



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0122762
 (43) 공개일자 2017년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/10 (2006.01) *A61B 3/10* (2006.01)
A61F 9/008 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/10 (2013.01)
A61B 3/102 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7024830

(22) 출원일자(국제) 2016년03월02일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2017년09월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/020443

(87) 국제공개번호 WO 2016/141053

국제공개일자 2016년09월09일

(30) 우선권주장

62/126,968 2015년03월02일 미국(US)

(71) 출원인

더 보오드 오브 트러스티스 오브 더 유니버시티
 오브 일리노이즈

미국 61801 일리노이 어바나 사우쓰 라이트 스트
 리트 506 헨리 어드미니스트레이션 빌딩 352

(72) 발명자

코마로바, 올리아, 에이.

미국, 일리노이주 60611, 시카고, 쇼 211, 405
 엔. 와바쉬 애비뉴

로젠퍼트, 마크

미국, 일리노이주 60611, 시카고, 아파트 1103,
 474 엔. 와바쉬 애비뉴

말릭, 아스라, 비.

미국, 일리노이주 60521, 힌즈데일, 821 메릴 우
 즈

(74) 대리인

신관호

전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 혈관신생 억제용 웹타이드

(57) 요 약

본 발명은 혈관신생의 억제를 위한 웹타이드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 웹타이드를 사용하여 혈관신생을 억제하는 방법 및 VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61F 9/00821 (2013.01)
A61K 38/08 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61F 2009/00851 (2013.01)
A61F 2009/00863 (2013.01)
A61F 2009/00872 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

치료가 필요한 환자에게 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 펫타이드를 투여하는 단계를 포함하는, 혈관신생을 억제하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 환자가 VEGF-유도된 투과성과 연관된 장애 또는 암을 앓고 있는, 방법.

청구항 3

치료가 필요한 환자에게 상기 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 펫타이드를 투여하는 단계를 포함하는, VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애를 치료하는 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애가 손상(impairment), 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성 성 연령 관련 황반 변성(age-related macular degeneration: AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구 내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 흥색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포증, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펫타이드가 캐리어 펫타이드에 연결되는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 캐리어 펫타이드가 안텐나페디아 펫타이드(antennapedia peptide: AP), 안텐나페디아 펫타이드, 페네트라틴 펫타이드(penetratin peptide), TAT, 트랜스포탄(tranportan) 또는 폴리아르기닌인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펫타이드가 지방산에 접합되는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 펫타이드가 미리스토일화되는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펫타이드 또는 이의 단편이 하나 이상의 VEGF 억제제와 조합으로 투여되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펫타이드 또는 이의 단편이 눈 질환의 레이저 치료와 조합으로 투여되는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펫타이드 또는 이의 단편이 스테로이드와 조합으로 투여되는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펩타이드, VEGF 억제제 또는 스테로이드가 유리체내 주사를 통해 또는 국소적으로 전달되는, 방법.

청구항 13

치료가 필요한 환자에서 혈관신생의 억제를 위한 약제의 제조를 위한 단리된 펩타이드의 용도로서, 상기 펩타이드가 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는, 용도.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 환자가 VEGF-유도된 투과성과 연관된 장애 또는 암을 앓고 있는, 용도.

청구항 15

VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 단리된 펩타이드의 용도로서, 상기 단리된 펩타이드가 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는, 용도.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 VEGF 연관된 혈관 장애가 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 혼색증, 신혈관내장, 망막모세포증, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성인, 용도.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드가 캐리어 펩타이드에 연결되는, 용도.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 안тен나페디아 펩타이드(AP), 안тен나페디아 펩타이드, 페네트라틴 펩타이드, TAT, 트랜스포탄 또는 폴리아르기닌인, 용도.

청구항 19

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드가 지방산에 접합되는, 용도.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 펩타이드가 미리스토일화되는, 용도.

청구항 21

제13항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펩타이드 또는 이의 단편이 하나 이상의 VEGF 억제제와 조합으로 투여되는, 용도.

청구항 22

제13항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펩타이드 또는 이의 단편이 눈 질환의 레이저 치료와 조합으로 투여되는, 용도.

청구항 23

제13항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펩타이드 또는 이의 단편이 스테로이드와 조합으로 투여되는, 용도.

청구항 24

제13항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펩타이드, VEGF 억제제 또는 스테로이드가 유리체내 주사률 통해 또는 국소적으로 전달되는, 용도.

청구항 25

혈관신생의 억제를 위한 단리된 펩타이드로서, 상기 펩타이드가 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는, 펩타이드.

청구항 26

VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애를 앓고 있는 환자에서 혈관신생을 억제하는데 사용하기 위한 제25항의 펩타이드.

청구항 27

VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애의 치료를 위한 단리된 펩타이드.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애가 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 혼색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성인, 펩타이드.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드가 캐리어 펩타이드에 연결되는, 펩타이드.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 안тен나페디아 펩타이드(AP), 페네트라틴 펩타이드, TAT, 트랜스포탄 또는 폴리아르기닌인, 펩타이드.

청구항 31

제25항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드가 지방산에 접합되는, 펩타이드.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 펩타이드가 미리스토일화되는, 펩타이드.

청구항 33

제25항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펩타이드 또는 이의 단편이 하나 이상의 VEGF 억제제 와 조합으로 투여되는, 펩타이드.

청구항 34

제25항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펩타이드 또는 이의 단편이 눈 질환의 레이저 치료와 조합으로 투여되는, 펩타이드.

청구항 35

제25항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펩타이드 또는 이의 단편이 스테로이드와 조합으로 투여되는, 펩타이드.

청구항 36

제25항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 펩타이드, VEGF 억제제 또는 스테로이드가 유리체내 주사에 의해 또는 국소적으로 투여되는, 펩타이드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2015년 3월 2일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/126,968호에 대한 우선권을 주장하고, 이는 본 명세서에 그 전문이 참고로 원용된다.

발명의 분야

[0003] 본 발명은 혈관신생 억제용 펜타이드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 혈관신생을 억제하는 방법 및 본 발명의 펜타이드를 사용하는 VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 미세소관(microtubule: MT) 세포골격은 내피 장벽 조절의 중요한 제어점을 제공하고; 그러나, 이러한 중요한 세포골격 요소의 역할은 활발하게 연구되고 있지 않았다. MT 안정화 약물 탁솔은 폐 염증의 마우스 모델에서 내피 혈관 누출을 약화시키는 것으로 나타났으며, 이는 MT가 증가된 폐 혈관 투과성을 매개하는데 중요할 수 있다는 것을 제시한다. 그러나, 탁솔은 의사들과 환자들에게 매우 불편한 약이 될 수 있도록 하는 일반적인 독성을 나타낸다.

[0005] 미세소관 단부 결합 단백질은 성장하는 미세소관(MT)에 결합하고 MT의 변동적 사건을 억제하는 매우 우수하게 보존된 미세소관 플러스-단부(plus-end) 추적 보조 인자이다. 2개의 이러한 단부 결합 단백질인 EB1 및 EB3은 내피 세포골격 역학 및 세포 형태 변화를 조절하는 역할을 하고, 내피 장벽의 투과성의 주된 결정요인이다.

[0006] Ca^{2+} 는 내피 투과성 및 혈관 항상성을 조절하는 고도로 다용도인 2차 전달자이다. 포스포리파제 C β (PLC β)의 활성화, 전염증성 매개체의 다운스트림은 포스포티딜 이노시톨비스포스페이트(PIP2)의 이노시톨 1,4,5-트리스포스페이트(IP₃) 및 디아실글리세롤(DAG)로의 가수분해를 촉진한다. IP₃는 IP₃-감응성 세포내 저장소, 즉, 소포체(ER)로부터 Ca^{2+} 방출을 자극한다. ER 저장소로부터의 Ca^{2+} 의 결핍은 ER 막의 IP₃R의 활성화에 의해 매개되고, 세포내 Ca^{2+} 에서 일시적 증가를 야기한다. Ca^{2+} 진입 또는 "유입"은 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 를 포함하는 다양한 양이온에 대해 투과성인 일시적인 수용체 전위 캐노니컬(transient receptor potential canonical: TRPC) 채널에 의해 매개된다. TRPC1 및 4는 ER의 결핍에 의해 활성화되는 내피 폐 미세혈관 세포에서 저장-작동되는(store-operated) Ca^{2+} 채널(SOC)이다.

[0007] Ca^{2+} 의 세포내 농도의 증가는 단백질 키나제 PKC α 의 활성을 상향조절한다. PKC α 는 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 포함한 다중 매개체에 대한 내피 투과성 반응의 주요 조절인자이다. PKC α 는 p120-카테인을 포스포릴화시키고, VE-카드헤린으로부터 이의 해리를 매개하며, 따라서 또한 p115RhoGEF 및 GDI-1을 포스포릴화시킴으로써 RhoA 활성화의 업스트림에 작용하는 VE-카드헤린 내재화 PKC α 를 야기한다. RhoA는 결국 Rho 키나제(ROCK)를 활성화시킴으로써 마이오신 광 체인 포스파타제(MLCP)의 포스포릴화-유도된 억제를 촉진한다. MLCP의 억제는 MLCK의 Ca^{2+} /칼모듈린-의존적 활성화에 의해 달성되고, 이는 MLC의 포스포릴화를 야기하고, 전염증성 매개체, 예를 들면, 트롬빈 및 히스타민 및 성장 인자에 반응하여 액토-미오신 수축을 유도하게 된다.

[0008] MT 세포골격의 무결성은 ER 저장소로부터 IP₃-유도된 Ca^{2+} 방출을 위해 필요하다. MT 불안정화제 또는 MT 안정화제 노코다졸, 콜치신 및 탁솔에 의한 MT 동역학의 변경은 Ca^{2+} 의 IP₃-게이트 방출을 억제하고, 이는 MT 동역학이 IP₃R의 완전한 활성화를 위해 필요하다는 것을 제시한다. MT 세포골격은 ER의 리모델링에 포함되며, 따라서 외부 자극에 반응하여 Ca^{2+} 전파의 조직화 및 증식을 보장해 준다. EB1과 EB3이 기질 상호작용 모듈 1(STIM1)과 직접적인 상호작용을 하더라도, ER은 MT 성장 단부들에 대해 부착하여 함께 연장된다. HeLa(HeLa 세포들은 EB3을 초과하지 않음) 내의 EB1의 결핍은 EB 돌출 사건을 감소시키나, 탑시가르긴에 의해 SOC의 활동을 억제하게 된다. 이것은 몇몇 다른 메카니즘들이 SOC의 활동과 내피 세포내의 칼슘 신호전달의 전파와 관련된다는 것을 제시한다. 내피 세포에서, 포낭 내의 IP₃R의 국부화가 ER Ca^{2+} 저장 결핍과 SOC 활성화를 위하여 중요하다. 이는 IP₃R의 활성화 및/또는 IP₃에 대한 반응성이 칼슘 신호전달의 주요 인자라는 것을 나타낸다. 이전 발견들과 일치

하게, 우리는 MT 세포골격이 IP₃에 반응하여 IP_{3R} 활성화를 양성 조절하고, 따라서 세포를 통해 세포외 신호를 전달하며 이는 생리학적 반응을 도출한다는 것을 확인하였다. EB1는 아니지만 EB3은 IP_{3R}과 직접적으로 상호작용하고, 이러한 상호작용은 내피 세포에서 칼슘 신호의 조직화에 중요한 제어점을 제공한다.

[0009] 혈관 내피 성장 인자(VEGF)는 직접 및 간접 방법을 통해 혈관신생에 기여하는 것으로 알려져 있다. VEGF는 미세 혈관 내피 세포에 과투과성을 부여하는 것으로 알려져 있고, 이는 혈장 단백질을 혈관외 공간으로 유출시켜 피브린 겔의 침착과 함께 혈관외유출 피브로겐의 응고를 야기한다. 혈관외 피브린은 신규한 혈관 및 성숙한 혈관 성 기질을 발생시키는 간중적 세포의 비성장을 지지하는 매트릭스를 제공한다. 따라서, VEGF-유도된 혈관 투과성의 억제는 혈관신생의 억제를 야기할 것이다. VEGF-유도된 혈관 투과성을 예방하고 혈관신생을 억제하는 신규한 치료법이 요구된다.

[0010] 혈관의 종양 네트워크의 형성, 즉 신혈관형성은 종양이 성장하고 전이되는 것을 도움으로써 종양 발달 전체에서 필수적인 역할을 한다. 일단 종양 병변이 직경에서 몇 밀리미터를 초과하면, 저산소증 및 영양소 부족이 "혈관 신생 스위치"를 촉발시킨다. 종양 세포는 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 방출하고, 이는 내피 세포의 발아 및 증식을 자극한다. 몇몇 성장 수용체를 표적으로 하는, VEGF-A에 대한 인간화 작용성-차단 항체 단편, 아바스틴(Avastin)(베바시주맙) 및 티로신 키나제 억제제, 소라페닙 및 수니티닙을 포함한, 몇몇 항혈관신생 요법이 암에 있어서 FDA에 의해 현재 승인되었다. 따라서, 종양 관련 혈관신생의 조절하는 요법은 암의 진행 및 전이를 제한하는 유망한 전략이다.

[0011] 내부 내피 혈액-망막 장벽의 손실 및 그 결과 황반 부종 및 손상은 노령 인구에서 안과 장애 및 설명의 주요 원인이다. 현재는, 연령 관련 황반 변성(age-related macular degeneration: AMD)으로도 알려진 이러한 병태는 치유 불가능하다. 추가로, AMD의 신혈관 형태는 맥락막으로부터의 혈관의 성장을 특징으로 하고, 이는 망막하 영역에서 브루치막(Bruch's membrane)을 통해 통과한다. 신혈관 AMD의 일반적인 근본적인 요인을 막는 몇몇 효과적인 요법은 맥락막에서 새로운 혈관이 발생하는 것을 파괴함으로써 시력 상실을 방해하는 목적으로 제한된다. 코르티코스테로이드 및 항-VEGF 제제의 유리체내 주사에 의한 현재 치료가 안구 질환의 진행을 지연시키는데 효과적임에도 불구하고, 이들은 설명의 위험성을 완전하게 제거하지는 못한다. 따라서, 안과 장애를 치료하고 시력 상실을 예방하는 신규하고 더 강력한 요법 또는 병용 요법이 요구된다.

발명의 내용

[0012] 단리된 웨타이드가 본 명세서에 제공된다. 웨타이드는 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3), 이의 단편, 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다. 웨타이드는 또한 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3), 이의 단편, 또는 이의 변이체로 이루어질 수 있다. 변이체는 보존적 치환을 포함할 수 있다. 변이체는 Ser/Thr-x-Ile-Pro 서열(서열번호 5), 최소 EB 결합 공통 모티프 서열을 함유하는 임의의 웨타이드 서열을 포함할 수 있다. 웨타이드는 지방산에 접합될 수 있고, 즉 미리스토일화(myristoylated)되거나 캐리어 웨타이드에 연결될 수 있다. 캐리어 웨타이드는 안텐나페디아 웨타이드(antennapedia peptide: AP), 안텐나페디아 웨타이드, 페네트라틴 웨타이드(penetratin peptide), TAT, 트랜스포탄(tranportan) 또는 폴리아르기닌일 수 있다. 웨타이드는 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함할 수 있는 약제학적 제형의 부분일 수 있다.

