

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 12월 22일 (22.12.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/204541 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 7/06 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/006419
- (22) 국제출원일: 2016년 6월 16일 (16.06.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0085331 2015년 6월 16일 (16.06.2015) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (Ewha University - Industry Collaboration Foundation) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이경림 (LEE, Kyunglim); 03168 서울시 종로구 경희궁길 57, 103동 1308호, Seoul (KR). 김미영 (KIM, Miyoung); 06547 서울시 서초구 반포대로 275, 103동 2201호, Seoul (KR). 맹지혜 (MAENG, Jee Hye); 06533 서울시 서초구 주흥1길, 25, 103동 201호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차, 8층, Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

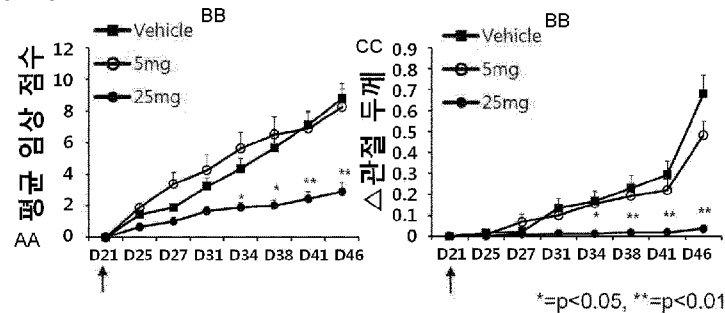
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PEPTIDES BINDING TO IGE-DEPENDENT HISTAMINE-RELEASING FACTOR (HRF) AND NOVEL USE OF NUCLEIC ACIDS ENCODING SAME

(54) 발명의 명칭 : IGE-의존적 히스타민 방출인자(HRF) 결합 펩타이드 및 그들을 코딩하는 핵산의 신규한 용도

[도9]



AA ... Average clinical score
BB ... Vehicle
CC ... Thickness of joint

(57) Abstract: The present invention relates to peptides binding to an IgE-dependent histamine-releasing factor (HRF), nucleic acids encoding the same, recombinant vectors, transformants, and medical uses thereof. The peptides of the present invention inhibit the secretion of histamine and the like in cells, thereby being effectively used in preventing or treating rheumatoid arthritis among diseases caused by immune responses. In addition, by using the peptides according to the present invention as leading compounds, several non-peptide inducers can be prepared.

(57) 요약서: 본 발명은 IgE-의존적 히스타민

[다음 쪽 계속]

WO 2016/204541 A1



방출인자(IgE-dependent histamine-releasing factor: HRF)에 결합하는 펩타이드, 이들을 코딩하는 핵산, 재조합 벡터 및 형질전환체 및 이들의 의학적 용도에 관한 것으로서, 본 발명의 펩타이드는 세포에서 히스타민 등의 분비를 저해하므로, 이를 면역작용에 의한 질환 중 류마티스 관절염의 예방 또는 치료에 효과적으로 이용할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 펩타이드를 선도물질로 하여 여러 비펩타이드(non-peptide) 유도물질을 제조할 수도 있다.

명세서

발명의 명칭: IGE-의존적 히스타민 방출인자(HRF) 결합 펩타이드 및 그들을 코딩하는 핵산의 신규한 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 IgE-의존적 히스타민 방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor: HRF) 결합 펩타이드 및 그들을 암호화하는 핵산의 신규한 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 혈액 속 면역 체계는 정교하게 작동하고 있다. 면역체계는 림프구와 면역 전달물질이 관여하는 매우 복잡한 체계이다. 그런데 최근 수십년 사이 외부 항원이 아닌 정상 세포를 적으로 오인해 공격하는 자가 면역 질환이 눈에 띄게 늘어나고 있다. 외부 항원에만 반응하고 자기 몸에 대해서는 반응하지 않아야 할 면역 반응 체계에 문제가 생긴 것이다. 이와 관련된 대표적인 질환이 류마티스 관절염이다.
- [4] 류마티스 관절염은 관절 활막의 지속적인 염증반응을 특징으로 하는 만성 염증성 전신질환이다. 활막의 지속적인 만성 염증반응으로 인하여 관절의 연골 손상, 골 미란(얇게 까지듯이 손상을 입는 것)이 일어나며, 결국은 관절의 파괴가 일어나 기능의 장애를 초래하는 것이 주요한 임상적 특징이다. 어느 연령에서도 발병할 수 있지만 35~50세 사이에 가장 흔하게 나타나며, 남녀 비율은 1:3 정도로 여성에서 더욱 많다. 이 질병의 경과를 경한 소수 관절염부터 심한 기능적 장애를 수반하는 진행성 다기관 침범의 형태까지 매우 다양하다. 또한 질병 발생 10년 정도 경과 후에는 환자의 50%에서 일상생활에 장애를 갖게 된다.
- [5] 류마티스 관절염은 자가면역질환의 하나로 림프구가 우리 몸의 일부인 활막을 공격하여 일어나는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 면역은 외부에서 침입하는 미생물 등으로부터 우리 몸을 보호하는 기능을 말하며 면역에서 림프구는 중요한 역할을 하는데, 림프구가 우리 몸의 일부를 외부에서 침입하는 이물로 잘못 인식할 경우 여러 가지 질환이 생기게 되는데, 이를 자가면역질환이라고 한다. 류마티스 관절염은 이러한 자가면역질환의 하나로 분류된다.
- [6] 류마티스 관절염이 발생하면, 림프구는 활막의 여러 세포들을 자극하고 그 과정에서 염증을 일으키는 여러 사이토카인이 생성된다. 이러한 사이토카인에는 종양괴사인자와 인터루킨-1(IL-1)이 대표적인데, 이들은 관절과 관절 주위의 뼈를 파괴하며, 피로감, 발열, 식욕감퇴, 체중감소 등의 전신적인 증세의 원인이 된다.
- [7]
- [8] 한편, 알러지는 유전적으로 알러젠(allergen)에 대해 과민하게 IgE를

생성하거나, IgE의 분비를 증가시키는 인터루킨-4(IL-4)와 IgE의 분비를 감소시키는 γ -인터페론(γ -interferon)간의 균형이 파괴된 것으로부터 기인한다고 알려져 있다. 일단 알러젠에 노출되면, 즉시 반응(immediate reaction)이 일어나고, 염증에 관련된 여러 세포들이 모이게 되며, 수 시간 후에는 호염기구(basophil), 호산구(eosinophil)와 림프구(lymphocyte)로부터 분비되는 히스타민에 의해 후기 반응(late-phase reaction, LPR)이 일어나게 된다. LPR에서는 호염기구로부터 히스타민이 분비되는데 MCP-3, MCP-1 또는 RANTES와 같은 사이토카인(cytokine)이 히스타민 분비를 유도하는 것으로 알려져 있었으나, IgE-의존적 LPR에서는 "IgE-dependent histamine releasing factor(HRF)"라고 불리는 물질이 호염기구에서 히스타민을 분비시켜 다양한 알러지 반응을 일으킬 수 있음이 밝혀졌다(MacDonald et al., 1995).

