

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0051091

(43) 공개일자 2023년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/397 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A61P 11/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/397 (2013.01)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2022-0128079

(22) 출원일자 2022년10월06일

심사청구일자 2022년10월06일

(30) 우선권주장

1020210134447 2021년10월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김송이

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 의과대학 내과학교실(신촌동)

이찬호

서울특별시 마포구 마포대로 195, 204동 304호(아현동, 마포 래미안 푸르지오)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리앤목특허법인

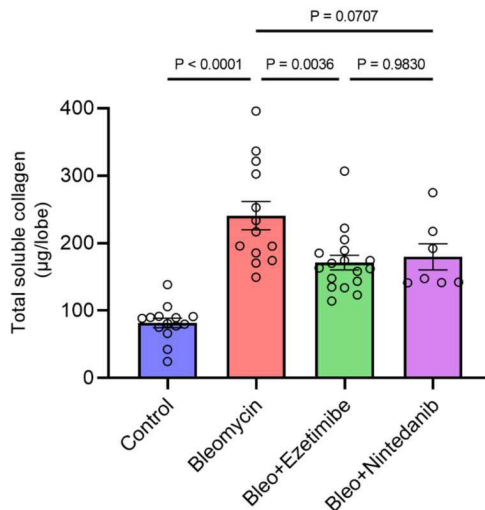
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 에제티미브를 유효성분으로 포함하는 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료용 약학적 조성물

## (57) 요약

에제티미브 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료용 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물, 이를 이용한 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료 방법, 및 이의 용도를 제공한다. 일 양상에 따른 조성물은 에제티미브를 포함함으로써 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료 효과를 가질 수 있다.

대표도 - 도14



(52) CPC특허분류

**A61P 11/00** (2018.01)

**A61P 43/00** (2018.01)

**A23V 2002/00** (2013.01)

**A23V 2200/314** (2013.01)

**A23V 2250/30** (2013.01)

(72) 발명자

**배수한**

경기도 고양시 일산서구 산현로17번길 38, 1106동 604호(탄현동, 탄현마을11단지아파트)

**김영삼**

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 의과대학 내과 학교실(신촌동)

**이진구**

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 의과대학 흉부 외과학교실(신촌동)

**한지수**

경기도 안양시 동안구 관악대로106번길 72, 112동 1104호(비산동, 비산롯데캐슬)

**임범진**

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 의과대학 병리 학교실(신촌동)

**곽세현**

경기도 용인시 기흥구 기흥역로58번길 78, 201동 1901호(구갈동, 기흥역 더샵)

**신주혜**

서울특별시 구로구 디지털로31길 85, 107동 1605호(구로동, 구로두산위브)

**이유설**

서울특별시 관악구 난곡로78길 9(신림동)

**박정수**

서울특별시 금천구 범안로 1136, 106동 1202호(독산동, 중앙하이츠아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465034437

과제번호 HI21C1474000021

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 공익적의료기술연구사업

연구과제명 특발성 폐섬유증에서 항산화 기전 및 자가포식과 연관된 새로운 발병기전 규명 및

이에 기반하여 항산화 약제인 ezetimibe의 치료제로서의 효능 검증

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2021.07.01 ~ 2021.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

에제티미브(Ezetimibe) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 에제티미브는 폐 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화를 억제하거나 콜라겐 발현을 감소시키는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 에제티미브의 일일 투여량은 0.001 내지 20 mg의 용량으로 포함되는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 폐섬유증은 특발성 폐섬유증 및 특발성 비특이 간질성 폐렴에 의한 폐섬유증을 포함하는 특발성 간질성 폐렴에 의한 폐섬유증; 류마티스성 관절염, 루푸스, 전신경화증, 근염 및 쇼그렌 증후군을 포함하는 결체조직질환 또는 자가면역질환에 의한 폐섬유증; 감염 질환 및 위식도 역류성 질환을 포함하는 질병으로 인한 폐섬유증; 가족성 폐섬유증; 석면, 실리카, 베릴륨, 먼지 및 흡연을 포함하는 유해물질에 의한 폐섬유증; 방사선 치료 또는 방사선 노출로 인한 폐섬유증; 항암제, 항생제 및 항부정맥제를 포함하는 약물에 의한 폐섬유증; 급성 호흡부전 증후군의 후유증으로 인한 폐섬유증으로 이루어진 군에서 선택된 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 폐섬유증은 블레오마이신(Bleomycin)의 투여로부터 발생하는 것 또는 COVID-19 감염 후 후유증으로 인한 폐섬유증인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 6

에제티미브(Ezetimibe) 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

에제티미브 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003]

폐섬유증(pulmonary fibrosis)은 폐 조직이 손상되고 상처를 입어 두껍고 딱딱하게 변성되어 폐가 정상적으로 작동하지 않는 질환이다. 폐섬유증이 악화됨에 따라 점차 호흡이 짧아진다. 폐섬유증을 유발하는 원인을 정확히 찾아 낼 수 없는 경우가 많은데, 이러한 섬유증을 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)이라고 한다. 폐섬유증에는 특발성 폐섬유증; 류마티스성 관절염 같은 자가 면역 질환, 바이러스 감염, 위식도 역류성 질환(gastroesophageal reflux disease, GERD) 등의 질병으로 인한 폐섬유증; 가족성 폐섬유증(familial PF); 석면, 실리카, 먼지, 방사선 치료, 흡연과 같은 유해물질에 의한 폐섬유증 등 다양한 종류가 있다. 폐섬유

증의 치료 전략은 환자의 상태, 증상에 따라 다양하고 개별적이거나, 아직까지 폐섬유증을 완치할 수 있는 치료제는 찾지 못하고 있다.

[0004] 에제티미브(Ezetimibe)는 콜레스테롤의 흡수를 억제하는 지질저하제이며, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증의 치료제로 사용되고 있다. 에제티미브 단일제 제품으로는 이지트롤<sup>®</sup>이 있고, 에제티미브와 다른 고지혈증 치료제의 복합제 제품으로는 바이토린<sup>®</sup>(에제티미브+심바스타틴), 로수젯<sup>®</sup>(에제티미브+로수바스타틴), 아토젯<sup>®</sup>(에제티미브+아토르바스타틴)이 있다(특허문헌 1).

[0005] 그러나, 에제티미브의 폐섬유증 치료 용도 등 다른 의약 용도에 대한 연구는 부족한 실정이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) US 2014-0287042 A1

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 에제티미브 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 에제티미브 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유증의 예방, 개선 또는 완화용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0010] 유효량의 에제티미브 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료 방법을 제공한다.

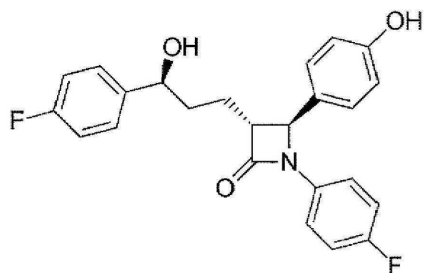
[0011] 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한 에제티미브 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

[0012] 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료를 위한 에제티미브 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0014] 일 양상은 에제티미브(Ezetimibe) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 “에제티미브(Ezetimibe)”는 하기 화학식 1로 표시되는 구조식을 갖는다:



[0016]

[0017] 상기 에제티미브는 2002년 미국식품의약국(FDA)의 승인을 받았으며, 이의 물질특허는 2016년 만료되었다.

[0018] 상기 에제티미브는 폐 섬유모세포에서 TGF- $\beta$ , 구체적으로 TGF- $\beta$ 1에 의해 유도된 폐섬유증 관련 인자를 감소시

킬 수 있다.

