(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0118250
(43) 공개일자 2018년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/68 (2006.01) *A61K 38/04* (2006.01)
A61K 38/34 (2006.01) *A61K 47/50* (2017.01)
C07K 5/10 (2006.01) *C07K 7/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/68 (2013.01)
A61K 38/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7030624(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년03월20일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2017-7023883
원출원일자(국제) 2009년03월20일
심사청구일자 2017년09월22일
(85) 번역문제출일자 2018년10월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/037809
(87) 국제공개번호 WO 2009/151708
국제공개일자 2009년12월17일
(30) 우선권주장
61/056,373 2008년05월27일 미국(US)

(71) 출원인
젠자임 코포레이션
미국 매사추세츠 02142 캠브리지 켄달 스트리트 500
(72) 발명자
페리콘, 마이클, 에이.
미국 매사추세츠 02451 월담 세컨드 애브뉴 153
드주리스, 존, 라일
미국 매사추세츠 02451 월담 세컨드 애브뉴 153
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박장원

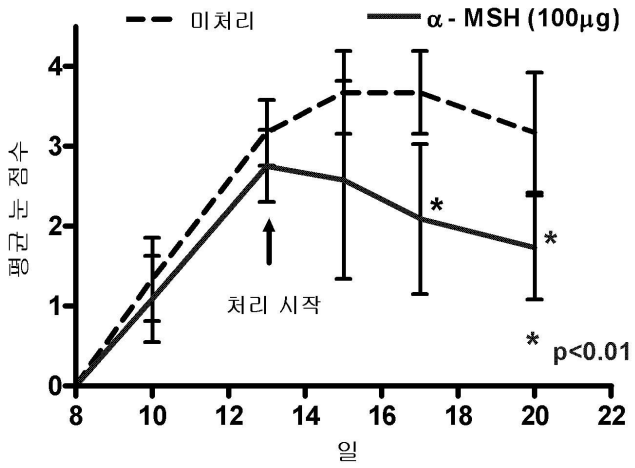
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **알파-멜라노사이트 자극 호르몬의 펩티드 유사체**

(57) 요 약

본 발명에 제공되는 것은 멜라노코르틴 1 수용체 (MC1R)에 대한 선택성을 가지는 네이티브 α-멜라노사이트 자극 호르몬 (α-MSH)의 안정한 펩티드 유사체이다. 또한 본 발명에 제공되는 것은 α-MSH 펩티드 유사체의 약학 제제를 비롯하여, MC1R을 포함하는 의학적 및 수의학적 상태(conditions)의 치료에서 이들 유사체들을 이용하는 방법이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 38/34 (2013.01)
A61K 47/50 (2017.08)
C07K 5/10 (2013.01)
C07K 7/08 (2013.01)
(72) 발명자
위든, 티모씨, 이.
미국 매사추세츠 02451 월담 세컨드 애브뉴 153
스테파노, 제임스, 이.
미국 매사추세츠 02451 월담 세컨드 애브뉴 153
판, 클락, 큐.
미국 매사추세츠 02451 월담 세컨드 애브뉴 153
에들링, 안드레아, 이.
미국 매사추세츠 02451 월담 세컨드 애브뉴 153

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열이 His Xaa_1 Arg Trp (SEQ ID NO:1) 또는 D-Trp D-Arg Xaa_2 D-His (SEQ ID NO:2) (상기 서열 중, Xaa_1은 D-Cha, D-Phe 또는 Cha이고, Xaa_2는 D-Cha, D-Phe 또는 Phe이다)인 코어 테트라펩티드를 포함하고, 멜라노코르틴 1 수용체 (melanocortin 1 receptor; MC1R)에 선택적으로 결합하는 실질적으로 순수한 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 서열이 D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO:3)인 C-말단 폴리펩티드를 포함하는 것인 화합물.

청구항 3

서열이 Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_4 Xaa_5 Xaa_6 Xaa_7 Xaa_8 Xaa_9 Xaa_{10} Xaa_{11} Xaa_{12} Xaa_{13}

(상기 서열 중, Xaa_1은 D-Val, D-Ala 또는 D-Lys이고,

Xaa_2는 D-Pro, D-Ala 또는 D-Lys이며,

Xaa_3은 D-Lys, D-Orn, D-Nle, D-Ala 또는 D-Lys이고,

Xaa_4는 Gly, 또는 D-Ala이며,

Xaa_5는 D-Trp, Trp, D-3-벤조티에닐-Ala, D-5-하이드록시-Trp, D-5-메톡시-Trp, D-Phe, 또는 D-Ala이고,

Xaa_6은 D-Arg, D-His, 또는 D-Ala이며,

Xaa_7은 D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-플루오로-Phg, D-3-피리딜-Ala, D-Thi, D-Trp, D-4-니트로-Phe, 또는 D-Ala이고,

Xaa_8은 D-His, His, D-Arg, Phe, 또는 D-Ala이며,

Xaa_9는 D-Glu, D-Asp, D-시트룰린, D-Ser, 또는 D-Ala이고,

Xaa_{10}은 D-Met, D-부티오닌, D-Ile, 또는 D-Ala이며,

Xaa_{11}은 D-Ser, D-Ile 또는 D-Ala이고,

Xaa_{12}는 D-Tyr, D-Ser, 또는 D-Ala이며,

Xaa_{13}은 D-Ser 또는 D-Ala이고,

Xaa_{1-3}가 모두 D-Ala인 경우를 제외하고, 단지 1개의 Xaa_{1-13}만이 D-Ala이며,

단지 1개의 Xaa_{1-13}는 L-아미노산이다)인 폴리펩티드를 포함하고, 멜라노코르틴 1 수용체 (MC1R)에 선택적으로 결합하는 실질적으로 순수한 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 화합물은 서열이

Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_4 Xaa_5 Xaa_6 Xaa_7 Xaa_8 Xaa_9 Xaa_{10} Xaa_{11} Xaa_{12} Xaa_{13}

(상기 서열 중, Xaa_1은 D-Val이고,

Xaa_2는 D-Pro이며,

Xaa_3은 D-Lys, D-Orn 또는 D-Nle이고,

Xaa_4는 Gly이며,

Xaa_5는 D-Trp, Trp, D-3-벤조티에닐-Ala, D-5-하이드록시-Trp, D-5-메톡시-Trp, 또는 D-Phe이고,

Xaa_6는 D-Arg 또는 D-His이며,

Xaa_7은 D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-플루오로-Phg, D-3-피리딜-Ala, D-Thi, D-Trp, 또는 D-4-니트로-Phe이고,

Xaa_8은 D-His, His, D-Arg, Phe, 또는 D-Ala이며,

Xaa_9는 D-Glu, D-Asp, D-시트룰린 또는 D-Ser이고,

Xaa_{10}은 D-Met, D-부티오닌 또는 D-Ile이며,

Xaa_{11}은 D-Ser 또는 D-Ile이고,

Xaa_{12}는 D-Tyr 또는 D-Ser이며,

Xaa_{13}는 D-Ser이고,

단지 1개의 Xaa_{1-13}만이 L-아미노산이다)

인 폴리펩티드를 포함하는 것인 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 화합물은 서열이

Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_4 Xaa_5 Xaa_6 Xaa_7 Xaa_8 Xaa_9 Xaa_{10} Xaa_{11} Xaa_{12} Xaa_{13}

[상기 서열 중, Xaa_1은 D-Val이고,

Xaa_2는 D-Pro이며,

Xaa_3은 D-Lys, D-Orn 또는 D-Nle이고,

Xaa_4는 Gly이며,

Xaa_5는 D-Trp 또는 Trp이고,

Xaa_6은 D-Arg이며,

Xaa_7은 D-Cha, D-Phe, Phe 또는 D-Thi이고,

Xaa_8은 D-His 또는 His이며,

Xaa_9는 D-Glu 또는 D-Ser이고,

Xaa_{10}은 D-Met, D-부티오닌 또는 D-Ile이며,

Xaa_{11}은 D-Ser 또는 D-Ile이고,

Xaa_{12}는 D-Tyr 또는 D-Ser이며,

Xaa_{13}는 D-Ser이고,

단지 1개의 Xaa_{1-13}만이 L-아미노산이다)

을 가지는 폴리펩티드를 포함하는 것인 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 6

서열이

D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg Phe D-His D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO:4),

D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Cha D-His D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO:5),

Ser Tyr Ser Met Glu His Cha Arg Trp Gly Lys Pro Val (SEQ ID NO:6), 또는

D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Phe D-His D-Glu D-Met D-Ser D-Tyr D-Ser (SEQ ID NO:7)

인 폴리펩티드를 포함하는 실질적으로 순수한 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 7

제1항, 제3항, 제4항, 제5항, 또는 제6항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 PEG화한 것인 화합물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 화합물은 선택적으로 MC1R에 결합하는 것인 화합물.

청구항 9

제1항, 제3항, 제4항, 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 화합물은,

MC1R을 선택적으로 활성화시키는 능력과,

시험관내 (*in vitro*)에서의 혈장내 안정성, 또는

프로테아제 분해에 대한 내성

중 한 가지 이상의 성질을 나타내는 것인 화합물.

청구항 10

제1항, 제3항, 제4항, 제5항 또는 제6항에 기재된 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 11

제1항, 제3항, 제4항, 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 화합물은 생물학적으로 활성인 모이어티에 컨쥬게이트되는 것인 화합물.

청구항 12

제1항, 제3항, 제4항, 제5항 또는 제6항에 기재된 화합물의 유효 치료량과 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체에서의 자가 면역 질환 또는 질병의 치료 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 자가 면역 질환 또는 질병은 다발성 경화증, I형 당뇨병, 재생 불량성 빈혈, 그레이브스병, 셀리악병, 크론병, 루퍼스, 관절염, 골관절염, 자가면역성 포도막염 및 중증 근무력증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 14

제1항, 제3항, 제4항, 제5항 또는 제6항에 기재된 화합물의 유효 치료량과 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체에서의 염증 치료 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 염증은 염증성 장질환, 류마티스성 관절염, 알러지, 아테롬성 동맥 경화증, 건선, 위염 및 허혈성 심장병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질병과 관련되어 있는 것인 방법.

청구항 16

제1항, 제3항, 제4항, 제5항 또는 제6항에 기재된 화합물의 유효 치료량과 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체에서의 이식 거부 반응 감소 또는 억제 방법.

청구항 17

제1항, 제3항, 제4항, 제5항 또는 제6항에 기재된 화합물의 유효 치료량과 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체에서의 흑색종 치료 방법.

청구항 18

항암 페이로드 (payload)에 컨쥬게이팅된 제1항, 제3항, 제4항, 제5항 또는 제6항에 기재된 화합물을 포함하는 컨쥬게이트의 유효 치료량과 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체에서의 흑색종 치료 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 항암 페이로드는 방사성 핵종, 방사성 증감제, 광감작제, 화학 치료제 또는 독소인 것인 방법.

청구항 20

제10항에 기재된 약학 조성물과 임의로 이의 사용 설명서를 포함하는 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] [0001] 본 발명은 펩티드 유사체에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 멜라노코르틴 1 수용체 (MC1R)에 대한 선택성을 가지는 네이티브 (native) 알파-멜라노사이트 자극 호르몬 (α-MSH)의 펩티드 유사체와, 이의 약학 제제, 그리고 의학적 및 수의학적 증상의 치료에 이들 유사체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] [0002] 뉴로펩티드는 신체내에 고루 분포하고 신경 전달 물질로부터 성장 인자에 이르는 기능을 가진 소형의 생물학적으로 활성인 펩티드이다. 수많은 증거들이 뉴로펩티드가 항염증능이 있음을 가리키고 있다. 다수의 뉴로펩티드 중에서도, 멜라노코르틱 펩티드 (멜라노코르틴)가 있는데, 이는 멜라노코르틴 (MC) 수용체에 결합하여 이를 자극한다. 멜라노코르틴의 예에는 알파-멜라노사이트-자극 호르몬 (α-MSH)이 있는데, 이는 주로 말초 색소 침착을 조절할 수 있는 이의 능력에 대하여 알려져 있지만, 항염증 및 면역 조절 능력을 가지는 것으로도 알려져 있다. α-MSH 뉴로펩티드는 몇 가지 기관에서 검출되며, 신경, 뇌하수체, 장, 피부 및 면역 세포에 의하여 생성된다.

[0003] [0003] α-MSH의 면역 조절 능력은 접촉 과민의 모델에서 증명되었는데, 이 모델에서는 헵텐 특이적 내성 (tolerance)이 α-MSH를 주사함으로써 유도되었고, 박테리아 내독소 매개 염증을 억제하였다. 또한, α-MSH는 염증성 장 질환, 관절염 및 실험적 심장 이식 등의 다수의 동물 질병 모델에서 치료 활성을 가진 것으로 증명되었다. 뇌 염증, 신장 외상 및 간 염증의 다른 동물 모델에서는 이러한 뉴로펩티드를 사용하여 항염증 효과가 증명되었다. α-MSH는 TNF-α, IL-6 및 IL-1 등의 염증 촉진 사이토카인의 생성을 억제하고, 마크로파지 및 호중성구가 염증 부위로 이동하는 것을 감소시키는 케모카인을 억제한다. 일산화질소 (NO)는 다양한 염증 형태를 위

한 통상의 매개자이다. 내독소 자극 마크로파지 및 호중성구에 의한 NO 합성은 α-MSH에 의하여 억제되는 것으로 증명되었다. 사이토카인 생성에 대한 이의 효과 외에도, α-MSH는 MHC 클래스 I, CD86 및 CD40의 단핵구 및 덴드라이트 세포에서의 발현을 하향 조절하고, 이들은 항원 제시 및 동시 자극에 영향을 미친다. α-MSH는 단핵구에서 인터류킨 10 (IL-10)의 형성을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 이는 면역 억제 효과에 있어 중요한 성분인 것으로 생각된다.

[0004] [0004]α-MSH의 면역 조절 효과의 분자 메커니즘은 완전히 이해되어 있지는 않지만, α-MSH의 잠재적인 작용 메카니즘은 세포에서 핵 인자-κB 활성화를 억제하는 이의 능력인 것으로 파악된다. NF-κB의 억제는 마크로파지에 의한 염증 자극 사이토카인 생성 및 일산화질소 합성을 억제한다. α-MSH는 G 단백질 커플링된 수용체군에 속하는 특이적 수용체가 7개의 막통과 도메인과 결합함으로써 기능한다. 이들 수용체에는 마크로파지 상의 멜라노코르틴 1 및 멜라노코르틴 3 수용체 (MCR-1 및 MCR-3)가 있는데, 여기에 α-MSH가 결합함으로써 NF-κB를 억제한다. α-MSH의 다수의 면역 조절 효과는 cAMP의 축적을 통하여 매개된다. α-MSH가 멜라노코르틴 수용체에 결합하면, cAMP 양을 증가시키고, 이는 IκB의 분해를 억제할 수 있고, 이에 따라 NF-κB의 이동 및 일산화질소 생성을 억제하게 된다.

[0005] [0005] α-MSH가 결합하여 자극하게 될 MC1 수용체는 다양한 항염증 및 면역 조절 반응에 관여하여 왔다. 5가지 타입의 멜라노코르틴 수용체인 MC1-MC5가 동정되어 있다. MC1-수용체는 멜라노사이트, 흑색종 세포, 마크로파지, 호중성구, 글리오마 세포, 성상 세포, 단핵구, 내피 세포, 뇌, 정소 및 난소의 특정 영역 상에서 그 존재가 발견된다. 현재까지, MC1-수용체를 자극하기 위하여 효과적인 항염증 및 면역 조절 반응을 생성하기 위한 화합물 및 방법에 대한 관심이 꾸준히 이어지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 발명의 요약

[0007] [0006] 본 발명에 제공되는 것은, 서열이 His Xaa_1 Arg Trp (SEQ ID NO:1) 또는 D-Trp D-Arg Xaa_2 D-His (SEQ ID NO:2) (상기 서열 중, Xaa_1은 D-Cha, D-Phe 또는 Cha이고, Xaa_2는 D-Cha, D-Phe 또는 Phe이다)인 코어 테트라펩티드를 포함하고, 멜라노코르틴 1 수용체 (melanocortin 1 receptor; MC1R)에 선택적으로 결합하는 실질적으로 순수한 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다. 일부 실시 상태에 있어서, C-말단 서열은 D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO:3)이다.

과제의 해결 수단

[0008] [0007] 또한 본 발명에 제공되는 것은, 서열이 Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_4 Xaa_5 Xaa_6 Xaa_7 Xaa_8 Xaa_9 Xaa_{10} Xaa_{11} Xaa_{12} Xaa_{13}

[0009] (상기 서열 중, Xaa_1은 D-Val, D-Ala 또는 D-Lys이고,

[0010] Xaa_2는 D-Pro, D-Ala 또는 D-Lys이며,

[0011] Xaa_3은 D-Lys, D-Orn, D-Nle, D-Ala 또는 D-Lys이고,

[0012] Xaa_4는 Gly, 또는 D-Ala이며,

[0013] Xaa_5는 D-Trp, Trp, D-3-벤조티에닐-Ala, D-5-하이드록시-Trp, D-5-메톡시-Trp, D-Phe, 또는 D-Ala이고,

[0014] Xaa_6은 D-Arg, D-His, 또는 D-Ala이며,

[0015] Xaa_7은 D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-플루오로-Phg, D-3-피리딜-Ala, D-Thi, D-Trp, D-4-니트로-Phe, 또는 D-Ala이고,

[0016] Xaa_8은 D-His, His, D-Arg, Phe, 또는 D-Ala이며,

[0017] Xaa_9는 D-Glu, D-Asp, D-시트룰린, D-Ser, 또는 D-Ala이고,

[0018] Xaa_{10}은 D-Met, D-부티오닌, D-Ile, 또는 D-Ala이며,

[0019] Xaa_{11}은 D-Ser, D-Ile 또는 D-Ala이고,

[0020] Xaa_{12}는 D-Tyr, D-Ser, 또는 D-Ala이며,

[0021] Xaa_{13}은 D-Ser 또는 D-Ala이고,

[0022] Xaa_{1-3}가 모두 D-Ala인 경우를 제외하고, 단지 1개의 Xaa_{1-13}만이 D-Ala이며,

[0023] 단지 1개의 Xaa_{1-13}만은 L-아미노산이다)인 폴리펩티드를 포함하고, 멜라노코르틴 1 수용체 (MC1R)에 선택적으로 결합하는 실질적으로 순수한 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다.

[0024] [0008] 또 다른 측면에서 본 발명에 제공되는 것은

[0025] 서열이

[0026] D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg Phe D-His D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO:4),

[0027] D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Cha D-His D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO:5),

[0028] Ser Tyr Ser Met Glu His Cha Arg Trp Gly Lys Pro Val (SEQ ID NO:6), 또는

[0029] D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Phe D-His D-Glu D-Met D-Ser D-Tyr D-Ser (SEQ ID NO:7)

[0030] 인 폴리펩티드를 포함하는 실질적으로 순수한 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다.

[0031] [0009] 다른 측면에 있어서, 본원 발명에 제공된 폴리펩티드는 PEG화한 것이다.

[0032] [0010] 일부 실시 상태에 있어서, 본원 발명에 제공된 화합물은 생물학적으로 활성인 모이어티에 컨쥬게이트될 수 있다.

[0033] [0011] 일부 실시 상태에 있어서, 본원 발명에 제공된 화합물은 선택적으로 MC1R에 결합한다. 일부 실시 상태에 있어서, 이 화합물은 MC1R을 선택적으로 활성화시키는 능력과, 시험관내 (*in vitro*)에서의 혈장내 안정성, 또는 프로테아제 분해에 대한 내성 중 어느 한 가지 이상의 능력을 나타낸다.

[0034] [0012] 한 가지 측면에 있어서, 본원 발명에 제공되는 것은 본원 발명에 제공된 실질적으로 순수한 화합물의 어느 한 가지와 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물이다.

[0035] [0013] 다른 측면에 있어서, 본원 발명에 제공되는 것은 본원 발명에 제공된 화합물의 유효 치료량과 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체에서의 자가 면역 질환 또는 질병의 치료 방법이다. 일부 실시 상태에 있어서, 상기 자가 면역 질환 또는 질병은 다발성 경화증, I형 당뇨병, 재생 불량성 빈혈, 그레이브스병, 셀리악병, 크론병, 루퍼스, 관절염, 골관절염, 자가면역성 포도막염 및 중증 근무력증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이다.

[0036] [0014] 다른 측면에 있어서, 본원 발명에 제공되는 것은 본원 발명에 제공된 화합물의 유효 치료량과 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체에서의 염증 치료 방법이다. 일부 실시 상태에 있어서, 상기 염증은 염증성 장질환, 류마티스성 관절염, 알러지, 아테롬성 동맥 경화증, 건선, 위염 및 허혈성 심장병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질병과 관련되어 있는 것이다.

[0037] [0015] 한 가지 측면에 있어서, 본원 발명에 제공되는 것은 본원 발명에 제공된 화합물의 유효 치료량과 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체에서의 이식 거부 반응 감소 또는 억제 방법이다.

[0038] [0016] 다른 측면에 있어서, 본원 발명에 제공되는 것은 본원 발명에 제공된 화합물의 유효 치료량과 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체에서의 흑색종 치료 방법이다.

[0039] [0017] 다른 측면에 있어서, 본원 발명에 제공되는 것은 항암 페이로드 (payload)에 컨쥬게이팅된 본원 발명에 제공된 화합물을 포함하는 컨쥬게이트의 유효 치료량과 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제를 개체

에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체에서 흑색종 치료 방법이다. 상기 항암 페이로드는 방사성 핵종, 방사성 증감제, 광감작제, 화학 치료제 또는 독소이다.

[0040] [0018] 다른 측면에 있어서, 본원 발명에 제공되는 것은 본원 발명에 제공된 약학 조성물과 임의로는 이의 사용 설명서를 포함하는 키트이다.

도면의 간단한 설명

[0041] [0019] 도 1은 네이티브 α-MSH에 의한 포도막염의 감소를 나타낸다. 도 1a는 B10.RIII 마우스를 임상 점수가 2 내지 3점이었을 때 네이티브 α-MSH(100 ㎍/마우스)를 정맥내로 매일 처리한 것으로부터의 데이타를 나타낸다. 포도막염은 미처리군에 비하여 유의하게 감소되었다 ($p<0.01$). 도 1b는 B10.RIII 마우스를 임상 점수가 1 내지 2점이었을 때 네이티브 α-MSH(100 ㎍/마우스)로 또는 덱사메타손 (0.2 mg/kg 또는 2.0 mg/kg)으로 복강 내로 매일 처리한 것으로부터의 데이타를 나타낸다 (n=5). 망막 염증은 처리를 개시한 후 감소되었다 ($p<0.05$). 별표는 대조군과 비교하였을 때 유의한 차이를 나타낸다.

[0020] 도 2는 RI α-MSH 및 네이티브 α-MSH에 의한 질병의 말기 단계에서 포도막염의 완화를 나타낸다. EAU를 B10.RIII 마우스에서 유도하고, 마우스가 질병말기에 이르렀을 때 (3점), 즉 12일째에, 100 ㎍/마우스 네이티브 α-MSH, RI α-MSH 또는 PBS를 매일, 정맥내로 투여하였다. 도 2a는 네이티브 α-MSH 또는 retro-RI α-MSH로 처리한 마우스로부터의 데이타는 PBS 대조군 마우스에 비교하여 포도막염 질병 눈 점수를 감소시켰음을 나타낸다. 도 2b는 EAU 유도후 16일째 각 군에서 마우스의 개별적 최대 눈 점수를 나타낸다 (n=8). 별표는 각 군간의 유의한 차이를 나타낸다 ($p<0.05$).

[0021] 도 3은 α-MSH 또는 RI α-MSH로 처리한 동물로부터의 망막 사진 및 개별적 눈 점수를 나타낸다. EAU를 B10.RIII 마우스에서 유도하였고, 마우스가 질병의 말기 단계에 이르른 13일째에 시작하여, 100 ㎍/마우스의 네이티브 α-MSH, RI α-MSH 또는 PBS를 사용하여 매일 정맥내 처리하였다. 처리 13일 후 각 군으로부터의 중간 눈 점수를 나타내는 망막의 검안경 검사 (fundoscopic) 사진도 제시된다 (n=11). 3점의 눈 점수를 가진 PBS로 처리된 마우스는 눈의 사분원 몇 군데에 염증성 병변을 나타내었고, 시신경에 가까운 위치에 혈관염이 나타났다 (도 3a). 1점의 눈 점수를 가진 α-MSH 및 RI α-MSH로 처리된 마우스는 단지 시신경 주위에만 염증이 있는 포도막염을 나타내었다 (각각 도 3b 및 3c). 망막은 각 군으로부터 중간 눈 점수를 나타낸다. 처리후 13일째 각 군에서 마우스의 개별적 눈 점수를 그래프로 나타낸다. 별표는 각 군 사이의 유의한 차이를 나타낸다 ($p<0.01$).

[0022] 도 4는 EAU에서 RI α-MSH 및 네이티브 α-MSH로 처리된 마우스의 조직학 사진을 나타낸다. 암컷 B10.RIII 마우스에 IRBP + CFA를 주사하여 EAU를 유도하였다. 마우스가 임상 점수 3점에 이르렀을 때 retro-inverso α-MSH, 네이티브 α-MSH, 또는 PBS 각각 100 ㎍/마우스를 매일 정맥내로 처리하였다. 마우스의 RI α-MSH 또는 α-MSH 처리군은 눈의 염증 반응을 완화시켰다 ($p<0.05$). 사진은 PBS (도 4a), α-MSH (도 4b), 및 RI α-MSH (도 4c)로 처리된 마우스 군으로부터 중간 눈 점수를 나타내는 처리 시작 후 10일째 눈의 헤마톡실린 및 에오신 염색 결과를 나타낸다. 100배 확대도이다.

[0023] 도 5는 스크램블 펩티드 대조군과 비교한 포도막염에 대한 retro-inverso α-MSH의 매일 복강내 투여의 효과를 나타낸다. B10.RIII 마우스를 질병 유도 후 11일째에, RI α-MSH 또는 스크램블 D 아미노산 펩티드 대조군 100 ㎍으로 매일 복강내로 처리하였다. 데이타는 RI α-MSH(n=4) 및 스크램블 대조군 펩티드 (n=5)로 처리된 마우스 군의 임상 평균 눈 점수를 나타낸다. 마우스는 총 13일간 처리되었다. 데이타는 두 개의 실험을 나타낸다. 별표는 각 군 사이의 유의한 차이를 나타낸다 ($p<0.04$).

[0024] 도 6은 망막 염증의 치료에서 RI α-MSH의 효능을 나타낸다. B10RIII 마우스를 임상 점수가 4점일 때 RI α-MSH(3, 10, 또는 100 ㎍/마우스)로 매일 IP 주사하여 처리하였다. 스크램블 펩티드 대조군을 100 ㎍/마우스로 매일 주사하였다. 그래프는 시간에 따른 임상 점수를 나타낸다. 10 또는 100 ㎍/마우스로 시작한 후, 감소된 망막 염증이 관찰되었다. 더 낮은 용량의 RI α-MSH(3 ㎍/마우스) 또는 PBS 또는 대조군 스크램블 펩티드 (n=4)를 사용하여 처리된 마우스에서 한정된 장점을 가지는 임상 반응이 관찰되었다. 별표는 각 군 사이의 유의한 차이를 나타낸다 ($p<0.05$).

[0025] 도 7은 쥣과 흑색종 세포에서 cAMP 생성에 대한 RI α-MSH의 효과를 나타낸다. cAMP를 네이티브 α-MSH, retro-inverso α-MSH 또는 스크램블 대조군 펩티드를 0.01 ng/ml - 1000 ng/ml의 농도로 세포에 처리한 후, B16-F1 흑색종 세포에서 측정하였다. 도 7a는 네이티브 α-MSH 및 RI α-MSH 양자가 cAMP 수준을 유의하게 증가시켰음을 나타낸다. cMAP를 측정하기 위하여 사용된 대조군은 100 μM 농도의 forskolin을 포함하였다. 도 7b는 알라닌 스캐닝 데이타를 나타낸다. 1 ㎍/ml의 RI α-MSH의 알라닌 치환된 펩티드를 쥣과 B16-F1 흑색종 세포주

의 cAMP 수준의 증가에 대하여 시험하였다. 데이타는 두 개의 실험의 대표예이다. 서열 목록은 표 1에서 찾아볼 수 있다. 발표는 각 군 사이의 유의한 차이를 나타낸다 ($p<0.01$).

[0026] 도 8은 MOG 유도된 EAE의 질병 경로를 나타낸다. EAE를 MOG35-55 펩티드 (200 ㎍/마우스) 및 CFA 에멀젼의 주사에 의하여 C57BL/6 마우스에서 유도하였다. 퍼투시스 독소를 0일째 및 2일째에 주사하였다. 10일째에 100 ㎍의 α-MSH, 100 ㎍의 RI α-MSH, 또는 PBS로 마우스에 매일 복강내 처리하는 것을 시작하였다. 도 8a는 매일 기록한 임상 질병 점수를 나타낸다. 도 8b는 질병 유도 후 20일째 각 군에서 개별적인 질병 점수를 나타낸다.

[0027] 도 9는 RI α-MSH에 의한 평균 EAE 질병 점수의 감소를 나타낸다. EAE를 MOG35-55 펩티드 (200 ㎍/마우스) 및 CFA의 에멀젼을 주사함으로써 C57BL/6 마우스에서 유도하였다. 퍼투시스 독소를 0일째 및 2일째에 주사하였다. 10일째부터, α-MSH 또는 RI α-MSH를 100 ㎍ 또는 30 ㎍/마우스로 복강내 매일 처리하거나, 덱사메타손 2 mg/kg 또는 PBS를 매일 복강내 처리하였다. 임상 질병 점수를 매일 기록하였다.

[0028] 도 10은 RI α-MSH로 처리한 마우스의 척수 조직을 나타낸다. EAE를 MOG35-55 펩티드 (200 ㎍/마우스) 및 CFA 에멀젼을 주사함으로써 C57BL/6 마우스에서 유도하였다. 퍼투시스 독소를 0일째 및 2일째에 주사하였다. 10일째에 시작하여 RI α-MSH의 100 ㎍/마우스를 복강 내로 매일 처리하였다. 척수를 질병 유도 후 24일째에 수집하였다. 각 군으로부터의 대표적인 2마리의 마우스를 나타내었다. 즉, PBS 처리된 것 (도 10a 및 10 c)과, RI α-MSH 처리된 것 (도 10b 및 10d). 화살표는 염증성 세포 침윤의 부위를 나타낸다.

