



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0101145
(43) 공개일자 2021년08월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61P 33/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0013944

(22) 출원일자 2021년02월01일

심사청구일자 2021년02월01일

(30) 우선권주장

1020200014941 2020년02월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

이경림

서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학교 약학대학약학관 B동 112호

서혜란

서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학교 약학대학 약학관 B동 111호

편혜준

서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학교 약학대학약학관 B동 111호

(74) 대리인

이원희

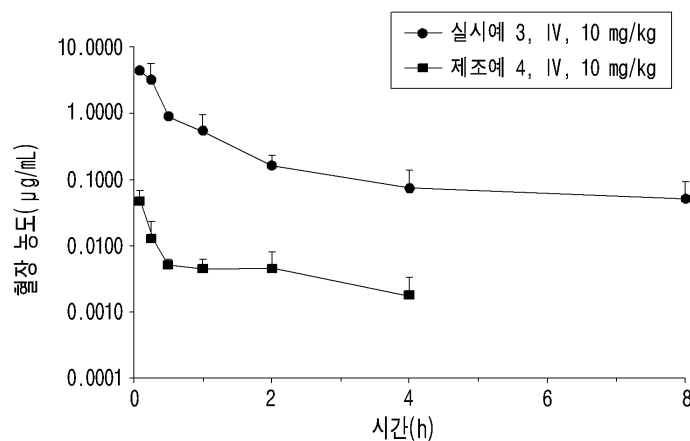
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 폐길화된 IgE-의존적 히스타민 방출인자(HRF) 결합 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

변형(modification)된 HRF 결합 펩타이드에 관한 것으로, 본 발명에 따른 변형(modification)된 HRF 결합 펩타이드는 생체 내에서 높은 안정성을 가지고 약효를 발휘할 수 있으며, 높은 반감기로 인해 투약 횟수를 줄일 수 있으므로 약물로서 유용하게 사용될 수 있으며, 세포 내에서 히스타민 분비를 효과적으로 저해함으로써, 동물은 물론 인간의 알러지, 말라리아, 자가 면역 질환, 급성 또는 만성 염증성 질환, 고혈압, 암을 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도26



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 33/06 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119656
과제번호	2020M3E5E2036808
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신약분야원천기술개발(R&D)
연구과제명	만성 염증성 질환의 유발인자인 이량체 TCTP를 타겟으로 하는 신규 PEGylated
peptide 치료제 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.07.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

폐길화된 HRF 결합 펩타이드로서,

상기 HRF 결합 펩타이드는,

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; 및

일곱 번째 아미노산은 A, P 및 M로 구성된 군으로부터 선택되는 일련의 아미노산 서열로 이루어지는 것이고; 및

상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드는 HRF 펩타이드에 폴리에틸렌글리콜이 결합된, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폴리에틸렌글리콜 또는 이의 유도체의 분자량은, 1 kDa 내지 50 kDa인 것을 특징으로 하는, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 결합은 HRF 결합 펩타이드의 카르복실기 또는 아미노기에 폴리에틸렌글리콜이 공유결합된 것을 특징으로 하는, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 폴리에틸렌글리콜은 말단에 알데하이드기, 카르복실기, 아미노기 또는 하이드라지드기를 포함하는 관능기가 결합된 것을 특징으로 하는, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 폴리에틸렌글리콜 또는 이의 유도체는 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 접합되는 것을 특징으로 하는, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 HRF 결합 펩타이드는,
아미노산 서열 W-Y-V-Y-P-S-M으로 이루어진 것을 특징으로 하는, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 7

제1항에 있어서,
IL-8 분비 억제 효능이 있는 것을 특징으로 하는, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 8

제1항에 있어서,
호산구(Eosinphil) 증가 억제 효능이 있는 것을 특징으로 하는, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 9

제1항에 있어서,
IL-5 분비 억제 효능이 있는 것을 특징으로 하는, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 10

제1항에 있어서,
IL-4 분비 억제 효능이 있는 것을 특징으로 하는, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 11

제1항에 있어서,
IL-13 분비 억제 효능이 있는 것을 특징으로 하는, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 12

제1항에 있어서,
오발부민(Ovalbumin) 특이적 IgE 분비 억제 효능이 있는 것을 특징으로 하는, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 알러지 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

천식; 비염; 아토피; 담마진; 아나필락시스; 알러지성 기관지 확장증; 음식, 약물, 화분 또는 벌레로 인한 알러지; 알레르기성 결막염; 헤이 피버; 한냉두드러기; 또는 아토피성 피부염의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 말라리아 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

열대열 말라리아(*Plasmodium falciparum*); 삼일열 말라리아(*Plasmodium vivax*); 난원형 말라리아(*Plasmodium ovale*); 또는 사일열 말라리아(*Plasmodium malariae*)의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 자가 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서,

류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis); 쇼그렌 증후군(Sjogren's disease); 전신 경화증(systemic sclerosis); 다발성 근염(polymyositis); 전신성 혈관염(systemic angitis); 혼합결합조직병(mixed connective tissue disease); 크론병(Crohn's disease); 하시모토병(Hashimoto's disease); 그레이브스병(Grave's disease); 굿파스투어 증후군(Goodpasture's syndrome); 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrom); 특발성 혈소판 감소성 자반증; 과민성 장 증후군; 중증 근무력증; 기면증; 심상성천포창; 악성 빈혈; 원발성 담즙성 간경변증; 궤양성 대장염; 혈관염; 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis); 건선(Psoriasis); 원형탈모증; 류마티스 열(Rheumatic fever); 루푸스(Systemic lupus erythematosus); 또는 다발성 경화증(Multiple Sclerosis)의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 급성 또는 만성 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

결막염, 치주염; 비염; 중이염; 인후염; 편도염; 피부염; 위염; 대장염; 강직성 척추염; 건선관절염; 골관절염; 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis); 건관절주위염; 건염; 건조염; 건주위염; 근육염; 간염; 방광염; 신장염; 폐렴; 위궤양; 크론병(Crohn's disease); 쇼그렌 증후군(Sjogren's disease); 통풍(gout); 섬유성근육통(fibromyalgia); 낭창(lupus); 활액낭염(bursitis); 또는 전신 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus)의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 고혈압의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서,

구강암; 간암; 위암; 결장암; 유방암; 폐암; 골암; 췌장암; 피부암; 두경부암; 피부암; 자궁경부암; 난소암; 대장암; 소장암; 직장암; 나팔관암; 항문부근암; 자궁내막암; 질암; 음문암; 호지킨병(Hodgkin's disease); 식도암; 임파선암; 방광암; 담낭암; 내분비선암; 갑상선암; 부갑상선암; 부신암; 연조직 육종; 요도암; 음경암; 전립선암; 만성 백혈병; 급성 백혈병; 림프구 림프종; 신장암; 수뇨관암; 신장세포 암; 신장골반암; 중추신경계 종양; 1차 중추신경계 림프종; 척수 종양; 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종의 예방 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 폐길화된 IgE-의존적 히스타민 방출인자(HRF) 결합 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 염증성 질환이란 만성 혹은 급성 염증에 의해 발생하는 병리적 상태를 의미하며 면역계의 이상으로 유발되기도 한다. 염증은 물리적인 외상, 유해한 화학물질, 미생물에 의한 감염이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 의하여 야기되는 조직손상에 대하여 국소적으로 나타나는 정상적이고 보호적인 생체 내 방어기전의 발현이다. 이러한 염증은 손상조직과 이동하는 세포(migrating cells)로부터 생산되는 다양한 화학 매개 인자에 의하여 촉발되며, 이들 화학매개인자들은 염증 과정의 형태에 따라 다양한 것으로 알려져 있다. 정상적인 경우에 생체는 염증반응을 통하여 발병 요인을 중화시키거나 제거하고 상한 조직을 재생시켜서 정상적인 구조와 기능을 회복시키지만, 그렇지 못한 경우에는 만성 염증과 같은 질병 상태로 진행되기도 한다. 또한, 꽃가루와 같이 무해한 물질이나 천식, 류마티스성 관절염, 건선과 같은 자가면역반응에 의해 부적절하게 염증이 촉발되는 경우에는 방어 반응 자체가 오히려 조직을 손상시킴으로 염증성 질환 예방 또는 치료용제가 필요하게 된다. 거의 모든 임상질환에서 염증 반응을 관찰할 수 있고, 이들 염증성 질환 중에는 항생제 투여로 원인적 치료가 가능한 세균성 질환도 있지만, 대부분은 그 발병이 자가면역반응에 의한 조직손상에 기인하므로 특이적 치료법이 없는 난치병으로 알려져 있다.

[0005] 염증성 질환의 일 예로는 알레르기성 질환을 들 수 있다. 알레르기의 질환에는 아토피성 피부염, 천식, 알레르기성 기관지확장증, 헤이피버, 결막염, 비염, 피부염, 습진, 담마진, 두드러기, 식품, 대기, 약물, 화분, 곰팡이, 먼지 및 동물로 인한 알레르기, 혈청병, 아나필락시스 쇼크(anaphylactic shock)

[0006] 등이 있으며 이들 질환은 단독 또는 여러 질환이 동시에 나타날 수 있는데, 일반적으로 아토피 피부염을 포함한 면역 과민반응 염증성 질환이 그 대표적인 예라 할 수 있다. 현재까지 알려진 아토피 피부염을 포함한 면역 과민반응 염증성 질환의 발병 원인은 정확히 밝혀져 있지 않지만 보편적으로 유전적, 면역학적 요인이 관여하는 것으로 추정되며, 기타 환경적, 정신적 요인 등이 악화 요인으로 작용한다는 것이 전문가들의 보편적인 견해이다.

- [0007] 현재 아토피 피부염을 포함한 면역 과민반응 염증성 질환에서 가장 널리 사용되는 치료제는 스테로이드제로 알려진 덱사메타손(Dexamethasone)을 사용하고 있으나, 이는 단기 치료에는 효과적일 뿐, 1년 이상 장기 치료 시에는 안정성과 그 효능이 성립되지 않고 피부가 얇아지거나, 피부위축, 상흔, 피부변색 등의 부작용이 발생하는 사례가 보고되는등 문제점이 나타나고 있다(신길란, 2009, 대전대학교 학위논문, 13).
- [0009] 말라리아는 21세기에 인류의 건강을 위협하고 있는 매우 심각하고 복합적인 질환이다. 전 세계적으로 대략 [0024] 3백만 명이 말라리아에 감염되고, 매년 15백만 명이 사망하고 있다. 말라리아는 4종류의 말라리아 원충(Plasmodium)에 의해 유발되는 감염성 질환으로, 이들 중 열대열 말라리아인 플라스모디움 팔시파룸(Plasmodium falciparum)이 가장 심각하다. 말라리아는 특히 아프리카 등의 개발 도상국에서 심각한 문제로 대두되고 있는데, 말라리아 균주에 감염되면 적혈구가 기형이 되고 이것이 혈관벽에 쌓이게 되면 혈액의 흐름을 차단하여 뇌, 신장, 간 등에 합병증이 나타나기도 한다. 따라서, 전염원이 되는 모기를 방제하기 위한 살충제 및 항말라리아 약제가 개발되고 있다. 항말라리아 약제 중 몇가지 약물들이 TCTP 즉, HRF에 결합하여 약효를 낸다는 논문이 보고된바 있으며, 예를 들어 아르테미시닌(artemisinin)은 그 작용기전이 HRF에 결합함으로써 약효를 낸다는 보고가 있었다. 그러나 기존의 살충제에 대한 모기의 저항성 증가 및 항말라리아 약제에 대한 내성균주의 출현으로 말라리아의 발생은 오히려 증가되는 추세에 있다. 더욱이 지구 온난화 현상 등으로 말라리아 발생 지역 이외에서도 말라리아가 발생할 가능성이 높아짐에 따라 새로운 모기 살충제 및 항말라리아 약제에 대한 개발이 절실히 요구되고 있다.
- [0011] 알러지(allergy)는 유전적으로 알러젠(allergen)에 대해 과민하게 IgE를 생성하거나, IgE의 분비를 증가시키는 IL-4 (Interleukin-4)와 IgE의 분비를 감소시키는 γ -인터페론(γ -interferon)간의 균형이 파괴된 것으로부터 기인한다고 알려져 있다. 일단 알러젠에 노출되면, 즉시 반응(immediate reaction)이 일어나고, 염증에 관련된 여러 세포들이 모이게 되며, 수 시간 후에는 호염기구(basophil), 호산구(eosinophil)와 림프구(lymphocyte)로부터 분비되는 히스타민과 여러 사이토카인에 의해 후기 반응 (late-phase reaction, 이하 "LPR"이라 함)이 일어나게 된다. LPR에서는 호염기구로부터 히스타민이 분비되는데, 이때에는 처음에 반응을 시작하게 했던 알러젠이 없으므로, 무엇이 호염기구에서 히스타민을 분비하게 하는지와, 알러지 환자의 약 절반만이 LPR로 진전되는데, 그 원인 물질이 무엇인지가 큰 관심 대상이었다. 그동안 MCP-3, MCP-1 또는 RANTES와 같은 사이토카인(cytokine)이 히스타민을 분비하는 것으로 알려져 있었으나, IgE-의존적 LPR에서는 IgE-의존적 히스타민 방출인자(IgE-dependent histamine-releasing factor, 이하 "HRF"라 함)라고 불리는 물질만이 호염기구에서 히스타민을 분비시킬 수 있음이 밝혀졌다(MacDonald et al., 1995).
- [0013] HRF는 translationally controlled tumor protein (TCTP)로 알려진, 모든 세포질에 존재하는 172개의 아미노산으로 구성되어 있는 공지의 단백질이다(Bohm et al., 1989). 그 중 C-말단의 45개 아미노산은 염기성 도메인(basic domain)을 형성하고 있으며, 이 부위는 미소관-결합 단백질(microtubule-associated protein)인 MAP-1B와 약 46%의 상동성을 나타내므로, 미소관 결합 단백질인 것으로 추정되고 있다. 본 발명자들은 대한민국 등록특허 10-0457350을 통해 HRF가 친수성 단백질임에도 불구하고, 세포막을 건너갈 수 있다는 사실과, 세포내 존재하는 HRF는 (Na,K)ATPase 알파서브유닛 중 대형 세포질 루프(large cytoplasmic loop) CD3(cytoplasmic domain 3)에 결합한다는 사실을 최초로 규명하고 세포내 HRF를 과발현하는 형질전환 마우스에서 고혈압이 유발됨을 입증하였다. 한편, HRF는 세포질 내에 존재하는 단백질임에도 불구하고, 맥도날드 등 (1995)은 HRF를 세포 밖에서 발견하였으며, 또한, HRF가 세포 밖에 존재하면서 IgE-감작된(sensitized) 호염기구를 자극하여 히스타민을 유리하게 하는 것으로 알려졌다.
- [0015] 하지만, HRF는 후기 알레르기 질환의 가장 중요한 매개체로 이미 잘 알려져 있으면서도 정확한 작용기전이 알려지지 않은 관계로 뚜렷한 치료제의 개발이 진행되지 못하고 있었다. 즉, 재조합 단량체(monomer) 형태의 HRF의 경우 히스타민 방출 능력이 세포로부터 분비된 HRF에 대비하여 현저히 감소하는 등 어떤 형태의 HRF가 알레르기를 유발하는 지 명확하게 밝혀지지 않았다. 본 발명자들은 이러한 의문점을 해결하는 HRF의 이량체형이 알레르기기를 유발하는 물질임을 최초로 증명하여 원천 기술(대한민국 등록 특허 10-0780255, 유럽 등록 특허 1683866, 일본 등록 특허 4564926, 미국 등록 특허 7772368)을 확보함으로써 알레르기 치료제 신약 개발에 유효한 신규

타겟을 발견하였다.

