

(11) 공개번호 10-2023-0092954
(43) 공개일자 2023년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2020.05)
A61P 27/02 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2023-7016105

(22) 출원일자(국제) 2021년10월13일
 심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2023년05월11일

(86) 국제출원번호 PCT/KR2021/014090

(87) 국제공개번호 WO 2022/080847
 국제공개일자 2022년04월21일

(30) 우선권주장
 1020200131953 2020년10월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
 재단법인 아산사회복지재단
 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
 울산대학교 산학협력단
 울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자
 이준엽
 서울특별시 송파구 석촌호수로 61
 김수진
 대구광역시 남구 성당로 52

(74) 대리인
 이명진

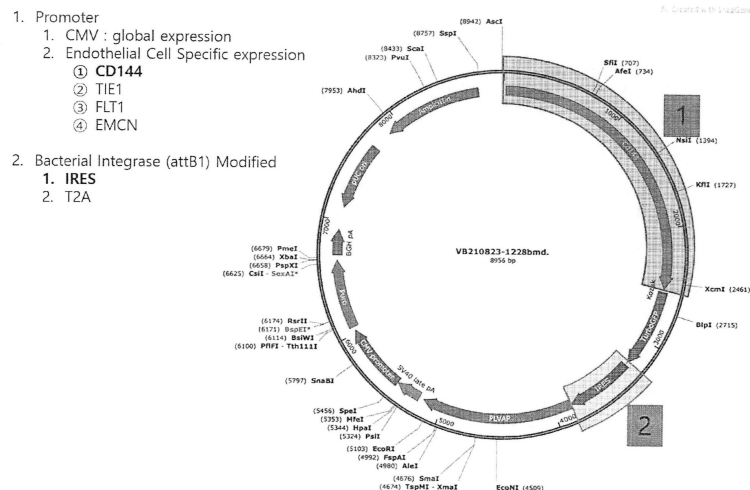
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 PLVAP를 유효성분으로 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 PLVAP를 유효성분으로 포함하는 망막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것으로, 본 발명자들은 PLVAP의 감소가 맥락막혈관의 초미세구조의 변화를 초래하여 망막변성을 유발할 수 있음을 기초로 하여, PLVAP 플라스미드 DNA를 망막 질환 동물모델에 투여함에 따라 맥락막혈관의 구조와 기능을 유지하면서, 맥락막혈관의 정상적인 기능 유지에 중요한 친공을 증가시키는 효과를 나타냄을 확인하였다. 따라서, PLVAP 단백질 또는 유전자를 망막 또는 맥락막 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/47 (2013.01)

C12N 15/85 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제(activator), 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 유효성분으로 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PLVAP 단백질은 서열번호 25로 표시되는 아미노산 서열, 또는 이와 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 PLVAP 단백질은 PLVAP 단백질, 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 융합 단백질인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 재조합 벡터에 포함되는 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 프로모터, 인핸서, 인트론, 리포터 마커 서열, 단백질 정제 태그, 종결 서열, mRNA 안정화 서열, 외생성 유전자의 서열, 세포 선택 마커 서열, 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 혈관내피세포에서 특이적인 발현을 유도하는 프로모터를 포함하며, 상기 프로모터는 CD144, TIE1, FLT1, 및 EMCN으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 망막 또는 맥락막 질환은 혈관 투과성 관련 망막 또는 맥락막 질환인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 망막 또는 맥락막 질환은 색소성 망막염 (RP), 레베르 선천 흑암시 (LCA), 스타가르트병, 어서 증후군, 맥락막 결어, 로드-콘 또는 콘-로드 디스트로피, 섬모병증, 미토콘드리아 장애, 진행성 망막 위축증, 퇴행성 망막 질환, 나이관련황반변성 (AMD), 습성 AMD, 건성 AMD, 중심장액맥락망막병증, 맥락막비후 질환군, 변성근시, 결절성 맥락막망막병증, 맥락막망막염, 맥락막 종양, 맥락막신생혈관, 유전성 맥락막질환, 지도상 위축증, 가족형 또는 획득 황반병증, 망막 광수용체 질환, 망막 색소 상피계 질환, 당뇨병성 망막증, 당뇨맥락망막병증, 낭포성

황반 부종, 포도막염, 망막박리, 외상성 망막 손상, 의원성 망막 손상, 황반 원공, 황반 모세관확장증, 신경절 세포 질환, 시신경 세포 질환, 녹내장, 시신경병증, 허혈성 망막 질환, 미숙아 망막증, 망막 혈관 폐색, 가족형 마크로아뉴리즘, 망막 혈관 질환, 안혈관 질환, 녹내장으로 인한 망막신경세포 퇴화, 허혈성 시신경병증, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1로 표시되는 염기서열, 또는 이와 80% 이상의 상동성을 갖는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 비강 내, 근육 내, 정맥 내, 동맥 내 및 안국소 투여로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 경로로 개체에 투여되도록 제형화된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 안국소 투여는 결막낭 내 투여, 유리체 내 투여, 망막하 투여, 맥락막 상강 투여, 결막 하 투여, 테논낭 하 투여, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 내피세포의 천공(fenestration)을 회복시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 항VEGF제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 15

PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방 또는 치료용 의약품 조성물.

청구항 16

PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방, 개선 또는 치료 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1로 표시되는 염기서열, 또는 이와 80% 이상의 상동성을 갖는 염기서열을

포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 비강 내, 근육 내, 정맥 내, 동맥 내 및 안국소 투여로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 경로로 개체에 투여되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 19

제16항에 있어서,

상기 개체는 망막 또는 맥락막 질환의 치료를 필요로 하는 개체로서,

상기 망막 또는 맥락막 질환은 색소성 망막염 (RP), 레베르 선천 흑암시 (LCA), 스타가르트병, 어서 증후군, 맥락막 결여, 로드-콘 또는 콘-로드 디스트로피, 섬모병증, 미토콘드리아 장애, 진행성 망막 위축증, 퇴행성 망막 질환, 나이관련황반변성 (AMD), 습성 AMD, 건성 AMD, 중심장액맥락망막병증, 맥락막비후 질환군, 변성근시, 결절성 맥락막병증, 맥락막막염, 맥락막 종양, 맥락막신생혈관, 유전성 맥락막질환, 지도상 위축증, 가족형 또는 획득 황반병증, 망막 광수용체 질환, 망막 색소 상피계 질환, 당뇨병성 망막증, 당뇨맥락막망막병증, 낭포성 황반 부종, 포도막염, 망막박리, 외상성 망막 손상, 의원성 망막 손상, 황반 원공, 황반 모세관확장증, 신경절 세포 질환, 시신경 세포 질환, 녹내장, 시신경병증, 허혈성 망막 질환, 미숙아 망막증, 망막 혈관 폐색, 가족형 마크로아뉴리즘, 망막 혈관 질환, 안혈관 질환, 녹내장으로 인한 망막신경세포 퇴화, 허혈성 시신경병증, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 20

제16항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 항VEGF제와 동시 또는 순차적으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 21

PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 망막 또는 맥락막 질환의 예방, 개선 또는 치료 용도.

청구항 22

PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 망막 또는 맥락막 질환 예방 또는 치료 약제를 생산하기 위한 용도.

청구항 23

맥락막혈관의 초미세구조를 개선하는 것을 특징으로 하는, PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 분리된 뉴클레오티드 서열.

청구항 24

PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 분리된 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 맥락막혈관의 초미세구조 개선용 약학적 조성물.

청구항 25

PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 분리된 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 맥락막혈관의 초미세구조 개선 방법.

청구항 26

PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 분리된 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 조성물의 맥락막혈관의 초미세구조 개선 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PLVAP를 유효성분으로 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

[0002] 본 출원은 2020년 10월 13일에 출원된 한국특허출원 제10-2020-0131953호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

배경 기술

[0003] 눈의 안쪽 망막의 중심부에 위치한 신경조직을 황반이라고 하는데, 빛 자극에 반응하는 시세포의 대부분이 이곳에 모여 있고 물체의 상이 맺히는 곳도 황반의 중심이므로 시력에 대단히 중요한 역할을 담당하고 있다. 나이관련황반변성(AMD: Age-related Macular Degeneration)은 황반의 망막색소상피와 부르크막 및 맥락막 모세혈관의 변성을 특징으로 하는 만성 질환이다. 해부학적으로 감각신경망막은 망막색소상피의 앞쪽에 위치하며 영양, 지지, 재순환 및 노폐물의 처리를 망막색소상피에 의존한다. 부르크막은 5층으로 된 구조물로 맥락막과 망막색소상피 사이에 끼어 있다. 가장 안쪽 층은 망막색소상피의 기저막이고 가장 바깥쪽은 맥락막 모세혈관 내피세포의 기저막이다. 즉, 망막색소상피와 부르크막 및 맥락막 모세혈관 복합체에 발생한 변성 질환이다.

[0004] 이 질환은 50세 이상의 연령층에서 주로 발생하는데, 이미 서구에서는 60세 이상의 인구에서 실명의 가장 주된 원인이며 우리나라에서도 점점 증가하는 추세이다. 나이관련황반변성의 원인에 대해서는 아직 정확히 밝혀지지 않았으나 위험인자로 알려져 있는 것은 나이(특히 75세 이후 가파른 증가를 보인다), 가장 주목받는 환경적 요인인 흡연 외에도 고혈압, 비만, 유전적 소인, 과도한 자외선 노출, 낮은 혈중 항산화제 농도 등이 있다.

[0005] 황반변성에는 건성(비삼출성) 황반변성과 습성(삼출성) 황반변성의 두 유형이 있다. 건성 황반변성(dry AMD, nonexudative AMD, nonneovascular AMD)은 노폐물이 망막하에 드루젠(drusen)이라는 황색 침전물을 형성하여 쌓이게 되는데 이것이 커지게 되면 망막 특히 황반으로의 혈류를 방해하고 시야를 가리게 되어 시력에 장애가 오기 시작한다. 건성 황반변성은 급격한 시력 상실을 유발하지는 않지만 습성 황반변성(wet AMD, exudative AMD, neovascular AMD)으로 진행할 수 있다. 망막의 아래에는 섬유조직 내에 파묻힌 혈관 집합성은 망막 아래 맥락막 부분에서 신생혈관이 자라서 생긴다. 이러한 약한 신생혈관이 터져서 출혈이 발생하고 삼출을 일으켜서 망막의 황반 영역에 변성을 일으켜 시력장애가 발생하는 것이다. 습성 황반변성은 진행속도가 매우 빨라서 수주 안에 시력이 급속히 나빠지기도 하고 2개월 ~ 3년 사이에 실명을 초래하기도 하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 한편, 현재까지 알려진 황반변성 치료법으로는 광역학치료법(Photodynamic Therapy, PDT)과 신생혈관성장인자 항체(anti-VEGF) 주사법이 사용되고 있다. 광역학치료법은 광민감 물질인 비쥬다인(Visudyne)을 혈관을 통해 주입한 후 일정 시간 뒤에 망막의 신생혈관에 광민감물질이 도달했을 때 광민감물질에만 반응하는 특수한 레이저를 눈에 조사함으로써 선택적으로 신생혈관을 파괴하는 방법이다. 하지만 치료 후에도 재발하는 경우가 많아서 반복치료해야 하는 경우가 많고 반복적인 치료시에는 망막자체의 손상도 발생할 수 있는 단점이 있다.

[0007] 항체주사 치료법은 신생혈관의 생성과 진행에 중요한 혈관내피세포 성장인자(VEGF)에 선택적인 결합을 해서 신생혈관의 생성과 증식을 억제하는 항체(anti-VEGF)를 유리체 내에 직접 주사하는 방법(intravitreal injection)이다. 항체주사요법에 사용되는 단백질 항체 약물로는 루센티스(Lucentis, ranibizumab), 아일리아(Eylea, aflibercept), 비오뷰(Beovu, brolucizumab), 아바스틴(Avastin, bevacizumab)이 있는데 루센티스, 아일리아, 비오뷰는 습성 황반변성 치료제로 FDA의 허가를 받은 약물이고 아바스틴은 암질환에 허가된 약물을 안질환에 사용하고 있다. 그러나, 상기 단백질 치료법은 비용이 많이 들고, 점안투여가 불가능하여 눈에 직접 주사해야하고, 약 1-3개월에 한 번씩 주기적인 투여가 필요하여, 출혈, 고통, 감염, 망막 박리(retinal detachment) 등의 위험성이 있다.

[0008] 뿐만 아니라, 맥락막혈관은 내피세포(endothelial cell)의 천공(fenestration)을 통해 망막에 산소와 영양

분을 공급하고 망막에서 발생한 대사산물을 맥락막으로 배출하는 역할을 하며, 맥락막혈관의 천공은 대부분 망막쪽을 향하여 노폐물의 배설을 돕는다. 그러나 항혈관내피성장인자 항체 치료는 혈관생성은 효과적으로 억제하지만, 맥락막혈관의 정상적인 기능 유지에 중요한 천공을 감소시켜 망막변성을 오히려 악화시키는 연구 결과가 보고되고 있다. 따라서 이러한 맥락막혈관의 초미세구조와 기능을 유지하면서 질병을 치료하는 새로운 기술 개발이 필요한 실정이다.

[0009] 당뇨병망막병증은 젊은 연령의 가장 흔한 실명의 원인으로 만성적인 고혈당에 의해 발병하는 혈관 합병증이다. 이러한 당뇨병망막병증의 발생은 혈관주위세포의 소실로 인한 모세혈관의 폐쇄, 신생혈관의 증식으로 망막출혈 및 박리를 유발하여 망막신경의 기능 소실을 초래하여 실명을 유발한다. 이를 치료하기 위해 루센티스를 포함하여 혈관내피세포성장인자 (VEGF)를 억제하는 항체주사요법이 사용되고 있지만, 반복적인 주사가 필요하며, 근본적인 혈관 구조와 기능을 회복하는 것은 어렵다. 당뇨병맥락막병증은 이러한 당뇨병망막병증의 존재 여부에 관련없이 발생할 수 있는 질병으로 맥락막혈관의 확장과 누출의 증가, 맥락막 조직의 염증과 허혈을 특징으로 한다. 이러한 당뇨에 의한 맥락막의 변화가 망막색소상피의 변성으로 초래하고 이로 인해 시세포의 소실과 시력저하로 이어진다. 그동안 당뇨병맥락막병증의 병인과 치료 표적에 대한 연구가 부족하여 이를 회복하거나 예방할 수 있는 효과적인 치료제가 없어 새로운 기술 개발이 필요한 실정이다.

[0010] 또한, 지금까지 나이관련황반변성과 당뇨병맥락막병증을 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 치료를 위한 맥락막 혈관의 초미세구조 변화에 대해서는 시도된 바 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에 본 발명자들은 PLVAP를 발현하는 재조합 플라스미드 DNA를 제작하고, 상기 재조합 플라스미드를 나이관련 황반변성 및 당뇨병맥락막병증 마우스 모델에 망막하 주사한 결과, PLVAP의 보충을 통해 맥락막혈관의 초미세구조의 극성을 정상화시킬 수 있을 뿐만 아니라, 맥락막혈관의 내피세포 천공의 구조와 기능을 회복시켜 노폐물의 배설 효과가 유의하며, 그에 따라 망막 구조 개선 및 시기능 개선 효과가 나타남을 확인하였는 바, 본 발명을 완성하였다.

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제(activator), 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방 또는 치료용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 분리된 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 맥락막혈관의 초미세구조 개선용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제(activator), 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 PLVAP 단백질은 서열번호 25로 표시되는 아미노산 서열, 또는 이와 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 PVLAP 단백질은 PLVAP 단백질, 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 융합 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 재조합 벡터에 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0020] 상기 재조합 벡터는 프로모터, 인핸서, 인트론, 리포터 마커 서열, 단백질 정제 태그, 종결 서열, mRNA 안정화 서열, 외생성 유전자의 서열, 세포 선택 마커 서열, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 재조합 벡터는 혈관내피세포에서 특이적인 발현을 유도하는 프로모터를 포함하며, 상기 프로모터는 CD144, TIE1, FLT1, 및 EMCN으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 망막 또는 맥락막 질환은 혈관 투과성 관련 망막 또는 맥락막 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 망막 또는 맥락막 질환은 색소성 망막염 (RP), 레베르 선천 흑암시 (LCA), 스타가르트병, 어서 증후군, 맥락막 결여, 로드-콘 또는 콘-로드 디스트로피, 섬모병증, 미토콘드리아 장애, 진행성 망막 위축증, 퇴행성 망막 질환, 나이관련황반변성 (AMD), 습성 AMD, 건성 AMD, 중심장액맥락망막병증, 맥락막비후 질환군, 변성근시, 결절성 맥락막병증, 맥락막암, 맥락막 종양, 맥락막신생혈관, 유전성 맥락막질환, 지도상 위축증, 가족형 또는 획득 황반병증, 망막 광수용체 질환, 망막 색소 상피계 질환, 당뇨병성 망막증, 당뇨맥락망막병증, 낭포성 황반 부종, 포도막염, 망막박리, 외상성 망막 손상, 의원성 망막 손상, 황반 원공, 황반 모세관확장증, 신경절 세포 질환, 시신경 세포 질환, 녹내장, 시신경병증, 허혈성 망막 질환, 미숙아 망막증, 망막 혈관 폐색, 가족형 마크로아뉴리즘, 망막 혈관 질환, 안혈관 질환, 녹내장으로 인한 망막신경 세포 퇴화, 허혈성 시신경병증, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1로 표시되는 염기서열, 또는 이와 80% 이상의 상동성을 갖는 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 비강 내, 근육 내, 정맥 내, 동맥 내 및 안국소 투여로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 경로로 개체에 투여되도록 제형화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 안국소 투여는 결막낭 내 투여, 유리체 내 투여, 망막하 투여, 맥락막 상강 투여, 결막 하 투여, 테논낭 하 투여, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 내피세포의 천공(fenestration)을 회복시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 항VEGF제를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 상기 항VEGF제와 동시 또는 순차적으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 또한, 본 발명은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방 또는 치료용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 개체는 망막 또는 맥락막 질환의 치료를 필요로 하는 개체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 항VEGF제와 동시 또는 순차적으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 또한, 본 발명은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 망막 또

는 맥락막 질환의 예방, 개선 또는 치료 용도를 제공한다.

- [0036] 또한, 본 발명은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 망막 또는 맥락막 질환 예방 또는 치료 약제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 맥락막혈관의 초미세구조를 개선하는 것을 특징으로 하는, PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 분리된 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 맥락막혈관의 초미세구조 개선용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0039] 또한, 본 발명은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 분리된 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 맥락막혈관의 초미세구조 개선 방법을 제공한다.
- [0040] 또한, 본 발명은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 분리된 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 조성물의 맥락막혈관의 초미세구조 개선 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명자들은 PLVAP의 감소가 맥락막혈관의 초미세구조의 변화를 초래하여 망막변성을 유발할 수 있음을 기초로 하여, PLVAP 플라스미드 DNA를 망막 또는 맥락막 질환 동물모델에 투여함에 따라 맥락막혈관의 구조와 기능을 유지하면서, 맥락막혈관의 정상적인 기능 유지에 중요한 천공을 증가시키는 효과를 나타냄을 확인하였다. 따라서, PLVAP 단백질 또는 유전자를 망막 또는 맥락막 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 PLVAP 플라스미드 DNA의 구조 및 구성요소를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 PLVAP 플라스미드 DNA를 프로모터 및 인테그라아제 종류에 따라 사람맥락막혈관내피세포에 처리한 결과, PLVAP의 발현을 확인한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 PLVAP 플라스미드 DNA를 프로모터 종류에 따라 마우스에 망막하 주사하고, 72시간 뒤 PLVAP의 발현율을 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 나이관련황반변성 마우스 모델의 맥락막혈관의 초미세구조의 변형을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 건성 나이관련황반변성 마우스 모델에서, 맥락막혈관의 천공의 수, 및 방향성이 변화된 천공의 수를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 건성 나이관련황반변성 마우스 모델에서, 망막 대사 노폐물의 배출 양상을 망막하 공간 및 브루크막에서 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 건성 나이관련황반변성 마우스 모델에 PLVAP 플라스미드 DNA를 투여한 결과, 맥락막혈관의 천공의 수가 증가하고, 격막(diaphragm)이 회복되는 양상을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8a 및 도 8b는 본 발명의 일 실시예에 따른 건성 나이관련황반변성 마우스 모델에 PLVAP 플라스미드 DNA를 투여한 결과, 지질 대사산물이 잘 배출되고, 지질 방울 및 축적이 거의 다 소실됨을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9a 및 도 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 건성 나이관련황반변성 마우스 모델에 PLVAP 플라스미드 DNA를 투여한 결과, 황반변성의 진행 정도를 안저촬영으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10a 및 도 10b는 본 발명의 일 실시예에 따른 건성 나이관련황반변성 마우스 모델에 PLVAP 플라스미드 DNA를 투여한 결과, 황반변성의 진행 정도를 안저촬영 및 맥락막혈관조영술로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 건성 나이관련황반변성 마우스 모델에 PLVAP 플라스미드 DNA를 투여한 결과, 시기능저하가 회복됨을 망막전위도 검사로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 습성 나이관련황반변성 마우스 모델에 PLVAP 플라스미드 DNA를 투여한 결과, 맥락막 신생혈관이 억제됨을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 당뇨맥락망막병증 마우스 모델의 맥락막혈관의 초미세구조의 변형을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 14a 및 도 14b는 본 발명의 일 실시예에 따른 당뇨맥락망막병증 마우스 모델에서 맥락막혈관의 천공의 수, 방향성이 변화된 천공의 수 및 격막(diaphragm)이 소실된 비정상적인 천공의 비율을 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 당뇨맥락망막병증 마우스 모델에 PLVAP 플라스미드 DNA를 투여한 결과, 맥락막혈관의 천공의 수가 증가함을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 당뇨맥락망막병증 마우스 모델에 PLVAP 플라스미드 DNA를 투여한 결과, 황반변성의 진행 정도를 안저촬영으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 당뇨맥락망막병증 마우스 모델에 PLVAP 플라스미드 DNA를 투여한 결과, 시기능저하가 회복됨을 망막전위도 검사로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 PLVAP 포유류 플라스미드 벡터의 구조 및 구성요소를 나타낸 것이다.