[0029] 도 11은 EAE의 질병기 도중 MOG 펩티드로 프라이밍된 (primed) 마우스의 비장에서 TNF α 및 IL-10 mRNA의 양을 나타낸다. 마우스를 0일째에 MOG 펩티드 200㎍으로 프라이밍하고, 10 내지 15일째에 PBS, α-MSH(100 ㎍) 또는 RI α-MSH(100 ㎍)로 매일 처리하였다. 비장을 처리 시작 후 1일째 (도 11a 및 도 11b), 4일째 (도 11c 및 11d) 및 7일째 (도 11e 및 11f)에 정량적 PCR에 의하여 TNF α 및 IL-10 mRNA의 발현에 대하여 분석하였다. 데이타는 각 처리군에서 4마리 마우스의 평균을 나타내고 있다. RNA 양은 β-액틴에 대하여 정규화한 것이다.

[0030] 도 12는 MOG 35-55 펩티드에 대한 리콜 (recall) 반응을 나타내고 있다. 마우스를 0일째에 MOG35-55 펩티드 200 ㎍으로 프라이밍하였다. 2일 내지 8일째에, 마우스에 PBS, 100 ㎍ α-MSH 또는 100 ㎍ RI α-MSH (n=5)를 복강내 주사하였다. 9일 째에, 비장 (도 12a) 및 림프절 (도12b) 세포를 수집하여, 시험관내에서 25 ㎍/ml MOG35-55 펩티드 또는 OVA 펩티드로 자극시켰다. 세포를 배양 3일째에 [3H] 티미딘으로 펄스 처리하였다. 데이타는 표준 ± 표준편차로 나타낸다. 상청액을 24시간 후 MOG 펩티드로 자극시킨 비장 세포 배양액으로부터 모으고, TNF α 및 IFN γ (도 12c) 및 MCP-1 (도 12d)의 사이토킨 양을 유세포 분석을 통하여 분석하였다. 데이타는 평균 ± 표준 편차로 나타낸다. 나이브 (naive) 마우스는 MOG 펩티드로 프라이밍 하지 않은 것을 말한다.

[0031] 도 13은 MOG로 프라이밍된 마우스에서 RI α-MSH 처리 후 혈청 및 비장에서 사이토카인 특성을 나타낸다. 마우스를 0일째에 MOG35-55 펩티드 200 ㎍으로 프라이밍하였다. 2 내지 8일째에, 마우스에 PBS, 100 ㎍ α-MSH 또는 100 ㎍ RI α-MSH (n=5)로 복강내 주사하였다. 9일째에, 비장 및 혈청을 모았다. 도 13a 및 13b는 각각 비장 중의 TNF-α 및 IL-10 mRNA 수준을 나타내며, 이는 실시간 PCR에 의하여 정량된 것이다. 데이타는 각 처리군에서 4마리의 평균을 나타내고 있다. RNA 수준은 β-액틴에 대하여 정규화한 것이다. 혈청을 유세포 분석을 통하여 사이토카인 수준에 대하여 분석하였다. 도 13c는 TNF-α, MCP-1, IL-6 혈청 수준을 나타내고, 도 13d는 IL-10 및 IL-12 혈청 수준을 나타낸다. 나이브 마우스는 MOG 펩티드로 프라이밍하지 않은 것을 말한다. 데이타는 평균 ± 표준 편차로 나타낸다.

[0032] 도 14는 마크로파지 마커에 대한 α-MSH 및 RI α-MSH의 효과를 나타낸다. 마우스를 생체내에서 MOG 펩티드로 프라이밍하고, 1 내지 7일째에 α-MSH 또는 RI α-MSH(100 ㎍/마우스)로 처리하였다. 비장 마크로파지를 유세포 분석을 통하여 CD14, CD40 및 CD86의 발현 수준에 대하여 분석하였다. 세포는 $CD11b^{+}$ (도 14a) 또는 $F4/80^{+}$ (도 14b) 마크로파지 세포 군집에 대하여 게이팅되었다 (gated). 데이타는 게이팅된 마크로파지 집단 (n=5)의 양성 평균 %를 나타낸다.

[0033] 도 15는 복강내 마크로파지 (도 15a) 및 비장 (도 15b)에서 mMC1R mRNA 수준의 LPS 유도성 증가를 나타낸다. C57BL/6 마우스 (n=4)에 LPS (1 ㎍/마우스)를 복강내 주사하였다. 복강내 마크로파지 및 비장을 0.5시간, 1시간, 및 24시간째에 수집하였다. mMC1R mRNA 수준을 실시간 PCR로 정량하였다. RNA 양을 18s에 대하여

정규화하였다.

[0034] 도 16은 MSH의 효과는 생체내 LPS 염증 모델임을 나타내고 있다. C57BL/6 마우스에 LPS 1 ㎍을 복강내 주사하였다. 30분 후, 마우스를 덱사메타손 (2 mg/kg) 및 α-MSH (도 16a 내지16c) 또는 RI α-MSH 유사체 891 (도 16d-16f)로 복강내 처리하였다. LPS 챌린지한지 2시간 후 혈청을 모았다. TNF-α (도 16a 및 16d), MCP-1 (도 16b 및 16e), IL-10 (도 16c 및 16f)를 유세포 분석계에 의하여 유세포 비드 분석법으로 분석하였다. 데이타는 각 사이토카인 측정치 및 각 군 (n=6)의 평균을 나타내고 있다.

[0035] 도 17은 RI-α-MSH 및 α-MSH의 혈장 및 혈청 중에서의 안정성을 나타낸다. 도 17a는 37℃에서 혈장 및 PBS 중의 RI-α-MSH 및 α-MSH 펩티드 안정성을 나타낸다. 도 17b는 단일 정맥내 주사 후 RI-α-MSH 및 α-MSH 펩티드의 혈청내 반감기를 나타낸다.

[0036] 도 18은 MSH (도 18a) 및 RI-MSH (도 18b)의 멜라노코르틴 수용체 1, 3, 4, 및 5에 대한 결합 연구 결과를 나타낸다.

[0037] 도 19는 코어 테트라펩티드 HfRW 및 retroinverso MSH의 역전을 나타낸다.

[0038] 도 20은 RI-MSH의 여러 가지 위치에서 비천연 아미노산 잔기의 치환을 나타낸다.

[0039] 도 21은 MC1R에서 RI-MSH 및 이의 변이체의 대표적인 경쟁적 결합 분석을 나타낸다.

[0040] 도 22는 B16 F1 쥣과 흑색종 세포에서 cAMP 수준에 대한 RI α-MSH 유사체의 효과를 나타내고 있다. 도 22a: 유사체 890, 891 및 892; 도 22b: 유사체 893, 894 및 895; 도 22c: 유사체 880, 886 및 878; 및 도 22d: 유사체 872, 878 및 869.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 정의

[0043] [0041] 본 발명의 α-MSH 및 MC1R 단백질 및 핵산은 특정 공급원의 것 또는 특정 종의 것으로 한정되지 않는다. 그러므로, 이러한 단백질 및 핵산은 분리된 것이거나 재조합 형태일 수 있다.

[0044] [0042] α-멜라노사이트 자극 호르몬 (α-MSH)은 서열 Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val (SEQ ID NO:8) (SYSMEHFRWGKPV)을 포함하는 폴리펩티드이다. α-MSH는 최근에 이의 항염증 능력 및 면역 조절 능력에 대하여 시험된 바 있다. α-MSH는 프로피오멜라노코르틴 호르몬 (POMC)의 세포내 단백질 분해로부터 유래된다. α-MSH 뉴로펩티드는 여러 기관에서 검출되며, 신경, 뇌하수체, 장, 피부 및 면역 세포에 의하여 생성된다. α-MSH는 이펙터 T 세포 기능을 억제하고, 조절 T 세포를 유도하며, 자가 면역 및 이식 모델에서 유익한 효과를 가지는 것으로 보고되어 있다.

[0045] [0043] "컨쥬게이트"는 2개 이상의 구성원이 서로 연결, 결합, 커플링, 복합체화 또는 다른 방식으로 결합된 것을 포함한다. 상기 구성원은 공유 결합, 이온 결합, 정전기성 결합, 수소 결합, 반데르 발스 상호 작용 또는 물리적 수단을 통하여 서로 결합될 수 있다.

[0046] [0044] "생물학적으로 활성인" 모이어티에는 생리학적 반응을 유발시키거나 조절하는 분자 또는 화합물이 포함된다. 한 가지 측면에 있어서, 상기 생물학적으로 활성인 화합물은 멜라노코르틴 수용체, 좋기로는 MC1-수용체를 자극한다.

[0047] [0045] "조절하다" 및 "조절"이라는 용어는 발현, 양 또는 활성 등이 조절제의 부재하에서 관찰되는 것보다 더 크거나 더 적을 수 있도록, 1종 이상의 단백질 또는 단백질 서브 유닛의 활성이 상향 조절 또는 하향 조절되는 것을 일컫는다. 예를 들어, "조절하다"라는 용어는 "억제하다" 또는 "자극하다"를 의미할 수 있다.

[0048] [0046] "C-말단 서열"이라는 용어는 반드시 그러한 것은 아니지만 보통 카르복시기가 아미노산쇄의 말단에 있는 것을 의미한다. 펩티드 서열을 기재하는 데 있어서, C말단을 오른쪽에 두고, 서열을 N-말단에서부터 C-말단 방향으로 기재한다. C말단 서열은 1 내지 100개의 아미노산, 좋기로는 2 내지 15개의 아미노산, 더욱 더 좋기로는 3 내지 10개의 아미노산을 포함할 수 있다. C-말단 서열은 카르복시기로 끝날 수 있고, 또는 말단은 잘 알려져 있는 방식으로 기능기를 포함하도록 변형될 수 있다 (예컨대, 표적화기, 리텐션 시그널, 지질 및 앵커).

[0049] [0047] 본 발명은 "실질적으로 순수한 화합물"을 제공한다. "실질적으로 순수한 화합물"이라는 용어는 다른 단백질, 지질, 탄수화물, 핵산 및 기타 자연 발생적인 생물학적 물질이 실질적으로 존재하지 않는 폴리펩티드 (예컨대, MC1R에 결합하는 폴리펩티드 또는 이의 단편)를 설명하는 데 사용된다. 예를 들어, 폴리펩티드 등의 실질

적으로 순수한 분자는 해당 분자의 적어도 60% 건조 중량을 차지할 수 있다. 폴리펩티드의 순도는 표준 방법을 사용하여 측정할 수 있는데, 이러한 방법으로는, 예컨대, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (가령, SDS-PAGE), 컬럼 크로마토그래피 (가령, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)), 및 아미노 말단 아미노산 서열 분석이 있다.

[0050] [0048] 한 가지 실시 상태에 있어서, "선택적으로 결합한다"라는 용어는 본 발명에서 만들어지거나 사용된 화합물 또는 폴리펩티드가 2가지 이상의 수용체의 혼합물이 존재할 때에 (예컨대, 멜라노코르틴 수용체, MC1, MC2, MC3, MC4, MC5 수용체) 어떤 한 가지 타입의 수용체에 더 잘 결합함을 의미한다.

[0051] [0049] "아미노산" 또는 "아미노산 서열"은 올리고펩티드, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열 또는 이들의 단편, 일부, 또는 서브유닛과, 천연 발생 또는 합성 분자를 말하는 것이다. "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합, 즉, 펩티드 이소스테어 (isosteres)를 통하여 서열 연결된 아미노산을 포함하는 것이고, 20개의 유전자 코딩된 아미노산 이외의 변형된 아미노산도 함유할 수 있다. "폴리펩티드"라는 용어는 펩티드 및 폴리펩티드 단편, 모티프 등을 포함하는 것이다. 아미노산의 대문자의 단문자 약어는 천연 L-이성질체를 말하는 것이고, 아미노산의 소문자의 단문자 약어는 D-이성질체를 말하는 것이다.

[0052] [0050] "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 호환 사용되며, 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 말하는 것이다. 펩티드 및 폴리펩티드는 전체적으로 아미노산의 합성 비천연 유사체들로 이루어질 수 있거나, 또는 부분적으로 천연 펩티드 아미노산들 및 부분적으로 아미노산의 비천연 유사체로 이루어진 키메라 분자일 수 있다. 한 가지 측면에 있어서, 폴리펩티드는 본 발명의 조성물, 세포 시스템 또는 방법에 사용된다 (예컨대, 본 발명의 1가지 이상의 효소를 발현하는 플라스미드를 갖는 호스트 세포). 뿐만 아니라, 폴리펩티드는 다른 작용기에 공유 결합된 아미노산의 중합체로 이루어진 화합물을 일컫는 것일 수도 있다 (가령, 용해기, 표적화기, PEG, 비아미노산기, 또는 다른 치료제).

[0053] [0051] 아미노산은 다음의 괄호 속의 약자를 사용하여 약칭될 수 있다. 프롤린 (Pro), 발린 (Val), 리신 (Lys), 오르니틴 (Orn), 노르류신 (Nle), 글리신 (Gly), 트립토판 (Trp), 알라닌 (Ala), 페닐알라닌 (Phe), 아르지닌 (Arg), 히스티딘 (His), 글루탐산 (Glu), 아스파르트산 (Asp), 세린 (Ser), 메티오닌 (Met), 이소류신 (Ile), 티로신 (Tyr), 사이클로헥실알라닌 (Cha), 4-플루오로-D-페닐글리신 (4-플루오로-D-Phg), 2-티에닐-D-알라닌 (D-Thi).

[0054] [0052] "치료", "치료하는", "치료하다" 등의 본 발명에 사용된 용어는 포유류에게 개체에서 예방, 치료 또는 다른 유리한 효과를 유발시킬 수 있는 약제를 투여하는 것을 말한다. 치료는 개체에서 질병 또는 질병의 징후를 감쇄시키는 것 또는 완화시키는 것을 유발할 수 있다.

[0055] [0053] 본 발명에 사용된 "a', "an" "the" 등의 단수 용어는 별도로 나타내지 않는 한 복수의 의미도 포함하는 것이다. 예를 들어, "a target cell (표적 세포)"는 1개 이상의 표적 세포를 포함하는 것이다.

[0056] [0054] 본 발명의 폴리펩티드 조성물은 비천연 구조 성분의 임의의 조합체를 함유할 수 있다. 개별적인 펩티드 잔기는 펩티드 결합에 의하여, 다른 화학 결합에 의하여, 또는 커플링 수단에 의하여, 가령, 글루타르알데히드, N-하이드록시숙신이미드 에스테르, 이작용성 말레이미드, N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드 (DCC) 또는 N,N'-디이소프로필카르보디이미드 (DIC)에 의하여 연결될 수 있다. 전통적인 아미드 결합 (펩티드 결합) 대신에 사용될 수 있는 연결기로는 예컨대, 케토메틸렌 (가령, -C(=O)-NH- 대신 -C(=O)-CH_2-), 아미노메틸렌 (CH_2-NH), 에틸렌, 올레핀 (CH=CH), 에테르 (CH_2-O), 티오에테르 (CH_2-S), 테트라졸, 티아졸, 레트로아미드, 티오아미드, 또는 에스테르가 있다. 예컨대, 본 발명에 참조로서 포함되는 문헌 [Spatola (1983) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp. 267-357, "Peptide Backbone Modifications", Marcel Dekker, NY]을 참조할 것.

[0057] [0055] 본 발명의 방법의 실시에 사용되는 폴리펩티드는 자연적인 방법, 가령, 해독후 가공 (예컨대, 인산화, 아실화 등), 또는 화학적 변형법으로 변형될 수 있으며, 생성된 변형된 폴리펩티드일 수 있다. 변형은 펩티드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복실 말단을 포함하여 폴리펩티드 중 어느 곳에서도 발생할 수 있다. 동일한 유형의 변형이 동일하게 발생할 수 있거나, 또는 소정의 폴리펩티드의 여러 곳에서 정도를 달리하여 변형이 발생할 수 있다는 것을 잘 알 것이다. 또한, 소정의 폴리펩티드는 여러 가지로 변형될 수 있다. 변형에는 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 부착, 헴 모이어티의 공유 부착, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스파티딜이노시톨의 공유 부착, 가교 결합 사이클화, 이황화 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교 결합의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토

일화, 산화, PEG화, 단백질 분해 가공, 인산화, 프레닐화, 셀레노일화, 황산화 및 전달 RNA 매개성 단백질의 아미노산의 첨가, 가령 아르지닐화가 있다. 본원에 참조로서 포함되는 문헌 [Creighton, T.E., Proteins - Structure and Molecular Properties 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983)]을 참조할 것.

[0058] 화합물의 추가의 실시 상태

[0059] [0056] 일부 실시 상태에 있어서, 본원 발명에 제공되는 것은 서열이 Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_4 Xaa_5 Xaa_6 Xaa_7 Xaa_8 Xaa_9 Xaa_{10} Xaa_{11} Xaa_{12} Xaa_{13}

[0060] (상기 서열 중, Xaa_1은 D-Val, D-Ala 또는 D-Lys이고,

[0061] Xaa_2는 D-Pro, D-Ala 또는 D-Lys이며,

[0062] Xaa_3은 D-Lys, D-Orn, D-Nle, D-Ala 또는 D-Lys이고,

[0063] Xaa_4는 Gly, 또는 D-Ala이며,

[0064] Xaa_5는 D-Trp, Trp, D-3-벤조티에닐-Ala, D-5-하이드록시-Trp, D-5-메톡시-Trp, D-Phe, 또는 D-Ala이고,

[0065] Xaa_6은 D-Arg, D-His, 또는 D-Ala이며,

[0066] Xaa_7은 D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-플루오로-Phg, D-3-피리딜-Ala, D-Thi, D-Trp, D-4-니트로-Phe, 또는 D-Ala이고,

[0067] Xaa_8은 D-His, His, D-Arg, Phe, 또는 D-Ala이며,

[0068] Xaa_9는 D-Glu, D-Asp, D-시트룰린, D-Ser, 또는 D-Ala이고,

[0069] Xaa_{10}은 D-Met, D-부티오닌, D-Ile, 또는 D-Ala이며,

[0070] Xaa_{11}은 D-Ser, D-Ile 또는 D-Ala이고,

[0071] Xaa_{12}는 D-Tyr, D-Ser, 또는 D-Ala이며,

[0072] Xaa_{13}은 D-Ser 또는 D-Ala이다)이고, 멜라노코르틴 1 수용체 (MC1R)에 선택적으로 결합하는 실질적으로 순수한 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다.

[0073] [0057] 일부 실시 상태에 있어서, 본원 발명에 제공된 펩티드 유사체는 MC1R에 선택적으로 결합하고 서열이

[0074] Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_4 Xaa_5 Xaa_6 Xaa_7 Xaa_8 Xaa_9 Xaa_{10} Xaa_{11} Xaa_{12} Xaa_{13}

[0075] (상기 서열 중, Xaa_1은 D-Val이고,

[0076] Xaa_2는 D-Pro이며,

[0077] Xaa_3은 D-Lys, D-Orn 또는 D-Nle이고,

[0078] Xaa_4는 Gly이며,

[0079] Xaa_5는 D-Trp, Trp, D-3-벤조티에닐-Ala, D-5-하이드록시-Trp, D-5-메톡시-Trp, 또는 D-Phe이고,

[0080] Xaa_6는 D-Arg 또는 D-His이며,

[0081] Xaa_7은 D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-플루오로-Phg, D-3-피리딜-Ala, D-Thi, D-Trp, 또는 D-4-니트로-Phe이고,

[0082] Xaa_8은 D-His, His, D-Arg, Phe, 또는 D-Ala이며,

[0083] Xaa_9는 D-Glu, D-Asp, D-시트룰린 또는 D-Ser이고,

[0084] Xaa_{10}은 D-Met, D-부티오닌 또는 D-Ile이며,

[0085] Xaa_{11}은 D-Ser 또는 D-Ile이고,

[0086] Xaa_{12}는 D-Tyr 또는 D-Ser이며,

[0087] Xaa_{13}는 D-Ser이고,

[0088] 단지 1개의 Xaa_{1-13}만이 L-아미노산이다)

[0089] 인 폴리펩티드, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0090] [0058] 다른 실시 상태에 있어서, 본원 발명에 제공된 펩티드 유사체는 다음 서열

[0091] Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_4 Xaa_5 Xaa_6 Xaa_7 Xaa_8 Xaa_9 Xaa_{10} Xaa_{11} Xaa_{12} Xaa_{13}

[0092] [여기에서, Xaa_1은 D-Val이고,

[0093] Xaa_2는 D-Pro이며,

[0094] Xaa_3은 D-Lys, D-Orn 또는 D-Nle이고,

[0095] Xaa_4는 Gly이며,

[0096] Xaa_5는 D-Trp or Trp이고,

[0097] Xaa_6는 D-Arg이며,

[0098] Xaa_7은 D-Cha, D-Phe, Phe 또는 D-Thi이고,

[0099] Xaa_8은 D-His 또는 His이며,

[0100] Xaa_9는 D-Glu 또는 D-Ser이고,

[0101] Xaa_{10}은 D-Met, D-부티오닌 또는 D-Ile이며,

[0102] Xaa_{11}은 D-Ser 또는 D-Ile이고,

[0103] Xaa_{12}는 D-Tyr 또는 D-Ser이며,

[0104] Xaa_{13}는 D-Ser이고,

[0105] 단지 1개의 Xaa_{1-13}은 L-아미노산이다]을 갖는 폴리펩티드, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0106] [0059] 본원 발명에 제공된 화합물은 α-멜라노코르틴 자극 호르몬 (α-MSH)의 펩티드 유사체를 포함한다.

[0107] [0060] 한 가지 다른 실시 상태에 있어서, 펩티드 유사체는 D-아미노산으로 이루어진다. 다른 실시 상태에 있어서, 펩티드는 D 아미노산, L 아미노산, 또는 D와 L 아미노산의 혼합물을 포함한다. 다른 실시 상태에 있어서, 펩티드는 40% 이상, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%의 D 아미노산을 포함한다. 본 발명의 화합물은 다음의 비제한적이고 비표준인 아미노산을 포함할 수도 있다. D-오르니틴, D-노르류신, 3-벤조티에닐-D-알라닌, 5-하이드록시-D-Trp, 5-메톡시-D-Trp, 4-플루오로-D-페닐글리신 (4-플루오로-D-Phg), 3-피리딜-D-알라닌, 2-티에닐-D-알라닌 (D-Thi), D-사이클로헥실알라닌 (D-Cha), 4-니트로-D-Phe, D-시트룰린, α-메틸-D-Met 및 D-부티오닌.

[0108] [0061] 일부 실시 상태에 있어서, 코어 테트라펩티드는 아미노산 서열 His Phe Arg Trp 또는 Trp Arg Phe His를 포함하고, 좋기로는 D-아미노산 형태이다. 다른 실시 상태에 있어서, 코어 테트라펩티드는 아미노산 서열 His D-Cha Arg Trp 또는 Trp Arg D-Cha His로 이루어지고, 좋기로는 D-아미노산 형태이다. 일부 실시 상태에

있어서, 코어 테트라펩티드는 4개의 D-아미노산으로 이루어진다. 다른 실시 상태에 있어서, 코어 테트라펩티드는 1개 이상의 비표준 아미노산을 가진다.

[0109] [0062] 본원 발명에 제공된 화합물은 합성 화합물이거나 재조합 화합물일 수 있다. 본원 발명의 화합물은 이 기술 분야에 알려져 있는 통상의 화학 기술에 의하여 제조할 수 있다. 고상 합성법은 문헌을 통하여 공개되어 있다. 가령, 문헌 [Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (E. Atherton, *et al.* 1989)]을 참조할 것. 본 발명의 화합물은 이 기술 분야에 알려져 있는 통상의 분자 생물 기술에 의하여 제조될 수 있다. 이 출원 내에서, 별도로 언급하지 않은 한, 본 출원의 용어 및 설명의 정의는 잘 알려져 있는 몇 가지 문헌 [Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Goeddel, D., ed., Gene Expression Technology, Methods in Enzymology, 185, Academic Press, San Diego, CA (1991); Guide to Protein Purification in Deutshcer, M.P., ed., Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1989); Innis, et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990); Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2nd Ed., Alan Liss, Inc. New York, NY (1987); Murray, E.J., ed., Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, The Humana Press Inc., Clifton, NJ and Lewin, B., Genes VI, Oxford University Press, New York (1997)]에서 찾아볼 수 있다. 상기 참조 문헌은 본원 발명에 모두 포함된다.

[0110] [0063] 일부 실시 상태에 있어서, 본원 발명에 제공된 펩티드 유사체는 멜라노코르틴 1 수용체 (MC1R)에 선택적으로 결합하거나 이를 활성화시킨다. MC1R의 결합 또는 활성화를 측정하기 위하여 임의의 적당한 분석법을 사용할 수 있다. 예컨대, 시험관내 cAMP 유도는 MC1R 활성화를 측정하기 위하여 사용할 수 있다. 시험관내 측정은 생체내 활성화를 나타낼 수 있다. 본 발명의 추가의 실시 상태는 MC1 수용체에 대하여 선택적인 임의의 폴리펩티드를 포함한다. 선택적 MC1 수용체 화합물의 확인은 적당한 스크린 분석법에 의하여 측정할 수 있다. MC1 수용체 결합 분석법의 비제한적인 예는 실시예 4에 기재되어 있다. 일부 실시 상태에 있어서, 바람직한 MC1 수용체는 호모 사피엔스 (*homo sapiens*)로부터의 멜라노코르틴 1 수용체 (GenBank Accession No: NP_002377)를 포함한다.

[0111] [0064] 본 발명의 다른 실시 상태는 cAMP, 일산화질소 (NO), TNF-α TNF-αmRNA, IL-10 mRNA, IL-10, IFNɣ, IL-6, IL-12 및/또는 MCP-1 양을 조절하는 화합물에 관한 것이다. 일부 실시 상태에 있어서, 화합물은 cAMP 수준을 증가시킨다. 다른 실시 상태에 있어서, 이 화합물은 일산화질소 (NO), TNF-α, TNF-α mRNA, IL-10 mRNA, IL-10, IFNɣ, IL-6, IL-12 및/또는 MCP-1의 양을 감소시키거나 억제하는 것에 관한 것이다. 전술한 것의 양을 조절하는 화합물의 확인은 스크린 분석을 통하여 측정할 수 있다. 이 기술 분야에 알려져 있는 허용 가능한 분석법을 전술한 것의 양을 측정하기 위하여 사용할 수 있다. 이러한 양을 바람직하게 조절하는 화합물을 확인하기 위한 분석법의 비제한적인 예들이 실시예에 기재되어 있다.

[0112] [0065] 일부 실시 상태에 있어서, 본 발명의 화합물은 다른 작용 메카니즘에 의하여 면역 반응 및 염증을 조절할 수 있고, 본원 발명에 기재된 메카니즘으로 한정되는 것은 아니다.

[0113] [0066] 일부 실시 상태에 있어서, 본원 발명에 기재된 펩티드는 개선된 혈장내 안정성 및 프로테아제 분해에 대한 내성을 가진다. 혈장내 안정성 및 프로테아제 분해에 대한 내성은 임의의 적당한 방법에 의하여 측정할 수 있다. 비제한적인 실시예는 실시예 19에 기재되어 있다. 시험관내 측정은 성능, 개선된 내성 및 더욱 긴 생체내 반감기를 나타낼 수 있다.

[0114] [0067] 본원 발명에 기재된 방법은 생체내 (*in vivo*), 생체외 (*ex vivo*) 또는 시험관내 (*in vitro*)에서 실시될 수 있다.

[0115] PEG화 펩티드

[0116] [0068] 일부 실시 상태에 있어서, 펩티드는 펩티드의 반감기를 증가시키도록 변형된다. 일부 실시 상태에 있어서, 펩티드는 PEG화된다. 일부 실시 상태에 있어서, PEG화된 펩티드는 1개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 중합체쇄에 공유 결합되거나 컨쥬게이팅된 펩티드에 관한 것이다. PEG 중합체쇄는 변형되거나, 작용화되거나 또는 유도체화된 PEG쇄를 포함할 수 있다. 다른 실시 상태에 있어서, PEG 중합체쇄는 1개 이상의 분지점을 가질 수 있다. 일부 양호한 실시 상태에 있어서, PEG 중합체쇄 및 이의 해당 PEG화된 펩티드는 수용성이고, 용액 중에서 활발히 이동하며, 독성이 없고, 면역원성이 없으며, 인체로부터 제거될 준비가 되어 있고, 인체 내에서 변경된 분포를 가진다. 양호한 실시 상태에 있어서, PEG화된 펩티드의 약동학적 특성은 PEG쇄의 타입에 의하여 조절된

다. PEG화된 펩티드의 제조를 위한 전략 및 방법은 이 기술 분야에 알려져 있는 방법에 의하여 수행된다 본 발명에 참조로서 포함되는 문헌 [G. Pasuta and F.M.Veronese (2007) "Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies" *Progress in Polymer Science* 32(8-9): 933-961] 참조. 단백질 가공의 제1 및 제2 발생 PEG화는 이 기술 분야에서 발견될 수 있다.

[0117] [0069] PEG화의 비제한적인 예는 한쪽 또는 양쪽 말단 (선형 PEG에 대하여)에 PEG 중합체로 적당하게 작용화시키는 제1 단계를 포함한다. 동일한 반응성 모이어티를 가지는 각 말단에서 활성화된 PEG는 "호모 이작용성 (homobifunctional)"으로 알려져 있고, 여기에서, 작용기가 상이하게 존재하는 경우에, PEG 유도체는 "헤테로 이작용성 (hetetobifunctional)" 또는 "헤테로 작용성"으로 불린다. PEG 중합체의 화학적으로 활성인 또는 활성화된 유도체는 PEG를 희망하는 분자에 부착함으로써 제조된다. PEG 유도체에 대한 적당한 작용기의 선택은 PEG에 커플링될 분자 상의 시판되는 반응기의 타입에 기초한다. 반응성 아미노산의 비제한적인 예로는 라이신, 시스테인, 히스티딘, 아르지닌, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌 및 티로신이 있다. N-말단 아미노기 및 C-말단 카르복실산도 사용될 수 있다.

[0118] [0070] 컨쥬게이트용 다른 헤테로 이작용성 PEG: 이들 헤테로 이작용성 PEG는 친수성, 유연성 및 생적합성 스페이서가 필요한 두 개의 개체를 연결시키는 데 유용하다. 양호한 헤테로 이작용성 PEG에 대한 말단기로는 말레이미드, 비닐 술폰, 피리딜 디술피드, 아민, 카르복실산 및 N-하이드록시숙신이미드 (NHS) 에스테르가 있다.

[0119] [0071] 본 발명의 일부 실시 상태에 있어서, PEG화 펩티드는 분자량 범위가 0.2 kDa 내지 100 kDa일 수 있다. 본 발명의 양호한 실시 상태에 있어서, PEG화 펩티드는 분자량이 0.2 kDa 내지 40 kDa일 수 있다. 본 발명의 양호한 실시 상태에 있어서, PEG화 펩티드는 분자량이 0.2 kDa 내지 15 kDa일 수 있다. 다른 실시 상태에 있어서, 시판되는 PEG에 대한 양호한 평균 분자량 (Da 단위; 크기 배제 크로마토그래피로 측정)은 <1k, 2k, 3.5k, 5k, 10k, 20k, 30k, 40k로부터 선택될 수 있으며, 이는 원하는 약동학적 특성에 따라 달라지는 분자량일 수 있다. 예를 들어, 링커로 사용될 수 있는 저분자량 헤테로 이작용성 PEG 및 저분자량 PEG는 펩티드 용해도를 개선시킬 수 있다. PEG는 멀티-암 (multi-arm), 포크형 (forked), 또는 분지쇄형 (branched)일 수 있다.

