

명세서

발명의 명칭: 안구 건조증의 개선 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도

기술분야

- [1] [관련출원과의 상호인용]
- [2] 본 출원은 2023년 08월 10일에 출원된 한국특허출원 제10-2023-0104783호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 한국특허출원 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [3] [기술분야]
- [4] 본 발명은 안구 건조증 개선 활성을 갖는 신규 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [5] 안구 건조증(dry eye disease, dry eye syndrome)은 눈물의 분비가 감소하거나 눈물의 분비량이 정상이라도 그 성분에 변화가 생김으로써 안구의 각막이나 결막에 건조 증상이 발생하는 상태나 질환을 의미한다. 안구 건조증의 원인으로는 노화로 인한 눈물 분비량의 감소 또는 눈물 성분의 변화, 류마티스성 관절염, 쇼그렌 증후군, 루푸스, 공피증, 당뇨병, 비타민 A 결핍증 등의 질병으로 인한 눈물 생산량의 감소, 만성 결막염으로 인한 점액 분비량의 감소, 갑상선 기능 항진증으로 인한 과도한 눈물의 증발, 여성호르몬 감소로 인한 눈물 생성의 감소, 항생제, 항히스타민 제 등의 약물 복용으로 인한 눈물의 증발, 건조한 환경, 연기, 먼지, 햇빛, 바람 등에 의한 눈의 자극, 눈을 깜박이는 횟수의 감소 등의 매우 다양한 원인이 있다.
- [6] 안구 건조증은 안구 각막 및 결막에 대한 건조 스트레스(desiccating stress)로부터 시작되며, 이러한 건조 스트레스로 인해 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 염증증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)의 발현이 증가하게 된다. 이에 따라, 안구 각막 및 결막 조직 주변의 APCs (Antigen Presenting Cells)이 활성화된 후 림프절로 이동하여 Th1, Th17 세포의 분화를 유도한다. 분화된 Th1, Th17 세포는 다시 병변 부위로 이동하여 TNF- α , IL-1 β , IL-17, IFN- γ 와 같은 염증증성 사이토카인의 분비를 촉진하여 염증을 더욱 심화시키고, 이러한 자극으로 인해 증가된 MMPs (Matrix metalloproteinases)에 의해 기질분해(matrix degradation)와 같은 손상이 유도된다(Mucosal Immunol. 2009 Jul;2(4):375-6. Role of Th17 cells in the immunopathogenesis of dry eye disease).
- [7] PACAP(Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)는 체내 펩타이드 호르몬이며, 그 수용체로는 VPAC1, VPAC2, PAC1 수용체들이 알려져 있고, 최근에는 안구 건조증 동물 모델에서 PACAP/PAC1R 기전 활성화에 의해 눈물샘(lacrimal gland)에서 눈물 분비가 촉진되어 안구 건조증의 증상이 개선되는 효

과를 확인한 결과가 보고된 바 있다(Int J Mol Sci. 2022 Jan 8;23(2):664., Potential Therapeutic Role of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide for Dry Eye Disease). 또한, PAC1R-특이적 효능제 활성을 갖는 PACAP로부터 유래된 합성 펩타이드가 각막 손상을 치유하고 눈물샘으로부터 눈물 분비를 증가시키는 활성을 가짐을 확인한 결과가 보고되어 있다(Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015 Jul;56(8):4336-49., A New Recombinant PACAP-Derived Peptide Efficiently Promotes Corneal Wound Repairing and Lacrimal Secretion). 현재까지 PACAP는 항염증 활성, 각막 손상 억제 활성, 및 눈물 분비 유도 활성을 통해 안구 건조증의 증상 개선에 관여하는 것으로 확인되어 있다.

- [8] [선행기술문헌]
- [9] [비특허문헌]
- [10] Mucosal Immunol. 2009 Jul;2(4):375-6.
- [11] Int J Mol Sci. 2022 Jan 8;23(2):664.
- [12] Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015 Jul;56(8):4336-49.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 본 발명자들은 안구 건조증의 개선 활성을 갖는 안정하고 유효성 있는 활성물질을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들이 합성한 신규한 펩타이드가 눈물 분비 촉진 활성, 눈물막 성분인 뮤신 분비 촉진 활성, 및 각막상피세포의 손상 방지 활성 등을 통해 매우 뛰어난 안구 건조증 개선 활성을 가짐을 실험적으로 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [14] 따라서, 본 발명의 목적은 안구 건조증의 개선 활성을 갖는 신규한 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 안구 건조증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것에 있다.

과제 해결 수단

- [16] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위해,
- [17] 본 발명의 일 측면은 서열번호 1에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 제공한다.
- [18] 본 발명의 다른 측면은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 안구 건조증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [19] 이하에서 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [20] 펩타이드 및 이의 활성
- [21] 본 발명의 일 측면에 따르면, 서열번호 1에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 제공한다.
- [22] [서열번호 1의 아미노산 서열]
- [23] TLKKNKRFSK

