(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0141958
(43) 공개일자 2023년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) *C07K 7/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7026532
(22) 출원일자(국제) 2022년01월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년08월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/011716
(87) 국제공개번호 WO 2022/150655
국제공개일자 2022년07월14일
(30) 우선권주장
63/135,498 2021년01월08일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
노노 인코포레이티드
캐나다 엠5브이 1이7, 온타리오, 토론토, 479에이 웰링턴가 웨스트
(72) 발명자
가만, 조나단 데이비드
캐나다 엘4제이 8엔1 온타리오 손힐 로리 로드 148
티미안스키, 마이클
캐나다 케이6브이 1씨1 온타리오 이스트 브록빌 킹 스트리트165
메이어, 디아나
캐나다 엠3케이 0비8 온타리오 토론토 윌리엄 던컨 로드 5-171
(74) 대리인
특허법인 남앤남

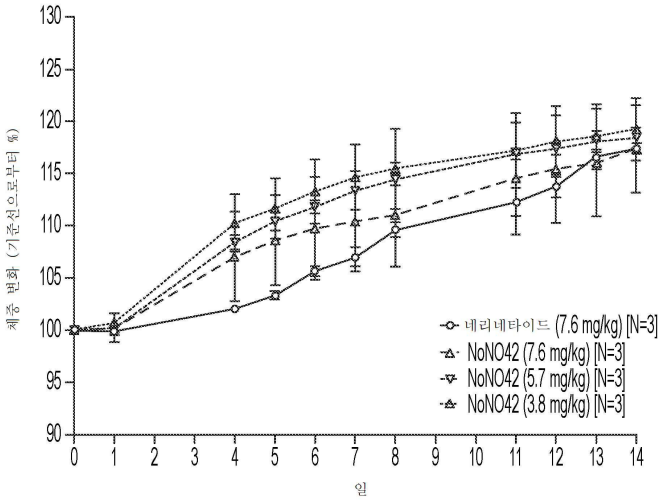
전체 청구항 수 : 총 78 항

(54) 발명의 명칭 **개선된 치료 지수를 위한 플라스민-내성 펩티드**

(57) 요 약

본 발명은 C-말단에 L-아미노산의 포함에 의해 표적 결합 특성이 유지되고 D-아미노산의 포함에 의해 플라스민-내성이 부여되는 뇌졸중 치료를 위한 전술한 활성제 Tat-NR2B9c의 변이체를 제공한다. D-아미노산과 관련된 신독성은 최소 수의 위치에 D-아미노산을 포함시키고/거나 D-아미노산 옥시다제의 억제제와 공동-투여함으로써 감소될 수 있다. 생성된 활성제는 플라스민 분해로 인한 활성의 현저한 손실 없이 혈전용해제와 동시에 투여하는 것을 포함하는 여러 이점을 갖는다. 생성된 제제는 또한 피하, 비강내 및 근육내와 같은 정맥내 주입에 대한 대안적인 경로에 의한 투여, 및 만성 질환의 치료를 위한 다중-투여 요법에 더욱 적합하다.

대 표 도 - 도34



(52) CPC특허분류
A61K 47/64 (2017.08)
A61K 47/645 (2017.08)
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)
C07K 7/08 (2013.01)
C07K 2319/10 (2013.01)

(30) 우선권주장
63/147,711 2021년02월09일 미국(US)
63/221,874 2021년07월14일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

NOS 및/또는 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드를 포함하는 활성제, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드의 서열에 총 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체로서, 여기서 내재화 펩티드가 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드가 C-말단에 ESDV(SEQ ID NO:14)를 포함하는 서열을 가지며, 여기서 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산이 L-아미노산이고, 내재화 펩티드의 3-5개 잔기가 D-아미노산인, 활성제.

청구항 2

제2항에 있어서, 억제제 펩티드가 C-말단에 IE[S/T]DV(SEQ ID NO:4)를 포함하고, 여기서 IE[S/T]DV(SEQ ID NO:4)가 L-아미노산인 활성제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 각각의 D 잔기가 K 또는 R에 있거나 K 또는 R의 C-말단 잔기에 있는 활성제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치가 R 또는 K로부터 독립적으로 선택된 인접한 아미노산을 포함하는 활성제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치가 R 또는 K로부터 선택된 아미노산을 포함하는 활성제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치가 R 또는 K로부터 독립적으로 선택된 인접한 아미노산을 포함하고, 단, 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우 이는 내재화 펩티드의 N-말단에 위치하는 활성제.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치가 R 또는 K로부터 선택된 아미노산을 포함하고, 단, 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우 이는 내재화 펩티드의 N-말단에 위치하는 활성제.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 내재화 펩티드가 3개의 D 잔기를 갖는 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하는 아미노산 서열을 가지며, 위치 3-5 사이의 D 잔기, 위치 7 또는 8의 D 잔기 및 위치 9-11 사이의 D 잔기가 N-말단으로부터 넘버링되는 활성제.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 억제제 펩티드가 스페이서를 통해 내재화 펩티드에 연결되는 활성제.

청구항 10

제9항에 있어서, 스페이서가 선택적으로 2-4개 잔기의 펩티드인 활성제.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 스페이서에 리신 또는 아르기닌 잔기가 없는 활성제.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 스페이서가 글리신, L-알라닌, L-세린 및 L-류신으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 잔기를 포함하고, 선택적으로 스페이서가 KLSS(SEQ ID NO:113)이며, 여기서 K 또는 L 또는 K와 L 둘 모두가 D 형태인 활성제.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 억제제 펩티드의 적어도 2개 카피를 포함하는 활성제.

청구항 14

제13항에 있어서, 억제제 펩티드의 2개 카피가 분지형 링커를 통해 내재화 펩티드에 연결되는 활성제.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 내재화 펩티드가 하기 중 하나로 구성되거나 이를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 활성제:

YGrKKRrQrRr(SEQ ID NO:91),

YGrKKRrQrRR(SEQ ID NO:92),

YGrKKRrQRrR(SEQ ID NO:93),

YGRKkRrQrrRV(SEQ ID NO:95),

RKkrrQrrR(SEQ ID NO:100),

rKKRrQrRr(SEQ ID NO:101),

RKkRrQrrR(SEQ ID NO:102), 또는

rKKRrQrRR(SEQ ID NO:103),

여기서 소문자는 D-아미노산을 나타내고, 대문자는 L-아미노산을 나타낸다.

청구항 16

YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:58)를 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 갖는 활성제, 또는 서열에서 5개 이하의 치환, 결실 또는 첨가를 갖는 이의 변이체로서, 여기서 5개의 C-말단 아미노산 이외의 위치에 있는 3-5개 아미노산이 D-아미노산인 활성제.

청구항 17

서열 YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:58)에 대해 적어도 75, 80, 85, 90 또는 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 활성제로서, 여기서 5개의 C-말단 아미노산 이외의 위치에 있는 3-5개 아미노산이 D-아미노산인 활성제.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, D-아미노산 중 어느 것도 활성제에서 인접한 위치를 차지하지 않는 활성제.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 D-아미노산이 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부

터 독립적으로 선택된 적어도 2개의 아미노산에 의해 또 다른 D-아미노산으로부터 분리되는 활성제.

청구항 20

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 D-아미노산이 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 적어도 3개의 아미노산에 의해 또 다른 D-아미노산으로부터 분리되는 활성제.

청구항 21

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 4개의 D-아미노산을 함유하는 활성제.

청구항 22

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 3개의 D-아미노산을 함유하는 활성제.

청구항 23

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치가 R 및 K로부터 독립적으로 선택된 2개의 인접한 아미노산을 포함하는 활성제.

청구항 24

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 선택된 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치가 R 또는 K로부터 선택된 아미노산을 포함하는 활성제.

청구항 25

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치가 R 및 K로부터 독립적으로 선택된 2개의 인접한 아미노산을 포함하고, 단, 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우 이는 활성제의 N-말단에 위치하는 활성제.

청구항 26

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치가 R 또는 K로부터 선택된 아미노산을 포함하고, 단, 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우 이는 내재화 펩티드의 N-말단에 위치하는 활성제.

청구항 27

제16항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 3개 또는 4개의 D-아미노산을 함유하며, 하나는 위치 3-5 사이, 두 번째는 위치 7 또는 8, 세 번째는 위치 9-11 사이, 및 선택적으로 네 번째는 위치 12 또는 13에 있는 활성제.

청구항 28

제16항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 아미노산 서열이 동일한 아미노산의 D에서 L로의 치환을 계수하지 않고 아미노산 서열 YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:58)에 대해 0개의 치환, 결실 또는 첨가를 갖는 활성제.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, YGrKKRrQrRRkLSSIESDV(SEQ ID NO:114), YGRkKRrQRrRKLSSIESDV(SEQ ID NO:115), YGrKKRrQrRRK1SSIESDV(SEQ ID NO:116), RKkRrQrrRIESDV(SEQ ID NO:111), 또는 rKKRrArRRIESDV(SEQ ID NO:112)로 구성되거나 이를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 활성제.

청구항 30

NOS 및/또는 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드를 포함하는

활성제, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드에서 총 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체로서, 여기서 내재화 펩티드가 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드가 C-말단에 ESDV(SEQ ID NO:14)를 포함하는 서열을 가지며, 여기서 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산이 L-아미노산이고, 내재화 펩티드의 잔기 전부는 아니지만 적어도 하나가 D-아미노산인 활성제.

청구항 31

제30항에 있어서, 내재화 펩티드의 C-말단이 융합 펩티드로서 억제제 펩티드의 N-말단에 연결되는 활성제.

청구항 32

제31항 또는 제32항에 있어서, 내재화 펩티드가 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드가 C-말단에 IE[S/T]DV(SEQ ID NO:4)를 포함하는 서열을 가지며, 여기서 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)의 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 또는 1-2개 아미노산 잔기가 D-아미노산인 활성제.

청구항 33

제32항에 있어서, RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)의 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3개 잔기가 D-아미노산인 활성제.

청구항 34

제32항에 있어서, RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)의 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-8, 5-7, 5-6, 6-8, 6-7 또는 7-8개 잔기가 D-아미노산인 활성제.

청구항 35

제30항 또는 제31항에 있어서, 내재화 펩티드가 GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)을 포함하며, 잔기의 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 또는 1-2개가 D-아미노산인 활성제.

청구항 36

제35항에 있어서, 내재화 펩티드의 잔기의 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 또는 2-3개가 D-아미노산인 활성제.

청구항 37

제35항에 있어서, 내재화 펩티드의 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-8, 5-7, 5-6, 6-8, 6-7 또는 7-8개 잔기가 D-아미노산인 활성제.

청구항 38

제31항 또는 제32항에 있어서, 내재화 펩티드가 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하며, 잔기의 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2개가 D-아미노산인 활성제.

청구항 39

제38항에 있어서, 내재화 펩티드의 잔기의 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 또는 2-3개가 D-아미노산인 활성제.

청구항 40

제38항에 있어서, 내재화 펩티드의 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-9, 6-8, 6-7, 7-9, 7-8, 또는 8-9개 잔기는 D-아미노산인 활성제.

청구항 41

제31항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 억제제 펩티드가 C-말단에 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L](SEQ ID NO:3)을 포함하는 활성제.

청구항 42

제31항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 억제제 펩티드가 C-말단에 I-E-[S/T]-D-V(SEQ ID NO:4)를 포함하는 활성제.

청구항 43

제31항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 억제제 펩티드가 C-말단에 IESDV(SEQ ID NO:5)를 포함하는 활성제.

청구항 44

제31항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 억제제 펩티드의 5개의 C-말단 아미노산 각각이 L-아미노산인 활성제.

청구항 45

제31항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 억제제 펩티드가 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2)를 포함하며, 여기서 억제제 펩티드의 각각의 잔기가 L-아미노산이고, 단, K는 L 또는 D-아미노산일 수 있는 활성제.

청구항 46

제31항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 내재화 펩티드가 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 아미노산에 의해 서로 분리된 적어도 2개의 D-아미노산을 포함하는 활성제.

청구항 47

제31항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 내재화 펩티드가 적어도 3개의 D-아미노산을 포함하고, 각각이 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 아미노산에 의해 서로 분리되는 활성제.

청구항 48

제31항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 D-아미노산이 R 또는 K이거나, R 또는 K 잔기의 C-말단 측에 바로 있는 활성제.

청구항 49

제31항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 모든 D-아미노산이 R 또는 K이거나, R 또는 K 잔기의 C-말단 측에 바로 있는 활성제.

청구항 50

제31항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 D-아미노산이 R 또는 K가 아니고, R 또는 K 잔기의 C-말단 측에 바로 있지도 않은 활성제.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 네리네타이드에 비해 증가된 플라스민 내성 및/또는 증가된 혈장 반감기를 갖는 활성제.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, PSD-95에 대한 결합에 대해 네리네타이드와 경쟁하는 활성제.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2)(여기서 각각의 아미노산은 L-아미노산이다)의 억제제 펩티드에 연결된 서열 ygrkkrrqrrr(SEQ ID NO:96)(이들 각각은 D-아미노산이다)의 내재화 펩티드를 포함하는 활성제와 비교하여 및/또는 klssIESDV(SEQ ID NO:117)(여기서 소문자는 D-아미노산을 나타내고, 대문자는 L-아미노산을 나타낸다)에 연결된 내재화 펩티드와 비교하여, 및/또는 아미노산 서열 vdseisslkrrrqrrkkrgy(SEQ ID NO:118)(여기서 소문자는 D-아미노산을 나타낸다)을 갖는 활성제와 비교하여 감소된 신장 독성 및/또는 더 큰 치료 지수를 나타내는 활성제.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 네리네타이드의 2배 이내의 PSD-95에 대한 결합 친화성을 갖고/거나 네리네타이드의 2배 이내의 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 IC50을 갖는 활성제.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 네리네타이드의 AUC 또는 CMax보다 큰 AUC 또는 CMax를 갖고, 선택적으로 AUC 또는 CMax가 피하 투여에 대한 것인 활성제.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 클로라이드 염으로서의 활성제.

청구항 57

히스티딘 및 트레할로스, 및 선택적으로 소듐 벤조에이트를 추가로 포함하는 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 활성제의 제형.

청구항 58

포스페이트 완충제, 및 선택적으로 소듐 벤조에이트를 추가로 포함하는 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항의 활성제의 제형.

청구항 59

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항의 활성제 및 항염증제, 선택적으로 비만 세포 탈과립 억제제 또는 항히스타민제를 포함하는 복합제형.

청구항 60

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항의 활성제 및 혈전용해제를 포함하는 복합제형.

청구항 61

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항의 활성제 및 D-아미노산 옥시다제의 억제제, 선택적으로 리스페리돈 또는 소듐 벤조에이트 또는 5-클로로-벤조[d]이속사졸-3-올을 포함하는 복합제형.

청구항 62

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항의 활성제 또는 제57항 내지 제61항 중 어느 한 항의 제형의 효과적인 요법을 투여하는 것을 포함하는 뇌졸중, 뇌 허혈, CNS에 대한 외상성 손상, 재관류 손상, 지주막하 출혈, 뇌진탕, 통증, 불안, 간질, 또는 신경퇴행성 질환으로부터 선택된 질환을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 질환이 뇌졸중인 방법.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 있어서, 선택적으로 혈전용해제를 투여하거나, 기계적 재관류, 또는 혈관내 혈전절제술에 의해 대상체에서 재관류를 수행하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 65

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, D-아미노산 옥시다제 활성의 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 66

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 정의된 활성제 또는 제57항 내지 제61항 중 어느 한 항의 제형의 효과적인 요법을 투여하는 것을 포함하는 뇌졸중을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체에서 허혈성 뇌졸중을 치료하는 방법

으로서, 여기서 대상체에게 혈전용해제가 공동-투여되고, 활성제 및 혈전용해제가 혈전용해제에 의해 유도된 활성제의 절단이 활성제에 D-아미노산(들)을 포함시킴으로써 감소되는 시간에 충분히 근접하게 투여되는, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, D-아미노산 옥시다제 활성의 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 68

제66항 또는 제67항에 있어서, 혈전용해제가 활성제 전 60, 30 또는 15분의 범위 내에 투여되거나, 활성제 및 혈전용해제가 동시에 투여되는 방법.

청구항 69

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 활성제 또는 제57항 내지 제61항 중 어느 한 항의 제형을 비정맥내 경로로 투여하는 것을 포함하는 활성제를 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하는 방법으로서, 여기서 활성제가 치료 수준으로 혈장에 전달되는, 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 활성제가 피하, 근육내, 비강내 또는 폐내 투여되는 방법.

청구항 71

제69항 또는 제70항에 있어서, 용량이 3 mg/kg 초과, 10 mg/kg 초과, 또는 20 mg/kg 초과인 방법.

청구항 72

제69항 또는 제70항에 있어서, 용량이 10 mg/kg 미만이고, 활성제가 비만 세포 탈과립 억제제 또는 항히스타민제의 공동-투여 없이 투여되는 방법.

청구항 73

제69항 또는 제70항에 있어서, 용량이 10 mg/kg 초과이고, 활성제가 비만 세포 탈과립 억제제 또는 항히스타민제와 함께 투여되는 방법.

청구항 74

제69항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 뇌졸중, 뇌진탕, 재관류 손상, 뇌 허혈, CNS에 대한 외상성 손상, 통증, 불안, 간질, 지주막하 출혈, 또는 알츠하이머병 또는 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환으로부터 선택된 질환을 갖거나 가질 위험이 있는 방법.

청구항 75

대상체에게 활성제 및 D-아미노산 옥시다제 활성의 억제제의 효과적인 요법을 투여하는 것을 포함하는 뇌졸중, 뇌 허혈, CNS에 대한 외상성 손상, 지주막하 출혈, 통증, 불안, 간질로부터 선택된 질환을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 여기서 활성제가 NOS에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드에서 총 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체를 포함하고, 내재화 펩티드가 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드가 C-말단에 ESDV(SEQ ID NO:14)를 포함하는 서열을 가지며, 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산이 L-아미노산이고, 내재화 펩티드의 잔기의 적어도 하나가 D-아미노산인, 방법.

청구항 76

대상체에게 활성제 및 D-아미노산 옥시다제 활성의 억제제의 효과적인 요법을 투여하는 것을 포함하는 뇌졸중을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체에서 허혈성 뇌졸중을 치료하는 방법으로서, 여기서 대상체에게 혈전용해제가 공동-투여되고, 활성제가 NOS 및/또는 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드에서 총 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체를 포함하고, 내재화 펩티드가 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드가 C-말단에 ESDV(SEQ ID NO:14)를 포함하는 서열을 가지며, 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산이 L-아미노산이

고, 내재화 펩티드의 잔기의 적어도 하나가 D-아미노산이며, 활성제 및 혈전용해제가 혈전용해제에 의해 유도된 활성제의 절단이 활성제에 D-아미노산(들)을 포함시킴으로써 감소되는 시간에 충분히 근접하게 투여되는, 방법.

청구항 77

제75항 또는 제76항에 있어서, 활성제가 NOS 및/또는 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드에서 총 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체를 포함하고, 여기서 내재화 펩티드가 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드가 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2)를 포함하는 서열을 가지며, 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산이 L-아미노산이고, 모든 R 및 K 잔기를 포함하는 아미노산의 연속 세그먼트가 D-아미노산인 방법.

청구항 78

장애를 치료하는데 유용한 제제에 연결된 내재화 펩티드를 포함하는 키메라 제제로서, 여기서 내재화 펩티드가 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열 또는 최대 1, 2, 또는 3개의 치환 또는 결실(동일한 아미노산의 L에서 D로의 대체를 포함하지 않음)을 갖는 이의 변이체를 갖고, 여기서 내재화 펩티드의 3-5개 잔기가 D-아미노산인, 키메라 제제.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

발명의 내용

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] [0001] 본 출원은 2021년 7월 14일에 출원된 US 63/221,874, 2021년 2월 9일에 출원된 US 63/147,711, 및 2021년 1월 8일에 출원된 US 63/135,498의 이익을 주장하며, 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] [0002] 본 출원은 2022년 1월 6일에 작성된 42kbytes의 텍스트 파일 572703-SQLIST의 서열을 포함하며, 이는 참조로 포함된다.

[0005] 배경

[0006] [0003] Tat-NR2B9c(NA-1 및 네리네타이드(nerinetide)로도 공지됨)는 PSD-95를 억제하여, N-메틸-D-아스파르테이트 수용체(NMDAR) 및 신경세포 산화질소 신타제(nNOS)에 대한 결합을 방해하고 뇌 허혈에 의해 유도된 흥분독성을 감소시키는 제제이다. 치료는 뇌 손상 및 신경퇴행성 질환의 모델에서 경색 크기 및 기능적 결손을 감소시킨다. Tat-NR2B9c는 성공적인 II 상 시험(WO 2010144721 and Aarts et al., Science 298, 846-850 (2002), Hill et al., Lancet Neurol. 11:942-950 (2012) 참조) 및 성공적인 3 상 시험(Hill et al, Lancet 395:878-887 (2020))을 거쳤다.

[0007] [0004] 글리신을 제외하고, 모든 표준 α-아미노산은 2개의 광학 이성질체 중 하나로 존재할 수 있으며, 이는 L- 및 D-아미노산이라고 불리는 다른 하나의 거울상이다. 단백질 및 대부분의 자연 발생 펩티드는 완전히 L-배열의 아미노산으로 형성된다. D-아미노산은 단지 소수의 천연 펩티드에서만 검출되었다. 이러한 D-아미노산은 L-아미노산이 번역후 변경을 겪을 때 형성된다. 자연에서 D-아미노산은 희귀하기 때문에, 이들은 일반적으로 적어도 L-아미노산과 동일한 정도로 L-단백질에 의해 인식되지 않는다. L-아미노산을 단순히 D로 대체하는 것은 표적 부위에 대한 측쇄 배향을 변경시키기 때문에 일반적으로 모 분자의 모방체를 생성하는데 효과적이지 않다. L 또는 D-아미노산을 대체하고 아미노산의 순서를 역전시키는 것은 모 분자와 유사하지만 역 아미드 펩티드 결합을 갖는 측쇄 토폴로지를 초래하며, 이는 좌측 나선을 채택하는 반면, L 펩티드는 우측 나선을 채택한다. 따라서, 표적 결합은 여전히 손실되거나 변경될 수 있다.

[0008] [0005] 2020년 1월 9일에 출원된 US 62/959,091 및 WO2021140485는 각각 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 포함된다.

[0009] 청구된 발명의 개요

[0010] [0006] 본 발명은 NOS 및/또는 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드를 포함하는 활성제, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드에서 총 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체를 포함하며, 여기서 내재화 펩티드는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드는 C-말단에 ESDV(SEQ ID NO:14)를 포함하는 서열을 가지며, 여기서 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산은 L-아미노산이고, 내재화 펩티드의 잔기 전부는 아니지만 적어도 하나는 D-아미노산이다.

[0011] [0007] 선택적으로, 내재화 펩티드의 C-말단은 융합 펩티드로서 억제제 펩티드의 N-말단에 연결된다. 선택적으로, 내재화 펩티드는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드는 IE[S/T]DV(SEQ ID NO:4)를 포함하는 서열을 가지며, 여기서 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)의 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 또는 1-2개 아미노산 잔기는 D-아미노산이다. 선택적으로, RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)의 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3개 잔기는 D-아미노산이다. 선택적으로, RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)의 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-8, 5-7, 5-6, 6-8, 6-7 또는 7-8개 잔기는 D-아미노산이다. 선택적으로, 내재화 펩티드는 GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)을 포함하며, 잔기의 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 또는 1-2개는 D-아미노산이다. 선택적으로, 내재화 펩티드의 잔기의 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 또는 2-3개는 D-아미노산이다. 선택적으로, 내재화 펩티드의 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-8, 5-7, 5-6, 6-8, 6-7 또는 7-8개 잔기는 D-아미노산이다. 선택적으로, 내재화 펩티드는 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하며, 잔기의 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2개는 D-아미노산이다. 선택적으로, 내재화 펩티드의 잔기의 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 또는 2-3개는 D-아미노산이다. 선택적으로, 내재화 펩티드의 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-9, 6-8, 6-7, 7-9, 7-8, 또는 8-9개 잔기는 D-아미노산이다. 선택적으로, 억제제 펩티드는 C-말단에 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L](SEQ ID NO:3)을 포함한다. 선택적으로, 억제제 펩티드는 C-말단에 I-E-[S/T]-D-V(SEQ ID NO:4)를 포함한다. 선택적으로, 억제제 펩티드는 C-말단에 IESDV(SEQ ID NO:5)를 포함한다. 선택적으로, 억제제 펩티드의 5개의 C-말단 아미노산 각각은 L-아미노산이다. 선택적으로, 억제제 펩티드는 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2)를 포함하며, 여기서 억제제 펩티드의 각각의 잔기는 L-아미노산이고, 단, K는 L 또는 D-아미노산일 수 있다. 선택적으로, 내재화 펩티드는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 아미노산에 의해 서로 분리된 적어도 2개의 D-아미노산을 포함한다. 선택적으로, 내재화 펩티드는 적어도 3개의 D-아미노산을 포함하고, 각각은 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 아미노산에 의해 서로 분리된다. 선택적으로, 적어도 하나의 D-아미노산은 R 또는 K이거나, R 또는 K 잔기의 C-말단 측에 바로 있다. 선택적으로, 모든 D-아미노산은 R 또는 K이거나, R 또는 K 잔기의 C-말단 측에 바로 있다. 선택적으로, 적어도 하나의 D-아미노산은 R 또는 K가 아니거나, R 또는 K 잔기의 C-말단 측에 바로 있지 않다. 선택적으로, 내재화 펩티드는 하기 중 하나로 구성되거나 이를 포함하는 아미노산 서열을 갖는다:

[0012] [0008] yGrkkrrqrrr (SEQ ID NO:88)

[0013] [0009] YGrkkrrQrrr (SEQ ID NO:89)

[0014] [0010] YGrkkrrQrRr (SEQ ID NO:90)

[0015] [0011] YGrKKRrQrRr (SEQ ID NO:91)

[0016] [0012] YGrKKRrQrRR (SEQ ID NO:92)

[0017] [0013] YGrKKRrQRrR (SEQ ID NO:93)

[0018] [0014] YGRKkrrQrrr (SEQ ID NO:94)

[0019] [0015] YGRKkRrQrrRV (SEQ ID NO:95)

[0020] [0016] ygrkkrrqrrr (SEQ ID NO:96)

[0021] [0017] rkkrrqrrr (SEQ ID NO:97)

[0022] [0018] RkkrrQrRr (SEQ ID NO:98)

[0023] [0019] RkkrrQrrR (SEQ ID NO:99)

[0024] [0020] RKkrrQrrR (SEQ ID NO:100)

[0025] [0021] rKKRrQrRr (SEQ ID NO:101)

[0026] [0022] RKkRrQrrR (SEQ ID NO:102)

[0027] [0023] rKKRrQrRR (SEQ ID NO:103)

[0028] [0024] rKKRrQRRR (SEQ ID NO:104)

[0029] [0025] rKKRRQrRR (SEQ ID NO:105)

[0030] [0026] RKKRrQrRR (SEQ ID NO:106)

[0031] [0027] RKKRRQrRR (SEQ ID NO:107)

[0032] [0028] rKKRRQRRR (SEQ ID NO:108)

[0033] [0029] RKKRrQRRR (SEQ ID NO:109),

[0034] [0030] 여기서 소문자는 D-아미노산을 나타내고, 대문자는 L-아미노산을 나타낸다.

[0035] [0031] 선택적으로, 전술한 바와 같은 활성제는 RkkrrQrRrIESDV(SEQ ID NO:110, NoNO 411), RKkRrQrrRIESDV(SEQ ID NO:111), 또는 rKKRrArRRIESDV(SEQ ID NO:112)로 구성되거나 이를 포함하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0036] [0032] 본 발명은 NOS 및/또는 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드를 포함하는 활성제, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드의 서열에서 총 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체를 제공하며, 여기서 내재화 펩티드는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드는 C-말단에 ESDV(SEQ ID NO:14)를 포함하는 서열을 가지며, 여기서 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산은 L-아미노산이고, 내재화 펩티드의 3-5개 잔기는 D-아미노산이다. 선택적으로, 억제제 펩티드는 C-말단에 IE[S/T]DV(SEQ ID NO:4)를 포함하고, 여기서 IE[S/T]DV(SEQ ID NO:4)는 L-아미노산이다. 선택적으로, 각각의 D 잔기는 K 또는 R에 있거나 K 또는 R의 C-말단 잔기에 있다. 선택적으로, 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 또는 K로부터 독립적으로 선택된 인접한 아미노산을 포함한다. 선택적으로, 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 또는 K로부터 선택된 아미노산을 포함한다. 선택적으로, 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 또는 K로부터 독립적으로 선택된 인접한 아미노산을 포함하고, 단, 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우 이는 내재화 펩티드의 N-말단에 위치한다. 선택적으로, 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 또는 K로부터 선택된 아미노산을 포함하고, 단, 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우 이는 내재화 펩티드의 N-말단에 위치한다. 선택적으로, 내재화 펩티드는 3개의 D 잔기를 갖는 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하는 아미노산 서열을 가지며, 위치 3-5 사이의 D 잔기, 위치 7 또는 8의 D 잔기 및 위치 9-11 사이의 D 잔기는 N-말단으로부터 넘버링된다. 선택적으로, 억제제 펩티드는 스페이서를 통해 내재화 펩티드에 연결된다. 선택적으로, 스페이서는 펩티드이다. 선택적으로, 스페이서는 2-4개 잔기의 펩티드이다. 선택적으로, 스페이서는 리신 또는 아르기닌 잔기가 없다. 선택적으로, 스페이서는 글리신, 알라닌, 세린 및 류신으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 잔기를 포함하며, 각각은 L-형태이다. 선택적으로, 스페이서는 KLSS(SEQ ID NO:113)이며, 여기서 K 또는 L 또는 K와 L 둘 모두는 D 형태이다.

[0037] [0033] 본 발명은 YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:58)을 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 갖는 활성제, 또는 서열에서 5개 이하의 치환, 결실 또는 첨가를 갖는 이의 변이체(여기서 5개의 C-말단 아미노산 이외의 위치에 있는 3-5개 아미노산은 D-아미노산이다), 또는 서열 YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:58)에 대해 적어도 75% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 활성제(여기서 5개의 C-말단 아미노산 이외의 위치에 있는 3-5개 아미노산은 D-아미노산이다)를 추가로 제공한다. 선택적으로, D-아미노산 중 어느 것도 활성제에서 인접한 위치를 차지하지 않는다. 선택적으로, 각각의 D-아미노산은 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 적어도 2개의 아미노산에 의해 또 다른 D-아미노산으로부터 분리된다. 선택적으로, 각

각의 D-아미노산은 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 적어도 3개의 아미노산에 의해 또 다른 D-아미노산으로부터 분리된다. 선택적으로, 활성제는 4개의 D-아미노산을 함유한다. 선택적으로, 활성제는 3개의 D-아미노산을 함유한다. 선택적으로, 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 3개 초과의 연속 산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 및 K로부터 독립적으로 선택된 2개의 인접한 아미노산을 포함한다. 선택적으로, 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 또는 K로부터 선택된 아미노산을 포함한다. 선택적으로, 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 및 K로부터 독립적으로 선택된 2개의 인접한 아미노산을 포함하고, 단, 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우 이는 활성제의 N-말단에 위치한다. 선택적으로, 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 4개 초과의 연속 산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 또는 K로부터 선택된 아미노산을 포함하고, 단, 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우 이는 내재화 펩티드의 N-말단에 위치한다. 선택적으로, 활성제는 3개 또는 4개의 D-아미노산을 함유하며, 하나는 위치 3-5 사이, 두 번째는 위치 7 또는 8, 세 번째는 위치 9-11 사이, 및 선택적으로 네 번째는 위치 12 또는 13에 있다. 선택적으로, 활성제는 억제제 펩티드의 적어도 2개의 카피를 포함한다. 선택적으로, 억제제 펩티드의 2개의 카피는 분지형 링커를 통해 내재화 펩티드에 연결된다. 선택적으로, 활성제는 YGrKKRrQrRRkLSSIESDV(SEQ ID NO:114), YGRkKRrQRrRKLSSIESDV(SEQ ID NO:115), YGrKKRrQrRRKlSSIESDV(SEQ ID NO:116)를 포함하거나 이로 구성된 아미노 서열을 갖는다.

[0038] [0034] 선택적으로, 활성제는 네리네타이드에 비해 증가된 플라스민 내성을 갖는다. 선택적으로, 활성제는 네리네타이드에 비해 증가된 플라스민 반감기를 갖는다. 선택적으로, 활성제는 PSD-95에 대한 결합에 대해 네리네타이드와 경쟁한다. 선택적으로, 활성제는 서열 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2)(여기서 각각의 아미노산은 L-아미노산이다)의 억제제 펩티드에 연결되고/거나 klssIESDV(SEQ ID NO:117)(여기서 소문자는 D-아미노산을 나타내고, 대문자는 L-아미노산을 나타낸다)에 연결된 서열 ygrkkrrqrrr(SEQ ID NO:96)((글리신 외에) 이들 각각은 D-아미노산이다)의 내재화 펩티드를 포함하는 활성제와 비교하여, 또는 아미노산 서열 vdseisslkrrrqrrkkrgy(SEQ ID NO:118)(여기서 소문자는 (글리신 외에) D-아미노산을 나타낸다)을 갖는 활성제와 비교하여 감소된 신장 독성 및/또는 더 큰 치료 지수를 나타낸다. 선택적으로, 활성제는 네리네타이드의 2배 이내의 PSD-95에 대한 결합 친화성을 갖는다. 선택적으로, 활성제는 Tat-NR2B9c의 2배 이내의 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 IC50을 갖는다. 선택적으로, 활성제는, 예를 들어, 피하 투여에 대해, 네리네타이드보다 더 큰 곡선하 면적(AUC) 또는 Cmax를 갖는다.

[0039] [0035] 선택적으로, 활성제는 클로라이드 염이다.

[0040] [0036] 본 발명은 활성제와 히스티딘 및 트레할로스, 및 선택적으로 소듐 벤조에이트의 제형을 추가로 제공한다. 본 발명은 또한 활성제와 포스페이트 완충제, 및 선택적으로 소듐 벤조에이트의 제형을 제공한다.

[0041] [0037] 본 발명은 활성제 및 항염증제를 포함하는 복합제형(coformulation)을 추가로 제공한다. 선택적으로, 항염증제는 비만 세포 탈과립 억제제 또는 항히스타민제이다.

[0042] [0038] 본 발명은 활성제 및 혈전용해제를 포함하는 복합제형을 추가로 제공한다.

[0043] [0039] 본 발명은 청구항 중 어느 한 항의 활성제 및 D-아미노산 옥시다제의 억제제를 포함하는 복합제형을 추가로 제공한다. 선택적으로, D-아미노산 옥시다제의 억제제는 리스페리돈 또는 소듐 벤조에이트 또는 5-클로로-벤조[d]이속사졸-3-올이다.

[0044] [0040] 본 발명은 대상체에게 상기 정의된 바와 같은 활성제 또는 제형의 효과적인 요법을 투여하는 것을 포함하는 뇌졸중, 뇌 허혈, CNS에 대한 외상성 손상, 뇌진탕, 재관류 손상, 지주막하 출혈, 통증, 불안, 간질, 또는 신경퇴행성 질환으로부터 선택된 질환을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 선택적으로, 상기 방법은 D-아미노산 옥시다제 활성의 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0045] [0041] 본 발명은 대상체에게 상기 정의된 바와 같은 활성제 또는 제형의 효과적인 요법을 투여하는 것을 포함하는 뇌졸중을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체에서 허혈성 뇌졸중을 치료하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서 대상체에게 혈전용해제가 공동-투여되고, 활성제 및 혈전용해제는 혈전용해제에 의해 유도된 활성제의 절단이 활성제에 D-아미노산(들)을 포함시킴으로써 감소되는 시간에 충분히 근접하게 투여된다. 선택적으로, 상기 방법은 D-아미노산 옥시다제 활성의 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 선택적으로, 혈전용해제는 활성제 투여 전 60, 30 또는 15분의 범위 내에서 투여된다. 선택적으로, 활성제 및 혈전용해제는 동시에 투여된다.

[0046] [0042] 본 발명은 활성제를 비정맥내 경로에 의해 투여하는 것을 포함하는 활성제 또는 제형을 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서 활성제는 치료 수준으로 혈장에 전달된다. 선택적으로, 활성제는 피하 투여된다. 선택적으로, 활성제는 근육내 투여된다. 선택적으로, 활성제는 비강내 또는 폐내 투여된다. 선택적으로, 용량은 3 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg 초과이다. 선택적으로, 용량은 10 mg/kg 미만이고, 활성제는 비만 세포 탈과립 억제제 또는 항히스타민제의 공동-투여 없이 투여된다. 선택적으로, 용량은 10 mg/kg 초과이고, 활성제는 비만 세포 탈과립 억제제 또는 항히스타민제와 함께 투여된다. 선택적으로, 대상체는 뇌졸중, 뇌 허혈, CNS에 대한 외상성 손상, 뇌진탕, 재관류 손상, 통증, 불안, 간질, 지주막하 출혈, 또는 신경퇴행성 질환, 예를 들어, 알츠하이머병 또는 파킨슨병으로부터 선택된 질환을 갖거나 가질 위험이 있다.

[0047] [0043] 본 발명은 대상체에게 활성제 및 D-아미노산 옥시다제 활성의 억제제의 효과적인 요법을 투여하는 것을 포함하는 뇌졸중, 뇌 허혈, CNS에 대한 외상성 손상, 지주막하 출혈, 통증, 불안, 간질로부터 선택된 질환을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서 활성제는 NOS 및/또는 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드에서 총 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체를 포함하고, 여기서 내재화 펩티드는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드는 C-말단에 ESDV(SEQ ID NO:14)를 포함하는 서열을 가지며, 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산은 L-아미노산이고, 내재화 펩티드의 잔기의 적어도 하나는 D-아미노산이다. 본 발명은 대상체에게 활성제 및 D-아미노산 옥시다제 활성의 억제제의 효과적인 요법을 투여하는 것을 포함하는 뇌졸중을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체에서 허혈성 뇌졸중을 치료하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서 대상체에게 혈전용해제가 공동-투여되고, 활성제는 NOS에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드에서 총 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체를 포함하고, 여기서 내재화 펩티드는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드는 C-말단에 ESDV(SEQ ID NO:14)를 포함하는 서열을 가지며, 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산은 L-아미노산이고, 내재화 펩티드의 잔기의 적어도 하나는 D-아미노산이며, 활성제 및 혈전용해제는 혈전용해제에 의해 유도된 활성제의 절단이 활성제에 D-아미노산(들)을 포함시킴으로써 감소되는 시간에 충분히 근접하게 투여된다. 선택적으로 이러한 방법에서, 활성제는 NOS에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드에서 총 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체를 포함하고, 여기서 내재화 펩티드는 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드는 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2)를 포함하는 서열을 가지며, 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산은 L-아미노산이고, 모든 R 및 K 잔기를 포함하는 아미노산의 연속 세그먼트는 D-아미노산이다.

[0048] [0044] 선택적으로, 활성제는 NOS 및/또는 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드에서 총 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체를 포함하고, 여기서 내재화 펩티드는 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고 억제제 펩티드는 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2)를 포함하는 서열을 가지며, 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산은 L-아미노산이고, 모든 R 및 K 잔기를 포함하는 아미노산의 연속 세그먼트는 D-아미노산이다. 선택적으로, 대부분의 C-말단 R 또는 K 잔기의 바로 C-말단에 있는 잔기가 또한 D-잔기이다. 선택적으로, 내재화 펩티드의 C-말단은 융합 펩티드로서 억제제 펩티드의 N-말단에 연결된다. 선택적으로, 억제제 펩티드는 C-말단에 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L](SEQ ID NO:3)을 포함한다. 선택적으로, 억제제 펩티드는 C-말단에 I-E-[S/T]-D-V(SEQ ID NO:4)를 포함한다. 선택적으로, 억제제 펩티드는 C-말단에 IESDV(SEQ ID NO:5)를 포함한다.

[0049] [0045] 선택적으로, 억제제 펩티드의 5개의 C-말단 아미노산 각각은 L-아미노산이다. 선택적으로, 활성제의 각각의 다른 잔기는 D-아미노산이다. 선택적으로, 활성제는 아미노산 서열 ygrkkrrqrrrklssIESDV(SEQ ID NO:6), ygrkkrrqrrrkssIESDV(SEQ ID NO:7), ygrkkrrqrrrksIESDV(SEQ ID NO:8), 또는 ygrkkrrqrrrkIESDV(SEQ ID NO:9)를 갖는다. 선택적으로, 활성제는 아미노산 서열 ygrkkrrqrrrklssIESDV(SEQ ID NO:6)를 가지며, 여기서 소문자는 D-아미노산이고 대문자는 L-아미노산이다(키랄 형태가 없는 글리신을 제외하고, 대문자 또는 소문자로 표시될 수 있다).

[0050] [0046] 선택적으로, 활성제는 네리네타이드와 비교하여 혈장에서 향상된 안정성을 갖는다. 선택적으로, 활성제는 네리네타이드와 비교하여 향상된 플라스민 내성을 갖는다. 선택적으로, 활성제는 네리네타이드의 2배 이내의 PSD-95에 대한 결합 친화성을 갖는다. 선택적으로, 활성제는 네리네타이드의 2배 이내의 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 IC50을 갖는다.

[0051] [0047] 선택적으로, 활성제는 클로라이드 염이다.

[0052] [0048] 본 발명은 히스티딘 및 트레할로스를 추가로 포함하는 임의의 활성제의 제형을 추가로 제공한다.

[0053] [0049] 본 발명은 포스페이트 완충제를 추가로 포함하는 임의의 활성제의 제형을 추가로 제공한다.

[0054] [0050] 본 발명은 임의의 활성제 및 항염증제를 포함하는 복합제형을 추가로 제공한다. 선택적으로, 항염증제는 비만 세포 탈과립 억제제 또는 항히스타민제이다.

[0055] [0051] 본 발명은 임의의 활성제 및 혈전용해제를 포함하는 복합제형을 추가로 제공한다.

[0056] [0052] 본 발명은 대상체에게 임의의 활성제의 효과적인 요법을 투여하는 것을 포함하는 뇌졸중, 뇌 허혈, CNS에 대한 외상성 손상, 지주막하 출혈, 통증, 불안, 간질로부터 선택된 질환을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다.

[0057] [0053] 본 발명은 대상체에게 활성제의 효과적인 요법을 투여하는 것을 포함하는 뇌졸중을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체에서 허혈성 뇌졸중을 치료하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서 대상체에게 혈전용해제가 공동-투여되고, 활성제는 NOS 및/또는 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드를 포함하고, 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산은 L-아미노산이고, 활성제의 나머지 아미노산의 적어도 하나는 D-아미노산이며, 활성제 및 혈전용해제는 혈전용해제에 의해 유도된 활성제의 절단이 적어도 하나의 D-아미노산을 포함시킴으로써 감소되는 시간에 충분히 근접하게 투여된다. 선택적으로, 내재화 펩티드는 이의 N-말단에서 융합 단백질로서 억제제 펩티드의 C-말단에 연결된다. 선택적으로, 억제제 펩티드는 마지막 4개의 잔기로서 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L](SEQ ID NO:3)을 포함한다. 선택적으로, 억제제 펩티드는 마지막 5개의 잔기로서 [I]-[E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L](SEQ ID NO:10)을 포함하며, 이들 각각은 L 아미노산이다. 선택적으로, 내재화 펩티드는 tat 펩티드이다. 선택적으로, tat 펩티드의 적어도 8개의 잔기는 D-아미노산이다. 선택적으로, tat 펩티드의 각각의 잔기는 D-아미노산이다. 선택적으로, 내재화 펩티드는 이의 N-말단에서 융합 단백질을 형성하는 억제제 펩티드로서 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2) 또는 KLSSIETDV(SEQ ID NO:12)에 연결된 GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)를 포함한다. 선택적으로, 활성제는 각각의 K 및 R 잔기를 포함하는 D-잔기의 연속 세그먼트를 포함한다. 선택적으로, 활성제는 ygrkkrrqrrrklssIESDV(SEQ ID NO:6)를 포함하며, 여기서 소문자는 (글리신 외에) D-아미노산을 나타내고, 대문자는 L-아미노산이다. 선택적으로, 혈전용해제는 활성제 전 60, 30 또는 15분의 범위 내에서 투여된다. 선택적으로, 활성제 및 혈전용해제는 동시에 투여된다.

