

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0121678 (43) 공개일자 2013년11월06일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 38/28 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01) A61K 31/553 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-7028542(분할) (22) 출원일자(국제) 2008년07월30일 심사청구일자 2012년10월31일 (62) 원출원 특허 10-2010-7002645 원출원일자(국제) 2008년07월30일 심사청구일자 2010년02월05일 (85) 번역문제출일자 2012년10월31일 (86) 국제출원번호 PCT/IL2008/001049 (87) 국제공개번호 WO 2009/016629 국제공개일자 2009년02월05일 (30) 우선권주장 60/962,706 2007년07월30일 미국(US)		(71) 출원인 힐로 리미티드 루어베르그 사이언스 빌딩, 그라함 벨 엔트런스 5층, 3 페커리스 스트리트, 레초보트 76702 이스 라엘 (72) 발명자 데넨바움, 다말 12 헤르즐 블러바드 96105 예루살렘 이스라엘 브레이만-웁스만, 리오라 27 스테판 바이스 스트리트 75400 리손 레지온 이 스라엘 (뒷면에 계속) (74) 대리인 최재희, 박원용

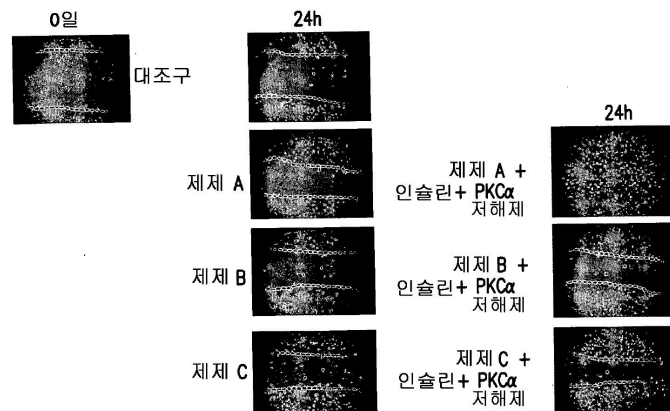
전체 청구항 수 : 총 82 항

(54) 발명의 명칭 약제학적 조성물 및 관련 방법

(57) 요약

본 발명은 창상 치료 과정을 가속화하고, 피부 창상 봉쇄를 증가시키고, 피부 창상 부위에서 염증을 감소시키기 위한 조성물과 방법에 관한 것이다. 특히, 본발명은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 인슐린 또는 인슐린 유사체 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이기도 하다.

대표도



(72) 발명자

솔로모닉, 이네사

3 해미즈페 스트리트 55900 가네이 티크바 이스라엘

레비-하썸, 오프라

게데라 8 페타크 티크바 이스라엘

브레너, 에프라임

마니아 쇼헛 4 스트리트 리손 레지온 이스라엘

특허청구의 범위

청구항 1

δ -PKC 활성화제,

서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호: 3, 서열 식별 번호: 4, 서열 식별 번호: 5, 서열 식별 번호: 6, 서열 식별 번호: 7, 서열 식별 번호: 8, 서열 식별 번호: 9, 서열 식별 번호: 10, 서열 식별 번호: 11, 서열 식별 번호: 12, 서열 식별 번호: 13, 서열 식별 번호: 14, 서열 식별 번호: 15, 서열 식별 번호: 16, 서열 식별 번호: 17, 서열 식별 번호: 18, 서열 식별 번호: 19, 서열 식별 번호: 20, 서열 식별 번호: 21, 서열 식별 번호: 22, 서열 식별 번호: 23, 서열 식별 번호: 24, 서열 식별 번호: 26, 서열 식별 번호: 27, 서열 식별 번호: 28, 서열 식별 번호: 29, 서열 식별 번호: 30, 서열 식별 번호: 31, 서열 식별 번호: 32, 서열 식별 번호: 33, 서열 식별 번호: 34, 서열 식별 번호: 35, 서열 식별 번호: 36, 서열 식별 번호: 37, 서열 식별 번호: 38, 서열 식별 번호: 39, 서열 식별 번호: 40, 서열 식별 번호: 41, 서열 식별 번호: 42, 서열 식별 번호: 43, 서열 식별 번호: 44, 서열 식별 번호: 45, 서열 식별 번호: 46, 서열 식별 번호: 47, 서열 식별 번호: 48, 서열 식별 번호: 49, 서열 식별 번호: 50, 서열 식별 번호: 51, 서열 식별 번호: 52, 서열 식별 번호: 53, 서열 식별 번호: 54, 및 서열 식별 번호: 55에서 나타낸 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 α -PKC 저해제, 및

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 2

δ -PKC 활성화제,

아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖고 카르복시 말단에서 아미드화되어 있는, 서열 식별 번호: 25에서 나타낸 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 3

δ -PKC 활성화제,

아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는, 서열 식별 번호: 1에 나타낸 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 4

제 1항 및 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, δ -PKC 활성화제는 인슐린 및 인슐린 유사체로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, 인슐린 글라진, 비스파틴, 및 L--포스파티딜이노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타암모늄 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서,

인슐린은 인간 인슐린, 소 인슐린, 및 돼지 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 조성물.

청구항 7

제 4항에 있어서,

인슐린은 재조합적으로 발현되는 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 7항 중 어느 한 항에 있어서,

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체는 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na_2HPO_4 을 포함하는 수성 담체인 조성물.

청구항 9

인슐린, 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는 서열 식별 번호: 1에 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na_2HPO_4 을 포함하는 수성인 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서,

0.0001 단위/L 내지 0.1 단위/L의 인슐린 및 1 M 내지 100 M의 펩티드를 포함하는 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서,

0.0001 단위/L의 인슐린 및 1 M의 펩티드를 포함하는 조성물.

청구항 12

δ -PKC 활성화제,

서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호: 3, 서열 식별 번호: 4, 서열 식별 번호: 5, 서열 식별 번호: 6, 서열 식별 번호: 7, 서열 식별 번호: 8, 서열 식별 번호: 9, 서열 식별 번호: 10, 서열 식별 번호: 11, 서열 식별 번호: 12, 서열 식별 번호: 13, 서열 식별 번호: 14, 서열 식별 번호: 15, 서열 식별 번호: 16, 서열 식별 번호: 17, 서열 식별 번호: 18, 서열 식별 번호: 19, 서열 식별 번호: 20, 서열 식별 번호: 21, 서열 식별 번호: 22, 서열 식별 번호: 23, 서열 식별 번호: 24, 서열 식별 번호: 26, 서열 식별 번호: 27, 서열 식별 번호: 28, 서열 식별 번호: 29, 서열 식별 번호: 30, 서열 식별 번호: 31, 서열 식별 번호: 32, 서열 식별 번호: 33, 서열 식별 번호: 34, 서열 식별 번호: 35, 서열 식별 번호: 36, 서열 식별 번호: 37, 서열 식별 번호: 38, 서열 식별 번호: 39, 서열 식별 번호: 40, 서열 식별 번호: 41, 서열 식별 번호: 42, 서열 식별 번호: 43, 서열 식별 번호: 44, 서열 식별 번호: 45, 서열 식별 번호: 46, 서열 식별 번호: 47, 서열 식별 번호: 48, 서열 식별 번호: 49, 서열 식별 번호: 50, 서열 식별 번호: 51, 서열 식별 번호: 52, 서열 식별 번호: 53, 서열 식별 번호: 54, 및 서열 식별 번호: 55에서 나타난 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 α -PKC 저해제,

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체, 및 약물 용리 지지체를 포함하는 조성물.

청구항 13

δ -PKC 활성화제,

아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖고 카르복시 말단에서 아미드화되어 있는, 서열 식별 번호: 25에서 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체, 및 약물 용리 지지체를 포함하는 조성물.

청구항 14

δ -PKC 활성화제,

아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는, 서열 식별 번호: 1에 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체, 및 약물 용리 지지체를 포함하는 조성물.

청구항 15

제 12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

약물 용리 지지체는 다공성 고체를 포함하는 조성물.

청구항 16

제 12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

δ -PKC 활성화제,는 인슐린 및 인슐린 유사체로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 조성물.

청구항 17

제 16항에 있어서,

인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, 인슐린 글라진, 비스파틴, 및 L--포스파티딜이노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타아모늄 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 조성물.

청구항 18

제 16항에 있어서,

인슐린은 인간 인슐린, 소 인슐린, 및 돼지 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 조성물.

청구항 19

제 18항에 있어서,

인슐린은 재조합적으로 발현되는 조성물.

청구항 20

제 16항에 있어서,

0.0001 단위/L 내지 0.1 단위/L의 인슐린 및 1 M 내지 100 M의 펩티드를 포함하는 조성물.

청구항 21

제 16항에 있어서,

0.0001 단위/L의 인슐린 및 1 M의 펩티드를 포함하는 조성물.

청구항 22

제 12항 내지 21항 중 어느 한 항에 있어서,

약물 용리 지지체는 스폰지인 조성물.

청구항 23

제 22항에 있어서,

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na_2HPO_4 를 포함하는 수성인 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 24

a) δ -PKC 활성화제, 서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호: 3, 서열 식별 번호: 4, 서열 식별 번호: 5, 서열 식별 번호: 6, 서열 식별 번호: 7, 서열 식별 번호: 8, 서열 식별 번호: 9, 서열 식별 번호: 10, 서열 식별 번호: 11, 서열 식별 번호: 12, 서열 식별 번호: 13, 서열 식별 번호: 14, 서열 식별 번호: 15, 서열 식별 번호: 16, 서열 식별 번호: 17, 서열 식별 번호: 18, 서열 식별 번호: 19, 서열 식별 번호: 20, 서열 식별 번호: 21, 서열 식별 번호: 22, 서열 식별 번호: 23, 서열 식별 번호: 24, 서열 식별 번호: 26, 서열 식별 번호: 27, 서열 식별 번호: 28, 서열 식별 번호: 29, 서열 식별 번호: 30, 서열 식별 번호: 31, 서열 식별 번호: 32, 서열 식별 번호: 33, 서열 식별 번호: 34, 서열 식별 번호: 35, 서열 식별 번호: 36, 서열 식별 번호: 37, 서열 식별 번호: 38, 서열 식별 번호: 39, 서열 식별 번호: 40, 서열 식별 번호: 41, 서열 식별 번호: 42, 서열 식별 번호: 43, 서열 식별 번호: 44, 서열 식별 번호: 45, 서열 식별 번호: 46, 서열 식별 번호: 47, 서열 식별 번호: 48, 서열 식별 번호: 49, 서열 식별 번호: 50, 서열 식별 번호: 51, 서열 식별 번호: 52, 서열 식별 번호: 53, 서열 식별 번호: 54, 및 서열 식별 번호: 55에서 나타난 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 제공하는 단계; 및

b) δ -PKC 활성화제, 상기 α -PKC 저해제, 및 상기 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 조합하는 단계; 이에 의해 약제학적 조성물이 생성되는 것

을 포함하는 방법에 의해 생성되는 생물활성 피부 창상 치료 및 또는 항염증을 위한 약제학적 조성물.

청구항 25

a) δ -PKC 활성화제, 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖고 카르복시 말단에서 아미드화되어 있는, 서열 식별 번호: 25에서 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 제공하는 단계; 및

b) δ -PKC 활성화제, 상기 α -PKC 저해제, 및 상기 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 조합하는 단계; 이에 의해 약제학적 조성물이 생성되는 것

을 포함하는 방법에 의해 생성되는 생물활성 피부 창상 치료 및 또는 항염증을 위한 약제학적 조성물.

청구항 26

a) δ -PKC 활성화제, 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는, 서열 식별 번호: 1에 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 제공하는 단계; 및

b) δ -PKC 활성화제, 상기 α -PKC 저해제, 및 상기 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 조합하는 단계; 이에 의해 약제학적 조성물이 생성되는 것

을 포함하는 방법에 의해 생성되는 생물활성 피부 창상 치료 및 또는 항염증을 위한 약제학적 조성물.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

δ -PKC 활성화제,는 인슐린 및 인슐린 유사체로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 약제학적 조성물.

청구항 28

제 27항에 있어서,

인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, 인슐린 글라진, 비스파틴, 및 L--포스포타디이노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타아모늄 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 약제학적 조성물.

청구항 29

제 27항에 있어서,

인슐린은 인간 인슐린, 소 인슐린, 및 돼지 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 약제학적 조성물.

청구항 30

제 29항에 있어서,

인슐린은 재조합적으로 발현되는 약제학적 조성물.

청구항 31

제 26항에 있어서,

0.0001 단위/L 내지 0.1 단위/L의 인슐린 및 1 M 내지 100 M의 펩티드를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 32

제 26항에 있어서,

0.0001 단위/L의 인슐린 및 1 M의 펩티드를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 33

제 24항 내지 32항 중 어느 한 항에 있어서,

Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체는 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH₂PO₄, 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na₂HPO₄를 포함하는 수성 담체인 약제학적 조성물.

청구항 34

a) δ-PKC 활성화제, 서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호: 3, 서열 식별 번호: 4, 서열 식별 번호: 5, 서열 식별 번호: 6, 서열 식별 번호: 7, 서열 식별 번호: 8, 서열 식별 번호: 9, 서열 식별 번호: 10, 서열 식별 번호: 11, 서열 식별 번호: 12, 서열 식별 번호: 13, 서열 식별 번호: 14, 서열 식별 번호: 15, 서열 식별 번호: 16, 서열 식별 번호: 17, 서열 식별 번호: 18, 서열 식별 번호: 19, 서열 식별 번호: 20, 서열 식별 번호: 21, 서열 식별 번호: 22, 서열 식별 번호: 23, 서열 식별 번호: 24, 서열 식별 번호: 26, 서열 식별 번호: 27, 서열 식별 번호: 28, 서열 식별 번호: 29, 서열 식별 번호: 30, 서열 식별 번호: 31, 서열 식별 번호: 32, 서열 식별 번호: 33, 서열 식별 번호: 34, 서열 식별 번호: 35, 서열 식별 번호: 36, 서열 식별 번호: 37, 서열 식별 번호: 38, 서열 식별 번호: 39, 서열 식별 번호: 40, 서열 식별 번호: 41, 서열 식별 번호: 42, 서열 식별 번호: 43, 서열 식별 번호: 44, 서열 식별 번호: 45, 서열 식별 번호: 46, 서열 식별 번호: 47, 서열 식별 번호: 48, 서열 식별 번호: 49, 서열 식별 번호: 50, 서열 식별 번호: 51, 서열 식별 번호: 52, 서열 식별 번호: 53, 서열 식별 번호: 54, 및 서열 식별 번호: 55에서 나타난 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 α-PKC 저해제, 및 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및

b) 동물에 대해 본 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계;이에 의해 피부 창상의 봉쇄가 증가되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 피부 창상의 봉쇄를 증가시키는 방법.

청구항 35

a) δ-PKC 활성화제, 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖고 카르복시 말단에서 아미드화되어 있는, 서열 식별 번호: 25에서 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α-PKC 저해제, 및 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및

b) 동물에 대해 본 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계;이에 의해 피부 창상의 봉쇄가 증가

되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 피부 창상의 봉쇄를 증가시키는 방법.

청구항 36

a) δ -PKC 활성화제, 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는, 서열 식별 번호: 1에 나타낸 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및

b) 동물에 대해 본 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 피부 창상의 봉쇄가 증가되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 피부 창상의 봉쇄를 증가시키는 방법.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

δ -PKC 활성화제,는 인슐린 및 인슐린 유사체로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 방법.

청구항 38

제 37항에 있어서,

인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, 인슐린 글라진, 비스파틴, 및 L--포스포티딜이노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타아모늄 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 방법.

청구항 39

제 37항에 있어서,

인슐린은 인간 인슐린, 소 인슐린, 및 돼지 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 방법.

청구항 40

제 39항에 있어서,

인슐린은 재조합적으로 발현되는 방법.

청구항 41

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 0.0001 단위/L 내지 0.1 단위/L의 인슐린 및 1 M 내지 100 M의 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 42

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 0.0001 단위/L의 인슐린 및 1 M의 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 43

제 34항 내지 42항 중 어느 한 항에 있어서, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체는 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na_2HPO_4 을 포함하는 수성 담체인 방법.

청구항 44

a) δ -PKC 활성화제, 서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호: 3, 서열 식별 번호: 4, 서열 식별 번호: 5, 서열 식별 번호: 6, 서열 식별 번호: 7, 서열 식별 번호: 8, 서열 식별 번호: 9, 서열 식별 번호: 10, 서열 식별 번호: 11, 서열 식별 번호: 12, 서열 식별 번호: 13, 서열 식별 번호: 14, 서열 식별 번호: 15, 서열 식별 번호: 16,

서열 식별 번호: 17, 서열 식별 번호: 18, 서열 식별 번호: 19, 서열 식별 번호: 20, 서열 식별 번호: 21, 서열 식별 번호: 22, 서열 식별 번호: 23, 서열 식별 번호: 24, 서열 식별 번호: 26, 서열 식별 번호: 27, 서열 식별 번호: 28, 서열 식별 번호: 29, 서열 식별 번호: 30, 서열 식별 번호: 31, 서열 식별 번호: 32, 서열 식별 번호: 33, 서열 식별 번호: 34, 서열 식별 번호: 35, 서열 식별 번호: 36, 서열 식별 번호: 37, 서열 식별 번호: 38, 서열 식별 번호: 39, 서열 식별 번호: 40, 서열 식별 번호: 41, 서열 식별 번호: 42, 서열 식별 번호: 43, 서열 식별 번호: 44, 서열 식별 번호: 45, 서열 식별 번호: 46, 서열 식별 번호: 47, 서열 식별 번호: 48, 서열 식별 번호: 49, 서열 식별 번호: 50, 서열 식별 번호: 51, 서열 식별 번호: 52, 서열 식별 번호: 53, 서열 식별 번호: 54, 및 서열 식별 번호: 55에서 나타낸 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및

b) 동물에 대해 상기 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 피부 창상의 부위에서의 염증이 감소되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 피부 창상 부위의 염증을 감소시키기 위한 방법.

청구항 45

a) δ -PKC 활성화제, 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖고 카르복시 말단에서 아미드화되어 있는, 서열 식별 번호: 25에서 나타낸 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및

b) 동물에 대해 상기 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 피부 창상의 부위에서의 염증이 감소되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 피부 창상 부위의 염증을 감소시키기 위한 방법.

청구항 46

a) δ -PKC 활성화제, 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는, 서열 식별 번호: 1에 나타낸 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및

b) 동물에 대해 상기 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 피부 창상의 부위에서의 염증이 감소되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 피부 창상 부위의 염증을 감소시키기 위한 방법.

청구항 47

제 44항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

δ -PKC 활성화제,는 인슐린 및 인슐린 유사체로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 방법.

청구항 48

제 47항에 있어서,

인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, 인슐린 글라진, 비스파틴, 및 L--포스포타이디노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타암모늄 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 방법.

청구항 49

제 47항에 있어서,

인슐린은 인간 인슐린, 소 인슐린, 및 돼지 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 방법.

청구항 50

제 49항에 있어서,

인슐린은 재조합적으로 발현되는 방법.

청구항 51

제 44항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 0.0001 단위/L 내지 0.1 단위/L의 인슐린 및 1 M 내지 100 M의 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 52

제 44항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 0.0001 단위/L의 인슐린 및 1 M의 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 53

제 44항 내지 52항 중 어느 한 항에 있어서,

Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체는 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH₂PO₄, 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na₂HPO₄를 포함하는 수성 담체인 방법.

청구항 54

a) δ-PKC 활성화제, 서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호: 3, 서열 식별 번호: 4, 서열 식별 번호: 5, 서열 식별 번호: 6, 서열 식별 번호: 7, 서열 식별 번호: 8, 서열 식별 번호: 9, 서열 식별 번호: 10, 서열 식별 번호: 11, 서열 식별 번호: 12, 서열 식별 번호: 13, 서열 식별 번호: 14, 서열 식별 번호: 15, 서열 식별 번호: 16, 서열 식별 번호: 17, 서열 식별 번호: 18, 서열 식별 번호: 19, 서열 식별 번호: 20, 서열 식별 번호: 21, 서열 식별 번호: 22, 서열 식별 번호: 23, 서열 식별 번호: 24, 서열 식별 번호: 26, 서열 식별 번호: 27, 서열 식별 번호: 28, 서열 식별 번호: 29, 서열 식별 번호: 30, 서열 식별 번호: 31, 서열 식별 번호: 32, 서열 식별 번호: 33, 서열 식별 번호: 34, 서열 식별 번호: 35, 서열 식별 번호: 36, 서열 식별 번호: 37, 서열 식별 번호: 38, 서열 식별 번호: 39, 서열 식별 번호: 40, 서열 식별 번호: 41, 서열 식별 번호: 42, 서열 식별 번호: 43, 서열 식별 번호: 44, 서열 식별 번호: 45, 서열 식별 번호: 46, 서열 식별 번호: 47, 서열 식별 번호: 48, 서열 식별 번호: 49, 서열 식별 번호: 50, 서열 식별 번호: 51, 서열 식별 번호: 52, 서열 식별 번호: 53, 서열 식별 번호: 54, 및 서열 식별 번호: 55에서 나타난 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 α-PKC 저해제, 및 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및

b) 동물에 대해 상기 약제학적 조성물의 유효량을, 당뇨성 궤양 창상, 말단 궤양 창상, 육아 조직 창상, 외과적 창상, 만성 일광 농양 창상, 및 골수염 창상으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 창상의 봉쇄가 증가되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 창상 봉쇄를 증가시키기 위한 방법.

청구항 55

a) δ-PKC 활성화제, 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖고 카르복시 말단에서 아미드화되어 있는, 서열 식별 번호: 25에서 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α-PKC 저해제, 및 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및

b) 동물에 대해 상기 약제학적 조성물의 유효량을, 당뇨성 궤양 창상, 말단 궤양 창상, 육아 조직 창상, 외과적 창상, 만성 일광 농양 창상, 및 골수염 창상으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 창상의 봉쇄가 증가되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 창상 봉쇄를 증가시키기 위한 방법.

청구항 56

a) δ -PKC 활성화제, 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는, 서열 식별 번호: 1에 나타낸 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및

b) 동물에 대해 상기 약제학적 조성물의 유효량을, 당뇨병 케양 창상, 말단 혈음 창상, 육아 조직 창상, 외과적 창상, 만성 일광 농양 창상, 및 골수염 창상으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 창상의 봉쇄가 증가되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 창상 봉쇄를 증가시키기 위한 방법.

청구항 57

제 54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서,

δ -PKC 활성화제,는 인슐린 및 인슐린 유사체로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 방법.

청구항 58

제 57항에 있어서,

인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, 인슐린 글라진, 비스파틴, 및 L--포스포티딜이노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타암모늄 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 방법.

청구항 59

제 57항에 있어서,

인슐린은 인간 인슐린, 소 인슐린, 및 돼지 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 방법.

청구항 60

제 59항에 있어서,

인슐린은 재조합적으로 발현되는 방법.

청구항 61

제 54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 0.0001 단위/L 내지 0.1 단위/L의 인슐린 및 1 M 내지 100 M의 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 62

제 54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 0.0001 단위/L의 인슐린 및 1 M의 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 63

제 54항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체는 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na_2HPO_4 를 포함하는 수성 담체인 방법.

청구항 64

δ -PKC 활성화제,

서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호: 3, 서열 식별 번호: 4, 서열 식별 번호: 5, 서열 식별 번호: 6, 서열 식별 번호: 7, 서열 식별 번호: 8, 서열 식별 번호: 9, 서열 식별 번호: 10, 서열 식별 번호: 11, 서열 식별 번호: 12, 서열 식별 번호: 13, 서열 식별 번호: 14, 서열 식별 번호: 15, 서열 식별 번호: 16, 서열 식별 번호: 17,

서열 식별 번호: 18, 서열 식별 번호: 19, 서열 식별 번호: 20, 서열 식별 번호: 21, 서열 식별 번호: 22, 서열 식별 번호: 23, 서열 식별 번호: 24, 서열 식별 번호: 26, 서열 식별 번호: 27, 서열 식별 번호: 28, 서열 식별 번호: 29, 서열 식별 번호: 30, 서열 식별 번호: 31, 서열 식별 번호: 32, 서열 식별 번호: 33, 서열 식별 번호: 34, 서열 식별 번호: 35, 서열 식별 번호: 36, 서열 식별 번호: 37, 서열 식별 번호: 38, 서열 식별 번호: 39, 서열 식별 번호: 40, 서열 식별 번호: 41, 서열 식별 번호: 42, 서열 식별 번호: 43, 서열 식별 번호: 44, 서열 식별 번호: 45, 서열 식별 번호: 46, 서열 식별 번호: 47, 서열 식별 번호: 48, 서열 식별 번호: 49, 서열 식별 번호: 50, 서열 식별 번호: 51, 서열 식별 번호: 52, 서열 식별 번호: 53, 서열 식별 번호: 54, 및 서열 식별 번호: 55에서 나타낸 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 α -PKC 저해제, 및

K^+ 양이온을 함유하고 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 65

δ -PKC 활성화제,

아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖고 카르복시 말단에서 아미드화되어 있는, 서열 식별 번호: 25에서 나타낸 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및

K^+ 양이온을 함유하고 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 66

δ -PKC 활성화제,

아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는, 서열 식별 번호: 1에 나타낸 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및

K^+ 양이온을 함유하고 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 67

제 64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서,

δ -PKC 활성화제,는 인슐린 및 인슐린 유사체로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 조성물.

청구항 68

제 67항에 있어서,

인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, 인슐린 글라진, 비스파틴, 및 L--포스파티딜이노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타암모늄 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 조성물.

청구항 69

제 67항에 있어서,

인슐린은 인간 인슐린, 소 인슐린, 및 돼지 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 조성물.

청구항 70

제 69항에 있어서,

인슐린은 재조합적으로 발현되는 조성물.

