



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월08일
(11) 등록번호 10-1997756
(24) 등록일자 2019년07월02일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/10 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-7033766</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2013년05월10일
심사청구일자 2017년05월19일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2014년12월01일</p> <p>(65) 공개번호 10-2015-0022798</p> <p>(43) 공개일자 2015년03월04일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/KR2013/004145</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2013/169060
국제공개일자 2013년11월14일</p> <p>(30) 우선권주장
1020120050529 2012년05월11일 대한민국(KR)
(뒷면에 계속)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
Current Pharmaceutical Biotechnology. Vol.
10, No. 1, pp. 122-137 (2009)
Expert Opinion on Investigational Drugs. Vol.
18, No. 5, pp. 687-694 (2009)
US20070190561 A1</p> | <p>(73) 특허권자
주식회사 쥘팩스엔카엘
대전광역시 유성구 테크노11로 58 (탑림동)
김상재
서울시 강남구 광평로 10길 15, 101동 405호(일원
동, 상록수아파트)</p> <p>(72) 발명자
김상재
서울시 강남구 광평로 10길 15, 101동 405호(일원
동, 상록수아파트)</p> <p>(74) 대리인
김영철, 김 순 영</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 패혈증 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 명세서에는 패혈증의 예방 또는 치료를 위한 펩티드가 제공된다. 상기 펩티드는 패혈증과 관련된 사이토카인인 TNF, IL-1 및 IL-6의 생산을 억제함으로써 패혈증의 증상을 개선하거나 패혈증을 예방 또는 치료할 수 있다. 상기 펩티드를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물 또는 식품 조성물, 상기 펩티드의 패혈증의 예방 또는 치료에의 용도, 및 상기 펩티드를 지시서와 함께 포함하는 키트 또한 개시된다.

(30) 우선권주장

1020120050533 2012년05월11일 대한민국(KR)

1020120071989 2012년07월02일 대한민국(KR)

1020120104207 2012년09월19일 대한민국(KR)

명세서

청구범위

청구항 1

유효성분으로서 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드를 포함하는 패혈증 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 펩티드는 인간의 텔로머라제로부터 유래된 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 패혈증성 쇼크를 예방, 개선 또는 치료하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 주사 제형인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물은 정맥 내 주사 제형인 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 주사 제형은 동결건조 펩티드가 식염수에 용해되어 있는 용액인 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 용액의 펩티드 농도는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 내지 1 mg/mg 인 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 펩티드는 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 내지 1 $\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 의 투여량으로 투여되는 것인 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 펩티드는 단회 투여되는 것인 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학 조성물인 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 조성물은 패혈증 예방 또는 개선용 식품 조성물인 조성물.

청구항 13

제1항, 또는 제3항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 조성물; 및 상기 조성물의 투여량, 투여 경로, 투여 횟수 및 적응증 중 하나 이상을 개시한 지시서를 포함하는 패혈증 예방, 개선 또는 치료를 위한 키트.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 명세서에 개시된 기술은 패혈증 예방 또는 치료용 조성물, 패혈증 예방 또는 치료 방법, 패혈증 예방 또는 치료용 펩티드, 및 펩티드의 패혈증 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 패혈증(sepsis)은 세균이 혈액 속에 들어가 번식하면서 그 생산한 독소에 의해 중독 증세를 나타내거나, 전신에 감염증을 일으키는 병이다. 원인 병소로는 중이염, 피부화농증, 욕창, 폐질환, 충치, 담낭염, 신우염, 골수염, 감염자궁 등을 들 수 있다. 그러나 화농균의 침입장소가 확실하지 않은 것도 있다. 병원균으로는 연쇄상구균, 포도상구균, 대장균, 폐렴균, 녹농균, 진균 등이 있다. 증세는 갑자기 오한 전열을 동반한 고열이 난다. 관절통, 두통, 권태감 등도 볼 수 있다. 맥박은 빈수가 미약하게 되고, 호흡이 빨라지며, 중증인 경우는 의식이 혼탁해진다.
- [0003] 심각한 패혈증은, 패혈증이 폐 기능장애, 혈액 응고 또는 다른 혈액 장애, 뇨 생산 감소, 또는 정신 상태 변형과 같은 기관 기능장애를 가져올 때 발생한다. 심각한 패혈증의 기관 기능장애는 혈압(저혈압) 또는 젯산산증과 같은 질환을 유발하는 하나 이상의 기관으로의 불충분한 혈류(저관류)와 관련되어 있는데 이것이 바로 패혈증성 쇼크이다.
- [0004] 한국 특허 공개 제1020040045400호 등에 패혈증 치료용 조성물이 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 패혈증을 예방 또는 치료하는 것이다.
- [0006] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 패혈증으로 인한 증상을 개선하는 것이다.
- [0007] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 패혈증성 쇼크를 미리 예방하거나 치료하는 것이다.
- [0008] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 패혈증과 관련된 사이토카인의 농도를 낮추는 것이다.
- [0009] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 패혈증을 유발하는 염증 또는 패혈증의 결과로서 나타나는 염증을 예방 또는 치료하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 일 측면에서, 본 발명은 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은, 유효성분으로서 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드를 포함할 수 있다.
- [0011] 일 측면에서, 본 발명은 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 유효량의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드를 패혈증 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 패혈증 예방 또는 치료방법이다.
- [0012] 일 측면에서, 본 발명은 용도에 관한 것으로서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드의 패혈증 예방 또는 치료에의 용도이다.
- [0013] 일 측면에서, 본 발명은 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 패혈증 예방 또는 치료를 위한 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드이다.
- [0014] 일 측면에서, 본 발명은 키트에 관한 것으로서, 상기 키트는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드,

상기 펩티드 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드; 및 펩티드의 투여량, 투여 경로, 투여 횟수 및 적응증 중 하나 이상을 개시한 지시서를 포함할 수 있다.