[0058] [0054] 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 활성제를 비정맥내 경로에 의해 투여하는 것을 포함하는 활성제를 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서 활성제는 치료 수준으로 혈장에 전달된다. 선택적으로, 활성제는 피하 투여된다. 선택적으로, 활성제는 근육내 투여된다. 선택적으로, 활성제는 비강내 또는 폐내 투여된다. 선택적으로, 용량은 3 mg/kg 초과이다. 선택적으로, 용량은 10 mg/kg 초과이다. 선택적으로, 용량은 20 mg/kg 초과이다. 선택적으로, 용량은 10 mg/kg 미만이고, 변이체는 비만 세포 탈과립 억제제 또는 항히스타민제의 공동-투여 없이 투여된다. 선택적으로, 용량은 10 mg/kg 초과이고, 변이체가 투여된다. 선택적으로, 대상체는 뇌졸중, 뇌 허혈, CNS에 대한 외상성 손상, 통증, 불안, 간질, 지주막하 출혈, 알츠하이머병 또는 파킨슨병으로부터 선택된 질환을 갖거나 가질 위험이 있다.

[0059] [0055] 본 발명은 장애를 치료하는데 유용한 제제에 연결된 내재화 펩티드를 포함하는 키메라 제제를 추가로 제공하며, 여기서 내재화 펩티드는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열 또는 최대 1, 2, 또는 3개의 치환 또는 결실(동일한 아미노산의 L에서 D로의 대체를 포함하지 않음)을 갖는 이의 변이체를 갖고, 여기서 내재화 펩티드의 3-5개 잔기는 D-아미노산이다.

도면의 간단한 설명

[0061] [0056] 도 1. NA-1(SEQ ID NO:58) 상의 플라스민 절단 부위.

[0062] [0057] 도 2 래트 혈장의 NA-1 함량은 rt-PA와 동시에 제공될 때 상당히 감소한다.

[0063] [0058] 도 3 인간 혈장의 NA-1 함량은 rt-PA와 동시에 제공될 때 상당히 감소한다.

[0064] [0059] 도 4 NA-1 Cmax 및 AUC는 rt-PA(5.4 mg/kg)와 동시에 투여될 때 상당히 감소한다.

[0065] [0060] 도 5: D-Tat-L-NR2B9c는 NA-1과 비교할 때 rt-PA의 존재 하에 래트 혈장에서 우수한 안정성을 입증한다.

[0066] [0061] 도 6: D-Tat-L-NR2B9c는 인간 혈장에서 rt-PA 주입 동안 단백질분해에 대해 내성이다.

[0067] [0062] 도 7 인간 혈장의 NA-1 함량은 TNK와 동시에 제공될 때 감소하지만, D-Tat-L-NR2B9c 함량은 보존된다.

[0068] [0063] 도 8 래트 혈장의 NA-1 함량은 TNK와 동시에 제공될 때 감소하지만, D-Tat-L-NR2B9c 함량은 보존된다.

[0069] [0064] 도 9: D-tat-L-NR2B9c는 PBS 배지에서 플라스민 절단에 대해 내성이다.

[0070] [0065] 도 10: 결과: D-Tat-L-NR2B9c는 래트 뇌 용해물에서 미리 형성된 NR2B:PSD95 복합체를 해리시킨다.

[0071] [0066] 도 11: D-tat-L-NR2B9c 및 D-Tat-L-IESDV(SEQ ID NO:6)는 표적 단백질 PSD95-PDZ2에 효과적으로 결합한다.

[0072] [0067] 도 12: 결과: NA-1 및 D-Tat-L-NR2B9c는 PSD95-PDZ2 도메인에 대해 높은 결합 친화성을 갖는다.

[0073] [0068] 도 13: 피하 NA-1은 IV NA-1에 비해 유사한 혈장 노출을 달성하였다.

[0074] [0069] 도 14: 피하 NA-3(D-Tat-L-IESDV SEQ ID NO:6)은 피하 NA-1에 비해 보다 높은 혈장 농도 및 보다 큰 혈장 노출을 달성하였다.

[0075] [0070] 도 15a(표) 및 도 15b(차트): 피하 NA-3(D-Tat-L-IESDV SEQ ID NO:6)은 SQ NA-1에 비해 보다 큰 혈장 노출을 달성하였다.

[0076] [0071] 도 16: D-NA-1 및 NA-3(D-Tat-L-IESDV SEQ ID NO:6)의 폐 점적은 폐내 NA-1에 비해 보다 높은 혈장 농도 및 보다 큰 혈장 노출을 달성하였다.

[0077] [0072] 도 17: 8.3 mg/kg 또는 2.8 mg/kg 용량의 NA-3(D-Tat-L-IESDV SEQ ID NO:6)의 피하 투여 후 현저한 히스타민 방출 없음.

[0078] [0073] 도 18: D-Tat-L-NR2B9c(7.6 mg/kg) 및 로독사미드(lodoxamide)(0.6 mg/kg)의 복합제형의 정맥내 투여 후 현저한 히스타민 방출 없음.

[0079] [0074] 도 19: 뇌졸중 발병 1시간 후 D-tat-L-NR2B9c 및 로독사미드의 정맥내 투여는 eMCAo 모델을 거친 동물에서 경색 부피 및 반구 종창을 감소시켰다.

[0080] [0075] 도 20: D-Tat-L-NR2B9c 및 로독사미드 투여는 뇌졸중 발병 24 시간 후 개선된 신경학적 결과를 초래하였다.

[0081] [0076] 도 21: 경색 부피에 대한 피하 NA-3 및 네리네타이드의 효과

[0082] [0077] 도 22: 피하 투여 15분 후 네네타이드 및 NA-3 혈장 농도

[0083] [0078] 도 23: 25 mg/kg의 피하 NA-3은 네리네타이드 IV 주입보다 더 큰 Cmax 및 AUC를 초래하였다.

[0084] [0079] 도 24: 피하 투여 후 NA-3 약동학적 프로파일.

[0085] [0080] 도 25: NHP NA-3 약동학 연구에서 실험 동물의 생리학적 매개변수

[0086] [0081] 도 26a 및 b: (a) BUN 및 크레아틴 및 (b) 다른 신장 기능 바이오마커의 수준이 NA-3 SQ(25 mg/kg) 투여 후 증가한다.

[0087] [0082] 도 27: 용량 감소, 감소된 D-아미노산 함량 및 DAAO 억제는 모두 크레아티닌 수준을 감소시킨다.

[0088] [0083] 도 28: 용량 감소, 감소된 D-아미노산 함량 및 DAAO 억제는 모두 BUN 수준을 감소시킨다.

[0089] [0084] 도 29: D-아미노산이 거의 없는 PSD-95 억제제는 플라스민에 대한 내성을 부여할 수 있다. NoNO 411 RkkrrQrRrIESDV(SEQ ID NO:110); NoNO 414 RKkRrQrrRIESDV(SEQ ID NO:111); NoNO 415 rKKRrQrRRIESDV(SEQ ID NO:134).

[0090] [0085] 도 30a, b: 네리네타이드는 (a) 경색 크기를 감소시키고, (B) 신경학적 결손을 감소시키는데 있어서 래트 tMCAo 모델에서 적어도 0.25-25 mg/kg의 투여량 범위에 걸쳐 효과적이다.

[0091] [0086] 도 31은 PSD-95 도메인 2에 대한 결합에 대해 비오티닐화된 네리네타이드와 경쟁하는 네리네타이드 및 D-아미노산을 함유하는 다른 펩티드를 나타낸다.

[0092] [0087] 도 32는 네리네타이드와 비교하여 다양한 투여량의 NoNO42를 IV 투여한 래트의 혈장 농도를 도시한다.

[0093] [0088] 도 33은 네리네타이드와 비교하여 다양한 투여량의 NoNO42로 처리된 래트에서 시간에 대한 혈압을 보여준다.

[0094] [0089] 도 34는 네리네타이드와 비교하여 다양한 투여량의 NoNO42로 처리된 래트에서 체중의 변화를 보여준다.

[0095] 정의

[0096] [0090] "약학적 제형" 또는 조성물은 활성제가 효과적일 수 있게 하고, 제형이 투여될 대상체에게 독성인 추가 성분들이 없는 제조물이다.

[0097] [0091] 문맥에서 달리 나타내지 않는 한, 대문자 한 글자 아미노산 코드의 사용은 D- 또는 L-아미노산을 지칭할 수 있다. 소문자 단일 문자 코드는 D-아미노산을 나타내는데 사용된다. 글리신은 D- 및 L-형을 갖지 않으므로 대문자 또는 소문자로 상호교환 가능하게 표현될 수 있다. 펩티드가 정의된 수의 D-아미노산을 갖는 것으로 언급될 때, 글리신은 이러한 D-아미노산 수에 포함되지 않는다. 펩티드가 연속 L-아미노산의 스트레치를 갖는다고 할 때, 이는 스트레치가 D-아미노산에 의해 중단되지 않는 것을 의미하지만 아미노산의 스트레치는 달리 명시적으로 나타내지 않는 한 글리신을 포함할 수 있다. 이러한 스트레치는 또한 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 아미노산의 연속 스트레치로 지칭된다.

[0098] [0092] 농도 또는 pH와 같은 수치 값은 그 값이 측정될 수 있는 정확도를 반영하는 허용 오차 내에서 제공된다. 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 분수 값은 가장 가까운 정수로 반올림된다. 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 값 범위의 언급은 범위 내의 임의의 정수 또는 하위 범위가 사용될 수 있음을 의미한다.

[0099] [0093] "질병" 및 "질환"이라는 용어는 대상체에서 정상적인 구조 또는 기능의 임의의 파괴 또는 중단을 표시하기 위해 동의어로 사용된다.

[0100] [0094] 지시된 투여량은 전형적인 병원 환경에서 투여량을 측정할 수 있는 정확도에 내재된 오차의 한계를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0101] [0095] "분리된" 또는 "정제된"이라는 용어는 대상 종(예를 들어, 펩티드)이 샘플, 예를 들어, 대상 종을 함유하는 천연 공급원으로부터 획득된 샘플에 존재하는 오염물질로부터 정제되었음을 의미한다. 대상 종이 분리되거나 정제되면, 이는 샘플에 존재하는 우세한 거대분자(예를 들어, 폴리펩티드) 종이며(즉, 몰 기준으로 조성물 내의 임의의 다른 개별 종보다 더 풍부함), 바람직하게는 대상 종은 존재하는 모든 거대분자 종의 적어도 약 50%(몰 기준으로)를 포함한다. 일반적으로, 분리되거나, 정제되거나 실질적으로 순수한 조성물은 조성물에 존재하는 모든 거대분자 종의 80 내지 90% 초과를 포함한다. 가장 바람직하게는, 대상 종은 본질적으로 균질하게 정제되며(즉, 오염 종이 종래의 검출 방법에 의해 조성물에서 검출될 수 없음), 여기서 조성물은 단일 거대분자 종을 필수적 요소로 하여 구성된다(consists essentially of). 분리된 또는 정제된이라는 용어는 분리된 종과 조합하여 작용하도록 의도된 다른 성분의 존재를 반드시 배제하지는 않는다. 예를 들어, 내재화 펩티드는 활성 펩티드에 연결되어 있음에도 불구하고 분리된 것으로 기술될 수 있다.

[0102] [0096] "펩티모방체(peptidimetic)"는 천연 아미노산으로 구성된 펩티드와 실질적으로 동일한 구조적 및/또는 기능적 특성을 갖는 합성 화학적 화합물을 지칭한다. 펩티드모방체는 완전히 합성된 비천연 아미노산 유사체를 함유할 수 있거나, 일부는 천연 펩티드 아미노산이고 일부는 비천연 아미노산 유사체인 키메라 분자일 수 있다. 펩티드모방체는 이러한 치환이 또한 모방체의 구조 및/또는 억제성 또는 결합 활성을 실질적으로 변경시키지 않는 한, 임의의 양의 천연 아미노산 보존적 치환을 또한 포함할 수 있다. 폴리펩티드 모방체 조성물은 비천연 구조 성분의 임의의 조합을 함유할 수 있으며, 이는 전형적으로 다음 3개의 구조 기로부터 유래된다: a) 천연 아미드 결합("펩티드 결합") 연결 이외의 잔기 연결 기; b) 자연 발생 아미노산 잔기 대신에 비천연 잔기; 또는 c) 2차 구조적 모방을 유도하는 잔기, 즉, 베타 턴, 감마 턴, 베타 시트, 알파 나선 입체형태 등과 같은 2차 구조를 유도하거나 안정화하는 잔기. 활성 펩티드 및 내재화 펩티드를 포함하는 키메라 펩티드의 펩티드모방체에서, 활성 모이어티 또는 내재화 모이어티 중 하나 또는 둘 모두는 펩티드모방체일 수 있다.

[0103] [0097] "특이적 결합"이라는 용어는 2개 분자, 예를 들어, 리간드와 수용체의 결합을 지칭하며, 이는 다른 많은 다양한 분자의 존재 하에서도 분자(리간드)가 다른 특정 분자(수용체)와 회합하는 능력을 특징으로 하며, 즉, 분자의 불균질 혼합물에서 한 분자가 다른 분자에 대해 우선적으로 결합하는 것을 나타낸다. 수용체에 대한 리간드의 특이적 결합은 또한 과량의 표지되지 않은 리간드의 존재 하에 검출 가능하게 표지된 리간드의 수용체에 대한 결합의 감소에 의해 입증된다(즉, 결합 경쟁 검정).

[0104] [0098] 흥분독성은 신경세포 및 주변 세포가 NMDA 수용체, 예를 들어, NMDAR2B 서브유닛을 보유하는 NMDA 수용체와 같은 흥분성 신경전달물질 글루타메이트에 대한 수용체의 과활성화에 의해 손상되고 사멸되는 병리학적 과정이다.

[0105] [0099] "대상체" 또는 "환자"라는 용어는 인간 및 수의학적 동물, 예를 들어, 포유동물뿐만 아니라 전임상 연구에 사용되는 마우스 또는 래트와 같은 실험실 동물 모델을 포함한다.

[0106] [0100] tat 펩티드는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하거나 이로 구성된 펩티드를 의미하며, 여기서 5개 이하의 잔기가 서열 내에서 결실, 치환 또는 삽입되고, 이는 세포 내로 연결된 펩티드 또는 다른 제제의 흡수를 촉진하는 능력을 유지한다. 바람직하게는 임의의 아미노산 변화는 보존적 치환이다. 바람직하게는, 응집체에서의 임의의 치환, 결실 또는 내부 삽입은, 바람직하게는 상기 서열의 것과 유사한 순 양이온 전하를 갖는 펩티드를 남긴다. 이는, 예를 들어, 어떠한 R 또는 K 잔기도 치환하지 않거나, 동일한 총 R 및 K 잔기를 유지함으로써 달성될 수 있다. tat 펩티드의 아미노산은 염증 반응을 감소시키기 위해 비오틴 또는 유사한 분자로 유도체화될 수 있다.

[0107] [0101] 약리학적 제제의 공동-투여는 제제들이 검출 가능한 양의 제제가 동시에 혈장에 존재할 수 있도록 충분히 가까운 시간에 투여되고/거나 제제가 질환의 동일한 에피소드에 치료 효과를 발휘하거나 제제가 질환의 동일한 에피소드를 치료하는데 있어서 협력적으로 또는 상승적으로 작용하는 것을 의미한다. 예를 들어, 항염증제는 항염증제가 내재화 펩티드에 의해 유도 가능한 항염증 반응을 억제할 수 있는 시간에 충분히 근접하게 상기 2개의 제제가 투여될 때 tat 펩티드를 포함하는 제제와 협력적으로 작용한다.

[0108] [0102] 통계적으로 유의하다는 것은 <0.05, 바람직하게는 <0.01 및 가장 바람직하게는 <0.001인 p-값을 지칭한다.

[0109] [0103] 질환의 에피소드는 질환의 징후 및/또는 증상이 징후 및/또는 증상이 없거나 더 적은 정도로 존재하는 더 긴 기간을 옆에 두고 산재해 있는 기간을 의미한다.

[0110] [0104] "NMDA 수용체" 또는 "NMDAR"이라는 용어는 하기에 기재된 다양한 서브유닛 형태를 포함하는 NMDA와 상호작용하는 것으로 공지된 막 결합 단백질을 지칭한다. 이러한 수용체는 인간 또는 비인간(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이)일 수 있다.

[0111] [0105] 치료 지수는 동물 연구에서 LD(치사량)50/ED(유효 용량)50 또는 인간에서 TD(독성 용량)50/ED(유효 용량)50로서 관례에 따라 사용된다.

[0112] [0106] "포함하는", "구성된" 및 필수적 요소로 하여 구성된"은 각각 관례에 따라 사용된다. 따라서, "포함하는"은 추가의 요소 또는 단계를 배제하지 않으며, "필수적 요소로 하여 구성된"은 본 발명의 기본적이고 신규한 특징을 지칭한다. 명세서에서 물질 또는 방법의 특징(들)에 대한 언급은 문맥에서 달리 요구하지 않는 한 다음 대안 중 하나를 청구하기 위한 뒷받침으로서 이해되어야 한다: 명시된 특징(들)을 포함하는 물질 또는 방법, 이로 구성된 물질 또는 방법, 또는 이를 필수적 요소로 하여 구성된 물질 또는 방법.

[0113] [0107] 명세서가 네리네타이드 서열 또는 네리네타이드의 tat 내재화 펩티드의 넘버링된 위치(예를 들어, 3번째 아미노산)를 지칭할 때, 명세서는 또한 변이체가 네리네타이드 또는 네리네타이드의 내재화 펩티드와 최대로 정렬될 때의 네리네타이드의 변이체 또는 네리네타이드의 내재화 펩티드의 상응하는 위치를 개시하는 것으로 이해되어야 한다.

[0114] 상세한 설명

[0115] [0108] I. 총론

[0116] [0109] 본 발명은 뇌졸중을 치료하기 위한 전술한 활성제 Tat-NR2B9c의 변이체를 제공하며, 여기서 C-말단 4개 또는 5개의 아미노산은 L-아미노산이고, 나머지 아미노산 중 하나 이상은 D-아미노산이다. D-아미노산의 포함은, 자연적으로 혈장에 존재하고 혈전용해제의 투여에 의해 유도되는 특히 플라스민에 의한 제제의 단백질분해를 억제한다. D-아미노산은 또한 Tat-NR2B9c가 접하는 다른 프로테아제, 예를 들어, 혈장 또는 피하 조직의 프로테아제를 억제할 수 있다. C-말단에 L-아미노산의 보유는 나머지 분자의 일부 또는 전부에서 D-아미노산의 존재에도 불구하고, Tat-NR2B9c의 결합 및 억제 특성을 유지하기에 충분하다. D-아미노산과 관련된 신독성은 최소 수의 위치에 D-아미노산을 포함시키고/거나 D-아미노산 옥시다제의 억제제와 공동-투여함으로써 감소될 수 있다. 결과적인 활성제는 공동-투여되거나 공동-제형화된 혈전용해제에 의해 유도되는 증가된 반감기, 및 플라스민에 대한 내성을 포함하는 여러 이점을 갖는다. 결과적인 제제는 또한 피하, 비강내 및 근육내와 같은 정맥

내 주입에 대한 대안적인 경로에 의한 투여에 보다 적합할 수 있는데, 이는 제제의 더 긴 반감기가 혈장에서 치료 농도를 발생시키기 위해 이러한 경로에 필요한 더 긴 시간을 보상할 수 있기 때문이다. 이러한 경로에 의한 투여는 상당한 히스타민 방출 없이 보다 높은 투여량의 투여를 허용할 뿐만 아니라 의료 시설보다는 현장에서의 수행에 보다 적합하다. 본 발명의 활성제의 더 큰 반감기는 또한 이들을 다중투여 요법(multidosing scheme)에서 연장된 기간에 걸쳐 치료 농도를 유지하는데 더욱 적합하게 만들 수 있다. 이러한 요법은 뇌졸중으로 인한 병리학적 및 인지적 결손으로부터의 회복을 촉진할 뿐만 아니라 초기 결손을 줄이는데 유용할 수 있다. 다중투여 요법은 또한 만성 질환, 예를 들어, 알츠하이머병 및 파킨슨병을 치료하는데 유용할 수 있다.

[0117] [0110] II. 활성제

[0118] [0111] 본 발명의 활성제는 NMDAR2B(예를 들어, GenBank ID 4099612) 및/또는 NOS(예를 들어, 신경세포 또는 nNOS Swiss-Prot P29475)를 포함하는 NMDA 수용체 2 서브유닛에 대한 결합을 억제하기 위해 PSD-95에 특이적으로 결합하는 펩티드 억제제(예를 들어, Stathakism, Genomics 44(1):71-82 (1997)), 및 세포막 및 혈뇌 장벽을 가로지르는 펩티드 억제제의 통과를 용이하게 하는 내재화 펩티드를 포함한다. 바람직한 펩티드는 인간 대상체에서 사용되는 인간 형태의 PSD-95 NMDAR 2B 및 NOS를 억제한다. 그러나, 억제는 또한 단백질의 종 변이체로부터 나타날 수 있다. 일부 억제제 펩티드는 C-말단에 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L](SEQ ID NO:3)을 포함하는 아미노산 서열을 갖는다. 예시적인 펩티드는 C-말단 아미노산으로서 ESDV(SEQ ID NO:14), ESEV(SEQ ID NO:15), ETDV(SEQ ID NO:16), ETAV(SEQ ID NO:17), ETEV(SEQ ID NO:18), DTDV(SEQ ID NO:19), 및 DTEV(SEQ ID NO:20)를 포함한다. 일부 펩티드는 C-말단에 [I]-[E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L](SEQ ID NO:10)을 포함하는 아미노산 서열을 갖는다. 예시적인 펩티드는 C-말단 아미노산으로서 IESDV(SEQ ID NO:5), IESEV(SEQ ID NO:21), IETDV(SEQ ID NO:22), IETAV(SEQ ID NO:23), IETEV(SEQ ID NO:24), IDTDV(SEQ ID NO:25), 및 IDTEV(SEQ ID NO:26)를 포함한다. 일부 억제제 펩티드는 C-말단에 X_1-[T/S]-X_2V(SEQ ID NO:27)를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 여기서 [T/S]는 대안적인 아미노산이고, X_1은 E, Q , A, 또는 D 또는 이의 유사체로부터 선택되고, X_2는 A, Q, D, E, N, N-Me-A, N-Me-Q, N-Me-D, 및 N-Me-N 또는 이의 유사체로부터 선택된다(Bach, J. Med. Chem. 51, 6450-6459 (2008) and WO 2010/004003 참조). 선택적으로, 펩티드는 P3 위치(C-말단으로부터 3번째 아미노산, 즉, [T/S]가 차지하는 위치)에서 N-알킬화된다. 펩티드는 사이클로헥산 또는 방향족 치환기로 N-알킬화될 수 있고, 치환기와 펩티드 또는 펩티드 유사체의 말단 아미노 기 사이에 스페이서 기를 추가로 포함하며, 여기서 스페이서는 바람직하게는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌 및 부틸렌으로부터 선택된 알킬 기이다. 방향족 치환기는 나프탈렌-2-일 모이어티 또는 1개 또는 2개의 할로겐 및/또는 알킬 기로 치환된 방향족 고리일 수 있다. 일부 억제제 펩티드는 C-말단에 IX_1-[T/S]-X_2V(SEQ ID NO:28)를 포함하는 아미노산 서열을 갖는다. 예시적인 억제제 펩티드는 서열 IESDV(SEQ ID NO:5), IETDV(SEQ ID NO:22), KLSSIESDV(SEQ ID NO:2), 및 KLSSIETDV(SEQ ID NO:12)를 갖는다. 억제제 펩티드는 일반적으로 3-25개의 아미노산(내재화 펩티드 없음)을 가지며, 5-10개 아미노산의 펩티드 길이, 및 특히 9개 아미노산(또한 내재화 펩티드 없음)이 바람직하다.

[0119] [0112] 내재화 펩티드는 많은 세포 또는 바이러스 단백질이 막을 횡단할 수 있게 하는 비교적 짧은 펩티드의 잘 알려진 부류이다. 이들은 또한 세포막 또는 혈뇌 장벽을 가로질러 연결된 펩티드의 통과를 촉진할 수 있다. 세포막 형질도입 펩티드, 단백질 형질도입 도메인, 뇌 셔틀 또는 세포 투과 펩티드로도 알려진 내재화 펩티드는, 예를 들어, 5-30개의 아미노산을 가질 수 있다. 이러한 펩티드는 전형적으로 막을 가로질러 이들의 통과를 용이하게 하는 것으로 여겨지는 아르기닌 및/또는 리신 잔기의 상기 정규 표현(일반적으로 단백질에 비해)으로부터의 양이온성 전하를 갖는다. 일부 이러한 펩티드는 적어도 5, 6, 7 또는 8개의 아르기닌 및/또는 리신 잔기를 갖는다. 예는 안테나피디아(antennapedia) 단백질(Bonfanti, Cancer Res. 57, 1442-6 (1997))(및 이의 변이체), 인간 면역결핍 바이러스의 tat 단백질, 단백질 VP22, 단순 포진 바이러스 타입 1의 UL49 유전자의 생성물, 페네트라틴(Penetratin), SynB1 및 3, 트랜스포탄(Transportan), 양친매성, gp41NLS, polyArg, 및 여러 식물 및 박테리아 단백질 독소, 예를 들어, 리신(ricin), 아브린(abrin), 모데신(modeccin), 디프테리아 독소, 콜레라 독소, 탄저 독소, 열 불안정 독소, 및 슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 외독소 A(ETA)를 포함한다. 다른 예는 하기 참고문헌에 기술되어 있다(Temsamani, Drug Discovery Today, 9(23):1012-1019, 2004; De Coupade, Biochem J., 390:407-418, 2005; Saalik Bioconjugate Chem. 15: 1246-1253, 2004; Zhao, Medicinal Research Reviews 24(1):1-12, 2004; Deshayes, Cellular and Molecular Life Sciences 62:1839-49, 2005); Gao, ACS Chem. Biol. 2011, 6, 484-491, SG3 (RLSGMNEVLSFRWL (SEQ ID NO:29)), Stalmans PLoS ONE 2013, 8(8) e71752, 1-11 and supplement; Figueiredo et al., IUBMB Life 66, 182-194 (2014); Copolovici et al., ACS Nano, 8, 1972-94 (2014); Lukanowski Biotech J. 8, 918-930 (2013); Stockwell,

Chem. Biol. Drug Des. 83, 507-520 (2014); Stanzl et al. Accounts. Chem. Res/ 46, 2944-2954 (2013); Oller-Salvia et al., Chemical Society Reviews 45: 10.1039/c6cs00076b (2016); Behzad Jafari et al., (2019) Expert Opinion on Drug Delivery, 16:6, 583-605 (2019)(모두 참조로서 포함됨). 또 다른 전략은 PSD-95 억제제와 같은 화물 분자의 뇌로의 전달을 향상시키기 위해 추가적인 방법 또는 조성물을 사용한다(Dong, Theranostics 8(6): 1481-1493 (2018)).

[0120] [0113] 바람직한 내재화 펩티드는 HIV 바이러스로부터의 tat이다. 이전 연구에서 보고된 tat 펩티드는 HIV Tat 단백질에서 발견되는 표준 아미노산 서열 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하거나 이로 구성된다. RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13) 및 GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)도 사용될 수 있다. 이러한 tat 모티프 옆에 추가 잔기가 존재하는 경우(약리학적 제제 외에), 잔기는 예를 들어 tat 단백질로부터의 이러한 세그먼트 옆에 있는 천연 아미노산, 2개의 펩티드 도메인을 연결하는데 일반적으로 사용되는 종류의 스페이서 또는 링커 아미노산, 예를 들어, gly (ser)$_4$(SEQ ID NO:30), TGEKP(SEQ ID NO:31), GGRRGGGS(SEQ ID NO:32), 또는 LRQRDGERP(SEQ ID NO:33)(예를 들어, 문헌[Tang et al. (1996), J. Biol. Chem. 271, 15682-15686; Hennecke et al. (1998), Protein Eng. 11, 405-410)] 참조)이거나, 측접 잔기 없이 변이체의 흡수를 부여하는 능력을 현저하게 감소시키지 않는 임의의 다른 아미노산일 수 있다. 바람직하게는, 활성 펩티드 이외의 측접 아미노산의 수는 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)의 어느 한쪽에서 10개를 초과하지 않는다. 그러나, 바람직하게는, 측접 아미노산이 존재하지 않는다. YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1) 또는 다른 억제제 펩티드의 C-말단에 측접한 추가 아미노산 잔기를 포함하는 하나의 적합한 tat 펩티드는 YGRKKRRQRRRPQ(SEQ ID NO:34)이다. 사용될 수 있는 다른 tat 펩티드는 GRKKRRQRRRPQ(SEQ ID NO:35) 및 GRKKRRQRRRP(SEQ ID NO:36)를 포함한다.

[0121] [0114] N-타입 칼슘 채널에 결합하는 능력이 감소된 상기 tat 펩티드의 변이체는 WO2008/109010에 기재되어 있다. 이러한 변이체는 아미노산 서열 XGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:37)을 포함하거나 이로 구성될 수 있고, 여기서 X는 Y 이외의 아미노산이거나 아미노산 서열 GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 예시적인 tat 펩티드는 F로 치환된 N-말단 Y 잔기를 갖는다. 따라서, 예시적인 tat 펩티드는 FGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:38)을 포함하거나 이로 구성된다. 또 다른 예시적인 변이체 tat 펩티드는 GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)로 구성된다. 또 다른 예시적인 tat 펩티드는 RRRQRRKKRG(SEQ ID NO:39) 또는 RRRQRRKKRGY(SEQ ID NO:40)를 포함하거나 이로 구성된다. N-타입 칼슘 채널을 억제하지 않고 약리학적 제제의 흡수를 촉진하는 다른 tat 유래 펩티드는 하기 표 1A에 제시된 것들을 포함한다.

[0122] [0115] 표 1A

[0123]

X-FGRKKRRQRRR (F-Tat)(SEQ ID NO:38)
X-GKKKKKQKKK(SEQ ID NO:41)
X-RKKRRQRRR (SEQ ID NO:13)
X-GAKKRRQRRR(SEQ ID NO:42)
X-AKKRRQRRR(SEQ ID NO:43)
X-GRKARRQRRR(SEQ ID NO:44)
X-RKARRQRRR(SEQ ID NO:45)
X-GRKKARQRRR(SEQ ID NO:46)
X-RKKARQRRR(SEQ ID NO:47)
X-GRKKRRQARR(SEQ ID NO:48)
X-RKKRRQARR(SEQ ID NO:49)
X-GRKKRRQRAR(SEQ ID NO:50)
X-RKKRRQRAR(SEQ ID NO:51)
X-RRPRRPRRPRR(SEQ ID NO:52)
X-RRARRARRARR(SEQ ID NO:53)
X-RRRARRRARR(SEQ ID NO:54)
X-RRRPRRRPRR(SEQ ID NO:55)
X-RRPRRPRR(SEQ ID NO:56)
X-RRARRARR(SEQ ID NO:57)

[0124] [0116] X는 유리 아미노 말단, 하나 이상의 아미노산, 또는 컨쥬게이션된 모이어티를 나타낼 수 있다.

[0125] [0117] 본 발명의 활성제는 전형적으로 억제제 펩티드가 유리 C-말단 및 내재화 펩티드의 C-말단에 연결된 N-말단을 갖도록 구성된 억제제 펩티드 및 내재화 펩티드를 포함한다. 이러한 제제에서, 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 잔기 및 바람직하게는 억제제 펩티드의 5개의 C-말단 잔기는 L-아미노산이고, 억제제 펩티드 및 내재화 펩티드의 나머지 잔기 중 적어도 하나는 D 잔기이다. D 잔기의 포함을 위한 위치는 D 잔기가 임의의 염기성 잔기(즉, 아르기닌 또는 리신)의 바로 다음에(즉, C-말단 측) 나타나도록 선택될 수 있다. 플라스민은 이러

한 염기성 잔기의 C-말단 측에서 펩티드 결합을 절단함으로써 작용한다. 절단 측접 부위, 특히 염기성 잔기의 C-말단 측에 D 잔기의 포함은 펩티드 절단을 감소시키거나 제거한다. 염기성 잔기의 C-말단 측에 있는 임의의 또는 모든 잔기는 D 잔기일 수 있다. 임의의 염기성 잔기가 또한 D-아미노산일 수 있다.

[0126] [0118] 예로서, 도 1은 Tat-NR2B9c에서 실제 및 잠재적 플라스민 절단 부위의 맵을 보여준다. 플라스민 절단이 일어날 수 있는 7개의 실제 부위(절단이 검출된 곳) 및 2개의 추가의 잠재적 부위가 있다. 일부 활성제는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드 둘 모두에 적어도 하나의 D-아미노산을 포함한다. 일부 활성제는 내재화 펩티드의 각 위치에 D-아미노산을 포함하는 억제제 펩티드를 포함한다. 일부 활성제는 L-아미노산인 4개 또는 5개의 C-말단 잔기를 제외하고 억제제 펩티드의 각 위치에 D-아미노산을 포함한다. 일부 활성제는 내재화 펩티드의 각 위치, 및 L-아미노산인 마지막 4개 또는 5개의 C-말단 아미노산 잔기를 제외하고 억제제 펩티드의 각 위치에 D-아미노산을 포함한다.

[0127] [0119] NA-1 또는 네리네타이드로도 공지된 Tat-NR2B9c는 아미노산 서열 YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:58)를 갖는다. 본 발명의 바람직한 활성제는 ESDV(SEQ ID NO:14) 또는 IESDV(SEQ ID NO:5)가 L-아미노산이고 나머지 아미노산 중 적어도 하나가 D-아미노산인 이러한 서열의 변이체이다. 일부 활성제에서, 적어도 C-말단으로부터 8번째 및 9번째 위치에 있는 L 또는 K 잔기, 또는 둘 모두는 D 잔기이다. 일부 활성제에서, N-말단으로부터 6번째, 7번째, 8번째, 10번째, 및 11번째 위치를 차지하는 R, R, Q, R, R 잔기 중 적어도 하나는 D 잔기이다. 일부 활성제에서, 이러한 잔기 모두는 D-잔기이다. 일부 활성제에서, 잔기 4-8 및 잔기 10-13 각각은 D-아미노산이다. 일부 활성제에서, 잔기 4-13 또는 3-13 각각은 D-아미노산이다. 일부 활성제에서, 키랄 형태가 없는 글리신 외에 내재화 펩티드의 11개 잔기 각각은 D-아미노산이다. 일부 예시적인 활성제는 ygrkkrrqrrrklssIESDV(SEQ ID NO:6)(NA-3이라고도 함), ygrkkrrqrrrklssiESDV(SEQ ID NO:59), ygrkkrrqrrrklsSIESDV(SEQ ID NO:60), ygrkkrrqrrrklSSIESDV(SEQ ID NO:61), ygrkkrrqrrrkssIESDV(SEQ ID NO:7), ygrkkrrqrrrksIESDV(SEQ ID NO:8), 또는 ygrkkrrqrrrkIESDV(SEQ ID NO:9)를 포함한다. 다른 활성제는 C-말단으로부터 3번째 위치에 있는 S가 T로 대체된 상기 서열의 변이체를 포함한다: ygrkkrrqrrrklssIETDV(SEQ ID NO:62), ygrkkrrqrrrklssiETDV (SEQ ID NO:63), ygrkkrrqrrrklsSIETDV(SEQ ID NO:64), ygrkkrrqrrrkssIETDV(SEQ ID NO:65), ygrkkrrqrrrksIETDV(SEQ ID NO:66), 및 ygrkkrrqrrrkIETDV(SEQ ID NO:67). 활성제는 ygrkkrrqrrrIESDV(SEQ ID NO:68), (D-Tat-L-2B5c) 및 ygrkkrrqrrrIETDV(SEQ ID NO:69)를 포함한다.

[0128] [0120] 본 발명은 또한 NOS 및/또는 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에, 예를 들어, 융합 펩티드로서 연결된 내재화 펩티드를 포함하는 활성제, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드에서 총 1, 2, 3, 4, 또는 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체를 포함하고, 여기서 내재화 펩티드는 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1), GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11), 또는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 억제제 펩티드는 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2)를 포함하는 서열을 갖는다. 이러한 활성제에서, 억제제 펩티드의 적어도 4개 또는 5개의 C-말단 아미노산은 L-아미노산이고, 모든 R 및 K 잔기 및 대부분의 C-말단 R 또는 K 잔기에 대해 바로 C-말단 잔기를 포함하는 아미노산의 연속 세그먼트는 D-아미노산이다. 따라서, 서열 YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:58)를 갖는 펩티드에서, 첫 번째 R에서 L 잔기까지의 연속 세그먼트는 키랄 형태가 없는 글리신을 제외하고 D-아미노산이다.

[0129] [0121] 허용되는 치환의 한 가지 예는 억제제 펩티드의 C-말단에 있는 모티프 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L](SEQ ID NO:3)에 의해 제공된다. 예를 들어, C-말단으로부터 3번째 아미노산은 S 또는 T일 수 있다. 바람직하게는, 억제제 펩티드의 5개의 C-말단 아미노산 각각은 L-아미노산이다. 선택적으로, 다른 모든 아미노산은 활성제 ygrkkrrqrrrklssIESDV(SEQ ID NO:6)에서와 같이 D-아미노산이고, 여기서 소문자는 D-아미노산이고 대문자는 L-아미노산이다(키랄 형태가 없는 글리신 제외).

[0130] [0122] 상기 기재된 바와 같이 네리네타이드의 변이체에 D-아미노산을 포함시키는 것은 플라스민 내성 및 혈장 반감기를 증가시키는데 유리하지만, D-아미노산은 또한 신독성을 유발할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 신독성의 정도는 활성제의 용량, 활성 펩티드의 D-아미노산의 함량 및 독성을 감소시키기 위한 D-아미노산 옥시다제 억제제의 사용에 의존한다. 놀랍게도, 증가된 플라스민 내성 및 혈장 반감기의 이익의 대부분 및 때때로 전부(예를 들어, 50, 75, 90, 99% 초과 또는 100%)는 동일한 투여량에 대해 감소된 신독성(예를 들어, 10, 25, 50, 75 또는 90%만큼 감소)의 추가적인 이점을 갖는 상기 기재된 활성제보다 더 적은 위치에 D-아미노산을 포함시킴으로써 달성될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 즉, D-아미노산과 관련된 이점 및 신독성은 D-아미노산의 함량과 동일한 상관관계를 나타내지 않는다.

[0131] [0123] 본 발명의 실행을 위해 메커니즘의 이해가 요구되지는 않지만, 상기 결과는 D-아미노산이 절단 부위를 가로지르는 2개의 아미노산 중 하나일 때 뿐만 아니라 예를 들어 2, 3 또는 4개의 아미노산만큼 떨어진(아미노산 1은 절단 부위 바로 옆에 있는 아미노산임), 절단 부위로부터 더 멀리 떨어져 있는 경우에도 플라스민 절단 및 때때로 다른 프로테아제에 대한 보호를 제공하는 D-아미노산에 의해 부분적으로 설명될 수 있다. 또한, D-아미노산으로부터의 신독성은 펩티드 용량 뿐만 아니라 펩티드에서 D-아미노산의 수에 비례하여 더욱 증가하는 것으로 보인다. 결과적으로, 최소 수의 D-아미노산을 사용하는 것은 유의한 신독성 없이 완전히 D-아미노산으로 제조된 펩티드의 안정성 이점의 전부는 아니지만 대부분을 부여할 수 있다.

[0132] [0124] 예를 들어, 일부 활성제는 내재화 펩티드의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 아미노산만을 D-아미노산으로서 갖고(존재하는 경우 글리신을 포함하지 않음), 억제제 펩티드는 초기 K 및/또는 L 잔기를 가능한 제외하고 모두 L-잔기로 형성된다. 일부 활성제는 내재화 펩티드의 2-6, 2-5, 2-4, 3-6, 3-5, 또는 4-5개(존재하는 경우 글리신을 포함하지 않음)를 D-아미노산으로서 갖고, 내재화 펩티드의 나머지 아미노산 각각 및 억제제 펩티드를 억제제 펩티드의 초기 K 및/또는 L을 가능한 제외하고 L-아미노산 또는 글리신으로서 갖는다. 일부 활성제는 내재화 펩티드의 2-6, 2-5, 2-4, 3-6, 3-5, 또는 4-5개(존재하는 경우 글리신을 포함하지 않음)를 D-아미노산으로서 갖고, 내재화 펩티드의 나머지 아미노산 각각 및 억제제 펩티드를 L-아미노산 또는 글리신으로서 갖는다.

[0133] [0125] 플라스민-내성 및 혈장 반감기는 활성제에서 선택된 L-아미노산을 D-아미노산으로 대체하고/거나 활성제의 활성에 필수적이지 않은 L-아미노산을 결실시킴으로써 증가될 수 있다. 약학적 활성의 실질적인 손실 없이 네리네타이드로부터 결실될 수 있는 예시적인 아미노산은 내재화 펩티드 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)의 처음 2개의 아미노산 Y 및 G, 및 억제제 펩티드 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2)의 N-말단으로부터 처음 4개 또는 심지어 5개의 아미노산을 포함한다. 따라서, 일부 활성제는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 내재화 펩티드에 기초한다. 내재화 펩티드의 아미노산의 전부는 아니지만 적어도 하나는 D-아미노산이다. 예를 들어, RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)의 아미노산 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개는 D-아미노산일 수 있다. 일부 활성제에서, RKKRRQRRR의 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 또는 1-2개 아미노산 잔기는 D-아미노산이다. 일부 활성제에서, RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)의 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3개 잔기는 D-아미노산이다. 일부 활성제에서, RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)의 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-8, 5-7, 5-6, 6-8, 6-7 또는 7-8개 잔기는 D-아미노산이다.

[0134] [0126] 일부 활성제는 GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)을 포함하는 내재화 펩티드에 기초한다. 일부 활성제에서, GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 잔기는 D-아미노산이다(키랄 형태를 갖지 않는 글리신은 펩티드에서 D-아미노산의 이러한 또는 유사한 카운트에서 D 잔기로 계수되지 않음). 일부 이러한 활성제에서, GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)의 잔기의 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 또는 1-2개는 D-아미노산이다. 일부 이러한 활성제에서, GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)의 잔기의 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 또는 2-3개는 D-아미노산이다. 일부 이러한 활성제에서, GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)의 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-8, 5-7, 5-6, 6-8, 6-7, 또는 7-8개 잔기는 D-아미노산이다.

[0135] [0127] 일부 활성제는 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하는 내재화 펩티드에 기초한다. 일부 활성제에서, 내재화 펩티드의 잔기의 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2개는 D-아미노산이다. 일부 이러한 활성제에서, 내재화 펩티드의 잔기의 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 또는 2-3개는 D-아미노산이다. 일부 이러한 활성제에서, 내재화 펩티드의 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-9, 6-8, 6-7, 7-9, 7-8, 또는 8-9개 잔기는 D-아미노산이다. 일부 이러한 활성제에서, 내재화 펩티드의 잔기의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개는 D-아미노산이다.

