



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월22일
(11) 등록번호 10-1242543
(24) 등록일자 2013년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/35 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7002771(분할)
(22) 출원일자(국제) 2005년10월27일
심사청구일자 2012년02월29일
(85) 번역문제출일자 2012년01월31일
(65) 공개번호 10-2012-0050440
(43) 공개일자 2012년05월18일
(62) 원출원 특허 10-2010-7020069
원출원일자(국제) 2005년10월27일
심사청구일자 2010년10월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/038789
(87) 국제공개번호 WO 2006/052468
국제공개일자 2006년05월18일
(30) 우선권주장
60/622,436 2004년10월27일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Gen. Comp. Endocrinol. 136(1): 12-16 (2004.3)
Endocr. J. 51(1): 89-95 (2004.2)

전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자
유니버시티 오브 덴버
미국 콜로라도 덴버 사우스 유니버시티 블러바드
2199 (우:80210)
오클라호마 메디컬 리써치 화운데이션
미국 오클라호마 73104 오클라호마 시티 스위트
410 리써치 파크웨이 755
유니버시티 오브 플로리다
미국 32611-5500 플로리다, 게인즈빌, 피.오. 박
스 11550
(72) 발명자
브렌난 마일즈 비.
미국 80207 콜로라도주 덴버 레이덴 스트리트
2945
도레스 로버트 엠.
미국 80120 콜로라도주 리틀톤 에스. 크라커 웨이
6666
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

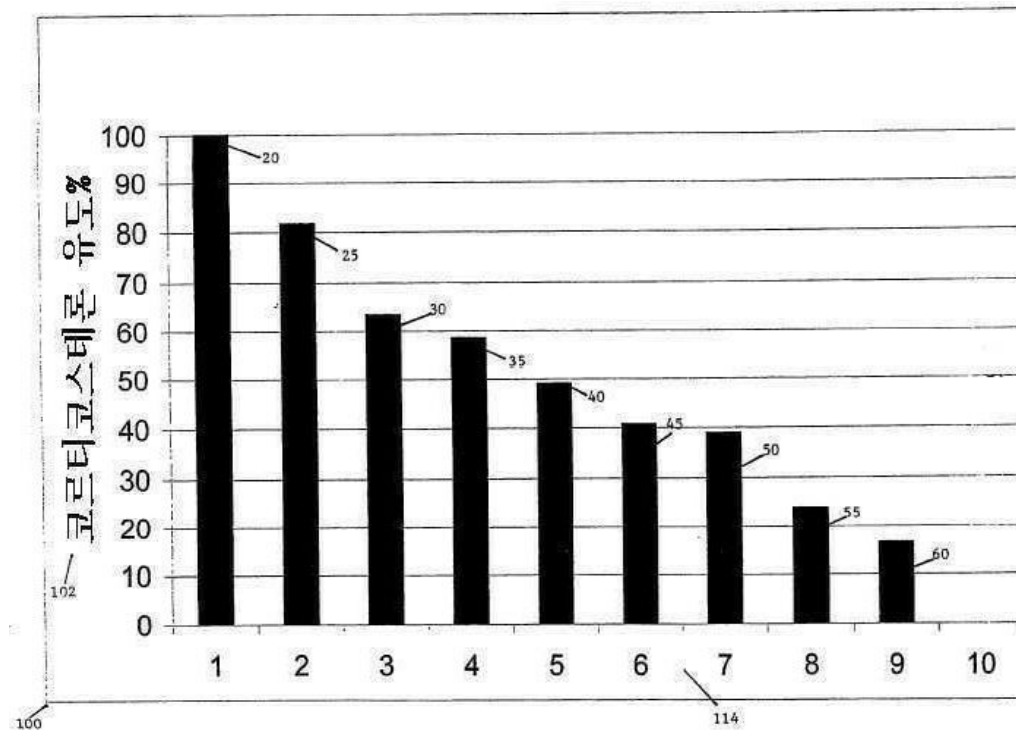
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 부신피질 자극 호르몬 유사체 및 관련 방법

(57) 요약

본 발명의 ACTH 유사체 화합물은 다음과 같은 바람직한 ACTH 유사체의 생물학적 기능들중 하나 이상을 가질 수 있는 하나 이상의 구조 변형이 있는, ACTH 서열을 포함하는 화합물을 포함한다: (1) 비변형 ACTH에 비해 ACTH 유사체 존재시 부신 막에서의 코르티코스테로이드 분비 감소, (2) 내인성 ACTH의 존재시에 부신 막에서의 코르티코스테로이드 분비 감소 및 (3) 비변형 ACTH의 MC-2R 멜라노코르틴 결합성에 비해 MC-2R 결합 친화성 증가 및 MC-2R 리셉터의 활성화 감소. 따라서, 본 발명의 ACTH 유사체 화합물은 조기 분만 및 쿠싱 질환과 같은 ACTH, ACTH 리셉터 또는 코르티코스테로이드 분비와 관련된 질환과 질병의 치료 및 예방에 이용가능하다.

대표도



(72) 발명자

하스켈-루에바노 캐리

미국 32618 플로리다주 아쳐 에스터블유 카운티 로드 346 10406

호크게슈윈더 유데 에이치.

미국 73136 오클라호마주 오클라호마 시티 피.오. 박스 11796

코스타 제시카 아이.

뉴질랜드 오클랜드 글렌도비에 웨스트 타마키 로드 89

특허청구의 범위

청구항 1

분리된 ACTH 유사체 펩티드 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 쿠싱 질환(Cushing's Disease) 또는 조기분만(premature labor)인 ACTH-관련 상태를 치료하기 위한 약학 조성물로서,

상기 ACTH 유사체 펩티드는 하기 식:

Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-A16-A17-A18-A19-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe

으로 이루어지고,

상기 A16은 Lys, Arg, Gly, Val, Leu, Ile, Nle, Gln, Asn, Glu, Asp 또는 알킬 측쇄를 가지는 아미노산이며;

상기 A17은 Lys, Arg, Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Nle, Asn, Glu, Asp 또는 알킬 측쇄를 가지는 아미노산이며;

상기 A18은 Lys, Arg, Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Nle, Asn, Glu, Asp 또는 알킬 측쇄를 가지는 아미노산이며;

상기 A19는 Pro 또는 Trp이고,

상기 위치 16-18에서의 아미노산 서열은 Lys 및 Arg으로 구성되는 군으로부터 선택되는 두 개의 이웃한 아미노산 잔기들을 포함하지 않고,

상기 위치 25-39에서의 아미노산 서열은 결실될 수도 있고; 또한,

상기 ACTH 유사체 펩티드는 Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Arg-Ala-Ala-Trp-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Ac(서열번호: 20)이 아닌 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 A19가 Trp인 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, A17 및 A18 중 하나 이상은 Ala 이고, A16, A17, 및 A18 중 하나 이상은 Arg인 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 위치 25-39에서의 아미노산 서열이 결실된 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 A19가 Trp인 약학 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 A17 및 A18 중 하나 이상이 Ala이고, 상기 A16, A17, 및 A18 중 하나 이상이 Arg인 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 기재된 ACTH 유사체 펩티드를 적합한 담체와 조합하는 단계를 포함하는, 쿠싱 질환(Cushing's Disease) 또는 조기분만(premature labor)인 ACTH-관련 상태를 치료하기 위한 의약의 제조 방법.

명세서

기술 분야

- [0001] 이건 출원의 수행 과제는 국립보건원(Grant Number NIH: DK50870) 및 국립과학재단(Grant Number NSF IBN-0132210)의 연구 원조에 의해 수행되었다. 따라서, 본 발명에 대해 정부가 일정한 권리를 가질 수 있다.
- [0002] 이건 출원은 2004년 10월 27일자로 출원된 미국 가출원 제 60/622,436호의 표제 "조기 분만, 쿠싱 증후군 및 관련 질환 치료용 조성물 방법"에 대한 우선권을 주장하며, 이는 원용에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함된다.
- [0003] 본 발명은 ACTH 유사체 화합물, 약학 조성물 및 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0004] 코르티코트로핀(corticotropin)은 부신피질 자극 호르몬(ACTH)라고도 알려져 있는 뇌하수체에서 분비되는 원시 호르몬으로, 생명유지에 필요한 다양한 기관의 성장 형성과 생리 조절 스테로이드의 생산에 매개체인 것으로 간주된다. ACTH는 부신 피질을 자극한다. 보다 상세하게는, ACTH는 인간에서 코르티솔(또는 설치류의 경우 코르티코스테론)과 같은 글루코코르티코이드의 분비를 자극하며, 부신 피질로부터 그외 주된 스테로이드 호르몬인 알도스테론의 과다 분비를 일부 조절한다. ACTH는 부신에서 발현된 MC-2R 부신피질 자극 호르몬 리셉터에 결합한다.
- [0005] ACTH는 시상하부 유래 코르티코트로핀 분비 호르몬(CRH)에 대한 반응으로 뇌하수체 전엽에서 분비된다. 뇌하수체에서, ACTH는 특이적인 펩티다제 효소 작용에 의해 절단되는 거대 전구체 분자인 프로-오피오멜라노코르틴(POMC)로부터 파생된다. 스테로이드 합성에 있어서의 ACTH의 작용은 콜레스테롤 에스터라제 증가, 콜레스테롤의 미토콘드리아 막 통과 전달 증가, 콜레스테롤의 P450SCC 결합 증가 및 그로 인한 프레그네놀론 생산 증가를 포함할 수 있다(Nussey, S. and S. Whitehead, Endocrinology: An Integrated Approach, BIOS Scientific Publishers Ltd. (2001)). 이후 작용으로는 스테로이드 형성 호르몬의 유도, 과혈관화, 세포 비대증 및 형성 저하증을 특징으로 하는 눈에 띄는 구조적 변화를 포함할 수 있다. 이는 과잉의 ACTH가 장기간 분비되는 것이 바람직하지 않을 수 있는 상태에서 특히 현저하다.
- [0006] 스테로이드 글루코코르티코이드는 부신의 속상-망상(fasciculata-reticula) 세포에 의해 생산되며, 혈장내 부신 피질 자극 호르몬(ACTH) 농도 증가시에 분비된다. 글루코코르티코이드는 탄수화물, 단백질 및 지질 대사에 관여하며, 항-염증성 특성을 가지는 것으로 입증되었으며, 스트레스 상태에서 과다 분비된다. 과잉시에, 글루코코르티코이드는 학습 및 기억과 같은 인지 기능에 중요한 뇌의 변연계 부위인 시상하부를 손상시키는 것으로 확인되었다. 예로 Sapolsky, R. M., Ann. N.Y. Acad. Sci. 746: 294(1994); 및 McEwen, B. S., Ann. N.Y. Acad. Sci. 746:134 (1994)를 참조한다. 또한, 글루코코르티코이드 신경독성 및 신경위험성(neuroendangerment)이 신경 발생 및 노화 뿐만 아니라 시상하부 손상과 관련된 신경 질환에 중요한 것으로 확인되었다. 예로, deKloet, E. R., et. al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 746:8(1994)을 참조한다.
- [0007] 코르티코스테로이드는 콜레스테롤과 구조적으로 관련있는 스테로이드 호르몬이다. 이러한 호르몬은 부신 피질에서 합성되며, 글루코코르티코이드(예, 코르티코스테로이드), 미네랄로코르티코이드(예, 알도스테론) 뿐만 아니라 약한 안드로겐 및 에스트로겐이 있다. 갑상선과 유사한 부신 기능은 시상하부(HPT) 및 뇌하수체(PIT)의 통제하에 있다. 코르티코스테로이드(천연적으로 형성되는 글루코코르티코이드) 농도가 세트 포인트(setpoint) 아래로 떨어지면, 시상하부는 뇌하수체에서 부신피질 자극 호르몬(ACTH)의 분비를 자극하는 CRH(코르티코트로핀 분비 호르몬)을 분비시킨다. ACTH는 코르티코스테로이드의 합성과 분비(알도스테론의 합성/분비에 최소한의 작용을 함) 및 부신 성장을 자극하는 자극 호르몬이다.
- [0008] ACTH 리셉터에 결합하며 코르티코스테로이드 분비 활성화를 감소시켜, 예컨대 쿠싱 증후군, 코르티코스테로이드의 과다 분비로 인한 손상된 면역 반응 및 부신 관련 원인으로 인한 조기 분만을 포함한 ACTH 관련 증상을 치료하는, 화합물이 요구된다.
- [0009] 쿠싱 증후군은 코르티코스테로이드의 부신피질에서의 분비 증가로 인해 유발되는 질환이다. 부신 피질의 기능 향상은 ACTH 의존적일 수 있으며, 또는 ACTH 조절, 예컨대 부신피질 선종 또는 암종에 의한 코르티코스테로이드 생산과 독립적일 수 있다. 쿠싱 증후군의 공통된 원인은 뇌하수체에 의한 ACTH의 과다 생산이다. 혈류내 ACTH 농도 상승은 전형적으로 뇌하수체 선종에 의해 형성되지만(쿠싱 증후군), 드문 경우에는 다른 병인으로 인한 것이다. 뇌하수체가 아닌 다른 부위에서의 ACTH 생산으로 인한 쿠싱 증후군은 이소성 쿠싱 증후군으로 알려져 있다. 이소성 부위의 예로는 가슴샘종(thymoma), 흉선의 수질 암종, 크롬친화세포종, 췌장의 섬세포 종양 및 폐의 귀리세포 암종이 있다. 그러나, 인간에게서 압도적으로 나타나는 대부분의 쿠싱 증후군은 그 병인이 뇌하수

체 선종으로 추적된다. 쿠싱 증후군의 증상으로는, 체중 증가, 중심부 비만(central obesity), 스테로이드 과다분비, 뇨중의 코르티솔 배출 증가, 달덩이 얼굴(moon face), 쇠약, 피로, 요통, 두통, 발기부전, 정신상태 변이, 근위축증 및 상기 질환을 앓고 있지 않는 포유류와 비교하여 갈증 및 배뇨 증가가 있다. 쿠싱 증후군의 진단 및 치료는 도전 과제로 남아 있다(Oldfield, E. W. et al., N. Engl. J. Med., 325:897-905 (1991); Findling, J. W. et al., "Diagnosis and differential diagnosis of Gushing's syndrome", Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 30:729-47 (2001); Orth, D. N., "Cushing's syndrome", N Engl J Med., 332:791-803 (1995) 참조). 현재 쿠싱 증후군에 대한 의학적 치료법은 없는 실정이다. 숙련된 전문 센터에서, ACTH 분비성 뇌하수체 미세선종의 외과적 절제의 전반적인 치유율은 약 70 - 80%이지만, 거대선종 절제술의 치유율은 약 30%에 불과하며, 이에 필수적인 넓은 범위의 외과적 절제는 주변 정상적인 뇌하수체 조직에 상당한 위험 전조가 되어, 약 80% 사례들에서 부분 또는 총체적인 뇌하수체저하증(hypopituitarism)이 발생된다(Simmons, N. E. et al., "Serum Cortisol response to transphenoidal surgery for Gushing disease", J. Neurosurg., 95:1-8(2001); Mampalam, T. J. et al., "Transsphenoidal microsurgery for Gushing's disease: A report of 216 cases", Ann. Intern. Med., 109:487-93(1988); 및 Trainer, P. J. et al., "Transsphenoidal resection in Gushing's disease: undetectable serum cortisol as the definition of successful treatment", Clin. Endocrinol., 38:73-8(1993)). 따라서, ACTH 기원이 파종성 뇌하수체 종양이거나, 또는 유효하며 환자들에서 위험성이 제거하지 않는 이소 기원인, 쿠싱 증후군의 치료제가 필요하다.

[0010] ACTH 리셉터에 결합하며 코르티솔 분비 활성화를 감소시키는 화합물은 또한, 예컨대 조기 진통 초기에 시상하부-하수체-부신축을 치료하는데 사용할 수 있다. 조기 분만율은 출생건에 약 7-10%이며, 출산전후 이환률 및 사망율에 실질적인 비율을 차지한다(McCormick, M.C., "The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity", N Engl J Med., 312:82-90 (1985)). 인간 여성에서 자연 유산 및 조기 분만을 방지하고 임신기를 연장시키는 것은 여러가지 이유로 바람직하다. (i) 생존가능한 출생 가능성 증가, (ii) 조기 분만이 관련 건강 합병증 발생을 감소, 및 (iii) 미숙아에게 건강하더라도 신체 크기 및 생존성으로 인해 특별 케어를 실시하는 기간 단축을 위해, 임신 기간을 연장하는 것이 적합하다. 이러한 요소들, (i) 출생, (ii) 건강한 아이 및 (iii) 부모의 보호하에 적시에 병원을 퇴원할 수 있는 아이는, 부모 및 인척의 행복과 안녕에 바람직하게 영향을 미친다. 또한, 매우 일찍 조기 분만한 아이를 보살피는데 있어 막대한 사회적 경제 영향을 포함하여, 조기 분만 문제의 사회적으로 영향을 미친다.

[0011] 농업 및 양식업은 유기체를 높은 개체 밀도로 생육시킬 수 있을때 보다 비용적인 측면에서 효과적일 수 있다. 그러나, 포유류중에서도 가금류와 어류는 종종 손상된 면역 기능 및 성장 감소를 포함하여, 유해한 결과를 초래하는 부신 스트레스 호르몬의 과다 생산을 발생시킨다. 지속적인 스트레스로 인해 초래되며 부적절한 건강 변화 예컨대 면역 기능 및 질병 감수성 감소를 발생시키는, 이러한 또는 다른 증상의 경우에 부신 스트레스 호르몬의 농도를 감소시키는 방법이 적합할 것이다.

[0012] 다양한 조성물 및 방법을 사용하여 예컨대 아르기닌 바소프레신(AVP)에 대한 특정 리셉터를 통해 ACTH 농도를 감소시킬 수 있다. 2000년 5월 3일자로 출원된 미국 특허 제 6,380,155호는 ACTH 분비 조절용 바소프레신 리셉터 길항제 조성물의 용도에 관한 것이다. ACTH MC-2R 리셉터에 결합할 수 있으며 ACTH 유도성 코르티코스테로이드 생산을 감소 또는 근절하는 조성물과 같은, ACTH 농도 증가와 관련있는 바람직하지 않은 증상을 완화시키기 위한, ACTH 농도를 조절하는 ACTH 관련 증상의 치료 조성물이 바람직하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 발명의 개요

[0014] 비변형 ACTH에 비해 ACTH 유도성 코르티코스테로이드 분비를 감소 또는 근절시키는 다양한 변형 부신피질자극 호르몬(ACTH) 펩티드("ACTH 유사체")를 제공한다. 바람직하게는, 상기 ACTH 유사체는 또한 비변형 ACTH 존재시에 부신 막으로부터의 코르티코스테로이드의 분비를 감소시킨다.

과제의 해결 수단

[0015] ACTH 유사체는 바람직하기로는 비변형 ACTH의 적어도 1-24개의 아미노산을 포함하며, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. ACTH 유사체 화합물은 비변형 인간 ACTH 아미노산 서열에 대하여 하나 이상이 아미노산 치환 또는 절단(truncation)을 포함할 수 있다. 비변형 인간 ACTH는 하기 39개의 아미노산 잔기를 가지는 폴리펩티

드이다: N-Ser¹-Tyr-Ser-Met-Glu⁵-His-Phe-Arg-Trp-Gly¹⁰-Lys-Pro-Val-Gly-Lys¹⁵-Lys-Arg-Arg-Pro-Val²⁰-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn²⁵-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu³⁰-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe³⁵-Pro-Leu-Glu-Phe³⁹-Ac(서열번호 1), 상기 서열에서 N 및 Ac는 각각 분자의 아미노 말단 및 카르복시 말단임. 또한 ACTH 유사체는 서열의 하나 이상의 치환 또는 변형이 있는 펩티드를 포함하는 화합물을 포함할 수 있다: N-Ser¹-Tyr-Ser-Met-Glu⁵-His-Phe-Arg-Trp-Gly¹⁰-Lys-Pro-Val-Gly-Lys¹⁵-Lys-Arg-Arg-Pro-Val²⁰-Lys-Val-Tyr-Pro-Ac(서열번호 2), 상기 서열에서 N 및 Ac는 각각 분자의 아미노 말단 및 카르복시 말단임. 바람직한 ACTH 유사체 화합물은 hACTH 또는 mACTH의 적어도 1-19개의 아미노산 잔기를, 더 바람직하기로는 1-24개의 아미노산 잔기를 포함하며, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0016] ACTH 유사체 화합물은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 ACTH 서열을 포함하며, 하기 바람직한 ACTH 생물학적 기능 중 한가지 이상을 형성하는 하나 이상의 구조 변형을 가지는 화합물을 포함한다: (1) 비변형 ACTH에 비해 ACTH 유사체 존재시 부신 막에서의 코르티코스테로이드 분비 감소, (2) 내인성 ACTH의 존재시에 부신 막에서의 코르티코스테로이드 분비 감소 및 (3) 비변형 ACTH에 비해 MC-2R 결합 친화성 증가 및 MC-2R 리셉터의 활성화 감소. ACTH 유사체 화합물을 형성하기 위한 바람직한 ACTH 아미노산 치환의 예로, 하기의 한가지 이상을 포함한다: (1) 6-9번째 아미노산을 보존하거나/보존하고 MC-2R 결합을 조장 또는 유지하는, 1-13번 위치의 아미노산 잔기 하나 이상의 치환, (2) 15-18번 위치에서 효소적 절단을 방지 또는 길항하는, 15-18번 위치의 아미노산 잔기 하나 이상의 치환, (3) ACTH 유사체가 15-18번 위치에 염기성 측쇄를 가진 인접한 아미노산 잔기를 포함하지 않을 수 있도록 15-18번 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, (4) ACTH 유사체의 혈청 반감기를 연장시키는, 20-24번 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환 또는 절단, (5) ACTH 유사체 화합물 존재시 비변형 ACTH 펩티드에 비하여 부신 막의 코르티코스테로이드 분비를 감소시키는 ACTH 유사체를 형성하는, 20-36번 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, (6) 원하는 분비 특성을 가지는 ACTH 유사체 화합물을 제공하는, 25-39번 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환 또는 바람직하기로는 절단, 또는 (7) 분자의 카르복시 말단을 형성하는 24번 위치에 아미노산 잔기로, 25-39번 아미노산 잔기의 절단.

[0017] ACTH 유사체 화합물은 바람직하기로는 부신 막에서 멜라노코르틴 2 리셉터(MC-2R)과 같은 ACTH 리셉터에 결합한다. 더 바람직하기로는, ACTH 유사체 화합물은 MC-2R 발현 세포를 활성화하지 않거나 또는 약하게 활성화하며, 비변형 내인성 ACTH의 작용을 저해 또는 감소시킨다.

