



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년03월25일
(11) 등록번호 10-0889993
(24) 등록일자 2009년03월16일

(51) Int. Cl.

C07K 5/08 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7000499

(22) 출원일자 2004년01월12일

심사청구일자 2007년04월26일

번역문제출일자 2004년01월12일

(65) 공개번호 10-2004-0019058

(43) 공개일자 2004년03월04일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2002/003203

국제출원일자 2002년07월11일

(87) 국제공개번호 WO 2003/006492

국제공개일자 2003년01월23일

(30) 우선권주장

09/904,492 2001년07월13일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

J. Comb. Chem., Vol. 2, pp220-223.*

J. Biol. Chem., Vol. 266, pp22355-22363.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

씨엠에스 웹타이드 패턴트 홀딩 컴퍼니 리미티드
영국 브리티쉬 버진 아일랜드 토르톨라 로드 타운
피.오. 박스 146 트라이엔트 챔버스

(72) 발명자

웡 와이 맹

홍콩 카이네 로드 95 플로라 코트 유니트 24에이
람 콩중국 선전 518053 난산 디스트릭 오버씨스 차이니
스 타운스완 캐슬 오프 포트롤리오 케이 빌딩 8씨

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 김경미

(54) 생물학적 활성 웹타이드

(57) 요약

본 발명은 30 개의 실질적으로 순수하고 생물학적으로 활성인 웹타이드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 생물학적 활성 웹타이드를 코딩하는 서열을 갖는 핵산 및 이들로부터 생산되는 약학적 제제에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

서열번호 16의 아미노산 서열로 구성된 순수한 펩타이드를 포함하는, 면역 활성 및 암 증식을 조절하기 위한 약학적 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

서열번호 16의 아미노산 서열로 구성된 순수한 펩타이드를 제공하는 단계; 및 상기 펩타이드를 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합하는 단계를 포함하는, 면역 활성 및 암 증식을 조절하기 위한 약학적 조성물의 제조방법.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 면역학 분야와 관련된 것이다. 특히, 본 발명은 면역 반응을 조절할 수 있는 펩타이드와 이의 약학적 조성물에 관련된 것이다.

배경기술

<2> 본 발명이 속하는 기술분야에 펩타이드는 질병을 치료용으로 및 약학적 조성물로서 알려져 있다. 예컨대, 미국 특히 제6,191,113호에는 평활근 세포의 성장에 대한 억제 활성을 가짐으로써, 동맥경화증(arteriosclerosis), 혈관형성술 (angioplasty) 후의 재협착(restenosis), 혈관 이식 후의 내경협착(luminal stenosis) 및 평활근 육종과 같이 평활근의 성장과 관련된 병리학적 상태를 예방하고 치료하는데 유용한 펩타이드가 기재되어 있다. 미국특허 제6,184,208호에는 상피 성장 부위의 무게 증가 활성(weight gain activity) 및 모발 성장과 같은 생

리적 과정의 조절하는 것으로 밝혀진 웨타이드가 기재되어 있다.

<3> 발명의 요약

<4> 따라서, 본 발명의 목적은 생물학적으로 활성인 폴리웨타이드를 동정하는 것이다. 표준 화학 방법에 의하여 많은 웨타이드를 합성하였고 이들의 생물학적 활성을 스크리닝하였다. 상기 웨타이드들은 영문자 CMS와 번호로 된 코드로서 나타낸다. 생체내(*in vivo*) 생물학적 활성을 갖는 것으로서 총 30 개의 웨타이드를 동정하였다. 이들 생물학적 활성 웨타이드의 서열과 이에 대응하는 서열번호를 표 A에 나타낸다.

표 A

<5>

서열 번호	웨타이드 명칭	웨타이드 서열
1	CMS001	Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe
2	CMS002	Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe
3	CMS008	Lys Ala Val Gly His Leu Asp Asp Leu Pro Gly Ala Leu
4	CMS010	Asn Pro Lys
5	CMS012	Leu Gly Met Glu Ala Cys Gly Ile His Glu Thr Thr Tyr
6	CMS013	Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu
7	CMS014	Ala Ala His His Pro Asp Asp Phe Asn Pro Ser Val
8	CMS015	Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His Gln Gly Val Met
9	CMS016	Ile Gly Met Glu Ser Ala Gly Ile His Glu Thr Thr Tyr
10	CMS018	Val Gly Met Gly Glu Lys Asp Ser Tyr
11	CMS019	Val Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr
12	CMS020	Val Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val
13	CMS021	Met Ala Thr Ala Ala Ser Ser Ser Ser Leu
14	CMS022	Tyr Ser Phe
15	CMS023	Ala Ala Phe
16	CMS024	Tyr Ser Leu
17	CMS026	Thr Thr Tyr Asn Ser Ile Met
18	CMS027	Phe Glu Glu Asn Met
19	CMS028	Phe Glu Pro Ser Phe
20	CMS029	Phe Asn Glu Glu
21	CMS030	Phe Glu Glu Met
22	CMS032	Phe Glu Glu Glu
23	CMS033	Phe Glu Ser Phe
24	CMS034	Pro Glu Asn Phe
25	CMS035	Phe Val Asn Asp
26	CMS036	Phe Gln Pro Ser Phe
27	CMS003	Phe Asn Phe Val Pro Pro
28	CMS007	Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ala Val Phe
29	CMS009	Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu
30	CMS011	Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu

<6>

따라서, 본 발명의 한 측면은 서열번호 1 내지 서열번호 30으로 동정되는 서열을 갖는 실질적으로 순수한 웨타이드에 관련된 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 구성된 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 실질적으로 순수한 웨타이드에 관련된 것이다. 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 30으로 구성된 군 중에서 선택되는 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는 실질적으로 순수한 웨타이드에 관한 것이다. 한 구체 예에 있어서, 상기 웨타이드는 다음 중 한 가지 이상을 조절할 수 있지만, 이들의 조절에 한정되는 것은 아니다: 면역 활성; 간염 감염 (B형 간염 감염을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 신장염; 암의 증식 (유종, 간암, 백혈병 및 흑색종을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 및 체중.

<7>

본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 1 내지 서열번호 30으로 동정되는 서열을 갖는 실질적으로 웨타이드의 기능적 유도체에 관련된 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 구성된 군 중에서 선택된 아미노

산 서열의 기능적 유도체인 아미노산 서열을 포함하는 실질적으로 순수한 웨타이드에 관련된 것이다. 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 30으로 구성된 군 중에서 선택되는 아미노산 서열의 기능적 유도체인 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는 실질적으로 순수한 웨타이드에 관한 것이다. 한 구체예에 있어서, 기능적 유도체인 상기 웨타이드는 다음 중 한 가지 이상을 조절할 수 있지만, 이들의 조절에 한정되는 것은 아니다: 면역 활성; 간염 감염 (B형 간염 감염을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 신장염; 암의 증식 (육종, 간암, 백혈병 및 흑색종을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 및 체중.

<8> 본 발명의 또 다른 측면은 상기에서 서열번호 1 내지 서열번호 30로서 동정되는 웨타이드를 코딩하는 서열을 갖는 핵산에 관련된 것이다. 본 발명의 또 다른 측면은 하기에 서열번호 1 내지 30으로서 보여지는 웨타이드의 핵산서열을 포함하는 발현벡터에 관련된 것이다. 따라서, 이번의 본 발명 측면은 서열번호 1 내지 30을 포함하는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 벡터에 관련된 것이다. 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 30으로 구성된 군 중에서 선택되는 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 벡터에 관련된 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 생물학적으로 활성인 아미노산 서열의 기능적 유도체를 포함하는 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 벡터에 관한 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 생물학적으로 활성인 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 벡터에 관한 것이다.

<9> 본 발명의 또 하나의 측면은 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 아미노산을 포함하는 웨타이드와 인접하여 리더 또는 시그널 웨타이드를 포함하는 하이브리드 웨타이드에 관련된 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 구성된 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 웨타이드의 기능적 유도체를 포함하는 웨타이드와 인접하여 리더 웨타이드를 포함하는 하이브리드 웨타이드에 관한 것이다.

<10> 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택된 생물학적으로 활성인 아미노산 서열의 기능적 유도체인 기능적 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드에 인접하여 리더 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 벡터에 관한 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택된 생물학적으로 활성인 아미노산 서열의 기능적 유도체인 기능적 아미노산으로 본질적으로 구성된 웨타이드에 인접하여 리더 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 벡터에 관한 것이다.

<11> 한 구체예에 있어서, 상기한 모든 유전자 벡터에서 생산되는 웨타이드는 다음 중 한 가지 이상을 조절 가능하지만, 이들의 조절에 한정되는 것은 아니다: 면역 작용; 간염 감염 (B형 간염 감염을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 신장염; 암(육종, 간암, 백혈병 및 흑색종을 포함하지만 이에 한정되지 않음)의 증식; 및 체중.

<12> 본 발명의 또 하나의 측면은 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 계놈을 갖는 미생물에 관련된 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 구성된 군 중에서 선택되는 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 계놈을 갖는 미생물에 관한 것이다.

<13> 본 발명의 또 하나의 측면은 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 생물학적으로 활성인 아미노산 서열의 기능적 유도체인 기능적 아미노산 서열을 포함하는 외인성(exogenous) 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전물질을 갖는 미생물에 관련된 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 생물학적으로 활성인 아미노산 서열의 기능적 유도체인 기능적 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는 외인성 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 조성(genetic composition)을 갖는 미생물에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 외인성 웨타이드는 변형되지 않은 본래 형태의 미생물에 의하여 정상적으로 발현되는 다른 모든 웨타이드와 상이한 아미노산 서열을 갖는 웨타이드를 의미한다.

<14> 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 1 내지 30으로 구성된 군 주에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드에 인접하여 리더 아미노산 서열을 포함하는 외인성 하이브리드 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 조성을 갖는 미생물에 관련된 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는 웨타이드에 인접하여 리더 아미노산 서열을 포함하는 하이브리드 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 계놈을 갖는 미생물에 관한 것이다.

<15> 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 생물학적으로 활성인 아미노산

서열의 기능적 유도체인 기능적 아미노산 서열을 포함하는 패타이드에 인접하여 리더 아미노산 서열을 포함하는 외인성 하이브리드 패타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 조성을 갖는 미생물에 관련된 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 생물학적으로 활성인 아미노산 서열의 기능적 유도체인 기능적 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는 패타이드에 인접하여 리더 아미노산 서열을 포함하는 외인성 하이브리드 패타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 조성을 갖는 미생물에 관한 것이다.

<16> 한 구체예에 있어서, 상기한 모든 미생물에서 생산되는 패타이드는 다음 중 한 가지 이상을 조절할 수 있지만, 이들의 조절에 한정되는 것은 아니다: 면역 활성; 간염 감염 (B형 간염 감염을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 신장염; 암(육종, 간암, 백혈병 및 흑색종을 포함하지만 이에 한정되지 않음)의 증식; 및 체중.

<17> 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 실질적으로 순수한 패타이드를 포함하는 약학적 조성물에 관련된 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 상미노산 서열로 본질적으로 구성되는 실질적으로 순수한 패타이드를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

<18> 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 1 내지 30으로 구성된 군 중에서 선택되는 아미노산 서열의 기능적 유도체를 포함하는 실질적으로 순수한 패타이드를 포함하는 약학적 조성물에 관련된 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 아미노산 서열의 기능적 유도체로 본질적으로 구성된 실질적으로 순수한 패타이드를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 아미노산 서열의 기능적 유도체로 본질적으로 구성되는 실질적으로 순수한 패타이드로 구성된 약학적 조성물에 관한 것이다.

<19> 한 구체예에 있어서, 상기한 모든 약학적 조성물에 존재하는 패타이드는 다음 중 한 가지 이상을 조절할 수 있지만, 이들의 조절에 한정되는 것은 아니다: 면역 활성; 간염 감염 (B형 간염 감염을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 신장염; 암(육종, 간암, 백혈병 및 흑색종을 포함하지만 이에 한정되지 않음)의 증식; 및 체중.

<20> 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 실질적으로 순수한 패타이드를 준비하고; 상기 실질적으로 순수한 패타이드를 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하는 것을 포함하는 약학적 조성물의 제조방법에 관련된 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는 실질적으로 순수한 패타이드를 준비하는 것을 포함하는 약학적 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

<21> 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 아미노산 서열의 기능적 유도체인 아미노산 서열을 포함하는 실질적으로 순수한 패타이드를 준비하고; 상기 실질적으로 순수한 패타이드를 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하는 것을 포함하는 약학적 조성물의 제조방법에 관련된 것이다.

<22> 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 아미노산 서열의 기능적 유도체인 아미노산 서열로 본질적으로 구성된 실질적으로 순수한 패타이드를 준비하는 것을 포함하는 약학적 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

<23> 상기한 모든 방법과 관련하여, 상기 패타이드는 다음 중 한 가지 이상을 조절할 수 있지만, 이들의 조절에 한정되는 것은 아니다: 면역 활성; 간염 감염 (B형 간염 감염을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 신장염; 암(육종, 간암, 백혈병 및 흑색종을 포함하지만 이에 한정되지 않음)의 증식; 및 체중.

<24> 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 실질적으로 순수한 패타이드의 약학적 유효 분량을 인간에게 투여하는 것을 포함하는 인간의 치료방법에 관련된 것이다. 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 30으로 이루어진 군 중에서 선택되는 아미노산 서열의 기능적 유도체인 아미노산 서열을 포함하는 실질적으로 순수한 패타이드의 약학적 유효 분량을 투여하는 것을 포함하는 인간의 치료방법에 관한 것이다.

<25> 한 구체예에 있어서, 상기한 인간의 치료방법에 사용되는 패타이드는 다음의 인간 증상 중 한 가지 이상을 조절하기 위하여 사용되지만, 이들의 조절에 한정되는 것은 아니다: 면역 활성; 간염 감염 (B형 간염 감염을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 신장염; 암(육종, 간암, 백혈병 및 흑색종을 포함하지만 이에 한정되지 않음)의 증식; 및 체중.

<26> 상기한 핵산 서열 중 어느 하나와 관련하여, 이들 핵산 서열로부터 발현되는 패타이드 및/또는 하이브리드 패타

이드는 다음을 조절할 수 있지만, 이들의 조절에 한정되는 것은 아니다: 면역 활성; 간염 감염 (B형 간염 감염을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 신장염; 암(육종, 간암, 백혈병 및 흑색종을 포함하지만 이에 한정되지 않음)의 증식; 및 체중.

<27> 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 1 내지 서열번호 30을 갖는 실질적으로 순수한 펩타이드의 약학적 유효 분량을 투여하는 것을 포함하는 질병의 치료방법에 관련된 것이다. 한 구체예에 있어서, 이와 같이 투여된 펩타이드는 다음을 조절할 수 있지만, 이들의 조절에 한정되는 것은 아니다: 면역 활성; 간염 감염 (B형 간염 감염을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 신장염; 암(육종, 간암, 백혈병 및 흑색종을 포함하지만 이에 한정되지 않음)의 증식; 및 체중.

<28> 상기한 바와 같이, 본 발명의 또 하나의 구체예는 본 발명의 펩타이드로 본질적으로 구성되는 폴리펩타이드 또는 펩타이드이다. 본 명세서에 사용된 바에 따르면, "본질적으로 구성되는 (consisting essentially of)"이란 용어는 아미노 말단 및/또는 카르복실 말단에 본 명세서에 제시되는 본 발명의 펩타이드의 활성을 유지하는 추가적인 아미노산과 함께 본 발명의 펩타이드의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 따라서, 비-한정적 예로서, 본 발명의 펩타이드의 활성이 면역 활성을 조절하는 것인 경우, 본 발명의 펩타이드로 "본질적으로 구성되는" 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 상기 펩타이드에 대하여 본 명세서에서 제시되는 면역 활성을 조절하는 활성을 가질 것이고, 면역 활성을 조절하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 능력을 실질적으로 감소시키거나 면역 활성의 조절자로서의 기본적이고 신규한 특성의 물질적 변화를 구성하는 어떠한 특성도 갖지 않을 것이다. 따라서, 상기한 예에 있어서, 면역 활성의 조절 이외의 주된 활성을 가지며 그 내부의 어떤 부위에서 본 발명의 펩타이드의 아미노산 서열을 포함하는 자연적으로 얻어지는 전장 폴리펩타이드는 본 발명의 펩타이드로 "본질적으로 구성되는" 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 구성하지 않을 것이다. 이와 유사하게, 상기한 예에 있어서, 면역 활성의 조절 이외의 주된 활성을 갖지만 그 내부의 어떤 부위에서 본 발명의 펩타이드의 아미노산 서열을 포함하는 유전적으로 엔지니어링된 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 본 발명의 펩타이드로 "본질적으로 구성되는" 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 구성하지 않을 것이다.

<29> 상기에서 예시를 위하여 사용된 면역 활성 조절의 예 이외에도, 상기의 정의는 본 발명의 모든 펩타이드에 있어서 상기 펩타이드에 대하여 제시된 활성에 대하여 또한 적용된다. 특히, 상기의 정의는 하기에 상세하게 설명되는 바와 같은 바이러스 감염 정도의 조절, 간염 감염 정도의 조절, 신장염 정도의 조절, 암 증식의 조절, 또는 체중 조절에 있어서의 활성을 갖는 본 발명의 펩타이드에 적용된다.

<30> 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 특정 펩타이드에 대하여 본 명세서에 제시된 면역 활성의 조절, 바이러스 감염 정도의 조절, 간염 감염 정도의 조절, 신장염 정도의 조절, 암 증식의 조절, 또는 체중 조절에 대한 검사를 이용하여 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 활성을 측정함으로써 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 상기한 정의에 따라 본 발명의 펩타이드로 본질적으로 구성되어 있는지 여부를 용이하게 결정할 수 있다.

<31> 바람직한 구체예에 있어서, "본질적으로 구성되는"이라는 용어는 본 발명에 따른 펩타이드에 더하여 20개 미만의 아미노산 잔기를 갖는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 보다 바람직한 구체예에 있어서, 상기 용어는 본 발명에 따른 펩타이드에 더하여 15개 미만의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 의미한다. 보다 더 바람직한 구체예에 있어서, 상기 용어는 본 발명에 따른 펩타이드에 더하여 10개 미만의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 의미한다. 또 다른 바람직한 구체예에 있어서, 상기 용어는 본 발명에 따른 펩타이드 중 하나에 더하여 6개 미만의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 또 다른 바람직한 구체예에 있어서, 상기 용어는 본 발명에 따른 펩타이드 중 하나에 더하여 4개 미만의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 가장 바람직한 구체예에 있어서, 상기 용어는 본 발명에 따른 펩타이드 중 하나에 더하여 2개 미만의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다.

발명의 상세한 설명

<32> 상기 펩타이드들은 표준 합성법에 의하여 L-아미노산들로부터 용이하게 합성될 수 있고, 각각의 펩타이드를 코딩하는 서열을 갖는 핵산을 사용하는 유전공학적 방법으로도 합성 가능하다.

I. 생물학적 활성

<34> 펩타이드의 가능한 생물학적 활성을 조사하기 위하여, 동물 모델에 대한 상기 펩타이드들의 면역학적 효과를 중국 보건 당국 (Ministry of Health of People's Republic of China)^[1]에 의하여 발간된 "Principles of Pre-

clinical Research of New Drugs"에 따른 방법으로 시험하였다.

<35> 특이적 세포 면역 작용에 대한 웨타이드의 가능한 모든 효과를 탐지하기 위하여, T 림프구 형질전환 테스트, NK 세포 세포독성(cytotoxicity) 활성 테스트 및 T 림프구 IL-2 및 IFN-γ 분비 테스트를 사용하였다. 비특이적 세포 면역 작용에 대한 웨타이드의 가능한 모든 효과를 탐지하기 위하여, 탄소입자 청정시험 (carbon particle clearance test)을 사용하였다. 양 적혈구 세포 (Sheep Red Blood Cell, SRBC) 용혈 테스트에 의하여, 체액성 면역 작용에 대한 웨타이드의 가능한 모든 효과를 탐지하였다. 면역성 기관 중량 테스트에 의하여 기관 수준에서의 웨타이드의 가능한 모든 효과를 검출하였다.

<36> 이러한 연구에 있어서, 음성 대조군으로서 살린기를 사용하였고, IL-2 및 IFN-γ 이 면역자극제로서 잘 연구되어 있기 때문에^[10], 양성 대조군으로서 IL-2 및 IFN-γ 기를 사용하였다. 본 연구에서는 샘플 웨타이드의 4 가지의 임의의 농도를 사용하여 1000 배 투약 범위를 커버하였다. 생체내 면역 반응 고유의 복잡성 및 반응 작용에 대한 투여량에 대한 선행 지식의 결여 때문에, 모든 투약군에서의 음성 대조군에 대한 통계학적으로 의미있는 차이를 양성 생물학적 활성으로써 계산하였다.

