

명세서

발명의 명칭: 섬유화증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 섬유화증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

배경기술

- [2] 섬유화(纖維化, Fibrosis)란 어떠한 이유로 장기의 일부가 굳는 현상을 말하며 폐섬유화나 간섬유화가 대표적인 병으로 꼽힌다. 폐섬유화 같은 경우 방사능의 피폭이나 폐의 물이 참으로 인해서 폐가 굳는 경우가 거의 지배적이나 일부 사람에게 한해서는 폐섬유화증이 일어날 수 있다. 섬유화증세는 현재까지 완치 방법이 거의 없으며 치료 방법은 개발 및 연구 중이다. 섬유화의 종류로는 간질성 폐질환(Interstitial lung disease, ILD), 피부경화증(Scleroderma), 켈로이드(Keloid), 비대성 흉터(Hypertrophic scar), 비알코올성 지방간(Non-alcoholic Fatty Liver Disease), 원발성 경화성 담관염(Primary sclerosing cholangitis, PSC), 원발성 담즙성 담관염(primary biliary cholangitis, PBC), 당뇨병망막병증(diabetic retinopathy), 황반변성(Age-related Macular Degeneration, AMD), 비후성 심근병증(hypertrophic cardiomyopathy), 심근경색(myocardial infarction), 근 위축증(Muscular Dystrophy), 당뇨병성 신장 질환(Diabetic kidney disease), 초점성 분절성 사구체 경화증(focal segmental glomerulosclerosis; FSGS), 염증성장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)이 있으며, 간질성폐질환에는 특발성폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), 전신경화증 연관 간질성폐질환(systemic sclerosis associated interstitial lung disease, SSc-ILD), 진행성 만성 섬유성 간질성폐질환(chronic fibrosing interstitial lung diseases with a progressive phenotype, PF-ILD)이 있다.
- [3]
- [4] 특발성폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)은 만성적으로 진행되는 간질성 폐질환의 하나로 희귀 질환에 해당하며, 병의 경과가 좋지 않고 증명된 치료 방법이 없는 질환으로 알려져 있다. 현재까지 원인으로 뚜렷하게 입증된 것은 없으며, 진단 후 5년 생존율은 43%, 10년 생존율은 15% 정도로 좋지 않으며, 비록 많은 연구가 시행되고 있지만 현재까지 생존율을 향상시킨 치료 방법이 없다. 비특이성 간질성 폐렴(NSIP), 특발성 기질화 폐렴(COP) 등의 다른 간질성 폐질환이 적절히 치료되면 비교적 경과가 좋은 것을 고려해 볼 때, 간질성 폐질환 중에서도 병의 경과가 안 좋은 병이라 할 수 있다. 가장 흔한 사망 원인은 호흡부전(39%)과 심장질환(27%)이며, 그 외에 폐암, 폐 색전증, 폐렴 등이 있다. 고령이거나 남성인 경우, 혹은 진단 당시 폐 기능이 안 좋거나 조직검사에서 섬유세포집단(fibroblastic foci) 등이 많을 경우 예후가 더 좋지 않다.

- [5]
- [6] 특발성폐섬유화증의 치료 방법은 비특이성 간질성 폐렴(NSIP)과 유사하게 스테로이드와 세포독성 약물(cytotoxic drug)을 사용하기도 하며, 최근에는 항섬유화제(anti-fibrotic agent)가 주종을 이루며 여러 시도가 되고 있다. 현재 특발성폐섬유화증에 대하여 허가된 약물로는 피르페니돈(Pirfenidone) 및 닌테다닙(Nintedanib)이 존재하며, 이러한 약물들은 완치제가 아닌 폐섬유화를 지연시키며 증상을 완화시키는 역할을 한다. 따라서, 환자들의 삶의 질을 향상시킬 수 있는 더욱 효과적인 약물에 대한 필요가 있었다.
- [7]
- [8] 전신경화증 연관 간질성 폐질환(SSc-ILD)은 전신경화증(Systemic Sclerosis; SSc) 환자 중 간질성폐질환(ILD)을 합병증으로 가지고 있는 질환이며, 폐기능 저하는 전신경화증의 주된 사망 원인이다. 미국에서 해당 질환으로 허가 받은 치료제로 폐기능 저하 감소 효과를 확인한 닌테다닙 및 토실리주맙(Tocilizumab)이 존재하지만, 특발성폐섬유증과 마찬가지로 환자들의 삶의 질을 향상시킬 수 있는 더욱 효과적인 약물에 대한 필요가 존재한다.
- [9]
- [10] 진행성 만성 섬유성 간질성폐질환(chronic fibrosing interstitial lung diseases with a progressive phenotype, PF-ILD)은 특발성폐섬유화증을 제외한 다양한 진행성 섬유화 간질성폐질환을 뜻하며 자가면역성 간질성 폐질환, 특발성 간질성 폐렴 등이 속해 있다. 닌테다닙은 다양한 섬유화 폐질환 환자에 있어 폐기능 저하 감소 효과를 확인하여 미국에서 치료제로 허가받았다. 섬유화 간질성폐질환들은 폐 섬유화, 폐 기능 감소, 삶의 질 악화 등 진행성 표현형이 발현될 수 있기 때문에, 분류 및 기저질환과 관계없이 특정 간질성폐질환에서 폐기능 저하 감소 효과를 입증한 경우 타 간질성폐질환에서도 폐기능 저하 감소 효과를 기대할 수 있다.
- [11]
- [12] 한편, PRS(prolyl-tRNA synthetase)는 아미노아실-tRNA 합성효소(aminoacyl-tRNA synthetase; ARS) 패밀리에 속한 효소군 중의 하나로서, 단백질 합성을 위해 아미노산을 활성화시키는 역할을 한다. 즉, ARS는 아미노아실 아데닐레이트(AA-AMP)를 형성한 후 활성화된 아미노산을 대응하는 tRNA의 3' 말단으로 이동시키는 역할(translational function)을 수행한다. ARS는 단백질 합성에 핵심적인 역할을 수행하기 때문에, ARS 저해는 모든 세포의 성장과 성장을 억제한다. 이에 따라, ARS는 항생제나 세포 과발현을 억제해야 하는 질병 치료제의 유망한 타겟으로 인식되고 있다(Nature, 2013, 494: 121-125).
- [13]
- [14] PRS는 EPRS(Glutamyl-Prolyl-tRNA Synthetase) 형태의 다중합성효소 복합체(multisynthetase complex, MSC) 상태로 존재하고 기능한다. 특히, 다양한

