



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0143639

(43) 공개일자 2015년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/32 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/32 (2013.01)

A61K 38/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7032241

(22) 출원일자(국제) 2014년04월11일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2015년11월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/033873

(87) 국제공개번호 WO 2014/169256

국제공개일자 2014년10월16일

(30) 우선권주장

61/811,078 2013년04월11일 미국(US)

(71) 출원인

벤더르빌트 유니버시티

미국, 테네시 37240, 내쉬빌, 웨스트 엔드 애비뉴
2201, 커클랜드 홀 305

(72) 발명자

듀발, 크레이그

미국, 테네시 37215, 내쉬빌, 22엔드 애비뉴 사우스
2813

에반스, 브라이언 코너

미국, 테네시 38135, 바틀렛트, 서니 메도우즈 로드
4110

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강명구

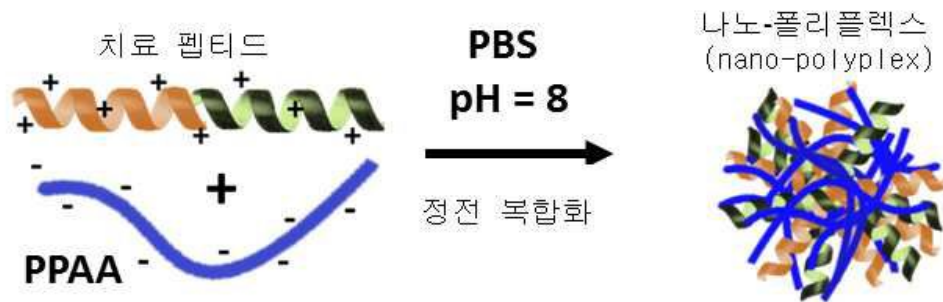
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 폴리플렉스

(57) 요약

본 발명은 (i) 활성제, 여기서 상기 활성제는 미리 결정된 pH에서 전하를 포함하고, (ii) 중합체, 여기서 상기 중합체는 미리 결정된 pH에서 활성제와 반대의 전하를 포함하고; 그리고 (iii) 미리 결정된 pH에서 정전으로 함께 결합된 상기 펩티드와 상기 중합체를 포함하는 폴리플렉스를 포함하는 화합물에 관계한다. 일부 구체예에서, 활성제는 펩티드, 예를 들면, MAPKAP 키나아제 II 저해성 펩티드를 포함하는 펩티드이고, 그리고 일부 구체예에서, 상기 펩티드는 세포-투과성 펩티드를 포함한다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 조성물을 치료가 필요한 개체에 투여함으로써, 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/48176 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

(72) 발명자

브로피, 콜레엔

미국, 테네시 37209, 내쉬빌, 아이비 스트리트
6385

호킹, 카일

미국, 조지아 30022, 알파레타, 메리웨더 우즈
3973

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 조성물:

미리 결정된 pH에서 전하를 포함하는 활성제; 그리고

미리 결정된 pH에서 활성제와 반대의 전하를 포함하는 중합체,

여기서 정전 결합이 미리 결정된 pH에서 활성제와 중합체 사이에 형성됨.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 활성제는 미리 결정된 pH에서 양이온성이고, 그리고 중합체는 미리 결정된 pH에서 음이온성인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 활성제는 미리 결정된 pH에서 음이온성이고, 그리고 중합체는 미리 결정된 pH에서 양이온성인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 활성제는 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 펩티드는 MAPKAP 키나아제 II 저해성 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 펩티드는 서열 번호: 1-4에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

전술한 청구항 중에서 어느 한 항에 있어서, 두 번째 활성제를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 두 번째 활성제는 펩티드, 폴리뉴클레오타이드, 그리고 이들의 조합에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 두 번째 활성제는 siRNA, DNA, 그리고 이들의 조합에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

전술한 청구항 중에서 어느 한 항에 있어서, 중합체는 폴리((C₁-C₆)알킬-아크릴산), 폴리((C₁-C₆)알킬-메타크릴산), 폴리((C₁-C₆)알킬-에타크릴산), 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 중합체는 폴리(프로필아크릴산) (PPAA)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

전술한 청구항 중에서 어느 한 항에 있어서, 중합체는 친수성 블록을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 친수성 블록은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (HPMA), 폴리(N,N-디메틸아크릴아미드) (pDMA), 폴리(PEG 메타크릴레이트) (pPEGMA), 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

전술한 청구항 중에서 어느 한 항에 있어서, 미리 결정된 pH는 약 6.5 내지 약 8인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

전술한 청구항 중에서 어느 한 항에 있어서, 펩티드와 중합체 사이에 정전 결합은 활성화 pH에서 파괴되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 활성화 pH는 약 6.5 또는 이보다 낮은 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

전술한 청구항 중에서 어느 한 항에 있어서, 활성화제 대 펩티드의 전하 비율은 약 10:1 내지 약 1:10인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 중합체 대 펩티드의 전하 비율은 약 1:3인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

다음을 포함하는 조성물:

미리 결정된 pH에서 전하를 포함하는 복수의 활성화제; 그리고

미리 결정된 pH에서 활성화제와 반대의 전하를 포함하는 복수의 중합체,

여기서 복수의 펩티드 및 복수의 중합체는 미리 결정된 pH에서, 복수의 활성화제에 정전 결합된 복수의 펩티드를 포함하는 폴리플렉스를 형성함.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 활성화제는 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

청구항 19에 있어서, 활성화제는 미리 결정된 pH에서 양이온성이고, 그리고 중합체는 미리 결정된 pH에서 음이온성인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 22

청구항 19에 있어서, 활성화제는 미리 결정된 pH에서 음이온성이고, 그리고 중합체는 미리 결정된 pH에서 양이온성인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 23

청구항 19에 있어서, 폴리플렉스는 약 50 nm 내지 약 500 nm의 크기를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 24

다음을 포함하는 제약학적 조성물:

청구항 1 내지 23 중에서 어느 한 항의 조성물; 그리고

제약학적으로 허용되는 담체.

청구항 25

청구항 1 내지 23 중에서 어느 한 항의 조성물을 포함하는 혈관 이식편.

청구항 26

혈관 질환을 치료하는 방법에 있어서, 청구항 1 내지 23 중에서 어느 한 항의 조성물의 효과량을 치료가 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 혈관 질환은 내막 과형성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

청구항 26 또는 27에 있어서, 투여하는 단계는 청구항 1 내지 23 중에서 어느 한 항의 조성물을 포함하는 혈관 이식편을 치료가 필요한 개체에서 이식하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

청구항 1 내지 23 중에서 어느 한 항의 조성물을 합성하기 위한 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련된 출원

본 출원은 2013년 4월 11일자 제출된 미국 특허가출원 일련 번호 61/811,078에 우선권을 주장하고, 이의 전체 공개는 본원에 참조로서 편입된다.

정부 권리

본 발명의 이러한 요부는 미국 심장 협회에 의해 수여된 보조금 번호 11SDG4890030, 국립보건원에 의해 수여된 보조금 번호 1R21HL110056-01, 그리고 국립 과학 재단에 의해 수여된 장학금 번호 DGE-090966 하에 미국 정부의 뒷받침을 받아 만들어졌다. 미국 정부는 본 발명의 요부에서 일정한 권리를 갖는다.

기술 분야

현재 개시된 요부는 폴리플렉스에 관계한다. 특히, 현재 개시된 요부는 반대로 하전된 중합체 및 활성제를 포함하는 폴리플렉스를 포함하는 조성물에 관계하고, 여기서 상기 활성제는 펩티드일 수 있다.

배경 기술

도입

펩티드는 합성 소형 분자와 비교할 때 더욱 특정한 및/또는 강력한 약물의 개발을 위한 유의미한 잠재력을 갖는다. 하지만, 전달 장벽은 펩티드-기초된 약물의 변용을 제한하였다. 가령, 펩티드는 전형적으로, 소형 분자 약물보다 더욱 큰 분자량을 갖고 더욱 친수성이며, 세포막을 통하여 직접적으로 확산하는 그들의 능력이 저해된다. 결과적으로, 이들은 리소솜에서 분해를 위해 표적화된 소포에서 구속 또는 세포외배출에 의한 세포의 재활용 제의를 종종 유발하는 엔도솜 경로를 통해 내재화된다. 실제로, 비효율적 세포 침투 및 불량한 세포내 약물동력학은 만약 그렇지 않으면, 특이성, 안전성, 그리고 제조의 용이함에 기초하여 세포내 단백질-단백질 상

호작용을 교란하기 위한 바람직한 약물인 펩티드 치료제의 광범위한 임상적 변용에 대한 주요 장애물이다.

[0009] 가령, MAPK 키나아제 II 저해성 펩티드 (MK2i)는 약물로서 유의미한 잠재력을 가질 수 있는 펩티드이다. MAPK 키나아제 II (MK2) 신호전달은 혈관 평활근 세포 (VSMCs)에서 발생한다. MK2 활성화는 혈관수축과 병리학적 VSMC 증식, 이주, 그리고 이식편 폐색을 야기하는 과잉 ECM 생산을 유발한다. MK2i는 이런 이유로, 인간 복재 정맥 (HSV)에서 혈관수축 및 차후 내막 과형성을 이론적으로 감소시키는 것으로 생각된다.

[0010] 이점에 관해서, MK2의 신호전달은 환경적 스트레스와 기계적 스트레스, 예를 들면, 외과적 이식 동안 이식편을 이식할 때 경험되는 것들에 의해 종종 촉발된다. 따라서, 자가 도관으로 관상 동맥 우회술이 여전히, 다중-맥관 관상 동맥 심장 질환에 대한 표준 치료이긴 하지만, 이들 복재 정맥 이식편 중에서 거의 절반이 내막 과형성으로 인해 첫 번째 18 개월 내에 실패한다. 이식편에 의해 유발된 내막 과형성을 치료하기 위해 MK2i를 전달하기 위한 현재 방법은 성공적이지 않은데, 그 이유는 현재 조성물에서 펩티드가 종종, 세포외배출 또는 리소좀 분해를 위해 수송되는 엔도리소좀 소포 내에 격리되기 때문이다.

[0011] 따라서, 활성제, 그리고 특히 펩티드를 치료가 필요한 개체에 투여하기 위한 향상된 조성물과 방법이 여전히 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

요약

[0012] **요약**

[0013] 본 요약은 현재 개시된 요부의 여러 구체예를 설명하고, 그리고 많은 경우에, 이들 구체예의 변이와 순열을 열거한다. 본 요약은 다양하고 변하는 구체예를 단지 예시한다. 소정의 구체예의 하나 또는 그 이상의 대표적인 특질의 언급은 유사하게 예시적이다. 이런 구체예는 전형적으로, 언급된 특질(들)을 갖거나 또는 갖지 않으면서 존재할 수 있다; 유사하게, 이들 특질은 본 요약에서 열거되는 지와 상관없이, 현재 개시된 요부의 다른 구체예에 적용될 수 있다. 과도한 반복을 방지하기 위해, 본 요약은 특질의 모든 가능한 조합을 열거하거나 제안하지는 않는다.

[0014] 현재 개시된 요부는 일부 구체예에서, (i) 활성제 (여기서, 활성제는 미리 결정된 p에서 전하를 포함한다), 그리고 (ii) 중합체 (여기서, 중합체는 미리 결정된 pH에서 활성제와 반대의 전하를 포함한다)를 포함하는 화합물을 제공한다. 일부 구체예에서, 정전 결합이 미리 결정된 pH에서 활성제와 중합체 사이에 형성되고, 일부 구체예에서 결합된 활성제와 중합체는 폴리플렉스로서 지칭된다.

[0015] 일부 구체예에서, 미리 결정된 pH는 약 6.5 내지 약 8이다. 게다가, 일부 구체예에서, 활성제 (가령, 펩티드)와 중합체 사이에 정전 결합은 활성화 pH에서 파괴되고, 이것은 미리 결정된 pH보다 낮거나 또는 약 6.5보다 낮은 pH일 수 있다.

[0016] 일부 구체예에서, 활성제는 미리 결정된 pH에서 양이온성이고 중합체는 미리 결정된 pH에서 음이온성이고, 그리고 다른 구체예에서 활성제는 미리 결정된 pH에서 음이온성이고 중합체는 미리 결정된 pH에서 양이온성이다. 일부 구체예에서, 활성제는 펩티드, 예를 들면, MAPKAP 키나아제 II 저해성 펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, 펩티드는 서열 번호: 1-4에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 두 번째 활성제, 예를 들면, 일부 구체예에서 siRNA, DNA, 그리고 이들의 조합을 비롯하여, 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 그리고 이들의 조합을 더욱 포함할 수 있다.

[0017] 일부 구체예에서, 조성물은 폴리((C₁-C₆)알킬-아크릴산), 폴리((C₁-C₆)알킬-메타크릴산), 폴리((C₁-C₆)알킬-에타크릴산), 또는 이들의 조합을 포함하는 중합체를 포함한다. 일정한 구체예에서, 중합체는 폴리(프로필아크릴산) (PPAA)을 포함한다. 예시적인 중합체는 친수성 블록을 더욱 포함할 수 있고, 이것은 폴리에틸렌 글리콜 ("PEG"), N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 ("HPMA"), 폴리(N,N-디메틸아크릴아미드) ("pDMA"), 폴리(PEG 메타크릴레이트) ("pPEGMA"), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0018] 게다가, 본 발명의 일부 구체예는 약 10:1 및 약 1:10 사이에 있는 중합체 대 펩티드의 전하 비율을 포함한다. 게다가, 일정한 구체예에서, 중합체 대 펩티드의 전하 비율은 약 1:3이다.

[0019] 폴리플렉스는 일부 구체예에서, 최소한 하나의 치수, 예를 들면, 직경에서 약 50 nm 내지 약 500 nm의 크기를 가질 수 있다.

- [0020] 일정한 구체예에서, 본 발명은 제약학적으로 허용되는 담체와 함께, 본 발명에서 설명된 임의의 조성물을 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다.
- [0021] 또 다른 구체예에서, 현재 개시된 요부는 혈관 이식편을 제공하고, 여기서 혈관 이식편은 본원에서 설명된 임의의 구체예에 따른 조성물을 포함한다.
- [0022] 그리고 또 다른 추가의 구체예에서, 본 발명은 질환 또는 장애, 예를 들면, 혈관 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 이들 방법은 본 발명의 임의의 조성물의 효과량을 치료가 필요한 개체에 투여하는 단계를 최소한 포함한다. 일정한 구체예에서, 혈관 질환은 내막 과형성이다.
- [0023] 최종적으로, 일정한 구체예에서, 본 발명은 본원에서 설명된 조성물을 합성하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도면의 간단한 설명

도면 1은 양이온성 펩티드, 예를 들면, MAPKAP 키나아제 2 (MK2i)를 포함하는 펩티드, 그리고 음이온성, 엔도소몰리티 중합체, 예를 들면, PPAA를 포함하는 폴리플렉스의 구체예의 합성을 위한 계통도를 제공한다.

도면 2는 용혈 검정의 결과를 제공하는데, 이것은 폴리플렉스의 구체예가 pH-의존성 막 교란 기전으로 엔도리소좀 경로로부터 탈출을 위해 조율될 수 있다는 것을 증명한다.

도면 3은 인간 관상 동맥 혈관 평활근 세포 (HCAVSMCs)에서 대조 폴리플렉스 및 유리 MK2i에 비하여 인터류킨-6 (IL-6) 생산을 제거하는 본 발명의 폴리플렉스의 일부 구체예를 보여준다. 도면 3에서 제공된 모든 데이터는 세포 수에 정규화된다. 게다가, "NT"는 처리 없음을 의미한다. *NT+TNF α 와 비교하여 $p < 0.05$, *NT+TNF α 와 비교하여 $p < 0.01$, #동일한 농도에서 MK2i와 비교하여 $p < 0.05$, ##동일한 농도에서 CPP 폴리플렉스와 비교하여 $p < 0.05$, $n = 4$.

도면 4는 블랭크 폴리플렉스, MK2i 단독, PPAA 단독, 또는 MK2i를 포함하는 폴리플렉스의 구체예로 처리된 인간 복재 정맥 (HSV) 표본의 이완에서 증가 퍼센트를 예측하는 막대 그래프를 제공한다. *대조와 비교하여 $p < 0.05$, **100 μm MK2i와 비교하여 $p < 0.05$, $n = 3$.

도면 5는 처리되지 않거나, MK2i 단독으로 처리되거나, 또는 MK2i 폴리플렉스의 다양한 구체예로 처리된 HSV 표본의 조직학적 섹션을 보여준다. 어두운 선은 내막 두께의 경계를 정한다. 눈금자는 길이에서 100 μm 이다.

도면 6은 HPLC-정제된 CPP-MK2i 융합 펩티드 (서열 번호 1: YAAAAARQARA-KALARQLGVAA)에 대한 전기분무-이온화 질량 분광분석법 (ESI-MS) 질량 스펙트럼을 제공한다. 분자량은 2283.67 g/mol이다. 이러한 질량 스펙트럼은 완전한 펩티드 서열의 단편화에 각각 상응하는 3개의 주요 피크를 보여준다.

도면 7은 D₂MSO에서 폴리(아크릴산) (PAA)의 ¹H NMR 스펙트럼이다. 분자량은 사슬 전달 작용제와 연관된 피크의 구역 (즉, PAA의 경우에 피크 c,d 및 PPAA의 경우에 피크 b)을 아크릴산/프로필아크릴산과 연관된 피크 (즉, PAA의 경우에 피크 및 PPAA의 경우에 피크 c)와 비교함으로써 결정되었다: PAA 중합도 = 106, PPAA 중합도 = 190.

도면 8은 폴리(아크릴산) (PAA)의 GPC 크로마토그램: $M_n = 10830$ (g/mol), PDI = 1.27, $d n/dC = 0.09$ (mL/g)이다. 혼적은 중합화에서 활용된 4-시아노-4-(에틸술파닐티오카르보닐) 술파닐펜탄산 (ECT) 사슬 전달 작용제에서 존재하는 트리티오카보네이트 모이어티 (310 nm)의 특징적인 흡수 피크에서 UV 흡광도를 보여준다.

도면 9는 D₂MSO에서 폴리(프로필아크릴산) (PPAA) 동중중합체의 ¹H NMR 스펙트럼을 제공한다. 분자량은 사슬 전달 작용제와 연관된 피크의 구역 (즉, PAA의 경우에 피크 c,d 및 PPAA의 경우에 피크 b)을 아크릴산/프로필아크릴산과 연관된 피크 (즉, PAA의 경우에 피크 a 및 PPAA의 경우에 피크 c)와 비교함으로써 결정되었다: PAA 중합도 = 106 PPAA 중합도 = 190, MW = 21,950 g/mol.

도면 10은 DMF에서 폴리(프로필아크릴산) (PPAA)의 GPC 크로마토그램: $M_n = 22010$ (g/mol), PDI = 1.471, $d n/dC = 0.087$ (mL/g) 중합체이다. 혼적은 중합화에서 활용된 4-시아노-4-(에틸술파닐티오카르보닐) 술파닐펜탄산 (ECT) 사슬 전달 작용제에서 존재하는 트리티오카보네이트 모이어티 (310 nm)의 특징적인 흡수 피크에서 UV 흡

광도를 보여준다.

도면 11은 MK2i 폴리플렉스의 설계와 기능적 특질을 관계시키는 예시를 제공하고, 여기서 MK2iNPs는 엔도솜 탈출을 매개하고 펩티드 치료제를 세포내에 방출하도록 최적화된다.

도면 12는 처리 비교 요약을 제공한다: MK2i-NPs는 엔도소몰리틱 PPAA 중합체로 조제되고, 반면 NE-MK2i-NPs는 PAA 중합체로 조제되는데, 이것은 PPAA와 구조적으로 유사하지만 더욱 낮은 pKa로 인해 엔도소몰리틱이 아니다. MK2i-NPs와 NE-MK2i-NPs 둘 모두 도시된 서열을 갖는 MK2i 펩티드로 만들어진 다 (위쪽 열 = 변형된 TAT 모방 세포 투과성 펩티드 서열, 아래쪽 열 = MK2 저해성 서열).

도면 13은 상이한 전하 비율 ($[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-]$)에서 제조된 폴리플렉스의 제타 전위(들)를 보여준다. 영상과 흡수 연구를 위해, NPs는 Alexa®-488 형광단으로 표지화된 MK2i 펩티드로부터 조제되었다. NE-NPs는 비-엔도소몰리틱 (NE) PAA 중합체로 조제된다. 도시된 값은 최소한 3개의 독립된 계측의 평균이다.

도면 14는 119 ± 26 nm의 직경을 갖는 MK2i-NPs의 동적 광 산란 (DLS) 분석을 제공한다.

도면 15는 114 ± 14 nm의 직경을 갖는 NE-MK2i-NPs의 동적 광 산란 분석을 제공한다.

도면 16은 우라닐 아세트산염 대비염색된 MK2i-NPs와 NE-MK2i-NPs의 대표적인 투과 전자 현미경 (TEM) 이미지를 제공한다. 눈금자는 길이에서 100 nm이다.

도면 17은 MK2i-NPs가 DLS 분석에 의해 증명된 바와 같이, 엔도솜 pH 범위에서 pH-촉발된 분해를 겪는다는 것을 보여준다.

도면 18은 형광으로 표지화된 MK2i, MK2i-NPs, 그리고 NE-MK2i-NPs의 세포 흡수와 체류의 정량을 보여주는 그래프를 제공한다. *MK2i와 대비하여 $p < 0.001$, ^TNE-MK2i-NPs와 대비하여 $p < 0.001$, $n = 3$. MK2i-NP 제제는 세포 흡수를 증가시키고, 세포내 체류를 연장하고, 그리고 MK2i의 엔도리소솜 동시국지화를 감소시킨다.

도면 19는 대표적인 흐름 히스토그램을 제공하는데, 이것은 MK2i-NPs를 통해 전달된 형광으로-표지화된 MK2i 펩티드의 증가된 세포 흡수와 더욱 긴 체류를 증명한다.

도면 20은 적혈구 용혈 검정의 결과를 보여주는데, 여기서 MK2i-NPs는 PPAA 중합체와 유사한 pH-의존성 막 교란 활성을 갖지만 NE-MK2i-NPs와 MK2i 펩티드 단독은 그렇지 않다.

도면 21은 완전한 적혈구 용혈 데이터 세트를 제공한다. 적혈구 용혈 검정은 MK2i-NPs는 PPAA 중합체와 유사한 pH-의존성 및 용량 의존성 막 교란 활성을 갖지만, NE-MK2i-NPs와 MK2i 펩티드 단독은 그렇지 않다는 것을 보여준다.

도면 22는 처리 후 24 시간에 LysoTracker® 레드로 Alexa Fluor®-488 표지화된 MK2i 동시국지화의 대표적인 공초점 현미경검사 이미지를 제공한다. 이들 이미지는 MK2i-NPs가 엔도리소솜 동시국지화를 감소시켰다는 것을 증명한다. 눈금자 = 20 μm .

도면 23은 처리 후 0, 12, 그리고 24 시간에 엔도/리소솜 염색제 LysoTracker® 레드로 MK2i 펩티드 동시국지화의 정량을 보여주는 그래프를 제공한다. *MK2i와 대비하여 $p < 0.01$, ^TNE-MK2i-NPs와 대비하여 $p < 0.01$, $n \geq 3$ 독립된 이미지.

도면 24는 상이한 펩티드 제제로 처리 후 24 시간에 MK2i를 내포하는 세포내 구획의 평균 크기를 전시한다. 구획 구역은 ImageJ 소프트웨어로 정량되었다. *MK2i와 대비하여 $p < 0.001$, ^TNE-MK2i-NPs와 대비하여 $p < 0.001$, 최소한 3개의 상이한 이미지로부터 $n = 50$ 개 세포.

도면 25는 MK2i-NP 제제가 Alexa® 568-MK2i의 HSV 전달을 증가시켰다는 것을 보여준다.

도면 26은 2 시간 동안 처리되고 장기 배양에서 14 일 동안 유지된 Verhoeff Van-Gieson (VVG) 염색된 HSV 섹션의 대표적인 현미경검사 이미지를 제공하고, MK2i-NPs가 신생내막 형성을 효과적으로 차단했다는 것을 보여준다. 적색 막대는 내막 두께의 경계를 정한다. 눈금자는 길이에서 100 μm 이다.

도면 27은 VVG 염색된 조직학적 섹션으로부터 내막 두께의 정량을 제공한다; 수치는 별개의 공여자로부터 최소한 3개의 정맥 고리로부터 6-12개 방사상으로 평행 계측의 평균이다. *NT와 대비하여 $p < 0.01$, ^T동일한 농도에

서 MK2i와 대비하여 $p < 0.05$.

도면 28은 2 시간 동안 처리되고, 그리고 이후, 장기 배양에서 14 일 동안 유지된 HSV 체외이식편의 내막 두께 치수를 제공한다. 최소한 3명의 상이한 공여자로부터 $n \geq 3$. *처리 없음 대조 (NT)와 비교하여 $p \leq 0.01$, **NT와 비교하여 $p \leq 0.001$, ^T $p \leq 0.05$.

도면 29는 MTT 검정을 통해 사정될 때, 2 시간 동안 처리되고 1 또는 장기 배양에서 14 일 동안 유지된 HSV 고리에서 세포 생존력을 보여준다. 최소한 3명의 별개 공여자로부터 $n \geq 3$ 개 정맥 고리.

도면 30은 웨스턴 블롯 분석의 결과를 제공하는데, 이들은 MK2i-NPs가 2 시간의 처리 이후에 인간 복재 정맥에서 HnRNP A0 인산화를 감소시킨다는 것을 보여준다, *NT와 대비하여 $p < 0.05$.

도면 31은 도면 30의 웨스턴 블롯 분석의 추가 결과를 제공하는데, 여기서 MK2i-NPs는 2 시간의 처리 이후에 인간 복재 정맥에서 HnRNP A0 인산화를 감소시켰다, *NT와 대비하여 $p < 0.05$.

도면 32는 MK2i-NP 처리가 ANG II로 자극된 HCAVSMCs에서 TNF α 생산을 차단한다는 것을 보여준다. 모든 데이터는 세포 수에 정규화된다. "NT"는 처리 없음을 의미하고, *NT + TNF α 와 대비하여 $p < 0.05$, ^T동일한 농도에서 MK2i와 대비하여 $p < 0.05$, [#]동일한 농도에서 NE-MK2i-NPs와 대비하여 $p < 0.05$. MK2i-NP 제제는 HCAVSMCs에서 MK2i 생물활성을 증강한다.

도면 33은 ANG II로 6 시간 동안 자극되고, MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, 또는 MK2i 펩티드 단독으로 2 시간 동안 처리되고, 그리고 새로운 배지에서 24 시간 동안 배양된 HCAVSMCs에서 TNF α 생산을 보여준다. 모든 데이터는 세포 수에 정규화된다. "NT"는 처리 없음을 의미한다. *NT + TNF α 군과 비교하여 $p < 0.05$, ^T동일한 농도에서 MK2i와 비교하여 $p < 0.05$, [#]동일한 농도에서 NE-MK2i-NPs와 비교하여 $p < 0.05$, $n = 4$.

도면 34는 MK2i-NPs가 HCAVSMCs에서 IL-6 생산에서 TNF α -유도된 증가를 부분적으로 차단한다는 것을 예증한다. 세포는 TNF α 로 6 시간 동안 자극되고, MK2i-NPs 또는 MK2i 펩티드 단독으로 2 시간 동안 처리되고, 그리고 새로운 배지에서 24 시간 동안 배양되었다. 모든 데이터는 세포 수에 정규화된다. "NT"는 처리 없음을 의미하고, *NT + TNF α 와 대비하여 $p < 0.05$, ^T동일한 농도에서 MK2i와 대비하여 $p < 0.05$, [#]동일한 농도에서 NE-MK2i-NPs와 대비하여 $p < 0.05$.