[0017] 본 발명자들은 이러한 신규 타겟 이량체 HRF가 알레르기를 유발하는 병태생리에 대한 이해를 바탕으로 하는 치료제 개발을 위해, 단량체 HRF보다 더 강한 친화력으로 이량체 HRF에만 특이적으로 결합하여 기능을 저해하는 항알레르기성 7-mer 펩타이드를 발견하였다. (대한민국 등록 특허 10-0457350, 유럽 등록 특허 1167526, 일본 등록 특허 4295449, 미국 등록 특허 6710165). 즉 이량체 HRF를 타겟으로 하여 이를 제어함으로써 항알레르기 효능을 갖는 펩타이드 약물(dTBP2)을 자체적으로 개발하였으며, 알레르기 질환과 류마티스성 관절염에서 억제 효능을 입증하였다(대한민국 등록 특허 10-1830838). 또한 알레르기를 유발하는 형태의 HRF 구조가 명확히 밝혀지지 않아, 이와 결합하여 HRF를 저해하는 물질을 스크리닝하여 의약품 개발 단계로 진입하기 못하는 상황이었으나 본 연구팀이 구조를 밝히고 그 중에서도 HRF로서의 기능에 중요한 유효한 도메인을 규명하였다. (대한민국 등록 특허 10-1830838, 대한민국 등록 특허 10-1804291, 대한민국 등록 특허 10-1804285, 대한민국 등록 특허 10-1843051)).

[0019] 한편, TCTP 단백질(translationally controlled tumor protein)은 MacDonald et al(1995)에 의해 히스타민 유리활성이 있는 IgE 의존적 히스타민 방출 인자(IgE-dependent histamine-releasing factor; 이하, HRF)로 보고된 단백질이다. TCTP는 1980년대까지 종양에 관련된 단백질(tumor-specific protein)로 알려져 왔으며, 그 합성은 종양의 증식 단계(proliferative stage)와 관련이 있을 것으로 생각되어 왔다. 마우스 적백혈병(erythroleukemia) 세포에서는 21kDa의 종양 단백질 p21으로 밝혀졌고(Chitpatima et al, 1988), 에를리히 복수암(Ehrlich ascites tumor)에서 세포성장과 관련이 있는 단백질 p23이 TCTP/HRF와 동일한 것으로 밝혀졌다(Bohm et al, 1989).

[0021] 펩타이드 약물은 부작용이 적고 약효가 빠르며 생체친화적이라는 장점이 있으며 20종의 아미노산은 화학적 제조와 변형이 쉬워서 QC(quality control, 품질관리)가 용이해 상품화 가능성이 높다. 이 때문에 전 세계적으로 대사질환(비만, 당뇨 등)과 항암제 분야에서 각광받고 있으며, 면역 치료제, 호르몬 치료제, 희귀 질환 치료제로도 개발되고 있다.

[0023] 그러나, 펩타이드 약물은 환자에게 투여했을 때 면역원성(immunogenicity)이 높다는 단점이 있고, 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 체내 단백질 가수 분해 효소에 의해 분해되어 그 활성을 잃으며, 또한 상대적으로 크기가 작아 신장을 통해 쉽게 제거되기 때문에 약리 성분으로 펩타이드를 포함하는 의약품의 혈중 농도 및 역가를 유지하기 위해서는 펩타이드 약물을 환자에게 자주 투여할 필요가 있다. 그러나 펩타이드 약물은 대부분 비경구 투여에 한정되어 주사제 형태로 환자에게 투여되며, 따라서 생리활성 펩타이드의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사하게 되는데, 이는 환자에게 큰 고통을 야기하게 된다. 뿐만 아니라 펩타이드 약물의 대부분은 생산 비용이 높아 환자에게 부담이 크다는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 극복하고 펩타이드 약물의 혈중 안정성을 증가시켜 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시켜 약효를 극대화하기 위한 다양한 노력이 이어져 오고 있다.

[0025] 펩타이드 약물의 단점을 보완하기 위한 대표적 방법이 바로 약물전달 시스템(drug delivery system)을 이용하는 것이다. 펩타이드 약물의 DDS를 선정하기 위해서는 다양한 측면을 고려하여야 하는데, 약물 방출률, 용해성, 안정성, 생분해성, 독성 등을 확인하여야 한다. 상기의 요인들을 만족할 가능성이 있는 다양한 방법들이 꾸준히 보고되고 있으며 그 중 가장 대표적인 방법이 바로 펩타이드를 변형(modification)하는 방법이다.

[0027] 현재 연구되어 온 펩타이드 변형 방법 중 대표적인 예는 단백질을 폐길화(PEGylation, PEG 변형 기법)하는 것으로, PEG를 펩타이드 또는 단백질에 공유 결합을 통해 연결하는 것이다. PEG(폴리에틸렌글리콜, polyethyleneglycol)은 FDA에서 공인한 대표적인 생체용 고분자 재료로서 약 2 kDa 내지 20 kDa의 분자량이 단백질의 폐길화를 위해 사용되는 것이 일반적이다. PEG는 항체가 인식하는 단백질 표면의 항원결정부위(epitope)를 가림으로써 면역원성을 감소시키는 효과가 있으며, 수용액 내에서 물분자를 흡수하여 다른 분자들이 침투

하는 현상을 방지할 수 있고, 펩타이드에 연결된 PEG이 구조적인 장벽(steric hindrance) 역할을 하면서 분해 효소의 접근을 차단할 수 있으므로 장기간 체내에 잔류할 수 있도록 할 수 있다. 또한 신장에서 여과로 소실되는 비율을 감소시켜 혈중 반감기를 증가시키는 효과도 있으며 단백질 분해에 대한 내성 증가, 약물 전달이나 약물 방출 속도 조절 등 다양한 효과가 보고되고 있다(Inada et al. J. Bioact. and Compatible Polymers, 5, 343, 1990).

[0028] 현재 여러 종류의 PEG화된 단백질이 임상적으로 적용되고 있다. 1990년도에 엔존 인코포레이티드(ENZON Inc)에 의해 제조된 PEG화된-소 아데노신 데아미나제(아다겐(Adagen))가 FDA에 의해 승인되었고, 중증 복합형 면역결핍 질환을 치료하는데 사용되었다(페그팜(pegfam)013102LB, <http://wwwfdagov>). 호프만-라 로슈 리미티드(Hoffman-la Roche Ltd)에 의해 제조된 PEG화된 인터페론-α (PEG IFN-α2a, 페가시스(Pegasys))은 2002년도에 판매를 승인 받았으며, 간염을 치료하는데 사용된다(103964s50371b1, 페가슈011901LB(pegasche011901LB), <http://wwwfdagov>). 2002년도에, 암젠 인코포레이티드(Amgen Inc)에 의해 제조된 PEG 변형된 인간 과립구 집락-자극 인자(PEG-필그라스티움(filgrastim, 뉴라스타(Neulasta))가 또한 FDA에 의해 승인받았고, 이는 전이성 유방암을 치료하는데 사용된다(페그팜013102LB, <http://wwwfdagov>). 이처럼 약물에서 PEG은 생체 내 대사가 명백하게 이해되고 있고, 부작용이 적은 안전한 약물 조절제인 것으로 입증되어 왔다.

[0030] 펩타이드를 변형하는 방법으로서 상기의 PEG을 대체할 수 있는 고분자에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 예를 들어, 폴리글리세롤(Poly(glycerol)), 폴리옥사졸린(Poly(oxazoline)), 폴리바이닐피롤리돈(Poly(vinylpyrrolidone)), 폴리아크릴아마이드(Poly(acrylamide)), 폴리펩타이드(Poly(peptide)), 폴리(2-알킬-2-옥사졸린)(Poly(2-alkyl-2-oxazoline)), 폴리사르코신(Polysarcosine), 폴리바이닐알콜(Poly(vinyl alcohol)), 폴리쯔비터이온(polyzwitterion) 등이 PEG을 대체할 수 있는 생체적합적인 고분자로서 보고된 바 있다 (Srinivas Abbina et al., Engineering of Biomaterials for Drug Delivery System, 2018; Vitaliy V. Khutoryanskiy, Advanced Drug Delivery Reviews, Volume 124, 140-149).

[0032] 이 중에서, 펩타이드 구조 단위가 반복되는 고분자인 폴리펩타이드를 이용하여 변형하는 방법인 펩타이드 고분자 융합(peptide polymer fusion)의 예로는 프롤린(Proline) - 알라닌(Alanine) - 세린(Serine) 잔기가 반복되는 PASylation이 비수용성이고 전하를 띠지 않는 고분자로서 생물리화적으로 PEG와 유사한 성질을 가지는 것으로 보고된 바 있다(Martin Schlapsch et al., Protein Engineering, Design & Selection, vol. 26, no. 8, 489-501, 2013).

[0033] 펩타이드 고분자 융합의 또 다른 예로서 대표적인 것이 바로 ELPs(Elastin-like polypeptides)이다. ELP는 포유류의 엘라스틴(elastin)에서 유래되어 유전자 재조합법으로 합성된 폴리펩타이드로, 발린(Valine) - 프롤린(Proline) - 글라이신(Glycine) - Xaa - 글라이신(Glycine)의 다섯 개의 아미노산이 반복되는 펩타이드이며, 이때 Xaa는 프롤린을 제외한 아미노산으로 이루어진다. 연구에 따르면 ELP의 이온강도를 조절하여 양이온성, 음이온성 약물을 모두 쉽게 방출할 수 있으며, ELP는 온도 민감성의 성질을 가지고 있어서, Xaa 부분에 라이신(lysine), 글루탐산(glutamic acid), 아스파틱산(aspartic acid)와 같은 이온성 아미노산으로 조합하면 매우 높은 하한임계용액온도(lower critical solution temperature, LCST)를 가지게 되고, 반대의 이온성을 가지는 물질과 결합하게 되면 LCST가 매우 낮아지게 되어 이런 특징을 이용하여 약물과 함께 ELP 캡슐이 되었을 때는 불용성이었다가, 약물이 없어지면 자연스럽게 용해되는 약물전달체로의 연구가 진행되고 있다(정재연 등, Biomaterials Research, 2008, 12, 2, 39-47). ELP를 이용한 단백질 약학제제에 관한 특허로는 파세비오 파마수티컬스 인코포레이티드에서 출원한 단백질 활성제 및 엘라스틴 유사 펩타이드(ELP)를 포함하는 지속 방출성 약학제제에 관한 발명이 공개된 바 있다(대한민국 특허 KR10-2019-0005171).

[0034] 펩타이드 고분자 융합의 또 다른 대표적 예는 아뮤닉스(Amunix)사의 엑스텐(XTEN) 기술이다. 재조합 폴리펩타이드인 엑스텐은 기존의 두 단계 이상을 거치는 융합 단백질의 제조 기술(heterogeneous product)을 개선하여 한 단계의 발현으로 융합 단백질을 제조할 수 있는 기술(homogeneous product)을 제공할 뿐만 아니라, 약물의 반감기를 연장시키고 면역원성이 낮은 장점이 있다. 관련하여 최근 로슈는 아뮤닉스의 엑스텐 기술을 의약품 체내 반감기 연장 플랫폼 도입을 위해 선금 4000만달러에 제휴했으며, 항암제 외 비공개 타겟에 적용하고 향후 15억 달러의 개발 및 판매 마일스톤을 지불하기로 합의했다고 보고되었다.

- [0036] 펩타이드 약물의 안정성 향상 및 체내 반감기 증가를 위해 개발되고 있는 방법으로서 또 다른 대표적 예는 바로 알부민 융합(albumin fusion)이다. 알부민 융합 펩타이드 기술은 재조합된 알부민을 단백질에 링커로 연결하여 펩타이드의 혈장 내 안정성을 증가시키고 부작용이 적으며 가격 측면에서 이점이 있어 PEGylation의 대체 기술로 주목받고 있다. 알부민 융합 기술의 대표적인 예로서 최근 2016년 알부민 융합 기술을 이용한 호주 제약회사 CLS 베링 사의 혈우병 치료제 이델비온(Idelvion)이 FDA의 승인을 받은 것으로 보고되었다.
- [0038] 펩타이드 약물의 운반을 위한 수단으로 개발되고 있는 것 중 하나로서 사이클로타이드(cyclotide)를 스캐폴드로 사용하는 기술이 있다. 사이클로타이드는 식물로부터 분리되는 이황화 결합이 풍부한 펩타이드로, 전형적으로 28-37개의 아미노산을 함유하며 머리와 꼬리가 고리화된 펩티드 골격 및 3개의 이황화 결합이 서로 맞물린 형태가 특징이다. 사이클로타이드는 약물과 결합 되어 약물의 경구투여를 가능하게 한다는 점에서 주목받기 시작하였다(Andrew Gould et al., Curr Pharm Des. 2011, 12, 17(38), 4294-4307).
- [0040] 펩타이드 약물의 안정성을 증가시키기 위한 노력으로 항체 기반 생체지속성 약물 플랫폼 기술은 생체 적용 가능성이 높은 주목해야 할 기술 중 하나이다. 대표적인 기술로 한미약품의 랩스커버리(Long Acting Protein/Peptide Discovery Platform Technology, Lapscovery) 기술과 제넥신의 HyFc(Hybrid Fc) 기술이 있다.
- [0041] 한미약품의 랩스커버리 기술은 약물과 고분자(IgG1 Fc)를 링커(예: PEG)로 연결하여 입체장애를 최소화하도록 함으로써 폐길화의 단점 중 하나인 단백질이 특정 부위와 결합이 어려워짐으로 인한 단백질 활성 저하를 극복하였으며, 약물의 생체 내 재활용 가능 및 높은 반감기에 따른 지속력 등의 장점이 있다. 랩스커버리 기술은 2011년에 국내 특허 등록된 바 있다(대한민국 특허 KR10-2008-0064750).
- [0042] 제넥신의 HyFc 기술은 우리 몸에 존재하는 항체 종류 중 IgG4와 IgD의 각 장점을 융합하여 만든 융합 단백질에 관한 기술로, 생물학적 활성과 체내 지속력을 극대화한 기술이다. 이때 Ig4는 반감기를 늘려주는 역할을 하고, IgD는 힌지(Hinge)의 유연성을 극대화하여 상호간섭을 최소화시키는 역할을 함으로써 약물활성을 매우 높이게 된다. HyFc 기술에 대한 원천특허는 2009년에 국내 특허 등록되었으며(대한민국 특허 KR10-2008-0094781), HyFc 기술이 적용된 치료제 특허로서 지속형 성장호르몬제(미국 등록 특허 US 8,586,038 B2), 빈혈치료제(미국 등록 특허 US 8,586,531 B2), 백혈구 감소증 치료제(미국 등록 특허 US 8,586,048 B2)가 2013년에 미국에서 등록되었다.
- [0044] 펩타이드 약물의 단점을 보완하기 위한 방법으로는 상기와 같이 변형, 융합, 항체 기반 기술 이외에도 나노입자(nanoparticle)를 이용하거나(리포솜, 엑소솜 등), 또는 패치형 또는 마이크로니들을 통해 약물을 피부에 코팅·로딩하여 약물을 투입하는 방법, 세포 투과성 펩타이드(Cell Penetrating peptide)를 이용한 약물 전달 방법 등 다양한 약물 전달 방법이 개발되고 있다. 이처럼 기존 바이오 의약품보다 효능이나 안전성, 편의성 등을 개량한 약인 바이오베터(biobetter)에 대한 연구 개발이 활발히 이루어지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0046] 본 발명의 일 목적은, HRF 결합 펩타이드의 변형(modification) 방법을 제공하는 것이다.
- [0047] 본 발명의 다른 일 목적은, 상기 변형된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 알러지의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0048] 본 발명의 다른 일 목적은, 상기 변형된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 말라리아의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0049] 본 발명의 다른 일 목적은, 상기 변형된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 자가 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0050] 본 발명의 다른 일 목적은, 상기 변형된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 급성 또는 만성 염증성 질환의 예방 또

