



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0031680
(43) 공개일자 2019년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/10 (2006.01) A61K 35/15 (2014.01)
A61K 9/70 (2006.01) A61L 15/44 (2006.01)
A61L 15/60 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/10 (2013.01)
A61K 35/15 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0119407

(22) 출원일자 2017년09월18일

심사청구일자 2017년09월18일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

황병희

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 29호관 506호
(송도동)

김기찬

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 29호관 504호
(송도동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

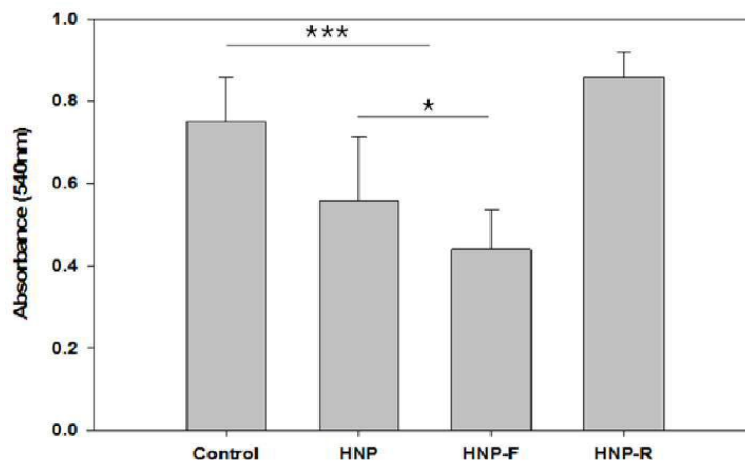
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 인간 유래 지혈 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간 유래 지혈 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 인간 유래 펩타이드를 포함하는 지혈용 약학적 조성물, 지혈용 패치, 지혈키트, 드레싱제, 출혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 인간 호중구 유래 펩타이드는 우수한 혈액응고 활성 및 혈소판 활성화 효과를 가지고 있어, 지혈용 패치, 지혈키트, 드레싱제, 지혈용 스펀지, 수술 보조제 및 출혈성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/70 (2013.01)
A61L 15/44 (2013.01)
A61L 15/60 (2013.01)
A61L 2300/20 (2013.01)
A61L 2400/04 (2013.01)

이재윤

경상북도 포항시 남구 청암로 77, 환경공학동 331호 (지곡동)

(72) 발명자

차형준

경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 4동 1001호 (지곡동, 교수아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	D11013213H320000110
부처명	해양수산부
연구관리전문기관	(재)한국해양과학기술진흥원
연구사업명	해양수산생명공학기술개발사업
연구과제명	해양 섬유복합소재 및 바이오플라스틱소재 기술개발
기 여 율	1/1
주관기관	인천대학교 산학협력단
연구기간	2017.05.01 ~ 2018.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 포함하는 지혈용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 인간 호중구 펩타이드(Human neutrophil peptide, HNP)에서 유래된 것을 특징으로 하는 지혈용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 혈소판 인자 4(platelet factor 4, PF4)를 활성화시키는 것을 특징으로 하는 지혈용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈용 패치.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈키트.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 드레싱제.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈용 스펀지.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 수술 보조제.

청구항 9

서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 포함하는 출혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 출혈성 질환은 비출혈, 혈액응고 장애, 혈우병, 혈소판 기능 이상증, 혈전저혈소판혈증자색반병(TTP), 본태성혈소판혈증, 본 발레브란트병(von Willebrand disease) 및 혈소판 무력증으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 하는 출혈성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 유래 지혈 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 인간 유래 펩타이드를 포함하는 지혈용 약학적 조성물, 지혈용 패치, 지혈키트, 드레싱제, 지혈용 스펀지, 수술 보조제 및 출혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 출혈(bleeding)은 일상생활에서도 흔하게 발생할 수 있으며, 야전이나 외과적 수술 과정에는 대량의 출혈이 동반되어 생명이 위급한 응급 상황이 자주 발생한다. 출혈이 지속되는 경우 혈액을 이용한 산소 공급이 어려워진다. 산소 공급의 저하는 세포 내 대사가 무산소 호흡으로 전환된다. 무산소 호흡이 지속되면 세포의 형태와 기능이 파괴되어 장기가 손상되며, 심각한 경우 사망에 이를 수 있다. 특히, 수술 중 발생하는 출혈은 출혈 부위를 찾기 어렵고 수술의 난이도를 증가시켜 환자의 생명에 위협이 될 수 있다. 또한, 수혈의 필요성을 증가시켜서 혈액을 매개로한 바이러스의 위험에 노출시킬 수 있으며, 환자의 경제적 부담을 증가시키기도 한다. 따라서 응급상황에서 환자의 생명을 살리기 위해, 출혈을 효과적으로 제어할 수 있는 지혈제 개발이 필요하다.

[0004] 종래 개발된 생체 지혈제로는 티셀 및 타코실이 있다. 티셀 및 타코실은 각각 피브리노겐과 트롬빈을 주성분으로 하는 글루 및 패치타입의 국소지혈제이다. 티셀의 경우 상처 부위가 건조한 상태여야하며, 냉동보관하기 때문에 사용 전 충분히 해동시켜야한다는 한계가 있다. 타코실의 경우 패치형태이므로 광범위한 출혈에는 사용이 어렵고, 수 분 동안 압착해주어야 한다. 또한 티셀 및 타코실은 사람의 혈장으로부터 제조되었기 때문에 혈액을 매개로 한 전염을 발생시킬 수 있고 생산하는데 드는 비용이 상대적으로 비싸다는 단점이 있다.