도면 35는 10 μ M ANG II로 6 시간 동안 자극되고, MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, 또는 MK2i 펩티드 단독으로 2 시간 동안 처리되고, 그리고 새로운 배지에서 24 시간 동안 배양된 HCAVSMCs에서 세포 생존력을 보여준다. "NT"는 처리 없음을 의미한다, $n = 4$.

도면 36은 TNF α 로 6 시간 동안 자극되고, MK2i-NPs 또는 MK2i 펩티드 단독으로 2 시간 동안 처리되고, 그리고 새로운 배지에서 24 시간 동안 배양된 HCAVSMCs에서 세포 생존력을 보여주고, 그리고 $n = 4$.

도면 37은 MK2i-NP 처리가 ANG II 자극에 대한 응답으로 F-액틴 스트레스 섬유 형성을 차단했다는 것을 예증한다. 데이터는 2개의 별개의 실험으로부터 $n \geq 3$ 개 세포를 나타내고, *NT + TNF α 와 대비하여 $p < 0.05$, ^T동일한 농도에서 MK2i와 대비하여 $p < 0.05$. [#]동일한 농도에서 NE-MK2i-NPs와 대비하여 $p < 0.05$. 모든 데이터는 세포 수에 정규화된다. "NT"는 처리 없음을 의미하고, *NT + TNF α 와 대비하여 $p < 0.05$, ^T동일한 농도에서 MK2i와 대비하여 $p < 0.05$. [#]동일한 농도에서 NE-MK2i-NPs와 대비하여 $p < 0.05$.

도면 38은 MK2i-NPs 또는 대조 (25 μ M MK2i)로 1 시간 처리 후, ANG II-자극된 HCAVSMCs에서 F-액틴 스트레스 섬유 형성의 대표적인 형광 현미경검사 이미지를 제공한다.

도면 39는 MK2i-NP 처리가 스크래치 상처의 형성 후 24 시간에 화학유인물질 PDGF-BB (50 ng/mL)로 자극된 HCAVSMCs에서 이주를 차단했다는 것을 보여준다, $n \geq 3$: * $p < 0.05$, **NT + PDGF와 대비하여 $p < 0.01$, ^T동일한 농도에서 MK2i와 대비하여 $p < 0.05$, [#]동일한 농도에서 NE-MK2i-NPs와 대비하여 $p < 0.05$. 모든 데이터는 세포 수에 정규화된다. "NT"는 처리 없음을 의미하고, *NT + TNF α 와 대비하여 $p < 0.05$, ^T동일한 농도에서 MK2i와 대비하여

$p < 0.05$, [#]동일한 농도에서 NE-MK2i-NPs와 대비하여 $p < 0.05$.

도면 40은 MK2i-NPs가 막 위에 파종 후 8 시간에 보이덴 챔버 검정에서 화학유인물질 PDGF-BB을 향한 세포 이주를 저해했다는 것을 보여준다, 7개 별개의 보이덴 챔버 검정으로부터 $n = 4$ 개 이미지. * $p < 0.05$, **NT + PDGF와 대비하여 $p < 0.01$, [†]동일한 농도에서 MK2i와 대비하여 $p < 0.05$, [#]동일한 농도에서 NE-MK2i-NPs와 대비하여 $p < 0.05$. 모든 데이터는 세포 수에 정규화된다. "NT"는 처리 없음을 의미하고, *NT + TNF α 와 대비하여 $p < 0.05$, [†]동일한 농도에서 MK2i와 대비하여 $p < 0.05$, [#]동일한 농도에서 NE-MK2i-NPs와 대비하여 $p < 0.05$.

도면 41은 트랜스웰 삽입물을 통하여 이주한 세포의 대표적인 현미경검사 이미지를 제공하는데, 이미지는 10x 배율에서 획득되었다. 처리 분량은 100 μ M MK2i, MK2i-NPs, 또는 NE-MK2i-NPs이다; PDGF-BB 분량은 50 ng/mL이다.

도면 42는 MK2i 펩티드 단독, MK2i-NPs, 또는 NE-MK2i-NPs로 30 분 동안 자극 처리되고, 그리고 50 ng/mL PDGF-BB를 포함하거나 (+) 또는 포함하지 않는 (-) 새로운 배지에서 24 시간 동안 배양된 HCAVSMCs에서 세포 증식을 보여준다. "NT"는 처리 없음을 의미하고, 그리고 $n = 4$.

도면 43은 MK2i-NP 처리가 정맥 이식편의 VVG 염색된 조직학적 섹션의 대표적인 이미지에 나타나 있는 바와 같이, 신생내막 형성을 감소시켰다는 것을 예증한다. 실제로, MK2i-NPs로 수술중 처리는 이식된 정맥 이식편에서 생체내에서 신생내막 형성과 대식세포 존속을 감소시킨다.

도면 44는 수술 후 28 일에 관류 고정된 경정맥 개재 이식편에서 내막 두께의 정량을 제공한다. *NT와 대비하여 $p < 0.01$, [†] $p < 0.05$, 처리군마다 $n \geq 7$ 개 이식편.

도면 45는 MK2i-NP 처리가 또한, 정맥 이식편에서 RAM-11 면역조직화학을 이용하여 도시된 바와 같이, 신생내막에서 대식세포의 존속을 감소시켰다는 것을 보여준다. 화살표는 양성으로 염색된 세포의 경계를 정한다. 왼쪽 칼럼 눈금자 = 100 μ m, 오른쪽 칼럼 확대된 보기 눈금자 = 50 μ m.

도면 46은 각 처리군에 대한 토끼 경정맥 이식편 체외이식편의 대표적인 RAM-11 염색 이미지를 보여준다. 화살표는 양성으로 염색된 세포의 경계를 정한다. 왼쪽 칼럼 눈금자 = 100 μ m, 오른쪽 칼럼 확대된 보기 눈금자 = 50 μ m.

도면 47은 경정맥 이식편 섹션에서 RAM-11 양성 대식세포 염색의 정량을 제공한다, 4개 정맥 분절로부터 $n = 16$ 개 조직학적 이미지, *NT와 대비하여 $p < 0.05$.

도면 48은 Zetasizer Nano ZS에서 결정된 상이한 전하 비율 ($[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-]$)에서 제조된 폴리플렉스의 ζ -전위를 보여준다. 도시된 값은 최소한 3개의 독립된 계측의 평균이다.

도면 49는 $[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-] = 1:3$ 의 전하 비율에서 제조된 폴리플렉스의 pH-의존성 용혈을 예증한다. 유의미한 용혈은 초기 내지 후기 엔도솜 소포의 대표적인 pH 값 (즉, $\text{pH} < 6.8$)에서 증명되었고, 반면 7.4의 생리학적 pH에서 어떤 유의미한 용혈도 관찰되지 않았다. YARA-MK2i 펩티드 단독 또는 AA 폴리플렉스 중에서 어느 것도 검사된 임의의 pH 값에서 임의의 유의미한 용혈을 보여주지 않았고, 그리고 $[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-] = 1:3$ 의 전하 비율에서 제조된 폴리플렉스의 pH-의존성 크기 변화는 DLS 분석을 통해 분석되었다.

도면 50은 pH 7.4에서 폴리플렉스가 단일모드 크기 분포를 보여준다는 것을 예증한다. 줄어드는 pH에서, 폴리플렉스는 나타나 있는 바와 같이, 개별 YARA-MK2i 펩티드와 PPAA 중합체 단일체로 해리하기 시작한다.

도면 51은 10 μ M ANG II로 6 시간 동안 자극되고, PPAA 폴리플렉스, AA 폴리플렉스, 또는 YARA-MK2i 펩티드 단독으로 2 시간 동안 처리되고, 그리고 새로운 배지에서 24 시간 동안 배양된 HCAVSMCs의 생존력을 보여준다. "NT"는 처리 없음을 의미하고, $n = 4$.

도면 52는 ANG II로 6 시간 동안 자극되고, PPAA 폴리플렉스, AA 폴리플렉스, 또는 융합 MK2i 펩티드 단독으로 2 시간 동안 처리되고, 그리고 새로운 배지에서 24 시간 동안 배양된 HCAVSMCs에서 TNF- α 생산을 보여준다. 처리는 10, 25, 50, 또는 100 μ M의 펩티드 농도에 대해 정규화되었다. 모든 데이터는 LDH 검정에 의해 결정될 때

세포 수에 정규화된다. NT= 처리 없음. *NT + TNF α 군과 비교하여 $p < 0.05$, *동일한 농도에서 MK2i와 비교하여 $p < 0.05$, **동일한 농도에서 AA 폴리플렉스와 비교하여 $p < 0.05$.

도면 53은 Mander의 계수, M1 (본질적으로, 적색 형광과 겹쳐지는 이미지에서 녹색 형광의 %, 다시 말하면, 엔도솜 소포 내에 내포된 펩티드의 %)의 계산을 통해 결정된, 녹색 형광단과 적색 형광단의 동시국지화의 백분율(들)을 보여준다. YARA-MK2i 분량은 모든 표본에 대해 25 μ M이다. 도시된 값은 평균 $n=3$ 별개의 이미지 $\pm$ SEM이다. *동일한 시점에서 YARA-MK2i와 비교하여 $p < 0.05$, **동일한 시점에서 YARA-MK2i와 비교하여 $p < 0.01$. 이러한 그래프는 HCAVSMC 폴리플렉스 흡수의 현미경적 분석의 결과이고, 그리고 이것은 폴리플렉스가 MK2i 펩티드의 흡수와 엔도솜 탈출을 증강한다는 것을 보여준다.

도면 54는 도면 53에서 데이터에 관계하고, 그리고 동시국지화를 정량하는데 이용된 대표적인 형광 이미지를 제공한다. 왼쪽에 숫자는 세포가 2 시간의 처리 이후에 새로운 배지에서 배양된 시간의 양을 나타내고, 적색과 녹색 통로 둘 모두에 대한 증가가 획득된 모든 이미지에 대해 일정하게 유지되었다.

도면 55는 PPAA 폴리플렉스에 대한 시간의 흐름에서 평균 형광 강도의 플롯을 보여준다.

도면 56은 PPAA 폴리플렉스에 대한 시간의 흐름에서 형광 강도의 히스토그램을 제공한다.

도면 57은 YARA-MK2i 펩티드 단독에 대한 시간의 흐름에서 평균 형광 강도의 플롯을 제공한다.

도면 58은 YARA-MK2i 펩티드 단독에 대한 시간의 흐름에서 형광 강도의 히스토그램이다.

도면 59는 AA 폴리플렉스에 대한 시간의 흐름에서 평균 형광 강도의 플롯이다.

도면 60은 AA 폴리플렉스에 대한 시간의 흐름에서 형광 강도의 히스토그램을 제공한다.

도면 61은 HSV 고리가 페닐에프린 (PE, 10^{-6} M)으로 수축되고, 그리고 차후에 SNP (10^{-8} - 10^{-6} M)로 이완된 후에, 나트륨 니트로프로시드 (SNP) 이완에서 백분율 증가를 보여주는 막대 그래프를 제공한다. HSV 고리는 이후, 이완에서 처리후 증가를 결정하기 위해, 2 시간 동안 처리되고, PE로 다시 한 번 수축되고, 그리고 SNP로 이완되었다. 처리후 수축 이후에, 모든 고리는 평활근 생존력을 실증하기 위해 KCl로 수축되었다. *대조와 비교하여 $p < 0.05$, ** 100 μ M MK2i와 비교하여 $p < 0.05$, $n = 3$.

도면 62는 MTT 검정을 통해 사정될 때, 2 시간 동안 처리되고 장기 배양에서 24 시간 동안 유지된 HSV 고리에서 세포 생존력을 보여준다. $n = 1$.

도면 63은 MTT 검정을 통해 사정될 때, 2 시간 동안 처리되고 장기 배양에서 14 일 동안 유지된 HSV 고리에서 세포 생존력을 보여준다. $n = 1$.

도면 64는 2 시간 동안 처리되고, 그리고 이후, 장기 배양에서 14 일 동안 유지된 HSV 체외이식편의 내막 두께를 전시한다, $n = 3$. *대조 (처리되지 않음)와 비교하여 $p \leq 0.01$, **대조와 비교하여 $p \leq 0.001$, $^T p \leq 0.05$.

도면 65는 2 시간 동안 처리되고, 그리고 이후, 장기 배양에서 14 일 동안 유지된 HSV 체외이식편의 내막/내측 (I/M) 비율의 플롯을 제공한다, $n = 3$. *대조 (처리되지 않음)와 비교하여 $p \leq 0.01$, **대조와 비교하여 $p \leq 0.001$, $^T p \leq 0.05$.

도면 66은 3:1 전하 비율에서 제조된 AZX-100 폴리플렉스의 DLS 크기 분포를 보여준다.

도면 67은 DLS 결과와 일치하는 크기 분포를 보여주는 우라닐 아세탄염 염색된 AZX-100 폴리플렉스의 대표적인 TEM 이미지를 제공한다.

도면 68은 다양한 전하 비율에서 제조된 AZX-100 폴리플렉스의 제타 전위의 요약을 제공한다. 제타 전위는 3:1 보다 높은 전하 비율에서 전하 비율에 직접적으로 비례하는 것으로 밝혀졌다. 제타 전위에서 예상치 못한 이동이 아마도 거대분자 재배열로 인해 3:1의 전하 비율에서 관찰되었다.

도면 69와 도면 70은 AZX-100 폴리플렉스가 안지오텐신 II 자극된 인간 관상 동맥 혈관 평활근 세포에서 스트레스 섬유 형성의 AZX-100 매개된 저해를 증강한다는 것을 보여준다. 세포는 1 시간 동안 처리되고, 그리고 이후,

안지오텐신 II로 2 시간 동안 차후 자극되었다. 액틴 스트레스 섬유는 팔로이딘 염색되고, 고정된 표본에서 가시화되었고, 그리고 각 처리군으로부터 개별 세포의 상대적 형광 강도가 액틴 스트레스 섬유 형성을 정량화하는데 활용되었다.

도면 71은 대조, AZ100 펩티드 또는 AZX 폴리플렉스로 처리된 쥐 대동맥 평활근에서 일어난 저해의 퍼센트를 제공한다.

도면 72는 쥐 대동맥 평활근의 수축을 보여준다.

도면 73은 AZX 폴리플렉스로 처리된 쥐 대동맥 평활근에서 수축의 용량 의존성 저해를 보여준다.

도면 74는 쥐 대동맥 평활근에서 힘의 대표적인 추적 및 칼슘 형광 추적을 전시한다.

도면 75는 쥐 대동맥 평활근에서 일어난 세포내 칼슘에서 변화 및 힘의 저해의 크기를 예측하는 누적 데이터를 제공한다.

도면 76은 상이한 농도에서 AZX-100 펩티드 또는 AZX 폴리플렉스로 처리 후, HSV에서 % 증강된 이완을 보여준다.

도면 77은 AZX-100 NPs가 인간 세기관지 기도 평활근의 AZX-100 매개된 이완을 증강한다는 것을 예증한다.

도면 78은 RN22-내포 폴리플렉스의 직경, 다분산성 지수 (PDI), 그리고 제타 전위에 대한 상이한 전하 비율의 효과를 보여주는 표와 차트를 제공한다.

도면 79는 페넨트라탄-BAK-BH3-내포 폴리플렉스의 직경, 다분산성 지수 (PDI), 그리고 제타 전위에 대한 상이한 전하 비율의 효과를 보여주는 표와 차트를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

예시적인 구체예의 상세한 설명

현재 개시된 요부의 하나 또는 그 이상의 구체예의 상세가 본 문서에서 진술된다. 본 문서에서 설명된 구체예, 그리고 다른 구체예에 대한 변형은 본 문서에서 제공된 정보의 연구 후 당업자에게 명백할 것이다. 본 문서에서 제공된 정보, 그리고 특히, 설명된 예시적인 구체예의 특정한 상세는 일차적으로 이해의 명료함을 위해 제공되고 불필요하지 않은 한정은 그것으로부터 이해될 것이다. 모순의 경우에, 정의를 비롯한 본 문서의 명세가 우선할 것이다.

각 실례는 본 발명의 설명에 의하여 제공되고 이를 한정하지 않는다. 실제로, 다양한 변형과 변이가 발명의 범위로부터 벗어나지 않으면서 본 발명의 교시에 만들어질 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 가령, 한 구체예의 일부로서 예시되거나 또는 설명된 특질은 또 다른 구체예를 산출하기 위해 다른 구체예에서 이용될 수 있다.

본 발명의 단수 특징 또는 한정에 대한 모든 언급은 달리 명시되지 않으면 또는 언급이 만들어지는 문맥에 의해 명확하게 반대로 암시되지 않으면, 상응하는 복수 특징(들) 또는 한정(들)을 포함할 것이고, 그 반대로도 그러할 것이다.

본원에서 이용된 바와 같은 방법 또는 과정 단계의 모든 조합은 달리 명시되지 않으면 또는 언급된 조합이 만들어지는 문맥에 의해 명확하게 반대로 암시되지 않으면, 임의의 순서로 수행될 수 있다.

본 발명의 방법과 조성물, 그리고 이들의 성분은 본원에서 설명된 구체예의 필수 원소와 한정뿐만 아니라 본원에서 설명된 또는 달리 유용한 임의의 추가 또는 임의선택적 성분 또는 한정을 포함할 수 있거나, 이들로 구성되거나, 또는 이들로 본질적으로 구성된다.

엔도솜 경로를 방지할 수 있고, 세포질 표적에 향상된 접근을 갖고, 증가된 세포내 체류 시간을 갖고, 그리고 세포내-작용 펩티드 약물의 향상된 생물활성을 갖는, 펩티드를 비롯한 활성제를 전달하기 위한 조성물과 방법이 요구된다. 본 발명의 요부는 최소한 이들 각각의 요구에 부합한다.

현재 개시된 요부는 펩티드와 중합체를 포함하는 조성물을 포함하고, 여기서 이러한 펩티드와 중합체는 서로에 정전으로 결합되어 미리 결정된 pH에서 폴리플렉스를 형성한다. 용어 "폴리플렉스"는 클러스터, 입자, 집괴, 또는 기타 등등을 형성하는 정전으로-결합된 펩티드와 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 이용된다. 따라서, 현재 개시된 요부의 구체예는 펩티드와 중합체의 폴리플렉스를 포함하는 조성물을 포함한다.

- [0033] 중합체
- [0034] 용어 "중합체"는 동일한 또는 상이한 유형인 지에 상관없이, 단위체를 중합함으로써 제조된 중합성 화합물을 지칭하기 위해 본원에서 이용된다. 일반 용어 "중합체"는 따라서, 용어 동중중합체, 또는 동일한 유형의 단위체 단위로 형성된 중합체, 그리고 용어 공중합체, 또는 2개 또는 그 이상 상이한 유형의 단위체 단위로 형성된 중합체를 포함한다.
- [0035] 일부 구체예에서, 중합체는 (C_1-C_6) 알킬-아크릴산, (C_1-C_6) 알킬-메타크릴산, 그리고 (C_1-C_6) 알킬-에타크릴산, 그리고 이들의 조합에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 단위체를 포함할 수 있다. 가령, 일부 구체예에서, (C_1-C_6) 알킬-아크릴산 단위체는 프로필 아크릴산 (PAA), 프로필 아크릴산, 부틸 아크릴산, 기타 등등을 포함한다. 결과의 중합체는 폴리 $((C_1-C_6)$ 알킬-아크릴산), 폴리 $((C_1-C_6)$ 알킬-메타크릴산), 그리고 폴리 $((C_1-C_6)$ 알킬-에타크릴산), 그리고 이들의 조합으로 구성되거나 또는 포함할 수 있다. 특정한 구체예에서, 중합체는 폴리(프로필아크릴산) (PPAA) 중합체이다.
- [0036] 용어 "알킬"은 일반식 C_nH_{2n+1} 을 갖는 알킬 기를 지칭하고, 여기서 n = 약 1 내지 약 18 또는 그 이상이다. 이들 기는 직쇄이거나 또는 분지될 수 있다. 알킬은 본원에서 이용될 때, 또한 "저급 알킬"을 포함하는데, 이것은 일반식 C_nH_{2n+1} (여기서 $n=1$ 내지 약 6)을 갖는 알킬 기를 지칭한다. 일부 구체예에서, $n = 1$ 내지 약 3이다. 실시예는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n -부틸, sec-부틸, t-부틸, 이소부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, n-헥실, 기타 등등을 포함한다. 이점에 관해서, 용어 "시클로알킬"은 최소한 3개의 탄소 원자로 구성된 비방향족 탄소-기초된 고리, 예를 들면, 시클로프로필, 시클로헥실, 기타 등등을 지칭한다. 용어 알킬은 시클로알킬을 포괄한다.
- [0037] 일부 구체예에서, 단위체의 기능화된 이형이 본 발명 중합체에서 임의선택적으로 이용된다. 기능화된 단위체는 본원에서 이용된 바와 같이, 가려진 또는 비-가려진 기능기, 예를 들면, 중합화 이후에 다른 모이어티가 부착될 수 있는 기를 포함하는 단위체이다. 이런 기의 무제한적 실례는 일차 아미노 기, 카르복실, 티올, 히드록실, 아지드, 그리고 시아노 기이다. 여러 적합한 가리움 기가 가용하다 (가령, T. W. Greene & P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis (2nd edition) J. Wiley & Sons, 1991. P. J. Kocienski, Protecting Groups, Georg Thieme Verlag, 1994를 참조한다).
- [0038] 일부 구체예에서, 중합체는 pH-반응성 중합체이다. 일정한 사례에서, 용어 중합체는 본원에서 이용된 바와 같이, pH-반응 중합체를 포괄한다. pH-반응 중합체는 pH에 따라 전하에서 변화를 경험하는 중합체를 포함한다. 중합체는 미리 결정된 pH에서 양이온성 또는 음이온성일 수 있는데, 이것은 특정한 pH, 일정한 범위의 pH, 일정한 pH 초과, 및/또는 일정한 pH 미만을 포함할 수 있다. 가령, 폴리(알킬 아크릴산)은 카르복실산 기를 포함하고, 그리고 폴리(프로필아크릴산)은 약 6.7의 pKa를 갖는다. 폴리(프로필아크릴산)은 자신의 pKa보다 높은 pH에 있을 때 음이온성 형질을 갖는다. 하지만, 폴리(프로필아크릴산)은 대략 자신의 pKa 또는 그 미만의 pH에 있을 때, 카르복실산 기가 양성화되고, 그리고 더 이상, 음이온성 형질을 갖지 않거나 또는 최소한, 미리 결정된 pH에서 그러했던 것만큼 큰 음이온성 형질을 갖지 않는다. 전하에서 이러한 변화는 폴리(프로필아크릴산) 및 다른 폴리(알킬 아크릴산)을 예시적인 pH-반응성 중합체로 만든다.
- [0039] 당업자는 중합체의 환경의 pH에 따라 상이한 전하를 가질 기를 포함하는 다른 중합체를 인지할 것이다. 중합체의 전하가 변화는 pH는 자신의 pKa보다 낮거나, 이와 동등하거나, 또는 이보다 높은 pH일 수 있다. 따라서, 미리 결정된 pH에서 하전된 기를 갖는 중합체는 폴리플렉스를 형성하는데 이용하기 바람직할 수 있고, 그리고 본 발명의 일정한 구체예에서, 중합체는 생리학적 pH에 있을 때 전하를 포함한다.
- [0040] 따라서, 예시적인 단위체와 중합체는 대략 생리학적 pH에서 및/또는 약 pH 6.0, 약 pH 7.0, 약 pH 8.0, 대략 엔도솜 pH (가령, 약 pH 5 내지 pH 6), 또는 이들의 조합에서 음이온성 또는 양이온성일 수 있다. 일부 구체예에서, 단위체는 약 pH 7.4 미만, 약 pH 7.0 미만, 약 pH 6.5 미만, 약 pH 6.0 미만, 약 pH 5.0 미만, 약 pH 4.5 미만, 또는 약 pH 4.0 미만의 pH에서 점점 더 양성화된다.
- [0041] 폴리플렉스의 최소한 부분적으로 분해는 이들 폴리플렉스의 코어에서 결합되는 폴리뉴클레오티드를 주변 환경에 노출시킬 수 있다. 따라서, 폴리플렉스의 최소한 부분적인 분해는 폴리뉴클레오티드가 그들의 최종 표적에 전달 되도록 허용할 수 있다. 최소한 부분적인 분해는 또한, 양이온성 단위체 및/또는 소수성 단위체를 주변 환경에 노출시킬 수 있고, 그리고 양이온성 단위체 및/또는 소수성 단위체는 막 교란 형질을 가질 수 있다. 따라서, 이들 단위체의 노출은 폴리플렉스를 내포하는 막의 교란을 유도할 수 있다. 일부 구체예에서, 폴리플렉스의 세포

내로의 흡수 후, 이들 폴리플렉스는 최소한 부분적으로 분해하여 폴리뉴클레오티드를 pH-반응성 방식으로 시토졸에 전달할 수 있다. 일부 구체예에서, 폴리플렉스는 대략 엔도솜 pH 또는 그 미만에서 최소한 부분적으로 분해하고, 그리고 최소한 부분적으로 분해된 폴리플렉스는 폴리뉴클레오티드가 특정 세포의 시토졸에 전달될 수 있도록, 엔도솜 또는 리포솜 막을 교란할 수 있다.

[0042] 이점에 관해서, 본 발명 단위체와 중합체는 막 교란 형질을 가질 수 있다. 따라서, 이들 단위체의 노출은 폴리플렉스를 내포하는 막의 교란을 유도할 수 있다. 일부 구체예에서, 폴리플렉스의 세포 내로의 흡수 후, 이들 폴리플렉스는 최소한 부분적으로 분해하여 폴리뉴클레오티드를 pH-반응성 방식으로 시토졸에 전달할 수 있다. 일부 구체예에서, 폴리플렉스는 미리 결정된 pH (가령, 엔도솜 pH) 또는 그 미만에서 최소한 부분적으로 분해하고, 그리고 최소한 부분적으로 분해된 폴리플렉스는 활성제가 특정 세포의 시토졸에 전달될 수 있도록, 엔도솜 또는 리포솜 막을 교란할 수 있다.

[0043] 중합체의 또 다른 구체예는 하나 또는 그 이상의 친수성 블록을 포함하는 공중합체를 포함한다. 용어 "친수성 블록"은 최소한 약 50 mol %의 수용성 및/또는 물-분산가능한 단위체를 포함하는 블록을 의미한다. 이런 구체예에서, 앞서 설명된 나머지 단위체는 본원에서 "pH-반응성 블록"으로서 지칭되는 것을 형성한다. 일부 구체예에서, 친수성 블록을 포함하는 중합체는 친수성 블록을 실제로 포함하는 관 및 중합체의 pH-반응성 블록을 실제로 포함하는 코어를 포함하는 입자 (가령, 폴리플렉스)를 형성할 수 있다.

[0044] 따라서, 중합체의 친수성 블록과 나머지 블록(들)은 중합체를, 친수성 중합체 블록으로 만들어진 친수성 표면을 포함하는 미셀 (즉, 관)으로 집합시킬 수 있다. 친수성 중합체 블록은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (HPMA), 폴리(N,N-디메틸아크릴아미드) (pDMA), 폴리(PEG 메타크릴레이트) (pPEGMA), 이들의 조합, 기타 등등에서 선택되는 단위체를 포함할 수 있다. 중합체 내에 친수성 블록을 포함하는 일부 조성물은 정맥내, 동맥내, 또는 기타 등등에 투여될 때 펩티드의 더욱 높은 안정성 및 증강된 전달을 달성할 수 있다. 일부 구체예에서, 다른 단위체 (즉, pH-반응성 단위체)에 비하여 친수성 단위체의 몰 비율은 약 10 mol%, 15 mol%, 20 mol%, 25 mol%, 30 mol%, 35 mol%, 40 mol%, 45 mol%, 50 mol%, 55 mol%, 60 mol%, 65 mol%, 70 mol%, 75 mol%, 80 mol%, 85 mol%, 및/또는 95 mol%일 수 있다.