[0013] 본 발명은 치료가 필요한 환자에게 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 웨타이드를 투여하는 것을 포함하는, 혈관신생을 억제하는 방법을 제공한다. 방법은 본 발명의 웨타이드의 치료학적 유효량, 예를 들면, 혈관신생을 억제하는 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 추가로, 방법은 본 발명의 웨타이드의 치료학적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 치료가 필요한 환자가 암 또는 VEGF-유도된 투과성과 연관된 장애, 예를 들면, 시각 손상(visual impairment) 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색, 중식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 중식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 홍색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성을 앓고 있는, 치료 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 치료가 필요한 환자에게 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 웨타이드를 투여하는 것을 포함하는, VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 방법은 본 발명의 웨타이드의 치료학적 유효량, 예를 들면, VEGF-유도된 혈관 투과성을 억제하는 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 추가로, 방법은 본 발명의 웨타이드의 치료학적 유효량을

포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 치료가 필요한 환자가 암 또는 VEGF-유도된 투과성과 연관된 장애, 예를 들면, 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 홍색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성을 앓고 있는, 치료 방법을 제공한다.

[0015] 임의의 상기 방법에 있어서, 투여되는 웨타이드는 캐리어 웨타이드, 예를 들면, 안텐나페디아 웨타이드(AP), 안텐나페디아 웨타이드, 페네트라틴 웨타이드, TAT, 트랜스포탄 또는 폴리아르기닌에 연결될 수 있다. 추가로, 임의의 상기 방법에 있어서, 투여되는 웨타이드는 지방산에 접합될 수 있고, 예를 들면, 미리스토일화될 수 있다.

[0016] 임의의 상기 방법에 있어서, KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 웨타이드는 하나 이상의 VEGF 억제제와 조합으로 투여되고, 여기서 "VEGF 억제제"는 항-VEGF 항체 및 이의 단편, 항-VEGF 수용체(항-VEGFR) 항체 및 이의 단편, VEGF 및/또는 VEGFR의 활성 또는 신호 전달 경로를 억제하는 길항 웨타이드 및 소분자를 의미한다. 예시적인 VEGF 억제제는 베바시주맙(Bevacizumab)(아바스틴), 라니비주맙(Ranibizumab)(루센티스(Luentis)), 페갑타닙(Pegaptanib)(마쿠겐(Macugen)), 아플리버셉트(Aflibercept)(아일리아(Eylea)), 소라페닙(Sorafenib)(넥스바(Nexvar)), 수니티닙(Sunitinib)(수텐트(Sutent)), 파조파닙(Pazopanib)(보트리엔트(Votrient)), 악시티닙(Axitinib)(인라이타(Inlyta)), PTK787/ZK222584, ZD-6474, SU6668, PD-547,632, VEGF-Trap, CEP-7055, NM-3, 또는 SU11248을 포함한다.

[0017] 본 발명의 임의의 상기 방법에 있어서, KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 웨타이드는 눈 질환을 위한 레이저 치료와 조합으로 투여될 수 있고, 여기서 "눈 질환"은 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 홍색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성을 의미한다.

[0018] 본 발명의 임의의 상기 방법에 있어서, KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 웨타이드는 스테로이드 또는 눈 질환을 위한 임의의 현재 방법 치료와 조합으로 투여될 수 있다.

[0019] 추가로, 본 발명의 임의의 상기 방법에 있어서, 본 발명의 단리된 웨타이드, VEGF 억제제, 스테로이드 또는 임의의 다른 치료는 유리체내 주사에 의해 또는 국소적으로, 예를 들면, 점안액의 형태로 투여될 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한 치료가 필요한 환자에서 혈관신생의 억제를 위한 약제의 제조를 위한 단리된 웨타이드의 용도를 제공하고, 여기서 웨타이드는 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 용도는 본 발명의 웨타이드의 치료학적 유효량, 예를 들면, 혈관신생을 억제하는 유효량을 포함하는 약제의 제조를 위한 본 발명의 단리된 웨타이드의 용도를 포함한다. 추가로, 본 발명은 본 발명의 웨타이드의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 포함하는 약제의 제조를 위한 본 발명의 단리된 웨타이드의 용도를 제공한다. 본 발명은 암 또는 VEGF-유도된 투과성과 연관된 장애, 예를 들면, 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 홍색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성을 앓고 있는 대상체에게 투여하는 약제의 제조를 위한 본 발명의 단리된 웨타이드의 용도를 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한 VEGF-유도된 혈관 장애의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 단리된 웨타이드의 용도를 제공하고, 여기서 웨타이드는 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 용도는 본 발명의 웨타이드의 치료학적 유효량, 예를 들면, VEGF-유도된 혈관 투과성을 억제하는 유효량을 포함하는 약제의 제조를 위한 본 발명의 단리된 웨타이드의 용도를 포함한다. 추가로, 본 발명은 본 발명의 웨타이드의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 포함하는 약제의 제조를 위한 본 발명의 단리된 웨타이드의 용도를 제공한다. 본 발명은 암 또는 VEGF-유도된 투과성과 연관된 장애, 예를 들면, 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성

성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 홍색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성을 앓고 있는 대상체에게 투여하는 약제의 제조를 위한 본 발명의 웹타이드의 용도를 제공한다.

[0022] 본 발명의 임의의 상기 용도에 있어서, 투여되는 단리된 웹타이드는 캐리어 웹타이드, 예를 들면, 안тен나페디아 웹타이드(AP), 안тен나페디아 웹타이드, 페네트라틴 웹타이드, TAT, 트랜스포탄 또는 폴리아르기닌에 연결될 수 있다. 추가로, 임의의 상기 방법에 있어서, 투여되는 단리된 웹타이드는 지방산에 접합될 수 있고, 예를 들면, 미리스토일화될 수 있다.

[0023] 임의의 상기 용도에 있어서, KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 웹타이드는 하나 이상의 VEGF 억제제와 조합으로 투여되고, 여기서 "VEGF 억제제"는 항-VEGF 항체 및 이의 단편, 항-VEGFR 항체 및 이의 단편, VEGF 또는 VEGFR의 활성 또는 신호전달 경로를 억제하는 길항 웹타이드 및 소분자를 의미한다. 예시적인 VEGF 억제제는 베바시주맙(아바스틴), 라니비주맙(루센티스), 페갑타닙(마쿠겐), 아플리버셉트(아일리아), 소라페닙(넥스바), 수니티닙(수텐트), 파조파닙(보트리엔트), 악시티닙(인라이타), PTK787/ZK222584, ZD-6474, SU6668, PD-547,632, VEGF-Trap, CEP-7055, NM-3, 또는 SU11248을 포함한다.

[0024] 본 발명의 임의의 상기 용도에 있어서, KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는 약제는 눈 질환의 레이저 치료와 조합으로 투여될 수 있고, 여기서 "눈 질환"은 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막 병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 홍색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성을 앓고 있는 대상체에게 투여되는 약제를 의미한다.

[0025] 본 발명의 임의의 상기 용도에 있어서, 약제는 스테로이드 또는 눈 질환의 임의의 현재 방법 치료와 조합으로 투여될 수 있다.

[0026] 추가로, 본 발명의 임의의 용도에 있어서, 약제는 유리체내 주사에 의해 또는 국소적으로, 예를 들면, 점안액의 형태로 투여될 수 있다.

[0027] 본 발명은 혈관신생의 억제를 위한 단리된 웹타이드를 제공하고, 여기서 웹타이드는 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 본 발명은 또한 혈관신생의 억제를 위한 본 발명의 웹타이드의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 암 또는 VEGF-유도된 투과성과 연관된 장애, 예를 들면, 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 홍색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성을 앓고 있는 대상체에서 혈관신생의 억제를 위한 단리된 웹타이드 또는 웹타이드의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명은 또한 VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애를 앓고 있는 환자에서 혈관신생의 억제에서 사용하기 위한 단리된 웹타이드를 제공하고, 여기서 단리된 웹타이드는 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), FTEIPTI(서열번호 3) 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함한다.

[0030] 본 발명은 또한 VEGF-유도된 혈관 투과성의 억제를 위한 본 발명의 단리된 웹타이드의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 암 또는 VEGF-유도된 투과성과 연관된 장애, 예를 들면, 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 홍색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성을 앓고 있는 대상체에서 VEGF-유도된 투과성의 억제를 위한 단리된 웹타이드 또는 웹타이드의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명은 또한 VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애의 치료를 위한 단리된 웹타이드를 제공한다. 예를 들면, VEGF 연관된 혈관 장애는 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성

망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 홍색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성이다.

[0032] 혈관신생의 억제 또는 VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애의 치료를 억제하는데 사용되는 본 발명의 임의의 웨타이드는 캐리어 웨타이드, 예를 들면, 안텐나페디아 웨타이드(AP), 안텐나페디아 웨타이드, 페네트라틴 웨타이드, TAT, 트랜스포탄 또는 폴리아르기닌에 연결될 수 있다. 추가로, 혈관신생의 억제 또는 VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애의 치료를 위한 본 발명의 임의의 단리된 웨타이드는 지방산에 접합될 수 있고, 예를 들면, 미리스토일화될 수 있다.

[0033] 본 발명의 임의의 단리된 웨타이드 또는 조성물은 하나 이상의 VEGF 억제제와 조합으로 투여될 수 있고, 여기서 "VEGF 억제제"는 항-VEGF 항체 및 이의 단편, 항-VEGFR 항체 및 이의 단편, VEGF 또는 VEGFR의 활성 또는 신호 전달 경로를 억제하는 길항 웨타이드 및 소분자를 의미한다. 예시적인 VEGF 억제제는 베바시주맙(아바스틴), 라니비주맙(루센티스), 페갑타닙(마쿠겐), 아플리버셉트(아일리아), 소라페닙(넥스바), 수니티닙(수텐트), 파조파닙(보트리엔트), 악시티닙(인라이타), PTK787/ZK222584, ZD-6474, SU6668, PD-547,632, VEGF-Trap, CEP-7055, NM-3, 또는 SU11248을 포함한다. 추가로, 웨타이드 또는 VEGFR은 유리체내 주사에 의해 또는 국소적으로, 예를 들면, 점안액의 형태로 투여된다.

[0034] 본 발명의 임의의 단리된 웨타이드 또는 조성물은 눈 질환의 레이저 치료와 조합으로 투여될 수 있고, 여기서 "눈 질환"은 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 홍색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성을 의미한다.

[0035] 본 발명의 단리된 웨타이드 또는 조성물은 스테로이드 또는 눈 질환의 임의의 현재 방법 치료와 조합으로 투여될 수 있다.

[0036] 추가로, 본 발명의 단리된 웨타이드 또는 조성물은 유리체내 주사에 의해 또는 국소적으로, 예를 들면, 점안액의 형태로 투여될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 내피 장벽의 염증-유도된 과투과성에서 EB3의 역할을 보여준다. EB3은 성장하는 MT 단부와 IP₃R₃의 일시적인 상호작용을 확립하고, IP₃R₃를 민감화하고, 염증 동안 저장소로부터의 Ca²⁺ 방출 및 SOC-의존적 Ca²⁺ 진입을 둘 다 양성 조절한다. 이는 Ca²⁺ 신호전달의 증폭 및 p120-카테닌의 PKC α-매개된 포스포릴화 및 액토-미오신 수축성을 통한 증가된 투과성을 야기한다.

도 2는 EB 결합 모티프(밝게 강조됨)와 함께 인간 IP₃ 수용체(IP₃R₃ 유형 3의 794-814 aa)의 정렬을 보여준다. IP₃R₃ 웨타이드(서열번호 1)는 정렬 아래 도시된다.

도 3은 EB3의 EB3 소수성 결합 홈으로 도킹된 EB3 구조(마젠타) 및 IP₃R₃ 유도된 웨타이드(서열번호 1)의 리본 묘사를 나타내고; 180° 회전이 도시된다. IP₃R₃ 유도체 웨타이드는 디스커버리 스튜디오(Discovery Studio) 3.0 소프트웨어와 함께 Z-Dock 프로그램을 사용하여 도킹되었다. 웨타이드와 EB3 사이의 결합 에너지는 -68.882 kcal/mol인 것으로 계산되었다.

도 4는 IP₃R₃ 웨타이드(서열번호 1)가 PAR-1 활성화에 반응하여 ER로부터의 Ca²⁺ 방출을 억제한다는 것을 보여준다. A. AP-부착된 IP₃R₃ 웨타이드 또는 대조군(AP) 웨타이드로 전처리된 HMVECs에 Fura 2-AM을 로딩하고, 세포 외 Ca²⁺의 부재 및 존재하에 트롬빈(50 nM)으로 세포를 자극한 후, 340/380 비를 컴퓨터로 계산하였다. 화살표는 트롬빈 추가 시간이다. B. 플롯은 기저 값에 대한 최대 증가로서 컴퓨터로 계산된 트롬빈-유도된 Ca²⁺ 방출 및 진입에 대한 평균±SD를 보여준다. 증가를 정규화하여 동일한 실험(n=4)으로부터의 미처리된 세포를 조절한다.

도 5는 EBIN(서열번호 3) 및 IP₃R₃ 웨პ타이드(서열번호 1)와 착물인 EB3의 리본 묘사를 나타낸다. 컴퓨터로 계산된 결합 에너지는 IPR 및 EBIN에 대하여 각각 -68.882 및 -60.251이다.

도 6A 내지 도 6B 패널 A는 일부민-결합된 에반스 블루(Evans Blue) 염료의 피하 혈관 누출을 나타내고, 이는 VEGF의 피내 주사에 의해 유도되었고, 패널 B는 620nm에서 분광광도법으로 측정된 바와 같은 혈관 누출을 정량한다.

도 7A 내지 도 7D 패널 A는 EBIN이 마트리겔 코팅된 웰에서 관생성(tubulogenesis)을 억제하였음을 보여준다(축척 막대 200 μ m). 패널 B는 면적당 분지의 수를 나타내고; UT = 미처리; Contr = 대조군 웨პ타이드; **p<0.001(그룹당 n=3 웰). 패널 C는 생체내 마트리겔 플러그의 혜메마톡실린 및 애오신(HE) 염색을 보여준다. 그룹 1은 대조군 웨პ타이드로 처리되었고, 그룹 3은 0, 36 및 60시간에 Myr-EBIN로 처리되었고; 그룹 2는 오직 36 및 60시간 처리를 제공받았다. 패널 D는 mm^2 당 관의 수를 나타낸다; ***p< 0.001(그룹당 n=15). 축척 막대, 200 μ m.

도 8A 내지 도 8B는 종양 성장 곡선 및 신혈관형성에 대한 EBIN 처리의 효과의 효과를 보여준다. 패널 A는 이종 이식 모델에서 종양 성장 곡선을 플롯팅하고; 평균을 나타낸다; 그룹당 n=8 마우스. 패널 B는 종양의 외부에서 계수된 면적당 관의 수를 플롯팅한다; n=25 필드/마우스; N= 5 마우스; *, p<0.05; **, p<0.01.

도 9는 맥락막 신혈관형성(CNV) 유도에 대한 동물 모델의 개괄을 보여준다: (a) 레이저 화상 및 브루치막의 파열을 유도하기 위한 망막의 색소 상피에 집중된 레이저 범을 설명하는 눈의 단면도, (b) 브루치막의 파열은 망막으로의 맥락막의 혈관 증식 및 CNV 병변을 유도한다.

도 10은 레이저-유도된 CNV, 안구 간섭 단층촬영(OCT), 안저 플루오레세인 혈관조영법, 그룹 1-3에 대한 처리 및 조직 수확(표 4에 기재된 바와 같음)에 대한 스케줄의 개요를 보여준다.