MSC 중에서도 EPRS는 혈관신생(angiogenesis)의 핵심인자인 VEGF A(vascular endothelial growth factor A)의 생성을 억제하는 전사침묵자(translational silencer)로서 기능을 하며, 또한 다양한 고형암과 밀접한 관련성이 있다고 보고되었다(Nat. Rev. Cancer, 2011, 11, 708-718).

[15]

[16] 이에 본 발명자들은 섬유화증의 예방 또는 치료 방법을 예의 연구한 결과, 후술할 특정 PRS 저해제가 특정 치료 용법 용량으로 사용되는 경우 효과적인 섬유화증의 예방 또는 치료가 가능함을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[17] 본 발명은 섬유화증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있는 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

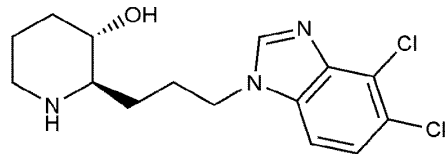
과제 해결 수단

[18] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기와 같은 섬유화증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[19] 1일 2회(BID) 100 내지 150 mg 투여를 위한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 섬유화증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[20] [화학식 1]

[21]



[22]

[23] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은, 한국특허 등록번호 제10-2084772호에 기재된 화합물로서, 구체적으로 해당 명세서의 실시예 40으로 기재된 물질이다. 상기 물질은 PRS 저해제로서 섬유화증의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[24]

[25] 특히, 본 발명과 같이 1일 2회(BID) 100 내지 150 mg 투여시 효과적인 섬유화증의 예방 또는 치료가 가능하다. 상기의 용법 용량은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 섬유화증의 예방 또는 치료 효과를 높이면서, 동시에 잠재적인 리스크를 최대한 방지할 수 있는 용법 용량이다. 또한, 상기의 용법 용량에 의하여, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 투여 후 혈장 약물 농도-시간 곡선 하 면적(AUC_{inf}), 즉 체내 노출이 섬유화증의 예방 또는 치료 효과에 최적의 결과를 나타낼 수 있다.

[26]

[27] 한편, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 각각 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다. 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄술폰산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산, 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은 염산염이다.

[28]

[29] 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 결정 형태로 제조될 경우, 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다. 본 발명에서는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 화학양론적 수화물뿐만 아니라 다양한 양의 물을 함유하는 화합물이 포함될 수 있다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 용매화물은 화학양론적 용매화물 및 비화학양론적 용매화물 모두를 포함한다.

[30]

[31] 한편, 상기 섬유화증의 예로는 간질성 폐질환 (Interstitial lung disease, ILD), 피부경화증 (Scleroderma), 켈로이드 (Keloid), 비대성 흉터 (Hypertrophic scar), 비알코올성 지방간 (Non-alcoholic Fatty Liver Disease), 원발성 경화성 담관염 (Primary sclerosing cholangitis, PSC), 원발성 담즙성 담관염(primary biliary cholangitis, PBC), 당뇨병망막병증 (diabetic retinopathy), 황반변성 (Age-related Macular Degeneration, AMD), 비후성 심근병증 (hypertrophic cardiomyopathy), 심근경색(myocardial infarction), 근 위축증 (Muscular Dystrophy), 당뇨병성 신장 질환(Diabetic kidney disease), 초점성 분절성 사구체 경화증(focal segmental glomerulosclerosis; FSGS), 또는 염증성장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)이 있다. 상기 간질성폐질환에는 특발성폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), 전신경화증 연관 간질성폐질환(systemic sclerosis associated interstitial lung disease, SSc-ILD), 또는 만성 섬유성 간질성폐질환(chronic fibrosing interstitial lung diseases with a progressive phenotype, PF-ILD)이 있다.

[32]

[33] 본 발명의 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 상기 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[34]

[35] 본 발명의 약학적 조성물은 표준 약학적 실시예에 따라 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다.

