



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0037487
 (43) 공개일자 2009년04월15일

(51) Int. Cl.
 A61K 38/16 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)
 A61P 17/06 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2009-7004065
 (22) 출원일자 2009년02월26일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2009년02월26일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2007/074514
 국제출원일자 2007년07월26일
 (87) 국제공개번호 WO 2008/014414
 국제공개일자 2008년01월31일
 (30) 우선권주장
 60/833,239 2006년07월26일 미국(US)

(71) 출원인
바이오마크 파마슈티칼스 리미티드
 미합중국 노스캐롤라이나주 27615, 랄레이, 수트 200, 폴스 오브 더 뉴스 로드 7200
 (72) 발명자
파리크, 인두
 미합중국 노스캐롤라이나주 27514, 차펠힐, 부커 크릭 로드 2558
 (74) 대리인
이한영

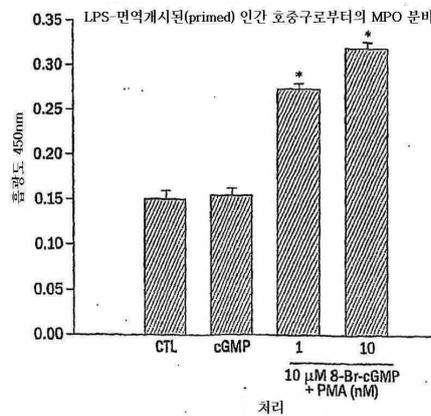
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 염증 매개물질의 분비를 감쇄시키는 방법 및 그에 유용한 펩티드

(57) 요약

본 발명은 세포 분비와정을 저해 또는 억제하는 방법들을 포함한다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 염증세포내 과립(granule)으로부터 염증 매개물질의 분비와 연관된 기작을 억제함으로써, 염증세포로부터 염증 매개물질의 분비를 저해 또는 감소시키는 것에 관한 것이다. 이에, 본 발명은 염증세포내 소낭체(vesicle)로부터 염증 매개물질의 분비와 관련된 질환에서의 약리적 중재(pharmacological intervention)를 위한 몇가지 신규한 세포내 표적(intracellular target)을 설명하는 세포내 신호전달기작(intracellular signaling mechanism)을 개시한다. 본 발명의 MANS 펩티드 단편들 및 그의 변이체들이 이러한 방법에 유용하다.

대표도 - 도9



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 참조서열인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열;

(b) GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 서열을 가지는 아미노산 서열; 및,

(c) (a)에 정의된 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 최소한 하나의 펩티드를 포함하는 약학조성물을, 최소한 하나의 펩티드가 부재할 경우 야기되는 염증 세포의 최소한 하나의 동형의 염증세포로부터 유리되는 염증 매개물질의 분비와 비교하여, 최소한 하나의 염증 세포로부터 상기 염증 매개물질의 분비를 억제하기에 치료적으로 유효한 염증 매개물질 분비-억제량(release-reducing amount)으로 조직 및/또는 체액에 투여하는 단계를 포함하고,

상기 펩티드의 C-말단 아미노산은 선택적, 독립적, 화학적으로 변형되고, 상기 펩티드의 N-말단 아미노산은 C₂ 내지 C₁₃ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₅ 내지 C₂₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, 및 트리플루오로 아세트산으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 카르복시산으로 아실화되어 독립적, 화학적으로 변형되거나, 화학적으로 변형되지 않고(단, 상기 펩티드는 그의 아미노산 서열이 C₂ 내지 C₁₃ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₅ 내지 C₂₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, 및 트리플루오로 아세트산으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 카르복시산으로 아실화되어 참조서열의 GAQF 서열로 시작하는 경우, 아실화에 의하여 변형되거나, 화학적으로 변형되지 않는다), 약학적으로 허용되는 담체와 선택적으로 결합하는 것을 특징으로 하는,

최소한 하나의 개체의 조직 및/또는 체액의 염증세포에서 과립으로부터 최소한 하나의 염증 매개물질의 분비를 억제하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 아세틸화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 펩티드는 최소한 10개의 연속하는 아미노산 잔기로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 펩티드는 아세틸-펩티드 106(서열번호 106)으로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 최소한 4개의 연속하는 아미노산 잔기로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 최소한 6개의 연속하는 아미노산 잔기로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 미리스토일화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의해 아미드화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 (a)의 아미노산 서열의 N-말단 아미노산이 참조서열인 GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 2 내지 21번 위치 아미노산으로부터 선택되는 (a)의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 미리스토일화 또는 아세틸화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의해 아미드화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서,

염증 매개물질의 분비를 억제하는 단계는 상기 개체의 염증세포로부터 염증 매개물질을 분비하는 기작을 저해 또는 억제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1항 내지 제 12항의 어느 한항에 있어서,

상기 펩티드는 추가로 약학적으로 허용되는 담체를 포함하여 약학 조성물을 형성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 12항에 있어서,

상기 염증세포는 백혈구인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 12항에 있어서,
상기 염증세포는 과립구인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 12항에 있어서,
상기 염증세포는 중성구, 호중구, 호산구 및 이들의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 12항에 있어서,
상기 염증세포는 단핵구 또는 대식구인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 12항에 있어서,
상기 염증 매개물질은 미엘로퍼옥시다제(MPO), 호산구 퍼옥시다제(EPO), 주요 기초 단백(MBP), 리소자임, 그랜자임, 히스타민, 프로테오글리칸, 단백질 분해효소, 화학주성 인자, 사이토카인, 아라키돈산 대사물, 디펜신, 세균 투과성 증대 단백질(BPI), 엘라스타제, 카텝신 G, 카텝신 B, 카텝신 D, 베타-D-글루쿠로니다제, 알파-만노시다제, 포스포리파제 A2, 콘드로이틴-4-설페이트, 단백질 가수분해효소 3, 락토펜린, 콜라겐 분해효소, 보체 활성화제, 보체 수용체, N-포르밀메티오닐-루실-페닐알라닌(FmIP) 수용체, 라미닌 수용체, 사이토크롬 b₅₅₈, 단핵세포 화학주성 인자, 히스타미나제, 비타민 B12 결합 단백질, 젤라티나제, 플라스미노젠 활성화제, 베타-D-글루쿠로니다제 및 이들의 조합으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 12항에 있어서,
염증 매개물질은 미엘로퍼옥시다제(MPO), 호산구 퍼옥시다제(EPO), 주요 기초 단백(MBP), 리소자임, 그랜자임, 및 이들의 조합으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 1항에 있어서,
펩티드의 효과적인 면역 매개물질 분비-억제량은 상기 펩티드가 부재할 경우 최소한 하나의 염증세포로부터 분비되는 양과 비교하여 최소한 하나의 염증세포로부터 분비되는 염증 매개물질의 양을 약 1% 내지 99% 감소시키는 펩티드의 탈과립-억제량(degranulation-inhibiting amount)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1항에 있어서,

펩티드의 효과적인 면역 매개물질 분비-억제량은 상기 펩티드가 부재할 경우 최소한 하나의 염증세포로부터 분비되는 양과 비교하여, 최소한 하나의 염증세포로부터 분비되는 염증 매개물질의 양을 약 5-50% 내지 약 99%사 이로 감소시키는 펩티드의 탈과립-억제량을 포함하는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 22

제 1항에 있어서,

개체는 호흡기 질환에 걸린 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 23

제 22항에 있어서,

호흡기 질환은 천식, 만성 기관지염, COPD 및 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 24

제 1항에 있어서,

개체는 포유동물인 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 25

제 24항에 있어서,

포유동물은 사람, 개과 동물, 말과 동물 및 고양이과로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 26

제 1항에 있어서,

투여는 국소 투여, 비경구 투여, 직장 투여, 폐 투여, 비강 투여, 및 경구투여로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 27

제 26항에 있어서,

폐 투여는 에어로졸을 포함하는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 28

제 27항에 있어서,

상기 에어로졸은 건조 분말 흡입기, 계량 용량 흡입기 및 분무기로부터 생성되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 29

제 1항에 있어서,

개체에 항생제, 항바이러스 화합물, 항기생충성 화합물, 항-염증 화합물 및 면역 억제제로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 2차 분자(second molecule)를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 30

제 1항에 있어서,

개체는 보웬 질환(bowel disease), 피부 질환, 자가면역 질환, 고통 증후군(pain syndrome) 및 이들의 조합으로 그룹으로부터 선택되는 질환으로 고통받는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 31

제 30항에 있어서,

보웬 질환은 궤양성 대장염, 크론병(Crohn's disease) 및 과민성 대장 증후군(irritable bowel syndrome)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 32

제 30항에 있어서,

피부질환은 빨간코(rosacea), 습진(eczema), 건선(psoriasis) 또는 심각한 좌창(severe acne)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 33

제 1항에 있어서,

개체는 관절염으로 고통받는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 34

제 1항에 있어서,

상기 아미노산 서열(c)는 서열번호 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 250, 251 및 252로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 35

제 34항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 아세틸화되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 36

제 34항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 미리스토일화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제 34항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의해 아미드화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

(a) 참조서열인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열;

(b) GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 서열을 가지는 아미노산 서열; 및,

(c) (a)에 정의된 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지고,

상기 펩티드의 C-말단 아미노산은 선택적, 독립적, 화학적으로 변형되며, 상기 펩티드의 N-말단 아미노산은 C₂ 내지 C₁₃ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₅ 내지 C₂₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, 및 트리플루오로 아세트산으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 카르복시산으로 아실화되어 독립적, 화학적으로 변형되거나, 화학적으로 변형되지 않고(단, 상기 펩티드는 그의 아미노산 서열이 C₂ 내지 C₁₃ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₅ 내지 C₂₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, 및 트리플루오로 아세트산으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 카르복시산으로 아실화되어 참조서열의 GAQF 서열로 시작하는 경우, 아실화에 의하여 변형되거나, 화학적으로 변형되지 않는다),

최소한 하나의 펩티드가 부재할 경우 야기되는 염증 세포의 최소한 하나의 동형의 염증세포로부터 유리되는 염증 매개물질의 분비와 비교하여, 최소한 하나의 염증 세포로부터 상기 염증 매개물질의 분비를 억제하기에 치료적으로 유효한 염증 매개물질 분비-억제량으로 약학적으로 허용되는 담체와 선택적으로 결합하는

펩티드.

청구항 39

제 38항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 아세틸화되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 40

제 39항에 있어서,

상기 펩티드는 최소한 10개의 연속되는 아미노산 잔기로 구성되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 41

제 40항에 있어서,

상기 펩티드는 아세틸-펩티드 106(서열번호 106)으로 구성되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 42

제 38항에 있어서,

상기 펩티드는 최소한 4개의 연속되는 아미노산 잔기로 구성되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 43

제 38항에 있어서,

상기 펩티드는 최소한 6개의 연속되는 아미노산 잔기로 구성되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 44

제 38항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 미리스토일화되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 45

제 38항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의해 아미드화되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 46

제 38항에 있어서,

상기 펩티드는 아미노산(a)의 N-말단 아미노산이 참조서열인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 2 내지 21번 위치의 아미노산으로부터 선택되는 (a)의 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 47

제 46항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 미리스토일화되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 48

제 46항에 있어서,

상기 펩티드는 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의해 아미드화되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 49

제 38항에 있어서,

상기 아미노산 서열(a)와 실제적으로 동일한 아미노산 서열(c)는 서열번호 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 250, 251 및 252로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는

펩티드.

청구항 50

제 49항에 있어서,
상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 아세틸화되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 51

제 49항에 있어서,
상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 미리스토일화되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 52

제 49항에 있어서,
상기 펩티드는 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의해 아미드화되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 53

제 38항 내지 제 52항의 어느 한 항에 개시된 분리된 펩티드 및 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 54

제 38항 내지 제 52항의 어느 한 항에 개시된 분리된 펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 55

제 54항에 있어서,
조성물은 무균상태(sterile), 살균가능(sterilizable) 또는 살균(sterilized)된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 56

제 38항 내지 제 52항의 어느 한 항에 개시된 최소한 1개의 분리된 펩티드를 포함하는 키트.

청구항 57

제 1항 내지 제 37항의 어느 한 항에 있어서,
상기 펩티드의 투여는 개체에 있어서 최소한 하나의 점액(mucus) 분비세포 또는 조직으로부터 MARCKS-연관 과분비를 감소시킴으로써, 개체의 뮤신 과분비는 상기 펩티드의 투여가 없을 경우 야기되는 것과 비교하여 감소하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

- <1> 관련출원의 상호참조
- <2> 본 출원은 전문이 참고문헌으로 본 명세서에 포함된, 2006년 7월 26일자 미합중국 특허출원 제 60/833,239호를 우선권으로 한다.
- <3> 발명의 분야
- <4> 본 발명은 염증 세포로부터 염증 매개물질의 자극분비(stimulated release)을 늦추는(억제하는 또는 저해하는) 펩티드 조성물 및 그를 이용하여 염증 세포로부터 염증 매개물질의 자극분비를 감쇄시키는(억제하는 또는 저해하는) 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 염증 세포로부터 염증 매개물질의 분비를 조절하는 세포내 신호기

작(intracellular signaling mechanism)을 조절하는 이들 펩티드 또는 펩티드 조성물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- <5> 염증성 백혈구(inflammatory leukocyte)는 세포내에서 분리되며 세포질막-결합 과립(cytoplasmic membrane-bound granule)으로 저장되는 수많은 염증 매개물질을 합성한다. 이러한 매개물질의 예로서는, 이에 제한되는 것은 아니나, 중성구에 존재하는 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO)(참조, 예를 들면, Borregaard N, Cowland JB. Granule of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood 1997; 89:3503-3521), 호산구에 존재하는 호산구 퍼옥시다제(eosinophil peroxidase, EPO) 및 주요 기초 단백질(major basic protein, MBP)(참조, 예를 들면, Gleich G J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. J. Allergy Clin Immunol 2000; 105:651-663), 단핵구/대식구(monocyte/macrophage)에 존재하는 리소자임(참조, 예를 들면, Hoff T, Spencker T, Emmendorfer A., Goppelt-Strube M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. J Leukoc Biol 1992; 52:173-182; and Balboba M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-dependent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. J Immunol 2003; 170:5276-5280), 및 자연살상(natural killer, NK) 세포 및 세포독성 임파구(참조, 예를 들면, Bochan MR, Goebel WS, Brahmi Z. Stably transfected antisense granzyme B and perforin constructs inhibit human granule-mediated lytic ability. Cell Immunol 1995; 164:234-239; Gong JH., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line(NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. Leukemia 1994; 8:652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tarn YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. J Hematother Stem Cell Res 2001; 10:369-383; and Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. J Immunol Methods 1987; 104: 183-190)을 포함한다. 이러한 매개물질들은 상처부위에서 분비되어 염증 및 폐나 다른 부위와 같은 조직 재생에 기여한다. 백혈구는 세포 외 기작에 의하여 이들 과립구를 분비하는 것으로 알려져 있으나(참조, 예를 들면, Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. Physiol Rev 2003; 83:581-632; and Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 923-932), 조절 분자 및 세포외 과정에 관여하는 특이적인 경로는 충분히 기술되고 있지 않다.
- <6> 몇몇 외인성 자극은 단백질 키나제 C의 활성화를 수반하는 경로 및 연속적인 인산화 과정을 통하여 백혈구의 탈과립을 자극할 수 있다(참조, 예를 들면, for example, Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. Physiol Rev 2003; 83:581-632; Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 923-932; Smolen JE, Sandborg RR. Ca²⁺-induced secretion by electropermeabilized human neutrophils: the roles of Ca²⁺, nucleotides and protein kinase C. Biochim Biophys Acta 1990; 1052: 133-142; Niessen HW, Verhoeven AJ. Role of protein phosphorylation in the degranulation of electropermeabilized human neutrophils. Biochim, Biophys. Acta 1994; 1223:267-273; and Naucier C, Grinstein S, Sandler R., Tapper H. Signaling to localized degranulation in neutrophils adherent to immune complexes. J Leukoc Biol 2002; 71: 701-710).
- <7> MARCKS 단백질(본 명세서에서 사용된 MARCKS는 "Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate"를 의미한다)는 단백질 키나제 C(PKC)의 보편적인 인산화 표적으로, 백혈구에서 고발현된다(참조, 예를 들면, Aderem AA, Albert KA, Keum MM, Wang JK, Greengard P, Cohn ZA. Stimulus-dependent myristoylation of a major substrate for protein kinase C. Nature 1988; 332:362-364; Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. Nature 1991 ; 351 :320-322; and Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. Nature 1992; 356:618-622). MARCKS 단백질은 호흡기도(respiratory airway)에 정렬된 배상세포(globlet cell)에 의하여 뮤신(mucin)의 세포외 분비와정에 기계적으로 관여한다(참조, 예를 들면, Li et al., J Biol Chem 2001 ; 276:40982-40990; and Singer et al., Nat Med 2004; 10: 193-196). MARCKS는 아미노산 서열의 N-말단(즉, 1번 위치)에 존재하는 글리신의 알파-아민 위치에서 MARCKS 단백질의 아미노산 서열의 N-말단에 존재하는 아마이드 결합을 통하여 미리스토릴화된다. 기도 상피세포에서, MARCKS 단백질의 미리스

토일화 N-말단 영역은 분비와정에 필수적인 것으로 여겨진다. L-아미노산인 미리스토일-GAQFSKTAAGEAAAERPGEAAVA(서열번호 1)을 포함하는 MANS 펩티드는 MARCKS 단백질의 N-말단을 의미한다. 아울러, 본 명세서에 개시된 MANS 펩티드의 펩티드 단편은 바람직하게는 L-아미노산으로 구성된다. 기작은 미리스토일화 단백질인 MARCKS의 세포내 과립의 막에의 결합을 포함하는 것으로 보여진다.

<8> MARCKS의 N-말단으로부터의 N-말단 미리스토일화 펩티드는 뮤신 분비 및 배상세포(globlet cell)에서 뮤신 과립 막에의 MARCKS의 결합을 저해하는 것으로 보여진다(참조, 예를 들면, Singer et al., Nat Med 2004; 10:193-196). 상기 펩티드는 아마이드 결합을 통하여 미리스토일화된 MARCKS 단백질의 N-말단 글리신으로부터 시작하는 MARCKS 단백질의 24개 아미노산을 함유하고, 미리스토일화 알파-N-말단 서열(MANS, myristoylated alpha-N-terminal sequence), 즉, 미리스토일-GAQFSKTAAGEAAAERPGEAAVA(서열번호 1)로 알려져 있다. 또한, [Vergeres et al., J. Biochem. 1998, 330:5-11]은 MARCKS 단백질의 N-말단 글리신 잔기가 미리스토일 CoA: 단백질 N-미리스토일 트랜스퍼라제(NMT, N-myristoyl transferase)에 의해 촉매되는 반응에 의하여 미리스토일화된다.

<9> 천식, COPD 및 만성 기관지염 등의 염증성 질환; 낭성 섬유증(cystic fibrosis) 등의 유전 질환; 알레르기 상태 (아토피, 알레르기 염증); 기관지 확장증(bronchiectasis); 및, 폐렴(pneumonia), 비염(rhinitis), 인플루엔자 또는 일반적인 감기, 관절염(arthritis) 또는 자가 면역질환 등 여러가지 급성, 전염성 호흡기 질환(infectious respiratory illness)에서, 염증세포는 염증성 질환상태와 연관된 손상(injury) 또는 감염(infection)의 영역, 특히 그러한 질환을 앓고 있는 환자의 호흡기도 또는 기도에서 발견되거나 그쪽으로 이동해 간다. 이들 염증세포들은 이들 세포로부터 분비되는 염증성 매개물질에 의한 조직 손상을 통하여 질환의 병리에 크게 기여한다. 만성 염증에 의한 이러한 조직 손상 또는 파괴의 한가지 예는 중성구로부터 분비되는 매개물질(예를 들면, 미엘로퍼옥시다제(MPO))가 기도 상피조직의 박리(desquamation)를 유도하는 낭성 섬유증 환자에서 일어난다.

<10> 약 82kD의 단백질인 MARCKS는 발생학적으로 세계의 보존된 영역을 가진다(참조: Aderem et al., Nature 1988; 332:362-364; Thelen et al., Nature 1991; 351:320-322; Hartwig et al., Nature, 1992; 356:618-622; Seykora et al., J. Biol. Chem. 1996; 271:19797-18802): N-말단, 인산화 부위 영역(phosphorylation site domain, PSD), 및 다중 상동성 2(multiple homology 2, HM2) 영역. 사람의 MARCKS cDNA 및 단백질은 할란(Harlan) 등과 사카이(Sakai) 등에 의하여 처음으로 밝혀지고 보고되었다(참조: Harlan et al., J. Biol. Chem., 266:14399(GenBank Accession No. M68956), 1991; Sakai et al, Genomics, 14:175, 1992). 이들 서열은 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 WO 00/50062에도 제공된다. 미리스틴산(myristic acid) 잔기가 N-말단의 글리신 잔기에 아마이드 결합을 통하여 부착되는 24개 아미노산 서열을 포함하는 알파-아미노산 서열의 N-말단은, MARCKS의 세포막에 대한 결합(참조: Seykora et al., J. Biol. Chem., 271:19797-18802, 1996) 및 칼모듈린(calmodulin)에 대한 결합에 관여한다(참조: Matsubara et al., J. Biol. Chem., 271:18797-18802, 1996). 이 24개 아미노산 서열은 MANS 펩티드로 알려져 있다.

<11> 발명의 요약

<12> 침입하는 백혈구의 과립으로부터 염증 매개물질의 분비에 있어서, MARCKS 단백질은 천식, COPD 및 섬유 소낭증과 같은 기도 염증으로 특징지어지는 폐질환을 포함하는, 모든 조직 및 기관에서의 질환과 관련이 있다. 그러나, 기도에서의 염증 및 기도 염증은 두가지 별도의 독립적인 과정이다(참조: Li et al., J. Biol Chem 2001; 276:40982-40990; Singer et al., Nat Med 2004; 10:193-196). 점액(mucus) 생성 및 분비는 염증 세포에 의해 분비되는 매개물질을 포함하는 수많은 요인들에 의하여 자극되지만, 과도한 점액이 염증을 유발한다는 알려진 직접적인 연결은 없다.

<13> 본 발명의 한가지 측면에 따르면, MANS 펩티드는 염증성 백혈구에서 염증 매개물질 과립 또는 소낭체의 분비 속도(rate) 및/또는 양(amount)을 감소시키는 역할을 할 수 있다.

<14> 본 발명의 다른 측면에 따르면, MARCKS N-말단으로부터 유도된 펩티드, 특히 24 아미노산 N-말단 서열, 즉 위치 1에 글리신을 가지는 MARCKS의 N-말단 1-24 아미노산 서열로부터 유도되는 활성의 연속하는 펩티드 단편, 뿐만 아니라 그러한 단편의 N-말단 아세트 산 아마이드와 같은 그러한 단편의 N-말단 아마이드, 및/또는 뿐만아니라 암모니아의 C-말단 아마이드와 같은 그러한 펩티드의 C-말단 아마이드가 염증성 백혈구로부터의 염증 매개물질의 분비 속도 및/또는 양을 억제 또는 감소시킬 수 있다. 이러한 분비의 억제 또는 감소는 염증성 백혈구로부터의 염증 매개물질의 MARCKS-관련된 분비의 저해를 포함한다.

<15> 본 발명의 다른 측면에 따르면, MARCKS N-말단으로부터 유도된 펩티드, 특히 24 아미노산 N-말단 서열, 즉 위치 1에 글리신을 가지는 MARCKS의 N-말단 1-24 아미노산 서열로부터 유도되는 활성의 연속하는 펩티드 단편, 뿐만

아니라 그러한 단편의 N-말단 아세트 산 아미드와 같은 그러한 단편의 N-말단 아미드, 뿐만아니라 암모니아의 C-말단 아미드와 같은 그러한 펩티드의 C-말단 아미드가 염증성 백혈구에서의 탈과립 과정을 저해함으로써 본 발명에서 본 명세서에 동정된 바와 같은 염증 매개물질의 분비 속도 및/또는 양을 저해할 수 있다.

- <16> 본 발명의 다른 측면에 따르면, MANS 펩티드 및 그의 활성 단편, 및 본 명세서에 기재된 그러한 단편의 활성 아미드는, 염증세포에서 염증 매개물질을 함유하는 과립 또는 소낭체로부터 염증 매개물질의 MARCKS-관련 분비를 감쇄(적게 또는 감소하게)하는 천연의 MARCKS 단백질과 염증세포와의 막결합에 대하여 서로 경쟁하게 된다.
- <17> 포볼 에스테르(phorbol ester)가 유도하는 PKC의 활성화에 반응하여 특이적 과립 내용물을 분비하는 백혈구 세포형 및 모델 세포형들은 본 발명의 펩티드 및 치환된 펩티드(예를 들면, 알파 N-아미드, C-말단 아미드 및 에스테르)의 역가를 실험실적 조건에서 입증하는데 유용하다.
- <18> 본 발명의 화합물 및 조성물에 의한 막-결합 염증 매개물질의 분비를 감쇄시키는 것은 사람 백혈구 세포주를 이용하여 입증될 수 있다. 예를 들면, 사람 혈액으로부터 분리된 호중구는 미엘로퍼옥시다제(MPO)의 분비를 감쇄하거나 억제할 입증하는데 유용하다. 사람의 전골수구성(promyelocytic) 세포주인 HL-60 클론 15는 본 발명의 화합물 및 조성물에 의한 호산구 퍼옥시다제(EPO, eosinophil peroxidase) 분비의 감쇄나, 분비 또는 분비의 억제를 입증하는데 유용하다(참조, 예를 들면, Fischkoff SA. Graded increase in probability of eosinophilic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells induced by culture under alkaline conditions. *Leuk Res* 1988; 12: 679-686; Resenberg HF, Ackerman S J, Tenen DG. Human eosinophil cationic protein: molecular cloning of a cytotoxin and helminthotoxin with ribonuclease activity. *J Exp Med* 1989; 170: 163-176; Tiffany HL, Li F, Rosenberg HF. Hyperglycosylation of eosinophil ribonucleases in a promyelocytic leukemia cell line and in differentiated peripheral blood progenitor cells. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 49-54; Badewa AP, Hudson CE, Heiman AS. Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil degranulation and superoxide anion generation. *Exp Biol Med* 2002; 227: 645-651). 단핵세포 백혈병 세포주(monocytic leukemia cell line) U937은 본 발명의 화합물 및 조성물에 의한 리소자임 분비의 감쇄나, 분비 또는 분비의 억제를 입증하는데 유용하다(참조, 예를 들면, Hoff T, Spencker T, Emmendoerffer A, Goppelt-Struebe M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 173-182; Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phosphatase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J Immunol* 2003; 170: 5276-5280; Sundstorm C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line(U-937). *Int J Cancer* 1976; 17: 565-577). 림프구 자연 살상세포주 NK-92은 본 발명의 화합물 및 조성물에 의한 그랜자임 분비의 감쇄나, 분비 또는 분비의 억제를 입증하는데 유용하다(참조, 예를 들면, Gong JH., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line(NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994; 8: 652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 369-383; Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J Immunol Methods* 1987; 104: 183-190). 본 명세서에 기재된 것들과 같은 염증 매개물질의 분비를 억제 또는 감쇄시키는 실험실 조건의 방법에 있어서, 세포 형태의 각각은 본 발명의 펩티드 화합물 또는 펩티드 조성물과 함께 농도범위에서 전배양한 다음, 포볼 에스테르와 같은 염증 매개물질의 분비 자극제에 의하여 이들 세포들을 배양한다. 염증 매개물질 분비억제 백분율은 분비된 매개물질의 농도의 광학관독 결과에서와 같은 펩티드 화합물 또는 펩티드 조성물이 부재하는 경우 매개물질의 분비와 비교하여 결정한다.
- <19> 본 발명의 펩티드에 있어서, 상대적인 아미노산 서열 위치의 중요성을 입증하기 위하여, MARCKS 단백질 N-말단 영역(즉, MANS-미리스토일화 알파 N-말단 서열 펩티드)의 24개 아미노산 서열과 동일한 펩티드에 의하여 분비되는 염증 매개물질의 양을 억제하거나 감소시키는 상대적 능력을 MANS에 존재하나 MANS에서 서열순서에 대하여 임의적 순서(즉, RNS 펩티드, "Random N-terminal sequence peptide")에 따라 서열이 결정된 24개 아미노산 잔기를 가지는 펩티드에 의하여 분비되는 염증 매개물질의 양을 억제하거나 감소시키는 능력과 비교하였다. 확인한 각 세포형태에서, RNS 펩티드가 아닌 MANS 펩티드는 0.5 내지 3.0시간 범위에서 농도의존적으로 염증 매개물질의 분비를 감쇄시켰다. 이러한 결과는 MARCKS 단백질에서, 특히 N-말단 영역, 보다 특이적으로는 그의 24개 아미노산 잔기 N-말단 영역에서, 발견되는 순서대로인 본 발명의 펩티드에서의 상대적인 아미노산 서열 위치가 백혈구 탈과립의 억제를 다루는 최소한 세포내 경로에 관여한다는 것을 암시한다.
- <20> 본 발명은 24개 아미노산 서열의 신규한 용도에 관한 것이고, 또한 알파 N-말단 아세틸화 펩티드 서열, MANS 펩

티드로도 알려진 미리스토일화 폴리펩티드, 및 그의 활성 단편에 관한 것으로, 이때, 활성 단편은 MANS 펩티드 아미노산 서열의 4 내지 23개의 연속하는 아미노산 잔기를 가지는 펩티드들로부터 선택되고, 및 서열번호 1의 1번 위치가 N-말단 글리신으로 시작되지 않는다면, N-말단 미리스토일화되며, 또는 N-말단 아세틸화되고/아세틸화되거나, NH₂ 기로 C-말단 아미드화되는 것을 포함하는 C₂ 내지 C₁₂ 아실기로 N-말단 아실화될 수 있다.

- <21> 또한, 본 발명은 MARCKS-관련 세포분비 과정, 특히 자극경로가 단백질 키나제 C(protein kinase C, PKC) 기질 MARCKS 단백질 및 세포내 소낭체 또는 과립으로부터의 내용물 분비가 관련되는 염증성 세포로부터 염증 매개물질의 MARCKS-관련 분비가 관여되는 세포분비 과정을 봉쇄하는 신규한 방법에 관한 것이다.
- <22> 본 발명은 최소한 하나의 펩티드가 부재할 경우 야기되는 동형의 염증세포로부터 유리되는 염증 매개물질의 분비와 비교하였을 때, 염증세포로부터 염증 매개물질의 분비를 감소시키는 효과적인 양으로 본 명세서에 개시된 MANS 펩티드 및 그의 활성 단편으로 구성되는 그룹에서 선택되는 최소한 하나의 펩티드로, 최소한 하나의 세포내 소낭체에 최소한 하나의 염증 매개물질을 포함하는 염증세포와 접촉하는 단계를 포함하는, 최소한 하나의 염증세포로부터 최소한 하나의 염증 매개물질을 세포외로의 분비를 억제하는 방법에 관한 것이다.
- <23> 또한, 본 발명은 세포내 소낭체에 최소한 하나의 염증 매개물질과 최소한 하나의 펩티드가 부재할 경우 발생하는 최소한 하나의 동형의 염증세포로부터 유리되는 염증 매개물질의 분비와 비교하였을 때, 최소한 하나의 염증세포로부터 염증 매개물질의 분비를 감소시키는 치료적으로 유효한 양의 MANS 펩티드 및 그의 활성 단편으로 구성되는 그룹에서 선택되는 최소한 하나의 펩티드와 약리적으로 효과가 있는 양의 약학적 조성물을 포함하는 최소한 하나의 염증세포를 포함하는 개체의 조직 및/또는 체액에 대한 투여를 포함하는, 개체의 조직 또는 체액에서 최소한 하나의 염증세포로부터 최소한 하나의 염증 매개물질의 분비를 억제하는 방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 염증 매개물질의 분비를 억제하는 단계는 염증세포로부터 염증 매개물질의 분비를 막거나 감소시키는 것을 포함한다.
- <24> 좀 더 구체적으로, 본 발명은 MANS 펩티드[예를 들어, N-미리스토일-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAV(서열번호 1)] 또는 그의 활성 단편]를 포함하는 약학적 조성물의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 염증을 감소시키는 방법을 포함한다. 상기 활성 단편은 길이가 최소한 4개, 바람직하게는 최소한 6개의 아미노산이다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, MARCKS 단백질의 "활성 단편(active fragment)"은 염증매개물질의 MARCKS 단백질-매개 분비와 같은 MARCKS 단백질이 매개하는 분비에 영향을 주는(억제 또는 저해하는) 것이다. 상기 활성 단편은 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAV(서열번호 2); GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAA(서열번호 4); GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAA(서열번호 7); GAQFSKTAAKGEEAAERPGE(서열번호 11); GAQFSKTAAKGEEAAERPGE(서열번호 16); GAQFSKTAAKGEEAAERP(서열번호 22); GAQFSKTAAKGEEAAER(서열번호 29); GAQFSKTAAKGEEAAE(서열번호 37); GAQFSKTAAKGEEAAA(서열번호 46); GAQFSKTAAKGEEAA(서열번호 56); GAQFSKTAAKGEEAA(서열번호 67); GAQFSKTAAKGE(서열번호 79); GAQFSKTAAKG(서열번호 92); GAQFSKTAAK(서열번호 106); GAQFSKTA(서열번호 121); GAQFSKTA(서열번호 137); GAQFSKT(서열번호 154); GAQFSK(서열번호 172); GAQFS(서열번호 191) 및 GAQF(서열번호 211)로 구성되는 그룹에서 선택할 수 있다. 이들 펩티드는, N-말단 아미노산에 미리스토일잔기를 포함하는 대신에, N-말단 아미노산에 화학적 잔기를 포함하지 않거나, 비-미리스토일 화학적 잔기를 포함하고/포함하거나, 본 명세서에 기재된 N-말단 아세틸기 및/또는 C-말단 아미드기와 같이, C-말단 아미노산에 화학적 잔기를 포함한다. MANS 펩티드의 소수성 N-말단 미리스토일 잔기 및 이들의 미리스토일화된 N-말단의 존재는 원형질막에 대한 적합성과 아마도 투과성을 증가시키고, 잠재적으로 세포가 펩티드를 흡수하도록 도울 수 있다. 지질 이중층으로의 미리스토일 잔기의 소수성 함입(hydrophobic insertion)은 추가적인 기능적 그룹과 그들간의 상호작용이 그들의 상대적인 막 투과성을 강화시키는 동안 최소한 부분적으로 본 명세서에 기술된 대로 세포의 원형질막으로의 MANS 펩티드(미리스토일화된) 및 미리스토일화된 MANS 펩티드 단편의 분배를 허용하기에 충분한 10⁴M⁻¹에 달하는 분배계수(partition coefficient) 및 겉보기 결합상수(apparent association constant) 또는 하나의 약 8kcal/mol 단위 깁스 자유에너지(unitary Gibbs free binding energy, 참조, 예를 들어, Peitxch, R. M., McLaughlin, S. 1993, Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. Biochemistry. 32:10436-10443)를 제공할 수 있다. 단편들은 각각 그들의 구조를 나타내는 분배계수(partition coefficient)와 막 친화성(membrane affinity)을 나타낼 수 있다. 단편들은 고체 상 펩티드 합성(solid phase peptide synthesis, 참조, 예를 들어, Chan, Weng C. And White, Peter D. Eds., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, New York(2000) 및 Lloyd-Williams, P. et al. Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins(1997)에 기술된 방법)과 고압 액체 크로마토그래피 등의 당업계에 공지된 펩티드 합성방법으로 제조할 수 있다. 각 펩티드의 분자량은 적절한 분자 질량에 따른 피크(peak)를 나타내는 질량 분광기로

확인하였다. 본 명세서에서 각 펩티드 및 각 펩티드의 조합(예를 들어, 펩티드 중 2개의 조합, 펩티드 중 3개의 조합, 펩티드 중 4개의 조합)의 역가(efficacy)는 본 명세서의 실시예에 기재된 방법을 이용하여 과도한 실험적 부담없이 용이하게 확인할 수 있다. 바람직한 조합은 두 개의 펩티드를 포함하는 것이다; 펩티드의 바람직한 몰 비는 50:50(예를 들어, 1:1) 내지 99.99:0.1로 다양할 수 있는데, 이러한 비율은 본 명세서의 실시예에 기술된 대로 이용하여 용이하게 결정할 수 있다.

- <25> 바람직하게는, MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편이 염증을 억제하는데 유용한 약학적 조성물에 함유된다. 또한, 본 발명은 개체에서 염증 매개물질을 조절하는 MANS 펩티드 및 그의 활성 단편을 포함하는 화합물의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함하는 개체에서 세포 분비과정(cellular secretory process)을 조절하는 방법을 포함한다. 투여방법은 일반적으로 국부 투여, 비경구 투여, 직장내 투여, 폐 투여, 흡입 및 비강 또는 경구투여로 구성되는 그룹으로부터 선택하는데, 폐 투여는 일반적으로 에어로졸(aerosol), 건조분말 흡입기(dry powder inhaler), 계량 용량 흡입기(metered dose inhaler), 또는 분무기(nebulizer)로 구성되는 그룹으로부터 선택된다.
- <26> 사람이나 동물에서, MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편의 약학적 조성물과 같은 MANS 펩티드의 탈과립 억제량(degranulation-inhibiting amount) 또는 그의 활성 단편의 탈과립 억제량을 포함하는 조성물은, MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편을 최소한 조직 또는 염증성 과립구 세포가 존재하는 조직의 표면과 접촉하는 체액함유층(fluid-containing layer) 또는 염증성 과립구 세포가 침윤하는 위치에 제공하여, MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편이 염증 과립구 과립구와 접촉하게 된다. 본 발명의 한 측면에 따르면, 이러한 조성물은 첫 번째 개시(onset), 또는 염증의 첫 번째 탐지(detection), 또는 사람 또는 동물에 의한 염증의 첫 번째 인식(perception), 또는 사람 또는 동물에서 염증 수준의 눈에 띄는 첫 번째 변화(change)에 적용하여, MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편이 부재할 경우 야기되는 염증의 양을 감소시킨다. 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 투여는 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편이 부재할 경우 야기되는 추가적인 염증의 양을 감소시키는 사람 또는 동물의 조직에서 염증이 진행되는 도중에 실시할 수 있다. 투여량 및 투여 빈도는 임상 측정, 질병의 작용 또는 염증의 원인 및 관련한 조직의 정도 및 환자의 나이와 크기에 의해 결정할 수 있지만, 약학적 조성물의 투여는 최초 약학적 조성물의 투여 후, 3 내지 8시간 후에 반복할 수 있고, 바람직하게는, 6 내지 8시간 후에 반복할 수 있다.
- <27> 또한, 본 발명은 개체에서 최소한 하나의 염증 매개물질의 분비는 치료가 부재할 경우와 비교하였을 때, 감소하도록 MARCKS에 관련된 염증 매개물질의 분비를 억제하는 치료적으로 유효한 양의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 염증을 감소시키는 방법을 포함한다. 명세서에 기술한 바와 같이, "감소(reducing)"이라는 용어는 일반적으로 염증의 효과가 줄어드는 것을 의미한다. 바람직하게는, 개시된 방법에 의해 염증 매개물질의 분비를 저해되거나 억제되는 것이다.
- <28> 본 발명의 또 다른 실시태양은 MARCKS에 관련된 염증 매개물질의 분비를 억제하여 개체에서의 염증이 치료가 부재할 경우 보다 감소시키는 화합물의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 염증을 감소시키는 방법을 포함한다. 또한, 본 발명은 염증부위에서 염증 매개물질을 조절하는데 효과가 있는 MANS 펩티드 또는 그것의 활성 단편의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 염증을 감소시키거나 억제하는 방법을 개시한다. 용어 "억제(inhibiting)"는 염증 매개물질 분비량의 감소를 의미한다. 용어 "완전한 억제(complete inhibiting)"는 염증 매개물질 분비량을 0으로 감소시키는 것을 의미한다. 다시, 상술한 대로, 활성 단편은 최소한 4개, 바람직하게는 최소한 6개의 아미노산이다. 용어 "세포외 유출과정(exocytotic process)"은 세포외 유출(exocytosis), 즉 세포내에 있는 운반체 내에 포함된 물질이 외부 세포 막에 있는 운반체의 막에 융합하여 세포로부터 분비되는 세포 분비(secretion) 또는 배설(excretion) 과정을 의미한다. "탈과립(degranulation)"은 세포의 입자 내용물의 분비를 의미한다. "탈과립 억제(degranulation inhibiting)"는 염증세포의 입자 내에 포함된 염증 매개물질의 분비 감소를 의미한다. 그러므로, MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편의 탈과립 억제량은 동일한 펩티드가 부재할 경우 분비하는 것과 비교하였을 때, 입자들에 포함되어 있는 염증 매개물질의 분비를 감소시키기에 충분한 펩티드의 양이다.
- <29> 참조 펩티드인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEEAVA(서열번호 1)의 N-말단에서, G는 1번 위치에; 1번 위치의 G에 인접한 것은 2번 위치의 A; 2번 위치의 A에 인접한 것은 3번 위치의 Q; 3번 위치의 Q에 인접한 것은 4번 위치의 F; 4번 위치의 F에 인접한 것은 5번 위치의 S; 5번 위치의 S에 인접한 것은 6번 위치의 K; 6번 위치의 K에 인접한 것은 7번 위치의 T; 7번 위치의 T에 인접한 것은 8번 위치의 A; 8번 위치의 A에 인접한 것은 9번 위치의 A; 9번 위치의 A에 인접한 것은 10번 위치의 K; 10번 위치의 K에 인접한 것은 11번 위치의 G; 11번 위치의 G에 인접한 것은 12번 위치의 E; 12번 위치의 E에 인접한 것은 13번 위치의 A; 13번 위치의 A에 인접한 것은 14번 위치의 A; 14

번 위치의 A에 인접한 것은 15번 위치의 A; 15번 위치의 A에 인접한 것은 16번 위치의 E; 16번 위치의 E에 인접한 것은 17번 위치의 R; 17번 위치의 R에 인접한 것은 18번 위치의 P; 18번 위치의 P에 인접한 것은 19번 위치의 G; 19번 위치의 G에 인접한 것은 20번 위치의 E; 20번 위치의 E에 인접한 것은 21번 위치의 A; 21번 위치의 A에 인접한 것은 22번 위치의 A; 22번 위치의 A에 인접한 것은 23번 위치의 V; 23번 위치의 V에 인접한 것은 24번 위치의 A이며, 상기 서열에서 24번 위치는 참조 펩티드의 C-말단이다.