[0120] [0072] 일부 실시 상태에 있어서, 이 펩티드는 표적화 분자와 컨쥬게이트되거나 표적화 분자로서 작용하는데, 여기서, 표적화 분자는 희망하는 수용체에 차별적으로 결합하는 것을 말한다. 본 발명의 일부 양호한 실시 상태에 있어서, 펩티드는 세포 독성제와 컨쥬게이트된다. '세포 독성제'라는 용어는 세포의 발현 활성, 세포의 기능을 억제 또는 예방하는 물질 및/또는 세포 파괴를 유발하는 물질을 말한다. 이 용어는 방사선 동위원소 화학 치료제, 소형 독소 등의 독소, 또는 박테리아, 균류, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 이들의 단편 및/또는 변이체를 포함하려고 하는 것이다. 세포독성제의 비제한적인 예로는 메이탄신 (maytansine), 돌라스타틴 (dolastatin) 및 타시도틴 (tasidotin) 및 오리스타틴 (auristatin)을 비롯한 이의 유사체가 있다. 본 발명의 다른 실시 상태에 있어서, 세포 독성제의 비제한적인 예로는 메이탄시노이드 (maytansinoids), 이트륨 (yttrium), 비스무쓰 (bismuth), 리신 (ricin), 리신 A-쇄 (ricin A-chain), 사포린 (saporin), 독소루비신 (doxorubicin), 다우노루비신 (daunorubicin), 탁솔 (taxol), 에티듐 브로마이드 (ethi디um bromide), 미토마이신 (mitomycin), 에토포사이드 (etoposide), 테노포사이드 (tenoposide), 빈크리스틴 (vincristine), 빈블라스틴 (vinblastine), 콜히친 (colchicine), 디하이드록시 안트라신 디온 (디hydroxy anthracin 디one), 액티노마이신 (actinomycin), 디프테리아 독소 서브유닛 A (디phtheria toxin subunit A), 결실된 슈도모나스 외독소 (truncated Pseudomonas exotoxin) (PE) A, PE40, 아브린 (abrin), 아브린 A 쇄 (abrin A chain), 모데신 A 쇄 (modeccin A chain), 알파 사신 (알파-sarcin), 겔로닌 (gelonin), 미토겔린 (mitogellin), 레스트릭토신 (restrictocin), 페노마이신 (phenomycin), 에노마이신 (enomycin), 큐리신 (curicin), 크로틴 (crotin), 칼리케아미신 (calicheamicin), 사파오나리아 오피시날리스 억제제 (sapaonaria officinalis inhibitor), 및 글루코코르티코이드 (glucocorticoid) 및 기타 화학 치료제와, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} 등의 방사선 동위원소 및 Lu의 방사선 동위원소가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 항체는 프로드럭을 이의 활성형으로 전환시킬 수 있는 항암 프로드럭 활성화 효소에 컨쥬게이팅될 수 있다.

[0121] [0073] 펩티드는 이 기술 분야에 이미 알려져 있는 방법에 의하여 세포 독성제 또는 표적화제에 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 본 발명의 일부 양호한 실시 상태에 있어서, 링커의 존재가 상기 펩티드 또는 컨쥬게이트 제제의 기능, 결합, 독성 또는 함유를 실질적으로 방해하지 않는 한 펩티드는 컨쥬게이트를 형성하기 위해 하나 이상의 링커들에 의해 세포독성제 또는 표적화제에 결합된다.

[0122] [0074] 링커의 비제한적인 예에는 이온 결합 및 공유 결합 및 컨쥬게이팅된 세포에 의하여 내부화될 표적화제가 표적화되도록 하는 임의의 다른 충분히 안정한 결합이 있다. 링커 모이어티는 희망하는 특성에 따라 선택된다.

링커 선택의 고려 사항에는 컨쥬게이팅된 성분의 근접성에 의하여 유발되는 입체 장애의 감소 또는 완화, 컨쥬게이트의 다른 특성의 변화, 가령, 특이성, 독성, 용해도, 혈청 안정성 및/또는 컨쥬게이트의 세포내 이용 가능성 및/또는 결합의 유동성의 증가가 있다. 링커는 임의의 결합 타입일 수 있고, 그 예는 본원 발명에 참조로서 포함되는 미국 특허 제7,166,702호 및 제5,194,425호에 기재되어 있다.

[0123] [0075] 화학적으로 결합되는 컨쥬게이트에 적합한 링커 및 결합에는 디설파이드 결합, 티오에테르 결합, 힌더드 디설파이드 결합 및 유리 반응성 작용기 간의 공유 결합, 가령, 아민기 및 티올기 간의 공유 결합이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이들 결합은 헤테로 이작용성 시약을 사용하여 폴리펩티드 한쪽 또는 양쪽에 반응성 티올기를 생성하고, 이어서 하나의 폴리펩티드 상의 티올기를 반응성 티올기 또는 아민기와 반응시킴으로써 반응성 말레이미도기 또는 티올기가 한쪽에 결합될 수 있도록 할 수 있다. 다른 링커에는 산 분해성 링커, 가령, 비스말레이미도에톡시 프로판, 산 취약성-트랜스페린 컨쥬게이트 및 아디프산 디하이드라지드 등, 더욱 산성인 세포내 대응부에서 절단되는 것과, UV 또는 가시광선에 노출되었을 때 절단되는 크로스 링커 및 인간 IgG1의 불변부로부터 유래한 CH1, CH2, 및 CH3 등으 가변 도메인 등의 링커가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. (참조: 본원 발명에 참조로서 인용되는 Batra *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:379-386).

[0124] [0076] 화학 링커 및 펩티드 링커는 펩티드 및 표적화제 및 세포 독성제에 링커를 공유 커플링시킴으로써 삽입될 수 있다. 아래에 제시된 헤테로 2 작용성 제제는 이러한 공유 커플링을 수행하기 위하여 사용될 수 있다.

[0125] 헤테로 이작용성 공유 결합 시약

[0126] [0077] 아미노기와 티올기 간의 공유 결합을 형성하여, 단백질에 티올기를 도입하기 위하여 사용될 수 있는 다양한 헤테로 이작용성 가교 결합 시약은 이 기술 분야의 숙련자에게 알려져 있다. 예컨대, 문헌 [the PIERCE CATALOG, Immuno Technology Catalog & Handbook, 1992-1993, which describes the preparation of and use of such reagents and provides a commercial source for such reagents] 참조할 것. 또한, 문헌 [Cumber *et al.* (1992) *Bioconjugate Chem.* 3':397-401; Thorpe *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:5924-5931; Gordon *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:308-312; Walden *et al.* (1986) *J. Mol. Cell Immunol.* 2:191-197; Carlsson *et al.* (1978) *Biochem. J.* 173: 723-737; Mahan *et al.* (1987) *Anal. Biochem.* 162:163-170; Wawryznaczak *et al.* (1992) *Br. J. Cancer* 66:361-366; Fattom *et al.* (1992) *Infection & Immun.* 60:584-589]을 참조할 것. 상기 문헌 안에 제공된 모든 인용 문헌도 본 발명에 포함된다. 이들 시약은 표적화 시약, 케모카인 및 표적화 시약 간의 공유 결합을 형성하기 위하여 사용될 수 있다. 이들 시약으로는, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP; 디설파이드 링커); 술포숙신이미딜 6-[3-(2-피리딜디티오)프로피온아미도]헥사노에이트 (술포-LC-SPDP); 숙신이미딜옥시카르보닐-α-메틸 벤질 티오술페이트 (SMBT, 힌더드 디술페이트 링커); 숙신이미딜 6-[3-(2-피리디이디티오)프로피온아미도]헥사노에이트 (LC-SPDP); 술포숙신이미딜 4-(N-말레이미도 메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트 (술포-SMCC); 숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)부티레이트 (SPDB; 힌더드 디설파이드 결합 링커); 술포숙신이미딜 2-(7-아지도-4-메틸쿠오마린-3-아세트아미드) 에틸-1,3-디티오프로피오네이트 (SAED); 술포-숙신이미딜 7-아지도-4-메틸쿠오마린-3-아세테이트 (SAMCA); 술포숙신이미딜 6-[알파-메틸-알파-(2-피리디이디티오)톨루아미도]헥사노에이트 (술포-LC-SMPT); 1,4-디-[3'-(2'-피리디이디티오)프로피온아미도]부탄 (DPDPB); 4-숙신이미딜옥시카르보닐-α-메틸-α-(2-피리딜티오)톨루엔 (SMPT, 힌더드 디술페이트 링커); 술포숙신이미딜6[α-메틸-α-(2-피리딜디티오)톨루아미도]헥사노에이트 (술포-LC-SMPT); m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스테르 (MBS); m-말레이미도벤조일-N-하이드록시술포숙신이미드 에스테르 (술포-MBS); N-숙신이미딜(4-아이오도아세틸)아미노벤조에이트 (SIAB; 티오에테르 링커); 술포숙신이미딜(4-아이오도아세틸)아미노 벤조에이트 (술포-SIAB); 숙신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트 (SMPB); 술포숙신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트 (술포-SMPB); 아지도벤조일 하이드라지드 (ABH)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0127] [0078] 다른 헤테로 이작용성 절단 가능한 가교 결합제로는 N-숙신이미딜(4-아이오도아세틸)-아미노벤조에이트; 술포숙신이미딜 (4-아이오도아세틸)-아미노벤조에이트; 4-숙신이미딜-옥시카르보닐-a-(2-피리딜디티오)-톨루엔; 술포숙신이미딜-6-[a-메틸-a-(피리딜디티올)-톨루아미도]헥사노에이트; N-숙신이미딜-3-(-2-피리디이디티오)-프로피오네이트; 숙신이미딜 6[3(-(-2-피리딜디티오)-프로피온아미도]헥사노에이트; 술포숙신이미딜 6[3(-(-2-피리딜디티오)-프로피온아미도]헥사노에이트; 3-(2-피리디이디티오)-프로피오닐 하이드라지드, 엘만 시약 (Ellman's reagent), 디클로로트리아진산 (chlorotriazinic acid), S-(2-티오피리딜)-L-시스테인이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 추가의 예시적인 이작용성 링커 화합물은 미국 특허 5,349,066, 5,618,528, 4,569,789, 4,952,394 및 5,137,877에 개시되어 있고, 이들은 모두 본 발명에 참조로서

포함된다.

[0128] 산에 의하여 절단 가능한 링커, 빛에 의하여 절단 가능한 링커 및 열 민감성 링커

[0129] [0079] 산에 의하여 절단 가능한 링커, 빛에 의하여 절단 가능한 링커 및 열 민감성 링커도 사용할 수 있는데, 특히 반응에 쉽게 접근가능할 수 있도록 하기 위하여 표적화된 제제를 절단하는데 필요한 곳에서 사용할 수 있다. 산에 의하여 절단 가능한 링커에는 비스말레이미도에톡시 프로판; 및 디아디프산 디하이드라지드 링커 (참조: 예컨대, 본원에 참조로서 인용되는 Fattom *et al*. (1992) *Infection & Immun*. 60:584-589) 및 세포내 트랜스페린 사이클링 경로에 들어갈 수 있도록 하기 위한 트랜스페린의 충분한 부분을 함유하는 산 취약성 트랜스페린 컨쥬게이트가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예컨대, 본원에 참조로서 인용되는 문헌 [Welhoener *et al*. (1991) *J. Biol. Chem*. 266:4309-4314] 참조.

[0130] [0080] 빛에 의하여 절단 가능한 링커는 빛에 노출되면 절단되어, 빛에 노출되었을 때 표적화 제제를 방출할 수 있는 링커를 말한다. 예컨대, 본원에 참조로서 포함되는 문헌 [Goldmacher *et al*. (1992) *Bioconj. Chem*. 3:104-107]을 참조할 것. 상기 링커는 본 발명에 참조로서 포함된다. 빛에 노출되면 절단되는 빛에 의하여 절단 가능한 링커는 알려져 있다 (예컨대, 다음 문헌 [Hazum *et al*. (1981) in *Pept., Proc. Eur. Pept. Symp*., 16th, Brunfeldt, K (Ed), pp. 105-110]을 참조-시스테인에 대한 빛에 의하여 절단 가능한 보호기로서의 니트로벤질기의 사용을 기재하고 있음. 또한 문헌 [Yen *et al*. (1989) *Makromol. Chem*. 190:69-72]을 참조- 하이드록시프로필메타크릴아미드 공중합체, 글리신 공중합체, 플루오레신 공중합체 및 메틸로다민 공중합체를 비롯한 수용성의 빛에 의하여 절단 가능한 공중합체를 기재하고 있음, 또한 문헌 [Goldmacher *et al*. (1992) *Bioconj. Chem*. 3:104-107]을 참조- 근자외선 (350 nm)에 노출되었을 때 광분해되는 가교 결합 및 시약을 기재하고 있음, 또한 문헌 [Senter *et al*. (1985) *Photochem. Photobiol*. 42:231-237]을 참조- 빛에 의하여 분해 가능한 결합을 생성시켜, 빛에 노출시 표적화된 제제를 방출시키는 니트로벤질옥시카르보닐 클로라이드 가교 결합제를 기재하고 있다). 상기 문헌에 기재된 모든 인용 문헌은 본원 발명에 참조로서 포함된다. 이러한 링커들은 광섬유를 사용하여 빛에 노출될 수 있는 피부과 질환 또는 안과 질환을 치료하는 데 있어 특정 용도를 가진다. 컨쥬게이트의 투여 후, 눈 또는 피부 또는 다른 인체 부위가 빛에 노출될 수 있고, 이는 컨쥬게이트로부터 표적화된 모이어티를 방출시키는 것을 초래한다. 동물 체내로부터 신속한 제거를 허용하기 위하여 표적화제를 제거하는 것이 바람직하다는 점에서 이러한 빛에 의하여 절단 가능한 링커는 진단 프로토콜과 관련하여 유용하다.

[0131] 화학적 컨쥬게이션을 위한 기타 링커

[0132] [0081] 기타 링커에는 트리틸 링커, 특히, 다양한 정도의 산성도 또는 알칼리도 (alkalinity)에서 치료제의 방출을 제공하는 컨쥬게이트 부류를 발생시키기 위한 유도체화된 트리틸기가 있다. 이에 따라, 방출될 치료제가 치료제의 전달이 필요한 조직 간의 알려져 있는 생리학적 차이에 기초하여 링커를 선택하게 하는 pH 범위에서 예비 선택하는 능력에 의하여 유동성이 부여된다 (참조: 예컨대, 본원 발명에 참조로서 인용되는 미국 특허 제 5,612,474호). 예컨대, 암 조직의 산성도는 정상 조직보다 낮다.

[0133] 펩티드 링커

[0134] [0082] 링커 모이어티는 펩티드일 수 있다. 펩티드 링커는 컨쥬게이트에 사용될 수 있다. 펩티드 링커는 보통 약 2 내지 60개 아미노산 잔기를 가지는데, 예컨대, 약 5개 내지 약 40개, 또는 약 10개 내지 약 30개 아미노산 잔기를 가진다. 선택되는 길이는 링커가 포함되는 용도 등의 인자에 따라서 달라진다.

[0135] [0083] 링커 모이어티는 유연한 스페이서 아미노산 서열일 수 있는데, 가령, 단쇄 항체 연구 분야에서 공지된 것들일 수 있다. 이러한 알려져 있는 링커 모이어티의 예에는 GGGGS, (GGGGS)n, GKSSGSGSESKS, GSTSGSGKSSEGKG, GSTSGSGKSSEGSGSTKG, GSTSGSGKSSEGKG, GSTSGSGKPGSGEGSTKG, EGKSSGSGSESKEF, SRSSG, SGSSC이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 서열 AMGRSGGGCAGNRVGSSLSCGGLNLQAM을 가지는 디프테리아 독소 트립신 민감성 링커가 유용하다.

[0136] [0084] 예컨대, 추가의 링커 모이어티에는 본원 발명에 참조로서 포함되는 문헌 [Huston *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 85:5879-5883, 1988; Whitlow, M., *et al*., *Protein Engin*. 6:989-995, 1993; Newton *et al*., *Biochemistry* 35:545-553, 1996; A. J. Cumber *et al*., *Bioconj. Chem*. 3:397-401, 1992; Ladurner *et al*., *J. Mol. Biol*. 273:330-337, 1997; 및 미국 특허 제 4,894,443호]에 기재된 것들이 있다.

[0137] [0085] 다른 링커에는 카테프신 (cathepsin) B 기질, 카테프신 D 기질, 트립신 기질, 트롬빈 기질, 서브틸리신 기질, Xa 인자 기질 및 엔테로키나아제 기질 등의 효소 기질이 있고, 용해도, 가용성 및/또는 세포내 소거성이 증가된 링커에는 (glymser)n 및 (sermgly)n 등의 링커가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다 (예컨대, 본원 발

명에 참조로서 포함되는 PCT 공개 제WO 96/06641호를 참조할 것, 여기에는 컨쥬게이트에서 사용하기 위한 예시적인 링커가 제공되어 있다). 일부 실시 상태에 있어서, 몇 가지 링커가 각 링커의 희망하는 장점을 이용하도록 포함될 수 있다.

[0138] 컨쥬게이트의 제조

[0139] [0086] 표적화된 제제와 연결된 컨쥬게이트는 화학적 컨쥬게이션, 재조합 DNA 기술, 또는 재조합 발현과 화학적 컨쥬게이션의 조합에 의하여 제조될 수 있다. 본 발명의 펩티드 및 세포 독성제 또는 표적화제는 임의의 방향으로 연결될 수 있고, 1개 이상의 표적화제 및/또는 표적화제가 컨쥬게이트 안에 존재할 수 있다.

[0140] [0087] 본 발명의 양호한 실시 상태에 있어서, 세포 독성제는 알킬 단쇄, 폴리시알산 또는 히알루론산, 폴리펩티드 또는 PEG를 비롯한 친수성 및 생체적합성 스페이서 중합체를 사용하여 펩티드로 고정 (tethered)된다. 본 발명의 일부 양호한 실시 상태에 있어서, 세포 독성제는 제거 가능한 링커, 가령, 카텝신 등의 리소좀 프로테아제에 의하여 절단 가능한 서열을 함유하는 디설파이드 연결 또는 펩티드를 통하여 컨쥬게이트된다. 본 발명의 양호한 실시 상태에 있어서, 스페이서는 펩티드의 N- 또는 C- 말단에 연결된다.

[0141] 제형물

[0142] [0088] 이들 제형물 또는 조성물의 제조 방법은 담체와, 임의로는 1종 이상의 부가 성분과 본 발명의 화합물을 잘 섞이게 하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 이 제형물은 액체 담체, 또는 미세하게 분쇄된 고체 담체, 또는 양자 모두와 함께 본 발명의 화합물을 잘 섞이게 일정하고 균일하게 섞는 단계에 이어, 필요한 경우, 생성물을 성형하는 단계에 의하여 제조된다.

[0143] [0089] 약학 제형물은 약제 제조의 분야에 공지된 임의의 방법에 따라 제조할 수 있다. 이러한 제형물은 감미료, 향료, 착색제 및 보존제를 함유할 수 있다. 제형물은 제조에 적합한 약학적으로 허용 가능한 비독성 부형제와 함께 혼합할 수 있다. 이러한 "부형제"는 일반적으로 해로운 방식으로 조성물의 다른 성분과 상호 작용하지 않고 비독성인 실질적으로 불활성인 물질을 말한다. 약학적으로 허용 가능한 부형제에는 물, 식염수, 폴리에틸렌 글리콜, 히알루론산, 글리세롤 및 에탄올 등의 액체가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 약학적으로 허용 가능한 염에는 예컨대, 트리플루오로아세테이트, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트, 술페이트 등의 무기산 염과, 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등의 유기산의 염이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0144] [0090] 치료제는 전달에 적합한 약학 조성물 또는 약제 형태로 투여될 수 있다. 제형물은 1종 이상의 희석제, 에멀젼화제, 보존제, 완충제, 부형제 등을 포함할 수 있으며, 동결 건조된 분말, 스프레이, 크림, 로션 겔, 패치, 임플란트 등의 형태로 제공될 수 있다. 경구 투여를 위한 약학 제형물은 적당한 투여량으로 이 기술 분야에 알려져 있는 약학적으로 허용 가능한 담체를 사용하여 제형될 수 있다. 이러한 담체는 정제, 필, 분말, 당의정, 캡슐, 액체, 로젠지, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁액 등, 환자가 섭취하기에 적합한 단위 투여형으로 제형될 수 있다. 경구용으로 사용하기 위한 약학 제형물은 정제 또는 당의정 코어를 얻기 위해 고체 부형제로서 제형화될 수 있는데, 상기 제형을 소망하는 경우 적당한 부가 화합물을 첨가한 후 선택적으로 생성된 혼합물을 분쇄하고, 과립 혼합물을 가공하여 제형화될 수 있다. 적당한 고체 부형제는 탄수화물 또는 단백질 충진재이고, 여기에는 락토스, 수크로스, 만니톨 또는 소르비톨을 포함한 당과, 옥수수, 밀, 쌀, 감자 또는 기타 식물로부터의 녹말과, 메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스 또는 소듐 카르복시-메틸 셀룰로스 등의 셀룰로스와, 아라비아 및 트라가칸트를 포함하는 검과, 젤라틴 및 콜라겐 등의 단백질이 있다. 가교 결합된 폴리비닐 피롤리돈, 아가, 알긴산 또는 알긴산 나트륨 등의 이의 염과 같은 붕해제 또는 용해제를 첨가할 수 있다.

[0145] [0091] 수성 현탁액은 수성 현탁액의 제조에 적합한 부형제와 함께 활성 제제 (예컨대, 본 발명의 폴리펩티드 또는 펩티드 유사체)를 함유할 수 있다. 이러한 부형제에는 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 소듐 알기네이트, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸트 및 아카시아 검과, 자연발생 포스파티드 (예컨대, 레시틴), 지방산과 알킬렌 옥사이드의 응축 생성물 (예컨대, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트), 장쇄 지방산 알콜과 에틸렌 옥사이드의 응축 생성물 (예컨대, 헵타데카에틸렌 옥시세탄올), 지방산과 헥시톨에서 유래한 부분 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 응축 생성물 (예컨대, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노-올레이트), 또는 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유래한 부분 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 응축 생성물 (예컨대, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노-올리에이트) 등의 분산제 또는 습윤제가 있다. 수성 현탁액은 에틸 또는 n-프로필 p-하이드록시벤조에이트 등의 1종 이상의 보존제, 1종 이상의 착색제, 1종 이상의 향료 및 수크로스, 아스파탐 또는 사카린 등의 1종 이상의 감미료를 함유할 수 있다. 제형물은 삼투압 조정될 수 있다.

[0146] [0092] 오일계 약제는 본 발명의 소수성 활성 제제의 투여를 위하여 적합하다. 오일계 현탁액은 가령, 아라키스 오일, 올리브 오일, 참기름 또는 코코넛 오일 등의 식물유에, 또는 액체 파라핀 등의 미네랄 오일에, 또는 이들의 혼합물에 활성 제제 (가령, 본 발명의 키메라 조성물)을 현탁시킴으로써 제형될 수 있다. 본 발명에 참조로서 포함되는 예컨대, 미국 특허 제5,716,928호를 참조할 것. 상기 문헌에는 경구 투여된 소수성 약학 화합물의 생체 적합성을 증가시키고 개인간 변이를 줄이기 위하여 엣센셜 오일 또는 엣센셜 오일 성분을 사용하는 것을 기재하고 있다 (본 발명에 참조로서 포함되는 미국 특허 제5,858,401호 참조). 오일 현탁액은 비스왁스, 경질 파라핀 또는 세틸 알콜 등의 증점제 (thickening agent)를 함유할 수 있다. 맛이 좋은 경구 제제를 제공하기 위해, 글리세롤, 소르비톨 또는 수크로스 같은 감미료가 첨가될 수 있다. 이들 제형물은 아스코르브산 등의 항산화제를 첨가함으로써 보존될 수도 있다. 주사 가능한 오일 비히클의 예는 본원 발명에 참조로서 포함되는 문헌 [Minto (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:93-102]를 참조할 것. 본 발명의 약학 제형물은 수중유 에멀젼 형태일 수 있다. 오일상은 전술한 바와 같은 식물유 또는 미네랄 오일, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적당한 에멀젼화제에는 아카시아 검 및 트라가칸트 검 등의 천연 발생 검, 대두 레시틴 등의 천연 발생 포스파티드, 지방산 및 소르비탄 모노 올리에이트 등의 헥시톨 무수물에서 유래된 에스테르 또는 부분 에스테르, 및 상술한 부분 에스테르들과 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노-올리에이트 등의 에틸렌 옥사이드의 응축 생성물 등이 있다. 에멀젼은 시럽 및 엘릭시르 제형물에서와 같이 감미료 및 항료를 함유할 수도 있다. 이러한 제형물은 보호제 (demulcent), 보존제, 또는 착색제를 함유할 수 있다.

[0147] [0093] 치료제를 포함하는 조성물 또는 의약은 특히 펩티드, 단백질, 폴리뉴클레오타이드 또는 다른 기타 제제를 위한 안정화제로서 작용하는 약학적으로 허용 가능한 담체를 함유할 수 있는 것으로 이해된다. 펩티드에 대한 안정화제로서 작용할 수 있는 적당한 담체의 예로는, 약제급의 덱스트로스, 수크로스, 락토스, 트레할로스, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 덱스트란 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다른 적당한 담체에는 녹말, 셀룰로스, 소듐 또는 칼슘 포스페이트, 시트르산, 타르타르산, 글리신, 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 이들의 혼합물이 있다. 전하를 띤 지질 및/또는 계면 활성제를 사용하는 것도 유용할 수 있다. 적당한 전하를 띤 지질에는 포스파디틸콜린 (레시틴) 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 계면 활성제는 보통 비이온성, 음이온성, 양이온성 또는 양친매성 계면활성제이다. 적당한 계면 활성제의 예에는 예컨대, Tergitol® 및 Triton® 계면 활성제 (Union Carbide Chemicals and Plastics, Danbury, CT), 폴리옥시에틸렌소르비탄, 예컨대, TWEEN® 계면 활성제 (Atlas Chemical Industries, Wilmington, DE), 폴리옥시에틸렌 에테르, 예컨대, Brij, 약학적으로 허용 가능한 지방산 에스테르, 예컨대, 라우릴 술페이트 및 이의 염 (SDS) 등의 물질이 있다. 약학적으로 허용 가능한 부형제, 담체, 안정화제 및 기타 부가적인 제제와 관한 심층적인 검토는 본 발명에 참조로서 포함되는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J.1991)]에서 찾아볼 수 있다.

[0148] [0094] 경구 투여에 적합한 본 발명의 약학 조성물은 당, 알콜, 항산화제, 완충액, 박테리오스탯, 의도하는 수령체의 혈액에 등장성을 부여하는 용질, 또는 현탁제 또는 증점제를 함유할 수 있는 1종 이상의 약학적으로 허용 가능한 멸균 등장 수용액 또는 비수용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀젼, 또는 사용 직전에 멸균 주사 가능한 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말과 배합된, 1종 이상의 본 발명의 화합물을 포함한다.

[0149] [0095] 본 발명의 약학 조성물에 사용될 수 있는 적당한 수용성 및 비수용성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올 (가령, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등)과, 이들의 적당한 혼합물, 올리브유 등의 식물유 및 에틸 올리에이트 등의 주사 가능한 유기 에스테르가 있다. 적당한 유동성은 예컨대, 레시틴 등의 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우에는 원하는 입자 크기를 유지함으로써, 그리고 표면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다.

[0150] [0096] 이들 조성물은 보존제, 습윤제, 에멀젼화제 및 분산제 등의 보조제를 함유할 수 있다. 본 발명의 화합물에 대한 미생물의 작용 억제는 예컨대, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등의 각종 항박테리아 및 항균제를 포함시킴으로써 확보할 수 있다. 당, 염화나트륨, 인산 완충 식염수 등의 등장화제를 조성물에 첨가하는 것도 좋을 수 있다. 또한, 주사 가능한 약학적 형태의 연장된 흡수도 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴 등의 흡수를 지연시키는 제제를 혼입함으로써 유발시킬 수 있다.

[0151] [0097] 일부 경우에, 약물의 약효를 연장시키기 위하여, 피하 주사 또는 근육 주사로부터 약물 흡수를 지연시키는 것이 좋다. 이는 물에 대한 용해도가 낮은 결정질 또는 무결정질 물질의 액체 현탁액을 사용함으로써 달성할 수 있다. 그러면, 약물의 흡수 속도는 이번에는 용해도에 의하여 좌우되게 되고, 이는 입자 크기 및 결정형에 따라 좌우될 수 있다. 대안적으로는, 비경구 투여된 약물 형태의 지연된 흡수는 오일 비히클 중의 약물의 용해

또는 현탁에 의하여 달성된다.

[0152] [0098] 본 발명의 방법에 있어서, 약학 조성물은 체내에서 서서히 방출되도록 하기 위한 마이크로스피어로서 전달될 수 있다. 예를 들어, 마이크로스피어는 피하에서 서서히 방출되는 약물의 피하 주사를 통하여 투여될 수 있다. 참조: Rao (1995) *J. Biomater Sci. Polym. Ed.* 7:623-645; 생분해성 및 주사 가능한 겔 제형, 참조: 예컨대, Gao (1995) *Pharm. Res.* 12:857-863 (1995); 또는 경구 투여를 위한 마이크로스피어, 참조: 예컨대, Eyles (1997) *J. Pharm. Pharmacol.* 49:669-674. 모든 인용 문헌은 본원 발명에 참조로서 포함된다.

[0153] [0099] 주사 가능한 데포 (depot) 형태는 폴리락티드-폴리글리콜라이드 등의 생분해성 중합체 중에 본 발명의 화합물의 미세캡슐 매트릭스를 형성함으로써 제조된다. 약물 대 중합체의 비율, 사용된 특정 중합체의 특성에 따라, 약물 방출 속도가 조절된다. 다른 생분해성 중합체의 예로는, 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)이 있다. 데포 (depot) 주사 가능한 제형물은 또한 체조직에 적합한 리포솜 또는 미세에멀젼 중에 약물을 인트랩핑함으로써 제조된다.