도 11은 CNV에 대한 EBIN 처리의 효과를 보여준다. 대조군 웨პ타이드(Myr-FAEIPPTI), EBIN(Myr-FTEIPPTI) 및 마우스 항-VEGF 항체(LEAF™)의 유리체내 주사에 의해 처리된 마우스에서 혈관 누출(a) 및 병변(b-c)의 상관적 분석. 레이저 광응고 15일 후, 안저 플루오레세인 혈관조영법(a) 및 상응하는 광학 간섭 단층촬영(b)의 대표적인 이미지; 황색 숫자는 상응하는 CNV 병변을 나타낸다. 누출 면적은 병변 크기와 관련이 있다. (c) CNV 병변은 망막 색소 상피/맥락막/공막의 평면-마운트를 사용하여 이소렉틴 B4에 있어서 염색에 의해 검출된다. (a) 및 (c)에서 도시된 이미지를 사용한 플루오레세인 누출(d) 및 병변(e)의 면적의 정량; 그룹당 n=6-9 마우스; **, p<0.01. 축척 막대, (a) 및 (c)에서 각각 200 μ m 및 100 μ m. 그룹 사이의 비교는 ANOVA를 사용하여 수행하였다. 항-VEGF 처리는 손상된 면적의 상처 치유/흉터화를 유의미하게 변경한 반면, EBIN에 의한 치료는 치유 과정에 영향을 미치지 않았다.

도 12는 EBIN에 대한 7-일 급성 독성 연구의 영향을 보여준다. EBIN(1 μ g/눈)에 의한 유리체내 처리 8일에서 안저 플루오레세인 혈관조영법(a) 및 상응하는 광학 간섭 단층촬영(b)의 대표적인 이미지. EBIN은 다양한 체액 내에 작은 결정/침전물을 형성한다는 것을 주의하고; 망막 맥관구조 및 망막 색소 상피, 맥락막, 공막에서 가시적 변화가 검출되지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038]

본 발명자들은 이노시톨 1,4,5-트리스포스페이트(IP₃) 수용체 유형 3(IP₃R₃)의 EB3-상호작용 도메인으로부터 유도된 웨პ타이드가 말단 결합 단백질 3(EB3)과 IP₃R₃ 사이의 상호작용을 감소시키고, VEGF-유도된 혈관 투과성 또는 VEGF-유도된 미세혈관 누출을 억제시킨다는 놀라운 발견을 하였다. 본 발명의 웨პ타이드는 다양한 염증 질환에서 장벽-보호 성질을 입증하고, 시험관내 및 생체내 항-혈관신생 성질을 입증한다.

[0039]

ER 저장소 및 EB3으로부터의 Ca²⁺의 IP₃-게이트 방출을 조절하는 MT 세포골격의 역할에 의해 제안된 이전 작업은 ER Ca²⁺ 결핍에 필요하다. IP₃R₃는 EB 결합 공통 모티프, Ser/Thr-x-Ile-Pro(SxIP)(서열번호 5). IP₃R₃ 서열(KFARLWTEIPTAIT--서열번호 1)을 기반으로 한 짧은 웨პ타이드는 EB3에 대한 높은 결합 활성을 보인다(실시예 1 참조). 이를 연구는 IP₃R₃과 EB3 사이의 상호작용이 IP₃R 활성화의 메커니즘에서 중요하다는 것을 입증한다.

[0040]

내피 장벽의 염증-유도된 과투파성에서 EB3의 역할은 성장하는 MT 단부와 IP₃R₃의 일시적인 상호작용을 확립하는 이의 능력에 초점을 맞춘다. 그 결과 EB3는 IP₃R₃을 IP₃으로 민감화하고, 소포체(ER)로부터의 Ca²⁺ 방출을 양성

조절한다. 이는 SOC-의존적 Ca^{2+} 진입 및 Ca^{2+} 신호전달의 증폭을 야기한다. 세포액 Ca^{2+} 의 증가된 농도는 VE-카드헤린 접착의 분해를 야기하는 p120-카테닌의 PKC α -매개된 인산화를 유도한다. 이는 또한 세포 모양 변화를 야기하는 RhoA-의존적 액토-미오신 수축성을 촉진한다. 도 1을 참조한다. 이러한 작업은 국제 특허 출원 제 PCT/US2012/042118호 및 미국 특허 제8,912,139호에 상세하게 기재되어 있고, 이는 그 전문이 본 명세서에 참조로서 인용된다.

[0041] 하기 기재된 방법 및 물질은 VEGF-유도된 미세혈관 누출을 예방하거나 억제하고, 따라서 혈관신생을 억제하고, 몇가지 예를 들자면, 황반 변성, 당뇨병성 망막병증, 암, 중심성 망막 정맥 폐색 및 분지성 망막 정맥 폐색과 같은 장애를 치료하는데 유용하다.

정의

[0043] 본 명세서에서 사용되는 용어는 단지 특정한 예시들을 기재하기 위해 사용되며 제한되는 것을 의도하지 않는다. 첨부된 청구항들과 명세서에서 사용되는 바와 같이, "하나", "그리고" 및 "그"는 문맥상에서 달리 명백하기 지시하지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다.

[0044] 본 명세서에서 수치 범위의 기재에 있어서, 동일한 정밀도를 가지는 각각의 중간 수치는 충분히 고려된 것이다. 예를 들면, 6-9의 범위에 대해서는, 7과 8은 6과 9에 추가되는 것으로 고려된다. 6.0-7.0의 범위에 대해서는, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 및 7.0의 수치가 명백하게 고려된다.

[0045] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "혈관신생"은 새로운 혈관이 기존의 혈관으로부터 형성되는 과정을 의미한다. 예를 들면, 시토카인 및 세포외 기질 프로테아제는 새로운 관을 형성하는 기존의 혈관으로부터 내피 세포의 이동을 위한 제조에서 조직 리모델링을 유도한다.

[0046] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "단편"은 참조 펩타이드 또는 폴리펩타이드 또는 핵산 서열의 일부분을 의미할 수 있다.

[0047] 2개 이상의 폴리펩타이드 또는 뉴클레오타이드 서열의 맥락에서, 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 사용되는 "동일하다" 또는 "동일성"은 서열이 특정한 영역상에서 동일한 특정한 비율의 잔기 또는 뉴클레오티드를 갖는다는 것을 의미할 수 있다. 2개의 서열들을 최적으로 정렬하고, 2개의 서열들을 특정한 영역상에서 비교하고, 동일한 나머지가 2개의 서열내에서 발생하는 위치들의 개수를 결정하여 매칭(matching) 위치들의 개수를 산출하고, 특정한 영역상에서 위치들의 총 개수만큼 매칭위치의 개수를 분할하고, 그 결과를 100을 증배하여 서열 동일성 비율을 산출하여, 상기 특정한 비율이 계산된다. 2개의 서열들이 서로 다른 길이를 가지거나, 또는 그 배열이 한 개 이상의 지그재그(staggered) 형태의 단부들을 생성하고, 상기 특정한 비교 영역이 단지 단일한 서열을 가지고 있는 경우에는, 단일한 서열의 나머지들은 계산 분모에 포함되고 분자에는 포함되지 않는다.

[0048] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "펩타이드" 또는 "폴리펩타이드"는 아미노산의 연결된 서열을 의미할 수 있으며, 천연, 합성, 또는 개질 또는 천연 및 합성의 조합일 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "실질적으로 동일"은 제1 및 제2 단백질과 뉴클레오타이드 서열이 6-100 또는 그 이상의 아미노산 뉴클레오타이드의 영역에서 적어도 50-99%가 동일하다는 것을 의미할 수 있다.

[0050] "치료함", "치료" 또는 "치료하다"는 각각 증상의 발생, 임상학적 표시, 또는 일시적 또는 영구적인 상태의 병태 또는 장애의 근본적인 병리 상태를 경감, 억압(suppress), 억제(repress), 제거, 예방 또는 지연시킨다는 것을 의미할 수 있다. 병태 또는 장애를 예방한다는 것은 본 발명의 약물을 질환의 발생 이전에 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 병태 또는 장애를 억압하는 것은, 병태 또는 장애의 임상학적인 증상이 나타나기 이전이 아니라, 병태 또는 장애의 유도 이후에 대상체에게 본 발명의 약물을 투여하는 단계를 포함한다. 병태 또는 장애를 억제한다는 것은 질환의 임상학적 증상 이후에 대상체에게 본 발명의 약물을 투여하는 것을 포함한다.

[0051] 용어 "치료학적으로 유효함"은 대상체의 병태 및 투여되는 특정한 화합물에 따라 좌우된다. 용어는 목적하는 임상학적 효과를 달성하는 유효량을 의미한다. 치료학적 유효량은 치료되는 병태의 속성, 활성이 바람직한 시간 길이, 대상체의 연령 및 병태에 따라 다양하고, 결국 건강 관리 제공자에 의해 투여된다. 하나의 측면에 있어서, 펩타이드 또는 조성물의 치료학적 유효량은 VEGF-유도된 혈관 투과성 및/또는 혈관신생을 억제하거나 감소시키거나 예방하는데 유효한 양이다.

[0052] "변이체"는 아미노산의 삽입, 삭제 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 다르나, 적어도 하나의 생물학적인 활성을 보유하고 있는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. "생물학적 활성"의 대표적인 예는 단부 결합

(End Binding) 단백질, 툴-유사 수용체(TLR)에 결합되고 특정 항체에 의해 결합되는 기능을 포함한다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하고 있는 아미노산 서열을 가지는 참조 단백질과 실제적으로 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 아미노산의 보존적 치환, 예를 들면, 아미노산을 유사한 성질(예를 들면, 친수성, 하전된 영역의 정도 및 분포)의 다른 아미노산으로 대체하는 것은 당해 분야에서 사소한 변화를 포함하는 것으로 인식된다. 이러한 사소한 변화들은 당해 분야에서 이해되는 바와 같이, 아미노산의 수치료 지수(hydrophatic index)를 고려함으로써 부분적으로 파악될 수 있다. 문헌[Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132(1982)]. 아미노산의 수치료 지수는 소수성과 전하를 고려하여 결정되는 것이다. 유사한 수치료 지수를 가지는 아미노산들은 치환되어도 여전히 단백질 기능을 보유할 수 있다는 것은 당해 분야에서 알려져 있다. 하나의 측면에 있어서, ±2의 수치료 지수를 가지는 아미노산들은 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 생물학적 기능을 가지는 단백질을 생성하는 치환을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 웹타이드와 관련하여 아미노산의 친수성을 고려하면, 그 웹타이드의 가장 큰 로컬 평균 친수성, 즉 항원성 및 면역원성과 상관 관계를 가진다고 보고되어 있는 유용한 측정 항목의 연산이 가능하다. 미국 특허 제4,554,101호는 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 인용된다. 당해 분야에서 이미 알려진 바와 같이, 유사한 친수성 수치를 가지는 아미노산의 치환은 생물학적 활동, 예를 들면, 면역원성을 가지는 웹타이드를 생성할 수 있다. 치환은 각각의 ±2의 범위내에서 친수성 수치를 가지는 아미노산들에 의해 실행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 수치는 둘 다 그 아미노산의 특정한 측쇄에 의해 영향을 받는다. 소수성, 친수성, 전하, 크기 및 다른 특성에 의해 밝혀진 바와 같이, 상기 관찰에 의하면, 생물학적인 기능과 양립하는 아미노산 치환들은 아미노산의 상대적 유사성, 그리고 특히 그 아미노산들의 측쇄들에 의해 영향을 받는다.

[0053] 아미노산 서열 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), KFARLWAEIPTAIT(서열번호 2)(본 명세서에서 IP₃R₃ 웹타이드로도 지칭됨), FTEIPTI(서열번호 3)(본 명세서에서 단부 결합 억제성 웹타이드, 또는 "EBIN"로도 지칭됨), 표 1에 기재된 웹타이드, 이의 단편, 또는 이의 변이체를 포함할 수 있는 웹타이드가 본 명세서에서 제공된다. 변이체는 보존적 치환을 포함할 수 있다. 웹타이드는 EB 결합 공통 모티프 서열, 예를 들면, IP₃R₃의 EB 결합 공통 서열, 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. IP₃R₃의 EB 결합 공통 서열은 Ser/Thr-x-Ile-Pro(서열번호 5)일 수 있다. 웹타이드는 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), KFARLWAEIPTAIT(서열번호 2), FTEIPTI(서열번호 3), Ser/Thr-x-Ile-Pro(서열번호 5)를 포함하는 공통 서열, 본 명세서에서 표 1에 기재된 웹타이드, 상기의 단편, 또는 상기의 보존적 변이체로 이루어질 수 있다. 변이체는 Ser/Thr-x-Ile-Pro 서열(서열번호 5)을 함유하는 임의의 웹타이드 서열, 최소 EB 결합 공통 모티프 서열을 포함할 수 있다.

[0054] 웹타이드는 KFARLWTEIPTAIT(서열번호 1), KFARLWAEIPTAIT(서열번호 2)(본 명세서에서 IP₃R₃ 웹타이드로도 지칭됨), FTEIPTI(서열번호 3)(본 명세서에서 단부 결합 억제성 웹타이드, 또는 "EBIN"로도 지칭됨), 본 명세서에서 표 1에 기재된 웹타이드, 이의 단편, 또는 이의 변이체의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 여기서 웹타이드 또는 웹타이드를 포함하는 폴리웹타이드는 7 아미노산 잔기, 8 아미노산 잔기, 9, 아미노산 잔기, 10, 아미노산 잔기, 11, 아미노산 잔기, 12 아미노산 잔기, 13 아미노산 잔기, 14 아미노산 잔기, 15 아미노산 잔기, 16 아미노산 잔기, 17 아미노산 잔기, 18 아미노산 잔기, 19, 아미노산 잔기, 20 아미노산 잔기, 21 아미노산 잔기, 22 아미노산 잔기, 23 아미노산 잔기, 24 아미노산 잔기, 25 아미노산 잔기, 26 아미노산 잔기, 27 아미노산 잔기, 28 아미노산 잔기, 29 아미노산 잔기, 30 아미노산 잔기, 35 아미노산 잔기, 40 아미노산 잔기, 45 아미노산 잔기, 50 아미노산 잔기, 55 아미노산 잔기, 60 아미노산 잔기, 65 아미노산 잔기, 70 아미노산 잔기, 75 아미노산 잔기, 80 아미노산 잔기, 85 아미노산 잔기, 90 아미노산 잔기, 95 아미노산 잔기 또는 100 아미노산 잔기이다.

[0055] 웹타이드는 아미노산 서열이 하나 이상의 아미노산 치환, 아미노산 삽입, 아미노산 결손, 카복시 말단 절단, 또는 아미노 말단 절단을 갖는 것으로 개질될 수 있다.

[0056] 웹타이드는 또한 글리코실화, 포스포릴화, 설페이트화, 글리코실화, 아니메이트화, 카복실화, 아세틸화될 수 있다. 예를 들면, C-말단은 아미드화, 웹타이드 알코올 및 알데히드의 첨가, 에스터의 첨가, p-니트라일린 및 티오에스터의 첨가 및 멀티펩란티젠(multipeptidogen) 웹타이드에 의해 개질될 수 있다. N-말단 및 측쇄는 폐길화, 아세틸화, 포르밀화, 지방산의 첨가, 벤조일의 첨가, 브로모아세틸의 첨가, 피로글루타밀의 첨가, 석시닐화, 테트라부티옥시카보닐의 첨가 및 3-머캅토프로필의 첨가, 아실레이션(예를 들면, 리포펩타이드), 비오티닐화, 인산화, 황산화, 글리코실화, 말레이미도 기의 도입, 킬레이팅 모이어티, 발색단 및 형광단에 의해 개질될 수 있다.

[0057] 웹타이드는 지방산에 접합될 수 있고, 예를 들면, 웹타이드는 미리스토일화된다. 예를 들면, 지방산은 웹타이드

의 N-말단에 접합될 수 있고, 이러한 지방산은 카프릴산(C8), 카프르산(C10), 라우르산(C12), 미리스트산(C14), 팔미트산(C16) 또는 스테아르산(C18) 등을 포함한다. 추가로 웨타이드의 시스테인은 팔미토일화될 수 있다.

