



공개특허 10-2020-0081402



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0081402
(43) 공개일자 2020년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01) *A61K 38/22* (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01) *A61P 1/04* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) *C07K 14/575* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0621 (2013.01)
A61K 38/2292 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7013814

(22) 출원일자(국제) 2018년11월23일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년05월14일

(86) 국제출원번호 PCT/KR2018/014522

(87) 국제공개번호 WO 2019/103523
국제공개일자 2019년05월31일

(30) 우선권주장
62/590,444 2017년11월24일 미국(US)

(71) 출원인
주식회사 지트리비엔티
경기도 성남시 분당구 정자동로 248, 오피스타워
22층 (정자동, 파크뷰)

(72) 발명자
강신옥
경기도 성남시 분당구 서현로 177, 106동 501호(
이매동, 이매촌금강아파트)

김경순
부산광역시 해운대구 센텀동로 123, A동 1805호(
재송동, 더샵센텀스타아파트)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 티모신 베타 4 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 티모신 베타 4(thymosin beta 4), 티모신 베타 4의 동형(isoform), 이의 유사체, 또는 티모신 베타 4의 유도체를 유효성분으로 포함하는 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 티모신 베타 4, 이의 동형 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 뮤신 분비 촉진용 조성물은 술잔세포 증식을 촉진시키고, 뮤신의 분비량을 증가시킨다. 특히, 상기 뮤신 분비 촉진용 조성물은 Muc5AC, Muc1, Muc4 및 Muc16의 발현을 증가시킨다. 따라서, 본 발명의 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 조성물은 술잔세포나 뮤신 관련 질환에 효과가 우수한 것으로 판단된다.

(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)

A61P 1/04 (2018.01)

A61P 27/02 (2018.01)

C07K 14/57581 (2013.01)

C12N 2500/05 (2013.01)

C12N 2500/30 (2013.01)

C12N 2501/30 (2013.01)

(72) 발명자

양원석

경기도 남양주시 와부읍 덕소로97번길 101, 113동
301호(동부센트레빌아파트)

성지혜

서울특별시 영등포구 도림로 464, 1동 1306호(문래
동3가, 국화맨션)

명세서

청구범위

청구항 1

티모신 베타 4(thymosin beta 4), 티모신 베타 4의 동형(isoform), 이의 유사체, 또는 티모신 베타 4의 유도체를 유효성분으로 포함하는 술잔세포 증식 또는 뮤신(mucin) 분비 촉진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 티모신 베타 4가 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것인, 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 티모신 베타 4의 유도체는 티모신 베타 4의 N-말단 또는 C-말단이 변이된 것인, 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 티모신 베타 4, 이의 동형 또는 이의 유도체의 농도가 0.02 %(w/v) 내지 0.5 %(w/v)인 것을 특징으로 하는, 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 조성물이 아세트산, 시트르산, 이들의 염, 또는 상기 염의 수화물을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는, 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 조성물이 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘수화물 및 염화마그네슘육수화물을 더 포함하는 것인, 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 조성물.

청구항 7

티모신 베타 4(thymosin beta 4), 티모신 베타 4의 동형(isoform), 이의 유사체, 또는 티모신 베타 4의 유도체를 유효성분으로 포함하는 술잔세포 또는 뮤신(mucin) 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 티모신 베타 4가 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것인, 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 티모신 베타 4의 유도체는 티모신 베타 4의 N-말단 또는 C-말단이 변이된 것인, 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제 7항에 있어서,

상기 티모신 베타 4, 이의 동형, 또는 이의 유도체의 농도가 0.02 %(w/v) 내지 0.5 %(w/v)인 것을 특징으로 하는, 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제 7항에 있어서,

상기 조성물이 아세트산, 시트르산, 이들의 염, 또는 상기 염의 수화물을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는, 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제 7항에 있어서,

상기 조성물이 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘수화물 및 염화마그네슘수화물을 더 포함하는 것인, 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제 7항에 있어서,

상기 뮤신 관련 질환이 위염, 위궤양, 장염, 궤양성 대장염 또는 안구건조증인 것인, 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 14

제7항 내지 제13항 중 어느 하나의 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 치료방법.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환이 위염, 위궤양, 장염, 궤양성 대장염 또는 안구건조증인 것인, 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 치료방법.

청구항 16

술잔세포 증식 또는 뮤신 분비를 촉진시키기 위한 제1항의 조성물의 용도.

청구항 17

술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 약제를 제조하기 위한 제1항의 조성물의 용도.

청구항 18

술잔세포 또는 뮤신 관련 질환을 예방 또는 치료하기 위한 제7항의 조성물의 용도.

청구항 19

술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 제7항의 조성물의 용도.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 티모신 베타 4(thymosin beta 4), 티모신 베타 4의 동형(isoform), 이의 유사체, 또는 티모신 베타 4의 유도체를 유효성분으로 포함하는 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 술잔세포(goblet cell)는 Muc5AC와 같은 점액성 뮤신을 분비하는 원주형태의 상피세포이다. 술잔세포는 주로 소장, 대장, 기관지, 결막 등의 상피에 분포되어 있다. 술잔세포는 뮤신을 분비하여 점막 표면을 적셔서 기계적인 마찰이나 화학적인 침입으로부터 조직을 보호한다.

[0003] 한편, 뮤신(mucin)은 위장관, 폐, 신장, 난소, 유방, 눈, 코 및 췌장 등의 상피조직에서 분비되는 당단백질(glycoprotein)이다. 정상적인 생리학적 조건에서 뮤신은 상피조직을 보호하는 역할을 한다. 하지만, 상피조직에서 뮤신의 분비가 잘 이루어지지 않을 경우, 위염, 위궤양, 장염, 궤양성 대장염, 변비 등의 질환들이 유발될 수 있다. 또한, 눈과 코와 같은 기관의 점막에서 뮤신 분비가 잘 이루어지지 않을 경우, 외부의 유해물질이 체내로 들어오게 되면서 각막염, 안구건조증, 비염, 기관지염, 폐렴 등과 같은 질환의 병인이 될 수 있다.

[0004] 한편, 티모신 베타 4는 1981년에 흉선에서 처음으로 발견된 단백질로서, 41 내지 43개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 등전점(isoelectric point)이 5.1인 단백질이다. 1991년 리바 등에 의해 동물세포에서 액틴-격리 분자(actin-sequestering molecule)로 처음 밝혀진 티모신 베타 4는 이후 면역 조절(immunoregulatory) 및 신경내분비(neuroendocrine)에도 관여함이 밝혀졌다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 효과적으로 뮤신의 분비를 촉진시킬 수 있는 조성물에 대해 연구한 결과, 티모신 베타 4가 효과적으로 술잔세포를 증식 시킬뿐 아니라, 뮤신 분비를 촉진시키는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 측면은, 티모신 베타 4(thymosin beta 4), 티모신 베타 4의 동형(isoform), 이의 유사체, 또는 티모신 베타 4의 유도체를 유효성분으로 포함하는 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명의 다른 측면은, 티모신 베타 4, 이의 동형 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 측면은, 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비를 촉진시키기 위한 상기 조성물의 용도를 제공한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 측면은, 술잔세포 증식 또는 뮤신 분비 촉진용 약제를 제조하기 위한 상기 조성물의 용도를 제공한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면은, 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환을 예방 또는 치료하기 위한 상기 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 측면은, 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 상기 약학 조성물의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 티모신 베타 4(thymosin beta 4), 티모신 베타 4의 동형(isoform), 이의 유사체, 또는 티모신 베타 4의 유도체를 유효성분으로 포함하는 뮤신 분비 촉진용 조성물은 술잔세포 증식을 촉진시키고, 뮤신의 분비량을 증가시킨다. 특히, 상기 뮤신 분비 촉진용 조성물은 Muc5AC, Muc1, Muc4 및 Muc16의 발현을 증가시킨다. 따라서, 본 발명의 뮤신 분비 촉진용 조성물은 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환에 효과가 우수한 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 티모신 베타 4의 술잔세포 증식 및 뮤신 분비 촉진효과를 확인하기 위해, 안구건조증 유발 마우스를 이용한 동물실험의 개요도를 나타낸 도면이다.

도 2는 티모신 베타 4의 술잔세포 증식 촉진효과를 확인하기 위해, 정상 마우스 및 시험물질을 점안한 안구건조증 유발 마우스의 안구를 적출하여 조직 내 술잔세포를 염색한 사진이다.