[0154] [0100] 폴리펩타이드는 다른 치료 화합물과 혼합하여, 또는 이들 독자적으로 투여될 수 있다. 특히, 폴리펩티드는 흑색종, 염증 또는 자가 면역 질환을 포유동물에서 치료하기 위하여 사용되는 치료 화합물과 혼합하여 투여될 수 있다. 폴리펩티드 및 추가의 치료 화합물은 동일 또는 상이한 조성물로 제형될 수 있다. 폴리펩티드는 추가의 치료 화합물과 동시에, 순차적으로 또는 따로 투여될 수 있다.

[0155] 투여량

[0156] [0101] 본 발명의 약학 조성물 중의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 특정 환자에게 원하는 치료 반응을 달성하기 위한 활성 성분의 양, 조성물, 투여 방식, 환자에게 독성이 없는 원하는 치료 반응을 얻기 위하여 다양할 수 있다. 본 발명의 화합물이 인간 및 동물에게 약제로서 투여되는 경우, 이들은 예컨대, 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 활성 성분 0.1 내지 99%, 더욱 좋기로는 10 내지 30%를 함유하는 약학 조성물로서, 또는 그 자체로서 투여될 수 있다.

[0157] [0102] 선택된 투여량은 사용되는 본 발명의 구체적인 화합물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 구체적인 화합물의 방출 속도 또는 대사 속도, 흡수의 속도 및 정도, 치료 기간, 사용되는 구체적인 화합물과 함께 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료될 환자의 연령, 성별, 체중, 컨디션, 일반적인 건강 상태 및 병력, 및 기타 인자들을 포함하는 의료 분야에 잘 알려져 있는 다양한 인자들에 따라 달라질 것이다.

[0158] [0103] 이 기술 분야의 숙련자인 의사 또는 수의사는 원하는 약학 조성물의 유효량을 용이하게 결정 및 조제할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 원하는 치료 효과를 달성하기 위하여 필요한 양보다 더 적은 양으로 약학 조성물을 사용하여 사용되는 본 발명의 화합물의 시작 투여량을 결정하고, 원하는 치료 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 늘릴 수 있다.

[0159] [0104] 일반적으로, 본 발명의 화합물의 적당한 1일 투여량은 치료 효과를 발생시키기 위한 가장 적은 투여량인 화합물의 양이 된다. 이러한 유효 투여량은 전술한 바와 같은 인자에 따라 일반적으로 좌우된다. 일반적으로, 본 발명의 환자를 위한 경구, 정맥내, 뇌실내 및 피하 투여량은 지정된 약효를 위하여 사용하였을 때, 시간당 체중 1킬로그람 당 약 1 mcg 내지 약 5 mg 범위의 비제한적인 범위가 된다. 다른 실시 상태에 있어서, 투여량은 시간당 체중 1킬로그람당 약 5 mcg 내지 약 2.5 mg 범위의 비제한적인 범위가 된다. 다른 실시 상태에 있어서, 투여량은 시간당 체중 1 킬로그람당 약 5 mcg 내지 약 1 mg의 비제한적인 범위가 된다.

[0160] [0105] 원하는 경우, 활성 화합물의 효과적인 1일 투여량은 하루에 적당한 시간 간격을 두고, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회 또는 더욱 더 세분화하여, 임의로는 단위 투여량 형태로 따로 투여할 수 있다. 한 가지 실시 상태에 있어서, 이 화합물은 하루에 1회 투여량으로서 투여된다. 추가의 실시 상태에 있어서, 이 화합물은 정맥내 또는 기타의 경로로 연속 투여된다. 다른 실시 상태에 있어서, 이 화합물은 매일보다 덜 자주, 가령, 매주 또는 그보다 덜 빈번하게 투여된다.

[0161] [0106] 본 발명의 화합물은 단독 투여하는 것도 가능하지만, 약학 제형물 (조성물)로서 화합물을 투여하는 것이 좋다.

[0162] [0107] 이 치료를 받는 개체는 영장류, 특히 인간과, 토끼, 말, 솟과의 동물 같은 소, 돼지, 염소 및 양 등의 다른 포유동물; 그리고 일반적인 가금류 및 애완 동물을 포함하는 치료를 필요로 하는 임의의 동물이다.

[0163] [0108] 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합하여, 또는 그 자체로 투여될 수 있고, 페니실린, 세팔로스포린, 아미노글리코시드 및 글리코펩티드 등의 항미생물제와 혼합하여 투여할 수도 있다.

그러므로, 복합 치료는 나중에 투여되는 것을 투여하였을 때, 처음에 투여된 것의 치료 효과가 완전히 사라지지 않는 방식으로 활성 화합물을 순차적으로, 동시에 및 개별적으로 투여하는 것을 포함한다.

[0164] 기재된 화합물에 대한 가능한 투여 경로

[0165] [0109] 이들 화합물은 임의의 적당한 투여 경로에 의하여 치료를 위하여 인간 및 동물에게 투여될 수 있다. 본 발명에 사용된 용어 투여의 "경로"는 피하 주사, 정맥내 주사, 안내 주사, 진피 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 기관지내 투여, 지방세포내 투여, 관절내 투여, 흉선내 투여, 경막내 투여, 흡입, 비내 투여, 경구 투여, 설하 투여, 볼 투여, 직장 투여, 질 투여, 낭내 투여, 피부내 투여 및 국소 투여 또는 국부 전달(예컨대, 카테터 또는 스텐트)을 통한 투여를 포함시키고자 사용된 것이지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 이 화합물은 서방 투여형으로 투여, 또는 동시 투여될 수 있다.

[0166] [0110] 본 발명의 방법에 있어서, 약학 조성물은 좌약, 통기법, 파우더, 에어로졸 제형을 비롯하여 코내, 안내, 복강내, 질내 경로에 의하여 투여될 수 있다 (스테로이드 흡입에 관하여는 본원 발명에 참조로서 포함되는 다음 문헌 [Rohatagi (1995) *J. Clin. Pharmacol.* 35:1187-1193; Tjwa (1995) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 75:107-111] 참조. 좌약 제형물은 보통 온도에서는 고체이지만 체온에서는 액체이고, 이에 따라서, 체내에서 용융되어 약물을 방출하는 적당한 비자극성 부형제와 함께 약물을 혼합함으로써 제조될 수 있다. 이러한 물질로는 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜이 있다.

[0167] [0111] 본 발명의 방법에 있어서, 약제 화합물은 국소 경로를 통하여 경피 전달되거나, 스틱, 용액, 현탁액, 에멀젼, 겔, 크림, 연고, 페이스트, 젤리, 파우더 및 에어로졸 등의 제제로서 제형될 수 있다.

[0168] [0112] 본 발명의 방법에 있어서, 약학 조성물은 정맥내 (IV) 투여, 또는 체강내 (예컨대, 활막강) 또는 기관의 루멘 내로의 투여 등으로 비경구 투여될 수 있다. 이들 제형물은 약학적으로 허용 가능한 담체 중에 용해된 활성 제제의 용액을 포함할 수 있다. 사용할 수 있는 허용 가능한 운반체(vehicle) 및 용매는 물과 링거액, 등장성 염화 나트륨이 있다. 더욱이, 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용될 수 있다. 이러한 목적을 위하여, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 비롯한 임의의 혼합물 고정 오일이 사용될 수 있다.

[0169] [0113] 본원 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명의 방법은 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 본원 발명에 기재된 자가 면역 질환 또는 다른 증상의 치료를 위한 다른 접근법과 함께 사용될 수 있다.

[0170] [0114] 복합 치료에 사용하기 위한 치료 (치료법 또는 시술)의 특정 조합은 원하는 치료 및/또는 시술 및 달성될 원하는 치료 효과의 적합성을 따지게 될 것이다. 치료는 동일한 질환에 대한 희망하는 효과를 달성하는 것으로 이해되거나 (예컨대, 본 발명의 화합물은 동일한 질병을 치료하기 위하여 사용되는 다른 제제와 동시 투여될 수 있다), 또는 이들은 상이한 효과를 달성하는 것으로 이해될 것이다 (예컨대, 임의의 부작용의 조절). 본 발명에 사용된 보통 특정 질환 또는 질병을 치료 또는 예방하기 위한 부가 치료제는 치료하고자 하는 질병, 증상에 적합한 것을 말한다.

[0171] [0115] 본 명세서에 기재된 본 발명의 복합 치료는 상기 치료의 개별 성분의 동시 투여, 순차적 투여 또는 개별 투여 방식에 의하여 달성될 수 있다.

[0172] **치료적 응용**

[0173] [0116] 본원 발명에 기재된 폴리뉴클레오티드 또는 조절제 (앞으로, 치료제로 언급)의 투여는 예방적 목적 또는 치료적 목적으로 사용될 수 있다. 예방 목적으로 사용되는 경우, 치료제는 임의의 징후 전에 제공된다. 치료제의 예방적 투여는 임의의 징후를 완화시키거나 예방하는 작용을 한다. 치료 목적으로 사용되는 경우, 치료제는 질병 또는 질환의 징후가 시작될 당시 (또는 직후)에 제공된다. 치료제의 치료적 투여는 징후의 실제적인 악화를 완화시키는 작용을 한다.

[0174] [0117] 치료되는 개체는 임의의 포유류일 수 있다. 한 가지 측면에 있어서, 포유류는 인간이다. 다른 측면에 있어서, 인간은 자가 면역 질환 또는 증상을 가진다. 다른 측면에 있어서, 자가 면역 질환 또는 증상은 다발성 경화증, I형 당뇨병, 재생 불량성 빈혈, 그레이브스 (Grave's) 병, 셀리악병, 크론병, 루퍼스, 관절염, 골관절염, 자가 면역성 포도막염, 자가면역성 뇌염 및 중증 근무력증으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0175] [0118] 한 가지 측면에 있어서, 인간은 염증 질환 또는 증상을 가진다. 다른 측면에 있어서, 염증 증상 또는 질환은 염증성 장 질환, 류마티스성 관절염, 알러지, 아테롬성 동맥경화증, 건선, 위염 및 허혈성 심장병으로 이루어지는 군으로부터 선택되거나, 이들과 관련이 있다. 다른 측면에 있어서, 염증은 뇌사와 관련이 있는데, 뇌사에서는 뇌조직내 순환 내인성 α-MSH 또는 α-MSH의 수준이 감소되어 있다. 다른 측면에 있어서, 치료제는 α

-MSH 또는 MC1-수용체 매개 질병 또는 질환을 치료하는 데 사용된다.

[0176] [0119] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 흑색종에 걸린 개체의 치료에 관한 것이다. 한 가지 측면에 있어서, 본 발명은 개체에서 흑색종을 완화시키거나 억제하는 방법에 관한 것이다. 다른 측면에 있어서, 본 발명의 화합물은 흑색종 검출 또는 영상화를 위한 방법에 사용된다.

[0177] 개시된 화합물을 포함하는 키트

[0178] [0120] 본 발명은 본 발명의 치료법을 수행하기 위한 키트도 제공한다. 이러한 키트는 약학적으로 허용 가능한 형태의 다른 제제와 혼합된 형태이거나, 또는 단독적 형태인, 약학적으로 허용 가능한 형태의 MC1R 모듈레이터로서 특이적 활성을 가지는 유효 치료량의 펩티드를 포함한다. 양호한 약제 형태는 멸균 식염수, 덱스트로스 용액, 완충액 또는 다른 약학적으로 허용 가능한 멸균액과 배합된 펩티드를 포함한다. 또는, 이 조성물은 동결 건조되거나, 건조된 형태일 수 있다. 예를 들어, 이 키트는 약학적으로 허용 가능한 용액, 좋기로는, 멸균 용액을 더 포함하여, 주사용 용액을 형성한다. 다른 실시 상태에 있어서, 이 키트는 조성물의 주사를 위하여, 좋기로는 멸균 형태로 포장된 니들 또는 시린지를 더 포함할 수 있다. 다른 실시 상태에 있어서, 이 키트는 개체에게 조성물을 투여하기 위한 설명서를 더 포함할 수 있다. 이 설명서에는 종이 삽입물, 오디오 녹음, 오디오비쥬얼 녹화 또는 기타 개체에게 조성물을 투여하는 것을 설명하는 임의의 다른 수단이 포함될 수 있다. 한 가지 실시 상태에 있어서, 이 키트는 (i) MC1R 특이적 조절 활성을 가지는 펩티드를 함유하는 제1 용기와, (ii) 사용 설명서를 포함한다.

[0179] 치료 방법에 관한 추가의 실시 상태

[0180] [0121] 일부 실시 상태에 있어서, 본 발명은 약학적으로 허용 가능한 담체와, 본 발명에 제공된 1종 이상의 펩티드 화합물 유효 치료량을 포함하는 약학 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 개체에게 이식 거부를 감소시키거나 억제하는 방법을 제공한다. 일부 실시 상태에 있어서, 본 발명은 이식된 조직, 세포 또는 기관에 의하여 유발된 개체의 면역 반응을 감소시키거나 억제하는 방법을 제공한다. 이식된 조직의 비제한적인 예는 실험적 심장 이식 및 췌장 섬세포에서의 알로그래프트 (allograft)이다.

[0181] 실험적 자가 면역 뇌척수염 (EAE) 모델에서 면역 억제 활성

[0182] [0122] 신규의 α-MSH의 D-아미노산 펩티드 유사체를 생성하여, 실험적 자가 면역 포도막염 (EAU) 및 실험적 자가 면역성 뇌척수염 (EAE) 모델과, 리포폴리사카라이드 (LPS) 서로게이트 염증 질환 모델에서 면역 조절 효과에 대하여 평가하였다. RI α-MSH 유사체로 처리한 것은 EAU 모델 및 MOG 유도된 EAE 마우스 모델에서 임상 질병 점수 및 질병의 발생을 감소시켰다. 더욱이, MOG로 프라이밍한 마우스의 비장 및 림프절에서 TNF-α 및 IL-10의 mRNA 발현 수준이 처리된 마우스에서 감소되었다. LPS로 유도된 전신 염증 모델에서, α-MSH 및 유사체 처리는 혈청 사이토카인 수준을 감소시켰다. 이들 데이타는 이들 신규 α-MSH 유사체는 염증 및 자가 면역 질환에서 치료적 용도에 대하여 효능이 있음을 나타내는 것이다.

[0183] 물질 및 방법

[0185] [0123] **펩티드.** α-MSH(SYSMEHFRWGKPV)를 바켐 [Bachem (King of Prussia, PA)]으로부터 구입하였다. D-아미노산 RI α-MSH 유사체 (vpkgwrfhemsys), RI α-MSH의 알라닌 치환된 펩티드, (스테아릴) HfRW (820), ($Ph(CH_2)_3CO$) HfRW (819), 및 RI α-MSH 유사체 891 [vpkGwr(D-Cha)hsiiss]을 표준 고상법으로 젠자임 코포레이션에서 합성하였고, 이를 역상 HPLC로 정제하였다. 스크램블 (scrambled) D 아미노산 대조군 펩티드 (ksrsmgvfpeyh)를 젠자임 코포레이션에서 합성하였다. 이와 무관한 D 아미노산 대조군 펩티드 (plykkiikklles)도 젠자임 코포레이션에서 합성하였다.

[0186] [0124] **동물.** 5주 내지 6주령된 암컷 B10.RIII-H2r 마우스를 잭슨 래버러토리즈 [Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME)]에서 구입하였다.

[0187] [0125] 6주 내지 8주령된 암컷 또는 수컷 C57BL/6 마우스를 잭슨 래버러토리즈 [Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME)]에서 구입하였다. 모든 동물 연구의 프로토콜은 젠자임 코포레이션에서 연구 동물 취급 및 사용 위원회 [Institutional Animal Care and use Committee (IACUC)]의 승인을 받은 것이었다.

[0188] [0126] **EAU 유도.** 암컷 B10.RIII의 두군데 부위 (견갑골 사이 및 골반)에, 각각 미코박테리움 투베르쿨로시스 H37Ra (Difco, Detroit, MI)와 함께 완전한 Freund's 보조제 (CFA; Sigma, St. Louis, MO) 2 mg/ml 중의 인터

포토리셉터 결합 단백질 펩티드 (IRBP) 161-180 (New England Peptide; Fitchburg, MA) 총 200㎕를 피하 주사하였다.

[0189] [0127] **눈 점수.** 1방울 또는 2방울의 Mydriacyl 1% (Alcon; Humacao, Puerto Rico)을 사용하여 마우스 눈을 확장시키고, 이를 암소에서 약 5분간 두었다. 마우스를 손으로 제압하고, 양 눈의 각막을 78 디옵터 렌즈가 장착된 간접 검안경을 사용하여 관찰하였다. 0점 내지 5점 사이의 단계적 점수 시스템을 사용하여 염증에 대하여 눈 점수를 매겼다. 0점: 정상적 망막, 1점: 시신경 쪽으로 혈관의 염증, 2점: 눈의 1/4까지 <5의 염증 병변이 생김. 3점: 눈의 1/4 이상에서 >5의 염증 병변이 생김, 4점: 염증 병변은 연속적. 5점: 망막 탈락. 마우스에서 눈 전체를 꺼내어, PBS에 담그었다. 안구를 동결 고정을 위한 OCT 매질 중에 담그었다. 5 ㎛ 섹션은 유두 시신경면 (papillary-optic nerve plane)을 따라 절단되었으며, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다.

[0190] [0128] **멜라노코르틴 수용체에 대한 결합 연구.** α-MSH, RI-MSH 및 스크램블 펩티드에 대한 결합 특성을 멜라노코르틴 수용체: 1, 3, 4, 및 5에 대하여 측정하였다. (Nle4,D-Phe7) α-MSH(Bachem)를 사용하는 경쟁적 결합 분석을 사용하여 결합을 수행하였다. 코딩된 샘플을 사용하여 세렙 래버래토리즈 [Cerep laboratories (Paris, France)]에서 결합 분석을 수행하였다.

[0191] [0129] 펩티드 결합 시험에 이어, HEK293 세포주로부터의 막 조제물을 사용하여 멜라노코르틴 수용체 1, 3, 4, 및 5와 결합하는 데 있어서, ^{125}I-NDP-MSH와 경쟁 시험을 수행하였다. 펩티드를 결합 완충액 (25 mM HEPES pH7, 1.5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 100 mM NaCl, 0.2% BSA) 중의 V-바닥 96웰 플레이트에서 ^{125}I-(Nle4,D-Phe7)-α-MSH (PerkinElmer, Boston MA)와 혼합하고, 1시간 동안 25℃에서 1-10 fmol 수용체를 함유하는 HEK293 형질 감염된 세포주 (Perkin Elmer, Boston MA)로부터의 막 조제물과 혼합하였다. 3 μM의 (Nle4,D-Phe7)-NDP-MSH (Bachem)를 양성 대조군으로서 사용하였다. 이 혼합물을 96웰 GFC 필터 ((Millipore, Billerica, MA)로 여과하고, BSA 없이 결합 완충액으로 3회 세척하고, 건조 및 계수하였다.

[0192] [0130] **cAMP 측정.** 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 (Manassas, VA)에서 입수한 B16-F1 (흑색종 세포주) 세포를 $5x10^4$/웰로 편평 바닥 96웰 플레이트에 시딩하고, 2 mM 글루타민, 항생제 (100 U/ml 페니실린 및 100 U/ml 스트렙토마이신) 및 10% 열-불활성화 송아지 혈청 (Invitrogen, Grand Island, NY)이 보충된 DMEM (Cambrex, Walkersville, MD) 중에서 밤새 배양하였다. 이어서, 세포를 나이브 α-MSH(0.01-1000 ng/ml), retro-inverso α-MSH(0.01-1000 ng/ml), 또는 스크램블 D 아미노산 대조 펩티드 (0.01-1000 ng/ml)로 30분간 처리하였다. 세포를 용해시키고, 세포내 cAMP 수준을 효소 면역분석 키트 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)로 측정하였다. 100 μM의 Forskolin (Sigma, St. Louis, MO)은 양성 대조군으로서 작용하였다.

[0193] [0131] **EAE 유도 및 점수.** 암컷 C57BL/6 마우스를 0.6 mg 미코박테리움 투베르쿨로시스 (Difco; Detroit, MI)를 함유하는 완전한 Freund's 보조제 (CFA; Sigma, St. Louis, MO) 중의 MOG35-55 펩티드 (200 ㎍/마우스; New England Peptide; Fitchburg, MA) 에멀젼으로 면역화하였다. 에멀젼을 두 군에 부위에 피하 주사하여 마우스 한마리당 0.2 ml 부피로 전달하였다. PBS 중의 보르데텔라 퍼투시스 독소 (PTX; Sigma)를 복강내 투여 경로를 통하여 400 ng/동물의 투여량으로 사용하였고, 이를 0일 및 3일째에 투여한다. 마우스를 EAE의 마비 징후에 대하여 매일 모니터링하였다. 0점 내지 5점의 단계적 점수 시스템을 사용하여 임상 징후에 대하여 마우스의 점수를 매겼다. 0점: 질병 없음, 1점: 늘어진 꼬리, 2점: 뒷다리 쇠약, 3점: 뒷다리 마비, 4점: 앞다리 쇠약/부분 마비; 5점: 사망. 척수 및 뇌를 수집하여 파라핀에 담그고, 헤마톡실린 및 에오신 염색하였다.

[0194] [0132] **증식 분석.** C57BL/6 마우스 스플리노사이트 및 림프절 세포를 96웰 플레이트에 $5x10^5$ 세포/웰에 배양하였다. MOG35-55 또는 OVA 257-264 펩티드를 25 ㎍/ml의 농도로 웰에 첨가하였다. MOG 펩타이드로 자극한지 48시간 후, 상청액을 수집하였다. 3일 후, 배양 세포를 1 μCi/웰에서 8시간 동안 [3H] 티미딘으로 펄스 처리하였다. 티미딘 혼입을 cpm 단위로 측정하였다.

[0195] [0133] **사이토카인 RNA 분석-RT-QPCR.** 전체 RNA를 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 조직으로부터 추출하였다. 전체 RNA의 1 ㎍을 역전사시키고, 이를 ABI 7900 상의 Applied Biosystems (Foster City, CA)으로부터의 시약으로 SYBR 그린 인코포레이션 (SYBR green incorporation)을 사용하여 정량적 PCR에 사용하였다. cDNA 표준을 사이토카인 표적에 대하여 각 PCR에서 돌리고, mRNA 농도를 마우스 β-액틴에 대하여 정규화하였다. 이러한 데이타를 얻는 데 사용된 프라이머는 다음과 같다: 마우스 TNFα-포워드-ggcaggtctactttggagtcattgc 및 리버스-acattcgaggctccagtgaattcgg (1). 본 발명자는 마우스 IL-10 포워드: tgctatgctgcctgctctta 및 리버스: tcatttccgataaggcttgg (2)를 사용하였다. 마우스 β-액틴에 대한 서열은 다

음과 같다: 포워드: gtgggccgctctaggcaccaa 및 리버스: ctctttgatgtcacgcacgatttc (3).

[0196] [0134] **CBA 분석.** 마우스 혈청 또는 세포 상청액의 염증 사이토카인 특성의 유세포 분석을 비디 바이오사이언스 [BD Bioscience, (San Jose, CA)]가 제조한 키트 [Cytometric Bead Array Kit (CBA)]를 사용하여 측정하였다. 샘플을 제조업자의 프로토콜에 따라 처리하였다.

[0197] [0135] **mMC1R RNA 분석-RT-QPCR.** 전체 RNA를 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 조직으로부터 추출하였다. 전체 RNA의 1 ㎍을 역전사시키고, 이를 ABI 7900 상의 Applied Biosystems (Foster City, CA)으로부터의 시약으로 Taqman 키트를 사용하여 정량적 PCR 분석하였다. cDNA 표준을 mMC1R에 대하여 각 PCR에서 돌리고, mRNA 농도를 대조군 (Eukaryotic 18S endogenous control; (VIC/MGB probe, Applied Biosystems part # 4319413E))에 대하여 정규화하였다. mMC1R에 대한 프라이머는 다음과 같다. 포워드 CTCTGCCTCGTCACTTTCTTTCTA 및 리버스 AACATGTGGGCATACAGAATCG 및 탐침 CCATGCTGGCACTCA. 이들은 프라이머 익스프레스 (Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA))를 사용하여 디자인하였다.

[0198] [0136] **LPS 모델.** 수컷 C57BL/6 마우스를 LPS (1ug/마우스)로 복강내 챌린징하였다. 30분 후, 마우스를 덱사메타손 ((2 mg/kg; Sigma), RI-α-MSH 유사체 891, 또는 RI-αMSH로 처리하였다. LPS 챌린지 2시간 후, 마우스를 출혈시켜 혈청을 얻었다. 사이토카인 분석을 키트 [Cytometric bead array kit (BD Biosciences)]를 사용하여 유세포계로 측정하였다.

[0199] [0137] **통계학적 모델.** 결과는 표준 ± 표준편차로 나타낸다. 각 실험을 적어도 2회 반복하였다. 결과를 분석하기 위하여, 단방향 ANOVA 및 투키 (Tukey) 다중 비교 시험을 사용하였다.

[0200] [0138] 다음 실시예는 이해의 목적으로 제시한 것이고, 본 발명을 한정하려는 것이 아니다.

[0201] 실시예 1

[0202] 실험적 자가 면역성 포도막염 (EAU) 모델에서 면역 억제 활성

[0203] [0139] 자가 면역성 포도막염은 통증 및 시력 손상을 유발할 수 있는 눈의 염증성 질환이다. 스테로이드 및 면역 억제 약물은 포도막염에 대한 유일한 현재의 치료제이고, 종종 심각한 눈의 독성 및 전신적 독성을 나타낸다. 그러므로, 더욱 안전한 대안적 치료제가 요구된다.

[0204] [0140] EAU는 미국에서 2천 3백만 인구가 감염되어 있는 인간 포도막염의 모델이다. 인터포토리셉터 레티노이드 결합 단백질 (IRBP) 또는 이의 펩티드 단편 또는 레티나 S-항원 (S-Ag)과 보조제를 사용하여 면역화하면, 설치류 내 민감한 스트레인들에서 질병을 유발할 수 있다. 이 질병은 눈의 각막에서 염증 세포의 침습을 포함하고, 자발적 재발이 없이 자연적으로 회복되는 광수용체 손상을 포함한다. 동계의 설치류 수령체로 포도막염성 T 세포를 어답티브 전달 (adoptive transfer)한 결과를 통해, 다발성 경화증, I형 당뇨병 및 류마티스성 관절염 등의 유사한 자가 면역 질환과 같이, 포도막염이 기관 특이적 T 세포 매개 자가 질환이라는 것을 알 수 있다.

[0205] [0141] 눈의 미세 환경은 면역 특권 위치(privileged site)로, 상기 환경에서 면역 억제를 유지하기 위한 메카니즘은 국소 염증을 예방하기에 적합하다. 눈 조직에서 뉴런에 의하여 발현되는 몇몇 뉴로펩티드는 눈에서 면역 특권을 유지하는 것을 돕는다. 이들 뉴로펩티드 중 하나는 30 pg/ml의 생리학적 농도에서 눈 미세 환경에서 조직적으로 발현하는 α-MSH이다.

[0206] [0142] 래트에서 내독소 유발성 포도막염의 유도 중에 네이티브 α-MSH의 전신 투여는 다수의 침윤 세포의 수 및 수용성 체액 내 IL-6, TNF-α, MCP-1, MIP-2, 그리고 일산화질소의 양을 용량 의존적인 방식으로 억제하였다. 마우스 EAU 모델에서, 망막 감염의 피크시 α-MSH의 투여는 질병의 심각도를 억제하였다. α-MSH는 T 세포 상의 멜라노코르틴 5 수용체 (MCR-5)를 통하여 T 조절 세포를 유도하였으며, EAU를 억제하였다.

[0207] [0143] 쥣과 후부 포도막염 모델에서 네이티브 α-MSH 처리의 효과를 평가하였다. 포도막염은 B10.RIII 마우스에서 IRBP 161-180 및 CFA를 주사함으로써 유도하였다. 질병은 프라이밍 약 10일 후에 발생하였다. 눈 점수가 2 내지 3점인 13일 째에, 마우스에 네이티브 α-MSH를 200 ㎍/마우스의 양으로 7일 연속 정맥 투여하거나, 처리하지 않고 두었다. 예방적 투여는 효과기 (effector phase)보다 질병의 프라이밍기 (priming phase)에서 활성을 표적화할 수 있기 때문에, 치료는 활성 망막감염이 관찰되었을 때 개시한다. 뿐만 아니라, 이 치료 전략은 임상적 응용을 더 잘 설명한다. α-MSH로 처리된 마우스는 처리하지 않은 마우스에 비하여 처리 후 7일에 평균 임상 눈 점수 감소를 나타내었다 (도 1a). 15일째에 3.67 ±0.52의 최대 평균 눈 점수에 도달한 미처리 마우스군과는 달리, α-MSH로 처리된 마우스는 13일째에 2.83 ±0.39의 최대 눈 평균 점수를 나타내었다.

[0208] 실시예 2

[0209] B10.RIII 실험적 자가 면역 포도막염 모델에서 덱사메타손과 네이티브 α-MSH의 비교

[0210] [0144] 포도막염에 대한 현재의 치료 형태는 코르티코스테로이드 및 면역 억제제를 포함한다. 네이티브 α-MSH의 효과를 기지의 코르티코스테로이드 치료제인 덱사메타손과 비교하였다. 포도막염은 IRBP161-180 및 CFA를 B10.RIII 마우스에 주사함으로써 유도하였다. 질병의 시작시에, 마우스가 1점의 임상 눈 점수에 다다랐을 때, 마우스에게 네이티브 α-MSH(100 ㎍/마우스), 덱사메타손 0.2 mg/kg, 또는 덱사메타손 2.0 mg/kg을 매일 복강내 투여하였다. 마우스를 21일 동안 매일 처리하였다. 네이티브 α-MSH로 처리한 마우스는 PBS 대조군 마우스로 처리한 것에 비하여 처리 기간 내내 평균 임상 눈 점수가 상당히 감소된 것을 나타내었다 (도 1b). 데이타는 네이티브 α-MSH를 매일 복강내 투여한 것은 0.2 mg/kg 또는 2.0 mg/kg 투여량으로 덱사메타손을 처리한 것보다 더 큰 정도로 포도막염을 억제하였음을 나타내었다.

[0211] 실시예 3

[0212] MCR-1에 특이적으로 결합하는 신규 retro-inverso α-MSH 유사체

[0213] [0145] 네이티브 α-MSH의 신규하고 안정한 D-아미노산 펩티드 유사체를 합성하여 (RI α-MSH) 시험관내 및 실험적 자가 면역성 포도막염 (EAU) 모델에서 에서 면역 조절 능력에 대하여 평가하였다. 결합 연구 결과, 네이티브 α-MSH와는 달리, RI α-MSH는 항염증 α-MSH 수용체 (MCR-1)에 특이적으로 결합하지만, 다른 α-MSH 수용체 (MCR-3, 4, 또는 5)에는 전혀 결합하지 않았다.

