(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0029161
(43) 공개일자 2021년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7037684
(22) 출원일자(국제) 2019년07월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년12월28일
(86) 국제출원번호 PCT/BR2019/050249
(87) 국제공개번호 WO 2020/006617
국제공개일자 2020년01월09일
(30) 우선권주장
62/694,162 2018년07월05일 미국(US)
16/502,215 2019년07월03일 미국(US)

(71) 출원인
바이오제우스 데센볼비멘토 데 프로듀토스 바이오파르마세우티코스
브라질 리우데자네이루 22410-002 리우데자네이루 이파네마 9 안다르 623 루아 비스콘데 데 피라자

(72) 발명자
도 나시멘토 카이오 빅토르 마샤도 프란카
브라질 리우데자네이루 20921-005 리우데자네이루 상 크리스토바오 아파르타멘토 302 588 루아 사오 자누아리오
다 실바 디에고 알론소 로드리게스 도스 산토스
브라질 리우데자네이루 21220-560 리우데자네이루 빌라 다 펜하 아파르타멘토 502 블로코 2 620 에스트라다 파드레 로저
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인(유한)케이비케이

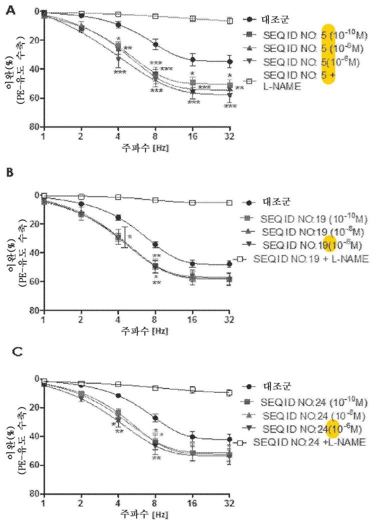
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **합성 펩타이드, 프로드럭, 약학적 조성물 및 용도**

(57) 요 약

본 발명은 평활근 긴장의 조절 합성 펩타이드에 관한 것이다. 이는 또한 이러한 펩타이드를 함유하는 약학적 조성물 및 평활근 긴장의 조절이 유익한 장애의 치료에서 이의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 11/00 (2018.01)

C07K 7/06 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

(72) 발명자

다 실바 펠라 빌라니 볼지스

브라질 리우데자네이루 20231-084 리우데자네이루 라파 아파르타멘토 502 229 루아 칼로스 삼파이오

가르시아 마리아 엘레나 데 리마 페레즈

브라질 미나스제라이스 31320-000 벨로 오리존치 바이호 엔제뇨 아파르타멘토 202 1020 루아 데젬바르가도르 파울로 모타

다 실바 카롤리나 누니스

브라질 미나스제라이스 30660-130 벨로 오리존치 바이호 디아만테 넘버 8 루아 페드로 페레이라 알베스

피멘타 아드리아나 몬테이로 드 캐스트로

브라질 미나스제라이스 33400-000 라고아 산타 알토 도 조아 240 루아 마리아 라이문다 데 제주스

브라가 마르셀라 누니스 드 멜로

브라질 미나스제라이스 30575-210 벨로 오리존치 부리티스 아파르타멘토 201 297 루아 마르코 오렐리오 데 미란다

라카티바 파울로 구스타보 삼파이오

브라질 리우데자네이루 22280-030 리우데자네이루 보타포고 블로코 3 아파르타멘토 105 45 루아 데제노브 데 페베레이로

데 파울라 주니오르 아이언 프란시스코

브라질 리우데자네이루 20511-270 리우데자네이루 티유카 아파르타멘토 406 15 루아 도나 델피나

그로스 게르하드 막스

브라질 상파울루 12500-320 과라틴구에타 143 루아 페이오

명 세 서

청구범위

청구항 1

식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열을 포함하는 펩타이드:

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Ile-Ala-Trp-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15(2), 아미노에서 카복시 방향은 왼쪽에서 오른쪽이다;

여기서:

Xaa1, Xaa2 및 Xaa15의 각각은 독립적으로 부재하거나 Ala, Arg, Lys 또는 His이고;

Xaa3은 독립적으로 부재하거나 Ala, Phe, Trp 또는 Tyr이고;

Xaa4, Xaa5 및 Xaa9의 각각은 독립적으로 부재하거나 Phe, Trp 또는 Tyr이고;

Xaa10은 독립적으로 부재하거나 His, Lys 또는 Arg이고;

Xaa11은 부재하거나 Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Pro, Cys 또는 Met이고;

Xaa12는 부재하거나 Ala이고; 및

Xaa13 및 Xaa14의 각각은 독립적으로 부재하거나 Asn, Gln, Ser 또는 Thr이고;

여기서 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 5개 이상의 인접 아미노산 잔기를 갖는 것인 펩타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

식(2)에서, Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa5, Xaa11, Xaa12, Xaa13, Xaa14 및 Xaa15로 이루어진 그룹의 하나 이상의 아미노산 잔기가 부재하는 것인 펩타이드.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 또는 SEQ NO ID: 5인 펩타이드.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 15 내지 18개의 인접 아미노산 잔기를 갖는 것인 펩타이드.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 18개의 인접 아미노산 잔기를 갖는 것인 펩타이드.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

적어도 제 2 펩타이드 또는 단백질을 추가로 포함하는 것인 펩타이드.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

식(1)의 펩타이드를 포함하는 펩타이드로서

-Z-X-Z'- (1)

여기서:

X는 상기 정의된 바와 같은 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열이고; 및

Z 및 Z'의 각각은 각각 독립적으로 세포 침투 강화 아미노산 서열 또는 2개 내지 15개의 자연 발생 아미노산을 갖는 활성 강화 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 펩타이드.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

H, 아세틸, 클로라이드 또는 트라이플루오로아세틸은 -Z-X-Z'-의 N-말단에 공유 결합되는 것인 펩타이드.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

OH 또는 NH_2는 -Z-X-Z'-의 C-말단에 공유 결합되는 것인 펩타이드.

청구항 10

제 7 항에 있어서,

Z는 N-말단으로부터 C-말단까지, 아미노산 잔기 Gly, Glu 및 Arg를 포함하는 서열을 포함하는 펩타이드이고, 각각 SEQ ID NO: 5의 약리학적 활성 펩타이드 서열을 가지며, Z'는 부재인 펩타이드

청구항 11

제 1 항에 있어서,

펩타이드는 알부민 결합 모이어티로 이루어진 그룹으로부터 선택된 반감기 향상 모이어티에 연결되는 것인 펩타이드.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

N-말단은 아세틸에 공유 결합되며, C-말단은 NH_2에 공유 결합되는 것인 펩타이드.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

아미노산 기반 절단 가능한 링커에 의해 공간을 차지한 식(2)의 서열을 갖는 2개 이상의 펩타이드를 포함하는 다량체 형태의 펩타이드.

청구항 14

제 1 항에 정의된 하나 이상의 펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 15

약학적으로 허용 가능한 부형제를 제 1 항의 하나 이상의 펩타이드에 도입하는 단계를 포함하여 약학적 조성물을 제조하는 방법으로서, 하나 이상의 펩타이드는 평활근의 긴장 조절이 유익한 장애의 치료에 충분한 양으로 존재하는 것인 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

장애는 발기 부전(ED), 여성 성기능 부전(FSD), 양성 전립선 비대증(BPH), 레이노 증후군, 폐동맥 고혈압(PAH), 전신 동맥 고혈압(SAH) 및 천식, COPD, 폐 섬유증, 규폐증, 알레르기 기관지폐 아스페르길루스증, 유전성 혈관 부종 및 신생아 저산소혈성 호흡 부전과 관련된 기도의 과민 반응으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

펩타이드는 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, 또는 SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 가지며 장애는 PAH인 방법.

청구항 18

환자에게 제 1 항의 펩타이드의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하여 평활근의 긴장 조절이 필요한 환자의 장애를 치료하는 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

장애는 발기 부전(ED), 여성 성기능 부전(FSD), 양성 전립선 비대증(BPH), 레이노 증후군, 폐동맥 고혈압(PAH), 전신 동맥 고혈압(SAH) 및 천식, COPD, 폐 섬유증, 규폐증, 알레르기 기관지폐 아스페르길루스증, 유전성 혈관 부종 및 신생아 저산소혈성 호흡 부전과 관련된 기도의 과민 반응으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

조성물은 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 23, 또는 SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 가지며 장애는 PAH인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 평활근 긴장의 조절 인자인 합성 펩타이드 및 이의 조성물에 관한 것이다. 이는 또한 이러한 펩타이드를 함유하는 약학적 조성물 및 평활근 긴장의 조절이 유익한 치료에서 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 평활근 조직은 다양한 기관과 시스템의 기능을 조절하는 중요한 구조적 구성 요소이다. 평활근 수축 장애는 다양한 임상 증상, 특히 호흡기, 혈관, 비뇨생식기 및 위장관 질환과 관련이 있다.

[0003] 상이한 메커니즘은 국소 또는 전신 자극에 반응하여 평활근의 긴장을 제어한다. 예를 들어, 산화 질소(NO)와 같은 인접 구조에 의해 생성된 중재자는 국소 수준에서 긴장을 미세 조정한다. 보완적으로, 교감 신경 또는 부교감 신경 섬유를 통한 자율 신경계(ANS)의 작용은 중추 신경계(CNS)가 인식하고 처리하는 자극에 대한 반응으로 평활근의 수축성을 조절한다. 그러나, 신경 전달물질 수용체는 이러한 세포가 삽입되는 거시 구조에 따라 평활근 조직에서 다르게 발현된다. 따라서, 평활근 긴장의 약리학적 조절은 호흡기, 혈관 및 비뇨생식기 질환에서 크게 다르다. 약리학적 접근법은 다른 시스템에서 반대 효과(즉, 수축 대 이완)를 생성할 수도 있다.

[0004] 평활근 세포는 모세 혈관과 혈관 주위 정맥을 제외한 모든 혈관의 벽에 있다. 평활근이 존재할 때마다, 평활근은 혈관 팽창의 주요 조절자이며 따라서 혈관 직경의 주요 조절자이다. 따라서, 평활근의 긴장의 변화는 혈관 직경을 결정하여, 말초 저항과 결과적으로 혈류에 크게 영향을 미친다. 병리학적 상태에서, 혈관 평활근은 동맥성 고혈압의 발달 및 진행과 관련이 있으므로 혈류에 대한 저항을 감소시키는 치료적 접근 방식의 표적이 된다. 이러한 목적을 위해 사용되는 약리학 종류는 교감 ANS 자극 차단제(아드레날린성 길항제), 안지오텐신 전환 억제제 또는 NO 공여자 혈관 확장제를 포함한다.

[0005] 유사하게, 음경의 팽창에 직접적으로 관여하는 혈관 구조인 해면체도 평활근 조직 층으로 구성된다. 발기는 음경을 구성하는 혈관, 근육 및 신경 하부 구조의 완전성에 의존하는 신경혈관 사건이다. 자극을 받으면, 해면체에 인접한 신경 종말과 혈관을 코팅하는 내피 세포는 NO를 방출한다. 이후의 신호전달 과정은 해면체 평활근을 이완시키고 혈관 구조로의 혈류를 증가시키고 마지막으로 발기시킨다. 이 메커니즘의 실패는 발기 부전(ED)을 특징으로 하는, 성관계에 불충분한 발기 장애를 초래할 수 있다.

[0006] ED의 역전 치료는 해면체 평활근의 이완과 해면체 내부의 혈류 증가를 목표로 한다. 이와 관련하여, 포스포다이에스테라제-5 억제제(PDE5i)는 제 1 치료 라인을 포함한다. 그러나, 환자의 36%는 PDE5i에 대해 명백히 내성이거나 불내성이며 다른 약리학적 옵션을 사용해야 한다. 일반적으로, 대체 요법은 효과가 제한적이며 투여(예를 들어, 요도 내 또는 해면 내) 및 부작용 측면에서 불편하므로 높은 중단률과 관련이 있다. 그러나, 치료의 최적 표준 및 제 2 라인은 모두 해면체 평활근을 이완시켜 해면체로의 혈류 증가를 촉진한다. 따라서, 보다 편리한 방식으로 동일한 효과를 낼 수 있는 약물에 대한 미충족 의학적 요구가 있다.

[0007] 호흡기에서, 평활근 세포는 상기도와 전체 기관지 수지상 구조를 통합하여, 이러한 구조의 구경과 결과적으로 기류를 능동적으로 조절한다. 생리적 상황에서 평활근 긴장은 국소 매개체와 ANS에 의해 조절된다. 그러나, 예를 들어, 해면체에서 발생하는 것과는 달리, 교감 신호는 기도의 이완과 구경 증가를 촉진한다. 또한이 경우, 아드레날린 및 콜린성 경로의 약리학은 병리학적 상황에서 기도 수축성의 조절을 위한 기초이다.

[0008] 평활근 조직은 기도의 염증성 질환의 특징인 기도 과민 반응과 관련된 기관지 수축의 중심 효과기이다. 이러한 상황에서, 평활근 층의 증식과 비대를 보는 것이 일반적이며, 이는 심해지고 증가된 기도 수축에 기여한다. B2-아드레날린 효현제는 천식 또는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 환자에서 급성 기관지 수축의 해방을 위한 표준 치료법을 통합한다. 이 치료법은 수축을 예방하고 기도에서 평활근의 이완을 유도하는 능력 때문에 특히 효과적이다. 수축성 감소의 동일한 원리에 따라, 무스카린 길항제 및 포스포다이에스테라제 4 억제제(PDE4i)는 특히 COPD와 관련된 악화에 대한 치료의 제 2 및 제 3 라인으로 역할을 한다.

[0009] 본 발명에 기술된 펩타이드는 다양한 해부학적 구조의 평활근을 이완시킬 수 있으므로 다발성 작용 메커니즘을 가진다. 따라서, 혈관, 위장관, 호흡기 및 비뇨생식기의 평활근 장애를 수반하는 질환의 치료에 유용하다.

[0010] 기술 과학 문헌은 본 발명에 기술된 것과 유사한 생물학적 활성을 가진 펩타이드에 대한 보고서를 포함한다. 예를 들어, 일반적으로 브라질 방황 거미로 알려진 포뉴트리아 니그리벤터(*Phoneutria nigriventer*)[남미 바나나 거미]의 독소는 다양한 약리학적 효과를 가진 생활성 폴리펩타이드가 풍부하다. 쏘임으로 자극된 증상 중, 남성 피해자에게서 관찰된 지속발기증은 약리학적 관점에서 관심을 불러 일으켰다. 2008년 브라질에서 출원된 특허 출원 번호 PI 0800596은 쥐의 발기 기능에서 PnTx2-6의 효과를 기술하였다. 발기 부전 치료에서 독소 PnTx-6의 치료 가능성은 CN101585872에서 유래된 패밀리 특허에 의해 기술된다.

[0011] 그 후, PnTx2-6은 고혈압 동물(DOCA-sal)과 당뇨병이 있는 마우스 또는 나이 든 쥐의 발기 기능도 회복한다는 것이 입증되었다(교정을 위해, NUNES, K. P. CARDOSO, F. L, CARDOSO-Jr., H. C, PIMENTA, A. M. C, De LIMA, M. E. **Animal toxins as potential pharmacological tools for treatment of erectile dysfunction.** In: Animal Toxin: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology. Maria Elena de Lima, Adriano Monteiro de Castro Pimenta, Marie France Martin-Eauclaire, Russolina Benedeta Zingali and Herve Rochat (editors), 759p., 2009; NUNES, K.P., COSTA-GONCALVES, A., LANZA, L.F., CORTES, S.F., CORDEIRO, M.N., RICHARDSON, M., PIMENTA, A.M., WEBB, R.C., LEITE, R., DE LIMA, M.E. **Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function.** Toxicon, 51(7):197-206, 2008; Antunes, A.A., Iscaife, A., Reis, S.T., Albertini, A., Nunes, M.A., Lucon, A.M., Nahas, W.C., Srougi, M. **Can we predict which patients will experience resolution of detrusor overactivity after transurethral resection of the prostate?** The Journal of Urology, 9 (10): 2574-81, 2012 참조). 이러한 효과는 효소 질소 산화물 합성 효소(NOS)의 활성화와 NO의 방출에 의해 매개되는 것으로 보인다(YONAMINE, C.M., TRONCONE, L.R., CAMILLO, M.A. **Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal Phoneutria nigriventer spider toxin.** Toxicon, 44, 169- 172, 2004; NUNES, K.P., COSTA-GONCALVES, A., LANZA, L.F., CORTES, S.F., CORDEIRO, M.N., RICHARDSON, M., PIMENTA, A.M., WEBB, R.C., LEITE, R., DE LIMA, M.E. **Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function.** Toxicon, 51(7):197-206, 2008, NUNES, K. P. CARDOSO, F. L, CARDOSO-Jr., H. C, PIMENTA, A. M. C, De LIMA, M. E. **Animal toxins as potential pharmacological tools for treatment of erectile dysfunction.** In: Animal Toxin: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology. Maria Elena de Lima,

Adriano Monteiro de Castro Pimenta, Marie France Martin-Eauclaire, Russolina Benedeta Zingali and Herve Rochat (editors), 759p., 2009). 또한, NO 경로에 관여하는 일부 유전자는 독소 PnTx2-6 처리 후 생쥐의 발기 조직에서 발현이 강화된 것으로 제안된다(VILLANOVA F.E., ANDRADE E., LEAL E., ANDRADE, P.M., BORRA, R.C., TRONCONE, L.R., MAGALHAES, L., LEITE, K.R., PARANHOS, M., CLARO, J., SROUGI, M. **Erection induced by Tx2-6 toxin of Phoneutria nigriventer spider: expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice.** Toxicon. 54(6), 793-801, 2009.). 미국 특허 제 9,279,004호는 독소 PnTx2-6에서 생성된 2,485.85 Da의 분자량를 가진 19개 아미노산 유도체인 펩타이드 PnTx(19)를 입증한다. 본 발명은 생체 외 뮤린 해면체 스트립의 이완 유도에 의해 입증된 바와 같이 펩타이드가 발기 기능을 향상시킬 수 있음을 보여준다. 나중에, 실바 등(SILVA, CN, NUNES, KP, TORRES, FS, CASSOLI, JS, SANTOS, DM, ALMEIDA, Fde.M., MATAVEL, A., CRUZ, JS, SANTOS-MIRANDA, A., NUNES, AD, CASTRO, CH , MACHADO DE AVILA, RA, CHAVEZ-OLORTEGUI, C., LAUAR, SS, FELICORI, L., RESENDE, JM, CAMARGOS, ER, BORGES, MH, CORDEIRO, MN, PEIGNEUR, S., TYTGAT, J., DE LIMA, M.E. **PnPP19, a synthetic and nontoxic peptide designed from a *Phoneutria nigriventer* Toxin, potentiates erectile function via NO/cGMP.** J Urol; 194(5): 1481-90. 2015)은 PnTx(19)에 의해 촉진된 혈관 확장은 NOS의 활성화와 NO의 생성, 특히 NOS의 신경 세포 및 유도된 아이소폼에 의해 매개된다는 것을 확인하였다. 따라서, PnTx(19)는 ED 치료에 대한 잠재적 후보로 주장되었으며, PDE5i에 기초한 치료에 잘 낫지 않는 환자에게 사용될 가능성이 있다.

[0012] 본 발명에 기술된 평활근 긴장 조절 펩타이드는 종래 기술에 보고된 것보다 더 강력하다. 예를 들어, 펩타이드는 과학 문헌에 이미 확립된 평활근 수축 실험 모델에서 PnTx(19)와 비교하여 평가하였다. 추가로 도시되는 바와 같이, 평활근 조절제 펩타이드는 비교기(PnTx (19))가 완전히 비활성이거나(기도의 평활근) 명백히 열등한 활동(음경 해면체의 평활근)을 갖는 유의한 활성을 나타낸다. 또한, PnTx(19)는 기도 평활근에서 전 염증 효과를 발휘하는 것으로 나타났다. 염증은 많은 상기 질환의 악화를 유발하거나 증폭시키는 메커니즘으로, 여러 질환, 그 중에서도, 천식과 COPD와 같은 폐 질환의 병태생리학에서 중요한 부분이다. 따라서, 전 염증 화합물의 사용은 현재 이러한 폐 질환에서 금지된다. 본 발명에 기술된 펩타이드는 폐 시스템에서 염증을 억제하는 대신에 전 염증 효과 작용을 하지 않는다. 더욱이, 본 발명에 기술된 펩타이드의 효과는 잠재적인 치료 응용분야의 폭을 증가시키는 다발성 메커니즘인 NO에 의해 매개된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 상기한 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 일부 실시태양에서, 펩타이드는 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열을 포함한다:

[0015] Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Ile-Ala-Trp-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15(2), 아미노에서 카복시 방향은 왼쪽에서 오른쪽이다;

[0016] 여기서:

[0017] Xaa1, Xaa2 및 Xaa15의 각각은 독립적으로 부재하거나 Ala, Arg, Lys 또는 His이고;

[0018] Xaa3은 독립적으로 부재하거나 Ala, Phe, Trp 또는 Tyr이고;

[0019] Xaa4, Xaa5 및 Xaa9의 각각은 독립적으로 부재하거나 Phe, Trp 또는 Tyr이고;

[0020] Xaa10은 독립적으로 부재하거나 His, Lys 또는 Arg이고;

[0021] Xaa11은 부재하거나 Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Pro, Cys 또는 Met이고;

[0022] Xaa12는 부재하거나 Ala이고; 및

[0023] Xaa13 및 Xaa14의 각각은 독립적으로 부재하거나 Asn, Gln, Ser 또는 Thr이고;

[0024] 여기서 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 5개 이상의 인접 아미노산 잔기를 갖는다.