청구항 71

서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호: 3, 서열 식별 번호: 4, 서열 식별 번호: 5, 서열 식별 번호: 6, 서열 식별 번호: 7, 서열 식별 번호: 8, 서열 식별 번호: 9, 서열 식별 번호: 10, 서열 식별 번호: 11, 서열 식별 번호: 12, 서열 식별 번호: 13, 서열 식별 번호: 14, 서열 식별 번호: 15, 서열 식별 번호: 16, 서열 식별 번호: 17, 서열 식별 번호: 18, 서열 식별 번호: 19, 서열 식별 번호: 20, 서열 식별 번호: 21, 서열 식별 번호: 22, 서열

식별 번호: 23, 서열 식별 번호: 24, 서열 식별 번호: 26, 서열 식별 번호: 27, 서열 식별 번호: 28, 서열 식별 번호: 29, 서열 식별 번호: 30, 서열 식별 번호: 31, 서열 식별 번호: 32, 서열 식별 번호: 33, 서열 식별 번호: 34, 서열 식별 번호: 35, 서열 식별 번호: 36, 서열 식별 번호: 37, 서열 식별 번호: 38, 서열 식별 번호: 39, 서열 식별 번호: 40, 서열 식별 번호: 41, 서열 식별 번호: 42, 서열 식별 번호: 43, 서열 식별 번호: 44, 서열 식별 번호: 45, 서열 식별 번호: 46, 서열 식별 번호: 47, 서열 식별 번호: 48, 서열 식별 번호: 49, 서열 식별 번호: 50, 서열 식별 번호: 51, 서열 식별 번호: 52, 서열 식별 번호: 53, 서열 식별 번호: 54, 및 서열 식별 번호: 55에서 나타난 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 α -PKC 저해제, 및

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 72

아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖고 카르복시 말단에서 아미드화되어 있는, 서열 식별 번호: 25에서 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 73

아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는, 서열 식별 번호: 1에 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제, 및

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 74

제 73항에 있어서,

본 약제학적 조성물은 1 M 내지 100 M의 펩티드를 포함하는 조성물.

청구항 75

제 73항에 있어서,

본 약제학적 조성물은 1 M의 펩티드를 포함하는 조성물.

청구항 76

제 71항 내지 75항 중 어느 한 항에 있어서, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체는 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na_2HPO_4 를 포함하는 수성 담체인 조성물.

청구항 77

a) 서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호: 3, 서열 식별 번호: 4, 서열 식별 번호: 5, 서열 식별 번호: 6, 서열 식별 번호: 7, 서열 식별 번호: 8, 서열 식별 번호: 9, 서열 식별 번호: 10, 서열 식별 번호: 11, 서열 식별 번호: 12, 서열 식별 번호: 13, 서열 식별 번호: 14, 서열 식별 번호: 15, 서열 식별 번호: 16, 서열 식별 번호: 17, 서열 식별 번호: 18, 서열 식별 번호: 19, 서열 식별 번호: 20, 서열 식별 번호: 21, 서열 식별 번호: 22, 서열 식별 번호: 23, 서열 식별 번호: 24, 서열 식별 번호: 26, 서열 식별 번호: 27, 서열 식별 번호: 28, 서열 식별 번호: 29, 서열 식별 번호: 30, 서열 식별 번호: 31, 서열 식별 번호: 32, 서열 식별 번호: 33, 서열 식별 번호: 34, 서열 식별 번호: 35, 서열 식별 번호: 36, 서열 식별 번호: 37, 서열 식별 번호: 38, 서열 식별 번호: 39, 서열 식별 번호: 40, 서열 식별 번호: 41, 서열 식별 번호: 42, 서열 식별 번호: 43, 서열 식별 번호: 44, 서열 식별 번호: 45, 서열 식별 번호: 46, 서열 식별 번호: 47, 서열 식별 번호: 48, 서열 식별 번호: 49, 서열 식별 번호: 50, 서열 식별 번호: 51, 서열 식별 번호: 52, 서열 식별 번호: 53, 서열 식별 번호: 54, 및 서열 식별 번호: 55에서 나타난 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 α -PKC 저해제 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계 ; 및

b)동물에 대해 본 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 피부 창상의 부위에서의 염증이 감소되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 피부 창상 부위의 염증을 감소시키기 위한 방법.

청구항 78

a) 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖고 카르복시 말단에서 아미드화되어 있는, 서열 식별 번호: 25에서 나타낸 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계 ; 및

b)동물에 대해 본 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 피부 창상의 부위에서의 염증이 감소되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 피부 창상 부위의 염증을 감소시키기 위한 방법.

청구항 79

a) 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는, 서열 식별 번호: 1에 나타낸 아미노산 서열로 구성된 펩티드로 이루어지는 α -PKC 저해제 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계 ; 및

b)동물에 대해 본 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 피부 창상의 부위에서의 염증이 감소되는 것

을 포함하는, 인간을 제외한 동물에 대해 피부 창상 부위의 염증을 감소시키기 위한 방법.

청구항 80

제 77항 내지 79항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 1 M 내지 100 M의 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 81

제 80항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 1 M의 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 82

제 77항 내지 제 81항 중 어느 한 항에 있어서,

Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체는 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na_2HPO_4 을 포함하는 수성 담체인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 우선권

[0002] 본 출원은 2007년 7월 30일에 "약제학적 조성물"이라는 명칭으로 출원된 미국 가특허 출원 제 60/962,706호에 대해 우선권을 주장하고, 그 전체 내용을 참조로서 본명세서에 포함한다.

[0003] 본 개시물은 창상 치료의 가속화, 피부 창상의 봉쇄 증가, 및 피부 창상 부위에서의 염증 감소를 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0004] 피부는 별도의 층들, 말하자면, 표피, 진피 및 하피로 구성되고, 각각이 서로 다른 세포 특성 및 생리적 중요성을 갖는 복합 조직이다(Fuchs and Byrne 1994; Goldsmith 1991).
- [0005] 표피는 성장과 분화를 겪는 세포가 엄밀히 구분되어 있는 편평 상피 세포이다(Fuchs and Byrne 1994). 정상 생리 상태에서, 증식은 기저 막에 부착하는 기저 세포에 한정된다. 분화는 기저 세포가 기저막에 대한 부착성을 상실하고, DNA 합성을 중단하고, 일련의 형태학적 생화학적 변화를 겪는 공간적 과정이다. 최종 성숙 단계는 피부의 보호 장벽을 형성하는 각화층을 생성하는 것이다(Tennenbaum et al. 1991; Wysocki 1999).
- [0006] 진피는 매트릭스 섬유로 구성되고 변이체 세포 타입을 함유한다. 또한, 모든 피부 부속기관, 즉, 미소혈관계, 한선 및 피지선, 감각 신경 및 모낭은 진피 내에서 국소화된다. 진피는 표피와, 인체의 다른 부분으로부터 외층에 신호가 도달하는 경로를 유지하면서, 피부 영양을 지원하는 역할을 하는 것으로 생각되었다(Green 1977; Wysocki 1999). 하피는 피부의 가장 깊은 층으로서, 주로 지방 세포로 구성되어 피하 지방층으로서도 알려져 있다. 최근까지, 이 층은 외부 온도 변화로부터의 절연역할을 하고, 피부 상층에 대해 기계적 지지를 하는 것으로 생각되었다(Nash et al. 2004; Querleux et al. 2002).
- [0007] 피부에서, 중층 표피의 연속적 재생은 연속적이고 고도로 특수화된 과정에 의해 유지되어, 분비 박관상 바디로부터 유래된 지방과 함께 인체의 보호 수 장벽을 구성하는 비-생존, 각화 편평세포를 구성한다. 증식 기저 세포는 표피-특이적 기저 막에 부착한다. 케라티노사이트 분화 과정은 기저 막과의 세포 접촉 손실과 밀접하게 관련되어 있고; 기저 세포가 극층(spinous layer)으로 점점 이동함에 따라 증식 능력을 상실한다. 또한, 과립 세포 구획으로의 성숙 이후 고정 각화막이 형성되는데, 고정 각화막 형성은 세포내 기관의 자기분해 및 프로그램화된 세포 죽음과 관련되어 있고, 성숙 편평 세포를 발생시킨다(Adams and Watt 1990; Eckert 1989; Yuspa et al. 1980).
- [0008] 개방 피부 창상은(i) 염증;(ii) 섬유아세포 증식;(iii) 혈관 증식;(iv) 결합 조직 합성;(v) 상피형성; 및 vi) 창상 수축;의 6개 주요 요소를 포함하는 과정에 의해 통상 치료한다. 이들 요소가 개별적으로 또는 전체적으로 제대로 작용하지 않을 때 창상 치료에 장애가 발생한다. 영양실조, 감염, 약리학적 약물(예를 들면, 악티노마이신 및 스테로이드), 고령 및 당뇨병을 포함하는 여러 요인이 창상 치료에 영향을 미칠 수 있다(Keast and Orsted 1998; Kirsner and Eaglstein 1993; Williams and Armstrong 1998).
- [0009] 당뇨병의 흔한 형태인 진성 당뇨병은 인슐린 신호 전달 장애, 혈당 상승, 및 몇몇 개별 조직을 수반하는 만성 합병증 발병 소인에 의해 특징지어진다. 당뇨병의 모든 만성 합병증 중, 발 궤양을 유도하는 창상 치료 장애는 가장 연구가 덜 진행된 것들 중 하나이다(Goodson and Hunt 1979; Grunfeld 1992). 그렇지만, 당뇨 환자에서 피부 궤양은 엄청난 확대된 개인적 재정적 비용을 발생시킨다. 또한, 발 궤양 및 이에 뒤따르는 하지 절단은 당뇨 환자의 입원의 가장 흔한 원인이다. 당뇨병에서, 창상 치료 과정에 장애가 있고, 치료된 창상은 창상 강도 감소가 특징이다(Shaw and Boulton 1997). 조직 재생 결함은 신경증, 혈관 질환 및 감염을 포함하는 여러 인자와 관련되어 있다(Mousley 2003; Silhi 1998). 그러나, 비정상적인 인슐린 신호전달과 관련된 당뇨병 상태가 창상 치료를 방해하고, 피부 생리학을 변경하는 그 밖의 메카니즘은 규명되지 않았다. 또한, 연령과, 당뇨병과 비만과 같은 만성 질환의 발병에 의해 영향을 받는 인체의 변이체 부분에서는 외과 수술 이후의 창상 치료라는 공통적인 문제가 있다. 외과수술 현장에서, 환자의 1/3은 창상 부위에서의 관련 염증 발병과 함께 생리적 상태로 인해 창상 치료에 지연을 겪는다(Diegelmann and Evans 2004).
- [0010] 피부 창상은 말, 개, 고양이와 가축을 포함하는 동물에서 흔히 발견된다. 동물에 있어서, 창상은 창상 처치를 필요로 하는 다양한 공통적인 질병 상태가 있다. 따라서, 수의 피부학은 수의약품에서 가장 신속하게 성장하는 분야 중 하나이다.
- [0011] 일반적으로, 대부분의 이들 창상은 2차적 의도로 치료한다. 이 과정은, 특히 사지가 수반되는 경우 장시간을 소요한다. 동물에서는, 사람과 더불어, 창상 치료 과정이 오염, 감염 또는 이개(離開, dehiscence)와 같은 요인에 의해 복잡해질 수 있고, 종종 치료 기간 지연 또는 부적절한 창상 봉쇄의 원인이 된다(Grunfeld 1992; Knol and Wisselink 1996; Yeruham et al. 1992; Yim et al. 2007).
- [0012] 대표적으로, 창상 치료는 새로운 표피와 과립 조직 형성의 유도(활성화)와 염증 감소를 필요로 한다. 이들 과정은 또한 수술후 창상, 말단 핏물 궤양(acral lick ulcer), 당뇨병성 궤양 등과 같은 다양한 급성 및 만성 창상의 치료를 위한 동물에 있어서도 필수적이다. 말(horse)은 섬유아세포 증식과 혈관신생이 병적으로 증가하는 육아 조직 과다에 의해 발생하는 만성 창상(예를 들면 "육아조직(Proud flesh)")을 앓는다. 이러한 비정상적 육아 조직은 상피세포 수준을 넘어서서 과성장하고, 해당 영역에 걸쳐 성장할 수 있는 인접 피부의 접근을 방해

한다. 섬유아세포의 이러한 제어불가한 성장의 메카니즘은 알려져 있지 않다. 가능한 유일한 치료는 침범당한 조직의 외과적 제거, 압박 붕대법과 코르티코스테로이드를 포함한다. 이 치료법은 장시간(5 내지 8개월)을 요하고, 병변이 통상 재발한다(De, I and Theoret 2004; Stone 1986).

[0013] 동물에서의 기타 특이적 병리학은 개에서의 말단 핥음 피부병(Acral Lick Dermatitis)과 친식성 궤양(rodent ulcers)을 포함한다. 말단 핥음 피부병은 같은 부위를 반복적으로 핥음으로써 개의 병변과 관련하여 부풀어 팽창고, 딱딱하고, 고무같은 조직을 말하는 것으로서, 개에서는 흔한 문제이다. 말단 핥음 피부병의 치료를 위한 수많은 전략에도 불구하고, 치료율과 효능이 불충분하고 많은 경우 궤양의 재발이 발생한다(White 1990; Yeruham et al. 1992).

[0014] 단백질 키나제 C(PKC)는 단백질에 대해 ATP로부터 세린 및 트레오닌 잔기로 인산을 공유적으로 이동시키는 것을 촉매화하고, 피부 병리학 조절에서 중요한 역할을 하는 인지질 독립 효소의 군이다. 기질 단백질의 인산화는 구조 변화를 유발하고, 이 구조 변화는 그 기능적 특성의 변화를 유발한다. 현재까지, 다양한 세포 기능과, 증식, 분화, 세포 생존과 죽음을 조절하는 신호 전달 경로에 11개의 이소형태(isoform)가 관련되어 있는 것으로 밝혀졌다(Nishizuka 1995). 특이적 보조인자 요건, 조직 국소화와 세포 구획화는 각 이소형태에 대해 차별적 기능과 특이적 신호 전달 캐스케이드의 미세 튜닝을 암시한다. 따라서, 특이적 자극은 특정 생물학적 상황에서 발현, 국소화 및 인산화 상태에 의해 조절되는 이소형태 특이적 PKC 신호 전달을 통해 차별적 반응을 유도할 수 있다. PKC 이소형태는 다양한 세포 신호에 의해 활성화되고, 결국은 수용체, 효소, 세포골격 단백질 및 전사 인자를 포함하는 세포 단백질의 활성을 변조시킨다. 따라서, PKC 군은 세포 신호 처리에 중추적 역할을 한다.

[0015] 세린/트레오닌 키나제의 단백질 키나제 C(PKC)의 원형은 Nishizuka와 그의 동료들에 의해 최초로 기술되었는데(Kikkawa et al. 1989), Nishizuka는 포스파티딜이소시톨의 분해 산물인 디아실글리세롤(DAG)에 의해 활성화되는 PKC를 최초로 발견하였다(Castagna et al. 1982). 다른 연구에서는 PKC가 종양 촉진 포르볼(phorbol) 에스테르의 세포내 수용체라는 것을 밝혀냈다.

[0016] 모든 PKC 군의 구성원은 구조적 골격을 공유하고, 이 구조적 골격은 N-말단에서의 조절 도메인과, C-말단에서의 효소적 도메인의 두 개의 주요 도메인으로 나뉠 수 있다. 영역은 보존 영역(C1-C4)과 이소형태 사이에서 변하는 영역(V1-V5)으로 나뉜다(Nishizuka 1988). 또한, PKC는 조절 영역에서 위기질 도메인을 나타내어, 기질 인지 모티프(motif)를 모방하여 인지 부위를 봉쇄하고 활성화를 방해한다(Blumberg 1991; House and Kemp 1987). 이소형태의 PKC 군은 구조적 특성과 보조인자 요건에 기초하여 세 개의 주요 그룹으로 나뉜다. 이들은 전통적 cPKC(α , β I, β II, 및 γ), 신규 nPKC(δ , ϵ , η , θ), 및 비전형적 aPKC(ζ 및 ι/λ) 이소형태를 포함한다(Azzi et al. 1992; Kikkawa et al. 1989; Svetek et al. 1995).

[0017] 모든 PKC 이소형태는 활성화를 위해 인지질 이중층의 성분을 필요로 한다. 전통적 cPKC는 칼슘(Ca^{2+}) 의존적이고 활성화를 위해 DAG 또는 포르볼 에스테르와 같은 DAG 유사체를 또한 필요로 한다. 신규 nPKC는 Ca^{2+} 와는 독립적이지만 최대 활성화를 위해 DAG 또는 포르볼 에스테르를 필요로 한다(Kazanietz et al. 1993). 비전형적 aPKCs는 Ca^{2+} 와 독립적이고, DAG 또는 포르볼 에스테르를 필요로 하지 않지만, 활성화를 위해 포스파티딜세린을 필요로 한다(Chauhan et al. 1990). 또한, 기질 인지의 주요 요소는 세포 신호 전달에서 PKC 이소형태의 특이적 활성화에서 암시된 조절 메카니즘을 제어하고, 개별적 표적 기질의 인산화와 관련되어 있는 조절 도메인 내에서의 위기질 영역이다(Eichholtz et al. 1993; Hofmann 1997).

[0018] 인 비모 피부 표피 및 배양된 케라티노사이트에서 다섯개의 PKC 이소형태 - α , δ , ϵ , η 및 ζ -가 확인되었다. 그러나, 피부의 피층 내에서 β 및 γ 와 같은 다른 PKC 이소형태가 검출되었다. 또한, PKC 이소형태의 타입 및 PKC 분포 패턴은 여러 조직 중에서 달라지고, 또한 표현형의 함수로서 달라질 수도 있다. 중요한 것은, PKC 이소형태는 인 비모 및 인 비트로에서의 기저 및 분화 피부 케라티노사이트 모두에서 분포되고 창상 치료에서 중요한 역할을 할 수 있다는 것이다.

[0019] 따라서, 피부 창상 및 기타 만성 창상의 치료를 보조하기 위해 PKC 활성을 조절하는 개선된 조성물 및 방법이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0020] 본 발명은 일반적으로 칼슘 및 마그네슘 이온이 없는 생물활성 피부 창상 치료 및 또는 항염증제를 포함하는 약제학적 조성물 및 이 약제학적 조성물을 사용한 피부 창상 및/또는 염증의 치료 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 본 약제학적 조성물은 국부 또는 국소 투여, 특히 피하 투여에 적합하다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명의 한 측면은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다.

[0022] 본 발명의 또다른 측면은 인슐린, 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는 서열 식별 번호: 1에 나 타낸 아미노산 서열로 구성된 펩티드, 및 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na_2HPO_4 를 포함하고 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 수성인 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다.

[0023] 바람직하게는 약제학적으로 허용가능한 담체는 조성물을 완충시키는데 적합한 인산염 또는 인산염-함유 화합물 을 포함한다. 특히 바람직한 구체에는 0.2 L KCl, 0.2 g/L 무수 KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl 및 1.15 g/L 무수 Na_2HPO_4 를 포함한다. 그러한 약제학적으로 허용가능한 담체도 또한 본 발명의 한 측면이고, 필요한 성분들을 혼합하여 칼슘 또는 마그네슘 이온을 함유하지 않는 약제학적으로 허용가능한 담체를 제공함으로써 제조될 수 있다.

[0024] 본 발명의 또다른 측면은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체, 및 약물 용리 지지체를 포함하는 조성물이다.

[0025] 본 발명의 또다른 측면은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가 능한 담체를 제공하는 단계; 및 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 상기 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적 으로 허용가능한 담체를 조합하는 단계;를 포함하고, 이에 의해 본 약제학적 조성물이 생성되는 과정에 의해 생 성되는 약제학적 조성물이다.

[0026] 본 발명의 또다른 측면은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가 능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및 본 약제학적 조성물의 유효량을 동물의 피부 창상 에 투여하는 단계;를 포함하고, 이에 의해 피부 창상의 봉쇄가 증가하는, 동물에 대한 피부 창상 봉쇄 증가 방 법이다.

[0027] 본 발명의 또다른 측면은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가 능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및 본 약제학적 조성물의 유효량을 동물의 피부 창상 에 투여하는 단계;를 포함하고, 이에 의해 피부 창상 부위에서의 염증이 감소되는, 동물에 대한 피부 창상 부위 의 염증 감소 방법이다.

[0028] 본 발명의 또다른 측면은 인슐린 또는 인슐린 유사체 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다.

[0029] 본 발명의 또다른 측면은 약 0.0001 단위/L 내지 약 0.1 단위/L의 인슐린 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학 적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다.

[0030] 본 발명의 또다른 측면은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가 능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및 본 약제학적 조성물의 유효량을 당뇨병 케양 창상, 말단 궤양 창상, 욕아 조직 창상, 외과적 창상, 만성 일광 농양 창상, 및 골수염 창상으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 동물의 피부 창상에 투여하는 단계를 포함하고; 이에 의해 창상의 봉쇄가 증가되는, 동 물에 대한 피부 창상 봉쇄 증가 방법이다.

[0031] 본 발명의 또다른 측면은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 K^+ 양이온을 함유하고 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없

는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다.

- [0032] 본 발명의 또다른 측면은 δ -PKC 활성화제, 및 K^+ 양이온을 함유하고 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다. 본 발명의 또다른 측면은 α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다.
- [0033] 본 발명의 또다른 측면은 α -PKC 저해제 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및 동물에 대해 피부 창상에 본 약제학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계;를 포함하고, 이에 의해 피부 창상의 부위에서의 염증이 감소되는, 동물에 대한 피부 창상 부위의 염증 감소 방법이다.
- [0034] 본 발명의 다른 측면은 본명세서에서 기술된 바와 같은 본 발명의 조성물을 사용하는 육아 조직의 형성, 표피 증식, 및 피부 성장의 촉진이다.
- [0035] 마지막으로, 본명세서에서 개시된 조성물은 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 완전히 없거나 또는 이들 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1A는 다양한 제제로 제제화된, 표시된 약제학적 화합물을 이용하는 인 비트로 창상 치료의 효능을 나타내는 세포 배양 접시의 사진을 제공한다(Axiovert 25 Zeiss 현미경 하에서 x50 배율).
- 도 1B는 치료 24시간 후 봉쇄%로서 창상 봉쇄를 나타낸다.
- 도 2A는 제제 A 내에서 상당한 창상 봉쇄를 촉진하는 본 약제학적 조성물을 나타내는 그래프이다.
- 도 2B는 다양한 제제를 이용하여 치료 후 대표적인 창상 사진이다.
- 도 3은 다양한 제제에서 치료 후 창상 부위에서의 염증 부담을 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 다양한 제제를 이용하여 치료 후의 육아 조직 형성을 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 다양한 제제에서 PKC α 활성을 저해하는 Myr-위기질 PKC α 펩티드의 능력을 나타내는 그래프이다.
- 도 6A는 창상 봉쇄 및 세포 증식에 대해 다양한 제제에서 인슐린의 효과를 나타내는 세포 배양 접시의 확대 사진이다(Axiovert 25 Zeiss 현미경 하에서 x200 배율).
- 도 6B는 인슐린의 존재 또는 부존재 하에서 다양한 제제를 사용한 치료 24시간 후 대조구%로서 인 비트로 창상 봉쇄를 나타내는 그래프이다.
- 도 6C는 티미딘 취입에 의해 측정되는 세포 증식을 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 세포 배양 배지의 교환 전후의 7개월령 내지 2년령 마우스로부터의 케라티노사이트 세포에서의 세포 증식에 대한 인슐린 및 인슐린 + PKC α 저해제의 효과를 나타내는 그래프이다.
- 도 8A는 다양한 제제에서 약제학적 조성물을 사용한 만성 족부 궤양의 처치와 봉쇄 증가를 나타내는 사진과 그래프를 제공한다.
- 도 8B는 다양한 제제에서 0일과 60일에 환자의 만성 당뇨병 창상의 처치와 봉쇄 증가를 나타내는 사진이다.
- 도 9는 본 약제학적 조성물을 사용하여 0일, 3개월 및 6개월에서 말에서의 만성 육아 조직 창상의 처치를 나타내는 사진을 제공한다.
- 도 10은 본 약제학적 조성물을 사용하여 0일, 30일 및 60일에서의 만성 일광 농양의 치료를 나타내는 사진을 제공한다.
- 도 11은 본 약제학적 조성물을 사용하여 0일, 2개월 및 3.5개월에서 자가 외상에 의해 초래된 비-치료 말단 혈음 창상의 처치의 경과를 나타내는 사진을 제공한다.
- 도 12는 상표 HUMALOG®로 공지된 인간 인슐린 유사체인 인슐린 리스프로(rDNA 기원)의 1차 구조의 모식도이다.

도 13은 상표 NOVLOG®로서 공지된 인간 인슐린 유사체인 인슐린 아스파르트(rDNA 기원)의 1차 구조의 모식도이다.

도 14는 상표 LANTUS®로서 공지된 인간 인슐린 유사체인 인슐린 글라진(rDNA 기원)의 1차 구조의 모식도이다.

도 15는 상표 NOVOLIN® R로서도 공지된 인간 인슐린 유사체인 HUMULIN® R의 1차 구조의 모식도이다.

도 16은 제제 A 내에 단독 제공된 인슐린 유사체를 사용한 치료 후 표피 및 육아 조직의 형성에 의해 측정되는 창상 치료의 퍼센트를 비처치된 대조 창상과 비교하여 나타내는 그래프이다. 검토된 인슐린 유사체는 인슐린 리스프로(HumL), 인슐린 아스파르트(Novo), 인슐린 글라진(LANTUS®), 및 HUMULIN® R(HumR)이었다.

도 17은 HUMULIN® R(HumR), USP 인슐린(Ins USP), 및 PKC α 위기질 저해 펩티드(pep)를 단독 또는 인슐린 유사체 및 상기 저해 펩티드와의 조합의 처치를 사용하여 육아 조직의 형성에 의해 측정되는 창상 치료의 속도를 나타내는 그래프이다.

도 18은 HUMULIN® R(HumR), 인슐린 리스프로(HumL), 및 PKC α 위기질 저해 펩티드(pep)를 단독 또는 인슐린 유사체 및 상기 저해 펩티드와의 상승적 조합의 치료를 사용하여 중증 염증의 퍼센트를 나타내는 그래프이다.