- [36]
- [37] 적당한 담체로는 예를 들어, 생리식염수, 폴리에틸렌글리콜, 에탄올, 식물성 오일 및 아이소프로필미리스테이트 등이 있고, 희석액으로는 예를 들어 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 화합물들은 주사 용액의 제조에 통상적으로 사용되는 오일, 프로필렌글리콜 또는 다른 용매에 용해시킬 수 있다. 또한, 국소 작용을 위해 본 발명의 화합물을 연고나 크림으로 제형화할 수 있다.
- [38]
- [39] 본 발명의 화합물들의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물들과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다. 일례로, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 섬유화증의 예방 또는 치료에 사용되는 다른 유효 성분을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 다른 유효 성분의 예로는, 피르페니돈(Pirfenidone) 또는 닌테다닙(Nintedanib)을 들 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물이 다른 유효 성분을 추가로 포함하는 경우, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 다른 유효 성분의 중량비는 1:0.1 내지 1:10이 바람직하다.
- [40]
- [41] 본 발명의 화합물들은 일반적인 식염수, 5% 텍스트로스와 같은 수용성 용매 또는 합성 지방산 글리세라이드, 고급 지방산 에스테르 또는 프로필렌글리콜과 같은 비수용성 용매에 화합물을 용해시키거나, 현탁시키거나 또는 유화시켜 주사제로 제형화 될 수 있다. 본 발명의 제형은 용해제, 등장화제(isotonic agents), 현탁화제, 유화제, 안정화제 및 방부제와 같은 통상의 첨가제를 포함할 수 있다.
- [42]
- [43] 본 발명에 따른 약학적 조성물을 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여될 수 있다. 투여 방법에 따라, 본 발명에 따른 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 0.001 내지 99 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 60 중량% 함유할 수 있다.
- [44]
- [45] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축 및 인간 등을 비롯한 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

- [46] 상술한 바와 같이 본 발명에 따른 약학적 조성물은 특정 치료 용법 용량으로 사용되어, 섬유화증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [47] 도 1은, 실험예 1-1의 폐기능 평가 결과를 나타낸 것이다.
 [48] 도 2는, 실험예 1-2의 폐 내부 콜라겐 함량 측정 결과를 나타낸 것이다.
 [49] 도 3은, 실험예 1-3의 조직병리학적 분석 결과를 나타낸 것이다.
 [50] 도 4는, 실험예 1-4의 염증세포 침윤 분석 결과를 나타낸 것이다.
 [51] 도 5는, 실험예 1-5의 몸무게 변화 측정 결과를 나타낸 것이다.
 [52] 도 6은, 실험예 3의 활성 성분의 혈중 농도 변화를 나타낸 것이다.
 [53] 도 7은, 실험예 4의 단회 투여에 대한 혈장 농도 변화를 나타낸 것이다.
 [54] 도 8은, 실험예 4의 다회 투여에 대한 혈장 농도 변화를 나타낸 것이다.
 [55] 도 9는, 실험예 4에서 투여 용량에 따른 AUC와의 상관관계를 그래프로 나타낸 것이다.
 [56] 도 10은, 실험예 5에서 오심, 구토 부작용의 발생 시점과 체내 노출과의 관계를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

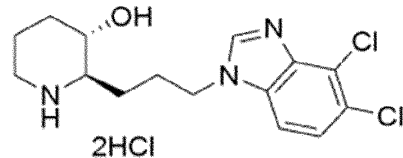
- [57] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[58]

[59] 실시예

- [60] 한국특허 등록번호 제10-2084772호의 실시예 40과 동일한 방법으로 하기 화합물을 제조하였고, 이하 '활성 성분' 또는 'Example'로 명명하였다.

[61]



- [62] ¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 9.67 (s, 1H), 8.02 (d, 1H), 7.82 (d, 1H), 4.62 (m, 2H), 3.60 (m, 1H), 3.28 (m, 1H), 2.99 (m, 2H), 2.25 (m, 2H), 2.08 (m, 2H), 1.99 (m, 1H), 1.78 (m, 2H), 1.54 (m, 1H)

[63]

[64] 실험예 1: 용량별 항섬유화 효능 동물 실험

- [65] 5일 이상 순화된 실험 동물에 카테터를 이용하여 폐에 BLM 용액(bleomycin 1 ~ 3 mg/kg) 70 ~100 uL를 투여하였고, 시험 목적에 따라 BLM 투여 7일 후 시험약물을 투여하며 BLM 투여 21일까지 2주간 약물을 경구 투여하였다. 실험군의 구성은 하기 표 1과 같으며, 몸무게, SpO₂, hydroxyproline 및 inflammation cell count를 측정하여 활성 성분의 항 섬유화 효능을 측정하였다.

[66]

- [67] 대조군으로는 특발성폐섬유증에 대한 표준치료제(Standard of Care, 이하 'SoC')인 닌테다닙(Nintedanib, 이하 'NIN') 및 피르페니돈(Pirfenidone, 이하

'PID')를 사용하였다. 사용된 NIN 유효용량은 NIN 개발사인 Boehringer Ingelheim에서 발표한 문헌 내 in vivo efficacy 자료를 통하여 확인하였으며, PID의 유효용량은 FDA Pharmacology Review 내 in vivo efficacy (rat) 자료 및 2주 반복 독성 용량(rat)을 토대로 마우스로 환산하여 설정하였다.