- [24] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다.
- [25] 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 변형 없이 사용될 수 있으나, 상기 펩타이드가 가지는 본래의 활성, 예컨대 안구 건조증 개선 활성에 영향을 미치지 않는 범위 내에서, 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환, 또는 이들의 조합에 의해서 상이한 서열을 가지는 아미노산의 변이체 또는 단편을 사용할 수 있다.
- [26] 본 발명의 펩타이드는 그 활성을 변화시키지 않는 범위내에서 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 변형될 수 있다.
- [27] 본 발명의 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 및 이의 변이체 또는 이의 활성 단편을 포함한다. 상기 실질적으로 동일한 아미노산 서열이란 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 각각 75% 이상, 예컨대 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 의미한다. 또한, 상기 펩타이드에는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [28] 본 발명의 펩타이드는 아미노산 서열의 일부 부위를 선정하고 그 활성을 증가시키기 위해 N-말단 및/또는 C-말단 변형이 유도된 것일 수 있다. 이러한 N-말단 및/또는 C-말단 변형을 통해 본 발명의 펩타이드의 안정성을 현저하게 향상시킬 수 있으며, 예를 들어, 펩타이드의 생체 내 투여 시 반감기를 증가시킬 수 있다. 상기 용어 "안정성"은 생체 내 단백질 절단 효소의 공격으로부터 본 발명의 펩타이드를 보호하는 인 비보에서의 안정성뿐만 아니라, 저장안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 포함하는 의미이다.
- [29] 상기 N-말단 변형은 펩타이드의 N-말단에 아세틸기(acetyl group), 플루오레닐 메톡시카르보닐기(fluorenylmethoxycarbonyl group), 포르밀기(formyl group), 팔미토일기(palmitoyl group), 미리스틸기(myristyl group), 스테아릴기(stearyl group) 및 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol; PEG)로 이루어진 군으로부터 선택된 보호기가 결합한 것일 수 있다. 상기 C-말단 변형은 펩타이드의 C-말단에 히드록시기(hydroxyl group, -OH), 아미노기(amino group, -NH₂), 아자이드(azide, -NHNH₂) 등이 결합한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [30] 본 발명의 펩타이드는 본 발명이 속하는 기술분야에서 널리 알려진 다양한 방법으로 제조할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques; Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) 또는 액상 합성 기술(US 등록특허 제5,516,891호)에 따라 제조될 수 있다.

- [31] 본 발명의 펩타이드는 안구 건조증의 개선, 치료 또는 예방하는 활성을 갖는다.
- [32] 일 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 눈물 분비 촉진 활성과 관련하여 다음의 활성을 갖는다.
- [33] (i) PAC1R (Pituitary Adenylate Cyclase 1 Receptor)에 대한 결합능(binding capacity)을 가지며, PAC1R 신호 경로의 활성화를 촉진한다.
- [34] (ii) Aquaporin 5 (AQP5) 단백질의 세포막(plasma membrane)으로의 이동을 촉진시킨다.
- [35] (iii) 신경모세포(neuroblast)의 분화를 유도한다.
- [36] 일 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 결막 술잔세포에서 눈물의 구성성분인 뮤신(mucin) 발현 및 분비를 촉진하는 활성을 갖는다.
- [37] 일 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 인간 각막 상피세포에서 IFN- γ 에 의해 유도되는 염증 반응과 세포 손상을 억제하는 활성을 갖는다.
- [38] 일 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 인간 각막 상피세포에서 자외선(UVB) 조사에 의해 유도되는 염증 반응과 세포 손상을 억제하는 활성을 갖는다.
- [39] 안구 건조증 치료 또는 예방용 조성물
- [40] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 서열번호 1에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 안구 건조증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [41] 본 명세서에서 사용된 용어 "안구 건조증"은 눈물이 부족하거나, 눈물이 과도하게 증발하거나, 눈물막의 불안정성, 눈물의 구성성분의 불균형으로 인해, 안구의 표면이 손상되고, 시각장애, 눈이 시린 증상, 자극감, 이물감, 또는 건조감과 같은 자극 증상을 느끼게 되는 눈의 질환을 의미한다.
- [42] 본 명세서에서 사용된 용어 "안구 건조증"은 불충분하거나 결합이 있는 눈물을 특징으로 하는 장애, 예를 들어 다음의 명칭으로 불리는 장애를 하나 이상 포함할 수 있으나, 반드시 하기 장애 또는 질환들로 한정되는 것은 아니다: 안구건조(dry eye), 안구 건조 증후군(dry eye syndrome), 안구 건조증 질환(dry eye disease), 증발성 안구 건조, 수분 결핍성 안구 건조, 건성 각막염(각막의 건조 및 염증질환), 건성 각결막염(keratoconjunctivitis sicca)(각막과 결막 모두에 영향을 미치는 건조) 및 기능 장애 눈물 증후군(dysfunctional tear syndrome)(부적절한 눈물의 질 또는 양).
- [43] 본 명세서에서 사용된 용어 "치료"는 상태, 질환 또는 장애의 적어도 하나의 증상을 예방, 제거, 치유, 억제, 감소시키는 것을 지칭한다.
- [44] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 서열번호 1에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 치료학적 유효량 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것일 수 있다.
- [45] 상기 치료학적 유효량은 합리적인 이익/위험 비율로 원하는 효과를 내는 활성 물질 또는 제형의 양을 지칭한다. 상기 치료학적 유효량은 안구 건조증 또는 안구 건조증의 증상을 치료하는데 필요하거나 충분한 양인 것을 지칭한다. 유효량

은 치료되는 질환 또는 상태, 투여되는 특정 조성물, 또는 질환 또는 상태의 중증도와 같은 요인에 따라 달라질 수 있다.

- [46] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [47] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 등장화제, 완충제, 방부제, 계면 활성제, 부형제, pH 조정제등을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [48] 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (19th ed., 1995, Williams & Wilkins)에 상세히 기재되어 있다.
- [49] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 본 발명의 펩타이드 및 식염수(saline solution) 또는 인공 눈물(artificial tears)과 같은 임의의 적합한 담체를 함유하는, 눈에 국소 투여하기에 적합한 용액, 현탁액 또는 겔을 포함할 수 있다.
- [50] 본 발명의 약학적 조성물은 눈에 국소 투여하기 위한 조성물을 제조하는 기술에서 공지된 하나 이상의 성분을 더 포함할 수 있다.
- [51] 본 발명의 약학적 조성물은 안구 건조증을 치료 또는 예방하기 위한 적합한 모든 경로로 투여될 수 있으며, 예를 들어, 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육내 주입, 복강내 주입, 국소 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물이 안구 건조증을 치료하기 위한 조성물이라는 점에서 눈에 국소 투여하는 경로가 바람직하다.
- [52] 상기 약학적 조성물의 투여량은 1일당 0.0001 μg 내지 100 mg, 0.001 μg 내지 100 mg, 0.01 μg 내지 100 mg, 0.1 μg 내지 100 mg, 또는 1.0 μg 내지 1000 mg 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [53] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이 때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [54] 일 실시예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 눈물 분비 촉진 활성과 관련하여 다음의 활성을 갖는다.