[0005] 따라서 생체적합성이 우수하고 독성이 없으며, 습윤 환경에서도 지혈효과를 유지할 수 있고, 신속한 지혈 효과를 보이면서도 저렴한 지혈제의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 전술한 바와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 지혈과 관련된 작용을 하는 인간 단백질을 스크리닝하여 인간 유래 지혈 펩타이드를 개발하고, 이의 혈액응고 및 혈소판 활성화 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 인간 유래 펩타이드를 포함하는 지혈용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈용 패치를 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈키트를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 드레싱제를 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈용 스펀지를 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 수술 보조제를 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 포함하는 출혈성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 포함하는 지혈용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈용 패치를 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈키트를 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 드레싱제를 제공한다.
- [0019] 또한 본 발명은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈용 스펀지를 제공한다.
- [0020] 또한 본 발명은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 수술 보조제를 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 포함하는 출혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따른 인간 호중구 유래 펩타이드는 우수한 혈액응고 활성 및 혈소판 활성화 효과를 가지고 있어, 지혈용 패치, 지혈키트, 드레싱제, 지혈용 스펀지, 수술 보조제 및 출혈성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명에 따른 지혈 펩타이드(HNP-F)의 혈액응고 활성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 지혈 펩타이드(HNP-F)의 혈소판 활성화 효과 확인 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3 및 4는 본 발명에 따른 지혈 펩타이드(HNP-F)의 혈소판 응집 효과 확인 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 마우스 간출혈 모델에서 본 발명에 따른 지혈 펩타이드(HNP-F)의 지혈 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 이때, 여기서 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가진다. 또한, 종래와 동일한 기술적 구성 및 작용에 대한 반복되는 설명은 생략하기로 한다.
- [0028] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 포함하는 지혈용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명에 있어서, “펩타이드”는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 상기 펩타이드는 당업계에서 공지된 화학적 합성방법에 따라 제조될 수 있으며, 바람직하게는 고체상 합성기술에 따라 제조될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0030] 상기 펩타이드는 인간 호중구 펩타이드(human neutrophil peptide, HNP)에서 유래되는 것이 바람직하다. 상기 펩타이드는 인간 호중구 펩타이드에서 유래된 것으로, 구체적으로 15개의 아미노산으로 이루어진 인간 호중구 펩타이드의 전반부 서열인 것이 바람직하다. 이러한 지혈 펩타이드는 혈소판 인자 4(platelet factor 4, PF4)를 활성화시킨다. 본 발명에 따른 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 인간 호중구 펩타이드 유래 전반부 펩타이드(HNP-F)는 15개의 짧은 길이로 이루어져 있어 대량생산이 용이하며 상용화가 가능한 장점을 가지고 있으며, 전체 아미노산 서열로 이루어진 인간 호중구 유래 펩타이드에 비해 지혈 효과가 현저하게 우수한바, 그 서열 선

택에 특이성을 갖는다.

- [0031] 상기 지혈용 약학적 조성물은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드의 기능적 동등물을 포함할 수 있다. 본 발명의 펩타이드의 범위에는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드의 기능적 동등물을 포함한다. 상기 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩타이드를 말한다. 또한, 본 발명의 펩타이드는 생체내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위해서 N 말단 또는 C 말단을 변형하거나 여러 유기단으로 보호한 형태일 수 있다. 즉, 상기 펩타이드의 C 말단은 안정성을 증가시키기 위해서 변형될 수 있는 형태라면, 특별한 제한은 없으나 바람직하게는 히드록시기(-OH) 또는 아미노기(-NH₂)로 변형되는 것일 수 있다. 또한 상기 펩타이드의 N 말단은 안정성을 증가시키기 위해서 변형될 수 있는 형태라면, 특별한 제한은 없으나 바람직하게는 아세틸(Acetyl)기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐(Fmoc)기, 포르밀(Formyl)기, 팔미토일(Palmitoyl)기, 미리스틸(Myristyl)기, 스테아릴(Stearyl)기 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 이루어진 군에서 선택되는 기로 변형되는 것일 수 있다.
- [0032] 상기 지혈용 약학적 조성물은 외상 및 외과 수술 등으로 인한 출혈을 지혈하기 위한 용도이며, 출혈부위에 적용 시 혈소판 및 지혈 관련 인자를 활성화시켜 지혈한다.
- [0033] 본 발명의 지혈용 약학적 조성물은 투여를 위하여 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 제제화 할 수 있다.
- [0034] 상기 지혈용 약학적 조성물은 추가적인 성분을 더 포함할 수 있다. 상기 추가적인 성분의 예로는 유당, 탈크, 전분, 스테아린산 마그네슘, 결정성 셀룰로오스, 락토오스, 젤라틴, 만니톨, 과옥소산, 이성화당, 폴리비닐알코올, 붕산 및 탄산나트륨이 있다.
- [0035] 상기 지혈용 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여할 수 있으며, 신속한 효과를 위하여 비경구 투여하는 것이 바람직하며, 출혈부위에 직접적으로 처치되는 것이 더 바람직하다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수막강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두 개강내(intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있다. 상기 지혈용 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 상기 서열번호 2로 표시되는 펩타이드와 함께 지혈 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈 패치를 제공한다. 지혈 패치는 수술 및 외상 등으로 인한 출혈을 지혈하기 위한 용도이다. 상기 지혈 패치는 출혈부위에 용이하게 적용 가능한 패치 형태인 것이 바람직하며, 구체적으로 하이드로겔 패치, 매트릭스형 패치, 드레싱 패드, 식물형 패치, 스펀지형 패치 또는 습윤 밴드인 것이 더 바람직하다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈키트를 포함한다. 지혈키트는 상처, 출혈, 손상된 조직 및 출혈조직의 빠르고 간편한 지혈을 위한 것이다. 지혈키트는 지혈용 약학적 조성물이 건조형태로 포함될 경우 투여를 위하여 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수

