(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월11일
(11) 등록번호 10-2142978
(24) 등록일자 2020년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/22 (2006.01) *A61K 38/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/22 (2013.01)
A61K 38/046 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0174295(분할)
(22) 출원일자 2017년12월18일
심사청구일자 2020년06월08일
(65) 공개번호 10-2018-0000330
(43) 공개일자 2018년01월02일
(62) 원출원 특허 10-2015-0081555
원출원일자 2015년06월09일
심사청구일자 2015년06월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020060023123 A
US20130096050 A1
WO2008095004 A2*
WO2011133948 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(주)엘앤케이바이오메드
경기도 용인시 기흥구 동백중앙로 16번길 16-25, 201호 (중앙동, 대우프론티어밸리1)
(72) 발명자
손영숙
서울특별시 강남구 언주로 107, 205동 703호 (개포동, 현대2차아파트)
홍현숙
서울특별시 동대문구 경희대로 23, 동관 9층 (회기동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

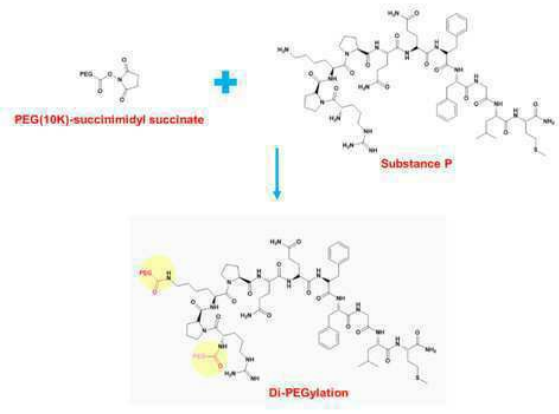
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **신규 폐길화 서브스턴스 P**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 PEG화 서브스턴스 P를 제공한다. 본 발명의 신규한 PEG화 서브스턴스-P는 서브스턴스-P 본래의 활성은 유지하면서 시험관내 및 생체 내에서 향상된 안정성을 가지며, 특히, 생체 내에서 증가된 반감기를 가져, 인체 적용을 위한 신규 약학적 조성물로써 현저한 효과를 보인다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김선아

경기도 부천시 원미구 조마루로 135, 824동 1003호 (중동, 포도마을 영남아파트)

조승우

서울특별시 마포구 와우산로33길 26-7, 604호 (서교동, 서교동대아아파트)

이해신

대전광역시 유성구 반석서로 98, 602동 301호 (반석동, 반석마을6단지아파트)

박현지

경기도 고양시 덕양구 호국로 860, 216동 1901호 (성사동, 래미안휴레스트아파트)

윤강준

서울특별시 강남구 남부순환로381길 15, 101동 603호 (도곡동, 포스코트아파트)

임선기

경기도 의왕시 이미로 17, 204동 1302호 (포일동, 포일숲속마을아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI13C1479
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발
연구과제명	줄기세포 촉진제 substance-P의 전문의약품 개발
기 여 율	1/1
주관기관	경희 의료원
연구기간	2013.11.01 ~ 2019.10.31

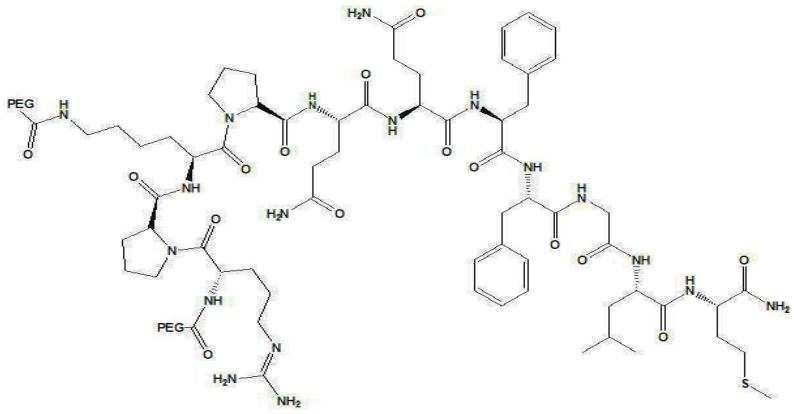
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 4의 Di-PEG화 서브스턴스 P:

[화학식 4]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Di-PEG화는 N-말단의 아민 및 리신 잔기의 아민 위치에서 이루어지는 것인 PEG화 서브스턴스 P.

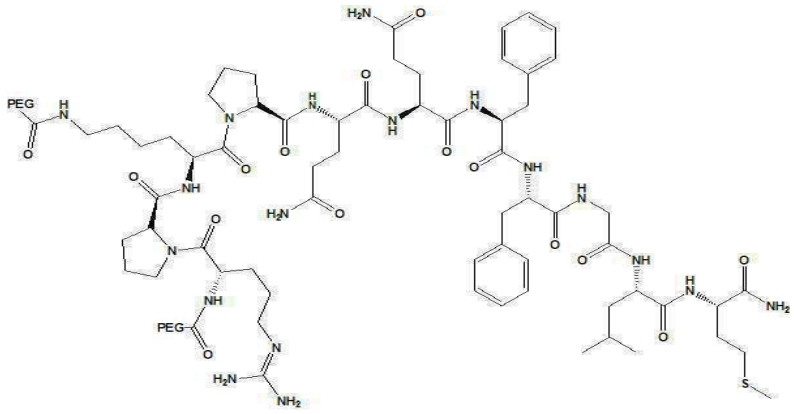
청구항 3

(a) pH 6.0 내지 pH8.5의 트리스, PBS, 소듐 보레이트 포스페이트 또는 증류수 용매 하에 서브스턴스 P를 용해시키는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 서브스턴스 P 용액에 메톡시 폴리에틸렌 글리콜 숙시니미딜 숙시네이트를 혼합하여 2 ℃ 내지 8 ℃에서 10 내지 30시간동안 교반하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 교반액으로부터 Di-PEG화 서브스턴스 P를 분리하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 4의 Di-PEG화 서브스턴스 P의 제조 방법:

[화학식 4]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 페길화 서브스턴스 P에 관한 것이다.

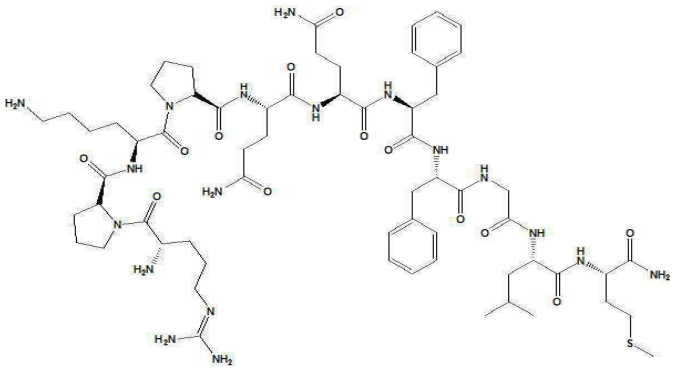
배 경 기 술

[0002] 서브스턴스-P (Substance-P; 또한 'SP'라 함)는 면역, 신경계를 조절하는 신경 펩타이드로써, 종래에는 신경 전달 물질로만 알려져 왔지만 최근 들어서는 면역계와 신경계를 연결해주는 역할을 하며 상처치유과정에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 서브스턴스 P는 골수에서 분비될 수 있는 뉴로펩타이드로 다른 성장인자들처럼 특정 수용체 (receptor)에 결합하여 신호를 전달하고, 골수와 림프구의 기능을 조절한다.

[0003] 서브스턴스 P는 11개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로 사람, 쥐, 토끼에서 동일한 아미노산 서열을 가지고 있어 종간 구별이 없는 인자이다. 뉴로키닌 리셉터 (neurokinin receptor)-1을 통해 시그널을 전달하고 이 리셉터는 각막, 피부, 면역세포 등에서 발현된다. 서브스턴스 P의 기능은 통증 유도, 혈관 확장 등이 있다. 이러한 결과들을 통해 서브스턴스 P가 기존에 알려진 기능인, 신경 전달 물질로서의 역할 외에도 신경-면역계 조절, 골수 섬유증, 암세포 증식, 상처치유 등에서도 중요한 역할을 할 수 있음을 알 수 있다.

[0004] 서브스턴스 P의 구조는 하기 화학식 1과 같다.

[0005] [화학식 1]

[0006] 

[0007] 최근 서브스턴스 P는 상처 치유에 이용되고 있으며, 그 중 하나로, 각막 손상 시 상피세포의 재생을 촉진시키는 안약으로의 개발이 진행되어 왔으며 각막손상 동물 모델에서 서브스턴스 P에 의한 치유 효과가 보고되었다. 또한, 현재 안약으로서의 개발이 일본에서 진행 중이다. 이외에도 다양한 분야에서 서브스턴스 P를 활용하기 위한 연구 개발이 지속적으로 진행중에 있다.

[0008] 그러나, 서브스턴스 P는 혈청 내에 있는 중성 엔도펩티다제(Neutral endopeptidase)에 의해 분해되기 때문에, 실제로 체내에서 머무르는 시간은 매우 짧다는 한계가 있다.

[0009] 이와 관련하여, 생체내 안정성이 증가된 서브스턴스 P 변이체에 관하여 연구 개발이 필요한데, 이와 관련된 연구 개발이 거의 진행된 바가 없다. 즉, 단백질의 안정성을 증가시키기 위한 기술로써, 시알화 (sialation), 당화 (glycosylation), 타 단백질과의 접합(conjugation), 점 돌연변이 (point mutation) 등과 같은 기술들을 서브스턴스 P에 적용하여 인체에서 이용가능성을 증진시킨 서브스턴스 P를 제조할 필요성이 크게 증가하고 있으나, 현재까지 서브스턴스 P를 이용한 관련 연구개발이 이루어지지 못하였다.

