 유발된 흉터의 형성이다. 본 개시의 폐섬유증은 특발성 폐섬유증, 즉 원인불명(unexplained) 폐섬유증일 수 있거나; 또는 2차 폐섬유증, 즉 다수의 원인에 의해 유발된 폐섬유증일 수 있다. 원인은 작업상 먼지 (SiO_2 등), 방사선 손상, 자가면역 질환, 약물 부작용 (블레오마이신(bleomycin) 등), 만성 폐 감염 (결핵), 급성 폐 손상 등일 수 있다. 본 개시의 폐섬유증은 과민성 폐렴, 방사선 유도 폐섬유증, 블레오마이신 유도 폐섬유증, 특발성 폐섬유증, 규폐증, 석면증 및 폐결핵을 포함한다. 폐섬유증은 폐 염증, 특히 간질성 폐렴, 폐 기능의 퇴화 및 폐경화(pulmonary consolidation) (예를 들면, 폐간질(pulmonary interstitium) 및 폐 구조 장애에서 다양한의 섬유증 결합 조직의 형성) 중 하나 이상으로 나타날 수 있다.

[0142] 본 개시의 류머티즘성 관절염은 관절외 기관의 관여에 의해 종종 수반되는, 윤활막염(synovitis)으로 주로 나타나는 만성 염증 질환으로, 관절 변형과 기능 상실로 이어질 수 있다. 이는 윤활 조직에서 많은 양으로 과다 발현되고 활성화된 사이토카인이 존재한다. 여기서, TGF- β 는 류머티즘성 관절염 발생 전에 비정상적으로 활성화되어, 연골하골(subchondral) 골수에 중간엽 줄기세포를 동원하고, 골파괴성 골 흡수뿐만 아니라 비결합(unconjugated) 뼈의 골 흡수 및 골 형성을 초래하여, 과도한 관절 연골의 퇴화, 관절 손상 및 파괴를 가져온다.

[0143] 본 개시의 골수섬유증은 심각하게 영향받은 조혈 기능에 의해 유발된 골수 증식성 질환으로, 골수 조혈 조직에서 콜라겐 증식에 의해 유발된다. TGF- β 는 골수 내 혈소판, 거핵세포(megakaryocyte) 및 골수 세포에서 널리 발현되고, 콜라겐 및 피브로네틴의 합성을 촉진하고, 콜라겐을 분해하는 기질 메탈로프로테아제를 억제하고, 메탈로프로테아제 억제제의 합성을 촉진하며, 결국 콜라겐 침착으로 이어진다. TGF- β 는 상피세포 증식 및 골수 미세혈관 성장을 유발할 수 있다.

[0144] 본 개시의 전신 경화증(systemic sclerosis)은 임상적으로 제한되거나 확산되는 피부 비후화 및 섬유증을 특징으로 하는 결합 조직 질환으로, 심장, 폐, 신장, 소화관과 같은 내부 장기를 포함한다. TGF- β 는 섬유아세포의 근섬유질아세포로의 전환을 촉진하면서 피부 섬유아세포의 세포외 기질의 과도한 침착을 촉진한다.

[0145] 본 개시의 화상으로 유도된 비후성 반흔은 화상 환자에서 상처 치유 후 심각한 후유증이다. 이는 정상 피부 조직 구조 또는 생리학적 기능이 없는 정상 조직의 생명력이 부족한 비정상적이고 불안정한 조직이다. 관련된 기전은 복잡하다. 연구에서는 화상 흉터 내 캐라틴세포의 TGF- β 발현이 비교적 높은 것으로 나타났다. 게다가, TGF- β 및 그의 하류 조절 인자 결합 조직 성장 인자인 데코린(decorin) 및 결합 단백질 P311은 상처 치유 및

흉터 형성에 중요한 역할을 한다.

- [0146] 본 개시의 낭포성섬유증은 위장관 및 호흡기에 주로 영향을 미치는 유전적인 외분비선 질환이다. 일반인과 비교하여, TGF- β 1는 낭포성섬유증 환자에서 유의성 있게 증가되며, 근섬유아세포 활성이 명백하다. 기전은 상피-중간엽 전이, 및 섬유아세포의 근섬유아세포로의 전환을 촉진하는 기계적 자극에 의해 활성화된 TGF- β 가 관여하여, 궁극적으로 세포외 기질의 증가된 분비, 콜라겐 침착 및 조직 수축을 초래한다.
- [0147] 본 개시의 사르코이드증은 비-건락성(non-caseous) 괴사 상피세포 과립성 염증 질환이다. 이는 주로 폐 실질의 침습으로 나타나며, 텁프절, 피부, 관절, 간, 신장 및 심장과 같은 많은 장기와 관여한다. 원인은 완전히 명확하지 않으나, 주로 육아종 종양 내 또는 주변에서의 염증세포 내 TGF- β 와 같은 다양한 사이토카인 및 성장 인자의 방출이 관여한다.
- [0148] 본 개시의 심근 섬유증은 중등 내지 중증 관상동맥 축상경화 협착증에 의해 유발된 심근허혈 및 저산소증의 심근 섬유 지속성 및/또는 재발성 악화의 결과이고, 점차 심부전으로 발전하는 만성 허혈성 심장 질환을 초래한다. TGF- β 는 심장 섬유아세포 및 섬유아세포의 근섬유아세포로의 전환, 상피-중간엽 전이 및 내피-중간엽 전이를 촉진시키고, 세포외 기질 합성을 증가시키고 섬유증의 발달을 촉진하는 결합 조직 성장 인자의 별현을 촉진시킬 수 있다.
- [0149] 본 개시의 간섬유증은 병리학적 과정(pathological process)으로, 다양한 병리적 요인에 의해 유발된 간에서의 결합 조직의 비정상적인 증식을 의미하고, 섬유증 과정의 지속이 경변증으로 발달할 것이다. 경변증은 만성 진행형 간 질환으로, 하나 이상의 원인의 장기적 또는 반복적인 작용에 의해 유발된 확산 간 손상(diffuse liver damage)이다. TGF- β 신호전달 경로는 간염, 간섬유증, 경변증 및 간암의 전체 병리학적 과정과 관련된다. 일반적으로, 간세포에서 TGF- β 는 세포 성장을 억제하고 아포토시스(apoptosis)를 촉진할 수 있다. 만성 간 손상 후 TGF- β 의 과다 활성화는 간성상세포의 근섬유아세포로의 전환, 세포외 기질의 과다 침착, 및 경변증이 될 때까지 섬유증이 생성되도록 염증 및 산화 스트레스를 생성하는 많은 수의 간세포의 사멸을 일으킨다.
- [0150] 본 개시의 신장 섬유증은 만성 신장 질환에서 주요한 비가역적 과정으로, 돌이킬 수 없는 신장 손상을 초래한다. TGF- β 는 신세뇨관 상피세포에서 콜라겐 합성을 자극하고 신세뇨관 상피세포를 상피-중간엽 전이를 통해 근섬유아세포로 전환하도록 유도하여, 신장 섬유증을 초래한다. 본 개시의 신장 섬유증은 약물 중독, 고혈압, 당뇨, 저온 지속(persistence of cold), 및 감염과 같은 병리적 요인에 의해 유발될 수 있다.
- [0151] 본 개시의 녹내장은 안압의 증가로 인한 심각한 안질환으로, 디스크 함몰(disc depression) 및 시야 결손을 일으키고, 결국 실명까지 초래할 수 있다. 안압의 증가는 세포외 기질 침착에 의해 유발된 섬유주 그물망 경로(trabecular meshwork pathway)로부터의 배출물 유출 시스템에서 체액(aqueous humor) 및 병변의 유출 저항에서의 증가에 의해 유발된다. 체액에서 유래된 TGF- β 는 국소적으로 피브로네틴과 같은 다양한 세포외 기질을 발현하도록 섬유주 그물망 세포를 유도하고, 세포외 기질 합성 및 분해 평형을 깨뜨릴 수 있고, 이는 세포외 기질 침착을 초래한다.
- [0152] 본 개시의 백내장은 수정체 대사의 장애로 인한 단백질 변성에 의해 유발된 수정체 혼탁(lens opacity)으로, 노화, 유전, 국소영양장애(local nutritional disorder), 면역 및 대사 이상, 트라우마, 중독, 방사선 등과 같은 다양한 요인에 의해 유발된다. 후낭혼탁(posterior capsule opacification)은 피막외 백내장 적출의 가장 흔한 합병증이다. 백내장 수술 후 후낭혼탁은 수술시 남은 수정체 상피세포의 비정상적 성장 및 퇴화성 섬유증(degeneration fibrosis)에 의해 유발된다. TGF- β 유도 수정체 상피-중간엽 전이는 후낭혼탁 및 섬유성 백내장(fibrotic cataract)의 주요 원인이다.
- [0153] 본 개시의 증식성 망막증은 열공성 망막 박리(rhegmatogenous retinal detachment) 수술 후 망막 표면 상 및 유리체 뒷면에서 광범위한 섬유 증식막(fibrous proliferative membrane)의 수축 및 신장(stretching)에 의해 유발된 재발성 망막 분리이다. 섬유 증식막은 망막색소상피세포, 섬유아세포, 신경교세포 및 대식세포로 구성된다. TGF- β 는 유리체, 망막하액(subretinal fluid) 및 증식막에서 과발현되어, 망막색소상피세포의 이동 및 증식, 근섬유아세포로의 전환, 및 신경교세포의 증식 및 수축을 유도한다.
- [0154] 본 개시의 켈로이드는 피부 손상의 치유 과정 동안 과민반응을 지속하는 콜라겐 합성 및 대사 기전의 정상 압박(constraint) 조절의 부족에 의해 유발되는 콜라겐 섬유의 과다한 증식의 결과로, 결합 조직 증식증으로 잘 알려져 있다. TGF- β 는 섬유아세포 증식을 자극하고, 기질 프로테아제 억제제의 합성 및 활성을 증가시키고, 콜라겐 침착 및 결합 증식을 촉진하는 결합 조직 성장 인자를 활성화시킨다.
- [0155] 본 개시의 혈관 재협착은 민무늬근 비대증, 혈관성형술, 혈관 수술 또는 혈관 손상 후 혈관 치유 반응으로 인한

콜라겐 및 흉터 조직 비대증에 의한 국소 혈관 내강의 재협착증이다. TGF- β 는 혈관 민무늬근 세포 증식 및 신생내막(neointimal) 형성을 촉진하는 하류 Smad 및 ERK/MAPK 신호전달 경로를 조절하고, 세포의 기질 단백질 분비를 촉진하고 내막 비대증을 강화시킬 수 있다.

[0156] 본 개시의 마르판 증후군은 가늘고 고르지 못한 팔다리, 손가락 및 발가락으로 특징되는 유전적 결합조직 질환이며, 키는 명백하게 일반인에 비해 크고 비정상적인 심혈관계를 동반하며, 폐, 눈, 경질막(dura mater), 경구개(hard palate)를 포함하는 다른 기관에 영향을 미칠 수 있다. 마르판 증후군은 15번 염색체에 있는 당단백질 미세섬유(microfibrilla)를 암호화하는 마이크로피브린-1(FBN1) 유전자에서의 돌연변이에 의해 유발되어, 미세섬유의 형성을 차단한다. 잠재적 TGF- β 결합 단백질과 마이크로피브린의 상호작용은 비활성 TGF- β 잠재적 복합체를 안정화하는데 이용될 수 있기 때문에, 마이크로피브린이 비정상일 때 TGF- β 가 과활성화된다. 관여된 세포의 기질 구성 및 이상 신호 전달이 함께 마르판 증후군의 표현형을 결정한다.

[0157] 본 개시의 치료 대상 개체는 전술한 질병 및 상태를 갖거나 가질 수 있는 인간 또는 동물이다.

[0158] 본 개시의 섬유증 질환의 예방 및 치료에서의 용도는 본 개시의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 폴리펩티드 단편 유도체, 폴리펩티드 유도체, 및 화학 변형을 통한 전술된 단편의 폴리펩티드 유도체 및 그의 유도체가 단일 활성 성분으로 사용되거나, 상호 간에 조합으로, 또는 활성 성분으로 섬유증을 예방하거나 치료하는 활성을 갖는 다른 전통 중국 약제, 화합물 또는 생물학적 제제와 조합으로 사용될 수 있다는 것이다.

[0159] 본 개시의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 폴리펩티드 단편 유도체, 폴리펩티드 유도체, 및 화학 변형을 통한 전술된 단편의 폴리펩티드 유도체 및 그의 유도체는 약물 물질(drug substance)로서 직접 사용될 수 있고, 섬유증의 예방 또는 치료를 위한 약물을 제조하는데 약학적으로 허용가능한 담체를 통해 사용될 수도 있다. 여기서, 약학적으로 허용가능한 담체는 약학적 제형에 따라 통상적으로 선택될 수 있고, 예를 들면, 희석제, 충전제, 부형제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 기포제, 계면활성제, 흡수 강화제, 윤활제, 흡착 담체, 지속적 방출 마이크로스피어, 이식제, 인 시투 형성 미세입자(in situ forming microparticle), 리포좀, 마이크로에멀젼, 인 시투 히드로겔(in situ hydrogel), 나노입자, 프로테아제 억제제, 생물 접착제, 융합 단백질, 항체, 및 폴리펩티드이다.

[0160] 본 개시의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 폴리펩티드 단편 유도체, 폴리펩티드 유도체, 및 화학 변형을 통한 전술된 단편의 폴리펩티드 유도체 및 그의 유도체의 투여 제형(dosage form)은 특별하게 제한되지 않는다. 이는 당업계에서 통상적인 제형이고, 바람직하게는 고체, 반고체 또는 액체이며, 수용액, 비수용액 또는 혼탁액일 수도 있고, 정제, 주사제, 캡슐, 과립, 안제(ophthalmic preparation), 흡입제, 연고, 크림, 스프레이, 에어로졸, 젤, 파우더, 안료, 이식물, 로션 등일 수도 있다.

[0161] 본 개시의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 폴리펩티드 단편 유도체, 폴리펩티드 유도체, 및 화학 변형을 통한 전술된 단편의 폴리펩티드 유도체 및 그의 유도체는 적절한 투여의 경로에 의해 투여될 수 있으며, 바람직하게는 주사에 의해 또는 경구 투여, 폐 투여, 비강 투여, 경피 투여 및 안구 투여에 투여될 수 있다. 여기서 주사에 의한 투여의 방법은 바람직하게는 정맥내 주사 또는 정맥내 점적, 복강내 주사, 피하 주사, 및 근육내 주사를 포함한다.

[0162] 본 개시의 일 구체예에서, 선택된 폴리펩티드는 서열 목록에서 서열번호 1의 단편으로, 서열번호 2 (N2로 약칭됨)이다. 선택된 폴리펩티드 유도체 서열번호 3 (N3로 약칭됨)은 아미드 결합을 통해 폴리펩티드의 N 말단에 PEG2를 결합하여 N2에서의 화학 변형을 갖는 산물이다. 선택된 폴리펩티드의 투여 제형은 수용액이고 용매는 멸균 0.01 M PBS 버퍼이다. 선택된 치료 대상 개체는 블레오마이신 (BLM; 용량 3 mg/kg)에 의해 유도된 폐섬유증을 갖는 랫트이다. 선택된 랫트는 특정 무병원성(SPF) SD 랫트(Sprague-Dawley rat)이다. 랫트의 체중은 200 내지 250 g이다. N2 및 N3의 투여 경로는 최소한으로 침습적인 기관내 점적 주입(intratracheal instillation)이고, 폴리펩티드 N2 및 N3의 바람직한 용량은 둘다 2.5 mg/kg 이다. 블레오마이신 단독의 기관내 점적 주입과 비교하여, 랫트에 블레오마이신과 폴리펩티드 N2 또는 N3의 기관내 점적 주입 후, 염증세포 침윤이 감소되었고, 세포의 기질 단백질 합성이 감소되었고, 콜라겐 침착이 감소되어, 이에 따라 랫트에서 블레오마이신에 의해 유도된 폐 염증 및 섬유증이 억제되었다.

[0163] 나아가, 본 개시의 일 구체예에서, 선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 그의 유도체는 각각 서열번호 4 내지 11이다. 선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 유도체의 투여 제형은 수용액이고 용매는 멸균 생리식염수(pH 5 내지 7)이다. 선택된 치료 대상 개체는 블레오마이신 (BLM; 용량 3 mg/kg)에 의해 유도된 폐섬유증을 갖는 랫트이다. 선택된 랫트는 SPF(specific pathogen free) SD 랫트이다. 랫트의 체중은 200 내지 250 g이다.

선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 유도체의 투여 경로는 최소한으로 침습적인 기관내 점적 주입이고, 투여 용량은 모두 6 mg/kg 이다. 블레오마이신 단독의 기관내 점적 주입과 비교하여, 랫트에 블레오마이신과 서열 번호 4 내지 11의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 또는 그의 유도체의 기관내 점적 주입 후, 염증성 세포 침윤이 감소되었고, 세포외 기질 콜라겐의 침착이 감소되었고, 이에 따라 랫트에서 블레오마이신에 의해 유도된 폐 염증 및 섬유증이 억제되었다.

[0164] 나아가, 본 개시의 일 구체예에서, 선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 그의 유도체는 각각 서열번호 2 내지 54이다. 선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 유도체의 투여 제형은 수용액이고 용매는 멸균 생리식염수 (pH 5 내지 7)이다. 선택된 치료 대상 개체는 블레오마이신 (용량 4 mg/kg)에 의해 유도된 폐섬유증을 갖는 랫트이다. 선택된 랫트는 특정 SPF SD 랫트이다. 랫트의 체중은 200 내지 250 g이다. 선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 유도체의 투여 경로는 최소한으로 침습적인 기관내 점적 주입이고, 투여 용량은 모두 8 mg/kg 이다. 블레오마이신 단독의 기관내 점적 주입과 비교하여, 랫트에 블레오마이신과 서열번호 2 내지 54의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 또는 그의 유도체의 기관내 점적 주입 후, 폐 섬유증에 의한 랫트에서의 삶의 질의 저하가 유의성 있게 향상되었고, 폐조직 내 염증세포 침습이 감소되었고, 세포외 기질 콜라겐의 침착은 감소되었고, TGF- β 의 단백질 활성 및 유전자 발현이 섬유증 동안 유의성 있게 감소되어, 서열번호 2 내지 54의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 또는 그의 유도체의 기관내 점적 주입이 랫트에서의 블레오마이신에 의해 유도된 폐 염증 및 섬유증을 억제하고, 섬유증에 의한 삶의 질의 저하를 개선시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[0165] 나아가, 본 개시의 일 구체예에서, 선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 그의 유도체는 각각 서열번호 2 내지 54이다. 선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 유도체의 투여 제형은 수용액이고 용매는 멸균 생리식염수 (pH 5 내지 7)이다. 선택된 치료 대상은 블레오마이신 (용량 4 mg/kg)에 의해 유도된 폐섬유증을 갖는 랫트이다. 선택된 랫트는 특정 무병원성(SPF) SD 랫트(Sprague-Dawley rat)이다. 랫트의 체중은 200 내지 250 g이다. 선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 유도체의 투여 경로는 정맥 주사이고, 투여 용량은 모두 10 mg/kg 이다. 블레오마이신의 유도 후 4일차에, 멸균 생리식염수 또는 서열번호 1 내지 54의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 또는 유도체를 1일 1회씩 13일차까지 주사하기 시작되었다. 정맥내로 생리식염수가 주사된 랫트와 비교하여, 랫트에 서열번호 2 내지 54의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 또는 그의 유도체의 정맥내 주사 후, 폐 섬유증에 의한 랫트에서의 삶의 질의 저하가 유의성 있게 향상되었고, 폐조직 내 염증세포 침습이 감소되었고, 세포외 기질 콜라겐의 침착이 감소되었고, TGF- β 의 유전자 발현 및 단백질 활성화가 섬유증 동안 유의성 있게 감소되어, 서열번호 2 내지 54의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 또는 그의 유도체의 정맥내 주사가 랫트에서의 블레오마이신에 의해 유도된 폐 염증 및 섬유증을 억제하고, 섬유증에 의한 삶의 질의 저하를 개선시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[0166] 나아가, 본 개시의 일 구체예에서, 선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 그의 유도체는 각각 서열번호 2 내지 54이다. 선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 유도체의 투여 제형은 수용액이고 용매는 멸균 생리식염수 (pH 5 내지 7)이다. 선택된 대상은 특정 무병원성 C57BL/6J 마우스이다. 마우스의 체중은 16 내지 17 g이다. 선택된 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 유도체의 투여 경로는 정맥내 주사이고, 투여 용량은 모두 20 mg/kg 이다. 대조군에서의 마우스에는 13일차까지 1일 1회씩 멸균 생리식염수를 주사하고, 뇌, 심장, 간, 폐, 신장 및 비장을 병리학적 검사를 위해 빼어냈다. 정맥내로 생리식염수가 주사된 마우스와 비교하여, 서열번호 2 내지 54의 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 또는 그의 유도체의 정맥내 주사 후, 마우스에서 관련된 장기 독성이 생성되지 않았고, 따라서, 안전하다. 본 개시의 유용한 효과는 본 개시가 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 폴리펩티드 단편 유도체 및 폴리펩티드 유도체, 및 그의 제조 방법, 및 섬유증 질환의 예방 및 치료에서의 약제의 제조에 대한 그의 용도를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0167] 본 개시의 구체예 또는 종래 기술에서의 기술적 문제점을 더 명확하게 설명하기 위해, 구체예들 또는 종래 기술 설명에서 사용된 도면이 하기에서 간략하게 설명될 것이다.