- [9] TCTP(translationally controlled tumor protein)가 호염기구(basophil)의 히스타민 등 방출을 유도하여 후기 알레르기 반응을 유발한다고 알려져 있으나(MacDonald et al., *Science*, 269, 688-690, 1995) 그 기전 등은 명확하지 않고, HRF가 특이한 세포막 수용체에 결합하여 작용함을 제시하였으나, 아직 HRF의 구체적인 작용에 대해서는 밝혀진 바가 없다(Bheekha-Escura et al., *Blood*, 96, 2191-2198, 2000).
- [10] 이에, 본 발명자들은 TCTP 이량체가 IgE-의존성 히스타민 방출인자(HRF)임을 확인하였고, 세포 외로 분비된 HRF가 호염기구 세포 내에서 히스타민 등의 분비를 촉진하는 작용기전도 규명하였다. 이러한 연구결과들을 바탕으로, HRF에 결합하는 펩타이드가 류마티스 관절염을 예방 또는 치료할 수 있을 것이라는 사실에 착안하였다. 그에 따라, 도데카머 및 헵타머 파아지 디스플레이 라이브러리(12mer and 7mer phage display library)를 검색하여 HRF에 결합하는 펩타이드를 연구하던 중, 특정 서열을 갖는 펩타이드가 염증성 사이토카인과 히스타민 분비 저해율이 탁월함을 확인하고, 류마티스 관절염 모델에서 in vivo 실험을 한 결과 류마티스 관절염에 대한 예방 및 치료 효과가 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명의 목적은 TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein) 이량체형(dimer) IgE-의존성 히스타민 방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor: HRF)에 결합하는 특정 펩타이드, 이들을 코딩하는 핵산, 이에 대한 재조합 벡터 및 형질전환체를 류마티스 관절염 예방 및 치료용도로 사용하기 위함에 있다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 7개의 아미노산으로 구성되는 펩타이드로서, 첫 번째 아미노산은 A, L 및 W로 구성된 군으로부터 선택되며, 두 번째 아미노산은 V, Y, E 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, 세 번째 아미노산은 T, V, F 및 A로 구성된 군으로부터 선택되며, 네 번째 아미노산은 Y, P 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, 다섯 번째 아미노산은 P, G 및 K로 구성된 군으로부터 선택되며, 여섯 번째 아미노산은 A, L, S 및 W로 구성된 군으로부터 선택되고, 일곱 번째 아미노산은 A, P 및 M로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 이의 유사체를 암호화하는 핵산을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 핵산을 포함하는 제조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 제조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [18] 아울러, 본 발명은
- [19] 1) 피검개체로부터 분리된 시료로부터 TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein) 단백질의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- [20] 2) 상기 단계 1)의 TCTP 단백질의 발현 또는 활성이 정상 대조군에 비해 증가한 경우, 류마티스 관절염 질환을 갖거나 류마티스 관절염 질환을 가질 위험성이 있는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 류마티스 관절염 질환 진단의 정보를 제공하기 위한 TCTP 단백질의 검출 방법을 제공한다.
- [21]
- [22] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [23]
- [24] 본 발명은 7개의 아미노산으로 구성되는 펩타이드로서, 첫 번째 아미노산은 A, L 및 W로 구성된 군으로부터 선택되며, 두 번째 아미노산은 V, Y, E 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, 세 번째 아미노산은 T, V, F 및 A로 구성된 군으로부터 선택되며, 네 번째 아미노산은 Y, P 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, 다섯 번째 아미노산은 P, G 및 K로 구성된 군으로부터 선택되며, 여섯 번째 아미노산은 A, L, S 및 W로 구성된 군으로부터 선택되고, 일곱 번째 아미노산은 A, P 및 M로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 것이 바람직하다.

- [25] 또한, 상기 펩타이드의 첫 번째 아미노산은 A 또는 W로부터 선택되고, 두 번째 아미노산은 Y 또는 A로부터 선택되며, 세 번째 아미노산은 V 또는 A로부터 선택되고, 네 번째 아미노산은 Y 또는 A로부터 선택되며, 다섯 번째 아미노산은 P 또는 K로부터 선택되고, 여섯 번째 아미노산은 S 또는 A로부터 선택되며, 일곱 번째 아미노산은 M 또는 A로부터 선택되는 일련의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드인 것일 수 있으며, 서열번호 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하다.
- [26] 또한, 상기 펩타이드는 첫 번째 아미노산이 W이고, 일곱 번째 아미노산이 M인 일련의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드인 것이 더욱 바람직하고, 서열번호 2, 5, 6, 7 및 8로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드일 수 있다.
- [27] 상기 펩타이드는 L-, D-, 또는 L- 및 D-아미노산으로 구성된 펩타이드일 수 있고, 하나 이상의 변형 아미노산을 포함하는 펩타이드일 수 있으며, 상기 변형 아미노산은 아미노산 유도체 또는 알킬화된 아미노산인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [28] 본 발명자는 TCTP 즉 IgE-의존성 히스타민방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor, HRF)가 HRF에 대한 수용체에 결합하여 히스타민 등 분비를 유도함을 확인하고 류마티스 관절염 환자의 관절낭에서 TCTP가 다량 발견됨을 확인한 바, HRF에 결합하는 7mer 펩타이드를 제작(서열번호 1 내지 10)하고 HRF와 반응시킨 뒤 히스타민 분비 정도를 확인한 결과 히스타민 분비가 유의적으로 저해됨을 규명하여 본 발명의 7mer 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물의 류마티스 관절염 치료 및 예방 등에 사용될 수 있음을 확인하였다(도 7 참조).
- [29] 또한, 마우스를 이용하여 류마티스 관절염 유도 모델을 만들고 본 발명의 7mer 펩타이드를 처리한 결과 증상의 예방 및 치료 효과가 있음을 확인하였다(도 9 및 도 10 참조).
- [30]
- [31] 본 발명자는 상기 펩타이드를 파아지 디스플레이 라이브러리 스크리닝을 통해 얻고 합성 펩타이드로 다시 확인하였다. 본 발명의 펩타이드는 화학적으로 합성되거나 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 펩타이드를 구성하는 도메인을 생체내에 존재하는 단백질이나 그 일부로부터 제조할 수 있다. 또 다른 방법으로, 본 발명의 펩타이드는 그를 코딩하는 염기 서열을 갖는 DNA가 삽입된 발현 벡터를 이용하는 재조합 DNA 기술로 제조될 수 있다. 상기 벡터는 생체내에 존재하도록 제조되며, 샘브룩(Sambrook) 등(Molecular Cloning, 1989, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press)의 방법에 따라 적당한 숙주세포로 형질전환되고 적당한 조건하에서 발현되도록 제조된다. 또한, 본 발명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질을 이용하여 본 발명의 펩타이드를 제조할 수도 있다.

- [32] 따라서, 본 발명을 통해 상기 펩타이드 또는 이의 유사체를 암호화하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 재조합 벡터 또는 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물도 제공할 수 있는 것이다.
- [33] 한편, 본 발명에 따른 펩타이드의 아미노산 서열은 당업계에서 공지된 통상의 기술에 따라 변형될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드는 아미노산 수를 증가시키거나 감소시킴으로써 변형될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 펩타이드의 활성을 감소시키지 않는 범위 내에서, 결합에 직접적으로 관여하거나 보존되어야 하는 잔기를 제외한 특정 잔기 성분이나 그 순서를 바꿈으로써 변형될 수도 있다. 변형가능한 아미노산은 자연적으로 존재하는 L- α -아미노산 뿐만 아니라, β , γ , δ 아미노산은 물론 D- α -아미노산의 유도체로도 변형가능하다.
- [34] 전형적으로, 하나의 아미노산이 치환된 펩타이드를 이용하여 정전기력이나 친수성이 결합에 미치는 영향을 조사한 결과, 양전하를 띠는 아미노산(예: Lys, Arg, His)이나 음전하를 띠는 아미노산(예: Glu, Asp, Asn, Gln)이 치환되면 민감도가 변화함을 알 수 있다. 이와 같이, 치환되거나 부가되는 잔기의 수나 형태는 필수적인 결합점 사이에 필요한 공간과 친수성 또는 소수성과 같이 요구되는 기능에 의해 결정된다. 이러한 치환에 의해 본 발명에 따른 펩타이드의 목적 단백질에 대한 친화도를 더 증가시킬 수 있다.
- [35] 치환으로 인해 기능에 있어서 중요한 변화가 나타나기도 한다. 변화되는 잔기의 선택은 목적 위치에 존재하는 분자의 전기도, 소수성, 측쇄의 변화 또는 나선구조의 변화 등과 같이 펩타이드의 기본 골격을 유지하는데 큰 영향을 미치기도 한다. 일반적으로, 펩타이드의 성질에 중대한 변화를 일으키는 것은 세린과 같은 친수성 잔기가 루이신, 이소루이신, 페닐알라닌, 발린 또는 알라닌과 같은 소수성 잔기로 치환되거나, 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘과 같이 전기적으로 양성인 잔기가 글루탐산이나 아스파르트산과 같은 전기적으로 음성인 잔기로 치환되거나, 글리신과 같이 측쇄를 갖지 않는 아미노산이 부피가 큰 측쇄를 갖는 잔기로 치환되는 경우이다.
- [36] 이상 언급한 바와 같은 사실을 고려하여, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 상기 특정 펩타이드를 그의 HRF에 대한 결합력 및 그에 따른 히스타민 분비 저해 활성을 유지 내지 증가시키거나 손상시키지 않는 범위 내에서 통상의 기술을 이용하여 변형시킬 수 있으며, 이는 본 발명의 범위 내에 속하는 것이다.
- [37]
- [38] 본 발명의 펩타이드는 HRF에 결합하여, 히스타민의 분비를 방지하여 자가면역반응을 경감시킬 수 있음을 확인하였는 바, 본 발명의 펩타이드는 HRF가 관여하는 모든 자가면역관련 질환 및 알러지 질환, 예를 들어, 천식, 비염, 담마진, 아나필락시스, 알러지성 기관지확장증, 각종 알러젠으로 인한 알러지, 헤이 피버, 한냉두드러기 및 아토피성 피부염 등의 치료 등에 유용하고, 특히 본 발명의 *in vivo* 실험을 통해 확인하였듯이 자가면역질환 중 류마티스 관절염에