있다.

[0042] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 드레싱제를 제공한다. 상기 드레싱제는 피부의 손상된 부위를 보호하기 위한 것으로서, 외상으로 인한 출혈 부위의 피부 표면의 상피조직과 하부의 결합조직을 연결시켜 지혈 효과를 향상시키기 위한 용도이다. 상기 드레싱제는 외상으로 인한 출혈 부위에 용이하게 적용 가능한 형태인 것이 바람직하며, 구체적으로 하이드로겔형, 도포형, 거즈형, 폼형 또는 습윤형의 형태일 수 있다.

[0044] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 지혈용 스펀지를 제공한다. 상기 지혈용 스펀지는 외상 또는 수술로 인한 출혈부위를 효과적으로 지혈하기 위한 용도이며, 상기 지혈용 약학적 조성물을 함유하고 있는 스펀지 형태인 것이 바람직하다.

[0046] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 지혈용 약학적 조성물을 포함하는 수술 보조제를 제공한다. 수술 보조제는 외과 수술 시 발생하는 출혈 부위의 신속한 지혈을 위한 보조제이다. 보조제는 수술에서 사용하기 위한 용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화 할 수 있다. 수술 보조제에 포함된 지혈용 약학적 조성물이 건조형태로 포함될 경우 투여를 위하여 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 포함하는 출혈성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 출혈성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 출혈성 질환으로 인한 출혈을 출혈방지와, 지혈 및 혈액응고 촉진을 위한 용도이며, 출혈부위에 적용 시 혈소판 및 지혈 관련 인자를 활성화시켜 지혈한다. 본 발명에 있어서, 상기 출혈성 질환은 1차 지혈의 이상 및 2차 지혈의 이상으로 인하여 발병되는 질환이며, 구체적으로 혈소판 기능 이상, 혈소판 수 감소 및 응고인자 이상으로 인하여 발병되는 질환이다. 출혈성 질환의 예로는 비출혈, 혈액응고 장애, 혈우병, 혈소판 기능 이상증, 혈전저 혈소판혈증자색반병(TTP), 본태성혈소판혈증, 본 발레브란트병(von Willebrand disease), 혈소판 무력증 및 응고인자 이상을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0049] 상기 출혈성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 비경구 및 경구 투여하는 것이 바람직하며, 출혈부위에 직접적으로 처리되는 것이 더 바람직하다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수막강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두 개강내(intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있다. 상기 출혈성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0053] 실시예 1. 지혈 펩타이드 개발 및 특성 분석

[0054] 지혈 펩타이드 개발을 위하여 지혈과 관련된 작용을 하는 단백질을 스크리닝하였다. 단백질 스크리닝 결과로 인간 호중구 펩타이드(HNP)를 선별하였다. 또한 특성 분석 결과에 따르면, 인간 호중구 펩타이드(HNP)는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되며 등전점 8.68, 분자량 3448.09 및 소수성 0.3인 특성을 가진다. 또한 인간 호중구 펩타이드(HNP)는 혈소판 활성화와 적혈구를 용혈시키는 작용을 한다. 선별된 인간 호중구 펩타이드(HNP)의 아미노산 서열을 분석하여, 아미노산 서열이 15개인 전반부 펩타이드(HNP-F) 및 후반부 펩타이드(HNP-R)를 지혈 펩

타이드의 후보군으로 선별하였다.

[0055] 특성 분석 결과에 따르면, 전반부 펩타이드(HNP-F)는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되며 등전점 8.71, 분자량 1682.01 및 소수성 0.11인 특성을 가진다. 또한 후반부 펩타이드(HNP-R)은 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되며 등전점 7.95, 분자량 1784.1 및 소수성 0.49인 특성을 가진다. 상기 전반부 펩타이드(HNP-F) 및 후반부 펩타이드(HNP-R)은 지혈에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 판단된다.

[0056] 선별된 전반부 펩타이드 및 후반부 펩타이드는 공지된 FMOC 고체상 방법으로 합성하였으며, 합성된 펩타이드는 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)법으로 정제하여 실험에 사용하였다.