- [0015] 일 측면에서, 상기 단편은 3개 이상의 아미노산으로 구성된 단편일 수 있다.
- [0016] 일 측면에서, 상기 펩티드는 인간의 텔로머라제로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0017] 일 측면에서 상기 패혈증의 예방 또는 치료는 패혈증성 쇼크를 예방 또는 치료하는 것일 수 있다.
- [0018] 일 측면에서 상기 펩티드는 주사 제형의 형태로 투여되는 것일 수 있다.
- [0019] 일 측면에서 상기 주사 제형은 정맥 내 주사 제형일 수 있다.
- [0020] 일 측면에서, 상기 주사 제형은 동결건조 펩티드가 식염수에 용해되어 있는 용액일 수 있다.
- [0021] 일 측면에서 상기 용액의 펩티드 농도는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 내지 1 mg/mg 일 수 있다.
- [0022] 일 측면에서 상기 펩티드는 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 내지 1 $\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 의 투여량으로 투여되는 것일 수 있다.
- [0023] 일 측면에서 상기 펩티드는 단회 투여되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0024] 일 측면에서, 본 발명은 패혈증과 관련된 사이토카인의 농도를 현저히 낮출 수 있다.
- [0025] 일 측면에서, 본 발명은 패혈증을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0026] 일 측면에서, 본 발명은 패혈증으로 인한 증상을 효과적으로 개선할 수 있다.
- [0027] 일 측면에서, 본 발명은 패혈증성 쇼크를 미리 예방하거나 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 표 1에 따라 각각 PEP 1, LPS, 및 LPS + PEP 1를 랫트에 투여한 후 혈액을 채취하여 혈액 내 TNF- α 의 농도를 측정한 결과이다.
- 도 2는 표 2에 따라 각각 PEP 1, LPS, 및 LPS + PEP 1를 랫트에 투여한 후 혈액을 채취하여 혈액 내 IL6의 농도를 측정한 결과이다.
- 도 3은 표 2에 따라 각각 PEP 1, LPS, 및 LPS + PEP 1를 랫트에 투여한 후 혈액을 채취하여 혈액 내 IL1b의 농도를 측정한 결과이다.
- 도 4는 HeLa 세포에서 수행한 PEP 1의 독성 시험 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] **발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [0030] 패혈증성 쇼크(Septic shock)는 심각한 감염 및 패혈증의 결과를 의미하는 것으로서, 다양한 기관 기능장애 증후군(multiple organ dysfunction syndrome (MODS)) 및 죽음을 야기할 수 있다. 심각한 패혈증은, 패혈증이 폐 기능장애, 혈액 응고 또는 다른 혈액 장애, 노 생산 감소 또는 정신 상태 변형과 같은 기관 기능장애를 가져올 때 발생한다. 심각한 패혈증의 기관 기능장애는 혈압(저혈압) 또는 젖산산증과 같은 질환을 유발하는 하나 이상의 기관으로의 불충분한 혈류(저관류)와 관련되어 있는데 이것이 바로 패혈증성 쇼크이다.
- [0031] 패혈증은 기관의 기능장애는, 혈류의 국소적 변화, 패혈증 유도 저혈압(< 90 mmHg 또는 베이스라인으로부터 \geq 40 mmHg의 감소), 확산된 혈관내 응집으로부터 야기된다. MODS의 발달을 촉진하는 것으로 보이는 인자들 중 하나는 패혈증 환자에서 미세혈관성 혈전증으로서 관찰되어 온 미세순환의 사이토카인-유도 장애이다.
- [0032] 박테리아로부터 생산된 엔도톡신과 사이토카인, 특히 TNF, IL-1 및 IL-6은 내피에서 전응집(procoagulation) 인자를 활성화시켜 내피 손상을 야기한다. 이러한 손상된 내피 표면은 항응집 특성을 저해할 뿐만 아니라 항섬유소용해(antifibrinolysis)를 증가시킴으로써 혈관내 응고, 미세 혈관성 혈전증(thrombosis) 및 다중 기관 부전을 야기할 수 있다.
- [0033] 따라서, TNF, IL-1 및 IL-6과 같은 사이토카인을 억제할 수 있는 약물은 패혈증 환자의 증상을 개선하거나 패혈

증을 치료 또는 예방하는 데에 효과적이다.

- [0034] 텔로미어(telomere)는 염색체의 말단에 반복적으로 존재하는 유전 물질로서, 해당 염색체의 손상이나 다른 염색체와의 결합을 방지한다고 알려져 있다. 세포가 분열할 때마다 텔로미어의 길이는 조금씩 짧아지는데, 일정한 횟수 이상의 세포 분열이 있게 되면 텔로미어는 매우 짧아지고, 그 세포는 분열을 멈추고 죽게 된다. 반면 텔로미어를 길게 하면 세포의 수명이 연장된다고 알려져 있으며, 그 예로 암세포에서는 텔로머라제(telomerase)라는 효소가 분비되어 텔로미어가 짧아지는 것을 막기 때문에, 암세포가 죽지 않고 계속 증식할 수 있다고 알려져 있다.
- [0035] 일 측면에서, 본 발명은 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드를 포함할 수 있다.
- [0036] 일 측면에서, 본 발명은 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 유효 량의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드를 패혈증 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 패혈증 예방 또는 치료방법이다.
- [0037] 일 측면에서, 본 발명은 용도에 관한 것으로서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드의 패혈증 예방 또는 치료에의 용도이다.
- [0038] 일 측면에서, 본 발명은 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 패혈증 예방 또는 치료를 위한 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드이다.
- [0039] 일 측면에서 본 발명은 키트에 관한 것으로서, 상기 키트는, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드; 및 펩티드의 투여량, 투여 경로, 투여 횟수 및 적응증 중 하나 이상을 개시한 지시서를 포함할 수 있다.
- [0040] 일 측면에서, 상기 단편은 3개 이상의 아미노산으로 구성된 단편일 수 있다. 다른 측면에서, 상기 단편은 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상 또는 15개 이상의 아미노산으로 구성된 단편일 수 있다.
- [0041] 일 측면에서, 상기 펩티드는 인간의 텔로머라제로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로 서열번호 1의 펩티드는 인간의 텔로머라제 전체 서열(1132개 아미노산, 서열번호 2) 중 611 내지 626 위치의 펩티드를 의미한다.
- [0042] 일 측면에서 상기 패혈증의 예방 또는 치료는 패혈증성 쇼크를 예방 또는 치료하는 것일 수 있다.
- [0043] 일 측면에서 상기 펩티드는 주사 제형의 형태로 투여되는 것일 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 일 측면에서 상기 주사 제형은 정맥 내 주사 제형일 수 있다. 일 측면에서, 상기 주사 제형은 동결건조 펩티드가 식염수에 용해되어 있는 용액일 수 있다.
- [0044] 일 측면에서 상기 용액의 펩티드 농도는 0.5 내지 1.0mg/mL일 수 있다. 다른 측면에서 상기 용액의 펩티드 농도는 0.6mg/mL이상 또는 0.7mg/mL이상일 수 있다. 다른 측면에서, 상기 용액의 펩티드 농도는 0.9mg/mL이하 또는 0.8mg/mL이하일 수 있다. 예컨대, 0.75mg/mL일 수 있다.
- [0045] 일 측면에서 상기 펩티드는 0.5 내지 5.0mg/kg의 1회 투여량으로 투여되는 것일 수 있다. 일 측면에서 상기 1회 투여량은 0.6mg/kg 이상, 0.7mg/kg 이상, 0.8mg/kg 이상, 0.9mg/kg 이상, 1.0mg/kg 이상, 1.1mg/kg 이상, 1.2mg/kg 이상, 1.3mg/kg 이상, 1.4mg/kg 이상 일 수 있다. 상기 투여량은 4.5mg/kg 이하, 4.0mg/kg 이하, 3.5mg/kg 이하, 3.0mg/kg 이하, 2.5mg/kg 이하, 2.0mg/kg 이하, 1.8mg/kg 이하 일 수 있다.
- [0046] 일 측면에서 상기 펩티드는 단회 투여될 수 있다. 패혈증은 급성 염증이므로 비교적 고용량을 짧은 간격으로 투여하는 것이 필요하다. 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편은 0.5 내지 5.0mg/kg의 투여량일 때 투여 횟수가 단회인 경우에도 그 효과가 매우 우수하다. 그러나 반드시 단회에 한정되는 것은 아니다. 필요에 따라서는 0.5 내지 5.0mg/kg의 투여량을 2회 이상 투여할 수도 있다. 또한, 경우에 따라서는, 투여량을 낮추고 투여 횟수를 늘릴 수도 있다. 예컨대, 투여량을 0.1 내지 1.0mg/kg으로 낮추고 대신 투여 횟수를 2회 이상, 3회 이상 또는 4회 이상, 투여 간격을 30분 이상, 1시간 이상, 2시간 이상 또는 3시간 이상으로 하여 투여할 수도 있다.
- [0047] 일 측면에서, 상기 조성물은 약학 조성물일 수 있다. 다른 측면에서, 상기 조성물을 식품 조성물일 수 있다.