도 3은 티모신 베타 4의 술잔세포 증식 촉진효과를 확인하기 위해, 정상 마우스 및 시험물질을 점안한 안구건조증 유발 마우스의 안구를 적출하여 조직 내 술잔세포를 염색한 후 염색부위를 정량화하여 나타낸 도면이다.

도 4는 티모신 베타 4의 뮤신 분비 촉진효과를 확인하기 위해, 정상 마우스 및 시험물질을 점안한 안구건조증 유발 마우스의 안구를 적출하여 조직 내 뮤신을 염색한 사진이다.

도 5는 티모신 베타 4의 뮤신 분비 촉진효과를 확인하기 위해, 정상 마우스 및 시험물질을 점안한 안구건조증 유발 마우스의 안구를 적출하여 조직 내 뮤신을 염색한 후 염색부위를 정량화하여 나타낸 도면이다.

도 6은 티모신 베타 4의 Muc1, Muc4, Muc16 및 Muc5AC 발현 증가 효과를 확인하기 위해, 정상 마우스 및 시험물질을 점안한 안구건조증 유발 마우스의 안구를 적출하여 각막에서 발현되는 Muc1, Muc4, Muc16 및 Muc5AC를 면역형광법으로 염색한 사진이다.

도 7은 티모신 베타 4의 Muc1, Muc4, Muc16 및 Muc5AC 발현 증가 효과를 확인하기 위해, 정상 마우스 및 시험물질을 점안한 안구건조증 유발 마우스의 안구를 적출하여 결막에서 발현되는 Muc1, Muc4, Muc16 및 Muc5AC를 면역형광법으로 염색한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[0016]

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0017]

본 발명은 일 측면은, 티모신 베타 4(thymosin beta 4), 티모신 베타 4의 동형(isoform), 이의 유사체 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 술잔세포 증식 또는 뮤신(mucin) 분비 촉진용 조성물을 제공한다.

[0018]

본 발명에서 사용하는 용어 "티모신 베타 4"란, Thymosin beta 4 또는 T β 4로 지칭되기도 하는 단백질로서, 최초 흥선으로부터 단리되었고, 여러 조직들에서 식별된 4.9 kDa의 43개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 티모신 베타 4는 시험관 내 내피 세포 이동 및 분화 중에 상향-조절되는 단백질이다. 많은 티모신 베타 4 동형(isoform)들이 확인되었으며, 티모신 베타 4의 공지된 아미노산 서열과 약 70%, 또는 약 75%, 또는 약 80% 이상의 상동성을 갖는다. 상기 티모신 베타 4는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다.

[0019]

상기 티모신 베타 4의 유도체는 티모신 베타 4의 N-말단 또는 C-말단이 변이된 것일 수 있다. 상기 티모신 베타 4의 유도체는 티모신 베타 4의 활성을 유지하는 한, N-말단 및/또는 C-말단의 일부가 절단되거나 아미노산이 추가된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 티모신 베타 4의 유도체는 티모신 베타 4의 N-말단에 1 또는 2의 아미노산이 추가된 것일 수 있다. 또한, 상기 티모신 베타 4의 유도체는 티모신 베타 4의 C-말단에 1 또는 2의 아미노산이 추가된 것일 수 있다.

[0020]

이때, 상기 아미노산은 글리신(glycine), 알라닌(alanine), 아르기닌(arginine), 아스파테이트(aspartate), 시스테인(cysteine), 글루탐산(glutamate), 글루타민(glutamine), 히스티딘(histidine), 프롤린(proline), 세린(serine), 티로신(tyrosine), 이소류신(isoleucine), 류신(leucine), 라이신(lysine), 트립토판(tryptophan), 발린(valine), 메티오닌(methionine), 페닐알라닌(phenylalanine), 아스파라긴(asparagine) 및 트레오닌(threonine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021]

상기 티모신 베타 4의 유도체는 티모신 베타 4의 N-말단의 1 내지 3의 아미노산이 절단된 것일 수 있다. 또한, 상기 티모신 베타 4의 유도체는 티모신 베타 4의 C-말단의 1 내지 3의 아미노산이 절단된 것일 수 있다.

[0022]

상기 술잔세포 증식 및 뮤신 분비 촉진용 조성물 내 티모신 베타 4, 티모신 베타 4의 동형, 이의 유사체 또는 이의 유도체의 농도가 0.01 %(w/v) 내지 1.0 %(w/v)일 수 있으며, 바람직하게는 0.02 %(w/v) 내지 0.5 %(w/v)일 수 있다.

[0023]

본 발명에서 사용하는 용어 "술잔세포"란 점막의 상피열 속에 존재하는 점액분비 세포를 의미한다. 술잔세포는 Muc5AC와 같은 점액성 뮤신을 분비하는 원주형태의 세포이다. 또한, 술잔세포는 주로 소장, 대장, 기관지, 결막 등의 상피에 분포되어 있다. 술잔세포는 뮤신을 분비하여 점막 표면을 적셔서 기계적인 마찰이나 화학적인 침입

으로부터 조직을 보호한다.

[0024] 이와 같이 각 조직의 점막을 보호하는 역할을 하는 술잔세포에 기능 이상이 발생하면 위장관, 폐, 신장, 난소, 췌장, 눈, 코 등의 상피조직에서 분비되는 뮤신의 분비량이 감소하여 질환이 유발될 수 있다. 상기 술잔세포의 기능 이상으로 유발되는 질환은 위염, 위궤양, 장염, 궤양성 대장염 또는 안구건조증일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 상기 조성물은 통상의 방법에 따라 제형화하여 사용될 수 있다. 적합한 제형으로는 경질 또는 연질의 캡슐제, 용액제, 혼탁제, 유화액제, 주사제, 좌제, 안과용 제형 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 상기 조성물은 불활성인 유기 또는 무기 담체를 이용하여 적합한 제형으로 제조할 수 있다. 즉, 제형이 경질 캡슐제인 경우, 락토오스, 수크로오스, 전분 또는 그 유도체, 탈크, 칼슘 카보네이트, 젤라틴, 스테아르산 또는 그 염을 포함할 수 있다. 또한, 제형이 연질 캡슐제인 경우, 식물성 오일, 왁스, 지방, 반고체 및 액체의 폴리올을 포함할 수 있다. 나아가, 제형이 용액 또는 시럽 형태인 경우, 물, 폴리올, 글리세롤, 및/또는 식물성 오일 등을 포함할 수 있다.

[0027] 상기 조성물은 상기의 담체 외에도 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 용해제, 감미제, 착색제, 삼투압 조절제, 산화방지제 등을 더 포함할 수 있다.

[0028] 상기 조성물의 제형이 안과용 제형일 경우, 상기 조성물은 추가적으로 아세트산, 시트르산, 이들의 염, 또는 상기 염의 수화물을 추가로 함유할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 시트르산나트륨수화물 또는 아세트산나트륨수화물을 추가로 함유할 수 있다.

[0029] 상기 시트르산은 구연산이라고도 하며, $C_6H_8O_7$ 의 화학식을 갖는 화합물이다. 또한, 상기 시트르산은 시트르산염의 형태로 사용될 수 있다. 시트르산염은 시트르산의 유도체로서 일 구체예로는 시트르산나트륨일 수 있으며, 시트르산나트륨수화물일 수 있다. 시트르산 또는 이의 염은 통상 pH 변화를 완화하기 위한 완충제로 사용되고 있으나, 본 발명에서 사용되는 시트르산 또는 이의 염은 통상적으로 사용되는 양에 비하여 많은 양을 사용하여야 한다. 이때, 시트르산 또는 이의 염은 전체 조성물에서 0.01 %(w/v) 내지 0.5 %(w/v)가 포함될 수 있다. 또한, 시트르산 또는 이의 염은 전체 조성물에서 0.05 %(w/v) 내지 0.25 %(w/v)가 포함될 수 있으며, 바람직하게는, 0.1 % 내지 0.3 %가 포함될 수 있다.

[0030] 상기 아세트산은 초산이라고도 지칭되는 CH_3COOH 의 화학식을 갖는 약산이다. 또한, 상기 아세트산은 아세트산염의 형태로 사용될 수 있다. 아세트산염의 일 구체예는 아세트산나트륨수화물 일 수 있다. 이때, 아세트산 또는 이의 염은 전체 조성물에서 0.01 %(w/v) 내지 1.5 %(w/v)가 포함될 수 있다. 또한, 아세트산 또는 이의 염은 전체 조성물에서 0.1 %(w/v) 내지 0.8 %(w/v)가 포함될 수 있으며, 바람직하게는, 0.2 % 내지 0.5 %가 포함될 수 있다.