[0010] 이러한 배경하에, 서브스턴스 P의 생체내 안정성 증진을 위한 연구 개발이 시급한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 신규한 페길화 서브스턴스 P를 제공하고자 한다.

[0012] 본 발명은 페길화 서브스턴스 P를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명자들은 시험관 내 및/또는 생체 내 안정성이 증진된 서브스턴스-P의 개발을 위해 연구 개발을 수행하여, 페길화된 서브스턴스 P가 시험관 내 및/또는 생체 내 안정성, 특히 생체내 반감기를 크게 증가시켜 인체에 적용

하기 적합한 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0014] 이에, 본 발명은 시험관 내 및/또는 생체 내 안정성이 증가된 신규한 페길화(PEG화) 서브스턴스 P를 제공한다.

[0015] 본 발명은 페길화 서브스턴스 P, 예컨대, 서브스턴스 P의 새로운 형태의 특히 제약 제형에서의 용도 및 제조방법에 관하여 신규한 페길화 서브스턴스 P를 제공한다.

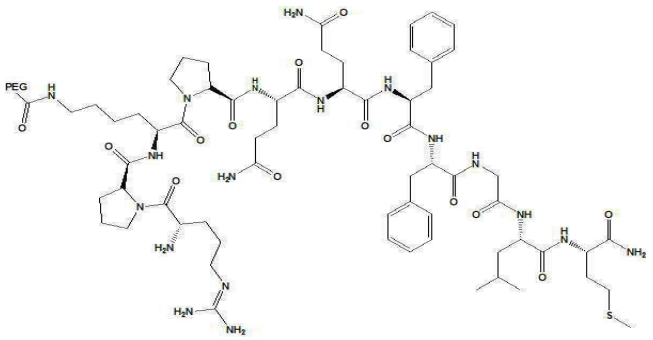
[0016] 본 발명은 페길화 서브스턴스 P를 제공하며, 이 서브스턴스 P는 적어도 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 공유 결합된다. 본 발명에 따른 페길화된 서브스턴스 P는 시험관 내 및/또는 생체 내 안정성, 특히 생체 내 반감기를 크게 증가시키는 장점을 가진다.

[0017] 본 발명의 페길화 서브스턴스 P는 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 공유 결합되며, 바람직하게 한 개 또는 두 개의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 공유 결합된 서브스턴스 P (즉, 각각 모노- 또는 다이-페길화 서브스턴스 P), 및/또는 이의 혼합물을 포함한다.

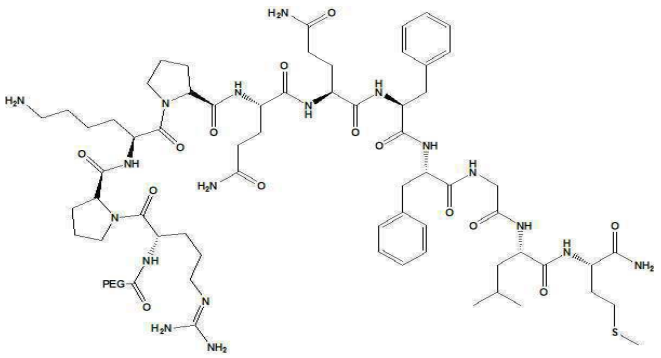
[0018] 서브스턴스 P가 작용하기 위해서 neurokinin receptor (NKR)와 결합할 때 직접적으로 참여하는 부분인 C-terminus의 7 내지 11의 잔기의 활성이 필수적이기 때문에, C-terminus를 페길화하는 것은 서브스턴스 P의 효능을 저하시킬 가능성이 있다. 이에 따라, 본 발명에 따른 PEG화 서브스턴스 P는 pegylation시 N-terminus 아민과 서브스턴스 P 서열 중간에 위치한 lysine 잔기의 side chain의 아민기에 PEG를 결합함으로써 receptor binding에 요구되는 C-terminus 위치는 보존하여 서브스턴스 P의 활성을 크게 유지 시키는 장점을 가진다.

[0019] 본 발명의 특정 실시 양태에서, 본 발명의 페길화 서브스턴스 P는 한 개 또는 두 개의 PEG 분자에 공유 결합된 서브스턴스 P이다. 예컨대, Mono-PEG화 서브스턴스 P는 하기 화학식 2 또는 화학식 3의 구조를 가질 수 있다.

[0020] [화학식 2]

[0021] 

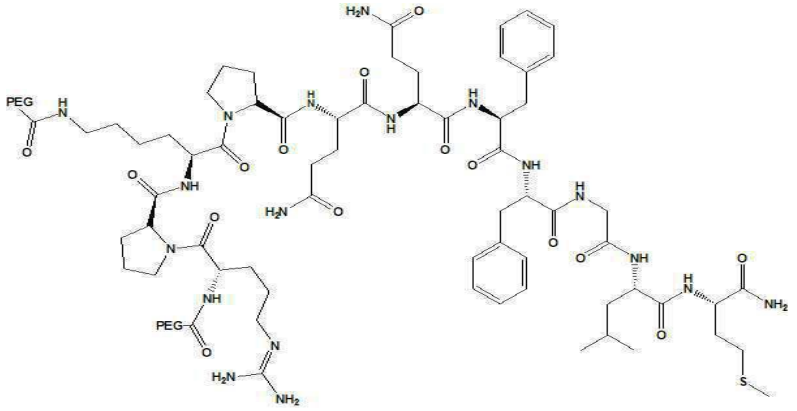
[0022] [화학식 3]

[0023] 

[0024] 상기 mono-PEG 서브스턴스 P는 pegylation 시 N-terminus 아민 또는 서브스턴스 P 서열 중간에 위치한 lysine 잔기의 side chain의 아민기에 PEG가 결합된 것이다.

[0025] 보다 바람직하게, 페길화 서브스턴스 P는 두 개의 PEG 분자에 공유 결합된 서브스턴스 P로 하기 화학식 4의 구조를 가진다.

[0026] [화학식 4]



[0027]

[0028] 본 발명의 가장 바람직한 예인 상기 화학식 4의 구조는 서브스턴스 P의 N-terminus 아민 및 서브스턴스 P 서열 중간에 위치한 lysine 잔기의 side chain의 아민기에 PEG가 결합되는 구조이다.

[0029] 본원에서 사용되는 바, "PEG"라는 용어는 폴리에틸렌 글리콜 분자를 의미한다. 그의 전형적인 형태의 경우, PEG는 말단 하이드록실기를 가진 선형 중합체로서, 이는 식 $HO-(CH_2CH_2O)_n-H$ (여기서, n은 약 8 내지 약 4,000이다)를 가진다. 말단 수소는 캡핑기, 예를 들어, 알킬기 또는 알카놀기로 치환될 수 있다. 바람직하게, PEG는 적어도 하나의 하이드록실기를 가지며, 더욱 바람직하게, 이는 말단 하이드록실기이다.

[0030] 이러한 하이드록실기는 바람직하게 펩티드와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 링커 모이어티에 부착된다. 본 발명의 서브스턴스 P에 공유적으로 결합되는 PEG 분자의 평균 분자량은 대략 3000, 4000, 5000, 8000, 10,000, 20,000, 30,000, 또는 40,000 달톤일 수 있다. PEG 분자는 바람직하게, 3,000 내지 12,000 달톤이다. 더욱 바람직하게는, 4,000 내지 12,000 달톤이다. 가장 바람직하게는 대략 10,000 달톤이다. PEG화 시약은 선형 또는 분지형 분자일 수 있고, 단일로 또는 나란히 직렬로 존재할 수 있다. 본 발명의 PEG화된 서브스턴스 P는 바람직하게 펩티드의 N-terminus 아민 및/또는 서브스턴스 P 서열 중간에 위치한 lysine 잔기의 side chain의 아민기에 PEG가 붙도록 다양한 반응성 모이티를 보유하기 위해 변형될 수 있다. 보다 바람직하게는 직렬형으로 N-terminus 아민 및 서브스턴스 P 서열 중간에 위치한 lysine 잔기의 side chain의 아민기에 PEG가 결합된다.

[0031] 이러한 활성화된 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자는 mPEG-숙시니미딜 숙시네이트, mPEG-숙시니미딜 카보네이트, mPEG-니트로페닐 카보네이트, mPEG-이미데이트, mPEG-숙시닐 글루타레이트 및 mPEG-시아누르 클로라이드를 포함한다. 바람직하게, 메톡시 폴리에틸렌 글리콜 숙시니미딜 숙시네이트는 트리스 용매 하에 서브스턴스 P와 반응하여, PEG화 서브스턴스 P를 제조할 수 있다.

[0032] 본원에서 사용되는 바, "PEG화"라는 용어는 상기 기술된 바와 같은 하나 이상의 PEG 분자를 서브스턴스 P에 공유적으로 부착시키는 것을 의미한다.

[0033] 본 발명은 또한 Di-PEG화 서브스턴스 P의 제조 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명에 따른 제조방법은 바람직하게 하기 단계를 포함한다:

[0035] (a) pH 6.0 내지 pH8.5의 트리스, PBS, 소듐 보레이트 포스페이트 또는 증류수로부터 선택되는 어느 하나의 용매 하에 서브스턴스 P를 용해시키는 단계;

[0036] (b) 상기 (a) 단계의 서브스턴스 P 용액에 메톡시 폴리에틸렌 글리콜 숙시니미딜 숙시네이트를 혼합하여 2 ℃ 내지 8 ℃에서 10 내지 30시간동안 교반하는 단계; 및

[0037] (c) 상기 (b) 단계의 교반액으로부터 Di-PEG화 서브스턴스 P를 분리하는 단계.

[0038] 본 발명에서, 서브스턴스-P는 아미노산 서열 "RPKPQQFFGLM"을 가지며, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 펩티드로써, 시판되는 것을 이용하거나 당 분야에 알려진 방법으로 화학적, 또는 유전공학적으로 합성할 수 있다.