- [0048] 본 명세서에서 사용되는 패혈증과 관련된 증상을 "실질적으로 제거하는"은 적어도 96%로 그 증상의 발생을 감소시키는 것을 의미한다.
- [0049] 본 명세서에서 사용되는 "치료하는"은, 예를 들어 장애의 억제, 퇴보, 또는 정체를 유발하고, 또는 장애의 중증도를 줄이고, 억누르고, 억제하고 감소시키고, 또는 장애의 증상을 제거하거나 개선시키는 것을 포함한다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 피험자에서 질병 진행 또는 질병 합병증의 "억제"는 피험자에서 질병 진행 및/또는 질병 합병증을 방지하거나 감소시키는 것을 의미한다.
- [0051] 본 명세서에서 사용되는 패혈증과 관련된 "증상"은 관절염과 관련된 임의의 임상적 또는 검사 징후를 포함하며, 피험자가 느끼거나 관찰할 수 있는 것으로 제한되지 않는다. 염증은 패혈증의 증상일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일측면은 서열번호 1을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드를 이용하여 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 대량 생산할 수 있다. 예컨대, 해당 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주 세포에 넣어 배양함으로써, 해당 펩티드를 대량 생산할 수 있다.
- [0053] 본 명세서에 개시된 펩티드는 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에 개시된 펩티드는, 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그 단편들과 1개 이상의 아미노산, 2개 이상의 아미노산, 3개 이상의 아미노산, 4개 이상의 아미노산, 5개 이상의 아미노산, 6개 이상의 아미노산 또는 7개 이상의 아미노산이 변화된 펩티드를 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 일측면에서, 아미노산 변화는 펩티드의 물리화학적 특성이 변경되도록 하는 성질에 속한다. 예를 들어, 펩티드의 열안정성을 향상시키고, 기질 특이성을 변경시키고, 최적의 pH를 변화시키는 등의 아미노산 변화가 수행될 수 있다.
- [0055] 본 명세서에서 "아미노산"이라 함은 자연적으로 펩티드로 통합되는 22개의 표준 아미노산들 뿐만 아니라 D-아이소머 및 변형된 아미노산들을 포함한다. 이에 따라, 본 발명의 일측면에서 펩티드는 D-아미노산을 포함하는 펩티드일 수 있다. 한편, 본 발명의 다른 측면에서 펩티드는 번역 후 변형(post-translational modification)된 비표준 아미노산 등을 포함할 수 있다. 번역 후 변형의 예는 인산화(phosphorylation), 당화(glycosylation), 아실화(acylation) (예컨대, 아세틸화(acetylation), 미리스토일화(myristoylation) 및 팔미토일화(palmitoylation)를 포함), 알킬화(alkylation), 카르복실화(carboxylation), 히드록실화(hydroxylation), 당화반응(glycation), 비오틴닐화(biotinylation), 유비퀴틴닐화(ubiquitinylation), 화학적 성질의 변화(예컨대, 베타-제거 탈아미드화, 탈아미드화) 및 구조적 변화(예컨대, 이황화물 브릿지의 형성)를 포함한다. 또한, 펩티드 크로싱을 형성하기 위한 가교제(crosslinker)들과의 결합과정에서 일어나는 화학 반응들에 의해 생기는 아미노산의 변화, 예컨대 아미노기, 카르복시기 또는 사이드 체인에서의 변화와 같은 아미노산의 변화를 포함한다.
- [0056] 본 명세서에 개시된 펩티드는 자연 그대로의 공급원으로부터 동정 및 분리된 야생형 펩티드일 수 있다. 한편, 본 명세서에 개시된 펩티드는 서열번호 1의 단편들인 펩티드와 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 및/또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는, 인공 변이체일 수 있다. 인공 변이체에서 뿐만 아니라 야생형 폴리펩티드에서의 아미노산 변화는 단백질의 폴딩(folding) 및/또는 활성에 유의한 영향을 미치지 않는 보존성 아미노산 치환을 포함한다. 보존성 치환의 예들은 염기성 아미노산(아르기닌, 리신 및 히스티딘), 산성 아미노산(글루탐산 및 아스파르트산), 극성 아미노산(글루타민 및 아스파라긴), 소수성 아미노산(루신, 이소로이신, 발린 및 메티오닌), 방향족 아미노산(페닐알라닌, 트립토판 및 티로신), 및 작은 아미노산(글리신, 알라닌, 세린 및 트레오닌)의 군의 범위 내에 있다. 일반적으로 특이적 활성을 변경시키지 않는 아미노산 치환이 본 분야에 공지되어 있다. 가장 흔하게 발생하는 교환은 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, 및 Asp/Gly, 그리고 이들과 반대인 것들이다. 보존적 치환의 다른 예는 다음 표와 같다.

표 1

원래 아미노산	예시적인 잔기 치환	바람직한 잔기 치환
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	Leu
Leu (L)	norleucine; ile ; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe ; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	Leu

[0057]

[0058]

펩티드의 생물학적 특성에 있어서의 실제적인 변형은 (a) 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들면 시트 또는 나선 입체 구조를 유지하는데 있어서의 이들의 효과, (b) 표적 부위에서의 상기 분자의 전하 또는 소수성을 유지하는데 있어서의 이들의 효과, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는데 있어서의 이들의 효과가 상당히 상이한 치환부를 선택함으로써 수행된다. 천연 잔기는 통상의 측쇄 특성에 기준하여 다음 그룹으로 구분된다:

[0059]

(1) 소수성: 노르루이신, met, ala, val, leu, ile;

[0060]

(2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0061]

(3) 산성: asp, glu;

[0062]

(4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0063]

(5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0064]

(6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0065]

비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또다른 부류로 교환함으로써 이루어질 것이다. 펩티드의 적당한 입체 구조를 유지하는 것과 관련이 없는 어떠한 시스테인 잔기도 일반적으로 세린으로 치환되어 상기 분자의 산화적 안정성을 향상시키고 이상한 가교결합을 방지할 수 있다. 역으로 말하면, 시스테인 결함(들)을 상기 펩티드에 가하여 그의 안정성을 향상시킬 수 있다

[0066]

펩티드의 다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 글리코실화 패턴이 변화된 것이다. 변화란 의미는 펩티드에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 잔기의 결실 및(또는) 펩티드 내에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의

부가를 나타낸다.