도 1은 실험동물의 폐 계수(coefficient)를 나타낸다.

도 2는 실험동물의 병리학적 절편(section)을 나타낸다.

도 3은 실험동물의 병리학적 절편 점수(score)의 결과를 나타낸다.

도 4는 실험동물의 기관지 폐포 세척액 내 염증 세포의 분류를 나타낸다.

도 5는 실험동물의 폐 조직 파쇄물 내 세포의 기질 단백질의 발현을 나타낸다.

도 6은 실험동물의 폐 조직 파쇄물 내 세포의 기질 단백질의 반-정량적 분석(semi-quantitative assay)을 나타낸다.

도 7은 실험동물의 폐 조직 중 히드록시프롤린(hydroxyproline) 함량(amount)을 나타낸다.

도 8은 실험동물의 폐 조직 파쇄물 중 Smad 단백질 발현을 나타낸다.

도 9는 실험동물의 폐 조직 파쇄물 중 Smad 단백질의 반-정량적 분석을 나타낸다.

도 10은 실험동물의 폐 조직 중 활성 TGF- β 의 함량을 나타낸다.

도 11은 실험동물의 폐 조직 중 ctgf, 콜라겐 I 및 콜라겐 III의 유전자 발현을 나타낸다.

도 12는 실험동물의 폐 조직 중 히드록시프롤린 함량의 발현을 나타낸다.

도 13은 실험동물의 폐 조직의 병리학적 검사(HE)을 나타낸다.

도 14는 실험동물의 폐 조직의 병리학적 검사(HE)의 평가(scoring) 결과를 나타낸다.

도 15는 실험동물의 폐 조직의 병리학적 검사(마손(Masson))를 나타낸다.

도 16은 실험동물의 폐 조직의 병리학적 검사(마손)의 평가 결과를 나타낸다.

도 17은 실험동물의 폐 조직의 병리학적 검사(HE)를 나타낸다(투여 경로: 기관내 점적 주입).

도 18은 실험동물의 폐 조직의 병리학적 검사(마손)를 나타낸다(투여 경로: 기관내 점적 주입).

도 19는 실험동물의 폐 조직의 병리학적 검사(HE)를 나타낸다(투여 경로: 정맥내 주사).

도 20은 실험동물의 폐 조직의 병리학적 검사(마손)를 나타낸다(투여 경로: 정맥내 주사).

도 21은 실험동물의 뇌 조직의 병리학적 검사(HE)를 나타낸다(투여 경로: 정맥내 주사).

도 22는 실험동물의 심장 조직의 병리학적 검사(HE)를 나타낸다(투여 경로: 정맥내 주사).

도 23은 실험동물의 간 조직의 병리학적 검사(HE)를 나타낸다(투여 경로: 정맥내 주사).

도 24는 실험동물의 폐 조직의 병리학적 검사(HE)를 나타낸다(투여 경로: 정맥내 주사).

도 25는 실험동물의 신장 조직의 병리학적 검사(HE)를 나타낸다(투여 경로: 정맥내 주사).

도 26은 실험동물의 비장 조직의 병리학적 검사(HE)를 나타낸다(투여 경로: 정맥내 주사).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0168]

본 개시는 하기 실시예에 의해 더 자세히 설명될 것이나, 본 발명은 실시예의 범위로 제한되지 않는다. 하기 실시예에서 실험 방법의 특정되지 않은 조건의 경우, 실험은 통상적인 방법 및 조건 또는 제품의 설명서에 따라 수행되었다.

[0169]

실시예 1. 주요 실험 재료, 동물 및 웨티드 합성

[0170]

1. 주요 실험 재료 및 동물

[0171]

블레오마이신 히드로클로라이드는 하이很差 화이자 제약회사(Hisun Pfizer Pharmaceuticals Co., LTD)로부터 구입하고; 졸레틸(Zoletil)은 프랑스 벼박 Virbac Co., Ltd으로부터 구입하며 (배치번호 6ALU); 0.9% 소듐 클로라이드 주사액은 쓰촨 켈룬 제약회사(Sichuan Kelun Pharmaceutical Co., Ltd)로부터 구입하였다 (batch number: M16110319).

[0172]

SPF 등급 SD 랫트로 청두 다슈오 실험동물(Chengdu Dashuo Experimental Animal Co., Ltd)로부터 체중이 200 내지 250 g인 수컷을 구입하였다.

[0173]

2. 폴리펩티드 N1 내지 N54의 서열은 표 1의 서열번호 1 내지 54으로, 합성 방법은 다음과 같다:

[0174]

Fmoc-보호 레진을 출발 물질로 사용하고, 완전히 보호된 웨티드 사슬 레진을 합성하기 위해 고체상 웨티드 합성 기로 Fmoc 고체상 합성 방법을 이용함으로써 각 아미노산을 하나씩 결합시켰다. 사용된 아미노산은 모두 천연

L-형 아미노산이었다. 결사슬이 완전히 보호된 웨티드 사슬 레진을 절단제(cleavage reagent)로 절단시켰다. 탈보호된 웨티드를 레진으로부터 절단시키고, 결사슬 보호기를 제거하였다. 원심분리하고 건조하여 비정제(crude) 폴리웨티드를 얻었다. 마지막으로, 비정제 폴리웨티드를 프렙 HPLC(preparative HPLC)를 이용하여 정제하고, 특정 성분들을 수집하고, 동결건조하여 정제된 폴리웨티드 산물을 얻었다. 순도 검출 조건은 다음과 같다: 크로마토그래피 컬럼: SepaxGP-C18 5 μ 120 Å 4.6*150 mm, 이동상 조성: A상 H₂O 중 0.1% TFA; B상 (80% CAN + 20% H₂O) 중 0.09% TFA, 유속(flow rate) 1.0 ml / 분, B상을 20-30 %에 28.0-30.0%에서 38.0-40.0%까지 증가시켰고, 1회 주입량은 30 μl였다.

[0175] PEG 변형 방법: 먼저, mPEG-SC 및 폴리웨티드 (물 농도 (1.5 내지 2.0) : 1)를 청량하여 PBS 완충용액 (pH 5 내지 8.5) 40 ml 내지 100 mL에 넣었고, 4°C에서 밤새 반응시켰다. 반응 후 시료를 세미-프렙(semi-preparative) HPLC를 이용하여 정제하였다. 정제 조건은 다음과 같다: 세미-프렙 컬럼: YMC, 250 mm X 10 mm (5 μm 필터); 이동상: CAN (+0.1% TFA), H₂O (+0.1% TFA); ACN 선형 구배(linear gradient): 30%-35%; 유속: 2 mL/분; 작동 시간: 15 분; 로딩/loading) 부피: 1.0 ml; 검출 파장: 220 nm. 목적 피크가 상승할 때, 산물을 원심분리 투브로 수집하여 밤새 -70°C 저온 냉동고에서 예비 동결하고 순백색(whole white) 가루가 시작적으로 관찰될 때까지 동결 건조기를 사용하여 동결건조시켰다 (약 30시간). 마지막으로, 동결건조된 산물을 얻어, 청량하고 기록하고, 확인(identification)을 위해 -20°C에서 냉동고에서 보관하였다.

표 1

웨티드 서열		
웨티드 서열	서열번호	서열
N1	1	TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsn
N2	2	TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAsp
N3	3	(PEG2)TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAsp
N4	4	ArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAsp
N5	5	ArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnCys
N6	6	TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAsp
N7	7	TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspArgGluAspAsnCys
N8	8	TyrArgPheLeuAlaLysGluAsnThrGlnAsp
N9	9	(PEG2)TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAsp
N10	10	ArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAsp(PEG2)
N11	11	(PEG2)ArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAsp
N12	12	ValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAsp
N13	13	LeuAlaLysGluAsnValThrGlnAsp
N14	14	LeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnCys
N15	15	TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspArgCys
N16	16	TyrArgValArgPheLeuArgLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnCys
N17	17	TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnCysThr
N18	18	PheTyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnCys
N19	19	LeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspArgCys
N20	20	ArgTyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAsp
N21	21	SerLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAsp
N22	22	ArgPheLeuArgLysGluAsnValThrGlnAsp
N23	23	TyrArgValArgPheLeuArgLysGluAsnThrGlnAspAlaGluAsp
N24	24	ValArgPheLeuArgLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAsp
N25	25	TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspArgCysThr
N26	26	PheTyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspArgGluAspAsnCys
N27	27	TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnCys (PEG2)
N28	28	(PEG2)ValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAsp

N29	29	(PEG2)LeuAlaLysGluAsnValThrGlnAsp
N30	30	LeuAlaLysGluAsnValThrGlnAsp(PEG2)
N31	31	(PEG2)TyrArgPheLeuAlaLysGluAsnThrGlnAsp
N32	32	ArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnCys (PEG2)
N33	33	LeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnCys (PEG2)
N34	34	(PEG2)TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspArgGluAspAsnCys
N35	35	TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspArgGluAspAsnCys (PEG2)
N36	36	TyrArgValArgPheLeuArgLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnCys(PEG2)
N37	37	(PEG2)TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnCysThr
N38	38	PheTyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnCys(PEG2)
N39	39	TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnThrCys(PEG2)
N40	40	(PEG2)LeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspArgCys
N41	41	ArgTyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAsp(PEG2)
N42	42	(PEG2)LeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspArg
N43	43	ArgTyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAsp(PEG2)
N44	44	TyrArgSerValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAsp(PEG2)
N45	45	LeuAlaLysGluAsnArgThrGlnAsp(PEG2)
N46	46	(PEG2)TyrArgValArgPheLeuArgLysGluAsnThrGlnAspAlaGluAsp
N47	47	ValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspArgCys(PEG2)
N48	48	TyrArgValArgPheLeuArgLysGluAsnThrGlnAspAlaGluAsp(PEG2)
N49	49	ValArgPheLeuArgLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAsp(PEG2)
N50	50	(PEG2)TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspArgCysThr
N51	51	(PEG2)PheTyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspArgGluAspAsnCys
N52	52	TyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspArgCysThr(PEG2)
N53	53	PheTyrArgValArgPheLeuAlaLysGluAsnValThrGlnAspArgGluAspAsnCys(PEG2)
N54	54	TyrArgValArgPheLeuArgLysGluAsnValThrGlnAspAlaGluAspAsnThrCys(PEG2)

[0177] 실시예 2. 폴리펩티드 및 폐섬유증의 랫트 모델

[0178] 1. 주요 실험 재료 및 동물

[0179] 블레오마이신은 니폰 카야큐(Nippon Kayaku Co., Ltd)로부터 구입하고(배치 번호: 650472); 콜레틸 50은 프랑스 벼박 Virbac Co., Ltd)으로부터 구입하였다 (배치번호 6ALU).

[0180] N2 및 N3은 청두 카이지 생물의학 기술 개발(Chengdu Kaijie Biomedical Technology Development Co., Ltd)에 의해 합성되었다. N2의 서열은 다음과 같다: Tyr-Arg-Val-Arg-Phe-Leu-Ala-Lys-Glu-Asn-Val-Thr-Gln-Asp-Ala-Glu-Asp (서열은 서열번호 2이다). N3의 서열번호는 다음과 같다: PEG2-Tyr-Arg-Val-Arg-Phe-Leu-Ala-Lys-Glu-Asn-Val-Thr-Gln-Asp-Ala-Glu-Asp (PEG2는 아미드 결합을 통해 폴리펩티드의 N-말단에 결합되었고, 서열은 서열번호 3이다)

[0181] SPF 등급 SD 랫트는 총칭시의 다평 병원(Daping Hospital of Chongqing City)으로부터 체중 200 내지 250 g인 수컷으로 구입하였다.

[0182] 2. 폐섬유증의 랫트 모델

- [0183] 랫트를 투여 전에 체중을 측정하여, 콜레틸 마취액 65 mg / kg으로 근육내 주사하였다. 랫트가 마취 3기(stage)에 들어간 후, 실험 랫트를 측면으로 눕혀 고정하였다. 게이지 바늘 크기 12를 약물을 주입하기 위해 성문(glottis)을 따라 구강을 통해 랫트 기관(trachea) 내 삽입하였다. 기관내 투여 후 1일차부터 7일차까지 실험 동물에 정상적으로 사료를 공급하고, 사료 및 물을 원하는대로 주면서 매일 체중을 측정하였다.
- [0184] 블랭크 대조군(blank control group)의 랫트에는 마취 후 어떠한 처리도 제공하지 않았다; 모델군(블레오마이신)의 랫트에는 블레오마이신(3 mg/kg)을 기관내로 점적 주입하였다; PBS 대조군의 랫트에는 동일한 양의 멸균 PBS 버퍼(0.01 M, pH=9.5)를 기관내로 점적 주입하였다; 폴리펩티드 대조군의 랫트에는 폴리펩티드 N2 2.5 mg/kg(용매는 0.01 M, pH=9.5 PBS 버퍼였다)을 기관내로 점적 주입하였다; N2 처리군의 랫트에는 폴리펩티드 N2 2.5 mg/kg 및 블레오마이신 3 mg/kg를 동시에 기관내로 점적 주입하였다; N3 처리군의 랫트에는 폴리펩티드 N3 2.5 mg/kg 및 블레오마이신 3 mg/kg를 동시에 기관내로 점적 주입하였다.
- [0185] 실시예 3. 랫트에서 폐 계수의 검출
- [0186] 실시예 2에서의 랫트를 체중을 측정하고 과량 마취로 희생시켰다. 랫트의 양쪽의 폐 조직을 채취하고, 폐 조직 주변 결합 조직을 조심스럽게 제거하였다. 생리식염수로 세척하여 여과자로 건조시킨 후, 전체 폐의 습중량(wet weight)을 전자 저울로 측정하였다. 전체 폐의 습중량을 전자저울로 측정한 후, 폐 계수를 식 폐 계수 = 폐 질량(mg) / 체중(g)에 따라 계산하였다(결과는 도 1에 나타낸다). 결과는 다음과 같다: 블랭크 대조군, PBS 대조군 및 약물 대조군과 비교하여, 블레오마이신군의 왼쪽 폐, 오른쪽 폐 및 전체 폐의 폐 계수는 모두 유의성 있게 증가되어 (*: p < 0.01). 랫트 폐 조직이 병변을 갖는 것을 나타낸다; 블레오마이신군에서의 랫트와 비교하여, N2 및 N3 처리군의 왼쪽 폐, 오른쪽 폐 및 전체 폐의 폐 계수는 유의성 있게 감소되어 (#: p < 0.05), N2 및 N3 처리군에서 폐 조직 병변이 완화되는 것을 나타낸다.
- [0187] 실시예 4. 랫트 폐 조직의 병리학적 절편의 HE 염색
- [0188] 실시예 2의 랫트의 폐 조직을 채취하고, 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 파라핀에 포매시켰다(embedded). 폐 조직이 포매된 왁스 블록(wax block)을 가장 큰 단면을 따라 절단하였다. 폐 조직에서의 병리학적 변화는 헤마토실린-에오신(hematoxylin-eosin; HE) 염색을 이용하여 관찰하였다. 폐 조직에서의 병리학적 변화를 광학 현미경(저배율)에서 100배 배율로 관찰하였다(결과는 도 2에 나타낸다). 결과는 다음과 같다: PBS 대조군 및 약물 대조군에서, 폐포 형태가 정상이었고, 폐포벽이 빈약하였고, 간질(interstitial)에 매우 적은 양의 염증성 세포 침윤이 있었다; 모델군에서, 폐 실질 병변의 작은 영역이 더 많았고, 폐 실질 병변 영역에서는 폐포벽이 두꺼워졌고, 폐포중격(alveolar septum)이 파열되었고, 격리된 폐포가 폐포낭(pulmonary vesicle)으로 융합되었고, 더 많은 폐포 구조가 사라졌고, 간질에 더 많은 염증성 세포 침윤이 있었다; 모델군과 비교하여, N2 및 N3 군에서의 폐 조직의 폐포 구조가 적은 양의 폐 실질 병변의 작은 영역이 있어서 비교적 온전한 상태였고, 간질에 적은 양의 염증성 세포 침윤이 있었다.
- [0189] Szapie, et al.에 의해 제공된 방법에 따라, 폐포염(alveolitis)의 정도는 병변의 범위에 따라 등급이 매겨졌고 0 내지 3점에 해당하는 0 내지 3 등급으로 나눌 수 있었다. 폐포염의 정도에 대한 평가 지수는 다음과 같다: 0 등급, 폐포염 없음; 1 등급, 경증(mild) 폐포염, 늑막(pleura) 근처 또는 국소적으로 폐포중격 내 단핵구의 침윤이 약간 증가한 것으로 나타나며, 폐포 구조 손상 없이 20% 미만의 병변 범위를 가짐; 2 등급, 중등(moderate) 폐포염, 늑막 근처에 비교적 심각한 20% 내지 50% 병변 범위; 3 등급, 확산 분포된 중증(severe) 폐포염, 병변 범위는 50% 보다 높고, 간헐적으로(occasionally) 폐 실질 병변을 가짐. 염증성 병리 점수의 결과(결과는 도 3에 나타낸다)는 다음과 같다: 블랭크 대조군, PBS 대조군 및 약물 대조군과 비교하여, 블레오마이신군에서 랫트의 유의성 있는 염증성 병리학적 변화가 있었다 (*: p < 0.01); BLM군과 비교하여, N2 및 N3 처리군에서 랫트 폐 조직의 염증성 병변에 유의성 있는 완화가 있었다 (#: p < 0.01); 결과는 폴리펩티드 N2 및 N3이 블레오마이신에 의한 랫트에서 폐 염증을 억제할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0190] 실시예 5. 라이트-김자(Wright-Giemsa) 염색에 의한 랫트의 기관지 폐포 세척액 내 염증성 세포의 개수의 변화의 검출
- [0191] 기관지 폐포 세척액을 수집하고, 원심분리로 재현탁시켰다. 세포 재현탁액의 또 다른 5 μ l를 현미경 슬라이드에 적용하였다. 세포 현탁액을 자연적으로 건조시킨 후, 적절한 양의 메탄올을 30초 반응을 위해 첨가하고, 라이트-김자로 염색하고, 세포의 계수 및 분류를 현미경 관찰로 수행하였다. 계수(counting) 방법은 다음과 같다: 대식세포, 림프구 및 호중구의 개수는 100개의 온전한 세포 중 대식세포, 림프구, 및 호중구의 각각의 비율에 기초하여 염증성 세포의 총 개수에 따라 계산되었다(결과는 도 4에 나타낸다). 블랭크 대조군, PBS 대조군 및 약

물 대조군에서의 랫트와 비교하여, 블레오마이신군에서 랫트의 대식세포, 이형핵 세포(heteromorphic nuclear cell) 및 램프구의 개수는 유의성 있게 증가되었다 (*: p < 0.01); 블레오마이신군에서의 랫트와 비교하여, N2 및 N3 처리군에서 랫트의 대식세포, 이형핵 세포 및 램프구의 개수는 유의성 있게 감소되어 (#: p < 0.05), 폴리펩티드 N2 및 N3이 블레오마이신에 의한 랫트에서 폐 염증을 억제할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0192] 실시예 6. 웨스턴 블롯에 의한 랫트의 폐 조직 파쇄물 중 세포외 기질 단백질의 수준의 검출

[0193] 실시예 2의 랫트 폐 조직을 채취하고, RIPA 용해물(lysate)을 사용하여 균질화시키고(폐 조직 100 mg이 용해액 1 mL에 해당함), 원심분리하여 상층액을 얻고, 단백질 농도를 BCA 방법으로 결정하였다. 동일한 양의 단백질 시료를 취하여 웨스턴 블롯 실험을 항-GAPDH, 항-피브로넥틴, 항-콜라겐 I 및 항-콜라겐 III 항체를 사용하여 수행하였다 (결과는 도 5에 나타낸다).