[0031] 상기 조성물은 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘수화물 및 염화마그네슘육수화물을 더 포함할 수 있다.

[0032] 또한, 염화나트륨의 농도는 0.1 %(w/v) 내지 1.2 %(w/v)일 수 있으며, 0.3 %(w/v) 내지 1.0 %(w/v)일 수 있다. 바람직하게는, 0.5 %(w/v) 내지 0.7 %(w/v)일 수 있다. 또한, 염화칼륨의 농도는 0.01 %(w/v) 내지 0.15 %(w/v)일 수 있으며, 0.03 %(w/v) 내지 0.12 %(w/v)일 수 있다. 바람직하게는, 0.05 %(w/v) 내지 0.09 % (w/v)일 수 있다. 또한, 염화칼슘수화물의 농도는 0.01 %(w/v) 내지 0.12 %(w/v)일 수 있으며, 0.03 %(w/v) 내지 0.09 %(w/v)일 수 있다. 바람직하게는, 0.03 %(w/v) 내지 0.06 % (w/v)일 수 있다. 또한, 염화마그네슘육수화물의 농도는 0.01 %(w/v) 내지 0.12 %(w/v)일 수 있으며, 바람직하게는, 0.01 %(w/v) 내지 0.05 % (w/v)일 수 있다.

[0033] 또한, 상기 조성물은 염산 또는 수산화나트륨을 추가로 포함할 수 있다. 염산 및 수산화나트륨은 조성물 내의 pH를 조절하기 위하여 적정량 첨가될 수 있다. 또한, 조성물의 pH는 6.5 내지 7.5일 수 있으며, 6.8 내지 7.2일 수 있다. 바람직하게 조성물의 pH는 7.0 일 수 있다.

[0034] 본 발명자들은 티모신 베타 4의 술잔세포 증식 및 뮤신 분비 촉진 효과와 뮤신 관련 질환 치료 효과를 확인하기 위해, 안구건조증 유발 마우스를 이용하여 실험을 진행하였다.

[0035] 구체적으로, 10일간 티모신 베타 4 및 다른 시험약물을 안구건조증 유발 마우스 그룹에 각각 점안하였다. 10일 경과 후 각 그룹의 안구건조증 유발 마우스를 희생시켜 안구를 적출하여 조직면역 염색과 분자생물학적 분석을 진행하였다(도 1). 그 결과, 티모신 베타 4를 점안한 안구건조증 유발 마우스의 술잔세포의 수가 증가한 것을

확인하였다(도 2 및 도 3). 또한, 티모신 베타 4를 접안한 암구건조증 유발 마우스의 뮤신 분비량이 증가한 것을 확인하였다(도 4 및 도 5). 나아가, 티모신 베타 4를 접안한 암구건조증 유발 마우스의 Muc1, Muc4, Muc16 및 Muc5AC의 발현량이 증가한 것을 확인하였다(도 6 및 도 7).

[0036] 이를 통해, 티모신 베타 4가 술잔세포를 증식시키는 것이 확인되었고, 또한 뮤신의 분비를 촉진시켜, 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0037] 본 발명의 다른 측면은, 티모신 베타 4, 티모신 베타 4의 동형, 이의 유사체 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0038] 상기 티모신 베타 4, 티모신 베타 4의 동형, 이의 유사체 및 이의 유도체는 상술한 바와 같다.

[0039] 본 발명에서 사용하는 용어 "술잔세포 또는 뮤신 관련 질환"이란, 위장관, 폐, 신장, 난소, 췌장, 눈, 코 등의 상피조직에서 분비되는 뮤신의 분비량이 감소하여 유발되는 질환을 의미한다. 상기 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환은 위염, 위궤양, 장염, 궤양성 대장염 또는 암구건조증일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 "약학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.

[0041] 상기 담체는 자연적이거나 또는 비자연적인 담체일 수 있다. 제형에 따라, 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제와 같은 다양한 담체를 사용하여 제제화 할 수 있다.

[0042] 예를 들어, 경구 투여를 위한 고형제제에는 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 혼탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되며, 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0043] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 혼탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 혼탁용제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위테솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 제형화하여 사용될 수 있다. 적합한 제형으로는 경질 또는 연질의 캡슐제, 용액제, 혼탁제 또는 유화액제, 주사제, 좌제, 안과용 제형 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 상기 약학 조성물은 상기의 담체 외에도 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 용해제, 감미제, 착색제, 삼투압 조절제, 산화방지제 등을 더 포함할 수 있다.

[0045] 상기 약학 조성물 내 티모신 베타 4, 티모신 베타 4의 동형, 이의 유사체 또는 이의 유도체의 농도가 0.01 %(w/v) 내지 1.0 %(w/v)일 수 있으며, 바람직하게는 0.02 %(w/v) 내지 0.5 %(w/v) 일 수 있다.

[0046] 상기 약학 조성물의 제형이 안과용 제형일 경우, 추가적으로 아세트산, 시트르산, 이들의 염, 또는 상기 염의 수화물을 추가로 함유할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 시트르산나트륨수화물 또는 아세트산나트륨수화물을 추가로 함유할 수 있다.

[0047] 상기 시트르산은 구연산이라고도 하며, $C_6H_8O_7$ 의 화학식을 갖는 화합물이다. 또한, 상기 시트르산은 시트르산염의 형태로 사용될 수 있다. 시트르산염은 시트르산의 유도체로서 일 구체예로는 시트르산나트륨일 수 있으며, 시트르산나트륨수화물일 수 있다. 시트르산 또는 이의 염은 통상 pH 변화를 완화하기 위한 완충제로 사용되고 있으나, 본 발명에서 사용되는 시트르산 또는 이의 염은 통상적으로 사용되는 양에 비하여 많은 양을 사용하여야 한다. 이때, 시트르산 또는 이의 염은 전체 조성물에서 0.01 %(w/v) 내지 0.5 %(w/v)가 포함될 수 있다. 또한, 시트르산 또는 이의 염은 전체 조성물에서 0.05 %(w/v) 내지 0.25 %(w/v)가 포함될 수 있으며, 바람직하게는, 0.1 % 내지 0.3 %가 포함될 수 있다.

[0048] 상기 아세트산은 초산이라고도 지칭되는 CH_3COOH 의 화학식을 갖는 약산이다. 또한, 상기 아세트산은 아세트산염의 형태로 사용될 수 있다. 아세트산염의 일 구체예는 아세트산나트륨수화물 일 수 있다. 이때, 시트르산 또는 이의 염은 전체 조성물에서 0.01 %(w/v) 내지 1.5 %(w/v)가 포함될 수 있다. 또한, 시트르산 또는 이의 염은 전체 조성물에서 0.1 %(w/v) 내지 0.8 %(w/v)가 포함될 수 있으며, 바람직하게는, 0.2 % 내지 0.5 %가 포함될 수 있다.

[0049] 상기 약학 조성물의 제형이 안과용 제형일 경우, 추가적으로 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘수화물 및 염화마그네슘육수화물을 더 포함할 수 있다.

[0050] 또한, 염화나트륨의 농도는 0.1 %(w/v) 내지 1.2 %(w/v)일 수 있으며, 0.3 %(w/v) 내지 1.0 %(w/v)일 수 있다. 바람직하게는, 0.5 %(w/v) 내지 0.7 %(w/v)일 수 있다. 또한, 염화칼륨의 농도는 0.01 %(w/v) 내지 0.15 %(w/v)일 수 있으며, 0.03 %(w/v) 내지 0.12 %(w/v)일 수 있다. 바람직하게는, 0.05 %(w/v) 내지 0.09 % (w/v)일 수 있다. 또한, 염화칼슘수화물의 농도는 0.01 %(w/v) 내지 0.12 %(w/v)일 수 있으며, 0.03 %(w/v) 내지 0.09 %(w/v)일 수 있다. 바람직하게는, 0.03 %(w/v) 내지 0.06 % (w/v)일 수 있다. 또한, 염화마그네슘육수화물의 농도는 0.01 %(w/v) 내지 0.12 %(w/v)일 수 있으며, 바람직하게는, 0.01 %(w/v) 내지 0.05 % (w/v)일 수 있다.