[68] [표1]

Group	약물	No of Animals (Male)	Dose 1	Dose 2	Volume	투여 방법
			(mg/kg)	(mg/kg) (SoC)	(uL)	
G1(NC)	Saline	9	N/A	N/A	100	경구
G2(PC)	Saline	9	N/A	N/A	100	경구
G3(Test)	활성 성분	9	3	N/A	100	경구
G4(Test)	활성 성분	9	10	N/A	100	경구
G5(Test)	활성 성분	9	30	N/A	100	경구
G6(Test)	Nintedanib	9	N/A	60	100	경구
G7(Test)	Pirfenidone	9	N/A	200	100	경구

[69]

[70] 실험예 1-1: 폐기능(Lung Function) 평가

[71] 본 폐기능 평가는 폐섬유화 환자의 증상과 삶의 질을 좌우하는 가장 큰 영향을 끼치는 가장 직접적이고 중요한 평가 지표로서, 체내 산소 농도를 측정함으로써 폐섬유화 동물 모델에서 폐의 기능 개선 효과를 가장 직접적으로 보여줄 수 있는 실험이다.

[72]

[73] 21일째 마우스의 복부 쪽을 통해 SpO2 측정 장치(Berry, Veterinary Pulse Oximeter)로 측정하였으며, 그 결과를 표 2 및 도 1에 나타내었다.

[74]

[75] 마우스 복부 SpO2 측정을 통하여 폐의 산소 투과 기능을 확인하고자 하였으며, Vehicle과 비교시 '활성 성분' 10 mg/kg에서는 18% 이상, 30 mg/kg에서는 28% 이상 개선되었음을 확인하였으며, 이는 기존 SoC 물질과 유사한 산소 투과 기능 개선도임을 확인하였다. 폐 섬유화 과정에서 감소되어지는 산소 투과율의 증가를 통해 '활성 성분' 투여시 폐 기능의 직접적인 개선 효과가 있었음을

확인할 수 있는 결과이다.

[76] [표2]

Normal	Vehicle	활성 성분			Pirfenidone	Nintedanib
		3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	200 mg/kg	60 mg/kg
99.89	74.44	75.00	77.89	81.33	82.00	78.67

[77]

[78] 실험예 1-2: 폐 내부 콜라겐 함량(Total Collagen in Lung) 측정

[79] 폐 섬유화는 폐에 콜라겐이 쌓여 단단해지는 것으로서, 이러한 폐 섬유화의 주요 병인으로 콜라겐의 축적이 있으며, 폐 조직 내부 콜라겐 함량 측정을 통하여 섬유화 진행 정도를 예측할 수 있다.

[80]

[81] 본 실험예에서는 INSOLUBLE Collagen Assay(Biicolor, S2000)를 이용하여 분석하였다. 21일째 sacrifice 후 냉동 보관된 폐조직을 100 uL Fragmentation Reagent를 첨가하여 분쇄한 후 37% HCl 100 uL를 첨가하고 65°C에서 3시간 incubation 하였다. 30분 간격으로 조직 분해를 돕기 위해 튜브 내용물을 흔들어주었다. 원심분리 후 100 uL에 맞추어 농도 조정 및 콜라겐 염색을 진행하여 샘플을 준비하였으며, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyproline 값을 normal 군에 대비하여 ratio 값을 측정하였고 그 결과를 표 3 및 도 2에 나타내었다.

[82] [표3]

Normal	Vehicle	활성 성분			Pirfenidone	Nintedanib
		3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	200 mg/kg	60 mg/kg
96.11	260.33	253.56	217.22	171.33	177.44	239.78

[83]

[84] 본 실험을 통하여 Vehicle 대비 '활성 성분' 10, 30 mg/kg에서 폐 내부 콜라겐의 함량이 유의하게 감소함을 확인하였으며, 이는 기존 SoC 물질인 PID와 유사한 수준의 결과였다. 본 실험을 통하여 활성 성분 투여시 폐 섬유화 정도가 완화됨을 알 수 있다.

[85]

[86] 실험예 1-3: 조직병리학적(Histopathology, Ashcroft Score) 분석

[87] 현미경을 통해 폐조직의 섬유화 정도 및 염증 정도를 육안으로 관찰하여, 정규화 된 기준에 따라 Fibrotic Index로 폐조직의 섬유화 정도를 측정하였다. Fibrotic Index 값이 높을수록 섬유화 정도 및 병증이 심각한 것으로, 값이 낮을수록 병증이 완화된 것으로 해석된다.

[88]

[89] 21일째 폐조직 분리하여 H&E 및 MT stain 사용하여 염색하였으며, 200X 배율로 관찰하였고, 관찰된 결과를 Ashcroft 점수화(Hubner et al., 2008) 하였다. 섬유증 지수는 수정된 Ashcroft 필드 점수의 합을 검사된 필드 수로 나눈 값으로 계산하여 표 4 및 도 3에 나타내었다.

[90] [표4]

그룹	개체수	Fibrotic Index ($\pm$ SEM)
Normal	9	0.1 ($\pm$ 0.1)
vehicle	9	5.2 ($\pm$ 0.2)
활성 성분 3 mg/kg	9	4.6 ($\pm$ 0.3)
활성 성분 10 mg/kg	9	2.7 ($\pm$ 0.6)
활성 성분 30 mg/kg	9	2.8 ($\pm$ 0.4)
Pirfenidone 200 mg/kg	9	4.1 ($\pm$ 0.3)
Nintedanib 60 mg/kg	9	3.1 ($\pm$ 0.6)

[91]

[92] '활성 성분' 10, 30 mg/kg의 경우 NIN 대비 동등 이상의 조직 개선 효과를 확인하였으며, PID 대비 매우 월등한 조직 개선 효과를 확인하였다.

[93]

[94] 실험예 1-4: 염증세포 침윤(Inflammation cell count) 분석

[95] 섬유증은 과도한 콜라겐 침착과 만성 염증 질환이므로, 폐조직 내 염증 정도를 확인하기 위하여 염증 세포의 침윤을 분석하였다.

