

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

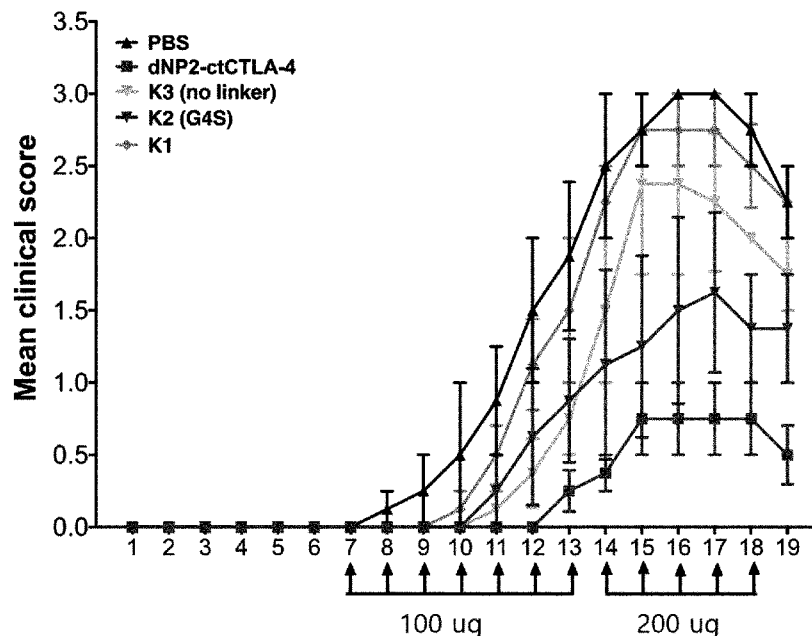
WO 2022/211544 A1

2022 년 10 월 6 일 (06.10.2022) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *C07K 14/00* (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/004634
- (22) 국제출원일: 2022 년 3 월 31 일 (31.03.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2021-0041584 2021 년 3 월 31 일 (31.03.2021) KR
10-2021-0124034 2021 년 9 월 16 일 (16.09.2021) KR
10-2022-0040191 2022 년 3 월 31 일 (31.03.2022) KR
- (71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) [KR/KR]; 04763
서울특별시 성동구 왕십리로 222, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 최제민 (CHOI, Je-Min); 03716 서울특별시 서대문구 동교로 291, 102동 601호, Seoul (KR). 김길란 (KIM, Gilran); 03741 서울특별시 서대문구 충정로2길 22, 101호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울특별시 서초구 동산로 23 베텔 회관 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: REGULATORY T CELL-DERIVED PEPTIDE AND COMPOSITION INCLUDING SAME FOR PREVENTION OR TREATMENT OF AUTOIMMUNE DISEASE

(54) 발명의 명칭: 조절 T 세포 유도 펩타이드 및 이를 포함하는 자가면역 질환 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for prevention or treatment of autoimmune disease, which is based on a CTLA4-derived peptide of regulator T cells. The composition has an excellent effect of inhibiting differentiation into cytotoxic Th17 cells that produce and secrete inflammatory cytokines and increasing differentiation into regulatory T cells (Treg) and thus can be advantageously utilized as a pharmaceutical composition that can prevent or treat autoimmune diseases caused by regulatory anomalies of various immune responses.

(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 제21조(3))
 - 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
-

(57) 요약서: 본 발명은 CTLA4 유래 조절 T 세포 유도 펩타이드를 기반으로 하는 자가면역 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서 염증성 사이토카인을 생성 및 분비하는 세포 독성 Th17 세포로의 분화를 억제하고, 면역조절 T 세포(Treg) 로의 분화를 증가시키는 효과가 우수하여 각종 면역반응의 조절 이상으로 유발되는 자가면역 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 약학 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 조절 T 세포 유도 펩타이드 및 이를 포함하는 자가면역 질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 조절 T 세포 유도 펩타이드를 기반으로 하는 자가면역 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 자가면역 질환은 인체의 면역계가 이상을 일으키는 것이다. 정상적인 면역 반응은 병원체와 같은 외부 항원으로부터 우리 몸을 보호하는 작용을 나타내지만, 자가 면역반응은 자기 세포를 외부 항원으로 인식하여 우리면역계가 스스로의 기관이나 조직을 공격하게 되어 인체에 여러 가지 질병을 일으킨다.
- [4] 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 루푸스가 대표적인 자가면역질환으로 알려져 있으며, 전신성 경피증, 아토피 피부염, 다발성 경화증, 그레이브스병, 하시모토병 외에도 크론병, 베체트병, 쇼그렌증후군, 굴랑베레증후군 등의 희귀병으로 알려진 질병들이 자가면역질환으로 진단받고 있다. 현재 미국국립보건원은 자가면역질환의 종류가 80가지라고 보고하고 있으며, 대체로 남성보다는 여성에게서 많이 나타난다고 보고되고 있다. 최근 '면역계의 Th17 세포 및 조절 T 세포 (Treg 세포)가 정상적인 인체 면역반응의 관용성(tolerance)을 깨고 자가 면역반응을 일으키는데 중요한 역할을 나타낸다.'는 연구가 발표되면서, 자가면역 질환에 관한 연구가 더욱 확대되고 활발해졌다.
- [5] 전신성 자가면역 질환(Systemic Autoimmune Diseases)은 비정상적으로 활성화된 면역체계가 신체의 다양한 기관을 침범하여 공격하는 질환으로 항체가 여러 조직 및 기관을 자기항원으로 인식하여 자기 세포를 파괴하는 특징을 가진다. 전신성 자가면역 질환은 특히 결합조직의 이상을 초래하여 전신에 염증을 일으키는데, 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 혼합결합조직병(mixed connective tissue disease) 등이 여기에 속한다.
- [6] 국소성 자가면역 질환(Localized Autoimmune Diseases)(또는 장기특이성 자가면역질환)은 체내 면역 시스템이 특정 장기를 공격하여 정상 세포를 손상시킴에 따라 발생할 수 있는 질병을 말한다. 장기특이성 자가면역 질환은 장기의 특이 항원에 대하여 비정상적인 면역반응이 일어남으로써 생기며, 우리 몸의 거의 모든 장기에서 생길 수 있다. 이와 같은 자가면역 질환에 의한 장기손상은 T세포에 의하여 일어날 수도 있고 자가항체(autoantibodies)에 의하여

일어날 수도 있다.

- [7] 다발성 경화증은 뇌, 척수, 그리고 시신경을 포함하는 중추신경계에 발생하는 만성 신경면역계 질환(chronic neuroimmunologic disorder)이다. 이 질환의 기전은 정확하게 알려지지는 않았지만 T세포에 의한 자가면역질환으로 신경을 둘러싸고 있는 수초가 손상되어 뇌로부터 신체의 여러 부분으로 신경전도 전달이 방해되면서 나타나는 다양한 증상으로, 탈수초성질환(demyelinating disease; 신경세포의 축삭을 둘러싸고 있는 절연물질인 수초가 탈락되는 질병)에 해당된다.
- [8] 다발성 경화증은 재발완화형 다발성 경화증(relapsing remitting multiple sclerosis: RRMS), 2차 진행형 다발성 경화증(secondary-progressive multiple sclerosis: SPMS), 원발성 진행형 다발성 경화증(primary progressive multiple sclerosis: PPMS), 진행성 재발형 다발성 경화증(progressive-relapsing multiple sclerosis: PRMS)으로 구분될 수 있다.
- [9] 크론병(Crohn's Disease)은 입에서 항문까지 소화관 전체에 걸쳐 어느 부위에서든지 발생할 수 있는 만성 염증성 장 질환이다. 궤양성 대장염과 달리 염증이 장의 모든 층을 침범하며, 병적인 변화가 분포하는 양상이 연속적이지 않고 드문드문 나타나는 경우가 많다. 대장과 소장이 연결되는 부위인 회맹부에 질환이 발현하는 경우가 가장 흔하며 그 다음으로 대장, 회장 말단부, 소장 등에서 흔히 발생한다.
- [10] 갑상선염의 두 개의 주요 자가면역질환에는 하시모토병(Hashimoto's disease)과 그레이브스병(Grave's disease)이 있다.
- [11] 건선(Psoriasis)은 피부 상피(epidermis)의 많은 부분을 차지하는 형태의 각질형성세포(keratinocyte)에 영향을 미치는 비전염성 만성 피부질환이다.
- [12] 현재 자가면역질환 치료기술 수준은 항염증제나 스테로이드제제 등으로 증상을 완화시키거나 진행을 늦추는 정도로서 대개 경험적인 효과에 의존하는 접근 방식으로, 발병 원인을 없애는 근본 치료 기술은 없는 실정이다. 자가면역질환이 심한 경우에는 면역억제제를 투여하여 면역기능을 약화시키는 방법이 선택되기도 하지만, 이와 같은 치료 기술은 건강한 성인이 막아낼 수 있는 세균 등에 대해 방어하는 면역성도 함께 억제되기 때문에 감염성 질환에 치명적인 결과를 가져오는 부작용이 있어 장기간 사용하는데 문제가 있다.
- [13] 이러한 자가면역질환은 조절 T 세포의 수 및 기능이 감소되어 있는 것으로 알려져 있으며, 생체 내에서 조절 T 세포를 유도하는 것이 주요한 치료 전략으로 여겨져 왔다.

[14]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [15] 본 발명의 목적은 조절 T 세포 유도 펩타이드를 제공하는데 있다.

- [16] 또한 본 발명의 다른 목적은 조절 T 세포 유도 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 자가면역 질환 치료 및 예방을 위한 약학적 용도를 제공하는데 있다.

[17]

과제 해결 수단

- [18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 서열로 표시되는 조절 T 세포 유도 펩타이드를 제공한다.

[19] [Lys-Xaa1-Leu-Xaa2-Xaa3-Arg-Xaa4]_n

[20] 상기 서열에서,

[21] Xaa1, Xaa2, Xaa3 및 Xaa4는 각각 독립적으로, 알라닌(alanine; A), 발린(Valine; V), 이소류신(isoleucine; I), 류신(leucine; L), 메티오닌(methionine; M), 페닐알라닌(phenylalanine; F), 티로신(tyrosine; Y), 트립토판(trypotophan; W), 리신(lysine; K), 아르기닌(arginine; R), 히스티딘(histidine; H), 세린(serine; S), 트레오닌(threonine; T), 아스파라긴(asparagine, N), 글루타민(glutamine; Q), 아스파르트산(aspartate, D), 글루탐산(glutamate, E), 시스테인(cysteine, C), 글리신(glycine, G) 및 프롤린(proline, P)로 이루어진 아미노산 잔기 중에서 선택되는 어느 하나이고, n은 2 내지 3의 정수이고,

[22] 상기 서열 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 잔기는 L 형 또는 D 형 아미노산 잔기이다.

[23] 상기 서열에서, Xaa1은 알라닌(alanine; A), 발린(Valine; V), 이소류신(isoleucine; I), 류신(leucine; L), 메티오닌(methionine; M), 페닐알라닌(phenylalanine; F), 티로신(tyrosine; Y), 트립토판(trypotophan; W)로 이루어진 소수성 아미노산 잔기 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[24] 상기 서열에서, Xaa2 및 Xaa3은 각각 독립적으로 리신(lysine; K), 아르기닌(arginine; R), 히스티딘(histidine; H)로 이루어진 염기성 아미노산; 및 알라닌(alanine; A)중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[25] 상기 서열에서, Xaa4는 세린(serine; S), 트레오닌(threonine; T), 아스파라긴(asparagine, N), 글루타민(glutamine; Q)로 이루어진 극성 아미노산; 및 알라닌(alanine; A) 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[26] 상기 서열에서, Xaa1은 메티오닌(methionine; M)일 수 있다.

[27] 상기 서열에서, Xaa2 및 Xaa3은 리신(lysine; K)일 수 있다.

[28] 상기 서열에서 Xaa4는 세린(serine; S)일 수 있다.

[29] 상기 서열에서 첫 번째 위치, 두 번째 위치, 여섯 번째 위치 및 일곱 번째 위치의 아미노산 잔기 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 잔기는 D형 아미노산일 수 있다.

[30] 상기 서열에서 여섯 번째 위치 및 일곱 번째 위치의 아미노산 잔기는 D형 아미노산일 수 있다.

[31] 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드는 링커를 더 포함하는 것일 수 있다.

- [32] 상기 링커는 (GGGGS) m ($m=1\sim4$), (GG) m ($m=1\sim4$), (GSSGGS) m ($m=1\sim4$), (EAAAK) m ($m=1\sim4$), PAPAP, (AP) m ($m=1\sim4$), A(EAAAK) m ($m=1\sim4$), (RR) m ($m=1\sim4$) 및 GFLG로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [33] 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드의 N 또는 C 말단에 지방산이 추가적으로 결합되어 있는 것일 수 있다.
- [34] 상기 지방산은 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드의 N 말단에 아마이드 결합으로 결합되어 있는 것일 수 있다.
- [35] 상기 지방산은 탄소수 10 내지 20의 포화 또는 불포화 지방산일 수 있다.
- [36] 상기 지방산은 미리스트산(Myristic acid), 스테아르산(Stearic acid), 리놀레산(Linoleic acid), 팔미트산(Palmitic acid), 올레산(Oleic acid) 및 라우르산(Lauric acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [37] 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드의 N 또는 C 말단에 세포투과성 펩타이드(cell penetrating peptide, CPP)가 추가적으로 결합되어 있는 것일 수 있다.
- [38] 상기 세포투과성 펩타이드는 서열번호 18로 표시되는 dNP2, 서열번호 19로 표시되는 AP, TAT(HIV 1 trans-activating protein), 6 내지 8개 아르기닌을 갖는 폴리아르기닌 폴리펩티드, 7 내지 11개의 리신을 갖는 폴리리신 폴리펩티드 및 iRGD(internalizing RGD)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [39] 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드는 서열번호 1 내지 6, 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 50 내지 54로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.
- [40] 상기 세포투과성 펩타이드가 결합된 조절 T 세포 유도 펩타이드는 서열번호 7 내지 10, 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [41] 또한 본 발명은 조절 T 세포 유도 펩타이드를 유효성분으로 하는 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [42] 상기 자가면역 질환은 루푸스(systemic lupus erythematosus), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 크론병(crohn disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 전신성 경피증(Progressive systemic sclerosis, Scleroderma), 아토피 피부염, 건선, 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 염증성 장염, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 혼합결합조직병(mixed connective tissue disease), 자가면역성 용혈성 빈혈(Autoimmune hemolytic anemia), 베체트병(Behcet's disease), 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증(Myasthenia gravis), 자가면역성 갑상선염(Autoimmune thyroiditis), 결절성 다발성 동맥염(Polyarteritis nodosa), 강직성 척추염(Ankylosing spondylitis), 섬유조직염(Fibromyalgia syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmuneuveitis), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating

polyneuropathy) 및 측두동맥염(Temporal arteritis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[43] 상기 조성물은 Th17의 활성을 저해하고 Treg를 활성화시키는 것일 수 있다.

[44] 또한 본 발명은 자가면역 질환 예방 또는 치료용 의약 제조를 위한 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[45] 또한 본 발명은 자가면역 질환 환자에게 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함하는 자가면역 질환의 치료방법을 제공한다.

[46]

[47] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[48] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결(접속, 접촉, 결합)"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우 뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[49] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[50]

[51] 본 발명의 일 측면은 하기 서열로 표시되는 조절 T 세포 유도 펩타이드에 관한 것이다.

[52] [Lys-Xaa1-Leu-Xaa2-Xaa3-Arg-Xaa4]_n

[53] 상기 서열에서, Xaa1, Xaa2, Xaa3 및 Xaa4는 각각 독립적으로, 알라닌(alanine; A), 발린(Valine; V), 이소류신(isoleucine; I), 류신(leucine; L), 메티오닌(methionine; M), 페닐알라닌(phenylalanine; F), 티로신(tyrosine; Y), 트립토판(tryptophan; W), 리신(lysine; K), 아르기닌(arginine; R), 히스티딘(histidine; H), 세린(serine; S), 트레오닌(threonine; T), 아스파라긴(asparagine, N), 글루타민(glutamine; Q), 아스파르트산(aspartate, D), 글루탐산(glutamate, E), 시스테인(cysteine, C), 글리신(glycine, G) 및

프롤린(proline, P)로 이루어진 아미노산 잔기 중에서 선택되는 어느 하나이고, n은 2 내지 3의 정수이고, 상기 서열 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 잔기는 L 형 또는 D 형 아미노산 잔기이다.

- [54] 본 발명에서 용어 '펩타이드(peptide)'는 펩타이드 결합에 의해 2개 내지 1000개의 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 사슬 형태의 고분자를 의미하며, '폴리펩타이드'와 상호 혼용 가능한 의미이다.
- [55] 본 발명에 있어서, 상기 펩타이드는 상기 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 펩타이드는 상기 아미노산의 비율이 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 100%로 높은 것이 바람직하다.
- [56] 또한, 본 발명에서 용어 '폴리뉴클레오티드(polynucleotide)'는 염기, 당, 인산의 세 가지 요소로 구성된 화학적 단량체인 뉴클레오티드가 다수의 인산에스테르 결합을 매개로 사슬 형태로 이어진 고분자 화합물을 의미한다.
- [57] 본 발명의 조절 T 세포 유도 펩타이드는 CTLA4 단백질(Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4)에서 유래된 펩타이드로, 14개 내지 31개의 아미노산으로 구성된 펩타이드이며, 상기 아미노산 잔기 중에서 선택되는 어느 하나 이상이 L- 또는 D- 아미노산 잔기일 수 있다.
- [58] 구체적으로, 상기 서열에서, Xaa1은 알라닌(alanine; A), 발린(Valine; V), 이소류신(isoleucine; I), 류신(leucine; L), 메티오닌(methionine; M), 페닐알라닌(phenylalanine; F), 티로신(tyrosine; Y), 트립토판(trypotophan; W)로 이루어진 소수성 아미노산 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 상기 서열에서, Xaa1는 메티오닌(methionine; M)인 것일 수 있다.
- [59] 구체적으로, 상기 서열에서, Xaa2 및 Xaa3은 각각 독립적으로 리신(lysine; K), 아르기닌(arginine; R), 히스티딘(histidine; H)로 이루어진 염기성 아미노산 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 상기 서열에서 Xaa2 및 Xaa3은 서로 동일한 아미노산일 수 있으며, 보다 바람직하게 상기 Xaa2 및 Xaa3은 리신(lysine; K)인 것일 수 있다.
- [60] 또한, 상기 서열에서, Xaa4는 세린(serine; S), 트레오닌(threonine; T), 아스파라긴(asparagine, N), 글루타민(glutamine; Q)로 이루어진 극성 아미노산 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있고, 바람직하게 Xaa4는 세린(serine; S)인 것일 수 있다.
- [61] 구체적으로 가장 바람직한 조절 T 세포 유도 펩타이드는 상기 서열에서, Xaa1은 메티오닌(methionine; M)이고, Xaa2 및 Xaa3은 리신(lysine; K)이며, Xaa4는 세린(serine; S)인 것일 수 있으며, 다음 일반식 2와 같이 표시할 수 있으며, 이는 청구항 1에 기재된 '서열'과 구별되는 것으로, 본 발명의 '서열'과 혼용하여 사용되지 않는다. 일반식 2라는 별도의 언급이 없는 한, 본 발명에서 '서열'은 청구항 1의 '[Lys-Xaa1-Leu-Xaa2-Xaa3-Arg-Xaa4]_n'을 의미한다.

- [62] [일반식 2]
- [63] [Lys-Met-Leu-Lys-Lys-Arg-Ser]_n(n=2~3)
- [64] 구체적으로, 상기 서열에서 첫 번째 위치, 두 번째 위치, 여섯 번째 위치 및 일곱 번째 위치의 아미노산 잔기 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 잔기는 D형 아미노산일 수 있는데, 상기 가장 바람직한 서열일 때를 예로 들면 상기 서열에서 첫 번째 위치의 리신 잔기, 두 번째 위치의 메티오닌 잔기, 여섯 번째 위치의 아르기닌 잔기 및 일곱 번째 위치의 세린 잔기 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 잔기는 D형 아미노산일 수 있다.
- [65] 상기 서열에서 여섯 번째 위치 및 일곱 번째 위치의 아미노산 잔기는 D형 아미노산일 수 있는데, 상기 가장 바람직한 서열일 때를 예로 들면 상기 서열에서 여섯 번째 위치의 아르기닌 잔기 및 일곱 번째 위치의 세린은 D형 아미노산일 수 있다.
- [66] 다만 상기 서열에서 n이 3의 정수인 경우에는, 전체 서열을 기준으로 첫 번째 위치의 리신 잔기, 두 번째 위치의 메티오닌 잔기, 여섯 번째 위치의 아르기닌 잔기, 열세 번째 위치의 아르기닌 잔기, 스물 번째 위치의 아르기닌 잔기, 일곱 번째 위치의 세린 잔기, 열네 번째 위치의 세린 잔기 및 스물한 번째 위치의 세린 잔기가 D형 아미노산인 것일 수 있다.
- [67] 본 발명에 따른 조절 T 세포 유도 펩타이드는 세포투과성 펩타이드와 결합되지 않더라도, 조절 T 세포 유도 및 활성화 효능이 우수하고, 조절 T 세포(Treg 세포)로의 분화 유도 기능을 가질 뿐만 아니라 동시에 Th17 분화를 억제하는 효능을 갖는다. 이에 CTLA4와 달리 합성에 용이하고, 향상된 안정성을 가져 생체 내에서도 우수한 치료 효과를 유지할 뿐만 아니라, 뛰어난 약리 특성을 달성할 수 있으며, 이외에 사용되는 제형이나 필요한 특성을 획득하기 위하여 펩타이드의 N- 및/또는 C- 말단에 수식(modification)이 유용하므로, 종래 긴 사슬을 갖는 CTLA4보다 활용성이 현저히 우수하다.
- [68] 또한, D 형 아미노산 잔기를 갖는 경우, L 형 아미노산 잔기보다 안정성(stability)이 높아지고, Treg 세포, 즉 과도한 면역반응에 의해 증상이 유도된 경우 면역기능을 조절하는 능력은 크게 향상되는 것을 확인할 수 있다.
- [69] 본 발명에 있어서, 상기 펩타이드는 당 분야에 널리 공지된 다양한 방법으로 획득할 수 있다. 상세하게는 유전자 재조합과 단백질 발현 시스템을 이용하여 제조하거나 펩타이드 합성과 같은 화학적 합성을 통하여 시험관 내에서 합성하는 방법, 및 무세포 단백질 합성법 등으로 제조될 수 있다.
- [70] CTLA4는 세포독성 T 세포에 존재하는 수용체로 항원표지세포 B7과 결합하여 T 세포의 활성화 신호를 차단할 수 있고, 음성신호전달을 매개할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한 조절 T 세포의 면역억제기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다, CTLA4 단백질 또는 CTLA4 세포질 도메인은 기능은 밝혀졌으나, 세포투과성 펩타이드와의 결합을 통해야만 세포내로 전달되어 효과를 발휘할 수 있다는 한계점이 있으므로, 보다 근본적인 자가면역 질환의 치료를 위해서는

새로운 구조의 치료제가 필요하다.

[71] 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드는 링커를 더 포함할 수 있다.