[0051] 또한, 상기 약학 조성물은 염산 또는 수산화나트륨을 추가로 포함할 수 있다. 염산 및 수산화나트륨은 조성물 내의 pH를 조절하기 위하여 적정량 첨가될 수 있다. 또한, 조성물의 pH는 6.5 내지 7.5일 수 있으며, 6.8 내지 7.2일 수 있다. 바람직하게 조성물의 pH는 7.0 일 수 있다.

[0052] 또한, 상기 약학 조성물의 제형이 안과용 제형일 경우, 안과용으로 허용되는 비독성 부형제들 또는 담체들과 혼합함으로써 제형화될 수 있다. 예를 들면 아래 언급된 유형의 것들, 특히 담체, 안정제, 용해제, 완충제 기질, 보존제, 긴장제, 증점제 및 기타 부형제가 사용될 수 있다. 또한, 용액은 바람직한 pH로 조절되어 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 담체들은 전형적으로 국소 투여 또는 범용 투여에 적절하고, 예를 들면 물, 물과 수-흔화성 용매들의 혼합물, 예를 들면 C₁-C₇-알칸올류, 식물성 오일류 또는 미네랄 오일류, 예를 들면 0.5 내지 5 중량%의 히드록시에틸셀룰로스, 에틸 올레이트, 카르복시메틸셀룰로스, 폴리비닐-파롤리돈 및 안과 용도의 기타 무독성 수-용해성 중합체, 예를 들면 셀룰로스 유도체, 예를 들면 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스의 알칼리금속 염들, 히드록시메틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 메틸히드록시프로필셀룰로스 및 히드록시프로필셀룰로스, 아크릴레이트류 또는 메타크릴레이트류, 예를 들면 폴리아크릴산의 염류 또는 에틸 아크릴레이트, 폴리아크릴아미드류, 천연 생성물류, 예를 들면 젤라틴, 알기네이트류, 팩틴류, 트라간트, 카라야 검, 크산탄 검, 캐라기닌, 한천, 아카시아, 전분 유도체, 예를 들면 전분 아세테이트 및 히드록시프로필 전분, 및 또한 다른 합성 생성물들, 예를 들면 폴리비닐 알콜, 폴리비닐파롤리돈, 폴리비닐 메틸 에테르, 폴리에틸렌 산화물, 바람직하게는 가교된 폴리아크릴산, 예를 들면 중성 카르보폴, 또는 이들 중합체들의 혼합물들이다. 바람직한 담체들은 물, 셀룰로스 유도체, 예를 들면 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스의 알칼리 금속염류, 히드록시메틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 메틸히드록시프로필셀룰로스 및 히드록시프로필셀룰로스, 중성 카보폴, 또는 이들의 혼합물들이다.

[0054] 상기 안정제들은 예를 들면 텔록사폴, 지방산 글리세롤 폴리-저급 알킬렌 글리콜 에스테르류, 지방산 폴리-저급 알킬렌 글리콜 에스테르류, 폴리에틸렌 글리콜류, 글리세롤에테르류 또는 이들 화합물들의 혼합물들이다. 부가된 양은 전형적으로 활성성분을 용해시키기에 충분하다.

[0055] 상기 완충제들은 보레이트, 탄산 수소/카르보네이트, 글루코네이트, 포스페이트, 프로피오네이트 및 TRIS (트로메타민) 완충제들이다. 트로메타민 및 보레이트 완충제는 바람직한 완충제이다. 부가된 완충제 기질의 양은 예를 들면 생리학상 허용되는 pH 범위를 보장하고 유지하는데 필요한 것이다. pH 범위는 전형적으로 5 내지 9, 바람직하게는 6 내지 8.2, 더욱 바람직하게는 6.8 내지 8.1이다.

[0056] 상기 보존제들은 4차 암모늄염, 예를 들면 세트리미드, 염화 벤잘코늄 또는 염화 벤족소늄, 티오살리실산의 알킬-수은 염류, 예를 들면 티메로살, 폐닐머큐리산 나이트레이트, 폐닐머큐리산 아세테이트 또는 폐닐머큐리산 보레이트, 파라벤류, 예를 들면 폐닐파라벤 또는 프로필파라벤, 알콜류, 예를 들면 클로로부탄올, 벤질 알콜 또는 폐닐 에탄올, 구아니딘 유도체, 예를 들면 클로로헥시딘 또는 폴리헥사메틸렌 비구아이드, 또는 소르브산이다. 바람직한 보존제들은 세트리미드, 염화 벤잘코늄, 염화 벤족소늄 및 파라벤류이다. 충분한 양의 보존제가 세균 및 진균에 의해 유발되는 사용중 2차 오염을 막기위해 적절한 양이 첨가될 수 있다.

[0057] 상기 긴장제는 본원에 열거된 것들 중에서 목적물이 생리학적 강장성(예, 0.9% 염수)을 조절하기 위해 사용되는 것이다. 예를 들면, 염화나트륨, 칼륨 염화물, 염화칼슘, 텍스트로스 및/또는 만니톨이 본 발명의 티모신 베타4를 포함한 조성물에 부가될 수 있다. 긴장제의 양은 부가되어야 하는 특정작용제에 따라 변화한다. 일반적으로, 특정한 본 발명의 조성물들은 바람직하게는 150 mOsm 내지 450 mOsm 및 가장 바람직하게는 250 mOsm 내지 350 mOsm의 안과용으로 허용되는 삼투성을 최종 조성물이 갖게 위해 긴장제가 첨가될 수 있다. 바람

직한 긴장제들은 나트륨 염들, 및 칼륨 염들, 특히 염화나트륨 및 염화칼륨이다. 가장 바람직한 긴장제는 염화나트륨이다.

[0058] 또한, 안과용 제형 내의 적절한 점도를 유지하기 위하여 다음 제형이 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다: (a)단량체성 폴리올류, 예를 들면 틸록사폴, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜; (b)중합체성 폴리올류, 예를 들면 폴리에틸렌 글리콜(예, PEG 300, PEG 400); (c)셀룰로스 유도체 (셀룰로스 부류의 중합체들), 예를 들면 히드록시에틸셀룰로스, 히프로멜로스, 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 메틸셀룰로스; 카르복시메틸셀룰로스 소듐, 히드록실프로필셀룰로스; (d)덱스트란류, 예를 들면 덱스트란 70; (e)수용성 단백질들, 예를 들면 젤라틴; (f)비닐 중합체류, 예를 들면 폴리비닐 알콜; 폴리비닐 피롤리딘; (g)다른 폴리올류, 예를 들면 폴리소르베이트 80; 포비돈; (h)카르보머류, 예를 들면 카르보머 934P, 카르보머 941, 카르보머 940, 및 카르보머 974P, 및 (i)다당류/글리코사미노글리칸류, 예를 들면 히알루로난 (히알루로란산/히알루로네이트), 콘드로이틴 살레이트. 아울러, 1개 이상의 점도 증진제가 담체(비히클)의 점도를 증가시키기 위해 본 발명의 조성물에 부가될 수 있다.

[0059] 부가된 부형제의 양 및 유형은 특정 요건들에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 대략 0.0001 중량% 내지 대략 90 중량% 범위에서 사용될 수 있으며, 통상 안과용 당업자가 사용하는 범위 내에서 사용할 수 있다. 또한, 안과용 제형들의 pH 범위는 3.5 내지 9, 바람직하게는 4.5 내지 8 및 가장 바람직하게는 pH 5.5 내지 7.8을 나타낼 수 있다.

[0060] 본 발명의 다른 측면으로, 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0061] 구체적으로, 상기 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환을 치료하는 방법은 티모신 베타 4 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물을 유효량으로 조직에 접촉시키는 단계를 포함하는 치료방법일 수 있다. 직접 투여의 실례는 예를 들면 본원에 개시된 바의 웨티드 작용제를 포함하는 용액, 로션, 고약, 젤, 크림, 페이스트, 분무제, 혼탁액, 분산액, 하이드로겔, 연고, 오일 또는 발포제에 의한 직접 도포에 의해 조직과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0062] 상기 술잔세포 또는 뮤신 관련 질환은 상술한 바와 같다.

[0063] 또한, 상기 조성물은 시트르산 및 이의 염을 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 시트르산, 아세트산 및 이의 염을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 티모신 베타 4 및 시트르산 또는 이의 염은 병용 투여 또는 순차적으로 투여될 수 있으며, 일일 수회에 나누어 적정량으로 투여될 수 있다. 하지만, 가장 바람직한 형태의 투여 방법은 티모신 베타 4 및 시트르산 또는 이의 염을 동시에 병용투여하는 것이다.