도 19a 및 도 19b는 본 발명의 일 실시예에 따른 PLVAP^{ECKO} 마우스 모델에 PLVAP 플라스미드 DNA를 투여한 결과, 맥락막혈관의 천공의 수가 증가하고, 맥락막혈관의 극성이 정상화됨을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 PLVAP 플라스미드의 주사 후 나이관련황반변성/당뇨맥락망막병증의 맥락막혈관의 초미세구조 변화를 나타낸 것이다.

도 21a 내지 도 21e는 본 발명의 일 실시예에 따른 맥락막혈관의 극성을 확인한 결과로, 노화 또는 당뇨에 의해 PLVAP가 감소하며, 그로 인해 맥락막혈관의 초미세구조 변화를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[0044] 본 발명은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0045] 또한, 또한, 본 발명은 맥락막혈관의 초미세구조를 개선하는 것을 특징으로 하는, PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다.

[0046] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0047] 본 발명에서, “PLVAP”란 원형질막 소포-관련 단백질, 또는 PV-1으로도 명명되며, 천연적으로 존재하거나 내인성인 PLVAP(예를 들면, 포유동물, 인간) 단백질, 및 천연적으로 존재하거나 내인성 PLVAP 단백질(예를 들면, 재조합체 단백질, 합성 단백질)과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 말한다. 따라서, 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 PLVAP는 포유동물(예를 들면, 인간)에서 천연적으로 존재하는, 예를 들면, 교호적인 스플라이싱(splicing) 또는 다른 세포 과정에 의해 생산된 PLVAP 단백질의 다형성 또는 대립유전자 변이체 및 다른 동형(isoform)을 포함한다. 본 발명에서, PLVAP 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_112600.1의 아미노산 서열을 포함하거나, 그로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에서, 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에 있어서, “PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열”은 서열번호 1로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 뉴클레오티드 변이체가 본 발명의 범위에 포함된다. 구체적으로, 상기 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상의 서열 상동성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0049] 본 발명에서, 상기 PLVAP 단백질은 서열번호 25로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에 있어서, "PLVAP 단백질"은 서열번호 25로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 25로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, PLVAP 단백질, 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 융합 단백질이 본 발명의 범위에 포함된다. 구체적으로, 상기 단백질은 서열번호 25의 아미노산 서열과 80 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 단백질을 포함한다.

[0050] 본 발명에서, 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 재조합 벡터에 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명에서, "벡터(expression vector)"란 벡터 내에 삽입된 이중의 핵산에 의해 코딩되는 펩타이드 또는 단백질을 발현할 수 있는 벡터를 지칭하는 것으로, 바람직하게는 PLVAP 단백질을 발현할 수 있도록 제조된 재조합 발현 벡터를 의미한다. 상기 "벡터"는 시험관 내, 생체 왜 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기의 도입 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말하며, 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위(replicon)일 수 있으며, "복제 단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가 가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스 등)를 말한다. 본 발명의 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 RNA 중합효소가 결합하는 전사 개시 인자인 프로모터(promoter), 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열과 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열, 터미네이터 등을 포함할 수 있으며, 또한 형질전환체를 선별하기 위한 항생제 내성 유전자 등의 선별용 마커 유전자 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명에서, PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 PLVAP와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 이러한 핵산 분자의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA) 분자일 수 있다.

[0053] 본 발명에서, 벡터는 리포솜, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 바람직한 바이러스 벡터의 예로는 아데노바이러스(adenovirus), 아데노부속바이러스(adeno-associated virus), 레트로바이러스(retrovirus), 렌티바이러스(lentivirus), 단순 포진바이러스(herpes simplex virus), 알파바이러스(alpha virus) 등이 있다. 본 발명에서, 벡터는 프로모터, 인핸서, 인트론, 리포터 마커 서열, 단백질 정제 태그, 종결 서열, mRNA 안정화 서열, 외생성 유전자의 서열, 세포 선택 마커 서열, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명의 재조합 벡터는 PLVAP를 코딩하는 핵산과 이의 전사 또는 해독을 위한 조절서열을 포함할 수 있다. 특히 중요한 조절서열은 프로모터, 인핸서와 같이 전사 개시를 조절하는 것이다. 또한, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 코작(Kozak), 인핸서, 막 표적화 및 분비를 위한 신호서열, IRES(Internal Ribosome Entry Site) 등으로 이루어진 조절서열을 포함할 수 있다. 이러한 조절서열과 PLVAP를 코딩하는 핵산은 작동가능하게 연결되어야 할 것이다.

[0054] 본 발명에서, 인핸서는 CMV 인핸서, RSV 인핸서, 알파 태아 단백질 인핸서, TTR 최소 프로모터/인핸서, LSP (TH-결합 글로불린 프로모터/알파-마이크로글로불린/비쿠닌 인핸서), APB 인핸서, ABPS 인핸서, 알파 mic/bik 인핸서, TTR 인핸서, en34, 또는 ApoE를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명에서, 인트론은 CBA, 인간 베타 글로빈, IVS2, SV40, bGH, 알파-글로불린, 베타-글로불린, 콜라겐, 오브 알부민, p53, 또는 이의 단편으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 본 발명에서, 리포터 마커 서열은 당업계에 공지된 다양한 리포터 마커 서열을 포함하며, 바람직하게는 GFP(green fluorescent protein) 유전자, eGFP 유전자, 루시페라아제 유전자, β 갈락토시다아제 유전자, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제 유전자, 인간성장호르몬 유전자 또는 분비성 태반 알칼린 포스파테이즈(secreted placental alkaline phosphatase) 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명에서, 본 발명의 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 DNA 분자를 발현을 조절하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결한 형태, 예를 들어 발현벡터의 형태로 치료 대상 환자 내에서 이것이 발현되도록 상기 폴리뉴클레오티드를 투여할 수 있다. 상기 벡터는 코딩 서열을 발현시킬 수 있는 프로모터 부위를 포함하는 적당한 전사 조절 신호를 포함하고, 상기 프로모터는 치료될 환자 내에서 작

동 가능한 것이 바람직하다. 따라서, 인간 유전자 치료용으로, RNA 폴리머라제를 전사 개시 부위로 인도하는데 필요한 서열뿐만 아니라, 적당하다면 인핸서를 포함하는 다른 작동 서열 또는 조절 서열들을 포함하는 용어인 프로모터는, pEMU 프로모터, MAS 프로모터, 히스톤 프로모터, Clp 프로모터, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 35S 프로모터, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 19S RNA 프로모터, 식물의 액틴 단백질 프로모터, 유비퀴틴 단백질 프로모터, CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, SV40(Simian virus 40) 프로모터, RSV(Respiratory syncytial virus) 프로모터, EF-1 α (Elongation factor-1 α) 프로모터 등이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 인간 유전자로부터의 인간 프로모터 서열 또는 일반적으로 인간에게서 발현되는 유전자로부터의 인간 프로모터 서열, 예를 들어 인간 CMV로부터의 프로모터일 수 있다.

[0058] 본 발명에서, 상기 벡터는 도 1 또는 도 18에 개시된 개열지도로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명에서, 상기 재조합 벡터는 CD144, TIE1, FLT1, 및 EMCN으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 혈관내피세포에서 특이적으로 발현하는 프로모터를 추가로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 CD144를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명에서, 상기 재조합 벡터는 내부 리보솜 유입점(IRES) 또는 2A 펩타이드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 본 발명에서, “A 펩타이드”는 단일 코딩 서열 내의 개별 단백질 산물들의 효율적인 조화 발현(concordant expression)을 허용 하는 작은(18-22 아미노산) 펩티드 서열을 의미한다. 어떤 편리한 2A 펩티드, 예를 들면 구제역 바이러스(foot-and-mouth disease virus, F2A), 말 비염(equine Rhinitis) A 바이러스, 돼지 테스코바이러스(porcine teschovirus)-1(P2A) 또는 토세어 아시그나 바이러스(Thosea asigna virus, T2A), 또는 Szymczak-Workman, A. 등. "Design and Construction of 2A Peptide-Linked Multicistronic Vectors"에서 설명된 2A 펩티드들 중 어느 하나와 같은, 바이러스로부터의 2A 펩티드가 표적화 벡터 내에서 사용될 수 있다. 문헌 [Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (ed. Friedmann and Rossi). CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007]는 참조로써 본 명세서에 전체가 통합된다.

[0062] 본 발명에서, 상기 망막 또는 맥락막 질환은 혈관 투과성 관련 망막 또는 맥락막 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. "혈관 투과성 관련 망막 또는 맥락막 질환"이란 혈관 투과성의 정상적인 조절이 붕괴되어 일어나는 망막 질환으로, 일반적으로는 혈관이 변화되어 투과성이 증가됨으로써 출혈이나 부종 및 염증을 일으키는 망막 또는 맥락막 질환을 의미한다.

[0063] 본 발명에서, 상기 망막 또는 맥락막 질환은 색소성 망막염(RP), 레베르 선천 흑암시(LCA), 스타가르트병, 어서 증후군, 맥락막 결어, 로드-콘 또는 콘-로드 디스트로피, 섬모병증, 미토콘드리아 장애, 진행성 망막 위축증, 퇴행성 망막 질환, 나이관련황반변성(AMD), 습성 AMD, 건성 AMD, 중심장액맥락망막병증, 맥락막비후 질환군, 변성근시, 결절성 맥락막망막병증, 맥락막암, 맥락막 종양, 맥락막신생혈관, 유전성 맥락막질환, 지도상 위축증, 가족형 또는 획득 황반병증, 망막 광수용체 질환, 망막 색소 상피계 질환, 당뇨병성 망막증, 당뇨맥락망막병증, 낭포성 황반 부종, 포도막염, 망막박리, 외상성 망막 손상, 의원성 망막 손상, 황반 원공, 황반 모세관확장증, 신경절 세포 질환, 시신경 세포 질환, 녹내장, 시신경병증, 허혈성 망막 질환, 미숙아 망막증, 망막 혈관 폐색, 가족형 마크로아뉴리즘, 망막 혈관 질환, 안혈관 질환, 녹내장으로 인한 망막신경세포 퇴화 및 허혈성 시신경병증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명에서, “나이관련황반변성(Age-related macular degeneration, AMD)”이란 시력에 매우 중요한 역할을 하는 망막의 황반부에 나이가 들면서 여러 가지 변화가 동반되어 생기는 질병이다. 본 발명에서, 상기 나이관련 황반변성은 건성(비삼출성) 또는 습성(삼출성)을 포함할 수 있다. “건성 AMD”는 망막에 드루젠이나 망막색소 상피의 위축과 같은 병변이 생긴 경우를 말하며, AMD의 90% 가까이를 차지한다. 황반에 있는 시세포가 서서히 위축되어 시간이 지날수록 시력이 차차 떨어지며, 습성 형태로 발전할 수 있다. “습성 AMD”는 망막 밑에 맥락막 신생혈관이 자라서, 이 신생혈관 자체 또는 혈관으로부터의 출혈, 삼출 등에 의해 심한 시력 손상이 발생하기 쉬우며, 발병 후 수개월-수년 사이에 원반형 위축, 심한 출혈 등으로 실명을 초래할 수 있다.

[0065] 본 발명에서, “당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy)”이란 당뇨병에서 나타나는 미세혈관 합병증의 하나로, 고혈당과 이에 동반되는 여러 생화학 적인 변화로 망막의 혈관 투과성 증가 허혈과 신생혈관 생성과 같은 모세혈관의 기능적 형태학적 변화에 의해 발생한다. 본 발명에서, 상기 당뇨병성 망막증은 비증식성 또는 증식성 망막병증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. “비증식성 망막병증”은 망막의 작은 혈관들이 약해

저서 혈청이 새거나 혈관이 막혀서 영양 공급이 중단되는 상태를 말한다. “증식성 망막병증”은 혈액순환이 나쁜 곳에 신생 혈관이 생김으로써 적절한 치료를 받지 않으면 신생 혈관에서 발생하는 출혈에 의해 5년 이내에 실명하게 되는 것으로 알려져 있다.

[0066] 본 발명에서, “당뇨맥락망막병증(diabetic chorioretinopathy, diabetic choroidopathy)”이란, 당뇨병에서 맥락막 혈관에서 나타나는 미세혈관 합병증의 하나로, 만성 고혈당이 맥락막 모세혈관층에서 천공과 내피의 수송을 억제하며, 맥락막과 망막 사이의 거대분자의 내피 수송이 당뇨에 의해 손상됨에 따라 발생한다. 또한 혈관 주위세포의 소실과 변성으로 인해 맥락막 동맥과 정맥 등 큰 맥락막 혈관의 구조적 기능적 변화도 동반되어 맥락막 조직의 염증과 허혈을 초래한다. 상기 당뇨병성맥락망막병증은 망막의 영양실조 및 대사 노폐물의 축적을 유발하는 맥락막의 구조적 및 기능적 이상이 유발됨에 따라, 시력이 감퇴하는 질환일 수 있다.

[0067] 본 발명에서, “맥락막”이란 공막과 망막 사이에 위치한 안구벽 중 하나로, 안구 뒷부분의 혈관과 멜라닌 세포가 풍부한 얇은 막이다. 맥락막은 외부에서 들어온 빛이 분산되지 않도록 하는 역할을 하며, 눈의 뒷부분에서는 맥락막으로, 눈의 앞부분에서는 홍채로 작용하는 것으로 알려져 있다.

[0068] 본 발명에서, “맥락막혈관의 초미세구조”란 망막하 공간, 브루크막, 망막색소상피, 맥락막혈관, 맥락막혈관의 내피세포, 내피세포의 천공, 및 상기 구성들의 총체적인 구조를 포함하는 하나 이상을 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 초미세구조는 안저촬영, 맥락막혈관조영술, 망막전위도 검사 등으로 확인될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 본 발명에서, “맥락막혈관의 초미세구조 개선”이란 맥락막혈관 초미세구조의 변형과 관련된 파라미터, 예를 들면 천공의 수의 감소, 천공의 극성(polarity) 변화, 내피세포의 두께의 변화, 내피세포의 망막 노폐물 축적, 천공 격막(diaphragm)의 소실을 포함하는 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0070] 본 발명에서, 상기 약학적 조성물은 내피세포의 천공(fenestration)을 증가 또는 회복(restoration)시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서, 상기 천공의 회복은 내피세포의 천공 방향을 공막쪽에서 망막쪽으로 회복시키거나, 천공의 극성을 망막쪽으로 정상화시키거나, 천공의 수를 증가시키거나, 천공 격막의 소실을 억제 또는 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 본 발명에서, 상기 약학적 조성물은 항VEGF제를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서, 상기 항VEGF제는 예를 들어 베바시주맵, 라니비주맵, 페갑타닙, 파조파닙, 수니티닙, 소라페닙, 레고라페닙, 카보잔티닙, 렌바티닙, 포나티닙, 악시티닙, 티보타닙, 라무시루맵, 반데타닙, 브롤루시주맵, 파리시맵 및 애플리버셉트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 항VEGF제는 혈관상피성장인자(VEGF)에 결합하여 수용체에 대한 그의 결합을 예방 또는 저감시키는 펩타이드, VEGF에 결합하는 항체, 또는 VEGF에 결합할 수 있는 핵산 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] 본 발명에서, 상기 약학적 조성물은 상기 항VEGF제와 동시 또는 순차적으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서, 상기 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 조성물은 항VEGF제와 혼합물의 형태로 하나의 용기 내에 존재하도록 제형화될 수 있고, 별개의 용기 내에 존재하여 동시 또는 순차적으로 투여되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 조성물은 항VEGF제의 치료 이후 2차 요법으로서 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0073] 본 발명의 조성물 내의 상기 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제, 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0074] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0075] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제,

점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0076] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0077] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0078] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀라, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트린, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 젤화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜 지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0079] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0080] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0081] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0082] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나

트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비셀파이트 0.1%, 소듐포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비셀파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠티나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위템솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스펀, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0085] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0086] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0087] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비용, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0088] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0089] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[0090] 본 발명에서, 상기 조성물은 경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 비강 내, 근육 내, 정맥 내, 동맥 내 및 안국소 투여로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 경로로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서, 상기 안국소 투여는 결막낭 내 투여, 유리체 내 투여, 망막하 투여, 맥락막 상강 투여, 결막 하 투여 및 테논낭 하 투여로 이루어진 군으로부터 선택된 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0092] 본 발명에서 “개체”란 목적 질환의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인

간인 영양류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 개체는 망막 또는 맥락막 질환의 치료를 필요로 하는 개체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0093] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0094] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0095] 또한, 본 발명은 PLVAP (Plasmalemma vesicle-associated protein) 단백질, 상기 단백질의 발현 또는 활성 촉진제(activator), 또는 상기 PLVAP 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 유효성분으로 포함하는 망막 또는 맥락막 질환의 예방 또는 치료용 의약품 조성물을 제공한다.

[0096] 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 섬유·고무 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염병을 막기 위한 살균·살충제 등도 이에 포함된다.

[0097] 본 발명에 있어서, 의약품 조성물은 안과용 조성물의 제형으로 제형화하여 사용할 수 있고, 예컨대 안과용 액제, 점안제, 안연고, 주사액, 및 세안약(eyewash)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형으로 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0098] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0099] 발명의 실시를 위한 형태

[0100] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0101] [실시예]

[0102] 실시예 1. PLVAP를 발현하는 최적의 플라스미드 DNA 제작

[0103] 1-1. PLVAP를 발현하는 최적의 플라스미드 DNA 제작

[0104] 비특이적 세포발현 프로모터인 CMV(cytomegalovirus)와 혈관내피세포에 특이적으로 발현하는 프로모터를 이용하여 PLVAP 플라스미드 DNA를 구성하였다. 혈관내피세포에서 특이적으로 발현하는 프로모터는 다음과 같다: CD144(VE-cadherin), TIE1, FLT1(VEGFR1), EMCN(Endomucin). 성공적인 플라스미드 삽입과 유전자 발현을 확인하기 위한 리포터 유전자로써 eGFP를 PLVAP 서열 앞에 삽입하였으며, 이때 플라스미드의 사이즈에 따라 다음과 같은 인테그레이팅 링커(integrating linker)를 사용하였다: attB1/2, IRES(*internal ribosome entry site*), T2A(Thomasa signa virus 2A peptide). PLVAP 과발현을 위하여, 프로모터-eGFP-PLVAP 플라스미드 DNA를 다음과 같은 방법으로 제작하였다. 기본 플라스미드의 백본(back bone)은 벡터빌더사(Vector Builder)의 Design Vector Studio툴을 이용하였으며, CMV, CD144, TIE1, FLT1, 혹은 EMCN의 프로모터 염기서열을 삽입 후 ORF1(Open Reading Frame 1)에 eGFP 염기서열을, ORF2(Open Reading Frame 2)에 PLVAP 염기서열을 삽입하였고, eGFP와 PLVAP 모두 발현되도록 하는 인테그레이팅 링커(integrating linker; 두 폴리펩타이드를 연속하여 발현 후 자동으로 끊어냄) 염기서열인 attB1/2, IRES 또는 T2A를 ORF1과 ORF2 사이에 삽입하였다. ORF2 말단에 SV40 후기 mRNA 폴리아데닐레이션 시그널 서열(SV40 late polyadenylation signal sequence)을 삽입 후 CMV 프로모터와 항생제 내성 유전자를 삽입하였다. 이후 해당 플라스미드 맵(map)을 이용하여 벡터를 주문 제작하였다. 제작된 벡터의 구조는 도 1에 나타내었다.

