(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 12 월 23 일 (23.12.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/194831 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 27/14* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/006088

(22) 국제출원일: 2015 년 6 월 16 일 (16.06.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0072700 2014 년 6 월 16 일 (16.06.2014) KR

(71) 출원인: **이화여자대학교 산학협력단 (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: **이경림 (LEE, Kyunglim)**; 110-766 서울시 종로구 경희궁길 57 풍림스페이스본 아파트 106 동 304 호, Seoul (KR). **신동해 (SHIN, Dong Hae)**; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교 종합과학관 C 동 408 호, Seoul (KR). **김미선 (KIM, Mi-Sun)**; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교 종합과학관 C 동 408 호, Seoul (KR). **김미영 (KIM, Mi Young)**; 137-764 서울시 서초구 반포대로 275 래미안 퍼스티지아파트 103 동 2201 호, Seoul (KR). **맹지혜 (MAENG, Jeehye)**; 137-808 서울시 서초구 주흥 17 길 25 반포훼밀리아파트 103 동 201 호, Seoul (KR). **이희원 (LEE, Hee-Won)**; 137-796 서울시 서초구 잠원로 150 잠원한신아파트 1-901, Seoul (KR).

(74) 대리인: **이원희 (LEE, Won Hee)**; 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2 차 8 층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

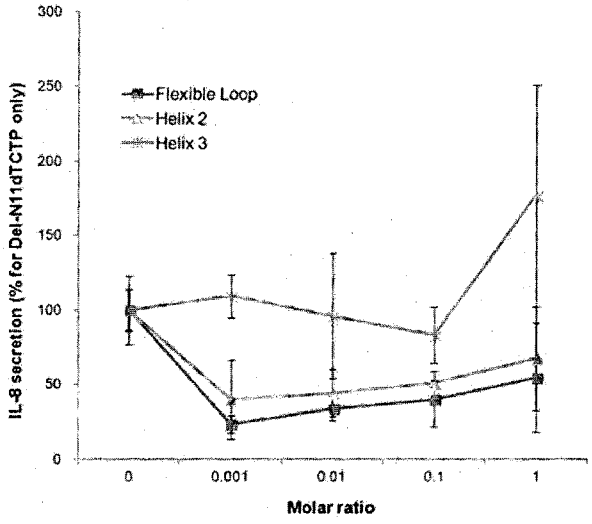
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: BINDING INHIBITOR BETWEEN TCTP DIMER TYPE IGE-DEPENDENT HISTAMINE RELEASING FACTOR AND RECEPTOR THEREOF, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : TCTP 이량체형 IgE-의존성 히스타민 방출인자와 이의 수용체 간의 결합 억제제 및 이의 용도

[도 4]



(57) Abstract: The present invention relates to a receptor-binding domain of an IgE-dependent histamine releasing factor (HRF), and a use thereof and, more specifically, ascertains, as an HRF framework region, an FL domain and an H2 domain which bind to a receptor of an HRF existing in a cell membrane, ascertains the C-terminus of the HRF, and ascertains that a material binding thereto inhibits IL-8 secretion, thereby determining that the FL and H2 domains and the C-terminus can be utilized in: the development of a therapeutic agent for and prevention of HRF-related diseases including malaria and inflammatory diseases such as asthma, bronchitis, chronic obstructive pulmonary disease, bronchiectasis, rhinitis, atopic dermatitis, hives, hay fever, conjunctivitis, anaphylactic allergic diseases, pneumonia, arthritis, nephritis, psoriasis, dermatitis, Crohn's disease, enteritis, gingivitis, arteriosclerosis, coronary arteritis, hepatitis, Behcet's disease, bladder cancer, prostatitis, pyelonephritis, glomerulonephritis, osteomyelitis, thyroiditis, uveitis, abdominal cavity inflammation, meningitis, pulmonary fibrosis and rheumatoid arthritis; and a method for screening for the HRF-related diseases.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2015/194831 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 IgE-의존적 히스타민 방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor: HRF)의 수용체 결합 도메인 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는, HRF 구조 부위로서 세포막에 존재하는 HRF 의 수용체에 결합하는 FL 도메인 및 H2 도메인을 확인하였고, HRF 의 C-말단을 확인하였으며, 이들에 대한 결합 물질이 IL-8 의 분비능을 억제시키는 것을 확인함으로써, 상기 FL, H2 도메인 및 C-말단을 이용하여 천식, 기관지염, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증, 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 건초열, 결막염, 아나필락시스의 알레르기 질환, 기관지염, 폐렴, 관절염. 신장염, 건선, 피부염, 크론병, 장염, 치은염, 동맥경화증, 관상동맥염, 간염, 베체트병, 방광암, 전립선염, 신우신염, 사구체신염, 골수염, 갑상선염, 포도막염, 복강염, 수막염, 폐섬유화증, 류마티스 관절염 등 염증성 질환 및 말라리아를 포함한 HRF 관련 질환의 치료제 개발 및 예방, HRF 관련 질환의 스크리닝 방법으로 유용하게 이용할 수 있음을 규명하였다.

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

TCTP 이량체형 IgE-의존성 히스타민 방출인자와 이의 수용체 간의 결합 억제제 및 이의 용도

【기술분야】

본 발명은 TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein) 이량체형 IgE-의존성 히스타민 방출인자와 이의 수용체 간의 결합 억제제 및 이의 용도에 관한 것이다.

【배경기술】

TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein)는 IgE-의존성 히스타민방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor, HRF)라고 불리며 호염구(basophil)에서 히스타민 등의 방출을 유도하여 후기 알레르기 반응을 유발한다고 알려져 있다(MacDonald *et al.*, *Science*, 269, 688-690, 1995). Bheekha-Escura 등은 HRF가 특이한 세포막 수용체에 결합하여 작용함을 제시하였으나, 아직 HRF와 그 수용체 간의 구체적인 결합 작용에 대해서는 밝혀진 바가 없다(Bheekha-Escura *et al.*, *Blood*, 96, 2191-2198, 2000).

이에, 본 발명자들은 TCTP 이량체인 IgE-의존성 히스타민방출인자(HRF)의 수용체 결합에 대한 연구를 계속하여 TCTP 이량체의 구조 중에서 활성형 HRF의 무정형 단백질(Intrinsically Unfolded Protein: IUP) 도메인인 유연성 루프(flexible loop: FL) 부위 및 헬릭스 도메인 중 헬릭스 2(Helix 2: H2) 부위가 세포막에 존재하는 특이적 수용체에 결합하는 부위임을 규명하고, HRF의 수용체 결합 도메인을 이용하면 다양한 염증성 질환, 알레르기성 질환 및 말라리아 치료를 위한 예방 및 억제제 개발에 유용함을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명의 목적은 TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein) 이량체형(dimer) IgE-의존성 히스타민방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor: HRF)와 세포막에 존재하는 HRF에 대한 수용체 간의 결합 억제제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 또 다른 목적은 TCTP 이량체형 HRF 구조 중에서 세포막에 존재하는 상기 HRF 수용체에 결합에 관여하는 부위로서 유연성 고리(FL) 도메인 및 헬릭스 2(H2) 도메인을 규명하고, 이량체 형성 혹은 수용체 활성화 등에 관여하는 C-말단을 규명하여, 이를 이용하여 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택된 HRF 관련 질환의 치료제, 스크리닝 방법, 진단용 키트, 항체 등의 제조방법 등을 제공하는 것이다.

【과제의 해결 수단】

상기 목적을 달성하기 위하여, TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein) 이량체형(dimer) IgE-의존성 히스타민방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor: HRF)와 세포막에 존재하는 HRF에 대한 수용체 간의 결합 억제제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은

1) HRF의 FL 도메인 또는 H2 도메인 중 어느 하나, 둘 모두, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상과 HRF에 대한 수용체를 피검시료와 접촉시키는 단계;

2) 상기 도메인, 이들의 유사체 또는 이들의 단편과 HRF에 대한 수용체 간의 결합 수준을 측정하는 단계; 및

3) 단계 1)의 과정을 거치지 않은 대조군에 비해 결합을 감소시키는 피검시료를 선별하는 단계;를 포함하는,

알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 HRF 관련 질환의 진단, 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은

1) HRF의 FL 도메인 또는 H2 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 모두, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상과 HRF에 대한 수용체를 발현하는 세포를 피검시료와 접촉시키는 단계;

2) 상기 단계 1)의 세포를 배양하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 배양액에서 히스타민, IL-8 또는 GM-CSF를 포함하는 활성물질의 분비수준을 측정하여 상기 단계 1)의 과정을 거치지 않은 대조군에 비해 분비수준이 낮은 피검시료를 선별하는 단계;를 포함하는,

알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 HRF 관련 질환의 진단, 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 FL 도메인, H2 도메인 및 HRF의 C-말단(C-terminus)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상과 결합하는 항체 등을 제작하고, 피검시료를 처리하여 상기 항체 등과 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단 도메인과의 결합량을 측정하여 무처리 대조군에 비해 결합이 증가한 피검시료를 선별하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택된 HRF 관련 질환 치료의 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 FL, H2 도메인 또는 C-말단을 포함하는 HRF의 발현을 측정하여 무처리 대조군에 비해 발현량을 감소시킨 피검시료를 선별하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택된 HRF 관련 질환 치료의 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 FL 도메인, H2 도메인 및 HRF의 C-말단으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상과 결합하는 항체를 이용하여, FL 도메인 및 H2 도메인과 HRF 수용체와의 결합량 또는 수용체 활성 정도를 측정하여 무처리 대조군에 비해 결합이 증가한 피검시료를 선별하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택된 HRF 관련 질환 진단 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 HRF의 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상과 HRF에 대한 수용체 간의 결합을 검출하는 물질을 포함하는 알레르기 질환, 염증성 질환 또는 말라리아 질환 진단용 키트를 제공한다.

또한, 본 발명은 HRF에 대한 수용체에 결합하거나 결합에 관여하는 것을 특징으로 하는 FL 도메인을 제공하고, HRF에 대한 수용체에 결합하거나 결합에 관여하는 것을 특징으로 하는 H2 도메인을 제공하며, HRF에 대한 수용체와의 결합에 관여하거나 HRF의 활성화 또는 HRF 이량체(dimer) 형성에 관여하는 C-말단을 제공한다.

또한, 상기 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 코딩하는 유전자를 제공하며, 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하고, 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 FL 도메인에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 제공한다.

또한, 본 발명은 H2 도메인에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 제공한다.

또한, 본 발명은 HRF의 C-말단에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 HRF, FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 히스타민 방출

유도제를 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 인간을 제외한 동물에 서열번호 1 내지 서열번호 4 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 FL 도메인 펩타이드를 항원으로 사용하여 면역을 유도하고 특이적인 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 생산하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 생산된 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편이 항원 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 항원에 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, FL 도메인에 대한 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 인간을 제외한 동물에 서열번호 11 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 H2 도메인을 포함하는 펩타이드를 항원으로 사용하여 면역을 유도하고 특이적인 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 생산하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 생산된 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편이 항원 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 항원에 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, H2 도메인에 대한 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 인간을 제외한 동물에 HRF의 C-말단을 포함하는 펩타이드를 항원으로 사용하여 면역을 유도하고 특이적인 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 생산하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 생산된 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의

면역학적 활성 단편이 항원 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 항원에 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, HRF의 C-말단에 대한 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 단백질-단백질 상호작용 분석을 수행하는 단계를 포함하는 HRF 특이적 수용체를 동정하는 방법을 제공한다.

【발명의 효과】

본 발명에 따른 TCTP 이량체인 IgE-의존성 히스타민방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor: HRF)의 구조 부위로서 세포막에 존재하는 HRF의 수용체에 결합하는 FL 도메인 및 H2 도메인을 확인하였고, TCTP 이량체 형성 및 활성화에 관여하는 HRF의 C-말단 도메인을 확인하였으며, 상기 FL 및 H2 도메인이 HRF의 수용체에 결합하여 IL-8의 분비능을 억제시키는 것을 확인함으로써, 상기 HRF의 수용체 결합 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단을 이용하여 천식, 기관지염, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증, 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 건초열, 결막염 및 아나필락시스 등의 알레르기 질환, 류마티스 관절염을 비롯한 기관지염, 폐렴, 관절염, 신장염, 건선, 피부염, 크론병, 장염, 치은염, 동맥경화증, 관상동맥염, 간염, 베체트병, 방광암, 전립선염, 신우신염, 사구체신염, 골수염, 갑상선염, 포도막염, 복강염, 수막염 및 폐섬유화증 등의 염증성 질환 및 말라리아를 포함한 HRF 관련 질환의 진단, 예방, 치료제 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 BEAS-2B 세포에서 f-TCTP(단량체 TCTP), △-dTCTP(FL 결실 이량체 TCTP) 및 Del-N11dTCTP(N-말단 결실 이량체 TCTP, HRF)의 농도에 따른 IL-8 유도능을 비교한 그래프이다.

도 2는 BEAS-2B 세포에서 f-TCTP, △-dTCTP 및 Del-N11dTCTP의 농도에

따른 GM-CSF 유도능을 비교한 그래프이다.

도 3은 ELISA를 이용하여 f-TCTP, △-dTCTP 및 Del-N11dTCTP의 펩타이드 dTBP2(dTCTP binding peptide 2)에 대한 친화도를 비교한 그래프이다.

도 4는 BEAS-2B 세포에서 Del-N11dTCTP에 대한 FL domain, Helix 2, 또는 Helix 3의 저해능을 비교한 그래프이다.

도 5는 BEAS-2B 세포에서 Del-N11dTCTP에 대한 FL 도메인을 인식하는 항체의 저해능을 비교한 그래프이다.

도 6은 BEAS-2B 세포에서 Del-N11dTCTP에 대한 H2 도메인을 인식하는 항체의 저해능을 비교한 그래프이다.

도 7은 f-TCTP His Trap SDS-PAGE 결과를 나타낸 그림이다. 37℃ 2시간 30분 과다발현(overexpression), SDS-PAGE 순서는 소니케이션(sonication) 후 상층액(supernatant)(S), 펠렛(pellet)(P), His trap 로딩(loading) 후 unbound(Unb), dump, 마커(M), 분획물(fraction) A1, A2, A3, A4, 마커(M), A5, A6, 마커(M), A8, A10. 마커의 크기는 240-140-100-70-50-35-25-20-15-7 kDa이다.

도 8은 f-TCTP Q(anion exchange column) SDS-PAGE 결과를 나타낸 그림이다. 상기 도 7에서 수득한 분획물 중 A2 내지 A6의 5 mℓ를 10배 희석, SDS-PAGE 순서는 Q(anion exchange column) 로딩 후 Unbound(Unb), 분획물 A1, A2, A3, 마커(M), 분획물 A4, A5, A6, A7, 마커(M), A8, A9, A10. 마커의 크기는 240-140-100-70-50-35-25-20-15-7 kDa이다.

도 9는 △-TCTP His Trap SDS-PAGE 결과를 나타낸 그림이다. 37℃ 2시간 30분 과다발현, SDS-PAGE 순서는 과다발현 전(전), 후(후), 소니케이션 후 상층액(S), 마커(M), 펠렛(P), His trap 로딩 후 unbound(Unb), dump, 마커(M), 분획물 A1, A2, A3, 마커(M), A4, A5, A6. 마커의 크기는 240-140-100-70-50-35-25-20-15-7 kDa이다.

도 10은 △-TCTP Q(anion exchange column) SDS-PAGE 결과를 나타낸 그림이다. 상기 도 9에서 수득한 분획물 중 A2 내지 A4의 3 mℓ를 10배 희석, SDS-PAGE 순서는 Q(anion exchange column) 로딩 후 Unbound(Unb), 분획물 A2,

마커(M), A3, A4, A5, 마커(M), A6, A7, 마커(M), A8, A9. 마커의 크기는 240-140-100-70-50-35-25-20-15-7 kDa이다.

도 11은 f-TCTP(녹색), △-TCTP(분홍) 및 NMR로 규명된 TCTP(2HR9, 청록색) 간의 구조를 비교한 그림이다.

도 12는 이황화 결합으로 형성된 f-dTCTP(녹색) 및 △-dTCTP(분홍) 간의 구조를 비교한 그림이다.

도 13은 이황화 결합으로 형성된 f-dTCTP(녹색), △-dTCTP(분홍) 및 모델 HRF(청록색) 간의 구조를 비교한 그림이다.

도 14는 HRF와 수용체간의 결합 모델 및 dTBP2 펩타이드와의 결합모델을 나타낸 그림이다.

도 15는 HRF 수용체 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 항체를 제작하여 affinity chromatography 정제 후 얻은 IgG의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 그림이다. 1-3은 FL에 결합하는 항체(1: 0.5 μg, 2: 1 μg, 3: 2 μg), 4-5는 BGG (4: 0.5 μg, 5: 1 μg,), 6-8은 H2에 결합하는 항체(6: 0.5 μg, 7: 1 μg, 8: 2 μg)이다.

도 16은 천식 및 비염 질환 모델을 제작하고 펩타이드를 투여하기 위한 프로토콜 및 면역 일정을 도식화한 그림이다.

도 17은 천식 및 비염 질환 모델에 PBS, FL 도메인 (20 mg/kg) 및 H2 도메인 (20mg/kg)을 적용했을 때 기관지폐포세척액 중으로 침윤된 염증성 세포 수를 비교한 그래프이다.

도 18은 천식 및 비염 질환 모델에서 PBS, FL 도메인 (20 mg/kg) 및 H2 도메인 (20mg/kg)의 기관지폐포세척액 중으로의 IL-5 분비 저해능을 비교한 그래프이다.

도 19는 천식 및 비염 질환 모델에서 PBS 및 FL 도메인 (20 mg/kg)의 OVA 특이적 IgE 분비 저해능을 비교한 그래프이다.

도 20은 천식 및 비염 질환 모델에서 PBS와 FL 도메인의 용량에 따른 기관지폐포세척액 중으로 침윤된 염증성 세포 수를 비교한 그래프이다.

도 21은 천식 및 비염 질환 모델에서 PBS와 FL 도메인의 용량에 따른

기관지폐포세척액 중으로의 IL-5 분비 저해능을 비교한 그래프와 HRF를 immunoblotting으로 검출한 결과를 나타낸 그림이다.

도 22는 천식 및 비염 질환 모델에서 PBS와 FL 도메인의 용량에 따른 폐조직의 IκBα 인산화 저해능을 immunoblotting 결과로 나타낸 그림이다.

도 23은 천식 및 비염 질환 모델에서 PBS와 FL 도메인의 용량에 따른 혈장 중 OVA- 특이적 IgE 분비 저해능을 비교한 그래프이다.

도 24는 BEAS-2B 세포에서 Del-N11dTCTP에 대한 C-말단(terminal) 도메인을 인식하는 항체의 저해능을 비교한 그래프이다.

도 25는 천식 및 비염 질환 모델에서 Pre-immune serum, FL 및 C-말단 도메인에 대한 항혈청의 기관지폐포세척액 중으로의 IL-5 분비 저해능을 비교한 그래프이다.

도 26은 상기 도 16의 천식 및 비염 질환 모델을 바탕으로 Pre-immune IgG 및 C-말단 도메인에 대한 IgG 항체를 투여하는 프로토콜에 대한 도이다.

도 27은 천식 및 비염 질환 모델에 Pre-immune IgG 항체, C-말단 도메인에 대한 IgG 항체를 비강 또는 복강투여 시 기관지폐포세척액 중으로 침윤된 염증성 세포수를 비교한 도이다.

도 28은 천식 및 비염 질환 모델에 Pre-immune IgG 항체, C-말단 도메인에 대한 IgG 항체를 비강 또는 복강투여 시 기관지폐포세척액 중으로 침윤된 총 백혈구(White Blood Cell: WBC), 호중구(Neutrophil: NE), 림프구(Lymphocyte: LY), 단핵구(Monocyte: MO), 호산구(Eosinophil: EO), 호염구(Basophil: BA) 수를 비교한 그래프이다.

도 29는 천식 및 비염 질환 모델에 Pre-immune IgG 및 C-말단 도메인에 대한 IgG 항체의 비강 또는 복강투여 시 기관지폐포 중으로 분비되는 IL-5 농도를 비교한 그림이다.

도 30은 류마티스성 관절염 모델에서 7-mer 펩타이드인 dTBP2가 류마티스성 관절염 예방에 미치는 영향을 분석한 그래프이다.

도 31은 류마티스성 관절염 모델에서 dTBP2가 류마티스성 관절염 치료에 미치는 영향을 분석한 그래프이다.

도 32a는 아토피 피부염 모델에서 dTBP2가 미치는 개선 효과를 육안상으로 나타낸 그림이다.

도 32b는 아토피 피부염 모델에서 dTBP2가 미치는 개선 효과를 나타낸 그래프이다.

도 33은 아토피 피부염 모델에서 HRF가 증가했음을 나타내는 그림이다.

도 34a는 아토피 피부염 모델에서 dTBP2가 미치는 영향을 조직학적으로 평가하기 위해 H/E염색의 결과를 나타낸 그림이다.

도 34b는 아토피 피부염 모델에서 피부두께에 dTBP2가 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 34c는 아토피 피부염 모델에서 비만세포의 침윤에 대해 dTBP2가 미치는 영향을 조직학적으로 나타낸 도이다.

도 34d는 아토피 피부염 모델에서 비만세포의 침윤에 대해 dTBP2가 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 35는 Lymph node assay를 통해 dTBP2가 미치는 영향을 확인한 그림이다.

도 36은 dTBP2가 HRF를 억제함으로써 항알레르기 활성을 나타냄을 히스타민 수치로 나타낸 그래프이다.

도 37a는 아토피 관련 Th2 cell 사이토카인인 IL-4에 대해 mRNA level로 수치를 확인한 그래프이다.

도 37b는 아토피 관련 Th2 cell 사이토카인인 IL-13에 대해 mRNA level로 수치를 확인한 그래프이다.

도 38은 dTBP2가 Th17A를 수준 감소에 미치는 영향을 확인한 그래프이다.

도 39는 류마티스 관절염의 경과가 진행될수록 TCTP의 양이 증가함을 나타낸 그래프이다.

도 40은 IHC(immunohistochemistry) 실험을 토대로 류마티스 관절염 환자들의 관절에 TCTP 분포하는 정도를 현미경으로 통해 확인한 그림이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein) 이량체형(dimer) IgE-의존성 히스타민방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor: HRF)와 세포막에 존재하는 HRF에 대한 수용체 간의 결합 억제제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

TCTP는 세포 밖으로 분비되는 특이한 단백질로, 작은 분비 소포체에 저장되었다가 비전형적 경로를 통하여 분비되며, 이 과정에 TSAP6라는 p53 유도성 막단백질이 관여한다는 보고가 있다(Amzallag *et al.*, *J Biol Chem*, 279, 46104-46112, 2004). 이렇게 분비된 HRF는 IgE-감작된(sensitized) 호염구(basophil)를 자극하여 히스타민 및 인터루킨-4 (IL-4)의 유리를 촉진시킴으로써 알레르기성 비염, 천식 및 아토피성 피부염과 같은 후기반응 알레르기 질환을 일으킨다고 보고되어 있다(MacDonald *et al.*, *Science*, 269, 688-690, 1995).

상기 알레르기 질환은 천식, 기관지염, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증, 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 건초열, 결막염 및 아나필락시스으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 천식, 비염 또는 아토피 피부염인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 기관지염, 폐렴, 관절염. 신장염, 건선, 피부염, 크론병, 장염, 치은염, 동맥경화증, 관상동맥염, 간염, 베체트병, 방광암, 전립선염, 신우신염, 사구체신염, 골수염, 갑상선염, 포도막염, 복강염, 수막염 및 폐섬유화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 류마티스성 관절염인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

HRF에 의해 증가되는 IL-8은 천식 또는 기관지염(Chanez *et al.*, *Int Arch Allergy Immunol*, 111, 83-88, 1996), 만성폐쇄성폐질환(Nocker *et al.*, *Int*

Arch Allergy Immunol, 109, 183-191, 1996), 기관지 확장증(bronchiectasis, Simpson *et al.*, *Thorax*, 62, 211-218, 2007), 비염(Benson *et al.*, *Pediatr Allergy Immunol*, 10, 178-185, 1999; Kuna *et al.*, *J Allergy Clin Immun*, 97, 104-112, 1996), 아토피성 피부염(Kimata & Lindley, *Arch Dis Child* 70,119-122, 1994), 두드러기(urticaria, Choi *et al.*, *J Clin Immunol*, 28, 244-249, 2008), 건초열(hay fever, Ciprandi *et al.*, *Otolaryngol Head Neck Surg*, 133, 429-435, 2005), 결막염(Miyoshi *et al.*, *Cornea*, 20, 743-747, 2001) 아나필락시스(anaphylaxis) 등의 여러 알레르기성 질환에 관여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

또한, IL-8은 만성기관지염 등 만성 염증성 기관지 질환(Richman-Eisenstat *et al.*, *Am J Physiol*, 264, L413-418, 1993), 폐렴 등 염증성 폐질환(Erger and Casale, Eur Respir J, 11, 299-305, 1998; Pease & Sabroe, *Am J Respir Med*, 1, 19-25, 2002), 관절염 또는 신장염(Harada *et al.*, *J Leukoc Biol*, 56, 559-564, 1994), 건선(Schulz *et al.*, *J Immunol*, 151, 4399-4406, 1993; Bruch-Gerharz *et al.*, *J Exp Med*, 184, 2007-2012, 1996), 피부염(Sticherling *et al.*, *Arch Dermatol Res*, 284, 82-85, 1992), 크론병(Izutani *et al.*, *Inflamm Bowel Dis*, 1, 37-47, 1995), 염증성 장질환(Mitsuyama *et al.*, *Clin Exp Immunol*, 96, 432-436, 1994), 치은염(Haake & Huang, Clinical Periodontology, 9th Edition. Philadelphia: W.B.Saunders Co. 2002. page 162), 동맥경화증, 관상동맥질환 등 심혈관계 질환(Apostolakis *et al.*, *Cardiovasc Res*, 84, 353-360, 2009; Boekholdt *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1503-1508, 2004), 만성간질환(Zimmermann *et al.*, *PLoS ONE*, 6, e21381, 2011), 베체트병(Behcet's disease, Katsantonis *et al.*, *Dermatology*, 201, 37-39, 2000), 방광암, 전립선염, 신우신염 또는 골수염(Shahzad *et al.*, *Int arch med*, 3, 11, 2010), 갑상선질환(Kobawala *et al.*, *J Thyroid Res*, 8, 270149, 2011), 포도막염(uveitis, Klok *et al.*, *Br J Ophthalmol*, 82, 871-874, 1998), 사구체 신염, 복강염, 수막염 및 폐섬유화증(Harada *et al.*, *Mol Med Today*, 2, 482-489, 1996)의 다양한 염증성 질환에 관여하는 것이 바람직하나, 이에

한정되지 않는다. 따라서, 폐질환, 류머티스성 관절염, 염증성 장질환, 건선, 수장족저농포증(palmoplantar pustulosis) 등 만성 염증성 피부질환, 안구 염증 등 염증성 질환에서 IL-8을 저해하는 것이 치료 전략으로 제시되었다(Mukaida, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284, L566-L577, 2003; Skov *et al.*, *J Immunol*, 181, 669-679, 2008; Harada *et al.*, *J Leukoc Biol*, 56, 559-564, 1994). IL-8의 차단항체(blocking antibody)나 IL-8 수용체를 코딩하는 유전자를 저해하는 치료법은 염증 치료 효과가 있으며(Harada *et al.*, *Mol Med Today*, 2, 482-489, 1996), 일례로 만성 염증성 피부질환 환자에서 IL-8에 대한 항체를 투여하여 염증이 감소되었다(Skov *et al.*, *J Immunol*, 181, 669-679, 2008). HRF에 의해 분비가 증가하는 GM-CSF도 다양한 염증성 질환과 관련성이 있어(Hamilton, *Trends Immunol*, 23, 403-408, 2002), GM-CSF 또한 류머티스성 관절염 등의 염증성 질환의 타겟으로 제시되고 있다(Cornish *et al.*, *Nat Rev Rheumatol*, 5, 554-559, 2009). 따라서, HRF 수용체 결합 억제제가 IL-8 분비 억제에 관여하는 것을 확인함으로써, 본 발명의 HRF 수용체 결합 억제제가 상기 질환을 예방 및 치료할 수 있는 이론이 확실한 것으로 나타났다.

한편, 1998년 항말라리아제인 아르테미시닌(Artemisinin)이 말라리아 단백질인 HRF에 결합하여 작용하는 것이 밝혀진 바 있다(Bhisutthibhan *et al.*, *J Biol Chem*, 273, 16192-16198, 1998). IL-8은 말라리아 환자에서도 분비되며(Friedland *et al.*, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87, 54-55, 1993), 말라리아의 HRF가 IL-8 분비를 촉진시킨다고 보고되었다(MacDonald *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10829-32, 2001). 따라서, HRF의 수용체 결합을 저해하여 HRF 활성을 억제시킴으로써, 본 발명의 HRF의 수용체 결합 억제제를 아르테미시닌과 마찬가지로 말라리아 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

상기 TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein)는 이량체형(dimer)이 활성형이고 상기 TCTP 이량체형 HRF의 구조 중에서 유연성 루프(flexible loop: FL) 도메인 또는 헬릭스 2(helix 2: H2) 도메인이 HRF에 대한 수용체와 결합하는 부위이며, 상기 TCTP는 전장, 유연성 고리(flexible

loop: FL)가 결실된 것, 헬릭스 2(helix 2: H2) 부위가 결실된 것, C-말단이 결실된 것 및 N-말단이 결실된 것으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것으로서 자연적으로 유래하는 것 또는 인위적으로 제조한 것이 바람직하다.

상기 TCTP 이량체형 HRF는 전장, FL 결실형, H2 결실형, N-말단 결실형 또는 C-말단 결실형 TCTP의 이량체일 수 있고 이량체는 동형 또는 이형일 수 있다.

상기 TCTP 이량체형 HRF는 척추동물의 것일 수 있다.

상기 결합 억제제는 유연성 고리(flexible loop: FL) 도메인 또는 헬릭스 2(helix 2: H2) 도메인 중 하나 또는 둘 모두와 HRF에 대한 수용체 간의 결합을 억제하는 것일 수 있다.

상기 TCTP 이량체형 HRF 구조 중에서 무정형단백질(Intrinsically Unfolded Protein: IUP) 구조부위로서, 세포막에 존재하는 상기 HRF 수용체에 결합하는, Flexible loop(FL) 도메인인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 FL 도메인은 (X)n-(S 또는 T)-RTEG-(A, N 또는 Q)-IDDSLIGGNASAEGPEGEGTE-(S 또는 A)-TV-(V 또는 I)-T-(X)n의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하며, 여기에서 X는 임의의 아미노산이며, n은 0 내지 5의 정수를 나타낸다.

상기 FL 도메인은 하기 표 1에 기재된 서열번호 1 내지 서열번호 4 중 어느 하나의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

상기 FL 도메인은 이를 암호화하는 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

상기 FL 도메인은 하기 표 1에 기재된 서열번호 5 내지 서열번호 10 중 어느 하나의 염기서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 DNA 중 어느 하나에 의해 암호화되는 것일 수 있다.

상기 TCTP 이량체형 HRF는 그 구조 중에서 세포막에 존재하는 상기 HRF

수용체에 결합하는, Helix 2(H2) 도메인인 것일 수 있다.

상기 H2 도메인은 (X)n-TKE-(A 또는 S)-YKKYIKDYMK-(S 또는 A)-(L 또는 I)-K-(G 또는 A)-(K 또는 R)-LEE-(Q 또는 H)-(K 또는 R)-P-(X)n 의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하다. 여기에서 X는 임의의 아미노산이며, n은 0 내지 5의 정수를 나타낸다.

상기 H2 도메인은 하기 표 1에 기재되어 있는 서열번호 11 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

상기 H2 도메인은 암호화하는 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

상기 H2 도메인은 서열번호 13 내지 서열번호 15 중 어느 하나의 염기서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의해 암호화되는 것일 수 있다.

상기 C-말단은 서열번호 33 또는 서열번호 34 중 어느 하나의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 아미노산 서열에서 하나 또는 둘 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 추가된 서열일 수 있다.

또한, 상기 C-말단은 암호화하는 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

상기 C-말단은 서열번호 35 내지 서열번호 37 중 어느 하나의 염기서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의해 암호화되는 것일 수 있다. 상기 C-말단은 하기 표 1에 기재되어 있는 서열번호 33 내지 서열번호 34 중 어느 하나의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것일 수 있고, 상기 아미노산 서열에서 하나 또는 둘 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 추가된 서열일 수 있다.

【표 1】

도메인	서열번호	종	서열
FL 아미노산 서열			

FL (37-68)	1	래트 마우스	SRTEGAIDDSLIGGNASAEGPEGEGTESTVVT
	2	사람	SRTEGNIDDSLIGGNASAEGPEGEGTESTVIT
FL (38-66)	3	래트 마우스	RTEGAIDDSLIGGNASAEGPEGEGTESTV
	4	사람	RTEGNIDDSLIGGNASAEGPEGEGTESTV
FL DNA 서열			
FL (37-68)	5	래트	agt aga aca gag ggt gcc atc gat gat tca ctc att ggt gga aat gct tcc gct gaa ggt ccg gag ggc gaa ggt acc gaa agc aca gta gtc acc
	6	마우스	agt aga aca gag ggt gcc atc gat gac tcg ctc atc ggt gga aat gct tcc gct gaa ggt ccg gag ggc gaa ggt acc gaa agc aca gta gtc acc
	7	사람	agt agg aca gaa ggt aac att gat gac tcg ctc att ggt gga aat gcc tcc gct gaa ggc ccc gag ggc gaa ggt acc gaa agc aca gta atc act
FL (38-66)	8	래트	aga aca gag ggt gcc atc gat gat tca ctc att ggt gga aat gct tcc gct gaa ggt ccg gag ggc gaa ggt acc gaa agc aca gta
	9	마우스	aga aca gag ggt gcc atc gat gac tcg ctc atc ggt gga aat gct tcc gct gaa ggt ccg gag ggc gaa ggt acc gaa agc aca gta
	10	사람	agg aca gaa ggt aac att gat gac tcg ctc att ggt gga aat gcc tcc gct gaa ggc ccc gag ggc gaa ggt acc gaa agc aca gta
H2 아미노산 서열			
H2 (84-108)	11	래트 마우스	TKEAYKKYIKDYMKSLKGKLEEQKP
	12	사람	TKEAYKKYIKDYMKSIKGKLEEQRP
H2 DNA 서열			
H2 (84-108)	13	래트	aca aaa gag gcc tac aaa aag tat atc aaa gac tac atg aaa tca ctc aag ggc aaa ctt gaa gaa cag aaa cca
	14	마우스	aca aaa gag gct tac aaa aag tac atc aaa gac tac atg aaa tca ctc aaa ggc aaa ctt gaa gag cag aaa cca
	15	사람	aca aaa gaa gcc tac aag aag tac atc aaa gat tac atg aaa tca atc aaa ggg aaa ctt gaa gaa cag aga cca
C-말단 아미노산 서열			
C-말단 (162-172)	33	래트 마우스	FFKDGLEMEKC
	34	사람	FFKDGLKMEKC
C-말단 DNA 서열			
C-말단	35	래트	ttc ttt aag gag ggc tta gag atg gaa aaa tgt

(162-172)			
	36	마우스	ttc ttt aag gat ggc tta gag atg gag aaa tgt
	37	사람	ttc ttt aag gat ggt tta aaa atg gaa aaa tgt

또한, 본 발명에 따른 FL, H2 도메인 또는 C-말단의 아미노산 서열은 당업계의 공지된 통상의 기술에 따라 변형될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 FL, H2 도메인 또는 C-말단은 아미노산 수를 증가시키거나 감소시킴으로써 변형될 수 있다. 또한 본 발명에 따른 FL, H2 도메인 또는 C-말단의 활성을 감소시키지 않는 범위 내에서, 특정 잔기나 그 순서를 바꿈으로써 변형될 수 있다. 변형 가능한 아미노산은 자연적으로 존재하는 L-α-아미노산만이 아니라, β, γ, δ 아미노산은 물론 D-α-아미노산의 유도체로도 변형 가능하다.