- [0019] 상기 에제티미브는 폐 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화를 억제하거나 콜라겐 발현을 감소시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 에제티미브는 폐 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화를 억제하거나 폐 섬유모세포에서 콜라겐 단백질 및/또는 mRNA의 발현을 감소시킬 수 있다. 상기 콜라겐은 COL1A1 (collagen, type I, alpha 1)일 수 있다.
- [0020] 상기 에제티미브는 약학적으로 허용가능한 임의의 형태일 수 있다.
- [0021] 상기 "약학적으로 허용가능한"이란 치료 효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용을 일으키지 않는 것을 의미하며, 질환의 종류, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여 횟수, 치료 기간 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0022] 상기 에제티미브는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 형태일 수 있다. 상기 염은 약학 분야에서 사용되는 산 부가염, 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 술판산, 인산 또는 질산과 같은 무기산으로부터 유도된 염; 및 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 시트르산, 말레산, 말론산, 메탄술폰산, 타르타르산, 말산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔술폰산, 옥살산, 트리플루오로아세트산 또는 글루쿠론산과 같은 유기산으로부터 유도된 염을 포함한다. 또한, 상기 염은, 암모늄, 디메틸아민, 모노메틸아민, 모노에틸아민, 디에틸아민과 같은 염기 부가 염일 수 있다. 또한, 상기 염은 통상의 금속 염 형태, 예를 들면 리튬, 소듐, 칼륨, 마그네슘, 또는 칼슘과 같은 금속으로부터 유도된 염을 포함한다. 상기 산 부가염, 염기 부가염 또는 금속염은 통상의 방법에 따라 제조될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 제조하는 일반 방법론은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [P. Stahl, et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011)]; [S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977]을 참조할 수 있다.
- [0023] 상기 조성물에 상기 에제티미브는 유효성분으로 포함된다. 용어 "유효성분으로 포함"은 상기에서 언급한 효과를 나타낼 수 있을 정도로 에제티미브가 첨가되는 것을 의미하고, 약물전달 및 안정화 등을 위하여 다양한 성분을 부성분으로 첨가하여 다양한 형태로 제형화(formulation)되는 것을 포함하는 의미이다.
- [0024] 따라서, 상기 에제티미브는 약학적 유효량으로 상기 조성물에 포함될 수 있다.
- [0025] 용어 "유효량" 또는 "약학적 유효량"은 환자에게 단일 또는 다회 용량으로 투여되었을 때, 진단 또는 치료 하에 환자에서 원하는 효과를 제공하는, 상기 에제티미브의 양 또는 용량을 지칭한다. 유효량은 공지 기술을 사용함으로써 또는 유사 환경 하에서 수득한 결과를 관찰함으로써 관련 기술분야의 통상의 기술자로서 주치의의 진단의에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 환자에 대한 유효량을 결정할 때, 포유동물종; 그의 크기, 연령 및 일반적인 건강 상태; 연루된 구체적인 질환 또는 장애; 질환 또는 장애의 연루 정도 또는 중증도; 개별 환자의 반응; 투여되는 특정 화합물; 투여 모드; 투여되는 제제의 생체이용성 특징; 선택된 투약 요법; 동시 약물처리 사용; 및 다른 관련된 환경을 포함하나, 이에 제한되지 않는 다수의 인자가 주치의의 진단의에 의해 고려된다.
- [0026] 일 구체예에서, 상기 에제티미브는 일일 투여량 0.001 내지 20 mg, 0.001 내지 15 mg, 0.001 내지 10 mg, 0.01 내지 20 mg, 0.01 내지 15 mg, 0.01 내지 10 mg, 0.1 내지 20 mg, 0.1 내지 15 mg, 또는 0.1 내지 10 mg의 용량으로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 에제티미브의 용량은 개체에 따라 적절히 조절할 수 있다.
- [0027] 상기 "폐섬유증(pulmonary fibrosis, PF)"은 폐의 간질(Interstitium)에 에 콜라겐을 포함한 세포외 기질(Extracellular matrix)가 다량 축적되는 현상 및 이러한 현상이 나타나는 모든 질환을 총칭한다. 상기 폐섬유증은 그 원인에 제한이 없다. 따라서, 상기 폐섬유증은 원인을 정확히 알 수 없는 특발성 간질성 폐렴(Idiopathic interstitial pneumonia)에 의한 폐섬유증(예: 특발성 폐섬유증, 특발성 비특이 간질성 폐렴에 의한 폐섬유증 등); 류마티스성 관절염, 루푸스, 전신경화증, 근염, 쇼그렌 증후군과 같은 결체조직질환 또는 자가면역질환에 의한 폐섬유증; 감염 질환(예: 코로나바이러스감염증, 폐포자충 폐렴 등), 위식도 역류성 질환(Gastroesophageal reflux disease, GERD) 등의 질병으로 인한 폐섬유증; 가족성 폐섬유증(familial PF); 석면, 실리카, 베릴륨, 먼지, 흡연과 같은 유해물질에 의한 폐섬유증; 방사선 치료나 방사선 노출로 인한 폐섬유증; 항암제(예: Bleomycin), 항생제, 항부정맥제 등 약물에 의한 폐섬유증; 급성 호흡부전 증후군(Acute respiratory distress syndrome, ARDS)의 후유증으로 인한 폐섬유증 등을 모두 포함할 수 있다.

- [0028] 일 구체예에서, 상기 폐섬유증은 특발성 폐섬유증일 수 있다.
- [0029] 일 구체예에서, 상기 폐섬유증은 폐섬유증은 블레오마이신(Bleomycin)의 투여로부터 발생하는 것 또는 COVID-19 감염 후 후유증으로 인한 폐섬유증일 수 있다. 예를 들어, 블레오마이신은 두경부, 폐, 피부 등의 편평상피암 등에 사용하는 항암제인데, 폐섬유증 등의 부작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 따라서, 상기 폐섬유증은 블레오마이신과 같은 다른 약물의 사용에 의해 발생한 폐섬유증을 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 "코로나바이러스감염증(coronavirus disease)"은 코로나바이러스에 의해 감염되는 감염성 질환이다. 상기 코로나바이러스감염증은 코로나바이러스감염증-19일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "코로나바이러스감염증-19(COVID-19)"는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2)에 의해 감염되는 감염성 질환이다. 따라서, 상기 폐섬유증은 COVID-19에 의한 폐섬유증일 수 있다.
- [0031] 일 구체예에서, 상기 폐섬유증은 특발성 폐섬유증일 수 있다.
- [0032] 일 구체예에서, 상기 폐섬유증은 폐섬유증은 블레오마이신(Bleomycin)의 투여로부터 발생하는 것 또는 COVID-19 감염 후 후유증으로 인한 폐섬유증일 수 있다. 예를 들어, 블레오마이신은 두경부, 폐, 피부 등의 편평상피암 등에 사용하는 항암제인데, 폐섬유증 등의 부작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 따라서, 상기 폐섬유증은 블레오마이신과 같은 다른 약물의 사용에 의해 발생한 폐섬유증을 포함할 수 있다.
- [0033] 용어 "예방"은 상기 조성물의 투여로 폐섬유증의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0034] 용어 "개선"은 상기 조성물의 투여로 폐섬유증의 증세가 개선되는 모든 과정을 의미한다.
- [0035] 용어 "완화"는 상기 조성물의 투여로 폐섬유증의 증상이 완화되거나, 폐섬유증의 진행이 지연되거나, 또는 폐섬유증 자체의 원인(들)의 완화 또는 소멸을 포함하는 것을 의미한다. 또한 본 명세서 내에서 완화는 폐섬유증의 진행을 완화하는 것을 포함할 수 있다.
- [0036] 용어 "치료"는 상기 조성물의 투여로 폐섬유증의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0037] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제 및 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0038] 상기 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 그 외에도 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐 및 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0039] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 약학적 조성물은 폐섬유증을 치료하기 위한 하나 이상의 다른 제제를 더 포함할 수 있다. 상기 다른 제제는 폐섬유증 치료제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 폐섬유증 치료제는 공지의 물질을 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 폐섬유증 치료제는 피르페니돈(pirfenidone), 닌테다닙(nintedanib) 등일 수 있다.
- [0042] 다른 양상은 에제티미브(Ezetimibe) 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유증의 예방, 개선 또는 완화를 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0043] 상기 건강기능식품 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있다.
- [0044] 상기 건강기능식품 조성물은 에제티미브 단독을 사용하거나, 또는 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합 양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료



적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 건강기능식품의 종류 중 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드; 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 식품 조성물은 또한 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제, 또는 그 조합을 함유할 수 있다. 상기 식품 조성물은 또한, 천연 과일주스, 과일주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육, 또는 그 조합을 함유할 수 있다.

- [0046] 또 다른 양상은 유효량의 에제티미브(Ezetimibe) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0047] 용어 "개체"란 질환의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로 인간 또는 비-인간인 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다. 상기 "이를 필요로 하는 개체"란 폐섬유증의 예방, 개선 또는 치료를 필요로 하는 개체를 의미한다.
- [0048] 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미한다. 투여 경로는 환자의 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로일 수 있다. 상기 투여는, 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 직장 내 투여일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 구체예에서, 상기 투여는 경구 투여일 수 있다.
- [0049] 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 예를 들어, 상기 투여량은 개체당 일당 에제티미브 0.001 mg 내지 1,000 mg, 0.001 mg 내지 500 mg, 0.001 mg 내지 100 mg, 0.001 mg 내지 50 mg, 0.001 mg 내지 20 mg, 0.001 mg 내지 10 mg, 0.1 mg 내지 100 mg, 0.1 mg 내지 50 mg, 0.1 mg 내지 20 mg, 0.1 mg 내지 10 mg일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 투여 횟수는 1일 1회 또는 임상적으로 용인가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개소 또는 2개소 이상에 투여할 수 있으며, 매일 또는 2 내지 5일 간격으로 총 투여 일수는 한번 치료 시 1일에서 30일까지 투여될 수 있다. 필요한 경우, 적정 시기 이후에 동일한 치료를 반복할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간의 기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다.
- [0050] 상기 방법에서, 유효량의 에제티미브 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 유효량의 하나 이상의 다른 활성 성분과 동시에, 개별적으로, 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 상기 하나 이상의 다른 활성 성분은 폐섬유증을 치료하기 위한 하나 이상의 다른 제제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 또 다른 양상은 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한 에제티미브 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.
- [0053] 또 다른 양상은 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료를 위한 에제티미브 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.
- [0054] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

## 발명의 효과

- [0056] 일 양상에 따른 조성물은 에제티미브 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함함으로써 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료 효과를 가질 수 있다. 따라서, 에제티미브를 폐섬유증의 예방, 개선, 완화 또는 치료를 위한 약학적 조성물 등으로 이용할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0058]

도 1은 FBS 15% 세포 배양액 조건에서 마우스 폐 섬유모세포에 에제티미브를 24시간 동안 표시된 농도 대로 처리하고, MTT assay를 진행한 결과이다.

도 2는 FBS 0.1% 세포 배양액 조건에서 마우스 폐 섬유모세포에 에제티미브를 24시간 동안 표시된 농도 대로 처리하고, MTT assay를 진행한 결과이다.

도 3은 FBS 15% 세포 배양액 조건에서 사람 폐 섬유모세포에 에제티미브를 24시간 동안 표시된 농도 대로 처리하고, MTT assay를 진행한 결과이다.

도 4는 TGF  $\beta$  1 미처리 상태와 TGF  $\beta$  1 처리 상태를 비교하고, 동시에 TGF  $\beta$  1 처리 상태에서 에제티미브의 처리 농도별 Col1A1 단백질 발현 정도를 나타낸 결과이다.

도 5는 상기 에제티미브의 처리 농도별 Col1A1과 Acta2의 mRNA 발현 정도를 나타낸 결과이다.

도 6은 에제티미브의 농도를 20  $\mu$ M으로 고정하였을 때, 에제티미브 처리 시간에 따른 Col1A1 단백질 발현 정도를 나타낸 결과이다.

도 7은 상기 에제티미브의 농도를 20  $\mu$ M으로 고정하였을 때, 에제티미브 처리 시간에 따른 Col1A1과 Acta2의 mRNA 발현 정도를 나타낸 결과이다.

도 8은 TGF  $\beta$  1 미처리 상태와 TGF  $\beta$  1 처리 상태를 비교하고, 동시에 TGF  $\beta$  1 처리 상태에서 에제티미브의 농도별 COL1A1 단백질 발현 정도를 나타낸 결과이다.