<37> 본 연구의 결과는 다음과 같다:

<38> 1. 웨타이드 CMS001, CMS002, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS015, CMS019, CMS021, CMS029, 및 CMS034는, 살린 정상 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 가지며, T 림프구 형질전환을 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 웨타이드 CMS014 및 CMS036은 또한, 살린 정상 대조군과 통계학적으로 의미 있는 차이를 가지며, T 림프구 형질전환을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

<39> 2. 웨타이드 CMS001, CMS002, CMS003, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS013, CMS015, CMS016, CMS020, CMS021, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035, 및 CMS036은, 살린 정상 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 가지며, NK 세포의 세포독성 활성을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 웨타이드 CMS008 및 CMS012는, 적절한 농도에서, 살린 정상 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 가지며, NK 세포의 세포독성 활성을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<40> 3. 웨타이드 CMS001, CMS003, CMS007, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS015, CMS020, CMS022, 및 CMS034는, 살린 정상 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 가지며, T 림프구에 의한 인터루킨-2(IL-2)의 분비를 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<41> 4. 웨타이드 CMS001, CMS003, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS013, CMS016, CMS021, CMS022, 및 CMS028은, 살린 정상 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 가지며, T 림프구에 의한 IFN의 분비를 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<42> 5. 웨타이드 CMS001, CMS002, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS013, CMS014, CMS015, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS021, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035, 및 CMS036은, 살린 정상 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 갖는 바에 따라, 항원자극(antigenic challenge)에 대한 항-SRBC 항체의 합성을 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 웨타이드 CMS002, CMS003, CMS009, CMS010, CMS011, CMS013, CMS014, CMS015, CMS018, CMS019, CMS020, CMS026, CMS028, CMS029, CMS030, CMS034, 및 CMS036은 또한, 적절한 농도에서, 살린 정상 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 갖는 바에 따라, 항원자극에 대한 항-SRBC 항체의 합성을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

<43> 6. 웨타이드 CMS003, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS013, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS022, CMS024, CMS027, CMS030, CMS035, CMS036은, 살린 정상 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 가지며, 단핵식세포의 식세포 활성을 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<44> 7. 웨타이드 CMS001, CMS002, CMS008, CMS010, CMS012, CMS013, CMS014, CMS015, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS021, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035, 및 CMS036은, 살린 정상 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 가지며, 흉선 중량을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<45> 8. 웨타이드 CMS019, CMS020, 및 CMS030은, 살린 정상 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 가지며, 비장 중량을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 웨타이드 CMS001, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS013, CMS014, CMS015, CMS021, CMS023, CMS024, CMS027, CMS029, 및 CMS036, 적절한 농도에서, 살린 정상

대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 가지며, 비장 중량을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<46> 마우스에서의 펩타이드의 효과를 분석하기 위하여 사용된 재료 및 방법은 다음과 같다:

<47> 재료

<48> 1. 시험 동물

<49> BALB/c 마우스, 중량 18-22g, 50%는 암컷이고 50%는 수컷, 중국 국립 의과학 연구소 시험동물센터 (Experimental Animal Center, National Institute of Medical Science, PR China)에서 입수.

<50> 2. 투여

<51> 재조합 마우스 IFN- γ (rmIFN- γ) 그룹: 3×10^5 IU/kg/day

<52> 재조합 인간 IL(rhIL)-2 그룹: 3×10^5 IU/kg/day

<53> 살린 그룹: 0.5 ml/개체/day

<54> 펩타이드 투여량 I 그룹: 500 μ g/kg/day

<55> 펩타이드 투여량 II 그룹: 50 μ g/kg/day

<56> 펩타이드 투여량 III 그룹: 5 μ g/kg/day

<57> 펩타이드 투여량 IV 그룹: 0.5 μ g/kg/day

<58> 상기 물질은 모두 0.5 ml 살린에 용해시켰고, 15 일 동안 연속하여 하루에 한 번씩 복막내(i.p.) 주입하였다.

<59> 3. 주요 시약

<60> 상기 펩타이드는 American Peptide Company, Inc., USA에 의하여 주문 제작되었다.

<61> 소의 태아 혈청 및 RPMI-1640 세포 배양액, Gibco, USA

<62> MTT, 및 ConA, Sigma, USA

<63> rmIFN- γ , Beijing Biotech Inc., China

<64> rhIL-2, Shanghai Huaxin Biotech Inc., China

<65> 험프구 분리 용액, Research Institute of Hematologic Disease, National Institute of Medical Science, PR China

<66> 수포성구내염바이러스 (Vesicular Stomatitis Virus, VSV), IFN- γ 및 IL-2 표준 샘플, National Institute For The Control Of Pharmaceutical And Biological Products, PR China

<67> HT-2 세포 및 L929 세포, 중국 베이징 대학 면역학부의 WF Chen 교수 증여

<68> 방법

<69> 1. 세포 면역성에 대한 펩타이드의 효과

<70> 1.1 비장 혼탁액의 제조^[1,2]

<71> BALB/c 마우스를 펩타이드, IFN, IL-2, 및 살린 그룹으로 무작위로 나누었다. 각 그룹당 10 마리씩 하였다. 마지막 테스트 물질 투여한 다음 날, 마우스를 경추를 탈구시켜 희생시켰다. 비장을 무균적으로 분리하고, 주사바늘을 사용하여 찬 D-Hank 용액 (D-Hank's solution)에 수동으로 분산시켰다. 분산된 세포 혼탁액을 100 케이지 150 μ m 지름의 스테인레스 스틸 체에 추가적으로 통과시켰다. 200 g에서 10 분동안 원심분리한 후, 상청액을 버렸다. 세포 펠렛을 10 부피의 Tris-NH₄Cl 버퍼에서 재현탁시킨 후, 실온에서 10 분동안 그대로 두었다. 150 g에서 10 분동안 원심분리하여 혼탁된 세포를 모았다. 찬 D-Hank 용액으로 세포를 재현탁 및 상기와 같은 조건으로의 원심분리에 의하여 수집하여 2 내지 4 회 세척하였다. 그리고 나서, 세척된 세포를 10 % 소의 태아 혈청을 함유하는 RPMI-1640 배양액으로 원하는 세포 농도가 될때까지 희석하였다.

<72> 1.2 T 램프구 형질전환에 대한 웹타이드의 효과^[1,2]

<73> $1 \times 10^6/\text{ml}$ 농도의 비장 세포를 96 웨л 세포 배양 플레이트 상에 위치시키고, 마우스당 분석 샘플 및 대조 샘플을 각각 3개의 병렬 웨л에 넣었다($100 \mu\text{l}/\text{웰}$). 분석 웨л에 RPMI-1640 내의 $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ ConA $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하고, $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 플레이트 RPMI-1640를 대조 샘플용으로 사용하였다. 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 에서 66 시간동안 상기 세포를 배양하였다. 그리고 나서, 상기 세포를 150 g 에서 10 분동안 원심분리하여 펠레팅하였다. 사이토카인 IL-2 및 IFN 측정을 위하여 상청액을 모아서 -20°C 에서 저장하였다.

<74> RPMI-1640 내의 $50 \mu\text{l}/\text{웰}$ MTT $1 \text{ mg}/\text{ml}$ 를 세포 펠렛에 첨가하고, 2 분 동안 흔들어 상기 세포를 재현탁시켰다. 4 시간동안 계속하여 배양하였다. 150 g 에서 10 분동안 원심분리한 후 상청액을 버렸다. $40\text{mM} \text{HCl-2-프로판올} 120 \mu\text{l}$ 를 상기 세포 펠렛에 첨가하고 3 분동안 흔들어서 630 nm 를 기준으로 각 웨л마다 $\text{OD}_{570\text{nm}}$ 를 얻었다. ELISA 리더를 사용하였다.

<75> 계산:

<76> 각각의 마우스가 3 개의 분석 웨л 및 세 개의 대조 웨를 구성하였다. 각각의 마우스의 자극지수 (Stimulation Index, SI)는 먼저 세 병렬 웨의 평균 OD 값을 유도한 후, 분석 웨의 값을 대조 웨의 값으로 나누어서 얻었다.

<77> 1.3 NK 세포 활성에 대한 웹타이드의 효과^[3,4]

<78> 상기 1.1 섹션에 기재한 바와 같이 마우스 비장 세포를 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 로 준비하였다. 표적세포 YAC-1을 대수기에 이르게 하고 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 로 조절하였다. 96 웨л 세포 배양 플레이트를 이용하여, 마우스 비장 세포 $100 \mu\text{l}$ 와 배양액 $100 \mu\text{l}$ 를 비장세포만 포함하는 대조 웨에 첨가하고; 표적세포 $100 \mu\text{l}$ 와 배양액 $100 \mu\text{l}$ 를 표적세포만을 포함하는 대조 웨에 첨가하고; 마우스 비장세포 $100 \mu\text{l}$ 와 표적세포 $100 \mu\text{l}$ 를 NK 활성 분석 웨에 첨가하였다. 상기의 3 개의 병렬 세트를 각 마우스마다 준비하였다.

<79> 샘플들을 150 g 에서 10 분동안 원심분리하여 세포를 수집하였다. 상청액을 버리고, $50 \mu\text{l}/\text{웰}$ MTT $1 \text{ mg}/\text{ml}$ 를 첨가하였다. 그리고 나서, 상기 반응 혼합물을 2 분동안 흔들고, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 에서 4 시간동안 배양하였다. 150 g 에서 10 분동안 원심분리한 후 상청액을 버렸다. $40\text{mM} \text{HCl-2-프로판올} 120 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 3 분동안 흔들었다. ELISA 리더를 사용하여 630 nm 를 기준으로 각 웨л마다 $\text{OD}_{570\text{nm}}$ 를 얻었다.

<80> 계산:

<81> 각각의 마우스는 9개의 웨를 갖는다: 비장세포만을 갖는 3 개의 대조 웨, 표적세포만을 갖는 3 개의 대조 웨, 및 비장세포와 표적세포를 모두 갖는 3 개의 분석 웨. 각각의 마우스의 NK 세포 활성 지수는 먼저 각각의 조합의 세 병렬 웨의 평균 OD 값을 유도한 후, 이 평균 OD를 다음의 공식에 대입하였다:

<82> NK 세포 활성 지수 = $[1 - (\text{비장세포 및 표적세포를 포함하는 웨의 평균 OD} - \text{비장세포만을 포함하는 웨의 평균 OD}) / (\text{표적세포만을 포함하는 웨의 평균 OD})] \times 100\%$

<83> 1.4 IL-2 분비에 있어서의 T 램프구의 활성에 대한 웹타이드의 효과

<84> 대수기의 HT-2 세포를 150 g 에서 10 분동안 원심분리하여 수집하고, 찬 Hank's 용액으로 재현탁 및 원심분리하여 3 번 세척하였다. 수집된 HT-2 세포를 RPMI-1640에 재현탁시키고, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 에서 30 분동안 배양하였다. 상기 세포를 RPMI-1640으로 재현탁 및 원심분리하여 2 번 더 세척하고, RPMI-1640로 재현탁하여 최종농도가 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 가 되게 하였다.

<85> 섹션 1.2에서 얻어진 상청액을 RPMI-1640으로 희석하여 다음과 같은 퍼센티지가 되도록 하였다: 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 및 3.125%.

<86> r IL-2를 RPMI-1640으로 희석하여 다음과 같은 농도가 되도록 하였다: 500 IU/ml, 250 IU/ml, 125 IU/ml, 62.5 IU/ml, 31.25 IU/ml, 및 15.5 IU/ml.

<87> 96 웨л 세포 배양 플레이트는 각 조합마다 3 병렬 웨를 포함한다:

<88> 음성 대조: RPMI-1640 $100 \mu\text{l}$ + HT-2 세포 혼탁액 $100 \mu\text{l}$

<89> rIL-2 표준: rIL-2 용액 100 μl + HT-2 세포 혼탁액 100 μl

<90> 분석 웰: 희석 상청액 100 μl + HT-2 세포 혼탁액 100 μl

<91> 상기 플레이트를 37 °C, 5% CO₂에서 68 시간동안 배양한 후, 150 g에서 15 분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 페놀솔忿프탈레인을 함유하지 않는 RPMI-1640 내의 0.5 mg/ml MTT 100 μl 를 각각의 웰에 첨가하였다. 3 내지 4 분동안 흔들어 세포를 재현탁시키고, 4 시간 더 배양을 지속하였다. 그리고 나서, 샘플을 150 g에서 15 분동안 원심분리하고 상청액을 제거하였다. 각각의 웰에 40 mM HCl-2-프로판올 120 μl 를 첨가하고, 3 내지 4 시간동안 혼합하고, ELISA 리더를 사용하여 630 nm를 기준으로 OD값이 570 nm인 것으로 측정되었다.

<92> 계산:

<93> 각 희석액의 3 병렬 웰의 평균 OD를 얻고 X 축을 농도로 하여 반(semi)-로그 모눈종이 상에 농도에 대하여 플로팅하였다. 50% OD 포화에서의 농도를 테스팅 상청액과 rIL-2 모두에 대하여 얻었다.

<94> 샘플 IL-2 활성 = (50% 최대 작용에서의 샘플 희석 \div 50% 최대 작용에서의 rIL-2 표준 희석) \times 50% 최대 작용에서의 rIL-2 표준의 활성(IU/ml)

<95> 1.5 인터페론(IFN)의 분비에 있어서의 T 림프구의 활성에 대한 웨타이드의 효과^[6]

<96> 섹션 1.2에서 얻어진 상청액을 RPMI-1640 배양액으로 희석하여 다음과 같은 퍼센티지가 되도록 하였다: 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 및 3.125%.

<97> 재조합 인터페론(rIFN) 표준을 RPMI-1640으로 희석하여 다음과 같은 농도가 되도록 하였다: 500 IU/ml, 250 IU/ml, 125 IU/ml, 62.5 IU/ml, 31.25 IU/ml, 및 15.5 IU/ml.

<98> 대수기의 표적세포 L929를 RPMI-1640을 사용하여 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 로 조절하고, 섹션 1.4에 기재된 HT-2 세포와 동일한 처리를 하였다. VSV 주 또한 RPMI-1640을 사용하여 100 TCID₅₀으로 조절하였다.

<99> 96 웰 세포 배양 플레이트는 각 조합마다 다음의 3 병렬 웰을 포함한다:

<100> 음성 대조: RPMI-1640 100 μl + L929 100 μl

<101> 양성 대조: RPMI-1640 100 μl + L929 100 μl + VSV 50 μl

<102> rIFN 활성웰: rIFN 표준 100 μl + L929 100 μl + VSV 50 μl

<103> 분석 웰: 희석 상청액 100 μl + L929 100 μl + VSV 50 μl

<104> 샘플들을 37 °C, 5% CO₂에서 24 시간동안 배양하였다. 양성 대조 웰을 도립현미경(inverted microscope)하에서 주기적으로 관찰하여 세포용해를 확인한 후, 수집하고 세척하고 섹션 1.4에 기재된 바와 동일하게 모든 웰의 OD를 측정하였다.

<105> 계산:

<106> 50% 최대 작용에서의 농도를 섹션 1.4와 동일한 방법으로 얻었다. 샘플의 IFN 활성을 다음과 같이 계산하였다:

<107> 샘플 IFN 활성 = (50% 최대 작용에서의 샘플 희석 \div 50% 최대 작용에서의 rIFN 표준 희석) \times 50% 최대 작용에서의 표준 rIFN 활성(IU/ml)

<108> 2. 항체 형성에 대한 웨타이드의 효과^[7]

<109> 목 정맥으로부터 혈액을 채취하여 양의 적혈구 세포(SRBC)를 준비하고, 유리비드와 함께 살균 플라스크에 넣었다. 상기 플라스크를 3 분동안 흔들고 나서, 상기 혈액을 알시버 용액(글루코오스 2.05g, NaCl 0.4g, Na 레몬에이드 0.8g, 종류수를 넣어 100 ml로 만듬)과 함께 혼합하고 4 °C에서 저장하였다. 사용 직전에, 샘플을 130 g에서 5 분동안 원심분리하여 SRBC를 수집하였다. 세포를 일반 살린에서 재현탁하고 원심분리하여 2 번 세척하였다. 그리고 나서, 상기 세포 웰렛을 180 g에 10 분동안 원심분리하여 쥐하고 살린에 재현탁시켜 최종 시험 SRBC 혼탁액, 2%(v/v)를 제조하였다.

<110> 1 부피의 원심분리 패킹된 SRBC에 10 부피의 신선한 기니피그(Cavy) 혈청을 첨가하여 보체를 제조한 후, 4 °C에서 30 분동안 천천히 흔들었다. 200 g에서 10 분동안 원심분리하여 SRBC를 제거하였다. 일반 살린을 첨가하여

시험 보체 용액을 얻었다.

<111> BALB/c 마우스를 무작위로 웨타이드 그룹, IFN 그룹, IL-2 그룹, 및 살린 그룹으로 각 그룹 당 10 마리씩으로 나누었다. 섹션 1.1에 기재된 바와 같이 시험 물질을 투여하고, 이에 더하여 12일 째에 각 마우스 당 SRBC 0.2 ml를 복막내 투여하였다. 마지막으로 시험 물질을 투여한 다음 날 (16일째), 안각 (eye canthus)으로부터 혈액을 채취하고, 혈청을 삼출시키기 위하여 실온에서 1 시간동안 두었다. 200 g에서 10 분동안 원심분리한 후, 일반 살린으로 혈청을 500 배 희석시켰다.

<112> 각각의 마우스의 회석 마우스 혈청 1 ml에 SRBC 혼탁액 0.5 ml를 첨가하였다. 얼음 냉각시켰다. 그리고 나서, 시험 보체 용액 1 ml를 넣고, 37 °C 수조에서 10 분동안 배양하였다. 얼음 냉각에 의하여 반응을 종결시켰다. 그리고 나서, 샘플을 200 g에서 10 분동안 원심분리하여 상청액을 얻었다.

<113> 이와 같이 얻은 상청액 1 ml에 드랍킨 용액 (Drabkin solution) 3 ml를 첨가하고 실온에서 10 분동안 두었다. OD_{540nm}을 구하였다.

<114> 계산:

<115> SRBC 혼탁액 0.25 ml를 4 ml까지의 드랍킨 용액과 혼합하여 기준 OD_{540nm}을 얻었으며, OD_{540nm}을 얻기 전 10 분동안 실온에 두었다.

<116> 샘플 혈청 지수 = (시험 샘플의 OD_{540nm} ÷ 기준 OD_{540nm}) × 500

<117> 3. 단핵 식세포의 식균작용 및 면역 기관의 중량에 대한 웨타이드의 효과^[8,9]

<118> 마지막 시험 물질 투여 다음 날 (16 번째 날), 체중 1kg 당 0.1 ml의 인디아 잉크(India ink, 일반 살린으로 5 배 희석)를 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다.

<119> 인디안 잉크 주입후 1 분 및 5 분 후에, 헤파린 첨가된 (응혈방지 처리된) 튜빙을 이용하여 안각으로부터 20 µl의 혈액을 채취하였다. 상기 혈액을 2 ml 0.1 % w/v Na₂CO₃와 혼합한 후, OD_{680nm}을 얻었다. 아웃라인 클리어 인덱스(outline clear index) K를 다음의 식에 의하여 계산하였다:

<120> $K = (lgA_1 - lgA_2) \div (t_2 - t_1)$

<121> 약어:

<122> A1: 1 분째에서의 OD_{680nm}

<123> A2: 5 분째에서의 OD_{680nm}

<124> t2: 5 분

<125> t1: 1 분

<126> 마지막 시험 물질 투여 후 첫 번째 날 (16 번째 날), 간, 비장, 및 흉선을 분리해내고 필터 페이퍼를 사용하여 수분을 뺀아들여 건조시키고 무게를 측정하였다. 식세포작용 지수 a를 다음과 같이 계산하였다:

<127> $a = (\sqrt[3]{K}) (W \div W_{LS})$

<128> 약어:

<129> W: 체중

<130> W_{LS}: 간과 비장의 무게

<131> 흉선 지수 (%) = (흉선 무게/체중) × 100

<132> 비장 지수 (%) = (비장 무게/ 체중) × 100

<133> 결과

<134> 수반된 대량의 미처리 데이터 때문에, 편집된 최종 결과만 제시한다. 또한, 갈린 음성 대조군과 통계학적으로

의미있는 차이를 보이지 않은 그룹은 생략하였다.

<135> 1. T 림프구 형질전환에 대한 웨타이드의 효과

<136> 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS002, CMS007, CMS008, CMS010, CMS012, CMS015, CMS019, CMS021 및 CMS029가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), T 림프구 형질전환을 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웨타이드 중에서, CMS010 및 CMS015는, 하기의 표 1에 나타낸 바와 같이, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 보이는 것으로 나타났다.

표 1

<137>

그룹	N	$\bar{X} \pm \text{SD}$ (자극지수)
CMS002	8	1.8 $\pm 0.3^*$
CMS007	9	1.6 $\pm 0.1^*$
CMS008	9	1.7 $\pm 0.1^*$
CMS009	10	1.7 $\pm 0.2^*$
CMS010	9	2.0 $\pm 0.3^* @^\wedge$
CMS012	9	1.6 $\pm 0.2^*$
CMS015	9	1.9 $\pm 0.3^* @^\wedge$
CMS019	9	1.8 $\pm 0.3^*$
CMS021	10	1.6 $\pm 0.1^*$
CMS029	9	1.7 $\pm 0.3^*$
IFN- γ	10	1.6 $\pm 0.2^*$
IL-2	10	1.7 $\pm 0.2^*$
살린	10	1.3 ± 0.1

<138> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)

<139> @ IFN- γ 그룹과 비교 ($P<0.05$)

<140> ^ IL-2 그룹과 비교 ($P<0.05$)

<141> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS001, CMS002 및 CMS003이 살린 그룹, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), T 림프구 형질전환을 자극할 수 있는 것으로 나타났다. CMS014 및 CMS036은 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), T 림프구 형질전환을 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 상세한 결과를 아래의 표 2에 나타내었다.