따라서, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 상기 FL, H2 도메인 또는 C-말단을 그의 HRF 억제 활성을 유지 내지 증가시키거나 손상시키지 않는 범위 내에서 통상의 기술을 사용하여 변형시킬 수 있으며, 이는 본 발명의 범주 내에 속하는 것이다.

상기 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단은 척추동물의 것일 수 있다.

본 발명에 의해 HRF의 수용체 결합 도메인 및 그 기전이 밝혀진 이상, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 누구든지 래트, 생쥐, 인간, 토끼, 닭 등에서 FL, H2 도메인 및 C-말단을 용이하게 동정할 수 있다. 따라서 래트, 생쥐, 인간 토끼, 닭 등의 HRF 수용체 결합 도메인 또한 본 발명의 범주 내에 속하는 것이다.

TCTP의 아미노산 전장서열을 다양한 진핵생물에서 정렬한 결과 여러 종에서 고도로 보존되어 있으며(Thaw *et al., Nat Struct Biol*, 8, 701-704, 2001), 3차원 구조 또한 고도의 유사성을 가지고 있는 것으로 나타났다(Hinojosa-Moya *et al., J Mol Evol*, 66, 472-483, 2008). 따라서 TCTP의 전장 서열뿐 아니라 수용체 결합 도메인인 FL, H2 도메인 및 C-말단 도메인도 척추동물에서 높은

상동성을 가지고 있어 종간에서 구조적으로 동일하게 수용체 결합, 이량체 형성 또는 활성화 부위로 작용할 것으로 판단된다.

상기 결합 억제제는 HRF의 구조 중에서 HRF에 대한 수용체에 결합에 관여하는 도메인과 결합하여, HRF와 HRF에 대한 수용체 간의 결합 억제, 수용체 활성 억제 또는 이량체 형성을 억제하는 것이 바람직하다.

상기 결합 억제제는 HRF의 상기 결합 억제제는 HRF의 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단(C-terminus)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상에 결합하여, 상기 FL 도메인 또는 H2 도메인 중 어느 하나 또는 둘 모두와 HRF에 대한 수용체 간의 결합을 억제하는 것일 수 있다.

상기 결합 억제제는 HRF의 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상에 대한 항체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

상기 결합 억제제는 상기 (X)n-(S 또는 T)-RTEG-(A, N 또는 Q)-IDDSLIGGNASAEGPEGEGTE-(S 또는 A)-TV-(V 또는 I)-T-(X)n의 아미노산 서열, 이의 유사체 또는 이들의 단편을 인식하는 항체 또는 이들의 단편인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 FL 부위를 인식하는 항체이면 어느 것이나 가능하다. 여기에서 X는 임의의 아미노산이며, n은 0 내지 5의 숫자를 나타낸다.

상기 결합 억제제는 상기 (X)n-TKE-(A 또는 S)-YKKYIKDYMK-(S 또는 A)-(L 또는 I)-K-(G 또는 A)-(K 또는 R)-LEE-(Q 또는 H)-(K 또는 R)-P-(X)n의 아미노산 서열, 이의 유사체 또는 이들의 단편을 인식하는 항체 또는 이들의 단편인 것일 수 있으나 이에 한정되지 않으며, H2 부위를 인식하는 항체이면 어느 것이나 가능하다. 여기에서 X는 임의의 아미노산이며, n은 0 내지 5의 숫자를 나타낸다.

상기 결합 억제제는 서열번호 33 또는 서열번호 34의 아미노산 서열, 이의 유사체 또는 이들의 단편을 인식하는 항체 또는 이들의 단편인 것일 수 있고, 상기 아미노산 서열에서 하나 또는 둘 이상의 아미노산이 치환, 결실

또는 추가된 서열일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, HRF의 C-말단 도메인을 인식하는 항체이면 어느 것이나 가능하다.

상기 결합 억제제는 HRF의 수용체에 결합하여, HRF의 작용을 억제하는 것일 수 있고, C-말단의 경우 TCTP 이량체 형성을 억제하거나 HRF 또는 HRF 수용체의 활성화를 억제하는 것일 수 있다.

상기 HRF의 작용 억제는 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) 분비, IL-8 분비 및 산화적 스트레스 활성을 억제하는 것이 바람직하다.

상기 결합 억제제는 HRF의 수용체를 경쟁적(competitive), 비경쟁적(non-competitive), 반경쟁적(uncompetitive)으로 저해하는 것일 수 있다.

상기 결합 억제제는 HRF의 FL 도메인, H2 도메인, C-말단, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 HRF 수용체 결합 억제제를 유효성분으로 하는 것일 수 있다.

상기 결합 억제제는 HRF의 FL 도메인, H2 도메인, C-말단, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

서열번호 1 내지 4로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 FL 도메인은 TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein) 이량체형 IgE-의존성 히스타민방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor, HRF)와 세포막에 존재하는 상기 HRF 수용체 간의 결합 억제제로 작용할 수 있다.

또한, 서열번호 11 또는 12로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 H2 도메인은 상기 결합 억제제로 작용할 수 있다.

또한, 서열번호 33 또는 34로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C-말단은 상기 결합 억제제로 작용할 수 있다.

또한, 상기 FL 도메인, H2 도메인 또는 C-말단을 결합한 융합 단백질, 및 HRF 도메인도 상기 결합 억제제로 작용할 수 있다.

또한, 상기 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단 간 가능한 여러 서열의 조합으로 이루어진 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단도 상기 결합억제제로 작용할 수 있다.

상기 결합 억제제는 상기 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단의 서열과 상동성을 갖는 유사 서열이나 이의 단편을 포함할 수 있다.

상기 결합 억제제는 (X)n-(S 또는 T)-RTEG-(A, N 또는 Q)-IDDSLIGGNASAEGPEGEGTE-(S 또는 A)-TV-(V 또는 I)-T-(X)n의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하다. 여기에서 X는 임의의 아미노산이며, n은 0 내지 5의 숫자를 나타낸다.

상기 결합 억제제는 상기 표 1에 기재되어 있는 서열번호 1 내지 서열번호 4의 아미노산의 서열, 이의 유사체 또는 이들의 단편을 포함하는 것일 수 있다..

상기 결합 억제제는 (X)n-TKE-(A 또는 S)-YKKYIKDYMK-(S 또는 A)-(L 또는 I)-K-(G 또는 A)-(K 또는 R)-LEE-(Q 또는 H)-(K 또는 R)-P-(X)n의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하다. 여기에서 X는 임의의 아미노산이며, n은 0 내지 5의 숫자를 나타낸다.

상기 결합 억제제는 상기 표 1에 기재되어 있는 서열번호 11 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 아미노산 서열, 이의 유사체 또는 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하다.

상기 결합 억제제는 상기 표 1에 기재되어 있는 서열번호 33 내지 서열번호 34의 아미노산의 서열, 이의 유사체 또는 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 아미노산 서열에서 하나 또는 둘 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 추가된 서열일 수 있다.

상기 결합 억제제는 FL 도메인, H2 도메인, C-말단 및 HRF로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 발현을 억제하는 발현

억제제를 유효성분으로 함유하는 것일 수 있다.

상기 FL 도메인, H2 도메인, C-말단 및 HRF로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 발현을 억제하는 발현 억제제는 FL 도메인, H2 도메인, FL 및 H2 도메인, C-말단 또는 HRF 유전자의 mRNA에 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA)로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

또한, 상기 결합 억제제는 HRF의 C-말단에 특이적으로 결합하는 항체, 이의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 포함하는 것일 수 있다.

또한, 상기 결합 억제제는 7개의 아미노산으로 구성되고, 첫 번째 아미노산은 A, L 및 W로 구성된 군으로부터 선택되고, 두 번째 아미노산은 V, Y, E 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, 세 번째 아미노산은 T, V, F 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, 네 번째 아미노산은 Y, P 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, 다섯 번째 아미노산은 P, G 및 K로 구성된 군으로부터 선택되고, 여섯 번째 아미노산은 A, L, S 및 W로 구성된 군으로부터 선택되고, 일곱 번째 아미노산은 A, P 및 M로 구성된 군으로부터 선택되는 일련의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드, 이의 유사체 또는 이들의 단편일 수 있다.

또한, 상기 결합 억제제는 서열번호 23 내지 32 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드, 이의 유사체 또는 이들의 단편인 것일 수 있다.

상기 7개의 아미노산으로 구성되는 펩타이드 또는 이의 유사체는 HRF에 결합하는 것일 수 있고, HRF의 H2 도메인에 결합하는 것이 바람직하다.

상기 7개의 아미노산으로 구성되는 펩타이드 또는 이의 유사체는 HRF에 결합하여 HRF가 그 수용체와 결합하는 것을 억제하여 최종적으로 면역반응 유발 물질 분비를 방지하는 것일 수 있다.

본 발명의 구체적인 실험예에서, 본 발명자들은 BEAS-2B 세포에서 f-TCTP(단량체 TCTP), △-dTCTP(FL 결실 이량체 TCTP), Del-N11dTCTP(N-말단 결실 이량체 TCTP, HRF)에 의한 IL-8 및 GM-CSF 분비능을 분석하기 위하여

f-TCTP, △-dTCTP 및 Del-N11dTCTP의 활성을 BEAS-2B 세포(ATCC)에서의 IL-8 분비능을 통해 비교한 결과, Del-N11dTCTP가 f-TCTP 및 △-dTCTP에 비하여 IL-8 및 GM-CSF 분비능이 뛰어남을 확인하였다(도 1 및 도 2 참조). 이는 Del-N11dTCTP는 이량체를 형성하여 활성형으로 IL-8 분비능을 나타내는 반면, FL 도메인이 결실된 △-dTCTP는 이량체를 형성해도 IL-8 분비능을 유발하지 못하는 비활성형임을 의미한다. 따라서 FL 도메인이 TCTP 이량체가 특이적인 수용체 결합하는 데 관여함으로써 싸이토카인 분비 활성에 중요한 부위임을 확인하였다.

또한, 본 발명의 구체적인 실험예에서, 본 발명자들은 f-TCTP, △-dTCTP 및 Del-N11dTCTP의 dTBP2(dTCTP binding peptide 2)에 대한 친화도 분석을 하기 위하여 펩타이드 dTBP2의 COOH-말단에 비오틴(biotin)을 붙이고 정제한 다음 이를 고정(immobilization)시킨 후, f-TCTP, △-dTCTP 및 Del-N11dTCTP를 첨가해 그 결합능에 차이가 있는지를 알아본 결과 Del-N11dTCTP가 f-TCTP 및 △-dTCTP에 비하여 dTBP2에 대한 친화도가 높은 것을 확인하였다(도 3 참조). 이는 Del-N11dTCTP와 달리 FL 도메인이 없는 △-dTCTP는 이량체를 형성하더라도 dTBP2 펩타이드에 대한 친화도가 낮음을 의미한다. 따라서, dTBP2가 활성형 HRF인 Del-N11dTCTP에 결합하는 과정에서 FL 도메인이 중요하게 작용함으로써 FL 도메인이 없으면 이량체를 형성해도 dTBP2가 결합하지 못하며, FL 도메인이 수용체에 결합하여 구조적인 변화를 통해 HRF와 dTBP2의 결합이 가능할 수 있음을 확인하였다.

또한, 본 발명의 구체적인 실험예에서, 본 발명자들은 FL 도메인, Helix 2 도메인 및 Helix 3 도메인이 Del-N11dTCTP의 수용체 결합을 저해하는지 확인하기 위하여, 각각의 도메인을 합성한 펩타이드를 이용하여 Del-N11dTCTP에 대한 억제능을 실험하였다. FL 도메인, Helix 2 도메인 및 Helix 3 도메인은 NH_2-말단 아세틸화(acetylation) 및 COOH-말단 아미드화(amidation)한 펩타이드로 합성 및 정제(Peptron)한 것을 사용한 결과, Del-N11dTCTP에 대한 FL 도메인 및 Helix 2 도메인이 Helix 3 도메인과 비교하여 IL-8의 분비능이 저해되는 것을 확인하였다(도 4 참조).

또한, 본 발명의 구체적인 실험예에서, 본 발명자들은 FL 및 Helix 2 도메인을 인식하는 다클론항체의 IL-8 저해능을 분석하기 위하여, BEAS-2B 세포에 anti-FL 항체 및 anti-H2 항체를 농도별로 각각 처리하여 Del-N11dTCTP로 유도된 IL-8의 저해능을 비교한 결과, 상기 세포에 Del-N11dTCTP 처리 없이 항체만 처리한 NC(negative control) 군에서는 IL-8 분비가 검출되지 않았으며, Del-N11dTCTP만 처리한 세포에서는 IL-8 분비가 증가하였고, FL 도메인을 인식하는 특이적인 항체를 각각 처리한 상기 세포에서는 Del-N11dTCTP에 의한 IL-8 분비가 감소하였으며(도 5 참조), H2 도메인을 인식하는 특이적인 항체를 각각 처리한 상기 세포에서도 Del-N11dTCTP에 의한 IL-8 분비가 감소하여 본 항체의 IL-8 분비 억제능을 확인하였다(도 6 참조).

또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 X-ray 구조결정학을 이용하여 FL 부위의 유무에 따른 TCTP의 수용체 결합을 모델링 하기 위해 먼저 단량체형 f-TCTP(FL 도메인 존재) 및 △-TCTP(FL 도메인 결실)를 생성한 후, 이량체화 시킴으로써 f-dTCTP 및 △-dTCTP를 제작하여, 이를 결정화한 후 구조를 규명하였다.

또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 f-dTCTP(FL 도메인 존재)를 제작하기 위하여 단량체형 f-TCTP(FL 도메인 존재) 단백질을 클로닝하여 발현시켰다. HisTrap 컬럼으로 분리된 f-TCTP(도 7 참조)를 두 번째로 Hi-Trap Q 컬럼을 이용하여 이온-교환 크로마토그래피로 정제하여 SDS-PAGE에 나타내었다(도 8 참조).

또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 △-dTCTP(FL 도메인 결실)를 제작하기 위하여 단량체형 △-TCTP(FL 도메인 결실) 단백질을 클로닝하여 발현시켰다. HisTrap 컬럼으로 분리된 △-TCTP(도 9 참조)를 두 번째로 Hi-Trap Q 컬럼을 이용하여 이온-교환 크로마토그래피로 정제하여 SDS-PAGE에 나타내었다(도 10 참조).

또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 발현 및 정제하여 얻은 f-TCTP와 △-TCTP에 터셔리부틸 하이드로 퍼옥사이드(tertiary butyl

hydroperoxide)를 처리하여 이량화시킴으로써 f-dTCTP 및 △-dTCTP 단백질을 얻었다.

또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 f-dTCTP 및 △-dTCTP 단백질의 결정을 얻기 위한 최적 조건을 탐색하여 달린 방울 증기확산법(hanging drop vapour diffusion method) 또는 앉은 방울 증기확산법(sitting-drop vapour diffusion method)으로 결정화하였다. 싱크로트론(Synchrotron)에서의 자료 수집을 위해 안정화된 크라이오-조건(cryo-condition)을 검색하여, 결정화된 f-dTCTP 및 △-dTCTP 단백질을 안정화된 크라이오-조건에서 X-선 자료를 수집하였다. f-dTCTP 및 △-dTCTP 단백질의 결정구조를 분석한 결과 조사 모델로 사용했던 네이티브(native) TCTP과 거의 유사한 구조를 나타냈다(도 11 참조). 이량체인 f-dTCTP 및 △-dTCTP의 삼차원 구조는 대칭적으로 생긴 나비모양을 하고 있었으며, 이량체의 구조는 예상대로 Cys172를 매개로 하여 이루어져 있는 것을 확인하였다(도 12 참조).

또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 f-dTCTP 중 FL 부위는 루프의 유연성 때문에 구조 결정이 어려워, FL이 존재하는 f-dTCTP의 구조는 모델링을 통하여 생성하였고, FL 부분을 에너지 최소화하여 모델링한 결과, FL을 붙인 f-dTCTP의 구조에서 FL은 HRF의 본체와 떨어져 있어서 FL의 유무에 따라 전체적인 HRF의 구조에는 크게 영향을 주지 않음을 확인하였다(도 13 참조). f-dTCTP와 수용체간의 결합 모델 및 dTBP2 펩타이드와의 결합모델을 나타내었다(도 14 참조).

또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 본 발명의 HRF 구조 중에 존재하는 HRF 수용체 결합 도메인인 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단(C-terminus) 부위에 각각 결합하여 HRF의 활성을 저해하기 위한 항체를 제작하기 위하여, 토끼(New Zealand White)에 수용체 결합 도메인 펩타이드를 항원으로 사용하여 면역 유도하여 특이적인 다클론항체를 생산하였다. 생산된 항체가 항원특이적으로 결합하는 지 확인하고, 항원 특이적인 항체분리정제(affinity chromatography)를 통해 수용체 결합 도메인 FL, H2 및

C-말단에 결합하는 IgG를 순수 분리 정제하여 확인하였고(도 15 및 실시예 8 참조), 이들의 면역반응 유발 물질 억제 및 항염증 효과 등을 검증하였다.

아울러, 본 발명의 구체적인 실시예에서, HRF의 친화성 선별을 통해 HRF에 결합할 수 있는 7-mer 펩타이드를 분리하였으며, 7개의 아미노산으로 구성된 7-mer 펩타이드의 서열을 분석하였고(서열번호 23 내지 32 참조) 상기 펩타이드가 HRF의 H2 도메인이나 HRF의 일정 부위에 결합하여 HRF의 그 수용체와의 결합 등을 억제함으로써 최종적으로 면역반응 유발 물질 분비를 방지함을 규명하였다.

따라서, HRF 구조 부위로서 세포막에 존재하는 HRF의 수용체에 결합하는 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단과 이들에 대한 항체, HRF에 결합하는 7-mer 펩타이드를 확인함으로써, 이를 이용하여 천식, 기관지염, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증, 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 건초열, 결막염, 아나필락시스 등의 알레르기 질환, 기관지염, 폐렴, 관절염. 신장염, 건선, 피부염, 크론병, 장염, 치은염, 동맥경화증, 관상동맥염, 간염, 베체트병, 방광암, 전립선염, 신우신염, 사구체신염, 골수염, 갑상선염, 포도막염, 복강염, 수막염, 폐섬유화증 및 류마티스 관절염 등의 염증성 질환 및 말라리아를 포함한 HRF 관련 질환의 치료제 개발 및 스크리닝, 예방 및 진단 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

본 발명에 따른 조성물은 HRF 수용체와의 결합억제제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있다.

상기 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여시 복강내 주사, 직장내 주사, 피내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사, 흉부내 주사, 관절강내 주사, 경막외 주사, 척수내 주사, 심장내 주사, 동맥내 주사, 골내 주사, 비강, 직장 및 기관지 투여, 경피 투여, 점안제 및 스프레이 제제 형태 등으로 투여될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

상기 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학

치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

상기 조성물의 일일 투여량은 약 0.0001 내지 1000 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 ㎎/㎏ 이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하나 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

상기 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 HRF와 수용체 간 결합 억제제를 함유하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 HRF 관련 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

상기 질환이란 천식, 기관지염, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증, 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 건초열, 결막염, 아나필락시스 등의 알레르기 질환, 기관지염, 폐렴, 관절염. 신장염, 건선, 피부염, 크론병, 장염, 치은염, 동맥경화증, 관상동맥염, 간염, 베체트병, 방광암, 전립선염, 신우신염, 사구체신염, 골수염, 갑상선염, 포도막염, 복강염, 수막염, 폐섬유화증 및 류마티스 관절염 등의 염증성 질환 및 말라리아 등으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 1000 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.001 내지 100 ㎎/㎏이며 이에 한정되는 것은 아니다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율,

질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

상기 투여는 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여시 복강내 주사, 직장내 주사, 피내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사, 흉부내 주사, 관절강내 주사, 경막외 주사, 척수내 주사, 심장내 주사, 동맥내 주사, 골내 주사, 비강, 직장 및 기관지 투여, 경피 투여, 점안제 및 스프레이 제제 형태 등으로 투여될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

상기 개체는 인간을 포함한 척추동물, 포유동물, 쥐, 토끼, 기니아피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이나 이에 한정되지 않는다. 본 발명은 TCTP 이량체의 구조 중에서 활성형 HRF의 유연성 루프인 FL 도메인 및 H2 도메인 부위가 세포막에 존재하는 특이적 수용체에 결합하는 부위임을 규명하였고 이러한 FL 도메인 및 H2 도메인을 타깃으로 이용한 HRF 수용체와의 결합 억제제는 천식, 기관지염, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증, 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 건초열, 결막염, 아나필락시스 등의 알레르기 질환, 기관지염, 폐렴, 관절염. 신장염, 건선, 피부염, 크론병, 장염, 치은염, 동맥경화증, 관상동맥염, 간염, 베체트병, 방광암, 전립선염, 신우신염, 사구체신염, 골수염, 갑상선염, 포도막염, 복강염, 수막염, 폐섬유화증 및 류마티스 관절염 등의 염증성 질환 및 말라리아 등 HRF 관련 질환의 억제제 개발에 유용하게 사용할 수 있다.

또한, 본 발명은

1) HRF의 FL 도메인 또는 H2 도메인 중 어느 하나, 둘 모두, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상과 HRF에 대한 수용체를 피검시료와 접촉시키는 단계;

2) 상기 도메인, 이들의 유사체 또는 이들의 단편과 HRF에 대한 수용체 간의 결합 수준을 측정하는 단계; 및

3) 단계 1)의 과정을 거치지 않은 대조군에 비해 결합을 감소시키는 피검시료를 선별하는 단계;를 포함하는,

알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 HRF 관련 질환의 진단, 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 알레르기 질환은 천식, 기관지염, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증, 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 건초열, 결막염 및 아나필락시스로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 기관지염, 폐렴, 관절염. 신장염, 건선, 피부염, 크론병, 장염, 치은염, 동맥경화증, 관상동맥염, 간염, 베체트병, 방광암, 전립선염, 신우신염, 사구체신염, 골수염, 갑상선염, 포도막염, 복강염, 수막염 및 폐섬유화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 단계 3)의 피검시료는 펩타이드, 단백질, 항체, 비펩타이드성 물질, 합성 물질, 화학물질, 핵산, 천연물, 천연화합물, 반합성물질, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 및 혈장으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

또한, 본 발명은

1) HRF의 FL 도메인 또는 H2 도메인 중 어느 하나, 둘 모두, 이들의 유사체 및 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상과 HRF에 대한 수용체를 발현하는 세포를 피검시료와 접촉시키는 단계;

2) 상기 단계 1)의 세포를 배양하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 배양액에서 히스타민, IL-8 또는 GM-CSF를 포함하는 활성물질의 분비수준을 측정하여 상기 단계 1)의 과정을 거치지 않은 대조군에 비해 분비수준이 낮은 피검시료를 선별하는 단계;를 포함하는,

알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 HRF 관련 질환의 진단, 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 알레르기 질환은 천식, 기관지염, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증,

비염, 아토피 피부염, 두드러기, 건초열, 결막염 및 아나필락시스로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 기관지염, 폐렴, 관절염. 신장염, 건선, 피부염, 크론병, 장염, 치은염, 동맥경화증, 관상동맥염, 간염, 베체트병, 방광암, 전립선염, 신우신염, 사구체신염, 골수염, 갑상선염, 포도막염, 복강염, 수막염 및 폐섬유화증 으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 단계 3)의 피검시료는 펩타이드, 단백질, 항체, 비펩타이드성 물질, 합성 물질, 화학물질, 핵산, 천연물, 천연화합물, 반합성물질, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 및 혈장으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

또한, 본 발명은 피검시료와 상기 FL 도메인, H2 도메인 또는 C-말단 중 어느 하나 또는 둘 이상과 결합하는 항체 등을 제작하고 FL 도메인, H2 도메인 또는 C-말단과 결합량을 측정하여 무처리 대조군에 비해 결합이 증가한 피검시료를 선별하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택된 HRF 관련 질환 치료의 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 FL, H2 도메인 및 C-말단을 내포하는 HRF의 발현을 측정하여 무처리 대조군에 비해 감소시킨 피검시료를 선별하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택된 HRF 관련 질환 치료의 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

아울러, 본 발명은 상기 FL 도메인, H2 도메인 또는 C-말단 중 어느 하나 또는 둘 이상과 결합하는 항체를 이용하여, FL 도메인, H2 도메인 또는 C-말단과 결합량을 측정하여 무처리 대조군에 비해 결합이 증가한 피검시료를 선별하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택된 HRF 관련 질환 진단 방법을 제공한다.

본 발명의 HRF 관련 질환 치료 물질의 스크리닝 방법은 HRF 구조 부위로서 세포막에 존재하는 HRF의 수용체에 결합하는 FL 도메인 및 H2 도메인을 확인하고, 상기 도메인이 HRF의 수용체에 결합하여 IL-8의 분비능을 억제시키는 것을 확인함으로써, 상기 HRF의 수용체 결합 도메인을 이용하여 다양한 염증성 질환, 알레르기성 질환 및 말라리아 치료 물질의 스크리닝 방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 HRF의 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상과 HRF에 대한 수용체 간의 결합을 검출하는 물질을 포함하는 알레르기 질환, 염증성 질환 또는 말라리아 질환 진단용 키트를 제공한다.

상기 HRF의 FL 도메인 또는 H2 도메인 중 어느 하나 또는 둘 모두와 HRF 수용체 간의 결합을 검출하는 물질을 측정하기 위하여 상기 도메인에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프루브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 HRF의 FL 도메인 또는 H2 도메인 중 어느 하나 또는 둘 모두와 HRF 수용체 간의 결합을 검출하는 물질을 측정하는 제제는 상기 도메인에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

또한, 알레르기 질환, 염증성 질환 또는 말라리아 질환 진단용 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immnosorbent assay) 키트, 샌드위치 ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid)키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring)키트 등이 있으며, 이에 한정되지 않고, 당업자에게 알려진 모든 공지의 방법을 통해 이루어질 수 있다.

본 발명의 HRF 관련 질환 진단용 키트는 HRF 구조 부위로서 세포막에 존재하는 HRF의 수용체에 결합하는 FL 도메인 또는 H2 도메인을 확인하며, HRF 활성화 또는 수용체 활성화 등에 관여하는 C-말단을 확인하고, 상기 FL 또는 H2

도메인이 HRF의 수용체에 결합하여 IL-8의 분비능을 억제시키는 것을 확인함으로써, 상기 HRF의 수용체 결합 도메인을 이용하여 다양한 염증성 질환, 알레르기성 질환 및 말라리아 질환 진단용 키트로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 FL 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편을 제공한다.

또한, 본 발명은 서열번호 11 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 H2 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편을 제공한다.

또한, 본 발명은 서열번호 33 또는 서열번호 34 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 C-말단에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편을 제공한다.

상기 항체는 다클론(polyclonal) 항체, 단일클론(monoclonal) 항체, 쥐(murine) 항체, 키메라(chimeric) 항체 및 인간화(humanized) 항체로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 다클론 항체는 본 발명의 단백질 마커 중 어느 하나를 동물에 주사하고 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 만들어질 수 있다.

상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술 등이 포함된다(Kohler G et al., Nature 256:495-497, 1975; Kozbor D et al., J Immunol Methods 81:31-42, 1985; Cote RJ et al., Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030, 1983; 및 Cole SP et al., Mol Cell Biol 62:109-120, 1984).

상기 키메라 항체는 가변 영역 서열이 하나의 종으로부터 유래되고 및 가변영역 서열이 마우스 항체로부터 유래되고 불변영역이 인간 항체로부터 유래된 항체와 같은, 불변영역 서열이 또 다른 종으로부터 유래된 항체를 포함한다.

상기 인간화 항체는 마우스와 같은, 또 다른 포유류 종의 생식세포(germline)로부터 유래된 CDR 서열이 인간 구조형성영역에 접목된 항체를 포함한다. 추가적인 구조형성영역 변형은 또 다른 포유류 종의 생식세포로부터 유래된 CDR 서열 내에서뿐만 아니라 인간 구조형성 서열 내에서 만들어질 수도 있다.

상기 면역학적 활성 단편은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fd, 단일쇄 Fv (scFv) 및 디설파이드 안정화 Fv (dsFv)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

또한, 본 발명은 HRF에 대한 수용체에 결합하거나 결합에 관여하는 것을 특징으로 하는 FL 도메인을 제공한다. 상기 FL 도메인은 (X)n-(S 또는 T)-RTEG-(A, N 또는 Q)-IDDSLIGGNASAEGPEGEGTE-(S 또는 A)-TV-(V 또는 I)-T-(X)n의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하다.

또한, 본 발명은 상기 HRF에 대한 수용체에 결합하거나 결합에 관여하는 것을 특징으로 하는 H2 도메인을 제공한다. 상기 H2 도메인은 (X)n-TKE-(A 또는 S)-YKKYIKDYMK-(S 또는 A)-(L 또는 I)-K-(G 또는 A)-(K 또는 R)-LEE-(Q 또는 H)-(K 또는 R)-P-(X)n 의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하다.

또한, 본 발명은 상기 HRF에 대한 수용체와의 결합에 관여하거나 HRF의 활성화 또는 HRF 이량체 형성에 관여하는 C-말단을 제공한다. 상기 C-말단은 서열번호 33, 서열번호 34, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 아미노산 서열에서 하나 또는 둘 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 추가된 서열일 수

있다.

또한, 본 발명은 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 코딩하는 유전자를 제공하고, 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하며, 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

또한, 본 발명은 FL 도메인에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 제공하고, H2 도메인에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 제공하며, C-말단에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 제공한다.

또한, 본 발명은 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 히스타민 방출 유도제를 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 인간을 제외한 동물에 서열번호 1 내지 서열번호 4 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 FL 도메인 펩타이드를 항원으로 사용하여 면역을 유도하고 특이적인 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 생산하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 생산된 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편이 항원 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 항원에 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, FL 도메인에 대한 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 인간을 제외한 동물에 서열번호 11 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 H2 도메인을 포함하는 펩타이드를 항원으로

사용하여 면역을 유도하고 특이적인 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 생산하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 생산된 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편이 항원 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 항원에 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, H2 도메인에 대한 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 인간을 제외한 동물에 HRF의 C-말단을 포함하는 펩타이드를 항원으로 사용하여 면역을 유도하고 특이적인 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 생산하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 생산된 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편이 항원 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 항원에 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, HRF의 C-말단에 대한 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편의 제조 방법

또한, 본 발명은 단백질-단백질 상호작용 분석을 수행하는 단계를 포함하는 HRF 특이적 수용체를 동정하는 방법을 제공한다. 이 경우, 상기 단백질-단백질 상호작용 분석은 동시정제(co-purification), 효모 투-하이브리드 시스템(Yeast Two-hybrid system) 또는 단백질 칩 시스템을 통해 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

또한, 상기 동시정제는

1) HRF-HRF 수용체 복합체를 분리하는 단계;

2) 상기 분리된 복합체를 정제하는 단계; 및

3) 상기 정제된 복합체로부터 수용체를 확인하는 단계를 포함하는 것이

바람직하나 이에 한정되지 않는다.

아울러, 단백질 칩 시스템은

1) 기능이 밝혀지거나 밝혀지지 않은 다양한 단백질들이 집적된 단백질 칩에 본 발명의 결실형 HRF 또는 본 발명의 동형 또는 이형 TCTP 이량체를 처리하는 단계; 및

2) 상기 결실형 HRF 또는 TCTP 이량체에 특이적인 항체가 없거나 있는 상태에서 상기 언급된 분석방법을 이용하여 단백질-단백질 상호작용이 일어나는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

이하, 본 발명을 실험예, 실시예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

단, 하기 실험예, 실시예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실험예, 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 및 실험예에서 사용한 여러 종류의 TCTP 구조를 구분하기 위해, 다음과 같이 표기하였다.

구체적으로, f-TCTP는 전장서열의 TCTP이고, △-TCTP는 FL 부위가 결실된 TCTP이며, f-dTCTP는 전장서열의 이량체형 TCTP이고, △-dTCTP는 FL 부위가 결실된 이량체형 TCTP이며, Del-N11dTCTP는 아미노기 말단이 결실된 이량체형 TCTP이다.

<실시예 1> f-TCTP 및 △-TCTP 제작

<1-1> 단량체형 f-TCTP 및 △-TCTP 단백질의 클로닝

FL 도메인이 존재하거나 결실된 HRF의 활성을 측정하고 X-ray 결정구조를 규명하기 위한 단백질을 발현 및 추출하기 위해 하기 [표 2]에 기재된 서열을 사용하여 컨스트럭트(construct)를 디자인하였다.