큰 효과가 있으므로 류마티스 관절염의 예방 또는 치료에 매우 유용함을 알 수 있다(도 8 내지 12 참조).

[39]

[40] 본 발명의 펩타이드, 이를 암호화하는 핵산, 이에 대한 재조합 벡터 및 이를 이용한 형질전환체를 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함되나 이에 한정되지 않는다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 비경구 투여시 관절강내 주사, 피내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 주사, 복강내 주사, 직장내 주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사, 흉부내 주사, 경막외 주사, 척수내 주사, 심장내 주사, 동맥내 주사, 골내 주사, 비강, 직장 및 기관지 투여, 경피 투여, 점안제 및 스프레이 제제 형태 등으로 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[41] 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 본 발명의 조성물의 유효용량은 0.001 ~ 10,000 mg/kg이고, 바람직하기로는 0.1 g ~ 5 g/kg이며, 하루 1 ~ 6회 투여될 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[42] 본 발명의 조성물을 랫트에 경구 투여하여 독성 실험을 수행한 결과, 경구 투여 독성시험에 의한 50% 치사량(ID₅₀)은 적어도 1 g/kg 이상인 안전한 물질로

판단된다. 본 발명의 조성물은 류마티스 관절염의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[43]

발명의 효과

[44] 본 발명의 펩타이드, 이의 유사체, 이들을 코딩하는 핵산, 이를 포함하는 재조합백터 및 상기 백터로 형질전환된 형질전환체를 유효성분으로 함유하는 조성물을 통해 류마티스 관절염의 효과적인 예방 및 치료를 달성할 수 있다.

[45] 따라서, 본 발명은 류마티스 관절염에 대한 예방 및 개선 용도로 관련 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

[46]

도면의 간단한 설명

[47] 도 1은 IgE 의존성 히스타민 방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor: HRF) 결합 펩타이드의 분리과정을 개략적으로 도시한 도이다.

[48] 도 2는 본 발명에 따른 펩타이드가 특이적으로 결합하는 것을 나타내는 도이다.

[49] 도 3은 본 발명에 따른 펩타이드와 HRF 단백질의 결합 친화도를 나타내는 도이다.

[50] 도 4a 내지 4c는 HRF 결합 파아지(phage)가 갖는 펩타이드와, 그와 아미노산 서열이 동일한 합성 펩타이드가 상호 경쟁하는 것을 나타내는 도이다.

[51] 도 5는 본 발명에 따른 펩타이드의 HRF 결합능을 비교한 도이다.

[52] 도 6은 RBL-2H3 세포주에서 본 발명에 따른 펩타이드가 히스타민 분비를 억제하는데 필요한 양을 측정한 용량-반응 결과를 나타내는 도이다.

[53] 도 7은 RBL-2H3 세포주에서 본 발명에 따른 펩타이드의 HRF에 의한 히스타민 분비 억제를 비교한 도이다.

[54] 도 8은 다양한 알러지 환자의 혈액에서 HRF의 검출을 나타내는 도이다.

[55] 도 9는 류마티스성 관절염 모델에서 7mer 펩타이드인 dTBP2(dTCTP binding protein 2)가 류마티스성 관절염 예방에 미치는 영향을 분석한 도이다.

[56] 도 10은 류마티스성 관절염 모델에서 dTBP2가 류마티스성 관절염 치료에 미치는 영향을 분석한 도이다.

[57] 도 11은 류마티스 관절염의 경과가 진행될수록 TCTP의 양이 증가함을 나타낸 그래프이다.

[58] 도 12는 IHC(immunohistochemistry) 실험을 토대로 류마티스 관절염 환자들의 관절에 TCTP가 분포하는 정도를 현미경으로 통해 확인한 그림이다.

[59]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[60] 이하, 본 발명의 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[61] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이

하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[62]

[63] <실시예 1> HRF에 결합하는 파아지 디스플레이 펩타이드 클론의 분리

[64] HRF를 플라스틱 웰에 고정화(immobilization)시킨 후 헵타머 랜덤 리퍼트 펩타이드 라이브러리(7-mer random peptide library; New England Biolabs, USA)의 친화성 선별을 통해 HRF에 결합할 수 있는 펩타이드를 분리하였다(도 1).

[65] 구체적으로, 코팅 완충액(0.1 M NaHCO₃, pH8.6)에 20 µg/ml 농도로 용해시킨 HRF를 50 µl씩 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트에 가하고, 4 °C에서 밤새 코팅한 후 BSA로 비특이적 결합을 차단하였다. 0.1 % Tween/TBS(TBST)로 6 회 세척한 후 파아지-디스플레이 펩타이드 라이브러리(phage-displayed peptide library) 원액 10 µl를 3 % BSA/TBS 40 µl에 희석한 용액을 가하고 실온에서 1 시간 동안 정치하였다. TBST를 사용하여 5 분간 방치한 후 세척하되, 1 회 패닝(panning)시에는 한 번, 2 회와 3 회 패닝시에는 다섯 번, 4 회 패닝시에는 열 번 실시하였다. 글리신/HCl 완충액(pH 2.2) 50 µl를 가하고 5 분간 방치한 후 파아지를 용출하고 1 M Tris-HCl(pH 9.1) 8 µl로 중화하였다.

[66] 용출한 파아지 용액을 20 ml의 ER2537 배양액(OD₆₀₀=0.5~1)에 첨가하고 37 °C 셰이킹 인큐베이터(shaking incubator; rpm=200)에서 2 시간 배양한 후 100 ml SB 배지를 가하고 250 rpm에서 밤새 배양하였다. 배양액을 10,000 rpm(4 °C)에서 15 분간 원심분리하여 얻은 상청액 100 ml에 30 ml의 5×PEG/NaCl(20% PEG(w/v), 15% NaCl(w/v))를 가하여 5 분동안 용해시키고 얼음에 30 분간 정치하였다. 10,000 rpm(4 °C)에서 20 분간 원심분리한 후 상청액을 모두 제거하고 펠렛을 1 ml의 3% BSA/TBS에 부유시켰다. 그 후, 14,000 rpm에서 5 분간 원심분리한 상청액을 다음 패닝에 사용하였다. 친화성 정제와 파아지 복제를 4 회 반복한 후 얻은 용출 파아지의 적정 플레이트로부터 각각의 파아지 클론을 얻고 ELISA 분석을 통해 특이적인 친화도를 나타내는 파아지 클론만을 서열분석하여 펩타이드 서열을 확인하였다. 또한, HRF에 대해 우세한 결합을 나타내는 파아지 디스플레이 펩타이드를 하기 표 1에 나타내었다.