는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

- [0051] 본 발명의 다른 일 목적은, 상기 변형된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 고혈압의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0052] 본 발명의 다른 일 목적은, 상기 변형된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0054] 본 발명의 다른 일 목적은, 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를, 이를 필요로 하는 개체나 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 알러지, 말라리아, 자가면역질환, 급성 또는 만성 염증성 질환, 고혈압, 또는 암의 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0055] 본 발명의 다른 일 목적은 알러지, 말라리아, 자가면역질환, 급성 또는 만성 염증성 질환, 고혈압, 또는 암의 치료에 사용하기 위한 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0056] 본 발명의 다른 일 목적은 알러지, 말라리아, 자가면역질환, 급성 또는 만성 염증성 질환, 고혈압, 또는 암 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드의 용도(use)를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0058] 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0059] 폐길화된 HRF 결합 펩타이드로서,
- [0060] 상기 HRF 결합 펩타이드는,
- [0061] 첫 번째 아미노산은 A, L 및 W로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0062] 두 번째 아미노산은 V, Y, E 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0063] 세 번째 아미노산은 T, V, F 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0064] 네 번째 아미노산은 Y, P 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0065] 다섯 번째 아미노산은 P, G 및 K로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0066] 여섯 번째 아미노산은 A, L, S 및 W로 구성된 군으로부터 선택되고; 및
- [0067] 일곱 번째 아미노산은 A, P 및 M로 구성된 군으로부터 선택되는 일련의 아미노산 서열로 이루어지는 것이고; 및
- [0068] 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드는 HRF 펩타이드에 폴리에틸렌글리콜이 결합된, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 제공한다.
- [0070] 또한, 본 발명은,
- [0071] 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 알러지 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0073] 또한, 본 발명은,
- [0074] 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 말라리아 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0076] 또한, 본 발명은,
- [0077] 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 자가 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

- [0079] 또한, 본 발명은,
- [0080] 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 급성 또는 만성 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0082] 또한, 본 발명은,
- [0083] 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 고혈압의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0085] 또한, 본 발명은,
- [0086] 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0088] 본 발명은, 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를, 이를 필요로 하는 개체나 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 알러지, 말라리아, 자가면역질환, 급성 또는 만성 염증성 질환, 고혈압, 또는 암의 치료 방법을 제공한다.
- [0090] 또한, 본 발명은 알러지, 말라리아, 자가면역질환, 급성 또는 만성 염증성 질환, 고혈압, 또는 암의 치료에 사용하기 위한 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 제공한다.
- [0092] 또한, 본 발명은 알러지, 말라리아, 자가면역질환, 급성 또는 만성 염증성 질환, 고혈압, 또는 암 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드의 용도(use)를 제공한다.

발명의 효과

- [0094] 본 발명에 따른 변형(modification)된 HRF 결합 펩타이드는 생체 내에서 높은 안정성을 가지고 약효를 발휘할 수 있으며, 높은 반감기로 인해 투약 횟수를 줄일 수 있으므로 약물로서 유용하게 사용될 수 있으며, 세포 내에서 히스타민 분비를 효과적으로 저해함으로써, 동물은 물론 인간의 알러지, 말라리아, 자가 면역 질환, 급성 또는 만성 염증성 질환, 고혈압, 암을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0096] 도 1은 본 발명에 따른 실시예 1의 폐길화된 HRF 결합 펩타이드의 HPLC 결과를 그래프로 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 제조예 1(상) 및 실시예 1(하)의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 나타낸 도면이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 실시예 2의 폐길화된 HRF 결합 펩타이드의 HPLC 결과를 그래프로 나타낸 도면이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 제조예 2(상) 및 실시예 2(하)의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 나타낸 도면이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 실시예 3의 폐길화된 HRF 결합 펩타이드의 HPLC 결과를 그래프로 나타낸 도면이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 실시예 3의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 나타낸 도면이다.
- 도 7은 본 발명에 따른 제조예 4, 실시예 1 및 실시예 2의 BEAS-2B 세포에서 HRF에 의한 IL-8 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 8은 본 발명에 따른 실험예 4에 따른 실험의 간단한 모식도를 나타내는 도면이다.
- 도 9는 본 발명에 따른 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 텍사메타손, 제조예 4, 실시예 3의 호산구 증가 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 10은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-5 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를

나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 매일 1회씩 총 8회 투여).

도 11은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-5 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 4일에 1회씩 총 2회 투여).

도 12은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-5 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 1일째에 1회 투여).

도 13은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-5 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 5일째에 1회 투여).

도 14은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-4 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 매일 1회씩 총 8회 투여).

도 15은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-4 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 4일에 1회씩 총 2회 투여).

도 16은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-4 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 1일째에 1회 투여).

도 17은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-4 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 5일째에 1회 투여).

도 18은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-13 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 매일 1회씩 총 8회 투여).

도 19은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-13 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 4일에 1회씩 총 2회 투여).

도 20은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-13 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 1일째에 1회 투여).

도 21은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 IL-13 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 5일째에 1회 투여).

도 22은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 오발부민 특이적 IgE 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 매일 1회씩 총 8회 투여).

도 23은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 오발부민 특이적 IgE 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 4일에 1회씩 총 2회 투여).

도 24은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 오발부민 특이적 IgE 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 1일째에 1회 투여).

도 25은 정상 대조군(NC), 양성 대조군(PC), 제조예 4, 실시예 3의 오발부민 특이적 IgE 분비 억제 효과에 대해 실험한 결과를 나타내는 도면이다(제조예 4, 실시예 3을 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 5일째에 1회 투여).

도 26은 수컷 마우스에서 제조예 4와 실시예 3의 시간에 따른 농도 변화를 확인한 결과를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명은,

폐질환된 HRF 결합 펩타이드로서,

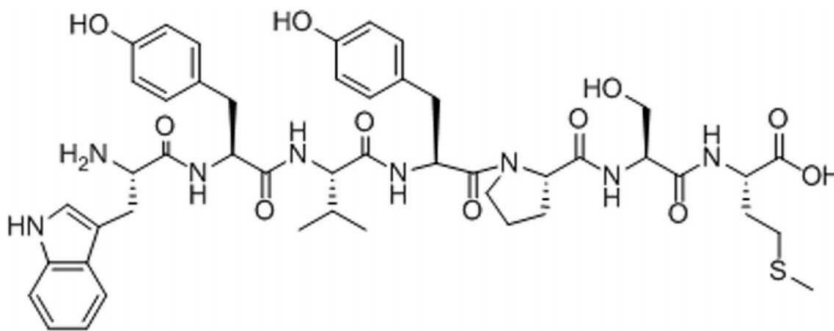
상기 HRF 결합 펩타이드는,

- [0102] 첫 번째 아미노산은 A, L 및 W로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0103] 두 번째 아미노산은 V, Y, E 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0104] 세 번째 아미노산은 T, V, F 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0105] 네 번째 아미노산은 Y, P 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0106] 다섯 번째 아미노산은 P, G 및 K로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0107] 여섯 번째 아미노산은 A, L, S 및 W로 구성된 군으로부터 선택되고; 및
- [0108] 일곱 번째 아미노산은 A, P 및 M로 구성된 군으로부터 선택되는 일련의 아미노산 서열로 이루어지는 것이고; 및
- [0109] 상기 폐길화된 HRF 결합 펩타이드는 HRF 펩타이드에 폴리에틸렌글리콜이 결합된, 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 제공한다.
- [0110] 상기 폴리에틸렌글리콜의 분자량은, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드의 활성을 나타낼 수 있는 분자량이라면 제한은 없으나, 1 kDa 내지 50 kDa일 수 있고, 2 kDa 내지 45 kDa일 수 있고, 3 kDa 내지 40 kDa일 수 있고, 4 kDa 내지 35 kDa일 수 있고, 5 kDa 내지 30 kDa일 수 있고, 3 kDa내지 25 kDa일 수 있고, 3 kDa내지 20 kDa일 수 있고, 3 kDa 내지 15 kDa일 수 있고, 3 kDa 내지 13 kDa일 수 있고, 4 kDa 내지 6 kDa일 수 있고, 5 kDa일 수 있고, 5 kDa 내지 10 kDa일 수 있고, 9 kDa 내지 11 kDa 일 수 있고, 10 kDa일 수 있다.
- [0111] 상기 HRF 결합 펩타이드와 폴리에틸렌의 결합은 HRF 결합 펩타이드의 카르복실기 또는 아미노기에 폴리에틸렌글리콜이 공유결합된 것일 수 있다.
- [0112] 상기 폴리에틸렌글리콜은 말단에 알데하이드기, 카르복실기, 아미노기 또는 하이드라지드기를 포함하는 관능기가 연결될 수 있다.
- [0113] 상기 관능기는 폴리에틸렌글리콜의 말단 산소에 C₁₋₆의 알킬렌(alkylene)을 통하여 연결될 수 있다.
- [0114] 상기 폴리에틸렌글리콜의 다른 말단은 캡핑(capping)된 것일 수 있는데, 알콕시(alkoxy)기로 캡핑될 수 있고, 한 예로서 메톡시(methoxy)기로 캡핑될 수 있다.
- [0115] 상기 폴리에틸렌글리콜은 메톡시 폴리에틸렌글리콜 프로피온알데하이드(5000), 메톡시 폴리에틸렌글리콜 하이드라지드(5000) 또는 메톡시 폴리에틸렌글리콜 프로피온알데하이드(1000)일 수 있다.
- [0116] 상기 폴리에틸렌 글리콜 또는 이의 유도체는 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 접합될 수 있다.
- [0118] 상기 HRF 결합 펩타이드는,
- [0119] 첫 번째 아미노산은 A 또는 W로부터 선택되고;
- [0120] 두 번째 아미노산은 Y 또는 A로부터 선택되고;
- [0121] 세 번째 아미노산은 V 또는 A로부터 선택되고;
- [0122] 네 번째 아미노산은 Y 또는 A로부터 선택되고;
- [0123] 다섯 번째 아미노산은 P 또는 K로부터 선택되고;
- [0124] 여섯 번째 아미노산은 S 또는 A로부터 선택되고;
- [0125] 일곱 번째 아미노산은 M 또는 A로부터 선택되는 일련의 아미노산 서열로 이루어 지는 것일 수 있다.
- [0126] 또는, 상기 HRF 결합 펩타이드는,
- [0127] 첫 번째 아미노산은 W이고;
- [0128] 일곱 번째 아미노산은 M일 수 있다.
- [0129] 바람직하게는, 상기 HRF 결합 펩타이드는,
- [0130] 아미노산 서열 W-Y-V-Y-P-S-M; A-Y-V-Y-P-S-M; 또는 W-Y-V-A-P-S-M로 이루어지는 것일 수 있다.

- [0131] 가장 바람직하게는, 상기 HRF 결합 펩타이드는,
- [0132] 아미노산 서열 W-Y-V-Y-P-S-M으로 이루어지는 것일 수 있다.
- [0133] 상기 HRF 결합 펩타이드는, L-, D-, 또는 L- 및 D- 아미노산으로 구성된 펩타이드일 수 있다.
- [0134] 상기 HRF 결합 펩타이드는, 하나 이상의 변형 아미노산을 포함하는 펩타이드일 수 있다.
- [0135] 상기 변형 아미노산이 아미노산 유도체 또는 알킬화된 아미노산일 수 있다.
- [0136] 상기 HRF 결합 펩타이드는, IL-8 분비 억제 효능이 있다.
- [0137] 상기 HRF 결합 펩타이드는, 호산구(Eosinphil) 증가 억제 효능이 있다.
- [0138] 상기 HRF 결합 펩타이드는, IL-5 분비 억제 효능이 있다.
- [0139] 상기 HRF 결합 펩타이드는, IL-4 분비 억제 효능이 있다.
- [0140] 상기 HRF 결합 펩타이드는, IL-13 분비 억제 효능이 있다.
- [0141] 상기 HRF 결합 펩타이드는, 오발부민(Ovalbumin) 특이적 IgE 분비 억제 효능이 있다.

[0143] 상기 아미노산 서열 W-Y-V-Y-P-S-M을 포함하는 펩타이드는 본 발명자들이 제조하여 (대한민국 공개 특허 10-2017-0004906) dTBP2[dTCTP(dimerized translationally controlled tumor protein) binding peptide 2]로 명명한 헵타머(heptamer)로서, dTCTP의 작용을 억제함으로써 확인하였다. dTBP2의 화학구조는 아래와 같다.

[0144] [dTBP2의 화학구조]



[0145]

[0146] 대한민국 공개 특허 10-2017-0004906에 기재된 것과 같이, 상기 dTBP2의 첫번째 아미노산인 트립토판과 네번째 아미노산인 타이로신의 경우 알라닌으로 치환하더라도 dTBP2의 활성이 동등하게 유지되는 것을 확인한 바 있다.

[0148] 본 발명은,

[0149] 상기 기재한 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 알러지 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데, 상기 알러지는 천식; 비염; 아토피; 담마진; 아나필락시스; 알러지성 기관지 확장증; 음식, 약물, 화분 또는 벌레로 인한 알러지; 알레르기성 결막염; 헤이 피버; 한냉두드러기; 또는 아토피성 피부염일 수 있다.

[0151] 본 발명은,

[0152] 상기 기재한 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 말라리아 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데, 상기 말라리아는 열대열 말라리아(Plasmodium falciparum); 삼일열 말라리아(Plasmodium vivax); 난원형 말라리아(Plasmodium ovale); 또는 사일열 말라리아(Plasmodium malariae)일 수 있다.