표 1

[0105]

	Sequence (5'→3')	서열 번호
hPLVAP	CCCCGAGACCCAGCTAGCGCTGGAGGAGAAGGCGGTGCTGCGGAAGGAACGAGACAACCTGGCCAAGGAGCTGGAA GAGAAGAAGAGGGAGGCGGAGCAGCTCAGGATGGAGCTGGCCATCAGAACTCAGCCCTGGACACCTGCATCAAGAC CAAGTCGACAGCCGATGATGCCAGTGTCAAGGCCCATGGGCCCTGTCCCAACCCCGAGCCATCGACCCAGCTAGCC TGGAGGAGTTCAAGAGGAAGATCCTGGAGTCCCAGAGGCCCCCTGCAGGCATCCCTGTAGCCCCATCCAGTGGCTGA	1
mPLVAP	CGCAGCTGGCTCTGGAGGAGAAGGCGGCGCTGCGCGCGCAGCGGGACAACCTAGAGCGCGAGCTGGAGGCGCGTAAG CGGGAGCTGGAGCAACTGCGCACCGAGGTGGATGTGCGCATTAGCGCGCTGGACACCTGCGTCAAGGCCAAGTCGCT GCCAGCCGTCCCCGCGAGAGTCTCAGGCCACCCCGAACCCCTCCACCCATTGATCCAGCTAGCCTGGAGGAATTCA AGAAAAGGATCCTGGAGTCTCAGCGGCTCCCTGTAGTCAACCCCTGCTGCCCAACCCAGCGGTGA	2
h/mCMV	GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGTCTATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGC GTTACATAACTTACGTAATATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTA TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTAT GCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT GCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCAGGGGATTTCAGTCTCCACCCCATTGACG TCAATGGGAGTTGTTTTTGGCACCACAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCTGAACAACTCCGCCCCATTGACGCA ATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT	3
hCD144	TGATGCTGCAGCCAAGGTTCCCCACAGCCAGGCTCTTTGACAGGTGCTGGGTTTCAGAGTCCCAGAGCTGAGGCCGGGA GTAGGGGTTCAAGTGGGGTGCCCCAGGCAGGGTCCAGTGCCAGCCCTCTGTGGAGACAGCCATCCGGGGCCGAGGCA GCCGCCACCGCAGGGCTGCTATATGTCAGCCAGCCAGCCCTCACAAGGAACAATAACAGGAAACCATCCCAGG GGGAAGTGGGCCAGGGCAGCTGGAACCTGAAGGGGAGGCAGCCAGGCCTCCCTCGCCAGCGGGGTGTGGCTCCC CTCCAAAGACGGTCGGGTGACAGGCTCCACAGAGCTCCACTACGCTCAGCCCTGGACGGACAGGCAGTCCAAACGGA ACAGAAACATCCCTCAGCCACAGGCACGGTGAGTGGGGGCTCCACACTCCCTCCACCCCAACCCGCCACCCCTG CGCCCAAGATGGGAGGGTCTCAGCTTCCCCATCTGTAGAATGGGCATCGTCCACTCCCATGACAGAGAGGCTCC	4
mCD144	GGCTCTGTGGAGAAGCTGAGGTAGCTGGGTTTCTGTCTGGGTTACTCTGTCCAGCGAGGAACAAGTACCTTAGACC CACTAAGCCTCTGCTTTCTGAACTGTAAAGTGGGGATATGACACCTGCCTCCAGGGATGGCTGAATGCTCTGGCA GAAGCTTAGAGCCCCACAGCTACCCCTAGGCTCAGAGCTCCTCCGATGAGACCTAGAATTGAGGTATGAGTTGAAT ACCCAGGCAGGTCCAAGGCTTCCACGGGCCAGGCTGACCAAGCTGAGGCCGCCACCCTAGGGCTTGCTATCTG CAGGCAGCTCACAAGGAACAATAACAGGAAACCATCCCGAGGGGAAGTGGGCCAGGGCAGTTGGAACCTGCCT CCCTCCAGCCTGGGTGTGGCTCCCTCTCCCTCCTGAGGCAATCAACTGTCTCTCCAAAGCTCGGCCCTGGA CAGACT	5
hTIE1	GGGGTGCAGGAGACCCACTGTGGATAGACGTGGACAGGCTGAGGAGACAAGCACCATCATCCGTGGCCTCAACGCC AGCACGCGCTACCTTCTCCGATGCGGGCCAGCATTACGGGGCTCGGGACTGGAGCAACAGTAGAAGAGTCCAC CCTGGGCAACGGGCTGCAGGCTGAGGGCCAGTCCAAGAGAGCGGGCAGTGAAGAGGGCTGGATCAGCAGCTGA TCTTGGCGGTGGTGGGCTCCGTGTCTGCCACCTGCCTCACCATCCTGGCTGCCCTTTAAACCTGTGCTGCTCCGC AGAAGCTGCCTGCATCGGAGACGCACCTTACCTACCAGTCAGGCTCGGGCGAGGAGACCATCTGCAGTTACAGCTC AGGGACCTTGACACTTACCCGGCGGCCAAACTGCAGCCGAGCCCTGAGTACCCAGTGCTAGAGTGGGAGGACA TCACCTTTGAGGACCTCATCGGG	6
mTIE1	GTCTGTGTCTCTCTGGCCCTAACCGATCTTCAATCCCAGCCA	7
hFLT1	TCTTCAGAGGCGCCTTCACTTTTCATCACTCTGTTTCATGCTGCTGCTGCTGCAAGACCTTTTCCCTCCCTCTGTG TCTCTCTCTCTCTGCTGGCAAGATCCAGCCAGTAATCACCATCTCTGGGAGCTCCTCTGTAGCTCCAGACAG CACTTGCCATTTCTTCTGCTCTCCTGTAGCCCTGAGGTGTACTCCTCCTTCAGTAATTC	8
mFLT1	GGGGGACCCCTTGACGTCACTGGAAGGAGGTGCGGGGTAGGAAGTGGGCTGGGGAAGGTTATAAATCGCCCCGC CCTCGGCTGCACTTCAGCGAGGTCTTGAAGGCTCGGAGCGGCTGGCGGACACTCCCGGAGGTAGTGCTAGTGG TGGTGGGCTGCTGCTCGGAGCGGGCTCGGGACTCAAGCGCAGCGGCTAGCGGACGCGGGAGCGGAGGATCCCCCA CACCACCCCTCGGCTGCAGGCGCGGAGAGGGCTCTCGCGGCCAAGCAGAAGCAGGAGGGGACCGGCTCGAGC GGCTGCGCGCTCGGCCTCGGAGAGCGCGGGC	9
hEMCN	ACATTCACTACACCTTTTCCATTTGCTAATAAGGCCCTGCCAGGCTGGGAGGGAATTGTCCCTGCCTGCTTCTGGAG AAAGAAGATATTGACACCATCTACGGGCACCATGGAATGCTTCAAGTGACCATTTTCTTCTTCTGCCAGTATTT GCAGCAGTAACAGCACAGGTATTTTGTCTCTTATCCTCTGTTGGTACGGATTGGAAATCACTAGTAGGTGACTCA GCCTCAGTTTACTTTTCAAGGATCTTCCCTGACACTTAGATGCAGCAATTCCTTTGATGAGTTGAGTGTGATGT TGACTTGGAGTGGCTGGAGAAGGCTTGAGAGAGACGGTATTTGTTTCTACTGAAGGGAATGTTTGGGGTACAGCA GCCTGAAAGCATGTTTCGATGAAATCACAAGTACTGGA	10
mEMCN	AGGGGAATGCCAGGGCCAAGAAGTGGGAGGGGAGGGGAGAGGAGTGGGGGGTATGGGGGACTTTTGAATAGCA GTGGAAATGTAAATGAAGAAAATATCTAATAAAAAATATTTAAAAAGAAAGAAAGAAATGTCTTGAACCTCTCTGG GCAGTAATAAGAGGCCAGCTTACTTCTCAAGAGCAGAACGTGATCCAGTTTACACTTGTATTTGCTCTAGAAGGT GGTCTTCACTGACTTGGCTTATGAGTTGAGAAGAGAGAAGAAATGCAATTCCTTTGAGATTGTTGACTCAAAATCCAG ACCTTGGGAAGTACAGCCTTTTACGCCGACCTGGGGGCTACTTGGTGAGGTCTCTTTACAGCTTCTCTAAAAATGC ACTTTCAAAAACAAAAGTTAGAAAGCTCTCTGGCCCTTTCTCAAGAAGGGTCTCTTCTGTTCATATCCATCCTGAC CTTTTTGTTGAAGAAGAGTAAATAATGCAGTAACAAAAACACAAGTGGCTGCCAAAGGAAGAGAGAGGAAAAAAA AGAAGTTCTGTAAAGGGCTGAAACAATAAATCTCTCTCTGCTGACCTCCAAAGGAGTGGGTGATTTCTCTTA GTTCTTTATCAGAATCCCCAAAATAAGTAGGAATGGGCAGCGTCTGCTCAGAGTCACTACACCTTTCCATTGCTA ATACGGCCTGGCCAGGCTGAGAGGAATCCTTCCCTGCCTTACCCT	11
at tB1	ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT	12

attB2	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	13
IRES	GCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATG TTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCC TAGGGGTCTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTT CTTGAAGACAAACAACGCTCTGTAGCGACCCCTTTGACGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGC CAAAGGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGA AAGAGTCAAATGGCTCTCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGTGAAGGATGCCAGAGGTACCCCATTTGATGGGAT CTGATCTGGGGCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTAAAAAACGTCCTAGGCCCCCGAACCCAC GGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACC	14
T2A	GGAAGCGGAGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGCCCC	15
eGFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA CAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG GCAAGCTGCCCGTGGCCCGCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGACGTGCTTACGCCGTACCCCGAC CACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA TCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTATATCATG GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGAGCGTGCAGCTCGC CGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGT CCAAGCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACT CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG	16

1-2. 플라스미드 DNA의 사람맥락막혈관내피세포에서의 발현 확인

인체유래물동의를 얻어 각막이식을 위해 기증된 안구로부터 채취된 초기배양(Primary Culture)된 사람맥락막혈관내피세포에 플라스미드 DNA를 처리하여, 실시예 1-1에서 제작된 플라스미드 DNA가 혈관내피세포에서 잘 발현되는지 확인하였다. Invitrogen 사의 세포내전달용액(in-vitro transfection reagent)인 Lipofectamine™ 3000을 이용하여, 최종 플라스미드 DNA의 농도가 2 µg/ml이 되도록 만들었다. 플라스미드를 사람맥락막혈관내피세포에 처리하였으며, 이를 후 배양액을 변경한 뒤 추가로 이틀동안 배양하고 PLVAP 플라스미드의 발현을 확인하였다.

도 2에 나타난 바와 같이, 모든 플라스미드 DNA가 사람맥락막혈관내피세포에서 효과적으로 도입되고, 형질주입(transfection) 되어 혈관내피세포에서 PLVAP를 발현하는 것을 확인하였다. 그 중에서 CD144를 프로모터로 하는 플라스미드 DNA가 가장 발현율이 높았다.

1-3. 플라스미드 DNA의 마우스 망막 및 맥락막에서의 발현 확인

야생형 C57BL/6 마우스에 플라스미드 DNA를 망막하(subretinal) 주사하고, 실시예 1-1에서 제작된 CD144 및 IRES를 포함하는 플라스미드 DNA의 PLVAP 유전자가 마우스의 망막 및 맥락막에서 잘 발현되는지 RT-PCR을 통해 확인하였다. 하우스키핑 유전자로 GAPDH를 사용하였다. 총 RNA는 제조업체의 지침에 따라 RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출되었으며, PrimeScript™1st strand cDNA Synthesis Kit(Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 cDNA로 역전사되었다. 정량적 실시간 PCR(RT-PCR)은 실시간 PCR 검출 시스템(Bio-Rad TM CFX96; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 사용하여 표 2의 프라이머와 함께 SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, CA, US)를 사용하여 수행되었다. RT-PCR 데이터는 증폭 소프트웨어(Bio-Rad CFX Manager; Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 사용하여 분석하였다.

표 2

RT-PCR 프라이머

		Sequence (5'→3')	서열번호
Human	GAPDH	F: CCTCCAAGGAGTAAGACCCC	17
		R: AGGGGTCTACATGGCAACTG	18
	PLVAP	F: AGAACTCAGACCTCCAACGC	19
		R: TCTCCACCTTCTGTTTCGCC	20
Mouse	GAPDH	F: TGTCCTGCTGGATCTGAC	21
		R: CCTGCTTACCACCTTCTTG	22
	PLVAP	F: GCTGGTACTACCTGCGCTATT	23
		R: CCTGTGAGGCAGATAGTCCA	24

- [0112] 도 3에 나타난 바와 같이, 모든 플라스미드 DNA가 유의하게 PLVAP 발현을 유도하였고, 그 중에서 CMV 와 CD144 프로모터를 포함하는 플라스미드 DNA의 발현율이 유의미하게 높았다.
- [0113] 실시예 2. PLVAP를 발현하는 플라스미드 DNA 주사를 통한 나이관련황반변성(Age-related Macular Degeneration, AMD) 치료 효과 확인
- [0114] 2-1. 나이관련황반변성 마우스 모델의 제작
- [0115] VE-cadherin-cre^{ERT2} 마우스와 PLVAP flox 마우스의 교배를 통해 마우스의 혈관내피세포 특이적으로 PLVAP를 결핍시킴으로써, 나이관련황반변성 모델을 제작하였다. 구체적으로, 마우스 계통 1번에 해당하는 VE-cadherin-cre^{ERT2}와 마우스 계통 2번에 해당하는 PLVAP flox 마우스를 교배하여 조합한 혈관내피세포특이적 PLVAP 유도성 결핍마우스(inducible Endothelial Cell specific Knock Out Mouse)인 VE-cadherin-cre^{ERT2}; PLVAP flox (VEcad-Cre^{ERT2}; PLVAP^{flox/flox}, 이하 PLVAP^{iECKO}) 유전자형 마우스를 이용하였다. PLVAP^{iECKO}에 타목시펜(tamoxifen) 약물을 투약 시 ERT2 (타목시펜 유도성 Estrogen Receptor)에 의해 활성화된 환형제한효소(Cyclic Recombinase; Cre)가 만들어지며, PLVAP 유전자 엑손(exon)의 앞뒤에 위치한 FLOX 카세트를 환형으로 연결하며 그 사이에 존재하는 PLVAP 활성유전자의 일부를 제거하여 PLVAP 유전자가 정상적으로 전사(transcript)되지 못하도록 하는 시스템을 이용하였다.
- [0116] 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 AMD 모델에서는 맥락막모세혈관의 천공의 전체 수가 감소하고, 천공이 향하는 방향성이 변화하며, 천공의 격막(diaphragm)이 소실되었다. 이는 사람의 황반변성에서 발견되는 조직학적 소견과 일치하는 결과이다.
- [0117] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, 상기 맥락막모세혈관의 변화로 인해, 망막의 대사 노폐물(metabolic waste)은 맥락막혈관을 통해 제대로 배출되지 못하여 망막하 공간과 브루크막(Bruch's membrane)에 축적되며, 이는 건성 황반변성 환자에서 발견되는 지질 방울(lipid droplet)이나 드루젠(drusen)과 유사한 양상을 띤다. 따라서, 상기 유전자변형 마우스를 나이관련황반변성 동물모델로 사용하는 것이 적합함을 확인하였다.
- [0118] 2-2. 플라스미드 DNA 투여에 따른 나이관련황반변성 마우스 모델의 맥락막모세혈관 구조 개선 확인
- [0119] 실시예 2-1의 AMD 모델에 PLVAP 플라스미드 DNA를 망막하 공간으로 투여함에 따라, 맥락막모세혈관의 구조가 회복되는지 확인하였다. Polyplus Transfection 사의 in vivo-jetPEI 제품을 사용하여 생체 내로 플라스미드 DNA를 전달하였다. 5% 글루코스 용액 10 μ l에 4 μ g의 실시예 1-1의 CMV 와 CD144 프로모터를 포함하는 플라스미드 DNA와 생체내전달용액(in-vivo transfection reagent) 0.4 μ l가 혼합된 시약을 인사이토(Incyto)사의 38G의 미세주사침(incyto Needle)을 이용하여 4 μ l의 부피로 PLVAP^{iECKO} 마우스 모델의 망막하 공간에 1회 주사하였다. 대조군의 경우 플라스미드를 넣지 않은 5% 글루코스 용액과 생체내 전달용액의 혼합물인 vehicle을 망막하 공간으로 1회 주사하였다.
- [0120] 도 7에 나타난 바와 같이, 제작된 동물 모델에서 줄어들었던 Fenestration의 수가 회복되고, fenestration을 구성하는 막이 회복하여 정상적인 맥락막모세혈관의 구조로 회복함을 확인하였다.
- [0121] 상기 결과는 본 발명의 PLVAP 플라스미드 DNA가 나이관련황반변성 마우스의 맥락막모세혈관 구조를 정상화시킴을 나타낸다.
- [0122] 2-3. 플라스미드 DNA 투여에 따른 나이관련황반변성의 예방 및 치료 기전 확인
- [0123] 실시예 2-2의 방법에 따라, PLVAP 플라스미드를 투여하였다. 상기 AMD 모델에 플라스미드 PLVAP를 투여함에 따라, 건성 황반변성 환자의 증상인 지질방울 및 드루젠이 개선되는지 확인하고, 망막의 대사 노폐물이 잘 배출되는지 확인하였다.
- [0124] 도 8a 및 도 8b에 나타난 바와 같이, AMD 모델의 브루크막에 축적되어 있던 지질 방울이 거의 모두 소실되었는 바, PLVAP 플라스미드 DNA에 의해 유도된 맥락막모세혈관의 구조 변화가 망막의 지질 대사산물을 잘 배출하도록 촉진한다는 사실을 확인하였다. 구체적으로는 망막색소상피(RPE)의 대표적인 지질 대사산물인 멜라노-리포푸신(melano-lipofuscin)과 과립(granule), 및 지질 방울(lipid droplet)이 맥락막모세혈관과 브루크막으로부터 내피세포(EC)의 내부로 흡입되었음을 확인하였다.
- [0125] 따라서, PLVAP 플라스미드 DNA를 투여함으로써 나이관련황반변성의 드루젠과 브루크막사이 기저 축적물(Basal

Deposit)을 방지하여, 나이관련황반변성을 예방 및 치료할 수 있다.

[0126] **2-4. 플라스미드 DNA 투여에 따른 나이관련황반변성의 발병 및 초기진행 억제 효과 확인**

[0127] PLVAP 플라스미드 DNA 투여를 통해 나이관련황반변성의 발병 및 초기진행억제 효과를 평가하고자 하였다. PLVAP 플라스미드는 실시예 2-2의 방법에 따라 투여하였다. 마우스의 생후 8주차에 황반변성을 유도하는 동시에 CMV와 CD144 프로모터를 포함하는 PLVAP 플라스미드 DNA를 나이관련황반변성 모델의 안구에 주사 후 2주의 incubation time을 두어 PLVAP 플라스미드 DNA가 충분히 발현할 시간을 두었다. 망막 변성의 진행은 광각 안저 촬영(Ultra-widefield Fundus Photography)을 통해 분석하였다.

[0128] 도 9a 및 도 9b에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 PLVAP 플라스미드를 투여한 안구에서 망막 변성의 진행이 억제되었다. 구체적으로, 망막색소상피(RPE)의 변성이 유의하게 억제되었으며, 와정맥(Vortex vein)의 확장이 유의하게 감소함을 확인하였다.

[0129] 이는 나이관련황반변성의 초기단계에서 PLVAP 플라스미드를 이용해 질병의 발병과 진행을 예방 및 억제하는 효과가 있음을 시사한다.

[0130] **2-5. 플라스미드 DNA 투여에 따른 나이관련황반변성의 치료 효과 확인**

[0131] 한편, 치료 효과 검증을 위해서 나이관련황반변성을 유도한 후 2주가 지나 황반변성 증상이 충분히 발현된 이후에 PLVAP 플라스미드를 투여하였다. 주사 후 2주의 발현 시간을 두었다. PLVAP 플라스미드는 실시예 2-2의 방법에 따라 투여하였다.

[0132] 도 10a 및 도 10b에 나타난 바와 같이, PLVAP 플라스미드의 투여에 따라, 망막변성의 진행이 억제되었다. 또한, 맥락막혈관조영술 (Indocyanine green angiography, ICGA) 결과 와정맥(Vortex vein)의 확장이 줄어들고 맥락막혈관의 누출이 감소함을 확인하였다. 이를 통해 건성 및 습성의 나이관련황반변성 모두에 대해 PLVAP 플라스미드가 치료 효과를 나타낼 것임을 기대할 수 있다.

[0133] **실시예 3. PLVAP 플라스미드 DNA의 시기능 저하 회복 효과 확인**

[0134] 건성 나이관련황반변성 모델의 시기능을 평가를 위해 망막전위도 검사 (Electroretinogram, ERG)를 시행하였다. 망막전위도(electroretinogram, ERG)는 망막 기능의 이상을 진단하고 연구하는 데 중요한 역할을 하고 있다. 암순응 하에서 a파 및 b파의 진폭의 감소가 관찰되며, a파의 진폭감소는 광수용세포(Photoreceptor) 기능저하를 나타내며, b파의 진폭감소는 쌍극세포(bipolar cell)의 기능저하를 나타낸다. 망막전위도 검사 방법은 문헌 [Documenta Ophthalmologica volume 130, pages1-12 (2015)]을 참조하여 수행하였다. 나이관련황반변성 모델의 안구에 PLVAP 플라스미드 DNA 주사 후 4주 뒤에 망막전위도 검사를 수행하였다.

[0135] 도 11에 나타난 바와 같이, 나이관련황반변성 모델에서 PLVAP 플라스미드를 망막하 투여한 실험군은 대조군 대비 a-wave, b-wave의 진폭(amplitude)이 증가되고, 지연시간(latency)은 감소시켜 시세포의 기능을 회복시키는 것을 확인하였다. 이는 본 발명의 PLVAP 플라스미드 DNA가 나이관련황반변성으로 인한 시기능 저하의 회복에도 효과가 있음을 나타낸다.

[0136] **실시예 4. PLVAP 플라스미드 DNA의 습성(삼출성) 나이관련황반변성에 대한 효과 확인**

[0137] 상기 실시예들을 바탕으로 PLVAP 플라스미드 DNA가 맥락막혈관의 정상화 효과를 나타냄을 확인하였는 바, 이를 바탕으로 레이저유발 맥락막 신생혈관 모델 (Laser-induced choroidal neovascularization model)을 사용하여 습성 나이관련황반변성에 대한 혈관신생억제효과를 확인하였다. 마우스의 생후 7주차에 실시예 2-2의 PLVAP 플라스미드 용액 제조 및 주사방법과 동일하게 4 μ l를 모델의 안구에 주사하였으며, 1주 후인 생후 8주차에 레이저를 사용하여 습성황반변성을 모방한 맥락막 신생혈관모델을 제작하였다. 레이저 조사 후 혈관신생이 충분히 진행될 시간으로 2주의 시간을 두었다. 이후 마우스 안구를 채취해 조직검사를 시행하였다.

[0138] 도 12에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해, PLVAP 플라스미드 DNA를 투여한 경우 맥락막 신생혈관이 억제됨을 확인하였는 바, 이는 습성 나이관련황반변성의 치료에 PLVAP 플라스미드가 효과적임을 시사한다.

[0139] **실시예 5. PLVAP를 발현하는 플라스미드 DNA 주사를 통한 당뇨망막/맥락망막병증 치료 효과 확인**

[0140] **5-1. 당뇨맥락망막병증 마우스 모델의 제작**

[0141] 당뇨맥락망막병증은 장기간 당뇨병에 의해 맥락막혈관의 구조적 기능적 변화로 인해 망막변성이 발생하여 시력 저하를 유발하는 질환이다. 당뇨맥락망막병증에서는 맥락막혈관의 확장과 맥락막 모세혈관의 소실 등 다양한 맥

락막혈관의 변화가 보고되었고 그 중에서도 맥락막 모세혈관의 변화가 망막의 기능 유지에 가장 중요하다. 당뇨 맥락막병증 동물모델의 제작을 위해, 먼저 7-8 주령의 수컷 C57BL6/J 마우스의 복강에 STZ (streptozotocin, Sigma)를 200mg/kg 용량으로 투여한 후, 일주일 후에 혈당을 측정하여 고혈당으로 유도되었는지 확인하였다. 혈당이 400mg/dL 이상으로 유도된 마우스를 선별하여 추후 실험에 사용하였다. STZ를 투여하고, 약 8주 후부터 당뇨맥락막병증의 초기 증상이 나타나기 시작하였다.