[0018] 제1 예에서, 다양한 ACTH 유사체 화합물은 비변형 인간 ACTH 아미노산 서열에 대하여 하나 이상의 아미노산 치환 또는 절단을 포함할 수 있다. 예컨대, 분리된 ACTH 유사체 펩티드를 포함하는 조성물은 하기 아미노산 치환 한가지 이상이 가미된 서열번호 2의 펩티드를 포함할 수 있다:

[0019] *a. 서열번호 2의 19번 위치의 Pro 잔기가 아미노산 Trp로 치환, 또는

[0020] b. ACTH 유사체의 16, 17 및 18번 아미노산 잔기가 Lys 및 Arg로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 2종을 연속하게 포함하지 않도록 서열번호 2의 16 내지 18번 아미노산 잔기로부터 선택된 잔기 하나 이상에 대한 치환; 및 서열번호 2의 16, 17, 18 번 위치에서 치환된 하나 이상의 아미노산 잔기는 Lys, Arg, Gln, Gly, Ala, Val, Leu, Ile 및 알킬 측쇄(예, Nle)를 가지는 아미노산 유사체로 이루어진 군으로부터 선택됨. 선택적으로 ACTH 유사체 펩티드는 하나 이상의 Ala, Gly, 또는 알킬 측쇄(즉, Val, Leu, Ile, Nle와 같은 알킬 측쇄를 포함하는 아미노산 유사체)를 가지는 다른 아미노산, 및 서열번호 2의 15, 16, 17 또는 18번 위치의 2이상의 아미노산에 하나 이상의 Arg 잔기 치환을 포함할 수 있다. ACTH 유사체는 선택적으로 하기 아미노산 치환을 가지는 서열번호 2의 서열로 필수적으로 구성된다: 서열번호 2의 19번 위치의 Pro 잔기가 아미노산 Trp로 치환됨; 서열번호 2의 15번 위치의 아미노산이 Lys, Ala 및 Gln으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 및 ACTH 유사체 펩티드는 ACTH 유사체의 16, 17 및 18번 아미노산 잔기들이 Lys 및 Arg로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산을 2종 연속하여 포함하지 않도록 서열번호 2의 16 내지 18번 아미노산 잔기로부터 선택된 잔기의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있음. 바람직하기로는, ACTH 유사체 펩티드는 6, 7, 8 및 9번 위치의 아미노산 잔기에 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함한다. 또한, ACTH 유사체 펩티드는 15-19번 아미노산 잔기에 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함한다.

[0021] 또한, 제1 예는 서열번호 1의 19, 26, 30 또는 36번 위치의 아미노산 잔기의 치환과 같은 하나 이상의 아미노산 치환이 있는 서열번호 1의 펩티드를 가지는 ACTH 유사체를 포함한다. ACTH 유사체 펩티드는 또한 하기 아미노

산 치환이 있는 서열번호 1의 펩티드를 포함할 수 있다:

- [0022] a. 서열번호 1의 19번 위치의 Pro 잔기가 아미노산 Trp로 치환, 또는
- [0023] b. ACTH 유사체의 16, 17 및 18번 아미노산 잔기가 Lys 및 Arg로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의 아미노산이 2개 연속하지 않으며; 및 서열번호 2의 16, 17 또는 18 번 위치에서 치환된 하나 이상의 아미노산 잔기가 Lys, Arg, Gln, Gly, Ala, Val, Leu, Ile 및 Nle(또는 알킬 측쇄를 가지는 다른 아미노산 유사체)로 이루어진 군으로부터 선택되도록 서열번호 1의 16 내지 18번 아미노산 잔기로부터 선택된 잔기 하나 이상에 대한 치환됨.
- [0024] 다른 바람직한 ACTH 유사체 펩티드는, ACTH 유사체 펩티드가 15-19번 아미노산 잔기에 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하도록, 서열번호 1 또는 2의 펩티드 변형을 포함한다. 또한, ACTH 유사체 펩티드는 하나 이상의 펩티드 절단을 포함하며, 서열번호 1의 25-39번 아미노산 잔기의 절단을 더 포함한다. 서열번호 20의 ACTH 유사체 펩티드가 특히 바람직하다.
- [0025] 일부 예들에서, ACTH 유사체 펩티드 투여시 시험관내 혈청 코르티코스테로이드 유도 분석에서 부신 막에 의한 코르티코스테론의 생산이 적어도 10%, 바람직하기로는 최대 100%로, 서열번호 2의 펩티드에 비해 유도된다. 예로, 제2 예에 있어서, ACTH 유사체는 비변형 ACTH에 비해 ACTH 유사체의 존재시 부신 막에 의한 코르티코스테로이드 분비를 감소시키도록 기능하는 변형된 ACTH 펩티드이다.
- [0026] 일부 예들에서, 시험관내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석에서 ACTH 유사체 펩티드 투여시 ACTH 유도성 코르티코스테로이드 분비는 적어도 10%까지 감소되었다. 제3 예에서, ACTH 유사체는 내인성 ACTH의 존재시 부신 막에 의한 코르티코스테로이드 분비를 감소시키도록 작용하는 변형된 ACTH 펩티드이다.
- [0027] 일부 예에서, 하나 이상의 아미노산 치환이 있는 서열번호 2의 분리된 ACTH 유사체 펩티드를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 ACTH 유사체 펩티드는 부신 막에 결합하여 서열번호 2의 펩티드를 부신 막에서 교체한다. 펩티드 결합은 시험관내 무혈청 부신 경쟁 결합 분석으로 측정할 수 있다. 예로, 제 4번째 예에서, ACTH 유사체는 MC-2R 리셉터와 같은 부신 ACTH 리셉터에 결합하도록 작용하는 변형된 ACTH 펩티드이며, 바람직하기로는 비변형 ACTH에 비해 MC-2R 리셉터에 대한 증가된 결합 친화성 및 MC-2R 리셉터에 대한 감소된 활성화를 보인다. 바람직하기로는, ACTH 유사체 펩티드는 부신 막에 결합하여 서열번호 2의 펩티드를 대체할 수 있으며, 상기 펩티드 결합은 시험관내 무혈청 부신 경쟁적 결합 분석으로 측정한다. 가장 바람직하기로는, ACTH 유사체 펩티드는 서열번호 2의 펩티드에 비해 적어도 2배 이상의 친화성으로 MC-2R 부신 막에 결합한다.
- [0028] 일부 예들에서, ACTH 유사체 펩티드는 시험관내 무혈청 부신 저해 분석에서 부신 막에 의한 ACTH 유도성 코르티코스테론의 생산을 감소시킨다. 예로, 제5번째 예에서, ACTH 유사체 화합물은 비변형 ACTH에 의한 코르티코스테로이드 유도를 제외 배양한 조직에서 시험관내로 감소시킬 수 있다. ACTH 유사체는 시험관내 무혈청 부신 저해 분석에서 부신 막에 의한 ACTH 유도성 코르티코스테론 생산을 감소시키는 펩티드를 포함한다.
- [0029] 제 6번째 예에서, 반감기가 길어진 ACTH 유사체를 제공한다. 반감기가 길어진 ACTH 유사체는 시험관내 활성에서 검출된 코르티코스테로이드의 무혈청 농도에 의해 측정된 제2 활성보다 높은, 생체내에서 검출한 혈청 코르티코스테로이드 농도에 의해 측정된 제1 활성을 가지는 것으로서 동정할 수 있으며, 생체내 활성은 실시예 2의 혈청 부신 코르티코스테로이드 저해 분석에 의해 측정되며, 상기 시험관내 활성은 실시예 4의 시험관내 무혈청 부신 코르티코스테로이드 저해 분석에 의해 측정된다.
- [0030] 제 7번째 예는 또한 부신 긴장도(adrenal tone)를 유지하면서 과잉의 ACTH를 차단하는데 유용한 ACTH 유사체 스크리닝 방법을 제공한다. 다양한 ACTH 유사체를 제조할 수 있으며, 환자에게 투여하여 생체내 코르티손 유도를 분석할 수 있다.
- [0031] 제 8번째 예로, 본 발명은 ACTH 유사체를 포함하는 약학 조성물, 및 ACTH 관련 상태와 연관된 증상 치료에 상응하는 방식으로 환자에게 상기 조성물을 투여하는 것에 관한 것이다. 본원에 개시된 ACTH 유사체는 인간 또는 동물에서 ACTH 과다 발현과 같은 ACTH 관련 질환을 치료하기 위한 약학 조성물에 병합될 수 있다. ACTH 유사체 및 ACTH 유사체를 포함하는 관련 약학 조성물의 제조 방법도 제공한다. 예로, 일 측면에 있어서, 부신 긴장도를 유지하면서 과잉의 ACTH 차단에 유용한 화합물에 대한 ACTH 유사체 클래스를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0032] ACTH 유사체 화합물은 ACTH 리셉터(예, MC-2R)의 조절에 반응하는 질환과 같이 ACTH 농도와 관련있는 질환 치료에 유용할 수 있다. 또한, 코르티코스테로이드 분비 또는 코르티코스테로이드 농도 조절에 유용한 화합물을 제

공한다. ACTH 유사체 화합물은 ACTH 농도 조절과 관련된 증상을 치료하기 위해, 예컨대 부신 기능의 긴장 상태를 유지하면서 환자의 높은 수준의 ACTH 농도 영향을 감소시키기 위해 투여할 수 있다. ACTH 유사체 조성물은, 예컨대 쿠싱 증후군, 코르티코스테로이드의 과다 분비로 인한 손상된 면역 반응, 조기 분만 개시(예, 시상하부-뇌하수체-부신 축에 의한), 및 관련 질환과 같은 ACTH 관련 질환 치료에 유용하다. 일 측면에 있어서, 다양한 ACTH 유사체가 제조되며 환자에게 투여하여 생체내 코르티손 유도를 평가한다. 다른 측면에서, 높은 밀도로 성장시킨 농산물 및 양식물의 건강에 이롭기 위한 스트레스 호르몬을 감소시키는 방법과 같은, 수의학 대상체의 치료 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 비변형 ACTH의 투여 이후에 측정된 코르티코스테론의 농도와 비교한, 다양한 ACTH 유사체 화합물을 주입한 후 생체내에서 코르티코스테론의 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 비변형 ACTH, 비변형 ACTH와 ACTH 유사체의 조합, ACTH 유사체 투여 후 비변형 ACTH의 각각 투여, 및 ACTH 유사체 단독 투여에 의해 유도된 생체내 코르티코스테론을 비교한 그래프이다.
- 도 3은 비변형 ACTH 및 ACTH 유사체 화합물에 대한 부신 ACTH 리셉터에 대한 경쟁적인 결합 분석 결과를 비교한 그래프이다.
- 도 4는 비변형 ACTH, 비변형 ACTH와 ACTH 유사체의 조합 및 ACTH 유사체 단독 투여에 의한 체외 부신 막에서의 시험관내 유도된 코르티코스테론을 비교한 그래프이다.
- 도 5는 비변형 ACTH의 활성을 기준으로(즉, 100%) 다양한 ACTH 작용제 화합물의 코르티코스테론 유도에 대한 생체내 및 시험관내 활성을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] **발명의 상세한 설명**
- [0035] 별도로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공통적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 상충되는 경우, 정의를 포함하여 본원에 따른다. 본원에 기재된 바와 유사한 또는 동등한 방법 및 재료들을 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용할 수 있지만, 하기에 바람직한 방법 및 재료를 나타낸다. 본원에 언급된 공개문헌, 특허 출원, 특허 및 그의 문헌들은 그 전체가 원용에 의해 본 발명에 포함된다. 본원에 언급된 재료, 방법 및 실시예들은 단지 예를 든 것이며, 한정하고자 하는 의미는 아니다.
- [0036] 본원에서, 용어 "비변형 부신피질 자극 호르몬(비변형 ACTH)"은 부신 피질을 자극하여 글루코코르티코이드 호르몬을 분비하도록 하는 뇌하수체 전엽에서 생성되는 펩티드 호르몬으로, 세포를 도와 글루코스신 합성(gluconeogenesis) 과정을 통해 클루코스를 합성하여, 단백질 대사 유리 지방산을 이동시키고, 및 알레르기 반응에서 염증을 저해한다. 이러한 호르몬은 탄수화물, 지방 및 단백질 대사를 조절하는, 코르티코스테로이드이다.
- [0037] 용어 "코르티코스테로이드"는 본원에서 인간의 코르티코스테로이드 코르티솔 및 설치류의 코르티코스테로이드 코르티코스테론을 포함한다.
- [0038] 수량을 언급하는데 사용된 용어 "약"은 언급한 수와 동일한 언급된 수의 변동, 예컨대 의도한 목적 또는 기능에 있어 언급된 수와 비실질적으로 상이한 양을 포함한다.
- [0039] 본원에서 명명 " $P(x-y)$ "는 P는 폴리펩티드 명칭이고 x 및 y는 정수로, "P"라고 하는 폴리펩티드의 (x) 위치 내지 (y) 위치에 보존적인 아미노산이 구성된 아미노산 서열을 나타낸다. 예컨대, "hACTH(1-24)"는 인간 ACTH 펩티드의 아민 말단으로부터 1에서 24의 잔기로 구성된 24개의 보존적인 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드이다. "mACTH"는 무라인 ACTH이다. 특히, hACTH(1-24) 및 mACTH(1-24)는 동일한 펩티드 서열이다.
- [0040] 명명 " aXb "는 a 및 b는 아미노산의 단문자 약어이고 X는 숫자로, 비변형 ACTH 펩티드의 "X" 위치에 아미노산 "a"를 아미노산 "b"로 치환한 것을 의미한다. 예컨대, "(V26F,E30K)mACTH"는 분자의 아미노 말단으로부터 26번째 위치의 Val이 Phe 아미노산으로 치환되고, 분자의 아미노 말단으로부터 30번째 위치의 Glu 아미노산이 Lys 아미노산으로 치환됨으로써 변형된, 39개의 아미노산으로 이루어진 마우스 ACTH 분자이다. 유사하게, 명명 " $\alpha\beta\chi X-Y\delta\epsilon\phi$ "는 α , β , χ , δ , ϵ 및 ϕ 는 아미노산의 단문자 약어이고 X 및 Y는 숫자로, 위치 X에서 Y에

보존적인 아미노산 " $\alpha \beta \chi$ "가 아미노산 " $\delta \epsilon \phi$ "로 치환된 것을 의미한다.

[0041] ACTH 유사체 화합물은 하기 바람직한 ACTH 유사체 생물학적 기능들중 하나 이상을 제공하는 하나 이상의 구조적 변형이 있는 ACTH 서열을 포함하는 화합물을 포함한다: (1) ACTH 유사체 존재시 비변형 ACTH에 비해 부신 막에 의한 코르티코스테로이드 분비 감소, (2) 내인성 ACTH 존재시 부신 막에 의한 코르티코스테로이드 분비 감소, (3) 비변형 ACTH에 비해 MC-2R 리셉터의 활성화 감소를 수반하는 MC-2R 결합 친화성 증가. ACTH 유사체 화합물은 멜라노코르틴 2 리셉터(MC-2R)에 결합하여, MC-2R을 발현하는 세포를 약하게 활성화하여 MC-2R 리셉터상의 내인성 ACTH의 작용을 차단하는 것으로 작용하는 것으로 추정된다.

[0042] 원하는 기능 한가지 이상을 가지는 ACTH 유사체 화합물 형성에 사용할 수 있는 바람직한 ACTH 아미노산 치환의 예로는 이하를 포함한다: (1) 6-9번 위치에서 아미노산을 보존하며/하거나 MC-2R 결합을 조장 또는 유지하는, 1-13 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, (2) 15-18 위치에서 효소적 절단을 방지 또는 길항하는, 15-18 위치에서의 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, (3) 인접한 두개의 염기성 아미노산으로 특정되지 않는, 15-18번 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, (4) ACTH 유사체의 혈청 반감기를 연장시키는, 20-24번 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환 또는 절단, (5) 원하는 분비 특성을 가지는 ACTH 유사체 화합물을 제공하는, 25-39번 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환 또는 바람직하기로는 절단, 또는 (6) 분자의 카르복시 말단을 형성하는 24번 위치에 아미노산 잔기가 있는, 25-39번 아미노산 잔기의 절단.

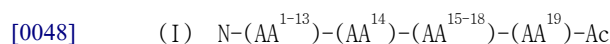
[0043] ACTH 유사체 화합물

[0044] 첫번째 예에서, 다양한 ACTH 유사체 화합물은 비변형 인간 ACTH 아미노산 서열에 비해 하나 이상의 아미노산 치환 또는 절단을 포함할 수 있다. 비변형 인간 ACTH는 서열, N-Ser¹-Tyr-Ser-Met-Glu⁵-His-Phe-Arg-Trp-Gly¹⁰-Lys-Pro-Val-Gly-Lys¹⁵-Lys-Arg-Arg-Pro-Val²⁰-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn²⁰-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu³⁰-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe³⁵-Pro-Leu-Glu-Phe³⁹-Ac(서열번호 1)("hACTH")의 39개의 아미노산 잔기를 가지는 폴리펩티드이며, 상기 서열에서 N 및 Ac는 각각 분자의 아미노 말단 및 카르복시 말단이다. ACTH(1-24)가 인간 ACTH(1-24)를 포함하는 많은 척색 동물들에서 발견되며 펩티드 서열 N-Ser¹-Tyr-Ser-Met-Glu⁵-His-Phe-Arg-Trp-Gly¹⁰-Lys-Pro-Val-Gly-Lys¹⁵-Lys-Arg-Arg-Pro-Val²⁰-Lys-Val-Tyr-Pro-Ac(서열번호 2)(뮤라인 ACTH("mACTH(1-24)"))의 1-24번 위치와 동일함)를 가진다는 점에서, ACTH(1-24)는 보존되어 있으며, 상기 서열에서 N 및 Ac는 각각 분자의 아미노 말단 및 카르복시 말단이다.

[0045] ACTH 유사체 화합물은 하나 이상의 아미노산 치환이 있는, hACTH(서열번호 1)의 적어도 1-19개의 아미노산 잔기, 바람직하기로는 1-24개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 바람직한 ACTH 유사체 화합물은 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형된 서열번호 2를 포함한다. ACTH 유사체 화합물은 다음과 같은 바람직한 ACTH 유사체 생물학적 기능들중 하나 이상을 제공하는 하나 이상의 구조 변형이 있는 ACTH 서열을 포함하는 화합물을 포함한다: (1) 비변형 ACTH에 비해 ACTH 유사체 존재시 부신 막에서의 코르티코스테로이드 분비 감소, (2) 내인성 ACTH의 존재시에 부신 막에서의 코르티코스테로이드 분비 감소 및 (3) 비변형 ACTH에 비해 MC-2R 결합 친화성 증가 및 MC-2R 리셉터의 활성화 감소.

[0046] 특히 바람직한 ACTH 유사체 화합물은 비변형된 인간 ACTH 서열에 다음과 같은 하나 이상의 아미노산 치환을 가진다: (1) 6-9번째 아미노산을 보존하는, 1-13번 위치의 아미노산 잔기 하나 이상의 치환, (2) 15-18번 위치에서 효소적 절단을 방지 또는 길항하는, 15-18번 위치의 아미노산 잔기 하나 이상의 치환, (3) 인접한 두개의 염기성 아미노산으로 특정되지 않는— 15-18번 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, (4) ACTH 유사체의 혈청 반감기를 연장시키는, 20-24번 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환 또는 절단, 및 (5) 비변형 ACTH 또는 다른 ACTH 유사체 화합물에 비해 연장된 혈청 반감기를 가진 ACTH 유사체 화합물을 제공하는, 25-39번 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환 또는 바람직하기로는 절단.

[0047] ACTH 유사체는 바람직하기로는 하기 식(I)의 폴리펩티드를 포함한다:



[0049] 상기 식에서, N 및 Ac는 각각 폴리펩티드의 아미노 말단 및 카르복시 말단이며, $(AA^{1-13})-$ 은 13개의 첫번째 보존적인 아미노산 또는 아미노산 유사체 시리즈를 의미하며, $(AA^{14})-$ 는 상기 첫번째 시리즈의 카르복시 말단에 붙어 있는 아미노산 잔기를 의미하며, $(AA^{15-18})-$ 은 (AA^{14}) 의 카르복시 말단에 붙어있는 4개의 두번째 보존적인 아미노

산 시리즈를 의미하며, (AA¹⁹)-는 상기 두번째 시리즈의 카르복시 말단에 붙어있는 하나의 아미노산 잔기를 의미한다.

[0050] 바람직하기로는, 식(I)의 ACTH 유사체는 (AA¹⁹)-Ac 부분의 카르복시 끝에 붙어있는 거대 분자 부분을 더 포함한다. ACTH 유사체는 식(I)의 카르복시 끝(AC)에 붙어있는 부가적인 아미노산을 더 포함할 수 있다. 가장 바람직하기로는, ACTH 유사체는 식(I)의 AC 부분에 붙어있는 총 5개의 부가적인 아미노산을 포함하여, ACTH 유사체의 총 아미노산은 적어도 24개이다.

[0051] ACTH 유사체는 바람직하기로는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 식(I)에 대응되는 비변형 ACTH의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 부가적인 아미노산 또는 아미노산 유사체는 바람직하기로는 식(I)의 (AA¹⁹)-잔기의 카르복시 말단끝에 부착되는 것이 바람직하다.

[0052] 식(I)의 (AA¹⁻¹³)-부분은 표 1의 두번째 열에 나타난 비변형 ACTH 아미노산 서열을 가지는 식(II)의 13개의 아미노산 서열:

[0053] (II) -AA¹-AA²-AA³-AA⁴-AA⁵-AA⁶-AA⁷-AA⁸-AA⁹-AA¹⁰-AA¹¹-AA¹²-AA¹³-

[0054] 로 표시되며, 선택적으로 표 1의 세번째 열에 나타난 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 비변형된 인간 ACTH의 (AA¹⁻¹³)-부분은 서열 Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val(서열번호 3)을 갖는다. 바람직하기로는, 식(II)의 AA⁶-AA⁷-AA⁸-AA⁹-부분은 선택적으로 하나 이상의 (D) 아미노산 유사체로 치환된, 비변형 아미노산 서열 His-Phe-Arg-Trp-(서열번호 4)를 갖는다.

[0055] 표 1: (AA¹⁻¹³)의 ACTH 유사체 아미노산 치환

표 1

잔기	AA ¹ -	AA ² -	AA ³ -	AA ⁴ -	AA ⁵ -	AA ⁶ -	AA ⁷ -	AA ⁸ -	AA ⁹ -	AA ¹⁰ -	AA ¹¹ -	AA ¹² -	AA ¹³ -
비변형 ACTH 잔기	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val
선택적인 ACTH 유사체 아미노산 치환	(D)Ser	(D)Tyr	(D)Ser	(D)Met Nle	(D)Glu Cys Asp	(D)His	(D)Phe (D)-p-iodoPhe (D)-1-naph-Ala	(D)Arg	(D)Trp	Cys Lys Orn Dab Dpr	(D)Lys Gly	(D)Pro	(D)Val

[0057] 표 1에서, 표시(D)는 표시한 아미노산의 (D) 거울상이성질체를 의미하며, Nle는 아미노산 유사체인 노르루신 또는 알킬 측쇄가 있는 다른 아미노산이며, Orn은 오르니틴 또는 유사한 측쇄를 가지고 있는 다른 변형 아미노산이며, Dab는 2,4 디아미노부티르산 또는 유사한 디아미노산이며; Dpr은 2,3 디아미노프로피온산 또는 다른 디아미노산이며, (D) p-iodo-Phe는 p-요오도 변형된 Phe 아미노산과 같은 스테릭기(steric group)이며, 및 (D)-1-naph-Ala은 1-naph-변형된 (D)-Ala 아미노산 또는 그외 입체적으로 변형된 다른 아미노산이다. 비변형 ACTH의 비변형된 (AA¹⁻¹³) 부분에 치환을 포함하는 ACTH 유사체 화합물은 바람직하기로는 표 1에 나타난 잔기 위치에 하기에 나타난 최적의 ACTH 유사체 아미노산 잔기들중 하나를 포함한다. 예컨대, 비변형 ACTH는 AA⁵ 위치에 Glu 잔기를 가지며, 선택적으로 ACTH 유사체 형성시 (D)-Glu, Cys 또는 Asp 잔기로 치환될 수 있다. 식(II)의 아미노산 서열은 또한 미국 특허 4,485,039; 4,457,864; 4,866,038; 5,731,408; 5,714,576; 5,049,547; 4,918,055; 4,649,191; 및 5,674,839에서 Hruby 등이 개시한 MC-2R 결합 서열에 대응되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있으며, 상기 특허는 원용에 의해 본 발명에 포함된다.