[0154] 본 발명은,

- [0155] 상기 기재한 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 자가 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데, 상기 자가 면역 질환은 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis); 쇼그렌 증후군(Sjogreen's disease); 전신 경화증(systemic sclerosis); 다발성 근염(polymyositis); 전신성 혈관염(systemic angitis); 혼합결합조직병(mixed connective tissue disease); 크론병(Crohn's disease); 하시모토병(Hashimoto's disease); 그레이브스 병(Grave's disease); 굿파스튜어 증후군(Goodpasture's syndrome); 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrom); 특발성 혈소판 감소성 자반증; 과민성 장 증후군; 중증 근무력증; 기면증; 심상성천포창; 악성 빈혈; 원발성 담즙성 간경변증; 궤양성 대장염; 혈관염; 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis); 건선(Psoriasis); 원형탈모증; 류마티스 열(Rheumatic fever); 루푸스(Systemic lupus erythematosus); 또는 다발성 경화증(Multiple Sclerosis)일 수 있다.
- [0157] 본 발명은,
- [0158] 상기 기재한 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 급성 또는 만성 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데, 상기 급성 또는 만성 염증성 질환은 결막염; 치주염; 비염; 중이염; 인후염; 편도염; 피부염; 위염; 대장염; 강직성 척추염; 건선관절염; 골관절염; 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis); 건관절주위염; 건염; 건조염; 건주위염; 근육염; 간염; 방광염; 신장염; 폐렴; 위궤양; 크론병(Crohn's disease); 쇼그렌 증후군(Sjogreen's disease); 통풍(gout); 섬유성근육통(fibromyalgia); 낭창(lupus); 활액낭염(bursitis); 또는 전신 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus)일 수 있다.
- [0160] 본 발명은,
- [0161] 상기 기재한 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 고혈압의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0163] 본 발명은,
- [0164] 상기 기재한 폐길화된 HRF 결합 펩타이드를 함유하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데, 상기 암은 구강암; 간암; 위암; 결장암; 유방암; 폐암; 골암; 췌장암; 피부암; 두경부암; 피부암; 자궁경부암; 난소암; 대장암; 소장암; 직장암; 나팔관암종; 항문부근암; 자궁내막암종; 질암종; 음문암종; 호지킨병(Hodgkin's disease); 식도암; 임파선암; 방광암; 담낭암; 내분비선암; 갑상선암; 부갑상선암; 부신암; 연조직 육종; 요도암; 음경암; 전립선암; 만성 백혈병; 급성 백혈병; 림프구 림프종; 신장암; 수노관암; 신장세포 암종; 신장골반암종; 중추신경계 종양; 1차 중추신경계 림프종; 척수 종양; 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있다.
- [0166] 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드는 상기와 같이 폴리에틸렌글리콜 또는 그 유도체로 폐길화(pegylation)되어 변형(modification)되는 방법 외에도 사이클로타이드(cyclotide) 또는 고리형 펩타이드(cyclic peptide)를 스캐폴드로 사용하는 기술을 적용할 수 있다.
- [0167] 즉, 본 발명에서 제공하는 발명의 일 측면은,
- [0168] HRF 결합 펩타이드; 및
- [0169] 사이클로타이드(cyclotide)를 결합한 결합체로서,
- [0170] 상기 사이클로타이드는 25개 내지 35개의 아미노산을 함유하며, 머리와 꼬리가 고리화된 펩타이드이다.
- [0171] 상기 사이클로타이드는 3개의 이황화 결합을 포함한다.
- [0172] 상기 3개의 이황화 결합은 연동배열(interlocking)일 수 있다.
- [0173] 상기 사이클로타이드는 식물로부터 유래할 수 있는데,
- [0174] 상기 식물은 *C. parvifolia*, *P. longipes*, *V. odorata*, *O. affinis*, *P. condensata*, *V. tricolor*, *V. arvensis* 및 *M. cochinchinensis*로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 식물일 수 있다.

- [0175] 상기 결합체는 경구용 제제일 수 있다.
- [0177] 또한, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드는 상기와 같이 폴리에틸렌글리콜 또는 그 유도체로 폐길화(pegylation)되어 변형(modification)되는 방법 외에도 하기와 같은 화합물이 폴리에틸렌글리콜을 대체되어 사용될 수 있다.
- [0178] 예를 들어, 폴리글리세롤(Poly(glycerol)), 폴리옥사졸린(Poly(oxazoline)), 폴리바이닐피롤리돈(Poly(vinylpyrrolidone)), 폴리아크릴아마이드(Poly(acrylamide)), 폴리펩타이드(Poly(peptide)), 폴리(2-알킬-2-옥사졸린)(Poly(2-alkyl-2-oxazoline)), 폴리사르코신(Polysarcosine), 폴리바이닐알콜(Poly(vinyl alcohol)), 폴리즈비터이온(polyzwitterion) 등의 생체적합적인 고분자가 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드와 직접 또는 링커(linker)를 통해 결합될 수 있다. 다만, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드의 변형 방법으로서 폴리에틸렌글리콜을 대체할 수 있는 화합물은 상기에 한정되는 것은 아니고, 생체 적합성을 가진 화합물로서 펩타이드 약물의 단점을 보완할 수 있는 화합물이라면 제한되지 않는다.
- [0179] 즉, 본 발명에서 제공하는 발명의 일 측면은,
- [0180] 폴리글리세롤(Poly(glycerol)), 폴리옥사졸린(Poly(oxazoline)), 폴리바이닐피롤리돈(Poly(vinylpyrrolidone)), 폴리아크릴아마이드(Poly(acrylamide)), 폴리펩타이드(Poly(peptide)), 폴리(2-알킬-2-옥사졸린)(Poly(2-alkyl-2-oxazoline)), 폴리사르코신(Polysarcosine), 폴리바이닐알콜(Poly(vinyl alcohol)) 및 폴리즈비터이온(polyzwitterion)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 화합물로 변형(modification)된 HRF 결합 펩타이드이다.
- [0182] 또한, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드는, 상기 폴리에틸렌글리콜을 대체할 수 있는 고분자 중 하나인 폴리펩타이드(Polypeptide)를 이용하여 변형(modification)될 수 있다. 예로서, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드를 프롤린(Proline) - 알라닌(Alanine) - 세린(Serine) 잔기가 반복되는 펩타이드를 연결(결합)시킬 수 있다(PASylation). 이때, PASylation된 HRF 결합 펩타이드는 본 발명에 따른 폐길화된 HRF 결합 펩타이드와 성질이 유사할 것이다.
- [0183] 즉, 본 발명에서 제공하는 발명의 일 측면은,
- [0184] 아미노산 서열 P-A-S이 반복되는 펩타이드를 결합 또는 연결 시킨(파실레이션, PASylation), HRF 결합 펩타이드이다.
- [0186] 또한, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드를 폴리펩타이드를 이용하여 변형(modification)시킬 수 있는 또 다른 예로서, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드를 ELPs(엘라스틴 유사 폴리펩타이드, Elastin like polypeptides)를 결합시킬 수 있다. ELPs는 발린(Valine) - 프롤린(Proline) - 글라이신(Glycine) - Xaa - 글라이신(Glycine) 잔기가 반복되는 펩타이드이다(이때, Xaa는 프롤린(Proline, P)을 제외한 아미노산이다).
- [0187] 즉, 본 발명에서 제공하는 발명의 일 측면은,
- [0188] HRF 결합 펩타이드, 및 대한민국 공개특허 10-2019-0005171에 개시된 서열번호 1 내지 13 중 어느 하나로부터 선택되는 적어도 60개의 엘라스틴 유사 펩타이드(ELP) 구조 단위를 포함하는 알러지, 말라리아, 자가 면역 질환, 급성 또는 만성 염증성 질환, 고혈압, 암의 진단, 예방 또는 치료용 조성물이다.
- [0189] 또 다른 측면은,
- [0190] 상기 조성물을 포함하는 지속 방출성 약학 제제이다.
- [0191] 상기 제제는 투여시 주사 부위로부터 느린 흡수를 제공한다.
- [0192] 상기 제제는 상기 엘라스틴 유사 펩타이드 비존재 하에서의 HRF 결합 펩타이드의 PK(Pharmacokinetic) 프로파일과 비교할때, 투여 시 평탄한 PK 프로파일을 제공한다.

- [0193] (대한민국 공개특허 10-2019-0005171)
- [0195] 또한, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드를 폴리펩타이드를 이용하여 변형(modification)시킬 수 있는 또 다른 예로서, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드를 엑스텐(XTEN) 기술을 통해 변형(modification)할 수 있다. XTEN 기술은 아뮤닉스(Amunix) 사의 기술로, 의약품의 체내 반감기 연장 효과가 있으며, 면역원성이 낮은 장점이 있다.
- [0196] 즉, 본 발명에서 제공하는 발명의 일 측면은,
- [0197] HRF 결합 펩타이드; 및
- [0198] 연장된 재조합 폴리펩타이드(XTEN)을 포함하는 재조합 융합 단백질로서,
- [0199] 이때, XTEN이
- [0200] (a) XTEN이 36개 이상의 아미노산 잔기를 포함하고;
- [0201] (b) 글리신(G), 알라닌(A), 세린(S), 쓰레오닌(T), 글루타메이트(E) 및 프롤린(P) 잔기의 합계가 XTEN의 총 아미노산 잔기의 약 80% 초과 수준을 차지하고;
- [0202] (c) (i) 아미노산이 세린이 아닌 한, XTEN이 동일한 3개의 인접 아미노산을 함유하지 않거나, (ii) XTEN 서열의 약 80% 이상이 글리신(G), 알라닌(A), 세린(S), 쓰레오닌(T), 글루타메이트(E) 및 프롤린(P)으로부터 선택된 4종 내지 6종의 아미노산으로 구성된 약 9개 내지 약 14개의 아미노산 잔기를 각각 포함하는 비-중첩 서열 모티프로 구성되고, 이때 임의의 2개 인접 아미노산 잔기가 각각의 비-중첩 서열 모티프에서 2회 초과 빈도로 존재하지 않거나, (iii) XTEN 서열이 10 미만의 하위서열 점수를 갖도록 XTEN이 실질적으로 비-반복성을 갖고;
- [0203] (d) XTEN이 GOR 알고리즘에 의해 측정될 때 90% 초과 빈도 코일 형성을 갖고;
- [0204] (e) XTEN이 초우-파스만 알고리즘에 의해 측정될 때 2% 미만의 알파 나선 및 2%의 베타-시트를 갖고;
- [0205] (f) XTEN이 TEPITOPE 알고리즘에 의해 분석될 때 예측된 T 세포 에피토프를 결여하고, 이때 상기 알고리즘에 의한 상기 예측에 대한 TEPITOPE 역치 점수가 -9의 역치를 갖는 것
- [0206] 을 특징으로 하고;
- [0207] 상기 융합 단백질이 약 4 이상의 겔보리 분자량 계수를 나타내고 치료 유효량을 사용함으로써 대상체에게 투여될 때 알러지, 말라리아, 자가 면역 질환, 급성 또는 만성 염증성 질환, 고혈압, 암의 진단, 예방 또는 치료의 효과를 나타내는 것인, 재조합 융합 단백질이다.
- [0208] (대한민국 공개 특허 10-2014-0069131, 대한민국 공개 특허 10-2011-01276969)
- [0210] 또한, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드는 알부민 융합(albumin fusion) 기술을 이용하여 변형(modification)할 수 있다. 즉, 재조합된 알부민(recombinant)을 HRF 결합 펩타이드에 연결할 수 있다.
- [0211] 즉, 본 발명에서 제공하는 발명의 일 측면은,
- [0212] HRF 결합 펩타이드와 재조합된 알부민이 분해 가능한 펩타이드 링커로 연결된 알부민 융합된 HRF 결합 펩타이드이다.
- [0214] 또한, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드는 항체 기반 생체 지속성 약물 플랫폼 기술을 적용할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드에 한미약품의 랩스커버리(Long Acting Protein/Peptide Discovery Platform Technology, Lapscovery) 기술 또는 제넥신의 HyFc(Hybrid Fc) 기술을 적용할 수 있다.
- [0215] 즉, 본 발명에서 제공하는 발명의 일 측면은,
- [0216] HRF 결합 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역이
- [0217] 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산

및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 중합체를 통해 연결된 HRF 결합 펩타이드 결합체이다.

[0218] (대한민국 공개 특허 10-2008-0064750)

[0220] 또한, 본 발명에서 제공하는 발명의 일 측면은,

[0221] HRF 결합 펩타이드가 하이브리드 Fc에 결합된 결합체로서,

[0222] 상기 하이브리드 Fc는 인간 IgG 서브클래스의 조합 또는 인간 IgD 및 IgG의 조합으로 유도되는 결합체이다.

[0223] 구체적으로, N-말단에서 C-말단 방향으로 힌지(Hinge) 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 하이브리드 인간 면역글로불린 Fc 단편인데, 여기에서 힌지 영역은 적어도 인간 IgD 힌지 영역 또는 인간 IgG1 힌지 영역의 부분적 아미노산 서열이며; CH2 도메인은 인간 IgG4 CH2 도메인으로서, 그 N-말단 영역이 인간 IgG2 CH2 또는 인간 IgD CH2 도메인의 N-말단 영역의 4-37개의 아미노산 잔기로 치환된 것이다.

[0224] 상기 결합체는 HRF 결합 펩타이드가 하기 식으로 표현되는 폴레펩타이드와 연결된 것이다:(하기 서열번호는 대한민국 공개 특허 10-2008-0094781)

[0225] $N'-(Z1)_p-Y-Z2-Z3-Z4-C'$

[0226] 상기 N'은 폴리펩타이드의 N-말단이고 C'는 폴리펩타이드의 C-말단이고;

[0227] p는 0 또는 1인 정수이고; 및

[0228] (i) Z1은 서열번호 11의 내지 90 내지 98 위치의 아미노산 잔기를 가지는 아미노산 서열이고,

[0229] Y는 서열번호 11의 99 내지 113 위치의 아미노산 잔기를 가지는 아미노산 서열이며,

[0230] Z2는 서열번호 12의 111 내지 116 위치의 아미노산 잔기를 가지는 아미노산 서열이고,

[0231] Z3-Z4는 서열번호 13의 118 내지 220 위치의 아미노산 잔기 및 서열번호 13의 221 내지 327 위치의 아미노산 잔기를 가지는 연속된 아미노산 서열로 구성된 아미노산 서열이거나, 또는

[0232] (ii) Z1은 서열번호 14의 90 내지 98 위치의 아미노산 잔기를 가지는 아미노산 서열이고,

[0233] Y는 서열번호 14의 158 내지 162 위치의 아미노산 잔기, 서열번호 14의 153 내지 162 위치의 아미노산 잔기, 서열번호 14의 148 내지 162 위치의 아미노산 잔기, 서열번호 14의 143 내지 162 위치의 아미노산 잔기, 서열번호 14의 133 내지 162 위치의 아미노산 잔기, 또는 서열번호 14의 99 내지 162 위치의 아미노산 잔기를 가지는 아미노산 서열이고,

[0234] Z2는 서열번호 14의 163 내지 170 위치의 아미노산 잔기를 가지는 아미노산 서열이고,

[0235] Z3-Z4는 서열번호 13의 121 내지 220 위치의 아미노산 잔기 및 서열번호 13의 221 내지 327 위치의 아미노산 잔기를 가지는 연속된 아미노산 서열로 구성된 아미노산 서열이다.

[0236] HRF 결합 펩타이드는 하이브리드 Fc의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 것이고, HRF 결합 펩타이드는 그 HRF 결합 펩타이드의 천연형의 순환 반감기에 비해 증가된 순환 반감기를 나타내는 것일 수 있다.

[0237] HRF 결합 펩타이드 및 하이브리드 Fc는 링커로 연결될 수 있다.

[0238] 상기 링커는 알부민 링커 또는 합성 링커일 수 있는데,

[0239] 상기 알부민 링커는 대한민국 공개 특허 10-2008-0094781의 서열번호 25, 321 내지 323, 318 내지 325, 316 내지 328, 313 내지 330, 311 내지 333, 또는 306 내지 338을 포함하는 것일 수 있다

[0240] 상기 합성 링커는 Gly 및 Ser 잔기로 구성된 10 내지 20개의 아미노산 잔기의 펩타이드일 수 있다.

[0241] 상기 합성 링커는 GGGGSGGGGSGGGSG일 수 있다.

