



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0060940
 (43) 공개일자 2011년06월08일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>C07K 5/06</i> (2006.01) <i>C07K 5/10</i> (2006.01)
 <i>A61K 38/05</i> (2006.01) <i>A61K 38/07</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7009058</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년09월22일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년04월21일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2008/067076</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/032322
 국제공개일자 2010년03월25일</p> | <p>(71) 출원인
 닛신 파마 가부시키키가이샤
 일본 도쿄도 지요다꾸 간다 니시끼쵸 1쵸메 25반쵸</p> <p>(72) 발명자
 사토 겐지
 일본 교토후 교토시 사쿄쿠 시모가모 나카라기쵸 1-5 교토후리즈다이카쿠 나이
 오노 신
 일본 도야마켄 도야마시 고후쿠 3190 도야마다이 가쿠 나이
 스즈키 요시오
 일본 도쿄도 지요다쿠 간다니시키키쵸 1쵸메 25반쵸 닛신 파마 가부시키키가이샤 나이</p> <p>(74) 대리인
 특허법인코리아나</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 항염증성 펩티드

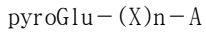
(57) 요약

효과가 높고 부작용의 우려가 없으며, 섭취가 용이하고 또한 가격적으로도 안전성 면에서도 장기간 복용할 수 있는 항염증 조성물을 제공한다. 본 발명은 pyroGlu-(X)n-A (X 는 동일하거나 상이하고, Gln, Asn 또는 Pro 이고, A 는 Gln, Asn, Leu, Ile, Met, Val 또는 Phe 이고, n 은 0 ~ 2 의 정수이다) 로 나타내는 아미노산 배열로 이루어지는 펩티드 또는 그 염, 그리고 이것을 함유하는 항염증 조성물에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

다음 식 :



(X 는 동일하거나 상이하고, Gln, Asn 또는 Pro 이고, A 는 Gln, Asn, Leu, Ile, Met, Val 또는 Phe 이고, n 은 0 ~ 2 의 정수이다)

로 나타내는 아미노산 배열로 이루어지는 펩티드 또는 그 염.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

X 가 Gln 또는 Pro 이고, A 가 Gln, Leu, Met, Val 또는 Phe 이고, n 이 0 또는 1 인 펩티드 또는 그 염.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

pyroGlu-Leu, pyroGlu-Val, pyroGlu-Met, pyroGlu-Phe, pyroGlu-Gln-Gln 및 pyroGlu-Pro-Gln 으로 이루어지는 군에서 선택되는 펩티드 또는 그 염.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 기재된 펩티드 또는 그 염의 적어도 1 종을 유효 성분으로 함유하는 항염증 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

종양 괴사 인자 변환 효소 및/또는 카스파아제 1 을 저해시킴으로써 염증을 억제하기 위한 조성물.

청구항 6

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서,

종양 괴사 인자 및/또는 인터류킨이 관여하는 염증성 질환 또는 상태를 예방, 개선 또는 치료하기 위한 조성물.

청구항 7

제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

식품의 형태인 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 항염증 활성을 갖는 펩티드, 그리고 그 펩티드를 유효 성분으로 하는 항염증 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 종양 괴사 인자 (TNF), 특히 TNF- α 는 염증성 세포로부터 방출되어 다채로운 세포 상해 반응, 면역 반응 및 염증 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. TNF- α 는 많은 염증 질환 및 자기 면역 질환의 발증이나 천연화 (遷延化) 에 관여하고, 또한 혈액 중에 방출되어 전신에 작용하면, 중증의 패혈증 및 패혈증성 쇼크를 일으키는 것이 알려져 있다. 이와 같이 TNF- α 는 생체의 면역계에 광범위하게 관련된 인자이기 때문에, TNF- α 를 억제하는 약제의 개발이 활발히 실시되고 있다. TNF- α 는 불활성형으로 생합성되고 프로테아제에 의해 절단되어 활성형이 되지만, 이 활성화에 관여하는 효소는 종양 괴사 인자 변환 효소 (TACE) 로 불리고 있다.

따라서 이 TACE 를 저해하는 물질은 TNF- α 에서 기인되는 질환, 병태, 이상 상태, 상태가 좋지 않음, 좋지 않은 자각 증상 등을 치료, 개선, 예방할 수 있다.

[0003] 인터류킨-1 (IL-1) 은 프로스타글란딘, 콜라게나제 및 포스포리파아제의 산생, 호염기구 및 호산구의 탈과립 그리고 호중구의 활성화를 자극하는 주요한 염증성 사이토카인이다. IL-1 의 생리 작용은 매우 다양한 분야에 걸쳐서, 면역 세포의 활성화나 분화·증식 촉진을 통해서 국소성 또는 전신성에 염증 반응을 야기시키고, 발열, 급성기 단백질의 유도, 파골 세포의 활성화 등에 관여한다. 이와 같이 IL-1 은 생체의 면역계에 광범위하게 관련하는 인자이기 때문에, IL-1 을 억제시키는 약제의 개발이 활발히 실시되고 있다. IL-1 은 IL-1 α , IL-1 β 의 서브 타입이 존재하지만, 모두 불활성형으로 생합성되고 프로테아제에 의해 절단되어 활성형이 된다. IL-1 β 의 활성화에 관여하는 효소는 카스파아제 1 (별명, 인터류킨 1 β 변환 효소 (ICE)) 로 불리고 있다. 따라서 이 ICE 를 저해시키는 물질은 IL-1 에서 기인되는 질환, 병태, 이상 상태, 상태가 좋지 않음, 좋지 않은 자각 증상 등을 치료, 개선, 예방할 수 있다.

[0004] 종래부터 TACE 저해제로서 수목인 모린다·시트리폴리아 L 유래의 성분이 있다 (특허문헌 1). 또, ICE 저해제로서 Cbz-Val-Ala-(OMe)-플루오로메틸케톤이 알려져 있다 (특허문헌 2). 그러나, 이들 성분은 간편하게 입수할 수 있는 것이 아니고, 입수할 수 있다 해도 섭취 용이성이나 안전성 등에 문제가 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 일본 공개특허공보 2007-016015호
(특허문헌 0002) 일본 공개특허공보 평11-302192호

발명의 내용

[0006] 본 발명의 과제는 효과가 높고 부작용의 우려가 없으며, 섭취가 용이하고 또한 가격적으로도 안전성 면에서도 장기간 복용할 수 있는 항염증 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명자들은 중앙 피사 인자 변환 효소 (TACE) 저해 작용을 갖는 물질 및 카스파아제 1 (ICE) 저해 작용을 갖는 물질의 검색을 예의 실시한 결과, 특정한 배열을 갖는 펩티드가 TACE 저해 활성 및 ICE 저해 활성을 갖는 것을 발견하여, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0008] 즉, 본 발명은 이하의 발명을 포함한다.

[0009] (1) 다음 식 :

[0010] $\text{pyroGlu}-(X)_n-A$

[0011] (X 는 동일하거나 상이하고, Gln, Asn 또는 Pro 이고, A 는 Gln, Asn, Leu, Ile, Met, Val 또는 Phe 이고, n 은 0 ~ 2 의 정수이다)

[0012] 로 나타내는 아미노산 배열로 이루어지는 펩티드 또는 그 염.

[0013] (2) X 가 Gln 또는 Pro 이고, A 가 Gln, Leu, Met, Val 또는 Phe 이고, n 이 0 또는 1 인 (1) 에 기재된 펩티드 또는 그 염.

[0014] (3) pyroGlu-Leu , pyroGlu-Val , pyroGlu-Met , pyroGlu-Phe , pyroGlu-Gln-Gln 및 pyroGlu-Pro-Gln 으로 이루어지는 군에서 선택되는 (2) 에 기재된 펩티드 또는 그 염.

[0015] (4) (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 기재된 펩티드 또는 그 염의 적어도 1 종을 유효 성분으로서 함유하는 항염증 조성물.