[0045] 본 발명 중합체는 크기에서 변할 수 있다. 크기는 치료되는 개체, 전달되는 활성제, 중합체를 형성하는 단위체, 또는 기타 등등에 의존하거나 또는 의존하지 않을 수도 있다. 예시적인 중합체는 약 10,000 Da, 15,000 Da, 20,000 Da, 25,000 Da, 30,000 Da, 35,000 Da, 40,000 Da, 45,000 Da, 또는 50,000 Da의 크기를 포함할 수 있다. 중합체가 친수성 블록을 포함하는 일정한 구체예에서, 친수성 블록은 약 500 Da, 5,000 Da, 10,000 Da, 15,000 Da, 또는 20,000 Da일 수 있고, 그리고 pH-반응성 블록은 약 5,000 Da, 10,000 Da, 15,000 Da, 20,000 Da, 25,000 Da, 30,000 Da, 35,000 Da, 40,000 Da, 45,000 Da, 또는 50,000 Da일 수 있다.

[0046] 활성제

[0047] 현재 개시된 요부는 본 발명 중합체의 구체예와 함께 이용되는 활성제를 더욱 포함한다. 일부 구체예에서, 활성제는 미리 결정된 pH에서, 이러한 pH 미만, 또는 이러한 pH 초과일 때 정전 전하를 포함한다. 용어 "활성제"는 개체에서 생물학적 또는 화학적 이벤트를 변경하거나, 증진하거나, 진척시키거나, 연장하거나, 저해하거나, 활성화시키거나, 제거하거나, 또는 만약 그렇지 않으면 영향을 주는 화합물 또는 실체를 지칭하기 위해 본원에서 이용된다. 일부 구체예에서, 본 발명 폴리플렉스는 두 번째 활성제 또는 추가 활성제를 더욱 포함한다. 일정한 구체예에서, 활성제는 펩티드, 핵산 (가령, DNA, siRNA), 항생제, 또는 기타 등등이다.

[0048] 용어 "폴리펩티드", "단백질", 그리고 "펩티드"는 크기 또는 기능에 상관없이, 아미노산, 또는 아미노산 유사체의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 교체가능하게 이용된다. 비록 "단백질"이 상대적으로 큰 폴리펩티드에 관하여 종종 이용되고, 그리고 "펩티드"가 작은 폴리펩티드에 관하여 종종 이용되긴 하지만, 이들 용어의 용법은 당분야에서 겹치고 변한다. 용어 "펩티드"는 본원에서 이용된 바와 같이, 달리 언급되지 않으면 펩티드, 폴리펩티드, 그리고 단백질을 지칭한다. 용어 "단백질", "폴리펩티드", 그리고 "펩티드"는 유전자 산물을 지칭할 때 본원에서 교체가능하게 이용된다. 따라서, 예시적인 폴리펩티드는 유전자 산물, 자연발생 단백질, 비자연발생 단백질, 동족체, 오르소로그, 파라로그, 단편, 그리고 이들의 다른 등가물, 변이체와 유사체를 포함한다. 게다가, 용어 "융합 폴리펩티드"는 2개 또는 그 이상의 상이한 폴리펩티드로부터 형성된 폴리펩티드를 전반적으로 지칭하기 위해 본원에서 이용된다.

[0049] 일부 구체예에서, 활성제인 펩티드는 MAPKAP 키나아제 II 저해성 펩티드 (MK2i)를 포함한다. 이론 또는 기전에 한정됨 없이, MK2i 펩티드는 항염증제로서 활성을 갖고, 그리고 평활근 세포 이주를 주동하는 F-액틴 스트레스

섬유 형성을 저해하는 것으로 생각되는데, 이것은 신생내막 형성 및 맥관의 수축을 유발할 수 있다. MK2i는 이런 이유로, 혈관이완을 증강하고 신생내막의 형성을 감소시키는 것으로 생각된다. 따라서, MK2i는 혈관 합체 기술, 특히 복재 정맥 합체와 함께 이용될 때 유익할 수 있다.

[0050] MK2 펩티드 및/또는 MK2i 펩티드에 관한 추가 정보를 위하여, U.S. 특허 출원 공개 번호 2012/0263680, 2011/0288036, 그리고 2008/0293640을 참조하고, 이들은 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다.

[0051] 펩티드는 정전으로 하전될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 그들이 미리 결정된 pH에 있을 때 정전으로 하전된다. 가령, 펩티드는 미리 결정된 pH에서, 이러한 pH 미만에서, 또는 이러한 pH 초과에서 양이온성 또는 음이온성일 수 있다. 당업자는 최소한, 펩티드가 pKa보다 낮은, 이에 동등한, 또는 이보다 높은 pH에 있을 때 전하를 갖는 기능기(가령, 아민 기)를 갖는 다양한 펩티드를 인지할 것이다. 일부 바람직한 구체예는 생리학 pH에서 하전되는(가령, 양이온성) 펩티드를 포함한다.

[0052] 본 발명의 조성물의 일부 예시적인 구체예는 MK2i 펩티드를 포함하는데, 이것은 MK2i가 일차 아민의 pKa보다 낮은 pH(즉, 약 pH 9 to 약 pH 12)에 있을 때, 양이온성 형질을 MK2i에 부여하는 일차 아민을 포함한다. 다른 예시적인 펩티드는 Bak의 BH3 모방 저해제를 포함하는데, 이것은 암 세포 아포토시스를 촉발하는데 이용될 수 있고, 그리고 미리 결정된 pH에서 하전될 수 있다. 다른 예시적인 펩티드는 AZX100 펩티드(서열 번호: 2)를 포함하는데, 이것은 기도 이완에 활용될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 활성제는 RN22 펩티드(서열 번호: 3) 및 페네트라틴-Bak-BH3 펩티드(서열 번호: 4)가 포함되지만 이들에 한정되지 않는 친아포토시스성 펩티드일 수 있다. 따라서, 조성물에서 이용된 펩티드에 따라, 조성물은 다양한 상이한 장애 및/또는 질환을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0053] 일부 구체예에서, 펩티드는 2개의 상이한 펩티드를 포함하는 융합 펩티드일 수 있다. 융합 펩티드인 펩티드는 활성제를 포함하는 첫 번째 펩티드 및 세포-투과성 펩티드를 포함하는 두 번째 펩티드를 포함할 수 있다. 세포-투과성 펩티드는 일반적으로, 세포-투과성 펩티드 및/또는 거기에 결합된 임의의 분자의 세포 흡수를 촉발하거나, 가속화하거나, 활성화시키거나, 또는 조장하는 펩티드이다.

[0054] 가령, 일부 구체예에서, 세포-투과성 펩티드는 "YARA"이다. YARA는 활성제를 포함하는 첫 번째 펩티드에 결합될 수 있다. 다른 세포-투과성 펩티드는 TAT 펩티드, 안테나페디아(Antennapedia)(AntP) 펩티드뿐만 아니라 당분야에서 공지된 다른 세포 투과성 펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 펩티드의 세포-투과성 펩티드와 활성제는 각각, YARA와 MK2i이다. 본원에서 이용된 바와 같이, "YARA-MK2i"(서열 번호: 1)는 세포 투과성 펩티드(YARA) 및 MAPKAP 키나아제 II 저해제 펩티드(MK2i) 둘 모두를 포함하는 펩티드를 지칭한다.

[0055] 따라서, 일부 구체예에서, 활성제는 펩티드이다. 일부 구체예에서, 펩티드는 세포 투과성 펩티드를 더욱 포함한다. 세포 투과성 펩티드는 활성제 펩티드와 동일한 펩티드 또는 별개의 펩티드일 수 있다. 게다가, 일부 구체예에서, 활성제는 활성제 펩티드인 부분 및 세포-투과성 펩티드인 다른 부분을 포함하는 융합 펩티드이다.

[0056] 폴리플렉스

[0057] 현재 개시된 요부는 본원에서 설명된 중합체와 활성제를 포함하는 폴리플렉스를 더욱 포함한다. 일부 구체예에서, 중합체와 활성제는 미리 결정된 pH에서 반대 전하를 갖고, 그리고 이런 이유로, 미리 결정된 pH에 있을 때 정전으로 결합하여 폴리플렉스를 형성할 수 있다. 미리 결정된 pH는 활성제(가령, 펩티드) 또는 중합체의 pKa 초과이고, 그리고 활성제 또는 중합체 중에서 다른 하나의 pKa 미만일 수 있다. 가령, 미리 결정된 pH는 약 6.5 내지 약 8.0의 pH일 수 있고, 그리고 더욱 특정하게는, 약 pH 6.5, 약 pH 6.6, 약 pH 6.7, 약 pH 6.8, 약 pH 6.9, 약 pH 7.0, 약 pH 7.1, 약 pH 7.2, 약 pH 7.3, 약 pH 7.4, 약 pH 7.5, 약 pH 7.6, 약 pH 7.7, 약 pH 7.8, 약 pH 7.9, 또는 약 pH 8.0일 수 있다. 미리 결정된 pH는 또한, 개체의 생리학적 pH일 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "미리 결정된 pH에서"는 특정한 pH이거나, 특정 pH 미만이거나, 특정 pH 초과이거나, 또는 일정한 pH 범위 내에 있는 pH를 지칭할 수 있다.

[0058] 본 발명 폴리플렉스의 구체예는 미리 결정된 pH에서 반대로 하전되는 특정 중합체와 활성제로 형성할 수 있다. 본 발명 폴리플렉스의 구체예의 형성은 중합체와 활성제 둘 모두 미리 결정된 pH에서 존재할 때 일어날 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 폴리플렉스는 최소한 정전 상호작용을 통해 결합되는 중합체와 활성제를 포함한다. 본원에서 설명된 바와 같이, 본 발명 중합체 및/또는 활성제의 전하는 pH가 미리 결정된 pH로부터 미리 결정된 pH가 아닌 pH로 변화될 때, 중화되거나, 강화되거나, 또는 양성에서 음성으로 또는 음성에서 양성으로 변할 수 있다. 이것이 발생할 때, 중합체와 활성제는 이들이 더 이상, 반대 전하를 갖지 않고 및/또는 덜한 정도의 반대 전하를 갖고, 따라서 폴리플렉스의 분해를 허용하도록 변할 수 있다.

- [0059] 이점에 관해서, 폴리플렉스의 최소한 부분적으로 분해는 폴리플렉스에 결합되고 이를 구성하는 활성제 (가령, 폴리뉴클레오타이드)를 주변 환경에 노출시킬 수 있다. 따라서, 폴리플렉스의 최소한 부분적인 분해는 활성제가 그들의 최종 표적에 전달되도록 허용할 수 있다. 본원에서 설명된 바와 같이, 최소한 부분적인 분해는 또한, 막 교란 형질을 가질 수 있는 중합체를 노출시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 폴리플렉스의 세포 내로의 흡수 후, 이들 폴리플렉스는 최소한 부분적으로 분해하여 활성제를 pH-반응성 방식으로 시토졸에 전달할 수 있다. 일부 구체예에서, 폴리플렉스는 대략 엔도솜 pH 또는 그 미만에서 최소한 부분적으로 분해하고, 그리고 최소한 부분적으로 분해된 폴리플렉스는 활성제가 특정 세포의 시토졸에 전달될 수 있도록, 엔도솜 또는 리포솜 막을 교란할 수 있다. 따라서, 활성제와 폴리플렉스를 형성하는 본 발명 중합체의 구체예는 엔도소몰리티이고, 그리고 따라서, 폴리플렉스를 거쳐 세포에 들어간 활성제의 세포질 전달을 허용하고 및/또는 증강할 수 있다.
- [0060] 폴리플렉스의 특정한 구체예는 MK2i와 폴리(프로필아크릴산)의 조성물을 포함한다. 약 6.5 내지 약 8.0의 미리 결정된 pH에서, MK2i는 음이온성이고, 그리고 폴리(프로필아크릴산)은 양이온성이다. 조성물은 이런 이유로, 약 6.5 내지 약 8.0의 미리 결정된 pH에 있을 때, MK2i와 폴리(프로필아크릴산)의 폴리플렉스를 형성하고 및/또는 포함할 수 있다.
- [0061] 조성물은 활성화 pH에 종속될 때 활성화될 수 있다. 일부 구체예에서, 활성화 pH는 미리 결정된 pH보다 낮은 pH이다. 일부 구체예에서, 활성화 pH는 대략, 개체의 세포의 초기 엔도솜에서 발견된 pH이다. 조성물이 활성화 pH에 있을 때, 펩티드와 중합체 사이에 정전 결합이 파괴 (가령, 개열)될 수 있다. 결합은 2개 또는 그 이상 결합된 분자가 서로로부터 해리할 수 있을 정도로 약화되거나 또는 제거될 때에는 언제든지 파괴된다.
- [0062] 가령, MK2i 펩티드와 폴리(프로필아크릴산) 중합체를 포함하는 조성물의 일부 구체예는 또한, 약 6.5 또는 더욱 낮은 활성화 pH를 갖는다. 따라서, MK2i와 폴리(프로필아크릴산) 폴리플렉스가 6.5 또는 더욱 낮은 pH에 노출될 때, MK2i와 폴리(프로필아크릴산)은 서로로부터 해리할 수 있다.
- [0063] 활성화 pH에서 활성화됨에 의해서, 활성화 pH에 있는 폴리플렉스의 조성물은 활성제를 비활성 결합된 상태에서 활성 결합되지 않은 상태로 활성화시킬 수 있다. 중합체와 활성제의 해리는 또한, 엔도솜 상호작용 및/또는 교란 및 엔도리소좀 또는 재활용 경로로부터 펩티드의 탈출을 할 수 있게 하는 막-교란 활성을 활성화시킬 수 있는데, 이것은 상기 펩티드가 엔도솜 등으로부터 시토졸 내로 전달되도록 허용할 수 있다. 차후에, 활성제는 세포 내에서 하나 또는 그 이상의 세포질 또는 다른 표적을 표적으로 할 수 있다.
- [0064] 따라서, 이전 조성물과 달리, 그리고 이론 또는 기전에 한정됨 없이, 현재 개시된 요부의 구체예는 먼저 표적 세포의 엔도솜 경로를 들어갈 수 있고, 그리고 이후, 표적 세포의 엔도솜으로부터 시토졸 내로 최소한 부분적으로 탈출하기 위해 pH-활성화될 수 있다. 이것은 펩티드 활성제의 효력을 증가시키는 이점을 갖는다. 이것은 또한, 단독으로 투여된 또는 단지 세포-투과성 펩티드에만 결합된 펩티드에 비하여 펩티드의 세포내 체류 시간 및/또는 생물활성을 증가시킬 수 있다.
- [0065] 더 나아가, 상기 조성물 및/또는 폴리플렉스는 넓은 범위의 상이한 농도의 활성제와 중합체를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 활성제 및/또는 중합체의 상대적 농도는 전하 비율, 또는 활성제 상에서 하전된 기의 몰 비율 대 중합체 상에서 하전된 기의 몰 비율에 의해 결정된다. 가령, 조성물이 MK2i와 폴리(아크릴산)을 포함하면, 전하 비율은 $[\text{NH}_3^+]:[\text{COO}^-]$ 의 몰 비율로서 규정될 수 있다. 예시적인 조성물은 약 10:1, 약 9:1, 약 8:1, 약 7:1, 약 6:1, 약 5:1, 약 4:1, 약 3:1, 약 2:1, 약 1:1, 약 1:2, 약 1:3, 약 1:4, 약 1:5, 약 1:6, 약 1:7, 약 1:8, 약 1:9, 또는 약 1:10의 전하 비율을 포함한다.
- [0066] 펩티드 생물활성은 일부 구체예, 혈관 평활근 세포에서 병리학적 신호 안지오텐신 II (Ang II)에 대한 응답으로 염증성 신호 생산 (TNF-알파)의 저해의 면에서 확인된다. 인간 복제 정맥 (HSV)에서, PPAA 폴리플렉스는 HSV의 혈관이완을 증강하고 HSV에서 신생내막의 형성을 감소시키는 것으로 확인된다.
- [0067] 일정한 구체예에서, 미리 결정된 pH는 펩티드 활성제 상에 존재하는 일차 아민 및/또는 중합체 내에 존재하는 카르복실산 기의 pKa 값에 대하여 선별된다. 일정한 구체예에서, 펩티드의 pKa는 약 9와 약 12 사이이고 및/또는 중합체의 pKa는 약 6과 약 7 사이이다. 이러한 혼합은 폴리플렉스의 형성을 유발한다.
- [0068] 일부 구체예에서, 본 발명의 조성물/화합물은 최소한 나노규모 또는 다른 서브마이크론 규모에서 측정될 수 있는 치수를 갖는 폴리플렉스를 포함한다. 폴리플렉스의 크기는 세포 전달, 그리고 특히, 엔도솜 경로를 통한 세포 전달을 위해 최적화될 수 있다. 다른 구체예에서, 조성물은 최소한 하나의 치수에서 약 50 nm, 약 60 nm, 약 70 nm, 약 80 nm, 약 90 nm, 약 100 nm, 약 110 nm, 약 120 nm, 약 130 nm, 약 140 nm, 약 150 nm, 약 160

nm, 약 170 nm, 약 180 nm, 약 190 nm, 약 200 nm, 약 210 nm, 약 220 nm, 약 230 nm, 약 240 nm, 약 250 nm, 약 260 nm, 약 270 nm, 약 280 nm, 약 290 nm, 약 300 nm, 약 310 nm, 약 320 nm, 약 330 nm, 약 340 nm, 약 350 nm, 약 360 nm, 약 370 nm, 약 380 nm, 약 390 nm, 약 400 nm, 약 410 nm, 약 420 nm, 약 430 nm, 약 440 nm, 약 450 nm, 약 460 nm, 약 470 nm, 약 480 nm, 약 490 nm, 또는 약 500 nm인 폴리플렉스를 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 폴리플렉스는 최소한 하나의 치수, 예를 들면, 직경에서 약 90 nm 내지 약 200 nm의 크기를 갖는다. 일정한 폴리플렉스가 나노규모에서 제작될 수 있기 때문에, 폴리플렉스는 또한, 본원에서 나노 입자 또는 나노폴리플렉스로 지칭될 수 있다.

[0069]

일부 구체예에서, 중합체는 폴리플렉스의 외부 껍질 (관)을 형성할 수 있고 폴리플렉스를 보호할 수 있는 친수성 블록을 포함한다. 일부 구체예에서, 중합체 상에서 이런 블록은 폴리플렉스가 단백질을 흡착하는 정도를 감소시키거나 또는 제거할 수 있다. 예시적인 폴리플렉스 상에서 친수성 외부 껍질은 또한, 적혈구의 용혈 또는 응집을 저해할 수 있거나, 면역 자극을 방지할 수 있거나, 순환 시간을 향상시킬 수 있거나, 화물 (가령, 활성제)을 효소적 분해로부터 보호할 수 있거나, 콜로이드 안정성과 '잠행'을 제공할 수 있거나, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0070]

현재 개시된 요부는 더 나아가, 본원에서 설명된 폴리플렉스 및/또는 이들의 제약학적 조성물을 비롯하여, 본원에서 설명된 조성물 중에서 한 가지를 합성하기 위한 방법을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 중합체와 펩티드가 부분적으로 또는 완전하게 반대로 하전되고 정전으로 결합하여 최소한 하나의 폴리플렉스를 형성하도록, 중합체와 활성제를 미리 결정된 pH에서 혼합하는 것을 포함한다. 조성물을 형성하는데 이용된 중합체와 펩티드의 농도는 특별히 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 중합체와 펩티드는 이들 2가지 성분분배에 의해 달성된 전하 비율이 약 10:1 내지 약 1:10인 정도의 농도에서 혼합된다. 일부 구체예에서, 중합체와 펩티드는 완충액, 예를 들면, PBS 완충액에서 혼합된다.

[0071]

앞서 설명된 바와 같이, 일부 구체예에서, 활성제는 세포-투과성 펩티드를 더욱 포함하는 펩티드를 포함할 수 있다. 이점에 관해서, 세포-투과성 펩티드를 포함하는 폴리플렉스를 합성하기 위한 방법은 활성제와 중합체를 혼합하는 단계에 앞서, 활성제 (가령, 펩티드)를 세포-투과성 펩티드에 융합하는 단계를 포함할 수 있다. 결과의 조성물은 이런 이유로, 중합체 및 활성제 펩티드와 세포-투과성 펩티드의 융합 펩티드를 포함하는 최소한 하나의 폴리플렉스를 포함한다.

[0072]

일부 구체예에서, 본 발명은 폴리플렉스 조성물을 합성하는 방법에 관계하고, 여기서 상기 방법은 활성제, 예를 들면, 펩티드 (가령, YARA-MK2i 융합 펩티드)를 중합체, 예를 들면, pH-반응성, 엔도소몰리티 중합체 PPAA와 미리 결정된 pH에서 혼합하는 단계를 포함한다.

[0073]

이용 동안, 치료 방법에서, 또는 폴리플렉스를 분해하기 위해, 이들 폴리플렉스는 다양한 pH일 수 있는 미리 결정된 pH로부터 다양한 pH일 수 있는 활성화 pH로 변이될 수 있다. 이러한 변이는 폴리플렉스를 포함하는 중합체와 활성제의 최소한 부분적인 분해를 용이하게 할 수 있다.

[0074]

조성물과 장치

[0075]

현재 개시된 요부는 본원에서 개시된 조성물, 폴리플렉스, 펩티드 및/또는 중합체의 제약학적 조성물을 더욱 포함한다. 게다가, 현재 개시된 요부는 또한, 본원에서 설명된 화합물의 임의의 제약학적으로-허용되는 염, 용매 화합물, 생리학적으로 기능적 유도체 및/또는 제약학적으로-허용되는 유도체를 포함한다.

[0076]

이런 제약학적 조성물은 제약학적으로-허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이점에 관해서, 용어 "제약학적으로 허용되는 담체"는 무균 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 유제뿐만 아니라 이용 직전에 무균 주사가능 용액 또는 분산액으로의 재구성을 위한 무균 분말을 지칭한다. 적절한 유동성은 예로서, 코팅 물질, 예를 들면, 레시틴의 이용에 의해, 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 이용에 의해 유지될 수 있다. 이들 조성물은 또한, 어췌버트, 예를 들면, 보존제, 적십제, 유화제 및 분산제를 내포할 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균제와 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등의 포함에 의해 담보될 수 있다. 등장성 작용제, 예를 들면, 당, 염화나트륨 등을 포함하는 것이 또한 바람직할 수 있다. 주사가능 제약학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연하는 작용제, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트와 젤라틴의 포함에 의해 달성될 수 있다. 주사가능 저장소 형태는 생물분해성 중합체, 예를 들면, 폴리락티드-폴리글리콜리드, 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)에서 약물의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성함으로써 만들어진다. 약물 대 중합체의 비율 및 이용된 특정 중합체의 성격에 따라, 약물 방출의 속도가 제어될 수 있다. 저장소 주사가능 제제는 또한, 약물을 신체 조직과 양립하는 리포솜 또는 마이크로유체에 가둠으로써

제조된다. 주사가능 제제는 예로서, 세균-보류 필터를 통한 여과에 의해, 또는 이용 직전에 무균수 또는 다른 무균 주사가능 매체에서 용해되거나 또는 분산될 수 있는 무균 고체 조성물의 형태에서 살균제를 함유함으로써 살균될 수 있다. 적합한 비활성 담체는 당, 예를 들면, 락토오스를 포함할 수 있다.

[0077] 적합한 제제는 항산화제, 완충액, 세균발육저지제, 살균적 항생제, 제제를 의도된 수용자의 체액과 등장성이 되게 만드는 용질; 그리고 현탁제와 농화제를 포함할 수 있는 수성과 비수성 무균 현탁액을 내포할 수 있는 수성과 비수성 무균 주사 용액을 포함한다.

[0078] 조성물은 현탁액, 용액 또는 유성 또는 수성 운반제에서 유제와 같은 형태를 취할 수 있고, 그리고 조제 작용제, 예를 들면, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 내포할 수 있다. 대안으로, 활성 성분은 이용 전에, 적합한 운반제, 예를 들면, 무균 발열원 없는 증류수로 구성을 위한 분말 형태일 수 있다.

[0079] 제제는 단위분량 또는 다중분량 용기, 예를 들면, 밀봉된 앰플과 바이알에서 담겨 제공될 수 있고, 그리고 이용 직전에 무균 액체 담체의 첨가만을 필요로 하는 동결된 또는 동결-건조된 (동결건조된) 조건에서 보관될 수 있다.

[0080] 조성물은 또한, 이식 또는 주사를 위한 제제물로서 조제될 수 있다. 따라서, 예로서, 조성물은 적합한 중합성 또는 소수성 물질로 조제될 수 있다 (가령, 허용되는 오일에서 유제로서). 일부 구체예에서, 조성물은 이식을 위한 장치 또는 물질로 또는 이러한 장치 또는 물질에서 제조된다. 구현된 조성물에서 이용될 수 있는 예시적인 장치는 조성물, 예를 들면, MK2i-내포 조성물을 포함하는 혈관 이식편 (가령, 복재 정맥 이식편)을 포함한다. 조성물은 장치를 형성하는 물질 내에, 장치의 표면 상에, 또는 기타 등등에 제공될 수 있다. 조성물을 포함하는 이식편 장치의 구체예는 조성물을 포인트에 직접적으로 전달하는 능력을 가질 수 있고, 여기서 이식편은 내막 과형성 등을 유발할 수 있다. 장치는 개체에서 이식을 위한 광범위한 어레이의 의학적 장치를 포함할 수 있다. 장치는 또한, 개체 내에 또는 개체 상에 이식될 수 있는, 생체재료를 비롯한 물질을 포괄한다.

[0081] 현재 개시된 요부는 조성물 또는 제약학적 조성물의 투여에 유용한 장치와 함께 포장된, 본원에서 설명된 바와 같은 조성물 또는 제약학적 조성물을 포함할 수 있는 키트를 더욱 포함한다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 적절한 투여-보조 장치는 선별되는 조성물 또는 제약학적 조성물의 제제 및/또는 원하는 투여 부위에 의존할 것이다. 가령, 조성물의 제제가 개체에서 주사에 적절하면, 장치는 주사기일 수 있었다. 다른 실패의 경우에, 원하는 투여 부위가 세포 배양 배지이면, 장치는 무균 피펫일 수 있었다. 또 다른 실패의 경우에, 원하는 투여 부위가 정맥 또는 동맥, 장치는 이식편일 수 있었다.

[0082] 게다가, 예시적인 조성물이 연관된 펩티드의 효력을 증가시킬 수 있기 때문에, 조성물의 일부 구체예는 펩티드의 분량이 개체에서 활성을 보여주는 기간을 연장할 수 있다. 이것은 투여가 어렵거나 또는 단지 제한된 횟수로만 제공될 수 있는 적용에서 특히 도움이 될 수 있다. 가령, 혈관 이식편은 전형적으로, 활성제로 단지 1회 처리되고 (즉, 수술 및/또는 이식 동안), 그리고 이런 이유로, 혈관 이식편과 함께 투여된 조성물은 연관된 펩티드가 생물학적 활성을 전시하는 기간을 연장할 수 있는 것이 바람직하다.