표 2

<142>

그룹	N	$\bar{X} \pm \text{SD}$ (자극지수)
CMS001	10	2.2 $\pm 0.5^* @^\wedge$
CMS002	10	2.6 $\pm 0.3^* @^\wedge$
CMS003	8	2.2 $\pm 0.5^* @^\wedge$
CMS014	9	1.0 $\pm 0.1^*$
CMS036	9	1.0 $\pm 0.1^*$
IFN- γ	9	1.7 $\pm 0.2^*$
IL-2	10	1.8 $\pm 0.2^*$
살린	10	1.3 ± 0.1

<143> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)

<144> @ IFN- γ 그룹과 비교 ($P<0.05$)

<145> ^ IL-2 그룹과 비교 ($P<0.05$)

<146> 표 3에 나타낸 바와 같이, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS001, CMS003, CMS007 및 CMS034가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), T 림프구 형질전환을 자극할 수 있는 것으로 나타났다.

표 3

<147>

그룹	N	X ± SD (자극지수)
CMS001	10	1.7 ± 0.2*
CMS003	10	1.6 ± 0.2*
CMS007	8	1.7 ± 0.1*
CMS034	9	1.5 ± 0.2*
IFN-γ	10	1.6 ± 0.2*
IL-2	9	1.6 ± 0.1*
살린	10	1.3 ± 0.1

<148>

* 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<149>

표 4에 나타낸 바와 같이, 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS008, CMS010 및 CMS011이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), T 림프구 형질전환을 자극할 수 있는 것으로 나타났다.

표 4

<150>

그룹	N	X ± SD (자극지수)
CMS008	10	1.7 ± 0.3*
CMS010	9	1.7 ± 0.3*
CMS011	10	1.6 ± 0.4*
IFN-γ	10	1.6 ± 0.2*
IL-2	10	1.6 ± 0.1*
살린	10	1.3 ± 0.1

<151>

* 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<152>

2. NK 세포 세포독성에 대한 웨타이드의 효과

<153>

500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS010, CMS013, CMS016, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 및 CMS036이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), NK 세포 세포독성 활성을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웨타이드 중에서, CMS010, CMS016 및 CMS030은, 하기의 표 5에 나타낸 바와 같이, IFN-γ 그룹 및 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 보이는 것으로 나타났다.

표 5

<154>

그룹	N	X ± SD (%)
CMS010	9	91 ± 4*@^
CMS013	8	84 ± 9*
CMS016	9	91 ± 7*@^
CMS023	10	79 ± 12*
CMS024	10	89 ± 8*
CMS026	10	89 ± 7*
CMS027	10	88 ± 8*
CMS028	10	90 ± 5*
CMS029	10	87 ± 4*
CMS030	10	91 ± 5*@^
CMS032	10	87 ± 5*
CMS033	9	89 ± 8*
CMS034	11	85 ± 9*
CMS035	8	90 ± 10*
CMS036	10	88 ± 7*

IFN-γ	10	77 ±8*
IL-2	10	77 ±8*
살린	8	63 ±9

<155> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<156> @ IFN-γ 그룹과 비교 (P<0.05)

<157> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<158> 50 µg/kg/day 에서, CMS001, CMS003, CMS015, CMS021, CMS026 및 CMS035이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), NK 세포 세포독성 활성을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웹타이드 중에서, CMS021은 IFN-γ 그룹 및 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 보이는 것으로 나타났다. CMS012은 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 나타내며, NK 세포 세포독성 활성을 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 상세한 결과를 하기의 표 6에 나타내었다.

표 6

그룹	N	X ± SD (%)
CMS001	10	85 ±10*
CMS003	10	85 ±6*
CMS012	9	40 ±9*
CMS015	8	78 ±8*
CMS021	8	88 ±12*@^
CMS026	10	76 ±9*
CMS035	10	72 ±9*
IFN-γ	10	73 ±10*
IL-2	10	74 ±8*
살린	10	56 ±8

<160> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<161> @ IFN-γ 그룹과 비교 (P<0.05)

<162> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<163> 5 µg/kg/day 에서, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS020, CMS024, CMS034 및 CMS036이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), NK 세포 세포독성 활성을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웹타이드 중에서, CMS008 및 CMS09는, 표 7에서 보여지는 바와 같이, IFN-γ 그룹 및 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 갖는 것으로 나타났다.

표 7

그룹	N	X±SD (%)
CMS008	10	92±4*@^
CMS009	8	92±6*@^
CMS010	10	82±9*
CMS011	10	76±10*
CMS012	10	85±7*
CMS020	9	91±6*
CMS024	9	78±3*
CMS034	8	90±5*
CMS036	10	75±9*
IFN-γ	10	80±8*
IL-2	10	80±8*
살린	10	60±9

<164>

<165> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<166> @ IFN- γ 그룹과 비교 (P<0.05)

<167> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<168> 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS002, CMS011, CMS012, CMS022, CMS028 및 CMS035가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), NK 세포 세포독성 활성을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웨타이드 중에서, CMS008은 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 보이며, NK 세포 세포독성 활성을 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 상세한 결과를 아래의 표 8에 나타내었다.

표 8

그룹	N	X \pm SD (%)
CMS002	8	76 \pm 9*
CMS008	10	46 \pm 12*
CMS011	9	79 \pm 3*
CMS012	9	77 \pm 6*
CMS022	10	73 \pm 11*
CMS028	8	79 \pm 3*
CMS035	10	76 \pm 10*
IFN- γ	10	72 \pm 9*
IL-2	10	74 \pm 10*
살린	11	58 \pm 7

<169>

<170> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

3. IL-2 분비에 있어서의 T 림프구의 활성에 대한 웨타이드의 효과

<172>

500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS007, CMS009, CMS010 및 CMS015이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), T 림프구에서의 IL-2 분비를 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웨타이드 중에서, CMS007 및 CMS015은 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 갖는 것으로 나타났다. 또한, CMS009 및 CMS010은, 하기의 표 9에서 보여지는 바와 같이, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 보이는 것으로 나타났다.

표 9

그룹	N	X \pm SD (IU)
CMS007	9	86 \pm 15*^
CMS009	10	114 \pm 13*@^
CMS010	9	125 \pm 17*@^
CMS015	9	85 \pm 17*^
IFN- γ	10	100 \pm 18*
IL-2	10	70 \pm 13*
살린	10	39 \pm 10

<173>

<174> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<175> @ IFN- γ 그룹과 비교 (P<0.05)

<176> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<177> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS001 및 CMS003이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), IL-2 분비에 있어서의 T 림프구의 활성을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웨타이드 중에서, 표 10에서 보여지는 바와 같이, CMS003은 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 갖는 것으로 나타났다.

표 10

그룹	N	X \pm SD (IU)
CMS001	10	60 \pm 10*
CMS003	8	86 \pm 9*^
IFN- γ	9	99 \pm 16*
IL-2	10	72 \pm 12*
살린	10	39 \pm 10

<178>

<179> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<180> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<181> 표 11에서 보여지는 바와 같이, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS007, CMS012 및 CMS020이 살린 그룹과 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이며(P<0.05), IL-2 분비에 있어서의 T 림프구 활성을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다.

표 11

그룹	N	X \pm SD (IU)
CMS007	8	64 \pm 12*
CMS012	9	65 \pm 16*
CMS020	8	63 \pm 11*
IFN- γ	10	96 \pm 14*
IL-2	10	77 \pm 13*
살린	10	37 \pm 9

<182> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<184> 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS010, CMS011, CMS012, CMS022 및 CMS034이 살린 그룹과 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이며(P<0.05), IL-2 분비에 있어서의 T 림프구 활성을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웨타이드 중에서, CMS034는 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미 있는 차이를 갖는 것으로 나타났다(P<0.05). 또한, CMS011 및 CMS022는, 표 12에서 보는 바와 같이, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과도 통계학적으로 의미 있는 차이(P<0.05)를 보이는 것으로 나타났다.

표 12

그룹	N	X \pm SD (IU)
CMS010	9	66 \pm 11*
CMS011	10	101 \pm 19* ^{@^}
CMS012	8	59 \pm 13*
CMS022	9	109 \pm 14* ^{@^}
CMS034	10	85 \pm 10* ^{@^}
IFN- γ	10	87 \pm 15*
IL-2	10	73 \pm 13*
살린	10	38 \pm 13

<186> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<187> @ IFN- γ 그룹과 비교 (P<0.05)

<188> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<189> 4. IFN 분비에 있어서의 T 림프구의 활성에 대한 웨타이드의 효과

<190> 표 13에서 보여지는 바와 같이, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS010, CMS013, 및 CMS016이 살린 그룹, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이며(P<0.05), 인터페론 (IFN) 분비에 있어서의 T 림프구 활성을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다.

표 13

그룹	N	X \pm SD (IU)
CMS010	9	167 \pm 13* ^{@^}
CMS013	9	154 \pm 15* ^{@^}
CMS016	6	162 \pm 19* ^{@^}
IFN- γ	10	139 \pm 16*
IL-2	10	120 \pm 13*
살린	10	65 \pm 11

<192> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<193> @ IFN- γ 그룹과 비교 (P<0.05)

<194> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<195> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS001, CMS003 및 CMS021이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 (P<0.05), IFN 분비에 있어서의 T 림프구의 활성을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웨타이드 중에서, 표 14에서 보여지는 바와 같이, CMS021은 IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이 (P<0.05)를 갖는 것으로 나타났다.

표 14

그룹	N	X±SD (IU)
CMS001	10	110±15*
CMS003	8	106±16*
CMS021	8	143±17*@^
IFN- γ	9	125±18*
IL-2	10	113±17*
살린	10	61±11

<196> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<198> @ IFN- γ 그룹과 비교 (P<0.05)

<199> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<200> 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS009 및 CMS012이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 (P<0.05), IFN 분비에 있어서의 T 림프구 활성을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웨타이드 중에서, 표 15에서 보여지는 바와 같이, CMS009가 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이는 것으로 나타났다.

표 15

그룹	N	X±SD (IU)
CMS009	10	121±15*^
CMS012	9	86±9*
IL-2	9	105±14*
살린	10	66±10

<202> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<203> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<204> 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS010, CMS011, CMS022 및 CMS028이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 (P<0.05), IFN 분비에 있어서의 T 림프구 활성을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웨타이드 중에서, CMS010과 CMS022는, 표 16에서 보는 바와 같이, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이 (P<0.05)를 보이는 것으로 나타났다.

표 16

그룹	N	X±SD (IU)
CMS010	9	142±18*@^
CMS011	10	89±18*
CMS022	9	145±13*@^
CMS028	10	96±13*
IFN- γ	10	124±16*
IL-2	10	107±13*
살린	10	64±13

<206> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<207> @ IFN- γ 그룹과 비교 (P<0.05)

<208> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<209> 5. 항체 형성에 대한 웹타이드의 효과

<210> 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS002, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009, CMS0010, CMS0011, CMS0012, CMS013, CMS014, CMS015, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS022, CMS023, CMS024, CMS029, CMS033 및 CMS035가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), 항-SRBC 항체 형성을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웹타이드 중에서, CMS002, CMS003, CMS007, CMS008, CMS013, CMS019, CMS024 및 CMS035는 IFN- γ 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다. 또한, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS014, CMS015, CMS016, CMS020, CMS023, CMS029 및 CMS033은, 표 17에서 볼 수 있는 바와 같이, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과도 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다.

표 17

그룹	N	X \pm SD (유니트)
CMS002	10	87 \pm 18* [@]
CMS003	10	96 \pm 18* [@]
CMS007	10	69 \pm 17* [@]
CMS008	10	82 \pm 15* [@]
CMS009	10	113 \pm 22 * [@] [^]
CMS010	10	112 \pm 30* [@] [^]
CMS011	8	188 \pm 16* [@] [^]
CMS012	8	141 \pm 21* [@] [^]
CMS013	10	80 \pm 16* [@]
CMS014	10	130 \pm 24* [@] [^]
CMS015	10	136 \pm 22* [@] [^]
CMS016	8	143 \pm 38* [@] [^]
CMS018	10	66 \pm 16*
CMS019	10	91 \pm 26* [@]
CMS020	6	155 \pm 35* [@] [^]
CMS022	8	68 \pm 31*
CMS023	9	110 \pm 45* [@] [^]
CMS024	8	75 \pm 29* [@]
CMS029	8	115 \pm 22* [@] [^]
CMS033	10	143 \pm 27* [@] [^]
CMS035	10	88 \pm 16* [@]
IFN- γ	9	37 \pm 10
IL-2	10	71 \pm 11*
살린	10	32 \pm 7

<211> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)<212> @ IFN- γ 그룹과 비교 ($P<0.05$)<213> ^ IL-2 그룹과 비교 ($P<0.05$)

<215> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS003, CMS011, CMS012, CMS013, CMS0015, CMS0021, CMS0022, CMS023, CMS026, CMS027, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035, 및 CMS036이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), 항-SRBC 항체 형성을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웹타이드 중에서, CMS011, CMS013, 및 CMS015는 IFN- γ 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다. 또한, CMS021, CMS022, CMS023, CMS026, CMS027, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 및 CMS036은 IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과도 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다. CMS009는 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), 항-SRBC 항체 형성을 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 상세한 결과를 아래의 표 18에 나타내었다.

표 18

그룹	N	X±SD (유니트)
CMS003	10	52±11*
CMS009	8	13±5*
CMS011	9	67±9* [@]
CMS012	8	50±14*
CMS013	8	70±9* [@]
CMS015	10	54±9* [@]
CMS021	9	94±20* ^{@^}
CMS022	9	110±16* ^{@^}
CMS023	8	84±11* ^{@^}
CMS026	9	98±9* ^{@^}
CMS027	9	93±11* ^{@^}
CMS029	10	143±13* ^{@^}
CMS030	10	141±33* ^{@^}
CMS032	9	131±24* ^{@^}
CMS033	8	112±15* ^{@^}
CMS034	10	136±11* ^{@^}
CMS035	8	97±10* ^{@^}
CMS036	10	118±11* ^{@^}
IFN- γ	9	37±10
IL-2	10	71±11*
살린	10	32±7

<216> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<218> @ IFN- γ 그룹과 비교 (P<0.05)

<219> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<220> 5 μ g/kg/day 에서, CMS001, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009, CMS011, CMS012, CMS013, CMS015, CMS016, CMS019, CMS020, CMS021, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 및 CMS036이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), 항-SRBC 항체 형성을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웨타이드 중에서, CMS003, CMS008, CMS009, CMS012, CMS015, CMS016, CMS020 및 CMS021은 IFN- γ 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 갖는 것으로 나타났다. 또한, CMS001, CMS007, CMS011, CMS019, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035, 및 CMS036은, 표 19에서 볼 수 있는 바와 같이, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과도 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 갖는 것으로 나타났다.

표 19

그룹	N	X±SD (유니트)
CMS001	9	110±24* [@]
CMS003	9	91±24* [@]
CMS007	9	122±12* ^{@^}
CMS008	9	97±26* [@]
CMS009	8	79±18* [@]
CMS011	10	115±27* ^{@^}
CMS012	10	81±22* [@]
CMS013	10	93±28* [@]
CMS015	8	94±37* [@]
CMS016	9	93±32* [@]
CMS019	10	118±20* ^{@^}
CMS020	10	89±24* [@]
CMS021	9	82±30* [@]
CMS023	10	166±27* ^{@^}
CMS024	7	171±39* ^{@^}
CMS026	9	191±17* ^{@^}
CMS027	9	117±45* ^{@^}
CMS028	10	121±48* ^{@^}
CMS029	9	147±23* ^{@^}
CMS030	9	158±37* ^{@^}
CMS032	9	157±37* ^{@^}
CMS033	7	128±39* ^{@^}
CMS034	8	172±37* ^{@^}
CMS035	9	176±39* ^{@^}
CMS036	8	179±34* ^{@^}
IFN- γ	9	37±10
IL-2	10	71±11*
살린	10	32±7

<221> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)<223> @ IFN- γ 그룹과 비교 ($P<0.05$)<224> ^ IL-2 그룹과 비교 ($P<0.05$)

<225> 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS001, CMS023, CMS024, CMS027, 및 CMS033이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), 항-SRBC 항체 형성을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이를 펫타이드 종에서, CMS021과 CMS033은 IFN- γ 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다. 또한, CMS023, CMS024, 및 CMS027은 IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과도 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다. 또한, CMS002, CMS003, CMS009, CMS010, CMS011, CMS013, CMS014, CMS015, CMS018, CMS019, CMS020, CMS026, CMS028, CMS029, CMS030, CMS034, 및 CMS036은 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), 항-SRBC 항체 형성을 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 상세한 결과를 아래의 표 20에 나타내었다.

표 20

그룹	N	X±SD (유니트)
CMS002	9	4±1*
CMS003	9	2±1*
CMS009	9	2±1*
CMS010	10	10±3*
CMS011	10	5±3*
CMS013	10	7±1*
CMS014	10	15±6*
CMS015	9	13±4*
CMS018	9	3±1*
CMS019	9	12±3*
CMS020	9	10±3*
CMS021	9	57±9* [@]
CMS023	10	108±21* ^{@^}
CMS024	10	98±6* ^{@^}
CMS026	10	19±6*
CMS027	10	99±14* ^{@^}
CMS028	10	18±5*
CMS029	9	18±7*
CMS030	9	19±7*
CMS033	9	78±12* [@]
CMS034	10	20±2*
CMS036	9	20±6*
IFN-γ	9	37±10
IL-2	10	71±11*
살린	10	32±7

<226>

<227> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<228> @ IFN-γ 그룹과 비교 (P<0.05)

<229> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<230> 6. 단핵 식균세포의 식균작용 활성에 대한 웹타이드의 효과

<231> 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS003, CMS008, CMS020, CMS022 및 CMS024가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), 단핵 식균세포의 식균작용 활성을 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웹타이드 중에서, CMS022는, 표 21에서 보여지는 바와 같이, IFN-γ 그룹 및 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 갖는 것으로 나타났다(P<0.05).

표 21

그룹	N	X±SD (식 세포 작용지수)
CMS003	10	6.6±0.7*
CMS008	10	6.5±1.2*
CMS020	10	6.4±0.6*
CMS022	10	7.4±0.6* ^{@^}
CMS024	10	6.4±1.0*
IFN-γ	10	6.4±0.9*
IL-2	9	5.7±0.8
살린	10	5.1±0.6

<232>

<233> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<234> @ IFN-γ 그룹과 비교 (P<0.05)

<235> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<236> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS019, CMS024 및 CMS030이 이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며

(P<0.05), 단핵 식균세포의 식균작용 활성을 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웹타이드 중에서, 표 22에서 보여지는 바와 같이, CMS019는 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 갖는 것으로 나타났다.

표 22

그룹	N	X±SD (식세포 작용지수)
CMS019	9	6.7±0.9* [^]
CMS024	8	6.6±0.7*
CMS030	10	6.3±0.5*
IFN- γ	10	6.4±0.9*
IL-2	9	5.7±0.8
살린	10	5.1±0.6

<237> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<239> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<240> 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS003*, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS013, CMS016, CMS018, CMS019, 및 CMS035가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), 단핵 식균세포의 식균작용 활성을 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웹타이드 중에서, 표 23에서 보여지는 바와 같이, CMS003, CMS009, CMS010, CMS016, CMS019, 및 CMS035는 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이는 것으로 나타났다.

표 23

그룹	N	X±SD (식세포 작용지수)
CMS003	9	6.9±0.9* [^]
CMS008	9	6.4±0.5*
CMS009	9	6.9±0.9* [^]
CMS010	10	7.1±0.7* [^]
CMS011	10	6.4±1.1*
CMS013	10	6.7±0.2*
CMS016	9	6.9±0.8* [^]
CMS018	8	6.7±1.2*
CMS019	8	6.8±0.6* [^]
CMS035	9	6.9±0.9* [^]
IFN- γ	10	6.4±0.9*
IL-2	9	5.7±0.8
살린	10	5.1±0.6

<241> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<243> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<244> 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS024, CMS027 및 CMS036이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), 단핵 식균세포의 식균작용 활성을 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웹타이드 중에서, CMS024는, 표 24에서 보는 바와 같이, IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이(P<0.05)를 보이는 것으로 나타났다.

표 24

그룹	N	X±SD (식세포 작용지수)
CMS024	10	6.7±0.5* [^]
CMS027	10	6.4±0.6*
CMS036	9	6.2±0.3*
IFN- γ	10	6.4±0.9*
IL-2	9	5.7±0.8
살린	10	5.1±0.6

<246> * 살린 그룹과 비교 (P<0.05)

<247> ^ IL-2 그룹과 비교 (P<0.05)

<248> 7. 면역 기관의 중량에 대한 웹타이드의 효과

<249> 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS008, CMS0010, CMS016, CMS019, CMS020, CMS022, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 및 CMS036이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 ($P<0.05$), 흥선의 중량을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웹타이드 중에서, CMS027 및 CMS034는 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다. 또한, CMS008, CMS022, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, 및 CMS035는, 표 25에서 볼 수 있는 바와 같이, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹 모두와도 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다.

표 25

그룹	N	X \pm SD (%)
CMS008	8	0.21 \pm 0.03*@ [^]
CMS010	10	0.19 \pm 0.04*
CMS016	9	0.18 \pm 0.05*
CMS019	10	0.19 \pm 0.02*
CMS020	10	0.19 \pm 0.04*
CMS022	9	0.26 \pm 0.05*
CMS026	10	0.20 \pm 0.03*
CMS027	8	0.20 \pm 0.03* [^]
CMS028	10	0.19 \pm 0.02*
CMS029	10	0.22 \pm 0.04* [^]
CMS030	8	0.30 \pm 0.03* [^]
CMS032	8	0.25 \pm 0.03* [^]
CMS033	9	0.25 \pm 0.04* [^]
CMS034	9	0.20 \pm 0.05* [^]
CMS035	10	0.21 \pm 0.03* [^]
CMS036	9	0.18 \pm 0.02*
IFN- γ	10	0.15 \pm 0.04
IL-2	9	0.14 \pm 0.03
살린	9	0.12 \pm 0.02

<250>

<251> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)<252> @ IFN- γ 그룹과 비교 ($P<0.05$)<253> ^ IL-2 그룹과 비교 ($P<0.05$)

<254>

표 26에서 보여지는 바와 같이, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS019는 살린 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), 비장의 중량을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. CMS001, CMS003, CMS007, CMS009, CMS011, CMS013, CMS014, CMS015, CMS021, CMS023, CMS024, CMS027, 및 CMS036이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), 비장의 중량을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 상세한 결과를 아래의 표 26에 나타내었다.