[0058] 웨타이드는 또 다른 웨타이드, 예를 들면, 캐리어 웨타이드에 접합되거나 연결될 수 있다. 캐리어 웨타이드는 세포-투과를 촉진할 수 있고, 예를 들면, 안тен나페디아 웨타이드, 페네트라틴 웨타이드, TAT, 트랜스포탄 또는 폴리아르기닌이다.

[0059] 웨타이드는 고리형일 수 있다. 본 명세서에 기재된 웨타이드는 단일 또는 다중 이황화 브릿지를 첨가하거나, N-말단과 C-말단 사이의 단일 또는 다중 아미드 결합을 첨가하거나, 가열하여 고리 고리화하거나, 측쇄 고리화(예를 들면, 락탐 브릿지, 티오에스터), 탄화수소-안정화된 웨타이드에 의해 고리화될 수 있다.

[0060] 웨타이드는 무거운 아이소토프 라벨링, 예를 들면, ¹⁵N, ¹³C, FITC, 캐리어 단백질에 대합 접합, 영상화제에 대한 접합, 형광단/렌쳐 쌍을 갖는 FRET 기질, 웨타이드-DNA 접합, 웨타이드-RNA 접합 및 웨타이드-효소 라벨링에 의해 라벨링될 수 있다.

[0061] 웨타이드는 융합 단백질, 예를 들면, 류신 지페 도메인과 같은 올리고머화를 촉진하는 융합된 폴리웨타이드 또는 웨타이드; 면역글로불린 불변 영역과 같은 안정성을 증가시키거나 반감기를 감소시키는 폴리웨타이드 또는 웨타이드; 및 본 발명과 상이한 치료적 활성을 갖는 웨타이드 또는 폴리웨타이드, 화학요법제, 조직 특이적 표적화를 위한 항체 또는 단백질 내에 있을 수 있다.

[0062] 융합은 폴리웨타이드의 아미노 말단 또는 카복시 말단에서 만들어질 수 있다. 융합 단백질은 링커 또는 아답터 문자 없이 직접적일 수 있거나, 링커 또는 아답터 문자를 사용하여 간접적일 수 있다. 링커 또는 아답터 문자는 하나 이상의 아미노산 잔기, 전형적으로 약 20 내지 약 50 이하의 아미노산 잔기일 수 있다. 링커 또는 아답터 문자는 또한 융합된 모이어티의 포화를 허용하는 프로테아제에 대한 절단 부위와 함께 설계될 수 있다. 예를 들면, 웨타이드는 인간 IgG의 Fc 영역의 하나 이상의 도메인에 융합되어 웨타이드의 반감기를 증가시키거나, Fab 가변 도메인을 첨가하여 웨타이드의 반감기를 높게 만들 수 있다.

처리 방법

[0064] 혈관신생을 억제하거나 예방하거나 감소시키는 방법이 본 명세서에 제공된다. 혈관신생은, 몇 가지만 예를 들자면, 종양 성장, 암의 진행 및 전이, 실명 및 황반 변성, 당뇨병성 망막병증과 관련이 있다.

[0065] 본 발명은 종양 성장, 암의 진행 및 전이와 관련된 혈관신생을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 종양 성장 및 암, 예를 들면, 뇌 종양(수막종, 다형성 교아종, 역형성 별아교세포종, 소뇌 성상세포종, 다른 고급 또는 저급 성상세포종, 뇌간교종, 희소돌기 아교세포종, 혼합 신경교종, 다른 신경교종, 뇌 신경아세포종, 두개 인두종, 간뇌 신경교종, 종자세포종, 수모세포종, 상의세포종, 맥락막 망상 종양, 송파체 조직질실 종양, 신경 절교세포종, 신경상피 종양, 뉴런 또는 혼합 뉴런 신경교 종양 포함), 폐 종양(소세포 암종, 표피모양 암종, 선암종, 대세포 암종, 유암종, 기관지샘 종양, 중피종, 육종 또는 혼합 종양 포함), 전립선 암(선암종, 편평상피 세포 암종, 이행 세포 암종, 전립선남의 암종, 또는 암육종 포함), 유방암(선암종 또는 유암종 포함), 또는 위, 장, 또는 결장 암(선암종, 침습성 도관 암종, 침윤성 또는 침습성 소엽 암종, 수질 암종, 도관 제자리 암종, 소엽 제자리 암종, 콜로이드질 암종 또는 유두의 파제트병 포함), 피부 암(흑색종, 평편상피세포 암종, 인간 피부 케라티노사이트의 종양 진행, 기저 세포 암종, 혈관주위세포종 및 카포시육종 포함), 림프종(호지킨 질환 및 비호지킨 림프종 포함), 육종(골육종, 연골육종 및 섬유육종 포함)의 치료, 억제 및 예방 방법뿐만 아니라 신경계 장애의 치료 방법을 제공한다.

[0066] 본 발명의 웨타이드의 투여는 다른 암 요법, 항종양제 및 화학요법제, 예를 들면, 아로마타제 억제제, 항-에스트로겐, 항-안드로겐, 고나도렐린 효능제, 토포아이소머라제 I 억제제, 토포아이소머라제 II 억제제, 미세소관 활성제, 알킬화제, 레티노이드, 카로테노이드, 토코페롤, 사이클로옥시제나제 억제제, MMP 억제제, mTOR 억제제, 항대사성물질, 플라틴 화합물, 메티오닌 아미노웨타이드 억제제, 비스포스포네이트, 항증식성 항체, 헤파라나제 억제제, Ras 종양발생 아형의 억제제, 텔로머라제 억제제, 프로테아좀 억제제, 혈액 악성종양의 치료에 사용되는 화합물, F1t-3 억제제, Hsp90 억제제, 키네신 스판들 단백질 억제제, MEK 억제제, 항종양 항생제, 니트로소우레아, 지질 키나제 활성을 표적화/감소시키는 화합물, 단백질 또는 지질 포스파타제 활성을 표적화/감소시키는 화합물, 임의의 추가의 항-혈관신생 화합물, 및 이의 조합물과 조합될 수 있다. 항종양제의 특정한 예는 아자시티딘, 악사티오프린, 베마시주맙, 블레오마이신, 카페시타빈, 카르보플라틴, 클로라부실, 시스플라틴, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 다우노루비신, 도세탁셀, 독시플루리딘, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 플루오로우라실, 켙시타빈, 헤르셉틴, 이다루비신, 메클로레타민, 멜팔란, 머캅토푸린, 메토트렉세이트, 미

톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 타플루포시드, 테니포시드, 티오구아닌, 레티노산, 발루비신, 빙글라스틴, 빙크리스틴, 빙데신, 비노렐빈, 수용체 터로신 키나제 억제제, 및 이의 조합물을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 항종양 또는 화학요법제의 추가의 예는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0067] 본 발명은 본 발명의 웨타이드를 투여하는 것을 포함하는, 습성 및 건성 황반 변성을 포함한 황반 변성의 치료 방법을 제공한다. 습성 황반 변성은 비정상적인 혈관이 황반 뒤에서 성장하는 경우에 발생한다. 이러한 혈관은 유약하고 유액 및 혈액을 누출할 수 있고, 이는 황반의 흉터를 야기하고 빠르고 심각한 손상에 대한 가능성을 야기한다. 브루치막은 파열되고, 일반적으로 근처에 균피가 침착된다. 이는 새로운 혈관 성장, 또는 신혈관형성이 발생하는 곳이다. 중심시는 왜곡되거나 짧은 시간 동안, 때때로 수일 안에, 완전히 손실될 수 있다.

[0068] 황반 변성의 치료 방법에 있어서, 본 발명의 웨타이드의 안구 투여가 고려된다. 추가로, 웨타이드의 투여는 다른 항혈관신생 약물, 예를 들면, 베바시주맙(아바스틴), 라니비주맙(루센티스), 폐პ타닙(마쿠겐), 아플리버셉트(아일리아), 로다민(Lodamin)(TNP-470의 중합체 제형), 베르테포르핀(Verteporfin)(비수다인(Visudyne))(광역학 요법 또는 PDT), 올리고뉴클레오타이드 요법, Dr5에 대한 항체, c-Met를 표적화하는 소분자 키나제 조절제, 퀴놀론 유도체, 융합된 이환형 피리딘 및 피라진 유도체, 또는 CDK4/6의 억제제로서 피롤로피리미딘 화합물과 같은 다른 치료제와 조합될 수 있다. 추가의 치료제는 당해 분야에 알려져 있다. 추가로, 황반 변성을 치료하기 위한 본 발명의 웨타이드의 투여는 이식 가능한 원시경, 레이저 광응고 및 황반 전좌 수술과 같은 다른 절차와 조합될 수 있다.

[0069] VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애의 치료 방법이 본 명세서에서 제공된다. 예를 들면, 본 발명은 시각 손상 또는 시력 상실(실명), 황반 변성, 중심성 망막 정맥 폐색, 분지성 망막 정맥 폐색 증식성 당뇨병성 망막병증, 신혈관형성성 연령 관련 황반 변성(AMD), 미숙아의 망막병증, 허혈성 망막병증, 안구내 신혈관형성, 각막 신혈관형성, 망막 신혈관형성, 맥락막 신혈관형성, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 당뇨병성 망막 부종, 및 증식성 당뇨병성 망막병증, 홍채 홍색증, 신혈관 녹내장, 망막모세포종, 포도막염 및 각막 이식 신혈관형성의 치료 방법을 제공한다.

대상체

[0070] 대상체는 포유동물일 수 있고, 이는 인간일 수 있다. 진단 전에, 대상체는 하나 이상의 위험 인자에 노출되거나 암 발달에 대한 유전적 위험성을 갖기 때문에 임에 대한 위험성이 있을 수 있다. 하나 이상의 위험 인자는, 예를 들면, 암의 가족력을 가진 대상체, 연령, 흡연, 일광 노출, 알코올 음료 섭취, 신체 활동의 부족, 비만 및/또는 식이 부족을 포함할 수 있다.

[0071] 진단 전에, 대상체는 하나 이상의 위험 인자에 노출되거나 황반 변성 발달에 대한 유전적 위험성을 갖기 때문에 황반 변성에 대한 위험성이 있을 수 있다. 하나 이상의 위험 인자는, 예를 들면, 황반 변성의 가족력을 가진 대상체, 연령, 흡연, 연장된 일광 노출, 고지방 식단, 식이 부족, 고혈압, 비만, 및/또는 밝은 색 눈을 포함할 수 있다.

투여

[0072] 생리학적으로 허용 가능한 조성물, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 화합물 및/또는 미셀을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 적합한 방법이 당해 분야에 잘 알려져 있다. 웨타이드를 투여하는데 하나 이상의 경로가 사용될 수 있지만, 특정한 경로가 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 반응을 제공할 수 있다. 상황에 따라, 웨타이드를 포함하는 약제학적 조성물은 체강 내로 적용 또는 주입, 피부 또는 점막을 통한 흡수, 섭취, 흡입, 및/또는 순환계로 도입될 수 있다. 예를 들면, 특정한 상황에서, 약제학적 조성물을 경구적으로; 정맥내, 종양내, 복강내, 대뇌내(뇌실질내), 뇌실내, 근육내, 안구내, 동맥내, 내문, 병변내, 척수내, 척추강내, 심실내, 경피, 피하, 복강내, 코내, 장, 국소적으로, 설하, 요도, 질, 또는 직장 수단에 의한 주사 또는 주입을 통해; 제어되거나, 지연되거나, 지속되거나 또는 달리 개질된 방출 시스템에 의해; 또는 이식 장치에 의해 전달되는 것이 바람직할 것이다. 하나의 측면에 있어서, 약물 노출은 시간에 대하여 일정한 약물 혈장 농도를 유지함으로써 최적화될 수 있다. 이러한 정상 상태는 일반적으로 약물의 청소율 및 지속되는 혈장 농도에 따른 용량에서 연속적인 약물 주입에 의하여 임상적 환경에서 달성된다. 목적하는 경우, 조성물은 흥미있는 부위를 표적화나는 종양내 투여, 척추강내 투여, 대뇌내(뇌실질내) 투여, 뇌실내 투여, 또는 동맥내 또는 정맥내 투여를 통해 국지적으로 투여된다. 대안적으로, 웨타이드는 그 위에서 목적하는 화합물이 흡수되거나 캡슐화되는 매트릭스, 막, 스폰지, 또는 또 다른 적절한 물질의 이식을 통해 국지적으로 투여된다. 이식 장치가 사용되는 경우, 장치는, 하나의 측면에 있어서, 임의의 적합한 조직 또는 기관에 이식되고, 목적하는 화합물의 전달은, 예를 들

면, 확산, 지효성 볼루스, 또는 연속 투여를 통한다.

[0075] 웨타이드의 안구 투여는 안구내 이식물, 유리체내 주사, 전신적 투여, 국소 적용, 나노입자, 마이크로입자, 점안액, 생점착성 젤 또는 페브린 실란트, 상피 세포 장벽 캠플렉스의 투과성을 조절하는 다당류, 각막 약물 전달을 개선시키는 웨타이드, 점막 투여, 예를 들면, 바이오벡터 중합체를 사용하는 투여, 수성 안과 스프레이 및 전기역학적 눈 스프레이 치료를 사용하여 수행될 수 있다. 하나의 특정한 실시형태에 있어서, 웨타이드는 유리체내 주사에 의해 또는 국소적으로, 예를 들면, 점안액의 형태로 투여될 수 있다.

[0076] 웨타이드는 단일요법으로, 또는 다른 치료와 동시에 또는 정기적으로 투여될 수 있고, 이는 수술 또는 종양의 제거일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "동시" 또는 "동시에"는 웨타이드 및 다른 치료가 서로 48시간, 바람직하게는 24시간, 더 바람직하게는 12시간, 매우 더 바람직하게는 6시간, 가장 바람직하게는 3시간 이하 내레 투여되는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "정기적으로"는 웨타이드의 투여가 다른 치료와 상이한 시간에 반복 투여에 대하여 특정한 빈도인 것을 의미한다. 예를 들면, 본 발명의 웨타이드는 하나 이상의 VEGF 억제제와 함께 투여될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 웨타이드는 하나 이상의 VEGF 억제제와 함께 또는 시력 상실의 레이저 치료와 조합으로 투여될 수 있다.

[0077] 웨타이드는 약 120시간, 118시간, 116시간, 114시간, 112시간, 110시간, 108시간, 106시간, 104시간, 102시간, 100시간, 98시간, 96시간, 94시간, 92시간, 90시간, 88시간, 86시간, 84시간, 82시간, 80시간, 78시간, 76시간, 74시간, 72시간, 70시간, 68시간, 66시간, 64시간, 62시간, 60시간, 58시간, 56시간, 54시간, 52시간, 50시간, 48시간, 46시간, 44시간, 42시간, 40시간, 38시간, 36시간, 34시간, 32시간, 30시간, 28시간, 26시간, 24시간, 22시간, 20시간, 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 55분, 50분, 45분, 40분, 35분, 30분, 25분, 20분, 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분, 및 1분을 포함하는 또 다른 치료 전의 임의의 시간점에서 투여될 수 있다. 웨타이드는 약 120시간, 118시간, 116시간, 114시간, 112시간, 110시간, 108시간, 106시간, 104시간, 102시간, 100시간, 98시간, 96시간, 94시간, 92시간, 90시간, 88시간, 86시간, 84시간, 82시간, 80시간, 78시간, 76시간, 74시간, 72시간, 70시간, 68시간, 66시간, 64시간, 62시간, 60시간, 58시간, 56시간, 54시간, 52시간, 50시간, 48시간, 46시간, 44시간, 42시간, 40시간, 38시간, 36시간, 34시간, 32시간, 30시간, 28시간, 26시간, 24시간, 22시간, 20시간, 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 55분, 50분, 45분, 40분, 35분, 30분, 25분, 20분, 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분, 및 1분을 포함하는 웨타이드의 제2 치료 전의 임의의 시간점에서 투여될 수 있다.