도 9는 에제티미브의 처리 농도별 Col1A1과 Acta2의 mRNA 발현 정도를 나타낸 결과이다.

도 10은 에제티미브의 농도를 20  $\mu$ M으로 고정하였을 때, 에제티미브 처리 시간에 따른 Col1A1 단백질 발현 정도를 나타낸 결과이다.

도 11은 에제티미브의 농도를 20  $\mu$ M으로 고정하였을 때, 에제티미브 처리 시간에 따른 Col1A1과 Acta2의 mRNA 발현 정도를 나타낸 결과이다.

도 12는 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 완화 효과를 확인하기 위한 실험에 있어서 각 군의 투여 방법을 간단한 모식도로 확인한 도이다.

도 13은 블레오마이신 투여 후 일수(Days)에 따른 마우스의 생존율 변화를 나타낸 그래프이다.

도 14은 블레오마이신 미투여군(Control, n=14), 블레오마이신 투여군(Bleomycin, n=13), 블레오마이신 + 에제티미브 투여군(Bleo+Ezetimibe, n=17) 및 블레오마이신 + 닌테다닙 투여군(Bleo+Nintedanib, n=7)에서 콜라겐 양을 측정된 결과이다. 도 14의 그래프 상의 각각의 점은 각각 한 마리의 마우스의 실험 결과를 표시하며, 평균  $\pm$  표준오차로 표기하였고, one-way ANOVA로 분석하였다.

도 15는 웨스턴 블랏을 이용하여 각 군의 섬유화 마커인 COL1A1과 피브로넥틴(Fibronectin)을 비교한 결과 및 Image J를 통해 웨스턴 블랏의 결과를 정량한 결과를 확인한 도이다.

도 16은 RT-qPCR을 통해 섬유화 마커인 Col1a1, Col1a2, Acta2, Col3a1 및 Eda-fn mRNA의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 17은 Masson-trichrome stain으로 섬유화 정도를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 마우스별 폐 병리조직의 슬라이드에서 콜라겐이 염색된 부위를 Aperio Imagescope 프로그램을 이용하여 정량한 결과를 나타낸 도이다.

도 19는 블레오마이신 투여 후 일수(Days)에 따른 마우스 체중 변화를 나타낸 그래프이다. 평균  $\pm$  표준오차로 표기하였고, Two-way ANOVA (측정 날짜와 투약군)로 분석하였다. 각 군당 대조군으로 n=23, 블레오마이신 투여군(Bleomycin)으로 n=18 / 블레오마이신 + 에제티미브 투여군(Bleo+Eze)으로 n=21 마리가 분석에 활용되었다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하



기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

## [0061] 재료 및 방법

### [0062] 1. 인간 및 마우스 폐 섬유모세포의 분리 및 배양

[0063] 본 실험에는 타 논문(Seluanov et al., “Establishing Primary Adult Fibroblast Cultures From Rodents” . J Vis Exp. 2010 Oct 5;(44):2033. doi: 10.3791/2033)을 참고하고, 부분적으로 수정하여 적용하였다. 모든 약품 및 비품은 상기 논문과 동일하게 사용하였다.

[0064] 마우스 폐 조직의 경우, 7~10주령 사이의 성체 마우스를 안락사하여 무균적으로 양쪽 폐를 채취하였다.

[0065] 인간 폐 조직의 경우, IRB(Institutional Review Board)를 통과한 폐 조직 채취 연구에 동의한 환자에 한하여, 일반적인 수술 과정에서 얻어지는 폐 조직 약 2 cm<sup>3</sup> 크기를 무균적으로 떼어와서 사용하였다.

[0066] 21번 blade를 이용하여 폐 조직을 1 mm<sup>3</sup> 미만의 크기로 잘게 자른 뒤, DMEM/F12 배지에 Liberase™ TM Research Grade를 0.14 Wunsch units/mL로 녹여서, 37℃에서 천천히 교반기로 저어주며 40분간 인큐베이션을 진행하였다. 이후 혈청이 포함된 세포 배양액으로 조직을 씻어주고, 100 mm 세포 배양 디쉬 5개에 나누어서 배양하였다. O<sub>2</sub> 3%의 저산소 조건에서 배양을 진행하였다.

[0067] 분리 1주 뒤 배양액을 새로 갈아주며, 분리 2주 뒤 계대배양을 시행하고, FBS 15% 및 1X P/S (penicillin/streptomycin)를 추가한 MEM 세포배양액으로 변경하였다. 이때 100 μm 세포 필터를 이용해서 조직을 제거하여, 분리된 폐 섬유모세포만을 배양하였다. 이후 약 5일 간격으로 계대배양하여 세포의 순도를 높이고 세포 수를 늘렸다. 3번째 계대(passage)에서 정상 산소 조건으로 변경하면서 모든 실험을 시행하였다.

### [0069] 2. 세포 실험 조건

[0070] 모든 실험은 계대(passage) 3의 세포를 사용하였다. TGFβ1 처리 전에 세포 배양액을 FBS의 농도가 0.1%로 감소된 MEM 세포 배양액으로 변경하여 1시간 30분간 처리하였다. 이후에 비히클(vehicle) 또는 TGFβ1 2 ng/ml과 에세티미브를 24시간 동안 처리하였다. TGFβ1는 100 mM NaCl이 포함된 20 mM 시트레이트(citrate) 용액(pH 3.0)에 0.1%(w/v) BSA(Bovine Serum Albumin)이 포함된 용액을 비히클로 사용하였고, 에세티미브는 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)를 비히클로 사용하였다. 모든 약물 및 그 용매는 세포에 1:1000 (v/v)으로 처리되었다.

### [0072] 3. 블레오마이신(Bleomycin)을 이용한 마우스 폐 섬유증 유발 및 약물 투여

[0073] 블레오마이신은 두경부, 폐, 피부 등의 편평상피암 등에 사용하는 항암제로, 폐섬유증 등의 부작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 이러한 특성을 바탕으로 블레오마이신은 폐 섬유증의 동물모델에 사용하는 가장 대표적인 약물이다. 따라서, 블레오마이신을 사용하여 폐섬유증을 유발하였다. 7~10주령 사이의 C57BL/6J 마우스를 이용하여 아래의 순서로 실험을 진행하였다.

[0074] 1) 인두 흡인 과정이 원활할 수 있도록 마우스에 15분의 공복시간 주고, 호흡마취를 통해 마취를 진행하였다.

[0075] 2) 마우스는 바닥과 수직이 되게 세워주고, 코와 혀를 잡아주어 기도를 통해 호흡할 수 있게 위치하였다.

[0076] 3) 대조군(control, normal saline)은 무균적으로 처리된 생리식염수 50 ul를 마우스에 인두 흡인 시켜주었고, 블레오마이신 투여군과 블레오마이신 및 에세티미브 투여군은 블레오마이신 2U/kg 50 ul를 마우스에 인두 흡인 시켜주었다.

[0077] 4) 주입 직후 마우스 무게를 측정하고, 일주일에 3번 마우스 희생 전까지 무게를 측정하며 관찰하였다.

[0078] 5) 블레오마이신 주입 7일 후부터, 블레오마이신과 에세티미브를 투여한 군은 증류수로 제작한 0.5% 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스(Sodium Carboxymethyl Cellulose)에 희석한 에세티미브 2 mg/kg를, 블레오마이신과 닌테다닙(Nintedanib)을 투여한 군은 0.5% 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스에 희석한 닌테다닙 40mg/kg를, 대조군과 블레오마이신 군은 0.5% 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스를 일주일에 5번, 매일 경구 투여하였다.

- [0079] 6) 블레오마이신 주입 3주 뒤 안락사하여 폐 검체를 획득하였다.
- [0080] 7) 실험 과정에서 사망한 마우스로부터는 검체를 획득하지 않았고, 생존 분석을 제외한 모든 분석에서 제외하였다.
- [0082] **4. 단백질 정량 및 웨스턴 블랏**
- [0083] 1) 세포에 류페틴(Leupeptin), 아프로티닌(Aprotinin) 및 PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)가 함유된 용해 혼합액을 넣은 뒤, 4℃에서 5분 동안 유지시켰다.
- [0084] 2) 스크래퍼로 세포를 모아준 뒤, 강한 진동으로 세포가 더욱 잘 용해될 수 있도록 해주고, 4℃에서 10분 이상 유지시켰다.
- [0085] 3) 4℃에서 13500 rpm의 속도로 15분 동안 원심분리하여, 상층액만 획득하였다.
- [0086] 4) 브래드포드 시약 500  $\mu$ l에 상기 획득한 용해물 1  $\mu$ l을 넣고, 잘 섞어주어 200  $\mu$ l씩 96웰 플레이트에 분주하였다.
- [0087] 5) VERSAmax™ microplate reader 기기를 이용하여 595 nm로 농도를 측정하였다.
- [0088] 6) 각 샘플은 5X SDS 시약과 함께 1 mg/ml의 농도로 일정하게 맞추어주고, 100℃에서 10분 동안 가열하였다.
- [0089] 7) 확인하고자 하는 단백질의 크기에 따라 각기 다른 폴리아크릴아마이드 농도를 가진 젤을 이용하여 전기영동 상에서 분리 시켜주며, 약 80V에서 30분 전개 후, 120V에서 1시간 전개하였다.
- [0090] 8) 분리가 끝난 젤을 나일론 막에 옮겨 75V에서 2시간 전사하였다.
- [0091] 9) 5% 탈지우유 혹은 소혈청알부민 용액으로 15분 이상 블로킹하여 불특정 항원항체 반응을 막아주었다.
- [0092] 10) 1차 항체는 4℃에서 18~24시간 반응 시키고, TTBS (Tween-Tris buffered saline)로 세척 후, 2차 항체를 상온에서 1시간 이상 반응시켰다.
- [0093] 11) TTBS로 세척 후, 화학발광기질이 포함된 용액을 막 위에 고르게 분주한 뒤, 노출 시간에 따라 X-ray 필름 또는 ImageQuant800 기기로 그 발광양을 측정하였다.
- [0094] 12) Image J 프로그램을 이용하여 정량적으로 비교하였다.
- [0096] **5. qPCR**
- [0097] 1) 조직 혹은 세포에 트라이졸 1000  $\mu$ l과 클로로포름 200  $\mu$ l를 넣고 잘 섞어준 뒤, 4℃의 원심분리기를 이용하여 13,000 rpm 속도로 15분 동안 원심분리하였다.
- [0098] 2) 분리된 상층액 200  $\mu$ l과 동량의 아이소프로필 알코올 200  $\mu$ l을 넣은 뒤, 4℃의 원심분리기를 이용하여 13,000 rpm 속도로 15분 동안 원심분리하였다.
- [0099] 3) 상층액은 제거하고, 75% 에탄올 1 ml을 넣은 뒤, 4℃의 원심분리기를 이용하여 13,000 rpm 속도로 15분 동안 원심분리시켜 침전물을 세척하였다.
- [0100] 4) 모든 상층액을 깨끗하게 제거한 뒤, 적당량의 0.1% DEPC (Diethylpyrocarbonate)가 처리된 증류수로 침전물을 녹이고, 미량 분광광도계를 이용하여 용액 내의 RNA를 정량하였다.
- [0101] 5) 정량한 농도를 기반으로 cDNA (complementary DNA)를 합성하였다.
- [0102] 6) SYBR GREEN의 형광 표식을 사용하며, QuantStudio3 혹은 StepOnePlus Real time PCR (55℃:2분 - 95℃:10분 - 95℃:15초 - 60℃:1분)을 이용하여, 증폭량에 따라 내부제어유전자인 18S 리보솜 RNA의 Ct 값으로 보정하여 상대값으로 결과를 도출하였다.
- [0104] **6. MTT assay**
- [0105] 본 실험은 세포를 용해시키며 나온 ATP를 측정하여 생존 가능한 세포 수를 반영하여 세포 독성을 확인하는 실험