[0039] 본 발명에서, 메톡시 폴리에틸렌 글리콜 숙시니미딜 숙시네이트는 5,000 내지 40,000 Dalton의 분자량을 가지는 것이 바람직하며 당 분야에서 일반적으로 사용되는 것으로 시판되는 것을 사용할 수 있으며, 본 발명의 가장 바람직한 실시양태에 따르면, 10,000 dalton의 분자량을 가지는 메톡시 폴리에틸렌 글리콜 숙시니미딜 숙시네이트

를 사용할 수 있다.

[0040] Di-PEG화 서브스턴스 P의 제조 방법의 제조 방법에 있어서, 상기 (a) 단계는 pH 6.0 내지 pH8.5의 트리스, PBS, 소듐 보레이트 포스페이트 또는 증류수로부터 선택되는 어느 하나의 용매 하에서 서브스턴스 P를 용해시키는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법은 서브스턴스 P의 구조적 변형을 유발하지 않고 활성에 영향을 주지 않는 중성 조건의 pH에서 반응을 수행하는 장점을 가진다.

[0041] 상기 (b) 단계에서 서브스턴스 P 용액에 메톡시 폴리에틸렌 글리콜 숙시니미딜 숙시네이트를 혼합하는 단계는 2 ℃ 내지 8 ℃에서 반응이 수행되어 서브스턴스 P 펩티드의 활성에 변형을 주지 않으며, 10 내지 30시간동안 교반하는 것이 바람직하다.

[0042] 상기 (c) 단계의 교반액으로부터 Di-PEG화 서브스턴스 P를 분리하는 단계는 당업계에 알려진 방법에 따라 분리 가능하며, 예컨대, amicon centrifugal filter, Hydrophobic interaction chromatography (HIC 정제), ion exchange chromatography (IEC, 이온교환 정제), affinity chromatography 등을 이용하여 분리하는 것이 바람직하다.

[0043] 상기 Di-PEG화 서브스턴스-P의 제조는 당 분야의 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시하는 기술수준의 범위에 해당하며, 구체적인 제조방법은 본원 실시예를 참조할 수 있다.

[0044] 본 발명은 또한 PEG화 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 PEG화 서브스턴스 P는 화학식 2 내지 4의 구조를 가질 수 있으며, 보다 바람직하게 화학식 4의 구조를 가진다.

[0045] 본 발명의 약학적 조성물은 서브스턴스-P에 의해 매개되는 질환이나 상태의 개선, 예방 또는 치료를 위하여 사용될 수 있다.

[0046] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 허혈성 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게 본 발명에 있어서 허혈성 질환은 허혈성 궤양, 허혈성 심장 질환, 심근 경색, 협심증, 뇌졸중, 뇌경색, 당뇨성 궤양, 당뇨성 하지 허혈질환 또는 하지 허혈질환으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 가장 바람직하게, 본 발명에 있어서 허혈성 질환은 하지 허혈 질환, 특히 당뇨성 하지 허혈질환이다.

[0047] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 인체 내에서 긴 반감기를 가지며, 줄기세포의 이동을 촉진시키며, 허혈에 따른 세포 괴사를 억제하고, 혈류를 증진시키며, 조직 섬유화를 억제하며, 근육 조직의 비율을 증진시킴으로써 허혈성 질환에 현저한 예방 및 치료 효과를 보인다.

[0048] 본 발명의 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 적절한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명의 약학적 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경구, 설하, 직장, 피부, 피하, 근육, 복강, 정맥, 동맥 등으로 투여될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 목적하는 순도를 갖는 PEG화 서브스턴스 P를 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 저장 또는 투여용으로 제조될 수 있다. 이러한 물질은 사용되는 투여량 및 농도에서 복용자에게 무독성인 것으로, 인산염, 시트르산염, 아세트산염 및 다른 유기산염과 같은 완충제 아스코르브산과 같은 산화방지제 폴리아르기닌, 단백질, 예를 들면 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 저분자량 (약 10개 미만의 잔기를 갖는) 펩티드 폴리비닐피롤리디논과 같은 친수성 중합체 글리신, 글루탐산, 아스파르트산 또는 아르기닌과 같은 아미노산 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 셀룰로오스 또는 그의 유도체를 포함하는 다른 탄수화물, 글루코스, 만노스 또는 덱스트린 EDTA와 같은 킬레이트제 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알콜 나트륨과 같은 카운터 이온 및(또는) 트윈(Tween), 플루로닉스(Pluronics) 또는 폴리에틸렌글리콜과 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.

[0050] 본 발명의 약학적 조성물은 주사용 멸균 조성물의 형태로 당업계의 통상적 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 주사용 멸균 조성물은 비히클, 예를 들면, 물 또는 참깨유, 땅콩유 또는 면실유와 같은 천연 식물성 오일 또는 에틸 올레이트와 같은 합성 지방 비히클 중의 활성 화합물의 용액 또는 현택액을 포함할 수 있다.

[0051] 상기 주사용 멸균 조성물에는 또한 완충제, 방부제, 산화 방지제 등이 당업계에 통상적으로 사용되는 모습에 따라 혼입될 수 있다.

[0052] 본 발명에서 사용되는 PEG화 서브스턴스 P의 "치료적으로 유효한 양"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의에 의해 생각되는 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효

성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.

[0053] 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 일례로, 성인의 경우, 본 발명의 PEG화 서브스턴스-P를 1일 1회 투여시, 0.000005 - 500 mg/체중kg, 바람직하게는 0.00005-50 mg/체중 kg 의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0054] 본 발명의 약학적 조성물의 투여용량은 상기 설명된 질병들을 치료하는 방법에 관련하여 의사에 의해 약물의 효과를 변형시킬 만한 요인들, 예를 들어 나이, 상태, 체중, 성별, 식이, 어떤 감염에 의한 중증도, 투여시점 등의 기타 임상학적인 조건에 따른 요인들에 따라서 결정되어야 한다.

[0055] 본 발명의 약학적 조성물은 단회 또는 계속적 투여가 가능하다. 다만, 초회 투여 후 일정한 순환계 농도를 유지시키기 위해 계속적인 투여를 하는 것이 바람직하다. 효과적인 투여용량과 방법은 당업계에 공지된 일반적 기술들에 기초하여 최적화될 것이며, 반복투여 횟수는 각 환자의 약동학적인 인자들과 투여경로에 따라 달라질 것이다. 상기 투여용량, 용법 및 투여횟수는 또한 투여된 약물의 물리적인 상태, 안정성, 생체내 방출속도, 생체내 제거율 등에 따라 최적화될 수 있다. 또한, 투여경로에 따른 적절한 투여용량이 체중, 체표면적, 장기의 크기에 따라 계산될 수 있다. 적절한 용량은 적절한 용량-반응 자료와 함께 혈중농도의 자료와 함께 판단하여 확정되어야 한다. 최종의 투여법은 의사에 의해 결정될 것이며, 의사는 약물의 비활성, 환자의 중증도, 약물에 대한 환자의 반응정도, 나이, 컨디션, 체중, 성별, 그리고 식이와 기타 다른 임상학적인 요인들을 고려하여 처방해야 한다.

발명의 효과

[0056] 본 발명의 신규한 PEG화 서브스턴스-P는 서브스턴스-P 본래의 활성은 유지하면서 시험관내 및 생체내에서 향상된 안정성을 가지며, 특히, 생체 내에서 증가된 반감기를 가져, 인체 적용을 위한 신규 약학적 조성물로써 현저한 효과를 보인다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 본 발명의 일실시양태에 따른 서브스턴스 P의 페길화를 위한 과정의 모식도를 나타내는 도이다.

도 2는 Gel permeation chromatography (GPC)을 통한 Di-PEG화 서브스턴스 P의 정제 전후의 크로마토그래피 결과를 나타내는 도이다.

도 3은 Di-PEG화 서브스턴스 P의 ^{1}H-NMR 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 PEG화 서브스턴스 P의 MALDI-ToF 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 Di-PEG화 서브스턴스 P의 Digestion 후 MALDI-ToF 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 Di-PEG화 서브스턴스 P의 Digestion 후 MALDI-ToF 결과를 나타내는 도이다.

도 7은 PEG화 서브스턴스 P 혼합물의 Digestion 후 MALDI-ToF 결과를 나타내는 도이다.

도 8은 인간 혈청 내 서브스턴스 P 및 PEG화 서브스턴스 P의 반감기를 분석한 결과를 나타내는 도이다.

도 9는 하지 허혈 마우스 동물 모델을 이용한 PEG화 서브스턴스 P의 치료 효과 확인 실험에 관한 모식도이다.

도 10은 유세포 분석법을 통하여 PEG화 서브스턴스 P의 중간엽줄기세포(MSC)와 혈관내피전구세포(EPC) 이동 촉진 작용을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 11은 비당뇨성 하지 허혈 동물 모델에서 PEG화 서브스턴스 P 투여에 의한 하지 생존율 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 12는 비당뇨성 하지 허혈 동물 모델에서 PEG화 서브스턴스 P 투여에 의한 혈류량 변화를 분석한 결과를 나타내는 도이다.

도 13은 비당뇨성 하지 허혈 동물 모델에서 PEG화 서브스턴스 P 투여에 의한 조직학적 변화를 H&E 염색, Masson's trichrome 염색, 및 CD31(capillary: 모세혈관) 및 SMA(arteriole: 세동맥) 염색을 통해 분석한 결과

와 허혈 조직 내 Fibrosis 면적 분석 결과를 나타내는 도이다.

도 14는 당뇨성 하지 허혈 동물 모델에서 PEG화 서브스턴스 P 투여에 의한 하지 생존율 변화를 분석한 결과를 나타내는 도이다.

도 15는 당뇨성 하지 허혈 동물 모델에서 PEG화 서브스턴스 P 투여에 의한 혈류량 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 16은 당뇨성 하지 허혈 동물 모델에서 괴사 및 정상군의 비율을 통해 PEG화 서브스턴스 P 투여에 의한 혈류량 비율 변화를 분석한 결과를 나타내는 도이다.