도 19는 배지 A 및 배지 B에서 배양된 1차 피부 케라티노사이트에서 비스파틴 또는 L- α -포스포티딜이노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타암모늄 염의 처치 후 7개월령 내지 2년령 마우스 발현으로부터의 케라티노사이트 세포에서의 케라틴 1을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 발명의 본 약제학적 조성물은 다양한 용매 내에 서로 다른 무기 및 유기 염을 포함하는 약제학적으로 허용가능한 담체 및 PKC α 저해제, 및/또는 인슐린을 포함한다.

[0038] 약제학적으로 허용가능한 담체의 예시적 제제 조성물은 생리적으로 허용가능한 수준에서 물, 염화칼륨, 염화나트륨, 및 인산염을 포함할 수 있고, 다음과 같이 제조될 수 있다:

[0039] A) 염화칼륨 0.2 g/L(KCl)

[0040] B) 인산칼륨 일염기(무수) 0.2 g/L(KH₂PO₄)

[0041] C) 염화나트륨 8.0(g/L)(NaCl)

[0042] D) 인산나트륨 이염기(무수) 1.15(g/L)(Na₂HPO₄)

[0043] 본 제제는 칼슘 또는 마그네슘 이온을 함유해서는 안된다.

[0044] 어떠한 PKC α 저해제도 사용될 수 있지만, 바람직하게는, PKC α 저해제는 PKC α (Myr*-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-OH(서열 식별 번호: 1 CAS [147217-25-2])의 위기질 영역에 상응하는 미스트로일화 펩티드이다. PKC α 위기질 영역은 이 특정 이소형태의 기질 영역에 대해 특히 높은 친화성을 갖는다. 기타 사용가능한 PKC 저해제의 예시는 아래의 표 1에 나타난 펩티드를 포함한다.

[0045]

표 1. PKC 저해제 펩티드

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val	서열식별번호 : 2
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His Glu Val Lys Asn	서열식별번호 : 3
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His Glu Val Lys Asn Leu Lys Gly Ala	서열식별번호 : 4
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Leu Ala Val	서열식별번호 : 5
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val	서열식별번호 : 6
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg	서열식별번호 : 7
Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe (Xaa는 어떠한 자연 발생적 아미노산일 수 있음)	서열식별번호 : 8
Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala	서열식별번호 : 9
Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ala Phe Phe Tyr Gly Gly	서열식별번호 : 10
Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ala Phe Arg Arg Lys Ala	서열식별번호 : 11
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val Tyr	서열식별번호 : 12
Asp Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Asn Lys Val	서열식별번호 : 13
Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val	서열식별번호 : 14
Gly Pro Arg Pro Leu Phe Cys Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Val Val	서열식별번호 : 15
Gln Lys Arg Pro Ala Gln Arg Ser Lys Tyr Leu	서열식별번호 : 16
Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Leu	서열식별번호 : 17
Gly Gly Pro Leu Arg Arg Thr Leu Ala Val Arg Arg	서열식별번호 : 18
Gly Gly Pro Leu Ser Arg Arg Leu Ala Val Arg Arg	서열식별번호 : 19
Gly Gly Pro Leu Ser Arg Thr Leu Ala Val Arg Arg	서열식별번호 : 20
Gly Gly Pro Leu Ser Arg Arg Leu Ala Val Ala Arg	서열식별번호 : 21
Gly Gly Pro Leu Arg Arg Thr Leu Ala Val Ala Arg	서열식별번호 : 22
Val Arg Lys Ala Leu Arg Arg Leu	서열식별번호 : 23
Gly Gly Arg Leu Ser Arg Thr Leu Ala Val Ala Arg	서열식별번호 : 24
Thr Arg Lys Arg Gln Pro Ala Met Arg Arg Arg Val His Gln Ile Asn Gly	서열식별번호 : 25

[0046]

이 펩티드는 N 말단에서 미리스토일화되고 C 말단에서 아미드화되어 있음	
Arg Lys Arg Gln Arg Ala Met Arg Arg Arg Val His	서열 식별 번호: 26
Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val	서열 식별 번호: 27
Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala	서열 식별 번호: 28
Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe Xaa는 어떠한 자연 발생적 아미노산일 수 있음	서열 식별 번호: 29
Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ala Phe Phe Tyr Gly Gly	서열 식별 번호: 30
Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ala Phe Arg Arg Lys Ala	서열 식별 번호: 31
Ala Ala Ala Lys Ile Gln Ala Ala Trp Arg Gly His Met Ala Arg Lys Lys Ile Lys Ser	서열 식별 번호: 32
Ala Ala Ala Lys Ile Gln Ala Ala Phe Arg Gly His Met Ala Arg Lys Lys Ile Lys	서열 식별 번호: 33
Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val	서열 식별 번호: 34
Val Arg Lys Ala Leu Arg Arg Leu	서열 식별 번호: 35
Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ala Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys	서열 식별 번호: 36
Gly Pro Arg Pro Leu Phe Cys Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Val Val	서열 식별 번호: 37
Glu Ser Thr Val Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val	서열 식별 번호: 38
Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val	서열 식별 번호: 39
Arg Phe Ala Arg Leu Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val	서열 식별 번호: 40
Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe Xaa는 어떠한 자연 발생적 아미노산일 수 있음	서열 식별 번호: 41
Arg Arg Phe Lys Arg Gln Gly Ala Phe Phe Tyr Phe Phe	서열 식별 번호: 42
Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala	서열 식별 번호: 43
Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ser Phe Phe Tyr Gly Gly	서열 식별 번호: 44
Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ser Phe Lys Lys Phe Ala	서열 식별 번호: 45
Arg Arg Phe Lys Arg Gln Gly Ser Phe Phe Tyr Phe Phe	서열 식별 번호: 46

Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ser Phe Phe Glu Phe Phe Xaa는 어떠한 자연 발생적 아미노산일 수 있음	서열 식별 번호: 47
Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ser Phe Arg Arg Lys Ala	서열 식별 번호: 48
Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ser Val Arg Arg Arg Val	서열 식별 번호: 49
Met Asn Arg Arg Gly Ser Ile Lys Gln Ala Lys Ile	서열 식별 번호: 50
Met Phe Ala Val Arg Asp Arg Arg Gln Thr Val Lys Lys Gly Val Ile Lys Ala Val Asp Ala Val	서열 식별 번호: 51
Phe Gly Glu Ser Arg Ala Ser Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp	서열 식별 번호: 52
Lys Ala Arg Leu Ser Tyr Ser Asp Lys Asn	서열 식별 번호: 53
Ser Ala Phe Ala Gly Phe Ser Phe Val Asn Pro Lys Phe	서열 식별 번호: 54
Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys	서열 식별 번호: 55

또한, 본 발명에 따른 약제학적 조성물 내에 다음 PKC 저해제도 사용할 수 있다:

A) NPC 15437 - (5)-2,6-디아미노-N-[(1 -(I -옥소트리데실)-2-피페리디닐)메틸]헥산아미드 이염산 수화물로서
도 공지된 이염산 수화물(Sigma)

분자식 - $C_{25}H_{50}N_4O_2 \cdot 2HCl \cdot xH_2O$

[0052] 분자량 - 511.61(무수 기준)

[0053] CAS 번호 - 141774-20-1(무수)

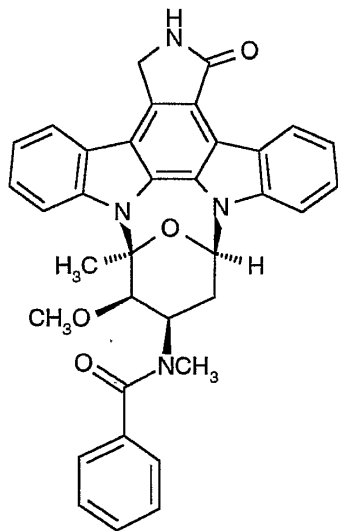
[0054] MDL 번호 - MFCD00210207

[0055] PubChem 물질 ID - 24897504

[0056] B) CGP41251 - [4'-N-벤조일 스타우로스포린] [Midostaurin]. 스타우로스포린 유도체 PKC 412(CGP 41251)는 단백질 키나제 C(PKC)의 종래의 이소형태의 더욱 선택적 저해제이다.

[0057] 분자식 - $C_{35}H_{30}N_4O_4$

[0058] 분자량 - 570.65



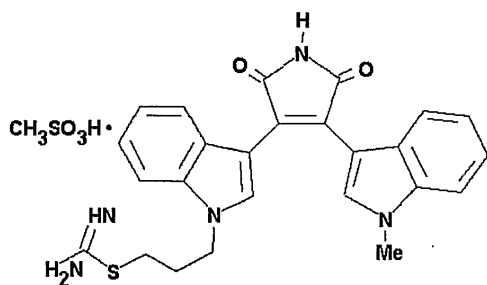
[0059]

[0060] C) Ro 31-8220 - 비스인돌릴말레이미드 IX, 메탄설폰산 염. (Upstate Biotechnology)

[0061] 분자식 - $C_{25}H_{23}N_5O_2S \cdot CH_4O_3S$

[0062] 분자량 - 553.66

[0063] 카탈로그 # 19-163; 구조식은 아래와 같다:



[0064]

[0065] D) Go6976, 12-(2-시아노에틸)-6,7,12,13-테트라하이드로-13-메틸-5-옥소-5H-인돌로[2,3-a]피롤로[3,4-c]카바졸, α 및 PKC β 1 저해제.

[0066] E) GF-109203X, 2-[1-(3-디메틸아미노프로필)-1H-인돌-3-일]-3-(1H-인돌-3-일) 말레이미드, 강력한 선택적 단백질 키나제 C 저해제.

[0067] F) ISIS 3521/LY900003, 아스피노카르센(aprinocarsen)으로서도 공지됨, 다음 서열(서열 식별 번호: 56)을 갖고, Isis Pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, CA로부터 상업적으로 이용가능한 20-뉴클레오타이드 포스포로티오에이트 데옥시리보-올리고뉴클레오타이드:

- [0068] 5' -GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3'
- [0069] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 본 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 레귤러 인슐린 또는 PKC δ 를 활성화시키는 그의 기능적 유사체, 및 9개의 아미노산으로 구성되고, PKC α 를 저해하는 상업적으로 이용가능한 합성 펩티드를 포함한다.
- [0070] 바람직한 약제학적 조성물은 다음을 포함한다:
- [0071] a) 염화칼륨 0.2 g/L(KCl)
- [0072] b) 인산칼륨 일염기(무수) 0.2 g/L(KH₂PO₄)
- [0073] c) 염화나트륨 8.0(g/L)(NaCl)
- [0074] d) 인산나트륨 이염기(무수) 1.15(g/L)(Na₂HPO₄)
- [0075] e) Myr*-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-OH(서열 식별 번호: 1)와 같은 미스트로일화 펩티드(1-100 μ M)
- [0076] f) 레귤러 인슐린 또는 그의 기능적 유사체(치료 투여량: 0.1-10 단위/ml)
- [0077] 상기에서 나열된 농도는 바람직한 조성물 내 최종 농도이다.
- [0078] 본 약제학적 조성물은 인슐린 또는 그의 기능적 유사체를 칼슘 또는 마그네슘 이온을 함유하지 않는 약제학적으로 허용가능한 담체 내에서의 PKC α 저해제와 함께 혼합함으로써 제조된다. 본발명에 따른 약제학적 조성물은 본 업계의 숙련자에게 쉽게 이용가능한 방법에 의해 용액, 겔, 연고, 크림, 또는 유액의 형태로 제조될 수 있다.
- [0079] 상기 두 개의 생물활성 성분인 인슐린 및 PKC α 저해제 펩티드는 용액 내에 제제화될 때 함께 창상 치료를 유도하는 작용을 한다. 인슐린 또는 그의 기능적 유사체의 농도는 0.1-10 단위/mL일 수 있다. PKC α 의 펩티드 저해제 농도는 1 내지 100 μ M일 수 있다. 바람직한 농도는 1 mL의 용액 내에 인슐린 0.1 단위(10^{-6} M) 및 펩티드(10^{-6} M) 1 μ g이다.
- [0080] 본 발명에 따른 약제학적 조성물에 사용되는 인슐린은 재조합되거나, 또는 인체 용도에 적합한 인간 인슐린 또는 비-인간 포유동물 인슐린과 같은 천연 공급원으로부터 유래할 수 있다. 또한, 본 약제학적 조성물은 인슐린의 기능적 유사체와 같은 인슐린 유사체를 사용하여 제조될 수 있다고 생각된다. 인슐린 유사체의 비제한적 예시는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, 인슐린 글라진, 및 재조합 인간 인슐린, 비스파틴, 및 L- α -포스포티딜이노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타암모늄 염(본명세서에서 L- α 로서도 나타냄)이다.
- [0081] 이들 중 특정 인슐린 유사체는 레귤러 인간 인슐린과 유사한 기본적인 1차 구조를 공유한다. 인슐린 리스프로는 B-28에서의 프롤린 및 B-29에서의 리신이 유사체에서 반대이기 때문에 인간 인슐린과는 구별된다. 인슐린 아스파르트는 B-28에서의 프롤린이 아스파르트산으로 치환되기 때문에 인간 인슐린과는 구별된다. 인슐린 글라진은 A-21 위치에서 아미노산 아스파라긴이 글리신으로 대체되고, 두 개의 아르기닌 잔기가 β -사슬의 C-말단에 부가되기 때문에 인간 인슐린과는 구별된다. 재조합 인간 인슐린은 구조적으로 인간 인슐린과 동일하고, 펩티드를 생성하기 위해 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용하는 것과 같은 rDNA 기술에 의해 생성된다.
- [0082] 비스파틴은 인슐린 유사체로서 작용하는 아디포사이토카인(adipocytokine)이고 인슐린 수용체에 결합하여 이를 활성화시킬 수 있는 인슐린 모방제이다. L- α 는 Ca²⁺-비감수성 PKC 아이소자임 δ , ϵ , 및 η 를 활성화시키는 유기 화합물이다. L- α 는 플렉스트린 상동성(plekstrin homology)(PH) 도메인을 통해 포스포이노시티드-1(GRP1) 단백질에 대한 일반적 수용체에 결합하고 또한 NIH/3T3 세포의 유동성을 증가시키고 액틴(actin) 인지와 막 교란(ruffling)을 생성한다고 알려져 있다.
- [0083] 바람직한 구체예에서, 본 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 치료를 필요로 하는 개체에 투여한다. 본 약제학적 조성물은 소정의 치료를 제공하는데 효과적인 어떠한 공지된 투여 경로, 바람직하게는 용액, 연고, 겔, 크림 또는 어떠한 국소 적용법(피하 주사와 같은) 내에서 국부 적용에 의해 투여될 수 있다. 본 약제학적 조성물은 거즈, 패치, 패드, 또는 스폰지와 같은 약물 용리 장치에 의해서도 투여될 수 있다.
- [0084] 본발명에 따른 본 약제학적 조성물의 또다른 측면은 본 약제학적 조성물을 사용하여 손상된 피부 또는 피부 창상을 치료하는 것이다. 본 조성물은 필요한 만큼 자주 투여되어야 하고, 원하는 목표, 예를 들면 창상이 완전

히 해결될 때까지 창상을 치료하는데 필요한 시간 동안 투여되어야 한다. 본 업계의 숙련자는 본발명에 따른 본 조성물 및 방법을 사용하여 적절한 치료 과정을 용이하게 결정할 수 있다.

[0085] 본발명에 따른 본 약제학적 조성물의 또다른 측면은 육아 조직의 형성, 표피 증식, 및 피부 성장을 촉진하는 것이다. 본발명에 따른 본 약제학적 조성물의 또다른 측면은 염증성 피부 질환에 의해 발생한 염증과 같은 염증을 치료하는 방법이다.

[0086] 본 명세서에서 사용된 " α -PKC 저해제"라는 용어는 어떠한 매커니즘에 의한 PKC α 이소형태의 활성을 저해할 수 있는 분자를 의미한다. PKC α 이소형태의 예는 수탁 번호 NM_002737(인간(*Homo sapiens*) PKC α), XM_548026(개(*Canis lupus familiaris*) PKC α), XM_001494589(말(*Equus caballus*) PKC α), 및 NM_011101(생쥐(*Mus musculus*) PKC α)에서 기술된 핵산에 의해 엔코딩되는 PKC α 이소형태, 또는 CLUSTALW 알고리즘의 오류 설정을 사용하여 결정되는 이들 PKC α 이소형태의 성숙 형태에 적어도 95% 동일한 펩티드 사슬을 포함한다. α -PKC 저해제 분자는 결합, 공유결합 변조 또는 그러한 분자와 PKC α 이소형태와의 물리적 상호작용을 수반하는 기타 매커니즘에 의해 PKC α 이소형태를 직접 저해할 수 있다. α -PKC 저해제 분자는 PKC α 이소형태의 활성화와 관련된 제 2 분자의 활성을 조절함으로써(예를 들면 PKC α 이소형태의 활성을 저해하기 위해 PKC α 이소형태 관련 신호 전달 캐스케이드의 성분의 활성을 조절함으로써, 또는 PKC α 이소형태의 발현을 방해하는 RNAs를 사일런싱(silencing)함으로써) 간접적으로 PKC α 이소형태를 저해할 수도 있다.

[0087] 본 명세서에서 사용된 " δ -PKC 활성화제,"라는 용어는 어떠한 매커니즘에 의해 PKC δ 이소형태를 활성화시키거나, 또는 세포 또는 조직 내의 PKC δ 이소형태 활성을 증가시킬 수 있는 분자를 의미한다. PKC δ 이소형태의 예는 수탁 번호 NM_006254(인간(*Homo sapiens*) PKC δ), NM_001008716(개(*Canis lupus familiaris*) PKC δ), XM_001915127(말(*Equus caballus*) PKC δ), 및 NM_011103(생쥐(*Mus musculus*) PKC δ)에서 기술된 핵산에 의해 엔코딩되는 PKC δ 이소형태, 또는 CLUSTALW 알고리즘의 오류 설정을 사용하여 결정되는 이들 PKC δ 이소형태의 성숙 형태에 적어도 85% 동일한 펩티드 사슬을 포함한다. δ -PKC 활성화제, 분자는 결합, 공유결합 변조 또는 그러한 분자와 PKC δ 이소형태와의 물리적 상호작용을 수반하는 다른 매커니즘에 의해 PKC δ 이소형태를 직접 저해할 수 있고, PKC δ 이소형태 기질 또는 보조인자를 포함할 수 있다. δ -PKC 활성화제, 분자는 PKC δ 이소형태의 활성화와 관련된 제 2 분자의 활성을 조절함으로써(예를 들면 PKC δ 이소형태를 활성화시키기 위한 인슐린 수용체와 같은 PKC δ 이소형태 관련 신호 전달 캐스케이드의 성분의 활성을 조절함으로써) 간접적으로 PKC δ 이소형태를 저해할 수도 있다. δ -PKC 활성화제, 분자는 세포 또는 조직에서 PKC δ 이소형태의 발현을 증가시킴으로써 세포 또는 조직 내 PKC δ 이소형태 활성을 증가시킬 수도 있다.

[0088] 본 명세서에서 사용된 "약물 용리 지지체"라는 용어는 생리적으로 활성인 분자를 방출할 수 있는 고정 물질을 의미한다. 약물 용리 지지체는 불용성, 가용성, 비-생물흡수성 또는 생물흡수성인 고정상 물질을 포함할 수 있다.

[0089] 본 명세서에서 사용된 "인슐린"이라는 용어는 자연적으로 발생하는 펩티드 호르몬, 및 성숙 형태 내에 인슐린 수용체를 활성화시킬 수 있는 디설파이드 결합에 의해 연결된 A 및 B 사슬을 포함하고 당뇨병에서 유용하다고 공지된 프리프로인슐린 및 프로인슐린 전구체 형태를 의미한다. 인간, 젖소, 및 돼지와 같이 수많은 여러 동물로부터의 인슐린은 널리 공지되어 있고, 본 업계의 숙련자가 쉽게 이해하는 것이다. 중요한 것은, 인슐린을 재조합적으로 생산할 수 있다는 것이다.

[0090] 본 명세서에서 사용된 "인슐린 유사체"라는 용어는 어떠한 매커니즘에 의해 인슐린 수용체를 활성화시킬 수 있는 자연적으로 발생하는 인슐린에서 발견되지 않는 구조를 포함하는 분자를 의미한다. 그러한 분자는 자연적으로 발생하는 인슐린의 하나 이상의 구조적 형태가 변조되어 있는, 인슐린의 구조적 유사체일 수 있다. 그러한 분자는 자연적으로 발생하는 인슐린에서 발견되지 않는 구조를 포함하는 모방제 분자일 수 있다. 인슐린 유사체는 인슐린-유사 성장 인자(예를 들면 인슐린-유사 성장 인자-1)를 또한 포함할 수 있다. 인슐린 유사체는 공유결합 변조 또는 그러한 수용체와의 물리적 상호작용을 포함하는 다른 매커니즘에 의해 직접 인슐린 수용체를 활성화할 수 있다. 인슐린 유사체는 그러한 수용체의 활성화에 수반되는 제 2 분자의 활성을 조절함으로써 간접적으로 인슐린 수용체를 활성화할 수도 있다. 이론에 얽매일 필요없이, 인슐린 수용체의 활성화는 PKC δ 이소형태의 간접적 활성화를 유발한다고 생각된다. 여러 가지 서로 다른 인슐린 유사체가 널리 공지되어 있고 본 업계의 숙련자는 이를 쉽게 이해한다.

[0091] 본 명세서에서 사용된 "표준 상태"라는 용어는 25°C +/-2°C 온도 및 1 기압 압력을 의미한다. 본명세서에서 기술되고, 단위 부피 기준(예를 들면 mol/L, M, 단위/ml, μ g/ml 등)으로 표현된 용액, 현탁액, 및 기타 제제의 농도는 "표준 상태"에서 결정된다. "표준 상태"라는 용어는 단일 기술로 인식되는 온도 또는 압력의 세트가 아

나라, 기준 "표준 상태" 조건 하에서 특정 조성물을 사용하여 용액, 현탁액, 또는 기타 제제를 기술하는데 사용되는 온도 및 압력을 특정하는 기준 상태를 말한다. 이것은 왜냐하면 용액의 부피는 부분적으로 온도와 압력의 함수이기 때문이다. 본업계의 숙련자는 본명세서에서 기술된 것과 동등한 조성물이 다른 온도 및 압력에서 생성될 수 있음을 이해한다.

[0092] 본 명세서에서 사용된 "약제학적으로 허용가능한 담체"라는 용어는 인간 또는 다른 동물에 투여하기에 적합한 하나 이상의 적합한 고체 또는 액체 충전제 희석제 또는 피복 물질을 의미한다.

[0093] 본 발명의 한 측면은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다. 이상적으로는, 약제학적으로 허용가능한 담체는 치료될 인간 또는 동물에 투여하기에 적합하도록 하는 고순도 및 저독성이어야 한다. 그러한 약제학적으로 허용가능한 담체는 δ -PKC 활성화제, 및 α -PKC 저해제의 생물학적 활성도 유지해야만 한다. 그러한 약제학적으로 허용가능한 담체는 예를 들면, 초산염계 완충제, 2-모르폴리노에탄설폰산(MES)계 완충제, 프탈산 수소 칼륨계 완충제, KH_2PO_4 계 완충제, 트리스(하이드록시메틸) 아미노메탄계 완충제, 및 붕사($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)계 완충제를 또한 포함할 수 있다. 100 mL 0.1 M 프탈산 수소 칼륨 + 부피로 표시된(mL로) 0.1 M NaOH. 그러한 완충제는 다음 처방으로 제조되거나 다음을 포함할 수 있다:

[0094] 0.1 M NaOH로 소정의 pH로 조정된 100 mL의 0.1 M KH_2PO_4 ;

[0095] 0.1 M HCl로 소정의 pH로 조정된 100 mL 0.1 M 트리스(하이드록시메틸) 아미노메탄; 및

[0096] 0.1 M HCl로 소정의 pH로 조정된 100 mL 0.025 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (붕사).

[0097] 약제학적으로 허용가능한 적절한 담체의 예는 물, 마셀린, 광물유, 식물유, 동물유, 미세결정, 파라핀 및 지랍(ozocerite) 왁스와 같은 유기 및 무기 왁스, 잔탄, 몰트, 탈크, 젤라틴, 설탕, 셀룰로오스, 콜라겐, 전분 또는 아리비아검과 같은 천연 중합체, 합성 중합체, 알콜, 폴리올, 인산염 완충제 용액, 코코아버터, 유화제, TWEENSTM과 같은 세제 등을 포함한다. 상기 담체는 예를 들면, 알콜과 같이 실질적으로 물과 혼화가능한 물 혼화성 담체 조성물일 수 있다. 물 혼화성인 약제학적으로 허용가능한 국소 담체는 상기한 하나 이상의 성분으로 제조된 것을 포함할 수 있고, 리포솜, 마이크로소폰지, 마이크로스피어 또는 마이크로캡셀, 수성 기체 연고, 워터-인-오일 또는 오일-인-워터 유액, 젤 등과 같이 물 함유, 물 혼화성 또는 물 가용성 조성물을 포함하는, 서방출 또는 지연방출 담체를 포함할 수도 있다. 본 업계의 숙련자는 기타 약제학적으로 허용가능한 담체를 이해한다.

[0098] 본 발명의 조성물에 사용하기 위해 약제학적으로-허용가능한 담체 내에 그 밖의 적합한 약제학적 활성성분 및 첨가제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 약제학적으로 허용가능한 담체 내에 NOVOCAINETM, 리도카인과 같은 국소 마취제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체 내에 벤질 알콜 및 기타 보존제와 같은 첨가제도 포함할 수 있다. 본 업계의 숙련자는 기타 약제학적으로 허용가능한 활성성분 및 첨가제를 쉽게 이해한다.

[0099] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, δ -PKC 활성화제,는 인슐린 및 인슐린 유사체로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나이다.