- [55] (i) PAC1R (Pituitary Adenylate Cyclase 1 Receptor)에 대한 결합능(binding capacity)을 가지며, PAC1R 신호 경로의 활성화를 촉진한다.
- [56] (ii) Aquaporin 5 (AQP5) 단백질의 세포막(plasma membrane)으로의 이동을 촉진시킨다.
- [57] (iii) 신경모세포(neuroblast)의 분화를 유도한다.
- [58] 일 실시예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 결막 술잔세포에서 눈물의 구성성분인 뮤신(mucin) 발현 및 분비를 촉진하는 활성을 갖는다.
- [59] 일 실시예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 인간 각막 상피세포에서 IFN- γ 에 의해 유도되는 염증 반응과 세포 손상을 억제하는 활성을 갖는다.
- [60] 일 실시예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 인간 각막 상피세포에서 자외선(UVB) 조사에 의해 유도되는 염증 반응과 세포 손상을 억제하는 활성을 갖는다.
- [61] **펩타이드의 용도**
- [62] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 서열번호 1에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 안구 건조증의 치료, 예방 또는 개선하는데 사용하는 용도를 제공한다.
- [63] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 안구 건조증의 치료, 예방 또는 개선하기 위한 의약(medicament)의 제조를 위해 서열번호 1에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 사용하는 용도를 제공한다.
- [64] 본 발명의 다른 측면에서, 서열번호 1에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 안구 건조증의 치료, 예방 또는 개선이 필요한 환자 또는 대상체(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 안구 건조증의 치료, 예방 또는 개선하는 방법을 제공한다.
- [65] 본 명세서에서 사용된 상기 용어 "환자" 또는 "대상체(subject)"는 인간 또는 인간이 아닌 동물, 예를 들어 인간, 영장류, 포유류 및 척추 동물을 지칭한다.
- [66] 상기한 용도 및 치료 방법에는 상술한 본 발명의 펩타이드, 이의 활성 및 약학적 조성물에 관해 설명된 내용이 모두 동일하게 적용될 수 있으며, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복하여 기재하지 않는다.

발명의 효과

- [67] 본 발명의 펩타이드는 PAC1R에 대한 결합능을 가지며, PAC1R 신호 경로의 활성화를 촉진하고, 신경모세포의 분화를 유도함으로써 눈물 분비 촉진 활성을 갖는다.
- [68] 또한, 본 발명의 펩타이드는 결막 술잔세포에서 눈물의 구성성분인 뮤신(mucin) 발현 및 분비를 촉진하고, 인간 각막 상피세포에서 염증 반응과 세포 손상을 억제하는 활성을 갖는다.
- [69] 본 발명의 펩타이드는 안구 건조증의 치료, 예방 및 개선 용도의 활성물질로 이용될 수 있다.

- [70] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [71] 도 1a 및 도 1b은 본 발명의 펩타이드가 PAC1R에 대한 결합능을 가짐을 보여주는 SPR 분석 결과이다.
- [72] 도 2a 본 발명의 펩타이드가 인간 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y에서 PAC1R 신호 경로를 활성화시켜 PKA 및 CREB의 인산화를 증가시키는 것을 보여주는 웨스턴 블로팅 결과이며, 도 2b는 도 2a의 웨스턴 블로팅 결과의 밴드의 강도를 대조군 상대 비율로 나타낸 그래프이다.
- [73] 도 3은 본 발명의 펩타이드가 인간 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y에서 AQP5 단백질의 세포막으로의 이동을 촉진시키는 것을 보여주는 웨스턴 블로팅 결과이다.
- [74] 도 4는 본 발명의 펩타이드가 인간 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y에서 성숙 신경 마커인 GAP43의 발현 수준을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 보여주는 웨스턴 블로팅 결과이다.
- [75] 도 5는 본 발명의 펩타이드가 결막 술잔세포에서 MUC2 및 MUC5AC 유전자의 발현 수준을 증가시키는 것을 보여주는 실험결과이다.
- [76] 도 6a 및 도 6b는 각각 본 발명의 펩타이드가 결막 술잔세포에서 MUC2 및 MUC5AC 단백질의 발현 수준을 증가시키는 것을 보여주는 웨스턴 블로팅 및 ELISA 결과이다.
- [77] 도 7a는 인간 각막 상피세포에서 IFN- γ 에 의해 증가한 COX-2, IL-1 β , IL-6 유전자들의 발현 수준을 본 발명의 펩타이드가 억제하는 것을 보여주는 실험결과이고, 도 7b는 도 7a의 밴드의 강도를 대조군 상대 비율로 나타낸 그래프이다.
- [78] 도 7c는 인간 각막 상피세포에서 IFN- γ 에 의해 증가한 MMP3 및 MMP9 유전자들의 발현 수준을 본 발명의 펩타이드가 억제하는 것을 보여주는 실험결과이고, 도 7d는 도 7c의 밴드의 강도를 대조군 상대 비율로 나타낸 그래프이다.
- [79] 도 8a는 인간 각막 상피세포에 UVB 조사에 의해 증가한 COX-2, IL-1 β , IL-6 유전자들의 발현 수준을 본 발명의 펩타이드가 감소시키는 것을 보여주는 실험결과이고, 도 8b는 도 8a의 밴드의 강도를 대조군 상대 비율로 나타낸 그래프이다.
- [80] 도 8c는 인간 각막 상피세포에 UVB 조사에 의해 증가한 MMP3 및 MMP9 유전자들의 발현 수준을 본 발명의 펩타이드가 억제하는 것을 보여주는 실험결과이고, 도 8d는 도 8c의 밴드의 강도를 대조군 상대 비율로 나타낸 그래프이다.
- [81] 도 9a는 임상학적 각막 손상 평가시 NIE (National Institute of Eye) 가이드라인에 따라 각막 손상을 스코어링(scoring)하는 각막의 5개 영역에 대한 모식도이다.