[0025] 일부 실시태양에서, 식(2)에서, Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa5, Xaa11, Xaa12, Xaa13, Xaa14 및 Xaa15로 이루

어진 그룹의 하나 이상의 아미노산 잔기가 부재한다.

[0026] 일부 실시태양에서, 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 또는 SEQ NO ID: 5이다.

[0027] 일부 실시태양에서, 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 15 내지 18개의 인접 아미노산 잔기를 갖는다.

[0028] 일부 실시태양에서, 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 18개의 인접 아미노산 잔기를 갖는다.

[0029] 일부 실시태양에서, 펩타이드는 적어도 제 2 펩타이드 또는 단백질을 포함한다.

[0030] 일부 실시태양에서, 펩타이드는 식(1)의 펩타이드를 포함한다.

[0031] -Z-X-Z'- (1)

[0032] 여기서:

[0033] X는 상기 정의된 바와 같은 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열이고; 및

[0034] Z 및 Z'의 각각은 각각 독립적으로 세포 침투 강화 아미노산 서열 또는 2개 내지 15개의 자연 발생 아미노산을 갖는 활성 강화 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이다.

[0035] 일부 실시태양에서, H, 아세틸, 클로라이드 또는 트라이플루오로아세틸은 -Z-X-Z'-의 N-말단에 공유 결합된다.

[0036] 일부 실시태양에서, OH 또는 NH_2는 -Z-X-Z'-의 C-말단에 공유 결합된다.

[0037] 일부 실시태양에서, Z는 N-말단으로부터 C-말단까지, 아미노산 잔기 Gly, Glu 및 Arg를 포함하는 서열을 포함하는 펩타이드이고, 각각 SEQ ID NO: 5의 약리학적 활성 펩타이드 서열을 가지며, Z'는 부재한다.

[0038] 일부 실시태양에서, 상기 임의의 펩타이드는 알부민 결합 모이어티로부터 선택된 반감기 향상 모이어티에 연결된다. 일부 실시태양에서, 펩타이드는 펩타이드가 아세틸인 N- 말단 및 NH_2인 C-말단을 갖는 펩타이드이다.

[0039] 일부 실시태양에서, 다량체 형태의 펩타이드는 예를 들어, C-말단 도메인의 에스터화에 의해 아미노산 기반 절단 가능한 링커에 의해 공간을 차지한 식(2)의 서열을 갖는 2개 이상의 펩타이드를 포함하며, 여기서 다량체는 임의로 N-말단 아 실화되고 C-말단 아마이드화된다.

[0040] 일부 실시태양에서, 본 발명은 평활근의 수축의 조절 이상과 관련된 질환의 치료에 유용한 평활근 긴장 조절 펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 비히클, 부형제 또는 첨가제를 함유하는 약학적 조성물을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 상기 정의된 하나 이상의 펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함한다.

[0041] 일부 실시태양에서, 본 발명은 발기 부전(ED), 여성 성기능 부전(FSD), 양성 전립선 비대증(BPH), 레이노 증후군, 폐동맥 고혈압(PAH), 전신 동맥 고혈압(SAH) 및 천식, COPD, 폐 섬유증, 규폐증, 알레르기 기관지폐 아스페르길루스증, 유전성 혈관부종 및 신생아 저산소혈성 호흡 부전과 관련된 기도의 과민 반응을 포함하나 이에 제한되지 않는 평활근 수축의 조절로부터 이익을 얻는 질환의 치료를 위한 평활근 긴장 조절 펩타이드의 용도를 포함한다.

[0042] 예를 들어, 약학적 조성물의 제조 방법은 평활근의 긴장 조절이 유익한 장애의 치료에 충분한 양을 초과하는 임의의 하나 이상의 펩타이드를 약학적으로 허용 가능한 부형제에 도입하는 단계를 포함한다.

[0043] 일부 실시태양에서, 장애는 발기 부전(ED), 여성 성기능 부전(FSD), 양성 전립선 비대증(BPH), 레이노 증후군, 폐동맥 고혈압(PAH), 전신 동맥 고혈압(SAH) 및 천식, COPD, 폐 섬유증, 규폐증, 알레르기 기관지폐 아스페르길루스증, 유전성 혈관부종 및 신생아 저산소혈성 호흡 부전과 관련된 기도의 과민 반응으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0044] 일부 실시태양에서, 펩타이드는 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, 또는 SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 가지며 장애는 PAH이다.

[0045] 일부 실시태양에서, 평활근의 긴장 조절이 필요한 환자의 장애를 치료하는 방법은 환자에게 상기 임의의 하나 이상의 펩타이드의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0046] 일부 실시태양에서, 장애는 발기 부전(ED), 여성 성기능 부전(FSD), 양성 전립선 비대증(BPH), 레이노 증후군,

폐동맥 고혈압(PAH), 전신 동맥 고혈압(SAH) 및 천식, COPD, 폐 섬유증, 규폐증, 알레르기 기관지폐 아스페르길루스증, 유전성 혈관부종 및 신생아 저산소혈성 호흡 부전과 관련된 기도의 과민 반응으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0047] 일부 실시태양에서, 펩타이드는 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 23, 또는 SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 가지며 장애는 PAH이다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 내용 중에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 생체 외 히스타민에 의해 유도된 기관연골고리의 경련 수축에 대한 PnTx(19)(0.01 내지 10 μM)의 효과를 도시한다. 그래프는 다른 동물의 8개의 기관연골고리로 얻은 결과의 평균±SEM을 도시한다.

도 2는 생체 외에서 페닐에프린과 사전 계약된 해면체의 조각에서 전기 자극에 의해 유도된 이완에 대한 PnTx(19)(10^{-8} M)의 강화 효과를 도시한다. 그래프는 다른 동물의 6개의 해면상 스트립으로 얻은 결과의 평균±SEM을 도시한다.

도 3은 페닐에프린(PE)에 의해 미리 수축된 해면체의 조각에서 전기 자극에 의해 유도된 이완에 대한 평활근 긴장 조절 펩타이드의 생체 외 강화 효과를 도시한다. 펩타이드 SEQ ID NO: 5 (A), SEQ ID NO: 19 (B), 및 SEQ ID NO: 24 (C)는 해당 모델에서 예시적인 방식으로 평가되었다. 그래프는 다른 동물의 6개의 해면상 스트립으로 얻은 결과의 평균±SEM을 도시한다.

도 4는 페닐에프린(PE)에 의해 미리 수축된 해면체의 조각에서 전기 자극(8Hz)에 의해 유도된 이완에 대한 비교기 PnTx(19)(10^{-8} M) 및 평활근 긴장 조절 펩타이드의 생체 외 효과를 도시한다. 그래프는 다른 동물에서 추출한 적어도 6개의 해면체의 조각으로 얻은 결과의 평균±SEM을 도시한다. 그룹 간의 차이는 일원 분산 분석(One-Way ANOVA)에 이어 본페로니(Bonferroni) 사후 테스트로 분석되었다. *는 대조군과 비교된 $p<0.05$를 나타내며; **는 대조군과 비교된 $p<0.01$을 나타낸다.

도 5는 매일 치료 14일 후, 폐동맥 고혈압(PAH)의 모노크로탈린-유도 모델에서 폐동맥압 및 결과적으로 우심실(RV) 압력의 회복에서 SEQ ID NO: 19(0.06 mg/kg)의 생체 내 효과를 도시한다. 그래프는 질환이 없는 그룹(대조군) 및 비히클로 치료된 모노크로탈린 유도 그룹(MCT)과 비교된 심초음파 검사에 의해 측정된 폐동맥압 등급과 역 상관인 (A) PAT/PET 비율(폐동맥 가속 시간(PAT)/폐 동맥 박출 시간(PET) 비율); (B) 침습적 RV 카테터 삽입에 의해 측정된 RV의 수축기 압력(RVSP); (C) RV 카테터 삽입에 측정된 RV의 압력과 관련이 있는 비율 dP/dt(압력의 도함수/최대 시간의 도함수)에 대한 SEQ ID NO: 19의 효과를 도시한다. 그래프는 7개의 다른 동물에서 얻은 결과의 평균±SEM을 도시한다. 그룹 간의 차이는 양방향 ANOVA에 이어 본페로니 사후 테스트로 분석되었다. *는 $p<0.05$를 나타내며; **는 $p<0.01$을 나타내며; ***는 $p<0.001$을 나타내며; 모두는 대조군과 비교된다.

도 6은 매일 치료 14일 후, PAH의 모노크로탈린-유도 모델에서 심장 리모델링에 있어서 SEQ ID NO: 19(0.06mg/kg)의 생체 내 효과를 도시한다. 그래프는 질환이 없는 그룹(대조군) 및 비히클로 치료된 모노크로탈린 유도 그룹(MCT)과 비교된 (A) RV 출구 영역 및 (B) LV 영역에 대한 SEQ ID NO: 19의 효과를 도시한다. 그래프는 7개의 다른 동물에서 얻은 결과의 평균±SEM을 도시한다. 그룹 간의 차이는 양방향 ANOVA에 이어 본페로니 사후 테스트로 분석되었다. *는 $p<0.05$를 나타내며; **는 $p<0.01$을 나타내며; ***는 $p<0.001$을 나타내며; 모두는 대조군과 비교된다.

도 7은 매일 치료 28일 후, PAH의 모노크로탈린-유도 모델에서 SEQ ID NO: 19(0.06mg/kg)의 생체 내 항 염증 효과를 도시한다. 그래프는 질환이 없는 그룹(대조군) 및 치료가 없는 모노크로탈린 유도 그룹(MCT)과 비교된 하기 전 염증성 사이토카인 방출의 심장 균질물의 감소에 대한 SEQ ID NO: 19의 효과를 도시한다: (A)는 종격동 림프절 비대의 예방에 미치는 영향, (B) 인터페론(IFN)-γ, (C) ELISA에 의해 측정되고 그래프 상에 pg/mg 단백질로 나타낸 인터루킨(IL)-1β, 및 (D) 종양 괴사 인자로 측정(TNF)-α을 도시한다. 그래프는 7개의 다른 동물에서 얻은 결과의 평균±SEM을 도시한다. 그룹 간의 차이는 일방향 ANOVA에 이어 본페로니 다중 테스트로 분석되었다. *와 #는 각각 대조군과 MCT 그룹과 비교될 때 $p<0.05$를 나타내며; ***는 $p<0.001$을 나타내며; ##는 $p<0.01$을 나타낸다.

도 8은 뮤린 모델(n = 5)에서 면역원성 검사 6시간 후 펩타이드(10nMol 및 30nMol)의 기관 내 점적 후 기관지 폐포 공간에서 호중구 이동에 대한 PnTx(19), SEQ ID NO: 19 및 SEQ ID NO: 24의 효과를 도시한다. 값은 적어도 5 마리 동물의 평균±SEM을 나타내며, +++는 PBS로 자극된 PBS 치료된 마우스와 비교할 때 $p<0.001$을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] I-정의

[0051] 달리 표시되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어 및 표현은 본 발명의 당업자에게 동일한 의미를 갖는다. 당업자는 특히 참조문헌 "Current Protocols in Molecular Biology" for definitions and terms of the art (AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, G., SMITH, J.A., STRUHL, K. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc., Media Pa. 2015)을 참조한다.

[0052] 아미노산 잔기의 약어는 일반적인 20-L 아미노산 중 하나를 참조하기 위해 당업계에서 사용되는 3 글자 및/또는 1 글자의 표준 코드이다.

[0053] "보존적 아미노산 치환"은 평활근 이완 활성(예를 들어, 평활근 이완 촉진 활성) 또는 주어진 폴리펩타이드 또는 단백질의 3차 구조의 상당한 변형을 초래하지 않는 치환이다. 이러한 치환은 일반적으로 유사한 물리 화학적 특성을 가진 다른 잔기에 의해 선택된 아미노산 잔기의 치환을 필요로 한다. 예를 들어, 아스파르트산(Asp)에 의한 글루타민산(Glu)의 치환은 둘 다 유사한 크기의 음으로 하전된 아미노산이기 때문에 보존적 치환을 구성하는 것으로 간주된다. 물리 화학적 특성에 의한 아미노산 그룹화는 당업자에게 공지되어 있다.

[0054] "펩타이드" 및 "폴리펩타이드"는 본 발명에서 상호 교환 가능한 형태로 사용되며 펩타이드 연결에 의해 연결된 아미노산 잔기 사슬로 구성된 화합물을 의미한다. 달리 명시되지 않는 한, 펩타이드의 서열은 카복시-말단에 대한 아미노-말단의 순서로 제공된다.

[0055] 서열의 "동일성"은 중첩을 최대화하기 위해 정렬될 때 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 비교하고, 서열의 갭을 최소화한 다음, 서열 사이의 동일한 잔기를 설명함으로써 결정된다. 아미노산 또는 핵산의 두 서열의 동일성 백분율은, 일반적으로 컴퓨터 프로그램을 사용하여 서열의 정보를 비교하는 더 긴 서열에 대해 수행된 육안 검사 및/또는 수학적 계산에 의해 결정될 수 있다. 펩타이드 및 핵산의 서열을 비교하기 위해 당업자에 의해 사용될 수 있는 프로그램의 예는 국립 의학 도서관 웹 사이트[ncbi.nlm.nih.gov/BLAST]에서 무료로 입수할 수 있는 BLAST(BLASTP) 및 BLASTN이다. 바람직한 양식에서, 서열은, 육안 검사 또는 적절한 컴퓨터 프로그램으로부터 결정될 때, 아미노산 서열이 적어도 50% 동일하면, 보다 바람직하게는 서열이 70% 또는 75% 동일하면, 더욱더 바람직하게는 서열이 80% 또는 85% 동일하면, 더욱더 바람직하게는 서열이 90 또는 95% 동일하면, 서열이 서로 상동성이거나 동일한 것으로 간주된다.

[0056] 펩타이드 또는 펩타이드 단편은 원래 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 동일하거나 상동인 아미노산 서열이 있는 경우 원래 펩타이드 또는 펩타이드 단편에서 "유래"된다.

[0057] II-평활근 이완제 펩타이드 및 조성물

[0058] 일부 실시태양에서, 본 발명은 평활근, 특히 기도 및 혈관에 존재하는 평활근의 이완을 촉진할 수 있는 합성 펩타이드에 관한 것이다. 유사한 활성을 갖는 다른 펩타이드가 선행 기술에 제시되어 있지만, 이용 가능한 보고 중 어느 것도 본 발명에 제시된 화합물을 개시하거나 예상하지 않는다. 해당 펩타이드는 구조적으로 독특하고 다른 펩타이드에 대해 매우 민감하지 않거나 확실히 무감각한 시스템에서 생물학적 효과를 가지므로 그와 상관관계가 있는 것으로 간주될 수 있다.

[0059] 일부 실시태양에서, 펩타이드는 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열을 포함한다:

[0060] Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Ile-Ala-Trp-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15(2), 아미노에서 카복시 방향은 왼쪽에서 오른쪽이다;

[0061] 여기서:

[0062] Xaa1, Xaa2 및 Xaa15의 각각은 독립적으로 부재하거나 Ala, Arg, Lys 또는 His이고;

[0063] Xaa3은 독립적으로 부재하거나 Ala, Phe, Trp 또는 Tyr이고;

[0064] Xaa4, Xaa5 및 Xaa9의 각각은 독립적으로 부재하거나 Phe, Trp 또는 Tyr이고;

[0065] Xaa10은 독립적으로 부재하거나 His, Lys 또는 Arg이고;

[0066] Xaa11은 부재하거나 Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Pro, Cys 또는 Met이고;

[0067] Xaa12는 부재하거나 Ala이고; 및

[0068] Xaa13 및 Xaa14의 각각은 독립적으로 부재하거나 Asn, Gln, Ser 또는 Thr이고;

[0069] 여기서 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 5개 이상의 인접 아미노산 잔기를 갖는다.

[0070] 일부 실시태양에서, 식(2)에서, Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa5, Xaa11, Xaa12, Xaa13, Xaa14 및 Xaa15로 이루어진 그룹의 하나 이상의 아미노산 잔기가 부재한다.

[0071] 일부 실시태양에서, 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 또는 SEQ NO ID: 5이다.

[0072] 일부 실시태양에서, 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 15 내지 18개의 인접 아미노산 잔기를 갖는다.

[0073] 일부 실시태양에서, 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열은 18개의 인접 아미노산 잔기를 갖는다.

[0074] 일부 실시태양에서, 펩타이드는 적어도 제 2 펩타이드 또는 단백질을 포함한다.

[0075] 일부 실시태양에서, 본 발명은 식(1)의 약리학적으로 활성인 펩타이드 서열을 갖는 펩타이드를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0076] -Z-X-Z'- (1)

[0077] 여기서:

[0078] Z 및 Z'의 각각은 각각 독립적으로 세포 침투 강화 아미노산 서열 또는 2개 내지 15개의 자연 발생 아미노산을 갖는 활성 강화 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고, H, 아세틸, 클로라이드 또는 트라이플루오로아세틸은 -Z-X-Z'-의 N-말단에 공유 결합되고, X는 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열을 갖는 펩타이드 X이다:

[0079] Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Ile-Ala-Trp-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15(2), 아미노에서 카복시 방향은 왼쪽에서 오른쪽이다;

[0080] 여기서:

[0081] Xaa1, Xaa2 및 Xaa15의 각각은 독립적으로 부재하거나 Ala 또는 염기성 측쇄를 가진 아미노산(Arg, Lys 또는 His)이고;

[0082] Xaa3은 독립적으로 부재하거나 Ala 또는 방향족 측쇄를 가진 아미노산(Phe, Trp 또는 Tyr)이고;

[0083] Xaa4, Xaa5 및 Xaa9의 각각은 독립적으로 부재하거나 방향족 측쇄를 가진 아미노산(Phe, Trp 또는 Tyr)이고;

[0084] Xaa10은 독립적으로 부재하거나 염기성 측쇄를 가진 아미노산(His, Lys 또는 Arg)이고;

[0085] Xaa11은 부재하거나 비 극성 아미노산(Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Pro, Cys 또는 Met)이고;

[0086] Xaa12는 부재하거나 Ala이고;

[0087] Xaa13 및 Xaa14의 각각은 독립적으로 부재하거나 하전되지 않은 측쇄를 갖는 아미노산(Asn, Gln, Ser 또는 Thr)이고;

[0088] X는 5개 이상의 아미노산 연속 잔기이다.

[0089] 일부 실시태양에서, X는 다음 서열을 가진다: Ac-Arg-Ala-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys-NH_2 (SEQ ID NO: 1)

[0090] 일부 실시태양에서, 펩타이드는 식(1)의 펩타이드를 포함한다.

[0091] -Z-X-Z'- (1)

[0092] 여기서:

[0093] X는 상기 정의된 바와 같은 식(2)의 약리학적 활성 펩타이드 서열이고; 및

[0094] Z 및 Z'의 각각은 각각 독립적으로 세포 침투 강화 아미노산 서열 또는 2개 내지 15개의 자연 발생 아미노산을 갖는 활성 강화 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이다.

[0095] 일부 실시태양에서, H, 아세틸, 클로라이드 또는 트라이플루오로아세틸은 -Z-X-Z'-의 N-말단에 공유 결합된다.

[0096] 일부 실시태양에서, OH 또는 NH_2는 -Z-X-Z'-의 C-말단에 공유 결합된다.

[0097] 일부 실시태양에서, Z는 N-말단으로부터 C-말단까지, 아미노산 잔기 Gly, Glu 및 Arg를 포함하는 서열을 포함하는 펩타이드이고, 각각 SEQ ID NO: 5의 약리학적 활성 펩타이드 서열을 갖지며, Z'는 부재한다.

[0098] 일부 실시태양에서, 상기 임의의 펩타이드는 알부민 결합 모이어티로부터 선택된 반감기 향상 모이어티에 연결된다. 일부 실시태양에서, 펩타이드는 펩타이드가 아세틸인 N- 말단 및 NH_2인 C-말단을 갖는 펩타이드이다.

[0099] 일부 실시태양에서, 다량체 형태의 펩타이드는 예를 들어, C-말단 도메인의 에스터화에 의해 아미노산 기반 절단 가능한 링커에 의해 공간을 차지한 식(2)의 서열을 갖는 2개 이상의 펩타이드를 포함하며, 여기서 다량체는 임의로 N-말단 아 실화되고 C-말단 아마이드화된다.

[0100] 일부 실시태양에서, 본 발명은 평활근의 수축의 조절 이상과 관련된 질환의 치료에 유용한 평활근 긴장 조절 펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 비히클, 부형제 또는 첨가제를 함유하는 약학적 조성물을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 상기 정의된 하나 이상의 펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함한다.

[0101] III-펩타이드 합성

[0102] 본 발명의 펩타이드는 재조합 및 비-재조합 방법을 포함하여 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 합성 경로(비 재조합)는 제한 없이 펩타이드의 고체상 화학 합성, 펩타이드의 액체상 화학 합성 및 생촉매 합성을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 펩타이드는 수동, 자동 또는 반자동 시스템을 사용하여 액체 또는 고체상에서 화학적 합성에 의해 수득된다.