[0214] [0146] 멜라노코르틴 수용체 (MCR)에 대한 RI α-MSH 유사체의 결합을 분석하였다. MCR 1, 3, 4 및 5를 포함하는 MCR 패널을 사용하여 경쟁적 결합 분석을 수행하였다. 펩티드의 결합 분석에 이어, 전술한 바와 같이 ^{125}I-NDP-MSH와의 경쟁 결합을 수행하였다. 네이티브 α-MSH는 MCR 1, 3, 4, 및 5에 결합하였다. 그러나, 네이티브 α-MSH와는 달리, RI α-MSH는 염증 반응을 조절하는 MCR-1에만 결합하는 것으로 드러났다 (표 1). 스크램블 D 아미노산 대조군 펩티드는 멜라노코르틴 수용체 어디에도 결합하지 않았다. MCR-1에 특이적으로 결합하지만 MCR-3 및 MCR-4에는 결합하지 않는 α-MSH 유사체의 개발은 이들 수용체의 결합을 통하여 네이티브 α-MSH가 일으키는 잠재적인 부작용을 감소시킬 수 있다.

표 1

No.	N-말단	서열	C-말단	Ki (표시된 경우를 제외하고 nM) MC1R	MC3R	MC4R	MC5R
MSH	Ac	SYSMEHFRWGKPV	아미드	0.41 ± 0.14	23	41	~1500
RI-MSH (720e)	Ac	vpkGwrfhemsys (SEQ ID NO:7)	아미드	4.6 ± 1.3	>30 μM	>30 μM	~25 μM
804	Ac	vpkGwrfhemsy**a**	아미드	nd			
805	Ac	vpkGwrfhems**a**s	아미드				
806	Ac	vpkGwrfhem**a**ys	아미드				
807	Ac	vpkGwrfhe**a**sys	아미드	1400 ± 190			
808	Ac	vpkGwrfh**a**msys	아미드	2.5			
809	Ac	vpkGwrf**a**emsys	아미드	1200 ± 270			
810	Ac	vpkGwr**a**hemsys	아미드	>30 μM			
811	Ac	vpkGw**a**fhemsys	아미드	13 ± 7 μM			
812	Ac	vpkG**a**rfhemsys	아미드	3 μM			
813	Ac	vpk**a**wrfhemsys	아미드				
814	Ac	vp**a**Gwrfhemsys	아미드				
815	Ac	v**a**kGwrfhemsys	아미드				
816	Ac	**a**pkGwrfhemsys	아미드				
817	Ac	**aaa**Gwrfhemsys	아미드				
818	Ac	**kkk**Gwrfhemsys	아미드				
819	**(Ph(CH$_2$)$_3$CO)**	HfRW	아미드	0.07	277	27	~3000
820	스테아릴	HfRW	아미드	1.3	1371	390	860
847	H_2N	vpkGwrfh	**(CH$_2$)$_3$ 페닐)**	104 ± 72			
847int	H_2N	vpkGwrfh	**OH**	150			
857	Ac	vp(**D-**오르니틴)Gwrfhemsys	아미드	3.0			
858	Ac	vp(**D-**노르류신)Gwrfhemsys	아미드	18			
859	Ac	vpkG(**3-**벤조티에닐**-D-**알라닌)rfhemsys	아미드	206			
860	Ac	vpkG(**5-**하이드록시**-D-Trp**)rfhemsys	아미드	96			
861	Ac	vpkG(**5-**메톡시**-D-Trp**)rfhemsys	아미드	75			
862-b	Ac	vpkG**f**rfhemsys	아미드	128			
863	Ac	vpkGw**q**fhemsys	아미드	>100 μM			
864	Ac	vpkGw**n**fhemsys	아미드	>30 μM			
865	Ac	vpkGw**h**fhemsys	아미드	2300			
866	Ac	vpkGwr(**4-**플루오로**-D-**페닐글리신)hemsys	아미드	>30 μM			
867	Ac	vpkGwr(**3-**피리딜**-D-**알라닌)hemsys	아미드	480			

[0215]

			Ki (표시된 경우를 제외하고 nM)			
No.	N-말단	서열	C-말단	MC1R	MC3R	MC4R	MC5R
868	Ac	vpkGwr(2-티에닐-D-알라닌)hemsys	아미드	5.4			
869	Ac	vpkGwr(D-Cha)hemsys	아미드	2.2 ± 0.44	>30 μM	>10 μM	~25 μM
870	Ac	vpkGwrwhemsys	아미드	~2.5 μM			
871	Ac	vpkGwr(4-Nitro-D-Phe)hemsys	아미드	324			
872	Ac	vpkGwrfremsys	아미드	13.5			
873	Ac	vpkGwrfwemsys	아미드	1900			
874	Ac	vpkGwrffemsys	아미드	>100 μM			
875	Ac	vpkGwrfhdmsys	아미드	400			
876	Ac	vpkGwrfh(D-시트룰린)msys	아미드	nd			
877	Ac	vpkGwrfhe(α-메틸-D-Met)sys	아미드	282			
878	Ac	vpkGwrfhe(D-부티오닌)sys	아미드	2.3 ± 0.8	~40 μM	>30 μM	~30 μM
879	Ac	vpkGwrfheksys	아미드	832			
880	Ac	vpkGwrFhsiiss (SEQ ID NO:4)	아미드	1.8 ± 0.5	~18 μM	~10 μM	>30 μM
881	Ac	wrFh	C_3-페닐	>10 μM			
882	Ac	wrFh	(1,6-디아미노-헥산)스테아릴	120			
883	Ac	wrFh	아미드	>100 μM			
884	Ac	vpkGwrFhemsys	아미드	72	>30 μM	~30 μM	>30 μM
886	Ac	vpkgwrfhsiiss	아미드	1.0 ± 0.43	~19 μM	~10 μM	~20 μM
890	Ac	vpkGwr(D-Cha)he(d-부티오닌)sys	아미드	1.9 ± 0.01	~15 μM	~14 μM	~4.5 μM
891	Ac	vpkGwr(D-Cha)hsiiss (SEQ ID NO:5)	아미드	0.43 ± 0.01	~8 μM	~3.2 μM	~2.5 μM
892	Ac	SYSMEH(L-Cha)RWGKPV (SEQ ID NO:6)	아미드	0.51			
893	Ac	vpkGWrfhemsys	아미드	6.5	~28 μM	>30 μM	~27 μM
894	Ac	vpkGwRfhemsys	아미드	380	>30 μM	>30 μM	>30 μM
895	Ac	vpkGwrfHemsys	아미드	19	~37 μM	~11 μM	~37 μM

소문자는 D-이성질체 아미노산을 나타내고, 밑줄은 RI α-MSH 로부터의 변화를 나타냄

[0216]

[0217] [0147] 펩티드의 결합에 이어, HEK293 세포주 유래의 막 조제물을 사용하여 멜라노코르틴 수용체 1, 3, 4, 및 5와 결합하는 것에 대하여, ^{125}I-NDP-MSH 와 경쟁 결합을 수행하였다. 도 18에서 보이는 바와 같이, RI α-MSH는 MC1R에 대하여 매우 강한 선택성을 나타내고, 모든 MC 3, 4 및 5R에서 30 μM의 정도의 Ki 값을 가지는 반면, α-MSH는 MC3R에 비하여 CM1R에 대하여 100배 낮은 선택성을 가지면서, 모든 4개의 수용체에 대하여 유의한 결합을 나타내었다.

[0218] 실시예 4

[0219] retro-inverso α-MSH 유사체의 처리는 EAU에서 질병을 완화시킨다

[0220] [0148] 신규 retro-inverso α-MSH 펩티드의 면역 조절 효과를 실험적 자가 면역성 포도막염 마우스 (EAU) 모델에서 관찰하여, 이를 네이티브 α-MSH 펩티드의 결과와 비교하였다. 질병의 시작시에, 또는 질병의 말기에 RI α-MSH를 전신 전달한 것은 포도막염을 현저하게, 그리고, 재현 가능한 방식으로 완화시켰다. 더욱이, 신규 RI α-MSH 펩티드 유사체로 처리한 것은 네이티브 α-MSH 펩티드와 유사한 강도로 포도막염을 억제하였다. 이들 데이타는 신규 RI α-MSH는 항염증 활성을 나타내고, 포도막염에서 치료적 용도를 가지며, 다른 자가 면역성 질환 및 염증에서도 치료적 용도를 가지는 것임을 제시하는 것이다.

[0221] [0149] EAU는 IRBP 161-180를 사용하여 암컷 B10.RIII 마우스에서 유도하였다. RI α-MSH 및 네이티브 α-MSH의 예방적 치료제로서보다는 치료 목적의 치료제로서의 효능을 검사하였다. 포도막염의 중간 정도의 질병 단

계에 다다랐을 때 (눈 점수 2점) 시작하여, 마우스에게 매일, 정맥 주사로, 100 ㎍/마우스 RI α-MSH, 100 ㎍/마우스 네이티브 α-MSH, 또는 PBS를 주사하였다. 도 2a에서 보이는 바와 같이, 대조군 PBS 처리된 마우스에서는 16일째 최대 눈 점수에 도달하였으며, 평균 눈 점수는 2.75 ± 0.68이었다. 그러나, 매일 RI α-MSH 유사체 또는 네이티브 α-MSH로 처리한 마우스는, PBS 처리한 대조군 마우스에 비하여, 치료 기간 동안에 평균 임상 눈 점수의 상당한 감소를 나타내었다. 16일째, 처리 시작 후 4일 째에, PBS 처리된 군 중의 8마리 마우스 중 5마리는 3점 이상의 최대 눈 점수를 나타낸 반면에, 네이티브 α-MSH로 처리한 마우스 8마리 중 1마리만, 그리고, RI α-MSH로 처리한 마우스 중 0마리가 3 이상의 평균 눈 점수를 나타내었다 (도 2b 참조).

[0222] 실시예 5

[0223] RI α-MSH로 처리한 개체에서 망막 이미지 및 조직학적 검사는 EAU 모델에서 질병의 억제를 나타냄

[0224] [0150] 말기 포도막염에서 처리를 시작하여, RI α-MSH 또는 네이티브 α-MSH로 매일 처리한 마우스의 망막 이미지들은 PBS 대조군 마우스와 비교하여 질병의 억제를 나타내었다. 치료 시작 후 13일째 검안경 검사 이미지를 얻었다 (도 3). PBS로 처리한 군에서 질병은 안정화되었거나, 발전되었거나, 심각한 혈관염 및 염증 병변과 함께 3점의 중앙값 눈 점수를 나타내었다 (도 3a). 그러나, 질병은 RI α-MSH 및 네이티브 α-MSH 펩티드로 처리된 마우스에서 급격히 완화되었다. 망막 이미지들은 시신경에서만 염증을 가진 1점의 눈 점수를 나타내었다 (도 3b 및 3c). 각 군에서 개별적 마우스에 대한 최대 눈 점수는 도 3d에 나타낸다. PBS 처리된 군에서, 11마리 마우스 중 7마리가 3점 이상의 눈 점수를 가졌다. 그러나, 네이티브 또는 RI α-MSH 군의 11마리 마우스 중에는 2마리 만이 3점 이상의 눈 점수를 나타내었다.

[0225] [0151] 매일 처리하기 시작한 후, 10일째 눈의 조직 검사 결과는, 네이티브 α-MSH 및 RI α-MSH 군은 눈의 병변을 감소시켰음을 나타낸다 (도 4). 네이티브 α-MSH 및 RI α-MSH 처리된 마우스 군은 시신경 부위에서 약간의 염증을 가진 정상적인 망막 구조를 나타낸다 (도 4b 및 4c). 반대로, PBS로 처리된 마우스는 눈의 염증 및 조직 손상을 나타내었다. 염증은 망막 및 시신경 영역에서 관찰되었는데, 광수용체 손상이 있었다 (도 4a).

[0226] 실시예 6

[0227] EAU에서 스크램블 대조군 펩티드에 대한 retro-inverso α-MSH의 복강내 투여의 비교

[0228] [0152] 포도막염을 IRBP161-180 및 CFA를 주사하여 B10.RIII 마우스에서 유도하였다. 본 발명자는 매일 복강내 주사를 통하여 RI α-MSH를 질병의 말기 단계에 (눈 점수가 2-3점 일때) 처리하는 것을 시작으로 하여, 대조군 스크램블 D 아미노산 펩티드를 사용한 효과와 그 효과를 비교하였다. 마우스에 13일간 100 ㎍/마우스로 RI α-MSH 또는 스크램블 펩티드로 매일 복강내 처리하였다. RI α-MSH로 처리한 마우스는 스크램블 펩티드 대조군 마우스에 비하여, 질병의 진행 도중 15, 21, 및 23일째에 평균 임상 눈 점수에서 유의한 감소 ($p<0.04$)를 나타내었다(도 5). 질병 유발 후 23일째 개별적인 최대 눈 점수는, 대조군인 스크램블 펩티드군에서 ≤1점의 점수를 가지는 마우스가 단 한마리도 없었던 것과 비교하여, RI α-MSH에서는 75%가 ≤1점의 점수를 나타내었다. 마우스의 개별 체중은 질병의 진행 도중 4회 기록하였다. RI α-MSH 처리된 마우스 및 스크램블 펩티드로 처리된 마우스 군의 모든 마우스는 이들의 체중을 유지하였고, 정상적인 체중 증가를 나타내었다 (데이타는 나타내지 않음). 펩티드를 매일 복강내 처리한 것은 체중 감소를 일으키지 않았다. 그 외에, 네이티브 α-MSH 또는 RI α-MSH를 100 ㎍/마우스로 복강 투여하는 것은, 질병의 시작시에 처리를 시작하였을 때, 마우스가 1점의 임상 눈 점수에 도달하였을 때 효과적이었다 (데이타는 나타내지 않음). 그러므로, RI α-MSH의 복강내 투여 경로는 스크램블 대조군 펩티드와 비교하여, 질병 점수의 유의한 감소를 나타내었다.

[0229] 실시예 7

[0230] EAU 모델에서 여러 가지 투여량의 RI α-MSH의 투여

[0231] [0153] 본 발명자는 중증 말기의 포도막염 동안에 retro-inverso α-MSH를 최적 투여량과 효능을 검사하였다. B10.RIII 마우스에 IRBP161-180 및 CFA를 주사하여 포도막염을 유도하였다. 마우스에 매일 PBS, 대조군 스크램블 펩티드 (100 ㎍/마우스), 또는 100 ㎍, 10 ㎍ 또는 3 ㎍/마우스의 용량의 RI α-MSH를 복강내 투여하였다. 마우스가 눈의 뒤쪽 부분의 염증 병변을 포함하고 가능한 출혈을 포함하고 있는 눈 점수 4점에 이르는 질병의 피크시에 처리를 시작하였다. PBS 및 스크램블 펩티드 대조군에서 질병은 중증인 그대로 유지되었다 (도 6). 대조적으로, 10 ㎍ 또는 100 ㎍/마우스로 RI α-MSH를 처리한 것은 포도막염을 신속하게 완화시켰다 ($p \leq 0.05$). 뿐만 아니라, 10 ㎍ 또는 100 ㎍/마우스의 투여량은 균등한 효과를 가졌다. 3 ㎍ /마우스 투여량의 RI α-MSH는 질병을 감소시키거나 억제하지 않았다.

[0232] 실시예 8

[0233] cAMP 수준에 미치는 Retro-inverso α-MSH의 효과

[0234] [0154] 네이티브 α-MSH, RI α-MSH, 또는 스크램블 대조군 펩티드로 처리한 후 B16-F1 흑색종 세포에서 cAMP 수준을 검사하였다. B16-F10 흑색종 세포주는 단 100 내지 200개 수용체/세포를 발현하는 마크로파지 세포주에 비하여 많은 수의 MCR1 수용체 (3000 내지 4000 수용체/세포)를 발현한다. 그러므로, 본 발명자는 흑색종 세포주에 대한 RI α-MSH 처리의 효과를 검사하도록 선택하였다. 쥣과 흑색종 B16-F1 세포를 1 pg/ml-1 ㎍/ml 농도로 네이티브 α-MSH, RI α-MSH, 또는 대조군 스크램블 펩티드로 처리하였다. 30분 후, 세포를 용해시키고, 세포내 cAMP 수준을 효소 면역 분석으로 측정하였다. cAMP 수준을 증가시키기 위하여 흔히 사용되는 Forskolin, 즉 세포의 대조군 (100 μM) 처리는 cAMP 증가를 나타내었다 (3455.39 ± 406.6 SD). cMAP 수준은 미처리 세포에 비하여 네이티브 α-MSH로 처리한 세포에서 용량 의존적인 방식으로 유의하게 증가되었다 (도 7a). RI α-MSH 유사체는 또한 미처리 또는 스크램블 펩티드 대조군에 비하여 용량 의존적인 방식으로 cAMP 수준을 유의하게 증가시켰다. 그러나, 10 pg/ml 농도에서 cAMP를 증가시키는 네이티브 α-MSH에 비하여 cAMP를 증가시키기 위하여 더 높은 농도의 RI α-MSH (100 ng/ml)가 필요하였다. 이러한 cAMP 수준을 증가시키기 위하여 필요한 펩티드 농도의 차이는 MCR1 수용체에 대한 결합 친화도에 연유할 수 있다.

[0235] 실시예 9

[0236] 서열 변화 및 이것이 cAMP 수준 및 MC1R 결합에 미치는 효과

[0237] [0155] MSH는 MC1R, MC3R, MC4R 및 MC5R에 결합하므로, MC1R은 면역 매개 질병에 대한 좋은 표적이 된다. Retro-inverso MSH (RI-MSH)를 향상된 혈장 안정성 (도 17) 및 MC1R 선택성을 가지도록 조작하였지만, MC1R에 대한 친화성은 네이티브 MSH 펩티드보다 11배 더 낮았다 (표 1). MC1R 친화도를 회복시키기 위해, 본 발명자들은 MSH의 MC1R 친화도를 개선시키는 것으로 알려진 RI-MSH 변형체로 개량하였다. N-말단 SYSME 서열-지방산 아실, 페닐 부티르산 및 SSIIS 서열- 중 3개의 치환은 MSH의 MC1R 친화도를 향상시켰으며, 최종적으로는 RI-MSH에 대한 유의한 개선을 유도하였다. RI-MSH의 D-알라닌 스캐닝 유사체화는, MSH의 알라닌 스캐닝 유사체화와 유사한 구조적 활성 관계를 가지지만, 코어 4개 잔기 MC1R 결합 영역의 입체 화학적 역전 스캐닝은 MSH과 RI-MSH 간의 유의한 차이를 암시한다. 더욱이, 핵심 페닐알라닌 잔기에서 사이클로헥실알라닌 치환은 RI-MSH를 개선시키지만, MC1R에 대한 MSH 결합을 개선시키지는 않는다. 사이클로헥실알라닌 및 SSIIS 치환을 조합하면, 개선된 안정성 및 높은 RI-MSH의 MC1R 선택성에 중요한 retro-inversion 구조는 유지하면서 MC1R에 대한 MSH 친화도의 완전한 회복이 가능하게 된다.

[0238] [0156] retro-inverso MSH (RI-MSH)의 알라닌 스캐닝 유사체 (펩티드 804-816)의 세트를 준비하여, B16/F1 쥣과 동물 및 M624 인간 흑색종 세포에서 cAMP 유도에 대하여 준비하였다. 이어서, cAMP 결과에 기초하여 하위군을 MC1R 결합에 대하여 시험하였다. MC1R 결합에 대한 관찰된 Ki 값을 표 1에 나타내었다.

[0239] [0157] 쥣과 흑색종 B16-F1 세포를 네이티브 α-MSH, RI α-MSH, 스크램블 펩티드 대조군, KPV, 또는 RI α-MSH의 알라닌 치환된 펩티드로 1 ㎍/ml의 농도로 처리하였다 (도 7b). 세포를 Forskolin 대조군 (100 μM)으로 처리한 것은 cAMP의 증가를 나타내었다 (3294.82 ± 54.53). cAMP 수준은 미처리 세포, 스크램블 펩티드, 또는 KPV 처리된 세포와 비교하여 네이티브 α-MSH 및 RI α-MSH로 처리된 세포에서 유의하게 증가되었다. 알라닌 치환된 펩티드는 810, 811, 812로 각각 명명되었고, 이는 cAMP 활성의 증가를 나타내지 않았으며, 미처리, 스크램블 펩티드 또는 KPV 처리된 세포와 동등한 cAMP의 수준을 나타내었다. 810, 811 및 812로 명명된 펩티드는 멜라노코르틴 수용체에 대한 네이티브 α-MSH의 결합 및 이의 생물학적 활성에 포함되는 것으로 제안된 중심 코어 테트라펩티드 서열(D-Trp D-Arg D-Phe D-His 영역; AA 5-8)에서 알라닌 치환을 가진다. RI α-MSH 펩티드의 N 말단 또는 C 말단 영역에서 알라닌 치환은 흑색종 세포에서 cAMP 축적에 영향을 미치지 않았다. 메티오닌 및 히스티딘 아미노산 (807 및 809)에서의 알라닌 치환은 코어 테트라펩티드 서열 (810, 811, 또는 812)에서 관찰되는 것만큼 크지는 않지만, cAMP 축적 감소를 나타내었다. 코어 테트라펩티드(wrfh)에서의 잔기 및 덜 중요한 정도로 RI-MSH의 메티오닌 4는 MC1R에 대한 결합을 위하여 중요하다.

[0240] [0158] MC1R에 대한 MSH의 친화도를 증가시키는 것으로 나타난 다른 수단도 MSH 변이체 서열의 파지 디스플레이에 기초한 선택법을 사용하여 증명하였다. MC1R에 대하여 매우 선택적인 서열 (MS05)은 파지 디스플레이로 선택된 펩티드 및 모 MSH 서열의 일부의 재조합에 의하여 추후 발견되었는데, 이는 MC1R에 대한 나노몰 이하의 친화도를 나타낸다. 예상 밖으로, 이 서열의 retro-inverso 버젼은, MS05가 MSH보다 MC1R에 대하여 약간 더 낮은 친화도를 가지는 것으로 보고된 것에도 불구하고 (Ki 0.865nM vs. MSH에 대하여 0.557 nM), RI-MSH (4 nM)보다

MC1R에 대한 높은 친화도를 나타내었다 (1 nM, 표 1 펩티드 886).

[0241] [0159] RI-MSH의 각 부위에서 전하 및 구조가 약간씩 다른 몇 가지 비천연 아미노산 잔기를 치환하는 것은, 매우 보존적인 변화에 대하여서만 MC1R이 내성이 있음을 나타내었다. 3종 이외에는 모두 더욱 적거나 이에 동등한 결합을 나타냈다. 두 가지 변화는 MC1R에 대한 친화도에서 유의한 증가를 제공하였다. 즉, D-페닐알라닌을 D-사이클로헥실알라닌으로 치환하는 것 ((D-Cha, 펩티드 869; 2.2 nM Ki) 및 D-메티오닌을 D-부티오닌으로 치환하는 것 (펩티드 878, 2.3 nM Ki)이 그것이다. L-사이클로헥실알라닌으로 치환하는 것을 수행하였는데, 이는 MC1R에 대하여 약간 억제능을 가지는 것으로 밝혀졌다 (펩티드 892, Ki가 0.51 nM vs. MSH에 대하여 0.41 nM). 예상 밖으로, 부티오닌과 사이클로헥실알라닌 치환의 조합은 MC1R에 대한 친화도에서 약간의 추가적 증가를 생성시켰다 (펩티드 890, 1.9 nM Ki). 그러나, C-말단 서열 (emsys)에 대한 MS05 (siiss)의 retro-inverso N-말단 서열 치환 및 RI-MSH에서 D-Phe에 대한 D-사이클로헥실알라닌의 치환을 포함하는 변화의 조합은, 한 가지 변화보다는 결합에 있어 더욱 개선 효과를 나타내고, 이는 곧 이 효과가 시너지 효과임을 나타내는 것이다. 생성된 펩티드 (891)는 MSH와 구분되는 MC1R에 대한 Ki를 나타낸다. 이러한 변화 및 다른 변화는 다른 MCR에 대한 친화도에서 증가를 생성시켰지만, Ki값은 여전히 마이크로몰 단위이고, 이는 곧 RI-MSH의 선택성이 매우 보존된 것임을 나타낸다. 이 변화는 도 20에 도시되어 있다. 대표적인 경쟁적 결합 분석은 도 21에 나타나 있다. 관찰된 Ki 값에 관해서는 표 1을 참조하면 된다.

[0242] 실시예 10

[0243] EAE에서 RI α-MSH로 처리한 것은 임상 질병 점수를 감소시킴

[0244] [0160] 만성으로 진행되는 EAE 마우스 모델에서 네이티브 α-MSH 및 RI α-MSH 유사체의 투여 효과를 평가하였다. 암컷 C57BL/6 마우스를 CFA와 에멀젼화된 MOG 35-55 펩티드 200 μg으로 면역화하였다. 퍼투시스 독소를 0일째 및 2일째에 투여하였다. 마우스를 임상적 징후 및 체중 감소에 대하여 매일 모니터링 하였다. 마우스를 8일째 시작된 마비의 징후에 대하여 평가하고 0 내지 5점으로 점수를 매겼다. 마비의 임상적 징후가 나타난 것은 대부분의 마우스에서 9 내지 11일째였다 (도 8a). 10일째에 α-MSH 또는 RI α-MSH 펩티드 100 μg/마우스 또는 PBS 대조군으로 매일 복강내 처리를 시작하였다. 마우스에 RI α-MSH 100 μg을 처리한 것은 PBS 대조군과 비교하여 평균 임상 점수의 상당한 감소를 나타내었다 (도 8a). PBS 비히클 대조군과 비교하여, RI α-MSH에서 14 내지 22일째에 $p \leq 0.05$의 유의도가 달성되었다. 그러나, 네이티브 α-MSH 펩티드 처리는 질병 유도 또는 진행에 있어 효과를 나타내지 않았다. RI α-MSH 처리된 마우스 군의 질병의 최대 발생율(20%)은 PBS (80%) 또는 네이티브 α-MSH 처리된 마우스 군 (75%)에 비하여 감소되었다.

[0245] 실시예 11

[0246] EAE에서 RI α-MSH의 용량 변화

[0247] [0161] 100 μg/마우스 용량으로 RI α-MSH의 치료 효과는 뚜렷하였다. 100 μg/마우스 및 30 μg/마우스로 α-MSH 또는 RI α-MSH 펩티드를 처리한 것의 효과를 MOG EAE 마우스 모델에서 시험하였다. MOG 면역화 후 10일째에 매일 복강내 처리를 시작하였다. 매일 덱사메타손 (2 mg/kg) 처리하는 군을 대조 치료로서 추가하였다. RI α-MSH 100 μg으로 처리한 마우스는 반복하여, PBS 대조군에 비하여 평균 임상 질병 점수 감소를 나타내었다 (도 9). 그러나, RI α-MSH 30 μg/마우스는 평균 임상 점수 감소에 대하여 유의한 효과를 나타내지 않았다. 덱사메타손 처리는 질병의 진행 도중 점수 감소를 나타내었다. 네이티브 α-MSH로 처리한 마우스는 PBS보다 더 낮은 평균 임상 점수를 가졌지만, α-MSH로 처리한 마우스는 RI α-MSH 또는 덱사메타손 처리한 마우스와 유사한 효과를 나타내지 않았다. PBS 처리한 마우스에서, 75%의 최대 질병 발생율을 나타내고, 덱사메타손에서 40%를 나타내는 것과는 달리, RI α-MSH로 처리한 군에서 질병의 발생율은 35%였다 (도 9 참조). 이들 데이타는 EAE에서 RI α-MSH 펩티드 유사체로 처리한 것은 평균 임상 질병 점수 및 질병 발생율을 유의하게 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0248] 실시예 12

[0249] CNS 조직학

[0250] [0162] PBS 및 RI α-MSH 처리된 마우스에서 질병 유도 24일 째에 척수를 모았다. 척수 부위의 헤마톡실린 및 에오신 염색을 병변의 수 및 염증의 정도를 측정하기 위하여 사용하였다. EAE의 병리학은 염증 세포의 침윤이 집중된 영역 (focal areas)과 탈수초화 (demyelination)가 발생함였음을 나타내었다. 척수의 조직 평가 결과, MOG EAE 모델에서 RI α-MSH 처리의 효과가 증명되었다. 각 처리군에 대한 평균 임상 점수의 대표적인 마우스로부터의 절편은 도 10a 내지 10d에 나타낸다. 데이타는 염증의 집중 영역이 결여된 RI α-MSH 처리된 마우스와

비교하여, PBS 처리된 마우스 군에서는 염증이 많이 침윤되었음을 나타내고 있다.

[0251] 실시예 13

[0252] 질병 진행 중 비장에서 TNF-α 및 IL-10의 측정

[0253] [0163] EAE에서 RI α-MSH 처리한 것의 효과의 작용 메카니즘을 시험하였다. 네이티브 α-MSH는 TNF-α 수준을 감소시키고 IL-10을 증가시키는 것에 의하여 단핵구/마크로파지에 대한 효능을 가지는 것으로 보고되어 있다. RI α-MSH 또는 네이티브 α-MSH로 처리된 MOG로 프라이밍된 마우스의 비장에서 TNF-α 및 IL-10 mRNA 수준을 정량적 PCR을 통하여 평가하였다. 마우스를 MOG p35-55로 면역화시키고, 10일째에 RI α-MSH 또는 네이티브 α-MSH로 매일 처리하는 것을 개시하였다. 매일 처리하는 것을 개시한 후 1일, 4일 및 7일째에 마우스로부터 비장 샘플을 모았다. 데이타는 RI α-MSH 및 α-MSH로 처리한 것은 매일 처리한 것을 개시한 후 7일 째에, PBS 대조군에 비하여 TNF-α를 유의하게 감소시킨다 ((p≤0.001)는 것을 나타내었다 (도 11e). 그러나, 그 이전의 시점 (1일 및 4일: 도 11a 및 11c)에서 TNF-α수준에서의 유의한 변화는 없었다. IL-10 mRNA 수준은 RI α-MSH 및 MSH 처리군 모두에서, PBS 대조군에 비하여 7일째에 감소되었다 (도 11f). 그러나, IL-10 mRNA 수준의 차이는 이전의 시점에서 검출되지 않았다 (도 11b 및 11d). 네이티브 α-MSH 처리는 평균 임상 질병 점수 또는 질병의 발생율을 감소시키지 않았지만, 이 연구에서, α-MSH 처리는 질병 진행 17일째까지, PBS 대조군에 비하여 비장에서의 TNF-α 및 IL-10 mRNA 수준을 모두 감소시켰다. RI α-MSH 유사체는 매일 처리 후 비장에서 TNF-α mRNA 수준을 감소시킬 수 있다.