[0064] 상기 조성물 내의 티모신 베타 4는 총 조성물 기준으로 0.01 %(w/v) 내지 1.0 %(w/v)이며, 또는 0.02 %(w/v) 내지 0.5 %(w/v)이며, 일일 총 0.08 mL 내지 2.0 mL의 용량으로 투약되는 것일 수 있다. 일일 1회 또는 수회에 나누어 투여할 수 있으며, 바람직하게는 일일 2회 내지 5회에 걸쳐 투여될 수 있다. 또한, 시트르산 또는 이의 염은 총 조성물 기준으로 0.01 %(w/v) 내지 0.5 %(w/v)가 포함될 수 있으며, 시트르산 또는 이의 염은 총 조성물에서 0.05 %(w/v) 내지 0.25 %(w/v)가 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.1 %(w/v) 내지 0.3 %(w/v)가 포함될 수 있다. 또한, 일일 총 0.1 mL 내지 4.0 mL의 용량으로 투약되는 것일 수 있다. 일일 1회 또는 수회에 나누어 투여할 수 있으며, 바람직하게는 일일 2회 내지 5회에 걸쳐 투여될 수 있다

[0065] 또한, 아세트산 또는 이의 염은 티모신 베타 4 및 시트르산 또는 이의 염과 병용 투여되거나 순차적으로 투여될 수 있으나, 바람직하게는 상기 아세트산 또는 이의 염은 티모신 베타 4 및 시트르산 또는 이의 염과 동시에 투여될 수 있다. 이때, 상기 아세트산 또는 이의 염은 총 조성물 기준으로 0.01 %(w/v) 내지 1.5 %(w/v)가 포함될 수 있으며, 아세트산 또는 이의 염은 총 조성물에서 0.1 %(w/v) 내지 0.8 %(w/v)가 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.2 % 내지 0.5 %가 포함될 수 있다. 또한, 일일 총 0.15 mL 내지 6.0 mL의 용량으로 투약되는 것일 수 있다. 일일 1회 또는 수회에 나누어 투여할 수 있으며, 바람직하게는 일일 2회 내지 5회에 걸쳐 투여될 수 있다

[0066] 상기 조성물의 투여 경로의 예는 비경구 투여, 이를 테면, 정맥내, 피내, 피하, 경구, 비강내(이를 테면, 흡입), 경피(이를 테면, 국소), 점액막을 통해 그리고 직장을 통한 투여를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0067] 본 발명의 또 다른 측면은, 술잔세포 증식, 뮤신 분비를 촉진시키기 위한 본 발명의 조성물의 용도를 제공한다.

[0068] 본 발명의 또 다른 측면은, 술잔세포나 뮤신 분비 촉진용 약제를 제조하기 위한 본 발명의 조성물의 용도를 제공한다.

[0069] 본 발명의 또 다른 측면은, 술잔세포나 뮤신 관련 질환을 예방 또는 치료시키기 위한 상기 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0070] 본 발명의 또 다른 측면은, 술잔세포나 뮤신 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 상기 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0071] 발명의 실시를 위한 형태

[0072] 이하, 본 발명의 이해를 돋기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0073] 실시예 1. 티모신 베타 4를 포함한 조성물(GBT-201)의 제조

[0074] 멸균조제용수에 하기 표 1과 같은 함량이 되도록, 각각 정량된 시약을 넣고 각 시약이 다 녹을 때까지 혼합한 뒤, 혼합된 용액에 티모신 베타 4(Bachem, US, 서열번호 1)를 1 mg/ml 농도가 되도록 넣고 다 녹을 때까지 혼합하였다. 위 혼합 공정을 마친 용액을 수산화나트륨 및 염산을 이용하여 산도를 7.0으로 조정하였다. 그 후, 위 조정 공정을 거친 용액을 0.2 μm 필터에 여과시킨 후, 위 여과 공정을 거친 혼합액을 저밀도 폴리에틸렌 용기에 충전한 후 밀봉하였다.

표 1

시약	첨가량 (mg/ml)	%(w/v)	기능
Thymosin beta 4	1	0.1	약효성분
Sodium Chloride	6.4	0.64	등장화제
Calcium Chloride Dihydrate	0.3	0.03	전해질
Citric Acid	1.0	0.10	완충제
Hydrochloride Acid	pH 7.0을 맞추기 위해 필요시 첨가		pH 조절제
Sodium Hydroxide	pH 7.0을 맞추기 위해 필요시 첨가		pH 조절제
Sterile Water for Injection	100 %(w/v)를 만들기에 충분한 양		용제

[0076] 실험예 1. 안구건조증 유발 마우스 제조 및 약물 점안

[0077] 12주령 이상의 NOD.B10-H2^b 마우스를 10일 동안 습도 40% 이하의 챔버(chamber)에서 사육시켰다. 사육하는 동안 매일 4회(9시, 12시, 15시, 18시) 0.5 mg/0.2 ml 농도의 브롬화수소산 스코폴라민(scopolamine hydrobromide, Sigma-Aldrich, SLBR8568V)를 대퇴부에 피하주사하였다. 10일 경과 후, 눈물 분비량 및 각막 평활도 점수(corneal smoothness score)를 측정하여, 0.06 μl 이하의 눈물 분비량 및 각막 평활도 점수가 2점 이하인 마우스만을 선별하였다. 선별한 마우스를 하기 표 2와 같이 그룹을 나누었다.

표 2

군	정상군	DS D10 대조군	vehicle	GBT-201, 2회	GBT-201, 4회	디쿠아스(Diquas, 6회)	자이드라(Xidra, 2회)
n수	4	4	4	5	5	4	4

[0079] 상기 표 2와 같이 그룹을 나눈 후, 10일간 각 그룹의 마우스에 해당하는 시험약물을 점안하였다. 상기 vehicle은 하루 4회, 디쿠아스(Santen, JP)는 하루 6회, 자이드라(Shire, US)는 하루 2회, GBT-201은 하루 2회 또는 4회 점안하여 점안하였다. 10일 경과 후 각 그룹의 마우스를 희생시켜 안구를 적출하여 조직면역 염색과 분자생물학적 분석을 진행하였다(도 1).

[0080] 실험예 2. 티모신 베타 4의 술잔세포 증식 촉진효과 확인

[0081] 결막에서 뮤신을 분비하는 세포인 술잔세포의 증식을 촉진시키는지 확인하기 위해, 실험예 1에서 희생시킨 마우스의 안구를 적출하여 PAS(Periodic-Acid-Schiff) 염색을 통해 확인하였다. 각 그룹의 절편은 각막의 0.1 mm^2 영역 또는 결막의 하결막원개(inferior fornices of the conjunctiva) 부분을 평가하였다.

[0082] 구체적으로, 실험예 1에서 희생시킨 마우스의 안구를 적출하여 그 조직을 3일 동안 포르말린에 고정된 눈과 눈

부속기(adnexa)를 마이크로톰(microtome)을 사용하여 $6\text{ }\mu\text{m}$ 단면으로 절단하였다. $6\text{ }\mu\text{m}$ 두께로 자른 눈과 눈부속기의 절편을 PAS kit(Merck Chemicals International, USA)를 사용하여 염색하였다. 필요한 경우 절편을 탈파라핀화(deparaffinization)하고 증류수로 수화(hydration)시켰다. 수화시킨 절편을 증류수로 세척한 후, 과요오드산을 처리하였다. 그 후, 알데히드를 처리하여 산화시키고, 시프(Schiff) 시약으로 10분 동안 반응시켜 적 보라색으로 염색하였다. 절편을 헤마톡실린으로 대조 염색 후, 탈수과정 및 투명과정을 거쳐 봉입제로 봉입하였다. 봉입한 슬라이드는 가상 현미경(NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japan)을 이용하여 촬영 및 조직 분석을 수행하였다.

[0083] 그 결과, 정상군과 DS D10 대조군을 비교하였을 때, 정상군보다 DS D10 대조군에서 술잔세포의 수가 감소된 것을 육안으로 확인하였다. 반면, GBT-201, 디쿠아스 또는 자이드라를 점안한 그룹의 경우, DS D10 대조군보다 술잔세포의 수가 증가한 것을 육안으로 확인하였다(도 2).