[0242] (대한민국 공개 특허 10-2008-0094781)

- [0244] 또한, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드는 나노입자(리포좀, 엑소좀 등)를 이용하거나, 패치형 또는 마이크로니들을 통해 피부에 코팅 또는 로딩하여 투입할 수 있다.
- [0245] 또한, 본 발명에 따른 HRF 결합 펩타이드는 세포투과성 펩타이드를 이용하여 약물 전달에 사용할 수 있다. 예를 들어, 대한민국 공개 특허 10-2017-0114997의 펩타이드를 이용할 수 있다.
- [0246] 즉, 본 발명에서 제공하는 발명의 일 측면은,
- [0247] HRF 결합 펩타이드; 및
- [0248] 하기의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 알러지, 말라리아, 자가 면역 질환, 급성 또는 만성 염증성 질환, 고혈압, 암의 진단, 예방 또는 치료용 조성물:
- [0249] R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8-R9-R10
- [0250] R1은 M, L 또는 P로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,
- [0251] R2는 I, A, L, P 또는 H로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,
- [0252] R3는 I, L, A, P, 또는 H로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,
- [0253] R4는 F, E, A, L, P 또는 H로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,
- [0254] R5는 R 또는 K로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,
- [0255] R6는 A, M, I, P, H 또는 L로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,
- [0256] R7은 L, A, P 또는 H로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,
- [0257] R8은 I, L, A, P 또는 H로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,
- [0258] R9는 S, E 또는 Y로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,
- [0259] R10은 H, K, R, P 또는 L로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고, KK, KKK, 및 KKKK로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이 부가될 수 있다.
- [0260] 단, 상기 서열이 MIIFRIAASHKK, MIIFRALISHKK, MIIFRAAASHKK, LIIFRIAASHKK, MIIFRIAAYHKK, MIIFKIAASHKK, LIIFRILISHKK, 또는 MIIFRILISHKK인 경우는 제외한다.
- [0262] 한편, 본 발명에 따른 펩타이드의 아미노산 서열은 당업계에 공지된 통상의 기술에 따라 변형될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드는 아미노산 수를 증가시키거나 감소시킴으로써 변형될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 펩타이드의 할
- [0263] 성을 감소시키지 않는 범위내에서, 결합에 직접적으로 관여하거나 보존되어야 하는 잔기를 제외한 특정 잔기 성분이나 그 순서를 바꿈으로써 변형될 수도 있다. 변형가능한 아미노산은 자연적으로 존재하는 L- α -아미노산 뿐만 아니라, β , γ , δ 아미노산은 물론 D- α -아미노산의 유도체로도 변형 가능하다. 전형적으로, 하나의 아미노산이 치환된 펩타이드를 이용하여 정전기력이나 친수성이 결합에 미치는 영향을 조사한 결과, 양전하를 띠는 아미노산(예: Lys, Arg, His)이나 음전하를 띠는 아미노산(예: Glu, Asp, Asn, Gln)이 치환되면 민감도가 변화함을 알 수 있다. 이와 같이, 치환되거나 부가되는 잔기의 수나 형태는 필수적인 결합점 사이에 필요한 공간과 친수성 또는 소수성과 같이 요구되는 기능에 의해 결정된다. 이러한 치환에 의해 본 발명에 따른 펩타이드의 목적 단백질에 대한 친화도를 더 증가시킬 수 있다. 치환으로 인해 기능에 있어서 중요한 변화가 나타나기도 한다. 변화되는 잔기의 선택은 목적 위치에 존재하는 분자의 전기도, 소수성, 측쇄의 변화 또는 나선구조의 변화 등과 같이 펩타이드의 기본 골격을 유지하는데 큰 영향을 미치기도 한다. 일반적으로, 펩타이드의 성질에 중대한 변화를 일으키는 것은 세린과 같은 친수성 잔기가 루이신, 이소루이신, 페닐알라닌, 발린 또는 알라닌과 같은 소수성 잔기로 치환되거나, 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘과 같이 전기적으로 양성인 잔기가 글루탐산이나 아스파르트산과 같은 전기적으로 음성인 잔기로 치환되거나, 글리신과 같이 측쇄를 갖지 않는 아미노산이 부피가 큰 측쇄를 갖는 잔기로 치환되는 경우이다. 이상 언급한 바와 같은 사실을 고려하여, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 상기 특정 펩타이드를 그의 HRF에 대한 결합력 및 그에 따른 히스타민 분비 저해 활성을 유지 내지 증가시키거나 손상시키지 않는 범위내에서 통상의 기술을 이용하여 변형시킬 수 있으며, 이는 본 발

명의 범위내에 속하는 것이다.

[0265] 이하, 본 발명의 실시예 및 실험예를 하기에 구체적으로 예시하여 설명한다. 다만, 후술하는 실시예 및 실험예는 본 발명의 일부를 예시하는 것일 뿐, 본 발명에 이에 한정되는 것은 아니다.

[0267] <제조예 1> 메톡시 폴리에틸렌글리콜 프로피온알데하이드(5000)(aldehyde-PEG (5000))의 제조

[0268] 메톡시 폴리에틸렌글리콜 프로피온알데하이드 5 kDa를 NOF CORPORATION(일본)에서 구입하여 준비하였다.

[0270] <제조예 2> 메톡시 폴리에틸렌글리콜 하이드라지드 (5000)(hydrazide-PEG (5000))의 제조

[0271] 메톡시 폴리에틸렌글리콜 하이드라지드 5 kDa를 (주)선바이오(대한민국)에서 구입하여 준비하였다.

[0273] <제조예 3> 메톡시 폴리에틸렌글리콜 프로피온알데하이드 (10000)(aldehyde-PEG (10000))의 제조

[0274] 메톡시 폴리에틸렌글리콜 프로피온알데하이드 10 kDa를 NOF CORPORATION(일본)에서 구입하여 준비하였다.

[0276] <제조예 4>

[0277] 대한민국 공개 특허 10-2017-0004906의 실시예 1에 따라 아미노산 서열이 WYVYPSM(dTBP2)인 펩타이드를 준비하였다.

[0279] <실시예 1> N-말단 5K PEG 접합 dTBP2 (aldehyde-PEG (5000)-dTBP2)의 제조

[0280] 상기 N-말단 5K PEG 접합 dTBP2 (aldehyde-PEG (5000)-dTBP2)은 하기에 명시한 방법으로 제조한 것을 공급받아 사용하였다. 구체적으로, 상기 제조예 4에서 준비한 5 mg의 dTBP2를 정제수에 녹여 10 mg/mL 농도로 펩타이드 용액을 제조하고, 상기 제조예 1에서 준비한 메톡시 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드 53 mg을 취해 0.1 M 아세트이트 버퍼(40 mM NaCNBH₃ (pH 5.5))에 녹여 PEG 용액을 제조하였다. 제조예 4와 제조예 1의 반응 몰비가 1:2가 되도록 섞은 후 4 °C에서 18시간 동안 반응시켜 상기 실시예 1의 N-말단 5K PEG 접합 dTBP2을 준비하였다.

[0282] <실시예 2> C-말단 5K PEG 접합 dTBP2 (hydrazide-PEG (5000)-dTBP2)의 제조

[0283] 상기 C-말단 5K PEG 접합 dTBP2 (hydrazide-PEG (5000)-dTBP2)은 하기에 명시한 방법으로 제조한 것을 공급받아 사용하였다. 구체적으로, 상기 제조예 4에서 준비한 2 mg의 dTBP2를 정제수에 녹여 5 mg/mL 농도로 펩타이드 용액을 제조하고, 상기 제조예 2에서 준비한 메톡시 폴리에틸렌 하이드라지드 52.2 mg을 취해 50 mM MES 버퍼(pH 4.4)에 녹여 PEG 용액을 제조한 다음 dTBP2 펩타이드 용액에 제조예 4와 제조예 2의 반응 몰비가 1:5가 되도록 가한 후 실온에서 10분 동안 교반하였다. 농도 4mg의 EDAC(N-(3-메틸아미노프로필)-N-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드) 실온에서 1시간 30분 동안 반응시켜 상기 실시예 2에 따른 C-말단 5K PEG 접합 dTBP2를 준비하였다.

[0285] <실시예 3> N-말단 10K PEG 접합 dTBP2 (aldehyde-PEG (10000)-dTBP2)의 제조

[0286] 상기 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2 (aldehyde-PEG (10000)-dTBP2)은 하기에 명시한 방법으로 제조한 것을 공급받아 사용하였다. 구체적으로, 상기 제조예 4에서 준비한 50 mg의 dTBP2를 정제수에 녹여 10 mg/mL 농도로 펩타이드 용액을 제조하고, 상기 제조예 3에서 준비한 메톡시 폴리에틸렌 하이드라지드 1060 mg을 취해 0.1 M 아세트이트 버퍼(40 mM NaCNBH₃ (pH 5.5))에 녹여 PEG 용액을 제조하였다. 제조예 4와 제조예 3의 반응 몰비가 1:2가

되도록 섞은 후 4 °C에서 18시간 동안 반응시켰다.

[0288] <실험예 1> 실시예 1 및 실시예 2에 따른 PEG (5000)-dTBP2의 분리 정제 및 HPLC 분석, 질량 분석

[0289] 상기 실시예 1 및 실시예 2에서 제조한 PEG (5000)-dTBP2를 센트리콘-30을 사용하여 10 mM Tris 완충용액으로 투석한 후 음이온교환수지(mono-Q; Pharmacia, Sweden)로 실시예 1 및 실시예 2에서 각각 제조한 PEG (5000)-dTBP2를 분리하였다. 분리 과정에서 사용된 나트륨 염은 0으로부터 300 mM까지의 농도 구배로 사용하였다. 분리된 실시예 1 및 실시예 2에 따른 PEG (5000)-dTBP2의 양은 크기-배제 HPLC(size-exclusion High Performance Liquid Chromatography) 및 MALDI-TOF 질량 분석기(MALDI-TOF mass spectrometer)로 확인하였다. 그 결과를 도 1 내지 도 4에 나타내었다.

[0291] <실험예 2> 실시예 3에 따른 PEG (10000)-dTBP2의 분리 정제 및 HPLC 분석, 질량 분석

[0292] 상기 실시예 3에서 제조한 PEG (10000)-dTBP2를 센트리콘-30을 사용하여 10 mM Tris 완충용액으로 투석한 후 음이온교환수지(mono-Q; Pharmacia, Sweden)로 실시예 3에서 제조한 aldehyde-PEG (10000)-dTBP2를 분리하였다. 분리 과정에 사용된 나트륨 염은 0으로부터 300 mM까지의 농도 구배로 사용하였다. 분리된 실시예 3에 따른 aldehyde-PEG (10000)-dTBP2의 양은 크기-배제 HPLC(size-exclusion High Performance Liquid Chromatography) 또는 MALDI-TOF 질량 분석기(MALDI-TOF mass spectrometer)로 확인하였다. 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0294] <실험예 3> dTBP2, 실시예 1 및 실시예 2에 따른 PEG (5000)-dTBP2의 BEAS-2B 세포에서 HRF에 의한 IL-8 분비 억제 확인

[0295] 제조예 4, 실시예 1 및 실시예 2에서 각각 제조한 PEG (5000)-dTBP2를 농도별(0, 0.75 nM, 7.5 nM)로 1% 페니실린스트렙토마이신/DMEM(Gibco)으로 희석한 후 재조합 HRF 75 nM과 상온에서 15분 동안 인큐베이션 시킨 후 48 well 플레이트에서 70% 정도 자란 BEAS-2B 세포에 처리하였다. 상기 세포를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 상등액을 취하여 유리된 IL-8을 효소 면역흡착검출법(Biolegend)으로 정량하였다. IL-8 효소면역흡착검출법은 Biolegend Human IL-8 ELISA kit with pre coated plates(431508)의 프로토콜로 시행하였다. IL-8 항체가 미리 코팅된 플레이트를 각 웰 당 wash buffer를 300 μ l씩 넣고 총 4회 세척한 후 상등액을 50 μ l씩 넣고 2시간 동안 상온에 두었다. 2시간 후 플레이트 안의 상등액을 제거하고 다시 각 웰 당 wash buffer를 300 μ l씩 넣고 총 4회 세척한 후 100 μ l의 검출 항체(detection antibody) 용액을 넣고 1시간 동안 상온에 두었다. 그 후 다시 웰 당 wash buffer를 300 μ l씩 넣고 총 4회 세척한 후 100 μ l Avidin-HRP A 용액을 넣고 30분 동안 상온에 두었다. 마지막으로 웰 당 wash buffer를 300 μ l씩 넣고 5회 세척한 후 기질용액 F(substrate solution F) 100 μ l를 넣고 상온, 암실에서 10분 동안 둔 후 100 μ l의 정지용액(stop solution)을 추가로 넣고 450 nm, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Wash buffer, 검출 항체 용액, avidin HRP A 용액, 기질용액 F, 정지용액은 모두 kit(431508, biolegend)에 포함된 시약으로 사용하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0296] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, HRF에 의한 BEAS-2B 세포에서의 IL-8 분비 억제에 있어서, 제조예 1, 실시예 1 및 실시예 2가 모두 효과가 있음을 확인하였으며, 특히 실시예 1에 따른 N-말단 5K PEG 접합 dTBP2의 HRF에 의한 IL-8 분비 억제 효과가 가장 좋은 것으로 나타났다.

[0298] <실험예 4> 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid) 내에서 dTBP2와 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 호산구 증가 억제 효과 확인

[0299] 4-1. 오발부민(ovalbumin)으로 유도된 기관지 천식 및 비염 마우스 모델 제작 및 dTBP2와 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 투여

[0300] 기관지 천식 및 비염 동물 모델을 하기의 방법으로 제작하였다. 기관지 천식 및 비염 유발 시작 28, 14일 전에 오발부민(ovalbumin)을 수산화알루미늄 용액에 1 mg/ml의 농도로 용해시켜 오발부민용액을 제조하였고, 상기 용액 200 μ l를 마우스에 복강 주사하여 감작(sensitization)시켰다. 최종 감작 14일 경과 후, 8일 동안 격일로 총 4회 가볍게 마취시킨 마우스의 비강에 살린(saline)/PBS(정상 대조군, normal control; NC) 또는 10 mg/mL 오

발부민용액(양성 대조군, positive control; PC) 20 μ l를 피펫으로 점적하여 기관지 천식 및 비염을 유발시켰다. 상기 PC군과 동시에 같은 조건으로 기관지 천식 및 비염을 유발시키면서 제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2를 1 mg/kg의 농도로 200 μ l를 동시에 복강 주사하였다. 텍사메타손(D2915, Sigma Aldrich)은 멸균한 3차 증류수를 이용하여 용해하였으며 1mg/kg 로 제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2와 동일한 횟수로 투여하였다. (도 8).

표 1

	그룹	감작(IP)	점적(IN)	치료(IP)
1	NC	PBS	PBS	PBS, IP
2	PC	OVA/alum	OVA	PBS, IP
3	텍사메타손	OVA/alum	OVA	1 mg/kg, IP
4	제조예 4	OVA/alum	OVA	1 mg/kg, IP
5	실시예 3	OVA/alum	OVA	1 mg/kg, IP

4-2. 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid) 내에서 dTBP2와 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 호산구 증가 억제 효과 확인

제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 기관지 천식 및 비염 모델에서 호산구 증가 억제 효과를 확인하기 위하여, 상기 4-1의 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 동안 제조예 4와 실시예 3의 복강주사를 매일 총 8회 투여하였다. 조레틸(250 mg/kg)과 림폰(50 mg/kg) 혼합액을 마우스 복강 내로 주입하여 마취 후 개흉한 뒤, 기관에 칼날로 홈을 내어 20 게이지(gauge) 카테터를 기관에 삽입하고, 1회에 0.6 mL의 PBS를 3회 주입-수거하였으며, 수거율은 80%로 맞추었다. 수거된 기관지폐포세척액을 4℃, 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포침전물을 0.1 mL PBS로 재분산하여, 그 중 20 μ L를 전자동 혈구분석기 HEMAVET 950 FS(Drew Scientific, Inc.)를 사용하여 혈구세포의 조성을 분석하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 양성 대조군(PC)과 비교하였을 때 제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2를 처리한 그룹에서 모두 염증세포인 호산구가 감소함을 확인하였다. 구체적으로 제조예 4에 따른 dTBP2는 오발부민용액에 의해 약 0.75×10^5 cells/mL로 증가한 호산구를 약 40%만큼 감소시켰는데, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2 처리한 경우에는 그보다 더 우수한 효과로 약 55%만큼 감소시키는 것을 확인하였다. 이를 통해 dTBP2를 aldehyde-PEG (10000)을 이용하여 폐길화합으로써 호산구 감소 효과를 더욱 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

<실험예 5> 기관지 폐포 세척액 내에서 dTBP2와 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 IL-5 분비 억제 효과 확인

제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의

기관지 천식 및 비염 모델에서 IL-5 분비 억제 효과를 확인하기 위하여, 상기 4-1의 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 동안 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 매일 총 8회 투여하였다. 실험 종료 후 기관지폐포세척액을 원심분리하여 얻은 상등액에서의 IL-5의 양을 Mouse IL-5 ELISA Kit(Biolegend, 미국)을 이용하여 효소 면역흡착검출법으로 측정후 정량하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2이 기관지 폐포 세척액 내의 IL-5 분비를 효과적으로 억제함을 확인하였다. 구체적으로 제조예 4에 따른 dTBP2는 IL-5 분비를 약 25% 정도로 감소시켰으며, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2는 약 50% 정도로 감소시켰다.