<30> 참조 펩티드의 "변이체(variant)" 또는 참조 펩티드의 4 내지 23개 아미노산 단편의 변이체는, 각각 참조 펩티드 또는 참조 펩티드 단편 아미노산 서열 내에 적어도 하나의 아미노산 위치가 다른 아미노산 서열을 가지는 펩티드이지만, 뮤신- 또는 점액-억제활성을 유지하고, 이 활성은 통상적으로, 각각 참조 펩티드 또는 단편의 활성에 0.1과 10배 사이이며, 바람직하게는, 각각 참조 펩티드 또는 단편의 활성에 0.2와 6배 사이이고, 보다 바람직하게는, 각각 참조 펩티드 또는 단편의 활성에 0.3과 5배 사이이다. 참조 아미노산 서열의 "변이체(variant)" 또는 참조 아미노산 서열의 4 내지 23개 아미노산 단편의 변이체는, 각각 참조 아미노산 서열 또는 참조 아미노산 서열의 단편에 적어도 하나의 아미노산이 다른 아미노산 서열이지만, 각각 펩티드 또는 단편의 뮤신- 또는 점액 억제활성을 유지하는 펩티드의 아미노산 서열을 가지고, 참조 아미노산 서열에 의하여 암호화되며, 이 활성은 통상적으로, 참조서열의 각각 펩티드 또는 단편의 활성의 0.1 내지 10배 사이이고, 바람직하게는 참조서열의 각각 펩티드 또는 단편의 활성의 0.2 내지 6배 사이이며, 보다 바람직하게는, 참조서열의 각각 펩티드 또는 단편의 활성의 0.3 내지 5배 사이이다. 치환 변이체 펩티드 또는 치환 변이체 아미노산 서열은 참조 펩티드 또는 참조 아미노산 서열과 참조 아미노산 서열에서의 하나 또는 그 이상의 치환에 의해 다르다; 결실 변이체 펩티드 또는 결실 변이체 아미노산 서열은 참조 펩티드 또는 참조 아미노산 서열과 참조 아미노산 서열에서의 하나 또는 그 이상의 결실에 의해 다르다; 부가 변이체 펩티드 또는 부가 변이체 아미노산 서열은 참조 펩티드 또는 참조 아미노산 서열과 참조 아미노산 서열에서의 하나 또는 그 이상의 부가에 의해 다르다. 변이체 펩티드 또는 변이체 아미노산 서열은 참조서열에서의 하나 또는 그 이상의 아미노산의 치환(예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 아미노산의 치환)의 결과, 또는 참조서열의 하나 또는 그 이상의 결실(예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 아미노산의 결실)의 결과, 또는 참조서열의 하나 또는 그 이상의 부가(예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 아미노산의 부가)의 결과, 또는 그의 조합으로부터 생길 수 있다. 치환 변이체 4 내지 23개 아미노산 펩티드 단편 또는 치환 변이체 4 내지 23개 아미노산 단편 서열은 참조 아미노산 단편 서열에서의 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환에 의해 4 내지 23개 아미노산 펩티드 단편 또는 참조 4 내지 23개 참조 아미노산 단편 서열과 다를 것이다; 결실 변이체 4 내지 23개 아미노산 펩티드 단편 또는 결실 변이체 4 내지 22개 아미노산 단편 서열은 참조 아미노산 단편 서열에서의 하나 또는 그 이상의 아미노산 결실에 의해 5 내지 23개 참조 아미노산 펩티드 단편 또는 5 내지 23개 참조 아미노산 단편 서열과 다를 것이다; 또한, 4 내지 23개 아미노산 부가 변이체 펩티드 또는 4 내지 23개 아미노산 부가 변이체 아미노산 서열은 참조서열 내에 하나 또는 그 이상의 아미노산 부가에 의해 4에서 22 아미노산 참조 펩티드 서열 또는 4에서 22 아미노산 참조 아미노산 서열과 다를 것이다. 4 내지 23개 아미노산 변이체 펩티드 또는 4 내지 23개 아미노산 변이체 아미노산 서열은 참조 아미노산 서열의 4 내지 23개 아미노산 단편에서의 하나 또는 그 이상의 아미노산의 치환(예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 아미노산의 치환)의 결과, 또는 더 큰 참조 아미노산 서열에서의 하나 또는 그 이상의 아미노산의 결실(예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 아미노산의 결실)의 결과, 또는 작은 참조 아미노산 서열에서의 하나 또는 그 이상의 아미노산의 부가(예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 아미노산의 부가), 또는 그의 조합으로부터 생길 수 있다. 바람직하게는, 변이체 펩티드 또는 아미노산 서열은, 각각 참조 펩티드 또는 참조 펩티드의 단편 또는 참조 아미노산 서열 또는 참조 아미노산 서열의 단편으로부터, 10 이하의 아미노산 치환, 결실 및/또는 부가에 의해 다르고; 보다 바람직하게는, 8 이하의 아미노산 치환, 결실 및/또는 부가; 더욱 바람직하게는, 6 이하의 아미노산 치환, 결실 및/또는 부가; 더욱 바람직하게는, 5 이하의 아미노산 치환, 결실 및/또는 부가; 반면의 더욱 바람직하게는, 4 이하의 아미노산 치환, 결실 및/또는 부가에 의해 다르다. 가장 바람직하게는, 상기 변이체 아미노산 서열은 참조 펩티드 또는 단편 아미노산 서열과 하나 또는 두 개 또는 세 개의 아미노산이 다르다.

<31> "서열상동성(sequence identity)"은 두 펩티드의 아미노산 서열에 있어서, 동일한 아미노산을 가지는 위치의 수를 두 서열 중 짧은 서열의 아미노산 수에 의해 나눈 것을 의미한다.

<32> "실질적으로 동일한(substantially identical)"은 두 펩티드의 아미노산 서열의 비교 또는 두 펩티드 단편(예를 들어, 참조 펩티드 아미노산 서열의 단편)의 아미노산 비교에 있어서, 상기 펩티드의 아미노산 서열 또는 펩티드의 단편이 적어도 75% 서열상동성을 가지고, 바람직하게는, 적어도 80% 서열상동성을, 보다 바람직하게는, 적

어도 90%의 서열상동성을, 가장 바람직하게는, 적어도 95% 서열상동성을 가짐을 의미한다.

- <33> 본 명세서에 사용된 "펩티드(peptide)"라는 용어는 펩티드뿐만 아니라, 약학적으로 허용되는 펩티드의 염을 포함한다.
- <34> 본 명세서에 사용된 "분리된(isolated)" 펩티드란 세포 구성물(예를 들어, 핵산 및 다른 펩티드)로부터 정제, 제조합 합성, 또는 화학 합성에 의해 분리된 또는 실질적으로 분리된 자연적으로 발생한 펩티드를 의미하고, 또한, 세포 구성물, 생물학적 물질, 화학적 전구체, 또는 다른 화학 약품으로부터 정제 또는 실질적으로 정제된 비-자연적으로 발생 제조합된 또는 화학적으로 합성된 펩티드도 포함한다.
- <35> 다음의 세-글자 또는 한-글자 아미노산 약어는 본 문서의 도처에 사용되었다: 알라닌: (Ala) A; 아르기닌: (Arg) R; 아스파라긴: (Asn) N; 아스파르트산: (Asp) D; 시스테인: (Cys) C; 글루타민: (Gln) Q; 글루탐산: (Glu) E; 글리신: (Gly) G; 히스티딘: (His) H; 이소루이신: (Ile) I; 루이신: (Leu) L; 라이신: (Lys) K; 메티오닌: (Met) M; 페닐알라닌: (Phe) F; 프롤린: (Pro) P; 세린: (Ser) S; 트레오닌: (Thr) T; 트립토판: (Trp) W; 타이로신: (Tyr) Y; 발린: (Val) V. 괄호 안의 본 명세서에 유용하게 사용된 아미노산의 추가의 세-글자 기호는 (Hyp) 히드록시프롤린, (Nle) 노르루이신, (Orn) 오르니틴, (Pyr) 피로글루탐산 및 (Sar) 사로신을 포함한다. 통상적으로, 펩티드의 아미노말단(또는 N-말단)은 펩티드의 기재된 아미노산 서열의 왼쪽 끝에 나타내고, 카르복시말단(또는 C-말단)은 기재된 아미노산 서열의 오른쪽 끝에 나타낸다. 펩티드의 아미노산 서열은 펩티드에서의 펩티드결합에 의해 공유결합된 아미노산을 나타내기 위해 한 글자 기호로 기재될 수 있다.
- <36> MANS 펩티드의 활성 단편은 염증 매개물질에 의해 야기되는 동물조직에 있어서의 염증의 양을 예방 또는 감소하는데 유용하다. 또한, MANS 펩티드의 활성 단편은 염증 매개물질에 의해 생성되거나 야기되는 동물에 있어서의 조직손상의 양을 예방 또는 감소하는데 유용하다. MANS 펩티드의 활성 단편은 MANS 펩티드(서열번호 1)의 최소한 4개의 내지 23개의 연속되는 아미노산으로 구성된다. 본 발명의 맥락에서, "활성 단편(active fragment)"이라는 용어는 염증세포로부터의 염증 매개물질의 분비를 예방하거나 감소시킬 수 있는 MANS 펩티드의 단편들을 포함하는 것으로 해석된다. 활성 단편에 의한 염증 매개물질의 분비감소는 MANS 펩티드와 같은 참조서열과 비교하여, 최소한 5%로부터 최소한 99% 감소범위를 갖는다.
- <37> 표 1은 각각의 상응하는 펩티드번호 및 서열번호와 함께 한 글자(single letter) 약어 형식의 아미노산 서열 리스트를 포함한다. 참조 펩티드 아미노산 서열(MANS 펩티드)은 펩티드 1로 나타내었다. MANS 펩티드의 아미노산을 포함하는 임의의 N-말단 서열(RNS: random N-terminal sequence)의 아미노산 서열을 펩티드 232로 나타냄과 함께, 본 명세서에 참조 아미노산 서열의 4 내지 23개의 인접한 아미노산의 아미노산 서열을 가지는 펩티드의 아미노산 서열은 펩티드 2 내지 231로 나타내었다. 본 명세서에 기술된 본 발명의 펩티드 아미노산 서열의 대표적인 변이체 아미노산 서열 역시 펩티드 233 내지 245 및 247 내지 251로 나타내었다. 상기에서 변이체 펩티드는 펩티드를 제한하는 그룹은 아니고, 본 발명의 변이체 펩티드의 대표적인 예를 나타내는 것이다. 또한, 본 발명의 대표적인 역(reverse) 아미노산 서열(펩티드 246) 및 대표적인 임의의(random) 펩티드(펩티드 232) 아미노산 서열을 나타내었다. 표에서 역(reverse) 및 임의의(random) 아미노산 서열은 본 발명을 대표하는 것은 아니다.
- <38> 표 1은 본 발명의 펩티드 및 그들 각각의 아미노산 서열과 이에 상응하는 서열번호를 나타낸다.

표 1

<39> 펩티드 및 아미노산 서열

펩티드 번호	서열	서열번호
펩티드 1	GAQFSKTAAKGEEAAAERPGEAAVA	서열번호 1
펩티드 2	GAQFSKTAAKGEEAAAERPGEAAV	서열번호 2
펩티드 3	AQFSKTAAKGEEAAAERPGEAAVA	서열번호 3
펩티드 4	GAQFSKTAAKGEEAAAERPGEAA	서열번호 4
펩티드 5	AQFSKTAAKGEEAAAERPGEAAV	서열번호 5
펩티드 6	QFSKTAAKGEEAAAERPGEAAVA	서열번호 6
펩티드 7	GAQFSKTAAKGEEAAAERPGEA	서열번호 7
펩티드 8	AQFSKTAAKGEEAAAERPGEAA	서열번호 8
펩티드 9	QFSKTAAKGEEAAAERPGEAAV	서열번호 9
펩티드 10	FSKTAAKGEEAAAERPGEAAVA	서열번호 10
펩티드 11	GAQFSKTAAKGEEAAAERPGE	서열번호 11
펩티드 12	AQFSKTAAKGEEAAAERPGEA	서열번호 12
펩티드 13	QFSKTAAKGEEAAAERPGEAA	서열번호 13
펩티드 14	FSKTAAKGEEAAAERPGEAAV	서열번호 14
펩티드 15	SKTAAKGEEAAAERPGEAAVA	서열번호 15
펩티드 16	GAQFSKTAAKGEEAAAERPG	서열번호 16
펩티드 17	AQFSKTAAKGEEAAAERPGE	서열번호 17
펩티드 18	QFSKTAAKGEEAAAERPGEA	서열번호 18
펩티드 19	FSKTAAKGEEAAAERPGEAA	서열번호 19
펩티드 20	SKTAAKGEEAAAERPGEAAV	서열번호 20
펩티드 21	KTAAKGEEAAAERPGEAAVA	서열번호 21
펩티드 22	GAQFSKTAAKGEEAAAERP	서열번호 22
펩티드 23	AQFSKTAAKGEEAAAERPG	서열번호 23
펩티드 24	QFSKTAAKGEEAAAERPGE	서열번호 24
펩티드 25	FSKTAAKGEEAAAERPGEA	서열번호 25
펩티드 26	SKTAAKGEEAAAERPGEAA	서열번호 26
펩티드 27	KTAAKGEEAAAERPGEAAV	서열번호 27
펩티드 28	TAAKGEEAAAERPGEAAVA	서열번호 28
펩티드 29	GAQFSKTAAKGEEAAAER	서열번호 29
펩티드 30	AQFSKTAAKGEEAAAERP	서열번호 30

<40>

펩티드 번호	서 열	서열번호
펩티드 31	QFSKTAAKGEEAAERPG	서열번호 31
펩티드 32	FSKTAAKGEEAAERPGE	서열번호 32
펩티드 33	SKTAAKGEEAAERPGEA	서열번호 33
펩티드 34	KTAAKGEEAAERPGEAA	서열번호 34
펩티드 35	TAAKGEEAAERPGEAAV	서열번호 35
펩티드 36	AAKGEEAAERPGEAAVA	서열번호 36
펩티드 37	GAQFSKTAAKGEEAAE	서열번호 37
펩티드 38	AQFSKTAAKGEEAAER	서열번호 38
펩티드 39	QFSKTAAKGEEAAERP	서열번호 39
펩티드 40	FSKTAAKGEEAAERPGE	서열번호 40
펩티드 41	SKTAAKGEEAAERPGE	서열번호 41
펩티드 42	KTAAKGEEAAERPGEA	서열번호 42
펩티드 43	TAAKGEEAAERPGEAA	서열번호 43
펩티드 44	AAKGEEAAERPGEAAV	서열번호 44
펩티드 45	AKGEEAAERPGEAAVA	서열번호 45
펩티드 46	GAQFSKTAAKGEEAAA	서열번호 46
펩티드 47	AQFSKTAAKGEEAAE	서열번호 47
펩티드 48	QFSKTAAKGEEAAER	서열번호 48
펩티드 49	FSKTAAKGEEAAERP	서열번호 49
펩티드 50	SKTAAKGEEAAERPGE	서열번호 50
펩티드 51	KTAAKGEEAAERPGE	서열번호 51
펩티드 52	TAAKGEEAAERPGEA	서열번호 52
펩티드 53	AAKGEEAAERPGEAA	서열번호 53
펩티드 54	AKGEEAAERPGEAAV	서열번호 54
펩티드 55	KGEEAAERPGEAAVA	서열번호 55
펩티드 56	GAQFSKTAAKGEAA	서열번호 56
펩티드 57	AQFSKTAAKGEEAAA	서열번호 57
펩티드 58	QFSKTAAKGEEAAE	서열번호 58
펩티드 59	FSKTAAKGEEAAER	서열번호 59
펩티드 60	SKTAAKGEEAAERP	서열번호 60
펩티드 61	KTAAKGEEAAERPGE	서열번호 61
펩티드 62	TAAKGEEAAERPGE	서열번호 62
펩티드 63	AAKGEEAAERPGEA	서열번호 63
펩티드 64	AKGEEAAERPGEAA	서열번호 64
펩티드 65	KGEEAAERPGEAAV	서열번호 65
펩티드 66	GEAAERPGEAAVA	서열번호 66
펩티드 67	GAQFSKTAAKGEA	서열번호 67
펩티드 68	AQFSKTAAKGEAA	서열번호 68
펩티드 69	QFSKTAAKGEEAAA	서열번호 69
펩티드 70	FSKTAAKGEEAAE	서열번호 70
펩티드 71	SKTAAKGEEAAER	서열번호 71
펩티드 72	KTAAKGEEAAERP	서열번호 72
펩티드 73	TAAKGEEAAERPGE	서열번호 73
펩티드 74	AAKGEEAAERPGE	서열번호 74
펩티드 75	AKGEEAAERPGEA	서열번호 75
펩티드 76	KGEEAAERPGEAA	서열번호 76
펩티드 77	GEAAERPGEAAV	서열번호 77
펩티드 78	EAAERPGEAAVA	서열번호 78

<41>

펩티드 번호	서 열	서열번호
펩티드 79	GAQFSKTAAKGE	서열번호 79
펩티드 80	AQFSKTAAKGEA	서열번호 80
펩티드 81	QFSKTAAKGEAA	서열번호 81
펩티드 82	FSKTAAKGEAAA	서열번호 82
펩티드 83	SKTAAKGEAAA	서열번호 83
펩티드 84	KTAAKGEAAAER	서열번호 84
펩티드 85	TAAKGEAAAERP	서열번호 85
펩티드 86	AAKGEAAAERPG	서열번호 86
펩티드 87	AKGEAAAERPGE	서열번호 87
펩티드 88	KGEAAAERPGEA	서열번호 88
펩티드 89	GEAAAERPGEAA	서열번호 89
펩티드 90	EAAAERPGEAAV	서열번호 90
펩티드 91	AAAERPGEAAVA	서열번호 91
펩티드 92	GAQFSKTAAKG	서열번호 92
펩티드 93	AQFSKTAAKGE	서열번호 93
펩티드 94	QFSKTAAKGEA	서열번호 94
펩티드 95	FSKTAAKGEAA	서열번호 95
펩티드 96	SKTAAKGEAAA	서열번호 96
펩티드 97	KTAAKGEAAA	서열번호 97
펩티드 98	TAAKGEAAAER	서열번호 98
펩티드 99	AAKGEAAAERP	서열번호 99
펩티드 100	AKGEAAAERPG	서열번호 100
펩티드 101	KGEAAAERPGE	서열번호 101
펩티드 102	GEAAAERPGEA	서열번호 102
펩티드 103	EAAAERPGEAA	서열번호 103
펩티드 104	AAAERPGEAAV	서열번호 104
펩티드 105	AAERPGEAAVA	서열번호 105
펩티드 106	GAQFSKTAAK	서열번호 106
펩티드 107	AQFSKTAAKG	서열번호 107
펩티드 108	QFSKTAAKGE	서열번호 108
펩티드 109	FSKTAAKGEA	서열번호 109
펩티드 110	SKTAAKGEAA	서열번호 110
펩티드 111	KTAAKGEAAA	서열번호 111
펩티드 112	TAAKGEAAA	서열번호 112
펩티드 113	AAKGEAAAER	서열번호 113
펩티드 114	AKGEAAAERP	서열번호 114
펩티드 115	KGEAAAERPG	서열번호 115
펩티드 116	GEAAAERPGE	서열번호 116
펩티드 117	EAAAERPGEA	서열번호 117
펩티드 118	AAAERPGEAA	서열번호 118
펩티드 119	AAERPGEAAV	서열번호 119
펩티드 120	AERPGEAAVA	서열번호 120
펩티드 121	GAQFSKTAA	서열번호 121
펩티드 122	AQFSKTAAK	서열번호 122
펩티드 123	QFSKTAAKG	서열번호 123
펩티드 124	FSKTAAKGE	서열번호 124
펩티드 125	SKTAAKGEA	서열번호 125
펩티드 126	KTAAKGEAA	서열번호 126

<42>

펩티드 번호	서 열	서열번호
펩티드 127	TAAKGAAA	서열번호 127
펩티드 128	AAKGAAA	서열번호 128
펩티드 129	AKGAAAER	서열번호 129
펩티드 130	KGAAAERP	서열번호 130
펩티드 131	GEAAAERPG	서열번호 131
펩티드 132	EAAAERPGE	서열번호 132
펩티드 133	AAAERPGEA	서열번호 133
펩티드 134	AAERPGEAA	서열번호 134
펩티드 135	AERPGEAAV	서열번호 135
펩티드 136	ERPGEAAVA	서열번호 136
펩티드 137	GAQFSKTA	서열번호 137
펩티드 138	AQFSKTAA	서열번호 138
펩티드 139	QFSKTAAK	서열번호 139
펩티드 140	FSKTAAKG	서열번호 140
펩티드 141	SKTAAKGE	서열번호 141
펩티드 142	KTAAKGEA	서열번호 142
펩티드 143	TAAKGEAA	서열번호 143
펩티드 144	AAKGAAA	서열번호 144
펩티드 145	AKGAAA	서열번호 145
펩티드 146	KGAAAER	서열번호 146
펩티드 147	GEAAAERP	서열번호 147
펩티드 148	EAAAERPGE	서열번호 148
펩티드 149	AAAERPGEA	서열번호 149
펩티드 150	AAERPGEAA	서열번호 150
펩티드 151	AERPGEAAV	서열번호 151
펩티드 152	ERPGEAAVA	서열번호 152
펩티드 153	GAQFSKT	서열번호 153
펩티드 154	AQFSKTA	서열번호 154
펩티드 155	QFSKTAA	서열번호 155
펩티드 156	FSKTAAK	서열번호 156
펩티드 157	SKTAAKG	서열번호 157
펩티드 158	KTAAKGE	서열번호 158
펩티드 159	TAAKGEA	서열번호 159
펩티드 160	AAKGEEA	서열번호 160
펩티드 161	AKGEEA	서열번호 161
펩티드 162	KGEEA	서열번호 162
펩티드 163	KGEEA	서열번호 163
펩티드 164	GEAAAER	서열번호 164
펩티드 165	EAAAERP	서열번호 165
펩티드 166	AAAERPGE	서열번호 166
펩티드 167	AAERPGE	서열번호 167
펩티드 168	AERPGEA	서열번호 168
펩티드 169	ERPGEAA	서열번호 169
펩티드 170	RPGEAAV	서열번호 170
펩티드 171	PGEEAAVA	서열번호 171
펩티드 172	GAQFSK	서열번호 172
펩티드 173	AQFSKT	서열번호 173
펩티드 174	QFSKTA	서열번호 174

<43>

펩티드 번호	서 열	서열번호
펩티드 175	FSKTAA	서열번호 175
펩티드 176	SKTAAK	서열번호 176
펩티드 177	KTAAKG	서열번호 177
펩티드 178	TAAKGE	서열번호 178
펩티드 179	AAKGEA	서열번호 179
펩티드 180	AKGEAA	서열번호 180
펩티드 181	KGEAAA	서열번호 181
펩티드 182	GEAAA	서열번호 182
펩티드 183	EAAAER	서열번호 183
펩티드 184	AAAERP	서열번호 184
펩티드 185	AAERPG	서열번호 185
펩티드 186	AERPGE	서열번호 186
펩티드 187	ERPGEA	서열번호 187
펩티드 188	RPGEAA	서열번호 188
펩티드 189	PGEA	서열번호 189
펩티드 190	GEAAVA	서열번호 190
펩티드 191	GAQFS	서열번호 191
펩티드 192	AQFSK	서열번호 192
펩티드 193	QFSKT	서열번호 193
펩티드 194	FSKTA	서열번호 194
펩티드 195	SKTAA	서열번호 195
펩티드 196	KTAAK	서열번호 196
펩티드 197	TAAKG	서열번호 197
펩티드 198	AAKGE	서열번호 198
펩티드 199	AKGEA	서열번호 199
펩티드 200	KGEAA	서열번호 200
펩티드 201	GEAAA	서열번호 201
펩티드 202	EAAA	서열번호 202
펩티드 203	AAAER	서열번호 203
펩티드 204	AAERP	서열번호 204
펩티드 205	AERPG	서열번호 205
펩티드 206	ERPGE	서열번호 206
펩티드 207	RPGEA	서열번호 207
펩티드 208	PGEA	서열번호 208
펩티드 209	GEAAV	서열번호 209
펩티드 210	EAAVA	서열번호 210
펩티드 211	GAQF	서열번호 211
펩티드 212	AQFS	서열번호 212
펩티드 213	QFSK	서열번호 213
펩티드 214	FSKT	서열번호 214
펩티드 215	SKTA	서열번호 215
펩티드 216	KTAA	서열번호 216
펩티드 217	TAAK	서열번호 217
펩티드 218	AAKG	서열번호 218
펩티드 219	AKGE	서열번호 219
펩티드 220	KGEA	서열번호 220
펩티드 221	GEAA	서열번호 221
펩티드 222	EAAA	서열번호 222

<44>

펩티드 번호	서 열	서열번호
펩티드 223	AAAAE	서열번호 223
펩티드 224	AAER	서열번호 224
펩티드 225	AERP	서열번호 225
펩티드 226	ERPG	서열번호 226
펩티드 227	RPGE	서열번호 227
펩티드 228	PGEA	서열번호 228
펩티드 229	GEAA	서열번호 229
펩티드 230	EAAV	서열번호 230
펩티드 231	AAVA	서열번호 231
펩티드 232	GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF	서열번호 232
펩티드 233	GKQFSKTAAKGE	서열번호 233
펩티드 234	GAQFSKTKAKGE	서열번호 234
펩티드 235	GKQFSKTKAKGE	서열번호 235
펩티드 236	GAQASKTAAK	서열번호 236
펩티드 237	GAQASKTAAKGE	서열번호 237
펩티드 238	GAEFSKTAAKGE	서열번호 238
펩티드 239	GAQFSKTAAGGE	서열번호 239
펩티드 240	GAQFSKTAAKAE	서열번호 240
펩티드 241	GAQFSKTAAKGA	서열번호 241
펩티드 242	AAQFSKTAAK	서열번호 242
펩티드 243	GAAFSTAAK	서열번호 243
펩티드 244	GAQFAKTAAK	서열번호 244
펩티드 245	GAQFSATAAK	서열번호 245
펩티드 246	KAATKSFQAG	서열번호 246
펩티드 247	GAQFSKAAAK	서열번호 247
펩티드 248	GAQFSKTAATA	서열번호 248
펩티드 249	GAQFSATAATA	서열번호 249
펩티드 250	GAQASKTA	서열번호 250
펩티드 251	AAGE	서열번호 251
펩티드 252	GKASQFAKTA	서열번호 252

<45>

표 1에 개시된 펩티드의 아미노산 서열은 화학적으로 변이될 수 있다. 예를 들어, 표 1에 개시된 펩티드의 아미노산 서열의 N-말단 아민이 화학적으로 변이되어 카르복시산을 가지는 아민을 형성하면, 상기 결과의 펩티드는 때때로 본 명세서에서 펩티드 번호에 하이픈(-)으로 연결된 접두어(prefix)로서 카르복시산의 조합으로 표시된다. 하나의 예로, 펩티드 79에 있어서, N-말단이 미리스토일화된 펩티드 79는 본 명세서에서 때때로 "미리스토일화-펩티드 79" 또는 "myr-펩티드 79"로 표시되고; N-말단이 아세틸화된 펩티드 79는 본 명세서에서 때때로 "아세틸-펩티드 79" 또는 "Ac-펩티드 79"라 표시된다. 펩티드 79의 환형은 "환형-펩티드 79" 또는 "cyc-펩티드 79"로 표시된다. 또한, 예를 들어, 표 1에 개시된 펩티드의 아미노산 서열의 C-말단 카르복실기가, 예를 들어, 암모니아 등의 아민이 C-말단 아미드를 형성에 의한 것처럼 화학적으로 변이되면, 상기 결과 펩티드는 본 명세서에서 펩티드 번호에 하이픈(-)으로 연결된 접미어(suffix)로서 아민잔기(amine residue)의 조합으로 표시된다. 따라서, 예를 들어, 펩티드 79의 C-말단 아미드는 때때로 "펩티드-NH₂"로 표시된다. 예를 들어, 펩티드 (예를 들어, 펩티드 79)의 N-말단이, 미리스토일기로 화학적으로 변이되고, C-말단 카르복실기가 암모니아기로 화학적으로 변이되어 상술한 바와 같이 아미드를 형성하면, 상기 결과 펩티드는 접두어 및 접미어 표시법을 모두 사용하여, "myr-펩티드 79-NH₂"로 표시된다.

<46>

본 발명은 MANS 펩티드의 아미노산 서열과 관계된 아미노산 서열을 가지는 24개 이하의 아미노산으로 구성된 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 포함한다(즉, MANS 펩티드는 미리스토일-펩티드 1이고, MANS 펩티드의 참조 24개 아미노산 서열은 펩티드 1이다). 본 발명의 펩티드는 24개 이하의 아미노산을 포함하는 아미노산 서열로 구성되고, 8 내지 14개, 10 내지 12개, 9 내지 14개, 9 내지 13개, 10 내지 13개, 10 내지 14개, 적어도 9개, 적어도 10개 또는 그와 유사한 아미노산으로 구성된다. 상기 펩티드는 통상적으로 직쇄형이지만, 환형 펩티드일 수도 있다. 아울러, 상기 펩티드는 분리된 펩티드일 수 있다.

<47> 펩티드 1(서열번호 1)인 참조 24 아미노산 서열에 있어서, 연속된 23개 아미노산의 단편은 본 명세서에서 때때로 23-머(mer)로 표시된다. 마찬가지로, 참조서열의 연속된 22개 아미노산의 단편은 본 명세서에서 때때로 20-머로 표시되고; 19개 아미노산 서열은 19-머로; 18개 아미노산 서열은 18-머로; 17개 아미노산 서열은 17-머로; 16개 아미노산 서열은 16-머로; 15개 아미노산 서열은 15-머로; 14개 아미노산 서열은 14-머로; 13개 아미노산 서열은 13-머로; 12개 아미노산 서열은 12-머로; 11개 아미노산 서열은 11-머로; 10개 아미노산 서열은 10-머로; 9개 아미노산 서열은 9-머로; 8개 아미노산 서열은 8-머로; 7개 아미노산 서열은 7-머로; 6개 아미노산 서열은 6-머로, 5개 아미노산 서열은 5-머로; 4개 아미노산 서열은 4-머로 표시된다. 본 발명의 일 측면에서는, "4- 내지 23-머" 아미노산 서열 중 어느 하나는 그 자체로 펩티드(본 명세서에서, 때때로 H₂N-펩티드-COOH를 의미한다)이며, 독립적, 화학적으로 변이될 수 있다. 예를 들어, 이러한 화학적 변이는 (i) C₁ 또는 바람직하게는 C₂(아세트산)에서 C₂₂ 카르복시산으로 N-말단 아민기(H₂N-펩티드-)에 아미드형성; (ii) 암모니아 또는 C₁ 내지 C₂₂ 일차 또는 이차 아민으로 C-말단 카르복실기에 아미드 형성; 및, (iii) 그의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다.

<48> 펩티드는 (a) 참조서열인 펩티드 1의 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열; (b) (a)에서 정의된 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 서열; 및, (c) (a)에서 정의된 아미노산 서열의 치환 변이체, 결실 변이체, 부가 변이체 및 그의 조합 등의 변이체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 변이체의 아미노산 서열을 가진다. 본 발명의 일 실시태양에 따르면, 펩티드는 (a) 참조서열인 펩티드 1의 8 내지 14개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열; (b) (a)에서 정의된 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열; 및, (c) (a)에서 정의된 아미노산 서열의 치환 변이체, 결실 변이체, 부가 변이체 및 그의 조합 등의 변이체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 변이체의 아미노산 서열을 가진다. 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 펩티드는 (a) 참조서열인 펩티드 1의 10 내지 12개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열; (b) (a)에서 정의된 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열; 및, (c) (a)에서 정의된 아미노산 서열의 치환 변이체, 결실 변이체, 부가 변이체 및 그의 조합 등의 변이체를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 변이체의 아미노산 서열을 가진다. 본 발명의 또 다른 실시태양에 따르면, 펩티드는 참조서열인 펩티드 1의 적어도 9개, 적어도 10개, 9 내지 14개, 9 내지 13개, 10 내지 13개, 10 내지 14개, 또는 그와 같은 연속된 아미노산; 그에 실질적으로 동일한 아미노산 서열; 또는, 치환 변이체, 결실 변이체, 부가 변이체 및 그의 조합 등의 것들을 포함하는 그룹에서 선택되는 변이체의 아미노산 서열을 가진다. 아래에 상세히 기술한 바와 같이, 펩티드의 하나 또는 그 이상의 아미노산(예를 들어, N-말단 및/또는 C-말단 아미노산)은 선택적, 독립적, 화학적으로 변이될 수 있고; 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 펩티드의 하나 또는 그 이상의 아미노산은 화학적으로 변이될 수 있는 반면, 본 발명의 또 다른 실시태양에 따르면, 펩티드 아미노산의 어느 것도 화학적으로 변이되지 않을 것이다. 본 발명의 일 측면에서는, 바람직한 변이는 펩티드 또는 펩티드 단편의 N-말단 아미노산의 아민기(H₂N-)에서 일어날 수 있다(이 아민기가 N-말단보다는 펩티드 서열의 내부에 존재한다면, 펩티드 아민결합을 형성할 수 있다). 본 발명의 다른 측면에 따르면, 바람직한 변이는 펩티드 또는 펩티드 단편의 C-말단 아미노산의 카르복실기(-COOH)에서 일어날 수 있다(이 카르복실기가 C-말단보다는 펩티드 서열의 내부에 존재한다면, 펩티드 아미드결합을 형성할 수 있다). 본 발명의 다른 측면에 따르면, 바람직한 변이는 N-말단 아민기(H₂N-) 및 C-말단 카르복실기(-COOH)에서 일어날 수 있다.

<49> 본 발명의 일 실시태양에 따르면, 펩티드의 아미노산 서열은 참조서열인 펩티드 1의 N-말단 아미노산으로부터 시작한다. 예를 들어, 펩티드는 (a) 참조서열인 펩티드 1의 N-말단 아미노산으로부터 시작되는, 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열(즉, 펩티드 2, 펩티드 4, 펩티드 7, 펩티드 11, 펩티드 16, 펩티드 22, 펩티드 29, 펩티드 37, 펩티드 46, 펩티드 56, 펩티드 67, 펩티드 79, 펩티드 92, 펩티드 106, 펩티드 121, 펩티드 137, 펩티드 154, 펩티드 172, 펩티드 192, 또는 펩티드 211); (b) (a)에서 정의된 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 서열; 및, (c) (a)에서 정의된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이들 펩티드는 화학적 잔기를 포함하지 않거나, N-말단 글리신에 미리스토일기를 제외한 화학적 잔기를 포함한다. 바람직하게는, 화학적 잔기는 아세틸기 또는 알킬기와 같은 아미드 결합을 형성하는 아실기이다.

<50> 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 펩티드의 아미노산 서열은 참조서열 펩티드 1의 C-말단 아미노산에서 끝난다. 예를 들어, 펩티드는 (a) 참조서열인 펩티드 1의 C-말단 아미노산에서 끝나는, 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열(즉, 펩티드 3, 펩티드 6, 펩티드 10, 펩티드 15, 펩티드 21, 펩티드 28, 펩티드 36, 펩티드 45, 펩티드 55, 펩티드 66, 펩티드 78, 펩티드 91, 펩티드 105, 펩티드 120, 펩티드 136, 펩티드 153, 펩티드 171, 펩티드 190, 펩티드 210, 또는 펩티드 231); (b) (a)에서 정의된 아미노산 서열과 실질적으로

유사한 서열; 및, (c) (a)에서 정의된 아미노산 서열의 변이체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

<51> 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 펩티드의 아미노산 서열은 참조서열인 펩티드 1(서열번호 1)의 N-말단 아미노산에서 시작되지 않고, 그보다는 참조서열인 펩티드 1의 2번 위치의 아미노산과 21번 위치의 아미노산 사이에서 시작한다. 예를 들어, 펩티드는 (a) 참조서열인 펩티드 1의 위치 2 내지 위치 21 사이의 어느 한 아미노산에서 시작하는, 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이러한 펩티드는, 참조서열인 펩티드 1의 중앙부 4 내지 23개의 아미노산; (b) (a)에서 정의된 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 서열; 및, (c) (a)에서 정의된 아미노산 서열의 변이체일 수 있다. 이러한 펩티드는 표 1 또는 2에 개시하였다. 이들 펩티드는, 공유결합된 화학적 잔기를 포함하지 않거나, 또는 N-말단 글리신이 아니거나, 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단 글리신에 상응하는, N-말단 아미노산에 화학적 잔기를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 화학적 잔기는 아세틸기 또는 미리스토일기와 같은 아미드 결합을 형성하는 아실기이거나, 또는 알킬기이다.

<52> 본 발명에서 포유동물의 뮤신 과분비 억제, 뮤신 과분비량의 감소에 유용하고, 뮤신 과분비 억제 및 뮤신 과분비 감소에 유용한 펩티드 아미노산 서열은 분리된 펩티드의 아미노산 서열 및 본 발명의 N-말단- 및/또는 C-말단이 화학적으로 변이된 그룹을 선택적으로 포함하는 펩티드의 아미노산 서열을 포함하며, 이러한 펩티드 아미노산 서열은 23-머(즉, 23 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 2; 및 펩티드 3; 및 22-머(즉, 22 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 4; 펩티드 5; 및 펩티드 6; 21-머(즉, 21 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 7; 펩티드 8; 펩티드 9; 및 펩티드 10; 20-머(즉, 20 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 11; 펩티드 12; 펩티드 13; 펩티드 14; 펩티드 15; 19-머(즉, 19 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 16; 펩티드 17; 펩티드 18; 펩티드 19; 펩티드 20; 및 펩티드 21; 18-머(즉 18 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 22; 펩티드 23; 펩티드 24; 펩티드 25; 펩티드 26; 펩티드 27; 및 펩티드 28; 17-머(즉, 17 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 29; 펩티드 30; 펩티드 31; 펩티드 32; 펩티드 33; 펩티드 34; 펩티드 35; 및 펩티드 36; 16-머(즉, 16 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 37; 펩티드 38; 펩티드 39; 펩티드 40; 펩티드 41; 펩티드 42; 펩티드 43; 펩티드 44; 및 펩티드 45; 15-머(즉, 15 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 46; 펩티드 47; 펩티드 48; 펩티드 49; 펩티드 50; 펩티드 51; 펩티드 52; 펩티드 53; 펩티드 54; 및 펩티드 55; 14-머(즉, 14 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 56, 펩티드 57, 펩티드 58, 펩티드 59, 펩티드 60; 펩티드 61; 펩티드 62; 펩티드 63; 펩티드 64; 펩티드 65; 및 펩티드 66; 13-머(즉, 13 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 67; 펩티드 68; 펩티드 69; 펩티드 70; 펩티드 71; 펩티드 72; 펩티드 73; 펩티드 74; 펩티드 75; 펩티드 76; 펩티드 77; 및 펩티드 78; 12-머(즉 12 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 79; 펩티드 80; 펩티드 81; 펩티드 82; 펩티드 83; 펩티드 84; 펩티드 85; 펩티드 86; 펩티드 87; 펩티드 88; 펩티드 89; 펩티드 90; 및 펩티드 91; 11-머(즉 11 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 92; 펩티드 93; 펩티드 94; 펩티드 95; 펩티드 96; 펩티드 97; 펩티드 98; 펩티드 99; 펩티드 100; 펩티드 101; 펩티드 102; 펩티드 103; 펩티드 104; 및 펩티드 105; 10-머(즉, 10 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 106; 펩티드 107; 펩티드 108; 펩티드 109; 펩티드 110; 펩티드 111; 펩티드 112; 펩티드 113; 펩티드 114; 펩티드 115; 펩티드 116; 펩티드 117; 펩티드 118; 펩티드 119; 및 펩티드 120; 9-머(즉, 9 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 121; 펩티드 122; 펩티드 123; 펩티드 124; 펩티드 125; 펩티드 126; 펩티드 127; 펩티드 128; 펩티드 129; 펩티드 130; 펩티드 131; 펩티드 132; 펩티드 133; 펩티드 134; 펩티드 135; 및 펩티드 136; 8-머(즉, 8 아미노산을 가지는 펩티드): 펩티드 137; 펩티드 138; 펩티드 139; 펩티드 140; 펩티드 141; 펩티드 142; 펩티드 143; 펩티드 144; 펩티드 145; 펩티드 146; 펩티드 147; 펩티드 148; 펩티드 149; 펩티드 150; 펩티드 151; 펩티드 152; 및 펩티드 153; 7-머(즉, 7 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 154; 펩티드 155; 펩티드 156; 펩티드 157; 펩티드 158; 펩티드 159; 펩티드 160; 펩티드 161; 펩티드 162; 펩티드 163; 펩티드 164; 펩티드 165; 펩티드 166; 펩티드 167; 펩티드 168; 펩티드 169; 펩티드 170; 및 펩티드 171; 6-머(즉, 6 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 172; 펩티드 173; 펩티드 174; 펩티드 175; 펩티드 176; 펩티드 177; 펩티드 178; 펩티드 179; 펩티드 180; 펩티드 181; 펩티드 182; 펩티드 183; 펩티드 184; 펩티드 185; 펩티드 186; 펩티드 187; 펩티드 188; 펩티드 189; 및 펩티드 190; 5-머(즉, 5 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 191; 펩티드 192; 펩티드 193; 펩티드 194; 펩티드 195; 펩티드 196; 펩티드 197; 펩티드 198; 펩티드 199; 펩티드 200; 펩티드 201; 펩티드 202; 펩티드 203; 펩티드 204; 펩티드 205; 펩티드 206; 펩티드 207; 펩티드 208; 펩티드 209; 및 펩티드 210; 4-머(즉, 4 아미노산 서열을 가지는 펩티드): 펩티드 211; 펩티드 212; 펩티드 213; 펩티드 214; 펩티드 215; 펩티드 216; 펩티드 217; 펩티드 218; 펩티드 219; 펩티드 220; 펩티드 221; 펩티드 222; 펩티드 223; 펩티드 224; 펩티드 225; 펩티드 226; 펩티드 227; 펩티드 228; 펩티드 229; 펩티드 230; 및 펩티드

드 231로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

<53> 분리된 펩티드와 본 발명의 N-말단- 및/또는 C-말단-화학적으로 변이된 펩티드의 바람직한 아미노산 서열은, 23-머: 펩티드 2; 및 펩티드 3; 및 22-머: 펩티드 4; 펩티드 5; 및 펩티드 6; 21-머: 펩티드 7; 펩티드 8; 펩티드 9; 및 펩티드 10; 20-머: 펩티드 11; 펩티드 12; 펩티드 13; 펩티드 14; 펩티드 15; 19-머: 펩티드 16; 펩티드 17; 펩티드 18; 펩티드 19; 펩티드 20; 및 펩티드 21; 18-머: 펩티드 22; 펩티드 23; 펩티드 24; 펩티드 25; 펩티드 26; 펩티드 27; 및 펩티드 28; 17-머: 펩티드 29; 펩티드 30; 펩티드 31; 펩티드 32; 펩티드 33; 펩티드 34; 펩티드 35; 및 펩티드 36; 16-머: 펩티드 37; 펩티드 38; 펩티드 39; 펩티드 40; 펩티드 41; 펩티드 42; 펩티드 43; 펩티드 44; 및 펩티드 45; 15-머: 펩티드 46; 펩티드 47; 펩티드 48; 펩티드 49; 펩티드 50; 펩티드 51; 펩티드 52; 펩티드 53; 및 54; 14-머: 펩티드 56, 펩티드 57, 펩티드 58, 펩티드 59, 펩티드 60; 펩티드 61; 펩티드 62; 펩티드 63; 및 펩티드 64; 13-머: 펩티드 67; 펩티드 68; 펩티드 69; 펩티드 70; 펩티드 71; 펩티드 72; 펩티드 73; 펩티드 74; 및 펩티드 75; 12-머: 펩티드 79; 펩티드 80; 펩티드 81; 펩티드 82; 펩티드 83; 펩티드 84; 펩티드 85; 펩티드 86; 및 펩티드 87; 11-머: 펩티드 92; 펩티드 93; 펩티드 94; 펩티드 95; 펩티드 96; 펩티드 97; 펩티드 98; 펩티드 99; 및 펩티드 100; 10-머: 펩티드 106; 펩티드 107; 펩티드 108; 펩티드 109; 펩티드 110; 펩티드 111; 펩티드 112; 펩티드 113; 및 펩티드 114; 9-머: 펩티드 122; 펩티드 123; 펩티드 124; 펩티드 125; 펩티드 126; 펩티드 127; 펩티드 128; 및 펩티드 129; 8-머: 펩티드 139; 펩티드 140; 펩티드 141; 펩티드 142; 펩티드 143; 펩티드 144; 및 펩티드 145; 7-머: 펩티드 157; 펩티드 158; 펩티드 159; 펩티드 160; 펩티드 161; 및 펩티드 162; 6-머: 펩티드 176; 펩티드 177; 펩티드 178; 펩티드 179; 및 펩티드 180; 5-머: 펩티드 196; 펩티드 197; 펩티드 198; 및 펩티드 199; 4-머: 펩티드 217; 및 펩티드 219로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

<54> 분리된 펩티드와 본 발명의 N-말단- 및/또는 C-말단-화학적으로 변이된 펩티드의 보다 바람직한 아미노산 서열은, 23-머: 펩티드 2; 및 펩티드 3; 및 22-머: 펩티드 4; 펩티드 5; 및 펩티드 6; 21-머: 펩티드 7; 펩티드 8; 펩티드 9; 및 펩티드 10; 20-머: 펩티드 11; 펩티드 12; 펩티드 13; 펩티드 14; 펩티드 15; 19-머: 펩티드 16; 펩티드 17; 펩티드 18; 펩티드 19; 펩티드 20; 및 펩티드 21; 18-머: 펩티드 22; 펩티드 23; 펩티드 24; 펩티드 25; 펩티드 26; 펩티드 27; 및 펩티드 28; 17-머: 펩티드 29; 펩티드 30; 펩티드 31; 펩티드 32; 펩티드 33; 펩티드 34; 펩티드 35; 및 펩티드 36; 16-머: 펩티드 37; 펩티드 38; 펩티드 39; 펩티드 40; 펩티드 41; 펩티드 42; 펩티드 43; 펩티드 44; 및 펩티드 45; 15-머: 펩티드 46; 펩티드 47; 펩티드 48; 펩티드 49; 펩티드 50; 펩티드 51; 펩티드 52; 펩티드 53; 및 54; 14-머: 펩티드 56, 펩티드 57, 펩티드 58, 펩티드 59, 펩티드 60; 펩티드 61; 펩티드 62; 펩티드 63; 및 펩티드 64; 13-머: 펩티드 67; 펩티드 68; 펩티드 69; 펩티드 70; 펩티드 71; 펩티드 72; 펩티드 73; 및 펩티드 74; 12-머: 펩티드 80; 펩티드 81; 펩티드 82; 펩티드 83; 펩티드 84; 펩티드 85; 펩티드 86; 및 펩티드 87; 11-머: 펩티드 92; 펩티드 93; 펩티드 94; 펩티드 95; 펩티드 96; 펩티드 97; 펩티드 98; 펩티드 99; 및 펩티드 100; 10-머: 펩티드 106; 펩티드 107; 펩티드 108; 펩티드 109; 펩티드 110; 펩티드 111; 펩티드 112; 펩티드 113; 및 펩티드 114; 9-머: 펩티드 124; 펩티드 125; 펩티드 126; 펩티드 127; 펩티드 128; 및 펩티드 129; 8-머: 펩티드 141; 펩티드 142; 펩티드 143; 펩티드 144; 및 펩티드 145; 7-머: 펩티드 159; 펩티드 160; 펩티드 161; 및 펩티드 162; 6-머: 펩티드 178; 펩티드 179; 및 펩티드 180; 5-머: 펩티드 198; 및 펩티드 199; 4-머: 펩티드 219로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

<55> 본 발명의 또 다른 실시태양에 따르면, 펩티드의 아미노산 서열은 참조서열인 펩티드 1의 펩티드 219에서와 같이 연속된 A, K, G 및 E 잔기를 포함한다. 예를 들어, 펩티드는 (a) 참조서열인 펩티드 1의 펩티드 219에서와 같이 연속된 A, K, G 및 E 잔기를 포함하는, 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열(예를 들어, 펩티드 219, 펩티드 45, 펩티드 79, 펩티드 67, 펩티드 80 등); (b) (a)에서 정의된 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 서열; 및, (c) (a)에서 정의된 아미노산 서열의 변이체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

<56> 참조 펩티드 아미노산 서열인 펩티드 1의 AKGE 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 단편의 예로는, (a) 23-머: 펩티드 2; 및 펩티드 3; 및 22-머: 펩티드 4; 펩티드 5; 및 펩티드 6; 11-머: 펩티드 7; 펩티드 8; 펩티드 9; 및 펩티드 10; 20-머: 펩티드 11; 펩티드 12; 펩티드 13; 펩티드 14; 펩티드 15; 19-머: 펩티드 16; 펩티드 17; 펩티드 18; 펩티드 19; 펩티드 20; 및 펩티드 21; 18-머: 펩티드 22; 펩티드 23; 펩티드 24; 펩티드 25; 펩티드 26; 펩티드 27; 및 펩티드 28; 17-머: 펩티드 29; 펩티드 30; 펩티드 31; 펩티드 32; 펩티드 33; 펩티드 34; 펩티드 35; 및 펩티드 36; 16-머: 펩티드 37; 펩티드 38; 펩티드 39; 펩티드 40; 펩티드 41; 펩티드 42; 펩티드 43; 펩티드 44; 및 펩티드 45; 15-머: 펩티드 46; 펩티드 47; 펩티드 48; 펩티드 49; 펩티드 50; 펩티드 51; 펩티드 52; 펩티드 53; 및 54; 14-머: 펩티드 56, 펩티드 57, 펩티드 58, 펩티드 59, 펩티드 60; 펩티

드 61; 펩티드 62; 펩티드 63; 및 펩티드 64; 13-머: 펩티드 67; 펩티드 68; 펩티드 69; 펩티드 70; 펩티드 71; 펩티드 72; 펩티드 73; 펩티드 74; 및 펩티드 75; 12-머: 펩티드 79; 펩티드 80; 펩티드 81; 펩티드 82; 펩티드 83; 펩티드 84; 펩티드 85; 펩티드 86; 및 펩티드 87; 11-머: 펩티드 93; 펩티드 94; 펩티드 95; 펩티드 96; 펩티드 97; 펩티드 98; 펩티드 99; 및 펩티드 100; 10-머: 펩티드 108; 펩티드 109; 펩티드 110; 펩티드 111; 펩티드 112; 펩티드 113; 및 펩티드 114; 9-머: 펩티드 124; 펩티드 125; 펩티드 126; 펩티드 127; 펩티드 128; 및 펩티드 129; 8-머: 펩티드 141; 펩티드 142; 펩티드 143; 펩티드 144; 및 펩티드 145; 7-머: 펩티드 159; 펩티드 160; 펩티드 161; 및 펩티드 162; 6-머: 펩티드 178; 펩티드 179; 및 펩티드 180; 5-머: 펩티드 198; 및 펩티드 199; 4-머: 펩티드 219, (b) (a)에서 정의된 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 서열; 및, (c) (a)에서 정의된 아미노산 서열의 치환 변이체, 결실 변이체, 부가 변이체 및 그의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 변이체를 포함하고, 단편이 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 포함하거나 구성한다.