[0084] 구체적으로, 염색된 영역을 정량화 하였을 때, DS D10 대조군의 술잔세포 수는 경우 정상군의 술잔세포 수보다 약 65.9%가 감소되었다(16.476 ± 1.722 vs 5.619 ± 0.918 cells/ 0.1 mm^2). 반면, GBT-201 그룹의 술잔세포 수는 DS D10 대조군의 술잔세포 수보다 약 2 내지 2.4배 증가하였다(11.143 ± 0.495 , 13.619 ± 0.918 vs 5.619 ± 0.918 cells/ 0.1 mm^2). 또한, 디쿠아스 또는 자이드라를 점안한 그룹의 술잔세포 수는 DS D10 대조군의 술잔세포 수보다 약 1.1배 정도 증가하였다(11.238 ± 0.436 , 6.095 ± 1.082 vs 5.905 ± 1.190 cells/ 0.1 mm^2). 특히, GBT-201을 4회 점안한 그룹의 술잔세포 수는 정상군의 술잔세포 수준으로 회복되었다(도 3).

실험 예 3. 티모신 베타 4 점안에 따른 뮤신 분비량 증가 확인

[0085] 결막에서 뮤신의 분비량이 증가하는지 확인하기 위해, 실험 예 1에서 희생시킨 마우스의 안구를 적출하여 알시안 블루(Alcian blue) 염색을 통해 확인하였다.

[0086] 구체적으로, 실험 예 1에서 희생시킨 마우스의 안구를 적출하여 그 조직을 3일 동안 포르말린에 고정된 눈과 눈부속기를 마이크로톰을 사용하여 $6\text{ }\mu\text{m}$ 단면으로 절단하였다. $6\text{ }\mu\text{m}$ 두께로 자른 눈과 눈부속기의 절편을 Alcian Blue pH 2.5 Stain Kit(Abcam Inc, Cambridge, MA)를 사용하여 염색하였다. 필요한 경우 절편을 탈파라핀화하고 증류수로 수화시켰다. 수화시킨 절편을 증류수로 세척한 후, 3분 동안 아세트산 용액에 반응시켜 산화시킨 후, 증류수로 세척하였다. 산화시킨 절편을 알시안 블루 용액에서 15분간 반응시켜 파란색으로 뮤신을 염색하였다.

[0087] 그 후, 대조염색을 위해 2회 증류수로 알시안 블루로 염색된 절편을 세척한 후, Safranin O 용액을 이용해 대조 염색을 하였다. 그 후, 절편을 탈수과정 및 투명과정을 거쳐 봉입제로 봉입하였다. 봉입한 슬라이드는 가상 현미경(NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japan)을 이용하여 촬영 및 조직 분석을 수행하였다.

[0088] 그 결과, 정상군과 DS D10 대조군을 비교하였을 때, 정상군보다 DS D10 대조군에서 뮤신 분비량이 감소된 것을 육안으로 확인하였다. 반면, GBT-201, 디쿠아스 또는 자이드라를 점안한 그룹의 경우, DS D10 대조군보다 뮤신 분비량이 증가한 것을 육안으로 확인하였다(도 4).

[0089] 구체적으로, 염색된 영역을 정량화 하였을 때, DS D10 대조군의 뮤신 분비량은 경우 정상군의 뮤신 분비량보다 약 65.6%가 감소되었다(14.952 ± 2.463 vs 5.143 ± 0.857 cells/ 0.1 mm^2). 반면, GBT-201 그룹의 뮤신 분비량은 DS D10 대조군의 뮤신 분비량보다 약 2.6배 증가하였다(12.095 ± 1.438 , 13.143 ± 1.030 vs 5.143 ± 0.857 cells/ 0.1 mm^2). 또한, 디쿠아스 또는 자이드라를 점안한 그룹의 뮤신 분비량은 DS D10 대조군의 뮤신 분비량보다 각각 1.3배, 1.5배 정도 증가하였다(6.571 ± 0.857 , 7.714 ± 1.714 vs 5.143 ± 0.857 cells/ 0.1 mm^2). 특히, GBT-201을 점안한 두 그룹의 뮤신 분비량은 정상군의 뮤신 분비량 수준으로 회복되었다(도 5).

실험 예 4. 티모신 베타 4 점안에 따른 Muc5AC, Muc1, Muc4 및 Muc16의 발현량 증가 확인

[0090] 결막에서 Muc5AC, Muc1, Muc4 및 Muc16의 발현량이 증가하는지 확인하기 위해, 실험 예 1에서 희생시킨 마우스의 안구를 적출하여 면역형광법(Immunofluorescence)으로 염색하였다.

[0091] 구체적으로, 실험 예 1에서 희생시킨 마우스의 안구를 적출하여 그 조직을 3일 동안 포르말린에 고정된 눈의 각막과 결막을 마이크로톰을 사용하여 $6\text{ }\mu\text{m}$ 단면으로 절단하였다. $6\text{ }\mu\text{m}$ 두께로 자른 눈의 각막 또는 결막의 절편을 PBS로 재수화한 후, 0.3% Triton X-100 용액에 20분 동안 담가 두었다. 그 후, PBS로 3회 세척한 후, 비특이적인 염색을 방지하게 위해, 3% BSA bovine serum albumin) 용액에 1시간 동안 담가 두었다. 그 후, 항-Muc1

항체(1:250, Abcam Inc, Cambridge, MA), 항-Muc4 항체(1:250, Bioss Inc, Woburn, MA), 항-Muc5AC 항체(1:250, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA) 및 항-Muc16 항체(1:250, Abbiotec Inc, San Diego, CA)를 처리하고 4°C 온도에서 하룻동안 반응시켰다.

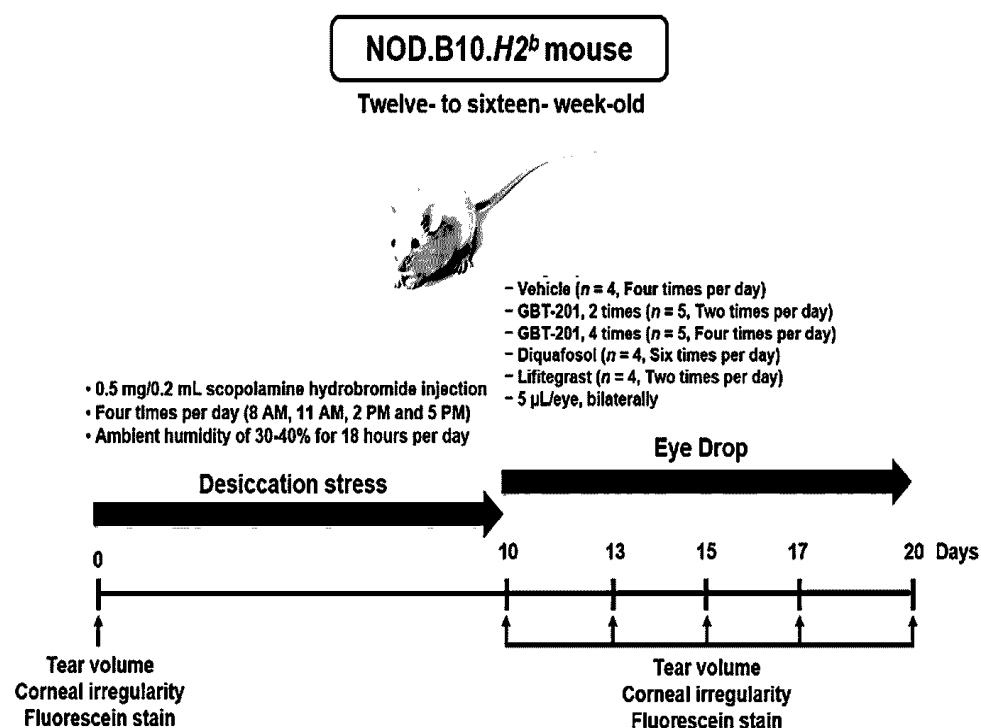
[0094] 다음날, 절편을 PBS로 3회 세척한 후, Alexa FluorTM 488 donkey anti-mouse IgG antibody(1:500; Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA) 또는 Alexa FluorTM 555 donkey anti-rabbit IgG antibody(1:500; Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA)를 처리하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 절편을 PBS로 3회 세척한 후, DAPI가 포함되어 있는 봉입제로 봉입하였다. 봉입한 슬라이드는 형광 현미경(Leica DM2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)을 이용하여 촬영하였다.