이다.

[0106] 1) 96웰 플레이트에 세포  $1.25 \times 10^4$  개를 분주 후 하루 배양하였다.

[0107] 2) 기존 배양액을 제거하고, 실험용 배양액에 에제티미브를 농도에 따라 처리하여 24시간 배양을 진행하였다.

[0108] 3) 상온에서 30분 유지시켜 온도 평형을 맞춰주었다.

[0109] 4) CellTiter-Glo 기질 시약 25  $\mu$ l을 주입 후, Centro XS<sup>3</sup> LB 960 High Sensitivity Microplate Luminometer를 이용하여 발광 세포 생존력 분석을 진행하였다.

## [0111] 7. Sircol 콜라겐 분석(Collagen assay)

[0112] Sircol<sup>TM</sup> Soluble Collagen Assay (Biocolor Ltd., S1000)를 이용하였으며, 제조사의 매뉴얼에 따라 아래 과정대로 실험을 진행하였다.

[0113] 1) 0.5 M 아세트산으로 희석한 0.1 mg/ml 펩신을 1 ml 분주하고 물리적으로 분쇄하여 마우스의 우측 폐 상엽을 용해시켰다.

[0114] 2) 4°C의 원심분리기를 이용하여 13500 rpm 속도로 15분 동안 분리하여, 용해된 상층액 200  $\mu$ l을 획득하였다.

[0115] 3) 용해된 조직 샘플을 1/10로 희석시켜 100  $\mu$ l을 만들고, Sircol 염색시약 1 ml 넣어주었다.

[0116] 4) 실온에서 30분 동안 셰이커에 두어 잘 섞이도록 하였다.

[0117] 5) 12,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리한 뒤 상층액은 버리고, 침전물을 획득하였다.

[0118] 6) 차가운 산-염 세척 시약 750  $\mu$ l을 조심스럽게 첨가하여, 침전물과 튜브 표면의 결합하지 않은 염색약을 세척하였다.

[0119] 7) 12,000 rpm의 속도로 10분간 다시 한번 원심분리 하여 상층액은 제거하고, 최대한 용액이 남아있지 않게 하였다.

[0120] 8) 1 ml의 알칼리 시약을 넣고, 10초 이상 강한 진동으로 혼합액을 섞어주었다.

[0121] 9) 96웰 플레이트에 200  $\mu$ l의 샘플을 넣고 3~4번 반복으로 분주하여, VERSAmax microplate reader 기기를 이용하여 555 nm로 측정하였다.

## [0123] 8. 조직학적 분석

[0124] 1) 마우스 해부 과정에서 좌측 폐엽을 기관지와 함께 10% Formalin으로 부풀린 상태로 적출하고, 10% Formalin 용액에서 24시간 동안 고정하였다.

[0125] 2) 고정된 조직을 파라핀 절편으로 제작하여 슬라이드글라스에 붙인 뒤, Masson's trichrome 염색으로 염색하였다.

[0126] 3) 제작된 염색 슬라이드를 Aperio AT2 기기로 400배 고해상도 디지털 이미지로 스캔하였다.

[0127] 4) 스캔한 이미지를 Aperio ImageScope 프로그램을 활용하여 정량 및 정성적으로 분석하였다.

## [0129] 9. 통계처리

[0130] R version 4.0.2 및 Prism 9를 이용하였고, 3개 이상의 그룹이 포함된 모든 실험에서 one-way ANOVA 및 다중 비교에 대해 Tukey 검증을 이용하여 통계적으로 분석하였다. 마우스 체중 변화의 분석에는 two-way ANOVA를 사용하였다. 통계적 유의성은 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  순으로 표시하였으며, 일부 data에서는 p-value를 직접 기재하였다.

[0132] **결과**

[0133] **실험예 1: MTT assay를 이용한 에제티미브의 세포 투여 농도 결정**

[0134] MTT assay를 이용하여 세포에 독성이 발생하는 에제티미브의 농도를 확인하였다. 마우스 폐 섬유모세포에서는 FBS 0.1% 배양액과 FBS 15% 배양액에서 각각 실험을 진행하였다.

[0135] 도 1은 FBS 15% 세포 배양액 조건에서 마우스 폐 섬유모세포에 에제티미브를 24시간 동안 표시된 농도 대로 처리하고, MTT assay를 진행한 결과이다.

[0136] 도 2는 FBS 0.1% 세포 배양액 조건에서 마우스 폐 섬유모세포에 에제티미브를 24시간 동안 표시된 농도 대로 처리하고, MTT assay를 진행한 결과이다.

[0137] 도 3은 FBS 15% 세포 배양액 조건에서 사람 폐 섬유모세포에 에제티미브를 24시간 동안 표시된 농도 대로 처리하고, MTT assay를 진행한 결과이다.

[0138] 도 1 내지 3에 나타난 바와 같이, 사람 및 마우스 폐 섬유모세포에서 에제티미브는 20  $\mu$ M 농도 미만에서는 세포 독성이 발생하지 않는 것으로 확인되었다. 이를 바탕으로, 이후 실험은 에제티미브 20  $\mu$ M를 최대 농도로 사용하였다.

[0140] **실험예 2: 마우스 폐 섬유모세포에서의 에제티미브의 폐섬유증 치료 효능 확인**

[0141] 마우스 폐 섬유모세포에서의 에제티미브의 폐섬유증 치료 효능을 확인하기 위한 실험을 하였다. 섬유모세포에 TGF  $\beta$ 1를 처리하여 근섬유모세포로 분화시키며 생성되는 섬유화의 최종 산물 중 하나인 Collagen 1a1 (Col1A1)을 주요 검출 대상으로 확인하였다.

[0142] 도 4는 TGF  $\beta$ 1 미처리 상태와 TGF  $\beta$ 1 처리 상태를 비교하고, 동시에 TGF  $\beta$ 1 처리 상태에서 에제티미브의 처리 농도별 Col1A1 단백질 발현 정도를 나타낸 결과이다.

[0143] 도 5는 상기 도 4와 같은 실험 조건에서 에제티미브의 처리 농도별 Col1A1과 Acta2의 mRNA 발현 정도를 나타낸 결과이다.

[0144] 도 6은 에제티미브의 농도를 20  $\mu$ M으로 고정하였을 때, 에제티미브 처리 시간에 따른 Col1A1 단백질 발현 정도를 나타낸 결과이다.

[0145] 도 7은 상기 도 6과 같은 실험 조건에서 에제티미브의 농도를 20  $\mu$ M으로 고정하였을 때, 에제티미브 처리 시간에 따른 Col1A1과 Acta2의 mRNA 발현 정도를 나타낸 결과이다.

[0146] 도 4 및 5에 나타난 바와 같이, 에제티미브는 농도가 증가함에 따라 Col1A1의 단백질 및 mRNA 발현을 감소시키는 것으로 확인되었고, 보조적으로 함께 측정한 Acta2 mRNA도 함께 감소시키는 것을 확인하였다.

[0147] 도 6 및 7에 나타난 바와 같이, 에제티미브의 농도를 20  $\mu$ M로 고정하였을 때, 처리 시간이 24시간으로 충분할 경우 Col1A1과 Acta2를 감소시키는 것을 확인하였다.

[0148] 따라서, 마우스 폐 섬유모세포를 이용한 폐섬유증 세포 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 치료 효과를 확인하였다.

[0150] **실험예 3: 인간 폐 섬유모세포에서의 에제티미브의 폐섬유증 치료 효능 확인**

[0151] 인간 폐 섬유모세포에서의 에제티미브의 폐섬유증 치료 효능을 확인하기 위한 실험을 하였다. 섬유모세포에 TGF  $\beta$ 1를 처리하여 근섬유모세포로 분화시키며 생성되는 섬유화의 최종 산물 중 하나인 Collagen 1a1 (Col1A1)을 주요 검출 대상으로 확인하였다.

[0152] 도 8은 TGF  $\beta$ 1 미처리 상태와 TGF  $\beta$ 1 처리 상태를 비교하고, 동시에 TGF  $\beta$ 1 처리 상태에서 에제티미브의 농도별 COL1A1 단백질 발현 정도를 나타낸 결과이다.