[0058] 다른 아미노산은 ACTH 유사체 화합물의 ACTH에 비해 ACTH 유사체에 의한 코르티코스테로이드 분비 감소, 내인성 ACTH에 의한 코르티코스테로이드 분비 및/또는 MC-2R 결합 감소와 같은 적합한 생물학적 기능을 유지하도록,

(AA¹⁴)- 부분에서 치환될 수 있지만, 식(I)의 (AA¹⁴)- 부분은 바람직하기로는 Gly 또는 (D)Gly인 아미노산 잔기이다.

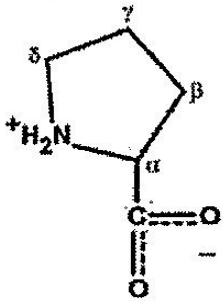
[0059] 식(I)의 (AA¹⁵⁻¹⁸)- 부분은 식(III)의 4개의 아미노산 서열로 표시된다:

[0060] (III) -AA¹⁵-AA¹⁶-AA¹⁷-AA¹⁸-

[0061] 비변형된 인간 ACTH의 (AA¹⁵⁻¹⁸)- 부분은 서열 Lys-Lys-Arg-Arg(서열번호 5)를 포함하며, 이는 염기성 측쇄가 있는 4개의 인접한 아미노산을 포함한다. 바람직하게는, ACTH 유사체 화합물은 이들 부위에 효소 절단을 방지 또는 길항하는 식(III)에 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 또한, 바람직하게는, ACTH 유사체 화합물은, 염기성 측쇄를 가진 인접한 아미노산으로 특정화되지 않는, 식(III)에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. AA¹⁵- 및 AA¹⁶-은 바람직하기로는 Lys, Ala, Gly 및 Val으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; AA¹⁷-AA¹⁸은 Arg, Ala, Gly 및 Val으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것이 바람직하다.

[0062] 일 측면에서, 서열번호 2 또는 식(III)의 잔기 AA¹⁶-AA¹⁷-AA¹⁸들중 하나 이상의 아미노산 치환은 ACTH 유사체의 아미노산 잔기 16, 17 및 18이 Lys 및 Arg로 이루어진 군으로부터 선택되는 인접한 2개의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록, 선택된다. 즉, 일부 ACTH 유사체에서, 아미노산 Lys 및 Arg는 펩티드 서열의 AA¹⁶-AA¹⁷-AA¹⁸ 부분에서 서로(즉, 아르기닌 옆에 라이신 또는 라이신 옆에 아르기닌), 또는 동일한 아미노산이(즉, 아르기닌 옆에 아르기닌, 또는 라이신 옆에 라이신) 인접하지 않는다. 대신, AA¹⁶-AA¹⁷-AA¹⁸ 부분에 하나 이상의 아미노산은 하기 바람직한 ACTH 유사체의 생물학적 기능들중 하나 이상을 제공하는, Lys 또는 Arg 이외의 다른 임의의 아미노산이나 아미노산 유사체로 치환된다: (1) 비변형 ACTH에 비해 ACTH 유사체 존재시 부신 막에서의 코르티코스테로이드 분비 감소, (2) 내인성 ACTH의 존재시에 부신 막에서의 코르티코스테로이드 분비 감소 및 (3) 비변형 ACTH에 비해 MC-2R 결합 친화성 증가 및 MC-2R 리셉터의 활성화 감소. 예컨대, ACTH 유사체 화합물은 식(III) 내 하나 이상의 위치에 비변형 ACTH 잔기에 대해 치환된 Ala 잔기를 포함할 수 있다. ACTH 유사체 화합물은 식(III)에서 서열번호 5의 Gly 또는 알킬 측쇄가 있는 임의의 아미노산(즉, Ala, Val, Leu, Ile 또는 Nle와 같은 알킬 측쇄를 포함하는 아미노산 유사체)으로의 잔기 치환을 포함할 수 있다. 또한, 바람직하기로는, 또한, ACTH 유사체는 서열번호 2의 15, 16, 17 또는 18번 위치중 임의의 아미노산 위치 2곳에 치환된 하나 이상의 Ala 및 하나 이상의 Arg 잔기를 포함할 수 있다. 선택적으로, 서열번호 2의 15, 16, 17 또는 18번 위치에 ACTH 유사체 치환은 Lys, Arg, Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Nle과 같은 측쇄를 포함하는 아미노산 유사체, Gln, Asn, Glu, 및 Asp로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산이다. 가장 바람직하기로는 ACTH 유사체는 Lys-Arg-Ala-Ala-(서열번호 6), Ala-Lys-Ala-Arg(서열번호 7), Lys-Ala-Ala-Arg(서열번호 8), Lys-Ala-Arg-Ala-(서열번호 9), Gln-Lys-Gln-Arg(서열번호 10) 및 Ala-Ala-Ala-Ala(서열번호 11)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 식(III)에 따른 아미노산 서열을 포함한다. 또한, ACTH 유사체 화합물은 Gly, Ala, Val, Leu, Ile 또는 Nle를 포함하는 아미노산 또는 알킬 측쇄를 가지는 아미노산 유사체를 이용한, 15, 16, 17 또는 18번 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함할 수 있다. ACTH 유사체 화합물은 비변형 ACTH에 비해 ACTH 유사체에 의한 코르티코스테로이드 분비 감소, 내인성 ACTH에 의한 코르티코스테로이드 분비 및/또는 MC-2R 결합 감소와 같은, ACTH 유사체 화합물의 바람직한 한가지 이상의 생물학적 기능을 유지하는, AA¹⁵-AA¹⁶-M¹⁷-AA¹⁸ 위치들 중 한 곳 이상에 치환되어 있는 다른 아미노산을 포함한다.

[0063] 식(I)의 (AA¹⁹)- 부분은 Pro, Trp 또는 Ala일 수 있는 아미노산 잔기이며, 바람직하기로는, Trp, Ala, 또는, 비변형 ACTH에 비해 ACTH 유사체에 의한 코르티코스테로이드 분비 감소, 내인성 ACTH에 의한 코르티코스테로이드 분비 및/또는 MC-2R 결합 감소와 같은, ACTH 유사체 화합물의 바람직한 한가지 이상의 생물학적 기능을 유지하면서, (AA¹⁹)- 부분에 치환될 수 있는 다른 화합물이다. 바람직하기로는, ACTH 유사체 화합물은 (AA¹⁹)- 부분에 치환된 프롤린 이외의 아미노산을 가진다. 더 바람직하기로는, ACTH 유사체는 Pro 대신에 (AA¹⁹)- 부분에 치환된 아미노산 Trp를 포함한다. hACTH 및 mACTH와 같은 비변형 ACTH 펩티드 서열은 (AA¹⁹)- 부분에 프롤린 잔기를 포함한다. 프롤린은 하기 화학 구조를 갖는다.



[0064]

[0065]

프롤린(Pro)

[0066]

프롤린의 화학 구조는 고리 구조를 형성하는 측쇄를 갖는다. 프롤린은 종종 알파 나선 또는 턴 또는 루프 말단에서 발견된다. 폴리펩티드에서 거의 trans-형태만 존재하는 다른 아미노산과는 다르게, 프롤린은 펩티드에서 cis 배위로 존재할 수 있다. cis 및 trans 형태는 거의 등에너지(isoenergetic)이다. ACTH 유사체에서 (AA¹⁹)-이 Pro인 화합물이 또한 제공되지만, 바람직하게는, 식(III)에 서열번호 6-10을 포함하는 ACTH 유사체에서 (AA¹⁹)-는 Trp이다.

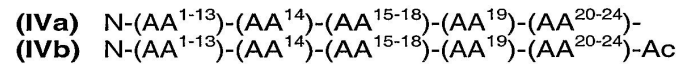
[0067]

따라서, 특히 바람직한 ACTH 유사체는 변형된 hACTH, mACTH 또는 hACTH(1-24) 펩티드 서열이며, 여기서 (AA¹⁴)-(AA¹⁵⁻¹⁸)-(AA¹⁹)-는 -Gly¹⁴-Lys¹⁵-Arg¹⁶-Ala¹⁷-Ala¹⁸-Trp¹⁹- (서열번호 12); -Gly¹⁴-Ala¹⁵-Lys¹⁶-Ala¹⁷-Arg¹⁸-Pro¹⁹- (서열번호 13); -Gly¹⁴-Lys¹⁵-Ala¹⁶-Ala¹⁷-Arg¹⁸-Pro¹⁹- (서열번호 14); -Gly¹⁴-Lys¹⁵-Ala¹⁶-Arg¹⁷-Ala¹⁸-Pro¹⁹- (서열번호 15); -Gly¹⁴-Gln¹⁵-Lys¹⁶-Gln¹⁷-Arg¹⁸-Pro¹⁹- (서열번호 16) 및 -Gly¹⁴-Lys¹⁵-Arg¹⁶-Ala¹⁷-Ala¹⁸-Pro¹⁹- (서열번호 17)로 이루어진 군으로부터 선택되는다.

[0068]

ACTH 유사체는 식(IVa) 또는 식(IVb)로 나타낸 폴리펩티드를 포함한다:

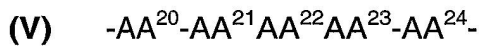
[0069]



[0070]

상기에서, N-은 폴리펩티드의 N-말단이며, Ac는 폴리펩티드의 카르복시 말단이다. 식(VIa) 또는 (VIb)의 ACTH 유사체는 전술한 식(I)에 대해 설명한 바와 같이 N-(AA¹⁻¹³)-(AA¹⁴)-(AA¹⁵⁻¹⁸)-(AA¹⁹)-를 포함하며, 식(I)의 아미노산 서열의 카르복시 말단에 결합되어 있는 (AA²⁰⁻²⁴)- 부분을 더 포함한다. 식(VIa) 및 (VIb)의 (AA²⁰⁻²⁴)- 부분은 식(V)의 5개의 아미노산 서열로 표시된다:

[0071]



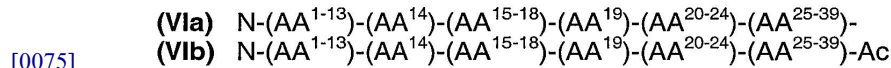
[0072]

비변형 인간 ACTH의 (AA²⁰⁻²⁴)- 부분은 서열 Val-Lys-Val-Tyr-Pro (서열번호 18)을 포함한다. 바람직하기로는, ACTH 유사체 화합물은 식(V) ACTH 유사체의 혈청 반감기 연장에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 예컨대, ACTH 유사체는 식(V): -Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-(서열번호 19)에 상응하는 서열을 포함할 수 있다.

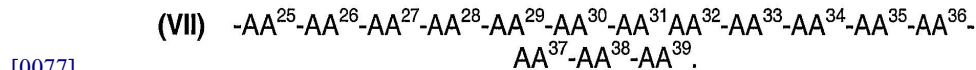
[0073]

식(IVa)에 따른 특히 바람직한 ACTH 유사체는 식(III)의 AA¹⁵-AA¹⁶-AA¹⁷ M¹⁸- 부위가 서열번호 6으로 치환된 서열 hACTH(1-24)을 포함한다. 특히 바람직한 식(IVa)의 화합물은, "AT814"라고도 하는 N-Ser¹-Tyr-Ser-Met-Glu⁵-His-Phe-Arg-Trp-Gly¹⁰-Lys-Pro-Val-Gly-Lys¹⁵-Arg-Ala-Ala-Trp-Val²⁰-Lys-Val-Tyr-Pro-Ac(서열번호 20)을 가지는, ACTH 유사체 (KKRRP15-19KRAAW) mACTH(1-24)이다. 다른 특히 바람직한 ACTH 유사체 화합물은 서열번호 2의 펩티드로 필수적으로 구성되며, 예컨대, Costa, JL et al., "Mutational analysis of evolutionarily conserved ACTH residues", Gen Comp Endocrinol. Mar;136(1):12-6 (2004)에 개시된 바와 같이, 15, 16, 17 또는 18번 위치에 하나 이상의 아미노산 잔기의 알라닌 또는 글루타민 치환, 및/또는 20, 21, 22, 23 또는 24번 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환을 가지며, 상기 문헌은 그 전체가 원용에 의해 본 발명에 포함된다.

[0074] 제1 예의 세번째 측면에서, ACTH 유사체는 식(VIa) 또는 식(VIb)로 나타낸 폴리펩티드를 포함한다:



[0076] 상기에서 N-은 폴리펩티드의 아미노 말단이며, Ac는 폴리펩티드의 카르복시 말단이다. 식(IVa) 또는 (IVb)의 ACTH 유사체는 식(IVa)에 대해 전술한 바와 같이 N-(AA¹⁻¹³)-(AA¹⁴)-(AA¹⁵⁻¹⁸)-(AA¹⁹)-(AA²⁰⁻²⁴)-를 포함하며, 식(IVa)의 아미노산 서열의 카르복시 말단에 부착된 (AA²⁵⁻³⁹)- 부분을 더 포함한다. 식(VIa)는 선택적으로 AA³⁹ 잔기에 부착된 추가적인 화학 구조를 포함할 수 있으며, AA³⁹ 잔기는 식(VIb) 구조의 카르복시 말단을 형성한다. 식(VIa) 및 (VIb)의 (AA²⁵⁻³⁹)- 부분은 식(VII)의 15개의 아미노산 서열이다:



[0078] 인간 비변형 ACTH의 (AA²⁵⁻³⁹)- 부분은 서열 Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe(서열번호 21)을 포함한다. 바람직하기로는, ACTH 유사체 화합물은 식(VII)에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환이나 또는 식(VII)의 카르복시 말단으로부터 하나 이상의 아미노산 잔기의 절단을 포함하여, 원하는 지속적인 방출 특성을 가진 ACTH 유사체 화합물을 제공한다. 예컨대, ACTH 유사체는 선택적으로 AA³⁰의 Lys 치환 또는 AA³⁶의 Arg의 치환에 의해 변형된, 서열번호 10의 비변형 ACTH 서열을 가지는 식(VII)에 해당되는 서열을 포함할 수 있다.

[0079] 치환 변이체는 아미노산 서열에서 하나 이상의 잔기가 제거되고 그 자리에 상이한 잔기가 삽입된 것이다. 이러한 치환은 단백질의 특징들을 정교하게 조절하는 것이 바람직할 경우에 표 2에 따라 행해질 수 있다. 표 2는 단백질에서 본래 아미노산에 대해 치환될 수 있으며, 당업계에서 보존적인 치환으로 간주되는 아미노산을 나타낸다. ACTH 유사체 화합물은 하기 바람직한 ACTH 유사체의 생물학적 기능중 한가지 이상을 유지하는, 하나 이상의 보존적인 치환이 있는 화합물을 포함한다: (1) 비변형 ACTH에 비해 ACTH 유사체 존재시 부신 막에 의한 코르티코스테론의 분비 감소, (2) 내인성 ACTH 존재하에 부신 막에 의한 코르티코스테로이드 분비 감소 및 (3) 비변형 ACTH에 비해 MC-2R 결합 친화성 증가 및 MC-2R 리셉터의 활성화 감소.

표 2

[0080]

원 잔기	보존적인 치환
Ala	ser
Arg	lys
Asn	gln, his
Asp	glu
Cys	ser
Gln	asn
Glu	asp
Gly	pro
His	asn; gln
Ile	leu, val
Leu	ile; val
Lys	arg; gln; glu
Met	leu; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu

[0081] 기능 또는 면역학적 아이덴티티의 실질적인 변화는 표 2에 기재한 것 보다 보존성이 낮은 치환체를 선택함으로써, 즉 그것이 하기를 유지하는 효과 측면에서 매우 현저하게 상이한 잔기를 선택함으로써 발생될 수 있다: (a) 치환 영역내 폴리펩티드의 백본 구조, 예컨대 시트 또는 나선 구조; (b) 타겟부에 분자의 전하 또는 소수성; 또는 (c) 측쇄의 벌크(bulk). 일반적으로 단백질 특성에 가장 큰 변화를 형성할 것으로 추정되는 치환은 다음과 같다: (a) 친수성 잔기, 예컨대 세릴 또는 트레오닐이 소수성 잔기, 예컨대 루실, 이소루실, 페닐알라닐, 발릴

또는 알라닐에 대해(또는 에 의해) 치환됨; (b) 시스테인 또는 프롤린이 임의의 다른 잔기에 대해(또는 에 의해) 치환됨; (c) 양전성 측쇄를 가지는 잔기, 예컨대 라이실, 아르기닐 또는 히스타딜은 음전성 잔기, 예컨대 글루타밀 또는 아스파르틸에 대해(또는 에 의해) 치환됨; (d) 벌키 측쇄를 가지는 잔기, 예컨대 페닐알라닌이 측쇄를 가지지 않은 잔기, 예컨대 글리신에 대해(또는 에 의해) 치환됨.

[0082] ACTH 유사체 화합물의 바람직한 ACTH 유사체의 생물학적 기능은 임의의 적합한 방법으로 측정할 수 있지만, 바람직하기로는 후술된 한가지 이상의 분석을 수행함으로써 평가할 수 있다.

[0083] **ACTH 기능이 감소된 ACTH 유사체 화합물**

[0084] 두번째 예에 있어서, ACTH 유사체는 ACTH 유사체의 존재시 비변형 ACTH에 비해 부신 막에 의한 코르티코스테로이드 분비를 감소시키도록 기능하는 변형된 ACTH 펩티드이다. ACTH 유사체의 구조는 전술한 하나 이상의 구조에 따라 선택하는 것이 바람직하다. ACTH 유사체 화합물은 예컨대 ACRG 유사체를 투여한 후 개체의 혈중 코르티코스테로이드의 농도 감소로 측정된 바에 따라 혈중 코르티코스테론의 ACTH 매개 분비 감소를 가질 수 있다. ACTH 유사체는 바람직하기로는 생체내 혈청 코르티코스테로이드 유도 분석에 의해 측정된 바에 따르면, 비변형 ACTH 펩티드를 투여한 경우와는 비교되는, 혈청 코르티코스테론 농도의 적어도 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 감소를 보인다.

[0085] 생체내 혈청 코르티코스테론 유도 분석은 개체의 혈류내 코르티코스테로이드 또는 코르티코스테론의 농도를 측정한다. 보다 구체적으로는, 생체내 혈청 코르티코스테로이드 유도 분석은 하기 단계를 포함할 수 있다: 첫째, 내인성 ACTH 생산을 억제하는 제제를 마우스 개체에 텍사메타손의 복막내 주사와 같이 투여하는 단계; 두번째로 내인성 ACTH 생산 억제에 적합한 시간(예, 1.5 - 2.0)동안 대기한 후, 테스트 화합물은 복막내 또는 피하 주사와 같은 적정 방법으로 마우스에 투여하는 단계; 및 세번째로, 주사한 테스트 화합물이 작용하도록 적정 시간동안(예, 1시간) 대기한 후, 혈액 샘플을 개체에서 취하여, ¹²⁵I RIA 키트(ICN, Costa Mesa, CA)를 이용한 경쟁적 방사면역분석과 같은 적합한 방법으로 혈청 코르티코스테론의 농도를 결정하는 단계. 실시예 1은 마우스 생체내 혈청 코르티코스테로이드 유도 분석을 구체적으로 개시하고 있다.

[0086] ACTH 유사체 화합물에 의해 생체내 유도된 코로이드 또는 코르티코스테론 분비는 테스트 화합물로서 ACTH 또는 ACTH 유사체 중 어느 하나를 투여한 후 혈청 코르티코스테로이드를 측정함으로써, 비변형 ACTH 화합물에 의해 생산된 코로이드 분비 농도와 비교한다. 도 1은 실시예 1의 방법에 따라 mACTH(1-24) 및 다양한 ACTH 유사체 테스트 화합물로 수행한 마우스 생체내 코르티코스테로이드 부신 유도 분석 결과를 나타낸다. 기능이 감소된 ACTH 유사체 조성물은 텍사메타손-억제 마우스에 mACTH(1-24) 또는 ACTH 유사체 화합물을 투여한 후 1시간 경과 시 채혈한 혈액 샘플에 대해 표준적인 방사면역분석(RIA) 방법으로 코르티코스테론 농도를 측정함으로써 확인되었다. 도 1에서, 다양한 ACTH 유사체 펩티드의 효과는 코르티코스테론 유도%로 표시하였으며, 마우스 ACTH는 100%이다. 그래프 10은 ACTH에 대한 코르티코스테론 유도 %(12)이며, ACTH 유사체 화합물의 9개의 샘플(14)을 나타낸다. 샘플 2-10에서 ACTH 유사체 화합물의 코르티코스테론 유도%(12)는 생체내 혈청 코르티코스테로이드 부신 유도 분석에서 비변형 mACTH(1-24)에 대해 측정된 혈청 코르티코스테론 농도의 백분율(20)로서 나타낸다. 도 1에서 샘플 2-10에 대하여 측정된 구조 변이 및 측정된 혈청내 감소%는 하기 표 3에 나타낸다.

표 3

샘플	도 1에서 표시	구조 변이	혈청내 코르티코스테로이드의 감소%
2	20	(V26F,E30K)mACTH	18.3%
3	25	(P19W,K21E,Y23R)mACTH	36.5%
4	30	(E30K,P36R)mACTH	41.5%
5	35	(PVKVYP19-24AAAAA)mACTH	51%
6	40	(V26F,P36R)mACTH	59.3%
7	45	(P19W, K21E)mACTH	61.1%
8	50	(P19W,K21A,delY23)mACTH	76.0%
9	55	(P19W,K21A)mACTH	83.4%
10	60	(KKRRP15-19KRAAW)mACTH	100%

[0088] **내인성 ACTH 유도성 코르티코스테론 유도 감소**

[0089] 세번째 예에 있어서, ACTH 유사체는 내인성 ACTH 존재시 부신 막에 의한 코르티코스테로이드 분비를 감소시키는 작용을 하는 변형된 ACTH 펩티드이다. ACTH 전에 또는 동시에 투여하는 경우, ACTH 유사체 화합물은 혈청 코르티코스테로이드를 10-100% 감소된 농도로 생성할 수 있다. 바람직하게는, 실시예 2에 언급한 방법과 같은 생체 내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석으로 측정된 바에 따르면, ACTH 유사체 화합물은 ACTH 단독 투여시에 비해 약 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 생체 내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석으로 측정된 혈청 코르티코스테로이드 농도 감소를 형성한다. 내인성 ACTH에 의해 유도된 부신 호르몬 생산을 저해하는 ACTH 유사체 화합물의 예는 일련의 생체 내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석을 수행함으로써 동정하였다. ACTH 유사체는 ACTH 투여 전에 단독으로 또는 ACTH와 병용으로 동시에 투여할 수 있다.