[0058] 실시예 2. 지혈 펩타이드의 혈액응고 활성 측정

[0059] 인간 호중구 펩타이드(Human neutrophil peptide, HNP), 전반부 펩타이드(HNP-F) 및 후반부 펩타이드(HNP-R)의 혈액응고 활성을 측정하였다.

[0060] 혈액응고 활성 확인을 위하여, 12주령의 BALB/c 계통의 수컷 마우스를 사용하였다. 상기 마우스로부터 심장 채혈 방법으로 혈액을 수집하였다. 수집된 혈액은 헤파린 튜브에 담아 보관하였으며, 수집 후 30분 내지 4시간 이내에 실험에 사용하였다. 상기 헤파린 튜브에 보관된 혈액을 24 웰 플레이트에 100 μ l씩 분주하였다. 헤파린 제거를 위해 프로타민(1 mg/ml) 10 μ l을 첨가하였다. 그 후 응고 반응을 촉진시키기 위하여, 0.2 M 칼슘이온 10 μ l 및 5 μ M 인간 호중구 펩타이드(HNP)를 10 μ l을 첨가하여 37°C에서 2시간동안 배양하였다. 배양된 혈액에 PBS 2 ml을 넣어 혈액을 희석하였다. 희석된 혈액을 96웰 플레이트에 100 μ l씩 로딩하고, UV 플레이트 리더를 사용하여 540 nm 파장에서 적혈구의 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군은 혈액에 PBS를 처리한 것이다. 또한 전술한 바와 같은 방법으로, 전반부 펩타이드(HNP-F) 및 후반부 펩타이드(HNP-R)의 혈액응고 활성을 측정하였다. 혈액응고 활성 측정 결과는 도 1에 나타내었다.

[0061] 도 1에 나타낸 바와 같이, 음성 대조군과 비교하여 인간 호중구 펩타이드(HNP)의 흡광도는 0.74배 낮게 나타났으며, 전반부 펩타이드(HNP-F)의 흡광도는 음성대조군보다 0.59배 낮았다. 상기 인간 호중구 펩타이드 및 전반부 펩타이드의 흡광도 차이는 통계학적으로 유의미한 차이이다(***<0.01). 또한 전반부 펩타이드(HNP-F)의 흡광도는 인간 호중구 펩타이드보다 0.79배 낮았으며, 이는 통계학적으로 유의미한 차이(*<0.05)이다. 이러한 결과로부터 전반부 펩타이드(HNP-F)의 혈액응고 활성이 가장 좋은 것을 알 수 있다.

[0062] 이러한 결과는 전반부 펩타이드(HNP-F)가 혈소판을 활성화시키는 부분이며, 후반부 펩타이드(HNP-R)가 적혈구를 용혈시키는 부분이라는 것을 의미하며, 지혈 펩타이드로서 전반부 펩타이드(HNP-F)의 효과가 우수하고, 이를 이용해 혈소판 활성화 효율을 높일 수 있음을 시사한다.

[0064] 실시예 3. 지혈 펩타이드의 혈소판 활성화 효과

[0065] 인간 호중구 펩타이드(Human neutrophil peptide, HNP), 전반부 펩타이드(HNP-F) 및 후반부 펩타이드(HNP-R)의 혈소판 활성화 효과를 측정하였다.

[0066] 혈소판 활성화 효과 측정은 미국 FDA로부터 승인받은 흑인여성의 혈액을 사용하였으며, 혈액은 헤파린 튜브에 담아 보관되었다. 상기 혈액 100 μ l에 1 mg/ml 프로타민 10 μ l, 5 μ M 인간 호중구 펩타이드(HNP) 10 μ l 및 0.2 M 칼슘이온 10 μ l을 첨가하여 37°C에서 45분 동안 배양하였다. 배양된 혈액을 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리 후, 상층액을 1:1000 비율로 희석하여 분석 샘플을 제조하였다. 상기 분석 샘플을 이용하여 혈소판 인자 4(platelet factor 4, PF 4)를 분석하였다.

[0067] 혈소판 인자 4의 농도를 분석하기 위하여, 혈소판 인자 4 캡처 항체(PF4 capture antibody)가 포함되어 있는 웰에 분석 희석액(assay diluent) 100 μ l 및 분석 샘플 50 μ l을 실온에서 2시간동안 혼합하여 반응시켰다. 반응 후 웰에 있는 반응액을 제거하였다. 혈소판 인자 4 캡처 항체에 무작위로 결합한 단백질들을 제거하기 위하여 워싱버퍼(wash buffer)를 각 웰에 400 μ l씩 넣어 워싱(washing)하였다. 상기 워싱을 4회 반복한 후 웰의 물기를 완전히 제거하였다. 워싱된 각 웰에 인간 혈소판 인자 컨쥬게이트(Human PF4 conjugate) 200 μ l을 첨가하여 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 반응 후 반응액을 제거 하였으며, 워싱 과정을 반복하여 남아있는 면역결합(immunoconjugate)을 제거하였다. 워싱 후 기질 용액(substration solution)을 각 웰에 200 μ l씩 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다. 이때, 기질 용액 및 샘플의 보호를 위해 암실에서 실험을 진행하였다. 마지막으로 정지

용액(stop solution) 50 μ l을 각 웰에 첨가하여 색변화를 관찰하였다. 웰 내부 용액의 색이 파란색에서 노란색으로 변하면 마이크로 플레이트 리더기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군으로는 펩타이드 대신 PBS를 처리하였다. 또한 전술한 바와 같은 방법으로, 전반부 펩타이드(HNP-F) 및 후반부 펩타이드(HNP-R)의 혈소판 활성화 효과를 측정하였다. 혈소판 활성화 효과는 도 2에 나타내었다.