[0142] 도 13에 나타난 바와 같이, 당뇨를 유발한 실험 동물은 나이관련황반변성 동물 모델과 유사하게 큰 맥락막혈관이 확장되는 현상을 나타내었다.

[0143] 또한, 도 14a 및 도 14b에 나타난 바와 같이, 맥락막모세혈관의 fenestration의 전체 수가 감소하고 격막(diaphragm)이 소실된 천공의 비율이 증가하는 당뇨맥락막병증의 특징을 관찰하였는 바, 상기 동물모델을 당뇨맥락막병증의 동물모델로서 사용이 적합함을 확인하였다.

[0144] 5-2. 플라스미드 DNA 투여에 따른 당뇨맥락막병증 마우스 모델의 맥락막모세혈관 구조 개선 확인

[0145] 실시예 5-1의 당뇨맥락막병증 모델에 16주령부터 CMV와 CD144 프로모터를 포함하는 PLVAP 플라스미드 DNA를 실시예 2-2의 용액 제조 및 주사 방법과 동일하게 망막하 주사하고, 4주 후에 맥락막모세혈관의 구조를 확인하였다.

[0146] 도 15에 나타난 바와 같이, PLVAP 플라스미드 투여군은 음성 대조군에 비해 맥락막 모세혈관의 Fenestration 수가 증가되어 정상으로 회복되었다.

[0147] 상기 결과는 본 발명의 PLVAP 플라스미드 DNA가 나이관련황반변성 뿐만 아니라 당뇨맥락막병증 마우스의 맥락막모세혈관 구조 또한 정상화시킴을 나타낸다.

[0148] 5-3. 플라스미드 DNA 투여에 따른 당뇨맥락막병증의 발병 및 진행 억제 효과 확인

[0149] 실시예 5-1의 당뇨맥락막병증 모델에 16주령에 실시예 2-2의 PLVAP 플라스미드 용액 제조 및 주사방법과 동일하게 PLVAP 플라스미드를 망막하 주사하였다. 망막 변성의 진행은 안저 촬영 및 맥락막혈관조영술을 통해 분석하였다.

[0150] 도 16에 나타난 바와 같이, 안저 촬영 결과, 대조군의 망막에서는 면화반(cotton Wool Spot)과 동일 위치의 맥락막혈관의 확장과 누출이 관찰되었으며(빨간 점선 영역), 맥락막 조직의 염증을 시사하는 맥락막 과형광 반점과 당뇨망막병증의 대표적인 소견인 망막의 미세동맥류(microaneurysm) 역시 여러 부위에서 관찰되었다. 이에 비해, PLVAP 플라스미드를 주사한 실험군의 경우, 안저 촬영에서 면화반이 관찰되지 않았으며, ICGA 결과 맥락막혈관의 누출이나 확장이 발견되지 않았고, 미세동맥류나 과형광 반점 역시 대폭 감소한 것을 확인하였다.

[0151] 따라서, PLVAP 플라스미드의 망막하 투여가 당뇨망막병증과 당뇨맥락막병증의 예방과 치료에 효과적임을 확인하였다.

[0152] 5-4. PLVAP 플라스미드 DNA의 시기능 저하 회복 효과 확인

[0153] 실시예 5-1의 당뇨맥락막병증 모델에 16주령부터 PLVAP 플라스미드를 망막 하 주사하였다. 시기능 평가를 위해 망막전위도 검사(Electroretinogram, ERG)를 시행하였다.

[0154] 도 17에 나타난 바와 같이, 시기능 분석 결과, 당뇨망막/당뇨맥락막병증 모델에서 PLVAP 플라스미드를 망막하 투여한 실험군은 대조군 대비 a-wave, b-wave의 진폭이 증가되고, 지연시간은 감소시켜 시세포의 기능을 회복시키는 것을 확인하였다.

[0155] 이는 본 발명의 PLVAP 플라스미드 DNA가 당뇨망막/맥락막병증으로 인한 시기능저하의 회복에도 효과가 있음을 나타낸다.

[0156] 실시예 6. CMV 프로모터를 이용한 PLVAP를 발현하는 포유류 플라스미드 벡터의 효과 확인

[0157] 6-1. PLVAP를 발현하는 포유류 플라스미드 벡터의 제작

[0158] 도 18에 나타난 바와 같이, PLVAP 단백질을 발현할 수 있는 DNA 서열과 포유류 공통발현 프로모터인 CMV프로모터, 인테그레이팅 링커 attB1/2를 삽입하여 전체 플라스미드 DNA 크기가 7500 bp 정도가 되도록 제작하였다. 본 플라스미드의 제작 방법은 실시예 1-1에서 기술한 바와 같다.

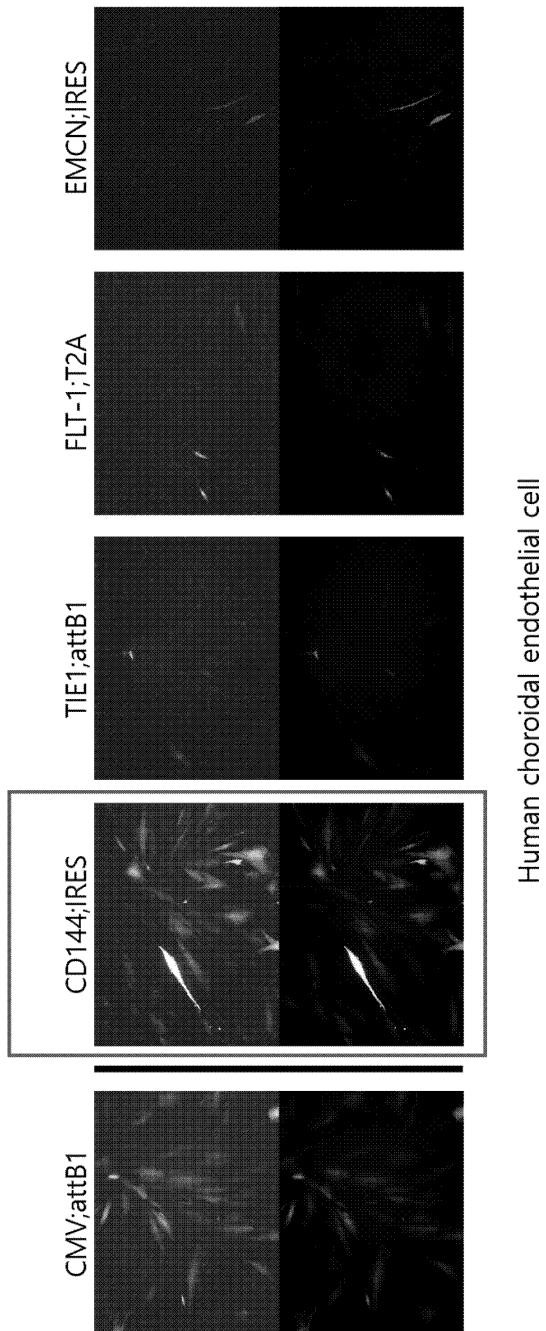
[0159] 6-2. PLVAP를 발현하는 포유류 플라스미드 벡터의 나이관련황반변성 치료 효과 확인

- [0160] 실시예 6-1의 PLVAP 플라스미드 DNA를 생체 내로 전달하는 내용은 실시예 2-2와 동일한 방법을 사용하였다. 주사 후 6주 뒤에 맥락막모세혈관의 구조를 확인하였다. 맥락막혈관의 누출이나 확장은 맥락막혈관조영술을 통해 분석하였다.
- [0161] 도 19a 및 도 19b에 나타난 바와 같이, CMV를 프로모터로 하는 PLVAP 플라스미드 DNA 또한 주사 후 1개월 이후, PLVAP의 보충에 의해 맥락막혈관 천공의 수가 증가하고, 극성(polarity)이 다시 망막쪽을 향하여 정상화 되었으며, 망막노폐물이 잘 배출됨을 확인하였다. 또한, 격막이 없는 천공의 수가 PLVAP의 보충에 의해 유의하게 감소됨을 확인하였다. 또한, PLVAP 플라스미드 DNA의 주사 후 나이관련황반변성 모델의 맥락막혈관의 누출이나 확장이 눈에 띄게 감소함을 확인하였다.
- [0162] 따라서, CMV프로모터-PLVAP의 투여를 통해 망막변성의 증상이 호전되어 시력이 향상되는 치료 효과가 있음을 나타낸다.
- [0163] 또한, 도 20에 나타난 바와 같이, PLVAP 플라스미드의 주사에 의해 맥락막혈관의 초미세구조가 회복됨을 확인할 수 있었다.
- [0164] **실시예 7. 노화 및 당뇨 환자에서 PLVAP의 발현 확인**
- [0165] 노화 및 당뇨 환자에서 PLVAP의 발현확인은 기증 안구에서 기저 질환의 여부의 의무기록 확인을 통해 조사하였고, 이로부터 얻은 안구를 이용하였다. 연령에 따른 구분은 안과 기저질환과 대사성 기저질환이 없는 기증자의 안구만을 이용하였으며, 연령은 20세 이상 40세 미만인 Young과 60세 이상인 Old로 구분하여 분류하였다. Fenestration의 방향을 확인하는 실험은 Young 그룹만을 사용하였다. 당뇨환자로부터 기증받은 기증 안구의 경우 별도의 연령을 구분하지 않았으나, 모두 40세 이상 70세 미만에 해당하여 동일 연령그룹의 기증 안구를 대조군으로 삼았다. 당뇨환자의 광각안저혈관조영 촬영 및 OCT 촬영 결과는 연구에 참여한 환자의 데이터를 사용하였다.
- [0166] 도 21a에 나타난 바와 같이, 정상 인간 맥락막모세혈관에서는 천공이 균일하게 잘 분포되어 있음을 확인할 수 있었다.
- [0167] 또한, 도 21b 및 도 21c에 나타난 바와 같이, 노화된 사람의 맥락막모세혈관 내피세포에서 PLVAP 발현이 감소하여, 천공의 절대적인 수가 감소하고, 그 방향성이 망막쪽이 아닌 반대 방향인 공막쪽을 향하여, 모세혈관 천공의 극성이 변화함을 확인하였다. 이러한 초미세구조의 변화로 인해 망막은 노폐물을 배출하지 못하고, 노폐물이 쌓이게 되어 염증을 유발하며, 망막 기능 저하로 인해 황반변성이 발병함을 확인하였다.
- [0168] 또한, 도 21d 및 도 21e에 나타난 바와 같이, 당뇨 환자의 맥락막모세혈관 내피세포에서도 PLVAP의 발현이 감소함을 확인하였다.
- [0169] 상기 결과는 노화와 당뇨에서 감소한 맥락막혈관의 PLVAP의 보충이 나이관련황반변성과 당뇨맥락망막병증을 포함하는 망막 질환 치료 효과를 나타냄을 뒷받침하는 결과이다.
- [0170] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가지는 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

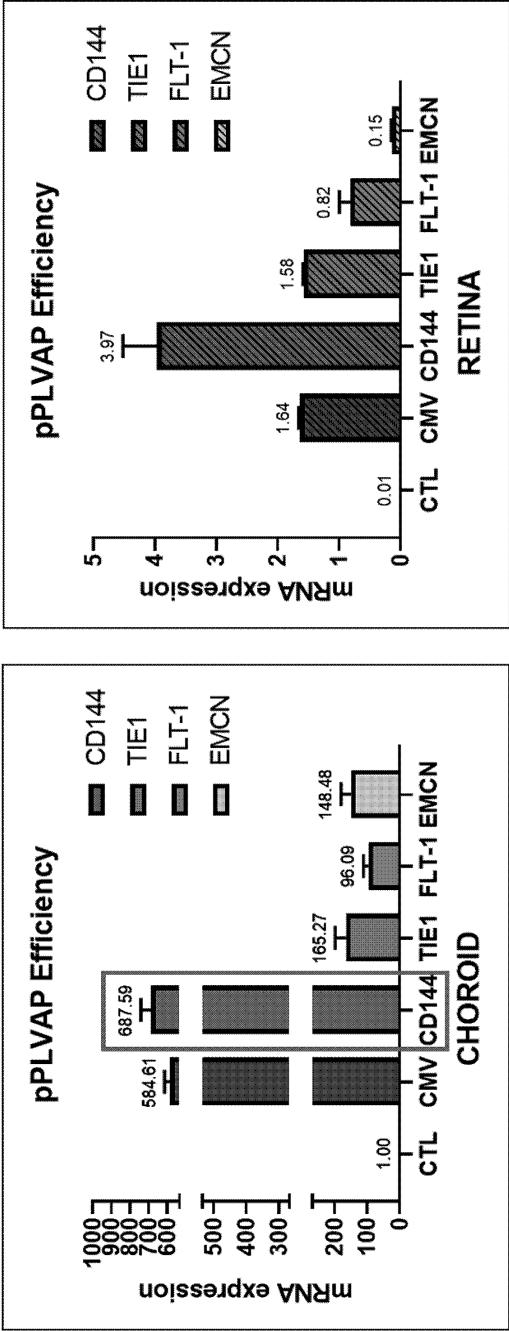
산업상 이용가능성

- [0171] 본 발명자들은 PLVAP의 감소가 맥락막혈관의 초미세구조의 변화를 초래하여 망막변성을 유발할 수 있음을 기초로 하여, PLVAP 플라스미드 DNA를 망막 또는 맥락막 질환 동물모델에 투여함에 따라 맥락막혈관의 구조와 기능을 유지하면서, 맥락막혈관의 정상적인 기능 유지에 중요한 천공을 증가시키는 효과를 나타냄을 확인하였다. 따라서, PLVAP 단백질 또는 유전자를 망막 또는 맥락막 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있어, 산업상 이용가능성이 있다.

도면2

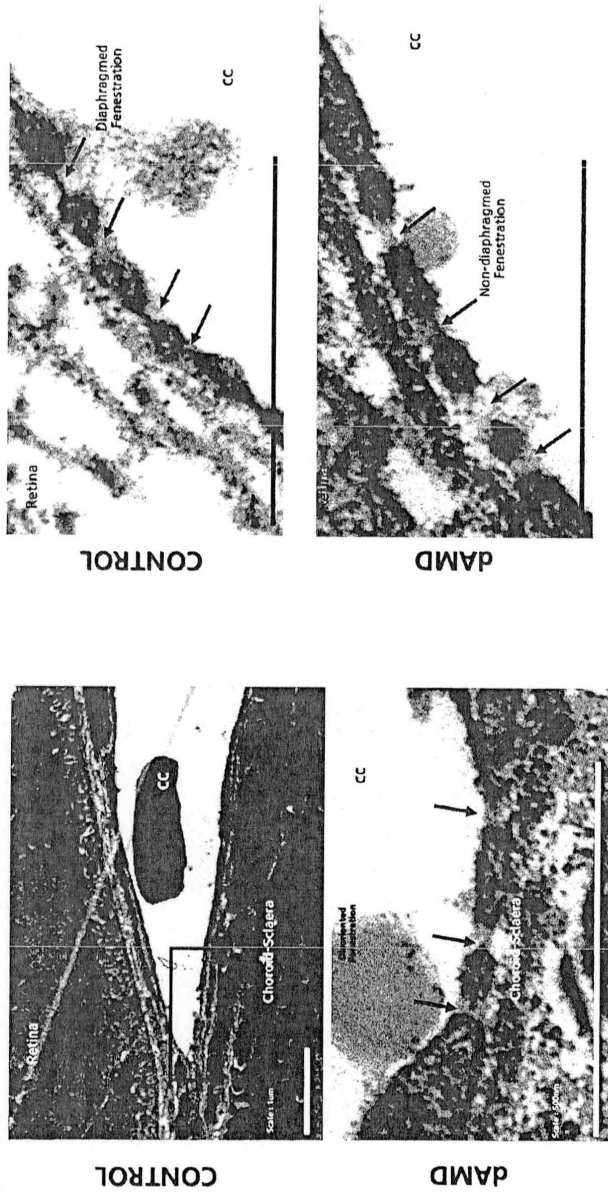


도면3

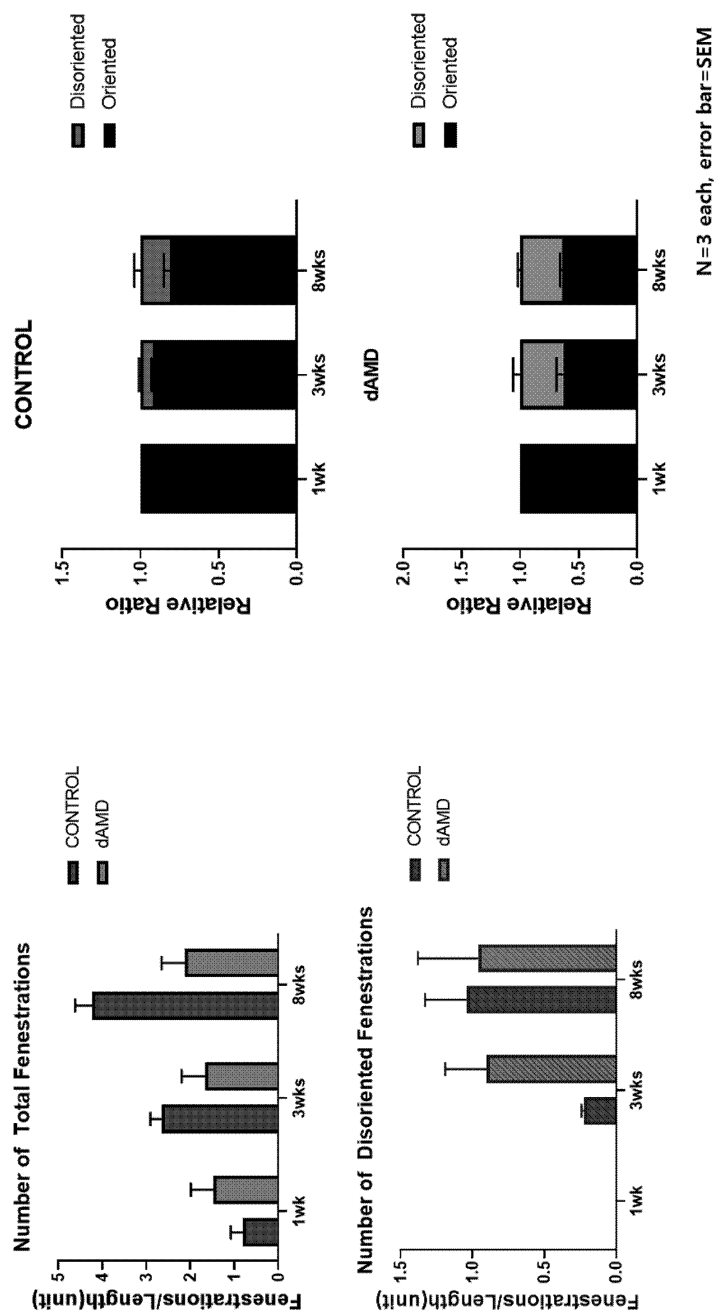


도면4

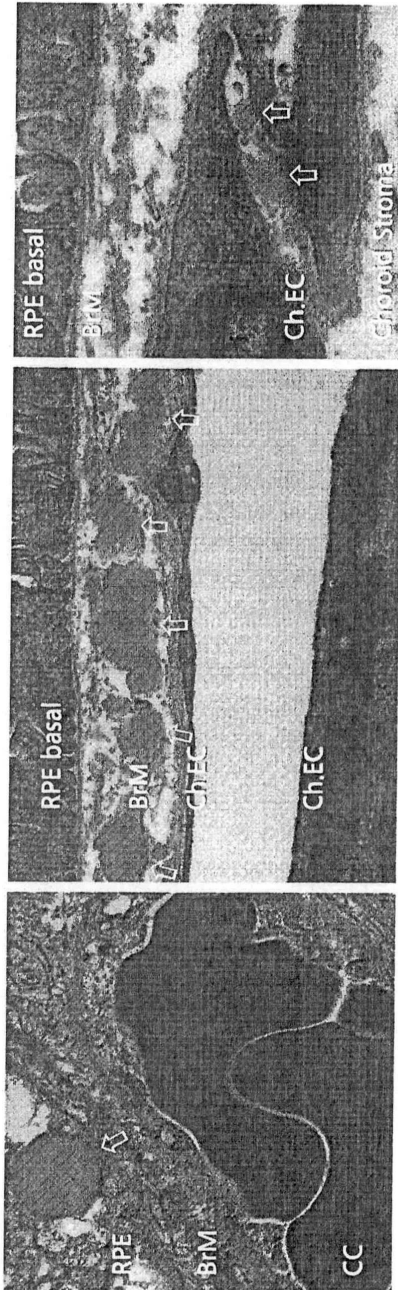
1) Fenestration are disoriented in dAMD model
2) Diaphragm loss is increased in dAMD model