[0194] 내부 참조(internal reference)로 GAPDH를 사용하여, 블랭크 대조군, PBS 대조군 및 약물 대조군과 비교하여, BLM군의 랫트 폐 조직에서 피브로넥틴, 콜라겐 I 및 콜라겐 III의 발현 밴드의 강도는 유의성 있게 증가되어, 블레오마이신이 랫트 폐 조직에서 세포외 기질 침착을 유도하였다는 것을 나타냈다; 블레오마이신군과 비교하여, 처리군의 랫트 폐 조직에서 피브로넥틴, 콜라겐 I 및 콜라겐 III의 발현 밴드의 강도는 대조군의 수준으로 거의 되돌아가, 폴리펩티드 N2 및 N3가 블레오마이신에 의한 폐섬유증을 유의성 있게 감소시킬 수 있다는 것을 나타냈다.

[0195] 각 밴드의 그레이스케일(grayscale) 값은 이미지 프로 플러스 6.0(Image pro plus 6.0) 영상 분석 소프트웨어를 사용하여 검출 및 분석하였다 (결과는 도 6에 나타낸다). 결과는 다음과 같다: 블랭크 대조군, PBS 대조군 및 약물 대조군에서의 랫트와 비교하여, 블레오마이신군의 랫트 폐 조직에서 피브로넥틴, 콜라겐 I 및 콜라겐 III 단백질의 수준은 유의성 있게 증가되었다 (*: p < 0.01); 블레오마이신군의 랫트와 비교하여, N2 및 N3 처리군에서 랫트의 피브로넥틴, 콜라겐 I 및 콜라겐 III의 수준은 유의성 있게 감소되었다 (#: p < 0.05). 그레이스케일 값의 검출은 전술된 설명을 뒷받침하였다.

[0196] 실시예 7. 랫트의 폐 조직 파쇄물 중 히드록시프롤린 함량의 검출

[0197] 실시예 2의 랫트 폐 조직을 채취하고, 폐 조직 파쇄물 중 히드록시프롤린 함량을 보스터 히드록시프롤린 알칼리 가수분해 분석 키트(Boster Hydroxyproline Alkali Hydrolysis Assay Kit) (Cat. No. A030)를 이용하여 검출하였다 (결과는 도 7에 나타낸다). 결과는 다음과 같다: 블랭크 대조군, PBS 대조군 및 약물 대조군과 비교하여, 블레오마이신군의 폐 조직 내 히드록시프롤린 함량은 유의성 있게 증가되어 (*: p < 0.01), BLM이 랫트의 폐에서 콜라겐 섬유 침착을 유도했다는 것을 나타낸다; 블레오마이신군과 비교하여, N2 및 N3 처리군의 폐 조직 내 히드록시프롤린 함량은 유의성 있게 감소되어 (#: p < 0.05), 폴리펩티드 N2 및 N3가 BLM 유도 폐 섬유증을 유의성 있게 억제하였다는 것을 나타낸다.

[0198] 실시예 8. 웨스턴 블롯에 의한 랫트의 폐 조직 파쇄물 중 Smad 단백질의 수준의 검출

[0199] 실시예 2의 랫트 폐 조직을 채취하고, 조직을 RIPA 용해물을 사용하여 균질화시키고 (폐 조직 100 mg이 용해물 1 mL에 해당함), 원심분리하여 상층액을 얻고, 단백질 농도를 BCA 방법으로 결정하였다. 동일한 양의 단백질 시료를 취하여 웨스턴 블롯 실험을 항-GAPDH, 항-p-Smad2 및 항-p-Smad3 항체를 사용하여 수행하였다 (결과는 도 8에 나타낸다).

[0200] 내부 참조로 GAPDH를 사용하여, 블랭크 대조군, PBS 대조군 및 약물 대조군과 비교하여, BLM군의 랫트 폐 조직에서 p-Smad2 (인산화 Smad2) 및 p-Smad3 (인산화 Smad3)의 발현 밴드의 강도는 유의성 있게 증가되어, 블레오마이신이 랫트 폐 조직에서 TGF-β /Smad 신호전달 경로의 전달을 유도하였다는 것을 나타냈다; 블레오마이신군과 비교하여, N2 및 N3 처리군의 랫트 폐 조직에서 p-Smad2 및 p-Smad3의 발현 밴드의 강도는 대조군의 수준으로 거의 되돌아가, 웹티드 N2 및 N3가 블레오마이신에 의한 폐 조직에서 TGF-β /Smad 신호전달 경로의 전달을 유의성 있게 억제할 수 있다는 것을 나타냈다.

[0201] 각 밴드의 그레이스케일 값은 이미지 프로 플러스 6.0(Image pro plus 6.0) 영상 분석 소프트웨어를 사용하여 검출 및 분석하였다 (결과는 도 9에 나타낸다). 결과는 다음과 같다: 블랭크 대조군, PBS 대조군 및 약물 대조군에서의 랫트와 비교하여, 블레오마이신군의 랫트 폐 조직에서 p-Smad2 및 p-Smad3의 수준은 유의성 있게 증가되었다 (*: p < 0.01); 블레오마이신군에서의 랫트와 비교하여, N2 및 N3 처리군에서 랫트의 p-Smad2 및 p-Smad3의 수준은 유의성 있게 감소되었다 (#: p < 0.05). 그레이스케일 값의 검출은 전술된 설명을 뒷받침했다.

[0202] 실시예 9. 폴리펩티드 및 폐 섬유증의 랫트 모델

- [0203] 1. 주요 실험 재료 및 동물
- [0204] 블레오마이신은 하이정 화이자 제약회사로부터 구입되었다 (배치번호 16037911, 16033811); 콜레틸 50 마취제은 프랑스 베박으로부터 생산되었다.
- [0205] 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 및 그의 유도체 서열번호 4 (N4로 약칭됨), 서열번호 5 (N5로 약칭됨), 서열번호 (N6으로 약칭됨), 서열번호 7 (N7로 약칭됨), 서열번호 8 (N8 줄여씀), 서열번호 9 (N9 약칭됨), 서열번호 10 (N10로 약칭됨) 및 서열번호 11 (N11로 약칭됨)은 청두 카이지 생물의학 기술 개발에 의해 합성되었다. 서열은 서열번호 4 내지 11이다.
- [0206] SPF 등급 SD 랫트는 청두 다슈오 실험동물 회사로부터 체중이 200 내지 250 g인 수컷으로 구입되었다.
- [0207] 2. 폐섬유증의 랫트 모델
- [0208] 랫트를 투여 전에 체중을 측정하였고, 콜레틸 마취액의 근육내 주사 용량은 65 mg / kg 였다. 랫트가 마취 3기 에 들어간 후, 실험 랫트를 측면으로 눕혀 고정하였다. 크기 12 게이지 바늘을 약물을 주입하기 위해 성문을 따라 구강을 통해 랫트 기관내 삽입하였다. 실험 동물을 기관내 투여 후 1일차부터 14일차까지 정상적으로 사료를 공급하고, 사료 및 음용수의 제한없이 매일 정기적으로 체중을 측정하였다.
- [0209] 모델군의 랫트에는 블레오마이신 (3 mg/kg)을 기관내로 점적 주입시켰다; 대조군의 랫트에는 동일한 양의 생리식염수를 기관내로 점적 주입시켰다; 처리군의 랫트에는 블레오마이신 (3 mg/kg)과 해당 치료 약물 (6 mg/kg)을 동시에 기관내로 점적 주입시켰다;
- [0210] 실시예 10. ELISA에 의한 랫트의 폐 조직 중 활성 TGF- β 의 검출
- [0211] 실시예 9의 모델군, 대조군 및 N4 처리군에서 랫트 폐 조직을 채취하고, RIPA 용해물을 사용하여 균질화시키고 (폐 조직 100 mg은 용해물 1 mL에 해당함), 원심분리하여 상층액을 얻었고, 단백질 농도를 BCA 방법으로 결정하였다. 동일한 양의 단백질 시료를 취하여 활성 TGF- β 함량을 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) (Promega, Cat. No. G7591)로 측정하고 (결과는 도 10에 나타낸다), 생물통계분석을 위해 일원분산분석(one-way ANOVA)을 이용하였다.
- [0212] 대조군과 비교하여, 모델군에서 랫트 폐 조직 내 활성 TGF- β 함량은 유의성 있게 증가되었다 (**: p < 0.01); 모델군과 비교하여, N4 처리군의 폐 조직에서 활성 TGF- β 함량은 유의성 있게 감소되어 (†: p < 0.05), N4가 블레오마이신에 의한 TGF- β 의 활성을 유의성 있게 억제시킬 수 있다는 것을 나타냈다.
- [0213] 실시예 11. RT-qPCR에 의한 랫트의 폐 조직 중 ctgf, 콜라겐 I 및 콜라겐 III의 함량의 검출
- [0214] 실시예 9의 모델군, 대조군 및 N4 처리군에서 랫트 폐 조직을 채취했다. 폐 조직 중 RNA를 TRIZOL (Invitrogen) 방법을 사용하여 추출하였다. 역전사를 이용하여 cDNA를 얻은 후, 형광 정량 PCR (qPCR) 키트 (Applied Biosystems, Cat. No. 4319413E)를 사용하여 결합 조직 성장 인자 ctgf (정방향 프라이머: 5'-TGGCCCTGACCCAACATATGA-3', 역방향 프라이머: 5'-CTTAGAACAGGCCTCCACTCT-3') TGF- β 경로의 하류, 콜라겐 I (정방향 프라이머: 5'-TGCGATGTCGCTATCCA-3', 역방향 프라이머: 5'-TCTTGCAGTGATAGGTGATGTTCTG-3') 및 콜라겐 III (정방향 프라이머: 5'-GGAAAAGATGGATCAAGTGGACAT-3', 역방향 프라이머: 5'-GAGCCCTCAGATCCTCTTCAC-3')의 발현 수준을 검출하였다. 18S RNA를 내부 참조로 사용하였고 (결과는 도 11에 나타낸다), 생물통계분석을 위해 일원분산분석을 이용하였다.
- [0215] 대조군과 비교하여, 모델군의 폐 조직 중 ctgf, 콜라겐 I 및 콜라겐 III의 발현 수준은 유의성 있게 증가하였다 (*: p < 0.05, **: p < 0.01); 모델군과 비교하여, N4 처리군의 폐 조직 중 ctgf, 콜라겐 I 및 콜라겐 III의 발현 수준은 유의성 있게 감소되어 (†: p < 0.05), N4는 블레오마이신 유도 TGF- β 신호전달 경로를 유의성 있게 억제할 수 있다는 것을 나타냈다.
- [0216] 실시예 12. 산 가수분해 방법에 의한 폐 조직 과쇄물 중 히드록시프롤린 함량의 검출
- [0217] 실시예 9의 모델군, 대조군 및 N4 처리군에서 폐 조직을 채취하고, 폐 조직 과쇄물 중 히드록시프롤린 함량을 바이오비전 히드록시프롤린 산 가수분해 분석 키트(BioVision Hydroxyproline Acid Hydrolysis Assay Kit) (Cat. No. K555-100)를 이용하여 검출하고 (결과는 도 12에 나타낸다), 생물통계분석을 위해 일원분산분석을 이용하였다.
- [0218] 대조군과 비교하여, 모델군의 폐 조직 중 히드록시프롤린 함량은 유의성 있게 증가하여 (*: p < 0.05), BLM가

랫트의 폐에서 콜라겐 섬유 침착을 유도하였다는 것을 나타내고; 모델군과 비교하여, N4 처리군의 폐 조직 중 히드록시프롤린 함량은 유의성 있게 감소되어 ($\dagger: p < 0.05$), N4가 BLM 유도 폐 섬유증을 유의성 있게 억제시켰다는 것을 나타냈다.

[0219] 실시예 13. 뱃트 폐 조직의 병리학적 절편의 HE 염색

[0220] 실시예 9의 뱃트의 폐 조직을 채취하고, 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 파라핀에 포매시켰다. 폐 조직을 포매한 왁스 블록을 가장 큰 단면을 따라 절단하였다. 폐 조직의 병리학적 변화는 혜마톡실린-에오신 (HE) 염색을 이용하여 관찰하였다. 폐 조직에서의 병리학적 변화는 광학 현미경 (저배율)에서 100배 배율로 관찰되었다 (결과는 도 13에 나타낸다). 결과는 다음과 같다: 대조군에서, 폐포 형태는 정상이었고, 폐포벽은 빈약하였고, 간질에 매우 적은 양의 염증성 세포 침윤이 있었다; 모델군에서, 폐 실질 병변의 작은 영역이 더 많았고, 이 영역들에서 폐포벽이 비후화되고, 폐포중격이 파열되고, 격리된 폐포가 폐포낭으로 융합되며, 더 많은 폐포 구조가 사라졌고, 간질에 더 많은 염증성 세포 침윤이 있었다; 모델군과 비교하여, 각 군에서 뱃트 폐 조직의 폐포 구조는 적은 양의 폐 실질 병변의 작은 영역이 있으나, 비교적 온전한 상태였고, 간질에 적은 양의 염증성 세포 침윤이 있었다.

[0221] Szapie, et al.에 의해 제공된 방법에 따라, 폐포염의 정도는 병변의 범위에 따라 등급이 매겨졌고 0 내지 3점에 해당하는 0 내지 3 등급으로 나눌 수 있었다. 폐포염의 정도에 대한 평가 지수는 다음과 같다: 0 등급, 폐포 염 없음; 1 등급, 경증(mild) 폐포염, 능막 균처 또는 국소적으로 폐포중격 내 단핵구의 침윤이 약간 증가한 것으로 나타나며, 폐포 구조 손상 없이 20% 미만의 병변 범위를 가짐; 2 등급, 중등(moderate) 폐포염, 능막 균처에 비교적 심각한 20% 내지 50% 병변 범위; 3 등급, 확산 분포된 중증(severe) 폐포염, 병변 범위는 50% 보다 높고, 간헐적으로 폐 실질 병변을 가짐. 염증성 병리 접수의 결과 (결과는 도 14에 나타내고, 일원분산분석은 생물통계 분석에 이용하였다)는 다음과 같다: 대조군과 비교하여, 모델군에서 폐조직 내 유의성 있는 염증성 병리학적 변화가 있었다 (****: $p < 0.0001$); BLM군에서의 뱃트와 비교하여, N4 내지 N11 처리군에서 뱃트 폐 조직 내 염증성 병변에 상이한 정도의 유의성 있는 개선이 있어 ($\dagger: p < 0.05$, $\ddagger: p < 0.01$, $\ddagger\ddagger\ddagger: p < 0.0001$), N4 내지 N11 모두가 뱃트에서 블레오마이신에 의한 폐 염증을 억제할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0222] 실시예 14. 뱃트 폐 조직의 병리학적 절편의 마손(masson) 염색

[0223] 실시예 9의 뱃트의 폐 조직을 채취하고, 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 파라핀에 포매시켰다. 폐 조직을 포매한 왁스 블록을 가장 큰 단면을 따라 절단하였다. 폐 조직에서 병리학적 변화는 마손 트리크롬 염색(Masson's trichrome stain) (마손)을 이용하여 관찰하였다. 폐 조직의 병리학적 변화는 광학 현미경 (저배율)에서 100배 배율로 관찰되었다 (결과는 도 15에 나타낸다). 결과는 다음과 같다: 대조군에서, 폐포 형태는 정상이었고, 매우 적은 양의 폐포중격만이 파열되어 두꺼워졌으며, 단리된 결절(nodule) 또는 섬유성 덩어리가 형성되지 않았다; 모델군에서, 뱃트 폐 조직에서 폐포중격이 파열되어 두꺼워졌고, 일부 폐포 구조가 확대되어 늘어지고, 형성된 결절이 단리되었고, 폐포중격이 달라지거나 사라졌고, 섬유성 덩어리가 형성되어 융합되고 심지어 폐포의 흔적을 없앴다; 모델군과 비교하여, N4 내지 N11 처리군에서, 파열된 폐포중격은 더 적었고, 비후화의 정도는 더 약화되었고, 폐포 구조는 소수의 단리된 결절 또는 섬유성 덩어리가 있었으나, 거의 온전했다.