다음으로, 적은 횟수로 투여한 경우에도 IL-5 분비 억제의 효과가 있는지 확인하기 위하여 다른 실험 조건은 동

일하게 하되, 상기 4-1의 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 동안 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 4일에 1회씩 총 2회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역흡착검출법으로 측정하여 정량하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0314] 또한, 상기 4-1의 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 1일째에 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 1회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역흡착검출법으로 측정하여 정량하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0315] 그 결과, 도 11, 도 12에 나타난 바와 같이, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2은 기관지 천식 및 비염 유발 기간 내 1회만 투여하더라도 IL-5 분비 억제에 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0317] 다음으로, 기관지 천식 및 비염이 유발된 후에 투여한 경우에도 IL-5분비 억제 효과가 있는지 확인하기 위하여 다른 실험 조건은 동일하게 하되, 상기 4-1 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 5일째에 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 1회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역 흡착검출법으로 측정하여 정량하였다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0318] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2이 기관지 폐포세척액 내의 IL-5 분비를 효과적으로 억제함을 확인하였다. 제조예 4에 따른 dTBP2는 IL-5 억제 효과가 보이긴 했으나 약하게 나타났고, 반면 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2은 기관지 천식 및 비염이 유발된 후 1회만 투여하더라도 IL-5 분비 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 이를 통해 dTBP2를 aldehyde-PEG (10000)을 이용하여 폐길화함으로써 IL-5 분비 억제 효과를 더욱 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0320] <실험예 6> 기관지폐포세척액 내에서 dTBP2와 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 IL-4 분비 억제 효과 확인

[0321] 제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 기관지 천식 및 비염 및 천식 모델에서 IL-4 분비 억제 효과를 확인하기 위하여, 상기 4-1의 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 동안 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 매일 총 8회 투여하였다. 실험 종료 후 상기 기관지 천식 및 비염 마우스 모델에서 기관지폐포세척액을 원심분리하여 얻은 상등액에서의 IL-4의 양을 Mouse IL-4 ELISA Kit(Biolegend, 미국)을 이용하여 효소 면역흡착검출법으로 측정 후 정량하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[0322] 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이, 제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2이 기관지 폐포 세척액 내의 IL-4 분비를 효과적으로 억제함을 확인하였다. 구체적으로 제조예 4에 따른 dTBP2는 IL-4 분비를 약 50% 정도로 감소시켰으며, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2는 약 60% 정도로 감소시켰다.

[0324] 다음으로, 적은 횟수로 투여한 경우에도 IL-4 분비 억제의 효과가 있는지 확인하기 위하여 다른 실험 조건은 동일하게 하되, 상기 4-1의 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 동안 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 4일에 1회씩 총 2회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역흡착검출법으로 측정하여 정량하였다. 그 결과를 도 15에 나타내었다.

[0325] 또한, 상기 4-1의 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 1일째에 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 1회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역흡착검출법으로 측정하여 정량하였다. 그 결과를 도 16에 나타내었다.

[0326] 그 결과, 도 15, 도 16에 나타난 바와 같이, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2은 기관지 천식 및 비염 유발 기간 내 1회만 투여하더라도 IL-4 분비 억제에 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0328] 다음으로, 기관지 천식 및 비염이 유발된 후에 투여한 경우에도 IL-4분비 억제 효과가 있는지 확인하기 위하여 다른 실험 조건은 동일하게 하되, 상기 4-1 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 5일째에 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 1회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역 흡착검출법으로 측정하여 정량하

였다. 그 결과를 도 17에 나타내었다.

[0329] 그 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2이 기관지 폐포세척액 내의 IL-4 분비를 효과적으로 억제함을 확인하였다. 제조예 4에 따른 dTBP2는 IL-4 억제 효과가 보이긴 했으나 약하게 나타났고, 반면 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2은 기관지 천식 및 비염이 유발된 후 1회만 투여하더라도 IL-4 분비 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 이를 통해 dTBP2를 aldehyde-PEG (10000)을 이용하여 폐길화함으로써 IL-4 분비 억제 효과를 더욱 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0331] <실험예 7> 기관지폐포세척액 내에서 dTBP2와 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 IL-13 분비 억제 효과 확인

[0332] 제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의

[0333] 기관지 천식 및 비염 모델에서 IL-13 분비 억제 효과를 확인하기 위하여, 상기 4-1의 마우스 모델에서 비염을 유발하는 8일 동안 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 매일 총 8회 투여하였다. 실험 종료 후 상기 기관지 천식 및 비염 마우스 모델에서 기관지폐포세척액을 원심분리하여 얻은 상등액에서의 IL-13의 양을 Mouse IL-13 ELISA Kit(R&D system, 미국)을 이용하여 효소 면역흡착검출법으로 측정 후 정량하였다. 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[0334] 그 결과, 도 18에 나타난 바와 같이, 제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2이 기관지 폐포 세척액 내의 IL-13 분비를 효과적으로 억제함을 확인하였다. 구체적으로 제조예 4에 따른 dTBP2는 양성 대조군과 비교할 때 약 30% 정도로 IL-13 분비 억제하는 효과를 보였고, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2는 약 20% 정도로 IL-13 분비를 억제하는 효과를 보였다.

[0336] 다음으로, 적은 횟수로 투여한 경우에도 IL-13 분비 억제의 효과가 있는지 확인하기 위하여 다른 실험 조건은 동일하게 하되, 상기 4-1의 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 동안 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 4일에 1회씩 총 2회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역흡착검출법으로 측정하여 정량하였다. 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[0337] 또한, 상기 4-1의 마우스 모델에서 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 1일째에 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 1회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역흡착검출법으로 측정하여 정량하였다. 그 결과를 도 20에 나타내었다.

[0338] 그 결과, 도 19, 도 20에 나타난 바와 같이, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2은 천식 및 비염 유발 기간 내 1회만 투여하더라도 IL-13 분비 억제에 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0340] 다음으로, 기관지 천식 및 비염이 유발된 후에 투여한 경우에도 IL-13분비 억제 효과가 있는지 확인하기 위하여 다른 실험 조건은 동일하게 하되, 상기 4-1 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 5일째에 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 1회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역 흡착검출법으로 측정하여 정량하였다. 그 결과를 도 21에 나타내었다.

[0341] 그 결과, 도 21에 나타난 바와 같이, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2은 기관지 천식 및 비염이 유발된 후 1회만 투여하더라도 IL-13 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 이를 통해 dTBP2를 aldehyde-PEG (10000)을 이용하여 폐길화함으로써 IL-13 분비 억제 효과를 더욱 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0343] <실험예 8> 마우스 혈장 내에서 dTBP2와 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 오발부민 특이적 IgE 분비 억제 효과 확인

[0344] 오발부민(Ovalbumin)은 알레르기를 유발하는 물질로 달걀 흰자에 주로 들어 있는 물질이다. 제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 기관지 천식 및 비염 모델에서 혈장 내 오발부민 특이적 IgE 분비 억제 효과를 확인하기 위하여, 상기 4-1의 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 동안 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 매일 총 8회 투여하였다. 상기 비염 마우스 모델에서 실험 종료 후, 조레틸 (250 mg/kg)과 덤폰(50 mg/kg) 혼합액을 마우스 복강 내로 주입하여 마취 후 개흉한 뒤, 폐파란이 코팅된 26 게

이지 1 mL 주사기로 심장을 천자하여 0.8 mL 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 4℃, 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈장성분을 채취하였다. 이러한 과정을 통하여 얻은 혈정에서 오발부민 특이적 IgE의 양을 Mouse OVA specific IgE Kit(Biolegend, 미국)을 이용하여 효소 면역흡착검출법으로 측정후 정량하였다. 그 결과를 도 22에 나타내었다.

[0345] 그 결과 도 22에 나타난 바와 같이, 제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2이 혈장 내의 오발부민 특이적 IgE 분비를 효과적으로 억제함을 확인하였다. 구체적으로, 제조예 4에 따른 dTBP2은 약 50% 수준으로 IgE 분비를 감소시켰으며, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2 또한 약 50% 수준으로 IgE 분비를 억제하는 효과를 보였다.

[0346] 이를 통해 dTBP2와 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2이 혈장 내 오발부민 특이적 IgE 분비 억제 효과가 매우 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0348] 다음으로, 적은 횟수로 투여한 경우에도 혈장 내 오발부민 특이적 IgE 분비 억제 효과가 있는지 확인하기 위하여 다른 실험 조건은 동일하게 하되, 상기 4-1의 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 동안 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 4일에 1회씩 총 2회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역흡착검출법으로 측정하여 정량하였다. 그 결과를 도 23에 나타내었다.

[0349] 상기 4-1의 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 1일째에 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 1회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역흡착검출법으로 측정하여 정량하였다. 그 결과를 도 24에 나타내었다.

[0350] 그 결과, 도 23, 도 24에 나타난 바와 같이, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2은 기관지 천식 및 비염 유발 기간 내 1회만 투여하더라도 혈장 내 오발부민 특이적 IgE 분비 억제에 효과가 있으며 제조예 4보다 실시예 3이 억제능이 우수함을 확인하였다.

[0352] 다음으로, 기관지 천식 및 비염이 유발된 후에 투여한 경우에도 혈장 내 오발부민 특이적 IgE 분비 억제 효과가 있는지 확인하기 위하여 다른 실험 조건은 동일하게 하되, 상기 4-1 마우스 모델에서 기관지 천식 및 비염을 유발하는 8일 중 5일째에 제조예 4와 실시예 3의 복강 주사를 1회 투여하고 동일한 방법으로 효소 면역 흡착검출법으로 측정하여 정량하였다. 그 결과를 도 25에 나타내었다.

[0353] 그 결과, 도 25에 나타난 바와 같이, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2은 기관지 천식 및 비염이 유발된 후 1회만 투여하더라도 혈장 내 오발부민 특이적 IgE 분비 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 이를 통해 dTBP2을 aldehyde-PEG (10000)을 이용하여 폐길화합으로써 혈장 내 오발부민 특이적 IgE 분비 억제 효과를 더욱 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0355] <실험예 9> dTBP2와 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 약동학적 분석 (Pharmacokinetic study)

[0356] 순화기간을 거친 7~8주령 ICR 마우스에 제조예 4에 따른 dTBP2와 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2를 각각 10 mg/kg IV 투여한 후 정해진 시간에 따라 채혈하였다. 제조예 4와 실시예 3을 DMSO:PEG400:DW=5:55:40으로 제조된 용액에 5 mL/kg 투여하였다. 혈액 샘플을 주사 후 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 시간에 채취하였다. 혈액은 4℃, 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 internal standard가 포함된 cold acetonitrile을 혈장 성분의 4배 용량을 가한 후 제 단백 처리하였다. 다시 4℃, 13000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 채취한 후 Agilent 6460 LC-MS/MS로 분석하였다. 약동학적 분석은 Phoenix WinNonlin (Pharsight ver 6.4, 미국)을 사용하여 non-compartmental analysis 모델을 이용하여 산출하였다. 그 결과를 도 26에 나타내고, 하기 표 2에 약동학적 결과를 분석하여 나타내었다.

표 2

파라미터	제조예 4, IV, 10 mg/kg	실시예 3, IV, 10 mg/kg
T _{max} (h)	NA	NA

$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	NA	NA
$T_{1/2}$ (h)	1.91	3.18
AUC_{last} ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)	0.02	2.83
AUC_{∞} ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)	0.03	3.15
CL (L/h/kg)	292.34	3.29
V_{ss} (L/kg)	782.86	7.37
F_t (%)	NA	NA

[0359] NA: 해당사항 없음(not applicable)

[0360] $T_{\max}$: $C_{\max}$ 에 대한 시간

[0361] $C_{\max}$: 혈장 농도의 최대값

[0362] $T_{1/2}$: 반감기

[0363] AUC_{last} : 처음부터 농도 측정이 가능한 최대 시간까지의 농도-시간 곡선의 면적

[0364] AUC_{∞} : 처음부터 무한대까지의 농도-시간 곡선의 면적

[0365] CL: 전체 혈장 청소양(clearance from plasma)

[0366] V_{ss} : 확산된 정상상태 양 (steady-state volume of distribution)

[0367] F_t : 생체이용률(bioavailability) ($AUC_{p.o.}/AUC_{i.v.}$) x 100

[0369] 그 결과, 도 26에 나타난 바와 같이, 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 혈장 내 안정성이 제조예 4에 따른 dTBP2에 의해 개선되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 표 1을 통해 제조예 4에 비해 폐길화된 실시예 3의 반감기가 약 1.6 배 증가한 것을 확인하였다. 또한, 도 18의 초기 혈장 농도가 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2가 약 1000배 높은 것을 확인할 수 있으며, 이를 통해 제조예 4의 펩타이드를 폐길화함으로써 안정성이 약 1000배로 증가한 것을 알 수 있다.