[67] [표1]

파아지	펩타이드	아미노산 서열	빈도	서열번호
ph1	p1	LVTYPLP	1	1
ph2	p2	WYVYPSM	18	2
ph3	p3	SYLPYPY	1	-
ph4	p4	WEFPGWM	5	3

[68]

[69] <실시예 2> 파아지(phage) ELISA 분석

[70] 하기와 같이, 실시예 1에서 얻은 파아지의 결합 친화도를 ELISA로 비교하였다.

- [71] 즉, SB 배지에서 배양한 ER2537 배양액($OD_{600}=0.5\sim 1$) 1 ml씩에 각각의 파아지 플라크를 옮기고 37 °C 인큐베이터($rpm=250$)에서 5 시간 배양하였다. 각각의 배양액 100 μ l씩을 900 μ l의 SB 배지에 가하고 밤새 배양한 후, 14,000 rpm에서 5 분씩 2 회 원심분리한 상청액을 ELISA 분석에 사용하였다.
- [72] HRF 또는 BSA(대조)를 코팅한 플라스틱 웰에, 분리해낸 각각의 파아지 용액을 동량의 6% BSA/PBS에 희석한 용액 50 μ l씩을 가하고 2 시간동안 정치하였다. PBST로 5 회 세척한 후 3 % BSA/PBS에 1:5000으로 희석한 HRP-컨쥬게이트된 항-M13 항체(Pharmacia) 100 μ l씩을 가하고 1 시간동안 정치하였다. PBST로 6 회, PBS로 1 회 세척한 후 퍼옥시다아제(peroxydase) 기질 용액 100 μ l씩을 가하여 발색 정도를 ELISA 리더를 사용하여 405 nm에서 측정하였다. 그 결과로도 2에 나타내었다. 이로부터, 본 발명의 파아지 ph1, ph2 및 ph4, 특히 ph2 및 ph4가 HRF에 특이적으로 결합함을 알 수 있다(도 2).
- [73]
- [74] <실시예 3>: 농도에 따른 HRF와 파아지 클론의 결합력 측정
- [75] HRF를 20 μ g/ml 농도에서부터 1/5로 연속적으로 희석한 후(각각 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 μ g/ml) 50 μ l 씩 플라스틱 웰에 고정화하였다. 여기에 역시 1/5 씩 연속적으로 희석한(원액의 1/2, 1/10, 1/50, 1/250, 1/1250) 파아지 ph2 용액을 가하여 ELISA 분석을 실시하고 405 nm에서 발색정도를 측정하였다. 그 결과로도 3에 나타내었다. 도 3으로부터, 본 발명에 따른 파아지 ph2 클론이 HRF를 0.4, 0.08, 0.016 및 0.032 μ g/ml까지 희석한 경우에도 HRF와의 특이적 결합력을 유지하고 있음을 확인하였다.
- [76]
- [77] <실시예 4> 경쟁 결합 분석
- [78] a) ELISA 분석을 통해 특이적인 친화도를 나타내는 파아지 클론(ph2 및 ph4)만을 서열분석하여 디스플레이된 펩타이드 서열을 확인한 후, 헵타머 펩타이드(p2 및 p4)를 제작하였다. 또한, 음성 대조군으로서 랜덤 펩타이드(ran, 아미노산 서열: LMEGCRA)를 합성하였다. HRF를 코팅한 웰에 1000 nM에서부터 연속적으로 6% BSA/PBS에 희석한(1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 nM) 펩타이드 용액 30 μ l씩을 가하고 실온에서 30 분간 정치한 후, 여기에 파아지 원액을 1/25로 희석한 것을 가하여 2 시간 더 정치하였다. PBST로 5 회 세척한 후 HRP-컨쥬게이트된 항-M13 항체를 100 μ l씩 가하고 1 시간 정치하였다. PBST로 6 회, PBS로 1 회 세척한 후, 퍼옥시다아제 기질 용액 100 μ l씩을 가하여 발색 정도를 통해 경쟁 여부를 확인하였다. 그 결과로도 4a 및 4b에 나타내었다. 이로부터, 합성 펩타이드 p2 및 p4가 모두 파아지 클론 ph2 및 ph4와 경쟁적으로 HRF에 결합함을 알 수 있다(도 4a 및 도 4b).
- [79] b) p1, p2 및 p4가 HRF의 동일한 부위에 결합하는지 여부를 시험하기 위하여, 상기 a)와 실질적으로 동일한 방법에 따라 HRF를 코팅하고 ph2에 대한 p1, p2 및 p4의 경쟁결합 분석을 수행하였다. 그 결과로도 4c에 나타내었다. 이로부터, p1,

p2 및 p4가 모두 HRF의 동일 부위에 결합함을 알 수 있다.

[80]

[81] <실시예 5> HRF 결합 펩타이드의 아미노산 서열 변이

[82] 본 발명에 따른 헵타머 펩타이드의 HRF 결합 친화도에 관여하는 잔기를 확인하기 위하여, p2의 아미노산 서열을 하나씩 알라닌(A)으로 치환하고, 단 m5의 경우에만 라이신(K)으로 치환하였다(표 2).

[83] [표2]

헵타펩타이드	아미노산 서열	서열번호
p2	WYVYPSM	2
m1	AYVYPSM	4
m2	WAVYPSM	5
m3	WYAYPSM	6
m4	WYVAPSM	7
m5	WYVYKSM	8
m6	WYVYPAM	9
m7	WYVYPSA	10

[84] 상기 펩타이드의 HRF 결합능을 실시예 2와 실질적으로 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. 이로부터, HRF 결합능이 p2, m6>m7>m3>m2>m5>m1>m4임을 알 수 있다(도 5).

[85]

[86] <실시예 6> 히스타민 분비 측정

[87] pRSET-A 벡터에 PCR로 클로닝된 래트 HRF 전장 서열(Chitpatima 등, 1988)을 클로닝한 후, *E. coli*에서 과발현시켰다. 발현된 재조합 단백질을 His-결합 Ni 칼럼(Novagen)을 이용하여 정제하고 RBL-2H3 세포를 자극하기 위해 사용하였다. RBL-2H3을 1×10^6 세포로 24-웰에서 증식시킨 후, 래트 IgE 항체($0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, Serotec)로 45~60 분간 감작시키고 재조합 HRF 단백질을 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하였다(양성 대조군). 상기에서 준비한 세포에 헵타머 펩타이드 p1 및 p2를 용량-의존적 방법으로 처리하였다. 또한, 재조합 HRF 단백질과 펩타이드 p1, p2, p4 및 m1 내지 m7을 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 HRF와 동일한 농도로 처리하였다.

[88] 상기에서 얻은 샘플을 RIA-분석 키트(Immunotech, 프랑스)를 이용하여 아실화된 히스타민으로 제조한 후 ^{125}I -아실화된 히스타민과 모노클로날 항체에 경쟁 결합시켰다. 이 샘플을 다시 γ -계수기에서 측정하였다. 그 결과를 도 6 및 7에 나타내었다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 서열번호 2의 펩타이드(p2)를 RBL-2H3 세포에 가한 경우, $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서부터 HRF에 의한 히스타민 분비를 저해하였다. 또한, 도 7에 나타낸 바와 같이, p1, p2, p4 및 m1 내지 m7을 20

$\mu\text{g/ml}$ 를 가하였을 때, $m_2 > m_5 > m_4 > p_2 > m_3 > p_1 = p_4 > m_1 > m_7$ 의 순서로 HRF에 의한 히스타민 분비를 저해하며, m_6 의 경우 히스타민 분비를 오히려 증가시킴을 관찰하였다.