<57> 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 바람직한 펩티드 서열은 (a) 참조서열인 펩티드 1의 10 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열; (b) (a)에서 정의된 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 서열; 및, (c) (a)에서 정의된 아미노산 서열의 바람직한 아미노산 서열이 23-머: 펩티드 2; 22-머: 펩티드 4; 21-머: 펩티드 7; 20-머: 펩티드 11, 19-머: 펩티드 16; 18-머: 펩티드 22; 17-머: 펩티드 29; 16-머: 펩티드 37; 15-머: 펩티드 46; 14-머: 펩티드 56; 13-머: 펩티드 67; 12-머: 펩티드 79; 11-머: 펩티드 92; 및 10-머: 펩티드 106을 포함하는 치환 변이체, 결실 변이체, 부가 변이체 및 그의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 변이체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진다.

<58> 본 발명의 또 다른 실시태양에 따르면, 펩티드의 아미노산 서열은 참조서열인 펩티드 1의 N-말단 아미노산으로부터 시작하고, 참조서열인 펩티드 1의 펩티드 219 에서와 같이 연속된 A, K, G 및 E 잔기를 포함하는 반면, 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 펩티드의 아미노산 서열은 참조서열인 펩티드 1의 C-말단 아미노산에서 끝나며, 참조서열인 펩티드 1의 펩티드 219에서와 같이 연속된 A, K, G 및 E 잔기를 포함한다.

<59> 펩티드는 참조 아미노산 서열에 있어서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 결실, 치환 및/또는 부가를 포함한다. 바람직하게는, 상기 치환은 보존적인 아미노산 치환 또는 비-보존적인 아미노산 치환일 수 있다. 본 발명의 일 실시태양에 따르면, 참조 아미노산 서열의 변이체와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 포함하는 펩티드는, 참조 아미노산 서열의 연속된 아미노산에 상응하는 것에 비하여, 결실 또는 부가를 가지지 않을 것이지만, 보존적인 또는 비-보존적인 치환을 가질 수 있다. 본 발명의 펩티드에 참조 아미노산 서열을 제조하는 아미노산 치환은 다음을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: 라이신(K), 발린(V), 루이신(L), 또는 이소루이신(I)으로 치환되는 아닐린(A); 아스파르트산(D)로 치환되는 글루타민산(E); 프롤린(P)로 치환되는 글리신(G); 아르기닌(R), 글루타민(Q), 또는 아스파라긴(N)으로 치환되는 라이신(K); 루이신(L), 발린(V), 이소루이신(I), 또는 알라닌(A)으로 치환되는 페닐알라닌(F); 글리신(G)로 치환되는 프롤린(P); 글루타민산(E) 또는 아스파라긴(N)으로 치환되는 글루타민(Q); 라이신(K), 글루타민(Q), 또는 아스파라긴(N)으로 치환되는 아르기닌(R); 트레오닌(T)로 치환되는 세린(S); 세린(S)으로 치환되는 트레오닌(T); 및 루이신(L), 이소루이신(I), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 알라닌(A), 또는 노르루이신(Nle)으로 치환되는 발린(V). 예를 들어, 본 발명의 펩티드에서의 참조 아미노산 서열을 제조할 수 있는 치환은 알라닌(A)의 페닐알라닌(F)로의 치환(예를 들어, 참조 아미노산 서열의 4번 위치 아미노산에), 글루타민산(E)의 글루타민(Q)로의 치환(예를 들어, 참조 아미노산 서열의 3번 위치 아미노산에), 라이신(K)의 알라닌(A)로의 치환(예를 들어, 참조 아미노산 서열의 2번 위치 및/또는 8번 위치 아미노산에) 및/또는 세린(S)의 트레오닌(T)으로의 치환(예를 들어, 참조 아미노산 서열의 7번 위치 아미노산에).

<60> 참조 아미노산 서열에 있어서, 본 발명의 펩티드의 아미노산 서열 내에 치환이 포함될 때(상기 펩티드는 변이되지 않은 것뿐만 아니라, 예를 들어, 아미드 형성과 같이 N-말단 및/또는 C-말단 변이에 의해 화학적으로 변이된 펩티드를 포함한다), 펩티드의 아미노산 서열과 참조 아미노산 서열 간에는, 바람직하게 적어도 80%의 서열상동성이 있다. 참조 아미노산 서열에 있어서, 5 내지 23개 아미노산을 가지는 펩티드와 하나의 아미노산 치환을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 96%(즉, ~97%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 참조 아미노산 서열에 있어서, 10 내지 23개 아미노산을 가지는 펩티드와 하나의 아미노산 치환을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 약 90% 내지 약 96%(즉, ~95.7%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 참조 아미노산 서열에 있어서, 20 내지 23개 아미노산을 가지는 펩티드와 하나의 아미노산 치환을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 약 95% 내지 약 96%(즉, ~95.7%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 참조 아미노산 서열에 있어서, 10 내지 23개 아미노산을 가지는 펩티드와 두 개의 아미노산 치환을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 92%(즉, ~91.3%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 참조 아미노산 서열에 있어서, 16 내지 23개 아미노산을

가지는 펩티드와 두 개의 아미노산 치환을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 약 87.5% 내지 약 92%(즉, ~91.3%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 참조 아미노산 서열에 있어서, 20 내지 23개 아미노산을 가지는 펩티드와 두 개의 아미노산 치환을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 약 90% 내지 약 92%(즉, ~91.3%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 참조 아미노산 서열에 있어서, 15 내지 23개 아미노산을 가지는 펩티드와 세 개의 아미노산 치환을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 87%의 서열상동성을 가질 수 있다. 참조 아미노산 서열에 있어서, 20 내지 23개 아미노산을 가지는 펩티드와 세 개의 아미노산 치환을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 약 85% 내지 약 87%의 서열상동성을 가질 수 있다. 참조 아미노산 서열에 있어서, 20 내지 23개 아미노산을 가지는 펩티드와 네 개의 아미노산 치환을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 83%(즉, ~82.6%)의 서열상동성을 가질 수 있다.

<61>

본 발명의 펩티드에서, 참조서열(24-머)의 연속된 아미노산 서열에 있어서, 24개 참조 아미노산 서열로부터 선택되는 연속된 23개 아미노산 서열(23-머)에서의 아미노산 1개의 치환은, 참조서열에서의 아미노산 단편과 23-머는 상동성을 가져 95.6%(또는 ~96%) 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 상기 23-머 내에 두 개, 세 개, 네 개 및 다섯 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 91.30%(또는 ~91%), 86.96%(또는 ~87%), 82.61%(또는 ~83%) 및 78.27%(또는 ~78%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 22-머 내에 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 및 다섯 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 95.45%(또는 ~95%), 90.91%(또는 ~91%), 86.36%(또는 ~86%), 81.82%(또는 ~82%) 및 77.27%(또는 ~77%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 21-머 내에 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 및 다섯 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 95.24%(~95%), 90.48%(~91%), 85.71%(~86%), 80.95%(~81%) 및 76.19%(~76%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 20-머 내에 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 및 다섯 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 95.00%(~95%), 90.00%(90%), 85.00%(~85%), 80.00%(~80%) 및 75.00%(~75%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 19-머 내에 한 개, 두 개, 세 개 및 네 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 94.74%(~95%), 89.47%(~89%), 84.21%(~84%) 및 78.95%(~79%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 18-머 내에 한 개, 두 개, 세 개 및 네 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 94.44%(~94%), 88.89%(~89%), 83.33%(~83%) 및 77.78%(~78%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 17-머 내에 한 개, 두 개, 세 개 및 네 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 94.12%(~94%), 88.23%(~88%), 82.35%(~82%) 및 76.47%(~76%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 16-머 내에 한 개, 두 개, 세 개 및 네 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 93.75%(~94%), 87.50%(~88%), 81.25%(~81%) 및 75.00%(~75%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 15-머 내에 한 개, 두 개 및 세 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 93.33%(~93%), 86.67%(~87%) 및 80.00%(~80%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 14-머 내에 한 개, 두 개 및 세 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 92.86%(~93%), 85.71%(~86%) 및 78.57%(~79%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 13-머 내에 한 개, 두 개 및 세 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 92.31%(~92%), 84.62%(~85%) 및 76.92%(~77%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 12-머 내에 한 개, 두 개 및 세 개 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 91.67%(~92%), 83.33%(~83%) 및 75.00%(~75%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 11-머 내에 한 개 및 두 개의 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 90.91%(~91%) 및 81.82%(~82%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 10-머 내에 한 개 및 두 개의 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 90.00%(~90%) 및 80.00%(~80%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 9-머 내에 한 개 및 두 개의 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 88.89%(~89%) 및 77.78%(~78%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 8-머 내에 한 개 및 두 개의 아미노산의 치환은 참조 펩티드 아미노산 서열에 대하여, 각각, 87.50%(~88%) 및 75.00%(~75%)의 서열상동성의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 마찬가지로, 7-머, 6-머, 5-머 및 4-머에서의 한 개의 아미노산의 치환은 참조 펩티드에 대하여, 각각 85.71%(~86%), 83.33%(~83.3%), 80.00%(~80%) 및 75.00%(~75%)의 서열상동성 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 제공한다. 본 발명의 바람직한 아미노산 서열은 참조서열의 아미노산 서열과 80%이상의 서열상동성을 가지며, 보다 바람직하게는, 참조서열의 아미노산 서열과 81% 내지 96%의 서열상동성을 가지며, 보다 바람직하게는, 참조서열의 아미

노산 서열과 80% 내지 96%의 서열상동성을 가진다. 바람직한 아미노산 서열은 말단 펩티드 아미노기에 선택적, N-말단적, 화학적으로 C₂ 내지 C₂₂ 직쇄형 지방족 카르복시산 일부분에 결합할 수 있다. 보다 바람직하게는, C₂ 내지 C₁₆ 직쇄형 지방족 카르복시산 일부분에, 가장 바람직하게는, C₂ 또는 C₁₆ 직쇄형 지방족 카르복시산 일부분에 아마이드 결합에 의해, 또한 말단 펩티드 카르복실기에서, 선택적으로 아마이드 결합에 의해 암모니아 같은 아민에 C-말단의 화학적으로 결합하거나 일차 또는 C₁ 내지 C₁₆ 직쇄형 지방족 일차 아민 등의 이차 아민에 아마이드 결합에 의해 결합할 수 있다.

- <62> 12-머인 펩티드 79의 치환 변이체의 예들은 펩티드 79에서의 3번 위치에 Q가 서열 238에서의 E로 치환된 펩티드 238; 펩티드 79에서의 2번 위치에 A가 펩티드 233에서의 K로 치환된 펩티드 233; 펩티드 79에서의 8번 위치에 A가 펩티드 234에서의 K로 치환된 펩티드 234; 펩티드 79에서의 2번 위치와 8번 위치에 A가 펩티드 235에서의 K로 치환된 펩티드 235; 펩티드 79에서의 4번 위치에 F가 펩티드 237에서의 A로 치환된 펩티드 237; 펩티드 79에서의 10번 위치에 K가 펩티드 239에서의 A로 치환된 펩티드 239; 펩티드 79에서의 11번 위치에 G가 펩티드 240에서의 A로 치환된 펩티드 240; 및 펩티드 79에서의 12번 위치에 E가 펩티드 241에서의 A로 치환된 펩티드 241을 포함한다.
- <63> 10-머인 펩티드 106의 치환 변이체의 예들은 펩티드 106에서의 4번 위치에 F가 펩티드 236에서의 A로 치환된 펩티드 236; 펩티드 106에서의 1번 위치에 G가 펩티드 242에서의 A로 치환된 펩티드 242; 펩티드 106에서의 3번 위치에 Q가 펩티드 243에서의 A로 치환된 펩티드 243; 펩티드 106에서의 5번 위치에 S가 펩티드 244에서의 A로 치환된 펩티드 244; 펩티드 106에서의 6번 위치에 K가 펩티드 245에서의 A로 치환된 펩티드 245; 펩티드 106에서의 7번 위치에 T가 펩티드 247에서의 A로 치환된 펩티드 247; 펩티드 106에서의 10번 위치에 K가 펩티드 248에서의 A로 치환된 펩티드 248; 펩티드 106에서의 6번 위치 및 10번 위치에 K가 펩티드 249에서의 각각 A로 치환된 펩티드 249를 포함한다.
- <64> 8-머인 펩티드 137의 치환 변이체의 예로는 펩티드 137에서의 4번 위치에 F가 펩티드 250에서의 A로 치환된 펩티드 250을 포함한다.
- <65> 4-머인 펩티드 219의 치환 변이체의 예로는 펩티드 219에서의 2번 위치에 K가 펩티드 251에서의 A로 치환된 펩티드 251을 포함한다.
- <66> 본 명세서에 기술한 바와 같은 치환 변이체 펩티드는, 분리된 펩티드 형태 또는 예를 들어, 미리스토일아미드, 아세틸아미드, 및 본 명세서에 기술한 바와 같은 N-말단 아미드, 암모니아로 형성된 아미드와 같은 C-말단 아미드, N-말단 아미드 및 C-말단 아미드 등의 화학적으로 변이된 펩티드 형태일 수 있다.
- <67> 참조 아미노산 서열에 있어서, 본 발명의 펩티드의 아미노산 서열 내에 결실이 포함될 때, 참조 아미노산 서열과 상기 펩티드의 아미노산 서열 사이의 바람직한 서열상동성은 적어도 80%이다. 5 내지 23개 아미노산을 가지고, 참조 펩티드에 있어서, 하나의 아미노산 결실을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 80% 내지 약 90%사이(즉, ~95.7%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 10 내지 23개 아미노산을 가지는 펩티드를 가지고, 참조 펩티드에 있어서, 하나의 아미노산 결실을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 90% 내지 약 96%사이(즉, ~95.7%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 20 내지 23개 아미노산을 가지는 펩티드고, 참조 펩티드에 있어서, 하나의 아미노산 결실을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 95% 내지 약 96%사이(즉, ~95.7%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 10 내지 23개 아미노산을 가지고, 참조 펩티드에 있어서, 두 개의 아미노산 결실을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 80% 내지 약 92%사이(즉, ~91.3%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 16 내지 23개 아미노산을 가지고, 참조 펩티드에 있어서, 두 개의 아미노산 결실을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 87.5% 내지 약 92%사이(즉, ~91.3%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 20 내지 23개 아미노산을 가지고, 참조 펩티드에 있어서, 두 개의 아미노산 결실을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 90% 내지 약 92%사이(즉, ~91.3%)의 서열상동성을 가질 수 있다. 15 내지 23개 아미노산을 가지고, 참조 펩티드에 있어서, 세 개의 아미노산 결실을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 80% 내지 약 87%사이의 서열상동성을 가질 수 있다. 20 내지 23개 아미노산을 가지고, 참조 펩티드에 있어서, 세 개의 아미노산 결실을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 85% 내지 약 87%사이의 서열상동성을 가질 수 있다. 20 내지 23개 아미노산을 가지고, 참조 펩티드에 있어서, 네 개의 아미노산 결실을 포함하는 펩티드는 참조 아미노산 서열과 80% 내지 약 83%사이(즉, ~82.6%)의 서열상동성을 가질 수 있다.
- <68> 상술한 바와 같이, 펩티드의 하나 또는 그 이상의 아미노산은 또한 화학적으로 변이될 수 있다. 이 분야에 알려진 어떠한 아미노산의 변이도 이 분야에 알려진 어떠한 방법을 이용하여 만들어질 수 있을 것이다.

- <69> 본 발명의 일부 실시태양에 따르면, N-말단 및/또는 C-말단 아미노산이 변이될 수 있다. 예를 들어, 펩티드의 알파-N-말단 아미노산은 알파-N-말단 아미노기($\alpha\text{-H}_2\text{N}$)가 알킬화, 아미드화, 또는 아세틸화될 수 있고, 또한, 예를 들어, 펩티드의 C-말단 아미노산은 C-말단 카르복실기($-\text{COOH}$)가 아미드화 또는 에스테르화될 수 있다. 예를 들어, N-말단 아미노기는 아세틸기(즉, $\text{CH}_3\text{-C(=O)-}$), 미리스토일기, 또는 둘 다 바람직하다)를 포함하는 아실기 또는 지방족 아실기를 포함하도록 아실화에 의해 변이되어 아미드를 형성할 수 있다. 본 발명의 일부 실시태양에 따르면, N-말단 아미노기는 $-\text{C(O)R}$ 의 화학식을 가지는 아실기를 포함하도록 변이될 수 있다(이때, R은 1 내지 15개의 탄소원자를 가지는 직쇄형 또는 분지형 알킬기이다). 또한, $-\text{C(O)R}^1$ 화학식을 가지는 아실기를 포함하도록 변이될 수 있다(이때, R^1 은 1 내지 15개의 탄소원자를 가지는 직쇄형 알킬기이다). N-아미드 역시 포름아미드($\text{R}=\text{H}$)가 될 수 있다. 펩티드의 C-말단 아미노산 역시, 화학적으로 변이될 수 있다. 예를 들어, C-말단 아미노산의 C-말단 카르복실기는 카르복실기의 위치에서 카르복시아미드기로의 전환에 의하여 화학적으로 변이될 수 있다(즉, 아미드화). 본 발명의 일부 실시태양에 따르면, N-말단 및/또는 C-말단 아미노산은 화학적으로 변이되지 않는다. 본 발명의 일부 실시태양에 따르면, N-말단기는 변이되고 C-말단기는 변이되지 않는다. 본 발명의 일부 실시태양에 따르면, N-말단 및 C-말단기 모두 변이된다.
- <70> 상기 펩티드는 N-말단 아미노산의 아미노기가 다음으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 산으로 아실화되어 N-말단 아미드를 생성할 수 있다:
- <71> (i-a) 직쇄형, 분지형(C_3 보다 큰 경우) 또는 고리(C_3 보다 큰 경우)를 포함하는, C_2 (아세틸) 내지 C_{13} 지방족(포화 또는 선택적으로 불포화) 카르복시산(예를 들어, 아세트산(바람직한 그룹), 프로판산, 부탄산, 헥산산, 옥탄산, 데칸산, 도데칸산을 갖는 N-말단 아미드);
- <72> (i-b) 직쇄형, 분지형 또는 고리를 포함하는 포화 C_{14} 지방족 카르복시산;
- <73> (i-c) 직쇄형, 분지형 또는 고리를 포함하는 불포화 C_{14} 지방족 카르복시산;
- <74> (i-d) 직쇄형, 분지형 또는 고리를 포함하는, C_{15} 내지 C_{24} 지방족(포화 또는 선택적으로 불포화) 카르복시산(예를 들어, 테트라데칸산(바람직한 그룹인 미리스틴산), 헥사데칸산, 9-헥사데센산, 옥타데칸산, 9-옥타데센산, 11-옥타데센산, 9,12-옥타데카디엔산, 9,12,15-옥타데카트리엔산, 6,9,12-옥타데카트리엔산, 에이코사산산, 9-에이코센산, 5,8,11,14-에이코사테트라엔산, 5,8,11,14,17-에이코사펜타엔산, 도코산산, 13-도코센산, 4,7,10,13,16,19-도코사헥사엔산, 테트라코산산 및 이들의 유사물질을 갖는다);
- <75> (ii) 트리플루오로아세트산;
- <76> (iii) 벤조산;
- <77> (iv-a) 지방족 알킬술폰아미드를 생성하는 C_1 내지 C_{12} 지방족 알킬술폰산(이때, 술폰산의 C_1 내지 C_{12} 지방족 알킬탄소 사슬구조는 상술한 지방족 알킬 카르복시산에서의 지방족 알킬 카르복시산 사슬과 유사하다). 예를 들어, 펩티드는 (C_1 내지 C_{11})-알킬- C(O)OH 로 나타내어지는 카르복시산기를 이용하여 카르복시산기의 활성화로 인한 탈수성 결합(dehydrative coupling)을 통하여 아실화되어, C_1 내지 C_{11} -알킬- C(O)-NH -펩티드로 나타내어지는 아미드를 생성할 수 있다. 마찬가지로, 술폰아미드는 술폰산($(\text{C}_1$ 내지 $\text{C}_{12})$ -알킬- $\text{S(O}_2\text{)-X}$ 등으로 나타내어지는 술폰산(이때, X는 할로젠 또는 OCH_3 또는 다른 적합한 이탈기이다)와 N-말단 아미노기의 반응에 의해 (C_1 내지 C_{12})-알킬- $\text{S(O}_2\text{)-NH}$ -펩티드로 나타내어지는 술폰아미드를 생성할 수 있다.
- <78> (iv-b) 지방족 알킬술폰아미드를 생성하는 C_{14} 내지 C_{24} 지방족 알킬술폰산(이때, 술폰산의 C_{14} 내지 C_{24} 지방족 알킬탄소 사슬구조는 상술한 지방족 알킬 카르복시산에서의 지방족 알킬 카르복시산 사슬과 유사하다). 예를 들어, 펩티드는 (C_{13} 내지 C_{23})-알킬- C(O)OH 로 나타내어지는 카르복시산기를 이용하여 카르복시산기의 활성화로 인한 탈수성 결합(dehydrative coupling)을 통하여 아실화되어, C_{13} 내지 C_{23} -알킬- C(O)-NH -펩티드로 나타내어지는 아미드를 생성할 수 있다. 마찬가지로, 술폰아미드는 술폰산($(\text{C}_{14}$ 내지 $\text{C}_{24})$ -알킬- $\text{S(O}_2\text{)-X}$ 등으로 나타내어지는 술폰산(이때, X는 할로젠 또는 OCH_3 또는 다른 적합한 이탈기이다)와 N-말단 아미노기의 반응에 의해 (C_{14} 내지 C_{24})-알킬- $\text{S(O}_2\text{)-NH}$ -펩티드로 나타내어지는 술폰아미드를 생성할 수 있다.

- <79> 또 다른 예로, N-말단 아미노산의 N-말단 아미노기는 상술한 지방족 알킬기 구조의 C₁ 내지 C₂₄ 지방족 알킬기로 알킬화될 수 있다. 알킬화는 지방족 알킬 할로겐화물 또는 지방족 알킬술폰산 에스테르(메실레이트, 토실레이트 등)를 이용하여 수행할 수 있고, 바람직하게는, 일차 알킬할로겐화물 또는 일차 알킬술폰산에스테르를 이용한다. N-말단 아미노산은 또한 말단 아미노에서, 아세틸기(즉, 바람직하게는 -C(O)CH₃), 미리스토일기(바람직하게는), 부타노일기, 헥사노일기, 옥타노일기, 데카노일기, 도데카노일기, 테트라데카노일기, 헥사데카노일기, 9-헥사데세노일기, 옥타데카노일기, 9-옥타데세노일기, 11-옥타데세노일기, 9,12-옥타데카디에노일기, 9,12,15-옥타데카트리에노일기, 6,9,12-옥타데카트리에노일기, 에이코사노일기, 9-에이코세노일기, 5,8,11,14-에이코사테트라에노일기, 5,8,11,14,17-에이코사펜타노일기, 도코사노일기, 13-도코세노일기, 4,7,10,13,16,19-도코사헥사에노일기, 테트라코사노일기를 포함하는, 아실 또는 지방족 아실 지방 아실기(aliphatic acyl fatty acyl group)를 아미드로 포함하도록, 펩티드의 말단 아미노기에 아미드 결합에 의해 공유결합되어 변이될 수 있다.
- <80> 예를 들어, C-말단 아미노산은 펩티드의 C-말단 카르복실기와 아민의 반응에 의해 변이되어, 바람직한 그룹인 암모니아의 아미드; C₁ 내지 C₁₂ 지방족 알킬아민의 아미드 등의 아미드기를 형성할 수 있고, 바람직하게는 직쇄형 지방족 알킬아민; 수산기가 치환된 C₂ 내지 C₁₂ 지방족 알킬아민의 아미드; 직쇄형 2-(C₁ 내지 C₁₂ 지방족 알킬)옥시에틸아민기의 아미드; 및 오메가-메톡시-폴리(에틸렌옥시)_n-에틸아민기(이때, n은 0 내지 10이다)의 아미드 등의 아미드기를 형성할 수 있다. 펩티드의 C-말단 아미노산의 C-말단 카르복실기 또한, C₁ 내지 C₁₂ 지방족 알킬알코올의 에스테르 및 2-오메가-메톡시-폴리(에틸렌옥시)_n-에탄올(MPEG)기(이때, n은 0 내지 10이다)의 에스테르로 구성된 그룹으로부터 선택되는 에스테르의 형태일 수 있다. 본 발명의 한 측면에 따르면, PEG 에스테르, MPEG 에스테르, PEG 아미드, MPEG 아미드 및 이들의 유사물질과 같은 폴리에틸렌글리콜 구성성분은, 바람직하게는 500 내지 40,000달톤의 분자량을 갖고, 보다 바람직하게는 1,000 내지 25,000달톤의 분자량을 갖으며, 가장 바람직하게는 1,000 내지 10,000달톤의 분자량을 갖는다.
- <81> 일반식 펩티드-COOH로 나타내어지는 펩티드의 C-말단 카르복실기는 또한, 카르복시산 할로겐화물, 카르복시산 무수물, N-히드록시숙신이미드에스테르, 펜타플루오로페닐(OPfp) 에스테르, 3-히드록시-2,3-디히드로-4-옥소-벤조-트리아존에스테르 등으로 전환됨으로써 아미드화될 수 있어, 암모니아 또는 일차 또는 이차 아민과 쉽게 반응하고, 바람직하게는, 암모니아 또는 일차 아민과 쉽게 반응하며, 바람직하게는, 펩티드에서의 다른 반응기는 펩티드 합성분야, 특히 벤질에스테르, t-부틸에스테르, 페닐에스테르 등의 고상펩티드 합성분야에 잘 알려진 합성화학으로 적합한 보호기에 의해 보호되는 동안에 쉽게 반응한다. 결과 펩티드 아민은 펩티드-C(O)-NR³R⁴(아미드는 펩티드의 C-말단에 존재)로 나타낼 수 있다(이때, R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 수소; 메틸, 에틸, 부틸, 이소부틸, 싸이클로프로필메틸 헥실, 도데실, 선택적으로 테트라데실과 같은 C₁₄ 내지 C₂₄로부터 유래된 그룹 및 이들의 유사물질과 같은 C₁ 내지 C₁₂ 알킬로 구성된 그룹으로부터 선택된다).
- <82> C-말단 아미노산의 C-말단 카르복시산은 또한, 2-히드록시우틸아민, 4-히드록시부틸아민 및 12-히드록시도데실아민 등의 수산기가 치환된 C₂ 내지 C₂₄ 지방족 알킬아민(수산기는 아민의 질소원자보다는 탄소원자에 부착된다)의 아미드로 전환될 수 있다.
- <83> C-말단 카르복시산은 또한, 상술한 바와 같이, 수산기가 아세틸화되어 C₂ 내지 C₁₂ 지방족 카르복시산을 가지는 에스테르를 형성할 수 있는, 수산기가 치환된 C₂ 내지 C₁₂ 지방족 알킬아민의 아미드로 전환될 수 있다. 바람직하게는, 펩티드-C(O)R⁵R⁶로 나타내어지는 펩티드의 C-말단의 펩티드 아미드에서, R⁵는 수소이고, R⁶는 수소, C₁ 내지 C₁₂ 알킬 및 수산기가 치환된 C₂ 내지 C₁₂ 알킬로 구성된 그룹으로부터 선택된다.
- <84> 또한, C-말단 아미노산의 C-말단 카르복시산은 직쇄형 2-(C₁ 내지 C₁₂ 지방족 알킬)옥시에틸아민의 아미드로 전환될 수 있다. 예를 들어, 이러한 아미드는, 직쇄형 C₁ 내지 C₁₂ 지방족 알코올의, 2-클로로에탄올을 함유하는 디글림(diglyme) 중의 칼륨수소화물(potassium hydride)와의 반응에 의해 직쇄형 C₁ 내지 C₁₂ 알킬 에탄올을 생성하고, 이를 다시 알데히드로의 산화에 의해 아민으로 전환된 다음, 환원성 아민화에 의해(예를 들어, 암모니아를 사용하여) 아민으로 전환하거나, 또는 알킬할로겐화물(예를 들어, 티오닐클로라이드)로 전환한 다음, 암모니아 등의 아민 처리에 의해 제조될 수 있을 것이다.

- <85> C-말단 아미노산의 C-말단 카르복시산은 직쇄형 PEG-아민(예를 들면, 오메가-히드록시-PEG-알파-아민; 오메가-메톡시-PEG-알파-아민, 즉 MPEG-아민 등의 오메가-(C₁ 내지 C₁₂)-PEG-알파-아민)의 아미드로 전환될 수 있다. 본 발명의 한가지 측면에 의하면, 폴리에틸렌 글리콜 또는 PEG 성분은, 바람직하게는, 500 내지 40,000달톤, 보다 바람직하게는 1,000 내지 25,000달톤, 가장 바람직하게는 1,000 내지 10,000달톤의 분자량을 가진다.
- <86> C-말단 아미노산의 C-말단 카르복시산은 또한, 대응하는 오메가-메톡시-폴리(에틸렌옥시)_n-에탄올로부터, 예를 들어, 상술한 바와 같이, 알콜의 아민으로의 전환에 의해 제조되는, 오메가-메톡시-폴리(에틸렌옥시)_n-에틸아민(이때, n은 0 내지 10이다)의 아미드로 전환될 수 있다.
- <87> 본 발명의 또 다른 실시태양에 따르면, C-말단 카르복실기는 펩티드-C(O)-NR⁷R⁸의 화학식으로 나타내어지는 아미드로 전환될 수 있다(이때, R⁷은 수소이고, R⁸은 직쇄형 2-(C₁ 내지 C₁₂ 지방족 알킬)옥시에틸기(이때, C₁ 내지 C₁₂ 지방족 알킬 부분은 상술한 바와 같이 메톡시에틸(즉, CH₃O-CH₂CH₂-), 2-도데실옥시에틸 등의 그룹을 포함한다)이며; 또는, R⁷은 수소이고, R⁸은 2-메톡시에틸(즉, CH₃O-CH₂CH₂-), 오메가-메톡시에톡시에틸(즉, CH₃O-CH₂CH₂O-CH₂-CH₂-) 내지 CH₃O-(CH₂CH₂O)₁₀-CH₂CH₂- 등의 오메가-메톡시-폴리(에틸렌옥시)_n-에틸기(이때, 폴리에틸렌옥시) 부분의 n은 0 내지 10이다))이다.
- <88> 또한, 펩티드의 C-말단 아미노산의 C-말단 카르복시산 그룹은 C₁ 내지 C₁₂ 지방족 알킬알콜의 에스테르 형태이고, 지방족 알킬알콜은 상기와 같다. 펩티드의 C-말단 아미노산의 C-말단 카르복시산 그룹은 또한, 2-(오메가-메톡시-폴리(에틸렌옥시)_n)-에탄올 그룹(이때, n은 0 내지 10이다)의 에스테르 형태일 수 있고, 이는 소듐 2-메톡시에탄올레이트로서의 2-메톡시에탄올과 n의 크기에 의존하는 화학양론적 량(stoichiometric amount)에 해당하는 에틸렌옥사이드와의 반응에 의해 제조될 수 있다.
- <89> 또한, 펩티드의 아미노산에서의 측쇄는 화학적으로 변이될 수 있다. 예를 들어, 페닐알라닌 또는 타이로신에서의 페닐기는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 치환기로 치환될 수 있다:
- <90> 메틸(바람직하게는), 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 싸이클로프로필, 2-메틸싸이클로프로필, 싸이클로헥실, 옥틸, 데실, 도데실, 헥사데실, 옥타데실, 에이코사닐, 도코사닐, 테트라코사닐, 9-헥사데세닐, 9-옥타데세닐, 11-옥타데세닐, 9,12-옥타데세닐, 9,12,15-옥타데세닐, 6,9,12-옥타데세닐, 9-에이코세닐, 5,8,11,14-에이코스테트라에닐, 5,8,11,17-에이코스테트라에닐, 13-도코세닐 및 4,7,10,13,16,17-도코사헥사에닐 등의 C₁ 내지 C₂₄ 지방족 알킬기;
- <91> 예를 들어, 히드록시메틸, 히드록경우틸, 히드록시도데실 등의 수산기로 불포화 부위에서 적어도 하나의 탄소원자와 떨어져 치환된 C₁ 내지 C₁₂ 지방족 알킬기; 아세트산, 부탄산, 헥산산, 옥탄산, 데칸산, 도데칸산, 테트라데칸산, 헥사데칸산, 9-헥사데센산, 옥타데칸산, 9-옥타데센산, 11-옥타데센산, 9,12-옥타데카디엔산, 9,12,15-옥타데카트리엔산, 6,9,12-옥타데카트리엔산, 에이코산산, 9-에이코센산, 5,8,11,14-에이코사테트라엔산, 5,8,11,14,17-에이코사펜타엔산, 도코산산, 13-도코센산, 4,7,10,13,16,19-도코사헥사엔산, 테트라코산산 등의 산의 C₂ 내지 C₂₅ 지방족 카르복실기, 숙신산 등의 디카르복시산, 또는 젓산으로 에스테르화된 수산기로 치환된 C₁ 내지 C₁₂ 지방족 카르복실기(이때, 에스테르 치환기의 탄소원자 수는 3 내지 25개이다); 플루오로-, 클로로-, 브로모- 및 이오도- 등의 할로겐; 니트로-; NH₂, 메틸아미노, 디에틸아미노 등의 아미노; 트리플루오로메틸-, 카르복실(-COOH); 메톡시, 에톡시, 프로필옥시, 이소프로필옥시, 부틸옥시, 이소부틸옥시, 싸이클로프로필옥시, 2-메톡시싸이클로프로필옥시, 싸이클로헥실옥시, 옥틸옥시, 데실옥시, 도데실옥시, 헥사데실옥시, 옥타데실옥시, 에이코사닐옥시, 도코사닐옥시, 테트라코사닐옥시, 9-헥사데세닐옥시, 9-옥타데세닐옥시, 11-옥타데세닐옥시, 9,12-옥타데카디에닐옥시, 9,12,15-옥타데카티리에닐옥시, 6,9,12-옥타데카트리에닐옥시, 9-에이코세닐옥시, 5,8,11,14-에이코사테트라에닐옥시, 5,8,11,14,17-에이코사펜타에닐옥시, 13-도코세닐옥시 및 4,7,10,13,16,19-도코사헥사에닐옥시 등의 C₁ 내지 C₂₄ 알콕시기; 및, 2-히드록경우틸옥시 등의 C₂ 내지 C₁₂ 히드록시알킬옥시 및 상술한 카르복시산과 또는 트리플루오로아세트산과의 에스테르.
- <92> 세린 히드록시기는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 치환기로 에스테르화될 수 있다:
- <93> 상술한 바와 같은 C₂ 내지 C₁₂ 지방족 카르복시산 그룹;

- <94> 트리플루오로아세트산; 및
- <95> 벤조산 그룹.
- <96> 라이신에서의 엡실론아미노기(epsilon amino group)는, 예를 들어, 상술한 C₂ 내지 C₁₂ 지방족 카르복시산 그룹 (예를 들어, 아민과 산클로라이드(acid chloride), 무수화합물(anhydride), N-히드록시숙신이미드에스테르, 펜타플루오로페닐(OPfp) 에스테르, 3-히드록시-2,3-디히드로-4-옥소-벤조-트리아존(ODhbt) 에스테르 등의 카르복시산의 화학적으로 활성화된 형태와의 반응에 의해) 또는 벤조산 그룹, 또는 아미노산 그룹과의 아미드 형성에 의해 화학적으로 변이될 수 있다. 아울러, 리신에서의 엡실론아미노기는 하나 또는 두 개의 C₁ 내지 C₄ 지방족 알킬기의 알킬화에 의해 화학적으로 변이될 수 있다.
- <97> 글루타민산에서의 카르복실기는 암모니아 등의 아민; 메틸아민을 포함하는 C₁ 내지 C₁₂ 일차 지방족 알킬아민(이것의 알킬 부분은 상술한 바와 같다)과 아미드의 형성에 의해 변이될 수 있다.
- <98> 글루타민산에서의 카르복실기는 상술한 C₁ 내지 C₁₂ 일차 지방족 히드록시알킬기와, 바람직하게는, 메탄올, 에탄올, 프로판-1-올, n-도데카놀 등과 같은 C₁ 내지 C₁₂의 일차 알콜과의 에스테르의 형성에 의해 변이될 수 있다.
- <99> 본 발명의 바람직한 실시태양에 따르면, 본 발명은
- <100> (a) 참조서열인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열;
- <101> (b) GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 서열을 가지는 아미노산 서열; 및,
- <102> (c) (a)에 정의된 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 최소한 하나의 펩티드를 포함하는 약학조성물을 조직 및/또는 체액에 투여하는 단계를 포함하고,
- <103> 상기 펩티드의 C-말단 아미노산은 선택적, 독립적, 화학적으로 변형되고, 상기 펩티드의 N-말단 아미노산은 C₂ 내지 C₁₃ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₅ 내지 C₂₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, 및 트리플루오로 아세트산으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 카르복시산으로 아실화되어 독립적, 화학적으로 변형되거나, 화학적으로 변형되지 않고(단, 상기 펩티드는 그의 아미노산 서열이 C₂ 내지 C₁₃ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₅ 내지 C₂₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, 및 트리플루오로 아세트산으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 카르복시산으로 아실화되어 참조서열의 GAQF 서열로 시작하는 경우, 아실화에 의하여 변형되거나, 화학적으로 변형되지 않는다), 약학적으로 하용되는 담체와 선택적으로 결합하는 것을 특징으로 하는,
- <104> 최소한 하나의 개체의 조직 및/또는 체액의 염증세포에서 과립으로부터 최소한 하나의 염증 매개물질의 분비를 억제하는 방법을 포함한다.
- <105> 본 발명의 방법은 바람직하게는 알파 N-말단 아미노산이 아세틸화될 수 있는 펩티드를 이용한다. 상기 펩티드는 바람직하게는 아세틸-펩티드 106(서열번호 106)에 의하여 실시되는 최소한 10개의 연속하는 아미노산으로 구성될 수 있다.
- <106> 또한, 본 발명의 방법은 최소한 4개의 연속하는 아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 최소한 6개의 연속하는 아미노산 잔기로 구성되는 펩티드를 이용한다. 상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 미리스토일화될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의해 아미드화될 수 있는 펩티드를 이용할 수 있다.
- <107> 본 발명의 다른 실시태양에 따른 방법은 (a) 참조서열인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열의 아미노산을 포함하는 펩티드를 이용하는데, 이때 (a)의 아미노산 서열의 N-말단 아미노산이 참조서열인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 2 내지 21번 위치 아미노산으로부터 선택된다. 아울러, 이들 펩티드들은 알파 N-말단 아미노산이 미리스토일화될 수 있고, 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의해 아미드화될 수 있다.
- <108> 본 발명의 투여방법은 상기 개체의 염증세포로부터 염증 매개물질을 분비하는 기작을 저해 또는 억제함으로써 염증 매개물질의 분비를 감소시킨다.