[82] 도 9b는 안구 건조 모델 마우스에서 본 발명의 펩타이드가 눈물막 유지 효과를 보여주는 실험결과이고, 도 9c는 도 9b 실험결과의 실험군 구성, 투여물질, 투여용량에 관한 정보를 보여주는 표이다.

[83] 도 10a 내지 도 10c는 각각 안구 건조 모델 마우스에서 본 발명의 펩타이드가 각막의 손상을 개선하는 효과를 보여주는 실험결과 및 실험에 대한 실험군 구성, 투여물질, 투여용량에 관한 정보를 보여주는 표이다.

발명의 실시를 위한 형태

[84] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

[85] **제조예 1: 펩타이드**

[86] 자동 펩타이드 합성기(Milligen 9050, Millipore, 미국)를 이용하여 하기의 표 1에 기재된 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 합성하고, C18 역상 고성능액체크로마토그래피(HPLC)(Waters Associates, 미국)를 이용하여 이들 합성된 펩타이드를 순수 분리하였다. 컬럼은 ACQUITY UPLC BEH300 C18 (2.1 mm X 100 mm, 1.7 μ m, Waters Co, 미국)을 이용하였다.

[87] [표1]

서열번호	아미노산 서열 (N말단 -> C말단)
1	TLKKNKRFSK

[88] 상기 제조한 서열번호 1의 펩타이드에 대해 다음의 실험을 통해 그 효능을 평가하였다.

[89] **실험예 1: SPR (Surface Plasmon Resonance) 분석**

[90] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 PAC1R (Pituitary Adenylate Cyclase 1 Receptor)에 대한 결합능(binding capacity)을 갖는지를 SPR 분석을 통해 평가하였다.

[91] 분석은 Biacore T200 (Cytiva, USA) 장비를 사용하여 수행하였다. CM5 chip (Cytiva, USA)에 재조합 인간 PAC1R 단백질(LSBio, USA)을 아민 커플링(amine coupling) 방법을 사용하여 고정화시켰다. 러닝 버퍼(Running buffer)인 1X HBS-EP 버퍼(buffer)로 펩타이드를 농도 별로 희석시킨 시료들을 제조한 후, 제조한 시료들을 상기 칩(chip) 표면에 흘려주었다. PAC1R에 대한 농도별 펩타이드의 결합에 따라 나타나는 농도별 반응 유닛(Response Unit, RU)의 증가를 Biacore T200 evaluation software ver. 3.1 (Cytiva, USA)를 이용하여 분석하였다.

[92] SPR 분석 결과, 서열번호 1의 펩타이드가 농도 의존적으로 RU 값의 증가를 나타내어, 상기 펩타이드가 PAC1R에 대해 결합능(binding capacity)을 가짐을 확인하였다(도 1a 및 도 1b).

[93] **실험예 2: PAC1R 신호 경로 활성화 분석**

- [94] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 PAC1R 신호 경로를 활성화시키는 지에 대해 웨스턴 블로팅 방법을 통해 평가하였다.
- [95] 인간 신경모세포종 세포주(human neuroblastoma cell line) SH-SY5Y를 1.5×10^6 세포/웰(well)의 밀도로 6-웰 플레이트에 시딩(seeding)하여 24시간 동안 배양하였다. PAC1R 길항제(antagonist)인 PA8을 10 nM의 농도로 1시간 동안 세포에 전처리 하였다. 이어서, 펩타이드를 농도 별(10 μ M, 50 μ M, 100 μ M)로 15분 동안 세포에 처리하고, PBS로 2회 세척(wash)한 후, 세포 용해 버퍼(cell lysis buffer)를 넣어 세포를 용해시켰다. 5X 샘플버퍼(sample buffer)를 처리한 후 10% SDS-PAGE 젤을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. SDS-PAGE를 통해 분리한 단백질을 PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 5% 탈지유를 이용하여 1시간 동안 실온에서 블로킹(blocking) 시켰다. 이어서, 아래 표 2에 기재한 p-PKA 및 p-CREB에 대한 1차 항체(primary antibody)를 1:1000의 비율로 5% 탈지유에 희석하여 멤브레인과 2시간 동안 반응시켰다. 0.1% PBS-T (0.1% Tween-20 in PBS)로 10분씩 3회 세척하였다. 이어서, 아래 표 2에 기재한 각각의 해당 2차 항체(secondary antibody)를 1:3000의 비율로 5% 탈지유에 희석하여 멤브레인과 1시간 동안 반응시켰다. ECL 용액(GE Healthcare, Cat. No.: RPN2232, USA)을 처리한 후, ImageQuant 800 (Cytiva, Cat. No.: 29-3994-81, USA)을 이용하여 p-PKA 및 pCREB의 발현 수준을 분석하였다.
- [96] 상기와 같은 웨스턴 블로팅 분석 결과, 서열번호 1의 펩타이드 처리시 PAC1R 신호 경로를 활성화시킴에 따라, PKA (Protein kinase A) 및 CREB (cAMP Response Element Binding Protein)의 인산화가 증가되었고, 이러한 인산화의 증가는 PAC1R 특이적 길항제인 PA8의 전처리에 의해 감소되는 것이 확인되었다(도 2a 및 도 2b). 이러한 실험결과에 의해 서열번호 1의 펩타이드가 PAC1R에 대하여 효능제(agonist)로 작용하는 것을 확인하였다.
- [97] **실험예 3: Aquaporin 5 (AQP5) 단백질의 세포막(plasma membrane) 이동 분석**
- [98] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 PAC1R 신호 경로 활성화에 이어서 Aquaporin 5 (AQP5) 단백질의 세포막(plasma membrane)으로의 이동을 촉진시키는 지에 대해 웨스턴 블로팅 방법을 통해 평가하였다.
- [99] 인간 신경모세포종 세포주(human neuroblastoma cell line) SH-SY5Y를 1.5×10^6 세포/웰(well)의 밀도로 6-웰 플레이트에 시딩(seeding)하여 24시간 동안 배양하였다. 펩타이드를 농도 별(10 μ M, 50 μ M, 100 μ M)로 1시간 동안 세포에 처리하고, 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 세포막 단백질 추출키트(plasma membrane protein extraction kit) (Abcam, Cat. No.: ab65400, USA)을 이용하여 단백질 시료를 제조하였다. 5X 샘플버퍼를 처리한 후 10% SDS-PAGE 젤을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. SDS-PAGE를 통해 분리한 단백질을 PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 5% 탈지유를 이용하여 1시간 동안 실온에서 블로킹 시켰다. 아래 표 2의 AQP5에 대한 1차 항체를 1:1000의 비율로 5% 탈지유에 희석하여 멤브레인