[0100] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, 인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, 인슐린 글라진, 비스파틴, 및 L- α -포스파티딜이노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타암모늄 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나이다. 다른 인슐린 유사체의 예는 인슐린 글루리신, 인슐린 디테미어(detemir), 및 알부민을 포함한다. 이들 인슐린 유사체 중 일부는 상표 APIDRA®, HUMALOG®, LANTUS®, LEVEMIR®, NOVOLIN®, HUMULIN®, NOVOLOG®로서도 공지되어 있다. 또한, HUMULIN® R은 0.16 mg/ml 글리세린 및 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 염화 아연을 포함하도록 제제화될 수 있다. 이들 HUMULIN® R 조성물의 pH는 1 N 염산 또는 1 N 수산화나트륨을 사용하여 pH 7.4로 조정될 수 있다. 본명세서에서 개시된 본 조성물은 상기에서 기술된 Zn^{2+} 이온을 포함하는 HUMULIN® R 인슐린 유사체 제제의 성분도 또한 포함할 수 있다.

[0101] 비스파틴은 서열 식별 번호: 63에서 나타난 인간(*Homo sapiens*) 비스파틴 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 비스파틴은 서열 식별 번호: 64에서 나타난 생쥐(*Mus musculus*) 비스파틴 아미노산 서열도 또한 포함할 수 있다. 본업계의 숙련자는 서열 식별 번호: 63 또는 서열 식별 번호: 64에 대해 90% 이상 동일성, 또는 95% 이상 동일성을 갖는 분자 또는 이들의 생물학적으로 활성인 단편 또는 변이체와 같은 기타 비스파틴 분자를 이해한다. 부가적으로, 본 업계의 숙련자는 아미노 말단 메티오닌 잔기가 대표적으로 비스파틴과 같은 폴리펩티드 사슬의 성숙 형태로부터 절단되고 나머지는 인 비보에서 발현됨을 이해한다.

- [0102] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, 인슐린은 인간 인슐린, 소 인슐린, 및 돼지 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나이다.
- [0103] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, 인슐린은 재조합적으로 발현된다. 재조합 DNA를 사용한 숙주 세포의 형질전환에 의한 재조합 발현은 본업계의 숙련자에게 널리 공지된 종래의 기술에 의해 수행할 수 있다. 숙주 세포는 원핵, 고세균(archaeal), 또는 진핵 세포일 수 있다. 재조합 인슐린 펩티드 사슬과 같은 재조합적으로 발현된 폴리펩티드의 분리 및 정제는 예를 들면, 분취용 크로마토그래피 및 항체 또는 주어진 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 기타 분자를 이용한 친화성 정제를 포함하는 널리 공지된 기술에 의해 수행될 수 있다.
- [0104] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, α -PKC 저해제는 (S)-2,6-디아미노-N-[(1-(1-옥소트리데실)-2-피페리딘)메틸]헥산아미드 이염산 수화물; 4'-N-벤조일 스타우로스포린; 비스인돌릴말레이미드 IX, 메탄설폰산 염; 12-(2-시아노에틸)-6,7,12,13-테트라하이드로-13-메틸-5-옥소-5H-인돌로[2,3-a]피롤로[3,4-c]카바졸; 2-[1-(3-디메틸아미노프로필)-1H-인돌-3-일]-3-(1H-인돌-3-일) 말레이미드; 및 아프로노카르센으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나이다. 본 업계의 숙련자는 본 조성물에서 PKC 저해제는 염, 수화물, 및 복합체의 형태일 수 있음을 이해한다. 부가적으로, 본 업계의 숙련자는 PKC 저해제를 개시된 조성물 내에 조합시킬 수 있음을 이해한다.
- [0105] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, α -PKC 저해제는 서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호: 3, 서열 식별 번호: 4, 서열 식별 번호: 5, 서열 식별 번호: 6, 서열 식별 번호: 7, 서열 식별 번호: 8, 서열 식별 번호: 9, 서열 식별 번호: 10, 서열 식별 번호: 11, 서열 식별 번호: 12, 서열 식별 번호: 13, 서열 식별 번호: 14, 서열 식별 번호: 15, 서열 식별 번호: 16, 서열 식별 번호: 17, 서열 식별 번호: 18, 서열 식별 번호: 19, 서열 식별 번호: 20, 서열 식별 번호: 21, 서열 식별 번호: 22, 서열 식별 번호: 23, 서열 식별 번호: 24, SEQ ID NO: 26, 서열 식별 번호: 27, 서열 식별 번호: 28, 서열 식별 번호: 29, 서열 식별 번호: 30, 서열 식별 번호: 31, 서열 식별 번호: 32, 서열 식별 번호: 33, 서열 식별 번호: 34, 서열 식별 번호: 35, 서열 식별 번호: 36, 서열 식별 번호: 37, 서열 식별 번호: 38, 서열 식별 번호: 39, 서열 식별 번호: 40, 서열 식별 번호: 41, 서열 식별 번호: 42, 서열 식별 번호: 43, 서열 식별 번호: 44, 서열 식별 번호: 45, 서열 식별 번호: 46, 서열 식별 번호: 47, 서열 식별 번호: 48, 서열 식별 번호: 49, 서열 식별 번호: 50, 서열 식별 번호: 51, 서열 식별 번호: 52, 서열 식별 번호: 53, 서열 식별 번호: 54, 및 서열 식별 번호: 55에서 나타난 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나이다.
- [0106] 그러한 펩티드는 α -아미노 기의 t-BOC 또는 FMOC 보호와 같은 통상 사용되는 방법에 의해 합성될 수 있다. 두 방법은 모두 펩티드의 카르복시 말단으로부터 시작하여 각 단계에서 단일 아미노산이 부가되는 단계적 합성을 수반한다(Coligan et al., Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991, Unit 9). 본 발명의 펩티드는 0.1-1.0 mMol 아민/g 중합체를 함유하는 코폴리(스티렌-디비닐벤젠)을 사용하여 Merrifield(85 J. Am. Chem. Soc. 2149(1962)), 및 Stewart 및 Young, Solid Phase Peptide Synthesis, (Freeman, San Francisco, 1969, pp.27-62)에 기술된 널리 공지된 고체상 펩티드 합성법에 의해서도 합성될 수 있다. 화학적 합성이 완료되면, 펩티드를 탈보호하여, 0°C에서 약 1/4-1 시간 동안 액체 HF-10% 아니졸로 처리함으로써 중합체로부터 분리할 수 있다. 시약들을 증발시킨 후, 1% 초산 용액을 사용하여 중합체로부터 펩티드를 추출한 후, 동결건조하여 크루드 물질을 얻는다. 이것을 5% 초산을 용매로 사용하여 Sephadex G-15 상에서 겔 여과와 같은 기술을 사용하여 통상 정제시킬 수 있다. 칼럼의 적절 분획을 동결건조하면 동질 펩티드 또는 펩티드 유도체를 얻고, 이들은 아미노산 분석, 박층 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피, 자외선 흡수 스펙트로스코피, 물 회전, 및 용해도 기초 방법과 같은 표준 기술에 의해 특성화할 수 있다.
- [0107] 포유동물 세포, 곤충 세포, 이스트 및 박테리아, 및 인 비트로 전사 및 번역 시스템과 같은 세포 없는 시스템에서 단백질의 재조합 발현과 같은 어떠한 생물학적 방법에 의해서도 펩티드를 합성할 수 있다. 널리 확립된 방법에 의해 각 시스템에 대해 단백질 발현을 최적화할 수 있다. 표준 방법(Frederich M. Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, 1989)에 의해 단백질을 정제할 수 있다. 예를 들면, GST-융합 단백질과 같은 박테리아 내에서 단백질을 발현시키고(Erangement 및 Neel, Analytical Biochemistry, 210:179, 1993)에서 기술된 바와 같이 글루타치온 아가로스 비드(Sigma)에 의해 정제시킬 수 있다. 택일적으로, 단백질을 포유동물 세포 내에서 분비성 생성물로서 발현시키고 순화 배지로부터 정제할 수 있다(Cadena 및 Gill, Protein Expression and Purification 4:177, 1993). Merrifield의 방법에 의해 제조된 펩티드는 the Applied Biosystems 43 1A-01 Peptide Synthesizer(Mountain View, Calif.)와 같은 자동화 펩티드 합성기 또는 Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:5131(1985)에 의해 기술된 수동 펩티드 합성 기

술을 사용하여 합성될 수 있다. 펩티드는 공유결합 변조, 액체-상 펩티드 합성, 또는 본 업계의 숙련자에게 공지된 어떠한 다른 방법에 의해서도 합성될 수 있다.

- [0108] 펩티드는 아미노산 또는 아미노산 유사체를 사용하여 합성될 수 있고, 그의 활성 기는 예를 들면, t-부틸디카르보네이트(t-BOC) 기 또는 플루오레닐메톡시 카르보닐(FMOC) 기를 사용하여 필요시 보호될 수 있다. 아미노산 및 아미노산 유사체는 상업적으로 구입가능하거나(Sigma Chemical Co.; Advanced Chemtec) 또는 업계에서 공지된 방법을 사용하여 합성할 수 있다.
- [0109] 본명세서에서 개시된 펩티드 내 아미노산은 예시된 펩티드에서 나타난 하나 이상의 특이적 아미노산의 아미노산 치환에 의해 변조될 수 있다. 아미노산 치환 변경은 다른 염기성 아미노산에 대한 염기성 아미노산의 치환, 다른 소수성 아미노산에 대한 소수성 아미노산의 치환 또는 그 밖의 보존적 치환을 포함한다. 아미노산 치환은 예를 들면, 오르니틴(Orn) 또는 Arg에 대한 호모아르기닌(homoArg)과 같은 비-자연적으로 발생하는 아미노산의 사용을 또한 포함할 수 있다.
- [0110] 펩티드는 다른 분자의 공유결합적 부착, 또는 펩티드 내에 존재하는 관능기의 반응에 의해서도 또한 변조될 수 있다. 그러한 변조의 예는 폴리에틸렌글리콜 분자, 지질, 탄수화물, 또는 그 밖의 분자의 부착을 포함한다. 그러한 변조의 특이적 예는 미리스토일화 및 아미드화를 또한 포함한다. 펩티드의 공유결합 변조 기술은 업계에서 널리 공지되어 있고 통상의 숙련자는 그러한 여러 가지 기술을 이해한다.
- [0111] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, α -PKC 저해제는 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖고 카르복시 말단에서 아미드화되어 있는 서열 식별 번호: 25에서 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드이다.
- [0112] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, α -PKC 저해제는 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는 서열 식별 번호: 1에 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드이다.
- [0113] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체는 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na_2HPO_4 를 포함하는 수성 담체이다.
- [0114] 본 발명의 또다른 측면은 인슐린; 아미노 말단에서 미스트로일화 아미노산 잔기를 갖는 서열 식별 번호: 1에 나타난 아미노산 서열로 구성된 펩티드; 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없고 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L 무수 KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 및 1.15 g/L 무수 Na_2HPO_4 를 포함하는 수성인 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다.
- [0115] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, 본 조성물은 약 0.0001 단위/L 내지 약 0.1 단위/L의 인슐린 및 약 1 μM 내지 약 100 μM 의 펩티드를 포함한다.
- [0116] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, 본 조성물은 0.0001 단위/L의 인슐린 및 1 μM 의 펩티드를 포함한다.
- [0117] 본 발명의 또다른 측면은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체, 및 약물 용리 지지체를 포함하는 조성물이다. 이 약물 용리 지지체는 약제학적 조성물을 송달할 수 있는 어떠한 고체 상 구조일 수 있다. 약물 용리 지지체는 본 약제학적 조성물을 유지하고, 확산, 모세관 작용, 중력, 또는 기타 분자를 이동시키는 물리적 과정에 의해 시간에 걸쳐 약물을 송달할 수 있다. 약물 용리 지지체는 예를 들면, 적층 또는 직조 섬유, 섬유상 매트, 발포체, 겔, 서로 다른 고체의 매트릭스 또는 기타 고체상 구조를 포함할 수 있고, 예를 들면 스텐트와 같이 어떠한 형태로 제공될 수 있다. 본 업계의 숙련자는 그 밖의 적절한 약물 용리 지지체를 이해한다.
- [0118] 본 조성물의 한 구체예에서, 약물 용리 지지체는 다공성 고체를 포함한다. 그러한 다공성 고체의 예는 스폰지, 발포체, 거즈, 겔, 또는 그 밖의 매트릭스를 포함한다. 본업계의 숙련자는 기타 약물 용리 지지체의 예를 이해한다.
- [0119] 본 조성물의 한 구체예에서, 약물 용리 지지체는 스폰지이다.
- [0120] 본 발명의 또다른 측면은 a) δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허

용가능한 담체를 제공하는 단계; 및 b) δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 상기 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 조합하는 단계; 이에 의해 본 약제학적 조성물이 생성되는 것을 포함하는 과정에 의해 생성되는 약제학적 조성물이다.

[0121] 본 명세서에서 개시된 기타 조성물은 본 조성물의 성분을 제공하는 단계 및 이들 성분을 조합하여 그러한 조성물을 생성하는 단계를 수반하는 공정에 의해 또한 생성될 수 있다.

[0122] 본 발명의 또다른 측면은 a) δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및 b) 동물에 대해 본 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 피부 창상의 봉쇄가 증가되는 것을 포함하는 동물에 대해 피부 창상의 봉쇄를 증가시키기 위한 방법이다.

[0123] 피부 창상 봉쇄는 정상 조직을 포함하는 창상의 침범되지 않는 가장자리를 확인하고 치료되지 않은 창상의 가장자리 내의 면적을 결정함으로써 평가될 수 있다. 창상 가장자리 내 비처치된 면적이 이전의 측정치와 비교하여 감소된 때에 창상 봉쇄가 일어난다. 궁극적으로, 피부 창상 봉쇄 증가는 비처치된 영역이 없이 창상이 완전히 봉쇄되는 것을 유발한다. 본 업계의 숙련자는 창상 봉쇄 기술 및 창상이 증가되었는지 아닌지를 측정하는 그 밖의 기술을 이해한다.

[0124] 본 업계의 숙련자는 조직학, H & E 염색, 케라틴 14 염색, 또는 면역화학 또는 본 업계의 숙련자에 의해 용이하게 수행되는 일상적 실험에 의해 농양 형성, 과도한 백혈구 증가, 및 혈관 내 높은 RBC/WBC 비를 관찰함으로써 본 약제학적 조성물의 유효량을 결정할 수 있다. 본 업계의 숙련자는 치료 이전과 치료후 적절한 시간 이후 창상 영역의 변화를 단순히 관찰 또는 측정함으로써 피부 창상이 있는 개체에 본 약제학적 조성물의 유효량이 투여되었는지를 또한 확인할 수 있다.

[0125] 본 발명의 방법에 있어서 투여에 적절한 약제학적 조성물은 용액, 연고제, 유액, 크림제, 젤제, 과립제, 필름제 및 플라스틱제의 형태로 제공될 수 있다. 본 업계의 숙련자는 투여에 적절한 본 약제학적 조성물의 그 밖의 형태를 이해한다.

[0126] 본 발명의 또다른 측면은 a) δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및 b) 동물에 대해 본 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 피부 창상의 부위에서의 염증이 감소되는 것을 포함하는 동물에 대해 피부 창상 부위의 염증을 감소시키기 위한 방법이다.

[0127] 과도한 백혈구 증가(고정배율x200에서 >100 세포); 및 혈관 내 >20%의 WBC 함량이 고정배율(x200)에서 나타나는 혈관 내에서의 높은 WBC/RBC(백혈 세포/적혈 세포) 비;의 파라미터 중 적어도 두 가지가 창상 영역의 피부 창상 농양 형성 부위에 존재할 때, 염증이 발생한다. 피부 창상 부위에 상기 파라미터가 없거나 단지 하나뿐인 경우 염증이 감소된 것을 간주될 수 있다. 또한, 피부 창상 부위에서의 염증은 부종, 발적, 화농 등과 같은 기타 널리 알려진 임상적 징후에 의해 평가될 수 있다. 이들 임상 징후의 중증도가 감소되거나 또는 완전히 없어진 경우 염증은 감소된 것으로 간주될 수 있다. 본 업계의 숙련자는 기타의 염증 평가 및 염증 감소 평가 기술을 또한 이해한다.

[0128] 본 발명의 또다른 측면은 인슐린 또는 인슐린 유사체 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다.

[0129] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, 본 조성물은 약 0.0001 단위/L 내지 약 0.1 단위/L의 인슐린 또는 인슐린 유사체를 포함한다.

[0130] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, 본 조성물은 약 0.0001 단위/L의 인슐린 또는 인슐린 유사체를 포함한다.

[0131] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, 본 조성물은 약 0.0001 단위/L 내지 약 0.1 단위/L의 인슐린 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한다.

[0132] 본 발명의 또다른 측면은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및 본 약제학적 조성물의 유효량을 당뇨병 케양 창상, 말단 궤양 창상, 욕아 조직 창상, 외과적 창상, 만성 일광 농양 창상, 및 골수염 창상으로 구성된 군으로부터

선택되는 적어도 하나인 동물의 피부 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 창상의 봉쇄가 증가되는 것을 포함하는 동물에 대한 피부 창상 봉쇄 증가 방법이다.

[0133] 본 발명의 또다른 측면은 δ -PKC 활성화제, α -PKC 저해제, 및 K^+ 양이온을 함유하고 Ca^{+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다. K^+ 양이온 공급원의 예는 염화칼륨(KCl), 중탄산칼륨($KHCO_3$), 및 인산칼륨(KH_2PO_4)을 포함한다. 본 업계의 숙련자는 기타 K^+ 양이온 공급원을 쉽게 이해한다.

[0134] 본 발명의 또다른 측면은 δ -PKC 활성화제, 및 K^+ 양이온을 함유하고 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다.

[0135] 본 발명의 또다른 측면은 α -PKC 저해제, 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이다.

[0136] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, 본 약제학적 조성물은 약 1 μM 내지 약 100 μM 의 α -PKC 저해제 펩티드를 포함한다.

[0137] 본 발명의 본 조성물 및 방법의 어떤 구체예에서, 본 약제학적 조성물은 1 μM 의 α -PKC 저해제 펩티드를 포함한다.

[0138] 본 발명의 또다른 측면은 α -PKC 저해제 및 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 양이온이 없는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및 동물에 대해 본 약제학적 조성물의 유효량을 피부 창상에 투여하는 단계; 이에 의해 피부 창상의 부위에서의 염증이 감소되는 것을 포함하는 동물에 대해 피부 창상 부위의 염증을 감소시키기 위한 방법이다.

[0139] 실시예

[0140] 재료 및 실험 방법

[0141] **재료:** 조직 배양 배지 및 혈청을 Biological Industries

[0142] (Beit HaEmek, Israel)로부터 구입하였다. BioRad(Israel)로부터 구입한 키트를 사용하여 고도화학발광(ECL)을 수행하였다. 모노클로날 항 p-tyr 항체를 Upstate Biotechnology Inc.(Lake Placid, NY, USA)로부터 구입하였다. PKC 이소형태에 대한 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 Santa Cruz(California, USA) 및 Transduction Laboratories(Lexington, KY)로부터 구입하였다. 양고추냉이 펩톡시다제-항-토끼 및 항-마우스 IgG를 Bio-Rad(Israel)로부터 구입하였다. 류펩틴, 아프로티닌, PMSF, DTT, Na-오르토바나데이트, 및 펩스타틴을 Sigma Chemicals(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 인슐린(humulinR-재조합 인간 인슐린)을 Eli Lilly France SA(Fergersheim, France)로부터 구입하였다. IGF1을 Cytolab(Rehovot, Israel)로부터 구입하였다. 케라틴 14 항체를 Babco-Convance(Richmond, CA)로부터 구입하고 BDGF-BB을 R&D systems(Minneapolis)로부터 구입하고 미리스톨화 PKC α 위기질을 Calbiochem(San Diego, CA)로부터 구입하였다. 급속 세포 증식 키트를 Calbiochem(San Diego, CA)로부터 구입하였다.

[0143] 사용된 인슐린 유사체는 인슐린 리스프로(HUMALOG®, Eli Lilly), 인슐린 아스파르트(NOVOLOG®, Novo Nordisk), 인슐린 글라진(LANTUS®, Sanofi Aventis), 및 레글러 재조합 인간 인슐린(HUMULIN® R, Eli Lilly)이었다. 사용된 부가적인 인슐린 유사체는 쥐 비스파틴(ALEXIS Corporation, Lausen, Switzerland, 생성물 번호 ALX-201-318-C050) 및 L- α -포스파티딜이노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타암모늄 염(Calbiochem; 카탈로그 번호 제 524615호)(L- α)이었다.

[0144] 케라틴 1 특이적 항체 및 웨스턴 블로팅 2차 항체는 상업적으로 구입가능하다.

[0145] **쥐 케라티노사이트의 분리 및 배양:** 1차 케라티노사이트를 위에서 기재한 바와 같이 신생 피부로부터 분리하였다. 케라티노사이트를 8% Chelex(Chelex-100, BioRad)처리된 태아 소 혈청을 함유하는 이글 최소 필수 배지(EMEM) 내에서 배양하였다. 증식성 기저 세포 표현형을 유지하기 위해, 최종 Ca^{2+} 농도를 0.05 mM로 조정하였다. 콜로니 형성 5 내지 7일 후 실험을 수행하였다.

[0146] 배지 A 및 B는 모두 8% CHELEX™ 처리된 태아 소 혈청을 함유하는 Biological Industries(Israel)로부터의 EMEM 이글 최소 필수 배지이었다. CHELEX™은 자유 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 이온에 결합하여 이들 이온이 배양 세포에 생

물학적으로 이용되는 것을 방지하는 강력한 킬레이터이다. 배지 A는 KCl을 함유하지 않고, 배지 B는 KCl 0.4 mg/ml을 함유한다.

- [0147] **면역침강용 세포 용해물의 제조:** 케라티노사이트를 함유하는 배양 접시를 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -없는 PBS로 세척하였다. 세포를 기계적으로 떼어내고 프로티아제와 포스파타제의 혼합물(20 μg 류펩틴; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아프로티닌; 0.1 mM PMSF; 1 mM DTT; 200 μM 오르토바나데이트; 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 펩스타틴)을 함유하는 RIPA 완충제(50 mM 트리스-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM NaF; 0.1% SDS, 1% 데옥시콜린산나트륨) 내에 용해시켰다. 이 제제를 4℃에서 20분간 최대 속도에서 마이크로원심분리기 내에서 원심분리시켰다. 상청액을 면역침강용으로 사용하였다.
- [0148] **면역침강:** 상기 용해물을 25 μL 의 단백질 A/G 세파로스(Santa Cruz, CA, USA)와 함께 300 μg 세포 용해물과 혼합함으로써 예비정제(preclear)시키고, 그 현탁액을 4℃에서 30분간 연속 회전시켰다. 이 제조물을 이후 4℃에서 10분간 최대 속도에서 원심분리시키고, 30 μL 의 A/G 세파로스를 특이적 폴리클로날 또는 모노클로날 항체와 함께 개별 항체(희석율 1:100)에 부가시켰다. 이 샘플을 4℃에서 밤새 회전시켰다. 이 현탁액을 이후 4℃에서 10분간 최대 속도에서 원심분리시키고, 상기 펠렛을 RIPA 완충제로 세척하였다. 이 현탁액을 다시 15,000 x g(4℃에서 10분간)로 원심분리시키고 TBST로 네 번 세척시켰다. 샘플 완충제(0.5 M 트리스-HCl pH 6.8; 10% SDS; 10% 글리세롤; 4% 2- β -메르캅토에탄올; 0.05% 브로모페놀 블루)를 부가시키고, 샘플을 5분간 끓이고, 이후 SDS-PAGE 처리시켰다.
- [0149] **아데노바이러스 축조물:** 재조합 아데노바이러스 벡터를 Saito et al. 54 J. Virol. 711(1985)에 의해 위에서 기재한 바와 같이 축조하였다.
- [0150] **PKC 이소형태 유전자를 사용한 케라티노사이트의 형질도입:** 배양 배지를 흡인하고 케라티노사이트 배양물을 PKC α 와 같은 특이적 PKC 이소형태를 엔코딩하는 PKC 재조합 아데노바이러스로 한 시간동안 감염시켰다. 배양물을 이후 MEM으로 두 번 세척하고 재공급시켰다. 10 시간 후-감염 세포를 혈청-없는 낮은 Ca^{2+} -함유 MEM으로 24 시간 동안 도입시켰다.
- [0151] **PKC 활성화:** 적절한 처리 후 케라티노사이트 배양물로부터 바로 제조한 면역침강물 내에서 특이적 PKC 활성을 결정하였다. 이들 용해물을 NaF가 없는 RIPA 완충제 내에서 제조하였다. SignaTECT 단백질 키나제 C 분석 시스템(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 제조자의 설명서에 따라 활성을 측정하였다. PKC α 위기질을 이들 연구에서 기질로서 사용하였다.
- [0152] **세포 증식:** 6 웰 플레이트에서 [^3H]티미딘 취입에 의해 세포 증식을 측정하였다. 세포를 [^3H]티미딘(3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)으로 한 시간 동안 진동시켰다. 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 5번 세척시키고 5% TCA를 각 웰에 한 시간 동안 부가시켰다. 용액을 제거하고, 세포를 1 M NaOH 내에 용해시켰다. 세포 내로 취입된 표식 티미딘을 TRI-CARB™ 액체 신타레이션 카운터의 ^3H -윈도우 내에서 계산하였다.
- [0153] **PKC 이뮤노키나제 분석:** 정제되어 표준화된 PKC 아이소자임을 고맙게도 Dr. P. Blumberg(NCI, NIH, 미국) 및 Dr. Marcello G. Kazanietz(University of Pennsylvania, School of Medicine)로부터 공급받았다. 1차 케라티노사이트를 500 μl 1% Triton Lysis 완충제(1 x PBS 내 1% Triton-X 100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아프로티닌 및 류펩틴, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 펩스타틴, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 200 μM Na_2VO_4 , 10 mM NaF) 내에서 수확하였다. 용해물을 4℃에서 30분간 인큐베이션하고, 16,000 x g에서 4℃에서 30분간 회전시켰다. 상청액을 신선한 관 내로 도입시켰다. 항- $\alpha 6/\text{GoH3}$ (PharMingen) 5 $\mu\text{g}/\text{샘플}$ 및 단백질 A/G-Plus 아가로스 슬러리(Santa Cruz)의 30 $\mu\text{l}/\text{샘플}$ 을 사용하여 세포 용해물의 면역침강을 4℃에서 밤새 수행하였다. 비드를 RIPA 완충제로 한번, 50 mM 트리스/HCl pH 7.5로 두 번 세척시켰다. 35 μL 의 반응 완충제(1 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 , 50 mM 트리스-HCl pH 7.5)을 각각의 분석물에 부가시켰다. 각각의 분석물에, DMSO 또는 10 mM TPA를 함유하는 5.5 μl 의 인지질 소포 현탁액/분석물을 특이적 PKC 아이소자임의 표준량과 함께, 슬러리에 부가시켰다. 10 μl 125 mM ATP(1.25 $\mu\text{Ci}/\text{분석물}$ [γ - ^{32}P] ATP, Amersham)/분석물을 부가시킴으로써 반응을 개시하고, 30℃에서 10분간 계속 방치하였다. 비드를 이후 RIPA 완충제로 두 번 세척시켰다. 30 μl 단백질 로딩(load) 염료(3 x Laemmli, 5% SDS)/샘플을 부가시키고 상기 샘플을 수욕 내에서 5분간 끓였다. 단백질을 8.5% 겔 상에서 SDS-PAGE에 의해 분리하고, Protran 막(Schleicher & Schuell)으로 이동시키고 오토라디오그래피에 의해 가시화시켰다. PKC 활

성에 대한 대조구로서, 히스톤 인산화 및 PKC 기질 펩티드의 인산화를 사용하였다.