[0016] (5) 중앙 피사 인자 변환 효소 및/또는 카스파아제 1 을 저해시킴으로써 염증을 억제하기 위한 (4) 에 기재된 조성물.

[0017] (6) 중앙 피사 인자 및/또는 인터류킨이 관여하는 염증성 질환 또는 상태를 예방, 개선 또는 치료하기 위한 (4) 또는 (5) 에 기재된 조성물.

[0018] (7) 식품의 형태인 (4) 내지 (6) 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0019] 본 발명에 의해 종래의 의약품에 의한 치료보다 안전성이 높고 간단한 방법으로 섭취할 수 있는 항염증 조성물이 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명의 바람직한 실시형태에 대해 구체적으로 설명한다.

[0021] 본 발명자들은 $\text{pyroGlu}-(X)_n-A$ 로 나타내는 아미노산 배열로 이루어지는 펩티드 또는 그 염 (이하, 그 펩티드를 본 발명의 펩티드라고 칭하는 경우가 있다) 이 중앙 피사 인자 변환 효소 및/또는 카스파아제 1 을 저해시키는 활성을 가져, 항염증 작용을 갖는 것을 발견하였다. 여기서 pyroGlu 는 피로글루탐산을 나타내고, X 는 동일하거나 상이하고, Gln (글루타민), Asn (아스파라긴) 또는 Pro (프롤린), 바람직하게는 Gln 또는 Pro 이고, A 는 Gln , Asn , Leu (류신), Ile (이소류신), Met (메티오닌), Val (발린) 또는 Phe (페닐알라닌), 바람직하게는 Gln , Leu , Met , Val 또는 Phe 이고, n 은 0, 1 또는 2, 바람직하게는 0 또는 1 이다. 이 식으로 나타내는 펩티드로는, 예를 들어 pyroGlu-Leu , pyroGlu-Val , pyroGlu-Met , pyroGlu-Phe , pyroGlu-Gln-Gln 및 pyroGlu-Pro-Gln 등을 들 수 있다.

[0022] 피로글루탐산은 글루탐산의 γ 위치의 아미드기와 α 위치의 아미노기가 폐환한 것이다. 본 발명의 펩티드는 천연 혹은 재조합 단백질의 부분적 가수분해물, 화학 합성법에 의해 혹은 유전자 공학적으로 제조한 펩티드, 또는 이들의 조합이어도 된다.

[0023] 본 발명의 펩티드를 구성하는 아미노산으로는, D 체, L 체, DL 체 (라세미체) 중 어느것이나 사용할 수 있지만, 특히 L 체를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 펩티드를 천연 단백질의 부분 가수분해에 의해 조제하는 경우, 구성 아미노산은 모두 L 체가 된다. 본 발명의 펩티드를 화학 합성법에 의해 조제하는 경우, 구성 아미노산 전부가 L-아미노산 또는 D-아미노산으로 이루어지는 펩티드이어도, 아미노산 중 어느 것이 L-아미노산이고 나머지가 D-아미노산인 펩티드이어도 조제할 수 있고, 모두 본 발명의 펩티드에 포함된다.

[0024] 본 발명의 펩티드의 조성은 아미노산 분석법에 의해 확인할 수 있다. 그 때, 일반적으로 실시되고 있는 산 가수분해법으로는, 피로글루탐산도 글루타민도 글루탐산이 되어 버리기 때문에, 글루타민 및 피로글루탐산은 각각에 특이적 효소를 사용하여 분해 후 정량하는 방법이 바람직하게 사용된다. 또, 펩티드가 합성물인 경우, 합성시에 있어서의 각 아미노산의 사용량이나 비율 등에서 조성을 구할 수 있다.

[0025] 본 발명의 펩티드의 염은 약학적 또는 식품으로서 허용할 수 있는 염이면 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어 산부가염 및 염기부가염을 들 수 있다. 산부가염으로는 염산, 황산, 질산 및 인산 등의 무기산과의 염, 아세트산, 말산, 숙신산, 타르타르산 및 시트르산 등의 유기산과의 염을 들 수 있다. 염기부가염으로는 나트륨 및 칼륨 등의 알칼리 금속과의 염, 칼슘 및 마그네슘 등의 알칼리 토금속과의 염, 암모늄 및 트리에틸아민 등의 아민류와의 염을 들 수 있다.

[0026] 본 발명의 펩티드를 천연 단백질의 부분 가수분해에 의해 조제하는 경우, 단백질의 가수분해 방법으로는 공지된 방법을 적절히 채용할 수 있다. 구체적으로는 산을 사용하여 가수분해하는 방법이나, 프로테아제를 사용하여 가수분해하는 방법 등을 들 수 있다.

[0027] 가수분해에 사용하는 천연 단백질은 입수 가능한 것이면 어떠한 단백질이어도 되는데, 안전성이 확인된 단백질을 사용하는 것이 바람직하다. 그러한 단백질로서, 예를 들어 동물의 살, 가죽, 젖, 혈액 등에서 유래되는 동물성 단백질, 그리고 쌀이나 소맥 등의 곡류 및 감이나 복숭아 등의 과실류 등에서 유래되는 식물성 단백질을 들 수 있다. 이들 중에서도, 소맥의 종자에 함유되는 글루텐 등의 단백질은 글루타민이 풍부하게 함유되어 있는 것이 알려져 있어 본 발명의 펩티드를 조제하기 위한 원료로서 바람직하다.

[0028] 산을 사용하여 단백질을 가수분해하는 방법으로는 관용 방법을 채용할 수 있다. 산으로는 광산인 황산, 염산, 질산, 인산, 아황산 등, 유기산인 옥살산, 시트르산, 아세트산, 포름산 등을 사용할 수 있다.

[0029] 산을 사용하여 가수분해하는 경우, 수성 매체 중에 있어서의 단백질의 농도는 산의 종류나 규정에 따라 적절히 조절할 필요가 있지만, 통상적으로 1.0 ~ 80 질량% 로 조정하여 처리하는 것이 바람직하다.

[0030] 프로테아제를 사용하여 단백질을 가수분해하는 경우, 수성 매체 중, 1 종 또는 복수 종의 프로테아제를 작용시켜 가수분해물을 생성시킬 수 있다. 산성 프로테아제를 단독으로 사용하는 방법 및 산성 프로테아제와 중성 프로테아제 혹은 알칼리성 프로테아제를 사용하는 방법이 효율적으로 가수분해할 수 있다는 점에서 바람직하다.

또, 단백질로서 식물성 단백질을 사용하는 경우, 식물에 함유되는 전분이나 섬유질이 프로테아제 작용이나 정제시의 장애가 되는 경우가 있다. 그러한 경우, 전술한 프로테아제를 작용시키기 전후, 혹은 프로테아제와 함께 아밀라아제나 셀룰라아제 등의 당분해 효소를 작용시키는 것이 바람직하다.