[0068] 도 2에 나타난 바와 같이, 전반부 펩타이드(HNP-F) 처리군의 혈소판 인자 4 농도는 음성대조군보다 2.46배 높았으며, 인간 호중구 펩타이드(HNP) 및 후반부 펩타이드(HNP-R)보다 높았다. 이러한 결과는 전반부 펩타이드(HNP-F)가 혈소판을 활성화시키며, 이로부터 초기 지혈 반응이 촉진될 수 있음을 시사한다.

[0070] 실시예 4. 지혈 펩타이드의 혈소판 응집 효과

[0071] 인간 호중구 펩타이드(Human neutrophil peptide, HNP), 전반부 펩타이드(HNP-F) 및 후반부 펩타이드(HNP-R)의 혈소판 응집 효과를 측정하였다.

[0072] 혈소판 응집 효과 확인은 미국 FDA로부터 승인받은 흑인여성의 혈액(도 3)과 생쥐의 심장으로부터 혈액을 직접 채혈(도 4)하여 사용하였으며, 혈액은 heparin 튜브에 담아 보관되었다. 상기 혈액 100 μ l에 1 mg/ml 프로타민 10 μ l, 5 μ M 인간 호중구 펩타이드들(HNP, HNP-F, HNP-R) 10 μ l 및 0.2 M 칼슘이온 10 μ l을 첨가하여 37°C에서 5분 동안 배양하였다. 배양된 혈액 10 μ l을 슬라이드 위에 옮긴 후, 다른 슬라이드 글라스를 이용하여 도 말하였다. 혈액이 도말된 슬라이드 글라스를 3분 동안 건조시킨 후 메탄올 20 μ l을 혈액위에 첨가하여 혈구를 고정시켰다. 또한 상기 슬라이드 글라스를 5분 동안 건조시킨 후, 혈구 염색을 위하여 김자액(Gimmesa stain)을 슬라이드 글라스에 떨어뜨려 10분간 건조하였다. 건조된 슬라이드 글라스의 뒷면에 물을 흘려보내 김자액을 씻은 후, 광학현미경을 이용하여 혈구를 관찰하였다. 또한 전술한 바와 같은 방법으로, 음성 대조군으로는 펩타이드 대신 PBS를 처리하였다. 전반부 펩타이드(HNP-F)의 혈소판 응집 효과를 확인하였다. 혈소판 응집 효과 확인 결과는 인간 혈액의 경우 도 3에 생쥐 혈액의 경우 도 4에 나타내었다.

[0073] 도 3에 나타난 바와 같이, 전반부 펩타이드(HNP-F) 처리군이 음성대조군보다 더 많은 혈소판이 응집된 것을 확인하였다.

[0074] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 전반부 펩타이드(HNP-F) 처리군에서 후반부 펩타이드(HNP-R) 처리군 또는 음성 대조군에 비해 더 많은 혈소판이 응집된 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 인간 호중구 펩타이드(HNP) 중에서도 전반부 펩타이드(HNP-F)가 혈소판 활성화 및 응집에 관여하며, 지혈 반응에 있어 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

[0076] 실시예 5. 지혈 펩타이드의 마우스 간 출혈 모델에서의 지혈 효과

[0077] 전반부 펩타이드(HNP-F)의 지혈 효과는 마우스 간 출혈 모델의 출혈량을 측정하여 확인하였다.

[0078] 먼저, 간 출혈 모델의 제조에 사용된 마우스를 오리엔트바이오에서 구입하였으며 BALB/c 계통의 12 주령인 것을 사용하였다. 상기 마우스는 이소플루렌(isoflurane)으로 호흡마취 시켰다. 마취된 마우스의 복강피부를 절개하여 간을 노출시킨 후 간 주변에 체액을 거즈로 제거하였다. 체액 제거 후 5 mm 생검핀치(Biopsy punch)를 이용하여 간의 우엽 부위에 출혈을 발생시켜 간 출혈 모델을 제조하였다.

[0079] 음성대조군은 간 출혈 모델의 최초 출혈 확인 후 별도의 처리 없이 2분 동안 출혈상태를 유지하였다. 출혈 2분 후, 거즈를 이용하여 혈액을 한 번 닦고, 새로운 거즈로 출혈부위를 덮어 2분 동안 일정한 압박을 가하여 지혈한 후 거즈의 무게를 측정함으로써 출혈량을 확인하였다. 전반부 펩타이드(HNP-F) 처리군은 상기 음성대조군과 같은 방법으로 출혈량을 확인하되, 최초 출혈발생 시 500 μ M 전반부 펩타이드(HNP-F) 40 μ l를 처리하고 출혈상태를 2분간 유지하였다. 전반부 펩타이드의 마우스에서의 지혈 효과 확인 결과는 도 5에 나타내었다.