[0136] [0128] 방금 논의된 내재화 펩티드에 연결된 억제제 펩티드는 화학식 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L](SEQ ID NO:3)에 따른 4개의 C-말단 아미노산을 포함한다. 바람직하게는 억제제 펩티드는 C-말단에 ESDV(SEQ ID NO:14), IESDV(SEQ ID NO:5), ETDV(SEQ ID NO:16) 또는 IETDV(SEQ ID NO:22)를 포함한다. 억제제 펩티드의 4개 또는 5개의 말단 아미노산, 예를 들어, ESDV(SEQ ID NO:14), IESDV(SEQ ID NO:5), ETDV(SEQ ID NO:16) 또는 IETDV(SEQ ID NO:22)는 L-아미노산이다. 추가 아미노산이 억제제 펩티드에 존재하는 경우, 이들은 전형적으로 IE[S/T]DV(SEQ ID NO:4)의 N-말단에 연결된 KLSS(SEQ ID NO:113), KLS, KL, K, S, SS, 또는 SL이다. 억제제 펩티드의 이러한 추가 아미노산은 전형적으로 L 아미노산이지만, K는 L- 또는 D-아미노산일 수 있다. KLSSIESDV(SEQ ID NO:2) 또는 KLSSIETDV(SEQ ID NO:12)는 예시적인 억제제 펩티드이고, 여기서 억제제 펩티드의 각 잔기는 L-아미노산이지만, K 및 L은 독립적으로 L- 또는 D-아미노산일 수 있다. 일부 억제제 펩티드에서, K 및 L은 둘 모두 L-아미노산이다. 일부 억제제 펩티드에서, K 및 L은 둘 모두 D-아미노산이다. 일부 억제제 펩

티드에서, K는 D-아미노산이고 L은 L-아미노산이거나 또는 그 반대이다.

[0137] [0129] 다른 치환, 결실 또는 첨가(L-아미노산을 D-아미노산으로 대체하는 것 외에)가 개시된 서열에 대해 선택적으로 이루어질 수 있다(예를 들어, 바람직하게는 결합, 억제, 플라스민-내성 및 혈장 반감기를 적어도 실질적으로 유지하고 하기에 추가로 논의된 바와 같이 신독성을 증가시키지 않으면서, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 이하의 치환, 결실 또는 첨가). 예를 들어, 일부 변이체는 개시된 서열에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환(들)을 포함한다. 일부 변이체는 개시된 서열에 비해 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 치환(들) 및 결실(들)의 조합을 포함한다. 일부 변이체는 개시된 서열에 비해 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 치환(들), 결실(들) 또는 첨가(들)의 조합을 포함한다.

[0138] [0130] 상기 개시된 내재화 펩티드에 존재하는 D-잔기는 서로 연속하거나 연속하지 않을 수 있다. 예를 들어, 일부 내재화 펩티드에서 적어도 2개의 D-아미노산은 하나 이상의 L-아미노산 또는 글리신에 의해 서로 분리된다. 일부 내재화 펩티드에서 적어도 3개의 D-아미노산은 각각 하나 이상의 L-아미노산 또는 글리신에 의해 분리된다.

[0139] [0131] 일부 활성제에서, D-아미노산으로 대체된 L-아미노산의 적어도 하나 또는 전부는 K 및 R이거나 K 또는 R 잔기의 C-말단 측에 바로 있는 잔기인데, 이는 이들 잔기가 플라스민 절단의 잠재적 부위 옆에 있기 때문이다. 일부 활성제에서, 2개 이상의 연속적인 K 또는 R 잔기의 스트레치에 대해 바로 C-말단에 있는 잔기는 D-아미노산으로 대체된다. K, R 및 바로 C-말단 인접 잔기 이외의 다른 L-잔기가 또한 D-잔기로 대체될 수 있다.

[0140] [0132] 일부 예시적인 내재화 펩티드는 하기 표 1B에 제시된 바와 같은 서열을 갖는다.

[0141] [0133] 표 1B

서열	SEQ ID NO:
yGrkkrrqrrr	88
YGrkkrrQrrr	89
YGrkkrrQrRr	90
YGrKKRrQrRr	91
YGrKKRrQrRR	92
YGrKKRrQRrR	93
YGRKkrrQrrr	94
GRKkRrQrrRV	119
Ygrkkrrqrrr	120
Rkkrrqrrr	121
RkkrrQrRr	98
RkkrrQrrR	99
RKkrrQrrR	100
rKKRrQrRr	101
RKkRrQrrR	102
rKKRrQrRR	103
rKKRrQRRR	104
rKKRRQrRR	105
RKKRrQrRR	106
RKKRRQrRR	107
rKKRRQRRR	108
RKKRrQRRR	109

[0142]

[0143] [0134] 일부 예시적인 활성제는 RkkrrQrRrIESDV(SEQ ID NO:110, NoNO 411), RKkRrQrrRIESDV(SEQ ID NO:111), 또는 rKKRrArRRIESDV(SEQ ID NO:112) 중 임의의 것을 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 갖는다.

[0144] [0135] 일부 바람직한 활성제는 kLSSIESDV(SEQ ID NO:122) 또는 KlSSIESDV(SEQ ID NO:123) 또는 klSSIESDV(SEQ

ID NO:70)에 연결된 임의의 상기 내재화 펩티드를 갖는다.

[0145] [0136] 일부 활성제는 NOS 및/또는 NMDAR2B에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 억제제 펩티드에 연결된 내재화 펩티드, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드의 서열에서 총 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 치환, 첨가 또는 결실을 갖는 이의 변이체(동일한 아미노산의 L에서 D로의 치환은 세지 않음)를 포함하고, 여기서 내재화 펩티드는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 억제제 펩티드는 C-말단에 ESDV(SEQ ID NO:4)를 포함하는 서열을 갖는다. 일부 활성제는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13), GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11) 또는 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하는 서열, 또는 내재화 펩티드 및 억제제 펩티드의 서열에서 총 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 치환 또는 결실을 갖는 이의 변이체(동일한 아미노산의 L에서 D로의 치환은 세지 않음)를 포함하고, 억제제 펩티드는 C-말단에 ESDV(SEQ ID NO:14)를 포함하는 서열을 갖는다. 억제제 펩티드의 적어도 4개의 C-말단 아미노산은 L-아미노산이다. 내재화 펩티드의 2-6, 또는 바람직하게는 3-5개 잔기, 예를 들어, 3개 또는 4개 잔기(글리신은 세지 않음)는 D-아미노산이다. C-말단 아미노산은 바람직하게는 IE[S/T]DV(SEQ ID NO:4)이고, 이들 모두는 L-아미노산이다. 억제제 펩티드 또는 내재화 펩티드와 억제제 펩티드 사이의 스페이서 펩티드의 추가 위치는 각각 L 또는 D일 수 있다. 일부 이러한 제제에서, 각각의 D 잔기는 K 또는 R에 있거나 K 또는 R의 C-말단 잔기에 있다. 이러한 활성제에서 D 잔기는 바람직하게는 플라스민 및 활성제가 접할 수 있는 다른 프로테아제에 의한 절단을 감소시키는 최대 효과를 위해 이격되어 있다. 일부 이러한 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 3개 초과의 연속 산의 스트레치를 함유하지 않으며, 이 스트레치는 R 및 K로부터 독립적으로 선택된 인접한 아미노산(즉, 플라스민 절단 부위)을 포함한다. 즉, 하나의 L-형태 R 또는 K는 L-아미노산 또는 글리신인 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치의 일부로서 또 다른 L-형태 R 또는 K에 인접하여 발생하지 않는다. 일부 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치를 함유하지 않으며, 이 스트레치는 R 또는 K(또는 둘 모두)를 포함한다. 즉, L-형태 R 또는 K는 L-아미노산 또는 글리신인 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치의 일부로서 발생하지 않는다. 일부 이러한 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치를 함유하지 않으며, 이 스트레치는 R 및 K로부터 독립적으로 선택된 인접한 아미노산(즉, 플라스민 절단 부위)을 포함한다. 즉, L-형태 R 또는 K는 L-아미노산 또는 글리신인 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치의 일부로서 또 다른 L-형태 R 또는 K에 인접하여 발생하지 않는다. 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우, 바람직하게는 이러한 스트레치가 단지 하나이고, 이는 내재화 펩티드의 N-말단(즉, 처음 4개 잔기)에 위치하며, 다른 곳에 2개 또는 3개 이하의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 있다. 일부 활성제는 R 또는 K(또는 둘 모두)를 포함하는 L-아미노산 또는 글리신으로부터 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치를 함유하지 않는다. 즉, L-형태 R 또는 K는 L-아미노산 또는 글리신인 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치의 일부로서 발생하지 않는다. 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우, 바람직하게는 이러한 스트레치가 단지 하나이고, 이는 내재화 펩티드의 N-말단(즉, 처음 4개 잔기)에 위치하며, 다른 곳에 2개 또는 3개 이하의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 있다.

[0146] [0137] 따라서, 예를 들어, 일부 활성제는 서열 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 갖는 내재화 펩티드에서 3개의 D-잔기(글리신은 세지 않음)를 가지며, 하나의 D-아미노산은 위치 3-5 사이, 다른 하나는 위치 7 또는 8, 및 세 번째는 위치 9-11 사이에 있고, 위치는 N-말단으로부터 넘버링된다. 일부 활성제는 억제제 펩티드와 내재화 펩티드 사이에 스페이서 펩티드를 포함한다. 스페이서 펩티드는 그 자체가 억제제 펩티드가 PSD-95에 결합하는데 필요한 것은 아니지만 억제제 펩티드와 내재화 펩티드 사이의 이격을 용이하게 하여, 내재화 펩티드가 PSD-95에 대한 억제제 펩티드의 결합을 증가시킬 수 있기 때문에 그렇게 불린다. 스페이서는 전형적으로 2-4개 아미노산의 펩티드이지만 유사한 간격을 갖는 임의의 형태의 링커일 수 있다. 일부 스페이서는 글리신, 알라닌, 세린 또는 류신으로부터 독립적으로 선택된 아미노산의 일부 또는 전부를 포함한다. 이러한 아미노산은 종종 결합되는 분자 사이에 가요성을 부여하기 위해 스페이서에 포함된다. 일부 스페이서에서, 리신 및/또는 아르기닌은 플라스민 또는 다른 절단 부위의 도입을 피하기 위해 사용되지 않는다. 스페이서는 또한 네리네타이드에서 IESDV(SEQ ID NO:5)와 내재화 펩티드 사이에 존재하는 아미노산인 KLSS(SEQ ID NO:113)일 수 있다. 이 경우, K 또는 L 또는 둘 모두는 플라스민 및 다른 프로테아제에 의한 절단을 감소시키기 위해 D-형태일 수 있다. 이러한 제제는 선택적으로 분지형 링커에 의해 내재화 펩티드에 연결된 억제제 펩티드의 2개 이상의 카피를 포함할 수 있다.

[0147] [0138] 일부 활성제는 YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:58)를 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열, 또는 서열에서 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 치환, 결실 또는 첨가를 갖는 이의 변이체를 갖고(동일한 아미노산의 L에서 D 형태로의 치환은 세지 않음), 여기서 5개의 C-말단 아미노산 이외의 위치에 있는 2-7, 2-6, 3-6, 또는 바람직하게는 3-5개 아미노산(글리신은 세지 않음)은 D-아미노산이다. 일부 활성제는 서열 YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ

ID NO:58)에 대해 적어도 75, 80, 85, 90 또는 95%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖고, 여기서 5개의 C-말단 아미노산 이외의 위치에 있는 2-7, 2-6, 3-6, 또는 바람직하게는 3-5개 아미노산(글리신은 세지 않음)은 D-아미노산이다. 본원 및 본 출원의 다른 곳에서, 동일성은 변이체 서열을 참조 서열로서 YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:58)와 최대 정렬하고, 일치 아미노산의 수를 참조 아미노산의 총 수로 나누어 결정된다. 동일한 타입의 L- 및 D-아미노산은 이러한 목적을 위해 일치하는 것으로 간주된다. 변이체에서 참조와 정렬된 서열 외부의 측접 아미노산은 스코어링되지 않는다. 일부 이러한 활성제에서, D-아미노산 중 어느 것도 활성제에서 인접한 위치를 차지하지 않는다. 일부 이러한 활성제에서, 각각의 D-아미노산은 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산에 의해 분리된다. 일부 활성제는 3, 4 또는 5개의 D-아미노산을 갖는다(글리신은 D-아미노산으로 계수되지 않음). 일부 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 선택된 3개 초과의 연속 산의 스트레치가 없으며, 이 스트레치는 R 및 K로부터 독립적으로 선택된 2개의 인접한 아미노산(즉, 플라스민 절단 부위)을 포함한다. 즉, 하나의 L-형태 R 또는 K는 L-아미노산 또는 글리신인 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치의 일부로서 또 다른 L-형태 R 또는 K에 인접하여 발생하지 않는다. 일부 활성제는 R 또는 K 또는 둘 모두를 포함하는 3개 초과의 연속 L-아미노산 또는 글리신의 스트레치가 없다. 즉, L-형태 R 또는 K는 L-아미노산 또는 글리신인 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치의 일부로서 발생하지 않는다. NoNO42는 3개(KKR)의 이러한 연속 아미노산이지만 3개 이하의 이러한 연속 아미노산의 스트레치를 포함하는 활성제의 예이다. 일부 활성제는 R 및 K로부터 독립적으로 선택된 2개의 인접한 아미노산(즉, 플라스민 절단 부위)을 포함하는 4개 초과의 연속 L-아미노산 또는 글리신의 스트레치가 없다. 즉, L-형태 R 또는 K는 L-아미노산 또는 글리신인 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치의 일부로서 또 다른 L-형태 R 또는 K에 인접하여 발생하지 않는다. 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우, 바람직하게는 이러한 스트레치가 단지 하나이고, 이는 활성제의 N-말단(즉, 처음 4개 잔기)에 위치하며, 다른 곳에 2개 또는 3개 이하의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 있다. NA-411.4는 N-말단에서 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치(YGRK SEQ ID NO:124) 및 다른 곳에서 2개 이하의 이러한 연속 아미노산의 스트레치를 포함하는 이러한 활성제의 예이다. 일부 활성제는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치를 함유하지 않으며, 이 스트레치는 R 또는 K(또는 둘 모두)를 포함한다. 즉, L-형태 R 또는 K는 L-아미노산 또는 글리신인 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치의 일부로서 발생하지 않는다. 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우, 바람직하게는 이러한 스트레치가 단지 하나이고, 이는 활성제의 N-말단(즉, 처음 4개 잔기)에 위치하며, 다른 곳에 2개 또는 3개 이하의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 있다. 일부 활성제는 3개 또는 4개의 D-아미노산(글리신은 D-아미노산으로 계수되지 않음)을 함유하며, 하나는 위치 3-5 사이, 두 번째는 위치 7 또는 8, 세 번째는 위치 9-11 사이, 및 선택적으로 네 번째는 위치 12 또는 13에 있다.

[0148] [0139] 바람직한 활성제는 YGrKKRrQrRRkLSSIESDV(NA4.2, SEQ ID NO:114), YGRkKRrQRrRKLSSIESDV(NA4.4.3, SEQ ID NO:115), 또는 YGrKKRrQrRRK1SSIESDV(NA4.4.2, SEQ ID NO:116)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 이를 필수적 요소로 하여 구성된 아미노산 서열을 가지며, D-아미노산은 소문자로 표시된다. 이러한 제제는 3개 또는 4개의 D-아미노산을 가지며, 네리네타이드에 비해 증가된 혈장 반감기 및 플라스민 내성 및 ygrkkrrqrrrklssIESDV(SEQ ID NO:6)에 비해 감소되거나 없는 신독성의 유리한 균형을 갖는다. 다른 바람직한 활성제는 실시예 10, 표 6에 제시된 플라스민 내성 펩티드이다.

[0149] [0140] 바람직한 활성제는 Tat-NR2B9c 또는 달리 동일한 모든 L-활성제와 비교하여 래트 또는 인간 혈장에서 향상된 안정성을 갖는다. 안정성은 실시예에서와 같이 측정될 수 있다. 바람직한 활성제는 Tat-NR2B9c 또는 달리 동일한 모든 L 활성제와 비교하여 향상된 플라스민 내성 및/또는 혈장 반감기를 갖는다. 플라스민 내성 및 혈장 반감기는 실시예에서와 같이 측정될 수 있다. 일부 활성제는 특히 피하 투여 후 Tat-NR2B9c 또는 달리 동일한 모든 L 활성제와 비교하여 증가된 곡선하 면적 및/또는 CMax를 갖는다. 활성제는 바람직하게는 Tat-NR2B9c(모두 L) 또는 달리 동일한 모든 L 펩티드의 1.5배, 2배, 3배 또는 5배 내에서 PSD-95에 결합하거나 실험 오차 내에서 구별할 수 없는 결합을 갖는다. 바람직한 활성제는 PSD-95에 대한 결합에 대해 PDZ 결합 도메인을 함유하는 NMDA 수용체 서브유닛 2 서열의 마지막 15-20개 아미노산을 함유하는 펩티드 또는 Tat-NR2B9c와 결합에 대해 경쟁한다(예를 들어, 10배 과량의 활성제는 Tat-NR2B9c 결합을 적어도 10%, 25% 또는 50%만큼 감소시킨다). 경쟁은 활성제가 Tat-NR2B9c와 동일하거나 중첩되는 결합 부위에 결합한다는 표시를 제공한다. 동일하거나 중첩되는 결합 부위의 소유는 또한 PSD-95의 알라닌 돌연변이유발에 의해 나타날 수 있다. 동일하거나 중첩되는 잔기 세트의 돌연변이유발이 활성제 및 Tat-NR2B9c의 결합을 감소시키는 경우, 활성제 및 TAT-NR2B9c는 PSD-95 상의 동일하거나 중첩되는 부위에 결합한다. 일부 활성제는 서열 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2)(여기서 각각의 아미노산은 L-아미노산이다)의 억제제 펩티드에 연결되고/거나 klssIESDV(SEQ ID NO:117)(여기서 소문자는 D-아미노산을 나타

내고, 대문자는 L-아미노산을 나타낸다)에 연결된 서열 ygrkkrrqrrr(SEQ ID NO:96)(이들 각각은 D-아미노산이다)의 내재화 펩티드를 포함하는 활성제와 비교하여, 또는 아미노산 서열 vdseisslkrrrqrrkkrgy(SEQ ID NO:118)(여기서 소문자는 D-아미노산을 나타낸다)을 갖는 활성제와 비교하여 감소된 신장 독성 및/또는 더 큰 치료 지수를 나타낸다. 신장 독성 또는 치료 지수는 실시예에서 또는 본원에 달리 기재된 바와 같이 측정될 수 있다. 반감기와 같은 원하는 활성의 향상, 또는 신독성과 같은 원하지 않는 활성의 감소는 실험 오차를 넘어서는 향상 또는 감소를 지칭하며, 즉, 95% 확률로 통계적으로 유의하다. 선택적으로, 향상은 적어도 10%, 25%, 50%, 100%, 200%, 500% 또는 1,000%의 배수만큼이고, 감소는 적어도 10%, 25%, 50%, 75%, 95 또는 99%의 배수만큼이다.

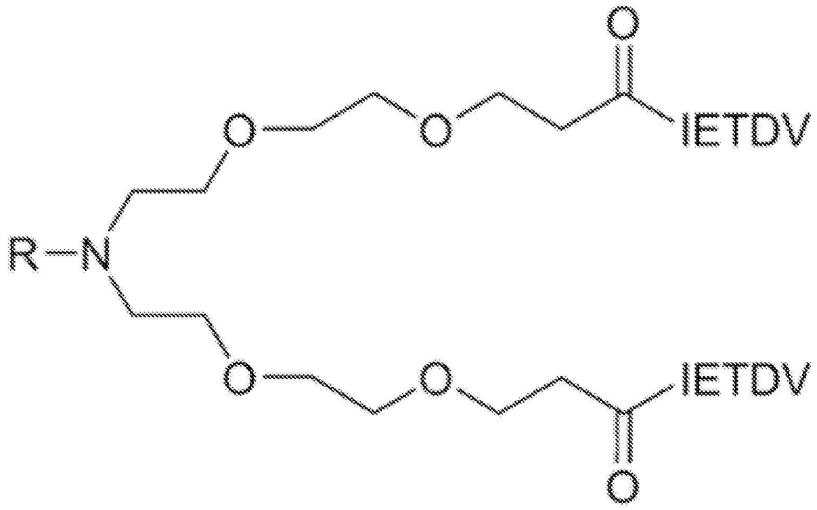
[0150] [0141] 본 발명의 활성제는 변형된 아미노산 잔기, 예를 들어, N-알킬화된 잔기를 함유할 수 있다. N-말단 알킬 변형은, 예를 들어, N-메틸, N-에틸, N-프로필, N-부틸, N-사이클로헥실메틸, N-사이클로헥실에틸, N-벤질, N-페닐에틸, N-페닐프로필, N-(3,4-디클로로페닐)프로필, N-(3,4-디플루오로페닐)프로필, 및 N-(나프탈렌-2-일)에틸)을 포함할 수 있다. 활성제는 또한 레트로 펩티드를 포함할 수 있다. 레트로 펩티드는 역 아미노산 서열을 갖는다. 펩티드모방체는 또한 아미노산의 순서가 역전되어 원래 C-말단 아미노산이 N-말단에 나타나고 D-아미노산이 L-아미노산 대신에 사용된 레트로 인버소 펩티드를 포함한다(예를 들어, 산 vdseisslkrrrqrrkkrgy(SEQ ID NO:118), RI-NA-1로도 알려짐).

[0151] [0142] 펩티드, 펩티드모방체 또는 다른 제제의 적절한 약리학적 활성은 원하는 경우 본 출원에 기재된 영장류 및 임상 시험에서 시험하기 전에 앞서 기재된 뇌졸중의 래트 모델을 사용하여 확인될 수 있다. 펩티드 또는 펩티드모방체는 또한, 예를 들어, 참조로서 포함된 US 20050059597에 기재된 검정을 사용하여 PSD-95와 NMDAR 2B 사이의 상호작용을 억제하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다. 유용한 펩티드는 전형적으로 이러한 검정에서 50 μM, 25 μM, 10 μM, 0.1 μM 또는 0.01 μM 미만의 IC50 값을 갖는다. 바람직한 펩티드는 전형적으로 0.001-1 μM, 및 보다 바람직하게는 0.001-0.05, 0.05-0.5 또는 0.05 내지 0.1 μM의 IC50 값을 갖는다. 펩티드 또는 다른 제제가 하나의 상호작용, 예를 들어, NMDAR2B에 대한 PSD-95 상호작용의 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 경우, 이러한 설명은 펩티드 또는 제제가 또한 또 다른 상호작용, 예를 들어, nNOS에 대한 PSD-95 결합을 억제하는 것을 배제하지 않는다.

[0152] [0143] 방금 기재된 것과 같은 펩티드는 선택적으로 유도체화(예를 들어, 아세틸화, 포스포릴화, 미리스토일화, 게라닐화, 페길화 및/또는 글리코실화)되어 억제제의 결합 친화성을 개선하거나, 세포막을 가로질러 수송되는 억제제의 능력을 개선하거나 안정성을 개선할 수 있다. 특정 예로서, C-말단으로부터 3번째 잔기가 S 또는 T인 억제제의 경우, 이 잔기는 펩티드의 사용 전에 포스포릴화될 수 있다.

[0153] [0144] 내재화 펩티드는 통상적인 방법에 의해 억제제 펩티드에 부착될 수 있다. 예를 들어, 억제제 펩티드는 화학적 연결에 의해, 예를 들어, 커플링 또는 컨쥬게이션 제제를 통해 내재화 펩티드에 연결될 수 있다. 다수의 이러한 제제는 상업적으로 이용 가능하며 문헌[S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991)]에 의해 검토된다. 가교제의 일부 예는 J-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP) 또는 N,N'-(1,3-페닐렌)비스말레이미드; N,N'-에틸렌-비스-(아이오도아세트아미드) 또는 6 내지 11개의 탄소 메틸렌 브릿지를 갖는 다른 이러한 시약(설프하이드릴 기에 대해 비교적 특이적임); 및 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠(아미노 및 티로신 기와 비가역적 결합을 형성함)을 포함한다. 다른 가교 시약은 p,p'-디플루오로-m,m'-디니트로디페닐설폰(아미노 및 페놀 기와 비가역적 가교를 형성함); 디메틸 아디피미데이트(아미노 기에 특이적임); 페놀-1,4-디설포닐클로라이드(주로 아미노 기와 반응함); 헥사메틸렌디이소시아네이트 또는 디이소티오시아네이트, 또는 아조페닐-p-디이소시아네이트(주로 아미노 기와 반응함); 글루타르알데히드(여러 상이한 측쇄와 반응함) 및 디스디아조벤지딘(주로 티로신 및 히스티딘과 반응함)을 포함한다.

[0154] [0145] 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 링커는 탠덤 PDZ 도메인을 함유하는 단백질에 대한 이의 친화성 및 선택성을 향상시키기 위해 억제제 펩티드 펩티드의 활성 모이어티 또는 펩티드모방체를 이량체화하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Bach et al., (2009) Angew. Chem. Int. Ed. 48:9685-9689 and WO 2010/004003] 참조. PL 모티프-함유 펩티드는 바람직하게는 2개의 이러한 분자의 N-말단을 연결함으로써 이량체화되어, 유리 C-말단을 남긴다. Bach는 NMDAR 2B의 C-말단으로부터의 펜타머 펩티드 IESDV(SEQ ID NO:5)가 PSD-95에 대한 NMDAR 2B의 결합을 억제하는데 효과적이었다고 추가로 보고한다. IETDV(SEQ ID NO:22)가 또한 IESDV(SEQ ID NO:5) 대신에 사용될 수 있다. 선택적으로, PEG의 약 2-10개 카피가 링커로서 일렬로 연결될 수 있다. 선택적으로, 링커는 또한 내재화 펩티드에 부착되거나 지질화되어 세포 흡수를 향상시킬 수 있다. 이량체 억제제의 예는 하기에 제시되어 있다(IETDV, SEQ ID NO:22)(Bach et al., PNAS 109 (2012) 3317-3322 참조).



[0155]

[0156] [0146] R은 하나 이상의 D-아미노산을 포함하는 본원에 개시된 임의의 내재화 펩티드이다. N은 O로 대체될 수 있다. 본원에 개시된 임의의 PSD-95 억제제가 IETDV(SEQ ID NO:22), 특히 IESDV(SEQ ID NO:5) 대신에 사용될 수 있고, 임의의 내재화 펩티드 또는 지질화 모이어티가 tat 대신에 사용될 수 있다. 제시된 것에 대한 다른 링커가 또한 사용될 수 있다.

[0157] [0147] 내재화 펩티드는 또한 융합 펩티드로서 억제제 펩티드에 연결될 수 있으며, 바람직하게는 내재화 펩티드의 C-말단이 억제제 펩티드의 N-말단에 연결되어 유리 C-말단을 갖는 억제제 펩티드를 남긴다.

[0158] [0148] 펩티드를 내재화 펩티드에 연결하는 것 대신에 또는 그에 더하여, 이러한 펩티드는 지질에 연결되어(지질화) 펩티드 단독에 비해 컨쥬게이트의 소수성을 증가시킴으로써 세포막을 가로질러 및/또는 뇌 장벽을 가로질러 연결된 펩티드의 통과를 용이하게 할 수 있다. 지질화는 바람직하게는 N-말단 아미노산에서 수행되지만, PSD-95와 NMDAR 2B 사이의 상호작용을 억제하는 펩티드의 능력이 50% 초과만큼 감소하지 않는다면, 내부 아미노산에 대해서도 수행될 수 있다. 바람직하게는, 지질화는 5개의 가장 C-말단 아미노산 중 하나 이외의 아미노산에서 수행된다. 지질은 물보다 에테르에 더 가용성인 유기 분자이며, 지방산, 글리세리드 및 스테롤을 포함한다. 적합한 형태의 지질화는 미리스토일화, 팔미토일화 또는 바람직하게는 10-20개 탄소의 사슬 길이를 갖는 다른 지방산, 예를 들어, 라우르산 및 스테아르산의 부착뿐만 아니라 게라닐화, 게라닐게라닐화, 및 이소프레닐화를 포함한다. 천연 단백질의 번역 후 변형에서 발생하는 유형의 지질화가 바람직하다. 펩티드의 N-말단 아미노산의 알파-아미노 기에 대한 아미드 결합의 형성을 통한 지방산에 의한 지질화가 또한 바람직하다. 지질화는 미리 지질화된 아미노산을 포함하는 펩티드 합성에 의해 수행될 수 있거나, 시험관 내에서 효소적으로 또는 펩티드의 재조합 발현, 화학적 가교 또는 화학적 유도체화에 의해 수행될 수 있다. 미리스토일화 및 다른 지질 변형에 의해 변형된 아미노산은 상업적으로 이용 가능하다. 내재화 펩티드 대신에 지질을 사용하면 플라스민 절단 부위를 제공하는 K 및 R 잔기의 수가 감소한다. 일부 예시적인 지질화된 분자는 바람직하게는 N-말단에서 지질화된 KLSSIESDV(SEQ ID NO:2), klSSIESDV(SEQ ID NO:70), lSSIESDV(SEQ ID NO:71), LSSIESDV(SEQ ID NO:72), SSIESDV(SEQ ID NO:73), SIESDV(SEQ ID NO:74), IESDV(SEQ ID NO:5), KLSSIETDV(SEQ ID NO:12), klSSIETDV(SEQ ID NO:75), lSSIETDV(SEQ ID NO:76), LSSIETDV(SEQ ID NO:77), SSIETDV(SEQ ID NO:78), SIETDV(SEQ ID NO:79), IETDV(SEQ ID NO:22)를 포함한다.

[0159] [0149] 내재화 펩티드에 선택적으로 융합된 억제제 펩티드는 고체 상 합성 또는 재조합 방법에 의해 합성될 수 있다. 펩티드모방체는 과학 및 특허 문헌, 예를 들어, 문헌[Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY, al-Obeidi (1998) Mol. Biotechnol. 9:205-223; Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1:114-119; Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3:17-27; Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267:220-234]에 기술된 다양한 절차 및 방법론을 사용하여 합성될 수 있다.

[0160] [0150] III. 염

[0161] [0151] 상기 기재된 유형의 펩티드는 전형적으로 고체 상태 합성에 의해 제조된다. 고체 상태 합성은 트리플루오로아세테이트(TFA)를 사용하여 보호기를 제거하거나 수지로부터 펩티드를 제거하기 때문에, 펩티드는 전형적으로 초기에 트리플루오로아세테이트 염으로서 생산된다. 트리플루오로아세테이트는, 예를 들어, 펩티드를 고체 지지체, 예를 들어, 컬럼에 결합시키고, 컬럼을 세척하여 기존의 반대이온을 제거하고, 컬럼을 새로운 반대이온

을 함유하는 용액으로 평형화한 다음, 펩티드를 용리함으로써, 예를 들어, 아세토니트릴과 같은 소수성 용매를 컬럼에 도입함으로써 다른 음이온으로 대체될 수 있다. 트리플루오로아세테이트를 아세테이트로 대체하는 것은 펩티드가 달리 통상적인 고체 상태 합성에서 용리되기 전 마지막 단계로서 아세테이트 세척으로 수행될 수 있다. 트리플루오로아세테이트 또는 아세테이트를 클로라이드로 대체하는 것은 암모늄 클로라이드로 세척한 후 용리함으로써 수행될 수 있다. 소수성 지지체의 사용이 바람직하고, 이온 교환을 위해 분취용 역상 HPLC가 특히 바람직하다. 트리플루오로아세테이트는 클로라이드로 직접 대체될 수 있거나, 먼저 아세테이트로 대체된 다음 아세테이트가 클로라이드로 대체될 수 있다.

[0162] [0152] 트리플루오로아세테이트, 아세테이트 또는 클로라이드이든 간에, 반대이온은 Tat-NR2B9c 및 이의 D-변이체, 특히 N-말단 아미노 기 및 아미노 측쇄 아르기닌 및 리신 잔기 상의 양으로 하전된 원자에 결합한다. 본 발명의 실행에도 불구하고, Tat-NR2B9c의 염 및 이의 D-변이체에서 음이온에 대한 펩티드의 정확한 화학량론을 이해하는 것에 의존하는 것은 아니지만, 염 분자 당 약 9개 이하의 반대이온 분자가 존재하는 것으로 여겨진다.

[0163] [0153] 하나의 반대이온을 다른 것으로 효율적으로 대체하더라도, 최종 반대이온의 순도는 100% 미만일 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 Tat-NR2B9c의 클로라이드 염 또는 이의 D-변이체에 대한 언급은 염의 제조에서, 클로라이드가 염의 응집체에 존재하는 다른 모든 음이온보다 중량(또는 몰) 기준으로 우세한 음이온임을 의미한다. 즉, 클로라이드는 중량 또는 몰 기준으로 염에 존재하는 모든 음이온의 50% 초과, 및 바람직하게는 75%, 95%, 99%, 99.5% 또는 99.9% 초과를 구성한다. 이러한 염 또는 염으로부터 제조된 제형에서, 아세테이트 및 트리플루오로아세테이트는 조합하여 및 개별적으로 염 또는 제형에서 중량 또는 몰 기준으로 50%, 25%, 5%, 0.5% 또는 0.1% 미만의 음이온을 구성한다.

[0164] [0154] IV. 제형

[0165] [0155] 활성제는 액체 제형 또는 동결건조된 제형에 혼입될 수 있다. 액체 제형은 완충제, 염 및 물을 포함할 수 있다. 바람직한 완충제는 소듐 포스페이트이다. 바람직한 염은 소듐 클로라이드이다. 소듐 벤조에이트는 또한 이중 목적인 보존제 및 D-아미노산 옥시다제의 억제제로서 존재할 수 있다. pH는, 예를 들어, pH 7.0 또는 대략 생리학적 pH일 수 있다.

[0166] [0156] 동결건조된 제형은 활성제, 완충제, 증량제 및 물을 포함하는 미리 동결건조된 제형으로부터 제조될 수 있다. 냉동 또는 동결보존제, 등장화제, 약학적으로 허용되는 담체 등과 같은 다른 성분이 있거나 존재할 수 있다. 바람직한 완충제는 히스티딘이다. 다시, 소듐 벤조에이트는 또한 이중 목적인 보존제 및 D-아미노산 옥시다제의 억제제로서 존재할 수 있다. 바람직한 증량제는 트레할로스이다. 트레할로스는 또한 냉동 및 동결보존제로서 작용한다. 예시적인 미리 동결건조된 제형은 활성제, 히스티딘(10-100 mM, 15-100 mM 15-80 mM, 40-60 mM 또는 15-60 mM, 예를 들어, 20 mM 또는 선택적으로 50 mM, 또는 20-50 mM) 및 트레할로스(50-200 mM, 바람직하게는 80-160 mM, 100-140 mM, 보다 바람직하게는 120 mM)를 포함한다. pH는 5.5 내지 7.5, 보다 바람직하게는 6 내지 7, 보다 바람직하게는 6.5이다. 활성제의 농도는 20-200 mg/ml, 바람직하게는 50-150 mg/ml, 보다 바람직하게는 70-120 mg/ml 또는 90 mg/ml이다. 따라서, 예시적인 미리 동결건조된 제형은 20 mM의 히스티딘, 120 mM의 트레할로스, 및 90 mg/ml의 활성제의 클로라이드 염이다. 선택적으로, 제형에서 임의의 잔류 아세테이트 또는 트리플루오로아세테이트를 추가로 감소시키기 위해, US 10,206,878에 기재된 바와 같이, 리신과 같은 아세틸화 스캐빈저가 포함될 수 있다.

[0167] [0157] 동결건조 후, 동결건조된 제형은 낮은 물 함량, 바람직하게는 약 0 중량% 내지 5 중량%의 물, 보다 바람직하게는 2.5 중량% 미만의 물을 갖는다. 동결건조된 제형은 냉동고(예를 들어, -20 또는 -70℃), 냉장고(0-40℃) 또는 실온(20-25℃)에서 저장될 수 있다.

[0168] [0158] 활성제는 수용액, 바람직하게는 주사용수 또는 선택적으로 생리 식염수(0.8-1.0% 식염수 및 바람직하게는 0.9% 식염수)에서 재구성될 수 있다. 재구성은 미리 동결건조된 제형과 동일하거나 더 작거나 더 큰 부피일 수 있다. 바람직하게는, 부피는 재구성 후 전보다 더 크다(예를 들어, 3-6배 더 큼). 예를 들어, 3-5 ml의 동결건조 전 부피는 특히 10 mL, 12 mL, 13.5 ml, 15 mL 또는 20 mL 또는 10-20 mL의 부피로 재구성될 수 있다. 재구성 후, 히스티딘의 농도는 바람직하게는 2-20 mM, 예를 들어, 2-7 mM, 4.0-6.5 mM, 4.5 mM 또는 6 mM이고; 트레할로스의 농도는 바람직하게는 15-45 mM 또는 20-40 mM 또는 25-27 mM 또는 35-37 mM이다. 리신의 농도는 바람직하게는 100-300 mM, 예를 들어, 150-250 mM, 150-170 mM 또는 210-220 mM이다. 활성제는 바람직하게는 10-30 mg/ml, 예를 들어, 15-30, 18-20, 20 mg/ml의 활성제 또는 25-30, 26-28 또는 27 mg/mL의 활성제의 농도이다. 재구성 후 예시적인 제형은 4-5 mM의 히스티딘, 26-27 mM의 트레할로스, 150-170 mM의 리신 및 20 mg/ml의 활성제를 갖는다(농도는 가장 가까운 정수로 반올림됨). 재구성 후 제2 예시적인 제형은 5-7 mM의 히스티딘,

35-37 mM의 트레할로스, 210-220 mM의 리신 및 26-28 mg/ml의 활성제를 갖는다(농도는 가장 가까운 정수로 반올림됨). 재구성된 제형은, 예를 들어, 생리 식염수를 함유하는 유체 백에 첨가함으로써 투여 전에 추가로 희석될 수 있다.

[0169] [0159] IV. 질환

[0170] [0160] 활성제는 다양한 질환, 특히 신경학적 질환, 및 특히 흥분독성에 의해 부분적으로 매개되는 질환을 치료하는데 유용하다. 이러한 질환은 뇌졸중, 간질, 저산소증, 지주막하 출혈, 뇌진탕, 뇌졸중과 관련이 없는 CNS에 대한 외상성 손상, 예를 들어, 외상성 뇌 손상 및 척수 손상, 다른 뇌 허혈, 재관류 손상, 알츠하이머병 및 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환을 포함한다. 이러한 질환은 또한 망막병증, 망막 허혈 관련 다른 안구 장애, 또는 이명을 포함하는 눈 또는 귀의 장애 또는 질병을 포함할 수 있다. 흥분독성과 관련된 것으로 알려지지 않은 본 발명의 활성제에 의해 치료될 수 있는 다른 신경학적 질환은 불안 및 통증(신경병성 또는 염증성)을 포함한다.

[0171] [0161] 뇌졸중은 원인에 관계없이 CNS의 혈류 장애로 인한 질환이다. 잠재적인 원인은 색전증, 출혈 및 혈전증을 포함한다. 일부 신경 세포는 혈류 장애의 결과로 즉시 죽는다. 이러한 세포는 글루타메이트를 포함하는 이들의 성분 분자를 방출하고, 이는 차례로 NMDA 수용체를 활성화시켜, 세포내 칼슘 수준, 및 추가의 신경 세포 사멸을 초래하는 세포내 효소 수준을 상승시킨다(흥분독성 캐스케이드). CNS 조직의 사멸은 경색으로 지칭된다. 경색 부피(즉, 뇌에서 뇌졸중으로 인한 죽은 신경 세포의 부피)는 뇌졸중으로 인한 병리학적 손상 정도의 지표로서 사용될 수 있다. 증상 효과는 경색의 부피 및 뇌에서의 위치 둘 모두에 의존한다. 장애 지수는 Rankin 뇌졸중 결과 척도(Rankin, Scott Med J;2:200-15 (1957)) 및 Barthel 지수와 같은 증상 손상의 척도로 사용될 수 있다. Rankin 척도는 하기와 같이 대상체의 전반적인 상태를 직접 평가하는 것을 기반으로 한다.

[0172] [0162] 0: 증상이 전혀 없음

[0173] 1: 증상에도 불구하고 유의한 장애 없음; 모든 일상적인 의무와 활동을 수행할 수 있음.

[0174] 2: 약간의 장애; 이전의 모든 활동을 수행할 수 없지만 도움 없이 자신의 일을 돌볼 수 있음.

[0175] 3: 약간의 도움이 필요하지만 도움 없이 걸을 수 있는 중등도 장애

[0176] 4: 중등도 내지 중증 장애; 도움 없이 걸을 수 없고 도움 없이는 자신의 신체적 필요를 돌볼 수 없음.

[0177] 5: 중증 장애; 병상 생활, 요실금, 및 지속적인 간호 및 주의 필요.

[0178] [0163] Barthel 지수는 일상 생활의 10가지 기본 활동을 수행하는 대상체의 능력에 대한 일련의 질문에 기초하여 0에서 100 사이의 점수를 부여하며, 점수가 낮을수록 더 많은 장애를 나타낸다(Mahoney et al, Maryland State Medical Journal 14:56-61 (1965)).

[0179] [0164] 대안적으로, 뇌졸중 중증도/결과는 월드 와이드 웹 ninds.nih.gov/doctors/NIH Stroke ScaleJBooklet.pdf에서 이용 가능한 NIH 뇌졸중 척도를 사용하여 측정될 수 있다.

[0180] [0165] 척도는 대상체의 의식 수준, 운동, 감각 및 언어 기능의 평가를 포함하는 11가지 기능 그룹을 수행하는 대상체의 능력에 기반한다.

[0181] [0166] 허혈성 뇌졸중은 보다 구체적으로 뇌로의 혈류의 차단에 의해 야기된 뇌졸중의 유형을 지칭한다. 이러한 유형의 차단에 대한 기본 상태는 가장 일반적으로 혈관 벽을 감싸는 지방 침착물의 발생이다. 이 상태를 죽상동맥경화증이라고 한다. 이러한 지방 침착물은 두 가지 유형의 폐색을 유발할 수 있다. 뇌혈전증은 혈관의 막힌 부분에서 발생하는 혈전(피떡)을 지칭한다. "뇌색전증"은 일반적으로 순환계의 다른 위치, 일반적으로 심장 및 상부 흉부 및 목의 큰 동맥에서 형성되는 혈전을 지칭한다. 그 후 혈전의 일부가 느슨해져서 혈류로 들어가며 통과하기에 너무 작은 혈관에 도달할 때까지 뇌의 혈관을 통해 이동한다. 색전증의 두 번째 중요한 원인은 심방세동으로 알려진 불규칙한 심박동이다. 이는 혈전이 심장에서 형성되고, 떨어져 나가 뇌로 이동할 수 있는 조건을 생성한다. 허혈성 뇌졸중의 추가적인 잠재적 원인은 출혈, 혈전증, 동맥 또는 정맥의 박리, 심정지, 출혈을 포함하는 임의의 원인의 쇼크, 및 뇌 혈관 또는 뇌 또는 심장 수술로 이어지는 혈관에 대한 직접적인 외과적 손상과 같은 의원성 원인이다. 허혈성 뇌졸중은 모든 뇌졸중 사례의 약 83%를 차지한다.

[0182] [0167] 일과성 허혈 발작(TIA)은 경미한 또는 경고 뇌졸중이다. TIA에서, 허혈성 뇌졸중을 나타내는 상태가 존재하고 전형적인 뇌졸중 경고 징후가 발생한다. 그러나, 폐색(혈전)은 짧은 시간 동안 발생하고 정상적인 메커니즘을 통해 스스로 해결되는 경향이 있다. 심장 수술을 받는 대상체는 특히 일과성 뇌 허혈 발작의 위험이 있

다.