[96]

[97] 투약 21일째 sacrifice에서 mouse의 기도세척을 통해 획득한 BALF(Bronchoalveolar lavage fluid) cell을 1.05 X PBS로 희석하여 slide에 부착시킨 후 1,2,3 diff quick stain solution 순서에 따라 30초씩 slide를 담갔다 빼 염색하였다. 500 cell을 기준으로 count 하였다. Macrophage는 가장 크기가 크고 단핵으로 파랗게 염색되며, Neutrophil과 eosinophil은 다핵구를 이루나 eosinophil은 eosin이 붉게 염색되어 neutrophil과 구분된다. Lymphocyte는 세포질이 매우 적고 단핵구로 크기가 작다. 총 세포를 count 하여 %로 환산하여 표 5 및 도 4에 나타내었다.

[98] [표5]

	Normal	Vehicle	활성 성분			Pirfenidone 200 mg/kg	Nintedanib 60 mg/kg
			3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg		
Macrophage	0.42	6.96	7.80	5.60	4.91	5.01	5.61
Neutrophil	0.00	2.12	1.74	1.54	0.82	0.68	1.29
Lymphocyte	0.00	0.87	0.79	0.51	0.46	0.46	0.68
Total cell	0.42	9.93	10.32	7.66	6.19	6.14	7.57

[99]

[100] 본 실험을 통하여, Vehicle 대비 Total cell 수치가 '활성 성분' 10 mg/kg에서는 20% 이상, 30 mg/kg에서는 30% 이상 개선되어 폐조직 염증이 개선되었음을 알 수 있다. 특히, Neutrophil 세포는 폐 섬유화 염증에 높은 비율을 보이는 염증세포로 이 세포의 수가 Vehicle 대비 '활성 성분' 10 mg/kg에서는 20% 이상, 30 mg/kg에서는 60% 이상 감소하여 주요 염증 세포의 비율이 월등히 개선되었음을 확인하였으며, 이는 기존 SoC 물질인 PID와 동등한 정도이며, NIN보다 월등한 효과임을 알 수 있다.

[101]

[102] 실험예 1-5: 몸무게(Body weight) 변화 측정

[103] 몸무게는 동물 모델의 전반적인 몸상태 개선 정도를 알 수 있는 간접적인 지표로서, 몸무게 감소 정도가 적은 경우 전반적인 몸상태나 질환에 대한 증상이 개선되었음을 추측할 수 있다.

[104] 저울을 사용하여 투약이 완료되는 21일에 몸무게를 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 6과 도 5에 나타내었다.

[105] [표6]

Normal	Vehicle	활성 성분			Pirfenidone 200 mg/kg	Nintedanib 60 mg/kg
		3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg		
13.22	-23.33	-22.44	-19.11	-16.78	-14.67	-19.44

[106]

[107] Vehicle 군보다 10 mg/kg, 30 mg/kg의 몸무게 감소 정도가 개선됨이 확인되며 이는 SoC 물질 유사 또는 이상의 개선 효과가 확인되며 '활성 성분' 투여시 전체적인 증상이 호전되어 짐을 확인할 수 있다.

[108]

[109] 상기와 같은 일련의 실험 결과를 통하여, 마우스에 '활성 성분'을 10 mpk로 1일1회 투여한 경우 기존 IPF 표준 치료제와 동등한 정도의 치료 효과가 있음을 확인할 수 있다.

[110]

[111] 실험예 2: 마우스 2주 반복투여 독성시험

[112] 7일 이상 순화된 ICR 마우스에 2주간 활성 성분을 경구 투여하였다. 실험군의 구성은 하기 표 7과 같으며, 체중, 일반증상 관찰, 혈액학/혈액생화학 검사, 장기중량 측정, 조직병리검사를 실시하였다.

[113] [표7]

그룹	성별	동물수 (마리)	투여물질	투여량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg/day)
G1	M	6	멸균증류수	-	10
G2	M	6	활성 성분	30	10
G3	M	6	활성 성분	60	10
G4	M	6	활성 성분	120 → 90 ¹⁾	10
1) 고용량군 초기 투여(투여 후 며칠내)에서 사망 개체 확인, 또는 동물의 상태가 2주를 못 버틸 것 같은 소견 발생시 용량을 낮춰서 남은 기간 투여					

[114]

[115] 2주간 투여 후 모든 동물에 대해 부검을 실시하였고, 부검시 각 장기의 중량을 측정하였다. 2주간 반복투여 후 측정된 모든 결과에서 독성 혹은 중대한 이상 증후도 확인되지 않았다. 다만, 하기 표 8과 같이 30 mg/kg/day 이상 투여군에서 모든 장기 중 비장과 가슴샘에서만 미세한 중량의 감소 경향이 관찰되었다.

[116] [표8]

Dose (mg/kg)	0			30			60			120→90		
SPLEEN	0.080	±	0.018	0.059	±	0.011	0.070	±	0.015	0.046	±	0.021
% to BODY WEIGHT	0.28	±	0.07	0.22	±	0.04	0.25	±	0.05	0.17	±	0.08
THYMUS	0.034	±	0.008	0.026	±	0.008	0.029	±	0.006	0.015	±	0.012
% to BODY WEIGHT	0.12	±	0.02	0.10	±	0.03	0.11	±	0.02	0.05	±	0.04

[117]

[118] 이와 같은 결과는 독성과는 무관한 것으로 판단되나, 상기 비장 및 가슴생의 중량 감소 경향을 근거로 장기 투여시 잠재적인 독성 리스크 방지를 위하여 활성성분의 유효 용량을 10 mg/kg으로 설정하였다.