[0154] **인 비보 절개 창상 발생 및 염증 유발:** 마취된 C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 위쪽 등(back)에 대해 전체 두께 (20mm 길이) 피부 절개를 수행하였다.

[0155] **기타 기술:** 웨스턴 블로팅 등의 기타 기술을 Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(3d ed, 2001)에 기술된 것과 같이 업계에서 널리 공지되어 있는 표준 프로토콜을 사용하여 수행하였다.

[0156] 실시예 및 도면에서, PKC α 저해제는 특별히 기재하지 않는 한 서열 식별 번호: 1에서 나타난 미리스톨화 펩티드이다. 유사하게, 인슐린은 특별히 기재하지 않는 한 인간 재조합 인슐린이고, "인슐린," "USP 인슐린," 또는 "Ins USP"로 표시된다.

[0157] 실시예 1

[0158] 다양한 제제로 제조된 인슐린(10^{-6} M; 0.1 단위/ml) 및 PKC α 저해제(Myr-위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M)를 사용하여 인 비트로 창상 치료의 효능을 결정하기 위해 다음 실험을 수행하였다.

[0159] 일단, 쥐 케라티노사이트를 분리하고 배양하였다. 간단히, Alt et al. 2004; Li et al. 1996에 따라 신생 피부로부터 1차 케라티노사이트를 분리하였다. 케라티노사이트를 8% Chelex(Chelex-100, BioRad)처리된 태아 소 혈청을 함유하는 이글 최소 필수 배지(EMEM) 내에서 배양하였다. 증식성 기저 세포 표현형을 유지하기 위해, 배양 배지 내 최종 Ca^{2+} 농도를 0.05 mM로 조정하였다.

[0160] 5일 후, 컨플루언트(confluent) 케라티노사이트에 대해 인 비트로 스크래치 분석을 하고 이후 창상을 치료하였다. 창상 형성 후, 인슐린 + PKC α 저해제를 제제 A, Dulbecco's 인산염-완충된 식염수(DPBS--); 제제 B, 인산염-완충된 식염수(PBS) 함유 인산염, 칼륨, 칼슘 및 마그네슘; 제제 C, 트리스 하이드록시메틸아미노에탄(CAS 제 [77-86-1]호) 및 제제 D, 트리스 하이드록시메틸아미노에탄(CAS 제 [77-86-1]호) 및 KCl 0.4 mg/ml 함유;의 다양한 제제 내의 세포 배양물에 부가시켰다. 제제를 대략 7.2 pH에서 공급하였고, 주어진 삼투압을 유지하기 위해 필요한 염 등과 같은 다른 성분을 포함할 수 있다.

[0161] 창상 봉쇄는 다음과 같았다. 24 시간 이후, 제제 A 내의 인슐린 + PKC α 저해제로 처리된 배양물만이 비처리 대조구와 비교하여 창상의 봉쇄를 보였다. 이 실험은 삼중으로 수행되었다. 대표적인 세포 배양 접시를 도 1A에 나타낸다. 도 1B는 치료 24 시간 후 봉쇄%로서 창상 봉쇄를 나타낸다($p < 0.05$).

[0162] 실시예 2

[0163] 다양한 제제로 제조된 인슐린 및 PKC α 저해제에 의해 매개된 창상 봉쇄를 더욱 평가하기 위해 다음 실험을 수행하였다.

[0164] 마취된 C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 위쪽 등에 대해 전체 두께(20mm 길이) 피부 절개를 수행하였다. 절개 후, 상기에서 기술된 바와 같은 다양한 제제(제제 A-C) 내 인슐린(10^{-6} M; 0.1 단위/ml); 위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M(PKC α 저해제); 또는 인슐린 + PKC α 저해제(Myr-위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M 및 인슐린 0.1 단위)를 창상 위에 직접 도포하여 창상을 날마다 처리하였다.

[0165] 7일 후, 창상을 절제하고 창상의 형태학 및 조직학을 검사함으로써 치료된 창상의 퍼센트를 평가하였다. 결과를 그룹 당 전체 창상 수에 대해 치료된 창상의 퍼센트로서 나타낸다. 제제 B 및 제제 C에서의 창상의 최소 봉쇄와 비교하여, 제제 A 내 인슐린 + PKC α 저해제의 치료에 의해 극적으로 창상의 완전한 치료를 유도하였다. 모든 제제에 대해, 인슐린 또는 위기질 펩티드 단독은 제제 단독으로만 치료된 대조 그룹과 비교하여 창상 치료를 촉진시키지 않았다. 결과를 도 2A에 나타내었다. 창상 치료 7일 후의 대표적인 사진을 도 2B에 제공한다.

[0166] 실시예 3

[0167] 위기질 PKC α 펩티드(PKC α 저해제)의 항염증 효과를 평가하기 위해 다음 실험을 수행하였다.

[0168] 마취된 C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 위쪽 등에 대해 전체 두께(20mm 길이) 피부 절개를 수행하였다. 절개 후, 상기에서 기술된 다양한 제제(제제 A-C) 내 Myr-위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M를 창상 위에 직접 도포하여 창상을 날마다 처리하였다. 7일 후, 창상을 절제하고 조직학 및 면역조직화학을 수행하였다. 다음 세 개의 파라미터 중 적어도 두 개가 창상 갭에 존재할 때 염증 부담이 심하다고 간주하였다: (1) 창상 영역에서 농양 형성, (2) 과도한 백혈구 증가(고정배율 x200에서 >100 세포), (3) 혈관 내 >20%의 WBC 함량이 고정

배울(x200)에서 나타나는, 혈관 내에서의 높은 WBC/RBC(백혈 세포/적혈 세포) 비. 결과를 그룹 내 여러 가지 창상과 비교하여 중증 염증을 갖는 창상 퍼센트로서 요약하고 나타낸다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 제제 A 내에 위기질 PKC α 펩티드를 적용할 때만이, 심한 염증의 상당한 감소가 관찰되었다. 제제 B 또는 제제 C 내에서의 처치를 적용할 때는 염증 부담의 경감이 보이지 않았다.

[0169] 실시예 4

[0170] 과립 조직 형성에 대한 본 약제학적 조성물의 효과를 평가하기 위해 다음 실험을 수행하였다.

[0171] 마취된 C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 위쪽 등에 대해 전체 두께(20mm 길이) 피부 절개를 수행하였다. 절개 후, 상기에서 기술된 다양한 제제(제제 A-C) 내 Myr-위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M 및 인슐린 0.1 단위/ml를 창상 위에 직접 도포하여 창상을 날마다 처치하였다.

[0172] 7일 후, 창상을 절제하고, 고정하고, 표준 방법에 따라 H&E 염색 이후 조직학적으로 평가하였다. 육아 조직 형성을 H&E 염색을 사용하여 평가하고 창상 부위에서 전체 창상 영역 중 형성된 육아 조직의 퍼센트에 따라 점수화하였다. 인슐린 + PKC α 저해제로 처치되었을 때, 제제 A 내 인슐린 + PKC α 저해제로 날마다 처치한 창상만이 대조구 및 상기 제제 B 및 제제 C 처치 그룹과 비교하여 육아 조직 형성에 있어서 상당한 증가를 나타내었다. 결과를 도 4에 나타낸다.

[0173] 실시예 5

[0174] 제제의 함량이 PKC α 활성을 저해하는 위기질 PKC α 펩티드의 능력에 영향을 미치는지를 확인하기 위해 다음 실험을 수행하였다.

[0175] 쥐 케라티노사이트를 분리하고 상기에서 기술된 바와 같이 배양하였다. 5일 후, 컨플루언트(confluent) 케라티노사이트를 PKC α 재조합 아데노바이러스로 감염시켰다. 재조합 아데노바이러스 벡터를 Alt et al. 2001; Alt et al. 2004; Gartsbein et al. 2006에 기술된 바와 같이 축조하였다. 케라티노사이트 배양물을 PKC 재조합 아데노바이러스를 함유한 상청액으로 한 시간 동안 감염시켰다. 배양물을 이후 MEM로 두 번 세척시키고 재공급시켰다. 10 시간 후-감염 세포를 혈청-없는 낮은 Ca^{2+} -함유 MEM에 24 시간 동안 도입시켰다.

[0176] 감염 24 시간 후, 세포를 상기에서 기술된 바와 같은 다양한 제제 내(제제 A 및 B)의 PKC α 저해제(My-위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M)로 15분간 처치하였다.

[0177] 세포 추출물에 대해 이후 PKC 활성 분석을 수행하였다. 일단, 1차 케라티노사이트를 500 μ L의 1% Triton Lysis 완충제(1 x PBS 내 1% Triton-X 100, 10 μ g/ml 아프로티닌 및 류펩틴, 2 μ g/ml 펩스타틴, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 200 μ M Na_2VO_4 , 10 mM NaF) 내에서 수확하였다. 용해물을 이후 4°C에서 30분간 인큐베이션하고, 16,000 x g에서 30분간 4°C에서 회전시켰다. 상청액을 신선한 관 내로 도입시켰다. 항- α 6/GoH3(PharMingen) 항체 5 μ g/샘플 및 단백질 A/G-Plus 아가로스 슬러리(Santa Cruz) 30 μ l/샘플을 사용하여 4°C에서 밤새 세포 용해물의 면역침강을 수행하였다. 비드를 RIPA 완충제로 한번, 50 mM 트리스/HCl pH 7.5로 두 번 세척시켰다. 35 μ L의 반응 완충제(1 mM $CaCl_2$, 20 mM $MgCl_2$, 50 mM 트리스-HCl pH 7.5)을 각각의 분석물에 부가시켰다. 각각의 분석물에, DMSO 또는 10 mM TPA를 함유하는 5.5 μ l의 인지질 소포 현탁액/분석물을 특이적 PKC 아이소자임의 표준량과 함께, 슬러리에 부가시켰다. 10 μ l 125 mM ATP(1.25 μ Ci/분석물 [γ -32P] ATP, Amersham)/분석물을 부가시킴으로써 반응을 개시하고, 30 °C에서 10분간 계속 방치하였다. 비드를 이후 RIPA 완충제로 두 번 세척시켰다. 30 μ l 단백질 로딩(loading) 염료(3 x Laemmli, 5% SDS)/샘플을 부가시키고 상기 샘플을 수 욕 내에서 5분간 끓였다. 단백질을 8.5% 겔 상에서 SDS-PAGE에 의해 분리하고, Protran 막(Schleicher & Schuell)으로 이동시키고 오토라디오그래피에 의해 가시화시켰다. PKC 활성에 대한 양성 대조구로서, 히스톤 인산화 및 PKC 기질 펩티드의 인산화를 사용하였다.

[0178] 특이적 PKC 활성을, SignaTECT 단백질 키나제 C 분석 시스템(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 제조자의 설명서에 따라 측정하였다. PKC α 위기질을 이들 연구에서 기질로서 사용하였다.

[0179] 제제 A 내 PKC α 저해제만이 대조구 제제 및 비처리된 세포 배양 플레이트와 비교하여 과다발현 세포 내 PKC α 활성을 상당히 저해할 수 있었다. 이중으로 실험을 수행하였다. 결과를, PKC α 를 과다발현하는 대조구 세포 내 PKC α 활성과 비교한 PKC α 활성의 감소%로서 도 5에 나타낸다.

[0180] 실시예 6

- [0181] 다양한 제제에서 인슐린에 의해 매개된 인 비트로 창상 봉쇄 및 세포 증식을 평가하기 위해 추가적 실험을 수행하였다.
- [0182] 상기에서 기술된 바와 같이 쥐 케라티노사이트를 분리하고 배양하였다. 5일 후, 컨플루언트(confluent) 케라티노사이트에 대해 인 비트로 스크래치 분석을 하고 이후 창상을 치료하였다. 창상 형성 후, 인슐린(인슐린 10^{-6} M; 0.1 단위/ml)을 상기에서 기술된 다양한 제제(제제 C 및 D) 내의 세포 배양물에 부가시켰다. 이후, 48 시간 동안 창상 봉쇄를 수행하였다. 이 실험을 3중으로 수행하였다. 대표적인 세포 배양 접시를 도 6A에 나타낸다. 도 6B에서, 처치 48 시간 후의 봉쇄로서 창상 봉쇄를 나타낸다.
- [0183] 다음, 6 웰 플레이트에서 티미딘 취입에 의해 창상에서의 배양된 세포 증식을 세포 증식을 측정하였다(도 6C). 세포를 24 웰 플레이트 내에 두고 [^{3} H]티미딘($3 \mu\text{Ci/ml}$)으로 한 시간 동안 진동시켰다. 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 5번 세척시키고 5% TCA를 각 웰에 한 시간 동안 부가시켰다. 이후 이 용액을 제거하고, 세포를 1 M NaOH 내에 용해시켰다. 세포 내로 취입된 표식 티미딘을 액체 신틸레이션 카운터의 ^3H -윈도우 내에서 계산하였다.
- [0184] 도 6A-C에서 나타난 바와 같이, KCl의 부가로, 인슐린-유도 창상 봉쇄 및 세포 증식을 변경시켰다.
- [0185] **실시예 7**
- [0186] 인 비트로 세포 증식에 대한 인슐린 및 인슐린 + PKC α 저해제의 효과에 대한 배지 B 내 케라티노사이트의 예비-인큐베이션의 영향을 평가하였다. 성체 마우스(7-10 개월에서 2년령까지)의 꼬리로부터의 컨플루언트(confluent) 케라티노사이트의 5일된 배양물을 인 비트로 증식하도록 방지하였다. MEM(배지 A) 내에서 5일 후, 성장 배지를 배지 B(상기에서 기술된)로 교환하였다. 상기 배지 교환과 함께 또는 그 24시간 후, 세포를 인슐린 또는 인슐린 + PKC α 저해제로 처치하였다. 세포 증식율을 상업적으로 이용가능한 급속 세포 증식 키트(카탈로그 번호 제 Q1A127호; Calbiochem)로 측정하였다. 실험을 6중으로 수행하였다. 비처리된 세포(대조구)에 대한 퍼센트로서 결과를 나타낸다. 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 배지 B 내 세포의 24 시간 예비-인큐베이션은 세포 증식에 대한 인슐린 및 인슐린 + PKC α 저해제의 효과를 증가시킨다.
- [0187] **실시예 8A**
- [0188] 제제 A(도 8A 아래쪽 부분에서 나타난 결과) 또는 제제 C(도 8A 위쪽 부분에서 나타난 결과) 내에 적용된 인슐린 + PKC α 저해제를 국소 도포함으로써 만성 족부 궤양에 걸린 인간 환자를 날마다 12주 동안 처치하였다. 제제 A 내에 적용된 인슐린 + PKC α 저해제는 12주 후 완전한 봉쇄를 나타낸 반면, 제제 C 내에 적용된 인슐린 + PKC α 저해제로 처치된 환자의 궤양에서는 상당한 치료가 보이지 않았다. 환자 창상이 매주 이어지고 VISITRAK®(Smith & Nephew)를 사용하여 측정하였다. 두 환자 모두의 12주 측정에 대한 창상 폭 및 창상 길이의 추적 그래프를 나타낸다(아래쪽 부분).
- [0189] **실시예 8B**
- [0190] 당뇨병 창상에 걸린 인간 환자를 제제 A(도 8B의 왼쪽 부분에서 나타난 결과) 또는 제제 C(도 8B의 오른쪽 부분에서 나타난 결과) 내에 적용한 인슐린 + PKC α 저해제를 60일간 날마다 국소 도포함으로써 처치하였다. 제제 A 내에 적용된 인슐린 + PKC α 저해제는 60일 후 완전한 봉쇄를 나타낸 반면, 제제 C 내에 적용된 인슐린 + PKC α 저해제로 처치된 창상에서는 상당한 치료가 보이지 않았다. 도 8B은 0일 및 60일에서의 창상의 추적 기록을 나타낸다.
- [0191] **실시예 9**
- [0192] 1년령 암컷 쿼터 말이 몇 달 동안 치료 없이 심한 육아 조직 창상에 걸렸다. 이 창상을 3개월 간 제제 A 내 인슐린 + PKC α 저해제로 날마다 처치하였다. 이 기간 경과후, 창상은 완전히 봉쇄되어 치료되었다. 6개월 추적에서 완전한 조직 재생을 나타내었다.
- [0193] 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0194] **실시예 10**
- [0195] 2년령 말이 골수염을 동반한 만성 일광 농양으로서 진단된 발굽 창상에 걸렸다. 수개월간 이 창상에 대해 어떠

한 치료도 없었다. 제제 A 내 인슐린 + PKC α 저해제를 사용하여, 본 조성물을 창상에 30분간 직접 도포함으로써 날마다 처치를 수행하였다. 도 10에서 나타낸 바와 같이, 1개월 이내의 치료로 창상 크기가 상당히 감소하고, 2개월 이내에 창상이 완전히 봉쇄되고 치료되었다.

[0196] 실시예 11

지속적인 앓음(즉 말단 앓음)으로 인해 발에 창상이 걸린 개를 어떠한 치료 없이 수개월 동안 종래의 처치를 사용하여 처치하였다. 제제 A 내 인슐린 + PKC α 저해제를 사용하여 날마다 처치를 수행하였고, 상기 창상이 완전히 봉쇄되고 2개월 이내에 치료되었다. 3.5개월의 처치 후, 완전한 털 성장이 보였다. 결과를 도 11에 나타내었다.

[0198] 실시예 12

인슐린 유사체 단독이 창상 치료를 촉진하는지를 확인하기 위한 실험을 제제 A 내에 제조된 네 개의 인슐린 유사체에 대해 수행하였다. 마취된 C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 위쪽 등에 대해 전체 두께(20mm 길이) 피부 절개를 수행하였다. 절개 후, 제제 A(상기에서 기술된) 내 0.1 단위/mL의 변이체 인슐린 유사체를 창상 위에 직접 도포하여 날마다 창상을 처치하였다. 실험한 인슐린 유사체는 인슐린 리스프로(HumL), 인슐린 아스파르트(Novo), 인슐린 글라진(LANTUS®), 및 HUMULIN® R(HumR)이었다. 7일 후, 창상을 절제하고, 고정하고 H&E 염색 이후 조직학적으로 평가하였다.

표피 기저층 형성 및 육아 조직 형성을 측정함으로써 창상 치료 퍼센트를 별도로 평가하였다. 표피 기저층 형성을 검출하기 위해 케라틴 14 염색을 사용하여 표피 봉쇄를 평가하였다. 완전한 표피 재축조를 나타내는 창상을 치료되었다고 간주하였다. 육아 조직 형성을 H&E 염색을 사용하여 평가하고 창상 부위에서 전체 창상 영역 중 형성된 육아 조직의 퍼센트에 따라 점수화하였다. >70% 육아 조직의 형성을 나타내는 창상을 치료되었다고 간주하였다.

그 결과, 대조구와 비교하여 제제 A 내 인슐린 유사체 단독은 창상 치료 및 창상 봉쇄를 증가시키는 것을 나타낸다. 결과를 도 16에 나타내었다. 도 16에서, 인슐린 유사체를 상표의 약어로 언급한다: 인슐린 리스프로는 "HumL", 인슐린 아스파르트는 "Novo", 인슐린 글라진은 "LANTUS®", 및 HUMULIN® R은 "HumR".

[0202] 실시예 13

상승 효과를 확인하기 위해, 도 17에 표시된 바와 같이 레귤러의 재조합 인간 인슐린, 및 USP 인슐린, PKC α 위기질 저해 펩티드를 사용한 치료 후 육아 조직의 형성을 평가함으로써 창상 치료를 측정하였다. 마취된 C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 위쪽 등에 대해 전체 두께(20mm 길이) 피부 절개를 수행하였다. 절개 후, 도 17에 표시된 바와 같이, PKC α 위기질 저해 펩티드(1 μ g/ml)로, 또는 0.1 단위/mL의 레귤러 재조합 인간 인슐린, USP 인슐린, 및 제제 A 내 PKC α 위기질 저해 펩티드(1 μ g/ml)를 창상 위에 직접 도포하여 날마다 창상을 처치하였다. 7일 후, 창상을 절제하고, 고정하고 H&E 염색 이후 조직학적으로 평가하였다. 육아 조직 형성을 H&E 염색을 사용하여 평가하고 창상 부위에서 전체 창상 영역 중 형성된 육아 조직의 퍼센트에 따라 점수화하였다. >70% 육아 조직의 형성을 나타내는 창상을 치료되었다고 간주하였다.

대조 창상 또는 단독 투여된 각각의 화합물과 비교하여, 결과는 PKC α 위기질 저해 펩티드와 조합한 USP 인슐린은 레귤러 재조합 인간 인슐린 + PKC α 위기질 저해 펩티드와 유사하게 창상 치료에 대해 상승 효과를 유발한다는 것을 나타낸다. 이 데이터는 인슐린 유사체와 PKC α 위기질 저해 펩티드의 조합이 육아 조직의 형성의 촉진 및 창상 치료에 도움이 된다는 것을 나타낸다.

결과를 도 17에 나타내었다. 도 17에서, 레귤러 재조합 인간 인슐린 및 USP 인슐린은 각각 약어 "HumR" 및 "Ins USP"로 언급된다. PKC α 위기질 저해 펩티드는 "pep"로 언급된다.

[0206] 실시예 14

인슐린 유사체, 재조합 인간 인슐린 및 PKC α 위기질 저해 펩티드를 사용한 처치 후의 염증을 측정하여, 이들 치료가 염증에 미치는 영향을 측정하였다.

C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 피부 창상 부위에서 중증 염증의 수준을 측정하였다. 상기에서 기술된 바와 같은 절개에 의해 창상을 만들었다. 도 18에 표시된 바와 같이, PKC α 위기질 저해 펩티드(1 μ g/ml), 0.1 단위/mL의 재조합 인간 인슐린, 또는 제제 A 내 0.1 단위/ml 인슐린 리스프로를 사용하여 매일 처치를 수행하였다. 표준 방법을 사용하여 유액을 제조하고 약물 용리 지지체의 역할을 하는 거즈 밴드를 사용하여

피부에 송달하였다. 7일 후, 피부 조직을 절개하고, 고정하고 H&E 염색 이후 조직학적으로 평가하였다.

[0209] 중증 염증을 다음 파라미터를 사용하여 평가하였다(상기에서 기술된 바와 같음):

[0210] (1) 농양 형성

[0211] (2) 과도한 백혈구 증가(>100 세포 고정배율에서 x200)

[0212] (3) 혈관 내 >20%의 WBC 함량이 고정배율(x200)에서 나타나는, 혈관 내에서의 높은 WBC/RBC 비.

[0213] 각각의 표본에 대해 관찰되는 상기 각각의 파라미터에 따라 기록한 데이터를 종합함으로써 중증 염증의 전체 퍼센트를 결정하였다. 상기 세 개의 파라미터 중 적어도 두 개가 창상 겹에 존재할 때 염증 부담이 심하다고 간주하였다.

[0214] 결과는 인슐린 유사체 및 재조합 인간 인슐린은 대조구와 비교하여 제제 A 내 PKC α 저해 펩티드와 조합될 때 심하게 염증난 피부에서 염증성 반응의 감소를 상승적으로 촉진시킨다는 것을 나타낸다. 이 데이터는 염증성 피부 질환에 의해 유발된 피부의 염증성 장애를 치료함에 있어서 도 18 에서 나타낸 치료를 사용할 수 있다는 것을 나타낸다. 이 데이터는 본명세서에서 개시된 본 약제학적 조성물을 송달하기 위해 유액 제제 및 거즈 스폰지와 같은 약물 용리 지지체를 사용할 수 있다는 것을 또한 나타낸다.

[0215] 결과를 도 18에 도시한다. 도 18에서, 레귤러 재조합 인간 인슐린 및 인슐린 리스프로는 각각 "HumR" 및 "HumL"로서 표시한다. PKC α 위기질 저해 펩티드는 "pep"로서 표시한다.

[0216] 실시예 15

[0217] 케라틴 1 발현에 대한 배지 A 및 배지 B 내 케라티노사이트의 인큐베이션과, 쥐 비스파틴 및 L- α -포스포티딜 이노시톨-3,4,5-트리스인산염, 디팔미토일-, 헵타암모늄 염(L- α)(Calbiochem; 카탈로그 번호 제 524615 호) 처리의 영향.

[0218] 성체 마우스(7-10 개월에서 2년령까지)의 꼬리로부터 분리한 1차 피부 케라티노사이트를 상기에서 기술된 바와 같은 배지 A(MEM) 내에 유설명서켰다. (배지 A) 내에서 5일 후, 배양된 플레이트 절반 내의 성장 배지를 배지 B(상기에서 기술된 바와 같음)로 대체하였다.