[0090] 생체 내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석은 첫번째 코르티코스테로이드-생산 생물활성을 가지는 화합물 및 테스트 화합물을 투여한 후, 개체의 혈류 내 코르티코스테로이드 또는 코르티코스테론의 농도를 측정한다. 코르티코스테로이드-생산성 생물 활성을 가지는 화합물은 코르티코스테로이드 생산에서 검출가능한 증가를 유발하는 것으로 알려진 임의의 화합물일 수 있다. 테스트 화합물은 코르티코스테로이드-생산 화합물 이전에, 코르티코스테로이드-생산 화합물과 조합하여, 및/또는 코르티코스테로이드-생산 화합물 이후에 투여할 수 있다. 상기 코르티코스테로이드-생산 화합물은 바람직하기로는 ACTH이지만, 또한 코르티코스테로이드-생산하는 생물 활성이 공지되어 있는 ACTH 유사체일 수 있다. ACTH 유사체 테스트 화합물을 이용하여 생체 내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석을 수행함으로써 사용한 코르티코스테로이드-생산 화합물에 비해 코르티코스테로이드 생산을 저해하는 ACTH 유사체를 파악할 수 있다. 바람직하기로는, 이러한 방법으로 동정된 ACTH 유사체는 내인성 비변형 ACTH의 존재하에 코르티코스테로이드 생산을 저해한다.

[0091] 생체 내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석은 하기 단계에 의한 테스트 화합물 및 코르티코스테로이드 생산 화합물의 순차적인 투여를 포함할 수 있다: 첫번째로, 내인성 ACTH 생산을 억제하는 제제를 마우스 개체에 텍사메타손의 복막내 주사와 같이 투여하는 단계; 두번째로 내인성 ACTH 생산 억제에 적합한 시간(예, 1.5 - 2.0)동안 대기한 후, 테스트 화합물은 복막내 주사와 같은 적정 방법으로 마우스에 투여하는 단계; 세번째로, 주사한 테스트 화합물이 작용하도록 적정 시간동안(예, 1시간) 대기한 후, 코르티코스테로이드-생산 활성을 가지는 화합물을 복막 주사와 같은 적합한 방법으로 마우스에 투여하는 단계; 및 네번째로, 투여한 2가지 화합물들의 생물 활성이 발생하는 적정 시간동안(예, 1시간) 대기한 다음, 혈액 샘플을 개체에서 취하여, ¹²⁵I RIA 키트(ICN, Costa Mesa, CA)를 이용한 경쟁적 방사면역분석과 같은 적합한 방법으로 혈청 코르티코스테론의 농도를 결정하는 단계. 선택적으로, 2번째 단계와 3번째 단계의 순서를 바꿀 수 있다(먼저 코르티코스테로이드 생산 화합물을 투여한 후 테스트 화합물을 투여함). 또한, 생체 내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석은 하기 단계에 의해 테스트 화합물 및 코르티코스테로이드-생산 화합물의 병용 투여를 포함할 수 있다: 첫째, 내인성 ACTH 생산을 억제하기 위한 제제를 텍사메타손의 복막내 주사와 같이 마우스 개체에 투여하는 단계; 두번째로 내인성 ACTH 생산 저해를 위해 적정 시간(예, 1.5 내지 2.0 시간)동안 대기한 다음, 코르티코스테로이드 생산 화합물 및 테스트 화합물을 복막 주사와 같이 적정 방법으로 마우스에 병용 투여하는 단계; 및 세번째로, 투여한 2가지 화합물들의 생물 활성 형성을 위한 적정 시간(예, 1시간)동안 대기한 후, 개체로부터 혈액 샘플을 취한 다음 ¹²⁵I RIA 키트(ICN, Costa Mesa, CA)를 이용한 경쟁적 방사면역분석과 같은 적합한 방법으로 혈청 코르티코스테론의 농도를 결정하는 단계. 또한, 일부 예에서, 임의의 생체 내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석에서 첫번째 단계는 ACTH 생산을 억제하기 위한 제제를 투여하는 대신, 4번째 단계의 방법으로 개체의 혈액 내 초기 내인성 코르티코스테로이드 또는 코르티코스테로이드 농도를 측정하는 단계로 대체할 수 있다. 실시예 2는 구체적인 마우스 생체 내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석을 설명한다.

[0092] 일련의 별개의 생체 내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석을 수행하여, 생체 내 ACTH 부신 호르몬 생산을 저해하는 ACTH 유사체를 동정하였다. 텍사메타손-억제된 마우스의 혈청 코르티코스테론 농도는 (1) ACTH(코르티코스테로이드-생산 화합물), (2) ACTH 유사체(테스트 화합물) 이후, ACTH 투여, (3) ACTH 및 ACTH 유사체의 조합, 및 (4) ACTH 단독 투여후, 실시예 2에 언급한 바와 같이 측정하였다. 표 4는 투여 시간에 대한 함수로서 마우스에서 측정된 혈청 코르티코스테로이드 농도를 나타낸다.

[0093] 표 4. ACTH 및 ACTH 유사체의 병용 투여

표 4

샘플	시 간			
	0 분	90 분	120 분	180 분
비히클	덱사메타손 (모든 군에 투여)		비히클	0 ± 0 ng/mL
ACTH			mACTH(1-24)	500 ± 76 ng/mL
AT90-ACTH120		(KKRRP15- 19KRAAW) mACTH(1-24)	mACTH(1-24)	175 ± 27 ng/mL
(AT+ACTH)120			(KKRRP15- 19KRAAW) mACTH(1-24) + mACTH(1-24)	51 ± 8 ng/mL
AT			(KKRRP15- 19KRAAW) mACTH(1-24)	7 ± 7 ng/mL

[0094]

[0095]

표 4에서, 실시예 2에 나타난 바와 같이, 5회의 별도의 생체내 혈청 코르티코스테로이드 분석에서, 먼저 덱사메타손을 0분에 마우스에 투여하였다. "비히클" 샘플의 경우, 액체 비히클을 단독으로 덱사메타손 주사 후 120분에 투여하였으며, 그 결과 1시간 후에 취한 혈액 샘플내 코르티코스테론의 농도는 검출가능한 농도 수준이 아니었다. "ACTH" 샘플의 경우, ACTH를 덱사메타손 주사후 120분에 투여하였고, 그 결과 1시간후에 혈액 샘플내 코르티코스테론의 검출 농도는 500 ± 76 ng/mL이었다. "AT90-ACTH120" 샘플의 경우, ACTH 유사체(KKRRP15-19KRAAW)mACTH(1-24)를 덱사메타손 주사후 1.5 시간경과후 투여한 다음, ACTH(1-24)를 30분 후에 투여하였으며, 그 결과 1시간 후에 채혈한 혈액내 혈청 코르티코스테론 농도는 175 ± 27 ng/mL으로 측정되었다. "(AT+ACTH)120"의 경우, ACTH 유사체(KKRRP15-19KRAAW)mACTH(1-24)("AT814")는 덱사메타손 주사 후 mAGTH(1-24)와 함께 투여하였으며, 한시간 후 채혈한 혈액 샘플내 측정된 혈청 코르티코스테론 농도는 51 ± 8 ng/mL이었다. "AT" 샘플에 경우, ACTH 유사체(KKRRP15-19KRAAW) mACTH(1-24)를 덱사메타손 주사후 120분 경과시에 투여하였으며, 그 결과 혈청 코르티코스테론 농도는 약 7 ± 7 ng/mL로 무시가능한 수준이었다.

[0096]

도 2는 실시예 2에 언급한 바와 같이, 덱사메타손 주사 후 180분 경과시에 측정한 코르티코스테론 농도의 백분율로서 표 2 결과를 나타낸 것이다. 그래프 100은 표 2에 개시한 ACTH에 대한 코르티코스테론 유도 %(112) 및 4개의 샘플에 대한 코르티코스테론 유도%(114)를 나타낸 것이다. 샘플 "AT90-ACTH120"(140)은 ACTH 투여 30분 전에 ACTH 유사체를 투여한 것으로, ACTH 투여 한시간 후 취한 혈액 샘플내 혈청 코르티코스테론 농도가 약 65% 감소되었다. 샘플 "(AT+ACTH)120"(160)은 ACTH와 ACTH 유사체의 동시 투여한 것으로, 한 시간후 취한 혈액 샘플내 혈청 코르티코스테론 농도가 약 90% 감소되었다. "AT" 샘플(180) 및 표 1의 샘플10에서 확인된 바와 같이, ACTH 유사체를 단독으로 다시 투여한 경우 한시간 이후에 취한 혈액 샘플내 혈청 코르티코스테론 농도가 약 99% - 100% 감소되었다. "비히클"은 도 2에 나타내지 않았다.

[0097]

부신 ACTH 리셉터에 대한 결합 분석

[0098]

네번째 예에 있어서, ACTH 유사체는 MC-2R 리셉터와 같은 부신 ACTH 리셉터에 결합하도록 작용하는 변형된 ACTH 펩티드이며, 바람직하기로는 비변형 ACTH에 비해 MC-2R 결합 친화성이 높으며 MC-2R 리셉터에 대해 낮은 활성화를 보인다.

[0099]

바람직한 ACTH 유사체 화합물은 내인성 비변형 ACTH보다 증가된 친화성으로 부신 막에 결합하고, 시험관내 무혈청 부신 경쟁 결합 분석(실시예 3)에서 변형된 ACTH를 대체할 수 있다. ACTH 유사체 화합물은 바람직하기로는 시험관내 무혈청 부신 경쟁 결합 분석으로 분석된 바와 같이 부신 막 조제물에 대한 ACTH 결합성의 20% 이상으로 치환한다. 더 바람직하기로는 ACTH 유사체 화합물은 비변형 ACTH에 비해 체외 부신 막에 대해 2-, 3-, 4-, 5-, 10-, 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 90-, 100-배 높은 친화성을 가질 수 있다.

[0100]

내인성 비변형 ACTH 보다 높은 친화성으로 부신 막에 결합하며, 비변형 ACTH를 치환할 수 있는 ACTH 유사체는 시험관내 무혈청 부신 경쟁 결합 분석(실시예 3)으로 동정할 수 있다. 도 3은 서열번호 20("AT814")을 가지는 ACTH 유사체 AT814 예를 이용하여 실시예 3의 방법으로 수행한 시험관내 무혈청 부신 경쟁 결합 분석의 결과를 나타낸 것이다. 그래프 200은 방사성 ACTH와 인큐베이션한 부신 막 조제물의 감마 카운터에 의해 측정된 CPM(count per minute, 212)을 나타낸다. 높은 CPM 수치는 방사능 표지된 화합물이 보다 많은 양으로 존재함을

나타낸다. 컬럼 210은 부신 막이 없는 상태에서의 백그라운드 측정치이다. 컬럼 220은 2시간동안(경쟁적인 결합 없이) 체외 부신 막을 단지 방사능 표지된 mACTH(1-24)와 조합한 후 검출한 방사능 표지된 비변형 mACTH(1-24)의 수치를 나타낸 것이다. 컬럼 230, 240 및 250은 부신 막상에서 MC-2R과 같은 리셉터에 대한 경쟁적인 결합에 의해 체외 부신 막(컬럼 220에서 측정함)으로부터 방사능 표지된 mACTH(1-24)를 치환하는 비-방사능 표지된("cold") mACTH(1-24)의 결합성에 대한 경쟁적 결합의 분석 결과이다. 특히, 컬럼 230은 10 nM "cold" mACTH(1-24)와 방사능 표지한 체외 부신 막을 조합한 후 검출된 방사능 표지된 mACTH(1-24)의 수치 감소를 나타내며; 컬럼 240은 100 nM의 "cold" mACTH(1-24)를 첨가한 후 표지된 체외 부신 막에 결합된 방사능 표지된 mACTH(1-24)의 부가적인 수치 감소를 나타내며; 및 컬럼 250은 체외 부신 막 조제물을 1000 nM의 "cold" mACTH(1-24)와 조합한 후 방사능 표지된 체외 부신 막에 부착된 방사능 표지한 mACTH(1-24)의 추가적인 수치 감소를 나타낸다. "cold" mACTH(1-24)의 농도가 증가됨에 따라 검출되는 방사능 표지된 mACTH(1-24)의 농도 감소는, MC-2R 리셉터에서 방사능 표지한 mACTH(1-24)가 "cold" mACTH(1-24)로 치환됨을 나타낸다.

[0101] 시험관내 무혈청 부신 경쟁 결합 분석을 mACTH(1-24) 대신에 서열번호 20으로 언급된 "cold"(비-방사능 표지된)AT814ACTH 유사체 화합물을 이용하여 반복 실시하였다. 컬럼 235, 245 및 255는 10 nM(컬럼 235), 100 nM(컬럼 245) 및 1000 nM(컬럼 255)의 농도에서 "cold" AT814의 경쟁적인 결합에 의해 체외 부신 막으로부터 방사능 표지된 mACTH(1-24)를 치환하는 비-방사능 표지된 AT814 결합에 대한 경쟁적인 결합 분석 결과를 나타낸다. "cold" AT814의 농도가 증가될수록 검출되는 방사능 표지된 AT814의 농도가 감소되는 것은, 방사능 표지된 mACTH(1-24)가 "cold" AT814로 치환됨을 의미한다. 특히, 그래프 200의 결과는 AT814가 방사능 표지된 mACTH(1-24)에 비해 약 3배 내지 4배 높은 부신 막에 대한 결합하는 증가된 친화성을 가짐을 시사한다. 부신 막에 대한 AT814의 친화성 증가는 MC-2R 리셉터 결합 친화성 증가를 나타낼 수 있다.

[0102] ACTH 유사체 화합물의 시험관내 테스트

[0103] 다섯번째 예에 있어서, ACTH 유사체 화합물은 시험관내 체외 조직에서 비변형 ACTH에 의한 코르티코스테론 유도를 감소시킬 수 있다. 체외 부신 막과 조합하는 경우, ACTH 유사체 화합물은 바람직하기로는 무혈청 배지에서 코르티코스테로이드 농도를 10 - 100% 감소시킨다. 바람직하기로는, ACTH 유사체 화합물은 비변형 ACTH 단독 투여시에 비해 시험관내 무혈청 부신 코르티코스테로이드 저해 분석에 의해 측정된 혈청 코르티코스테로이드 농도를 약 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 감소시킨다(실시예 4). 체외 부신 막을 비변형 ACTH에 노출시킴으로써 유도된 부신 호르몬 생산을 저해하는 예시적인 ACTH 유사체 화합물은, 부신 코르티코스테론 생산에 대한 ACTH 유사체 화합물의 직접적인 작용을 시사하는, 일련의 시험관내 무혈청 부신 코르티코스테론 저해 분석을 수행함으로써 동정하였다.

[0104] 일련의 개별적인 시험관내 무혈청 부신 코르티코스테로이드 저해 분석을 수행하여, ACTH 유도성 부신 호르몬 생산을 시험관내에서 저해하는 ACTH 유사체를 동정하였다. 코르티코스테론의 농도는 실시예 4에 따라 체외 부신 막 및 비변형 ACTH, AT814 ACTH유사체(서열번호 20) 또는 ACTH 및 AT841 조합을 각각 100 ng/mL로 포함하고 있는 무혈청 배양 배지에서 측정하였다. 표 3은 체외 마우스 부신 막을 이용하여 수행한 일련의 시험관내 무혈청 부신 코르티코스테론 저해 분석으로 측정한 무혈청 배지중의 코르티코스테로이드 농도를 나타낸다. 코르티코스테론 농도는 부신 막을 무혈청 M199 배지에 둔 후 2.0 시간후에 취하였으며, 5개의 샘플의 평균을 표 5의 각 코르티코스테론 농도로 나타내었다.

[0105] 표 5. ACTH 및 ACTH 유사체의 병용 투여

표 5

샘플	0시간	0.5시간	2.5시간
M199 배지	M199 무혈청 배지에서 조직 배양(모든 샘플에 적용됨)		278 mg/mL
ACTH		ACTH	600 mg/mL
AT814		AT814	290 mg/mL
ACTH + AT814		ACTH + AT814	396 mg/mL

[0107] 표 5에서, 마우스의 체외 부신의 반응을 실시예 4와 같이 30분간 M199 무혈청 배지(Invitrogen)에 두었다. "M199 배지" 샘플의 경우, 배양물에서 코르티코스테론 농도를 표준적인 RIA 방사분석 기법으로 측정하기 전에 처음 30분이 지난 후 총 2.0 시간(총 2.5시간)동안 M199 무혈청 배지에 침지하였다. "ACTH" 샘플의 경우, 비변형 ACTH를 M199 배지에 가하였으며, 그 결과 2시간 후에 배양 배지에서 코르티코스테론이 약 600 mg/mL 농도로 검출되었다. "AT814" 샘플의 경우, ACTH 유사체 (KKRRP15-19KRAAW) mACTH(1-24)(서열번호 20)을 M199 배지에 가하였

으며, 그 결과 2시간 후에 배양 배지에서 코르티코스테론이 약 290 mg/mL 농도로 검출되었다. "ACTH + AT814" 샘플의 경우, 100 ng/mL의 AT814 ACTH 유사체(서열번호 20) 및 100 ng/mL의 비변형 ACTH를 함께 M199 배지에 가하였고, 그 결과 2시간 후에 배양배지에서 코르티코스테론이 약 396 mg/mL 농도로 검출되었다. 도 4는 전술한 바 및 실시예 4에 나타난 바와 같이, "ACTH" 샘플(310), "AT814" 샘플(320), 및 "ACTH + AT814" 샘플(330)에 대한 M199 배양 배지에서 측정된 ACTH 양(310)에 상대적인 퍼센트로서, 표 3의 코르티코스테론 유도%(302)를 나타낸 그래프(300)이다. "M199 배지" 샘플은 도 2에 나타내지 않았다. 도 4에서, AT814를 M199 무혈청 배지에서부신 막에 첨가하면 무시할만한 수준으로 코르티코스테론이 유도되지만, AT814 ACTH 유사체와 비변형 ACTH를 동량으로 조합하여 첨가하면 비변형 ACTH 단독 첨가 경우에 비해 약 65%로 코르티코스테론 유도량이 감소된다.

[0108] **ACTH 유사체 화합물의 생체내 테스트**

[0109] 연장된 혈청 반감기를 가진 ACTH 유사체 화합물이 특정 적용에 바람직할 수 있다. ACTH 유사체 화합물은 선택적으로 비변형 ACTH 또는 다른 ACTH 유사체에 비해 ACTH 유사체의 혈청 반감기를 연장시킬 수 있는, 하나 이상의 아미노산 치환 또는 절단을 포함할 수 있다. 예컨대, ACTH 유사체 화합물은 ACTH 서열에 비해 상기 화합물의 혈청 반감기를 연장시키는 비변형 ACTH 서열의 25-39번 위치의 아미노산의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 바람직한 ACTH 유사체 화합물은 비변형 ACTH의 반감기에 비해 보다 우수한 혈청 반감기를 가질 수 있다. 혈중 ACTH의 반감기는 약 20분 보다 짧다. 따라서, 특히 바람직한 ACTH 유사체 화합물은 약 20, 30, 40, 또는 50분, 또는 그 이상의 혈청 반감기를 가진다.

[0110] 6번째 예에 있어서, 반감기가 연장된 ACTH 유사체를 제공한다. 반감기가 연장된 ACTH 유사체는 시험관내 활성으로 검출된 코르티코스테로이드의 무혈청 농도에 의해 측정된 제2 활성 보다 높은, 생체내 검출된 혈청 코르티코스테로이드의 농도에 의해 측정된 제1 활성을 가지는 것으로서 동정될 수 있으며, 상기 생체내 활성은 실시예 1의 혈청 부신 코르티코스테로이드 저해 분석에 의해 측정되며, 상기 시험관내 활성은 실시예 4의 시험관내 무혈청 부신 코르티코스테로이드 저해 분석에 의해 측정된다.

[0111] 다른 위치에서 아미노산 치환 또한 일부 경우에는 ACTH 유사체의 혈청 반감기를 증강시킬 수도 있지만, 특정 예는 hACTH 또는 mACTH를 포함하여 ACTH 분자의 20-24번 위치에서 하나 이상의 아미노산 변형에 의한 ACTH 유사체의 혈청 반감기 연장을 제공한다. 도 5는 7개의 ACTH 유사체 화합물들, 410, 420, 430, 440, 450, 460 및 470의 생체내 활성(회색 막대) 및 시험관내 활성(백색 막대)를 비교한 그래프이다. 7종의 ACTH 유사체 화합물 모두, 생체내 활성은 실시예 1의 방법으로 측정하였고, 시험관내 활성은 실시예 4의 방법으로 측정하였다. 그 결과는 mACTH(1-24) 서열(서열번호 2)에 상대적인 퍼센트로서 측정한 "% 코르티코스테론 유도" 막대 그래프(402)로서 제공된다. 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, "A1a 19-24"로 칭하는 샘플 460은 mACTH의 19-24번 위치의 아미노산 각각에 A1a 잔기 치환이 있는 ACTH 유사체(AAAAAA20-24VKVYP)ACTH(1-24)이다. 샘플 460은 본 화합물에 대해 측정된 시험관내 활성(464)에 비해 생체내(462) 측정된 반감기 증가를 보였으며, 비변형 mACTH의 시험관내 활성보다 약 50% 높았다. 더욱이, (AAAAA20-24VKVYP)ACTH(1-24) ACTH 유사체(460)의 생체내 활성은 mACTH와 다른 ACTH 유사체들, 410, 420, 430, 440, 450 및 470에 비해 더 높았다. 이러한 결과는 20-24번 위치의 아미노산 잔기들이 ACTH 유사체 화합물의 혈청 반감기를 결정하는 역할을 할 수 있음을 시사한다. ACTH의 20-24번 위치에 하나 이상의 아미노산 치환이 있는 ACTH 유사체 화합물이 특히 ACTH 보다 혈청 반감기를 연장시키는 데 바람직하다.