[0103] 예를 들어, 고체상 펩타이드 합성(SPPS)은 MERRIFIELD(MERRIFIELD, R.B. **Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide** J. Am. Chem. Soc., 85 : 2149- 2154. 1963)에 의한 설명 때문에 공지되고 널리 사용된다. 당업자는 다양한 SPPS 변형을 사용할 수 있다(GUTTE, B. **Peptide Synthesis, Structures, and Applications**. Academic Press, San Diego, CA, Chapter 3, 1995; and WHITE, P.D., and CHAN, W.C. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis**: A practical Approach. Oxford University Press, Oxford, 2004; MACHADO, A., LIRIA, C.W., PROTI, P.B., REMUZGO, C., MIRANDA, T.M. **Sinteses quimica e enzimatica de peptideos**: principios basicos e aplicacoes. Quim. Nova, 5:781-789 2004 참조). 간단히 말해서, SPPS에 의한 펩타이드의 구축은 C → N 말단에서 일어난다. 이를 위해, 관심 C-말단 아미노산은 고체 지지체에 결합된다. 후속적으로 부착될 아미노산은 그룹 Boc, Fmoc 또는 다른 적절한 보호 라디칼로 보호된 N-말단 부분을 가지며, C-말단 부분은 표준 결합 시약으로 활성화된다. 이어서, 지지체에 결합된 아미노산의 유리 말단 아민은 후속 아미노산의 말단 카복시 부분과 반응한다. 그런 다음 다이펩타이드의 말단 아민은 탈보호되고 폴리펩타이드가 완성될 때까지 과정이 반복된다. 적절할 때마다, 출발 아미노산은 측쇄에서 보호 기능을 가질 수도 있다.

[0104] 대안적으로, 본 발명의 펩타이드는 재조합 방법으로 얻을 수 있다. 가능한 방법적 변이를 제한하지 않고, 예시적인 프로토콜은 다음을 포함한다: 관심 펩타이드를 암호화하는 핵산의 구축; 발현 벡터에서 상기 핵산의 클로닝; 상기 벡터에 의한 숙주 세포 (세포, 채소, 대장균과 같은 박테리아, 사카로마이세스 세레비시애와 같은 효모 또는 중국 햄스터 난소 세포와 같은 포유 동물 세포)의 형질 전환; 관심 펩타이드를 생산하기 위한 핵산의 발현. 시험관 내 및 원핵 및 진핵 숙주 세포에서 재조합 폴리펩타이드의 생산 및 발현 방법은 당업자에게 공지되어 있다(U.S. 4,868,122 및 SAMBROOK, J., FRITSCH, EF, MANIATIS, **T. Molecular Cloning**: A Laboratory Manual. Ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 참조).

[0105] III.A - 상관 펩타이드

[0106] 당업자는 본 발명에 기술된 것과 같은 펩타이드에 대해 특정 변형이 이루어질 수 있으며, 이는 상기 펩타이드의 특성에 약간의 변화를 일으키거나 전혀 변경하지 않을 수 있음을 인지한다. 따라서, 본 발명에서 입증된 것과 관련된 펩타이드는 원래 펩타이드의 치료 활성의 일부 또는 전부를 보유하는 유사체 및/또는 유도체를 포함한다. 이러한 맥락에서, 용어 "유사체"는 본 발명에 기술된 펩타이드에 대한 아미노산의 치환, 결실 또는

첨가에 의해 수득된 변이체를 나타내고; "유도체"는 본 발명에 기술된 펩타이드 및/또는 이들의 유사체의 1차 서열에 화학적 변형을 포함하는 변이체를 나타낸다. 특정 양태에서, 이러한 변이체는 펩타이드의 치료 활성 중 적어도 하나의 개선을 입증할 수 있다. 추가로, 본 발명의 펩타이드는 L-아미노산, D-아미노산 또는 이들의 조합으로 임의의 비율로 구성될 수 있다.

[0107] 다른 실시태양은 이를 필요로하는 환자에게 투여하기 전, 후에 또는 동안 임의의 활성 펩타이드로 화학적 또는 효소적으로 전환되는 전구 약물 또는 약물 전구체를 포함한다. 이러한 화합물은 무엇보다도 아미노산의 에스터, N-알킬, 포스페이트 또는 접합체(ARNAB, DE, Application of Peptide-Based Prodrug Chemistry in Drug Development; Springer, New York Heidelberg Dordrecht London, 2013), 보다 친 유성 펩타이드(CACCETTA, R., BLANCHFIELD, J.T., HARRISON, J., TOTH, I., BENSON, H.A.E. Epidermal Penetration of a Therapeutic Peptide by Lipid Conjugation; Stereo-Selective Peptide Availability of a Topical Diastereomeric Lipopeptide. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 12 (3), 327-333. 2006)를 포함할 수 있으며, 일부 경우에, 이러한 화합물은, 예를 들어, C-말단 도메인의 에스터화에 의해 극성 링커를 추가함으로서 더 친수성이 된다.

[0108] 본 발명은 또한 임의의 선형 활성 펩타이드로 전환될 수 있는 임의의 고리형 펩타이드를 포함한다. 본 발명은 생체 접합체 또는 글리코실화 또는 페길화와 같은 거대 분자에 의한 화학적 변형을 추가로 포함한다(HUTTUNEN, K.M., RAUNIO, H., RAUTIO, J. Prodrugs—from Serendipity to Rational Design. Pharmacol Rev. 63:750-771, 2011).

[0109] 본 발명은 아미노산 그룹의 바이오 에스터에 기초한 활성 구조를 투영하기 위한 지지체로서 임의의 활성 펩타이드를 사용하는 펩타이드 모방 접근법을 추가로 포함한다(VAGNER, J., QU, H. and HRUBY, V.J. Peptidomimetics, a synthetic tool of drug Discovery; Curr Opin Chem Biol. 12(3): 292-296. 2008.).

[0110] 본 발명은 본 발명에 기술된 펩타이드와 관련된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 보존적 또는 비 보존적 아미노산 치환을 함유하는 유사체를 포함한다. 보존적 또는 비 보존적인 바람직한 아미노산 치환은 통상적인 방법을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서, 평활근 긴장 조절 펩타이드는 보존적 치환을 포함하는 유사체를 포함하며, 이는 원래 펩타이드의 것과 유사한 기능적 및 화학적 특성을 갖는 변이체를 생성한다. 또 다른 양태에서, 유사체는 원래의 펩타이드에 의해 입증된 것과 상당히 다른 특성을 생성할 수 있는 비 보존적 치환을 포함한다.

[0111] 천연 아미노산은 비극성(비극성:(글리신(Gly), 알라닌(Ala), 발린(Val), 류신(Leu), 이소류신(Ile), 메티오닌(Met)); 비하전 극성:(시스테인(Cys), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 프롤린(Pro), 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln)); 산(아스파르트 산(Asp), 글루탐산(Glu); 염기성(히스티딘(His), 라이신(Lys), 아르기닌(Arg)); 및 방향족(트립토판(Trp), 티로신(Tyr), 페닐알라닌(Phe))의 측쇄 특성으로 분류될 수 있다. 예를 들어, 비 보존적 치환은 한 종류의 아미노산과 상이한 그룹으로부터의 다른 것의 교환을 수반할 수 있으며; 이들은 치료 활성에 중요하지 않은 펩타이드 영역으로 추가로 도입될 수 있다. 그러나, 치환은 바람직하게는 보존적이다. 즉, 이들은 아미노산과 동일한 종류의 다른 것의 교환을 수반한다. 이 유형의 변형은 또한 펩타이드의 합성 동안 규칙적으로 사용될 수 있는 펩티도모방체 및 기타 비정형의 아미노산 형태을 포함하는 인공 및/또는 비 필수 아미노산 잔기에 의한 치환을 포함한다.

[0112] 아미노산의 치환을 정의하기 위한 전략은 측쇄의 소수성 지표에 의해 안내될 수 있다. 폴리펩타이드의 기능에 대한 친수성 아미노산의 중요성은 당업자에 의해 이해된다(KYTE, J. and DOOLITTLE. R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. 157:105-31. 1982). 각 아미노산은 소수성과 전하의 특성에 기반하여 결정된 친수성 지수를 가진다. 이들은 Ile(+4.5); Val(+4.2); Leu(+3.8); Phe(+2.8); Cys(+2.5); Met(+1.9); Ala(+1.8); Gly(-0.4); Thr(-0.7); Ser(-0.8); Trp(-0.9); Tyr(-1.3); Pro(-1.6); His(-3.2); Glu(-3.5); Gln(-3.5); Asp(-3.5); Asn(-3.5); Lys(-3.9); 및 Arg(-4.5)이다. 당업자는 생물학적 활성의 현저한 손실 없이 유사한 친수성 지수를 갖는 아미노산이 상호 교환될 수 있음을 이해한다.

[0113] 보존적 치환은 또한 친수성에 기초할 수 있는 것으로 알려져 있다. 인접한 아미노산의 친수성에 의해 결정되는 폴리펩타이드의 평균 친수성은 화합물의 생물학적 특성과 관련이 있다. 특허 US 4,554,101에 따르면, 천연 아미노산은 다음과 같은 친수성 값을 갖는다: Arg(+3.0); Lys(+3.0); Asp(+ 3.0±1); Glu(+3.0±1); Ser(+0.3); Asp(+0.2); Gln(+0.2); Gly(0); Thr(-0.4); Pro(-0.5±1); Ala(-0.5); His(-0.5); Cys(-1.0); Met(-1.3); Val(-1.5); Leu(-1.8); Ile(-1.8); Tyr(-2.3); Phe(-2.5); 및 Trp(-3.4).

[0114] 본 발명에서 언급된 보존적 치환은 제한 없이 다음을 포함한다 :

[0115] Ac-Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Ala-NH_2 (SEQ ID NO: 2)

[0116] Ac-Arg-Gln-Ala-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys-NH_2 (SEQ ID NO: 3)

[0117] Ac-Ala-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys-NH_2 (SEQ ID NO: 4)

[0118] Ac-Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys-NH_2 (SEQ ID NO: 5)

[0119] Ac-Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Ser-Asn-Lys-NH_2 (SEQ ID NO: 6)

[0120] 본 발명의 특정 양태에서, 펩타이드의 유사체는 원래 기술된 펩타이드와 비교하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 결실을 포함한다. 결실 된 아미노산(들)은 양쪽 측면에서, 펩타이드의 서열 내부적으로 또는 한쪽 또는 양쪽 측면 및 서열 내부적으로 N-말단 또는 C-말단 영역에서 발견될 수 있다. 유사체가 하나 이상의 결실을 갖는 경우, 제거된 아미노산은 인접하거나 다른 영역에 위치될 수 있다.

[0121] 본 발명에 의해 고려되는 결실은 제한 없이 다음을 포함한다:

[0122] Ac-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-NH_2 (SEQ ID NO: 17)

[0123] Ac-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-NH_2 (SEQ ID NO: 18)

[0124] Ac-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-NH_2 (SEQ ID NO: 19)

[0125] Ac-Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-NH_2 (SEQ ID NO: 20)

[0126] Ac-Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-NH_2 (SEQ ID NO: 22)

[0127] Ac-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-NH_2 (SEQ ID NO: 23)

[0128] Ac-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-NH_2 (SEQ ID NO: 24)

[0129] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 원래 기술된 펩타이드와 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 첨가를 갖는 유사체를 포함한다. 해당 삽입은 양쪽 측면에서, 펩타이드의 서열 내부적으로, 또는 한쪽 또는 양쪽 측면 및 서열 내부적으로 N-말단 또는 C-말단 영역에서 발생할 수 있다. 유사체가 하나 이상의 첨가를 가질 때, 아미노산은 분자의 다른 영역에 연속적으로 또는 구별되어 삽입될 수 있다.

[0130] 본 발명은 또한 연결 그룹에 의해 연결되고 단독 활성 펩타이드에서 전환되거나 전체 분자로서의 약학적 활성을 나타내는 2개 이상의 활성 펩타이드의 임의의 조합을 포함한다(HUTTUNEN, K. AND RAUTIO, J. Prodrugs - An Efficient Way to Breach Delivery and Targeting Barriers. Current Topics in Medicinal Chemistry.11, 2265-2287. 2011). 아미노산의 삽입은 또한 본 발명에 기술된 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단 영역에 첨가될 수 있는 아미노산, 융합 펩타이드 및 투과-향상 서열의 링커를 포함한다. 세포 투과 및/또는 경피 흡수를 향상시킬 수 있는 펩타이드 서열은 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들어, 쿠마 등(KUMAR, S., NARISHETTY, S.T., TUMMALA, H. Peptides as Skin Penetration Enhancers for Low Molecular Weight Drugs and Macromolecules. In: Dragicevic N., Maibach H. (eds) Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Springer, Berlin, Heidelberg. 2015) 및 미국 특허 US 14, 911,019 및 WO 2012064429에서 발견될 수 있다.

[0131] 특정 양태에서, 상기 언급된 아미노산, 융합 펩타이드 및 투과-향상 서열의 상기 링커는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 15개의 추가 아미노산을 가질 수 있으며, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 및 SEQ ID NO: 30에 예시된 연결 모이어티를 통해 평활근 긴장 조절 펩타이드에 연결될 수 있다. 이러한 모이어티는 치료 펩타이드를 다른 치료 펩타이드에 연결하는 데 선택적으로 사용된 원자 또는 원자 집합일 수 있다. 대안적으로, 커넥터 분자는 적절한 환경에서 생물학적 활성 부분의 방출을 허용하기 위해 단백질 분해 절단을 위해 디자인된 아미노산 서열로 구성될 수 있다. 또한, 본 발명에 기술된 평활근 긴장 조절 펩타이드는 약리학적 특성(약동학 및/또는 약력학) 및/또는 물리화학적 특성을 개선하도록 디자인된 펩타이드에 융합될 수 있다.

[0132] 본 발명에 의해 고려되는 추가는 제한 없이 다음을 포함한다:

[0133] Ac-Gly-Glu-Arg-Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys-NH_2 (SEQ ID NO: 27)

[0134] Ac-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-NH_2 (SEQ ID NO: 28)

[0135] Ac-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Arg-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Arg-Lys-Tyr-Trp-Ala-Ile-NH_2 (SEQ ID NO: 29)

[0136] Ac-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-NH_2 (SEQ ID NO: 30)

[0137] 일부 양태에서, 본 발명은 펩타이드 사슬의 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 메틸 또는 또 다른 소형 알킬 그룹을 갖는 화학적 변형을 함유하는 유도체를 포함한다. 이러한 그룹의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 부틸, 아이소부틸, 펜틸 등을 포함한다. 대안적으로, 유도체는 펩타이드 서열에 대한 하나 이상의 글리코시드 모이어티의 부착으로부터 생성된다. 예를 들어, 인용된 유도체는 펩타이드 서열에 대한 하나 이상의 단당류, 이당류 또는 삼당류의 부착에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 상기 유도체는 펩타이드 서열의 임의의 위치에서 하나 이상의 단당류, 이당류 또는 삼당류의 부착에 의해 수득될 수 있다. 글리코실화는 펩타이드의 천연 아미노산에 영향을 미칠 수 있거나, 대안적으로 하나의 아미노산이 변형을 받기 위해 치환되거나 첨가될 수 있다.

[0138] 상기 글리코실화 펩타이드는 통상적인 SPPS 기술에 의해 수득될 수 있으며, 여기서 관심 글리코-아미노산은 펩타이드의 합성 이전에 제조되고 이어서 원하는 위치의 서열에 첨가된다. 따라서, 평활근 긴장 조절 펩타이드는 시험관 내에서 글리코실화될 수 있다. 이 경우, 글리코실화가 이전에 발생할 수 있다. 참조를 위해 본 발명에 포함된 문헌 US 5,767,254, WO 2005/097158, 및 DOORES 등(DOORES, K., GAMBLIN, D.P. AND DAVIS, B.G. Exploring and exploiting the therapeutic potential of glycoconjugates. Chem. Commun., 1401-1403, 2006)은 아미노산의 글리코실화를 기술한다. 예를 들어, 세린 및 트레오닌 잔기의 알파 또는 베타 선택적 글리코실화는 코에니히-크노르 반응 및 중간 시프 염기를 사용하는 레미엑스의 제자리 아노머화 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 그런 후에 글리코실화된 시프 염기의 탈보호는 약산성 조건에서 또는 수소 분해에 의해 수행된다.

[0139] 본 발명에 기술된 펩타이드의 아미노산 잔기 중 하나 이상에 도입될 수 있는 단당류 중에는 글루코스(덱스트로스), 프룩토스, 갈락토스 및 리보스가 있다. 잠재적으로 사용하기에 적합한 다른 단당류는, 다른 것들 중에서, 글리세르알데하이드, 다이하이드록시아세톤, 에리트로스, 트레오스, 에리트룰로스, 아라비노스, 릭소스, 자일로스, 리불로스, 자일룰로스, 알로스, 알트로스, 만노스, N-아세틸뉴라민산, 푸코스, N-아세틸갈락토사민, N-아세틸글루코사민이다. 평활근 긴장 조절 펩타이드의 변형에 사용하기 위한 단당류, 이당류 및 삼당류와 같은 글리코사이드는 합성 또는 천연 기원일 수 있다. 본 발명에 기술된 아미노산의 하나 이상의 잔기에 도입될 수 있는 이당류는 수크로스, 락토스, 트레할로스, 알로스, 멜리비오스, 셀로비오스 등을 포함한다. 삼당류는 아카보스, 라피노스 및 멜레지토스일 수 있다.

[0140] 본 발명의 추가 양태에서, 평활근 긴장 조절 펩타이드는 비오틴에 결합될 수 있다. 그런 다음 이러한 펩타이드-비오틴 복합체는 아비딘에 결합될 수 있다.

[0141] 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명에 기술된 펩타이드는 상기 펩타이드의 생물학적 활성 및 특성의 부분적 감소만을 나타내거나 전혀 감소시키지 않도록 변형될 수 있다. 일부 경우에, 그러한 변형은 의도된 치료 활성의 개선을 가져 오기 위해 실현될 수 있다. 따라서, 본 발명의 범위는 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 및 그로부터 유도 가능한 임의의 범위, 예를 들어, 비 변형 펩타이드에 비해 적어도 70% 내지 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 81% 내지 90%, 또는 더욱더 바람직하게는 91% 내지 99%의 치료 활성을 보유하는 변형체를 포함한다. 본 발명의 범위는 또한 비 변형 펩타이드와 비교하여, 100%, 110%, 125%, 150%, 200% 또는 300% 초과보다 높은 치료 활성을 갖거나 100 또는 100배 더 높은 활성 및 이로부터 유래될 수 있는 임의의 범위를 나타내는 변이체를 포함한다.

[0142] 본 발명에 기술된 평활근 긴장 조절 펩타이드는 또한 직접적으로 또는 스페이서 그룹에 의해 수용성 폴리머에 공유 결합될 수 있다. 본 발명의 범위에 삽입된 펩타이드-폴리머 접합체의 예는 다음을 포함한다: 분리 가능하거나 안정한 방식으로 펩타이드에 결합된, 특히 N-말단 부분에 결합된 수용성 폴리머를 함유하는 접합체; 분리 가능하거나 안정한 방식으로 펩타이드에 결합된, 특히 C-말단 부분에 결합된 수용성 폴리머를 함유하는 접합체; 분리 가능하거나 안정한 방식으로 펩타이드에 결합된, 특히 펩타이드 사슬에 내부에 위치한 아미노산에 결합된 수용성 폴리머를 함유하는 접합체; 분리 가능하거나 안정한 방식으로 펩타이드에 결합된, 예를 들어, N-말단 부분 및 펩타이드 서열 내부에 위치된 아미노산의 측쇄와 같은 별개의 영역에서 펩타이드에 결합된 접합체. 대안

적으로, 수용성 폴리머에 결합될 아미노산은 N-말단 또는 C-말단 부분, 또는 펩타이드의 1차 구조의 중간에 삽입될 수 있다.

[0143] 전형적으로, 상기 고려된 폴리머는 친수성, 비 펩타이드성, 생체 적합성 및 비 면역원성이다. 이와 관련하여, 단독으로 또는 다른 물질(예를 들어, 치료 펩타이드와 같은 생물학적 활성 성분)과 조합하여 살아있는 유기체에 투여하는 것과 관련된 유익한 효과가 임상적으로 관찰 가능한 임의의 유해한 효과를 극복한다면 물질은 생체 적합성으로 간주된다. 생체 내 물질의 의도된 사용이 바람직하지 않은 면역학적 반응(예를 들어, 항체 형성)을 생성하지 않거나 면역학적 반응이 촉발되는 경우 그러한 사건이 임상적으로 중요하거나 중요하지 않은 경우 물질은 비 면역 원성으로 간주된다. 이러한 수용성 폴리머의 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리 프로필렌 글리콜(PPG), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 코폴리머, 폴리올레핀 알코올, 폴리바이닐피롤리돈, 폴리(하이드록시알킬 메타크릴아마이드), 폴리(하이드록시알킬 메타크릴레이트), 황산화 또는 비 황산화 다당류, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린) 및 이의 코폴리머 및 터폴리머를 포함하는 이들 폴리머의 조합을 제한 없이 포함한다.