[0080] 도 5에 나타난 바와 같이, 전반부 펩타이드(HNP-F) 처리군은 음성대조군보다 출혈량이 현저히 적은 것을 확인하였다. 이러한 결과는 전반부 펩타이드(HNP-F)가 동물 모델에서도 지혈 효과가 있음을 의미한다.

[0082] 종합적으로 본 발명자들은 인간 호중구 펩타이드(HNP) 유래의 전반부 펩타이드(HNP-F)를 혈액에 처리하였을 때 혈액응고 활성 및 혈소판 활성화 효과가 우수한 것을 확인하였다. 이는 본 발명의 전반부 펩타이드(HNP-F)가 탁

월한 지혈효과를 가지며 지혈 펩타이드로서 이용될 수 있다는 것을 의미하는 바, 본 발명의 지혈 펩타이드는 지혈용 패치, 지혈키트, 드레싱제, 지혈용 스펀지, 수술 보조제 및 출혈성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

[0084] 이하, 제제예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 제제예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 제제예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는다.

[0086] **제제예 1. 지혈용 약학적 조성물의 제조**

[0087] **1-1. 산제의 제조**

[0088] 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 지혈 펩타이드 20 mg

[0089] 유당 100 mg

[0090] 탈크 10 mg

[0091] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0093] **1-2. 정제의 제조**

[0094] 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 지혈 펩타이드 10 mg

[0095] 옥수수전분 100 mg

[0096] 유당 100 mg

[0097] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0098] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0100] **1-3. 캡슐제의 제조**

[0101] 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 지혈 펩타이드 10 mg

[0102] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0103] 락토오스 14.8 mg

[0104] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0105] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0107] **1-4. 주사제의 제조**

[0108] 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 지혈 펩타이드 10 mg

[0109] 만니톨 180 mg

[0110] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0111] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[0112] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0114] **1-5. 액제의 제조**

[0115] 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 지혈 펩타이드 20 mg

[0116] 이성화당 10 g

[0117] 만니톨 5 g

[0118] 정제수 적량

[0119] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0121] 제제예 2. 드레싱제의 제조

[0122] 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 지혈 펩타이드 20 mg

[0123] 폴리비닐알코올 3.5 g

[0124] 탄산나트륨 1.6 g

[0125] 5 % 붕산용액 10 ml

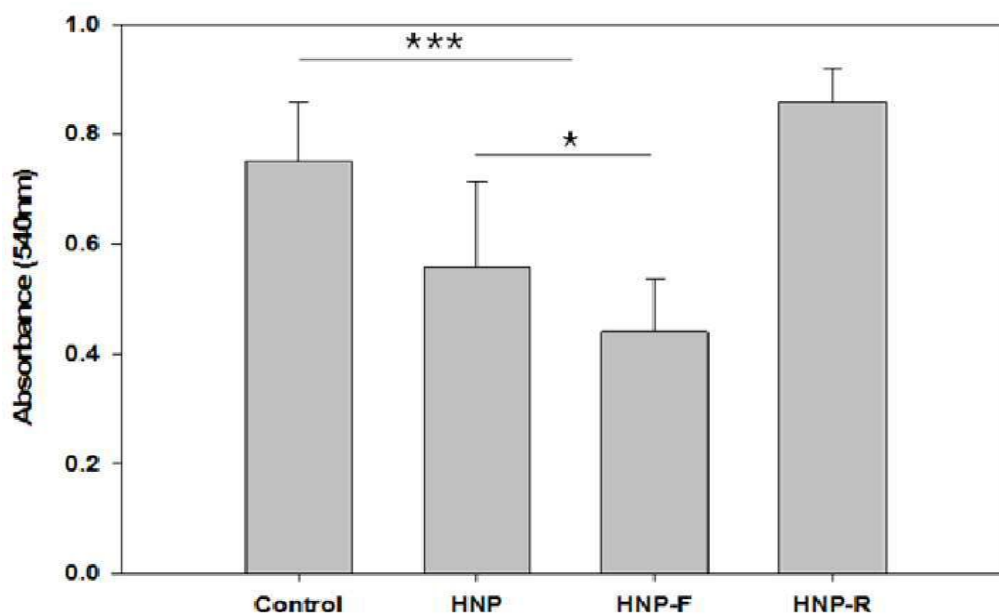
[0126] 정제수 적량

[0127] 통상의 드레싱제 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고, 상기 성분들을 혼합한다. 상기 혼합물을 성형(casting)하여 원하는 형태의 드레싱제를 제조한다.