표 26

그룹	N	X \pm SD (%)
CMS001	10	0.43 \pm 0.07*
CMS003	8	0.40 \pm 0.04*
CMS007	9	0.32 \pm 0.05*
CMS009	9	0.41 \pm 0.03*
CMS011	9	0.41 \pm 0.04*
CMS013	10	0.44 \pm 0.07*
CMS014	10	0.40 \pm 0.03*
CMS015	9	0.36 \pm 0.07*
CMS019	9	0.63 \pm 0.08*
CMS021	9	0.36 \pm 0.04*
CMS023	9	0.36 \pm 0.06*
CMS024	9	0.34 \pm 0.05*
CMS027	10	0.37 \pm 0.03*
CMS036	10	0.40 \pm 0.03*
살린	10	0.53 \pm 0.05

<255>

<256> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)

<257>

50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS002, CMS008, CMS012, CMS014, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS022, CMS023,

CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034 및 CMS036이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), 흉선의 중량을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웹타이드 중에서, CMS034는 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다. 또한, CMS002, CMS008, CMS012, CMS014, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS030, CMS032, 및 CMS036은, 표 27에서 볼 수 있는 바와 같이, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹 모두와 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다.

표 27

그룹	N	X±SD (%)
CMS002	10	0.21±0.02* ^{@^}
CMS008	10	0.20±0.04* ^{@^}
CMS012	10	0.26±0.02* ^{@^}
CMS014	10	0.21±0.02* ^{@^}
CMS016	10	0.20±0.03* ^{@^}
CMS018	10	0.23±0.02* ^{@^}
CMS019	10	0.20±0.03* ^{@^}
CMS020	10	0.27±0.03* ^{@^}
CMS022	10	0.30±0.03* ^{@^}
CMS023	10	0.20±0.02* ^{@^}
CMS024	10	0.27±0.02* ^{@^}
CMS026	10	0.27±0.02* ^{@^}
CMS027	8	0.21±0.03* ^{@^}
CMS028	10	0.18±0.04*
CMS029	9	0.18±0.05*
CMS030	10	0.25±0.04* ^{@^}
CMS032	10	0.27±0.03* ^{@^}
CMS033	9	0.18±0.03*
CMS034	8	0.19±0.04* [^]
CMS036	9	0.22±0.02* ^{@^}
IFN- γ	10	0.15±0.04
IL-2	9	0.14±0.04
살린	9	0.12±0.02

<258>

<259> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)<260> @ IFN- γ 그룹과 비교 ($P<0.05$)<261> ^ IL-2 그룹과 비교 ($P<0.05$)<262> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS008, CMS010, 및 CMS029가 살린 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 ($P<0.05$), 비장의 무게를 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 상세한 결과를 아래의 표 28에 나타내었다.

표 28

그룹	N	X±SD (%)
CMS008	10	0.39±0.08*
CMS010	10	0.38±0.05*
CMS029	10	0.42±0.04*
IFN- γ	10	0.50±0.04
IL-2	9	0.62±0.07
살린	9	0.53±0.05

<263>

<264> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)<265> 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS001, CMS002, CMS010, CMS011, CMS012, CMS013, CMS0014, CMS015, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS021, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, 및 CMS036이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), 흉선의 중량을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웹타이드 중에서, CMS002, CMS014, CMS024 및 CMS030은 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다. 또한, CMS010, CMS012, CMS018, CMS019, CMS020, CMS022, CMS026, CMS028, CMS032, CMS033, CMS034, 및 CMS036은, 표 29에서 볼 수 있는 바와 같이, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹 모두와 통계학적으로 의미있는 차이($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다.

표 29

그룹	N	X±SD (%)
CMS001	10	0.22±0.05*
CMS002	9	0.24±0.05* [△]
CMS010	9	0.27±0.05* [△]
CMS011	10	0.22±0.04*
CMS012	10	0.27±0.06* [△]
CMS013	10	0.21±0.05*
CMS014	10	0.23±0.06* [△]
CMS015	9	0.20±0.08*
CMS016	10	0.22±0.06*
CMS018	10	0.24±0.04* [△]
CMS019	10	0.24±0.02* [△]
CMS020	10	0.24±0.07* [△]
CMS021	9	0.20±0.06*
CMS022	9	0.25±0.04* [△]
CMS023	10	0.23±0.06*
CMS024	9	0.23±0.06* [△]
CMS026	10	0.31±0.05* [△]
CMS028	10	0.28±0.06* [△]
CMS029	10	0.21±0.03*
CMS030	10	0.23±0.07* [△]
CMS032	10	0.29±0.04* [△]
CMS033	10	0.20±0.02*
CMS034	9	0.27±0.06* [△]
CMS035	10	0.21±0.04*
CMS036	10	0.25±0.04* [△]
IFN- γ	10	0.15±0.04
IL-2	9	0.14±0.04
살린	9	0.12±0.02

<266> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)<268> @ IFN- γ 그룹과 비교 ($P<0.05$)<269> ^ IL-2 그룹과 비교 ($P<0.05$)<270> 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS030이 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이면서 ($P<0.05$), 비장의 무게를 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. CMS015는 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이면서 ($P<0.05$), 비장의 무게를 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 상세한 결과를 아래의 표 30에 나타내었다.

표 30

그룹	N	X±SD (%)
CMS015	9	0.38±0.15*
CMS030	10	0.64±0.09*
살린	10	0.53±0.05

<272> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)<273> 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 에서, CMS002, CMS008, CMS010, CMS012, CMS014, CMS018, CMS020, CMS022, CMS026, CMS028, CMS030, 및 CMS032가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 ($P<0.05$), 흉선의 무게를 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이들 웨타이드 중에서, CMS008과 CMS012는 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이 ($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다. 또한, CMS002, CMS020, 및 CMS030은, 표 31에서 보여지는 바와 같이, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과도 통계학적으로 의미있는 차이 ($P<0.05$)를 갖는 것으로 나타났다.

표 31

그룹	N	X±SD (%)
CMS002	8	0.26±0.06*@^
CMS008	10	0.22±0.07*^
CMS010	9	0.21±0.03*
CMS012	10	0.22±0.06*^
CMS014	10	0.20±0.04*
CMS018	10	0.20±0.03*
CMS020	9	0.23±0.05*@^
CMS022	10	0.21±0.06*
CMS026	9	0.21±0.05*
CMS028	10	0.20±0.06*
CMS030	8	0.24±0.05*@^
CMS032	10	0.21±0.06*
IFN- γ	10	0.15±0.04
IL-2	9	0.14±0.04
살린	9	0.12±0.02

<274> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)<275> @ IFN- γ 그룹과 비교 ($P<0.05$)<276> ^ IL-2 그룹과 비교 ($P<0.05$)<277> 0.5 μ g/kg/day 에서, CMS020이 살린 그룹, IFN- γ 그룹 및 IL-2 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 ($P<0.05$), 비장의 무게를 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. CMS001은 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 ($P<0.05$), 비장의 무게를 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 상세한 결과를 아래의 표 32에 나타내었다.

표 32

그룹	N	X±SD (%)
CMS001	10	0.40±0.05*
CMS020	8	0.68±0.09*@^
Saline	10	0.53±0.05
IFN- γ	10	0.50±0.04
IL-2	10	0.62±0.07

<278> * 살린 그룹과 비교 ($P<0.05$)<279> @ IFN- γ 그룹과 비교 ($P<0.05$)<280> ^ IL-2 그룹과 비교 ($P<0.05$)

<281> 요컨대, 웨타이드 CMS001, CMS002, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS013, CMS014, CMS015, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS021, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 및 CMS036은 시험된 동물 모델에서 생체내 생물학적 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

<282> II. 웨타이드의 생체내 항바이러스 효과

<283> 상기 웨타이드들이 바이러스 감염에 대하여 가능한 치료적 효과를 갖는지를 확인하기 위하여, 본 연구에서 B형 간염 감염된 오리 동물모델을 사용하여 병에 걸린 동물에 대한 상기 웨타이드의 생체내 효과를 시험하였다.

<284> 충칭 오리 B형 간염 모델을 준비하고 4 주일 동안 웨타이드를 복막내 주입 (50 μ g/kg/day, 하루에 한번)하여 처리하였다. DHBV DNA의 혈청 농도를 혈청 도트-블라트 하이브리디제이션에 의하여 분석하였다. 라미비다인 (Lamivudine)과 일반 살린 처리를 각각 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다. 웨타이드 CMS001은 살린 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 ($P<0.05$), 처리 4 주째에 DHBV DNA의 혈청 농도를 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 적절한 투약 농도의 CMS001은 간염 바이러스 감염의 치료를 위하여, 한 부분으로, 또는 단독으로 사용될 수 있다고 결론지을 수 있다.

<285> 재료 및 방법

<288> 1. 웨타이드는 L-아미노산으로부터 American Peptide Company, Inc., USA 에 의하여 주문 합성되었다.

<289> 2. 동물모델^[1]

<290> 하루 된 충청 오리를 복막내 주입에 의하여 오리 B형 간염 바이러스(Duck Hepatitis B Virus, DHBV) DNA (5×10^7 copy/ml) 양성인 0.1 ml 보존 혈청(stock serum)으로 접종하였다. 일 주일 후, 외부 경정액으로부터 혈액 샘플을 채취하고, 디고신(digoxin)^[2]으로 표지된 DHBV DNA 프로브를 사용하여 도트-블라트 하이브리디제이션에 의하여 감염을 수행하였다. 본 연구를 개시하기 위하여 상기 오리를 2 주령까지 사육하였다.

<291> 3. 분류 및 처리

<292> DHBV 감염된 오리를 다음과 같은 그룹으로 무작위로 나누었다:

<293> a) 음성 대조군 (n=9): 오리 당 2 ml의 일반 살린을 하루에 한 번 복막내 주입함.

<294> b) 라미뷰다인 그룹 (n=8): 양성 대조군. 하루에 한 번 라미뷰다인^[4] 50mg/kg/day를 경구 투여함.

<295> c) 웨타이드 그룹 (n=9): 50 μ g/kg/day의 웨타이드 (일반 살린으로 최종 부피가 0.5 ml 내지 1 ml가 되도록 조절됨)을 하루에 한 번 복막내 주입함.

<296> 4 주 동안 처리를 지속하고, 처리 종료 후 1 주일동안 계속하여 관찰하였다. 처리 개시 후 0, 7, 14, 21, 28 및 35 일째에 오리의 외부 경정액으로부터 1 ml의 혈액 샘플을 채취하였다. 혈액의 혈청을 즉시 분리하고^[3], 분석 시까지 -20 °C에서 보관하였다.

<297> 4. 혈청 DHBV DNA 농도 측정

<298> 키트 제조자(Amersham Pharmacia Biotech Co.)의 라벨링 키트 프로토콜에 따라서 DHBV DNA 프로브를 형광표지하였다. 40 μ l의 오리 혈청을 니트로-셀룰로오스 멤브레인 상으로 도트-블라팅(샘플 당 1 듀플리케이션 도트)하고, 정량을 위하여 형광-표지된 DHBV DNA 프로브로 혼성화하였다^[2]. 혼성화 완료 후, 블라트를 CDP-Star 형광 측정 시약 RPN3690에 전개시키고, Vuelo Scan (Brisa-620st) 스캐너로 스캐닝하였다. ImageMaster TotalLab v1.11.Ink 소프트웨어를 사용하여 블라트를 정량분석 하였다. SPSS 소프트웨어를 사용하는 페어 t-테스트에 의하여 통계 분석을 수행하였다.

<299> 결과

표 II.1

처리 전후의 혈청 DHBV DNA 역가

	DHBV DNA 농도 (평균 \pm 표준편차, 10^3 유니트)					
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 35
일반 살린	26 \pm 12	45 \pm 31	49 \pm 23	102 \pm 66	60 \pm 38	50 \pm 43
라미뷰다인	21 \pm 9	6 \pm 4*	7 \pm 6*	8 \pm 7*	8 \pm 5*	20 \pm 19
CMS001	21 \pm 18	11 \pm 13	20 \pm 18	14 \pm 14	5 \pm 3*	18 \pm 16

<300>

<301> 페어 t-테스트, 동일 동물의 0 일째와 비교: * $P<0.05$

<302> 음성 대조군 (일반 살린) 및 양성 대조군 (라미뷰다인)은 간염 동물모델의 성공적인 수립을 입증하였다. 50 μ g/kg/day에서, 웨타이드 CMS001은 동일 동물의 이전 처리값과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($P<0.05$), 4 주일의 처리 후 혈청 DHBV DNA 역가를 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 처리가 종결되자, 혈청 DHBV DNA 역가가 처리 이전과 통계학적 차이를 갖지 않는 값으로 회복하였고, 이는 웨타이드 CMS001의 효과가 가역적이거나 및/또는 바이러스 박멸을 위하여 보다 오랜 처리 기간이 필요하다는 것을 보여준다.

<303> 검토

<304> 오리 간염 동물모델^[1]은 인간 B형 간염 병인 연구 및 B형 간염 치료 항원의 스크리닝을 위한 하나의 확립된 실험 모델이다. 본 연구에서, CMS001은 처리 4 주 후 DHBV DNA의 혈청 역가를 감소시킬 수 있는 것으로 나타났으

며, 이는 적절한 투여 농도의 적절한 적용 스킁을 갖는 펩타이드 CMS001이 인간 B형 간염 치료를 위한 항원으로서 다른 물질과 조합하여 또는 단독으로 사용될 수 있다는 것을 보여준다.

<305> 본 연구에 있어서, 복막내 주입에 의한 투여를 시험하였으나, 이는 다른 대체 경로를 통하여 투여된 경우의 펩타이드의 가능한 효능을 배제하는 것은 아니다. 또한, 펩타이드를, 정맥내 주입, 근육내 주입, 피하 주입 및 피하 이식을 통하여, 리포좀, 지속 방출 프로텍션 등과 같은 전달 용이 기구를 사용하거나 사용하지 아니하고 투여할 수 있다. 펩타이드는 또한 위장 프로텍션을 사용하거나 사용하지 아니하고, 또는, 변형을 하지 않은 일반적 제형 또는 서방성 형태로, 타블렛, 캡슐, 혼탁액, 용액 등과 같은 모든 경구 투여 형태로 투여될 수 있다. 상기 펩타이드는 또한 연고, 크림, 젤 등의 형태로, 경피 전달 용이 기구를 사용하거나 사용하지 아니하고, 또는 분말 흡입, 용해 또는 리포좀 방어 형태로서, 국부적 적용의 모든 형태로 적용될 수 있다. 상기 펩타이드는 또한 다른 펩타이드 서열과 조합하거나 단독으로 자신의 유전자 서열로 변역되어 발현 시스템으로 클로닝되어, 얻어진 펩타이드를 정제하거나 정제하지 아니하고, 본 명세서에서 설명된 펩타이드의 활성을 사용하기 위한 최종 펩타이드 분자를 생성할 수 있다.

표 II.2

<306> B형 간염에 대하여 효과적인 펩타이드

CMS 코드	서열번호
CMS001	1

<307> 참고문헌

- Chen Yaxi, Guo shuhua, Zhang Dingfeng, et al. Foundation and application of Chongqing duck Hepatitis B model. Chinese Journal of Hepatology. 1993;1 (2): 89-91
- Chen Yaxi, Guo shuhua, ChenXuehua. Preparation and application of DHBV DNA probe labeled with digoxin. Journal of Chongqing University of Medical Sciences. 1994; 19 (4): 295-297
- Tang Ni, Huang Ailong, Guo shuhua, et al. Systemic foundation and application of serological parameters of humoral immunity to duck Hepatitis B virus. Chinese Journal of Hepatology. 2001 ; 9(1) :13-15
- Chen Yaxi, Guo shuhua, Qi Zhenyuan, et al. An experimental study of lamivudine against duck Hepatitis B virus in combination withfamciclovir. Chinese Journal of Hepatology. 2001; 9 (4): 209-211

III. 신장염에 대한 펩타이드의 효과

<313> 이들 펩타이드가 신장염(nephritis)에 대하여 가능한 치료적 효과를 갖는지를 확인하기 위하여, 본 연구에서는 래트 마수지(rat Masugi) 신장염 동물모델을 사용하여 병에 걸린 동물에 대한 상기 펩타이드의 생체내 효과를 시험하였다^[3,4].

<314> 본 연구의 목적은 만성 사구체신염에 대한 펩타이드의 생체내 치료 효과를 조사하는 것이다. 마수지 신장염 래트 모델은 건강한 스프라그 다우리(Sprague Dawley) 래트에 래빗 항-래트-신장-피질 IgG를 주입한 직후, 3 주일 동안 하루에 한번씩 50 μ l/kg/day의 펩타이드를 복막내 주입 처리함으로써 수행하였다. 하이드로코르티손을 양성 대조군으로 사용하였다. CMS014, CMS018, CMS030, 및 CMS036으로 처리된 래트의 비장지수, 혈청 크레아티닌 농도 및 단백뇨(proteinurea) 지수가, 통계학적 유의성을 가지고($P<0.05$), 대조군과 비교하여 감소되는 것을 확인하였다. 신장의 사후 혈미경 검사는 이들 펩타이드의 치료적 효과가 하이드로코르티손 처리시와 유사하다는 것을 보여주었다. CMS014, CMS018, CMS030, 및 CMS036를 만성 신장염 치료를 위한 방법으로 사용할 수 있다고 결론지을 수 있다.

<315> 재료

<316> 체중 120 \pm 20g의 수컷 스프라그 다우리 (SD) 래트를 Center of Experimental Animal, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine 및 First Military Medical University로부터 얻었다. 체중 3 kg의 친칠라 래빗(Chinchilla rabbits)을 Center of Experimental Animal, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine로부터 얻었다.

<317> American Peptide Company, Inc, USA에 의하여 주문 제작된 L-아미노산 기원의 펩타이드를 멸균 일반 살린에서 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하였다. 하이드로코르티손은 Yangzhou Pharmaceutical Factory, China로부터 얻었다.

<318> 혈청 크레아티닌 농도 측정 키트는 Shanghai Rongsheng Biological Technique Company, PR China로부터 입수하였다.

<319> 방법

<320> 1. 래빗 항-래트-신장-피질 항-혈청의 제조^[1]: 3%의 소듐 펜토바르비탈, 40 mg/kg을 정맥내 주입하여 20 마리의 건강한 SD 래트를 마취시켰다. 복부 대동맥을 노출시키고, 혈액이 정화될때까지 일반 살린으로 신장을 관류 (perfused)시켰다. 신장 피질을 분리하고, pH 8.1의 0.01M Tris-HCl 버퍼 5 부피에서 균질화시키고, 140-케이지 스테인레스 스틸 메쉬를 통하여 여과하였다. 여과물을 모으고, GIBCO-RRE 완전 또는 불완전 프로인드 아쥬반트 (Freunds adjuvant)와 1:1로 혼합하고, 에멀젼화하여 연구용 면역화 용액을 얻었다.

<321> 10 마리의 건강한 래빗을 상기 면역화 용액으로, 우선 완전 프로인드 아쥬반트로, 이어서 불완전 프로인드 아쥬반트로 면역화시켰다. 상기 항원을 6 개의 무작위 지점을 통하여 한 지점 당 0.1 ml씩 10일에 한 번씩 페하 주입하였다. 그 이후 6주째부터, 귀 정맥으로부터 혈액을 채취하고 이중 확산법(double diffusion method)에 의하여 항체 역가를 측정하였다. 면역화 개시 후 8 째주에, 3% 소듐 펜토바르비탈 20 mg/kg을 정맥내 주입하여 래빗을 마취시키고, 경동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 그리고 나서, 상기 항-혈청을 삼출시키고 분리하였다.

<322> 15 마리의 건강한 SD 래트로부터 전체 혈액을 채취하였다. 적혈구 세포를 분리하고 일반 살린으로 3 번 세척하였다. 상기 세척된 적혈구 세포를 래빗 항-혈청 250 ml와 혼합하고 4 °C에서 하룻밤동안 배양하였다. 배양 후, 원심분리하여 혈액 세포를 제거하고 상청액을 56 °C에서 30 분동안 추가적으로 불활성화시켰다. 원심분리하여 모든 침전물을 제거한 후, 미정제 IgG를 분리해내고, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 세 번 (50%, 33%, 그리고 나서 33%)^[5] 침전시킴으로써 상청액으로부터 부분적으로 정제하였다. 상기 미정제 IgG를 이중 증류수 125 ml에 재용해시키고 암모늄 살레이트에 완전히 투석시켰다. 상기 항-래트-신장-피질 항체 역가를 이중확산법에 의하여 측정하였다^[2].

<323> 2. 래트 사구체신염 유도^[5]: 준비자극 용액(priming solution, 완전 프로인드 아쥬반트와 약 4 mg의 비-특이적 래빗 IgG 함유)을 건강한 SD 래트에 복막내 주입하여 유도 전 5 일동안 래트를 준비자극 하였다. 그리고 나서, 일반 살린을 투여받은 정상 건강 대조군을 제외한 모든 그룹이 방법 1 섹션에 기재된 바와 같이 제조된 래빗 항-래트-신장-피질 IgG 1 ml를 복막내 주입함으로써 유도되었다.