[0219] 다음, 도 19에 표시된 바와 같이, 비스파틴 또는 L- α 를 배지 A에서 배양된 세포(도 19A) 및 배지 B에서 배양된 세포(도 19B)에 각각 개별적으로 부가시켰다. 비스파틴 배양 배지 내 최종 농도는 0.0001 μ g 비스파틴/ml 이었다. L- α 배양 배지 내 최종 농도는 100 ng/ml이었다.

[0220] 상기에서 기술된 바와 같이 0.05 mM로부터 0.12 mM로 칼슘을 증가시켜 세포 분화를 유도하였다. 24 시간 후 분화 세포를 수확하고 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 표준 웨스턴 블로팅 기술을 사용하여 케라틴 1 단백질의 발현을 평가하기 위해 케라틴 1에 대한 특이적 항체를 사용하였다. 케라틴 1 발현을 이후 표준 덴시오메트리 방법을 사용하여 정량하였다.

[0221] 케라틴 1은 극(spinous) 분화 마커이다. 케라티노사이트 내 케라틴 1의 발현은 표피 케라티노사이트 내 유사분열 활성과 연관되어 있고 말단 분화의 중간 단계로 제한된다. 케라티노사이트 분화 감소는 케라티노사이트 이동 및 증식, 및 그리하여 표피 형성과 연관되어 있다.

[0222] 결과는 배지 A 내 비스파틴 및 L- α 모두를 사용한 처리 후 대조구 샘플과 비교하여 케라틴 1 발현이 감소되었음을 나타낸다(도 19A). 대조적으로, 배지 B 내에서 배양된 케라티노사이트의 케라틴 1 발현은 비스파틴 또는 L- α 의 처리에 의해 상당히 변하지 않았다(도 19B). 이들을 종합하여, 이들 결과는 비스파틴 또는 L- α 와 같은 인슐린 유사체는 배지 A 내에서 제공될 때 케라티노사이트 분화를 저해하고 표피 형성을 촉진할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0223] 도면의 상세한 설명

[0224] 도 1

[0225] 다양한 제제로 제조된 인슐린 + PKC α 저해제를 사용한 인 비트로 창상 치료의 효능.

[0226] 컨플루언트(confluent) 케라티노사이트의 5일된 배양물에 대해 인 비트로 스크래치 분석을 하고 이후 창상을 치료하였다.

[0227] 창상 형성 후, 인슐린 및 PKC α 저해제(인슐린 10^{-6} M; 0.1 단위/ml), Myr-위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M)을 상지에서 기술된 다양한 제제(제제 C 및 D) 내의 세포 배양물에 부가시키고 창상을 봉쇄시켰다. 처치 24 시간 후, 제제 A 내에 제공된 인슐린 및 상기 PKC α 저해제로 처리한 세포만이 비처리된 대조구와 비교하여 창상의 봉쇄를 나타내었다. 이 실험을 3중으로 수행하였다. 도 1A는 대표적인 세포 배양 플레이트의 사진을 나타낸다. 도 1B는 처치 24 시간 후 창상 봉쇄의 퍼센트를 나타낸다($p < 0.05$).

[0228] 도 2

[0229] **인슐린 + PKC α 저해제는 제제 A 내에서만 상당한 창상 봉쇄를 촉진한다.**

[0230] 마취된 C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 위쪽 등에 대해 전체 두께(20mm 길이) 피부 절개를 수행하였다. 절개 후, 상지에서 기술된 다양한 제제(제제 A-C)내의 인슐린(10^{-6} M; 0.1 단위/ml), PKC α 저해제(위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M) 또는 인슐린 + PKC α 저해제(위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M 및 인슐린 0.1 단위)로 날마다 창상을 처리하였다. 7일 후, 창상을 절제하고 치료된 창상의 퍼센트를 창상의 형태학 및 조직학을 검사함으로써 평가하였다. 도 2A에서, 그룹 당의 전체 창상 당 치료된 창상의 퍼센트로서 결과를 나타낸다. 제제 A 내에 적용된 인슐린 + PKC α 저해제의 처리에 의해 완전한 치료 및 창상 봉쇄를 유도하였다. 반대로, 제제 B 및 제제 C를 사용하여서는 단지 최소의 창상 봉쇄만이 관찰되었다. 모든 제제 조건에 대해, 인슐린 또는 위기질 펩티드 단독을 사용한 처리는 다양한 제제로 처리된 대조구 그룹과 비교하여 창상 치료 효능을 증가시키지 않았다. 도 2B는 대표적인 창상 조직검사로부터의 사진을 나타낸다.

[0231] 도 3

[0232] **PKC α 저해제는 제제 A 내에서 투여된 때에만 창상 부위에서 중증 염증 부담을 감소시킨다.**

[0233] 마취된 C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 위쪽 등에 대해 전체 두께(20mm 길이) 피부 절개를 수행하였다. 절개 후, 상지에서 기술된 다양한 제제(제제 A-C) 내의 PKC α 저해제(위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M)를 창상에 직접 도포하여 날마다 창상을 처리하였다. 7일 후, 창상을 절제하고 조직학 및 면역조직화학을 수행하였다. 창상 겹에 다음 세가지 파라미터 중 적어도 두가지가 존재하면 염증 부담이 중증으로 간주하였다: (1) 창상 영역에서 농양 형성, (2) 과도한 백혈구 증가(>100 세포 고정배율에서 $\times 200$), (3) 혈관 내 >20%의 WBC 함량이 고정배율($\times 200$)에서 나타나는, 혈관 내에서의 높은 WBC/RBC(백혈 세포/적혈 세포) 비. 결과를 그룹 내 전체 창상과 비교하여 중증 염증을 갖는 창상 퍼센트로서 요약하여 나타낸다. 막대 그래프에서 보여진 바와 같이, 제제 A 내에 PKC α 저해제를 적용할 때만이, 심한 염증의 상당한 감소가 관찰되었다. 제제 B 또는 제제 C 내의 처리를 적용할 때는 염증 부담의 경감이 보이지 않았다.

[0234] 도 4

[0235] **인슐린 + PKC α 저해제는 제제 A 내에서 처치시 육아 조직 형성을 유도한다.**

[0236] 마취된 C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 위쪽 등에 대해 전체 두께(20mm 길이) 피부 절개를 수행하였다. 절개 후, 상지에서 기술된 바와 같은 다양한 제제(제제 A-C) 내 인슐린 및 PKC α 저해제(위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M 및 인슐린 0.1 단위/ml)를 창상 위에 직접 도포하여 날마다 창상을 처리하였다. 7일 후, 창상을 절제하고, 고정하고 H&E 염색 이후 조직학적으로 평가하였다. 육아 조직 형성을 H&E 염색을 사용하여 평가하고 창상 부위에서 전체 창상 영역에 대해 상대적으로 형성된 육아 조직의 퍼센트에 따라 점수화하였다. 제제 A 내 인슐린 및 PKC α 저해제로 날마다 처리한 창상만이 대조구, 제제 B 및 제제 C 처리 그룹과 비교하여 육아 조직 형성에 있어서 상당한 증가를 나타내었다.

[0237] 도 5

[0238] **제제 조건은 PKC α 활성을 저해하기 위한 위기질 PKC α 펩티드의 능력에 영향을 미친다.**

[0239] 5일 된 컨플루언트(confluent) 케라티노사이트 배양물을 재조합 아데노바이러스를 엔코딩하는 PKC α 로 감염시켰다. 감염 24 시간 후 세포를 도 5에 표시된 바와 같이 제제(제제 A, B) 내에서 PKC α 저해제(My-위기질 PKC α 펩티드, 1 μ M)로 15분간 처리하였다. 치료 후, 세포를 용해시키고 상지에서 기술된 바와 같이 PKC α 활성 분석을 수행하였다. 제제 A 내에 제공된 PKC α 저해제만이 대조구에 대해 상대적으로 과다발현 세포 내에서 상당히 PKC α 활성을 저해할 수 있었다. 실험을 이중으로 수행하였다. PKC α 과다발현 대조구 세포에 대해 상대적인 PKC α 활성 감소의 퍼센트로 결과를 나타내었다.

[0240] **도 6**

[0241] **인슐린을 사용한 창상 봉쇄 및 인 비트로 세포 증식의 효능은 제제 함량에 의존적이다.**

[0242] 5일 된 컨플루언트(confluent) 케라티노사이트 배양물에 대해 인 비트로 스크래치 분석을 하고 창상 치료를 겸사하였다. 창상 형성 후, 인슐린(10^{-6} M; 0.1 단위/ml)을 상기에서 기술된 바와 같은 다양한 제제(제제 C 및 D) 내의 세포 배양물에 부가시켰다.

[0243] 이후 48 시간 동안 창상 봉쇄를 하였다. 실험을 삼중으로 수행하였다. (A) 대표적인 세포 배양 접시의 사진을 나타낸다. (B) 처치 48 시간 후 봉쇄 퍼센트로서 창상 봉쇄를 나타낸다. (C) 상기에서 기술된 티미딘 취입 증식 분석을 사용하여 창상 내 배양된 세포에 대해 증식 분석을 수행하였다. 인슐린 자체는 KCl을 함유하는 제제 D 내에 제공된 때에 부분적 창상 봉쇄 및 세포 증식을 유도하였다. 제제 C는 도 6A-6C에서 보이는 인슐린 유도 창상 봉쇄 및 세포 증식을 저해하였다.

[0244] **도 7**

[0245] **배지 B 내 예비-인큐베이션은 인 비트로 세포 증식에 대해 인슐린 및 인슐린 + PKC α 저해제의 효과를 증가시킨다.**

[0246] 성체 마우스(7-10 개월부터 2년령까지)의 꼬리로부터 제조한 5일 된 컨플루언트(confluent) 케라티노사이트 배양물을 상업적으로 이용가능한 급속 세포 증식 키트(카탈로그 번호 제 Q1A127호; Calbiochem)을 사용하여 증식 분석을 수행하였다. MEM 내에서 5일 후, 성장 배지를 상기에서 기술된 바와 같이 배지 B로 교체하였다.

[0247] 배지 교환과 함께, 또는 그 24시간 후, 세포를 인슐린 또는 인슐린 + PKC α 저해제로 처리하였다. 실험을 6중으로 수행하였다. 비처리된 세포(대조구)에 대한 퍼센트로서 결과를 나타낸다. 배지 B 내에서 24 시간 동안 세포의 예비-인큐베이션은 도 7에서 나타낸 바와 같이 세포 증식에 대해 인슐린 및 인슐린 + PKC α 저해제의 효과를 증가시킨다.

[0248] **도 8**

[0249] **제제 C가 아닌 제제 A 내에서 제조한 인슐린 + PKC α 저해제는 만성, 비-치료 창상의 창상 치료를 유도한다.**

[0250] 당뇨병 합병증 족부 및 손 궤양과 같은 만성 당뇨병 합병증 궤양에 걸린 환자를, 제제 A 내(도 8 A, 아래쪽 부분) 또는 제제 C(도 8 A, 위쪽 부분) 내에 적용된 인슐린 + PKC α 저해제를 12주간 국소 도포함으로써 날마다 처리하였다. 제제 A 내에 적용된 인슐린 + PKC α 저해제는 12주까지 완전 봉쇄를 보였지만, 제제 C 내 인슐린 + PKC α 저해제로 처리받은 환자의 궤양에서는 상당한 어떠한 치료가 보이지 않았다. 환자 창상을 매주 VISITRAK®(Smith & Nephew)를 사용하여 측정하였다. 창상 폭 및 창상 길이의 추적 그래프를 두 환자의 12주간 측정에 대해 나타낸다(도 8A의 오른쪽 부분).

[0251] 당뇨병 창상에 걸린 환자를 제제 A(도 8B, 오른쪽 부분) 또는 제제 C(도 8B, 왼쪽 부분) 내에 적용된 인슐린 + PKC α 저해제의 국부 도포로 날마다 60일간 처리하였다. 제제 A 내에 적용된 인슐린 + PKC α 저해제는 60일까지 완전 치료와 창상 봉쇄를 제공하였다. 제제 C 내 인슐린 + PKC α 저해제를 사용한 창상 치료에서는 어떠한 치료도 보이지 않았다. 0일과 60일에서의 창상의 추적 사진-자료를 도 8B에 나타낸다.

[0252] **도 9**

[0253] **제제 A 내에서 제조된 인슐린 + PKC α 저해제는 말에서 육아 조직 만성 창상의 치료를 유도하였다.**

[0254] 1년령 암컷 퀴터 말이 몇 달 동안 치료 없이 심한 육아 조직 창상에 걸렸다. 이 창상을 3개월 간 제제 A 내 인슐린 + PKC α 저해제로 날마다 처리하였다. 이 기간 경과후, 창상은 완전히 봉쇄되어 치료되었다. 6개월 추적에서 완전한 조직 재생을 나타내었다.

[0255] **도 10**

[0256] **제제 A 내에 제조된 인슐린 + PKC α 저해제는 만성 일광 농양 및 골수염을 치료하였다.**

[0257] 2년령 말이 골수염을 동반한 만성 일광 농양으로서 진단된 발굽 창상에 걸렸다. 수개월간 이 창상에 대해 어떠한 치료도 없었다. 제제 A 내 인슐린 + PKC α 저해제를 사용하여, 본 조성물을 창상에 30분간 직접 도포함으로써 날마다 처치를 수행하였다. 도 10에서 나타낸 바와 같이, 1개월 이내의 치료로 창상 크기가 상당히 감소하고, 2개월 이내에 창상이 완전히 봉쇄되고 치료되었다.

- [0258] **도 11**
- [0259] 제제 A 내에 제조된 인슐린 + PKC α 저해제는 자가 외상에 의해 생긴 만성 창상(말단 궤양)을 치료한다.
- [0260] 지속적인 궤양(즉 말단 궤양)으로 인해 발에 창상이 걸린 개를 어떠한 치료 없이 수개월 동안 종래의 처치를 사용하여 처치하였다. 제제 A 내 인슐린 + PKC α 저해제를 국소 도포하여 날마다 처치를 수행하였다. 상기 창상이 완전히 봉쇄되고 2개월 이내에 치료되었다. 3.5개월의 처치 후, 완전한 털 성장이 보였다.
- [0261] **도 12**
- [0262] 상표 HUMALOG®로서 공지된 인슐린 리스프로(rDNA 기원)의 모식도. 인슐린 리스프로의 α 사슬(서열 식별 번호: 57) 및 β 사슬(서열 식별 번호: 58)의 아미노산 서열을 각각 나타낸다.
- [0263] **도 13**
- [0264] 상표 NOVOLOG®로서 공지된 인간 인슐린 유사체 인슐린 아스파르트(rDNA 기원)의 1차 구조의 모식도. 인슐린 아스파르트의 α 사슬(서열 식별 번호: 57) 및 β 사슬(서열 식별 번호: 59)의 아미노산 서열을 각각 나타낸다.
- [0265] **도 14**
- [0266] 상표 LANTUS®로서 공지된 인간 인슐린 유사체 인슐린 글라진(rDNA 기원) 1차 구조의 모식도. LANTUS®의 α 사슬(서열 식별 번호: 60) 및 β 사슬(서열 식별 번호: 61)의 아미노산 서열을 각각 나타낸다.
- [0267] **도 15**
- [0268] 상표 HUMULIN® R 및 NOVOLIN® R로서 공지된 레귤러 재조합 인간 인슐린 1차 구조의 모식도. HUMULIN® R의 α 사슬(서열 식별 번호: 57) 및 β 사슬(서열 식별 번호: 62)의 아미노산 서열을 각각 나타낸다.
- [0269] **도 16**
- [0270] 제제 A 내에 제공된 다양한 인슐린 유사체는 창상 치료에 유사하게 영향을 미친다.
- [0271] 마취된 C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 위쪽 등에 대해 전체 두께(20mm 길이) 피부 절개를 수행하였다. 절개 후, 제제 A 내(상기에서 기술된)의 도 6에서 표시된 인슐린 유사체 0.1 단위/mL를 창상 위에 직접 도포하여 창상을 날마다 처치하였다. 실험한 인슐린 유사체는 인슐린 리스프로("HumL"), 인슐린 아스파르트("Novo"), 인슐린 글라진("LANTUS®"), 및 재조합 인간 인슐린("HumR")이었다. 7일 후, 창상을 절제하고, 고정하고 H&E 염색 이후 조직학적으로 평가하였다.
- [0272] 창상 치료 퍼센트를 표피 기저층 형성 및 육아 조직 형성 측정에 의해 평가하였다. 표피 기저층 형성을 검출하기 위해 케라틴 14 염색을 사용하여 표피 봉쇄를 평가하였다. 완전한 표피 재축조를 보인 창상을 치료되었다고 간주하였다. 육아 조직 형성을 H&E 염색을 사용하여 평가하고 창상 부위에서 전체 창상 영역에 대해 상대적으로 형성된 육아 조직의 퍼센트에 따라 점수화하였다. >70% 육아 조직의 형성을 나타내는 창상을 치료되었다고 간주하였다.
- [0273] 인슐린 유사체를 상표명의 약어로 표시한다: 인슐린 리스프로에 대해 "HumL", 인슐린 아스파르트에 대해 "Novo", 인슐린 글라진에 대해 "LANTUS®", 및 HUMULIN® R에 대해 "HumR".
- [0274] **도 17**
- [0275] PKC α 저해 펩티드와 조합한 USP 인슐린은 HUMULIN® R + PKC α 저해 펩티드와 유사하게 창상 치료를 촉진한다.
- [0276] 마취된 C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)의 위쪽 등에 대해 전체 두께(20mm 길이) 피부 절개를 수행하였다. 절개 후, 제제 A 내(상기에서 기술된) PKC α 위기질 저해 펩티드(1 μ g/ml) 또는 0.1 단위/mL의 HUMULIN® R 또는 USP 인슐린을 창상 위에 직접 도포하여 날마다 창상을 처치하였다. 7일 후, 창상을 절제하고, 고정하고 H&E 염색 이후 조직학적으로 평가하였다. 육아 조직 형성을 H&E 염색을 사용하여 평가하고 창상 부위에서 전체 창상 영역에 대해 상대적으로 형성된 육아 조직의 퍼센트에 따라 점수화하였다. >70% 육아 조직의 형성을 나타내는 창상을 치료되었다고 간주하였다.

- [0277] 레귤러 재조합 인간 인슐린 및 USP 인슐린은 약어 "HumR" 및 "Ins USP,"로 각각 나타낸다. PKC α 위기질 저해 펩티드는 "pep"로 나타낸다.
- [0278] **도 18**
- [0279] **PKC α 저해 펩티드와 조합한 인슐린 유사체는 심하게 염증난 피부에서** 염증성 반응의 감소를 상승적으로 촉진한다.
- [0280] C57BL/6J 마우스(그룹 당 여섯 마리 마우스)에 대해 피부 창상 부위에서 중증 염증 수준을 측정하였다. 상기에 서 기술된 바와 같은 절개에 의해 창상을 유발하였다. 도 19에 표시된 바와 같이, PKC α 위기질 저해 펩티드(1 μ g/ml) 또는 0.1 단위/mL의 HUMULIN® R, 또는 제제 A 내(상기에서 기술된) 인슐린 리스프로를 사용하여 매일 처치를 수행하였다. 유액을 제조하고 약물 용리 지지체로서 작용하는 거즈 밴드로부터의 송달에 의해 피부 상에 적용하였다. 7일 후, 피부 조직을 절개하고, 고정하고 H&E 염색 이후 조직학적으로 평가하였다.
- [0281] 중증 염증을 다음 파라미터를 사용하여 평가하였다:
- [0282] (1) 농양 형성
- [0283] (2) 과도한 백혈구 증가(>100 세포 고정배율에서 x200)
- [0284] (3) 혈관 내 >20%의 WBC 함량이 고정배율(x200)에서 나타나는, 혈관 내에서의 높은 WBC/RBC 비.
- [0285] 상기 세 개의 파라미터 중 적어도 두 개가 창상 겹에 존재할 때 염증 부담이 심하다고 간주하였다.
- [0286] 각각의 표본에 대해 관찰된 파라미터 각각에 따라 기록된 데이터를 참조하여 상기 중증 염증의 전체 퍼센트를 결정하였다.
- [0287] HUMULIN® R 및 인슐린 리스프로는 약어 "HumR" 및 "HumL"로 각각 표시한다. PKC α 위기질 저해 펩티드는 "pep"로 표시한다.
- [0288] **도 19**
- [0289] **배지 A 및 배지 B 내 비스파틴 및 L- α 로 처리된 오래된 케라티노사이트 내 케라틴 1의 발현.**
- [0290] 성체 마우스 꼬리(7-10 개월부터 2년령까지)로부터 제조한 1차 피부 케라티노사이트를 배지 A(MEM) 내에 유설명 서켰다. 배지 A 내에서 5일 후, 배양된 플레이트의 절반의 성장 배지를 배지 B(상기에서 기술된 바와 같음)로 교체하였다. 비스파틴 또는 L- α 을 이후 배지 A 및 배지 B 내에서 배양된 세포에 제공하였다.
- [0291] 배양 배지 내 칼슘 수준을 0.05 mM로부터 0.12 mM까지 상승시킴으로써 세포 분화를 유도하였다. 분화 유도 24 시간 후 세포를 수확하고 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 이후 상업적으로 이용가능한 케라틴 1 특이적 항체를 사용하여 세포 용해물 내 케라틴 1의 발현을 평가하였다. 표준 웨스턴 블로팅 및 농도측정 기술을 사용하여 발현을 평가하였다.
- [0292] 본명세서에서 언급된 모든 참고문헌(예를 들면 논문, 특허 문서, 및 수탁 번호)은 전체로서 참고로서 본명세서에 포함된다.
- [0293] **참고문헌**
- [0294] Adams JC and Watt FM (1990) Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. Cell 63: 425-435.
- [0295] Alt A, Gartsbein M, Ohba M, Kuroki T, and Tennenbaum T (2004) Differential regulation of alpha6beta4 integrin by PKC isoforms in murine skin keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun 314: 17-23.
- [0296] Alt A, Ohba M, Li L, Gartsbein M, Belanger A, Denning MF, Kuroki T, Yuspa SH, and Tennenbaum T (2001) Protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation of alpha6beta4 is associated with reduced integrin localization to the hemidesmosome and decreased keratinocyte attachment. Cancer Res 61: 4591-4598.
- [0297] Ausubel FM, et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience.
- [0298] Azzi A, Boscoboinik D, and Hensey C (1992) The protein kinase C family. Eur J Biochem 208: 547-557.

- [0299] Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, Rosen S, Chamson A, Asselineau D, Dubertret L, Coulomb B, Lapiere C, Nusgens B, and Neveux Y (1983) The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol* 81: 2s-10s.
- [0300] Blumberg PM (1991) Complexities of the protein kinase C pathway. *Mol Carcinog* 4: 339-344. Boyce ST and Ham RG (1983) Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* 81: 33s-40s.
- [0301] Bradshaw D, Hill CH, Nixon JS, and Wilkinson SE (1993) Therapeutic potential of PKC inhibitors. *Agents Actions* 38: 135-147.
- [0302] Breitkreutz D, Bohnert A, Herzmann E, Bowden PE, Boukamp P, and Fusenig NE (1984) Differentiation specific functions in cultured and transplanted mouse keratinocytes: environmental influences on ultrastructure and keratin expression. *Differentiation* 26: 154-169.
- [0303] Breitkreutz D, Stark HJ, Plein P, Baur M, and Fusenig NE (1993) Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca²⁺. *Differentiation* 54: 201-217.
- [0304] Cadena, Gill (1993) *Protein Expression and Purification* 4:177.
- [0305] Castagna M, Takai Y, Kabuchi K, Kikkawa U, and Nishizuka Y (1982) Direct activation of calcium-activated phospholipid dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257: 7847-7851.
- [0306] Chakravarthy BR, Isaacs RJ, Morley P, Durkin JP, and Whitfield JF (1995) Stimulation of protein kinase C during Ca²⁺-induced keratinocyte differentiation. Selective blockade of MARCKS phosphorylation by calmodulin. *J Biol Chem* 270: 1362-1368.
- [0307] Chauhan VPS, Chauha A, Deshmukh DS, and Bockerhoff H (1990) Lipid activators of protein kinase C. *Life Sci* 47: 981-986.
- [0308] Coligan et al, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991, Unit 9.
- [0309] De M, I and Theoret CL (2004) Spatial and temporal expression of types I and II receptors for transforming growth factor beta in normal equine skin and dermal wounds. *Vet Surg* 33: 70-76.
- [0310] Denning MF, Dlugosz AA, Cheng C, Dempsey PJ, Coffey RJJ, Threadgill DW, Magnuson T, and Yuspa SH (2000) Cross-talk between epidermal growth factor receptor and protein kinase C during calcium-induced differentiation of keratinocytes. *Exp Dermatol* 9: 192-199.
- [0311] Denning MF, Dlugosz AA, Williams EK, Szallasi Z, Blumberg PM, and Yuspa SH (1995) Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth Differ* 6: 149-157.
- [0312] Deucher A, Efimova T, and Eckert RL (2002) Calcium-dependent involucrin expression is inversely regulated by protein kinase C (PKC)alpha and PKCdelta. *J Biol Chem* 277: 17032-17040.
- [0313] Diegelmann RF and Evans MC (2004) Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 9:283-9.: 283-289.
- [0314] Eckert RL (1989) Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev* 69: 1316-1346.
- [0315] Eichholtz T, de Bont DB, de WJ, Liskamp RM, and Ploegh HL (1993) A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor. *J Biol Chem* 268: 1982-1986.
- [0316] Erangionic, Neel (1993) *Analytical Biochemistry*, 210:179.
- [0317] Freeman (1969) San Francisco, pp. 27-62.
- [0318] Fuchs E and Byrne C (1994) The epidermis: rising to the surface. *Curr Opin Genet Dev* 4: 725-736.