- <109> 본 발명의 투여방법은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하여 약학 조성물을 형성하는 펩티드를 혼입하거나 혼입하는 단계를 포함한다.
- <110> 본 발명의 투여방법은 최소한 하나의 펩티드가 부재할 경우 야기되는 염증 세포의 최소한 하나의 동형의 염증세포로부터 유리되는 염증 매개물질의 분비와 비교하여, 최소한 하나의 염증 세포로부터 상기 염증 매개물질의 분비를 억제하기에 치료적으로 유효한 염증 매개물질 분비-억제량으로 분비한다. 상기 개체에서 염증세포는 백혈구, 과립구, 중성구, 호중구, 호산구, 단핵구, 대식구 또는 이들의 조합일 수 있다.
- <111> 최소한 하나의 염증세포의 최소한 하나의 과립구로부터 분비되는 염증 매개물질은 미엘로퍼옥시다제(MPO), 호산구 퍼옥시다제(EPO), 주요 기초 단백질(MBP), 리소자임, 그랜자임, 히스타민, 프로테오글리칸, 단백질 분해효소, 화학주성 인자, 사이토카인, 아라키돈산 대사물, 디펜신, 세균 투과성 증대 단백질(BPI), 엘라스타제, 카텡신 G, 카텡신 B, 카텡신 D, 베타-D-글루쿠로니다제, 알파-만노시다제, 포스포리파제 A2, 콘드로이틴-4-설페이트, 단백질 가수분해효소 3, 락토페린, 콜라겐 분해효소, 보체 활성화제, 보체 수용체, N-포르밀메티오닐-루실-페닐알라닌(FmIP) 수용체, 라미닌 수용체, 사이토크롬 b₅₅₈, 단핵세포 화학주성 인자, 히스타미나제, 비타민 B12 결합 단백질, 젤라티나제, 플라스미노젠 활성화제, 베타-D-글루쿠로니다제 및 이들의 조합으로 구성되는 그룹으로부터 선택된다.
- <112> 상기 펩티드의 효과적인 면역 매개물질 분비-억제량은 상기 펩티드가 부재할 경우 최소한 하나의 염증세포로부터 분비되는 양과 비교하여, 최소한 하나의 염증세포로부터 분비되는 염증 매개물질의 양을 약 5-50% 내지 약 99%사이로 감소시키는 펩티드의 탈과립-억제량(degranulation-inhibiting amount)을 포함한다.
- <113> 본 발명의 방법은 호흡기 질환에 걸렸거나 고통받는 개체의 치료에 유용하다. 이들 호흡기 질환은 천식, 만성 기관지염, COPD 및 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)일 수 있다. 본 발명의 방법에 의하여 치료가능한 개체는 바람직하게는 사람, 개과 동물, 말과 동물 및 고양이과와 같은 포유동물이다.
- <114> 본 발명의 펩티드의 투여방법은 국소 투여, 비경구 투여, 직장 투여, 폐 투여, 비강 투여, 및 경구투여에 의한 다. 보다 바람직하게는, 폐 투여는 건조 분말 흡입기, 계량 용량 흡입기 및 분무기에 의하여 생성되는 에어로졸을 포함한다. 아울러, 개체에의 투여는 항생제, 항바이러스 화합물, 항기생충성 화합물, 항-염증 화합물 및 면역 억제제로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 2차 분자(second molecule)를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- <115> 본 발명의 방법은 개체는 보웬 질환(bowel disease), 피부 질환, 자가면역 질환, 고통 증후군(pain syndrome) 및 이들의 조합으로 그룹으로부터 선택되는 질환에 걸렸거나 고통받는 개체의 치료에 유용하다. 보다 바람직하게는, 상기 보웬 질환은 궤양성 대장염, 크론병(Crohn's disease) 및 과민성 대장 증후군(irritable bowel syndrome)으로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 피부질환은 빨간코(rosacea), 습진(eczema), 건선(psoriasis) 및 심각한 좌창(severe acne)을 포함한다. 아울러, 관절염으로 고통받고 있는 개체도 본 발명에 의해 치료될 수 있다.
- <116> 본 발명의 한가지 실시태양에 따르면, 참조서열인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 (a)의 아미노산 서열의 아미노산과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 펩티드의 투여를 포함한다. 이들 펩티드는 바람직하게는, 서열번호 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 250, 251 및 252로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 이들 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 아세틸화되거나, 알파 N-말단 아미노산이 미리스토일화되고, 선택적으로 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의해 아미드화된다.
- <117> 또한, 본 발명의 방법은 개체에 있어서 최소한 하나의 점액(mucus) 분비세포 또는 조직으로부터 MARCKS-연관 과분비를 감소시킴으로써, 개체의 뮤신 과분비는 상기 펩티드의 투여가 없을 경우 야기되는 것과 비교하여 감소시키는, 본 명세서에 기재된 본 발명의 펩티드의 투여에 의하여 개체에서 뮤신 과분비를 감소시키는데 유용하다.
- <118> 본 발명은
- <119> (a) 참조서열인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열;
- <120> (b) GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 서열을 가지는 아미노산 서열; 및,
- <121> (c) (a)에 정의된 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을

가지고,

- <122> 상기 펩티드의 C-말단 아미노산은 선택적, 독립적, 화학적으로 변형되며, 상기 펩티드의 N-말단 아미노산은 C₂ 내지 C₁₃ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₅ 내지 C₂₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, 및 트리플루오로 아세트산으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 카르복시산으로 아실화되어 독립적, 화학적으로 변형되거나, 화학적으로 변형되지 않고(단, 상기 펩티드는 그의 아미노산 서열이 C₂ 내지 C₁₃ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, C₁₅ 내지 C₂₄ 포화 또는 비포화 지방족 카르복시산, 및 트리플루오로 아세트산으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 카르복시산으로 아실화되어 참조서열의 GAQF 서열로 시작하는 경우, 아실화에 의하여 변형되거나, 화학적으로 변형되지 않는다),
- <123> 최소한 하나의 펩티드가 부재할 경우 야기되는 염증 세포의 최소한 하나의 동형의 염증세포로부터 유리되는 염증 매개물질의 분비와 비교하여, 최소한 하나의 염증 세포로부터 상기 염증 매개물질의 분비를 억제하기에 치료적으로 유효한 염증 매개물질 분비-억제량으로 약학적으로 허용되는 담체와 선택적으로 결합하는 펩티드를 제공한다.
- <124> 상기 분리된 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 아세틸화될 수 있다. 상기 펩티드는 최소한 10개의 연속되는 아미노산 잔기로 구성되고, 바람직하게는 아세틸-펩티드 106(서열번호 106)으로 구성된다.
- <125> 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 상기 펩티드는 상기 펩티드는 최소한 4개의 연속되는 아미노산 잔기로 구성되거나, 최소한 6개의 연속되는 아미노산 잔기로 구성된다.
- <126> 상기 펩티드는 알파 N-말단 아미노산이 미리스토일화되고/미리스토일화되거나, 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의해 아미드화될 수 있다.
- <127> 본 발명의 분리된 펩티드는 상술한 (a)의 아미노산 서열, (a) 참조서열인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열을 추가로 포함하는데, 이때 아미노산(a)의 N-말단 아미노산은 참조서열인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 2 내지 21번 위치의 아미노산으로부터 선택된다. 상기 펩티드는 추가로 알파 N-말단 아미노산이 미리스토일화 또는 아세틸화되거나, 선택적으로 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의하여 아미드화된다.
- <128> 본 발명의 또 다른 실시태양에 따르면, 상기 분리된 펩티드는 참조서열인 GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1)의 4 내지 23개의 연속된 아미노산을 가지는 아미노산 서열과 실제적으로 동일하다. 이들 펩티드들은 바람직하게는, 서열번호 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 250, 251 및 252로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 이들 펩티드들은 알파 N-말단 아미노산이 아세틸화되거나 미리스토일화되고, 선택적으로 알파 C-말단 아미노산이 암모니아에 의해 아미드화된다. (a)의 아미노산에 실질적으로 동일한 (c)의 아미노산은 서열번호 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 250, 251 및 252로 구성되는 그룹으로부터 선택된다.
- <129> 또한, 본 발명은 상기 단락들 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 분리된 펩티드 및 부형제를 포함하는 조성물을 포함한다. 아울러, 본 발명은 상기 단락들 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 분리된 펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 포함한다. 상기 약학 조성물은 바람직하게는 무균상태(sterile), 살균가능(sterilizable) 또는 살균(sterilized)된 것이다. 이들 펩티드들은 투여에 유용한 시약을 포함하는 키트에 함유된다.

발명의 상세한 설명

- <142> 본 발명은 이제 본 발명의 바람직한 실시예들이 도시된 첨부된 도면을 참조하여, 이하에서 좀 더 충분히 기술될 것이다. 그러나, 본 발명은 다른 형태들로도 구체화할 수 있고, 본 명세서에 개시된 실시예들에 제한되어 해석되지 않아야 한다. 또한, 이들 실시예들은 본 개시가 완전하고 당업계의 숙련된 자들에게 발명의 범주를 충분히 전달하기 위하여 제공되는 것이다.
- <143> 달리 정의하지 않는다면, 본 명세서에 사용된 모든 기술적, 과학적 용어들은 본 발명이 속한 당업계의 통상의 숙련된 자들이 공통적으로 이해하는 것과 같은 의미를 가진다. 본 명세서에 언급된 모든 출판물, 특허출원, 특허 및 다른 참고문헌들은 전문이 참조문헌으로 포함된다. 본 발명의 여러가지 측면을 기술하기 위하여 사용된 본 명세서에서의 관사 "a" 또는 "an"는 하나 또는 그 이상을 표현하는 것으로 이해해야 한다.

- <144> 본 발명은 최소한 하나의 세포내 소낭체(vesicle)에 함유된 최소한 하나의 염증 매개물질을 포함하는 염증세포와, MANS 펩티드 및 그의 활성 단편으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 최소한 하나의 펩티드를, 최소한 하나의 펩티드가 부재할 경우 야기되는 동형의 염증세포로부터의 염증 매개물질 분비와 비교하여 염증세포로부터 염증 매개물질의 분비를 감소시키는 효과적인 양으로 접촉하는 단계를 포함하는, 최소한 하나의 염증세포로부터 최소한 하나의 염증 매개물질을 세포외로 분비하는 것을 억제하는 방법에 관한 것이다.
- <145> 또한, 본 발명은 세포내 소낭체에 함유된 최소한 하나의 염증 매개물질을 포함하는 최소한 하나의 염증세포를 포함하는 개체의 조직(tissue) 및/또는 체액(fluid)에, 최소한 하나의 펩티드가 부재할 경우 야기되는 동형의 최소한 하나의 염증세포로부터의 염증 매개물질의 분비와 비교하여 최소한 하나의 염증세포로부터 염증 매개물질의 분비를 감소시키도록 치료적으로 유효한 양의 MANS 펩티드 및 그의 활성 단편으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 최소한 하나의 펩티드를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 조직 및/또는 체액의 최소한 하나의 염증세포로부터 최소한 하나의 염증 매개물질의 분비를 억제하는 방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 상기에서 염증 매개물질의 분비를 감소시키는 것은, 염증세포로부터 염증 매개물질을 분비하는 기작을 막거나 저해하는 것을 포함한다.
- <146> 본 발명은 세포내 소낭체에 함유된 최소한 하나의 염증 매개물질을 포함하는 개체의 조직 또는 체액에 함유될 수 있는 공지의 염증세포에, 상술하고 본 명세서에 기술된 펩티드를 접촉(contact) 및/또는 투여(administration)하는 것에 관한 것이다. 상기 염증세포는 바람직하게는, 백혈구(leukocyte)이고, 좀 더 바람직하게는, 과립구(granulocyte)인데, 이는 호중구(neutrophil), 호염기구(basophil), 호산구(eosinophil) 및 이들의 조합으로 좀 더 세분화할 수 있다. 본 발명에서 접촉되는 염증세포는 또한 단핵세포(monocyte)/대식세포(macrophage)일 수 있다.
- <147> 본 발명은 염증세포의 운반체 내에 함유된 염증 매개물질의 분비를 감소시키는 것에 관한 것이며, 이러한 염증 매개물질은 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO), 호산구 퍼옥시다제(eosinophil peroxidase, EPO), 주요 기초 단백질(major basic protein, MBP), 리소자임, 그랜자임(granzyme), 히스타민, 프로테오글리칸, 단백질 분해효소, 화학주성 인자(chemotactic factor), 사이토카인, 아라키돈산 대사물, 디펜신(defensin), 세균 투과성 증대 단백질(bacterial permeability-increasing protein, BPI), 엘라스타제(elastase), 카텡신(cathepsin) G, 카텡신 B, 카텡신 D, 베타-D-글루쿠로니다제, 알파-만노시다제, 포스포리파제 A2, 콘드로이틴-4-설페이트, 단백질 가수분해효소(proteinase) 3, 락토페린, 콜라겐 분해효소, 보체 활성화제(complement activator), 보체 수용체(complement receptor), N-포르밀메티오닐-루실-페닐알라닌(N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine, FmIP) 수용체, 라미닌(laminine) 수용체, 사이토크롬 b558, 단핵세포 화학주성 인자(monocyte-chemotactic factor), 히스타미나제, 비타민 B12 결합 단백질, 젤라티나제(gelatinase), 플라스미노젠 활성화제, 및 이들의 조합으로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 바람직하게는, 이러한 염증 매개물질들은 MPO, 호염기성 퍼옥시다제, MBP, 리소자임, 그랜자임 및 이들의 조합으로 구성되는 그룹으로부터 선택된다.
- <148> 본 발명은 염증세포와 펩티드의 유효량을 접촉시키는데, 이때, 유효량은 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편이 부재할 경우 최소한 하나의 염증세포로부터 분비되는 양과 비교하여 최소한 하나의 염증세포로부터 분비되는 염증 매개물질의 양을 약 1% 내지 99% 감소시키는 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편의 탈과립-억제량으로 정의된다. 상기 양은 염증 매개물질의 분비를 감소시킴으로써 유효량으로도 알려져 있다. 좀 더 바람직하게는, 접촉된 펩티드의 이러한 유효량은 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편이 부재할 경우 최소한 하나의 염증세포로부터 분비되는 양과 비교하여 최소한 하나의 염증세포로부터 분비되는 염증 매개물질의 양을 약 5-50% 내지 약 99%사이로 감소시키는 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편의 탈과립-억제량을 포함한다.
- <149> 본 발명의 한가지 실시태양은 호흡기 질환, 바람직하게는, 천식, 만성 기관지염 또는 COPD로 고통받는 개체의 조직 또는 체액에 치료적으로 유효한 양의 MANS 펩티드 및 그의 활성 단편을 포함하는 최소한 하나의 펩티드를 투여하는 것에 관한 것이다. 다른 실시태양에 따르면, 개체는 보웬병(bowel disease), 피부병, 자가면역 질환, 통증(pain) 증후군 및 이들의 조합으로부터 고통받을 수도 있다. 보웬병은 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 크론씨병(Crohn's disease) 또는 과민성 장 증후군(irritable bowel syndrome)일 수 있다. 개체는 빨간코(rosacea), 습진(eczema), 건선(psoriasis) 또는 심각한 좌창(severe acne)와 같은 피부 질환으로 고통받을 수 있다. 개체는 또한 류마티스 관절염, 건선 관절염(psoriatic arthritis), 전신 홍반성 낭창(systemic lupus erythematos)와 같은 관절염으로 고통받을 수 있다. 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)으로 고통받는 개체 또한 본 발명의 방법과 펩티드로 치료할 수 있다. 본 발명의 방법은 바람직하게는, 포유동물과 같은 개체의 치료에, 바람직하게는, 사람, 개과 동물, 말과 동물 및 고양이과 동물의 치료에 유용하다.

- <150> 본 발명의 개체의 치료방법은, 국소 투여, 비경구 투여, 직장 투여, 폐 투여, 비강 투여 또는 경구투여를 포함하며, MANS 펩티드 또는 본 명세서에 기술된 활성 단편을 포함하는 하나 또는 그 이상의 펩티드를 투여하는 것이다. 좀 더 구체적으로, 폐 투여(pulmonary administration)는 에어로졸, 건조 분말 흡입기, 계량 용량 흡입기 및 분무기로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 이외에도, 개시된 방법은 또한 항생제, 항바이러스 화합물, 항기생충성 화합물, 항-염증 화합물 및 면역조절제로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 2차 분자의 개체에 대한 투여를 포함한다.
- <151> 본 발명의 한 측면에 따르면, 본 발명은 약학적 조성물을 투여하는 방법에 관한 것이다. 약학적 조성물은 공지된 화합물과 약학적으로 허용되는 담체의 치료적으로 유효한 양을 포함한다. 본 명세서에 사용된 "치료적으로 유효한(therapeutically effective)" 양은 개체가 나타내는 증상을 완화시키기에 충분한 화합물의 양이다. 치료적으로 유효한 양은 환자의 나이 및 신체 상태, 치료받는 환자 상태의 심각성, 치료 기간, 모든 동시 치료의 성향, 사용한 약학적으로 허용되는 담체 및 당업계의 숙련된 자들의 지식과 전문적 기술 내의 요인들에 따라 달라질 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 바람직하게는, 정제나 캡슐제와 같은 고형제 형태이다. 경구투여를 위한 액상 제제 또한 사용할 수 있고, 예를 들면, 유효성분, 당, 및 에탄올, 물, 글리세롤, 및 프로필렌 글리세롤의 혼합물을 포함하는, 시럽이나 현탁액의 형태로 제제화될 수 있다. 원하는 경우, 이러한 액상 제제는 착색제, 향미제 및 사카린 중 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 이외에도, 카복시메틸셀룰로오스 같은 농후제(thickening agent)는 또한 당업계의 공지된 선택인 다른 사용 가능한 운반체로서 사용할 수도 있다.
- <152> 상술하였듯이, 본 발명은 세포 분비와정, 특히 염증세포로부터 염증 매개물질의 분비를 조절하는 방법에 관한 것이다. 본 명세서에 사용되었듯이, "조절(regulating)"이라는 용어는 저해하는 것(blocking), 억제하는 것(inhibiting), 낮추는 것(decreasing), 감소시키는 것(reducing), 증가시키는 것(increasing), 또는 증강시키는 것(enhancing) 또는 자극하는 것(stimulating)을 의미한다. 다수의 세포내 분비와정은 세포내의 막-결합 소낭체(vesicle) 또는 과립(granule)으로부터 내용물을 분비하는 것을 포함한다. 막-결합 소낭체 또는 과립은 세포내 입자(intracellular particle)로 정의되는데, 이는 우선 소낭성(vesicular)(또는 세포내 소낭체)이며 분비될 수 있는 저장물질을 포함한다. 염증세포내에 포함된 물질 같은 이러한 운반체의 내용물의 일부는 다수의 포유동물 조직에서 다양한 병리에 관련되어 있다고 알려졌다. 이러한 분비효과의 일부는 염증의 진전 중에 기존의 건강한 조직에 대한 손상을 포함하는 것처럼 보인다. 본 발명은 합성 펩티드를 가진 세포내 분비경로에서 중요한 특별한 분자를 표적으로 함으로써, 염증세포에서 발견되는 것을 포함하는 모든 막-결합 소낭체로부터 분비를 막는 방법을 제공한다. 이러한 접근방법은 사람과 동물의 다양한 과다분비 및 염증 상태의 치료에 대하여 치료적으로 중요할 수 있다.
- <153> 좀 더 구체적으로, 본 발명은 세포내 세포질의 하나 또는 그 이상의 입자나 운반체 내에 함유된 염증 매개물질을 포함하는 염증세포를 표적으로 한다. 세포는 본 명세서에서 모두 상세히 기술한 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 펩티드와 접촉한다. 바람직하게는, 염증세포와 펩티드의 접촉은 염증세포가 특정 조직 또는 조직 내 체액에 있는 질병으로부터 고통받는 개체로의 투여를 통한 것이다. 세포내 펩티드의 투여 또는 접촉 시에, 펩티드는 본래의 MARCKS 단백질이 염증 매개물질을 포함하는 세포내 입자 또는 운반체의 막에 결합하는 것과 경쟁하거나 경쟁적으로 억제시킨다. 염증세포의 운반체에 대한 MARCKS 단백질의 결합을 억제한 결과로서, 이러한 세포에서 이런 운반체는 세포외로 그들의 염증 매개물질 내용물의 세포외 분비시에 정상적으로 야기되는 것처럼 세포의 원형질막(plasma membrane)으로 이동하지 않는다. 그러므로, 본 발명의 방법은 세포의 원형질막으로 운반체의 이동을 저해하고, 그 결과, 염증세포로부터 염증 매개물질의 분비를 감소시킨다. 염증세포로부터의 분비 속도(release rate)와 매개물질의 분비량(release amount)이 투여한 펩티드의 농도에 의존하고 염증세포와 관련되기 때문에, 시간의 경과에 따라 세포로부터 분비된 염증 매개물질의 양은 감소된다.
- <154> 본 발명의 한 가지 장점은 본 발명이 특이적인 항-염증 치료요법과, 점액분비를 직접적으로 저해하는 단계를 포함하는 치료방법을 조합할 수 있다는 것이다. 면역체계의 일반적 억제에 영향을 주는 현존하는 항-염증 치료요법보다 우월한 본 발명의 장점은, 펩티드가 염증세포로부터 분비되는 단지 세포내 성분(intracellular component)의 분비만을 억제한다는 것이다. 그러므로, 면역체계의 여러 측면은 염증 매개물질의 억제에도 불구하고 여전히 기능을 다한다.
- <155> 본 발명의 화합물들은 세포로부터 염증 매개물질의 분비를 억제하는 것과 같이 조절한다. 이러한 염증 매개물질 분비의 억제는 염증을 포함하는 질환 또는 병리적 상태를 포함하는 다양한 질환의 예방 및 치료에 매력적인 방법이다. 그러므로, 본 발명의 화합물들은 이러한 상태의 치료에 유용할 것이다. 이러한 예로서는, 이에 한정되는 것은 아니나, 기도 질환 및, 골 관절염(osteoarthritis), 다중 경화증(multiple sclerosis), 길랑-바

레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 크론병, 궤양성 대장염, 건선, 이식대숙주병(Graft versus Host Disease) 및 전신 홍반성 낭창(lupus erythematosus)을 포함하는, 만성 염증 질환을 포함한다. 본 발명의 화합물은 또한 다양한 감염체에 대한 반응과 같은 전-염증(pre-inflammatory) 매개물질 및 효소들의 증가한 수준의 활성 및, 류마티스 관절염, 독성 쇼크 증후군(toxic shock syndrome), 당뇨 및 염증 보웰(bowel) 질환과 같은 여러가지 자가면역 질환과 연관된 다른 질환을 치료하는데도 사용될 수 있다.

<156> 본 발명의 펩티드 및 방법들의 용도는 점액분비를 억제하는 본래의 능력과, 펩티드의 항-염증 활성을 조합한 치료방법을 조합하는 염증에 대항하는 치료를 포함한다. 염증과 점액분비를 억제하는 펩티드의 작용으로 치료할 수 있는 질병들의 예로서는, 이에 한정되는 것은 아니나, 염증성 보웰 질환, 소화기 질환(예를 들어, 염증성 췌장염, 메네티에르(Menetier's) 질환) 및 염증 기도성 질환들을 포함한다.

<157> 다른 전-염증 매개물질은 염증이 생기거나 상처가 생긴 부위로의 호중구 유입과 연관된 다양한 질환과 관련되어 있었다. 차단성(blocking) 항체는 급성 염증에서 호중구에 관련된 조직의 손상에 대한 효과적인 치료법으로 알려져 있다(참조: Harada *et al.*, 1996, *Molecular Medicine Today* 2, 482). 염증 매개물질을 분비할 수 있는 호중구 외의 세포들은 호염기구, 호산구, 단핵세포 및 림프구와 같은 다른 백혈구들을 포함하고, 치료방법들은 이러한 세포로부터의 분비에 대항한 것일 수도 있다. 호중구, 호산구 및 호염기구는 과립구, 즉 세포질 내에 과립을 가지는 백혈구의 형태이다. 백혈구는 세포질 과립(cytoplasmic granule)에 일괄해서 저장하는 다수의 염증 매개물질을 합성한다. 이러한 매개물질 중에는 예를 들어, 호중구 내의 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO, 참조: Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89: 3503-3521), 호산구 퍼옥시다제(eosinophil peroxidase, EPO)와 호산구 내의 주요 기초 단백질(major basic protein, MBP, 참조: Gleich G J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 651-663), 단핵세포/대식세포의 리소자임(참조: Hoff T, Spencker T, Emmendoerffer A., Goppelt-Struebe M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 173-182; Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J Immunol* 2003; 170: 5276-5280), 자연 살상세포와 세포독성 림프구의 그랜자임(참조: Bochan MR, Goebel WS, Brahma Z. Stably transfected antisense granzyme B and perforin constructs inhibit human granule-mediated lytic ability. *Cell Immunol* 1995; 164: 234-239; Gong J H., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line(NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994; 8: 652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 369-383; and Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J Immunol Methods* 1987; 104: 183-1907-10) 등이 있다. 이러한 매개물질들은 상처 부위로부터 분비될 수 있고, 폐나 다른 장소에서 염증 또는 회복에 기여할 수 있으며, 그 결과 이러한 세포들이 상처나 질환이 생긴 조직부위로 침윤하게 된다. 백혈구들은 세포의 분비작용을 통해 이러한 과립들을 분비한다(참조: Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003; 83: 581-632; Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 923-932).

<158> 혈류 내에서 보통 순환하지 않는 비만세포와 호염기구는 히스타민과 같은 미리 형성된 염증(과민성) 매개물질, 헤파린과 황산 콘드로이틴과 같은 프로테오글리칸, 트립타제(tryptase), 카이마제(chymase), 카복시펩티다제 및 카텡신 G-양(cathepsin G-like) 단백질 가수분해효소 등의 단백질 가수분해효소들, 화학주성인자(chemotactic factor), 사이토카인 및 맥관구조(vasculature), 평활근, 연결조직, 점액선(mucous gland), 염증세포들에 작용하는 아라키돈산의 대사물들을 세포 활성화시에 분비할 수 있는 분비성 세포질 과립(secretory cytoplasmic granule)을 포함한다.

<159> 다핵백혈구(PMN, polymorphonuclear leukocyte)로 알려진 호중구는 전체 순환하는 백혈구의 50 내지 60%를 차지한다. 호중구는 감염 또는 상처 부위에 신체의 물리적 장애를 뚫는 암세포뿐만 아니라, 미생물, 곰팡이, 원생동물, 바이러스, 바이러스에 감염된 세포 등의 감염성 물질에 대하여 작용한다. 호중구는 여섯 가지 형태학적 단계(myeloblast, promyeloblast, myeloblast, myelocyte, metamyelocyte, non-segmented(band) neutrophil, and segmented(functionally active) neutrophil)를 거쳐 성숙된다.

<160> 호중구에서, 염증 매개물질들은 분비성 운반체(secretory vesicle) 뿐만 아니라, 1차(azurophil), 2차(specific), 3차(gelatinase) 과립으로 저장된다. 다수의 염증 매개물질 중에서, 1차 과립들은 MPO, 리소자임,

디펜신(defensin), BPI, 엘라스타제, 카텡신 G(cathepsin G), 카텡신 B(cathepsin B), 카텡신 D(cathepsin D), 베타-D-글루쿠로니다제, 알파-만노시다제, 포스포리파제 A₂, 콘드로이틴-4-황산 및 단백질 가수분해효소 3(예를 들어, Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janney PA, Narin AC, Aderem A. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. Nature 1992; 356: 618-622를 참조하라)를 포함한다; 2차 과립들은 리소자임, 락토펜린, 콜라겐 분해효소, 보체 활성화제, 포스포리파제 A₂, 보체 수용체, CR3, CR4, N-포밀메티오닐-류실-페닐알라닌(FmIP) 수용체, 라미닌 수용체, 사이토크롬 b558, 단핵세포-화학주성 인자(chemotactic factor), 히스타미나제, 비타민 B12 결합 단백질 등을 포함한다; 소량 저장 과립구들은 젤라티나제, 플라스미노젠 활성화제, 카텡신 B(cathepsin B), 카텡신 D(cathepsin D), 베타-D-글루쿠로니다제, 알파-만노시다제 및 사이토크롬 b558을 포함한다.

- <161> 호중구 과립들은 항균 또는 세포독성 물질, 중성 단백질 가수분해효소, 산성 가수분해효소 및 일군의 세포질 막 수용체들을 포함한다. 호아주르(azurophil) 과립 성분 중에서, MPO는 과산화수소를 차아염소산으로 전환하는 과정에서 매우 중요한 효소이다. 과산화수소와 할로겐화물-조인자(halide-cofactor)와 함께, MPO는 백혈구의 효과적인 항균 및 세포독성 기작(즉, myeloperoxidase system)을 구성한다.
- <162> 30 내지 50%의 호아주르성 과립 단백질(azurophilic granule protein)을 구성하는 디펜신(defensin)은, 광범위한 세균, 곰팡이(fungi) 및 일부 바이러스에 세포독성을 나타내는 작고(분자량 400이하) 강력한 항생 펩티드이다.
- <163> BPI 단백질은 퍼포린(perforin)의 한 종류이다. BPI 단백질은 그람-음성 세균에 대해 매우 독성이 있지만, 그람-양성 세균 또는 곰팡이에 대해서는 독성이 약하며, 내독소, 독성있는 그람-음성세균 세포외피의 지질다당(LPS, lipopolysaccharide) 성분을 중화시킬 수 있다.
- <164> 락토펜린(lactoferrin)은 분비 금속(free iron)을 격리시킴으로써, 사멸단계 (killing process)에서도 생존하고, 리소자임에 대한 세균 투과성을 증가시키는 섭취된 미생물의 성장을 억제시킨다.
- <165> 엘라스타제 및 카텡신 G와 같은 세린 단백질 분해효소들은 세균 세포외피의 단백질을 가수분해시킨다. 과립구 엘라스타제의 기질은 콜라겐 교차-연결체와 혈관, 인대 및 연골의 엘라스틴 성분과 같은 프로테오글리칸을 포함한다. 카텡신 D는 연골 프로테오글리칸을 절단하는 반면, 과립구 콜라겐 분해효소는 절단 형태 I(cleaving type I)에 활성이 있고, 뼈, 연골 및 힘줄로부터의 콜라겐 형태 III (type III collagen)에 대해서는 활성이 더 적다. 콜라겐 분해산물은 호중구, 단핵세포 및 섬유아세포에 대한 화학주성을 갖는다.
- <166> 라이소좀 단백질 분해효소의 조직과괴능에 대한 조절은 알파 2-마이크로글로불린과 알파 1-항-단백질 분해효소 같은 단백질 분해효소 억제제를 통해 매개된다. 이러한 항-단백질 분해효소는 혈청과 활액(synovial fluid) 내에 존재한다. 단백질 분해효소-항 단백질 분해효소의 불균형은 폐기종(emphysema)의 발병기전에 중요한 역할을 한다.
- <167> 호아주르(azurophil) 과립은 세포내 환경(식세포성 라이소좀 액포 내)에서 두드러진 작용을 하고, 그 곳에서 미생물체를 죽여서 분해시키는 과정에 관여한다. 호중구 특이적 과립은 세포 외부로 그 내용물을 분비시키는 것에 민감하고, 염증의 시작에 중요한 역할을 한다. 특정 과립은 사이토크롬 b(NADPH 산화제 성분, 슈퍼옥사이드(superoxide) 생산에 필요한 효소), 보체 단편 iC3b(CR3, CR4), 라미닌 및 포밀메티오닐-펩티드 화학적 유인제에 대한 수용체를 포함하는 세포내 다양한 원형질막 성분의 세포내 저장소를 대표한다. 이외에도, 히스타민, 비타민 결합 단백질 및, 플라스민 형성과 C₅로부터 C5a를 절단하는 플라스미노젠 활성화제의 분해에 관련된 히스타미나제가 있다.
- <168> 염증에서 호중구 과립의 중요성은 과립의 선천성 비정상을 지닌 여러 환자에 대한 연구로부터 명백해졌다. 체디아-히가시(Chediak-Higashi) 증후군 환자들은 염증반응의 진행속도가 심각할 정도로 비정상적이고, 비정상적으로 큰 라이소좀 과립을 가지고 있다. 특정 과립 결핍성의 선천성 증후군은 염증반응의 감소와 피부와 피하 조직에 대한 심각한 미생물 감염이 특징인 매우 드문 질환이다.
- <169> 이러한 과립의 세포외 분비를 조절하는 기작은 단지 일부만이 이해되었음에도 불구하고, 그 과정에서 세포내 Ca²⁺ 전이체(transient)(참조: Richter et al. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 9472-9476; Blackwood et al., Biochem J 1990; 266: 195-200), G 단백질, 타이로신 및 단백질 키나제들(PK, 특히 PKC)(참조: Smolen et al., Biochim Biophys Acta 1990; 1052:133-142; Niessen et al., Biochim. Biophys. Acta 1994; 1223: 267-273; Naucner et al., Pettersen et al., Chest 2002; 121: 142-150), Rac2(참조: Abdel-Latif et al., Blood

2004; 104: 832-839; Lacy et al., J Immunol 2003; 170:2670-2679) 및 다양한 SNARE, SNAP 및 VAMP(참조: Sollner et al., Nature 1993; 362: 318-324; Lacy, Pharmacol Ther 2005; 107: 358-376)를 포함하여, 여러 가지 주요 분자들이 동정되었다.

<170> SNARE(soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor, 수용성 N-에틸말레이미드 부착 단백질 수용체) 단백질은, SNARE 모터프(참조: Li et al., Cell. Mol. Life Sci. 60: 942-960(2003))라 불리는 알파-나선 꼬인 코일(coiled coil) 영역의 특성을 지닌 막-결합 단백질에 속한다. 이 단백질들은 소낭체 또는 표적 막에 대한 그들의 위치에 따라, v-SNARE, t-SNARE로 분류된다; 다른 분류방식은 SNARE 모터프 중심부에 있는 보존된 아르기닌(R) 또는 글루타민(Q) 잔기에 따라, R-SNARE 및 Q-SNARE로 정의된다. SNARE는 분비 및 세포내(endocytic) 운반경로의 다른 막 구획에 위치하여, 세포내 막 융합 과정의 특이성에 관여한다. SNARE 모터프는 네 가지로 분류된다: 신택신(syntaxin) 1a 유사체(t-SNARE), VAMP-2(v-SNARE), SNAP-25의 N-, C- 말단 SNARE 모터프. 각 그룹의 한 가지는 서로 반응하여 SNARE 복합체를 형성할 수 있다. SNARE 모터프는 신경전달 물질의 분비에 필요한 신택신 1a(참조:Lerman et al., Biochemistry 39: 8470-8479(2000)) 및 엔도솜 수송 운반체에서 발견되는 신택신 6(참조:Misura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 9184-9189(2002)) 등의 신택신 구성원의 N-말단영역에서 발견된다.

<171> SNAP-25(스냅토솜-결합 단백질(synaptosome-associated protein) 25kDa) 단백질은 SNARE 복합체의 구성성분으로서, 막 융합의 특이성을 결정하여 시냅스 운반체와 원형질막을 동시에 운반하는 강한 복합체(tight complex, SNARE 또는 중심 복합체(corecomplex))를 형성함으로써 융합을 직접적으로 촉진시킨다. SNARE는 SNARE 모터프로 알려진 60-잔기 서열로 특징지어지는 큰 단백질 그룹을 형성하고, SNARE 모터프는 꼬인 코일을 형성하려는 강한 성향이 있으며, 주로 카복시-말단 막 통과 부분보다 앞서 존재한다. 시냅스 중심 복합체(synaptic core complex)는 분리되면 구조가 해체되지만, 조립시에는 평행한 네개의 나선 다발(parallel four-helix bundle)을 형성하는 4개의 SNARE 모터프(2개는 SNAP-25로부터, 시냅토프레빈(synaptobrevin)과 신택신 1(syntaxin 1)으로부터 각각 하나)에 의해 구성된다. 중심 복합체의 결정구조는 내부의 소수성 잔기 층뿐만 아니라, 나선 다발(helix bundle)이 심하게 비틀려 있고, 표면에 여러 개의 염 다리(salt bridge)를 갖고 있음이 밝혀졌다. 복합체 중심의 극 층은 세 개의 글루타민(2개는 SNAP-25로부터, 하나는 신택신 1으로부터)과 하나의 아르기닌(시냅토프레빈으로부터)으로 형성된다(참조: Rizo et al., Nat Rev Neurosci 3: 641-653(2002)). SNAP-25 그룹의 구성원은 막 부착시 팔미토일화될 수 있는 시스테인 잔기의 묶음(cluster)을 가지고 있다(참조: Risinger et al., J. Biol. Chem. 268: 24408-24414(1993)).

<172> 호중구의 주된 역할은 감염 물질들을 식세포작용을 통해 파괴하는 것이다. 감염 물질들은 또한 적응(특이적) 면역반응이 시작하기 전에 일부 미생물의 성장을 제한한다. 호중구가 숙주의 방어작용에 필수적임에도 불구하고, 호중구들은 또한 많은 만성 염증상태의 병리화 및 허혈성 재관류(ischemia-reperfusion) 손상에 관련되어 있다. 호중구 기원의 가수분해 효소들 및 산화적으로 불활성화된(oxidatively inactivated) 단백질 분해효소 억제제들은 염증부위에서 분리된 유액에서 발견된다. 정상상태에서, 호중구들은 숙주 조직에 피해를 주지 않고, 감염된 부위로 이동할 수 있다. 그러나, 숙주 조직에 대한 원치 않는 피해가 때때로 발생할 수 있다. 이러한 피해는 여러 독립적인 기작들을 통해 나타날 수 있다. 이러한 기작들은, 이동(migration), 일부 미생물을 사멸시키는 동안 독물의 세포의 분비, 조직 재편(tissue remodeling)의 첫단계로서의 감염 또는 손상된 숙주 세포 및 잔해물의 제거, 또는 급성 면역반응 제거의 실패시 야기되는 미성숙 활성화(premature activation)를 포함한다. 허혈성 재관류 손상은 영향받은 조직으로의 호중구 유입 및 이후의 활성화와 연관되어 있다. 이는, 손상된 숙주세포로부터 분비된 물질 또는 크산틴 산화제를 통한 슈퍼옥사이드(superoxide) 생산의 결과로서 촉발된다.

<173> 정상 상태에서, 혈액은 정상(normal), 면역개시된(primed), 활성화된(activated) 및 소비된(spent) 호중구의 혼합물을 함유할 수도 있다. 염증부위에서는, 주로 활성화된 호중구와 소비된 호중구가 존재한다. 활성화된 호중구는 활성화 산소 중간생성물(reactive oxygen intermediate, ROI)의 생산을 증가시킨다. 증가된 호흡 급증(enhanced respiratory burst) 현상이 있는 호중구의 하위 개체군(subpopulation)은 급성 세균감염 환자와 성인 호흡기 장애 증후군(adult respiratory distress syndrome, ARDA) 환자의 혈액에서 발견된다. 이는 호중구 패러독스(neutrophil paradox)의 한 예이다. 호중구는 활성화된 호중구로부터 분비된 산화제와 가수분해성 효소들에 의한 폐로의 이러한 세포들의 다량 유입과 관련된 조직의 손상때문에, 이러한 상태의 병리에 연관되어 있다. ARDS가 악화되면서 발생한 호중구의 살균 활성화의 장애는 숙주에 대한 보호반응이며, 이는 염증산물에 의해 국소적으로 유도된다.

<174> 열상해(thermal injury)의 급성기(acute phase)는 또한 호중구 활성화와 연관되고, 이는 다양한 호중구 기능의

일반적인 손상으로 이어진다. 활액(synovial fluid)에서 면역 복합체에 의한 호중구의 활성화는 류마티스 관절염의 병리에 기여한다. 호중구에 의하여 생성되는 일부 ROI는 DNA를 손상시키고 단백질 분해효소는 종양세포의 이동을 촉진하기 때문에, 호중구의 만성적인 활성화는 또한 종양의 발생을 야기할 수 있다. 심각한 화상으로 고통받는 환자에서, 미생물 감염의 시작(onset)과 비율(proportion)의 감소 및 항체에 대해 양성인 호중구의 절대수(absolute number)와 보체 수용체와의 사이에 상관관계가 성립한다. 호중구로부터의 산화제는 저-밀도 지질단백질(low-density lipoprotein, LDL)을 산화시키는데, LDL은 산화된 후에 특이적인 스캐빈저(scavenger) 수용체를 통한 대식세포의 원형질막에 더 효과적으로 결합한다. 대식세포가 이러한 산화된 LDL을 흡수하면, 아테롬성 동맥경화증(atherosclerosis)을 일으킬 수도 있다. 그외에도, 면역개시된 호중구는 면역개시가 고농도의 순환하는 TNF-알파(cachectin)에 관련된, 본태고혈압(essential hypertension), 호킨병(Hodgkin's disease), 염증성 보혈 질환, 건선, 우육종증(sarcoidosis) 및 패혈증(septicemia) 환자에서 발견된다.

<175> 숙주조직에 대한 가수분해성 손상(hydrolytic damage) 및 그로 인한 만성 염증상태는 항산화제(antioxidant)와 항-단백질 분해효소(antiprotease) 장벽이 거의 사라지면 나타날 수 있다. 항-단백질 분해효소 결핍은 기종(emphysema)의 병리에 관련되어 있다고 추정되고 있다. 많은 항-단백질 분해효소들은 세린 단백질 분해효소 억제제(serine protease inhibitor, SERPIN) 그룹의 일원이다. 순환계에는 항-단백질 분해효소가 풍부하지만, 호중구가 그들의 표적에 결합하기 때문에 이러한 거대 단백질들은 염증부위에서 선택적으로 배제될 것이다. 산화적 스트레스(oxidative stress)는 세포외 항-단백질 분해효소의 농도를 분비한 단백질 분해효소를 억제하는데 필요한 정도까지 감소시켜서 조직손상을 일으킬 수 있다. 염소화 산화제(chlorinated oxidant) 및 과산화수소(hydrogen peroxide)는 엘라스타제의 내생 억제제인 알파 1-단백질 분해효소 억제제와 알파 2-마이크로글로불린 같은 항 단백질 분해효소를 불활화시킬 수 있지만, 동시에 콜라겐 분해효소와 젤라티나제 같은 잠복성 금속단백질 분해효소를 활성화시킬 수도 있다.

<176> 호중구의 세포질 성분은 또한 특이적인 항-호중구 세포질 항체(ANCA) 생성의 원인이 될 수 있는데, 이는 전신적인 맥관염(systemic vasculitis) 및 사구체 신염(glomerulonephritis)의 발생에 밀접하게 관련된다. ANCA는 주로 호아주르(azurophil) 또는 호중구의 1차 과립내에서 주로 발견되는 효소를 표적으로 하는 항체들이다. ANCA는 세 가지 형태가 있는데, 정상적으로 에탄올을 이용하여 고정시킨 호중구에 간접적으로 면역형광을 관찰하였을 때, 발생하는 형태에 따라 구분할 수 있다. 확산하는 미세 과립성 세포질 형광(fine granular cytoplasmic fluorescence, cANCA)은 전형적으로 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis), 일부 미시적인 다발동맥염(polyarteritis)와 처르크 스트라우스(Churg Strauss) 증후군 및 일부 초승달 모양의(crescentic) 단편화된(segmented) 괴사 중인 사구체 신염(necrotizing glomerulonephritis)에서 발견된다. 표적항원은 통상적으로 단백질 가수분해효소 3이다. pANCA는 많은 종류의 다발동맥염과 사구체 신염에서 확인된다. 이러한 항체들은 종종 MPO를 표적으로 하지만, 다른 표적들은 엘라스타제, 카텡신(cathepsin) G, 락토펙틴, 리소자임 및 베타-D-글루쿠로니다제를 포함한다. "비전형(atypical)" ANCA로 명명되는 세 번째 그룹은 호중구 핵 형광 및 일부 비정상적인 세포질 형태를 포함하고 일부 표적항원은 pANCA와 공유하고 있지만, 다른 항원들은 아직 밝혀지지 않았다. pANCA는 또한 크론병 환자의 세 번째 그룹에서 확인된다. 류마티스 관절염과 SLE에서 ANCA의 보고된 발병률은 매우 다양하지만, 그 주된 형태는 pANCA와 부정형 ANCA이다.

<177> 호산구(eosinophil)는 점막하 조직(submucosal tissue)에 주로 존재하며, 알러지 질환 같은 특이적인 면역반응이 발생한 부위로 이동하는 최종적으로 분화된, 최종-단계의(end-stage) 백혈구이다. 호산구 세포질은 전자가 밀집한(electron-dense) 결정 핵(crystalline nucleus)과 부분적으로 투과성이 있는 매트릭스를 포함한다. 이러한 주요한 결정상 과립(crystalloid granule)이외에도, 더 작고(작은 과립) 결정 핵이 없는 또 다른 과립형태가 있다. 호산구의 커다란 특이적 과립은 최소한 네 개의 특별한 양이온성 단백질을 포함하는데, 이는 숙주세포와 세균 표적에 대한 다양한 생물학적 영향을 준다: 주요 기초 단백(major basic protein, MBP), 호산구 양이온성 단백질(eosinophil cationic protein, ECP), 호산구에서 유래한 신경독소(eosinophil derived neurotoxin, EDN), 호산구 퍼옥시다제(eosinophil peroxidase, EPO). 호염기구(basophil)는 탐지가능한 양의 EDN, ECP 및 EPO와 같이 있는 호산구처럼 다수의 주요 기초 단백을 약 1/4 정도 포함한다. 소량의 EDN과 ECP는 또한 호중구에서도 볼 수 있다(참조: Gleich G J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 651-663). MBP는 효소활성이 없는 것으로 보이지만, 이상(derangement)을 일으키는 지질막과의 상호작용에 의해 독성을 발휘하는 고도의 양이온성(highly cationic) 폴리펩티드이다. MBP와 EPO 둘다 M2 무스카린(muscarnic) 수용체에 대한 작용약(agonist) 결합의 선택적인 알로스테릭 억제제(allosteric inhibitor)로서 작용할 수 있다. 이러한 단백질들은 M2 수용체 기능손상을 일으켜서 미주신경이 매개하는 천식에서의 기관지 수축을 증가시킬 수 있다. EDN은 특이적으로 신경세포의 미엘린 수초(myelin sheath)에 손상을 줄 수 있다. 히스타미나제와 다양한 가수분해성 라이소좀 효소는 또한 특이적으로 큰 호산구

과립에 있다. 작은 과립의 호산구의 효소들은 아릴 설패타제(aryl sulphatase), 산성 탈인산화효소, 92kDa 급속단백분해효소(metalloproteinase), 젤라티나제이다. 호산구는 호산구에 대하여 잠재적인 자가분비성 성장인자-활성(potential autocrine growth-factor activity)을 갖춘 사이토카인과 급성 및 만성 염증반응에서 잠재적인 역할을 하는 사이토카인을 포함하는 사이토카인을 생산한다. 세 가지 사이토카인들은 호산구에 대한 성장인자 활성을 갖추고 있다: 과립구-대식세포 군집 촉진인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), IL-3 및 IL-5. 급성 및 만성 염증반응에서 활성을 가지는 사람의 호산구가 생산하는 다른 사이토카인들은 IL-1 알파, IL-6, IL-8, TNF-알파 및 두 형질전환 성장인자인 TGF-알파와 TGF-베타를 포함한다.