<324> 3. 분류 및 투여: 수컷 SD 래트를 정상 건강 대조군(정상), 신장염 플라시보 처리 대조군(플라시보), 신장염 펩타이드 처리, 및 신장염 하이드로코르티손 처리 대조군(하이드로코르티손)으로 하나의 군 당 12 마리씩 무작위로 분류하였다. 유도가 일어난 날에 처리를 개시하였다. 펩타이드 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, 하이드로코르티손 3.3 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, 및 일반 살린을 플라시보로서 사용하였으며, 모든 투여는 복막내로 하루에 한 번씩 3 주일동안 지속하였다.

<325> 4. 모니터링 파라미터^[4]:

<326> (a) 소변 단백질 농도: 각각의 래트를 하나의 사육장에서 개별적으로 사육하였다. 충분한 음료수를 제공하였다. 일주일에 한번씩 회당 24시간 동안 소변을 채취하였다. 소변의 단백질 함량을 쿠마지 블루법(Coomassie blue method)에 의하여 측정하였다.

<327> (b) 혈청 크레아티닌 농도: 처리 3주 후에 혈액을 채취하고, 혈청 크레아티닌 농도를 측정하였다. 크레아티닌 키트를 Shanghai Rongsheng Biological Technique Company에서 제공받았다.

<328> (c) 비장 중량 지수: 비장 중량 지수를 다음과 같은 공식에 의하여 측정하였다:

<329> 비장 중량 지수 = 평균 비장 중량 \div 평균 체중

<330> (d) 신장의 병리학적 혈관경 검사: 병리학적 검사를 위하여 가장 무거운 신장 6 개를 선택하였다.

<331> 통계학적 분석

<332> 그룹간 비교를 위하여 t-테스트를 사용하였고, $p<0.05$ 에서 세트를 컷 오프하였다. 모든 그룹에 있어서, 가장 낮은 소변 프로테인 농도를 갖는 두 마리의 래트를 통계 분석에서 제외하였다.

<333>

결과

<334>

1. 소변 단백질 농도에 대한 웨타이드 처리의 효과

표 III.1

뇨 단백질 농도에 대한 웨타이드 처리의 효과 (유니트:mg)

그룹	n	Week 1	Week 2	Week 3
CMS014	10	5.5±4.0*	6.3±6.8*	2.8±1.9*
CMS018	10	7.0±3.7*	5.5±7.9*	3.3±3.4*
CMS030	10	5.4±3.4*	9.5±16.2	2.4±1.5*
CMS036	10	7.9±5.8*	5.0±7.1*	1.3±0.9*
하이드로코르티손	10	3.1±2.0*	7.5±7.7	7.6±7.1*
플라시보	10	22.9±22	17.2±14.5	20.2±29.0
정상	9	1.7±1.3*	2.3±1.1*	0.4±0.2*

<335>

플라시보와 비교, * p<0.05

<336>

하루에 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 씩 투여된 웨타이드 CMS014, CMS018, CMS030 및 CMS036이 플라시보 처리 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($p<0.05$), 마수지 신장염 래트의 소변 단백질 농도를 낮출 수 있는 것으로 나타났다. 또한, CMS014, CMS030, CMS036 및 하이드로코르티손 그룹의 성장 속도가 정상 그룹의 성장 속도보다 느린 것으로 나타났다. 하이드로코르티손 그룹의 성장속도는 첫번째 주 이후에 심각한 과민증을 피하기 위하여 투여량을 반으로 줄여야 할 정도로 감소되었다.

<337>

2. 혈청 크레아티닌 농도에 대한 웨타이드 처리의 효과

표 III.2

혈청 크레아티닌 농도에 대한 웨타이드의 영향

그룹	n	혈청 크레아티닌 농도($\mu\text{mol}/\text{L}$)
CMS014	10	159±1
CMS018	10	67±1*
CMS030	10	93±1*
CMS036	10	80±1*
플라시보	10	265±212
하이드로코르티손	10	239±107
정상	9	80±1*

<338>

플라시보 처리받은 신장염 래트(플라시보)와 비교, *p<0.05

<339>

플라시보 처리받은 마수지 신장염 래트의 혈청 크레아티닌 농도는 정상 대조군보다 매우 높았으며, 이는 신장염 래트의 신장 기능이 비정상적임을 보여주는 것이다. 하루에 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 씩 투여된 웨타이드 CMS014, CMS018, CMS030 및 CMS036이 플라시보 처리된 신장염 래트와 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 혈청 크레이티닌의 농도를 낮출 수 있는 것으로 나타났다.

<340>

3. 비장 지수에 대한 웨타이드의 효과

표 III.3비장 지수 ($\times 10^{-3}$)에 대한 웨타이드의 효과

그룹	n	비장 지수
CMS014	10	3.6±1.3*
CMS018	10	3.3±0.8*
CMS030	10	3.0±0.5*
CMS036	10	3.4±0.8*
플라시보	10	4.8±1.1
하이드로코르티손	10	4.5±1.4
정상	9	2.4±0.1*

<341>

플라시보 처리받은 신장염 래트(플라시보)와 비교, *p<0.05

<342>

모든 유도된 래트의 비장은 정상 래트와 비교하여 비대되어 있었으며, 이는 신장염의 유도가 면역반응과 관련있음을 보여주는 것이다. 하루에 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 씩 투여된 웨타이드 CMS014, CMS018, CMS030 및 CMS036가 플라시보

처리된 신장염 래트 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며($p<0.05$), 비장 지수를 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이는 웨타이드가 면역억제 메카니즘을 통하여 신장염에 대하여 치료 효과를 발휘할 수 있다는 것을 뒷받침한다.

<346> 4. 신장 병리학적 현미경 검사에 대한 웨타이드의 효과

<347> 정상 래트와 비교하여, 플라시보 처리를 받은 신장염 래트 (플라시보 그룹)가 사구체 캡슐 내 섬유 조직 형성, 사구체 상피 과형성, 반월형 구조(crescent) 형성, 사구체 모세혈관 비대 및 울혈(congestion), 근위 세관 상피 부종, 및 원위 세관과 수집관(collecting duct)에서의 원주(cast) 형성의 징후를 나타내었다. 이러한 병리학적 변화가 신장염이 성공적으로 유도되었음을 확인시켜 주었다. CMS014 그룹에 있어서, 사구체 캡슐 내 섬유 조직 형성 및 사구체 상피 과형성의 징후를 나타낸 래트는 단지 한 마리 뿐이었다. 동일한 래트 및 동일한 그룹 내의 다른 래트에서의 다른 파라미터는 정상 래트와 근본적으로 동일한 신장 조직 구도를 갖는다. CMS014, CMS018, CMS030 및 CMS036 그룹에 있어서, 모든 래트의 모든 병리학적 파라미터는 정상이었다.

<348> 결론

<349> 하루에 한 번, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 씩, 복막내 투여된 웨타이드 CMS014, CMS018, CMS030 및 CMS036이 마수지 신장염 래트 실험 모델에 대하여 치료 효과를 갖는 것으로 결론지어졌다. 처리되는 래트의 신장 조직 구도, 크레아티닌 배설, 및 단백뇨(proteininurea)가 이들 웨타이드에 의하여, 플라시보 처리를 받은 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며, 치료되었다. 이들 웨타이드는 비장 중량 지수에 대한 영향으로 나타나는 바와 같이 면역학적 메카니즘을 통하여 작용할 수 있지만, 다른 메카니즘을 통한 작용 가능성을 배제하는 것은 아니다.

<350> 결론

<351> 웨타이드 CMS014, CMS018, CMS030 및 CMS036은 일부분으로서 또는 단독으로 인간의 신장염을 치료하는데 유용할 것이다. 예컨대, 상기 웨타이드를 신장염 환자의 배설 기능의 회복 및 단백뇨의 치료에 사용할 수 있다. 이들 웨타이드를 단독, 두 가지 이상의 웨타이드의 조합, 또는 다른 의약품 또는 식품 보충물과의 조합으로 신장염 치료를 위한 전 과정으로서 사용할 수 있다.

표 III.4

<352> 신장염에 대하여 효과적인 웨타이드

CMS 코드	서열번호
CMS014	7
CMS018	10
CMS030	21
CMS036	26

<353> 참조문헌

<354> 1. SDA (State Drug Administration, 중국). The guideline of preclinical researches of new drugs. 1994, 제 1판, 96면

<355> 2. Xu Shuyun, 등. The methodology of pharmacological experiment, the

<356> People's Sanitation Publishing Company, Beijing, 제 2판, 1991:1071.

<357> 3. Chen Qi, 등. The methodology of pharmacological researches of traditional Chinese medicine, the People's Sanitation Publishing Company, Beijing, 제 1판, 1993:390.

<358> 4. Du Guanhua. The guideline for pharmacological experiment -- the discovery and pharmacological evaluation of new drugs, Science Publishing Company, Beijing, 제 1판, 2001:598.

<359> 5. Wang Shuxian. Nephrology the People's Sanitation Publishing Company, Beijing, 제 1판, 1987:244.

IV. 암에 대한 CMS 웨타이드의 효과

<360> 이들 웨타이드가 암에 대하여 적절한 치료적 효과를 갖는지를 밝히기 위하여, 본 연구에 있어서 다양한 표준 동물 암 모델을 사용하여 상기 웨타이드의 병에 걸린 동물에 대한 생물학적 효과를 시험하였다.

<362> 재료

<363> 1. 실험 동물

<364> BALB/c 마우스, C₅₇BL/6 마우스, 및 DBA/2 마우스, 중량 18 내지 22 g, 중국의 China Medical Science Institute에서 입수.

<365> 2. 세포주

<366> 마우스 육종 S₁₈₀ 세포, B₁₆ 세포, and L₁₂₁₀ 세포, Cancer Research Department, China Medical Science Institute에서 입수.

<367> YAC-1 세포, Tianjin Medical University의 Yao Zhi 교수로부터 제공받음.

<368> 3. 주된 약물 및 시약

<369> 본 연구에 사용된 펩타이드는 American Peptide Company, Inc., (USA)에서 주문 제작하였다.

<370> 소의 태아 혈청, RPMI-1640 세포 배양액, Gibco (USA)에서 입수.

<371> MTT, ConA, Sigma (USA)에서 입수.

<372> 재조합 마우스 인터페론-γ (rmIFN-γ), Beijing Biotech Inc. (PR China)로부터 입수.

<373> 재조합 인간 인터루킨-2 (rhIL-2), Shanghai Huixin Biotech Inc. (PR China)로부터 입수.

<374> 림프구 분리 용액, 중국의 National Institute of Medical Science의 혈액학적 질병의 연구 기관으로부터 입수.

<375> 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 중국 상하이 12th 제약 공장에서 입수.

<376> 방법

<377> 1. 시험 물질의 투여

<378> 하루에 한번 복막내 투여한다. 시클로포스파미드 그룹을 제외한 모든 그룹이 암세포 이식 5 일 전에 치료를 시작하였다. 시클로포스파미드 그룹은 암세포 이식 다음날에 치료하였다. 다른 기재가 없는 한, 시험 물질을 사용하는 모든 치료를 30일 동안 또는 동물이 죽을 때까지 지속하였다.

<379> 2. BALB/c 마우스에서의 이식된 S₁₈₀ 세포의 성장을 및 숙주의 면역학적 기능에 대한 펩타이드의 효과

<380> BALB/c 마우스를 펩타이드 그룹, 시클로포스파미드 그룹, rmIFN-γ 그룹, rhIL-2 그룹, 및 살린 그룹으로 각 그룹 당 10 마리씩 무작위로 나누었다.

<381> 보존 S₁₈₀ 육종 세포를 10% 소의 태아 혈청이 보충된 DMEM/F12 배지에서 37 °C, 5% CO₂ 하에서, 72 시간동안 배양한 후, 실온에서 Hank's 용액으로 3 내지 4 차례 세척하였다. Hank's 용액을 사용하여 리터당 1 - 2 × 10⁹으로 세포 농도를 조절하였다. 10 내지 12일 동안 견드랑이를 통하여 몇몇 BALB/c 마우스에 세포 혼탁액 0.2 ml를 이식하였다. 마우스를 경추 탈구시켜 희생시켰다. 왕성하게 성장하고 비-분쇄된 종양 덩어리를 적출하고 살균 살린으로 깨끗이 세척하였다. 상기 조직은 살린에서 분산되고 살린 4 ml에 대하여 조직 1 g의 비율로 균질 세포 혼탁액이 되었다. 세포 혼탁액 0.2 ml를 견드랑이를 통하여 주입하여 육종을 포함하는 마우스 모델을 제조하였다[1]. 시험 물질의 투여 및 치료는 방법 1 섹션에 기재한 바와 같이 시작하였다.<382> 2.1. S₁₈₀ 육종[2,3]이 이식된 마우스에서의 단핵 쇠세포의 죽세포 기능에 대한 펩타이드의 효과를 마지막 시험 물질 투여 후 2 일째 되는 날에 인디안 잉크(일반 살린으로 1:5 희석)를 체중 10 g당 0.1 ml의 양으로 꼬리 정맥을 통하여 마우스에 주입하여 분석하였다. 주입하고 1 분 및 5 분 후에, 혈관 첨가된 튜빙을 이용하여 안각으로부터 20 μl의 혈액을 채취하였다. 상기 혈액을 0.1% w/v Na₂CO₃ 2 ml와 혼합한 후, OD_{680nm}를 측정하였다. 개략적인 클리어 지수 K를 다음의 식에 의하여 계산하였다:<383> K = (lg A₁ - lg A₂) ÷ (t₂-t₁)

<384> 키워드:

<385> A1: 1 분째의 OD_{680nm}

<386> A2: 5 분째의 OD_{680nm}

<387> t2: 5 분

<388> t2: 1 분

<389> 식세포 작용 지수 실험 후, 마우스를 경추 탈구시켜 희생시켰다. 간, 비장 및 암조직을 절개하고 블라팅 건조하고 무게를 측정하였다.

<390> 식세포 작용 지수 α 를 다음과 같이 계산하였다:

$$\alpha = (\sqrt[3]{K}) \times (W \div W_{LS})$$

<392> 키워드:

<393> W: 체중

<394> W_{LS}: 간과 비장의 무게

<395> 2.2. 종양 증식 억제 지수를 다음의 식에 따라 계산하였다:

<396> 종양 증식 억제 지수 = (대조군의 평균 종양 무게 - 처리군의 평균 종양 무게) \div 대조군의 평균 종양 무게

<397> 3. 복수형(ascitic fluid type) 간암 H₂₂가 이식된 BALB/c 마우스의 생존에 대한 웨타이드의 효과

<398> BALB/c 마우스를 웨타이드 그룹, 시클로포스파미드 그룹, rmIFN-γ 그룹, rhIL-2 그룹 및 살린 그룹으로, 각 그룹 당 20 마리씩 무작위로 나누었다.

<399> 보존 H₂₂ 세포를 10% 소 태아 혈청이 보충된 DMEM/F12 배지에서, 37°C/5% CO₂하에서 72 시간동안 배양한 후, 실온에서 Hank's 용액으로 3 내지 4 회 세척하였다. Hank's 용액을 사용하여 세포 농도를 $1 - 2 \times 10^9/L$ 로 조절하였다. 세포 혼탁액 0.2 ml를 6 내지 8일 동안 몇 마리의 BALB/c 마우스 복강에 이식하였다[1]. 상기 마우스를 경추 탈골시켜 희생시켰다. 마우스의 복수를 무균적으로 수집하고 Hank's 용액으로 세포 농도를 $1 \times 10^6/ml$ 로 조절하였다. 세포 혼탁액 0.2 ml를 건강한 마우스 복강에 이식시켜 복수형 간암을 위한 H22 캐링 마우스 모델을 만들었다. 방법 1 섹션에 기재된 바와 같이 개시된 바와 같이 시험 물질의 투여를 개시하였다. 마우스의 생존 데이터를 기록하였다. 마우스가 실험보다 오래 생존한 경우, 생존일을 실험 지속 기간으로 기록하였다. SPSS 소프트웨어의 생존 옵션의 Kaplan-meier 방법을 사용하여 평균 생존일을 구하였다. 다음의 식에 의하여 생존 지수를 계산하였다:

<400> 생존 지수 = (처리군의 평균 생존일 - 대조군의 평균 생존일) \div 대조군의 평균 생존일 $\times 100\%$

<401> 4. 복수형 간암 H₂₂가 이식된 BALB/c 마우스의 세포 면역에 대한 웨타이드의 효과

<402> 4.1. 비장 세포 혼탁액의 제조^[1,4]

<403> 건강한 BALB/c 마우스를 웨타이드 그룹, rmIFN-γ 그룹, rhIL-2 그룹 및 살린 그룹으로 각 그룹 당 15 마리씩 무작위로 나누고, 방법 3 섹션에 기재한 바와 같이 H₂₂ 캐링 마우스 모델을 제조하였다. 암 세포를 이식한 후, 시험 물질을 15일 동안 투여하고, 마우스를 경추 탈구시켜 희생시켰다. 비장을 무균적으로 적출하고, 주사바늘을 이용하여 D-Hank's 용액내에 수동으로 분산시켰다. 상기 분산된 세포 혼탁액을 100-케이지 150 μm 지름 스테인레스 스틸 체를 통하여 추가적으로 걸렀다. 200 g에서 10 분 동안 원심분리 한 후, 상청액을 제거하였다. 세포 웨렛을 트리스-NH₄Cl 버퍼 10 부피에 재-현탁시킨 후, 실온에서 10 분동안 방치하였다. 150 g에서 10분 동안 원심분리하여 혼탁된 세포를 수집하였다. 상기 세포를 상기와 같은 조건으로 원심분리하여 재현탁 및 수집함으로써, 찬 D-Hank's 용액을 사용하여 2 내지 4 회 세척하였다. 그리고 나서, 상기 세척된 세포를 10% 소 태아 혈청을 함유하는 RPMI-1640 배양액을 사용하여 원하는 세포 농도로 희석하였다.

<404> 4.2. 복수형 간암 H₂₂가 이식된 BALB/c 마우스의 T 림프구 형질전환에 대한 웨타이드의 효과^[1,4]

<405> $1 \times 10^6/\text{ml}$ 농도의 비장 세포를 96 웰 세포 배양 플레이트, 마우스 당 분석 샘플 및 대조 샘플 각각의 3 병렬 웰, $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 에 놓았다. 분석 웰에 RPMI-1640 내의 $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ ConA $100 \mu\text{l}/\text{ml}$ 를 첨가하고, $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 플레이인 RPMI-1640을 대조군으로 사용하였다. 세포를 37°C , 5% CO_2 에서 66 시간동안 배양하였다. 그리고 나서, 상기 세포를 150 g에서 10 분동안 원심분리하여 펠렛화하였다. 사이토카인 IL-2 및 IFN 측정을 위하여 상청액을 수집하여 -20°C 에 보관하였다.

<406> RPMI-1640 내 $50 \mu\text{l}/\text{웰}$ MTT $1 \text{ mg}/\text{ml}$ 을 세포 펠렛에 첨가하고, 상기 세포를 2 분동안 흔들어 재현탁시켰다. 4 시간 동안 계속하여 배양하였다. 150 g에서 10 분동안 원심분리 후 상청액을 제거하였다. $120 \mu\text{l}$ 의 40 nM HCl-2-프로판올을 세포 펠렛에 첨가하고 3 분간 흔들었다. ELISA 리더를 사용하여 630 nm 에서 기준으로 하여 각각의 웰의 $\text{OD}_{570\text{nm}}$ 를 구하였다.

<407> 각각의 마우스로 세개의 분석 웰 및 세개의 대조 웰을 만들었다. 우선, 세 개의 병행 웰의 평균 OD를 유도한 후, 분석 웰의 값을 대조 웰의 값으로 나누어서, 각각의 마우스의 자극 지수 (SI)를 구하였다.

<408> 4.3. 복수형 간암 H_{22} 가 이식된 마우스의 NK 세포 활성에 대한 웹타이드의 효과^[5,6]

<409> 상기 섹션 4.1에 기재된 바와 같이, 마우스 비장 세포를 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 로 준비하였다. 표적 세포 YAC-1을 대수기까지 키우고 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 로 조절하였다. 96 웰 세포 배양 플레이트를 사용하여, 비장 세포만을 포함하는 대조 웰에 마우스 비장 세포 $100 \mu\text{l}$ 과 배양액 $100 \mu\text{l}$ 을 첨가하였고; 표적 세포만을 포함하는 대조 웰에 표적 세포 $100 \mu\text{l}$ 과 배양액 $100 \mu\text{l}$ 을 첨가하였고; NK 활성 분석 웰에 마우스 비장 세포 $100 \mu\text{l}$ 과 표적 세포 $100 \mu\text{l}$ 을 첨가하였다. 상기 세 개의 병행 세트를 마우스마다 준비하였다. 그리고 나서, 96 웰 세포 배양 플레이트를 37°C , 5% CO_2 에서 4 시간동안 배양하였다.

<410> 시료를 150 g에서 10 분동안 원심분리하여 세포를 수집하였다. 상청액을 제거하고 $50 \mu\text{l}/\text{웰}$ MTT $1 \text{ mg}/\text{ml}$ 을 첨가하였다. 그리고 나서, 상기 반응 혼합물을 2 분동안 2 분동안 흔들고, 37°C , 5% CO_2 에서 4 시간동안 배양하였다. 150 g에서 10 분간 원심분리 한 후, 상청액을 버렸다. 540 mM HCl-2-프로판을 $120 \mu\text{l}$ 을 첨가하고 3 분간 흔들었다. ELISA 리더를 사용하여 630nm 을 기준으로 각 웰의 $\text{OD}_{570\text{nm}}$ 를 구하였다.