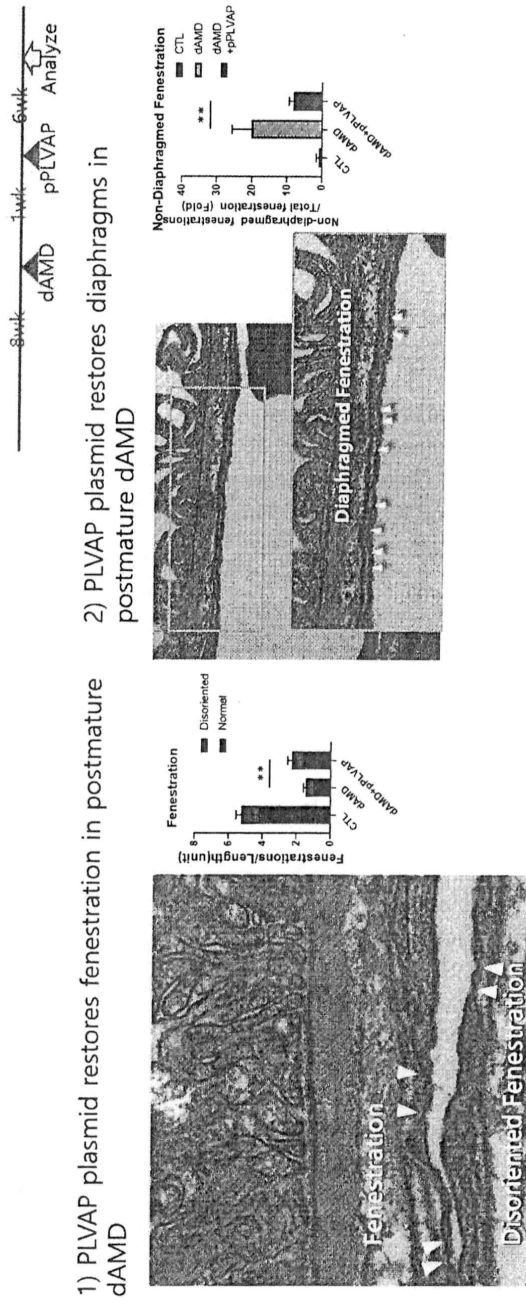
도면5



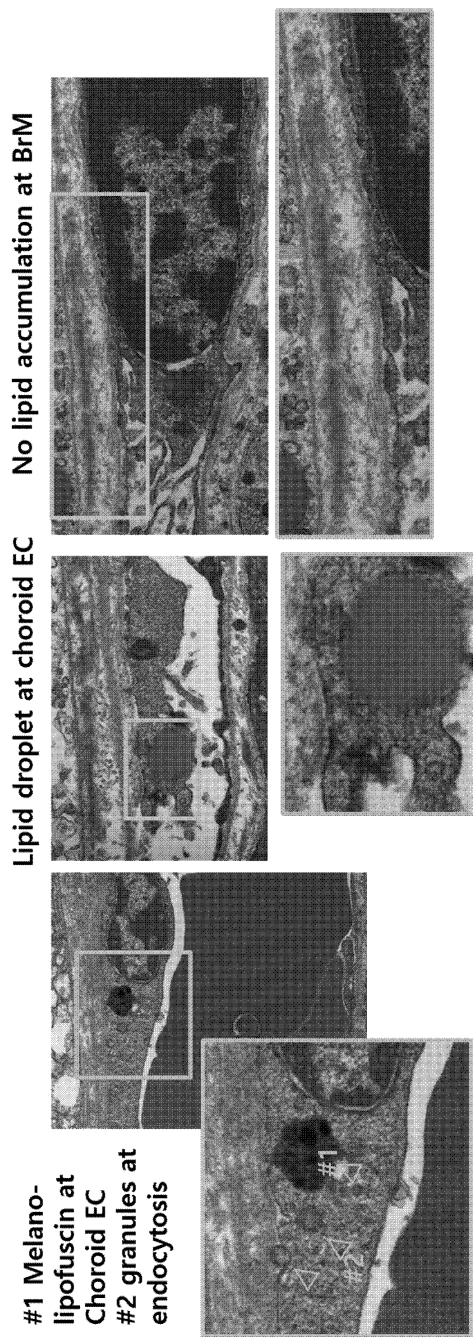
도면6



도면7

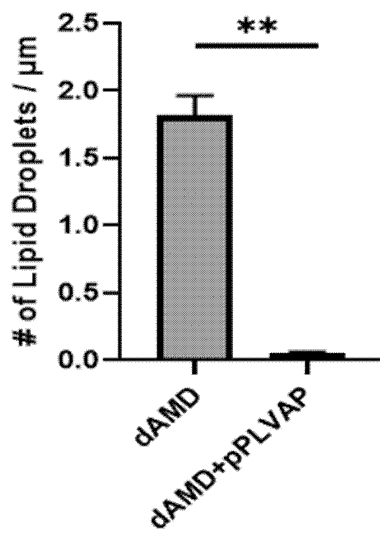


도면8a

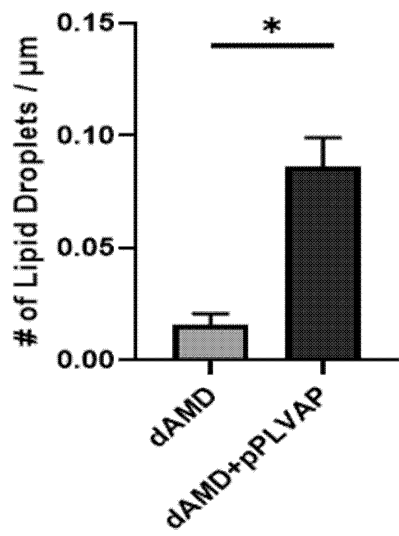


도면8b

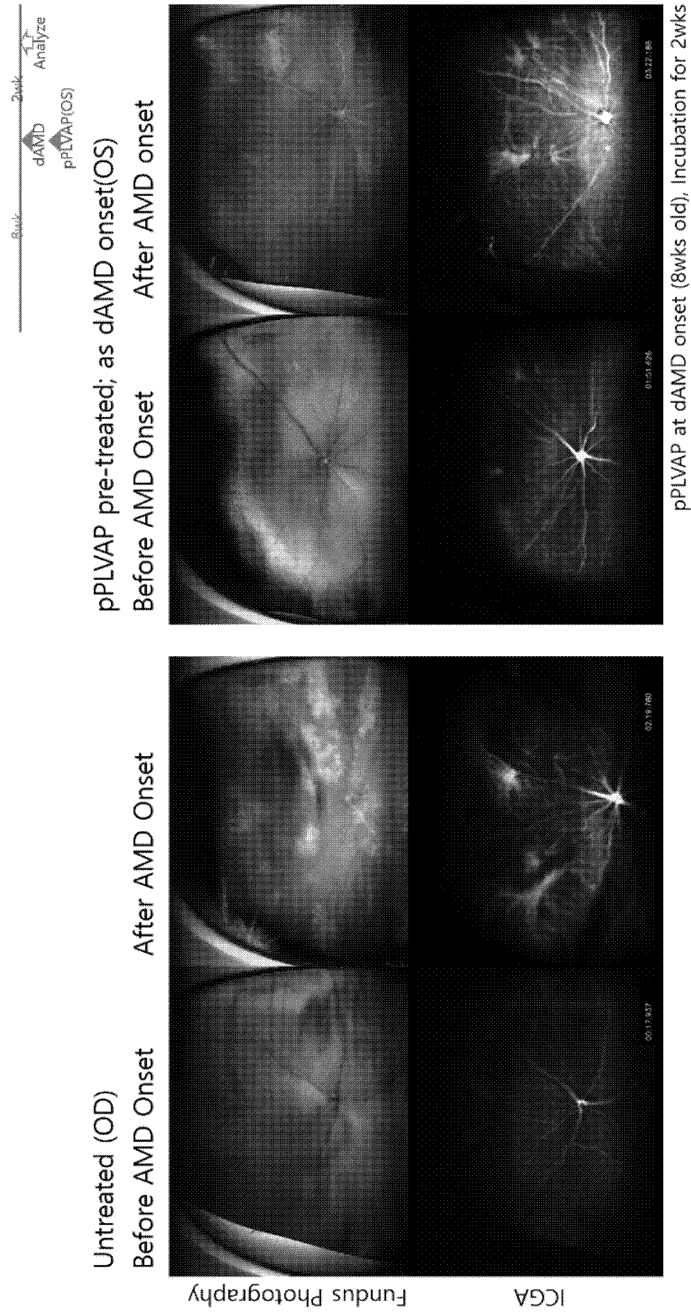
Lipid Droplets at BrM



Lipid Droplets at CC.EC

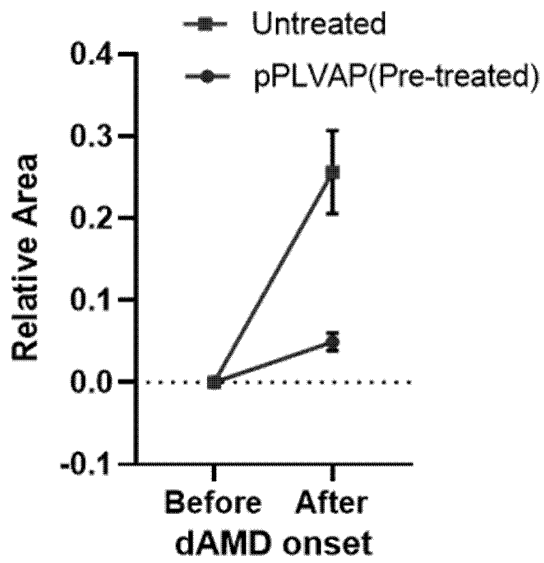


도면9a

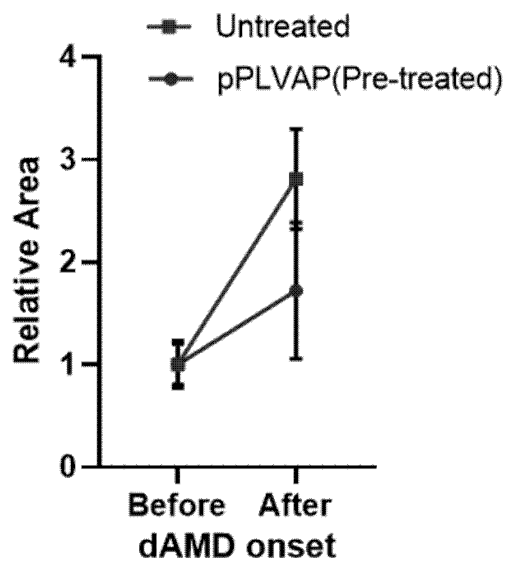


도면9b

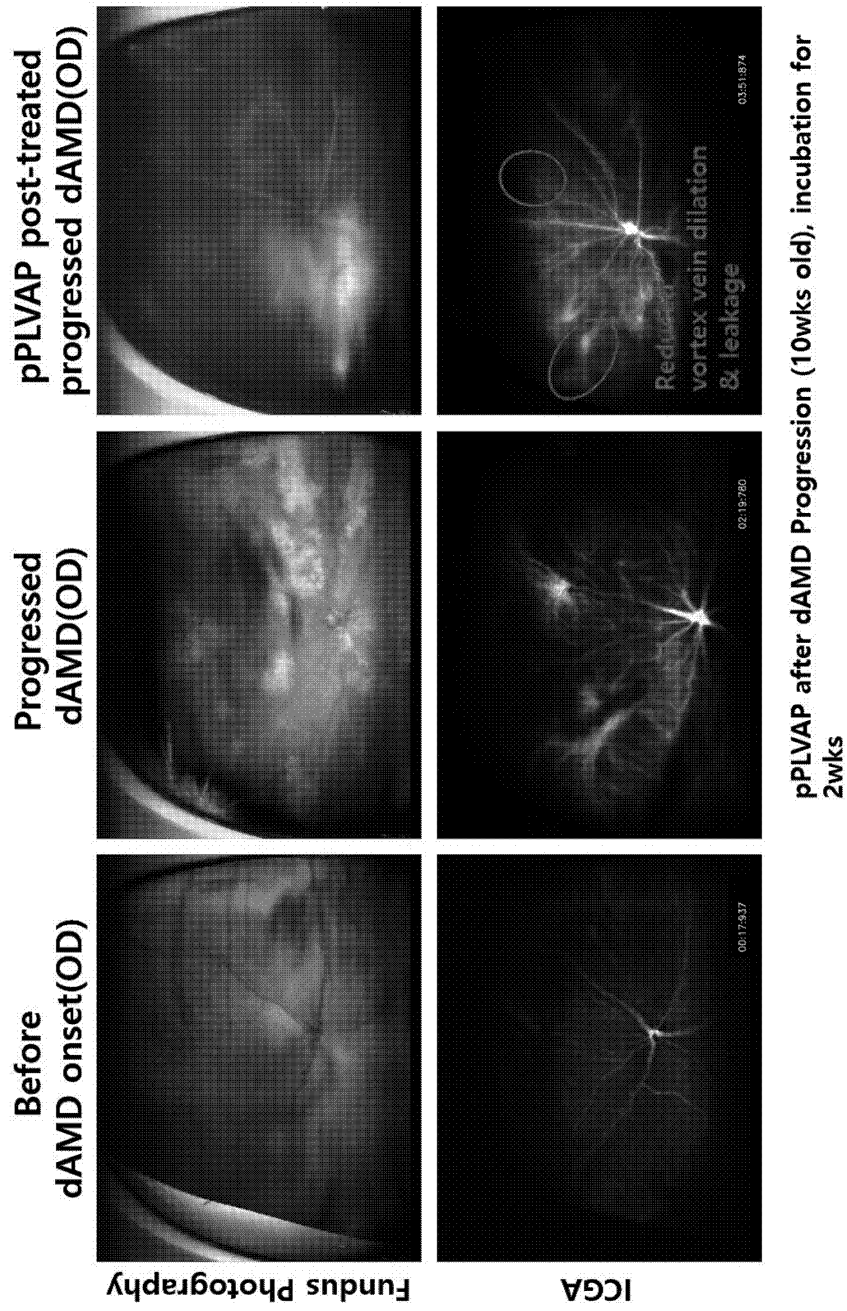
RPE degeneration (Fundus)



Vortex Vein Enlargement

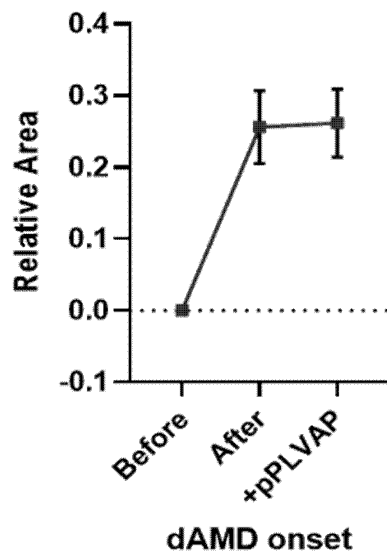


도면10a

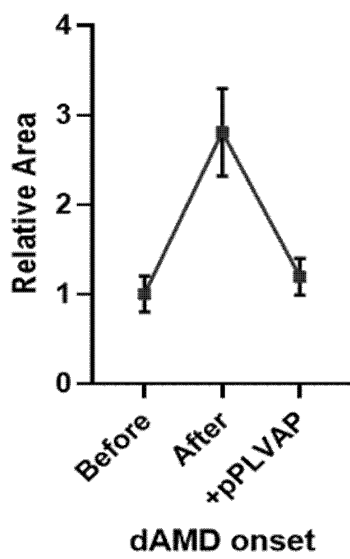


도면10b

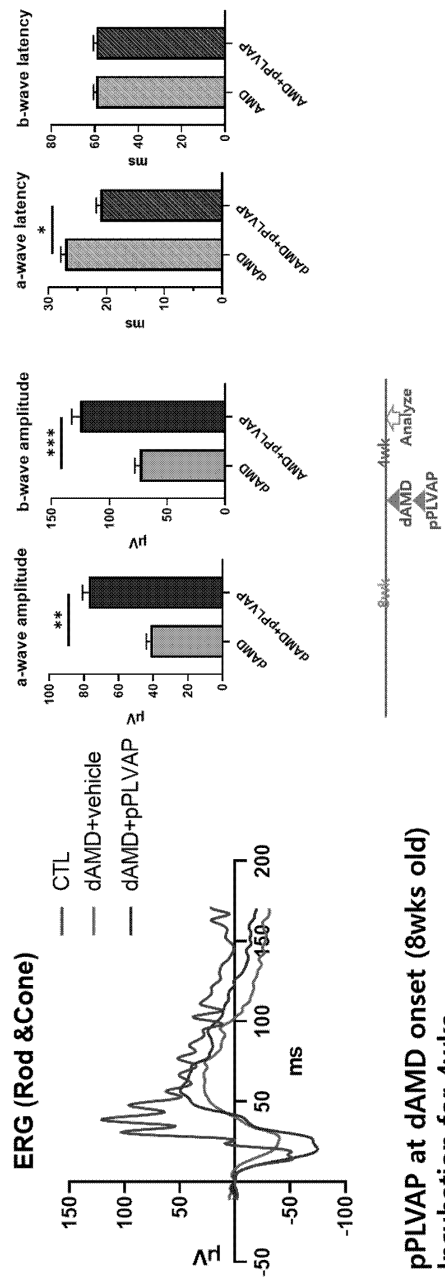
RPE degeneration (Fundus)