[0254] 실시예 14

[0255] MOG 펩티드에 대한 리콜 반응에 미치는 RI α-MSH의 효과

[0256] [0164] MOG 35-55 펩티드에 대한 리콜 반응에 있어서, 생체내에서 α-MSH 또는 RI α-MSH로 마우스를 처리하는 것이 미치는 효과를 평가하였다. 마우스를 MOG35-55 펩티드로 프라이밍하고, 2일 및 8일 째에, 마우스를 PBS, 100 ㎍ α-MSH 또는 100 ㎍ RI α-MSH로 처리하였다. 9일 째에, 비장 및 흘러내리는 림프절을 모으고, 이를 [3H] 티미딘 혼입법으로 시험관내에서 MOG35-55 펩티드에 대한 리콜 반응에 대하여 분석하였다. 데이타는 PBS로 처리된 군에 비하여, α-MSH 마우스 군에서 MOG35-55 펩티드에 대한 비장 세포의 증식 반응에 있어서의 유의한 감소를 나타내었다 (도 12a). RI α-MSH로 처리된 군은 MOG 35-55 펩티드에 대한 리콜 반응에 있어 약간의 감소를 나타내었다. 그러나, 림프절 세포 집단에서의 MOG 펩티드에 대한 리콜 반응은 PBS, α-MSH, 및 RI α-MSH 처리된 군 사이의 반응에 있어 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 12b).

[0257] [0165] 생체내 처리군 각각으로부터 (나이브, PBS, α-MSH, RI α-MSH) 시험관내에서 MOG35-55 펩티드로 자극하였던 비장 세포로부터의 세포 상청액을 모았다. 사이토카인 수준을 유세포 분석에 의하여 유세포 비드 어레이를 통하여 평가하였다. 데이타는 PBS 군에 비하여 α-MSH 처리된 군 및 RI α-MSH 처리된 군 양자에서 TNF-α, IFN γ, IL-6 및 MCP-1 수준이 감소되었음을 나타내었다 (도 12c 및 12d). α-MSH 처리된 군 및 RI α-MSH 처리된 군 양자에서의 비장 세포 상청액의 사이토카인 수준은 프라이밍되지 않은 마우스의 비장 세포로부터의 사이토카인 수준과 유사하였다.

[0258] [0166] 그러므로, RI α-MSH 펩티드 처리는 MOG 펩티드에 대한 사이토카인 리콜 반응에 대한 효과를 나타내었지만, T 세포 증식 반응에 대해서는 영향을 미치지 않았다.

[0259] 실시예 15

[0260] EAE의 프라이밍기 도중 α-MSH 또는 RI α-MSH로 마우스를 처리한 것의 효과

[0261] [0167] 마우스를 MOG 35-55 펩티드로 면역화하고, 2 내지 8일째에 PBS 비히클 대조군, α-MSH 또는 RI α-MSH로 매일 처리하였다. 개별적인 마우스로부터의 비장을 9일째에 모으고, mRNA 사이토카인 발현을 실시간 PCR을 사용하여 정량하였다. 도 13은 질병의 프라이밍기에, PBS, α-MSH 또는 RI α-MSH로 처리된 마우스의 비장에서 TNF-α 및 IL-10 mRNA 발현 수준을 나타낸다. MOG 펩티드로 면역화하지 않은 나이브 마우스는 TNF-α 및 IL-10의 기준선 mRNA 수준을 정량화하기 위하여 사용하였다. α-MSH 또는 RI α-MSH로 처리한 것은 PBS 비히클 대조군과 비교하여 IL-10 및 TNF-α mRNA 수준을 감소시켰다.

[0262] [0168] 혈청 샘플을 연구 9일째에 모아서, 사이토카인, 즉 TNF-α MCP-1, IL-12, IL-10 및 IL-6 수준에 대하여 평가하였다 (도 13c 및 13d). 데이타는 PBS 대조군과 비교한 α-MSH 및 RI α-MSH 처리된 군 양자에서의 MCP-1 및 IL-6의 감소를 나타낸다. MCP-1은 PBS 대조군과 비교하여 RI α-MSH 처리된 군에서 유의하게 감소되었다 (p<0.01). 또한, RI α-MSH로 처리된 군은 PBS 군과 비교하여, TNF-α 및 IL-12에서의 감소를 나타내었다. 세

가지 처리된 군 사이의 혈청 IL-10 수준에는 차이가 없었다.

[0263] 실시예 16

[0264] RI α-MSH는 마크로파지 마커에 대하여 영향을 미치지 않음

[0265] [0169] MOG 35-55 면역화된 마우스에 α-MSH 또는 RI α-MSH로 매일 투여한 7일 후, 유세포 분석으로 CD86, CD40, 및 CD14의 표면 발현 수준에 대하여 비장 $CD11b^+$ 및 $F4/80^+$ 마크로파지를 검사하였다. 데이타는 α-MSH 또는 RI α-MSH로 처리된 마우스에서 비장 $CD11b^+$ 또는 $F4/80^+$ 마크로파지에서 CD86, CD40 또는 CD14의 발현 수준 차이는 없었음을 나타내고 있다(도 14). 결과는, CD86, CD40 및 CD14 발현 수준에 대하여 혈액 단핵구를 검사하였을 때 유사한 결과를 나타내었다 (데이타는 나타내지 않음).

[0266] 실시예 17

[0267] LPS 염증 마우스 모델에서 효과

[0268] [0170] 네이티브 α-MSH는 멜라노코르틴 수용체 (MCR), 특히 멜라노코르틴 1 수용체의 자극을 통하여 TNF-α 생산을 하향 조절함으로써 염증을 억제하는 것으로 보고되어 있다. LPS는 TNF-α, MCP-1, IL-6 및 IFNγ 등의 염증 매개자를 자극하고 급성 염증 모델로서 사용된다. α-MSH 유사체가 LPS 마우스 염증 모델에서 염증 사이토카인을 억제할 수 있는지를 시험하였다. LPS 투여 후 비장 및 복강 마크로파지에서 MC1R 발현 수준을 측정하였다. C57BL/6 마우스에 LPS를 복강 주사하고, LPS 주사 후 몇 가지 시점에 비장 및 복강 마크로파지를 분석을 위하여 모았다. 데이타는 복강 마크로파지의 임의의 시점 중 MC1R mRNA 발현의 수준의 뚜렷한 차이는 없음을 나타내었다 (도 15a). 그러나, LPS 투여는, LPS 챌린지를 받지 않은 나이브 마우스보다 MC1R의 mRNA 수준을 더 증가시켰다. 비장에서, MC1R mRNA 수준은 LPS 주사 후 30분에 증가되었고, 이어서 주사 후 1시간까지 감소되었다 (도 15b). LPS는 나이브 마우스의 기준선 수준 이상으로 비장에서 MC1R의 mRNA 수준을 유사하게 증가시켰다.

[0269] [0171] 비장 및 복강 마크로파지에서의 MC1R mRNA 발현을 증명하는 데이타는, LPS 챌린지 후 30분은 α-MSH 또는 RI α-MSH 유사체 치료를 위한 최적의 시점일 수 있음을 나타낸다. C57BL/6 마우스에 LPS를 복강내 주사하고 30분 후에 네이티브 α-MSH 또는 RI α-MSH 유사체 891이 5 mg/kg 내지 0.156 mg/kg 범위의 투여량으로 복강내 투여되었다. RI α-MSH 유사체 891은 d-Cha 및 hsiiss D-아미노산이 코어 펩티드 서열에 첨가된 RI α-MSH의 유사체이다. RI α-MSH 유사체 891은 마우스 MC1R에 대한 결합 친화도를 증가시키는 것으로 나타났고, 또한 cAMP를 자극하는 능력을 증가시키는 것으로 나타났다 (데이타는 나타내지 않음). 결과들은, PBS 비히클 대조군에 비하여, 네이티브 α-MSH로 처리된 군에서 TNF-α 및 IL-10 수준이 유의하게 감소되었음을 나타낸다 (도 16a 및 16c). MCP-1은 네이티브 α-MSH 처리에 의하여 영향받지 않았다 (도 16b). RI α-MSH 유사체 891을 LPS로 챌린징된 마우스에 처리하는 것은, 비히클 대조군과 비교하여, MCP-1 수준에 대하여 아무런 영향을 미치지 않으면서 TNF-α 및 IL-10의 유의한 감소를 초래하는 유사한 결과를 나타내었다 (도 16d-16f). 네이티브 α-MSH 및 RI α-MSH 유사체 891 양자의 양이 적을 수록, 염증성 사이토카인의 억제가 증가되었음이 드러났다. 덱사메타손 양성 대조군은 TNF-α 및 MCP-1 수준의 억제와 일치하였다.

[0270] 실시예 18

[0271] 혈장내 펩티드 안정성

[0272] [0172] 네이티브 α-MSH의 혈청내 반감기는 약 10분인 것으로 추정된다. 이러한 제한된 반감기에도 불구하고, 이 펩티드는 강력한 항염증 활성을 유발할 수 있다. 그러나, 더욱 안정한 α-MSH 유사체가 치료제로서 추가로 개발하고 또한 항염증 활성의 효능을 더욱 증가시키기 위하여 필요하다. 네이티브 α-MSH의 D-아미노산 유사체 (retro-inverso α-MSH 또는 RI α-MSH로 언급)를 합성하였는데, 이는 더욱 안정한 네이티브 α-MSH이다. 펩티드의 D-아미노산 형태는 단백질 분해에 더욱 내성이고, 펩티드의 L-아미노산보다 더욱 느린 속도로 대사된다.

[0273] [0173] RI-α-MSH의 안정성은 24시간 동안 37℃에서 시험관내에서 PBS 또는 혈장 중에 인큐베이트함으로써 측정하였다. 분취액을 취하여 단백질을 2 용적의 아세토니트릴로 침전시켰다. α-MSH를 대조군으로 사용하고 브래드키닌을 내부 표준으로서 사용하였다. 원심 분리 후에, 시료를 C18 컬럼 분리 및 양성 전기분사 이온화 방식을 사용하는 LC/MS/MS (MRM)로 분석하기 전까지 -80℃로 동결시켰다. 도 17a에 제시된 바와 같이, MSH는 혈장내에서 반감기가 약 3시간이지만, PBS 중에서 안정하였다. 그러나, PBS 및 혈장 모두에서 RI-α-MSH는 안정하였고, 이는 24시간 동안 검출 가능한 분해를 나타내지 않았다.

[0274] [0174] α-MSH 및 RI-α-MSH에 대한 약동학적 (PK) 특성은, RI-α-MSH는 네이티브 α-MSH (도 17b)보다 더 긴

혈청내 반감기를 가짐을 나타내었다. 100 ㎍ RI-α-MSH 또는 α-MSH의 단일 투여량으로 처리한 마우스는 24시간 후 RI-α-MSH의 측정 가능한 혈청내 수준을 가졌지만, 처리 120분 후에는 α-MSH의 검출 가능한 수준을 나타내지 않았다 (n=5).

[0275] 실시예 19

[0276] retro-inverso 펩티드의 결합 효과

[0277] [0175] D-Phe를 함유하는 코어 MSH 테트라펩티드 (HfRW)는 MC1R에 대한 충분한 결합을 생성시킨다 (20-50 nM Ki). 그러나, 동일한 테트라펩티드의 retro-inverso 버젼으로는 거의 결합이 관찰되지 않았다 (wrFh, 883, Ki>30μM, 표 1). 이는 곧, retro-inverso 펩티드는 HfRW과 동일한 방식으로 수용체와 완전히 접촉하는 데 실패하였음을 나타낸다. HfRW의 N-말단에 지방 아실기를 첨가하는 것은 MC1R에 대한 결합을 선택적으로 개선시키고, MSH에 필적하는 친화도를 발생시킨다. 이는 MC1R에서 스테아릴-HfRW 펩티드에 대하여도 관찰되었다 (1.3 nM, 펩티드 820). retro-inverso wrFh (펩티드 882)에 대한 디아미노헥산 스테아릴기의 첨가는 MC1R에 대한 결합을 개선시키며 (120 nM, >250배), HfRW의 N-말단에 스테아르산 첨가와 필적한 수준이지만 (80배), RI-MSH에 대하여 관찰된 친화도를 달성하지는 못하였고 (4.1 nM), 다시, 이는 곧 RI-MSH에서 다른 잔기가 MSH보다 MC1R에 대한 RI-MSH의 결합에서 큰 역할을 수행함을 나타내는 것이다.

[0278] 실시예 20

[0279] retro-inverso 펩티드의 결합에 대한 입체 화학적 효과

[0280] [0176] 코어 retro-inverso 테트라펩티드 중의 잔기의 입체 화학은 L 형태의 MSH보다 MC1R에의 결합에 상당히 상이한 효과를 나타낸다. 도 19에 제시되어 있는 바와 같이, RI-MSH에서 코어 테트라펩티드 잔기의 L-형태로의 전환 (펩티드 884, 893-895)은 모두 MC1R에 대한 펩티드의 친화도를 감소시켰다. 놀랍게도, RI 서열 중에서 D-Phe를 L-Phe로 역전시키는 것은 결합능의 20배 감소를 유발시키는 반면에, HFRW (L-Phe에서 D-Phe로)에서의 해당 변화는 400배 결합능 증가를 가져오는 것으로 보고되어 있다. 다른 잔기에 대하여, 입체 화학적 전환은 코어 HfRW 펩티드에 대한 것보다 RI-MSH에 대하여 더욱 적은 효과를 가지는 것으로 밝혀졌는데, 이는 곧 코어 테트라펩티드 중의 각 잔기의 상대적인 중요성이 HfRW 테트라펩티드에서보다 RI-MSH에서 더 낮음을 나타내는 것이다.

[0281] 실시예 21

[0282] 말단 캡핑 retro-inverso MSH의 효과

[0283] [0177] MC1R에 대한 더욱 높은 친화도를 달성하기 위한 다른 가능한 경로는 HfRW 펩티드를 페닐 부티르산으로 선택적으로 말단 캡핑하고, 이것이 MC1R에 대한 HfRW의 친화도를 매우 증가시켰다(Ki=6 pM)는 관찰에 기초한다. 그러나, C-말단 페닐프로필아민을 함유하는 말단이 절단된 RI-MSH (펩티드 847)의 친화도에서는 증가가 관찰되지 않았는데, 히스티딘 잔기에서 절단된 펩티드 (펩티드 847int) 및 이의 아미노프로필-페닐 첨가물(펩티드 847, 표 1)에서 150 nM의 Ki가 관찰되었고, 이는 곧 RI-MSH를 사용하여, 테트라펩티드 서열과 MC1R에서 히스티딘 결합 성분 근처의 후술되는 방향족 상호 작용 부위의 동시 상호 작용을 허용하지 않는 방식으로 결합이 변경되었음을 암시한다.

[0284] 실시예 22

[0285] retroinverso MSH의 독소 컨쥬게이트의 합성

[0286] [0178] 시스테인이 N-말단에 첨가되는 펩티드 891의 변형 버젼(표 1)을 Fmoc 화학에 의하여 만들었다. 티올에 대한 커플링을 위한 말레이미도-카프로일 모이어티와 함께 프로테아제 민감성 발린-시트룰린 링커를 함유하는 모노메틸 오리스타틴 E (MMAE)의 컨쥬게이트를 본원에 참조로서 포함되는 문헌 [Doronina *et al*. (2003) *Nature Biotechnol*. 21:778-784]에 따라 합성하였다. 펩티드 및 MMAE 컨쥬게이트를 14시간 동안 25℃에서 25mM Na 포스페이트, 2mM EDTA pH7의 용액에서 인큐베이트하고, C18 역상 HPLC (RP-HPLC)로 생성물을 정제하였다.

[0287] 실시예 23

[0288] 쥣과 흑색종 세포주에서 cAMP에 미치는 RI α-MSH 유사체의 효과

[0289] [0179] 네이티브 α-MSH 및 RI α-MSH 양자는 쥣과 흑색종 세포에서 cAMP 양을 증가시킨다. RI α-MSH 펩티드 유사체는 RI α-MSH 펩티드의 코어 서열에 대한 변형이 RI α-MSH 펩티드와 비교하여 cAMP 양을 증가시킬 수 있는지에 대하여 측정하기 위하여 생성시킨 것이다. 쥣과 B16-F1 흑색종 세포를 사용하는 cAMP 분석법에서 발생된

RI α-MSH 유사체에 대하여 용량 반응 실험을 수행하였다.

[0290] [0180] **시험관내 세포 배양액**: B16-F1 쥣과 흑색종 세포를 L-글루타민 및 pen/strep 및 FBS가 보충된 매지 중에서 $5x10^4$ 세포/웰의 농도로 96웰 플레이트에 배양하였다. 배지를 제거하고, IBMX가 보충된 새로운 배지를 1시간 동안 세포에 첨가하였다. 이어서, 세포를 RI α-MSH, 또는 RI α-MSH 펩티드 유사체 (890, 891, 892, 893, 894 또는 895)로 처리하였다. 세포를 cAMP 분석 키트를 사용하여 30분 후에 용해시키고, 상청액을 분석에 사용하였다. 10 μM의 Forskolin을 양성 대조군으로서 사용하였다.

[0291] [0181] **cAMP 수준**: 세포내 cAMP를 키트 [cAMP competition Assay Kit (Amersham Biosciences)]를 사용하여 측정하였다. 모든 세포 용해물 샘플을 분석을 위하여 1:100으로 희석시켰다.

[0292] 펩티드:

[0293] 869 vpkGwr(d-Cha)hemsys

[0294] 872 vpkGwrfremsys

[0295] 880 vpkGwrFhsiiss

[0296] 878 vpkGwrfhe(d-부티오닌)sys

[0297] 886 RI-MS05 vpkgwrfhsiiss

[0298] 890 vpkGwr(d-Cha)he(d-부티오닌)sys

[0299] 891 vpkGwr(d-Cha)hsiiss

[0300] 892 SYSMEH(Cha)RWGKPV

[0301] 893 vpkGWrfhemsys

[0302] 894 vpkGwRfhemsys

[0303] 895 vpkGwrfHemsys

[0304] [0182] **결과**: 쥣과 흑색종 B16-F1 세포를 10^{-4}-10^{-11} M의 농도 범위로 RI α-MSH 또는 RI α-MSH 유사체 (869, 872, 880, 878, 886 및 890-895) 로 처리하였다. RI α-MSH, 또는 RI α-MSH 유사체로 처리한 세포로부터의 cAMP 수준을 측정하였다. RI α-MSH 유사체 대부분은 유사체 894를 제외하고, RI α-MSH와 비교하여 개선된 EC_{50} 값을 나타내었다. 유사체 891, 892 및 886은 RI α-MSH 펩티드와 비교하여, cAMP 분석법에서 EC_{50} 값의 가장 큰 개선을 보였다. 요약하면, RI α-MSH 유사체는 RI α-MSH 펩티드와 비교하여 용량 반응 및 EC_{50} 값의 개선을 나타내었다. 그래프 데이타에 대해서는 도 22를 참조하고, EC_{50} 데이타에 대해서는 표 2를 참조하면 된다.

표 2

	EC_{50}, μM
α-MSH	0.0004
RI α-MSH	9.7
유사체 **ID:**	
890	3.6
891	0.081
892	0.021
893	0.27
894	212
895	0.3

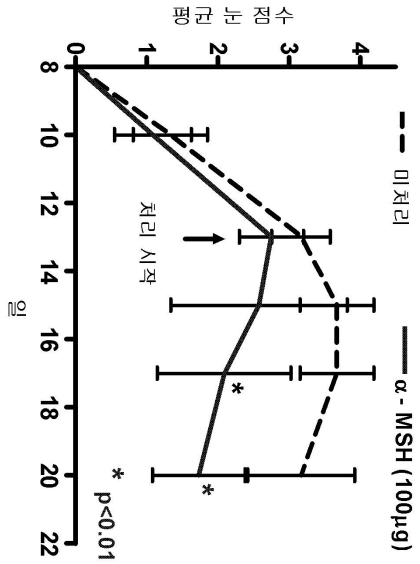
	EC_{50}, μM
α-MSH	0.0004
RI α-MSH	9.7
유사체 **ID:**	
878	0.13
880	0.023
886	0.002

	EC_{50}, μM
α-MSH	0.0004
RI α-MSH	9.7
유사체 **ID:**	
869	0.014
872	2.0
878	0.13

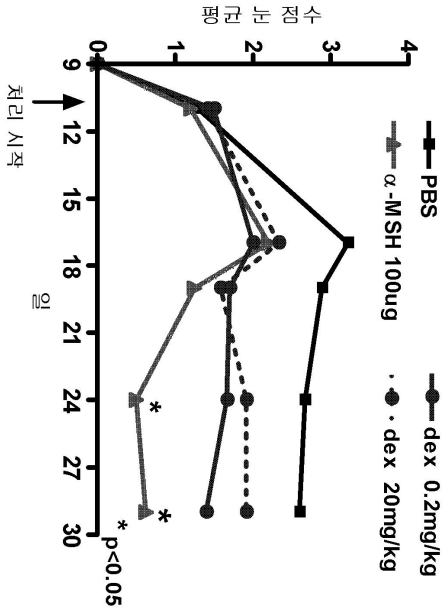
[0305]

도면

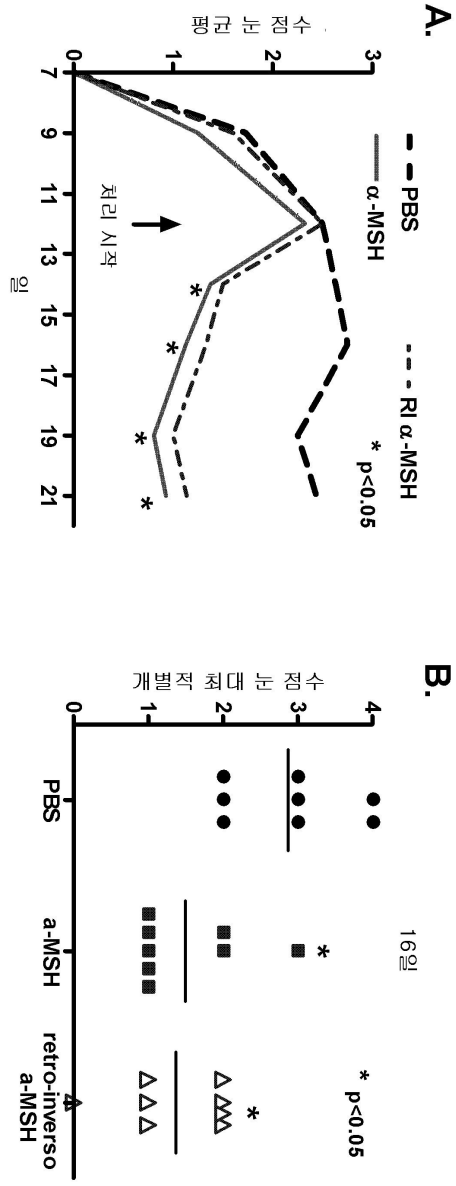
도면1a


평균 눈 점수
0
1
2
3
4
8
10
12
14
16
18
20
22
일
처리 시작
미처리
α-MSH (100μg)
*
*
*
p<0.01

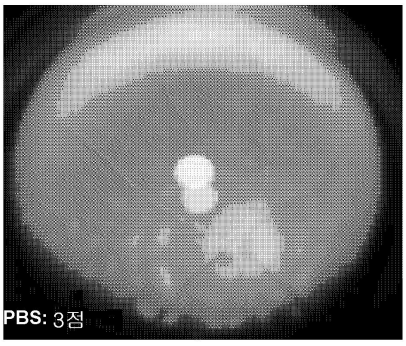
도면1b


평균 눈 점수
0
1
2
3
4
0
9
12
15
18
21
24
27
30
일
처리 시작
PBS
α-MSH 100ug
dex 0.2mg/kg
dex 20mg/kg
*
*
*
p<0.05

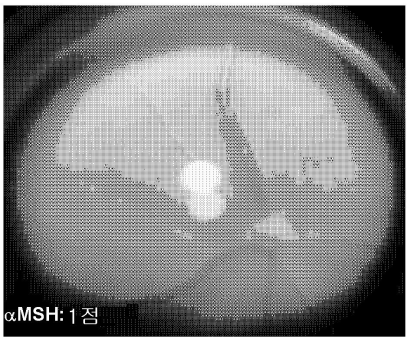
도면2


A.
평균 눈 점수
PBS
α-MSH
RI α-MSH
* p<0.05
처리 시작
일
B.
개별적 최대 눈 점수
16일
* p<0.05
PBS
a-MSH
retro-inverso a-MSH

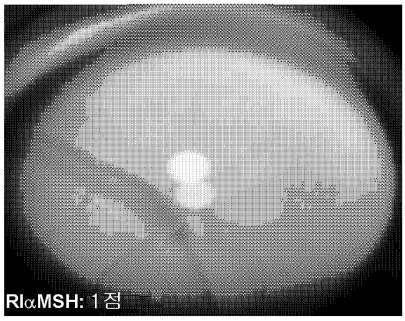
도면3a


PBS: 3점

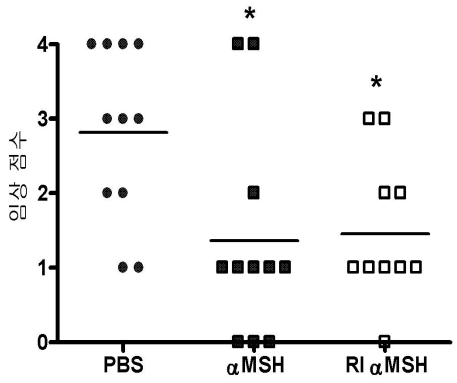
도면3b



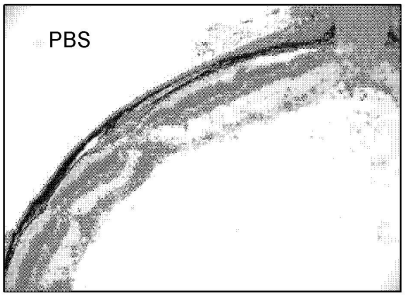
도면3c



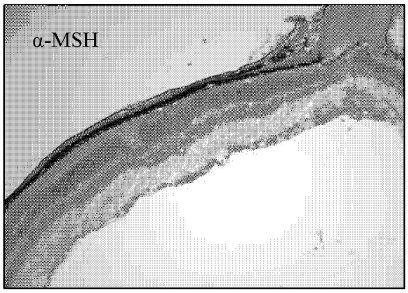
도면3d



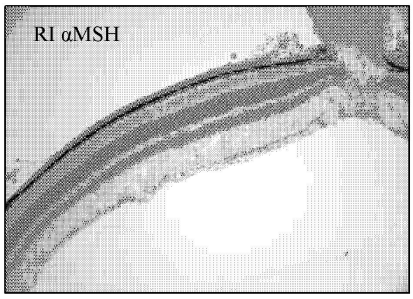
도면4a



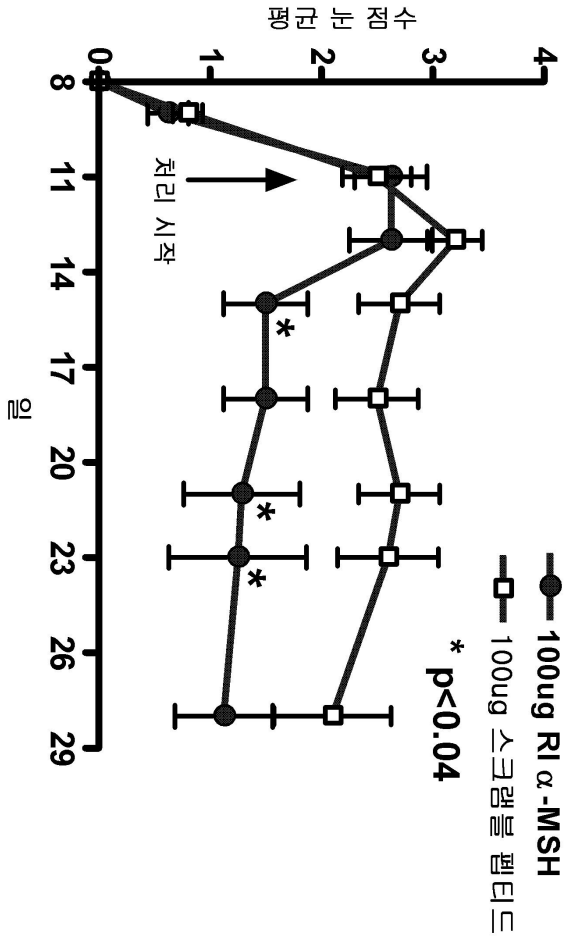
도면4b



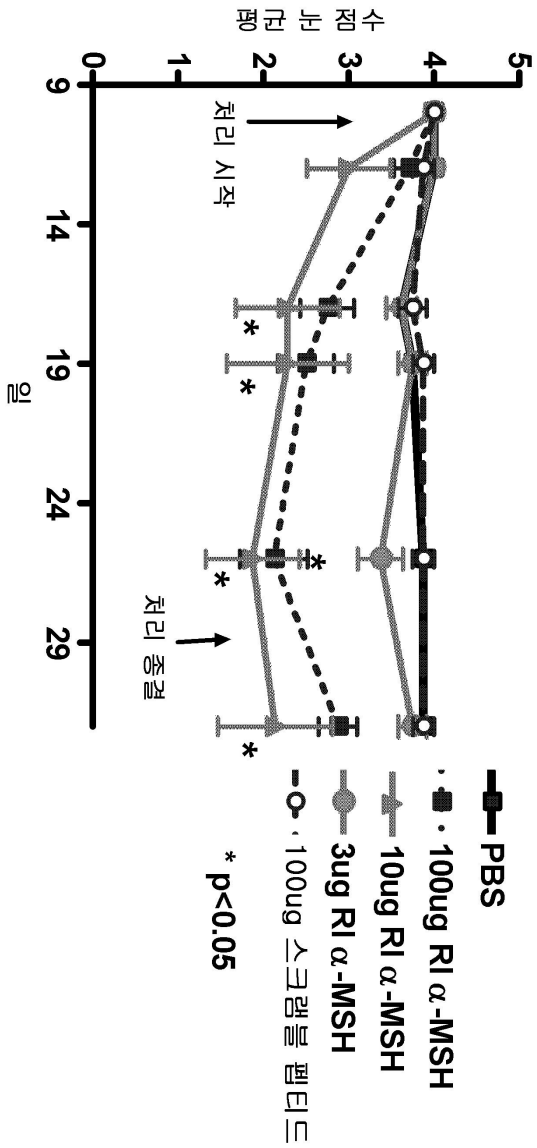
도면4c



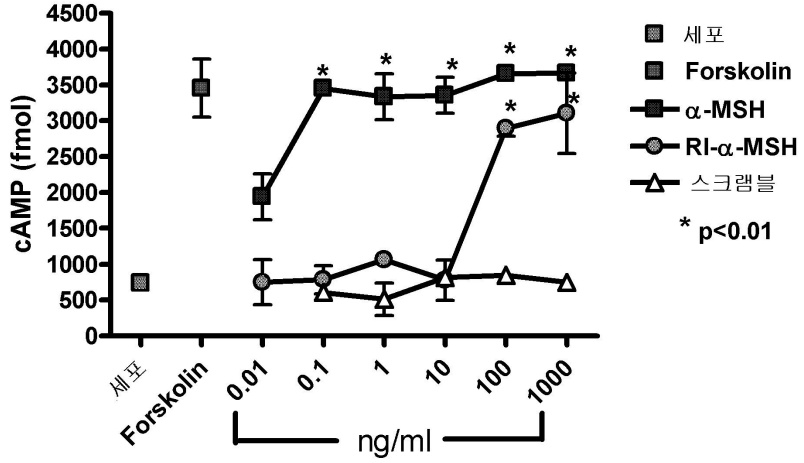
도면5



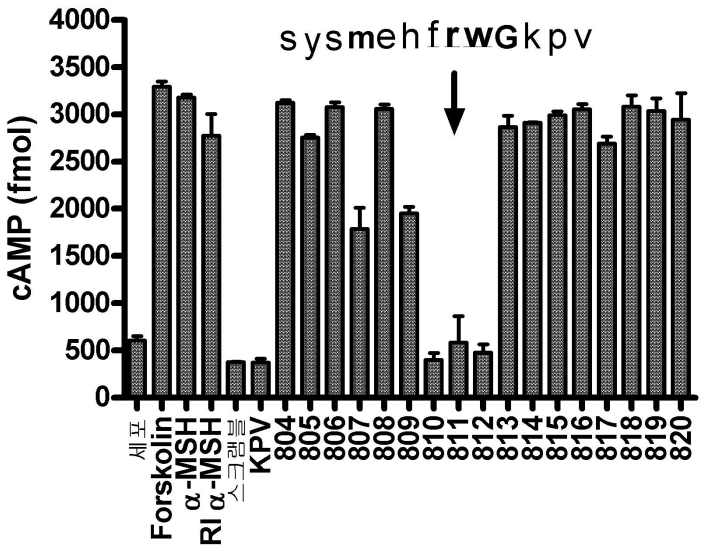
도면6


평균 귀 점수
0
1
2
3
4
5
9
14
19
24
29
일
처리 시작
처리 종결
*
PBS
100ug RI α-MSH
10ug RI α-MSH
3ug RI α-MSH
100ug 스크램블 펩티드
* p<0.05