[0078] 웨타이드는 약 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 14시간, 16시간, 18시간, 20시간, 22시간, 24시간, 26시간, 28시간, 30시간, 32시간, 34시간, 36시간, 38시간, 40시간, 42시간, 44시간, 46시간, 48시간, 50시간, 52시간, 54시간, 56시간, 58시간, 60시간, 62시간, 64시간, 66시간, 68시간, 70시간, 72시간, 74시간, 76시간, 78시간, 80시간, 82시간, 84시간, 86시간, 88시간, 90시간, 92시간, 94시간, 96시간, 98시간, 100시간, 102시간, 104시간, 106시간, 108시간, 110시간, 112시간, 114시간, 116시간, 및 120시간을 포함하는 또 다른 치료 후의 임의의 시간점에서 투여될 수 있다. 웨타이드는 약 120시간, 118시간, 116시간, 114시간, 112시간, 110시간, 108시간, 106시간, 104시간, 102시간, 100시간, 98시간, 96시간, 94시간, 92시간, 90시간, 88시간, 86시간, 84시간, 82시간, 80시간, 78시간, 76시간, 74시간, 72시간, 70시간, 68시간, 66시간, 64시간, 62시간, 60시간, 58시간, 56시간, 54시간, 52시간, 50시간, 48시간, 46시간, 44시간, 42시간, 40시간, 38시간, 36시간, 34시간, 32시간, 30시간, 28시간, 26시간, 24시간, 22시간, 20시간, 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 55분, 50분, 45분, 40분, 35분, 30분, 25분, 20분, 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분, 및 1분을 포함하는 웨타이드의 제2 치료 후의 임의의 시간점에서 투여될 수 있다.

제형

[0080] 방법은 웨타이드의 투여를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 웨타이드는 통상적인 방식으로 제형화된 정제 또는 로젠지의 형태일 수 있다. 예를 들면, 경구 투여를 위한 정제 및 캡슐은 결합제, 충전제, 윤활제, 봉괴제 및 습윤제일 수 있는 통상적인 부형제를 함유할 수 있다. 결합제는 시럽, 아카시아, 젤라틴, 소르비톨, 트리아칸트, 전분의 점액 및 폴리비닐피롤리돈을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 충전제는 락토스, 당, 미세결정질 셀룰로스, 옥수수전분, 인산칼슘, 및 소르비톨일 수 있다. 윤활제는 스테아르산마그네슘, 스테아르산, 탈크, 폴리에틸렌 글리콜, 및 실리카를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 봉괴제는 감자전분 및 나트륨 전분 글

리콜레이트일 수 있다. 습윤제는 나트륨 라우릴 설페이트일 수 있다. 정제는 당해 분야에 잘 알려진 방법에 따라 코팅될 수 있다.

[0081] 본 명세서에서 제공되는 웨타이드는 또한 액체 제형, 예를 들면, 수성 또는 유성 혼탁액, 용액, 에멀전, 시럽, 및 엘릭서제일 수 있다. 웨타이드는 또한 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클로 구성되는 건조 제품으로서 제형화될 수 있다. 이러한 액체 제형은 첨가제, 예를 들면, 혼탁제, 유화제, 비수성 비히클 및 보존제를 함유할 수 있다. 혼탁제는 소르비톨 시럽, 메틸 셀룰로스, 글루코스/당 시럽, 젤라틴, 하이드록시에틸셀룰로스, 카복시메틸 셀룰로스, 알루미늄 스테아레이트 젤, 및 수소화된 식용 지방일 수 있다. 유화제는 레시틴, 소르비탄 모노올레이트, 및 아카시아일 수 있다. 비수성 비히클은 식용 오일, 아몬드 오일, 정제 코코넛 오일, 유성 에스터, 프로필렌 글리콜, 및 에틸 알코올일 수 있다. 보존제는 메틸 또는 프로필 p-하이드록시벤조에이트 및 소르브산일 수 있다. 특히, 본 발명의 웨타이드는 국소 투여를 위한 수성 제형, 예를 들면, 점안액의 형태일 수 있다.

[0082] 본 명세서에서 제공되는 웨타이드는 또한 좌제로서 제형화될 수 있고, 이는 좌제 기제, 예를 들면, 코코아 버터 또는 글리세라이드를 함유할 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 웨타이드는 또한 흡입용으로 제형화될 수 있고, 이는 건조 분말 또는 디클로로디플루오로메탄 또는 트리클로로플루오로메탄과 같은 추진제를 사용하는 에어로졸로서 투여될 수 있는 용액, 혼탁액, 또는 에멀전과 같은 형태일 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 웨타이드는 또한 수성 또는 비수성 비히클, 예를 들면, 크림, 연고, 로션, 페이스트, 약물첨가된 석고, 패치, 또는 막을 포함하는 경피 제형으로서 제형화될 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 웨타이드는 또한 비경구 투여, 예를 들면, 주사, 종양내 주사 또는 연속 주입을 위해 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 혼탁액, 용액, 또는 유성 또는 수성 비히클 중의 에멀전의 형태일 수 있고, 혼탁제, 안정화제, 및 분산제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 제형화제를 함유할 수 있다. 웨타이드는 또한 살균 피로겐-무함유 물을 포함하지만 이에 한정되지 않는 적합한 비히클로 재구성되는 분말 형태로 제공될 수 있다.

[0083] 본 명세서에서 제공되는 웨타이드는 또한 테포 제형으로 제형화될 수 있고, 이는 이식에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 웨타이드는 적합한 중합체성 또는 소수성 물질(예를 들면, 허용 가능한 오일 중의 에멀전), 이온 교환 수지, 또는 난용성 유도체(예를 들면, 난용성 염)와 함께 제형화될 수 있다.

투여량

[0085] 방법은 웨타이드의 치료학적 유효량을 치료가 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 요법에서 사용하기 위해 필요한 치료학적 유효량은 치료되는 병태의 속성, TLR 활성을 활성화시키는데 바람직한 시간 길이, 및 환자의 연령/상태에 따라 다양한다. 일반적으로, 그러나, 성인 인간 치료에 사용되는 용량은 전형적으로 일당 0.001 mg/kg 내지 약 200 mg/kg 범위이다. 용량은 일단 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 g/kg일 수 있다. 목적하는 용량은 단일 용량, 또는 적절한 간격으로, 예를 들면, 일당 2, 3, 4 또는 그 이상의 하위용량으로 투여되는 다중 용량으로 편리하게 투여될 수 있다. 다중 투여가 바람직할 수 있거나 필요할 수 있다.

[0086] 투여량은 약 0.05 µg/kg, 0.06 µg/kg, 0.07 µg/kg, 0.08 µg/kg, 0.09 µg/kg, 0.1 µg/kg, 0.2 µg/kg, 0.3 µg/kg, 0.4 µg/kg, 0.5 µg/kg, 0.6 µg/kg, 0.7 µg/kg, 0.8 µg/kg, 0.9 µg/kg, 1 µg/kg, 1.5 µg/kg, 2 µg/kg, 3 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 50 µg/kg, 75 µg/kg, 100 µg/kg, 125 µg/kg, 150 µg/kg, 175 µg/kg, 200 µg/kg, 225 µg/kg, 250 µg/kg, 275 µg/kg, 300 µg/kg, 325 µg/kg, 350 µg/kg, 375 µg/kg, 400 µg/kg, 425 µg/kg, 450 µg/kg, 475 µg/kg, 500 µg/kg, 525 µg/kg, 550 µg/kg, 575 µg/kg, 600 µg/kg, 625 µg/kg, 650 µg/kg, 675 µg/kg, 700 µg/kg, 725 µg/kg, 750 µg/kg, 775 µg/kg, 800 µg/kg, 825 µg/kg, 850 µg/kg, 875 µg/kg, 900 µg/kg, 925 µg/kg, 950 µg/kg, 975 µg/kg과 같은 임의의 투여량일 수 있다.

[0087] 투여량은 약 0.05 mg/kg, 0.06 mg/kg, 0.07 mg/kg, 0.08 mg/kg, 0.09 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg, 425 mg/kg, 450 mg/kg, 475 mg/kg, 500 mg/kg, 525 mg/kg, 550 mg/kg, 575 mg/kg, 600 mg/kg, 625 mg/kg, 650 mg/kg, 675 mg/kg, 700 mg/kg, 725 mg/kg, 750 mg/kg, 775 mg/kg, 800 mg/kg, 825 mg/kg, 850 mg/kg, 875 mg/kg, 900 mg/kg, 925 mg/kg, 950 mg/kg, 975 mg/kg, 1 g/kg, 2 g/kg, 3 g/kg, 4 g/kg, 5 g/kg, 6 g/kg, 7 g/kg, 8 g/kg, 9 g/kg, 또는 10 g/kg과 같은 임의의 투여량일 수 있다.

키트

[0089] VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애 또는 혈관신생을 치료하기 위하여 사용될 수 있는 키트가 본 명세서에서 제공된다. 키트는 하나 이상의 웹타이드를 포함할 수 있다. 웹타이드는 약제학적 조성물의 부분일 수 있다. 키트는 키트를 사용하고 웹타이드 또는 제형의 투여를 수행하기 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

[0090] 키트는 또한 각각의 컨테이너가 분리된 시약을 함유하는 하나 이상의 컨테이너, 예를 들면, 바이알 또는 병을 포함할 수 있다. 키트는 추가로 서면 설명서를 포함할 수 있고, 이는 어떻게 본 명세서에 기재된 방법을 수행하는지 또는 해석하는지를 설명할 수 있다.

[0091] 실시예

[0092] 실시예 1

[0093] Ca²⁺의 IP3-게이트 방출의 메커니즘에서 IP3R와 EB3 상호작용의 역할

[0094] 본 발명의 웹타이드(서열번호 1 및 서열번호 3)에 의한 EB3 기능의 다른자리입체성(allosteric) 조절이 VEGF-유도된 혈관 누출 및 혈관신생 둘 다를 억제하는지 여부를 측정하였다. 마우스를 마트리겔의 피하 주사, 종양 세포 또는 브루치막의 레이저 화상에 의해 VEGF 또는 혈관신생으로 챌린징하였다.

[0095] IP₃R₅는 EB 결합 공통 모티프, Ser/Thr-x-Ile-Pro(SxIP)(서열번호 5)를 함유한다. IP₃R₃ 서열을 기반으로 한 짧은 웹타이드(KFARLWTEIPTAIT-서열번호 1)(도 2)는 -68.882 kcal/mol의 자유 에너지 결합으로 EB3에 대한 높은 결합 활성을 나타낸다(도 3). EB3과 IP₃R₃의 상호작용의 역할은 문헌[Geyer *et al.*, *Cell Rep* 12(1):79-89; 2015]에 의해 최근 기재되었다. 10 nM에서 세포 투과성 안тен나페디아 웹타이드(AP)의 C-말단에 부착된 IP₃R₃ 서열에 의한 세포의 전처리는 트롬빈에 반응하여 저장소로부터의 Ca²⁺ 방출을 감소시켰고(도 4A), 이는 IP₃R₃과 EB3 사이의 상호작용이 IP₃R₃ 활성화의 메커니즘에서 중요하다는 것을 제시한다. Ca²⁺ 방출의 조절에서 IP₃R₃ 웹타이드 및 탁솔의 효과를 비교하였다. 트롬빈 자극 전 20분 동안 탁솔 5 µg/ml에 의한 세포의 전처리는 IP₃R₃ 웹타이드와 동일한 정도로 ER로부터의 Ca²⁺ 방출을 억제한다는 것이 확인되었다(도 4B).

[0096] 실시예 2

[0097] 단부 결합 억제성 웹타이드(EBIN)의 구조-기반 디자인

[0098] 단부 결합 억제성 웹타이드, 즉 EBIN을 EB 결합 포켓에 대한 IPR 웹타이드의 실리코 알라닌-스캐닝 및 완전하게 유연한 도킹에서 컴퓨터 사용을 기반으로 디자인하였다(표 2 및 3). 결합 자유 에너지(ΔG)를 사용하여 EB 단백질과 웹타이드의 상호작용의 안정화에서 각각의 잔기의 기여도를 측정하였다.

[0099] 하기 기준을 사용하였다: ΔG 값.gtoreq.1=안정화 잔기 ΔG 값.gtoreq.-1=불안정화 잔기 ΔG 값<-1 내지 0 내지 <1=중성 잔기 알라닌 스캐닝은 안정화(0.50 Kj/mol 또는 그 이상의 양성 결합 에너지; 흑색으로 표시) 및 불안정화(-1의 음성 결합 에너지, 청색으로 나타냄) 잔기를 드러낸다.

표 1

IP ₃ R ₃ 의 Thr-x-Pro 모티프를 둘러싼 아미노산 잔기의 절단 후, 컴퓨터로 계산된 결합 자유 에너지의 변화		
웹타이드 서열	자유 에너지 결합(- kcal/mol)	서열번호
KFARLWTEIPTAIT(IP ₃ R ₃ 웹타이드)	-68.882	1
FARLWTEIPTAIT	-68.809	6
RLWTEIPTAIT	-46.571	7
LWTEIPTAIT	-54.443	8
WTEIPTAIT	-42.886	9
TEIPTAIT	-37.16	10
TEIPTAI	-39.337	11
TEIPTA	-41.234	12
TEIPT	-34.5	13
FARLWTEIPTAI	-51.42	14
TEIP	-45.071	15
RTE IPTI	-49.74	16
FRTE IPTI	-40.728	17

FTKIPTI	-55.469	18
KFARTKIPTAIT	-57.32	19
FARTEIPTAI	-33.415	20
KFARTEIPTAIT	-55.736	21

표 2

[0101] 알라닌에 대하여 IP_3R_3 의 각각의 아미노산 잔기를 돌연변이시킨 후, 컴퓨터로 계산된 결합 자유 에너지의 변화: $\text{K}_1\text{F}_2\text{A}_3\text{R}_4\text{L}_5\text{W}_6\text{T}_7\text{E}_8\text{I}_9\text{P}_{10}\text{T}_{11}\text{A}_{12}\text{I}_{13}\text{T}_{14}$

아미노산	ΔG
K1	0.25
F2	0.52
R4	0.01
L5	-1.03
W6	-1.08
T11	0.91
I13	1.33
T14	0.40

표 3

[0102] 알라닌에 대하여 EBIN의 각각의 아미노산 잔기를 돌연변이시킨 후, 컴퓨터로 계산된 결합 자유 에너지의 변화.

아미노산	ΔG
F1	1.64
T2	1.07
E3	0.02
I4	0.68
T11	0.98
I7	0.94

[0103] 결과적으로, 14 아미노산 IPR 웹타이드는 7 아미노산 단부 결합 억제성 웹타이드(EBIN; FTEIPTI(서열번호 3))으로 감소되었다. 도 5는 EB3과 EBIN 사이의 상호작용을 입증한다. IP_3R_3 과 유사하게(도 5에서 황색 막대로 도시됨), EBIN은 EB 산성 꼬리와 코일-코일 도메인 사이의 소수성 흄에 결합한다. EB3에 대한 EBIN의 계산된 결합 에너지는 -60.251 kcal/mol이고, 이는 IPR과 EB3 사이의 결합 에너지와 유사하다. EBIN의 위치 2에서 트레오닌은 알라닌에 대한 이 잔기의 돌연변이가 결합을 완전하게 철폐시키기 때문에 EB3 계면에 결합하는데 중요한 역할을 한다. 따라서, 단일 아미노산 돌연변이 TA 웹타이드, FAEIPTI(서열번호 4)는 결합 손실 대조군으로서 사용되었다.