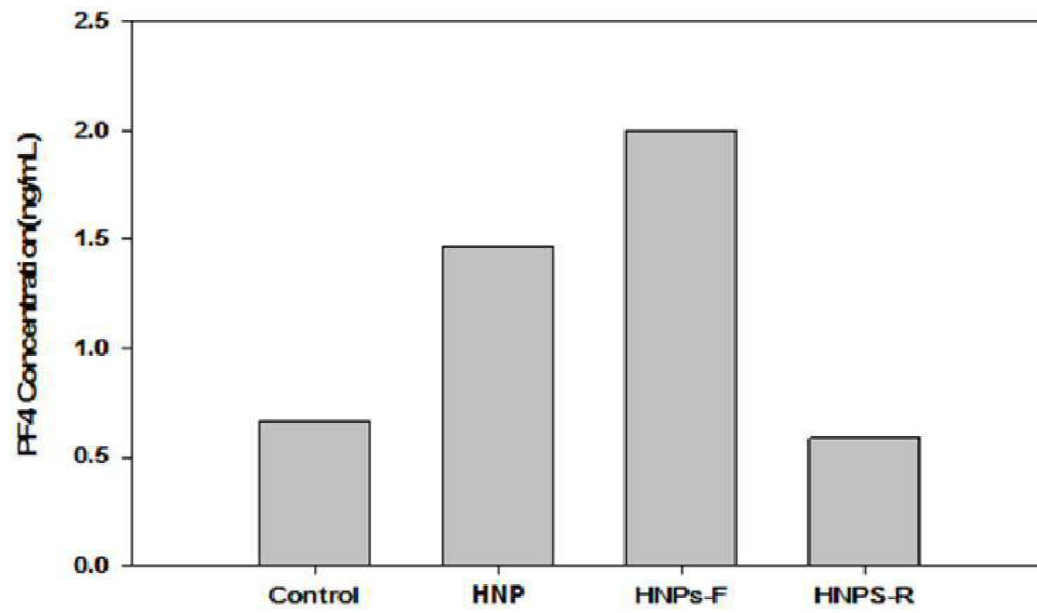
[0129] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