[0224] 변형된 애쉬크로프트 스케일(Modified Ashcroft scale) 평가 방법에 따라, 폐섬유증의 정도를 병변의 범위에 따라 평가하고 0 내지 8 등급으로 나눌 수 있었다. 폐섬유증의 정도를 결정하기 위한 평가 지수는 다음과 같다: 0 등급, 발생된 폐섬유증이 없음; 1 등급, 경증(mild) 폐포중격 비후화, 비후화의 정도가 0 등급의 기준의 3배를 초과하지 않으며, 일부 폐포 구조가 확대되어 늘어지고 일부 폐포중격 파열을 가짐; 2 등급, 폐포중격이 비후화되고, 비후화의 정도가 0 등급의 기준의 3배를 초과하며, 일부 폐포 구조가 확대되어 늘어지고 일부 폐포중격 파열을 갖고, 단리된 결절이 형성되지만 서로 관련이 없음; 3 등급: 폐포중격이 비후화되고, 비후화의 정도가 0 등급의 기준의 3배를 초과하며, 대부분의 폐포 구조가 확대되어 늘어지고, 단리된 결절이 형성되어 서로 연결됨; 4 등급: 폐포중격이 변하고, 단일 섬유성 덩어리가 형성되며, 섬유성 덩어리의 면적이 현미경 시야 (microscopic field)의 10% 미만임; 5 등급: 폐포중격이 변하고, 섬유성 덩어리가 형성되어 융합되며, 섬유성 덩어리의 면적이 현미경 시야의 10% 내지 50%를 차지하고, 폐 구조가 심각하게 손상되나 여전히 보존됨; 6 등급: 폐포중격이 변하고 대부분 존재하지 않으며, 섬유성 덩어리가 형성되어 융합되고, 섬유성 덩어리의 면적이 현미경 시야의 50%를 초과하고, 대부분의 폐 구조가 사라짐; 7 등급: 폐포중격이 사라지고, 섬유성 덩어리가 융합되어 폐포의 흔적을 지우고, 최대 5개의 기포가 현미경 하에서 관찰될 수 있음; 8 등급: 폐포중격이 존재하지 않으며, 섬유성 덩어리가 융합되어 폐포의 흔적을 완전히 지움. 폐섬유증의 스케일의 결과 (결과는 도 16에 나타내고, 생물통계분석을 위해 일원분산분석을 이용하였다)는 다음과 같다: 대조군과 비교하여, 모델군에

서 폐조직 내 폐섬유증의 극도로 유의성 있는 염증성 병리학적 변화가 있었다 (****: $p < 0.0001$); 모델군과 비교하여, N4 내지 N11 처리군에서 랫트 폐 조직 내 폐섬유증 병변에서 상이한 정도의 유의성 있는 완화가 있었다 (\dagger : $p < 0.05$, \ddagger : $p < 0.01$, $\ddagger\ddagger\ddagger$: $p < 0.0001$). 결과는 N4 내지 N11 모두가 랫트에서 블레오마이신에 의한 폐 섬유증을 억제할 수 있다는 것을 보여준다.

[0225] 실시예 15. 폐섬유증의 랫트 모델 및 기관내 점적 주입 투여 경로에 의한 치료

[0226] 모델군에서의 랫트에 블레오마이신 (4 mg/kg)을 기관내로 점적 주입하였다; 마취 후, 처리군에서의 랫트에 블레오마이신 (4 mg/kg) 및 해당 치료 약물 (8 mg/kg)을 동시에 기관내로 점적 주입하였다. 나머지 실행 (implementation) 단계는 실시예 9의 설명과 동일하였다.

[0227] 실시예 16. 랫트 체중의 결정

[0228] 모델 및 투여 경로는 실시예 15를 참조했다. 실시예 15에서 설명된 대조군, 모델군, 및 처리군의 실험 랫트는 1 일차부터 14일차까지 매일 체중이 측정되었다. 측정할 때, 전자 저울의 "불안정한 칭량(unstable weighing)"를 선택하고, 판독 단계(reading phase) 동안 적절한 회수의 칭량 및 허용가능한 불안정의 정도(degree of tolerable instability)를 판독치(the reading) 측정 및 기록에 대한 지침에 따라 설정하였다. 결과는 도 2에서 체중비로 표시된다 (14일차/0일차).

[0229] 결과는 다음과 같다: 대조군과 비교하여 (표 2에서 C로 약칭됨), 모델군 (표 2에서 B로 약칭됨)에서 랫트의 체중 증가율은 유의성 있게 감소되었다; 모델군과 비교하여, N1 내지 N54 처리군의 각각에서 랫트의 체중 증가율은 상이한 회복의 정도를 가졌다, N1 내지 N54 모두가 블레오마이신에 의한 삶의 질의 저하를 개선할 수 있으며, N2 내지 N54의 치료 효능(therapeutic efficacy)이 N1 처리군에 비해 더 우수했다는 것을 나타낸다.

[0230] 실시예 17. 랫트의 폐 계수의 결정

[0231] 실시예 15의 대조군, 모델군 및 처리군의 실험 랫트를 취하여 폐 계수를 결정하였다. 실행 단계는 실시예 2의 설명과 동일하였다. 결과는 표 2의 폐 계수에 나타낸다.

[0232] 결과는 다음과 같다: 대조군과 비교하여 (표 2에서 C로 약칭됨), 모델군 (표 2에서 B로 약칭됨)에서 랫트의 폐 계수는 유의성 있게 증가되었다; 모델군과 비교하여, N1 내지 N54 처리군의 각각에서 랫트의 폐 계수에서 상이한 정도의 유의성 있는 감소가 있어, N1 내지 N54 모두가 블레오마이신에 의한 폐부종 및 폐섬유증을 유의성 있게 억제할 수 있으며, N2 내지 N54의 치료 효능이 N1 처리군에 비해 더 우수했다는 것을 나타낸다.

[0233] 실시예 18. 랫트 폐 조직의 병리학적 절편의 HE 염색

[0234] 실시예 15의 대조군, 모델군 및 처리군의 랫트의 폐 조직을 채취하여 HE 염색 및 평가에 적용시켰다. 구체적 실행 단계 및 폐포염의 정도의 평가 방법은 실시예 3의 설명과 동일하였다. HE 염색 결과는 도 17에 나타낸다. 염증성 병리 점수의 결과는 표 2에서 HE 점수값으로 나타낸다.

[0235] HE 염색 및 평가의 결과는 다음과 같다: 대조군과 비교하여 (표 2에서 C로 약칭됨), 모델군 (표 2에서 B로 약칭됨)에서 폐 조직 내 유의성 있는 염증성 병리학적 변화가 있었다; 모델군에서의 랫트와 비교하여, N1 내지 N54 처리군의 각각에서 랫트 폐 조직 내 염증성 병변에서 상이한 정도의 유의성 있는 완화가 있어, N1 내지 N54 모두가 블레오마이신에 의한 폐 염증을 유의성 있게 억제할 수 있고, N2 내지 N54의 치료 효능이 N1 처리군에 비해 더 우수했다는 것을 나타낸다.

[0236] 실시예 19. 랫트 폐 조직의 병리학적 절편의 마손 염색

[0237] 실시예 15의 대조군, 모델군 및 처리군의 폐 조직을 채취하여 마손 염색 및 평가에 적용시켰다. 구체적 실행 단계는 실시예 13의 설명과 동일하였다. 마손 염색 결과는 도 18에 나타낸다. 섬유증 병리 점수의 결과는 표 2에서 마손 점수값(Masson score value)으로 나타낸다.

[0238] 마손 염색 및 평가의 결과는 다음과 같다: 대조군과 비교하여 (표 2에서 C로 약칭됨), 모델군 (표 2에서 B로 약칭됨)에서 폐 조직 내 극히 유의성 있는 염증성 변화가 있었다; 모델군과 비교하여, N1 내지 N54 처리군의 각각에서 랫트의 폐 섬유증 병변에서 상이한 정도의 유의성 있는 완화가 있어, N1 내지 N54 모두가 블레오마이신에 의한 폐 섬유증 병변을 유의성 있게 억제할 수 있고, N2 내지 N54의 치료 효과가 N1 처리군에 비해 더 우수했다는 것을 나타낸다.

표 2

실험 랫트의 체중비, 폐 계수, HE 점수, 및 마손 점수의 결과 (투여 경로: 기관내 점적 주입) (평균 ± SEM)

번호	체중비	폐 계수	HE 점수	마손 점수	번호	체중비	폐 계수	HE 점수	마손 점수
C	1.49±0.02	4.61±0.07	0.53±0.08	0.45±0.06	B	0.89±0.04	9.86±0.44	3.05±0.08	4.41±0.08
N1	1.05±0.02	8.49±0.09	2.45±0.09	3.93±0.09	N28	1.46±0.04	4.65±0.18	1.90±0.46	3.19±0.61
N2	1.12±0.06	8.15±0.11	2.44±0.05	3.88±0.07	N29	1.45±0.03	4.68±0.10	1.90±0.24	3.23±0.72
N3	1.15±0.02	7.39±0.46	2.43±0.34	3.86±0.17	N30	1.45±0.03	4.69±0.30	1.91±0.19	3.26±0.25
N4	1.30±0.05	6.44±0.56	2.40±0.48	3.80±0.26	N31	1.37±0.04	5.71±0.87	2.25±0.12	3.61±0.26
N5	1.30±0.10	6.61±0.23	2.40±0.33	3.80±0.07	N32	1.37±0.08	5.72±0.49	2.26±0.18	3.62±0.10
N6	1.41±0.04	5.42±0.49	2.12±0.32	3.45±0.52	N33	1.36±0.07	5.81±0.58	2.28±0.16	3.62±0.14
N7	1.27±0.06	6.68±0.38	2.41±0.32	3.81±0.16	N34	1.35±0.05	5.83±0.37	2.28±0.43	3.63±0.11
N8	1.41±0.06	5.43±0.48	2.13±0.37	3.45±0.19	N35	1.35±0.07	5.85±0.36	2.29±0.44	3.70±0.15
N9	1.25±0.07	6.79±0.21	2.42±0.25	3.83±0.12	N36	1.35±0.08	5.86±0.47	2.31±0.32	3.70±0.26
N10	1.40±0.02	5.48±0.29	2.13±0.10	3.48±0.18	N37	1.34±0.07	5.92±0.61	2.31±0.26	3.70±0.24
N11	1.22±0.05	7.08±0.54	2.42±0.32	3.83±0.17	N38	1.34±0.05	5.95±0.79	2.32±0.16	3.71±0.21
N12	1.39±0.02	5.49±0.41	2.14±0.11	3.49±0.20	N39	1.33±0.12	5.96±0.22	2.35±0.18	3.71±0.27
N13	1.39±0.03	5.52±0.16	2.15±0.48	3.53±0.21	N40	1.33±0.02	6.02±0.75	2.36±0.13	3.72±0.11
N14	1.38±0.02	5.53±0.54	2.16±0.38	3.54±0.13	N41	1.44±0.04	4.81±0.55	1.94±0.33	3.26±0.42
N15	1.38±0.01	5.53±0.69	2.19±0.44	3.56±0.13	N42	1.44±0.09	4.92±0.38	1.96±0.17	3.27±0.08
N16	1.38±0.05	5.55±0.67	2.20±0.38	3.57±0.08	N43	1.43±0.03	4.97±0.33	1.96±0.42	3.28±0.14
N17	1.38±0.06	5.61±0.54	2.22±0.34	3.58±0.02	N44	1.42±0.04	4.99±0.56	1.96±0.13	3.31±0.24
N18	1.38±0.02	5.62±0.54	2.23±0.13	3.60±0.21	N45	1.42±0.04	5.04±0.61	2.00±0.43	3.31±0.57
N19	1.38±0.02	5.65±0.46	2.24±0.06	3.60±0.22	N46	1.42±0.03	5.08±0.41	2.01±0.07	3.36±0.05
N20	1.37±0.04	5.69±0.73	2.24±0.56	3.60±0.11	N47	1.42±0.07	5.09±0.55	2.02±0.40	3.38±0.14
N21	1.53±0.01	4.39±0.59	1.65±0.16	2.22±0.28	N48	1.41±0.04	5.09±0.32	2.04±0.44	3.39±0.24
N22	1.52±0.07	4.41±0.51	1.66±0.26	2.94±0.25	N49	1.41±0.02	5.18±0.47	2.08±0.25	3.40±0.25
N23	1.48±0.07	4.45±0.26	1.81±0.25	2.99±0.44	N50	1.41±0.06	5.21±0.55	2.12±0.54	3.44±0.19
N24	1.48±0.04	4.50±0.11	1.83±0.12	3.00±0.53	N51	1.32±0.07	6.10±0.38	2.36±0.52	3.74±0.30
N25	1.47±0.07	4.56±0.35	1.85±0.16	3.03±0.30	N52	1.31±0.13	6.11±0.77	2.38±0.33	3.75±0.25
N26	1.46±0.01	4.58±0.26	1.86±0.42	3.11±0.66	N53	1.31±0.02	6.12±0.28	2.38±0.55	3.78±0.19
N27	1.46±0.06	4.59±0.23	1.89±0.39	3.16±0.72	N54	1.30±0.08	6.39±0.71	2.39±0.24	3.78±0.20

[0239]

[0240] 실시예 20. 폐 섬유증의 랫트 모델 및 정맥내 주사 투여 경로에 의한 치료

랫트를 투여 전에 체중을 측정하고, 콜레틸 마취액 65 mg / kg으로 근육내 주사하였다. 랫트가 마취 3기에 들어간 후, 실험 랫트를 측면으로 눕혀 고정하였다. 게이지 바늘 크기 12를 생리식염수 또는 블레오마이신 (4 mg/kg) (0일차)을 주입하기 위해 성문을 따라 구강을 통해 랫트 기관 내 삽입하였다. 마취 후, 대조군의 랫트에 동일한 양의 생리식염수를 기관내로 점적 주입하고, 모델군 및 처리군의 랫트에 블레오마이신 (4 mg/kg)을 기관내로 점적 주입하였다. 4일차에, 멸균 생리식염수 또는 웨티드 약물을 13일차까지 1일 1회씩 미정맥을 통해 주사하였다. 14일차에 후속 실험을 위해 랫트를 회생시켰다. 대조군의 랫트는 약물 처리를 받지 않았다; 모델군의 랫트에 미정맥을 통해 멸균 생리식염수를 주사하였다; 처리군의 랫트에는 미정맥을 통해 해당 웨티드 약물 (10 mg/kg)을 주사하였다. 모든 실험 동물을 1일차부터 14일차까지 정상적으로 사료를 먹였고, 사료 및 물을 제한없이 공급하면서 매일 체중을 측정하였다.

[0242]

실시예 21. 랫트 체중의 결정

[0243]

모델 및 투여 경로는 실시예 20을 참조하였다. 실시예 20에서 설명된 대조군, 모델군, 및 처리군의 실험 랫트를 1일차부터 14일차까지 매일 체중을 측정하였다. 체중의 결정 방법은 실시예 16의 설명과 동일하였다. 결과는 도 3에서 체중비로 나타낸다 (14일차/0일차).

[0244]

결과는 다음과 같다: 대조군과 비교하여 (표 2에서 C로 약칭됨), 모델군 (표 2에서 B로 약칭됨)에서 랫트의 체중 증가율은 유의성 있게 감소되었다; 모델군과 비교하여, N1 내지 N54 처리군의 각각에서 랫트의 체중 증가율

은 상이한 정도의 회복을 가져, N1 내지 N54의 성분의 정맥내 주사가 블레오마이신에 의한 삶의 질의 저하를 개선할 수 있으며, N2 내지 N54의 치료 효능이 N1 처리군에 비해 더 우수했다는 것을 나타낸다.

[0245] 실시예 22. 랫트의 폐 계수의 결정

[0246] 실시예 20의 대조군, 모델군 및 처리군의 실험 랫트를 취하여, 폐 중량을 측정하고 폐 계수를 계산하였다. 구체적인 실행 단계는 실시예 2의 설명과 동일하였다. 결과는 표 3에서 폐 계수로 나타낸다.

[0247] 결과는 다음과 같다: 대조군과 비교하여 (표 3에서 C로 약칭됨), 모델군 (표 2에서 B로 약칭됨)에서 랫트의 폐 계수는 유의성 있게 증가되었다; 모델군과 비교하여, N1 내지 N54 처리군의 각각에서 랫트의 폐 계수에서 상이한 정도의 유의성 있는 감소가 있어, N1 내지 N54의 성분의 정맥내 주사가 랫트에서 블레오마이신에 의한 폐부종 및 폐섬유증을 유의성 있게 억제할 수 있고, N2 내지 N54의 치료 효능이 모두 N1 처리군에 비해 더 우수했다는 것을 나타낸다.

[0248] 실시예 23. 랫트 폐 조직의 병리학적 절편의 HE 염색

[0249] 실시예 20의 대조군, 모델군 및 처리군의 폐 조직을 채취하여 HE 염색 및 평가에 적용시켰다. 구체적 실행 단계는 실시예 3의 설명과 동일하였다. HE 염색 결과는 도 19에 나타낸다. 염증성 병리 점수(inflammatory pathology score)의 결과는 표 3에서 HE 점수값으로 나타낸다.

[0250] HE 염색 및 평가의 결과는 다음과 같다: 대조군과 비교하여 (표 3에서 C로 약칭됨), 모델군 (표 3에서 B로 약칭됨)에서 폐 조직에 유의성 있는 염증성 병리학적 변화가 있었다; 모델군의 랫트와 비교하여, N1 내지 N54 처리군의 각각에서 랫트 폐 조직에 상이한 정도의 염증성 병변의 유의성 있는 완화가 있어, N1 내지 N54의 성분 중 어느 하나의 정맥내 주사가 블레오마이신에 의한 폐 염증을 유의성 있게 억제할 수 있고, N2 내지 N54의 치료 효능이 모두 N1 처리군에 비해 더 우수했다는 것을 나타낸다.

[0251] 실시예 24. 랫트 폐 조직의 병리학적 절편의 마손 염색

[0252] 실시예 20의 대조군, 모델군 및 처리군의 폐 조직을 채취하여 마손 염색 및 평가에 적용시켰다. 실행 단계는 실시예 13의 설명과 동일하였다. 마손 염색 결과는 도 18에 나타낸다. 섬유증 병리 점수(fibrosis pathology score)의 결과는 표 3에서 마손 점수값으로 나타낸다.

[0253] 마손 염색 및 평가의 결과는 다음과 같다: 대조군과 비교하여 (표 3에서 C로 약칭됨), 모델군 (표 3에서 B로 약칭됨)에서 폐 조직 내 극히 유의성 있는 병리학적 변화가 있었다; 모델군과 비교하여, N1 내지 N54 처리군의 각각에서 랫트에서 상이한 정도의 폐섬유증 병변의 유의성 있는 완화가 있어, N1 내지 N54의 성분의 정맥내 주사가 블레오마이신에 의한 폐섬유증 병변을 유의성 있게 억제할 수 있고, N2 내지 N54의 치료 효능이 모두 N1 처리군에 비해 더 우수했다는 것을 나타낸다.