- [0067] 펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된 것이다. N-연결된이란 탄수화물 잔기가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 말한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 잔기를 아스파라긴 측쇄에 효소적 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이들 트리펩티드 서열 중의 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써, 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중의 하나를 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 의미하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신을 사용할 수도 있다.
- [0068] 펩티드로의 글리코실화 부위의 부가는 하나 이상의 상기 언급된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변화시킴으로써 편리하게 수행된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 이러한 변화는 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 최초 항체의 서열에 부가하거나 이들 잔기로 치환함으로써 이루어질 수도 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).
- [0069] 다른 양태에서 본원은 상기 폴리펩타이드를 코딩하는, 핵산 분자를 제공하며, 이의 염기서열은 예를 들면 GAA GCG CGC CCG GCG CTG CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA 서열(서열번호 3)을 가진다. 핵산 분자는 당업자에게 공지된 기법에 따라 숙주 세포 안에 도입될 수 있다. 예를 들면 칼슘 포스페이트법, 리포솜, 일렉트로포레이션, 바이러스와 세포를 접촉시키는 것에 의한 형질전환, 또는 직접 세포내로 마이크로 주사하는 방법 등이 있다. 숙주 세포는 고등 진핵 세포, 예컨대 포유류 세포, 또는 하급 진핵 세포, 예컨대 효모 세포이거나, 또는 원핵 세포, 예컨대 박테리아 세포일 수 있다. 형질전환에 적당한 원핵 숙주로는 대장균, 바실러스 서브틸리스, 살모넬라 타이피뮤리움, 슈도모나스, 스트렙토마이세스, 마이크박테리아 속에 속하는 종들을 예로 들 수 있다.
- [0070] 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터는 일반적으로 재조합 발현 벡터로 숙주 세포의 형질전환을 가능하게 하는 복제 기원 및 선택가능한 마커(예컨대 진핵 세포 배양을 위한 디하이드로폴레이트 환원효소 또는 네오마이신 내성, 또는 이. 콜라이에서의 테트라사이클린 또는 암피실린 내성, 또는 *S. cerevisiae* TRP1 유전자), 및 단백질 코딩 서열의 전사를 조절하는 프로모터를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 유용한 발현 벡터는 예를 들면 SV40 및 pcDNA의 유도체 및 col E1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX(Smith, et al., Gene 67:31-40 (1988))와 같은 공지된 박테리아 플라스미드, pMB9 및 이것의 유도체 RP4와 같은 플라스미드, NM989와 같은 파지 I의 수많은 유도체와 같은 파지 DNA, 및 M13 및 필라멘트형 단일 가닥의 파지 DNA와 같은 파지 DNA; 효모 플라스미드, 예컨대 파지 DNA 또는 발현 제어 서열을 사용하기 위해 변형된 플라스미드와 파지 DNA의 조합으로부터 유도된 벡터 등이 있다. 포유류 발현 벡터는 복제 기원, 적당한 프로모터 및 인핸서를 포함한다. 또한 필수 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여체 및 수용체 부위, 전사 종결 서열, 및 5' 플랭킹 비전사 서열을 포함할 수 있다. 포유류 발현 벡터는 유도성 프로모터, 예컨대 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터를 포함하는 벡터, DHFR 발현 카세트를 포함하는 어떠한 발현 벡터 또는 pED와 같은 DHFR/메토포렉세이트 공-중폭 벡터(Randal J, Kaufman, 1991, Randal J. Kaufman, Current Protocols in Molecular Biology, 16, 12 (1991))를 포함한다. 또는 글루타민 합성효소/메티오닌 술폭시딘 공-중폭벡터, 예컨대 pEE14(Celltech). 엡스타인 바 바이러스(EBV) 또는 핵 항원(EBNA)의 제어하에 에피조성 발현을 지시하는 벡터, 예컨대 pREP4(Invitrogen), pCEP4(Invitrogen), pMEP4(Invitrogen), pREP8(Invitrogen), pREP9(Invitrogen), 및 pEBVHis(Invitrogen)가 사용될 수 있다. 선택성 포유류 발현 벡터로는 Rc/CMV(Invitrogen), pRc/RSV(Invitrogen) 등이 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 백시니아 바이러스 포유류 발현 벡터는 pSC11, pMJ601, pTKgptF1S등이 있다.
- [0071] 본 발명에 사용될 수 있는 효모 발현 시스템으로는 비-융합 pYES2 벡터(Invitrogen), 융합 pYESHisA, B, C(Invitrogen), pRS 벡터 등이 있다.
- [0072] 상기 벡터는 다양한 세포 포유류 특히 인간 유래 세포, 또한 박테리아, 효모, 진균, 곤충, 선충류 및 식물 세포로 도입될 수 있다. 적당한 세포의 예로는, VERO 세포, HELA 세포, 예컨대 ATCC No. CCL2, CHO 세포주, 예컨대 ATCC No. CCL61, COS 세포, 예컨대 COS-7 세포 및 ATCC No. CRL 1650세포, W138, BHK, HepG2, 3T3, 예컨대 ATCC No. CRL6361, A549, PC12, K562 세포, 293세포, Sf9세포, 예컨대 ATCC No. CRL1711 및 Cv1 세포, 예컨대 ATCC No. CCL70 등이 있다.
- [0073] 본 발명에 사용될 수 있는 다른 적당한 세포로는 원핵 숙주 세포 균주, 예컨대 대장균(예컨대 DH5-α 균주), 바실러스 서브틸리스, 살모넬라 타이피뮤리움, 또는 슈도모나스, 스트렙토마이세스 및 스태필로코쿠스 속에 속하는 균주들이 있다.