도 17은 당뇨성 하지 허혈 동물 모델에서 PEG화 서브스턴스 P 투여에 의한 조직학적 변화를 H&E 염색 및 Masson's trichrome 염색을 통해 분석한 결과와 허혈 조직 내 fibrosis 면적 분석 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 후술하는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되지 않는다.

[0059] **<실시예 1> PEG화 서브스턴스 P의 제조 및 분석**

[0060] **1. PEG화 서브스턴스 P의 제조**

[0061] PEG화 서브스턴스 P 제조를 위한 합성 모식도를 도 1에 나타내었다. 구체적으로, 100 mg 서브스턴스 P (출처: Anygene)를 20 ml Tris buffer (10 mM, pH 7.5)에 녹인 후, 5 equivalent mPEG(10K)-succinimidyl succinate (출처: sunbio)를 서브스턴스 P 용액에 넣어준 뒤 4 ℃에서 overnight으로 교반하여 반응시켰다. 합성물을 Amicon centrifugal filter (10K MWCO)를 이용하여 수 회 반복된 원심분리를 수행함으로써 Di-pegylated 서브스턴스 P (Di-PEG화 서브스턴스 P)를 분리하였다.

[0062] **2. Gel permeation chromatography (GPC) 분석**

[0063] 상기 합성된 PEG화 서브스턴스 P를 Gel permeation chromatography (GPC)를 이용하여 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

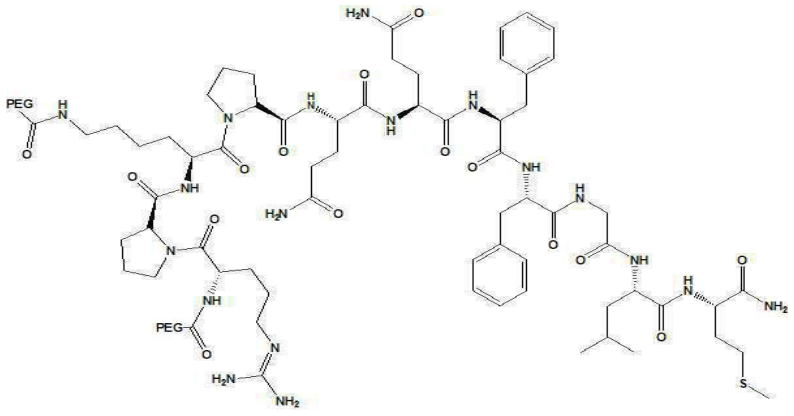
[0064] 정제 전 결과를 도 2의 A에 나타냈으며, 정제 후 결과를 도 2의 B에 나타내었다.

[0065] 정제 전(도 2 A)에 분홍색 선은 PEG화 서브스턴스 P 혼합물을 나타내며, 회색 점선은 서브스턴스 P를 나타낸다.

[0066] 한편, 정제 후 (도 2 B)에 회색 점선 및 회색 실선은 각각 반응에 참여하지 않은 SP 및 PEG을 나타내는 것이며, 빨간선은 Amicon centrifugal filter (10K)를 이용해 혼합물을 분리정제한 후 filter되지 않고 filter 위쪽 부분에 남아있는 시료로 diPEG-SP (Di-PEG화 서브스턴스 P)을 나타낸다.

[0067] 분리된 Di-PEG화 서브스턴스 P는 하기 화학식 4와 같다.

[0068] [화학식 4]

[0069] 

[0070] **3. Di-pegylated 서브스턴스 P의 ^{1}H-NMR 분석**

[0071] 상기에서 분리된 Di-PEG-10K-서브스턴스 P를 ^{1}H-NMR을 통해 확인하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 확인되는 바와 같이, Di-PEG화 서브스턴스 P의 분석 peak가 확인되었으며, 이는 예상되었던 ^{1}H-NMR 값과 동일한 분석 결과를 보여준다.

[0072] **4. MALDI-ToF 분석**

[0073] MALDI-ToF 분석을 통하여, 서브스턴스 P의 PEG화 위치를 확인하였다.

[0074] Digestion 전에 Di-PEG화 서브스턴스 P와 PEG화 서브스턴스 P 혼합물의 MALDI-ToF 분석 결과를 도 4에 나타내었다.

[0075] 도 4의 A는 분리된 Di-PEG화 서브스턴스 P이며, 도 4의 B는 PEG화 서브스턴스 P 혼합물을 보여준다.

[0076] 도 4의 A에서 확인되는 바와 같이, 20,000 근처의 peak는 Dipegylated SP를, 10,000 근처의 peak은 +2 charge가 된 dipegylated SP를 (m/z에서 z가 2)보여준다. 또한, 도 4의 B에서 확인되는 바와 같이, PEG화 서브스턴스 P 혼합물의 경우 Mono-PEG화 SP (11,386 peak), Di-PEG화 SP (22,582 peak), unpurified free PEG (10,505)이 혼합되어 있는 것이 확인되었다.

[0077] 상기 DI-PEG화 SP 및 PEG화 서브스턴스 P혼합물은 Digestion 방법에 의해 PEG화 위치가 확인되었다. 시료는 8 M Urea 와 1: 1의 비율(각 100 ul)로 혼합된 뒤, 200 ul의 1 % 암모니움 바이카보네이트 용매가 첨가되었다. 여기에 10 ug 트립신이 첨가되고, $CaCl_2$를 첨가하여 5 mM $CaCl_2$ 용액이 제조되었다. 상기 용액은 37 ℃에서 3.5 시간동안 반응이 수행되었다. Digestion 위치의 경우, 빗금 친 (N)-R/PK/PQQFFGLM-(C) 2 군데에 해당하며, PEG화 서브스턴스 P의 경우 밑줄 친 하기 (N)-RPKPQQFFGLM-(C) 위치에서 이루어질 것으로 예상되었으며, Digestion에 따른 peptide 단편은 하기 표 1과 같다.

[0078] [표 1] 펩타이드 단편

[0079]

펩타이드 단편	분자량 (Da)
N-RPKPQQFFGLM-C	1347.63
N-R	174.2
N-RPK	399.4
PK	243.31
PKPQQFFGLM-C	1192.44
PQQFFGLM-C	967.15

[0080] 해당 분석 결과를 도 5 내지 도 7에 나타내었다.

[0081] 도 5는 Di-PEG화 서브스턴스 P 분석 결과를 나타내며, Digestion에 따라서 10489 peak(ΔMW : 11,735-10,489 = 1,246)이 새로 확인되었다. 이는 Digestion 전후의 분자량 차이를 통해 PEG+N-R/PKPQQFFGLM-C로 나눠진 것이라 볼 수 있으며, N-terminus가 pegylation됨을 보여준다.

[0082] 도 6 역시 Di-PEG화 서브스턴스 P 분석 결과를 나타내며, 1192 peak(PKPQQFFGLM-C, 1192.44)가 확인되지 않았다. 이는, PKQQFFGLM-C 쪽에 PEG이 붙어있기 때문(다시 말하면 PEG이 붙어서 MW가 증가했기 때문)이며, 이에 따라, 해당 위치에서의 PEG화가 이루어졌음을 보여준다.

[0083] 즉, 상기 도 5 및 도 6의 결과를 통해, 본 발명에 따른 화학식 4의 Di-PEG화 서브스턴스 P의 PEG화 위치가 확인되었다.

[0084] 도 7은 PEG화 서브스턴스 혼합물의 분석 결과를 나타내며, PKQQFFGLM-C 만큼의 MW(ΔMW : 11386-10452 = 934)이 떨어진 것으로 보아 N-RPK쪽에 PEG화가 이루어졌음을 확인하였다. 즉, 화학식 2 또는 3의 mono-PEG화 서브스턴스 P 및 화학식 4의 Di-PEG화 서브스턴스 P가 확인되었다.

[0085] **<실시예 2> 인간 혈청 내에서 서브스턴스 P와 PEG화 서브스턴스 P의 반감기** 분석

[0086] R&D Biosystems 사의 서브스턴스 P 정량 분석용 parameter ELISA kit를 이용해 인간 혈청 내에서의 서브스턴스 P와 분리된 Di-PEG화 서브스턴스 P의 반감기를 분석하였다.

[0087] 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에 나타낸 바와 같이, 서브스턴스 P는 37 ℃의 인간 혈청 내에서 10~20분 안에 전부 분해되어 사라지는 것을 확인하였다. 반면, PEG화 서브스턴스 P는 PEG의 효과로 인해 안정성이 증진되어 반감기가 크게 증가되었으며, 이에 따라 37℃ 조건의 혈청 내에서 48시간까지 안정한 형태를 유지하고 있음

을 확인하였다.

[0088] 상기 결과로부터, 본원 발명에 따른 PEG화 서브스턴스 P가 시험관 내를 비롯하여 생체 내에서 높은 안정성을 가짐을 확인하였다.

[0089] **<실시예 3> 비당뇨성 하지 허혈 모델에서의 PEG화 서브스턴스 P의 효과 확인**

[0090] **1. 비당뇨성 하지 허혈 동물 모델의 제조**

[0091] 하지 허혈 동물 모델 제조를 위한 모식도는 도 9에 나타내었다.

[0092] 마우스 (ICR, male, 5w)를 마취한 후, 수술 부위의 털을 제거하고 70% 에탄올과 베타딘을 이용하여 수술부위를 3회 소독하였다. 그 후, 왼쪽 뒷다리의 대퇴부 안쪽 피부를 절개하고 대퇴동맥 (femoral artery)을 노출시켰다. 6-0 prolene 봉합사를 이용하여 대퇴동맥의 proximal, distal 양 부분을 2회 묶은 뒤, 묶인 부위 사이의 femoral artery를 microforcep 또는 fine-point tweezers를 이용해 제거하였다. 절개된 피부를 6-0 prolene 봉합사로 봉합한 후 saline, 서브스턴스 P(SP), 또는 PEG화 서브스턴스 P 혼합물 (Di-PEG-SP, mono-PEG-SP 혼합물로, 즉, 화학식 2 내지 4의 화합물)을 2주간 주 3회 정맥 주사(용량: 5 nmole per mouse kg)하였다.