【표 2】

구 분	Sequence
f-TCTP(Full TCTP)	
DNA (서열번호 16)	ATG ATT ATC TAC CGG GAC CTC ATC AGC CAC GAT GAG ATG TTC TCC GAC ATC TAC AAG ATC CGG GAG ATC GCG GAC GGG TTG TGC CTG GAG GTG GAG GGG AAG ATG GTC AGT AGG ACA GAA GGT AAC ATT GAT GAC TCG CTC ATT GGT GGA AAT GCC TCC GCT GAA GGC CCC GAG GGC GAA GGT ACC GAA AGC ACA GTA ATC ACT GGT GTC GAT ATT GTC ATG AAC CAT CAC CTG CAG GAA ACA AGT TTC ACA AAA GAA GCC TAC AAG AAG TAC ATC AAA GAT TAC ATG AAA TCA ATC AAA GGG AAA CTT GAA GAA CAG AGA CCA GAA AGA GTA AAA CCT TTT ATG ACA GGG GCT GCA GAA CAA ATC AAG CAC ATC CTT GCT AAT TTC AAA AAC TAC CAG TTC TTT ATT GGT GAA AAC ATG AAT CCA GAT GGC ATG GTT GCT CTA TTG GAC TAC CGT GAG GAT GGT GTG ACC CCA TAT ATG ATT TTC TTT AAG GAT GGT TTA GAA ATG GAA AAA TGT TAA
단백질 (서열번호 17)	MIIYRDLISHDEMFSDIYKIREIADGLCLEVEGKMVSRTEGNIDDSLIGGNASAEGPEGEGTESTVITGVDI VMNHHLQETSFTKEAYKKYIKDYMKSIKGKLEEQRPERVKPFMTGAAEQIKHILANFKNYQFFIGENMNPDG MVALLDYREDGVTPYMIFFKDGLEMEKC
TCTP(FL domain deletion mutant)	
DNA (서열번호 18)	ATG ATT ATT TAT CGC GAT CTG ATT AGC CAT GAT GAA ATG TTT TCG GAT ATT TAT AAA ATT CGC GAA ATT GCG GAT GGC CTG TGC CTG GAA GTG GAA GGC AAA ATG GTG AGC GGC GGC ATT ACC GGC GTG GAT ATT GTG ATG AAC CAT CAT CTG CAG GAA ACC AGC TTT ACC AAA GAA GCG TAT AAA AAA TAT ATT AAA GAT TAT ATG AAA TCG ATT AAA GGC AAA CTG GAA GAA CAG CGC CCG GAA CGC GTG AAA CCG TTT ATG ACC GGC GCG GCG GAA CAG ATT AAA CAT ATT CTG GCG AAC TTT AAA AAC TAT CAG TTT TTT ATT GGC GAA AAC ATG AAC CCG GAT GGC ATG GTG GCG CTG CTG GAT TAT CGC GAA GAT GGC GTG ACC CCG TAT ATG ATT TTT TTT AAA GAT GGC CTG GAA ATG GAA AAA TGC CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC
단백질 (서열번호 19)	MIIYRDLISHDEMFSDIYKIREIADGLCLEVEGKMVSGGITGVDIVMNHHLQETSFTKEAYKKYIKDYMKSI KGKLEEQRPERVKPFMTGAAEQIKHILANFKNYQFFIGENMNPDGMVALLDYREDGVTPYMIFFKDGLEMEK CLEHHHHHH
FL(FL domain)	
DNA (서열번호 10)	AGG ACA GAA GGT AAC ATT GAT GAC TCG CTC ATT GGT GGA AAT GCC TCC GCT GAA GGC CCC GAG GGC GAA GGT ACC GAA AGC ACA GTA
단백질 (서열번호 4)	RTEGNIDDSLIGGNASAEGPEGEGTESTV

상기 단백질을 제작하기 위해 f-TCTP 및 △-TCTP의 클로닝은 pET22b(+) 벡터(Novagen)를 이용하여 진행하였다. f-TCTP는 하기 [표 3] 프라이머(primer)를 이용하여 클로닝 하였다. 그런 다음, △-TCTP의 클로닝에서는 △-TCTP 유전자를 *E.coli*에서 발현시키기 위해 코돈

최적화(codon optimization) 하였다. 코돈 최적화된 △-TCTP 전체 서열에 대한 유전자를 합성 의뢰(Bioneer)하여 준비하고, *Nde* I, *Xho* I 제한효소 부위를 이용하여 pET22b(+) 벡터에 삽입하였다.

【표 3】

구분	프라이머 서열
Forward (서열번호 20)	5'-ggaattccatatgattatctaccgggac-3'
Reverse (서열번호 21)	5'-ccgctcgagacatttttccatttctaa-3'

<1-2> 단량체형 f-TCTP 단백질의 발현 및 정제

상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 클로닝 된 f-TCTP 벡터를 *E. coli* BL21(DE3-GEN-X)에 150 ㎍/ml 엠피실린(ampicillin)(Generay Biotech)을 넣은 LB(Luria-Bertani) 아가 플레이트(agar plates)에 형질전환하였다. 콜로니로 프로즌 세포 스탁(frozen cell stock)을 만들고 5 ml LB 배지에 하룻밤 키운 후 1000 ml 프레쉬(fresh) LB 배지에 희석하여 310 K 쉐이킹 배양기(shaking indubator)(N-Biotek)에서 $O.D._{600}$ 값이 0.6 내지 0.8에 도달하도록 배양하였다. $O.D._{600}$ 값이 0.6 내지 0.8에 도달한 후 IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)(Gold Biotechnology)를 최종 농도 1 mM이 되도록 넣어준 후 310 K 쉐이킹 배양기에서 2.5 시간 더 배양하였다. 세포의 회수(harvest)는 277 K의 고속 냉동 원심분리기(high-speed refrigerated centrifuge)(Hanil, Supra 22K)에서 7,650 g(6,500 rev/min)으로 10분간 원심분리하였다. 회수한 세포를 50 mM Tris-Cl(Georgiachem) pH 8.0, 100 mM NaCl(USB), 10 mM 이미다졸(imidazole)(USB), 1 mM PMSF(Sigma), 10 mg/ml DNase I 및 Roche 프로테아제-저해제 칵테일(protease-inhibitor cocktail)(Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana, USA)을 포함하는 버퍼 25 ml에 녹인 후 초음파분쇄기(Digital Sonifier 50)(Branson Ultrasonics Co., Danbury, Connecticut, USA)를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄한 세포는 277 K의 고속 냉동 원심분리기에서 24,900 g(15,000 rev/min)으로 30분간 원심분리한 후, 상등액을 AKTA Explorer system(GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, USA)에서 HisTrap

컬럼(column)을 이용하여 친화성-정제(affinity-purified)를 하였다. 하기 [표 4] 및 도 7에 나타낸 바와 같이, f-TCTP는 50 mM Tris-Cl pH 8.0 및 100 mM NaCl을 포함하는 버퍼로 이미다졸을 10에서 500 mM까지 구배(gradient)를 주어 용출(elution)하여 SDS-PAGE에 나타내었다(도 7).

【표 4】

His trap(f-TCTP)	
His trap 바인딩 완충용액	50 mM pH 8.0 Tris + 100 mM NaCl + 10 mM 이미다졸
His trap 세척 완충용액	50 mM pH 8.0 Tris + 300 mM NaCl + 10 mM 이미다졸
His trap 용출 완충용액	50 mM pH 8.0 Tris + 100 mM NaCl + 500 mM 이미다졸

상기 HisTrap 컬럼으로 분리된 f-TCTP를 두 번째로 5 ml Hi-Trap Q 컬럼을 이용하여 이온-교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography)를 하였다. 하기[표 5] 및 도 8에 나타낸 바와 같이, f-TCTP는 20 mM Tris(pH 7.5)를 포함하는 버퍼로 NaCl을 0에서 500 mM까지 구배를 주어 용출하여 SDS-PAGE에 나타내었다(도 8).

【표 5】

Hi-Trap Q(f-TCTP)	
Q 바인딩 완충용액	20 mM pH 7.5 Tris
Q 용출 완충용액	20 mM pH 7.5 Tris + 1 M NaCl

<1-3> 단량체형 △-TCTP 단백질의 발현 및 정제

상기 실시예<1-1>에서 클로닝 한 △-TCTP 벡터를 *E. coli* BL21(DE3-GEN-X)에 150 ㎍/ml 엠피실린을 넣은 LB아가 플레이트에 형질전환하였다. 콜로니로 프로즌 세포 스탁을 만들고 5 ml LB 배지에 하룻밤 키운 후 1000 ml 프레쉬 LB 배지에 희석하여 310 K 쉐이킹 배양기에서 $O.D._{600}$ 값이 0.6 내지 0.8에 도달하도록 배양하였다. $O.D._{600}$ 값이 0.6 내지 0.8에 도달한 후 IPTG를 최종 농도 1 mM이 되도록 넣어준 후 310 K 쉐이킹 배양기에서 2.5 시간 더 배양하였다. 세포의 회수는 277 K의 고속 냉동 원심분리기에서 7,650 g(6,500 rev/min)로 10분간 원심분리하였다. 그런 다음, 회수한 세포를 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, 1 mM PMSF, 10 mg/ml DNase

I 및 Roche 프로테아제-저해제 칵테일을 포함하는 버퍼 25 ml에 녹인 후 초음파분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄한 상기 세포는 277 K의 고속 냉동 원심분리기에서 24,900 g(15,000 rev/min)으로 30분 동안 원심분리한 후 상등액을 AKTA Explorer system에서 HisTrap 컬럼을 이용하여 친화성-정제를 하였다. 하기 [표 6] 및 도 9에 나타낸 바와 같이, △-TCTP는 50 mM Tris-Cl pH 8.0 및 100 mM NaCl을 포함하는 버퍼로 이미다졸을 10에서 500 mM까지 구배를 주어 용출하여 SDS-PAGE에 나타내었다(도 9).

【표 6】

His trap(△-TCTP)	
His trap 바인딩 완충용액	50 mM pH 8.0 Tris + 100 mM NaCl + 10 mM 이미다졸
His trap 세척 완충용액	50 mM pH 8.0 Tris + 300 mM NaCl + 10 mM 이미다졸
His trap 용출 완충용액	50 mM pH 8.0 Tris + 100 mM NaCl + 500 mM 이미다졸

상기 HisTrap 컬럼으로 분리된 △-TCTP를 두 번째로 5 ml Hi-Trap Q 컬럼을 이용하여 이온-교환 크로마토그래피를 하였다. 하기 [표 7] 및 도 10에 나타낸 바와 같이, △-TCTP는 20 mM Tris(pH 7.5)를 포함하는 버퍼로 NaCl을 0에서 500 mM까지 구배를 주어 용출하여 SDS-PAGE에 나타내었다(도 10).

【표 7】

Hi-Trap Q(△-TCTP)	
Q 바인딩 완충용액	20 mM pH 7.5 Tris
Q 용출 완충용액	20 mM pH 7.5 Tris + 1 M NaCl

<1-4> 이량체형 f-dTCTP, △-dTCTP 단백질의 형성

상기 실시예 <1-2> 및 실시예 <1-3>에서 크로마토그래피로 분리한 f-TCTP 및 △-TCTP를 농축한 후 1 mM 터셔리부틸 하이드로 퍼옥사이드(tertiary butyl hydroperoxide) 를 처리하여 이량체화하여 f-dTCTP, △-dTCTP를 생성하였다.

<실시예 2> f-dTCTP 및 △-dTCTP 단백질의 결정화 및 데이터수집

f-dTCTP 및 △-dTCTP 단백질의 결정을 얻기 위한 최적 조건을 탐색하여 결정화하고, 싱크로트론에서의 자료 수집을 위해 안정화된 크라이오-조건을 검색하였다. 결정화된 f-dTCTP 및 △-dTCTP 단백질을 안정화된 크라이오-조건에서 X-선 자료를 수집하였다.

<2-1> f-dTCTP 및 △-dTCTP 단백질의 결정화 방법

f-dTCTP 및 △-dTCTP의 결정화를 위한 최적의 농도는 침전제 실험을 통하여 50 mg/ml로 결정되었다. 초기 결정화는 sparse matrix 이론(Jancarik & Kim, *J Appl Cryst*, 24, 409-411, 1991)에 의거한 Hampton research(Laguna Niguel, CA, USA)의 스크리닝 키트(screening kit)인 Screen I & II, Index screen 시약을 이용하였으며 달린 방울 증기확산법(Hanging drop vapour diffusion method) 또는 앉은 방울 증기 확산법(sitting-drop vapour diffusion method)을 이용하여 수동 혹은 자동화 방법으로 수행되었다. 자동화 방법은 본 실험실에서 구축한 고속-대량 결정화 시스템(high-throughput crystallization system)에서 사용하는 Hydra e-Drop(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 수행하였다. f-dTCTP 단백질 결정을 얻을 수 있는 최적의 조건은 25% PEG3350, 0.1M Bis-Tris pH 5.5의 결정화 용액(mother liquor) 200 ㎕가 들어 있는 웰(well)에 이 결정화 용액과 50 mg/ml 단백질을 1:1로 섞어서 만든 달린 방울 2 ㎕를 커버글라스(cover glass)에 올려놓고 달린 방울 증기확산법으로 결정을 만들었다. △-dTCTP 단백질 결정을 얻을 수 있는 최적의 조건은 30% PEG 300, 0.1M MES pH 6.5의 결정화 용액 200 ㎕가 들어 있는 웰에 이 결정화 용액과 50 mg/ml 단백질을 1:1로 섞어서 만든 달린 방울 2 ㎕를 커버글라스에 올려놓고 달린 방울 증기확산법으로 결정을 만들었다.

<2-2> f-dTCTP 및 △-dTCTP의 크라이오-조건 탐색

안정화된 크라이오-조건을 찾는 과정은 싱크로트론에서의 자료수집 과정에서 필수적인데 싱크로트론의 방사선(radiation)의 세기가 강해,

결정내의 단백질이 쉽게 산화되고 그 결과 단백질 골격이 분해되어 완전한 자료수집이 불가능하기 때문이다. 따라서 결정이 급속 냉동(flash frozen)되는 조건을 주는 크라이오-조건을 찾아내었다. f-dTCTP는 LV 크라이오 오일(MiTeGen, Ithaca, NY)을 사용하였다. f-dTCTP 결정이 있는 방울에 웰 용액:LV 크라이오 오일을 1:1 부피로 섞어 첨가한 후 결정을 마운팅 루프(mounting loop)로 건져서 급속 냉동하였다. 또한, △-dTCTP는 100% PEG300을 사용하였다. △-dTCTP 결정이 있는 방울에 웰 용액:100% PEG300을 1:1 부피로 섞어 첨가한 후 결정을 마운팅 루프로 건져서 급속 냉동하였다.

<2-3> f-dTCTP 및 △-dTCTP의 X-선 자료 수집

f-dTCTP X-선 자료는 Pohang Accelerator Laboratory(PAL)의 Pohang Light Source(PLS)로부터 2.7 Å까지 수집하여 하기 [표 8]에 나타내었다. 디텍터(Detector)는 ADSC Q315r였다. 또한, △-dTCTP X-선 자료는 Swiss Light Source로부터 1.79 Å까지 수집하였다. 디텍터는 필라투스(philatus)였다.

【표 8】

	f-dTCTP	Δ-dTCTP
X-ray source	Pohang Light Source (PLS)	Swiss Light Source (SLS)
X-ray wavelength (Å)	0.97941	1.000
Temperature (K)	100	100
Space group	$P4_3$	$P6_122$
Unit cell parameter		
a = b (Å)	56.3	69.3
c (Å)	195.6	146.5
γ (°)		120
V_m(Å^3/Dalton)	2.00	3.01
Resolution range (Å)	50.00-2.70 (2.75-2.70)	46.44-1.79 (1.89-1.79)
Unique reflections	15213 (767)	19809 (2719)
R_{sym} (%)	11.5 (84.8)	4.2 (67.0)
Data completeness (%)	90.8 (93.1)	97.9 (86.3)
Average I/σ	8.4 (1.24)	12.0 (1.2)

* The values in parentheses are for the highest resolution shell.

<실시예 3> f-dTCTP 및 △-dTCTP 단백질의 결정구조 분석

<3-1> 분자치환법을 이용한 f-dTCTP 및 △-dTCTP의 결정구조 규명 과정

f-dTCTP 및 △-dTCTP의 결정구조는 분자치환법(molecular replacement)을 이용함으로써 위상문제를 해결하여 규명하였다. 단백질 사이의 구조적인 유사성이 예상되기 때문에 기존에 알려진 구조를 이용하여 분자 치환에 의한 위상 문제의 해결 방법이 이용되었다. 신속한 회전 기능(fast rotation function)을 써서 분자의 배향(orientation)을 찾고, 이동 기능(translation function), R-요소 조사(R-factor search) 및 상관 조사(correlation search) 등의 계산을 통하여 분자의 위치를 찾았다. 이렇게 얻어낸 근사적인 배향과 위치를 리지드 바디 정제(rigid body refinement) 또는 R-요소 최소화(R-factor minimization) 방법으로 더 정밀하게 한 다음, 원자위치의 정밀화 계산(refinement)과 모형수정(model rebuilding)을 하였다. 분자 치환 방법을 사용할 수 있는 프로그램으로는 CNS(Brunger *et al.*, *Acta Cryst*, D54, 905-921, 1998), AMoRe(Navaza, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 49, 588-591, 1993), EPMR(Kissinger *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 57, 1474-1479, 2001) 및 PHASER 등이 사용되고 있다. f-dTCTP 및 △-dTCTP의 결정구조 규명에는 인간 TCTP 구조(PDB ID:2HR9)를 조사 모델로 이용하여 EPMR을 사용하여 해결책을 찾아내었다. △-dTCTP의 위상은 인간 TCTP를 모델을 이용한 분자치환법으로 얻었다. 초기 모델은 그래픽 소프트웨어 COOT(Emsley & Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 2126-2132, 2004)를 이용하여 만들었으며 에너지 최소화(energy minimization)는 CNS를 이용하여 진행하였다. 최종적인 모델은 PHENIX(Adams *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66, 213-221, 2010)를 통하여 얻어졌다. 최종 모델의 정밀화 값은 하기 [표 9]에 표기하였다.

【표 9】

Crystal parameters and refinement statistics	f-dTCTP	Δ-dTCTP
Space group	$P4_3$	$P6_122$
Cell dimensions	56.3 Å x 56.3 Å x 195.6 Å	69.3 Å x 69.3 Å x 146.5 Å
Volume fraction of solvent	38.69 %	57.58 %
V_m (Å^3/Dalton)	2.00	3.01
Total number of residues	596	149
Total non-H atoms	4902	1217
Number of water molecules	43	71
Average temperature factors		
Protein	53.75 Å^2	33.39 Å^2
Solvent	42.80 Å^2	39.97 Å^2
Resolution range of reflections used	50.0-2.7 Å	46.44-1.79 Å
Amplitude cutoff	0.0 σ	0.0 σ
R-factor	22.7 %	22.6 %
Free R-factor	31.5 %	26.2 %
Stereochemical ideality:		
Bond	0.009 Å	0.008 Å
Angle	1.167°	1.166°
Chirality	0.078°	0.090°
Planarity	0.004°	0.004°
Dihedral	18.56°	16.31°
Ramachandran plot		
Residues in most favored regions	87.7 %	90.9 %
Residues in additional allowed regions	11.7 %	8.3 %
Residues in generously allowed regions	0.6 %	0.8 %
Residues in disallowed regions	0.0 %	0.0 %

<3-2> 단량체 f-TCTP 및 △-TCTP 단백질의 삼차원 결정구조 규명

f-dTCTP 및 △-dTCTP에 대한 각각의 단량체, 즉 f-TCTP 및 △-TCTP의 구조를 규명한 결과, 사용된 조사 모델과 거의 유사한 구조로 나타났다(도 11).

<3-3> 이량체 f-dTCTP 및 △-dTCTP 단백질의 삼차원 결정구조 분석

터셔리부틸 하이드로 퍼옥사이드(tertiary butyl hydroperoxide) 처리 하에서 만들어진 △-dTCTP는 예측대로 C-말단 시스테인(C-terminal cysteine)끼리 이황화결합(disulfide bridge)를 만들어 이량체 형태를 이루었다. 특이한 점은 N-terminal 부분의 잔기(residue)가 결실(deletion)되지 않았는데도 이량체 구조를 이루고 있었다는 점이다. FL의 부재로 이량체 계면(interface)에서 충돌하는 문제가 사라지면서 패킹(packing)이 잘 되어 △-dTCTP의 결정은 f-dTCTP 결정보다 훨씬 크고 회절

분해능이 좋았다. 그러나 FL의 유연성(flexibility) 때문에 f-dTCTP에서 FL의 전자밀도를 찾을 수가 없었다. 규명된 f-dTCTP와 △-dTCTP의 삼차원 구조에서 각각의 단량체는 조사 모델로 사용했던 네이티브 TCTP와 거의 일치하고 있다. 이량체인 f-dTCTP 및 △-dTCTP의 삼차원 구조는 대칭적으로 생긴 나비모양을 하고 있었으며, 이량체의 구조는 예상대로 Cys172를 매개로 하여 이루어져 있었다(도 12).

흥미롭게도 f-dTCTP 및 △-dTCTP의 삼차원 구조 역시 거의 일치하였다. 이는 f-dTCTP 구조에 있던 FL 부위가 매우 유연하여 전자 밀도(electron density)에서 나타나지 않았고 그 위치가 표면에 노출된 구조라서 본체구조에 충돌하지 않고 아무런 영향을 주지 않았기 때문이다. f-dTCTP 및 △-dTCTP의 삼차원 구조를 f-TCTP 및 △-TCTP의 구조와 비교할 때, 분자의 표면구조가 달라져 단량체와 이량체들의 생리적 작용에 관여하는 파트너 단백질들이 각각 달리 작용하게 되었다.

본 발명팀의 선행 연구 결과, 항체(Antibody)의 Fc 부위를 이용하여 야생형 TCTP를 이량체화 시킨 형태는 싸이토카인 분비 활성을 가졌으며, 이처럼 N-말단의 결실이 없이도 TCTP가 이량체를 형성하면 HRF로 활성화됨을 증명하였다(Kim *et al.*, PLoS one, 4, e6464, 2009). 따라서 TCTP가 이량체를 형성하는 것이 HRF의 활성에 중요함을 뒷받침 하였다.

<실시예 4> 모델링(modeling)을 이용하여 구성한 FL을 포함한 야생형 f-dTCTP 구조 생성

f-dTCTP 중 FL은 루프의 유연성 때문에 전자밀도를 얻을 수 없어서, FL이 존재하는 f-dTCTP의 구조는 모델링을 통하여 생성하였다. FL 부분을 에너지 최소화하여 모델링한 결과, FL을 붙인 f-dTCTP의 구조에서 FL은 HRF의 본체와 떨어져 있어서 전체적인 FL의 유무에 따라 HRF의 구조에는 크게 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

<4-1> FL을 포함하는 야생형 f-dTCTP 구조 모델링 과정

f-dTCTP에서 FL은 유연성 때문에 구조를 관측할 수 없었기 때문에 FL 존재 하의 f-dTCTP의 구조를 모델링을 통하여 생성하였다. FL의 구조는 조사 모델로 사용한 NMR의 구조를 이용하였다. TINKER 6.0 패키지를 사용하여 FL 부분을 에너지 최소화했다. 모든 프로그램의 force field로는 charmm22를 사용하였다.

먼저 정련(refine)하려는 구조를 TINKER 패키지 중 PDBXYZ 프로그램을 사용하여 pdb 파일에서 xyz 파일로 변환하였다. xyz 파일은 TINKER 패키지의 모든 프로그램의 기본 파일 형식으로 Cartesian coordinates system을 사용하고, 구조의 각 원자에 대해 원자의 이름과 X-Y-Z-coordinates, force field atom type number of atom, 그리고 원자의 연결에 대한 정보를 가지고 있다. pdb 파일에서 xyz 파일로 변환한 후, 단백질 구조의 최소화를 위해 TINKER 패키지 중 최소화하는 프로그램을 사용했다.

최소화하는 프로그램은 단백질 구조를 Cartesian coordinates에서 Jorge Nocedal 알고리즘을 변형한 버전을 사용해서 limited memory L-BFGS minimization 해주었다. FL 부분만 최소화하기 위해서 열쇠 파일(key file)에 활성 명령 뒤에 FL 부분의 원자 번호를 써주었다. 루프 부분인 Chain 1의 37 Ser 내지 69 Gly, Chain 2의 213 Ser 내지 245 Gly까지의 부분에 대응하는 xyz파일의 원자번호 594~1019, 3382~3807을 각각 활성 명령어 후 써 주었다(active 594, active 595, active 596... 등 이런 방법으로 모두 써준다). Minimize.x로 최소화를 실행하고 Root mean square(RMS) gradient 값은 0.1로 실행하였다. RMS gradient는 최소화에서 에너지의 미분 계수로 보통 에너지를 어느 정도의 최소값까지 최소화 시켜줄 것인지의 기준으로 사용된다. RMS가 0일 때, 최소화는 완전히 에너지가 최소가 될 때까지 일어나는데, 실제로 RMS 값이 0이 될 수 없고, 그래서 최소한의 값을 기준으로 정해주는 것이다. 최소화가 끝난 후에는 XYZPDB 프로그램을 이용해서 xyz 파일을 다시 pdb 파일로 변환시켜 단백질 구조를 얻었다. 에너지 최소화 전 후 단백질 구조의 안정성을 알아보기 위해서 ANALYZE 프로그램을 통해 Total Potential Energy and its Components와 List of the Large Individual Interactions을 구하였다.

<4-2> 모델링을 통한 FL이 포함된 f-dTCTP 구조 규명

먼저 FL을 최소화하기 전에 전체 잠재된 에너지(total potential energy)와 분석 결과는 하기와 [표 10]과 같다.

【표 10】

Total Potential Energy : 1010627540.1709 Kcal/mole		
	Kcal/mole	Interactions
Bond Stretching	278.2128	856
Angle Bending	346.2104	1542
Urey-Bradley	25.2941	614
Improper Dihedral	158.5687	188
Torsional Angle	415.7188	2250
Van der Waals	1010625491.6590	4384976
Charge-Charge	1171.8493	4339845
Implicit Solvation	-347.3423	5576

FL 구조의 에너지 최소화 후 총 잠재된 에너지와 분석 결과는 하기 [표 11]과 같으며, 에너지 최소화 후 이전보다 에너지가 많이 줄어들어 안정화되었다.

【표 11】

Total Potential Energy : 6347.5705 Kcal/mole		
	Kcal/mole	Interactions
Bond Stretching	4397.9137	5629
Angle Bending	1386.2914	10182
Urey-Bradley	143.5526	4894
Improper Dihedral	132.2450	994
Torsional Angle	1819.1975	14847
Van der Waals	3676.4098	15527289
Charge-Charge	-5208.0396	15294410

f-dTCTP에서 FL의 유연성 때문에 구조를 규명할 수 없었기 때문에 FL을 붙인 f-dTCTP의 구조를 전술한 바와 같이 TINKER를 이용하여 모델링을 통하여 생성하였다.

그 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이, FL은 HRF의 본체와 떨어져 있어서 전체적인 구조에는 영향을 주지 않음을 알 수 있었다(도 13).

<실시예 5> HRF에 결합하는 dTBP2(dTCTP binding peptide 2)에 의한 f-dTCTP의 활성 조절 기작 규명

<5-1> HRF에 결합하는 헵타머(7mer) 펩타이드 제작 및 분리

HRF를 플라스틱 웰에 고정(immobilization)시킨 후 헵타머 랜덤 리피트 펩타이드 라이브러리(7-mer random peptide library, New England Biolabs, USA)의 친화성 선별을 통해 HRF에 결합할 수 있는 펩타이드를 분리하였다.

구체적으로, 코팅 완충액(0.1 M NaHCO 3 , pH8.6)에 20 ㎍/㎖ 농도로 용해시킨 HRF를 50 ㎕씩 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트에 가하고, 4 ℃에서 밤새 코팅한 후 BSA로 비특이적 결합을 차단하였다. 0.1 % Tween/TBS(TBST)로 6 회 세척한 후 파아지-디스플레이 펩타이드 라이브러리(phage-displayed peptide library) 원액 10 ㎕를 3 % BSA/TBS 40 ㎕에 희석한 용액을 가하고 실온에서 1 시간 동안 정치하였다. TBST를 사용하여 5

분간 방치한 후 세척하되, 1 회 패닝(panning)시에는 한 번, 2 회와 3 회 패닝시에는 다섯 번, 4 회 패닝시에는 열 번 실시하였다. 글리신/HCl 완충액(pH 2.2) 50 ㎕를 가하고 5 분간 방치한 후 파아지를 용출하고 1 M Tris-HCl(pH 9.1) 8 ㎕로 중화하였다. 용출한 파아지 용액을 20 ㎖의 ER2537 배양액(OD 600 =0.5~1)에 첨가하고 37 ℃ 쉐이킹 인큐베이터(shaking incubator; rpm=200)에서 2 시간 배양한 후 100 ㎖ SB 배지를 가하고 250 rpm에서 밤새 배양하였다. 배양액을 10,000 rpm(4 ℃)에서 15 분간 원심분리하여 얻은 상청액 100 ㎖에 30 ㎖의 5×PEG/NaCl(20% PEG(w/v), 15% NaCl(w/v))를 가하여 5 분 동안 용해시키고 얼음에 30 분간 정치하였다. 10,000 rpm(4 ℃)에서 20 분간 원심분리한 후 상청액을 모두 제거하고 펠렛을 1 ㎖의 3% BSA/TBS에 부유시켰다. 그 후, 14,000 rpm에서 5 분간 원심분리한 상청액을 다음 패닝에 사용하였다. 친화성 정제와 파아지 복제를 4 회 반복한 후 얻은 용출 파아지의 적정 플레이트로부터 각각의 파아지 클론을 얻고 ELISA 분석을 통해 특이적인 친화도를 나타내는 파아지 클론만을 서열분석하여 펩타이드 서열을 확인하였다. 또한, HRF에 대해 우세한 결합을 나타내는 파아지 디스플레이 펩타이드를 선별하여 하기와 같이 나타남을 확인하였다:

파아지 ph1에 의한 펩타이드(p1)의 아미노산 서열 LVTYPLP (서열번호 23);

파아지 ph2에 의한 펩타이드(p2)의 아미노산 서열 WYVYPSM (서열번호 24);

파아지 ph3에 의한 펩타이드(p3)의 아미노산 서열 SYLPYPY; 및

파아지 ph4에 의한 펩타이드(p4)의 아미노산 서열 WEFPGWM (서열번호 25).

또한, 상기와 같이 얻은 파아지의 결합 친화도를 ELISA로 비교하였다.

즉, SB 배지에서 배양한 ER2537 배양액(OD_{600}=0.5~1) 1 ㎖씩에 각각의 파아지 플라크를 옮기고 37 ℃ 인큐베이터(rpm=250)에서 5 시간 배양하였다. 각각의 배양액 100 ㎕씩을 900 ㎕의 SB 배지에 가하고 밤새 배양한 후, 14,000

rpm에서 5 분씩 2 회 원심분리한 상청액을 ELISA 분석에 사용하였다.

HRF 또는 BSA(대조)를 코팅한 플라스틱 웰에, 분리해낸 각각의 파아지 용액을 동량의 6% BSA/PBS에 희석한 용액 50 ㎕씩을 가하고 2 시간동안 정치하였다. PBST로 5 회 세척한 후 3 % BSA/PBS에 1:5000으로 희석한 HRP-컨쥬게이트된 항-M13 항체(Pharmacia) 100 ㎕씩을 가하고 1 시간동안 정치하였다. PBST로 6 회, PBS로 1 회 세척한 후 퍼옥시다아제(peroxydase) 기질 용액 100 ㎕씩을 가하여 발색 정도를 ELISA 리더를 사용하여 405 nm에서 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 파아지 ph1, ph2 및 ph4, 특히 ph2 및 ph4가 HRF에 특이적으로 결합함을 알 수 있었다.

또한, HRF를 20㎍/㎖ 농도에서부터 1/5로 연속적으로 희석한 후(각각 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 ㎍/㎖) 50㎕ 씩 플라스틱 웰에 고정화하였다. 여기에 역시 1/5 씩 연속적으로 희석한(원액의 1/2, 1/10, 1/50, 1/250, 1/1250) 파아지 ph2 용액을 가하여 ELISA 분석를 실시하고 405 nm에서 발색정도를 측정하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 파아지 ph2 클론이 HRF를 0.4, 0.08, 0.016 및 0.032 ㎍/㎖까지 희석한 경우에도 HRF와의 특이적 결합력을 유지하고 있음을 확인하였다.

아울러, 본 발명에 따른 헵타머 펩타이드의 HRF 결합 친화도에 관여하는 잔기를 확인하기 위하여, p2의 아미노산 서열을 하나씩 알라닌(A)으로 치환하고, m5의 경우에만 라이신(K)으로 치환하여 하기와 같이 서열을 확립하였다:

헵타머 펩타이드 m1의 아미노산 서열 AYVYPSM(서열번호 26);

헵타머 펩타이드 m2의 아미노산 서열 WAVYPSM(서열번호 27);

헵타머 펩타이드 m3의 아미노산 서열 WYAYPSM(서열번호 28);

헵타머 펩타이드 m4의 아미노산 서열 WYVAPSM(서열번호 29);

헵타머 펩타이드 m5의 아미노산 서열 WYVYKSM(서열번호 30);

헵타머 펩타이드 m6의 아미노산 서열 WYVYPAM(서열번호 31); 및

헵타머 펩타이드 m7의 아미노산 서열 WYVYPSA(서열번호 32).

상기 펩타이드의 HRF 결합능을 ELISA로 측정한 결과, HRF 결합능이 p2, m6>m7>m3>m2>m5>m1>m4임을 알 수 있었다.

<5-2> dTBP2에 의한 f-dTCTP의 활성 조절 기작 규명

모델링으로 도출된 구조에 따라 규명한 f-dTCTP의 수용체 결합 모델에서 7-mer 펩타이드인 dTBP2(상기 <5-1>의 p2)에 의한 f-dTCTP의 활성 조절은 FL의 영향을 받는 것으로 나타났다. 단량체인 f-TCTP는 FL이 자유롭게 움직여서 dTBP2의 결합을 방해하나 f-TCTP가 이량체를 형성한 f-dTCTP의 경우 FL이 방향성을 갖게 되고 H2 helix(도 14에서 붉은 헬릭스 부위)와 함께 dTBP2의 결합을 도와주는 것으로 나타났다. f-dTCTP 구조 중에서 FL 및 H2 도메인은 수용체와 직접적으로 결합할 것으로 예상된다. 이는 모델링 구조에서 보듯이 dTBP2가 f-dTCTP에 결합할 때에 FL과 H2 도메인의 도움을 받기 때문에, 반대로 f-dTCTP가 FL 및 H2 도메인을 통해 수용체에 결합하는 것을 방해하며 결과적으로 신호전달 억제 활성을 나타내는 것으로 예측할 수 있다. 따라서, 본 발명에는 HRF와 수용체간의 결합의 억제제에는 dTBP2와 같이 HRF의 H2 도메인 또는 다른 일정 부위에 결합하여 HRF의 수용체에 대한 결합을 간접적으로 억제하는 것도 포함된다.

<실시예 6> FL 및 H2 부위를 인식하여 결합하는 항체의 제작

본 발명자들은 본 발명의 HRF 구조 중에 존재하는 HRF 수용체 결합 도메인인 FL 도메인, H2 도메인 부위에 각각 결합하여 HRF의 활성을 저해하기 위한 항체를 제작하였다. FL 및 H2 부위를 각각 인식하여 특이적으로 결합하는 항체는 앱클론(AbClon)에 제작 의뢰하여 통상의 제조방법에 따라 얻었다. 토끼(New Zealand White)에 수용체 결합 도메인 펩타이드를 항원으로 사용하여 면역 유도하여 특이적인 다클론항체를 생산하였다. 생산된 항체가 항원특이적으로 결합하는지 확인하고, 항원 특이적인 항체분리정제(affinity chromatography)를 통해 수용체 결합 도메인 FL 및 H2에 결합하는 IgG를 순수 분리 정제하여 SDS-PAGE를 통해 확인하였다(도 15).

<실시예 7> 오발부민(Ovalbumin)으로 유도한 천식 및 비염 동물 모델의 제작

본 발명자들은 본 발명의 HRF 수용체 결합 도메인인 FL 도메인, H2 도메인 및 이에 대한 항체가 천식 및 비염 질환에 미치는 영향을 평가하기 위해 오발부민으로 천식 및 비염 동물 모델을 유도하였다.

구체적으로, 5주령의 특정병원체 미감염 백서 암컷 BALB/c을 (무게: 약 20g) (주)오리엔트(Seoul, Korea)에서 구입한 후 1주간 동물사육실에서 안정화하였다. 이후 1주 간격으로 1.3 mg 수산화알루미늄(Sigma A8222)과 오발부민 100 ㎍(Sigma A5503)을 현탁한 PBS 200 ㎕를 2회 복강에 주입하여 감작시켰다. 그 후 14일, 16일, 18일째에서는 오발부민 200 ㎍을 녹인 PBS 20 ㎕를 마이크로피펫을 이용하여 비강 점적하여 면역반응을 유발하였다. 양성 대조군으로 PBS를, 실험군으로는 FL 도메인, H2 도메인 및 이에 대한 항혈청 또는 항체를 항원투여 10분 전에 복강 투여하였다. 15일, 17일, 19일에는 항원 투여 없이 복강 투여만 실시하였다. 19일째에 물질 투여 2시간 후 동물을 희생하였다(도 16). 또한, C-말단 도메인에 대한 IgG 항체는 14일, 16일, 18일째 50 ㎍을 항원투여 30분 전 비강점적 또는 복강투여하였고, 마지막 투여 24시간 후 동물을 희생하였다(도 26).