[0095] 그 결과, 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, Muc1, Muc4 및 Muc16가 각막과 결막 상피의 표면층에서 적색으로 염색되었다. 정상군과 DS D10 대조군을 비교하였을 때, 정상군보다 DS D10 대조군에서 Muc1, Muc4 및 Muc16의 발현량이 감소된 것을 육안으로 확인하였다. 반면, GBT-201를 점안한 그룹의 경우, DS D10 대조군보다 Muc1, Muc4 및 Muc16의 발현량이 현저하게 증가한 것을 육안으로 확인하였다.

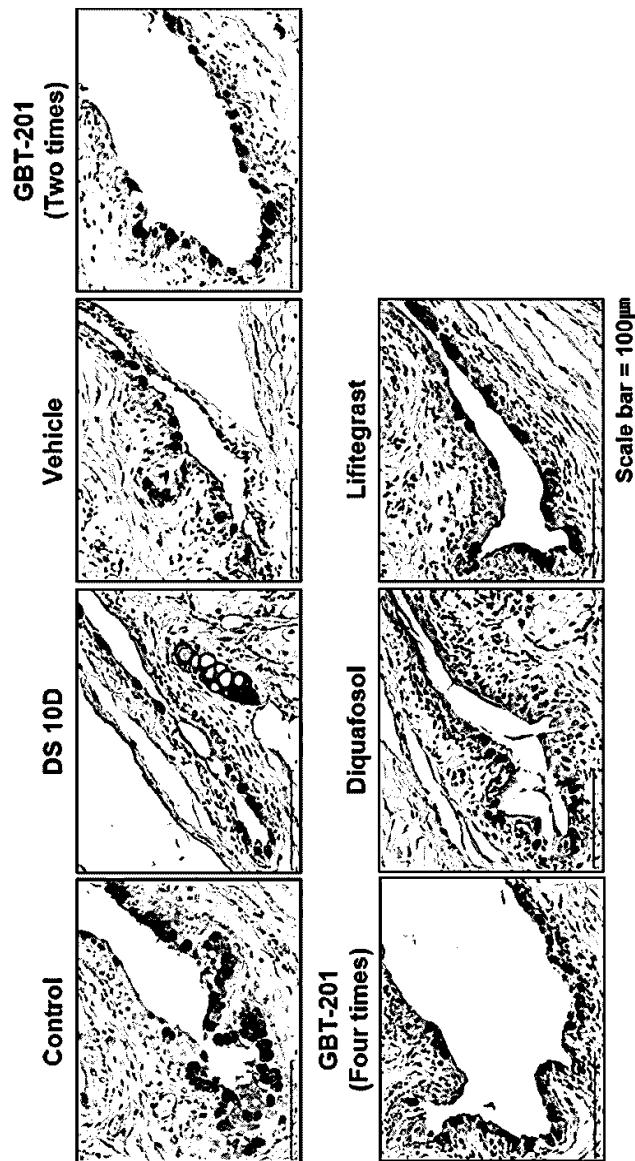
[0096] 또한, 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, Muc5AC는 각막과 결막에서 녹색으로 염색되었다. 정상군과 DS D10 대조군을 비교하였을 때, 정상군보다 DS D10 대조군에서 Muc5AC의 발현량이 감소된 것을 육안으로 확인하였다. 반면, GBT-201 또는 디쿠아스를 점안한 그룹의 경우, DS D10 대조군보다 Muc5AC의 발현량이 증가한 것을 육안으로 확인하였다. 특히, GBT-201를 점안한 그룹에서 GBT-201의 발현량이 현저하게 증가하였다.