[89]

[90] <실험예 1> 류마티스 관절염에 대한 dTCTP(dimer translationally controlled tumor protein)의 임상적 연관성 확인

[91] TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein) 이량체형(dimer) IgE-의존성 히스타민 방출인자(IgE-dependent histamine releasing factor: HRF)가 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis: RA)에 관여하는지 여부가 최근 관심의 대상이 되고 있는데, 본 발명자들은 TCTP 이량체(dTCTP: HRF)가 알레르기 반응을 촉발하는 히스타민 방출인자임을 세계최초로 규명한 바 있으며, 만성 염증성 질환 중 하나인 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis)이 dTCTP(HRF)와 연관되어 있을 것으로 생각되어 실험을 진행하였다.

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

[93] 그 결과, 실험결과 정상인 샘플과 퇴행성 관절염 샘플에서는 TCTP의 양이 거의 없음을 확인할 수 있었고, 초기 류마티스 관절염 환자와 말기 류마티스 관절염 환자 샘플에서는 경과가 진행될수록 TCTP의 양이 증가하는 것을 볼 수 있었다(도 11).

[94] 아울러, IHC(immunohistochemistry) 실험을 토대로 각 환자들의 관절에 TCTP가 어디에 얼마나 존재하는지 현미경으로 통해 확인하였다. 도 12와 같이, 갈색으로 염색된 부분이 TCTP를 나타내며 퇴행성 관절염 환자(OA)에 비해 말기 류마티스 관절염 환자(RA)의 관절 조직에서 많은 TCTP가 존재함을 알 수 있었다(도 12)

[95]

[96] <실험예 2> CIA(collagen-induced arthritis) 마우스에 대한 dTBP2(dTCTP binding protein)의 류마티스성 관절염 예방 효과 확인

[97] 본 발명의 헵타머 펩타이드(7mer-peptide) dTBP2(dTCTP binding protein, 상기 표 1 및 표 2의 p2)가 HRF와 결합하면 HRF의 활성을 저해하여 류마티스성 관절염에 대한 예방 효과가 있음을 확인하였다.

[98] 구체적으로, CIA를 유도하기 위하여, 7주령의 수컷 DBA1/j 마우스 26마리를 구입하여 1주 이상 적응기를 가진 뒤 1차로 bovine 제2형 콜라겐(Type2 collagen 2 mg/ml, Chondrex)과 동일한 농도의 complete Freund's Adjuvant(CFA containing 2

mg/ml M. tuberculosis, Chondrex)를 1:1로 혼합하여 150 μ l를 꼬리의 기저부에서 2 cm 아래쪽의 피내를 통해 천천히 주입하였다(0일차). 3주 후 2차 주사를 시행하였는데 CFA 대신 incomplete Freund's adjuvant(IFA)와 Bovine 제2형 콜라겐 용액을 역시 1: 1의 비율로 혼합하여 혼합액 100uL를 꼬리의 기저부 피내를 통해 천천히 주입하였다. 그 후 부형제(vehicle)만 투여할 9마리, dTBP2 5 mg을 투여할 8마리 및 dTBP2 25 mg을 투여할 9마리로 구별하였다. dTBP2는 PBS 1 ml 당 1.5 mg씩 용해하여 투여하였고, 관절염이 발생하기 전인 21일차부터 1주일에 3번씩 투여하였으며, 주 2회씩 각 발마다 0 내지 4점(총 0 내지 16점)의 관절염 임상점수를 평가하였다. 동시에 전자캘리퍼를 이용하여 양 발목의 두께를 측정하였으며, 최초 측정 당시 두께 대비 변화수치를 측정하였다.

- [99] 그 결과, 도 9와 같이 dTBP2 25 mg을 투여한 군은 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군 보다 류마티스성 관절염 발병이 억제되는 것을 확인하였다. 31일차에서는 dTBP2 25 mg을 투여한 군이 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군 보다 절반 이상 발병률이 억제되었고, 46일차에서는 dTBP2 25 mg을 투여한 군이 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군 보다 70 % 이상 발병률이 억제됨을 알 수 있었다. 또한, 관절염의 임상증상 지표인 관절 두께를 측정한 결과 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군은 41일차까지 지속적으로 증가하고 41일차부터 46일차까지는 급속하게 두꺼워지는 반면, dTBP2 25 mg을 투여한 군은 46일차까지도 관절 두께가 정상과 비슷하게 유지됨을 규명하여, dTBP2의 류마티스 관절염 예방 효과를 확인하였다(도 9).

[100]

- [101] <실험예 3> CIA 마우스에 대한 dTBP2의 류마티스성 관절염 치료 효과 확인

- [102] 본 발명의 헵타머 펩타이드 dTBP2가 HRF와 결합하면 HRF의 활성을 저해하여 류마티스성 관절염에 대한 치료 효과가 있음을 확인하였다.

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

- [104] 그 결과, 도 10과 같이 dTBP2 25 mg을 투여한 군은 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군에 비해 임상점수가 낮아지는 등 증상이 개선되어 류마티스성 관절염 치료효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 임상증상의 지표인 관절 두께 측정에서도 dTBP2 25 mg을 투여한 군은 41일차 이후로 두께가 감소하여 지속적으로 두께가 증가한 부형제만 투여한 군 및 dTBP2 5 mg을 투여한 군과는 대조적인 결과를 나타냄을 규명하여, 본 발명의 dTBP2가 류마티스 관절염 치료효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(도 10).

[105]

서열목록 Free Text

- [106] 서열목록 1: Leu Val Thr Tyr Pro Leu Pro
- [107] 서열목록 2: Trp Tyr Val Tyr Pro Ser Met
- [108] 서열목록 3: Trp Glu Phe Pro Gly Trp Met
- [109] 서열목록 4: Ala Tyr Val Tyr Pro Ser Met
- [110] 서열목록 5: Trp Ala Val Tyr Pro Ser Met
- [111] 서열목록 6: Trp Tyr Ala Tyr Pro Ser Met
- [112] 서열목록 7: Trp Tyr Val Ala Pro Ser Met
- [113] 서열목록 8: Trp Tyr Val Tyr Lys Ser Met
- [114] 서열목록 9: Trp Tyr Val Tyr Pro Ala Met
- [115] 서열목록 10: Trp Tyr Val Tyr Pro Ser Ala

청구범위

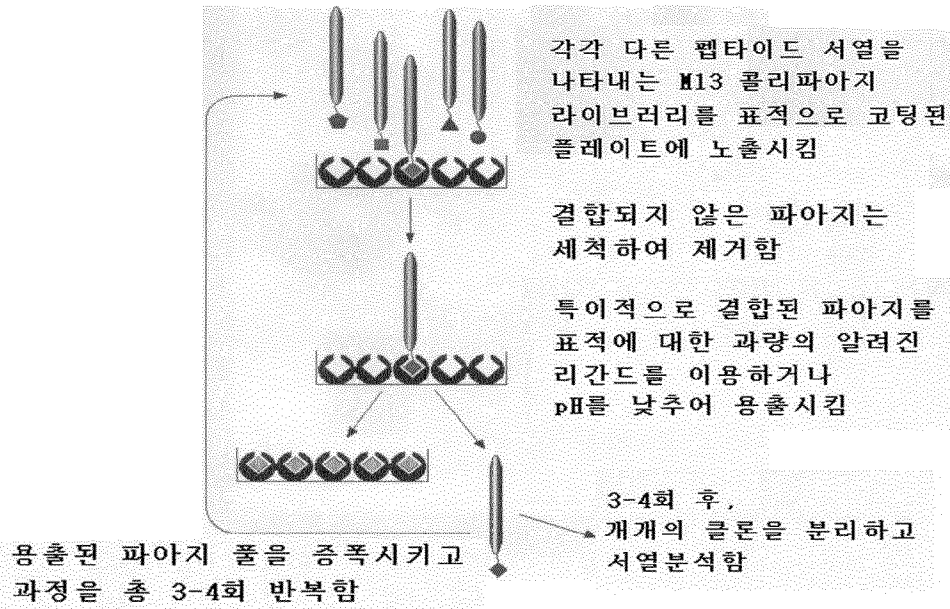
- [청구항 1] 7개의 아미노산으로 구성되고, 첫 번째 아미노산은 A, L 및 W로 구성된 군으로부터 선택되며, 두 번째 아미노산은 V, Y, E 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, 세 번째 아미노산은 T, V, F 및 A로 구성된 군으로부터 선택되며, 네 번째 아미노산은 Y, P 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, 다섯 번째 아미노산은 P, G 및 K로 구성된 군으로부터 선택되며, 여섯 번째 아미노산은 A, L, S 및 W로 구성된 군으로부터 선택되고, 일곱 번째 아미노산은 A, P 및 M로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 L-, D-, 또는 L- 및 D-아미노산으로 구성된 펩타이드인 것을 특징으로 하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 하나 이상의 변형 아미노산을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 변형 아미노산은 아미노산 유도체 또는 알킬화된 아미노산인 것을 특징으로 하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 펩타이드 또는 이의 유사체를 암호화하는 핵산을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 펩타이드 또는 이의 유사체를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 펩타이드 또는 이의 유사체를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 1) 피검개체로부터 분리된 시료로부터 TCTP(Translationally Controlled Tumor Protein) 단백질의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
2) 상기 단계 1)의 TCTP 단백질의 발현 또는 활성이 정상 대조군에 비해 증가한 경우, 류마티스 관절염 질환을 갖거나 류마티스 관절염 질환을