[0153] 도 9는 상기 도 8와 같은 실험 조건에서 에제티미브의 처리 농도별 Col1A1과 Acta2의 mRNA 발현 정도를 나타낸 결과이다.

- [0154] 도 10은 에제티미브의 농도를 20  $\mu$ M으로 고정하였을 때, 에제티미브 처리 시간에 따른 Col1A1 단백질 발현 정도를 나타낸 결과이다.
- [0155] 도 11은 상기 도 10과 같은 실험 조건에서 에제티미브의 농도를 20  $\mu$ M으로 고정하였을 때, 에제티미브 처리 시간에 따른 Col1A1과 Acta2의 mRNA 발현 정도를 나타낸 결과이다.
- [0156] 도 8 내지 11에 나타낸 바와 같이, 인간 폐 섬유모세포에 있어서도 TGF $\beta$ 1 처리군은 TGF $\beta$  자극에 의하여 COL1A1 단백질과 mRNA 발현이 증가하나, 이와 같은 COL1A1 단백질과 mRNA 발현증가는 에제티미브 처리에 의해 효과적으로 그 발현이 감소되는 것을 확인하였다.
- [0158] 따라서, 상기 실험에 2 및 3의 결과를 종합해보면, 폐 섬유모세포의 TGF $\beta$ 1 자극에 의한 인간과 마우스의 폐섬유증 세포 모델에서, 에제티미브는 폐섬유증 치료 효과를 가짐을 확인하였다.
- [0160] **실험예 4: 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 완화 효과 확인 - 마우스 생존율의 비교를 통하여**
- [0161] 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 완화 효과를 확인하기 위하여, 마우스의 생존율을 확인하였다.
- [0162] 도 12는 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 완화 효과를 확인하기 위한 실험에 있어서 각 군의 투여 방법을 간단한 모식도로 확인한 도이다.
- [0163] 도 13은 블레오마이신 투여 후 일수(Days)에 따른 마우스의 생존율 변화를 나타낸 그래프이다.
- [0164] 도 12에 나타난 바와 같이, 모든 약물은 블레오마이신 주입 후 7일차부터 투여되어 염증에 대한 효과를 배제하고 항섬유화 효과를 확인하였다. 도 13에서 확인한 바와 같이, 에제티미브를 투여한 마우스에서 블레오마이신을 투여한 마우스 대비 뛰어난 생존 효과가 나타났으며, 이는 기존 특발폐섬유증의 억제인 닌테다닙과 유사한 수준으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.
- [0165] 따라서, 마우스 생존율의 확인을 통한 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 치료 또는 완화 효과를 확인하였다.
- [0167] **실험예 5: 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 치료 효능 확인- 콜라겐 발현량 비교를 통하여**
- [0168] 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 치료 효과를 확인하기 위하여, 콜라겐 양을 측정하였다.
- [0169] 도 14는 블레오마이신 미투여군(Control, n=14), 블레오마이신 투여군(Bleomycin, n=13), 블레오마이신 + 에제티미브 투여군(Bleo+Ezetimibe, n=17) 및 블레오마이신 + 닌테다닙 투여군(Bleo+Nintedanib, n=7)에서 콜라겐 양을 측정한 결과이다. 도 14의 그래프 상의 각각의 점은 각각 한 마리의 마우스의 실험 결과를 표시하며, 평균  $\pm$  표준오차로 표기하였고, one-way ANOVA로 분석하였다.
- [0170] 도 14에서 확인한 바와 같이, 에제티미브를 투여한 군에서 블레오마이신 투여 군 대비 폐 내의 콜라겐 양이 더 적은 것으로 확인되어, 폐 섬유화를 억제하여 치료하는 효과가 있는 것을 확인하였다. 또한, 그 효과가 기존 특발폐섬유증 억제인 닌테다닙과 유사한 수준임을 확인하였다. 따라서, 콜라겐 발현 양 억제를 확인을 통한 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 치료 또는 완화 효과를 확인하였다.
- [0172] **실험예 6: 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 치료 효능 확인- 섬유화 마커 단백질 및 mRNA 변화를 통하여**
- [0173] 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 치료 효과를 확인하기 위하여, 섬유화 마커 단백질 및 mRNA 변화를 측정하였다.

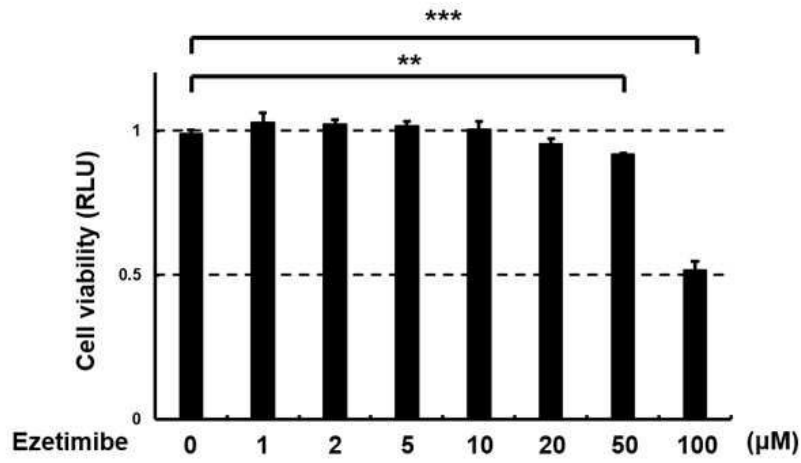


- [0174] 도 15는 웨스턴 블랏을 이용하여 각 군의 섬유화 마커인 COL1A1과 피브로넥틴(Fibronectin)을 비교한 결과 및 Image J를 통해 웨스턴 블랏의 결과를 정량한 결과를 확인한 도이다.
- [0175] 도 16은 RT-qPCR을 통해 섬유화 마커인 Colla1, Colla2, Acta2, Col3a1 및 Eda-fn mRNA의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [0176] 도 15 및 도 16의 그래프 상의 각각의 점은 각각 한 마리의 마우스의 실험 결과를 표시하며, 평균  $\pm$  표준오차로 표기하였고, one-way ANOVA로 분석하였다. 각 군 당 n=4~5 마리가 분석에 사용되었다.
- [0177] 도 15에 확인한 바와 같이, 에제티미브를 투여한 군에서 블레오마이신을 투여한 군 대비 섬유화 마커의 감소를 확인하였다.
- [0178] 도 16에 나타난 바와 같이, 에제티미브를 투여한 군에서 블레오마이신을 투여한 군 대비 모든 폐 섬유화 마커인 Colla1, Colla2, Acta2, Col3a1 및 Eda-fn 의 감소가 현저하게 나타나는 것을 확인하였다.
- [0180] **실험예 7: 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 치료 효능 확인- 폐 병리조직 비교를 통하여**
- [0181] 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 치료 효과를 확인하기 위하여, 폐 병리조직을 통한 치료 효과를 확인하였다.
- [0182] 도 17은 Masson-trichrome stain으로 섬유화 정도를 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- [0183] 도 18은 마우스별 폐 병리조직의 슬라이드에서 콜라겐이 염색된 부위를 Aperio Imagescope 프로그램을 이용하여 정량한 결과를 나타낸 도이다.
- [0184] 도 17에서 확인한 바와 같이, 블레오마이신 투여 군 대비 에제티미브 투여 군에서 섬유화가 호전된 것을 확인할 수 있었다.
- [0185] 도 18에 나타난 바와 같이, 블레오마이신 투여 군 대비 에제티미브 투여 군에서 콜라겐 염색부위의 면적이 감소한 것을 확인하여, 에제티미브 투여를 통한 폐 섬유증 치료 효과를 확인하였다.
- [0187] **실험예 8: 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 치료 효능 확인- 마우스 체중 회복 비교를 통하여**
- [0188] 블레오마이신 유발 마우스 폐섬유증 모델에서 에제티미브의 폐섬유증 치료 효과를 확인하기 위하여, 마우스 체중 회복을 통한 치료 효과를 확인하였다.
- [0189] 도 19는 블레오마이신 투여 후 일수(Days)에 따른 마우스 체중 변화를 나타낸 그래프이다. 평균  $\pm$  표준오차로 표기하였고, Two-way ANOVA (측정 날짜와 투약군)로 분석하였다. 각 군당 대조군으로 n=23, 블레오마이신 투여군(Bleomycin)으로 n=18 / 블레오마이신 + 에제티미브 투여군(Bleo+Eze)으로 n=21 마리가 분석에 활용되었다.
- [0190] 도 19에서 확인한 바와 같이, 블레오마이신에 의해 7일차까지 동일한 수준의 염증이 유도되었으나, 에제티미브를 투여한 마우스에서는 블레오마이신 투여 후 16일째부터 유의하게 체중 회복 효과가 더 크게 나타나는 것을 확인하였다.
- [0192] 종합하면, 에제티미브는 블레오마이신 투여한 마우스에서 섬유화를 억제하는 효능을 보였으며, 특히 이미 기존 시판되어 특발폐섬유증 환자에게 국제적으로 사용되고 있는 약물인 닌테다닙을 표준 용량으로 사용한 마우스와 비교한 경우에도, 이와 유사하거나 더 우월한 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 이에 에제티미브는 폐 섬유화를 완화 및 치료할 수 있음을 확인하였다.
- [0194] 이상의 설명은 본 발명의 기술 사상을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로서, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다.