<411> 각 마우스는 9 개의 웰을 갖는다: 비장 세포만을 포함하는 3 개의 대조 웰, 표적세포만을 포함하는 3 개의 대조 웰 및 비장세포와 표적세포를 모두 포함하는 3 개의 분석 웰. 우선, 각 조합의 3 개의 병행 웰의 평균 OD를 유도한 후, 이 평균 OD를 다음의 식에 대입하여 각각의 마우스의 NK 세포 활성 지수를 구하였다:

<412> NK 세포 활성 지수 = $[1 - (\text{비장 세포 및 표적 세포 웰의 평균 OD} - \text{비장 세포만을 포함하는 웰의 평균 OD}) \div (\text{표적 세포만을 포함하는 웰의 평균 OD})] \times 100\%$

<413> 5. L_{1210} 백혈병이 이식된 DBA/2 마우스의 생존에 대한 웹타이드의 효과

<414> 6 내지 8 주령의 DBA/2 마우스를 웹타이드 그룹, 시클로포스파미드 그룹, rmIFN- γ 그룹, rhIL-2 그룹, 및 살린 그룹으로 각 그룹당 20 마리씩 무작위로 나누었다.

<415> 보존 L_{1210} 세포를 10% 소 태아 혈청이 보충된 DMEM/F12 배지에서, 37°C , 5% CO_2 하에서 72 시간동안 배양한 후, Hank's 용액으로 3 내지 4 회 세척하고 $1 \times 10^5/\text{세포}/\ell$ 로 조정하였다. 상기 세포 혼탁액 0.1 ml 를 6 내지 8 일 동안 몇 몇 건강한 DBA 마우스의 복강에 이식하였다. 그리고 나서, 상기 마우스를 경추 탈수시켜 희생시키고 이들의 복수를 무균적으로 수집하였다. 수집된 복수의 세포 농도를 Hank's 용액을 사용하여 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 로 조절하였다. 상기 세포 혼탁액 0.1 ml 를 각각의 실험 동물에 이식하고 마우스의 생존 데이터를 기록하였다. 방법 1 섹션에 기재된 바와 같이 시험 동물에서의 처리를 시작하였다. SPSS 소프트웨어의 생존 옵션에서의 Kaplan-meier 방법에 의하여 평균 생존일을 구하였다. 마우스가 시험기간 보다 오래 생존하는 경우, 실험 지속기간을 생존일로 기록하였다. 다음의 식에 따라서 생존 지수를 계산하였다:

<416> 생존 지수 = $(\text{처리군의 평균 생존일} - \text{대조군의 평균 생존일}) \div \text{대조군의 평균 생존일}$

<417> 6. B16 흑색종이 이식된 $\text{C}_{57}\text{BL}/6$ 마우스의 체액성 면역 및 상기 접종된 흑색종 세포의 전이 포텐셜에 대한 웹타이드의 효과

<418> 체중 18 내지 22 g인 6 내지 8 주령의 C₅₇BL/6 마우스를 웨타이드 그룹, 시클로포스파미드 그룹, rmIFN-γ 그룹, rhIL-2 그룹, 및 살린 그룹으로 각 그룹당 20 마리씩 무작위로 나누었다.

<419> 보존 B₆ 마우스 흑색종 세포를 10% 소 태아 혈청이 보충된 DMEM/F12 배지에서, 37 °C/5% CO₂ 하에서 72 시간동안 배양한 후, Hank's 용액으로 3 내지 4 회 세척하였다. Hank's 용액을 사용하여 세포 농도를 1×10^5 세포/ℓ로 조정하고 상기 세포 혼탁액 0.1 ml를 시험 마우스의 꼬리 정맥에 주입하여 B₁₆ 흑색종을 갖는 동물 모델을 만들었다^[7,8]. 방법 1 섹션에 기재된 바와 같이 시험 물질로의 처리를 시작하였다.

<420> 6.1. 이식된 B₁₆ 흑색종을 갖는 C₅₇BL/6 마우스의 체액성 면역에 대한 웨타이드의 효과^[9]

<421> 경정맥으로부터 혈액을 수집하여 양 적혈구 세포 (SRBC)를 준비하고 글래스 비드를 사용하여 멸균 플라스크에 넣었다. 플라스크를 3 분간 흔들고 나서, 상기 혈액을 올시버 용액 (Alsever solution; 글루코오스 205 g, NaCl 4 g, Na 레문에이드 0.8 g, 중류수를 사용하여 100 ml로 조절)과 혼합하고 4 °C에서 보관하였다. 사용 직전에, 시료를 130 g에서 5 분간 원심분리하여 SRBC를 수집하였다. 상기 세포를 일반 살린에서 재현탁하고 원심분리하여 2 번 세척하였다. 그리고 나서, 180 g에서 10 분간 원심분리하여 세포 펠렛을 수집하고 살린에서 재-현탁하여 2% (v/v)의 최종 작업 SRBC 혼탁액을 제조하였다.

<422> 신선한 기니피그(Cavy) 혈청 1 부피를 1 부피의 운심분리 폐킹된 SRBC에 첨가하여 보체를 제조한 후, 4 °C에서 30 분간 천천히 흔들어 주었다. 200 g에서 10 분간 원심분리하여 SRBC를 제거하였다. 일반 살린 10 부피를 첨가하여 작업 보체 용액을 얻었다.

<423> 시험 동물에 대하여, 시험 물질 처리 27 일 째에, 각각의 동물에 작업 SRBC 세포 혼탁액 0.2 ml를 주입하여 항체를 형성하였다. 마지막으로 시험 물질을 투여한 다음날, 안각으로부터 혈액을 채취하고 혈청 삼출을 위하여 1 시간 동안 실온에 놓아 두었다. 200 g에서 10 분간 원시분리 한 후, 일반 살린으로 채취한 혈청을 500 배 희석하였다.

<424> 각각의 마우스의 희석된 마우스 혈청 1 ml에 SRBC 혼탁액 0.5 ml를 첨가하였다. 얼음 냉각시켰다. 그리고 나서, 작업 보체 용액 1 ml를 첨가하고 37 °C 수조에서 10 분간 배양하였다. 그리고 나서, 시료를 200 g에서 10 분간 원심분리하여 상청액을 취하였다.

<425> 이 상청액 1 ml에 Drabkin 용액 3 ml를 첨가하고 실온에서 10 분간 두었다. OD_{540nm}를 구하였다:

<426> SRBC 혼탁액 0.25 ml를 Drabkin 용액과 혼합하여 4 ml로 만들고 OD_{540nm}를 구하기 전 10 분간 실온에 놓아두어 OD기준 OD_{540nm}를 구하였다.

<427> 용혈 지수 = (시험 시료의 OD_{540nm} ÷ 기준 OD_{540nm}) × 500

<428> 6.2.

<429> 체액성 면역 연구 후, 마우스를 경추 탈구시켜 희생시켰다. 상기 동물의 부검을 수행하였다. 병리학적 변화가 기록되었고 흑색종 폐 전이 병소의 수를 측정하였다.

<430> 결과

<431> 1. S₁₈₀ 육종 이식된 BALB/c 마우스의 세포 식세포 작용에 대한 웨타이드의 효과 (방법 (2.1)

표 IV.1S₁₈₀ 육종 이식된 BALB/c 마우스의 식세포 작용 지수에 대한
펩타이드의 효과

그룹	투여량	N	식세포 작용지수
CMS001	50 μ g/kg	20	6.24 \pm 0.33* [^]
CMS001	5 μ g/kg	19	6.67 \pm 0.43* [^]
CMS034	5 μ g/kg	19	6.20 \pm 0.44* [^]
CMS034	0.5 μ g/kg	20	6.35 \pm 1.02*
IL-2	3 \times 10 ⁵ IU/kg	19	6.96 \pm 1.37*
IFN- γ	3 \times 10 ⁵ IU/kg	17	5.45 \pm 0.71
플라시보	20mg/kg	19	5.92 \pm 2.47
하이드로코르티손			
정상	0.5ml	19	5.38 \pm 0.85

<432>

*: 살린과 비교, P<0.05

<434>

^: rmIFN- γ 과 비교, P<0.05

<435>

50 μ g/kg/day와 5 μ g/kg/day의 CMS001, 및 5 μ g/kg/day와 0.5 μ g/kg/day의 CMS034가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며, 식세포 작용 지수를 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<436>

2. BALB/c 마우스에서의 이식된 S₁₈₀ 육종의 증식에 대한 펩타이드의 효과 (방법 2.2)**표 IV.2**이식된 S₁₈₀종양 증식에 대한 펩타이드의 효과

그룹	투여량	N	종양 무게(g)	종양 억제 지수 (%)
CMS010	500 μ g/kg	20	0.67 \pm 0.35*	48.4
CMS034	0.5 μ g/kg	20	0.83 \pm 0.48*	35.9
CMS035	5 μ g/kg	20	0.71 \pm 0.37*	44.6
IL-2	3 \times 10 ⁵ IU/kg	20	0.69 \pm 0.37*	46.2
IFN- γ	3 \times 10 ⁵ IU/kg	18	0.96 \pm 0.45	25.3
시클로- 포스파미드	20mg/kg	20	0.68 \pm 0.32*	47.3
살린	0.5ml	20	1.29 \pm 0.50	

<437>

*: 살린 그룹과 비교, P<0.05

<439>

500 μ g/kg/day CMS010, 0.5 μ g/kg/day CMS034 및 5 μ g/kg/day CMS035가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), 이식된 S₁₈₀ 육종의 증식을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<440>

3. 복수형 간암 H₂₂가 이식된 BALB/c 마우스의 생존에 대한 펩타이드의 효과 (방법 3)

표 IV.3

복수형 간암 H22가 이식된 BALB/c 마우스의 생존지수에 대한 웹타이드의 효과

그룹	투여량	N	종양 무게(g)	생존 지수 (%)
CMS008	5 μ g/kg	20	50.7 \pm 20.9*&	67.8
CMS011	5 μ g/kg	20	36.4 \pm 22.2*&	60.2
CMS024	50 μ g/kg	20	36.3 \pm 12.7*&§	38.4
CMS024	5 μ g/kg	19	40.6 \pm 14.6*&§	54.8
CMS024	0.5 μ g/kg	19	46.4 \pm 14.8*^&§	76.9
CMS032	0.5 μ g/kg	20	42.8 \pm 12.2*^&§	63.3
rhIL-2	3 \times 10 ⁵ IU/kg	18	13.6 \pm 0.5	
rmIFN- γ	3 \times 10 ⁵ IU/kg	20	27.8 \pm 7.5	6.1
시클로- 포스파미드	20mg/kg	20	24.7 \pm 10.2	
살린	0.5ml	19	26.2 \pm 6.8	

<441> *: 살린과 비교, P<0.05

<442> ^: rmIFN- γ 과의 비교, P<0.05

<443> &: rhIL-2와 비교, P<0.05

<444> §: 시클로포스파미드과 비교, P<0.05

<445> 5 μ g/kg/day CMS008, 5 μ g/kg/day CMS011, 50 μ g/kg/day CMS024, 0.5 μ g/kg/day CMS024, 및 0.5 μ g/kg/day CMS032가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며(P<0.05), 복수형 간암 H₂₂가 이식된 BALB/c 마우스의 생존을 연장시킬 수 있는 것으로 나타났다. 또한, 0.5 μ g/kg/day CMS024 그룹에서 30% (n=6) 이상의 마우스가 90일 (실험 종결 후 2 개월) 더 오래 생존한 것이 관찰되었다. 마우스의 부검 결과 종양 확립 증후가 나타나지 않았다. 따라서, 0.5 μ g/kg/day CMS024는 이식된 H₂₂의 확립을 방해하거나 확립된 암의 완전한 치료를 유도하여 이식된 H₂₂의 증식을 방해할 수 있다.<446> 4. 복수형 간암 H₂₂가 이식된 BALB/c 마우스에서의 T 림프구 형질전환에 대한 웹타이드의 효과 (방법 4.2)

표 IV.4

T 림프구 형질전환에 대한 펩타이드의 효과

그룹	투여량	N	자극 지수
CMS010	500 μ g/kg	20	1.45 \pm 0.21* ^{\$}
CMS019	0.5 μ g/kg	19	1.50 \pm 0.19* ^{\$}
CMS024	0.5 μ g/kg	19	1.46 \pm 0.19* ^{\$}
CMS024	5 μ g/kg	20	1.45 \pm 0.21* ^{\$}
CMS034	0.5 μ g/kg	20	1.37 \pm 0.10* ^{\$}
CMS035	0.5 μ g/kg	20	1.40 \pm 0.13* ^{\$}
CMS035	5 μ g/kg	20	1.46 \pm 0.16* ^{\$}
rhIL-2	3 \times 10 ⁵ IU/kg	19	1.46 \pm 0.21*
rmIFN- γ	3 \times 10 ⁵ IU/kg	18	1.27 \pm 0.14
시클로-포스파미드	20mg/kg	19	1.01 \pm 0.23*
살린	0.5ml	20	1.25 \pm 0.07

<448>

*: 살린과 비교, P<0.05

<450>

\$: 시클로포스파미드와 비교, P<0.05

<451>

500 μ g/kg/day CMS010, 0.5 μ g/kg/day CMS019, 0.5 μ g/kg/day 및 5 μ g/kg/day의 CMS024, 및 0.5 μ g/kg/day 및 5 μ g/kg/day의 CMS035가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 (P<0.05), T-림프구의 자극 지수를 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<452>

5. 복수형 간암 H₂₂이 이식된 BALB/c 마우스에서의 NK 세포 활성에 대한 펩타이드의 효과 (방법 4.3)

표 IV.5

NK 세포 세포독성 활성 지수에 대한 펩타이드의 효과

그룹	투여량	N	NK 활성 지수 (%)
CMS003	500 μ g/kg	17	37.9 \pm 14.5* ^{^\$}
CMS014	0.5 μ g/kg	17	40.7 \pm 19.7* ^{\$}
CMS024	0.5 μ g/kg	18	39.3 \pm 18.7* ^{\$}
CMS024	5 μ g/kg	20	34.9 \pm 12.1* ^{^\$}
CMS024	50 μ g/kg	20	43.6 \pm 13.9* ^{^\$&}
CMS032	5 μ g/kg	20	52.6 \pm 12.5* ^{^\$&}
CMS032	50 μ g/kg	19	41.0 \pm 18.7* ^{^\$&}
CMS034	50 μ g/kg	20	57.3 \pm 17.9* ^{^\$&}
IL-2	3 \times 10 ⁵ IU/kg	19	26.0 \pm 9.0
IFN- γ	3 \times 10 ⁵ IU/kg	18	20.9 \pm 3.3
시클로- 포스파미드	20mg/kg	19	16.5 \pm 7.2*
살린	0.5ml	20	24.0 \pm 8.2

<453>

*: 살린과 비교, P<0.05

<454>

^: rmIFN- γ 과의 비교, P<0.05

<455>

&: rhIL-2와 비교, P<0.05

<457> \$: 시클로포스파미딘과 비교, P<0.05

<458> 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CMS003, 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CMS014, 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 및 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 의 CMS024, 및 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CMS034가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 (P<0.05), 시험 동물 모델에서의 NK 세포 세포독성 활성을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<459> 6. L_{1210} 백혈병 이식된 DBA/2 마우스의 생존에 대한 웨타이드의 효과 (방법 5)

표 IV.6

실험 동물의 생존 지수에 대한 웨타이드의 효과

그룹	투여량	N	생존일	생존 지수 (%)
CMS019	0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20	21.1 \pm 5.8*	26.8
CMS035	0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20	29.3 \pm 15.4*	76.1
IL-2	3×10^5 IU/kg	20	32.0 \pm 13.7*	92.3
IFN- γ	3×10^5 IU/kg	20	15.6 \pm 2.2	
시클로- 포스파미드	20mg/kg	20	24.0 \pm 5.3*	44.2
살린	0.5ml	21	16.6 \pm 5.6	

<460>

*: 살린 그룹과 비교, P<0.05

<462> 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CMS019 및 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CMS035가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 (P<0.05), L_{1210} 백혈병 이식된 DBA/2 마우스의 생존을 연장시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<463>

7. B_{16} 흑색종 이식된 C57BL/6 마우스의 체액성 면역에 대한 웨타이드의 효과 (방법 6.1)

표 IV.7

B_{16} 흑색종이 이식된 C57BL/6 마우스의 용혈 지수에 대한 웨타이드의 효과

그룹	투여량	N	용혈 지수
CMS001	0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20	51.0 \pm 16.2* ^{\$}
CMS001	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20	41.3 \pm 17.7* ^{\$}
CMS001	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	19	45.0 \pm 31.9* ^{\$}
CMS001	500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20	36.0 \pm 10.2* ^{\$}
CMS003	0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20	61.6 \pm 26.9* ^{\$}
CMS003	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20	37.2 \pm 15.9* ^{\$}
CMS003	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20	38.7 \pm 13.5* ^{\$}
CMS003	500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20	35.9 \pm 13.0* ^{\$}
CMS008	0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	19	42.7 \pm 18.4* ^{\$}
CMS008	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20	38.9 \pm 12.0* ^{\$}

<464>

CMS008	50 μ g/kg	20	37.1 \pm 16.7* ^{\$}
CMS008	500 μ g/kg	20	50.1 \pm 17.8* ^{\$}
CMS010	0.5 μ g/kg	18	34.9 \pm 10.5* ^{\$}
CMS010	5 μ g/kg	20	51.0 \pm 14.6* ^{\$}
CMS010	50 μ g/kg	20	39.6 \pm 7.7* ^{\$}
CMS010	500 μ g/kg	20	50.1 \pm 16.7* ^{\$}
CMS011	0.5 μ g/kg	20	32.0 \pm 14.7*
CMS011	500 μ g/kg	20	34.4 \pm 19.4*
CMS016	500 μ g/kg	20	43.3 \pm 29.9*
CMS019	0.5 μ g/kg	20	42.0 \pm 12.0* ^{\$}
CMS019	5 μ g/kg	20	35.4 \pm 15.1* ^{\$}
CMS019	50 μ g/kg	20	28.3 \pm 7.6*
CMS024	0.5 μ g/kg	20	43.0 \pm 10.7* ^{\$}
CMS024	5 μ g/kg	20	42.2 \pm 11.8* ^{\$}
CMS024	50 μ g/kg	20	27.8 \pm 9.1*
CMS024	500 μ g/kg	18	30.1 \pm 10.0*
CMS034	0.5 μ g/kg	18	50.8 \pm 18.4* ^{\$}
CMS034	5 μ g/kg	19	43.0 \pm 11.7* ^{\$}
CMS034	50 μ g/kg	20	30.2 \pm 10.9*
CMS035	5 μ g/kg	20	38.9 \pm 21.2* ^{\$}
CMS035	50 μ g/kg	20	44.7 \pm 22.7* ^{\$}
CMS035	500 μ g/kg	19	40.5 \pm 25.8*
rhIL-2	3 \times 10 ⁵ IU/kg	19	49.3 \pm 24.7*
rmIFN- γ	3 \times 10 ⁵ IU/kg	19	60.5 \pm 17.4*
Cyclo-phosphamide	20mg/kg	19	20.7 \pm 19.1
Saline	0.5ml	20	19.0 \pm 9.1

<465>

<466> *: 살린과 비교, P<0.05

<467> ^: rmIFN- γ 과의 비교, P<0.05

<468> &: rhIL-2와 비교, P<0.05

<469> \$: 시클로포스파미딘과 비교, P<0.05

<470>

CMS001, CMS003, CMS008, CMS010, CMS011, CMS016, CMS019, CMS024, CMS034 및 CMS035가 살린 그룹과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이며 (P<0.05), 표 IV.7상에 나타낸 바와 같은 투여량에서 B₁₆ 흑색종 이식된 C₅₇BL/6 마우스의 체액성 반응을 증진시킬 수 있는 것(용혈 지수를 증가시킴)으로 나타났다.

<471>

8. C₅₇BL/6 마우스에서의 B16 흑색종 세포의 생존에 대한 펩타이드의 효과 (방법 6.2)

<472>

시험 물질 처리 종료 후의 동물의 부검에 있어서, 0.5 μ g/kg/day, 5 μ g/kg/day 및 50 μ g/kg/day의 CMS008, 및 5 μ g/kg/day 및 500 μ g/kg/day의 CMS016으로 처리된 마우스의 폐에서 B16 전이 병변이 존재한다는 어떠한 징후도 나타나지 않았다.

<473>

결론

<474> 1993년 중국의 Department of Health, Branch of Drug Administration에서 발행된 Preclinical New Drug Research Guideline에 따라서, 암세포가 이식된 마우스에 대한 웹타이드의 효과를 연구하였다. 그 결과는 다음과 같다:

<475> 1. 적절한 투여량의 CMS010, CMS034 및 CMS035가 마우스에서 이식된 S₁₈₀ 육종의 진전을 상당히 억제할 수 있으며;

<476> 2. 적절한 투여량의 CMS001 및 CMS034는 S₁₈₀ 육종으로 이식된 마우스의 식세포 면역 활성을 증진시킬 수 있으며;

<477> 3. 적절한 투여량의 CMS008, CMS011, CMS024 및 CMS032이 복수형 간암 H22로 이식된 마우스의 생존을 연장할 수 있으며;

<478> 4. 적절한 투여량의 CMS010, CMS019, CMS024, CMS034 및 CMS035이 복수형 간암 H22로 이식된 마우스에서의 T 림프구 형질전환을 증진시킬 수 있으며;

<479> 5. 적절한 투여량의 CMS003, CMS014, CMS024, CMS032 및 CMS034가 복수형 간암 H22로 이식된 마우스의 NK 세포 세포독성 활성을 증가시킬 수 있으며;

<480> 6. 적절한 투여량의 CMS019 및 CMS035가 L1210 백혈병으로 이식된 마우스의 생존을 연장시킬 수 있으며;

<481> 7. 적절한 투여량의 CMS008 및 CMS016이 마우스에 이식된 B16 흑색종의 진전을 억제할 수 있으며;

<482> 8. 적절한 투여량의 CMS001, CMS003, CMS008, CMS010, CMS011, CMS016, CMS019, CMS024, CMS034 및 CMS035이 B16 흑색종으로 이식된 마우스의 체액성 면역 반응을 증진시킬 수 있다.