[119]

[120] 실험예 3: 동물 약동학/약력학 분석

[121] ICR 마우스에서의 활성 성분 단회 경구 투여 후 체내동태 시험을 표 9와 같이 진행하였다. LC-MS/MS를 통해 얻어진 경시 변화에 따른 혈중 약물 농도를 Excel® 및 WinNonlin6.1 소프트웨어를 이용하여 약물 동태학적 파라미터를 산출하여 활성 성분의 혈중 농도 변화를 표 10 및 도 6에 나타내었다.

[122] [표9]

실험동물	ICR mice (male)
시험물질	활성 성분
투여 경로	경구
투여 횟수	단회
투여 용량(mg/kg)	10
투여 액량(mL/kg)	10
채혈 시간(hr)	0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24
부형제	saline
시험동물 수	6 (n=3, 교차채혈)

[123]

[124] [표10]

시험물질	활성 성분
투여 용량(mg/kg)	10
$t_{1/2}$ (hr)	2.50 ± 2.48
T_{max} (hr)	2.67 ± 1.15
C_{max} (ug/mL)	0.263 ± 0.032
AUC_{0-t} (hr·ug/mL)	1.07 ± 0.21
AUC_{inh} (hr·ng/mL)	1190

[125]

[126] 제조예 1: 활성 성분 포함한 장용코팅캡슐 제조

[127] 활성 성분의 염산염 형태에 추가 부형제 없이 주성분만을 Vcaps® 장용코팅 캡슐을 사용하여 용량별로 캡슐에 충전하였다.

[128]

[129] 제조예 2: 활성 성분 포함한 장용코팅정제 제조

[130] 활성 성분의 염산염 형태에 미결정 셀룰로오스, 유당 수화물, 크로스포비돈, 스테아르산 마그네슘을 혼합하여 건식 과립기를 이용하여 판상의 압축물로 제조하고, 오실레이터로 분쇄하여 건식 과립물을 제조하였다. 해당 과립물에 미결정 셀룰로오스, 유당 수화물, 스테아르산 마그네슘을 추가 혼합하고 압축 성형하여 정제로 제조하였으며, 장용성 코팅을 진행하여 완료하였다.

[131]

[132] 실험예 4: 인간 약동학/약력학 분석

[133] 인체에 대한 안전성/내성/pK를 확인하기 위하여, 표 11과 같이 건강한 성인 72명을 대상으로 무작위, 이중맹검, 위약대조 방식으로 단회투여, 단계적 증량으로 임상을 설계하였다. 임상시험에 사용된 제형은 상기 제조예 1 및 2와 같은 방법으로 제조하였다.

[134] [표11]

구분	그룹	활성 성분	제형	투여 방법
단회투여	SAD1	100 mg	장용코팅캡슐	공복 상태에서 단회 경구 투여
	SAD2	300 mg		
	SAD3	600 mg		
	SAD4	500 mg	장용코팅정제	
다회투여	MAD1	25 mg		13일 연속 1일 2회 공복 상태에서 경구 투여 후 14일째 아침 단회 투여
	MAD2	50 mg		
	MAD3	100 mg		
	MAD4	200 mg		

[135]

[136] 상기 임상 결과 중대한 이상 징후나 부작용은 확인되지 않았다.

[137]

[138] 단회 투여에 대한 pK 확인 결과, 하기 표 12 및 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 투여 후 1.5시간 내지 8시간 내 혈장 최대 농도를 기록하였으며, 기하평균 반감기는 6.91시간 내지 9.90시간 범위였고, 혈장농도는 용량 비례관계로 증가함을 확인하였다.

[139] [표12]

항목(GCV%)	활성 성분 100 mg (N=6)	활성 성분 300 mg (N=6)	활성 성분 600 mg (N=6)	활성 성분 500 mg (N=6)
C_{max} (ng/mL)	123.96 (37.72)	276.80 (66.21)	213.43 (433.75)	513.56 (41.27)
t_{max} (h)*	3.00 (1.50, 4.00)	2.50 (1.50, 8.00)	2.00 (1.50, 5.00)	3.01 (0.50, 5.00)
AUC_{0-last} (h*ng/mL)	594.10 (61.23)	1478.84 (48.07)	1008.65 (625.00)	2282.37 (54.92)
$AUC_{0-\infty}$ (h*ng/mL)	639.07 (58.10)	1525.99 (47.06)	1922.64 (222.08)	2339.20 (53.27)
$T_{1/2}$ (h)	6.91 (39.98)	8.33 (24.57)	9.90 (71.50)	7.80 (13.49)
V_z/F (L)	1560.44 (34.98)	2361.87 (41.96)	4459.07 (84.14)	2406.62 (48.04)
CL/F (L/h)	156.48 (58.10)	196.59 (47.06)	312.07 (222.08)	213.75 (53.27)
MRT (h)	9.26 (33.69)	9.75 (21.76)	9.79 (25.60)	9.57 (27.28)
GCV% = Geometric coefficient of variation Notes: t_{max} represented as median; min, max.				