과 2시간 동안 반응시켰다. 0.1% PBS-T (0.1% Tween-20 in PBS)로 10분씩 3회 세척하고, 아래 표 2의 해당 2차 항체를 1:3000의 비율로 5% 탈지유에 희석하여 멤브레인과 1시간 동안 반응시켰다. ECL 용액 (GE Healthcare, Cat. No.: RPN2232, USA)을 처리한 후, ImageQuant 800 (Cytiva, Cat. No: 29-3994-81, USA)을 이용하여 AQP5 단백질의 발현 수준을 분석하였다.

- [100] PAC1R 신호 경로가 활성화되는 때에, AQP5의 세포막(plasma membrane)이동을 통해 눈물 분비(tear secretion)이 나타나는 것으로 알려져 있다. 상기한 실험결과, 서열번호 1의 펩타이드를 처리한 후 세포막에서 발견되는 AQP5 단백질의 수준을 측정된 결과, 상기 단백질의 농도 의존적인 증가가 확인되었다(도 3).
- [101] **실험예 4: 신경 분화(neuronal differentiation) 분석**
- [102] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 신경모세포(neuroblast)의 분화를 유도하는지에 대해 성숙 신경 마커(mature neuronal marker)인 GAP43 (Growth Associated Protein 43)의 발현량을 측정하여 평가하였다.
- [103] 인간 신경모세포종 세포주(human neuroblastoma cell line) SH-SY5Y를 5×10^6 세포/웰(well)의 밀도로 6-웰 플레이트에 시딩(seeding)하여 24시간 동안 배양하였다. 펩타이드를 농도 별(10 μ M, 50 μ M, 100 μ M)로 24시간 동안 세포에 처리하고, 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 세포 용해 버퍼를 넣어 세포를 용해시켰다. 5X 샘플 플버퍼를 처리한 후 10% SDS-PAGE 젤을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. SDS-PAGE를 통해 분리한 단백질을 PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 5% 탈지유를 이용하여 1시간 동안 실온에서 블로킹 시켰다. 이어서, 아래 표 2의 1차 항체(primary antibody)를 1:1000의 비율로 5% 탈지유에 희석하여 멤브레인과 2시간 동안 반응시켰다. 0.1% PBS-T (0.1% Tween-20 in PBS)로 10분씩 3회 세척하였다. 이어서, 아래 표 2의 2차 항체(secondary antibody)를 1:3000의 비율로 5% 탈지유에 희석하여 멤브레인과 1시간 동안 반응시켰다. ECL 용액(GE Healthcare, Cat. No.: RPN2232, USA)을 처리한 후, ImageQuant 800 (Cytiva, Cat. No: 29-3994-81, USA)을 이용하여 GAP43 단백질의 발현 수준을 분석하였다.
- [104] 신경 펩타이드 PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)는 체내 펩타이드 호르몬이며, 이 호르몬의 수용체로는 VPAC1, VPAC2, PAC1 receptor가 알려져 있다. PACAP에 의해 신경모세포(nueroblast)가 분화하여 시냅스 형성(synapse formation)이 증가하고, 이를 통해 눈물막(tear film) 구성 인자들의 분비가 증가되는 것으로 알려져 있다(Int J Mol Sci. 2022 Jan 8;23(2):664.) 상기 실험결과, 신경모세포를 서열번호 1의 펩타이드를 처리하는 경우 성숙 신경 마커인 GAP43의 발현 수준이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 4).
- [105] **실험예 5: 뮤신(mucin) 유전자의 발현 수준 분석**
- [106] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 결막 술잔세포(conjunctival goblet cell)에서 뮤신(mucin) 유전자의 발현 수준을 증가시키는 지를 평가하였다.