도면

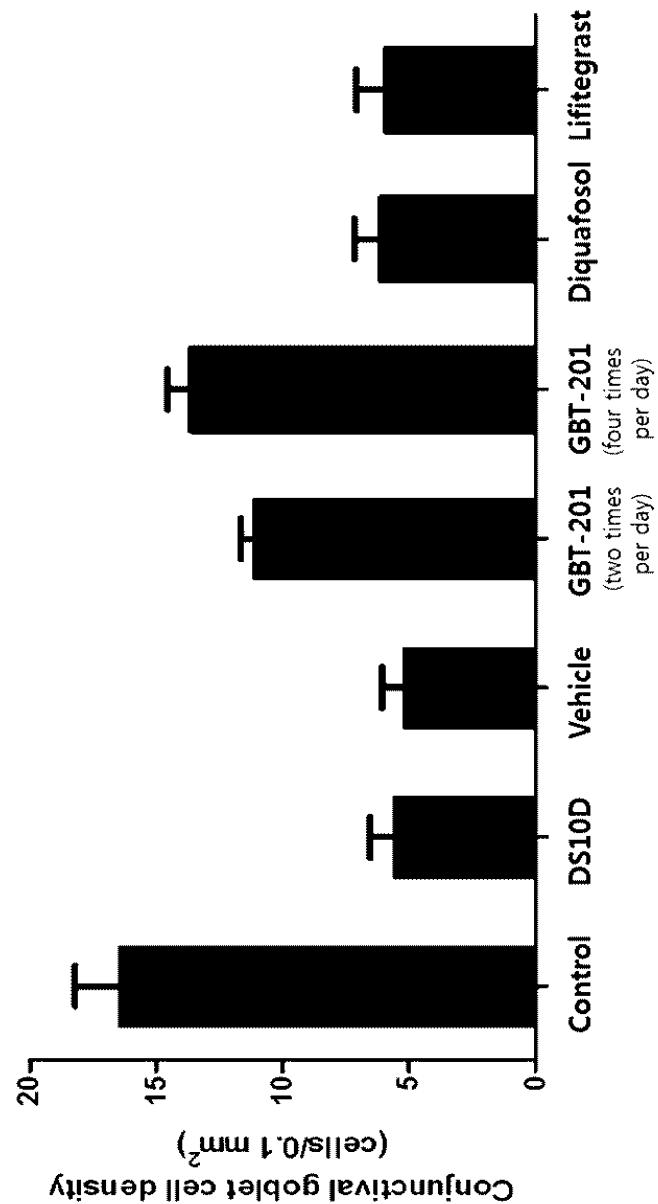
도면1



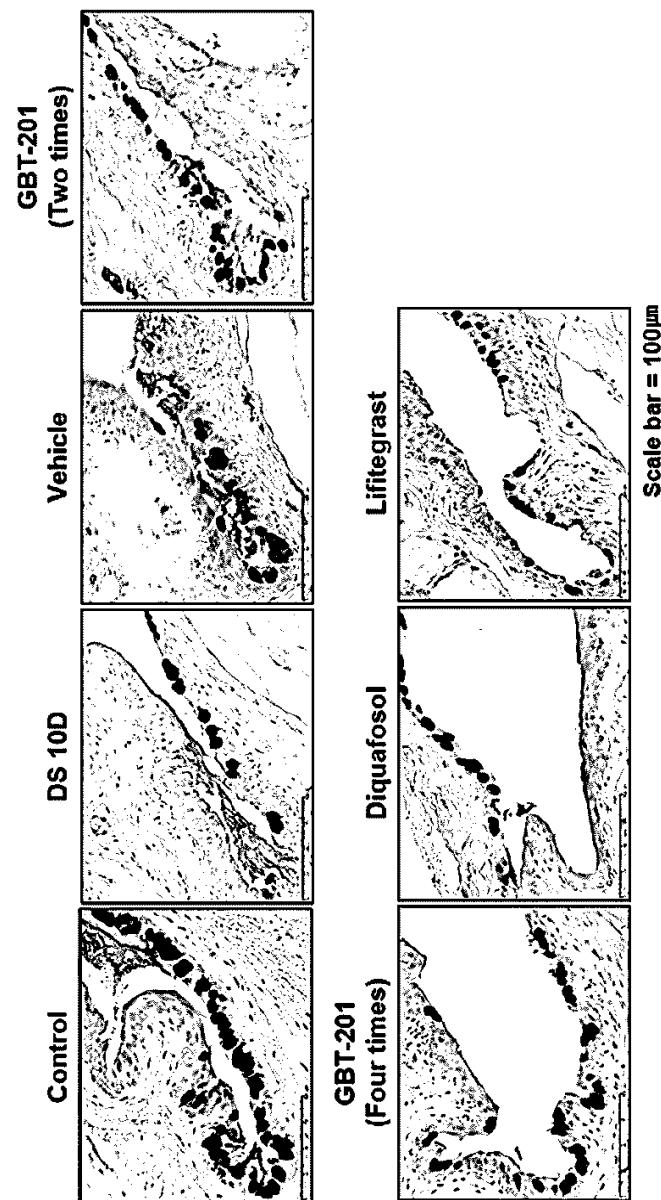
도면2



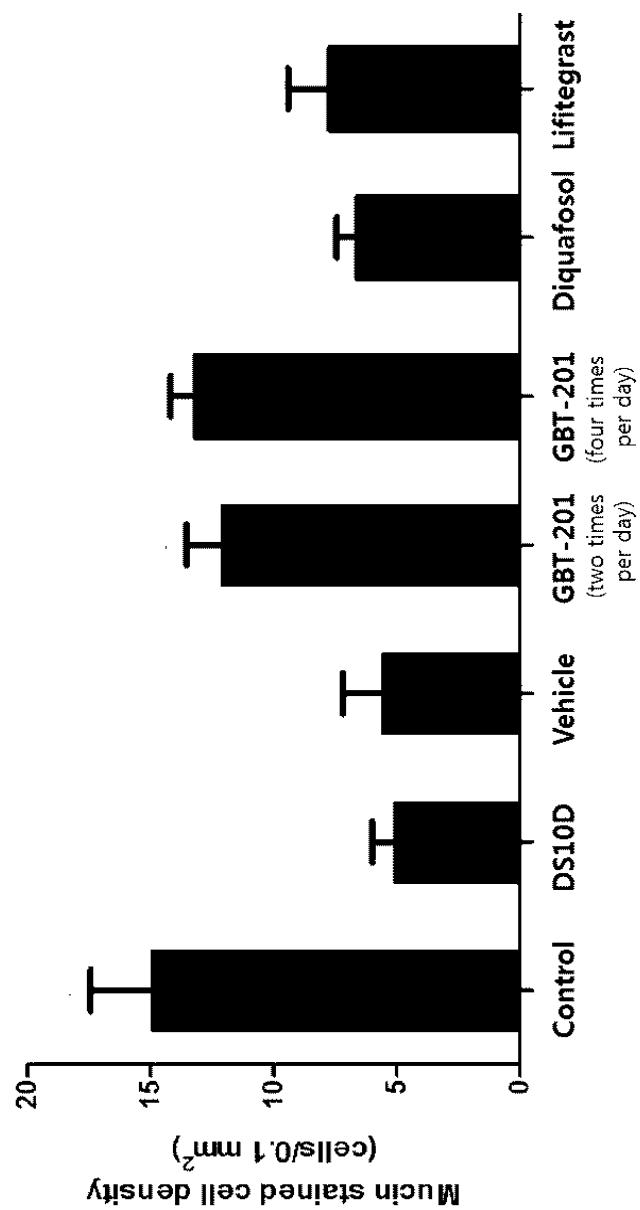
도면3



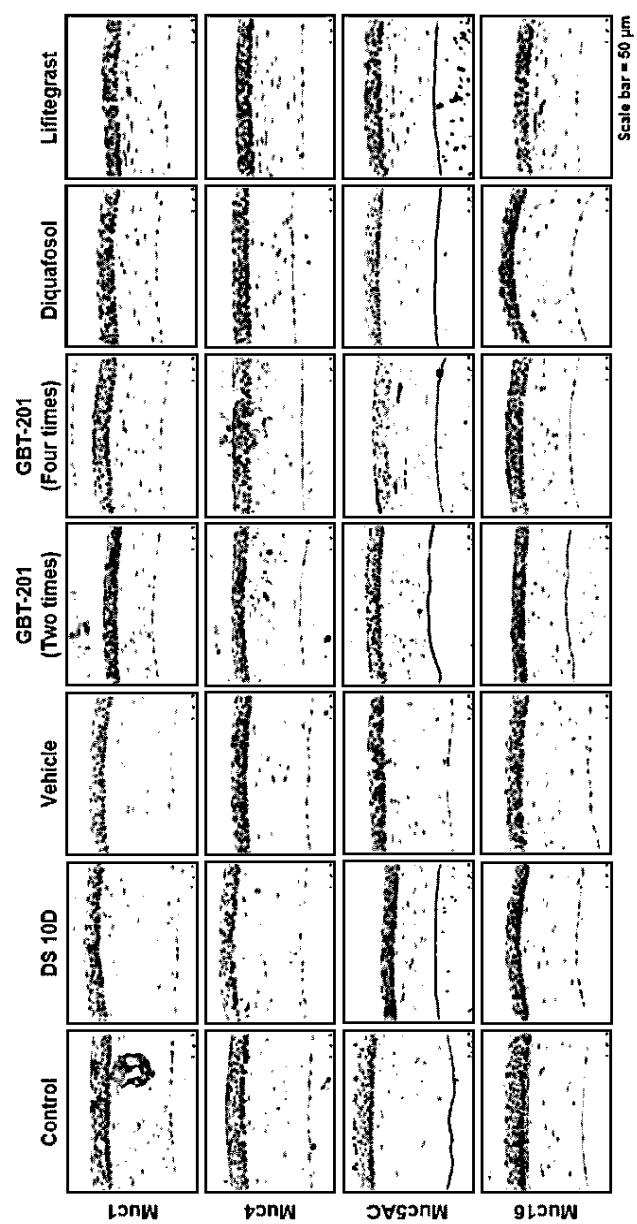
도면4



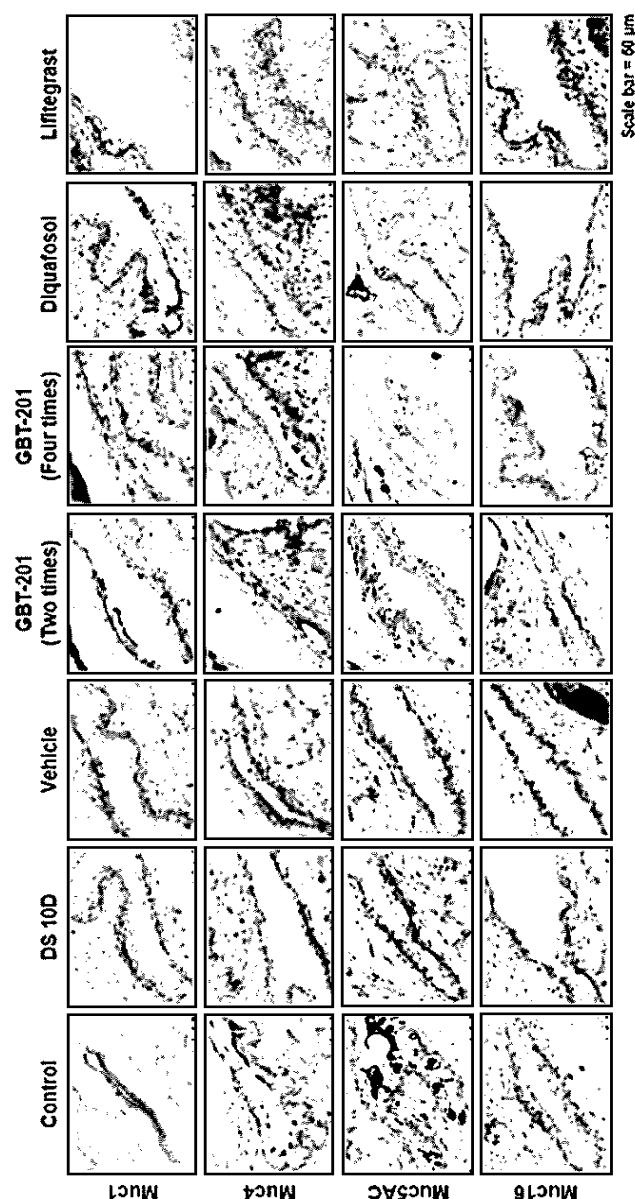
도면5



도면6



도면7



서 열 목록

<110> G-treeBNT Co., Ltd.

<120> A composition for promoting goblet cell proliferation or secretion of mucin comprising thymosin beta 4 or derivative thereof

<130> PCB711068GTR

<150> US 62/590,444

<151> 2017-11-24

<160> 1

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> thymosine beta 4

<400> 1

Ser Asp Lys Pro Asp Met Ala Glu Ile Glu Lys Phe Asp Lys Ser Lys

1

5

10

15

Leu Lys Lys Thr Glu Thr Gln Glu Lys Asn Pro Leu Pro Ser Lys Glu

20

25

30

Thr Ile Glu Gln Glu Lys Gln Ala Gly Glu Ser

35

40