- [0031] 이와 같이 하여 얻어진 단백질 가수분해물을 정제하는 방법으로는, 불용물을 여과하는 방법이나, 함수 알코올 등에 의해 분획 (추출) 하는 방법, 겔 여과 크로마토그래피 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC) 나 오토 포커싱으로 정제하는 방법 등을 들 수 있다.
- [0032] 본 발명의 펩티드를 화학 합성법에 의해 조제하는 경우, 액상 합성법 및 고상 합성법 중 어떤 것을 사용해도 된다. 바람직하게는, 고상 담체에 아미노산 또는 펩티드의 C 말단을, 링커를 개재하여 고정화시키고, 순차적으로 N 말단측으로 아미노산을 신장시켜 가는 고상 합성법이 바람직하다. 고상 합성법을 채용하는 경우, 펩티드 합성 장치 (예를 들어, 시마즈사 제조의 PSSM8, ABI 사 제조의 Model 433A 등) 를 사용하여 합성할 수도 있다.
- [0033] 고상 합성에 있어서 사용되는 고상 담체는 본 발명의 펩티드의 C 말단 아미노산인 Gln, Asn, Leu, Ile, Met, Val 또는 Phe 의 카르복실기와 결합성을 갖는 것이면 어느 것이어도 사용할 수 있고, 예를 들어 벤즈하이드릴 아민 수지 (BHA 수지), 클로로메틸 수지, 옥시메틸 수지, 아미노메틸 수지, 메틸벤즈하이드릴 수지 (MBHA 수지), 아세트아미드메틸 수지 (PAM 수지), p-알콕시벤질알코올 수지 (Wang 수지), 4-아미노메틸페녹시메틸 수지, 4-하이드록시메틸페녹시메틸 수지 등을 들 수 있다.
- [0034] 구체적인 합성법의 일례로 본 발명의 펩티드인 pyroGlu-Gln-Gln 을 조제하는 경우의 순서를 이하에 나타낸다.
- [0035] C 말단 아미노산인 글루타민 (Gln) 의 카르복실기를 보호한 것을 준비하고, 계속해서 아미노기가 Boc (tert-부틸옥시카르보닐) 기 또는 Fmoc (9-플루오렌틸메톡시카르보닐) 기 등의 보호기에 의해 보호되고, 카르복실기가 활성화된 2 번째 아미노산인 글루타민 (Gln) 을 축합시킨다. 이어서, 생성된 Gln-Gln 디펩티드의 N 말단측 글루타민의 아미노기의 보호기를 제거한 후, 아미노기가 Boc (tert-부틸옥시카르보닐) 기 또는 Fmoc (9-플루오렌틸메톡시카르보닐) 기 등의 보호기에 의해 보호되고, 카르복실기가 활성화된 3 번째 아미노산인 글루타민 (Gln) 을 축합시킨다. 고상 합성법을 사용하는 경우에는 C 말단 아미노산의 글루타민의 카르복실기를 보호하는 대신에, 고상 담체에 결합시키면 된다.
- [0036] 카르복실기의 활성화는 그 카르복실기와 각종 시약을 반응시켜, 대응하는 산클로라이드, 산무수물 혹은 혼합 산무수물, 아지드, 또는 -ONp 나 -OBt 등의 활성 에스테르 등을 형성시킴으로써 실시할 수 있다. 또, 상기 펩티드 축합 반응은 축합제나 라세미화 억제제, 예를 들어 디시클로헥실카르보디이미드 (DCC), 수용성 카르보디이미드 (WSCD), 카르보디이미다졸 등의 카르보디이미드 시약, 테트라에틸피로포스페이트, 1-하이드록시벤조트리아졸 (HOBt) 등의 존재하에 실시할 수도 있다.
- [0037] 합성 반응 종료 후, 고상 합성법의 경우에는 펩티드를 고상 담체로부터 해리시키고, 모든 보호기를 제거한 후 세정함으로써, Gln-Gln-Gln 트리펩티드를 미정제 펩티드 상태로 얻을 수 있다. 이어서, N 말단의 글루타민을 고리화시켜 피로글루탐산으로 함으로써 본 발명의 펩티드가 얻어진다. 고리화는 수용액 중에서도 서서히 진행되지만 온도를 상승시킴으로써 앞당길 수 있다. 또, N 말단 아미노산으로서 피로글루탐산을 축합 반응에 제공해서 조제할 수도 있다.
- [0038] 액상 합성법을 사용하는 경우, C 말단의 아미노산이 고상 담체에 결합되어 있지 않을 뿐, 고상 합성법과 동일한 수단에 의해 합성할 수 있다. 이와 같이 하여 얻어진 본 발명의 펩티드를 함유하는 미정제 펩티드는 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC) 등의 공지된 방법에 의해 적절히 정제시켜, 순도가 높은 펩티드로 얻을 수 있다.
- [0039] 상기와 같이 펩티드 화학 합성법에서는, C 말단측으로부터 N 말단측으로 순차적으로 아미노산을 축합-신장시켜 감으로써, 목적하는 아미노산 배열을 갖는 본 발명의 펩티드를 합성할 수 있다. 이때, 각 아미노산의 L 체 또는 D 체를 사용함으로써, 어느 하나의 아미노산이 L-아미노산이고, 나머지가 D-아미노산으로 이루어지는 펩티드를 합성할 수도 있다.
- [0040] 이와 같이 하여 얻어진 본 발명의 펩티드는 종양 괴사 인자 변환 효소 (TACE) 및/또는 카스파아제 1 (ICE) 을 저해하는 활성을 갖는다.
- [0041] TACE 저해 활성은 TACE 와 불활성형 TNF- α 를 반응시켜, 생성된 TNF- α 의 생성량이나 활성을 측정하는 방법, 또는 TACE 에 특이적인 기질과 반응시킨 생성 물량을 측정하는 방법 등에 의해 측정할 수 있다. 또, 시판되는 측정 키트 (Merck) 를 사용할 수도 있다.