<178> 호산구는 MBP, 호산구 양이온 단백질, EPO 및 호산구에서 유래한 신경독소를 포함하는 결정형 과립을 갖는다(참조: Gleich, J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 651-663). 사람의 전골수구성(promyelocytic) 세포주인 HL-60 클론 15는 EPO의 분비를 측정할 때 사용할 수 있다. 이 세포주는 두 달 간 높은 PH에서 성장한 HL-60 클론(참조: Fischkoff, Leuk Res 1988; 12: 679-686)으로부터 작제되고, 호산구-특이적인 과립 단백질들을 포함하는 말초 혈액 호산구(peripheral blood eosinophil)의 많은 특징을 발현하기 위하여, 부틸산을 처리해서 세포의 분화시킨다(참조: Rosenberg et al., J Exp Med 1989; 170: 163-176; Tiffany et al., J Leukoc Biol 1995; 58: 49-54; Badewa et al., Exp Biol Med 2002; 227: 645-651).

<179> 호산구는 특히 두개의 지질 염증 매개물질(lipid inflammatory mediator)인 류코트리엔 C⁴(LTC⁴)와 혈소판 활성화 인자(platelet activating factor, PAF)를 통하여 과민성(hypersensitivity) 반응에 관여한다. 두 매개물질들은 기도의 평활근을 수축하여 점액분비를 촉진하고, 기관 내 투과성(vascular permeability)을 변형시켜, 호산구와 호중구를 투과시킨다. 이러한 호산구-유래의 매개물질들의 직접적인 활성 외에, MBP는 호염기구(basophil)와 비만세포(mast cell)로부터 히스타민 분비를 자극하고, MBP는 세포로부터 EPO의 분비를 자극한다. 호산구는 비만 세포와 호염기구로부터 매개물질의 분비를 유도할 뿐만 아니라, 특정 지질 매개물질의 국소적인 기원(local source)으로서의 역할을 수행한다. 호산구 과립의 내용물은 식균된(opsonized) 입자와 화학주성 인자에 의한 포식작용(phagocytosis)과 같은 호중구 과립에 대한 유사한 자극에 이어 분비된다. 호산구 라이소좀 효소들은 주로 파고라이소좀(phygolysosome) 내에 포식된(engulfed) 물질에 대해 작용하는 반면, 호산구 과립 내용물들은 주로 기생충이나 염증 매개물질 같은 세포의 표적에 대하여 주로 작용한다.

<180> 단핵세포(monocyte)와 대식세포(macrophage)의 발달은 골수에서 이하의 각 단계를 거쳐 진행한다: 줄기세포(stem cell); 수입 줄기세포(committed stem cell); 단핵모세포(monoblast); 전단핵구(promonocyte); 골수의 단핵세포(monocyte in bone marrow); 말초혈액의 단핵세포(monocyte in peripheral blood); 조직의 대식세포(macrophage in tissue). 골수에서 단핵세포의 분화는 빠르게 진행한다(1.5일에서 3일). 분화과정 중에, 과립이 단핵세포 세포질에서 형성되어, 호중구 내에서 최소한 2가지 형태로 분리될 수 있다. 그러나, 상기 과립은 그들의 호중구 대응체(neutrophil counterpart, 호아주르(azurophil) 및 특이적 과립들)보다 숫자도 훨씬 작고 크기도 작다. 과립의 효소 내용물은 비슷하다.

<181> 단핵세포/대식세포의 과립-결합(granule-bound) 효소들은 리소자임, 산성 인산가수분해효소 및 베타-글루쿠로니다제를 포함한다. 생체조건에서의 연구모델로서, U937 세포로부터 리소자임 분비가 이용되었다. 이 세포주는 조직림프종(histiocytic lymphoma)으로부터 유래되고, PMA와 같은 다양한 작용약에 의해 활성화될 수 있는 단핵세포성 세포주로서 이용되어 왔다(참조: Hoff et al., J Leukoc Biol 1992; 52: 173-182; Balboa et al., J Immunol 2003; 170: 5276-5280; Sundstrom et al., Int J Cancer 1976; 176: 565-577).

<182> 자연 살상세포(natural killer cell)와 세포독성 림프구(cytotoxic lymphocyte)는 퍼포린(perforin), 세공-형성 단백질(pore-forming protein) 및 그랜자임(granzyme), 림프구-특이적인(lymphocyte-specific) 세린 단백질 분해효소를 포함하는 강력한 세포독성 과립들을 가지고 있다. 예를 들어, NK-92 세포주는 빠르게 진행되는 비호킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma) 환자로부터 수립된 IL-2 의존성 사람 세포주이다(참조: Gong JH., Maki G., Klingemann HG. Characterization of a human cell line(NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. Leukemia 1994; 8: 652-658). NK-92 세포는 다양한 악성 세포(malignant cell)를 표적으로 하는 퍼포린-그랜자임 세포파괴 경로에 관여하는 분자들을 고농도로 발현한다(참조: Gong et al., vide infra, and Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92, J Hematother Stem Cell Res 2001; 10: 369-383).

<183> 그랜자임은 세포독성 T 세포와 자연살상세포내의 세포질 과립(cytoplasmic granule)에 의해 분비되는 세린 단백질 분해효소이다. 그랜자임은 바이러스 감염된 세포에서 세포사멸(apoptosis)을 유도하여, 그 세포들을 파괴할

수 있다.

- <184> 과립구(또는 백혈구)로부터 염증 매개물질의 세포외 분비와 과립구(또는 백혈구)로부터 하나 이상의 염증 매개물질의 세포외 분비는 때때로 본 명세서에 탈과립(degranulation)으로 언급된다. 본 발명의 바람직한 실시태양에 따르면, 염증 매개물질의 분비는 과립구 또는 백혈구 내부에 존재하는 과립으로부터의 매개물질의 분비를 포함한다. 염증 매개물질의 분비는 바람직하게는, 이러한 과립구로부터 염증 매개물질의 분비이다.
- <185> TNF α와 같은 전-염증제(pre-inflammatory agent, 염증 자극제(inflammatory stimulant))에 의한 면역개시(priming)에 의해, 호중구와 대식세포는 MARCKS 단백질의 합성을 크게 증가시킨다: TNF α 또는 지질다당(lipopolysaccharide, LPS)에 반응하여, 호중구에 의해 만들어지는 새로운 단백질의 90% 정도는 MARCKS이다(참조: Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A. Tumor necrosis factor alpha modifies agonist-dependent responses in human neutrophils by inducing the synthesis and myristoylation of a specific protein kinase C substrate. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 5603-5607). MARCKS는 호중구와 대식세포 같은 과립을 포함하는 세포가 작동약, 특히 PKC를 활성화시키는 것들에 의해 자극받았을 경우, 그 후의 염증 매개물질의 분비에서 중요한 역할을 한다(참조: Burgoyne et al., Physiol Rev 2003; 83: 581-632; Logan et al. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 923-932; Smolen et al., Biochim Biophys Acta 1990; 1052: 133-142; Niessen et al., Biochim. Biophys. Acta 1994; 1223: 267-273; Naucier et al., J Leukoc Biol 2002; 71: 701-710).
- <186> 본 발명의 한 가지 측면에 따르면, 개체의 질병, 상태, 외상, 이물질(foreign body) 또는 이들의 조합이 개체의 염증부위에 진입에 의해 야기되는 염증부위로의 본 명세서에 기술된 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편의 탈과립 억제량의 투여는, 염증부위에 침윤하는, 바람직하게는, 과립구인 백혈구로부터 분비되는 염증 매개물질의 양을 감소시킬 수 있다. MANS 펩티드 및/또는 최소한 하나의 그의 활성 단편의 투여는 염증부위로 침윤하는 과립구와 같은 백혈구로부터 분비되는 염증 매개물질의 양을 감소시킨다. MANS 펩티드, 또는 그의 활성 단편의 탈과립-억제량은 그 위치로 침윤하는 염증세포내에 포함된 과립으로부터 염증 매개물질의 세포외 분비를 감소시키거나 억제하기에 충분하다. 탈과립-억제효율(degranulation-inhibiting efficacy)은 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편이 부재할 경우 동시에 대략적으로 분비하거나 생산하는 염증 매개물질의 수준, 양 또는 농도에 비례하여 상술한 세포(백혈구, 과립구 또는 다른 염증세포들)부터 염증 매개물질 분비의 억제 백분율(감소 퍼센트)의 비교에 의해 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편의 투여 후에 시간 대에서 측정하였다. 그외에도, 숙련된 임상가는 충분하고 치료적으로 유효한 양의 MANS 펩티드 및/또는 그의 활성 단편을 투여하였는지를 확인하는 질병의 지표로 알려진 염증의 증상 및 매개변수를 측정함으로써, 조직 내 염증이 감소하였는지를 결정할 수 있다. 충분한 탈과립-억제량(sufficient degranulation-inhibiting amount)은 염증부위에서 과립구로부터 분비된 염증 매개물질 감소의 백분율을 나타내는 양인데, 상기 백분율은 동일한 조건에서 시험한 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편이 부재할 경우, 상기 과립구로부터 분비된 염증 매개물질의 양의 약 1% 내지 약 99%이며, 바람직하게는, 약 5% 내지 약 99%이며, 좀 더 바람직하게는, 약 10% 내지 약 99%이며, 가장 바람직하게는, 약 25% 내지 약 99%이며, 가장 더 바람직하게는, 약 50% 내지 약 99%이다.
- <187> 본 발명의 한 측면에 따르면, 염증자극 부위로 염증을 자극하는 양의 염증 자극제를 투여함으로써 야기되는, 동물의 염증자극 부위로 MANS 펩티드의 탈과립 억제량을 투여하면, 상기 염증자극 부위에서 염증 자극제에 의해 자극을 받는 과립구로부터 분비되는 염증 매개물질의 양을, 상기 염증 자극제의 동일한 염증 자극량이 있고 MANS 펩티드가 부재할 경우 과립구로부터 분비되는 염증 매개물질의 약 1% 내지 약 99%, 바람직하게는, 약 5% 내지 약 99%, 보다 바람직하게는, 약 10% 내지 약 99%, 가장 바람직하게는, 약 25% 내지 약 99%, 아주 가장 바람직하게는, 약 50% 내지 약 99% 만큼 감소시킬 수 있다.
- <188> 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 염증을 자극하는 양의 염증 자극제를 투여함으로써 야기되는, 동물 내의 염증자극 부위로 MANS 펩티드의 탈과립 억제량을 투여하면, 염증 자극 부위에서 상기 염증 자극제에 의해 자극을 받는 과립구로부터 분비되는 염증 매개물질의 양을, 상기 염증 자극제와 동일한 염증 자극량이 있고 MANS 펩티드가 부재한 경우 상기 과립구로부터 분비되는 염증 매개물질의 양의 100% 만큼 감소시킬 수 있다.
- <189> 본 명세서에서 실험실 조건의 실시예에서 사용한 염증 자극제의 예는 포볼 12-미리스테이트 13 아세테이트(phorbol 12-myristate 13 acetate, PMA)이다. 단핵세포 화학유인제 단백질(monocyte chemoattractant protein, MCP-1)은 호염기구의 탈과립화로 히스타민을 분비하게 하는 C5a만큼 효과적이고, IL-8보다 훨씬 강력하다. 히스타민 분비는 케모카인(chemokine, 즉, 화학유인제 사이토카인)인 RANTES와 RIP-1으로 자극한 후에 발생할 수 있다.

- <190> 본 발명의 바람직한 실시태양에 따르면, 염증자극 부위에 있는 MARCKS 펩티드의 기준농도(basal concentration)에 비례하여, 동물의 염증자극 부위로 투여한 MANS 펩티드의 탈과립 억제량은, 상기 염증자극 부위에서 MARCKS 펩티드 농도의 약 1배 내지 1000000배, 바람직하게는, 약 1배 내지 10000배, 보다 바람직하게는, 약 1배 내지 약 1000배, 가장 바람직하게는, 약 1배 내지 약 100배, 아주 가장 바람직하게는, 약 1배 내지 약 10배이다.
- <191> 본 발명의 바람직한 실시태양에 따르면, 과립구들은 동물, 바람직하게는, 사람의 기도에 존재하고, MANS 펩티드는, 예를 들어, 에어로졸이나, 건조분말 흡입기를 사용하여 투여되는 건조 분말형태의 MANS 펩타드를 포함하는 약학적 조성물 형태로 투여되는, MANS 펩티드 및 수용성 용액을 포함하는 약학적 조성물 등의 MANS 펩티드를 포함하는 약학적 조성물의 흡입(inhalation)에 의해 투여된다. 소적(droplet), 스프레이 및 분무기와 같은 흡입에 의한 용액 또는 분말의 투여에 사용하는 당업계의 공지된 다른 방법들과 기구들을 사용할 수 있다.
- <192> 본 발명의 일부 실시태양에 따르면, 본 발명의 펩티드가 기본적인 분비 기능을 포함하여 생리적으로 중요한 분비와정을 억제하는 것이 가능할 것이다. 본 발명의 발명자들은 발명의 특정 이론에 얽매이는 것들을 원하지 않지만, 이러한 기본적인 분비(basal secretion)를 조절하는 기작은 이러한 조절에 의해 자극하는 분비와는 다른 것으로 추정된다. 또한, 기본적인 분비기작은 자극받은 분비보다 더 적은 MARCKS 단백질을 필요로 할 수 있다. 기본 분비는 MARCKS가 매개하는 분비를 억제하는 모든 치료법이 모든 MARCKS 기능을 제거할 수 없기 때문에 유지할 수 있다.
- <193> 본 명세서에 사용되었듯이, "MARCKS 뉴클레오티드 서열(MARCKS nucleotide sequence)"라는 용어는 예를 들어, DNA, RNA 서열, 유전자의 DNA 서열, 모든 전사된 RNA 서열, pre-mRNA, mRNA 또는 RNA 전사체 및 단백질에 결합한 DNA 또는 RNA를 포함하는 MARCKS 단백질을 암호화하는 유전자로부터 유래한 모든 뉴클레오티드 서열을 일컫는다.
- <194> MARCKS 펩티드의 정밀한 전달은 또한 중요한 분비와정을 억제하는 잠재적인 제한을 극복할 수 있다. 이러한 작용제는 흡입제를 사용하여 용이하게 호흡계로 전달해야 한다. 이러한 작용제들은 염증 보웬(bowel) 질환을 치료할 때, 사용할 수 있기 때문에, 시험자는 관장 또는 좌약을 통해 직장/대장/소장 벽으로의 억제제 전달을 계획할 수 있다. 염증을 일으킨 관절로의 관절내 주입 또는 피부를 통한 전달은 국소적인 염증세포로부터 분비를 억제하여 관절염 환자 또는 자가면역질환 환자에게 안정감을 줄 수 있다. 신경말단 주위 부위로의 주입은 심각한 고통이나 조절받지 않는 근육경련의 전달을 억제함으로써, 일부 형태의 신경전달물질의 분비를 억제할 수 있다. 염증 피부질환의 치료를 위한 펩티드의 전달은 당업계에 공지된 다양한 국소제제(topical formulation)를 사용하여 용이하게 실행되어야 한다.
- <195> MARCKS는 원형질 내에서 액틴과 미오신과 상호작용함으로써, 과립이 세포의 수축장치에 유지될 수 있고, 따라서 연속하여 과립 이동 및 세포의 유출을 매개한다고 알려져 있다. 호중구로부터 염증매개 MPO의 분비는 PKC 및 PKG 모두의 활성화에 의하여 극대화될 수 있다. MARCKS는 염증세포의 막-결합 구획(membrane-bound compartment)으로부터의 분비(즉, 호중구로부터의 MPO분비)를 조절하는 이들 두가지 단백질의 활동을 조정하는 접합점(point of convergence)으로 작용하는 것이 가능하다.
- <196> 본 발명은 개과(canine) 또는 사람(human)의 호중구로부터 염증 매개물질 MPO의 분비가 두 PKC와 PKG의 동시 활성화에 의해 증가한다는 것을 입증하지만, 각 인산화효소 하나만의 활성화는 최대의 분비반응을 유발하는데에는 불충분하다. 비록 반응의 크기는 랫트의 배상세포 유사 세포주(goblet-like cell line)에서 다른 이들이 관찰한 것보다 다소 적었지만, PMA에 대한 증가된 분비반응만이 본 명세서에 입증된 바와 같이 NHBE 세포와 호중구에서 증명되었다. 상기 문헌 Abdullah et al을 참조하라. 그외에도, 기존에 GMP 유사체가 배양된 기니아 피그 기관 상피세포(tracheal epithelial cell)로부터 상당한 양의 뮤신 분비를 유도한다는 것이 보고되었지만(참조: 상기 문헌 Fischer et al.), 이러한 반응이 8시간의 노출에 이르기 까지 상당한 수준에 이르지 못하였다는 점에 주목해야 한다. 이러한 긴 지체기간(lag time)을 가지는 분비반응은 직접적인 효과같지 않고, 아마도 미리 형성되어 저장된 세포질 과립의 분비에 대항하는 새로운 단백질 합성이 관여할 것이다.
- <197> 상술한 바와 같이, 본 발명은 약학적 조성물에 사용될 수 있다. 본 발명의 실시태양에 의하면, 약물은 경구투여에 적합한 고형의 약학적 조성물에 함유된다. 본 발명에 따라 고형 조성물이 제조될 수 있고, 부형제와 혼합하고/혼합하거나 부형제에 희석될 수도 있다. 또한, 고형 조성물은, 예를 들어, 캡슐제, 향낭(sachet), 정제, 종이(paper) 또는 다른 보관용기 형태인 운반체 내에 넣을 수 있다. 부형제가 희석제 역할을 하면, 부형제는 전달체, 담체 또는 조성물에 대한 매질 역할을 하는 고형, 반-고체 또는 액상의 물질이 될 수 있다.

- <198> 당업계에서 숙련된 자들이라면 다양하고 적합한 부형제들을 이해할 것이고, 전문가가 본 명세서에 포함된 *National Formulary*, 19: 2404-2406(2000)의 2404 내지 2406페이지를 보면 된다. 적합한 부형제의 예로서는, 이에 한정되는 것은 아니나, 전분, 아라비아 고무, 규산염화 칼슘(calcium silicate), 미세결정 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 메타크릴럼, 셸락(shellac), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 셀룰로오스, 물, 시럽 및 메틸셀룰로오스를 포함한다. 그외에도, 약물의 제제는, 예를 들어, 운모, 마그네슘 스테아르산염 및 미네랄 오일 같은 윤활제(lubricating agent); 습윤제; 유화제 및 현탁제; 메틸 및 프로필 하이드록시 벤조산염 같은 보존제; 감미제; 또는, 향미제 등을 포함할 수 있다. 폴리올, 완충액 및 불활성 충전제 또한 사용할 수 있다. 폴리올의 예로서는, 이에 한정되는 것은 아니나, 만니톨, 솔비톨, 자일리톨, 자당, 맥아당, 포도당, 젓당, 텍스트로스 등을 포함한다. 적절한 완충액은, 이에 한정되는 것은 아니나, 인산염, 구연산염, 타르타르산염, 숙신산염 등을 포함한다. 사용할 수 있는 다른 불활성 충전제들은 당업계에 잘 알려져 있고, 다양한 투여형태의 제조에 유용한 것들을 포함한다. 원하는 경우, 고품체제들은 충전제(bulking agent) 및/또는 과립화제(granulating agent) 등의 다른 성분들을 포함할 수 있다. 본 발명의 약물은 당업계에 공지된 절차에 따라 환자에 투여한 후, 유효성분의 신속하고, 지속적이며, 지연된 분비를 제공하도록 제제화될 수 있다.
- <199> 경구투여를 위한 정제를 만들기 위하여, 본 발명의 조성물은 직접적인 압축(compression) 공정을 통해 제제화될 수 있다. 이 과정에서, 활성 약물의 성분은 마그네슘 스테아르산염, 칼슘 스테아르산염 및 폴리에틸렌 글리콜 밀랍 등의 감마제(antifriction agent) 뿐만 아니라, 젓당, 자당, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 유도체 또는 젤라틴 및 그의 혼합물 등의 고품체, 분쇄성(pulverant) 담체를 이용하여 혼합할 수 있다. 그런 다음, 혼합물은 적절한 펀치와 다이(die)가 장착된 장치를 이용하여, 정제로 타정할 수 있다. 이 장치의 작동 매개변수는 당업계의 숙련된 자들에 의해 선택된다. 선택적으로, 경구투여를 위한 정제는 습식 과립화(wet granulation) 과정을 통해 제조할 수 있다. 활성 약제 성분은 부형제 및/또는 희석제와 혼합할 수 있다. 고품물질은 원하는 입자 크기로, 분쇄하거나 체로 걸을 수 있다. 결합제(binding agent)를 약물에 첨가할 수 있다. 결합제는 적절한 용매에서 현탁시키고 균질화시킬 수 있다. 유효성분 및 보조제들은 또한 결합제 용액과 혼합할 수 있다. 결과적인 건조 혼합물은 용액과 균일하게 습윤화된다. 습윤화(moistening)는 통상적으로 입자들이 약간 응집하도록 하며, 그 결과의 덩어리는 원하는 크기의 스테인레스 강철 체를 통해 압축된다. 그런 다음, 혼합물은 적당한 입자 크기 및 농도를 얻기 위하여 필요한 결정된 시간동안 조절가능한 건조장치에서 건조된다. 건조된 혼합물의 과립들은 체로 쳐서 분말을 제거한다. 이 혼합물에, 붕괴제(disintegrating agent), 감마제(antifriction agent) 및/또는 반-접착제(anti-adhesive agent)가 가해질 수 있다. 최종적으로, 혼합물을 원하는 정제 크기를 얻기 위하여, 적당한 펀치와 다이를 구비한 장치를 이용하여 정제로 타정된다. 장치의 작동 매개변수는 숙련된 자에 의해 선택될 수 있다.
- <200> 코팅정제(coated tablet)를 얻고자 하면, 위에서 제조한 중심체(core)를 당 또는, 아라비아 고무, 젤라틴, 운모(talc), 이산화티타늄을 포함하는 셀룰로오스 중합체, 또는 휘발성 유기용매에 용해시킨 레커 및 용매 혼합물의 고농축 용액으로 코팅할 수 있다. 이러한 코팅에, 다른 활성 화합물 또는 다른 양의 활성 화합물을 가진 정제를 구분하기 위하여 다양한 염료가 가해질 수 있다. 본 발명의 특정 실시태양에 따르면, 유효성분은 장용 피복층(enteric coating layer)을 포함하는 하나 또는 그 이상의 층으로 둘러싸인 중심체에 존재한다.
- <201> 연질 젤라틴 캡슐은 캡슐이 유효성분과 식물성 유지를 포함하도록 제제화될 수 있다. 경질의 젤라틴 캡슐은, 예를 들어, 젓당, 자당, 솔비톨, 만니톨, 감자 전분, 옥수수 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 유도체 및 젤라틴과 조합하여 유효성분의 과립을 함유할 수 있다.
- <202> 경구투여를 위한 액상 제제는, 예를 들면, 유효성분, 당 및 에탄올, 물, 글리세롤 및 프로필렌 글리콜의 혼합물을 포함하는 용액과 같은 시럽, 현탁액 형태로 제제화될 수 있다. 원하는 경우, 이러한 액상 제제는 착색제, 향미제 및 사카린 중의 한가지 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 또한, 카르복시메틸셀룰로오스와 같은 농후제(thickening agent)를 사용할 수 있다.
- <203> 상기 약물이 비경구투여에 사용되는 경우, 이러한 약물은 멸균된 수성의 주사액(aqueous injection solution), 비-수성의 주사액(non-aqueous injection solution), 또는 둘다를 포함할 수 있고, 여기에 본 발명의 조성물을 포함한다. 수성 주사액이 제조될 때, 조성물은 수용성의 약학적으로 허용되는 염으로 존재할 수 있다. 비경구 제제는 항산화제, 완충용액, 정균제(bacteriostat) 및 의도하는 수용자(recipient)의 혈액이 제제와 등장성을 가지도록 하는 용질(solute)을 포함한다. 수성 및 비수성의 멸균된 현탁액은 현탁제와 농후제를 포함할 수 있다. 제제는 봉인된 앰플 및 바이알과 같은 단위 용량 또는 다용량 용기에 존재한다. 임시(extemporaneous) 주사액 및 현탁액은 멸균된 분체, 과립제 및 상술한 정제로부터 제조될 수 있다.

- <204> 조성물은 또한 국소투여(예를 들면, 피부 크림)에 적합하도록 제제화될 수도 있다. 이러한 조성물은 당업계의 숙련된 자들에게 공지된 부형제를 포함할 수 있다. 적절한 부형제로서는, 이에 한정되는 것은 아니나, 세틸 에스테르 밀랍, 세틸 알코올, 화이트 왁스, 글리세릴 모노스테아르산염, 프로필렌 글리콜, 모노스테아르산염, 메틸 스테아르산염, 벤질 알코올, 소듐 로릴 설페이트, 글리세린, 미네랄 오일, 물, 카보머(carbomer), 에틸 알코올, 아크릴산염 점착제, 폴리이소부틸렌 점착제 및 실리콘 점착제를 포함한다.
- <205> 본 발명의 바람직한 실시태양에 따른 펩티드 단편은 하기 표 2에 개시하였는 바, 최소한 4 내지 23개의 아미노산 잔기의 길이를 가지고 MANS 펩티드의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는데, 이때 펩티드의 N-말단 아미노산은 MANS 펩티드 서열(서열번호 1)의 2 내지 21번 위치로부터 선택된다. 보다 바람직한 펩티드 단편의 길이는 최소한 6개 아미노산으로부터 23개의 아미노산이다. 바람직하게는, 이들 펩티드들은 알파 N-말단 아미노산이 아실화되고, 보다 바람직하게는, 알파 N-말단 아미노산 위치가 미리스토일화된다.

표 2

<206>

펩티드 번호	서열	서열번호
펩티드 3	AQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA	서열번호 3
펩티드 5	AQFSKTAAKGEEAAERPGEAAV	서열번호 5
펩티드 8	AQFSKTAAKGEEAAERPGEAA	서열번호 8
펩티드 12	AQFSKTAAKGEEAAERPGEA	서열번호 12
펩티드 17	AQFSKTAAKGEEAAERPGE	서열번호 17
펩티드 23	AQFSKTAAKGEEAAERPGE	서열번호 23
펩티드 30	AQFSKTAAKGEEAAERP	서열번호 30
펩티드 38	AQFSKTAAKGEEAAER	서열번호 38
펩티드 47	AQFSKTAAKGEEAAE	서열번호 47
펩티드 57	AQFSKTAAKGEEAAA	서열번호 57
펩티드 68	AQFSKTAAKGEEAA	서열번호 68
펩티드 80	AQFSKTAAKGEEA	서열번호 80
펩티드 93	AQFSKTAAKGE	서열번호 93
펩티드 107	AQFSKTAAKG	서열번호 107
펩티드 122	AQFSKTAAK	서열번호 122
펩티드 138	AQFSKTAA	서열번호 138
펩티드 155	AQFSKTA	서열번호 155
펩티드 173	AQFSKT	서열번호 173
펩티드 192	AQFSK	서열번호 192
펩티드 212	AQFS	서열번호 212
펩티드 6	QFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA	서열번호 6
펩티드 9	QFSKTAAKGEEAAERPGEAAV	서열번호 9
펩티드 13	QFSKTAAKGEEAAERPGEAA	서열번호 13
펩티드 18	QFSKTAAKGEEAAERPGEA	서열번호 18
펩티드 24	QFSKTAAKGEEAAERPGE	서열번호 24
펩티드 31	QFSKTAAKGEEAAERPGE	서열번호 31
펩티드 39	QFSKTAAKGEEAAERP	서열번호 39
펩티드 48	QFSKTAAKGEEAAER	서열번호 48
펩티드 58	QFSKTAAKGEEAAE	서열번호 58
펩티드 69	QFSKTAAKGEEAAA	서열번호 69
펩티드 81	QFSKTAAKGEEAA	서열번호 81
펩티드 94	QFSKTAAKGEEA	서열번호 94
펩티드 108	QFSKTAAKGE	서열번호 108
펩티드 123	QFSKTAAKG	서열번호 123
펩티드 139	QFSKTAAK	서열번호 139
펩티드 156	QFSKTAA	서열번호 156
펩티드 174	QFSKTA	서열번호 174
펩티드 193	QFSKT	서열번호 193
펩티드 213	QFSK	서열번호 213
펩티드 10	FSKTAAKGEEAAERPGEAAVA	서열번호 10
펩티드 14	FSKTAAKGEEAAERPGEAAV	서열번호 14
펩티드 19	FSKTAAKGEEAAERPGEAA	서열번호 19
펩티드 25	FSKTAAKGEEAAERPGEA	서열번호 25
펩티드 32	FSKTAAKGEEAAERPGE	서열번호 32
펩티드 40	FSKTAAKGEEAA?ERPGE	서열번호 40
펩티드 49	FSKTAAKGEEAAERP	서열번호 49
펩티드 59	FSKTAAKGEEAAER	서열번호 59

<207>

펩티드 번호	서열	서열번호
펩티드 70	FSKTAAKGEEAAE	서열번호 70
펩티드 82	FSKTAAKGEAAA	서열번호 82
펩티드 95	FSKTAAKGEAA	서열번호 95
펩티드 109	FSKTAAKGEA	서열번호 109
펩티드 124	FSKTAAKGE	서열번호 124
펩티드 140	FSKTAAKG	서열번호 140
펩티드 157	FSKTAAK	서열번호 157
펩티드 175	FSKTAA	서열번호 175
펩티드 194	FSKTA	서열번호 194
펩티드 214	FSKT	서열번호 214
펩티드 15	SKTAAKGEAAAERPGEAAVA	서열번호 15
펩티드 20	SKTAAKGEAAAERPGEAAV	서열번호 20
펩티드 26	SKTAAKGEAAAERPGEAA	서열번호 26
펩티드 33	SKTAAKGEAAAERPGEA	서열번호 33
펩티드 41	SKTAAKGEAAAERPGE	서열번호 41
펩티드 50	SKTAAKGEAAAERPGE	서열번호 50
펩티드 60	SKTAAKGEAAAERP	서열번호 60
펩티드 71	SKTAAKGEAAAER	서열번호 71
펩티드 83	SKTAAKGEAAA	서열번호 83
펩티드 96	SKTAAKGEAAA	서열번호 96
펩티드 110	SKTAAKGEAA	서열번호 110
펩티드 125	SKTAAKGEA	서열번호 125
펩티드 141	SKTAAKGE	서열번호 141
펩티드 158	SKTAAKG	서열번호 158
펩티드 176	SKTAAK	서열번호 176
펩티드 195	SKTAA	서열번호 195
펩티드 215	SKTA	서열번호 215
펩티드 21	KTAAKGEAAAERPGEAAVA	서열번호 21
펩티드 27	KTAAKGEAAAERPGEAAV	서열번호 27
펩티드 34	KTAAKGEAAAERPGEAA	서열번호 34
펩티드 42	KTAAKGEAAAERPGEA	서열번호 42
펩티드 51	KTAAKGEAAAERPGE	서열번호 51
펩티드 61	KTAAKGEAAAERPGE	서열번호 61
펩티드 72	KTAAKGEAAAERP	서열번호 72
펩티드 84	KTAAKGEAAAER	서열번호 84
펩티드 97	KTAAKGEAAA	서열번호 97
펩티드 111	KTAAKGEAAA	서열번호 111
펩티드 126	KTAAKGEAA	서열번호 126
펩티드 142	KTAAKGEA	서열번호 142
펩티드 159	KTAAKGE	서열번호 159
펩티드 177	KTAAKG	서열번호 177
펩티드 196	KTAAK	서열번호 196
펩티드 216	KTAA	서열번호 216
펩티드 28	TAAKGEAAAERPGEAAVA	서열번호 28
펩티드 35	TAAKGEAAAERPGEAAV	서열번호 35
펩티드 43	TAAKGEAAAERPGEAA	서열번호 43
펩티드 52	TAAKGEAAAERPGEA	서열번호 52
펩티드 62	TAAKGEAAAERPGE	서열번호 62

<208>

펩티드 번호	서열	서열번호
펩티드 73	TAAKGEEAAERPG	서열번호 73
펩티드 85	TAAKGEEAAERP	서열번호 85
펩티드 98	TAAKGEEAAER	서열번호 98
펩티드 112	TAAKGEEAAE	서열번호 112
펩티드 127	TAAKGEEAAA	서열번호 127
펩티드 143	TAAKGEEAA	서열번호 143
펩티드 160	TAAKGEEA	서열번호 160
펩티드 178	TAAKGE	서열번호 178
펩티드 197	TAAKG	서열번호 197
펩티드 217	TAAK	서열번호 217
펩티드 36	AAKGEEAAERPGEAAVA	서열번호 36
펩티드 44	AAKGEEAAERPGEAAV	서열번호 44
펩티드 53	AAKGEEAAERPGEAA	서열번호 53
펩티드 63	AAKGEEAAERPGEA	서열번호 63
펩티드 74	AAKGEEAAERPGE	서열번호 74
펩티드 86	AAKGEEAAERPG	서열번호 86
펩티드 99	AAKGEEAAERP	서열번호 99
펩티드 113	AAKGEEAAER	서열번호 113
펩티드 128	AAKGEEAAE	서열번호 128
펩티드 144	AAKGEEAAA	서열번호 144
펩티드 161	AAKGEEAA	서열번호 161
펩티드 179	AAKGEEA	서열번호 179
펩티드 198	AAKGE	서열번호 198
펩티드 218	AAKG	서열번호 218
펩티드 45	AKGEEAAERPGEAAVA	서열번호 45
펩티드 54	AKGEEAAERPGEAAV	서열번호 54
펩티드 64	AKGEEAAERPGEAA	서열번호 64
펩티드 75	AKGEEAAERPGEA	서열번호 75
펩티드 87	AKGEEAAERPGE	서열번호 87
펩티드 100	AKGEEAAERPG	서열번호 100
펩티드 114	AKGEEAAERP	서열번호 114
펩티드 129	AKGEEAAER	서열번호 129
펩티드 145	AKGEEAAE	서열번호 145
펩티드 162	AKGEEAAA	서열번호 162
펩티드 180	AKGEEAA	서열번호 180
펩티드 199	AKGEEA	서열번호 199
펩티드 219	AKGE	서열번호 219
펩티드 55	KGEEAAERPGEAAVA	서열번호 55
펩티드 65	KGEEAAERPGEAAV	서열번호 65
펩티드 76	KGEEAAERPGEAA	서열번호 76
펩티드 88	KGEEAAERPGEA	서열번호 88
펩티드 101	KGEEAAERPGE	서열번호 101
펩티드 115	KGEEAAERPG	서열번호 115
펩티드 130	KGEEAAERP	서열번호 130
펩티드 146	KGEEAAER	서열번호 146
펩티드 163	KGEEAAE	서열번호 163
펩티드 181	KGEEAAA	서열번호 181
펩티드 200	KGEEAA	서열번호 200

<209>

펩티드 번호	서열	서열번호
펩티드 220	KGEA	서열번호 220
펩티드 66	GEAAAERPGEAAVA	서열번호 66
펩티드 77	GEAAAERPGEAAV	서열번호 77
펩티드 89	GEAAAERPGEAA	서열번호 89
펩티드 102	GEAAAERPGEA	서열번호 102
펩티드 116	GEAAAERPGE	서열번호 116
펩티드 131	GEAAAERPGE	서열번호 131
펩티드 147	GEAAAERP	서열번호 147
펩티드 164	GEAAAER	서열번호 164
펩티드 182	GEAAA	서열번호 182
펩티드 201	GEAAA	서열번호 201
펩티드 221	GEAA	서열번호 221
펩티드 78	EAAAERPGEAAVA	서열번호 78
펩티드 90	EAAAERPGEAAV	서열번호 90
펩티드 103	EAAAERPGEAA	서열번호 103
펩티드 117	EAAAERPGEA	서열번호 117
펩티드 132	EAAAERPGE	서열번호 132
펩티드 148	EAAAERPGE	서열번호 148
펩티드 165	EAAAERP	서열번호 165
펩티드 183	EAAAER	서열번호 183
펩티드 202	EAAA	서열번호 202
펩티드 222	EAAA	서열번호 222
펩티드 91	AAAERPGEAAVA	서열번호 91
펩티드 104	AAAERPGEAAV	서열번호 104
펩티드 118	AAAERPGEAA	서열번호 118
펩티드 133	AAAERPGE	서열번호 149
펩티드 166	AAAERPGE	서열번호 166
펩티드 184	AAAERP	서열번호 184
펩티드 203	AAAER	서열번호 203
펩티드 223	AAA	서열번호 223
펩티드 105	AAERPGEAAVA	서열번호 105
펩티드 119	AAERPGEAAV	서열번호 119
펩티드 134	AAERPGEAA	서열번호 134
펩티드 150	AAERPGEA	서열번호 150
펩티드 167	AAERPGE	서열번호 167
펩티드 185	AAERPGE	서열번호 185
펩티드 204	AAERP	서열번호 204
펩티드 224	AAER	서열번호 224
펩티드 120	AERPGEAAVA	서열번호 120
펩티드 135	AERPGEAAV	서열번호 135
펩티드 151	AERPGEAA	서열번호 151
펩티드 168	AERPGEA	서열번호 168
펩티드 186	AERPGE	서열번호 186
펩티드 205	AERPGE	서열번호 205
펩티드 225	AERP	서열번호 225
펩티드 136	ERPGEAAVA	서열번호 136
펩티드 152	ERPGEAAV	서열번호 152
펩티드 169	ERPGEAA	서열번호 169

<210>

펩티드 번호	서열	서열번호
펩티드 187	ERPGEA	서열번호 187
펩티드 206	ERPGE	서열번호 206
펩티드 226	ERPG	서열번호 226
펩티드 153	RPGEAAVA	서열번호 153
펩티드 170	RPGEAAV	서열번호 170
펩티드 188	RPGEAA	서열번호 188
펩티드 207	RPGEA	서열번호 207
펩티드 227	RPGE	서열번호 227
펩티드 171	PGEAAVA	서열번호 171
펩티드 189	PGEAAV	서열번호 189
펩티드 208	PGEAA	서열번호 208
펩티드 228	PGEA	서열번호 228
펩티드 190	GEAAVA	서열번호 190
펩티드 209	GEAAV	서열번호 209
펩티드 229	GEAA	서열번호 229
펩티드 210	EAAVA	서열번호 210
펩티드 230	EAAV	서열번호 230
펩티드 231	AAVA	서열번호 231

<211>

도 5에 도시된 바와 같이, MARCKS는 PKC에 의하여 인산화되고, 결과적으로 막으로부터 원형질로 이동된다. 여기서, PKG 억제제 R_p-8-Br-PET-cGMP(참조: 도 2A, 라인 5)는 MARCKS의 탈인산화(참조: 도 2A, 라인 4 및 도 2B)를 유도하는 것으로 보여지는데, 이는 탈인산화가 유의적으로 PKG-의존적이라는 것을 암시한다. 도 2에서, NHBE 세포는 [³²P]오르토포스페이트로 표지된 다음, 지정된 시약에 노출된다. 처리에 대한 MARCKS 인산화는 면역침전법에 의하여 평가되었다. 도 2A에서, 8-Br-cGMP는 PMA에 의하여 유도된 MARCKS 인산화를 역전시키고, 이 8-Br-cGMP의 효과는 R_p-8-Br-PET-cGMP(PKG 억제제) 또는 오키다인산(okadaic acid, PP1/2A 억제제)에 의하여 억제된다. 도 2B에서 보듯이, PMA-유도 MARCKS의 인산화는 세포를 8-Br-cGMP에 노출시킴으로써 역전된다. 라인 1, 8분동안 배지 단독; 라인 2, 3분동안 100nM PMA; 라인 3, 3분동안 100nM PMA 및 5분간 1uM 8-Br-cGMP; 라인 4, 8분동안 100nM PMA; 라인 5, 3분동안 배지 단독 및 5분간 100nM PMA + 1uM 8-Br-cGMP. 도 2C에서 보듯이, 포스트리에신(fostriecin)에 의하여 8-Br-cGMP-유도 MARCKS 탈인산화가 농도의존적으로 감쇄되었다.

<212>

PKG는 단백질 탈인산화효소의 활성화를 통해 MARCKS를 탈인산화시키는 역할을 한다고 알려져 있다. 도 2A(라인 6)에서 보듯이, PP1과 PP2A를 동시에 억제하는 500nM 농도의 오키다인산(okadaic acid)은 PKG를 통한 MARCKS의 탈인산화를 억제하는데, 이는 PKG가 PP1과 PP2A를 활성화시켜 탈인산화를 유도한다는 것을 암시한다. 포스트리에신과 탈인산화 활성에 대한 직접적인 연구결과는 오직 PP2A만이 PKG가 활성화시키며, MARCKS로부터 인산화 그룹을 제거하는 역할을 한다는 것을 보여 주었다(도 2C). 도 3에서 보듯이, 오키다인산 또는 포스트리에신 중 하나는 PKG에 의한 MARCKS의 탈인산화를 억제하는 농도에서 PMA + 8-Br-cGMP 또는 UTP에 의한 뮤신 분비를 감쇄시키는 것으로 추정하였다. 도 3은 PP2A가 뮤신 분비경로의 필수요소라는 것을 보여준다. NHBE 세포는 지정한 농도의 포스트리에신, 오키다인산(50nM) 또는 배지 단독으로 15분간 미리 배양한 다음, PMA(100nM) + 8-Br-cGMP(1uM) 15분 또는 UTP 100uM 2시간 동안 배양하였다. 분비된 뮤신은 ELISA를 통해 분석하였다. 결과를 평균값 ± 표준편차(각 시점에서 n=6)로 나타내었고, * 표시는 배지 대조군과 상당히 다르다는 것을 나타내며 (p<0.05); † 표시는 PMA + 8-Br-cGMP 자극으로부터 상당히 다르다는 것을 나타내고(p<0.05); 및 ‡ 표시는 UTP 자극과 상당히 다르다는 것을 나타낸다. PKG에 의하여 활성화된 PP2A에 의한 MARCKS의 탈인산화는 뮤신 과립의 세포의 분비를 유도하는 신호전달 경로의 필수요소로 추정할 수 있었다.

<213>

MARCKS가 키나제 활성화(kinase activation)와 점액 분비(mucin secretion)를 연결하는 분자 행동(molecular events)을 규명하기 위하여, PKC/PKG 활성화에 의한 MARCKS의 인산화를 심층적으로 연구하였다. 도 1A에 도시된 바와 같이, PMA(100nM)는 NHBE 세포에서 MARCKS 인산화를 3 내지 4배 정도 크게 증가시켰고, 이러한 인산화는 PKC 억제제인 칼포스틴(calphostin) C(500nM)에 의해 감쇄되었다. 일단 인산화되면, MARCKS는 원형질막에서 세포질로 이동하였다(참조: 도 1B). 구체적으로, 도 1A는 PKC 활성화는 NHBE 세포에서 MARCKS 인산화를 야기시킨다는 것을 보여주고 있다. 세포를 [³²P] 오르토포스페이트로 2 시간 동안 표지하고, 그 후에 자극제 및/또는

억제제를 처리하였다. 이러한 처리에 의한 MARCKS 인산화를 상술한 면역침전 방법으로 측정하였다. 라인 1, 배지 대조군; 라인 2 운반체(vehicle), 0.1% Me.sub.2SO; 라인 3, 100nM 4 α -PMA; 라인 4, 100nM PMA; 라인 5, 100nM PMA + 500nM 칼포스틴 C; 라인 6, 500nM 칼포스틴 C. 도 1B는 인산화된 MARCKS는 원형질막에서 세포질로 이동하는 것을 도시한다. ³²P로 표지한 세포를 PMA(100nM) 또는 배지 단독으로 5분간 처리하고, 막과 사이토솔 분획을 분리하였다. 8-Br-cGMP(1 μ M, 뮤신 분비를 촉진하는데 필요한 다른 키나제의 활성화)에 의한 PKG 활성화는 MARCKS를 인산화시키지 못하였지만, 사실, 반대효과를 관찰할 수 있었다: PMA에 의한 MARCKS 인산화는 8-Br-cGMP에 의해 역전되었다(참조: 도 2A). PMA에 의한 인산화가 세포에 대한 이후의 8-Br-cGMP 처리에 의해 역전될 수 있기 때문에, 이러한 8-Br-cGMP의 효과는 PKC 활성화의 역제가 원인이 될 수 없다(참조: 도 2B). 따라서, PKG 활성화는 MARCKS를 탈인산화시킬 것이다.