[0083] 이용 방법

[0084] 현재 개시된 요부는 장애 및/또는 질환을 조성물로 치료하기 위한 방법을 더욱 포함한다. 본 발명의 방법은 본원에서 설명된 조성물 (즉, 중합체와 활성제를 포함하는 조성물) 중에서 한 가지의 효과량을 개체에 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 치료를 위한 질환은 혈관 질환, 예를 들면, 내막 과형성이다. 당업자는 또한, 본 발명에 따른 활성제를 포함하는 조성물로 치료될 수 있는, 혈관계뿐만 아니라 다른 시스템에 영향을 주는 다양한 다른 질환을 인지할 것이다. 일부 구체예에서, 개체는 세포-투과성 펩티드이거나 또는 이들을 포함하는 펩티드를 비롯한 펩티드인 활성제에 의해 치료가능한 질환 또는 장애에 대해 치료된다. 일정한 구체예는 이런 이유로, 일정한 질환을 치료하기 위해 활성제를 투여하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 질환을 조성물로 치료하는 방법은 활성제의 효력, 장기 지속, 또는 기타 등등을 증가시킬 수 있다.

[0085] 용어 "투여하는"은 조성물 및/또는 이의 제약학적 조성물을 개체에 제공하는 임의의 방법을 지칭한다. 이런 방법은 당업자에게 널리 공지되고 경구 투여, 경피 투여, 흡입에 의한 투여, 코 투여, 국소 투여, 질내 투여, 안과 투여, 귀내 투여, 뇌내 투여, 직장 투여, 그리고 주사가능, 예를 들면, 정맥내 투여, 동맥내 투여, 근육내 투여, 그리고 피하 투여를 비롯한 비경구 투여가 포함되지만 이들에 한정되지 않는다. 투여는 치료되는 조직, 예를 들면, 정맥을 조성물을 포함하는 용액에서 침수시킴으로써 조성물을 국소 투여하는 것을 포함할 수 있다. 투여는 또한, 조성물 또는 이의 제약학적 조성물을 포함하는 장치 또는 물질을 제공하고, 그리고 이후 이식함으로써 또는 만약 그렇지 않으면, 상기 장치 또는 물질을 개체에 제공함으로써 달성될 수 있다. 투여는 연속적 또

는 간헐적일 수 있다. 다양한 양상에서, 제조물은 치료적으로 투여될 수 있다; 다시 말하면, 현존하는 질환 또는 장애 (가령, 내막 과형성 등)을 치료하기 위해 투여된다. 추가의 다양한 양상에서, 제조물은 예방적으로 투여될 수 있다; 다시 말하면, 질환 또는 장애의 예방을 위해 투여된다.

[0086]

일부 구체예에서, 개체는 조성물의 효과량이 투여될 것이다. 이점에 관하여, 용어 "효과량"은 원하는 결과를 달성하거나 또는 바람직하지 않은 상태에 영향을 주는데 충분한 양을 지칭한다. 가령, "치료 효과량"은 원하는 치료적 결과를 달성하거나 또는 바람직하지 않은 증상에 영향을 주는데 충분하지만, 일반적으로 불리한 부작용을 유발하는데 불충분한 양을 지칭한다. 임의의 특정 환자에 대한 특정한 치료적으로 유효 분량 수준은 치료되는 장애와 장애의 심각도; 이용된 특정한 조성물; 환자의 연령, 체중, 전반적인 건강, 성별과 식이; 투여 시간; 투여 루트; 이용된 특정한 조성물의 배출 속도; 치료의 지속 시간; 이용된 특정한 조성물과 합동으로 또는 동시에 이용된 약물, 그리고 의학 분야에서 널리 공지된 기타 인자를 비롯한 다양한 인자에 의존할 것이다. 가령, 원하는 치료 효과를 달성하는데 필요한 분량보다 낮은 수준에서 조성물의 분량을 시작하고, 그리고 원하는 효과가 달성될 때까지 용량을 점진적으로 증가시키는 것은 당해 분야의 기술 내에 있다. 원하는 경우에, 효과적인 일일량은 투여의 목적으로 복수 분량으로 나뉘질 수 있다. 결과적으로, 단일 분량 조성물은 일일량을 구성하기 위해 이런 양 또는 이들의 약수를 내포할 수 있다. 용량은 임의의 금기의 이벤트에서 개별 주치의에 의해 조정될 수 있다. 용량은 변할 수 있다, 그리고 1 일 또는 여러 일 동안 매일 하나 또는 그 이상의 분량 투여에서 투여될 수 있다. 보도는 제약학적 산물의 소정의 부류에 대한 적절한 용량에 대해 기존 문헌에서 발견될 수 있다. 추가의 다양한 양상에서, 제조물은 "예방적 효과량"; 다시 말하면, 질환 또는 장애의 예방에 효과적인 양으로 투여될 수 있다.

[0087]

부가적으로, 용어 "개체" 또는 "치료가 필요한 개체"는 투여의 표적을 지칭하는데, 이것은 특정 질환, 병리학적 상태, 장애, 또는 기타 등등에 관련된 증상을 임의선택적으로 전신한다. 본원에서 개시된 방법의 개체는 척추동물, 예를 들면, 포유동물, 어류, 조류, 파충류, 또는 양서류이다. 따라서, 본원에서 개시된 방법의 개체는 인간, 비-인간 영장류, 말, 돼지, 토끼, 개, 양, 염소, 소, 고양이, 기니 피그 또는 설치류일 수 있다. 상기 용어는 특정 연령 또는 성별을 표시하지 않는다. 따라서, 수컷 또는 암컷인 지에 상관없이, 성체와 신생 개체뿐만 아니라 태아가 포함되는 것으로 의도된다. 환자는 질환 또는 장애로 고통받는 개체를 지칭한다. 용어 "개체"는 인간 및 수의학적 개체를 포함한다.

[0088]

용어 "치료" 또는 "치료하는"은 질환, 병리학적 상태, 또는 장애를 치유하거나, 개선하거나, 안정시키거나, 또는 예방하는 의도로 개체의 의학적 관리를 지칭한다. 이러한 용어는 적극 치료, 다시 말하면, 질환, 병리학적 상태, 또는 장애의 향상에 특이적으로 관계하는 치료를 포함하고, 그리고 또한, 원인 치료, 다시 말하면, 연관된 질환, 병리학적 상태, 또는 장애의 원인의 제거에 관계하는 치료를 포함한다. 이에 더하여, 이러한 용어는 완화 치료, 다시 말하면, 질환, 병리학적 상태, 또는 장애를 치료하기 보다는 증상을 경감하도록 설계된 치료; 방지적 치료, 다시 말하면, 연관된 질환, 병리학적 상태, 또는 장애의 발달을 최소화하거나 또는 부분적으로 또는 완전하게 저해하는 것에 관련된 치료; 그리고 지지 요법, 다시 말하면, 연관된 질환, 병리학적 상태, 또는 장애의 향상에 관계하는 다른 특정한 요법을 보충하는데 이용된 치료를 포함한다.

[0089]

실시예

[0090]

현재 개시된 요부는 다음의 특정하지만 무제한적 실례에 의해 더욱 예시된다. 이들 실시예는 현재 개시된 요부에 관련된 개발과 실험의 코스 동안 다양한 시점에서 모아진 데이터를 대표하는 데이터의 편집을 포함할 수 있다.

[0091]

본 발명의 발명자들은 엔도소몰리틱 나노폴리플렉스 (NPs)의 조제에 의한 치료적 펩티드의 세포질 전달과 체류를 위한 일반화가능한 접근법을 개발하였다. 이러한 기술은 예로서, 혈관 우회로 이식편 내에서 내막 과형성 (IH)을 차단하기 위한 항염증성 세포 투과성 펩티드 (CPP), 예를 들면, MAPKAP 키나아제 2 (MK2i)의 저해제의 전달에 이용될 수 있다.

[0092]

MK2i, 예를 들면, 많은 CPP의 작용의 효능과 장기 지속은 엔도리소좀 경로 내에서 구속 및 세포질 표적에 대한 제한된 생체이용률을 겪는다. 하지만, MK2i-NP로의 조제는 펩티드 흡수, 엔도솜 탈출, 세포내 반감기, 그리고 시험관내에서 생물활성을 유의미하게 증강하는 것으로 발견되었다. 실제로, MK2i-NP는 염증성 신호전달을 차단하고, 인간 복재 정맥에서 탈체에서 IH를 저해하고, 그리고 토끼 정맥 이식조직 모델에서 생체내에서 IH를 유의미하게 감소시킨다. 따라서, 현재 개시된 NP 기술은 펩티드 치료제의 세포내 전달을 위한 더욱 넓은 이용의 잠재력을 갖는 새로운 전달 플랫폼을 제공하고, 그리고 본원에서 제공된 유망한 MK2i-NP 데이터는 정맥 이식편 실패를 감소시키기 위한 이러한 접근법의 지속된 임상적 반응의 동기를 부여한다.

- [0093] 따라서, 주도적인 킬러, 관상 동맥 심장 질환 (CHD)에 대한 요법에 초기 집중으로 신규한 펩티드 전달 시스템이 개발되었다. 자가 복제 정맥과 내유 동맥으로 관상 동맥 우회술은 다중맥관 CHD에 대한 치료의 현재 표준이다; 하지만, 복제 정맥 이식편의 거의 절반이 내막 과형성 (IH)으로 인해 18 개월 내에 실패한다. IH의 근원적인 원인 중에서 한 가지는 수확과 이식후 동맥혈화/심장에서 더욱 빠른 더욱 박동성 혈류에 적응 동안 이식편에 대한 기계적 스트레스와 생화학적 스트레스로 인한 혈관 평활근 세포 (VSMCs)에서 p38 유사분열물질 활성화된 단백질 키나아제 경로의 활성화이다. 활성화된 p38은 MAPKAP 키나아제 II (MK2)를 인산화하고, 인산화된 MK2의 핵에서 시토졸로의 전치를 촉발하고, 여기서 이것은 염증 반응, 혈관수축, 그리고 병리학적 VSMC 표현형을 유도하는 신호를 전파하고, 이들은 합동될 때, IH, 그리고 궁극적으로, 이식편 폐색과 실패를 야기한다. 혈관재생 절차 동안, 자가 정맥은 전형적으로, 이식조직에 앞서 30 분 동안 외식된다. 결과적으로, 외식 동안 치료는 부정확한, 전신 효과를 제한하면서, 표적 조직으로 전달을 증강하는 국소 치료를 위한 환경을 제공한다. 하지만, 이러한 짧은 치료 윈도우는 전체 정맥 이식편 동맥혈화/적응 시기 내내 치료적 효력을 담보하기 위해 흡수와 작용 기간을 최대화하는 치료적 접근법으로부터 이익을 얻는다.
- [0094] p38 저해제에 대한 임상 시험은 이러한 상류 매개체의 다면발현성 효과를 차단하는 것과 연관된 독성 때문에 실패하였다. 이것은 항염증성 표적으로서 MK2의 추종에 대한 동기를 부여하였지만, 소형 분자 MK2 저해제 역시 특이성의 결여 및 물 용해도로 인해 FDA 승인을 획득하는데 실패하였다. 하지만, 인간 복제 정맥에서 일부 활성을 갖는 효과적인 세포-투과성 펩티드 (CPP) MK2 저해제 (MK2i)가 개발되었다; 유감스럽게도, MK2i 효능은 불량한 세포 흡수 및 후기 엔도솜/초기 리소좀 내에 격리에 의해 방해되고, 세포질에 국부화된 활성화된 MK2에 대한 비효율적 세포내 생체이용률을 유발한다.
- [0095] 본원에서, MK2i를 혈관 세포와 조직 내로 효율적으로 전달하고, 시험관내, 탈체, 그리고 생체내에서 펩티드 생물활성을 1 크기 자릿수 증강하는 엔도소몰리틱, 정전-복합화된 폴리플렉스의 조제를 위한 간단한 변용 방법이 개시된다. MK2i-NP는 혈관 우회로 이식편의 성과를 향상시키는 임상적 변용을 위한 강한 잠재력을 갖고, 그리고 이러한 NP 접근법은 생리활성 펩티드에 대한 전달 벡터로서 전신 이용될 태세를 갖춘, 제약학적 기술에서 유의미한 돌파구를 대표한다.
- [0096] **실시예 1**
- [0097] 폴리(프로필아크릴산) (PPAA) 동중중합체 ($M_n = 22,000$, $PDI = 1.47$)는 가역성 부가 단편화 사슬 전달 (RAFT) 중합화에 의해 합성되었다. MK2i 펩티드 (서열: YAAAAARAKALRQLGVAA)는 표준 Fmoc 화학을 통해 합성되고 역상 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC)에 의해 정제되었다. MK2i 펩티드와 PPAA 중합체는 10:1에서부터 1:10까지 다양한 전하 비율 (CR, 규정된 $[NH_3^+]/[COO^-]$)에서 혼합되어 폴리플렉스를 형성하였다.
- [0098] 폴리플렉스의 크기, 다분산성, 그리고 제타 전위는 동적 광 산란 (DLS)으로 측정되었다. 1:3의 전하 비율이 추가 연구를 최적 제제로서 선택되었는데, 이것은 약 119 ± 27 nm의 수력학적 직경 및 약 -11.9 ± 3.2 mV의 제타 전위 (ζ)를 갖는 폴리플렉스를 창출한다. 폴리플렉스의 pH-의존성 펩티드 방출과 막 교란 (즉, 엔도소몰리틱) 행태는 DLS 및 적혈구 용혈 검정을 이용하여 특징화되었다. 시험관내 MK2 저해는 TNF α -자극된 인간 관상 동맥 혈관 평활근 세포 (HCAVSMCs)에서 인터류킨-6 (IL-6) 생산의 하류 저해를 정량하기 위해 ELISA를 통해 사정되었다. 인간 복제 정맥 (HSV) 체외이식편은 동의하는 인간 환자로부터 획득되었고, 그리고 1 mm 두꺼운 정맥 고리 분절의 혈관이완은 근육 배스 / 힘 변환기를 이용하여 탈체에서 검정되었다.
- [0099] 고리는 퍼센트 이완을 결정하기 위해, MK2i 폴리플렉스, MK2i 단독, 또는 대조로 2 시간 동안 처리되고, 그리고 차후에, 페닐에프린 (10^{-6} 내지 10^{-7} M)으로 수축되고, 그리고 이후, 누적 로그 분량의 나트륨 니트로프루시드로 이완되었다. 추가 정맥 고리가 14 일 동안 배양되고, 고정되고, 파라핀에서 포매되고, 절편화되고, Verhoeff-van Gieson 염료로 염색되고, 그리고 이식편 내막 과형성을 제거하는 폴리플렉스 치료의 능력을 사정하기 위해 내막 두께와 내측 두께를 정량하는데 이용되었다.
- [0100] 동적 광 산란으로부터 결과는 폴리플렉스 (CR=1:3)가 pH 7.4에서 크기에서 약 119 nm이고, 그리고 pH 6.8에서 또는 그 미만에서 개별 중합체와 펩티드 단일체로의 해리를 증명하고, 엔도솜에서 폴리플렉스로부터 펩티드의 방출을 위한 효과적인 기전을 제공한다는 것이다. 폴리플렉스는 pH 7.4 또는 6.8에서 어떤 용혈 행태도 보여주지 않았지만, pH 6.2와 5.6에서 스위치-유사, 건실한 용혈을 보여준다. 이들 데이터는 폴리플렉스 해리와 펩티드 방출 이후에, 엔도솜 소포의 추가 산성화가 pH-의존성 엔도소몰리틱 활성을 촉발하고 펩티드 세포질 전달을 할 수 있게 한다는 것을 암시한다 (도면 2).
- [0101] MK2i 폴리플렉스의 생물활성은 시험관내에서 확증되었다. MK2i를 포함하는 폴리플렉스는 MK2i 단독과 비교하여

HCAVSMCs에서 TNF α 유도된 IL-6 분비를 저해하는 것으로 관찰되었다 (도면 3).

[0102] MK2i-폴리플렉스로 처리된 HSV 체외이식편에서 평활근 생리학은 또한, MK2i 단독에 노출된 HSV 체외이식편보다 훨씬 많은 이완을 보여준다. 게다가, 일정한 폴리플렉스는 10배 낮은 분량에서 MK2i 단독과 동일한 수준의 이완 증강을 달성하였다. 가령, 도면 4에 나타나 있는 바와 같이, 약 10 μ M의 MK2i 및 100 μ M 분량의 비-폴리플렉스화된 MK2i를 포함하는 폴리플렉스 둘 모두 약 15%-20% 이완을 보여주었다.

[0103] 도면 5는 MK2i 폴리플렉스가 MK2i 단독과 비교하여 내막 과형성을 예방하는 증강된 능력을 어떻게 나타내는 지를 보여주고, 줄어든 내막 두께를 보여준다. 14 일의 장기 배양 후, MK2i 폴리플렉스로 처리된 HSV 섹션은 63.8 ± 8 nm의 내막 두께를 갖고, 반면 비-폴리플렉스화된 MK2i로 처리된 HSV 섹션은 10 μ M에서 89.5 ± 13.9 nm의 내막 두께를 가졌다 ($p = 0.05$). MK2i 폴리플렉스 처리된 HSV에 대한 내막/내측 비율은 0.459 ± 0.058 이고, 반면 MK2i 단독으로 처리된 HSV 섹션은 14 일의 장기 배양 후, 10 μ M에서 0.736 ± 0.132 의 내막/내측 비율을 가졌다 ($p = 0.03$).

[0104] 실시예 2: MK2i-NPs의 합성과 물리화학적 특성화

[0105] MK2i 펩티드 (YARAAARQARAKALARQLGVAA)는 고체상 합성을 통해 합성되었고, 그리고 순도가 전기분무-이온화 질량 분광분석법을 통해 실증된다 (도면 6). 가역성 부가 단편화 사슬 전달 (RAFT) 중합화가 폴리(아크릴산) (PAA) [$M_n = 10,830$ (GPC), $M_n = 7,640$ (1H NMR), PDI = 1.27 (GPC) (도면 7과 도면 8)] 및 폴리(프로필아크릴산) (PPAA) [$M_n = 22,010$ (GPC), $M_n = 21,950$ (1H NMR), PDI = 1.47 (GPC) (도면 9와 도면 10)]를 합성하는데 활용되었다. 나노폴리플렉스 (NPs)는 pH 8.0에서 PBS에서 MK2i 펩티드와 PAA 또는 PPAA 동중중합체의 단순한 혼합에 의해 형성되었는데, 상기 pH는 MK2i 펩티드 상에 존재하는 일차 아민 및 PPAA 중합체에서 카르복실산 모이어티의 pKa 값 사이이었다. PAA는 벡터 대조로서 활용되는데, 그 이유는 이것이 PPAA에 구조적 유사성을 갖는 음이온성 중합체이긴 하지만, 더욱 낮은 pKa (pKa~4.3)로 인해 생리학적으로 관련한 범위에서 pH-반응도를 결여하기 때문이다.

[0106] 최적 폴리플렉스 조제 조건을 결정하기 위해, MK2i-NPs의 라이브러리가 다양한 전하 비율 [즉, CR = ($[NH_3^+]_{MK2i} : [COO^-]_{PPAA}$)]에서 제조되고, 그리고 크기 분포와 입자 표면 전하가 각각, 동적 광 산란 (DLS) 및 ζ -전위 분석을 통해 특징화되었다. MK2i-NP ζ -전위는 CR ~ 2:1에서 겔보기 등전점으로, CR에 직접적으로 비례하였다 (도면 13). CR은 또한, MK2i-NP 크기에 유의미하게 영향을 주었는데, 단지 좁은 범위의 CR만 단일모드 크기 분포를 산출하였다 (즉, CR = 1:2 및 1:3, 표 1).

[0107] 표 1. DLS 분석에 의해 결정될 때 상이한 전하 비율 ($[NH_3^+] / [COO^-]$)에서 제조된 MK2i-NPs의 크기 요약. 별표 (*)는 다중모드 크기 분포 (복수 피크 존재)를 지시한다. 1:3 (Alexa) 폴리플렉스는 세포 흡수 연구에서 이용을 위해 Alexa488-접합된 MK2i 펩티드로 조제되었다. 1:3 (NE) 폴리플렉스는 운반체 대조로서, 엔도솜 pH 범위에서 pH-의존성 막 교란 활성을 전시하지 않는 비-엔도소몰리틱 (NE) 폴리(아크릴산) 중합체로 조제되었다.

NH2:COOH	Z-평균 직경 (nm)	PDI
10:1	$10.32 \pm 2.63^*$	0.314
2:1	$52.1 \pm 46.86^*$	0.297
1:1	970.6 ± 662.4	0.41
1:1.5	$465.1 \pm 138.4^*$	0.5465
1:2	474.2 ± 32.59	0.239
1:3	118.8 ± 26.76	0.271
1:4	$607.4 \pm 285.2^*$	0.662
1:5	$213.0 \pm 67.95^*$	0.407
1:10	$21.57 \pm 9.89^*$	0.355
1:3 (FAM)	158 ± 56.67	0.308
1:3 (AA)	113.7 ± 14.47	0.577
1:3 (AA-FAM)	236.5 ± 69.74	0.522

[0108] 1:3의 CR이 본 실시예에서 선택되었는데, 그 이유는 이러한 비율이 최소 입자 크기 및 다분산성을 갖는 단일모드 크기 분포를 일관되게 산출하였기 때문이다 ($d_h = 119 \pm 28$ nm, $\zeta = -11.9 \pm 3.2$ mV). 비-엔도소몰리틱 MK2i 나노폴리플렉스 (NE-MK2i-NPs)가 생물학적 연구를 위한 운반체 대조로서 PAA로 조제되었다. PAA로 CR=1:3

에서 제조된 NE-MK2i-NPs는 엔도소몰리틱 MK2i-NPs에 통계학적으로 동등한 크기와 ζ -전위를 가졌다 ($d_h=114 \pm 38$ nm, $\zeta = -16.4 \pm 5.1$ mV). 형광 MK2i-NPs와 NE-MK2i-NPs는 세포내 추적할 수 있게 하기 위해 1:3의 CR에서 Alexa®-488 접합된 MK2i 펩티드로 제조되고 표지되지 않은 NPs와 유사한 크기와 전하를 산출하였다. CR = 1:3에서 제조된 NPs는 TEM 영상을 통해 더욱 특징화되었는데 (도면 14, 도면 15, 도면 16), 이것은 DLS 결과와 일치하였다.

[0110] 엔도리소좀 조건 하에 MK2i-NP 포장해체는 다양한 pH에서 DLS를 이용하여 사정되었고, 그리고 MK2i-NPs가 pH가 PPAA 상에서 카르복실산의 pKa (pH-6.7)를 향하여 세포의 pH로부터 낮아짐에 따라서 해리한다는 것을 드러내는데, 이것은 또한, 초기 엔도솜 조건에 상관한다 (도면 17). 이론에 한정됨 없이, 더욱 낮은 pH에서 PPAA 중합체는 양성화/탈이온화되고, 그리고 펩티드에서 순 양성 전하는 MK2i-NPs의 정전 반발과 분해를 유발한다. 초기 엔도솜-유사 조건 하에 NP 분해는 펩티드 생물활성 및/또는 PPAA 엔도솜 막 교란 기능이 중합체-펩티드 상호작용에 의해 입체적으로 방해되는 가능성을 감소시킨다.

[0111] **실시예 3: MK2i-NP 세포 내재화, 엔도솜 탈출, 그리고 세포내 체류**

[0112] 시간의 흐름에서 MK2i-NP 흡수와 세포내 체류의 양이 2 시간 동안 처리되고, 세척되고, 그리고 새로운 배지에서 5 일 동안 유지된 HCAVSMCs의 유세포분석을 통해 사정되었다. NE-MK2i-NPs와 MK2i와 비교하여 MK2i-NP 처리된 세포에서 펩티드 흡수에서 1 크기 자릿수 이상 증가가 예측된다. (도면 18) NE-MK2i-NPs 흡수가 유리 펩티드에 동등하였기 때문에, 이들 데이터는 세포 내재화에서 차이가 NP 구성에 기인하고 입자 형태와 전하와는 관계없다는 것을 지시한다. 부가적으로, MK2i-NPs로 처리된 HCAVSMCs는 펩티드의 더욱 안정된 세포내 체류를 증명하고, 반면 NE-MK2i-NP와 MK2i 처리된 세포는 아마도, 세포의 세포외배출을 위한 엔도리소좀 경로 또는 트래피킹에서 펩티드 분해로 인해 세포내 펩티드를 더욱 급속히 상실하였다 (도면 19). MK2i-NPs는 처리/세척 이후에 첫 72 시간의 배양에 걸쳐 형광에서 증가를 보여주었다. 이러한 효과는 세포의 외막에 결합된 MK2i-NPs의 지체된 내재화에 기인하지 않는다. 형광에서 이러한 증가는 NPs로부터 MK2i의 점진적인 세포내 포장해체 동안 축소되는 Alexa®-488 자가-퀀칭 기전에 기인하는 것으로 가정된다.

[0113] 적혈구 용혈 검정은 엔도솜 탈출 기능의 지표로서 MK2i-NPs의 pH-의존성 막 교란 활성을 사정하는데 활용되었다. PPAA는 자신의 pKa (~6.7)에서 또는 그 미만에서 pH에서 적혈구 막을 교란하였다 (도면 20). 세포 외 (7.4)와 초기 엔도솜 (6.8) pH에서, MK2i-NPs는 막 교란 활성을 거의 보여주지 않았다. 하지만, 후기 엔도솜 (6.2)과 리소솜 (5.6)의 대표적인 pH에서, 용혈에서 유의미한 증가가 관찰되었다. 후기 엔도솜 / 리소솜 pH에서 MK2i-NPs의 용혈 행태는 중합체 농도에 직접적으로 비례하였는데 (도면 21), >90% 적혈구 용해가 pH 5.6에서 40 μ g/mL MK2i-NPs에서 발생하였다. MK2i-NPs는 비록 NPs로의 조제가 pH 6.8에서 유리 PPAA에 비하여 막 교란 활성을 약간 가리긴 했지만, PPAA 중합체의 내재하는 막 교란 활성을 유지한다. MK2i 펩티드 단독과 비-엔도소몰리틱 NE-MK2i-NP 제제 중에서 어느 것도 엔도리소솜 pH 범위에서 막 교란 활성을 전시하지 않았다.

[0114] MK2i-NP의 엔도솜 탈출은 인간 광상 동맥 혈관 평활근 세포 (HCAVSMCs)에서 영상화되고 시험관내에서 정량되었다 (도면 22). 거의 모든 (~90%) MK2i는 유리 펩티드로서 또는 LysoTracker® 염색제와 동시국지화된 NE-MK2i-NPs를 통해 전달되었다. 하지만, MK2i-NP 제제는 MK2i 엔도리소솜 동시국지화를 유의미하게 감소시켰다. 2-시간 처리와 세척 이후에 MK2i/LysoTracker® 동시국지화의 종적 정량은 모든 시점에서 MK2i-NP 제제에 대한 유의미하게 감소된 MK2i/LysoTracker® 동시국지화를 드러냈고, 그리고 LysoTracker®와 NP 제제를 통해 전달된 MK2i의 동시국지화는 시간의 흐름에서 줄어들었다 (도면 23). 구획 크기의 정량은 NE-MK2i-NP 또는 MK2i 처리된 세포는 엔도솜을 나타내는 더욱 작은 소포 내에서 MK2i 국지화를 보여주고, 반면 MK2i-NPs를 통해 전달된 MK2i는 누출성, 종창성의 엔도솜 마크로피노솜, 또는 세포질 영역을 나타낼 수 있는 더욱 큰 구획 내에서 발견된다는 것을 드러냈다 (도면 24).