[72] 또한, 본 발명에서 용어 '링커(linker)'는, 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드 중간에 구비되어, 유연성을 제공할 수 있다. 구체적으로 상기 링커는 조절 T 세포 유도 펩타이드의 어디든 위치할 수 있으나, 상기 [Lys-Met-Leu-Lys-Lys-Arg-Ser]로 표시되는 서열의 반복단위 사이에 위치할 수 있다. 즉 상기 세린 잔기와 리신 잔기가 연결되는 부위에 위치할 수 있다. 상기 링커는 일반적으로 아미노산으로 구성되지만, 그 종류와 길이가 특별히 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 하나의 실시예에서와 같이 flexible한 성질을 가진 (GGGGS) m ($m=1\sim4$), (GG) m ($m=1\sim4$), (GSSGGS) m ($m=1\sim4$), (EAAAK) m ($m=1\sim4$), PAPAP, (AP) m ($m=1\sim4$), A(EAAAK) m ($m=1\sim4$), (RR) m ($m=1\sim4$) 및 GFLG로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 상기 (GGGGS) m 는 glycine 4개와 serine 1개가 반복적으로 배열될 수 있고, (GG) m 는 glycine 2개가 반복적으로 배열된 것일 수 있으며, (GSSGGS) m 는 glycine-serine-serine-glycine-glycine-serine의 반복적 배열로 구성된 것일 수 있다. rigid한 성질을 가진 alpha-helix linker, 즉 (EAAAK) m 또는 A(EAAAK) m ($m=1\sim4$) (여기서 E는 glutamate, A는 alanine, K는 lysine, G는 glycine, S는 serine이며, 상기 m 은 일반적으로 1 이상 정수이고, 바람직하게는 1 내지 4의 정수일 수 있다. 이외에도 PAPAP, (AP) m ($m=1\sim4$), (RR) m ($m=1\sim4$) 및 GFLG를 사용할 수 있다(여기서 P는 proline, A는 alanine, R은 arginine, F는 phenylalanine, L은 lysine이다).

[73] 본 발명에 있어서, 상기 펩타이드는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 추가의 아미노산 서열도 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드는 이펙터(effectors), 약물, 프로드럭, 독소, 펩타이드, 전달 분자 등의 커플링 파트너와 연결될 수 있다.

[74] 본 발명의 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드는, 생체 내 안정성을 확보할 목적으로 N 또는 C 말단에 지방산을 추가적으로 결합할 수 있다.

[75] 상기 지방산은 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드의 N 말단에 아마이드 결합으로 결합되어 있을 수 있다. 구체적으로 지방산의 카복실기 및 펩타이드의 아미노기 간의 아마이드 결합에 의해 연결될 수 있다.

[76] 상기 지방산은 탄소수 10 내지 20의 포화 또는 불포화 지방산일 수 있고, 바람직하게는 미리스트산(Myristic acid), 스테아르산(Stearic acid), 리놀레산(Linoleic acid), 팔미트산(Palmitic acid), 올레산(Oleic acid) 및 라우르산(Lauric acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는 미리스트산(Myristic acid, 'Myr'로도 표현됨) 또는 팔미트산(Palmitic acid, 'Pal'로도 표현됨)일 수 있다.

[77] 본 발명의 조절 T 세포 유도 펩타이드는 지방산과 결합하더라도 본래의 기능을 잃거나 저하되지 않고 오히려, 높은 치료 효과를 제공할 수 있다는 것을 확인할

수 있다.

- [78] 또한, 본 발명은 세포 투과 활성의 증진을 위하여 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드의 N 또는 C 말단에 세포투과성 펩타이드(cell penetrating peptide, CPP)가 추가적으로 결합할 수 있다.
- [79] 또한, 본 발명에서 용어 '세포투과성 펩타이드(cell penetrating peptide, CPP)'는 인 비트로(in vitro) 또는 인 비보(in vivo) 상에서 운반 대상인 카고를 세포 내로 전달할 수 있는 능력을 가진 펩타이드를 의미하며, '세포막 투과 도메인' 또는 '세포막 투과 펩타이드'와 상호 혼용가능한 의미이다.
- [80] 상기 세포투과성 펩타이드는 서열번호 18로 표시되는 dNP2, 서열번호 19로 표시되는 AP, TAT(HIV 1 trans-activating protein), 6 내지 8개 아르기닌을 갖는 폴리아르기닌 폴리펩티드, 7 내지 11개의 리신을 갖는 폴리리신 폴리펩티드 및 iRGD(internalizing RGD)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 구체적으로 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 33 내지 서열번호 41로 표시되는 서열 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 18 또는 서열번호 19로 표시되는 링커일 수 있다.
- [81] 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드와 지방산 또는 세포 투과성 펩타이드는 직접 연결되거나, 이들 사이에 링커 펩타이드를 더 포함하여 간접적으로 연결될 수 있다. 상기 링커 펩타이드는 당업계에 알려진 아미노산 또는 이들의 조합으로 이루어지는 펩타이드가 제한없이 사용될 수 있다. 구체적으로 상기 링커 펩타이드는 (GGGGS) m ($m=1\sim4$), (GG) m ($m=1\sim4$), (GSSGGS) m ($m=1\sim4$), (EAAAK) m ($m=1\sim4$), PAPAP, (AP) m ($m=1\sim4$), A(EAAAK) m ($m=1\sim4$), (RR) m ($m=1\sim4$) 및 GFLG로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [82] 본 발명의 다른 일 구체예에서, 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드는 지방산 또는 세포 투과성 펩타이드와 각각 연결될 수 있고, 지방산과 세포 투과성 펩타이드가 모두 연결될 수 있으며, 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드와 세포 투과성 펩타이드가 먼저 결합된 후, 지방산과 연결되는 것이 바람직하나, 상기 합성 순서에 한정되는 것은 아니다.
- [83] 본 발명에서는 CTLA4의 각 모티프(motif)에 대한 기능을 규명하고, CTLA4 단백질의 K 모티프(motif)가 주요한 역할을 하고 있음을 확인하였다. 그러나 K 모티프(motif)만으로는 조절 T 세포 유도 효과만 얻을 수 있고, Th17 억제활성에 대해서는 효과가 미미하며, 실제 생체 내 적용시 증상완화 효과를 얻을 수 없다는 것을 확인한 바, 본 발명에서 K 모티프(motif)의 2, 3개가 연결된 조절 T 세포 유도 펩타이드일 때, 조절 T 세포 유도 효과뿐만 아니라 Th17 억제활성을 동시에 가지는 것을 확인하였고, 생체 내 적용시에도 우수한 증상완화 효과를 가지는 것을 확인하였다.
- [84] 본 발명의 조절 T 세포 유도 펩타이드는 바람직하게 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드는 서열번호 1 내지 6, 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 50 내지

54로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, 보다 바람직하게 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드는 서열번호 1 내지 6, 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[85] 본 발명의 조절 T 세포 유도 펩타이드에 지방산 또는 세포투과성 펩타이드가 연결될 경우에는 서열번호 7 내지 10, 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[86] 본 발명은 종래 그 기능이 구체적으로 알려지지 않은 CTLA4 단백질에서 K 모티프(motif)가 면역반응 억제에 관여한다는 것을 확인하였고, K 모티프(motif)만으로는 충분한 효과를 얻을 수 없을 뿐만 아니라 생체 내에서 치료 효과로 이어지지 못하는 것을 확인한 바, 이들의 효과를 나타내도록 하기 위해 수 많은 실험을 통해 본 발명에 따른 조절 T 세포 유도 펩타이드인 경우, 자가면역 질환에 대한 예방, 치료 또는 개선 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[87] 본 발명에 따른 조절 T 세포 유도 펩타이드는 종래 CTLA4 단백질과 달리 세포투과성 펩타이드 등 세포 내 투과를 위한 담체가 결합되지 않은 상태에서도 우수한 자가면역 질환 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있을 뿐만 아니라 Th17 및 Treg를 타겟으로 하여 면역반응을 억제하도록 효율적으로 작용하므로, 자가면역 질환의 치료제에 획기적으로 적용될 수 있다.

[88] 본 발명에 따른 조절 T 세포 유도 펩타이드는 생체 내에서 자가면역 질환의 증상 완화를 눈에 띄게 완화 시키는 것을 확인하였고, 안정성 향상을 위해 D 형 아미노산을 갖더라도 다발성 경화증 동물모델의 생존율에는 전혀 영향을 미치지 않으면서 증상만을 유의적으로 개선하며, Th17 활성화를 방지하여 IL-17 생성을 효율적으로 억제하였을 뿐만 아니라 면역반응을 억제하는 Treg 세포의 활성화를 증가시키며, Th1과 같은 IFN-gamma 생산을 부정적으로 조절하는 것을 확인하였다.

[89] 따라서 본 발명의 조절 T 세포 유도 펩타이드는 자가면역 질환 예방 또는 치료할 수 있는 의약품으로 유용하게 사용될 수 있다.

[90]

[91] 본 발명은 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드를 유효성분으로 하는 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[92] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는

- Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [93] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드를 유효성분으로 하는 조성물의 투여로 자가면역 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [94] 본 발명에서 용어, "치료"는 본 발명의 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드를 유효성분으로 하는 조성물의 투여로 자가면역 질환이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [95] 또한, 본 발명에서 '자가면역 질환(autoimmune disease)'은 세균, 바이러스, 이물질 등 외부 침입자로부터 내 몸을 지켜주어야 할 면역세포가 이상을 일으켜 자기 세포를 외부 항원으로 인식하여 공격함으로써 발생하는 질환을 말한다.
- [96] 상기 자가면역 질환은 루푸스(systemic lupus erythematosus), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 크론병(crohn disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 전신성 경피증(Progressive systemic sclerosis, Scleroderma), 아토피 피부염, 건선, 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 염증성 장염, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 혼합결합조직병(mixed connective tissue disease), 자가면역성 용혈성 빈혈(Autoimmune hemolytic anemia), 베체트병(Behcet's disease), 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증(Myasthenia gravis), 자가면역성 갑상선염(Autoimmune thyroiditis), 결절성 다발성 동맥염(Polyarteritis nodosa), 강직성 척추염(Ankylosing spondylitis), 섬유조직염(Fibromyalgia syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmuneuveitis), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy) 및 측두동맥염(Temporal arteritis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [97] 자가면역 질환의 대부분은 Th1 세포의 활성이 비정상적으로 증가하여, Th1, Th2 면역세포의 불균형에 의해 유도된다. 조절 T 세포(Treg)는 비정상적으로 활성화된 면역세포의 기능을 억제하여 염증반응을 제어하는 특성이 있다. 이외에 분화 과정에서 만들어지는 Th17 세포가 있는데, Th17 세포는 미분화 T 세포의 분화과정에서 Treg 세포의 분화와 유사한 과정을 거쳐 형성된다. 분화된 Th17 세포는 IL-17을 분비하는데, 이는 자가면역 질환에서 보이는 염증반응에 관여하여 염증 반응의 신호를 최대화시켜 질병의 진행을 가속화시키는 것으로 알려져 있다. 이에 착안하여 대부분의 자가면역 질환 치료제들은, Th1, Th17 세포 활성의 억제를 표적으로 개발되고 있을 뿐, Treg 세포를 표적으로 하는 약물은 승인된 바 없다. 종래 자가면역 질환 치료제로 사용되는 면역억제제들은 독성, 감염, 임파종, 당뇨병, 진전(tremor), 두통, 설사, 고혈압, 오심, 신기능 장애 등의 부작용이 발생하는 문제점이 있다. 따라서 부작용이 없고 저렴하면서도 치료 효과가 우수한 치료제의 개발이 필요한 실정이다.
- [98] 이에 본 발명자들은 종래 자가면역 질환의 예방 또는 치료에 있어서, 한계를 극복하고 이를 대체할 수 있는 효율적인 물질을 개발하고자 노력하였다. 그

결과, CTLA4에 존재하는 모티프(motif)들 중에서 K 모티브(motif)가 효과를 가지나, 단독으로는 충분한 효과를 발휘할 수 없다는 것을 확인하고, 이를 2~3개 연결한 경우 매우 효과적으로 자가면역 질환을 치료할 수 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

- [99] 즉 본 발명에 따른 조성물은 조절 T 세포 유도 펩타이드를 단일 유효성분으로 함유함에도 불구하고, Th17의 활성을 저해하고 Treg를 활성화를 동시에 유도할 수 있으므로, 자가면역 질환의 면역반응을 억제함으로써 효율적으로 자가면역 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [100] 또한, 본 발명의 자가면역 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [101] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 또한 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있다. 또한, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [102] 본 발명의 약학 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들어, 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구적인 투여방법으로는 이에 제한되는 것은 아니나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여할 수 있다.
- [103] 본 발명의 약학 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다. 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 붕해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [104] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 액제, 젤제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 또는 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 덱스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다.

예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의 정제를 수득할 수 있다.

- [105] 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물 또는 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [106] 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있으며, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [107] 비경구적으로 투여하는 경우 본 발명의 약학 조성물은 적합한 비경구용 담체와 함께 주사제, 경피 투여제 및 비강 흡입제의 형태로 당 업계에 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다. 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 함유하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS (phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 덱스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [108] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 '경피 투여'는 약학 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.
- [109] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다. 비경구 투여용 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter

87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

- [110] 본 발명의 자가면역 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드를 유효량으로 포함할 때 바람직한 자가면역 질환 예방 및 치료 효과를 제공할 수 있다. 본 명세서에서, '유효량'이라 함은 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 자가면역 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 말한다. 본 발명의 약학 조성물에 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드가 0.01 내지 99.99% 포함될 수 있으며, 잔량은 약학적으로 허용 가능한 담체가 차지할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드의 유효량은 조성물이 제품화되는 형태 등에 따라 달라질 것이다.
- [111] 본 발명의 약학 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 비경구 투여시는 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드를 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.0001 내지 50 mg, 더 바람직하게는 0.001 내지 30 mg의 양으로 투여되도록, 그리고 경구 투여시는 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드를 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.0001 내지 100 mg, 더 바람직하게는 0.001 내지 50 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드의 용량은 약학 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드를 자가면역 질환 예방 및 치료를 위한 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.
- [112] 본 발명의 자가면역 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료, 생물학적 반응조절제 또는 자가면역 질환 치료제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [113] 앞서 살펴본 바와 같이, 종래 자가면역 질환 치료제는 단독으로는 전혀 효과를 나타내지 못하거나, 부작용을 나타내었으나, 본 발명의 조절 T 세포 유도 펩타이드는 Treg의 활성을 증가시키는 것과 동시에 Th17의 활성을 억제하여, 면역반응을 효과적으로 제어할 수 있을 뿐만 아니라, 14 내지 31개의 짧은 아미노산 서열로 우수한 효과를 발휘할 수 있으므로, 성능은 높고 부작용은 낮으며 제조가 용이하여 자가면역 질환 예방 또는 치료를 위한 새로운 치료제로써 활용될 수 있다.
- [114] 본 발명의 자가면역 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 또한 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 외용제의 제형으로 제공할 수 있다.
- [115] 본 발명의 자가면역 질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 피부외용제로

사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 유화제, 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 활성제, 친유성 활성제 또는 지질 소낭 등 피부 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

- [116] 본 발명의 자가면역 질환 예방 및 치료용 약학 조성물이 피부 외용제로 제공될 경우, 이에 제한되는 것은 아니나, 연고, 패취, 겔, 크림 또는 분무제 등의 제형일 수 있다.
- [117] 본 발명의 조성물은 자가면역 질환 예방 또는 개선을 목적으로 사료첨가제 또는 이를 포함하는 사료 조성물에 첨가할 수 있다.
- [118] 본 발명에서 용어, "사료첨가제"는 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 포함한다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 A D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 리신 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.
- [119] 본 발명에서 용어 "사료"는, 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분으로, 본 발명에 따른 자가면역 질환 예방 또는 개선용 조성물을 유효성분으로 포함하는 사료는 당업계에 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 바람직하게는 농후 사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.
- [120] 농후사료에는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 종자열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유채, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 뺀 나머진 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의 찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분(肉粉), 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 웨이(whey)를 건조한 건조웨이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류가 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [121] 조사료에는 야초, 목초, 풋베기 등의 생초(生草)사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋베기작물, 곡실(穀實) 등을

사일로에 채워 놓고 젖산발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 야초, 목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용(種畜用) 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎이 있으며, 이에 제한되지 않는다. 특수사료에는 굴껍데기, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드이소부탄 등의 요소사료, 천연사료원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[122] 본 발명에 따른 상기 자가면역 질환의 예방 또는 개선용 사료 첨가제는 당업계에 공지된 다양한 사료 제조방법에 따라 적절한 유효 농도 범위에서 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드를 첨가하여 제조 가능하다.

[123] 본 발명에 따른 사료 첨가제는 자가면역 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 하는 개체이면 제한 없이 적용가능하다. 예를 들면, 소, 말, 돼지, 염소, 양, 개, 고양이, 토끼 등과 같은 비인간동물, 조류 및 어류 등 어느 개체에도 적용이 가능하다.

[124]

[125] 본 발명은 상기 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[126] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 동물은 닭, 돼지, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 래트, 마우스, 소, 양, 염소 등과 같은 동물에 제한없이 적용가능하다. 바람직하게는 인간을 제외한 동물이라면 특별히 제한되지 않는다.

[127] 본 발명에서, 상기 투여는 당업계에 알려져 있는 임의의 투여 수단에 의하여 투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 투여는 정맥내, 근육내, 복강내, 경구, 경피(transdermal), 점막, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal) 또는 피하로 개체로 직접적으로 투여될 수 있다. 상기 투여는 전신적으로 또는 국부적으로 투여되는 것일 수 있다.

[128] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 본 발명의 조성물은 치료학적으로 또는 예방학적으로 유효한 양으로 투여되는 것일 수 있다. 상기 "치료학적으로 또는 예방학적으로 유효한 양"은 당업자라면, 증상의 경중, 개체의 성별, 나이 및 체중 등을 고려하여 적절하게 선택할 수 있다. 상기 치료학적으로 또는 예방학적으로 유효한 양은, 예를 들면 투여되는 개체 1kg 당 0.0001-100 mg의 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드일 수 있다.

[129]

발명의 효과

[130] 본 발명은 CTLA4 유래 조절 T 세포 유도 펩타이드에 관한 것으로, 염증성 사이토카인을 생성 및 분비하는 세포 독성 Th17 세포로의 분화를 억제하고, 면역조절 T 세포(Treg)로의 분화를 증가시키는 효과가 우수하여 각종 면역반응의 조절 이상으로 유발되는 자가면역 질환을 예방 또는 치료할 수 있는

약학 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

- [131] 본 발명의 조절 T 세포 유도 펩타이드는 생체 내에서도 자가면역 질환의 질병 중증도를 효과적으로 억제 및 완화시킬 수 있고, Th17의 활성을 저해하고 Treg를 활성화시키는 우수한 자가면역 질환 치료 또는 예방 효과를 갖는다.

[132]

도면의 간단한 설명

- [133] 도 1은 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)에 대한 구조를 나타낸 도면이다.
- [134] 도 2는 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 다섯 그룹(Th17, WT, KA, PA, YF)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이다.
- [135] 도 3은 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)로 제조된 다섯 그룹(Th17, WT, KA, PA, YF)에 대한 CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺foxp3⁺ T 세포의 유세포 분석 결과이다.
- [136] 도 4는 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)로 제조된 다섯 그룹(PBS, WT, KA, PA, YF)에 대한 다발성 경화증 동물모델의 임상 증후 평가 결과를 나타낸 그래프이다.
- [137] 도 5는 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)로 제조된 다섯 그룹(PBS, WT, KA, PA, YF)에 대한 면역세포(Th1, Th17, Treg)의 수를 분석하여 나타낸 그래프이다.
- [138] 도 6은 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)로 제조된 다섯 그룹(PBS, WT, KA, PA, YF)을 투여한 다발성경화증 동물모델 척수의 조직학적 분석결과이다.
- [139] 도 7은 dNP2-ctCTLA-4, dNP2, dNP2-ctCTLA-4의 결손 변이체(KSYPQ, KSYP, KSY, KS, K)에 대한 구조를 나타낸 도면이다.
- [140] 도 8은 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 여덟 그룹(Th17, dNP2, dNP2-ctCTLA4, KSYPQ, KSYP, KSY, KS, K)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이다.
- [141] 도 9는 여덟 그룹(Th17, dNP2, dNP2-ctCTLA4, KSYPQ, KSYP, KSY, KS, K)에 대한 CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺foxp3⁺ T 세포의 유세포 분석 결과이다.
- [142] 도 10은 다섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4, TAT-ctCTLA-4, KSY, K)에 대한 다발성 경화증 동물모델의 임상 증후 평가 결과를 나타낸 그래프이다.
- [143] 도 11은 다섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4, TAT-ctCTLA-4, KSY, K)에 대한 면역세포(Th1, Th17, Treg)의 수를 분석하여 나타낸 그래프이다.
- [144] 도 12는 dNP2-ctCTLA-4(WT), dNP2, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(K, S, Y1, P, Y2)에 대한 구조를 나타낸 도면이다.
- [145] 도 13은 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 여덟 그룹(Th17, dNP2, dNP2-ctCTLA-4(WT), K, S, Y1, P, Y2)에 대한 IL-17A 및

foxp3의 유세포 분석 결과이다.

- [146] 도 14는 여덟 그룹(Th17, dNP2, dNP2-ctCTLA-4, K, S, Y1, P, Y2)에 대한 CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺foxp3⁺ T 세포의 유세포 분석 결과이다. F는 Y2를 의미한다.
- [147] 도 15는 dNP2-ctCTLA-4(WT), K1, K2(G4S), K3(G4S), K3(GG), K3(no linker)에 대한 구조를 나타낸 도면이다.
- [148] 도 16은 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 일곱 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4(WT), K1, K2(G4S), K3(G4S), K3(GG), K3(no linker))에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이다.
- [149] 도 17은 여덟 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4(WT), AP-ctCTLA-4, K1, K2(G4S), K3(G4S), K3(GG), K3(no linker))에 대한 CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺foxp3⁺ T 세포의 유세포 분석 결과이다.
- [150] 도 18은 다섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4(WT), K1, K2(G4S), K3(no linker))에 대한 다발성 경화증 동물모델의 임상 증후 평가 결과를 나타낸 그래프이다.
- [151] 도 19는 다섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4(WT), K1, K2(G4S), K3(no linker))에 대한 면역세포(Th1, Th17, Treg)의 수를 분석하여 나타낸 그래프이다.
- [152] 도 20은 dNP2-ctCTLA-4(WT), 서열번호 1의 K2 펩타이드, 서열번호 4의 K3 펩타이드, 서열번호 9의 AP-K2 펩타이드 및 서열번호 10의 AP-K3 펩타이드에 대한 구조를 나타낸 도면이다.
- [153] 도 21은 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 여섯 그룹(Th17(대조군), dNP2-ctCTLA-4(WT), K2, K3, AP-K2, AP-K3)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이다.
- [154] 도 22는 여섯 그룹(PBS(대조군), dNP2-ctCTLA-4, dNP2, AP, AP-K2, AP-K3)에 대한 다발성 경화증 동물모델의 임상 증후 평가 결과를 나타낸 그래프이다.
- [155] 도 23은 여섯 그룹(PBS(대조군), dNP2-ctCTLA-4, dNP2, AP, AP-K2, AP-K3)에 대한 침윤된 림프구와 면역세포(Treg)의 수를 분석하여 나타낸 그래프이다.
- [156] 도 24는 dNP2-ctCTLA-4(WT), 서열번호 1의 K2 펩타이드, 서열번호 4의 K3 펩타이드, 실시예 15의 AP-K2 펩타이드 및 실시예 16의 AP-K3 펩타이드에 대한 구조를 나타낸 도면이다.
- [157] 도 25는 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 여섯 그룹(Th17(대조군), dNP2-ctCTLA-4, K2, K3, Myr-K2, Myr-K3)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이다.
- [158] 도 26은 여섯 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4, K2, AP-K2, Myr-K2, Myr-K3)에 대한 다발성 경화증 동물모델의 임상 증후 평가 결과를 나타낸 그래프이다.
- [159] 도 27은 여섯 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4, K2, AP-K2, Myr-K2, Myr-K3)에 대한 침윤된 림프구와 면역세포(Treg)의 수를 분석하여 나타낸 그래프이다.
- [160] 도 28은 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 일곱 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4, Myr-K3, Myr-K3D, Pal-K3, Myr-Ap-K2D, Pal-Ap-K2D)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이다.