- [0042] ICE 저해 활성은 ICE 와 불활성형 IL-1 β 를 반응시켜, 생성된 IL-1 β 의 생성량이나 활성을 측정하는 방법, 또는 ICE 에 특이적인 기질과 반응시킨 생성물량을 측정하는 방법 등에 의해 측정할 수 있다. 또, 시판되는 측정 키트 (R&D Systems) 를 사용할 수도 있다.
- [0043] TACE 는 염증성 세포로부터 방출되고, 다채로운 세포 상해 반응, 면역 반응 및 염증 반응을 일으키는 것으로 알려져 있는 종양 괴사 인자 (TNF), 특히 TNF- α 의 활성화에 관여하기 때문에, 이 TACE 를 저해시키는 활성을 갖는 본 발명의 펩티드는, 염증 특히 종양 괴사 인자 (바람직하게는 TNF- α) 에서 기인되는 염증을 억제시키는 활성을 갖는다. ICE 는 프로스타글란딘, 콜라게나제 및 포스포리파아제의 생성, 호염기구 및 호산구의 탈과립 그리고 호중구의 활성화를 자극하는 주요한 염증성 사이토카인으로서 국소성 또는 전신성에 염증 반응을 야기시키는 인터류킨, 특히 IL-1 β 의 활성화에 관여하기 때문에, 이 ICE 를 저해시키는 활성을 갖는 본 발명의 펩티드는 염증 특히 인터류킨 (바람직하게는 IL-1, 더욱 바람직하게는 IL-1 β) 에서 기인되는 염증을 억제하는 활성을 갖는다.
- [0044] 본 발명에 있어서 염증이란 물리적, 화학적 또는 생물학적인 요인에 의한 손상이나 자극에 대한 생체의 면역 반응의 결과 발생시키는 현상으로, 대부분의 경우, 염증 조직에 있어서의 통증, 열감 (熱感), 발적, 종창을 야기시키고, 또한 염증 조직의 기능 억제 또는 기능 상실을 발생시키는 경우도 있다.
- [0045] 따라서, 본 발명은 또한 상기 본 발명의 펩티드를 유효 성분으로서 함유하는, 항염증 조성물, 특히 TACE 및/또는 ICE 를 저해시킴으로써 염증을 억제시키기 위한 항염증 조성물에 관한 것이다 (이하, 본 발명의 조성물이라고 칭하는 경우가 있다). 본 발명의 조성물은 종양 괴사 인자 (특히 TNF- α) 및/또는 인터류킨 (특히 IL-1 β) 가 관여하는 염증성 질환 또는 상태를 예방, 개선 또는 치료하기 위한 조성물로서 사용할 수도 있다. 본 발명의 조성물은 본 발명의 펩티드를 1 종류만 함유하고 있어도 되고, 복수 종 함유하고 있어도 된다. 본 발명은 또한 본 발명의 펩티드 또는 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 염증을 억제시키는 방법, 특히 TACE 및/또는 ICE 를 저해시킴으로써 염증을 억제시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 펩티드 또는 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 종양 괴사 인자 (특히 TNF- α) 및/또는 인터류킨 (특히 IL-1 β) 가 관여하는 염증성 질환 또는 상태를 예방, 개선 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0046] 종양 괴사 인자 및/또는 인터류킨이 관여하는 염증성 질환 또는 상태로는, 구체적으로는 관절염, 염증, 류머티즘, 염증성 장질환, 크론씨병, 역류성 식도염, 기종, 천식, 만성 폐색성 폐질환, 알츠하이머병, 쇼그렌 증후군, 악액질, 화분증, 알레르기 반응, 음식 알레르기, 알레르기성 접촉 과민증, 접촉성 피부염, 암, 조직 궤양 형성, 재협착, 치주병, 표피 수포증, 골다공증, 이식 거절 반응, 임플란트 통증 등의 문제, 인공 관절의 통증 등의 문제, 동맥경화증, 대동맥 동맥류, 울혈성 심부전, 심근경색, 대뇌허혈, 허혈재관류 증상, 자궁 내막증, 전신 알레르기, 신경 변성 장애, 자기 면역 장애, 헌팅턴병, 파킨슨병, 편두통, 우울증, 골과괴성 질환, 수막염, 신경 장애성 동통, 근위축성측색경화증, 다발성 경화증, 강피증, 건선, 안신맥관 형성, 결막 장애, 각막 장애, 각막 반흔, 강막염, 황반변성, 이상창상유합, 열상, 당뇨병, 종양 침윤, 종양 증식, 종양 전이, AIDS, 패혈증 및 패혈증성 쇼크를 들 수 있고, 본 발명의 조성물은 특히 류머티즘의 예방, 개선 또는 치료에 특히 유효하다.
- [0047] 그 밖에, 종양 괴사 인자 및/또는 인터류킨이 관여하는 질환이나 병태로서 피로, 만성 피로 증후군, 근육통 등이 알려져 있고, 본 발명은 또한 이들에 대해서도 특히 유효하다.
- [0048] 본 발명에 있어서 질환 또는 상태의 예방에는 질환 또는 상태의 발증을 억제시키는 것 및 지연시키는 것이 포함되고, 질환 또는 상태가 되기 전의 예방뿐만 아니라 치료 후의 질환 또는 상태의 재발에 대한 예방도 포함된다. 본 발명에 있어서 질환 또는 상태의 치료에는, 질환 또는 상태를 치유하는 것, 증상을 개선시키는 것 및 증상의 진행을 억제시키는 것이 포함된다. 항염증 활성이란 염증을 억제시키는 활성을 가리키고, 염증을 억제에는 염증을 예방 및 치료가 포함되고, 염증을 억제시키는 것, 염증의 진행을 억제시키는 것, 염증을 치유하는 것 및 염증을 개선하는 것이 포함된다.
- [0049] 본 발명에 있어서 포유 동물은 온혈 척추동물을 가리키고, 예를 들어 사람 및 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 및 토끼 등의 설치류, 개 및 고양이 등의 애완동물, 그리고 소, 말 및 돼지 등의 가축을 들 수 있다. 본 발명의 조성물은 영장류, 특히 사람에 대한 투여에 바람직하다. 염증을 갖고 있는 사람, 염증을 갖고 있는 것으로 진단받은 사람, 염증이 발병될 가능성이 있는 사람, 염증을 예방할 필요가 있는 사람에게, 본 발명의 조성물을 투여하는 것이 특히 바람직하다.
- [0050] 본 발명의 조성물은 통상적인 경우, 펩티드의 질량으로 성인 1 일당 0.01 ~ 20 g, 바람직하게는 0.1 ~ 10 g 의 범위에서 투여된다. 본 발명에서 사용되는 펩티드를 천연 단백질을 부분 가수분해하여 조제하는 경우,

천연물에서 유래되는 안전성이 높은 것이므로, 그 투여량을 더욱 늘릴 수도 있다. 투여량은 효과 등을 보면서 적절히 증감시키는 것이 바람직하다. 1 일당 투여량을 1 회에 투여 또는 섭취할 수도 있지만, 몇 회로 나누어 투여하는 것이 바람직하다.

- [0051] 본 발명의 항염증 조성물의 형태는 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 의약 조성물 및 식품 (사료를 포함함) 으로 조제할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 조성물을 의약 조성물로 조제하는 경우에는, 통상적으로 본 발명의 펩티드와 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제제로서 조제한다. 약학 적으로 허용되는 담체란, 일반적으로 유효 성분인 본 발명의 펩티드와는 반응하지 않는 불활성의, 무독의, 고체 또는 액체의, 증량제, 희석제 또는 캡슐화 재료 등을 말하고, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌글리콜, 액체 폴리에틸렌글리콜 등), 적절한 그들의 혼합물, 식물성 오일 등의 용매 또는 분산 매체 등을 들 수 있다.
- [0053] 의약 조성물의 제형은 특별히 제한되지 않고, 정제, 환제, 과립제, 분제, 세립제, 산제, 캡슐제, 시럽제, 드링크제, 액제, 좌제, 유동식 등의 경구 투여 형태, 설하정, 점비 스프레이제, 주사제 등의 비경구 투여 형태 등 임의의 제형으로 할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 의약 조성물의 투여 방법으로는, 경구 투여 외에 의약의 투여에 일반적으로 사용되고 있는 투여 방법, 예를 들어 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 등을 들 수 있다. 또 직장, 설하, 비강 내 등 소화관 이외의 점막으로부터 흡수하게 하는 투여 방법을 채용할 수도 있고, 이 경우 예를 들어, 좌제, 설하정, 점비 스프레이제 등의 형태로 투여할 수 있다.
- [0055] 의약 조성물에 있어서의 본 발명의 펩티드 함유량은 그 형태에 따라 상이한데, 건조 질량을 기준으로 하여 통상적으로 0.001 ~ 99 질량%, 바람직하게는 0.01 ~ 90 질량%, 보다 바람직하게는 1 ~ 85 질량%, 더욱 바람직하게는 5 ~ 80 질량% 의 범위이고, 상기 서술한 성인 1 일당 섭취량을 달성할 수 있도록, 1 일당 투여량을 관리할 수 있는 형태로 하는 것이 바람직하다.
- [0056] 본 발명의 조성물을 식품으로 조제하는 경우, 그 형태는 특별히 제한되지 않는다. 식품에는 음료도 포함되고 건강 식품 및 기능성 식품도 포함된다. 건강 식품 및 기능성 식품은 구체적으로는 정제, 환제, 과립제, 분제, 세립제, 산제, 캡슐제, 시럽제, 드링크제, 액제, 유동식 등의 각종 제제 형태로 할 수 있다. 제제 형태의 식품은 상기 의약 조성물과 동일하게 제조할 수 있고, 예를 들어 적당한 부형제 (예를 들어, 전분, 가공 전분, 유당, 포도당, 물 등) 를 첨가한 후, 관용 수단을 사용하여 제조할 수 있다. 식품의 구체예로서 또한 커피 음료, 차 음료, 과즙이 들어간 음료, 청량 음료, 유음료, 버터, 마요네즈, 쇼트닝, 마가린, 여러 가지의 샐러드 드레싱, 빵류, 면류, 쌀밥류, 파스타, 소스류, 과자, 쿠키류, 초콜릿, 캔디, 추잉껌, 각종 조미료, 각종 다이어트 제품 등을 들 수 있다. 이들 식품에 본 발명의 펩티드를 배합함으로써, 본 발명의 식품 형태의 조성물을 조제 해도 된다.
- [0057] 본 발명의 식품에 있어서, 본 발명의 펩티드 함유량은 식품의 형태에 따라 상이한데, 건조 질량을 기준으로 하여 통상적으로 0.01 ~ 80 질량%, 바람직하게는 0.1 ~ 75 질량%, 보다 바람직하게는 1 ~ 70 질량%, 더욱 바람직하게는 5 ~ 70 질량% 의 범위이다. 본 발명의 펩티드는 안전성이 높은 것이므로 그 함유량을 더욱 늘릴 수도 있다. 1 일당 섭취량은 1 회에 섭취해도 되지만, 몇 회로 나누어 섭취해도 된다. 상기 서술한 성인 1 일당 섭취량을 달성할 수 있도록 관리할 수 있는 형태로 하는 것이 바람직하다.
- [0058] 항염증 작용을 갖는 본 발명의 펩티드 혹은 그 염, 또는 이것을 함유하는 본 발명의 조성물을 섭취함으로써, 염증을 억제시키고 특히 종양 괴사 인자 및/또는 인터류킨이 관여하는 염증성 질환 또는 상태의 예방, 개선 또는 치료의 효과를 기대할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 조성물에는 의약, 식품, 사료의 제조에 사용되는 여러 가지의 첨가제를 배합할 수 있고, 추가로 여러 가지의 활성 물질과 공존시켜도 된다. 이와 같은 첨가제 및 활성 물질로는, 각종 유지, 생약, 아미노산, 다가가 알코올, 천연 고분자, 비타민, 미네랄, 식물 섬유, 계면활성제, 정제수, 부형제, 안정제, pH 조제제, 산화방지제, 감미료, 정미 (呈味) 성분, 산미료, 착색료 및 향료 등을 들 수 있다. 또, 본 발명의 펩티드는 항염증 활성을 갖는 그 밖의 유효 성분의 1 종 또는 복수 종과 혼합 또는 조합하여 투여할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항염증 조성물은 본 발명의 펩티드에 첨가하여 항염증 활성을 갖는 그 밖의 유효 성분을 포함하고 있어도 된다.
- [0060] 상기 각종 유지로는, 예를 들어 대두유, 새플라워유, 올리브유 등의 식물 유지, 우지, 정어리유 등의 동물 유지