[0144] 상기 인용된 수용성 폴리머는 특정 구조에 제한되지 않으며 분지형, 분기 형, 다중 분지형(예를 들어, 폴리올 코어에 결합된 PEG) 또는 수지상형(여러 말단 그룹을 가진 밀집된 분지형 구조)과 같은 선형 또는 비선형 구조를 가질 수 있다. 펩타이드에 대한 폴리머의 접합을 위한 방법은 선행 기술뿐만 아니라 알킬화제 또는 아실화제 중에서 선택될 수 있는 적절한 시약에 대해 기술되어 있다(HARRIS, J. M. and ZALIPSKY, S., **Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications**. ACS, Washington, 1997; Veronese, F., and Harris, J.M. **Peptide and Protein PEGylation**. <u>Advanced Drug Delivery Reviews</u>, 54(4); 453-609. 2002; ZALIPSKY, S., LEE, C. **Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides**. in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, ed., Plenus Press, New York, 1992; ZALIPSKY, S. **Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates**. <u>Advanced Drug Reviews</u>, 16:157-182, 1995; and in ROBERTS, M.J., BENTLEY, M.D., HARRIS, J.M., **Chemistry for peptide and protein PEGylation**. <u>Adv. Drug Delivery Reviews</u>, 54, 459-476, 2002 참조). 일반적으로, 수용성 폴리머의 평균 분자량은 100달톤(Da) 내지 150,000Da(150kDa)에서 변할 수 있다. 예를 들어, 250Da 내지 80kDa, 500Da 내지 65kDa, 750Da 내지 40kDa, 또는 1kDa 내지 30kDa의 평균 분자량을 가진 수용성 폴리머가 사용될 수 있다. 본 발명의 추가 양태에서, 평활근 긴장 조절 펩타이드는 물리 화학적, 약동학 및/또는 약력학적 특성을 개선하기 위해 펩타이드 사슬의 하나 이상의 위치에서 아실화될 수 있다. 예를 들어, 친유성 아실기의 도입은 치료 펩타이드의 혈장 반감기를 증가시키기 위해 널리 사용되는데, 그 이유는 이들이 결합된 그룹을 산화에 덜 민감하게 만들기 때문이다. 펩타이드의 아실화를 위한 방법 및 시약은 당업자에게 공지되어 있다. 본 발명에 참고 문헌으로 포함된 문서 WO 98/08871, US 2003/0082671, WO 2015/162195는 펩타이드의 아실화를 위한 시약 및 조건을 예시한다. 아실기에 의한 유리 아민의 변형은 펩타이드와 단백질의 아실화를 촉진하는 데 특히 유용하다(ABELLO, N., KERSTJENS, H.A., POSTMA, D.S., BISCHOFF, R. **Selective acylation of primary amines in peptides and proteins**. <u>Journal of proteome research</u>, 6(12): 4770-4776. 2007). 이 특정 경우에, 평활근 긴장 조절 펩타이드는 N-말단 아민에서 또는 원래 서열에 존재하는 하나 이상의 아미노산의 측쇄에서 아실화되거나 해당 아실화를 수용할 목적으로 삽입될 수 있다.

[0145] **IV - 약학적 형태**

[0146] 본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 약학적 형태가 제공된다. 특정 방식에서, 본 발명의 펩타이드는 약학적으로 허용 가능한 비히클 및/또는 부형제 및/또는 첨가제와 조합된다.

[0147] 본 발명의 약학적 형태는, 예를 들어, 영국, 유럽 및 미국 약전에 개시된 것과 같은 통상적인 방법에 따라 제조 및 제제화될 수 있다(British pharmacopoeia. Vol. 1. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; 2018; European pharmacopoeia. 9th ed, Strassbourg: Council of Europe: 2018; United States Pharmacopoeia, 42, National Formulary 37, 2018), Remington's Pharmaceutical Sciences (REMINGTON, J.P., AND GENNARO, A.R. **Remington's Pharmaceutical Sciences**. <u>Mack Publishing Co.,</u> 18th ed. 1990), Martindale: The Extra Pharmacopoeia (MARTINDALE, W. AND REYNOLDS, J.E.F. **Martindale: The Extra Pharmacopoeia**. <u>London, The Pharmaceutical Press</u> 31st ed, 1996) and Harry's Cosmeticology (HARRY, R. AND ROSEN, M.R. **Harry's cosmeticology**. Leonard Hill Books, 9th ed. 2015), Pharmaceutical technology (PRISTA, L. V. N., ALVES, A.C., MORGADO, R.M.R. **Tecnica Farmaceutica e Farmacia Galenica**. 4th ed.

Fundacao Calouste Gulbenkian. Servico de Educacao e Bolsas, 1996).

[0148] 약학적 형태는, 예를 들어, 물, 완충제(예를 들어, 중탄산 나트륨, 인산염으로 완충된 염수 용액의 완충 중성 염수 용액), 에탄올, 미네랄 오일, 식물성 오일, 다이메틸 설폭사이드, 탄수화물(예를 들어, 락토스, 소르비톨, 트레할로스, 글루코스, 만노스, 수크로스, 아마이드, 글리세롤, 만니톨 또는 덱스트란), 단백질, (폴리머 및 사이클로덱스트린과 같은 안정제와 같은) 보조제, 폴리펩타이드 또는 (His, Gly, Lys, Asp , Glu 및 Arg와 같은) 아미노산, (아스코르브산, 알파-토코페롤, 아황산염, BHA(부틸하이드록시아니솔), BHT(부틸하이드록시톨루엔)와 같은) 항산화제, (비 이온성 세제 - 트리톤 X-100, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 플루로닉 F68, 플루로닉 F88, 플루로닉 F127, Brij 35와 같은) 계면활성제, (EDTA 및/또는 글루타티온와 같은) 킬레이트제 및/또는 방부제(파라벤, 소르브산, 이미다졸 우레아, 암모니아 쿼터나륨 화합물 히단토인, 페놀 유도체, 산성 유도체 수소화 화합물)의 하나 이상의 부분을 포함할 수 있다.

[0149] 약학적 형태는 예를 들어 국소, 경구 비강, 직장 또는 비경구 투여를 포함하는 임의의 투여 경로를 위해 제제화될 수 있다. 본 발명에 사용된 용어 비경구는 피하 주사, 피내 주사, 혈관내 주사(예를 들어, 정맥 내), 근육내 주사, 척추 주사, 두개내 주사, 척수강내 주사 및 복강내 주사뿐만 아니라 임의의 유사한 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 특정 양식에서, 경구용 조성물이 바람직하다. 이러한 조성물은, 예를 들어, 환약, 정제, 용액, 수성 또는 유성 현탁액, 분산성 분말 또는 과립, 에멀젼, 경질 또는 연질 캡슐 또는 시럽 또는 엘릭서를 포함한다. 다른 양식 중에서, 약학적 조성물은 동결 건조된 분말로 제제화될 수 있다.

[0150] 경구 사용을 위한 약학적 형태는 매력적이고 맛좋은 제제를 제공하기 위해 감미제, 향미제, 착색제 및/또는 보존제와 같은 다른 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0151] 알약은 알약 제조에 적합한 생리학적으로 적합한 부형제와 혼합된 활성 성분을 가진다. 이러한 부형제는, 예를 들어, 불활성 희석제(예를 들어, 탄산 칼슘, 탄산나트륨, 락토오스, 인산 칼슘 또는 인산 나트륨), 과립 및 붕해제(예를 들어, 옥수수 전분 또는 알긴산), 결합제(예를 들어, 전분, 젤라틴 또는 아카시아) 및 윤활제(예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 또는 활석)를 포함한다. 알약은 건식 과립화, 직접 압축 및 습식 과립화를 포함하는 표준 기술을 사용하여 형성될 수 있다. 알약은 코팅되지 않거나 알려진 기술을 사용하여 코팅될 수 있다.

[0152] 경구용 제형은 또한 활성 성분이 불활성 고체 희석제(예를 들어, 탄산 칼슘, 인산 칼슘, 카올린, 활석, 일수화 락토스, 콜로이드성 이산화 규소, 미세 결정질 셀룰로스, 나트륨 라우릴 설페이트, 나트륨 글리콜레이트 아마이드) 또는 연질 젤라틴 캡슐과 혼합되며, 여기서 활성 성분은 물 또는 유성 매질(예를 들어, 땅콩 오일, 액체 바셀린 또는 올리브)과 혼합된다.

[0153] 수성 현탁액은 현탁제(예를 들어, 나트륨 셀룰로오스 카르복시메틸, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스, 나트륨 알기네이트, 폴리바이닐피롤리돈, 트라가칸스 검 및 아카시아 검)와 같은 적절한 부형제; 및 분산 또는 습윤제(예를 들어, 레시틴과 같은 자연 발생 포스파티드, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트와 같은 지방산과 알킬렌 옥사이드의 축합 생성물, 헵타데카-에틸렌옥시-세타놀과 같은 장쇄 지방족 알코올과 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 소르비톨 폴리옥시에틸렌 모노-올레이트와 같은 지방산과 하나의 헥시톨에서 유래된 부분 에스터와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 또는 폴리에틸렌 소르비탄의 모노올레이트와 같은 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유래된 부분 에스터와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성)와 혼합된 활성 재료(들)를 함유한다. 수성 현탁액은 또한 에틸 p-하이드록시 벤조에이트 또는 n-프로필과 같은 하나 이상의 방부제, 하나 이상의 착색제, 하나 이상의 향미제 및/또는 수크로스 또는 사카린과 같은 하나 이상의 감미제를 포함할 수 있다.

[0154] 유성 현탁액은 식물성 오일(예를 들어, 땅콩 오일, 올리브 오일, 참기름 또는 코코넛 오일) 또는 액체 파라핀과 같은 광유에 활성 성분(들)의 현탁액에 의해 제제화될 수 있다. 유성 현탁액은 밀랍, 경질 파라핀 또는 세틸 알코올과 같은 증점제를 함유할 수 있다. 상기에 제시된 것과 같은 감미제 및/또는 향미제는 입맛에 맞는 경구 제제를 제공하기 위해 첨가될 수 있다. 이러한 현탁액은 아스코르브산과 같은 항산화제를 첨가하여 보존할 수 있다.

[0155] 물 첨가에 의한 수성 현탁액의 제조에 적합한 분산성 분말 및 과립은 활성 성분을 분산제 또는 습윤제, 분산제 및 하나 이상의 보존제와의 혼합물로 제공한다. 적절한 분산제 또는 습윤제는 이미 위에서 언급한 것들에 의해 예시된다. 감미제, 향미제 및 착색제와 같은 추가 부형제가 또한 존재할 수 있다.

[0156] 약학적 형태는 또한 유중수 에멀젼으로 제제화될 수 있다. 유상은 식물성 오일(예를 들어, 코코넛 오일, 아몬드 오일, 포도씨 오일, 올리브 오일 또는 땅콩 오일), 미네랄 오일(예를 들어, 액체 바셀린) 또는 이들의 혼합물일

수 있다. 적절한 유화제는 자연 발생 검(예를 들어, 아카시아 검 또는 트라가칸스 검), 자연 발생 인지질(예를 들어, 포스파티딜세린), 무수물(예를 들어, 소르비탄의 모노올레에이트) 및 지방산과 헥시톨에서 유래된 부분 에스터와 에틸렌 옥사이드(예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄의 모노올레이트)의 축합 생성물을 포함한다. 에멀젼은 또한 하나 이상의 감미제 및/또는 향미제를 포함할 수 있다.

[0157] 시럽 및 엘릭서는 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 소르비톨 또는 수크로스와 같은 감미제로 제제화될 수 있다. 이러한 제형은 또한 하나 이상의 방부제, 향미제 및/또는 착색제를 포함할 수 있다.

[0158] 국소 투여를 위한 제제는 전형적으로 추가 선택적 성분이 있거나 없는, 활성제(들)와 조합된 국소 비히클을 포함한다. 적절한 추가 구성 요소 및 국소 비히클은 당업계에 잘 알려져 있으며 비히클의 선택은 특히 물리적 형태 및 투여 방식에 의존할 것임이 명백할 것이다. 국소 비히클은 물; 알코올(예를 들어, 에탄올 또는 아이소프로필 알코올) 또는 글리세린과 같은 유기 용매; 글리콜(예를 들어, 부틸 렌, 아이소프렌 또는 프로필렌 글리콜); 지방족 알코올(예를 들어, 라놀린); 물과 유기 용매의 혼합물 및 글리세린 알코올과 같은 유기 용매의 혼합물; 지방산, 아실글리세롤(미네랄 오일과 같은 오일 및 동물 또는 합성 지방), 포스포글리세리드, 스핑고지질 및 왁스와 같은 지질 기반 재료; 콜라겐 및 젤라틴과 같은 단백질 기반 재료; 실리콘 기반 재료(휘발성 및 비휘발성); 및 마이크로스펀지 및 폴리머 매트릭스와 같은 탄화수소 기반 재료를 포함한다. 조성물은 안정화제, 현탁제, 유화제, 점도 조절제, 겔화제, 방부제, 항산화제, 피부 침투 향상제, 보습제 및 지속 방출 재료와 같이 적용되는 제형의 안정성 또는 효능을 개선하도록 조정된 하나 이상의 구성 요소를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 구성 요소의 예는 마르틴달에 기술된다: The Extra Pharmacopoeia (MARTINDALE, W. AND REYNOLDS, J.E.F. **Martindale: The Extra Pharmacopoeia**. 31st ed, London, The Pharmaceutical Press. 1996) and Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (**Remington**: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st ed., 2005). 제형은 하이드록시메틸 셀룰로스 또는 젤라틴의 마이크로캡슐, 리포솜, 알부민의 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 또는 나노캡슐과 같은 마이크로캡슐을 포함할 수 있다.

[0159] 국소 제제는, 예를 들어, 고체, 페이스트, 크림, 폼, 로션, 겔, 분말, 수성 액체 및 에멀젼을 포함하는 다양한 물리적 형태 중 어느 하나를 통해 제조될 수 있다. 이러한 약학적으로 허용 가능한 형태의 물리적 외관 및 점도는 제제에 존재하는 유화제(들) 및 점도 조절제(들)의 존재 및 양에 의해 맞춰질 수 있다.

[0160] 고체는 일반적으로 단단하고 부을 수 없으며 일반적으로 막대 또는 곤봉 또는 입자 형태로 제제화되며; 고체는 불투명하거나 투명할 수 있으며 선택적으로 용매, 유화제, 습윤제, 연화제, 방향제, 착색제/염료, 방부제 및 최종 생성물의 효과를 향상 또는 강화하는 기타 활성 성분을 함유할 수 있다.

[0161] 크림과 로션은 종종 서로 유사하며 주로 점도가 다르다; 로션과 크림은 불투명하거나 반투명하거나 투명할 수 있으며, 유화제, 용제 및 점도 조절제, 보습제, 완화제, 향료, 착색제/염료, 방부제 및 최종 생성물의 효과를 강화 또는 증가시키는 기타 활성 성분을 함유한다.

[0162] 겔은 점도가 높은 두꺼운 것부터 낮은 점도의 얇은 것까지 일련의 점도로 제조될 수 있다. 이러한 제제뿐만 아니라 로션 및 크림은 용매, 유화제, 보습제, 완화제, 향료, 착색제/염료, 방부제 및 최종 생성물의 효과를 강화 또는 증가시키는 기타 활성 성분을 함유할 수 있다.

[0163] 액체는 크림, 로션 또는 젤보다 얇고 종종 유화제가 함유하지 않는다. 액체 국소 생성물은 종종 용매, 유화제, 보습제, 완화제, 향료, 착색제/염료, 방부제 및 최종 생성물의 효과를 향상시키거나 증가시키는 기타 활성 성분을 함유한다.

[0164] 국소 제제에 사용하기에 적합한 유화제는 제한 없이 이온성 유화제, 세테랄릭 알코올, 폴리옥시에틸렌 올레일 에터와 같은 비 이온성 유화제, PEG-40 스테아 레이트, 세테아레스-12, 세테아레스-20, 세테아레-30와 같은 세테아릴 알코올, PEG-100 스테아레이트 및 글리세릴 스테아레이트를 포함한다. 점도 조절을 위한 적절한 제제는 제한 없이 하이드록시에틸 셀룰로스, 잔탄 검, 알루미늄 마그네슘 실리케이트, 실리카, 미세 결정질 왁스, 벌 왁스, 파라핀 및 세틸 팔미테이트와 같은 비 이온성 검의 보호 콜로이드를 포함한다. 겔 조성물은 암모니아와 키토산, 메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 폴리바이닐 알코올, 폴리쿼터늄, 하이드록시에틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필 셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스, 카보머 또는 글리시리지네이트와 같은 겔화제의 첨가에 의해 형성될 수 있다. 적절한 계면 활성제는 비 이온성 계면 활성제, 양쪽성 계면 활성제, 이온성 계면 활성제 및 음이온성 계면 활성제를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 다이메티콘 코폴리올, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80, 라우라미드 DEA, 코카미드 DEA 및 코카

미드 MEA, 올레일 베타인, 코카미도프로필 포스파티딜 PG-다이암모늄 및 암모늄 라우레스 설페이트 중 하나 이상이 국소 제제에 사용될 수 있다. 적절한 방부제는 제한 없이 메틸파라벤, 프로필파라벤, 소르브산, 벤조산 및 포름알데히드와 같은 항균제와 비타민-E, 아스코르브산 및 프로필 갈레이트와 같은 물리적 안정제 및 항산화제를 포함한다. 적절한 습윤제는 제한 없이 젖산 및 기타 하이드록시산 및 이의 염, 글리세린, 프로필렌 글리콜 및 부틸렌 글리콜을 포함한다. 적절한 연화제는 라놀린, 바셀린, 아이소스테아릴 네오펜타노에이트 및 미네랄 오일의 유도체를 포함한다. 적절한 향료 및 착색제는 제한 없이 FD & C Red No. 40 및 FD & C Yellow No. 5를 포함한다. 국소적으로 사용될 수 있는 기타 적절한 추가 성분은 제한 없이 연마제, 흡수제, 거품 방지제, 정전기 방지제, 수렴제(예를 들어, 카모마일 추출물과 같은 하마멜리스, 알코올 및 허브 추출물), 결합제/부형제, 완충제, 킬레이트제, 필름 형성제, 컨디셔닝제, 추진제, 불투명화제, pH 조절제 및 보호제를 포함한다.

[0165] 국소 사용을 위한 제제 중에서, 기능할 수 있는 피부 투과 촉진제 부형제는 경피 시스템에서 각질층을 통해 피부 표면상의 화합물의 방출을 향상시키는 것을 추가로 지적할 수 있다. 의약품 방출에 사용되는 주요 침투 촉진제는 에탄올, 프로필렌글리콜, 에톡시다이글리콜, 1-데칸올, 2-(2-에톡시에톡시)에탄올과 같은 알코올, 글리콜 및 글리세리드; 팔 미트산, 카프르산, 올레산, 미리스트산 또는 라우르 산과 같은 지방산 및 에스터(KANIKKANNAN, N. K., KANDIMALLA, K., LAMBA, S.S., SINGH, M. **Structure-Activity Relationship of Chemical Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery**. <u>Current Medicinal Chemistry</u>, 7(6): 593-608. 2000; Javadzadeh Y., Adibkia K., Hamishekar H. **Transcutol® (Diethylene Glycol Monoethyl Ether)**: A Potential Penetration Enhancer. <u>In: Dragicevic N., Maibach H. (eds) Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Springer, Berlin, Heidelberg</u>, 2015.); 다이메틸 설폭사이드 및 다이메틸포름아마이드와 같은 설폭사이드(WIECHERS, J. W. AND DE ZEEUW, R. A. **Transdermal drug delivery**: efficacy and potential applications of the penetration enhancer Azone. <u>Drug Des Deliv</u>. (2):87-100. 1990); 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜콜린 및 포스파티딜 에탄올 아민과 같은 인지질; 사이클로덱스트린(α-사이클로덱스트린, β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린); 도데실-N,N-다이메틸아미노 아세테이트(DDAA); 본 발명에서 이미 인용된 것과 같은 폴리머; 예를 들어 ACSSSPSKHCG와 같은 작은 펩타이드 및 트립신, 파파인, 브로멜라인과 같은 소화 효소(MAGNUSSON, B. M. and RUNN, P. **Effect of Penetration Enhancers on the Permeation of the Thyrotropin Releasing Hormone Analogue PGlu-3-Methyl-His-Pro Amide through Human Epidermis**. <u>International Journal of Pharmaceutics</u>, 178(2):149-59. 1999; HOU, Y.W., CHAN, M.H., HSU, H.R., LIU, B.R., CHEN, C.P., CHEN, H.H., LEE, H.J. **Transdermal Delivery of Proteins Mediated by Non-Covalently Associated Arginine-Rich Intracellular Delivery Peptides**. <u>Experimental Dermatology</u>, 16(12): 999-1006. 2007; LANE, M. E. **Skin penetration enhancers**. <u>Int J Pharm</u>. 15;447(1-2):12-21. 2013)를 포함한다. 투과 증진제에 대한 다른 경로는 이온 삼투(RAIMAN, J., KOLJONEN, M., HUIKKO, K., KOSTIANEN, R., HIRVONEN, J. **Delivery and Stability of LHRH and Nafarelin in Human Skin**: The Effect of Constant/Pulsed Iontophoresis. <u>European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences</u>, 21(2-3): 371-77. 2004), 전기 영동(WANG, Y., TRAKUR, R., FAN, Q., MICHNIAK, B. **Transdermal Iontophoresis: Combination Strategies to Improve Transdermal Iontophoretic Drug Delivery**. <u>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik</u>, 60(2): 179-91. 2005) 및 음성 영동(PARK, E. J., WERNER, J., SMITH, N.B. **Ultrasound Mediated Transdermal Insulin Delivery in Pigs Using a Lightweight Transducer**. <u>Pharmaceutical Research</u>, 24(7): 1396-1401. 2007)과 같은 물리적 방법을 포함한다.

[0166] 외부 사용을 위한 국소 조성물의 전형적인 투여 방식은 장갑의 사용을 통한 손을 사용하는 제품의 직접 도포; 또는 주걱, 투여 주사기, 투여 규칙, 접착제 또는 스틱과 같은 물리적 도포기를 사용하는 간접 도포; 분무(미스트 분무, 에어로졸 또는 폼 포함); 1ml의 단일 용량 주머니 사용; 드롭 카운터에 의한 도포; 분산 및 헹굼을 포함한다. 국소 사용을 위한 예시의 또 다른 형태는 흡입 또는 결막 조직에 도포된 안약 또는 귀 도포를 위한 이과 용액과 같은 피부의 다른 다른 조직에서의 도포이다.