<483> CMS001, CMS003, CMS008, CMS010, CMS011, CMS014, CMS016, CMS019, CMS024, CMS032, CMS034, CMS035를 일부분으로서 또는 단독으로 인간의 암 치료에 사용할 수 있다. 예컨대, CMS001, CMS003, CMS008, CMS010, CMS011, CMS014, CMS016, CMS019, CMS024, CMS032, CMS034 및 CMS035는 암 환자의 면역을 증가시키는데 사용할 수 있다. CMS008, CMS010, CMS016, CMS034, 및 CMS035는 환자에서의 암세포 증식을 방해하는데 사용할 수 있다. CMS008, CMS011, CMS019, CMS024, CMS032, 및 CMS035는 암환자의 기대 생명을 연장시키는데 사용할 수 있다. 상기 웹타이드는 암 치료의 전 과정으로서 단독, 두 가지 이상의 웹타이드의 조합 또는 다른 의약 또는 식품 보충물과의 조합으로 사용할 수 있다.

표 IV.8

암에 대하여 효과적인 웹타이드

CMS 코드	서열 번호
CMS001	1
CMS003	27
CMS008	3
CMS010	4
CMS011	30
CMS014	7
CMS016	9
CMS019	11
CMS024	16
CMS032	22
CMS034	24
CMS035	25

<484>

참고문헌

<485> 1. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:137-143

<486> 2. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:128-129

<487> 3. Yuanpei Zhang, Huaide Su. Pharmacological experiment (second edition). People's Health Publishing House. 1998, 137-138

<488> 4. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health

Publishing House. 1991, 1221-1234

<490> 5. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:140

<491> 6. Jinsheng He, Ruizhu Li, Tingyi Zong. The study on MTT reduction method of testing NK cell activity. China Immunology Journal. 1996, 1(6):356-358

<492> 7. Yaoqin Yang, Huchuan Yang, Huihong Tao, et al. The synergic effect of Tween-80 on the antitumor of hyperthermia-Experimental studies of mouse melanoma. Cancer Research on Prevention and Treatment. 1999, 26(4):8-12

<493> 8. Jian Fu, JieZheng, Weigang Fang, et al. Interleukin-12 gene transfection into murine B16 melanoma cells suppresses tumorigenicity and decreases metastatic potential. National Medical Journal of China. 1998, 78 (8):627-629

<494> 9. Qian Wang. Modern medical experiment method. People's Health Publishing House. 1998, 482-483

<495> 10. Qichao Pan, Bin Xu. Cancer pharmacology and chemotherapy. Henan medical university Publishing House. 2000, 66-69

<496> 11. Yuanpei Zhang, Huaide Su. Pharmacological experiment (second edition). People's Health Publishing House. 1998, 131

V. 체중에 대한 효과

<498> 건강한 래트를 동시에 펫타이드 처리 (300 µgg/kg/day 근육내 주입)를 동반하거나 동반하지 아니하고 고영양식을 5 주동안 공급하였다. 살린 주입과 함께 보통식을 공급한 래트를 음성 대조군으로 사용하였다. 처리 5 주 후, 주입을 중단하고 동일한 식사를 3 주 동안 더 공급하였다. 1 주일에 한 번 간격으로 체중 데이터를 수집하였다. 또한, 래트의 거동을 관찰하였다. 펫타이드 CMS015를 투여받은 래트가 펫타이드 처리 과정 동안에 대조군과 비교하여 통계학적으로 의미있게 낮은 체중 증가가 갖는 것으로 나타났다. 체중 감소 경향은 CMS015 처리를 중단한 후 점차적으로 감소하였다. 적절한 투여량 수준의 CMS015는 과식(over-feeding)으로 유발되는 비만 발생을 가역적으로 조절할 수 있는 것으로 결론지을 수 있다.

재료

<500> 체중 145±10 g의 SD (Sprague-Dawley) 래트를 중국의 Center of Experimental Animal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine (인증번호: 2000A019)에서 공급받았다. 펫타이드를 미국의 American Peptide Company, Inc., USA에 의하여 주문 합성하였고 (L-아미노산 유래), 일반 살린에서 10 µg/ml 까지 희석시켰다. 고영양식 및 일반 영양식을 중국의 SDA (State Drug Administration)에 의하여 발행된 "the guideline for pre-clinical research of antiobesity drug"^[1]에 따라서 제조하였다

방법

<502> 건강한 래트를 실험군, 양성 대조군, 및 음성 대조군 그룹으로 한 그룹당 10 마리씩 암컷과 수컷을 반 반씩으로 하여 무작위로 나누었다. 실험군 래트는 하루에 한번 300 µg/kg/day 펫타이드 근육내 주입과 동시에 5 주 동안 고영양식을 공급하였다. 양성 대조군에는 동일한 고영양식을 공급하고 플라시보 살린을 주입하였고, 비만 모델이 성공적으로 확립되었음을 증명하기 위하여 사용되는 음성 대조군에는 일반 영양식을 공급하고 플라시보 살린을 주입하였다. 처리 5주 후, 주입을 중단하고 동일한 식사를 3 주일 더 공급하였다. 일 주일에 한 번 간격으로 래트의 체중을 측정하였다. 또한 래트의 거동을 관찰하였다.

통계

<504> 데이터를 평균 ± 표준 편차로서 나타내었다. 그룹 간 및 그룹 내 비교를 위하여 페어 t 테스트 (paired t test) 또는 단일-인자 ANOVA를 사용하였다. P < 0.05에서 통계학적으로 의미있는 컷-오프를 하였다.

결과

<506> 1. SD 래트의 체중에 대한 펫타이드의 효과

표 V.1

SD 래트의 체중에 대한 웹타이드의 효과

	양성 대조군 (g)		CMS015 처리군 (g)	
	수컷 n=5	암컷 n=5	수컷 n=5	암컷 n=5
처리전	145.6 ± 13.6	133.6 ± 4.6	145.6 ± 8.5	129.2 ± 3.3
1 주	194.4 ± 14.5	164.4 ± 8.7	183.8 ± 10.6	157.8 ± 8.3
2 주	239.6 ± 13.4	188.0 ± 6.4	220.6 ± 12.2*	176.0 ± 11.2*
3 주	265.0 ± 11.8	208.8 ± 8.2	239.0 ± 16.0*	196.0 ± 10.5*
4 주	287.4 ± 17.7	227.2 ± 8.2	258.2 ± 18.1*	212.0 ± 13.5*
5 주	299.4 ± 21.2	236.6 ± 10.9	268.8 ± 17.7*	221.4 ± 13.2*
6 주	333.4 ± 27.1	249.4 ± 16.3	299.4 ± 21.2*	235.6 ± 16.3
7 주	349.2 ± 28.9	261.2 ± 13.4	310.4 ± 25.9*	242.2 ± 18.8*
8 주	374.4 ± 37.2	255.6 ± 11.5	337.4 ± 30.6	252.8 ± 22.5

<507>

<508> 양성 대조군과 비교: p<0.05

<509>

300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 분량에서 CMS015이 대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 가지며 ($p<0.05$), 과식에 의하여 유도된 비만 래트의 체중 증가를 제한할 수 있는 것으로 나타났다. 처리군과 대조군의 차이는 처리 기간에 따라 증가하였다. 처리군에 웹타이드 CMS015 처리를 종료 시, 처리군과 대조군의 차이는 점진적으로 감소하고 3 주일 후에는 통계학적으로 무의미해졌으며, 이는 SD 래트 체중에 대한 웹타이드의 효과가 가역적이라는 것을 보여주는 것이다.

<510>

실험 전체 과정 동안, 모든 그룹의 래트의 식욕과 활성이 정상적인 상태를 유지하는 것을 관찰하였다.

<511>

검토

<512>

적절한 투여량 수준의 CMS015가 과식으로 유도된 비만의 진전을 제한할 수 있다고 결론지을 수 있다. 상기 웹타이드는 비만을 조절하기 위한 용도로 인간에 투여할 수 있다. 상기 웹타이드는 비만 치료를 위한 전 과정으로서 단독으로, 두 가지 이상의 웹타이드와 조합으로, 또는 다른 약제 또는 음식 보충물과 조합으로 사용할 수 있다.

<513>

본 연구에 있어서, 근육내 주입에 의한 투여를 시험하였지만, 이는 웹타이드가 다른 대체적인 경로를 통하여 투여된 경우의 가능한 웹타이드의 효능을 배제하는 것은 아니다. 상기 웹타이드는, 리포좀, 지지 방출 프로텍션 (sustain release protection) 등과 같은 전달 용이 기구를 사용하거나 사용하지 않고, 정맥내 주입, 근육내 주입, 복막내 주입, 피하 주입, 및 피하 이식을 통하여 주입할 수 있다. 상기 웹타이드는 타블렛, 캡슐, 혼탁액, 용액 등과 같은 모든 경구 투여 형태로, 변형되지 않은 통상의 형태로, 또는 서방성 형태로, 또는 위-장관 보호를 하거나 하지 아니하고 투여할 수 있다. 상기 웹타이드는 연고, 크림, 젤 등과 같은 모든 국부적 적용 형태로 파우더 흡입기와 같은 경피전달 용이 기구를 사용하거나 사용하지 아니하고, 용해되거나 리포좀 보호된 형태로 적용할 수 있다. 상기 웹타이드는 또한 단독으로 또는 다른 웹타이드 서열과 조합하여, 유전자 서열로 번역되거나, 발현 시스템으로 클로닝하여, 최종 웹타이드 분자를 생성할 수 있으며, 상기 최종 웹타이드를 정제하거나 정제하지 아니하고, 본 명세서에 기재된 바와 같이 웹타이드 활성을 이용할 수 있다.

표 V.2

<514>

비만에 표과적인 웹타이드	
CMS 코드	서열번호
CMS015	8

<515>

참고문헌

<516>

1. SDA, PR China. The guideline for pre-clinical research of new drugs. 1993

<517>

본 발명을 수행하는 또 하나의 방법으로서, 상기 기재된 펩타이드의 아미노 말단 또는 카르복실 말단에 추가적인 아미노산을 추가하는 것이 가능하다고 생각된다. 예컨대, 상기 기재된 펩타이드에 그 생물학적 기능에 영향을 미치지 아니하고 하나 또는 두 개의 아미노산을 첨가할 수 있다. 세 개 또는 네 개의 아미노산을 첨가하고, 상기 펩타이드의 기능을 계속 유지하는 것 또한 가능하다. 이들을 모두 동일한 펩타이드의 변이체로 칭하였다. 또는, 상기 펩타이드에 그 생물학적 활성에 영향을 미치지 않고 하나 또는 두 개의 아미노산을 결실시킬 수 있다. 또한, 상기 펩타이드의 생물학적 기능에 영향을 미치지 않고 세 개 또는 네 개의 아미노산을 결실시키는 것이 가능하다. 이들을 본 펩타이드의 단편으로 칭하였다. 게다가, 하나의 아미노산이 동일한 기능적 분류에 속하는 다른 것으로 보존적으로 치환된 것과 같은 펩타이드의 유도체를 사용하여 본 발명의 또 다른 측면을 수행할 수 있다. 예컨대, 비극성 또는 소수성 측쇄를 갖는 펩타이드들의 하나의 사이드기를 생물학적 활성을 감소시키지 않는 다른 기로 치환할 수 있다. 추가적인 예로서, 펩타이드에 링커/스페이서를 삽입하여 변이체를 형성할 수 있고, 상기 변이체는 본 연구에 있어서 본래 펩타이드와 같은 활성 부분을 여전히 유지한다. 이를 또한 상기 펩타이드의 변이체로 고려된다. 본 명세서에 사용된 펩타이드 유사체는, 예컨대, 상이한 백본 구조 또는 D-아미노산 치환을 갖는 유사체와 같이, 천연 아미노산 구조와 유사한 아미노산 분자를 갖는 펩타이드를 포함한다. 추가적인 예로서, 펩타이드 합성에 사용된 아미노산이 이들의 L 광학 이성질 형태이지만, D-형태로 치환된 서열내의 하나 이상의 아미노산을 갖는 펩타이드는 유사한 생물학적 활성을 가질 수 있다. 청구의 범위에 사용된 "기능적 유도체(functional derivative)"라는 용어는 단편, 변이체, 유사체 또는 펩타이드의 화학적 유도체를 포함하는 것을 의미한다.

<518>

본 명세서에 사용되는 바에 있어서, "하이브리드 펩타이드(hybrid peptide)"는 서열번호 1 내지 30을 갖는 본래 생물학적 활성 펩타이드 또는 이들의 기능적 유도체에 삽입된 추가적인 펩타이드를 포함하지만 실질적으로 유사한 활성을 여전히 유지하는 펩타이드를 의미한다. 상기 추가적인 펩타이드는, 예컨대, 하이브리드 단백질을 외부 또는 세포로 분비하기 위한 신호로서 한 가지 이상의 원핵 또는 진핵 세포에 의하여 인지되는 아미노산 서열을 포함하는 리더 단백질을 포함한다. 상기 분비는 직접 분비 또는 분비 소낭을 통한 간접 분비일 수 있다.

<519>

"실질적으로 순수한 펩타이드(substantially pure peptide)"는 순도가 적어도 10% w/w, 바람직하게 20%, 보다 바람직하게 40%, 보다 더 바람직하게 60%, 가장 바람직하게 90%인 펩타이드를 의미한다. 가장 바람직한 구체예에 있어서, 순도는 99% 이상이다. 실질적으로 순수한 펩타이드는 하기하는 바와 같은 복합 혼합물인 약학적 및 영양 제제를 제조하는데 사용할 수 있다.

<520>

약학적 제제에 있어서 상기 정의한 펩타이드의 사용은, 예컨대, 암 또는 감염 또는 상기한 모든 종상과 같이 면역에 대하여 이차적 효과를 갖는 질병 및 면역학적 장애에 대한 가능한 치료로서 채용할 수 있다. 상기 제제는 다른 펩타이드를 포함하여 다른 활성 또는 비활성 구성성분과 혼합된 하나의 정의된 펩타이드를 포함할 수 있다. 예컨대, 두 개 내지 수 개 (예컨대, 3 내지 5)의 열거된 펩타이드를 다른 성분과 함께 또는 다른 성분 없이 동일한 제제에 첨가할 수 있다. 또는, 열거된 펩타이드 중 하나를 여기에 열거되지 않은 펩타이드와 함께 사용하여 제제를 제조할 수 있다. 이들을 정맥내, 근육내, 피내(intracutaneous), 피하 또는 피부내(intradermal) 형태로 투여할 수 있다. 투여 방식은 또한 직접적으로 문제가 있는 기관에 이르게 하는 정맥내 주입일 수 있다. 다른 투여 방식은 경피적, 분말 또는 스프레이의 흡입 및 이 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 다른 전달 형태일 수 있다. 또한, 상기 제제는 경구 투여되고, 경구 섭취 후 펩타이드의 위에서의 소화를 방지하는데 사용할 수 있는 담체 또는 이 기술분야에 알려진 다른 모든 담체 (리포좀과 같은 경피용)을 함유할 수 있다.

<521>

상기 약학적 제제는 모든 알려진 약학적 담체를 포함할 수 있다. 적절한 담체의 예는 이 기술분야의 통상의 지식을 갖는 자에게 알려진 모든 표준 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 이들은 생리 살린 용액, 물, 기름과 물의 혼합물 또는 트리글리세린 에멀젼을 포함하는 에멀젼 및 다른 형태의 작용제, 총진제, 코팅된 타블렛 및 캡슐을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 적절한 담체를 약학적 조성물의 투여 방식에 기초하여 선택할 수 있다.

<522>

상기 펩타이드를 정맥내 주입, 근육내 주입, 복막내 주입, 피하 주입 또는 피하 이식을 통하여 투여할 수 있다. 상기 펩타이드를 또한 타블렛, 캡슐, 혼탁액, 용액 등의 모든 경구 투여 형태로, 변형이 없는 통상의 형태 또는 서방성 형태, 또는 위-장관 보호를 하거나 하지 아니하고, 투여할 수 있다. 또한, 상기 펩타이드는 경피저달 용이 기구와 함께 또는 이를 사용하지 아니하고, 연고, 크림, 젤 등과 같은 모든 국부 적용 형태로 적용할 수 있다. 또한, 상기 펩타이드를 단독 또는 다른 펩타이드 서열과 조합하여 유전자 서열로 번역되고 발현 시스템으로 클로닝되어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드 활성을 사용하기 위한 최종 펩타이드를 만들 수 있다.

<523> 각 웨타이드의 투여 분량은 체중 kg 당 1 ng 내지 10 g일 수 있다. 주사 투여 방식에 있어서, 바람직한 투여 분량은 kg 당 10 ng 내지 10 mg이고 보다 바람직하게는 kg당 1 μ g 내지 1 mg이다. 그러나, 상기 웨타이드 중 한 가지 이상이 정상적인 생리적 반응의 캐스케이드(cascade)를 유도하는 수용체를 통하여 작용하기 때문에, 유효 투여 분량은 체중 kg 당 1 ng 정도로 작을 수 있다. 또는, 상기 웨타이드 중 한 가지 이상은 단지 반응의 전체 캐스케이드에 대한 개시자일 수 있다. 경구 섭취를 위하여, 분량은 하루에 체중 kg 당 1 ng 내지 10 g일 수 있으며 보다 바람직하게는 하루에 체중 kg 당 0.1 μ g 내지 1 g, 보다 더 바람직하게는 하루에 1 μ g 내지 10 mg일 수 있다.

VI. 유전자 치료 및 치료 방법

<525> 밝혀진 웨타이드 서열에 기초한 유전자 치료는 이들 웨타이드 중 하나를 코딩하는 핵산 서열을 설계함으로써 수행한다. 상기 핵산을 화학적으로 합성하고, 프로모터에 작동가능하게 연결하고, 발현 벡터에 클로닝할 수 있다. 그리고 나서, 상기 발현 벡터를 인간 세포에서의 발현을 위한 유전자 치료 형태로서 인체에 투여한다. 본 명세서에 사용된 "유전자 벡터(genetic vectors)" 용어는 이들 발현 벡터를 포함한다. 유전자 치료를 위하여 사용 가능한 벡터는 아데노-관련 바이러스 (Mizuno, M. et al. (1998). Jpn J Cancer Res 89, 76-80), LNSX 벡터 (Miller, A. D. et al. (1993) Methods Enzymol 217, 581-599) 및 렌티바이러스(lentivirus; Goldman, M. J. et al. (1997) Hum Gene Ther 8, 2261-2268)를 포함한다.

<526> 웨타이드 전달을 위한 다른 운반체 (vehicles)는 숙주 생물체의 건강에 심각하게 불리한 효과를 갖지 않는 웨타이드를 투여하는 것이 소망되는 숙주 생물체에서 복제 가능한 생물체로 전달 가능한 소망하는 웨타이드를 코딩하는 발현 벡터를 포함한다. 예컨대, 웨타이드를 투여하는 것이 바람직한 숙주 생물체에 대하여 비병원성인 발현 벡터를 생물체로 전달시키는 것이 가능하다. 몇몇 구체예에 있어서, 웨타이드를 투여할 숙주 생물체의 건강에 심각하게 불리한 효과를 갖지 않는, 박테리아 또는 균 생물체에서 소망되는 웨타이드를 생산한다. 예컨대, 원하는 웨타이드를 코딩하는 발현 벡터는 유산균(lactic acid bacteria), 대장균(*E. coli*) 및 효모와 같은 생물체에서 원하는 웨타이드를 생산하는 발현 벡터일 수 있다. 한 구체예에 있어서, 발현 벡터는 포유 동물 소화관 (digestive tract)에 의하여 허용되는 미생물 또는 포유 동물 소화관(gut)에서 발견되는 미생물에서 원하는 웨타이드를 생산한다. 원하는 웨타이드를 발현할 수 있는 몇몇 미생물 종은 *L. 악시도필러스* (*L. acidophilus*), *L. 아밀로보러스* (*L. amylovorus*), *L. 카세이* (*L. casei*), *L. 크리스파티스* (*L. crispatus*), *L. 갈리나룸* (*L. gallinarum*), *L. 가세리* (*L. gasseri*), *L. 존스니* (*L. johnsonii*), *L. 파라카세이* (*L. paracasei*), *L. 플란타룸* (*L. plantarum*), *L. 류테리* (*L. reuteri*), *L. 람노서스* (*L. rhamnosus*) 등과 같은 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 종; *B. 아돌레센티스* (*B. adolescentis*), *B. 애니멀러스* (*B. animalis*), *B. 비피덤* (*B. bifidum*), *B. 브레베* (*B. breve*), *B. 인판티스* (*B. infantis*), *B. 락티스* (*B. lactis*), *B. 롱검* (*B. longum*) 등과 같은 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 종; 엔테로코커스 패칼리스 (*Enterococcus faecalis*) 또는 엔테로코커스 파시엄 (*Ent. faecium*); 스포로락토바실러스 이눌리너스 (*Sporolactobacillus inulinus*); 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*); 대장균 (*Escherichia coli*); 프로피오니박테리움 프로이텐라이히 (*Propionibacterium freudenreichii*); 또는 사카로마이세스 세레비시애 (*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 사카로마이세스 보우라디 (*Saccharomyces bouardii*)를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

<527> 화학적으로 합성되거나 DNA를 생산하기 위한 mRNA의 역전사를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 방법에 의하여 생산되는, 본 발명의 웨타이드를 코딩하는 핵산 서열을 이 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려진 유전공학 방법에 의한 원하는 생물체로의 유전자 전달을 위한 발현 벡터내로 삽입시킨다. 상기 발현 벡터는 DNA 벡터 또는 RNA 벡터일 수 있다. 예컨대, 상기 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 유전자 요소에 기초한 것일 수 있다. 상기 발현 벡터는 염색체 외적으로 (extra-chromosomally) 복제하는 벡터 또는 염색체에 통합하는 벡터일 수 있다.