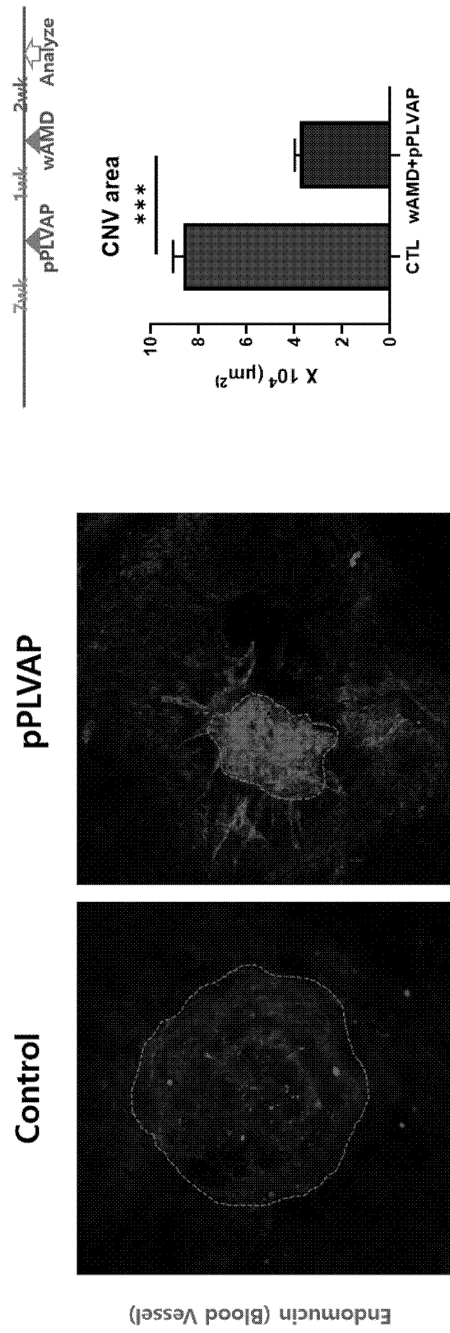
Vortex Vein Enlargement



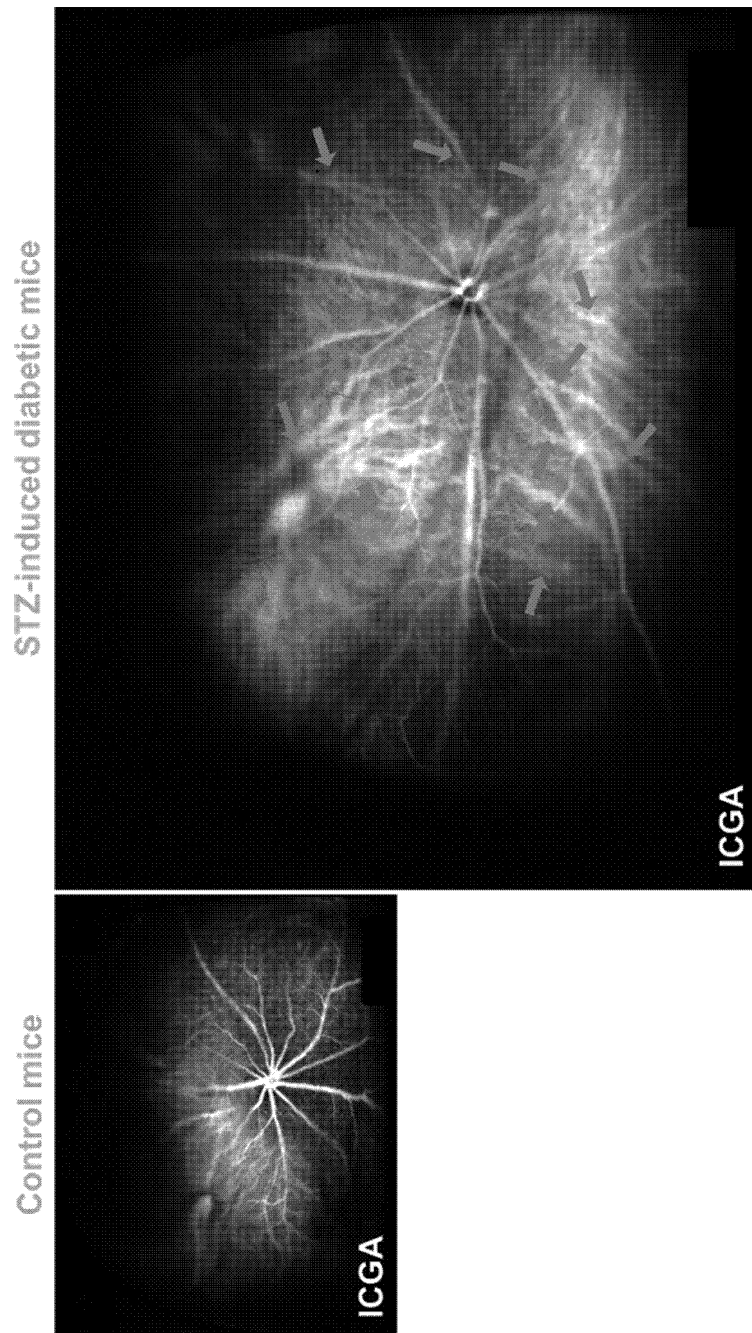
도면11



도면12

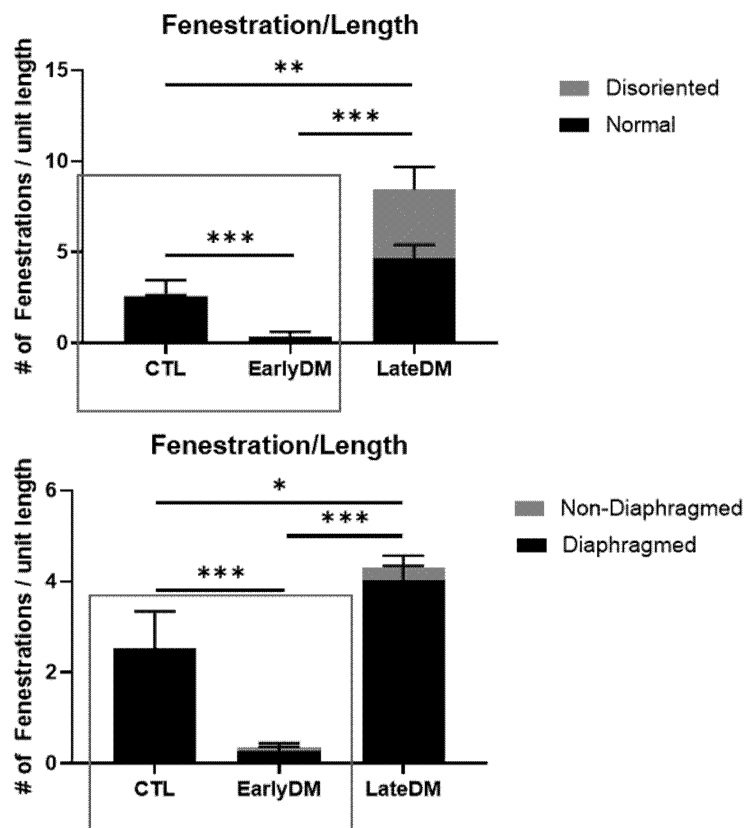


도면13



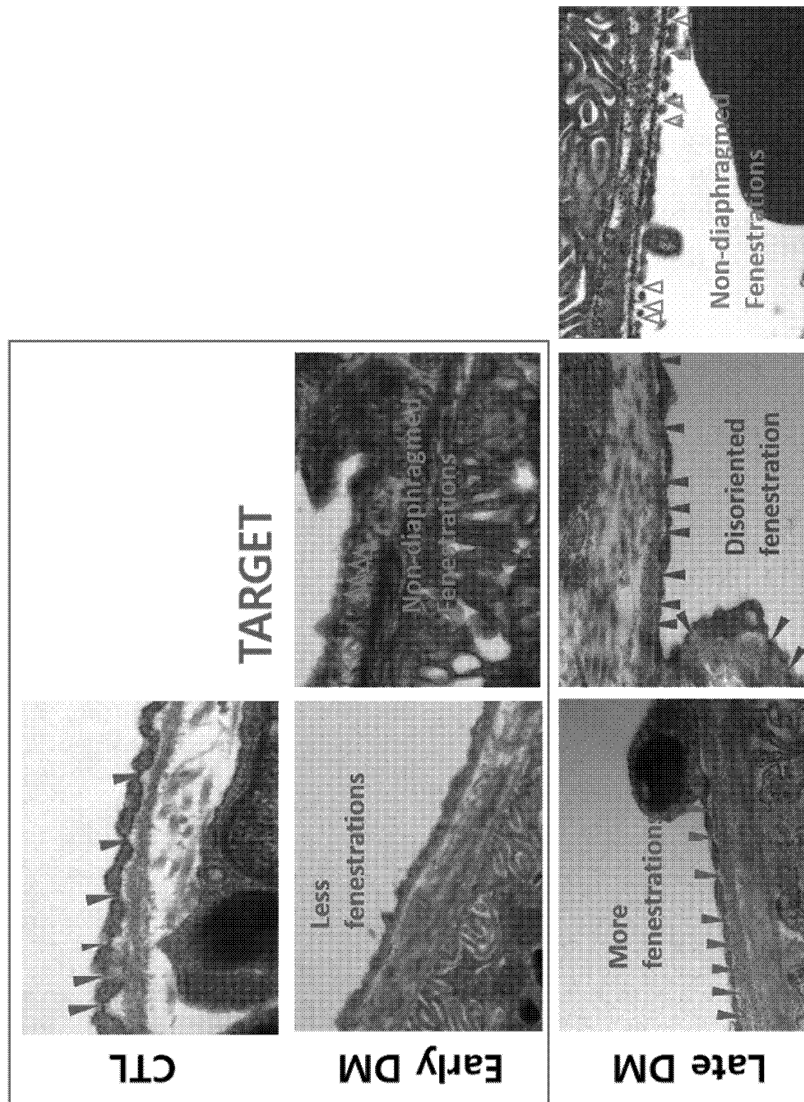
도면14a

1) Fenestration change in diabetic animal model

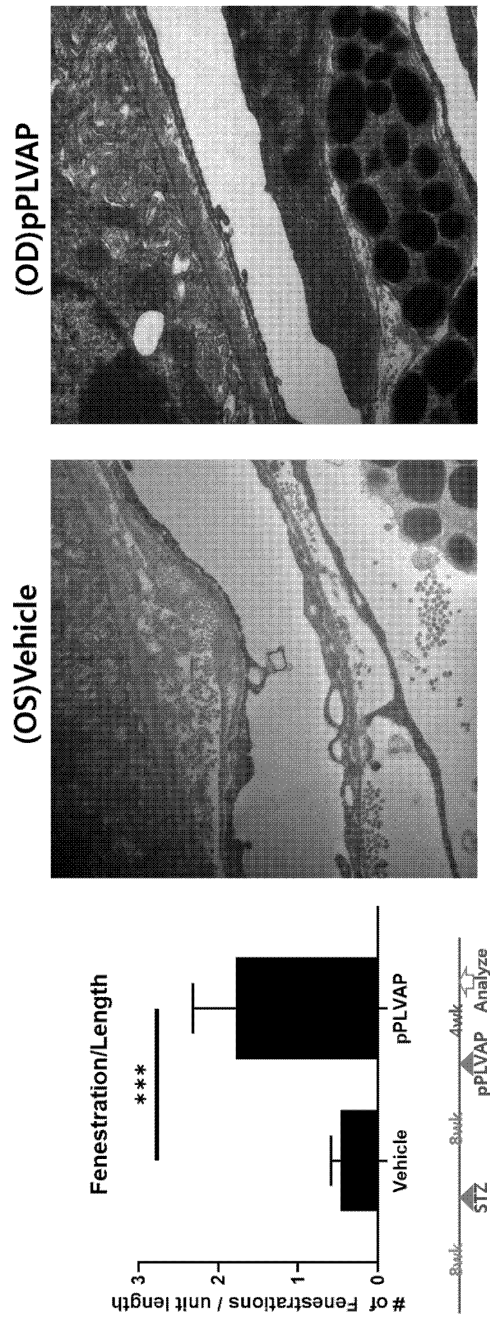


도면14b

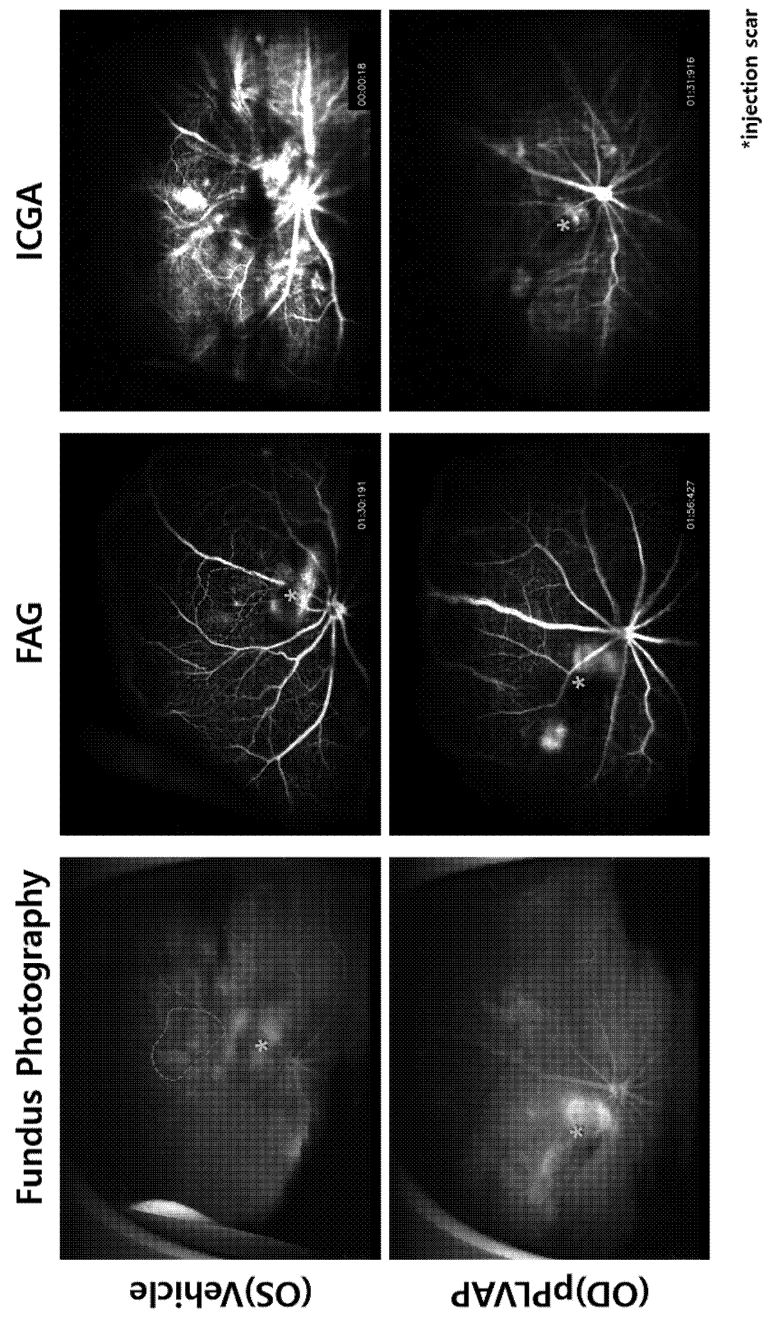
2) Abnormal Fenestrations are induced in diabetic animal model



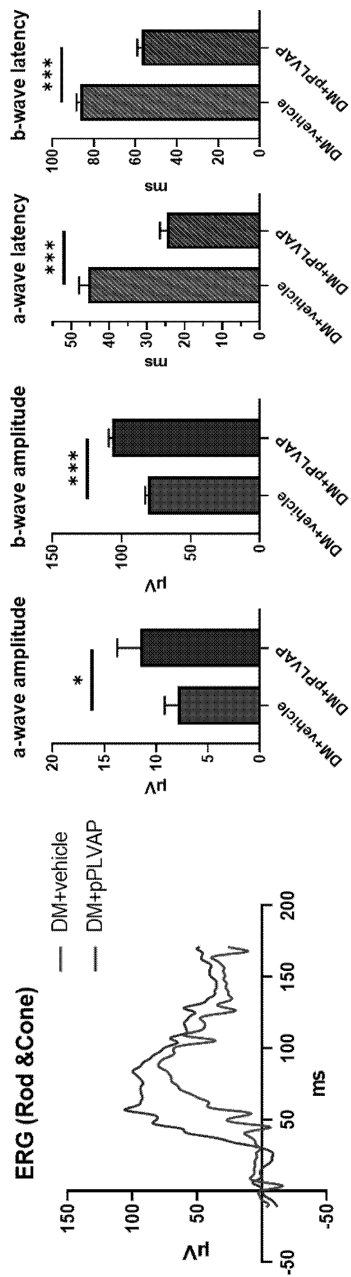
도면15



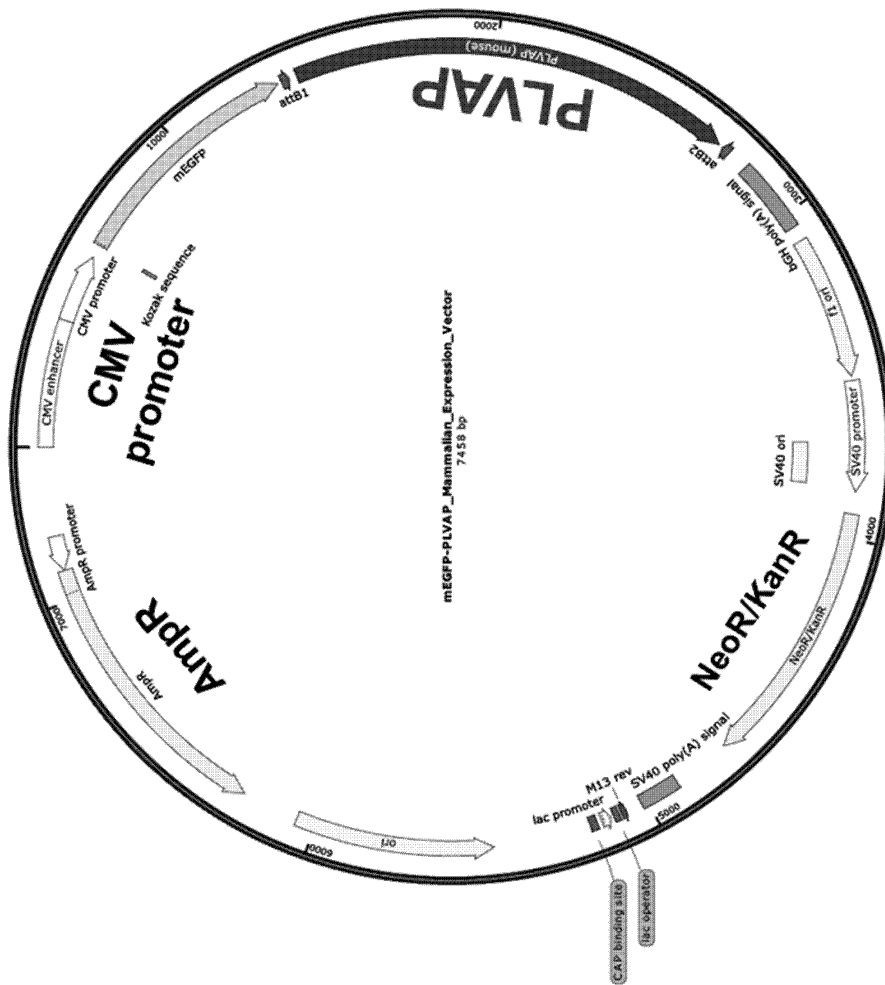
도면16



도면17

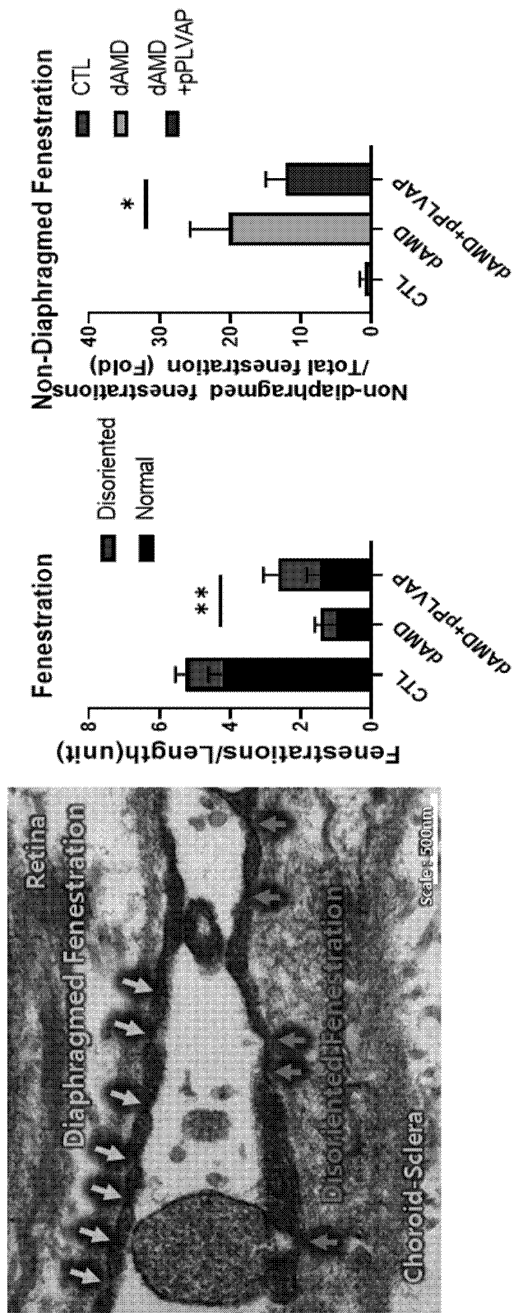


도면18

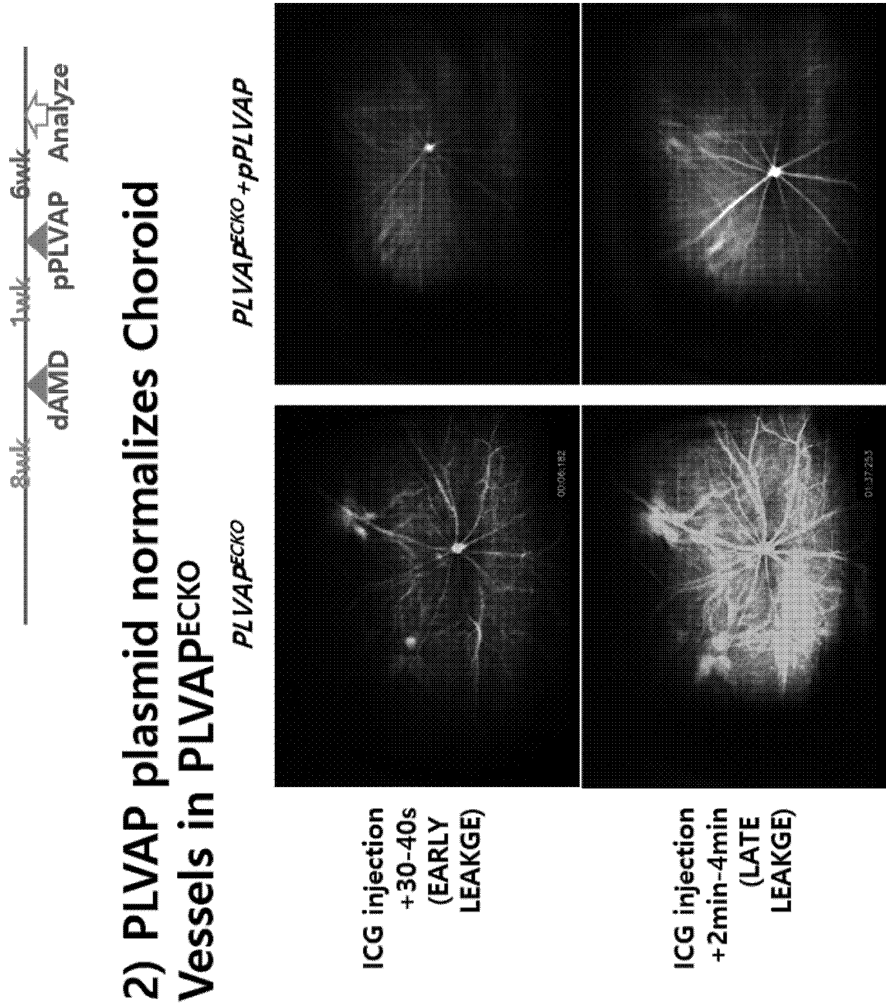


도면19a

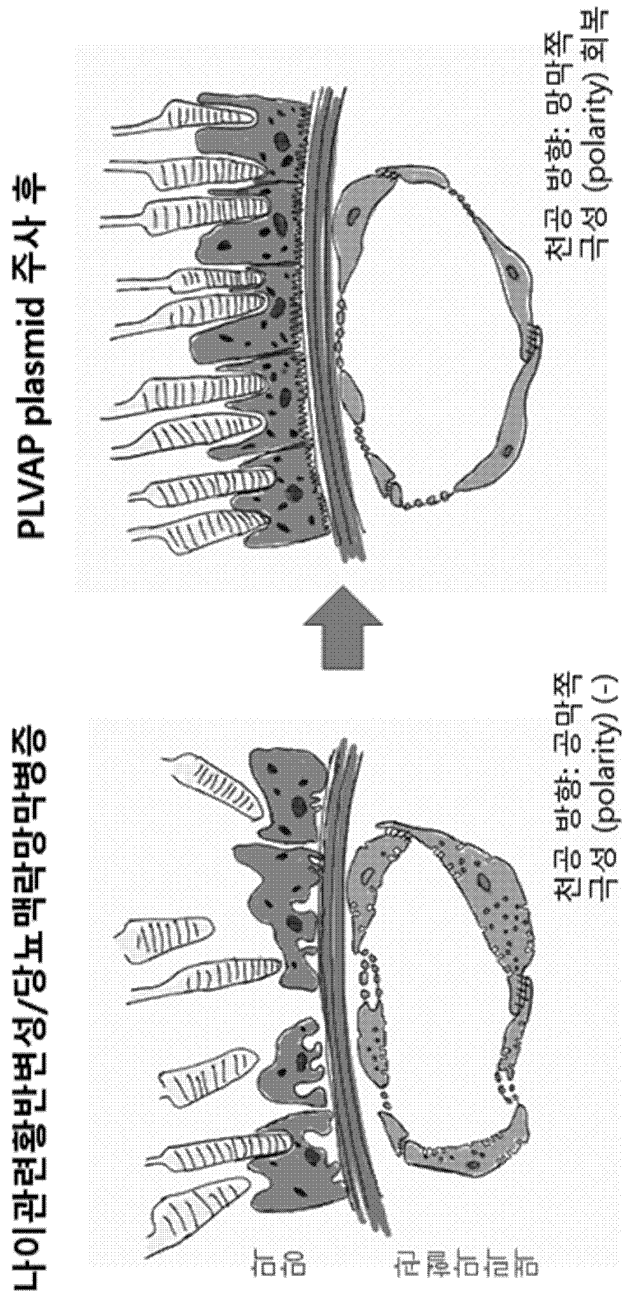
1) PLVAP plasmid restores fenestration in postmature dAMD