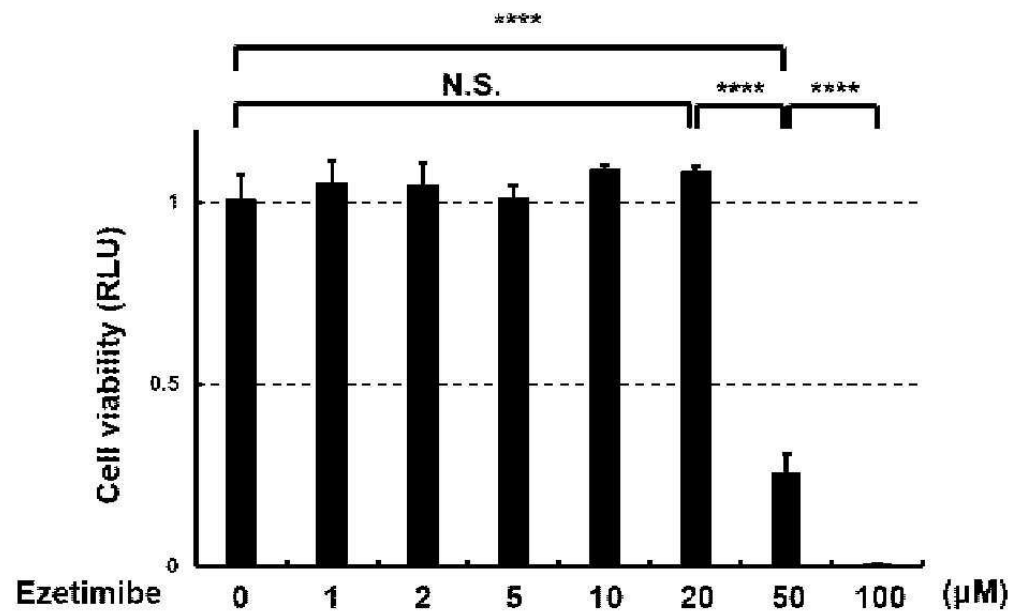


도면

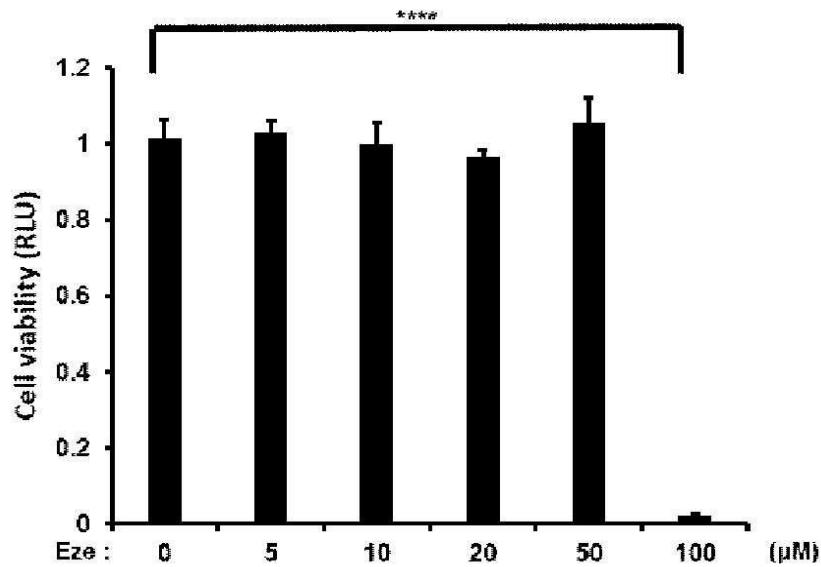
도면1



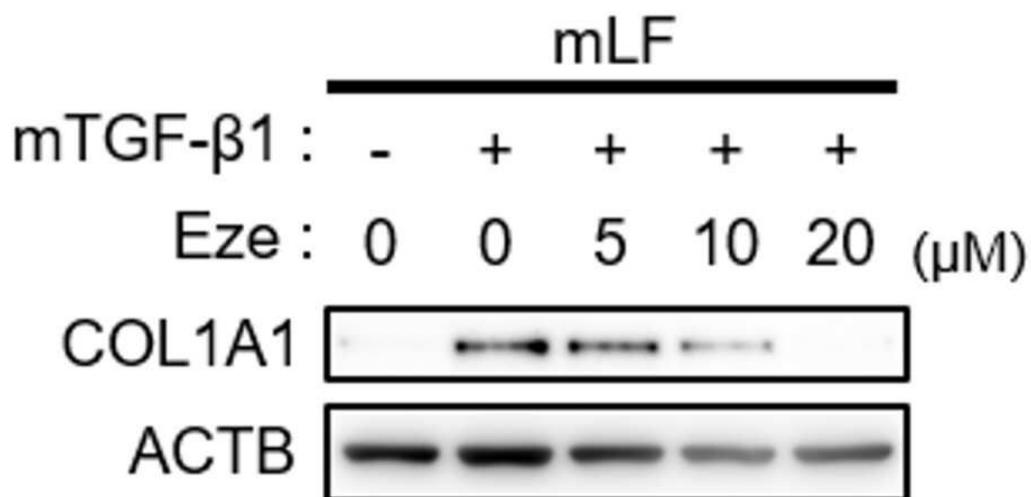
도면2



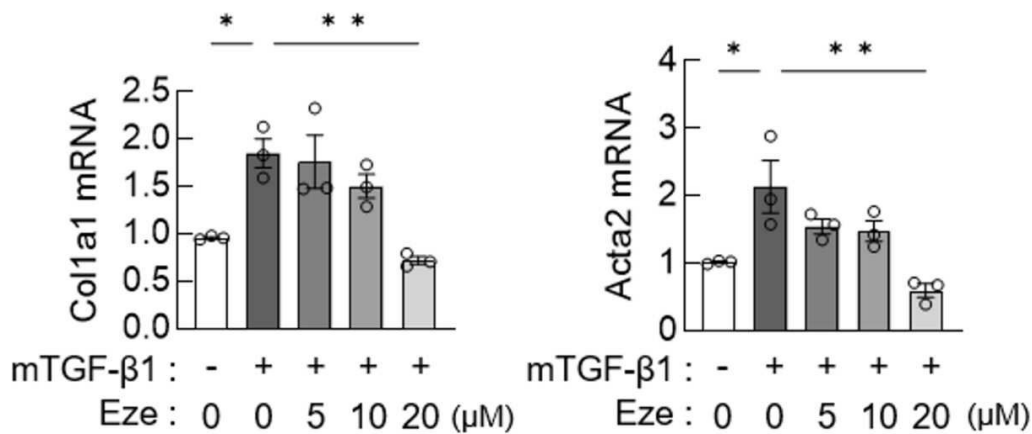
도면3



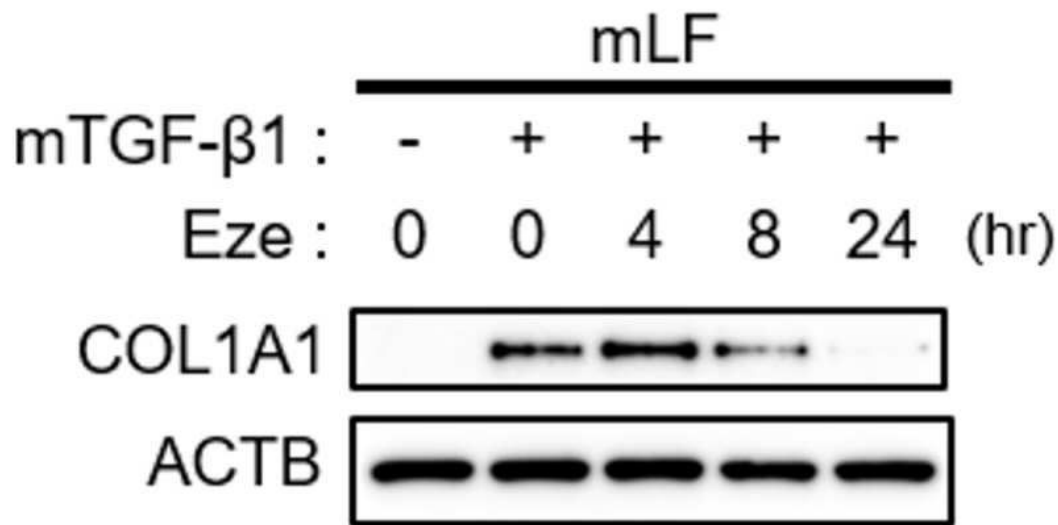
도면4



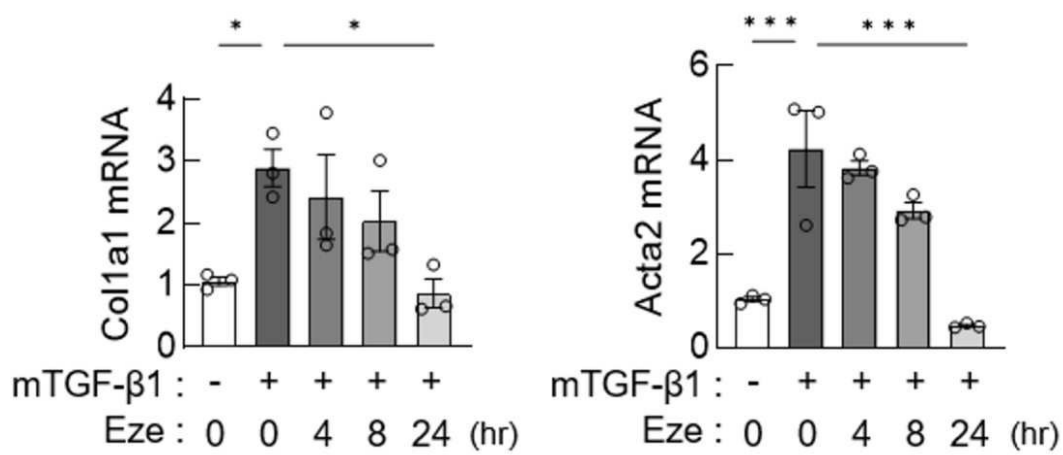