[0112] 또한, ACTH 유사체 화합물은 생체내(실시예 1) 또는 시험관내(실시예 4)에서 측정된 바와 같이, ACTH 유사체의 눈에 띄는 수준으로 코르티코스테론 유도 증가 또는 더 바람직하기로는 감소 없이도, 반감기를 연장시키는 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예컨대, ACTH 유사체, 410, 420, 430, 440, 450 및 470에서 15-19번 치환에 대한 코르티코스테론 유도는 비변형 mACTH(1-24)에 비해 ACTH 유사체의 생체내 및 시험관내 코르티코스테론 유도 활성 모두를 감소시켰다. 특히, ACTH 유사체 410은 시험관내 활성(414)가 생체내 활성(412)보다 높은 것으로 입증된 (K15A, R17A)mACTH(1-24) ACTH 유사체이며; ACTH 유사체 420은 시험관내 활성(424)가 생체내 활성(422)보다 높은 것으로 입증된 (K16A, R17A)mACTH(1-24) AGTH 유사체이며; ACTH 유사체 430은 시험관내 활성(434)가 생체내 활성(432)보다 높은 것으로 입증된 (K16A, R18A)mACTH(1-24) AGTH 유사체이며; ACTH 유사체 440은 시험관내 활성(444)가 생체내 활성(442)보다 높은 것으로 입증된 (K15Q, R17Q)mACTH(1-24) AGTH 유사체이며; ACTH 유사체 470은 시험관내 활성(474)가 생체내 활성 보다 높은 것으로 입증된(P19W, K21A)mACTH(1-24) ACTH 유사체이다.

[0113] **스크리닝 방법**

- [0114] 일곱번째 예는 또한 부신 긴장도를 유지하면서 과잉의 ACTH를 차단하는데 유용한 ACTH 유사체를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 다양한 ACTH 유사체를 제조하여 생체내 코티손 유도를 평가하기 위해 환자에 투여할 수 있다.
- [0115] 안정적인 콤플렉스를 형성하기 위한 특정 화합물의 분자 인식 특이성(즉, 항체에 의한 항원)은 용액중의 분석적인 면역 분석법 및 고상 인터페이스상에서의 면역센서법 둘다에서 역할을 할 수 있다. 이러한 분석적인 방법들은 타겟 분석물(즉, MC2R 리셉터에 결합하는 화합물) 및 매우 특이적인 결합제간의 리간드 결합 반응의 산물을 관찰을 토대로하는 리간드 결합 분석일 수 있다.
- [0116] 특정 예에서, 특히 민감한 스크리닝을 위해 아프타머(aptamer)와 같이 대안적인 분석물-결합성 화합물을 리간드 결합 분석에 적용할 수 있다. 아프타머는 고친화성 및 특이성으로 다양한 타겟 분자를 인식할 수 있는 능력을 가진, 단일가닥 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드 서열이다. 이러한 리간드 결합성 올리고뉴클레오타이드는 다양한 진단 포맷으로 항체의 특성을 모방한다. 이들은 타겟 구조에 대한 복잡한 결합 골을 형성하기 위해 독특한 전체적인 형태로 폴딩된다. 아프타머는 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)로 공지된 시험관내 선별 과정에 의해 동정된다. 아프타머는 감각 표면에 이들의 침착을 용이하게 하는데 항체 이상의 장점을 가질 수 있다. 더욱이, 어떠한 양에서도 재현성이 높은 합성 방법이기 때문에, 친화성 상수가 항원 보다 일관되게 낮고 이들 화합물의 안정성이 여전히 의심스럽더라도, 이들은 특히 복잡한 생물 기질에서 스크리닝하는데(즉, MC2R 결합에 특히 활성인 ACTH-(15-19) 및/또는 ACTH-(21) 위치에서 치환된 아미노산 잔기를 가지는 ACTH 유사체를 동정하는데) 사용할 수 있다.
- [0117] 대안적으로, 분자 임프린팅 기법을 사용하여 MC2R 활성에 작용하는 화합물 또는 방법을 스크리닝할 수 있다. 이는 특정 물질 또는 구조 유사체 군으로 선택적으로 사전 결정되는 폴리머성 흡착제 제조 방법을 기반으로 한 기법이다. 메타크릴릭 및 스티렌과 같은 플라스틱 물질의 기능적 및 가교성 모노머는 원형 리간드와 상호작용하도록 된 것으로 저에너지 상호작용을 형성한다. 이후, 중합이 유도된다. 이러한 과정중, 목적인 분자는 비공유, 자가-조립 방법으로, 또는 가역적인 공유결합 방법 중 어느 한가지 방법에 의해 원하는 분자가 폴리머 내에 포착된다. 중합을 중지시킨 다음 원형 분자를 씻어낸다. 수득되는 원형의 임프린트는 단단한 폴리머로 유지되며, 원형에 대한 입체적(크기, 형태) 및 화학적(보완 기능성 특수 정렬(special arrangement of complementary functionality)) 메모리를 보유한다. 분자로 임프린팅된 폴리머(MIP)는 항원-항체 상호작용과 유사한 특이성으로 원형(=분석물)에 결합할 수 있다.
- [0118] 고상 추출 및 색층분석에서의 주된 이용 뿐만 아니라, 분자로 임프린팅된 폴리머는 경쟁적인 결합 분석에서 항원에 대한 비-생물적인 대체물로서 사용될 수 있다. 전형적인 생물 세포가 성장하는 동안, 글루코스과 같은 탄소 함유 영양분을 흡수하고, 락산과 같은 산성 대사산물을 방출한다. 마이크로피지오미트리(microphysiometry)에서, 이러한 대사율 변화는 세포 주변 배지의 산성화를 변화로서 기록된다(즉, Raley-Susman, K.M. et al., "Effects of excitotoxin exposure on metabolic rate of primary hippocampal cultures: application of silicon microphysiometry to neurobiology", *J Neurosci.*, 12(3):773-780(1992); Baxter, G.T. et al., "PKC ϵ is involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signal transduction: evidence from microphysiometry and antisense oligonucleotide experiments", *Biochemistry*, 31:19050-10954 (1992); Bouvier, C. et al., "Dopaminergic activity measured in D₁- and D₂-transfected fibroblasts by silicon microphysiometry", *J. Recept. Res.*, 13(1-4):559-571(1993); and McConnell, H.M. et al., "The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology", *Science*, 257:1906-1912(1992)). 마이크로피지오미트리를 사용하여 세포에 작용하는 분자를 검출할 수 있다. 이러한 분자로는 뉴로트랜스미터, 성장 인자, 사이토카인, 리셉터 등을 포함한다. 따라서, 마이크로피지오미트리 방법은 MC2R 리셉터 활성에 작용하는 ACTH 유사체에 대한 쓸모있는 정보를 제공할 수 있다.
- [0119] 합성 조합 라이브러리는 대규모의 생화학적 스트리닝에 유용한 다양한 구조 공급원일 수 있다(즉, Sastry, L. et al., "Screening combinatorial antibody libraries for catalytic acyl transfer reactions", *Ciba Found Symp.*, 159:145-155(1991); Persson, M.A.A. et al., "Generation of diverse high-affinity monoclonal antibodies by repertoire cloning", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 33:2432-2436(1991); and Houghten, R.A., "Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery", *Nature*, 354:84-86 (1991)). 이러한 라이브러리들은 용액 및 고상 화학의 조합에 의해 제조되며, 스크리닝에서 고체 지지체를 절단 제거한다.
- [0120] 질량 분석계 또는 이단계 질량 분석계와 연계된 액체 색층 분석, 가스 색층분석 및 모세관 전기영동과 같은 분

리 기법은 구조 조사에 이용가능한 분석 시스템을 형성한다(즉, Hsieh, S. *et al.*, "Separation and identification of peptides in single neurons by microcolumn liquid chromatography-Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and postsource decay analysis", *Anal Chem.*, 70(9):1847-1 852 (1998); Tretyakova, N.Y. *et al.*, "Quantitative analysis of 1,3-butadiene-induced DNA adducts *in vivo* and *in vitro* using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry", *J. Mass Spectrom.*, 33:363-376 (1998); and Taylor, G.W. *et al.*, "Excursions in biomedical mass spectrometry", *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 41:11 9-126 (1996)). 질량 분석계는 특히 화합물/분자의 중량에 대한 정보를 제공하는데 유용하다. 거대 분자의 정밀하고 조절된 단편화로 서열에 대한 정보를 추출하는 것도 가능하다.

[0121] 서열번호 2 또는 1의 비변형 ACTH 보다 낮게 부신 막에 의한 코르티코스테로이드 분비를 유도하는 ACTH 유사체 화합물을 동정하기 위한 ACTH 유사체 화합물을 스크리닝하는 방법은 ACTH 유사체와 부신 막을 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. ACTH 유도성 코르티코스테로이드 분비를 감소시키는 화합물을 동정하기 위한 ACTH 유사체 화합물의 스크리닝 방법은 하기 단계들 중 한 단계 이상을 포함할 수 있다:

[0122] a. 제1 부신 막 및 제2 부신 막을 제공하는 단계;

[0123] b. 상기 제1 부신 막에 비변형 ACTH 펩티드를 포함하는 비변형 펩티드를 함유하고 있는 제1 조성물과 접촉시킨 다음, 비변형 ACTH 펩티드와 접촉한 후 상기 제1 부신 막에 의해 분비된 제1 코르티코스테로이드 농도를 측정하는 단계;

[0124] c. 상기 제2 부신 막을 ACTH 유사체를 포함하는 제2 조성물과 접촉시키고, ACTH 유사체 접촉 이후에 상기 제2 부신 막에 의해 분비되는 제2 코르티코스테로이드 농도를 측정하는 단계;

[0125] d. 상기 분비된 제1 코르티코스테로이드 농도 및 상기 분비된 제2 코르티코스테로이드 농도를 비교하는 단계; 및

[0126] e. 상기 제2 화합물이 상기 제2 화합물보다 코르티코스테로이드 분비를 약하게 유도하는지를 결정하는 단계.

[0127] 변형된 ACTH 펩티드는 바람직하기로는 서열번호 2 또는 서열번호 1의 펩티드이다.

[0128] 제1 부신 막 및 제2 부신 막은 개체내에 위치될 수 있으며, 코르티코스테로이드 농도는 개체의 혈액에서 측정할 수 있다(생체내 분석). 대안적으로, 상기 제1 부신 막 및 상기 제2 부신 막은 개체로부터 외식되며, 코르티코스테로이드 농도는 무혈청 배지에서 측정된다(시험관내 분석). 생체내 저해 분석 단계 또는 시험관내 경쟁적인 결합 분석 단계를 포함하는 스크리닝 분석은 또한 하기 단계를 포함할 수 있으며, 하기 단계는 단계(c)와 치환되거나 또는 단계 (c)와 단계(d) 사이에 수행하는 것이 바람직하다:

[0129] a. ACTH 펩티드를 포함하는 제1 조성물과 ACTH 유사체를 포함하는 제2 조성물을 제2 부신 막과 동시에 접촉시킨 다음, 상기 제2 부신 막에 의해 분비된 제2 코르티코스테로이드 농도를 측정하는 단계.

[0130] 스크리닝 분석은 혈청 코르티코스테로이드 유도 분석, 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석, 부신 결합 분석 또는 무혈청 부신 저해 분석과 같은 개시한 분석들을 포함하여, 한가지 이상의 다른 분석을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 단계를 다르게 명시되어 있지 않는한 임의의 순서로 수행할 수 있다.

[0131] **ACTH 유사체 조성물 및 투여**

[0132] ACTH 유사체는 환자에서 ACTH 과다 발현과 관련된 상태를 포함하여, 다양한 ACTH 관련 상태를 치료하기 위한 약학 조성물에 병합될 수 있다.

[0133] 표현 "제약학적으로 허용가능한" 또는 "약학적으로 허용가능한"은 의학적 판단 범위내에 속하며, 과잉의 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 그외 문제나 합병증이 없이 인류 및 동물의 조직에 접촉하여 사용하기에 적합하며, 합리적인 위험성과 유익성 비가 적당한, 리간드, 물질, 조성물 및/또는 투약 형태에 동일한 의미로 언급된다.

[0134] 치료에서 사용되는 ACTH 유사체 펩티드와 같은 화합물의 "치료학적 유효량"은 적합한 투약 요법의 일부분으로서 (포유류 또는 어류와 같은 척색 동물에) 투여하였을때, 증상을 완화시키고, 상태를 향상시키거나 치료되는 질병 또는 상태 또는 미용 목적에 대한 임상적으로 수용가능한 표준치에 따라 질병 상태의 개시를 늦추는, 예컨대 임의의 의학 치료제에 적용가능한 합리적인 위험성과 유익성 비를 가지는 조제물내의 폴리펩티드 또는 펩티드의 양을 나타낸다.

- [0135] 용어 "치료" 또는 이의 모든 변형어(즉, 치료(treatment), 치료(treating))는 본원에서 하기를 의미하며, 하기를 포함한다: 1) 이러한 질환 또는 상태로 예측될 수 있지만 아직 걸린 것으로서 진단되지 않은 환자에서 발생되는 ACTH 고농도와 관련있는 질환 또는 상태 예방; 2) 고농도의 ACTH와 관련있는 질병 또는 상태 저해, 예컨대 그것의 발생 중지; 또는 3) 고농도의 ACTH와 관련있는 질환 또는 상태 경감, 예컨대 질환 또는 상태 퇴행 유발.
- [0136] "환자" 또는 "개체"는 본 발명에 따라 치료가 제공되어지는 유기체, 바람직하기로는 포유류, 어류 또는 조류 종과 같은 척색 동물을 의미한다. 언급한 ACTH 유사체 및 치료 방법이 이로운 포유류 종들로는, 유인원, 침팬치, 오랑우탄, 인간, 원숭이; 가축(예, 애완동물), 예컨대 개, 고양이, 마우스, 랫, 기니아피그 및 햄스터가 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 어류 종으로는 연어 및 그외 양식업에 사용되는 종들이 있다.
- [0137] 용어 "ACTH 관련 상태"는 ACTH 매개 코르티코스테로이드 또는 코르티코스테로이드 농도 조절, ACTH의 부신 막 결합성 조절 또는 MC-2R과 같은 ACTH 리셉터의 조절에 의해, 또는 반응하는, 특정 멜라노코르틴 리셉터 관련 상태를 포함하여, 상태, 질병, 증상 또는 질환을 언급하는데 사용된다.
- [0138] 용어 "멜라노코르틴 리셉터 관련 상태"는 본원에서 개체에서 ACTH에 결합하는 리셉터의 조적에 의해 및/또는 코르티코스테로이드 농도 조절에 의해 치료될 수 있는 상태, 질병 또는 질환을 나타낸다. ACTH 관련 상태는 "MC-2R 관련 상태" 또는 MC-2R 리셉터의 조절에 의해 치료될 수 있는 상태, 질환 또는 질병을 포함할 수 있다. 바람직하기로는, MC-2R 관련 상태는 내인성 ACTH에 의한 코르티코스테로이드 분비 농도에 비해 코르티코스테로이드 분비 농도를 감소시키는, ACTH 유사체를 MC-2R 리셉터와 결합시킴으로써 치료할 수 있다.
- [0139] 본 발명의 방법을 이용하여 동정한 화합물의 거울상 이성질체 형태 및 부분입체 이성질체 형태를 포함한 모든 입체 이성질체는, 본 발명의 범위에 포함된다. 본 발명의 화합물들의 각 입체이성질체는 예컨대 다른 이성질체가 실질적으로 없거나 또는 라세믹체로서 또는 다른 모든 입체이성질체나 다른 선택된 입체 이성질체와 함께 혼성될 수 있다. 본 발명에 의해 동정된 화합물의 키랄 중심은 IUPAC 1974 권고안에 정의된 바와 같이 S 또는 R, 또는 D 또는 L 배위를 가질 수 있다.
- [0140] *여덟번째 예로, 본 발명은 ACTH 유사체를 포함하는 약학 조성물 및 ACTH 관련 상태와 관계된 증상 치료와에 상응하는 방식으로 개체에 이를 투여하는 것에 관한 것이다. 투여 경로는 공지 방법에 있어서 선택할 수 있다. ACTH 유사체는 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물의 일부분으로서 채택될 수 있다. ACTH 농도 증가와 관련된 질환 또는 상태를 치료하기 위해 본 발명의 ACTH 유사체 한가지 이상을 포함하는 상기 약학 조성물은, 예컨대, 공지의 고체 또는 액체 비히클이나 희석제 뿐만 아니라 원하는 투여 모두에 적합한 타입의 약학적 첨가제(예, 부형제, 결합제, 보존제, 안정화제, 향료)를 사용함으로써 약학 제형 분야에 잘 알려져 있는 기법과 같은 기법에 따라 제형화할 수 있다.
- [0141] ACTH 유사체를 포함하는 약학 조성물은 임의의 적합한 수단으로 투여할 수 있다. 예컨대, ACTH 유사체를 포함하는 조성물은 피하, 정맥내, 근육내 또는 수조내 주사(intracisternal injection)나 주입 기법(예, 멸균 주사액 또는 비수계 용액 또는 현탁액); 흡입 스프레이와 같은 코로; 크림 또는 연고 형태와 같은 국소로; 및 무독성의 제약학적으로 허용가능한 비히클 또는 희석제를 함유하는 투약 단위 제형에 의한 주입에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 ACTH 유사체는 예컨대 즉시 방출 또는 연장된 방출에 적합한 형태로 투여될 수 있다. 즉시 방출 또는 연장된 방출은 본 발명의 ACTH 유사체를 포함하는 적정 약학 조성물의 사용에 의해, 또는 특히 연장된 방출 경우에 피하 임플란트 또는 삼투성 펌프와 같은 기구의 사용에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 ACTH 유사체는 리포솜 형태로 투여될 수도 있다.
- [0142] 본 발명의 ACTH 유사체 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물은 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있으며, ACTH 유사체 산물은 제약학적으로 허용가능한 담체 비히클과 혼합물로 조합된다. 예방적 및 치료적 치료제로 사용될 수 있는 조성물은 하나 이상의 ACTH 유사체 화합물과 적용 수단(예, 주사가 가능한 담체 시스템, 코내 또는 경피 모드)을 포함한다.
- [0143] 본원에서 "담체"는 제약학적으로 허용가능하며 사용되는 투여량 및 농도에 노출되는 세포 또는 개체에 무독한 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 상기 표면 "제약학적으로 허용가능한 담체"는 본원에서 신체의 한가지 기관이나 부분으로부터 신체의 다른 기관이나 부분으로 대상 화합물을 운반 또는 수송하는데 관여하는, 액상 또는 고상 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화성 물질과 같은, 제약학적으로 허용가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다. 각 담체는 환자에게 해롭지 않으며 실질적으로 비-발열성이며 제형의 다른 성분들과 상용가능한 의미에서 "허용가능한" 것이어야 한다. 제약학적으로 허용가능한 담체로서 제공할 수 있는 물질의

일부 예로는 (1) 락토스, 글루코스 및 슈크로스와 같은 당; (2) 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; (3) 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 셀룰로스 및 이의 유도체; (4) 카가칸트(kagacanth) 분말; (5) 말트; (56) 젤라틴; (7) 탈크; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; (9) 오일, 예컨대 땅콩 오일, 면실유, 잇꽃기름, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 콩기름; (10) 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; (11) 폴리에틸렌, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; (12) 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; (13) 아가; (14) 완충화제, 예컨대 마그네슘 하이드록사이드 및 알루미늄 하이드록사이드; (15) 알긴산; (16) 피로겐 결핍성 물; (17) 등장성 염수; (18) 링거 용액; (19) 에틸 알콜; (20) 포스페이트 완충액; 및 (21) 그외 약학 제형에 사용되는 무독성의 혼용가능한 물질이 있다. 특정 예에 있어서, 본 발명의 약학 조성물은 비-발열성, 즉 환자에게 투여하였을 때 현저한 체온 상승을 유도하지 않는다. 종종, 생리학적으로 허용가능한 담체는 수계 pH 완충화된 용액이다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용체에 무독성이며, 포스페이트, 사이트레이트 및 다른 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산을 포함한 항산화제; 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 친수성 폴리머, 예컨대 폴리피닐피롤리돈, 아미노산 또는 노르루신 또는 오르니틴과 같은 아미노산 유도체; 단당류, 이당류 및 그외 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당 알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 소듐; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEENTM, PLURONICSTM 또는 PEG를 포함한다. ACTH 유사체에 대한 임의의 담체는 일반적인 방식으로 제조될 수 있다. 그러나, 담체에 알콜을 사용한다면, ACTH 유사체는 마이셀, 리포솜 또는 "역" 리포솜의 내부에 있어, ACTH 유사체의 변성이 방지되어야 한다. 유사하게, ACTH 유사체가 담체내에 위치되고 담체가 가열 또는 가열된 경우, ACTH 유사체의 열 변성을 막기 위해, 담체가 어느 정도 냉각된 후에 위치화가 이루어져야 한다. 담체는 바람직하기로는 멸균 상태이다. 하나 이상의 ACTH 유사체는 액체 형태 또는 동결건조된 상태에서 이러한 물질에 첨가될 수 있으며, 그 결과로 액체 바디(liquid body)에 접하게 되면 가용화될 것이다.

[0144] 변형된 ACTH 유사체가 담체와 조합될 수 있기 전에 또는 조합되었을 때, ACTH 유사체는 pH 약 5.0, 6.0, 7.0, 8.0을 포함하는 약 4.0 내지 약 9.0이나 또는 pH 5.2, 6.5, 7.4, 7.5 및 8.5를 포함하는 0.05 배수의 임의의 간격과 같이 약학적으로 적합한 pH 범위를 유지하기 위해 안정화 완충제 환경내에 일 수 있다. 치료 제형은 원하는 순도 수준의 ACTH 유사체 활성 성분을 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 동결 제형이나 수용액 형태로 혼합함으로써, 보관용으로 제조할 수 있다. 안정화 완충제는 ACTH 유사체의 최적 활성을 가능하게 하여야 한다. 완충제는 디티오프라이트와 같은 환원제를 함유할 수 있다. 또한, 안정화 완충제는 에틸렌디아민테트라아세트산 디소듐 염과 같은 금속 킬레이트제를 포함하거나 할 수 있으며, 또는 포스페이트, 사이트레이트 포스페이트 완충제 또는 그외 다른 완충제를 함유할 수도 있다.

[0145] 본 발명에 사용되는 화합물의 유효량은 당업자라면 결정할 수 있다. ACTH 유사체(들)의 유효 투약량 또는 유효량은 ACTH 유사체(들)가 치료학적으로 또는 예방학적으로 사용될 것인지의 여부에 따라, 감염성 세균에 수용체가 노출된 기간에 따라, 개체의 신장 및 체중에 따라, 의학적인 판단 범위내에 속하는 그외 고려사항에 따라 부분적으로 결정될 것이다. 또한 ACTH 유사체를 함유하는 조성물의 사용 기간도 예방 목적으로 단기간동안 매시간, 매일 또는 매주 사용되는지, 또는 보다 집중적으로 사용하는 요법이 필요하여 상기 조성물을 수시간, 수일간 또는 수주간 지속적으로 및/또는 매일 또는 하루동안 정해진 간격으로 지속적으로 사용할 수 있는 치료학적 목적으로 사용될 것인지에 의존적이다. 채택되는 어떠한 투약 형태도 최소 시간동안 최소 단위 수로 제공하여야 한다. 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량 및 적합한 약물 농도는 예상되는 특정 용도에 따라 변경될 것이다. 예컨대, 본 발명의 ACTH 유사체를 쿠싱 증후군 또는 조기 분만을 치료하기 위해 환자에게 투여하는 경우, 성인을 기준으로 투여량의 예는 1일당 활성 화합물 약 0.001 내지 100 mg/kg(체중)이며, 이는 1회 투약이나 또는 하루에 1 내지 4번과 같이 분할 투약으로 투여될 수 있다. 특정 화합물의 구체적인 투약 수준 및 투약 빈도는 사용되는 특정 화합물의 활성, 상기 화합물의 대사 안정적 및 작용 기간, 중, 나이, 체중, 전반적인 건강, 환자의 성별과 식이, 투여 모두 및 시간, 배출율, 약물 조합 및 특정 상태의 심각도를 포함한 여러가지 인자들에 따라 변경되며 의존적일 것이다.