- [107] 인간 대장암 세포주(Human colon adenocarcinoma cell line, a well-differentiated human colonic goblet cell line), LS174T를 2×10^6 세포/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 시딩(seeding) 하여 24시간 동안 배양하였다. 무혈청 배지에서 24시간 동안 배양 후, 펩타이드를 농도 별($10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$)로 4시간 동안 세포에 처리하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 후, easy blue (iNtRON, Cat. No.: 17061, Korea)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 정량한 후, RT 키트 (enzymomics, Cat. No.: RT200, Korea)을 이용하여 cDNA 합성을 진행하였다. 이어서, PCR 키트 (enzymomics, Cat. No.: P581T, Korea)을 이용하여 PCR 진행하였다. PCR에서 사용한 프라이머의 서열은 아래 표 3에 나타내었다.
- [108] 결막 술잔세포(conjunctival goblet cell)에서 분비되는 뮤신은 눈물막을 구성하는 또 다른 성분이다. 상기 실험결과 서열번호 1의 펩타이드를 결막 술잔세포에 처리하였을 때 MUC2(Mucin 2) 및 MUC5AC (Mucin 5AC)의 뮤신 유전자의 발현 수준이 증가하는 것을 확인하였다(도 5).
- [109] **실험예 6: 뮤신(mucin) 단백질의 발현 수준 분석**
- [110] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 결막 술잔세포(conjunctival goblet cell)에서 뮤신(mucin) 단백질의 발현 수준을 증가시키는 지를 평가하였다.
- [111] 인간 대장암 세포주(Human colon adenocarcinoma cell line, a well-differentiated human colonic goblet cell line), LS174T를 1.5×10^5 세포/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 시딩(seeding) 하여 24시간 동안 배양하였다. 무혈청 배지에서 24시간 동안 배양한 후, 펩타이드를 농도 별($10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$)로 24시간 동안 세포에 처리하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 세포 용해 버퍼를 넣어 세포를 용해시켰다.
- [112] 먼저, MUC2 단백질의 웨스턴 블로팅은 다음과 같이 진행하였다. 세포 용해물에 5X 샘플버퍼를 처리한 후 10% SDS-PAGE 젤을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. SDS-PAGE를 통해 분리한 단백질을 PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 5% 탈지유를 이용하여 1시간 동안 실온에서 블로킹시켰다. 이어서, 아래 표 2의 MUC2에 대한 1차 항체(primary antibody)를 1:1000의 비율로 5% 탈지유에 희석하여 멤브레인과 2시간 동안 반응시켰다. 0.1% PBS-T (0.1% Tween-20 in PBS)로 10분씩 3회 세척하였다. 이어서, 아래 표 2의 2차 항체(secondary antibody)를 1:3000의 비율로 5% 탈지유에 희석하여 멤브레인과 1시간 동안 반응시켰다. ECL 용액(GE Healthcare, Cat. No.: RPN2232, USA)을 처리한 후, ImageQuant 800 (Cytiva, Cat. No: 29-3994-81, USA)을 이용하여 MUC2 단백질의 발현 수준을 분석하였다.
- [113] 또한, 세포 용해물내의 MUC5AC 단백질의 발현 수준은 MUC5AC ELISA kit (LSBio, Cat. No.: LS-F38060, USA)을 이용하여 측정하였다.

- [114] 상기 실험결과, 술잔세포를 서열번호 1의 펩타이드 처리시 MUC2 (Mucin 2) 단백질 및 MUC5AC (Mucin 5AC) 단백질의 발현 수준이 증가함을 확인하였다(도 6a 및 도 6b).
- [115] **실험예 7: 인간 각막 상피세포에서 IFN- γ 에 의해 유도된 염증 및 세포 손상의 억제**
- [116] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 인간 각막 상피세포에서 IFN- γ 에 의해 유도되는 세포손상을 억제하는 활성을 갖는지 평가하였다.
- [117] 인간 각막 상피세포(Human corneal epithelial cells)을 5×10^5 세포/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 시딩(seeding) 하여 24시간 동안 배양하였다. 서열번호 1의 펩타이드를 농도 별(10 μ M, 50 μ M, 100 μ M)로 24시간 동안 세포에 처리하였다. 이때 유도군(induction group)의 경우 100 ng/mL IFN- γ 을 동시에 처리하였다. 이어서, 세포를 PBS로 2회 세척한 후, easy blue (iNtRON, Cat. No.: 17061, Korea)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 정량한 후, RT kit (enzymomics, Cat. No.: RT200, Korea)을 이용하여 cDNA 합성을 진행하였다. 이어서, PCR kit (enzymomics, Cat. No.: P581T, Korea)을 이용하여 PCR 진행하였다. PCR에 사용한 프라이머는 표 2에 나타내었다.
- [118] 눈물막 파괴에 의한 각막 및 결막에서의 건조 스트레스(desiccating stress) 이후에 Th1 세포의 활성화 및 그에 따른 IFN- γ 분비 축진이 각막 및 결막 조직의 손상을 심화시키는 것으로 알려져 있다. 상기 실험결과 인간 각막 상피세포에 IFN- γ 를 처리하였을 때, 염증증성 분자들인 COX-2, IL-1 β , IL-6 유전자의 발현 수준의 증가가 유도되었고, 이렇게 증가한 염증증성 분자의 COX-2, IL-1 β , IL-6 유전자의 발현 수준을 서열번호 1의 펩타이드가 억제하는 것을 확인하였다(도 7a 및 도 7b).
- [119] 또한, 인간 각막 상피세포에 IFN- γ 를 처리하였을 때, MMPs (MMP3 및 MMP9) 유전자들의 발현 수준이 증가하였고, 이렇게 증가한 MMPs (MMP3 및 MMP9) 유전자 발현 수준을 서열번호 1의 펩타이드가 억제하는 것을 확인하였다(도 7c 및 도 7d).
- [120] **실험예 8: 인간 각막 상피세포에서 UVB에 의해 유도된 염증 및 세포 손상의 억제**
- [121] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 인간 각막 상피세포에서 UVB에 의해 유도되는 세포손상을 억제하는 활성을 갖는지 평가하였다.
- [122] 인간 각막 상피세포(Human corneal epithelial cells)을 5×10^5 세포/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 시딩(seeding) 하여 24시간 동안 배양하였다. 무혈청 배지로 배지를 교체한 후, 서열번호 1의 펩타이드를 농도 별(10 μ M, 50 μ M, 100 μ M)로 1시간 동안 세포에 처리하였다. 세포에 20 mJ/cm² UVB를 조사한 후 무혈청 배지 조건에서 서열번호 1의 펩타이드를 농도 별(10 μ M, 50 μ M, 100 μ M)로 24시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 후, easy blue (iNtRON, Cat. No.: 17061, Korea)

를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 정량한 후, RT kit (enzymomics, Cat. No.: RT200, Korea)을 이용하여 cDNA 합성을 진행하였다. 이어서, PCR kit (enzymomics, Cat. No.: P581T, Korea)을 이용하여 PCR 진행하였다. PCR에 사용한 프라이머는 표 2에 나타내었다.