<528> 발현 벡터는 본 발명의 웨타이드를 코딩하는 핵산과 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 상기 프로모터는 유도성 프로모터, 또는 구성성 (constitutive) 프로모터와 같은 조절가능한 프로모터일 수 있다. 몇몇 구체예에 있어서, 상기 프로모터는 웨타이드 발현의 원하는 수준을 제공하도록 선택할 수 있다. 게다가, 소망되는 경우, 상기 발현 벡터는 다른 서열을 포함하여 웨타이드의 생산, 발현(presentation) 및/또는 분비를 촉진시킬 수 있다. 몇몇 구체예에 있어서, 본 발명의 웨타이드를 코딩하는 핵산을 웨타이드의 분비를 이끄는 핵산 서열에 작동가능하게 연결시킬 수 있다. 예컨대, 본 발명의 웨타이드를 코딩하는 핵산을 신호 웨타이드를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결시킬 수 있다.

<529> 몇몇 구체예에 있어서, 본 발명의 펩타이드를 코딩하도록 엔지니어링된 상기 발현 벡터는 락토바실러스 종 (*Lactobacillus species*) 및 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)와 같은 포유 동물의 정상 소화관 세균 총 (flora)를 구성하는 박테리아 종에서 본 발명의 펩타이드를 발현하는데 적응된 발현 벡터일 수 있다. 이러한 발현 벡터의 예를 미국특허 제6,100,388호 (Casas) 및 제5,728,571호 (Bellini)에서 각각 찾을 수 있다. 이들 문헌들은 완전히 참조로서 본 명세서에 명백하게 포함된다. 본 발명의 펩타이드가 투여될 수주 생물체의 건강에 불리하지 않은, 생물체에서의 상기 펩타이드의 발현을 촉진시키는 모든 발현 벡터를 사용할 수 있음을 인지할 것이다.

<530> 몇몇 구체예에 있어서, 본 발명의 펩타이드를 코딩하도록 엔지니어링된 발현 벡터는 사카로마이세스 세레비시 애 (*Saccharomyces cerevisiae*); 또는, 바람직하게는, 사카로마이세스 보울라디 (*Saccharomyces boulardii*)와 같이, 포유 동물 소화관에 의하여 잘 관용되는 효모 종에서 본 발명의 펩타이드를 발현시키기 위하여 적응되어, 인간 소화관을 콜로나이징할 수 있고 특정 설사 형태를 치료하는데 사용될 수 있는, 발현 벡터일 수 있다. 이종 단백질을 구성적으로 발현하고, 매우 안정적이며, 따라서, 유사분열 및 감수분열 동안 후대 세포에 잘 전달되고, 재조합 단백질을 높은 수준으로 분비하도록 하는 펩타이드 또는 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있는 효모 발현 벡터를 사용할 수 있다. 이러한 효모 벡터의 예가 미국 특허 제6,391,585 (Jang 등)에 기재되어 있으며, 이는 본 명세서에 명백하게 전적으로 참조로서 포함된다.

<531> 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 발현 벡터를 이 발명이 속하는 기술분야에 알려진 기술을 통하여 펩타이드를 발현하는 것이 의도된 생물체내로 도입할 수 있다. 이러한 기술은, 예컨대, 리튬 아세테이트 형질전환 (효모에 있어서), 일렉트로포레이션 또는 화학적으로 반응성 있는 (competent) 박테리아 세포의 사용을 통한 박테리아, 효모 또는 다른 미생물의 통상적인 형질전환 방법 뿐 아니라, 이를 과정에 대하여 내성이 있는 박테리아 종의 형질전환의 최근 진전을 포함한다. 몇몇 구체예에 있어서, 상기 발현 벡터를 Leer 등 (WO 95/35389)에 기재된 방법을 사용하는 형질전환에 내성이 있는 것으로 알려진 유산균으로 도입하며, 상기 문헌의 기재는 본 명세서에 전적으로 참조로서 포함된다. 도입된 서열을 염색체 외 DNA 요소로서 찬류시키거나 미생물 염색체 DNA에 통합할 수 있다.

<532> 그리고 나서, 이러한 발현 벡터를 포함하는 유전적으로 엔지니어링된 미생물을 소화관 (alimentary canal), 질, 기관 등에 접종하여, 지속적인 면역-치료를 달성할 수 있다. 몇몇 구체예에 있어서, 본 발명의 펩타이드를 발현하는 생물체를 불활성 형태 또는 바람직하게는 살아있는 형태로 섭취한다. 소화관 (gut)에서, 이러한 미생물은 상기 펩타이드를 생산하거나, 미생물의 용균 또는 분비에 의하여 이들을 내강 (lumen)으로 방출하거나, 아니면 숙주로 상기 펩타이드를 발현함으로써, 상기 펩타이드가 그들의 숙주 생물체에 대한 의도된 효과를 나타낸다. 다른 구체예에 있어서, 펩타이드가 숙주의 소장, 질 또는 코 통로 점막에 발현된다.

<533> 치료의 또 다른 방법은 특정 핵산을 인체 세포로 전달하기 위한 방법으로서 리포좀을 사용하는 것이다. 핵산 (서열 번호 1 내지 30의 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터와 같은)은 "Gao, X. 및 Huang, L. (1995) Gene Ther 2, 710-722" 및 미국특허 제6,207,456호에 기재된 바와 같이 염색체 편입 및 세포 섭취를 촉진하는 환경에서 전달된다. 또는, 펩타이드 자체를, 미국 특허 제6,245,427호에 기재된 방법을 사용하여, 직접적으로 전달하거나 리포좀에 인캡슐레이션 할 수 있다. 상기에 인용된 모든 과학 발행물 및 특허가 본 명세서에 참조로서 포함된다.

<534> 상기 유전자 치료 및 치료 방법에 유용한 핵산 서열은 이를 펩타이드 및 이들의 기능적 유도체를 코딩하는 서열을 포함한다. 많은 핵산 서열 중 어느 하나를 사용하여 디제너레이트 코돈 시스템 (degenerate codon system)에 기초하여 이를 펩타이드 및 이들의 유도체를 코딩할 수 있다.

<535> 다음의 참고문헌은 전적으로 참조로서 본 명세서에 포함된다:

1. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:134-135
2. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 1991, 1221-1234
3. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7:140
4. Jinsheng He, Ruizhu Li, Tingyi Zong. The study on MTT reduction method of testing NK cell activity. China Immunology Journal. 1996, 1(6):356-358

<540> 5. Qian Wang. Modern medical experiment method. People's Health Publishing House. 1998, 482-483

<541> 6. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7:141

<542> 7. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7:132-133

<543> 8. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7:128-129

<544> 9. Yuanpei Zhang, Huaide Su. Phamalogical experiment (second edition). People's Health Publishing House. 1998, 137-138

<545> 10. Jiatai Li, clinical pharmacology (second edition). People's Health Publishing House. 1998, 1338-1339.

실시 예

실시예 1

유전자 조작된 락토바실러스(*Lactobacillus*) 박테리아 종을 통한 웨타이드의 전달

<546> 하기의 내용은 상기한 바와 같이 본 발명의 웨타이드를 숙주로 전달하기 위한 하나의 대표적인 방법으로서 제시된다. 상기 표 A에 열거된 웨타이드 중 하나를 코딩하는 DNA 서열을 화학적 방법으로 합성하고 이러한 DNA 서열을 이 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 갖는 자에게 알려진 표준 유전공학 기술을 사용하여 발현 벡터에 삽입한다. 선택된 발현 벡터는 락토바실라이 (*Lactobacilli*)에서 작용 가능한 구성성(constitutive) 프로모터, 특정 5' → 3' 방향으로의 DNA 서열 도입을 위한 복합 클로닝 자리 뿐 아니라, 항생제에 대한 내성을 부여하는 선택적 마커 유전자 (클로닝 과정을 원조하는)를 포함하고, 신호 웨타이드 서열과 같은, 웨타이드의 생산 및/또는 선택을 조력하는 다른 서열을 포함할 수 있다. 이러한 벡터의 예가 미국특허 제5,592,908, (Pavla)에 제시되어 있으며, 이는 전적으로 참조로서 본 명세서에 포함된다. 간단히 말해서, 상기 특허는 몇몇 공지된 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 종에서 작용하는 프로모터 뿐 아니라, 모두 본 발명의 웨타이드를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결되어 락토바실라이 (*Lactobacilli*)에서 상기 웨타이드를 발현할 수 있는 신규한 프로모터를 상기 박테리아에서 발견하기 위한 방법을 논한다. 상기에서 인용된 미국특허 제5,529,908호에 기재된 락토바실러스 락티스 (*Lactobacillus lactis*)에서 활성인 대체적으로 소수성인 아미노산 16 내지 35 개를 포함하는 웨타이드와 같은, 신호 웨타이드를 코딩하는 핵산을, 상기 신호 서열을 코딩하는 핵산을 본 발명의 웨타이드를 코딩하는 핵산을 갖는 프레임 내(in frame)가 되도록, 본 발명의 웨타이드를 코딩하는 핵산과 프로모터 사이에 삽입한다.

<547> 상기 웨타이드의 코딩 서열에 더하여, 합성되는 DNA 서열은 상기 DNA를 발현 벡터내로 클로닝하고 연결(ligation)을 원조하는 서열을 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 벡터의 복합 클로닝 자리에서 발견되는 것들에 해당하는 제한효소 인지 자리를 상기 서열의 5' 및 3' 말단에 합성된 DNA내로 삽입하여, 상기 서열을 벡터내에서 적절한 방향으로 클로닝할 수 있다. 상기 벡터 및 상기 합성된 DNA 모두는 특정 제한효소로 소화시킨 후 정제한다. 벡터와 합성된 DNA를 사용하는 연결 반응 후 적절한 균주 *E. coli*로 형질전환된다. 상기 형질전환된 박테리아를 상기 벡터가 내성을 부여하는 항생제를 포함하는 배지에 플레이팅한다. 증식 배양물 및 플라스미드 제조 과정을 위하여 형질전환된 박테리아 콜로니를 선택한다; 올바른 방향으로 합성된 DNA가 존재하는 것을 확인한다.

<548> 그리고 나서, 이러한 발현 벡터를 *L. 악시도필러스* (*L. acidophilus*)와 같은 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 종의 박테리아 숙주 세포로 형질전환시킨다. 형질전환된 세포를 상기 벡터 서열 내에서 발견되는 선택적 마커에 의하여 선택하고, 웨타이드의 선택을 웨스턴 블라트를 수행하거나, 성장배지에 존재하는 웨타이드의 갤 전기영동 또는 다른 표준 기술을 수행하여 확인할 수 있다. 박테리아의 형질전환된 콜로니를 선택하고 사용하여 유전적으로 엔지니어링된 박테리아의 대규모 배양물을 제조한다. 원하는 웨타이드를 발현하는 유전적으로 엔지니어링된 박테리아의 배양물을 키우고, 이들의 적어도 한 부분을 소화관, 질, 기관 또는 박테리아가 복제할 수 있는 숙주 생물체의 다른 부위에 투여한다. 소망하는 경우, 박테리아 배양물을 다양한 방법으로 처리하여 숙주에 의한 장소비를 위한 보충물을 생산할 수 있다. 이러한 처리는, 박테리아를 용액, 용매, 분산 매질, 지연제 (delay agents), 에멀젼 등과 같은 담체 작용제와 혼합하는 것에 더하여, 동결건조 또는 박테리아를 보존하는 다른 방

법을 포함한다. 보충물을 생산하는 이들 작용제의 사용은 이 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있다. 예컨대, 배양된 유제품 또는 인간 소비를 위한 다른 식료품을 제조하는데 상기 박테리아를 사용하여, 상기 웨타이드를 발현하는 생물체가 숙주 생물체의 소화관을 콜로나이징하도록 한다. 특정 유산균 균주를 요구르트, 김치, 치즈 및 버터와 같은 식료품에 포함시키기 위한 많은 상이한 방법이 미국특허 제6,036,952, (Oh)에 개시되어 있으며, 이는 전적으로 참조로서 본 명세서에 포함된다. 많은 경로 중 하나를 통한 박테리아의 소비 도중에, 엔지니어링된 생물체가 소화관을 콜로나이징하고 소화관의 점막층을 통하여 본 발명의 웨타이드의 제시(presentation) 및/또는 흡수를 가능하게 할 수 있다.

<551>

실시예 2

바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)의 유전자 조작된 형태를 통한 웨타이드의 전달

<553>

다음의 내용은 상기한 바와 같이 본 발명의 웨타이드를 숙주로 전달하기 위한 또 하나의 대표적인 방법으로서 제시된다. 상기 표 A에 열거된 웨타이드 중 하나를 코딩하는 DNA 서열을 화학적 방법에 의하여 합성하고 이 DNA 서열을, 모두 이 발명이 속하는 기술분야에 알려진, 유전공학적 기술을 통하여 발현 벡터로 삽입한다. 선택된 발현 벡터는, *E. Coli* 및 *B. Subtilis* 모두에서 증식하고 형질전환된 박테리아의 클로니의 선택을 위한 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있는, pTZ18R (Pharmacia, Piscataway, NJ)과 같은 셔틀 벡터를 포함한다. 이러한 벡터는 박테리아 세포로부터 발현된 이종 단백질의 배출을 이끄는 *B. subtilis*에서 활성인 리더 웨타이드 또는 신호 웨타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 뿐 아니라, *B. subtilis*의 Sac B 유전자로부터 유도된 프로모터와 같이, *B. subtilis*에서 활성인 구성성 프로모터를 포함할 수 있다. 이러한 벡터의 예가 미국특허 제6,268,169호 (Fahnestock)에 기재되어 있으며, 상기 문헌의 기재는 전적으로 참조로서 본 명세서에 포함된다. 간단히 말해서, 상기에 상술한 바와 같이, 본 발명의 웨타이드를 코딩하는 DNA는 제한 효소 자리 및/또는 이 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 갖는 자에게 잘 알려진 기술을 통하여 DNA의 클로닝을 용이하게 하는 다른 서열과 함께 합성할 수 있다. *E. Coli*로 형질전환하고, 플레이팅(plating)하고, 선별하고, 플라스미드를 증식하여 플라스미드 스톡(stock)을 생성한 후, 상기 플라스미드를 *B. subtilis* 내로 형질전환시키고 형질전환체가 플레이팅된 배지 내의 항생제에 대한 내성에 의하여 선별한다.

<554>

유전자 조작된 *B. subtilis*에서의 웨타이드 생산 및 상기 *B. subtilis*로부터의 분비를 웨스턴 블라팅 또는 SDS-PAGE 분석 후의 오토래디오그래피 검출을 위한 웨타이드의 방사선 표지와 같이, 이 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 기술을 사용하여 확인한다.

<555>

유전자 조작된 박테리아의 배양물을 키우고, 이들의 적어도 일 부분을 소화관, 질, 기관 또는 박테리아가 복제할 수 있는 숙주 생물체의 다른 부위에 투여한다.

<556>

실시예 3

유전자 조작된 사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 효모 종을 통한 웨타이드의 전달

<558>

다음의 내용은 상기한 바와 같이 본 발명의 웨타이드를 숙주로 전달하기 위한 또 하나의 대표적인 방법으로서 제시된다. 상기 표 A에 열거된 웨타이드 중 하나를 코딩하는 DNA 서열을 화학적 방법에 의하여 합성하고 이 DNA 서열을, 모두 이 발명이 속하는 기술분야에 알려진, 유전공학적 기술을 통하여 발현 벡터로 삽입한다. 선택된 발현 벡터는 pADH1과 같은 구성성 효모 프로모터, 효모와 *E. Coli* 모두에서의 벡터의 복제를 위한 자리, 선별 과정을 위하여 영양 요구성 효모에게 독립 영양성을 부여하는 유전자 또는 유전자들, 복합 클로닝 부위 (multiple cloning site, MCS), 및, 소망하는 경우, 신호 웨타이드를 코딩하는 서열을 포함하는, 안정적으로 보존되는 효모 단백질 발현 벡터를 포함한다. 이러한 벡터는 상업적으로 입수 가능하고 이 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있거나, 표준적인 기술을 사용하여 용이하게 구축될 수 있다. 합성된 DNA를 효모 벡터내로 삽입하고, *E. coli* 내로 형질전환시키고, 형질전환된 *E. coli*를 선별 배지상에 플레이팅하고, 형질전환된 박테리아 클로니를 선별하고, 상기 클로니로부터 박테리아의 성장 배양물로부터 플라스미드 DNA를 제조한 후, 상기 벡터를 리튬 아세테이트 형질전환 또는 일렉트로포레이션과 같이 잘 알려진 기술을 통하여 사카로마이세스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 내로 형질전환시킨다. 형질전환을 위하여 선택된 사카로마이세스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*)는 최소 배지 플레이트 상에서 성장하기 위하여 플라스미드 상에 유전자를 필요로 하는 영양 요구성 돌연변이주이다. 벡터 상에 제공된 유전자가 결여된 성장 배지 상에 효모를 플레이팅함으로써 형질전환된 효모 클로니를 분리한다. 상기 벡터와 그의 선별 유전자를 받고 유전자 산물을 발현하는 이들 효모만이 최소 배지 상에서 클로니로 성장할 수 있을 것이다. 성장배지에 존재하는 웨타이드의 젤 전기영동, 웨스턴 블라트, 또는 다른 표준적인 방법을 수행함으로써 웨타이드 선별을 확인할 수 있다.

<559>

효모의 형질전환된 콜로니를 선택하고 사용하여 대규모 배양물을 제조한다. 원하는 웹타이드를 발현하는 유전자 조작된 효모 배양물을 키우고, 이들의 적어도 일 부분을 소화관, 절, 기관 또는 박테리아가 복제할 수 있는 숙주 생물체의 다른 부위로 투여한다. 소망하는 경우, 효모 배양물을 다양한 방법으로 처리하여 숙주에 의한 장 소비를 위한 보충물을 생산할 수 있다. 이러한 처리는, 박테리아를 용액, 용매, 분산 매질, 지연제, 에멀젼 등과 같은 담체 작용제와 혼합하는 것에 더하여, 동결건조 또는 효모를 보존하는 다른 방법을 포함한다. 보충물 제조를 위한 이들 작용제의 사용은 이 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 형질전환된 효모를, 이 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 갖는 자에게 잘 알려진 기술을 사용하여, 요구르트 및 케피어(kefir)와 같은 발효 유제품과 같은 식품의 제조에 사용할 수 있다. 이들 식료품에 살아있는 유산균 배양물을 포함함으로써, 형질전환된 효모는 적어도 일시적으로 소화관을 콜로나이징하고, 소화관 내강을 통하여 본 발명의 웹타이드를 제공한다.

서 열 목 록

<110> Wong, Wai Ming

Lin, Gang

<120> BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES

<130> WILKG3.001CP1

<140> unknown

<141> 2002-06-20

<150> 09/904,492

<151> 2001-07-13

<160> 30

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 1

Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe

1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 2

Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe

1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 3

Lys Ala Val Gly His Leu Asp Asp Leu Pro Gly Ala Leu

1 5 10

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 4

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn

1 5 10 15 Pro Lys

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 5

Leu Gly

Met Glu Ala Cys Gly Ile His Glu Thr Thr Tyr
1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 6

Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu
1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 7

Ala Ala His His Pro Asp Asp Phe Asn Pro Ser Val
1 5 10

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 8

Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His Gln Gly Val Met
1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 9

Ile Gly Met Glu Ser Ala Gly Ile His Glu Thr Thr Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 10

Val Gly Met Gly Glu Lys Asp Ser Tyr

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 11

Val Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 12

Val Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 13
 Met Ala Thr Ala Ala Ser Ser Ser Ser Leu
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa
 <400> 14
 Tyr Ser Phe
 1
 <210> 15
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa
 <400> 15
 Ala Ala Phe
 1
 <210> 16
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa
 <400> 16
 Tyr Ser Leu
 1
 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa
 <400> 17
 Thr Thr Tyr Asn Ser Ile Met
 1 5
 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa
 <400> 18
 Phe Glu Glu Asn Met
 1 5
 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa
 <400> 19
 Phe Glu Pro Ser Phe
 1 5
 <210> 20
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa
 <400> 20
 Phe Asn Glu Glu
 1
 <210> 21
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 21
 Phe Glu Glu Met
 1
<210> 22
<211> 4
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<400> 22
 Phe Glu Glu Glu
 1
<210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<400> 23
 Phe Glu Ser Phe
 1
<210> 24

<211> 4
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<400> 24
 Pro Glu Asn Phe
 1
<210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<400> 25
 Phe Val Asn Asp
 1
<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<400> 26
 Phe Gln Pro Ser Phe
 1 5
<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<400> 27
 Phe Asn Phe Val Pro Pro
 1 5
<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Sus
 scrofa
<400> 28
 Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ala Val Phe
 1 5 10
<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 29
Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu
1 5 10
<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<400> 30
Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu
1 5 10