를 들 수 있다.

- [0061] 상기 생약으로는, 예를 들어 우황, 지황, 구기자나무, 로얄젤리, 인삼, 녹용 등을 들 수 있다.
- [0062] 상기 아미노산으로는, 예를 들어 시스테인, 류신, 아르기닌 등을 들 수 있다.
- [0063] 상기 다가 알코올로는, 예를 들어 에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 글리세린, 당 알코올 등을 들 수 있다. 당 알코올로서, 예를 들어 소르비톨, 에리트리톨, 자일리톨, 말티톨, 만니톨 등을 들 수 있다.
- [0064] 상기 천연 고분자로는, 예를 들어 아라비아 검, 한천, 수용성 콘 화이버, 젤라틴, 크산탄 검, 카세인, 글루텐 또는 글루텐 가수분해물, 레시틴, 텍스트린 등을 들 수 있다.
- [0065] 상기 각종 비타민으로는, 예를 들어 비타민 C (아스코르브산), 비타민 B 군, 비타민 E (토코페롤) 이외에, 비타민 A, D, K, 부티르산리보플라빈 등이 포함된다. 또, 비타민 B 군에는 비타민 B1, 비타민 B1 유도체, 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 B12, 또한 비오틴, 판토텐산, 니코틴산, 엽산 등의 각종 비타민 B 복합체가 포함 된다. 비타민 B1 및 그 유도체에는 티아민 또는 그 염, 티아민디술파이드, 푸르솔티아민 또는 그 염, 디세티아민, 비스부티티아민, 비스벤티아민, 벤펜티아민, 모노포스페이트디술파이드, 시코티아민, 옥토티아민, 프로솔티아민 등의 비타민 B1 의 생리 활성을 갖는 모든 화합물이 포함된다.
- [0066] 상기 미네랄로는, 예를 들어 칼슘, 마그네슘, 아연, 철 등을 들 수 있다.
- [0067] 상기 식물 섬유로는, 검류, 만난, 펙틴, 헤미셀룰로오스, 리그닌, β -글루칸, 자일란, 아라비노자일란 등을 들 수 있다.
- [0068] 상기 계면활성제로는, 예를 들어 글리세린지방산에스테르, 소르비탄지방산에스테르, 자당지방산에스테르 등을 들 수 있다.
- [0069] 상기 부형제로는, 예를 들어 백당, 포도당, 콘스타치, 인산칼슘, 유당, 텍스트린, 전분, 결정 셀룰로오스, 사이클로덱스트린 등을 들 수 있다.
- [0070] 항염증 활성을 갖는 그 밖의 유효 성분으로는, 예를 들어 모린다·시트리폴리아 L 유래의 성분, Cbz-Val-Ala-(OMe)-플루오로메틸케톤, 감초, 글리시리진산, 베톨린, 우르솔산, 프로폴리스, 알로에, 아세로라, 유칼리 엑기스, 카미즈레 엑기스, 황백, 캄퍼, 벨라도나, 인도메타신, 이브프로펜, 피록시캄, 살리실산, 디클로페낙, 케토프로펜, 나프록센, 피록시캄 등을 들 수 있다.
- [0071] 상기 이외에, 예를 들어 타우린, 글루타티온, 카르니틴, 크레아틴, 코엔자임 Q, α -리포산, 글루크론산, 글루크로노락톤, 테아닌, γ -아미노부티르산, 캡사이신, 각종 유기산, 플라보노이드류, 폴리페놀류, 카테킨류, 크산틴 유도체, 푸락토올리고당 등의 난소화성 올리고당, 폴리비닐피롤리돈 등을 첨가제로서 배합해도 된다. 이들 첨가제의 배합량은 첨가제의 종류와 원하는 섭취량에 따라 적절히 결정되지만, 일반적으로는 0.01 ~ 30 질량% 의 범위이고, 바람직하게는 0.1 ~ 10 질량% 의 범위이다.
- [0072] 하기의 실시예에 의해 본 발명의 펩티드 및 조성물의 제조에 및 시험예를 구체적으로 설명하는데, 본 발명은 이하의 실시예에 의해 전혀 한정되지 않는다.
- [0073] 실시예
- [0074] (제조예 1) pyroGlu-Gln-Gln 의 합성
- [0075] ABI 사 제조의 Model 433A 펩티드 합성 장치를 사용하여 고상법으로 합성하였다.
- [0076] Boc-Gln-Pam 수지 2 g 을 출발 원료로 하고, Boc-Gln, Boc-Glu (OBzl) 의 각 보호 아미노산을 사용하여 이하의 순서로 자동 합성을 실시하였다.
- [0077] (1) Boc-Gln-Pam 수지의 Boc 기의 제거 반응
- [0078] (2) 세정
- [0079] (3) Boc-Gln 의 활성화
- [0080] (4) Gln-Pam 수지에 활성화 Boc-Gln 을 첨가하여 축합 반응
- [0081] (5) 세정