[0183] [0168] 출혈성 뇌졸중은 뇌졸중 사례의 약 17%를 차지한다. 이는 약해진 혈관이 파열되어 주변 뇌로의 출혈로 인해 발생한다. 혈액은 축적되어 주변 뇌 조직을 압박한다. 출혈성 뇌졸중의 두 가지 일반적인 유형은 뇌내 출혈 및 지주막하 출혈이다. 출혈성 뇌졸중은 약해진 혈관 파열로 발생한다. 약해진 혈관으로부터 잠재적인 파열 원인은 고혈압이 혈관의 파열을 야기하는 고혈압성 출혈, 또는 뇌동맥류, 동정맥 기형(AVM) 또는 해면 기형을 포함하는 파열된 뇌 혈관 기형과 같은 약해진 혈관의 또 다른 근본적인 원인을 포함한다. 출혈성 뇌졸중은 또한 경색에서 혈관을 약화시키는 허혈성 뇌졸중의 출혈성 변형, 또는 비정상적으로 약한 혈관을 함유하는 CNS의 원발성 또는 전이성 종양으로부터의 출혈로부터 발생할 수 있다. 출혈성 뇌졸중은 또한 뇌 혈관에 대한 직접적인 외과적 손상과 같은 의인성 원인으로부터 발생할 수 있다. 동맥류는 혈관의 약해진 영역이 풍선확장하는 것이다. 치료하지 않으면 동맥류가 파열되어 뇌로 출혈할 때까지 계속 약화된다. 동정맥 기형(AVM)은 비정상적으로 형성된 혈관의 클러스터이다. 해면 기형은 약해진 정맥 구조로부터 출혈을 일으킬 수 있는 정맥 이상이다. 이러한 혈관 중 어느 하나가 파열되어 뇌로의 출혈을 일으킬 수 있다. 출혈성 뇌졸중은 또한 신체적 외상으로 인해 발생할 수 있다. 뇌의 한 부분에서의 출혈성 뇌졸중은 출혈성 뇌졸중에서 손실된 혈액 부족을 통해 다른 부분에서 허혈성 뇌졸중으로 이어질 수 있다.

[0184] [0169] 치료를 받을 수 있는 한 대상체 부류는 뇌, 또는 달리 뇌 또는 CNS 상에 공급하는 혈관을 포함하거나 포함할 수 있는 수술 절차를 받는 대상체이다. 일부 예는 심폐 우회술, 경동맥 스텐팅, 대동맥활의 뇌 또는 관상동맥의 진단 혈관조영술, 혈관 수술 절차 및 신경외과 절차를 받는 대상체이다. 이러한 대상체의 추가 예는 상기 섹션 IV에서 논의된다. 뇌동맥류가 있는 대상체가 특히 적합하다. 이러한 대상체는 동맥류를 잘라내어 혈액을 차단하거나, 작은 코일로 동맥류를 차단하거나 동맥류가 나오는 혈관에 스텐트를 도입하기 위해 혈관내 수술을 수행하거나, 마이크로카테터를 삽입하는 것을 포함하는 다양한 수술 절차에 의해 치료될 수 있다. 혈관내 절차는 동맥류를 자르는 것보다 덜 침습적이며 더 나은 대상체 결과와 관련이 있지만, 결과는 여전히 높은 발생률의 작은 경색을 포함한다. 이러한 대상체는 PSD95와 NMDAR 2B 및 특히 상기 기재된 제제의 상호작용의 억제제로 치료될 수 있다. 수술 수행과 관련된 투여 시점은 임상 시험에 대해 상기 기재된 바와 같을 수 있다.

[0185] [0170] 치료를 받을 수 있는 또 다른 대상체 부류는 동맥류를 갖거나 갖지 않는 지주막하 출혈을 갖는 대상체이다(US 61/570,264 참조). 또 다른 대상체 부류는 ESCAPE-NA1 시험(NCT02930018)과 같이 혈전을 제거하기 위한 혈관내 혈전절제술의 후보인 허혈성 뇌졸중을 갖는 대상체이다. 약물은 혈전을 제거하기 위해 수술 전 또는 후에 투여될 수 있고, 뇌졸중 자체 및 상기 논의된 바와 같은 절차와 관련된 임의의 잠재적인 의원성 뇌졸중 둘 모두에서 결과를 개선시킬 것으로 예상된다. 또 다른 예는 영상화 기준을 사용하지 않고 잠재적인 뇌졸중으로 진단되고 뇌졸중의 수 시간 이내에, 바람직하게는 처음 3시간 이내에 그러나 선택적으로 뇌졸중 발병 후 처음 6, 9 또는 12시간 이내에 치료를 받은 사람들이다(NCT02315443과 유사).

[0186] [0171] IV. 효과적인 투여 요법

[0187] [0172] 활성제는 치료될 질환을 갖는 대상체에서 질환의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 추가 악화를 치유, 감소 또는 억제하기에 효과적인 양, 빈도 및 투여 경로로 투여된다. 치료적 유효량(투여 전) 또는 투여 후 치료적 유효 혈장 농도는 제제로 치료되지 않은 질환을 앓고 있는 대상체(또는 동물 모델)의 대조군 집단에서의 손상에 비해 본 발명의 제제로 치료된 질환을 앓고 있는 대상체(또는 동물 모델)의 집단에서 치료될 질환의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 추가 악화를 유의하게 치유, 감소 또는 억제하기에 충분한 활성제의 양 또는 수준을 의미한다. 양 또는 수준은 또한 개별 치료된 대상체가 본 발명의 방법에 의해 치료되지 않은 비교 가능한 대상체의 대조군 집단에서의 평균 결과보다 더 유리한 결과를 달성하는 경우 치료적으로 효과적인 것으로 간주된다. 치료적 유효 요법은 의도된 목적을 달성하는데 필요한 투여 빈도 및 경로로 치료적 유효 용량의 투여를 포함한다.

[0188] [0173] 뇌졸중 또는 다른 허혈성 질환을 앓고 있는 대상체의 경우, 활성제는 뇌졸중 또는 다른 허혈성 질환의 손상 효과를 감소시키는데 효과적인 양의 투여 빈도 및 경로를 포함하는 요법으로 투여된다. 치료가 필요한 질환이 뇌졸중인 경우, 결과는 경색 부피 또는 장애 지수에 의해 결정될 수 있고, 개별 치료된 대상체가 Rankin 척도에서 2 이하 및 Barthel 척도에서 75 이상의 장애를 나타내는 경우, 또는 치료된 대상체의 집단이 비교 가능한 치료되지 않은 집단보다 장애 척도에서 유의하게 개선된(즉, 장애가 적은) 점수 분포를 나타내는 경우, 투여량은 치료적으로 효과적인 것으로 간주된다(문헌[Lees et at L, N Engl J Med 2006;354:588-600] 참조). 뇌졸중의 치료에 단일 용량의 제제가 충분할 수 있다.

[0189] [0174] 본 발명은 또한 질환의 위험이 있는 대상체에서 질환의 예방을 위한 방법 및 제형을 제공한다. 일반적으

로 이러한 대상체는 대조군 집단에 비해 질환(예를 들어, 병, 장애 또는 질병)이 발생할 가능성이 높다. 대조군 집단은, 예를 들어, 진단되지 않았거나 질환의 가족력이 있는 일반 집단(예를 들어, 연령, 성별, 인종 및/또는 민족이 일치함)으로부터 무작위로 선택된 1명 이상의 개인을 포함할 수 있다. 대상체는 질환과 관련된 "위험 인자"가 그 대상체와 관련된 것으로 밝혀지면 장애에 대한 위험이 있는 것으로 간주될 수 있다. 위험 인자는, 예를 들어, 대상체의 집단에 대한 통계적 또는 역학적 연구를 통해 주어진 장애와 관련된 임의의 활성, 특성, 사건 또는 속성을 포함할 수 있다. 따라서, 근본적인 위험 인자를 확인하는 연구에 대상체가 구체적으로 포함되지 않은 경우에도 대상체는 장애에 대한 위험이 있는 것으로 분류될 수 있다. 예를 들어, 심장 수술을 받지 않은 대상체의 집단과 비교하여 심장 수술을 받은 대상체의 집단에서 일과성 뇌 허혈 발작의 빈도가 증가하기 때문에 심장 수술을 받은 대상체는 일과성 뇌 허혈 발작의 위험이 있다.

[0190] [0175] 뇌졸중에 대한 다른 일반적인 위험 인자는 연령, 가족력, 성별, 뇌졸중의 이전 발병률, 일과성 허혈 발작 또는 심장 마비, 고혈압, 흡연, 당뇨병, 경동맥 또는 다른 동맥 질환, 심방 세동, 심장 질환과 같은 다른 심장 질환, 심부전, 확장성 심근병증, 심장 판막 질환 및/또는 선천성 심장 결함; 높은 혈중 콜레스테롤, 및 포화 지방, 트랜스 지방 또는 콜레스테롤이 높은 식이를 포함한다.

[0191] [0176] 예방에서, 활성제는 질환의 위험이 있지만 아직 질환을 갖지 않은 대상체에게 질환의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 발생을 예방, 지연 또는 억제하기에 충분한 양, 빈도 및 경로로 투여된다. 투여 전 예방적 유효량 또는 투여 후 혈장 수준은 본 발명의 활성제로 치료되지 않은 질환의 위험이 있는 인간 대상체(또는 동물 모델)의 대조군 집단에 비해 제제로 치료된 관련 질환의 위험이 있는 인간 대상체(또는 동물 모델)의 집단에서 질환의 적어도 하나의 징후 또는 증상을 유의하게 예방, 억제 또는 지연시키기에 충분한 제제의 양 또는 수준을 의미한다. 양 또는 수준은 또한 개별 치료된 대상체가 본 발명의 방법에 의해 치료되지 않은 비교 가능한 대상체의 대조군 집단에서의 평균 결과보다 더 유리한 결과를 달성하는 경우 예방적으로 효과적인 것으로 간주된다. 예방적 유효 요법은 의도된 목적을 달성하는데 필요한 투여 빈도 및 경로로 예방적 유효 용량의 투여를 포함한다. 뇌졸중의 위험이 임박한 대상체(예를 들어, 심장 수술을 받은 대상체)에서 뇌졸중의 예방을 위해, 일반적으로 단일 용량의 제제로 충분하다.

[0192] [0177] 제제에 따라, 투여는 비경구, 정맥내, 폐내, 비강, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 척수강내, 복강내, 국소, 비강내 또는 근육내일 수 있다.

[0193] [0178] Tat-NR2B9c는 이전에 2.6 mg/kg의 단일 용량 정맥내 주입에 의해 인간에게 투여되었다. 본 발명의 활성제는 피하, 비강내 또는 근육내와 같은 비정맥내 경로에 의해 투여될 때 Tat-NR2B9c보다 더 큰 CMax 및 AUC를 달성할 수 있는데, 이는 이들의 더 긴 반감기가 활성제가 혈장에 도달하는데 필요한 추가 시간을 보상하기 때문이다. 이러한 비정맥내 경로에 의한 투여는 또한 비만 세포 탈과립으로 인한 상당한 양의 히스타민을 방출하지 않고 더 높은 투여량이 투여될 수 있게 한다. 예를 들어, 약 10 mg/kg 이하의 용량은 상당한 히스타민을 방출하지 않고 사용될 수 있고, 심지어 25 mg/kg 이하의 용량은 검출 가능하지만 동일한 용량의 정맥내 투여보다 훨씬 적은 히스타민을 방출한다.

[0194] [0179] 따라서, 투여 경로 및 항염증제가 히스타민 방출 또는 이의 하류 효과를 감소시키기 위해 공동-투여되는지 여부에 따라, 다양한 투여량이 투여될 수 있다. 정맥내 투여의 경우, 청구된 제제는 항염증제 없이 Tat-NR2B9c와 유사한 투여량, 예를 들어, 최대 3 mg/kg, 0.1-3 mg/kg, 2-3 mg/kg 또는 2.6 mg/kg, 또는 더 높은 투여량, 예를 들어, 항염증제와 함께 적어도 5, 10, 15, 20 또는 25 mg/kg으로 투여될 수 있다(적어도 0.25 mg/kg 내지 25 mg/kg의 범위에 걸쳐 효능을 나타내는 도 30a, b 참조). 피하, 비강내, 폐내 또는 근육내와 같은 경로의 경우, 용량은 항염증제 없이 최대 10, 15, 또는 20 mg/kg 또는 항염증제와 함께 10, 15, 20, 25 또는 50 mg/kg 초과일 수 있다. 더 높은 용량의 항염증제에 대한 필요성은 대안적으로 더 긴 기간에 걸친 활성제의 투여에 의해 감소되거나 제거될 수 있다(예를 들어, 1분 미만, 1-10분, 및 10분 초과의 투여는 일정한 투여량의 경우 히스타민 방출 및 항염증제에 대한 필요성이 기간이 증가함에 따라 감소되거나 제거되는 대안적인 요법을 구성함).

[0195] [0180] 활성제는 단일 용량 또는 다중-용량 요법으로 투여될 수 있다. 단일 용량 요법은 경색 및 인지 장애를 감소시키기 위해 급성 허혈성 뇌졸중과 같은 급성 질환의 치료에 사용될 수 있다. 이러한 용량은 신경혈관 수술을 받는 대상체와 같이 질환의 시기를 예측할 수 있는 경우 질환의 발병 전에, 또는 질환이 발생한 후 범위 내에(예를 들어, 최대 1, 3, 6 또는 12시간 후) 투여될 수 있다.

[0196] [0181] 다중-용량 요법은 장기간에 걸쳐, 예를 들어, 적어도 1, 3, 5 또는 10일, 또는 적어도 1개월, 3개월, 6개월 또는 무기한 혈장에서 검출가능한 수준으로 활성제를 유지하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 활성제는 매

일, 격일, 매주 등으로 일당 매시간, 2, 3, 4, 6, 또는 12시간마다 투여될 수 있다. 이러한 요법은 단일 용량 투여와 같이 급성 상태에서 초기 결손을 감소시킬 수 있고, 이후 여전히 발생하는 이러한 결손으로부터 회복을 촉진할 수 있다. 이러한 요법은 또한 만성 질환, 예를 들어, 알츠하이머병 및 파킨슨병을 치료하는데 사용될 수 있다. 활성제는 때때로 다중-용량 요법에서 사용하기 위해 제어 방출 제형에 혼입된다.

[0197] [0182] 활성제는 제어된 제형 또는 코팅과 같이 신체로부터의 빠른 제거에 대해 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 이러한 담체(변형, 지연, 연장 또는 지속 방출 또는 위 체류 투여 형태로도 알려짐, 예를 들어, 제제가 위에서 팽윤되고 약 8시간 동안 유지되는 중합체에 의해 캡슐화된 Depomed GR™ 시스템)는 많은 약물의 일일 투여에 충분하다. 제어 방출 시스템은 마이크로캡슐화된 전달 시스템, 임플란트 및 생물분해성, 생체적합성 중합체, 예를 들어, 콜라겐, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산, 매트릭스 제어 방출 장치, 삼투 제어 방출 장치, 다중미립자 제어 방출 장치, 이온-교환 수지, 장용 코팅, 다층 코팅, 미소구체, 나노입자, 리포솜, 및 이들의 조합을 포함한다. 활성제의 방출 속도는 또한 활성제의 입자 크기를 변화시킴으로써 변형될 수 있다: 변형된 방출의 예는, 예를 들어, 미국 특허 번호: 3,845,770; 3,916,899; 3,536,809; 3,598,123; 4,008,719; 5,674,533; 5,059,595; 5,591,767; 5,120,548; 5,073,543; 5,639,476; 5,354,556; 5,639,480; 5,733,566; 5,739,108; 5,891,474; 5,922,356; 5,972,891; 5,980,945; 5,993,855; 6,045,830; 6,087,324; 6,113,943; 6,197,350; 6,248,363; 6,264,970; 6,267,981; 6,376,461; 6,419,961; 6,589,548; 6,613,358; 및 6,699,500에 기재된 것들을 포함한다.

[0198] [0183] D-아미노산을 포함하는 활성제는 신독성의 대상이 되며, 이는 제제의 D-아미노산 함량 및 용량에 따라 증가한다. 신독성은 활성제와 D-아미노산 옥시다제의 억제제의 공동-투여에 의해 감소될 수 있다. 이러한 억제제는, 예를 들어, 정신분열증의 치료를 위해 이전에 제안되었다. 이러한 억제제의 수많은 예가 기술되었다(예를 들어, 문헌[Sacchi et al., Curr. Phar. Ds. 19:2499-511 (2013); Szilagyi et al., Molecules 24, 290 (2019); Terry_Lorenzo et al., Biosci Rep. 34, e00133 (2014); Katane et al., J. Med. Chem. 56, 1894-1907 (2013); Sacchi et al., Current Pharmaceutical Design 19, 2499-2511 (2013)] 참조). 이러한 억제제의 예는 리스페리돈, 소듐 벤조에이트 또는 5-클로로-벤조[d]이속사졸-3-올을 포함한다. 이러한 억제제는 활성제 전, 후 또는 동시에 투여될 수 있다. 후자의 경우, 이는 복합제형으로 또는 별도로 투여될 수 있다. 소듐 벤조에이트는 또한 약학적 조성물에서 보존제로서 사용되어 복합제형에서 이중 목적을 제공할 수 있다.

[0199] [0184] V. 항염증제와 공동-투여

[0200] [0185] 용량 및 투여 경로에 따라, 본 발명의 활성제는 비만 세포 탈과립 및 히스타민의 방출을 특징으로 하는 염증 반응 및 이의 후유증을 유도할 수 있다. 예를 들어, IV 투여의 경우 적어도 3 mg/kg, 및 다른 경로의 경우 적어도 10 mg/kg의 투여량은 히스타민 방출과 관련이 있다.

[0201] [0186] 매우 다양한 항염증제가 염증 반응의 하나 이상의 양태를 억제하기 위해 용이하게 이용 가능하다. 항염증제의 바람직한 부류는 비만 세포 탈과립 억제제이다. 이러한 부류의 화합물은 크로몰린(5,5'-(2-하이드록시프로판-1,3-디일)비스(옥시)비스(4-옥소-4H-크로멘-2-카르복실산)(크로모글리케이트로도 공지됨), 및 2-카르복실라토크로몬-5'-일-2-하이드록시프로판 유도체, 예를 들어, 비스(아세톡시메틸), 디소듐 크로모글리케이트, 네도크로밀(9-에틸-4,6-디옥소-10-프로필-6,9-디하이드로-4H-피라노[3,2-g]퀴놀린-2,8-디카르복실산) 및 트라닐라스트(tranilast)(2-{[(2E)-3-(3,4-디메톡시페닐)프로프-2-에노일]아미노}), 및 로독사미드(lodoxamide)(2-[2-클로로-5-시아노-3-(옥살로아미노)아닐리노]-2-옥소아세트산)을 포함한다. 특정 화합물에 대한 언급은 화합물의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다. 크로몰린은 비강, 경구, 흡입 또는 정맥내 투여용 제형으로 용이하게 이용 가능하다. 본 발명의 실행은 메커니즘의 이해에 의존적이지 않지만, 이러한 제제는 내재화 펩티드에 의해 유도된 염증 반응의 초기 단계에서 작용하고, 따라서 혈압의 일시적 감소를 포함하는 이의 후유증의 발생을 억제하는데 가장 효과적인 것으로 여겨진다. 하기에 논의된 다른 부류의 항염증제는 히스타민이 H1 또는 H2 수용체에 결합하는 것을 억제하는 것과 같이 비만 세포 탈과립으로 인한 하나 이상의 하류 사건을 억제하는 역할을 하지만, 비만 세포 탈과립의 모든 후유증을 억제하지 못할 수 있거나 그렇게 하기 위해 더 높은 투여량 또는 조합된 사용을 필요로 할 수 있다. 하기 표 2는 본 발명과 함께 사용될 수 있는 여러 비만 세포 탈과립 억제제의 명칭, 화학식 및 FDA 상태를 요약한 것이다.

[0202] [0187] 표 2

약물 명칭	대체 명칭	화학식	FDA 상태
아젤라스틴	아스텔린, 옵티바	4-[(4-클로로페닐)메틸]-2-(1-메틸아제판-4-일)프탈라진-1-온	승인됨
베포타스틴	베포타스틴 베실레이트, 베토타스틴 베실레이트, TAU-284DS, 베포타스틴	4-[4-[(4-클로로페닐)-피리딘-2-일메톡시]피페리딘-1-일]부탄산	승인됨
클로르족사존	바이오미오란, EZE-DS, 에스코플렉스, 플렉사존, 미오란, 미오트란, 마이오플렉신(Myoflexin), 마이오플렉신(Myoflexine), 네오플렉스, 파라플렉스, 파라폰 포르테 Dsc, 파토리신, 릴랙사존, 레뮬라, 레뮬라-S, 솔락신, 스트리폰 포르테 Dsc, Usaf Ma-10	5-클로로-3H-1,3-벤족사졸-2-온	승인됨
크로몰린	크로모글리케이트(Cromoglycate), 크로모글리케이트(Chromoglicate), 크로모글릭산, 아아란, 알레콤, 알레리온, 알레르고크롬, 아포크로몰린, 아동 나잘크롬, 콜리뮨, 크로롬, 크로몰린 나잘 용액, 크로몹틱, 크로모베트, 피벤트, 가스트로크롬, 가스트로프레날, 겐크로모글리케이트, 이노스트랄, 인탈, 인탈, 인헤일러, 인탈, 싱크로너, 인트롤, 이르탄, 로무달,	5-[3-(2-카르복시-4-옥소크로멘-6-일)옥시-2-하이드록시프로폭시]-4-옥소크로멘-2-카르복실산	승인됨

[0203]

약물 명칭	대체 명칭	화학식	FDA 상태
	로무프렌, 로무솔, 로무스프레이, 날크롬, 날크론, 나잘크롬, 나스밀, 옵티크롬, 옵티크론, 라이나크롬, 소프로, 비스타크롬, 비비드린		
에피나스틴	엘레스타트	C16H15N3, CAS 80012-43-7	승인됨
이소프로테레놀	에어롤론, 알류드린(Aleudrin), 알류드린(Aleudrine), 알루드린(Aludrin), 알루드린(Aludrine), 아시프레놀(Asiprenol), 아스말라, 아시프레놀(Assiprenol), 벨라스트만, 브론케프린, 유스피란, 이사드린, 이소노렌, 이소노린, 이소레닌, 이수프렐, 이수프렐 미스토미터, 이수프렌, 메디헤일러-Iso, 네오에피닌, 네오드레날, 노르이소드린, m 노리소드린, 에어로트롤, 노보드린, 프로테르놀, 레스피프랄, 사벤트린, 바포-Iso	4-[1-하이드록시-2-(프로판-2-일아미노)에틸]벤젠-1,2-디올	승인됨
케토티펜	자디토르	C19H19NOS, CAS 34580-14-8	승인됨
로독사미드(로독사미드 트로메타민)	알로미드	N,N'-(2-클로로-5-시아노-m-페닐렌)디옥삼산 트로메타민 염	승인됨

[0204]

약물 명칭	대체 명칭	화학식	FDA 상태
네도크로밀	알로크릴, 네도크로밀 [USAN:BAN:INN], 틸레이드	9-에틸-4,6-디옥소-10-프로필피라노[5,6-g]퀴놀린-2,8-디카르복실산	승인됨
올로파타딘	올로파타딘 하이드로클로라이드 파탄올	2-[(11Z)-11-(3-디메틸아미노프로필리덴)-6H-벤조[c][2]벤족세핀-2-일]아세트산	승인됨
페미롤라스트	알라마스트	9-메틸-3-(2H-테트라졸-5-일)피리도[2,1-b]피리미딘-4-온	승인됨
피르부테롤	맥스에어	6-[2-(3 차-부틸아미노)-1-하이드록시에틸]-2-(하이드록시메틸)피리딘-3-올	승인됨

[0205]

[0206] [0188] 또 다른 항염증제 부류는 항히스타민 화합물이다. 이러한 제제는 히스타민과 이의 수용체의 상호작용을 억제함으로써 상기 언급된 염증의 결과적인 후유증을 억제한다. 많은 항히스타민제가 상업적으로 이용 가능하며, 일부는 일반의약품이다. 항히스타민제의 예는 아자타딘, 아젤라스틴, 부르프롤린, 세티리진, 사이프로헵타딘, 독산트로졸, 에토드록시진, 포르스콜린, 하이드록시진, 케토티펜, 옥사토미드, 피조티펜, 프록시크로밀, N,N'-치환된 피페라진 또는 테르페나딘이다. 항히스타민제는 CNS 뿐만 아니라 말초 수용체에서 항히스타민을 차단하는 능력이 다양하며, 2세대 및 3세대 항히스타민제는 말초 수용체에 대해 선택성을 갖는다. 아크리바스틴, 아스테미졸, 세티리진, 로라타딘, 미졸라스틴, 레보세티리진, 데슬로라타딘, 및 펙소페나딘은 2세대 및 3세대 항히스타민제의 예이다. 항히스타민제는 경구 및 국소 제형으로 널리 이용 가능하다. 사용될 수 있는 일부 다른 항히스타민제가 하기 표 3에 요약되어 있다.

[0207] [0189] 표 3

약물 명칭	대체 명칭	화학식	FDA 상태
케토티펜 푸마레이트	케토티펜, 자디토르	C19H19NOS	승인됨
메퀴타진	부틱스, 인스토탈, 키타제민, 메타플렉산, 미르콜, 프리말란, 비지간, 버지난, 제술란	10-(1-아자비사이클로[2.2.2]옥탄-8-일메틸)페노티아진	승인됨
덱스브롬페니라민	일반	(3S)-3-(4-브로모페닐)-N,N-디메틸-3-피리딘-2-일프로판-1-아민	승인됨
메트딜라진	브리스탈린, 딜로신, 디싱크람, 디싱크란, 타카릴, 타카릴 하이드로클로라이드, 타카질, 타크릴	10-[(1-메틸피롤리딘-3-일)메틸]페노티아진	승인됨
클로르페니라민	알러-클로르, 알레르기칸, 알레르기산, 안타고네이트, 클로-아민, 클로르-트리메톤, 클로르-트리메톤 알레르기, 클로르-트리메톤 레페탑스, 클로르-트리폴론, 클로레이트, 클로로피릴(Chloropiril), 클로로피릴(Cloropiril), 에피닥 24 클로르페니라민 말레에이트, 겐-알레레이트, 헤이논, 히스타두르, 클로로민, 마일라라민, 노보-페니람, 페디아케어 알레르기 포뮬라, 페네트론, 피리톤, 폴라라민,	3-(4-클로로페닐)-N,N-디메틸-3-피리딘-2-일프로판-1-아민	승인됨

[0208]

약물 명칭	대체 명칭	화학식	FDA 상태
	폴라로닐, 피리다말 100, 텔라클로르, 텔드린		
브로로페니라민	프롬페드, 브롬페넥스, 디메탄, 벨탄	3-(4-브로모페닐)-N,N-디메틸-3-피리딘-2-일프로판-1-아민	승인됨
테르부탈린	브레테어, 브레틴, 브리칸, 브리카닐, 브리카, 브리카릴, 브리신	5-[2-(3 차-부틸아미노)-1-하이드록시에틸]벤젠-1,3-디올	승인됨
피메크롤리무스	엘리델	(3S,4R,5S,8R,9E,12S,14S,15R,16S,18R,19R,26aS)-3-{(E)-2-[(1R,3R,4S)-4-클로로-3-메톡시사이클로헥실]-1-메틸비닐}-8-에틸-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-헥사데카하이드로-5,19-디하이드록시-14,16-디메톡시-4,10,12,18-테트라메틸-15,19-에폭시-3H-피리도[2,1-c][1,4]옥사아자사이클로트리코신-1,7,20,21(4H,23H)-테트론	국소용으로 승인됨, 경구용으로 조사 중

[0209]

[0210] [0190] 염증 반응을 억제하는데 유용한 또 다른 항염증제 부류는 코르티코스테로이드이다. 이러한 화합물은 전사 조절제이며, 비만 세포 탈과립으로 인한 히스타민 및 다른 화합물의 방출로 인해 작동하는 염증 증상의 강력한 억제제이다. 코르티코스테로이드의 예는 코르티손, 하이드로코르티손(코르테프), 프레드니손(델타손, 메티코르텐, 오라손), 프레드니솔론(델타-코르테프, 페디아프레드, 프렐론), 트리암시놀론(아리스토코르트, 케나코르트), 메틸프레드니솔론(메드롤), 덱사메타손(데카드론, 덱손, 헥사드롤), 및 베타메타손(셀레스톤)을 포함한다. 코르티코스테로이드는 경구, 정맥내 및 국소 제형으로 널리 이용 가능하다.

[0211] [0191] 비스테로이드 항염증 약물(NSAID)이 또한 사용될 수 있다. 이러한 약물은 아스피린 화합물(아세틸살리실레이트), 비-아스피린 살리실레이트, 디클로페낙, 디플루니살, 에토돌락, 페노프로펜, 플루르비프로펜, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 메클로페나메이트, 나프록센, 나프록센 소듐, 페닐부타존, 술린닥, 및 토메틴을 포함한다. 그러나, 이러한 약물의 항염증 효과는 항히스타민제 또는 코르티코스테로이드의 항염증 효과보다 덜 효과적이다. 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 류케란, 및 사이클로스포린과 같은 더 강력한 항염증 약물이 또한 사용될 수 있지만, 이들은 더 느리게 작용하고/거나 부작용과 관련되기 때문에 바람직하지 않다. Tysabri® 또는 Humira®와 같은 생물학적 항염증제가 또한 사용될 수 있지만, 동일한 이유로 바람직하지 않다.

[0212] [0192] 염증 반응을 억제하는데 상이한 부류의 약물을 조합하여 사용할 수 있다. 바람직한 조합은 비만 세포 탈과립 억제제 및 항히스타민제이다.

[0213] [0193] 내재화 펩티드에 연결된 약리학적 제제가 항염증제와 함께 투여되는 방법에서, 2개의 물질은 항염증제가 내재화 펩티드에 의해 유도될 수 있는 염증 반응을 억제할 수 있는 시간에 충분히 근접하게 투여된다. 항염증제는 약리학적 제제 전, 동시에 또는 후에 투여될 수 있다. 바람직한 시간은 항염증제의 약동학 및 약역학에 부분적으로 의존한다. 항염증제는 약리학적 제제가 투여될 때 항염증제가 거의 최대 혈청 농도가 되도록 약리학적 제제 전에 간격을 두고 투여될 수 있다. 전형적으로, 항염증제는 약리학적 제제 6시간 전 내지 투여 후 1시간 사이에 투여된다. 예를 들어, 항염증제는 약리학적 제제 1시간 전 내지 투여 후 30분 사이에 투여될 수 있다. 바람직하게는 항염증제는 약리학적 제제 30분 전 내지 투여 후 15분 사이, 및 보다 바람직하게는 약리학적 제제 투여 전 15분 이내 및 동일한 시간에 투여된다. 일부 방법에서, 항염증제는 약리학적 제제가 투여되기 전 15분,

10분 또는 5분의 기간 내에 약리학적 제제 전에 투여된다. 일부 방법에서, 제제는 약리학적 제제 1-15분, 1-10분 또는 1-5분 전에 투여된다.

[0214] [0194] 정맥내 주입과 같이 제제의 투여가 순간적이지 않은 경우, 항염증제 및 약리학적 제제는 이들의 투여 기간이 동일하거나 중복되는 경우 동시에 투여되는 것으로 간주된다. 투여 전 투여 기간은 이의 투여 시작부터 시작된다. 투여 후 기간은 투여 종료시부터 시작된다. 항염증제의 투여를 지칭하는 기간은 이의 투여 시작을 지칭한다.

[0215] [0195] 항염증제가 내재화 펩티드에 연결된 약리학적 제제의 염증 반응을 억제할 수 있다고 말할 때, 이는 이러한 반응이 특정 대상체에서 발생하는 경우 항염증제가 내재화 펩티드에 연결된 약리학적 제제에 의해 유도될 수 있는 염증 반응을 억제할 시간에 충분히 근접하게 둘이 투여되는 것을 의미하고, 이러한 반응이 그 대상체에서 반드시 발생한다는 것을 의미하지는 않는다. 일부 대상체는 대조 임상 또는 비임상 시험에서 대상체의 통계적으로 유의한 수의 염증 반응과 관련된 내재화 펩티드에 연결된 약리학적 제제의 용량으로 치료된다. 반드시 모든 대상체가 그런 것은 아니지만 상당한 비율의 이러한 대상체가 내재화 펩티드에 연결된 약리학적 제제에 대해 항염증 반응을 발생시키는 것으로 합리적으로 추정될 수 있다. 일부 대상체에서, 내재화 펩티드에 연결된 약리학적 제제에 대한 염증 반응의 징후 또는 증상이 검출되거나 검출 가능하다.

[0216] [0196] 개별 대상체의 임상 치료에서, 항염증제의 존재 및 부재 하에 내재화 펩티드에 연결된 약리학적 제제로부터의 염증 반응을 비교하는 것은 일반적으로 가능하지 않다. 그러나, 대조 임상 또는 전임상 시험에서 동일하거나 유사한 공동-투여 조건 하에 유의한 억제가 관찰되는 경우, 항염증제는 펩티드에 의해 유도될 수 있는 항염증 반응을 억제한다고 합리적으로 결론지을 수 있다. 대상체에서의 결과(예를 들어, 혈압, 심박수, 두드러기)는 또한 개별 대상체에서 억제가 발생했는지의 지표로서 임상 시험에서 대조군의 전형적인 결과와 비교될 수 있다. 일반적으로, 항염증제는 약리학적 제제의 투여 후 1시간 이내의 특정 시점에 검출 가능한 혈청 농도로 존재한다. 많은 항염증제의 약동학은 널리 공지되어 있으며, 항염증제의 상대적인 투여 시점은 이에 따라 조정될 수 있다. 항염증제는 일반적으로 말초로, 즉, 혈뇌 장벽에 의해 뇌로부터 분리되어 투여된다. 예를 들어, 항염증제는 해당 제제에 따라 경구, 비강, 정맥내 또는 국소 투여될 수 있다. 항염증제가 약리학적 제제와 동시에 투여되는 경우, 둘은 조합된 제형으로 또는 별도로 투여될 수 있다.

[0217] [0197] 일부 방법에서, 항염증제는 적어도 뇌에서 검출 가능한 약리학적 활성을 발휘하기에 충분한 양으로 경구 또는 정맥내 투여될 때 혈뇌 장벽을 통과하지 않는 것이다. 이러한 제제는 그 자체가 뇌에서 임의의 검출 가능한 치료 효과를 발휘하지 않고 말초에서 활성제의 투여로 인한 비만 세포 탈과립 및 이의 후유증을 억제할 수 있다. 일부 방법에서, 항염증제는 혈뇌 장벽의 투과성을 증가시키거나 항염증제를 유도체화 또는 제형화하여 혈뇌 장벽을 가로지르는 이의 능력을 증가시키기 위해 임의의 공동-치료 없이 투여된다. 그러나, 다른 방법에서, 항염증제는 이의 성질, 유도체화, 제형 또는 투여 경로에 의해 뇌에 진입하거나 달리 뇌에서 염증에 영향을 미침으로써, 말초에서 내재화 펩티드로 인한 비만세포 탈과립 및/또는 이의 후유증 억제하고 뇌에서 염증을 억제하는 이중 효과를 발휘할 수 있다. Strbian et al., WO 04/071531은 정맥내로 투여되지 않지만 i.c.v.로 투여되는 비만 세포 탈과립화 억제제 크로모글리케이트가 동물 모델에서 경색을 억제하는데 직접적인 활성을 갖는 것으로 보고하였다.

[0218] [0198] 일부 방법에서, 대상체는 또한 활성제와 공동-투여하기 전 및/또는 후에 날, 주 또는 월 기준으로 활성제와 공동-투여되는 동일한 항염증제로 치료되지 않는다. 일부 방법에서, 대상체가 반복 요법(예를 들어, 동일한 양, 전달 경로, 투여 빈도, 투여일의 시간)에서 활성제와 공동-투여되는 동일한 항염증제로 달리 치료되는 경우, 항염증제와 활성제의 공동-투여는 양, 전달 경로, 투여 빈도 또는 투여일의 시간 중 일부 또는 전부에서 반복 요법에 적합하지 않다. 일부 방법에서, 대상체는 본 방법에서 활성제와 공동-투여되는 항염증제의 투여를 필요로 하는 염증성 질병 또는 질환을 앓고 있지 않는 것으로 알려져 있다. 일부 방법에서, 대상체는 비만 세포 탈과립 억제제로 치료 가능한 천식 또는 알레르기 질환을 앓고 있지 않다. 일부 방법에서, 항염증제 및 활성제는 질환의 에피소드에 대해 상기 정의된 바와 같은 범위 내에 각각 1회 또는 단 1회만 투여되며, 에피소드는 증상이 없거나 감소하는 더 긴 기간의 옆에 있는 질환의 증상이 존재하는 비교적 짧은 기간이다.

[0219] [0199] 항염증제는 이러한 염증 반응이 항염증제의 부재 하에 발생하는 것으로 알려진 조건 하에 내재화 펩티드에 대한 염증 반응을 억제하기에 효과적인 양, 빈도 및 경로의 요법으로 투여된다. 항염증제의 결과로서 염증의 징후 또는 증상의 임의의 감소가 있는 경우 염증 반응이 억제된다. 염증 반응의 증상은 발적, 두드러기와 같은 발진, 열, 부기, 통증, 따끔거림, 가려움증, 메스꺼움, 발진, 구강 건조, 무감각, 기도 울혈을 포함할 수 있다. 염증 반응은 또한 혈압 또는 심박수와 같은 징후를 측정함으로써 모니터링될 수 있다. 대안적으로, 염증 반응은

비만 세포 탈과립에 의해 방출된 히스타민 또는 다른 화합물의 혈장 농도를 측정함으로써 평가될 수 있다. 비만 세포 탈과립에 의해 방출된 히스타민 또는 다른 화합물의 상승된 수준의 존재, 감소된 혈압, 두드러기와 같은 피부 발진, 또는 감소된 심박수는 비만 세포 탈과립의 지표이다. 실용적인 문제로서, 상기 논의된 대부분의 항염증제의 용량, 요법 및 투여 경로는 Physicians' Desk Reference 및/또는 제조업체로부터 입수 가능하며, 이러한 항염증제는 이러한 일반적인 지침과 일치하도록 본 방법에서 사용될 수 있다.

[0220] [0200] VI. 혈전용해제와의 공동-투여 또는 기계적 재관류

[0221] [0201] 허혈을 유발하는 플라크 및 혈전(색전으로도 알려짐)은 약리학적 및 물리적 수단 둘 모두에 의해 용해, 제거 또는 우회될 수 있다. 플라크 및 혈전의 용해, 제거 및 이에 따른 혈류의 회복은 재관류로 지칭된다. 한 부류의 제제는 혈전용해에 의해 작용한다. 혈전용해제는 플라스민의 생산을 촉진함으로써 작용한다. 플라스민은 가교된 피브린 메쉬(혈전의 백본)를 제거하여, 혈전을 가용성으로 만들고 다른 효소에 의해 추가 단백질분해되도록 하며, 폐색된 혈관에서 혈류를 회복시킨다. 혈전용해제의 예는 조직 플라스미노겐 활성화제 t-PA, 알테플라제(액티바제), 레테플라제(레타바제), 테넥테플라제(TNKase), 아니스트레플라제(에미나제), 스트렙토키나제(카비키나제, 스트렙타제), 및 유로키나제(아보키나제)를 포함한다.

[0222] [0202] 재관류에 사용될 수 있는 또 다른 부류의 약물은 혈관확장제이다. 이러한 약물은 혈관을 이완시키고 개방시켜 혈액이 폐색 주위를 흐르게 함으로써 작용한다. 혈관확장제 유형의 일부 예는 알파-아드레날린수용체 길항제(알파-차단제), 안지오텐신 수용체 차단제(ARB), 베타.서브.2-아드레날린수용체 효능제(.베타..서브.2-효능제), 칼슘-채널 차단제(CCB), 중추 작용 교감신경차단제, 직접 작용 혈관확장제, 엔도텔린 수용체 길항제, 신경절 차단제, 니트로딜레이터, 포스포디에스테라제 억제제, 칼륨-채널 개방제, 및 레닌 억제제를 포함한다.

[0223] [0203] 재관류에 사용될 수 있는 또 다른 부류의 약물은 고혈압 약물(즉, 혈압을 높이는 약물), 예를 들어, 에피네프린, 페닐에프린, 슈도에페드린, 노르에피네프린; 노르에페드린; 테르부탈린; 살부타몰; 및 메틸에페드린이다. 증가된 관류 압력은 폐색 주위의 혈액 흐름을 증가시킬 수 있다.

[0224] [0204] 기계적 재관류 방법은 혈관성형술, 카테터 삽입술, 및 동맥 우회 이식 수술, 스텐팅, 색전절제술, 또는 동맥내막절제술을 포함한다. 이러한 절차는 혈관 개방을 유지하면서, 플라크의 기계적 제거에 의해 플라크 흐름을 회복시켜, 혈액이 플라크 주위를 흐르거나 우회할 수 있다.

[0225] [0205] 다른 기계적 재관류 방법은 혈류를 신체의 다른 영역에서 뇌로 전환시키는 장치의 사용을 포함한다. 예는 최근에 무작위 시험을 거쳤고 뇌졸중 치료에 대해 FDA 승인을 받을 수 있는 CoAxia NeuroFlo™ 카테터 장치와 같은 대동맥을 부분적으로 폐색하는 카테터이다. 이 장치는 허혈의 발병 후 최대 14시간까지 뇌졸중을 나타내는 대상체에서 사용되었다.

[0226] [0206] D-아미노산(들)을 포함하는 본 발명의 활성제는 치료를 받을 수 있는 대상체에게 임의의 형태의 재관류 요법과 함께 투여될 수 있다. 그러나, 본 발명의 활성제는 활성제에 하나 이상의 D-아미노산을 포함하는 것이 혈전용해제에 의해 유도되는 플라스민에 의한 절단에 대한 활성제의 감수성을 감소시키기 때문에 혈전용해제와 함께 투여하기에 특히 유리하다. 따라서, 하나 이상의 D-아미노산을 포함하는 활성제는 그렇지 않은 경우 혈전용해제에 의해 유도된 활성제의 절단을 초래할 요법에서 혈전용해제와 공동-투여될 수 있다. 예를 들어, 혈전용해제는 활성제 투여 전 60, 30, 또는 15분의 범위 내에서 투여될 수 있다. 일부 방법에서, 활성제는 혈전용해제와 동시에 투여된다. 활성제 및 혈전용해제는 공동-제형화되거나 별도로 투여될 수 있다. 일부 방법에서, 혈전용해제는 활성제 전에 투여되고, 활성제가 투여될 때 혈청에서 검출가능한 수준으로 지속된다.

[0227] [0207] 미리 예측할 수 없는 허혈의 치료를 위해, 활성제는 허혈의 발병 후 가능한 또는 실질적으로 빨리 투여될 수 있다. 예를 들어, 활성제는 허혈의 발병 후 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 또는 24시간의 기간 내에 투여될 수 있다. 미리 예측할 수 있는 허혈의 경우, 활성제는 허혈의 발병 전, 동시에 또는 후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 수술로 인한 허혈의 경우, PDS-95 억제제는 허혈이 있거나 발생할 것인지 여부와 관계없이 때때로 수술 시작 30분 전에 시작하여 수술 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 또는 24시간에 끝나는 기간에 일상적으로 투여된다. 활성제는 심각한 부작용이 없기 때문에, 당 분야에서 인정되는 기준에 따라 진단 없이 뇌졸중 또는 다른 허혈성 질환이 의심될 때 투여될 수 있다. 예를 들어, 활성제는 뇌졸중이 발생한 위치에서(예를 들어, 대상체의 집에서) 또는 대상체를 병원으로 이송하는 구급차에서 투여될 수 있다. 활성제는 또한 발병 전에 뇌졸중 또는 다른 허혈성 질환의 위험이 있는 대상체에게 안전하게 투여될 수 있으며, 대상체는 실제로 질환이 발병하거나 발병하지 않을 수 있다.