[140]

[141] 또한, 다회 투여에 대한 14일차 pK 확인 결과, 표 13 및 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, 투여 후 항정 상태에서 1.5시간 내지 5시간 내 혈장 최대 농도를 기록하였으며, 기하평균 반감기는 4.4시간 내지 12.35시간 범위였고, 기하평균 투여간격기간 체내 노출(AUC_{τ})은 183.32-3012.35 h·ng/mL 범위였다. 활성 성분 25 mg 내지 200 mg 용량 투여 범위 내에서 혈장농도가 용량 선형관계에 있음을 확인하였다.

[142] [표 13]

항목 (GCV%)	활성 성분 25 mg ^T (N=6)	활성 성분 50 mg ^T (N=6)	활성 성분 100 mg ^T (N=6)	활성 성분 200 mg ^T (N=6)
Day 14				
C _{max, ss} (ng/mL)	36.50 (66.19)	102.61 (67.99)	151.27 (65.36)	595.35 (36.32)
t _{max, ss} (h)*	2.00 (1.50, 4.00)	3.00 (3.00, 5.00)	3.00 (1.50, 4.00)	2.00 (1.50, 5.00)
AUC _τ (h*ng/mL)	183.32 (76.35)	429.09 (128.63)	617.40 (60.53)	3012.35 (48.42)
AUC _{0-∞} (h*ng/mL)	300.73 (102.79)	565.34 (232.53)	887.97 (60.55)	4747.29 (64.90)
T _{1/2} (h)	7.63 (46.84)	4.40 (101.38)	9.26 (22.69)	12.35 (34.54)
Vz/F _{ss} (L)	1433.79 (61.75)	738.97 (34.90)	2163.04 (63.58)	1182.53 (48.47)
CL/F _{ss} (L/h)	122.65 (79.49)	116.53 (128.63)	161.97 (60.53)	66.39 (48.42)
MRT (h)	10.53 (31.65)	8.44 (68.43)	10.17 (9.35)	12.07 (26.90)
Accumulation ratio based on AUC _τ	1.94 (26.34)	2.33 (31.42)	1.88 (35.07)	3.75 (36.01)
Abbreviations: GCV% = Geometric coefficient of variation; n = Number of subjects; SD = Standard Deviation; T = Tablet.				
Notes: * t _{max, ss} represented as median; min, max. MRT, AUC _τ , CL/F _{ss} , and Vz/F _{ss} are considering a 12 hour dosing interval.				

[143]

[144] 이에, 상기 인간 다회투여 임상시험에서 얻어진 혈중 약물 농도를 Excel® 및 WinNonlin8.1 소프트웨어를 이용하여 관찰된 모든 용량에서의 농도 변화를 설명할 수 있는 최적의 약물동태 모델 파라미터를 추정하였고 다양한 용량을 경구 투여 시 사람에서의 체내 노출 수준을 예측하였으며 주요 결과는 하기 표 14와 같았다.

[145] [표14]

	Dose (mg)			
Parameter	50	100	150	200
$T_{1/2}$ (h)	9.753195	9.753195	9.753195	9.753195
T_{max} (h)	2.803	2.803	2.803	2.803
C_{max} (ng/mL)	38.271	76.5419	114.813	153.084
CL/F (mL/hr)	215856.7	215856.7	215856.7	215856.5
Vd/F (mL)	3037295	3037295	3037295	3037293
AUC_{tau} (hr*ng/mL)	231.6352	463.2704	694.9055	926.5413
AUC_{tau_24hr} (hr*ng/mL)	463.2704	926.5407	1389.811	1853.08256

[146]

[147] 상기 실험예 2의 폐섬유화증에 대한 쥐실험 모델 실험으로부터, 10 mg/kg을 1일 1회 투여함이 쥐에 대한 효과 용량이며, 실험예 3으로부터 유효 용량에서의 쥐 혈장 AUC_{inf} 값은 1190 hr*ng/mL임을 확인하였다. 따라서, 인체 내에서 쥐의 유효 용량과 동일한 수준의 AUC_{inf} 값을 보일 것으로 예상되는 용량을 예측하기 위해, 투여 용량에 따른 AUC와의 상관관계를 도 9와 같이 검토하였고, 그 결과 사람에게 하루 두 번 투여하고자 하는 경우 150 mg 투여가 필요함을 확인하였다.

[148]

[149] 실험예 5: 인간 투여 안전성/약물 내성 분석

[150] 상기 실험예 4와 같은 방법으로 인간 투여시 본 발명의 화합물의 안전성 및 약물 내성을 확인하였다.

[151]

[152] 단회 투여에 대한 안전성 및 내약성 확인 결과, 가장 빈번하게 발생한 이상반응은 오심, 구토, 설사 및 복통을 포함한 위장관 이상 반응이었다. 이중 오심과 구토가 안전성 및 약물 내성에 더 영향이 큰 것으로 평가되는데, 이는 활성 성분 자체에 의하여 기인됨을 확인하였다. 이러한 오심, 구토 부작용의 발생시점과 체내 노출과의 관계를 도 10과 같이 확인 결과, 대부분 체내 혈중 농도가 올라가기 전 발생하는 것을 확인하였으며, 이는 곧 활성 성분 투여시 발생하는 오심 및 구토가 체내 혈중 노출에 의한 화학적 수용체 유도 부위 자극을 통한 구토 중추 활성화 경로가 아닌 위장관에 작용하여 미주 신경을 흥분시켜 구토 중추를 활성화하는 것임을 파악하였다.