[0093] 그 후, 4주간의 회복 관찰을 통해 실험 결과를 분석하였다.

[0094] **2. 유세포 분석법을 통한 PEG화 서브스턴스 P의 효과 확인**

[0095] 서브스턴스 P의 줄기세포 이동 촉진 작용이 PEG화 서브스턴스 P 주입 시, 더 개선 된 작용을 보이는지 확인하기 위하여 유세포 분석법을 통해 실험동물의 혈중 단핵구세포 중 중간엽줄기세포(MSC)와 혈관내피전구세포(EPC)의 비율을 조사하였다. 실험이 종료된 하지허혈질환 마우스의 전혈을 채취한 후, 피콜 구배 원심분리를 이용하여 적혈구를 제거하고 단핵구 세포를 분리하였고, 1 % bovine serum albumin이 포함된 PBS 완충액에 재현탁시켰다. 전체 단핵구 세포 중 중간엽줄기세포(MSC)의 비율을 조사하기 위해 중간엽줄기세포(MSC) 마커, 항-CD-29 (Miltenyi Biotec Inc.; Cat #130-096-309, 1:10), 항-CD-105 (Miltenyi Biotec Inc.; Cat #130-092-930, 1:10)와 중간엽줄기세포(MSC)에서는 발현되지 않는 항-CD-45 (Miltenyi Biotec Inc.; Cat #130-091-610, 1:10) 항체를 처리하여 중간엽줄기세포(MSC)를 표지하였으며, 혈관내피전구세포(EPC)의 비율을 조사하기 위해 혈관내피전구세포(EPC) 마커, 항-CD-31 (Miltenyi Biotec Inc.; Cat #130-097-422, 1:10), 항-CD-309 (Miltenyi Biotec Inc.; Cat #130-096-405, 1:10), 및 항-CD-133 (BioLegend Inc.; Cat #141204) 항체를 처리하여 혈관내피전구세포(EPC)를 표지하였다. 표지된 세포 수를 FACS Calibur (BD Bioscience)를 이용하여 측정하고 CELLQuest software (Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.

[0096] 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0097] 비당뇨성 하지 허혈 질환 마우스에 서브스턴스 P(SP)를 주입한 후 1일차에 혈중 중간엽줄기세포(MSC)와 혈관내피전구세포(EPC)의 수가 증가하였고, PEG화 서브스턴스 P(PEG-SP) 주입 시에도 서브스턴스 P와 같은 결과를 보였다. 한편, 이 작용은 서브스턴스 P에 대한 antagonist 처리(Ant+SP)에 의해 감소하였다.

[0098] 즉, PEG화에 의한 서브스턴스 P의 개질을 통해 물질의 안정성이 증가되었고 그 활성 측면에서 서브스턴스 P와 동등한 수준의 활성이 나타내는 것이 확인되었다. 이는 안정성 효과를 함께 고려 할 때, 본 발명에 따른 PEG화 서브스턴스 P가 서브스턴스 P와 대비하여 우수한 인체 내 약리적 활성을 보일 수 있음을 확인시켜준다.

[0099] **3. 비당뇨성 하지 허혈 질환 마우스 모델에서의 하지 생존율 분석**

[0100] 비당뇨성 하지 허혈 질환 마우스 모델에서 하지 생존율을 분석하여 그 결과를 도 11에 나타내었다. 치료를 받지 않은 비당뇨성 하지허혈 마우스 모델(PBS 그룹)이 40% 정도의 하지 절단율을 보이며 괴사도 거의 모든 마우스에서 일어나는 것과 달리, 서브스턴스 P나 PEG화 서브스턴스 P를 주사한 치료군의 다수에서 다리가 생존하거나, 괴사만 일부 일어나는 정도로 유지됨을 확인되었다. 특히, PEG화 서브스턴스 P 치료군의 경우는 하지가 모두 보존되고 극히 일부의 세포 괴사만을 보여, 서브스턴스 P 치료군보다 현저한 치료 효과가 있음이 확인되었다. 즉, PEG화 서브스턴스 P의 증진된 반감기로 인해 체내 안정성이 향상되어 서브스턴스 P보다 더 높은 치료 효능이 있음을 확인하였다.

[0101] **4. 비당뇨성 하지 허혈 질환 마우스 모델에서의 혈류 개통 정도 확인**

[0102] Doppler analysis를 통해 4주간의 혈류량 변화를 관찰하였다.

[0103] 구체적으로, 하지허혈모델 제작 직후를 포함하여 2, 7, 14, 21, 및 28일에 각 실험동물을 마취하여 High

resolution laser doppler imager (출처: Moor Instruments)를 이용해 혈류량의 변화 정도를 측정하였다. 이때 허혈을 유발한 하지와 허혈을 유발하지 않은 정상 하지를 동시에 측정하여 그 비율을 회복된 혈류량으로 계산하였다.

[0104] 그 결과를 도 12에 나타내었다. 대조군 (PBS 그룹 및 antagonist + 서브스턴스 P 그룹)의 경우 혈류량 회복 정도가 매우 낮은 수준임을 확인하였다. PEG화 서브스턴스 P 및 서브스턴스 P 치료 그룹에서의 혈류량이 크게 개선되는 것을 확인하였으며, 특히 PEG화 서브스턴스 P의 경우 허혈 질환 유발 일주일 이내에 60% 이상의 혈류가 회복되는 것을 확인하여, PEG화 서브스턴스 P의 증진된 반감기로 인해 체내 안정성이 향상되어 서브스턴스 P보다 더 빠르게 혈류량을 회복시킨 것을 확인하였다.

[0105] **5. 비당뇨성 하지 허혈 질환 마우스 모델에서의 조직학적 형상 분석 확인**

[0106] 비당뇨성 하지 허혈 모델 제작 4주 후, 조직학 분석을 통해 혈관이 제거된 허혈 근육 조직을 분석하였다. 조직학 분석을 위해 치료 4주 후 허혈 부위의 근육을 수거하여 hematoxylin & eosin (H&E) 염색과 Masson's trichrome 염색을 수행하였다.

[0107] H&E 염색을 위하여, 조직을 4 μm 두께로 파라핀 섹션한 후 xylene에서 파라핀을 제거하였다. 그 후 알코올을 통해 hydration 시켰다. Hematoxyline (Weigert, sigma)을 5분 동안 처리한 뒤 eosin Y로 1분간 처리하였다. 염색된 슬라이드를 95% 알코올에서 1회 워싱 한 뒤 dehydration을 거쳐 마운팅하였다.

[0108] Masson's trichrome 염색을 위하여, 파라핀 섹션된 샘플을 xylene과 알콜에서deparaffination, hydration, washing. Bouin soln을 샘플에 처리하고 56 ℃에서, 1 시간동안 두었다. 이차 증류수로 washing (노란색이 없어질 때까지)한 뒤. Weigert iron hematoxylin를 상온에서 10분간 처리하였다. 다시 이차증류수로 washing 10분을 진행한 후, Biebrich Scarlet-acid fuchsin soln을 상온에서 10분간 처리하였다. 이차 증류수로 다시 washing을 10분간 진행 후, 5% phosphotungstic acid를 10분간 처리하였다. 다음으로, aniline blue를 5 분간 처리하였다. 다시 이차 증류수로 washing을 10분간 진행한 후 1% acetic acid를 3분간 처리하고 다시 한번 워싱 단계를 거쳤다. 마지막으로 알코올을 거쳐 dehydration & mounting을 수행하였다.

[0109] 실험 결과를 도 13에 나타내었다.

[0110] 허혈 조직 내 근육 괴사 정도를 확인할 수 있는 H&E 염색을 통해 대조군(PBS 주입군과 antagonist + 서브스턴스 P 주입군)에서는 근육 조직의 괴사가 광범위하게 일어나고 있음이 관찰되었다. 이와는 달리 PEG화 서브스턴스 P 치료군에서는 근육의 괴사가 가장 크게 감소하였으며, 근육조직의 형태가 정상 다리근육 조직에서의 형태와 비슷함을 확인하였다.

[0111] 또한, 근육조직의 섬유화 정도를 확인할 수 있는 Masson's trichrome 염색을 통해 조직 내 섬유화 정도를 확인하고 이를 정량화한 결과를 살펴보면, 조직 내 섬유화가 많이 일어난 대조군(PBS 주입군과 antagonist + SP 주입군)과는 달리 서브스턴스 P(SP) 및 PEG화 서브스턴스 P (PEG-SP) 치료군에서는 섬유화 정도가 현저히 낮으며 H&E 염색에서의 결과와 마찬가지로 근육다발의 형태가 정상 다리근육 조직에서의 형태와 비슷함을 확인하였다. 특히, PEG화 서브스턴스 P 투여 그룹의 경우 서브스턴스 P 그룹보다 유의미하게 낮은 섬유화 정도를 보여주었으며 이는 PEG화 서브스턴스 P의 향상된 치료 효능을 보여준다.

[0112] 또한, 모세혈관(capillary) 염색(CD31)과 세동맥(arteriole) 염색(smooth muscle alpha-actin; SMA)의 co-staining을 통해 허혈 근육 부위의 조직을 염색한 결과, 비치료군(PBS 그룹 및 antagonist + 서브스턴스 P 그룹)과 대비하여, 서브스턴스 P(SP) 및 PEG화 서브스턴스 P (PEG-SP) 치료군에서 현저히 증가한 혈관 재생을 확인할 수 있었다. 특히, PEG화 서브스턴스 P를 투여한 그룹에서 근육의 괴사가 가장 크게 감소하였으며 섬유화 정도가 가장 낮으며 근육다발의 형태가 정상 다리근육 조직에서의 형태와 비슷한 것이 확인되었다. 즉, CD31 및 SMA 염색을 수행한 결과에서 확인되는 바와 같이, PEG-SP 처리에 따라 혈관 재생 효과가 현저히 높아졌음이 확인되었다.