- [0319] Gartsbein M, Alt A, Hashimoto K, Nakajima K, Kuroki T, and Tennenbaum T (2006) The role of protein kinase C delta activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin-induced keratinocyte proliferation. *J Cell Sci* 119: 470-481.
- [0320] Goldsmith, L. A.
- [0321] Goodson WH and Hunt TK (1979) Wound healing and the diabetic patient. *Surg Gynecol Obstet* 149: 600-608.
- [0322] Green H (1977) Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell* 11: 405-416.
- [0323] Grunfeld C (1992) Diabetic foot ulcers: etiology, treatment, and prevention. *Adv Intern Med* 37:103-32: 103-132.
- [0324] Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, and Yuspa SH (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19: 245-254.
- [0325] Hofmann J (1997) The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J* 11: 649-669.
- [0326] Houghten (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82:5131.
- [0327] House C and Kemp BE (1987) Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* 238: 1726-1728.
- [0328] Jones KT and Sharpe GR (1994) Staurosporine, a non-specific PKC inhibitor, induces keratinocyte differentiation and raises intracellular calcium, but Ro31-8220, a specific inhibitor, does not. *J Cell Physiol* 159: 324-330.
- [0329] Kazanietz MG, Areces LB, Bahador A, Mischak H, Goodnight J, Mushinski JF, and Blumberg PM (1993) Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and alcium-independent PKC isozymes. *MoI Pharmacol* 44: 298-307.
- [0330] Keast DH and Orsted H (1998) The basic principles of wound care. *Ostomy Wound Manage* 44: 24-1.
- [0331] Kikkawa U, Kishimoto A, and Nishizuka Y (1989) The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annu Rev Biochem* 58: 31-44.
- [0332] Kirsner RS and Eaglstein WH (1993) The wound healing process. *Dermatol Clin* 11 : 629-640.
- [0333] Knol BW and Wisselink MA (1996) Lick granuloma in dogs; an obsession for dogs, owners and veterinarians. *Tijdschr Diergeneesk* 121 : 21-23.
- [0334] Li L, Tennenbaum T, and Yuspa SH (1996) Suspension-induced murine keratinocyte differentiation is mediated by calcium. *J Invest Dermatol* 106: 254-260.
- [0335] Li W, Nadelman C, Gratch NS, Chen M, Kasahara N, and Woodley DT (2002) An important role for protein kinase C-delta in human keratinocyte migration on dermal collagen. *Exp Cell Res* 273: 219-228.
- [0336] Merrifield (1962) 85 *J. Am. Chem. Soc.* 2149.
- [0337] Mousley M (2003) Diabetes and its effect on wound healing and patient care. *Nurs Times* 99: 70, 73-70, 74.
- [0338] Nash LG, Phillips MN, Nicholson H, Barnett R, and Zhang M (2004) Skin ligaments: regional distribution and variation in morphology. *Clin Anat* 17: 287-293.
- [0339] Nishizuka Y (1988) The molecular heterogeneity of PKC and its implications for cellular regulation. *Nature* 334: 661-665.
- [0340] Nishizuka Y (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9: 484-496.

- [0341] Ohba M, Ishino K, Kashiwagi M, Kawabe S, Chida K, Huh NH, and Kuroki T (1998) Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C. *Mol Cell Biol* 18: 5199-5207.
- [0342] Querleux B, Cornillon C, Jolivet O, and Bittoun J (2002) Anatomy and physiology of subcutaneous adipose tissue by in vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy: relationships with sex and presence of cellulite. *Skin Res Technol* 8: 118-124.
- [0343] Saito I, Oya Y, Yamamoto K, Yuasa T, Shimojo H. (1985) Construction of nondefective adenovirus type 5 bearing a 2.8-kilobase hepatitis B virus DNA near the right end of its genome. *J Virol.* Jun;54 (3):711-719.
- [0344] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3d ed.).
- [0345] Seo HR, Kwan YW, Cho CK, Bae S, Lee SJ, Soh JW, Chung HY, and Lee YS (2004) PKC α induces differentiation through ERK 1/2 phosphorylation in mouse keratinocytes. *Exp Mol Med* 36: 292-299.
- [0346] Shaw JE and Boulton AJ (1997) The pathogenesis of diabetic foot problems: an overview. *Diabetes* 46 Suppl 2:S58-61: S58-S61.
- [0347] Shen S, Alt A, Wertheimer E, Gartsbein M, Kuroki T, Ohba M, Braiman L, Sampson SR, and Tennenbaum T (2001) PKC δ activation: a divergence point in the signaling of insulin and IGF-I -induced proliferation of skin keratinocytes. *Diabetes* 50: 255-264.
- [0348] Silhi N (1998) Diabetes and wound healing. *J Wound Care* 7: 47-51.
- [0349] Stone OJ (1986) Hyperinflammatory proliferative (blastomycosis-like) pyoderms: review, mechanisms, and therapy. *J Dermatol Surg Oncol* 12: 271-273.
- [0350] Svetek J, Schara M, Pecar S, Hergenbahn M, and Hecker E (1995) Spectroscopic characterization of specific phorbol ester binding to PKC-receptor sites in membranes in situ. *Carcinogenesis* 16: 2589-2592.
- [0351] Tennenbaum T, Yuspa SH, Knox B, Sobel ME, Castronovo V, Yamada Y, and De Luca LM (1991) Alterations in attachment to laminin and localization of laminin binding proteins during differentiation of primary mouse keratinocytes in vitro (abstract). *J Invest Dermatol* 96: Abstract 566.
- [0352] White SD (1990) Naltrexone for treatment of acral lick dermatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 196: 1073-1076.
- [0353] Williams RL and Armstrong DG (1998) Wound healing. New modalities for a new millennium. *Clin Podiatr Med Surg* 15: 117-128.
- [0354] Wysocki AB (1999) Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am* 34: 777-97, v.
- [0355] Yeruham I, Gur Y, and Harmelin A (1992) Acral lick dermatitis in a dairy cow. *Vet Rec* 130: 479-480.
- [0356] Yim VW, Yeung JH, Mak PS, Graham CA, Lai PB, and Rainer TH (2007) Five year analysis of Jockey Club horse-related injuries presenting to a trauma centre in Hong Kong. *Injury* 38: 98-103.
- [0357] Yuspa SH, Hawley-Nelson P, Stanley JR, and Hennings H (1980) Epidermal cell culture. *Transplant Proc* 12: 114-122.

서열목록 자유텍스트

- [0359] SEQUENCE LISTING

<110> HEALOR LTD.

<120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING WOUNDS AND RELATED METHODS

<130> P-10756-PC

<140>

<141>

<150> 60/962,706

<151> 2007-07-30

<160> 64

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220>

<223> N-term myristoylated

<400> 1

Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln

1 5

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 2

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val

1 5 10

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 3

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His Glu Val

1 5 10 15

Lys Asn

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His Glu Val

1 5 10 15

Lys Asn Leu Lys Gly Ala

20

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 5

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Leu Ala Val

1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val

1 5 10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 7

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg

1 5

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid

<400> 8

Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe

1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 9

Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 10

Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ala Phe Phe Tyr Gly Gly

1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 11

Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ala Phe Arg Arg Lys Ala

1 5 10

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 12

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 13

Asp Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Asn Lys Val

1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 14

Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val

1 5 10 15

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 15

Gly Pro Arg Pro Leu Phe Cys Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Val

1 5 10 15

Val

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 16

Gln Lys Arg Pro Ala Gln Arg Ser Lys Tyr Leu

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 17

Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Leu

1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 18

Gly Gly Pro Leu Arg Arg Thr Leu Ala Val Arg Arg

1 5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 19

Gly Gly Pro Leu Ser Arg Arg Leu Ala Val Arg Arg

1 5 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 20

Gly Gly Pro Leu Ser Arg Thr Leu Ala Val Arg Arg

1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 21

Gly Gly Pro Leu Ser Arg Arg Leu Ala Val Ala Arg

1 5 10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 22

Gly Gly Pro Leu Arg Arg Thr Leu Ala Val Ala Arg

1 5 10

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 23

Val Arg Lys Ala Leu Arg Arg Leu

1 5

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 24

Gly Gly Arg Leu Ser Arg Thr Leu Ala Val Ala Arg

1 5 10

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220>

<223> N-term myristoylated

<220>

<223> C-term amidated

<400> 25

Thr Arg Lys Arg Gln Pro Ala Met Arg Arg Arg Val His Gln Ile Asn

1 5 10 15

Gly

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 26

Arg Lys Arg Gln Arg Ala Met Arg Arg Arg Val His

1 5 10

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 27

Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val

1 5 10 15

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 28

Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid

<400> 29

Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe

1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 30

Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ala Phe Phe Tyr Gly Gly

1 5 10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 31

Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ala Phe Arg Arg Lys Ala

1 5 10

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 32

Ala Ala Ala Lys Ile Gln Ala Ala Trp Arg Gly His Met Ala Arg Lys

1 5 10 15

Lys Ile Lys Ser

20

<210> 33

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 33

Ala Ala Ala Lys Ile Gln Ala Ala Phe Arg Gly His Met Ala Arg Lys

1 5 10 15

Lys Ile Lys

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 34

Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val

1 5 10 15

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 35

Val Arg Lys Ala Leu Arg Arg Leu

1 5

<210> 36

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 36

Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ala Phe Lys Leu Ser

1 5 10 15

Gly Phe Ser Phe Lys Lys

20

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 37

Gly Pro Arg Pro Leu Phe Cys Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Val

1 5 10 15

Val

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 38

Glu Ser Thr Val Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn

1 5 10 15

Val

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 39

Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val

1 5 10 15

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 40

Arg Phe Ala Arg Leu Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val

1 5 10

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid

<400> 41

Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe

1 5 10

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 42

Arg Arg Phe Lys Arg Gln Gly Ala Phe Phe Tyr Phe Phe

1 5 10

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 43

Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala

1 5 10

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 44

Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ser Phe Phe Tyr Gly Gly

1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 45

Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ser Phe Lys Lys Phe Ala

1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 46

Arg Arg Phe Lys Arg Gln Gly Ser Phe Phe Tyr Phe Phe

1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid

<400> 47

Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ser Phe Phe Glu Phe Phe

1 5 10

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 48

Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ser Phe Arg Arg Lys Ala

1 5 10

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 49

Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ser Val Arg Arg Arg Val

1 5 10 15

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 50

Met Asn Arg Arg Gly Ser Ile Lys Gln Ala Lys Ile

1 5 10

<210> 51

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 51

Met Phe Ala Val Arg Asp Arg Arg Gln Thr Val Lys Lys Gly Val Ile

1 5 10 15

Lys Ala Val Asp Ala Val

20

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 52

Phe Gly Glu Ser Arg Ala Ser Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp

1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 53

Lys Ala Arg Leu Ser Tyr Ser Asp Lys Asn

1 5 10

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 54

Ser Ala Phe Ala Gly Phe Ser Phe Val Asn Pro Lys Phe

1 5 10

<210> 55

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 55

Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser

1 5 10 15

Gly Phe Ser Phe Lys Lys

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 56

gttctcgctg gtgagtttca

20

<210> 57

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 57

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 58

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 58

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr

20 25 30

<210> 59

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 59

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr

20 25 30

<210> 60

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 60

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly

20

<210> 61

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 61

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg

20 25 30

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 62

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

20 25 30

<210> 63

<211> 337

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Pro Pro Asn Thr Ser Lys Val Tyr Ser Tyr Phe Glu Cys Arg Glu Lys

1 5 10 15

Lys Thr Glu Asn Ser Lys Leu Arg Lys Val Lys Tyr Glu Glu Thr Val
 20 25 30
 Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr Ile Leu Asn Lys Tyr Leu Lys Gly Lys Val
 35 40 45
 Val Thr Lys Glu Lys Ile Gln Glu Ala Lys Asp Val Tyr Lys Glu His
 50 55 60
 Phe Gln Asp Asp Val Phe Asn Glu Lys Gly Trp Asn Tyr Ile Leu Glu
 65 70 75 80
 Lys Tyr Asp Gly His Leu Pro Ile Glu Ile Lys Ala Val Pro Glu Gly
 85 90 95
 Phe Val Ile Pro Arg Gly Asn Val Leu Phe Thr Val Glu Asn Thr Asp
 100 105 110
 Pro Glu Cys Tyr Trp Leu Thr Asn Trp Ile Glu Thr Ile Leu Val Gln
 115 120 125
 Ser Trp Tyr Pro Ile Thr Val Ala Thr Asn Ser Arg Glu Gln Lys Lys
 130 135 140
 Ile Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Glu Thr Ser Gly Asn Leu Asp Gly Leu
 145 150 155 160
 Glu Tyr Lys Leu His Asp Phe Gly Tyr Arg Gly Val Ser Ser Gln Glu
 165 170 175
 Thr Ala Gly Ile Gly Ala Ser Ala His Leu Val Asn Phe Lys Gly Thr
 180 185 190
 Asp Thr Val Ala Gly Leu Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Tyr Gly Thr Lys
 195 200 205
 Asp Pro Val Pro Gly Tyr Ser Val Pro Ala Ala Glu His Ser Thr Ile
 210 215 220
 Thr Ala Trp Gly Lys Asp His Glu Lys Asp Ala Phe Glu His Ile Val
 225 230 235 240
 Thr Gln Phe Ser Ser Val Pro Val Ser Val Val Ser Asp Ser Tyr Asp
 245 250 255
 Ile Tyr Asn Ala Cys Glu Lys Ile Trp Gly Glu Asp Leu Arg His Leu
 260 265 270
 Ile Val Ser Arg Ser Thr Gln Ala Pro Leu Ile Ile Arg Pro Asp Ser
 275 280 285
 Gly Asn Pro Leu Asp Thr Val Leu Lys Val Leu Glu Ile Leu Gly Lys
 290 295 300

Lys Phe Pro Val Thr Glu Asn Ser Lys Gly Tyr Lys Leu Leu Pro Pro
 305 310 315 320
 Tyr Leu Arg Val Ile Gln Gly Asp Gly Val Asp Ile Asn Thr Leu Gln
 325 330 335
 Glu
 <210> 64
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 64
 Met Asn Ala Ala Ala Glu Ala Glu Phe Asn Ile Leu Leu Ala Thr Asp
 1 5 10 15
 Ser Tyr Lys Val Thr His Tyr Lys Gln Tyr Pro Pro Asn Thr Ser Lys
 20 25 30
 Val Tyr Ser Tyr Phe Glu Cys Arg Glu Lys Lys Thr Glu Asn Ser Lys
 35 40 45
 Val Arg Lys Val Lys Tyr Glu Glu Thr Val Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr
 50 55 60
 Ile Leu Asn Lys Tyr Leu Lys Gly Lys Val Val Thr Lys Glu Lys Ile
 65 70 75 80
 Gln Glu Ala Lys Glu Val Tyr Arg Glu His Phe Gln Asp Asp Val Phe
 85 90 95
 Asn Glu Arg Gly Trp Asn Tyr Ile Leu Glu Lys Tyr Asp Gly His Leu
 100 105 110
 Pro Ile Glu Val Lys Ala Val Pro Glu Gly Ser Val Ile Pro Arg Gly
 115 120 125
 Asn Val Leu Phe Thr Val Glu Asn Thr Asp Pro Glu Cys Tyr Trp Leu
 130 135 140
 Thr Asn Trp Ile Glu Thr Ile Leu Val Gln Ser Trp Tyr Pro Ile Thr
 145 150 155 160
 Val Ala Thr Asn Ser Arg Glu Gln Lys Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Leu
 165 170 175
 Leu Glu Thr Ser Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Tyr Lys Leu His Asp
 180 185 190
 Phe Gly Tyr Arg Gly Val Ser Ser Gln Glu Thr Ala Gly Ile Gly Ala
 195 200 205

Ser Ala His Leu Val Asn Phe Lys Gly Thr Asp Thr Val Ala Gly Ile
210 215 220

Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Tyr Gly Thr Lys Asp Pro Val Pro Gly Tyr
225 230 235 240

Ser Val Pro Ala Ala Glu His Ser Thr Ile Thr Ala Trp Gly Lys Asp
245 250 255

His Glu Lys Asp Ala Phe Glu His Ile Val Thr Gln Phe Ser Ser Val
260 265 270

Pro Val Ser Val Val Ser Asp Ser Tyr Asp Ile Tyr Asn Ala Cys Glu
275 280 285

Lys Ile Trp Gly Glu Asp Leu Arg His Leu Ile Val Ser Arg Ser Thr
290 295 300

Glu Ala Pro Leu Ile Ile Arg Pro Asp Ser Gly Asn Pro Leu Asp Thr
305 310 315 320

Val Leu Lys Val Leu Asp Ile Leu Gly Lys Lys Phe Pro Val Thr Glu
325 330 335

Asn Ser Lys Gly Tyr Lys Leu Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Val Ile Gln
340 345 350