<실시예 8> C-말단 부위를 인식하여 결합하는 항체의 제작

본 발명자들은 본 발명의 HRF 구조 중에 존재하는 C-말단 부위에 결합하여 HRF의 활성을 저해하기 위한 항체를 제작하였다.

구체적으로, C-말단 부위를 인식하여 특이적으로 결합하는 항체는 펩트론(Peptron)에 제작 의뢰하여 통상의 제조방법에 따라 얻었다. 토끼(New Zealand White)에 C-말단 도메인(Ac-FFKDGLEMEKC-NH2) 펩타이드를 항원으로 사용하여 면역 유도하여 특이적인 다클론항체를 생산하였다. 생산된 항체가 항원특이적으로 결합하는지 확인하고, 일부 항혈청을 Protein A를 이용하여 항혈청 중 IgG를 분리 정제하였다.

<실험예 1> BEAS-2B 세포에서 f-TCTP, △-dTCTP, Del-N11dTCTP에 의한 IL-8 및 GM-CSF 분비능 분석

본 발명자들은 BEAS-2B 세포에서 f-TCTP, △-dTCTP, Del-N11dTCTP에 의한 IL-8 및 GM-CSF 분비능 분석하기 위하여 f-TCTP, △-dTCTP 및 Del-N11dTCTP의 활성을 BEAS-2B 세포(ATCC)에서의 IL-8 분비능을 통해 비교하였다.

구체적으로, BEAS-2B 세포를 48-웰 플레이트에서 70% 정도 자랄 때까지 배양한 후 1 % 페니실린-스트렙토마이신/BEBM(Clonetics)에서 2회 세척하였다. 상기 <실시예 1>에서 분리한 △-dTCTP, 대한민국 특허 출원 제 2006-0007663호에 기재된 방법에 따라 제작한 f-TCTP, Del-N11dTCTP 각각의 재조합 단백질을 1 ㎍/㎖, 5 ㎍/㎖ 또는 10 ㎍/㎖씩 첨가하였다. 그런 다음, 24시간 후 상등액을 취하여 유리된 IL-8 및 GM-CSF를 효소 면역흡착검출법을 이용해 정량하였다.

그 결과, 도 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, Del-N11dTCTP가 f-TCTP 및 △-dTCTP에 비하여 IL-8 및 GM-CSF 분비능이 뛰어남을 확인하였다(도 1 및 도 2).

<실험예 2> f-TCTP, △-dTCTP 및 Del-N11dTCTP의 dTBP2에 대한 친화도 분석

본 발명자들은 f-TCTP, △-dTCTP 및 Del-N11dTCTP의 dTBP2에 대한 친화도 분석을 하기 위하여 이미 HRF와 결합함이 알려진 펩타이드 dTBP2의 COOH-말단에 비오틴(biotin)을 붙이고 정제한 다음 이를 스트렙타비딘(streptavidin)이 코팅된 플라스틱 웰에 고정(immobilization)시킨 후, f-TCTP, △-dTCTP 및 Del-N11dTCTP를 첨가해 그 결합능에 차이가 있는지를 알아보았다.

구체적으로, 완충액(TBS[25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.2], 0.1% BSA, 0.05% Tween-20)에 0.01, 0.1, 1, 10 ㎛로 용해시킨 바이오틴화된(biotinylated) dTBP2를 50 ㎕씩 Reacti-Bind Streptavidin Coated Polystyrene

Plates(PIERCE)에 가하고, 상온에서 2시간 반응시킨 후 완충액으로 3회 세척하였다 f-TCTP, △-dTCTP 및 Del-N11dTCTP를 TBS에 0.2 ㎍/㎖로 녹인 후 60 ㎕씩 가하고 한 시간 반응시킨 후 완충액으로 3회 세척하였다. 완충액에 1:2000으로 희석한 항-HRF 토끼 항체(Bio-Rad)를 100 ㎕씩 가하고 실온에서 30분 동안 정치하였다. 완충액으로 3회 세척한 후, 완충액에 1:2000으로 희석한 HRP-컨쥬게이트된 항-rabbit 항체를 100 ㎕씩을 가하고 30분 동안 정치하였다. 완충액으로 3회, TBS로 1회 세척한 후 퍼옥시다아제(peroxydase) 기질 용액인 TBS 용액(PIERCE)을 100 ㎕씩을 가하여 발색 정도를 ELISA 리더(Bio-Rad)를 사용하여 450 nm와 570 nm 파장에서 측정하고 그 차를 통해 친화도를 결정하였다.

그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, Del-N11dTCTP가 f-TCTP 및 △-dTCTP에 비하여 dTBP2에 대한 친화도가 높은 것을 확인하였다(도 3).

<실험예 3> Del-N11dTCTP에 대한 FL 도메인, Helix 2 도메인 및 Helix 3 도메인의 저해능 분석

본 발명자들은 Del-N11dTCTP에 대한 FL 도메인, Helix 2 도메인 및 Helix 3 도메인의 저해능을 분석하기 위하여 FL 도메인(Ac-SRTEGAIDDSLIGGNASAEGPEGEGTESTVVT-NH2)(서열번호 1), Helix 2 도메인(Ac-TKEAYKKYIKDYMKSLKGKLEEQKP-NH2)(서열번호 11), Helix 3 도메인(Ac-KPERVKPFMTG AAEQIKHILANFN-NH2)(서열번호 22)는 NH2-말단 아세틸화(acetylation), COOH-말단 아미드화(amidation)한 펩타이드로 합성 및 정제(Peptron) 한 것을 사용하였다.

구체적으로, 상기 <실험예 1>과 동일한 방법으로 Del-N11dTCTP(70 nM)를 BEAS-2B에 처리하였는데, 이때 합성한 FL 도메인, Helix 2 및 Helix 3를 여러 몰비(0 내지 1)로 먼저 처리하고 30분간 반응시킨 후 Del-N11dTCTP를 첨가하였다. 24시간 후 상등액을 취하여 유리된 IL-8을 효소 면역흡착검출법을 이용하여 정량하였다.

그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, Del-N11dTCTP에 대한 FL 도메인,

Helix 2 도메인 및 Helix 3 도메인의 IL-8의 분비능을 비교하였을 때, Del-N11dTCTP에 대한 FL 도메인 및 Helix 2 도메인의 IL-8 분비능이 Helix 3의 IL-8 분비능보다 저해되는 것을 확인하였다(도 4).

<실험예 4> FL 및 H2 도메인을 인식하는 다클론항체의 IL-8 저해능 분석

본 발명자들은 상기 <실시예 6>에서 제작한 FL 및 H2 도메인을 각각 인식하는 항체를 BEAS-2B 세포에 처리하여 본 항체가 Del-N11dTCTP의 IL-8 분비 효능을 억제하는지 확인하였다.

구체적으로, BEAS-2B 세포에서 anti-FL 항체와 anti-H2 항체를 농도별로 각각 처리하였을 때 Del-N11dTCTP로 유도된 IL-8의 저해능을 비교하였다. 48-well 플레이트에 배양한 BEAS-2B 세포를 1% 페니실린-스트렙토마이신/BEBM (Lonza)에서 2회 세척하고, 7시간 동안 serum starvation하였다. 각각 1, 10 ng/mL이 되도록 PBS로 희석한 항체와 70 μM Del-N11dTCTP를 37℃에서 2시간 반응시키고, 이 혼합물을 세포에 처리하였다. 20시간 후 상등액을 취하여 유리된 IL-8을 효소 면역흡착검출법을 이용해 정량하였다.

그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 상기 세포에 Del-N11dTCTP 처리 없이 10 ng/mL의 항체만 처리한 NC(negative control)군에서는 IL-8 분비가 검출되지 않았으며, Del-N11dTCTP만 처리한 세포에서는 IL-8 분비가 증가하였고, FL 도메인을 인식하는 특이적인 항체를 각각 1 및 10 ng/ml를 처리한 경우, Del-N11dTCTP에 의한 IL-8 분비 정도가 감소하여 본 항체에 의한 IL-8 분비 억제능을 확인하였다(도 5).

또한, 도 6에 나타낸 바와 같이, H2 도메인을 특이적으로 인식하여 결합하는 항체 또한 상기와 동일한 방법으로 실험한 결과, Del-N11dTCTP에 의한 IL-8 분비가 감소하여 본 항체의 IL-8 분비 억제능을 확인하였다(도 6).

<실험예 5> 천식 및 비염 질환 모델에서 FL 도메인 및 H2 도메인의 항염증 효능 분석

본 발명자들은 상기 <실시예 7>에서 제작한 천식 및 비염 질환 모델에

FL 및 H2 도메인을 20mg/kg로 처리하여 두 HRF 수용체 결합 도메인이 천식 및 비염의 병태생리학적 병변을 억제하는지 확인하였다.

<5-1> 기관지폐포세척액(BALF)의 분석

본 발명자들은 천식 및 비염 유발 동물모델에서 FL 및 H2 도메인을 적용시켰을 때 기관지폐포세척액 중으로 침윤된 염증성 세포를 분석하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

구체적으로, 상기 <실시예 7>에서 제조한 동물모델에서 심장채혈 후 기관지폐포세척술을 수행하였다. 기도 부위를 절개하여 기도 내로 20 게이지의 혈관 내 튜브카테터를 삽관하고 2%의 소태아혈청(FBS)를 포함한 PBS 0.8 mL을 3회에 걸쳐 반복해서 천천히 주입한 후 회수하였다. 회수율은 80% 이상이었고 회수된 세척액은 4℃, 1,000 x g에서 15분간 원심분리하여 상층액은 IL-5와 같은 사이토카인을 측정하거나 TCTP 단백질의 검출에 사용하였다. 한편 침전물은 2%의 소태아혈청(FBS)를 포함한 PBS 100 ㎕로 재분산하여 세척액 중으로 침윤된 염증성 세포의 수를 HEMAVET 950FS (Drew Scientific) 기기로 측정하였다.

그 결과, 도 17 및 도 18에 나타낸 바와 같이 PBS만 주사한 양성대조군에서는 OVA에 의한 기관지폐포 내 염증세포 침윤이 많은데 반해, FL 도메인 처리군에서는 총 세포수와 백혈구 수치가 모두 유의하게 낮은 것을 확인하였다(도 17a). 또한, H2 도메인 처리군에서도 총 세포수가 양성대조군에 비해 감소하는 것을 확인하였다(도 17b 및 도 17c).

또한, 대표적인 Th2 사이토카인인 IL-5는 양성대조군에서 높았고, FL 및 H2 도메인을 주사한 군에서 모두 감소하는 것을 확인하였다(도 18).

상기 실험 결과 FL 도메인이 특히 효과적인 것으로 사료되었고, 이후 천식 및 비염 질환 모델에 FL 도메인을 각각 1 mg/kg, 20 mg/kg 두 농도로 주사하여 FL 도메인의 항염증 효과가 용량의존적인지 확인하였다.

그 결과, 도 20에 나타낸 바와 같이 기관지폐포액 중으로 침윤된 염증성

세포가 용량의존적으로 감소하는 양상을 보였다(도 20a). 총 세포수와 림프구 수치가 FL 도메인 20 mg/kg 투여군에서 유의하게 감소하는 것을 확인하였다($p<0.01$, 도 20b, 도 20c). 또한, 기관지폐포세척액의 IL-5 사이토카인을 측정한 결과, FL 도메인이 1 mg/kg 의 저용량으로도 IL-5 분비 억제능이 있음을 확인하였다(도 21).

아울러, FL 도메인에 의한 항염증효과와 세포 외로 분비된 TCTP와의 관련성을 보기 위해 기관지폐포세척액을 TCTP 항체를 이용하여 immunoblotting한 결과, 양성대조군에서는 세 마리에서 모두 이량체 TCTP에 해당하는 분자량(약 45 KDa)에서 TCTP가 검출되었으나 FL 도메인 처리군에서는 그 양이 감소하는 것을 확인하였다(도 21).

<5-2> 혈장 내 난알부민 특이적인 IgE 수준 확인

본 발명자들은 천식 및 비염 유발 동물모델에서 혈장 내 난알부민 특이적인 IgE 수준을 확인하기 위해 하기와 같이 혈액 채취 및 혈장을 분리하였다.

구체적으로, 상기 <실시예 7>의 동물모델에서 실험 종료 후 조레틸(250 mg/kg)과 럼푼(50 mg/kg) 혼합액을 마우스 복강 내로 주입하여 치사시키고, 심장에서 혈액을 0.7-0.8 mL 채취하여 헤파린 처리한 튜브에 수거하였다. 실온에서 30분-1시간 둔 혈액을 1,000 x g에서 15분간 원심분리 하여 얻어 혈장을 얻고, 혈장 내 난알부민 특이적인 IgE 수준을 효소 면역흡착검출법을 이용하여 측정하였다. 96-well ELISA plate에 오발부민 100 ㎍을 pH 9.6의 0.05 M carbonate 완충액에 녹여 4℃에서 밤새 코팅(coating) 시킨 후 1% BSA가 함유된 TBS 용액에서 30분간 실온에서 반응시켜 비 특이 반응을 억제하였다. 혈장 검체를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고 0.1% Tween-20이 함유된 TBS 용액으로 세척한 후 HRP-컨쥬게이트된 항-mouse IgE(SouthernBiotech)를 1:8000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 세척하였다. TMB를 실온에서 처리하고 10분 후에 0.2 M H_2SO_4로 반응을 멈추고 450 nm 파장에서 흡광도를 ELISA 리더로 측정하였다.

그 결과, 도 19에 나타낸 바와 같이 혈장 중 OVA 특이적인 IgE 수준 또한 양성대조군에서는 높았으나, FL 도메인을 사용한 경우 감소하는 양상을 보이는 것을 확인하였다(도 19).

또한, 혈장 중 OVA 특이적인 IgE 또한 양성대조군에서 가장 높았고, FL 도메인을 투여했을 때 용량 의존적으로 IgE를 감소시켜 본 FL 도메인의 항원 특이적 IgE 분비 억제능을 확인하였다(도 23).

<5-3> 폐 조직 분석

본 발명자들은 천식 및 비염 유발 동물모델에서 폐 조직 분석을 위해 하기와 같이 실험하였다.

구체적으로, 상기 <실시예 7>에서 제조한 천식 및 비염 모델의 기관지폐포세척액 채취 후 흉부를 절개하여 폐를 적출한 후 4℃의 PBS로 세척하고 적당한 크기로 잘라 일부는 4% Paraformaldehyde(PFA)가 함유된 상온의 PBS에서 o/n 고정하였다. 다음날 고정된 조직은 탈수과정을 거쳐 파라핀 블록을 만들고, 이후 파라핀을 제거하여 슬라이드에 5 ㎛ 두께로 연속 절편을 만들어 goblet cell 염색을 위한 Periodic acid-Shiff(PAS) 염색을 수행하였다. 나머지 폐 조직은 액체질소에서 급속냉동 시킨 후, lysis buffer로 조직 내 단백질을 추출하고 immunoblotting하여 폐 조직 내 phospho-IκBα분자를 검출하였다.

그 결과, 도 22에 나타낸 바와 같이 폐에 일어난 염증 개선 효과를 평가하기 위해 폐 조직에서 단백질을 적출하였을 때 양성대조군에서 phospho-IκBα가 가장 많이 검출되었고, FL 도메인 처리군에서는 phospho-IκBα가 감소하여 본 펩타이드에 의한 IκBα의 phosphorylation 억제능을 확인하였다(도 22).

<실험예 6> C-말단 도메인을 인식하는 다클론항체의 IL-8 저해능 분석

본 발명자들은 상기 <실시예 8>에서 제작한 C-말단 도메인을 인식하는 항체를 BEAS-2B 세포에 처리하여 본 항체가 Del-N11dTCTP의 IL-8 분비 효능을

억제하는지 확인하였다.

구체적으로, 상기 <실험예 4>와 비슷한 방법으로 Del-N11dTCTP(1 μg/mL)을 BEAS-2B에 처리하였는데, 이때 40nM이 되도록 PBS로 희석한 항체와 1 μg/mL Del-N11dTCTP를 실온에서 10분 반응시키고, 이 혼합물을 세포에 처리하였다. 20시간 후 상등액을 취하여 유리된 IL-8을 효소 면역흡착검출법을 이용해 정량하였다.

그 결과, 도 24에 나타낸 바와 같이 상기 세포에 Del-N11dTCTP 처리 없이 PBS 또는 40nM의 항체만 처리한 군에서는 IL-8 분비 수준이 낮았고, Del-N11dTCTP와 PBS를 처리한 세포에서는 IL-8 분비가 증가하였으며, C-말단 도메인을 인식하는 특이적인 항체를 Del-N11dTCTP와 함께 처리한 경우, Del-N11dTCTP에 의한 IL-8 분비 정도가 57.5% 수준으로 감소하여 본 항체에 의한 IL-8 분비 억제능을 확인하였다(도 24).

<실험예 7> 천식 및 비염 질환 모델에서 FL 및 C-말단(terminal) 도메인에 대한 항혈청의 항염증 효능 분석

본 발명자들은 상기 <실시예 7>에서 제작한 천식 및 비염 질환 모델에 FL 및 C-말단 도메인에 대한 항혈청을 처리하여 이들이 이량체 TCTP의 작용을 막음으로써 천식 및 비염의 병태생리학적 병변을 억제하는지 확인하였다.

그 결과, 기관지폐포세척액 중 IL-5은 음성대조군에서 높았고, FL 및 C-말단 도메인에 대한 항혈청을 주사한 군에서 모두 감소한 양상을 보여 IL-5 분비 억제능을 시사하였다(도 25).

<실험예 8> 천식 및 비염 질환 모델에서 C-말단 도메인에 대한 IgG 항체의 항염증 효능 분석

본 발명자들은 상기 <실시예 7>에서 제작한 천식 및 비염 질환 모델에 C-terminal 도메인에 대한 IgG 항체를 비강(intranasal; i.n) 또는 복강(intraperitoneal; i.p) 투여했을 때 대조군인 Pre-immune IgG 투여군과 비교하여 각 처치가 천식 및 비염의 병태생리학적 병변을 억제하는지

확인하였다.

그 결과, 도 26에 나타낸 바와 같이 Pre-immune IgG를 주사한 음성대조군에 비해 C-terminal 도메인에 대한 IgG 항체 투여군의 OVA에 의한 기관지폐포 내 염증세포 침윤이 감소하였다. 투여 경로를 비교했을 때 비강투여군 [C-term (i.n)]에 비해 복강투여군[C-term (i.p)]의 염증세포 침윤이 크게 감소하였다(도 26 내지 도 28).

기관지폐포세척액 중 IL-5 또한 C-말단 도메인에 대한 IgG 항체 투여군에서 감소하였다. 기관지폐포 중으로 분비된 IL-5는 비강투여군 63.6 %, 복강투여군 13.3 % 수준으로 복강투여군에서 특히 효과적으로 IL-5를 감소시켰다(도 29).

<실험예 9> CIA(collagen-induced arthritis) 마우스에 대한 dTBP2의 류마티스성 관절염 예방 효과 확인

본 발명의 헵타머 펩타이드(7mer-peptide) dTBP2(서열번호 24로 표시되는 펩타이드인 p2)가 HRF와 결합하면 HRF의 활성을 저해하여 류마티스성 관절염에 대한 예방 효과가 있음을 확인하였다.

구체적으로, CIA를 유도하기 위하여, 7주령의 수컷 DBA1/j 마우스 26마리를 구입하여 1주 이상 적응기를 가진 뒤 1차로 bovine 제2형 콜라겐(Type2 collagen 2 mg/ml, Chondrex)과 동일한 농도의 complete Freund's Adjuvant(CFA containing 2 mg/ml M. tuberculosis, Chondrex)를 1:1로 혼합하여 150 μl를 꼬리의 기저부에서 2 cm 아래쪽의 피내를 통해 천천히 주입하였다(0일차). 3주 후 2차 주사를 시행하였는데 CFA 대신 incomplete Freund' s adjuvant(IFA)와 Bovine 제2형 콜라겐 용액을 역시 1 : 1의 비율로 혼합하여 혼합액 100uL를 꼬리의 기저부 피내를 통해 천천히 주입하였다. 그 후 부형제(vehicle)만 투여할 9마리, dTBP2 5 mg을 투여할 8마리 및 dTBP2 25 mg를 투여할 9마리로 구별하였다. dTBP2는 PBS 1 ml 당 1.5 mg씩 용해하여 투여하였고, 관절염이 발생하기 전인 21일차부터 1주일에 3번씩 투여하였으며, 주 2회씩 각 발마다 0 내지 4점(총 0 내지 16점)의 관절염 임상점수를

평가하였다. 동시에 전자캘리퍼를 이용하여 양 발목의 두께를 측정하였으며, 최초 측정 당시 두께 대비 변화수치를 측정하였다.

그 결과, 도 30과 같이 dTBP2 25 mg을 투여한 군은 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군 보다 류마티스성 관절염 발병이 억제되는 것을 확인하였다. 31일차에서는 dTBP2 25 mg을 투여한 군이 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군 보다 절반 이상 발병률이 억제되었고, 46일차에서는 dTBP2 25 mg을 투여한 군이 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군 보다 70 % 이상 발병률이 억제됨을 알 수 있었다. 또한, 관절염의 임상증상 지표인 관절 두께를 측정한 결과 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군은 41일차까지 지속적으로 증가하고 41일차부터 46일차까지는 급속하게 두꺼워지는 반면, dTBP2 25 mg을 투여한 군은 46일차까지도 관절 두께가 정상과 비슷하게 유지됨을 규명하여, dTBP2의 류마티스 관절염 예방 효과를 확인하였다(도 30).

<실험예 10> CIA 마우스에 대한 dTBP2의 류마티스성 관절염 치료 효과 확인

본 발명의 헵타머 펩타이드(7mer-peptide) dTBP2가 HRF와 결합하면 HRF의 활성화를 저해하여 류마티스성 관절염에 대한 치료 효과가 있음을 확인하였다.

구체적으로, 상기 <실험예 9>와 같이 DBA1/j 마우스에서 CIA를 유도하였고, 41일차에 관절염 임상점수 평균 5를 기준으로 하여 41일차부터 dTBP2를 투여하되, 부형제(vehicle)만 투여한 4마리, dTBP2 5 mg을 투여한 5마리 및 dTBP2 25 mg 를 투여한 5마리로 구별하였다. dTBP2는 PBS 1 ml 당 1.5 mg씩 용해하여 투여하였고 1주일에 3번씩 투여하였으며 주 2회씩 결과를 측정하였다.

그 결과, 도 31와 같이 dTBP2 25 mg을 투여한 군은 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군에 비해 임상점수가 낮아지는 등 증상이 개선되어 류마티스성 관절염 치료효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 임상증상의

지표인 관절 두께 측정에서도 dTBP2 25 mg을 투여한 군은 41일차 이후로 두께가 감소하여 지속적으로 두께가 증가한 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군과는 대조적인 결과를 나타냄을 규명하여, 본 발명의 dTBP2가 류마티스 관절염 치료효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(도 31).

<실험예 11> 아토피성 피부염을 유발한 마우스에 대한 dTBP2의 효과 확인

본 발명의 dTBP2가 HRF와 결합하면 HRF와 HRF에 대한 receptor 간 결합 또는 활성화를 방해하여 아토피성 피부염에 대한 개선 효과가 있음을 확인하였다.

구체적으로, 5주령의 특정 병원체 미감염 암컷 NC/Nga 마우스를 구입(오리엔트, Seoul, Korea)하여 1주간 안정화시킨 뒤 제모제를 이용해 제모한 뒤 Biostir® AD 연고(Biostir사, Japan)를 이용하여 등쪽 피부에 아토피 피부염을 유발시켰다. 즉, 마우스 등의 털을 제거한 후, PBS에 녹인 4% SDS 150 μl 도포하고, 2 내지 3시간 자연건조한 뒤 100 mg Biostir® AD크림을 균등하게 마우스의 등 피부 및 귀에 도포하였다. 이후 1주마다 2회 연고를 도포하며 총 3주간 6회 도포 후, 마우스의 피부층이 두꺼워지고 등피부에 각질이 형성됨을 확인하였다.

또한, dTBP2가 아토피 유발 마우스에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 양성 대조군으로 PBS 투여군, 비교실험군으로 protopic 연고(Astellas Pharma Manufacturing Inc., USA) 50 mg/mouse 투약군 및 dTBP2 투여군으로 구별하여, 0일차에 PBS(피하주사, 25 mg/kg), protopic 연고(피부도포, 100 mg/mouse) 및 dTBP2(피하주사, 25 mg/kg)를 각각 처리한 후 1일차에 Biostir® AD크림 100 mg을 도포하고, 2 및 3일차에 PBS, protopic 연고 및 dTBP2를 0일차와 같이 처리한 후 4일차에 Biostir® AD크림 100 mg을 도포하였으며, 5일차에 PBS, protopic 연고 및 dTBP2를 0일차와 같이 투여하였다.

그 결과, 도 32a와 같이 protopic 연고 및 dTBP2를 투여한 마우스가 투여하지 않은 대조군 보다 아토피 유발 정도가 약한 것을 육안 상으로 확인할

수 있었다(도 32a). 아토피의 유발정도를 나타내는 지표(홍반, 건조, 껍질까짐, 부종 및 짓무름 등)로 아토피 증상을 관찰하여 점수를 합산해 그래프화 해보니(도 32b, 0: 무증상, 1: 미약한 증상, 2: 보통의 증상, 3: 심한 증상), protopic 연고 및 dTBP2를 투여한 마우스가 투여하지 않은 대조군 보다 아토피 유발 정도가 약한 것을 수치상으로 확인할 수 있었다.

또한, Biostir AD 연고로 아토피 알레르기를 유발한 양성대조군 PBS 군과 Protopic 처리군, dTBP2 처리군의 마우스 피부조직에 히스타민 방출인자 dTCTP(46kDa)가 현저하게 증가했음을 western blotting으로 확인하였다(도 33).

아토피 알레르기가 유발되면 각질층과 피부 층이 두꺼워 지며 염증세포들의 침윤이 증가하게 되는데, 이에 대한 조직학적 평가를 위해 Hematoxylin/eosin staining 과 비만세포 염색(Toluidine Blue staining) 실험을 진행하였다. 현미경을 통한 피부두께의 변화와 면역관련 염증세포들 침윤 상태를 확인해본 결과, 약물을 처리하지 않은 PBS의 군에 비해 Protopic과 dTBP2의 약물을 처리한 군의 각질층의 두께 등 아토피 피부염의 피부증상이 개선되었음을 확인하였다(도 34a 및 도 34b). 비만세포의 침윤 또한 약물을 처리한 Protopic 군과 dTBP2군에서 모두 양성대조군에 비해 현저하게 낮음을 확인하였다(도 34c 및 도 34d).

또한, 피부감작물질을 통한 염증반응 증명을 위해 림프절 무게의 변화를 통해 항원 또는 약물의 효과를 증명하는 Lymph node assay를 진행하였으며, PBS군의 림프절은 정상 림프절에 비해 무게, 크기가 모두 증가한 것을 확인할 수 있었고, Protopic 및 dTBP2 군의 림프절의 무게와 사이즈가 PBS군에 비해 적음을 확인할 수 있었다(도 35).

또한, dTBP2가 dTCTP를 억제함으로써 항알레르기 활성을 나타냄을 히스타민 수치로 나타내었고, PBS군에 비해 Protopic군, dTBP2군 모두 히스타민 수치가 떨어짐을 확인할 수 있었다(도 36).

대표적인 아토피 관련 Th2 cell 사이토카인인 IL-4와 IL-13은 mRNA level로 수치를 확인하였으며, PBS군에 비해 dTBP2군 및 Protopic군 순으로

현저하게 감소함을 확인하였다(도37a 및 도37b).

아울러, 최근 Th17 cell 또한 아토피 알레르기와 연관되어 있고 Th2 cell 사이토카인 중 Th17A가 밀접하게 관계되어 있다는 연구들이 발표됨에 따라, 이와 관련하여 dTBP2가 미치는 영향을 확인하기 위해 분석한 결과 PBS군에 비해 dTBP2군, Protopic군 순으로 수치가 낮은 것을 확인하여 dTBP2가 Th17A를 수준을 감소시킴을 규명하였다(도 38).

<실험예 12> 류마티스 관절염에 대한 dTCTP(HRF)의 효과 확인

TCTP가 류마티스 관절염(Rhuematoid arthritis: RA)에 관여하는지 여부가 최근 관심의 대상이 되고 있는데, 본 발명자들은 TCTP 이량체(dTCTP: HRF)가 알레르기 반응을 촉발하는 히스타민 방출인자임을 세계최초로 규명한 바 있으며, 만성 염증성 질환 중 하나인 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis)이 dTCTP(HRF)와 연관되어 있을 것으로 생각되어 실험을 진행하였다.

구체적으로, 정상인(Negative), 퇴행성 관절염 환자(Osteoarthritis: OA), 초기 류마티스 관절염환자(Early rheumatoid arthritis: ERA) 및 말기 류마티스 관절염환자(Late rheumatoid arthritis: LRA)의 관절강 내 윤활액(Synovial fluid)에서 염증성 반응에 관여하는 dTCTP(HRF)의 양을 확인하기 위해 TCTP detection ELISA(Antibody-protein-ELISA kit, MYBioSource사, CA, USA)를 실시하였다. dTCTP(HRF) 자체를 detection 하기는 어려우나, TCTP monomer는 TCTP dimer인 dTCTP의 구성요소인 바 monomer인 TCTP의 증가가 dimer인 dTCTP의 증가로 이어질 것이라는 당연한 귀결을 얻을 수 있기 때문이다.

그 결과, 실험결과 정상인 샘플과 퇴행성 관절염 샘플에서는 TCTP의 양이 거의 없음을 확인할 수 있었고, 초기 류마티스 관절염 환자와 말기 류마티스 관절염 환자 샘플에서는 경과가 진행될수록 TCTP의 양이 증가하는 것을 볼 수 있었다(도 39).

아울러, IHC(immunohistochemistry) 실험을 토대로 각 환자들의 관절에 TCTP가 어디에 얼마나 존재하는지 현미경으로 통해 확인하였다. 도 40과 같이, 갈색으로 염색된 부분이 TCTP를 나타내며 퇴행성 관절염 환자(OA)에 비해 말기

류마티스 관절염 환자(RA)의 관절 조직에서 많은 TCTP가 존재함을 알 수 있었다(도 40).

<제조예 1> 약학적 제제의 제조

<1-1> 산제의 제조

HRF 수용체와의 결합 억제제	2 g
유당	1 g

상기의 성분을 이용하여 산제를 만들어 기밀포에 충진하였다.

<1-2> 정제의 제조

HRF 수용체와의 결합 억제제	100 mg
옥수수전분	100 mg
유 당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<1-3> 캡슐제의 제조

HRF 수용체와의 결합 억제제	100 mg
옥수수전분	100 mg
유 당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

<1-4> 환의 제조

HRF 수용체와의 결합 억제제	1 g
유당	1.5 g

글리세린	1 g
자일리톨	0.5 g

상기의 성분을 혼합한 후, 통상과 동일한 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

<1-5> 과립의 제조

HRF 수용체와의 결합 억제제	150 ㎎
대두추출물	50 ㎎
포도당	200 ㎎
전분	600 ㎎

상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 ㎎을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

【청구범위】

【청구항 1】

TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein) 이량체형(dimer) IgE-의존성 히스타민방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor: HRF)와 세포막에 존재하는 HRF에 대한 수용체 간의 결합 억제제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein)는 동형 또는 이형의 이량체형(dimer)이 활성형이고 상기 TCTP 이량체형 HRF의 구조 중에서 유연성 루프(flexible loop) 도메인 또는 헬릭스 2(helix 2) 도메인이 HRF에 대한 수용체와 결합하는 부위이며, 상기 TCTP 이량체형 HRF는 전장 또는 N-말단 결실형 TCTP 이량체인 것으로 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 결합 억제제는 유연성 고리(flexible loop: FL) 도메인 또는 헬릭스 2(helix 2: H2) 도메인 중 하나 또는 둘 모두와 HRF에 대한 수용체 간의 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 FL 도메인은 (X)n-(S 또는 T)-RTEG-(A, N 또는 Q)-IDDSLIGGNASAEGPEGEGTE-(S 또는 A)-TV-(V 또는 I)-T-(X)n의 아미노산

서열(여기서 n은 0 내지 5의 정수), 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 5】

제 3항에 있어서, 상기 FL 도메인은 서열번호 1 내지 서열번호 4 중 어느 하나의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 6】

제 3항에 있어서, 상기 FL 도메인은 서열번호 5 내지 서열번호 10 중 어느 하나의 염기서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 7】

제 3항에 있어서, 상기 H2 도메인은 (X)n-TKE-(A 또는 S)-YKKYIKDYMK-(S 또는 A)-(L 또는 I)-K-(G 또는 A)-(K 또는 R)-LEE-(Q 또는 H)-(K 또는 R)-P-(X)n의 아미노산 서열(여기서 n은 0 내지 5의 정수), 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 8】

제 3항에 있어서, 상기 H2 도메인은 서열번호 11 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 9】

제 3항에 있어서, 상기 H2 도메인은 서열번호 13 내지 서열번호 15 중 어느 하나의 염기서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 10】

제 1항에 있어서, 상기 결합 억제제는 HRF의 구조 중에서 HRF에 대한 수용체에 결합에 관여하는 도메인과 결합하여, HRF와 HRF에 대한 수용체 간의 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 11】

제 1항에 있어서, 상기 결합 억제제는 HRF의 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상에 결합하여, 상기 FL 도메인 또는 H2 도메인 중 어느 하나 또는 둘 모두와 HRF에 대한 수용체 간의 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 12】

제 1항에 있어서, 상기 결합 억제제는 HRF의 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상에 대한 결합 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 13】

제 1항에 있어서, 상기 결합 억제제는 HRF의 FL 도메인, H2 도메인, C-말단, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 14】

제 1항에 있어서, 상기 결합 억제제는 7개의 아미노산으로 구성되고, 첫 번째 아미노산은 A, L 및 W로 구성된 군으로부터 선택되며, 두 번째 아미노산은 V, Y, E 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, 세 번째 아미노산은 T, V, F 및 A로 구성된 군으로부터 선택되며, 네 번째 아미노산은 Y, P 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, 다섯 번째 아미노산은 P, G 및 K로 구성된 군으로부터 선택되며, 여섯 번째 아미노산은 A, L, S 및 W로 구성된 군으로부터 선택되고, 일곱 번째 아미노산은 A, P 및 M로 구성된 군으로부터 선택되는 일련의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 15】

제 14항에 있어서, 상기 결합 억제제는 서열번호 23 내지 32 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 16】

제 1항에 있어서, 상기 알레르기 질환은 비염, 천식 및 아토피로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 17】

제 1항에 있어서, 상기 염증성 질환은 류마티스 관절염을 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 18】

1) HRF의 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상과 HRF에 대한 수용체를 피검시료와 접촉시키는 단계;

2) 상기 도메인, 이들의 유사체 또는 이들의 단편과 HRF에 대한 수용체 간의 결합 수준을 측정하는 단계; 및

3) 단계 1)의 과정을 거치지 않은 대조군에 비해 결합을 감소시키는 피검시료를 선별하는 단계;를 포함하는,

알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 HRF 관련 질환의 진단, 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

【청구항 19】

1) HRF의 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상과 HRF에 대한 수용체를 발현하는 세포를 피검시료와 접촉시키는 단계;

2) 상기 단계 1)의 세포를 배양하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 배양액에서 히스타민, IL-8 또는 GM-CSF를 포함하는 활성물질의 분비수준을 측정하여 상기 단계 1)의 과정을 거치지 않은 대조군에 비해 분비수준이 낮은 피검시료를 선별하는 단계;를 포함하는,

알레르기 질환, 염증성 질환 및 말라리아로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 HRF 관련 질환의 진단, 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

【청구항 20】

HRF의 FL 도메인, H2 도메인 및 C-말단으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상과 HRF에 대한 수용체 간의 결합을 검출하는 물질을 포함하는 알레르기 질환, 염증성 질환 또는 말라리아 질환 진단용 키트.