[0113] **<실시예 4> 당뇨성 하지 허혈 모델에서의 PEG화 서브스턴스 P의 효과 확인**

[0114] **1. 당뇨성 하지 허혈 모델의 제조**

[0115] 당뇨성 하지 허혈 모델을 제조하기 위하여, Streptozotocin (Sigma)을 주 2회 복강 투여함 (투여량: 100 mg/kg mouse)으로써, 당뇨를 유발하였다. Streptozotocin 주사 2주 후 혈당량 확인을 통해 혈당이 500 mg/dL 이상인 쥐만을 선별하여 당뇨성 하지허혈 질환 마우스 모델 제작에 사용하였다.

[0116] 상기 마우스 (ICR, male, 5w)를 마취한 후, 수술 부위의 털을 제거하고 70% 에탄올과 베타딘을 이용하여 수술부위를 3회 소독하였다. 그 후, 왼쪽 뒷다리의 대퇴부 안쪽 피부를 절개하고 대퇴동맥 (femoral artery)을 노출시켰다. 6-0 prolene 봉합사를 이용하여 대퇴동맥의 proximal, distal 양 부분을 2회 묶은 뒤, 묶인 부위 사이의 femoral artery를 microforcep 또는 fine-point tweezers를 이용해 제거하였다. 절개된 피부를 6-0 prolene 봉합사로 봉합한 후 saline, 서브스턴스 P(SP), 또는 Di-PEG화 서브스턴스 P(Di-PEG-SP)를 2주간 주 3회 정맥 주사(용량: 5 nmole per mouse kg)하였다. 그 후, 4주간의 회복 관찰을 통해 실험 결과를 분석하였다.

[0117] **2. 당뇨성 하지허혈 질환 마우스 모델에서의 하지 생존율 분석**

[0118] 상기 실시예 3의 4.와 동일한 방식으로, 앞서 제조된 당뇨성 하지 허혈 질환 마우스 모델에서 하지 생존율을 분석하여 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[0119] 도 14에 나타낸 바와 같이, 치료를 받지 않은 비당뇨성 하지 허혈 질환 마우스 모델(PBS 그룹)이 90%에 가까운 하지 절단과 괴사율을 보임과 달리, 서브스턴스 P나 PEG화 서브스턴스 P를 주사한 치료군에서는 60% 이상의 하지허혈 마우스에서 허혈 하지가 보존된 것이 확인되었다. 특히, PEG화 서브스턴스 P 치료군의 경우는 80% 정도의 모델에서 정상 하지 형태를 유지하여, PEG화 서브스턴스 P의 치료 효능이 서브스턴스 P와 대비하여 현저한 것을 확인하였다.

[0120] **3. 당뇨성 하지 허혈 질환 마우스 모델에서의 혈류 개통 정도 확인**

[0121] 상기 실시예 3의 4.와 동일한 방식으로, 혈류 개통 정도를 확인하여 그 결과를 도 15 및 도 16에 나타내었다.

[0122] 도 15은 시간 경과에 따른 혈류량 변화를 마우스에서 확인한 결과를 나타낸다. 실험 결과, PEG화 서브스턴스 P를 처리한 실험군에서 혈류량이 가장 높게 나타나는 것이 확인되었다.

[0123] 또한, 도 15의 실험 결과를 정량화하여 도 16에 나타내었다. 도 16에서도 확인되는 바와 같이, PEG화 서브스턴스 P에 의한 효과가 서브스턴스 P 단독과 대비하여서도 현저히 높은 것이 확인되었다. 즉, 서브스턴스 P의 Pegylation에 의한 증대된 치료 효과를 확인하였다.

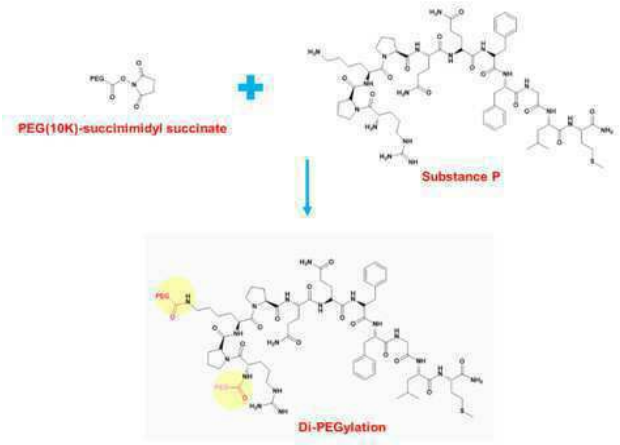
[0124] **4. 당뇨성 하지 허혈 질환 마우스 모델에서의 조직학적 형상 분석 확인**

[0125] 실시예 3의 5에서와 같이 hematoxylin & eosin (H&E) 염색과 Masson's trichrome 염색을 통해 조직학적 형상 분석을 수행하여, 그 결과를 도 17에 나타내었다.

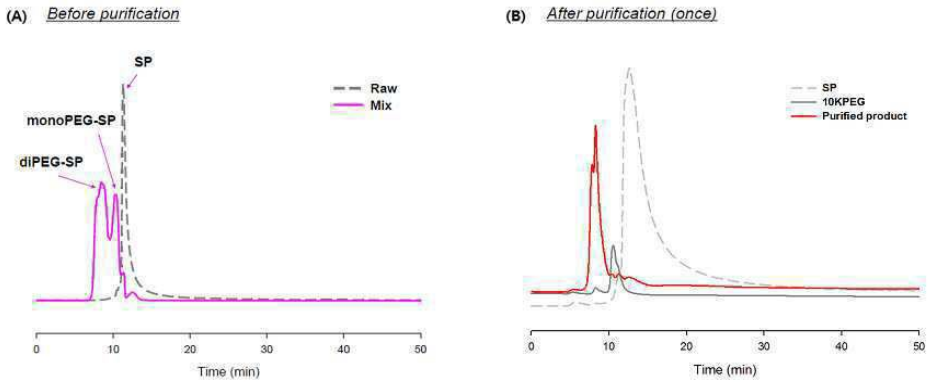
[0126] 상기 결과들로부터, PEG화 서브스턴스 P가 증가된 시험관 내 및/또는 생체 내 안정성 향상을 통해, 인체에서 더 높은 치료 효능을 가질 수 있음을 확인하였다.