- [161] 도 29는 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 열한 그룹(Th17, AP-K2, AP, AP-K2 KA, AP-K2 IKA, AP-K2 MA, AP-K2 LA, AP-K2 2KA, AP-K2 3KA, AP-K2 RA, AP-K2 SA)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이다.
- [162] 도 30은 열한 그룹(Th17, AP-K2, AP, AP-K2 KA, AP-K2 IKA, AP-K2 MA, AP-K2 LA, AP-K2 2KA, AP-K2 3KA, AP-K2 RA, AP-K2 SA)에 대한 CD4⁺IL-17A⁺ T 세포(a), CD4⁺foxp3⁺ T 세포(b)의 유세포 분석 결과이다.

[163]

발명의 실시를 위한 형태

- [164] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[165]

- [166] 실시예 1 내지 14. 펩타이드 합성

- [167] 서열번호 1 내지 14의 펩타이드를 하기 표 1에서와 같이 설계하고, 애니젠(AnyGen, Kwangju, Korea)에 의뢰하여 고체상 펩티드 합성(SPPS; solid-phase peptide synthesis)으로 제작하였다. 제조과정은 간략하게 Fmoc에 의해 보호된 아미노산은 트리틸클로라이드 수지(trityl chloride resin)에 순차적으로 접합되었고, 그 다음, 수지의 보호기 및 아미노산 잔기를 전체 절단법(global cleavage method)을 통해 제거하였고, 산성 조건 하에서 조(crude) 펩타이드를 얻었다. 상기 조(crude) 펩타이드는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC; Shimadzu, Kyoto, Japan)로 정제하였다. 최종적으로 얻어진 합성 펩타이드는 동결건조하여 보관하였고, 순도는 95% 이상인 것으로 확인하였다(AnyGen, Kwangju, Korea). 본 실험에서 제조된 14개의 구체적인 서열은 다음과 같다.

[168] [표1]

구분	명칭	서열 번호	서열
실시예 1	K2	1	KMLKKRSKMLKKRS
실시예 2	K2(G4S)	2	KMLKKRSGGGGSKMLKKRS
실시예 3	K2(GG)	3	KMLKKRSGGKMLKKRS
실시예 4	K3	4	KMLKKRSKMLKKRSKMLKKRS
실시예 5	K3(G4S)	5	KMLKKRSGGGGSKMLKKRSGGGGSKMLKKRS
실시예 6	K3(GG)	6	KMLKKRSGGKMLKKRSGGKMLKKRS
실시예 7	dNP2-K2	7	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRKKMLKKRSK MLKKRS
실시예 8	dNP2-K3	8	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRKKMLKKRSK MLKKRSKMLKKRS
실시예 9	AP-K2	9	RRRWCKRRRGGKMLKKRSKMLKKRS
실시예 10	AP-K3	10	RRRWCKRRRGGKMLKKRSKMLKKRSKMLKKR S
실시예 11	KD2	11	kmLKKrsKMLKKrs
실시예 12	KD3	12	kmLKKrsKMLKKrsKMLKKrs
실시예 13	AP-KD2	13	rrRWCKRRRGGKMLKKrsKMLKKrs
실시예 14	AP-KD3	14	rrRWCKRRRGGKMLKKrsKMLKKrsKMLKKrs

[169] 상기 표 1에서의 알파벳 소문자는 D형 아미노산을 의미한다.

[170]

[171] 실시예 15 내지 20. 지방산으로 수식된 펩타이드 합성

[172] 서열번호 3, 4, 11, 12, 13의 펩타이드를 지방산으로 수식된 펩타이드(Myrr-K2, Myrr-K3, Myrr-K3D, Pal-K3, Myrr-AP-K2D, Pal-AP-K2D)로 제조하였다. 제조과정은 간략하게 Fmoc에 의해 보호된 아미노산은 트리틸클로라이드 수지(trityl chloride resin)에 순차적으로 접합되었고, 그 다음, 수지의 보호기 및 아미노산 잔기를 전체 절단법(global cleavage method)을 통해 제거하였고, 산성 조건 하에서 조(crude) 펩타이드를 얻었다. 펩타이드 레진(resin)에 지방산과 반응 시약(HOBT, DIC, DMF)을 섞은 후, 하루 동안 상온에서 반응시켜 지방산으로 수식된 펩타이드를 형성하였다. 상기 조(crude) 펩타이드는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC; Shimadzu, Kyoto, Japan)로 정제하였다. 최종적으로 얻어진 합성 펩타이드는 동결건조하여 보관하였고, 순도는 95% 이상인 것으로 확인하였다(AnyGen, Kwangju, Korea).

[173]

[174] 실험방법 1. Th17 분화조건에서의 효능 분석

[175] 분화

[176] CD4 T 세포의 subset 중 하나로 Th17 세포가 있고, Th17 세포는 IL-17이라는 사이토카인(cytokine)을 분비하며 염증을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이는 자가면역 질환을 야기하는 주요 요인이다. Treg 세포(조절 T 세포)는 Foxp3라는 전사인자(transcription factor)를 발현하여 염증을 억제, 조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서 Th17(IL-17)을 저해하며 Treg(Foxp3) 세포를 늘려 염증을 조절하는 효과를 갖는다면, 자가면역 질환을 예방 및 치료하는 효과를 갖는다고 여길 수 있으므로, 본 발명의 펩타이드가 상술한 효과를 갖는지 확인하였다.

[177] 제조업체의 프로토콜에 따라 마우스 미분화 CD4+ T 세포(na Δ ve CD4 T cell) 분리 키트(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)를 사용하여 6 내지 8주령 C57BL/6 마우스의 비장세포에서 미분화 CD4 T 세포(na Δ ve CD4 T cell)를 분리하였다. RNAseq를 위해, Foxp3-GFP 마우스의 미분화 CD4 T 세포(na Δ ve CD4 T cell)를 정제하여 Th17 으로 분화시킨 후, FACS Aria 세포 분류기 III(FACS Aria cell sorter III)(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 Foxp3+ 및 Foxp3- 개체군을 분류하였다. 정제된 미분화 CD4 T 세포(na Δ ve CD4 T cell)는 플레이트와 결합된 항-CD3(2 또는 5 μ g/ml; 553057; BD Pharmingen, La Jolla, CA) 및 항-CD28(2 또는 5 μ g/ml; 553294; ???BD Pharmingen, La)로 활성화한 후, 3일 또는 4일 동안 96-웰 플레이트에서 다음의 사이토카인 콕테일(cytokine cocktails)을 처리하여 분화시켰다: Th0; 제조합 인간 TGF- β (R&D Systems) 0.25 ng/ml. Th1; 항-IL-4(11B11; 16-7041-85; eBioscience) 5 μ g/ml, IL-2(212-12; Peprotech, Rocky Hill, NJ) 50 U/ml, 제조합 뮤린(recombinant murine) IL-12(212-12; Peprotech) 2 ng/ml, Th1에 대한 제조합 인간 TGF- β (R&D Systems) 0.25 ng/ml. Th17; 항-IFN- γ (XMG1.2; 16-7311-85; eBioscience) 5 μ g/ml, 항-IL-4(11B11; 16-7041-85; eBioscience) 5 μ g/ml, 제조합 뮤린(recombinant murine) TGF- β (7666-MB; R&D Systems, Minneapolis, MN) 2 ng/mL, IL-6(216-16; Peprotech) 30 ng/mL, IL-23(1887-ML-101; R&D Systems) 20 ng/mL, IL-1 β (401-ML-010; R&D Systems) 20 ng/mL, 및 IL-2(Peprotech) 50 U/ml. Tregs; IL-2(Peprotech) 50 U/ml 및 TGF- β (R&D Systems) 0.5 ng/mL.

[178] 사이토카인 콕테일과 함께 시료(2 μ M)를 공동으로 처리하였다. 4일 후 IL-17, Foxp3 형광 항체를 이용하여 유세포 분석기(flow cytometry)로 분석을 하였다. 일부 실험에서 5 μ M PKC- η 유사기질 억제제(sc-3096; Santa Cruz) 또는 5 μ M ERK inhibitor(UO126; 662005; Sigma)를 추가로 첨가하였다.

[179] 유세포 분석

[180] 살아있는 세포에 대해서만 유세포 분석하기 위해 Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit(Biolegend)를 사용하였으며, 상온에서 10분간 항체 염색을 수행하였다. 세척 후, 분화시킨 Th1, Th17, Treg 세포의 표면 단백질을 4 °C에서

15분 동안 단일클론 항체로 염색하였다. 세포 내 사이토카인 수준을 결정하기 위해서는 세포를 37 °C에서 4시간 동안 Cell Stimulation Cocktail(plus protein transport inhibitors)(ThermoFisher)로 제자극하고 표면 마커 항체로 염색하였다. 다음으로 세포를 고정하고 Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set(eBioscience)를 사용하여 Permeabilization하고, 항-마우스 IFN- γ , 항-마우스 IL-17 및 항-마우스 Foxp3으로 염색하였다. 세포는 FACS Canto II 유세포 분석기와 FlowJo 소프트웨어 버전 10.7을 사용하여 분석하였다.

[181] 통계

[182] 통계적 분석은 PRISM 소프트웨어를 사용하여 t-test, two-way ANOVA로 분석하였다. P value < 0.5를 통계적 유의성이 있다고 판단하였다.

[183]

[184] 실험방법 2. 다발성경화증(MS; multiple sclerosis) 동물모델에서의 효능 분석

[185] 실험동물

[186] 8주령 암컷 C57BL/6 마우스는 Orient Bio(대전, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 모든 동물실험은 한양대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee of Hanyang University)의 동물실험운영규정을 준수하여 수행하였다. 실험전 마우스는 2주간 순화과정을 거쳤다. 마우스는 실험동안 온도 22 ± 2 °C, 습도는 40-60%로 유지되는 사육실에서 자유식으로 사육되었으며, 명암 주기(Light and dark cycle)는 12시간 간격으로 조절하였다.

[187] 다발성 경화증 유도

[188] 다발성 경화증은 제조사의 프로토콜에 따라 MOG₃₅₋₅₅/CFA Emulsion PTX 키트(Hooke Labs, Lawrence, MA, USA)를 사용하여 피하 면역화(subcutaneous immunization)로 다발성 경화증을 유도하였다. 마우스를 이소플루란으로 마취하고 MOG₃₅₋₅₅/CFA를 양측 피하 주사한 후(subcutaneously injected bilaterally), 2시간 및 24시간 후에 PTX(pertussis toxin)를 복강내 주사(intraperitoneal injection)하였다. 상기 동물모델은 MOG 면역화한 후, 각 그룹으로 무작위 배정하였다. PTX를 주사하고 7일째부터 면역반응에 의한 마비증상이 시작되므로, 7일째부터 본 발명에 따른 시료를 100 μ g(5 mg/kg)을 매일 1회 복강내로 주사하여, 그룹을 제조하였다. 각 그룹은 다발성경화증 동물모델을 유도하고 난 후부터 매일 관찰하고 임상 징후를 점수를 매겨 기록하였다. 임상 징후 평가는 하기 제시된 표 2에 기재된 등급에 따라 점수를 매겼다. 임상 징후 평가 점수가 높을수록 질병이 심해지는 것을 의미한다.

[189] [표2]

점수	설명
0	정상적으로 거동하는 상태-신경학적 징후 없음
0.5	꼬리를 말지 못할 정도로 마비가 되어 있는 상태-부분적으로 꼬리가 늘어져 있음
1.0	꼬리를 전혀 움직이지 못하는 상태-완전히 늘어진 꼬리
1.5	절뚝거리고, 뒤통거리는 걸음걸이
2.0	기우뚱한 걸음-마우스가 걸을 때 뒷다리가 불안정한 상태(한쪽 뒷다리의 마비)
2.5	한쪽 뒷다리가 완전히 마비되고, 다른 뒷다리 부분 마비됨
3.0	두쪽 뒷다리가 완전히 마비된 상태-마우스가 뒷다리로 서는 것이 어려우나, 나머지 부분은 여전히 움직임
3.5	앞다리도 정상적으로 움직이지 못하는 상태(상행마비)
4.0	마우스의 사지가 모두 마비되어, 전혀 다리를 움직이지 못하고 앓아지고 여위어가는 상태(몸통의 마비)
4.5	빈사 상태
5.0	사망

[190] 유세포 분석과 조직학적 분석

[191] 실험이 종료된 후에 각 그룹의 실험동물을 안락사한 후, 중추신경계인 척수(spinal cord)의 림프구(lymphocyte)를 분리하였다. 분리된 척수를 37 °C에서 1 mg/ml의 DNase 1(10104159001; Sigma-Aldrich) 및 1 mg/ml의 콜라게나제 D(11088866001; Sigma-Aldrich)로 처리하고, 40분 동안 진탕기에서 80 RPM으로 배양하였다. 효소처리 후, 500 mM EDTA를 첨가하고 림프구를 Percoll(GE Healthcare, Little Chalfont, UK) 밀도-구배 원심분리(density-gradient centrifugation)로 분리하였다. 분리된 침윤된 림프구(infiltrated lymphocytes)를 37 °C에서 4시간 동안 Cell Stimulation Cocktail(plus protein transport inhibitors) (ThermoFisher)로 재자극하고 항-마우스 CD4로 염색하였다. 상기 세포를 고정하고, Foxp3/전사 인자 염색 버퍼 세트(eBioscience)를 사용하여 Permeabilization하고, 항-마우스 IFN- γ , 항-마우스 IL-17 또는 항-마우스 Foxp3로 염색하였다. FACS Canto 유세포 분석기(flow cytometer) 및 FlowJo 소프트웨어 버전 10.7.1을 사용하여 세포를 분석하였다.

[192] 조직학적 분석을 위해, 척수 조직의 파라핀 블록을 탈파라핀화하고, Luxol fast blue를 처리하였다. 공동염색을 위해, hematoxylin과 eosin을 사용하였다(Dako). Image J 소프트웨어 버전 2.0.0을 사용하여 척수 조직의 백질 영역(white matter

region)에 침투된 세포(Infiltrated cells)를 계산하였다.

[193] 척수에서 Th1, Th17 면역세포의 수가 증가할수록 다발성 경화증의 병증이 심해지는 것을 의미하며, Treg 세포의 수가 증가하는 것은 자가항원에 대한 관용을 유지하고, 면역계에서의 과도한 반응을 막아 다발성 경화증과 같은 자가면역 질환을 예방 또는 치료하는 기능이 향상되는 것을 의미한다.

[194] 통계

[195] 통계적 분석은 PRISM 소프트웨어를 사용하여 t-test, two-way ANOVA로 분석하였다. P value < 0.5를 통계적 유의성이 있다고 판단하였다.

[196]

[197] 실험예 1. dNP2-ctCTLA-4의 변이체에 대한 기능 확인

[198] 시료의 준비

[199] 본 실험은 dNP2-ctCTLA-4에서 변이체의 기능을 확인하기 위한 것으로, dNP2-ctCTLA-4를 비롯하여 이의 변이체를 준비하여, 면역반응 억제정도를 분석하였다.

[200] 우선, dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)를 하기 표 3에서와 같이 설계하고, 애니젠(AnyGen, Kwangju, Korea)에 의뢰하여 고체상 펩티드 합성(SPPS; solid-phase peptide synthesis)으로 제작하였다. 구체적인 제조과정은 실시예 1과 동일하며, 본 실험에서 제조된 펩타이드 역시 순도는 95% 이상인 것으로 확인되었다.

[201] [표3]

명칭	서열 번호	아미노산 서열
dNP2-ctCTLA-4 WT	15	KIKKVKKKGRKGSKI KKVKKKGRKGGKMLKKRSPL TTGVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN
dNP2-KA	19	KIKKVKKKGRKGSKI KKVKKKGRKGGAMLA AA SPL TTGVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN
dNP2-PA	20	KIKKVKKKGRKGSKI KKVKKKGRKGGKMLKKRSPL TTGVYVKMA AA TE A ECEKQFQPYFIPIN
dNP2-YF	21	KIKKVKKKGRKGSKI KKVKKKGRKGGKMLKKRSPL TTGV F VKMPPTPECEKQFQ P F IPIN

[202] 시료의 투여 및 샘플링-Th17 분화

[203] 상기 실험방법 1에 따라 Th17 분화조건에서의 효능 분석하고자 하였다. 시료를 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)를 사용한 것을 제외하고 모두 실험방법 1과 동일하게 수행하였다. 하기와 같이 총 다섯 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4, KA, PA, YF)으로 나누어 진행하였다. 상기 그룹들은 4일 후 IL-17, Foxp3 형광 항체를 이용하여 유세포 분석(flow cytometry) 하였다.

- [204] Th17 그룹(대조군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 PBS를 양성대조군과 동일한 볼륨으로 처리.
- [205] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 15의 dNP2-ctCTLA-4(2 μ M)를 처리.
- [206] KA 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 20의 dNP2-KA(2 μ M)를 처리.
- [207] PA 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 21의 dNP2-PA(2 μ M)를 처리.
- [208] YF 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 22의 dNP2-YF(2 μ M)를 처리.
- [209] 시료의 투여 및 샘플링-다발성경화증 동물모델
- [210] 실험방법 2에 따라 다발성경화증 동물모델에서의 효능을 분석하고자 하였다. 실험방법 2에서 시료를 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)를 사용하여, 총 다섯 그룹(PBS, WT, KA, PA, YF)으로 나누어 진행하였다.
- [211] PBS 그룹(대조군) : PTX를 주사하고 7일째부터 14일까지 PBS 100 μ g을 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [212] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군) : PTX를 주사하고 7일째부터 14일까지 서열번호 15의 (dNP2-ctCTLA-4)_WT(100 μ g)을 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [213] KA 그룹 : PTX를 주사하고 7일째부터 14일까지 서열번호 20의 dNP2-KA 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [214] PA 그룹 : PTX를 주사하고 7일째부터 14일까지 서열번호 21의 dNP2-PA 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [215] YF 그룹 : PTX를 주사하고 7일째부터 14일까지 서열번호 22의 dNP2-YF 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [216] 각 그룹은 다발성경화증을 유도하고 난 후부터 실험방법 2와 같이 매일 관찰하고 임상 징후 점수를 매겨 기록하였고, 실험이 종료된 후 조직학적 분석을 통해 림프구, CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺IFN- γ ⁺ T 세포, Treg/Teff의 비율을 측정하였다.
- [217]
- [218] 도 1은 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)에 대한 구조를 나타낸 도면이고, 도 2는 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 다섯 그룹(Th17, WT, KA, PA, YF)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이며, 도 3은 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)로 제조된 다섯 그룹(Th17, WT, KA, PA, YF)에 대한 CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺foxp3⁺ T 세포의 유세포 분석 결과이다.
- [219] 도 1에 나타난 바와 같이, CTLA4의 세포질 영역을 'K, S, Y, P, Q, Y' 모티프(motif)로 나누어, 면역반응 억제 효과와의 관련성을 분석하였다.
- [220] 도 2 및 3에 나타난 바와 같이, K 모티프(motif)의 일부 아미노산 잔기가 알려진

잔기로 치환된 서열번호 20의 KA 펩타이드를 처리한 경우(KA 그룹), 다른 그룹과 달리 IL-17 감소 및 Foxp3 증가 기능이 소실되는 것을 확인하였다. 따라서 CTLA4에서 K 모티프(motif)가 면역반응 억제와 높은 관련성이 있다는 것을 확인하였다.

[221]

[222] 도 4는 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)로 제조된 다섯 그룹(PBS, WT, KA, PA, YF)에 대한 다발성 경화증 동물모델의 임상 증후 평가 결과를 나타낸 그래프이고, 도 5는 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)로 제조된 다섯 그룹(PBS, WT, KA, PA, YF)에서의 면역세포(Th1, Th17, Treg)의 수를 분석하여 나타낸 그래프이며, 도 6은 dNP2-ctCTLA-4, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(KA, PA, YF)로 제조된 다섯 그룹(PBS, WT, KA, PA, YF)을 투여한 다발성경화증 동물모델 척수의 조직학적 분석결과이다.

[223] 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, KA 그룹과 PA 그룹에서 임상징후 평가가 PBS 그룹(대조군)보다 유의적으로 낮다는 것을 확인하였다. 또한, KA 그룹과 PA 그룹은 척수에 침윤된 림프구의 숫자가 PBS 그룹(대조군)보다 유의적으로 높은 것을 확인하였다. 특히 KA 그룹은 Treg 세포의 수가 가장 낮은 것으로 확인되었다. 종합하면 CTLA4에서 K 모티프(motif)가 자가면역 질환의 면역반응 억제와 관련하여 주요한 역할을 수행하고 있다는 것을 알 수 있다.

[224] 도 6에 나타난 바와 같이, 다발성경화증 동물모델에서 다섯 그룹(PBS, WT, KA, PA, YF)의 척수를 조직학적으로 분석한 결과, KA 그룹에서 미엘린(myelin) 손상 억제 기능이 소실됨을 확인하여 K 모티프(motif)가 자가면역 질환에서 주요한 역할을 수행한다는 것을 확인하였다.

[225]

[226] 실험예 2. CTLA4의 결손 변이체에 대한 효능 분석

[227] 시료의 준비

[228] 본 실험은 dNP2-ctCTLA-4에서 K 모티프(motif)의 기능을 다시금 확인하기 위한 것으로, dNP2-ctCTLA-4으로부터 모티프(motif)를 하나씩 제거한 결손 변이체를 준비하여, 면역반응 억제정도를 분석하였다.

[229] 우선 dNP2-ctCTLA-4, dNP2, dNP2-ctCTLA-4의 결손 변이체(KSYPQ, KSYP, KSY, KS, K)를 하기 표 4에서와 같이 설계하고, 애니젠(AnyGen, Kwangju, Korea)에 의뢰하여 고체상 펩티드 합성(SPPS; solid-phase peptide synthesis)으로 제작하였다. 구체적인 제조과정은 실시예 1과 동일하며, 본 실험에서 제조된 펩타이드 역시 순도는 95% 이상인 것으로 확인되었다.