도면5



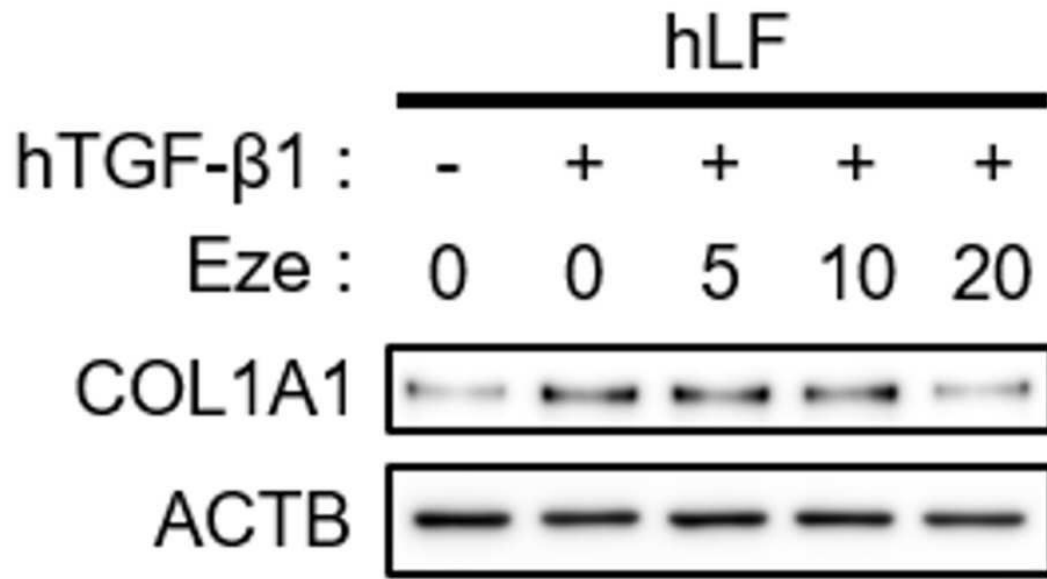
도면6



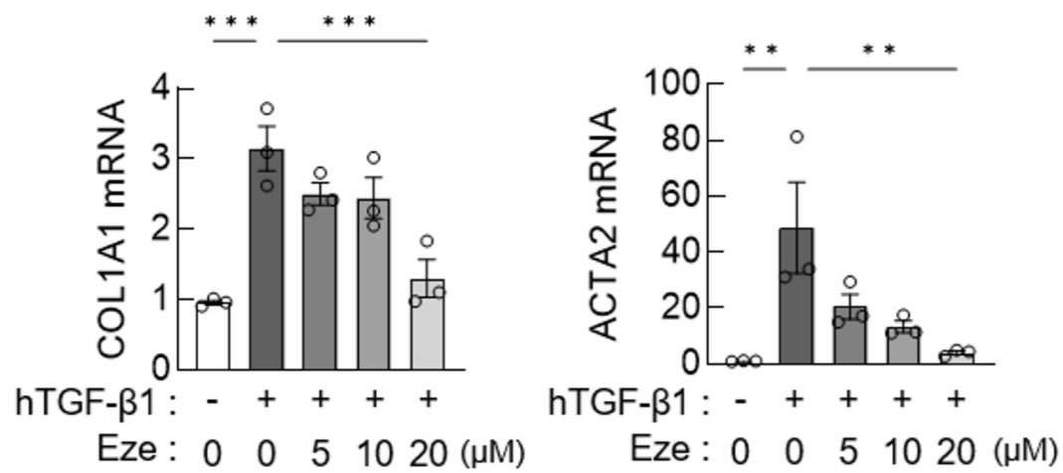
도면7



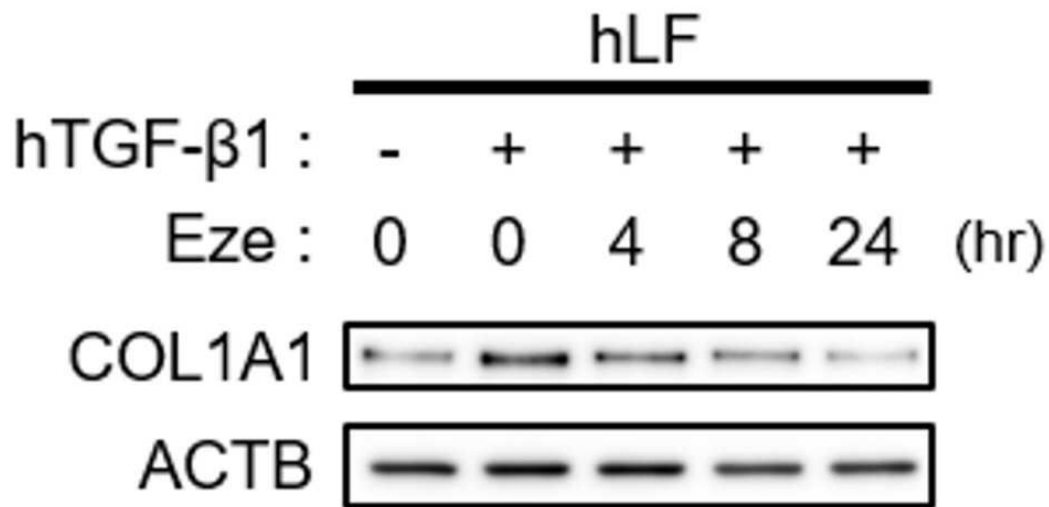
도면8



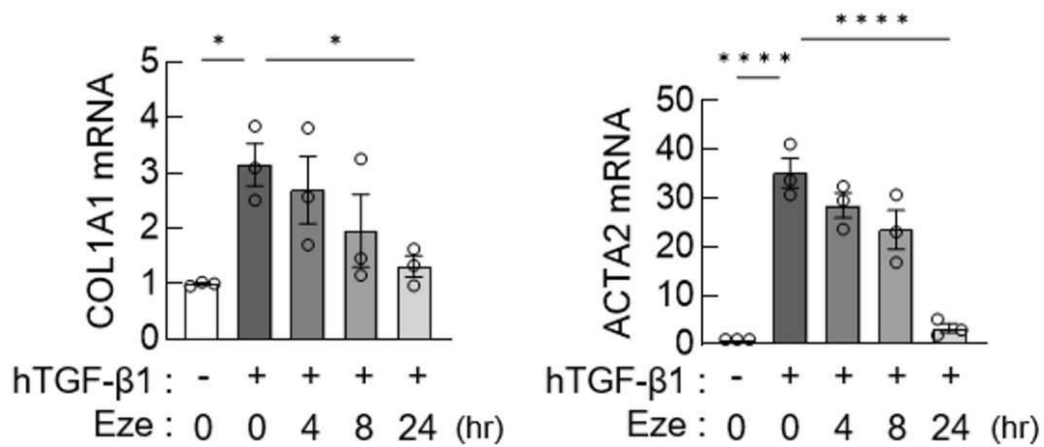
도면9



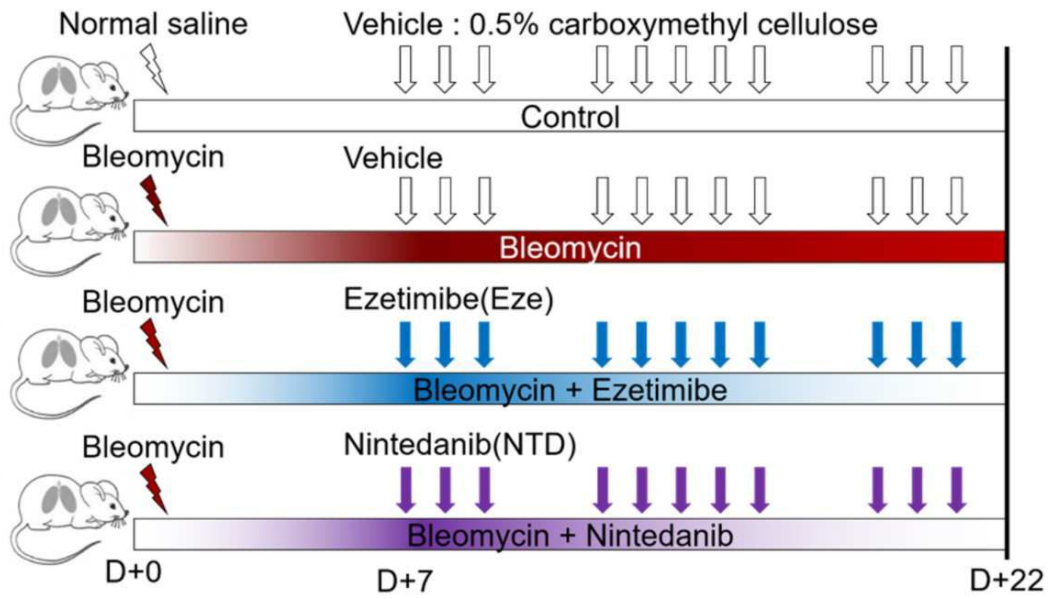
도면10



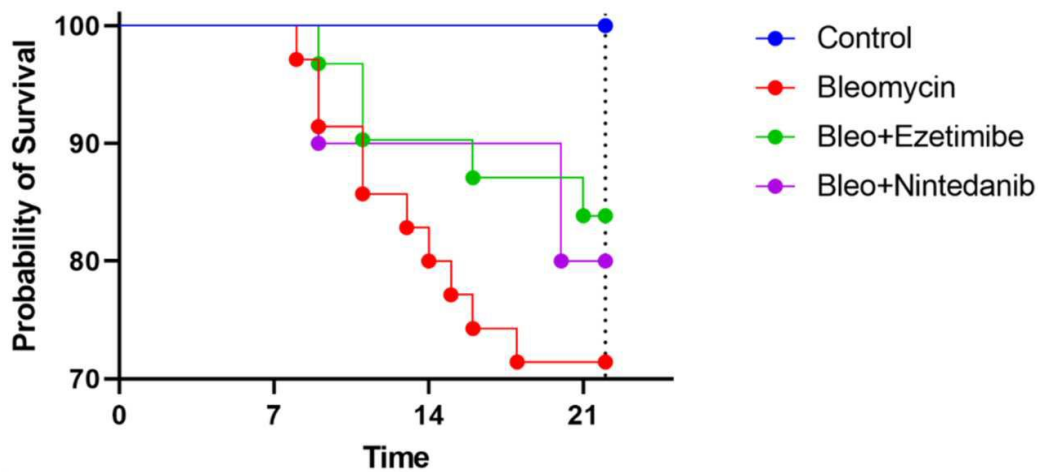