도면

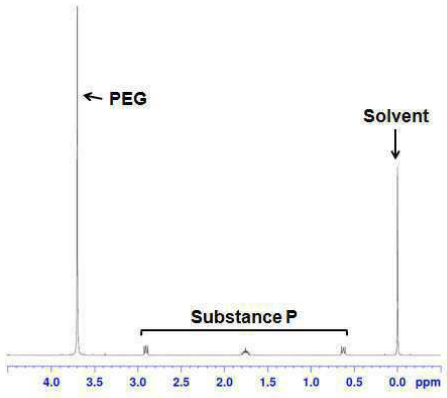
도면1



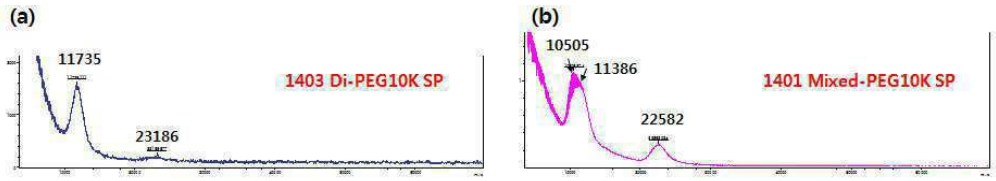
도면2



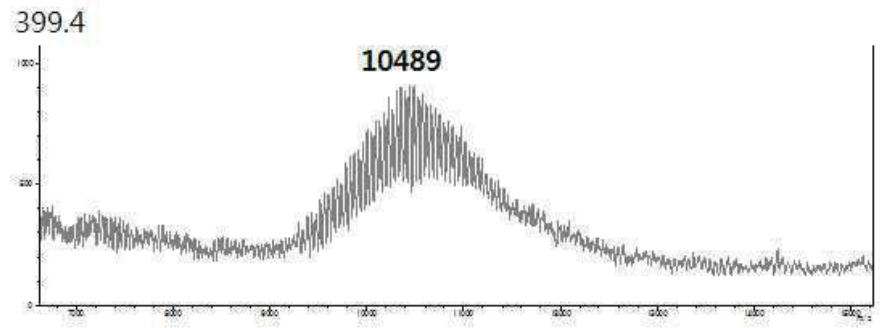
도면3



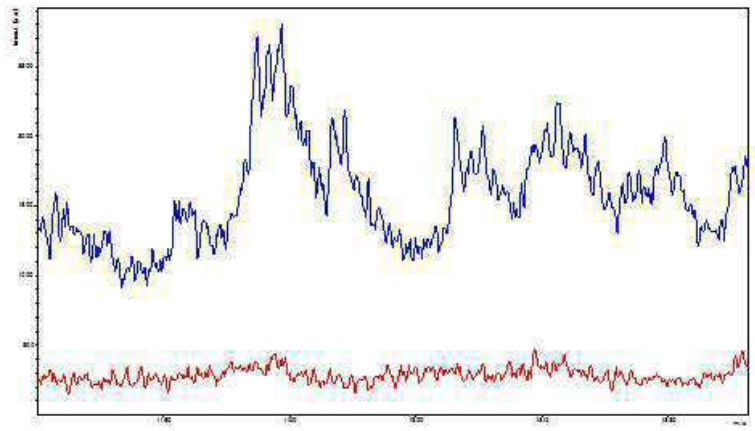
도면4



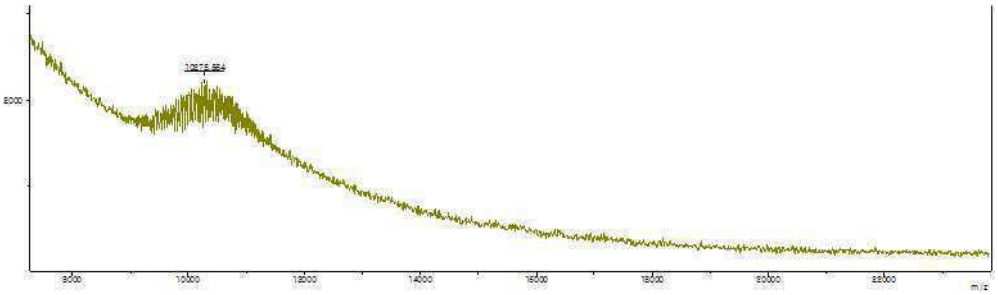
도면5



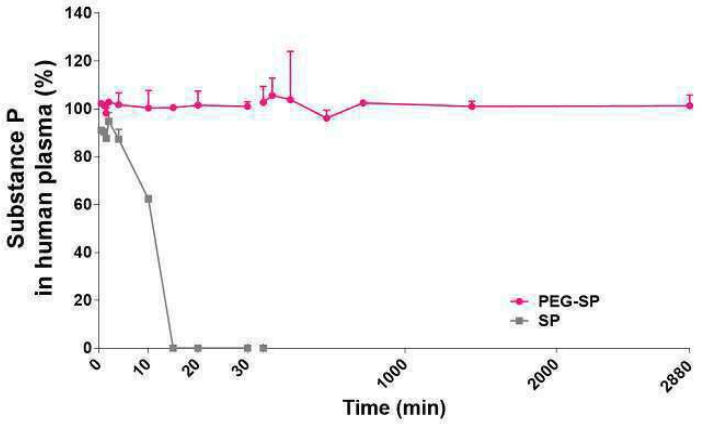
도면6



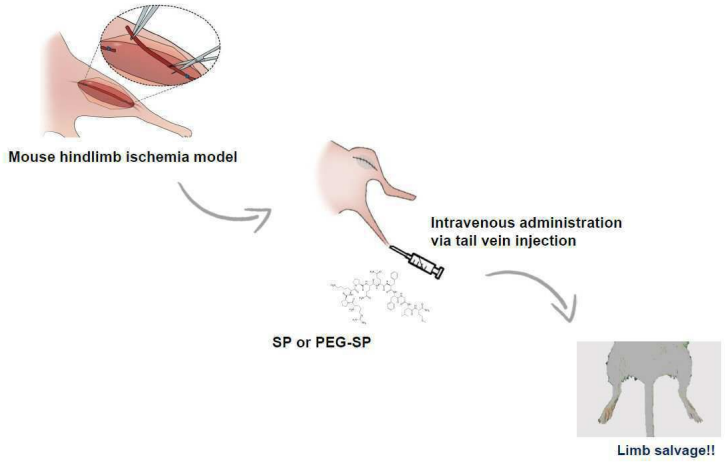
도면7



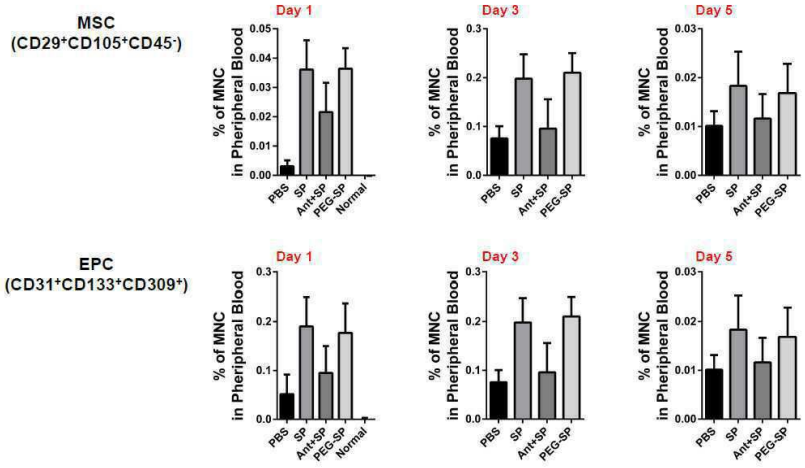
도면8


Substance P
in human plasma (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
PEG-SP
SP
0
10
20
30
1000
2000
2880
Time (min)

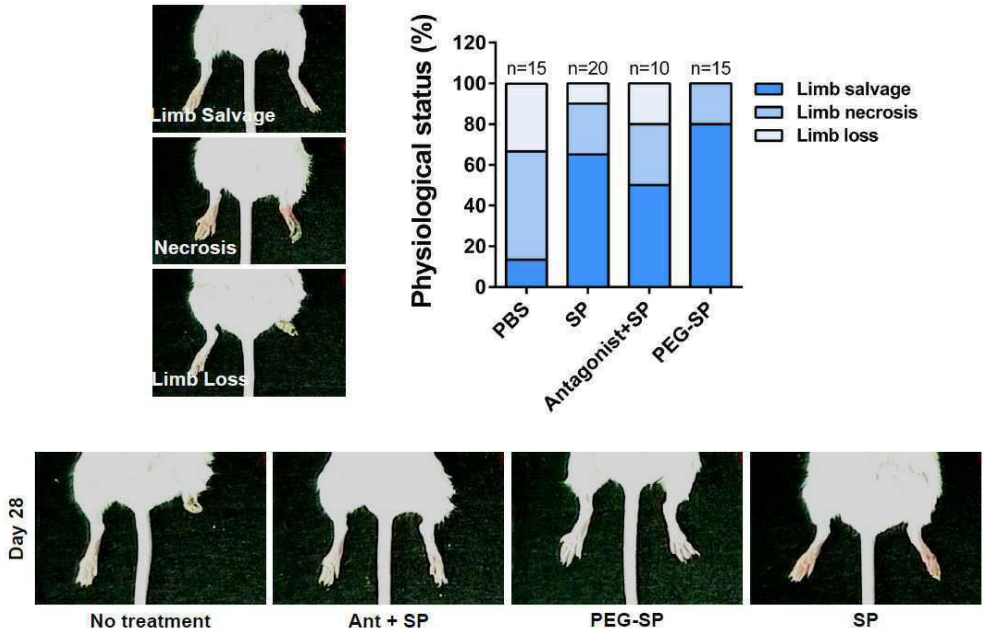
도면9


Mouse hindlimb ischemia model
Intravenous administration
via tail vein injection
SP or PEG-SP
Limb salvage!!

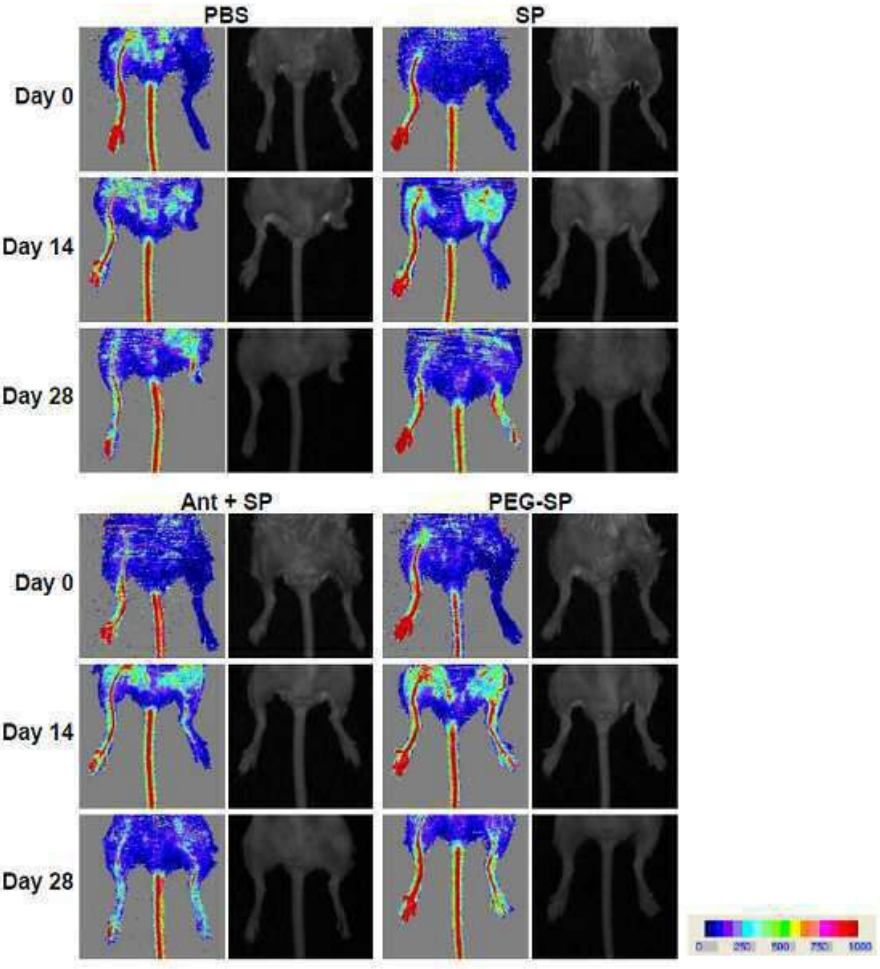
도면10


MSC
(CD29+CD105+CD45-)
EPC
(CD31+CD133+CD309+)
Day 1
Day 3
Day 5
% of MNC
in Pheripheral Blood
PBS
SP
Ant+SP
PEG-SP
Normal