【청구항 21】

제 1항에 따른 HRF에 있어서, HRF에 대한 수용체에 결합하거나 결합에

관여하는 것을 특징으로 하는 FL 도메인.

【청구항 22】

제 21항에 있어서, 상기 FL 도메인은 (X)n-(S 또는 T)-RTEG-(A, N 또는 Q)-IDDSLIGGNASAEGPEGEGTE-(S 또는 A)-TV-(V 또는 I)-T-(X)n의 아미노산 서열, 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 FL 도메인.

【청구항 23】

제 1항에 따른 HRF에 있어서, 상기 HRF에 대한 수용체에 결합하거나 결합에 관여하는 것을 특징으로 하는 H2 도메인.

【청구항 24】

제 23항에 있어서, 상기 H2 도메인은 (X)n-TKE-(A 또는 S)-YKKYIKDYMK-(S 또는 A)-(L 또는 I)-K-(G 또는 A)-(K 또는 R)-LEE-(Q 또는 H)-(K 또는 R)-P-(X)n의 아미노산 서열(여기서 n은 0 내지 5의 정수), 이의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 H2 도메인.

【청구항 25】

제 1항에 따른 HRF에 있어서, 상기 HRF에 대한 수용체와의 결합에 관여하거나 HRF의 활성화에 관여하는 C-말단.

【청구항 26】

제 25항에 있어서, 상기 C-말단은 서열번호 33, 서열번호 34, 이들의 유사체 및 이들의 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 C-말단.

【청구항 27】

제 21항에 따른 FL 도메인, 제 23항에 따른 H2 도메인 및 제 25항에 따른 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 코딩하는 유전자.

【청구항 28】

제 27항에 따른 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

【청구항 29】

제 28항에 따른 발현벡터로 형질전환된 형질전환체.

【청구항 30】

제 21항에 따른 FL 도메인에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편.

【청구항 31】

제 23항에 따른 H2 도메인에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편.

【청구항 32】

제 25항에 따른 C-말단에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편.

【청구항 33】

제 1항의 상기 HRF, 제 21항의 상기 FL 도메인, 제 23항의 상기 H2 도메인 및 제 25항의 상기 C-말단으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 히스타민 방출 유도제.

【청구항 34】

1) 인간을 제외한 동물에 서열번호 1 내지 서열번호 4 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 FL 도메인 펩타이드를 항원으로 사용하여 면역을 유도하고 특이적인 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 생산하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 생산된 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편이 항원 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 항원에 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, FL 도메인에 대한 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편의 제조 방법.

【청구항 35】

1) 인간을 제외한 동물에 서열번호 11 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 H2 도메인을 포함하는 펩타이드를 항원으로 사용하여 면역을 유도하고 특이적인 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 생산하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 생산된 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편이 항원 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 항원에 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, H2 도메인에 대한 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편의 제조 방법.

【청구항 36】

1) 인간을 제외한 동물에 HRF의 C-말단을 포함하는 펩타이드를 항원으로 사용하여 면역을 유도하고 특이적인 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 생산하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 생산된 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편이 항원 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 항원에 결합하는 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, HRF의 C-말단에 대한 펩타이드, 항체, 이들의 유사체 또는 이들의 면역학적 활성 단편의 제조 방법.

【청구항 37】

단백질-단백질 상호작용 분석을 수행하는 단계를 포함하는 HRF 특이적 수용체를 동정하는 방법.

【청구항 38】

제 37항에 있어서, 상기 단백질-단백질 상호작용 분석은 동시정제(co-purification), 효모 투-하이브리드 시스템(Yeast Two-hybrid system) 또는 단백질 칩 시스템을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 HRF 특이적 수용체를 동정하는 방법.

【청구항 39】

제 38항에 있어서, 상기 동시정제는

1) HRF-HRF 수용체 복합체를 분리하는 단계;

2) 상기 분리된 복합체를 정제하는 단계; 및

3) 상기 정제된 복합체로부터 수용체를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 HRF 특이적 수용체를 동정하는 방법.

【청구항 40】

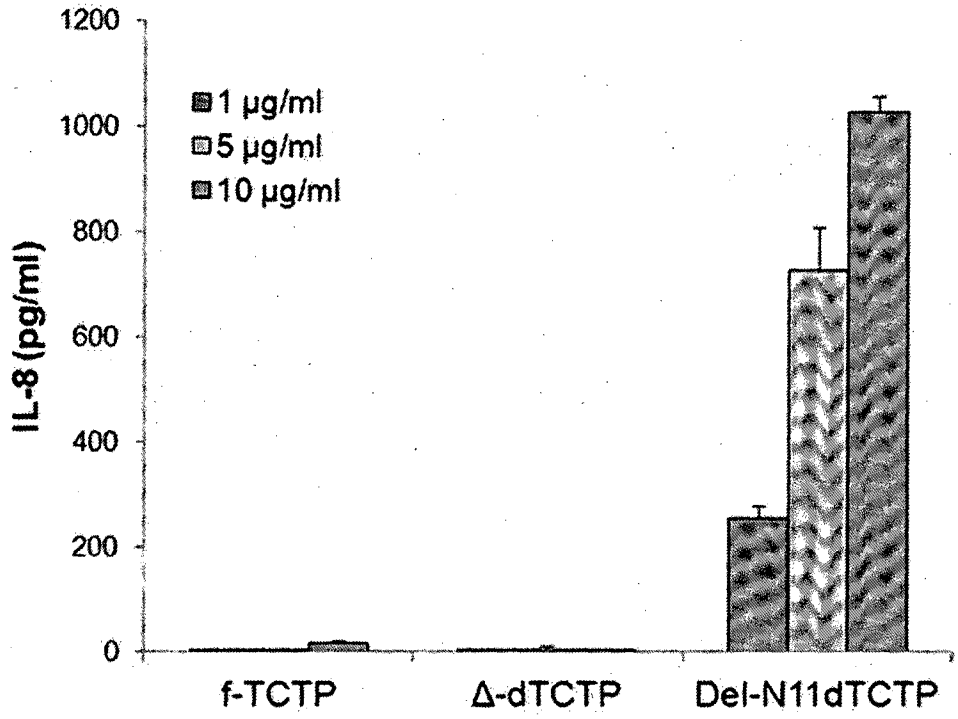
제 38항에 있어서, 단백질 칩 시스템은

1) 기능이 밝혀지거나 밝혀지지 않은 다양한 단백질들이 집적된 단백질 칩에 본 발명의 결실형 HRF 또는 본 발명의 동형 또는 이형 TCTP 이량체를

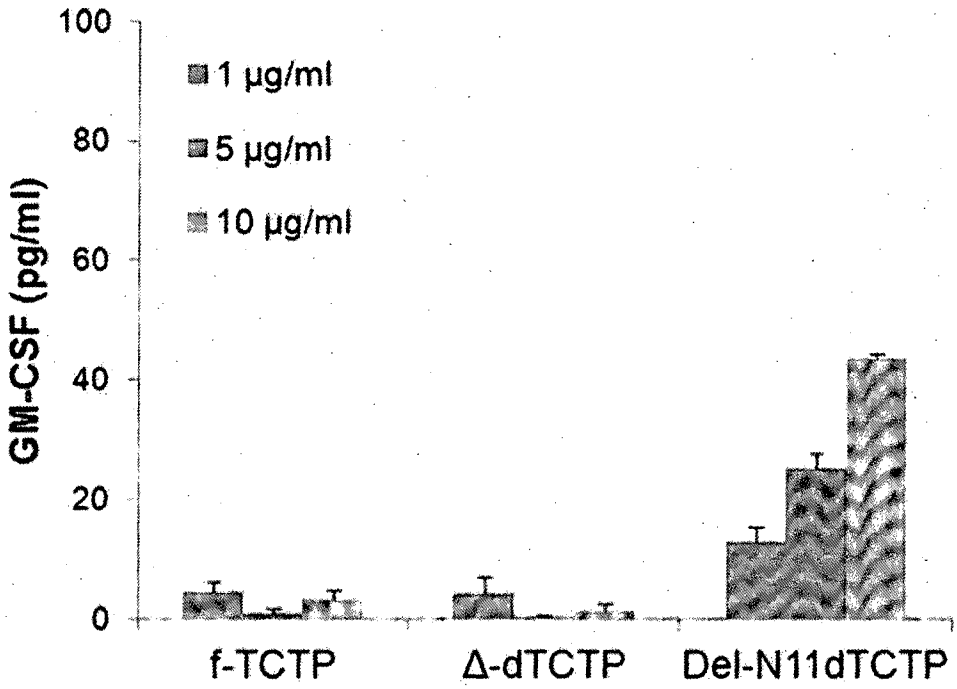
처리하는 단계; 및

2) 상기 결실형 HRF 또는 TCTP 이량체에 특이적인 항체가 없거나 있는 상태에서 상기 언급된 분석방법을 이용하여 단백질-단백질 상호작용이 일어나는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 HRF 특이적 수용체를 동정하는 방법.

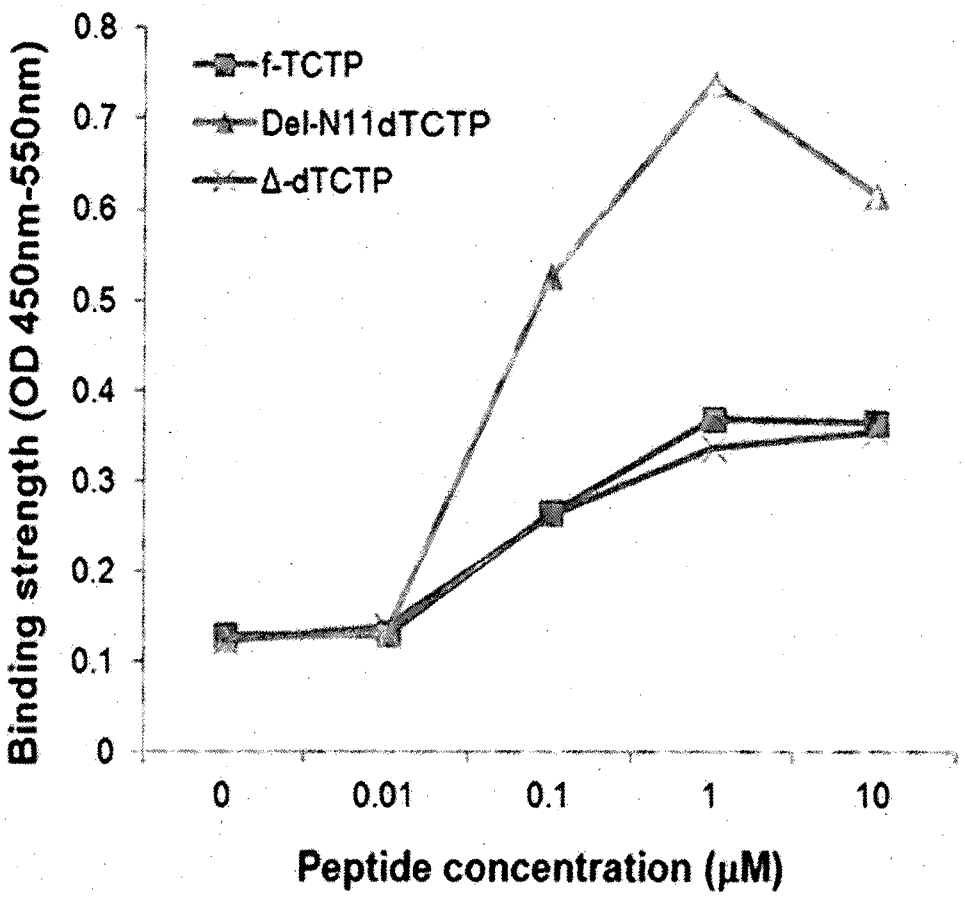
[도 1]


1200
1000
800
600
400
200
0
IL-8 (pg/ml)
1 μg/ml
5 μg/ml
10 μg/ml
f-TCTP
Δ-dTCTP
Del-N11dTCTP

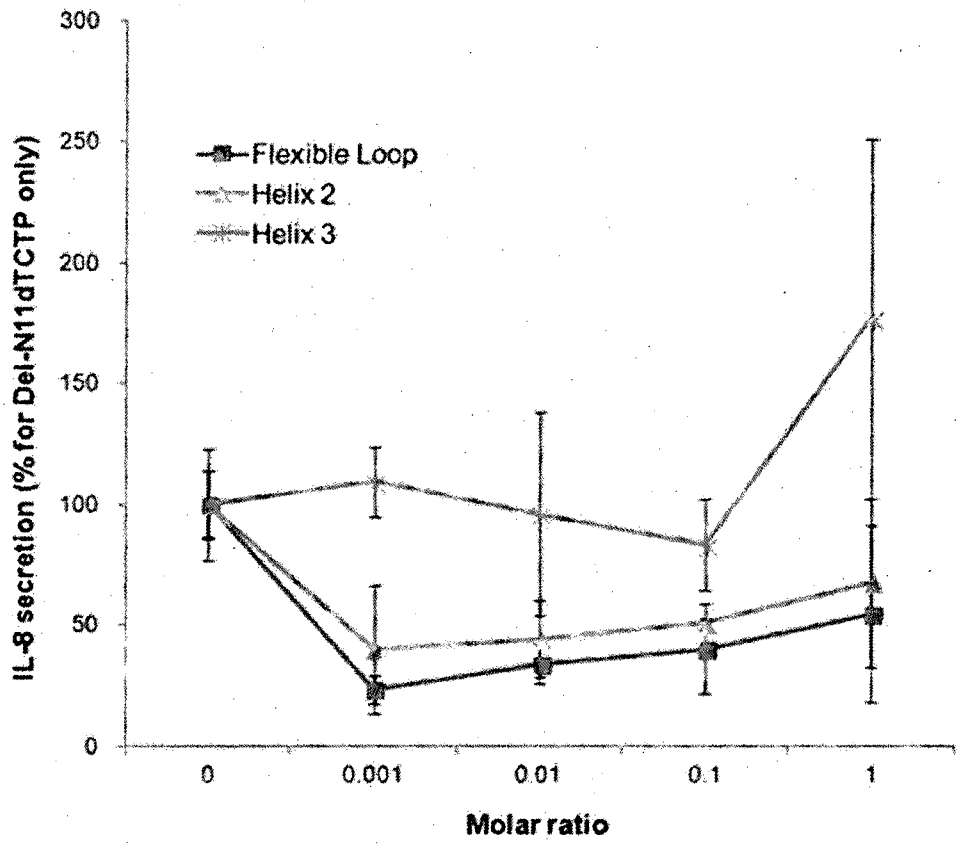
[도 2]


100
80
60
40
20
0
GM-CSF (pg/ml)
1 μg/ml
5 μg/ml
10 μg/ml
f-TCTP
Δ-dTCTP
Del-N11dTCTP

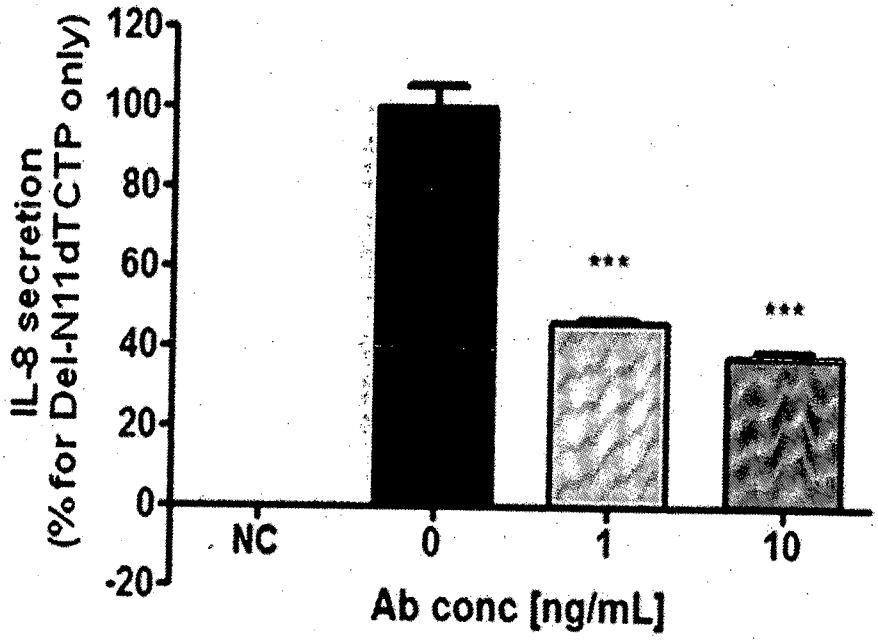
[도 3]


Binding strength (OD 450nm-550nm)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
f-TCTP
Del-N11dTCTP
Δ-dTCTP
0
0.01
0.1
1
10
Peptide concentration (μM)

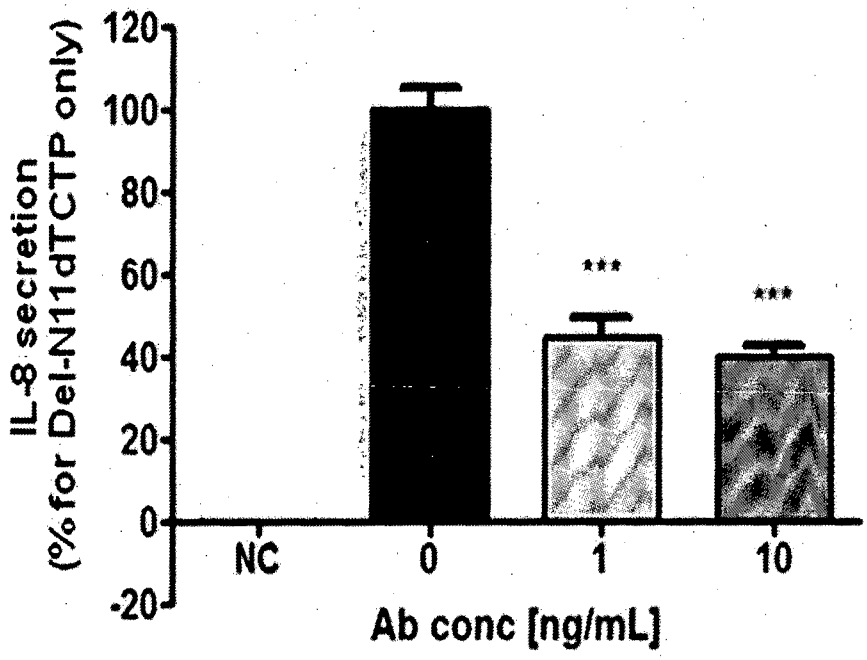
[도 4]


300
250
200
150
100
50
0
IL-8 secretion (% for Del-N11dTCTP only)
Flexible Loop
Helix 2
Helix 3
0
0.001
0.01
0.1
1
Molar ratio

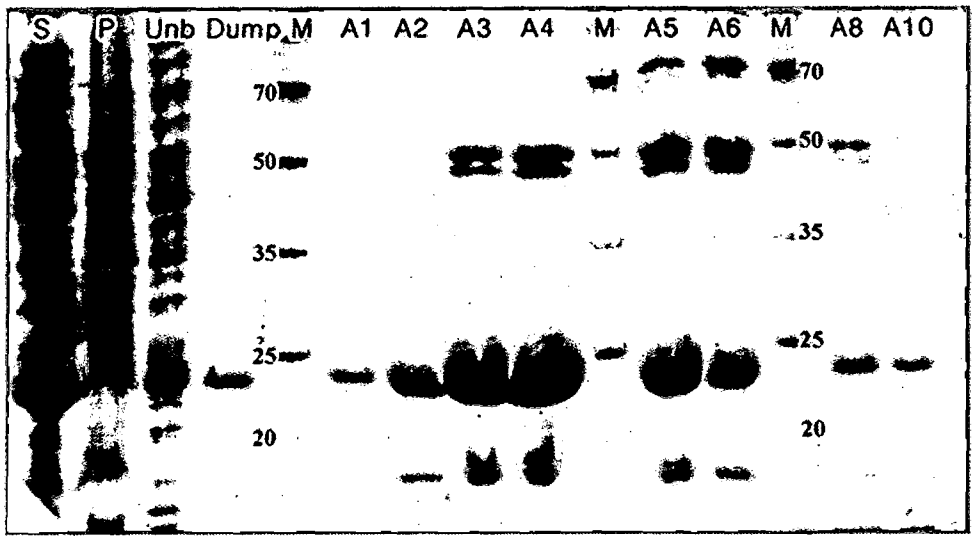
[도 5]


IL-8 secretion
(% for Del-N11dTCTP only)
120
100
80
60
40
20
0
-20
***
***
NC
0
1
10
Ab conc [ng/mL]

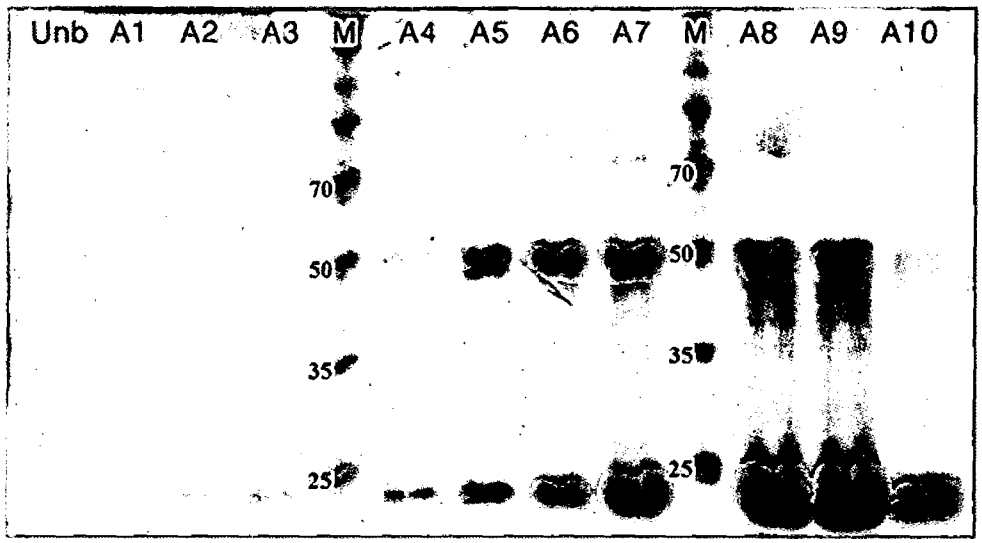
[도 6]


IL-8 secretion
(% for Del-N11dTCTP only)
120
100
80
60
40
20
0
-20
***
***
NC
0
1
10
Ab conc [ng/mL]

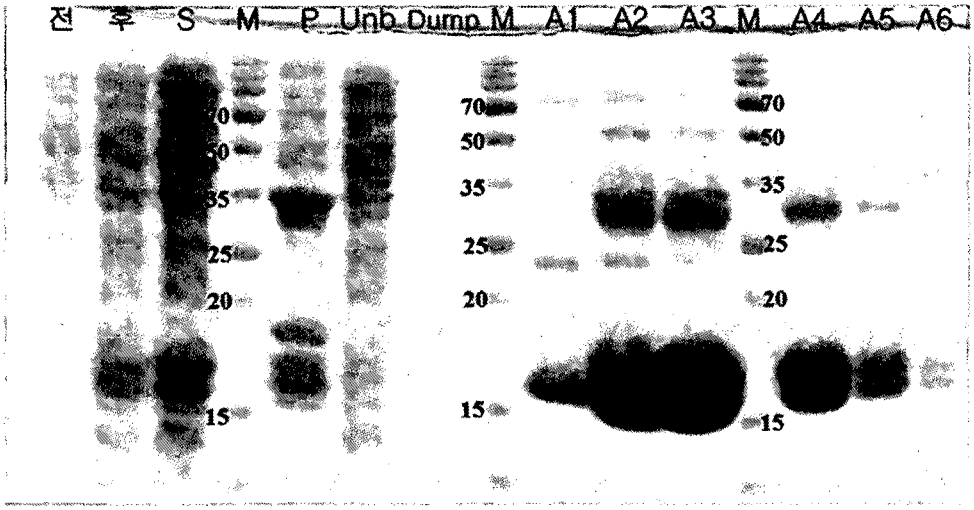
[도 7]



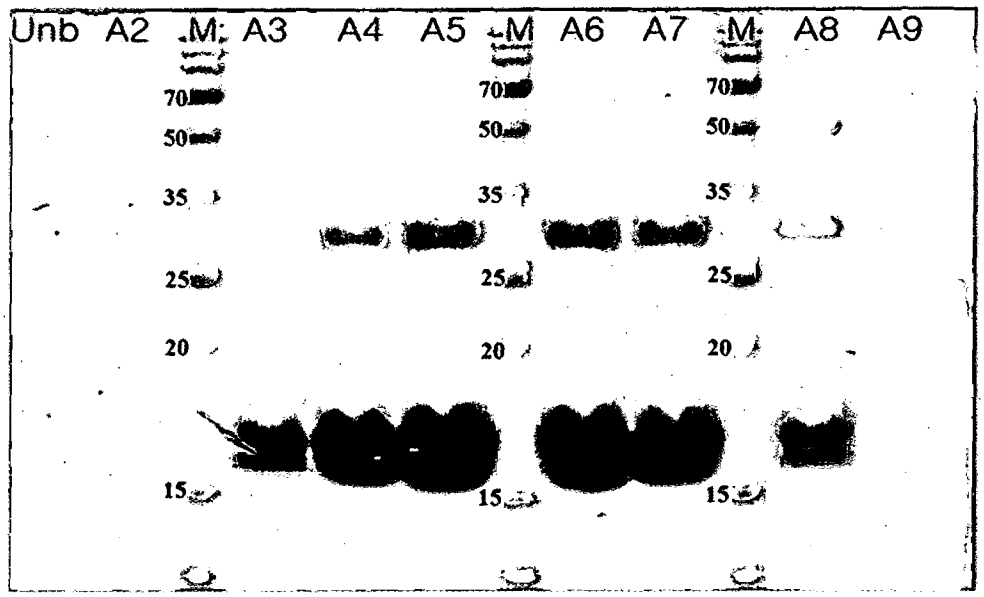
[도 8]



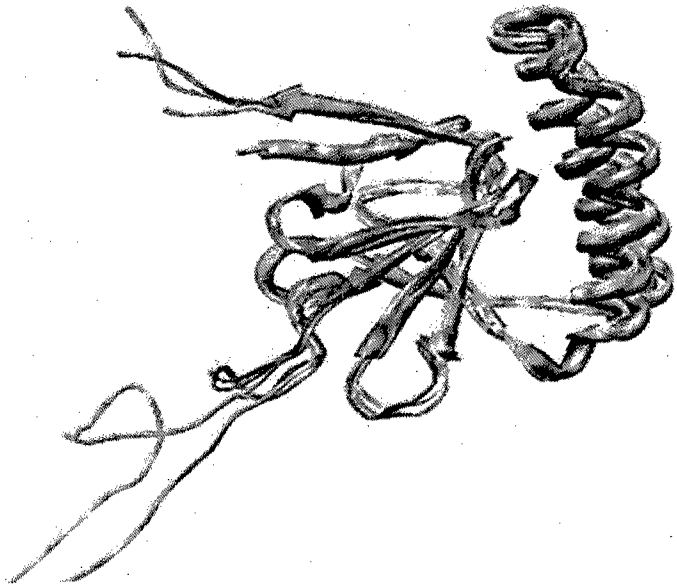
[도 9]


전
후
S
M
P
Unb
Dump
M
A1
A2
A3
M
A4
A5
A6
70
50
35
25
20
15
70
50
35
25
20
15
70
50
35
25
20
15

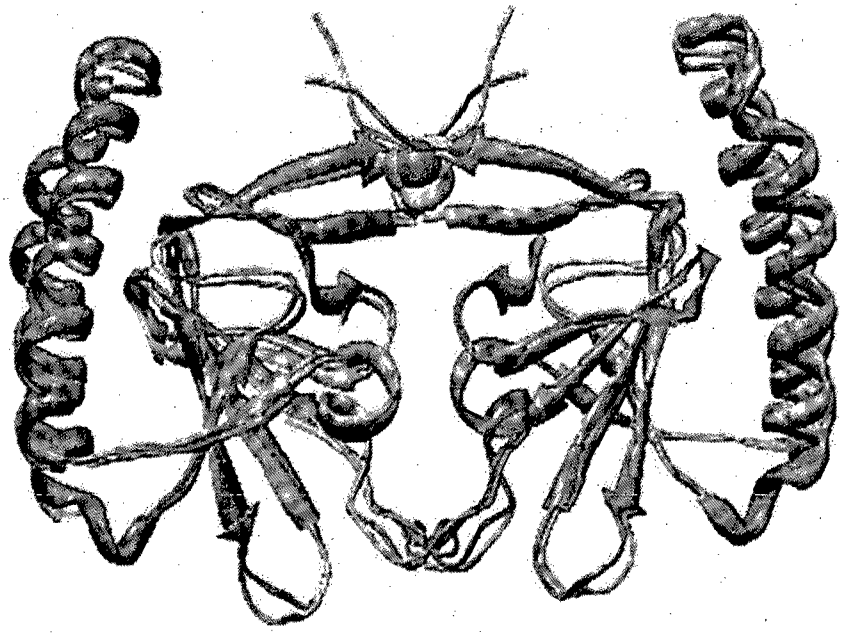
[도 10]



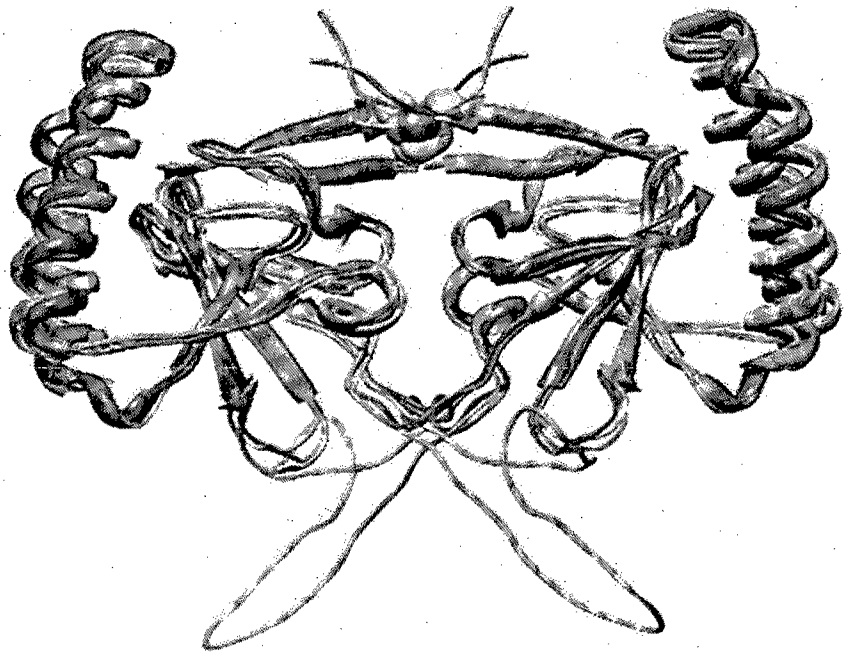
[도 11]



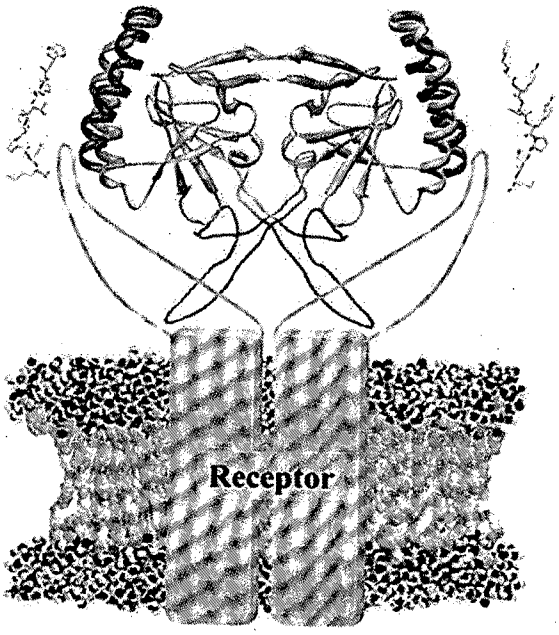
[도 12]



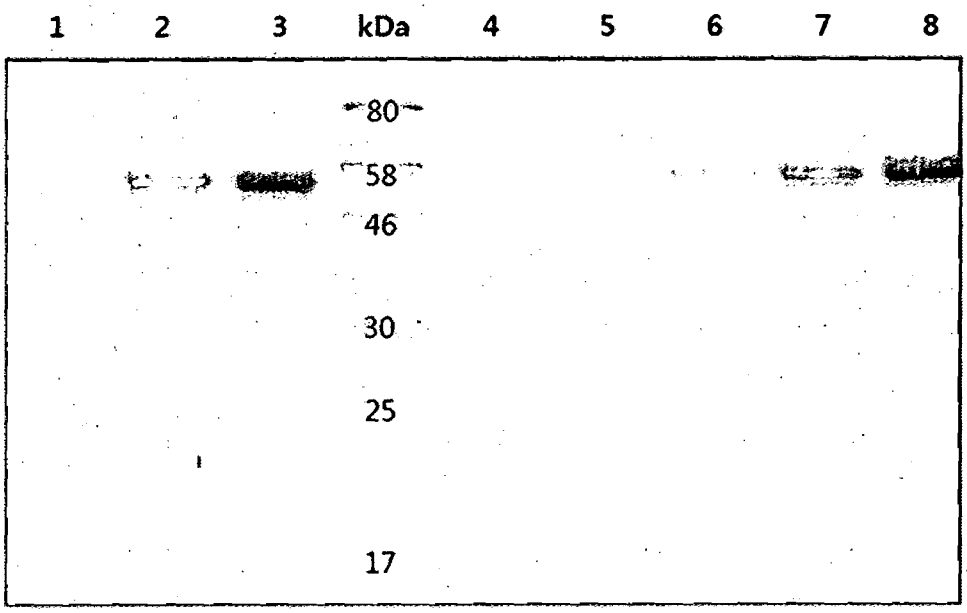
[도 13]



[도 14]