- [0082] (6) 미반응 N 단 아미노기의 아세틸화 반응
- [0083] (7) 세정
- [0084] (8) Boc-Gln-Gln-Pam 수지의 Boc 기의 제거 반응
- [0085] (9) 세정
- [0086] (10) Boc-Glu (OBzl) 의 활성화
- [0087] (11) Gln-Gln-Pam 수지에 활성화 Boc-Glu (OBzl) 를 첨가하여 축합 반응
- [0088] (12) 세정
- [0089] (13) 미반응 N 단 아미노기의 아세틸화 반응
- [0090] (14) 세정
- [0091] (15) Boc-Glu (OBzl)-Gln-Gln-Pam 수지.
- [0092] 또한, Boc 기의 제거 반응은 트리플루오로아세트산-디클로로메탄 (50 : 50) 으로 20 분간 처리함으로써 실시하였다. 세정 공정은 전부 디클로로메탄을 사용하여 3 회 실시하였다. 축합 반응은 Boc 보호 아미노산을 DCC, HOBt 의 존재하, 수지 결합 아미노기의 5 배 등량을 첨가하고, 60 분간 반응시킴으로써 실시하였다.
- [0093] 얻어진 Boc-Glu (OBzl)-Gln-Gln-Pam 수지를 펩티드 합성 장치로부터 꺼내 다른 용기로 옮기고, 수지 1 g 당 티오아니솔 1 ml, 에탄디티올 0.5 ml 를 첨가하여 실온에서 10 분간 교반하였다. 다음으로 빙랭하에서 불화 수소 10 ml 를 천천히 첨가하여 30 분간 교반한 후, 불화 수소를 감압 증류 제거하였다. 차가운 디에틸에테르 100 ml 로 용기를 채우고, 1 분간 교반하여 펩티드 및 수지를 석출시켰다. 이것을 폴리프론필터 PF060 (아드반테크 제조) 으로 여과 채취하고, 차가운 디에틸에테르 (-40 °C) 로 세정하였다. 미리 준비한 차가운 디에틸에테르 300 ml 에 펩티드를 트리플루오로아세트산 약 30 ml 로 용해시켜 적하하고, 다시 석출시켰다. 이것을 3 µm 구멍 PTFE 막 (아드반테크 제조) 으로 여과 채취하여 차가운 디에틸에테르 (-40 °C) 로 세정하고, 펩티드를 2 N 아세트산에 용해 후, 동결 건조시켰다. 보호 펩티드-Pam-수지 2.35 g 으로부터 미정제 펩티드 1.21 g 을 얻었다. 미정제 펩티드를 물에 용해하고, 60 °C 에서 6 시간 피로글루탐산으로 고리화 반응을 실시하고, 동결 건조시켰다.
- [0094] 얻어진 미정제 펩티드를 하기 조건의 HPLC 로 정제하였다.
- [0095] 칼럼 : Inertsil ODS-3 φ 20 × 250 mm (GL 사이언스 제조)
- [0096] 이동상 : 0.1 % 트리플루오로아세트산 → 0.1 % 트리플루오로아세트산 중 35 % 아세토니트릴의 농도 구배
- [0097] 유속 : 10 ml/분
- [0098] 검출기 : 자외 분광 광도계 210 nm
- [0099] 온도 : 40 °C
- [0100] HPLC 크로마토그램의 메인 피크를 분취하고, 펩티드 시퀀서를 사용하여 분취물의 아미노산 배열을 해석하였다. 1 g 의 미정제 펩티드로부터 0.88 g 의 pyroGlu-Gln-Gln 정제 펩티드를 얻었다.
- [0101] (제조예 2) pyroGlu-Leu 의 합성
- [0102] Boc 메소드를 사용하여 액상법에 의해 합성하였다.
- [0103] (1) Boc-pyroGlu 와 HCl Leu-O^tBu 의 축합 반응
- [0104] 가지형 플라스크에 HCl Leu-O^tBu (390 mg) 를 넣고 DMF 5 ml 에 용해 후, 빙랭시키고 트리에틸아민 0.124 ml 를 첨가하였다. 이어서 Boc-pyroGlu-OH (400 mg), HOBt (470 mg), WSCD HCl (367 mg) 을 첨가하고, 빙랭하 12 시간 교반하여 축합 반응시켰다. 반응 종료 후, 감압하여 DMF 를 증류 제거하고, 잔류물을 아세트산 에틸에 용해시킨 후, 5 % 탄산수소나트륨 수용액, 10 % 시트르산 수용액, 물, 포화 식염수의 순서로 아세트산 에틸을 세정 후, 무수황산나트륨 상에서 건조시켰다. 황산 나트륨을 여과 분리하고, 여과액을 감압 농축하여 얻어진 잔류물에 에테르-헥산을 첨가하고 Boc-pyroGlu-Leu-O^tBu 를 고화시켜, 채취하였다. 수량은 609

mg, 수율 88 % 이었다.

[0105] (2) 탈보호

[0106] 상기에서 얻어진 Boc-pyroGlu-Leu-O^tBu (600 mg) 를 가지형 플라스크에 취하고, 트리플루오로아세트산 5 ml 를 첨가하여 용해시키고, 1 시간 병행하에서 탈보호 반응시켰다. 트리플루오로아세트산은 N₂ 가스로 제거하고, 탈보호 펩티드를 에테르를 첨가하여 고화시킨 후, 여과 채취하였다. 얻어진 고체를 4N HCl/디옥산에 용해시키고, 에테르를 첨가하여 재차 고화시켜 여과 채취하였다. 수량 220 mg, 수율 53 % 이었다.

[0107] (제조예 3) pyroGlu-Val 의 합성

[0108] 제조예 2 와 동일한 방법으로 HCl H-Val-O^tBu 209.7 mg 을 출발 원료로서 합성하였다. 축합 반응의 수량은 326.6 mg, 수율 85 % 이고, 탈보호 펩티드는 수량 205.0 mg, 수율 91 % 이었다.

[0109] (제조예 4) pyroGlu-Met 의 합성

[0110] 제조예 2 와 동일한 방법으로 HCl H-Met-O^tBu 241.8 mg 을 출발 원료로서 합성하였다. 축합 반응의 수량은 208.3 mg, 수율 50 % 이고, 탈보호 펩티드는 수량 90.3 mg, 수율 60% 이었다.

[0111] (제조예 5) pyroGlu-Phe 의 합성

[0112] 제조예 2 와 동일한 방법으로 HCl H-Phe-O^tBu 257.8 mg 을 출발 원료로서 합성하였다. 축합 반응의 수량은 242.9 mg, 수율 56 % 이고, 탈보호 펩티드는 수량 103.1 mg, 수율 59 % 이었다.

[0113] (제조예 6) pyroGlu-Gln-Gln 의 합성

[0114] Fmoc 메소드를 사용하여 액상법에 의해 합성하였다.

[0115] (1) Fmoc-Gln (Trt) -Gln-O^tBu 의 합성

[0116] 가지형 플라스크에 HCl H-Gln-O^tBu (1.15 g) 를 넣고 DMF 5 ml 에 용해 후, 병행시키고 트리에틸아민 0.74 ml 를 첨가하였다. 이어서 Fmoc-Gln (Trt)-OH (2.94 g), HOBt (1.3 g), WSCD HCl (1.01 g) 을 첨가하고, 병행하 12 시간 교반하여 축합 반응시켰다. 반응 종료 후, 감압하여 DMF 를 증류 제거하고, 잔류물을 아세트산에틸에 용해시킨 후, 5 % 탄산수소나트륨 수용액, 10 % 시트르산 수용액, 물, 포화 식염수의 순서로 아세트산에틸을 세정 후, 무수황산나트륨 상에서 건조시켰다. 황산나트륨을 여과 분리하고, 여과액을 감압 농축하여 얻어진 잔류물에 에테르-헥산을 첨가하고 Fmoc-Gln(Trt)-Gln-O^tBu 고화시켜 채취하였다. 수량 3.51 g, 수율 92 % 이었다.

[0117] (2) Fmoc-Gln(Trt)-Gln-O^tBu 의 탈 Fmoc 기

[0118] 가지형 플라스크에 Fmoc-Gln(Trt)-Gln-O^tBu (1.12 g) 를 취하고, 1M NaOH 수용액 7 ml 를 병행하에서 첨가하였다. 백탁이 발생하였으므로 메탄올을 첨가하여 용해시키고, 0 °C 에서 2 시간 반응시켰다. 시트르산을 첨가하여 중화 후, 감압 농축하여 얻어진 백색 고체에 물을 첨가하여 교반하고, 검 형상의 고형물을 얻었다. 이것을, 클로로포름을 용매로 하여 실리카겔 칼럼에 실시하고 목적 성분을 분취하여 에테르로 고화시켰다. 수량은 590 mg, 수율 73 % 이었다.