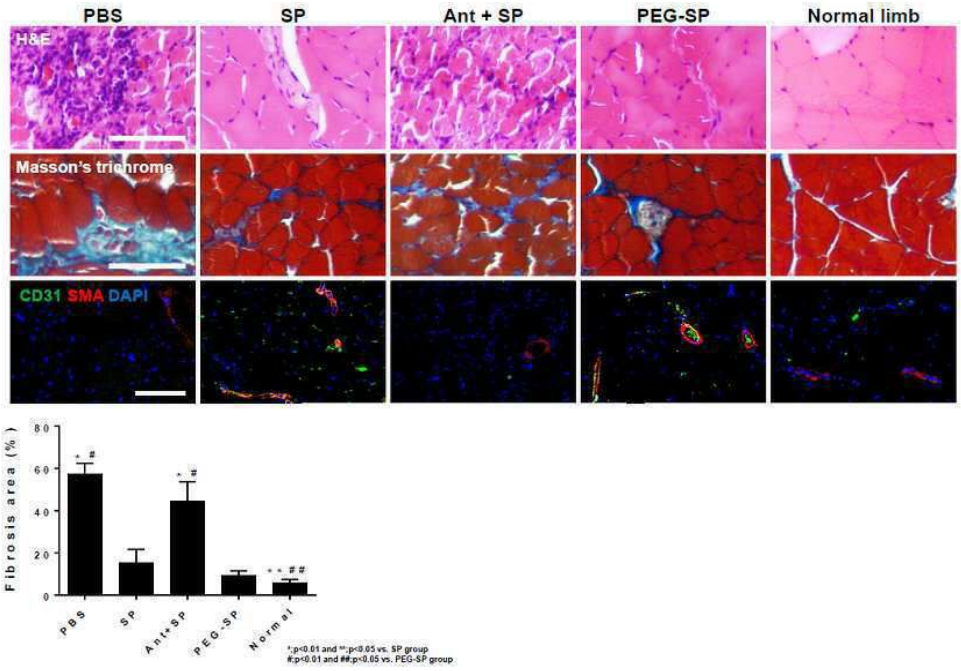
도면11


Limb Salvage
Necrosis
Limb Loss
Physiological status (%)
120
100
80
60
40
20
0
n=15
n=20
n=10
n=15
PBS
SP
Antagonist+SP
PEG-SP
Limb salvage
Limb necrosis
Limb loss
Day 28
No treatment
Ant + SP
PEG-SP
SP

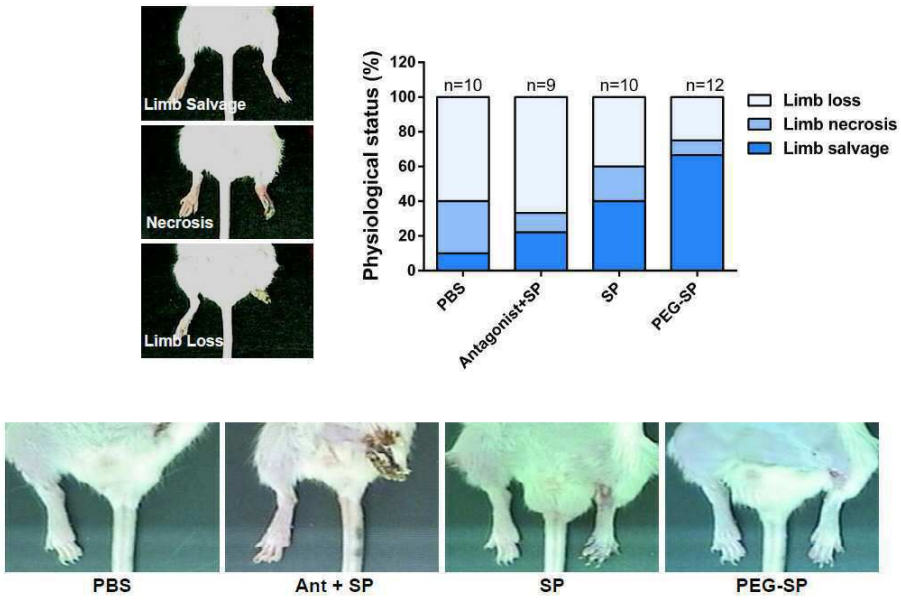
도면12


PBS
SP
Day 0
Day 14
Day 28
Ant + SP
PEG-SP
Day 0
Day 14
Day 28

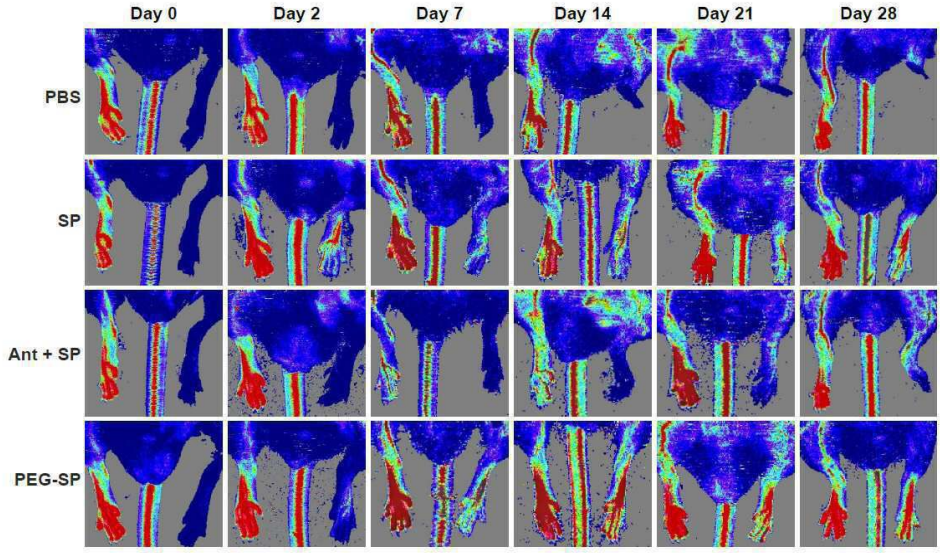
도면13


PBS
SP
Ant + SP
PEG-SP
Normal limb
H&E
Masson's trichrome
CD31 SMA DAPI
Fibrosis area (%)
80
60
40
20
0
PBS
SP
Ant+SP
PEG-SP
Normal
*,p<0.01 and **,p<0.05 vs. SP group
#,p<0.01 and ##,p<0.05 vs. PEG-SP group

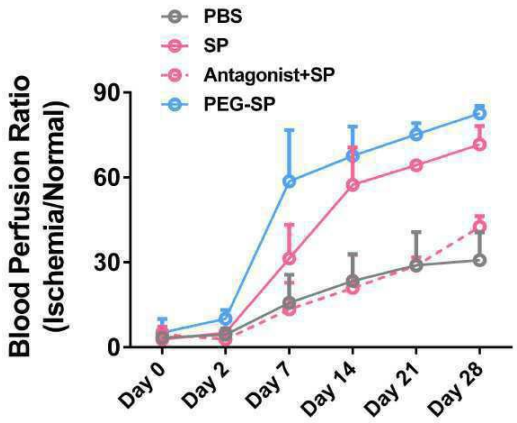
도면14


Limb Salvage
Necrosis
Limb Loss
Physiological status (%)
120
100
80
60
40
20
0
n=10
n=9
n=10
n=12
Limb loss
Limb necrosis
Limb salvage
PBS
Antagonist+SP
SP
PEG-SP
PBS
Ant + SP
SP
PEG-SP

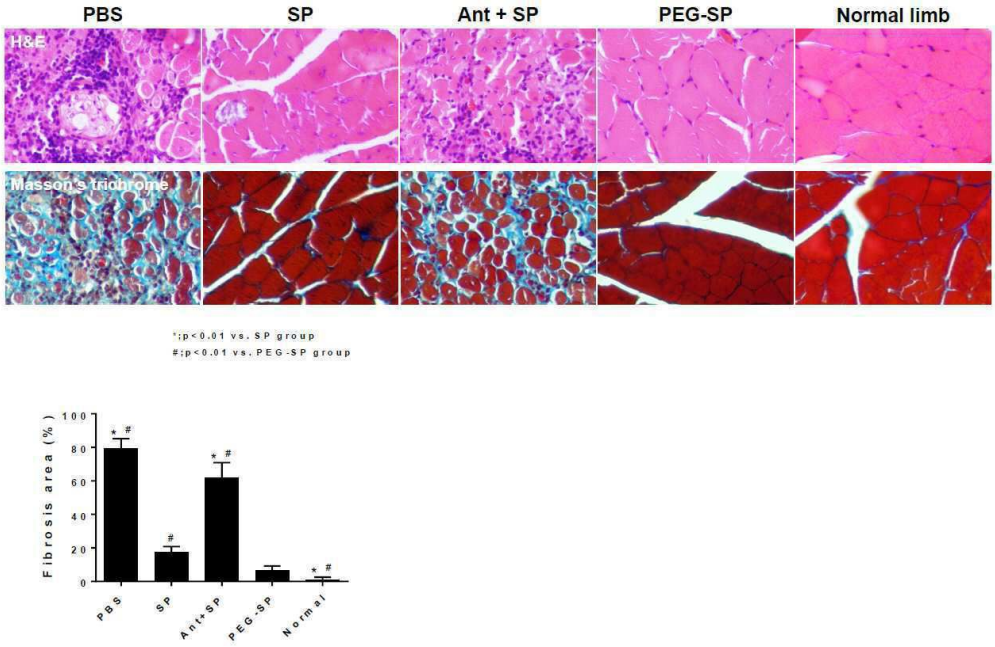
도면15


Day 0
Day 2
Day 7
Day 14
Day 21
Day 28
PBS
SP
Ant + SP
PEG-SP

도면16


PBS
SP
Antagonist+SP
PEG-SP
Blood Perfusion Ratio
(Ischemia/Normal)
90
60
30
0
Day 0
Day 2
Day 7
Day 14
Day 21
Day 28

도면17


PBS
SP
Ant + SP
PEG-SP
Normal limb
H&E
Masson's trichrome
*:p<0.01 vs. SP group
#:p<0.01 vs. PEG-SP group
Fibrosis area (%)
100
80
60
40
20
0
PBS
SP
Ant+SP
PEG-SP
Normal