<214> 추가적인 실험결과는 PKG-유도 MARCKS 탈인산화가 단백질 탈인산화효소(type 1 및/또는 2A(PP1/2A)) 억제제인 500nM의 오키다인산에 의해 저해된다는 것을 입증하였다(참조: 도 2A, 라인 6). 따라서, 탈인산화는 PP1 및/또는 PP2A에 의하여 매개되는 것으로 추정되었다. 관련된 단백질 탈인산화효소의 아형(subtype)을 확인하기 위하여, 좀 더 특이적인 PP2A의 억제제인 포스트리에신(fostriecin, IC₅₀=3.2nM)을 추가적인 인산화 연구에서 사용하였다. 도 2C에서 보듯이, 포스트리에신은 PKG에 의한 MARCKS 탈인산화를 농도의존적(1-500nM)으로 억제하는데, 이는 PKG가 PP2A 활성화를 통해 탈인산화를 유도한다는 것을 나타낸다. NHBE 세포에서 PKG에 의한 PP2A의 활성화를 확인하기 위하여, 세포에 8-Br-cGMP를 처리한 후 세포질의 PP1과 PP2A의 활성을 측정하였다. PP2A 활성은 8-Br-GMP 농도 최소 0.1 μ M에서 약 3배 증가하였지만(0.1에서 0.3 nmol/min/mg 단백질, p<0.01), PP1 활성은 변하지 않았다. 이 결과는 PP2A가 PKG에 의해 활성화될 수 있고, 이는 MARCKS의 탈인산화에 관련되어 있다는 것을 암시한다. 따라서, 이러한 PP2A 활성화는 뮤신 분비에 매우 중요한 것처럼 보인다; PKG에 의한 MARCKS 탈인산화가 오키다인산 또는 포스트리에신에 의해 억제될 때, PKC/PKG 활성화 또는 UTP 자극에 대한 비반응은 개선되었다(참조: 도 3).

<215> **MARCKS는 세포질에서 액틴과 미오신에 연관되어 있다.**

<216> 도 4는 MARCKS가 세포질에서 두 가지 다른 단백질(약 200kDa, 약 400kDa)과 관련되어 있음을 보여주는 방사성 원소로 표지된 면역침전 연구를 자세히 보여준다. 도 4에서, NHBE 세포는 [³H] 뮤신 과 [³H] 프롤린으로 방사성 표지하고, 세포막 분획과 사이토솔 분획을 "실험방법(Experimental Procedures)"에 기술된 대로 제조하였다. 분리한 분획들은 비-면역 대조군 항체(6F6)로 미리 세척하였다. 사이토솔은 동등하게 2등분하여, 10 μ M 사이토칼라신(cytochalasin, Biomol, Plymouth Meeting, Pa.) 존재하에 수행되는, 항-MARCKS 항체 2F12(라인 2)와 비-면역 대조군 항체 6F6(라인 3)을 이용한 면역침전 연구에 사용하였다. 막 분획에 있는 MARCKS 단백질은 또한 항체 2F12(라인 1)을 이용한 면역침전 연구로 분석하였다. 침전된 단백질 복합체는 8%-SDA-폴리아크릴아미드 젤 전기영동으로 분리하여 증강된 방사선사진술(enhanced autoradiography)로 가시화하였다. MARCKS는 각각 200kDa, 400kDa의 분자량을 지닌 두 개의 세포질 단백질과 관련되어 있는 것으로 추정되었다. 이러한 두 MARCKS-관련 단백질을 겔에서 잘라내서, matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry/internal sequencing(록펠러대학교 단백질/DNA 기술센터, N.Y.)으로 분석하였다. 수득한 펩티드 질량과 서열 데이터는 인터넷 프로그램 ProFound와 MS-Fit를 통해 단백질 데이터베이스를 탐색하는데 사용하였다. 그 결과, 단백질들이 각각 미오신(heavy chain, non-muscle type A)과 액틴임을 확인할 수 있었다. Matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry/internal sequence 분석은 이러한 두 가지 MARCKS-관련된 단백질들이 각각 미오신(heavy chain, non-muscle type A)과 액틴임을 확인할 수 있었다.

<217> 이러한 연구들은 생리적 과정에서 MARCKS의 특별한 생물학적 기능을 도시하는 것으로 믿어온 첫 번째 직접적인 증거뿐만 아니라, 기도의 뮤신 과립(airway mucin granule)의 세포외 분비를 조절하는 신호전달 기작에 대한 새로운 패러다임을 제시한다. MARCKS는 사람의 기도 상피세포에서 뮤신 과립을 조절하는 주요 매개 분자 역할을 한다. 기도의 뮤신 분비 촉진은 PKC와 PKG의 동시 활성화 및 상승 작용을 필요로 할 것이라 추정되었다. 활성화된 PKC는 MARCKS를 인산화시키고, 그 결과 MARCKS는 원형질막의 내 측면으로부터 세포질로 이동하였다. PKG 활성화는 PP2A를 활성화시키는데, 이는 세포질에서 MARCKS를 탈인산화시켰다. MARCKS의 막결합 능력이 인산화 상태에 의존하기 때문에, 탈인산화는 MARCKS가 자체의 막-결합 능력을 회복하도록 하고, MARCKS가 세포질 뮤신 과립의 막에 결합하도록 하였다. 세포질에서 액틴 및 미오신과 상호작용함으로써(참조: 도 4), MARCKS는 과립을 세포 수축 기작에 구속하여, 과립이 세포주위로 이동하는 것을 매개하고 세포외로 분비되도록 한다. MARCKS의 광범위한 분포는 이러한 기작 또는 유사한 기작이 정상 또는 병리 상태에서 다양한 세포 형태의 막-결합 과

립자의 분비를 조절할 가능성을 제시하였다.

<218> 도 5에 도시된 바와 같이, MARCKS는 그의 N-말단 영역의 과립 막(granule membrane)과 상호작용하고, 그의 PSD 부위에서 액틴 필라멘트에 결합함으로써, 과립의 이동 및 세포의 유출(exocytosis)을 위하여 수축성 세포골격(contractile cytoskeleton)에 구속시켜 분자 링커(molecular linker)로서 기능할 수 있다. 도 5는 뮤신 분비 촉진제(mucin secretagogue)가 기도 상피(epithelial, goblet) 세포와 상호작용하고, PKC 및 PKG의 두개의 단백질 키나제를 활성화시키는 것을 나타내는 기전을 도시한다. 활성화된 PKC는 MARCKS를 인산화시켜 MARCKS로 하여금 형질막(plasma membrane)으로부터 원형질(cytoplasm)으로 전이하도록 하는 한편, 산화질소(NO) → GC-S → cGMP → PKG 경로에 의하여 활성화된 PKG는 원형질 PP2A를 활성화시켜 MARCKS를 탈인산화한다. 이러한 탈인산화는 과립막에의 MARCKS 부착을 안정화시킨다. 또한, MARCKS는 액틴 및 미오신과 상호작용함으로써, 과립을 MPO와 같은 염증 매개물질의 이동 및 세포의 분비를 위한 세포수축기구(cellular contractile machinery)에 연결한다. 이러한 MARCKS의 원형질로의 분비 이후의 과립에의 부착은 특이적 표적 단백질 또는 MARCKS의 N-말단 영역이 관여하는 단백질-단백질 상호작용의 다른 형태에 의하여 인도된다. 어떤 경우든, MANS 펩티드 또는 최소한 4개의 아미노산을 포함하는 그의 활성 단편은, 뮤신 과립막에 대한 MARCKS의 표적화를 경쟁적으로 억제함으로써 분비를 억제한다.

<219> 또한, 본 발명은 모든 세포의 세포의 분비와정, 특히 염증세포에 포함된 과립으로부터 염증 매개물질을 분비함으로써 활성화되는 경로가 단백질 키나제 C(PKC) 기질인 MARCKS 단백질과 관련되고, 막-결합 소낭체로부터 내용물을 분비하는 것을 억제하는 신규한 방법을 제공한다. 특히, 본 발명자들은 MANS 펩티드에 의해 사람(도 9) 또는 개과(도 10)의 호중구로부터 염증 매개물질인 미엘로퍼옥시다제(MPO)의 자극에 의한 분비를 농도-의존적으로 억제할 수 있다는 것을 보여 주었다. 특히, 도 9는 100nM PMA와 10.μM 8-Br-cGMP를 이용하여 미엘로퍼옥시다제를 분비하도록 처리한 후, 분리된 호중구를 나타낸다. 100uM MANS 펩티드는 MPO 분비를 대조군 수준으로 감소시켰다(*p<0.05). 10uM MANS 펩티드는 MPO 분비를 조금 감소시켰다. 대조군 펩티드(RNS)는 MPO 분비에 전혀 효과가 없었다. 도 10에서, 분리된 호중구는 MPO 분비를 위하여 100nM PMA와 10uM 8-Br-cGMP로 처리하였다. 100uM MANS 펩티드는 대조군 수준에 비하여 MPO 분비를 감소시켰다(*p<0.05). 10uM MANS 펩티드는 MPO 분비를 조금 감소시켰다. 10 또는 100uM 대조군 펩티드(RNS)는 MPO 분비에 전혀 영향을 주지 못하였다. 그러므로, 모든 조직에서 투과성 염증세포로부터 분비하는 염증 매개물질의 분비를 억제하기 위하여, 펩티드를 치료적으로 사용할 수 있다. 많은 분비된 매개물질들은 다양한 만성 염증질환(천식, 만성 기관지염, COPD와 같은 호흡기 질환, 궤양성 대장염과 크론병을 포함하는 염증 보웬 질환, 자가면역 질환, 빨간코, 습진 같은 피부 질환 및 심각한 좌창(severe acne), 류마티스 관절염과 섬유근육통(fibromyalgia)과 같은 관절염 및 고통 증후군)에서 관찰되는 큰 조직 손상과 관련이 있다. 본 발명은 관절염, 만성 기관지염, COPD 및 낭포성 섬유증 같은 질환을 치료하는데 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 사람 및 동물의 질환, 특히 말, 개, 고양이 및 다른 가축 애완동물을 치료하는데 유용하다.

<220> 도 8 내지 12는 사람과 개과 동물로부터의 MPO 분비를 보여준다. 모든 실험에서, 분리된 호중구는 도시한 대로 처리하기 전에 1×10^{-6} M 농도의 LPS를 37°C에서 10분간 처리하였다. LPS는 세포들이 분비촉진제에 반응하도록 세포들을 면역개시시켰다.

<221> 본 발명의 한가지 실시태양에 따르면, 본 발명은 MANS 펩티드 및 그의 활성 단편을 포함하는 약학적 조성물의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 염증을 조절하는 방법을 개시한다. 이 실시태양의 한 측면에 따르면, 상술한 MANS 단백질의 활성 단편은 최소한 4개, 바람직하게는 최소한 6개의 아미노산을 포함한다. 다른 측면에 따르면, 상기 염증은 호흡기 질환, 보웬 질환, 피부 질환, 자가면역 질환 및 고통 증후군(pain syndrome)에 의해 야기된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 호흡기 질환은 천식, 만성 기관지염 및 COPD 환자 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 보웬 질환은 궤양성 대장염, 크론병 및 과민성 대장 증후군 환자 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 피부 질환은 빨간코, 습진, 건선 및 심각한 좌창(severe acne) 환자 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 염증은 관절염 또는 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)에 의해 야기된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 개체는 포유류이다. 그외에도, 또 다른 측면에 따르면, 상기 포유동물은 사람, 개과, 말과 및 고양이과로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 투여 과정은 국소 투여, 비경구 투여, 직장 투여, 폐 투여, 비강 투여, 흡입 및 경구투여로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 폐 투여는 에어로졸, 건조 분말 흡입기, 계량 용량 흡입기 및 분무기로 구성되는 그룹으로부터 선택된다.

<222> 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 본 발명은 개체에서 염증 매개물질을 조절하는 MANS 펩티드 및 그의 활성

단편을 포함하는 최소한 하나의 화합물을 포함하는 약학적 조성물의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 세포 분비와정을 조절하는 방법을 개시한다. 이 실시태양의 한 측면에 따르면, 상기 MANS 단백질의 활성 단편은 최소한 4개, 바람직하게는 최소한 6개의 아미노산을 포함한다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 세포 분비와정 조절은 세포 분비와정을 억제하거나 감소시키는 것이다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 염증 매개물질은 호흡기 질환, 보웬 질환, 피부 질환, 자가면역 질환 및 고통 증후군에 의해 야기된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 호흡기 질환은 천식, 만성 기관지염 및 COPD로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 보웬 질환은 궤양성 대장염, 크론병 및 과민성 대장 증후군으로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 피부 질환은 빨간코, 습진, 건선 및 심각한 좌창으로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 염증 매개물질은 관절염 또는 낭포성 섬유증에 의해 야기된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 개체는 포유류다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 포유류는 사람, 개과, 말과 및 고양이과로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 투여 과정은 국소 투여, 비경구 투여, 직장 투여, 폐 투여, 비강 투여, 흡입 및 경구투여로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 폐 투여는 에어로졸, 건조 분말 흡입기, 계량 용량 흡입기 및 분무기로 구성되는 그룹으로부터 선택된다.

<223> 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 본 발명은 치료가 부재할 경우 발생하는 경우와 비교하여 개체의 염증 매개물질 분비가 감소하도록 염증 매개물질의 MARCKS-관련 분비를 억제하는 화합물의 치료적으로 유효한 양의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 염증을 감소시키는 방법을 개시한다. 본 실시태양의 한 측면에 따르면, 상기 화합물은 MARCKS 단백질의 최소한 하나의 활성 단편이다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 활성 단편은 최소한 4개, 바람직하게는 6개의 아미노산이다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 화합물은 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편이다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 화합물은 MARCKS 단백질 또는 그 활성 단편의 암호화 서열을 목표로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 활성 단편은 최소한 4개, 바람직하게는 6개의 아미노산이다.

<224> 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 본 발명은 치료가 부재할 경우 발생하는 경우와 비교하여 개체의 염증이 감소하도록 염증 매개물질의 MARCKS-관련 분비를 억제하는 화합물을 포함하는 약리적으로 활성인 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 염증을 감소시키는 방법을 개시한다. 본 실시태양의 한 측면에 따르면, 상기 화합물은 MARCKS 단백질의 활성 단편이다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 활성 단편은 최소한 4개, 바람직하게는 6개의 아미노산이다. 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 상기 화합물은 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편이다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 화합물은 MARCKS 단백질 또는 그 활성 단편을 암호화하는 서열에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 활성 단편은 최소한 4개, 바람직하게는 6개의 아미노산이다. 본 발명은 하나 또는 그 이상의 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편을 포함하는 조성물 및 염증세포의 과립 또는 소낭체로부터 염증 매개물질의 분비를 억제하는 치료에의 용도를 제공한다.

<225> 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 본 발명은 염증부위에서 염증 매개물질의 분비를 억제하거나 저해하는 MANS 펩티드 또는 그의 활성 단편을 포함하는 치료적으로 유효한 양의 최소한 하나의 펩티드를 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 염증을 감소시키거나 억제하는 방법을 개시한다. 본 실시태양의 한 측면에 따르면, 상기 활성 단편은 최소한 4개, 바람직하게는 6개의 아미노산이다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 염증 매개물질은 호중구, 호염기구, 호산구, 단핵세포 및 백혈구로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 세포에 의해 생산된다. 바람직하게는, 그 세포들은 백혈구이고, 보다 바람직하게는, 과립구이며, 가장 바람직하게는, 호중구, 호염기구, 호산구 및 이들의 조합이다. 또 다른 측면에 따르면, 약물들은 경구, 비경구, 강내(vitarily), 직장내 또는 기도를 통해 투여한다. 또 다른 측면에 따르면, 상기 조성물은 항생제, 항바이러스 화합물, 항기생충 화합물, 항-염증 화합물 및 면역 억제제를 포함하는 2차 분자들을 추가로 포함한다.

<226> MANS 펩티드의 활성 단편은 표 1에 개시된 펩티드로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같이, 이들 펩티드들은 N-말단 및/또는 C-말단에 선택적인 화학적 부위(chemical moiety)를 포함한다.

<227> 본 발명의 다른 측면에 의하면, 본 발명에 개시된 방법들은 표 1에 개시된 펩티드들의 조합적 사용 또는 투여, 즉 하나 또는 그 이상의 사용 또는 투여에 의하여 달성될 수 있다. 바람직하게는, 본 명세서에 개시된 방법에는 단일 펩티드가 사용되거나 투여된다.

<228> 염증 자극제에 의한 단백질 키나제 C(protein kinase, PKC)의 활성화에 대응해서, 호중구, 호산구, 단핵세포/대식세포 및 림프구로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 세포의 탈과립화(degranulation)는 MARCKS 단백질의 N-말단 부위와 동일한 펩티드를 미리 배양(pre-incubation)하거나 함께 배양(co-incubation)함으로써 감쇄할 수 있

고, 그 펩티드는 표 1에 개시된 MANS 펩티드 단편의 그룹으로부터 선택된다. 시간의 경과와 농도가 세포 형태마다 다를 수 있지만, 모든 경우에서 MANS 펩티드는 PKC에 의한 탈과립화를 감쇄시켰다.

<229> 이상에서 본 발명을 기술하였지만, 이하에서는 동일한 내용을 본 명세서에 오직 기술하는 것을 목적으로 포함하고, 본 발명을 제한하지 않는 실시예를 참조하여 설명할 것이다.

실시예

<230> **방법 및 물질**

<231> 방사선표지 면역침전 시험 - [³²P]인산기로 표지할 때, 인산기가 없고 0.2% 소혈청 알부민(bovine serum albumin)을 포함하는 돌베코의 변형배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)에서 세포를 2시간 동안 미리 배양하였다. 그런 다음, 0.1 mCi/ml [³²P] 오르토포스페이트(9000 Ci/mmol, PerkinElmer Life Science)로 2시간 동안 표지하였다. [³H] 미리스트산 또는 ³H-아미노산으로 표지하기 위하여, 50uCi/ml [³H] 미리스트산(49 Ci/mol, PerkinElmer Life Science) 또는 0.2 mCi/ml [³H] 류신(159 Ci/mol, PerkinElmer Life Science)에 0.4 mCi/ml [³H] 프롤린(100 Ci/mol, PerkinElmer Life Sciences)를 포함한 배지에서 세포를 밤새 배양하였다. 표지한 후, 세포를 5분간 자극제로 처리하였다. 억제제를 사용할 때에는, 자극 이전에 세포를 15분간 억제제와 함께 미리 배양하였다. 처리가 끝날 때쯤, 50mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10% 글리세롤, 1% Nonidet P-40, 1 mM 페닐메틸술폰닐 플로리드, 1 mM 벤즈아미딘, 10 ug/ml 펩스타틴(pepstatin) A 및 10ug/ml 류펩틴(leupeptin)을 포함하는 완충용액으로 세포를 용해하였다. 트리클로로아세트산 침전과 섬광측정(scintillation counting)은 각각 배양에서 방사선 표지의 효율을 나타내었다. MARCKS 단백질의 면역침전은 동일한 counts/min을 포함하는 세포 용해물을 이용하여, 스피즈(Spizz)와 블랙셰어(Blackshear)의 방법에 따라 실시하였다(참조: Spizz et al., J. Biol. Chem. 271, 553-562(1996)). 침전시킨 단백질을 8% SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동으로 분리하여 방사능사진으로 가시화하였다. 항-사람 MARCKS 항체(2F12)와 비면역성 대조군 항체(6F6)를 시험에 사용하였다.

<232> 아세포 분획(subcellular fraction)에서 MARCKS 또는 MARCKS-결합한 단백질 복합체를 검사하기 위하여, 방사선 표지하여 처리한 세포를 떼어내어 균질화 완충액(50mM Tris-HCl(pH 7.5), 10mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM 페닐메틸술폰닐 플로리드, 1 mM 벤즈아미딘, 10 ug/ml 펩스타틴 A, 10ug/ml 류펩틴)에 넣어 질소 캐비테이션(nitrogen cavitation, 800 pounds/square inch for 20min at 4°C)을 통해 분쇄하였다. 핵과 분쇄되지 않은 세포를 제거하기 위하여, 세포 용해물을 600 x g, 4°C에서 10분간 원심분리하였다. Post-핵 현탁액을 400,000 x g, 4°C에서 30분간 초원심분리하여, 막 분획과 사이토졸 분획을 분리하였다. 막 펠렛을 초음파 분해를 통해 용해 완충액에서 용해시켰다. 그런 다음, 상술한 대로 면역침전을 실시하였다.

<233> MARCKS-관련 펩티드 - 미리스토일화된 N-말단 서열(MANS)과 무작위 N-말단 서열(RNS) 펩티드는 진메드 신테시스사(Genemed Synthesis, Inc., San Francisco, Calif.)에서 합성하여, 고압 액체 크로마토그래피(>95%)로 정제하고, 적절한 분자량에서 단일 피크를 보여주는 질량분광기로 확인하였다. MANS 펩티드는 MARCKS의 첫 24개 아미노산(MARCKS를 막으로 넣는 것을 매개하는 미리스토일화된 N-말단 부분, MA-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA, 서열번호 1, MA=N-말단 미리스트산염 사슬)과 동일 서열로 구성하였다. 이에 대응하는 대조군 펩티드(RNS)는 MANS와 아미노산 조성은 같지만 무작위 순서로 배열하였다 MA-GTAPAAEGAGAIEVKRASAEAKQAF(서열번호 2). 이들 합성 펩티드 내에 소수성 미리스트산염 부분은 원형질막에 대한 투과성을 증가시켜서, 세포가 용이하게 펩티드를 흡수하도록 한다. 이러한 펩티드의 뮤신 분비에 대한 효과를 검사하기 위하여, 세포는 분비촉진제를 넣기 15분 전에 펩티드를 미리 배양한 다음, ELISA로 뮤신 분비를 측정하였다.

<234> 안티센스 올리고뉴클레오티드 - MARCKS 안티센스 올리고뉴클레오티드와 그에 대응하는 대조군 올리고뉴클레오티드는 비오그노스틱 게엠베하사(Biognostik GmbHGöttingen, Germany)에서 합성하였다. NHBE 세포는 5uM 안티센스 또는 대조군 올리고뉴클레오티드를 3일간(최초 24시간 동안 2ug/ml 리포펙틴(lipofectin)을 같이 처리함) 정점에서 처리하였다. 그 후에 세포는 분비촉진제로 배양하여 뮤신 분비는 ELISA로 측정하였다. 전체 RNA와 단백질은 처리한 세포에서 분리하였다. MARCKS mRNA는 사람의 MARCKS cDNA를 탐침으로 사용한 통상적인 순서에 따라 노던 블롯으로 검사하였다. MARCKS 단백질 양은 1차 탐지 항체로서 정제된 항-MARCKS IgG1(클론 2F12)를 이용한 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

<235> 일시적 형질도입(transient transfection) - MARCKS의 인산화 부위 영역(PSD)은 PKC-의존성 인산화 부위이고

액틴 필라멘트가 결합하는 부위이다. PDS를 결실시킨 MARCKS cDNA를 만들기 위하여, PDS 서열(25 아미노산을 암호화)을 연결하는 2 단편은 PCR을 이용하여 만들어서 PCR을 위하여 작제한 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 5' 말단에 부착시킨 Xho I 위치를 통해 연결시켰다. 그 결과 변이 Cdna와 야생형 MARCKS cDNA는 각각 포유동물 발현벡터 pcDNA4/TO(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)에 삽입하였다. 분리한 재조합 구축물은 제한효소 절단과 DNA 서열분석을 통해 확인하였다.

<236> HBE1은 파필로마 바이러스로 형질전환시킨, 대기/액체 경계면에서 배양시 무신 분비를 할 수 있는 사람의 기관지 상피세포주이다. HBE1세포의 형질도입은 제조자의 지시에 따라, 이펙틴(Efectene) 형질도입 시약(Qiagen, Valencia, Calif.)을 이용하여 실시하였다. 요약하면, 대기/액체 경계면에서 자란 분화된 HBE1 세포는 트립신/EDTA로 분리하여 1×10^5 세포/cm²인 12-웰 배양 플레이트에서 재접종하였다. 밤새 배양한 후에, 세포는 야생형 MARCKS cDNA, PDS-절단형 MARCKS cDNA, 벡터 DNA로 형질도입하였다. 세포는 유전자 발현을 위하여 48시간 동안 배양한 다음, 분비촉진제를 처리하여 ELISA를 이용하여 무신 분비를 측정하였다. 모든 형질도입은 형질도입 효율의 차이를 검정하기 위하여, PCDNA4/TO/LacZ 플라스미드(Invitrogen)(DNA 비율 6:1, 전체 1ug DNA, DNA:이펙틴(Efecten) 시약의 비율=1:25)와 같이 실시하였다. 그 결과는 형질도입 실시한 세포로부터 분리한 세포 용해물에서 베타-갈락토시다제 활성에 큰 차이가 없음을 보여주었는 바, 이는 다른 DNA 구축물 사이에서 유사한 형질도입 효율임을 암시하는 것이었다(결과는 나타내지 않음).

<237> 단백질 탈인산화효소 활성시험 - PP1과 PP2A 활성은 약간의 변형시킨 당업계에 공지된 단백질 탈인산화효소 측정기기(Life Technologies, Inc.)를 이용하여 측정하였다(참조: Huang et al., Adv. Exp. Med. Biol. 396, 209-215(1996)). 요약하면, NHBE 세포에 8-Br-cGMP 또는 단독 배지를 5분간 처리하였다. 세포는 굵어내어 용해 완충액(50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 0.1% 베타-머캅토에탄올, 0.1 mM EDTA, 1 mM 벤즈아미딘, 10ug/ml 펩스타틴 A, 10ug/ml 류펩틴)에 넣고, 4°C에서 20초간 초음파 분해를 통해 분쇄하였다. 세포용해물은 원심분리하여 상등액은 탈인산화효소 활성 측정을 위하여 보관하였다. 이 실험은 ³²P-표지한 인산화효소 A를 기질로 사용하여 실시하였다. 분비된 ³²Pi는 섬광으로 측정하였다. 각각 시료의 단백질 농도는 브래드포드 시험법(Bradford assay)으로 측정하였다. PP2A 활성은 시료의 전체 탈인산화 활성에서 1nM 오카다인산(okadaic acid)이 있을 때, 잔류활성을 뺀 값으로 나타내었다. PP1 활성은 각각 1nM과 1uM 오카다인산이 있을 때, 잔류활성의 차이로 나타내었다. 단백질 탈인산화 활성은 min/mg 전체 단백질에 대한 분비된 Pi의 nmol로서 나타내었다.

<238> 세포독성 시험 - NHBE 세포를 처리하는데 사용한 모든 시약들은 세포로부터 젯산 탈수소효소(lactate dehydrogenase)의 전체 분비를 측정함으로써 세포독성을 확인하였다. 시험은 제조자의 지시에 따라 Promega Cytotox 96 kit를 이용하여 실시하였다.

<239> 통계 분석 - 데이터들은 Bonferroni post-test corrections로 차이를 일방분석(one-way analysis)하여 유의성을 분석하였다. 처리 간의 차이는 p<0.05 일 때, 유의한 것으로 판단하였다.

<240> 개과동물의 혈액으로부터 PMN의 분리 - PMN을 분리할 때의 단계들은 10ml ACD 항응고된(anticoagulated) 혈액을 수집하는 단계를 포함한다. 그런 다음, PMN 분리배지(IM)을 확인하는 동안, 3.5ml PMN 분리배지에 5ml을 넣고 상온(RI)에 방치하였다. 그 후, 혈액을 1700 RPM, 550g에서 30분간 상온에서 원심분리하였다. 아래 층의 흰색 띠는 15ml 코니칼 원심분리 튜브(conical centrifuge tube, CCFT)로 옮겼다. 그 후에, 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)를 포함하는 2배 부피의 HESS를 넣고, 1400 RPM, 400g, 상온에서 10분간 원심분리하였다. 그 후에, 펠렛을 PBS를 포함한 5ml 1-ESS에서 현탁시켰다. 세포 현탁액은 얼음으로 냉각시킨 0.88% NH₄Cl 20ml을 포함하는 50ml CCFT에 첨가하고, 2 내지 3회 전도시켰다. 그 결과물을 2000 RPM, 800g에서 10분간 원심분리하고, 흡인한 후 FBS를 포함한 5 ml HBSS에 현탁시켰다. Prep은 바람직하게는, 전혈(whole blood)에 대해 계수(counting) 및 시토스핀(cytospin)으로 측정하였는데, 이때 세포 수는 PMN에 대해 10⁹-10¹⁰ 사이에 있어야 하며, 세포 수는 2-4 x 10⁷ 사이에 있어야 한다. Wang et al., J. Immunol., "Neutrophil-induced changes in the biomechanical properties of endothelial cells: roles of ICAM-1 and reactive oxygen species," 6487-94(2000)을 참조하라.

<241> MPO 색상측정 효소 시험(colorimetric Enzyme assay) - 시료들은 96-웰 둥근 바닥 마이크로플레이트에서 샌드위치 ELISA 키트(R&D Systems, Minneapolis, Minn.)을 이용하여 MPO 활성을 측정하였다. 요약하면, 시료 20 마이크로리터와 33mM 인산칼슘, pH6.0, 0.56% 트리트론 X-100, 0.11 mM 과산화수소, 0.36mM 0-디아니시딘 디히드로클로리드(diannisidine dihydrochloride)를 포함하는 기질 혼합물 180 ul에 혼합하였다. 시험 혼합물의 최종농

도는 다음과 같았다: 30mM 인산칼슘, pH 6.0, 0.05% 트리톤 X-100, 0.1 mM 과산화수소, 0.32 mM O-디아니시딘 디히드로클로리드. 혼합한 다음, 시험 혼합물을 상온에서 5분간 배양하고, MPO 효소활성을 550nm에서 스펙트럼 광도 측정을 통해 확인하였다.

<242> 실시예 1

<243> **염증 매개물질의 분비실험**

<244> 포볼 에스테르(phorbol ester)에 의한 PKC 활성화에 대응하여, 특정 과립의 내용물을 분비하는 네가지 다른 백혈구 형태 및 모델들이 사용되었다. 사람의 혈액에서 호중구를 분리하여, 실험실 조건에서 이들 세포에 의한 MPO 분비를 측정하였다. 또한, 상업적으로 입수가 가능한 사람의 백혈구 세포주로부터 막-결합 염증 매개물질의 분비를 측정하였다. EPO 분비를 측정하기 위하여, 사람의 전골수구 세포주(promyelocytic cell line) HL-60 클론 15를 사용하였다(참조: Fischkoff SA. Graded increase in probability of eosinophilic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells induced by culture under alkaline conditions. *Leuk Res* 1988; 12: 679-686; Resenberg HF, Ackerman S J, Tenen DG. Human eosinophil cationic protein: molecular cloning of a cytotoxin and helminthotoxin with ribonuclease activity. *J Exp Med* 1989; 170: 163-176; Tiffany HL, Li F, Rosenberg HF. Hyperglycosylation of eosinophil ribonucleases in a promyelocytic leukemia cell line and in differentiated peripheral blood progenitor cells. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 49-54; Badewa AP, Hudson CE, Heiman AS. Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil degranulation and superoxide anion generation. *Exp Biol Med* 2002; 227: 645-651). 리소자임 분비를 측정하기 위하여는, 단핵세포 백혈병 세포주(monocytic leukemia cell line) U937을 사용하였다(참조: Hoff T, Spencker T, Emmendoerffer A, Goppelt-Strube M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 173-182; Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phosphatase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J Immunol* 2003; 170: 5276-5280; Sundstorm C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line(U-937). *Int J Cancer* 1976; 17: 565-577). 그랜자임의 분비를 측정하기 위하여는, 림프구 자연 살상세포주 NK-92를 사용하였다(참조: Gong JH., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line(NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994; 8: 652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 369-383; Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J Immunol Methods* 1987; 104: 183-190). 모든 경우에 있어서, 세포들은 다양한 농도의 24개 아미노산인 MARCKS N-말단과 동일한 합성 펩티드[MANS-미리스토일화된 N-말단 서열 펩티드; MA-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA(서열번호 1), 여기서 MA는 아마이드 결합으로 펩티드의 N-말단 아민에 결합한 미리스토일이다], 또는 동일한 24개 아미노산으로 구성되어 있으나, MANS 펩티드 서열과 13%이하의 서열 동일성을 가지는 무작위 순서로 배열된 미스센스(missense) 대조군 펩티드[RNS: 임의 N-말단 서열 펩티드; MA-GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF(서열번호 232)]와 미리 배양하였다. 선택적으로, 세포를 하기 표 3에 열거된 합성된 결실 펩티드(truncated peptide) 중의 하나로 전처리하였다.

<245> 각각의 세포 형태에서, RNS가 아닌 MANS는 농도-의존적으로 염증 매개물질의 분비를 감소시킨다. 관찰가능한 시간은 0.5 내지 3시간이다. 그 결과는 백혈구 탈과립을 유도하는 세포내 경로와 관련된 MARCKS 단백질의 N-말단 부위와 일치하였다.

<246> 사람의 호중구 분리 - 이 실험은 사람연구 윤리심의위원회(Institutional Reviews Board, IRB)에서 승인되었다. 사람의 호중구는 상술한 방법을 약간 변형하여 분리하였다(참조: Takashi S, Okubo Y, Horie S. Contribution of CD54 to human eosinophil and neutrophil superoxide production. *J Appl Physiol* 2001; 91: 613-622). 요약하면, heparinized 정맥혈(heparinized venous blood)을 정상인 건강한 지원자로부터 수집하여, RPMI 1640(Cellgro; Mediatech, Inc., Herndon, VA)에 1:1 비율로 희석하고, Histopaque(밀도, 1.077g/ml; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)에 넣고, 4°C에서 20분간 400g로 원심분리하였다. 경계면의 상등액과 단핵 세포들을 조심스럽게 분리하고, 침전물에 있는 적혈구를 냉각시킨 멸균수에서 용해하였다. 분리된 과립 백혈구들을 HBSS(Hank's balanced salts solution)으로 두 번 세척하고, 얼음 속에서 HBSS를 이용하여 현탁시켰다. 실험에 사용된 호중구는 순도가 98% 이상이고, 호산구 오염이 2% 미만이며, 트립판 블루 염색 배제법(trypan blue dye exclusion)에 의하여 생존율이 99% 이상으로 측정되었다.

- <247> 분비된 호중구의 MPO 활성 측정 - MPO 분비를 측정하기 위하여, HBSS에 현탁시킨 정제된 사람의 호중구를 15ml 튜브에 4×10^6 세포/ml로 균등하게 분주한 다음, 50 또는 100uM MANS 펩티드, RNS 펩티드 또는 본 발명의 펩티드 중의 하나로 37°C에서 10분간 미리 배양하였다. 이어, 세포를 3시간 까지 100mM PMA로 처리하여 자극시켰다. 대조군 참조(PMA 대조군 참조)을 15ml 튜브에 4×10^6 세포/ml로 균등분획하여 HBSS에 현탁시킨 정제된 사람의 호중구를 이용하여 수립하고, 같은 시간 동안 시험 펩티드(test peptide)가 없는 상태에서 100mM PMA를 처리하여 자극시켰다. 튜브를 얼음에 방치하여 반응을 종료시키고, 4°C에서, 400g의 조건으로 5분간 원심분리하였다.
- <248> 세포 현탁액에서 MPO 활성은 종래기술에 근거하여, 트리메틸벤지딘(tetramethylbenzidine, TMB)을 이용하여 측정하였다(참조: Abdel-Latif D, Steward M, Macdonald DL, Francis GA., Dinauer MC, Lacy P. Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. Blood 2004; 104: 832-839). 요약하면, 96-웰 플레이트에 100ul TMB 기질 용액과 50ul의 세포 현탁액 또는 표준화된 사람의 MPO(EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA)을 가하고, 상온에서 15분간 배양하였다. 1M H₂SO₄ 50ul를 첨가하여 반응을 종료시킨 다음, 흡광도를 450nm에서 분광 마이크로플레이트 판독기(spectrometric microplate reader, VERSA max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 판독하였다.
- <249> **백혈구 배양**
- <250> 세가지 형태의 사람 백혈구 세포주, 특히 전골수구(promyelocytic) 세포주 HL-60 클론 15, 단핵세포주 U937과 림프구 자연살상세포주 NK-92를 미합중국 종균협회(American Type Culture Collection, ATCC; Rockville, MD)로부터 입수하였다. HL-60 클론 15세포(ATCC CRL-1964)를 10%의 가열하여 비활성화시킨 우태아 혈청(Gibco; Invitrogen Co., Carlsbad, CA), 50 IU/ml 페니실린, 50ug/ml 스트렙토마이신, 25mM HEPES 완충용액, pH 7.8를 보충한 L-글루타민을 함유하는 RPMI 1640 로 구성된 배지에서, 5% CO₂, 37°C의 조건으로 유지하였다. 호산구를 닮은 형태(eosinophil-like phenotype)로의 최종분화는 상술한 바와 같이, 0.5mM 부티르산(Sigma-Aldrich Co.)를 함유하는 상기 배지에서 5×10^5 세포/ml로 5일간 세포를 배양함으로써 개시되었다(참조: Tiffany HL, Li F, Rosenberg HF. Hyperglycosylation of eosinophil ribonucleases in a promyelocytic leukemia cell line and in differentiated peripheral blood progenitor cell. J Leukoc Biol 1995; 58: 49-54; Tiffany HL, Alkhatib G, Combadiere C, Berger EA, Murphy PM. CC chemokine receptors 1 and 3 are differentially regulated by IL-5 during maturation of eosinophilic HL-60 cells. J Immunol 1998; 160: 1385-1392). U937 세포(ATCC CRL-593.2)는 10% FBS, 50 IU/ml 페니실린, 50ug/ml 스트렙토마이신을 보충하고 L-글루타민을 함유하는 RPMI1640를 포함하는 완전배지에서, 5% CO₂, 37°C의 조건으로 배양하였다. NK-92 세포(ATCC CRL-2407)는 20% FBS, 100 U/ml 인터루킨-2(IL-2)(Chemicon International, Inc., Temecula, CA), 5×10^{-5} M 2-머캅토에탄올, 50 IU/ml 페니실린, 50ug/ml 스트렙토마이신을 보충한 알파-MEM 배지(Sigma-Aldrich Co.)에서 5% CO₂, 37°C의 조건으로 유지되었다. 세포 형태는 라이트-김자-염색(Wright-Giemsa-stained) 세포의 측정을 통해 관찰하였다. 실험을 위하여 회수한 세포의 생존율은 트립판 블루 배제 시험법(trypan blue exclusion)으로 측정하고, 생존율 99% 이상인 세포의 개체군이 사용되었다.
- <251> **탈과립 시험을 위한 세포의 배양**
- <252> HL-60 클론 15, U937 및 NK-92 세포를 세척하고, 모든 탈과립 시험에서 페놀 레드(phenol red)가 없는 RPMI-1640 배지(Cellgro; Mediatech, Inc.)에 2.5×10^6 세포/ml로 현탁시켰다. 15ml 튜브에 세포를 균등분할하고 지정된 농도의 MANS, RNS 또는 시험 펩티드와 37°C에서 10분간 미리 배양하였다. 그런 다음, 세포를 2시간까지 PMA를 처리하여 자극시켰다. HL-60 클론 15, U937 및 NK-92세포를 이용하여 각각 세포 형태에 대하여 대조군 참조(PMA 대조군 참조)를 만들고, 세척하여 페놀 레드가 없는 RPMI-1640 배지에서 2.5×10^6 세포/ml로 현탁시키고, 같은 시간동안 MANS, RNS 또는 시험 펩티드가 없는 상태에서 PMA를 처리하여 자극시켰다. 튜브를 얼음 속에 넣어서 반응을 종료시키고, 세포는 4°C에서, 400g로 5분간 원심분리하였다.
- <253> 호중구로부터 분비된 MPO와 U937 세포로부터 분비된 리소자임을 측정하기 위하여, 각각 사람의 MPO와 계란 흰자의 오발부민을 표준으로 이용하여 분비를 정량하였다. HL-60 클론 15세포로부터 분비된 MPO와 NK-92세포로부터 분비된 그랜자임에 대하여는, 정량을 위한 어떤 표준도 사용가능하지 않았다. 그러므로, 분비되거나 세포내(용혈된 세포로부터) MPO와 그랜자임의 양을 측정하고, 분비된 EPO와 그랜자임을 각각에 대하여 전체(세포내 및 분

비된)의 백분율로서 나타내었다. HL-60 클론 15세포의 세포내 EPO와 NK-92세포의 세포내 그랜자임을 측정하기 위하여, 0.1% 트리톤 X-100으로 용해시킨 세포의 적절한 균등분획을 이용하여, 후술하는 바와 같이 세포내 과립 단백질을 정량하였다. 모든 처리는 배양물간의 차이를 최소화하기 위하여, 대조군의 백분율로서 나타내었다.

<254> **HL-60 EPO 분비의 측정**

<255> HL-60 클론 15 세포가 분비하는 EPO의 활성을 TMB를 이용하는 종래의 방법에 따라 측정하였다(참조: Lacy P, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, Hagen SC, Velazquez JR, Man SF, Moqbel R. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils. Blood 1999; 94: 23-32), 즉, 100ul TMB 기질 용액을 96 웰 플레이트내의 시료 50ul(ul=마이크로리터)에 가하고, 상온에서 15분간 배양하였다. 50ul 1M H₂SO₄를 가하여 반응을 종료시키고, 450nm(nm = nanometer)에서의 흡광도를 분광 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 측정하였다. 분비된 EPO의 양은, 동일한 수의 트리톤 X-100으로 용해시킨 세포에서 얻어진 양을 이용하여, 전체 내용물의 백분율로서 나타내었다.

<256> **단핵세포 리소자임 분비의 측정**

<257> U937 세포가 분비하는 리소자임은 상술한 분광측정법을 약간 변형하여 측정하였다(참조: Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. J Immunol 2003; 170: 5276-5280). 그리하여, 100ul의 시료를 96-웰 플레이트의 100ul 마이크로코커스 리스테이크티커스(Micrococcus lysodeikticus, Sigma-Aldrich Co.) 현탁용액(0.3mg/ml in 0.1M 소듐 포스페이트 완충용액, pH 7.0)과 혼합하였다. 상온에서 450nm에서의 흡광도 감소를 측정하였다. 표준시료로 닭의 계란의 흰 리소자임(white lysozyme, EMD Biosciences, Inc.)를 이용하여, 표준곡선(calibration curve)를 만들었다.

<258> **NK 세포 그랜자임 분비의 측정**

<259> NK-92세포로부터 분비된 그랜자임은 상술한 바와 같이 N α -벤질옥시카보닐-L-리신 티오벤질 에스테르(N α -benzyloxycarbonyl-L-lysine thiobenzyl ester, BLT)의 가수분해를 측정함으로써 시험하였다(참조: Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. J Immunol Methods 1987; 104: 183-190). 요약하면, 50ul 현탁액을 96-웰 플레이트로 운반하고, 150ul BLT 용액(0.2mM BLT; EMD Biosciences, Inc., and 0.22mM DTNB; Sigma-Aldrich Co.)(mM = millimolar) in PBS(pH 7.2)를 현탁액에 가하였다. 상온에서 30분간 배양한 후, 410nm에서의 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 동일한 수의 트리톤 X-100로 용해한 세포에서 수득한 양을 이용하여, 전체 세포의 효소 내용물의 백분율로서 나타내었다.

<260> **통계 분석**

<261> 다양한 처리구 간 편차의 통계적 유의성은 one-way ANOVA를 이용하여 측정하였다. 0.05이하의 P 값을 유의하다고 판단하였다.