표 3

실험 랫트의 체중비, 폐 계수, HE 점수, 및 마손 점수의 결과 (투여 경로: 정맥내 주사) (평균 ± SEM)

번호	체중비	폐 계수	HE 점수	마손 점수	번호	체중비	폐 계수	HE 점수	마손 점수
C	1.55±0.02	4.40±0.09	0.53±0.07	0.47±0.12	B	0.89±0.04	10.53±0.65	3.02±0.07	4.45±0.08
N1	1.05±0.02	9.25±0.28	2.44±0.24	3.85±0.11	N28	1.46±0.04	6.02±0.54	1.85±0.16	3.23±0.58
N2	1.12±0.06	9.03±0.36	2.44±0.15	3.83±0.06	N29	1.45±0.03	6.02±0.97	1.91±0.34	3.23±0.30
N3	1.15±0.02	8.94±0.41	2.42±0.20	3.83±0.03	N30	1.45±0.03	6.03±0.65	1.91±0.32	3.26±0.11
N4	1.30±0.05	8.16±0.45	2.38±0.27	3.73±0.16	N31	1.37±0.04	7.27±1.20	2.21±0.04	3.56±0.13
N5	1.30±0.10	8.26±0.34	2.39±0.32	3.74±0.03	N32	1.37±0.08	7.30±1.60	2.22±0.59	3.57±0.37
N6	1.41±0.04	6.88±0.92	2.04±0.21	3.42±0.52	N33	1.35±0.05	7.37±1.31	2.23±0.40	3.57±0.29
N7	1.27±0.06	8.35±0.40	2.39±0.29	3.75±0.17	N34	1.35±0.07	7.40±0.68	2.24±0.18	3.59±0.34
N8	1.41±0.06	6.90±0.31	2.04±0.11	3.43±0.29	N35	1.35±0.08	7.49±0.20	2.28±0.17	3.60±0.21
N9	1.25±0.07	8.35±0.48	2.41±0.35	3.78±0.16	N36	1.34±0.07	7.49±0.77	2.30±0.08	3.61±0.29
N10	1.40±0.02	6.90±0.74	2.08±0.13	3.44±0.38	N37	1.34±0.05	7.56±0.88	2.31±0.14	3.63±0.27
N11	1.22±0.05	8.81±0.14	2.42±0.22	3.82±0.14	N38	1.33±0.12	7.64±1.32	2.32±0.19	3.64±0.15
N12	1.39±0.02	6.97±1.24	2.08±0.22	3.45±0.18	N39	1.33±0.09	7.68±0.88	2.34±0.28	3.67±0.33
N13	1.39±0.03	7.15±0.60	2.11±0.22	3.45±0.50	N40	1.33±0.01	7.68±0.31	2.35±0.21	3.68±0.19
N14	1.38±0.02	7.19±1.08	2.12±0.29	3.47±0.18	N41	1.44±0.04	6.16±0.42	1.91±0.33	3.27±0.62
N15	1.38±0.01	7.21±1.22	2.14±0.49	3.48±0.25	N42	1.44±0.09	6.16±0.42	1.94±0.31	3.28±0.33
N16	1.38±0.05	7.22±1.15	2.14±0.27	3.50±0.14	N43	1.43±0.03	6.29±0.85	1.95±0.49	3.29±0.07
N17	1.38±0.06	7.25±0.97	2.15±0.23	3.51±0.13	N44	1.42±0.04	6.36±0.85	1.96±0.11	3.33±0.35
N18	1.38±0.02	7.25±1.48	2.16±0.27	3.53±0.28	N45	1.42±0.04	6.50±0.90	1.97±0.19	3.33±0.23
N19	1.38±0.02	7.26±1.03	2.17±0.40	3.54±0.30	N46	1.42±0.03	6.55±0.41	1.98±0.39	3.36±0.11
N20	1.37±0.04	7.27±0.64	2.21±0.30	3.54±0.23	N47	1.42±0.07	6.63±0.81	1.98±0.27	3.40±0.10
N21	1.53±0.01	4.67±0.26	1.57±0.30	2.62±0.42	N48	1.41±0.04	6.75±1.14	1.98±0.01	3.40±0.22
N22	1.52±0.07	5.13±0.50	1.63±0.45	3.05±0.48	N49	1.41±0.02	6.80±1.21	1.99±0.33	3.41±0.20
N23	1.49±0.09	5.49±0.11	1.65±0.24	3.12±0.54	N50	1.41±0.06	6.83±0.61	2.03±0.12	3.41±0.35
N24	1.48±0.04	5.67±0.52	1.69±0.37	3.14±0.46	N51	1.32±0.07	7.70±0.58	2.35±0.27	3.69±0.14
N25	1.47±0.07	5.68±0.44	1.76±0.35	3.14±0.39	N52	1.31±0.13	7.84±0.81	2.35±0.32	3.70±0.18
N26	1.46±0.01	5.80±0.65	1.81±0.09	3.17±0.70	N53	1.31±0.02	7.87±0.32	2.37±0.25	3.72±0.23
N27	1.46±0.06	5.83±0.53	1.85±0.35	3.21±0.37	N54	1.30±0.08	8.01±0.32	2.37±0.06	3.72±0.29

[0254]

실시예 25. 산 가수분해 방법에 의한 랫트 폐 조직 중 히드록시프롤린 함량의 검출

[0255]

실시예 20의 대조군, 모델군 및 처리군에서 폐 조직을 채취하고, 폐 조직 내 히드록시프롤린 함량을 바이오비전 히드록시프롤린 산 가수분해 분석 키트 (Cat. No. K555-100)를 이용하여 검출하였고, 결과는 표 4에서 HYP 값으로 나타낸다.

[0256]

결과는 다음과 같다: 대조군과 비교하여 (표 4에서 C로 약칭됨), 모델군 (표 4에서 B로 약칭됨)에서 폐 조직 내 히드록시프롤린 함량은 유의성 있게 증가하였다; 모델군과 비교하여, N1 내지 N54 처리군의 각각에서 폐 조직에서 상이한 정도의 히드록시프롤린 함량의 유의성 있는 감소가 있어, N1 내지 N54의 성분의 정맥내 주사가 블레오마이신에 의한 폐섬유증을 유의성 있게 억제할 수 있고, N2 내지 N54의 치료 효과가 모두 N1 처리군에 비해 더 우수했다는 것을 나타낸다.

[0257]

실시예 26. qPCR 방법에 의한 랫트 폐 조직 중 *tgf-β*의 mRNA 함량의 검출

[0258]

실시예 20의 대조군, 모델군 및 처리군에서 랫트 폐 조직을 채취했다. 폐 조직 중 RNA를 TRIZOL (Invitrogen) 방법을 사용하여 추출하였다. 역전사를 이용하여 cDNA를 얻은 후, 형광 정량 PCR (qPCR) 키트 (Applied Biosystems, Cat. No. 4319413E)를 이용하여 *tgf-β* (정방향 프라이머: GAGGTGACCTGGGCACCAT, 역방향 프라이머: GGCCATGAGGAGCAGGAA)의 mRNA 함량을 검출하는데 사용하였다. 18S RNA를 내부 참조로 사용하였고, 결과는 도 4에서 *tgf-β* 값으로 나타낸다.

[0260] 결과는 다음과 같다: 대조군과 비교하여 (표 4에서 C로 약칭됨), 모델군 (표 4에서 B로 약칭됨)에서 랫트 *tgf- β* 의 mRNA 함량은 유의성 있게 증가하였다; 모델군과 비교하여, N1 내지 N54 처리군의 각각에서 랫트 *tgf- β* 의 mRNA 함량에서 상이한 정도의 유의성 있는 감소가 있어, N1 내지 N54의 성분의 정맥내 주사가 블레오마이신에 의한 *tgf- β* 유전자 발현을 유의성 있게 억제할 수 있고, N2 내지 N54의 치료 효능이 모두 N1 처리군에 비해 더 우수했다는 것을 나타낸다.

[0261] 실시예 27. ELISA에 의한 랫트 폐 조직 중 활성 TGF- β 의 검출

[0262] 실시예 20의 모델군, 대조군 및 처리군에서 랫트 폐 조직을 채취하고, 활성 TGF- β 함량을 ELISA로 측정하였다. 구체적 실행 단계는 실시예 9의 설명과 동일하였다. 결과는 표 4에서 활성 TGF- β 함량으로 나타낸다 (활성 TGF- β /총 TGF- β).

[0263] 대조군과 비교하여 (표 4에서 C로 약칭됨), 모델군 (표 3에서 B로 약칭됨)에서 랫트 폐 조직 중 활성 TGF- β 함량은 유의성 있게 증가하였다; 모델군과 비교하여, N1 내지 N54 처리군의 각각에서 랫트 폐 조직 중 활성 TGF- β 함량에서 상이한 정도의 유의성 있는 감소가 있어, N1 내지 N54의 성분의 정맥내 주사가 블레오마이신에 의한 TGF- β 활성을 유의성 있게 억제할 수 있고, N2 내지 N54의 치료 효능이 모두 N1 처리군에 비해 더 우수했다는 것을 나타낸다.

표 4

실험 랫트 폐 조직 중 HYP, TGF- β 의 mRNA (*tgf- β*), 및 활성 TGF- β 단백질의 함량
(투여 경로: 정맥내 주사) (평균 \pm SEM)

번호	HYP	<i>tgf-β</i>	TGF- β	번호	HYP	<i>tgf-β</i>	TGF- β
C	8.82 \pm 0.15	0.73 \pm 0.11	5.89 \pm 0.54	B	67.86 \pm 11.16	3.45 \pm 0.38	16.61 \pm 1.16
N1	34.09 \pm 5.01	2.50 \pm 0.04	13.15 \pm 0.48	N28	16.75 \pm 2.57	1.17 \pm 0.57	6.78 \pm 0.80
N2	30.19 \pm 2.78	2.23 \pm 0.12	12.85 \pm 0.63	N29	16.76 \pm 3.66	1.18 \pm 0.24	6.81 \pm 0.86
N3	30.18 \pm 4.67	2.13 \pm 0.16	12.64 \pm 0.75	N30	16.87 \pm 2.17	1.18 \pm 0.28	6.85 \pm 0.79
N4	28.63 \pm 1.89	2.06 \pm 0.42	12.27 \pm 0.04	N31	22.87 \pm 2.12	1.81 \pm 0.53	10.41 \pm 0.97
N5	28.84 \pm 2.46	2.06 \pm 0.41	12.31 \pm 0.85	N32	22.96 \pm 1.26	1.81 \pm 0.23	10.48 \pm 0.77
N6	19.27 \pm 2.59	1.58 \pm 0.41	8.38 \pm 0.56	N33	23.21 \pm 2.93	1.82 \pm 0.16	10.50 \pm 0.45
N7	29.12 \pm 1.83	2.07 \pm 0.03	12.37 \pm 0.49	N34	23.81 \pm 1.50	1.84 \pm 0.08	10.78 \pm 0.33
N8	19.35 \pm 1.16	1.61 \pm 0.28	8.97 \pm 0.31	N35	24.94 \pm 1.20	1.89 \pm 0.37	10.79 \pm 0.44
N9	29.67 \pm 4.00	2.09 \pm 0.37	12.47 \pm 0.65	N36	25.53 \pm 4.84	1.90 \pm 0.25	10.79 \pm 0.87
N10	20.10 \pm 2.97	1.62 \pm 0.13	9.11 \pm 0.22	N37	25.67 \pm 1.72	1.90 \pm 0.13	10.84 \pm 0.22
N11	29.82 \pm 3.97	2.12 \pm 0.10	12.48 \pm 2.12	N38	26.22 \pm 1.72	1.92 \pm 0.15	10.95 \pm 0.53
N12	20.32 \pm 2.87	1.70 \pm 0.46	9.21 \pm 0.23	N39	26.50 \pm 2.98	1.92 \pm 0.03	11.09 \pm 0.50
N13	20.32 \pm 3.99	1.72 \pm 0.40	9.35 \pm 0.04	N40	26.82 \pm 1.63	1.92 \pm 0.03	11.83 \pm 0.19
N14	20.90 \pm 3.25	1.72 \pm 0.35	9.35 \pm 0.53	N41	16.99 \pm 4.53	1.20 \pm 0.02	6.98 \pm 0.90
N15	21.50 \pm 4.72	1.73 \pm 0.17	9.53 \pm 0.71	N42	17.68 \pm 2.86	1.25 \pm 0.16	7.11 \pm 0.22
N16	21.92 \pm 4.56	1.75 \pm 0.36	9.63 \pm 0.79	N43	17.71 \pm 3.75	1.28 \pm 0.41	7.19 \pm 0.21
N17	22.41 \pm 2.13	1.76 \pm 0.36	9.99 \pm 0.26	N44	17.81 \pm 2.26	1.29 \pm 0.15	7.28 \pm 0.28
N18	22.67 \pm 2.65	1.78 \pm 0.31	10.06 \pm 0.34	N45	17.90 \pm 1.44	1.35 \pm 0.55	7.31 \pm 0.71
N19	22.68 \pm 4.86	1.78 \pm 0.44	10.11 \pm 0.97	N46	17.92 \pm 3.96	1.40 \pm 0.26	7.52 \pm 0.22
N20	22.68 \pm 3.58	1.80 \pm 0.16	10.27 \pm 0.55	N47	17.93 \pm 3.65	1.46 \pm 0.83	7.55 \pm 0.15
N21	14.12 \pm 0.87	0.64 \pm 0.04	5.58 \pm 0.91	N48	18.46 \pm 2.70	1.54 \pm 0.60	7.92 \pm 0.95
N22	15.08 \pm 1.44	0.98 \pm 0.24	5.78 \pm 0.26	N49	18.97 \pm 1.12	1.54 \pm 0.45	8.21 \pm 0.98
N23	15.33 \pm 2.57	1.03 \pm 0.04	5.84 \pm 0.38	N50	19.04 \pm 3.83	1.54 \pm 0.34	8.24 \pm 0.64
N24	15.64 \pm 2.12	1.03 \pm 0.68	6.23 \pm 0.44	N51	26.82 \pm 2.20	1.93 \pm 0.25	11.88 \pm 0.77
N25	16.30 \pm 4.50	1.07 \pm 0.36	6.45 \pm 0.04	N52	27.19 \pm 1.10	1.95 \pm 0.07	12.02 \pm 0.32
N26	16.33 \pm 1.91	1.09 \pm 0.84	6.49 \pm 0.41	N53	27.71 \pm 2.38	1.98 \pm 0.37	12.16 \pm 0.40
N27	16.49 \pm 3.72	1.14 \pm 0.65	6.58 \pm 0.18	N54	28.37 \pm 1.22	2.05 \pm 0.38	12.18 \pm 0.21

[0264]

[0265] 실시예 28. 급성 독성 테스트

C57BL/6J 마우스를 실험 대상으로 사용하였다 (청두 다슈오 실험동물 회사로부터 체중이 16 내지 17 g인 수컷을 구입함). 멸균 생리식염수 또는 웨პ티드 약물을 13일차까지 1일 1회로 미정맥을 통해 주사하였다. 대조군의 마우스에는 생리식염수를 주사하고, 처리군의 마우스에는 폴리웨პ티드 약물 (20 mg/kg)을 주사하였다. 14일차에 마우스를 희생시킨 후, 뇌, 심장, 간, 폐, 신장, 및 비장을 병리학적 검사 (HE 염색)를 위해 떼어냈고, 결과는 도 21 내지 26에 나타낸다.

[0267] 도 21은 N1 및 N54 약물 투여군 각각과 대조군의 염색 결과 간에 유의성 있는 차이가 없었다는 것을 보여준다. 즉, 마우스 뇌에서 해마 뉴런(hippocampus neuron)이 깔끔하게 조직되어 있었고(neatly organized), 뇌에는 출혈 부위, 염증성 세포 침윤, 이완 부종(loose edema) 또는 기타 병리적인 현상이 없었다.

[0268] 도 22는 N1 내지 N54 약물 투여군 각각과 대조군의 염색 결과 간에 유의성 있는 차이가 없었다는 것을 보여준다. 즉, 심근세포의 경우, 부종 또는 비대가 없었고, 염증성 세포 침윤, 모세혈관 및 섬유아세포 증식 또는 병리적인 현상이 없었다.

[0269] 도 23은 N1 내지 N54 약물 투여군 각각과 대조군의 염색 결과 간에 유의성 있는 차이가 없었다는 것을 보여준다. 즉, 간세포가 중심정맥을 중심으로 일렬로 배열되었고, 간세포의 경우, 공포 변성(vacuolar degeneration) 또는 괴사가 없었고, 염증성 세포 침윤, 경계부 섬유화(marginal fibrosis) 또는 다른 병리적인 현상이 없었다.

[0270] 도 24는 N1 내지 N54 약물 투여군 각각과 대조군의 염색 결과 간에 유의성 있는 차이가 없었다는 것을 보여준다. 즉, 폐포강(alveolar cavity)이 폐포 벽의 비후화, 염증성 세포 침윤 또는 다른 병리적인 현상 없이 공포-유사 박판 구조(vacuole-like thin-walled structure)였다.

[0271] 도 25는 N1 내지 N54 약물 투여군 각각과 대조군의 염색 결과 간에 유의성 있는 차이가 없었다는 것을 보여준다. 즉, 사구체의 구조가 명확하며, 과립 변성(granular degeneration), 염증성 세포 침윤, 모세혈관 충혈 또는 기타 병리적인 현상이 없었다.

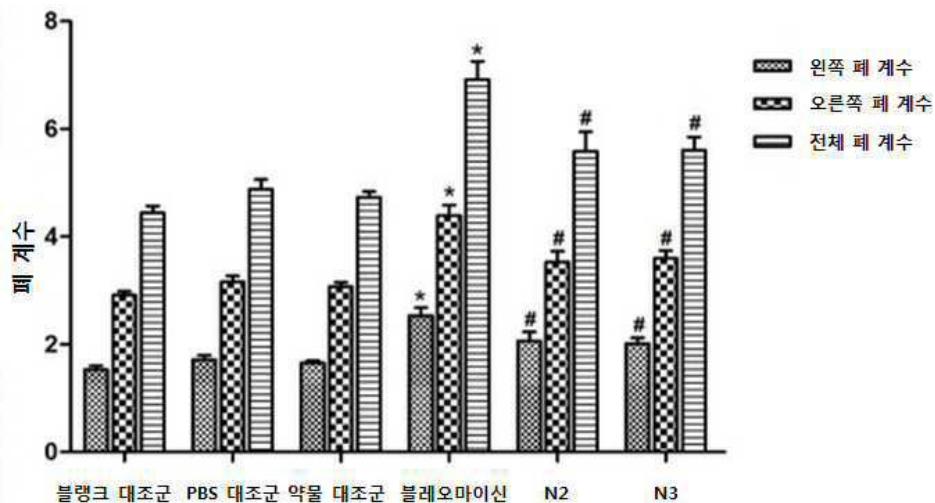
[0272] 도 26은 N1 내지 N54 약물 투여군 각각과 대조군의 염색 결과 간에 유의성 있는 차이가 없었다는 것을 보여준다. 즉, 비장의 구조가 온전했고, 비장굴(splenic sinusoid)은 비장끈(splenic cord)으로 둘러싸여 있고, 서로 연결되어 망(net)을 형성하고, 동맥 주변에 림프초(lymphatic sheath)의 비후화가 없었고, 비장체(spleen body)의 개수의 증가 또는 기타 병리적인 현상이 없었다.

[0273] 급성 독성의 결과는 N1 내지 N54의 성분의 정맥내 주사가 마우스에서 관련된 장기 독성을 생성하지 않았다는 것을 보여준다.