[0371] <실험예 10> 10K PEG 접합 dTBP2의 대사 안정성 확인

[0372] 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2의 간에서의 1단계 대사 안정성을 평가하기 위하여 마우스 및 인간의 간 마이크로솜을 사용하여 아래와 같이 평가하였다. 0.5 M 포타슘 포스페이트 완충액 (pH 7.4)으로 희석시킨 마우스, 인간 간 마이크로솜을 37℃에서 5분간 배양시킨 후 실시예 3과 함께 대사 효소를 활성화하기 위한 NADPH를 37℃에서 30분간 반응시킨 후 잔존한 실시예 3의 양을 분석하였다. 반응 종결시 internal standard가 포함된 cold acetonitrile을 가한 후 제 단백 처리하였으며 4℃ 4000 rpm에서 15분 원심 분리 후 상층액을 LC-MS/MS로 분석하였다. 레퍼런스 물질인 부스피론(bupirone)으로 시스템을 검증하였다. 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

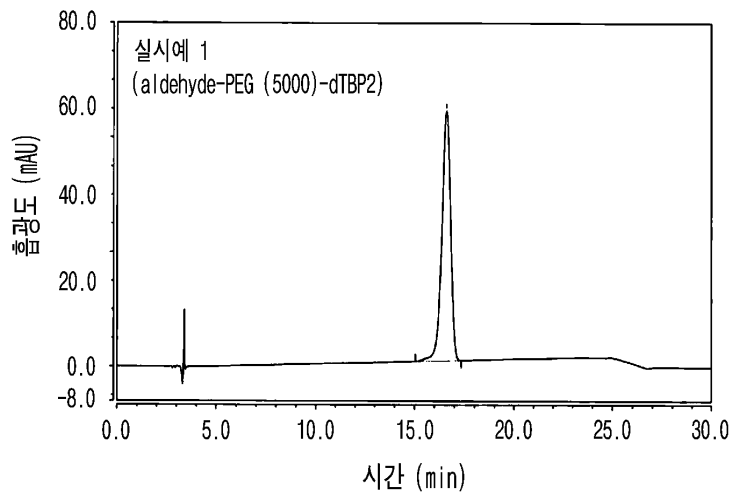
[0374]

화합물	쥐 (%)	인간 (%)
실시예 3	75.26	75.77
부스피론	0.10	6.15

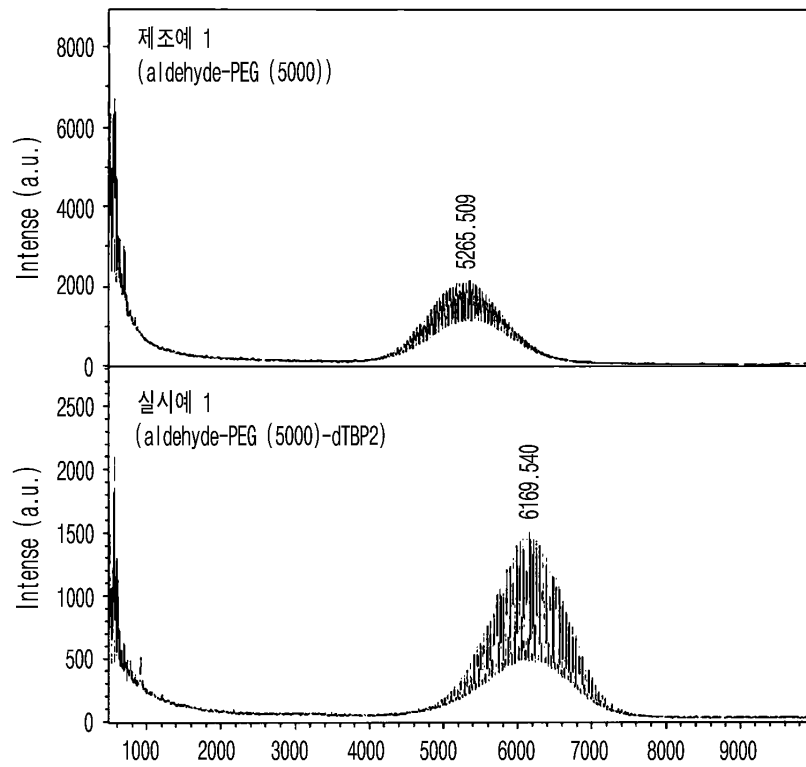
- [0376] 해당 실험의 평가에 있어, 30분간의 반응 실험 결과인 % 값에 따른 마이크로솜 안정성 평가 기준은 아래와 같다 (R.SCOTT OBACH, Prediction of human clearance of twenty-nine drugs form hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes, 1999, 27, (11): 1350-59).
- [0377] > 90%: 반감기가 3시간 이상으로 매우 안정한 화합물
- [0378] 70~90%: 반감기가 1~3시간 정도로 안정한 화합물
- [0379] 50~70%: 반감기가 30~60분 정도로 비교적 안정한 화합물
- [0380] 30~50%: 반감기가 15~30분 정도로 비교적 불안정한 화합물
- [0381] < 30%: 반감기가 15분 이하로 불안정한 화합물
- [0383] 상기 평가 기준을 참고할 때, 본 발명 실시예 3에 따른 N-말단 10K PEG 접합 dTBP2는 쥐와 인간에서 30분 후 잔존한 약물이 모두 75% 이상으로써, 반감기가 약 1 내지 3시간 정도인 안정한 화합물인 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 펩타이드가 생체 내에서 높은 안정성을 가지고 약효를 발휘할 수 있으므로 투약 횟수를 줄일 수 있으므로 약물로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0385] 이상, 본 발명을 바람직한 제조예, 실시예 및 실험예를 통해 상세히 설명하였으나, 본 발명의 범위는 특정 실시예에 한정되는 것은 아니며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 또한, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 이해하여야 할 것이다.