가질 위험성이 있는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 류마티스 관절염 질환 진단의 정보를 제공하기 위한 TCTP 단백질의 검출 방법.

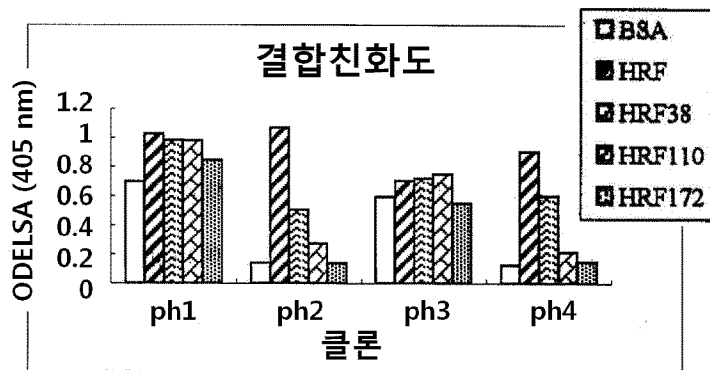
[청구항 10] 제 9항에 있어서, 상기 단계 1)의 시료는 세포, 조직, 혈액, 혈청, 체액, 관절액, 타액 및 소변으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 TCTP 단백질의 검출 방법.

[청구항 11] 제 9항에 있어서, 상기 단계 1)의 TCTP 단백질의 발현 또는 활성 정도는 웨스턴 블롯팅(Western Blotting), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역조직화학염색(immunohistochemical staining), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), 유세포분석법(FACS), 효소면역분석법(ELISA), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunoassay), 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay) 및 단백질 칩(chip)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 TCTP 단백질의 검출 방법.

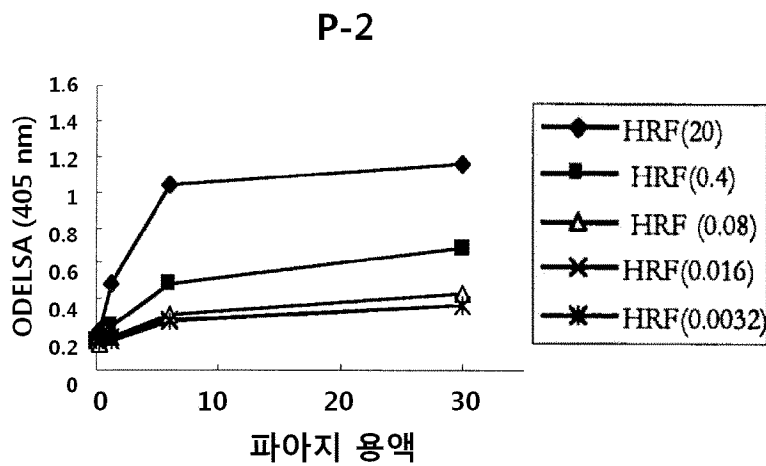
[도1]



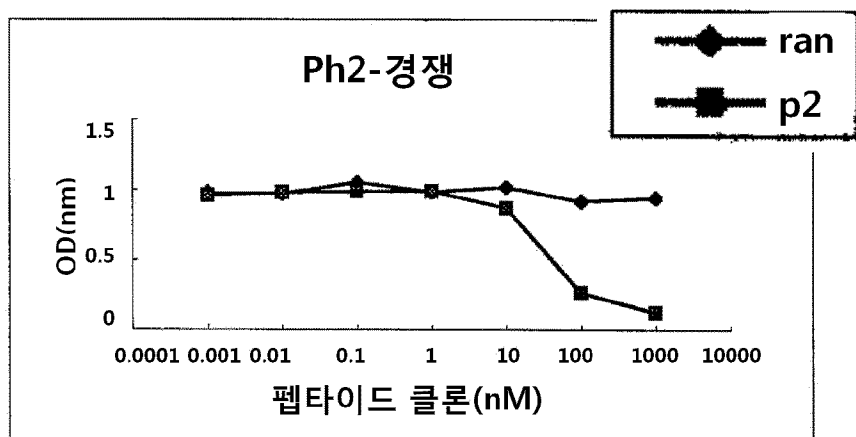
[도2]



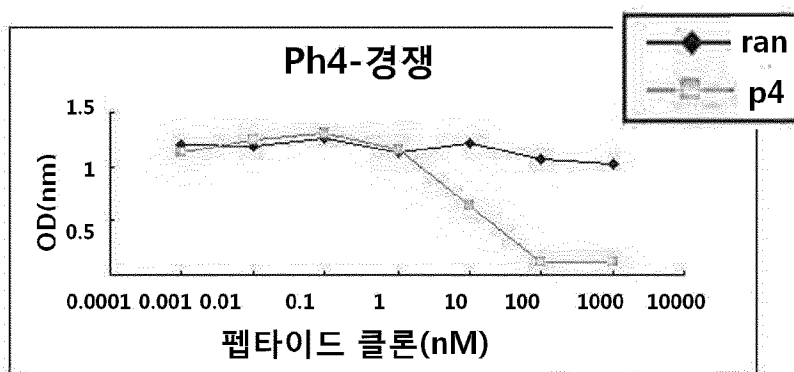
[도3]



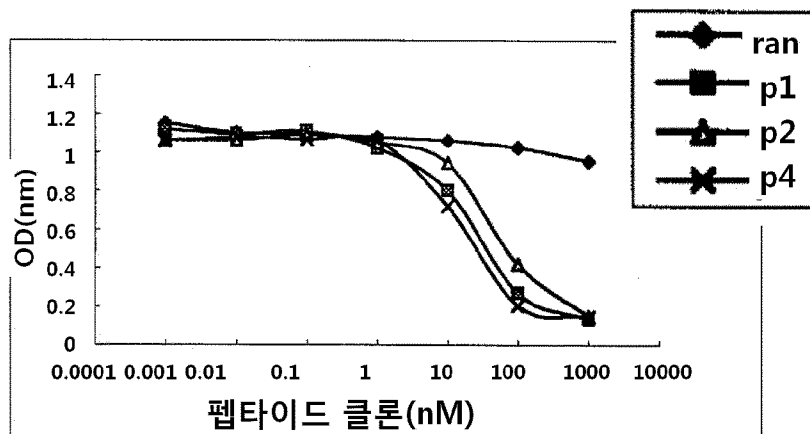
[도4a]