[230] [표4]

명칭	서열 번호	아미노산 서열
(dNP2-ctCTLA-4) WT	15	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRKGGKMLKKRSPL TTGVYVKMPPEPECEKQFPYFIPIN
(TAT-ctCTLA-4) WT	16	YGRKKRRRQRRRGSKIKKVKKKGRKGGKMLKKRSP LTTGVYVKMPPEPECEKQFPYFIPIN
dNP2	18	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRK
dNP2-KSYPQ	23	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRKGGKMLKKRSPL TTGVYVKMPPEPECEKQFP
dNP2-KSYP	24	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRKGGKMLKKRSPL TTGVYVKMPPEPECE
dNP2-KSY	25	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRKGGKMLKKRSPL TTGVYVKM
dNP2-KS	26	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRKGGKMLKKRS <u>SPL</u> <u>TTGV</u>
dNP2-K1	27	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRKKMLKKRS

[231] 시료의 투여 및 샘플링-Th17 분화조건

[232] 상기 실험방법 1에 따라 Th17 분화조건에서의 효능 분석하고자 하였다. 시료를 dNP2-ctCTLA-4, dNP2, dNP2-ctCTLA-4의 결손 변이체(KSYPQ, KSYP, KSY, KS, K)를 사용한 것을 제외하고 모두 실험방법 1과 동일하게 수행하였다. 하기와 같이 총 여덟 그룹(Th17, dNP2, dNP2-ctCTLA-4, KSYPQ, KSYP, KSY, KS, K)으로 나누어 진행하였다. 상기 그룹들은 4일 후 IL-17, Foxp3 형광 항체를 이용하여 유세포 분석(flow cytometry) 하였다.

[233] Th17 그룹(대조군1) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 PBS(2 μ M)를 처리.

[234] dNP2 그룹(대조군2) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 18의 dNP2 펩타이드(2 μ M)를 처리.

[235] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 15의 dNP2-ctCTLA-4(2 μ M)를 처리.

[236] KSYPQ 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 23의 dNP2-KSYPQ 펩타이드(2 μ M)를 처리.

[237] KSYP 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 24의 dNP2-KSYP 펩타이드(2 μ M)를 처리.

[238] KSY 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인

각테일과 함께 서열번호 25의 dNP2-KSY 펩타이드(2 μ M)를 처리.

- [239] KS 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 26의 dNP2-KS 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [240] K 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 27의 dNP2-K1 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [241] 시료의 투여 및 샘플링-다발성경화증 동물모델
- [242] 실험방법 2에 따라 다발성경화증 동물모델에서의 효능을 분석하고자 하였다. 실험방법 2에서 시료를 dNP2-ctCTLA-4, TAT-ctCTLA-4 및 dNP2-ctCTLA-4의 결손 변이체(KSY, K)를 사용하여, 총 다섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4, TAT-ctCTLA-4, KSY, K)으로 나누어 진행하였다.
- [243] PBS 그룹(대조군) : PTX를 주사하고 7일째부터 15일까지 PBS 100 μ g을 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [244] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군1) : PTX를 주사하고 7일째부터 15일까지 서열번호 15의 dNP2-ctCTLA-4-WT(100 μ g)을 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [245] TAT-ctCTLA-4 그룹(양성대조군2) : PTX를 주사하고 7일째부터 15일까지 서열번호 16의 TAT-ctCTLA-4 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [246] dNP2-KSY 그룹 : PTX를 주사하고 7일째부터 15일까지 서열번호 25의 dNP2-KSY 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [247] dNP2-K 그룹 : PTX를 주사하고 7일째부터 15일까지 서열번호 27의 dNP2-K1 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [248] 각 그룹은 다발성경화증을 유도하고 난 후부터 실험방법 2와 같이 매일 관찰하고 임상 징후 점수를 매겨 기록하였고, 실험이 종료된 후 조직학적 분석을 통해 림프구, CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺IFN- γ ⁺ T 세포, Treg/Teff의 비율을 측정하였다.
- [249]
- [250] 도 7은 dNP2-ctCTLA-4(WT), dNP2, dNP2-ctCTLA-4의 결손 변이체(KSYPQ, KSYP, KSY, KS, K)에 대한 구조를 나타낸 도면이고, 도 8은 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 여덟 그룹(Th17, dNP2, dNP2-ctCTLA4, KSYPQ, KSYP, KSY, KS, K)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이며, 도 9는 여덟 그룹(Th17, dNP2, dNP2-ctCTLA4, KSYPQ, KSYP, KSY, KS, K)에 대한 CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺foxp3⁺ T 세포의 유세포 분석 결과이다.
- [251] 도 7에 나타난 바와 같이, 앞서 실험을 통해 확인된 K 모티프(motif)의 성능을 보다 정확하게 분석하기 위하여, 'K, S, Y, P, Q, Y' 모티프(motif)를 하나씩 제거하면서 면역반응 억제 효과를 분석하였다.
- [252] 도 8 및 9에 나타난 바와 같이, dNP2-ctCTLA-4에서 K 모티프(motif)만 존재하는 서열번호 27의 dNP2-K1 펩타이드를 처리한 경우(K 그룹), 면역반응 억제활성을 나타내고 있으므로, 이를 통해 dNP2-ctCTLA-4 중에서 K 모티프(motif)가

면역반응 억제에 주요한 역할을 수행하고 있다는 것을 알 수 있다.

[253]

[254] 도 10은 다섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4, TAT-ctCTLA-4, dNP2-KSY, dNP2-K)에 대한 다발성 경화증 동물모델의 임상 증후 평가 결과를 나타낸 그래프이고, 도 11은 다섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4, TAT-ctCTLA-4, dNP2-KSY, dNP2-K)에 대한 면역세포(Th1, Th17, Treg)의 수를 분석하여 나타낸 그래프이다.

[255] 도 10 및 도 11에 나타난 바와 같이, KSY 그룹과 K 그룹에서 임상징후 평가가 TAT-ctCTLA-4 그룹과 PBS 그룹보다 유의적으로 우수한 것을 확인하였다. 또한, TAT-ctCTLA-4 그룹, PBS 그룹보다 dNP2-KSY 그룹과 dNP2-K 그룹에서 척수에 침윤된 림프구의 숫자가 유의적으로 낮은 것을 확인하였다. 즉, K 모티프(motif)만 있어도 우수한 면역반응 억제 활성을 가진다는 것을 확인하였다.

[256]

[257] 실험예 3. CTLA4의 각 모티프(motif)별 효능 분석

[258] 시료의 준비

[259] 본 실험은 dNP2-ctCTLA-4, dNP2, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(K, S, Y1, P, Y2)의 기능을 확인하기 위한 것으로, dNP2-ctCTLA-4를 비롯하여 이의 변이체를 준비하여, 면역반응 억제정도를 분석하였다.

[260] 우선, dNP2-ctCTLA-4(WT), dNP2, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(K, S, Y1, P, Y2)를 하기 표 5에서와 같이 설계하고, 애니젠(AnyGen, Kwangju, Korea)에 의뢰하여 고체상 펩티드 합성(SPPS; solid-phase peptide synthesis)으로 제작하였다. 구체적인 제조과정은 실시예 1과 동일하며, 본 실험에서 제조된 펩타이드 역시 순도는 95% 이상인 것으로 확인되었다.

[261] [표5]

명칭	서열 번호	아미노산 서열
dNP2-ctCTLA-4	15	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRKGGKMLKKRSPL TTGVYVKMPPTEPECEKQFQPYFIPIN
dNP2	18	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRK
K1	28	KMLKKRS
S	29	SPLTTGV
Y1	30	YVKM
P	31	PPTEPECE
Y2	32	YFIPIN

[262] 시료의 투여 및 샘플링-Th17 분화조건

[263] 상기 실험방법 1에 따라 Th17 분화조건에서의 효능 분석하고자 하였다. 시료를

dNP2-ctCTLA-4, dNP2, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(K, S, Y1, P, Y2)를 사용한 것을 제외하고 모두 실험방법 1과 동일하게 수행하였다. 하기와 같이 총 여덟 그룹(Th17, dNP2, dNP2-ctCTLA-4, K, S, Y1, P, Y2)으로 나누어 진행하였다. 상기 그룹들은 4일 후 IL-17, Foxp3 형광 항체를 이용하여 유세포 분석(flow cytometry)하였다.

- [264] Th17 그룹(대조군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 PBS(2 μ M)를 처리.
- [265] dNP2 그룹(대조군2) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 18의 dNP2 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [266] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 15의 (dNP2-ctCTLA-4)_WT(2 μ M)를 처리.
- [267] K 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 28의 K1 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [268] S 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 29의 S 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [269] Y1 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 30의 Y1 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [270] P 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 31의 P 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [271] Y2 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 32의 Y2 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [272]
- [273] 도 12는 dNP2-ctCTLA-4, dNP2, dNP2-ctCTLA-4의 변이체(K, S, Y1, P, Y2)에 대한 구조를 나타낸 도면이고, 도 13은 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 여덟 그룹(Th17, dNP2, dNP2-ctCTLA-4, K, S, Y1, P, Y2)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이며, 도 14는 여덟 그룹(Th17, dNP2, dNP2-ctCTLA-4, K, S, Y1, P, Y2)에 대한 CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺foxp3⁺ T 세포의 유세포 분석 결과이다.
- [274] 도 13 및 14에 나타난 바와 같이, K 모티프(motif)만으로 이루어진 K 그룹에서 dNP2-ctCTLA4 그룹과 유사한 정도의 면역반응 억제활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 다른 S 그룹, Y1 그룹, P 그룹 및 Y2 그룹은 dNP2 그룹 혹은 Th17 그룹과 유의미한 차이를 나타내지 못하는 것으로 확인되었다. K 모티프(motif)가 면역반응 억제에 주요한 역할을 수행하고 있다는 것을 확인하였다.
- [275]
- [276] 실험예 4. K, K2, K3 펩타이드에 대한 효능 분석
- [277] 시료의 준비
- [278] 본 실험은 dNP2-ctCTLA-4의 K 모티프(motif)에 대한 기능을 확인하기 위한

것으로, dNP2-ctCTLA-4의 K 모티프(motif)를 준비하여, 면역반응 억제정도를 분석하였다.

- [279] 우선, dNP2-ctCTLA-4, 서열번호 28의 K1 펩타이드, 서열번호 2, 4 내지 6의 K 변이체(K2(G4S), K3(G4S), K3(GG), K3)를 하기 표 6에서와 같이 설계하였다. dNP2-ctCTLA-4(WT), 서열번호 28의 K1 펩타이드는 애니젠(AnyGen, Kwangju, Korea)에 의뢰하여 고체상 펩티드 합성(SPPS; solid-phase peptide synthesis)으로 제작하였다. 구체적인 제조과정은 실시예 1과 동일하며, 서열번호 2, 4, 5, 6의 K 변이체(K2(G4S), K3(no linker), K3(G4S), K3(GG))는 실시예 2, 실시예 4, 실시예 5, 실시예 6을 사용하였다. 본 실험에서 제조된 펩타이드 역시 순도는 95% 이상인 것으로 확인되었다.
- [280] 본 발명에서 'K1'은 D 형 또는 L 형 아미노산이 치환 또는 추가되거나, 삭제되지 않은 어떠한 변형도 없는 순수 서열번호 28로 표시되는 펩타이드이며, 말단에도 지방산, 링커와 같은 어떠한 추가물질도 결합되지 않은 순수 펩타이드인 것을 사용하였다.

- [281] [표6]

명칭	서열 번호	아미노산 서열
dNP2-ctCTLA-4	15	KIKKVKKKGRKGSIKIKKVKKKGRKGGKMLKKRSPLTT GVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN
K1	28	KMLKKRS
K2(G4S) (실시예 2)	2	KMLKKRSGGGGSKMLKKRS
K3(no linker) (실시예 4)	4	KMLKKRSKMLKKRSKMLKKRS
K3(G4S) (실시예 5)	5	KMLKKRSGGGGSKMLKKRSGGGGSKMLKKRS
K3(GG) (실시예 6)	6	KMLKKRSGGKMLKKRSGGKMLKKRS

- [282] 시료의 투여 및 샘플링-Th17 분화조건

- [283] 상기 실험방법 1에 따라 Th17 분화조건에서의 효능 분석하고자 하였다. 시료를 dNP2-ctCTLA-4, 서열번호 28의 K1 펩타이드, 서열번호 2, 4 내지 6의 K1 변이체(K2(G4S), K3(G4S), K3(GG), K3)를 사용한 것을 제외하고 모두 실험방법 1과 동일하게 수행하였다. 하기와 같이 총 여덟 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4, K1, K2(G4S), K3(G4S), K3(GG), K3(no linker))으로 나누어 진행하였다. 상기 그룹들은 4일 후 IL-17, Foxp3 형광 항체를 이용하여 유세포 분석(flow cytometry)

하였다.

- [284] Th17 그룹(대조군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 PBS(2 μ M)를 처리.
- [285] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군1) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 15의 dNP2-ctCTLA-4(2 μ M)를 처리.
- [286] AP-ctCTLA-4 그룹(양성대조군2) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 17의 AP-ctCTLA-4(2 μ M)를 처리.
- [287] K1 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 28의 K1 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [288] K2(G4S) 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 2의 K2(G4S) 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [289] K3(no linker) 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 4의 K3(no linker) 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [290] K3(G4S) 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 5의 K3(G4S) 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [291] K3(GG) 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 6의 K3(GG) 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [292] 시료의 투여 및 샘플링-다발성 경화증 동물모델
- [293] 실험방법 2에 따라 다발성경화증 동물모델에서의 효능을 분석하고자 하였다. 실험방법 2에서 시료를 dNP2-ctCTLA-4, 서열번호 28의 K1 펩타이드, 서열번호 2 K2 펩타이드, 서열번호 4의 K3(no linker) 펩타이드를 사용하여, 총 다섯 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4, K1, K2(G4S), K3(no linker))으로 나누어 진행하였다.
- [294] PBS 그룹(대조군) : PTX를 주사하고 7일째부터 18일까지 PBS 100 μ g을 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [295] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군1) : PTX를 주사하고 7일째부터 18일까지 서열번호 15의 dNP2-ctCTLA-4-WT(100 μ g)을 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [296] K1 그룹(양성대조군2) : PTX를 주사하고 7일째부터 18일까지 서열번호 28의 K1 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [297] K2(G4S) 그룹 : PTX를 주사하고 7일째부터 18일까지 서열번호 2의 K2(G4S) 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [298] K3(no linker) 그룹 : PTX를 주사하고 7일째부터 18일까지 서열번호 4의 K3 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [299] 각 그룹은 다발성경화증을 유도하고 난 후부터 실험방법 2와 같이 매일 관찰하고 임상 징후 점수를 매겨 기록하였고, 실험이 종료된 후 조직학적 분석을 통해 림프구, CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺IFN- γ ⁺ T 세포, Treg/Teff의 비율을 측정하였다.
- [300]
- [301] 도 15는 dNP2-ctCTLA-4, K1, K2(G4S), K3(G4S), K3(GG), K3(no linker)에 대한

구조를 나타낸 도면이고, 도 16은 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 일곱 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4, K1, K2(G4S), K3(G4S), K3(GG), K3(no linker))에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이며, 도 17은 여덟 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4(WT), AP-ctCTLA-4, K1, K2(G4S), K3(G4S), K3(GG), K3(no linker))에 대한 CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺foxp3⁺ T 세포의 유세포 분석 결과이다.

[302] 도 16 및 도 17에 나타난 바와 같이, dNP2와 같은 세포투과성 펩타이드(CPP)를 제거하고 K 모티프(motif)를 두 개 및 세 개를 연결한 펩타이드를 사용한 경우(실시예 2, 실시예 4), K1 그룹보다 유의적으로 면역세포 억제 활성이 우수한 것을 확인할 수 있다. 즉 dNP2-ctCTLA4와 달리 K2 펩타이드와 K3 펩타이드는 CPP 없이도 현저히 우수한 면역반응 억제 효과가 있다는 것을 확인하였다. 반면 K1 펩타이드는 CPP없이 Th17(대조군)과 유의적 차이가 나타나지 않은 것으로 확인되었다.

[303] 따라서 dNP2-ctCTLA4 유래라고 하더라도 K1 펩타이드로는 본원발명이 얻고자 하는 자가면역 질환 예방 또는 치료 효과를 얻을 수 없다는 것을 알 수 있다.

[304]

[305] 도 18은 다섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4, K1, K2(G4S), K3(no linker))에 대한 다발성 경화증 동물모델의 임상 증후 평가 결과를 나타낸 그래프이고, 도 19는 다섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4, K1, K2(G4S), K3(no linker))에 대한 면역세포(Th1, Th17, Treg)의 수를 분석하여 나타낸 그래프이다.

[306] 도 18 및 도 19에 나타난 바와 같이, K2(G4S) 그룹과 K3(no linker) 그룹에서 임상징후 평가가 K1 그룹보다 유의적으로 현저히 우수한 것을 확인할 수 있다. 또한, K2(G4S) 그룹과 K3(no linker) 그룹은 K1 그룹보다 척수에 침윤된 림프구의 숫자가 유의적으로 낮은 것을 확인하였다. 특히 K2(G4S) 그룹과 K3(no linker) 그룹에서 Treg 세포의 수가 K1 그룹 보다 높은 것을 확인할 수 있다. 즉, K 모티프(motif)라고 하더라도, 단독으로는 다발성 경화증 동물모델에 대해 유의적 효과를 나타내지 못하나, K2, K3 펩타이드는 생체 내에서 다발성 경화증에 대해 현저히 유의한 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다.

[307]

[308] **실험예 5. AP-K2 복합체, AP-K3 펩타이드의 효능 분석**

[309] 시료의 준비

[310] 본 실험은 CPP와 결합한 K2, K3 펩타이드 복합체 효능을 분석한 것이다. 이를 위해 우선 dNP2-ctCTLA-4, K2, K3(no linker), AP-K2, AP-K3를 실시예 1, 실시예 4 및 실시예 9, 실시예 10과 같이 준비하였다. 각각의 서열은 다음 표 7과 같다.

[311] [표7]

서열 번호	명칭	아미노산 서열
15	dNP2-ctCTLA-4	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRKGGKMLKKRSPLTT GVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN
18	dNP2	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRK
19	AP	RRRWCKRRR
1	K2	KMLKKRSKMLKKRS
4	K3	KMLKKRSKMLKKRSKMLKKRS
9	AP-K2	RRRWCKRRRGGKMLKKRSKMLKKRS
10	AP-K3	RRRWCKRRRGGKMLKKRSKMLKKRSKMLKKRS

[312] 시료의 투여 및 샘플링-Th17 분화조건

[313] 실험방법 1에 따라 Th17 분화조건에서의 효능 분석하고자 하였다. 시료를 dNP2-ctCTLA-4, 서열번호 1의 K2 펩타이드, 서열번호 4의 K3 펩타이드, 서열번호 9의 AP-K2 펩타이드 및 서열번호 10의 AP-K3 펩타이드를 사용하였다는 것을 제외하고는 모두 실험방법 1과 동일하게 하여 수행하였다. 총 여섯 그룹(Th17(대조군), dNP2-ctCTLA-4, K2, K3, AP-K2, AP-K3)으로 나누어 진행하였다.

[314] Th17 그룹(대조군1) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 PBS(2 μ M)를 처리.

[315] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 15의 dNP2-ctCTLA-4(2 μ M)를 처리.

[316] K2 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 1의 K2 펩타이드(2 μ M)를 처리.

[317] K3 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 4의 K3 펩타이드(2 μ M)를 처리.

[318] AP-K2 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 9의 AP-K2 펩타이드(2 μ M)를 처리.

[319] AP-K3 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 10의 AP-K3 펩타이드(2 μ M)를 처리.

[320] 시료의 투여 및 샘플링-다발성경화증 동물모델

[321] 실험방법 2에 따라 다발성경화증 동물모델에서의 효능을 분석하고자 하였다. 실험방법 2에서 시료를 dNP2-ctCTLA-4, AP, dNP2, AP-K2 및 AP-K3를 사용하여, 총 여섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4, AP, dNP2, AP-K2 및 AP-K3)으로 나누어

진행하였다.

- [322] PBS 그룹(대조군): PTX를 주사하고 7일째부터 15일까지 PBS 100 μ g을 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [323] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군1): PTX를 주사하고 7일째부터 15일까지 서열번호 15의 dNP2-ctCTLA-4(100 μ g)을 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [324] AP 그룹: PTX를 주사하고 7일째부터 13일까지 서열번호 19의 AP 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [325] dNP2 그룹: PTX를 주사하고 7일째부터 13일까지 서열번호 18의 dNP2 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [326] AP-K2 그룹: PTX를 주사하고 7일째부터 13일까지 서열번호 9의 AP-K2 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [327] AP-K3 그룹: PTX를 주사하고 7일째부터 13일까지 서열번호 10의 AP-K3 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [328] 각 그룹은 다발성경화증을 유도하고 난 후부터 실험방법 2와 같이 매일 관찰하고 임상 징후 점수를 매겨 기록하였고, 실험이 종료된 후 조직학적 분석을 통해 림프구, CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺IFN- γ ⁺ T 세포, Treg/Teff의 비율을 측정하였다.
- [329]
- [330] 도 20은 dNP2-ctCTLA-4, 서열번호 1의 K2 펩타이드, 서열번호 4의 K3 펩타이드, 서열번호 9의 AP-K2 펩타이드 및 서열번호 10의 AP-K3 펩타이드에 대한 구조를 나타낸 도면이고, 도 21은 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 여섯 그룹(Th17(대조군), dNP2-ctCTLA-4, K2, K3, AP-K2, AP-K3)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이다.
- [331] 도 21에 나타난 바와 같이, K2 그룹과 K3 그룹은 PBS(대조군) 보다 유의적으로 우수한 면역반응 억제 효과를 가지는 것을 확인하였다. AP와 같은 세포투과성 펩타이드(CPP)를 결합한 AP-K2 그룹, AP-K3 그룹의 경우, PBS(대조군) 보다 유의적으로 우수한 면역반응 억제 효과를 가지는 것을 확인하였으며, 특히 K2 그룹과 K3 그룹은 dNP2-ctCTLA-4 그룹과 달리 CPP를 포함하고 있지 않음에도, 동등한 효과를 가지는 것으로 확인되었고, AP-K2 그룹 및 AP-K3 그룹은 dNP2-ctCTLA-4 그룹보다 현저히 우수한 IL-17 사이토카인 억제 효과를 갖는 것을 확인할 수 있다.
- [332]
- [333] 도 22는 여섯 그룹(PBS(대조군), dNP2-ctCTLA-4, dNP2, AP, AP-K2, AP-K3)에 대한 다발성 경화증 동물모델의 임상 증후 평가 결과를 나타낸 그래프이고, 도 23은 여섯 그룹(PBS(대조군), dNP2-ctCTLA-4, dNP2, AP, AP-K2, AP-K3)에 대한 침윤된 림프구와 면역세포(Treg)의 수를 분석하여 나타낸 그래프이다.
- [334] 도 22 및 도 23에 나타난 바와 같이, AP-K2 그룹과 AP-K3 그룹에서 임상징후 평가가 PBS(대조군)보다 유의적으로 개선된 것을 확인할 수 있다.