도면

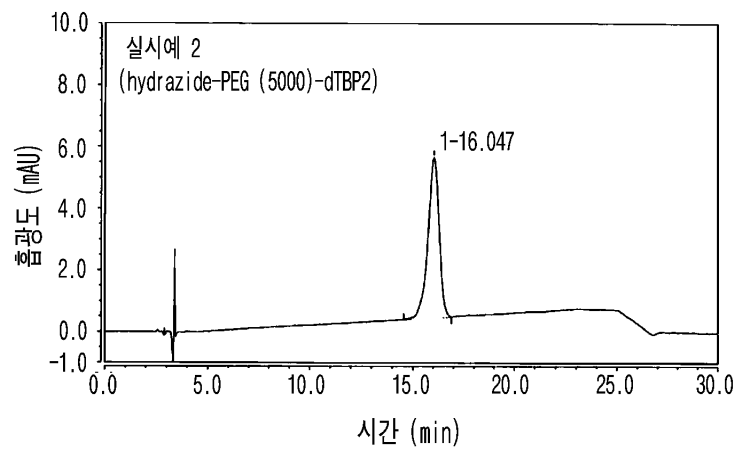
도면1



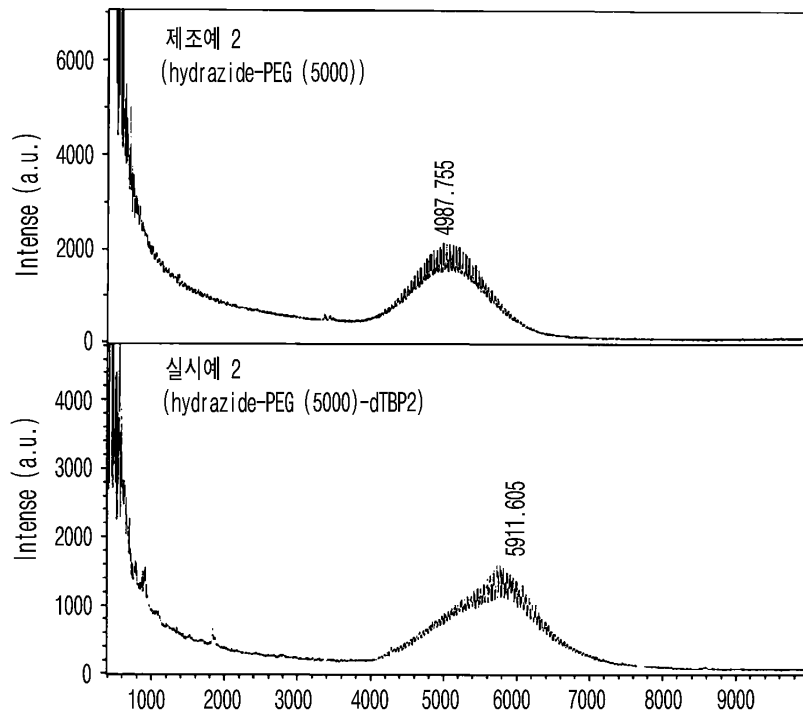
도면2



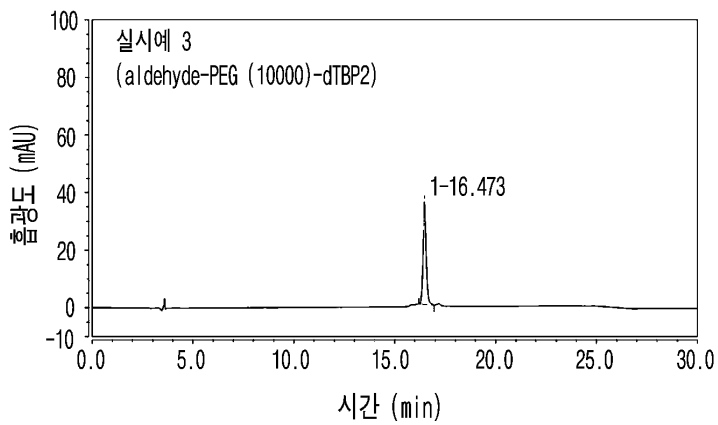
도면3



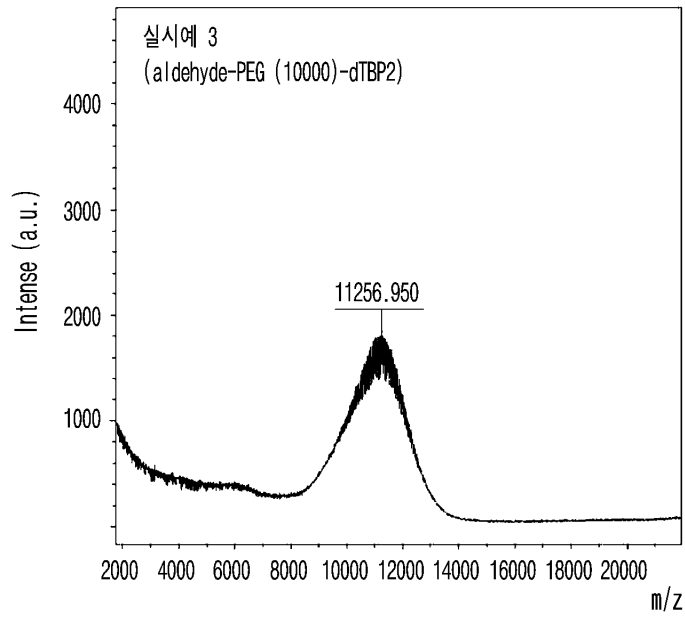
도면4



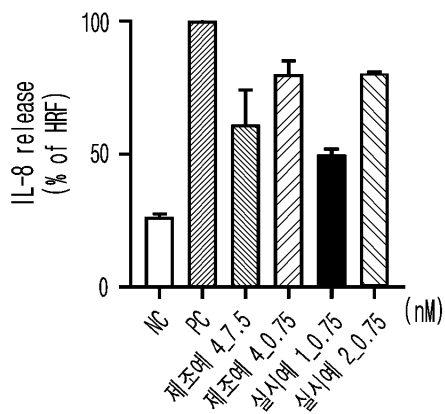
도면5



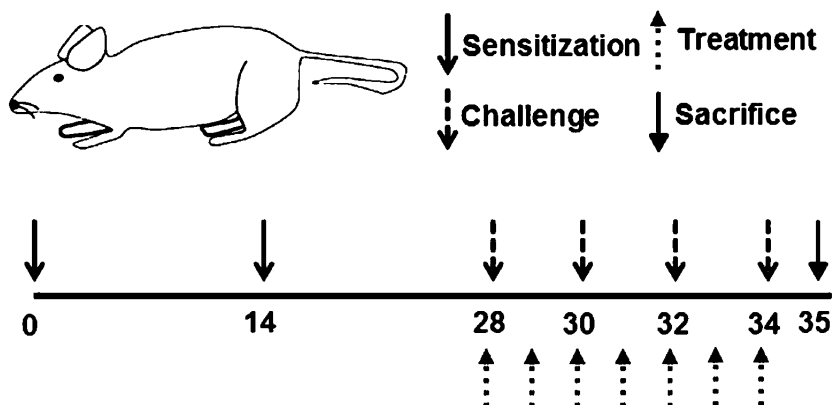
도면6



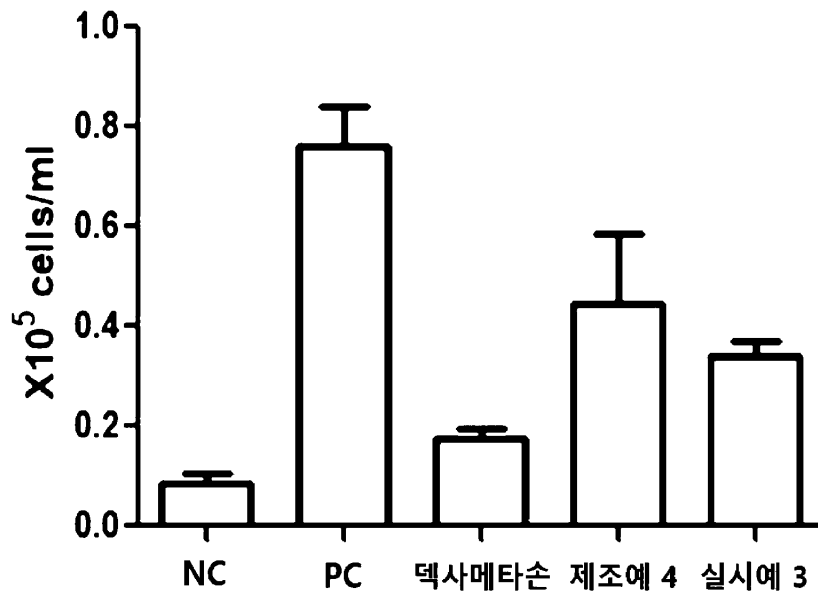
도면7



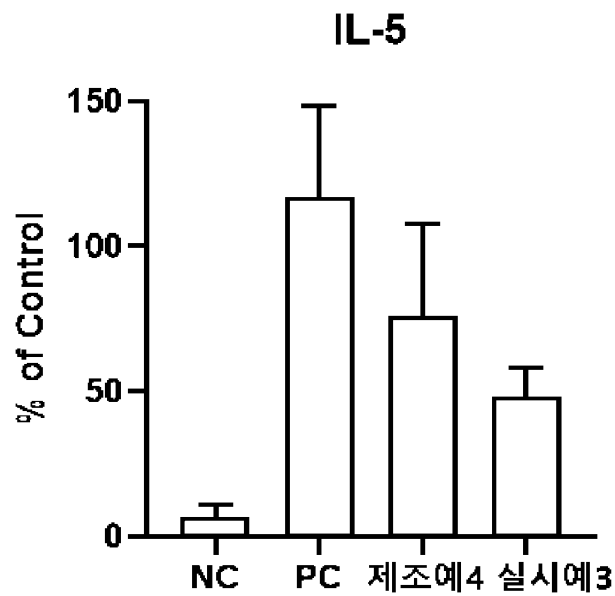
도면8



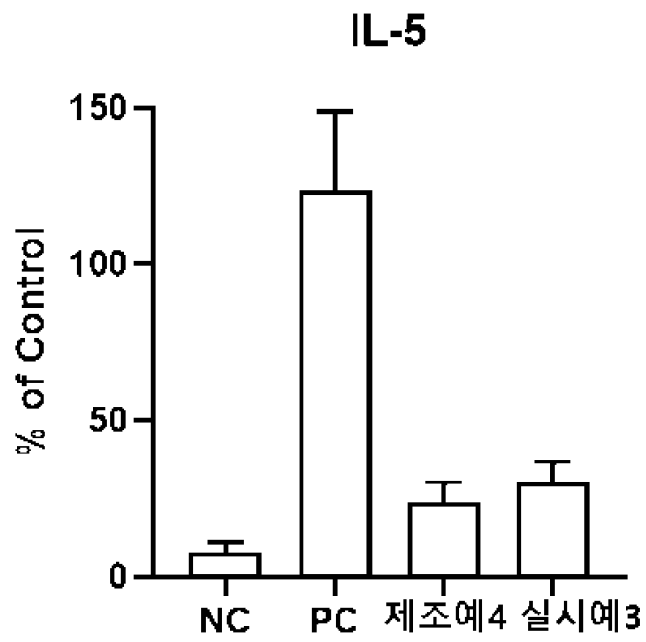
도면9



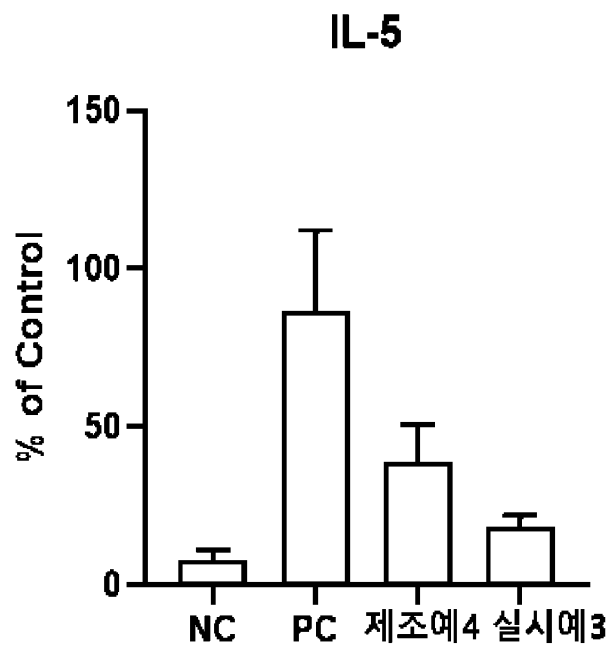
도면10



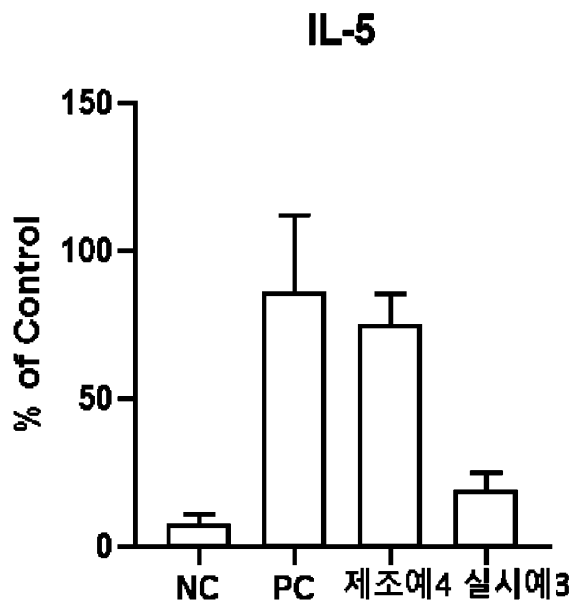
도면11



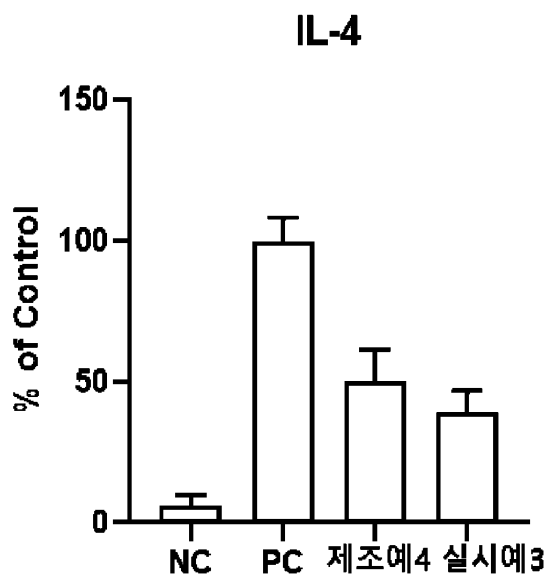
도면12



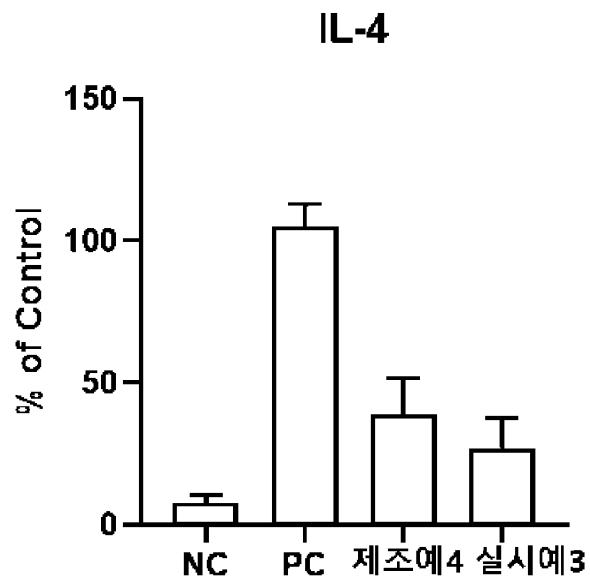
도면13



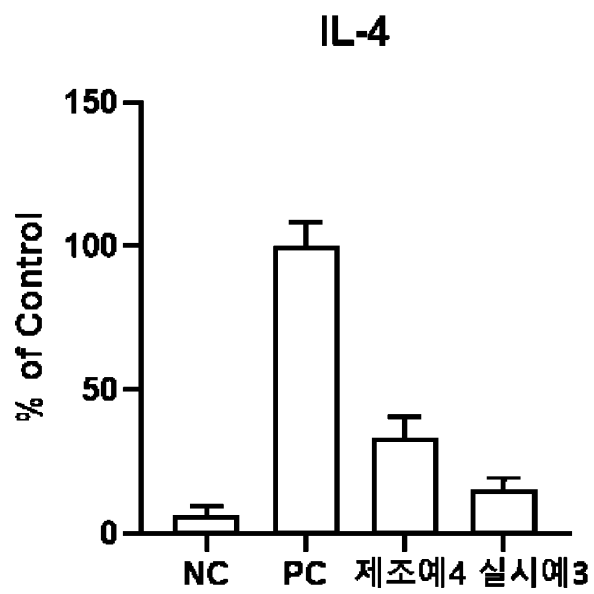
도면14



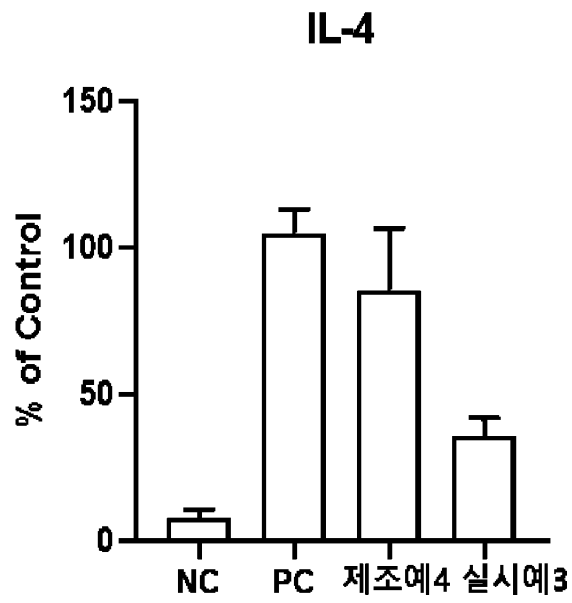
도면15



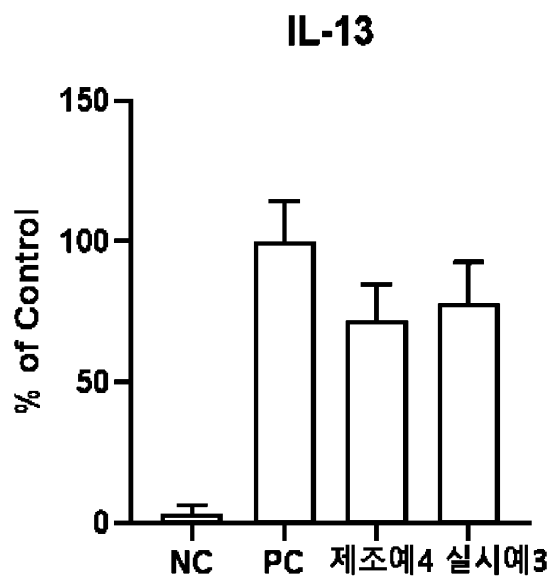
도면16



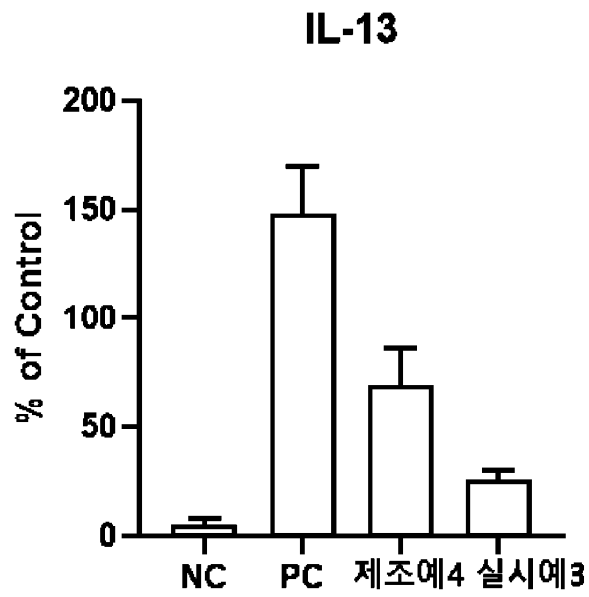
도면17



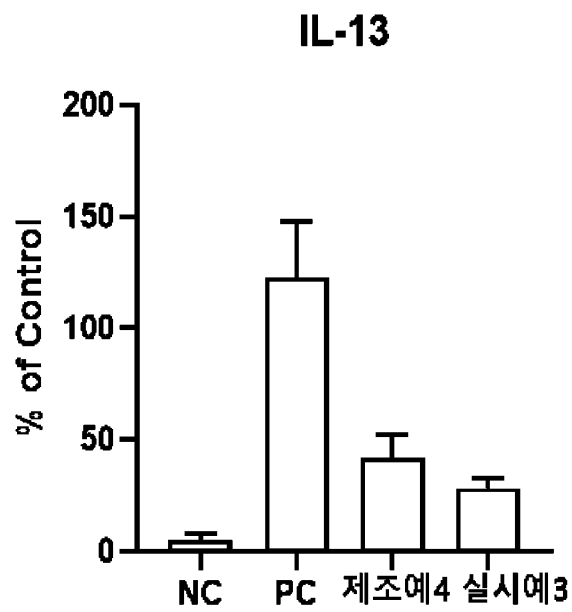
도면18



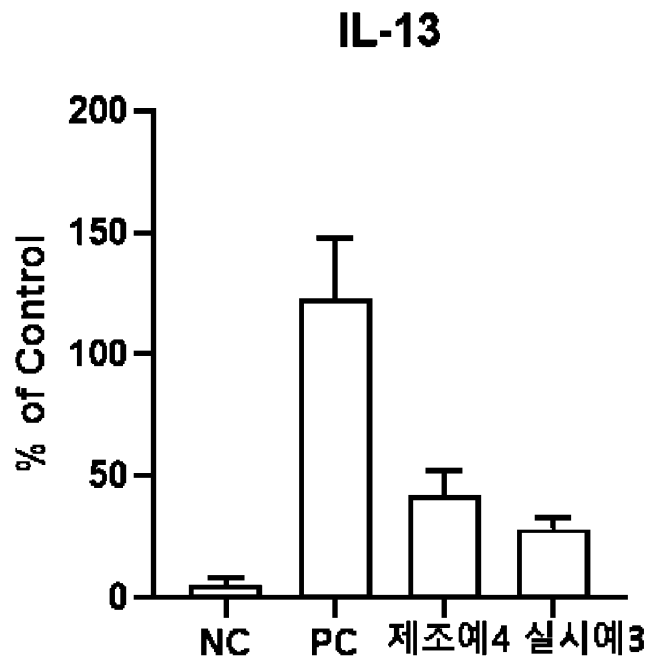
도면19



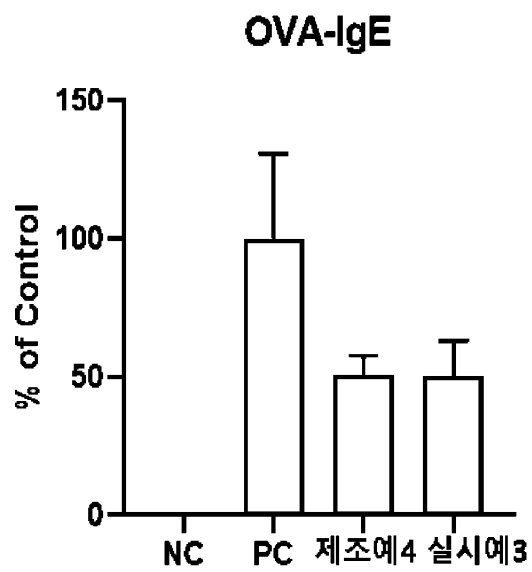
도면20



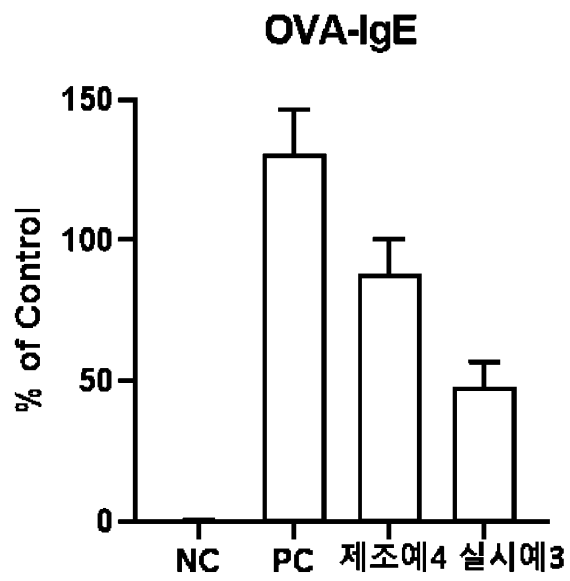
도면21



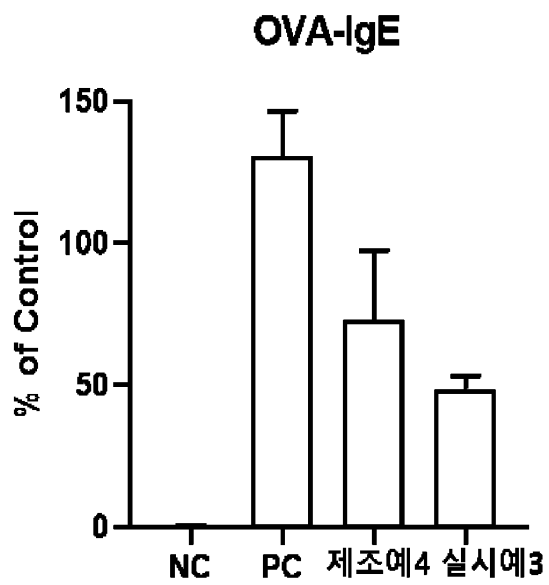
도면22



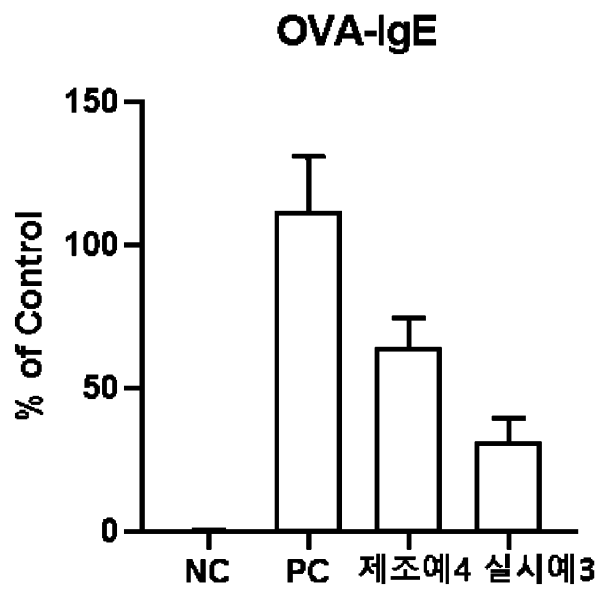
도면23



도면24



도면25



도면26