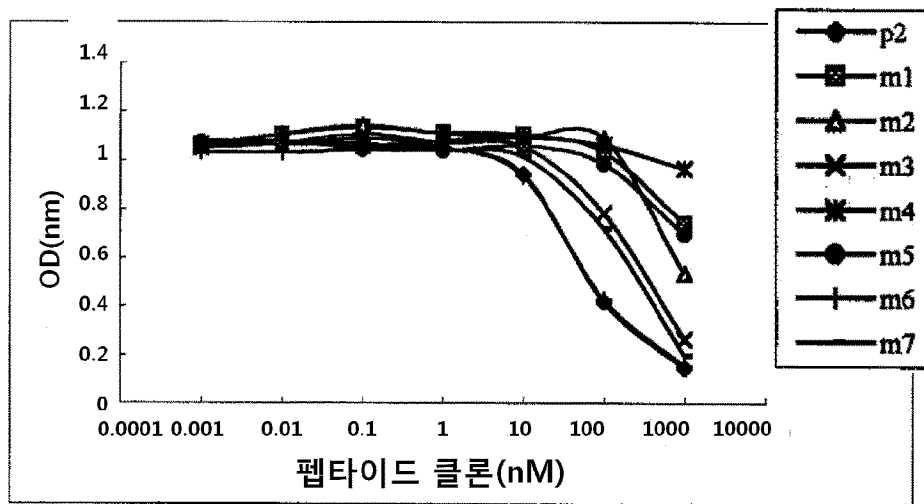
[도4b]



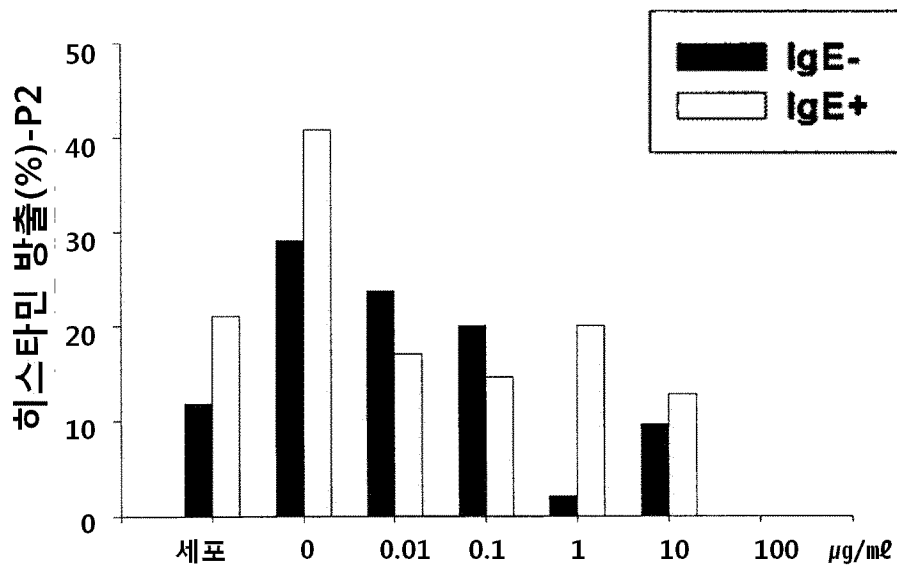
[도4c]



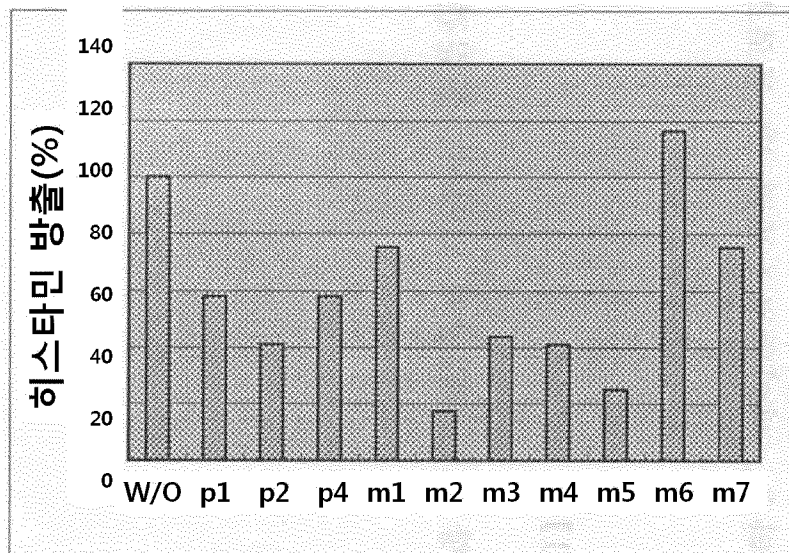
[도5]



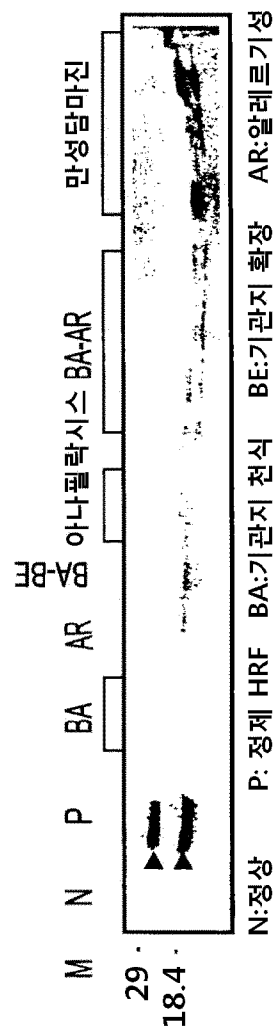
[도6]



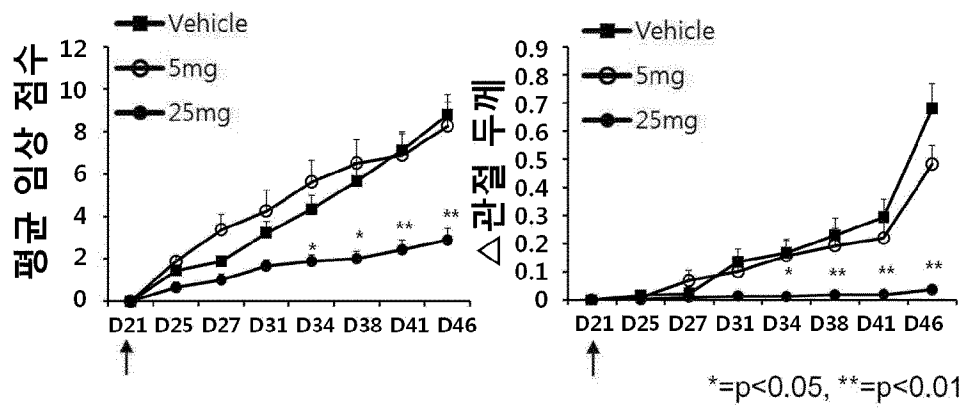
[도7]



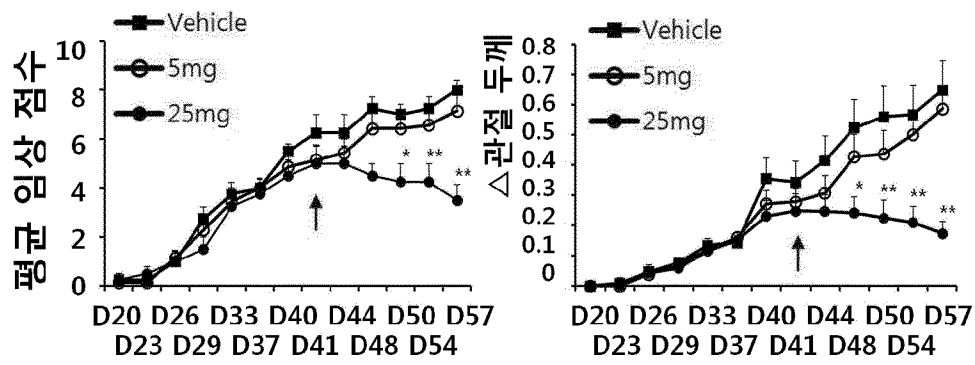
[도8]