[0119] (3) Boc-pyroGlu-Gln(Trt)-Gln-O^tBu 의 합성

[0120] 가지형 플라스크에 H-Gln(Trt)-Gln-O^tBu (580 mg) 를 넣고 DMF 5 ml 에 용해 후, 병행하여 트리에틸아민 156 μl 를 첨가하였다. 이어서 Boc-pyroGlu-OH (232 mg), HOBt (273 mg), WSCD HCl (213 mg) 를 첨가하고, 병행하 12 시간 교반하여 축합 반응시켰다. 감압하여 DMF 를 증류 제거하고, 잔류물을 아세트산에틸에 용해시킨 후, 5 % 탄산수소나트륨 수용액, 10 % 시트르산 수용액, 물, 포화 식염수의 순서로 아세트산 에틸을 세정 후, 무수 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 황산 나트륨을 여과 분리하고 여과액을 감압 농축하여 얻어진 잔류물을 추가로 진공 펌프로 감압하여 용매를 제거하였다. 수량 509.3 mg, 수율 64 % 이었다.

[0121] (4) 탈보호

- [0122] Boc-pyroGlu-Gln(Trt)-Gln-O^tBu (760 mg) 를 가지형 플라스크에 취하고, 트리플루오로아세트산 10 ml 를 첨가하여 용해시키고, 4 시간 빙랭하에서 반응시켰다. 트리플루오로아세트산은 N₂ 가스로 제거하고 에테르를 첨가하여 탈보호 펩티드를 고화시켰다. 원심분리에 의해 고체를 채취하고, 재차 에테르를 첨가하여 현탁시켜 원심분리로 고체를 채취하였다. 이 조작을 3 회 반복하여 미정제 펩티드를 얻었다. 수량 445 mg, 수율 100 % 이었다.
- [0123] (5) pyroGlu-Gln-Gln 의 정제
- [0124] 상기에서 얻어진 미정제 펩티드에는 물에 불용성인 불순물이 포함되어 있었으므로, 미정제 펩티드를 물에 현탁시키고 필터를 통과시켜 여과액을 모았다. 여과액에 1M 염산 2 ml 를 넣어 동결 건조시켰다. 동결 건조물에 에테르를 첨가하여 본 발명의 펩티드를 고화시키고 고체를 채취하여 건조시켰다. 최종 수량 256 mg, 수율 63 % 이었다.
- [0125] (제조예 7) pyroGlu-Pro-Gln 의 합성
- [0126] 제조예 6 과 동일하게 Fmoc 메소드를 사용하여 액상법에 의해 합성하였다. 최종 수량 174 mg, 수율 49 % 이었다.
- [0127] (제조예 8) 천연 단백질로부터의 pyroGlu-Gln-Gln, pyroGlu-Gln, pyroGlu-Leu, pyroGlu-Ile 의 추출
- [0128] (1) 반응 가마에 이온 교환수 9,700 kg, 무수 시트르산 38 kg 및 소맥글루텐 (활성 글루텐, Weston Foods Limited 제조) 1,500 kg 을 투입하고, 45 °C 로 가온시킨 후, 프로테아제 (아마노 제약 주식회사 제조 「프로테아제 M 아마노」) 2.2 kg 및 아밀라아제 (한큐 바이오인더스트리 주식회사 제조 「액화 효소 T」) 1.1 kg 을 첨가하고, 45 °C 에서 5 시간 가수분해 반응을 실시하고, 이어서 25 % 수산화 나트륨 수용액을 사용하여 액의 pH 를 4.4 ~ 4.5 로 조정하여 7 시간 유지하여 효소 처리를 실시하였다.
- [0129] (2) 이어서, 액을 80 °C 로 20 분간 유지시켜 프로테아제를 실활시킨 후, 65 °C 로 냉각시키고, 거기에 아밀라아제 (한큐 바이오인더스트리 주식회사 제조 「액화 효소 T」) 0.5 kg 을 첨가하여 소맥글루텐 중에 포함되어 있던 전분질 및 섬유질을 가수분해시킨 후, 액을 90 °C 로 20 분간 유지시켜 아밀라아제를 실활시켰다.
- [0130] (3) 다음으로, 액을 10 °C 이하로 냉각시킨 후, 재차 55 °C 로 가열시키고, 거기에 활성탄 (타케다 약품공업 주식회사 제조 「타케콜」) 100 kg 을 첨가하여 55 °C 에서 30 분간 교반하였다.
- [0131] (4) 액 온도를 45 °C 로 하고 농과 (濃過) 보조제 (쇼와 화학 공업 주식회사 제조 「라디오라이트」) 를 첨가하고, 가압 여과 장치를 사용하여 여과를 실시하고, 여과액 7,000 리터 (7 m³) 를 회수하였다.
- [0132] (5) 상기 (4) 에서 회수한 여과액을 감압하에서 농축시킨 후, 플레이트 히터를 사용하여 110 °C 에서 20 초간 가열하여 살균하고, 이어서 55 °C 까지 냉각시켰다.
- [0133] (6) 상기 (5) 에서 얻어진 액을 분무 건조 장치를 사용하여 송풍 온도 160 °C, 배풍 온도 80 °C 의 조건하에서 분무 건조시키고, 소맥글루텐의 가수분해물의 분말 약 1,000 kg 을 얻었다.
- [0134] (7) 상기 (6) 에서 얻어진 분말로부터 겔 여과법을 사용하여 분자량 1000 이하의 획분을 분취하고, 또한 HPLC 를 사용하여 정제를 실시하였다. HPLC 에서는 제조예 1 과 동일한 방법으로 얻어진 pyroGlu-Gln-Gln, pyroGlu-Gln, pyroGlu-Leu, pyroGlu-Ile 합성품을 기준으로, 동일한 조건에서 동일한 리텐션 타임의 부분을 채취하였다. 그 결과, 800 kg 의 소맥글루텐의 가수분해물 분말로부터 각각 4.5 kg, 1.6 kg, 0.9 kg, 0.7 kg 의 펩티드를 얻을 수 있었다.
- [0135] (8) 펩티드 시퀀서를 사용하여 정제한 펩티드의 아미노산 배열을 해석한 바, 각각 pyroGlu-Gln-Gln, pyroGlu-Gln, pyroGlu-Leu, pyroGlu-Ile 의 배열을 갖고 있었다.
- [0136] (실시예 1) 정제의 제조
- [0137] 제조예 8 에서 얻어진 pyroGlu-Leu 펩티드 84 g, 결정 셀룰로오스 (아사히카세이 주식회사 제조) 10 g 및 폴리비닐피롤리돈 (BASF 사 제조) 5 g 을 혼합하고, 이것에 에탄올 3 ml 를 첨가하여 습식법에 의한 통상적인 방법에 따라 유립 (類粒) 을 제조하였다. 그에 의해 얻어진 유립을 건조시킨 후, 스테아르산 마그네슘 1.1 g 을 첨가하여 타정용 과립 분말로 하고, 타정기를 사용하여 타정하고 1 정이 1 g 인 정제 100 개를 제조하였다 (정제 1 정당의 pyroGlu-Gln 함유량 0.84 g).