[0167] 예시적인 형태의 이러한 흡입기 제제는 에어로졸(전통적인 추진제, 예를 들어, 다이클로로플루오로메테인 또는 트라이클로로플루오로메테인 사용)의 기체 형태, 또는 분무 건조 형태의 미립자 및 분무에 의해 흡입되는 액체용 에멀젼, 용액 또는 현탁액 형태의 미립자를 포함한다. 또한, 본 발명자는 약학적 형태를 안과 또는 결막 경로, 콜드 크림, 점안제에 의해 분배된 등장성 현탁액 또는 멸균 현탁액 중의 재구성후 점안액 및 이과 경로, 콜드 크림 또는 드롭 디스펜서에 의해 분배된 액체 등장성 약학적 형태에 의해 예시할 수 있다.

[0168] 그러나, 예시적인 방식에서, 가능한 제제를 제한하지 않고, 본 발명의 펩타이드는 α-사이클로덱스트린, 하이드

록시에틸셀룰로오스, PEG6000, PEG400, 하이드록시프로필 β-사이클로덱스트린, 유화제 및 안정화제 폴리소르베이트 20(트윈 20) 또는 80(트윈 80)의 조성물로 제제화될 수 있다.

[0169] 약학적 형태는 멸균 주사 가능한 수성 또는 유성 현탁액으로 제조될 수 있다. 사용된 비히클 및 농도에 따라, 본 발명에 제공된 화합물(들)은 이러한 조성물에 현탁되거나 용해될 수 있으며, 위에 언급된 바와 같은 것과 같은 적절한 분산제, 습윤제 및/또는 현탁제를 사용하여 공지된 기술에 따라 제제화될 수 있다. 이들 중에서 사용될 수 있는 허용 가능한 비히클 및 용매는 물, 1,3-부테인다이올, 링거 용액 및 염화 나트륨, 시트르산 나트륨 및 사이클로덱스트린과 함유물의 착물과 같은 보조제 또는 나노에멀젼, 나노현탁액, 마이크로에멀젼, 고분자 미셀, 리포좀, 니오좀, 트랜스퍼좀 및 에토좀과 같은 방출 시스템이다(MELKAMU, G., WOHLRAB, J., NEUBERT, R.H. Dermal Delivery of Desmopressin Acetate Using Colloidal Carrier Systems. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 57(4):423-27. 2005; GOEBEL, A. S. B., SCHMAUS, G., NEUBERT, R.H., WOHLRAB, J. Dermal Peptide Delivery Using Enhancer Molecules and Colloidal Carrier Systems--Part I: Carnosine. Skin Pharmacology and Physiology, 25(6):281-87. 2012; MANOSROI, A., KHANRIN, P., LOHCHAROENKAL, W., WERNER, R.G., GOTZ, F., MANOSROI, W., MANOSROI, J. Transdermal Absorption Enhancement through Rat Skin of Gallidermin Loaded in Niosomes. International Journal of Pharmaceutics, 392(1-2): 304-10. 2010; EL MAGHRABY, G. M., Williams, A.C., Barry, B.W. Skin Delivery of Oestradiol from Deformable and Traditional Liposomes: Mechanistic Studies. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 51(10):1123-34. 1999; DAYAN, N., and E. TOUITOU. Carriers for Skin Delivery of Trihexyphenidyl HCl: Ethosomes vs. Liposomes. Biomaterials, 21(18): 1879-85. 2000).

[0170] 더욱이, 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매체로 사용될 수 있다. 이를 위해, 합성 모노글리세라이드 또는 합성 다이글리세라이드를 포함하는 모든 연질 고정 오일이 사용될 수 있다. 더욱이, 올레산과 같은 지방산은 주사 가능한 조성물의 제조에 유용하며 국소 마취제, 방부제 및/또는 완충제와 같은 보조제가 비히클에 용해될 수 있다.

[0171] 약학적 형태는 또한 좌약으로 제제화될 수 있다 (예를 들어, 직장 투여용). 이러한 조성물은 주위 온도에서는 고체이지만 직장 온도에서는 액체가 되어 직장에서 용해되어 약물을 방출할 적절한 비 자극성 부형제와 약물을 혼합하여 제조될 수 있다.

[0172] 약학적 형태는 미리 결정된 속도로 방출되도록 제제화될 수 있다. 즉시 방출은, 예를 들어, 설하 투여(즉, 활성 성분(들)이 설하 신경총의 혈관을 통해 빠르게 흡수되는 방식으로 입을 통한 투여)를 통해 얻어질 수 있다.

[0173] 제어 방출형 제제(즉, 투여 후 활성 성분(들)의 방출을 감소 및/또는 지연시키는 캡슐, 환약 또는 코팅된 정제와 같은 제제)는, 예를 들어, 경구로, 직장로 또는 피하로 또는 목표 위치에 임플란트를 통해 투여될 수 있다. 일반적으로, 제어 방출형 제제는 활성 성분(들)과 그 자체가 방출 속도를 변화시키는 매트릭스 재료의 조합에 의해 및/또는 장(또는 임플란트의 위치)에서 붕해 및 흡수를 지연시켜 더 오랜 기간 동안 지연되거나 지속적인 작용을 제공하는 제어 방출을 갖는 코팅의 사용을 통해 수득될 수 있다. 제어 방출을 갖는 이러한 유형의 제제 중 하나는 지속 방출을 갖는 제형으로서, 여기서 적어도 하나의 활성 성분이 일정 시간 동안 일정한 속도로 지속적으로 방출된다. 바람직하게는, 치료제는 혈중 농도(예를 들어, 혈장)가 적어도 4시간 동안, 바람직하게는 적어도 8시간, 보다 바람직하게는 적어도 12시간 동안 치료 범위 내에서 유지되지만 독성 수준 미만으로 유지되는 속도로 방출된다. 이러한 제제는 일반적으로 잘 알려진 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 제형 내에서 사용하기 위한 비히클은 생체 적합성이며 생분해성일 수도 있다. 바람직하게는, 제제는 조절제의 일정한 수준의 방출을 제공한다. 서방형 제제에 함유된 조절제의 양은, 예를 들어, 임플란트의 위치, 예상되는 방출 속도 및 지속 시간 및 치료 또는 예방될 상태의 특성에 따라 다르다.

[0174] 방출 속도는 (a) 코팅 조성물의 두께의 변화, (b) 코팅에 대한 가소제의 첨가 방식의 변경, (c) 방출을 조절하는 물질과 같은 추가 성분의 포함, (d) 조성물, 입자 크기 또는 매트릭스의 입자 형식의 변경 및 (e) 코팅을 통한 하나 이상의 통로 제공을 포함하는 당업계에 주지된 방법을 사용하여 변경될 수 있다. 서방형 제제에 함유된 조절제의 양은, 예를 들어, 투여 방법(예를 들어, 임플란트의 위치), 예상되는 방출 속도 및 지속 기간 및 치료 또는 예방될 상태의 특성에 따라 다르다.

[0175] 그 자체로 제어 방출 기능을 제공하거나 제공하지 않는 매트릭스 재료는 일반적으로 활성 성분(들)을 지지하는 임의의 재료이다. 예를 들어, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 다이에스테레이트와 같은 재료가 사용될 수 있다. 활성 성분(들)은 제형(예를 들어, 알약)의 형성 전에 매트릭스 재료와 조합될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 활성 성분(들)은 매트릭스 재료를 포함하는 입자, 과립, 구형, 미소구, 구형 또는 펠릿의 표면 상

에 코팅될 수 있다. 이러한 코팅은 다른 또는 또 다른 적절한 용매에 활성 성분(들)의 용해 및 분무와 같은 통상적인 수단을 통해 얻을 수 있다. 선택적으로, 추가 성분이 코팅 전에 첨가된다(예를 들어, 매트릭스 재료에 대한 활성 성분(들)의 결합을 돕기 위해). 그런 후에, 제어 방출 코팅을 도포하기 전에 매트릭스는 차단제로 코팅될 수 있다. 원하는 경우, 다중 코팅된 매트릭스 단위는 최종 제형을 생성할 수 있도록 캡슐화될 수 있다.

[0176] 제어 방출 코팅은 안료 및 불활성이며 무독성이며, 안정하며 점착성이 없는 다른 첨가제를 지지할 수 있는 연속적이고 균일한 필름일 수 있다. 조절제의 방출을 조절하는 코팅은 pH와 무관하거나 의존적인 코팅이 포함되며, 이는 위와 장용 코팅에서 조절제를 방출하는 데 사용될 수 있다(제제가 위를 통해 그대로 통과하고 소장에서 코팅이 용해되고 내용물은 몸에 흡수된다). pH 의존성 코팅은, 예를 들어, 셀락, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 폴리바이닐 아세테이트 프탈레이트, 셀룰로스 메틸 하이드록시프로필 프탈레이트, 메타크릴산의 에스터와 제인의 코폴리머를 포함한다.

[0177] 특정 방식에서, 코팅은 소수성 재료이며, 바람직하게는 투여 후 겔화제의 수화를 감소시키는 데 효과적인 양으로 사용된다. 적절한 소수성 재료는 알킬 셀룰로오스(예를 들어, 에틸 셀룰로오스 또는 카르복시메틸 셀룰로오스 에터), 셀룰로오스 에터, 셀룰로오스 에스터, 아크릴 폴리머(예를 들어, (폴리)아크릴산, (폴리)메타크릴산, 아크릴산과 메타크릴산의 코폴리머, 메틸메타크릴레이트의 코폴리머, 에톡시 에틸 메타크릴레이트, 알카미드/메타크릴산의 코폴리머, (폴리)메틸 메타크릴 레이트, 폴리아크릴아마이드, 암모늄 메타크릴레이트 코폴리머, 아미노알킬 메타 크릴레이트 코폴리머, (폴리)메타크릴산 무수물 및 글리시딜 메타크릴레이트 코폴리머) 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0178] 에틸 셀룰로스를 대표하는 수성 분산액은, 예를 들어, AQUACOAT®(FMC Corp., Philadelphia, PA) 및 SURELEASE®(Colorcon, Inc., West Point, PA)를 포함하며, 둘 다 제조업체의 지침에 따라 기판에 도포된다. 대표적인 아크릴 폴리머는, 예를 들어, 다양한 폴리머 EUDRAGIT®(Rohm America, Piscataway, NJ)를 포함하며, 이는 원하는 방출 프로파일에 따라 단독으로 또는 조합될 수 있다.

[0179] 소수성 재료의 수성 분산액을 포함하는 코팅의 물리적 특성은 하나 이상의 가소제의 첨가에 의해 개선될 수 있다. 알킬 셀룰로오스에 적합한 가소제는, 예를 들어, 다이부틸 세바케이트, 다이에틸 프탈레이트, 트라이에틸 시트레이트, 트라이부틸 시트레이트 및 트라이아세틴을 포함한다. 아크릴 폴리머에 적합한 가소제는, 예를 들어, 트라이에틸 시트레이트 및 트라이부틸 시트레이트, 다이부틸 프탈레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 다이에틸 프탈레이트, 피마자유 식물 및 트라이아세틴과 같은 시트르산 에스터를 포함한다.

[0180] 제어 방출 코팅은 일반적으로 수성 분산액 형태의 스프레이와 같은 통상적 인 기술을 사용하여 도포된다. 원한다면, 코팅은 활성 성분의 방출을 촉진하기 위해 기공 또는 채널을 포함할 수 있다. 기공 및 채널은 사용 환경에서 코팅으로부터 용해, 추출 또는 방출되는 유기 또는 무기 재료의 첨가를 포함하여 주지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 이러한 기공 형성 재료 중 일부는 하이드록시 알킬셀룰로오스(예를 들어, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스), 셀룰로오스 에터, 수용성 합성 폴리머(예를 들어, 폴리바이닐피롤리돈, 가교 폴리바이닐피롤리돈 및 폴리에틸렌 옥사이드), 수용성 폴리텍스트로스, 사카라이드 및 폴리사카라이드 및 알칼리성 금속염과 같은 친수성 폴리머를 포함한다.

[0181] 단위 용량을 생성하기 위해 비히클의 재료와 조합될 수 있는 활성 성분의 양은, 예를 들어, 치료 중인 환자, 특히 투여 방식 및 임의의 다른 공동 투여 약물에 따라 달라질 것이다. 투여 단위는 일반적으로 약 5㎍ 내지 약 2g의 활성 성분을 함유한다. 당업계에 주지된 테스트 및 일상적인 절차를 사용하여 최적의 투여량이 설정될 수 있다.

[0182] 본 발명의 한 양태에서, 조성물은 본 발명의 하나 이상의 평활근 긴장 조절 펩타이드에 추가하여, 제한 없이, 예를 들어 진통제, 항염증제, 항기생충제, 항부정맥제, 항생제, 항응고제, 혈전용해제, 이뇨제, 항우울제, 항당뇨제, 항간질제, 항히스타민제, 항고혈압제, 항무스카린제, 항마이코박테리아제, 항신생물제, 면역 억제제, 면역 조절제, 항바이러스제, 불안 완화제(최면제 및 신경이완제), 베타-아드레날린 수용체 차단제, 혈액 생성물 및 대체제, 유도제 심장제, 코르티코스테로이드, 기침 억제제(기침제 및 점액 용해제), 이뇨제, 도파민제(항파킨슨병제), 지혈제, 면역제, 지질 조절제, 근육 이완제, 파라교감신경작용제, 프로스타글란딘, 류코트리엔, 기관지확장제, 성 호르몬(스테로이드 포함), 항알레르기제, 교감신경흥분제, 혈관확장제, 촉진제, 구토 방지제, 화학 요법제 및 잔틴을 포함하는 하나 이상의 추가 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0183] 일부 실시태양에서, 본 발명은 발기 부전(ED), 여성 성기능 부전(FSD), 양성 전립선 비대증(BPH), 레이노 증후군, 폐동맥 고혈압(PAH), 전신 동맥 고혈압(SAH) 및 천식, COPD, 폐 섬유증, 규폐증, 알레르기 기관지폐 아스페

르길루스증, 유전성 혈관부종 및 신생아 저산소혈성 호흡 부전과 관련된 기도의 과민 반응을 포함하나 이에 제한되지 않는 평활근 수축의 조절로부터 이익을 얻는 질환의 치료를 위한 평활근 긴장 조절 펩타이드의 용도를 포함한다.

[0184] 예를 들어, 약학적 조성물의 제조 방법은 평활근의 긴장 조절이 유익한 장애의 치료에 충분한 양을 초과하는 임의의 하나 이상의 펩타이드를 약학적으로 허용 가능한 부형제에 도입하는 단계를 포함한다.

[0185] 일부 실시태양에서, 장애는 발기 부전(ED), 여성 성기능 부전(FSD), 양성 전립선 비대증(BPH), 레이노 증후군, 폐동맥 고혈압(PAH), 전신 동맥 고혈압(SAH) 및 천식, COPD, 폐 섬유증, 규폐증, 알레르기 기관지폐 아스페르길루스증, 유전성 혈관부종 및 신생아 저산소혈성 호흡 부전과 관련된 기도의 과민 반응으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0186] 일부 실시태양에서, 펩타이드는 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, 또는 SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 가지며 장애는 PAH이다.

[0187] V - <u>평활근 긴장 조절 펩타이드의 적용</u>

[0188] 본 발명의 평활근 긴장 조절 펩타이드는 평활근 긴장 조절로부터 이익을 얻는 질환의 치료에 사용될 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 펩타이드는 평활근 긴장의 영구적이거나 일시적인 불균형이 있는 질환의 치료에 적용될 수 있다.

[0189] 일부 실시태양에서, 평활근의 긴장 조절이 필요한 환자의 장애를 치료하는 방법은 환자에게 상기 임의의 하나 이상의 펩타이드의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0190] 일부 실시태양에서, 장애는 발기 부전(ED), 여성 성기능 부전(FSD), 양성 전립선 비대증(BPH), 레이노 증후군, 폐동맥 고혈압(PAH), 전신 동맥 고혈압(SAH) 및 천식, COPD, 폐 섬유증, 규폐증, 알레르기 기관지폐 아스페르길루스증, 유전성 혈관부종 및 신생아 저산소혈성 호흡 부전과 관련된 기도의 과민 반응으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0191] 일부 실시태양에서, 펩타이드는 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 23, 또는 SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 가지며 장애는 PAH이다.

[0192] 이하의 임상 조건은 해당 펩타이드의 가능한 치료적 적용을 비 포괄적으로 예시한다.

[0193] A) ED: 음경 해면체의 평활근 이완은 ED의 치료에 가장 많이 적용되는 약리학 등급의 작용 기전에서 흔한 사건이다. 예를 들어, PDE5i(예를 들어, 실데나필 및 타다라필)는 NO에 의한 활성화시 구아닐레이트 사이클라제에 의해 생성된 사이클릭 구아노신 모노포스페이트(cGMP)의 분해를 방지하고 음경 해면체의 이완을 강화하여 발기를 촉진하거나 강화한다. 그러나, PDE5i는 음경 신경과 국소 혈관의 내피에서 NO 방출을 유도할 수 있는 자극이 필요하다. 따라서, PDE5i는 고혈압, 당뇨병 환자 또는 추가 신경 손상이 있는 전립선 절제술을 받은 환자와 같이 신경 또는 내피 손상이 있는 환자에게 효과가 없다(SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. Erectile dysfunction. <u>The Lancet</u>, 381(9861): 153-165, 2013). 본 발명의 펩타이드는 신경 또는 내피 손상이 있는 경우에도 평활근 조직의 이완을 촉진한다. 따라서, 상기 펩타이드는 PDE5i에 내성이 있는 표현형을 포함하여 ED의 치료에 완전히 적용될 수 있다. 또한, 평활근 긴장 조절 펩타이드의 작용 메커니즘은 PDE5i와의 상승 작용을 촉진하여, 임상 공동 투여를 허용한다.

[0194] B) FSD: FSD는 질과 음핵에 침투하는 동맥 네트워크의 혈관 손상과 관련이 있을 수 있으며, 이 후자는 여성 오르가즘을 촉진하기 위한 핵심 구조를 구성한다. 음경과 해부학적으로 유사하기 때문에, 음핵도 NO 의존적 메커니즘을 통해 성적인 자극에 반응하여 팽창되는 것으로 알려져 있다(PARK, K., GOLDSTEIN, I., ANDRY, C., SIROKY, M.B., KRANE, R.J., AZADZOI, K.M. Vasculogenic female sexual dysfunction: the hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. <u>International Journal of Impotence Research</u>, 9, 27-38, 1997). 또한, 혈관 확장과 그에 따른 국소 혈류의 증가는 윤활과 즐거움에 대한 인식에 유리하다(VELTEN, J., CHIVERS, M.L., BROTTO, L.A. Does Repeated Testing Impact Concordance Between Genital and Self-Reported Sexual Arousal in Women? <u>Archives of Sexual Behavior</u>. 47(3): 1-10. 2018). 따라서, 본 발명의 펩타이드는 FSD의 치료에 사용될 수 있다.

[0195] C) BPH: BPH를 특징으로 하는 전립선의 증가는 요도 내 압력을 증가시켜, 소변 유출을 방해한다. 결국, 요로 폐색은 절대적이라서, BPH의 급성 합병증인 급성 요로 폐색을 일으킨다. 급성 요폐의 치료는 또한 요도 평활근의 이완을 유발하여 요도 내 압력을 감소시킬 수 있는 작용 기전을 기반으로 한다(THOMAS, K., CHOW, K., KIRBY,

R.S. Acute urinary retention: a review of the aetiology and management. Prostate cancer and prostatic diseases, 7(1): 32. 2004). 평활근에 대한 본 발명의 펩타이드의 활성을 고려하면, BPH 치료에 적용될 수 있을 것으로 예상된다.

[0196] D) PAH: PAH는 작은 폐동맥의 세포 증식 및 섬유화로 인해 발생하는 희귀한 심각한 만성 심폐 질환으로, 평활근 세포의 비대 및 비대를 동반한다. 구조적 변화의 결과로, PAH는 폐 혈관 저항의 점진적인 증가로 임상적으로 확인된다. PAH에 대한 현재 치료 옵션은 본질적으로 프로스타사이클린, 엔도텔린-1 및 NO의 세 가지 신호 전달 경로를 표적으로 한다. 이러한 모든 약리학적 등급은 혈관 운동 긴장을 조절하여, 혈관 이완을 촉진하고 혈관 저항을 감소시킨다(LAU, E.M.T., GIANNOULATOU, E., CELERMAJER, D.S., HUMBERT, M. **Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension.** Nature Reviews Cardiology, 14(10):603-614. 2017). PAH는 병인에 따라 세계 보건기구(WHO)에 의해 5개 그룹으로 더 세분화되었다. 가장 큰 그룹은 특발성 PAH(iPAH), 유전성 PAH, 약물 및 독소 유발성 PAH, 다른 질환과 관련된 PAH 및 신생아의 지속적인 폐 고혈압(PPHN)을 포함하는 그룹 1 PAH이다. 이 중, iPAH가 가장 많이 발생한다(CHESTER, A.H., YACOUB, M.H., MONCADA, S. **Nitric oxide and pulmonary arterial hypertension.** Global Cardiology Science and Practice, 14. 2017). PAH는 강한 전신 염증과 관련이 있는 것으로 이미 나타났고, 환자는, 다른 것 중에서, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α 등을 포함하는 순환하는 염증성 사이토카인 증가된 수준을 나타낸다(PRICE, L.C., WORT, S.J., PERROS, F., DORFMULLER, P., HUERTAS, A., MONTANI, D., COHEN-KAMINSKY, S., HUMBERT, M. **Inflammation in pulmonary arterial hypertension.** CHEST, 141(1):210-221. 2012). 본 발명의 펩타이드는 폐동맥의 혈관 확장을 촉진하고, 폐동맥압을 감소시키고, PAH 관련 2차 심혈관 변화를 개선하고, 염증을 감소시킬 수 있기 때문에 PAH 치료에 사용될 수 있다.