- [0074] 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드를 0.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 내지 1 mg/mg , 구체적으로 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 내지 0.5 mg/mg , 더 구체적으로 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 내지 0.1 mg/mg 함량으로 포함할 수 있다. 상기 범위로 포함하는 경우 본 발명의 의도한 효과를 나타내기 위해 적절한 뿐만 아니라, 조성물의 안정성 및 안전성을 모두 만족할 수 있으며, 비용 대비 효과의 측면에서도 상기 범위로 포함하는 것이 적절할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 인간, 개, 닭, 돼지, 소, 양, 기니아피그 또는 원숭이를 포함하는 모든 동물에 적용될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 경구, 직장, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 골수 내, 경막 내 또는 피하 등으로 투여될 수 있다.
- [0077] 경구 투여를 위한 제형은 정제, 환제, 연질 또는 경질 캡슐제, 과립제, 산제, 액제 또는 유탁제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여를 위한 제형은 주사제, 점적제, 로션, 연고, 젤, 크림, 현탁제, 유제, 좌제, 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 필요에 따라 희석제, 부형제, 활택제, 결합제, 붕해제, 완충제, 분산제, 계면 활성제, 착색제, 향료 또는 감미제 등의 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 당업계의 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물의 유효성분은 투여 받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 내지 1 $\text{g}/\text{kg}/\text{일}$, 구체적으로는 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 내지 100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{일}$, 더 구체적으로는 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 내지 10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{일}$, 보다 더 구체적으로는 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 내지 5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{일}$ 이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 1일 1회 내지 3회 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] 본 발명의 일측면에 따른 화장품 조성물은 국소 적용에 적합한 모든 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들면, 용액, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 유상에 수상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 고체, 젤, 분말, 페이스트, 포말(foam) 또는 에어로졸의 제형으로 제공될 수 있다. 이러한 제형은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0081] 본 발명의 일측면에 따른 화장품 조성물은 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분들을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 일측면에 따른 화장품 조성물은 보습제, 에몰리언트제, 계면 활성제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조정제, 유기 또는 무기 안료, 향료, 냉감제 또는 제한(制汗)제를 더 포함할 수 있다. 상기 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하며, 그 배합량은 화장품 조성물 전체 중량을 기준으로 0.01 내지 5 중량%, 구체적으로 0.01 내지 3 중량%일 수 있다.
- [0082] 본 발명의 일측면에 따른 식품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 분말제, 액제, 고형 제제 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형은 유효성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.
- [0083] 상기 유효성분의 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 구체적으로는 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 내지 10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{일}$, 더 구체적으로는 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 내지 1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{일}$, 보다 더 구체적으로는 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 내지 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 투여하고자 하는 대상의 연령, 건강 상태, 합병증 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있다.
- [0084] 경구 투여를 위한 제형은 고형 또는 액상의 용량 단위, 예컨대 말제, 산제, 정제, 당의제, 캡슐제, 과립제, 현탁제, 액제, 시럽제, 드롭제, 설하정 그 밖의 제형에 의해서 할 수 있다.
- [0085] 말제는 본 발명의 펩티드를 적절한 입도로 분쇄함으로써 제조된다. 산제는 본 발명의 펩티드를 적절한 입도로 분쇄한 후, 마찬가지로 적절한 입도로 분쇄한 의약품 담체, 예컨대 전분, 만니톨과 같은 식용 탄수화물 그 밖의 것과 혼합함으로써 제조한다. 필요에 따라, 풍미제, 보존제, 분산제, 착색제, 향료 그 밖의 것을 혼합할 수도 있다.
- [0086] 캡슐제는 우선 상술한 바와 같이 하여 분말형으로 된 말제나 산제 또는 정제의 항에서 설명한 것과 같이 과립화

한 것을, 예컨대 젤라틴 캡슐과 같은 캡슐 외피의 안에 충전함으로써 제조된다. 활택제나 유동화제, 예컨대 콜로이드형 실리카, 탈크, 스테아린산마그네슘, 스테아린산칼슘, 고형의 폴리에틸렌글리콜과 같은 것을 분말 상태인 것에 혼합하고, 그런 다음 충전 조작을 할 수도 있다. 붕괴제나 가용화제, 예컨대 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 크로스카르멜로오스나트륨, 카르복시메틸스타치나트륨, 탄산칼슘, 탄산나트륨을 첨가하면, 캡슐제를 섭취하였을 때의 의약의 유효성을 개선할 수 있다.

[0087] 또한, 본 발명의 펩티드의 미세 분말을 식물유, 폴리에틸렌글리콜, 글리세린, 계면활성제 중에 현탁 분산시키고, 이것을 젤라틴 시트로 둘러싸 연질 캡슐제로 할 수 있다.

[0088] 정제는 부형제를 가해 분말 혼합물을 만들고, 과립화 또는 슬러그화하고, 이어서 붕괴제 또는 활택제를 가한 후 타정함으로써 제조된다.

[0089] 필요하다면, 경구 투여를 위한 용량 단위 처방은 마이크로캡슐화할 수도 있다. 그 처방은 또한 피복을 하거나, 고분자 왁스 등 중에 매립함으로써 작용 시간의 연장이나 지속 방출을 일으킬 수도 있다.

[0090] 비경구 투여로서 주사제, 좌제 등을 이용할 수 있다. 피하○근육 또는 정맥내 주사용으로 한 액상 용량 단위 형태, 예컨대 용액이나 현탁제의 형태를 사용함으로써 수행할 수 있다. 이들은 본 발명의 펩티드의 일정량을 주사 목적에 적합한 비독성의 액상 담체, 예컨대 수성이나 유성의 매체에 현탁하거나 또는 용해하고, 이어서 이 현탁액 또는 용액을 멸균시킴으로써 제조된다. 주사액을 등장으로 하기 위해서 비독성의 염이나 염 용액을 첨가할 수도 있다. 또한 안정제, 보존제, 유화제 등을 병용할 수도 있다.

[0091] 직장 투여는 본 발명의 펩티드를 저용점의, 물에 가용 또는 불용의 고체, 예컨대 폴리에틸렌글리콜, 카카오지, 반합성의 유지, 고급 에스테르류 (예컨대 팔미틴산미리스틸에스테르) 및 이들의 혼합물에 용해 또는 현탁시켜 제조한 좌제 등을 사용함으로써 수행할 수 있다.

[0092] 본 발명에 따른 류마티스 관절염 치료 및 예방 조성물은 기타의 약제, 예컨대 항염증 스테로이드제나 비스테로이드계 항염증제, 면역 억제제, 질환 수식성 항류마티즘제 등을 배합 또는 병용할 수 있다.

[0093] 본 명세서에서 사용된 용어들은 특정 구체예들을 설명하기 위한 목적으로만 의도된 것이지 본 발명을 한정하고자 하는 의도가 아니다. 명사 앞에 개수가 생략된 용어는 수량을 제한하고자 하는 것이 아니라 언급된 명사 물품이 하나 이상 존재하는 것을 나타내는 것이다. 용어 "포함하는", "갖는", 및 "함유하는"은 열린 용어로 해석된다(즉, "포함하지만 이에 한정되지는 않는"의 의미).

[0094] 수치의 범위를 언급하는 것은 단지 그 범위 내에 속하는 각각의 별개의 수치들을 개별적으로 언급하는 것을 대신하는 쉬운 방법이기 때문이며, 그것이 아님이 명시되어 있지 않는 한, 각 별개의 수치는 마치 개별적으로 명세서에 언급되어 있는 것처럼 본 명세서에 통합된다. 모든 범위의 끝 값들은 그 범위 내에 포함되며 독립적으로 조합 가능하다.

[0095] 본 명세서에 언급된 모든 방법들은 달리 명시되어 있거나 문맥에 의해 명백히 모순되지 않는 한 적절한 순서로 수행될 수 있다. 어느 한 실시예 및 모든 실시예 또는 예시적 언어 (예컨대, "~과 같은")를 사용하는 것은, 청구범위에 포함되어 있지 않는 한, 단지 본 발명을 더 잘 기술하기 위함이지 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 명세서의 어떤 언어도 어떤 비청구된 구성요소를 본 발명의 실시예 필수적인 것으로 해석되어져서는 아니된다. 다른 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용되는 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 갖는 사람에 의해 통상 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다.