[0115] **실시예 4: 인간 복재 정맥에서 내막 과형성의 저해**

[0116] 정맥 IH의 탈체 장기 배양 모델에서, 인간 복재 정맥 (HSV) 고리는 2 시간 동안 처리되고, 그리고 차후에, 신생 내막 형성을 가속화하기 위해 높은 혈청 조건에서 유지되었다. Alexa®-568 접합된 MK2i 펩티드가 맥관 벽에 MK2i 전달을 사정하는데 이용되었고, 그리고, 시험관내 결과와 유사하게, MK2i-NPs는 유리 MK2i에 비하여 증강된 흡수를 일관되게 나타냈다 (도면 25). 배양액에서 14 일 후, 탄력성 판의 Verhoeff-Van Gieson (VVG) 염색이 조직 섹션에서 수행되었다 (도면 26). 복수 공여자로부터 내막 두께의 정량은 MK2i-NPs가 용량 의존성 방식에서 및 유리 MK2i보다 1 크기 자릿수 낮은 펩티드 분량에서 IH를 유의미하게 저해한다는 것을 드러냈다 (도면 27, 도면 28에서 완전한 데이터 세트). 100 μ M MK2i에서 MK2i-NP 요법은 IH를 완전히 제거하고, 수확 직후에 조직학을 위해 준비된 대조 조직에 통계학적으로 동등한 내막 두께를 산출하는 유일한 처리이었다 ($p=0.49$).

MTT 검정이 처리후 1과 14 일에 수행되었고, 그리고 장기 배양 결과가 조직 세포독성에 의해 영향을 받지 않았다는 것을 실증한다 (도면 29).

[0117] **실시예 5: MK2i-NP 생물활성의 기계적인 석명**

[0118] MK2의 염증성 작용은 하류 작동체, 다시 말하면, 전사후 유전자 조절인자 트리스테트라프롤린 (TTP) 및 비균질성 핵 리보핵산단백질 A0 (hnRNPA0)을 통해 행동하는데, 이것은 염증성 사이토킨 mRNA를 안정시키고 이들의 발현을 증강한다. MK2i-NPs가 이러한 기전을 차단함으로써 행동한다는 것을 확증하기 위해, HnRNP A0의 인산화가 사정되었다. 웨스턴 블롯은 MK2i-NPs가 HSV에서 HnRNP A0 인산화를 유의미하게 저해한다는 것을 확증하였다 (도면 30, 도면 31). 안지오텐신-II 자극된 HCAVSMCs에서 사이토킨 생산의 시험관내 ELISA 분석은 이러한 기전을 확증하였고, 그리고 MK2i-NPs는 일차성 hnRNPA0 표적 TNF α 의 분비를 효율적으로 저해하였다 (도면 32, 도면 33). MK2i-NPs는 1 크기 자릿수 낮은 분량에서 NE-MK2i-NP와 MK2i에 동등한 TNF α 저해를 달성하였고 (즉, 10 μ M MK2i가 100 μ M MK2i에 동등한 효과를 생산하였다), 그리고 100 μ M MK2i-NPs는 안지오텐신 II-자극된 TNF α 생산을 완전히 제거한다. TNF α -자극된 HCAVSMCs에서 인터류킨-6 생산의 저해는 또한, 유리 펩티드 단독과 비교하여 MK2i-NPs에 대한 생물활성에서 유의미한 증가를 보여주었다 (도면 34). 이들 처리 중에서 어느 것도 유의미한 독성을 유발하지 않았다 (도면 35, 도면 36).

[0119] MK2 활성은 또한, Lim 키나아제 (LIM-K)와 열 쇼크 단백질 27 (HSP-27)의 하류 인산화를 통해 스트레스 섬유 형성 및 세포 이주를 촉발하였다. 스트레스 섬유 형성은 안지오텐신-II 자극된 HCAVSMCs에서 MK2i-NPs에 의해 유의미하게 저해되고, NE-MK2i-NPs와 MK2i와 비교하여 유의미하게 증강된 생물활성을 증명하였다 (도면 37). MK2i-NP 처리된 세포는 자극되지 않은 대조 세포와 유사한 피질성 액틴 염색을 전시하고, 반면 NE-MK2i-NPs와 MK2i 처리는 스트레스 섬유 형성을 완전히 차단하지 못하였다 (도면 38). MK2i-NPs가 IH의 특징적인 병리학적 VSMC 이주를 예방한다는 것을 실증하기 위해, 스크래치 상처와 보이텐 챔버 이주 검정 둘 모두 PDGF-BB의 존재에서 HCAVSMCs에서 수행되었다 (도면 39, 도면 40, 도면 41). 양쪽 검정에서, MK2i-NPs는 유리 MK2i 펩티드보다 1 크기 자릿수 낮은 분량에서 세포 이주를 저해하였다. 증식 검정은 이들 결과가 세포 증식에 대한 치료 효과에 기인하지 않았다는 것을 확증하였다 (도면 42).

[0120] **실시예 6: 토끼 정맥 이식편 개재 모델에서 생체내 생물활성**

[0121] 생체내에서 MK2i-NPs의 치료적 이익은 격동 혈류를 유도하고 이식편 IH를 가속화하기 위해 중합성 커프 방법을 이용하는 토끼 양측성 경정맥 이식편 개재성 이식조직 모델에서 사정되었다. 이러한 모델에서, 경정맥 이식편은 탈체 30 분 동안 처리되었는데, 이것은 이식편이 전형적인 혈관재생 절차 동안 외식되는 최소 시간을 나타낸다. 각 토끼에 대해, 1개의 이식편이 처리되었고, 그리고 대측의 이식편은 운반체 대조를 투여 받았다. 이식편은 수술후 28 일에 수확되었고, 그리고 VVG 염색된 조직학적 섹션이 내막 두께 정량에 이용되었다 (도면 43). 30 μ M MK2i-NPs로 처리는 단독으로 신생내막 형성에서 임의의 유의미한 변화를 생산하지 못한 처리되지 않은 대조 및 유리 MK2i 펩티드 둘 모두와 비교하여 신생내막 성장을 유의미하게 저해하였다 (도면 44).

[0122] 이식된 정맥 이식편에서 MK2i-NPs의 항염증성 효과를 확증하기 위해, 조직 섹션은 토끼 대식세포 특이적 항체, RAM-11로 염색되었다 (도면 45, 도면 46). MK2는 염증성 사이토킨, 예를 들면, TNF α 의 생산을 상향조절하는 전사후 유전자 조절인자 hnRNP A0을 활성화시켰고, 그리고 TNF α 생산은 정맥 이식편 내에 존재하는 평활근 세포, 내피 세포, 섬유모세포, 그리고 백혈구에서 단백질 화학유인물질 단백질-1 (MCP-1)의 발현을 유도한다. MCP-1은 순환하는 염증 세포에 대한 강력한 화학유인물질이고, 그리고 MCP-1 mRNA 수준은 정맥 이식편에서 심지어 합체 후 8 주에서 상승되고, 단백질과 조직 대식세포의 정맥 벽으로의 모집을 유발하고 IH의 병인을 야기하는 것으로 나타났다. 이를 위해, 이식후 4 주에 수행된 대식세포 분석은 MK2i-NP 처리된 이식편에서 내막성 대식세포의 존속에서 유의미한 감소를 증명하고, MCP-1을 통한 TNF α -유도된 대식세포 모집의 치료적 저해를 암시한다 (도면 47).

[0123] **논의**

[0124] MK2i 펩티드의 세포 흡수와 생물활성은 치료적 펩티드의 선천적 구조를 변경하지 않으면서 1 크기 자릿수 증강되었고, 표적 결합과 생물활성에 대한 잠재적으로 유해한 효과를 회피하였다. 이들 결과는 또한, p38 MAPK / MK2 경로가 IH와 이식편 실패를 야기하는 활성화된, 병리학적 표현형으로 VSMCs의 전이에서 수행하는 역할을 강조한다.

[0125] 게다가, CPP가 세포 흡수를 증가시키기 위해 치료적 펩티드에 접합될 수 있지만, CPP 정체가 표적 특이성에 유의미하게 영향을 주는 것으로 나타났고, 그리고 대부분의 CPP는 엔도리소좀 트래피킹 경로를 탈출할 수 없다.

핵산의 전달을 위해 양성으로 하전된 CPP 서열 또는 중합성 형질감염 작용제를 이용하여 패리다임에 반하여, 양성으로 하전된, CPP-기초된 MK2i 펩티드의 순 음성으로 하전된 폴리플렉스 제제로의 조제는 VSMCs에서 흡수를 유의미하게 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0126] VSMCs는 음성으로 하전된 입자 (가령, LDL)를 흡수하는 다양한 스캐빈저 수용체를 발현하고, 그리고 혈관 스트레스는 이들 수용체의 발현을 상향조절한다. 시험관내 결과는 높은 수준의 MK2i 세포 내재화 및 MK2i-NPs로 달성된 엔도리소좀 트래피킹 경로로부터 탈출이 폴리플렉스 형태와 전하에 의해 전적으로 지배되기 보다는 PPAA의 특정한 조성에 의존하였다는 것을 암시한다. 이것은 MK2i-NPs와 유사한 크기와 전하의 NE-MK2i-NPs가 MK2i 펩티드의 세포 흡수를 증가시키는 것으로 발견되지 않았다는 관찰로부터 추론될 수 있다.

[0127] 이론에 의해 한정됨 없이, MK2i-NPs의 가속된 세포 내재화는 세포 표면 상호작용 및/또는 흡수 기전에서 변화에 기인할 수 있다. 이론에 의해 한정됨 없이, MK2i-NPs가 복수 세포내섭취 루트를 통해 평활근 세포에 들어가고, 그리고 대음세포작용이 MK2i-NPs의 내재화에서 작동할 수 있지만 NE-MK2i-NPs 또는 MK2i에서는 그렇지 않은 것으로 제안된다. 본원에서, PPAA-기초된 폴리플렉스는 대음세포작용과 엔도솜 누출의 조합을 촉발하고, 증강된 세포질 접근을 야기하는 것으로 보고된 아데노바이러스 내재화 기전을 생체모방할 수 있는 것으로 제안된다.

[0128] 마크로피노솜은 산성화된 구획으로 수송되고, 그리고 다른 단부 소포보다 누출성일 수 있다. 이러한 내재화 루트는 PPAA의 pH-의존성 막 교란 활성화와 합동으로, MK2i-NPs를 통해 전달될 때 MK2i 세포내 반감기의 유의미한 증가를 설명할 수 있다.

[0129] MK2i의 세포내 반감기 ($T_{1/2}$)는 MK2i-NPs 내로 함입에 의해 14-배 증가되었다 (MK2i-NP $T_{1/2}$ = 57.8 일 대 MK2i $T_{1/2}$ = 4.1 일; 처리 이후에 0과 5 일에 세포내 펩티드 형광에 기초하여 계산됨). $T_{1/2}$ 에서 이러한 증가는 정맥 합체 적용 또는 기타 유사한 것에 적용가능한데, 그 이유는 이것이 잠재적으로, 급성 염증 시기와 치유 시기 둘 모두의 완전한 지속 기간 내내 연장된 치료 효과를 가질, 합체의 시점에서 단일 치료의 적용을 할 수 있게 하기 때문이다.

[0130] MK2i-NPs가 대략 8 주의 추정된 세포내 반감기를 산출했기 때문에, 이식에 앞서 단일 처리는 정맥 이식편 적용의 지속 기간 동안 IH를 저해하는데 충분하고, 유의미하게 향상된 장기간 성과를 산출할 수 있다. 탈체에서, 이식편의 수술중 처리는 표적 조직에 전달을 증강하고 부정확한 효과 또는 전신 독성에 대한 잠재력을 방지하는데 유용한 치료적 전략이다.

[0131] 본 발명의 요부는 PPAA를 이용한 폴리플렉스 제제가 MK2i 펩티드의 세포내 전달과 생물활성을 유의미하게 증강시키고, 그리고 이러한 시스템이 IH를 저해하기 위해 혈관 이식편 이식 동안 적용된 예방적 요법으로서 유의미한 임상적 잠재력을 갖는다는 것을 확립한다.

[0132] **재료와 방법**

[0133] **세포 침투물 MK2 저해성 펩티드의 합성**

[0134] 서열 YARAAARQARA-KALARQLGVAA를 갖는 MK2 저해성 펩티드 (MK2i)는 표준 Fmoc 화학을 활용하여 PS3 펩티드 합성장치 (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ)에서 합성되었다. N-메틸피롤리돈 (NMP, Fischer Scientific)이 펩티드 합성에서 용매로서 활용되었다. HCTU가 N-메틸모르폴린의 존재에서 활성화제 (Chempep, Wellington, FL)로서 이용되었다. 모든 아미노산은 수율과 순도를 최대화하기 위해 이중 연계되었다. 펩티드는 TFA/페놀/ H_2O /트라이소프로필실란 (88/5/5/2)에서 개열되거나/탈보호되었다. 펩티드는 이후, 연장된 흐름 키트, Waters 2489 UV/가시광선 검출기, 그리고 phenomenex Luna C18(2) AXIA 충전된 칼럼 (100Å, 250 x 21.2 mm, 5 마이크론)으로 장비된 Waters 1525 이진 HPLC 펌프에서 역상 HPLC에 의해 더욱 정제되었다. 0.05% 포름산을 포함하는 HPLC 등급 물 및 HPLC 등급 아세트ونی트릴이 이동상으로서 이용되었고, 그리고 펩티드가 25 분에 걸쳐 90% A 내지 90% B 구배를 활용하여 정제되었다 (16 mL/분). 아세트ونی트릴은 정제된 분획물로부터 회전성 증발기로 제거되고, 그리고 정제된 분획물은 이후 동결건조되었다. 펩티드 순도는 Waters Synapt ESI-MS에서 전기분무 이온화 질량 분광분석법 (ESI-MS)을 통해 실증되었다.

[0135] **단위체와 중합체 합성**

[0136] 모든 시약은 Sigma로부터 구입되고, 그리고 달리 명시되지 않으면 분석적 등급이었다. 2-프로필아크릴산은 디에틸 프로필알로네이트 (Alfa Aesar)를 전구체로서 활용하여, Ferrito 등에 의해 개설된 절차에 따라 합성되었다. 4-시아노-4- (에틸술파닐티오)카르보닐) 술파닐펜탄산 (ECT) 사슬 전달 작용제 (CTA)는 앞서 설명된 바와 같이

합성되었다. PPAA 동중중합체의 RAFT 중합화는 2,2'-아조-비스- 이소부티릴니트릴 (AIBN)을 유리 라디칼 개시자로서 이용하여, 70 °C에서 48 시간 동안 질소 대기 하에 대량으로 수행되었다.

[0137]

반응 혼합물은 3회 동결-진공-해동 주기를 겪고 중합화에 앞서 30 분 동안 질소로 일소되었다. CTA 대 AIBN의 몰 비율은 1 대 1이고, 그리고 단위체 대 CTA 비율은 25,000 g/mol의 분자량이 100% 전환에서 달성되도록 설정되었다. 중합화 이후에, 결과의 중합체는 DMF에서 용해되고 진공에서 하룻밤 동안 건조에 앞서 에테르 내로 5 회 침전되었다. PAA 동중중합체의 RAFT 중합화는 AIBN을 유리 라디칼 개시자로서 이용하여 70 °C에서 18 시간 동안 질소 대기 하에 증류된 디옥산에서 수행되었다. 반응 혼합물은 중합화에 앞서 30 분 동안 질소로 일소되었다. CTA 대 AIBN의 몰 비율은 5 대 1이고, 그리고 단위체 대 CTA 비율은 8,000 g/mol의 분자량이 100% 전환에서 달성되도록 설정되었다. 중합화 이후에, 결과의 중합체는 디옥산에서 용해되고 진공에서 하룻밤 동안 건조에 앞서 에테르 내로 5 회 침전되었다. 겔 투과 크로마토그래피 (GPC, Agilent)는 60 °C에서 0.1% LiBr를 이동상으로서 내포하는 HPLC-등급 DMF를 이용하여 PPAA와 PAA 동중중합체의 분자량과 다분산성 (M_w/M_n , PDI)을 결정하는데 이용되었다. 분자량 계산은 ASTRA V 소프트웨어 (Wyatt Technology)로 수행되고, 그리고 굴절률 검출기를 통해 중합체의 오프라인 주사를 통해 결정된 실험적으로-결정된 dn/dc 값에 기초되었다 (계산된 PPAA dn/dc = 0.087 mL/g, 계산된 PAA dn/dc = 0.09 mL/g).

[0138]

MK2i 나노폴리플렉스 (MK2i-NP) 합성과 특성화

[0139]

PPAA는 1 M NaOH에서 용해되고 인산염 완충액 (pH 8) 내로 희석되어 원액이 획득되었다. 정제된 MK2i 펩티드는 인산염 완충액 (pH 8)에서 용해되었다. MK2i 펩티드와 PPAA 중합체는 $[NH_3^+]:[COO^-] = 10:1$ 내지 1:10로부터 다양한 CR에서 혼합되어 MK2i-NPs를 형성하였다. 결과의 폴리플렉스는 0.45 μ m PTFE 필터를 통해 주사가 여과되었고, 그리고 수력학적 직경과 ζ -전위는 재활용가능 덩 (dip) 세포 키트 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U.K.)로 Malvern Zetasizer Nano-ZS에서 특징화되었다.

[0140]

1:3의 CR이 이후 선택되고 차후 시험관내, 탈체, 그리고 생체내 연구에서 이용되었다. 비-엔도소몰리틱 중합체 PAA로 동일한 CR에서 조제된 나노폴리플렉스 (즉, NE-MK2i-NPs)는 DLS에 의해 분석되고 운반체 대조로서 이용되었다. DLS 분석에 의해 지시된 크기를 실증하기 위해, 1:3의 전하 비율에서 MK2i-NPs와 NE-MK2i-NPs가 전하 전자 현미경검사 (TEM) 영상을 통해 가시화되었다. TEM 표본은 탄소 필름-지지된 구리 격자 (Ted Pella)를 수성 폴리플렉스 현탁액의 20 μ L 비말 (1 mg/mL) 위에 반전시킴으로써 제조되고 건조 블롯팅되었다. 모든 표본은 이후, 3% 우라닐 아세트산염의 20 μ L 비말 위에 반전되고 2 분 동안 염색되었다. 표본을 건조 블로팅한 후에, 표본은 200 kV에서 작동하는 Philips CM20 시스템에서 영상화에 앞서 2 시간 동안 진공에서 건조되었다. 이미지는 AMT 이미지 포착 엔진 소프트웨어가 설치된 CCD 카메라 (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA)를 이용하여 수집되었다. 1:3의 CR에서 폴리플렉스의 pH-의존성 크기 변화는 이후, PBS +/-에서 다양한 pH 값 (즉, pH 7.4, 6.8, 6.2, 그리고 5.6)에서 DLS 분석에 의해 정량되었다.

[0141]

pH-의존성 막 교란 용혈 검정

[0142]

MK2i-NPs의 엔도솜 교란 잠재력을 사정하기 위해, 적혈구 용혈 검정이 지질 이중층의 MK2i-NP pH-의존성 교란을 계측하는데 활용되었다. 전체 인간 혈액이 익명 공여자로부터 뽑혀졌고, 그리고 혈장이 원심분리 및 식염수 세척을 통해 제거되었다. 나머지 적혈구는 150 mM NaCl로 3회 세척되고, 그리고 생리학적 (pH 7.4), 초기 엔도솜 (pH 6.8), 초기/후기 엔도솜 (pH 6.2) 및 후기 엔도솜/리소솜 (pH 5.8) 환경에 상응하는 인산염 완충액 내로 재현탁되었다. MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, MK2i 펩티드 단독 (1-40 μ g/mL), PBS (음성 대조), 또는 1% Triton X-100 (양성 대조)이 적혈구 현탁액에 첨가되고 37 °C에서 1 시간 동안 배양되었다. 무손상 적혈구는 원심분리를 통해 펠렛화되었고, 그리고 상층액이 새로운 96-웰 평판으로 이전되었다. 상층액 내에 헤모글로빈 함량은 이후, 541 nm에서 흡광도에 의해 계측되었다. 퍼센트 용혈은 Triton X-100 및 PBS 대조에 비하여 결정되었다.

[0143]

세포 배양

[0144]

일차성 HCAVSMCs는 Lonza로부터 획득되었다; HCAVSMCs는 5% FBS, 인간 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF, 5 ng/mL), 인간 인슐린 (5 μ g/mL), 아스코르빈산 (50 μ g/mL), L-글루타민 (10 mM), 인간 표피 성장 인자 (EGF, 5 ng/mL), 그리고 1% 페니실린-스트렙토마이신]으로 보충된 완전한 성장 배지 혈관 세포 기초 배지 (ATCC)에서 배양되었다.

[0145]

모든 배양액은 37 °C와 5% CO₂ 환경에서 75cm² 폴리스티렌 조직 배양 플라스크에서 유지되고 세포 배양 배지가

격일로 다시 채워졌다. 세포는 수확되고 계대되기에 앞서 80-90% 합류점까지 성장되었다. 모든 세포는 각 특정한 실험을 위해 필요하면, 20,000-30,000 세포/cm²의 밀도에서 파종되었다. 단지 초기 계대 (번호 3-8)로부터 세포만 실험에 이용되었다.

[0146]

염증성 사이토킨 분석

[0147]

200 μ L의 세포 현탁액 (10,000 세포/웰에서)이 웰마다 근사 70% 합류점을 산출하기 위해 96-웰 평판 위에 파종되었다. 세포는 하룻밤 동안 평판에 부착되도록 허용되었다.

[0148]

종양 괴사 인자- α ELISA

[0149]

세포는 낮은 혈청 배지 (DMEM, 1% FBS, 그리고 1% P/S, 달성하다 세포 무활동을 달성하기 위해)에서 10 μ M ANG-II로 4 시간 동안 처리되고, 그 이후에 MK2i-NPs, MK2i, 또는 NE-MK2i-NPs로 2 시간 동안 처리되었다. 처리 이후에, 각 웰은 흡인되고 새로운 배지로 보충되었다. 24 시간 후, 100 μ L의 상층액이 수집되고, 그리고 사이토킨 분석이 수행될 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 동결되었다. 인간 TNF- α (cat#900-K25) ELISA 발달 키트 (Peprotech; Rocky Hill, NJ)가 제조업체의 프로토콜에 따라, 처리된 세포로부터 수집된 상층액에서 사이토킨 수준을 측정하는데 이용되었다. 모든 데이터는 이후, 제조업체의 프로토콜에 따라 CytoTox-ONE 균질한 막 완전성 검정 (Promega)에 의해 결정된 세포 생존력에 정규화되었다.

[0150]

인터류킨-6 ELISA

[0151]

세포는 낮은 혈청 배지에서 20 ng/mL TNF- α 로 4 시간 동안 처리되고, 그 이후에 MK2i-NPs, MK2i, 또는 NE-MK2i-NPs로 2 시간 동안 처리되었다. 처리 이후에, 각 웰은 흡인되고 새로운 배지로 보충되었다. 24 시간 후, 100 μ L의 상층액이 수집되고, 그리고 사이토킨 분석이 수행될 수 있을 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 동결되었다. 인간 TNF- α (cat#900-K16) ELISA 발달 키트 (Peprotech; Rocky Hill, NJ)가 제조업체의 프로토콜에 따라, 처리된 세포로부터 수집된 상층액에서 사이토킨 수준을 측정하는데 이용되었다. 모든 데이터는 이후, 제조업체의 프로토콜에 따라 CytoTox-ONE 균질한 막 완전성 검정 (Promega)에 의해 결정된 세포 생존력에 정규화되었다.

[0152]

F-액틴 스트레스 섬유 검정

[0153]

HCAVSMCs는 Lab-Tek II 8-웰 챔버 덮개유리 (Thermo Scientific Nunc)에서 15,000 세포/웰에서 파종되고 하룻밤 동안 부착되도록 허용되었다. 세포는 이후, 낮은 혈청 배지에서 10, 25, 그리고 50 μ M의 농도에서 MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, 또는 MK2i 펩티드 단독으로 1 시간 동안 처리되었다. 처리 이후에, 세포는 PBS -/-로 2x 세척되고, 그리고 차후에, 1 μ M 안지오텐신 II (Sigma Aldrich) 또는 PBS -/- (음성 대조)로 2 시간 동안 처리되었다. ANG-II 자극 후, 세포는 PBS로 2x 세척되고, 4% 파라포름알데히드에서 5 분 동안 고정되고, 0.4% Triton-X 100으로 10 분 동안 투과화되고, 그리고 PBS -/-에서 1% BSA로 15 분 동안 차단되었다. 세포는 이후, Hoechst 용액 (PBS -/-에서 1/5000 희석)으로 10 분 동안 염색되고, 그 이후에 Alexa-488-팔로이딘으로 30 분 동안 염색되었다. 염색된 커버슬립은 이후, ProLong Gold 안티페이드 봉입제 (Invitrogen)로 유리 덮개 슬라이드 위에 반전되었다. 슬라이드는 밀봉과 영상에 앞서 24 시간 동안 건조되었다. 처리된 세포는 NIS Elements 영상 소프트웨어가 설치된 Nikon Eclipse Ti 도립 형광 현미경을 이용하여 영상화되었다. 획득 세팅과 노출 시간은 촬영된 모든 이미지에 대해 일정하게 유지되었다. 스트레스 섬유 형성은 개별 세포를 자유재량으로 선별하고, 그리고 각 처리군에 대한 2가지 독립된 실험으로부터 $n \geq 5$ 세포의 상대적 형광 강도를 계산하기 위해 imageJ 소프트웨어를 이용하여 정량되었다.

[0154]

화학주성 이주 검정: 스크래치 상처 검정

[0155]

HCAVSMCs는 250 μ L 낮은 혈청 성장 배지에서 20,000 세포/웰의 밀도에서 Lab-TEK II 8-웰 챔버 덮개유리에 파종되고, 그리고 거의 합류성 (90-95%) 단층을 달성하기 위해 하룻밤 동안 부착되도록 허용되었다. 세포는 MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, MK2i 펩티드 또는 PBS -/-로 30 분 동안 처리되었다. 처리 이후에, 스크래치 상처가 각 세포 단층의 중앙을 통하여 10 μ L 피펫 침부로 만들어졌다. 배지는 이후, 이주성 세포의 가시화를 위해 세포질을 염색하기 위해, 제조업체의 프로토콜에 따라 30 분 동안 CellTrackerTM Green BODIPY[®] 염색제 (Invitrogen)를 내포하는 낮은 혈청 성장 배지로 대체되었다. 상기 염색제로 처리 이후에, 배지는 50 ng/ml PDGF-BB를 내포하는 낮은 혈청 성장 배지 (또는 음성 대조의 경우에 PBS -/-)로 대체되었다. 스크래치 상처 구역은 이후, NIS Elements 영상 소프트웨어가 설치된 Nikon Eclipse Ti 도립 형광 현미경 (Nikon Instruments Inc, Melville, NY)을 이용하여 0, 3, 6, 12와 24 시간에 영상화되었다. 상처 봉합은 본래 스크래치 상처 구역에 정규화된 이주성 세포의 주변에서 스크래치 상처 구역을 정량함으로써, imageJ 소프트웨어로 계산되었다. 각 처리군에 대한

스크래치 상처 검정이 3가지 독립된 실험에서 수행되었다.