- [335] 또한, AP-K2 그룹과 AP-K3 그룹은 PBS(대조군)보다 척수에 침윤된 림프구의 숫자가 현저히 낮았으며, dNP2, AP 그룹보다 유의적으로 낮다는 것을 확인할 수 있다.
- [336] 또한, AP-K2 그룹과 AP-K3 그룹은 PBS(대조군)보다 면역세포인 조절 T 세포(Treg)의 숫자가 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있는데, 특히 AP-K2 그룹은 dNP2-ctCTLA-4와 동등한 수준으로 증가하는 것을 확인할 수 있다.
- [337] 종합하면 K2, K3 펩타이드는 단독으로도 자가면역 질환에 대한 예방 또는 치료효과를 가지나, 세포투과성 펩타이드와의 복합체 역시 자가면역 질환에 대한 우수한 치료효과를 갖는다는 것을 알 수 있다.
- [338]
- [339] **실험예 6. 지방산으로 수식된 펩타이드와의 효능 분석**
- [340] 시료의 준비
- [341] 본 실험은 K2 펩타이드와 K3 펩타이드에 지방산을 수식한 펩타이드의 면역반응 억제정도를 분석한 것이다.
- [342] 우선, dNP2-ctCTLA-4, K2, K3, Myr-K2, Myr-K3를 하기 표 8에서와 같이 설계하고, 실시예 1, 4, 15, 16에 따라 제조하였다. Myr-K2, Myr-K3는 실시예 15 및 16으로부터 제조된 지방산으로 수식된 펩타이드이다. 이때, Myr은 미리스트산을 의미한다.
- [343] [표8]

서열 번호	명칭	아미노산 서열
15	dNP2-ctCTLA-4	KIKKVKKKGRKGSKIKKVKKKGRKGGKMLKKRSPLTT GVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN
1	K2	KMLKKRSKMLKKRS
4	K3	KMLKKRSKMLKKRSKMLKKRS
9	AP-K2	RRRWCKRRRGKMLKKRSKMLKKRS

- [344] 시료의 투여 및 샘플링-Th17 분화조건
- [345] 상기 실험방법 1에 따라 Th17 분화조건에서의 효능 분석하고자 하였다. 시료를 dNP2-ctCTLA-4, K2, K3, Myr-K2, Myr-K3를 사용한 것을 제외하고 모두 실험방법 1과 동일하게 수행하였다. 하기와 같이 총 여섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4, K2, K3, Myr-K2, Myr-K3)으로 나누어 진행하였다. 상기 그룹들은 4일 후 IL-17, Foxp3 형광 항체를 이용하여 유세포 분석(flow cytometry) 하였다.
- [346] Th17 그룹(대조군): 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 PBS(2 μ M)를 처리.

- [347] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 15의 (dNP2-ctCTLA-4)_WT(2 μ M)를 처리.
- [348] K2 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 1의 K2 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [349] K3 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 서열번호 4의 K3 펩타이드(2 μ M)를 처리.
- [350] Myr-K2 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 실시예 15의 Myr-K2(2 μ M)를 처리.
- [351] Myr-K3 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 각테일과 함께 실시예 16의 Myr-K3(2 μ M)를 처리.
- [352] 시료의 투여 및 샘플링-다발성경화증 동물모델
- [353] 실험방법 2에 따라 다발성경화증 동물모델에서의 효능을 분석하고자 하였다. 실험방법 2에서 시료를 dNP2-ctCTLA-4, K2, AP-K2, Myr-K2, Myr-K3을 사용하여, 총 여섯 그룹(PBS, dNP2-ctCTLA-4, K2, AP-K2, Myr-K2, Myr-K3)으로 나누어 진행하였다.
- [354] PBS 그룹(대조군) : PTX를 주사하고 7일째부터 13일까지 PBS 100 μ g을 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [355] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군) : PTX를 주사하고 7일째부터 13일까지 서열번호 15의 (dNP2-ctCTLA-4)_WT(100 μ g)을 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [356] K2 그룹 : PTX를 주사하고 7일째부터 13일까지 서열번호 1의 K2 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [357] AP-K2 그룹 : PTX를 주사하고 7일째부터 13일까지 서열번호 9의 AP-K2 펩타이드(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [358] Myr-K2 그룹 : PTX를 주사하고 7일째부터 13일까지 실시예 15의 Myr-K2(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [359] Myr-K2 그룹 : PTX를 주사하고 7일째부터 13일까지 실시예 16의 Myr-K3(100 μ g)를 매일 1 회씩 복강내 주사.
- [360] 각 그룹은 다발성경화증을 유도하고 난 후부터 실험방법 2와 같이 매일 관찰하고 임상 징후 점수를 매겨 기록하였고, 실험이 종료된 후 조직학적 분석을 통해 림프구, CD4⁺IL-17A⁺ T 세포, CD4⁺IFN- γ ⁺ T 세포, Treg/Teff의 비율을 측정하였다.
- [361]
- [362] 도 24는 dNP2-ctCTLA-4(WT), 서열번호 1의 K2 펩타이드, 서열번호 4의 K3 펩타이드, 실시예 15의 AP-K2 펩타이드 및 실시예 16의 AP-K3 펩타이드에 대한 구조를 나타낸 도면이고, 도 25는 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 여섯 그룹(Th17(대조군), dNP2-ctCTLA-4, K2, K3, Myr-K2, Myr-K3)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이다.

- [363] 도 25에 나타난 바와 같이, K2 그룹 및 K3 그룹은 PBS 그룹보다 유의적으로 우수한 면역반응 억제 효과를 가지는 것을 확인하였다. K2 펩타이드 및 K3 펩타이드에 지방산을 담체로 결합한 Myr-K2 및 Myr-K3도 PBS 그룹보다 유의적으로 우수한 면역반응 억제 효과를 가지는 것을 확인하였으며, 특히 Myr-K3은 dNP2-ctCTLA-4 그룹보다 면역반응 억제 효과가 유의적으로 현저히 우수한 것을 확인할 수 있다.
- [364]
- [365] 도 26은 여섯 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4, K2, AP-K2, Myr-K2, Myr-K3)에 대한 다발성 경화증 동물모델의 임상 증후 평가 결과를 나타낸 그래프이고, 도 27은 여섯 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4, K2, AP-K2, Myr-K2, Myr-K3)에 대한 침윤된 림프구와 면역세포(Treg)의 수를 분석하여 나타낸 그래프이다.
- [366] 도 26 및 도 27에 나타난 바와 같이, K2 그룹, AP-K2 그룹 뿐만 아니라, Myr-K2와 Myr-K3를 사용한 그룹 역시 임상징후 평가가 PBS 그룹보다 유의적으로 개선된 것을 확인할 수 있다. 특히 Myr-K3를 사용한 그룹은 dNP2-ctCTLA-4 그룹보다 현저히 유사한 정도로 증상이 완화되는 것을 확인할 수 있다.
- [367] 또한, K2 그룹, AP-K2 그룹 뿐만 아니라, Myr-K2와 Myr-K3를 사용한 그룹 모두 PBS(대조군)보다 척수에 침윤된 림프구의 숫자가 유의적으로 낮은 것을 확인할 수 있다. 다만 이중에서 AP-K2 그룹과 Myr-K3 그룹이 가장 효과가 우수하였으며, 특히 Myr-K3 그룹은 dNP2-ctCTLA-4 그룹보다 더 낮은 수준으로 억제하는 것을 확인할 수 있다.
- [368] 또한, AP-K2 그룹 뿐만 아니라, Myr-K2와 Myr-K3를 사용한 그룹 모두 PBS(대조군)보다 IL-17 T 세포 및 IFN- γ T 세포의 발현을 억제하였고, Foxp3 T 세포의 증가를 유도하는 것을 확인할 수 있다. 특히 Myr-K3를 사용한 그룹은 dNP2-ctCTLA-4 그룹보다 더 낮은 수준으로 억제하는 것을 확인할 수 있다.
- [369] 종합하면 K2, K3 펩타이드 뿐만 아니라 Myr-K2, Myr-K3 역시 자가면역 질환에 대한 우수한 예방, 치료효과를 갖는다는 것을 알 수 있다.
- [370]
- [371] 실험예 7. D-아미노산을 갖는 조절 T 세포 유도 펩타이드에 대한 효능 분석
- [372] 시료의 준비
- [373] 본 실험은 서열번호 1 또는 서열번호 4의 조절 T 세포 유도 펩타이드의 일부 아미노산 잔기가 D-아미노산 잔기일 때 자가면역 질환에 대한 효과를 다시금 확인하기 위한 것으로, 우선 dNP2-ctCTLA-4, Myr-K3, Myr-K3D, Pal-K3, Myr-Ap-K2D, Pal-Ap-K2D를 준비하여 실험을 수행하였다. 구체적으로 dNP2-ctCTLA-4는 실험예 1과 동일하게 제조하여 준비하였고, Myr-K3, Myr-K3D, Pal-K3, Myr-Ap-K2D, Pal-Ap-K2D는 실시예 16, 실시예 17, 실시예 18, 실시예 19 및 실시예 20에 따라 제조하였다.
- [374] 시료의 투여 및 샘플링-Th17 분화조건

- [375] 상기 실험방법 1에 따라 Th17 분화조건에서의 효능 분석하고자 하였다. 시료를 dNP2-ctCTLA-4, Myr-K3, Myr-K3D, Pal-K3, Myr-AP-K2D, Pal-AP-K2D를 사용한 것을 제외하고 모두 실험방법 1과 동일하게 수행하였다. 하기와 같이 총 일곱 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4, Myr-K3, Myr-K3D, Pal-K3, Myr-AP-K2D, Pal-AP-K2D)으로 나누어 진행하였다. 상기 그룹들은 4일 후 IL-17, Foxp3 형광 항체를 이용하여 유세포 분석(flow cytometry) 하였다.
- [376] Th17 그룹(대조군1) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 PBS(2 μ M)를 처리.
- [377] dNP2-ctCTLA-4 그룹(양성대조군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 15의 (dNP2-ctCTLA-4)_WT(2 μ M)를 처리.
- [378] Myr-K3 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 실시예 16의 Myr-K3(2 μ M)를 처리.
- [379] Myr-K3D 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 실시예 17의 Myr-K3D(2 μ M)를 처리.
- [380] Pal-K3 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 실시예 18의 Pal-K3(2 μ M)를 처리.
- [381] Myr-AP-K2D 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 실시예 19의 Myr-AP-K2D(2 μ M)를 처리.
- [382] Pal-AP-K2D 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 실시예 20의 Pal-AP-K2D(2 μ M)를 처리.
- [383]
- [384] 도 28은 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 일곱 그룹(Th17, dNP2-ctCTLA-4, Myr-K3, Myr-K3D, Pal-K3, Myr-AP-K2D, Pal-AP-K2D)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이다.
- [385] 도 28에 나타난 바와 같이, D-아미노산 잔기를 갖는 Myr-K3D 그룹, Myr-AP-K2D 그룹, Pal-AP-K2D 그룹은 PBS 그룹보다 Treg 세포의 발현을 현저히 증가시키는 것을 확인할 수 있다. 특히 K3 펩타이드는 미리스티산(Myristic acid)과 팔미트산(Palmitic acid) 중에 어느 것을 사용하더라도 현저히 우수한 면역반응 억제효과를 갖는 것을 알 수 있다. 지방산 중에서 대량생산에 팔미트산이 용이한데, 팔미트산으로 결합하였을 때에도 효과가 없어지지 않고, 우수한 효능을 유지하고 있는 것을 확인하였다.
- [386] K2 펩타이드와 K3 펩타이드의 경우 D 형 아미노산 잔기로 변경시, L 형 아미노산 잔기보다 안정성(stability)이 높아지고, Treg 세포, 즉 과도한 면역반응에 의해 증상이 유도된 경우 면역기능을 조절하는 능력은 크게 향상되는 것을 확인할 수 있다.
- [387]
- [388] 실험예 8. K2의 변이체에 대한 효능 분석

[389] 시료의 준비

[390] 본 실험은 AP-K2 펩타이드를 구성하는 아미노산 잔기의 역할을 확인하기 위하여, 서열번호 9의 AP-K2 펩타이드에서 일부 아미노산 잔기를 알라닌으로 치환한 변이체를 하기 서열번호 42 내지 48과 같이 설계하고, 애니젠(AnyGen, Kwangju, Korea)에 의뢰하여 고체상 펩티드 합성(SPPS; solid-phase peptide synthesis)으로 제작하였다. 구체적인 제조과정은 실시예 1과 동일하며, 본 실험에서 제조된 펩타이드 역시 순도는 95% 이상인 것으로 확인되었다.

[391] 특히 서열번호 42는 AP-K2 펩타이드에서 주요한 기능을 수행할 것으로 예상되는 리신(lysine) 잔기와 아르기닌(arginine) 잔기를 모두 알라닌(alanine; A)으로 치환한 것으로 음성 대조군(negative control)으로 사용하였고, tjdufqjsgh 19로 표시되는 AP 펩타이드를 비교군으로 사용하였다(본 실험예에서 사용한 AP-K2 KA는 서열번호 19의 dNP2-KA와는 다른 펩타이드이다).

[392] 구체적으로, 하기 서열번호 42 내지

[393] 서열번호 9 : AP-K2

[394] RRRWCKRRRGGKMLKKRSKMLKKRS

[395] 서열번호 19 : AP-K2

[396] RRRWCKRRR

[397] 서열번호 42 : AP-K2 KA

[398] RRRWCKRRRGGAMLAAASAMLAAAS

[399] 서열번호 43 : AP-K2 1KA

[400] RRRWCKRRRGGAMLKKRSAMLKKRS

[401] 서열번호 44 : AP-K2 MA

[402] RRRWCKRRRGGKALKKRSKALKKRS

[403] 서열번호 45 : AP-K2 LA

[404] RRRWCKRRRGGKMAKKRSKMAKKRS

[405] 서열번호 46 : AP-K2 2KA

[406] RRRWCKRRRGGKMLAKRSKMLAKRS

[407] 서열번호 47 : AP-K2 3KA

[408] RRRWCKRRRGGKMLKARSKMLKARS

[409] 서열번호 48 : AP-K2 RA

[410] RRRWCKRRRGGKMLKKASKMLKKAS

[411] 서열번호 49 : AP-K2 SA

[412] RRRWCKRRRGGKMLKKRAKMLKKRA

[413] 시료의 투여 및 샘플링-Th17 분화

[414] 상기 실험방법 1에 따라 Th17 분화조건에서의 효능 분석하고자 하였다. 시료를 AP-K2, AP-K2의 변이체(KA, IKA, MA, LA, 2KA, 3KA, RA, SA)를 사용한 것을 제외하고 모두 실험방법 1과 동일하게 수행하였다. 하기와 같이 그룹을 제조하여 실험을 수행하였고, 각 그룹들은 약물을 처리하고 4일 후 IL-17, Foxp3

형광 항체를 이용하여 유세포 분석(flow cytometry)하였다.

- [415] Th17 그룹(PBS; 대조군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 PBS를 양성대조군과 동일한 볼륨으로 처리함.
- [416] AP-K2 그룹(양성대조군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 9의 AP-K2(2 μ M)를 처리함.
- [417] AP 그룹(AP; 비교군) : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 19의 AP(2 μ M)을 처리함.
- [418] AP-K2 KA 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 41의 AP-K2 KA(2 μ M)를 처리함.
- [419] AP-K2 IKA 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 42의 AP-K2 IKA(2 μ M)를 처리함.
- [420] AP-K2 MA 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 43의 AP-K2 MA(2 μ M)를 처리함.
- [421] AP-K2 LA 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 44의 AP-K2 LA(2 μ M)를 처리함.
- [422] AP-K2 2KA 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 45의 AP-K2 2KA(2 μ M)를 처리함.
- [423] AP-K2 3KA 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 46의 AP-K2 3KA(2 μ M)를 처리함.
- [424] AP-K2 RA 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 47의 AP-K2 RA(2 μ M)를 처리함.
- [425] AP-K2 SA 그룹 : 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 CD4 T 세포에 사이토카인 콕테일과 함께 서열번호 48의 AP-K2 SA(2 μ M)를 처리함.
- [426]
- [427] 도 29는 마우스로부터 분리한 비장세포로부터 분화된 Th17 세포에 처리된 열한 그룹(Th17, AP-K2, AP, AP-K2 KA, AP-K2 IKA, AP-K2 MA, AP-K2 LA, AP-K2 2KA, AP-K2 3KA, AP-K2 RA, AP-K2 SA)에 대한 IL-17A 및 foxp3의 유세포 분석 결과이며, 도 30은 열한 그룹(Th17, AP-K2, AP, AP-K2 KA, AP-K2 IKA, AP-K2 MA, AP-K2 LA, AP-K2 2KA, AP-K2 3KA, AP-K2 RA, AP-K2 SA)에 대한 CD4⁺IL-17A⁺ T 세포(a), CD4⁺foxp3⁺ T 세포(b)의 유세포 분석 결과이다.
- [428] 앞서 실험을 통해 확인된 K2 모티프(motif)에서 주요한 기능을 하는 아미노산 잔기를 보다 정확하게 분석하기 위하여, 각각의 아미노산 잔기를 치환한 변이체를 사용하여 면역반응 억제 효과를 분석하였다.
- [429] 도 29 및 30에 나타난 바와 같이, 대조군에 비하여 AP-K2 그룹은 Foxp3을 약 5 배 이상 증가시키며, IL-17은 절반 이하로 감소시키는 효과를 나타내고 있으므로, 이를 통해 본 발명의 AP-K2 펩타이드(서열번호 9)는 면역반응 억제에 우수한 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있다.

- [430] 반면, AP-K2 KA 그룹은 AP-K2 기능이 다소 감소하는 것을 확인할 수 있으며, AP-K2 1KA, AP-K2 RA 그룹에서 AP-K2 기능이 유의적으로 감소하였으므로, 이를 통해 AP-K2 중에서 첫 번째 리신 잔기와 아르기닌 잔기가 면역반응 억제에 주요한 역할을 수행한다는 것을 알 수 있다.
- [431] 또한 AP-K2 LA 그룹도 AP-L2 기능이 다소 감소하는 것을 확인할 수 있는 바, AP-K2 중에서 류신 잔기도 주요한 기능을 수행한다는 것을 확인할 수 있다.
- [432] 다음으로, AP-K2 SA 그룹, AP-K2 2KA 그룹, AP-K2 3KA 그룹 및 AP-K2 MA 그룹 순으로 IL-17 감소 및 Foxp3 증가 활성을 나타내므로, K2 모티프에서 세린 잔기, 두 번째 및 세 번째 리신 잔기 및 메티오닌 잔기 순으로 면역반응 억제에 관여한다는 것을 확인할 수 있다.
- [433]
- [434] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

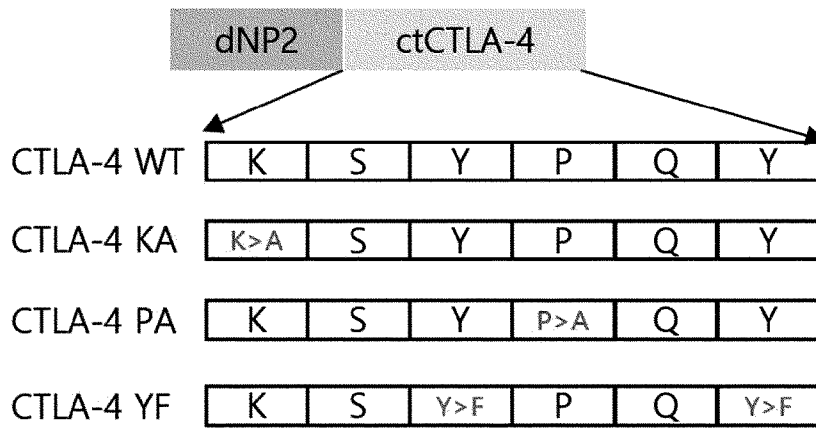
- [청구항 1] 하기 서열로 표시되는 조절 T 세포 유도 펩타이드:
 $[Lys-Xaa1-Leu-Xaa2-Xaa3-Arg-Xaa4]_n$
 상기 서열에서, Xaa1, Xaa2, Xaa3 및 Xaa4는 각각 독립적으로, 알라닌(alanine; A), 발린(Valine; V), 이소류신(isoleucine; I), 류신(leucine; L), 메티오닌(methionine; M), 페닐알라닌(phenylalanine; F), 티로신(tyrosine; Y), 트립토판(tryptophan; W), 리신(lysine; K), 아르기닌(arginine; R), 히스티딘(histidine; H), 세린(serine; S), 트레오닌(threonine; T), 아스파라긴(asparagine, N), 글루타민(glutamine; Q), 아스파르트산(aspartate, D), 글루탐산(glutamate, E), 시스테인(cysteine, C), 글리신(glycine, G) 및 프롤린(proline, P)로 이루어진 아미노산 중에서 선택되는 어느 하나이고, n은 2 내지 3의 정수이며, 상기 서열 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 잔기는 L 형 또는 D 형 아미노산 잔기이다.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 서열에서, Xaa1은 알라닌(alanine; A), 발린(Valine; V), 이소류신(isoleucine; I), 류신(leucine; L), 메티오닌(methionine; M), 페닐알라닌(phenylalanine; F), 티로신(tyrosine; Y), 트립토판(tryptophan; W)로 이루어진 소수성 아미노산 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 서열에서, Xaa2 및 Xaa3은 각각 독립적으로 리신(lysine; K), 아르기닌(arginine; R), 히스티딘(histidine; H)로 이루어진 염기성 아미노산 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 서열에서, Xaa4는 세린(serine; S), 트레오닌(threonine; T), 아스파라긴(asparagine, N), 글루타민(glutamine; Q)로 이루어진 극성 아미노산 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 서열에서, Xaa1은 메티오닌(methionine; M)인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 서열에서, Xaa2 및 Xaa3은 리신(lysine; K)인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.

- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 서열에서, Xaa4는 세린(serine; S)인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 서열에서 첫 번째 위치, 두 번째 위치, 여섯 번째 위치 및 일곱 번째 위치의 아미노산 잔기 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 잔기는 D형 아미노산인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 서열에서 여섯 번째 위치 및 일곱 번째 위치의 아미노산 잔기는 D형 아미노산인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 조절 T 세포 유도 펩타이드는 링커를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 링커는 (GGGGS) m ($m=1\sim4$), (GG) m ($m=1\sim4$), (GSSGGS) m ($m=1\sim4$), (EAAAK) m ($m=1\sim4$), PAPAP, (AP) m ($m=1\sim4$), A(EAAAK) m ($m=1\sim4$), (RR) m ($m=1\sim4$) 및 GFLG로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 조절 T 세포 유도 펩타이드의 N 또는 C 말단에 지방산이 추가적으로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 지방산은 상기 조절 T 세포 유도 펩타이드의 N 말단에 아마이드 결합으로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
상기 지방산은 탄소수 10 내지 20의 포화 또는 불포화 지방산인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 15] 제12항에 있어서,
상기 지방산은 미리스트산(Myristic acid), 스테아르산(Stearic acid), 리놀레산(Linoleic acid), 팔미트산(Palmitic acid), 올레산(Oleic acid) 및 라우르산(Lauric acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 16] 제1항에 있어서,
상기 조절 T 세포 유도 펩타이드의 N 또는 C 말단에 세포투과성 펩타이드(cell penetrating peptide, CPP)가 추가적으로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 세포투과성 펩타이드는 서열번호 18로 표시되는 dNP2, 서열번호

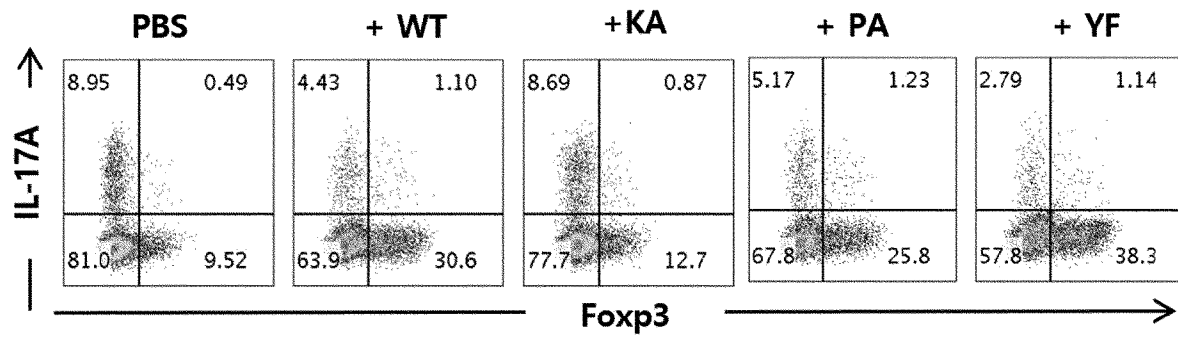
19로 표시되는 AP, TAT(HIV 1 trans-activating protein), 6 내지 8개 아르기닌을 갖는 폴리아르기닌 폴리펩티드, 7 내지 11개의 리신을 갖는 폴리리신 폴리펩티드 및 iRGD(internalizing RGD)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.

- [청구항 18] 제1항에 있어서,
상기 조절 T 세포 유도 펩타이드는 서열번호 1 내지 6, 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 50 내지 54로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 19] 제16항에 있어서,
상기 세포투과성 펩타이드가 결합된 조절 T 세포 유도 펩타이드는 서열번호 7 내지 10, 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포 유도 펩타이드.
- [청구항 20] 제1항에 따른 조절 T 세포 유도 펩타이드를 유효성분으로 하는 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 21] 제20항에 있어서,
상기 자가면역 질환은 루푸스(systemic lupus erythematosus), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 크론병(crohn disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 전신성 경피증(Progressive systemic sclerosis, Scleroderma), 아토피 피부염, 건선, 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 염증성 장염, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 혼합결합조직병(mixed connective tissue disease), 자가면역성 용혈성 빈혈(Autoimmune hemolytic anemia), 베체트병(Behcet's disease), 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증(Myasthenia gravis), 자가면역성 갑상선염(Autoimmune thyroiditis), 결절성 다발성 동맥염(Polyarteritis nodosa), 강직성 척추염(Ankylosing spondylitis), 섬유조직염(Fibromyalgia syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmuneuveitis), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy) 및 측두동맥염(Temporal arteritis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 22] 제20항에 있어서,
상기 조성물은 Th17의 활성을 저해하고 Treg를 활성화시키는 것을 특징으로 하는 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

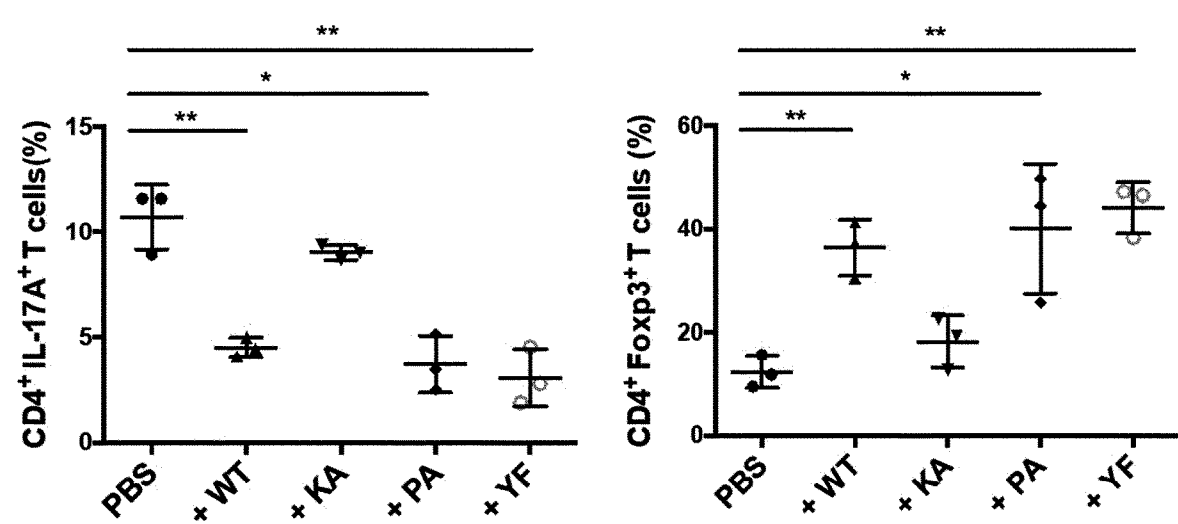
[도1]



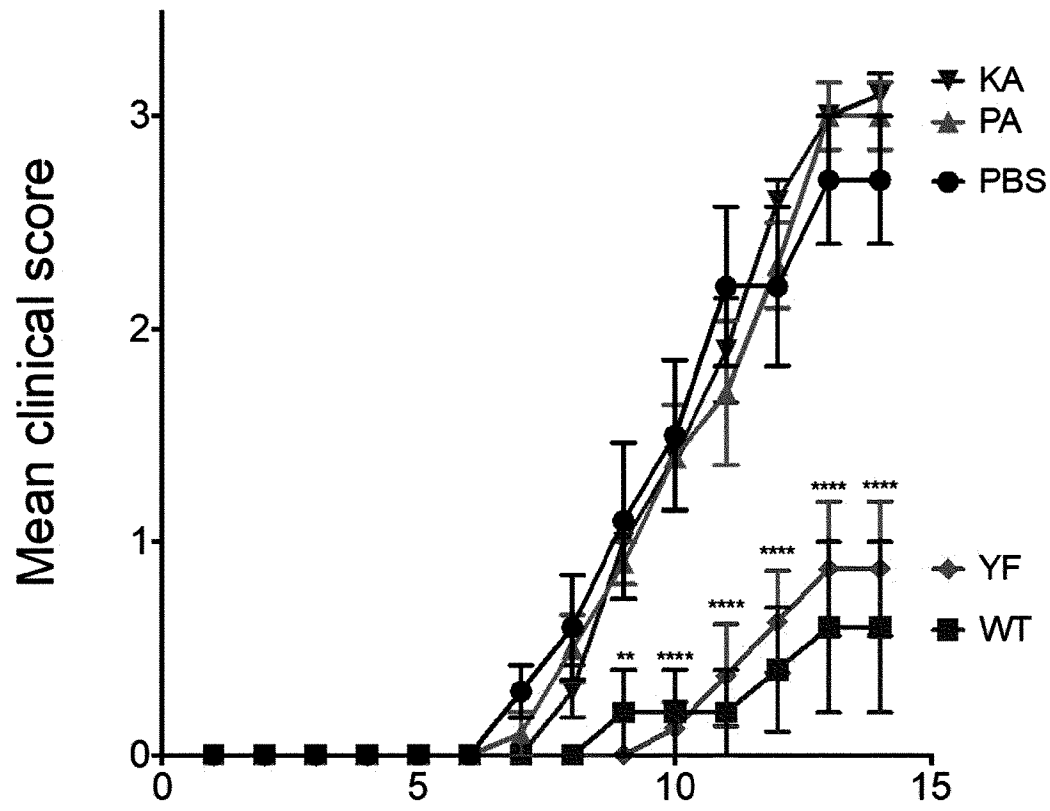
[도2]



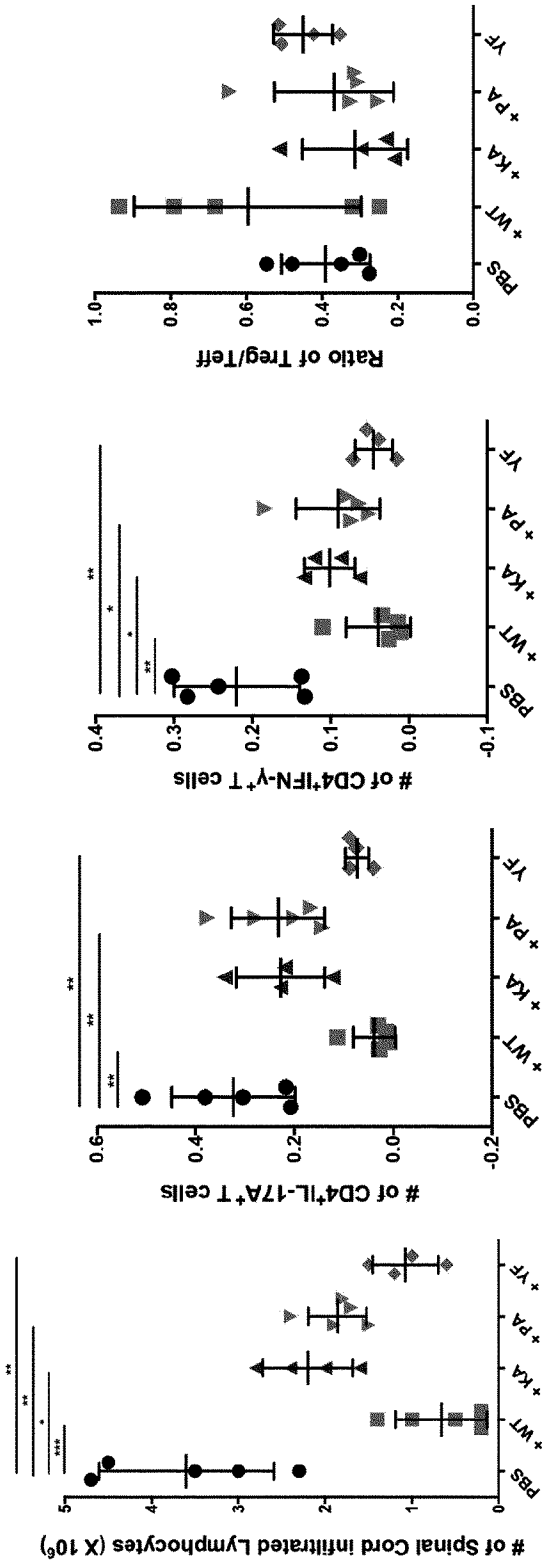
[도3]



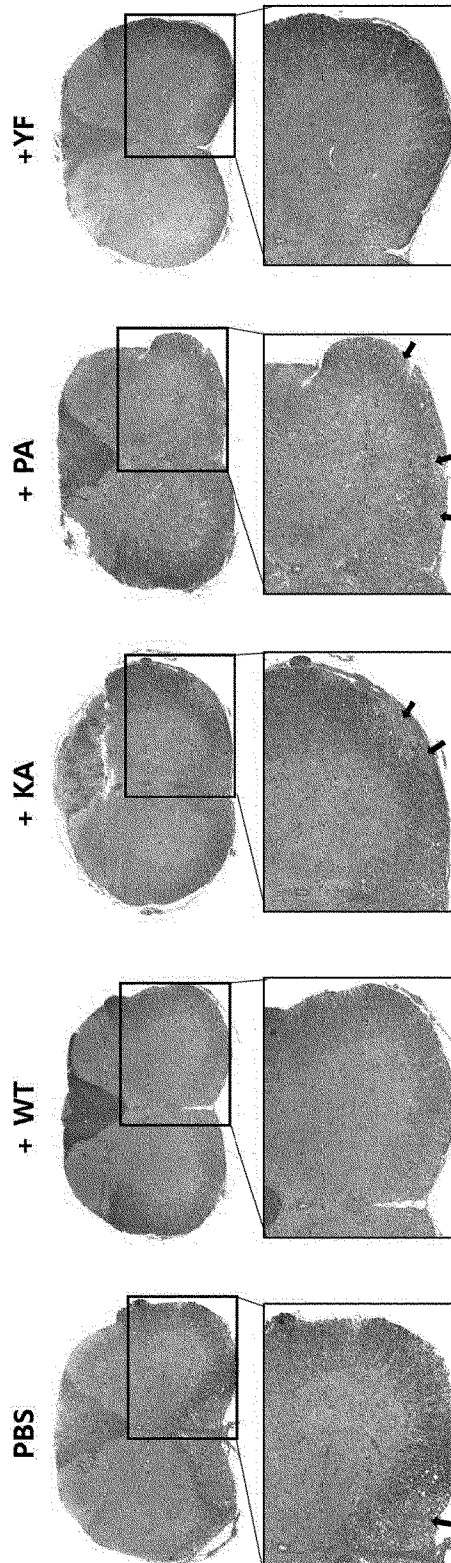
[도4]



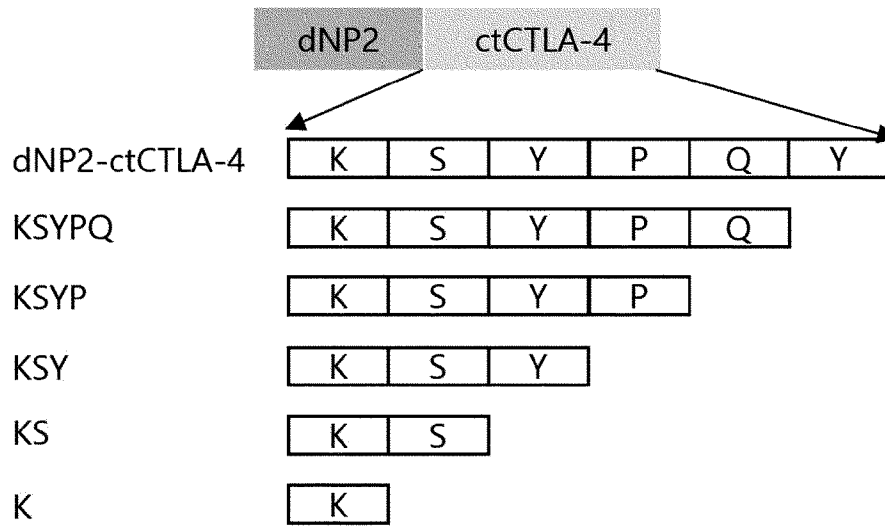
[도5]



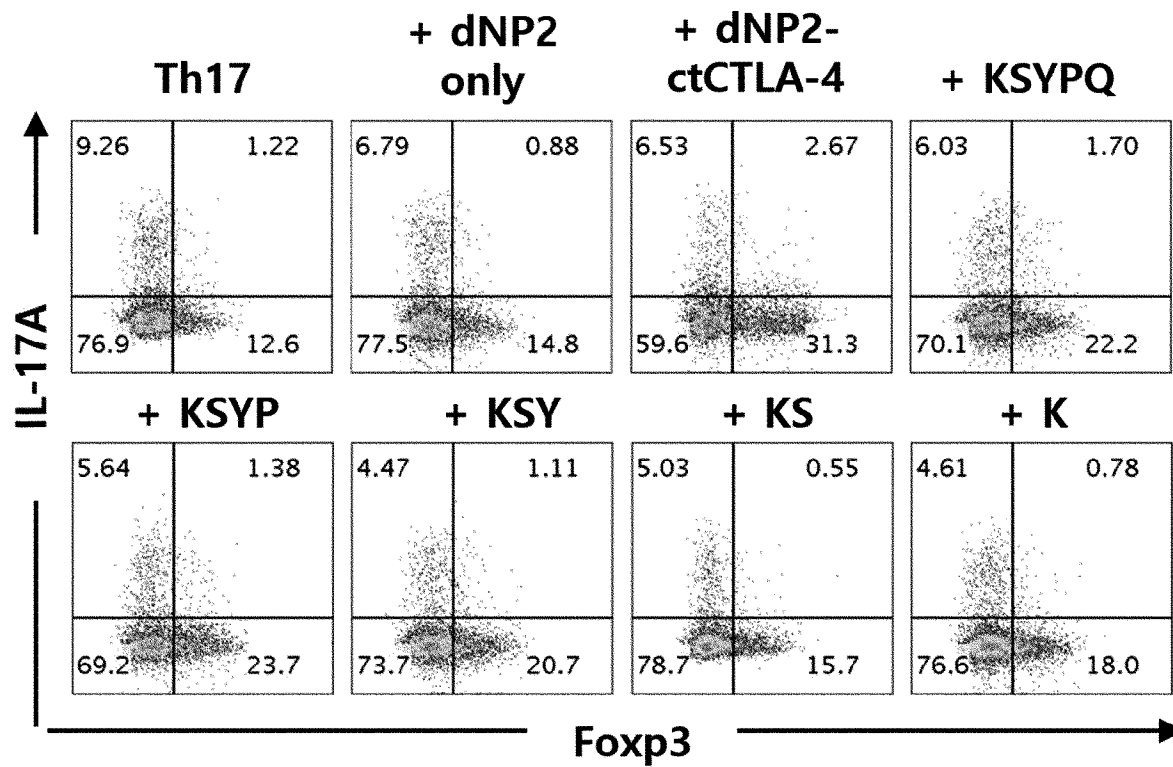
[도6]



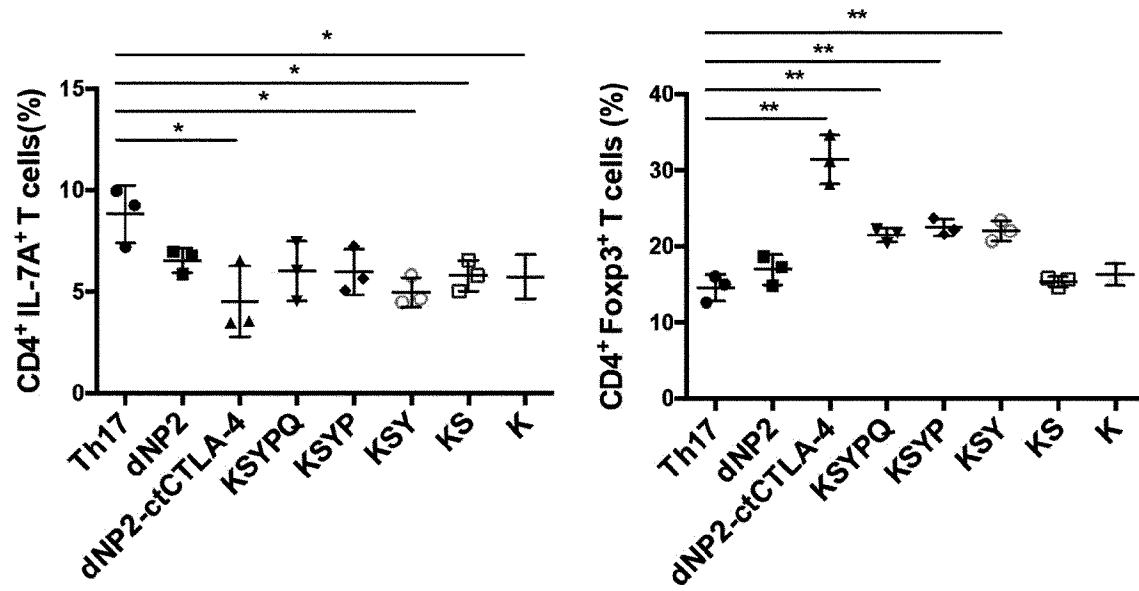
[도7]



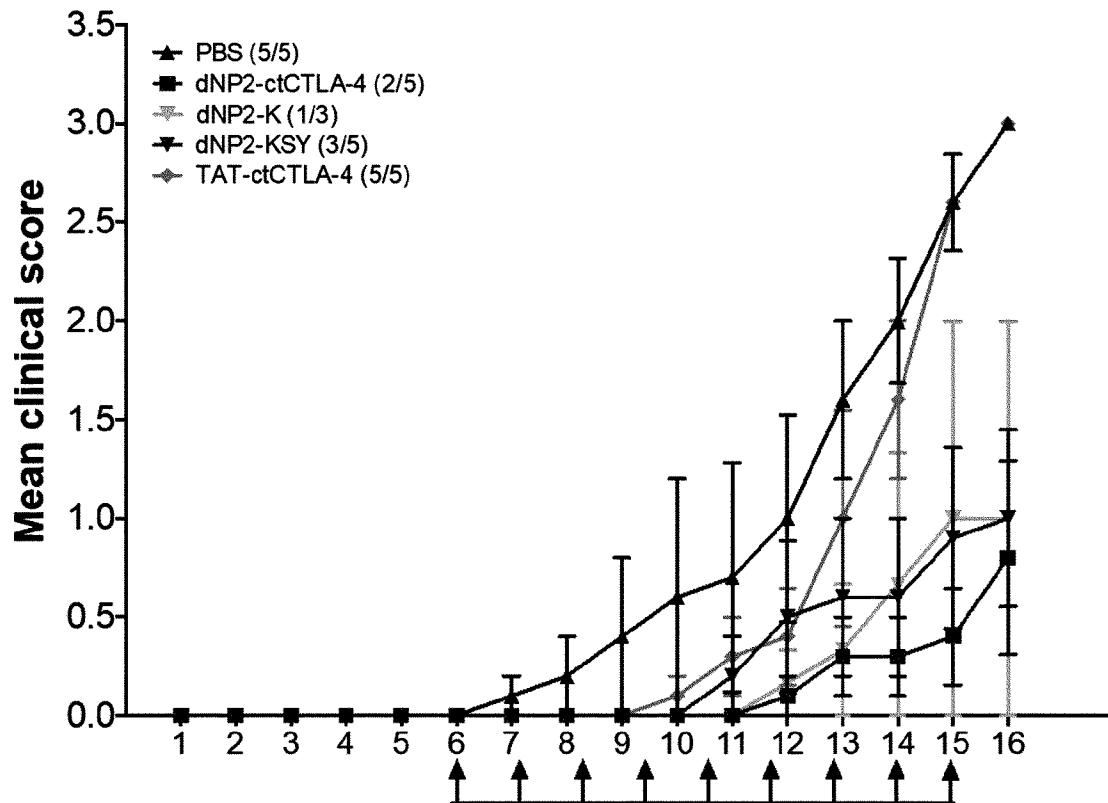
[도8]