- [123] 자외선(UV) 조사는 안구 건조를 유도할 수 있는 또 다른 스트레스 요인으로 알려져 있다. 자외선(UV) 조사에 의한 각막 상피세포 세포손상을 유도한 후 서열번호 1의 펩타이드의 세포 손상 개선 활성을 평가하였다. 실험결과, 인간 각막 상피세포에 UVB를 조사한 후 증가된 호염증성 분자들인 COX-2, IL-1 β , IL-6 유전자들의 발현 수준을 서열번호 1의 펩타이드가 다시 감소시키는 것을 확인하였다(도 8a 및 도 8b). 또한, 인간 각막 상피세포에 UVB를 조사하였을 때 MMPs (MMP3 및 MMP9) 유전자들의 발현 수준이 증가하였고, 이렇게 증가한 MMPs (MMP3 및 MMP9)의 발현 수준을 서열번호 1의 펩타이드가 다시 감소시키는 것을 확인하였다(도 8c 및 도 8d).
- [124] **실험예 9: 안구 건조증(dry eye disease) 마우스 모델에서 증상의 개선 활성**
- [125] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 안구 건조증 마우스 모델에서 안구건조 증상을 개선하는 활성을 가지는 지에 대해 평가하였다.
- [126] **(1) 안구 건조증의 유도 및 유지**
- [127] 시험동물(C57BL/6 mouse, 10주령, 암컷)을 상대습도 30% 이하의 건조 스트레스 챔버(desiccating stress chamber)에서 사육을 하면서 식염수(0.9% normal saline, 중외제약)에 2.5mg/mL의 농도로 조제한 scopolamine hydrobromide (Sigma-aldrich, Cat. No.: S0929, USA)를 10 mL/kg의 용량으로 10일간 1일 3회 (TID, 오전 9:30, 오후 13:30 및 오후 17:30) 피하 주사하여 안구 건조증을 유발시켰다. 시험물질 투여 시작 후 안구 건조증을 유지하기 위하여 마우스를 상대습도 30% 이하의 조건에서 사육하면서 scopolamine을 매일 1회(QD, 오전 09:30)에 목 주위 피하에 주사하여 안구 건조증을 유지하였다.
- [128] **(2) 투여 물질의 준비**
- [129] 시험군은 50 μ M 농도로 서열번호 1의 펩타이드를 식염수(0.9% normal saline, 중외제약)에 용해시킨 후 0.22 μ m 필터로 여과하여 투여에 사용하였다(도 9c의 표에서 CG-T1에 해당). 부형제 대조군으로는 동일한 식염수를 0.22 μ m 필터로 여과하여 투여에 사용하였다. 양성대조군으로는 레스타시스 점안액 0.05% (Restasis®, Allergan) 을 투여하였다.
- [130] **(3) 투여**
- [131] 시험물질, 대조물질 및 부형제를 1일 2회 (BID, 오전 9:30 및 오후 17:30) 각각 한 방울(5 μ L)씩 양안에 마이크로피펫(micropipette)으로 16일간 점안 투여하였다. 각 투여군 별 개체 수는 7마리이며, 최종 분석에 포함된 안구의 수는 12 - 14안이 었다.
- [132] **(4) 눈물막 파괴 시간 평가 (Tear break-up time, TBUT) 및 임상학적 각막 손상 평가 (corneal fluorescein score)**

- [133] 건조 스트레스(desiccating stress)와 scopolamine hydrobromide 투여에 의한 안구 건조증 유발 후에, 군 분리 시점(Day 0)과, 시험물질 투여 후 6일, 11일 및 16일에 마우스를 10 mg/kg 자일라진(xylazine)(Rompun®, BAYER)과 75 mg/kg 케타민(Ketamine)(케타민®, 유한양행)을 복강 주사하는 방법으로 전신 마취를 유도한 후 평가를 실시하였다.
- [134] 눈물막 파괴 시간 평가(TBUT)은 아래의 방법으로 수행하였다. 먼저, 0.4 M Fluorescein® (Haag-streit AG, switzerland) 검사지에 식염수 1 방울을 적셔 마우스 아래쪽 결막낭에 점적한 후, 눈을 2회 내지 3회 깜빡이게 하여 형광 염료가 눈물막에 충분히 염색되도록 하였다. 염색이 완료된 눈을 부드럽게 벌려 blue light 하에서 염색된 눈물막 층에 첫 번째 균열점 혹은 균열된 줄의 형태가 처음 나타나는 시간을 초 단위로 측정하였다.
- [135] 임상학적 각막 손상 평가는 아래의 방법에 따라 수행하였다. 먼저, 산동제(트로페린®, 한국알콘) 점안으로 산동을 유도한 후, 이어서 0.2% fluorescein sodium salt (후루오레사이트®, 한국알콘)를 양안에 각각 10 µL씩 점안하여 각막의 손상 부위를 형광 염색하였다. 이어서, 생리식염수로 가볍게 안구를 세척한 뒤 blue light 하에서 각막의 이미지를 촬영(Micron-IV®, Phoenix)한 후, NIE (National Institute of Eye) 가이드라인에 따라 각막의 영역을 5개 영역으로 나누어 한 영역당 0-3점의 점수로 스코어링(scoring)하고 그 값을 합산하여 플루오레세인 스코어(fluorescein score)를 산출하였다(도 9a).
- [136] (5) 실험결과
- [137] 안구 건조 모델 마우스에 50 µM 농도의 서열번호 1의 펩타이드가 포함된 시험물질(도 9c, CG-T1)을 하루 2회 투여하였을 때, 6일차, 11일차, 16일차 눈물막 파괴 시간 검사에서 무처치군 및 부형제군에 비해 유의한 수준의 시간 연장이 관찰되었다. 특히 11일차 및 16일차 결과에서는 양성대조군 대비 유의성이 더 높게 관찰되었다. 이러한 실험결과를 통해, 서열번호 1의 펩타이드가 세포 실험에서 확인한 여러 기전 조절을 통해 안구건조 동물 모델에서도 눈물막 유지 효과를 나타내어 과도한 눈물 증발을 막는 것으로 확인되었다(도 9b 및 도 9c).
- [138] 또한, 안구 건조 모델 마우스에 50 µM 농도의 서열번호 1 펩타이드가 포함된 시험물질(도 10b, CG-T1)을 하루 2회 투여하였을 때, 각막 손상에 따라 증가되는 각막 형광 스코어(corneal fluorescence score)가 무처치군에 비해 11일차에서 감소 경향을 나타내고, 16일차에서는 유의한 수준으로 감소되는 것을 확인하였다. 상기 실험결과를 통해, 안구 건조에 의한 각막 손상을 서열번호 1의 펩타이드가 유의한 수준으로 개선하는 것을 알 수 있었다(도 10a 내지 도 10c).