[0156] **화학주성 이주 검정: 보이덴 챔버 검정**

[0157] HCAVSMCs는 24 웰 평판에서 낮은 혈청 배지에서 30,000 세포/웰의 밀도에서 파종되고 하룻밤 동안 부착되도록 허용되었다. 세포는 MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, MK2i 펩티드 또는 PBS -/-로 30 분 동안 처리되었다. 처리 이후에, 각 웰은 PBS -/-로 2x 세척되고, 트립신처리되고, 100 μ l 낮은 혈청 성장 배지에서 재현탁되고, 그리고 하위 챔버에서 24 웰 평판에서 50 ng/ml PDGF-BB (또는 음성 대조의 경우에 PBS-/-)를 내포하는 600 μ l 낮은 혈청 성장 배지로 6.5 mm, 8 μ m 구멍 폴리카보네이트 삽입물 (Corning) 위에 도달되었다. 세포는 8 시간 동안 이주하도록 허용되었고, 그리고 이후, 각 삽입물의 위쪽에서 세포가 면봉으로 부드럽게 제거되었다. 각 삽입물의 아래쪽에서 세포는 이후, 고정되고 Modified Giemsa Differential Quik Stain 키트 (Polysciences)를 이용하여 염색되었다. 간단히 말하면, 삽입물은 용액 A에서 최소한 10 초 동안 고정되고, 용액 B에서 5 회 담가지고, 그리고 이후, 용액 C에서 5 회 담가졌다. 4개 이미지가 각 삽입물의 4개 사분면으로부터 촬영되었고, 그리고 세포의 숫자 / 고출력 장이 각 이미지를 임계화하고 세포를 수동으로 계수함으로써 imageJ에서 정량되었다. 각 처리는 삼중으로 수행되었고, 그리고 평균 세포 수/ HPF가 계산된다.

[0158] **세포 증식 검정**

[0159] HCAVSMCs는 96 웰 평판에서 낮은 혈청 배지에서 10,000 세포/웰에서 파종되고 하룻밤 동안 부착되도록 허용되었다. 세포는 MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, MK2i 펩티드 또는 PBS -/- (양성과 음성 대조의 경우에)로 30 분 동안 처리되었다. 각 처리물은 이후, 흡인되고 100 μ l 낮은 혈청 성장 배지 $\pm$ 50 ng/mL PDGF-BB로 대체되었다. 24 시간의 배양 후, CellTiter 96® 수성 비-방사성 세포 증식 검정 (Promega)이 제조업체의 프로토콜에 따라 수행되었다. 간단히 말하면, 100 μ l 페나진 메토선페이트 (PMS) 용액이 2.0 ml MTS 용액에 첨가되고 혼합되었다. 20 μ l의 PMS/MTS 용액이 이후, 100 μ l 배지를 내포하는 96 웰 평판의 각 웰에 첨가되고, 그리고 상기 평판은 가습된, 5% CO₂ 대기에서 37 °C에서 4 시간 배양되었다. 배양 이후에, 각 웰의 흡광도가 처리군 사이에 상대적 증식 비율을 결정하기 위해 TECAN Infinite M1000 Pro 평판 판독기로 490 nm에서 기록되었다.

[0160] **세포 흡수와 세포내 트래피킹의 현미경적 분석**

[0161] 아민-반응성 Alexa-488 숙신이미딜 에스테르가 DMSO에서 용해되고, 그리고 100 mM 중탄산나트륨 완충액 (pH = 8.3)에서 MK2i 펩티드와 1 대 3 몰 비율에서 혼합되었다. 반응하지 않은 형광단 및 유기 용매는 PD-10 miditrap G-10 탈염 칼럼을 이용하여 제거되고, 그리고 형광으로 표지화된 펩티드는 동결건조되었다. PPAA와 PAA 중합체는 형광으로 표지화된 MK2i 펩티드와 [NH₃⁺]/[COO⁻] = 1:3의 CR에서 혼합되고 0.45 μ m PTFE 필터를 통해 주사기 여과되어 각각, 형광 MK2i-NPs 및 대조 NE-MK2i-NPs를 형성하였다. 형광 MK2i-NP와 NE-MK2i-NP 수력학적 직경과 표면 전하는 각각, DLS와 제타 전위 분석에 의해 측정되었다. 형광 MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, 또는 MK2i 펩티드 단독이 1% FBS와 1% P/S로 보충된 DMEM 배지에서 10 μ M MK2i 펩티드의 농도에서 Lab-Tek II 8-웰 챔버 덮개유리 (Thermo scientific Nunc)에서 성장된 HCAVSMCs에 적용되었다. 세포는 2 시간 동안 처리되고, PBS -/-로 2x 세척되고, 그리고 배지가 대체되었다. 세포는 이후, 새로운 배지에서 추가 0, 2, 4, 10, 또는 22 시간 동안 배양되었다. 최종 2 시간의 배양을 위해, 50 nM LysoTracker® Red DND-99 (Invitrogen)가 세포 내에서 산성 엔도/리소좀 소포를 시각화하기 위해 각 웰에 첨가되었다. 배양 후에, 세포는 세포의 형광을 쿼칭하기 위해 0.1% 트리판 블루로 1 분 동안 세척되고, 그 이후에 PBS -/-로 2회 추가 세척되었다. 세포는 이후, ZEN 영상 소프트웨어가 설치된 LSM 710 META 형광 현미경 (Carl Zeiss Thornwood, NY)을 이용하여 영상화되었다. 획득 세팅은 모든 처리군에 대해 획득된 모든 이미지에 대해 일정하게 유지되었다.

[0162] 모든 이미지는 imageJ 소프트웨어를 이용하여 처리되었고, 그리고 동시국지화는 Just Another Colocalization Plugin (JACoP)을 이용하여 분석된다. Mander의 중복 계수 (양쪽 형광 통로에서 양성 픽셀 값을 갖는 픽셀의 비율)가 이후, 동시국지화를 정량하기 위해 각 처리군에 대한 n $\geq$ 3 별개의 이미지에 대해 계산되었다. 펩티드가 발견된 구획의 크기에 대한 처리 효과를 결정하기 위해, imageJ에서 자유재량 선별 도구가 각 처리군에 대해 $\geq$ 50 개별 세포내 구획을 개설하는데 이용되었고, 그리고 각각의 구역이 정량되고 평균화되었다.

[0163] **세포내 흡수와 체류의 유세포 측정 정량**

[0164] HCAVSMCs는 80-90% 합류점까지 성장되고, 수확되고, 그리고 24-웰 평판에서 웰마다 20,000 세포에서 파종되고 낮은 혈청 배지에서 하룻밤 동안 부착되도록 허용되었다. 형광 MK2i 펩티드, MK2i-NPs, 그리고 NE-MK2i-NPs가 현미경검사 분석을 위해 전술한 바와 같이 합성되었고, 그리고 HCAVSMCs가 10 μ M MK2i의 농도에서 2 시간 동안

처리되었다. 처리 이후에, 세포는 PBS -/-로 세척되고, 세포의 폴리플렉스 및/또는 펩티드를 제거하기 위해 실온에서 10 분 동안 CellScrub 완충액 (Genlantis)으로 세척되고, PBS -/-에서 2x 세척되고, 그리고 배지가 완전한 성장 배지로 다시 채워졌다. 세포는 이후, 추가 0, 12, 24, 72, 또는 120 시간 동안 배양되었다. 세포는 이후, PBS -/-로 세척되고, 트립신처리되고, 그리고 BD CellQuest™ Pro 소프트웨어 (V 5.2)가 설치된 FACSCalibur 유세포분석기 (Becton Dickinson)에서 분석을 위해 PBS (-/-)에서 0.1% 트리판 블루에서 재현탁되었다. 데이터는 이출되고 FlowJo 소프트웨어 (V 7.6.4)로 분석되었다. 모든 표본은 삼중으로 실행된다.

[0165]

인간 복제 정맥

[0166]

HSV의 익명화되고, 폐기된 분절이 관상 또는 말초 혈관 우회로 수술을 받은 동의 환자로부터 수집되었다. 외과적 적출 이후에, HSV 분절은 외과 시술의 종결 때까지 식염수에서 보관되었는데, 이 시점에서 이들은 차가운 이식조직 수확 완충액 (100 mM 칼륨 락토비오네이트, 25 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgSO_4 , 30 mM 라피노오스, 5 mM 아데노신, 3 mM 글루타민, 1 mM 알로퓨리놀, 50 g/L 히드록시에틸 전분, pH 7.4)에서 배치되었다. 모든 HSV 분절이 수확의 24 시간 이내에 이용되었다. 무균 배양 후드에서 무균 기술을 활용하여, HSV 분절이 60 mm 펠트리 접시로 이전되었다. 각 분절 (0.5 mm)의 끝이 블레이드로 제거되고, 그리고 과잉 외막과 지방 조직이 최소 조작으로 제거되었다. HSV 분절은 장기 배양 또는 근육 배스 실험에서 활용되는 1.0 mm의 근사 너비를 갖는 연속 고리로 절단되었다. 각 분절로부터 2개 고리는 배양전 내막 두께 치수를 획득하기 위해 37 °C에서 30 분 동안 10% 포르말린에서 즉시 고정되었다.

[0167]

HSV 장기 배양 및 탈체 IH에 대한 검증

[0168]

정맥 분절 기능적 생존력을 시험하기 위한 준비에서, HSV 고리는 계량되었다, 그리고 그들의 길이가 기록되었다. HSV 고리는 이후, 37 °C에서 95% O_2 와 5% CO_2 으로 평형화된 중탄산염 완충액 (120mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.0 mM MgSO_4 , 1.0 mM NaH_2PO_4 , 10 mM 글루코오스, 1.5 mM CaCl_2 , 그리고 25 mM Na_2HCO_3 , pH 7.4)을 내포하는 근육 배스에서 현탁되었다. 이들 고리는 신장되고, 그리고 최대 장력이 획득될 때까지 길이가 점진적으로 조정되었다. 정규화된 반응성은 각 맥관 분절에 대한 수동 길이-장력 관계를 결정함으로써 획득되었다. 고리는 수축성 효현제에 대한 최대 반응을 생산하는 1 g의 휴지기 장력에서 유지되고, 그리고 완충액에서 2 시간 동안 평형화되었다. 힘 치수는 Powerlab 자료 획득 시스템 및 Chart 소프트웨어 (AD Instruments, Colorado Springs, CO)으로 접속된 Radnoti Glass Technology (Monrovia, CA) 힘 변환기 (159901A)를 이용하여 획득되었다.

[0169]

HSV 고리는 초기에 110 mM KCl (중탄산염 완충액에서 NaCl의 동물 대체)로 수축되었고, 그리고 산출된 힘이 계측되었다. 110 mM KCl은 막 탈분극을 유발하고, 기능적으로 실행가능한 평활근을 내포하는 맥관의 수축을 야기하였다. 맥관 생존력이 복수 KCl 과제로 실증된 후에, 추가 고리가 절단되고, 24 웰 평판에서 배치되고, 그리고 공기 중에 5% CO_2 의 대기에서 37 °C에서 14 일 동안, 30% FBS, 1% L-글루타민 및 1% 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640 배지에서 유지되었다. 이들 고리는 처리되지 않고, MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, MK2i 펩티드, 또는 완충액 단독으로 2 시간 동안 처리되고, 세척되고, 그리고 새로운 배지가 제공되었다. 처리가 없는 배양 배지는 14 일 동안 격일로 대체되었다.

[0170]

HSV 생존력

[0171]

MTT 검정은 치료 후 1과 14 일에 HSV 고리에서 수행된다. HSV 고리는 전술한 바와 같이 준비되고 처리되고, 그리고 1 또는 14 일의 장기 배양 이후에, HSV 고리는 계량되고, 그리고 이후, DPBS에서 용해된 250 μL 의 0.01% 메틸 테트라졸륨에서 배치되었다. 이들 고리는 37 °C 인큐베이터에서 1 시간 동안 배치되었다. 반응은 고리를 증류수 내로 배치함으로써 중지되었다. 이들 고리는 이후, 1 mL의 CelloSolve 내로 배치되고 37 °C에서 하룻밤 동안 배양되었다. 배양 이후에, 고리는 용해 상태에서 혼합되었고, 그리고 CelloSolve는 추출되고 큐벳 내로 배치되었고, 여기서 570 nm에서 흡광도가 결정된다. 상대적 생존력 계산은 고리의 흡성 증량에 정규화된 흡광도에 기초되었다.

[0172]

맥관 형태계측

[0173]

14 일의 장기 배양 후, 정맥 분절은 37 °C에서 30 분 동안 0.5 ml의 10% 포르말린에서 고정되고 섹션화를 위해 파라핀에서 포매되었다. 각 고리의 중간부분에서 시작하여, 5 μm 이격된 5개 횡단 섹션이 각 검체로부터 절단되었다. 이들 섹션은 이후, Verhoeff-van Gieson 염료로 염색되었다. 조직학 섹션은 Nikon Eclipse Ti 도립 형광 현미경 (Nikon Instruments Inc, Melville, NY)을 이용하여 영상화되었고, 그리고 내막과 내측 두께의 6개 방사상으로 평행 계측이 NIS 원소 영상 소프트웨어를 이용하여 각 섹션으로부터 무작위로 채취되었다 (고리마다

총 6-12 계측, 별개의 공여자로부터 처리군마다 $n \geq 3$ 고리). 혈관내막은 내부 탄력성 판의 내강 쪽 또는 그 내에 내포된 세포의 무질서한 편성에서 조직으로서 규정되고, 반면 내측 층은 내막 층 및 외부 탄력성 판 사이에 내포되었다. 내막과 내측 농화가 현미경의 컴퓨터 영상 분석 소프트웨어로 10x 배율에서 각 섹션에 대해 계측되었다.

[0174] **MK2i 맥관 침투**

[0175] 생존력을 실증한 후에, HSV 고리는 Alexa-568 표지화된 MK2i 펩티드, MK2i-NPs, 또는 NE-MK2i-NPs로 30 분 동안 처리되고, PBS -/-에서 2x 세척되고, 그리고 OCT 화합물에서 즉시 포매되고 드라이아이스 위에서 동결되었다. 5 μ m 동결절편은 각 처리된 맥관의 중앙으로부터 절단되고 맥관 벽 내로 펩티드 전달의 분석을 위해 현미경 슬라이드 상에 적재되었다. 맥관 침투는 각 섹션으로부터 평균 내막 형광을 계산하고 내막 구역에 정규화 (각 처리군에 대해 $n=3$ 별개의 공여자)함으로써 imageJ에서 정량되었다.

[0176] **웨스턴 블롯 분석**

[0177] 새로운 배지에서 2 시간의 처리 및 24 시간의 장기 배양 이후에, 처리된 HSV 고리의 부분이 액체 질소로 즉시 동결되고, 분말화되고, 그리고 요소-DTT-CHAPS 완충액을 이용하여 균질화되었다. 용해물은 원심분리되고 (6000 g, 20 분), 그리고 상층액은 HnRNP A0 인산화의 평가를 위해 수집되었다. 동등한 양의 단백질 (레인마다 20 μ g)이 15, 10, 또는 4-20% SDS-PAGE 겔 위에 적하되었다; 단백질은 전기영동적으로 분리되고, 그리고 이후, Immobilon 막 (Millipore, Billerica, MA)으로 이전되었다. 막은 포스포-hnRNP A0 (Millipore) 및 탈인산화된 hnRNP A0 (Santa Cruz)에 대한 일차 항체로 4 °C에서 하룻밤 동안 탐침되었다. 세척 후, 이들 막은 실온에서 1 시간 동안 적절한 이차 항체 (Li-Cor)와 함께 배양되었다. 두 번째 항체는 Odyssey 직접적인 적외선 형광 영상 시스템 (Li-Cor)을 이용하여 영상화되고 800과 680 nm 파장에서 LiCor Odyssey 소프트웨어 v2.1로 농도계측에 의해 정량되었다.

[0178] **토끼 양측성 정맥 이식편 개재 모델**

[0179] 수컷 뉴질랜드 백색 토끼 (3.0-3.5 kg; $n = 24$)는 케타민 염산염 (1.4 mg/kg) 및 자일라진 (0.2 mg/kg)으로 근육내 주사를 통해 마취되었다. 마취는 기관내 삽관 및 흡입된 이소플루란 (2.0-5.0%)으로 유지되었다. 고분량 IV 헤파린 일시 주사 (250 U/kg)가 경동맥 교차 클램프 직전에 투여되었다. 이러한 수술 절차는 광학적 배율 (배율 x2.5) 하에 무균 기술로 수행되었다.

[0180] 정맥 우회로 이식편은 앞서 설명된 바와 같은 문합 커프 기술로 작제되었다. 간단히 말하면, 2.0-mm 바디 루프로 구성되는 중합체 커프가 4-Fr 유도계 덮개 (Terumo Medical, Elkton, MD)로부터 장식되었다. 더욱 작은 지류 맥관의 결찰 이후에, 외경 정맥이 총경동맥 내로 개재 이식편의 창출을 위해 수확되었다 (길이에서 3.0-4.0 cm). 경정맥 단부는 커프에 통과되고, 외변되고, 그리고 6-0 실크로 고정되었다. 정맥 이식편은 차후에, 30 μ M MK2i-NP, 30 μ M MK2i 펩티드, 또는 PBS (처리 없음)를 내포하는 2 mL의 헤파린 혈장-Lyte 용액에서 30 분 동안 처리되었다. 처리 이후에, 경동맥 내강은 2.0-cm 동맥절개술로 노출되었고, 그리고 커프트, 역전된 정맥 단부가 삽입되었다. 3-0 실크가 커프 주변에서 동맥을 확보하는데 이용되었다. 최종적으로, 1.0 cm의 경동맥 뒷벽이 정맥 이식편 연장을 허용하기 위해 커프 사이에서 잘라내졌다.

[0181] 토끼는 수술후 28 일에 안락사되었고, 그리고 정맥 이식편이 롤러 펌프로 ~50 mm Hg 압력 하에 10% 중성 완충된 포르말린으로 원지에서 관류 고정되었다. 정맥 이식편은 차후에, 절제되고 4개의 분절로 절개되어, 이식편의 길이를 따라서 형태학적 변이의 평가를 허용하기 위해 조직이 커프 위에 가로놓이는 것을 방지하였다. 조직학적 섹션이 준비되었고, 그리고 내막과 내측 두께가 각 맥관 섹션의 각 사분면으로부터 3 계측을 수행함으로써 정량되었다 (12 계측/분절 = 48 계측/이식편). 별개의 섹션이 각 이식편의 혈관내막 내로 면역 세포의 침윤에 대한 치료 효과를 평가하기 위해 토끼 대식세포 항체 RAM-11 (Dako)로 염색되었다. 혈관내막에서 대식세포 양성 염색은 염색된 이식편 섹션의 혈관내막에서 양성으로 염색된 세포의 숫자를 수동으로 계수함으로써 정량되었다. 상이한 이식편 섹션으로부터 조직학적 이미지가 각 처리군에 대해 분석되었다.

[0182] **통계**

[0183] 통계학적 분석은 실험군을 비교하기 위해, 일원 변량분석 (ANOVA), 그 이후에 Tukey의 사후 검사로 수행되었다. 분석은 OriginPro 8 소프트웨어 (Originlab, Northampton, MA) 또는 Minitab 16 소프트웨어 (State College, PA)로 행위되었다. 통계학적 유의성은 95% 신뢰 한계 내에서 인정되었다. 결과는 산술 평균 $\pm$ SEM으로서 그래픽적으로 제공되었고, 그리고 p-값은 도면 내에서 또는 도면 범례에서 포함된다.

- [0184] **추가적인 뒷받침 데이터**
- [0185] **도면 48**은 Zetasizer Nano ZS에서 결정된 상이한 전하 비율 ($[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-]$)에서 제조된 폴리플렉스의 ζ -전위를 보여준다. 도시된 값은 최소한 3개의 독립된 계측의 평균이다.
- [0186] 폴리플렉스 pH-의존성 막 교란 행태는 엔도솜 탈출이 세포질 펩티드 전달과 체류를 증진하도록 조율되었다. **도면 49**는 $[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-] = 1:3$ 의 전하 비율에서 제조된 폴리플렉스의 pH-의존성 용혈을 예증한다. 유의미한 용혈은 초기 내지 후기 엔도솜 소포의 대표적인 pH 값 (즉, $\text{pH} < 6.8$)에서 증명되었고, 반면 7.4의 생리학적 pH에서 어떤 유의미한 용혈도 관찰되지 않았다. YARA-MK2i 펩티드 단독 또는 AA 폴리플렉스 중에서 어느 것도 검사된 임의의 pH 값에서 임의의 유의미한 용혈을 보여주지 않았고, 그리고 $[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-] = 1:3$ 의 전하 비율에서 제조된 폴리플렉스의 pH-의존성 크기 변화는 DLS 분석을 통해 분석되었다.
- [0187] **도면 50**은 pH 7.4에서 폴리플렉스가 단일모드 크기 분포를 보여준다는 것을 예증한다. 줄어드는 pH에서, 폴리플렉스는 개별 YARA-MK2i 펩티드와 PPAA 중합체 단일체로 해리하기 시작하였다.
- [0188] 폴리플렉스 처리는 인간 관상 동맥 혈관 평활근 세포 (HCAVSMCs)에서 세포 생존력에 대한 유의미한 효과를 갖지 않았다. **도면 51**은 10 μM ANG II로 6 시간 동안 자극되고, PPAA 폴리플렉스, AA 폴리플렉스, 또는 YARA-MK2i 펩티드 단독으로 2 시간 동안 처리되고, 그리고 새로운 배지에서 24 시간 동안 배양된 HCAVSMCs의 생존력을 보여준다. NT = 처리 없음, n = 4.
- [0189] **도면 52**는 ANG II로 6 시간 동안 자극되고, PPAA 폴리플렉스, AA 폴리플렉스, 또는 융합 MK2i 펩티드 단독으로 2 시간 동안 처리되고, 그리고 새로운 배지에서 24 시간 동안 배양된 HCAVSMCs에서 TNF- α 생산을 보여준다. 처리는 10, 25, 50, 또는 100 μM 의 펩티드 농도에 대해 정규화되었다. 모든 데이터는 LDH 검정에 의해 결정될 때 세포 수에 정규화되었다. NT= 처리 없음. *NT + TNF α 군과 비교하여 $p < 0.05$, *동일한 농도에서 MK2i와 비교하여 $p < 0.05$, **동일한 농도에서 AA 폴리플렉스와 비교하여 $p < 0.05$.
- [0190] HCAVSMCs 폴리플렉스 흡수의 현미경적 분석은 이들 폴리플렉스가 MK2i 펩티드의 흡수와 엔도솜 탈출을 증가한다는 것을 보여준다. 펩티드는 추적 목적을 위해 녹색 형광단으로 표지화되었다. 세포 영상에 앞서, 이들 세포는 엔도리소좀 경로에서 세포내 소포를 표시하는 적색 LysoTracker $\text{\textcircled{R}}$ 염색제로 처리되었다. 이러한 분석은 유리 펩티드로 처리된 세포에 비하여 엔도리소좀 트래피킹 경로로부터 탈출을 증가하는 폴리플렉스의 능력을 사정하기 위해 행위되었다. **도면 53**은 Mander의 계수, M1 (본질적으로, 적색 형광과 겹쳐지는 이미지에서 녹색 형광의 %, 다시 말하면, 엔도솜 소포 내에 내포된 펩티드의 %)의 계산을 통해 결정된, 녹색 형광단과 적색 형광단의 동시 국지화의 백분율을 보여준다. YARA-MK2i 분량 = 모든 표본에 대해 25 μM . 도시된 값은 평균 $n=3$ 별개의 이미지 $\pm$ SEM이다. *동일한 시점에서 YARA-MK2i와 비교하여 $p < 0.05$, **동일한 시점에서 YARA-MK2i와 비교하여 $p < 0.01$. 이러한 그래프는 HCAVSMC 폴리플렉스 흡수의 현미경적 분석의 결과이고, 그리고 이것은 폴리플렉스가 MK2i 펩티드의 흡수와 엔도솜 탈출을 증가한다는 것을 보여준다.
- [0191] 펩티드 흡수와 세포내 반감기는 신규한 폴리플렉스 제제를 통해 전달될 때 HCAVSMCs에서 유의미하게 증가되었다. 연구는 형광으로 표지화된 펩티드 및 유세포분석법을 이용하여 행위되었다. PPAA 폴리플렉스 (**도면 55, 도면 56**), YARA-MK2i 펩티드 단독 (**도면 57, 도면 58**), 그리고 AA 폴리플렉스 (**도면 59, 도면 60**)에 대한 시간의 흐름에서 평균 형광 강도의 플롯 및 시간의 흐름에서 형광 강도의 히스토그램이 작성되었다. 지수 라인은 각 처리군에 대한 형광 반감기를 결정하기 위해 각 데이터 세트에 적합되었다. 평균 형광 강도 값은 처리되지 않은 대조와 비교하여 MFI에서 증가로서 보고되었다, $n=3$.
- [0192] 폴리플렉스는 유리 펩티드로 처리와 비교하여 HSV 혈관이완을 더욱 강력하게 증가한다. 폴리플렉스는 인간 복재 정맥 체외이식편의 나트륨 니트로프로시드 (SNP) 유도된 이완을 유의미하게 증강시켰다. HSV 고리는 페닐에프린 (PE, 10^{-6} M)으로 수축되고, 그리고 차후에, SNP (10^{-8} - 10^{-6} M)으로 이완되었다. HSV 고리는 이후, 이완에서 처리 후 증가를 결정하기 위해 2 시간 동안 처리되고, PE로 다시 한 번 수축되고, 그리고 SNP로 이완되었다. 처리 후 수축 이후에, 모든 고리는 평활근 생존력을 실증하기 위해 KCl로 수축되었다. **도면 61**에 나타나 있는 바와 같이, *대조와 비교하여 $p < 0.05$, **100 μM MK2i와 비교하여 $p < 0.05$, $n = 3$.
- [0193] **도면 62**는 MTT 검정을 통해 사정될 때, 2 시간 동안 처리되고 장기 배양에서 24 시간 동안 유지된 HSV 고리에서

세포 생존력을 보여준다. $n = 1$. **도면 63**은 MTT 검정을 통해 사정될 때, 2 시간 동안 처리되고 장기 배양에서 14 일 동안 유지된 HSV 고리에서 세포 생존력을 보여준다. $n = 1$.

[0194] **도면 64**는 2 시간 동안 처리되고, 그리고 이후, 장기 배양에서 14 일 동안 유지된 HSV 체외이식편의 내막 두께를 전시한다, $n = 3$. *대조 (처리되지 않음)와 비교하여 $p \leq 0.01$, **대조와 비교하여 $p \leq 0.001$, $^T_p \leq 0.05$.

[0195] **도면 65**는 2 시간 동안 처리되고, 그리고 이후, 장기 배양에서 14 일 동안 유지된 HSV 체외이식편의 내막/내측 (I/M) 비율의 플롯을 제공한다, $n = 3$. *대조 (처리되지 않음)와 비교하여 $p \leq 0.01$, ** $p \leq 0.001$.

[0196] **실시예 7: AZX-100 폴리플렉스 특성화 요약**

[0197] **도면 66**은 3:1 전하 비율에서 제조된 AZX-100 폴리플렉스의 DLS 크기 분포를 제공한다. **도면 67**은 DLS 결과와 일치하는 크기 분포를 보여주는 우라닐 아세트산염 염색된 AZX-100 폴리플렉스의 대표적인 TEM 이미지이다. **도면 68**은 다양한 전하 비율에서 제조된 AZX-100 폴리플렉스의 제타 전위 요약이다. 제타 전위는 3:1보다 높은 전하 비율에서 전하 비율에 직접적으로 비례하는 것으로 밝혀졌다. 제타 전위에서 예상치 못한 이동이 아마도 거대분자 재배열로 인해 3:1의 전하 비율에서 관찰된다.

[0198] AZX-100 폴리플렉스는 안지오텐신 II 자극된 인간 관상 동맥 혈관 평활근 세포에서 스트레스 섬유 형성의 AZX-100 매개된 저해를 증강시켰다. 세포는 1 시간 동안 처리되고, 그리고 이후, 안지오텐신 II으로 2 시간 동안 차후 자극되었다. 액틴 스트레스 섬유가 팔로이딘 염색된, 고정된 표본에서 가시화되었고, 그리고 각 처리군으로부터 개별 세포의 상대적 형광 강도가 액틴 스트레스 섬유 형성을 정량하는데 활용되었다. **도면 69**와 **도면 70**은 AZX-100 폴리플렉스가 안지오텐신 II 자극된 인간 관상 동맥 혈관 평활근 세포에서 스트레스 섬유 형성의 AZX-100 매개된 저해를 증강한다는 것을 보여준다.