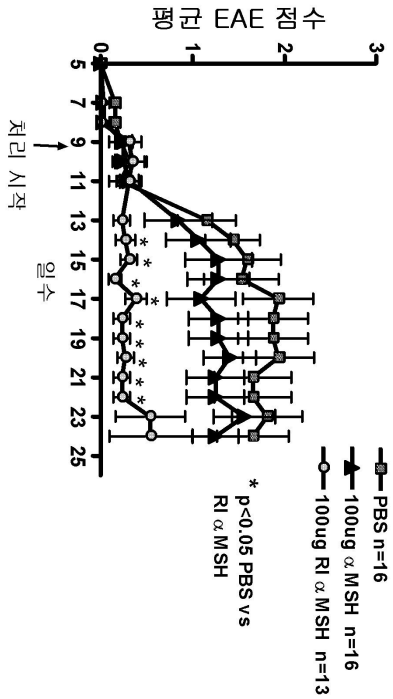
도면7a


4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
cAMP (fmol)
세포
Forskolin
0.01
0.1
1
10
100
1000
ng/ml
세포
Forskolin
α-MSH
RI-α-MSH
스크램블
* p<0.01

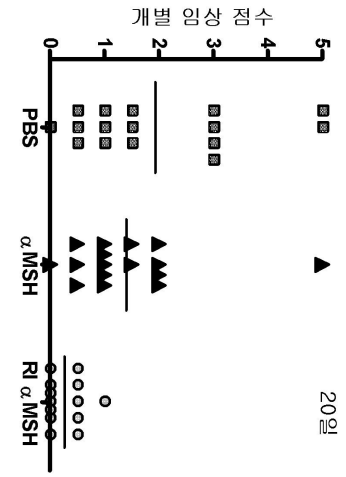
도면7b


4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
cAMP (fmol)
sysmehfrwGkpv
세포
Forskolin
α-MSH
RI α-MSH
스크램블
KPV
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820

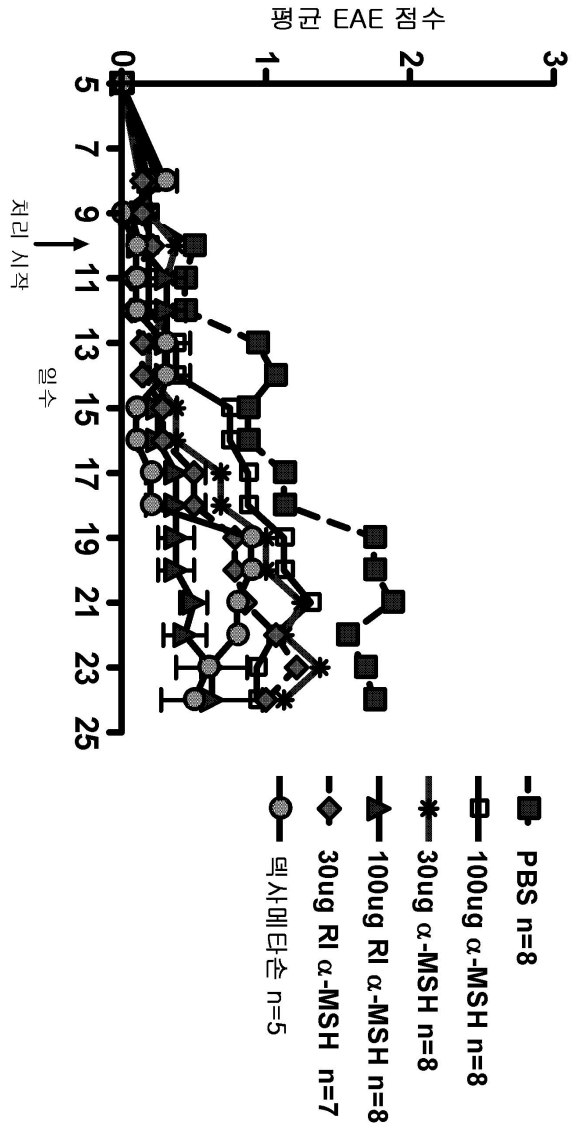
도면8a


평균 EAE 점수
0
1
2
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
처리 시작
일수
PBS n=16
100ug αMSH n=16
100ug RI αMSH n=13
* p<0.05 PBS vs RI αMSH

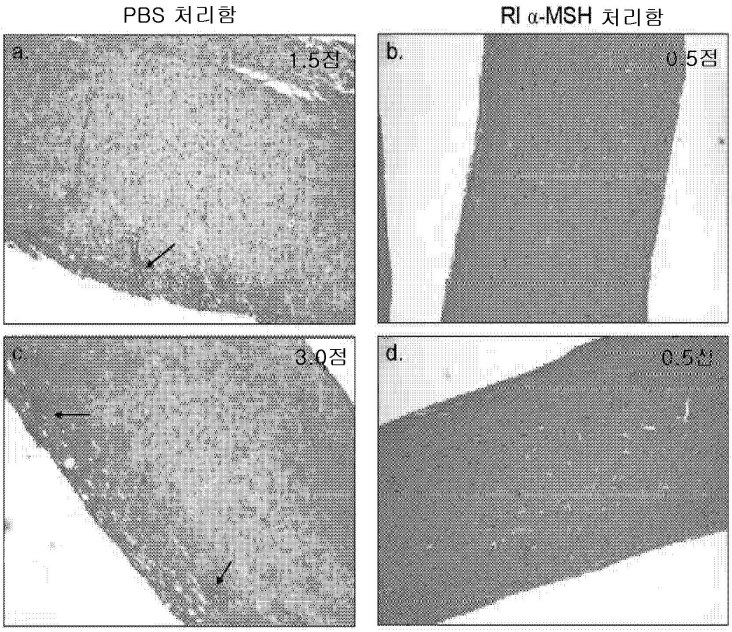
도면8b


개별 임상 점수
0
1
2
3
4
5
PBS
αMSH
RI αMSH
20일

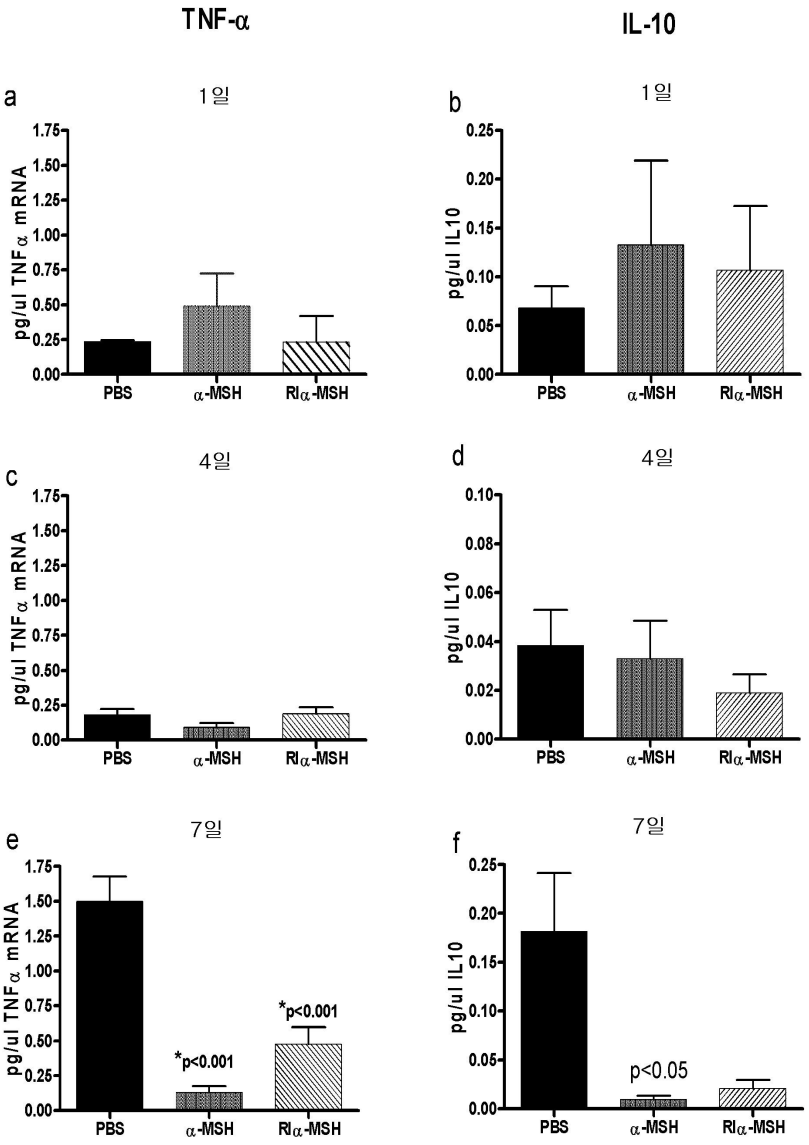
도면9


평균 EAE 점수
0
1
2
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
처리 시작
일수
PBS n=8
100ug α-MSH n=8
30ug α-MSH n=8
100ug RI α-MSH n=8
30ug RI α-MSH n=7
덱사메타손 n=5

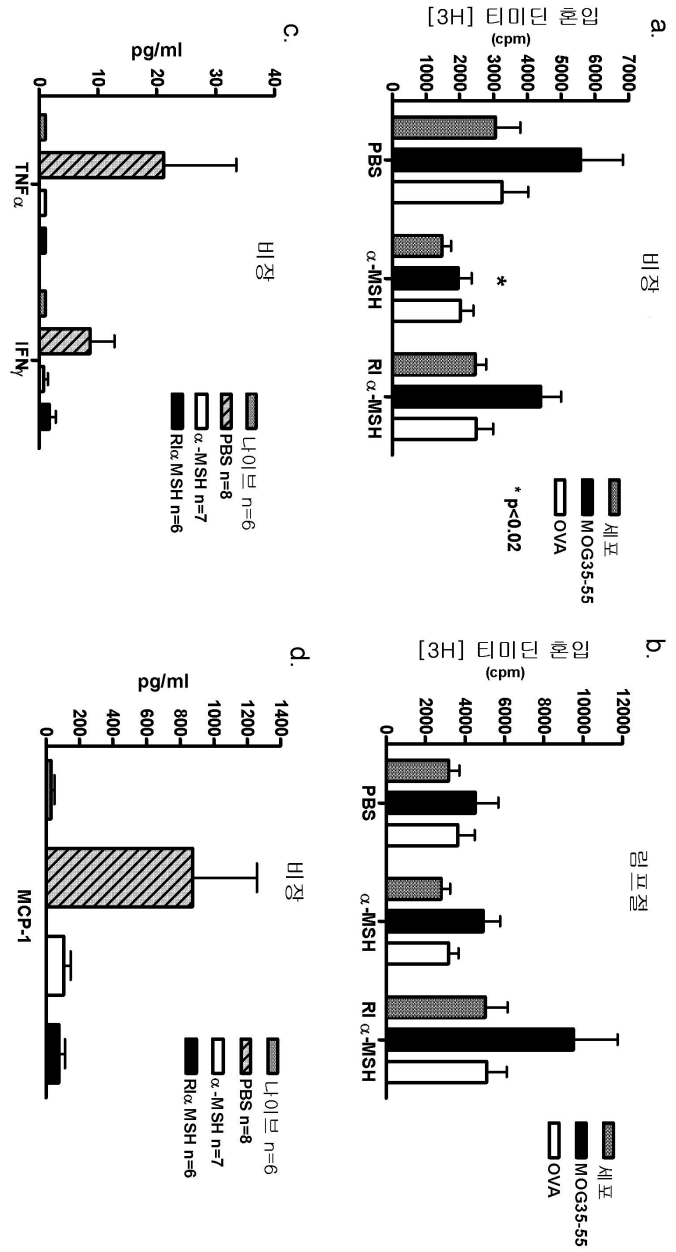
도면10



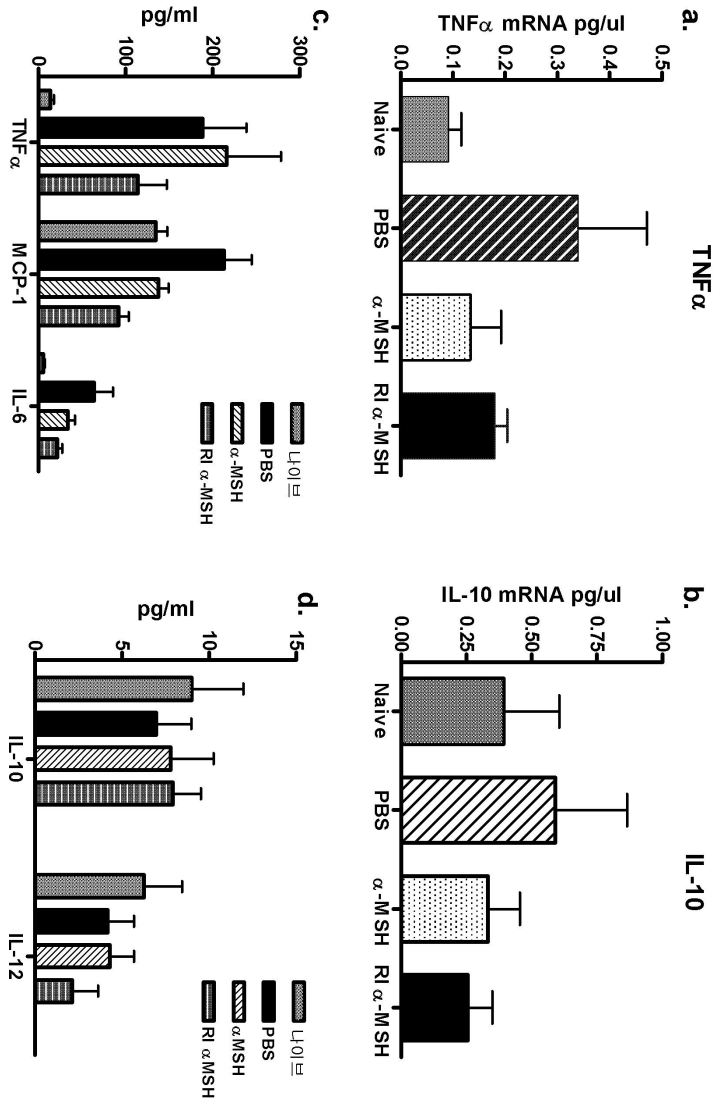
도면11


TNF-α
IL-10
a
1일
pg/ul TNFα mRNA
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
PBS
α-MSH
RIα-MSH
b
1일
pg/ul IL10
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
PBS
α-MSH
RIα-MSH
c
4일
pg/ul TNFα mRNA
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
PBS
α-MSH
RIα-MSH
d
4일
pg/ul IL10
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
PBS
α-MSH
RIα-MSH
e
7일
pg/ul TNFα mRNA
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
*p<0.001
*p<0.001
PBS
α-MSH
RIα-MSH
f
7일
pg/ul IL10
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
p<0.05
PBS
α-MSH
RIα-MSH

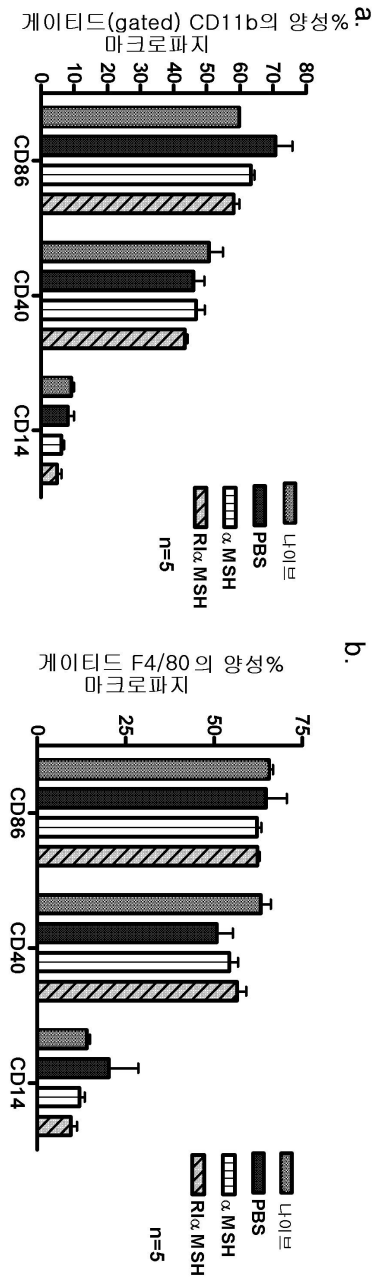
도면12


a.
[3H] 티미딘 혼입
(cpm)
비장
PBS
α-MSH
RI α-MSH
*
* p<0.02
세포
MOG35-55
OVA
b.
[3H] 티미딘 혼입
(cpm)
림프절
c.
pg/ml
TNFα
IFNγ
비장
나이브 n=6
PBS n=8
α-MSH n=7
RIα MSH n=6
d.
pg/ml
MCP-1
비장

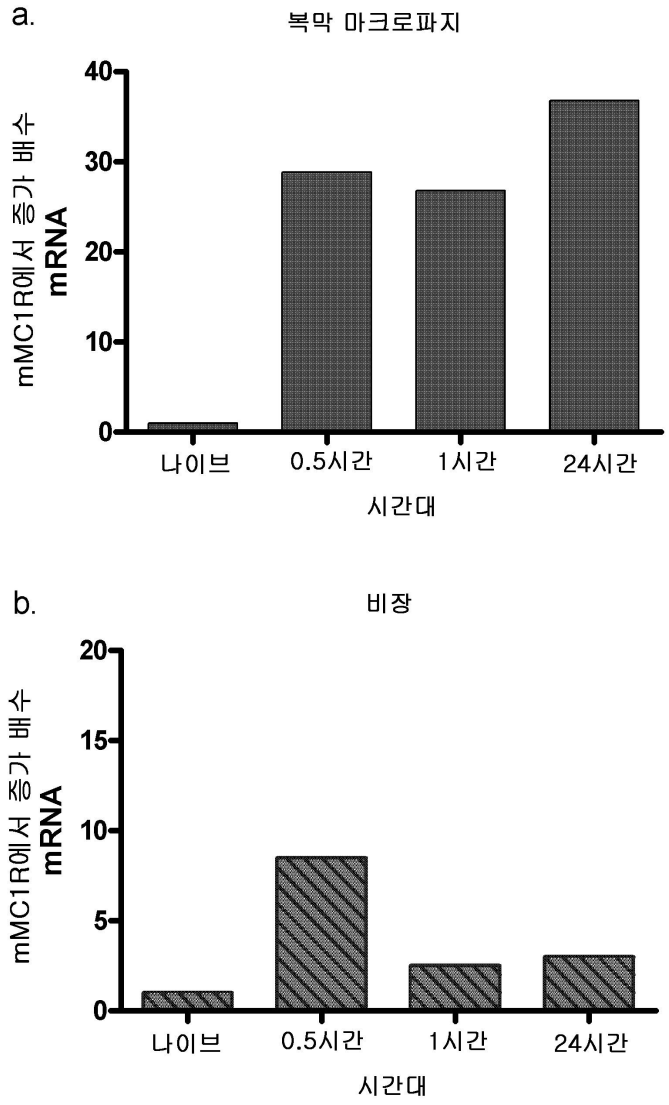
도면13


a.
TNFα mRNA pg/ul
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
Naive
PBS
α-MSH
RI α-MSH
TNFα
b.
IL-10 mRNA pg/ul
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
Naive
PBS
α-MSH
RI α-MSH
IL-10
c.
pg/ml
0
100
200
300
TNFα
MCP-1
IL-6
나이브
PBS
α-MSH
RI α-MSH
d.
pg/ml
0
5
10
15
IL-10
IL-12
나이브
PBS
αMSH
RI αMSH

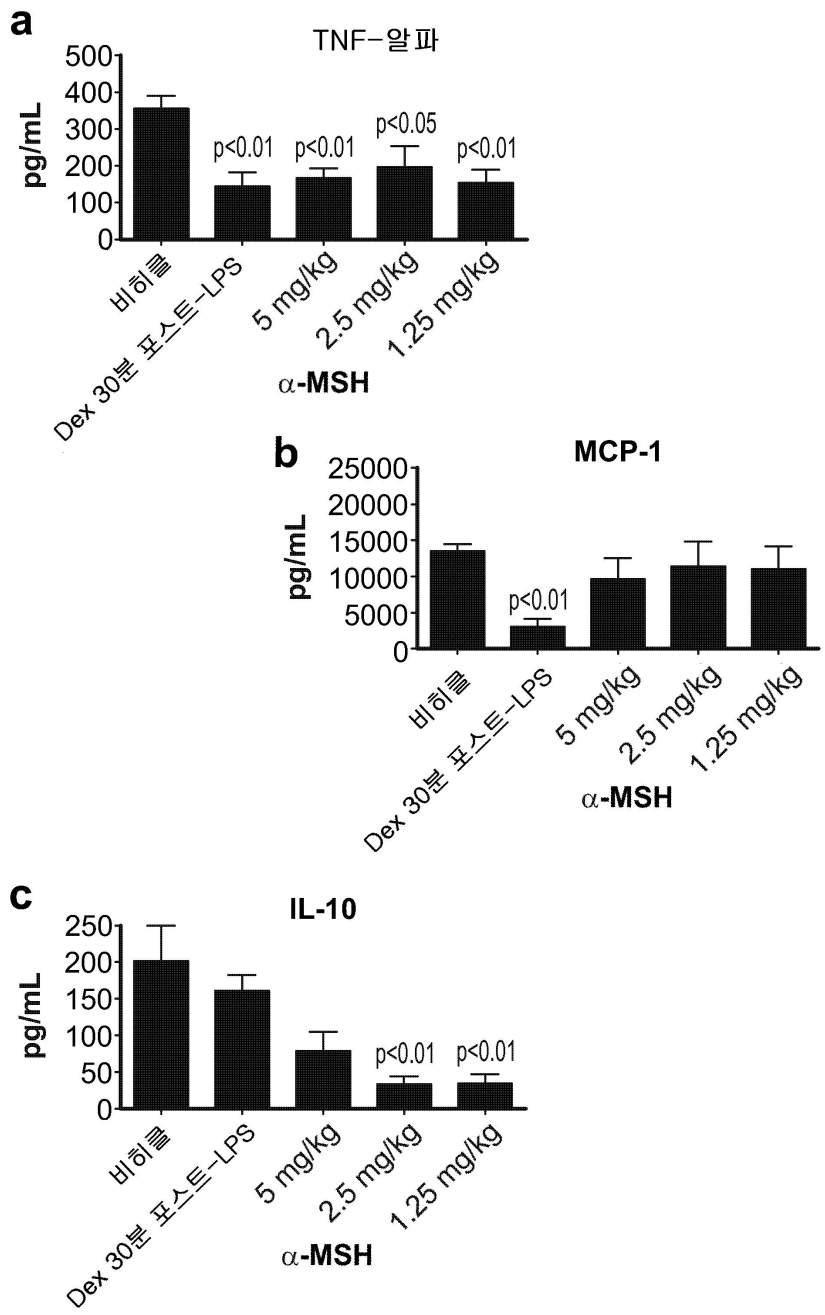
도면14


a.
게이티드(gated) CD11b의 양성% 마크로파지
0
10
20
30
40
50
60
70
80
CD86
CD40
CD14
나이브
PBS
αMSH
RIαMSH
n=5
b.
게이티드 F4/80의 양성% 마크로파지
0
25
50
75
CD86
CD40
CD14
나이브
PBS
αMSH
RIαMSH
n=5

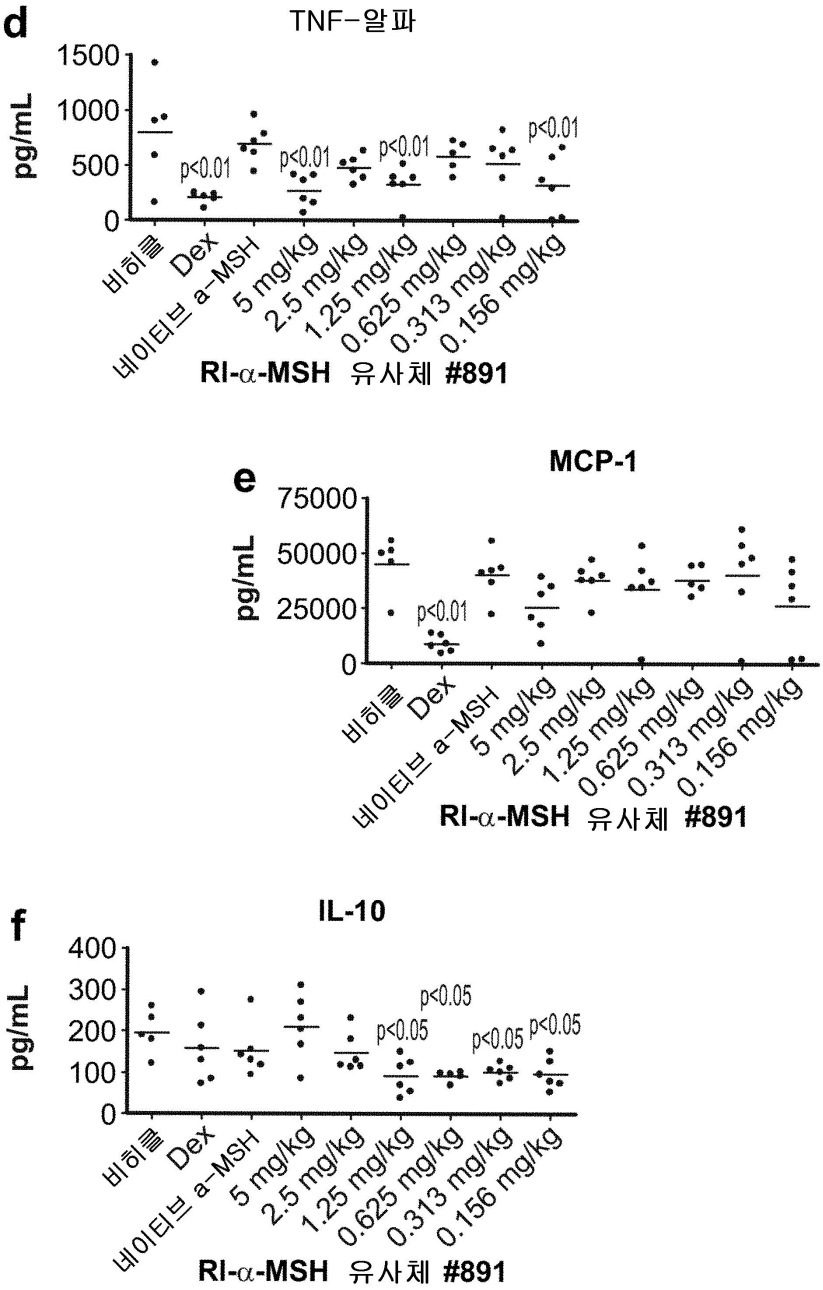
도면15


a.
복막 마크로파지
mMC1R에서 증가 배수
mRNA
40
30
20
10
0
나이브
0.5시간
1시간
24시간
시간대
b.
비장
mMC1R에서 증가 배수
mRNA
20
15
10
5
0
나이브
0.5시간
1시간
24시간
시간대

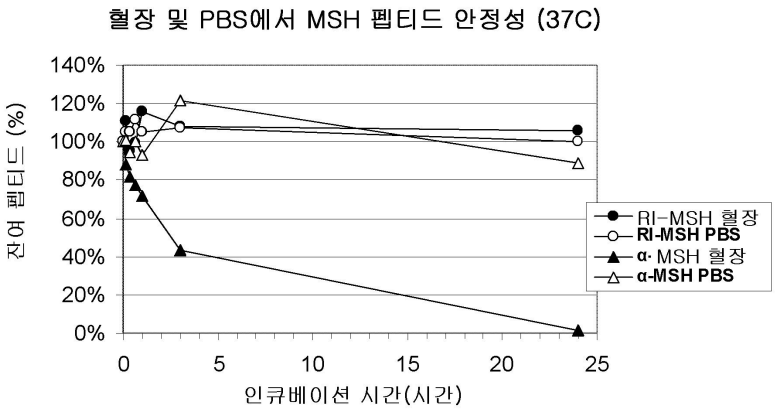
도면16a


a
TNF-알파
pg/mL
500
400
300
200
100
0
p<0.01
p<0.01
p<0.05
p<0.01
비히클
Dex 30분 포스트-LPS
5 mg/kg
2.5 mg/kg
1.25 mg/kg
α-MSH
b
MCP-1
pg/mL
25000
20000
15000
10000
5000
0
p<0.01
비히클
Dex 30분 포스트-LPS
5 mg/kg
2.5 mg/kg
1.25 mg/kg
α-MSH
c
IL-10
pg/mL
250
200
150
100
50
0
p<0.01
p<0.01
비히클
Dex 30분 포스트-LPS
5 mg/kg
2.5 mg/kg
1.25 mg/kg
α-MSH