[도9]

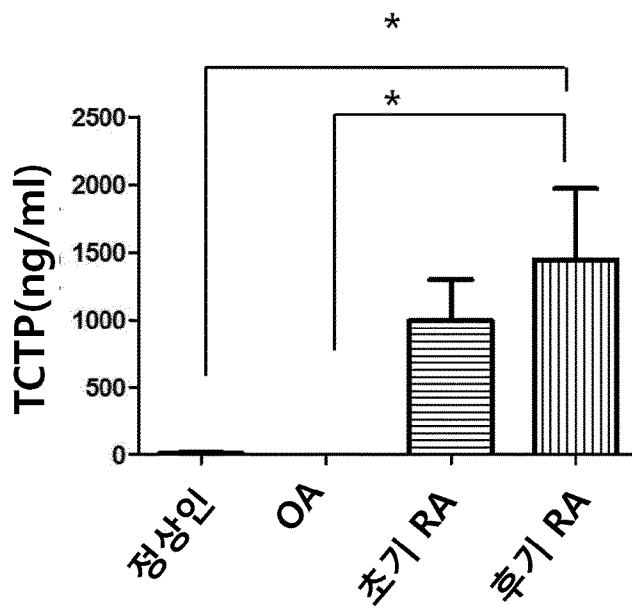


[도10]

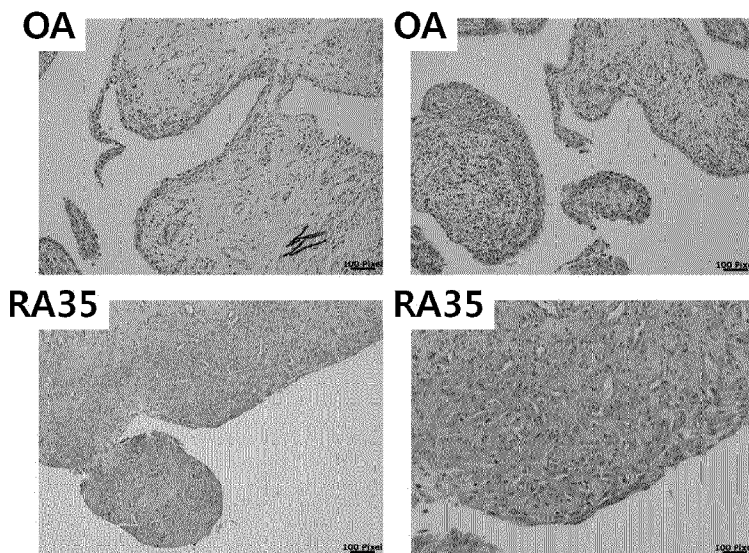


*=p<0.05, **=p<0.01

[도11]



[도12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/006419**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07K 7/06(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i**

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 7/06; A61K 39/395; C12N 5/06; C07K 16/22; C07K 14/705; A61K 38/19; A61K 38/17; G01N 33/53; A61K 38/08; C12N 15/63; A61K 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: rheumatoid arthritis prevention, therapy, diagnosis, histamine-releasing factor, TCTP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2002-0095023 A1 (LEE, Kyunglim et al.) 18 July 2002 See claims 10-13, 18-24; and sequence no. 13.	1-8
Y	MASLINSKA, D. et al., "Histamine Releasing Factor (HRF) in Pannus of Joints Affected by Rheumatoid Arthritis", Inflammation Research, 14 March 2008 (Online), vol. 57, Supplement 1, pages S61-S62 See page S61, right column, lines 18-24; page S62, left column, lines 10-13.	1-8
X	BO, Gan - Ping et al., "Analyses of Differential Proteome of Human Synovial Fibroblasts Obtained from Arthritis", Clinical Rheumatology, 20 September 2008 (Online), vol. 28, pages 191-199 See abstract; and table 1.	9-11
A	US 2006-0140970 A1 (TELERMAN, Adam et al.) 29 June 2006 See abstract; claim 17; and paragraph [0084].	1-11
A	US 2006-0165677 A1 (LEE, Kyunglim et al.) 27 July 2006 See abstract; and claims 1-7.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 SEPTEMBER 2016 (09.09.2016)

Date of mailing of the international search report

09 SEPTEMBER 2016 (09.09.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/006419

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2002-0095023 A1	18/07/2002	AT 295418 T	15/05/2005
		CA 2347276 A1	01/12/2001
		DE 60110683 D1	16/06/2005
		EP 1167526 A1	02/01/2002
		EP 1167526 B1	11/05/2005
		JP 2002-330772 A	19/11/2002
		JP 4295449 B2	15/07/2009
		KR 10-0457350 B1	16/11/2004
		KR 10-2001-0109481 A	10/12/2001
		US 6710165 B2	23/03/2004
US 2006-0140970 A1	29/06/2006	WO 2004-065572 A2	05/08/2004
		WO 2004-065572 A3	04/11/2004
US 2006-0165677 A1	27/07/2006	EP 1683866 A2	26/07/2006
		EP 1683866 A3	02/08/2006
		JP 2006-212029 A	17/08/2006
		JP 2010-158246 A	22/07/2010
		JP 4564926 B2	20/10/2010
		KR 10-0780255 B1	28/11/2007
		KR 10-2006-0086867 A	01/08/2006
		US 7772368 B2	10/08/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 7/06(2006.01)I, G01N 33/53(2006.01)I, A61K 38/08(2006.01)I, C12N 15/63(2006.01)I, A61K 48/00(2006.01)I

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/06; A61K 39/395; C12N 5/06; C07K 16/22; C07K 14/705; A61K 38/19; A61K 38/17; G01N 33/53; A61K 38/08; C12N 15/63; A61K 48/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 류마티스 관절염 예방, 치료, 진단, 히스타민 방출인자, TCTP

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2002-0095023 A1 (LEE, KYUNGLIM 등) 2002.07.18 청구항 10-13, 18-24; 및 서열번호 13 참조.	1-8
Y	MASLINSKA, D. 등, 'Histamine releasing factor (HRF) in pannus of joints affected by rheumatoid arthritis', Inflammation Research, 2008.03.14 (online), 57권, Supplement 1, 페이지 S61-S62 페이지 S61, 우측컬럼, 라인 18-24; 페이지 S62, 좌측컬럼, 라인 10-13 참조.	1-8
X	BO, GAN-PING 등, 'Analyses of differential proteome of human synovial fibroblasts obtained from arthritis', Clinical Rheumatology, 2008.09.20 (online), 28권, 페이지 191-199 요약; 및 표 1 참조.	9-11
A	US 2006-0140970 A1 (TELERMAN, ADAM 등) 2006.06.29 요약; 청구항 17; 및 단락 [0084] 참조.	1-11
A	US 2006-0165677 A1 (LEE, KYUNGLIM 등) 2006.07.27 요약; 및 청구항 1-7 참조.	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 09월 09일 (09.09.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 09월 09일 (09.09.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2002-0095023 A1	2002/07/18	AT 295418 T	2005/05/15
		CA 2347276 A1	2001/12/01
		DE 60110683 D1	2005/06/16
		EP 1167526 A1	2002/01/02
		EP 1167526 B1	2005/05/11
		JP 2002-330772 A	2002/11/19
		JP 4295449 B2	2009/07/15
		KR 10-0457350 B1	2004/11/16
		KR 10-2001-0109481 A	2001/12/10
		US 6710165 B2	2004/03/23
US 2006-0140970 A1	2006/06/29	WO 2004-065572 A2	2004/08/05
		WO 2004-065572 A3	2004/11/04
US 2006-0165677 A1	2006/07/27	EP 1683866 A2	2006/07/26
		EP 1683866 A3	2006/08/02
		JP 2006-212029 A	2006/08/17
		JP 2010-158246 A	2010/07/22
		JP 4564926 B2	2010/10/20
		KR 10-0780255 B1	2007/11/28
		KR 10-2006-0086867 A	2006/08/01
		US 7772368 B2	2010/08/10