Gly Asp Gly Val Asp Ile Asn Thr Leu Gln Glu Ile Val Glu Gly Met
355 360 365

Lys Gln Lys Lys Trp Ser Ile Glu Asn Val Ser Phe Gly Ser Gly Gly
370 375 380

Ala Leu Leu Gln Lys Leu Thr Arg Asp Leu Leu Asn Cys Ser Phe Lys
385 390 395 400

Cys Ser Tyr Val Val Thr Asn Gly Leu Gly Val Asn Val Phe Lys Asp
405 410 415

Pro Val Ala Asp Pro Asn Lys Arg Ser Lys Lys Gly Arg Leu Ser Leu
420 425 430

His Arg Thr Pro Ala Gly Asn Phe Val Thr Leu Glu Glu Gly Lys Gly
435 440 445

Asp Leu Glu Glu Tyr Gly His Asp Leu Leu His Thr Val Phe Lys Asn
450 455 460

Gly Lys Val Thr Lys Ser Tyr Ser Phe Asp Glu Val Arg Lys Asn Ala
465 470 475 480

Gln Leu Asn Ile Glu Gln Asp Val Ala Pro His
485 490

P-10756-PC

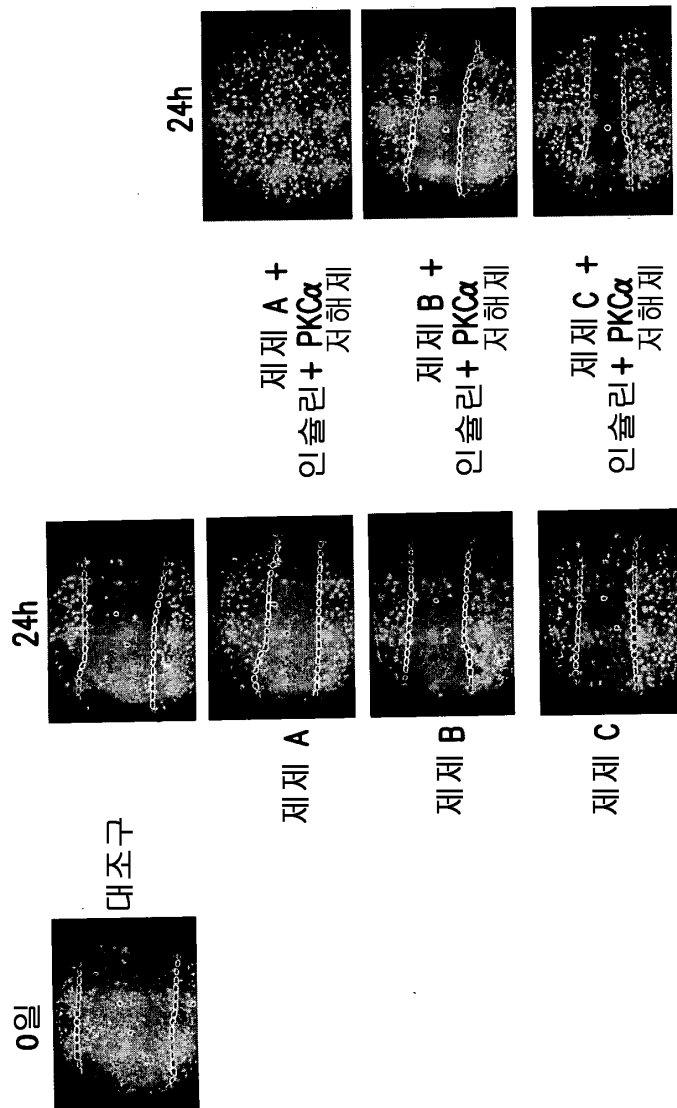
1

P-10756-PC

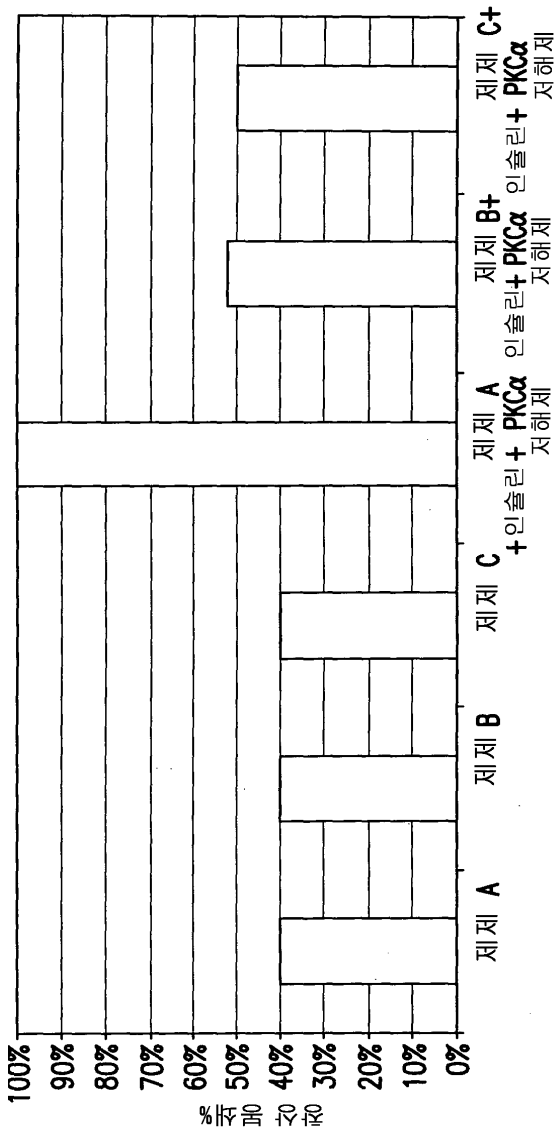
1

도면

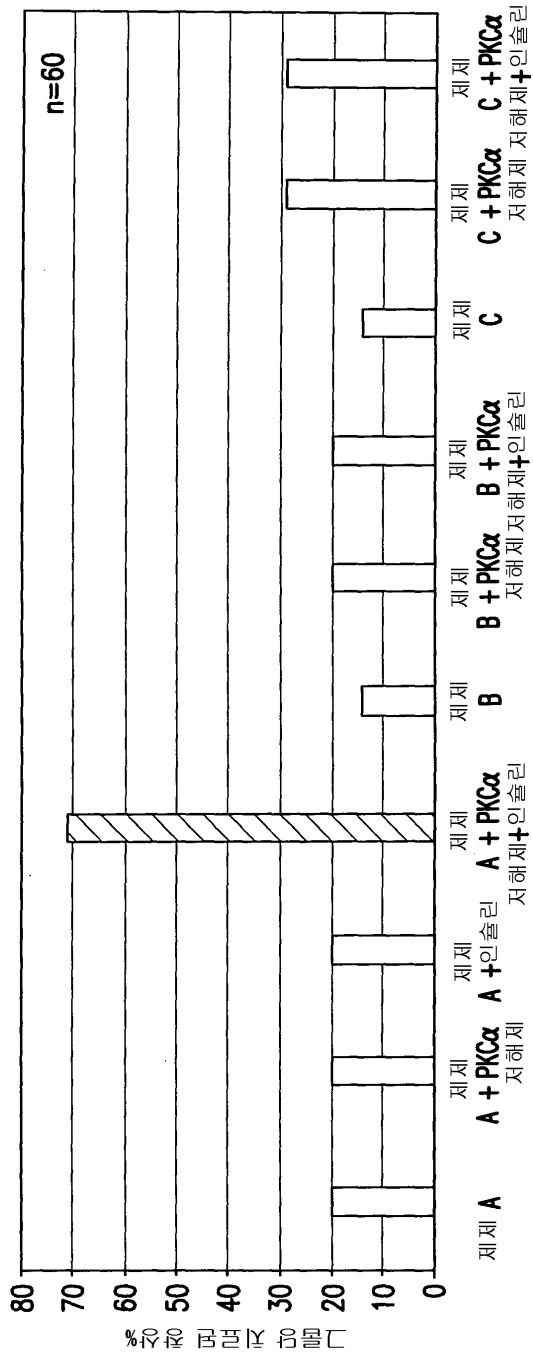
도면1a



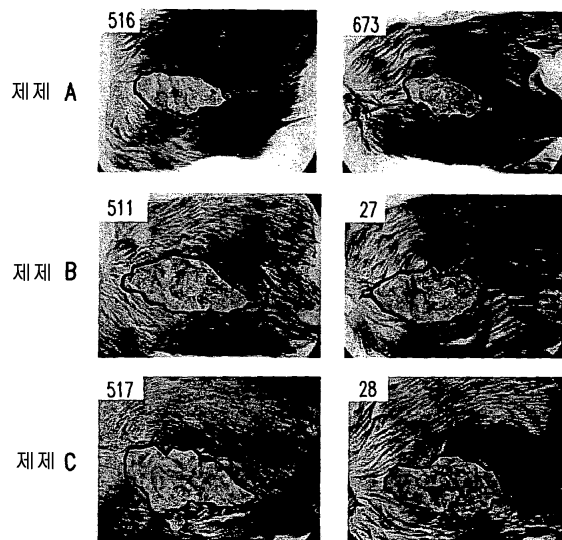
도면1b



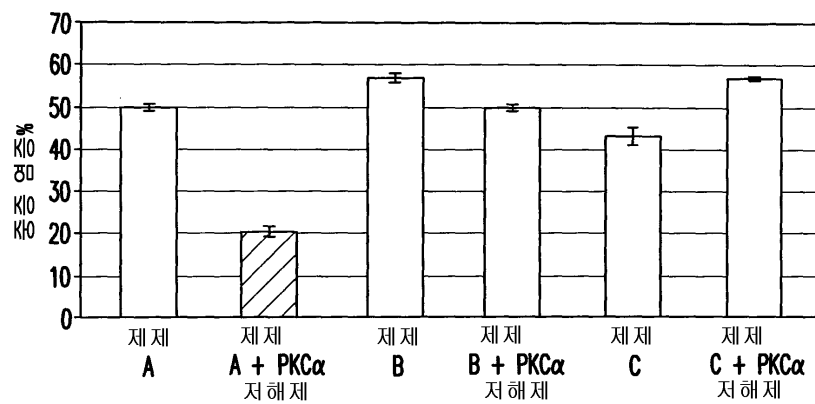
도면2a



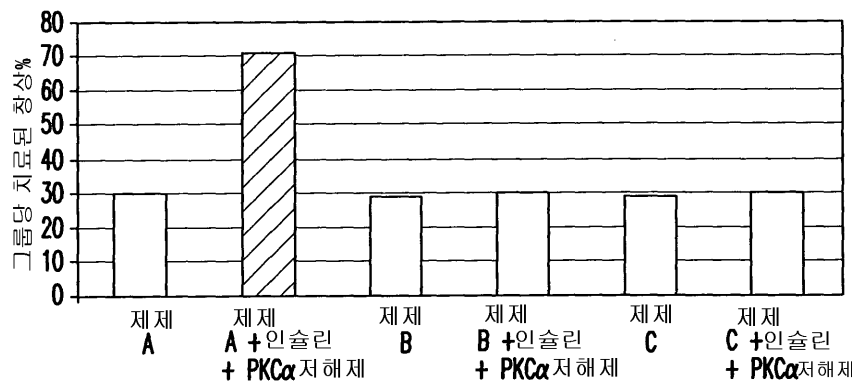
도면2b



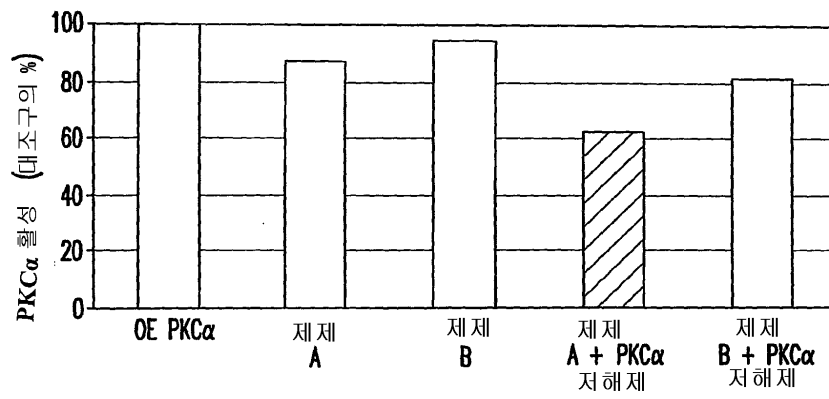
도면3



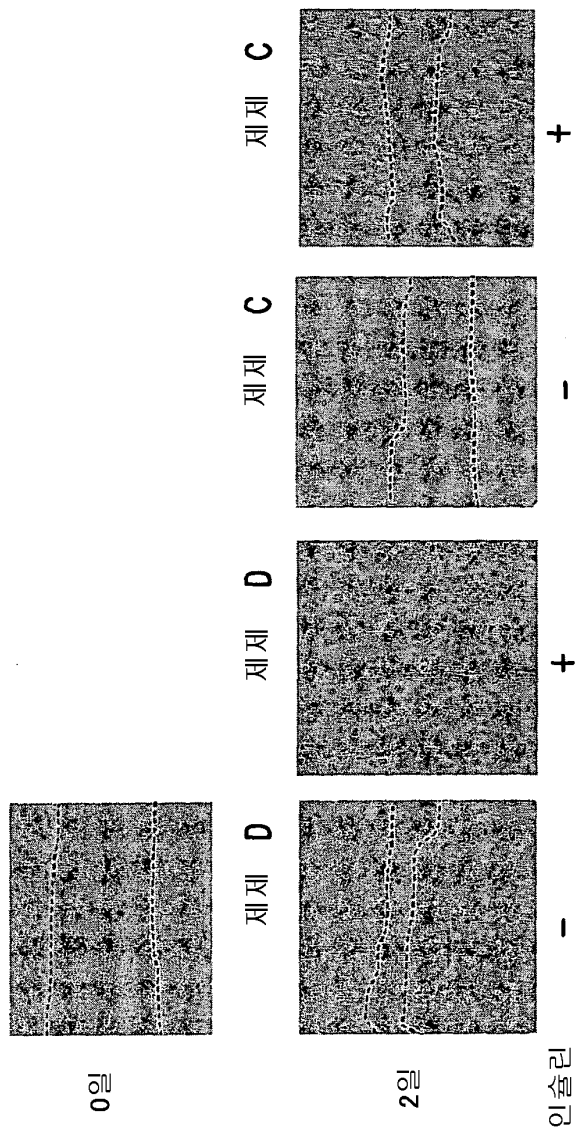
도면4



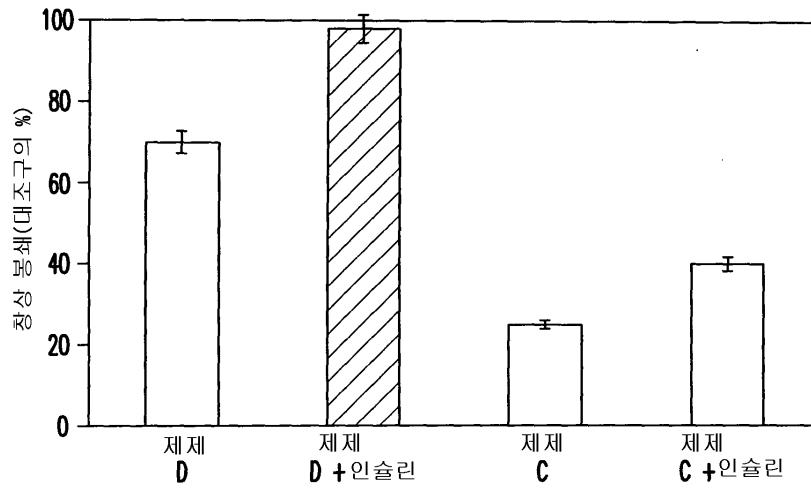
도면5



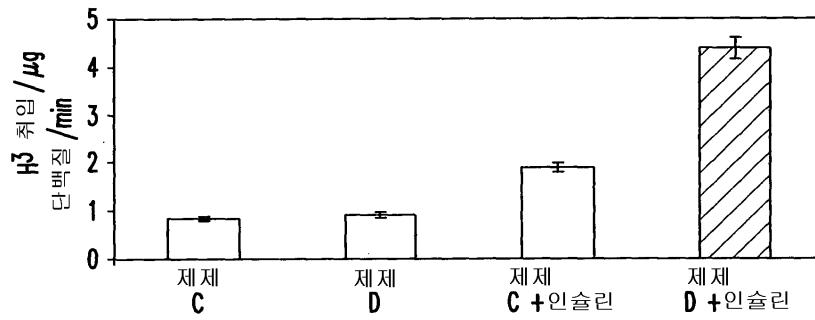
도면6a



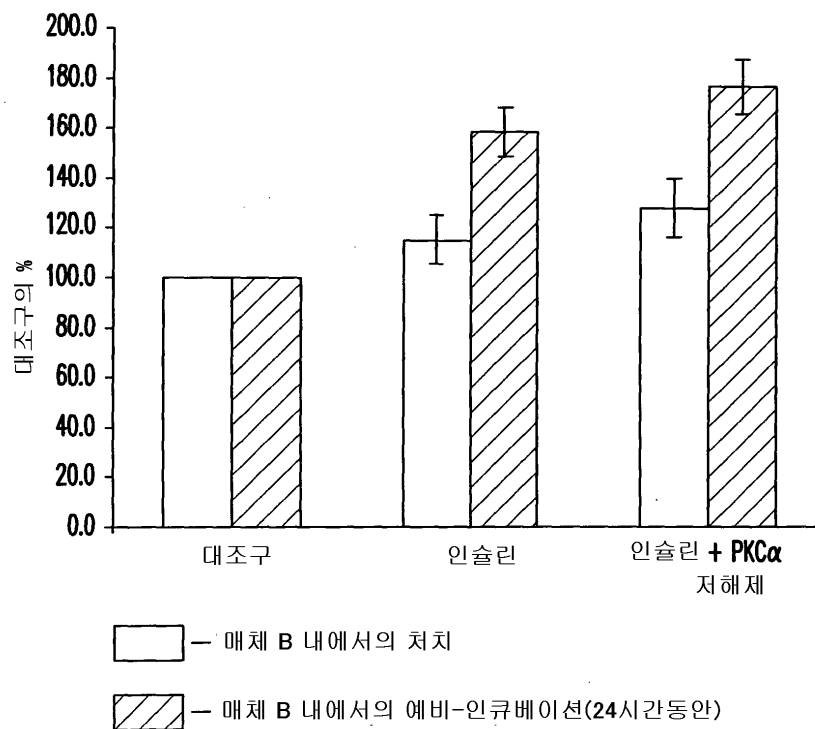
도면6b



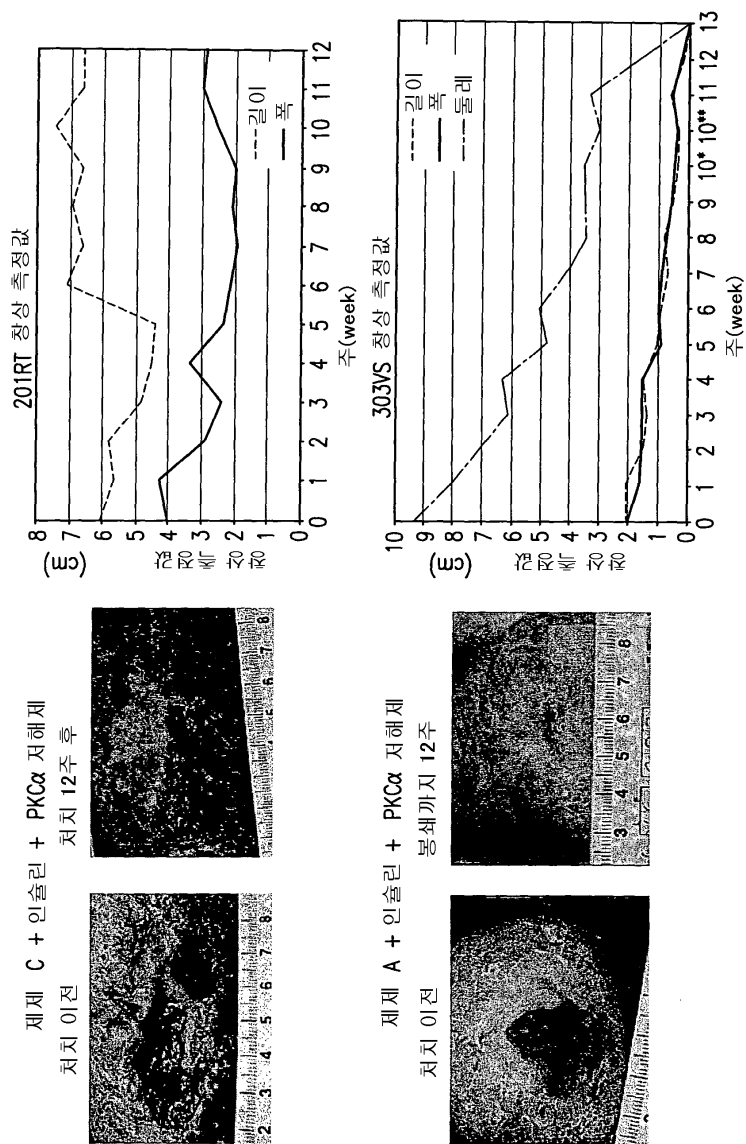
도면6c



도면7

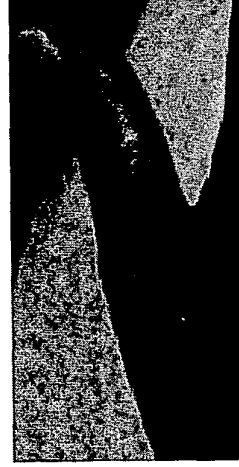


도면8a



도면8b

제제 A 왼쪽



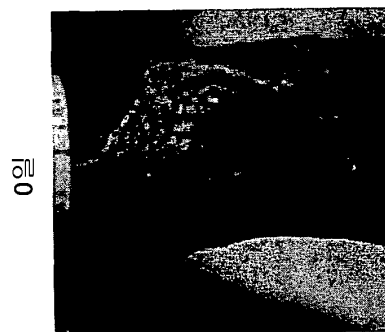
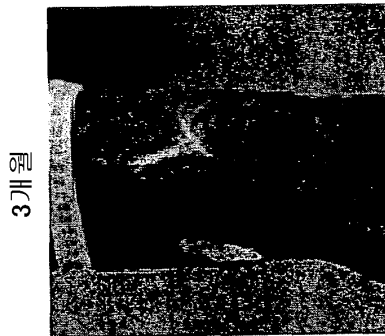
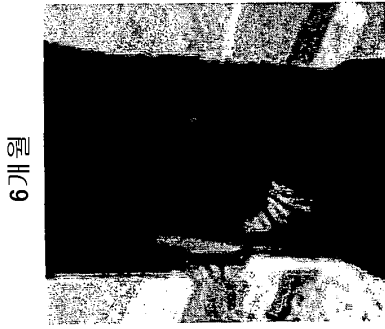
제제 C 오른쪽



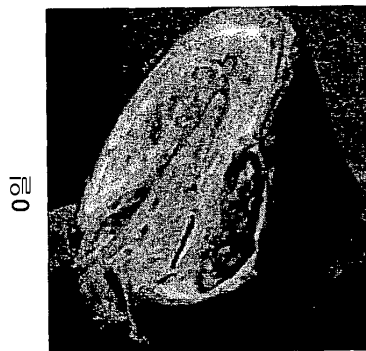
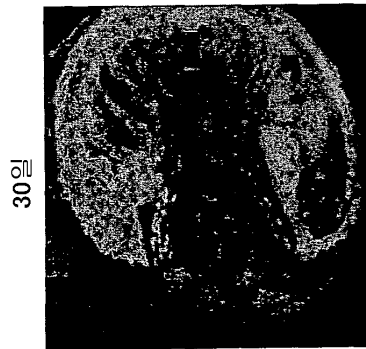
0인

60인

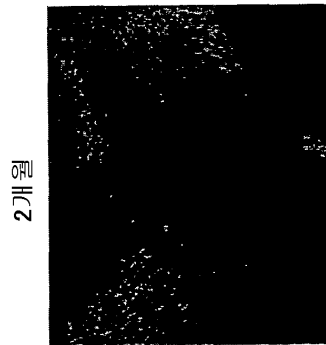
도면9



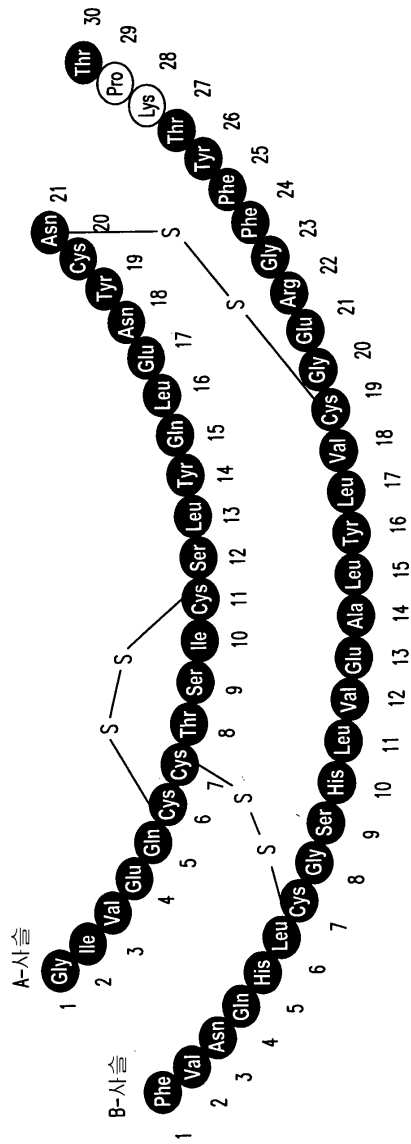
도면10



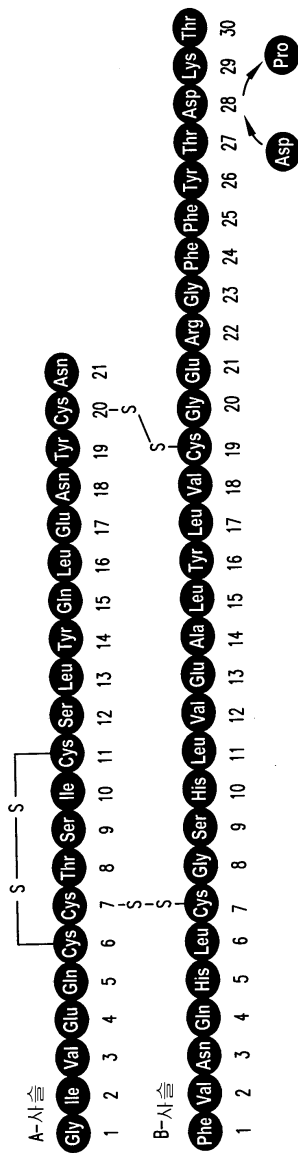
도면11



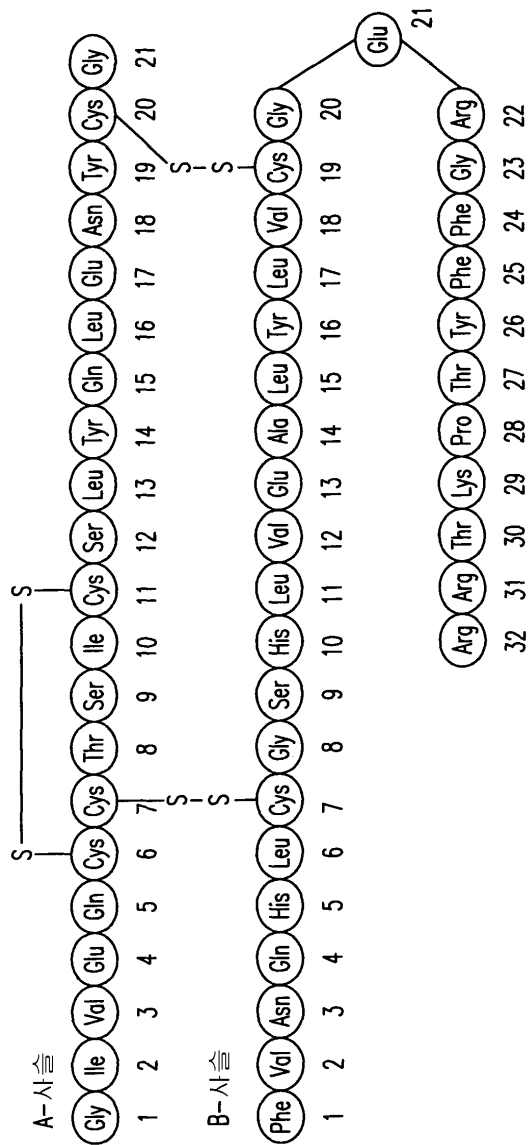
도면12



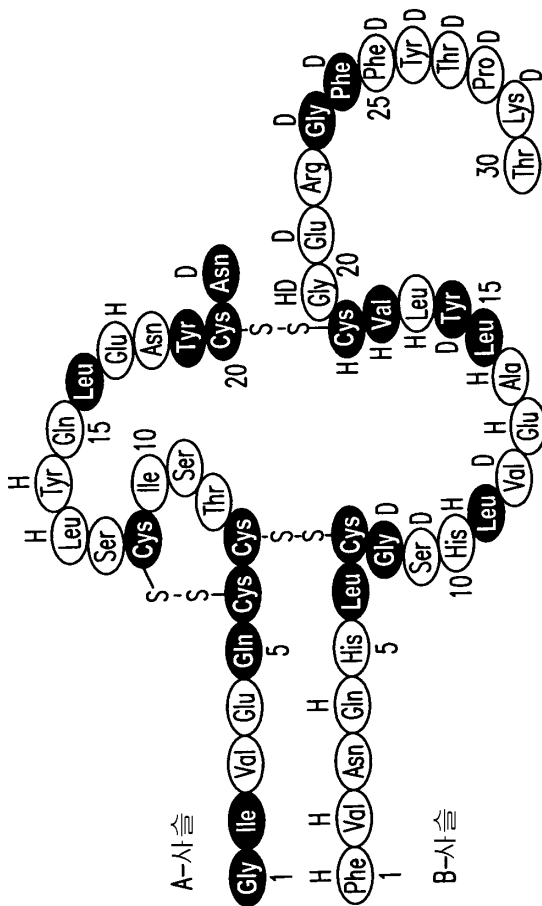
도면13



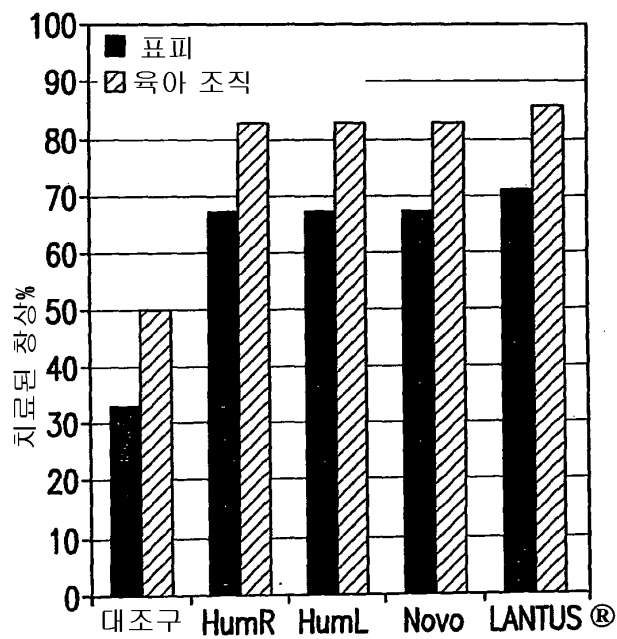
도면14



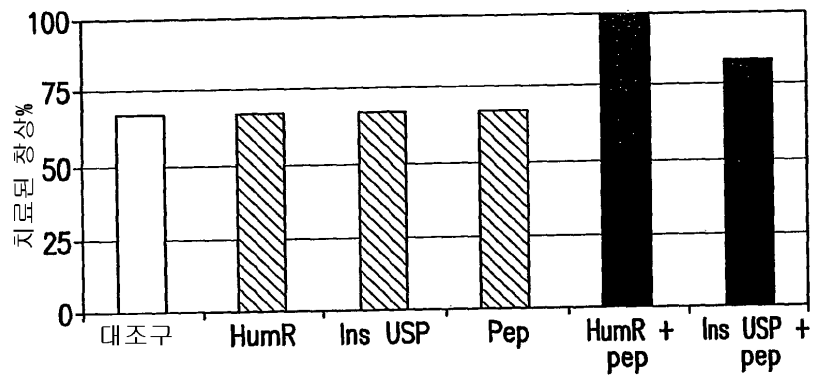
도면15



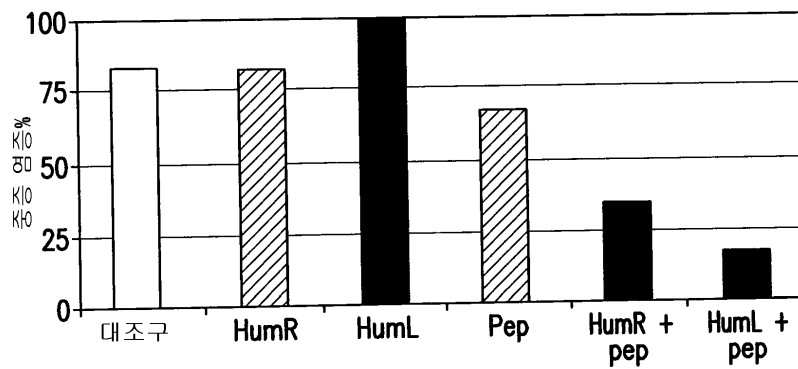
도면16



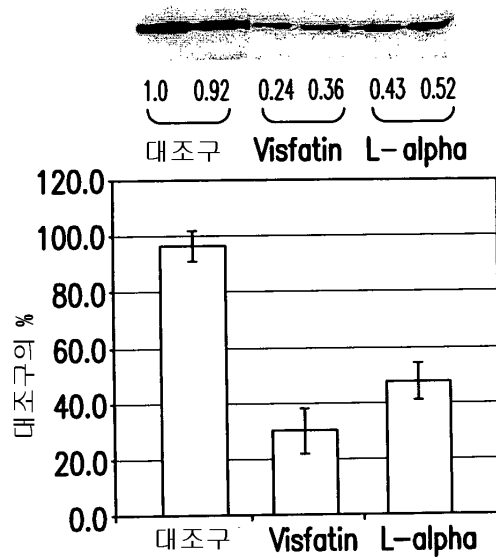
도면17



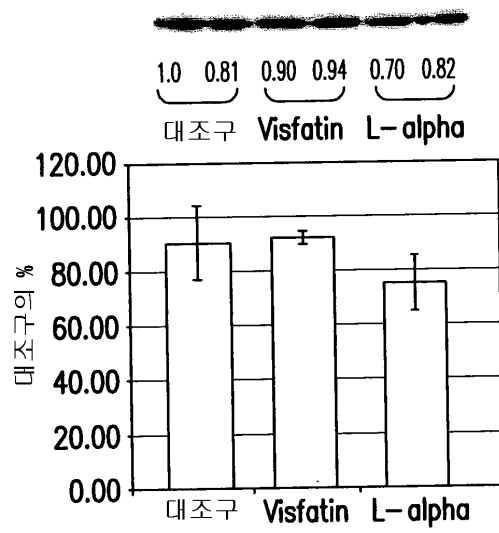
도면18



도면19a



도면19b



서열 목록