[0199] **도면 71-73**은 쥐 대동맥 평활근이 근육 베스 기구에서 현탁된 실험의 결과를 보여준다. 조직은 중탄산염 완충액에서 평형화되고, 그리고 상기 조직의 생존력을 확증하기 위해 KCl (110 mM)으로 공격되었다. 조직을 기저 장력으로 복귀시킨 후에, 평활근은 5×10^{-8} M 페닐에프린 (5×10^{-8} M)으로 공격되고, 그리고 이후, 중탄산염 완충액으로 세척되었다. 조직은 이후, 중탄산염 완충액의 차후 세척을 통해 기저 장력으로 복귀되고, 그리고 이후, 대조, AZX 100 펩티드, 또는 AZX 폴리플렉스로 처리되었다. 30 분의 배양 후, 이들 조직은 페닐에프린으로 공격되었고, 그리고 발생하는 퍼센트 저해를 결정하기 위해 수축력이 초기 수축과 비교되었다. AZX 100 펩티드는 쥐 대동맥 평활근에 첨가될 때, 수축의 용량 의존성 저해를 보여주었다. AZX 폴리플렉스는 또한, 수축의 용량 의존성 저해를 가졌지만, 필적하는 분량에 대해 수축의 더욱 큰 저해 (대략 5-배 증가)를 가졌다. ($n=6$)

[0200] **도면 74**와 **도면 75**는 대동맥 평활근이 Fluoroplex에서 현탁된 실험의 결과를 보여준다. 조직은 중탄산염 완충액에서 평형화되었고 실험에서 4 시간 동안 $5 \mu\text{M}$ Fura 2-AM으로 적하되었다. AZX 폴리플렉스와 함께 전배양은 페닐에프린으로 공격될 때, 세포내 칼슘에서 상승을 저해하지 않는다. **도면 74**는 힘의 대표적인 추적 및 칼슘 형광 추적을 전시한다. **도면 75**는 일어난 세포내 칼슘에서 변화 및 힘의 저해의 크기를 측정하는 누적 데이터를 제공한다.

[0201] **도면 76**은 인간 복재 정맥이 근육 베스 기구에서 현탁된 실험의 결과를 제공한다. 조직은 중탄산염 완충액에서 평형화되고, 그리고 상기 조직의 생존력을 확증하기 위해 KCl (110 mM)로 공격되었다. 조직을 기저 장력으로 복귀시킨 후에, 평활근은 10^{-6} M 페닐에프린으로 공격되고, 그리고 이후, 나트륨 니트로프루시드 (10^{-7} M)로 이완되었다. 조직은 이후, 중탄산염 완충액의 차후 세척을 통해 기저 장력으로 복귀되고, 그리고 이후, 대조, AZX 100 펩티드, 또는 AZX 폴리플렉스로 처리되었다. 30 분의 배양 후, 조직은 페닐에프린으로 공격되고, 그리고 이후, 나트륨 니트로프루시드로 이완되었다. 퍼센트 이완은 퍼센트 증강된 이완을 결정하기 위해 초기 이완과 비교되었다. AZX 100 펩티드는 대조와 비교하여 이완의 용량 의존성 증강을 보여주었다. AZX 폴리플렉스는 또한, 이완의 용량 의존성 증강을 가졌지만, 펩티드 단독과 비교하여 더욱 큰 이완 (거의 5-배 증가)을 나타냈다. ($n=3$).

[0202] 최종적으로, **도면 77**과 **표 2**는 합쳐, AZX-100 NPs가 인간 세기관지 기도 평활근 (HASM)의 AZX-100 매개된 이완을 증강한다는 것을 예증한다.

[0203] 표 2. HASM의 이완.

	HASM11	HASM17	HASM 18	HASM 20	HASM 22
p20 .5 mM	24	10		36	40
P20 1 mM		25	80	76	84
p-P20 .5mM-polyplex	37	31	59		38
p-P20 1 mM-polyplex			74		117

[0204]

[0205] 본원에서 이용된 다음의 용어는 당업자에 의해 널리 이해되는 것으로 생각되지만, 현재 개시된 요부의 설명을 용이하게 하기 위해 정의가 진술된다.

[0206] 달리 정의되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 현재 개시된 요부가 속하는 당해 분야의 평균적 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 비록 본원에서 설명된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법, 장치와 재료가 현재 개시된 요부의 실시 또는 시험에 이용될 수 있지만, 대표적인 방법, 장치와 재료가 하기에 설명된다.

[0207] 오래된 특허 법 규약에 따라서, 용어 단수 ("a", "an", 그리고 "the")는 청구항을 비롯하여, 본 출원에서 이용될 때 "하나 또는 그 이상"을 지칭한다. 따라서, 예로서, "조성물"에 대한 언급은 복수의 이런 조성물, 기타 등등을 포함한다.

[0208] 달리 지시되지 않으면, 명세서 및 청구항 내에서 이용된 양, 성질, 기타 등등을 표시하는 모든 숫자는 모든 경우에서 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해된다. 따라서, 반대로 지시되지 않으면, 명세서 및 첨부된 청구항에서 진술된 수치 파라미터는 현재 개시된 요부에 의해 획득이 추구되는 원하는 성질에 따라 변할 수 있는 근사이다.

[0209] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "약"은 질량, 중량, 시간, 부피, 농도 또는 백분율의 값 또는 양을 지칭할 때, 특정된 양으로부터 일부 구체예에서 $\pm 20\%$, 일부 구체예에서 $\pm 10\%$, 일부 구체예에서 $\pm 5\%$, 일부 구체예에서 $\pm 1\%$, 일부 구체예에서 $\pm 0.5\%$, 그리고 일부 구체예에서 $\pm 0.1\%$ 의 변이를 포괄하는 것으로 의미되는데, 그 이유는 이런 변형이 개시된 방법을 수행하는데 적절하기 때문이다.

[0210] 본원에서 이용된 바와 같이, 범위가 "약"특정 값에서부터, 및/또는 "약" 다른 특정 값까지로서 표현될 수 있다. 다수의 값이 본원에서 개시되고, 그리고 각 값이 또한, 특정 값 그 자체에 더하여 "약" 상기 값으로서 본원에서 개시되는 것으로 또한 이해된다. 가령, 값 "10"이 개시되면, "약 10" 역시 개시된다. 두 특정 단위 사이에 각 단위 또한 개시되는 것으로 또한 이해된다. 가령, 10과 15가 개시되면, 11, 12, 13, 그리고 14 역시 개시된다.

[0211] 참고문헌

[0212] 본 문서 전반에서, 다양한 참고문헌이 언급된다. 아래에 열거된 것들을 비롯하여, 모든 이런 참고문헌은 본원에 참조로서 편입된다.

[0213] 1. Go, A.S. et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 127, e6-e245 (2013).

[0214] 2. Alexander, J.H. et al. Efficacy and safety of edifoligide, an E2F transcription factor decoy, for prevention of vein graft failure following coronary artery bypass graft surgery: PREVENT IV: a randomized controlled trial. *JAMA* 294, 2446-2454 (2005).

[0215] 3. Saunders, P.C. et al. Vein graft arterialization causes differential activation of mitogen-activated protein kinases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127, 1276-1284 (2004).

[0216] 4. Raingeaud, J. et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270, 7420-7426 (1995).

[0217] 5. Zarubin, T. & Han, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15, 11-18 (2005).

[0218] 6. Engel, K., Kotlyarov, A. & Gaestel, M. Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J* 17, 3363-3371 (1998).

- [0219] 7. Xu, J.J., Hendriks, B.S., Zhao, J. & de Graaf, D. Multiple effects of acetaminophen and p38 inhibitors: towards pathway toxicology. *FEBS Lett* 582, 1276-1282 (2008).
- [0220] 8. Dambach, D.M. Potential adverse effects associated with inhibition of p38alpha/beta MAP kinases. *Curr Top Med Chem* 5, 929-939 (2005).
- [0221] 9. Ward, B., Seal, B.L., Brophy, C.M. & Panitch, A. Design of a bioactive cell-penetrating peptide: when a transduction domain does more than transduce. *Journal of Peptide Science* 15, 668-674 (2009).
- [0222] 10. Hayess, K. & Benndorf, R. Effect of protein kinase inhibitors on activity of mammalian small heat-shock protein (HSP25) kinase. *Biochem Pharmacol* 53, 1239-1247 (1997).
- [0223] 11. Lopes, L.B. et al. A novel cell permeant peptide inhibitor of MAPKAP kinase II inhibits intimal hyperplasia in a human saphenous vein organ culture model. *J Vasc Surg* 52, 1596-1607 (2010).
- [0224] 12. Flynn, C.R. et al. Internalization and intracellular trafficking of a PTD-conjugated anti-fibrotic peptide, AZX100, in human dermal keloid fibroblasts. *J Pharm Sci* 99, 3100-3121 (2010).
- [0225] 13. Jones, R.A. et al. Poly(2-alkylacrylic acid) polymers deliver molecules to the cytosol by pH-sensitive disruption of endosomal vesicles. *Biochem J* 372, 65-75 (2003).
- [0226] 14. Lackey, C.A., Press, O.W., Hoffman, A.S. & Stayton, P.S. A biomimetic pH-responsive polymer directs endosomal release and intracellular delivery of an endocytosed antibody complex. *Bioconjugate Chemistry* 13, 996-1001 (2002).
- [0227] 15. Murthy, N., Robichaud, J.R., Tirrell, D.A., Stayton, P.S. & Hoffman, A.S. The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J Control Release* 61, 137-143 (1999).
- [0228] 16. Foster, S., Duvall, C.L., Crownover, E.F., Hoffman, A.S. & Stayton, P.S. Intracellular delivery of a protein antigen with an endosomal-releasing polymer enhances CD8 T-cell production and prophylactic vaccine efficacy. *Bioconjug Chem* 21, 2205-2212 (2010).
- [0229] 17. Crownover, E., Duvall, C.L., Convertine, A., Hoffman, A.S. & Stayton, P.S. RAFT-synthesized graft copolymers that enhance pH-dependent membrane destabilization and protein circulation times. *J Control Release* 155, 167-174 (2011).
- [0230] 18. Sorkin, A. & Von Zastrow, M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 600-614 (2002).
- [0231] 19. Evans, B.C. et al. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J Vis Exp*, e50166 (2013).
- [0232] 20. Humphries, W.H.t. & Payne, C.K. Imaging lysosomal enzyme activity in live cells using self-quenched substrates. *Anal Biochem* 424, 178-183 (2012).
- [0233] 21. Rousseau, S. et al. Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs. *EMBO J* 21, 6505-6514 (2002).
- [0234] 22. Hitti, E. et al. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol* 26, 2399-2407 (2006).
- [0235] 23. Ronkina, N. et al. MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin. *Biochem Pharmacol* 80, 1915-1920 (2010).
- [0236] 24. Chen, H.F., Xie, L.D. & Xu, C.S. Role of heat shock protein 27 phosphorylation in migration of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 327, 1-6 (2009).
- [0237] 25. Schleimer, K. et al. Training a sophisticated microsurgical technique: interposition of external jugular vein graft in the common carotid artery in rats. *J Vis Exp* (2012).

- [0238] 26. Mueller, L. et al. TNF- α similarly induces IL-6 and MCP-1 in fibroblasts from colorectal liver metastases and normal liver fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 397, 586-591 (2010).
- [0239] 27. Mitchell, R.N. & Libby, P. Vascular remodeling in transplant vasculopathy. *Circ Res* 100, 967-978 (2007).
- [0240] 28. Stark, V.K., Hoch, J.R., Warner, T.F. & Hullett, D.A. Monocyte chemotactic protein-1 expression is associated with the development of vein graft intimal hyperplasia. *Arterioscl Throm Vas* 17, 1614-1621 (1997).
- [0241] 29. Walensky, L.D. et al. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* 305, 1466-1470 (2004).
- [0242] 30. Heitz, F., Morris, M.C. & Divita, G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British Journal of Pharmacology* 157, 195-206 (2009).
- [0243] 31. LaBelle, J.L. et al. A stapled BIM peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers. *J Clin Invest* 122, 2018-2031 (2012).
- [0244] 32. Walensky, L.D. et al. A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol Cell* 24, 199-210 (2006).
- [0245] 33. Okamoto, T. et al. Stabilizing the pro-apoptotic BimBH3 helix (BimSAHB) does not necessarily enhance affinity or biological activity. *ACS Chem Biol* 8, 297-302 (2013).
- [0246] 34. Mislick, K.A. & Baldeschwieler, J.D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12349-12354 (1996).
- [0247] 35. Richard, J.P. et al. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem* 280, 15300-15306 (2005).
- [0248] 36. Mietus-Snyder, M., Frieria, A., Glass, C.K. & Pitas, R.E. Regulation of scavenger receptor expression in smooth muscle cells by protein kinase C: a role for oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 969-978 (1997).
- [0249] 37. Li, H., Freeman, M.W. & Libby, P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J Clin Invest* 95, 122-133 (1995).
- [0250] 38. Voigt, J., Christensen, J. & Shastri, V.P. Differential uptake of nanoparticles by endothelial cells through polyelectrolytes with affinity for caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 2942-2947 (2014).
- [0251] 39. Alam, M.R. et al. The biological effect of an antisense oligonucleotide depends on its route of endocytosis and trafficking. *Oligonucleotides* 20, 103-109 (2010).
- [0252] 40. Meier, O. et al. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol* 158, 1119-1131 (2002).
- [0253] 41. Rossman, J.S., Leser, G.P. & Lamb, R.A. Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *J Virol* 86, 10950-10960 (2012).
- [0254] 42. Hewlett, L.J., Prescott, A.R. & Watts, C. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J Cell Biol* 124, 689-703 (1994).
- [0255] 43. Wadia, J.S., Stan, R.V. & Dowdy, S.F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 10, 310-315 (2004).
- [0256] 44. Muto, A. et al. Inhibition of Mitogen Activated Protein Kinase II with MMI-0100 reduces intimal hyperplasia ex vivo and in vivo. *Vascul Pharmacol* 56, 47-55 (2012).
- [0257] 45. Kalra, M. & Miller, V.M. Early remodeling of saphenous vein grafts: proliferation, migration and apoptosis of adventitial and medial cells occur simultaneously with changes in graft diameter and

blood flow. *J Vasc Res* 37, 576-584 (2000).

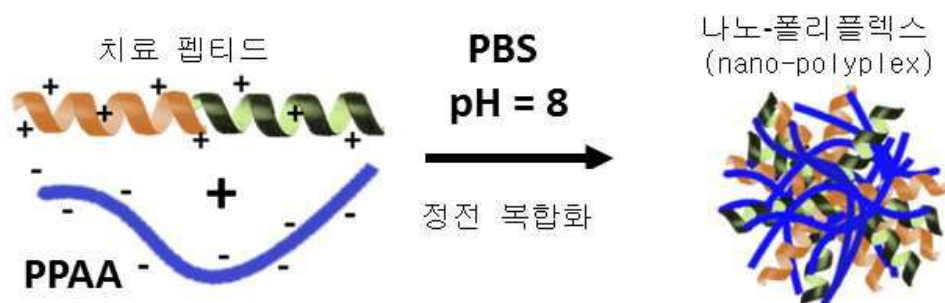
- [0258] 46. Zwolak, R.M., Adams, M.C. & Clowes, A.W. Kinetics of vein graft hyperplasia: association with tangential stress. *J Vasc Surg* 5, 126-136 (1987).
- [0259] 47. Alexander, J.H. et al. The PProject of Ex-vivo Vein graft Engineering via Transfection IV (PREVENT IV) trial: study rationale, design, and baseline patient characteristics. *Am Heart J* 150, 643-649 (2005).
- [0260] 48. Goldberg, M., Langer, R. & Jia, X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 18, 241-268 (2007).
- [0261] 49. Li, H., Nelson, C.E., Evans, B.C. & Duvall, C.L. Delivery of intracellular-acting biologics in pro-apoptotic therapies. *Curr Pharm Des* 17, 293-319 (2011).
- [0262] 50. Ferrito, M.a.T., D. A. Poly(2-ethylacrylic acid). *Macromolecular Syntheses* 11, 59-62 (1992).
- [0263] 51. Convertine, A.J., Benoit, D.S., Duvall, C.L., Hoffman, A.S. & Stayton, P.S. Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery. *J Control Release* 133, 221-229 (2009).
- [0264] 52. Henry, S.M., El-Sayed, M.E., Pirie, C.M., Hoffman, A.S. & Stayton, P.S. pH-responsive poly(styrene-alt-maleic anhydride) alkylamide copolymers for intracellular drug delivery. *Biomacromolecules* 7, 2407-2414 (2006).
- [0265] 53. Bolte, S. & Cordelieres, F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc-Oxford* 224, 213-232 (2006).
- [0266] 54. Jiang, Z. et al. A novel vein graft model: adaptation to differential flow environments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H240-245 (2004).
- [0267] 55. Duvall et al. *Mol Pharm.* 2010;7(2):468-476.

참조로서 편입

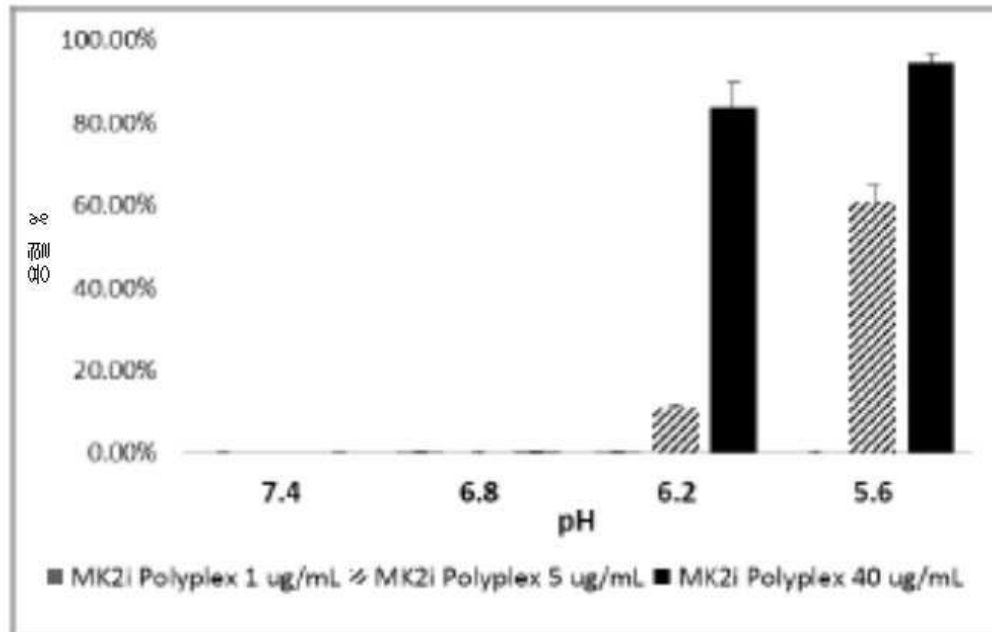
- [0269] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허, 그리고 특허 출원은 마치 각 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참조로서 편입되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 지시되는 것처럼 본원에 참조로서 편입된다. 현재 개시된 요부의 다양한 상세는 본원에서 개시된 요부의 범위로부터 벗어나지 않으면서 변화될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 게다가, 전술한 설명은 단지 예시를 목적으로 하고, 그리고 한정을 목적으로 하지 않는다.