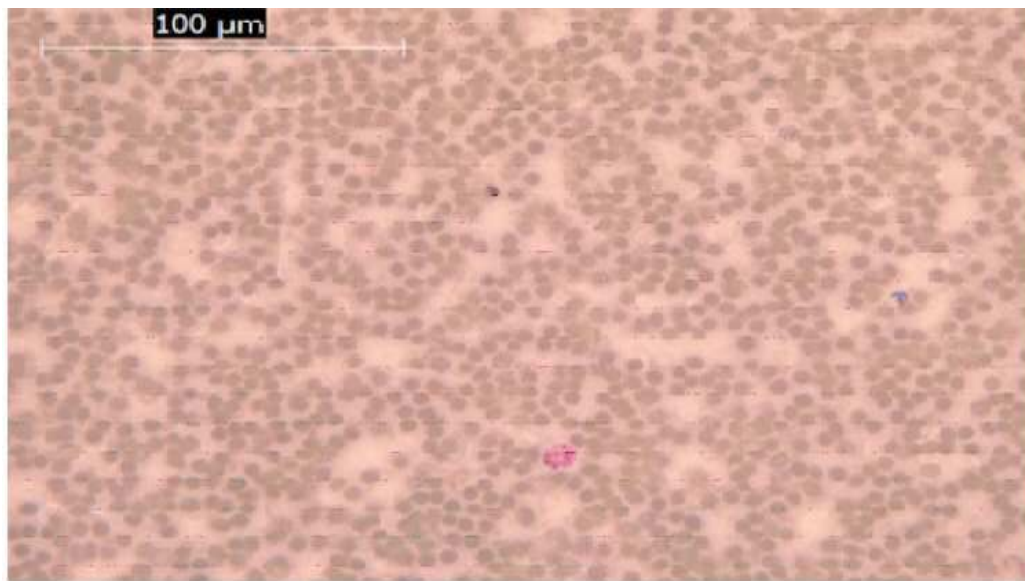
도면1



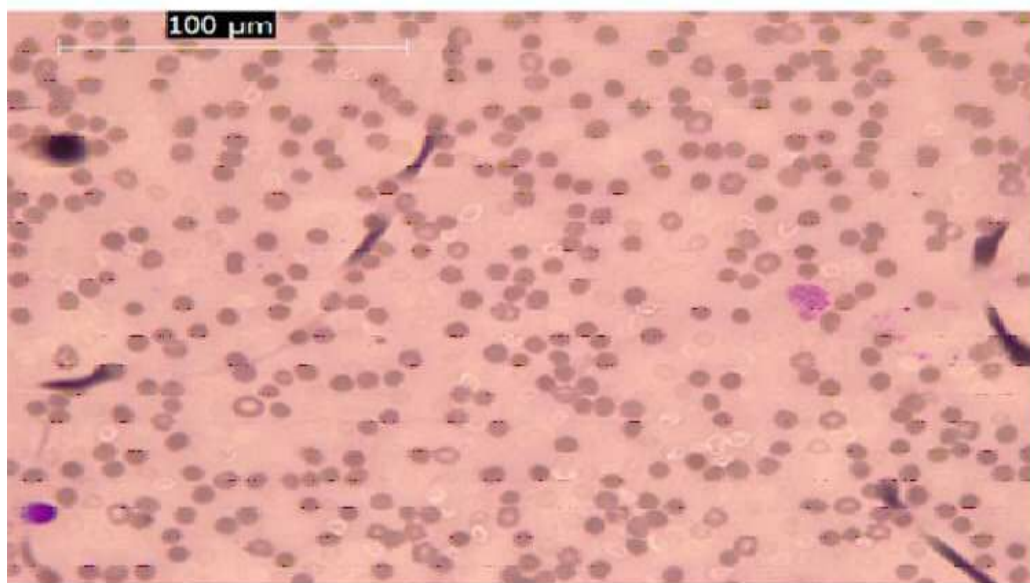
도면2



도면3

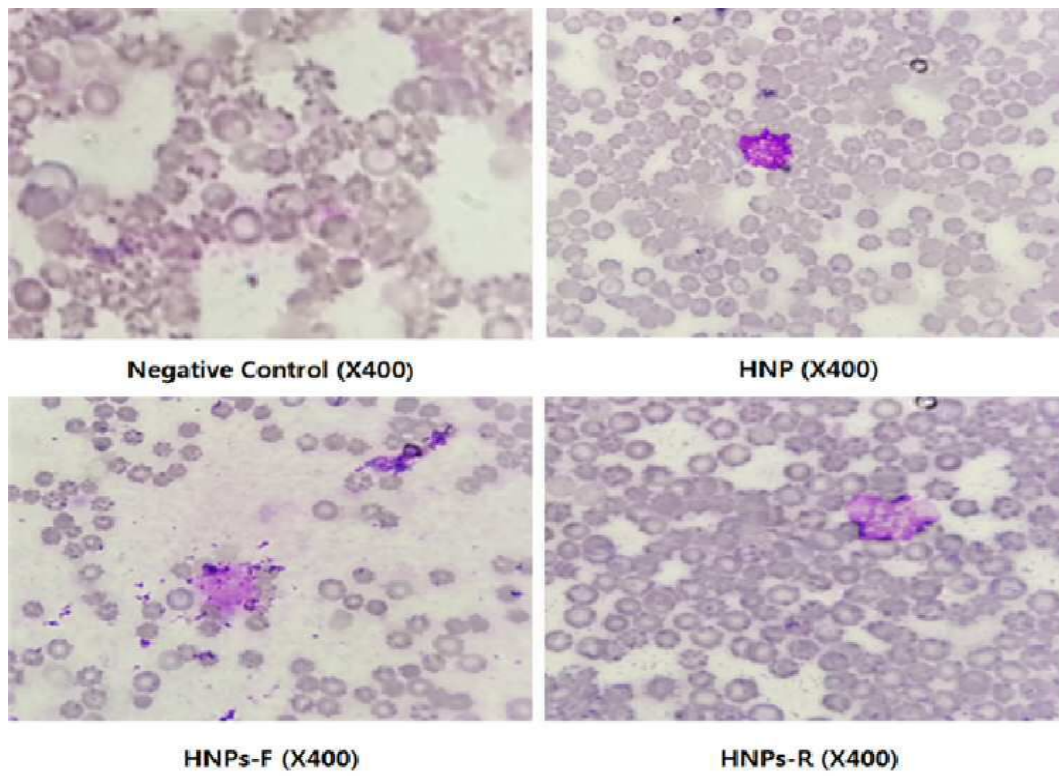


Control (X400)

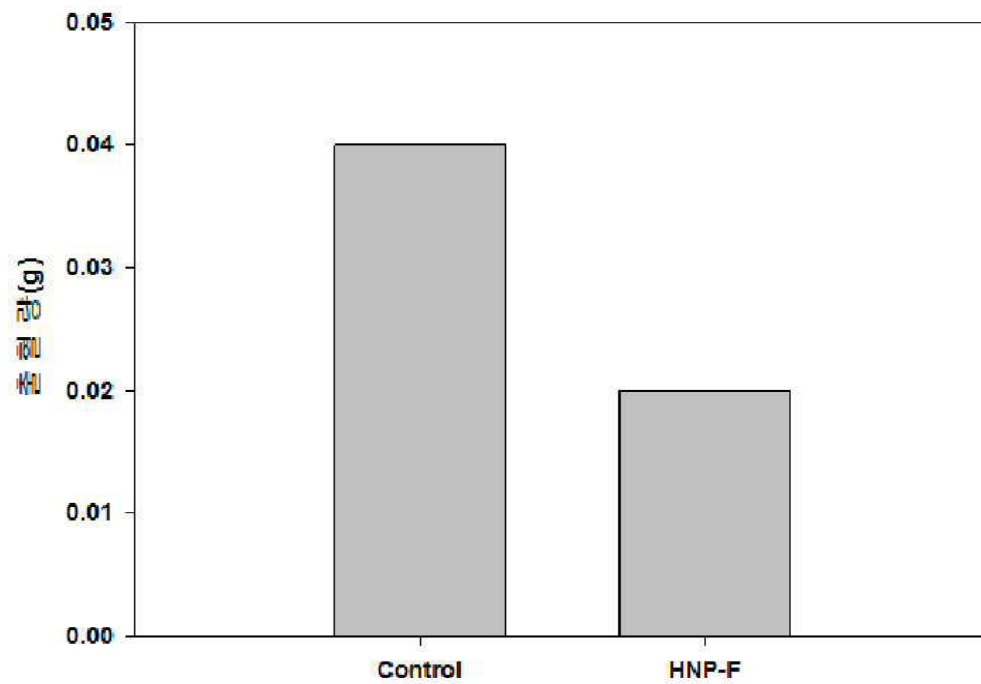


HNP s-F (X400)

도면4



도면5



서열 목록

<110> INCHEON UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> Human-derived hemostatic peptide and use thereof

<130> 1.2P

<160> 3

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr

1 5 10 15

Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys

20 25 30

<210

> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Tyr Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys

1 5 10 15