<262> **사람의 호중구로부터 MPO 분비의 억제**

<263> 100nM PMA(염증 매개물질 분비 촉진제)가 PMA 대조군 참조에서 30분이 경과하면 대조군의 양에 비하여 약 3배 정도로 사람의 호중구 MPO 분비를 증가시키고, 3시간후에는 약 5 내지 6배 정도 증가시키는 것을 확인하였다. 30분이 경과한 시점에서, PMA가 100% 부재한 상태에서의 대조군 MPO 활성을 100%로 보았을때, PMA 대조군 참조의 MPO 활성은, PMA가 부재하고 MANS, RNS 또는 시험 펩티드가 존재하는 경우 약 275%, PMA와 50uM MANS이 존재하는 경우 약 275%, 100uM MANS가 존재하는 경우는 약 305%로 증가되었다. MANS 펩티드는 30분이 경과한 시점에서 아무런 효과를 볼 수 없었다. 그러나, 1시간까지는 더 높은 농도의 MANS(100uM)는 유의한 저해효과(대조군의 약 260%로 측정됨)를 나타내거나, PMA 대조군 참조량(대조군의 약 340%로 측정됨)에 비하여 MPO 분비가 약 25% 감소하였다. 50uM MANS 시료는 대조군의 약 290% 또는 PMA 대조군 참조에 비하여 약 15% 감소하였다. 2시간대에서 또는 3시간까지 지속하면, MANS 펩티드는 농도- 의존적으로 MPO 활성을 유의하게 감쇄시켰다. 2시간이 경과한 시점에서, PMA 대조군 참조 MPO 활성은 대조군의 약 540%이고, 50uM MANS(대조군의 약 375%로 측정됨)는 PMA 대조군 참조에 비하여 MPO 분비를 약 30% 감소시켰다; 및, 100uM MANS(대조군의 약 295%로 측정됨)는 PMA 대조군 참조에 대해 MPO 분비를 약 45% 감소시켰다. 3시간이 경과한 시점에서, PMA 대조군 참조 MPO 활성은 대조군의 약 560%이고, 50uM MANS(대조군의 약 375%로 측정됨)는 PMA 대조군 참조에 비하여 MPO 분비를 거의 33% 감소시켰다; 100uM MANS(대조군의 약 320%로 측정됨)는 PMA 대조군 참조에 비하여 MPO 분비를 거의 40% 감소시켰다. RNS 펩티드는 실험한 모든 시간대 또는 농도에서 PMA에 의한 MPO 분비에 영향을 주지 못하였다. 하

기 표에 기재된 데이터는 100uM 시험 펩티드와 100nM PMA를 가하고 2시간 동안 방치시킨 결과를 나타낸다.

<264> HL-60 세포로부터 EPO 분비의 억제

<265> HL-60 클론 15세포 상등액의 EPO 활성은 PMA 자극 이후 1시간과 2시간이 경과한 시점에서 크게 증가되었다. 1시간이 경과한 시점에서, 대조군의 EPO 활성을 100%로 하였을 때, PMA 대조군 참조는 약 110%로 측정되었고; 10uM MANS를 함유하는 시료는 약 95%로서, PMA 대조군 참조에 비하여 EPO 활성이 15% 감소하였으며; 50uM MANS를 함유하는 시료는 약 78%로서, PMA 대조군 참조에 비하여, EPO 활성이 약 30% 감소하였고; 100uM MANS를 함유하는 시료는 약 65%로서, PMA 대조군 참조에 비하여 EPO 활성이 약 40% 감소하였다. 2시간이 경과한 시점에서, 대조군의 EPO 활성을 100%로 하였을 때, PMA 대조군 참조는 약 145%이었고; 10uM MANS를 포함하는 시료는 약 130%로서 PMA 대조군 참조에 비하여, EPO 활성이 약 10% 감소하였으며; 50uM MANS를 함유하는 시료는 약 70%로서 PMA 대조군 참조에 비하여 EPO 활성이 약 50% 감소하였으며; 100uM MANS를 함유하는 시료는 약 72%로서 PMA 대조군 참조에 비하여 EPO 활성이 약 50% 감소하였다. 그러므로, 1시간 및 2시간이 경과한 시점에서 모두, 50uM 또는 100uM MANS는 EPO 분비를 크게 감쇄시켰다. RNS 펩티드는 시험한 시간대 또는 농도에서 PMA에 의한 EPO 분비의 증가에 영향을 주지 않았다. 하기 표에 기재된 데이터는 50uM 시험 펩티드와 100nM PMA를 가하고 2시간 동안 방치시킨 결과를 나타낸다.

<266> U937 세포로부터 리소자임 분비의 억제

<267> U937 세포에 의한 리소자임 분비는 배양 후 1시간에 PMA 자극에 의해 증가하였고 2시간에 더 증가하였다. 1시간대에서, 대조군의 U937 세포에 의한 리소자임 분비를 100%로 하였을 때, PMA 대조군 참조는 약 210%이었고; 10uM MANS를 함유하는 시료에서 약 170%로서 PMA 대조군 참조에 비하여 U927세포에 의한 리소자임 분비가 약 20% 감소하였으며; 50uM MANS를 함유하는 시료에서 약 170%로서 PMA 대조군 참조에 비하여 U937 세포에 의한 리소자임 분비가 약 20% 감소하였고; 100uM MANS를 함유하는 시료에서 약 115%로서 PMA 대조군 참조에 비하여 U937 세포에 의한 리소자임 분비가 약 45% 감소하였으며; 2시간대에서, 대조군의 U937 세포에 의한 리소자임 분비를 100%로 하였을 때, PMA 대조군 참조는 약 240%이었고; 10uM MANS를 함유하는 시료에서 약 195%로서 PMA 대조군 참조에 비하여 U937 세포에 의한 리소자임 분비는 약 20% 감소하였으며; 50uM MANS를 포함하는 시료에서 약 185%로서 PMA 대조군 참조에 비하여 U937 세포에 의한 리소자임 분비가 약 25% 감소하였고; 100uM MANS를 포함하는 시료에서 약 140%로서 PMA 대조군 참조에 비하여 U937 세포에 의한 리소자임 분비가 약 40% 감소하였다. 그러므로, 리소자임 분비는 100uM MANS에 의해 자극한 후 1시간대와 2시간대에서 크게 감쇄하였고, 50uM 또는 10uM MANS에 의해서는 큰 감소가 없었다. RNS 펩티드는 시험한 모든 시간대 또는 농도에서 PMA에 의한 EPO 분비의 증가에 영향을 주지 않았다. 하기 표에 기재된 데이터는 50uM 시험 펩티드와 100nM PMA를 가하고 2시간 동안 방치시킨 결과를 나타낸다.

<268> NK-92 세포로부터 그랜자임(granzyme) 분비의 억제

<269> 그랜자임 분비 연구를 위하여, 림프구 자연 살상세포주 NK-92가 이용되었다(참조: Gong JH, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line(NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8: 652-658, 1994; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 10: 369-383, 2001; Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J. Immunol. Methods* 104: 183-190, 1987).

<270> 자연 살상세포의 그랜자임 분비 측정: NK-92 세포로부터 분비된 그랜자임은 기본적으로 상술한 바(참조: Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J. Immunol. Methods* 104: 183-190, 1987)와 같이 Na-벤질옥시카보닐-L-리신티오벤질 에스테르(Na-benzyloxycarbonyl-L-lysine thiobenzyl ester, BLT, EMD Bioscience, Inc.)의 가수분해를 측정함으로써 분석하였다. 50ul의 상등액을 96 웰(well) 플레이트에 분주하고, 상등액에 PBS(phosphate buffered saline)에 용해시킨 0.2mM BLT 용액과 0.22mM DTNB(Sigma-Aldrich Co.) 용액 150ul를 가하였다. 상온에서 30분간 반응시킨 다음, 410nm에서의 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 triton X-100으로 파쇄한 같은 수의 세포에서 얻은 양을 이용하여, 전체 세포 효소 함량의 백분율로서 나타내었다.

<271> NK-92 세포로부터의 표준 그랜자임은 정량에 사용할 수 없기 때문에, 그랜자임의 분비된양 및 세포내(파쇄된 세포로부터) 양을 측정하고, 각각에 대해 전체(세포내 및 분비된)의 백분율로서 분비된 그랜자임을 표현내었다. NK-92세포로부터의 세포내 그랜자임을 측정하기 위하여, 0.1% triton X-100으로 파쇄한 세포의 적절한 분

주(aliquot)를 상술한 바와 같이 효소의 정량에 사용하였다. 모든 데이터는 배양물 간의 변이(variability)를 최소화하기 위하여, 대조군의 백분율로서 나타내었다. 하기 표에 제시된 데이터는 시험 펩티드의 50uM 농도와 100nM PMA와 2시간 반응시킨 것을 나타낸다.

<272> **세포독성(cytotoxicity)**

<273> LDH 유지/분비(retention/release)에 의하여 분석한 바와 같이(결과는 나타내지 않음), 세포에서 독성반응을 일으키지 않았다(참조: Park J-A, He F, Martin LD, Li Y, Alder KB. Human neutrophil elastase induces hypersecretion of mucin mechanism. Am J Pathol 2005; 167: 651-661) .

<274> 예비 실험에서, 하기 표에 제시된 펩티드들은 사람의 호중구로부터의 MPO, HL-60 클론 15 세포로부터의 EPO, U937 세포로부터의 리소자임, NK-92 세포로부터의 그랜자임의 분비에 대한 각각의 억제 백분율을 나타내는데, 이때 MA-는 펩티드의 알파-N-말단 위치에서의 미리스토일 치환기의 존재를 나타내고; Ac-는 펩티드의 알파-N-말단 위치에서 아세틸 치환기의 존재를 나타내며; H는 펩티드에 부착된 기가 존재하지 않음을 나타내고; NH₂는 C-말단 위치에서 아미드가 존재함을 나타낸다. 억제 데이터(inhibition data)의 평균값을 여러번의 실험으로부터 도출하였다. pH 6.5의 0.5N 식염수에서 펩티드의 용해도를 하기 표 3에 mg/ml로 나타내었다. 미리스토일기로부터 N-말단 화학적 부위의 교환은 수용성 배지에서의 본 명세서에 개시된 펩티드의 용해도의 변화를 야기할 수 있다. 예를 들어, 미리스토일기를 아세틸기로 바꾸면, 표 3에서와 같이 수용해도(aqueous solubility)가 증가하였다.

표 3

<275> 대표적인 펩티드 및 치환된 펩티드의 용해도

서열 번호	N ⁻¹	아미노산 서열	C ⁻²	억제 백분율(% Inhibition)				용해도 ³
				EPO	리소자임	MPO	그랜자임	
219	Ac	AKGE		87.6	7.2			>200
45	Ac	AKGAAAERPGEAAVA		72.3	34.3			
37	Ac	GAQFSKTAAKGEAAAE		56.6	8.4			
239	Ac	GAQFSKTAAGE		55.8	37.2			>50
248	Ac	GAQFSKTAATAA		55.2	28.3			>100
91	Ac	AAAERPGEAAVA		51.2	29.5			
11	Ac	GAQFSKTAAKGAAAERPGE		48.8	0.0			
79	Ac	GAQFSKTAAKGE		46.7	43.3			>100
153	Ac	RPGEAAVA		45.8	0.0			
219	Ac	AKGE	NH ₂	45.6	26.8			>200
93	Ac	AQFSKTAAKGE	NH ₂	42.8	51.8			>90
141	Ac	SKTAAKGE	NH ₂	42.2	0			>200
241	Ac	GAQFSKTAAKGA		40.9	24.1			>50
143	Ac	TAAKGEEA		40.4	0.5			>230
251	Ac	AAGE		39.1	36.9			>200
106	Ac	GAQFSKTAAK		35.7	41.2	25.3		>100
249	Ac	GAQFSATAAA		35.7	3.2			<10
1	Ac	GAQFSKTAAKGAAAERPGE AAVA		33.7	39.8			>250
121	Ac	GAQFSKTAA		33.3	28.9			>20
106	Ac	GAQFSKTAAK(all d)		26.9	8.9	40.0		>100
124	Ac	FSKTAAKGE	NH ₂	25.3	56.7			>100
79	Ac	GAQFSKTAAKGE	NH ₂	24.7	38.6	26.5		>60
108	Ac	QFSKTAAKGE	NH ₂	15.7	60.7			>150
179	Ac	AAKGEEA		10.6	9.2			>150

159	Ac	KTAACKGE	NH ₂	0	24.3			>200
137	Ac	GAQFSKTA		0	0			>200
79	H	GAQFSKTAACKGE				27.9		>60
1	MA	GAQFSKTAACKGEAAAERPGE AAVA		46.1	40.8	31.2	76.0	<5.0
106	MA	GAQFSKTAACK		37.4	56.6			>10
11	MA	GAQFSKTAACKGEAAAERPGE		33.6	99			
179	MA	AAKGEA		31.4	28.6			<1.0
37	MA	GAQFSKTAACKGEAAAEE		30.3	99			>2.0
79	MA	GAQFSKTAACKGE		25.2	85.2	43.2		>2.0
91	MA	AAAERPGEAAVA		21.6	98			<20
45	MA	AKGEAAAERPGEAAVA		18.1	98			>80
153	MA	RPGEAAVA		0	99			
15	MA	SKTAAKGEAAAERPGEAAVA		0	99			>80
143	MA	TAAKGEAA		0	80.2			<1.0
219	MA	AKGE		0	28.6			<1.0
232	MA	GTAPAAEGAGAIEVKRASAEA KQAF		0	0	0	29.5	>15
234	MA	GAQFSKTKAKGE				65.2		>3.0

<276> ¹N- = N-말단기

<277> ²C- = C-말단기

<278> ³0.5N 식염수, pH 6.5

<279> 실시예 2

<280> **실험실 조건에서의 MANS 및 관련 펩티드에 의한 지질다당(LPS)-유도 염증의 억제**

<281> 본 실시예는 기본적으로 콕스 지.(Cox, G), 크로스리 제이.(Crossley, J.), 싱 지(Xing, Z)가 기술한 방법에 따라 수행되었다; Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo; Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 12:232-237, 1995; Hirano S., Quantitative time-course profiles of bronchoalveolar lavage cells following intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice, Ind. Health 35: 353-358, 1997; and Ulrich TR, Watson LR, Yin SM, Guo KZ, Wang P, Thang H, and del Castillo, J. Am. J. Pathol. 138:1485-1496, 1991.

<282> 그리하여, 15 내지 20g의 6 내지 7주령 CD1 암컷 마우스를 찰스 리버 레보러터리즈(Charles River Laboratories)에서 입수하여, 케이지당 5마리의 그룹으로 사육하였다. 동물에 대하여 표준 마우스 식이요법 (standard rodent diet)을 실시하고, 여과된 물을 자유로이 공급하였다. NIH 지침에 따라, 동물들을 표준온도 (64 내지 79°F)와 30% 내지 70%의 상대습도에서 사육하였다.

<283> 각 5마리로 구성된 마우스의 5개의 처리구를 PBS(phosphate buffered saline)에 이어 PBS, PBS에 이어 LPS, (미리스토일화) MANS 펩티드에 이어 LPS, 서열번호 1의 아세틸화 펩티드에 이어 LPS, 또는 서열번호 106의 아세틸화 펩티드에 이어 LPS의 어느 한가지로 투여하였다.

<284> 비강내 펩티드 점적 주입 전처리: 생체조건에서 LPS에 의한 폐 염증을 억제 또는 감소시키는 지를 평가하기 위하여, 본 발명의 펩티드를 PBS에 1mM의 농도로 용해시켰다. 0.8% 이소플로란(isofluorane)을 흡입시켜 마취시킨 동물을 LPS로 점적하기 전에, 2 x 10ul 펩티드 용액을 비강내 하나의 콧구멍에 30분간 일시투여하여 전처리 하였다.

<285> 비강간 LPS 점적 주입: 세포내 독소인 LPS(Escherichia coli Serotype 011: B4 derived endotoxin; Sigma, St Louis, MO; see Sigma product information sheet L4130 titled Lipopolysaccharides from Escherichia coli 011:B4)는 2500ug/ml 농도로 PBS에 용해시켰다. 세포내 독소에 동물을 노출시키기 위해, 2500ug/ml 세포내 독소 용액의 비강간 큰 환약 10ul을 0.8% 이소플로란을 흡입시켜 마취된 동물에 투여하였다. 10ul 큰 환약은 하

나의 콧구멍에만 투여하였다. 동물들에 대하여 세포내 독소 흡입에 따른 힘든 호흡, 무기력 및 수분/음식 섭취의 감소 등을 관찰하였다.

<286> 폐포세척(bronchoalveolar lavage, BAL): 최종 흡입 후 6시간이 되면, 동물들은 마취하여(90mg/kg Nembutal) 방혈을 통해 죽였다. 폐는 순차적으로 PBS 1ml 분주를 이용하여 2회 세척하였다. 모은 BAL 체액은 원심분리하여 이후의 산출 및 차이 분석을 위해 세포를 제거하였다. 회수한 BAL 체액은 전체 단백질, MPO (myeloperoxidase), LDH 및 헤모글로빈의 분석에 사용하였다.

<287> 분석: COBAS Fara 분석기(COBAS FARA II automated analyzer; Roche Diagnostic Systems Inc., Montclair, NJ)를 이용하여, BAL 체액의 분주를 즉시 LDH, 전체 단백질 또는 헤모글로빈의 양을 측정하는데 사용하였다. 차후의 마우스 특이적인 ELISA 분석(Cell Sciences, Inc., Canton, Mass)을 이용한 MPO 정량을 위하여, BAL 체액의 분주를 -80℃의 온도조건에서 냉동시켰다. BAL 데이터들은 대조군과 실험군 사이의 차이를 측정하는 표준화 기술을 이용하여 분석하였다. 시험 펩티드에 의한 염증의 억제 또는 감소 결과들을 하기 표에 개시하였다.

표 4

<288> MANS 펩티드인 MA-GAQFSKTAAKGAAAERPGEAAVA, 서열번호 1가 존재할 경우 염증 표지의 평균값

처리구	전체 세포수	전체 호중구수	전체 세포 중 호중구의 백분율 (%)	MPO (ng/ml)	전체 단백질 (ug/ml)	LDH (units/L)	Hb (g/dl)
PBS/PBS n=5	157,020	29,317	18.7	3.28	125.60	68.20	0.00
PBS/LPS n=5	264,200	110,061	41.7	28.98	272.40	60.40	0.19
MANS/LPS n=7	208,457	64,481	30.9	9.49	175.00	68.57	0.05

표 5

<289> MANS 펩티드인 Ac-GAQFSKTAAKGAAAERPGEAAVA, 서열번호 1의 N-말단 아세틸화 유사체가 존재할 경우 염증 표지들의 평균값

처리구	전체 세포수	전체 호중구 수	전체 세포 중 호중구의 백분율 (%)	MPO (ng/ml)	전체 단백질 (ug/ml)	LDH (units/L)	Hb (g/dL)
PBS/PBS n=5	89,440	19,770	22.1	5.45	230.6	84.0	0.00
PBS/LPS n=5	251,360	164,578	65.5	37.90	153.4	89.9	0.01
Ac-SEQ ID NO.: 1/LPS n=5	254,400	105,499	41.47	30.79	182.75	74.5	0.01

표 6

<290> 아세틸화 펩티드 Ac-GAQFSKTAAK, 서열번호 106이 존재할 경우 염증 표지들의 평균값

처리구	전체 세포수	전체 호중구 수	전체 세포 중 호중구의 백분율 (%)	MPO (ng/ml)	전체 단백질 (ug/ml)	LDH (units/L)	Hb (g/dL)
PBS/PBS n=5	312,620	66,521	21.3	4.88	113.8	61.80	0.00

PBS/LPS n=5	327,680	80,077	24.4	7.19	116.4	78.20	0.00
Ac-SEQ ID NO.:106/LPS n=5	305,688	9,170	3.0	1.50	131.0	106.86	0.00

표 7

<291> PBS/LPS 처리에 대한 상대적인 MANS 펩티드(myr-서열번호 1), 시험 펩티드(Ac-GAQFSKTAAKGAAAERPGEAAVA) 서열번호 1 및 Ac-GAQFSKTAAK, 서열번호 106에 의한 염증 표지의 억제

처리구	호중구 이동억제	MPO 억제
MANS/LPS	41.4%	67.2%
SEQ ID NO:1 /LPS	35.9%	18.75%
Ac-SEQ ID NO.106/LPS	88.5%	79.1%

<292> PBS/PBS는 오직 PBS 대조군만을 투여하였고, 화학주성(chemotactic) 호중구 이동을 증가시키기 위해 LPS 세포내 독소를 첨가하지 않았음을 표시하였다; PBS/LPS는 chemotactic 호중구 이동을 촉진하기 위해 LPS (세포내 독소)를 첨가한 것을 표시하였다; MANS/LPS는 PBS로 용해시킨 MANS 펩티드를 전처리하고 호중구 이동을 유발하는 LPS 촉진을 실시하였음을 표시하였다. LPS 처리한 그룹의 전체 세포 수에서 호중구의 비율은 MANS 펩티드 처리에 의해 41.7%에서 30.9%로 감소하였다; 서열번호 1 Ac-GAQFSKTAAKGAAAERPGEAAVA 펩티드에 의해 65.5%에서 41.47%로 감소하였다; 서열번호 106 Ac-GAQFSKTAAK 펩티드에 의해 24.4%에서 3.0%로 감소하였다. LPS 처리한 그룹에서 측정된 MPO의 양은 MANS 펩티드 처리에 의해 28.98ng/ml에서 9.49ng/ml로 감소하였다; 아세틸화된 서열번호 1 펩티드 처리에 의해 37.9ng/ml에서 30.79ng/ml로 감소하였고 아세틸화된 서열번호 106 펩티드 처리에 의해 7.19ng/ml에서 1.50ng/ml로 감소하였다

<293> 실시예 3

<294> 오존-유도 COPD의 마우스 모델

<295> 오존과 같은 화합물 자극제(chemical irritant)에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)는 널리 잘 알려진 만성 폐색성 호흡기 질환(COPD, chronic obstructive respiratory disease)의 특징이다. Repine JE, Bast A, Lankhorst I, and the Oxidative Stress Study Group, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156: 341-357, 1997; and also Harkema JR and Hotchkiss JA, Toxicology Letters, 68: 251-263, 1993를 참조하라.

<296> 10주령된 Balb/C 암컷 마우스를 찰스 리버 레보러터리에서 입수하여, 케이지당 5마리의 그룹으로 NIH 지침에 따라 사육하였다. 동물에 대하여 표준 마우스 식이요법을 실시하고, 여과된 물을 자유로이 공급하였다. 케타민(Ketamine, 100mg/kg)과 자일라진(Xylazine, 20mg/kg)을 각 그룹 별로 5마리씩 3개의 처리구의 마우스 복강내 주사하여 마취시키고, 각각 PBS 25ul 또는 PBS에 용해시킨 MANS 펩티드 1.0mM, 또는 PBS에 용해시킨 아세틸화된 서열번호 106에 나온 아세틸화 MANS 단편 펩티드 Ac-GAQFSKTAAK를 기관내 투여(intratracheal administration)하여 전처리하였다. 30분 후에, 동물들을 오존 또는 강제적인 대기노출을 위해 적절한 환경의 챔버로 이동하였다. 동물들을 오존에 2 시간(Haddad et al, 1995 에서 기술한 방법을 약간 수정한 1-10ppm의 오존농도에(참조: Haddad E-B, Salmon M, Sun J, Liu S, Das A, Adcock I, Barnes PJ, and chung KF, FEBS Letters, 363:285-288, 1995) 동안 노출시켰다. 오존은 CzoneLab, Burton, British Columbia, Canada에서 구입한 오존 발생장치 모델 OL80F/B를 이용하여 만들었다. 오존농도는 Teledyne Photometric O3 Analyzer (model 400E, Teledyne Instruments, City of Industry, CA)를 이용하여 지속적으로 검사하였다. 전처리를 하지 않은 2개의 추가적인 그룹은 동일한 조건에서 오존에 노출시키거나 오존 처리구와 유사하지만 오존이 없는 대기에 노출시켰다. 노출 후에, 동물들을 과다출혈(exanguination)시켜 죽이고, 페를 1.0ml PBS 분주(aliquot)를 이용하여 계속하여 2회 세척하였다. 회수한 폐포 세척액(BAL(bronchoalveolar lavage) fluid)은 이후의 산출 및 다른 분석을 위해 원심분리하여 세포를 제거하였다. 회수한 세척액은 ELISA 시험(assay kits obtained from R&D Systems, Minneapolis, MN)을 통한 단백질 및 추가적인 IL-6, IFN-KC(마우스 IL-8 유사체) 분석에 사용하였다.

<297> PBS만을 처리한 대조군에 대한 호중구의 BAL 체액로의 이동억제 백분율을 처리구의 함수로서 이하의 표에 나타

내었다.

표 8

<298> MANS 펩티드 및 아세틸화된 서열번호 106의 펩티드 Ac-GAQFSKTAAK에 의한 오존-유도 호중구의 이동억제

처리구	BAL 체액로의 이동억제 백분율(%)
MANS + 오존	93.0
아세틸화된 서열번호 106의 펩티드 + 오존	81.2
PBS + 오존	비적용
강제 대기노출	비적용

<299> 기관내 주입(intratracheal injection) 전처리 및 이후의 오존처리의 함수로서, BAL 체액 중의 IL-6 농도를 다음과 같이 구하였다: MANS 펩티드를 전처리하고 오존에 노출시킨 마우스 그룹, 약 364.5pg/ml; 아세틸화 MANS-단편-펩티드 Ac-GAQFSKTAAK(서열번호 106)으로 전처리하고 오존에 노출시킨 마우스 그룹, 약 130.4pg/ml; PBS로 전처리하고 오존에 노출시킨 마우스 그룹, 약 1,041.3pg/ml; 전처리없이 대기 중에 곧바로 노출시킨 마우스 그룹, 약 43.2pg/ml.

<300> 기관내 주입 전처리 및 이후의 오존노출의 함수로서, BAL 체액 중의 KC 농도를 다음과 같이 구하였다: MANS 펩티드로 전처리하고 오존에 노출시킨 마우스 그룹, 약 183.6pg/ml; 아세틸화 MANS-단편 펩티드 Ac-GAQFSKTAAK(서열번호 106)으로 전처리하고 오존에 노출시킨 마우스 그룹, 약 159.7pg/ml; PBS로 전처리하고 오존에 노출시킨 마우스 그룹, 약 466.6pg/ml; 전처리없이 대기 중에 곧바로 노출시킨 마우스 그룹, 약 36.3pg/ml.

<301> 기관내 주입 전처리 및 이후의 오존처리의 함수로서, BAL 체액의 IFN 농도를 다음과 같이 구하였다: MANS 펩티드로 전처리하고 오존에 노출시킨 마우스 그룹, 약 7.4pg/ml; 아세틸화 MANS-단편 펩티드 Ac-GAQFSKTAAK(서열번호 106)으로 전처리하고 오존에 노출시킨 마우스 그룹, 약 3.6pg/ml; PBS로 전처리하고 오존에 노출시킨 마우스 그룹, 약 8.6pg/ml; 전처리없이 대기 중에 곧바로 노출시킨 마우스 그룹, 약 5.0pg/ml.

<302> 마우스에 오존을 투여하면, BAL 체액에서의 IL-6와 KC의 양 뿐만 아니라 침윤성(infiltrated) 호중구 수를 유의적으로 증가시킨다. PBS로 전처리한 마우스의 대조구와의 비교를 위하여, MANS 펩티드를 전처리한 그룹, 및 아세틸화 펩티드, Ac-GAQFSKTAAK 아세틸화된 서열번호 106 로 전처리한 그룹을 비교하였다. 각 그룹은 오존에 노출된 후, BAL 체액의 호중구의 침윤이 감소하는 것을 보여 주었다(예를 들면, PBS 대조구에 비하여, 각각 93%, 0% 및 81%, 0%). 마찬가지로, MANS 펩티드 및 아세틸화 펩티드인 아세틸화된 서열번호 106 또한 오존노출 후에 KC 농도 (예를 들면, PBS 대조구에 비하여, 65.8% ± 10% 및 71.3% ± 10%) 및 IL-6 양 (예를 들면, PBS 대조구에 비하여, 67.8% ± 15%, MANS 펩티드 및 91.3% ± 15% 아세틸화된 서열번호 106)을 크게 감소시켰으나, 인터페론-γ의 양에는 거의 영향을 미치지 않았다. 결과를 종합하면, 이러한 데이터들은 MANS 펩티드와 아세틸화된 서열번호 106 펩티드는 선택적으로 키모카인 및 사이토카인을 감소시킬 뿐만 아니라, 오존-유발성 호중구의 대기 중으로의 이동을 크게 감소시키거나 억제한다는 것을 증명하고 있다. MANS 펩티드 또는 아세틸화된 펩티드 서열번호 106을 전처리한 동물로부터 얻은 BAL 체액에서의 IL-6 양은 PBS를 전처리한 그룹과 비교할 때 각각 68%와 91%의 억제효과를 나타내었다. 또한, MANS 펩티드 또는 아세틸화된 펩티드 서열번호 106으로 전처리한 동물로부터 얻은 BAL 체액에서의 KC 양은 PBS를 전처리한 그룹과 비교하면, 약 65%와 71%의 억제효과를 나타내었다.

<303> 실시예 4

<304> 만성 기관지염 모델

<305> Voynow JA, Fischer BM, Malarkey DE, Burch LH, Wong T, Longphre M, Ho SB, Foster WM, Neutrophil Elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 287: L1293-L1302, 2004 에 기재된 방법에 따라, 마우스에서 만성 기관지염 모델을 개발하였다. 특히, 만성 기관지염의 대표적인 병리적 특징인 기도 상피(goblet) 세포의 과형성(hyperplasia)은 기도로 주입되는 사람의 호중구 엘라스타제(NE, neutrophil elastase)에 대한 마우스의 만성 노출에 의해 유발되었다.

<306> 사람의 NE를 수컷 Balb/c 마우스의 기관내로 흡입시켰다. 총 30마리의 마우스(중량 약 25-30g)를 Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME와 같은 공급업체로부터 상업적으로 입수하였다. 마우스를 12시간의 주행성 주기(diurnal cycle)로 유지시키고, 음식과 물을 자율적으로 공급하였다. 동물들은 1일, 4일 및 7일에 구인두 흡

인(oropharyngeal aspiration)에 의해 NE를 흡입하였다. 이소플로란(Isoflurane, IsoFlo from Abbott Laboratories and Open-Circuit Gas Anesthesia System from Stoelting)으로 흡입 마취한 직후, 동물들을 60° 경사진 판 위에 윗니(upper incisor)를 이용하여 매달고, 사람의 NE[50ug (43.75units)/40ul PBS (Elstina Products, Owensville, MO)의 액체를 구인두의 원위부까지 연장시킨 동물의 혀를 이용하여 전달하였다. 연장된 혀로 인하여, 동물은 삼킬 수 없고, 액체는 기도로 흡입된다.

<307> 마지막 NE 노출 후 7일 째에, 만성 기관지염에서 기도를 만드는 기도 상피세포의 과형성이 최고조에 이르면(참조 Voynow et al, 2004), 마우스(그룹 별 5마리)에 50ul PBS(대조군), 또는 PBS에 용해시킨 100uM MANS 펩티드 용액, RNS 펩티드 용액 또는 아세틸화된 펩티드 서열번호 106와 같은 펩티드 용액을 기관 내로 흡입시켰다. 15분 경과후에, 점액 분비가 3분동안 약 60mM로 메타콜린(methacholine)을 투여하는 세분무(fine aerosol)를 제공하는 Buxco system Nebulizer를 이용하여, 메타콜린을 투여함으로써 개시되었다. 메타콜린 투여 후 15분에, 마우스를 100% CO₂ 기체에 흡입 노출시켜서 죽였다.

<308> 조직화학. 상술한 바와 같이 노출시키고, 동물의 폐를 혈액을 제거하기 위해 세척한 다음, 식염수에 1/2로 희석한 OCT(Optimum Cutting Temperature) 배지(Sakura Finetck, Torrence, CA)를 이용하여 부풀게 하였다. 허파를 4°C에서 PBS 중의 10% 포름알데히드 용액에 하룻밤 동안 침지시키고, 파라핀 밀랍으로 만들었다. 예를 들면, Singer M, Vargafing BB, Martin LD, Park JJ, Gruber AD, Li Y, Adler KB, A MARCKS-related peptide blocks mucus hypersecretion in a murine model of asthma., Nature Medicine 10:193-196, 2004에 기술한 바와 같이, 파라핀 왁스의 5um 단편을 기도의 점액 염색을 위하여 Periodic acid Schiff/haematoxylin으로 처리하였다.

<309> 조직학적 점액 지표(mucin index). 조직학적 점액 지표(참조: Whittaker L, Niu N, Temann U-A, Stoddard A, Flavell RA, Ray A, Homer RJ, and Cohn L, Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9, Am. J. Respri. Cell Mol. Biol. 27: 593-602, 2002)를 중심부 및 주변 기도를 모두 포함하는 AB/PAS-염색 구획(section)에 대해 행하였다. 슬라이드는 10배 대물렌즈로 관찰하였고, 영상은 디지털 사진기를 이용하여 취하였다. 동물마다 최소한 네 가지의 대표적인 교차(cross)- 또는 화살모양으로(sagittally) 구획된 기도의 영상을 확보하였다. 기도의 온전한 경계선(complete circumference)는 가시화될 수 있고, 영상에 포함된 기도만을 분석하였다. 폐포에 직접적으로 개방된 기도는 포함시키지 않았다. 각 기도에서 영상화한 PAS-양성 염색의 정도는 다음의 5단계 등급(five-titer grading system)를 이용하여, 각각의 구획에 대하여 처리조건을 알지 못하는 시험자에 의해 결정한 반-정량적으로 결정하였다: 단계 0, PAS 염색이 없음; 단계 1, 25% 또는 그 이하의 기도 상피세포가 PAS 염색됨; 단계 2, 기도 상피 세포의 26-50%가 PAS 염색됨; 단계 3, 기도 상피세포의 51-75%가 PAS 염색됨; 단계 4, 기도 상피세포의 75% 이상이 PAS 염색됨. 이러한 등급은 각 그룹에 대하여 점액지표 값을 산출하기 위해 사용하였고, 그 결과들은 평균 ± 평균오차로 나타내었다.

<310> 모든 결과들은 평균값 ± 평균오차(n = 5 동물, 각각에 대하여 10 내지 20 구획)로 나타내었다. 유의 수준은 SPSS 6.1 소프트웨어를 이용하여, Scheffe's test가 수반되는 one way ANOVA를 실시하여 산출하였다(*=p<0.05인 역치값(threshold)을 가지는 데이터들 간의 유의성).

<311> 실시예 5

<312>

<313> **생체조건에서의 분석**

<314> 이하에 개시된 실험의 목적은 RNS와 같은 대조군 펩티드와 비교하여, 염증 시 국부적인 점적 주입 또는 정맥 주사에 의하여, 본 발명에서의 펩티드를 생체조건에서 전달한 후, 염증에 대한 효과를 증명하기 위한 것이다. 두 가지 모델이 이러한 입증에 유용하였다: (i) 마우스 공기 주머니(air pouch) 염증 모델 (ii) 마우스 티오글리콜레이트(thioglycollate) 유발성 복막염(peritonitis) 모델. 두 가지 모델은 호중구가 중요한 역할을 하는 염증의 잘 만들어진 모델들이다. 공기 주머니 모델은 단시간(약 4시간)의 염증에 대한 펩티드의 효과를 입증하고, 복막염 모델은 좀 더 장시간(약 24시간)의 염증에 대하여 유용하였다.

<315> **전반적인 실험 설계:**

<316> 네 가지 연구, 각 모델에 대하여 두 가지, 펩티드의 정맥 전달을 시험하는 한 가지와 펩티드의 국부적 전달을 시험하는 한 가지가 본 실시예에 개시된 펩티드의 효과를 연구하는데 유용하다. 각각의 연구는 염증을 일으키

지 않은 대조군(운반체를 처리)과 염증을 일으킨 그룹(즉, 염증 자극제를 처리한)의 두 가지 실험 그룹으로 구성되었다. 각 그룹은 5가지로 나누고, 선택적으로, 하위 그룹에 대하여 n = 6으로 하여 6가지 처리구로 나누었다. 처리구들은, 예를 들어, 다음과 같다: 운반체, MANS, RNS, 시험 펩티드, 선택적으로 뒤섞인 서열(scrambled sequence)이 "펩티드-SCR"라 불리는 시험 펩티드의 뒤섞인 서열을 가지는 펩티드, 및 텍사메타손이다. 텍사메타손은 참고 항-염증제 역할을 한다. 정맥 또는 국부 점적주입을 위한 적절한 투여량은 예비 투여량 반응실험으로 결정하였다. 사람의 호중구에서의 MANS 펩티드의 억제 활성화에 기초한 시험적인 투여량(tentative dose)은, 1회 정맥투여시 1 mg/kg, 또는 국부(공기 주머니 또는 피하) 전달되는 최종농도 50 μ M이다. 정맥투여량은 21/kg의 분배 부피를 가정하여 결정하였다.

<317> 공기 주머니 염증 모델:

<318> 마우스 공기 주머니에서의 호중구 침윤 및 염증에 대한 시험들은 [Ish CB, O'Brien JA, Gronert K, Stahl GL, Petasis NA, Serhan CN. Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jul 6; 96 (14): 8247-52] 개시된 방법에 따라 행하였다. 그리하여, 흰색의 수컷 BALB/c 마우스(6-8주령)는 이소플루란으로 마취하고, 등의 공기 주머니(dorsal air pouch)는 0일 및 3일에 멸균한 대기 3ml을 피하주사하여 만들었다. 6일째에 마우스를 이소플루란으로 마취하는 동안, 운반체, MANS, RNS, 시험 펩티드, 또는 선택적인 펩티드-SCR을 멸균한 0.9% 식염수 100ul로 꼬리 정맥에 대하여 일시주입하거나, 900ul의 PBS +/- 공기 주머니(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without magnesium or calcium ions, BioWhittaker)을 이용하여 국부적으로 주입하여 전달하였다. 멸균한 0.9% 식염수 100ul에 0.1mg/kg으로 정맥투여하거나, PBS +/- 900ul에 10ug으로 국부투여한 텍사메타손(Sigma)은 참고적인 항-염증제 역할을 하였다. 공기 주머니의 염증은 100ul 멸균 PBS에 용해시킨 재조합 마우스 종양 괴사인자- α (TNF- α 20ng) (Boehringer Mannheim)의 국부주입에 의해 유발되었다. 마우스를 이소플루란으로 마취하는 동안, 공기 주머니를 최초의 TNF- α 주입 4시간 후에 멸균한 PBS 3ml로 두 번 세척하였다. 흡인물들은 23 $^{\circ}$ C에서, 2000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 세포들은 500ul PBS에서 현탁하였다. 상등액 분주들은 염증 매개물질 농도(선택적으로, TNF- α 를 제외), MPO 활성화 및 지방의 산화에 대한 검사를 실시하였다.

<319> 전체 백혈구는 세포 현탁액에서 광학 현미경을 이용하여 혈구계로 계수하였다. 재현탁시킨 흡인 세포들(50ul)를 150ul의 30% BSA에 가하고, 현미경 슬라이드 위로 사이토퉀즈(cytofuge)를 이용하여 4분동안 2,200rpm으로 원심분리하였다. 감별 백혈구(differentail leukocyte)를 라이트 김자(Wright Giemsa) 염색한 사이토스핀에서 계수하고, 공기 주머니 삼출물 당 각 백혈구의 절대수를 산출하는데 이용하였다. 현미경 분석을 위해, 조직을 6-mm 조직 생체검사 펀치(6-mm tissue biopsy punch, Acu-Punch, Acuderm)를 이용하여 수득하고, 10% 완충 포름알데히드에 고정시켰다. 그런 다음, 시료를 파라핀에 매립하고, 세절하여 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin)으로 염색하였다. 호중구들은 고배율 시야(tissue high power field) 당 세포의 수를 산출함으로써, 조직학적 구획에서 계수하였다. 멀리 떨어진 진피(distant dermis)는 염증 유발한 공기 주머니 진피에 대한 대조군 역할을 하였다.

<320> 테이타는 삼출물(exudate) 당 호중구, 단핵세포, 호산구, 호염기구 및 림프구의 전체 개수 또는 조직의 고배율 시야 당 호중구의 개수로 나타내었다. 수치들은 평균값 \pm 표준편차(n=6)로 나타내었다. 이동에 대한 처리의 유의성은 ANOVA에 의하여 결정하였다. P<0.05는 유의한 값으로 고려된다.

<321> 실시예 6

<322> 염증을 일으킨 복막염 모델:

<323> 수컷 BALB/c 마우스(6-8주령)를 사용하고, 다음 방법에 따라 티오글리콜레이트-유도(thioglycollate-induced) 복막염(peritonitis) 모델을 실시하였다(참조: Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. J Exp Med. 1995 Jun 1; 181(6): 2259-64). 운반체(vehicle), MANS, RNS, 시험 펩티드 및 선택적으로 펩티드-SCR를 0.9% 멸균 식염수에 용해시켜 꼬리 정맥에 일시주사(bolus injection) 투여하거나, 티오글리콜레이트의 정맥주사 전에 복막에 900ul PBS +/-를 국부적으로 투여하여 전달하였다. 0.9% 멸균 식염수에 0.1mg/kg으로 용해시켜 정맥으로 전달되거나, 또는 900ul PBS +/-에 10ug을 용해시켜 국부적으로 전달되는 텍사메타손(dexamethasone)은 참조 항-염증제(reference anti-inflammatory agent) 역할을 하였다. 염증은 마우스에 대하여 복막 내로 1ml의 티오글리콜레이트 용액(3% wt/vol; Sigma Immunochemicals)을 주사하여 유발하였다. 마우스는 염증 유발 24시간 후에 5ml의 따뜻한 (37 $^{\circ}$ C ~ 배지(RPMI 1640, 2% FCS, 및 2mM EDTA)를 복막에 주입하고, 복부에 적당한 마사지해 줌으로

써 안락사시켰다. 복부 세척액(abdominal lavage fluid)의 흡인물(aspirate)을 23℃에서, 2000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 세포를 500ul PBS에 현탁시켰다. 상등액을 분주하고, MPO 활성, 염증 매개물질 농도 및 지방 산화를 조사하였다.

<324> 전체 백혈구는 광학 현미경과 혈구계를 이용하여 세포 현탁액 상태로 계수하였다. 재현탁된 흡인 세포(resuspended aspirate cell, 50ul)를 150ul의 30% BSA에 가하고, 현미경 슬라이드 위로 사이토포즈(cytofuge)를 이용하여 4분간 2200rpm으로 원심분리하였다. 감별 백혈구 수(differential leukocyte count)를 라이트 김자(Wright Giemsa) 염색된 사이토스핀(cytospin)에서 계수하고, 공기 주머니(air pouch) 삼출물 당 각 백혈구의 절대수를 산출하는데 이용하였다.

<325> 데이터는 삼출물(exudate)에 대한 전체 호중구, 단핵세포, 호산구, 호염기구 및 림프구 수로 나타내었다. 수치들은 평균값 ± 표준편차(n=6)로 나타내었다. 이들에 대한 모든 처리의 유의성은 ANOVA를 이용하여 결정하였다. P<0.05는 유의성이 있는 것으로 고려된다.

<326> **탈과립화:**

<327> 탈과립화의 지표로서 미엘로퍼옥시다제를 사용하였다. 공기 주머니 또는 복막(peritoneum) 세척액(lavage fluid)로부터 수득한 세포 상등액의 미엘로퍼옥시다제 활성을 조사하여 상술한 바와 같이 TMB 방법을 이용하여 분석하였다.

<328> **염증 매개물질 농도:**

<329> 공기 주머니와 복막 세척액의 주요 전-염증 매개물질 TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-6, KC 및 PGE2의 농도는 제조자의 지침에 따라, 통상적인 ELISA 키트(R&D Systems)를 이용하여 결정하였다.

<330> **지질 과산화 작용:**

<331> F2-이소프로스탄(F2-isoprostane)의 농도는 호중구와 다른 세포들로부터 활성 산소 중간체들의 분비에 의한 결과인 산화적 손상에 대하여 민감하고 특이적인 측정수단이 된다(참조: Milne GL, Musiek ES, Morrow JD. F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. Biomarkers. 2005 Nov; 10 Suppl 1: S10-23). F2-이소프로스탄의 농도는 제조자의 지침에 따라, 상업적으로 입수가능한 ELISA(8-Isoprostane EIA, Cayman Chemical)를 이용하여 공기 주머니와 복막 삼출물 상등액에서 측정한다.

<332> **결론:**

<333> 본 실험은 시험 펩티드의 국부 또는 전신적인 운반이 하나 또는 그 이상의 염증 매개물질의 분비 억제 측정을 통하여 염증을 감소시킨다면 성공적이라 할 수 있다.

<334> 본 발명의 활성화 단편 펩티드는 염증을 일으킨 공기 주머니 또는 복막으로의 호중구 유입 및 탈과립화를 억제함으로써, MPO 활성, 지질 과산화 작용 및 염증 매개물질 생산을 감소시킨다.