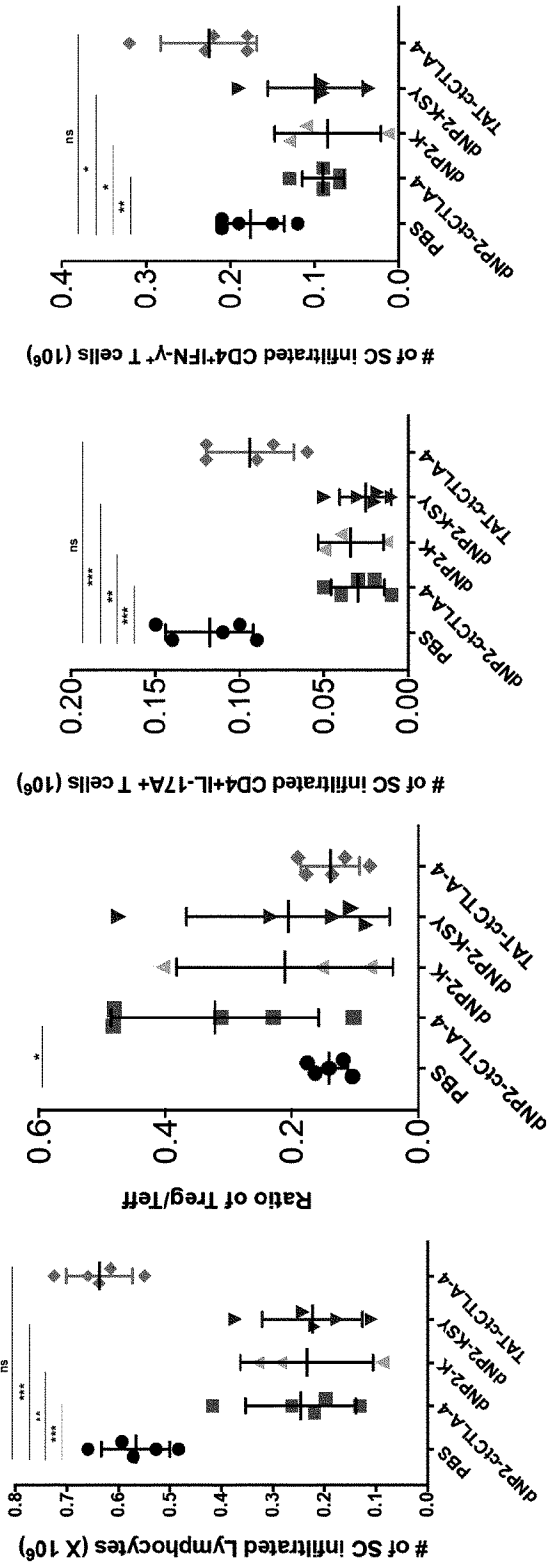
[도9]



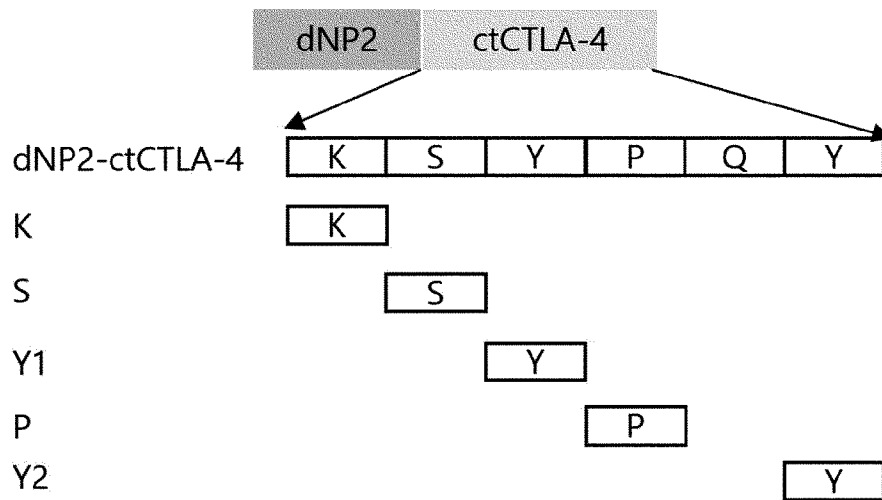
[도10]



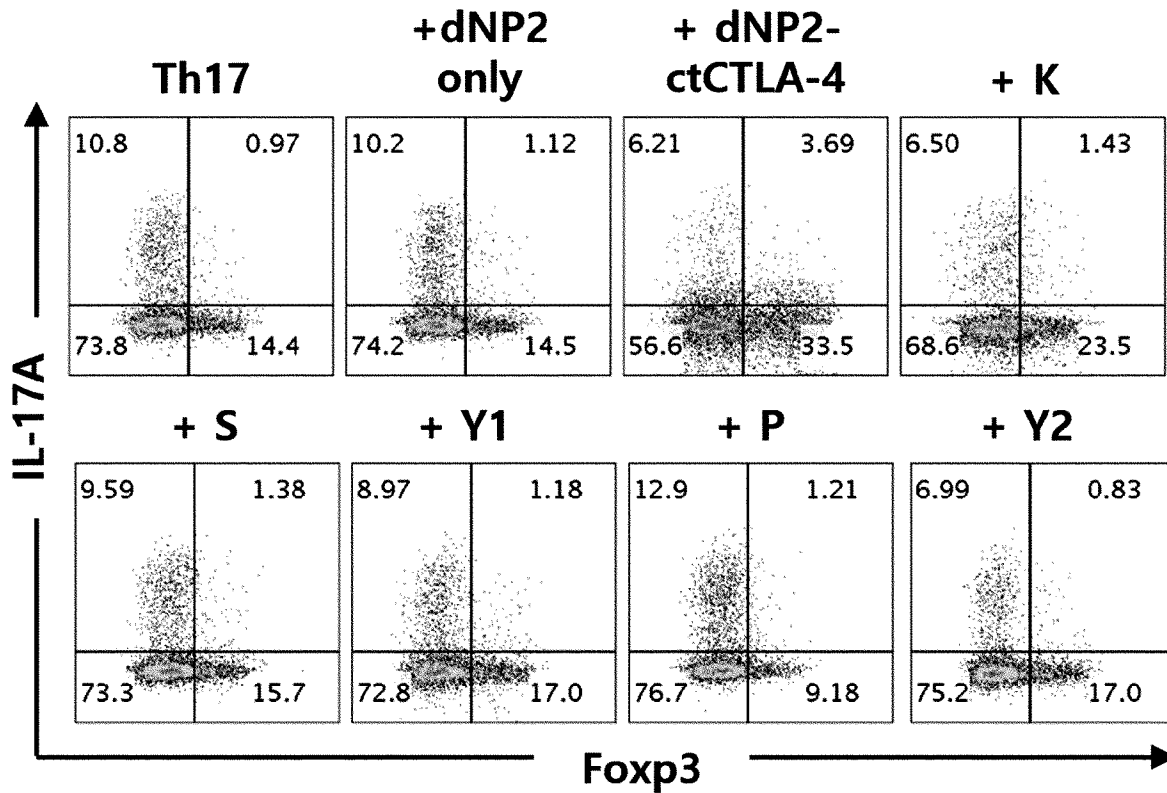
[115]



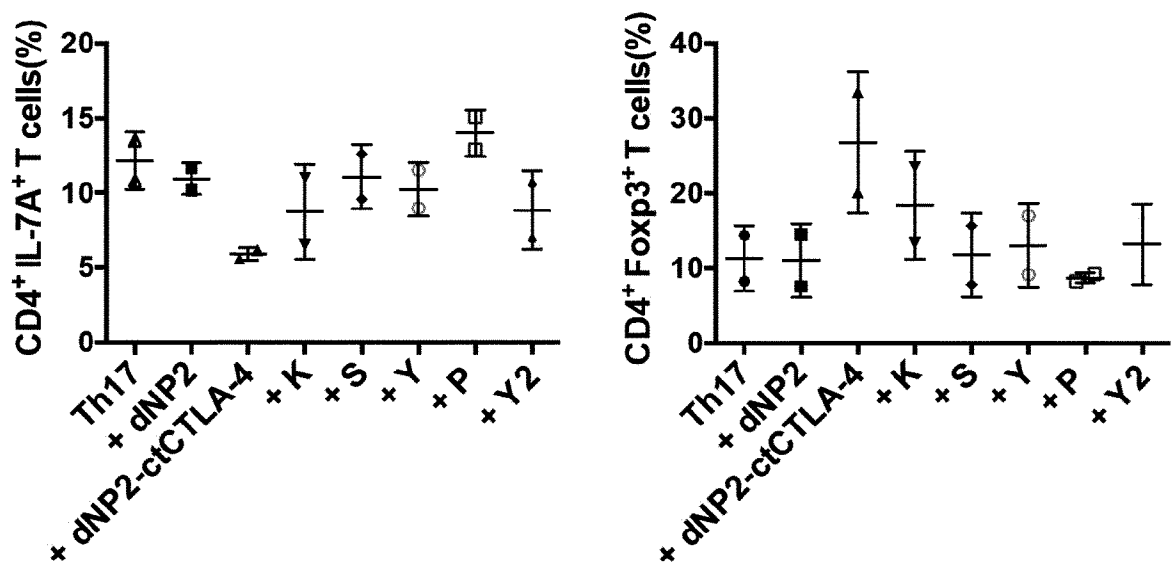
[도12]



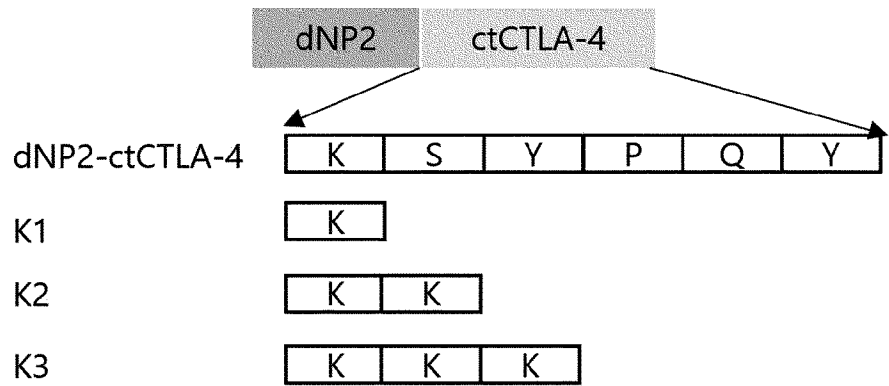
[도13]



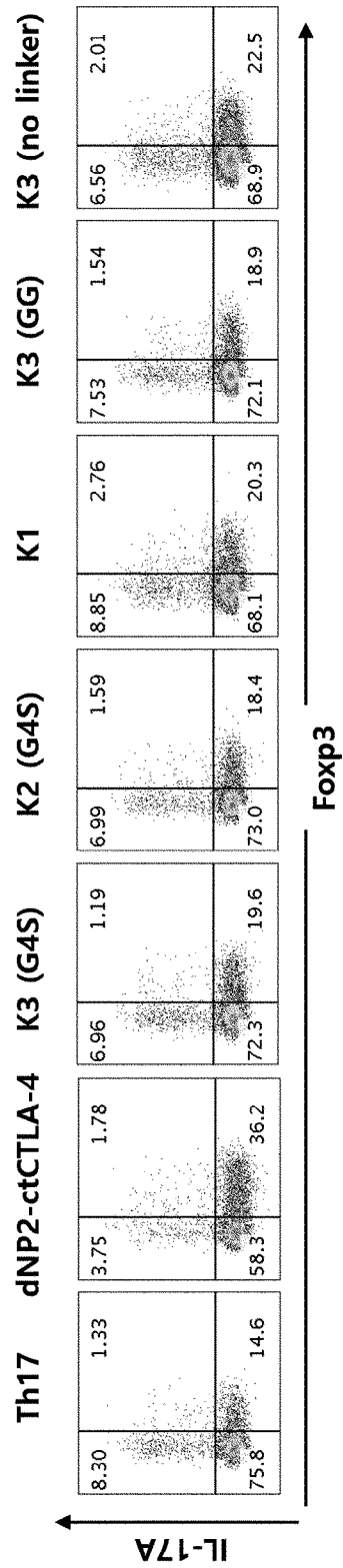
[도14]



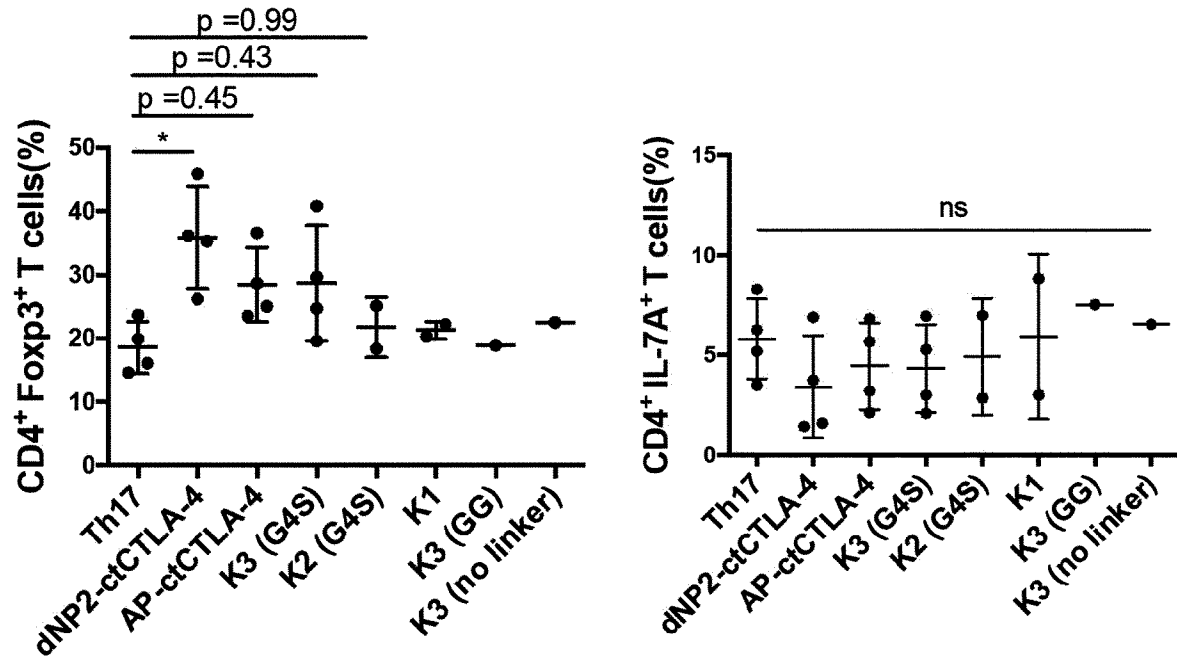
[도15]



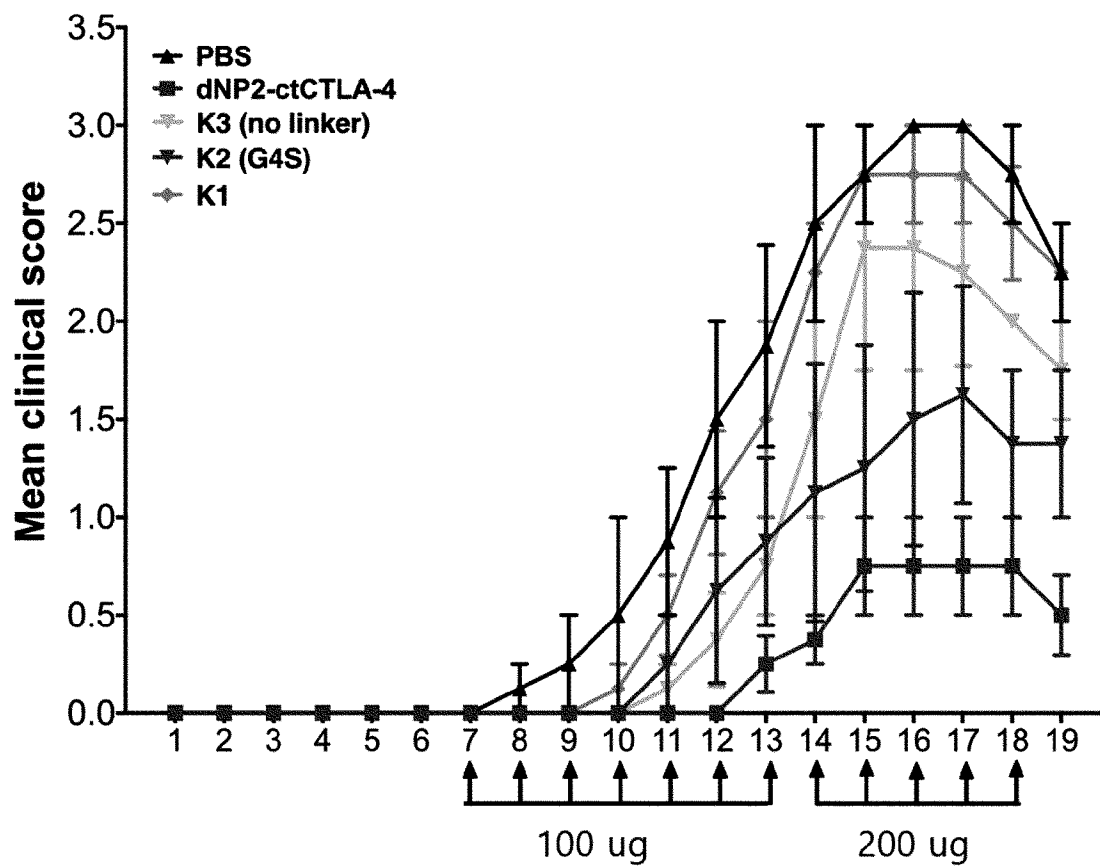
[도 16]



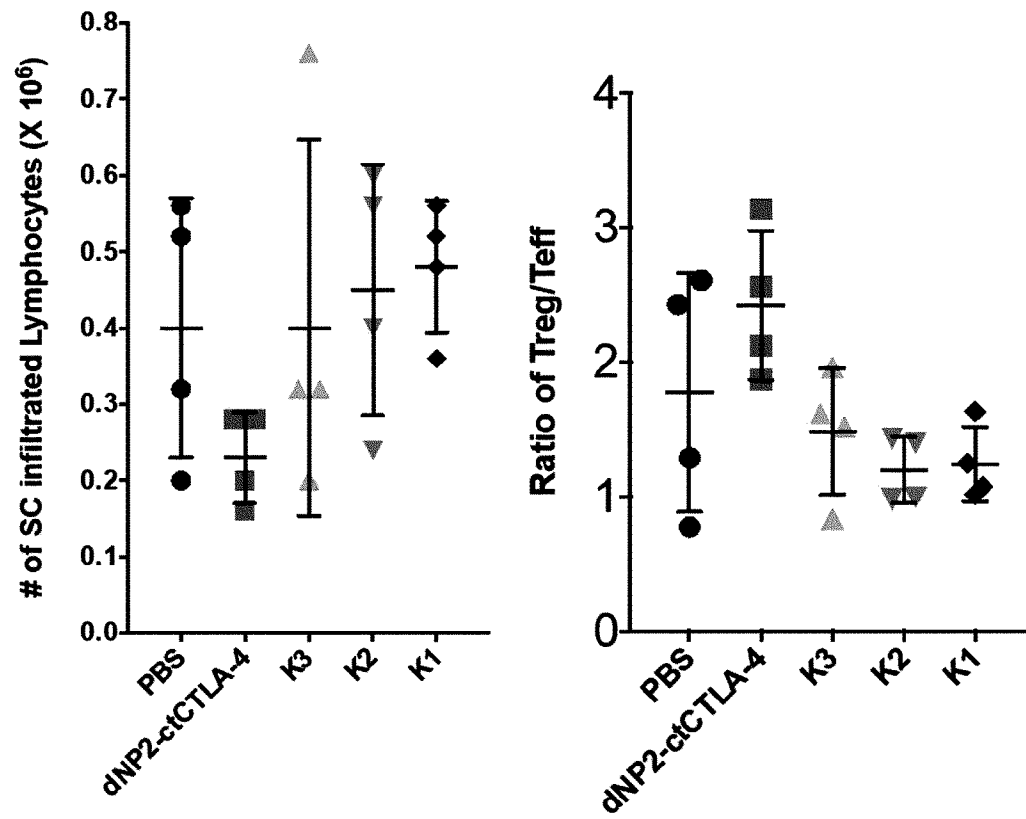
[도17]



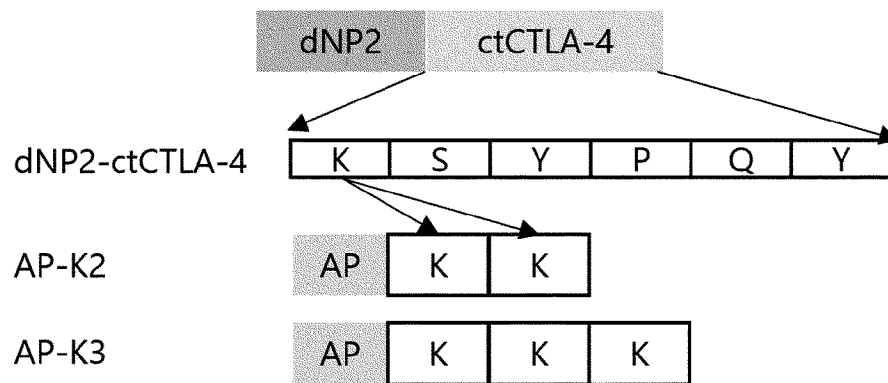
[도18]



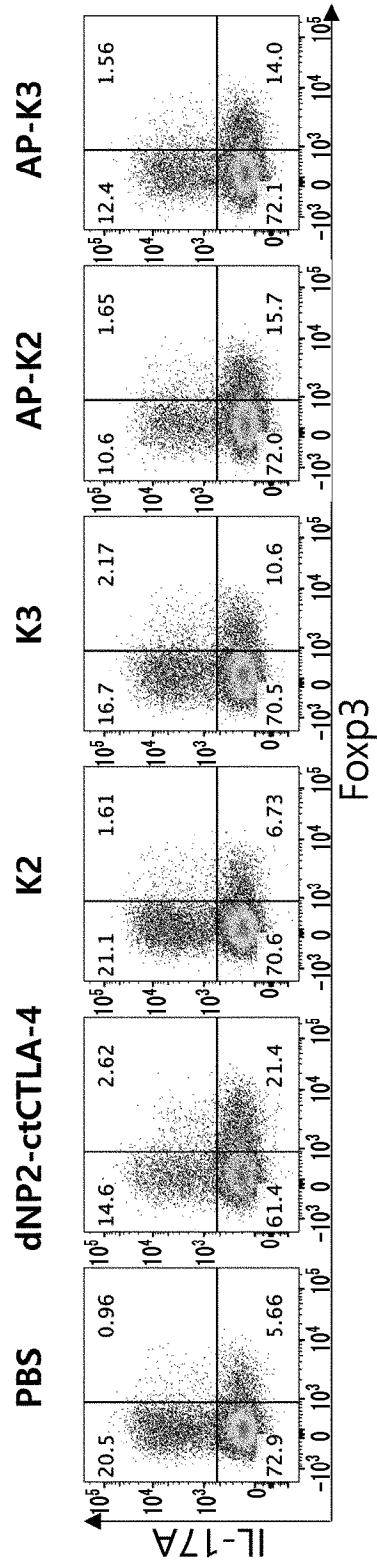
[도19]