[0197] E) SAH: 혈압의 병리학적 증가는 심장 부채 및/또는 말초 혈관 저항의 규제 완화를 초래한다. 현재 이용 가능한 치료법은 혈압의 한 가지 또는 두 가지 구성 요소를 목표로 한다. 말초 저항을 줄이기 위해 다양한 약리학 등급이 사용되지만, 그중 상당 부분은 혈관의 평활근 이완을 촉진하거나 수축 자극의 작용을 차단한다(예를 들어, 교감 ANS에서 방출되는 것)(GOODMAN, L.S. and GILMAN, A. **Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics.** New York: McGraw-Hill. p. 846, 2006 참조). 본 발명에서 기술하는 평활근 긴장 조절 펩타이드는 혈관 구조를 이완시키고 고혈압에 2차적인 심혈관 특징을 개선할 수 있으므로 SAH 치료에 유용할 수 있다.

[0198] F) 레이노 증후군: 질환의 생리 병리학은 추위 또는 정서적 스트레스에 의해 유발되는 손 끝의 허혈성 경련을 특징으로 한다. 제안된 치료법은 질산염, PDE5i, 칼슘 채널 차단제 및 프로스타글란딘과 같은 혈관 확장 물질의 국소 적용과 함께 국소 혈관 수축의 회복을 기반으로 한다(BAUMHAKEL, M., BOHM M. **Recent achievements in the management of Raynaud's phenomenon.** Vasc Health Risk Manag. 6: 207-214. 2010). 따라서, 평활근의 이완 및 이후 혈관 확장을 촉진할 수 있는 본 발명의 펩타이드는 레이노병의 예방 및 치료에 적용될 수 있다.

[0199] G) 기도 과민 반응: "과민 반응"이라는 표현은 수축 자극에 직면했을 때 기도의 수축이 증가하는 것을 나타낸다. 이 현상은 다양한 호흡기 질환에서 흔히 발생하며, 그 중 천식, COPD, 기관지염, 알레르기성 비염 등이 지적될 수 있다. 기도의 과민 반응은 상부 기도를 덮고 세기관지까지 확장되는 연근 조직층에 의해 매개된다. 치료는 기도의 과민 반응으로 이어지는 염증 과정의 무증상 제어를 포함하지만 고비로부터의 회복은 인접한 평활근의 이완을 촉진하는 기관지 확장제로 수행된다(BRAMAN, S.S., BARROWS, A.A., DECOTIIS, B.A., SETTIPANE, G.A., CORRAO, W.M. **Airway hyperresponsiveness in allergic rhinitis**: a risk factor for asthma. Chest, 91(5): 671-674. 1987; POSTMA, D. S., and KERTJENS, H. A. M. **Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease.** American journal of respiratory and critical care medicine, 158(supplement_2): S187-192, 1998; INMAN, M. D. **Airway hyperresponsiveness.** CHEST Journal, 123(3): 411S-416S. 2003 참조). 본 발명의 펩타이드는 염증 반응을 유발하지 않고 경련성 자극에 의해 유도된 기도의 수축을 되돌렸고, 따라서 이러한 물질은 적어도 염증 성분으로 호흡기 질환의 증상을 치료하는 데 사용될 수 있으며 그 예는 천식과 COPD이다.

[0200] H) 간질성 폐 질환(폐 섬유증): 폐 섬유증은 간질성 폐 질환의 하위 유형 중 하나이다. 이 질환은 염증 과정이 뒤따르는 폐 손상의 결과로 강렬한 섬유 증식을 특징으로 하고, 이어서 상기 섬유 증식 및 섬유증을 특징으로 한다(REYNOLDS, H.Y. GAIL, D.B., KILEY, J.P. **Interstitial pulmonary disease** - where we started from and are now going. Sarcoidosis Vasc. Diffuse Pulm. Dis., 22(1):5-12). iNOS 발현의 증가는 질환의 발병 기전에서 주목되고 질환 진행의 중요한 지표로 생각되는 것으로 초기 문헌에 기술되어 있다(2005; HSU Y.C., WANG, L.F., CHIEN, Y.W. **Nitric oxide in the pathogenesis of diffuse pulmonary fibrosis.** Free Radic Biol Med, 42(5):599-607, 2007). 3개의 NOS 동형에 대한 마우스 녹아웃을 사용하고 동물에서 폐 섬유증을 유발하는 실험

적 방법인 블레오마이신 처리를 실시한 이후 데이터에서, 3개의 동형에 대한 마우스 녹아웃이 건강한 동물보다 예후가 더 나쁘다는 것을 발견하였으며, 따라서 본 발명의 펩타이드 조성물은 근본적인 염증 및 현재 알려지지 않은 요인에 작용할 가능성이 있으며 폐 섬유증 치료에 사용하기 위한 후보가 된다(NOGUCHI, S., YATERA, K., WANG, K.Y., ODA, K., AKATA, K., YAMASAKI, K., KAWANAMI, T., ISHIMOTO, H., TOYOSHIRA, Y., SHIMOKAWA, H., YANAGIHARA, N., TSUTSUI, M., MUKAE, H. Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Respir Res, 15(1); 92; 2014).

[0201] I) 규폐증: 결정질 실리카 분진에 대한 직업적 노출은 만성 폐 질환인 규폐증을 초래할 수 있다. 실리카 입자가 흡입되면 폐포 및 폐 섬유증의 지속적인 염증을 유발한다(THAKUR A. S., BEAMER C. A., MIGLIACCIO C. T., HOLIAN A. Critical of MARCO on crystalline silica-induced pulmonary inflammation. Toxicol. Sci. (108): 462-471; 2009). 실리카 입자는 대식세포 활성화를 유도하여, 결과적인 섬유증의 원인인 호중구, 림프구 및 섬유 아세포의 모집을 증가시킨다. 이 글을 쓰는 시점에서 폐 섬유증을 치료하거나 질환의 진행 과정을 바꾸는 효과적인 치료법은 없다(GREENBERG M. I., WAKSMAN J., CURTIS J. (2007). Silicosis: a review. Dis. Mon. (53):394-416; 2007; LEUNG, C.C., YU, I.T., CHEN, W. Silicosis. Lancet, 379(9830):2008-2018; 2012; CARNEIRO, P.J., CLEVELARIO, A.L., PADILHA, G.A., SILVA, J.D., KITOKO, J.Z., OLSEN, P.C., CAPELOZZI, V.L., ROCCO, P.R., CRUZ, F.F. Bosutinib Therapy Ameliorates Lung Inflammation and Fibrosis in Experimental Silicosis. Front Physiol. 2017 Mar 15; 8:159. 2017). 기관 고리의 평활근 세포 이완에 2차적인 본 발명의 기관지 확장 효과는 폐 조직 염증을 증가시키지 않으면서 기류 장애가 있는 증상이 있는 환자에게 유용하다.

[0202] J) 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증(ABPA): ABPA는 천식 및 낭포성 섬유증 환자에서 아스페르길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)에 대한 과민 반응을 특징으로 하는 폐 장애이다. 통제되지 않은 천식과 반복적인 폐 침윤이 나타나서, 천명음, 객혈, 가래성 기침, 저열, 체중 감소, 불쾌감 및 피로를 유발한다(AGARWAL, R. CHAKRABARTI, A., SHAH, A., GUPTA, D., MEIS, J.F., GULERIA, R., MOSS, R., DENNING, D. W., and For the ABPA complicating asthma ISHAM working group. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. Clinical Et Experimental Allergy, (43):850-873, 2013). ABPA 발병 위험이 높은 낭포성 섬유증 환자에서, 호기 산화 질소는 위험이 낮은 환자보다 낮으며, 이는 iNOS가 아스퍼길루스 독소에 의해 하향 조절됨을 암시한다(LIM, A.Y., CHAMBERS, D.C., AYRES, J.G., STABLEFORTH, D.E., HONEYBOURNE, D. Exhaled nitric oxide in cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. Respir Med. 97(4):331-6, 2003). 더욱이, 기관 고리의 평활근 세포 이완에 2차적인 본 발명의 기관지 확장 효과는 폐 조직 염증을 증가시키지 않으면서 기류 폐쇄 환자에게 유용하다.

[0203] L) 신생아 저산소성 호흡 부전: 이것은 본 발명으로부터 이득을 얻을 수 있는 신생아 상태이다. 신생아의 지속적인 폐 고혈압(PPHN)은 출생시 또는 출생 직후에 정상적인 폐 혈관 적응의 부전이어서, 높은 폐 혈관 저항을 초래한다. PPHN 치료법은 폐 혈관 저항을 낮추는 데 목적이 있으며, 다양한 형태의 기계식 호흡기가 이를 위해 사용된다. 부전의 경우 정맥 내 혈관 확장제(톨라졸린, 에포프로스테놀 및 에녹시몬)와 PDE5i가 사용된다. 그러나, 이러한 화합물은 일부 환자에서 저혈압, 신부전 및 출혈을 유발하는 것으로 알려진 불리한 위험 프로파일을 가진다. 흡입된 산화 질소 투여는 이 환자 그룹에 대해 더 나은 안전성 프로파일을 갖지만, 이러한 환자의 차선적 폐 팽창은 잠재적인 결과를 손상시킨다(MURACA, M.C., NEGRO, S., SUN, B., BUONOCORE, G. Nitric oxide in neonatal hypoxemic respiratory failure. The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, 25(S(1)): 47-50. 2012). 본 발명에 기술된 펩타이드는 적절한 장치 또는 흡입기를 통해 비강 내 투여될 때 전신 노출이 없기 때문에, 더 나은 안전성 프로파일을 가질 수 있으며, 본 발명의 펩타이드가 NOS 동형의 발현을 유도할 수 있으므로 국소 적으로 이용 가능한 NO를 생성한다는 사실 때문에, 흡입된 산화 질소보다 더 효율적일 가능성을 가진다.

[0204] 따라서, 본 발명은 또한 상기 상태를 앓고 있는 개인을 치료하기 위한 평활근 긴장 조절 펩타이드의 용도를 고려한다.

[0205] 본 발명은 또한 상기 질환의 치료를 위한 약제의 제조에서 평활근 긴장 조절 펩타이드의 용도를 고려한다.

[0206] 평활근 긴장 조절 펩타이드, 이들의 유사체 및 유도체의 생물학적 활성은 생체 외 및 생체 내에서 상이한 방법론을 통해 검증될 수 있다. 아래의 실시예는 기관연골고리, 폐동맥 및 음경 해면체 조각의 단편, 평활근 조직이 풍부한 구조를 기반으로 한 "격리된 기관" 모델에서 염증을 유발하지 않고 평활근 긴장 조절 펩타이드의 생체

외 이완 활성을 기술한다. 아래의 다른 실시예는 혈관 확장, 혈역학적 매개 변수의 개선 및 PAH 쥐 모델에서 선택된 평활근 긴장 조절 펩타이드의 항염증 효과로 인한 폐동맥압 감소의 생체 내 효과를 기술하며, 이 모델은 지속적인 평활근 과수축으로 유발된 폐동맥의 압력 증가로 유발된 심폐 질환을 특징으로 한다.

[0207] 따라서 본 발명은 본 발명을 추가로 예시하는 실시예에 의해 예시될 것이지만, 본 발명은 본 발명의 범위를 제한할 수 있다는 의도는 없다.

[0208] **실시예**

[0209] 실시예 1: 펩타이드의 합성

[0210] 본 발명의 펩타이드는 브라질 리우데 자네이루 소재 제논사에 의해 생산된 수지 링크-아마이드(0.68 mmol/g)에서 고체 지지체에서 Fmoc/t-buyl 합성에 의해 화학적으로 합성되었다(배치: P170313-TL569356, P170313-TL569357, P170313-TL569358, P170315-TL569368, P170315-TL569382, P170313-TL569361, P170315-TL569362, P170313-TL569359, P170313-TL569360, P170315-TL569363, P170313-TL569367, WB170313-P171025366, P170313-TL569366, , WB170024-P171025, P170315-TL569382, P170315-TL569383, P170315-TL569384, P170315-TL569380, WB170028-P171025, P170315-TL569381, P170315-TL569385, P170315-TL569386, P170315-TL569171025, WB170315-TL569171025, WB170315-TL569387, WB170315-TL569383 -P171025, WB170027-P171025, WB170026-P171025 및 WB170022-P171025). 최종 절단 및 탈보호는 물-TFA-1.2-에테인다이티올-트라이아이소프로필 실란, 92.5-2.5-2.5-2.5(v/v), 25℃, 180분으로 실현되었다. 펩타이드를 50%(v/v)의 아세토나이트릴 수용액으로 추출하고 물 TFA 0.1%과 균형을 이루는 세파실 C8 펩타이드(5μ ST 4.6/100-HPLC) 컬럼에서 역상 크로마토 그래피(RPC)로 정제하였다. 샘플은 280nm에서 0.1% de TFA, 2ml/min의 유속으로 아세토나이트릴의 구배를 사용하여 용출되었다. 정제 후, 모든 조성물에 대한 TFA의 반대 이온 교환은 원하는 모든 물리화학적 특성(다른 것 중에서, 예를 들어, 용해도, pI, pK, 안정성)을 유지하기 위해 염화물 또는 아세테이트 이온으로 변경될 수 있다. 더욱이, 모든 펩타이드는 용해도를 증가시키기 위해 N-말단 아세틸화 및 C-말단 아마이드화되었다.

[0211] 실시예 2: 생체 외 기도 근육의 이완 효과

[0212] 펩타이드의 이완 효과의 크기는 생체 외 기관연골고리의 경련 수축 모델을 통해 평가되었으며, 주로 새로운 기관지 확장제를 테스트하는 데 사용되었다(CULLUM, V.A., FARMER, J.B., JACK, D., LEVY, G.P. Salbutamol: a new, selective β-adrenoceptive receptor stimulant. British journal of pharmacology, 35(1): 141-151. 1969; Kao, C.H., Chu, Y.H., Wang, H.W. Effects of lidocaine on rat's isolated tracheal smooth muscle. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 267(5): 817-820. 2010; SORIANO-URSUA, M.A., VALENCIA-HERNANDEZ, I., ARELLANO-MENDOZA, M.G., CORREA-BASURTO, J., TRUJILLO-FERRARA, J.G. Synthesis, pharmacological and *in silico* evaluation of 1-(4-dihydroxy-3, 5-dioxa-4-borabycyclo [4.4.0] deca-7,9,11-trien-9-yl)-2-(tert-butylamine) ethanol, a compound designed to act as a β2 adrenoceptor agonist. European journal of medicinal chemistry, 44(7): 2840-2846. 2009 참조).

[0213] 각 테스트에서, 던킨-하틀리 기니피그(400 - 500g)를 CO_2 분위기에서 안락사 시켰다; 그 후, 1-3개의 기관연골고리의 단편에서 기관을 노출시키고, 제거하고, 절개하였다. 각 단편을 카보겐 혼합물(95%의 O2 및 5%의 CO2)에 의한 일정한 폭기하에서, 37℃에서 크레브스 영양 용액(NaCl 118mM; KCl 4.8nM; $CaCl_2$ 2.5mM; $MgSO_4$ 1.2mM; KH_2PO_4 1.2mM; $NaHCO_3$ 24mM; 포도당 11mM)을 함유하는 개별 장기 바스 시스템에 옮겼다. 각 시스템에서, 용기의 바닥에 고정된 자루와 등각 변환기(GRASS FT-03)에 연결된 다른 자루가 조각의 지지대를 구성하였다. 등척성 변환기에 연결된 데이터 디지털화 시스템은 기관연골고리의 수축에 의해 생성된 장력 변화의 기록을 가능하게 하였다(PowerLab™ 16/30, LabChart, 버전 8.1, AD Instruments, Australia). 기초 장력을 1g으로 조정한 후, 카르바콜(2.5μM)을 이용한 자극으로 단편의 수축성을 평가하였다. 휴식 1시간 후, 기저 장력이 회복되고 조직을 히스타민(50μM)에 의해 유도된 수축에 노출시킨 다음 증가하는 농도의 치료제(0.01 내지 10μM; n = 8) 또는 비교기 PnTx(19)에 노출시켰다.

[0214] 표 1은 전압을 최대 히스타민 유도 수축(pEC50)의 50%로 감소시킨 농도의 음의 로그로 표시된 효능 값의 평균±SEM과 소프트웨어 Graph Prism 5.0(GraphPad Software, La Jolla, Ca, USA)의 시그모이드 비선형 회귀 방정식을 사용하는 적어도 8개의 독립적 테스트로 계산된 효과(Emax)를 나열한다. 비교기 PnTx(19)로 얻은 결과는 도 1에 도시된다.

표 1

[0215] 생체 외 기관연골고리의 평활근 이완에서 활성 펩타이드에 대한 농도-반응 곡선에서 얻은 효능(pEC50) 및 효과값(Emax).

서열	효능(pEC_{50}) 몰	효과(Emax)(%)
SEQ ID NO: 1	7.1 ± 0.4	45.7 ± 4.3
SEQ ID NO: 2	6.9 ± 0.2	40.4 ± 2.6
SEQ ID NO: 3	6.8 ± 0.2	36.7 ± 1.9
SEQ ID NO: 4	6.8 ± 0.3	38.8 ± 3.5
SEQ ID NO: 5	불활성	불활성
SEQ ID NO: 6	7.0 ± 0.3	25.3 ± 1.7
SEQ ID NO: 7	불활성	불활성
SEQ ID NO: 8	불활성	불활성
SEQ ID NO: 9	불활성	불활성
SEQ ID NO: 10	불활성	불활성
SEQ ID NO: 11	불활성	불활성
SEQ ID NO: 12	불활성	불활성
SEQ ID NO: 13	불활성	불활성
SEQ ID NO: 14	불활성	불활성
SEQ ID NO: 15	불활성	불활성
SEQ ID NO: 16	불활성	불활성
SEQ ID NO: 17	6.8 ± 0.3	37.1 ± 2.6
SEQ ID NO: 18	7.2 ± 0.3	38.0 ± 2.3
SEQ ID NO: 19	7.3 ± 0.4	40.0 ± 3.4
SEQ ID NO: 20	7.1 ± 0.3	37.8 ± 2.9
SEQ ID NO: 21	불활성	불활성
SEQ ID NO: 22	7.0 ± 0.2	35.2 ± 1.8
SEQ ID NO: 23	7.5 ± 0.3	35.5 ± 2.3
SEQ ID NO: 24	7.9 ± 0.3	29.0 ± 1.0
SEQ ID NO: 25	불활성	불활성
SEQ ID NO: 26	불활성	불활성
SEQ ID NO: 28	불활성	불활성
SEQ ID NO: 29	불활성	불활성
SEQ ID NO: 30	불활성	불활성

[0216] 각각 Xaa6, Xaa7 및 Xaa8로서 서열 Ile-Ala-Trp의 존재는 펩타이드의 생물학적 효과에 중요하다. 예를 들어, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 및 SEQ ID NO: 4는 Xaa5와 Xaa9 사이에 Ile-Ala-Trp를 가지며, 따라서 기도 근육의 평활근 세포를 이완시키는 데 효과적이다. 그러나, SEQ ID NO: 7은 Xaa6로서 Ile 대신 Ala를 갖고, SEQ ID NO: 8은 Xaa8로서 Trp 대신 Ala를 가지며, 따라서 둘 다 불활성이다. 마찬가지로, SEQ ID NO: 24는 각각 Xaa6, Xaa7 및 Xaa8과 같은 Ile-Ala-Trp를 가지며 기관연골고리 평활근을 이완시키는 데 효과적이다. 그러나, SEQ ID NO: 26은 Xaa8 위치에서 Trp 대신 Tyr을 갖고, 따라서 불활성이다.

[0217] 기술된 펩타이드의 생물학적 활성에 대한 또 다른 양태는 Xaa1, Xaa2 및 Xaa15가 독립적으로 부재하거나 Ala이거나 염기성 천연 아미노산(Arg, Lys 또는 His)이라는 것이다. 예를 들어, 펩타이드 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 및 SEQ ID NO: 4의 활성 서열과 비교할 때, 서열 SEQ ID NO: 15는 위치 Xaa1에 염기성 아미노산 대신에 산성 아미노산인 Glu를 가지며 따라서 불활성이다. 동일한 방식으로, SEQ ID NO: 16은 위치 Xaa 15에 염기성 아미노산 대신 Glu를 가지며 따라서 또한 불활성이다.

[0218] 기술된 펩타이드의 생물학적 활성에 대한 또 다른 양태는 각각의 Xaa4, Xaa5 및 Xaa9가 독립적으로 부재하거나 방향족 아미노산(Phe, Trp 또는 Tyr)이라는 것이다. 예를 들어, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 및 SEQ ID NO: 11은 펩타이드 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 및 SEQ ID NO: 4의 활성 서열로서 각각 위치 Xaa4, Xaa5 및 Xaa9에 방향족 아미노산(Phe, Trp 또는 Tyr) 대신에 비 방향족 아미노산인 Ala를 가지며 따라서 이들은 불활성이다.