[0104] 실시예 6

[0105] EBIN는 VEGF-유도된 미세혈관 누출을 예방하였다

[0106] VE-카드헤린은 단백질 풍부 유액에 대한 혈관벽의 제한적인 장벽을 유지하기 위하여 내피 세포를 연속적인 단층 내로 브릿지시키는 내피 내 정선의 주요 부착 단백질이다. VEGF 및 Ang2는 둘 다 VE-카드헤린의 티로신 인산화를 유도하고 내재화 및 분해에 대하여 VE-카드헤린를 표적화함으로써, 직접적으로, 또는 세포내 힘에 대한 반응으로 인한 VE-카드헤린 부착의 붕괴를 사용하여, 간접적으로 VE-카드헤린 부착을 불안정화시킨다.

[0107] VE-카드헤린 부착과 미세소관 세포골격 사이의 중요한 교차-상호작용은 최근 기재되었다(Komarova *et al.* *Molecular Cell* 48(6): 914-25; 2012.). 칼시뉴린, 즉 칼슘-의존적 포스파타제는 EB3를 탈-포스포릴화하고, MT 세포골격의 EB3-의존적 재조직화를 촉진하고, 따라서 VE-카드헤린 부착의 붕괴에 대한 전방향 공급 메커니즘을 제공하기 때문에 이러한 교차-상호작용에서 주요 신호전달 역할자인 것으로 확인되었다.

[0108] EBIN의 주사가 혈관 내피 성장 인자(VEGF)-유도된 미세혈관 누출을 예방하는지 여부를 조사하는 연구를 수행하

였다. Balb/cJ 마우스를 EBIN 웨타이드($1\mu M/kg$) 또는 대조군 웨타이드(2TA 돌연변이)로 전처리한 다음, 인간 VEGF(50 ng/kg 체중)를 피내 주사하여 알부민-결합된 에반스 블루의 혈관 누출을 유도하였다(도 6A 참조). 추가로, 포름아미드-추출된 에반스 블루를 620nm 에서 분광광도법으로 정량하고, 헤모글로빈(740nm) 및 피부 중량에 대하여 교정하였다(도 6B 참조). 도 6에서 제공된 데이터는 EBIN 웨타이드에 의한 동물 처리가 인간 VEGF의 피내 주사에 의해 유도된 바와 같은 피하 혈관 누출을 유의미하게 억제하였고, 따라서 EBIN이 혈관신생의 억제 및 VEGF-유도된 혈관 투과성과 연관된 장애의 치료를 위한 신규하고 강력한 요법을 나타낼 수 있다는 것을 입증하였다.

[0109] 실시예 7

EBIN은 혈관신생의 모델에서 혈관 성장을 파괴하였다

시험관내 관생성 및 생체내 혈관신생에 대한 EBIN의 효과를 마트리겔 모델을 사용하여 조사하였다. 인간 제대 정맥 내피 세포의 단일 세포 혼탁액을 $1\mu M$ EBIN 또는 대조군 웨타이드의 존재하에 마트리겔-코팅된 웰 위에 플레이팅하고; 관 형성을 16시간 후 평가하였다. 도 7A 및 7B에 도시된 바와 같이, EBIN은 이러한 시험관내 2D 마트리겔 모델에서 관의 형성을 유의미하게 파괴하였다.

이소성 마트리겔 혈관신생의 시험관내 모델에서 혈관 내성장에 대한 EBIN 효과를 또한 조사하였다. 혈관 내성장 마트리겔을 헤파린 및 VEGF과 미리 혼합하고, 내피 세포와는 혼합하지 않고, 마우스의 하복부에 i.p. 주사하였다. 마우스당 2개의 $400\mu l$ 플리그가 존재하였다. 대조군 웨타이드(그룹 1)로 처리된 마우스에서, 새롭게 형성된 혈관은 마트리겔 내에서 성장하였다(도 7C,1). 이를 혈관은 혈액에 의해 기능하고 판류되며, 이는 혈관 내의 적혈구의 존재로부터 명백하다. 추가로, 마우스를 마트리겔 주사 시간(도 7C,2; 그룹 2) 또는 마트리겔 후 36시간(도 7C,3; 그룹 3)에 EBIN으로 처리하였다. 마트리겔 플리그를 96시간에 제거하고, 고정화시키고, HE로 염색하여 관 형성을 평가하였다. 관의 수는 뚜렷하게 감소하였고, 이는 99% 신뢰성으로 혈관 내성장에서 유의미한 감소를 지시한다. 후-처리가 항-VEGF 요법 및 탁솔과 유사한 것을 제시하는 치료만큼 효과적이었고, EBIN은 관 퇴행을 유발할 수 있다는 것을 주목하여야 한다. 그럼에도 불구하고, EBIN은 내피 세포 사멸 또는 세포 주기 저지를 유도하지 않았다(데이터는 도시되지 않음).

[0113] 실시예 8

EBIN은 종양 세포 성장을 억제하였다

이종이식 모델을 사용하는 삼중 음성(에스트로겐 수용체[ER], 프로게스테론 수용체[PR] 및 인간 상피 성장 인자 수용체-2[HER-2]는 이 세포주에서 발현되지 않음) 인간 유방 암 세포의 성장률에 대한 EBIN의 효과를 조사하였다. 누드 마우스(그룹당 n=8 마우스)에 3×10^6 MDA-MB-231 인간 유방 암 세포를 좌상단 유방 지방 패드 내로 주사하였다. 모든 마우스는 13일에 종양이 발달하였다. 그 시간점에서, 마우스를 무작위화하고, 5개의 그룹으로 나누고, 각 그룹에 처리를 제공하였다. 종양이 2000mm^3 크기에 도달하는 때인 24일에 연구를 종료하였다. 대조군 웨타이드 및 EBIN에 의한 처리를 7일 동안 매일 수행하였다. EBIN 및 대조군 웨타이드를 꼬리 정맥 주사를 통해 전달하였다. 대조군 웨타이드를 $5\mu M/kg$ 체중으로 주사하였다. EBIN을 $1\mu M/kg$ 및 $5\mu M/kg$ 체중으로 주사하였다.

탁솔에 의한 처리를 복강내 주사를 통해 $10\mu M/kg$ 체중으로 4일 동안 수행하였다. 종양 크기를 1주에 3회 측정하였다. 도 8A에 도시된 바와 같이, 탁솔 그룹에서 종양 성장에서 유의미한 차이가 관찰되었고, EBIN-처리된 그룹에서 종양 크기의 감소가 4 처리 후 관찰되었다. 이러한 효과는 상당히 일시적이지만, EBIN-처리된 그룹에서 종양의 크기는 대조군 미처리 그룹과 비교하여 유의미하게 작았다. $1\mu M/kg$ EBIN로 처리된 마우스는 미처리 마우스와 동일한 속도로 종양이 발달하였고, 이는 저용량이 영향을 미치지 않는다는 것을 제시한다.

종양 신혈관형성에 대한 EBIN 처리의 효과를 보정하기 위하여, 종양 조직을 수집하고, 고정화시키고, 해마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다. 종양 덩어리 외부의 세포 수를 점수화하고, 면적당 정규화하였다. 종양 성장 곡선과 일치하게, 종양 외부의 관 수는 오직 탁솔 및 EBIN($5\mu M/kg$)-처리된 그룹에서만 유의미하게 감소하였다. EBIN은 탁솔과 비교하여 뛰어난 효과를 보여주었다(도 8B 참조). 모든 다른 그룹은 미처리 그룹과 비교하여 차이가 없다는 것을 보여주었다. 이를 데이터는 EBIN이 항-혈관신생 성질을 입증하고, 병리적인 혈관신생의 치료에 사용될 수 있다는 것을 제시한다. 오직 용량 $5\mu M/kg$ 체중의 탁솔 및 EBIN에 의한 처리만이 종양 외부의 관 수를 유의미하게 감소시켰다.

[0118] 실시예 9

[0119] 레이저-유도된 맥락막 신혈관형성(CNV)의 생체내 모델을 치료하는 EBIN의 효능의 측정

[0120] 신혈관 AMD는 맥락막으로부터의 혈관의 성장을 특징으로 하고, 이는 망막하 영역으로 브루치막을 통해 투과한다. 레이저-유도된 맥락막 신혈관형성(CNV)의 마우스 모델은 AMD의 삼출 형태의 잘 확립된 모델이다. 레이저 빔에 의한 브루치막의 파괴는 새로운 맥락막 관의 망막 내로의 성장을 촉진시키고, 따라서 AMD의 병리적인 상태를 모사한다(도 9). 이러한 모델은 신혈관 AMD에 대한 VEGF 요법의 임상적 효능을 예측하는데 성공적으로 사용되어 왔다.

[0121] EBIN의 장벽-보호적 및 항-혈관신생 활성을 평가하기 위하여, EBIN을 CNV의 뮤린 모델에서 시험한다. EBIN에 의한 처리 이외에, LEAF™ 항체(마우스 VEGF-A에 대항하는 단클론 래트 항체) 및 대조군 웨타이드(Myr-FAEIP1)를 각각 양성 및 음성 실험 대조군으로 사용하였다.

[0122] C57/BL6 마우스(6-8주 연령)를 찰스 리버 라보라토리(Charles River Laboratory)로부터 구입하고, 승인된 프로토콜에 따라 사용하였다. 마우스를 케타민/자일라진(100 mg/5 mg/kg IP)의 혼합물로 마취시키고, 이들이 동공을 사이클로마이드릴(Cyclomydril)(알콘 라보라토리스(Alcon Laboratories), 미국 텍사스주 포트워스 소재)의 국소적 적용으로 확장시켰다. 영상화 카메라로 안저를 관찰하고, 영상-안내 레이저 시스템(미크론 IV(Micron IV), 포에닉스 리서치 라보라토리스(Phoenix Research Laboratories), 미국 캘리포니아주 플리산톤 소재)를 사용하여 레이저 광응고를 유도하였다. 532nm의 파장, 50μm의 고정화된 직경, 70ms의 기간, 및 210 내지 250 mW의 전력 수준으로 녹색 아르곤 레이저 필스에 의해 오른쪽 눈에서 하나씩, 시신경으로부터 동일한 거리에서 4개의 레이저 화상을 유도하였다. 레이저 스팟에서 거품 또는 작은 망막하 출혈(직경 < 1mm)의 출현은 브루치막의 파열 및 레이저-유도된 CNV의 확인을 지시하는 것을 제공한다. 이러한 절차는 오직 각각의 마우스의 오른쪽 눈에만 수행하였다. 레이저-유도된 광응고의 스케줄 및 처리 프로토콜은 도 10에 도시한다. 대조군 및 EBIN 웨타이드(1μg/눈) 및 마우스 VEGF-A에 대항하는 항체(2μg/눈; LEAF™; 낮은 내독소, 아지드-무함유)에 의한 처리를 레이저 광응고 후 유리체내 주사(2μl)를 통해 오른쪽 눈에 1회 투여하였다. 눈을 살균 식염수로 부드럽게 행구어 윤활 점안액을 제거하고, 항생제 연고, 에리트로마이신(포우게라(Fougera), 미국 뉴욕주 멜빌 소재)로 처리하였다. 그 다음, 이들이 깨 때까지 레이저 처리 후 마우스를 35°C에서 미리 데운 따뜻한 플레이트에 놓았다. 안구 간섭 단층촬영(OCT)으로 8일 및 15일에 EBIN 항-혈관신생 효능을 평가하고, 혈관조영법을 오직 15일에만 수행하였다(도 10). 플루오레세인 혈관조영법 및 OCT를 환자에 대하여 임상적으로 일상적으로 사용되는 절차와 유사한 망막 맥관구조의 영상화를 위하여 수행하였다. 이는 마우스의 꼬리 정맥을 통해 주사 of 0.2% 형광 염료 10μl의 정맥내 주사를 통해 수행하였다. 처리 그룹당 10마리의 마우스의 샘플 크기는 문헌[Gong et al., PLoS One 2015, 10(7): e 0132643]에서 측정된 파라미터를 기반으로 혈관 누출(레슨 영역)에서 가정된 10% 차이를 검출하는데 충분한 전력을 제공한다.

[0123] 표 4는 10개의 처리 그룹(처리 그룹당 n=10 CNV 마우스, 총 30 마리의 마우스), 약물 섭생법 및 처리에 반응하여 측정하기 위한 의도된 종점을 열거한다. 그룹 1 마우스는 Myr-대조군 웨타이드를 제공받고, 그룹 2 마우스는 Myr-EBIN으로 처리하고, 그룹 3 마우스는 양성 대조군인 LEAF™ 항체로 처리하였다. 모든 처리는 도 10에서 개괄된 바와 같이 유리체내 경로를 통해 CNV의 시간에 단일 주사로서 전달된다.

표 4

치료 그룹, 약물 섭생법 및 마우스에서 CNV의 처리에 대한 반응을 측정하기 위한 종점 분석.				
그룹	N	약물	섭생법	종점 분석
1	10	Myr-대조군 웨타이드(1μg/눈)	1 ul 중의 1μg/눈의 유리체내 주사; 1일에(CNV의 시간에)	1. 15일에 플루오레세인 혈관조영법 및 8일 및 15일에 OCT
2	10	Myr-EBIN 유리체내(1μg/눈)	1 ul 중의 1μg/눈의 유리체내 주사; 1일에(CNV의 시간에)	2. 15일에 병리조직학적 시험을 위한 눈 수집
3	10	LEAF™ 항체	1 ul 중의 2μg/눈의 유리체내 주사(인간에서 2.5mg 용량과 동일함); 1일에(CNV의 시간에)	
합계	30			

[0125] 도 11a 및 11b는 EBIN, 항-VEGF 항체 또는 대조군 웨타이드 처리된 CNV 마우스에 대하여 레이저 광응고 후 15일에 안저 플루오레세인 혈관조영법(a) 및 상응하는 광학 간섭 단층촬영(b)의 이미지를 보여준다(숫자는 CNV 병변을 지시함). EBIN은 항-VEGF 처리와 유사한 CNV 병변을 감소시켰고, 따라서 황반 변성과 같은 눈 질환의 현재 치료에 대한 강력한 대안을 제공한다. 실험을 15일에 종료하고, 이 때, 동물들을 케타민/자일라진(100 mg/5 mg/

kg IP)으로 희생시킨 후, 경부 탈구를 수행하고, 눈 조직을 면역발광 염색 및 병리학적 분석을 위하여 수집하였다. 망막/맥락막/공막의 평면-마운트 제형을 CNV 영역의 검시 분석을 위하여 반데이래아 심플리시풀리아 (*Bandeiraea simplicifolia*) (B4)로부터의 Alexa594-라벨링된 렉틴에 의한 염색에 사용하였다(도 11c).

[0126] 이전 연구에서 확립된 배제 기준(Gong et al., *PLoS One* 2015, 10(7): e 0132643)을 사용하여 데이터 분석을 수행하였다. 심각한 출혈의 경우, 예를 들면, 브루치막뿐만 아니라 맥락막 및 망막 색소 상피를 손상시키는 과도한 레이저 화상, 융합된 병변, 동일한 실험 조건하에 병변의 평균보다 5배 이상 큰 병변은 배제시켰다. 플루오레세인 혈관조영법 이미지 및 메타모르프(MetaMorph) 소프트웨어를 사용하는 렉틴 B4에 대한 CNV 염색의 공초점 이미지를 사용하여 혈관 누출 및 CNV의 면적을 정량하였다. 시그마 플롯(Sigma Plot) 소프트웨어를 사용하여 데이터를 플로팅하고(도 11d 및 11e), 프리즘 6(Prism 6)(그래프패드(GraphPad), 미국 캘리포니아주 산디에고 소재)을 사용하는 일방향 ANOVA로 분석하였다.