도면19b

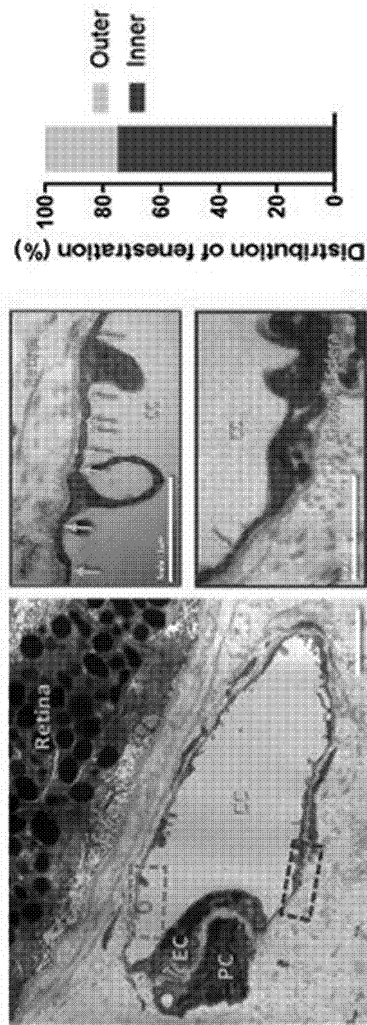


도면20



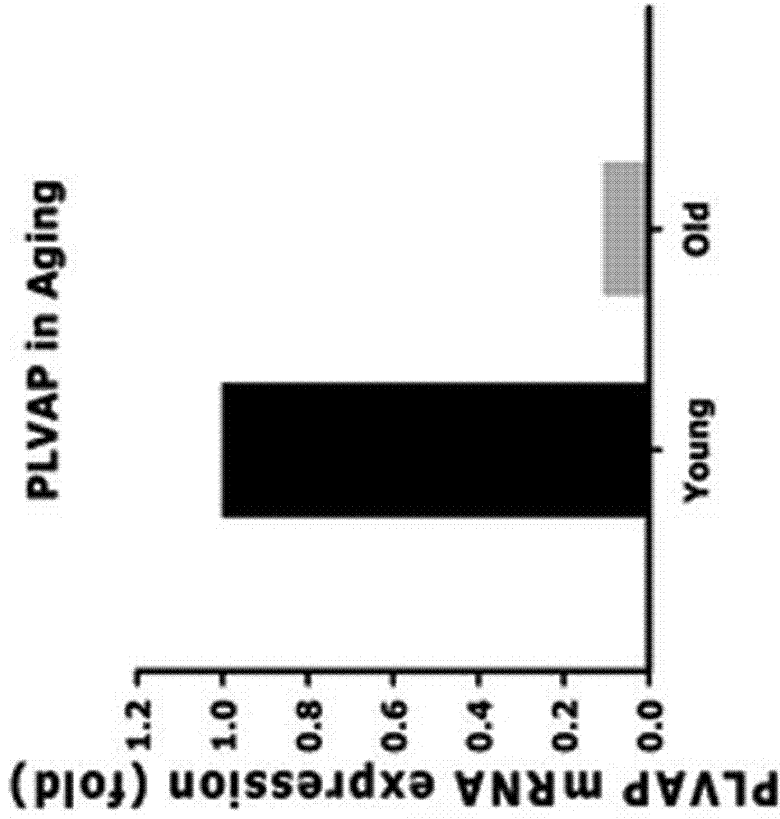
도면21a

Distribution of Fenestrations in Non-diseased human choriocapillaris



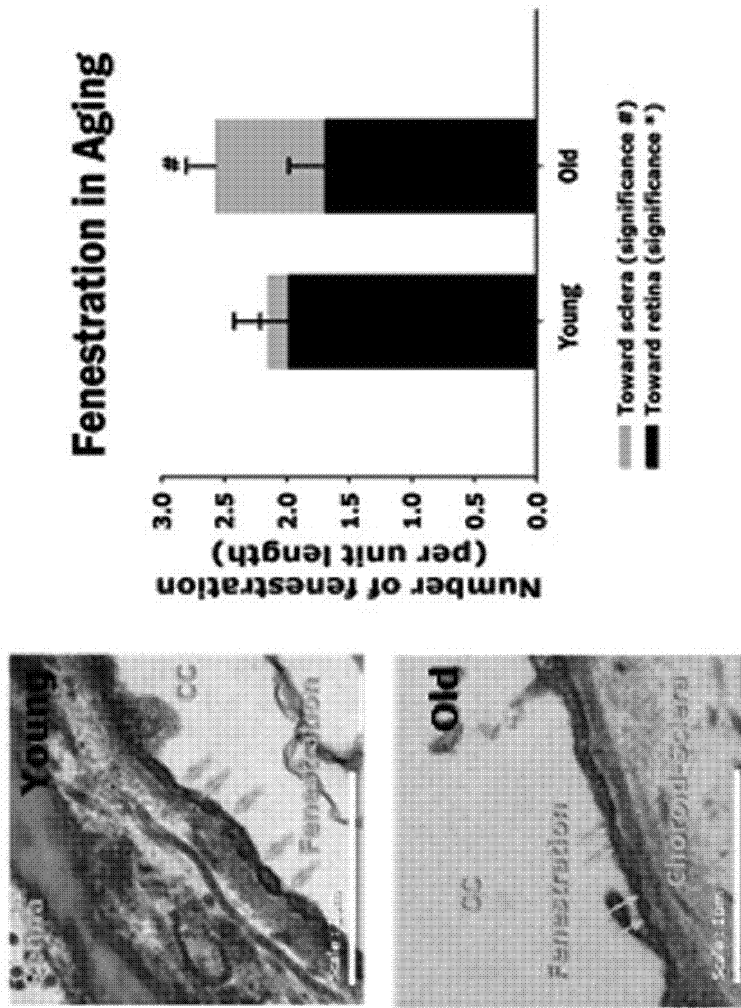
도면21b

PLVAP is reduced in aged human

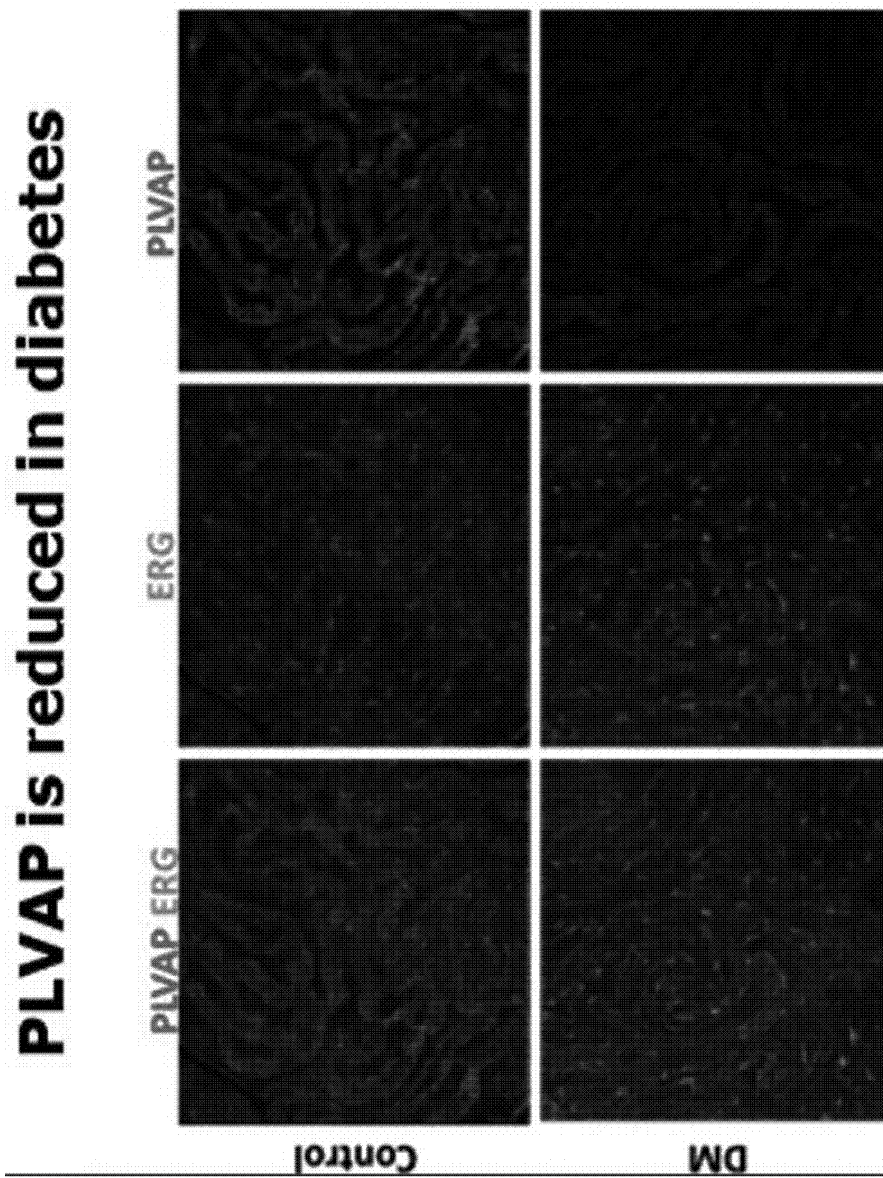


도면21c

Disoriented Fenestration with aging

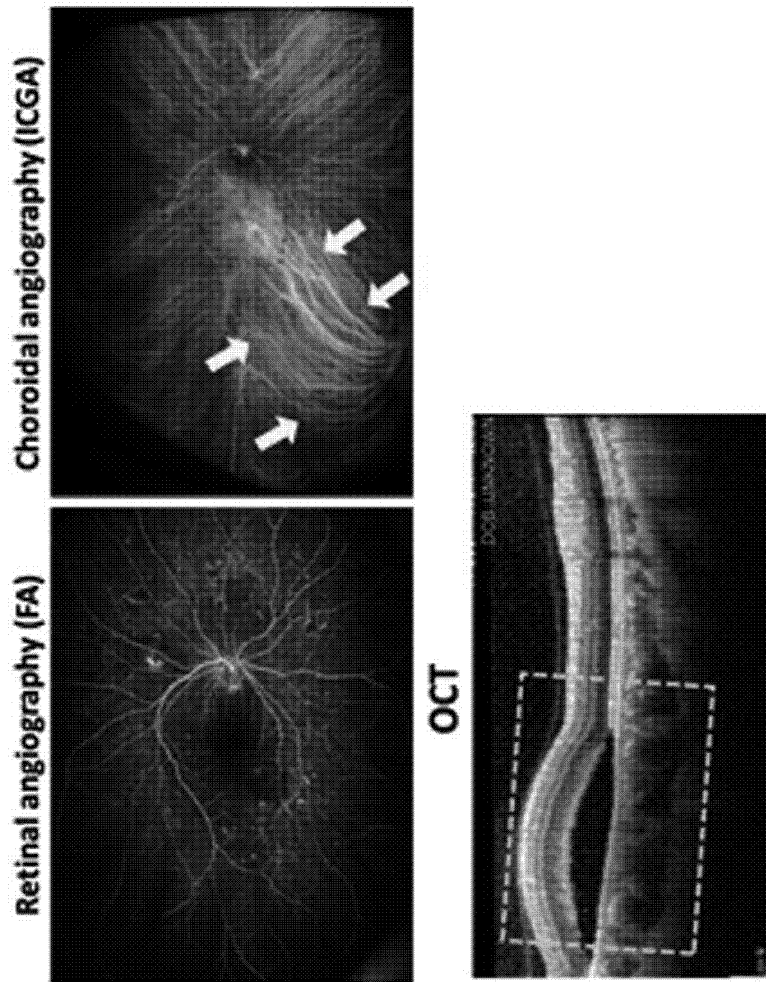


도면21d



도면21e

Diabetic choroidopathy in human



서열 목록

- <110> THE ASAN FOUNDATION
University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating retinal or choroidal disease comprising PLVAP as an active ingredient
- <130> MPCT21-098
- <150> KR 10-2020-0131953
- <151> 2020-10-13

<160> 25
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 1329
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hPLVAP
 <400> 1

atgggtctgg ccatggagca cggagggtcc tacgtcggg cggggggcag ctctcggggc 60

tgctggtatt acctgcgcta cttcttctc ttcgtctccc tcaccaatt cctcatc 120

ctggggctcg tgctcttcat ggtctatggc aacgtgcacg tgagcacaga gtccaacctg 180

caggccaccg agcgccgagc cgagggccta tacagtcagc tcctagggt caccggcctcc 240

cagtccaact tgaccaagga gctcaactc accaccgcg ccaaggatgc catcatgcag 300

atgtggctga atgctcgccg cgacctggac cgcataatg ccagcttccg ccagtgccag 360

ggtgaccggg tcatctacac gaacaatcag aggtacatgg ctgccatcat cttgagtgag 420

aagcaatgca gagatcaatt caaggacatg aacaagagct gcgatgcctt gctcttcatg 480

ctgaatcaga aggtgaagac gctggagggtg gagatagcca aggagaagac catttgact 540

aaggataagg aaagcgtgct gctgaacaaa cgcgtggcgg aggaacagct ggttgaatgc 600

gtgaaaaacc gggagctgca gcaccaagag cgccagctgg ccaaggagca actgcaaaag 660

gtgcaagccc tctgcctgcc cctggacaag gacaagttg agatggacct tcgtaacctg 720

tggagggact ccattatccc acgcagcctg gacaacctgg gttacaacct ctaccatccc 780

ctgggctcgg aattggcctc catccgcaga gcttgcgacc acatgcccag cctcatgagc 840

tccaaggtgg aggagctggc ccggagcctc cgggcggata tcgaacgcgt ggccccgcag 900

aactcagacc tccaacgcca gaagctggaa gcccagcagg gcctgcgggc cagtcaggag 960

gcgaaacaga aggtggagaa ggaggctcag gcccgggagg ccaagctcca agctgaatgc 1020

tcccggcaga cccagctagc gctggaggag aaggcgtgc tgcggaagga acgagacaac 1080

ctggccaagg agctggaaga gaagaagagg gaggcggagc agctcaggat ggagctggcc 1140

atcagaaact cagccctgga cacctgcac aagaccaagt cgcagccgat gatgccagtg 1200

tcaaggccca tgggccctgt cccaacccc cagcccatcg acccagctag cctggaggag 1260

ttcaagagga agatcctgga gtcccagagg cccctgcag gcatccctgt agccccatcc 1320

agtggctga 1329

<210> 2

<211> 1317

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mPLVAP

<400> 2

atggggctct ccatggaccg cagcccatat gcccgcacgg gggaccagca gcgcggctgc	60
tggtactacc tgcgctatct cttctctctt gtgtcgtca ttcagttcct catcatcctg	120
ggcctggtec tcttcatgat ctatggcaat gtgcacgcca ccactgagtc cagcctgcgc	180
gccacggaga tccgcgccga cagcctgtac agccaggtgg ttggactatc ggcctcacag	240
gctaacctga gcaaacagct gaacatcagc ttgcttgtca aggaaacagt catgcagcaa	300
ctgttgacta cgcgacgtga gatggagcgc atcaacgcca gcttccgcca gtgccaaggc	360
gacctgatca cctacataaa ctataatcgc ttcacgccc ctatcatcct gagcgagaag	420
cagtgccagg aacagctgaa ggaggtcaac aagacctgcg aagctttact cttcaagctg	480
ggagaaaaag ttaagacact ggagatggag gtggccaagg agaaggcagt gtgctccaag	540
gacaaggaga gcctgtggc aggaaagcgg cagacggaag agcagctgga ggcctgtggc	600
aaagcacgcg aaaggcaaca gcaggagcag caggtgaccg aggagaacct gcgcaaggtg	660
cagtcctctg gcatccact ggaccaggag aagttccagg cggacgtgct gagtgcgtgg	720
cgggactcgc tgatctaccg taccttggaa accctgccct accactacca gctgatgccg	780
gagtacgctg cctccgtcg gacctgcgag agcctgccc ggatcatgac caccaagata	840
gaagagctgg cccgcgggct gcgcgccggc attgagcgcg tgaccctga gaatgcagaa	900
ctgcgcgcc agaagtggga gctagagcgc gcggcacagg cggcgagga ggcgcgggcg	960
cgcgccggga ccgaggcgca ggcgcgagaa acccagctac gggcggagtg cgcgcgccag	1020
acgcagctgg ctctggagga gaaggcggcg ctgcgcgcgc agcgggacaa cctagagcgc	1080
gagctggagg cgcgtaagcg ggagctggag caactgcgca ccgaggtgga tgtgcgatt	1140
agcgcgctgg acacctgcgt caaggccaag tcgctgccag ccgtcccgcg gagagtctca	1200
ggcccacccc cgaacctcc acccattgat ccagctagcc tggaggaatt caagaaaagg	1260
atcctggagt ctacgggct ccctgtagtc aacctgctg cccaaccag cggttga	1317

<210> 3

<211> 584

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> h/mCMV

<400> 3

gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60
cataatgga gticcgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcca 120
acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaatagga 180

ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240
aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt 300
ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcttac ttggcagtac atctacgtat 360
tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc 420
ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt 480
ggcacaaaa tcaacgggac ttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc ttagcgcaaa 540
tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agct 584

<210> 4

<211> 1559

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCD144

<400> 4

catccatgcc catggcctca gatgccagcc ataagctgtt gggttcacaa cctcgactcc 60
aggctggact caccctgtc tccccacca gctgacacc tccacctggg tatctaacga 120
gcatctcaaa ctcaacctgc ctgagacaga ggaatcacta tcccctctc ctccaaaat 180
atccttccat cacactcccc atcttgtgct ctgatttact aaacggccct gggccctctc 240
tttctcaggg tctctgcttg ccagctata taataaaaca agtttgggac ttcccaacca 300
ttcacccatg gaaaaacaga agcaactctt caaaggacag attcccagga tctgccctgg 360

gagattccaa atcagttgat ctggggtgag ccagtcctc tgtagttttt agaagtcct 420
cctatgtctc tctgggtcag cagaatcttg gccctccct tccccacgc ctcttggttc 480
ttctgggctc tgatccagcc tcagcgtcac tgtcttcac gccctctttt gattctcgtt 540
tatgtcaaaa gccttgtgag gatgaggctg tgattatccc cattttacag atgaggaaac 600
tgtggctcca ggatgacaca actggccaga ggtcacatca gaagcagagc tgggtcactt 660
gactccacc aatateccta aatgcaaaca tccctacag accgaggctg gcacctaga 720
gctggagtcc atgcccgtc tgaccaggag aagccaacct ggtcctccag agccaagagc 780

ttctgtccct ttcccatctc ctgaagcctc cctgtcacct ttaaagtcca tccccacaaa 840
gacatcatgg gatcaccaca gaaaatcaag ctctggggct aggcctgaccc cagctagatt 900
tttggctctt ttatacccca gctgggtgga caagcacctt aaaccgctg agcctcagct 960
tcccgggcta taaaatgggg gtgatgacac ctgcctgtag cattccaagg aggggttaaat 1020
gtgatgctgc agccaagggt cccacagcc aggcctctttg caggctgtgg gttcagagtc 1080
ccagagctga ggccgggagt aggggttcaa gtgggggtgcc ccaggcaggg tccagtcca 1140
gccctctgtg gagacagcca tccggggccg aggcagccgc ccaccgagg gcctgcctat 1200

ctgcagccag ccagccctc acaaaggaac aataacagga aaccatcca gggggaagtg 1260
ggccagggcc agctggaaaa cctgaagggg aggcagccag gcctccctcg ccagcggggt 1320
gtggctcccc tcaaagacg gtcggctgac aggcctccaca gagctccact cacgctcagc 1380
cctggacgga caggcagtc aacggaacag aaacatccct cagccacag gcacggtgag 1440
tgggggctcc cacactcccc tccaccccaa acccgccacc ctgcgcccaa gatgggaggg 1500
tcctcagctt ccccatctgt agaatgggca tcgtccact cccatgacag agaggctcc 1559