도면11



도면12

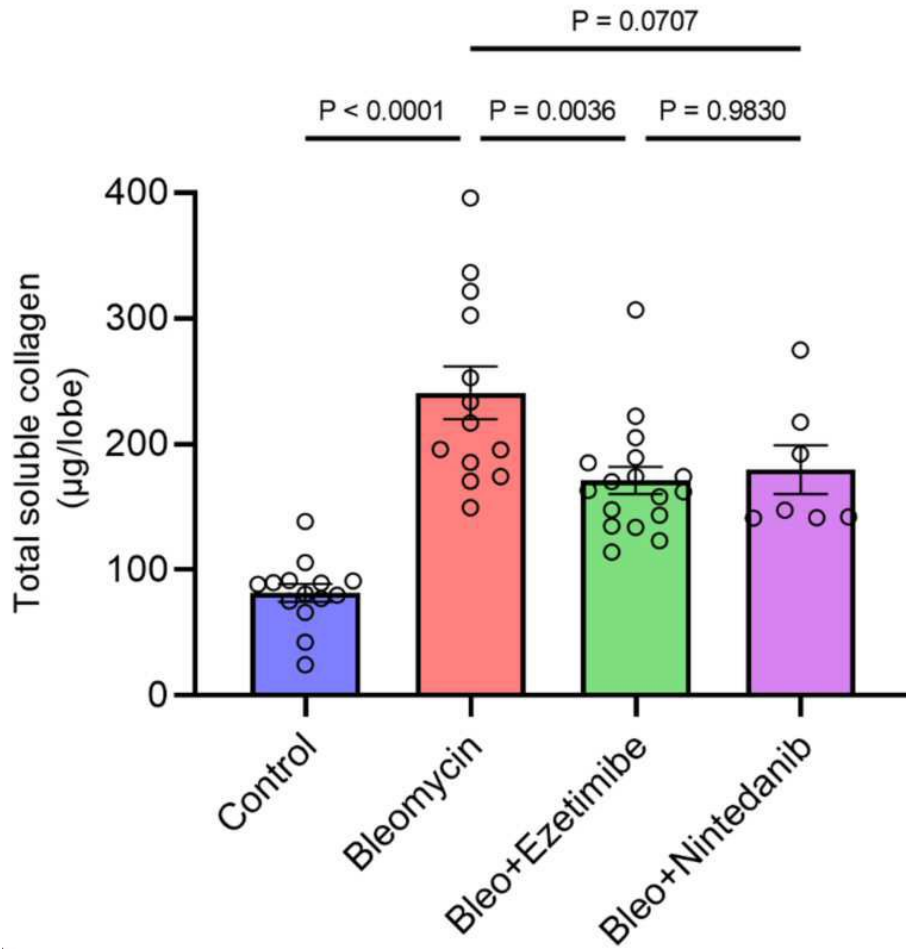


도면13

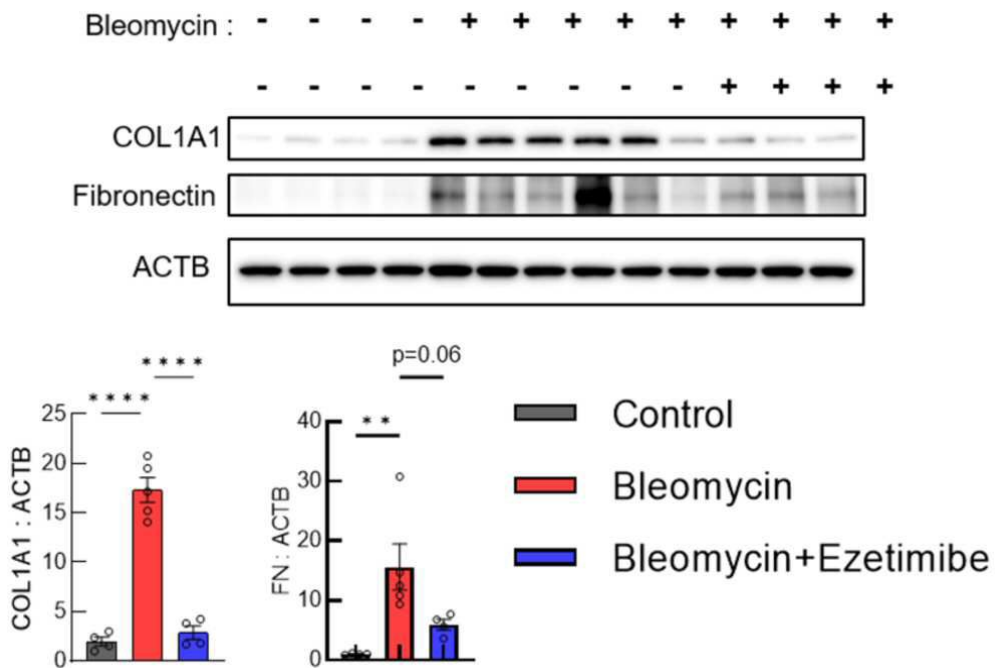




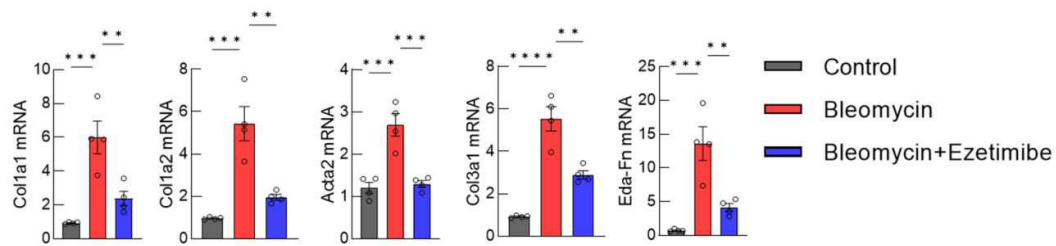
도면14



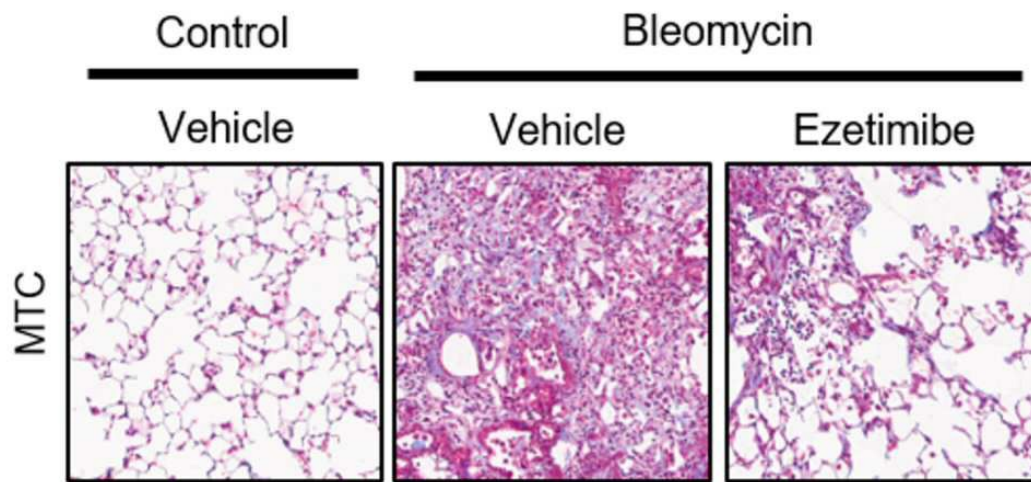
도면15



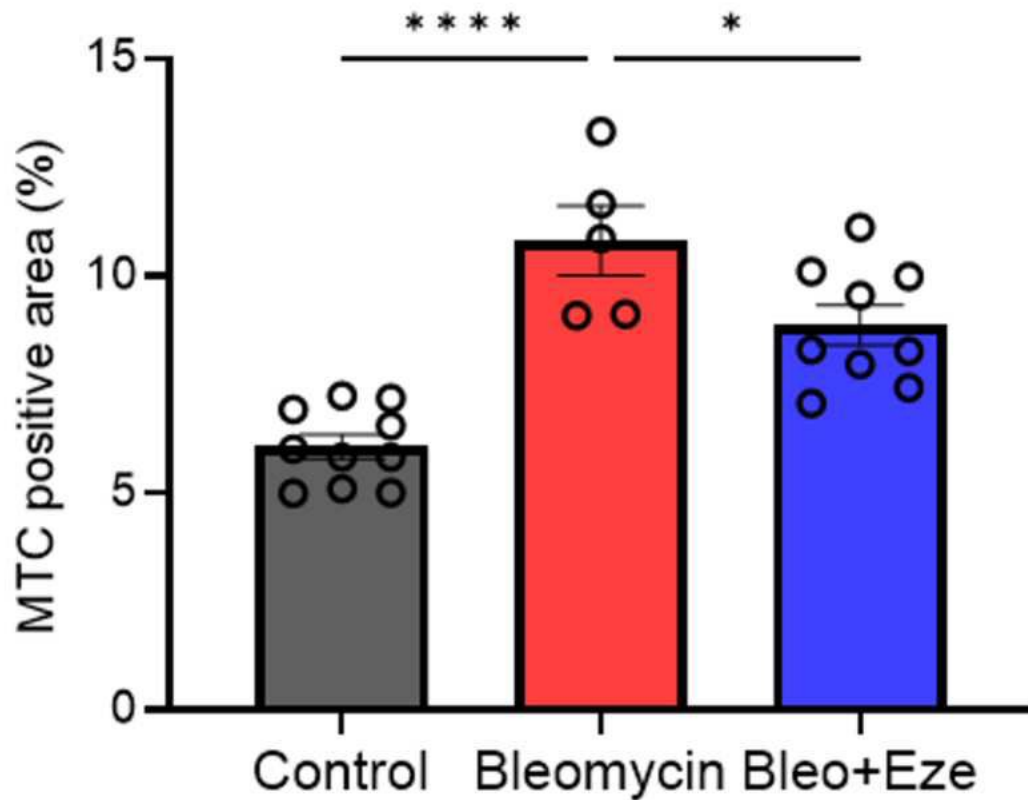
도면16



도면17



도면18



도면19