[0228] [0208] 활성제의 투여 후, 또는 때때로 전에, 허혈의 징후(들) 및/또는 증상(들)을 나타내는 대상체는 대상체가

CNS 내에 허혈이 있는지 또는 달리 CNS에 영향을 미치는지 여부를 결정하고 대상체가 출혈이 있는지 또는 취약한지 여부를 결정하기 위해 추가 진단 평가를 받을 수 있다. 가장 특히, 뇌졸중의 증상을 나타내는 대상체에서, 뇌졸중이 출혈 또는 허혈의 결과인지 구별하기 위한 시험을 시도하며, 출혈은 뇌졸중의 약 17%를 차지한다. 진단 시험은 하나 이상의 기관의 스캔, 예를 들어, CAT 스캔, MRI 또는 PET 영상 스캔 또는 뇌졸중이 발생했음을 시사하는 바이오마커에 대한 혈액 시험을 포함할 수 있다. 뇌졸중과 관련된 여러 바이오마커는 B-타입 신경영양 성장 인자, 폰 빌레브란트 인자, 매트릭스 메탈로프로테이나제-9, 및 단핵구 화학주성 단백질-1을 포함하는 것으로 알려져 있다(문헌[Reynolds et al., Clinical Chemistry 49: 1733-1739 (2003)] 참조). 스캔된 기관(들)은 허혈 부위인 것으로 의심되는 임의의 것(예를 들어, 뇌, 심장, 사지, 척추, 폐, 신장, 망막) 뿐만 아니라 달리 출혈의 근원인 것으로 의심되는 임의의 것을 포함한다. 뇌의 스캔은 허혈성 및 출혈성 뇌졸중을 구별하기 위한 통상적인 절차이다. 진단 평가는 또한 대상체의 병력을 확인하거나 검토하고 다른 시험을 수행하는 것을 포함할 수 있다. 단독으로 또는 조합된 임의의 하기 인자의 존재는 재관류 요법이 허용할 수 없는 위험을 나타내는지 여부를 평가하는데 사용될 수 있다: 대상체의 증상이 경미하거나 빠르게 개선됨, 대상체가 뇌졸중 발병 시 발작을 가짐, 대상체가 지난 3개월 이내에 또 다른 뇌졸중 또는 심각한 두부 외상을 입음, 대상체가 지난 14일 이내에 큰 수술을 받음, 대상체가 두개내 출혈의 병력이 있는 것으로 알려짐, 대상체가 수축기 혈압 >185 mmHg를 유지함, 대상체가 이완기 혈압 >110 mmHg를 유지함, 대상체의 혈압을 낮추기 위해 적극적인 치료가 필요함, 대상체가 지주막하 출혈을 암시하는 증상을 가짐, 대상체가 지난 21일 이내에 위장관 또는 요로 출혈이 있었음, 대상체가 지난 7일 이내에 비압축성 부위에서 동맥 천자가 있었음, 대상체는 지난 48시간 동안 헤파린을 투여받았고 PTT가 상승하였음, 대상체의 프로트롬빈 시간(PT)이 >15초임, 대상체의 혈소판 수가 <100,000/μL임, 대상체의 혈청 글루코스가 <50 mg/dL 또는 >400 mg/dL임, 대상체가 혈우병이거나 다른 응고 결핍을 가짐.

[0229] [0209] 추가 진단 조사는 조사 전에 대상체가 허혈성 질환이 있는지, 및 대상체가 출혈이 있는지, 허용할 수 없는 출혈 위험이 있는지 또는 허용할 수 없는 부작용 위험으로 인해 재관류 요법을 받는 것에서 달리 제외되는지 여부를 인정된 기준에 따라 또는 적어도 더 큰 확률로 결정한다. 허용할 수 없는 부작용 위험이 없는 CNS 내에 또는 CNS에 달리 영향을 미칠 가능성이 있는 허혈성 질환의 진단이 확인된 대상체는 이후 재관류 요법을 받을 수 있다. 재관류 요법은 임의의 진단 절차의 완료 후 가능한 한 빨리 수행될 수 있다.

[0230] [0210] 활성제에 의한 치료 및 재관류 요법 둘 모두는 독립적으로 허혈로 인한 경색 크기 및 기능적 결손을 감소시키는 능력을 갖는다. 본 방법에 따라 조합하여 사용될 때, 경색 크기 및/또는 기능적 결손의 감소는 바람직하게는 조합(즉, 협력) 이외의 비교 가능한 요법 하에 투여되는 어느 한 제제 단독의 전면 사용보다 크다. 보다 바람직하게는, 경색측 및/또는 기능적 결손의 감소는 조합을 제외하고 비교 가능한 요법 하에 제제 단독에 의해 달성되는 감소의 적어도 부가적이거나 바람직하게는 부가적인 것 이상이다(즉, 상승적). 일부 요법에서, 재관류 요법은 PSD-95 억제제의 동시 또는 사전 투여가 아닌 이상 효과가 없을 때 허혈의 발병 후 시간(예를 들어, 4.5 hr 초과)에 경색 크기 및/또는 기능 시간을 감소시키는데 효과적이다. 달리 말하면, 대상체에게 활성제 및 재관류 요법이 투여될 때, 재관류 요법은 바람직하게는 적어도 활성제 없이 더 이른 시간에 투여되는 경우만큼 효과적이다. 따라서, 활성제는 재관류 요법이 효과를 발휘하기 전 또는 효과가 발생함에 따라 허혈의 하나 이상의 손상 효과를 감소시킴으로써 재관류 요법의 효능을 효과적으로 증가시킨다. 따라서, 활성제는 지연이 대상체가 자신의 초기 증상의 위험을 인지하는 것이 늦어 병원 또는 다른 의료 기관으로 이송하는 것이 지연된 것이든 또는 허혈의 존재 및/또는 출혈의 부재 또는 이의 허용할 수 없는 위험을 확인하기 위한 진단 절차 수행이 지연된 것이든 간에 재관류 요법의 투여 지연을 보상할 수 있다. 부가적 또는 상승적 효과를 포함하는 활성제 및 재관류 요법의 통계적으로 유의한 조합 효과는 임상 시험에서 집단 간에 또는 전임상 연구에서 동물 모델의 집단 간에 입증될 수 있다.

[0231] ***X. 다른 제제에 대한 Tat 변이체의 연결***

[0232] [0211] 상기 기재된 tat 변이체는 세포막 및/또는 혈뇌 장벽을 통한 제제의 흡수를 촉진하기 위해 임의의 다른 제제에 연결될 수 있다. 치료 방법에서 tat 변이체 및 제제를 포함하거나 이로 구성된 키메라 제제의 사용은 제제 단독의 사용에 비해 의도된 부위에서의 생체이용률을 개선하고, 혈장 반감기, 및/또는 치료 지수를 증가시키고/거나 동일한 용량에 대한 CMax 및 AUC와 같은 약동학 값을 개선시킨다. tat 변이체는 활성을 발휘하기 위해 혈뇌 장벽을 통과할 필요가 있는 세포내 표적 및/또는 신경활성 약물을 갖는 제제에 특히 유용하다. tat 변이체의 부착에 적합한 제제의 전부는 아니지만 일부는 펩티드이다. tat 변이체의 사용은 불량한 생체이용률, 높은 투여량 또는 짧은 반감기를 갖는 기존 약제에 특히 유용하다.

[0233] [0212] 제제의 선택, 부착 방법 및 이의 사용에 대한 일부 지침은 이전의 tat 펩티드와 관련된 과학 및 특허 문헌에 의해 제공된다(예를 들어, US 6,316,003 및 US 5,804,604 참조). 뇌졸중 및 관련 질환의 치료를 위한 tat

변이체에 연결된 억제제 펩티드를 포함하는 키메라 펩티드에 관한 상기 모든 설명은 다른 제제에 연결된 tat 변이체를 포함하는 키메라 제제에 준용하여 적용된다.

[0234] [0213] 본 발명은 따라서 장애를 치료하는데 유용한 제제에 연결된 내재화 펩티드를 포함하는 키메라 제제를 포함하며, 여기서 내재화 펩티드는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13)을 포함하는 아미노산 서열 또는 최대 1, 2, 또는 3개의 치환 또는 결실(동일한 아미노산의 L에서 D로의 대체를 포함하지 않음)을 갖는 이의 변이체를 갖고, 여기서 내재화 펩티드의 3-5개 잔기는 D-아미노산이다. 일부 키메라 제제에서, 내재화 펩티드는 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13), GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11) 또는 YGKKRRQRRR(SEQ ID NO:125)를 포함하는 아미노산 서열을 가지며, 여기서 3-5개의 잔기는 D-아미노산이다. 일부 키메라 제제에서, 내재화 펩티드는 참조로서 RKKRRQRRR(SEQ ID NO:13), GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11) 또는 YGKKRRQRRR(SEQ ID NO:125) 중 임의의 것에 대해 적어도 75, 80, 85, 또는 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 키메라 제제에서, 각각의 D 잔기는 K 또는 R에 있거나 K 또는 R의 C-말단 잔기에 있다. 일부 활성제에서, 내재화 펩티드는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 또는 K로부터 독립적으로 선택된 인접한 아미노산을 포함한다. 일부 활성제에서, 내재화 펩티드는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 3개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 또는 K로부터 선택된 아미노산을 포함한다. 일부 활성제에서, 내재화 펩티드는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 또는 K로부터 독립적으로 선택된 인접한 아미노산을 포함하고, 단, 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우 이는 내재화 펩티드의 N-말단에 위치한다. 일부 활성제에서, 내재화 펩티드는 L-아미노산 및 글리신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 4개 초과의 연속 아미노산의 스트레치가 없으며, 여기서 스트레치는 R 또는 K로부터 선택된 아미노산을 포함하고, 단, 4개의 이러한 연속 아미노산의 스트레치가 존재하는 경우 이는 내재화 펩티드의 N-말단에 위치한다. 일부 활성제에서, 내재화 펩티드는 3개의 D 잔기를 갖는 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하는 아미노산 서열을 가지며, 위치 3-5 사이의 D 잔기, 위치 7 또는 8의 D 잔기 및 위치 9-11 사이의 D 잔기는 N-말단으로부터 넘버링된다. 일부 활성제에서, 제제는 스페이서를 통해 내재화 펩티드에 연결된다.

[0235] [0214] 하기 표는 제제의 명칭(일부는 승인된 약물임), 질환이 급성이든 만성이든 간에 이들이 치료에 유용한 장애, 약물의 투여 경로(확립된 정도까지) 및 tat 변이체 펩티드에 의해 부여된 막을 통한 개선된 수송에 의해 부분적으로 극복될 수 있는 기존 약물의 문제에 대한 코멘트를 나열한다.

[0236] [0215] 제제에 연결된 tat 변이체 펩티드를 포함하는 키메라 제제는 몰 기준으로 제제 단독과 동일하거나 더 낮은 투여량으로 사용될 수 있고, 제제 단독과 동일한 경로로, 및 제제 단독과 동일한 질병(들)의 치료를 위해 투여될 수 있다. 개시 내에서 펩티드:활성 컨쥬게이트의 바람직한 투여 방법은 정맥내, 동맥내, 비강내/흡입, 근육내, 복강내, 설하, 경-직장, 및 국소(진피 또는 상피 세포 근위부 장애의 경우)이다.

[0237] [0216] 표 4

제제	질병	급성 / 만성	투여 경로	코멘트	참고문헌
페노바르비톨 (루미날 소듐)	간질		IV/경구	의존성, 내성 문제, 상호작용, 부작용, 선천적 결함	Motamedi & Meador (2006) Curr Neurol Neurosci Rep, 6(4): 341-6. Drugs.com
프리미돈 (마이돈, 마이솔린)	간질		경구	부작용, 상호작용	Koristkova, et al (2006) Int J Clin Pharmacol Ther, 44(9): 438-42. Drugs.com
디아제팜 (발륨)	불안		IP/경구	의존성, 부작용, 상호작용	Beard, et al (2003) Health Technol Assess, 7(40): iii, ix-x, 1-111. Drugs.com
도파민	파킨슨병			BBB 를 통과할 수 없음, 부작용	Ahlskog (2001) Neurol Clin, 19(3): 579-605. Drugs.com
레보도파	파킨슨병			BBB 전에 분해됨, 부작용, 반감기 = 1.5 hrs	Nyholm (2006) Clin Pharmacokinet, 45(2): 109-36. USPTO.gov (patent # 7160913)

[0238]

제제	질병	급성 / 만성	투여 경로	코멘트	참고문헌
아포모르핀			IP	짧은 반감기	Nyholm (2006) Clin Pharmacokinet, 45(2): 109-36. Drugs.com
티릴라자드 메실레이트 (프리독스)	뇌졸중		IP	낮은 효능, III상 중단됨	Hickenbottom & Grotta (1998) Semin Neurol 18(4): 485-92. Strokecenter.org
사이클로스포린 (겐그라프)	면역 억제		IP	펩티드, 5-18 hr 반감기	Kees, et al (2006) Ther Drug Monit, 28(3): 312-20. Drugs.com
바코마이신	항생제		IP	펩티드, 낮은 흡수율, 4-6 hr 반감기	de Hoog, et al (2004) Clin Pharmacokinet, 43(7): 417-40. Drugs.com
리시노프릴 (프리니빌)	고혈압		IP/경구	펩티드, 불량한 BBB 통과, 12 hr 반감기	Tan, et al (2005) Am J Hypertens, 18(2): 158-64. Drugs.com
아지도티미딘 (AZT, 지도리딘, 콤비비어)	항바이러스제		경구	불량한 BBB 통과, 05-3 hr 반감기, 혈액독성학	Spitzenberger, et al (2006) J Cereb Blood Flow Metab,

[0239]

제제	질병	급성 / 만성	투여 경로	코멘트	참고문헌
					Oct 25, Epub ahead of print. Drugs.com
피라세탐	통증/간질			BBB 를 통과할 수 없음	Loscher & Potschka (2002) J Pharmacol Exp Ther, 301(1): 7-14. US7,157,421)
나트레코르 (BNP 펩티드)	심장-신장 대상부전 증후군		IV	효능 알 수 없음	Feldman & Sun (2004) Heart Fail Rev, 9(3): 203-8. Clinicaltrials.gov
AVR-118 (펩티드)	암 완화제		피하	효능 알 수 없음, 투여량 알 수 없음	Clinicaltrials.gov
옥시토신 (펩티드)	기분 장애		IV/IM	상호작용, 투여량 알 수 없음	Swaab, et al (2005) Ageing Res Rev, 4(2): 141-94. Drugs.com
프라바스타틴 (프라바콜)	MS		경구	효능 알 수 없음, 낮은 생체이용률	Hatanaka (2000) Clin Pharmacokinet, 39(6): 397-412. Clinicaltrials.gov

[0240]

제제	질병	급성 / 만성	투여 경로	코멘트	참고문헌
레미펜타닐	통증, 화상		IV	3.5 분 반감기, 알 수 없는 에스테라제에 의해 대사됨	Scott & Perry (2005) Drugs, 65(13): 1793-1823. Clinicaltrials.gov
뉴로텐신	정신분열병, 파킨슨병, 중독			13AA 펩티드, 쉽게 분해됨, BBB 를 통과할 수 없음	Boules, et al, (2006) Peptides, 27(10): 2523-33.
GDNF (아교세포 유래 신경영양 인자)	파킨슨병	만성	실질내	펩티드, BBB 를 통과할 수 없음	Grondin, et al (2003) Prog Drug Res, 61: 101-23.
프로테아제 억제제 -로피나비르 -리토나비르 -사퀴나비르 -다루나비르 -아타자나비르 -암프레나비르	HIV		경구	모든 HIV 프로테아제 억제제는 HIV 의 급성 돌연변이 능력으로 인해, 약물 내성 HIV 균주를 생성한다	-Oldfield & Plosker (2006) Drugs 66(9): 1275-99. -Porter & Charman (2001) Adv Drug Deliv Rev, Oct 1; 50 Suppl 1: S127-47. - Piacenti (2006) Pharmacotherapy 26(8): 1111-33.

[0241]

제제	질병	급성 / 만성	투여 경로	코멘트	참고문헌
디하이드로에르고타민	편두통		IV, IM, sub-Q	상호작용으로 말초 허혈 유발, 9 hr 반감기	Modi & Lowder (2006) Am Fam Physician 73(1): 72-8.
스포라맥스 (이타코나졸)	항진균제		경구	결국 약물 내성 발생, 일부 집단에서 울혈성 심부전	Wang & Remold (2006) Cardiol Rev 14(5): 223-6.
단백질 키나제 C 억제제	급성 심근경색, 뇌졸중, 허혈, 재관류 손상				**미국 특허 공보 20050267030, 20060148702, 20060293237, 20050215483, 20040204364, 20040009922**
AII-7	암, 유방암	만성		Erbb2 세포내 도메인을 차단하고 탁솔 민감성을 증가시키는 펩티드모방체	Kunz et al, Mol Cancer Res 2006;4(12):983–98
CRAMP 펩티드	살모넬라 감염			살모넬라 복제를 감소시키는 세포내 항미생물 펩티드	Rosenberger, CM. PNAS | February 24, 2004 | vol. 101 | no. 8 | 2422-2427

[0242]

제제	질병	급성 / 만성	투여 경로	코멘트	참고문헌
소듐 채널 펩티드	근육 경련(간질, 하지 불안, 파킨슨병)을 감소시킬 수 있음			소듐 채널 알파 서브유닛의 상동성 막횡단 도메인 III 및 IV 사이의 짧은 세포내 세그먼트에 상응하는 펩티드가 불활성화를 늦췄다	Vassilev, Science (1988) 241: 1658-6
앱타머 KDI1	EGF 신호전달 차단 - 항암 가능				Buerger. J. Biol. Chem., Vol. 278, Issue 39, 37610-37621, September 26, 2003
RNA/유전자 요법				수송체 펩티드는 치료를 위해 RNA 또는 siRNA/RNAi를 가져오는데 사용될 수 있음	Turner et al (2007) Blood Cells Mol Dis, 38(1): 1-7.

[0243]

[0244] [0217] 본 발명은 이해의 명확성을 위해 상세히 기술되었지만, 첨부된 청구 범위의 범위 내에서 특정 수정이 실시될 수 있다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 수탁 번호, 및 특허 문헌은 각각이 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 하나 초과의 서열이 상이한 시간에 수탁 번호와 관련된 정도로, 본 출원의 유효 출원일을 기준으로 수탁 번호와 관련된 서열을 의미한다. 유효 출원일은 해당 수탁 번호를 개시하는 가장 빠른 우선권 출원일이다. 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한, 본 발명의 임의의 요소, 구현예, 단계, 특징 또는 양태는 임의의 다른 것과 조합하여 수행될 수 있다.

[0245] [0218] 실시예

[0246] [0219] 실시예는 하기 명칭 및 서열을 갖는 펩티드를 지칭한다. 소문자는 D-아미노산을 나타내고, 대문자는 L-아미노산을 나타낸다.

[0247] NA-1 (Tat-NR2B9c 또는 네리네타이드로도 알려짐) YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:58)

[0248] D-TAT-L-2B9c ygrkkrrqrrrKLSSIESDV(SEQ ID NO:80)

[0249] NA-3 ygrkkrrqrrrklssIESDV(SEQ ID NO:6)

[0250] D-NA-1 ygrkkrrqrrrklssiesdv(SEQ ID NO:81)

[0251] [0220] 1. NA-1의 플라스민 절단 부위

[0252] [0221] 플라스민은 tPA와 같은 혈전용해제에 의해 유도된 혈청 프로테아제이다. 플라스민 절단 부위는 L-아미노

산으로 형성된 펩티드에서 염기성 아미노산 잔기의 C-말단 측에 발생할 수 있다.

[0253] [0222] NA-1을 플라스민으로 분해하고 생성물을 질량 분광분석법으로 분석하였다. 다음 절단 생성물이 검출되었다

[0254] YGRKKRRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:58)(전장 NA-1, 분해되지 않음)

[0255] RRQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:82)

[0256] RQRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:83)

[0257] QRRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:84)

[0258] RRKLSSIESDV(SEQ ID NO:85)

[0259] RKLSSIESDV(SEQ ID NO:86)

[0260] KLSSIESDV(SEQ ID NO:2)

[0261] LSSIESDV(SEQ ID NO:87)

[0262] [0223] 이러한 절단 생성물은 NA-1이 도 1에 도시된 바와 같이 9개의 잠재적 부위 중 7개에서 절단되는 것을 의미한다. 그러나, 다른 2개 부위에서의 절단은 더 적은 정도로 일어날 수 있다.

[0263] [0224] 2. 래트 또는 인간 혈장에서 tPA와 동시에 투여된 NA-1의 분해

[0264] 래트 또는 인간 혈장을 NA-1 단독으로 또는 하기 농도의 재조합 tPA와 함께 처리하였다

[0265] - NA-1 단독 [65ug/mL] (N=4)

[0266] - NA-1 [65ug/mL] + rt-PA [22.5ug/mL] (N=4)

[0267] - NA-1 [65ug/mL] + rt-PA [67.5ug/mL] (N=4)

[0268] - NA-1 [65ug/mL] + rt-PA [135ug/mL] (N=4)

[0269] [0225] 샘플을 6개의 상이한 시점에 수집하였다.

[0270] [0226] 도 2 및 3은 tPA가 공동-투여되었을 때 NA-1 함량이 각각 시험관내 래트 혈장 또는 시험관내 인간 혈장에서 NA-1 단독보다 훨씬 더 빠르게 감소하였음을 보여준다. 도 4는 다양한 시점 후 NA-1 수준을 결정하기 위해 NA-1 및 tPA를 래트에 투여하고 혈장을 수집한 후 CMax 및 AUC의 유사한 감소를 보여준다. 따라서, tPA는 시험관 내 또는 생체 내에서 함께 투여될 때 래트 또는 인간 혈장에서 NA-1의 절단을 유도한다. tPA 또는 TNK는 포스페이트 완충된 식염수 단독에서 NA-1을 직접 절단하지 않는다(데이터는 제시되지 않음). 따라서, NA-1의 절단은 동물의 혈장 또는 혈액과 관련하여 플라스미노겐 활성화의 결과이다.

[0271] [0227] 3. D-아미노산을 포함하는 펩티드의 분해

[0272] [0228] 도 5는 NA-1 및 D-Tat-L-2B9C(D-Tat-L-NA-1이라고도 함)를 단독으로 또는 tPA를 동시에 투여하여 시험관 내 래트 혈장에서 비교한다. tPA와 함께 처리된 NA-1은 약 15분 이내에 0으로 붕괴된 반면, D-Tat-L-2B9C는 tPA와 공동-투여될 때 단지 무시할 수 있는 분해를 나타내었다. 도 6은 래트 혈장과 유사한 인간 혈장의 결과를 보여준다. 발생한 이러한 분해는 tPA의 용량에 따라 증가하였다.

[0273] [0229] tPA 대신에 TNK-조직 플라스미노겐 활성화제를 사용하여 실험을 반복하였다. TNK-조직 플라스미노겐 활성화제는 더 긴 반감기를 갖는 tPA의 생물공학적 변이체이다. tPA와 유사한 결과가 TNK를 사용하여 수득되었다. NA-1은 TNK의 공동-투여로 빠른 분해를 나타낸 반면, D-Tat-L-2B9C는 안정적이었다(도 7 및 8).

[0274] [0230] 도 9는 PBS에서 플라스민을 사용한 NA-1 또는 D-Tat-L-2B9C의 처리에 대한 유사한 결과를 보여준다. NA-1은 빠르게 분해된 반면, D-Tat-L-2B9C는 플라스민의 유무에 관계없이 유사한 안정성을 나타내었다. PBS 완충제(혈장 없음)에서 tPA를 사용한 대조군 처리는 NA-1 또는 D-Tat-L-2B9C의 분해를 나타내지 않았는데, 그 이유는 혈장을 공급하지 않으면 tPA가 플라스민을 생성하지 않기 때문이다.

[0275] [0231] 4. D-Tat-L-NR2B9c는 PSD-95:NR2B9c 복합체를 파괴한다

[0276] [0232] Sprague-Dawley 래트에 3 뇌연막혈관 모델(3PVo)을 적용하였다. 뇌졸중 발병 1시간 후에 래트에 각각 7.6 mg/kg의 플라시보, NA-1 또는 D-Tat-L-2B9C를 투여하였다. 뇌졸중 발병 2시간 후에 뇌를 수확하였다. 분석

을 위해 피질 뇌졸중 영역을 수집하였다. 항-PSD-95 또는 항-NMDAR2B로 면역침전을 수행하였다. 샘플에서 PSD-95 및 NMDAR2B의 양을 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다. PSD-95-NMDAR2B 복합체 형성의 감소는 플라시보 대 치료의 배수 감소에 의해 평가되었다. 도 10은 NA-1 및 D-Tat-L-2B9C 둘 모두가 미리 형성된 NMDAR2B:PSD-95 복합체를 해리시킬 수 있고 생체내에서 효과적으로 작용할 수 있음을 보여준다.

[0277] [0233] 5. PSD-95에 대한 결합 친화성

[0278] [0234] 결합을 경쟁적 ELISA 검정으로 평가하였다. 플레이트를 50 mM 바이카르보네이트 완충제 중 1 ug/ml $PSD95_{PDZ2}$로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 PBST(0.05%) 중 2% BSA에서 실온에서 2시간 동안 차단하였다. 이후, 플레이트를 3배 희석률의 120 ug/ml에서 시작하는 농도의 상이한 시험 화합물 및 150 ng/ml의 비오티닐화된-NA-1의 혼합물과 함께 인큐베이션하고, PBS-T로 적절히 세척한 후, 플레이트를 (1:3000) SA-HRP와 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 웰을 다시 세척한 다음, TMB 용액과 함께 10분 동안 인큐베이션하였다. 반응을 100 ul의 H_2SO_4로 중단시켰다. 시너지 H1 판독기를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 결정하였다.

[0279] [0235] 도 12는 비오티닐화된 NA-1, D-Tat-L-2B9C 및 D-Tat-L-IESDV(SEQ ID NO:6)가 각각 PSD-95 도메인 2에 결합하는 것을 보여주고 NA-1, D-Tat-L-2B9C 및 D-NA-1에 대한 EC50을 나타낸다. NA-1 및 D-Tat-L-2B9C의 EC50은 실험 오차 내에서 거의 동일한 반면, D-NA-1의 EC50은 약 10배 더 낮았다. 이러한 결과는 PSD-95에 대한 결합을 가장 책임지는 NA-1의 C-말단 잔기를 D-아미노산으로 전환시키는 것이 결합 친화성을 감소시킨다는 증거를 제공한다. D-Tat-L-2B9C 및 D-Tat-L-IESDV(SEQ ID NO:6)는 용량-의존적 방식으로 표적 단백질 $PS95_{PDZ2}$에 효과적으로 결합한다. 둘 모두의 시험 펩티드는 <5 uM의 IC_{50} 값을 달성한다(도 11). 도 11은 IC50이 서로의 2배 이내였으며, 이는 실험의 오차 범위 내에 있음을 보여준다.

[0280] [0236] 6. 약동학적 분석

[0281] [0237] 래트를 바로 누운 자세로 마취시키고(이소플루란 1.5-%), 0.5L/분의 O2에서 자발적으로 호흡하게 하였다. 혈액 샘플링을 위해 좌측 대퇴 동맥에 캐뉼러를 삽입하였다.

[0282] [0238] 시험 제제를 비히클의 총 부피에서 안정된 농도로 제조하였다. 폐 점적은 1cc 주사기에 연결된 14G 카테터로 삽관법으로 수행되었고, 시험 제제는 카테터를 통해 전달될 것이다. 피하(SQ 또는 SC) 주사를 좌측 옆구리 영역에 부위당 2 ml 이하의 총 부피로 주사하였다.

[0283] [0239] 하기 화합물을 시험하였다: NA-1, D-Tat-L-NA1, D-Tat-L-IESDV(SEQ ID NO:6) 및 D-NA-1. 각 투여 전략에 대해 3마리의 래트에서 각 용량을 평가하였다. 계획된 용량 수준 및 경로는 하기 표 5에 제시되어 있다. 2개의 상이한 투여 경로(SQ 및 PI)를 평가하는 첫 번째 실험을 위해, 혈액 샘플을 8개의 상이한 시점에 수집하였다: 투여 전 및 투여 후(250 ul/샘플) 7개 추가 시점(1, 2.5, 5, 10, 15, 30, 60분). 24-시간 PK 곡선 실험을 위해, 혈액 샘플을 11개 시점에 수집하였다: 투여 전, 2.5, 5, 10, 15, 30, 60 min, 3 hr, 6 hr, 12 hr 및 24 hr.

[0284] [0240] 표 5

전달 방법	화합물	용량 (mg/kg)
피하	NA-1	25
	D-Tat-NR2B9c	25
	NA-3	25, 8.3, 2.8
	D-NA-1	25
폐 점적	NA-1	25
	D-Tat-NR2B9c	25
	NA-3	25
	D-NA-1	25

[0285]

[0286] [0241] HPLC 정량화: 혈장을 혈액으로부터 분리하고 사용할 때까지 -80℃에서 저장하였다. 1M HCl(10 ul/100 ul 샘플)을 >80℃에서 첨가하여 각 샘플을 침전시키고, 원심분리(12,000 rpm x 15분)하고, 침전물을 수집하였다. 25 cm C-18 RP-HPLC 컬럼을 40℃에서 0.1% TFA와 함께 10% 아세토니트릴로 평형화시키고, 샘플을 주입하고 Agilent 1260 Infinity Quaternary LC 시스템에서 진행시켰다. (1.5 mL/분으로 30분; 0.1% TFA 중 10% 내지 35% 아세토니트릴의 구배; 220 nm에서 흡광도 검출). HPLC에 대한 표준 곡선은 공지된 양의 시험 제제로 스파이킹된 혈장 샘플로부터 생성되었다.

[0287] [0242] 도 13은 피하 NA-1이 동일한 용량의 정맥내 NA-1보다 훨씬 더 낮은 CMax 및 다소 더 낮은 AUC를 갖지만 더 긴 반감기를 갖는다는 것을 보여준다. 근육내 NA-1은 정맥내 NA보다 더 낮은 CMax, 다소 더 높은 AUC 및 더 긴 반감기를 가졌다.

[0288] [0243] 도 14는 피하 D-Tat-L-IESDV(SEQ ID NO:6)(NA-3)가 피하 NA-1과 비교하여 Cmax 및 AUC를 증가시켰음을 보여준다. 피하 D-Tat-L-2B9C 및 D-NA는 또한 피하 NA-1에 비해 Cmax 및 AUC를 증가시켰지만 D-Tat-L-IESDV(SEQ ID NO:6)와 동일한 정도는 아니었다. 도 15a-b는 피하 D-Tat-L-IESDV(SEQ ID NO:6)의 Cmax 및 AUC가 용량에 따라 선형적으로 용량-의존적 증가함을 보여준다.

[0289] [0244] 도 16은 D-Tat-L-IESDV(SEQ ID NO:6)의 폐 점적이 NA-1 또는 D-Tat-L-2B9C의 경우보다 더 높은 CMax를 초래하였음을 보여준다.

[0290] [0245] 7. 히스타민 방출에 대한 펩티드의 효과

[0291] [0246] 히스타민 방출에 대한 D-Tat-L-IESDV(SEQ ID NO:6) 주사의 효과를 3개의 상이한 용량으로 NA-3[SQ] 투여된 래트로부터의 혈장 샘플에서 시험하였다. 혈액 샘플을 11개 시점에 수집하였다: 투여 전, 2.5, 5, 10, 15, 30, 60 min, 3 hr, 6 hr, 12 hr 및 24 hr. 히스타민 수준은 상업적으로 이용 가능한 히스타민 ELISA 검정 키트(Histamine ELISA-H1531-K01, Eagle Bioscience)를 사용하여 정량화되었다. 플레이트를 중간 빈도의 오비탈 진탕기 상에서 실온에서 60분 동안 인큐베이션된 혈장 샘플(50 ul/웰)로 코팅하였다. 이후, 100 ul의 효소 컨쥬게이트를 웰에 첨가하고 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 다시 세척한 다음, TMB 용액과 함께 실온에서 25분 동안 인큐베이션하였다. 반응을 100 ul의 H_2SO_4로 중단시켰다. 450 nm에서 ELISA 플레이트 판독기에서 흡광도를 결정하였다.

[0292] [0247] 주사 전 및 투여 후 0, 1, 2.5, 5, 10, 15, 30 및 60분에 혈액 샘플을 채취하고 상업적으로 이용 가능한 키트를 사용하여 히스타민 수준 정량화에 사용하였다. 이 샘플링 기간은 래트 샘플(N=3 동물/그룹)에서 IV 주사 후 NA-1에 대해 관찰된 히스타민 상승 기간을 포함한다.

[0293] [0248] 도 17은 8.3 mg/kg 또는 2.8 mg/kg의 용량의 D-Tat-L-IESDV(SEQ ID NO:6)의 피하 투여가 유의한 히스타민 방출을 초래하지 않았음을 보여준다. 7.6 mg/kg IV의 정맥내 D-Tat-L-NA1은 상당한 히스타민 방출을 초래하였다. 25 mg/kg SQ의 D-Tat-L-IESDV(SEQ ID NO:6)는 히스타민 방출을 초래했지만 여전히 7.6 mg/kg IV보다 훨씬 적었다. 7.6 mg/kg IV의 D-Tat-L-2B9C에 의해 유도된 히스타민은 로독사미드의 공동-투여에 의해 제거되었다(도 18).

[0294] [0249] 따라서, D-아미노산을 포함하는 활성제의 피하 투여는 정맥내 투여보다 더 높은 투여량으로 히스타민 방출을 감소시킨다.

[0295] [0250] 8. 색전성 MCA 폐색 모델에서 신경보호제로서 D-Tat-L-2B9C의 효능

[0296] [0251] 동물을 이소플루란(유도의 경우 5%, 수술의 경우 2%, 및 유지의 경우 1.5%)으로 마취시켰다. 대퇴 정맥 및 동맥에 약물 투여, 혈압 모니터링 및 혈액 샘플링을 위해 PE-50 튜빙으로 캐뉼러를 삽입하였다. 수술 전 및 수술 중에 완전한 모니터링(뇌 혈류, 동맥혈 가스, 혈장 글루코스, 온도)이 수행될 것이다. 모든 생리학적 매개변수는 정상 범위 내로 유지될 것이고, 관련 뇌 혈류는 표준 레이저 도플러 모니터(PF5010 LDPM 유닛 및 PF5001 메인 유닛, Perimed, Jarfalla, Stockholm, Sweden)에 연결된 PR407-1 직선 바늘 LDF-프로브(Perimed, Jarfalla, Stockholm, Sweden)로 연속적으로 측정되었다. 중간대뇌동맥 색전성 뇌졸중의 경우, PE-10 5cm 팁을 갖는 PE-50 튜빙을 외부 경동맥을 통해 내부 경동맥으로 두개골 기저부에 삽입하였고, 미리 제조된 단일 적혈구 응혈을 수동으로 주사할 것이다. 7분 후, 총경동맥(CCA) 상의 카테터 및 클립을 제거하였다. 동물을 전체 절차 및 주사 동안 마취 하에 유지시켰다. 뇌졸중 발병 1시간 후에 치료 약물을 동시에 투여하였다. 신경보호제를 정맥내 볼루스(<30초)로 주사하고, 혈전용해제를 1분 내에 초기 10% 볼루스 주사로 투여하고, 총 용량의 나머지 90%를 1시간에 걸쳐 주입으로 투여하였다. 투여가 완료된 후, 가열 램프가 있는 깨끗한 케이지에서 동물을 회수

하였다. 이 뇌졸중 모델의 급성 특성으로 인해, 본 발명자들은 거동 평가로서 신경학적 점수 시험(자세 반사 및 앞다리 위치 시험(0-12 등급))만을 수행하였다. 신경점수 시험 직후(뇌졸중 발병 24시간 후), 동물을 안락사시켰다. 뇌를 제거하고, 1.5 mm 두께의 8개 슬라이스로 관상으로 섹션화하고, 염색을 위해 섭씨 37도에서 2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드(TTC)의 2% 용액에 넣었다. 섹션을 스캔하고, 경색 부피를 ImageJ 소프트웨어로 측정하였다. 뇌 종창을 또한 측정하였다.

[0297] [0252] 연구는 하기 그룹을 포함하였다:

[0298] · Sham (수술 없음) (N=10)

[0299] · 플라시보 (음성 대조군) (N=12)

[0300] · NA-1 단독 [7.6mg/kg] (양성 대조군) (N=11)

[0301] · D-TAT-L-NA1$_{Lodo}$ [7.6mg/kg] (N=12)

[0302] · rt-PA 단독 [5.4mg/kg] (N=10)

[0303] · NA-1 [7.6mg/kg] + rt-PA [5.4mg/kg] (음성 대조군) (N=12)

[0304] · D-TAT-L-NA1$_{Lodo}$ [7.6mg/kg] + rt-PA [5.4mg/kg] (N=17)

[0305] [0253] 도 19는 tPA 처리 없이, NA-1 및 D-Tat-L-2B9C + 로독사미드 둘 모두가 경색 부피 및 우반구 종창을 유의하게 감소시켰음을 보여준다. tPA가 공동-투여될 때, D-Tat-L-NA1 로독사미드 조합물만이 경색 및 우반구 종창에 대해 유의하게 보호하였다. 이러한 결과는 NA-1의 tPA-유도된 단백질분해가 이의 효과를 감소시키는 것으로 설명될 수 있다. D-Tat-L-NA1은 D 잔기의 포함에 의해 이러한 단백질분해에 대해 보호되므로 여전히 효과적이다. 도 20은 신경학적 결과에 대한 유사한 결과를 보여준다. 따라서, D-Tat-L-2B9C는 rt-PA와 같은 혈전용해제와 동시에 투여되는 경우에도 뇌졸중 부피의 감소 및 개선된 거동 결과로 해석되는 혈장 안정성의 개선을 나타낸다.

[0306] [0254] 9. PSD-95 억제제의 피하 투여

[0307] [0255] 억제제의 C-말단 5개 아미노산을 제외하고 D-아미노산을 함유하는 PSD-95 억제제가 뇌졸중 모델에서 효과적일 것이고 피하 주사로 투여될 수 있음을 입증하기 위해, 일련의 동물 실험을 수행하였다. 도 21은 뇌졸중의 래트 3-뇌연막혈관 폐색 모델에서 3개의 용량 수준(2.6, 7.6 또는 25 mg/kg)의 네리네타이드 또는 NA-3의 피하 투여를 비교한다. 치료는 뇌졸중 발병 60분 후에 볼루스 주사로서 피하 투여되었다. 25 mg/kg의 농도의 NA-3 및 네리네타이드를 투여받은 래트는 플라시보와 비교할 때 경색 부피의 유의한 감소를 나타내었다. 7.6 mg/kg의 NA-3도 경색 부피를 상당히 감소시켰지만, 동일한 농도의 네리네타이드는 경색 부피를 감소시키지 못했다. 데이터는 평균 ± SD, N=10/그룹으로 제시된다. 별표(*)는 플라시보와 비교할 때 통계적 유의성을 나타낸다(ANOVA, Tukey의 사후 분석, *P < 0.0332, **P < 0.0021, ***P < 0.0002 및 ****P < 0.0001). NA-3은 이 모델에서 효과적이었으며, 이는 모든 아미노산을 C-말단 5개 아미노산(IESDV, SEQ ID NO: 5)을 제외하고 D-아미노산으로 변경하는 것이 뇌졸중 및 PSD-95 억제에 효과적임을 나타낸다. 또한, 증가된 안정성은 피하 투여될 때 네리네타이드에 비해 개선된 효능에 기여할 가능성이 있다. 25 mg/kg 용량의 네리네타이드와 7.6 mg/kg 용량의 NA-3 사이에 동등한 신경보호(경색 부피의 감소)가 관찰되며, 이는 3배 더 낮은 NA-3 용량이 효과적임을 시사한다.

[0308] [0256] 신경보호를 위해 훨씬 더 낮은 용량이 요구되는 래트에서의 일시적인 뇌졸중 모델과 달리, 뇌졸중의 3 뇌연막혈관 폐색 모델에서의 신경보호는 2 ug/mL(또는 몰 당량) 이상의 네리네타이드의 혈장 농도를 필요로 하는 것으로 보인다. 도 22는 이전 모델에서 투여 후 15분에 동물로부터 NA-3 및 네리네타이드의 혈장 농도를 보여준다(도 21). 혈장 수준은 약 3시간 동안 계속 증가한 다음 감소하지만, 뇌졸중과 같은 응급 적응증의 경우 혈액 및 뇌에서 빠른 축적을 달성하는 것이 중요하다. 이는 본원에 제시된 구조의 PSD-95 억제제의 피하 투여가 빠른 기간 내에 치료 농도를 달성할 수 있음을 입증한다. 약동학적 샘플 분석을 위해, 1 uL의 적절한 스톡을 100 uL의 혈장에 스파이킹함으로써 네리네타이드의 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 및 40 ug/mL의 농도의 보정 표준 샘플을 제조하였다. 약동학적 샘플 분석을 위한 NA-3 표준 곡선의 경우, 1 uL의 적절한 스톡을 100 uL의 혈장에 스파이킹함으로써 NA-3의 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 및 40 ug/mL의 농도의 보정 표준 샘플을 제조하였다. 25 mg/kg의 네리네타이드(N=6), 7.6 mg/kg의 네리네타이드(N=8), 2.5 mg/kg의 네리네타이드(N=4) 또는 25 mg/kg의 NA-3(N=7), 7.6 mg/kg의 NA-3(N=9), 2.5 mg/kg의 NA-3(N=9) 및 플라시보(N=8)의 피하 투여 15분 후에 혈액 샘플을 수집하였다. 데이터는 평균 ± SD로 제시된다. 도 22는 네리네타이드 또는 NA-3의 단일 피하 투여 후 치료

용량과 Cmax 사이의 용량 비례성을 보여준다. NA-3은 동일한 용량의 네리네타이드와 비교할 때 투여 15분 후 혈장에서 더 높은 안정성 및 더 높은 농도를 나타낸다.

[0309] [0257] 인간 연구로부터 공지된 유효 농도(2.6 mg/kg 용량에 대해 약 10 ug/mL 혈장 농도)와 동등하거나 더 큰 혈장 수준을 확인하기 위해, 25 mg/kg 또는 7.6 mg/Kg NA-3을 피하 주사로서 비인간 영장류(시노몰구스 마카크)에 투여하고 혈장 샘플을 상이한 시점에 시험하였다(도 23). 둘 모두의 농도는 인간에서 효과적인 것으로 입증된 것보다 높고 2.6 mg/kg NA-1의 정맥내 용량보다 큰 혈장 농도를 달성할 수 있었다(Hill, Lancet 2020). 도 24는 시험된 주사 수준에 대한 약동학적 프로파일을 보여준다. 모든 값은 평균 ± SD로 제시된다; 네리네타이드 단독과 비교할 때 통계적 유의성은 *로 표시된다(사후 turkey 보정을 사용한 일원 ANOVA, *P<0.01). (C_{max}: 외삽된 시간-제로 값에 기초한 최대 혈장 농도; $t_{1/2}$: 말기 반감기; tmax: C_{max}에 도달하는 시간; AUC_{0-t}: 0에서 마지막으로 측정된 값까지 농도-시간 곡선하 면적; AUC_{0-inf}: 0에서 무한대까지 농도-시간 곡선하 외삽 면적; Cl: 총 제거율). 데이터는 그룹당 3-4마리 동물의 평균 ± SD로 제시된다. (-)는 20%보다 큰 AUC_{0-inf} 및 0.9보다 낮은 R^2의 외삽으로 인해 보고되지 않은 데이터를 나타낸다.

[0310] [0258] NA-3 피하 투여 후 NHP 동물의 생리학적 매개변수를 조사했을 때, 정맥내 네리네타이드와 비교하여 유의한 안전성 문제는 확인되지 않았다(도 25). 인간에서 3.75 mg/kg 초과 또는 래트 또는 개에서 7.6 mg/kg의 정맥내 용량에 대해 관찰된 바와 같이 NA-1과 비교하여 혈압의 유의한 강하는 관찰되지 않았고, 따라서 개선을 나타낸다.