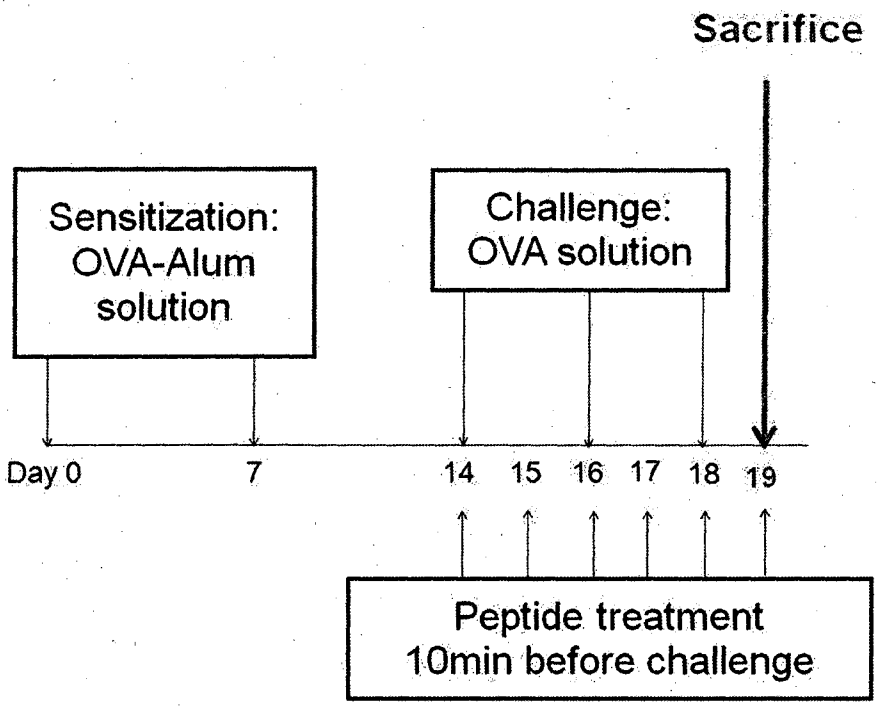


[도 15]

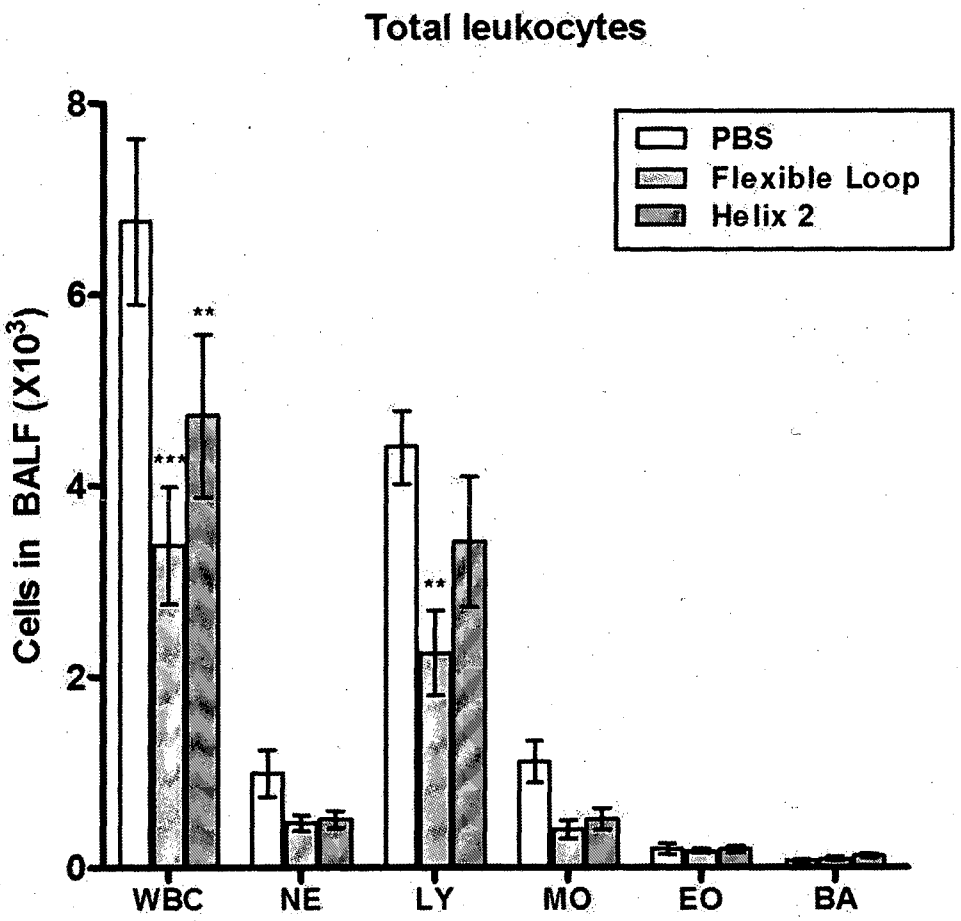


[도 16]

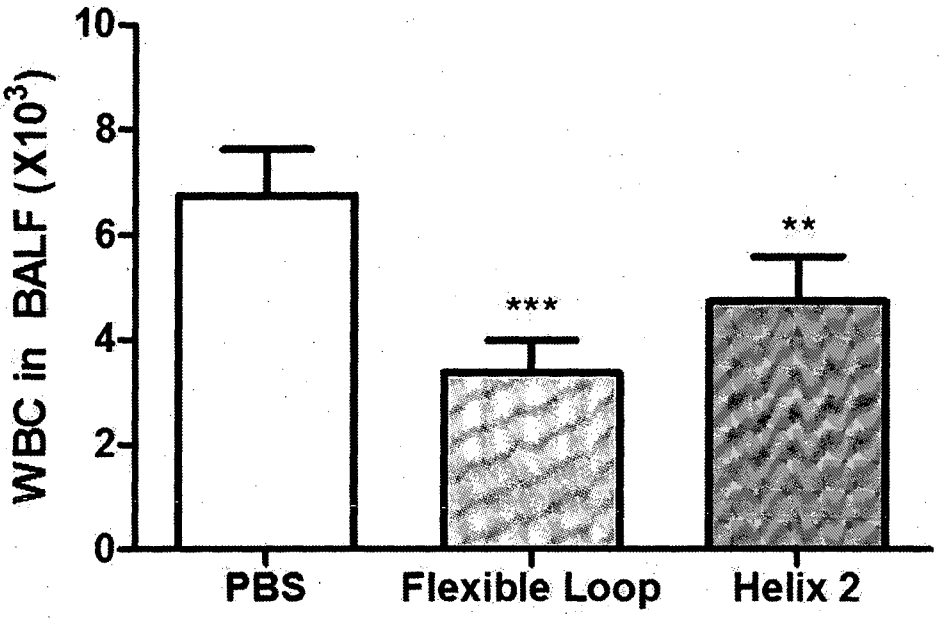
sensitization	100μg OVA + Alum 1.3mg per mouse	I.P.
challenge	200μg OVA per mouse	I.N.



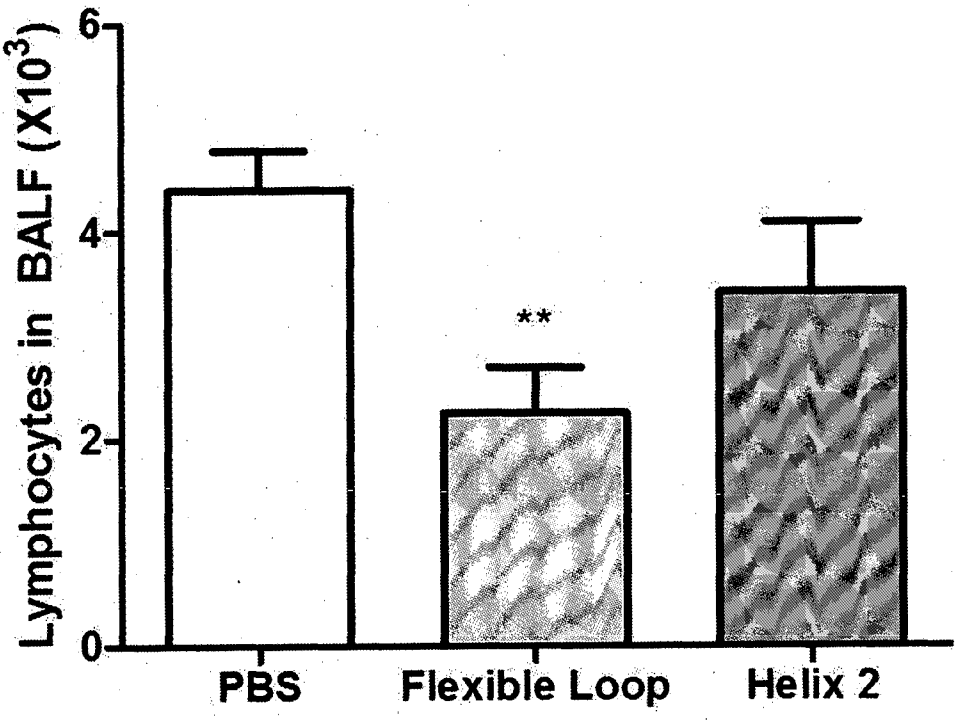
[도 17a]


Total leukocytes
PBS
Flexible Loop
Helix 2
Cells in BALF (X10³)
8
6
4
2
0
***
**
**
WBC
NE
LY
MO
EO
BA

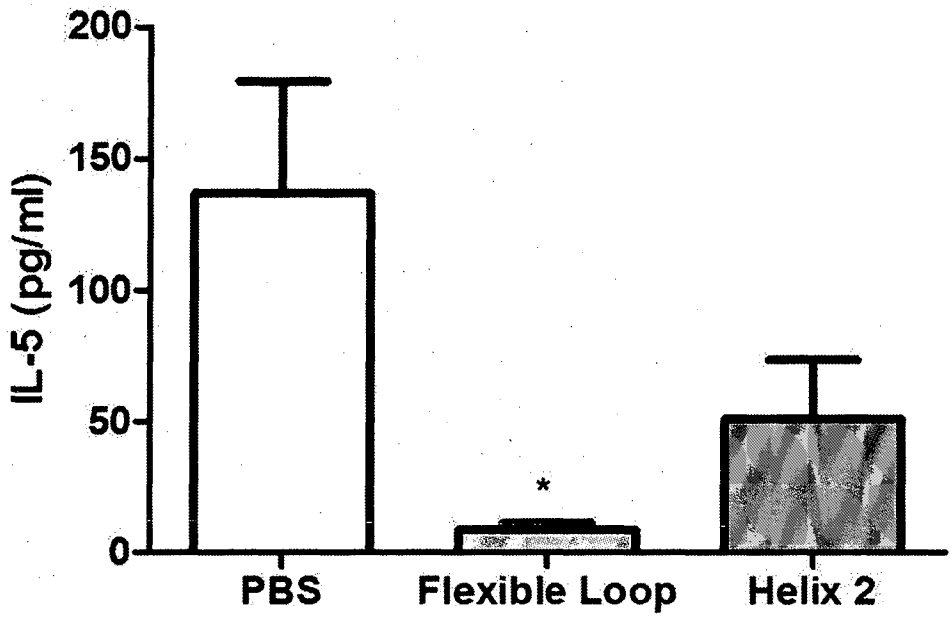
[도 17b]



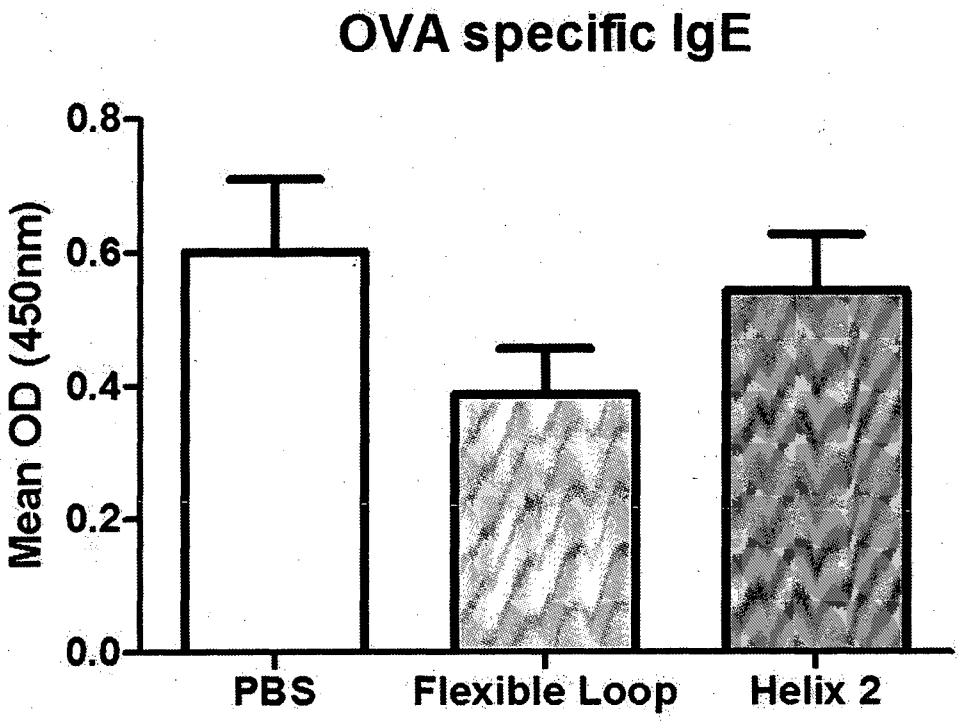
[도 17c]



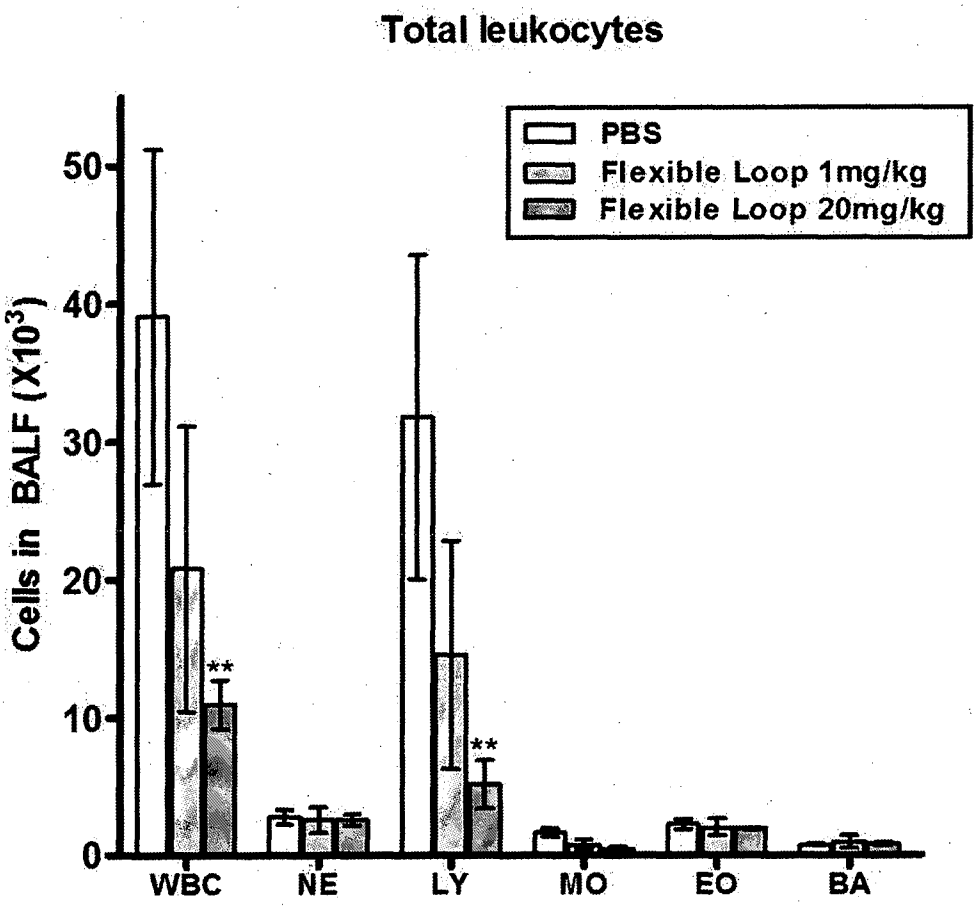
[도 18]



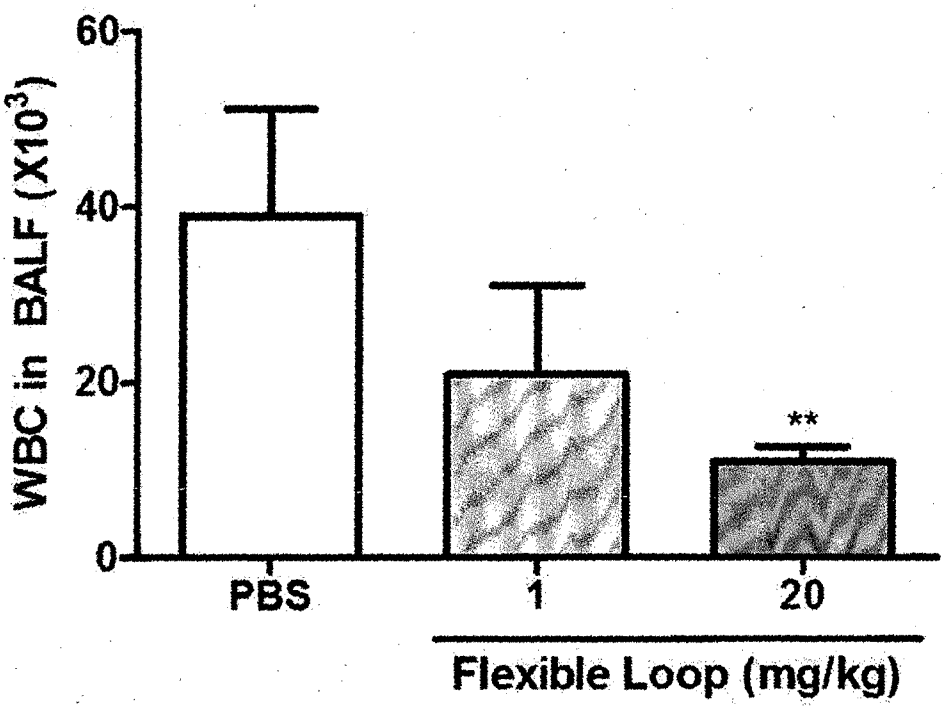
[도 19]


OVA specific IgE
Mean OD (450nm)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PBS
Flexible Loop
Helix 2

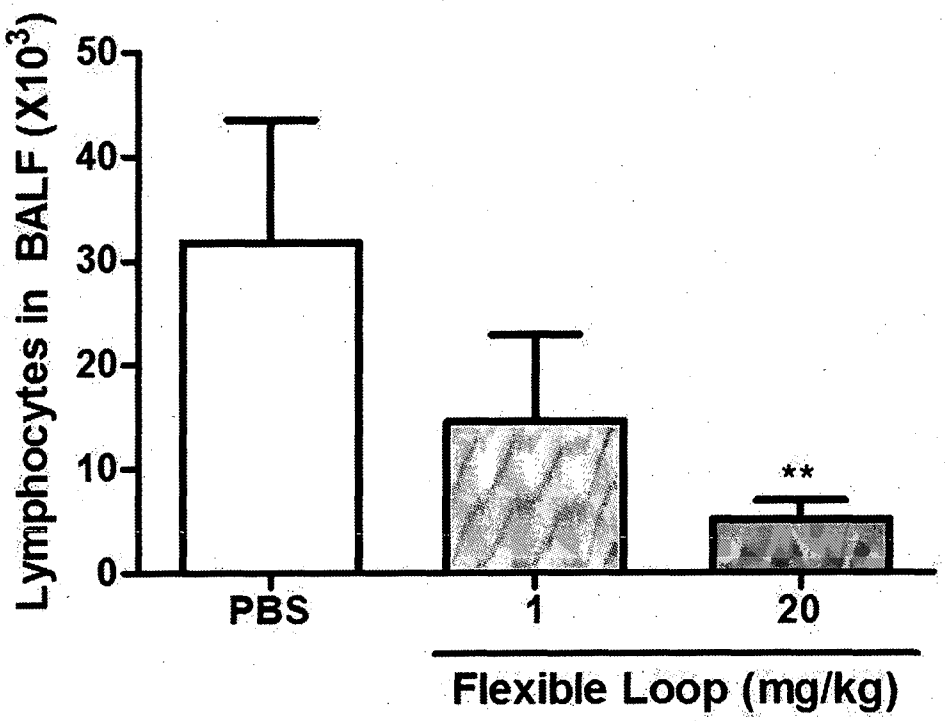
[도 20a]


Total leukocytes
PBS
Flexible Loop 1mg/kg
Flexible Loop 20mg/kg
Cells in BALF (X10³)
50
40
30
20
10
0
**
**
WBC
NE
LY
MO
EO
BA

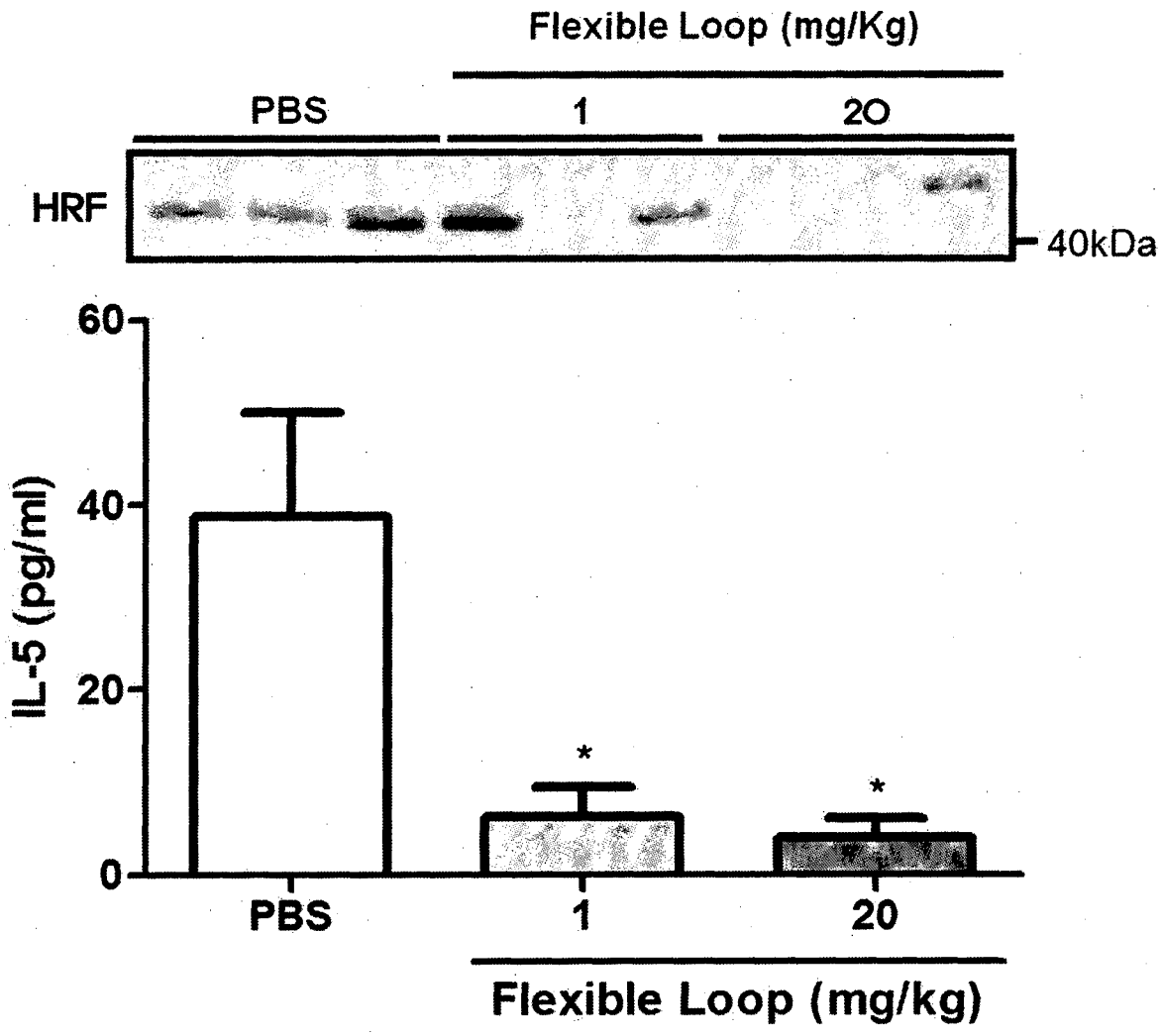
[도 20b]



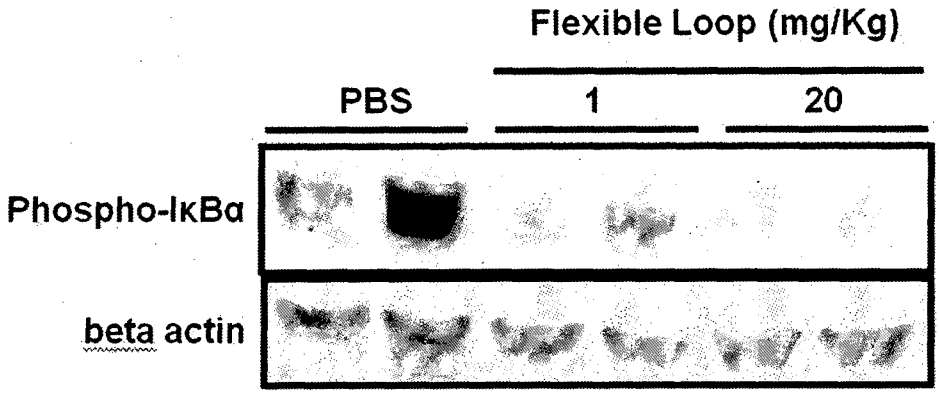
[도 20c]


Lymphocytes in BALF (X10^3)
50
40
30
20
10
0
**
PBS
1
20
Flexible Loop (mg/kg)

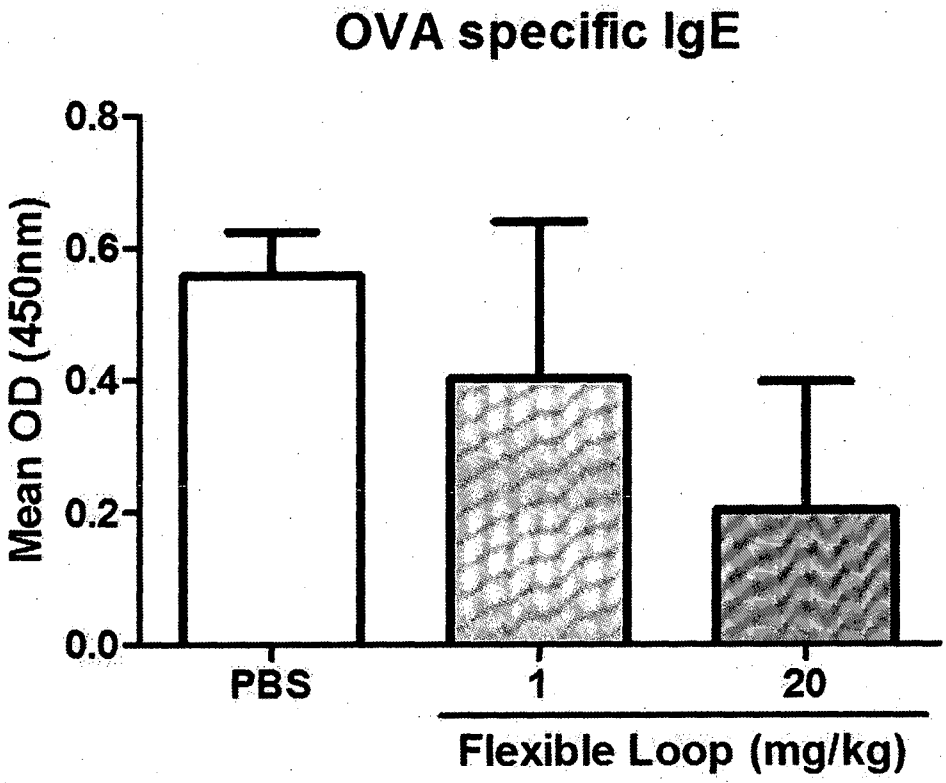
[도 21]


Flexible Loop (mg/Kg)
PBS
1
20
HRF
40kDa
60
40
20
0
IL-5 (pg/ml)
*
*
PBS
1
20
Flexible Loop (mg/kg)

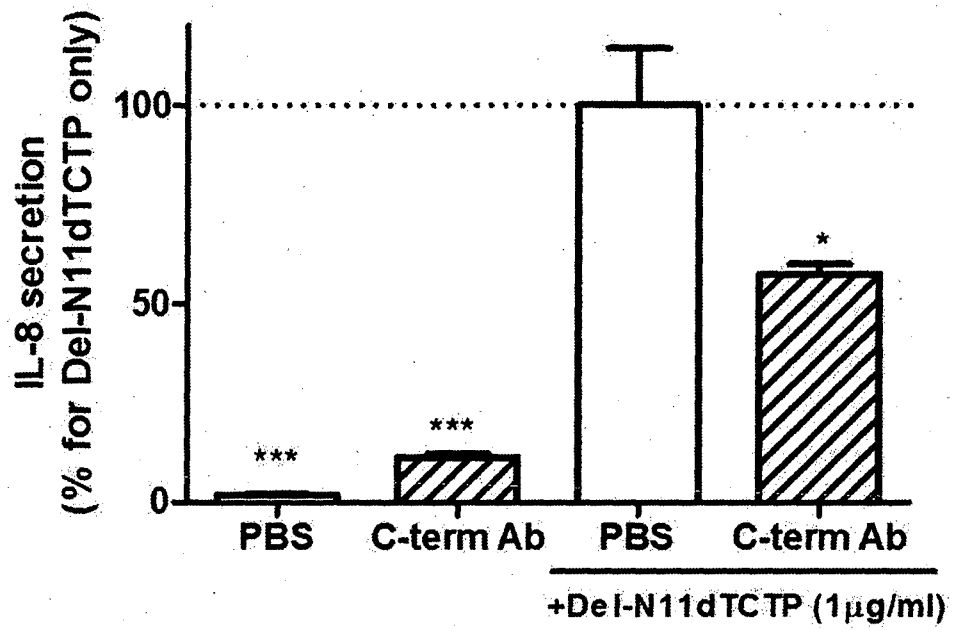
[도 22]



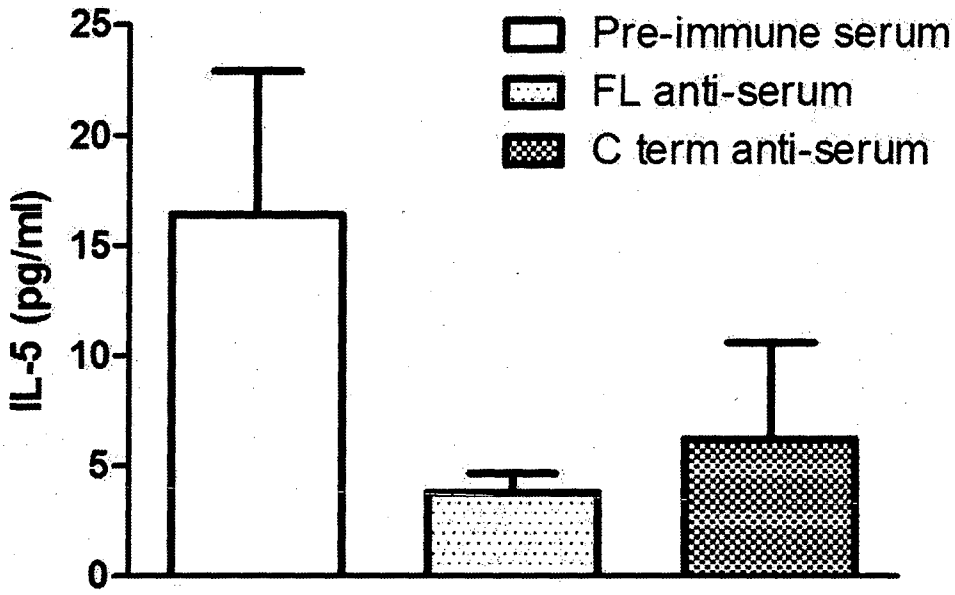
[도 23]


OVA specific IgE
Mean OD (450nm)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PBS
1
20
Flexible Loop (mg/kg)

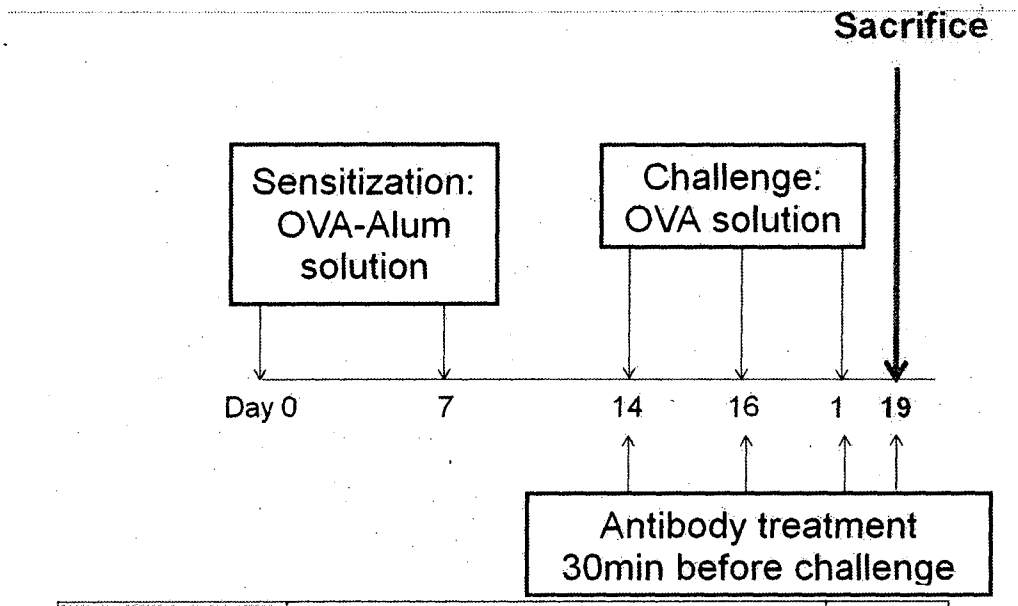
[도 24]


IL-8 secretion
(% for Del-N11dTCTP only)
100
50
0
***
***
*
PBS
C-term Ab
PBS
C-term Ab
+Del-N11dTCTP (1μg/ml)

[도 25]

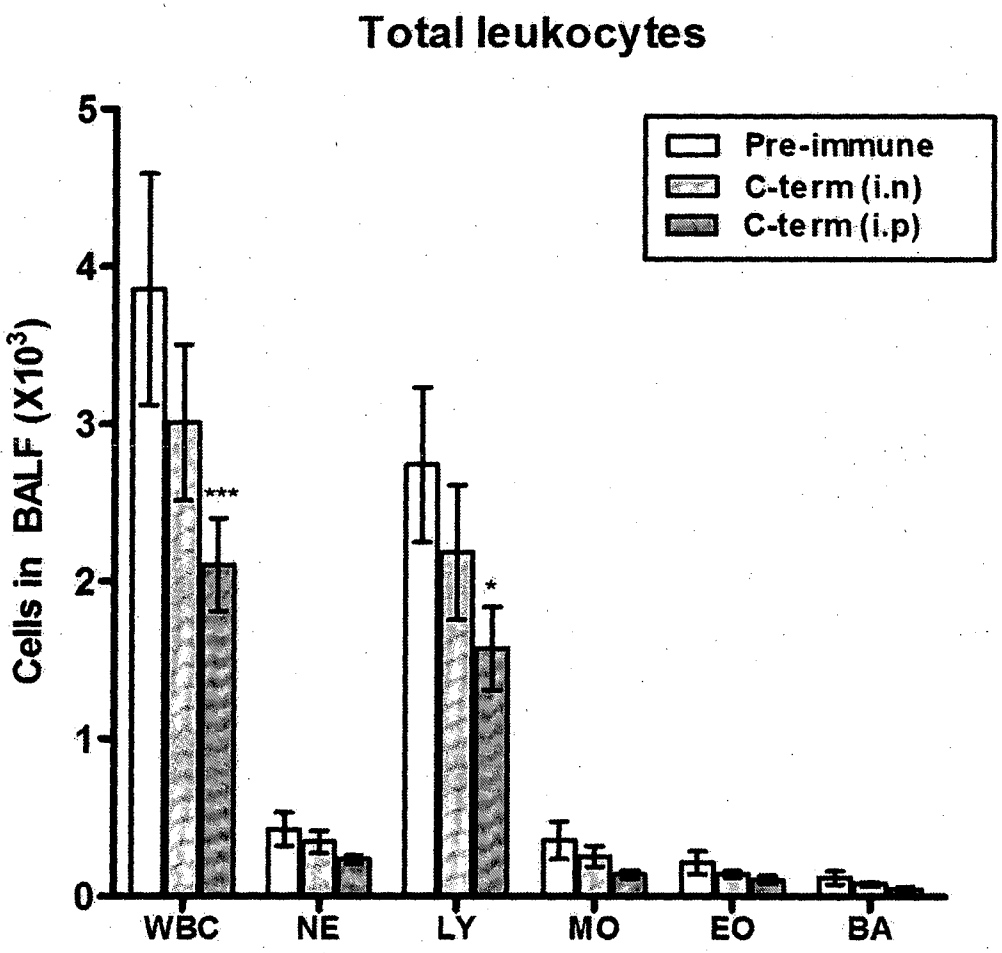

25
20
15
10
5
0
IL-5 (pg/ml)
Pre-immune serum
FL anti-serum
C term anti-serum

[도 26]

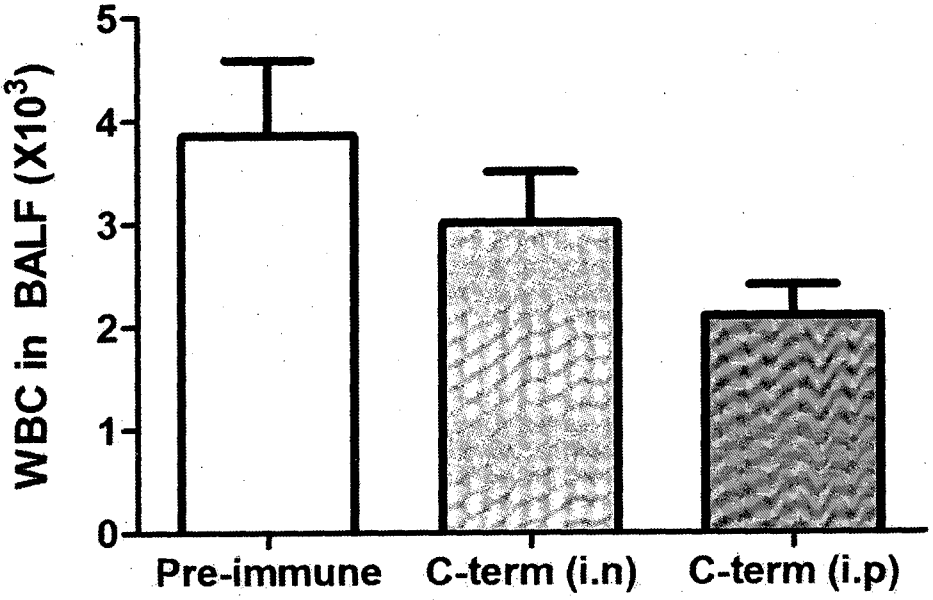


sensitization	100μg OVA + Alum 1.3mg per mouse	I.P.
challenge	200μg OVA per mouse	I.N.