[0219] 기술된 펩타이드의 생물학적 활성에 대한 또 다른 양태는 Xaa10이 독립적으로 부재하거나 염기성 천연 아미노산(Arg, Lys, His)이라는 것이다. 예를 들어, 펩타이드 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 및 SEQ ID

NO: 4의 활성 서열과 비교할 때, SEQ ID NO: 12는 염기성 아미노산 대신에 비극성 아미노산인 Ala를 가지며, 따라서 불활성이다.

[0220] 기술된 펩타이드의 생물학적 활성의 또 다른 양태는 Xaa12가 부재하거나 Ala라는 것이다. 예를 들어, SEQ ID NO: 19와 비교할 때, SEQ ID NO: 21은 위치 Xaa12에 Ala 대신에 Leu를 가지며 따라서 불활성이다.

[0221] 기술된 펩타이드의 생물학적 활성에 대한 또 다른 양태는 각각의 Xaa13 및 Xaa14가 독립적으로 부재하거나 하전되지 않은 극성 아미노산(Asn, Gln, Ser 또는 Thr)이라는 것이다. 예를 들어, 서열 SEQ ID NO: 13, 및 SEQ ID NO: 14는 펩타이드 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 및 SEQ ID NO: 4의 활성 서열로서 하전되지 않은 극성 아미노산 대신에 각각 위치 Xaa13 및 Xaa14에 비극성 아미노산인 Ala를 가지며 따라서 이들은 불활성이다.

[0222] 실시예 3: 생체 외 해면체 조각에서 이완 효과

[0223] 해면체 조각의 평활근에 대한 본 발명의 펩타이드의 이완 효능은 ED 치료를위한 약물 후보를 테스트하는 데 주로 사용되는 모델인 쥐에서 분리된 조직을 사용하여 생체 외에서 평가하였다(ITALIANO, G., CALABRO, A., PAGANO, F. A simplified in vitro preparation of the corpus cavernosum as a tool for investigating erectile pharmacology in the rat. Pharmacological research, 30(4): 325-334. 1994; GEMALMAZ, H., WALDECK, K., CHAPMAN, T.N., TUTTLE, J.B., STEERS, W.D., ANDERSSON, KE. *In vivo* and *in vitro* investigation of the effects of sildenafil on rat cavernous smooth muscle. The Journal of Urology, 165(3): 1010-1014.2001).

[0224] 스프라그 돌리(SD) 계통의 수컷 쥐를 단두대에 의해 희생하였다; 음경을 외과적으로 제거하고 크레브스-중탄산염 용액(NaCl 118.1mM; KCl 4.7mM; KH_2PO_4 1.0mM; $MgSO_4$ 1.0mM; $NaHCO_3$ 25.0mM; $CaCl_2$ 2.5mM 및 포도당 11.1mM)을 함유하는 페트리 접시 상에 놓았다. 해면체는 귀두, 요도, 해면체 및 등정맥을 제거하여 해부한 후 그 사이의 섬유질 중격을 절단하여 분리하였다. 2x2x7mm 크기의 해면체 조각을 37℃에서 중탄산염 용액-크레브스(pH 7.4)를 함유하는 분리된 기관용 욕조에 별도로 장착하고, 95%의 O_2 및 5%의 CO_2로 폭기하였다. 조직을 장력 변환기에 연결하고 장력 변화를 지속적으로 기록하였다. 해면체 조각을 페닐에프린(10^{-5}M)으로 수축하였고 이후 다른 주파수(1 내지 32Hz)에서 전기 자극으로 이완하였다. 자극은 상이한 농도의 펩타이드 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19 및 SEQ ID NO: 24(10^{-10}M; 10^{-8}M; 10^{-6}M)에 의한 10분 배양 후 일어났고, 설명을 위해, 비특이적 NOS 차단제 인 L-NAME의 존재 또는 부재하에서 시연하였다. 대안적으로, 펩타이드는 단일 농도 (10^{-8}M), n = 6에서 비교기 PnTx(19)로 대체되었다. 치료와 대조군 사이의 이완 비율의 차이는 양방향 분산 분석(Two-Way ANOVA)에 이어 본페로니 사후 테스트를 통해 통계적 유의성과 관련하여 평가하였다. 단일 주파수의 자극에 비추어 치료와 대조군 사이의 비교를 위해, 결과는 일방향 분석 분산(One-way ANOVA)에 이어 본페로니 사후 테스트로 평가하였다. 모든 경우에, 결과는 0.05 미만의 모든 값 p에 대해 통계적으로 구별되는 것으로 간주되었다.

[0225] 당업계에 기술된 바와 같이, PnTx(19)는 사전 수축된 해면체 조각(도 2)에 대한 전기 자극에 의해 촉진되는 평활근 이완을 강화하는 데 효과적이다. 그러나, 본 발명의 평활근 긴장 조절 펩타이드는 10^{-10}M의 낮은 농도에서 해면체 조각의 전기 자극 유도 이완을 강화시켰다(도 3). 따라서, PnTx(19)와 비교할 때, 본 발명의 펩타이드는 최적의 자극 주파수 범위에서 비교할 때, (10^{-10}M 대 10^{-8}M) 적어도 100배 더 강력하다(도 4). 그러나, 비특이적 NOS 차단제인 L-NAME의 존재하에, 본 발명의 펩타이드는 해면체의 평활근의 이완을 촉진할 수 없었으며, 이는 본 발명에 기술된 화합물의 치료 효과가 NO에 의해 매개됨을 나타낸다.

[0226] 본 발명이 특정 양식에 대해 기술되었지만, 본 발명의 범위 및 취지를 벗어나지 않고 다양한 수정 및 변경이 이루어질 수 있음을 당업자에게 명백할 것이다.

[0227] 실시예 4: 생체 외 폐동맥에서의 이완 효과

[0228] 페닐에프린을 사용한 폐동맥 평활근 수축의 생체 외 모델은 혈관 확장 효과를 요구하는 폐 질환에 대한 후보 화합물을 선별하는 데 매우 유용하다(ALENCAR, AK, PEREIRA, SL, MONTAGNOLI, TL, MAIA, RC, KUMMERLE, AE, LANDGRAF, SS, CARUSO-NEVES, C., FERRAZ, EB, TESCH, R., NASCIMENTO, JH, DE SANT'ANNA, CM , FRAGA, CA, BARREIRO, EJ, SUDO, RT, ZAPATA-SUDO, G. Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Br J Pharmacol, 169: 953-62. 2013).

[0229] 이 혈관 확장은 NO 생성 화합물을 통해 달성될 수 있기 때문에, 다른 조직에서 평활근을 이완시키는 적용 범위는 수컷 위스타 쥐 폐동맥을 사용하여 생체 외 분석에서 입증되었다. 복강 내 투여를 통해 쥐를 미다졸람 및 케타민(각각 2mg/kg 및 100mg/kg)으로 마취시켰다. 복강 내 투여(50mg/kg)를 통해 치사량의 티오펜탈 나트륨을 주입한 후 흉골 절개술을 통해 폐동맥의 몸통을 조심스럽게 제거하였다. 폐동맥을 조심스럽게 절개하고 결합 조직을 제거하였다. 동맥은 힘 변환기에 연결되어 크렙스 용액으로 채워진 수직 챔버에 위치하며 산소를 공급하고 37℃에서 보관하였다.

[0230] 1.5g의 장력에서 2시간의 안정화 기간 후, 동맥은 최대 평활근 수축을 얻기 위해 증가하는 용량의 페닐에프린(1nM-10μM)에 노출된 다음 각각 1nM-10μM(n = 9)의 농도에서 선택된 펩타이드의 증가하는 용량에 노출되었다. 폐동맥에 의해 생성된 긴장은 각 용량에 대해 5분 간격으로 평가되었다(ALENCAR, AK, PEREIRA, SL, MONTAGNOLI, TL, MAIA, RC, KUMMERLE, AE, LANDGRAF, SS, CARUSO-NEVES, C., FERRAZ, EB, TESCH, R., NASCIMENTO, JH, DE SANT'ANNA, CM , FRAGA, CA, BARREIRO, EJ, SUDO, RT, ZAPATA-SUDO, G. Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Br J Pharmacol 169: 953?62. 2013; ALENCAR, AK, PEREIRA, SL, DA SILVA, FE, MENDES, LV, CUNHA VDO, M., LIMA, LM, MONTAGNOLI, TL, CARUSO-NEVES, C., FERRAZ, EB, TESCH, R., NASCIMENTO, JH , SANT'ANNA, CM, FRAGA, CA, BARREIRO, EJ, SUDO, RT, ZAPATA-SUDO, G. N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. International Journal of Cardiology, 173(2): 154-62. 2014). 페닐에프린으로 수축되지 않은 동맥은 이 분석에서 제외되었다.

[0231] 분석 결과는 아래 표 2에 요약되어 있다. 효능 값은 전압을 최대 페닐에프린 유도 수축(pEC50)의 50%로 감소시킨 농도의 음의 로그로 표시되며 평균±SEM으로 표시된다. 주어진 동맥에서 달성된 최대 수축은 수축의 100%로 간주되었고 효과(Emax)는 이 최대 값과 관련된 이완 비율로 표현되었다. 결과는 시그모이드 비선형 회귀 방정식을 사용하여 3개 이상의 독립적인 테스트에서 계산되었으며, 농도 곡선의 통계 분석은 작용제 대 반응의 비선형 적합을 수행하여 수행되었다. 위의 모든 계산은 소프트웨어 Graph Prism 5.0(GraphPad Software, La Jolla, Ca, USA)에서 수행되었다. 장력 분석은 소프트웨어 LabChart7(AD Instruments, Sydney, Australia)에서 수행되었다. 생물학적 중요성을 결정하기 위한 기준으로, 본 발명자는 30% 이상의 폐동맥 이완 값을 생물학적으로 관련이 있는 것으로 간주하고 활성으로 간주한 다음 Emax 값을 계산하였다(SUN, C.K., LIN, Y.C., YUEN, C.M., CHUA, S., CHANG, L.T., SHEU, J.J., LEE, F.Y., FU, M., LEU, S., YIP, H.K. Enhanced protection against pulmonary hypertension with sildenafil and endothelial progenitor cell in rats. International journal of cardiology, 162(1): 45-58. 2012; ALENCAR, AK, PEREIRA, SL, DA SILVA, FE, MENDES, LV, CUNHA VDO, M., LIMA, LM, MONTAGNOLI, TL, CARUSO-NEVES, C., FERRAZ, EB, TESCH, R., NASCIMENTO, JH , SANT'ANNA, CM, FRAGA, CA, BARREIRO, EJ, SUDO, RT, ZAPATA-SUDO, G. N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. International Journal of Cardiology, 173(2): 154-62. 2014).

표 2

[0232] 생체 외 폐동맥의 평활근 이완에서 활성 펩타이드에 대한 농도-반응 곡선에서 얻은 효능(pEC_{50}) 및 효과 값(E_{MAX})(n = 9).

서열	pEC_{50}	효과(Emax) (%)
SEQ ID NO: 17	7.8 ± 3.0	15% ± 2.6
SEQ ID NO: 18	6.5 ± 9.3	18% ± 9.12
SEQ ID NO: 19	6.9 ± 6.55	24% ± 9.71
SEQ ID NO: 20	6.1 ± 6.9	6% ± 7.64
SEQ ID NO: 22	5.8 ± 3.1	8% ± 2.83
SEQ ID NO: 23	6.1 ± 6.2	4% ± 6.07
SEQ ID NO: 24	4.4 ± 6.4	5% ± 5.96

[0233] 테스트된 모든 펩타이드는 폐동맥 이완의 절대 값이 30%를 초과하여 모두 어느 정도의 효과를 나타내었다. 높은 효과 값으로 인해 추가 생체 내 실험을 위해 SEQ ID NO: 19가 선택되었다.

[0234] 실시예 5: SEQ ID NO: 19는 폐동맥 고혈압(PAH)의 모노크로탈린-유도 모델에서 생체 내 혈역학적 매개 변수의 복원을 유도한다

[0235] 모노크로탈린(MCT) 모델은 PAH의 가장 널리 사용되는 동물 모델로, 현존하는 가장 오래되고 사용 가능한 모델 중에서 가장 잘 기술된다. 이 모델은 단일 복강 내 또는 피하 MCT 주사 후 혈관 재형성, 평활근 세포의 증식, 내피 기능 장애, 염증성 사이토카인의 상향 조절 및 우심실 부전을 포함하여 인간 PAH의 여러 주요 양태를 모방하는 이점을 제공한다(GOMEZ-ARROYO, J.G., FARKAS, L., ALHUSSAINI, A.A., FARKAS, D., KRASKAUSKAS, D., VOELKEL, N.F., BOGAARD, H.J. The Monocrotaline Model of Pulmonary Hypertension in Perspective. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 302(4): L363-9. 2012).

[0236] MCT 유발 PAH 연구에 현재 선호되는 종은 쥐이며, MCT 주입 후 3-7 일 내에 식욕 부진, 무력감, 체중 증가 실패 및 빈호흡의 형태로 질환의 임상 징후가 나타났다. 폐 손상 및 혈관 재형성이 진행됨에 따라 동물은 다양한 정도의 호흡 곤란, 쇠약, 설사 및 말초 청색증을 발생시킨다(SCHOENTAL R., HEAD, M.A. Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline. Br J Cancer, 9(1):229-37. 1955). MCT 주사 1주 후 내피 손상, 염증성 침윤 및 부종이 관찰될 수 있지만 폐동맥압(PAP)은 증가하지 않는다. 2주 후, PAP가 증가하여 약물 투여 후 3주까지 우심실(RV) 비대를 유발한다(WEST, J., HEMMES, A. Experimental and transgenic models of pulmonary hypertension. Compr Physiol, 1(2):769-82. 2011).

[0237] PAH 치료에서 SEQ ID NO: 19의 잠재적인 이점을 평가하기 위해, 본 발명자는 건강한 성인 수컷 위스터 쥐를 사용했으며, 그런 다음 두 그룹으로 무작위 배정되었다: 모노크로탈린 유도 PAH(MCT, n = 14), 여기서 동물은 60mg/kg의 복강 내 MCT를 투여 받았다(C2401, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, Batch Number: WXBC4737V) 및 2) 대조군(CTRL, n = 7), 여기서 동물은 유사한 부피의 식염수 용액을 복강 내로 투여 받았다. 이것은 연구의 0일이 될 것이다. 같은 날, 무작위화되기 전에, 동물은 기준선을 설정하기 위해 심초음파 분석을 받았다. 14일째에, 또 다른 심장 초음파 검사를 수행하고, PAH 동물을 추가로 무작위화하여 14일 동안 1일 2회 비강 내 식염수(SAL) 또는 SEQ ID NO: 19(0.06mg/kg)를 투여 받았다. 28일째에, RV 출구 영역, 좌심실(LV) 영역 및 PAT/PET(폐동맥 가속 시간(PAT)/폐동맥 박출 시간(PET) 비율)에 심장 초음파 검사를 반복하였다. PAH 질환에서, PAP의 증가는 압력 증가로 인해 RV 영역을 증가시키고 좌심실로의 혈류 감소로 인해 LV 영역을 감소시킨다. PAT/PET 비율 측정은 경증 내지 중증의 PAH를 예측하며 가장 예측 가능한 비 침습적 측정 중 하나로 간주된다(KOSKENVUO, JW, MIRSKY, R., ZHANG, Y., ANGELI, FS, JAHN, S. , ALASTALO, TP, SCHILLER, NB, BOYLE, AJ, CHATTERJEE, K., DE MARCO, T., YEGHIAZARIANS, Y. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. Int J Cardiovasc Imaging, 26(5):509-18. 2010). RV의 수축기 압력(RVSP) 및 dP/dt 비율(압력의 도함수/최대 시간의 도함수)을 포함하여 RV의 압력과 상관 관계가 있는 침습적 RV 카테터 삽입으로 혈역학적 매개 변수를 측정하였다.

[0238] 실험은 양방향 ANOVA로 분석한 다음 본페로니의 사후 테스트를 통해 통계적 유의성을 결정하였다. 또한 도 5와 6의 그래프에는 피험자 간의 표준 편차가 나와 있다.

[0239] SEQ ID NO: 19는 비히클(MCT + 비히클)로 처리된 모노크로탈린-유도 그룹과 비교할 때, 비 처리 그룹(대조군)과 유사한 값으로 PAT/PET 비율을 증가시키며, 이는 다시 정상 값 범위로 PAP의 감소에 해당한다(도 5a). 이러한 개선은 SEQ ID NO: 19로 처리한 지 14일 후에 일어났다. PAP의 감소는 RV 압력의 감소로 이어지며, 이는 MCT + 비히클 그룹과 비교하여 SEQ ID NO: 19로 처리된 그룹에서 RVSP 및 dP/dt Max 비율의 감소에 의해 입증된다(각각 도 5b 및 5c).

[0240] SEQ ID NO: 19 처리는 또한 MCT + 비히클 그룹과 비교할 때 대조군과 유사한 값으로 RV 출구 영역의 감소(도 6a) 및 LV 영역의 증가(도 6b)를 유도하였으며, 이는 SEQ ID NO: 19가 심장을 정상으로 리모델할 수 있었다는 것을 의미한다.

[0241] 이러한 결과는 혈관 확장제인 것 외에도, 이 문서의 다른 곳에서 이미 논의 된 바와 같이, SEQ ID NO: 19가 염증 성분이 있거나 없는 PAH 및 기타 폐 질환에 대한 잠재적인 치료제로 사용될 수 있음을 보여준다.

[0242] 실시예 6: SEQ ID NO: 19의 생체 내 항 염증 효과

[0243] 실시예 5에 기술된 실험에서, 염증 마커의 사후 분석을 위해 동물을 죽였다.

[0244] 이 문서의 다른 곳에서 자세히 논의했듯이 천식, COPD 및 PAH를 포함하는 모든 폐 질환은 질환의 생리병리학의 일부인 어느 정도의 염증을 나타낸다. 이러한 질환을 치료하기 위한 약물은 염증을 유발할 수 없는데, 즉 전 염

증성이다.

[0245] 항 염증 작용의 기전 중 하나는 평활근 세포 이완이 내피 투과성을 감소시켜 결과적으로 혈액 염증 인자의 이동을 감소시켜, 염증 과정을 감소시킬 수 있다는 것이다(WALLACE, J.L. Nitric Oxide as a regulator of inflammatory processes. Mem Inst Oswaldo Cruz, 100:5-9. 2005).

[0246] PAH 환자 5명 중 1명에서, 염증 관련 부종에 의해 종격동 림프절이 비대해진다(BERGIN, C.J., PARK, K.J. Lymph node enlargement in pulmonary arterial hypertension due to chronic thromboembolism. J Med Imaging Radiat Oncol, 52(1):18-23. 2008). 증가된 액체 함량으로 인해 부종성 기관의 무게가 더 나가므로, 본 발명자는 안락사 후 실시예 5의 동물의 여러 기관의 무게를 측정하였다. SEQ ID NO: 19 처리는 종격동 림프절에서 MCT 처리에 의해 유도된 부종성 체중 증가를 감소시킬 수 있어서, CTRL 그룹과 구별할 수 없게 만들었다(도 7a).

[0247] 모노크로탈린 연구의 심장 샘플을 조사하여 SEQ ID NO: 19의 잠재적인 항 염증 작용을 밝혀냈다. 모든 샘플 균질화 과정 동안 심장을 얼음 위에 두었다. 인산염 완충 식염수(PBS)로 희석된 1% 프로테아제 억제제 칵테일(Sigma)을 함유하는 용해 완충액을 각 샘플에 대해 1mL의 비율로 첨가하였다. 나트륨 오르쏘바나데이트(SIGMA) 1mM도 첨가하였다. 조직을 균질화한 다음 10,000g에서 10분 동안 원심 분리하였다. 총 단백질 및 사이토카인 수준(종양 괴사 인자(TNF)-α, 인터페론(INF)-γ 및 인터루킨(IL) -1β)을 측정하기 위해 각 샘플의 상청액을 멸균 식별된 튜브에 수집하였다.

[0248] 샘플의 총 단백질 값은 제조업체의 지침에 따라 브라드포드 분석(BioRad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 측정되었다. 간단히 말해서, 프로토콜은 최종 부피 150μl의 마이크로플레이트에서 수행하였다. 0.025 내지 2.0mg/ml의 선형 검량선 범위를 소 혈청 알부민(BSA, SIGMA)으로 제조하였다. 단백질 용액을 이중으로 분석 하였다. 샘플을 용해 완충액으로 20배 희석한 다음, 이 샘플로부터 25μl를 각 웰에 적재하였다. 다중 채널 피펫을 사용하여 125μl의 Quick StartTM Bradford 1x 염료 시약 용액을 첨가하여 최종 부피 150μl를 생성하였다. 샘플을 실온에서 5분 동안 배양한 다음 595nm에서 분광 광도계(SpectraMax Microplate reader, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 mg/ml로 표시되는 샘플의 총 단백질 농도를 찾기 위해 각 샘플의 평균 흡광도로 보간된 선형 회귀선으로 표시되었다.

[0249] TNF-α, INF-γ 및 IL-1β의 농도는 심장 균질물에 대해 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA)을 사용하여 측정되었다. TNF-α(Catalog # 900-K54) 및 INF-γ(Catalog # 900-K98) 키트는 페프로테크(Rocky Hill, CO, USA)에서 구입한 반면 IL-1β(DY401) 키트는 R & D Systems(Minneapolis, MI, USA)으로부터 구입하였다. 분석은 제조업체의 권장 사항에 따라 수행되었다.