[0146] 적절한 투여량 및 투여 경로 결정은 일반 의사의 능력내에서 충분하다. 동물 실험은 인간 치료에 유효한 투여량을 결정하는 신뢰할 수 있는 지침을 제공한다. 유효 투여량의 중간 감축(Interspecies scaling)은 Mordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics In Toxicokinetics and New Drug Development", Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96에 규정된 원칙에 따라 수행할 수 있다. ACTH 유사체의 유효량 또는 투여량을 제공할 수 있는 ACTH 유사체의 활성 단위 농도는 코 또는 구강

통로의 젖거나 또는 습한 환경에서는 유동액의 약 10 units/ml 내지 약 500,000 units/ml일 수 있으며, 국소의 경우도 동일하며, 가능하게는 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100 units/ml 내지 약 50,000 units/ml의 범위일 수 있다. 따라서, 대표적인 값은 약 200 units/ml, 300 units/ml, 500 units/ml, 1,000 units/ml, 2,500 units/ml, 5,000 units/ml, 10,000 units/ml, 20,000 units/ml, 30,000 units/ml, 및 40,000 units/ml이다. 보다 구체적으로는, 활성 ACTH 유사체 단위에 대한 노출 시간은 ml 당 활성 ACTH 유사체 단위의 적합한 농도에 영향을 미칠 수 있다. 시험관내 투여로 사용되는 제형은 멸균인 것이 바람직하다. 이는 멸균 여과 막을 통과시키는 여과에 의해, 동결건조 및 재구성하기전에 또는 한 후 용이하게 실현된다. 본원의 치료 조성물은 일반적으로 멸균 접근 포트(sterile access port)가 있는 컨테이너, 예컨대 정맥 용액 백 또는 피하 주사 바늘로 관통가능한 스텝퍼가 있는 바이얼내에 위치된다.

[0147] ACTH 유사체를 포함하는 약학 조성물의 예는 주사용 조성물, 적정 시간동안 ACTH 유사체의 지속적인 방출을 제공하는 조성물, 주사가능한 젤, 이식가능한 의료기구용 코팅제, 점막부착성 조성물, 코 흡입 조성물 또는 다른 흡입가능한 조성물을 포함한다.

[0148] 일부 예에 있어서, ACTH 유사체는 근육내 또는 정맥내 주입에 의해 투여될 수 있다. 예로, ACTH 유사체는 근육내, 정맥내, 피하, 진피하, 진피내 또는 이들의 조합 경로로 투여될 수 있다.

[0149] 주사용 조성물은 바람직하기로는 적합한 담체 및 하나 이상의 ACTH 유사체 화합물을 포함한다. 상기 담체는 증류수, 염수, 알부민, 혈청 또는 이들의 조합물로 구성될 수 있다. 근육내 주사를 투여 방식으로 선택한 경우, 등장성 제형을 사용할 수 있다. 일반적으로, 등장을 위한 첨가제로는 소듐 클로라이드, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨 및 락토스가 있다. 일부 경우, 등장성 용액, 예컨대 포스페이트 완충화된 염수가 사용된다. 안정화제로는 젤라틴과 알부민이 있다. 일부 예에서, 혈관수축제를 상기 제형에 첨가한다. 약학 조성물은 멸균 및 발열원이 결핍된 상태로 제공된다. 일반적으로, 전술한 바와 같이, 정맥내 주사가 가장 적절할 수 있다. 비경구 투여용 조성물의 예로는 예컨대 적합한 무독성 비경구로 허용가능한 희석제 또는 용매, 예컨대 만니톨, 1,3-부탄디올, 물, 링거액, 등장성 소듐 클로라이드 용액 또는 그외 적정 분산제, 습윤제, 현탁제, 예컨대 합성 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 및 지방산, 예컨대 올레산을 포함할 수 있는, 주사용 용액 또는 현탁액을 포함한다. 글리세린 또는 글리세롤(1,2,3 프로판트리올)은 제약학적 이용을 위한 일반적으로 이용가능한 담체이다. 글리세린 또는 글리세롤은 멸균수 또는 소듐 클로라이드 주사액 또는 그외 제약학적으로 허용가능한 수계 주사액 중에 희석될 수 있으며, 0.1 내지 100% (v/v), 1.0 내지 50% 또는 약 20%의 농도로 사용될 수 있다. DMSO는 국소 적용된 수많은 약물의 침투를 증강시킬 수 있는 비양성자성 용매이다. DMSO는 주사용 멸균수, 소듐 클로라이드 주사액 또는 다른 제약학적으로 허용가능한 수계 주사액중에 희석될 수 있으며, 0.1 내지 100%(v/v)농도로 사용할 수 있다. 또한, 비히클은 링거액, 완충화된 용액 및 텍스트로스 용액을, 특히 정맥내 용액 제조시에 함유할 수 있다.

[0150] ACTH 유사체를 담체 시스템에 넣기 전에 또는 넣는 시점에, ACTH 유사체는 적합한 pH 범위를 유지하는 안정화성 완충제 환경에 있는 것이 적합할 수 있다. 상기 안정화 완충제는 ACTH 유사체의 최적 활성을 허용하여야 한다. 상기 완충제는 환원제, 예컨대 디티오프라이트일 수 있다. 또한, 안정화 완충제는 에틸렌디아민테트라아세트산 디소듐 염과 같은 금속 킬레이트제이거나 이를 포함할 수 있으며, 또는 포스페이트나 사이트레이트 포스페이트 완충제를 함유할 수도 있다. 담체에서 발견되는 완충제를 ACTH 유사체를 위한 환경을 안정화시키도록 제공할 수 있다.

[0151] 담체는 선택적으로 등장 및 화학적 안정성을 강화시키는 물질과 같은 첨가제를 소량 포함할 수 있다. 이러한 물질들은 사용하는 투여량 및 농도에서 수용체에 무독성이며, 완충제, 예컨대 포스페이트, 사이트레이트, 숙시네이트, 아세트산 및 그외 유기산 또는 이들의 염; 항산화제, 예컨대 아스코르브산; 저분자량(약 10개 미만의 잔기를 가지는) 폴리펩티드, 예, 폴리아르기닌 또는 트리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머, 예컨대 폴립비닐피롤리돈; 글리신; 아미노산, 예컨대 글루탐산, 아스파르트산, 히스티딘 또는 아르기닌; 단당류, 이당류 및 그외 탄수화물, 예컨대 셀룰로스 또는 그의 유도체, 글루코스, 만노스, 트레할로스 또는 텍스트린; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당 알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 반대이온, 예, 소듐; 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트, 폴록사민 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG); 및/또는 제약학적으로 허용가능한 염, 예, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, 등을 포함한다.

[0152] "제약학적으로 허용가능한 염"은 저해제의 비교적 무독성, 무기 및 유기 염기 부가염을 의미한다. 이들 염은 상기 저해제를 최종 분리 및 정제하는 동안 그 자리에서 제조하거나, 또는 그것의 유리 염기중에서 정제한 저해제를 적합한 유기 또는 무기산과 개별적으로 반응시킨 다음 그로인해 형성된 염을 분리함으로써 제조할 수

있다. 대표적인 예로는, -14 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 설페이트, 바이설페이트, 포스페이트, 나이트레이트, 아세테이트, 발레레이트, 올레이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 라우레이트, 벤조에이트, 락테이트, 포스페이트, 토실레이트, 사이트레이트, 말레이트, 푸마레이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 나프틸레이트, 메실레이트, 글루코헵토네이트, 락토비오네이트, 및 라우틸설페네이트 염 등이 있다(예, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19 참조.). 다른 경우들에서, 본 발명에 방법에 사용가능한 저해제는 하나 이상의 산성 관능기를 함유할 수 있으며, 따라서 제약학적으로 허용가능한 염기들과 제약학적으로 허용가능한 염을 형성할 수 있다. 이러한 경우에서 용어 "제약학적으로 허용가능한 염"은 저해제의 비교적 무독성, 무기 및 유기 염기 부가염을 의미한다. 이러한 염은 상기 저해제를 최종 분리 및 정제하는 동안 그 자리에서 제조하거나, 또는 그것의 유리 염기중에서 정제한 저해제를 적합한 염기와 각각 반응시킴으로써, 예컨대 제약학적으로 허용가능한 금속 양이온과 암모니아나 또는 제약학적으로 허용가능한 유기 일차, 이차, 삼차 아민의 하이드록사이드, 카보네이트 또는 바이카보네이트를 제조할 수 있다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토금속 염으로는 리튬, 소듐, 포타슘, 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄 염 등이 있다. 염기 부가염의 제조에 유용한 대표적인 유기 아민으로는 에틸아민, 디에틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 테이탄올아민, 피페라진 등이 있다(예, Berge et al., supra).

[0153] ACTH 유사체를 포함하는 주사용 약학 제형은 선택적으로 항미생물제, 항염증제, 항바이러스제 또는 국소 마취제를 포함하여 다른 치료제를 포함할 수 있다. 국소 마취제로는 테트라카인, 테트라카인 하이드로클로라이드, 이도카인, 리도카인 하이드로클로라이드, 디클로닌, 디클로닌 하이드로클로라이드, 디메티소퀸 하이드로클로라이드, 디부카인, 디부카인 하이드로클로라이드, 부탐벤피크레이트 및 프라목신 하이드로클로라이드가 있다. 국소 마취제의 농도의 예는 총 조성물의 중량에 약 0.025% 내지 약 5%이다. 또한 벤조카인과 같은 마취제는 약 2 내지 25 중량%의 바람직한 농도로 사용할 수 있다.

[0154] 또한, 약학 조성물은 다양한 농도에서 스테로이드 호르몬의 합성을 억제(즉, 스테로이드 호르몬 합성이 다양한 단계들을 촉매하는 효소 저해)하기 위해 하나 이상의 부가적인 생활성제를 선택적으로 포함할 수 있으며, 생활성제는 a) 디페닐메탄 유도체들, 예, 암페논 B(하이드록실라제의 11-베타, 17- 및 21- 단계에서 스테로이드 호르몬의 합성을 억제함); b) 피리딘 유도체(SU-c 시리즈), 예, 메티라폰(하이드록실라제의 11-베타 단계에서 합성을 억제함); c) 치환된 알파, 알파-글루카르아미드, 예, 아미노글루테티미드(20-알파-하이드록실라제 및 C20, C22-리아제의 억제를 통해 콜레스테롤로부터 프레그네놀론의 합성 지연시킴); d) 스테로이드 물질, 예, 트릴로스탄(3 베타-치환된 스테로이드-3베타-하이드록시-5-안드로스텐-17-온), 이는 3 베타-데옥시스테로이드하이드로게나제-5.4-이소머라제를 억제함(Steroids, vol.32, p.257); e) 신속 해리성 항-미네랄로코르티코이드로서 사용되는 스피로놀락톤 패밀리의 스테로이드(PNAS USA 71(4) p.1431-1435 (1974)); f) 신장(Z.Naturforsch., 45b, p.711-715 (1990)) 및 타입 II GR이 아닌 시상하부 타입 I MR(Life Science, 59, p.511-21(1996))에 대해 특이적인 결합 특성을 보이는 항-미네랄로코르티코이드로서 언급된 합성 스테로이드를 포함하여, J. Steroid Biochem., vol. 5, p.501(1974)에서 검토된 생활성제가 있다.

[0155] ACTH 유사체는 글루코코르티코이드 호르몬과 호르몬 리셉터 사이의 상호작용을 특히 억제하는 생활성제와 함께 선택적으로 투여될 수 있으며, 상기 생활성제로는, a) 글루코코르티코이드 작용을 이끄는 기작을 개시할 수 없는 콤플렉스를 형성하기 위해 글루코코르티코이드 호르몬의 리셉터상에 작용하는, 미페프리스톤(11 β , 17 β)-11-[4-(디메틸아미노)페닐]-17-하이드록시-17-(1-프로피닐)에스트라-2,9,-디엔-3-온(Annals of New-York Academy of Science, vol. 761, p.296-310 (1995)); 상기 화합물은 또한 콘트라게스티브 제제(contragestive agent)로 공지되어 있음(RU38486 또는 RU486); b) 비-스테로이드 물질(J.Steroid Biochem., vol. 31, p.481-492 (1988)), 예컨대 드로타베리나 하이드로클로라이드(이소퀴놀린-1-(3.4-디에톡시벤 질리덴)-6.7-디에톡시-1,2,3,4-테트라하이드리조퀴놀린) 또는 아세틸살리익산(Moskovskava Meditsina, 1990, "Receptor mechanisms of the glucocorticoid effect" by V. P. Golikov)가 있다. 임상적인 세팅에 사용되어져온 항-글루코코르티코이드(예, 미페프리스톤)는 비너하수체 쿠싱 증후군의 수술할 수 없는 사례를 치료하기 위한 것이다. (항-프로게스테론 및 항-글루코코르티코이드 둘다) 미페프리스톤의 경우, 고투여량(1일당 800 mg까지)이 필요할 수 있다. 활성은 증가시키면서 교차-반응성과 부적절한 부작용은 감소시키는 진신 적용 전략을 채택하여, 특히 항-에스트로겐 및 항-안드로겐 분야에서 효과와 선택성이 보다 우수한 새로운 항-호르몬제 개발에 인상적인 진전이 보고되었다.

[0156] 비경구 투여되는 ACTH 유사체의 유효한 투약율 또는 투여량과 치료 기간은 감염의 심각성, 환자 체중, 수용체가 감염성 세균에 노출된 기간, 감염의 심각도 및 그외 다수의 다양한 변수에 일정부분 의존할 것이다. 조성물은 하루에 한번 내지 수차례 어느 부위라도 적용할 수 있으며, 단기간 또는 장기간 적용될 수 있다. 사용은 단일

이나 수주간 지속될 수 있다. 사용되는 임의의 투약 형태는 최소 시간동안 최소 단위 수로 제공로 제공하여야 한다. ACTH 유사체의 활성 단위 농도는 조성물의 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100 units/ml 내지 약 10,000,000 units/ml, 약 1000 units/ml 내지 약 1 0,000,000 units/ml, 및 약 10,000 내지 10,000,000 units/ml 범위일 수 있다. ml 당 활성 단위량과 노출 지속 시간은 감염 특성에 따라 결정되며, 담체 접촉량은 ACTH 유사체를 가지게 한다. ACTH 유사체는 유동액 환경에서 최상으로 작용하는 것으로 기억된다. 그래서, ACTH 유사체의 효능은 담체에 의해 포착된 수분량과 부분적으로 관련있다. 치료시 ACTH 유사체의 농도는 혈중 세균수 및 혈액 부피에 의존적이다.

[0157] ACTH 유사체의 생체내 투여를 적용할때, 정상 투여량은 투여 경로에 따라 1일당 약 10 ng/kg에서 최대 100 mg/kg(체중) 또는 그 이상이거나 약 1 μ/kg/day 내지 10 mg/kg/day이다. 또한 하기 및 문헌에 특정 투여량 및 전달 방법에 대한 지침이 제공된다. 여러가지 제형들은 다른 치료 화합물 및 상이한 질환에 효과적일 것이므로, 하나의 기관이나 조직을 표적으로하는 투여는 예컨대 다른 기관이나 조직과는 다른 방식으로 전달되는 것이 필수적일 수 있을 것으로 생각된다.

[0158] 주입 또는 주사용 약학 용액은 예컨대 p-하이드록세벤조에이트와 같은 보존제나 에틸렌디아민 테트라아세트산의 알칼리 금속염과 같은 안정화제의 첨가로 통상적인 방식으로 제조할 수 있으며, 이는 이후 용합 혈관, 주사 바이얼 또는 앰플에 이동시킬 수 있다. 대안적으로, 주사용 화합물은 다른 성분과 함께 또는 첨가없이 동결건조하여, 사용시에 완충화된 용액 또는 증류수에 적절히 용해시킬 수 있다. 불휘발성 오일, 리포솜 및 에틸 올레이트와 같은 비수계 비히클도 사용가능하다.

[0159] 부가적으로, 수많은 방법을 사용하여 ACTH 유사체가 세포막을 통과하여 이동하는 것을 보조할 수 있다. ACTH 유사체를 리포솜내로 이동시켜 공지 기법에 의해 리포솜에 "삽입된" ACTH 유사체일 수 있다. 유사하게, ACTH 유사체는 뒤집힌 마이셀(reverse micelle) 내에 있을 수 있다. 또한, ACTH 유사체는 폐결하되어, ACTH 유사체의 비활성부에 폴리에틸렌 글리콜이 부착되어 있을 수 있다. 대안적으로, 소수성 분자를 사용하여 ACTH 유사체를 세포막을 통과시킬 수 있다. 마지막으로, ACTH 유사체의 당화를 사용하여 세포 막상에 특이적인 내재 리셉터를 표적으로 할 수 있다.

[0160] 조절성 방출 능력이 있는 물질이 특히 임의 치료 방법에 적합할 수 있다. ACTH 유사체는 적정 기간동안 ACTH 유사체 화합물을 지속적으로 방출을 제공하는 폴리머와 같은 담체 시스템과 조합하여, 사용할 수 있다. 또한, 이러한 제형에 고분자량의 부형제, 예컨대 셀룰로스(avicel) 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)가 포함될 수 있다. 또한, 상기 제형은 하이드록시 프로필 셀룰로스(HPMC), 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로스(HPMC), 소듐 카르복시 메틸 셀룰로스(SCMC), 말레익 안하이드라이드 공중합체(예, Gantrez)와 같은 점막 부착을 보조하기 위한 부형제, 및 폴리아크릴 공중합체(예, Carbopol 934)와 같이 방출을 조절하는 제제를 포함할 수 있다. 윤활제, 유동화제(glidant), 향료, 착색제 및 안정화제도 제조 및 사용 용이를 위해 사용할 수 있다.

[0161] ACTH 유사체 화합물은 2002년 7월 15일자로 출원되었고 2005년 5월 17일자로 등록된 미국 특허 제 6,893,645호에서 Loughman이 언급한 서방형 담체 조성물과 조합할 수 있으며, 상기 특허는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. ACTH 유사체와 조합할 수 있는 서방형 또는 조절 방출형 제형 및 방법의 다른 예로는 Cheung 등의 2004년 8월 18일자 미국 특허 공개번호 US2005/0164927A1, Hay 등의 2002년 9월 27일자 US2003/0125528A1, Kubek 등의 2002년 10월 21일자 US2003/0211966A1, Sharma 등의 2001년 11월 7일자 US2003/0148938A1 및 Sharma 등의 2003년 3월 31일자 US2003/0181361A1가 있으며, 이들 특허는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 일부 예들에서, 조절 방출형 치료 조성물은 조절성 방출 폴리머 및 유효량의 ACTH 유사체를 포함할 수 있다. 조절성 방출 폴리머는 선택적으로 적합한 수준의 가교 모이어티를 포함하는 수 팽윤성 폴리머일 수 있다. 상기 조절성 방출 폴리머는 적합한 수준의 수용성을 가지거나 또는 최소 수용성을 가질 수 있다.

[0162] 사용될 수 있는 폴리머 증점제는 화장품 및 약학 산업에서 흔히 사용되는 친수성 및 하이드로알콜성 겔화제와 같이 당업자에게 공지된 것을 포함한다. 상기 친수성 또는 하이드로알콜성 겔화제로 예컨대 "CARBOPOL®

"(B.F. Goodrich, Cleveland, Ohio), "HYPAN®

"(Kingston Technologies, Dayton, N.J.), "NATROSOL®

"(Aqualon, Wilmington, Del.), "KLUCEL®

"(Aqualon, Wilmington, Del.), 또는 "STABILEZE®

"(ISP Technologies, Wayne, N.J.)를 포함할 수 있다. 상기 겔화제는 조성물에 약 0.2% 내지 약 4 중량%를 구성할 수 있다. 보다 구체적으로는, "CARBOPOL®

"는 조성물의 중량% 범위의 약 0.5% 내지 약 2%일 수 있으며, "NATROSOL®

" 및 "KLUCEL®

"는 약 0.5% 내지 약 4%일 수 있다. "HYPAN®

" 및 "STABILEZE®

" 둘다 조성물 중량%의 약 0.5% 내지 약 4%일 수 있다.

[0163]

"CARBOPOL®

"은 일반적으로 사용되는 명칭 카르보머인 수많은 가교성 카르릴산 폴리머들중 하나이다. 이러한 폴리머는 물에 용해되고 소듐 하이드록사이드, 포타슘 하이드록사이드, 트리에탄올아민 또는 다른 아민 염기와 같은 부식성 물질으로 중화되면 투명하거나 약간 흐린 겔을 형성한다. "KLUCEL®

"은 물에 분산되며 수화 작용이 완료되면 균일한 겔을 형성하는 셀룰로스 폴리머이다. 그의 겔화성 폴리머로는 하이드록시에틸셀룰로스, 셀룰로스 검, MVE/MA 데카디엔 크로스폴리머, PVM/MA 공중합체 또는 이들의 조합이 있다.

[0164]

또한, 보존제도 본 발명에 사용할 수 있으며, 예로 조성물 총 중량에 약 0.05% 내지 0.5 중량%로 포함할 수 있다. 보존제의 사용은 제품에 미생물이 오염된 경우에 제형에 미생물 생육을 방지 또는 감소시킬 것임을 보장한다. 본 발명의 이용가능한 일부 보존제로는 메틸파라벤, 프로필파라벤, 부틸파라벤, 클로르옥실레놀, 소듐 벤조에이트, DMDM 하이단토인, 3-요오도-2-프로필부틸 카르바메이트, 포타슘 소르베이트, 클로르헥시딘 디글루코네이트 또는 이들의 조합이 있다.

[0165]

제형에서 ACTH 유사체의 지속적인 방출 투여가 바람직하며 ACTH 유사체 투여가 필요한 임의 질환 또는 질병 치료에 적합한 방출 특징을 가지는 경우, ACTH 유사체의 미세캡슐화(microencapsulation)가 고려된다. ACTH 유사체와 함께 사용하는데 적합한 바람직한 미세캡슐 조성물로는 Pellet 등의 미국 특허 6,475,507(2000. 11. 6) 및 Ignatious 등의 6,911,218(1999. 4. 20)에 개시된 것들이 있으며, 상기 문헌은 원용에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함된다. 지속적인 방출을 위한 재조합 단백질의 미세캡슐화는 인간 성장 호르몬(rhGH), 인터페론-(rhIFN-), 인터루킨-2, 및 MN rgp120을 이용하여 성공적으로 실현되었었다(Johnson et al., Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223 (1993); Hora et al., Bioflectchnology. 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems", in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; and U.S. Pat. No. 5,654,010).