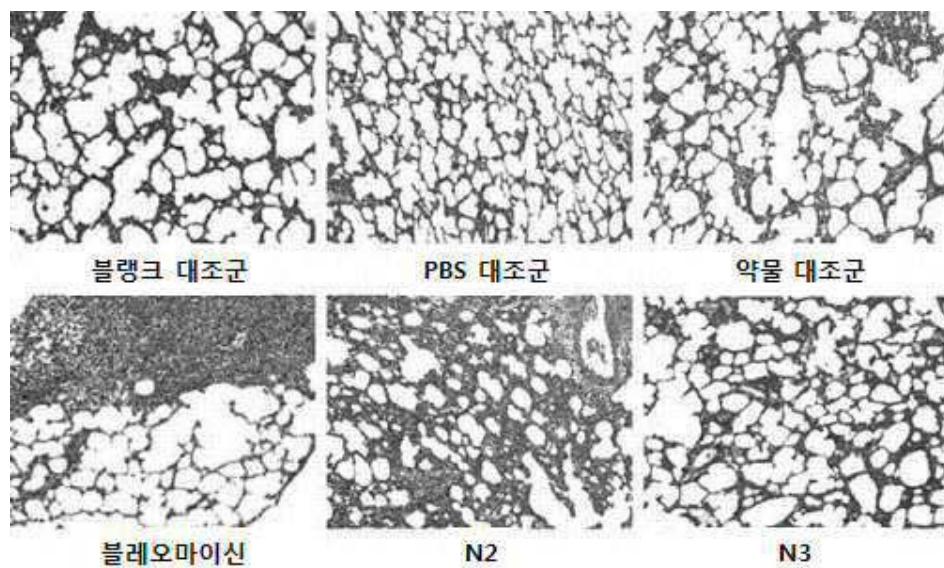
[0274] 전술한 설명은 본 발명의 실시예에 불과하며, 본 발명의 특허 범위를 제한하지 않는다. 본 발명의 특허 명세서의 내용을 이용한, 균등한 구조 또는 균등한 방법 전환, 또는 다른 관련 기술 분야로의 직접 또는 간접 적용은 동일하게 본 발명의 특허 보호 범위에 포함된다.