[139] [표2]

1차 항체				2차 항체		
Cell line	Antibodies	제조사	Cat. No.	Antibodies	제조사	Cat. No.

SH-SY5Y	p-PKA	cell signaling technology (USA)	4781	Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (USA)	111-035-003
	p-CREB	cell signaling technology (USA)	9198	Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (USA)	111-035-003
	AQP5	Santa Cruz Biotechnology(USA)	sc-514022	Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (USA)	111-035-003
	GAP-43	Santa Cruz Biotechnology(USA)	sc17790	Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (USA)	115-035-003
	α -tubulin	Santa Cruz Biotechnology (USA)	sc69969	Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (USA)	115-035-003
	Pan-cadherin	Santa Cruz Biotechnology (USA)	sc515872	Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (USA)	111-035-003
LS174T	Mucin2	Santa Cruz Biotechnology (USA)	sc515032	Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (USA)	115-035-003
	α -tubulin	Santa Cruz Biotechnology (USA)	sc69969	Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (USA)	115-035-003

[140]

[표3]

세포주	프라이머	서열 (5'-> 3')	서열번호
LS174T	MUC2 Forward	CGACTACTACAACCCTCCGC	2
	MUC2 Reverse	GGGAGGAGTTGGTACACACG	3

	MUC5AC Forward	AAGGTGGCTGACCAAGATG G	4
	MUC5AC Reverse	TCTCGTTTGTTCATCACCCCG	5
Human Corneal Epithelial Cell	COX2 Forward	ATCATTACACCAGGCAAATTG C	6
	COX2 Reverse	GGCTTCAGCATAAAGCGTTT G	7
	IL-1 β Forward	TTCGACACATGGGATAACGA	8
	IL-1 β Reverse	TCTTTCAACACGCAGGACAG	9
	IL-6 Forward	AAAGAGGCACTGCCAGAAA A	10
	IL-6 Reverse	ATCTGAGGTGCCCATGCTAC	11
	MMP3 Forward	CAAAACATATTTCTTTGTAG AGGACAA	12
	MMP3 Reverse	TTCAGCTATTTGCTTGGGAA	13
	MMP9 Forward	GGGACGCAGACATCGTCATC	14
	MMP9 Reverse	TCGTCATCGTCGAAATGGGC	15
	GAPDH Forward	GGAGCCAAAAGGGTCATCAT	16
	GAPDH Reverse	GTGATGGCATGGACTGTGGT	17

- [141] 상기에서는 본 출원의 대표적인 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 출원의 범위는 상기와 같은 특정 실시예만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드.
- [청구항 2] 청구항 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 안구 건조증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서,
상기 약학적 조성물은 다음의 활성 중 하나 이상의 활성을 통해 눈물 분비 촉진 활성을 갖는 것인, 안구 건조증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물:
(i) PAC1R (Pituitary Adenylate Cyclase 1 Receptor)에 대한 결합능을 가지며, PAC1R 신호 경로의 활성화를 촉진시키는 활성;
(ii) Aquaporin 5 (AQP5) 단백질의 세포막(plasma membrane)으로의 이동을 촉진시키는 활성; 및
(iii) 신경모세포(neuroblast)의 분화를 유도하는 활성.
- [청구항 4] 청구항 2에 있어서,
상기 약학적 조성물은 결막 술잔세포에서 뮤신(mucin) 발현 및 분비를 촉진하는 활성을 갖는 것인, 안구 건조증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 청구항 2에 있어서,
상기 약학적 조성물은 인간 각막 상피세포에서 염증 반응과 세포 손상을 억제하는 활성을 갖는 것인, 안구 건조증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 청구항 2에 있어서,
상기 안구 건조증은 증발성 안구 건조, 수분 결핍성 안구 건조, 건성 각막염, 건성 각결막염(keratoconjunctivitis sicca) 및 기능 장애 눈물 증후군(dysfunctional tear syndrome) 중 하나 이상의 질환, 장애 또는 증상을 포함하는 것인, 안구 건조증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 청구항 2에 있어서,
상기 약학적 조성물은 눈에 국소 투여하기에 적합한 용액, 현탁액 또는 겔을 포함하는 것인, 안구 건조증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.