[153]

[154] 따라서, 위장관에 작용하는 미주신경 자극의 비율을 줄이고자 유효용량을 하루 2회 나누어 투여하는 용법이 본 활성 성분에는 더욱 적절함을 알 수 있다.

[155]

[156] 실험예 6: 인간 치료 효과 확인

[157] 활성 성분의 특발성폐섬유화증 환자에 대한 안전성 및 효과를 확인하기 위하여, 표 15와 같이 표준치료제 투여군 또는 비투여군 대상으로 무작위, 이중맹검, 위약대조 방식으로 임상을 설계하였다. 활성 성분의 안전성, 내약성을 확인하기 위하여 24주간 활성 성분 투약 후 위약과 비교하여 평가한다. 활성 성분의 특발성폐섬유화증 치료 효과를 확인하기 위하여 24주간 활성 성분 투약 후 일차 유효성 평가 변수로서 24주 동안 기저치로부터 노력성 폐활량 (FVC) 감소율을 평가한다. 이차 유효성 평가 변수로서 1) 호흡기 관련 사망률 또는 입원, IPF 급성 악화, FVC 값이 정상예측치의 10% 이상 상대 감소, Hgb로 보정한 폐확산능(diffusing capacity for carbon monoxide, DLCO) 값이 정상예측치의 15% 이상 절대 감소를 포함하는 IPF 질병 진행까지의 시간; 2) 24주 동안 모든 원인의 계획되지 않은 첫번째 입원까지의 소요 시간; 3) 24주 시점에 6분 보행검사 (6MWT) 거리 기록으로 평가한 기능적 운동 능력의 기저치 대비 변화; 4) 24주 시점에 DLCO (Hgb로 보정) 수치와 기저치 대비 변화; 5) 24주 시점에 FVC 정상예측치 백분율 값의 기저치 대비 절대 변화의 범주적 평가; 6) 24주 시점에 정량적 흉부 고해상 CT (high-resolution CT; HRCT) 값의 기저치 대비 변화; 7) 24주 시점에 St George's Respiratory Questionnaire, SGRQ 및 Living with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (L-IPF)로 측정된 patient-reported outcomes (PRO)의 기저치 대비 변화 등을 평가한다. 탐색적 유효성 평가 변수로서 1) 24주 시점에 IPF 특이 바이오마커의 기저치 대비 변화; 2) 24주 시점에 혈액 내 바이오마커의 기저치 대비 변화 등을 평가한다. 안전성 평가 변수로서 1) 활성 성분 투약 후 발생한 이상반응 발생률; 2) 신체검사; 3) 12 리드 심전도 검사; 4) 활력징후; 5) 임상실험실적 검사 등을 평가한다.

[158]

[159] 대상군은 기존 표준치료제로서 피르페니돈을 투여하고 있는 환자, 닌테다닙을 투여하고 있는 환자, 어떠한 치료제도 투여하고 있지 않은 환자로 나뉘어져 있으며, 각각의 환자군에 대하여 활성 성분 또는 위약을 투여하여 효과를 확인한다. 활성 성분에 의한 이상 반응이 나타날 경우 환자의 반응을 면밀히 관찰하고 용량 감량을 고려한다.

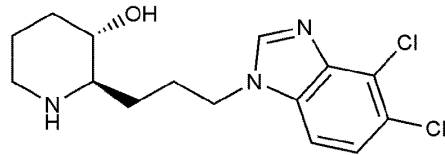
[160] [표15]

기존 투여 치료제	활성 성분 150 mg, BID	활성 성분 100 mg, BID	위약 (0 mg), BID
피르페니돈 (mg, 1일3회 투여)	801	801	801
	534	534	534
	267	267	267
	600	600	600
	400	400	400
	200	200	200
넌테다닙 (mg, 1일2회 투여)	150	150	150
	100	100	100
어떠한 치료제도 투여하지 않음 (mg)	0	0	0

청구범위

- [청구항 1] 1일 2회(BID) 100 내지 150 mg 투여를 위한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 섬유화증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 섬유화증은, 간질성 폐질환(Interstitial lung disease, ILD),
피부경화증(Scleroderma), 켈로이드(Keloid), 비대성 흉터(Hypertrophic scar), 비알코올성 지방간(Non-alcoholic Fatty Liver Disease), 원발성 경화성 담관염(Primary sclerosing cholangitis, PSC), 원발성 담즙성 담관염(primary biliary cholangitis, PBC), 당뇨병망막병증(diabetic retinopathy),
황반변성(Age-related Macular Degeneration, AMD), 비후성
심근병증(hypertrophic cardiomyopathy), 심근경색(myocardial infarction), 근
위축증(Muscular Dystrophy), 당뇨병성 신장 질환(Diabetic kidney disease),
초점성 분절성 사구체 경화증(focal segmental glomerulosclerosis; FSGS),
또는 염증성장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)인,
약학적 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 간질성폐질환은, 특발성폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), 전신경화증 연관 간질성폐질환(systemic sclerosis associated interstitial lung disease, SSc-ILD), 또는 만성 섬유성 간질성폐질환(chronic fibrosing interstitial lung diseases with a progressive phenotype, PF-ILD)인,
약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 약학적으로 허용 가능한 염은 염산염인,
약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 섬유화증의 예방 또는 치료에 사용되는 다른 유효
성분을 추가로 포함하는,
약학적 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 섬유화증의 예방 또는 치료에 사용되는 다른 유효 성분은,
피르페니돈 또는 닌테다닙인,

약학적 조성물.