도면

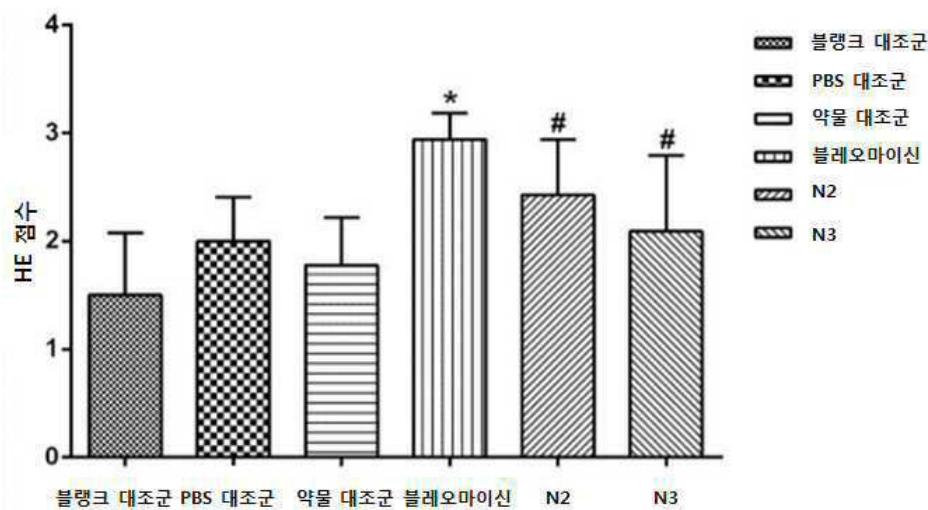
도면1



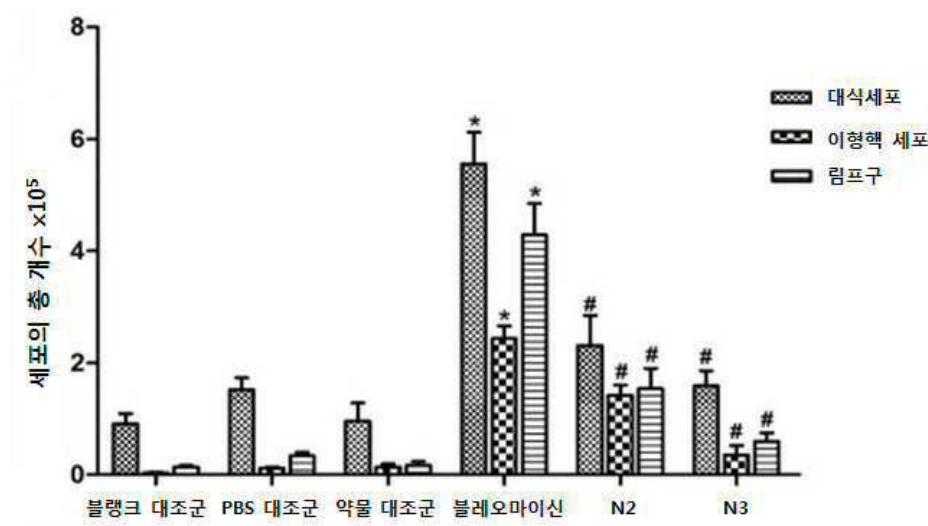
도면2



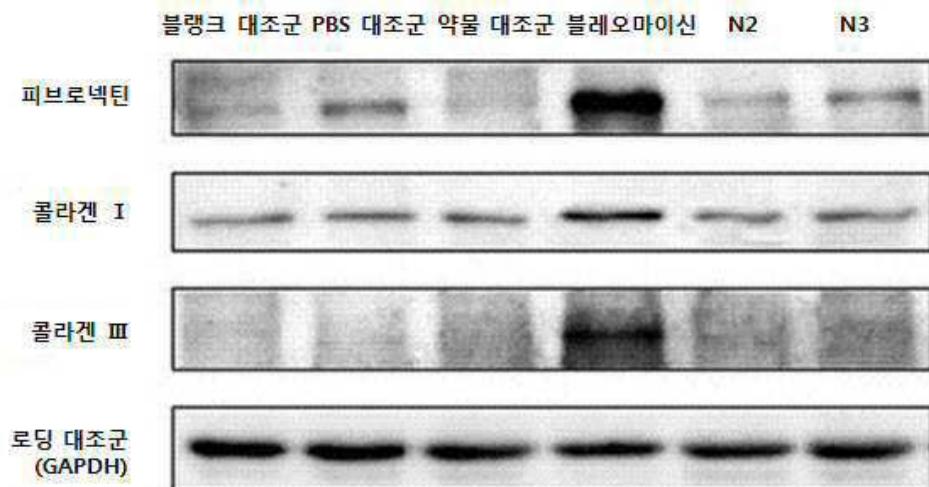
도면3



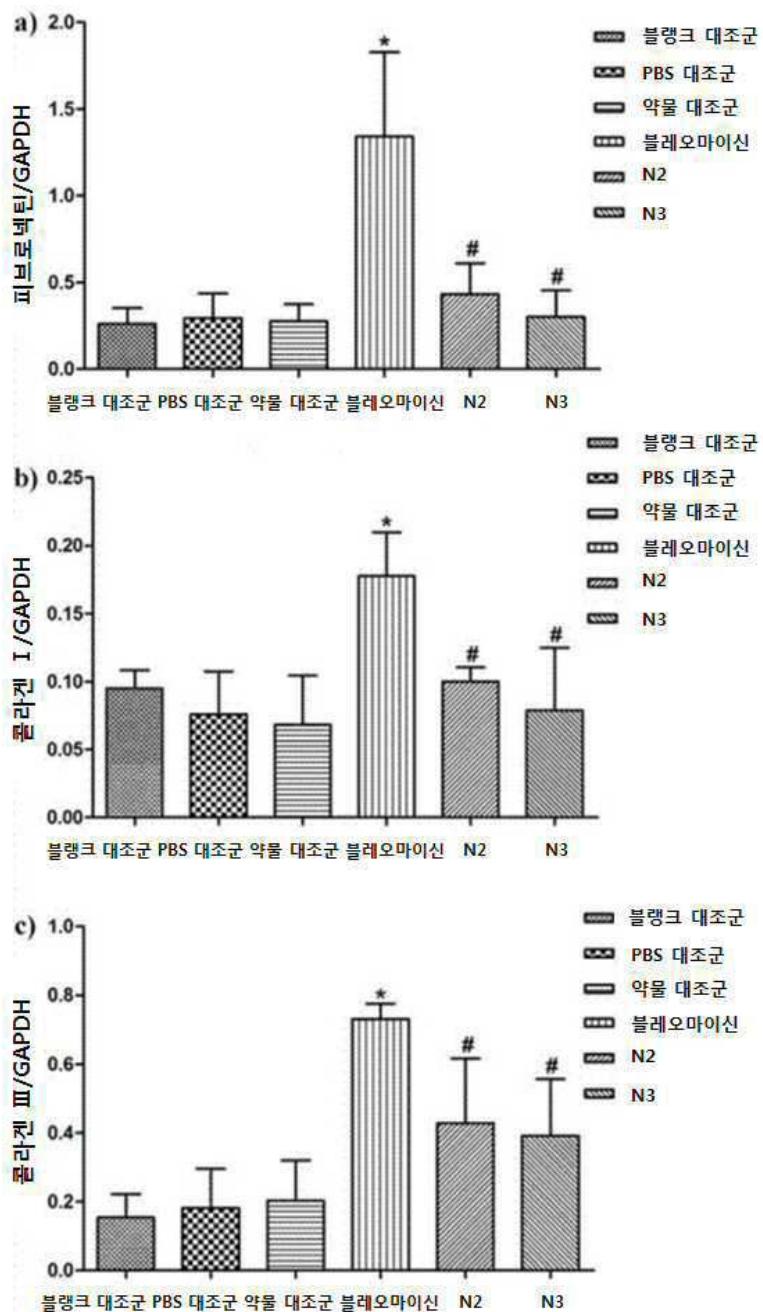
도면4



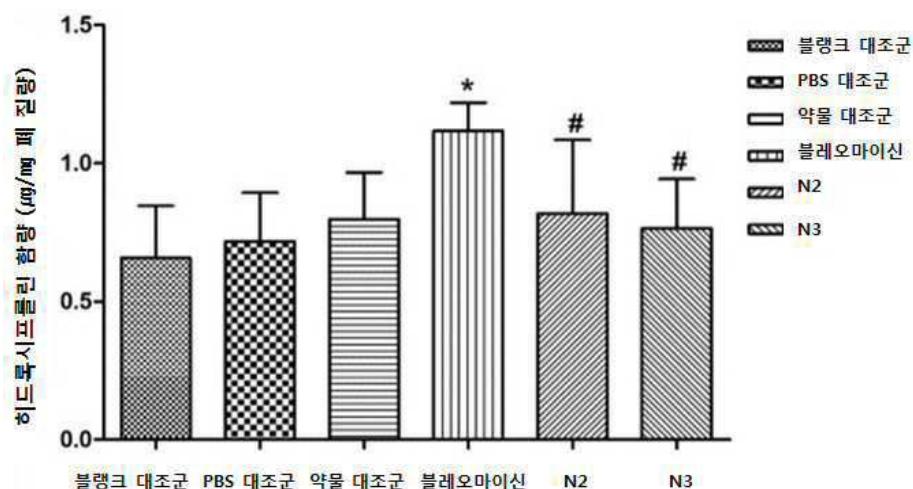
도면5



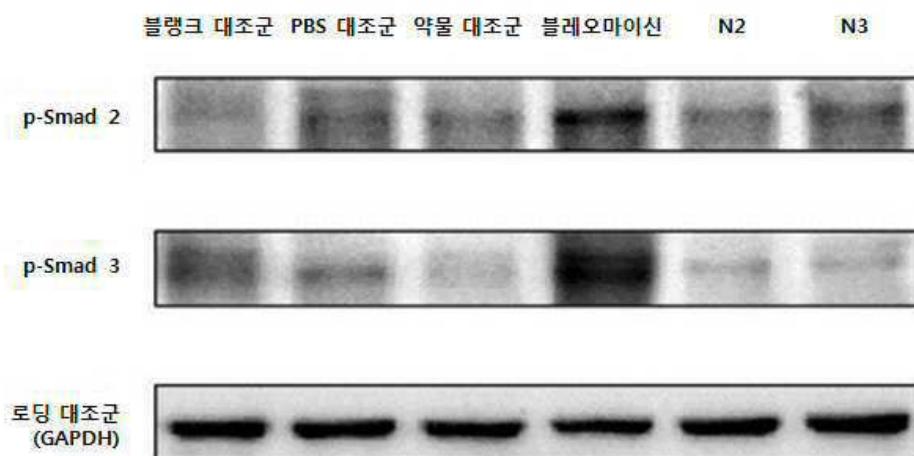
도면6



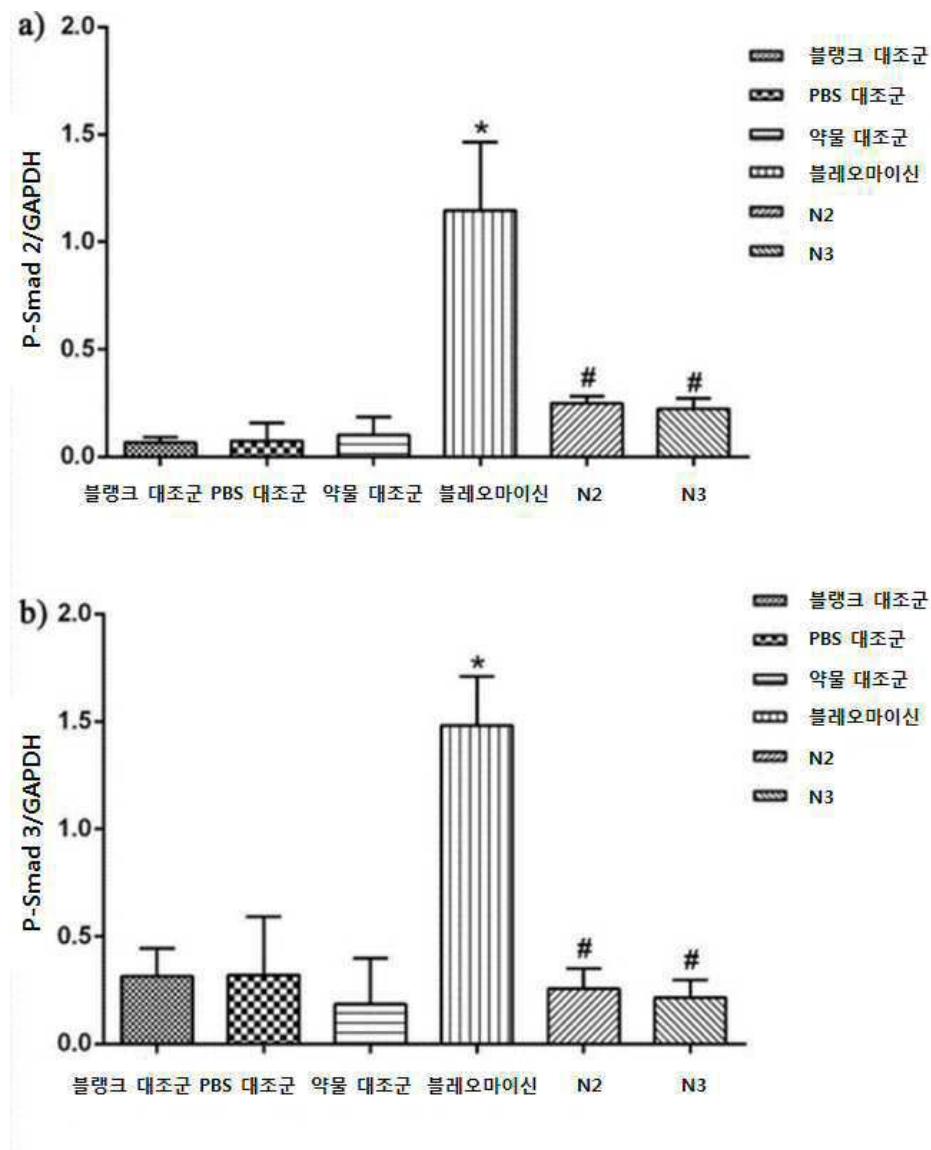
도면7



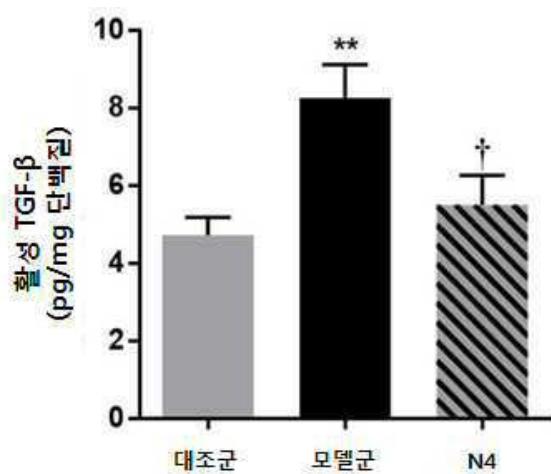
도면8



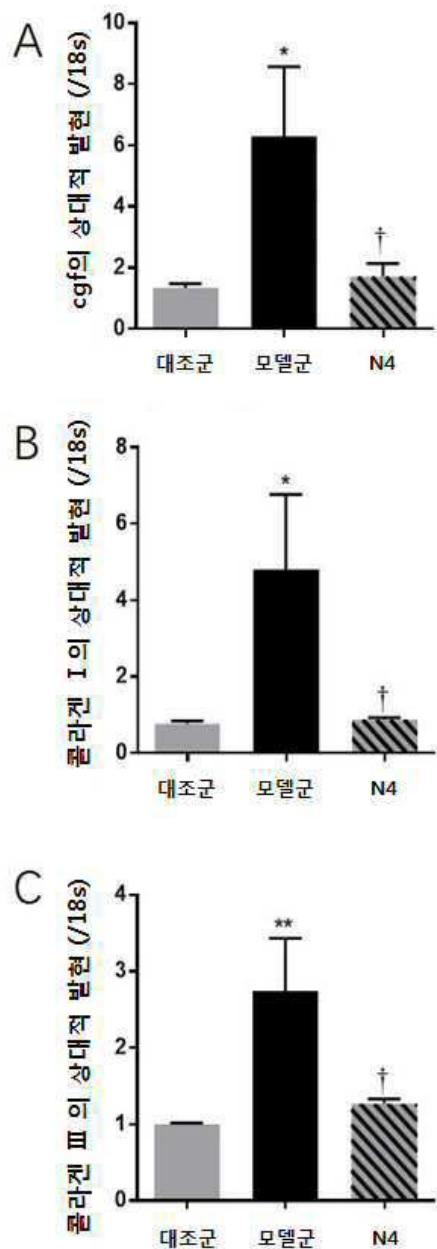
도면9



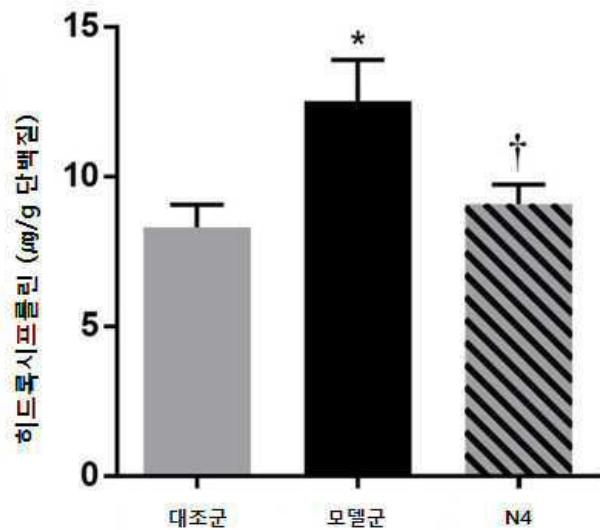
도면10



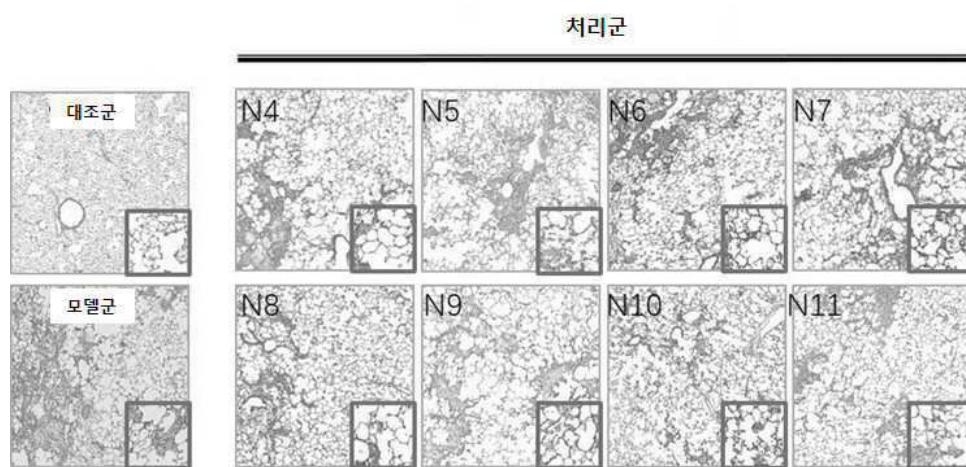
도면11



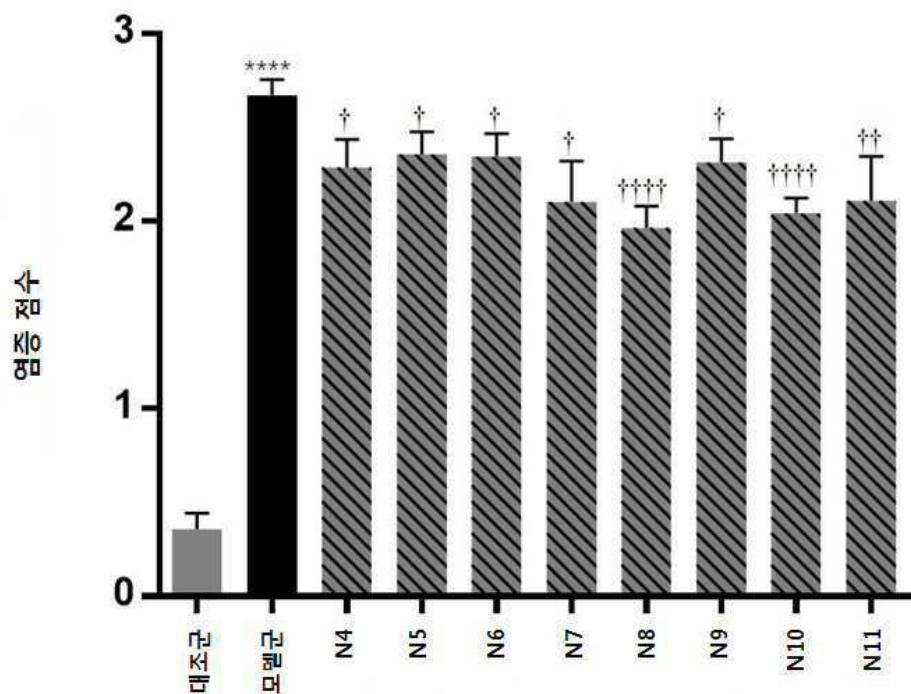
도면12



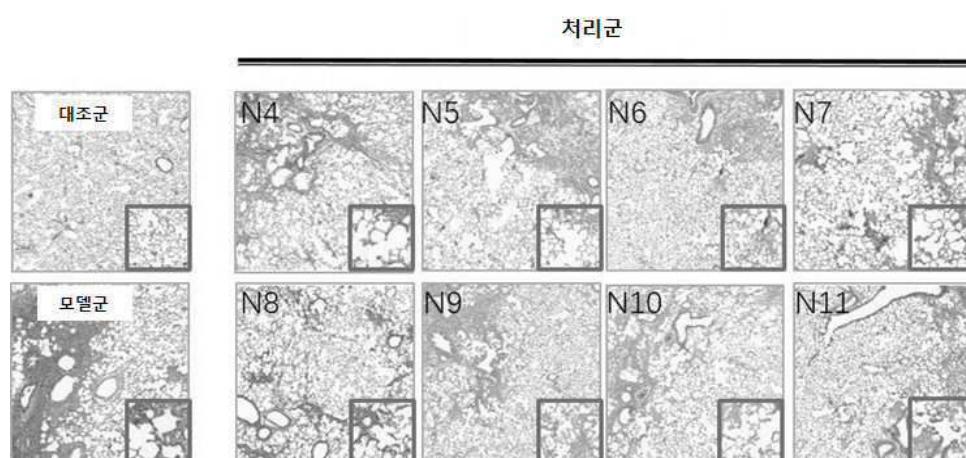
도면13



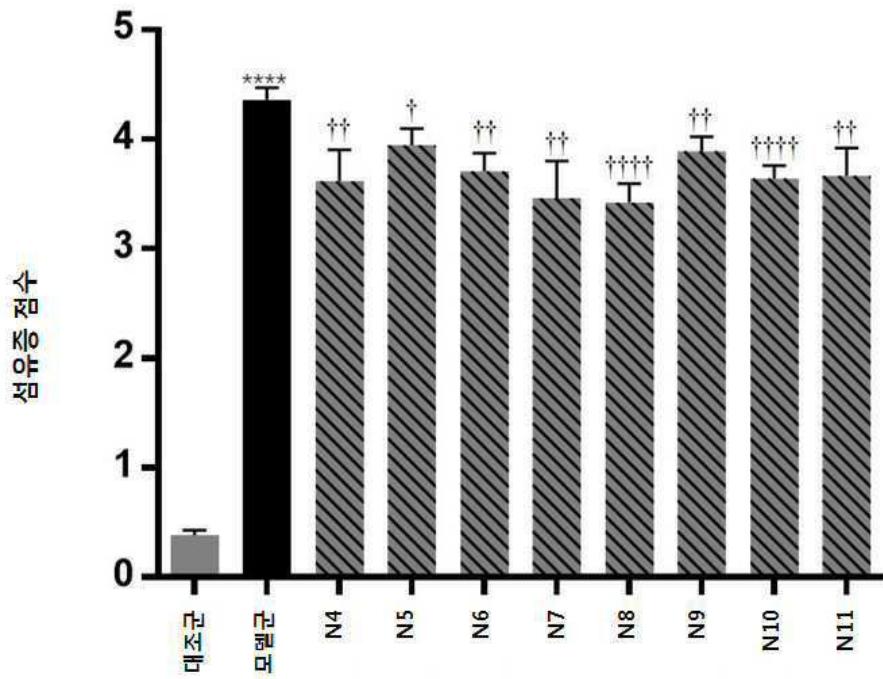
도면14



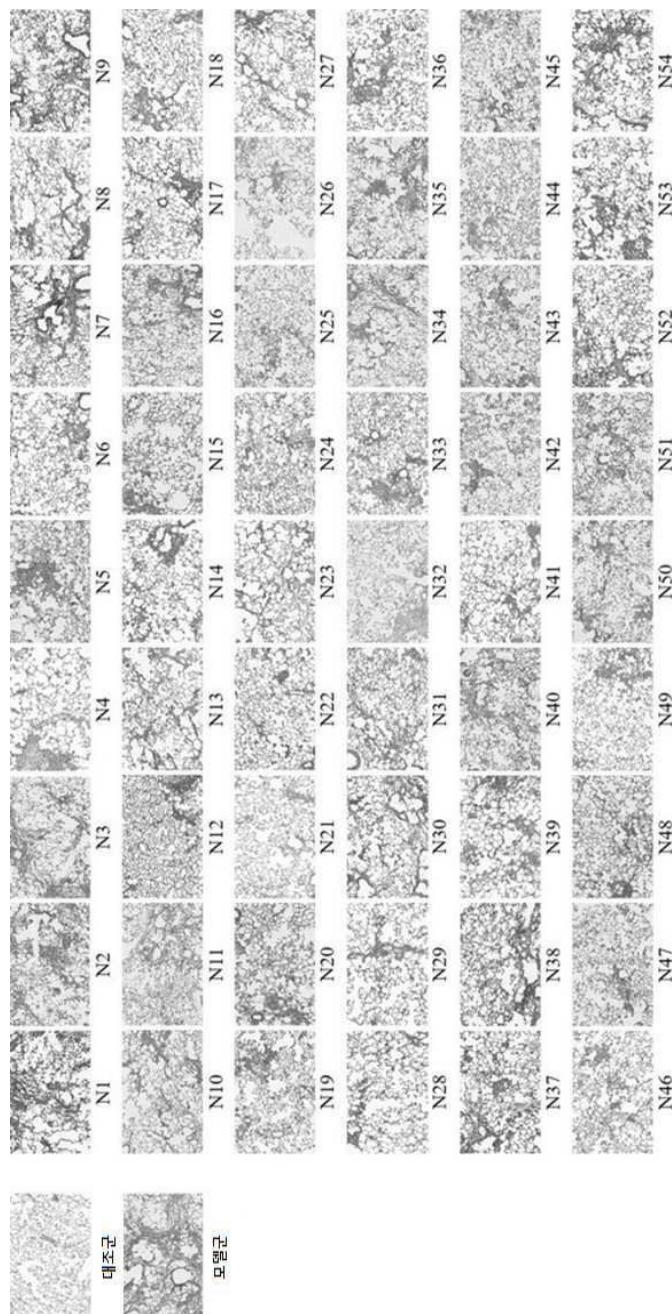
도면15



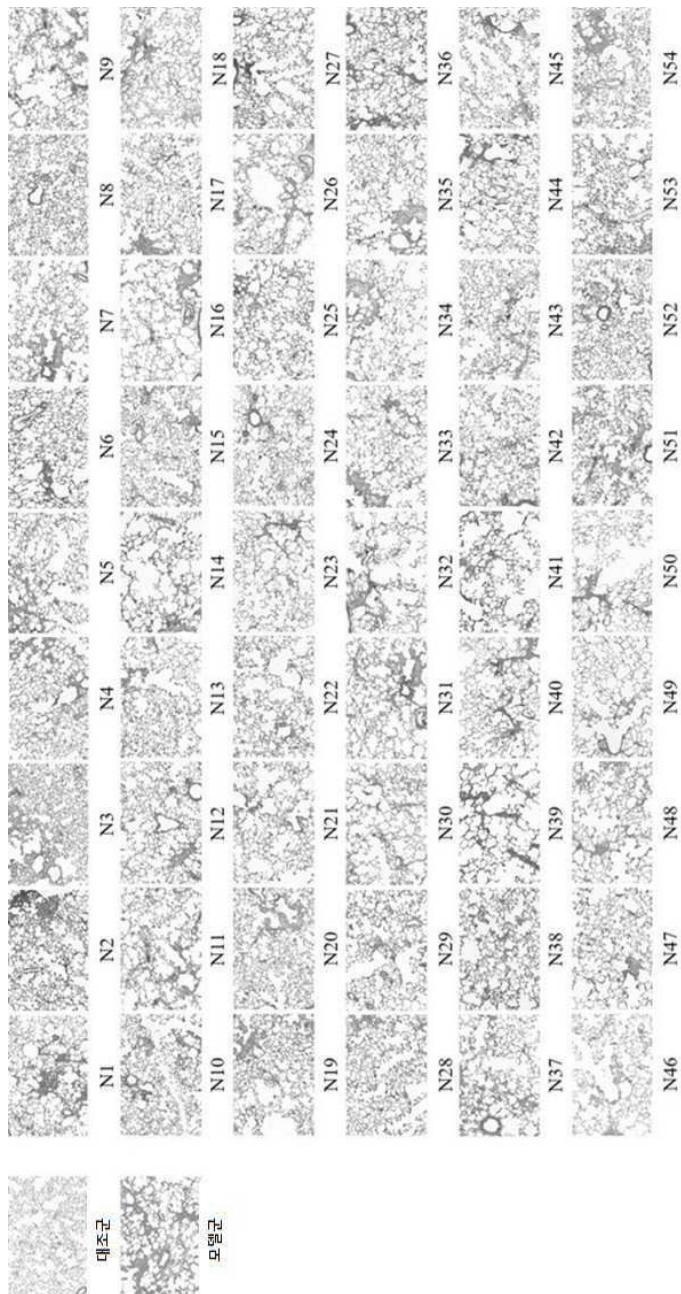
도면 16



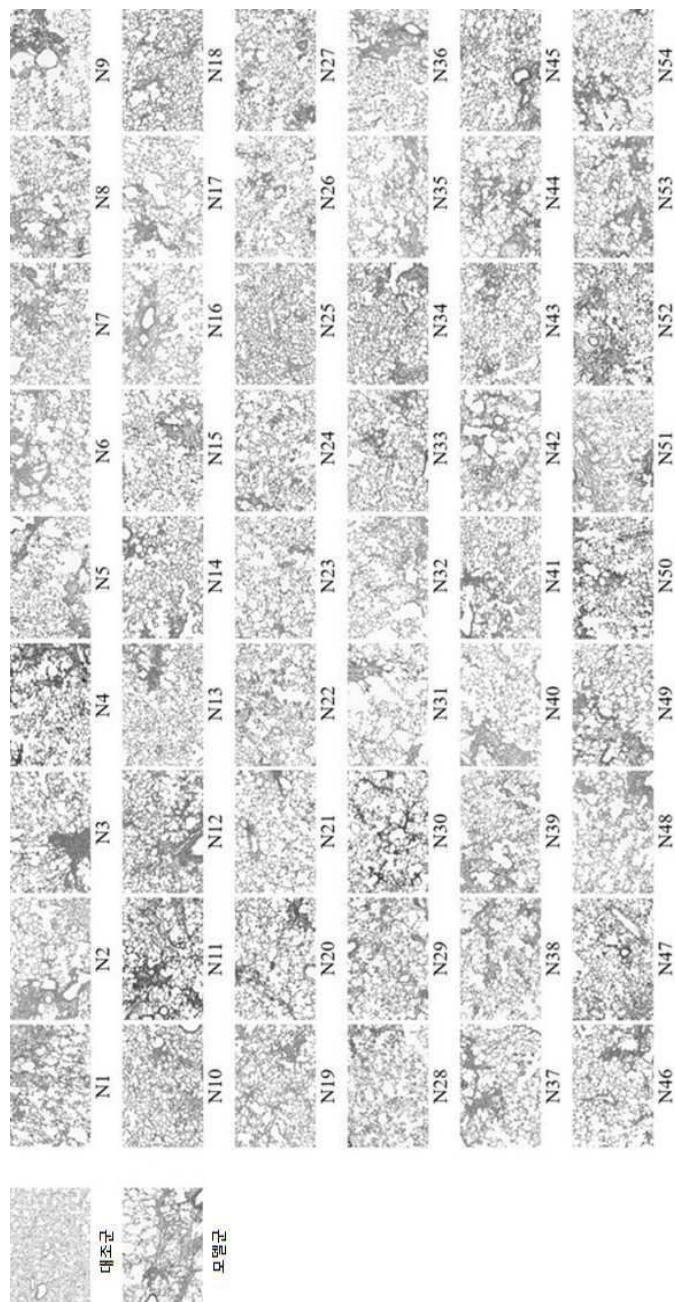
도면 17



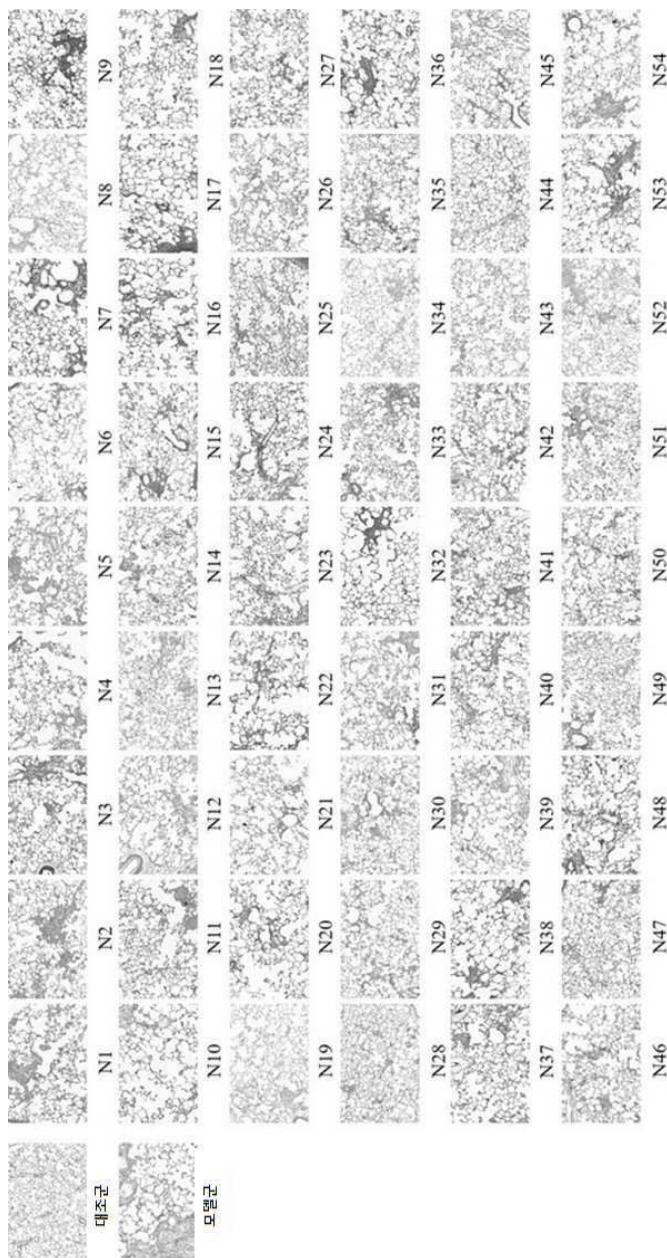
도면18



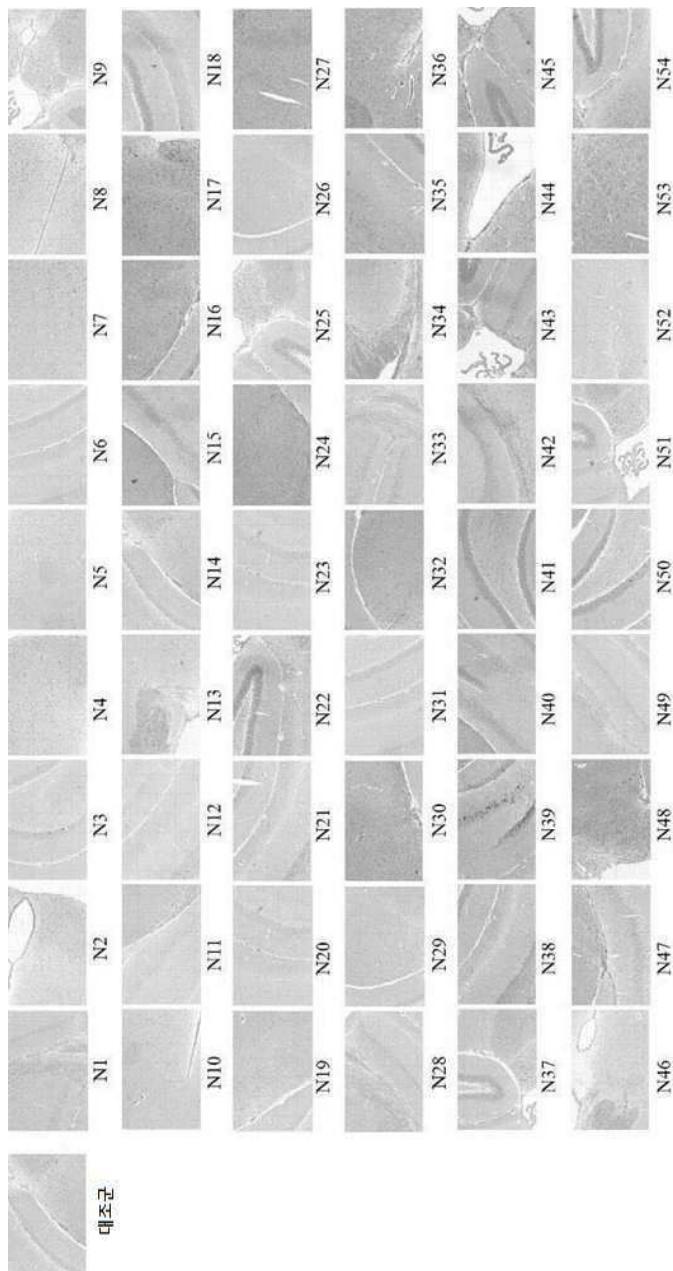
도면19



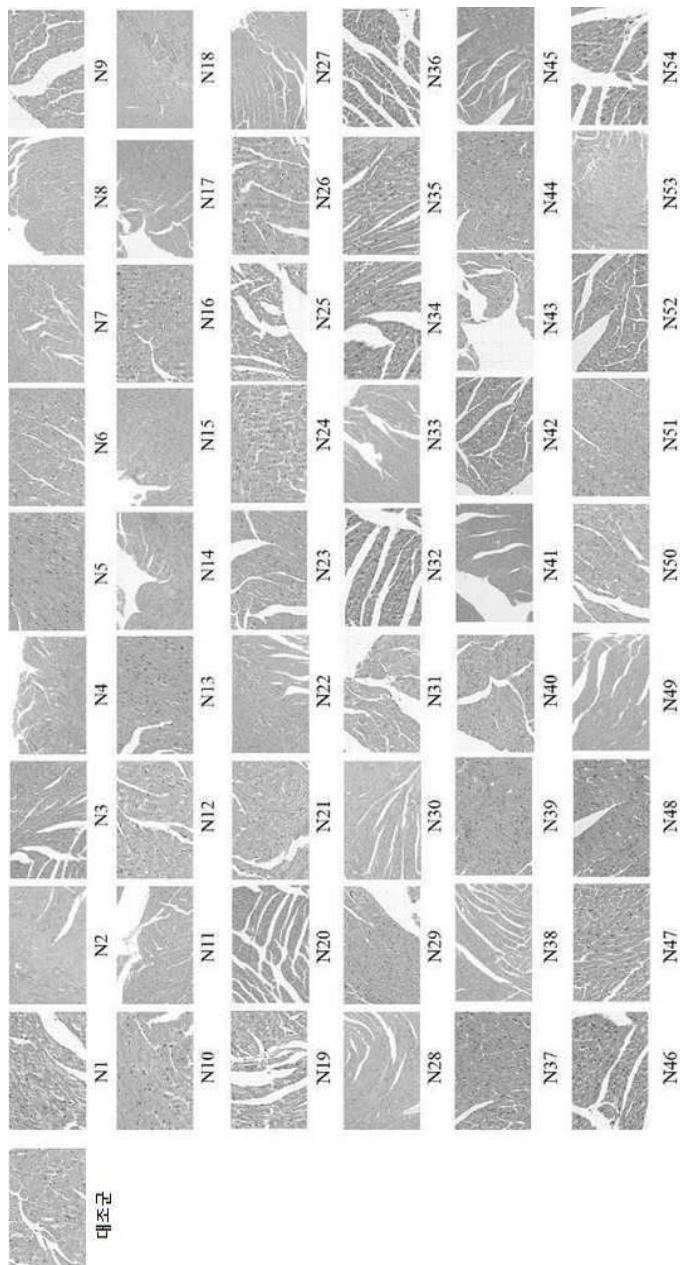
도면20



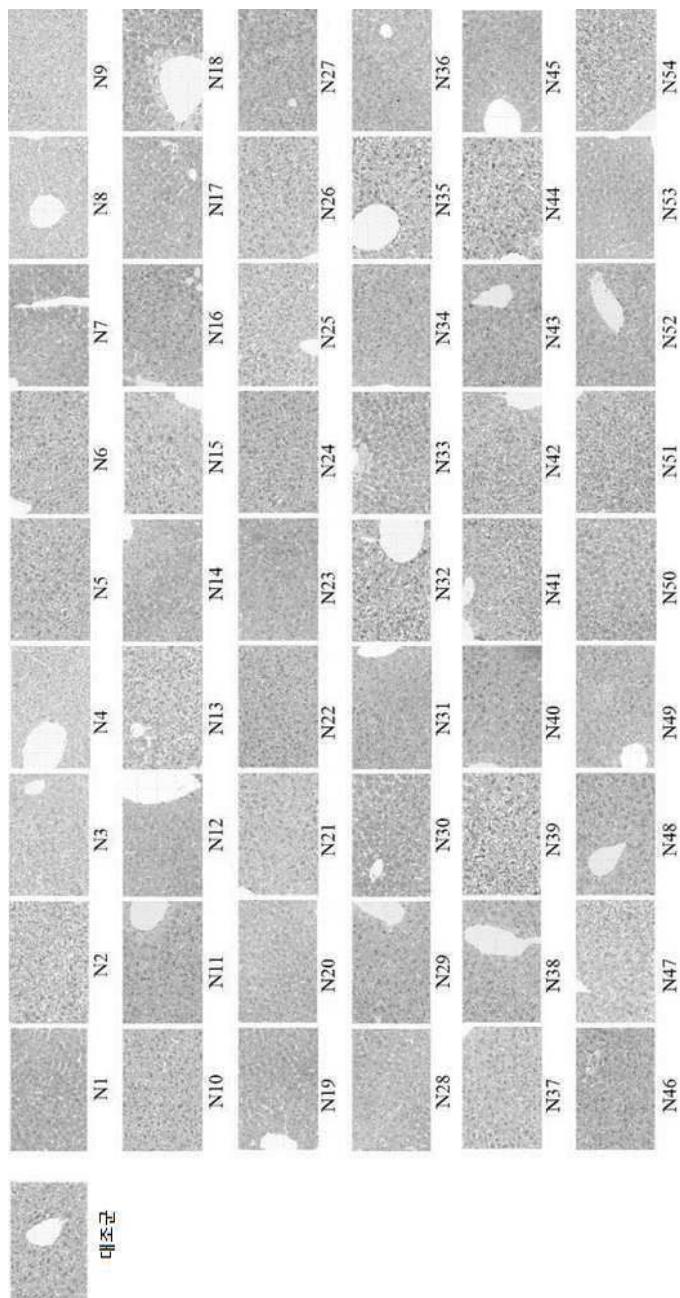
도면21



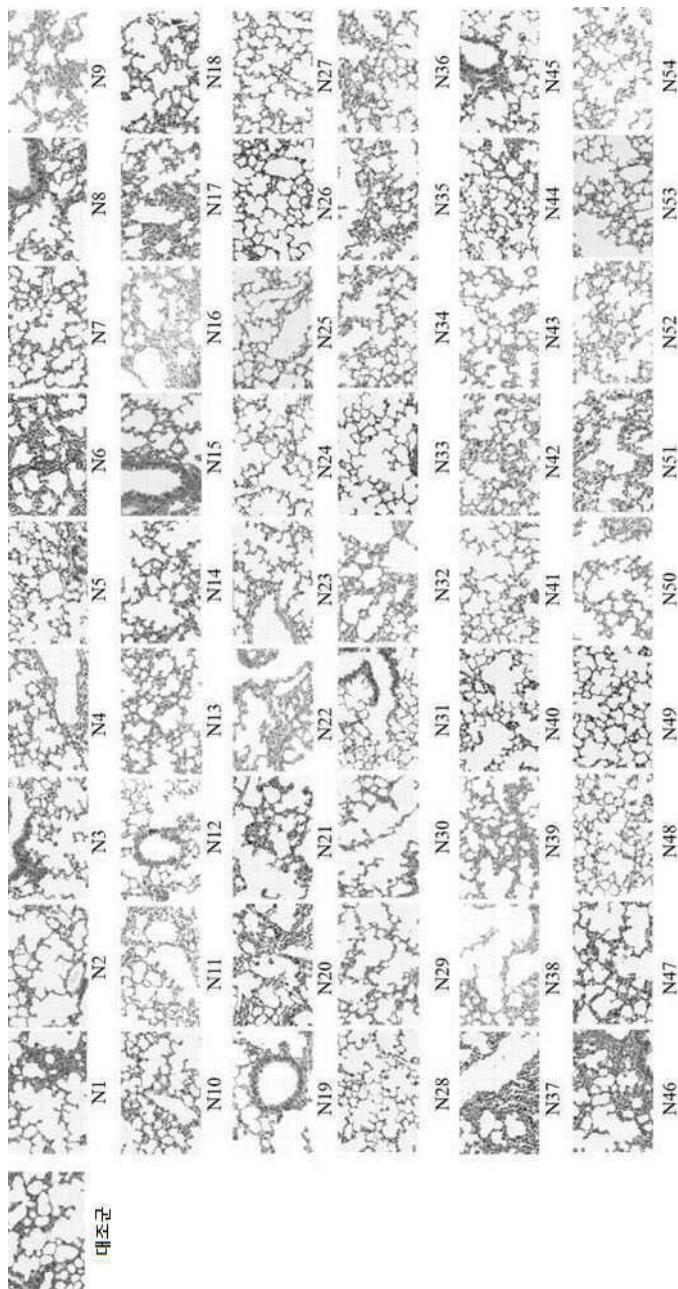
도면22



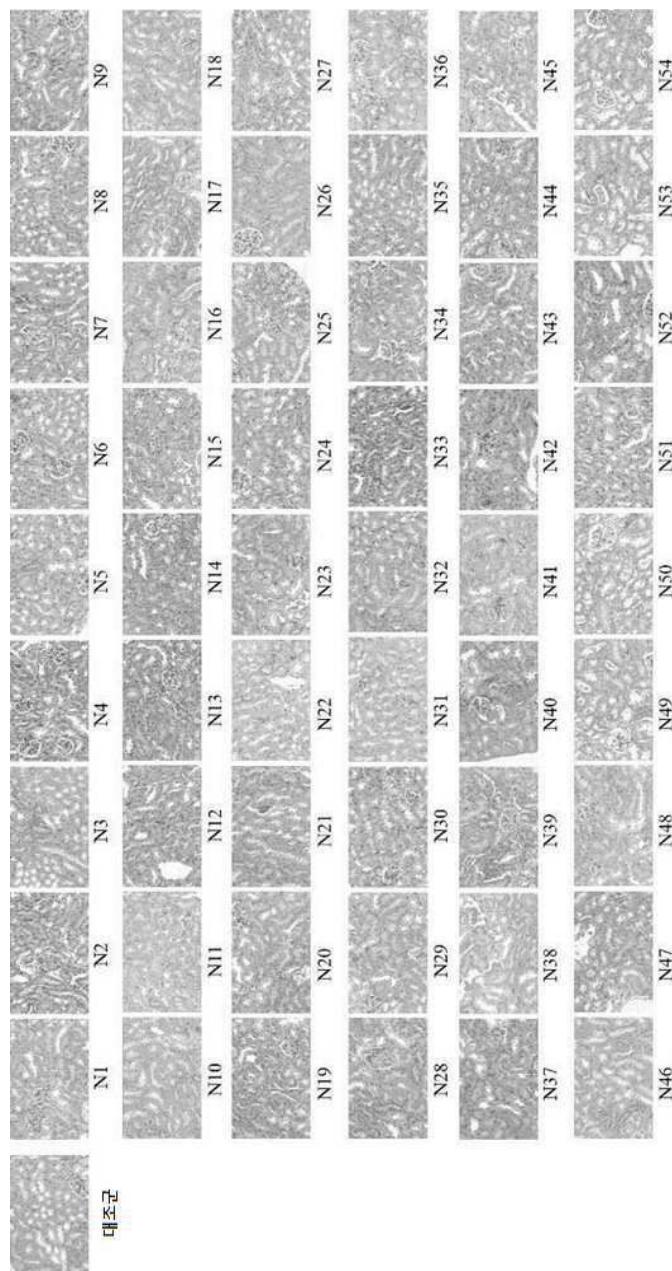
도면23



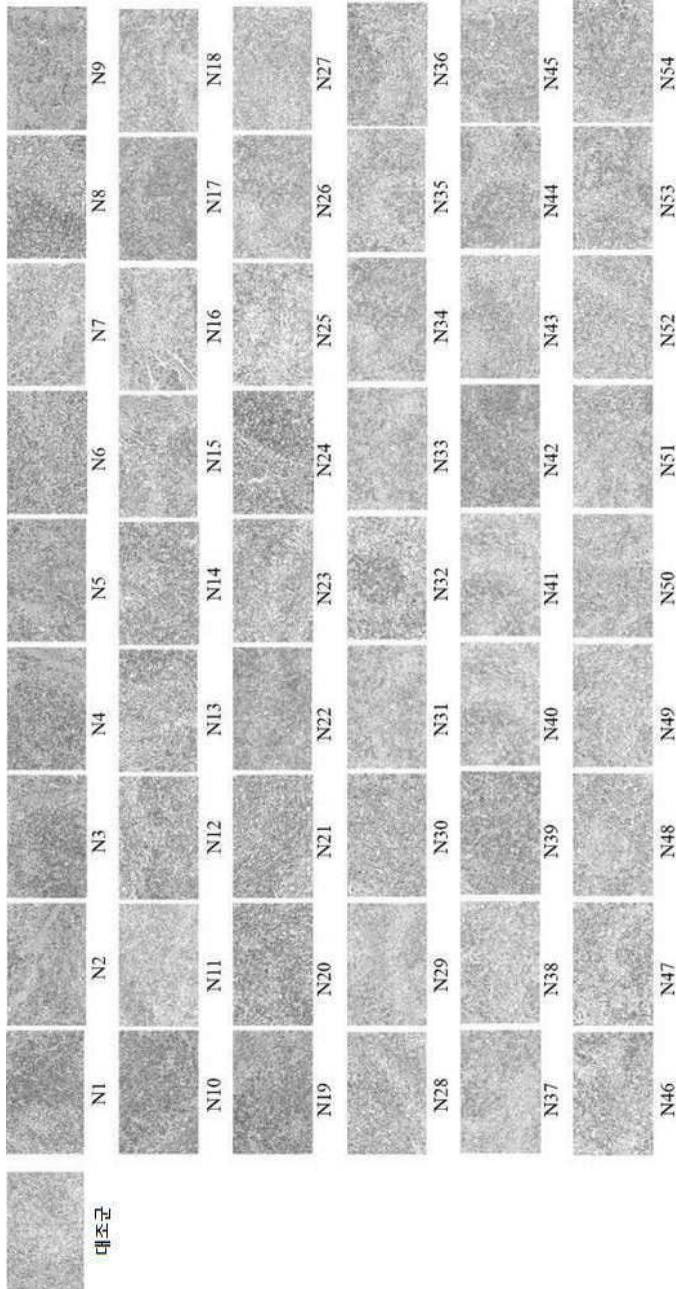
도면24



도면25



도면26



서 열 목 록

- <110> CHENGDU HUITAI BIOMEDICINE CO., LTD.
- <120> POLYPEPTIDE, POLYPEPTIDE FRAGMENT, DERIVATIVE THEREOF, AND APPLICATIONS THEREOF
- <130> OP1918-US-0097
- <150> PCT/CN2018/077492
- <151> 2018-02-28
- <150> 201710115604.4
- <151> 2017-03-01

<150> 201710677602.4

<151> 2017-08-09

<160> 54

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10

Asp Asn

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asp

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(17)

<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond

<400> 3

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asp

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp

1 5 10

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp Asn Cys

1 5 10 15

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp

1 5 10

<210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Arg Glu

1 5 10 15

Asp Asn Cys

<210> 8
<211> 11
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Tyr Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Thr Gln Asp

1 5 10

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(14)

<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond

<400> 9

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(11)

<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond

<400> 10

Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp

1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(11)

<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond

<400> 11

Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp

1 5 10

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp

1 5 10 15

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp

1 5

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp Asn Cys

1 5 10

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asp Arg Cys

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Arg Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asp Asn Cys

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asp Asn Cys Thr

20

<210

> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Phe Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala

1 5 10 15

Glu Asp Asn Cys

20

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Arg Cys

1 5 10

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala

1 5 10

Glu Asp

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Arg Phe Leu Arg Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp

1 5 10

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Arg Lys Glu Asn Thr Gln Asp Ala Glu Asp

1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Val Arg Phe Leu Arg Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp

1 5 10 15

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asp Arg Cys Thr

20

<

210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Phe Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Arg

1 5 10 15

Glu Asp Asn Cys

20

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(19)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 27

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asp Asn Cys

<210> 28

<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MOD_RES
<222> (1)..(15)
<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond
<400> 28

Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp

1 5 10 15

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MOD_RES
<222> (1)..(9)
<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond

<

400> 29

Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp

1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MOD_RES
<222> (1)..(9)
<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond
<400> 30

Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp

1 5

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(11)