[0096] 본 발명의 바람직한 구체예들은 본 발명을 수행하기 위해 발명자에게 알려진 가장 최적의 모드를 포함한다. 바람직한 구체예들의 변이들이 앞선 기재를 읽으면 당업자에게 명백하게 될 수 있다. 본 발명자들은 당업자들이 그러한 변이를 적절히 이용하길 기대하고, 발명자들은 본 명세서에 기재된 것과 다른 방식으로 본 발명이 실시되기를 기대한다. 따라서, 본 발명은, 특허법에 의해 허용되는 것과 같이, 첨부된 특허청구범위에서 언급된 발명의 요지의 균등물 및 모든 변형들을 포함한다. 더욱이, 모든 가능한 변이들 내에서 상기 언급된 구성요소들의 어떤 조합이라도 여기서 반대로 명시하거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 본 발명에 포함된다. 본 발명은 예시적인 구체예들을 참조하여 구체적으로 나타내어지고 기술되었지만, 당업자들은 하기 청구범위에 의해 정의되는 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고서도 형태 및 디테일에서 다양한 변화가 행해질 수 있음을 잘 이해할 것이다.

[0097] **발명의 실시를 위한 형태**

[0098] **실시예 1: 펩티드의 합성**

[0099] 서열번호 1의 펩티드(이하 "PEP 1"이라 함)를 종래에 알려진 고상 펩티드 합성법에 따라 제조하였다. 구체적으로, 펩티드들은 ASP48S(Peptron, Inc., 대한민국 대전)를 이용하여 Fmoc 고상 합성법(solid phase peptide synthesis, SPPS)을 통해 C-말단부터 아미노산 하나씩 커플링함으로써 합성하였다. 다음과 같이, 펩티드들의 C-말단의 첫번째 아미노산이 수지에 부착된 것을 사용하였다. 예컨대 다음과 같다:

[0100] $\text{NH}_2\text{-Lys(Boc)-2-chloro-Trityl Resin}$

[0101] $\text{NH}_2\text{-Ala-2-chloro-Trityl Resin}$

[0102] $\text{NH}_2\text{-Arg(Pbf)-2-chloro-Trityl Resin}$

[0103] 펩티드 합성에 사용한 모든 아미노산 원료는 N-term이 Fmoc으로 보호(Protection)되고, 잔기는 모두 산에서 제거되는 Trt, Boc, t-Bu (t-butylester), Pbf (2,2,4,6,7-pentamethyl dihydro-benzofuran-5-sulfonyl) 등으로 보호된 것을 사용하였다. 예컨대 다음과 같다:

[0104] Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Trt-Mercaptoacetic acid.

[0105] 커플링 시약(Coupling reagent)으로는 HBTU[2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetamethylammonium hexafluorophosphate] / HOBt [N-Hydroxybenzotriazole] / NMM [4-Methylmorpholine] 를 사용하였다. Fmoc 제거는 20%의 DMF 중 피페리딘(piperidine in DMF)을 이용하였다. 합성된 펩티드를 Resin에서 분리 및 잔기의 보호기 제거에는 절단 카테일(Cleavage Cocktail) [TFA (trifluoroacetic acid) / TIS (triisopropylsilane) / EDT (ethanedithiol) / H_2O =92.5/2.5/2.5/2.5] 를 사용하였다.

[0106] 아미노산 보호기가 결합된 출발 아미노산이 고상 지지체에 결합되어 있는 상태를 이용하여 여기에 해당 아미노산들을 각각 반응시키고 용매로 세척한 후 탈보호하는 과정을 반복함으로써 각 펩티드를 합성하였다. 합성된 펩티드를 수지로부터 끊어낸 후 HPLC로 정제하고, 합성 여부를 MS로 확인하고 동결 건조하였다.

[0107] 본 실시예에 사용된 펩티드에 대해 고성능 액체 크로마토 그래피 결과, 모든 펩티드의 순도는 95% 이상이었다.

[0108] PEP 1 제조에 관한 구체적인 과정을 설명하면 다음과 같다.

[0109] 1) 커플링

[0110] $\text{NH}_2\text{-Lys(Boc)-2-chloro-Trityl Resin}$ 에 보호된 아미노산(8당량)와 커플링 시약 HBTU(8당량)/HOBt(8당량)/NMM(16당량) 을 DMF에 녹여서 첨가한 후, 상온에서 2시간 동안 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다.

[0111] 2) Fmoc 탈보호

[0112] 20%의 DMF 중의 피페리딘(piperidine in DMF) 을 가하고 상온에서 5분 간 2회 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다.

[0113] 3) 1과 2의 반응을 반복적으로 하여 펩티드 기본 골격 $\text{NH}_2\text{-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-chloro-Trityl Resin}$ 을 만들었다.

[0114] 4) 절단(Cleavage): 합성이 완료된 펩티드 Resin에 절단 카테일(Cleavage Cocktail) 을 가하여 펩티드를 Resin에서 분리하였다.

[0115] 5) 얻어진 mixture에 Cooling diethyl ether를 가한 후, 원심 분리하여 얻어진 펩티드를 침전시킨다.

[0116] 6) Prep-HPLC로 정제 후, LC/MS로 분자량을 확인하고 동결하여 powder로 제조하였다.

[0117] **실시예 2: 제형의 조제**

[0118] **1. PEP 1의 정맥 주사 제형의 조제**

[0119] 상기 실시예 1에 따라 얻어진 동결 건조 파우더 형태의 PEP 1을 0.9% 식염수에 용해시켜 사용하였다. PEP 1의 순도에 대한 보정(순도: 97.3 %, 함량: 85.3 %)을 실시하여 투여 직전에 0.9% 식염수를 부형제로 하여 0.75

mg/mL의 농도로 주사용 용액을 조제하였다.

2. LPS의 정맥 주사 제형의 조제

리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)로는 *이. 콜라이(E. coli)* 0127:B8 (ATCC 12740) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, L3129)의 LPS를 사용하였다. LPS도 투여 직전 0.9% 식염수를 이용하여 0.25 mg/mL 용량으로 용해하여 조제하였다.

실시예 3: 동물 실험

본 실험은 주식회사 한국동물의과학연구소의 동물실험윤리규정을 준수하여 실시하였다. 또한, 본 실험은 Non GLP 시험으로서 식품의약품안전청 고시 제 2009-183호 (2009년12월 22일) '비임상시험관리기준' 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997)를 참조하여 수행하였다.

본 실험에서는 스프래그 다우리 랫트에 패혈증과 관련된 염증 반응을 유발시킨 후 시험물질인 PEP 1을 투여한 다음 혈중 산화질소(NO) 및 사이토카인을 측정하였다.

사용된 스프래그 다우리 랫트는 오리엔트바이오(대한민국 경기도 가평군 북면 목동리)에서 입수한 특정 병원체가 없는 SPF 랫트(Cr1j:CD(SD))이었다. 8.5주령, 250 g \pm 20% 이내의 체중을 갖는 수컷 랫트 100마리 중 7일간 관찰 결과 건강상태가 양호한 수컷 96마리 (평균 9.5주령, 평균체중(g)의 \pm 20% 이내)를 대상으로 실험을 수행하였다. 사육 조건은 온도 23 \pm 3 $^{\circ}$ C, 상대습도 55 \pm 15%, 환기횟수 10~20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등~오후 8 시 소등) 및 조도 150~300 Lux이었다.