[0311] [0259] 이후, 용량 제한 부작용이 존재하는지 여부를 평가하기 위해 NA-3을 사용한 래트에서 MTD 연구를 수행하였다. 래트에서 25 mg/kg 또는 50 mg/kg의 피하 용량은 크레아티닌 및 BUN(혈액 요소 질소)의 용량-의존적 증가를 나타내었고, 이는 신장에 대한 부작용을 나타낸다(도 26a, b). 이러한 증가는 투여 후 1일에 관찰되었고(좌측 패널) NA-3 25 mg/kg 용량 그룹에서 7일 동안 지속되었다. 7.6 mg/kg 또는 2.6 mg/kg NA-3의 피하 용량에 대해 범위를 벗어난 값은 관찰되지 않았다. 따라서, NA-3은 뇌졸중의 치료를 위해 효과적으로 투여될 수 있지만, 치료 지수(최소 유효 용량과 부작용이 관찰되지 않은 가장 높은 수준 사이의 차이의 척도)는 낮다. 치료제에 대한 치료 지수가 큰 것이 유리하다.

[0312] [0260] 플라스민-내성 PSD-95 억제제에 대한 치료 지수를 증가시키기 위해, 신장 독성을 특성화하고 더 많은 양의 D-아미노산의 투여 효과인 것으로 결정하였다. 치료 범위를 증가시키기 위한 3개의 전략이 확인되었다: 용량 감소, 억제제에서 D-아미노산 수의 감소, 및 높은 농도에서 신장 독성과 관련된 활성인 D-아미노산 옥시다제의 억제제 제공. 도 27 및 28은 1일 전후의 피하 용량을 비교한 크레아티닌 및 BUN에 대한 이러한 치료 전략의 결과를 보여준다. 첫 번째 전략의 경우, 전/후 막대의 제2 및 제3 세트를 비교할 수 있다. NA-3의 용량을 2배 감소시키는 것은 25 mg/kg NA-3에 의해 유도된 NA-3 크레아티닌 수준의 유의한 감소를 초래한다. 두 번째로, D-아미노산의 수를 감소시키기 위해, 막대의 제1 세트(25 mg/kg NA-3) 및 제4 세트(25 mg/kg D-Tat-L-2B9c)를 비교할 수 있다. 11/20 위치에 D 잔기를 함유하는 펩티드 억제제의 동일한 용량 수준이 제공될 때 14/20 위치에 D-아미노산을 갖는 NA-3보다 훨씬 적은 크레아티닌이 관찰된다. 이 도면은 또한 D-아미노산 옥시다제의 억제제인 소듐 벤조에이트의 첨가가 또한 25 mg/kg NA-3에 의해 유도된 크레아티닌 및 BUN 수준을 감소시킨다는 것을 입증한다(제1 및 제2 그룹의 전/후 쌍 비교 - 25 mg/kg NA-3 vs 25 mg/kg NA-3 + SB). 따라서, PSD-95 억제제의 치료 지수는 다수의 전략에 의해 증가될 수 있다.

[0313] [0261] D-Tat-L-2B9c는 플라스민의 존재 하에 안정적인 것으로 나타났으므로, 1 내지 10개의 D-아미노산을 함유하는 Tat 내재화 펩티드의 변이체를 제조하였다. 대표적인 내재화 펩티드는 상기 표에 제시되어 있고, 도 29는 네리네타이드의 마지막 5개 아미노산을 L 형태로 함유하는 예시적인 PSD-95 억제제 및 tat 형질도입 도메인의 D-아미노산-함유 변이체의 플라스민 내성을 보여준다. 네리네타이드 자체는 10 ug/mL 플라스민의 존재 하에 5분 이내에 분해되지만, 다른 변이체는 45분이 지나도 분해가 관찰되지 않으면서 안정하다. 이러한 변이체는 네리네타이드에 비해 플라스민 안정성이 증가하였고, NA-3와 비교할 때 치료 지수가 증가하였다.

[0314] [0262] 9. 용량 범위

[0315] [0263] 네리네타이드 및 로독사미드는 tMCAo 60분 후에 볼루스 주사로서 래트에 정맥내 투여되었다. 도 30a는 tMCAo 24시간 후에 반구 경색 부피 측정치를 보여준다. a의 막대는 평균 ± SD를 나타내며, 모든 개별 데이터 포인트가 플롯팅된다. a의 별표는 비히클 그룹과 비교할 때 P<0.01을 나타낸다(다중 비교 시험에 대한 일원 ANOVA 사후 Tukey 보정) N = 12-14 동물/그룹. 도 30b는 tMCAo 24시간 후에 신경학적 점수를 보여준다. 비히클

그룹과 비교할 때 유의한 차이는 별표로 표시된다(다중 비교 시험에 대한 사후 Dunn 보정을 사용한 순위에 대한 Kruskal-Wallis 분산 분석, *P<0.01). 비히클: PBS 단독. 스크램블됨: PSD-95에 결합할 수 없는 ADA 펩티드. 0.25 mg/kg만큼 낮은 용량은 경색 부피의 유의한 감소(P=0.01) 및 신경학적 기능의 개선을 야기하였다. 적어도 최대 25 mg/kg의 용량이 또한 효과적이었고, 최고 효능은 약 15 mg/kg에서 나타났다. 관찰된 넓은 치료 범위는 히스타민 방출로 인한 잠재적인 저혈압을 피하기 위해 모든 용액에 존재한 비만 세포 탈과립 억제제인 로독사미드가 아니라 네리네타이드에 기인하였다.

[0316] [0264] 10. 네리네타이드 변이체의 플라스민 안정성

[0317] [0265] 하기 펩티드를 합성하고 플라스민 민감성에 대해 시험하였다. PBS 중 약 65 ug/ml의 펩티드를 37℃에서 10 ug/ml 플라스민으로 챌린지하였다. 네리네타이드는 HPLC에 의해 평가된 약 5분 만에 완전히 분해되었다. 30분의 기간에 걸쳐 적어도 85%의 온전한 펩티드를 보유하는 펩티드를 플라스민 내성으로 분류하고 다른 펩티드를 플라스민 민감성으로 분류하였다. NoNO42, NA4.4.1 및 NA411.4는 30분 후에 본질적으로 100%의 온전한 펩티드를 나타내었고, NA4.4.3은 85% 이상의 온전한 펩티드 보유를 나타내었다(하기 표 6). 트립토판이 잠재적인 절단 부위의 3-4개 아미노산 내에 있을 때 플라스민 절단을 억제한다는 문헌 보고에도 불구하고, 네리네타이드의 8번째 위치에서 R에서 W로의 치환은 네리네타이드에 비해 플라스민 민감성을 개선하지 않았다.

[0318] [0266] 표 6

플라스민 내성		
명칭	**서열**	**SEQ ID NO:**
NA3	yGrkkrrqrrrklssIESDV	6
D-Tat-L-2B9c	yGrkkrrqrrrKLSSIESDV	80
NA5.6	yGrKkRrQrRrkLSSIESDV	126
NA5.9	Ac-YGrKkRrQrRrkLSSIESDV	127
NA5.5	yGrKkRrQrRrKLSSIESDV	128
NA5.8	Ac-YGrKkRrQrRrKLSSIESDV	129
NA5.7	Ac-YGrKKrRQrRRkLSSIESDV	130
NA5.10	YGrKKrRQrRRkLSSIESDV	131
NoNO42	YGrKKRrQrRRkLSSIESDV	114
NoNO414	RKkRrQrrR IESDV	111
NA-4 K12E	YGrKKRrQrRRELSSIESDV	132
NA-4 k12P	YGrKKRrQrRRPLSSIESDV	133
NoNO415	rKKRrQrRR IESDV	134
NA-4 Short	rkkrrqrrr IESDV	135
NA-4.4.1	YGrKKRrQRRrKLSSIESDV	136
NA-4.4.2	YGrKKRrQrRRKlSSIESDV	116
NA-4.4.3	YGRkKRrQRrRKLSSIESDV	115
NA-4.2.3	YGrKKRrQrRRklSSIESDV	137
NA-411.4	YGRKkRRqRRrKLSSIESDV	138

[0319]

플라스민 민감성		
명칭	서열	SEQ ID NO:
네리네타이드	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	58
NA4.4	YGrKKRrQrRRKLSSIESDV	139
NA-1 Q8W	YGRKKRRWRRRKLSSIESDV	140
NA-4.2.2	YGrKKRrQRRRkLSSIESDV	141
NA-411.3	YGRKkRRQRRrKLSSIESDV	142

[0320]

[0321] 11. NoNO42의 추가 시험

[0322] [0267] NoNO42, NA5.10, NA5.6 및 NA5.1을 PSD-95 PDZ 도메인 2에 대한 결합에 대해 비오티닐화된 네리네타이드와 경쟁하는 능력에 대해 시험하였다. ADA는 네리네타이드와 서열이 유사하지만 PSD-95 도메인 2에 결합할 수 없는 음성 대조군 펩티드였다. 음성 대조군을 제외한 각각의 펩티드는 도 31에 도시된 바와 같이 용량-의존적 방식으로 비오티닐화된 네리네타이드와 경쟁하였다. 기호는 중복의 평균 ± SD를 나타낸다. 흡광도 데이터는 A450 nm 값에서 A650 nm 값을 빼서 정규화한 다음, 중복 웰에 대한 각 시점에서의 흡광도 데이터의 평균을 구했다. 이에 따라, NoNO42의 내재화 펩티드로의 D-아미노산의 도입은 PSD-95 도메인 2에 대한 결합에 영향을 미치지 않는다.

[0323] [0268] 정맥내 투여된 Cmax에 대해 NoNO42를 네리네타이드와 비교하였다. 래트에 7.6 mg/kg, 5.7 mg/kg 및 3.8 mg/kg의 용량의 IV 10분 주입을 제공하였다. 혈장 샘플을 주사 전 및 투여 후 10, 15, 20, 30, 45, 60분에 수집하였다. 각 포인트는 그룹당 3마리 동물의 평균 ± SD를 나타낸다. NoNO42에 대한 C-max는 네리네타이드에 대한 것보다 높았다(도 32).

[0324] [0269] 다양한 투여량의 NoNO42를 래트에 투여 후 비만 세포 탈과립으로 인한 혈압 강하에 대해 네리네타이드와 비교하였다. 펩티드를 정맥내 10분 주입으로 제공하였다. 혈압의 감소는 NoNO42(7.6 mg/kg)(N=3)로 처리된 래트에서 관찰되었다(도 33). NoNO42 용량을 5.7 mg/kg으로 감소시키면 7.6 mg/kg의 네리네타이드에서 관찰된 것과 유사한 혈압 강하가 발생한다. 이러한 용량의 NONO42 및 네리네타이드는 동일한 CMax를 초래한다. 따라서, 저혈압은 비교 가능한 CMax를 발생시키는 투여량의 경우 네리네타이드보다 NoNO42에서 나쁘지 않다. NoNO42의 용량을 3.8 mg/kg으로 추가로 감소시키는 것은 저혈압을 실질적으로 예방한다. 대조군: 네리네타이드의 주사 (N=3). 결과는 기준선 값의 %로 제시된다(평균 ± S.D.)

[0325] [0270] NoNO42를 표 7에 제시된 바와 같이 래트에 투여한 후 네리네타이드와 비교하여 다양한 신장 바이오마커 또는 전해질 불균형에 대한 효과에 대해 시험하였다. NoNO42에 4개의 D-아미노산이 존재함에도 불구하고 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

[0326] [0271] 표 7

매개변수	네리네타이드 IV 7.6 mg/kg (N=3)			NoNO42 IV 7.6 mg/kg (N=3)		
	투여 전	4 일	14 일	투여 전	4 일	14 일
증량 (그램)	360.3 ± 8.14	368.0 ± 9.17	420.0 ± 6.93	331.0 ± 10.15	354.0 ± 9.85	388.3 ± 14.64
화학/전해질						
Na+ (mmol/L)	135.7 ± 1.15	137.3 ± 0.58	136.7 ± 1.53	135.0 ± 1.00	136.3 ± 0.58	137.3 ± 0.58
K+ (mmol/L)	4.8 ± 0.52	4.8 ± 0.32	4.4 ± 0.06	5.3 ± 0.12	4.9 ± 0.21	4.5 ± 0.36
iCa (mmol/L)	1.46 ± 0.04	1.43 ± 0.10	1.45 ± 0.03	1.44 ± 0.04	1.46 ± 0.02	1.42 ± 0.07
Cl (mmol/L)	98.0 ± 1.00	100.7 ± 0.58	98.3 ± 0.58	98.7 ± 1.15	97.7 ± 0.58	98.3 ± 1.15
tCO2 (mmol/L)	35.7 ± 2.52	35.0 ± 1.00	34.3 ± 0.58	33.7 ± 2.08	35.7 ± 1.53	35.7 ± 1.53
글루코스 (mg/dL)	251.7 ± 33.29	178.0 ± 8.72	253.3 ± 55.22	228.7 ± 8.08	187.0 ± 17.09	213.0 ± 16.52
음이온 갭 (mmol/L)	7.3 ± 2.08	7.3 ± 0.58	9.0 ± 1.00	8.7 ± 1.53	9.0 ± 1.00	8.7 ± 1.15
신장 기능						
크레아티닌 (mg/dL)	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.00	0.2 ± 0.00	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.00	0.2 ± 0.00
BUN (mg/dL)	15.0 ± 4.00	13.7 ± 0.58	16.7 ± 0.58	11.7 ± 1.15	13.0 ± 1.00	15.7 ± 1.53
혈액학						
Hgb (g/dL)	13.0 ± 0.23	13.4 ± 0.50	13.0 ± 0.51	13.1 ± 0.40	13.0 ± 1.25	13.4 ± 0.68
Hct (% PCV)	38% ± 0.01	39% ± 0.02	38% ± 0.02	38% ± 0.01	38% ± 0.04	39% ± 0.02

[0327]

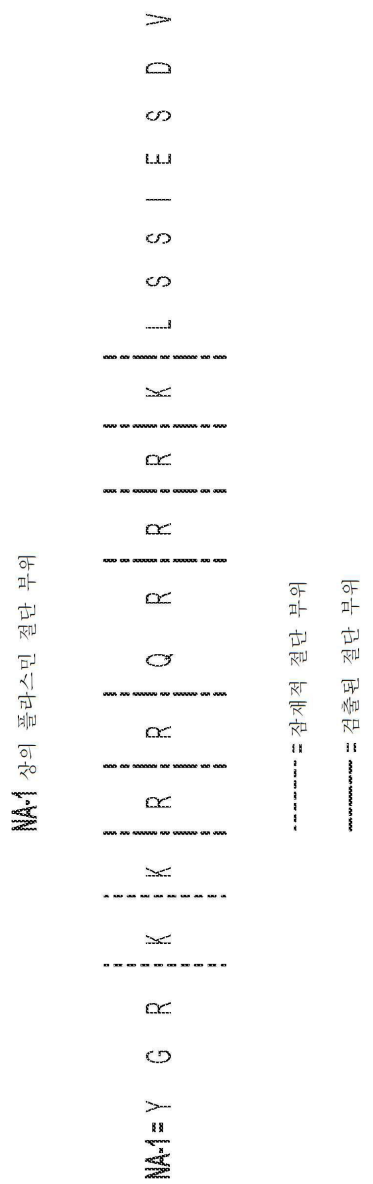
매개변수	NoNO42 IV 5.7mg/kg (N=3)			NoNO42 IV 3.8mg/kg (N=3)		
	투여 전	4 일	14 일	투여 전	4 일	14 일
중량 (그램)	341.7 ± 17.21	370.3 ± 18.01	404.7 ± 18.58	342.3 ± 11.55	377.3 ± 9.45	408.0 ± 8.89
화학/전해질						
Na+ (mmol/L)	135.3 ± 0.58	137.3 ± 1.53	136.3 ± 2.31	135.0 ± 1.00	137.3 ± 0.58	136.3 ± 1.53
K+ (mmol/L)	5.3 ± 0.06	4.8 ± 0.45	5.0 ± 0.51	5.2 ± 0.35	5.0 ± 0.17	4.6 ± 0.30
iCa (mmol/L)	1.46 ± 0.04	1.47 ± 0.02	1.46 ± 0.04	1.43 ± 0.04	1.47 ± 0.02	1.48 ± 0.02
Cl (mmol/L)	98.0 ± 1.00	98.7 ± 1.53	98.7 ± 1.15	98.3± 2.52	99.7 ± 1.15	100.3 ± 1.53
tCO2 (mmol/L)	36.3 ± 0.58	36.3 ± 0.58	35.3 ± 1.53	34.7 ± 1.53	35.0 ± 1.00	33.3 ± 2.08
글루코스 (mg/dL)	218.0 ± 20.88	175.7 ± 15.57	210.3 ± 32.33	222.3 ± 3.51	174.0 ± 11.14	226.3 ± 35.92
음이온 갭 (mmol/L)	7.3 ± 0.58	8.0 ± 1.00	8.0 ± 2.65	8.3 ± 0.58	8.7 ± 1.15	8.3 ± 1.15
신장 기능						
크레아티닌 (mg/dL)	0.2 ± 0.00	0.2 ± 0.00	0.3 ± 0.06	0.2 ± 0.00	0.2 ± 0.00	0.2 ± 0.06
BUN (mg/dL)	12.3 ± 0.58	11.3 ± 1.15	16.0 ± 2.00	11.0 ± 1.00	12.3 ± 1.15	15.3 ± 0.58
혈액학						
Hgb (g/dL)	12.1 ± 0.68	12.4 ± 0.86	12.9 ± 0.35	12.3 ± 0.51	12.3 ± 1.21	12.5
Hct (% PCV)	36% ± 0.02	36% ± 0.03	38% ± 0.01	36% ± 0.02	36% ± 0.04	37%

[0328]

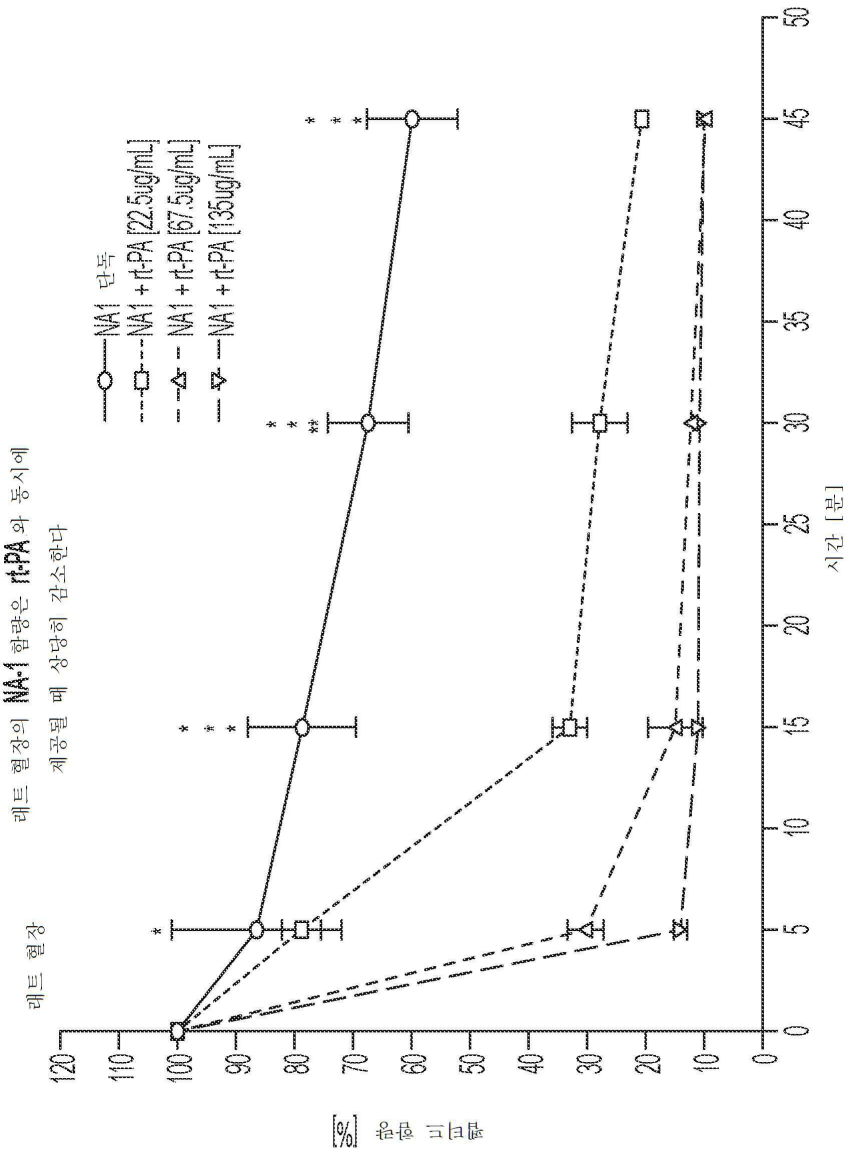
[0329] [0272] NoNO42는 또한 래트의 체중 증가에 대한 효과에 대해 네리네타이드와 비교되었다. 유의한 차이는 보이지 않았다(도 34). 정상 체중 증가는 정상 기능의 지표이며 NoNO42의 D-아미노산으로 인한 독성은 없다.

도면

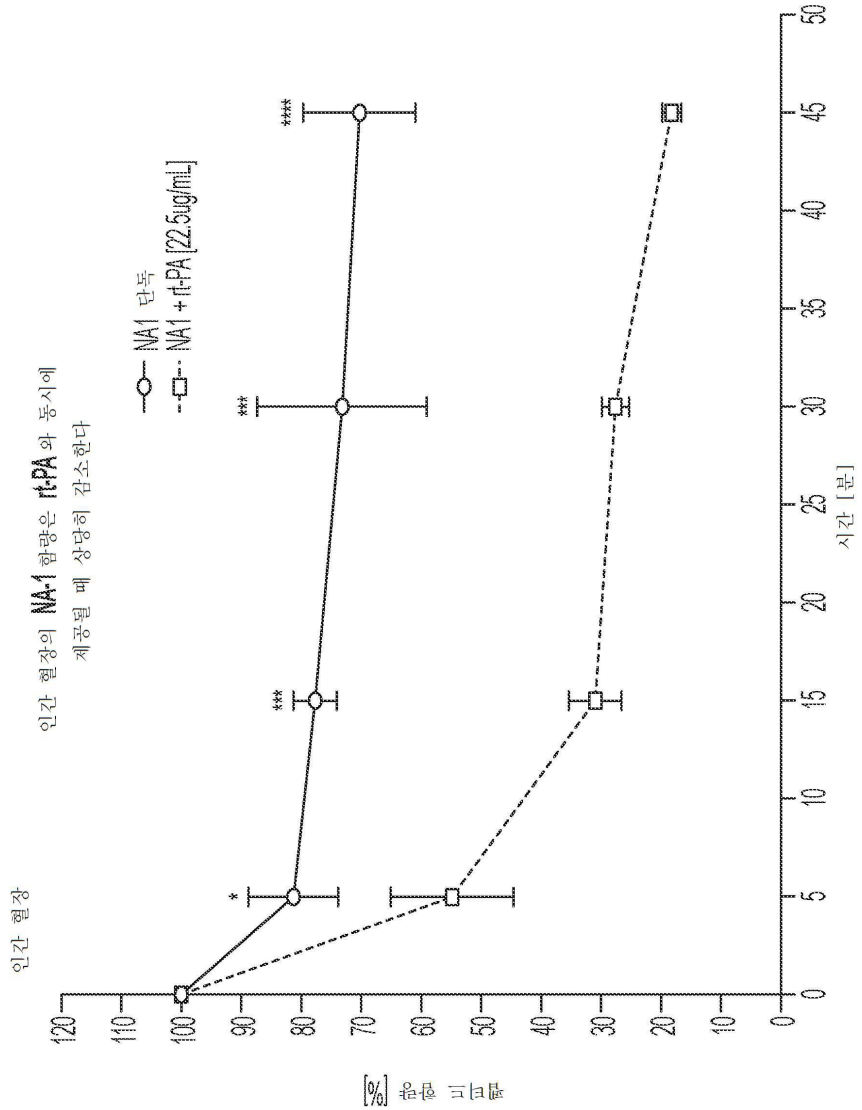
도면1



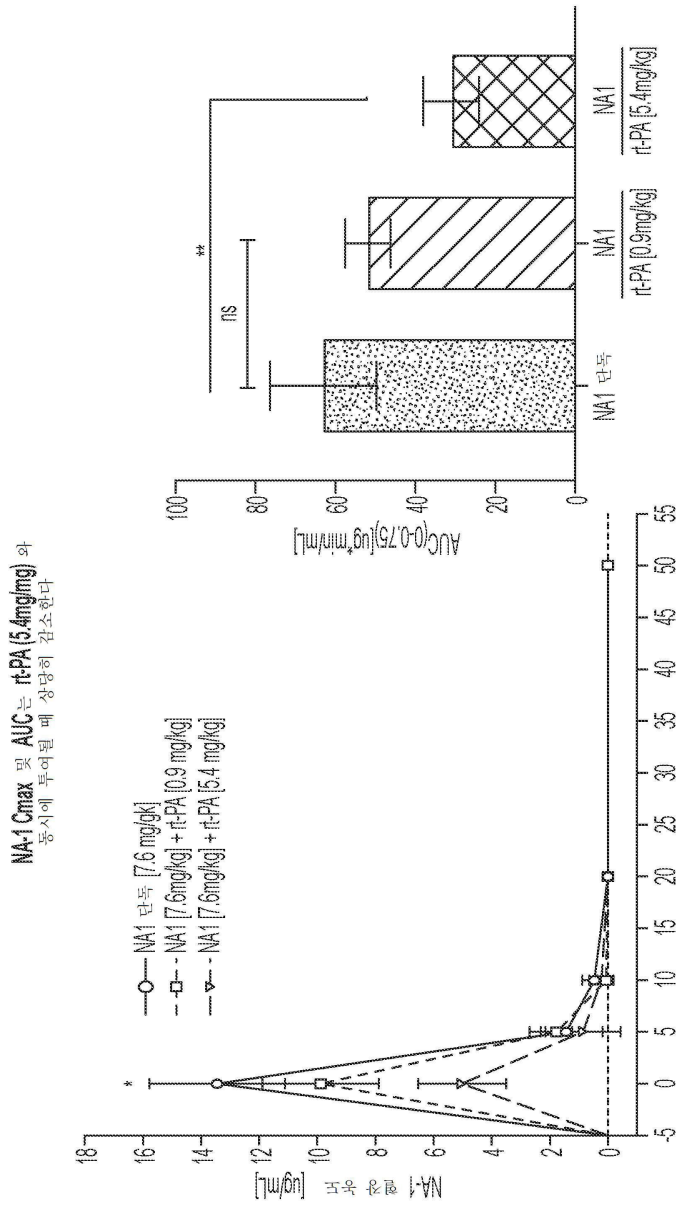
도면2


레트 혈장의 NA-1 함량은 rt-PA와 동시에
제공될 때 상당히 감소한다
레트 혈장
NA1 단독
NA1 + rt-PA [22.5ug/mL]
NA1 + rt-PA [67.5ug/mL]
NA1 + rt-PA [135ug/mL]
*
**
혈타드 함량 [%]
시간 [분]
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

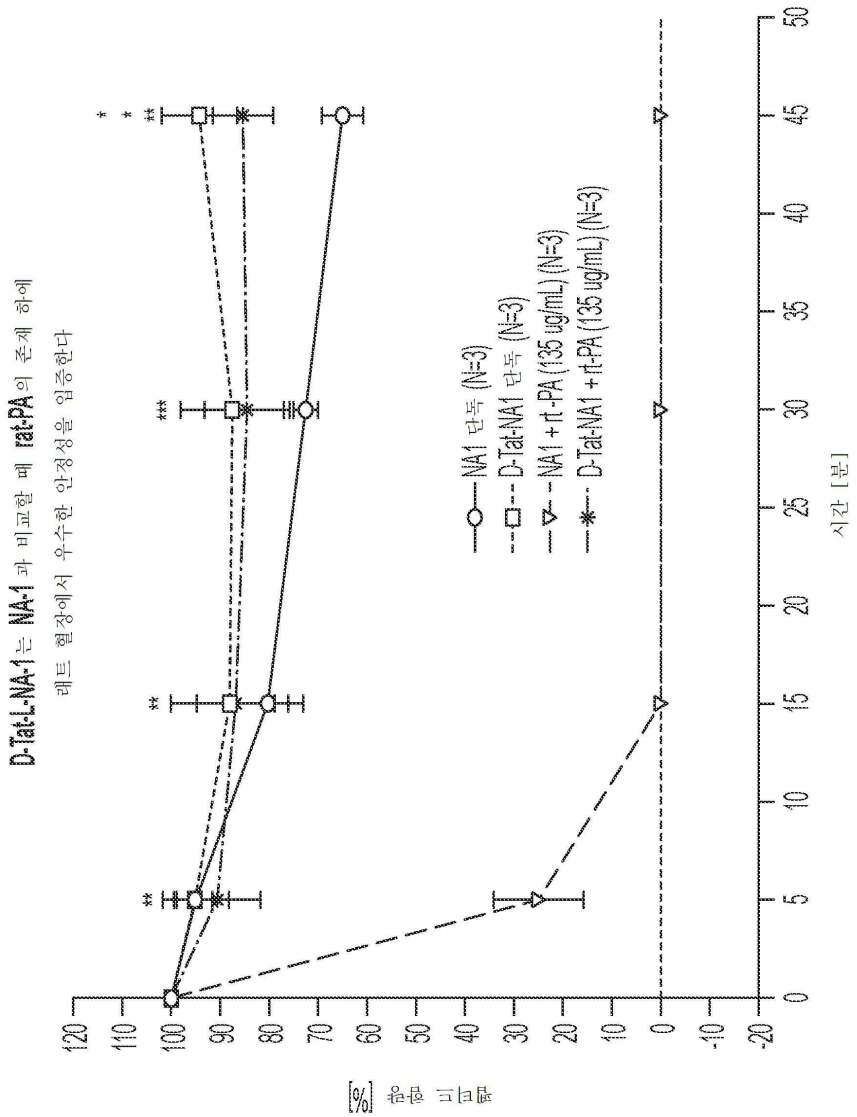
도면3


인간 혈장
인간 혈장의 NA-1 함량은 rt-PA와 동시에
제공될 때 상당히 감소한다
NA1 단독
NA1 + rt-PA [22.5ug/mL]
*
***
***
****
폴더드 함량 [%]
시간 [분]
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

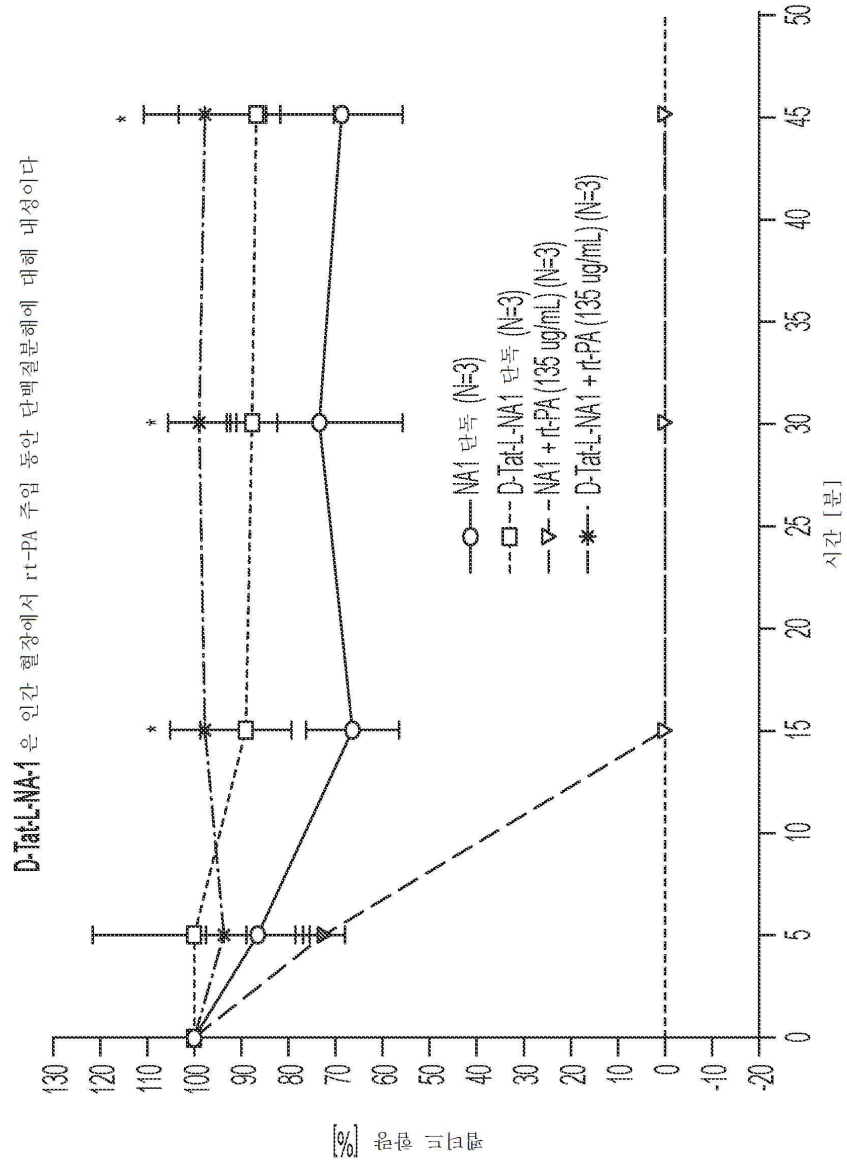
도면4


NA-1 Cmax 및 AUC는 rt-PA (5.4mg/mg)와
동시에 투여될 때 상당히 감소한다
NA1 만독 [7.6 mg/gk]
NA1 [7.6mg/kg] + rt-PA [0.9 mg/kg]
NA1 [7.6mg/kg] + rt-PA [5.4 mg/kg]
NA-1 혈장 농도 [ug/mL]
AUC(0-0.75)[ug*min/mL]
ns
**
NA1 만독
NA1
rt-PA [0.9mg/kg]
NA1
rt-PA [5.4mg/kg]

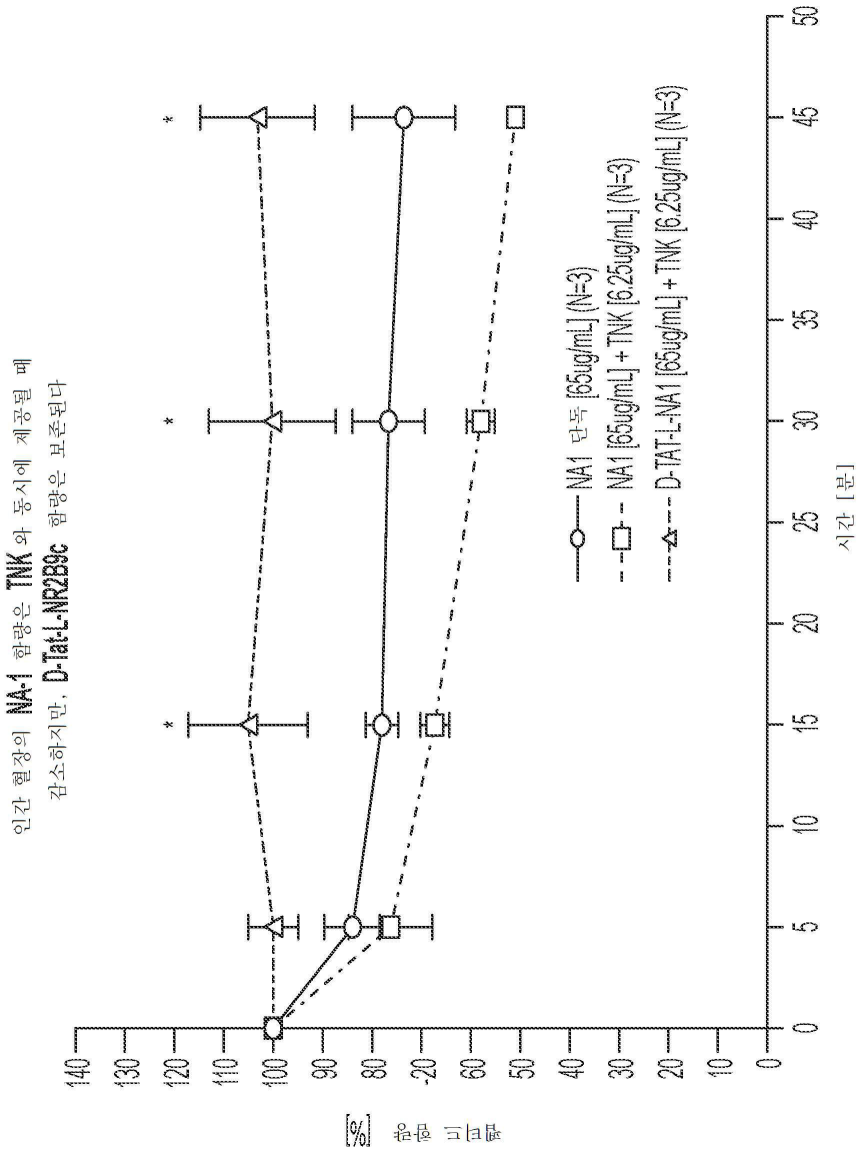
도면5


D-Tat-L-NA-1는 NA-1과 비교할 때 rat-PA의 존재 하에
레트 혈장에서 우수한 안정성을 입증한다
혈전 용량 [%]
시간 [분]
NA1 단독 (N=3)
D-Tat-NA1 단독 (N=3)
NA1 + rt-PA (135 ug/mL) (N=3)
D-Tat-NA1 + rt-PA (135 ug/mL) (N=3)

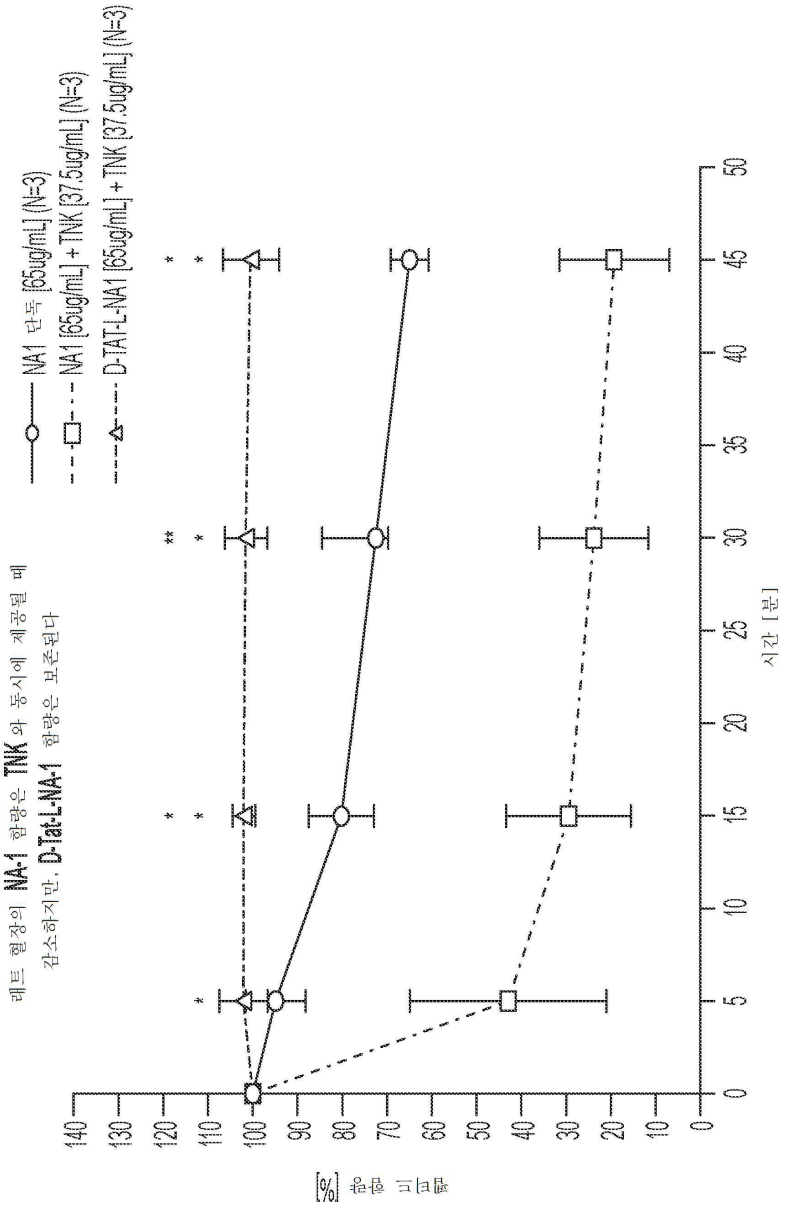
도면6


D-Tat-L-NA1 은 인간 혈장에서 rt-PA 주입 동안 단백질분해에 대해 내성이다
NA1 단독 (N=3)
D-Tat-L-NA1 단독 (N=3)
NA1 + rt-PA (135 ug/mL) (N=3)
D-Tat-L-NA1 + rt-PA (135 ug/mL) (N=3)
펩티드 함량 [%]
시간 [분]

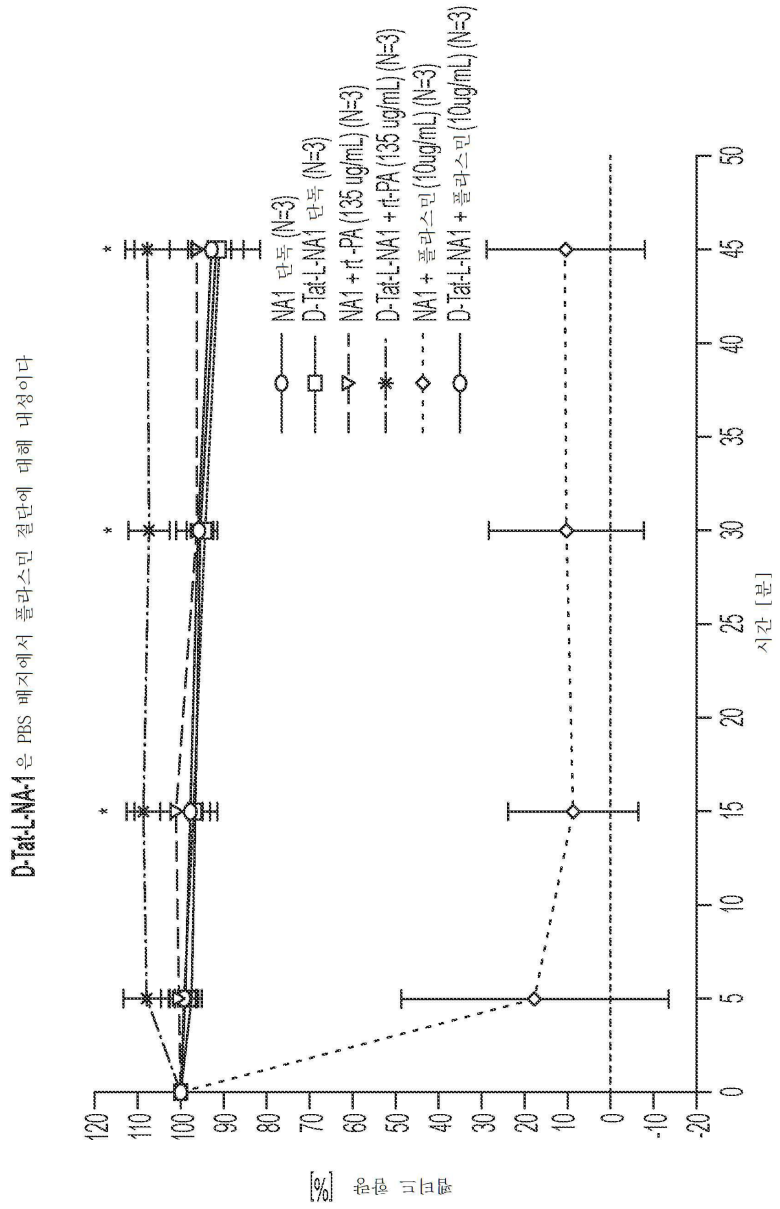
도면7


인간 혈장의 NA-1 함량은 TNK 와 동시에 제공될 때
감소하지만, D-Tat-L-NR2B9c 함량은 보존된다
NA1 단독 [65ug/mL] (N=3)
NA1 [65ug/mL] + TNK [6.25ug/mL] (N=3)
D-TAT-L-NA1 [65ug/mL] + TNK [6.25ug/mL] (N=3)
시간 [분]
펩티드 함량 [%]