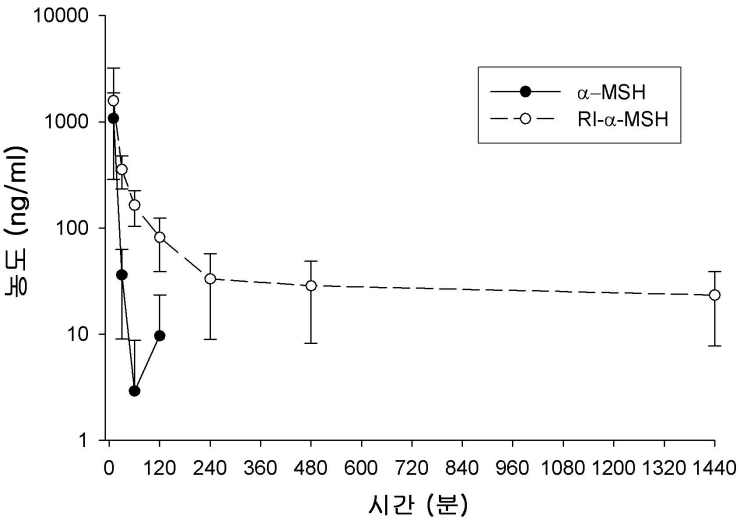
도면16d


d
TNF-알파
pg/mL
1500
1000
500
0
p<0.01
p<0.01
p<0.01
p<0.01
비히클
Dex
네이티브 a-MSH
5 mg/kg
2.5 mg/kg
1.25 mg/kg
0.625 mg/kg
0.313 mg/kg
0.156 mg/kg
RI-α-MSH 유사체 #891
e
MCP-1
pg/mL
75000
50000
25000
0
p<0.01
비히클
Dex
네이티브 a-MSH
5 mg/kg
2.5 mg/kg
1.25 mg/kg
0.625 mg/kg
0.313 mg/kg
0.156 mg/kg
RI-α-MSH 유사체 #891
f
IL-10
pg/mL
400
300
200
100
0
p<0.05
p<0.05
p<0.05
p<0.05
비히클
Dex
네이티브 a-MSH
5 mg/kg
2.5 mg/kg
1.25 mg/kg
0.625 mg/kg
0.313 mg/kg
0.156 mg/kg
RI-α-MSH 유사체 #891

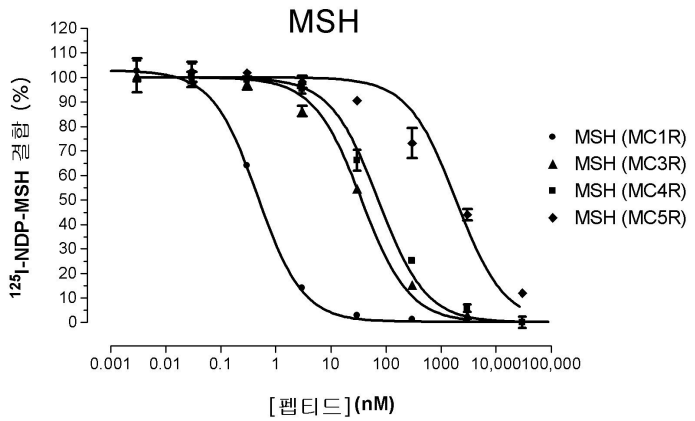
도면17a



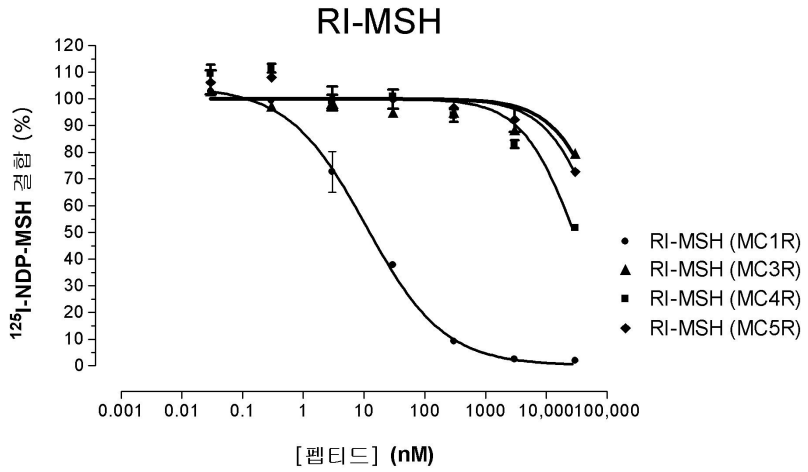
도면17b



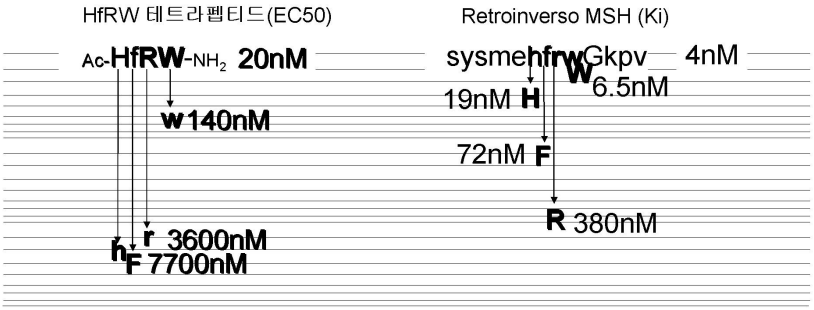
도면18a



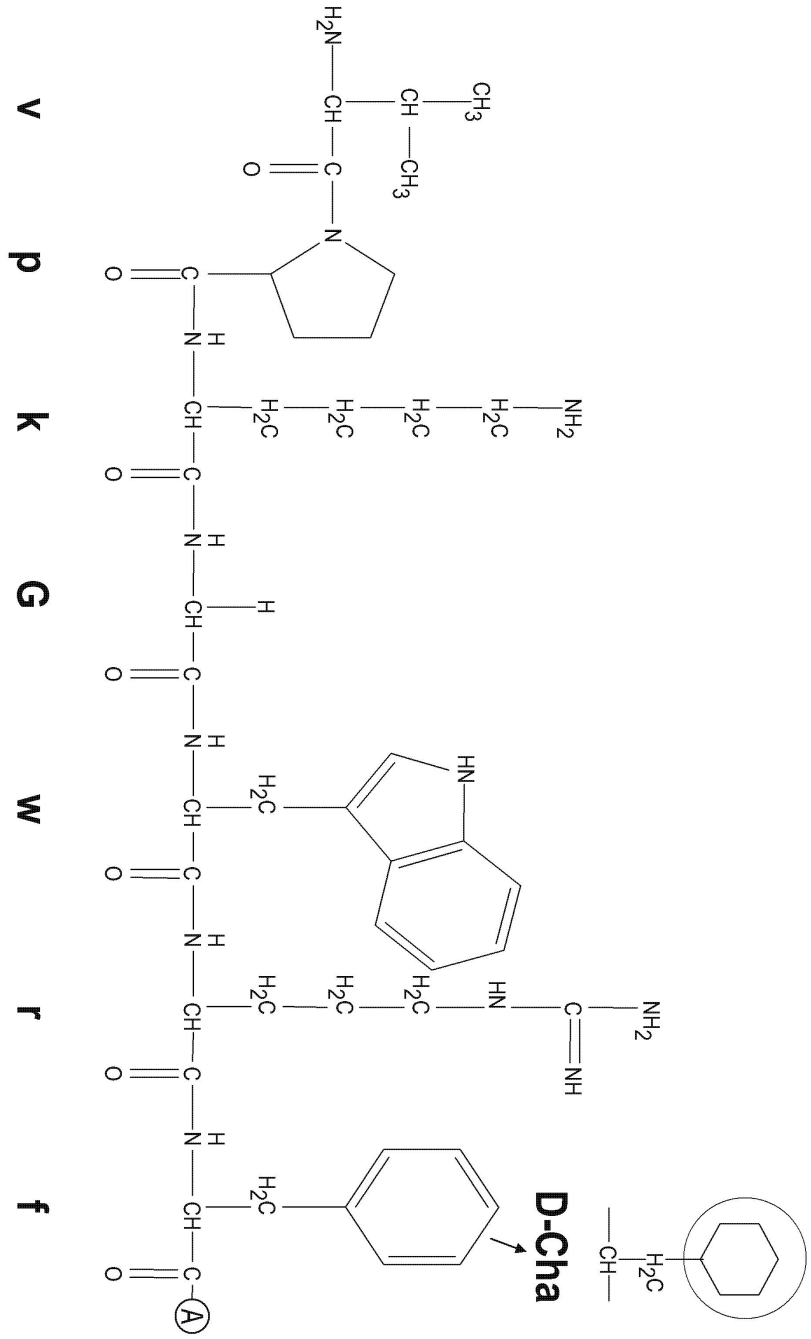
도면18b


RI-MSH
125I-NDP-MSH 결합 (%)
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10,000
100,000
[펩티드] (nM)
RI-MSH (MC1R)
RI-MSH (MC3R)
RI-MSH (MC4R)
RI-MSH (MC5R)

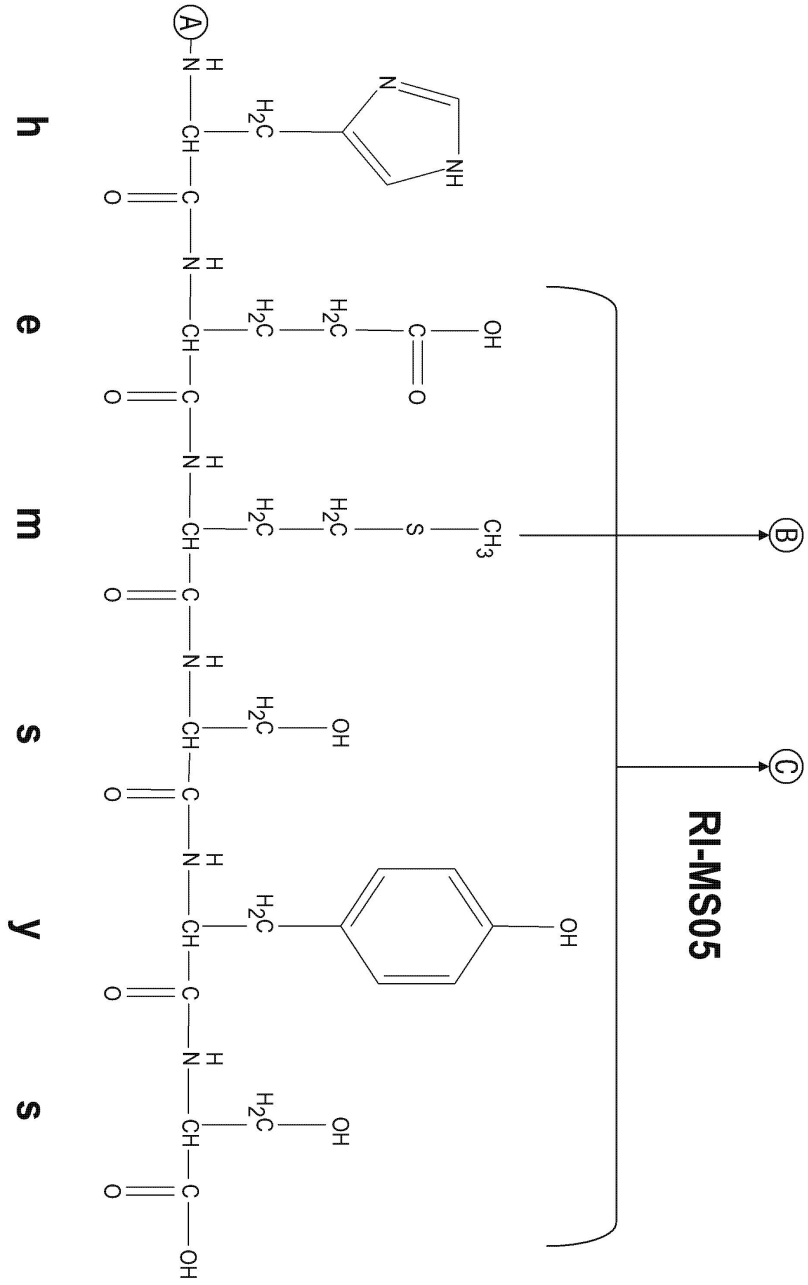
도면19


HfRW 테트라펩티드(EC50)
Ac-HfRW-NH2 20nM
w 140nM
h r 3600nM
F 7700nM
Retroinverso MSH (Ki)
sysmehfrwGkpv 4nM
19nM H
w 6.5nM
72nM F
R 380nM

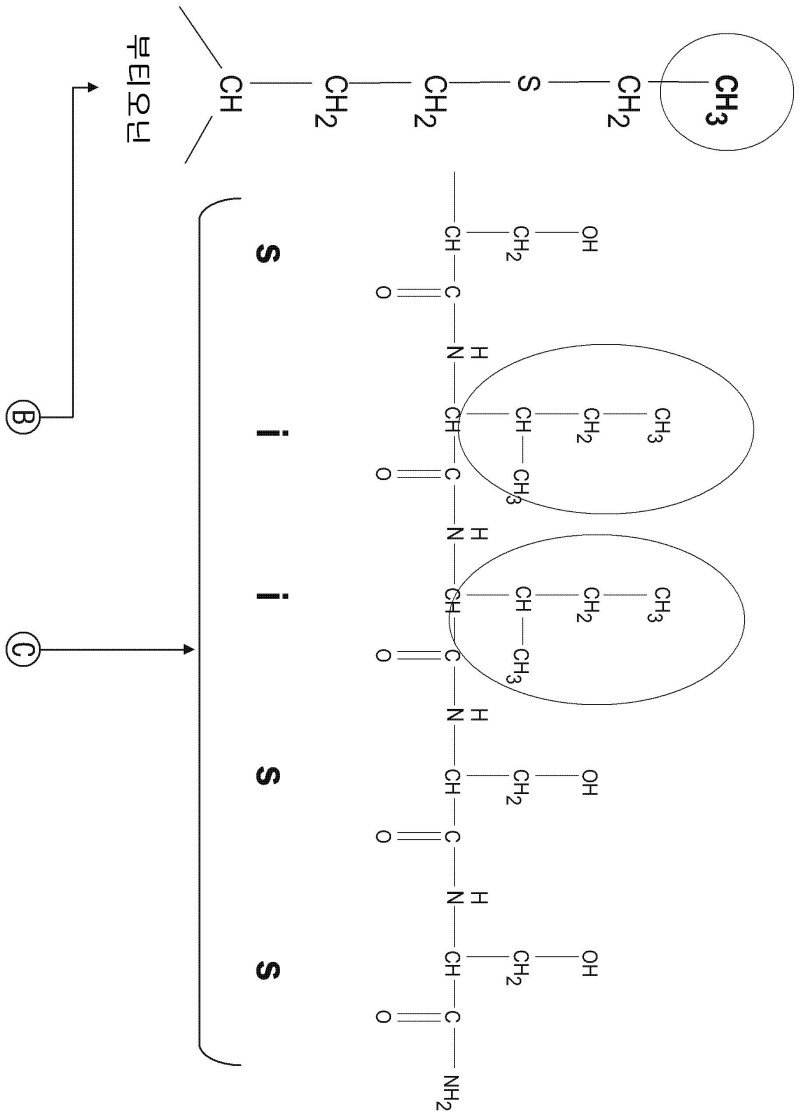
도면20a



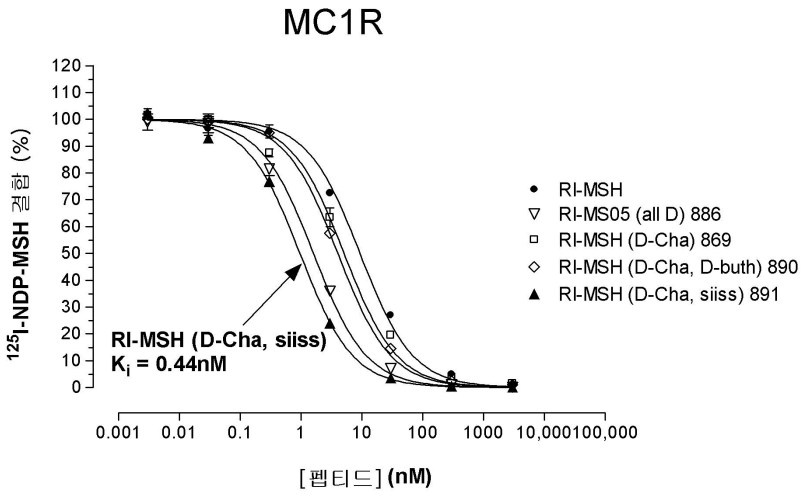
도면20b



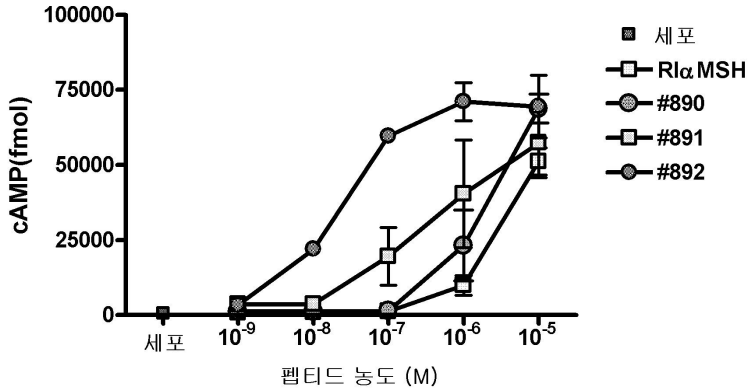
도면20c


부티오닌
CH
CH2
CH2
S
CH2
CH3
B
C
s
i
i
s
s
s
OH
NH2

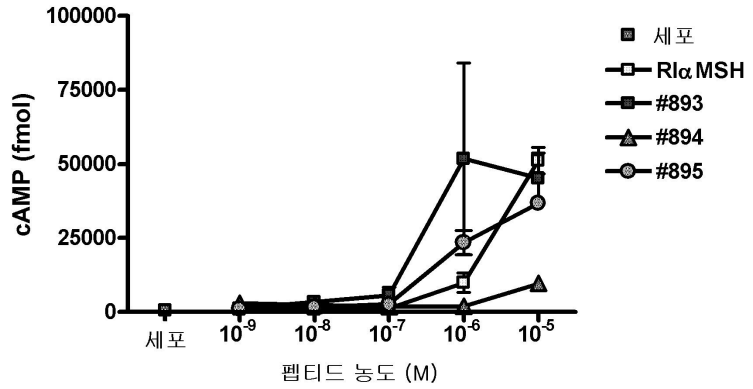
도면21


MC1R
125I-NDP-MSH 결합 (%)
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10,000
100,000
[펩티드] (nM)
RI-MSH (D-Cha, siiss)
Ki = 0.44nM
RI-MSH
RI-MS05 (all D) 886
RI-MSH (D-Cha) 869
RI-MSH (D-Cha, D-buth) 890
RI-MSH (D-Cha, siiss) 891

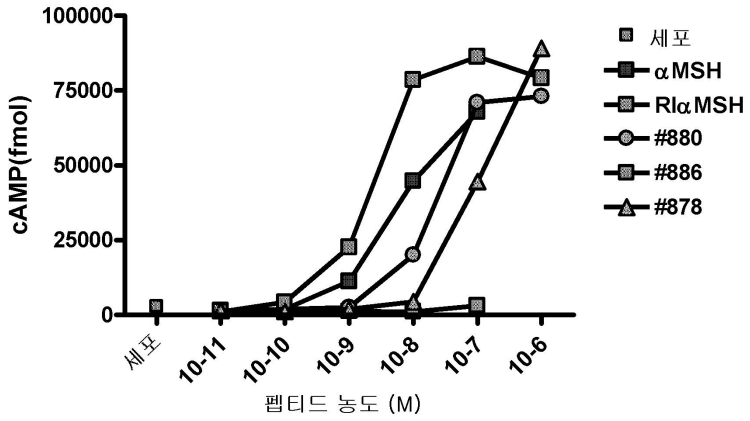
도면22a



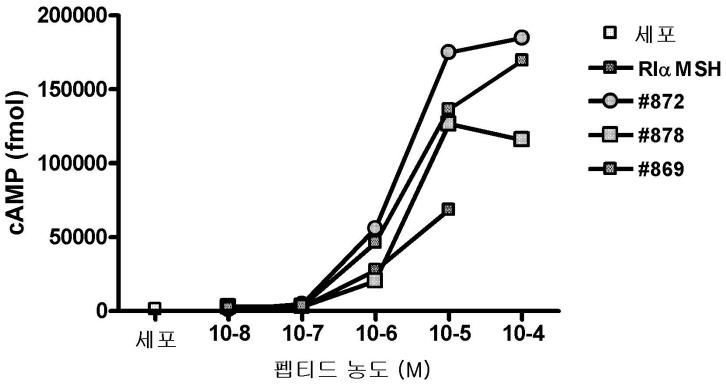
도면22b



도면22c



도면22d



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GENZYME CORPORATION

PERRICONE, Michael A.

DZURIS, John Lyle

WEEDEN, Timothy E.

STEFANO, James E.

PAN, Clark Q.

EDLING, Andrea E.

<120> PEPTIDE ANALOGS OF ALPHA-MELANOCYTE STIMULATING HORMONE

<130> 159792008140

<140> PCT/US2009/037809

<141> 2009-03-20

<150> US 61/056,373

<151> 2008-05-27

<160> 33

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed tetrapeptide

<220>

<221> SITE

<222> 2

<223> Xaa = D-Cha, D-Phe, or Cha

<400> 1

His Xaa Arg Trp

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed tetrapeptide

<220>

<221> SITE

<222> 1, 2, 4

<223> D-isomer form

<220>

<221> SITE

<222> 3

<223> Xaa = D-Cha, D-Phe, or Phe

<400> 2

Trp Arg Xaa His

1

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> SITE

<222> (1)...(5)

<223> D-isomer form

<400> 3

Ser Ile Ile Ser Ser

1 5

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed polypeptide

<220>

<221> SITE

<222> 1-3, 5-6, 8-13

<223> D-isomer form

<400> 4

Val Pro Lys Gly Trp Arg Phe His Ser Ile Ile Ser Ser

1 5 10

<210> 5

<

211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed polypeptide

<220>

<221> SITE

<222> 1-3, 5-6, 8-13

<223> D-isomer form

<220>

<221> SITE

<222> 7

<223> Xaa = D-Cha

<400> 5

Val Pro Lys Gly Trp Arg Xaa His Ser Ile Ile Ser Ser

1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed polypeptide

<220>

<221> SITE

<222> 7

<223> Xaa = L-Cha

<400> 6

Ser Tyr Ser Met Glu His Xaa Arg Trp Gly Lys Pro Val

1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed polypeptide

<220>

<221> SITE

<222> 1-3, 5-13

<223> D-isomer form

<400> 7

Val Pro Lys Gly Trp Arg Phe His Glu Met Ser Tyr Ser

1 5 10

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed polypeptide

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)...(13)

<223> alpha-Melanocyte-stimulating hormone

<400> 8

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val

1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed polypeptide

<220>

<221> SITE

<222> 1

<223> Xaa = D-Val, D-Ala, or D-Lys

<220>

<221> SITE

<222> 2

<223

> Xaa = D-Pro, D-Ala, or D-Lys

<220>

<221> SITE

<222> 3

<223> Xaa = D-Lys, D-Orn, D-Nle, D-Ala, or D-Lys

<220>

<221> SITE

<222> 4

<223> Xaa = Gly or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> 5

<223> Xaa = D-Trp, Trp, D-3-benzothienyl-Ala,

D-5-hydroxy-Trp, D-5-methoxy-Trp, D-Phe, or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> 6

<223> Xaa = D-Arg, D-His, or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> 7

<223> Xaa = D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-fluoro-Phg,

D-3-pyridyl-Ala, D-Thi (2-thienyl-D-alanine),

D-Trp, D-4-nitro-Phe, or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> 8

<223> Xaa = D-His, His, D-Arg, Phe, or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> 9

<223> Xaa = D-Glu, D-Asp, D-citrulline, D-Ser, or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> 10

<223> Xaa = D-Met, D-buthionine, D-Ile, or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> 11

<223> Xaa = D-Ser, D-Ile, or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> 12

<223> Xaa = D-Tyr, D-Ser, or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> 13

<223> Xaa = D-Ser or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> (1)...(13)

<223> D-Ala may be present at only 1 position except when present
concurrently at positions 1-3

<220>

<221> SITE

<222> (1)...(13)

<223> an L-amino acid may be present at only 1 position

<400> 9

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed polypeptide

<220>

<221> SITE

<222> 1

<223> Xaa = D-Val, D-Ala, or D-Lys

<220>

<221> SITE

<222> 2

<223> Xaa = D-Pro, D-Ala, or D-Lys

<220>

<221> SITE

<222> 3

<223> Xaa = D-Lys, D-Orn, D-Nle, D-Ala, or D-Lys

<220>

<221> SITE

<222> 4

<223> Xaa = Gly or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> 5

<223> Xaa = D-Trp, Trp, D-3-benzothienyl-Ala,
D-5-hydroxy-Trp, D-5-methoxy-Trp, D-Phe, or D-Ala

<220>
<221> SITE
<222> 6
<223> Xaa = D-Arg, D-His, or D-Ala
<220>
<221> SITE
<222> 7
<223> Xaa = D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-fluoro-Phg,
D-3-pyridyl-Ala, D-Thi (2-thienyl-D-alanine),
D-Trp, D 4-nitro-Phe, or D Ala
<220>
<221> SITE
<222> 8
<223> Xaa = D-His, His, D-Arg, Phe, or D-Ala
<220>
<221> SITE
<222> 9
<223> Xaa = D-Glu, D-Asp, D-citrulline, D-Ser, or D-Ala
<220>
<221> SITE
<222> 10
<223> Xaa = D-Met, D-buthionine, D-Ile, or D-Ala

<220>
<221> SITE
<222> 11
<223> Xaa = D-Ser, D-Ile or D-Ala
<220>
<221> SITE
<222> 12
<223> Xaa = D-Tyr, D-Ser, or D-Ala
<220>

<221> SITE

<222> 13

<223> Xaa = D-Ser or D-Ala

<400> 10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed polypeptide

<220>

<221> SITE

<222> 1

<223> Xaa = D-Val

<220>

<221> SITE

<222> 2

<223> Xaa = D-Pro

<220>

<221> SITE

<222> 3

<223> Xaa = D-Lys, D-Orn, or D-Nle

<220>

<221> SITE

<222> 4

<223> Xaa = Gly

<220>

<221> SITE

<222> 5

<223> Xaa = D-Trp, Trp, D-3-benzothienyl-Ala,

D-5-hydroxy-Trp, D-5-methoxy-Trp, or D-Phe

<220>

<221> SITE

<222> 6

<223> Xaa = D-Arg or D-His

<220>

<221> SITE

<222> 7

<223> Xaa = D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-fluoro-Phg,

D-3-pyridyl-Ala, D-Thi (2-thienyl-D-alanine), D-Trp, or D 4-nitro-Phe

<220>

<221> SITE

<222> 8

<223> Xaa = D-His, His, D-Arg, Phe, or D-Ala

<220>

<221> SITE

<222> 9

<223> Xaa = D-Glu, D-Asp, D-citrulline, or D-Ser

<220>

<221> SITE

<222> 10

<223> Xaa = D-Met, D-buthionine, or D-Ile

<220>

<221> SITE

<222> 11

<223> Xaa = D-Ser or D-Ile

<220>

<221> SITE

<222> 12

<223> Xaa = D-Tyr or D-Ser

<220>

<221> SITE

<222> 13

<223> Xaa = D-Ser

<220>

<221> SITE

<222> (1)...(13)

<223> an L-amino acid may be present at only 1 position

<400> 11

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed polypeptide

<220>

<221> SITE

<222> 1

<223> Xaa = D-Val

<220>

<221> SITE

<222> 2

<223> Xaa = D-Pro

<220>

<221> SITE

<222> 3

<223> Xaa = D-Lys, D-Orn, or D-Nle

<220>

<221> SITE

<222> 4

<223> Xaa = Gly

<220>

<221> SITE

<222> 5

<223> Xaa = D-Trp or Trp

<220>

<221> SITE

<222> 6

<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> SITE

<222> 7

<223> Xaa = D-Cha, D-Phe, Phe or D-Thi (2-thienyl-D-alanine)

<220>

<221> SITE

<222> 8

<223> Xaa = D-His or His

<220>

<221> SITE

<222> 9

<223> Xaa = D-Glu or D-Ser

<220>

<221> SITE

<222> 10

<223> Xaa = D-Met, D-buthionine, or D-Ile

<220>

<221> SITE

<222> 11

<223> Xaa = D-Ser or D-Ile

<220>

<221> SITE

<222> 12

<223> Xaa = D-Tyr or D-Ser

<220>

<221> SITE

<222> 13

<223> Xaa = D-Ser

<220>

<221> SITE

<222> (1)...(13)

<223> an L-amino acid may be present at only 1 position

<400> 12

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed peptide linker

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed peptide linker

<400> 14

Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed peptide linker

<400> 15

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly

1 5 10

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed peptide linker

<400> 16

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed peptide linker

<400> 17

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed peptide linker

<400> 18

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed peptide linker

<400> 19

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe

1 5 10

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed peptide linker

<400> 20

Ser Arg Ser Ser Gly

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed peptide linker

<400> 21

Ser Gly Ser Ser Cys

1 5

<210> 22

<211> 28

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> SITE

<222> (1)...(28)

<223> Diphtheria toxin trypsin sensitive linker

<400> 22

Ala Met Gly Arg Ser Gly Gly Gly Cys Ala Gly Asn Arg Val Gly Ser

1 5 10 15

Ser Leu Ser Cys Gly Gly Leu Asn Leu Gln Ala Met

20 25

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220

>

<221> DOMAIN

<222> (1)...(13)

<223> alpha-MSH peptide

<400> 23

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val

1 5 10

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 24

ctctgcctcg tcactttctt tcta 24

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 25

aacatgtggg catacagaat cg 22

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 26

ccatgctggc actca 15

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mouse TNF alpha forward primer

<400> 27

ggcaggtcta ctttggagtc attgc 25

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mouse TNF alpha reverse primer

<400> 28

acattcgagg ctccagtgaa ttcgg 25

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mouse IL-10 forward primer

<400> 29

tgctatgctg cctgctctta 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mouse IL-10 reverse primer

<400> 30

tcatttccga taaggcttgg 20

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mouse beta-actin forward primer

<400> 31

gtgggccgct ctaggcacca a 21

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mouse beta-actin reverse primer

<400> 32

ctctttgatg tcacgcacga tttc 24

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically constructed tetrapeptide

<400> 33

His Phe Arg Trp

1