상기 48마리 랫트를 총 4개 그룹으로 나누고, 각 그룹에 대해 PEP 1 및/또는 LPS를 투여하였다.

투여경로는 모두 정맥투여를 하였다. 구체적으로, 상기 실시예2에서 제조된 PEP 1 제형 및/또는 LPS 제형을 정맥내 주사로 투여하였다. 투여 횟수는 모두 1회였다. 투여량은 투여 전 가장 최근에 측정된 체중을 근거로 2mL/kg을 계산하여 투여하였다. 각 그룹의 투여는 하기 표와 같이 수행되었다.

표 2

No	투여량(mg/kg)		주사 제형 투여량(mL/kg)	동물수
	PEP 1	LPS		
G1	-	-	2	12
G2	1.5	-	2	12
G3	-	0.5	2	12
G4	1.5	0.5	2	12

먼저, 모든 동물에 대해 PEP 1 및/또는 LPS를 투여하기 전 날에 0.8mL씩 전 채혈하였다. 전 채혈 다음 날 먼저 LPS 투여 대상 군에 대해 상기 표에 따라 투여하고, LPS 투여 시점으로부터 30분 경과 후에, PEP 1 투여 대상 군에 대해 투여를 실시하였다. 투여량은 상기 표에 나타난 바와 같았다. 모든 투여가 완료된 후 LPS 투여 시점으로부터 75분 및 255분 (즉, PEP 1 투여 시점으로부터 각각 45분 및 195분)에 각각 0.8mL씩 채혈하였다. 채혈된 혈액에 대해서 사이토카인을 분석하였다. 사이토카인 중에서 패혈증의 주요 지표인 TNF- α , IL-1b 및 IL-6의 농도를 측정하였다. 표 1의 G1~G4에 대해서 TNF- α , IL-1, IL-6 농도를 측정하였다. 그 결과는 도 1 내지 도 3에 나타나 있다. 도에 표시된 "*"는 p<0.05를 의미한다.

도 1은 표 1에 따라 각각 PEP 1, LPS, 및 LPS + PEP 1를 투여한 후 혈액을 채취하여 혈액 내 TNF- α 의 농도를 측정한 결과이다. 도 1에 나타난 바와 같이, LPS로 패혈증을 유도한 랫트의 혈액에는 TNF- α 가 고농도로 존재하지만 LPS 투여 후 PEP 1을 처리한 결과 불과 195분만에 랫트의 혈액 내 TNF- α 의 농도가 현저히 감소한 것을 알 수 있다.

도 2는 표 2에 따라 각각 PEP 1, LPS, 및 LPS + PEP 1를 투여한 후 혈액을 채취하여 혈액 내 IL6의 농도를 측정한 결과이다. 도 2에 나타난 바와 같이, LPS로 패혈증을 유도한 랫트의 혈액에는 IL6가 고농도로 존재하지만 LPS 투여 후 PEP 1을 처리한 결과 불과 195분만에 랫트의 혈액 내 IL6의 농도가 현저히 감소한 것을 알 수

있다.

[0132] 도 3은 표 2에 따라 각각 PEP 1, LPS, 및 LPS + PEP 1를 투여한 후 혈액을 채취하여 혈액 내 IL1b의 농도를 측정한 결과이다. 도 3에 나타난 바와 같이, LPS로 패혈증을 유도한 랫트의 혈액에는 IL1b가 고농도로 존재하지만 LPS 투여 후 PEP 1을 처리한 결과 불과 195분만에 랫트의 혈액 내 IL1b의 농도가 현저히 감소한 것을 알 수 있다.

[0133] 한편, 1.5mg/kg의 1회 투여량으로도 모든 랫트들은 생존함을 알 수 있었다.

[0134] 실시예 4: 독성 실험

[0135] (1) 세포의 준비

[0136] ATCC로부터 얻은 HeLa 세포주를 MEM(Minimum Essential Medium)에 10% 우태아혈청 (Invitrogen, USA)과 Earle's salts, 비필수 아미노산, 소듐 파이루베이트 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 페니실린과 100 units/ml 스트렙토마이신 (streptomycin)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0137] (2) 세포생존율 및 독성 분석

[0138] 한편, 상기 배양된 세포주를 96-웰 플레이트)에 분주하여 배지에 10% 우태아혈청 (Invitrogen, USA)과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 페니실린과 100 유닛/ml 스트렙토마이신을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. PBS 세척 후, MEM(Minimum Essential Medium)에 1시간의 스타베이션(starvation)을 시켰다. 각 PEP 1 20 μM 을 100 μL 처리하여 37°C에 24시간 배양한 후 MTT 어세이 방법을 이용하여 세포생존율 및 독성을 분석하였다. 그 결과는 도 4에 나타난 바와 같다.

[0139] 서열목록 Free Text

서열번호 1(PEP 1): EARPALLTSRLRFIPK

서열번호 2(인간 텔로머라제):

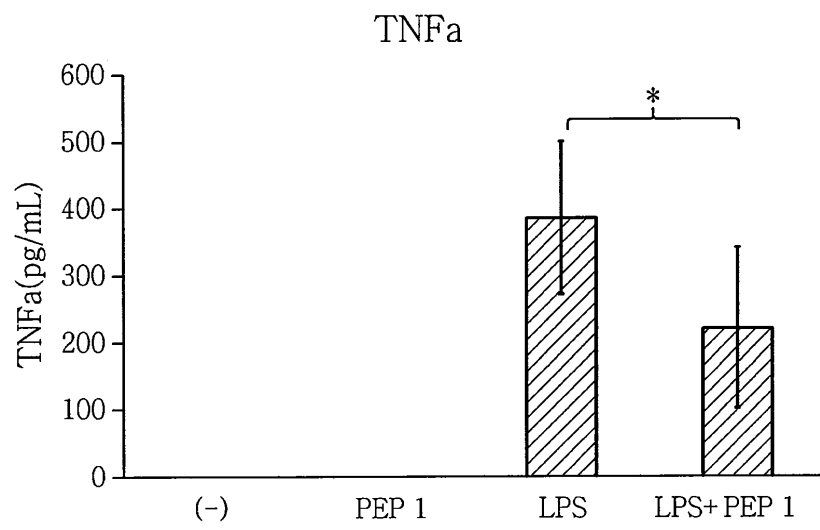
MPRAPRCRAVRSLRSHYREVLPLATFVRLGPGQWRVLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSC
KELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDVLAHLLA
RCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRS
LPLPKRPRRGAPEPERTPVGGQSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPP
STSRPPRPWDTPCPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTTPRRLPRLPQR
YWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAAPEEEDTDPRLVQLLRQHSSPWQVY
GFVRACLRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRDCAWLRSPGVGCVPAAEHRLREE
ILAKFLHWLMSVYVVELLRFFVYTETTFQKNRLFYRKSVMKLSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPAL
LTSRLRFIPKPDGLRPIVNDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVNLNERARRPGLLGASVGLDDIHRAWRTF
VLRVRAQDPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQ
PYMRQFVAHLQETSPLRDAVVEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPOQSILSTLLCSLCYG
DMENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRTVNVFPVEALGGTAFVQMPA
HGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRLFGVLRLLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNI
YKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAF
LLKLTRHRVTYVPLGLSLRTAQTLRSRKLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD

서열번호 3 (PEP 1을 암호화하는 뉴클레오티드) : GAA GCG CGC CCG GCG CTG
CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA 서열

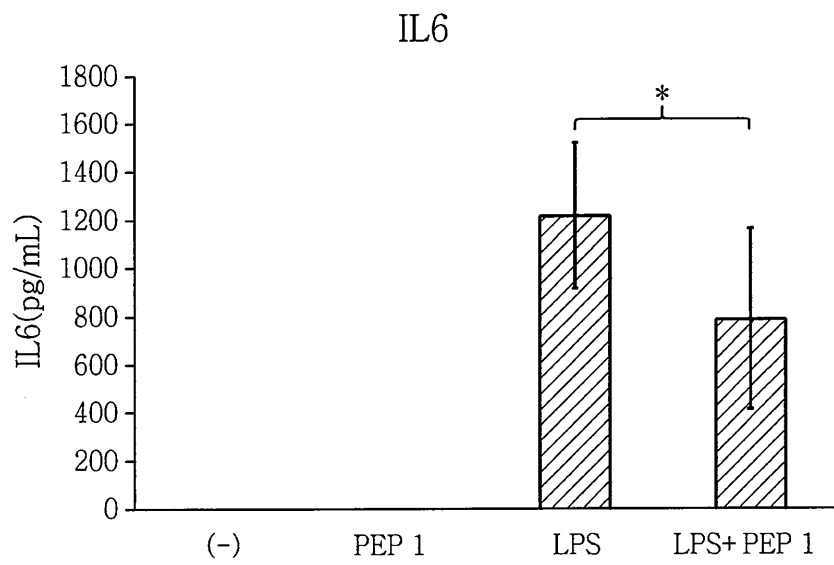
[0140]

도면

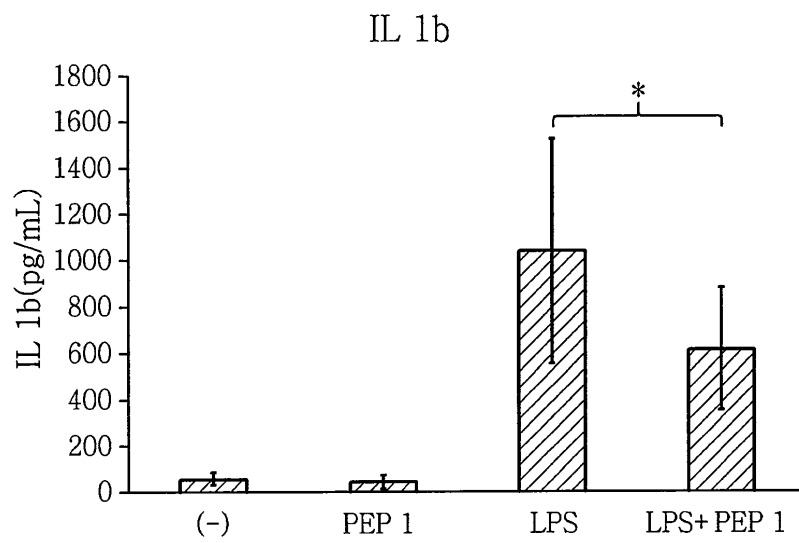
도면1



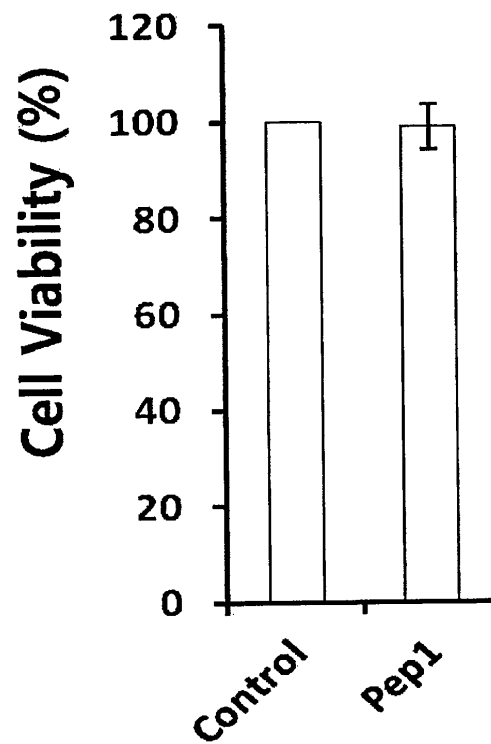
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> Kael-Gemvax Co., Ltd.

KIM, Sang Jae

<120> Composition for preventing or treating sepsis

<130> OF13P125/PCT

<150> KR1020120050529

<151> 2012-05-11

<150> KR1020120050533

<151> 2012-05-11

<150> KR1020120071989

<151> 2012-07-02

<150> KR1020120104207

<151> 2012-09-19

<160> 3

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys

1 5 10 15

<210> 2

<211> 1132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 180

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser

1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly

20 25 30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg

35 40 45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro

50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu

65 70 75 80

Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val

85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro

100	105	110	
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr			
115	120	125	
Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val			
130	135	140	
Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val			
145	150	155	160
Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr			
165	170	175	
Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly			
180	185	190	
Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg			
195	200	205	
Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg			
210	215	220	
Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg			
225	230	235	240
Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp			
245	250	255	
Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val			
260	265	270	
Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala			
275	280	285	
Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His			
290	295	300	
Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro			
305	310	315	320
Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly			
325	330	335	
Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro			
340	345	350	

Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
355 360 365

Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
370 375 380

Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His
385 390 395 400

Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
405 410 415

Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
420 425 430

Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu
435 440 445

Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe
450 455 460

Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser
465 470 475 480

Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser
485 490 495

Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met
500 505 510

Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys
515 520 525

Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe
530 535 540

Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe
545 550 555 560

Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr
565 570 575

Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
580 585 590

Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln
595 600 605

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
610 615 620

Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val
625 630 635 640

Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser
645 650 655

Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
660 665 670

Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
675 680 685

Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
690 695 700

Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
705 710 715 720

Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln
725 730 735

Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His
740 745 750

Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp
755 760 765

Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser
770 775 780

Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu
785 790 795 800

Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His
805 810 815

Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro
820 825 830

Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp
835 840 845

Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu

850	855	860	
Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala			
865	870	875	880
Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys			
	885	890	895
Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu			
	900	905	910
Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe			
	915	920	925
Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser			
	930	935	940
Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe			
945	950	955	960
Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly			
	965	970	975
Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn			
	980	985	990
Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln			
	995	1000	1005
Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln			
	1010	1015	1020
Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala			
1025	1030	1035	1040
Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu			
	1045	1050	1055
Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp			
	1060	1065	1070
Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr			
	1075	1080	1085
Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser			
	1090	1095	1100
Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn			

1105 1110 1115 1120
Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp

 1125 1130
<210> 3
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 181

gaagcgcgcc cggcgtgct gaccagccgc ctgcgttta ttccgaaa 48