[0166]

서방형 또는 조절성 방출용 담체는 "장기간" 또는 "느린" 방출 담체(예, 임의의 코 스프레이, 폴리머 또는 캡슐)일 수 있으며, 이는 보다 오랜 기간동안 ml 당 활성물질(ACTH 유사체)을 보다 낮은 농도로 소유하거나 또는 제공하지만, 반면에 "단기" 또는 "빠른" 방출 담체(예, 가글)는 좀더 짧은 기간동안 ml 당 활성물질(ACTH 유사체)을 높은 농도로 소유하거나 또는 제공할 수 있다. ml 당 활성물질 단위량 및 노출 기간은 감염 특성, 치료제가 예방제인지 치료제인지의 여부 및 그외 변수에 의존적이다. 따라서, 투여량 횟수는 조건에 따라 결정될 것이며, 하루에 1-4회 또는 그 이상일 수 있으며, 지속기간은 1일 내지 수주일 수 있다. 감염은 피부에 발생할 수 있으므로, 상기 조성물은 미국 특허 6,056,954 및 6,056,955에 개시된 바와 같은 잘 알려져 있는 비히틀을 이용하여 국소 적용용으로 제형화될 수 있다. 또한, 마이셀과 다중층상(multilamellar) 마이셀을 사용하여 ACTH 유사체의 방출을 조절할 수 있다.

[0167]

이러한 단백질의 서방형 제형은 그것의 생체친화성 및 광범위의 생분해 특성으로 인해 생흡수성 폴리머, 예컨대 폴리-락틱-코글리콜릭산(PLGA) 폴리머를 이용할 수 있다. PLGA, 락트산 및 글리콜산의 분해 산물은 체내에서 신속하게 제거될 수 있다. 더욱이, 상기 폴리머의 분해력은 이의 분자량 및 조성에 따라 수개월에서 수년으로 조절할 수 있다. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", in:

M. Chasm and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41을 참조한다.

[0168] 일부 예들에서, 치료 조성물은 점막부착성 서방형 제형 및 ACTH 유사체를 포함한다. 개시 및 언급된 바와 같이 점막 라이닝(lining)은 예컨대 상기도 및 하기도관, 눈, 구강, 코, 직장, 질, 치주낭, 장 및 결장을 포함한다. E.R. Squibb & Co의 구강점착제(Orabase®)

)는 구강 점막에 붙기 위해 끈끈한 하이드로카본 폴리머 중의 펙틴, 젤라틴 및 소듐 카르복시메틸 셀룰로스 조합의 부착제이다. 그러나, 이러한 친수성 및 소수성 성분의 물리적인 혼합물은 결국 분리된다. 반대로, 본 발명에 언급된 친수성 및 소수성 도메인은 불용성 공중합체를 형성한다. 미국 특허 4,948,580는 생체부착성 경구 약물 전달 시스템을 개시하고 있으며, 이 특허는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 조성물은 연고 기재에 분산된, 공중합체 폴리(메틸 비닐 에테르/말레익 안하이드라이드) 및 젤라틴으로 형성된 동결 건조한 폴리머 혼합물, 예컨대 미네랄 오일 함유 분산된 폴리에틸렌을 포함한다. 미국 특허 5,413,792(원용에 의해 포함됨)에는 (A) 3:6 내지 6:3 중량비로 존재될 수 있는 폴리유기실록산 및 수용성 폴리머 물질을 포함하는 페이스트계 염기와, (B) 활성 성분을 포함하는, 페이스트계 조제물이 언급되어 있다. 미국 특허 5,554,380에는 2상 이상의 상을 가지는 오일 시스템 중의 물을 함유하고 있는 고상 또는 반고상 생무착성 경구 비소화성 약물 전달 시스템이 청구되어 있다. 하나의 상은 내부 친수성 상의 부피에 약 25% 내지 약 75%를 구성하며, 다른 상은 외부 소수성 상의 부피에 약 23% 내지 75%를 구성하고, 상기 외부 소수성상은 (a) 유화제, (b) 글리세라이드 에스테르 및 (c) 왁스 물질의 3가지 성분으로 이루어져 있다. 미국 특허 5,942,243에는 항세균제 투여에 유용한 대표적인 일부 방출 물질이 개시되어 있으며, 상기 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 개시된 조성물의 투약 형태는 통상적인 방법으로 제조할 수 있다.

[0169] ACTH 유사체를 포함하는 조성물은 코 스프레이, 점비제, 코 연고, 코 세척제, 코 주사제, 코 팩킹제, 기관지 스프레이 및 흡입기에 의해 투여할 수 있다. ACTH 유사체(들)이 코 스프레이, 점비제, 코 연고, 코 세척제, 코 주입제, 코 팩킹제, 기관지 스프레이, 구강 스프레이 및 흡입기 사용에 의해 직접적으로 도입되는 경우, ACTH 유사체는 담체로서 액체 작용물질과 함께 액체 또는 겔 환경중에 있을 수 있다. 변형된 ACTH 유사체의 건조한 무수형은 액체 전달 형태를 사용할 수 있지만, 흡입기 및 기관지 스프레이에 의해 투여될 수 있다. 코 스프레이는 장기간 작용 스프레이 또는 정시 방출 스프레인 일 수 있으며, 당업계에 잘 알려진 방법으로 제조할 수 있다. 또한 ACTH 유사체가 폐를 포함한 기관지관 하부에 도달할 수 있도록, 흡입제를 사용할 수 있다. 코 에어로졸 또는 흡입 투여용 조성물의 예는 예컨대 벤질 알코올 또는 그외 적합한 보존제, 생체이용성을 증가시키는 흡수 촉진제, 및/또는 당업계에 공지된 바와 같은 그외 가용화제나 분산제를 포함할 수 있는 염수 중의 용액을 포함한다.

[0170] ACTH 유사체의 진피 투여용 조성물은 피부에 또는 피부를 통과하여 하나 이상의 ACTH 유사체를 전달하기 위해 담체를 이용하여 제형화할 수 있다. ACTH 유사체의 적용 방식은 상이한 다수개의 타입 및 비제한적으로 수용액, 알콜성 액체, 수용성 겔, 로션, 연고, 비수용성 액체 기재, 미네랄 오일 기재, 미네랄 오일과 페트롤라텀의 블랜드, 라놀린, 리포솜, 혈청 알부민이나 젤라틴과 같은 단백질 담체, 셀룰로스 카르멜 분말 및 이들의 조합을 포함하는 담체의 조합을 포함한다. 치료제를 함유하는 담체의 전달 방식은 스미어, 스프레이 정시 방출 ACTH, 액체가 흡수된 와이프 및 이들의 조합이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. ACTH 유사체는 직접적으로 또는 다른 담체들중 하나에 포함된 형태로, 붕대에 적용될 수 있다. 붕대는 ACTH 유사체가 붕대상에 동결건조된 형태로 있는, 판매되는 축축한 또는 건조형 상품일 수 있다. 이러한 사용 방법이 감염된 피부 치료에 가장 효과적이다. 국소 조성물의 담체는 폴리머 증점제, 물, 보존제, 활성형의 계면활성제 또는 유화제를 포함한 반고형 및 겔형 비히클, 향산화제, 선 스크린 및 용매나 혼합 용매 시스템을 포함할 수 있다. 미국 특허 5,863,560(Osborne)에는 피부에 약제 노출을 보조할 수 있는 여러가지 담체 조합 다수가 논의되어 있다. 국소 투여용 조성물의 다른 예는 Plastibase(폴리에틸렌으로 겔화된 미네랄 오일)과 같은 국소 담체를 포함한다.

[0171] 일 예에서, 본 발명은 약 0.5% 내지 10%의 카르보머 및 약 0.5% 내지 10%의 용해된 상태 및 미립자 상태 둘다로 존재하는 약제를 가지는 피부 조성물을 포함한다. 용해된 약제는 각질층(stratum corneum)을 통과하는 능력을 가지지만 미립자 약제는 그렇지 않다. 아민 베이스, 포타슘, 하이드록사이드 용액 또는 소듐 하이드록사이드 용액의 첨가시 겔 형성은 완료된다. 보다 구체적으로는, 상기 약제는 항-염증 특성을 가지고 있는 항미생물제인 다프손을 포함할 수 있다. 용해된 다프손에 대한 미립자 비는 일 예로 5 또는 그 미만이다.

[0172] 다른 예로, 본 발명은 약 1%의 카르보머, 약 80-90%의 물, 약 10%의 에톡시디글리콜, 약 0.2%의 메틸파라벤, 약 0.3 내지 3.0%의 미립자 다프손 및 용해된 다프손 모두를 포함하는 다프손, 및 약 2%의 가성 물질을 포함한다.

보다 구체적으로는, 카르보머는 "CARBOPOL®

980"을 포함할 수 있으며, 상기 가성 물질은 소듐 하이드록사이드 용액을 포함할 수 있다.

[0173] 치료 방법

[0174] ACTH 유사체 화합물을 사용하여 ACTH 관련된 다양한 상태들을 치료할 수 있다. 본 발명의 치료 방법은 ACTH 유도성 부신 호르몬 분비 속도를 저하시키거나, 환자에서 고농도의 ACTH 효과를 저감시키거나 또는 부신 기능의 긴장 상태를 유지하면서 과잉의 ACTH는 차단하기 위한, 하나 이상의 ACTH 유사체 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. ACTH 유사체 화합물은 ACTH 리셉터(예, MC-2R) 조절에 반응적인 상태와 같은 ACTH 농도와 관련있는 질병 치료에 유용할 수 있다. ACTH 유사체 화합물은 ACTH 농도 조절과 관련된 상태를 치료하기 위해, 예컨대 부신 기능의 긴장 상태를 유지하면서 환자에서 고농도의 ACTH 효과를 감소시키기 위해 투여될 수 있다.

[0175] ACTH 유사체 조성물은, 예컨대 ACTH 관련 상태, 예컨대 쿠싱 증후군, 코르티코스테로이드 과다분비의 결과로서 손상된 면역 반응, 조기 분만 개시(예, 시상하부-뇌하수체-부신축) 및 관련 상태를 치료하는데 유용하다. 일 측면에서, 다양한 ACTH 유사체들을 제조하여 생체내 코르티손 유도를 부가하기 위해 환자에게 투여한다.

[0176] *ACTH 유사체 화합물을 투여하여, 뇌하수체에서 ACTH 생산성 종양을 고해상도 MR 뇌하수체 이미징과 함께 사용하여 치료할 수 있다. 또한, ACTH 유사체 화합물은 추체정맥동(petrosal sinus) 샘플링 방법과 조합하여 투여함으로써 뇌하수체 유래 ACTH 과다분비, 수술전 뇌하수체 종양 국재화 및 좌우 기능분화(lateralization)를 확립할 수 있다(참조, Oldfield, E. W. et al., "Petrosal sinus sampling with and without corticotrophin-releasing hormone for the differential diagnosis of Cushing's syndrome", N Engl J Med., 325:897-905 (1991); and Findling, J. W. et al., Endocrinol Metab Clin North Am., 30:729-47 (2001)). 뇌하수체 마이크로아데리옴스(microadenomas)의 70%가 경접형통 방법(transsphenoidal approach)으로 성공적으로 절제되었음에도 불구하고, 마이크로아데리옴스의 외과적으로 "치유"된 환자는 특수 센터 환자의 약 1/3에 불과하였다(Mampalam, T. J. et al., Ann Intern Med., 109:487-93 (1988)).

[0177] ACTH 유사체 화합물은 또한 종양 치료제로, ACTH 과다분비 치료제와 함께, 또는 종양 성장 및 호르몬 수치를 억제하기 위한 뇌하수체 방사선 조사 방법과 병용하여 투여할 수 있다. 방사능 조사 효과는 수년간 입증되지 못할 수도 있지만, 궁극적으로 대부분의 환자에서 뇌하수체 손상 및 기능 부전과 관련있을 수 있다(Brada, M. et al., "The long-term efficacy of conservative surgery and radiotherapy in the control of pituitary adenomas", Clin Endocrinol., 38:571 -8 (1993)). 과코르티졸증(hypercortisolism), 즉 코르티솔 과다 분비는 부신적출술(부신 하나 또는 둘다의 외과적 제거)로 완전하게 해결될 수 있지만, 이러한 방법은 뇌하수체 종양 성장을 억제하지 않으며 또한 다른 병발 질환(co-morbidity)과 관련되어 있다(Trainer, P. J. et al., "Cushing's syndrome: Therapy directed at the adrenal glands", Endocrinol Metab Clin North Am., 23:571 -584 (1994)).

[0178] *ACTH 유사체 화합물은 ACTH 분비를 억제하기 위해 사용되었지만 궁극적인 효과가 약하여 사용이 중단된 항-세로토닌제인 사이프로헵타딘의 병용 투여와 같은 약물요법과 병용으로 투여할 수 있다(Krieger, D. T. et al., "Cyproheptadine-induced remission of Cushings disease", N Engl J Med. 293:893-6 (1975)). 항진균성 케토코나졸은 부신 코르티솔 생합성을 억제하지만, 상기 약제는 뇌하수체 종양 성장 또는 ACTH 분비를 억제하지 못하며, 특이체질성 간 손상시 장기 사용이 제한된다(Sonino, N., "The use of ketoconazole as an inhibitor of steroid production", N Engl J Med., 31 7:812-8 (1987)).

[0179] 임신중에, CRH는 임신의 제3 삼개월동안 태반 및 태막에서 상당한 양으로 생산되어(참조, Frim, D.M. et al., "Characterization and gestational regulation of corticotrophin-releasing hormone messenger RNA in human placenta", J Clin Invest., 82:287-292 (1988)), 특히 임신 30주 이후에 모체 말초 혈장내 CRH 농도가 증가할 수 있다(참조, Sasaki, A. et al., "Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in human plasma during pregnancy, labor, and delivery", J Clin Endocrinol Metab., 64:224-229 (1987); and Goland, R.S. et al., "High levels of corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy", J Clin Endocrinol Metab., 63:119-1204 (1986)). 최근 연구들은 조기 진통하는 여성들에서 모체 혈장내 CRH 농도가 증가되며(참조, Wolfe, C.D.A. et al., "Plasma corticotrophin

releasing factor (CRF) in abnormal pregnancy", Br J Obstet Gynaecol., 95:1003-1006 (1988); Warren, W.B. et al, "Elevated maternal plasma corticotropin-releasing hormone levels in pregnancies complicated by preterm labor", Am J Obstet Gynecol., 166:1198-1207 (1992); and McLean, M. et al., "A placental clock controlling the length of human pregnancy", Nat Med., 1:460-463 (1995)), 본만이 지연되는 모체에서는 낮은 것으로 제시하고 있다(McLean et al., supra.).

[0180] ACTH 유사체는 진통용해제(tocolytic), 또는 진통 방지성 약물, 진통 지연 약물과 조합하여 사용할 수 있다. 진통용해제의 예로는 리토드린 및 테르부탈린이 있으며, 이들은 베타-교감신경흥분제(sympathomimetic)이다. 그러나, 효과적인기 위해, 이들 화합물은 일반적으로 진통이 완전히 시작되기 전에 투여하여야 하며, 진통이 시작된 후 투여하면 효과 및 안전성이 불확실하다. 진통용해제는 때때로 임신한 여성에게 낮은 농도로 지속적으로, 정상적으로 주입에 의해 임신중 위험성이 높은 기간동안, 정상적으로는 약 28주 내지 34주 임신시기동안 (28-34주) 투여되기도 하지만, 상기 약물은 신장 기능, 호흡기 기능, 심장 속도 및 전반적인 신체 근육조직의 탄력성(musculature tone)에 부적절한 부작용을 가질 수 있다. 때때로 투여량은 낮게, 예컨대 1시간 당 최대 0.1 cc, 1 mg/cc(케르부탈린 용액)로 유지시켜야 한다. 이러한 낮은 투여량이 진통 개시를 막는 효과는 일정하지 않으며, 충분히 정량화되지 않았다. 따라서, 조기 진통을 치료하기 위한 새로운 치료제 및 방법이 필요하다. 더 중요한 점은, 부적합한 부작용이 없는 조기 진통에 대한 신규 치료제 및 방법이 요구된다.

[0181] 일 예에서, ACTH 유사체 조성물은 ACTH의 생합성을 감소시키기 위해 투여할 수 있다. 이러한 치료 방법은 메트리아폰과 같은 약제와 병용으로, 또는 바람직하게는 상기 약제 대신 사용할 수 있다. 바람직하게는 ACTH 유사체 조성물은, 예컨대 J.R. Lindsay and L.K. Nleman (2005) "The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Pregnancy: Challenges in Disease Detection and Treatment", Endocrine Reviews 26: 775-800)에 개시된 바와 같이, 임신중에 발생하는 쿠싱 질환의 발병을 치료하기 위해 투여할 수 있다. 일반적으로 임신 기간을 연장시키거나 또는 전달용으로 준비하기 위한 이러한 상태에 대한 치료는 ACTH 폴리펩티드 및/또는 메트리아폰의 투여를 포함할 수 있으며, 이는 모체의 간 기능이나 태아 발생에 나쁜 영향 없이 매우 허용적인 것으로 관찰되고 있다. ACTH 생합성을 서행시키기 위해 메트리아폰을 환자에게 투여할 수 있다. ACTH 유사체 조성물은 특히 코르티코스테로이드의 과다분비 원인이 (아마 이들 여성의 뇌하수체 종양으로부터) ACTH 농도 증가로 인한 것으로 간주되는 경우에, 예컨대 코르티코스테로이드 합성을 감소시키기 위한 전략의 일부분으로서, 특히 바람직하다.

[0182] 다른 측면은 높은 인구 밀도로 배양한 농업 및 양식업 종들의 건강을 돕기위하여 스트레스 호르몬을 감소시키는 방법과 같이 수의학 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 하나 이상의 ACTH 유사체 화합물을 포함하는 조성물은 높은 인구 밀도로 배양한 농업 및 양식업 종들의 건강을 돕기 위하여 스트레스 호르몬을 감소시키는 방법으로 투여할 수 있다.

[0183] (실시예)

[0184] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 예를 설명하기 위해 포함된다. 하기 실시예에 언급된 물질 및 기법들은 본 발명의 실시에서 원활하게 기능하기 위하여 본 발명자들이 발견한 물질 및 기법을 나타내며, 따라서 본 발명의 실시를 위한 바람직한 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있는 것으로, 당업자들은 인지하여야 한다. 그러나, 당업자는 본 발명에 기재된 사항에 비추어 본 발명의 사상 및 범위에서 벗어나지 않는 범주에서 개시된 특정 예에 수많은 변이를 가할 수 있으며, 유사하거나 또는 비슷한 결과를 여전히 수득할 수 있는 것으로 이해하여야 한다.

[0185] 실시예 1. 혈청 코르티코스테로이드 유도 분석(시험관내)

[0186] 혈중 ACTH 매개 코르티코스테로이드의 분비 감소성이 있는 ACTH 유사체는, 생체내 혈청 코르티코스테로이드 유도 분석을 수행하여 ACTH 유사체 투여 후 개체에서의 혈액내 코르티코스테로이드 농도를 결정함으로써, 동정할 수 있다.

[0187] 생체내 혈청 코르티코스테로이드 유도 분석은 하기 방법에 따라 수행하였다. 먼저, 그룹당 5마리씩, 발명자 실험실의 2 내지 3개월된 수컷 FVB/N 마우스에 내인성 ACTH 생산을 억제시키기 위해 텍사메타손(0.4 mg/0.1 ml PBS per mouse; Sigma, St. Louis, MO)을 복막내 주사하였다. Hajos, GT et al., "Studies of the potency of polypeptides with ACTH action by a new method based on continuous measurement of plasma corticosterone", *Steroids Lipids Res* 3:225-228 (1972), Costa, JL, et al., "Mutational analysis of

evolutionarily conserved ACTH residues", Gen Comp Endocrinol, 136:12-iS (2004), 및 2005년 2월 24일자 온라인 개시된 Karpac, J, et al., "Development, Maintenance, and Function of the Adrenal Gland in Early Postnatal Pro-opiomelanocortin Null Mutant Mice, Endocrinology (2005)를 참조하며, 이들은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0188] 두번째로, 90 내지 120분 후에, 텍사메타손으로 억제시킨 마우스에 비변형 mACTH(1-24) 또는 여러가지 ACTH 유사체 펩티드 화합물(1 μ g/0.1 mL PBS/0.5% BSA)들중 하나를 견갑골 사이에 피하 주사하거나, 또는 비히클(대조군)만 단독으로(0.1 mL PBS/0.5% BSA) 주사하였다. 하기 ACTH 유사체 펩티드 화합물을 개별 마우스에 투여하였다: 1: 류라인 ACTH 1-24; 2: V26F, E30K; 3: P19W, K21E, Y23R; 4: E30K, P36R; 5: ALA19-24; 6: V26F, P36R; 7: P19W, K21E; 8: P19W, K21A, delY23; 9: P19W, K21A; 10: KRRP16-19RAAW(AT814)(서열번호 20).

[0189] 세번째로, 한시간 후에, 꼬리의 작은 절개로부터 1분 이내에 혈액을 채혈하여 혈청을 순간 동결시켜 분석하기 전까지 -80 °C에 보관하였다. 혈청 코르티코스테론을 제조사의 권고안에 따른 경쟁적인 방사면역분석(¹²⁵I RIA 키트; ICN, Costa Mesa, CA)으로 측정하였다. 각 분석 샘플에 혈청 1 μ l를 사용하였다. 샘플은 이배수로 사용하였다. 전술한 ACTH 유사체 펩티드에 대한 결과는 도 1의 그래프로 나타내며, 도 1은 ACTH 활성%로서 활성을 나타낸다. 이러한 ACTH 유사체는 천연 ACTH 보다 낮은 활성을 보였다.

[0190] 실시예 2. 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석(생체내)

[0191] 혈중 ACTH 매개 코르티코스테로이드의 분비 감소성이 있는 ACTH 유사체는, 생체내 혈청 코르티코스테로이드 유도 분석을 수행하여 비변형 ACTH 유사체에 의해 유도된 부신 호르몬 생산 저해 능력을 테스트함으로써, 동정할 수 있다. 개체의 혈중 코르티코스테로이드 농도는 ACTH 유사체 테스트 화합물을 ACTH나 다른 ACTH 유사체와 같이 코르티코스테로이드-유도 활성이 알려져 있는 화합물과 조합하여 투여한 후, 측정하였다. 상기 ACTH 유사체 테스트 화합물은 코르티코스테로이드-생산 화합물 이전에, 동시에 또는 이후에 투여할 수 있다.

[0192] 생체내 혈청 코르티코스테로이드 저해 분석은 하기 방법에 따라 실시되었다. 실시예 1에서 낮은 활성을 보이는 화합물과 같은 ACTH 유사체 테스트 화합물은 비변형 ACTH에 의해 유도된 부신 호르몬 생산 저해능에 대해 평가하였다.

[0193] 먼저, 그룹당 5마리씩, 발명자 실험실의 2 내지 3개월된 수컷 FVB/N 마우스에 내인성 ACTH 생산을 억제시키기 위해 텍사메타손(0.4mg/0.1 ml PBS per mouse; Sigma, St. Louis, MO)을 복막내 주사하였다.