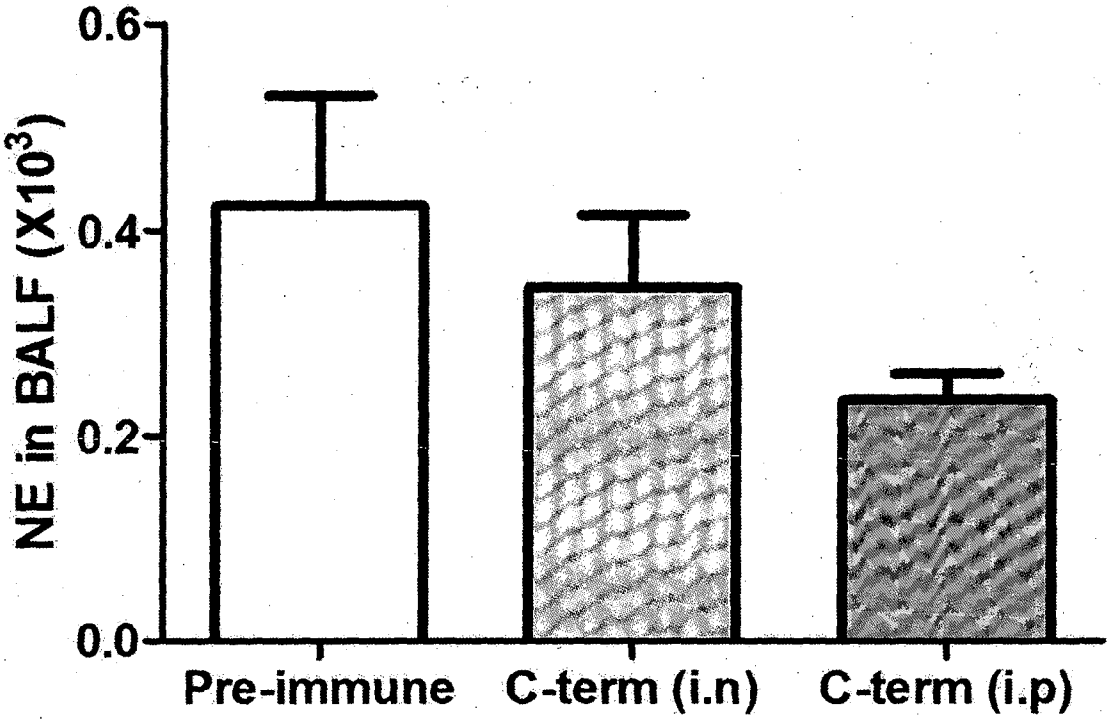
[도 27]


Total leukocytes
Pre-immune
C-term (i.n)
C-term (i.p)
Cells in BALF (X10^3)
5
4
3
2
1
0
***
*
WBC
NE
LY
MO
EO
BA

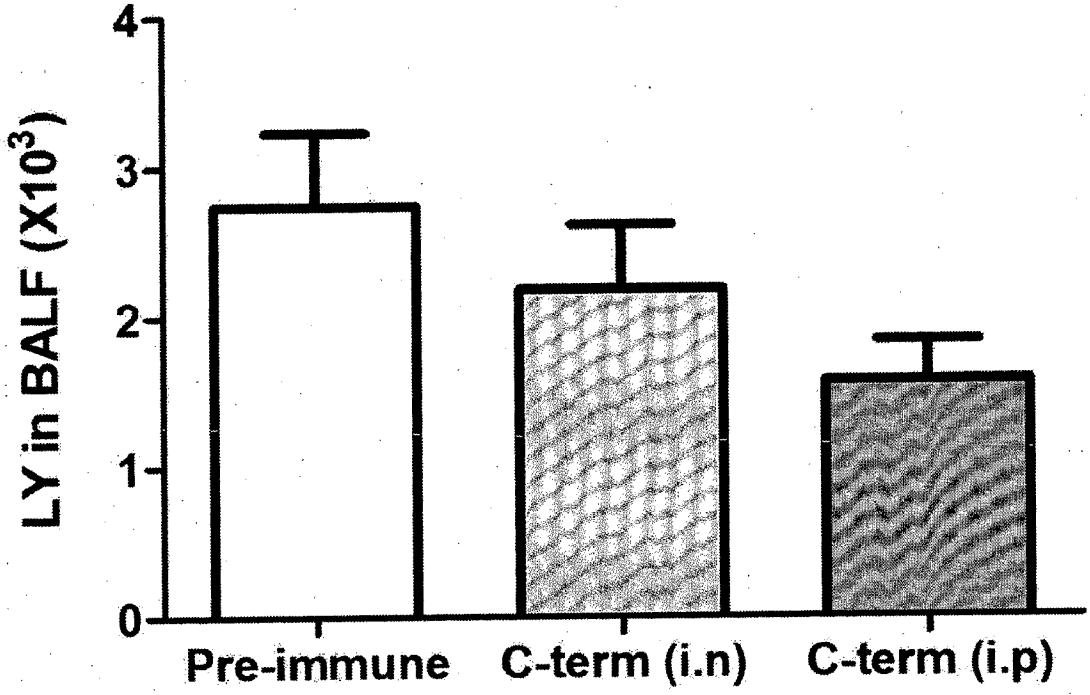
[도 28a]



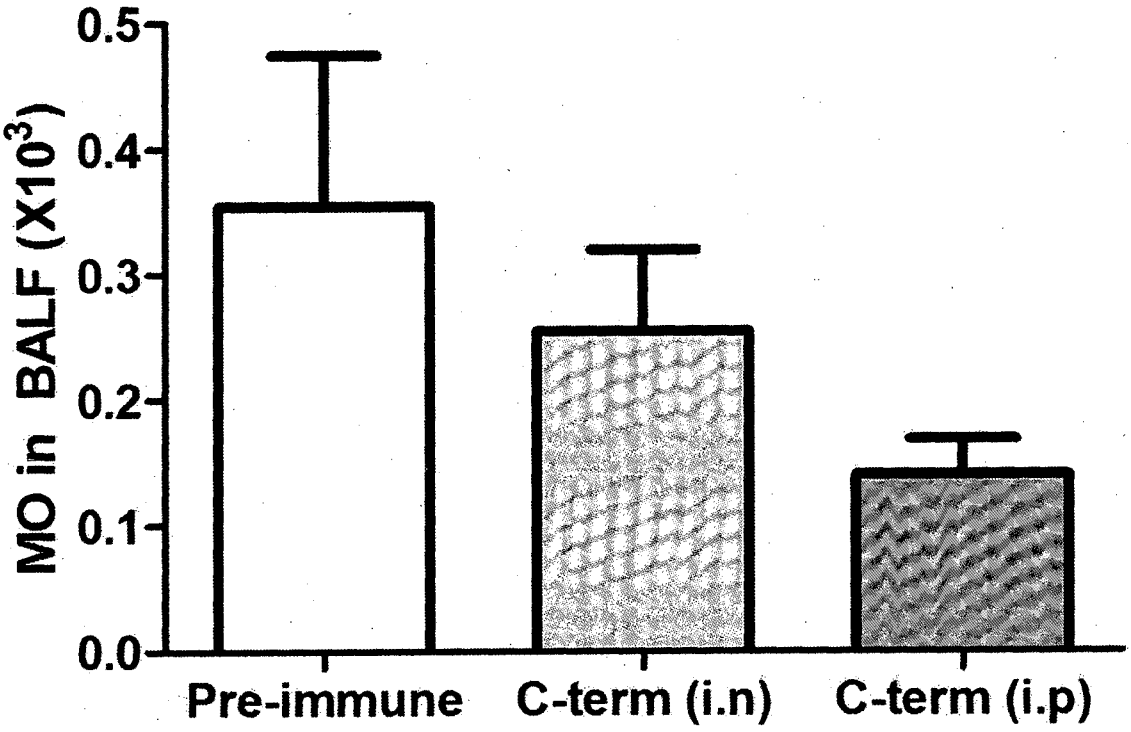
[도 28b]



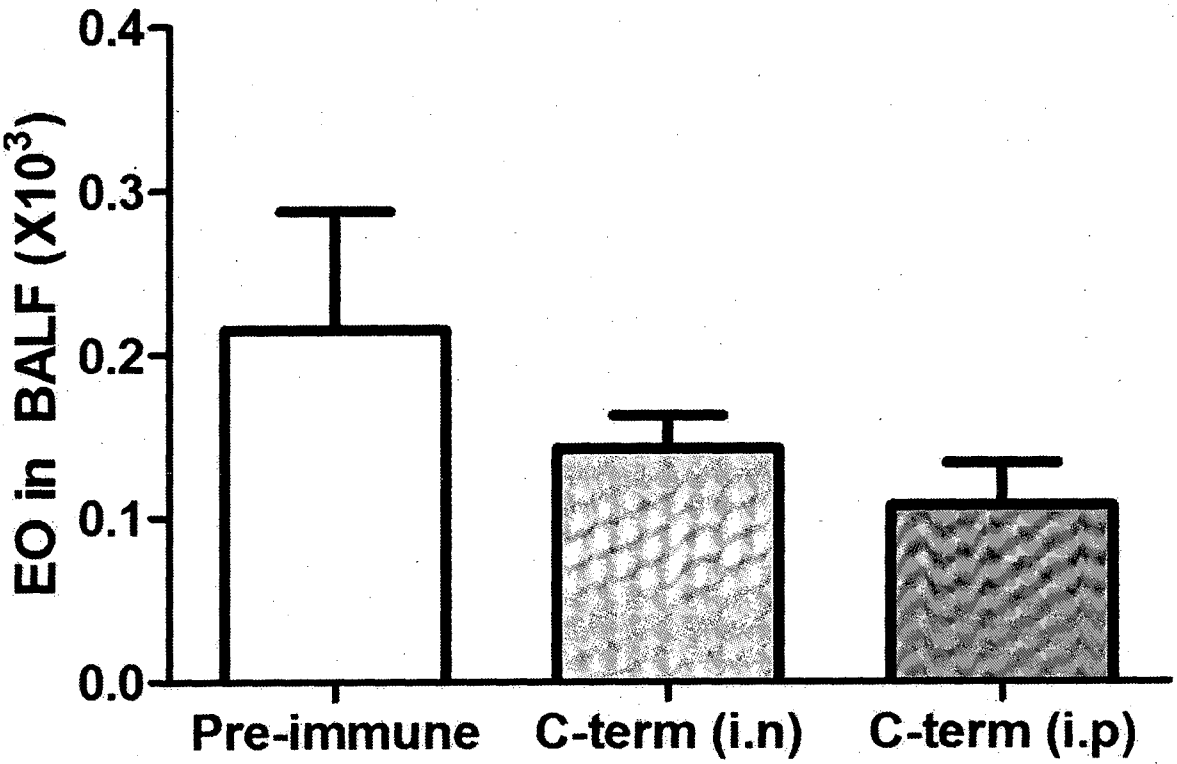
[도 28c]



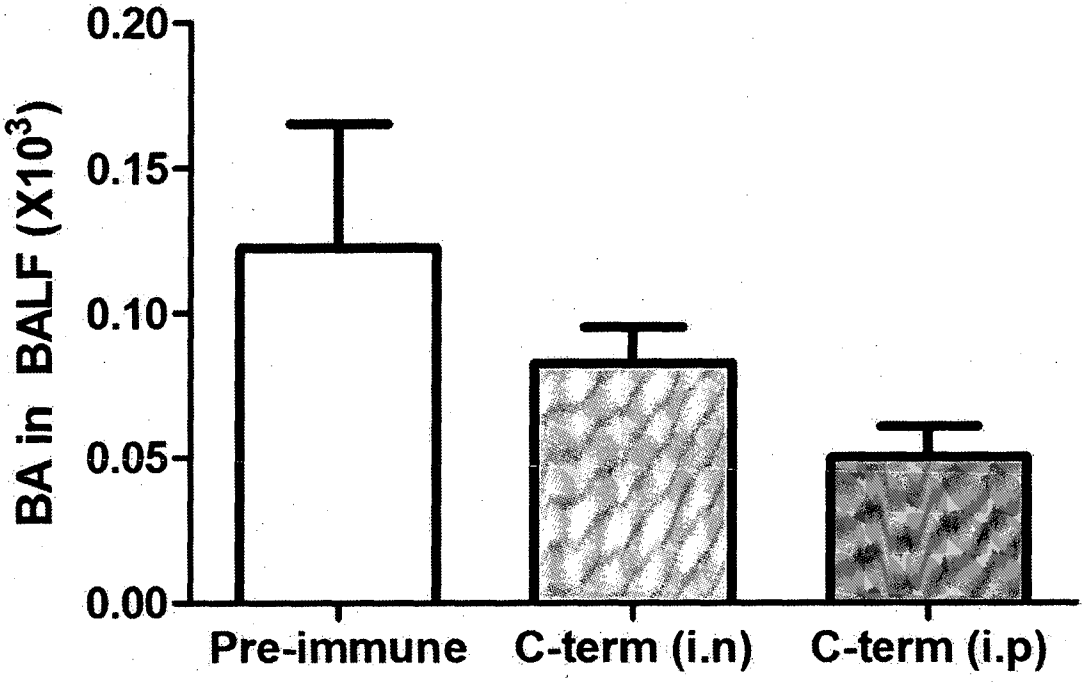
[도 28d]



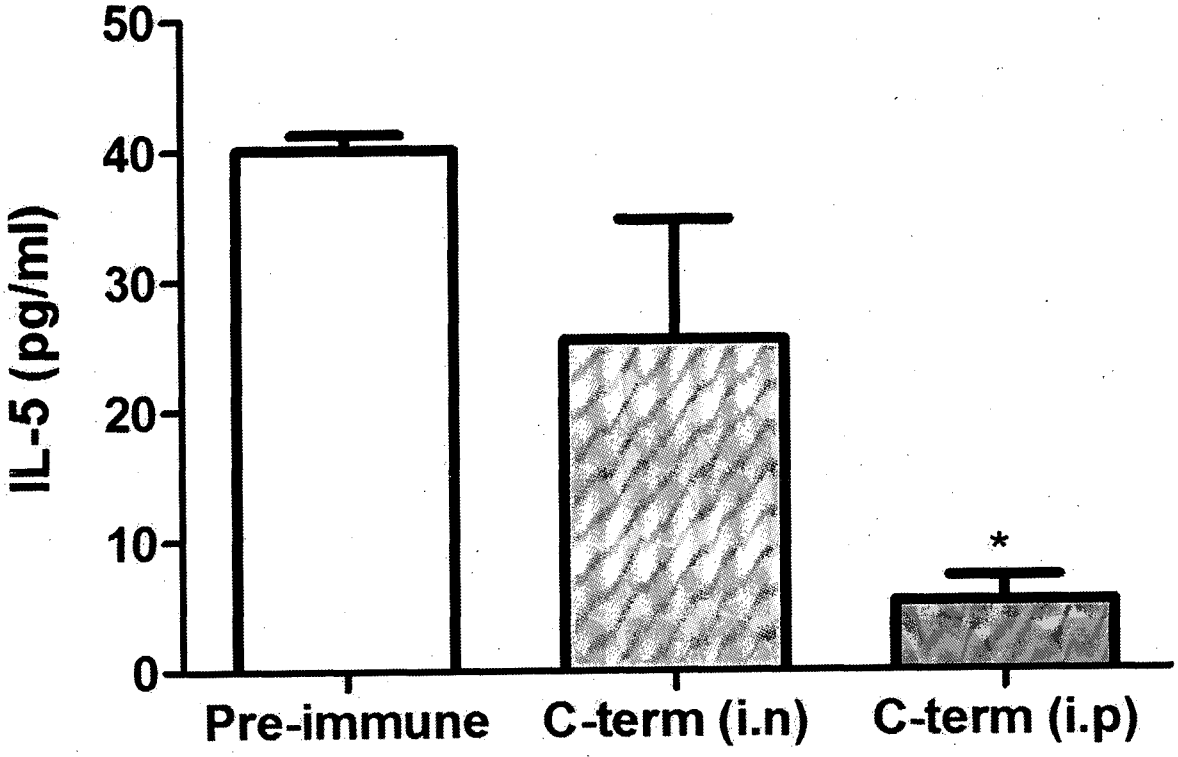
[도 28e]



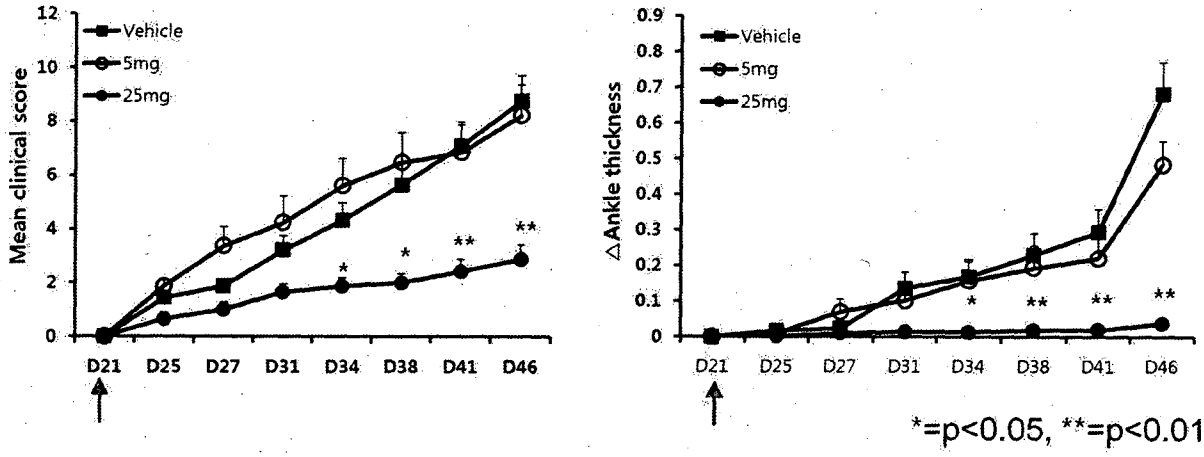
[도 28f]


0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
BA in BALF (X10^3)
Pre-immune
C-term (i.n)
C-term (i.p)

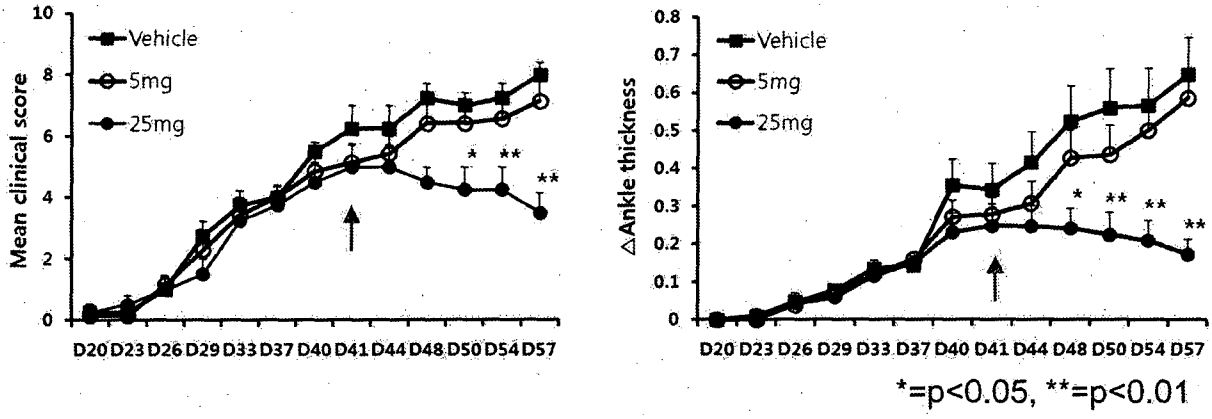
[도 29]



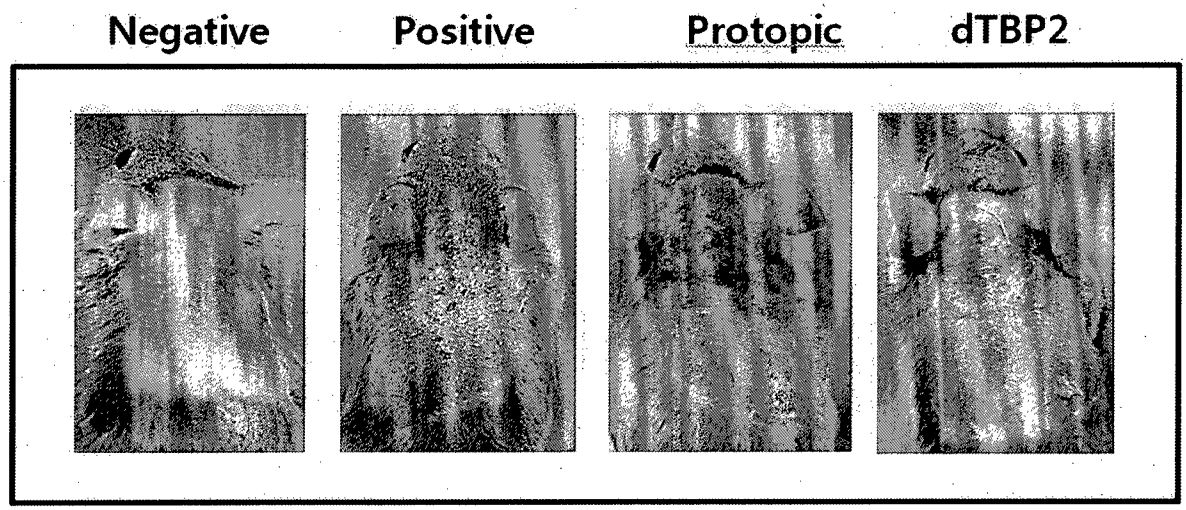
[도 30]


Mean clinical score
Vehicle
5mg
25mg
D21
D25
D27
D31
D34
D38
D41
D46
△Ankle thickness
*=p<0.05, **=p<0.01

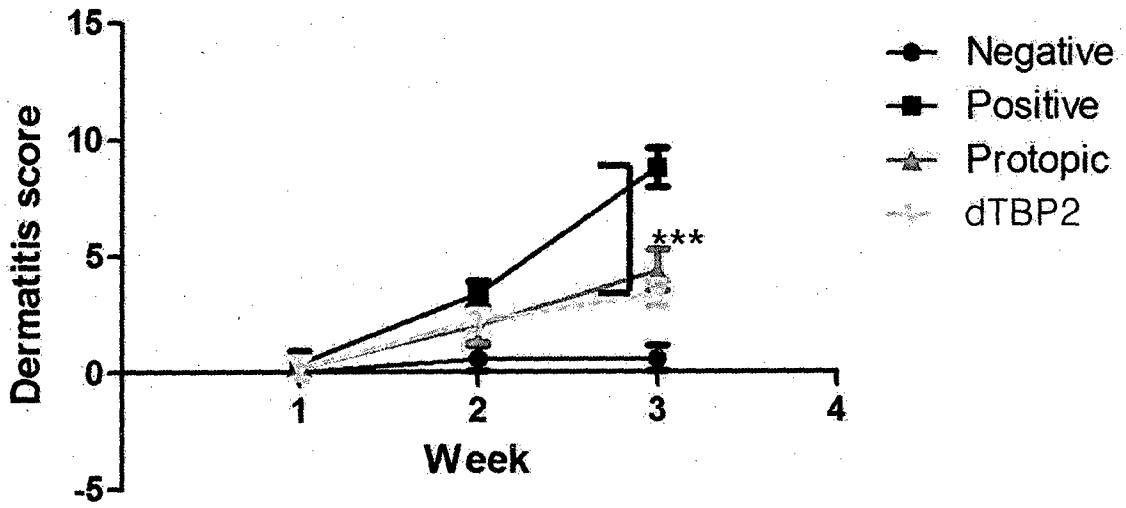
[도 31]


Mean clinical score
Vehicle
5mg
25mg
D20 D23 D26 D29 D33 D37 D40 D41 D44 D48 D50 D54 D57
△Ankle thickness
Vehicle
5mg
25mg
D20 D23 D26 D29 D33 D37 D40 D41 D44 D48 D50 D54 D57
*=p<0.05, **=p<0.01

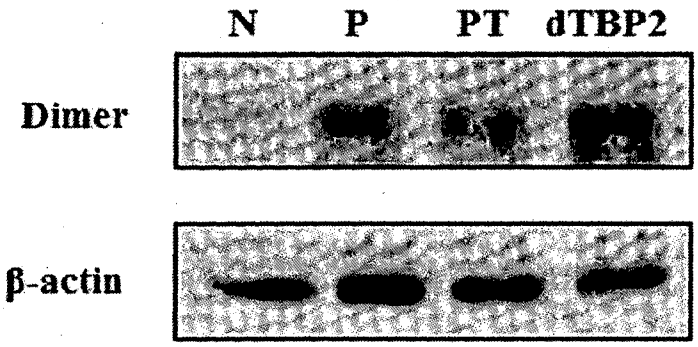
[도 32a]



[도 32b]

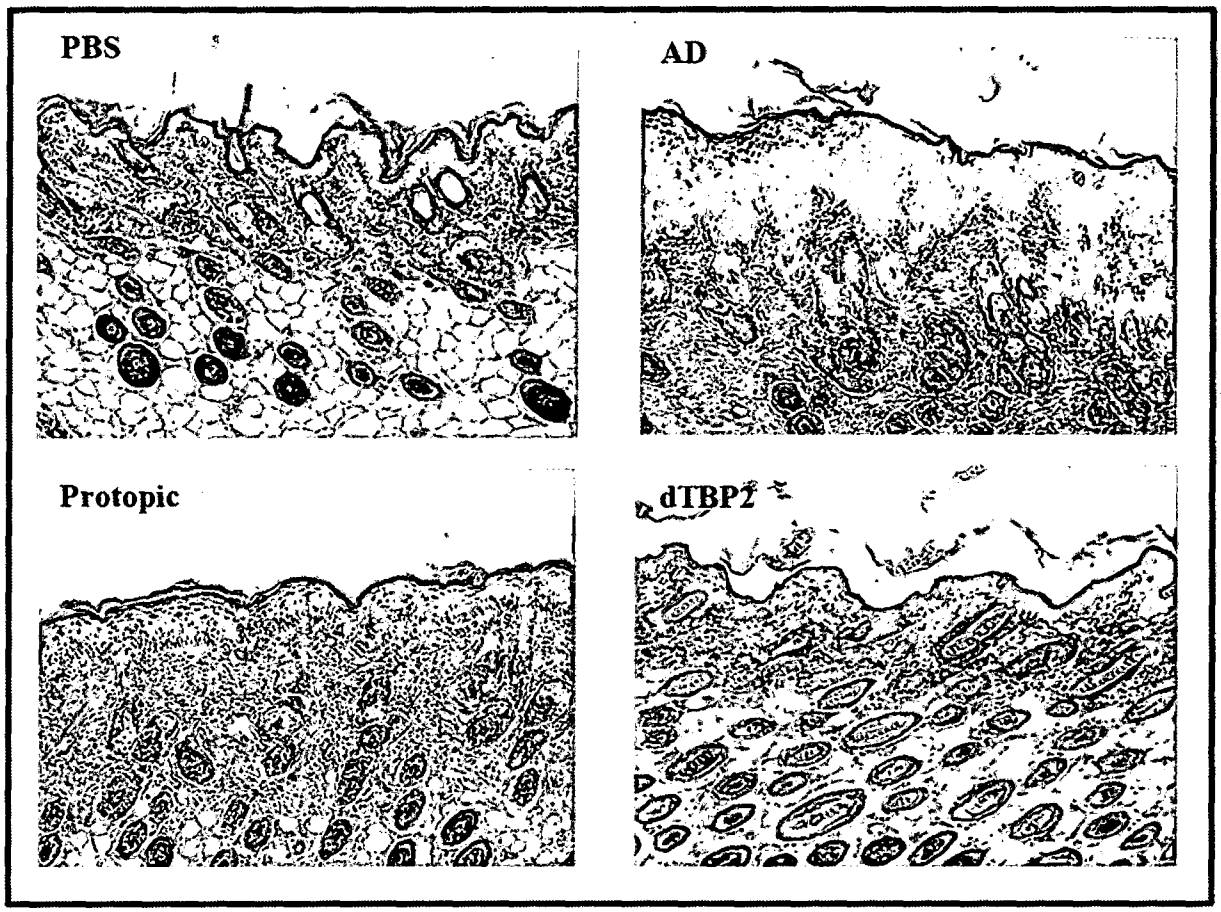

15
10
5
0
-5
Dermatitis score
1
2
3
4
Week
***
Negative
Positive
Protopic
dTBP2

[도 33]