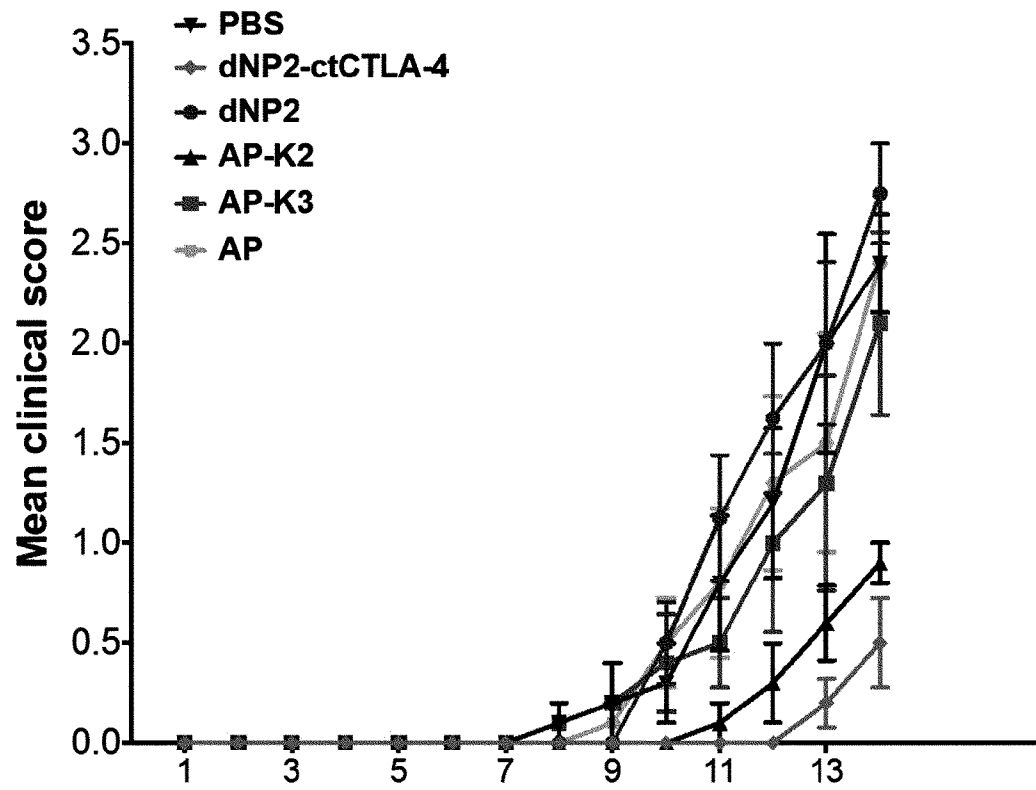
[도20]



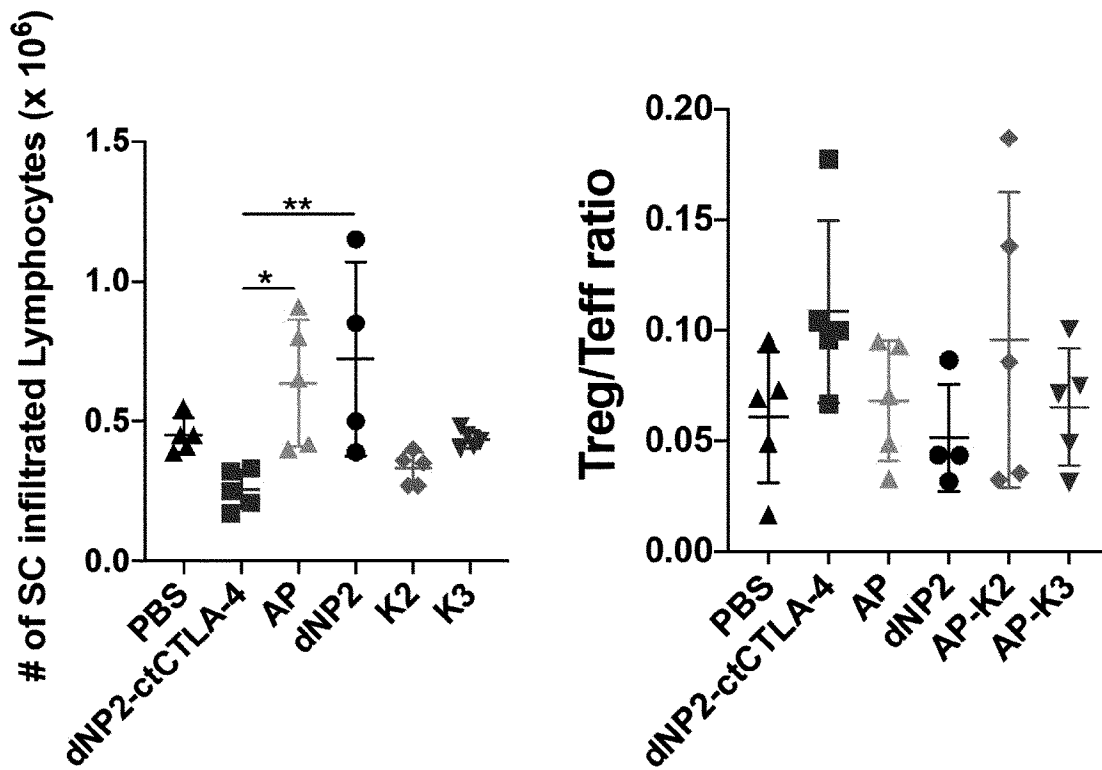
[도21]



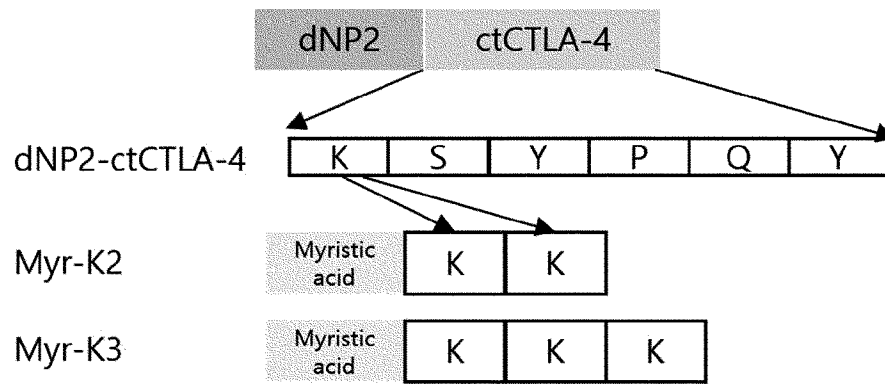
[도22]



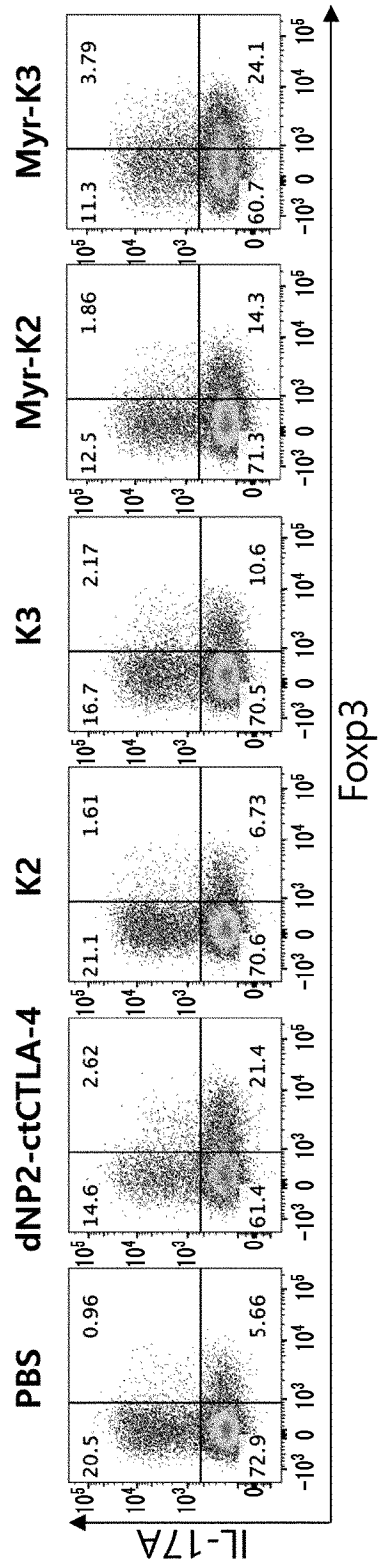
[도23]



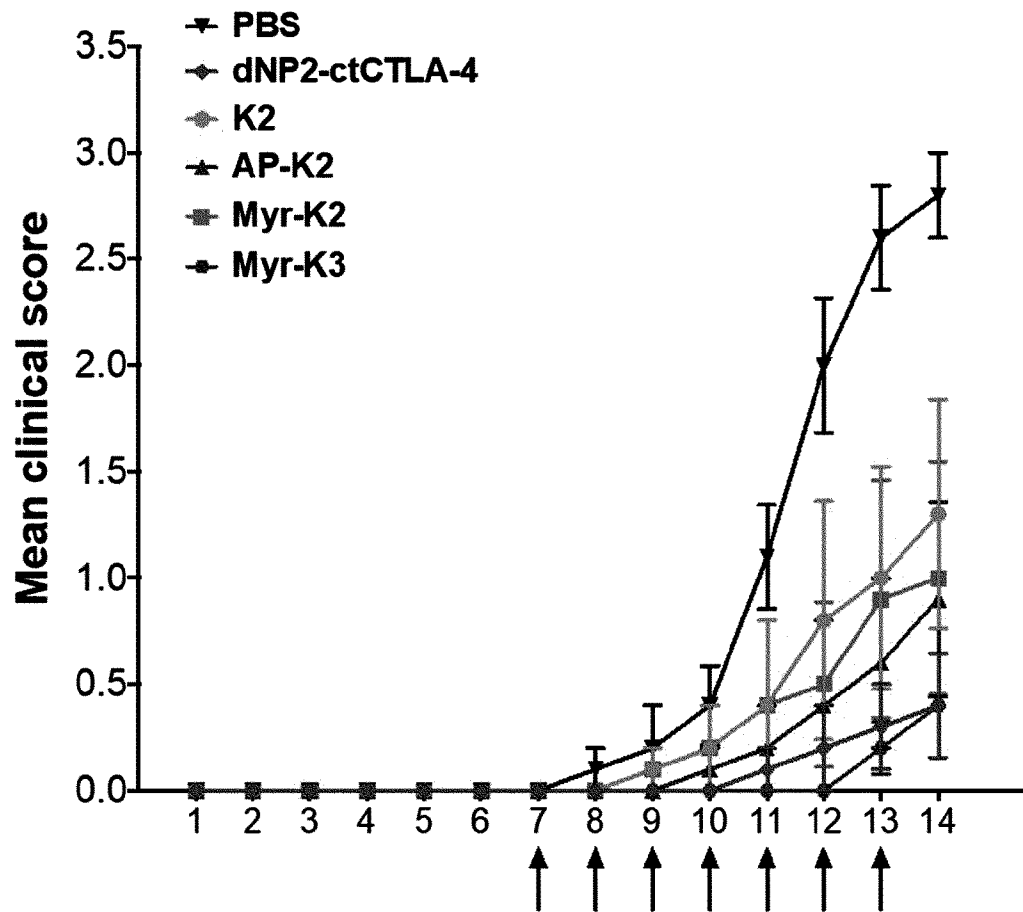
[도24]



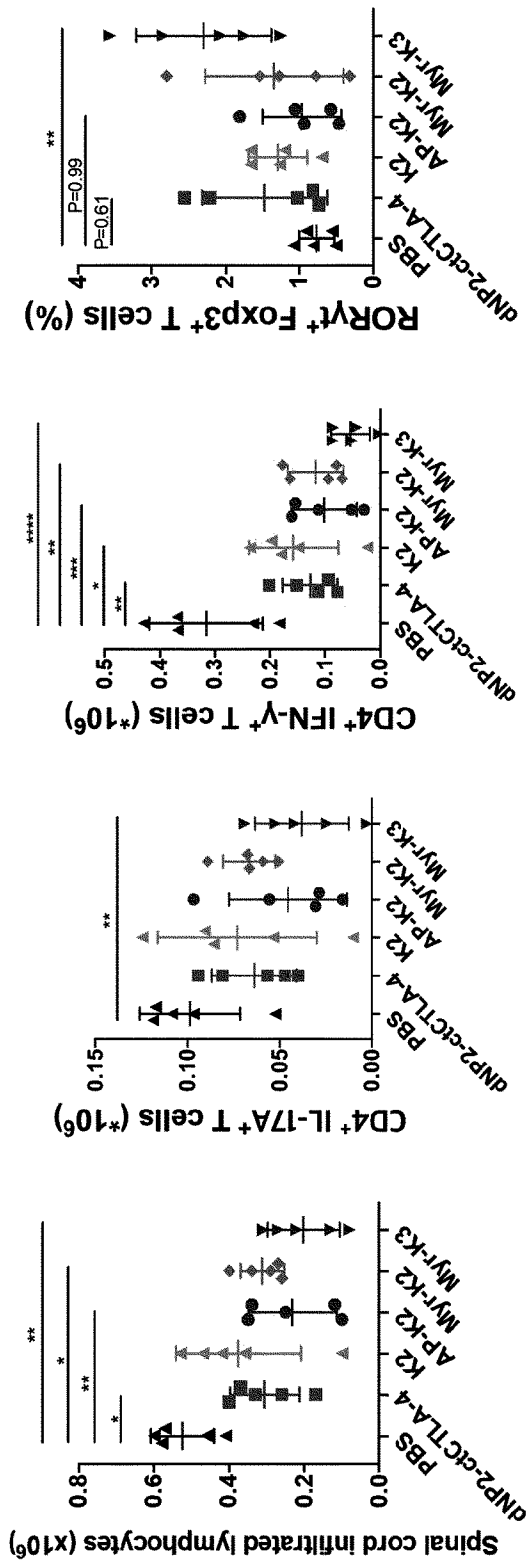
[도25]



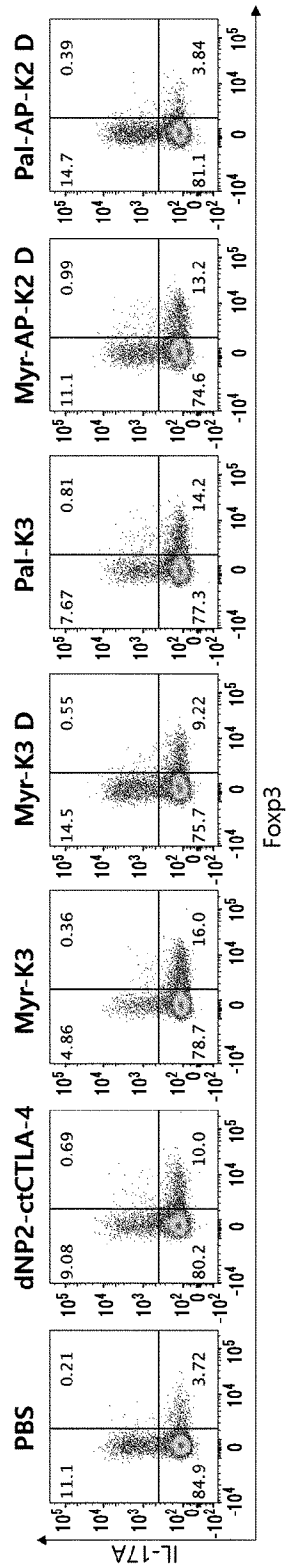
[도26]



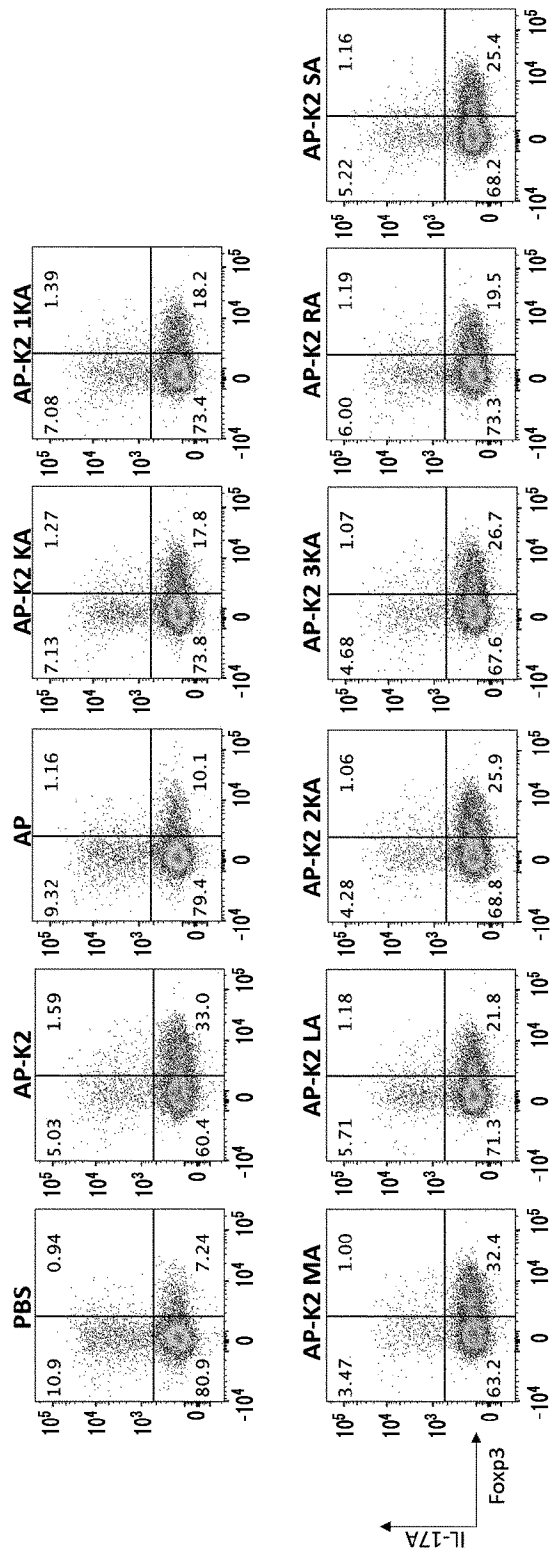
[도27]



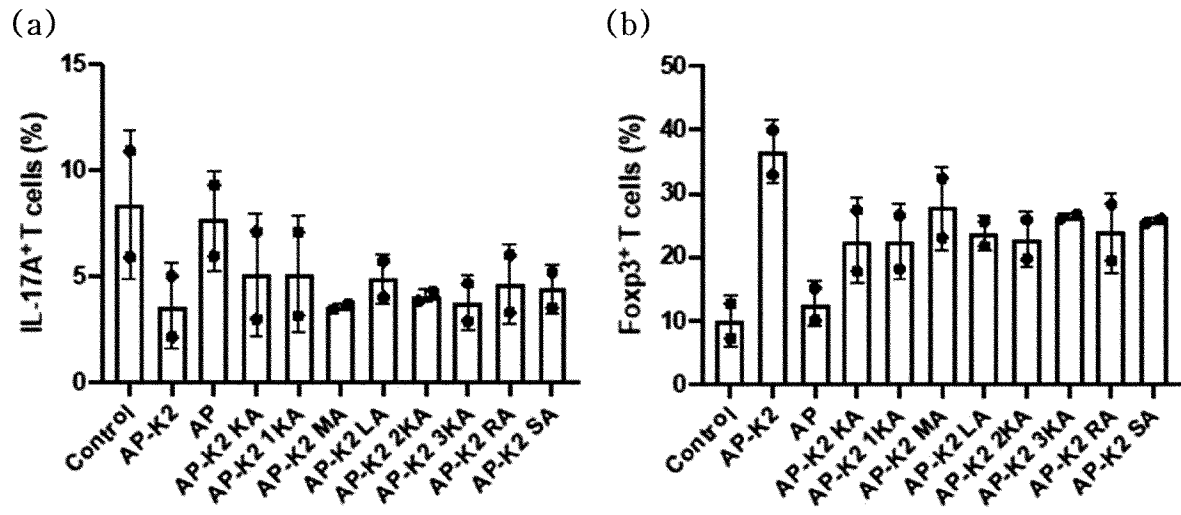
[도 28]



[도29]



[도30]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/004634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/00(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 25/28(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 14/00(2006.01); A61K 38/10(2006.01); C07K 7/08(2006.01)

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: CTLA-4, 라이신 모티프(lysine motif), 세포투과성 펩타이드(cell penetrating peptide), 지방산(fatty acid), 조절 T 세포(regulatory T cell), 유도(induction), 자가면역질환(autoimmune disease)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE, Kyung-Mi. T cell costimulation by CD28, CTLA-4, and ICOS. Immune Network. 2001, vol. 1, no. 2, pp. 95-103. See page 98.	1-22
A	LIM, Sangho. Role of the cytoplasmic domain of CTLA-4 in regulatory T cell conversion to inhibit autoimmunity. 한양대학교 (Hanyang University). 2018. Retrieved from <URL: https://repository.hanyang.ac.kr/handle/20.500.11754/75694>. See abstract.	1-22
A	CHIKUMA, Shunsuke. CTLA-4, an essential immune-checkpoint for T-cell activation. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2017, vol. 410, pp. 99-126 (inner pp. 1-28). See pages 7, 10-11 and 14; and figure 1.	1-22
A	KONG, Kok-Fai et al. Protein kinase C- η controls CTLA-4-mediated regulatory T cell function. Nature Immunology. 2014, vol. 15, pp. 465-472 (inner pp. 1-8). See abstract; and page 4.	1-22
A	US 2010-0234302 A1 (HAHN, Bevra H. et al.) 16 September 2010 (2010-09-16) See abstract; and paragraphs [0008]-[0011], [0035], [0037], [0089]-[0090] and [0095].	1-22

☐ 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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

08 July 2022

Date of mailing of the international search report

08 July 2022

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/004634

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/004634

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2010-0234302	A1	16 September 2010	US	8492347	B2	23 July 2013
				WO	2009-052415	A1	23 April 2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/00(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/00(2006.01); A61K 38/10(2006.01); C07K 7/08(2006.01) 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: CTLA-4, 라이신 모티프(lysine motif), 세포투과성 펩타이드(cell penetrating peptide), 지방산(fatty acid), 조절 T 세포(regulatory T cell), 유도(induction), 자가면역질환(autoimmune disease)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LEE, KYUNG-MI, 'T cell costimulation by CD28, CTLA-4, and ICOS', Immune Network, 2001, 1권, 2호, 페이지 95-103 페이지 98 참조.	1-22
A	임상호, 'Role of the cytoplasmic domain of CTLA-4 in regulatory T cell conversion to inhibit autoimmunity', 한양대학교, 2018, <URL: https://repository.hanyang.ac.kr/handle/20.500.11754/75694> 요약 참조.	1-22
A	CHIKUMA, SHUNSUKE, 'CTLA-4, an essential immune-checkpoint for T-cell activation', Current Topics in Microbiology and Immunology, 2017, 410권, 페이지 99-126(내부 페이지 1-28) 페이지 7, 10-11, 14; 도면 1 참조.	1-22
A	KONG, KOK-FAI 등, 'Protein kinase C-η controls CTLA-4-mediated regulatory T cell function', Nature Immunology, 2014, 15권, 페이지 465-472(내부 페이지 1-8) 요약; 페이지 4 참조.	1-22
A	US 2010-0234302 A1 (HAHN, BEVRA H. 등) 2010.09.16 요약; 단락 [0008]-[0011], [0035], [0037], [0089]-[0090], [0095] 참조.	1-22
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년07월08일(08.07.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년07월08일(08.07.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제출원번호

PCT/KR2022/004634