<335> 상술한 실시예들은 본 발명을 기술하기 위한 것으로, 이에 제한되는 것으로 이해되서는 아니될 것이다. 본 발명은 거기에 포함된 권리들의 균등물들과 더불어, 이하의 특허청구범위에 의해 정의된다.

도면의 간단한 설명

<130> 도 1A 내지 1B는 PKC-의존성 인산화(phosphorylation)에 의하여 원형질막으로부터 세포질로 MARCKS를 분비하는 것을 보여준다.

<131> 도 2A 내지 2C는 PKG가 PP2A를 활성화시켜서 MARCKS의 탈인산화(dephosphorylation)를 유도하는 것을 보여준다.

<132> 도 3은 PP2A가 뮤신 분비경로의 주요한 요소임을 보여주는 막대 그래프를 도시한다.

<133> 도 4는 MARCKS가 세포질에서 액틴 및 미오신과 결합하고 있는 것을 보여주는 젤 사진이다.

<134> 도 5는 호중구에서 MPO 분비를 조절하는 신호전달 기작(signaling mechanism)을 도시한다.

<135> 도 6은 분리된 개과의(canine) 호중구로부터 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase)의 분비를 억제하는 MANS 펩티드의 활성을 보여주는 막대 그래프이다.

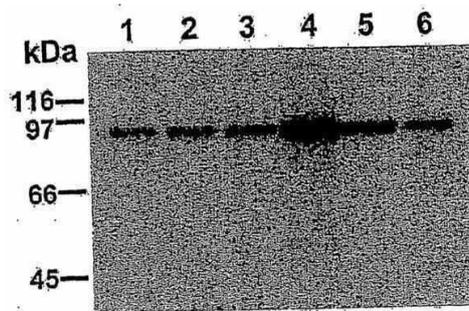
<136> 도 7은 분리된 사람 호중구로부터 미엘로퍼옥시다제의 분비를 억제하는 MANS 펩티드의 활성을 보여주는 막대 그

래프이다.

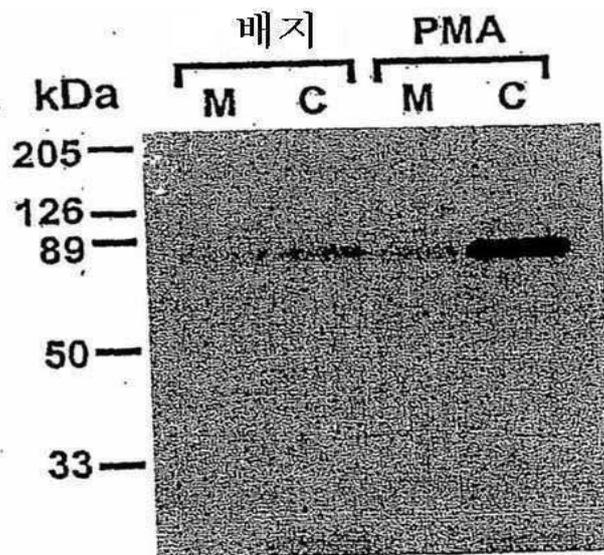
- <137> 도 8은 PMA가 8-Br-cGMP와의 동시자극(co-stimulation)에 의해 농도-의존적으로 증가되는 LPS-감작된 사람의 호중구로부터 MPO 분비가 소폭으로 증가시키는 것을 보여주는 막대 그래프이다.
- <138> 도 9는 8-Br-cGMP 자극이 PMA와의 동시자극이 농도-의존적으로 발생할 때까지 LPS-감작된 사람의 호중구로부터 MPO 분비에 거의 영향을 주지 않음을 보여주는 막대 그래프이다.
- <139> 도 10은 PMA가 8-Br-cGMP와의 동시자극에 의해 농도-의존적으로 증가하는 LPS-감작된 개과의 호중구의 MPO 분비를 소폭 증가시키는 것을 보여주는 막대 그래프이다.
- <140> 도 11은 8-Br-cGMP 자극이 PMA와의 동시자극이 농도-의존적으로 발생할 때까지 LPS-감작된 개과의 호중구로부터의 MPO 분비에 거의 영향을 주지 않는다는 것을 보여주는 막대 그래프이다.
- <141> 도 12는 PMA와 8-Br-cGMP의 동시자극이 LPS-감작된 개과의 호중구로부터 최대의 MPO 분비에 요구된다는 것을 보여주는 막대 그래프이다.

도면

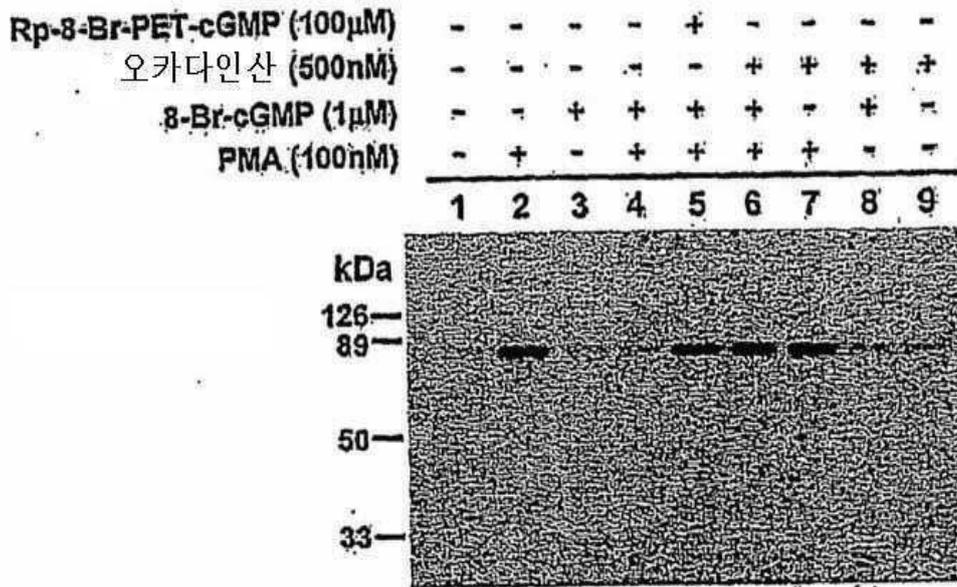
도면1a



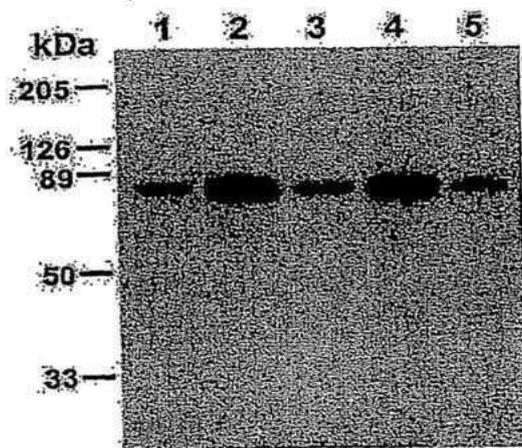
도면1b



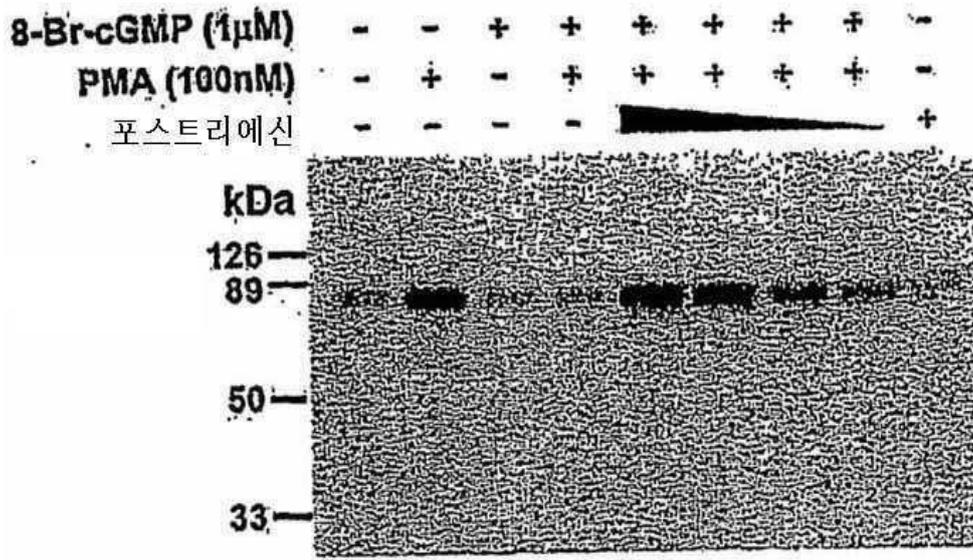
도면2a



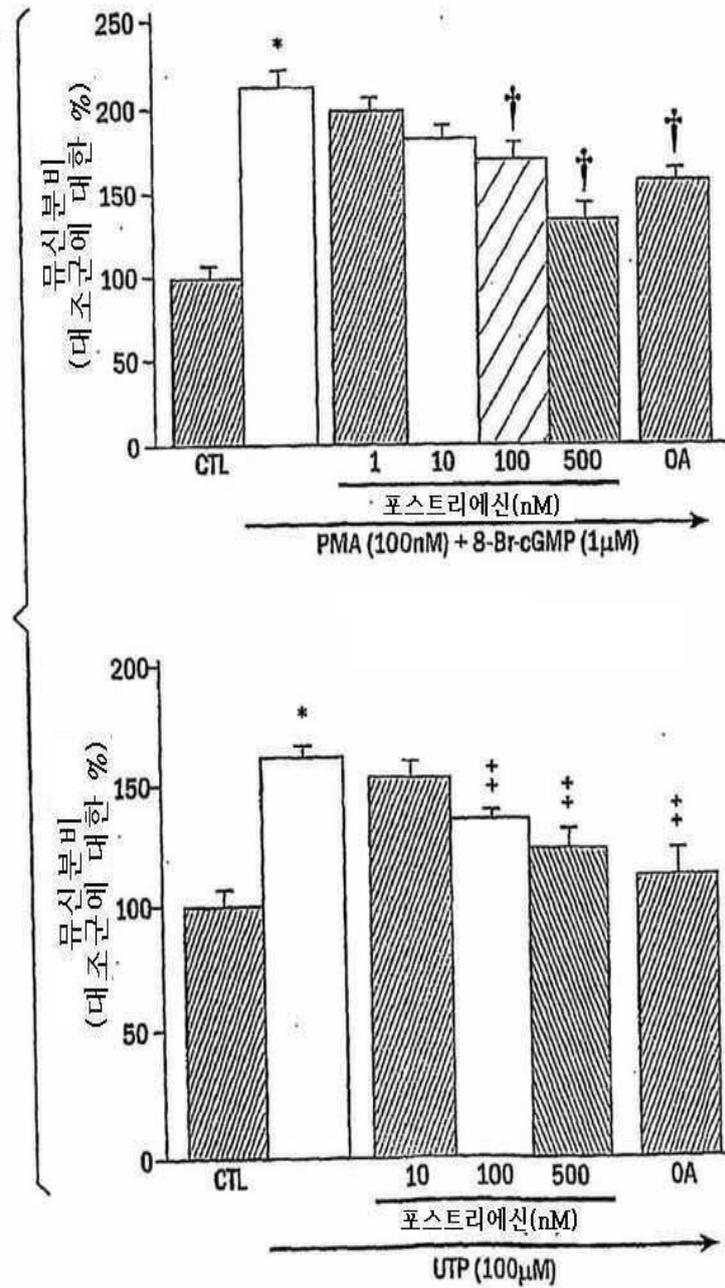
도면2b



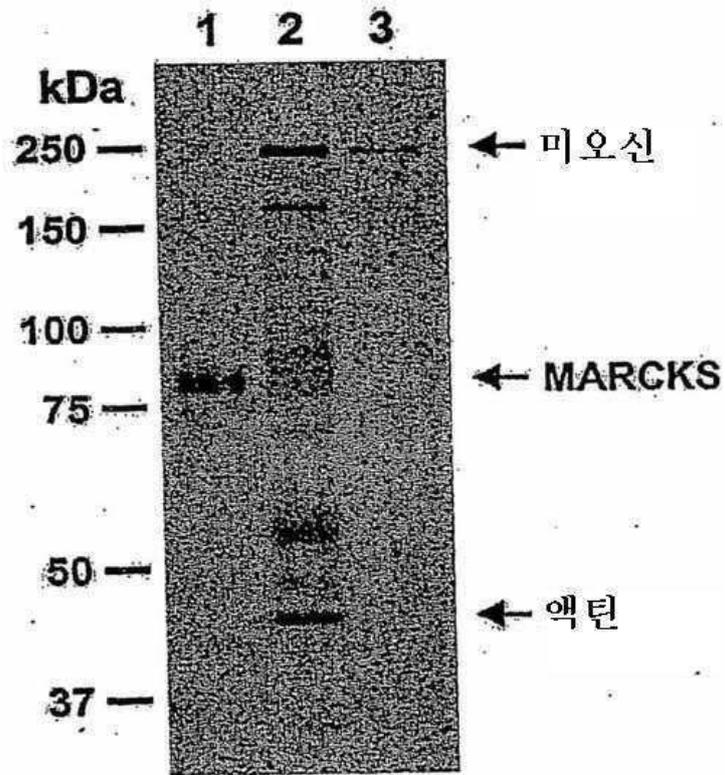
도면2c



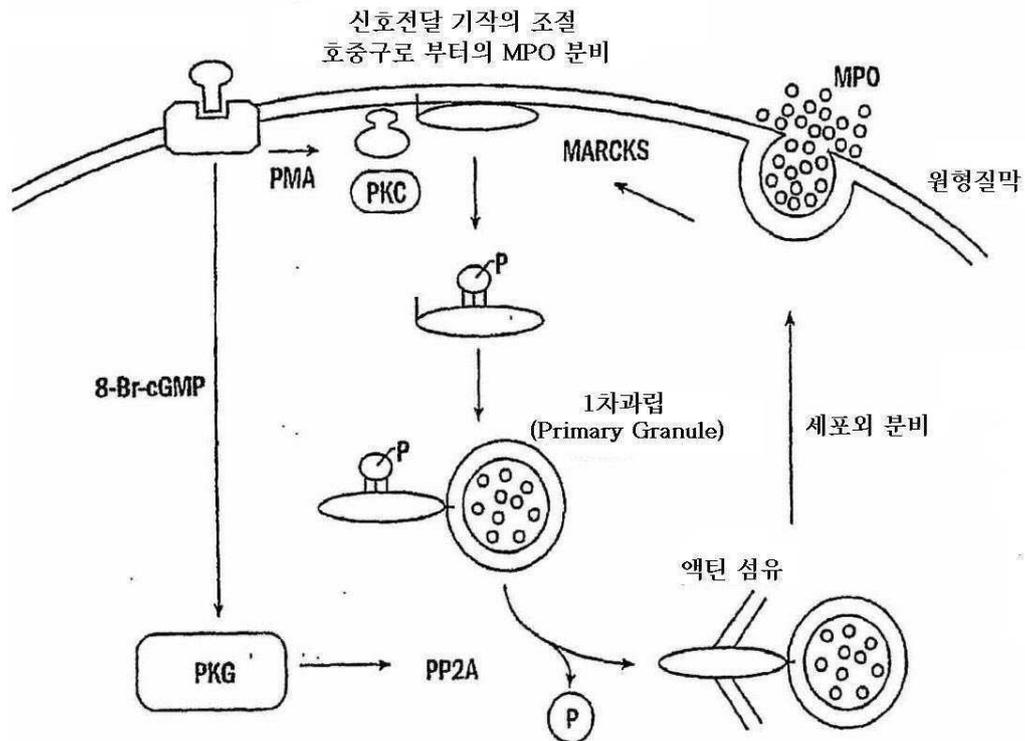
도면3



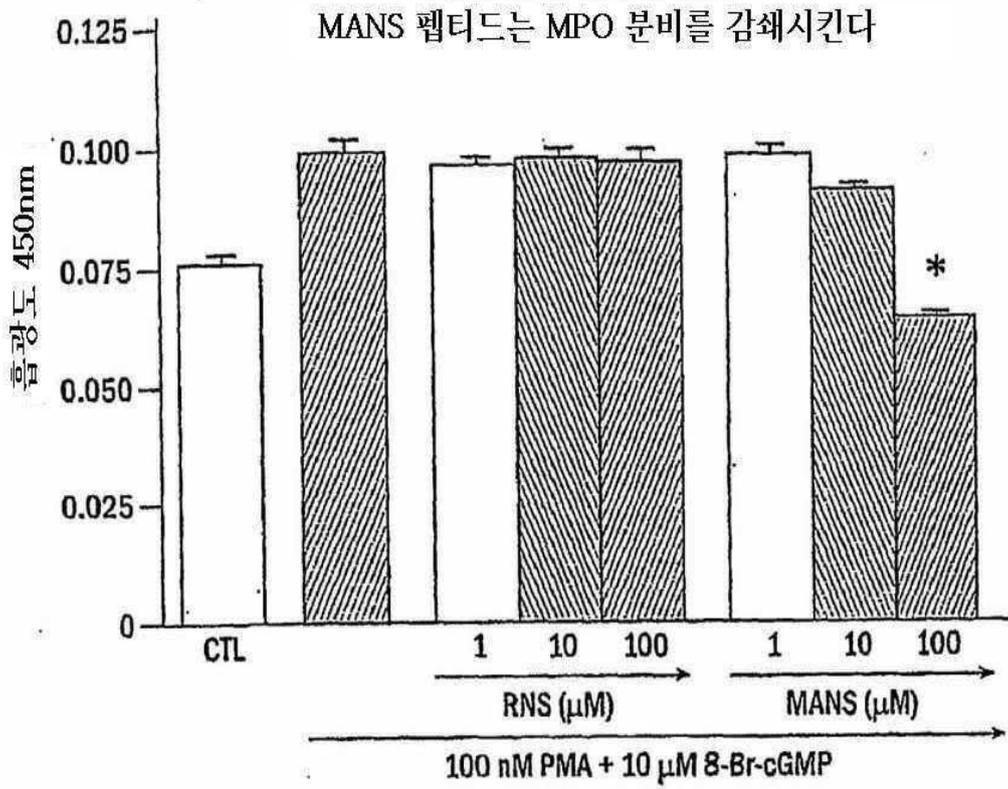
도면4



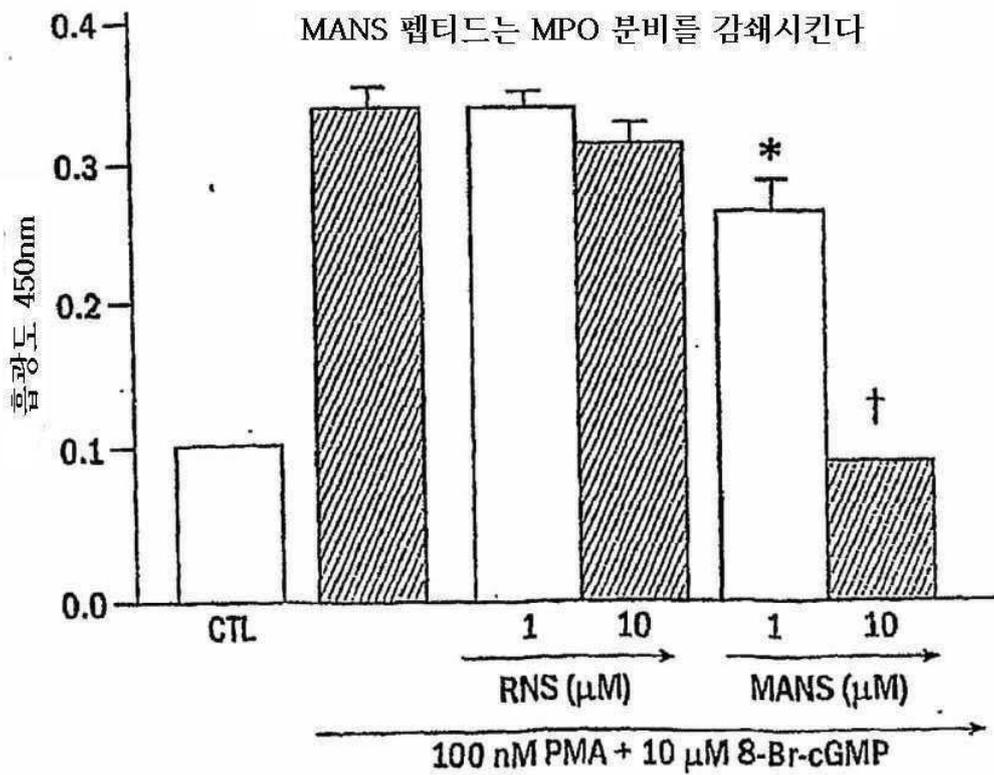
도면5



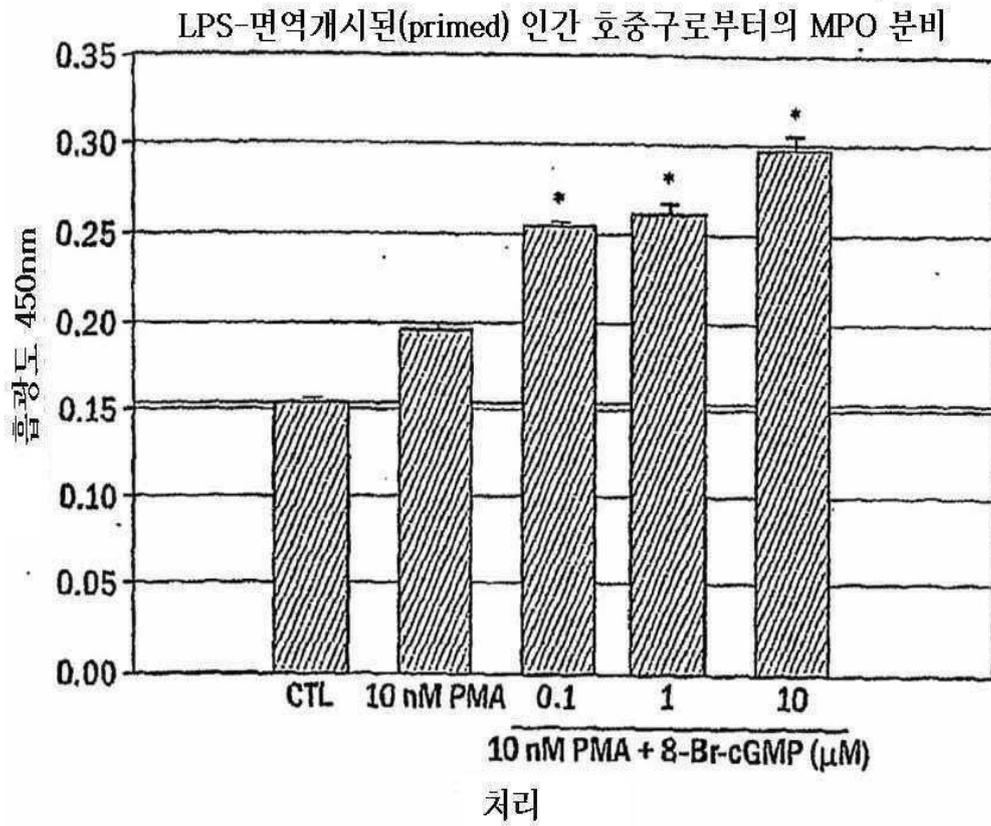
도면6



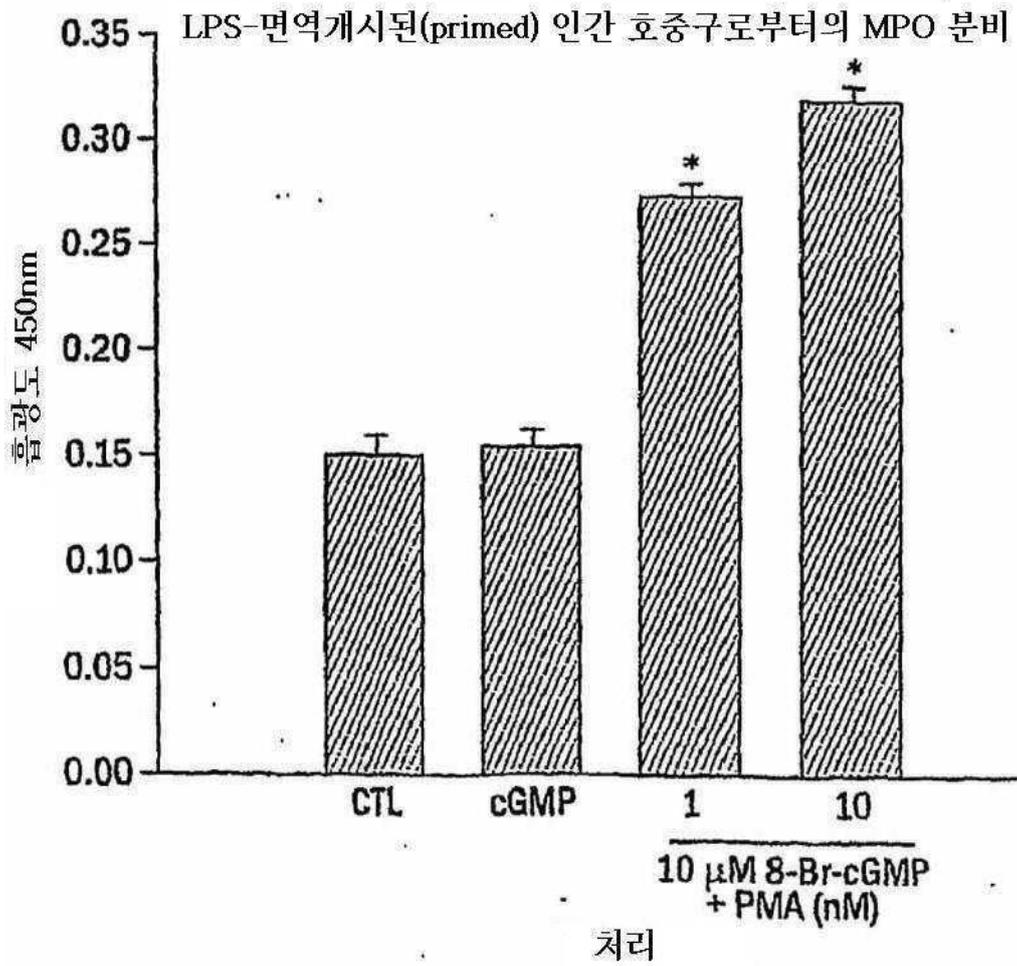
도면7



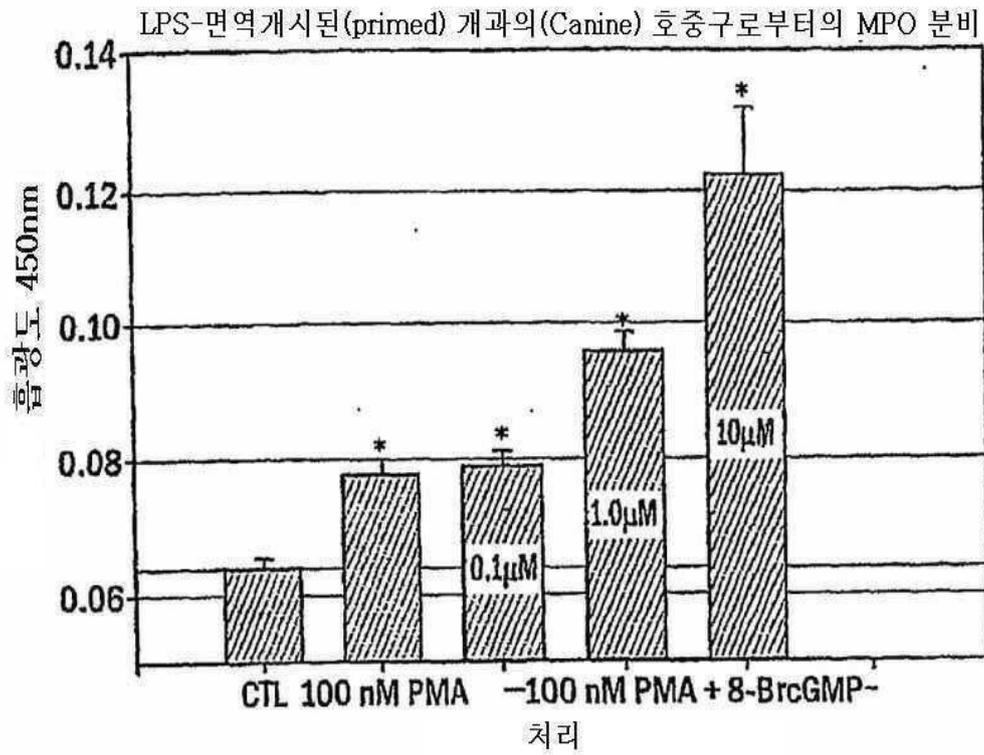
도면8



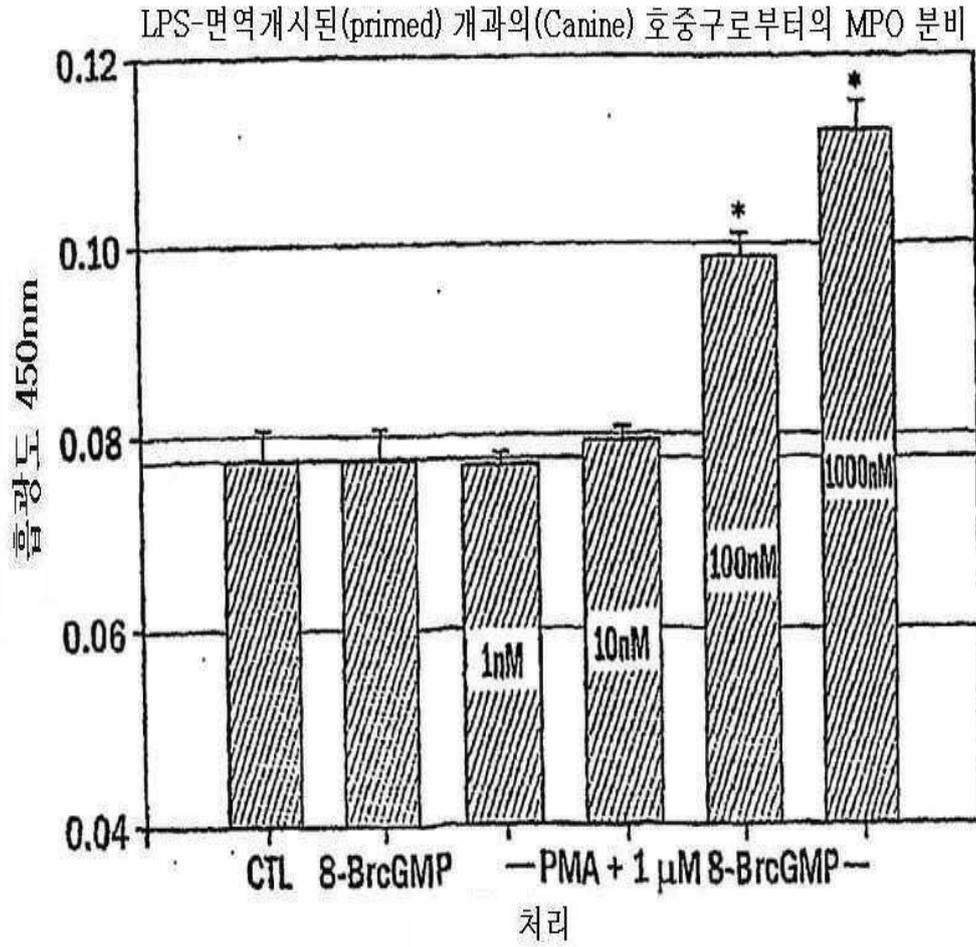
도면9



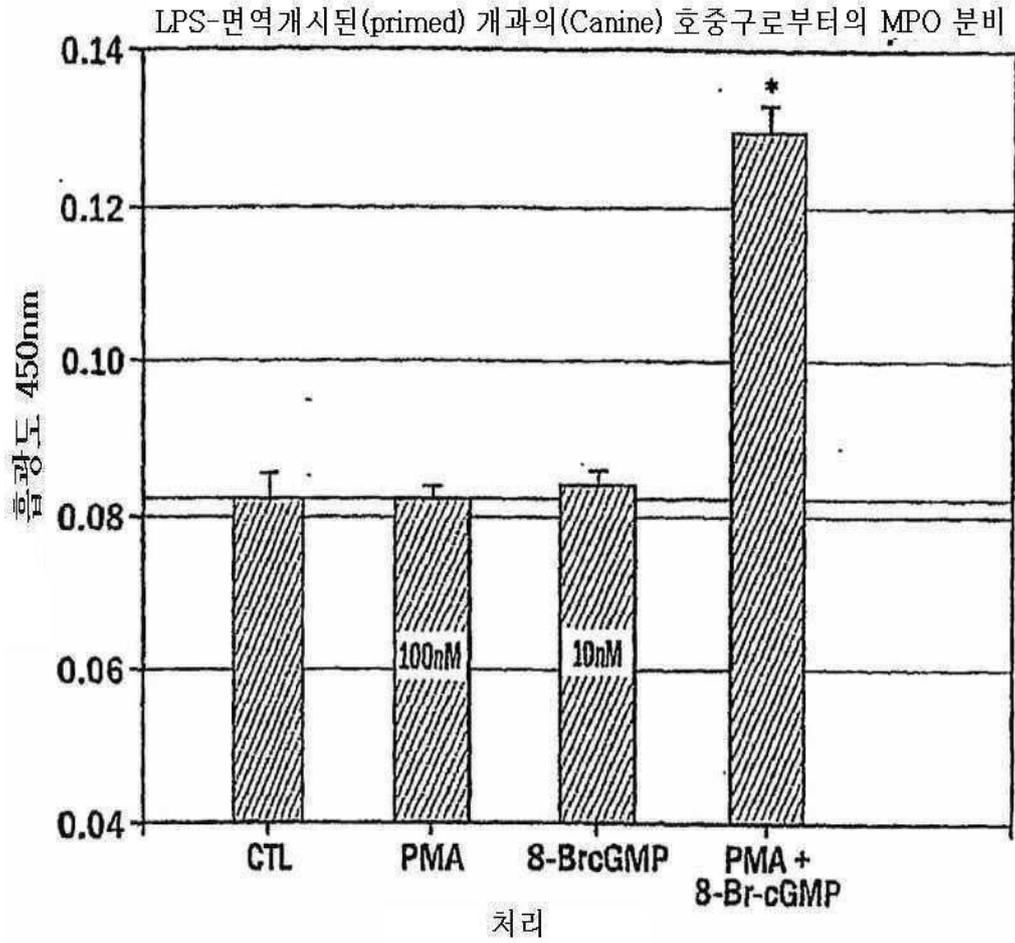
도면10



도면11



도면12



서열목록

- <110> BioMarck Pharmaceuticals, Ltd.
- <120> Methods for Attenuating Release of Inflammatory Mediators and Peptides Useful Therein

- <150> US 60/833,239
- <151> 2006-07-26

- <160> 252

- <170> KopatentIn 1.71

- <210> 1
- <211> 24
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 1

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 20

<210> 2

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 2

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 20

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 3

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 20

<210> 4
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 4
 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 20

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 5
 Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala Ala Val
 20

<210> 6
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 6
 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10 15

Gly Glu Ala Ala Val Ala
20

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 7
Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala
20

<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 8
Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala Ala
20

<210> 9
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 9

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10 15

Gly Glu Ala Ala Val
 20

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 10

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ala Ala Val Ala
 20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 11

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu
 20

<210> 12

<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 12
Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala
20

<210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 13
Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly Glu Ala Ala
20

<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 14
Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ala Ala Val
20

<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 15
Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ala Ala Val Ala
20

<210> 16
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 16
Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 17
Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly Glu

<210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 18
Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly Glu Ala

<210> 19
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 19
Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ala Ala

<210> 20
<211> 19
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 20

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ala Ala Val

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 21

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10 15

Ala Val Ala

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 22

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro

<210> 23
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 23
Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 24
Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly Glu

<210> 25
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 25
Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ala

<210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 26
Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ala Ala

<210> 27
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 27
Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10 15

Ala Val

<210> 28
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 28

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10 15

Val Ala

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 29

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 30

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 31
Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 32
Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

Glu

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 33

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ala

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 34
 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10 15

Ala

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 35
 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Val

<210> 36
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 36

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10 15

Ala

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 37

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 38

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

<210> 39

<211> 16

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 39
 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10 15

<210> 40
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 40
 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10 15

<210> 41
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 41
 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5 10 15

<210> 42
 <211> 16

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 42
 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10 15

<210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 43
 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 44
 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10 15

<210> 45
 <211> 16

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 45
 Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10 15

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 46
 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 47
 Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 48

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10 15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 49

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 50

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10 15

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 51

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5 10 15

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 52
 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10 15

<210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 53
 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10 15

<210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 54
 Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10 15

<210> 55

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 55
 Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10 15

<210> 56
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 56
 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

<210> 57
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 57
 Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 58
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 58
 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10

<210> 59
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 59
 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10

<210> 60
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 60
 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10

<210> 61
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 61
 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly

1 5 10

<210> 62
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 62
 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5 10

<210> 63
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 63
 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10

<210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 64
 Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

<210> 65
 <211> 14

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 65
 Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10

<210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 66
 Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 67
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 67
 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5 10

<210> 68
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 68
 Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

<210> 69
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 69
 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 70
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 70
 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10

<210> 71
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 71
 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg

1 5 10

<210> 72
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 72
 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10

<210> 73
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 73
 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10

<210> 74
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 74
 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5 10

<210> 75
 <211> 13

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 75
Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 76
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 76
Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 77
Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10

<210> 78
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 78

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 79

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 79

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5 10

<210> 80

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 80

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5 10

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 81

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala

1 5 10

<210> 82
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 82
 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 83
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 83
 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10

<210> 84
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 84
 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10

<210> 85
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 85
 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10

<210> 86
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 86
 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10

<210> 87
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 87
 Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5 10

<210> 88
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 88

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 89

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 90

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10

<210> 91

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 91

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala

1 5 10

<210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 92
 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
 1 5 10

<210> 93
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 93
 Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5 10

<210> 94
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 94
 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5 10

<210> 95
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 95
 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

<210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 96
 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 97
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 97
 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10

<210> 98
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 98

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 99

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 100

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 101

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu

1 5 10

<210> 102
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 102
 Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10

<210> 103
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 103
 Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

<210> 104
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 104
 Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10

<210> 105
 <211> 11

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 105
Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5 10

<210> 106
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 106
Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5 10

<210> 107
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 107
Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5 10

<210> 108
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 108
 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5 10

<210> 109
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 109
 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5 10

<210> 110
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 110
 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

<210> 111
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 111
 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 112
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 112
 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10

<210> 113
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 113
 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10

<210> 114
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 114
 Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10

<210> 115
 <211> 10

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 115
Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 116
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 116
Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10

<210> 117
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 117
Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 118
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 118

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

<210> 119

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 119

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10

<210> 120

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 120

Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 121

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala

1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 122
Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 123
Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 124
Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

<210> 125
<211> 9

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 125
Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 126
Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 127
Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 128
Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 129
Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 130
Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 131
Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly

1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 132
Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 133
Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 134
Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 135
<211> 9

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 135
Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 136
Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

<210> 137
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 137
Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

<210> 138
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 138
Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

<210> 139
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 139
Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 140
Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

<210> 141
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 141
Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu

1 5

<210> 142
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 142
 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5

<210> 143
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 143
 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5

<210> 144
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 144
 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5

<210> 145
 <211> 8

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 145
Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5

<210> 146
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 146
Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

<210> 147
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 147
Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

<210> 148
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 148

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

<210> 149

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 149

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 150

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 151

Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala

1 5

<210> 152
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 152
 Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5

<210> 153
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 153
 Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5

<210> 154
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 154
 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr
 1 5

<210> 155
 <211> 7

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 155
Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

<210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 156
Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

<210> 157
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 157
Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

<210> 158
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 158
Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 159
Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

<210> 160
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 160
Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

<210> 161
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 161
Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala

1 5

<210> 162
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 162
 Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5

<210> 163
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 163
 Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5

<210> 164
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 164
 Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5

<210> 165
 <211> 7

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 165
Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

<210> 166
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 166
Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

<210> 167
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 167
Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

<210> 168
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 168
Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 169
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 169
Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 170
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 170
Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5

<210> 171
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 171
Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala

1 5

<210> 172
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 172
 Gly Ala Gln Phe Ser Lys
 1 5

<210> 173
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 173
 Ala Gln Phe Ser Lys Thr
 1 5

<210> 174
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 174
 Gln Phe Ser Lys Thr Ala
 1 5

<210> 175
 <211> 6

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 175
Phe Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

<210> 176
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 176
Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

<210> 177
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 177
Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

<210> 178
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 178
Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

<210> 179
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 179
Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

<210> 180
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 180
Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 181
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 181
Lys Gly Glu Ala Ala Ala

1 5

<210> 182
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 182
 Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5

<210> 183
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 183
 Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5

<210> 184
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 184
 Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5

<210> 185
 <211> 6

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 185
Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

<210> 186
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 186
Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

<210> 187
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 187
Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 188
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 188
Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 189
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 189
Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5

<210> 190
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 190
Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

<210> 191
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 191
Gly Ala Gln Phe Ser

1 5

<210> 192
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 192
 Ala Gln Phe Ser Lys
 1 5

<210> 193
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 193
 Gln Phe Ser Lys Thr
 1 5

<210> 194
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 194
 Phe Ser Lys Thr Ala
 1 5

<210> 195
 <211> 5

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 195
Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

<210> 196
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 196
Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

<210> 197
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 197
Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

<210> 198
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 198
Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

<210> 199
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 199
Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

<210> 200
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 200
Lys Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 201
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 201
Gly Glu Ala Ala Ala

1 5

<210> 202
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 202
Glu Ala Ala Ala Glu
1 5

<210> 203
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 203
Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

<210> 204
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 204
Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

<210> 205
<211> 5

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 205
Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

<210> 206
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 206
Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

<210> 207
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 207
Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 208
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 208
Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 209
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 209
Gly Glu Ala Ala Val
1 5

<210> 210
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 210
Glu Ala Ala Val Ala
1 5

<210> 211
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 211
Gly Ala Gln Phe

1

<210> 212
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 212
Ala Gln Phe Ser
1

<210> 213
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 213
Gln Phe Ser Lys
1

<210> 214
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 214
Phe Ser Lys Thr
1

<210> 215
<211> 4

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 215
Ser Lys Thr Ala
1

<210> 216
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 216
Lys Thr Ala Ala
1

<210> 217
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 217
Thr Ala Ala Lys
1

<210> 218
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 218
Ala Ala Lys Gly
1

<210> 219
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 219
Ala Lys Gly Glu
1

<210> 220
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 220
Lys Gly Glu Ala
1

<210> 221
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 221
Gly Glu Ala Ala

1

<210> 222
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 222
Glu Ala Ala Ala
1

<210> 223
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 223
Ala Ala Ala Glu
1

<210> 224
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 224
Ala Ala Glu Arg
1

<210> 225
<211> 4

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 225
Ala Glu Arg Pro
1

<210> 226
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 226
Glu Arg Pro Gly
1

<210> 227
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 227
Arg Pro Gly Glu
1

<210> 228
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 228
Pro Gly Glu Ala
1

<210> 229
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 229
Gly Glu Ala Ala
1

<210> 230
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 230
Glu Ala Ala Val
1

<210> 231
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 231
Ala Ala Val Ala

1

<210> 232
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 232
 Gly Thr Ala Pro Ala Ala Glu Gly Ala Gly Ala Glu Val Lys Arg Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Glu Ala Lys Gln Ala Phe
 20

<210> 233
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 233
 Gly Lys Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5 10

<210> 234
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 234
 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Lys Ala Lys Gly Glu
 1 5 10

<210> 235
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 235
Gly Lys Gln Phe Ser Lys Thr Lys Ala Lys Gly Glu
1 5 10

<210> 236
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 236
Gly Ala Gln Ala Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5 10

<210> 237
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 237
Gly Ala Gln Ala Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5 10

<210> 238
<211> 12
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 238

Gly Ala Glu Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5 10

<210> 239

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 239

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Ala Gly Glu
1 5 10

<210> 240

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 240

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Ala Glu
1 5 10

<210> 241

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 241
Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Ala
1 5 10

<210> 242
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 242
Ala Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5 10

<210> 243
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 243
Gly Ala Ala Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5 10

<210> 244
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 244
Gly Ala Gln Phe Ala Lys Thr Ala Ala Lys

1 5 10

<210> 245
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 245
 Gly Ala Gln Phe Ser Ala Thr Ala Ala Lys
 1 5 10

<210> 246
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 246
 Lys Ala Ala Thr Lys Ser Phe Gln Ala Gly
 1 5 10

<210> 247
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 247
 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Ala Ala Ala Lys
 1 5 10

<210> 248
 <211> 10

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 248
Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 249
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 249
Gly Ala Gln Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 250
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 250
Gly Ala Gln Ala Ser Lys Thr Ala
1 5

<210> 251
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 251
Ala Ala Gly Glu
1

<210> 252
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 252
Gly Lys Ala Ser Gln Phe Ala Lys Thr Ala
1 5 10