<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond

<400> 31

Tyr Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Thr Gln Asp

1 5 10

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(16)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 32

Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp Asn Cys

1 5 10 15

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(14)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 33

Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp Asn Cys

1 5 10

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(19)

<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond

<400> 34

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Arg Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Asn Cys

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(19)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 35

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Arg Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Asn Cys

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(19)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 36

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Arg Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Asn Cys

<210> 37

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(20)

<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond

<400> 37

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asp Asn Cys Thr

20

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(20)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 38

Phe Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala

1 5 10 15

Glu Asp Asn Cys

20

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(20)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 39

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asp Asn Thr Cys

20

<210> 40

<211> 11

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MOD_RES
<222> (1)..(11)
<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond
<400> 40

Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Arg Cys

1 5 10

<210> 41
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES
<222> (1)..(18)
<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond
<400> 41

Arg Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala
1 5 10 15

Glu Asp

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MOD_RES
<222> (1)..(10)
<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond
<400> 42

Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Arg

1 5 10

<210> 43
<211> 18
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(18)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 43

Arg Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala

1 5 10 15

Glu Asp

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(18)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400>

> 44

Tyr Arg Ser Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala

1 5 10 15

Glu Asp

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(9)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 45

Leu Ala Lys Glu Asn Arg Thr Gln Asp

1 5

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222>

> (1)..(16)

<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond

<400> 46

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Arg Lys Glu Asn Thr Gln Asp Ala Glu Asp

1 5 10 15

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(17)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 47

Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp Arg

1 5 10 15

Cys

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(16)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 48

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Arg Lys Glu Asn Thr Gln Asp Ala Glu Asp

1 5 10 15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(15)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 49

Val Arg Phe Leu Arg Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(20)

<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond

<400> 50

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Cys Thr

20

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(20)

<223> PEG2 is linked to the N-terminus via an amide bond

<400> 51

Phe Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Arg

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Asp Asn Cys

20

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(20)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 52

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asp Arg Cys Thr

20

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(20)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 53

Phe Tyr Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Arg

1 5 10 15

Glu Asp Asn Cys

20

<210> 54

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(20)

<223> PEG2 is linked to the C-terminus via an amide bond

<400> 54

Tyr Arg Val Arg Phe Leu Arg Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asp Asn Thr Cys

20