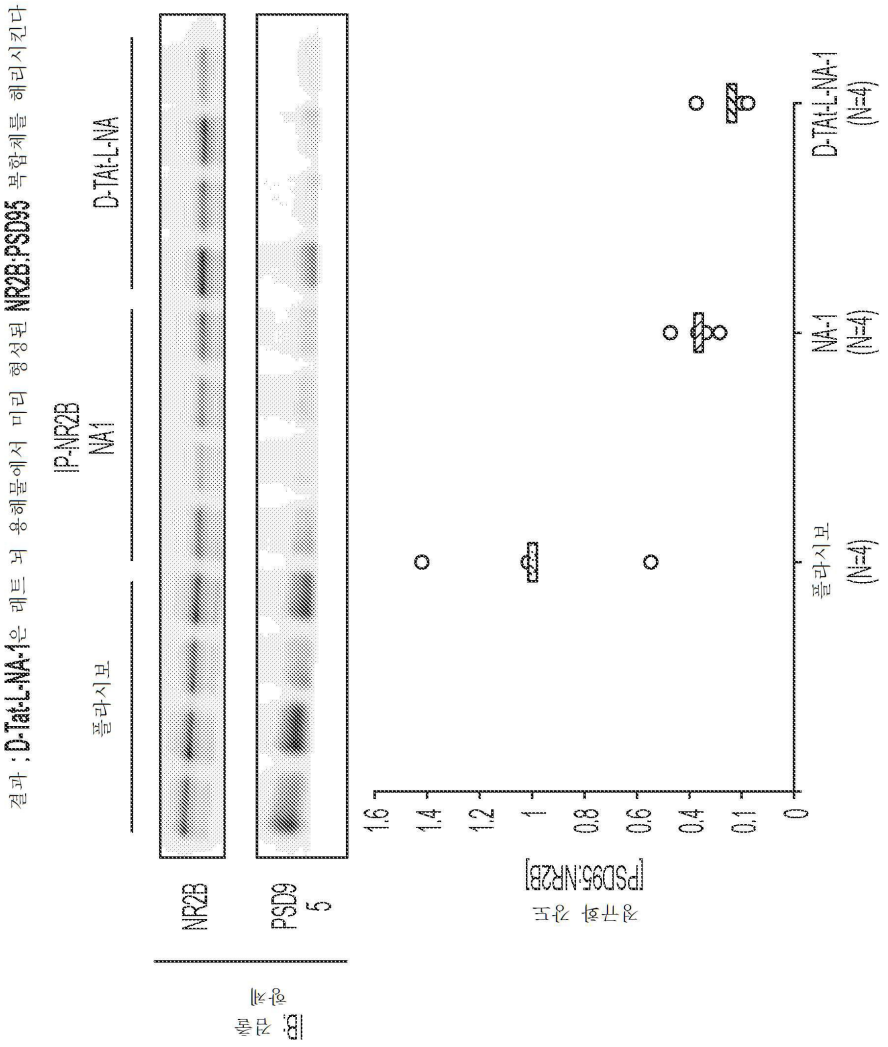
도면8


NA1 만독 [65ug/mL] (N=3)
NA1 [65ug/mL] + TNK [37.5ug/mL] (N=3)
D-TAT-L-NA1 [65ug/mL] + TNK [37.5ug/mL] (N=3)
레트 혈장의 NA-1 함량은 TNK 와 동시에 제공될 때
감소하지만, D-Tat-L-NA-1 함량은 보존된다
혈전 함량 [%]
시간 [분]
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
*
*
*
*
**
*
*

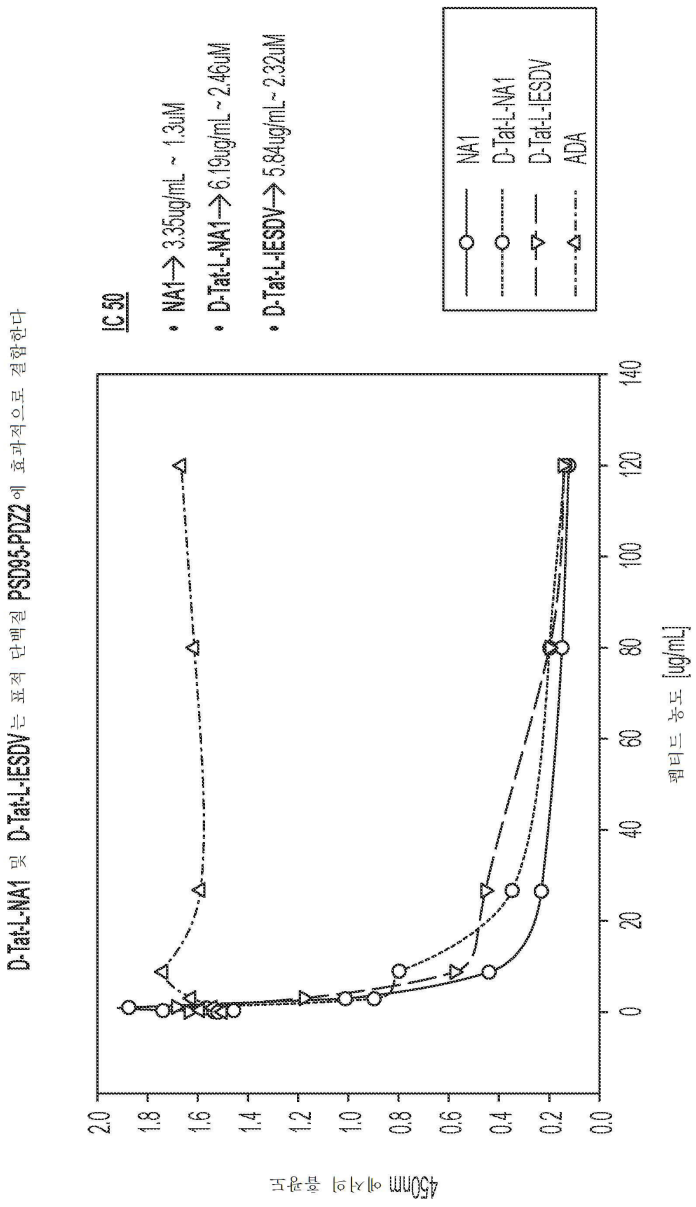
도면9


D-Tat-L-NA-1 은 PBS 배지에서 플라스민 절단에 대해 내성이다
NA1 만독 (N=3)
D-Tat-L-NA1 만독 (N=3)
NA1 + rt-PA (135 ug/mL) (N=3)
D-Tat-L-NA1 + rt-PA (135 ug/mL) (N=3)
NA1 + 플라스민(10ug/mL) (N=3)
D-Tat-L-NA1 + 플라스민(10ug/mL) (N=3)
잔류 활성 [%]
시간 [분]

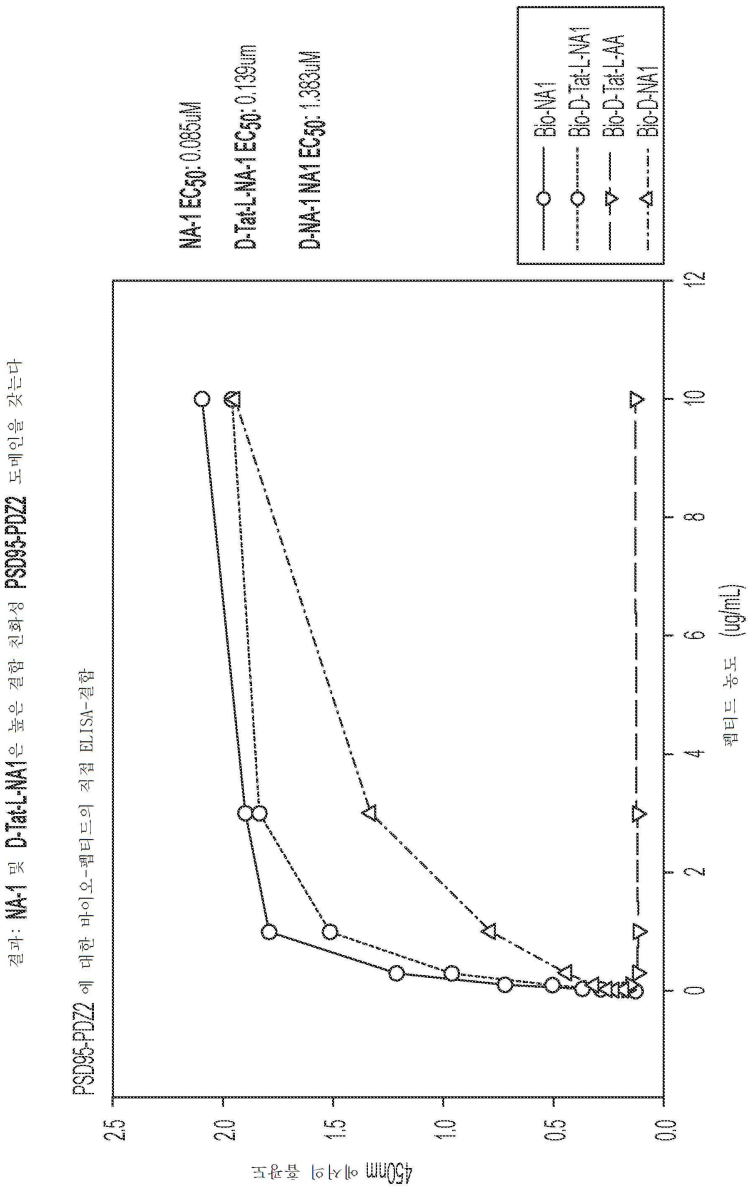
도면10


결과 ; D-Tat-L-NA-1은 래트 뇌 용해물에서 미리 형성된 NR2B:PSD95 복합체를 해리시킨다
IP-NR2B
플라시보
NA1
D-TAt-L-NA
NR2B
PSD95
IB: 겉줄
항체
정규화 강도
[PSD95:NR2B]
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.1
0
플라시보
(N=4)
NA-1
(N=4)
D-TAt-L-NA-1
(N=4)

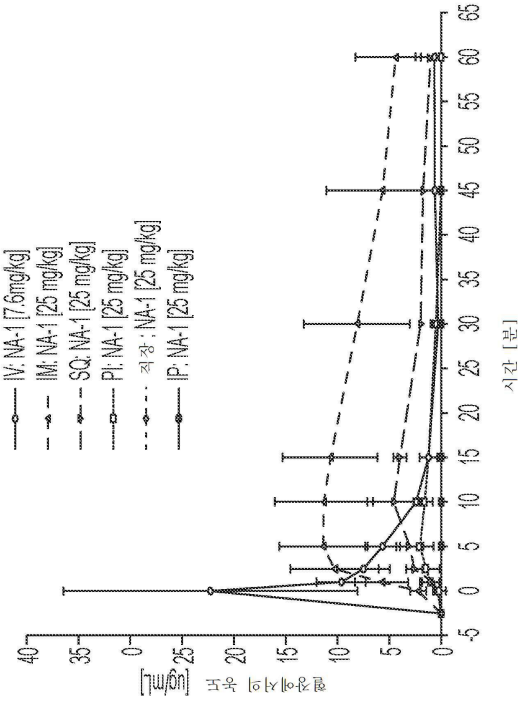
도면11


D-Tat-L-NA1 및 D-Tat-L-IESDV는 표적 단백질 PSD95-PDZ2에 효과적으로 결합한다
IC 50
• NA1→ 3.35ug/mL ~ 1.3uM
• D-Tat-L-NA1→ 6.19ug/mL ~ 2.40uM
• D-Tat-L-IESDV→ 5.84ug/mL ~ 2.32uM
NA1
D-Tat-L-NA1
D-Tat-L-IESDV
ADA
450nm 에서의 흡광도
펩티드 농도 [ug/mL]
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
0
20
40
60
80
100
120
140

도면12


결과: NA-1 및 D-Tat-NA1은 높은 결합 친화성 PSD95-PDZ2 도메인을 갖는다
PSD95-PDZ2 에 대한 바이오-펩티드의 직접 ELISA-결합
NA-1 EC50: 0.085uM
D-Tat-NA-1 EC50: 0.139um
D-NA-1 NA1 EC50: 1.383uM
Bio-NA1
Bio-D-Tat-L-NA1
Bio-D-Tat-L-AA
Bio-D-NA1
450nm 에서의 흡광도
펩티드 농도 (ug/mL)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
0
2
4
6
8
10
12

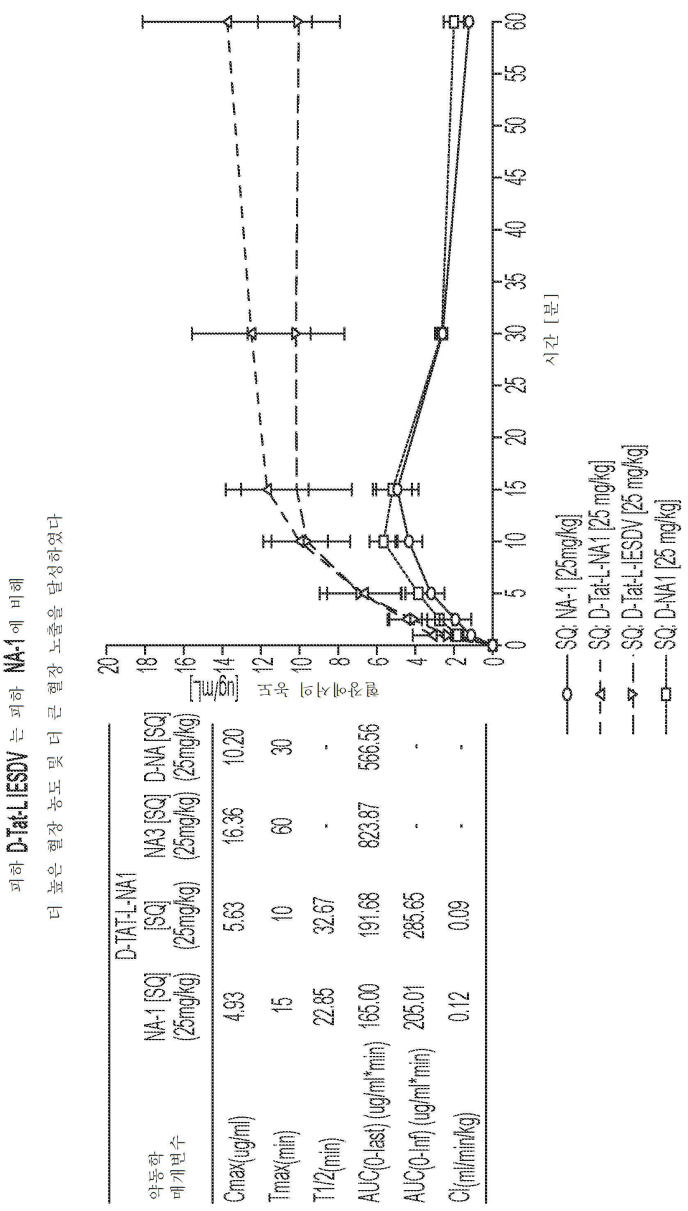
도면13



피하 **NA-1** 은 **IV NA-1**에 비해 유사한 혈장 노출을 달성하였다

약동학 매개변수	NA-1 IV (7.6mg/kg)	NA-1 IV (25mg/kg)	NA-1 IM (25mg/kg)	NA-1 SQ (25mg/kg)
Cmax(ug/ml)	22.27	54.28	11.37	4.93
Tmax(min)	1	1	5	15
T1/2(min)	12.40	17.10	34.40	22.85
AUC(0-last) (ug/ml*min)	130.59	266.94	467.21	165.00
AUC(0-inf) (ug/ml*min)	142.26	308.39	685.19	205.01
Cl(ml/min/kg)	0.05	0.08	0.04	0.12

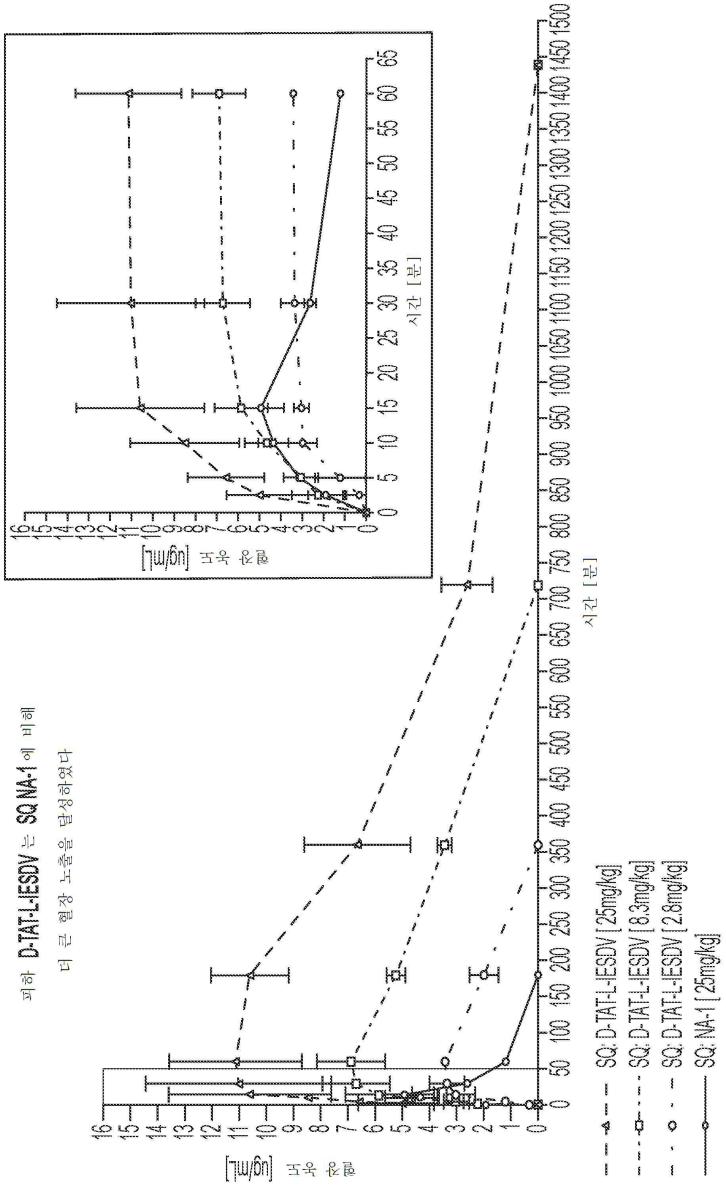
도면14


피하 D-Tat-L IESDV 는 피하 NA-1에 비해
더 높은 혈장 농도 및 더 큰 혈장 노출을 달성하였다
약동학 매개변수
D-TAT-L-NA1
NA-1 [SQ] (25mg/kg)
[SQ] (25mg/kg)
NA3 [SQ] (25mg/kg)
D-NA [SQ] (25mg/kg)
Cmax(ug/ml) 4.93 5.63 16.36 10.20
Tmax(min) 15 10 60 30
T1/2(min) 22.85 32.67 - -
AUC(0-last) (ug/ml*min) 165.00 191.68 823.87 566.56
AUC(0-inf) (ug/ml*min) 205.01 285.65 - -
Cl(ml/min/kg) 0.12 0.09 - -
혈장농도 [μg/ml]
시간 [분]
SQ. NA-1 [25mg/kg]
SQ. D-Tat-L-NA1 [25 mg/kg]
SQ. D-Tat-L-IESDV [25 mg/kg]
SQ. D-NA1 [25 mg/kg]

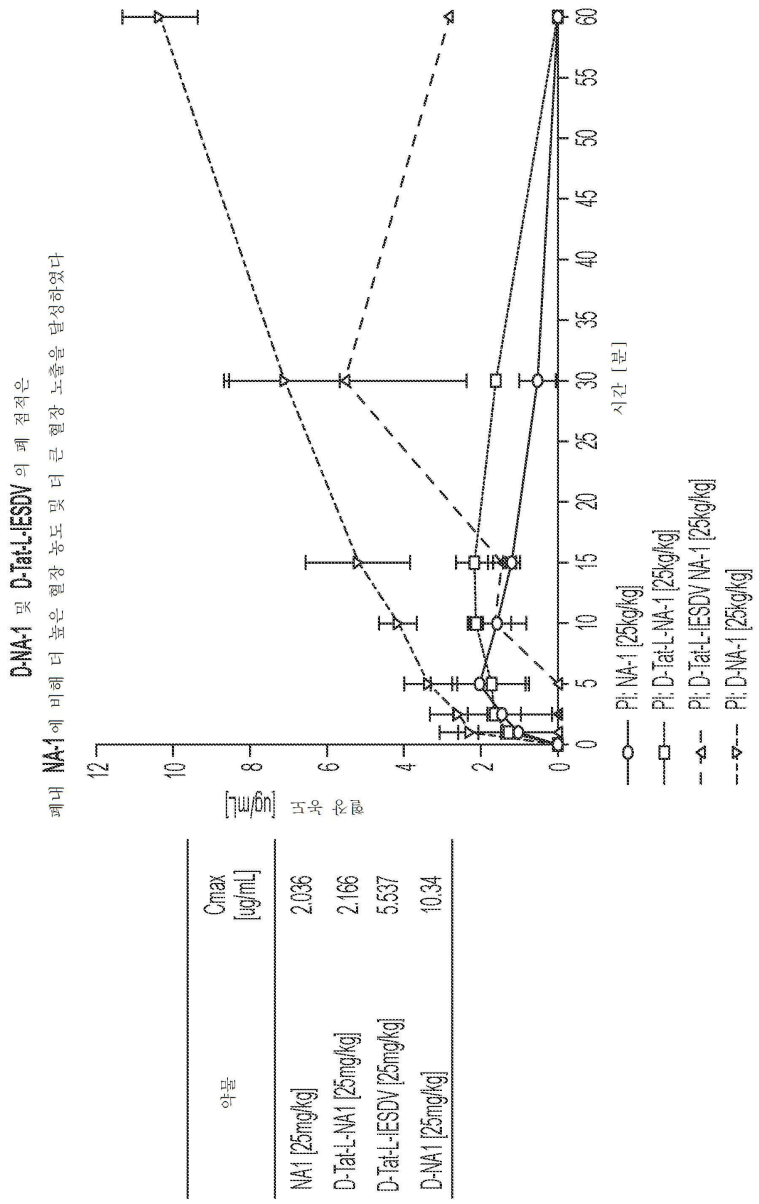
도면15a

약동학 매개변수	NA-1 SQ (25mg/kg)	NA-3 SQ (25mg/kg)	NA-3 SQ (8.3mg/kg)	NA-3 SQ (2.8mg/kg)
$Cmax_{(ug/ml)}$	4.93	11.16	6.89	3.42
$Tmax_{(min)}$	15	60	60	60
$T1/2_{(min)}$	22.85	267.08	300.24	200.62
$AUC_{(0\text{-}last)}$ (ug/ml*min)	165.00	5134.09	1862.66	503.79
$AUC_{(0\text{-}Inf)}$ (ug/ml*min)	205.01	6142.35	3355.93	684.26
$Cl_{(ml)}$ (min/kg)	0.12	0.004	0.002	

도면15b

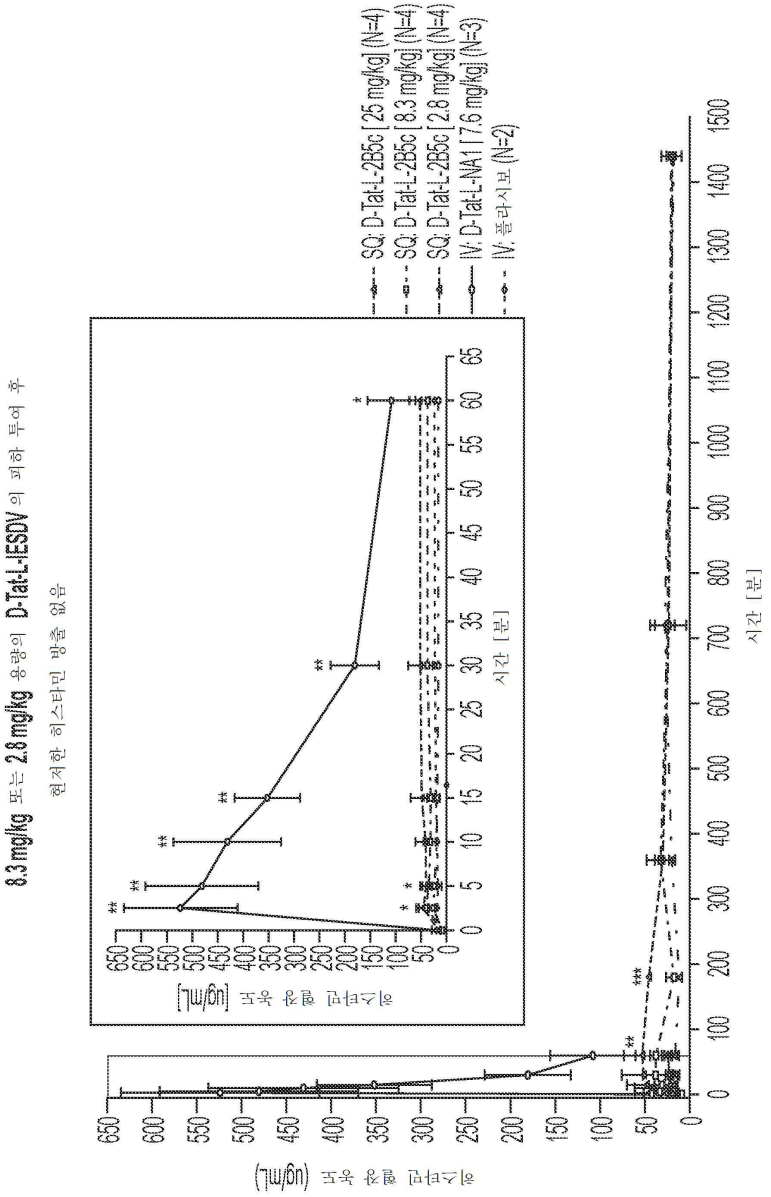

혈장 농도 [μg/mL]
시간 [분]
SQ: D-TAT-L-IESDV [25mg/kg]
SQ: D-TAT-L-IESDV [8.3mg/kg]
SQ: D-TAT-L-IESDV [2.8mg/kg]
SQ: NA-1 [25mg/kg]
피하 D-TAT-L-IESDV 는 SQ NA-1 에 비해
더 큰 혈장 노출을 달성하였다

도면16

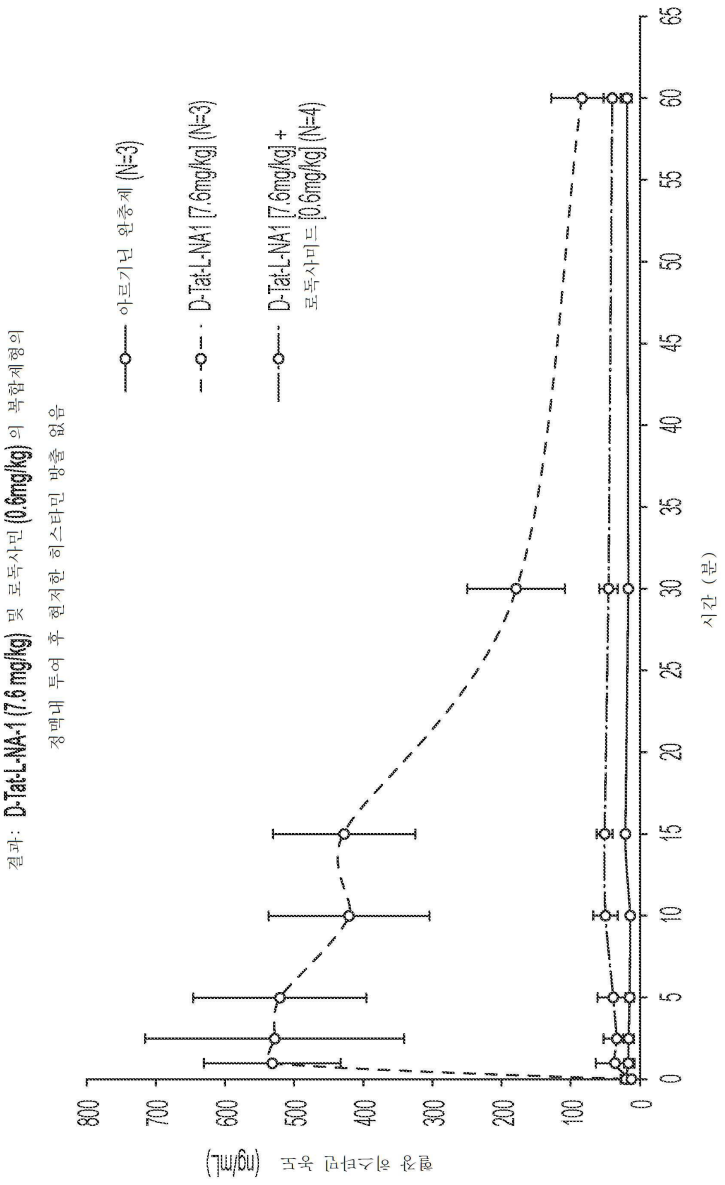


약물	Cmax [ug/mL]
NA1 [25mg/kg]	2.036
D-Tat-L-NA1 [25mg/kg]	2.166
D-Tat-L-IESDV [25mg/kg]	5.537
D-NA1 [25mg/kg]	10.34

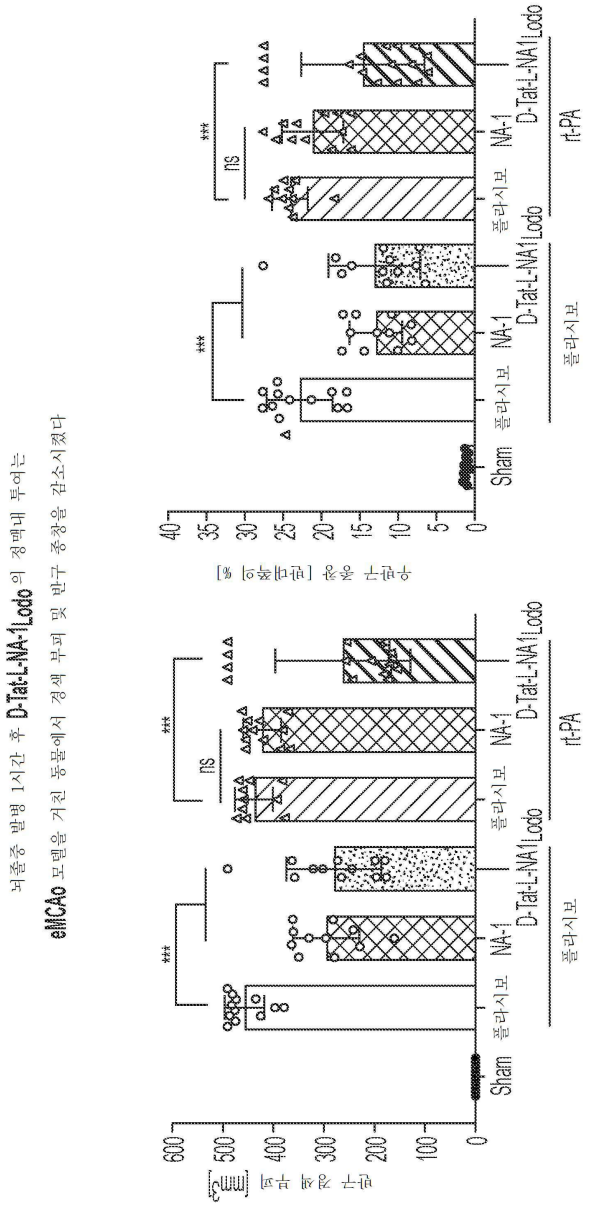
도면17


8.3 mg/kg 또는 2.8 mg/kg 용량의 D-Tat-LIESDV 의 피하 투여 후
혈장환 히스타민 방출 없음
SQ. D-Tat-L-2B5c (25 mg/kg) (N=4)
SQ. D-Tat-L-2B5c (8.3 mg/kg) (N=4)
SQ. D-Tat-L-2B5c (2.8 mg/kg) (N=4)
IV. D-Tat-L-NA117.6 mg/kg) (N=3)
IV. 플라시보 (N=2)
히스타민 혈장 농도 (ng/mL)
시간 (분)

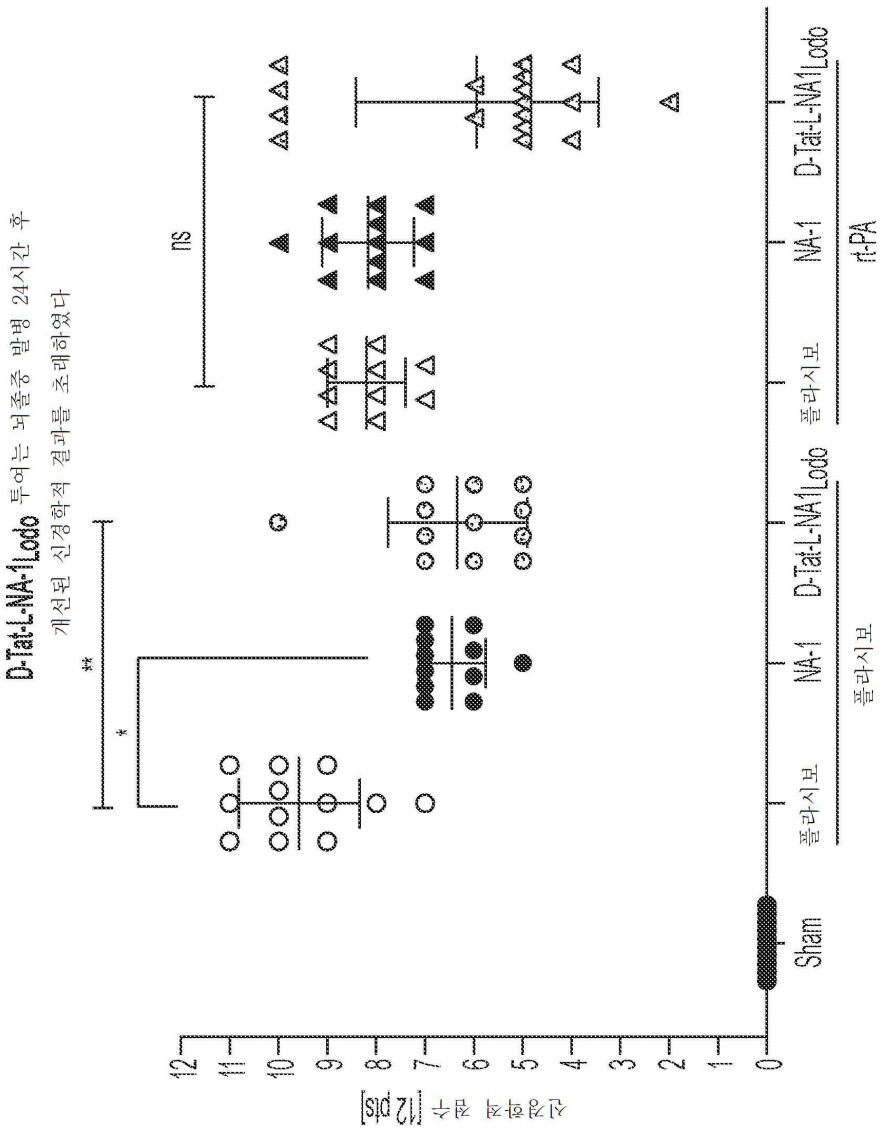
도면18


결과: D-Tat-L-NA-1 (7.6 mg/kg) 및 로독사민 (0.6mg/kg) 의 복합제형의
정맥내 투여 후 현저한 히스타민 방출 없음
아르기닌 완충제 (N=3)
D-Tat-L-NA1 [7.6mg/kg] (N=3)
D-Tat-L-NA1 [7.6mg/kg] +
로독사미드 [0.6mg/kg] (N=4)
혈장 히스타민 농도 (ng/mL)
시간 (분)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

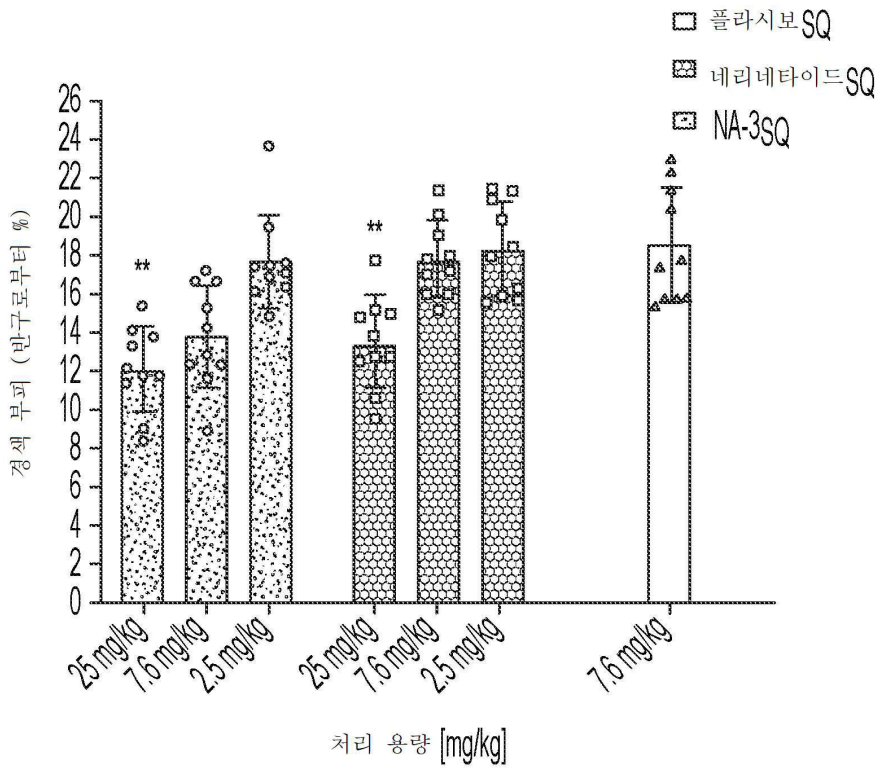
도면19


뇌졸중 발병 1시간 후 D-Tat-L-NA1Lodo의 정맥내 투여는
eMCAo 모델을 가진 동물에서 경색 부피 및 반구 종창을 감소시켰다
반구 경색 부피 [㎣]
반구 종창 [반대쪽의 %]
Sham
플라시보
NA-1
D-Tat-L-NA1Lodo
rt-PA
ns
***
ΔΔΔΔ

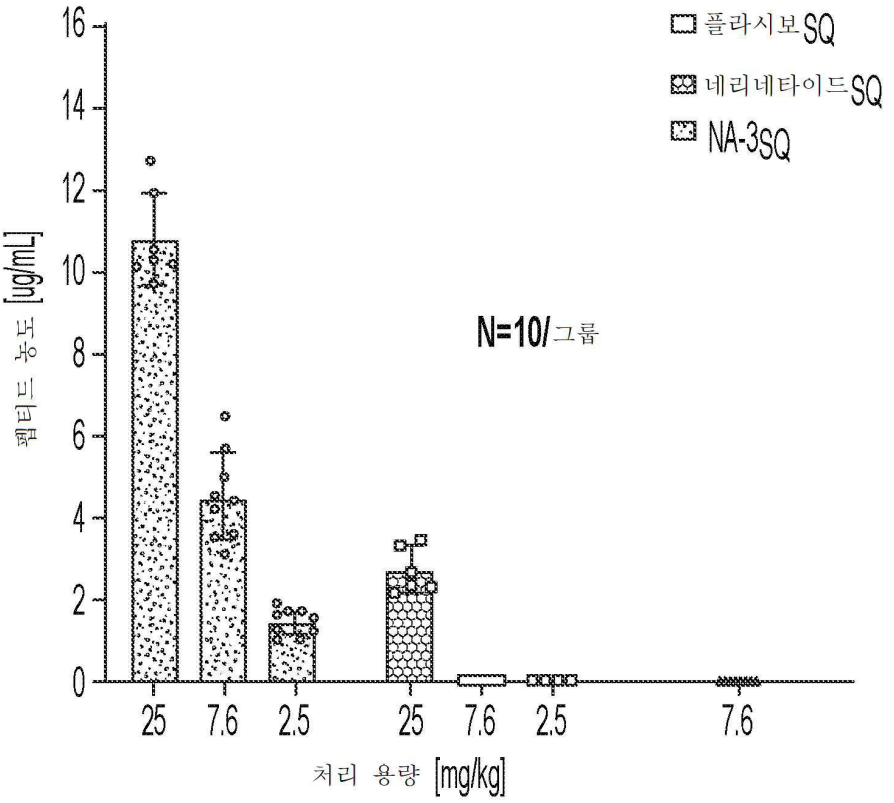
도면20


D-Tat-L-NA1Lodo 투여는 뇌졸중 발병 24시간 후
개선된 신경학적 결과를 초래하였다
신경학적 점수 (12 pts)
Sham
플라시보
NA-1
D-Tat-L-NA1Lodo
플라시보
플라시보
NA-1
D-Tat-L-NA1Lodo
rt-PA
ns
*
**

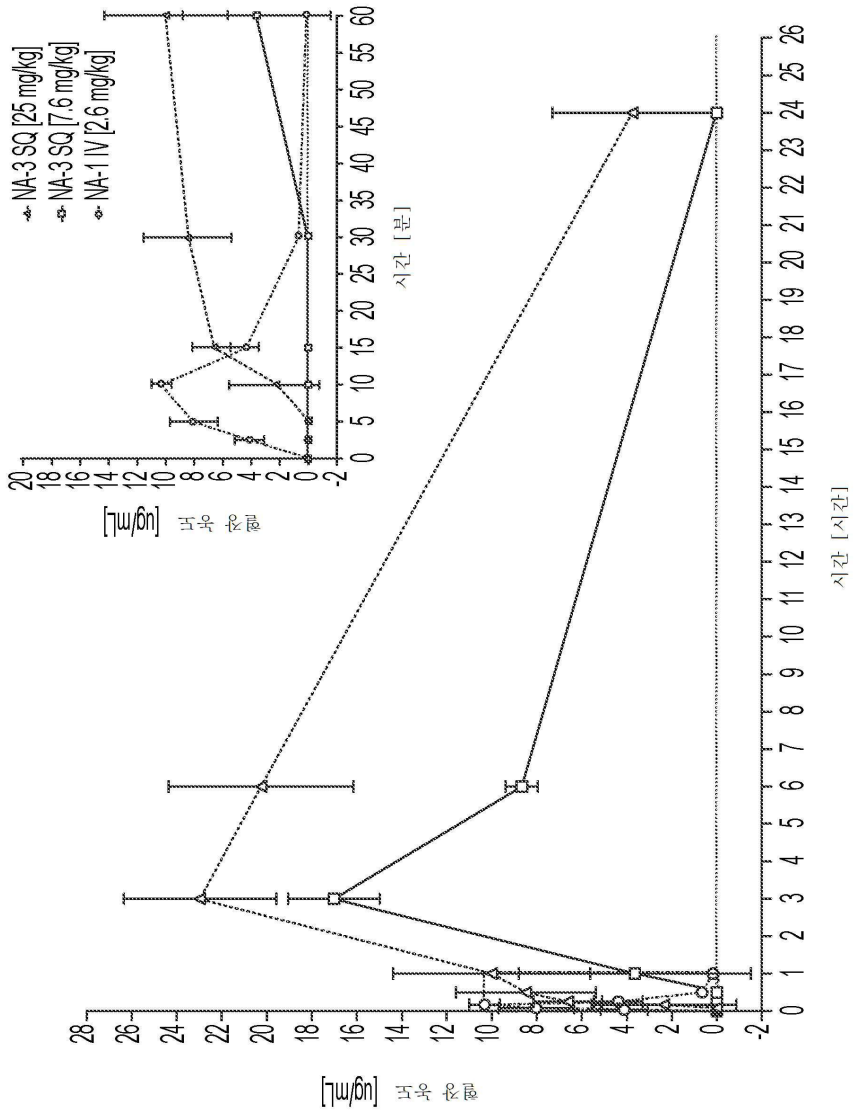
도면21


플라시보SQ
네리네타이드SQ
NA-3SQ
경색 부피 (반구로부터 %)
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
**
**
25 mg/kg
7.6 mg/kg
2.5 mg/kg
25 mg/kg
7.6 mg/kg
2.5 mg/kg
7.6 mg/kg
처리 용량 [mg/kg]