<210> 5

<211> 2510

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mCD144

<400> 5

ctagtagcag aaacaaggct ctctggaaga gcaactgatg ctcttaggta ctgaagcatc 60
atcctgcccc agagaccact cgcatatgaa gcacacatat tcagctgcc ttacttgtgt 120
taatgattgc cagtgtccct ctgacctct agccctgaaa agtgtggcct gaaggtcatt 180
tcagagacgg ggagagctgc tcagagaagc caatcggcga gtctaggaca cacagacagg 240
atctagtccc agagtctgct agcctaggtg agcgtccct ggccccttat accacttct 300
tctccagctt gcatctaate tgctctggca gaccatcgtg tttcctgtct tcctggcagc 360

ctccagcacg ctcagtgcta ctccctgcgc atgcgccctc ctcccagtac cttctctgac 420
tccagtgggc ttggagtgcg aggaggaagg gtgaggaagg ggtgaaatca ggtattggat 480
ccacaggggg tcgaagagc actagcctgg ccttttggga ctgaacttct gctatgaaga 540
cctccactgc catccctgga gtccggggca catccaaggc ttgctgtcca tcgtttactg 600
tttacagatg acaacaatga ctgtgttcgg ggcagaaata tccaccaggg ctagagtaca 660
aaaggagttt gcattgatgg ccggacaggc cctgtccctg gcagcctgcc agcgtgagt 720

atgagaccca gcgggaagtg ctaccctggc agacgtgtcc actgagtaca cagaccacca	780
aggcaggcag ctctcgggga agctgtctat gctgggccag cccaccttga gggcagggaa	840
cagaacagat tgtggcagag aggaaaatgt ggagcttctg tttgttcaca gacacacgca	900
ctcgcccacg cagcacgca cgcacgcacg cagcacgaa tgcacgcacg cagtagttga	960
atgctatgga ttccgctcag agctgagaac agccccagcg acagttccct ggctctctc	1020
cttactctga tgtctctatc tgtcttcaca tggcttcagg acgtaatac tccatcctaa	1080
tgtacactcc ttccctggg cctccgttcc agttcagttc tcagaggacc tggaggagg	1140
gattggctac accaactttg ctttcgttca ccaagcccat gtctctactt ggggtgtctaa	1200
tgggcatctc caacattacc taccccaaac agaaaaccct ttttccccc caaccacacc	1260
ccacctacc cccacagtat ttttccatg cccggaaaga tctgctctct tatggtcct	1320
ctttgcctca ctgaaaagca ggacaagtgt gggacttccc aaacttttat gcatgaagaa	1380
accaggcaa ttgccaaaa ggtacactct gggggtctgt catttactct gagccagaac	1440
cctgaaattt ttactaacc atcacataat gaatgaagag aatctttttc ttttttttt	1500
tttttcttt tttttggtt ttccagacag ggtttctctg tatagccctg gctatcctgg	1560
aacacactct gtagaccagg ctggcctcga actcagaaat ccacctgcct ctgcctccc	1620
agtgtcggga ttaaaggcgt gcgccaccac gcctggctga atgaagagaa tcttgacctc	1680
atctcccag cctcttggtc ctgagggacc ctggtctacc tactgctttg ctgtctctt	1740
agctctctct acttttttgc tgactcagac ctatggctat ctccattata cagatgagga	1800
gactgaggca tggatccctg gttggtccat ggtcacgtga agcccatcac ccagtatttg	1860
taaagtgaga tgggccaggc tggtagcttg gaactgaaac tcacactgcc ctacctggaa	1920
gaatctgaca ggcaaaatct gctgtgaaa gtgattgtct gtcacgtttc tcagctgccc	1980
gactctgaga actccacagc cccctttcgt tccaccatac tacagagtgc ccacggaaag	2040
ccggctctgt ggagaagctg aggtagctgg gtttctgtct gggttactct gtccagcgag	2100
gaaacaagta ccttagacc actaagctc tgtttctga actgtaaagt gggggatatg	2160
acacctgcct cccagggatg gctgaatgct ctggcagaag cttagagccc ccacagctac	2220
ccctaggctc acagctctc cgatgagacc tagaattgag gtatgagttg aataccccag	2280
gcaggtcac ggcttcacg ggcccaggct gaccaagctg aggccgccca ccgtagggt	2340
tgcctatctg caggcagctc acaaaggaac aataacagga aaccatccc aggggaagt	2400
ggccagggcc agttgaaaa cctgcctccc tcccagctg ggtgtggctc cctctcccc	2460

tcctgaggca atcaactgtg ctctccacaa agctcggccc tggacagact 2510

<210> 6

<211> 2527

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hTIE1

<400> 6

atttcctctt cctccccagc accgaccac actgaccaac acaggctgag cagtcaggcc 60

cacagcatct gaccccaggc ccagctcttc ctggctggcc tgggtcggcc tctggagtat 120

ggtctggcgg gtgccccctt tcttctctcc catcctcttc ttggcttctc atgtgggcgc 180

ggcgggtggac ctgacgtgc tggccaacct gcggctcacg gaccccagc gcttcttctt 240

gacttgctg tctggggagg ccggggcggg gaggggctcg gacgcctggg gcccgccctt 300

gctgctggag aaggacgacc gtatcgtgcg cccccgccc ggccacccc tgcgcctggc 360

gcgcaacggt tcgaccagg tcacgtctcg cgcttctcc aagccctcgg acctcgtggg 420

cgcttctctc tgcgtgggcg gtgctggggc gcggcgcacg cgctcatct acgtgcacaa 480

cagccctgga gccacctgc ttccagacaa ggtcacacac actgtgaaca aaggtgacac 540

cgctgtactt tctgcacgtg tgcacaagga gaagcagaca gacgtgatct ggaagagcaa 600

cggatcctac ttctacacc tggactggca tgaagcccag gatgggcggg tcctgctgca 660

gtcccaaat gtgcagccac catcgagcgg catctacagt gccacttacc tggaagccag 720

ccccctgggc agcgccttct ttccgctcat cgtgcggggt tgtggggctg ggcgctgggg 780

gccaggctgt accaaggagt gccagggttg cctacatgga ggtgtctgcc acgacatga 840

cggcgaatgt gtatgcccc ctggcttcac tggcacccgc tgtgaacagg cctgcagaga 900

gggcccgtttt gggcagagct gccaggagca gtgcccaggc atatcaggct gccggggcct 960

caccttctgc ctccagacc cctatggctg ctcttctgga tctggctgga gaggaagcca 1020

gtccaagaa gaccgatcc ccagatcct caacatggcc tcagaactgg agttcaactt 1080

agagacgatg ccccgatca actgtgcagc tgcagggaac cccttccccg tgcggggcag 1140

catagagcta cgcaagccag acggcactgt gctcctgtcc accaaggcca ttgtggagcc 1200

agagaagacc acagctgagt tcgaggctgc ccgcttggtt cttgcggaca gtgggttctg 1260

ggagtgccgt gtgtccacat ctggcggcca agacagccgg cgcttcaagg tcaatgtgaa 1320

agtgcacccc gtgcccctgg ctgcacctcg gctcctgacc aagcagagcc gccagcttgt 1380

ggtctccccg ctggtctcgt tctctgggga tggaccatc tccactgtcc gcctgcacta 1440

ccggccccag gacagtacca tggactggtc gaccattgtg gtggaccca gtgagaacgt 1500

gacgttaatg aacctgaggc caaagacagg atacagtgtt cgtgtgcagc tgagccggcc 1560

agggaagga ggagaggggg cctgggggcc tcccaccctc atgaccacag actgtcctga 1620

gcctttgttg cagccgtggt tggagggtg gcatgtggaa ggcactgacc ggctgcgagt 1680

gagctggtcc ttgcccttgg tgcccgggcc actggtgggc gacggtttcc tgctgcgcct 1740

gtgggacggg acacgggggc aggagcggcg ggagaacgtc tcatcccccc aggcccgcac 1800

tgccctcctg acgggactca cgcctggcac ccactaccag ctggatgtgc agctctacca 1860

ctgcaccctc ctggggccgg cctcggcccc tgacacgtg cttctgcccc ccagtggggc 1920

tccagcccc cgacacctcc acgcccaggc cctctcagac tccgagatcc agctgacatg 1980

gaagcacccg gaggtctctg ctgggccaat atccaagtac gttgtggagg tgcaggtggc 2040

tgggggtgca ggagaccac tgttgataga cgtggacagg cctgaggaga caagcaccat 2100

catccgtggc ctcaacgcca gcacgcgcta cctcttcgc atgcgggcca gcattcaggg 2160

gctcggggac tggagcaaca cagtagaaga gtccaccctg ggcaacgggc tgcaggtga 2220

gggcccagtc caagagagcc gggcagctga agagggcctg gatcagcagc tgatcctggc 2280

ggtggtgggc tccgtgtctg ccacctgcct caccatctg gctgcccttt taacctggt 2340

gtgcatccgc agaagctgcc tgcacggag acgcaccttc acctaccagt caggctcggg 2400

cgaggagacc atcctgcagt tcagctcagg gaccttgaca cttaccggc ggccaaaact 2460

gcagcccag cccctgagct acccagtgt agagtgggag gacatcacct ttgaggacct 2520

catcggg 2527

<210> 7

<211> 1063

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mTIE1

<400> 7

aaaagaaaa gaaaaacctg cagaagtatg tgccagcaga ctggaagcta agggaagagg 60

agcctgggct tggacaacct ggctctgtc ctttctaact gtatgacctt aggcaagttt 120

tgagcttttg ctccctggtt ataaaacat catcctggaa gaggataaca ctcacctccc 180

aggacagtgt ggicctgaaa ggacgagagc atcactaaag ggccccggca cataattgac 240

atccaataaa cattaattat tatgacagca ggaacacaag atgactctga agttagtgtc 300

tcaggtaatg ggtgttatcc ttgactcag aaagcttggg agaggtgagg gtgtagctta 360

ggaaacacag atgcaaatgc attgggagct gaaaggccac accagagcta ctgactcagg 420

ggtgacagtt aatgccgagg gagtggatga atgtgctccg tagttattac agcaaaggat 480
 gtcaacttca ctggaagcca tgaggatgcc agggagaaag ggcatTTGGT gcccgcgagg 540
 tggccaagag atgccagctt ctttggctta cgatagaccg tcaaaaatat gctaagtggc 600

 atttaaatga attgatgacc tgacagctaa caggcaggga agggccaggg aaggaggggc 660
 cttggaaggt ctggggtcac aggtctgaag caggctgac acattcttct cctcggtctt 720
 gccacttca ggttacagat tttaacgtcc agttgacta gcccggggca gctcccctcc 780
 ccacactaca acatttctca tacttgagcg tagggtggcc tctccctacg cctgaccttt 840
 cgttctctct cacccaagca ctttctaag aagtttgta tctgcatctt tctctgtccc 900
 ctttcttcc cccgcccc tgctggttag atgttcttcc ctctgagcca acacctccat 960
 ctgggaggga tgctgtgtc tggctctcca gcttccaag gtagggcca gaccacctg 1020

 tgtctgtgtc tctctggccc taaccgatct tcaatcccag cca 1063

 <210> 8
 <211> 1234
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hFLT1
 <400> 8

 gttaagcaa ttggtagaa ccgaacagtc cattctgtc cattggcctt cgtttatagg 60
 agagcttgt aagaaatgac aagatctct gccagatgct ttccaggatc actggtggtt 120
 cctcacactc ttgggtgtc tggaattgc atgtgtctga ttaaattgct ggattttata 180
 ccagattgag ggaggggaag gaaattggag gaatgggta ttgaggag ggcttgaaaa 240
 gaaagcctct gacttagctc acggggctgc aggggggttc attaaggaaa cagttgcatt 300

 gagtctgtc aagatagtg actagattc ctgcattgcc gctggggcgg atgtggggag 360
 atgtcaagaa ttcttggga ttcccatcc atcttggtta agctggatgc ctgaaagctg 420
 ttctgattg ctgtctctt cctcaattt gagctcttg aggaacttga tctgtctca 480
 cagatacaca cacagtgt aagagctaga tggaacctca ttgaccaat ctactcatgc 540
 cagagatgag aaaaccggc cagaggagc cagtgtgtt tttcaagtc aacagctggc 600
 tagcggcagg cctaggaaca gaacctgat ttctgtctac agacaacatc tcttctcac 660
 tgggtgattt cctcttccc agacggaaga cagatgttca aatatttatt gactaacatt 720

 attacagtgc taaaatttct ttcgaaatga catcttttta atatgaagtt ttcttctatt 780
 ttcttaacgc acataagggg tttaactaa gaatcaaat gatggctgct tagtagcatg 840

ccaagagatt tgatgagaag attaactttc cttacgagca cttggatatcc ttttctgaa 900
cagctgtggc ttacatactt gtggcttatg gtactagctt tgtctttcgc cacttctctc 960
cacacacaca ctgggttcca gctacacaaa ctctacccta gtcaaacaaa ttattccccc 1020
ttcttcagag gcgccttcac tttcatcact ctgttcatgc tgctcgtctg cctgcaagac 1080
cttttcctc cctctgtgtc tctcctctc ctgctggcaa gatccagccc agtaatcacc 1140

atctctggga gctcctcctt gtagctccca gacagcactt gccatttctt ctgctctcct 1200
gtagccctga ggtgtactcc tcttcagta attc 1234

<210> 9

<211> 1360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mFLT1

<400> 9

tggtcccat taggagccat tttatcacgg gtatctggca ggttctattg aggctatitt 60
tcaaacctgc agtatttaca gggacaagac tgggctgctc cggggaggcc gggacgactt 120
cagccttcca gttaatggat gcataattga ggaacaacgt ggaattagt tcatcgtaaa 180
tgatctagt tctcaagtta atttcacccg tttttgttc caagaacatt cgagtcagtc 240

atcttggcta gccggcttcc accaaaaaga ttgttttcc atccagcgtt tcagacctag 300
agttcaagtt cttggccctt acaagttgca ggagcgtgtc tcacgccttg gctttttttt 360
ttttttttt ttttttttt aaggtaacat gttattcctt gttttgttc taggaagcag 420
agggttgagg aaatggcttg ggcgggtgca ttaatgcagc cgaaaaagac acagactccc 480
tcccttggga cccgcgcggc cccgcgctct ttccgaaggt gcctggcaag gcgtccggtt 540
ccctcggacg ctccgggtcc aagtgcctta agcggagggt ctctggcgcc ttccttcgct 600
gtctggcaac agtctggcgg ggtcaggac cggcgggacc gctcgggaga gggtcgact 660

gcgcctcgtt cctcggtgcc agggacaccg tcgcgggagg cgcggccagc ttccttagga 720
taagacttcc cgccccgggg gcagggcggt gcacttagac ggtccctcc tcagtttcgg 780
gcggtcacca gagctgagta agctcgggtg agggagctgg gtaaggattt cctgagagcg 840
atgggcagga ggggctgggg cagcagagca cagagcaagg accctgaacc tcggaacctg 900
tccggcgacc cgcgcgccta gcgccaccgc acgcgcgctc tggccccgg gctaccgcc 960
ctgcgccgcc cccgccctc cgggaggaag aagaggtag gtggggaggc ggatgagggg 1020
tgggggaccc cttgacgtca ctggaaggag gtgccgggt aggaagtggg ctggggaaag 1080

gttataaatc gcccccgcgc tcggctgcac ttcagcgagg tccttgagag gctcggagcg 1140
 cggtagcgga cactccccggg aggtagtgtc agtgggtgtg gctgctgctc ggagcgggct 1200
 ccgggactca agcgcagcgg ctagcggacg cgggacggcg aggatcccc cacaccaccc 1260
 ccctcggtg caggcgcgga gaagggtctc cgcggcgcca agcagaagca ggaggggacc 1320
 ggctcgagcg gctgcgccgt cggcctcgga gagcgcgggc 1360

<210> 10

<211> 423

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hEMCN

<400> 10

acattcacta caccttttcc atttgcta ataggccctgc caggctggga gggaattgtc 60

cctgcctgct tctggagaaa gaagatattg acaccatcta cgggcacat ggaactgctt 120
 caagtacca ttctttttct tctgcccagt atttcagca gtaacagcac aggtattttt 180
 gtctcttatt cctctggtgg tacggattgg aaatcactag taggtgactc agcctcagtt 240
 tactttcagg gatcttcccc tgacacttag atgcagcaat tcctttgatg agttgagtgt 300
 ttggatgttg acttggagtg cgtggagaag gcttgagaga gacggtatct gtttctactg 360
 aagggaatg ttgcgggta cagcagcctg aaagcatgtt cgatgaaatc acaaagtact 420
 gga 423

<210> 11

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mEMCN

<400> 11

aggggaatgc caggccaag aagtgggagg gggaggggga gaggagtggg ggggtatggg 60
 ggacttttgg aatagcagt gaaatgtaa tgaagaaaat atctaataa aatatttaa 120
 aagaaagaaa gaaatgtctt gaaaacctct ctgggcagta ataagaggcc agcttacttc 180
 ctcaagagca gaacgtgac cagttcatac ttgtatttgc ctctagaagg tggctttcac 240
 tgacttggct tatgagtga gaagagagaa gaaatgcaat tccttgtgga ttttgtactc 300
 aaatccagac cttgggaagt cacagccttt tcagccgacc tggggggcta cttggtgagg 360

tctctttaca gttctctaa atgcacttt caaaacaaa gttagaaagc tctctggccc 420

ttttcaaga agggctctctt cctgttcaaa tcccatcctg acctttttgt tgaagaagag 480
 taaaataatg cagtaacaaa aacacaagtg gctgccaaag gaagagagag gaaaaaaaaa 540
 gaagtctctg taaggggctg aaacaataaa tctcctctct gctgacctcc caaagggagt 600
 gcgtgtatctt ccctagttc tttatcagaa tccccaaaat aagtaggaat gggcagcgtc 660
 tgctcacagt cagtacacct ttccatttg ctaatacggc ctggccaggc tgagaggaat 720
 ccttcctctg cttacct 738

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> attB1

<400> 12
 acaagtttgt acaaaaaagc aggct 25

<210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> attB2

<400> 13
 accactttgt acaagaaagc tgggt 25

<210> 14
 <211> 588
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IRES

<400> 14
 gcccctctcc ctccccccc cctaacttta ctggccgaag ccgcttgaa taaggccgt 60

gtgcgtttgt ctatatgta tttccacca tatlgcgtc ttttgcaat gtgagggcc 120
 ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttctagggg tctttccct ctgccaaag 180
 gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac 240
 aaacaacgtc tgtagegacc ctttcaggc agcggaaccc cccacctggc gacaggtgcc 300
 tctgcggcca aaagccagt gtataagata cacctgcaa ggcggcaca cccagtgcc 360
 acgttgtgag ttggatagtt gtggaagag tcaaatggct ctcctcaagc gtattcaaca 420

aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggt	480
gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg	540
gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacc	588
<210> 15	
<211> 63	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> T2A	
<400> 15	
ggaagcggag agggcagggg aagtcttcta acatgcgggg acgtggagga aaatcccggc	60
ccc	63
<210> 16	
<211> 717	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> eGFP	
<400> 16	
atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
ctcgtgacca cctgacctc cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
gacctacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
tacctgagca cccagtccaa gctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc	660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaag	717
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> hGAPDH Forward
 <400> 17

cctccaagga gtaagacccc 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hGAPDH Reverse

<400> 18

aggggtctac atggcaactg 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPLVAP Forward

<400> 19

agaactcaga cctccaacgc 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPLVAP Reverse

<400> 20

tctccacctt ctgtttcgcc 20

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mGAPDH Forward

<400> 21

tgtccgtcgt ggatctgac 19

<210> 22

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mGAPDH Reverse
 <400> 22
 cctgcttcac caccttcttg 20

<210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mPLVAP Forward
 <400> 23
 gctggtacta cctgcgctat t 21

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mPLVAP Reverse
 <400> 24
 cctgtgaggc agatagtcca 20

<210> 25
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> plasmalemma vesicle-associated protein [Homo sapiens]

<400> 25
 Met Gly Leu Ala Met Glu His Gly Gly Ser Tyr Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Arg Gly Cys Trp Tyr Tyr Leu Arg Tyr Phe Phe Leu Phe Val
 20 25 30
 Ser Leu Ile Gln Phe Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Phe Met Val
 35 40 45
 Tyr Gly Asn Val His Val Ser Thr Glu Ser Asn Leu Gln Ala Thr Glu

50 55 60
 Arg Arg Ala Glu Gly Leu Tyr Ser Gln Leu Leu Gly Leu Thr Ala Ser

 65 70 75 80
 Gln Ser Asn Leu Thr Lys Glu Leu Asn Phe Thr Thr Arg Ala Lys Asp

 85 90 95
 Ala Ile Met Gln Met Trp Leu Asn Ala Arg Arg Asp Leu Asp Arg Ile

 100 105 110
 Asn Ala Ser Phe Arg Gln Cys Gln Gly Asp Arg Val Ile Tyr Thr Asn

 115 120 125
 Asn Gln Arg Tyr Met Ala Ala Ile Ile Leu Ser Glu Lys Gln Cys Arg

 130 135 140

 Asp Gln Phe Lys Asp Met Asn Lys Ser Cys Asp Ala Leu Leu Phe Met
 145 150 155 160
 Leu Asn Gln Lys Val Lys Thr Leu Glu Val Glu Ile Ala Lys Glu Lys

 165 170 175
 Thr Ile Cys Thr Lys Asp Lys Glu Ser Val Leu Leu Asn Lys Arg Val

 180 185 190
 Ala Glu Glu Gln Leu Val Glu Cys Val Lys Thr Arg Glu Leu Gln His

 195 200 205
 Gln Glu Arg Gln Leu Ala Lys Glu Gln Leu Gln Lys Val Gln Ala Leu

 210 215 220
 Cys Leu Pro Leu Asp Lys Asp Lys Phe Glu Met Asp Leu Arg Asn Leu
 225 230 235 240
 Trp Arg Asp Ser Ile Ile Pro Arg Ser Leu Asp Asn Leu Gly Tyr Asn

 245 250 255
 Leu Tyr His Pro Leu Gly Ser Glu Leu Ala Ser Ile Arg Arg Ala Cys

 260 265 270
 Asp His Met Pro Ser Leu Met Ser Ser Lys Val Glu Glu Leu Ala Arg

 275 280 285

 Ser Leu Arg Ala Asp Ile Glu Arg Val Ala Arg Glu Asn Ser Asp Leu
 290 295 300

Gln Arg Gln Lys Leu Glu Ala Gln Gln Gly Leu Arg Ala Ser Gln Glu
 305 310 315 320
 Ala Lys Gln Lys Val Glu Lys Glu Ala Gln Ala Arg Glu Ala Lys Leu
 325 330 335
 Gln Ala Glu Cys Ser Arg Gln Thr Gln Leu Ala Leu Glu Glu Lys Ala
 340 345 350
 Val Leu Arg Lys Glu Arg Asp Asn Leu Ala Lys Glu Leu Glu Glu Lys

 355 360 365
 Lys Arg Glu Ala Glu Gln Leu Arg Met Glu Leu Ala Ile Arg Asn Ser
 370 375 380
 Ala Leu Asp Thr Cys Ile Lys Thr Lys Ser Gln Pro Met Met Pro Val
 385 390 395 400
 Ser Arg Pro Met Gly Pro Val Pro Asn Pro Gln Pro Ile Asp Pro Ala
 405 410 415
 Ser Leu Glu Glu Phe Lys Arg Lys Ile Leu Glu Ser Gln Arg Pro Pro
 420 425 430

 Ala Gly Ile Pro Val Ala Pro Ser Ser Gly
 435 440