[0194] 두번째로, 90 내지 120분 후에, 동물에 야생형 ACTH 및/또는 테스트 ACTH 유사체 펩티드(1 μ g/0.1 mL PBS/0.5% BSA)를 견갑골 사이에 피하 주사하거나, 또는 비히클만 단독으로(0.1 mL PBS/0.5% BSA) 주사하였다.

[0195] 세번째로, 한시간 후에, 꼬리의 작은 절개로부터 1분 이내에 혈액을 채혈하여 혈청을 순간 동결시켜 분석하기 전까지 -80 °C에 보관하였다. 혈청 코르티코스테론을 제조사의 권고안에 따른 경쟁적인 방사면역분석(¹²⁵I RIA 키트; ICN, Costa Mesa, CA)으로 측정하였다. 각 분석 샘플에 혈청 1 μ l를 사용하였다. 샘플은 이배수로 사용하였다.

[0196] 전술한 바와 같이 유사체 AT814(서열번호 20)에 대한 결과는 도 2에 그래프로 나타낸다. 펩티드의 효과는 코르티코스테론의 유도%로 나타내었고, 천연 마우스 ACTH는 100%로 하였다. 최종 펩티드 주사 후에 1시간 경과시 코르티코스테론 유도를 비교한 결과, AT814는 ACTH 주사전에 30분간 적용하였을때 야생형 ACTH의 코르티코스테론 유도에 35%로 코르티코스테론 유도를 감소시키며, ACTH 주사와 동시에 적용한 경우에는 야생형 ACTH에 10%로 감소시키는 것으로 확인되었다.

[0197] 실시예 3. 부신 결합 분석(시험관내)

[0198] 부신 리셉터 결합 능력이 있는 ACTH 유사체는 시험관내 부신 결합 분석을 수행함으로써 동정할 수 있다. 방사능 표지된 ACTH 유사체 테스트 화합물이 체외 부신 막에 결합하는 양을 측정하여 부신 리셉터 결합 활성이 있는 ACTH 유사체를 동정할 수 있다. 바람직하기로는, 이는 무혈청 배지(시험관내 무혈청 부신 결합 분석)중에 수행된다.

[0199] 부신 결합 활성이 알려져 있는 화합물(바람직하기로는 ACTH) 보다 친화성이 높은 부신 리셉터에 결합하는 능력

을 가진 ACTH 유사체는 또한, 방사능 표지된 부신 결합 화합물(예, ACTH)의 양 감소치를 제외 부신 막을 함유하고 있는 배지에서 비-방사능 표지된 ACTH 유사체 테스트 화합물의 다양한 농도에서 측정하여, 시험관내 경쟁적인 부신 결합 분석을 수행함으로써 동정할 수 있다. 방사능 표지된 부신 결합성 화합물에 의한 부신 막 결합 감소를 이용하여, ACTH 유사체 테스트 화합물의 결합 활성을 동정 및 특정화할 수 있다. 일련의 시험관내 경쟁적인 부신 결합 분석에서, 방사능 표지된 ACTH에 의한 결합 감소는 부신 막 배지에 ACTH 유사체 테스트 화합물을 첨가한 조합에서 측정하였다.

[0200] 시험관내 무혈청 부신 경쟁 결합 분석을 하기 방법에 따라 수행하였다. 먼저, 부신을 마우스에서 적출하여, 지방을 제거한 다음 반으로 잘랐다. Costa, JL, et al., "Mutational analysis of evolutionarily conserved ACTH residues", *Gen Comp Endocrinol.* 136:12-16 (2004); 및 Weber, MM, et al., "Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis", *Endocrinology* 140:1537-i 543 (1999)를 참조하며, 이는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0201] 두번째로, 각각의 부신 절반을 마우스 한마리 당 디쉬 하나씩 4웰 디쉬의 각 웰에 넣었다. 부신 절반 자른 것은 평형화하기 위해 30분간 0.5 ml 무혈청 배지(M199; Invitrogen) 중에 5% CO₂, 37 °C에서 인큐베이션하였다.

[0202] 세번째로, 부신 절반 자른 것을 소화되게 하거나 또는 Pounce Homogenizer로 분리시켜 막 분획을 만들었다. 상기 분획은 적정 완충액(Tris 또는 HEPES)에 재현탁하였다. ¹²⁵I 방사능 표지된 ACTH(200 ml)와 방사능 표지하지 않은 테스트 화합물(예, ACTH, 또는 ATS14(서열번호 20)와 같은 ACTH 유사체)를 상기 테스트 화합물의 최종 농도 0nM, 10nM, 100nM 및 1000nM가 되는 양으로 재현탁한 막 분획에 첨가하였고, 대조군은 펩티드를 첨가하지 않았다. 상기 막 분획은 회수하여, 감마 검출기로 방사능 신호를 검출하였다. 방사능 표지하지 않은 테스트 화합물을 첨가한 후 방사능 신호 검출 감소는 다양한 테스트 화합물의 결합 친화성과 상호관련있을 수 있다. ACTH 유사체 펩티드 테스트 화합물을 첨가한 후 방사능 신호 감소는 MC-2R과 같은 부신 ACTH 리셉터에 대한 결합 친화성 증가 및 부식 MC-2R 리셉터에서 ACTH 대체 능력 증가를 의미한다.

[0203] 도 3은 일련의 시험관내 무혈청 부신 경쟁 결합 분석 결과를 나타낸다.

[0204] 실시예 4. 부신 저해 분석(시험관내)

[0205] 부신 막으로부터 ACTH 매개성 코르티코스테로이드 분비를 감소 또는 차단하는 ACTH 유사체는 비변형 ACTH에 의해 유도된 부신 호르몬 생산을 저해하는 이들의 능력을 테스트하기 위해 시험관내 무혈청 코르티코스테로이드 저해 분석을 수행함으로써, 동정할 수 있다. 무혈청 배지내 코르티코스테로이드 농도는 ACTH 유사체 테스트 화합물을 ACTH 또는 다른 ACTH 유사체와 같이 코르티코스테로이드 유도 활성이 공지된 화합물과 조합하여 첨가한 후 측정하였다. ACTH 유사체 테스트 화합물은 코르티코스테로이드 생산 화합물 이전에, 동시에 또는 이후에 첨가할 수 있다.

[0206] 시험관내 무혈청 부신 저해 분석은 하기 방법에 따라 수행하였다. 먼저, 부신을 마우스에서 적출하여, 지방을 제거한 다음 반으로 잘랐다. Costa, JL, et al., "Mutational analysis of evolutionarily conserved ACTH residues", *Gen Comp Endocrinol.* 136:12-16 (2004); 및 Weber, MM, et al., "Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis", *Endocrinology* 140:1537-i 543 (1999)를 참조하며, 이는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0207] 두번째로, 각각의 부신 절반을 마우스 한마리 당 디쉬 하나씩 4웰 디쉬의 각 웰에 넣었다. 부신 절반 자른 것은 평형화하기 위해 30분간 0.5 ml 무혈청 배지(M199; Invitrogen) 중에 5% CO₂, 37 °C에서 인큐베이션하였다.

[0208] 세번째로, 배지를 제거하고, 각각 100 ng/ml의 ACTH, AT814, 또는 이들 모두를 함유하고 있는 0.5 ml의 M199로 교체하였고, 대조군은 펩티드를 첨가하지 않았다.

[0209] 네번째로, 2시간 인큐베이션한 다음, 배지를 제거하고, 각 마우스로부터 모두 4개의 절반 자른 것을 모아, 표준적인 RIA 방법으로 코르티코스테론에 의해 분석하였다. 코르티코스테론은 제조사의 권고안에 따른 경쟁적인 방사면역분석(¹²⁵I RIA 키트; ICN, Costa Mesa, CA)으로 측정하였다. 각 분석 샘플에 혈청 1 μl를 사용하였다. 샘플은 이배수로 사용하였다. 도 4는 결과를 나타낸다.

[0210] **실시예 5. 치료학적 동물 투여(예측)**

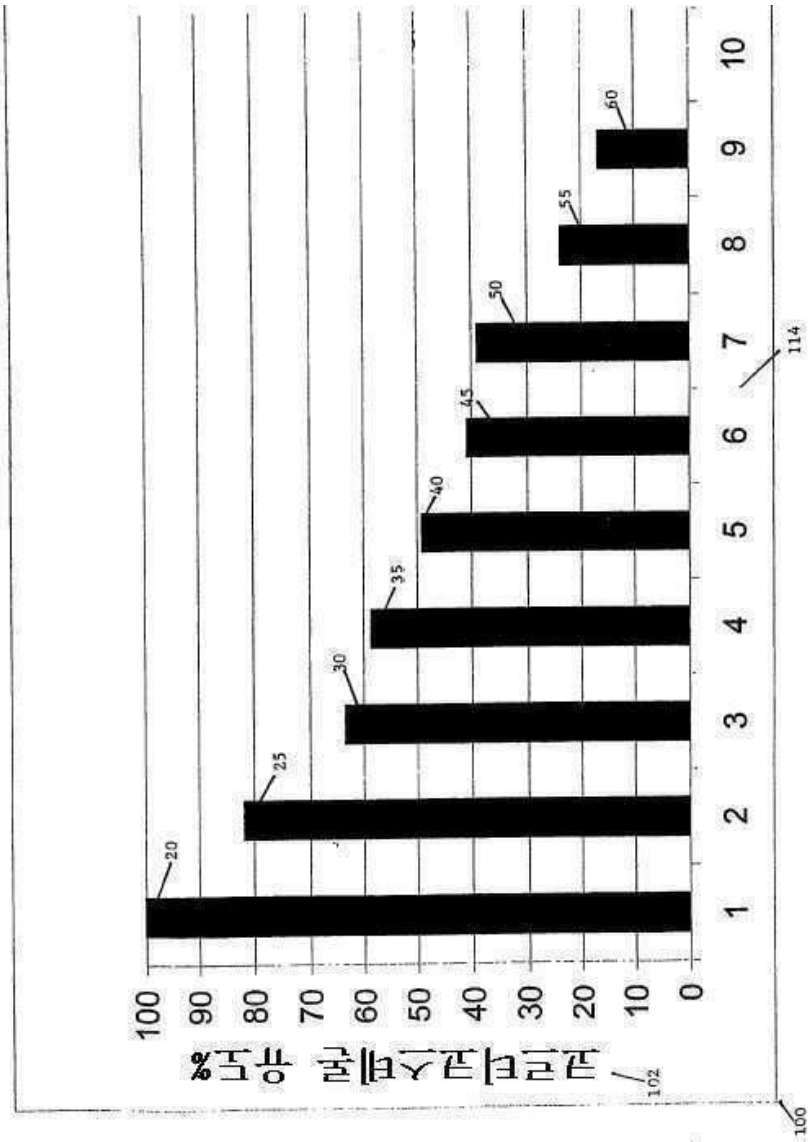
[0211] 어류 부화장(Fish hatcheries)은 상업적 목적에서 어류의 총 톤 수를 최대화하려는 목표가 밀집 효과 및 감염 전파에 의해 혼란에 빠짐에 따라 많은 문제에 부딪힌다. 이러한 환경에서, 어류는 시상하부-뇌하수체-신장(hypothalamus-pituitary-interrenal)(HPI) 축(axis)을 통해 만성 스트레스를 극복하려고 한다. 이러한 상황에서 코르티코스테로이드의 증가는, 일정 수준의 사망률, 코르티코스테로이드에 대한 탈감작, 및 이후 어류수에 대한 새로운 평형 상태에 의해, 보통 계속 생산되게 된다. 모순되게도, 이러한 "조정" 주기 중에 코르티코스테로이드 농도에 있어서의 확대된 증가는 감염에 대한 저항성을 약화시킨다.

[0212] 어류 부화장에서의 HPI는, 이들 어류 내 실라스틱(silastic) 캡슐 임플란트로부터의 정시 방출형 투여와 같은, 본 발명의 ACTH 유사체의 정시 분비 투여에 의해 조절될 수 있다. HPI 축의 이러한 완충하는 생존율을 개선해야 하며 부화장 어류의 체중 증가를 도모할 수도 있을 것이다.

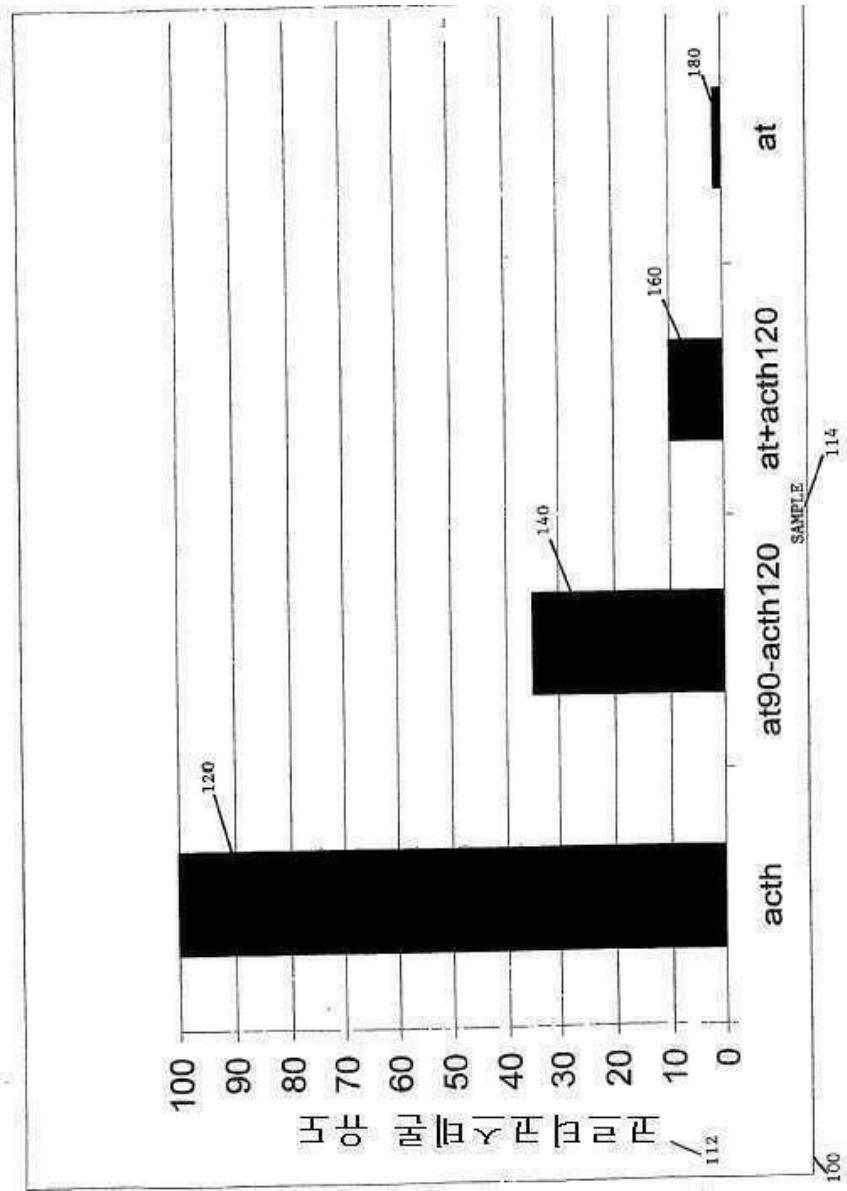
[0213] 본 발명의 ACTH 유사체나 ACTH 단독 중 어느 하나가 이식된 어류는 HPI 축(즉, 군집, pH 변동, 암모니아 및 나이트레이트의 축적)을 활성화시키는 환경 조건에 놓일 것이다. 이러한 패러다임에서 분석될 수 있는 두 가지 변수는 사망률과 체중 변화이다. 그러한 변수는 본 발명의 ACTH 유사체가 어류의 코르티코스테론 농도를 낮추는데 효과적인지를 입증할 것이다.

도면

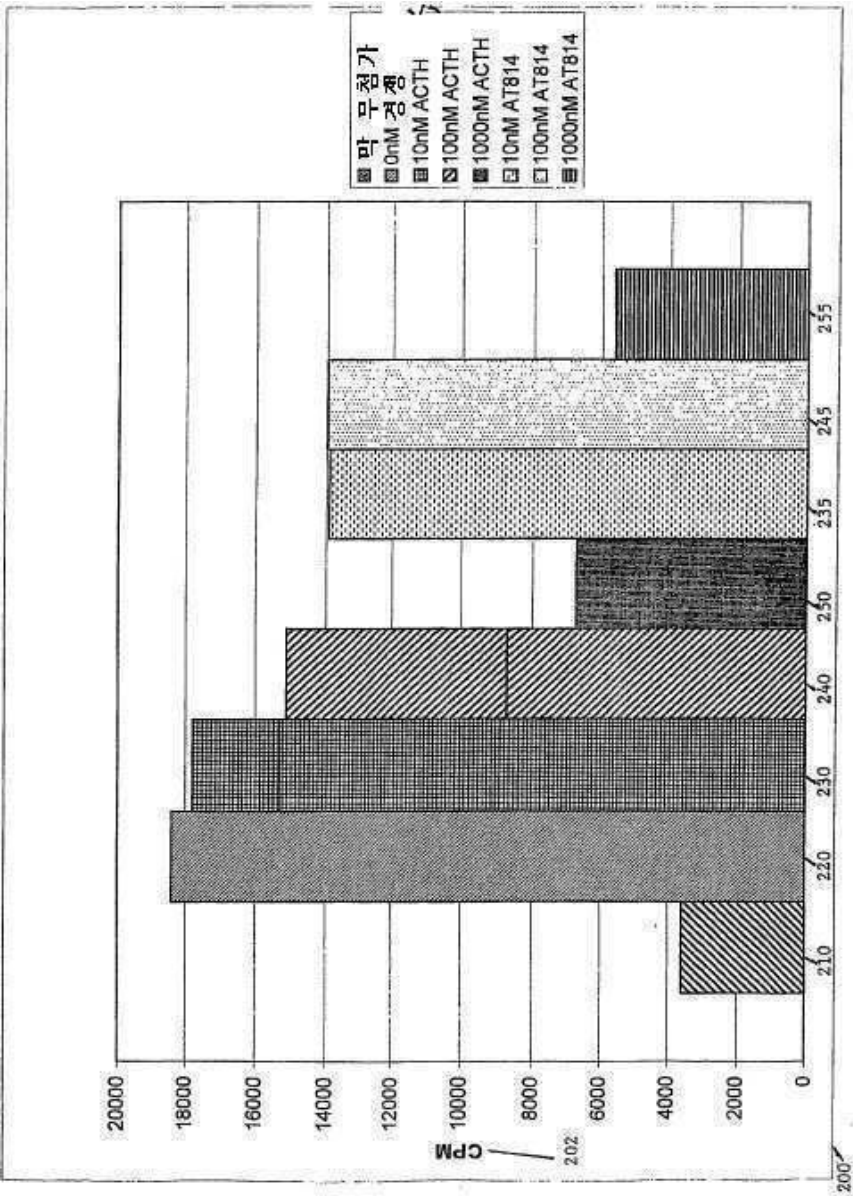
도면1



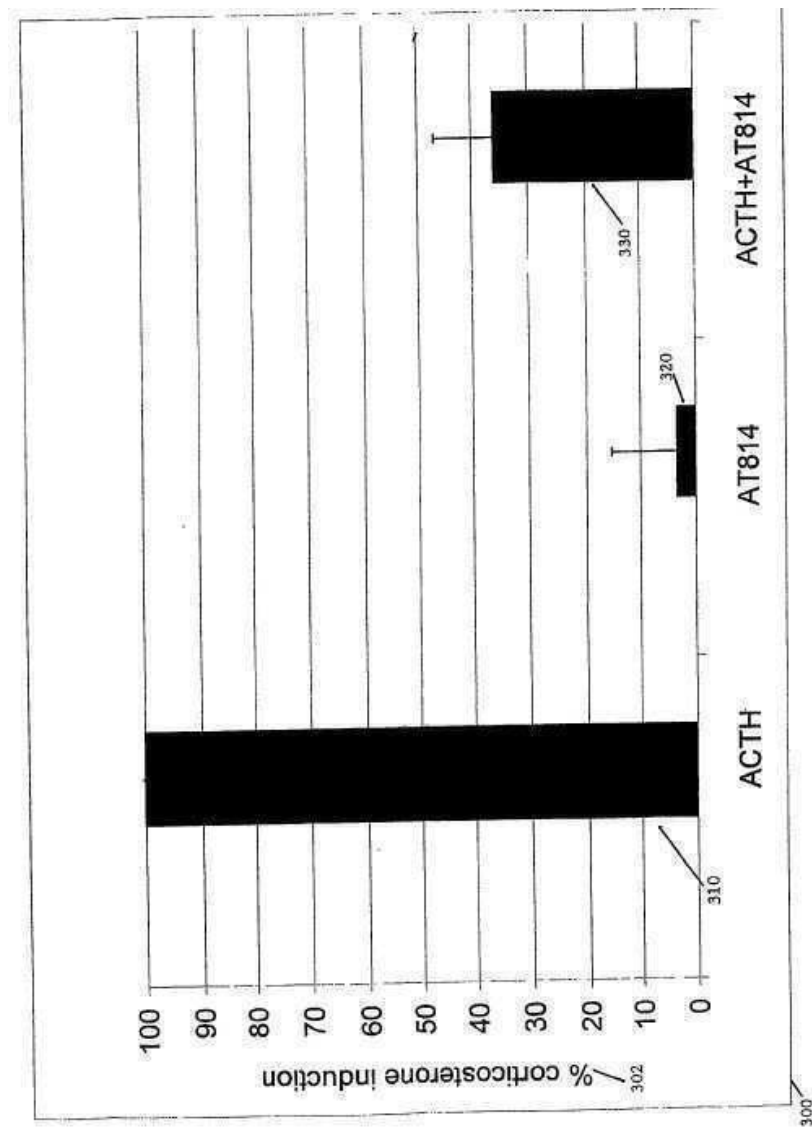
도면2



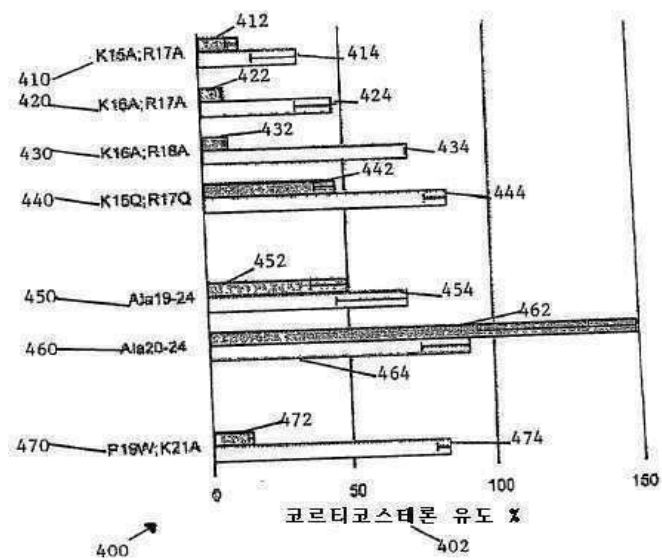
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부