도면22


플라시보SQ
네리네타이드SQ
NA-3SQ
펩티드 농도 [ug/mL]
16
14
12
10
8
6
4
2
0
N=10/그룹
25
7.6
2.5
25
7.6
2.5
7.6
처리 용량 [mg/kg]

도면23


혈장 농도 [ug/mL]
시간 [시간]
혈장 농도 [ug/mL]
시간 [분]
NA-3 SQ [25 mg/kg]
NA-3 SQ [7.6 mg/kg]
NA-1 IV [2.6 mg/kg]

도면24

약동학 매개변수	네리네타이드 단독 (N=3)	NA-3 25mg/kg (N=5)	NA-3 7.6mg/kg (N=2)	NA-3 2.6mg/kg (N=3)
Cmax (ug/ml)	10.30 ± 0.69	24.06* ± 1.96	17.02 ± 2.05	-
t_{max} (h)	0.17 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	-
$t_{1/2}$ (h)	0.15 ± 0.03	10.84 ± 1.66	-	-
AUC(0-last) (ug/ml*h)	2.59 ± 0.14	342.19* ± 31.01	65.66* ± 4.97	-
AUC(0-Inf) (ug/ml*h)	2.63 ± 0.15	442.96 ± 53.60	-	-
Cl(ml/h/kg)	0.99 ± 0.06	0.05 ± 0.01	-	-

도면25

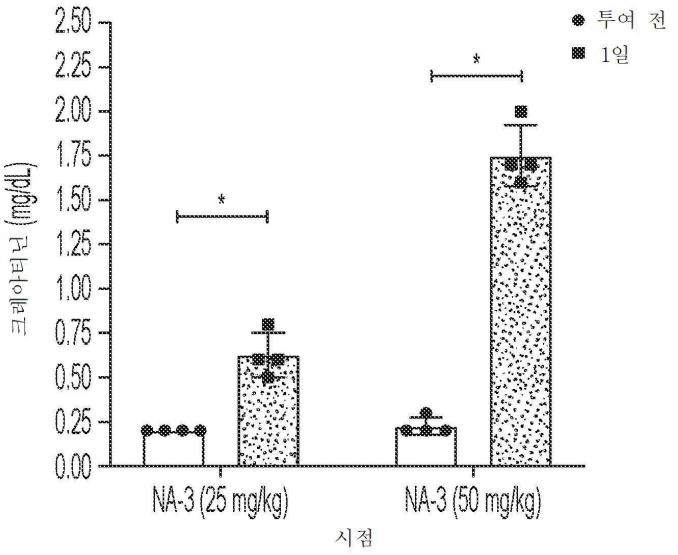
매개변수	기준선				네리네타이드 투여 30분 후		
	네리네타이드 IV 2.6 mg/kg (N=3)	NA-3 SQ 25mg/kg (N=5)	NA-3 SQ 7.6mg/kg (N=4)	NA-3 SQ 2.6mg/kg (N=3)	네리네타이드 IV 2.6 mg/kg (N=3)	NA-3 SQ 25mg/kg (N=5)	NA-3 SQ 7.6mg/kg (N=4)
온도 (C°)	36.60 ± 0.40	36.86 ± 0.61	37.18 ± 0.79	36.57 ± 0.55	-	-	-
심박수 (bpm)	130.33 ± 22.03	122.80 ± 9.01	124.00 ± 12.19	109.33 ± 17.10	120.67 ± 20.60	120.00 ± 6.67	119.25 ± 10.24
호흡률 (bpm)	29.33 ± 10.07	22.20 ± 2.95	23.75 ± 2.22	26.67 ± 13.80	28.67 ± 6.43	21.80 ± 2.49	24.50 ± 3.51
수축기 혈압 (mmHg)	81.00 ± 5.20	71.60 ± 17.83	84.25 ± 31.19	76.00 ± 12.12	67.00 ± 3.46	69.20 ± 6.18	68.50 ± 4.95
확장기 혈압 (mmHg)	33.33 ± 3.21	31.60 ± 5.77	53.50 ± 29.33	36.67 ± 8.74	36.00 ± 12.49	27.20 ± 4.87	26.50 ± 0.71
평균 동맥 혈압 (mmHg)	49.33 ± 0.58	45.00 ± 7.04	64.25 ± 30.90	49.67 ± 9.71	46.67 ± 7.57	41.20 ± 2.28	40.50 ± 0.71
O_2 포화도 (%)	93.67 ± 1.53	94.00 ± 3.54	96.50 ± 2.52	95.67 ± 4.16	96.00 ± 2.00	94.40 ± 2.30	93.25 ± 4.65
ET CO_2 (mmHg)	42.00 ± 2.00	41.20 ± 2.05	44.75 ± 2.06	42.67 ± 5.69	42.00 ± 2.65	41.00 ± 2.12	44.50 ± 3.32

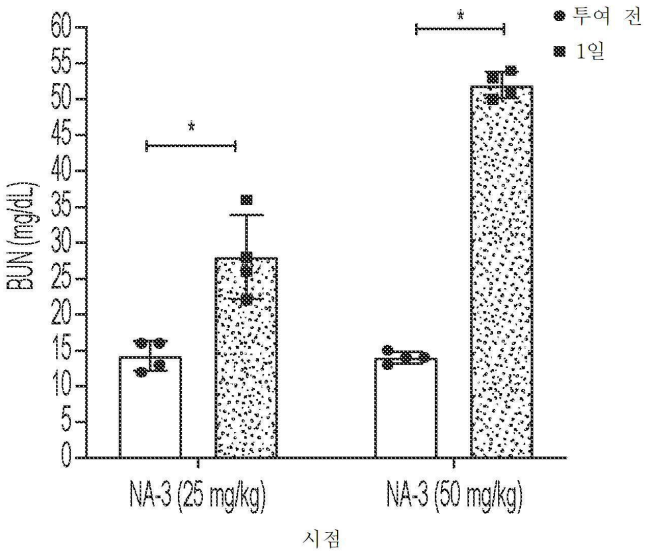
	네리네타이드 투여 60분 후				
매개변수	NA-3 SQ 2.6mg/kg (N=3)	네리네타이드 IV 2.6 mg/kg (N=3)	NA-3 SQ 25mg/kg (N=5)	NA-3 SQ 7.6mg/kg (N=4)	NA-3 SQ 2.6mg/kg (N=3)
온도 (C°)	-	-	-	-	-
심박수 (bpm)	103.67 ± 14.22	125.67 ± 14.22	123.40 ± 16.86	129.75 ± 20.27	110.67 ± 12.86
호흡률 (bpm)	23.67 ± 10.41	32.67 ± 10.41	24.40 ± 4.62	26.25 ± 4.27	24.67 ± 11.15
수축기 혈압 (mmHg)	70.67 ± 17.04	76.33 ± 17.04	75.60 ± 14.94	89.67 ± 18.90	70.67 ± 18.88
확장기 혈압 (mmHg)	38.67 ± 11.93	33.00 ± 11.93	33.60 ± 11.30	36.33 ± 9.07	34.00 ± 11.14
평균 동맥 혈압 (mmHg)	49.00 ± 13.08	47.33 ± 13.08	47.60 ± 11.63	54.00 ± 12.17	46.00 ± 13.75
O_2 포화도 (%)	97.00 ± 0.00	93.67 ± 0.00	92.00 ± 3.67	95.00 ± 2.94	97.33 ± 0.58
ET CO_2 (mmHg)	39.67 ± 4.73	42.67 ± 4.73	41.00 ± 2.12	43.75 ± 1.89	40.67 ± 4.73

도 25
계속

공개특허 10-2023-0141958

도면26a


투여 전
1일
2.50
2.25
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
크레아티닌 (mg/dL)
*
*
NA-3 (25 mg/kg)
NA-3 (50 mg/kg)
시점


투여 전
1일
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
BUN (mg/dL)
*
*
NA-3 (25 mg/kg)
NA-3 (50 mg/kg)
시점

도면26b

매개변수	참조 범위	NA-3SQ 25 mg/kg (N=4)		NA-3SQ 7.6 mg/kg (N=4)	NA-3SQ 2.6 mg/kg (N=3)	NA-1IV 2.6 mg/kg (N=3)
		7일	14일	7일	7일	7일
전해질						
소듐 (Na^+)(mmol/L)	**147 - 155**	137.5 ± 2.65	144.5 ± 5.0	159.8 ± 0.96	144.0 ± 0.00	145.3 ± 0.58
포타슘 (K^+)(mmol/L)	**4.7 - 5.7**	***5.9 ± 0.48***	4.6 ± 0.15	8.5 ± 0.00	3.9 ± 0.47	4.0 ± 0.36
총 칼슘 (CA)(mg/dL)	**9.9 - 10.9**	11.9 ± 0.21	10.2 ± 0.42	4.0 ± 0.00	10.1 ± 0.26	10.0 ± 0.10
인 (Phos)(mg/dL)	**3.8 - 5.6**	***9.1 ± 3.26 ****	3.2 ± 2.01	2.05 ± 0.51	2.97 ± 0.38	3.5 ± 0.55

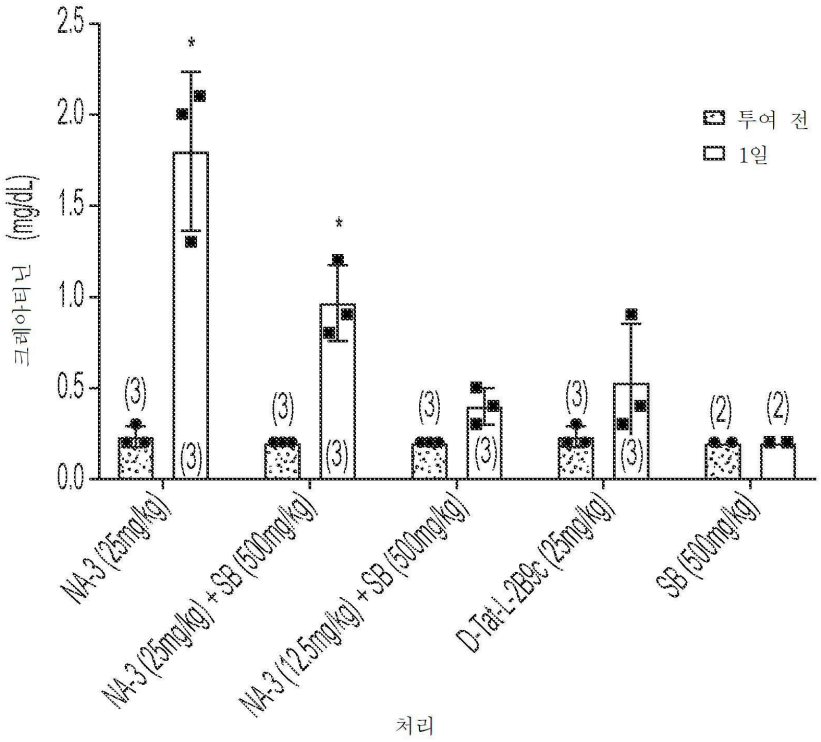
매개변수	참조 범위	NA-3SQ 25 mg/kg (N=4)		NA-3SQ 7.6 mg/kg (N=4)	NA-3SQ 2.6 mg/kg (N=3)	NA-1IV 2.6 mg/kg (N=3)
		7일	14일	7일	7일	7일
화학						
알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT)(U/L)	**24 - 78**	89.3 ± 7.80	43.8 ± 7.80	53.0 ± 18.28	39.67 ± 3.06	35.0 ± 13.53
알칼리성 포스파타제 (ALP)(U/L)	**55 - 237**	109.5 ± 16.30	129.5 ± 17.71	30.75 ± 9.91	74.33 ± 22.81	108.7 ± 19.63
알부민 (ALB)(g/dL)	**3.8 - 4.8**	3.95 ± 0.42	4.05 ± 0.45	4.28 ± 0.25	4.70 ± 0.26	4.27 ± 0.15
아밀라제 (AMY)(U/L)	**117 - 389**	***773.5 ± 208.31 ****	296.0 ± 53.96	279.25 ± 26.27	191.33 ± 38.21	242.3 ± 20.31
총 단백질 (TP)(mg/dL)	**7.3 - 8.3**	8.3 ± 0.35	7.1 ± 0.35	7.0 ± 0.08	7.5 ± 0.45	7.4 ± 0.21
총 빌리루빈 (TBIL)(U/L)	**0.0 - 0.3**	0.23 ± 0.05	0.25 ± 0.10	0.30 ± 0.0	0.40 ± 0.0	0.30 ± 0.1
글로불린 (GLOB)(g/dL)	**2.8 - 3.4**	4.4 ± 0.57	3.0 ± 0.67	2.73 ± 0.24	2.87± 0.47	3.1 ± 0.12
글루코스 (GLU)(mg/dL)	**55 - 89**	85.8 ± 7.23	68.8 ± 8.66	67.0 ± 7.75	71.0 ± 7.81	76.3 ± 10.69
크레아티닌 (CRE)(mg/dL)	**1.0 - 1.4**	***19.9 ± 0.15 ****	1.3 ± 0.19	1.1 ± 0.28	1.0 ± 0.06	0.8 ± 0.21
혈액 요소 질소 (BUN)(mg/dL)	**22 - 30**	***151.3 ± 27.57 ****	18.0 ± 2.0	19.25 ± 1.26	18.33 ± 2.31	20.0 ± 3.61

도 26b

계속

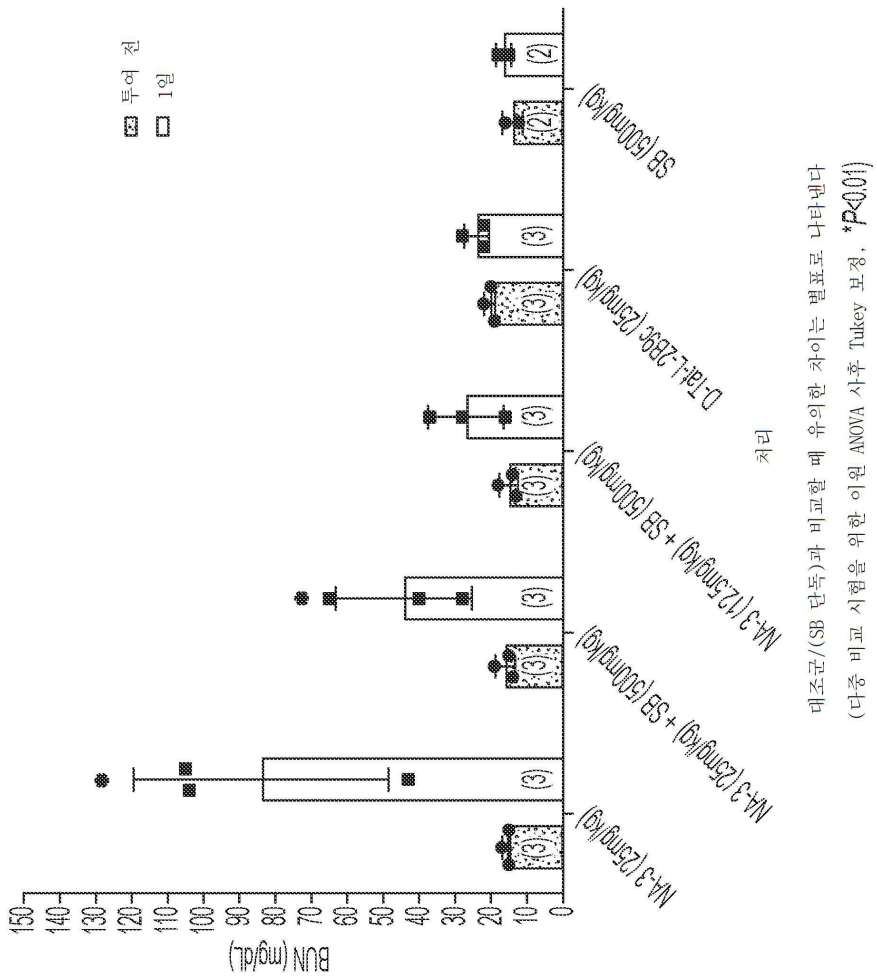
공개특허 10-2023-0141958

도면27



대조군/(SB 단독)과 비교할 때 유의한 차이는 별표로 나타낸다
(다중 비교 시험을 위한 이원 ANOVA 사후 Tukey 보정, *$P<0.01$)

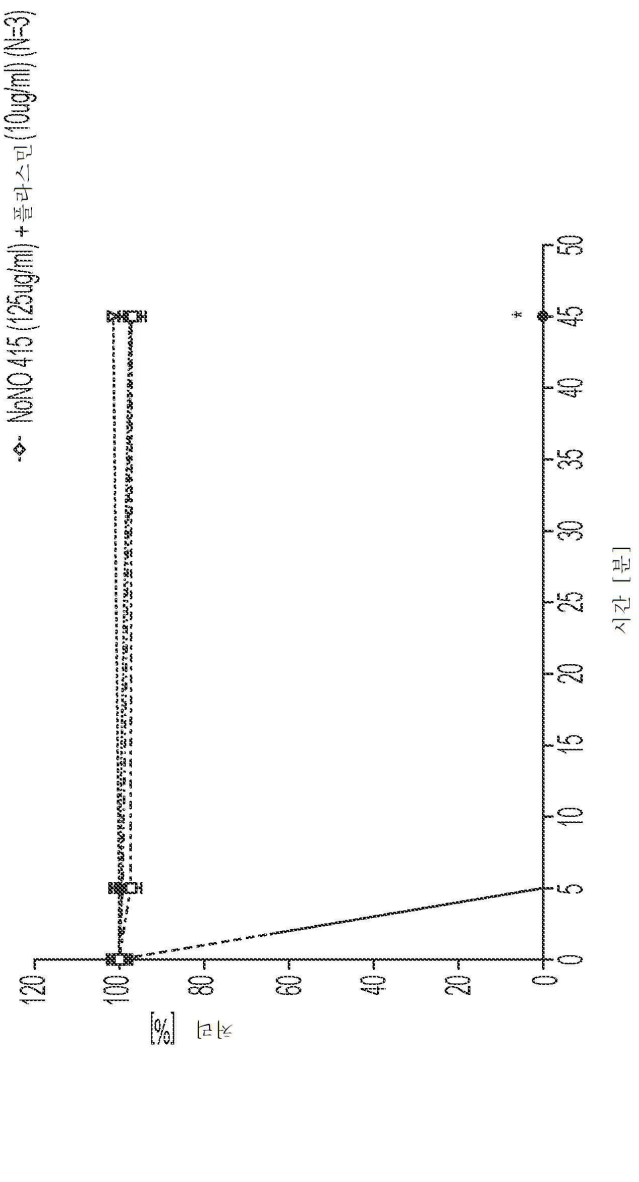
도면28



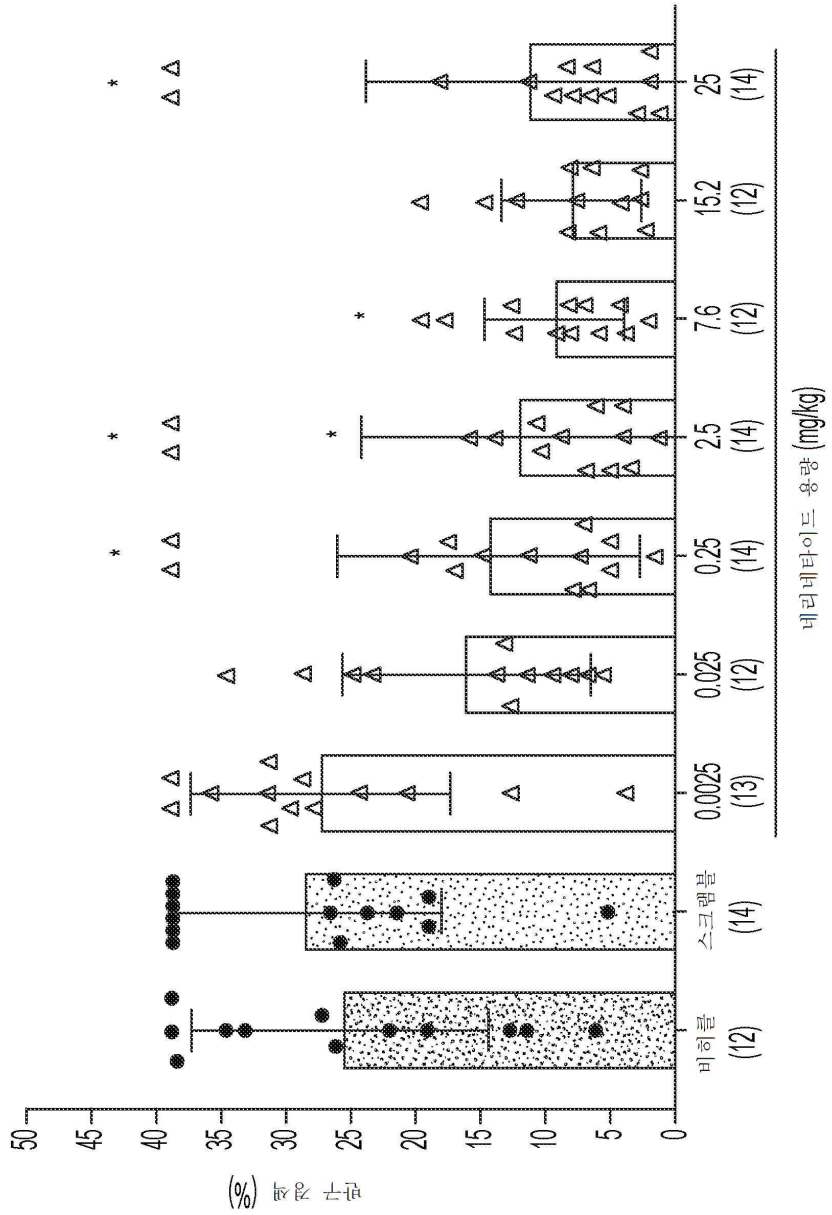
대조군/(SB 단독)과 비교할 때 유의한 차이는 별표로 나타낸다
(다중 비교 사험을 위한 이원 ANOVA 사후 Tukey 보정, *P<0.01)

도면29

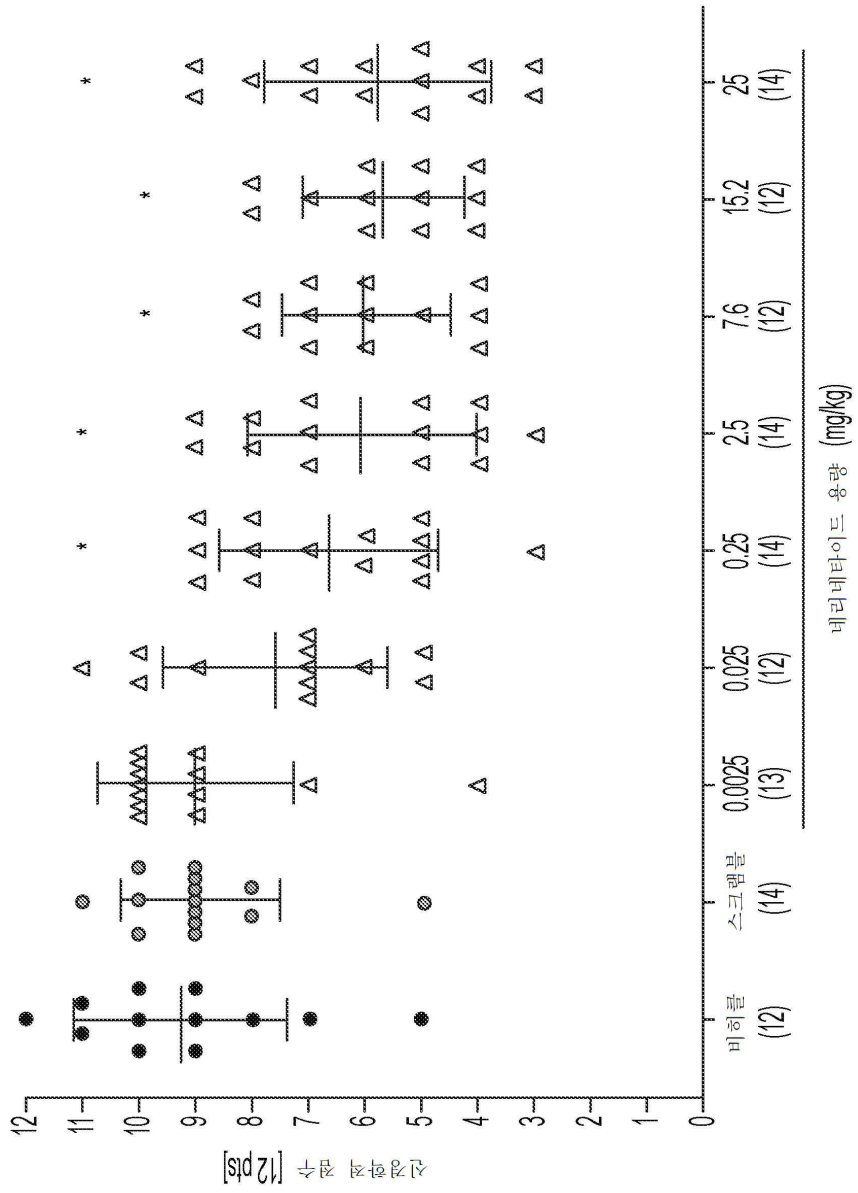
명칭	서열	MW
NoNO 411	RkkrrQrRrIESDV	1883.22
NoNO 414	RKkRQrrRIESDV	1883.22
NoNO 415	rKKRrQrRRIESDV	1883.22



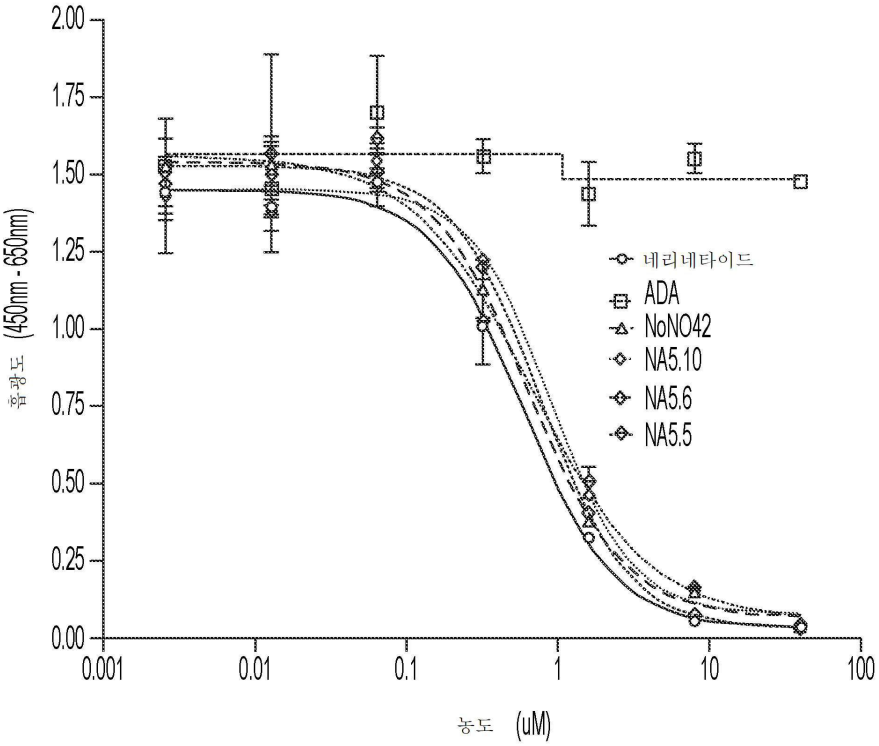
도면30a


뇌구 경색 (%)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
비히클 (12)
스크램블 (14)
0.0025 (13)
0.025 (12)
0.25 (14)
2.5 (14)
7.6 (12)
15.2 (12)
25 (14)
네리네타이드 용량 (mg/kg)

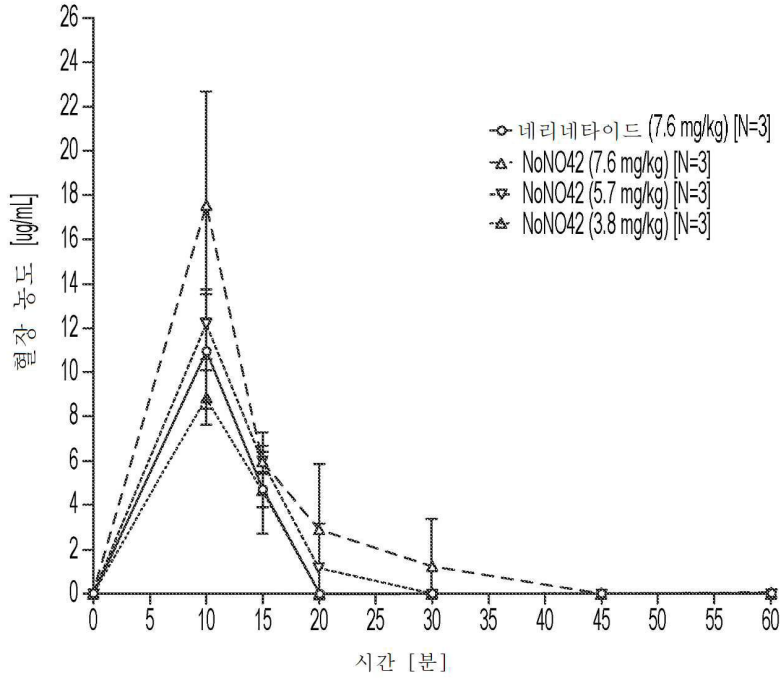
도면30b


신경학적 점수 [12 pts]
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
비히클 (12)
스크램블 (14)
0.0025 (13)
0.025 (12)
0.25 (14)
2.5 (14)
7.6 (12)
15.2 (12)
25 (14)
네라네타이드 용량 (mg/kg)

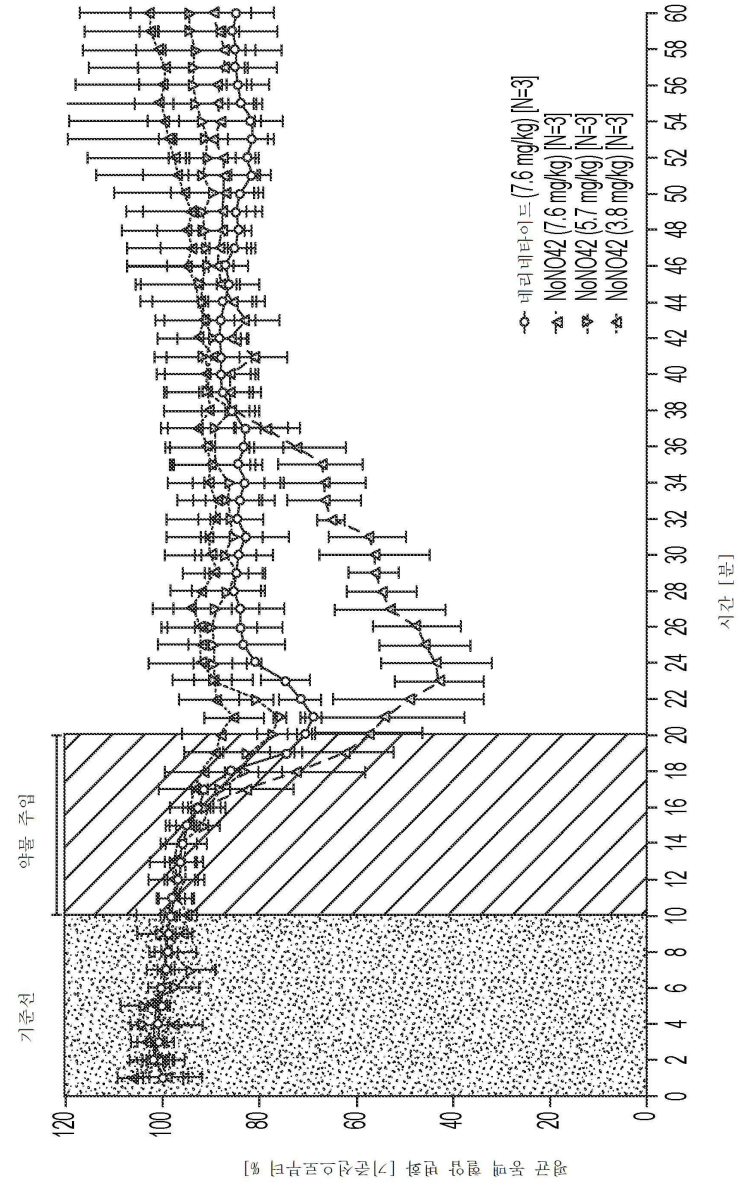
도면31


2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
흡광도 (450nm - 650nm)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
농도 (uM)
네리네타이드
ADA
NoNO42
NA5.10
NA5.6
NA5.5

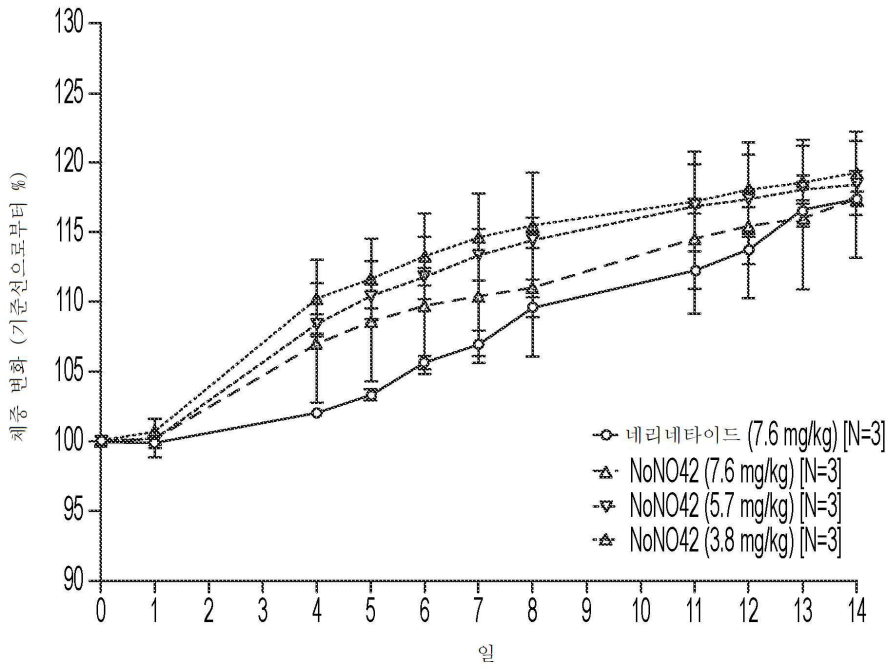
도면32


혈장 농도 [ug/mL]
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
시간 [분]
네리네타이드 (7.6 mg/kg) [N=3]
NoNO42 (7.6 mg/kg) [N=3]
NoNO42 (5.7 mg/kg) [N=3]
NoNO42 (3.8 mg/kg) [N=3]

도면33


평균 동맥 혈압 변화 [기준선으로부터 %]
120
100
80
60
40
20
0
기준선
약물 주입
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60
시간 [분]
네라네타이드 (7.6 mg/kg) [N=3]
NoNO42 (7.6 mg/kg) [N=3]
NoNO42 (5.7 mg/kg) [N=3]
NoNO42 (3.8 mg/kg) [N=3]

도면34



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> NONO INC.

TYMIANSKI, MICHAEL

GARMAN, JONATHAN DAVID

MAYOR, DIANA

<120> PLASMIN-RESISTANT PEPTIDES FOR IMPROVED THERAPEUTIC INDEX

<130> 057769-572703

<150> US 63/135,498

<151> 2021-01-08

<150> US 63/147,711

<151> 2021-02-09

<150> US 63/221,874

<151> 2021-07-14

<160> 142

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 1

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 2

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Glu, Asp, Asn, or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Ser or Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Asp, Glu, Gln, or Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Val or Leu

<400> 3

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Ser or Thr

<400> 4

Ile Glu Xaa Asp Val

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 5

Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(15)

<223> D-amino acids

<400> 6

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(14)

<223> D-amino acids

<400> 7

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Ser Ser Ile Glu

1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(13)

<223> D-amino acids

<400

> 8

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Ser Ile Glu Ser

1 5 10 15

Asp Val

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(12)

<223> D-amino acids

<400> 9

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Ile Glu Ser Asp

1 5 10 15

Val

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Glu, Asp, Asn, or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Ser or Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Asp, Glu, Gln, or Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Val or Leu

<400> 10

Ile Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213>

Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 11

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 12

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 13

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 14

Glu Ser Asp Val

1

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 15

Glu Ser Glu Val

1

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 16

Glu Thr Asp Val

1

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 17

Glu Thr Ala Val

1

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 18

Glu Thr Glu Val

1

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 19

Asp Thr Asp Val

1

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 20

Asp Thr Glu Val

1

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223

> Synthesized

<400> 21

Ile Glu Ser Glu Val

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 22

Ile Glu Thr Asp Val

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 23

Ile Glu Thr Ala Val

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 24

Ile Glu Thr Glu Val

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 25

Ile Asp Thr Asp Val

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 26

Ile Asp Thr Glu Val

1 5

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Glu, Gln, Ala, or Asp, or an analog thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Thr or Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Ala, Gln, Asp, Glu, Asn, N-Me-Ala, N-Me-Gln, N-Me-Asp, N-Me-Asn, or an analog thereof

<400> 27

Xaa Xaa Xaa Val

1

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Glu, Gln, Ala, or Asp, or an analog thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Thr or Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Ala, Gln, Asp, Glu, Asn, N-Me-Ala, N-Me-Gln, N-Me-Asp, N-Me-Asn, or an analog thereof

<400> 28

Ile Xaa Xaa Xaa Val

1 5

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 29

Arg Leu Ser Gly Met Asn Glu Val Leu Ser Phe Arg Trp Leu

1 5 10

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 30

Gly Ser Ser Ser Ser

1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 31

Thr Gly Glu Lys Pro

1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 32

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 33

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro

1 5

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 34

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln

1 5 10

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 35

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln

1 5 10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 36

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro

1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is an amino acid other than Tyr

<400> 37

Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400

> 38

Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 39

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly

1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 40

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 10

<212

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 41

Gly Lys Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys

1 5 10

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 42

Gly Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 43

Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 44

Gly Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 45

Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 46

Gly Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 47

Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 48

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 49

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg

1 5

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 50

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg

1 5 10

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 51

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg

1 5

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<

220><223> Synthesized

<400> 52

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg

1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 53

Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 54

Arg Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 55

Arg Arg Arg Pro Arg Arg Arg Pro Arg Arg

1 5 10

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 56

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 57

Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg

1 5

<210> 58

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 58

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 59

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(16)

<223> D-amino acids

<400> 59

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(14)

<223> D-amino acids

<400> 60

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(13)

<223> D-amino acids

<400> 61

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(15)

<223> D-amino acids

<400> 62

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Thr Asp Val

20

<210> 63

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221>

MISC_FEATURE

<222> (3)..(16)

<223> D-amino acids

<400> 63

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Thr Asp Val

20

<210> 64

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(14)

<223> D-amino acids

<400> 64

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Thr Asp Val

20

<210> 65

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(14)

<223> D-amino acids

<400> 65

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Ser Ser Ile Glu

1 5 10 15

Thr Asp Val

<210> 66

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(13)

<223> D-amino acids

<400> 66

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Ser Ile Glu Thr
1 5 10 15

Asp Val

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(12)

<223> D-amino acids

<400> 67

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Ile Glu Thr Asp
1 5 10 15

Val

<210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(11)

<223> D-amino acids

<400> 68

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ile Glu Ser Asp Val

1 5 10 15

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(11)

<223> D-amino acids

<400> 69

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ile Glu Thr Asp Val

1 5 10 15

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223

> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> D-amino acids

<400> 70

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<400> 71

Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 72

Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 73

Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 74

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 74

Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> D-amino acids

<400> 75

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val

1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<400> 76

Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val

1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 77

Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 78

Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val

1 5

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 79

Ser Ile Glu Thr Asp Val

1 5

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(11)

<223> D-amino acids

<400> 80

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 81

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(20)

<223> D-amino acids

<400> 81

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 82

Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5 10 15

<210> 83

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 83

Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5 10

<210> 84

<211> 13

<212

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 84

Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5 10

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 85

Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5 10

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 86

Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5 10

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 87

Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(11)

<223> D-amino acids

<400> 88

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(7)

<223> D-amino acids

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(11)

<223> D-amino acids

<400> 89

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(7)

<223> D-amino acids

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> D-amino acid

<400> 90

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<220><

221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> D-amino acid

<400> 91

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<400> 92

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> D-amino acid

<400> 93

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(7)

<223> D-amino acids

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(11)

<223> D-amino acids

<400> 94

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(10)

<223> D-amino acids

<400> 95

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Val

1 5 10

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(11)

<223> D-amino acids

<400> 96

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 97

<211> 9

<212

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> D-amino acids

<400> 97

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(5)

<223> D-amino acids

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<400> 98

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(5)

<223> D-amino acids

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(8)

<223> D-amino acids

<400> 99

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(5)

<223> D-amino acids

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(8)

<223> D-amino acids

<400> 100

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<400> 101

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(8)

<223> D-amino acids

<400> 102

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<400> 103

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<400> 104

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<400> 105

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 106

<211>

9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<400> 106

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<400> 107

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<400> 108

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<400> 109

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 110

<211

> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(5)

<223> D-amino acids

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<400> 110

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ile Glu Ser Asp Val

1 5 10

<210> 111

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(8)

<223> D-amino acids

<400> 111

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ile Glu Ser Asp Val

1 5 10

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223

> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<400> 112

Arg Lys Lys Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ile Glu Ser Asp Val

1 5 10

<210> 113

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 113

Lys Leu Ser Ser

1

<210> 114

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> D-amino acid

<400> 114

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 115

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> D-amino acid

<400> 115

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 116

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> D-amino acid

<400> 116

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> D-amino acids

<400> 117

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 118

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(18)

<223> D-amino acids

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> D-amino acid

<400> 118

Val Asp Ser Glu Ile Ser Ser Leu Lys Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys

1 5 10 15

Lys Arg Gly Tyr

20

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(9)

<223> D-amino acids

<400> 119

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Val

1 5 10

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222>

(3)..(11)

<223> D-amino acids

<400> 120

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(9)

<223> D-amino acids

<400> 121

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<400> 122

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> D-amino acid

<400> 123

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 124

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 124

Tyr Gly Arg Lys

1

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 125

Tyr Gly Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 126

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(12)

<223> D-amino acids

<400> 126

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 127

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> acetylated

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(12)

<223> D-amino acid

<400> 127

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 128

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> D-amino acid

<400> 128

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 129

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> acetylated

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223>

D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> D-amino acid

<400> 129

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 130

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> acetylated

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> D-amino acid

<400> 130

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 131

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> D-amino acid

<400> 131

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 132

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<400> 132

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Glu Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 133

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<400> 133

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 134

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<400> 134

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ile Glu Ser Asp Val

1 5 10

<210> 135

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> D-amino acids

<400> 135

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ile Glu Ser Asp Val

1 5 10

<210> 136

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> D-amino acid

<400> 136

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 137

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(13)

<223> D-amino acids

<400> 137

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 138

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> D-amino acid

<400> 138

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 139

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> D-amino acid

<400> 139

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 140

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<400> 140

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Trp Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 141

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> D-amino acid

<400> 141

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 142

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> D-amino acid

<400> 142

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20