[0127] 추가 연구

[0128] EBIN에 의한 마우스 처리는 대조군 웹타이드 처리된 마우스와 비교하여 혈관 누출 및 CNV 병변 둘 다를 유의미하게 감소시켰다(도 11). EBIN의 효과는 LEAF™ 처리와 유사하였고, 이는 EBIN이 현재 이용 가능한 AMD의 항-VEGF 치료, 예를 들면, 베마시주맙 및 아플리버셉트에 대한 비용 효율적이고 효과적인 대안을 제공할 수 있다는 것을 제시한다.

[0129] 대안적으로, EBIN는 점안액 경로를 통해 전달된다. 이 경우에, 레이저 광응고 전 1일에 처리를 시작하고, 마우스를 레이저 광응고 후 15일까지 매일 2회 처리한다. 처리 및 관찰 기간은 15일이다. 추가로, EBIN은 LEAF™ 항체와 조합으로 유리체내 주사 및/또는 점안액 경로를 통해 전달한다. 모든 경우에, LEAF™ 항체는 유리체내 주사로 투여한다. 이전에 기재된 바와 같이, EBIN 항-혈관신생 효능은 레이저-유도된 CNV 후 8 및 15일에 플루오레세인 혈관조영법 및 안구 간섭 단층촬영(OCT)로 평가하였다. 추가로, 눈 조직을 15일에 수확한다.

[0130] 표 5는 10개의 처리 그룹(처리 그룹당 n=10 CNV 마우스, 총 100 마리의 마우스), 약물 섭생법 및 미래 연구를 위하여 처리에 대한 반응을 측정하기 위한 의도된 종점 분석을 열거한다. 그룹 1 마우스를 양성 대조군으로서 LEAF™ 항체로 처리하고, 그룹 2 마우스에 그룹 1에 대한 대조군으로서 LEAF™ 정제된 래트 IgG2a, κ 아이소타입 Ctrl1을 제공한다. 그룹 3 및 4를 각각 마우스 VEGF에 대한 디코이(Decoy) 수용체(양성 대조군 2) 또는 음성 Myr-대조군 웹타이드로 처리한다. 모든 LEAF™ 항체, 디코이 수용체 및 대조군 웹타이드를 단일 주사로서 CNV의 시간에 유리체내 경로를 통해 전달한다. 그룹 5 및 6에 Myr-EBIN을 유리체내 경로를 통해 각각 0.1 μ g/눈 또는 1 μ g/눈으로 제공한다. 그룹 7 및 8에 Myr-EBIN을 점안액을 통해 각각 0.5 μ g/눈 또는 5 μ g/눈으로 매일 2회 제공한다. 그룹 9 마우스를 LEAF™ 항체와 조합으로 Myr-EBIN(0.1 μ g/눈)으로 처리하고, 둘 다 유리체내 경로로 전달한다. 그룹 10을 유리체내 경로를 통해 LEAF™ 항체와 조합으로 Myr-EBIN 점안액(0.5 μ g/눈)으로 처리한다.

표 5

미래 처리 그룹, 약물 섭생법 및 마우스에서 CNV의 처리에 대한 반응을 측정하기 위한 종점 분석.				
그룹	N	약물	섭생법	종점 분석

1	10	LEAF™ 항체	1 ul 중의 2 μ g/눈의 유리체내 주사(인간에서 2.5mg 용량과 동일함); 1일에(CNV의 시간에)	1. 15일에 플루오레세인 혈관조영법 및 8일 및 15일에 OCT 2. 15일에 병리조직학적 시험을 위한 눈 수집
2	10	LEAF™ 정제된 래트 IgG2a, κ아이소타입 Ctrl	1 ul 중의 2 μ g/눈의 유리체내 주사(인간에서 2.5mg 용량과 동일함); 1일에(CNV의 시간에)	
3	10	마우스 VEGF에 대한 디코이 수용체	1 ul 중의 2 μ g/눈의 유리체내 주사; 1일에(CNV의 시간에)	
4	10	Myr-대조군 펩타이드(1 μ g/눈)	1 ul 중의 1 μ g/눈의 유리체내 주사; 1일에(CNV의 시간에)	
5	10	Myr-EBIN 유리체내(0.1 μ g/눈)	1 ul 중의 0.1 μ g/눈의 유리체내 주사; 1일에(CNV의 시간에)	
6	10	Myr-EBIN 유리체내(1 μ g/눈)	1 ul 중의 1 μ g/눈의 유리체내 주사; 1일에(CNV의 시간에)	
7	10	Myr-EBIN 점안액(0.5 μ g/눈)	점안액, 0.5 μ g/눈; 매일 2회	
8	10	Myr-EBIN 점안액(5 μ g/눈)	점안액, 5 μ g/눈; 매일 2회	
9	10	Myr-EBIN 유리체내(0.1 μ g/눈) + LEAF™ 항체 유리체내	그룹 #5와 조합으로 그룹 #1	
10	10	Myr-EBIN 점안액(0.5 μ g/눈) + LEAF™ 항체 유리체내	그룹 #7과 조합으로 그룹 #1	
합계	100			

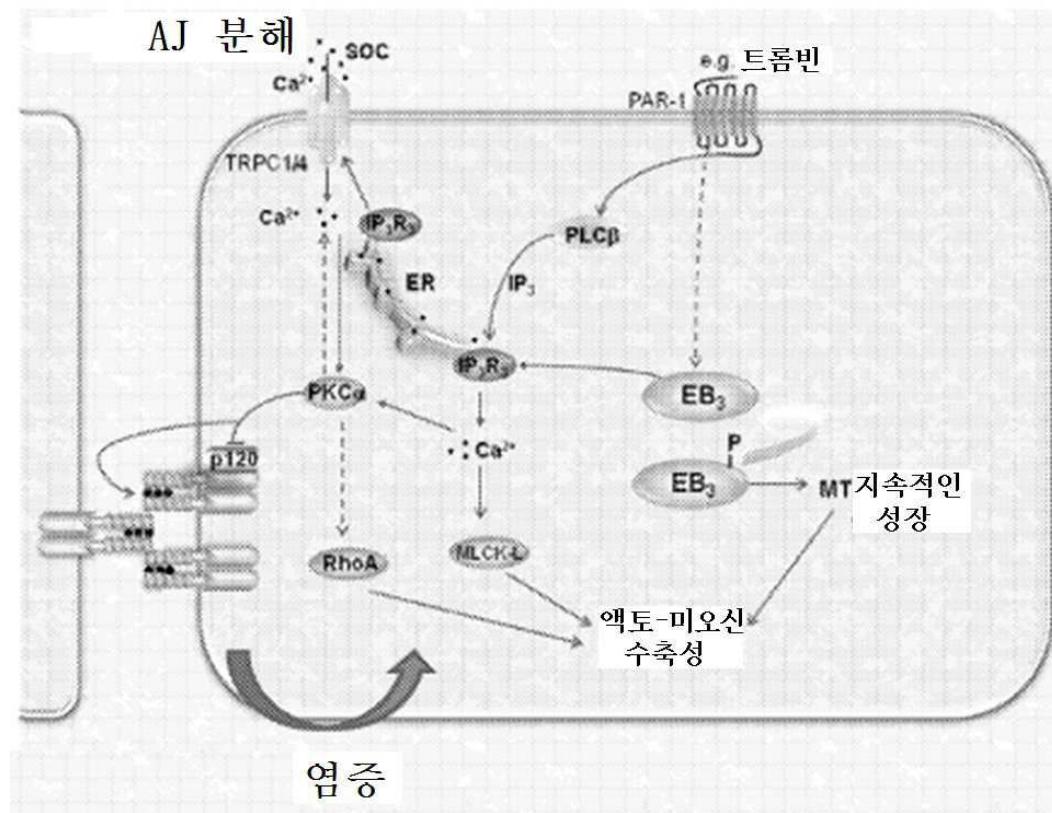
[0132] 실시예 10

[0133] EBIN 생체내의 급성 독성 시험

[0134] 생체내 투여의 안전성을 평가하기 위한 단기간 연구를 설계한다. C57BL/6 마우스(n=10, 그룹/처리 경로당 5 마리의 마우스)를 무작위화하고, 두 그룹으로 나눈다. 제1 그룹을 EBIN로 오른쪽 눈을 매일 2회, 눈당 5 μ g(10 μ l)로 점안액을 통해 처리하고, 제2 그룹을 오른쪽 눈에서 최대 용량, 눈당 1 μ g(2 μ l)로 1일에 EBIN의 유리체내 주사로 처리한다. 유리체내 주사는 케타민/자일라진(100 mg/5 mg/kg) 마취하에 수행한다. 두 그룹 모두 8일의 기간 동안 체중을 포함한 일반적인 건강뿐만 아니라 볼투명함, 안구돌출증, 안구함몰증, 결막염, 비정상 분비 또는 피각화, 및 각막 궤양을 포함한 어떠한 눈의 이상에 대하여 매일 모니터링한다. 후속적으로 동물에 플루오레세인 혈관조영법 및 OCT 영상화를 수행한다. CNV 유도 존재 또는 부재하에, EBIN에 의한 처리 후 독성을 관찰되지 않았다(도 12).

도면

도면1



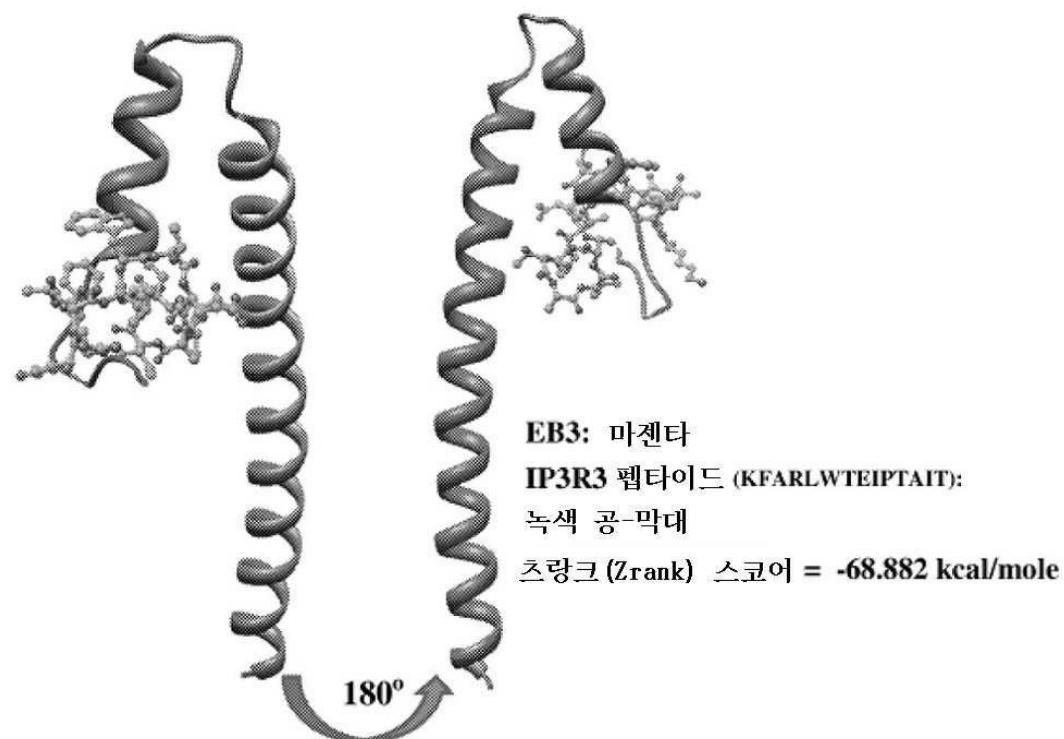
도면2

IP₃R₁ 아형1	VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
IP₃R₁ 아형2	VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
IP₃R₂	VVPVRYARLWTEIPTKTIHE
IP₃R₃	VTPVKFARLWTEIPTAITIKD
EB 결합	-----S/TxIP-----