[0250] 데이터 분석은 통계 소프트웨어 패키지(Prism version 5.0, Graph-Pad Software, San Diego, CA)로 수행되었다. 데이터는 평균±SEM으로 표현되었다. 모든 테스트는 일방향 분산 분석(ANOVA)과 본페로니의 다중 비교 테스트를 사용하여 수행되었다. 통계적 차이는 $p < 0.05$인 경우 유의한 것으로 간주되었다.

[0251] 심장 균질물에서, MCT 그룹은 대조군에 비해 측정된 모든 사이토카인(TNF-α, INF-γ 및 IL-1β)의 증가를 보였다. SEQ ID NO: 19는 사이토카인을 대조군과 유사한 값으로 감소시킨다(도 7b, 7c, 7d).

[0252] 실시예 7: PnTX(9)와 비교한 SEQ ID NO: 19 및 SEQ ID NO: 24의 생체 내 항 염증 효과

[0253] 수컷 A/J 마우스(18-20g)를 집먼지 진드기(HDM)에 의해 민감화하여 하스펠라그 등의 프로토콜에 따라 급성 알레르기성 천식을 확립하였다(HASPESLAGH, E., DEBEUF, N., HAMMAD, H., LAMBRECHT, BN Murine Models of Allergic Asthma. Methods Mol Biol, 1559 : 121-136. 2017). 기관지 폐포 세척액(BALF)의 염증성 세포 침윤을 유세포 분석으로 분석하였다.

[0254] 마우스(그룹당 n = 5)를 기관 내 점적에 의해 동물 당 10nMol 및 30nMol의 용량으로 비히클(PBS), SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 24 또는 PnTx (19)로 처리하고, 면역성 검사 후 6 시간에 재료를 수집하였다.

[0255] PnTx(19)(30nMol)에 노출된 마우스는 BALF의 총 백혈구 세포 수가 크게 증가한 것으로 나타났는데, 이는 주로 호중구의 축적 때문이었다(도 8). SEQ ID NO: 19 및 SEQ ID NO: 24 처리는 펩타이드의 기관 내 점적 6시간 후 기관지 폐포 공간에서 호중구 축적을 유도하지 않았으며(도 8), 이는 두 펩타이드 모두는 비교기 PnTx(19)와 달리, 마우스 폐에서 전 염증 효과가 없음을 시사한다. 천식 및 COPD와 같은 기타 폐 질환의 만성 염증은 주로 그 과정에 관여된 주요 염증 세포인 호중구가 작은 기도로 침투하는 것과 관련이 있다는 점에 유의하는 것이 중요하다.

[0256] 항 염증 작용의 한 가지 가능한 메커니즘은 평활근 세포 이완이 내피 투과성을 감소시켜 결과적으로 혈액 염증 인자의 이동을 감소시켜 염증 과정을 감소시킬 수 있다는 것이다. 따라서, SEQ ID: 24 및 SEQ ID: 19와 같은 보다 강력한 혈관 확장을 유도하는 강력한 펩타이드는 PnT(x)19에 비해 더 많은 항 염증 효과를 갖는다.

[0257] 서열(X) 목록

[0258] 1 Arg-Ala-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys

[0259] 2 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Ala

[0260] 3 Arg-Gln-Ala-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys

[0261] 4 Ala-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys

[0262] 5 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys

[0263] 6 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Ser-Asn-Lys

[0264] 7 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ala-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys

[0265] 8 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Ala-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys

[0266] 9 Arg-Gln-Tyr-Ala-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys

[0267] 10 Arg-Gln-Tyr-Phe-Ala-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys

[0268] 11 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Ala-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys

[0269] 12 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Ala-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys

[0270] 13 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Ala-Ser-Lys

[0271] 14 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ala-Lys

[0272] 15 Glu-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Asn-Ser-Lys

[0273] 16 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Asn-Ser-Glu

[0274] 17 Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser

[0275] 18 Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn

[0276] 19 Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala

[0277] 20 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr

[0278] 21 Tyr-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Leu

[0279] 22 Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp

[0280] 23 Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu

[0281] 24 Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys

[0282] 25 Ile-Ala-Trp-Tyr-Glu

[0283] 26 Ile-Ala-Tyr-Tyr-Lys

[0284] Gly-Glu-Arg-Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-

[0285] 27 Lys

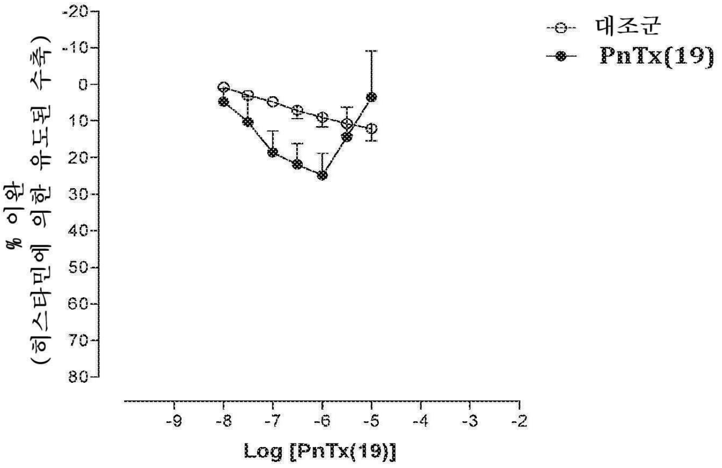
[0286] 28 Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys

[0287] 29 Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Arg-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Arg-Lys-Tyr-Trp-Ala-Ile

[0288] 30 Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys

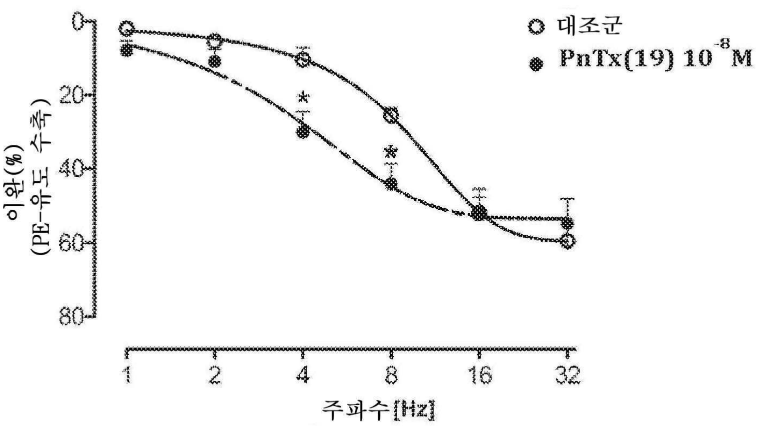
도면

도면1



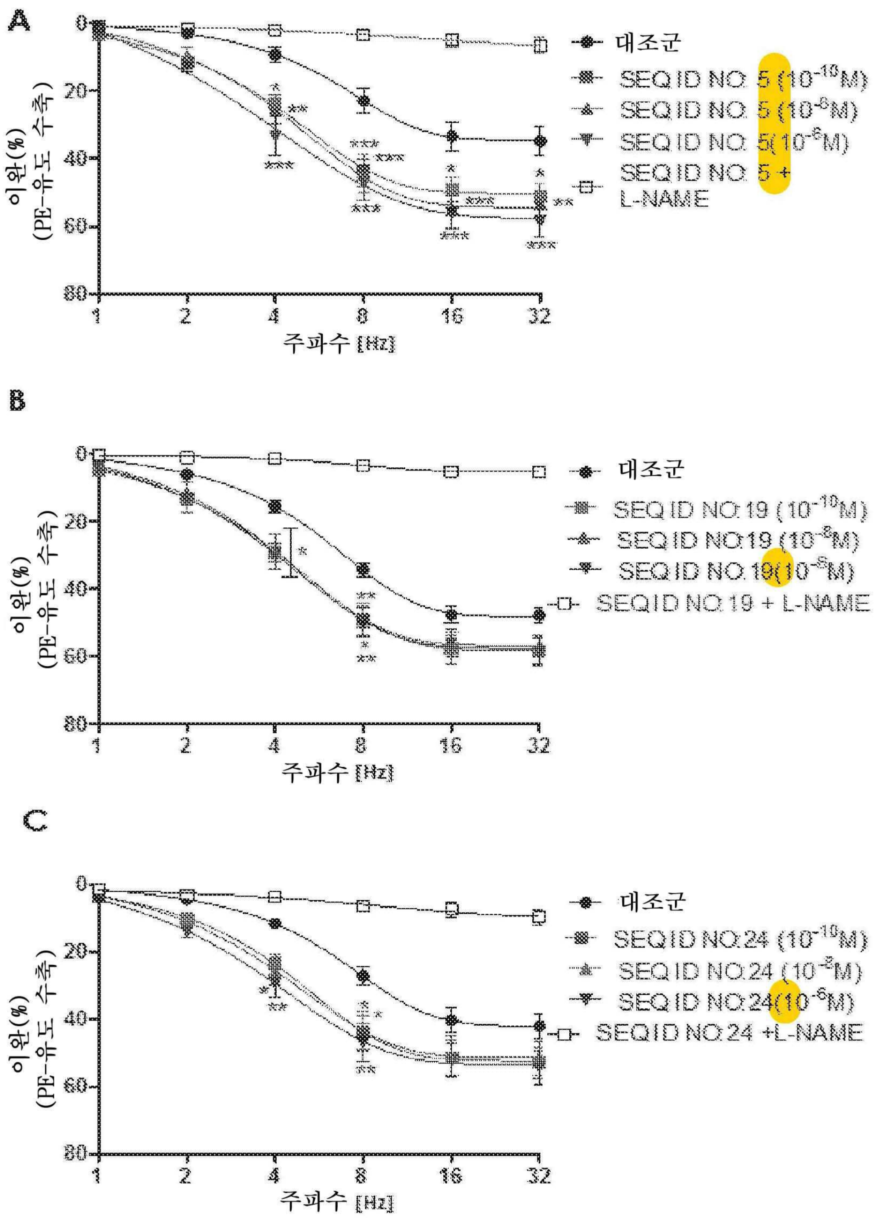
% 이완
(히스타민에 의한 유도된 수축)
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
-9
-8
-7
-6
-5
-4
-3
-2
Log [PnTx(19)]
대조군
PnTx(19)

도면2

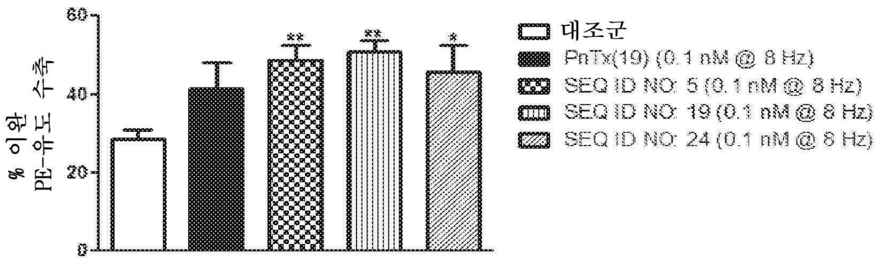


이완(%)
(PE-유도 수축)
0
20
40
60
80
1
2
4
8
16
32
주파수[Hz]
대조군
PnTx(19) 10-8M

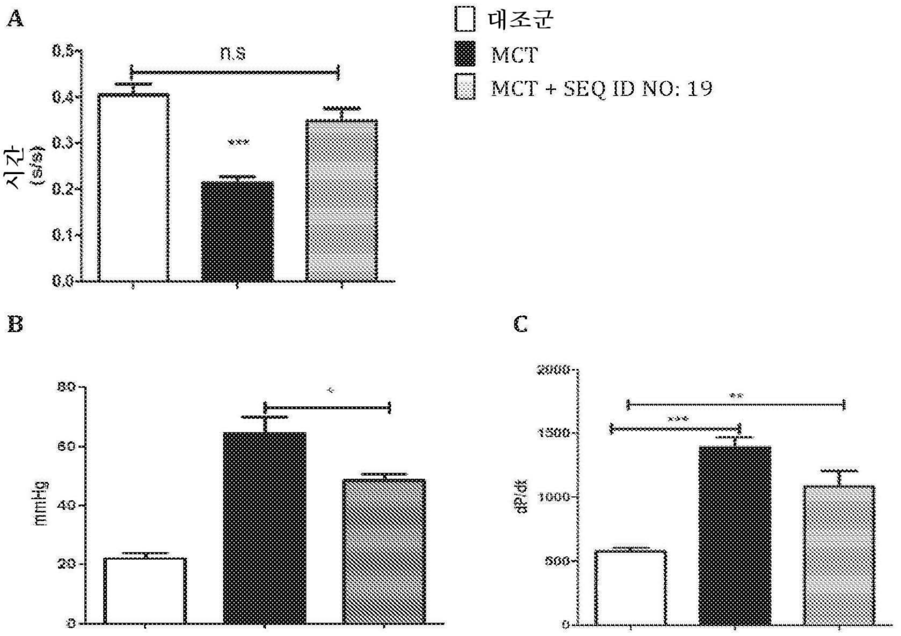
도면3


A
대조군
SEQ ID NO: 5 (10^-10 M)
SEQ ID NO: 5 (10^-8 M)
SEQ ID NO: 5(10^-6 M)
SEQ ID NO: 5 + L-NAME
이완(%)
(PE-유도 수축)
주파수 [Hz]
B
대조군
SEQ ID NO:19 (10^-10 M)
SEQ ID NO:19 (10^-8 M)
SEQ ID NO:19(10^-6 M)
SEQ ID NO:19 + L-NAME
이완(%)
(PE-유도 수축)
주파수 [Hz]
C
대조군
SEQ ID NO:24 (10^-10 M)
SEQ ID NO:24 (10^-8 M)
SEQ ID NO:24(10^-6 M)
SEQ ID NO:24 +L-NAME
이완(%)
(PE-유도 수축)
주파수 [Hz]

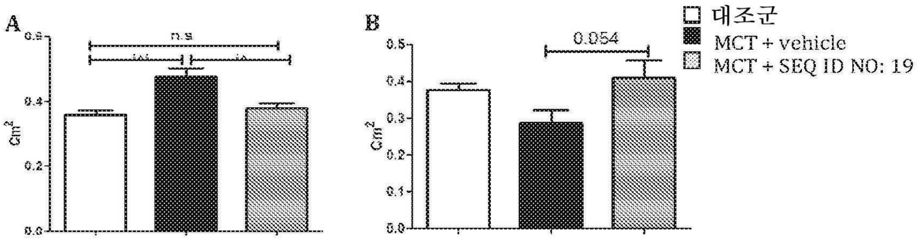
도면4


% 이완
PE-유도 수축
대조군
PnTx(19) (0.1 nM @ 8 Hz)
SEQ ID NO: 5 (0.1 nM @ 8 Hz)
SEQ ID NO: 19 (0.1 nM @ 8 Hz)
SEQ ID NO: 24 (0.1 nM @ 8 Hz)

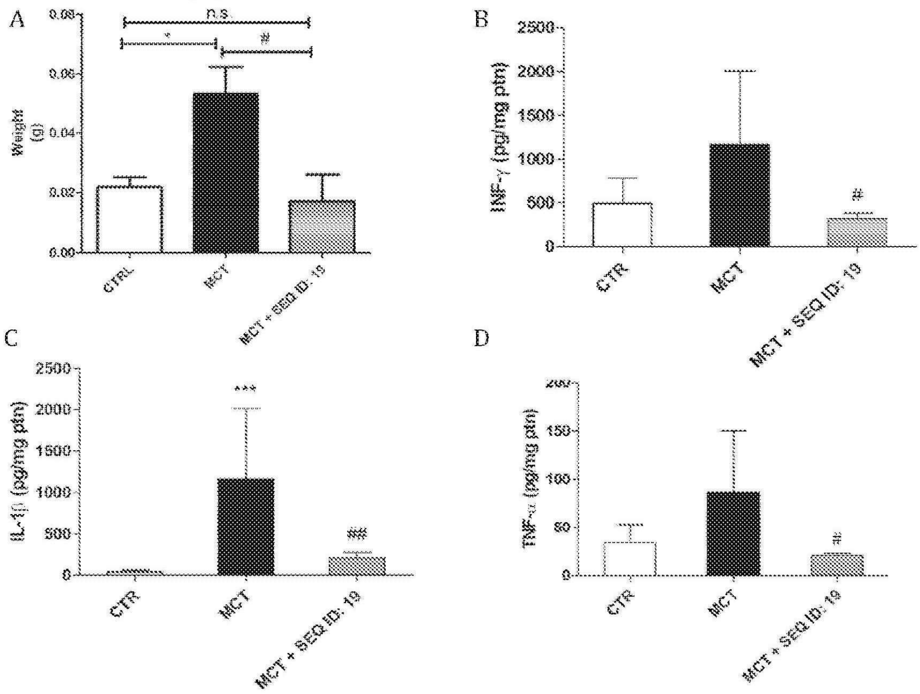
도면5


A
B
C
대조군
MCT
MCT + SEQ ID NO: 19
n.s
***
시간
(s/s)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
mmHg
80
60
40
20
0
*
dP/dt
2000
1500
1000
500
0
**

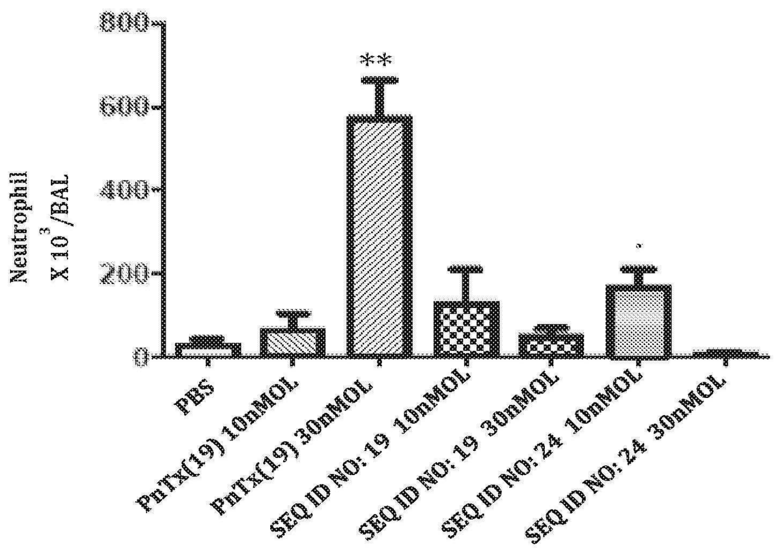
도면6


A
B
대조군
MCT + vehicle
MCT + SEQ ID NO: 19
n.s
0.054
Cm²
0.6
0.4
0.2
0.0
0.5
0.3
0.1

도면7


A
B
C
D
n.s.
*
#
Weight
(g)
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
CTRL
MCT
MCT + SEQ ID: 19
INF-γ (pg/mg ptn)
2500
2000
1500
1000
500
0
CTR
IL-1β (pg/mg ptn)
***
##
TNF-α (pg/mg ptn)
150
100
50

도면8



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Biozeus Desenvolvimento De Produtos Biofarmac?ticos

do Nascimento, Caio Victor Machado Fran?

<120> SYNTHETIC PEPTIDES, PRODRUGS, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND USES

<130> 146-023

<150> 62/694,162

<151> 2018-07-05

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 1

Arg Ala Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn Ser Lys

1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 2

Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn Ser Ala

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 3

Arg Gln Ala Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn Ser Lys

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 4

Ala Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn Ser Lys

1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 5

Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn Ser Lys

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 6

Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Ile Ala Ser Asn Lys

1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

<400> 7

Arg Gln Tyr Phe Trp Ala Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn Ser Lys

1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

<400> 8

Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Asn Ser Lys

1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 9

Arg Gln Tyr Ala Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn Ser Lys

1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 10

Arg Gln Tyr Phe Ala Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn Ser Lys

1 5 10 15

<210>

11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 11

Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Ala Lys Leu Ala Asn Ser Lys

1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 12

Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Ala Leu Ala Asn Ser Lys

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 13

Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Ala Ser Lys

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 14

Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn Ala Lys

1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 15

Glu Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Ile Ala Asn Ser Lys

1   5   10   15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221

> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 16

Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Ile Ala Asn Ser Glu

1   5   10   15

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (5)...(7)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 17

Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn Ser

1   5   10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (4)...(6)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 18

Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn

1   5   10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (3)...(5)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 19

Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 20

Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (3)...(5)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 21

Tyr Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Leu

1 5

<210>

22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (6)...(8)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 22

Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp

1   5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (2)...(4)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 23

Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu

1   5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (1)...(3)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 24

Ile Ala Trp Tyr Lys

1   5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (1)...(3)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 25

Ile Ala Trp Tyr Glu

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 26

Ile Ala Tyr Tyr Lys

1 5

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (9)...(11)

<223> Synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<400> 27

Gly Glu Arg Arg Gln Tyr Phe Trp Ile Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Asn

1 5 10 15

Ser Lys

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (1)...(3) AND (11)...(13)

<223> synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<220><221> misc_feature

<222> (6)...(10)

<223> amino acid is optionally linked to poly-Gly linkers

<400> 28

Ile Ala Trp Tyr Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ile Ala Trp Tyr Lys

1 5 10 15

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (1)...(3)

<223> synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<220><221> misc_feature

<222> (7)...(11)

<223> amino acid is optionally linked to poly-Gly linkers

<400> 29

Ile Ala Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Trp Ala

1 5 10 15

Ile

<210> 30

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> Conserved region

<222> (1)...(3) AND (11)...(13) AND (21)...(23)

<223> synthetic PRT based around -Ile-Ala-Trp-

<220><221> misc_feature

<222> (6)...(10) AND (16)...(20)

<223> amino acid is optionally linked to poly-Gly linkers

<400> 30

Ile Ala Trp Tyr Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ile Ala Trp Tyr Lys Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ile Ala Trp Tyr Lys

20 25