- [0138] (실시예 2) 시럽제의 제조
- [0139] 정제수 400 g 를 끓이고, 이것에 백당 750 g 및 제조예 8 에서 얻어진 pyroGlu-Leu 펩티드 100 g 을 섞으면서 첨가하여 용해시키고, 뜨거울 때에 천으로 거르고, 이것에 정제수를 첨가하여 전체량을 1000 ml 로 하여 시럽제를 제조하였다 (시럽제 100 ml 당의 pyroGlu-Leu 함유량 10 g).
- [0140] (실시예 3) 과립제의 제조
- [0141] 제조예 8 에서 얻어진 pyroGlu-Leu 펩티드 76 g, 유당 (DMV 사 제조) 13.3 g, 결정 셀룰로오스 (아사히카세이 주식회사 제조) 6.7 g 및 폴리비닐피롤리돈 (BASF 사 제조) 4 g 을 혼합시키고, 이것에 에탄올 30 ml 를 첨가하고 습식법에 의한 통상적인 방법에 따라 과립을 제조하고, 건조 후, 정립하여 과립제를 얻었다 (과립제 10 g 당의 pyroGlu-Ile 함유량 7.6 g).
- [0142] (실시예 4) 유동식의 제조
- [0143] 약 65 °C 의 순수 750 ml 에 카세인 나트륨 (DMV 사 제조) 40 g, 말토덱스트린 (산와 덴펜사 제조) 160 g 및 제조예 8 에서 얻어진 pyroGlu-Leu 펩티드 25 g 을 첨가하여 용해시키고, 이어서 비타민 믹스 5 g, 그리고 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 염소, 철, 인, 구리, 아연, 망간 및 황의 미네랄 혼합액 5 g 을 첨가하였다. 혼합액을 호모 믹서 (토쿠슈 키카 공업 제조) 에 투입하고 약 8000 rpm 으로 15 분간 거칠게 유화시켰다. 얻어진 유화액을 약 20 °C 로 냉각시키고 향료를 첨가 후, 1000 ml 에 최종 메스업을 실시하였다. 이 액 230 g 을 파우치에 충전 후, 질소 치환을 실시하면서 파우치를 밀봉하고 121 °C 에서 15 분간 살균을 실시하여 농후 유동식을 얻었다 (유동식 230 g 당의 pyroGlu-Ile 함유량은 약 5.8 g).
- [0144] (실시예 5) 빵의 제조
- [0145] 소맥분 (강력분) 150 g 과 드라이 이스트 2 g 을 섞었다. 그 밖에, 제조예 8 에서 얻어진 pyroGlu-Gln-Gln 펩티드 20 g, 설탕 20 g, 식염 3 g, 탈지분유 6 g 을 온탕 70 g 에 녹이고, 계란 1 개를 첨가하여 잘 섞었다. 이것을 소맥분에 첨가하여 손으로 잘 반죽한 후, 버터 약 40 g 을 첨가하여 다시 반죽하고, 20 개의 롤 빵 생지를 만들었다. 이어서, 발효시킨 후 표면에 푼 계란을 바르고, 오븐에서 180 °C 에서 약 15 분 구워, 롤 빵을 제조하였다 (이 롤 빵은 1 개 당 pyroGlu-Gln-Gln 을 약 1 g 함유하였다).
- [0146] (실시예 6) 파스타용 미트 소스의 제조
- [0147] 파스타용 미트 소스 1 인분 (150 g) 을 도가니에 넣고, 동시에 제조예 8 에서 얻어진 pyroGlu-Gln-Gln 펩티드 5 g 을 첨가하여 가운시키고, 파스타용 미트 소스를 조제하였다. 이 소스를 파우치에 충전시킨 후, 질소 치환을 실시하면서 파우치를 밀봉하고, 121 °C 에서 15 분간 살균을 실시하여 pyroGlu-Gln-Gln 펩티드를 함유하는 파스타용 미트 소스를 얻었다.
- [0148] (실시예 7) 우동의 제조
- [0149] 소맥분 (중력분) 300 g 에 대해, 물 150 g 에 제조예 8 에서 얻어진 pyroGlu-Leu 펩티드 15 g 및 식염 15 g 을 분산시킨 것을 첨가하여 잘 섞어 반죽해 둔다. 이 후, 생지를 연신시켜 폭 약 5 mm 로 절단하여 우동을 제조하였다. 이것을 비등시킨 뜨거운 물에서 약 10 분 삶은 결과, 외관, 맛, 식감 모두 양호하였다. 이 우동은 1 식사 분 당의 pyroGlu-Gln 펩티드를 약 5 g 함유하였다.
- [0150] (시험예 1) TACE 저해 활성의 측정
- [0151] 상기 제조예에서 합성한 피로글루타미드 펩티드 (pyroGlu-Leu, pyroGlu-Val, pyroGlu-Met, pyroGlu-Phe, pyroGlu-Gln-Gln, pyroGlu-Pro-Gln) 의 각 1 mg/ml 샘플을 조제하여, 이하와 같이 TACE 저해 활성을 평가하였다.
- [0152] 1 μmol/l 의 반응 기질 (TACE Substrate (Mac-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂); Biomol. International LP) 10 μl, 10 ng/10 μl 효소액 (리코비난트히트 TACE; R&D Systems) 10 μl, 완충액 (50 mmol/l Tris-HCl, pH 9.0, 5 μM ZnCl₂, 0.01 % Brij35) 50 μl, 증류수 20 μl 에 샘플 10 μl 를 첨가하고, 37 °C, 20 분간 반응시켰다. 10 % 트리플루오로아세트산을 중농도 1 % 가 되도록 첨가하여 반응을 정지시키고, 역상 고속 액체 크로마토그래피를 사용하여 하기 조건에서 기질과 생성물을 분리하였다. 기질 및 생성물은 여기 파장 320 nm, 측정 파장 405 nm 에서 형광 측정하여 정량하였다.
- [0153] 크로마토그래피 조건 :

- [0154] A 액 : 10 % 아세트니트릴 (0.1 % TFA)/B 액 : 80 % 아세트니트릴 (0.1 % TFA)
- [0155] 그라디언트 : B 액 50 % 내지 100 %
- [0156] 칼럼 : 5C18 AR- II ; 4.6 ϕ \times 150
- [0157] 오븐 온도 : 30 $^{\circ}$ C
- [0158] 측정 파장 : 230 nm
- [0159] 결과는 생성물의 형광 강도의, 생성물과 기질의 형광 강도에 대한 비로서 이하의 표 1 에 나타낸다.

표 1

[0160]	control (펩티드 없음)	100 %
	pyroGlu-Leu	61 %
	pyroGlu-Pro-Gln	66 %
	pyroGlu-Gln-Gln	70 %
	pyroGlu-Val	81 %
	pyroGlu-Met	83 %
	pyroGlu-Phe	84 %

- [0161] (시험예 2) ICE 저해 활성의 측정
- [0162] 상기 제조예에서 합성한 피로글루타밀펩티드 (pyroGlu-Leu, pyroGlu-Val, pyroGlu-Met, pyroGlu-Phe, pyroGlu-Gln-Gln, pyroGlu-Pro-Gln) 의 각 1 mg/ml 샘플을 조제하여, 이하와 같이 ICE 저해 활성을 평가하였다.
- [0163] 2000 μ mol/l 의 반응 기질 (Caspase-1 Substrate (Ac-Trp-Glu-His-Asp-AMC) ; Alexis Biochemicals) 10 μ l, 10U/ μ l 효소액 (Caspase-1 ; Biomol. International LP) 5 μ l, 완충액 (50 mmol/l HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 %CHAPS, 1 mM EDTA, 10 % 글리세롤, 10 mM DTT) 60 μ l, 증류수 20 μ l 에 샘플 5 μ l를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 20 분간 반응시켰다. 10 % 트리플루오로아세트산을 농도 1 % 가 되도록 첨가하여 반응을 정지시키고, 역상 고속 액체 크로마토그래피를 사용하여, 하기 조건에서 기질과 생성물을 분리하였다. 기질 및 생성물은 여기 파장 380 nm, 측정 파장 460 nm 에서 형광 측정하여 정량하였다.
- [0164] 크로마토그래피 조건
- [0165] A 액 : 10 % 아세트니트릴 (0.1 % TFA)/B 액 : 80 % 아세트니트릴 (0.1 % TFA)
- [0166] 그라디언트 : B 액 50 % 내지 100 %
- [0167] 칼럼 : 5C18 AR- II ; 4.6 ϕ \times 150
- [0168] 오븐 온도 : 30 $^{\circ}$ C
- [0169] 측정 파장 : 230 nm
- [0170] 결과는 생성물의 형광 강도의, 생성물과 기질의 형광 강도에 대한 비로서 이하의 표 2 에 나타낸다.

표 2

[0171]	control (펩티드 없음)	100 %
	pyroGlu-Leu	55 %
	pyroGlu-Pro-Gln	62 %
	pyroGlu-Gln-Gln	63 %
	pyroGlu-Val	74 %
	pyroGlu-Met	75 %
	pyroGlu-Phe	72 %

- [0172] 본 명세서에서 인용한 모든 간행물, 특허 및 특허 출원을 그대로 참고로 하여 본 명세서 내에 도입하는 것으로 한다.