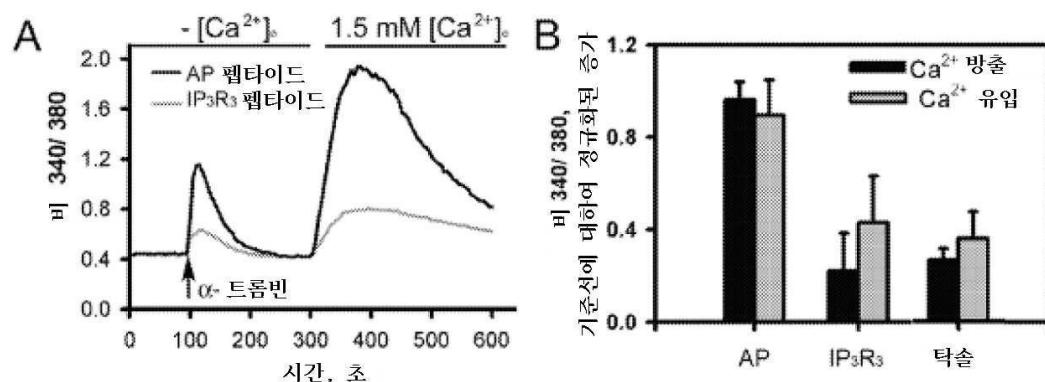
서열 번호: 1 IP₃R₃ 펩타이드

KFARLWTEIPTAIT

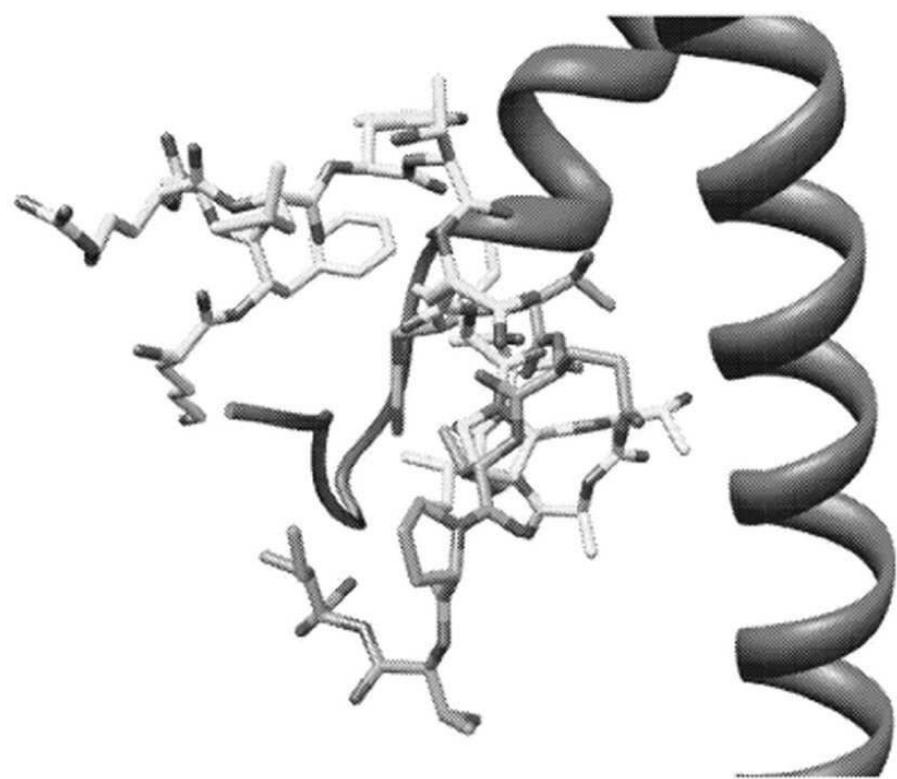
도면3



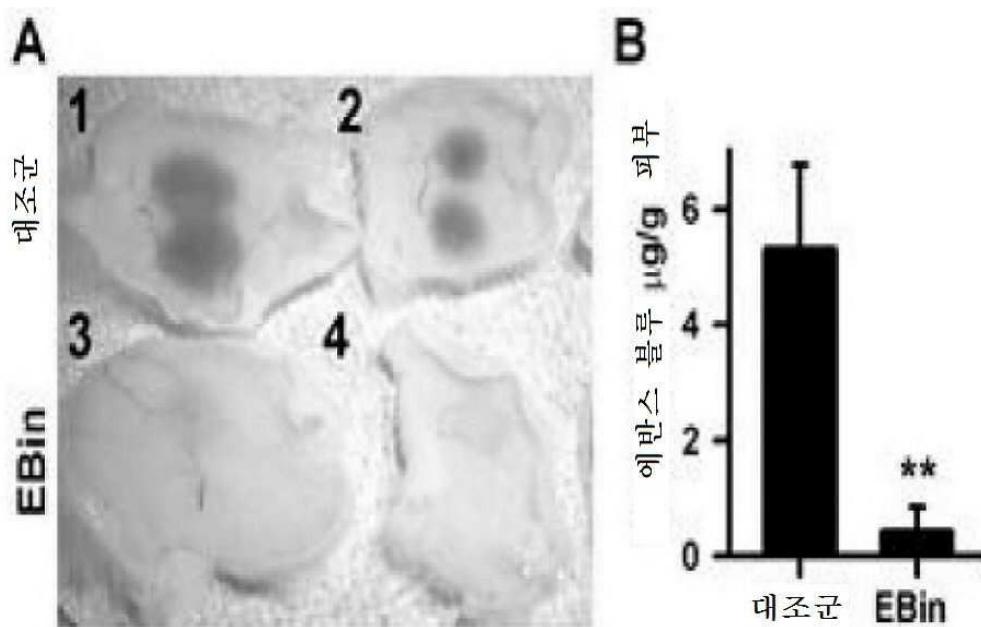
도면4



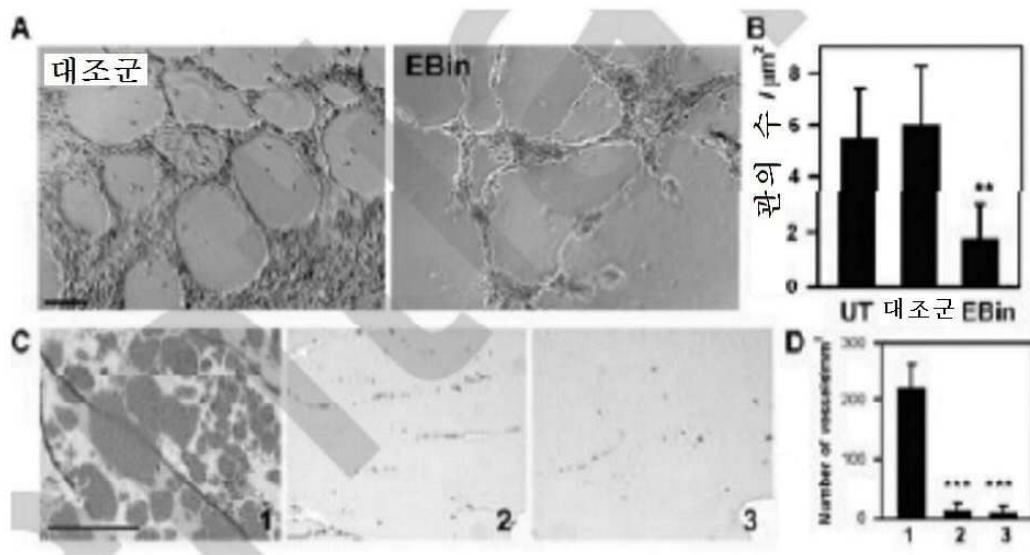
도면5



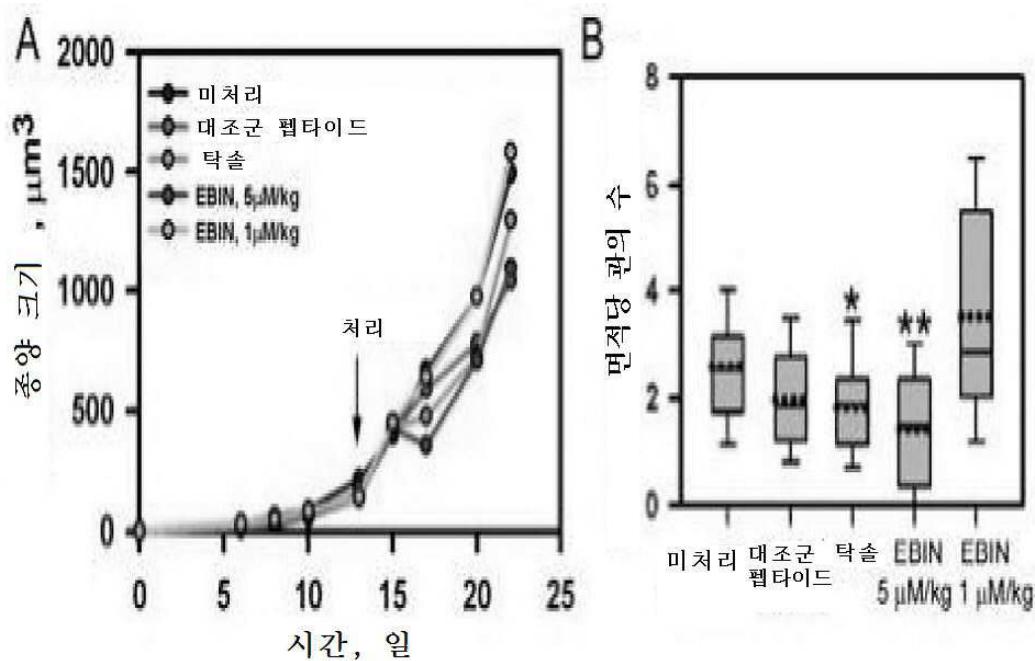
도면6



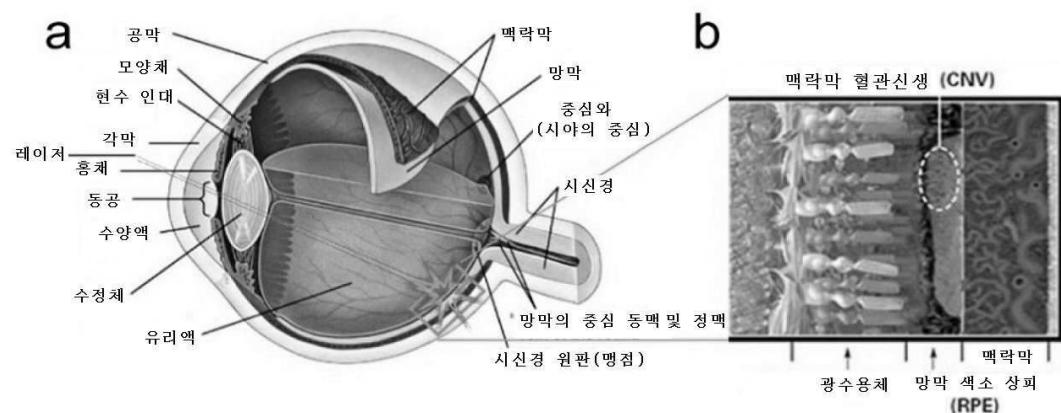
도면7



도면8

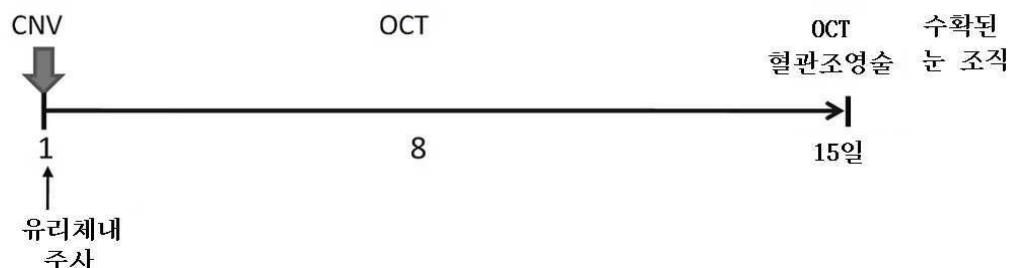


도면9

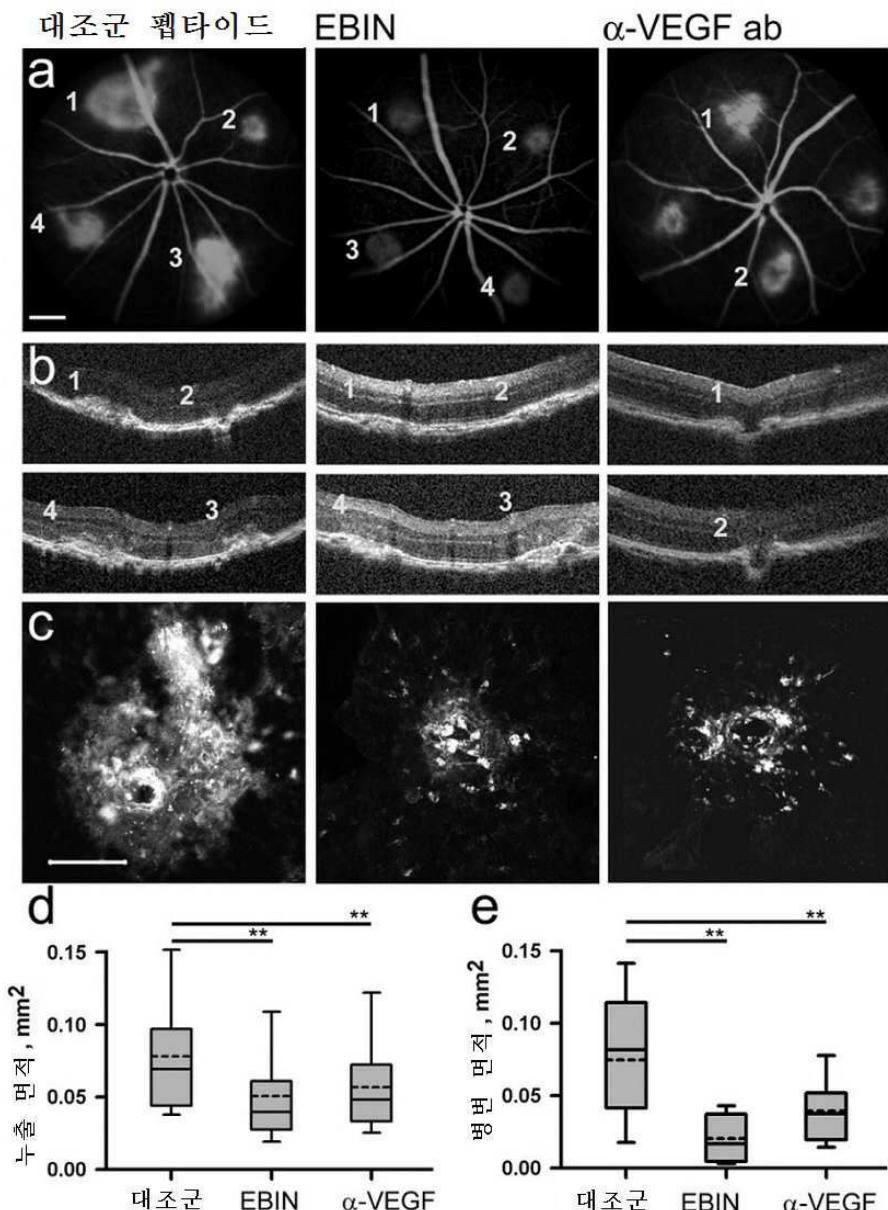


도면10

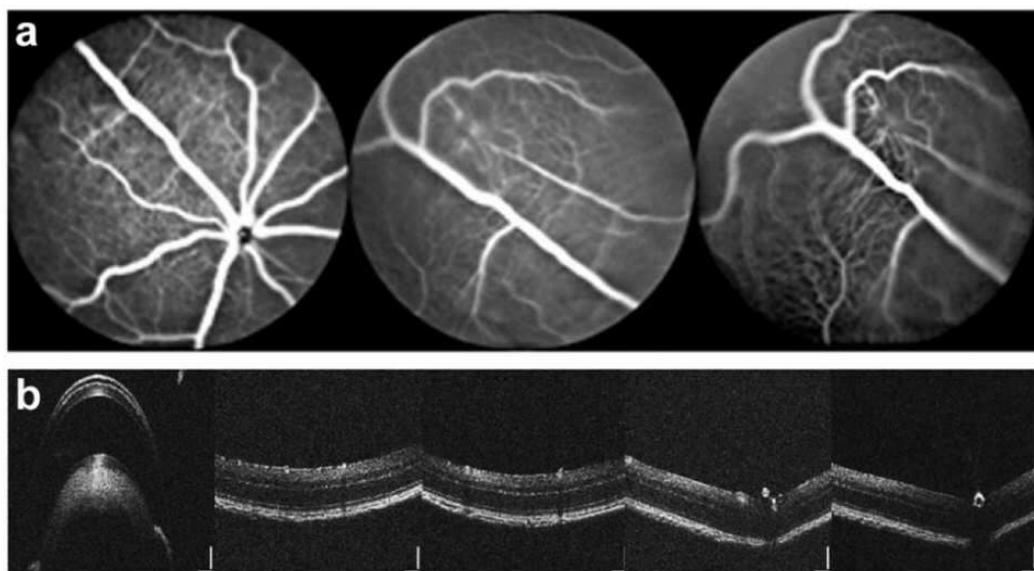
레이저-유도된 CNV 및 치리 스케줄:



도면11



도면12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS

<120> PEPTIDES FOR INHIBITING ANGIOGENESIS

<130> 30303/49324A PC

<140> PCT/US2016/020443

<141> 2016-03-02

<150> US 62/126,968

<151> 2015-03-02

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 1

Lys Phe Ala Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr

1

5

10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 2

Lys Phe Ala Arg Leu Trp Ala Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr

1 5 10

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 3

Phe Thr Glu Ile Pro Thr Ile

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 4

Phe Ala Glu Ile Pro Thr Ile

1 5

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus motif sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Ser or Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 5

Xaa Xaa Ile Pro

1

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 6

Phe Ala Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 7

Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 8

Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr

1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 9

Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 10

Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 11

Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile

1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 12

Thr Glu Ile Pro Thr Ala

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 13

Thr Glu Ile Pro Thr

1 5

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 14

Phe Ala Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile

1 5 10

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 15

Thr Glu Ile Pro

1

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 16

Arg Thr Glu Ile Pro Thr Ile

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 17

Phe Arg Thr Glu Ile Pro Thr Ile

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 18

Phe Thr Lys Ile Pro Thr Ile

1	5
---	---

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 19

Lys Phe Ala Arg Thr Lys Ile Pro Thr Ala Ile Thr

1	5	10
---	---	----

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 20

Phe Ala Arg Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile

1	5	10
---	---	----

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 21

Lys Phe Ala Arg Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr

1	5	10
---	---	----