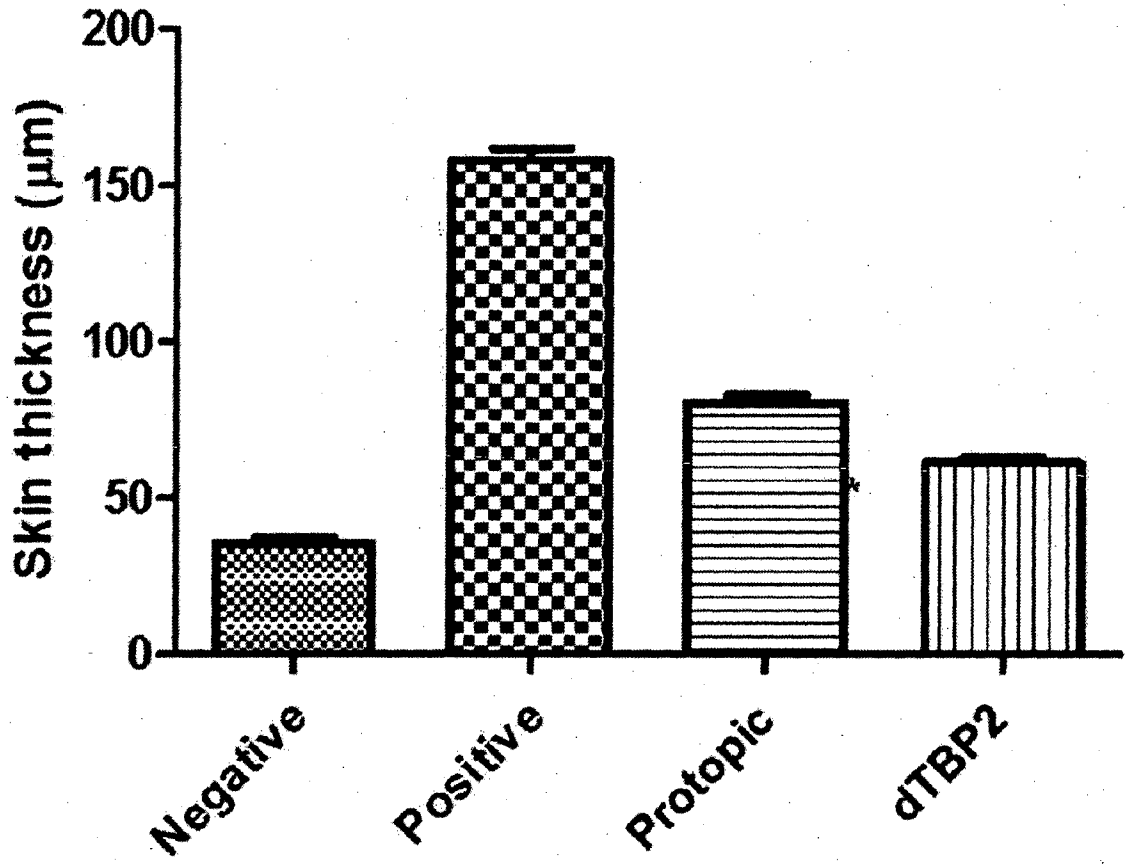


N; Negative, P; Positive, PT; Protopic, dTBP2; 7-mer peptide

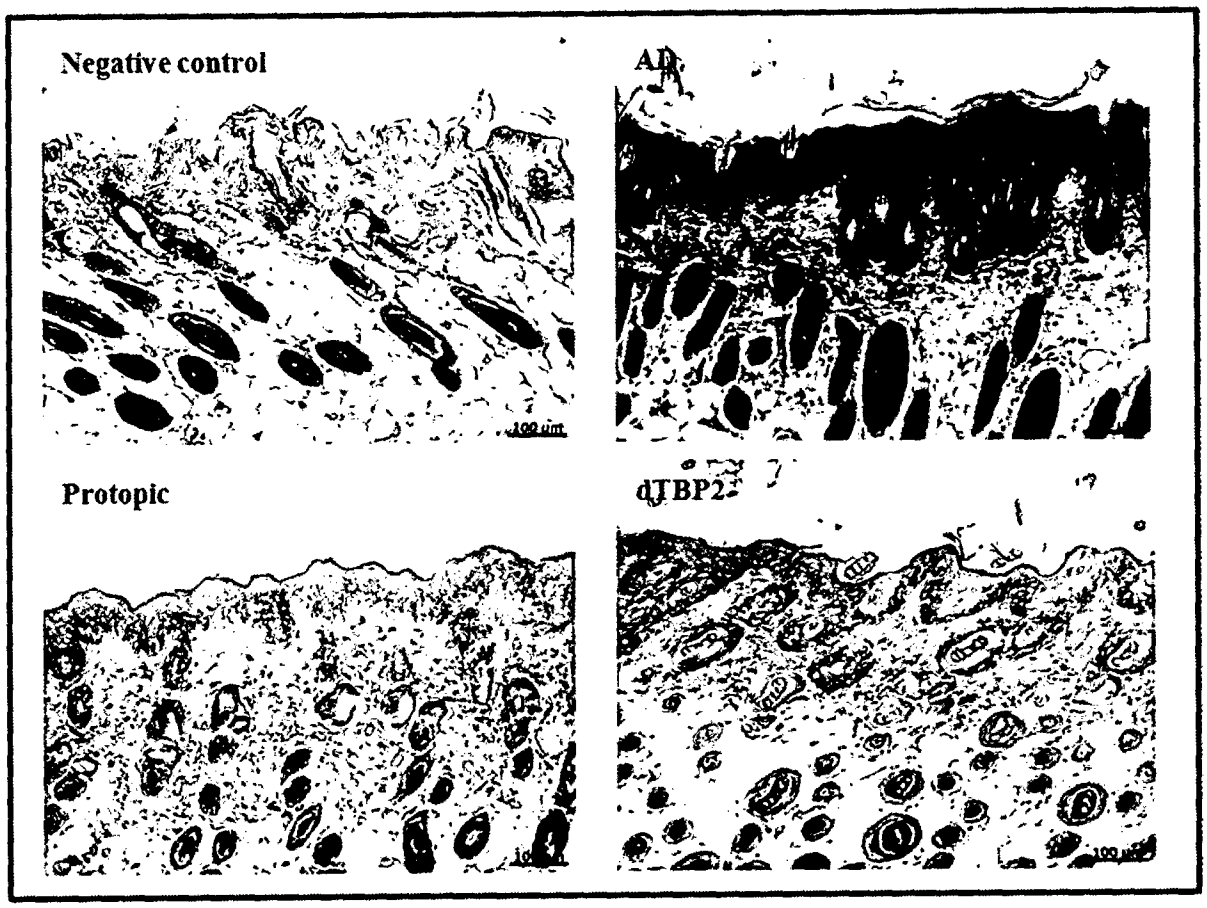
[도 34a]



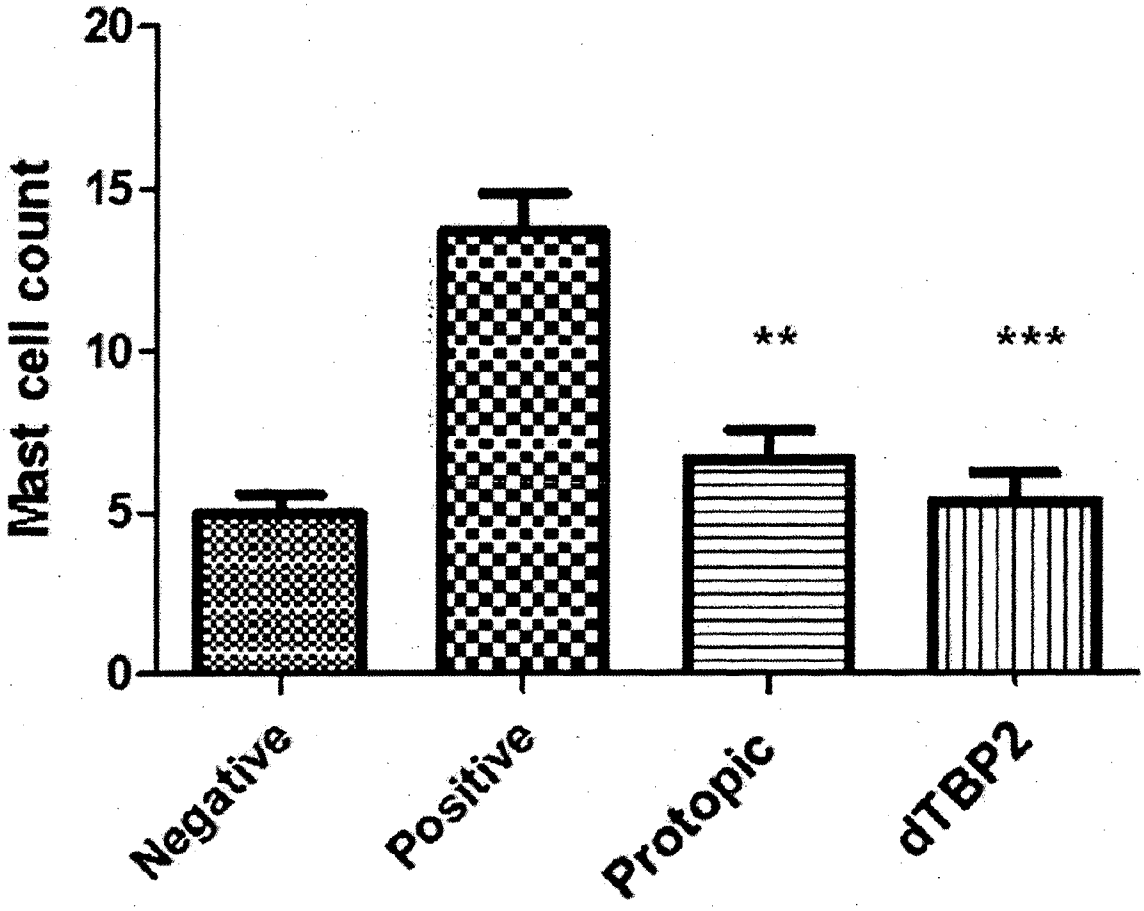
[도 34b]


Skin thickness (μm)
200
150
100
50
0
*
Negative
Positive
Protopic
dTBP2

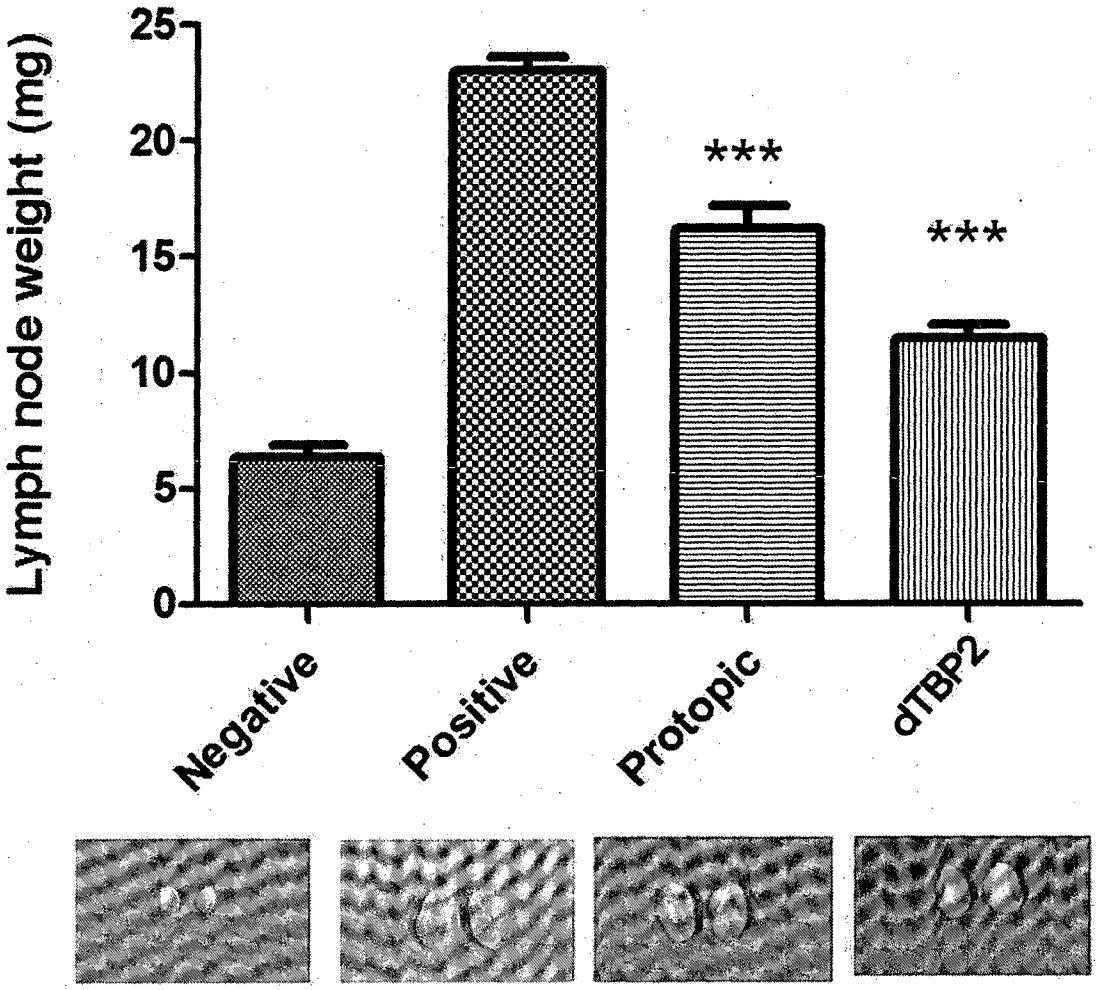
[도 34c]



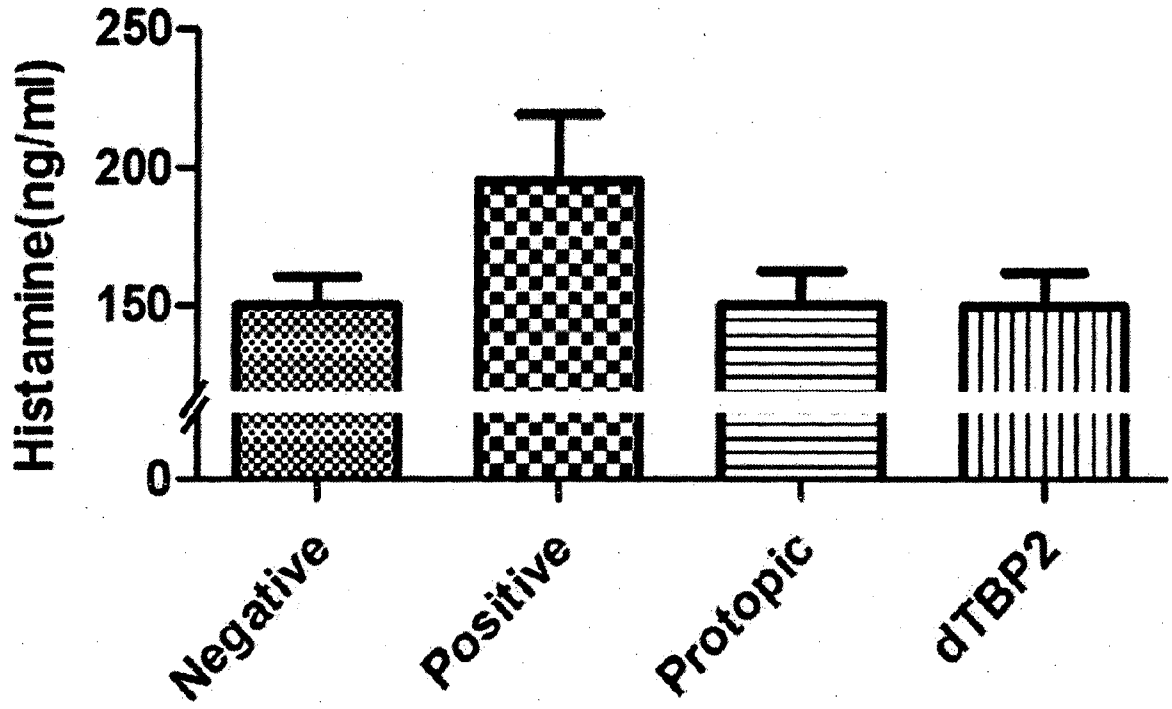
[도 34d]


Mast cell count
20
15
10
5
0
**
***
Negative
Positive
Protopic
dTBP2

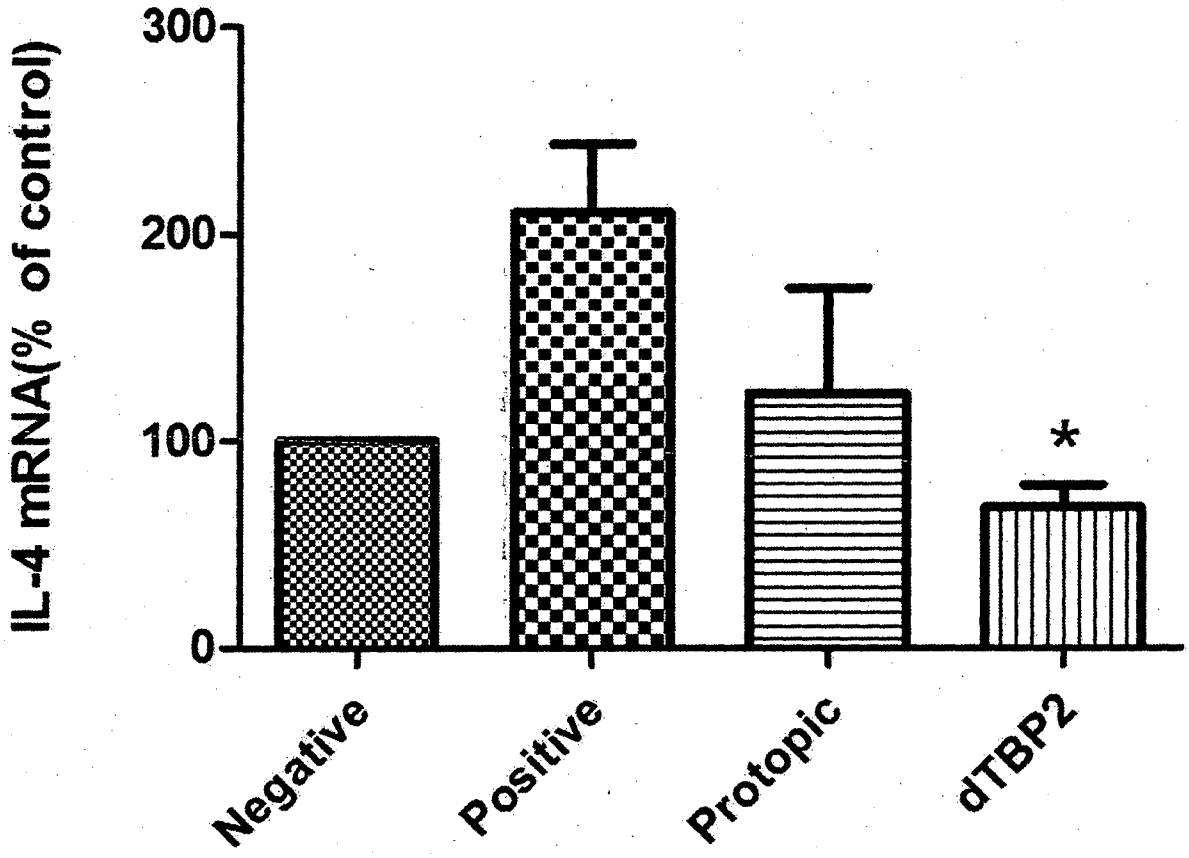
[도 35]


Lymph node weight (mg)
25
20
15
10
5
0
***
***
Negative
Positive
Protopic
dTBP2

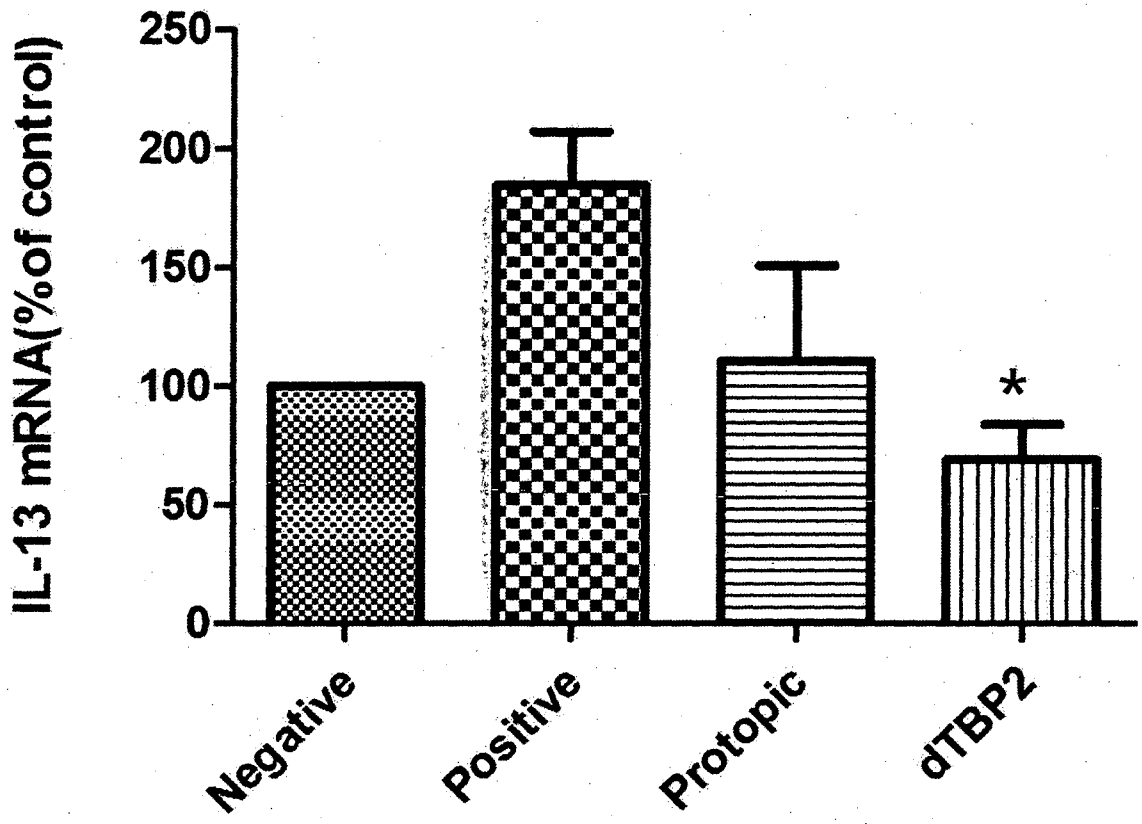
[도 36]


Histamine(ng/ml)
250
200
150
0
Negative
Positive
Protopic
dTBP2

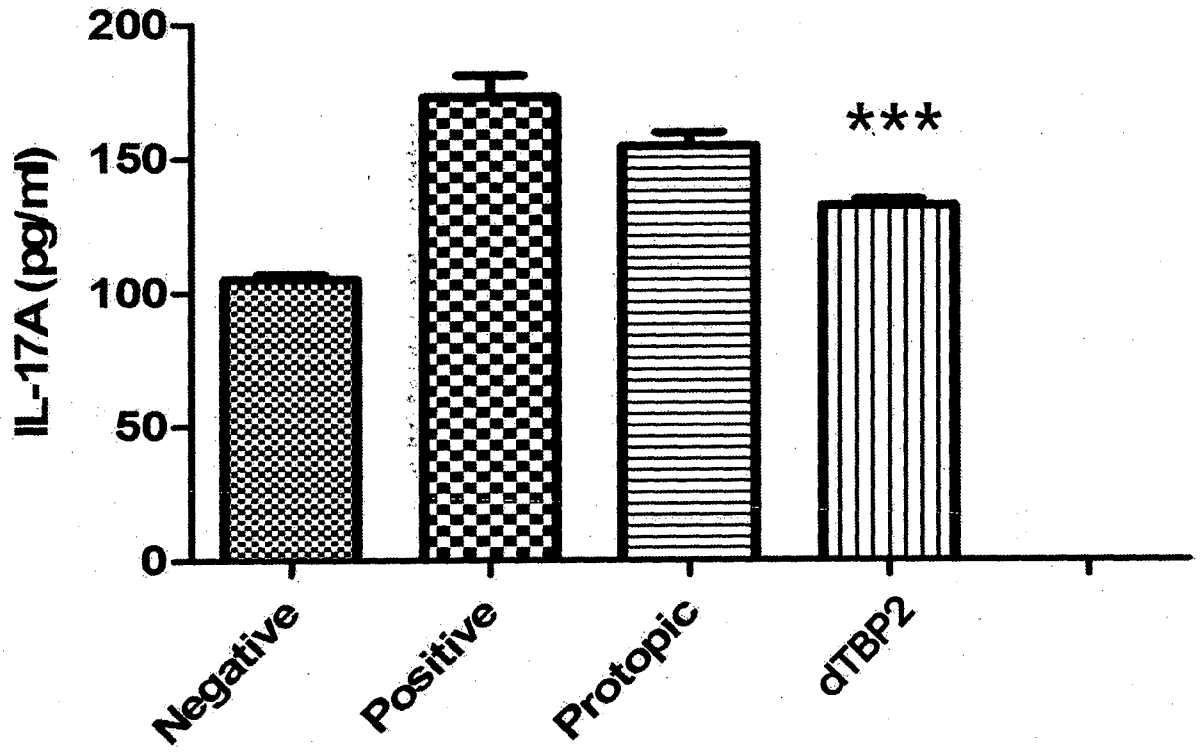
[도 37a]


IL-4 mRNA(% of control)
300
200
100
0
*
Negative
Positive
Protopic
dTBP2

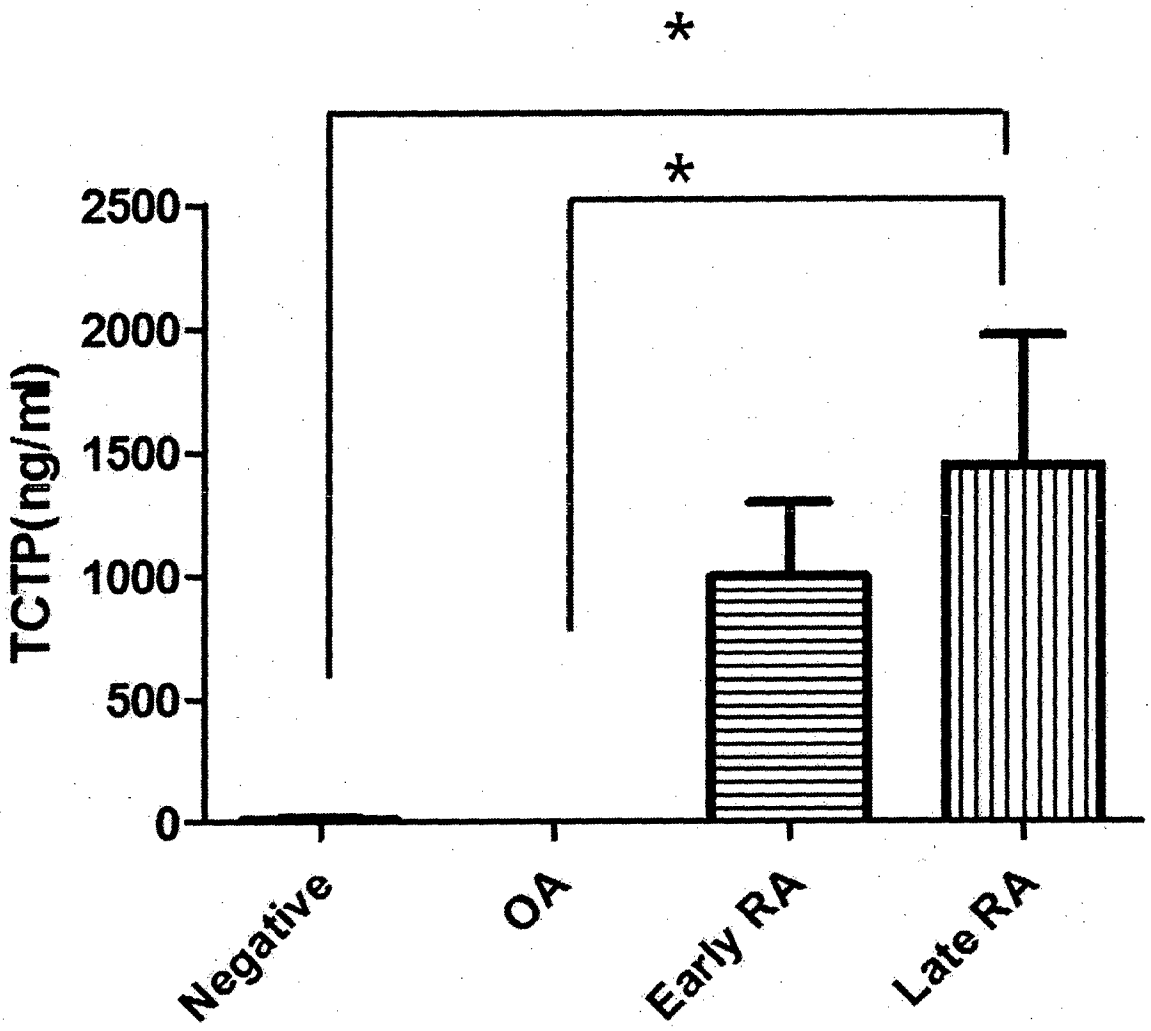
[도 37b]


IL-13 mRNA(%of control)
250
200
150
100
50
0
*
Negative
Positive
Protopic
dTBP2

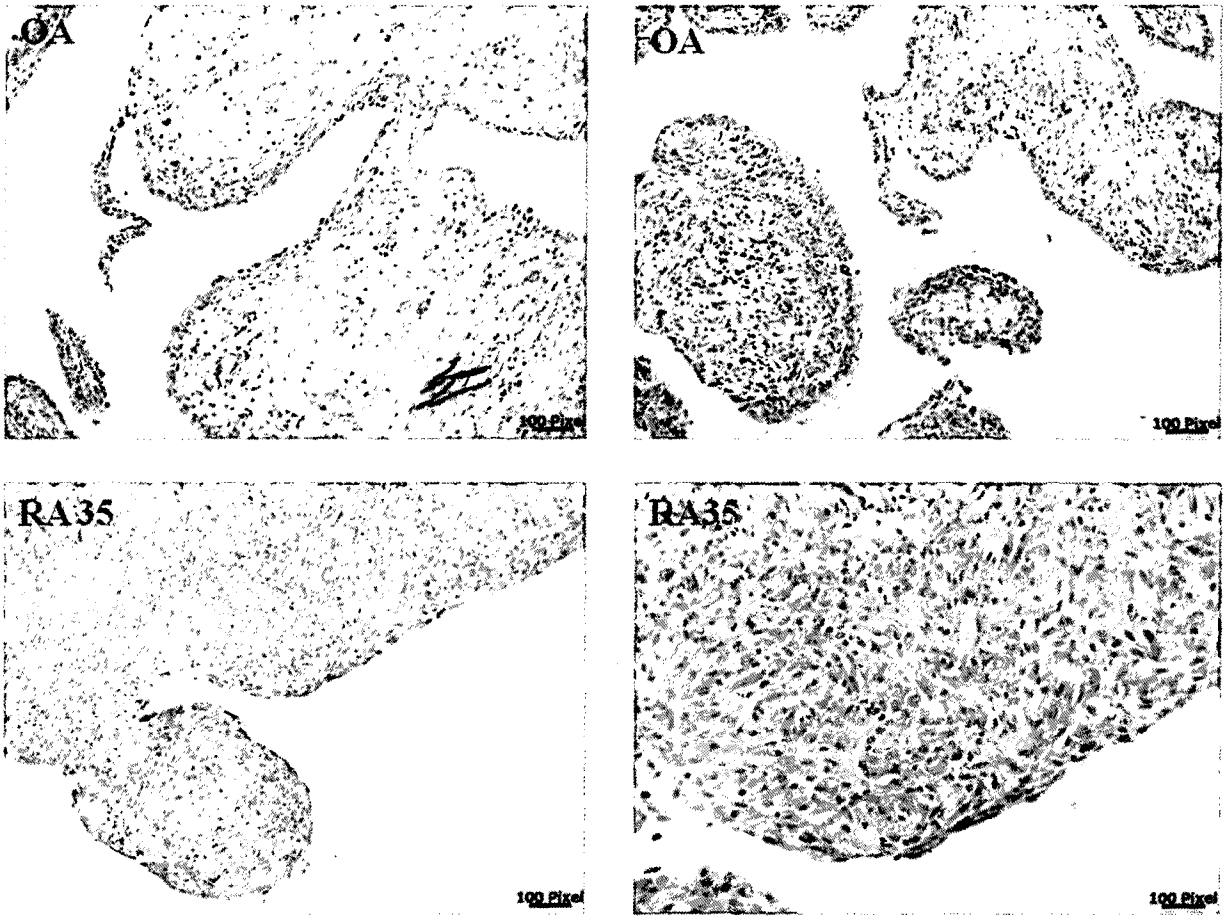
[도 38]


200
150
100
50
0
IL-17A (pg/ml)
***
Negative
Positive
Protopic
dTBP2

[도 39]


*
*
2500
2000
1500
1000
500
0
TCTP(ng/ml)
Negative
OA
Early RA
Late RA

[도 40]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/006088

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 27/14(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/16; A61K 39/395; C07K 16/22; C07K 16/18; A61P 29/00; A61P 27/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: TCTP dimer, HRF, FL domain, H2 domain, C-terminus, allergy, malaria, histamine, protein-protein interaction

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2006-0165677 A1 (LEE et al.) 27 July 2006 See abstract; paragraphs [0005], [0010], [0086], [0155], [0156]; claims 1-41; figure 1.	1,10,14-17,33 ,37-39 2-9,11-13,18-32 ,34-36
A	US 2013-0084293 A1 (LA JOLLA INSTITUTE FOR ALLERGY AND IMMU) 04 April 2013 See abstract; claims 2, 63, 64.	1-39
A	MACDONALD, "Potential role of histamine releasing factor (HRF) as a therapeutic target for treating asthma and allergy" Journal of Asthma and Allergy, Vol. 5, pp. 51-59 (2012) See the entire document.	1-39
A	KAWAKAMI et al., "Histamine-releasing factor and immunoglobulins in asthma and allergy" Allergy, Asthma & Immunology Research, Vol. 6, No. 1, pp. 6-12 (January 2014) See the entire document.	1-39
A	KASHIWAKURA et al., "Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy" The Journal of Clinical Investigation, Vol. 122, No. 1, pp. 218-228 (2012) See the entire document.	1-39

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 AUGUST 2015 (21.08.2015)	**24 AUGUST 2015 (24.08.2015)**
Name and mailing address of the ISA/**KR** Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/006088

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **40**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The feature indicated by the wording "a deletion form of histamine releasing factor (HRF) of the present invention or homo or hetero translationally controlled tumor protein (TCTP) dimer of the present invention" set forth in claim 40 is unclear, and thus clearly specifying the feature is difficult (PCT Article 6).

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/KR2015/006088

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2006-0165677 A1	27/07/2006	EP 1683866 A2	26/07/2006
		EP 1683866 A3	02/08/2006
		JP 2006-212029 A	17/08/2006
		JP 2010-158246 A	22/07/2010
		JP 4564926 B2	20/10/2010
		KR 10-0780255 B1	28/11/2007
		KR 10-2006-0086867 A	01/08/2006
		US 7772368 B2	10/08/2010
US 2013-0084293 A1	04/04/2013	US 2015-0037330 A1	05/02/2015
		WO 2011-123697 A2	06/10/2011
		WO 2011-123697 A3	01/12/2011

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/006088

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 27/14(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 38/16; A61K 39/395; C07K 16/22; C07K 16/18; A61P 29/00; A61P 27/14

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: TCTP 이량체, HRF, FL 도메인, H2 도메인, C-말단, 알레르기, 말라리아, 히스타민, 단백질-단백질 상호작용

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	US 2006-0165677 A1 (LEE 등) 2006.07.27. 요약; 단락 [0005], [0010], [0086], [0155], [0156]; 청구항 1-41; 도면 1 참조.	1,10,14-17,33 ,37-39 2-9,11-13,18-32 ,34-36
A	US 2013-0084293 A1 (LA JOLLA INSTITUTE FOR ALLERGY AND IMMU) 2013.04.04. 요약; 청구항 2, 63, 64 참조.	1-39
A	MACDONALD, 'Potential role of histamine releasing factor (HRF) as a therapeutic target for treating asthma and allergy' Journal of Asthma and Allergy, Vol.5, pp.51-59 (2012) 전체 문헌 참조.	1-39
A	KAWAKAMI 등, 'Histamine-releasing factor and immunoglobulins in asthma and allergy' Allergy, Asthma & Immunology Research, Vol.6, No.1, pp.6-12 (2014.01) 전체 문헌 참조.	1-39
A	KASHIWAKURA 등, 'Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy' The Journal of Clinical Investigation, Vol.122, No.1, pp.218-228 (2012) 전체 문헌 참조.	1-39

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2015년 08월 21일 (21.08.2015)	2015년 08월 24일 (24.08.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/006088

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☒ 청구항: 40
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 40의 "본 발명의 결실형 HRF 또는 본 발명의 동형 또는 이형 TCTP 이량체"가 가리키는 구성이 불명료하여 청구 범위를 명확하게 특정하기 곤란합니다(PCT 제6조).

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/006088

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2006-0165677 A1	2006/07/27	EP 1683866 A2	2006/07/26
		EP 1683866 A3	2006/08/02
		JP 2006-212029 A	2006/08/17
		JP 2010-158246 A	2010/07/22
		JP 4564926 B2	2010/10/20
		KR 10-0780255 B1	2007/11/28
		KR 10-2006-0086867 A	2006/08/01
		US 7772368 B2	2010/08/10
US 2013-0084293 A1	2013/04/04	US 2015-0037330 A1	2015/02/05
		WO 2011-123697 A2	2011/10/06
		WO 2011-123697 A3	2011/12/01