도면

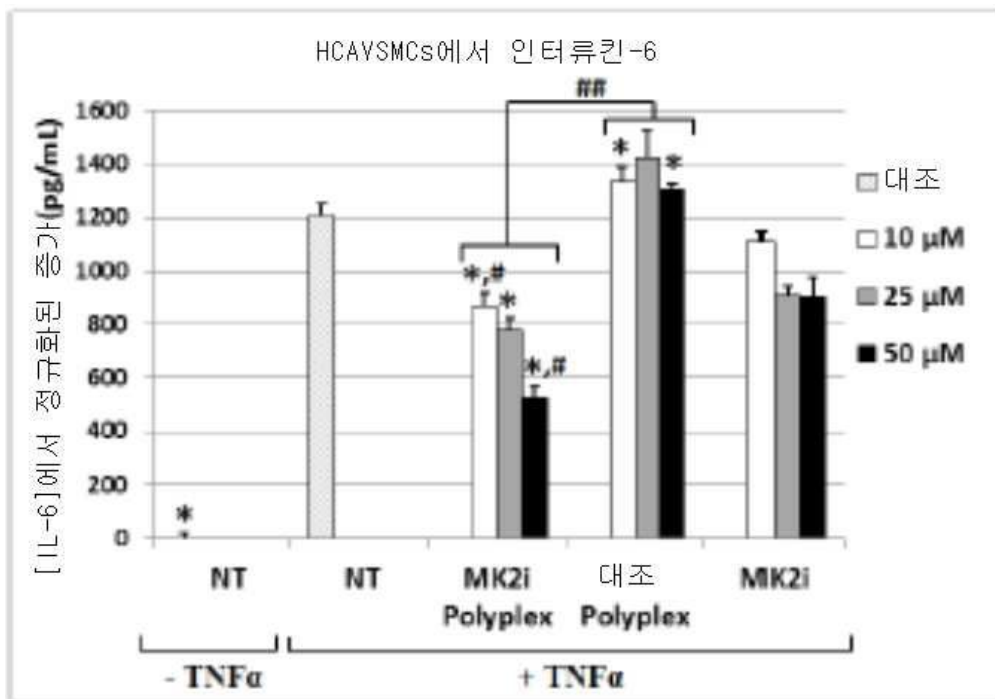
도면1



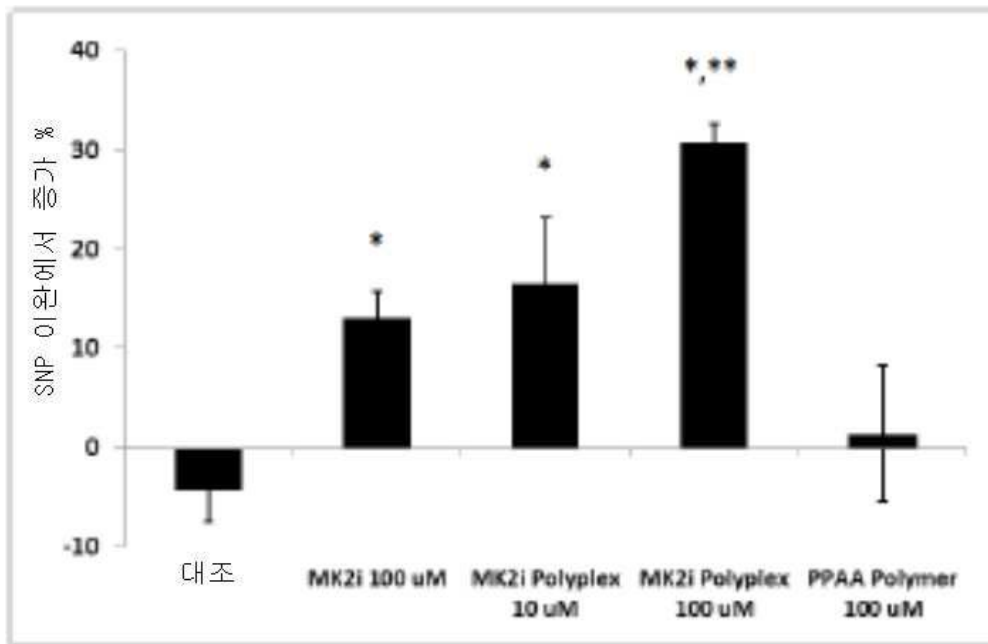
도면2



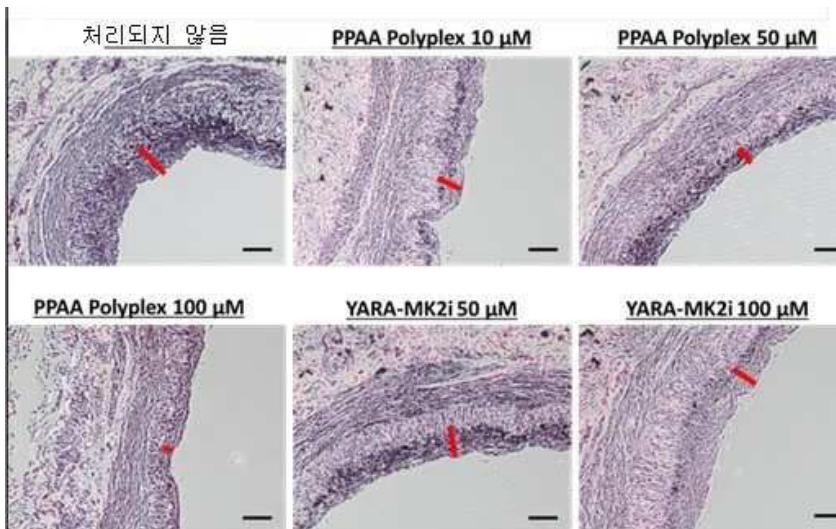
도면3



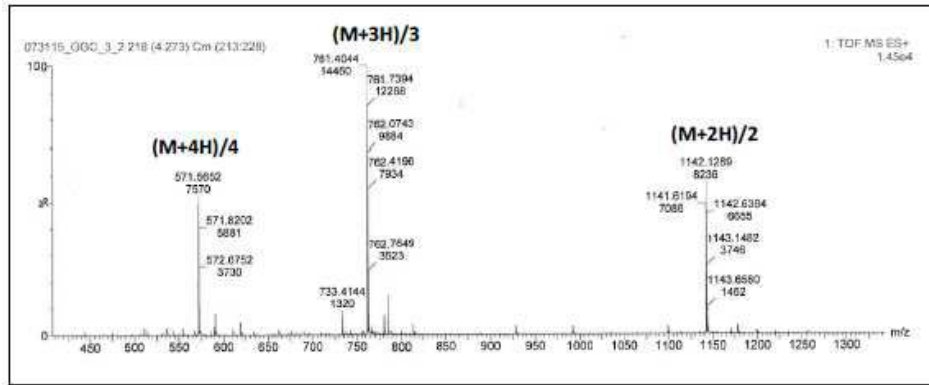
도면4



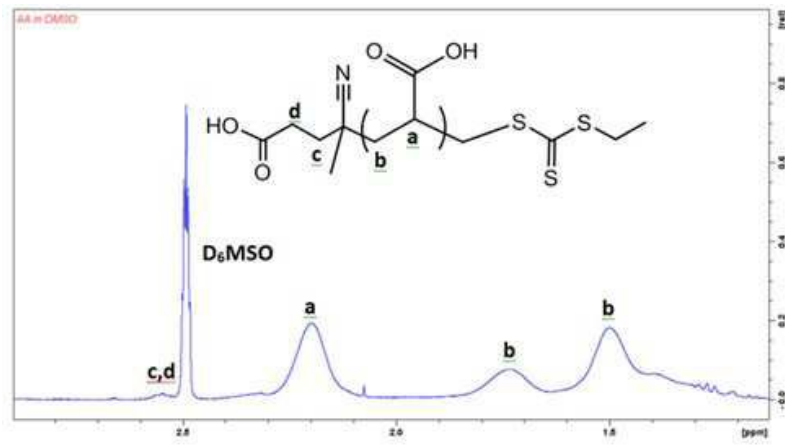
도면5



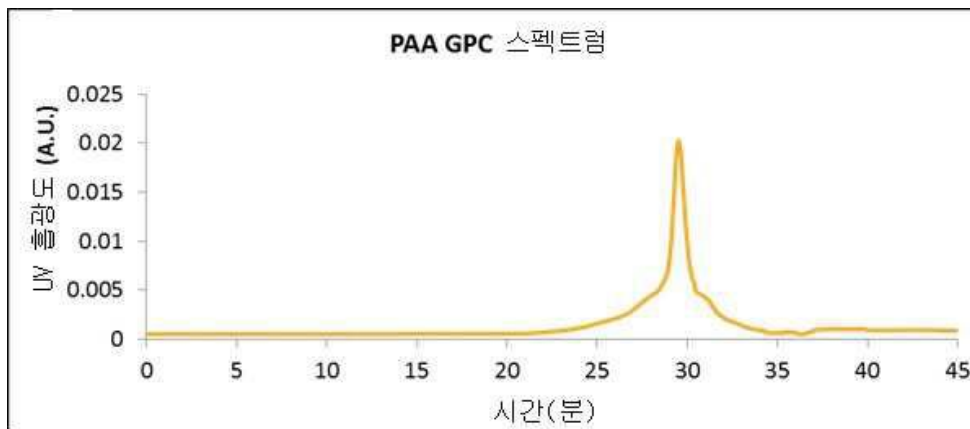
도면6



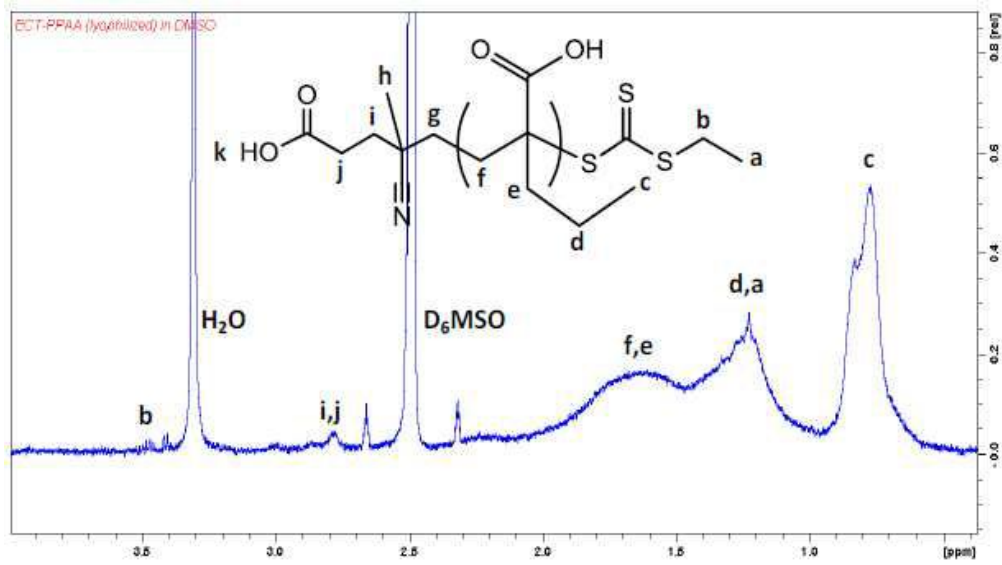
도면7



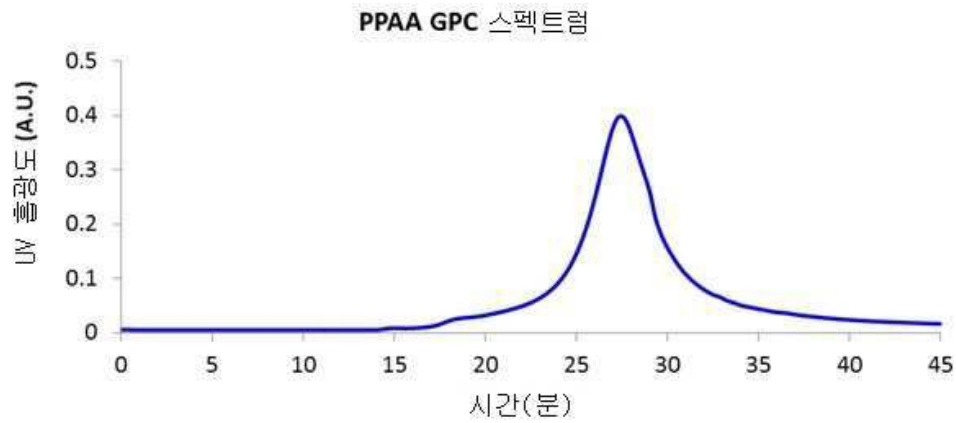
도면8



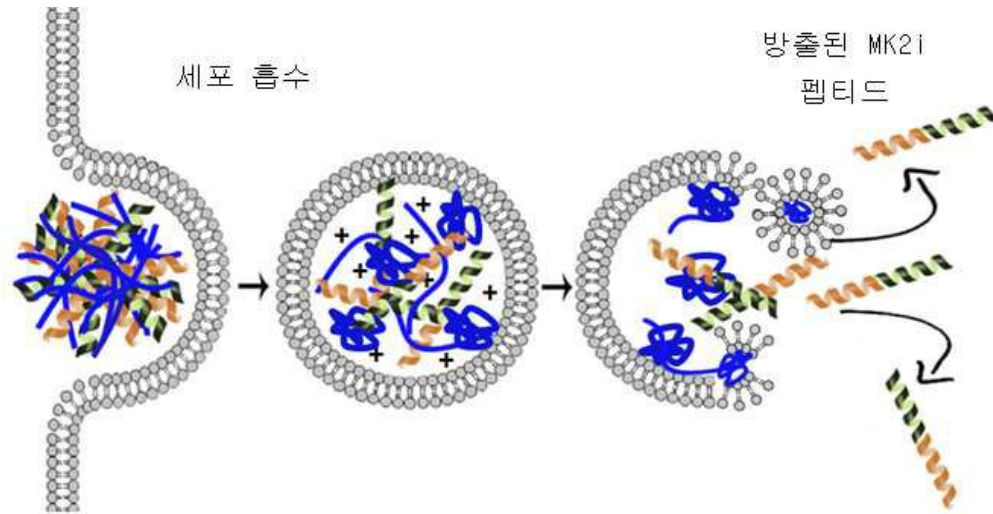
도면9



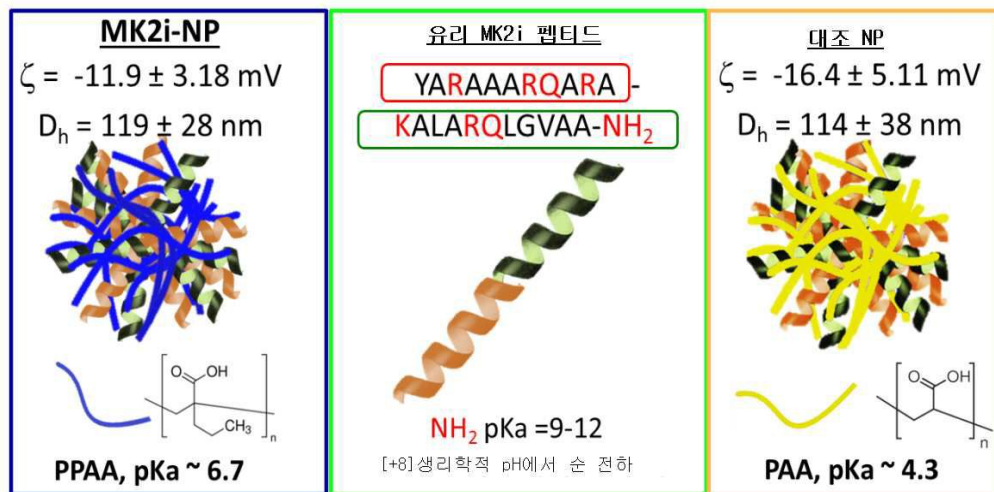
도면10



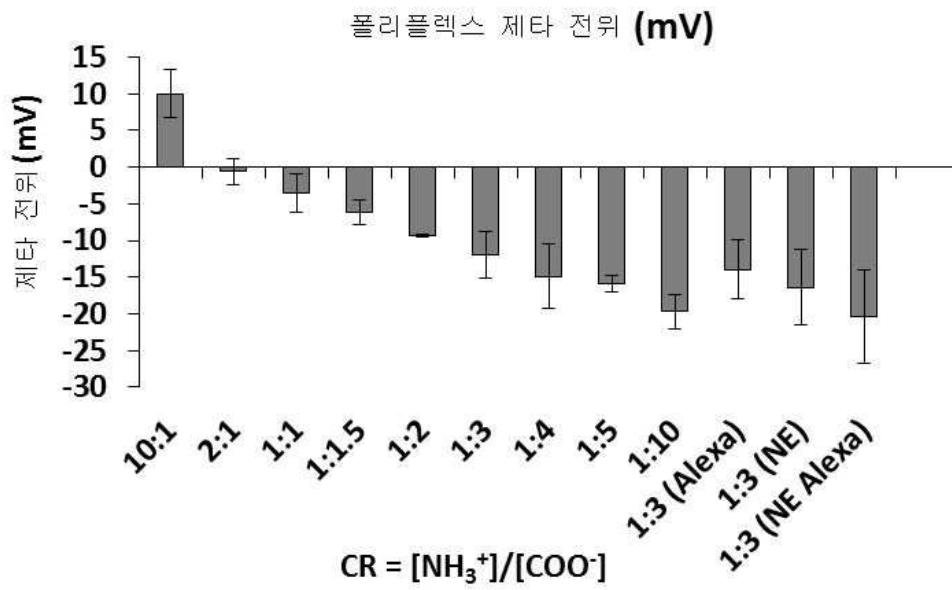
도면11



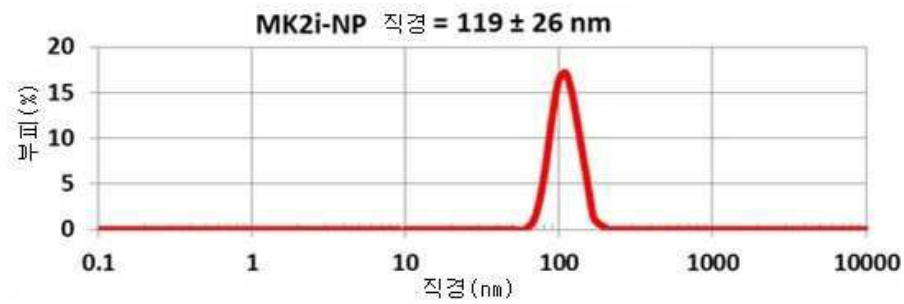
도면12



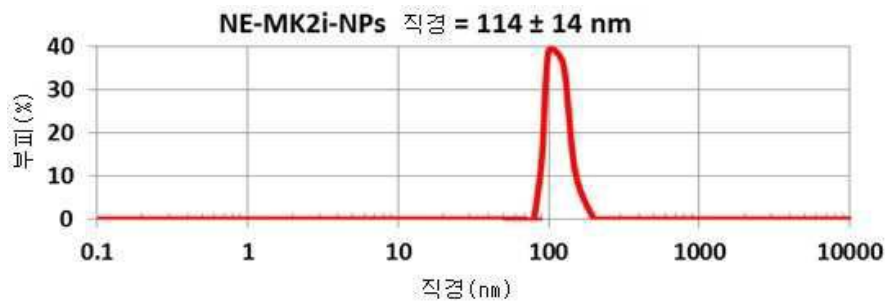
도면13



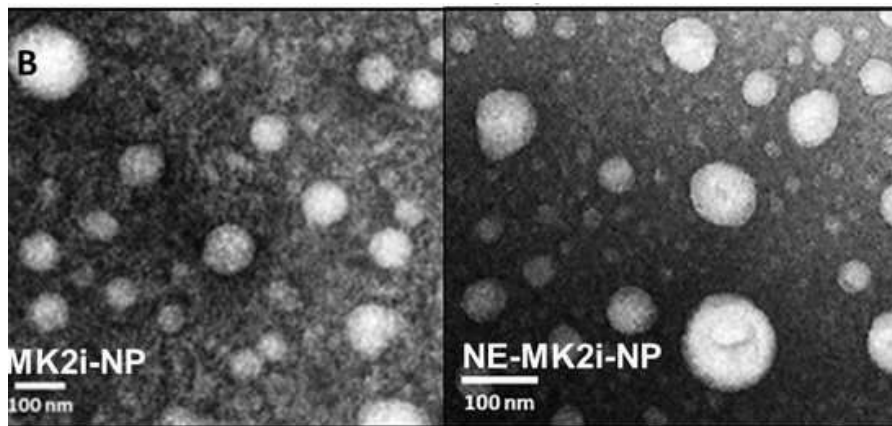
도면14



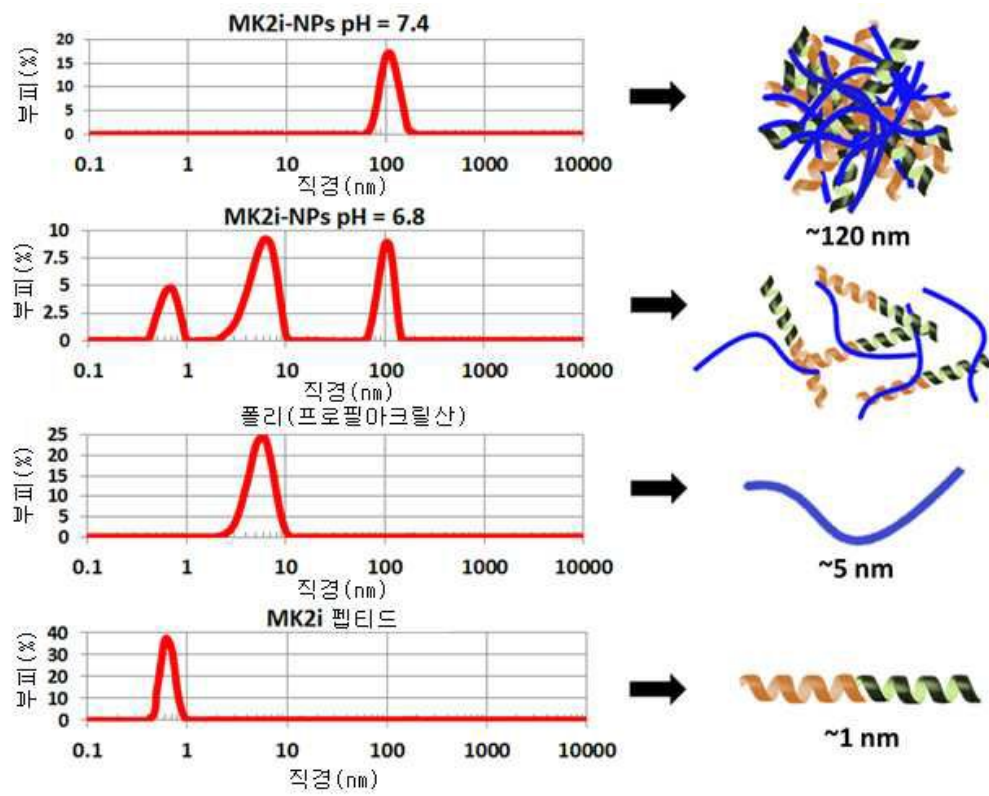
도면15



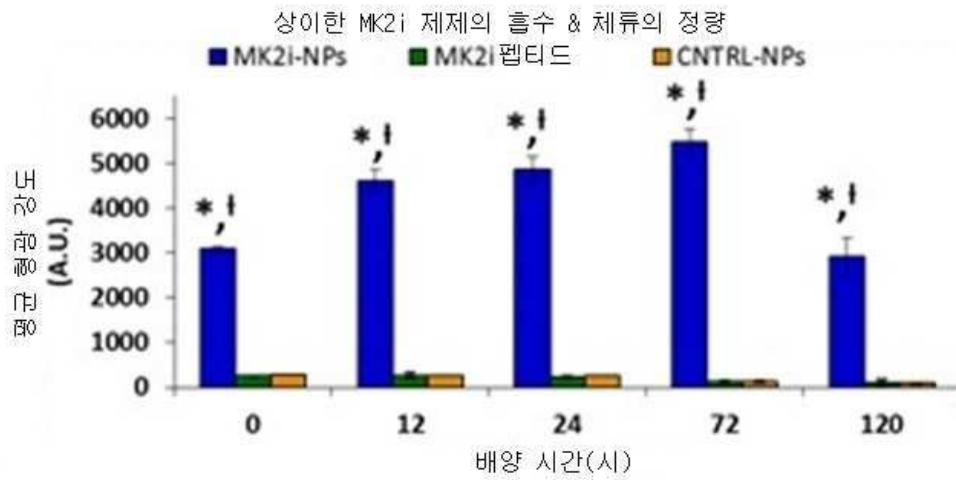
도면16



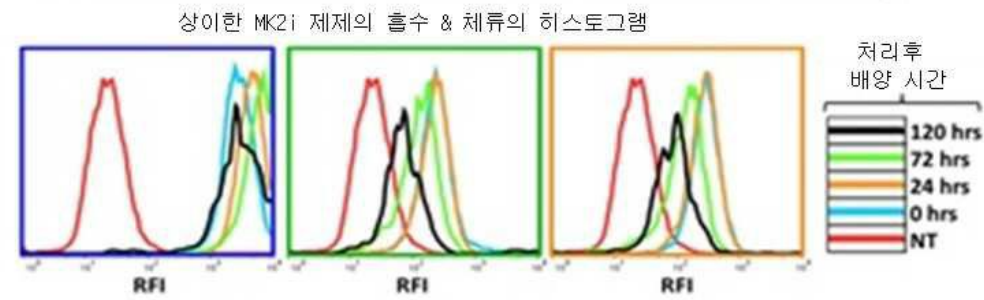
도면17



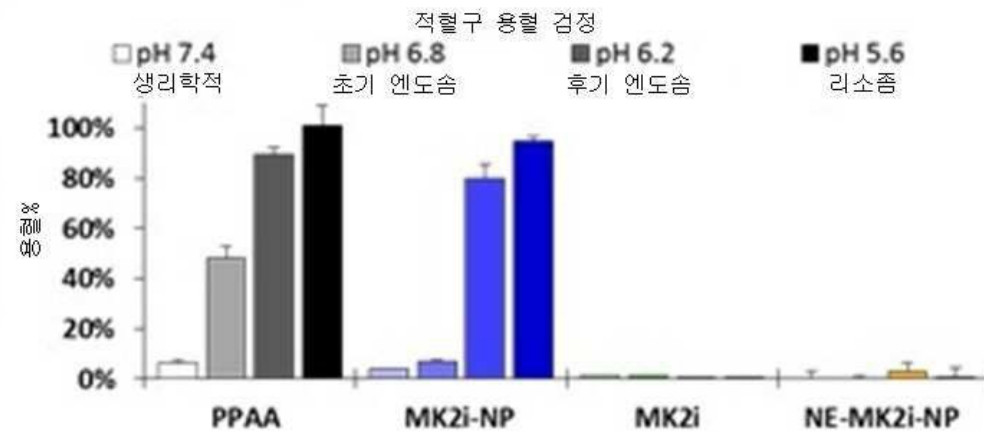
도면18



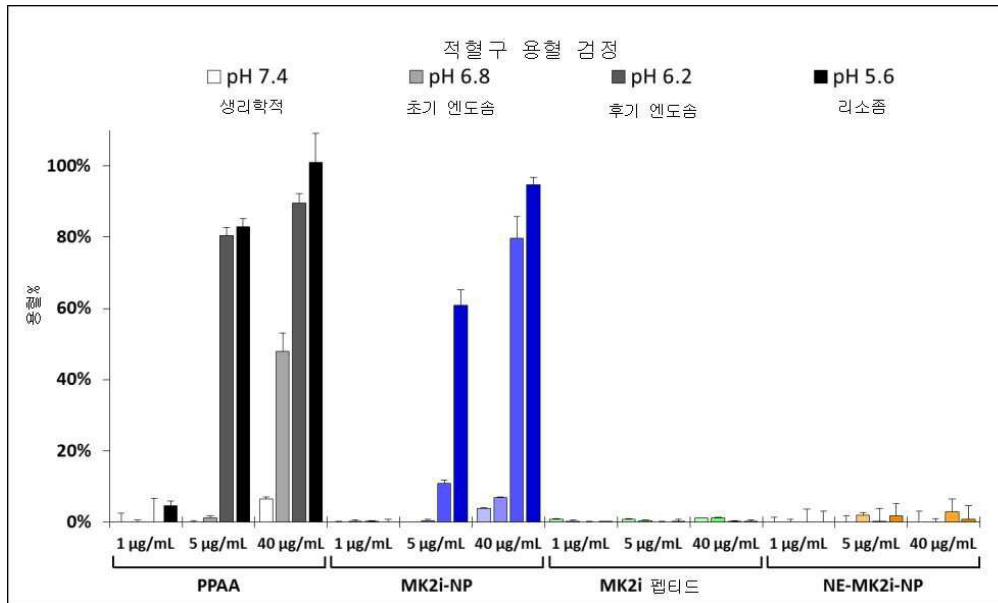
도면19



도면20

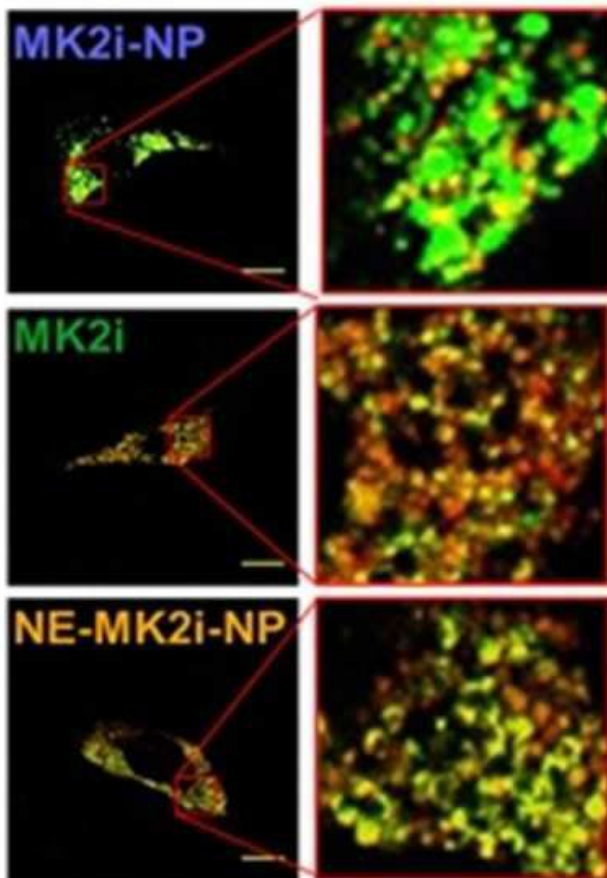


도면21

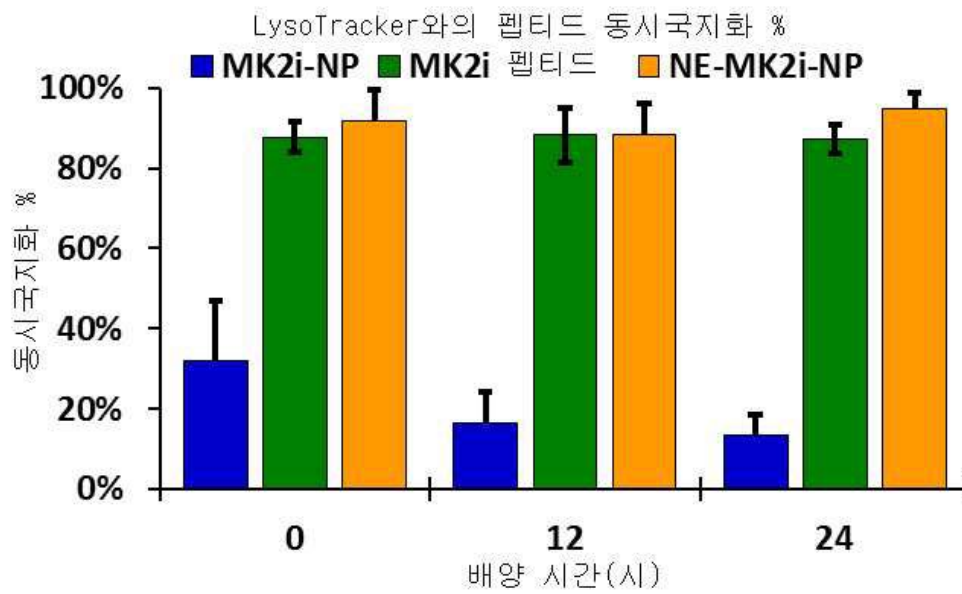


도면22

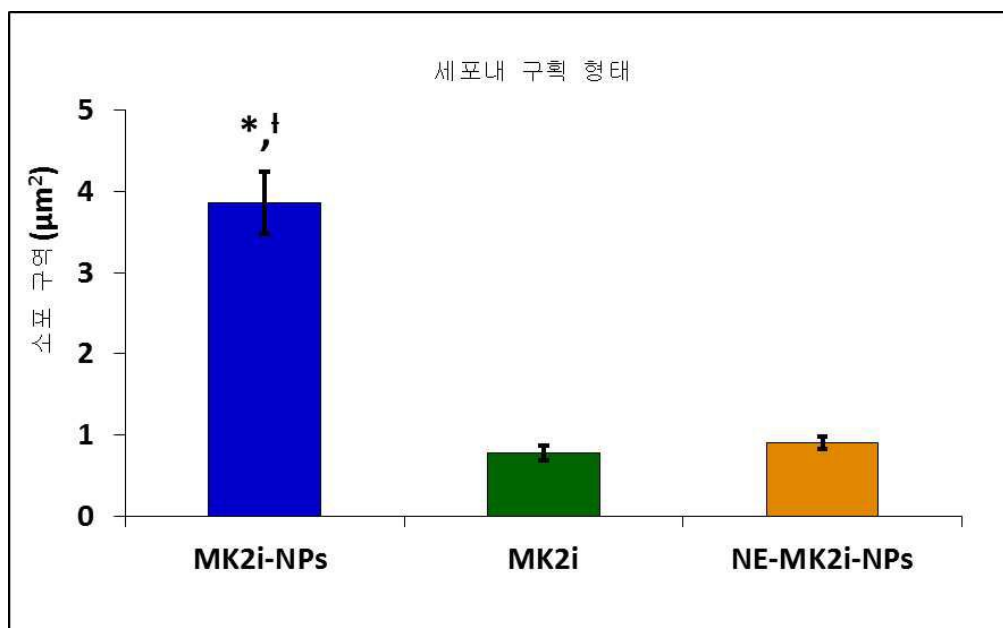
LysoTracker와의 MK2i 동시 국지화



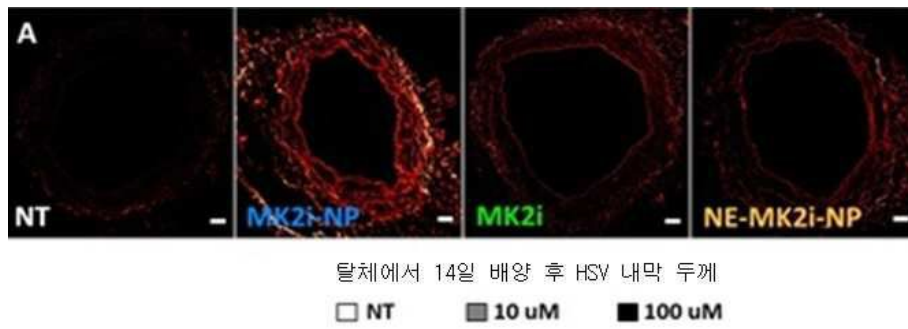
도면23



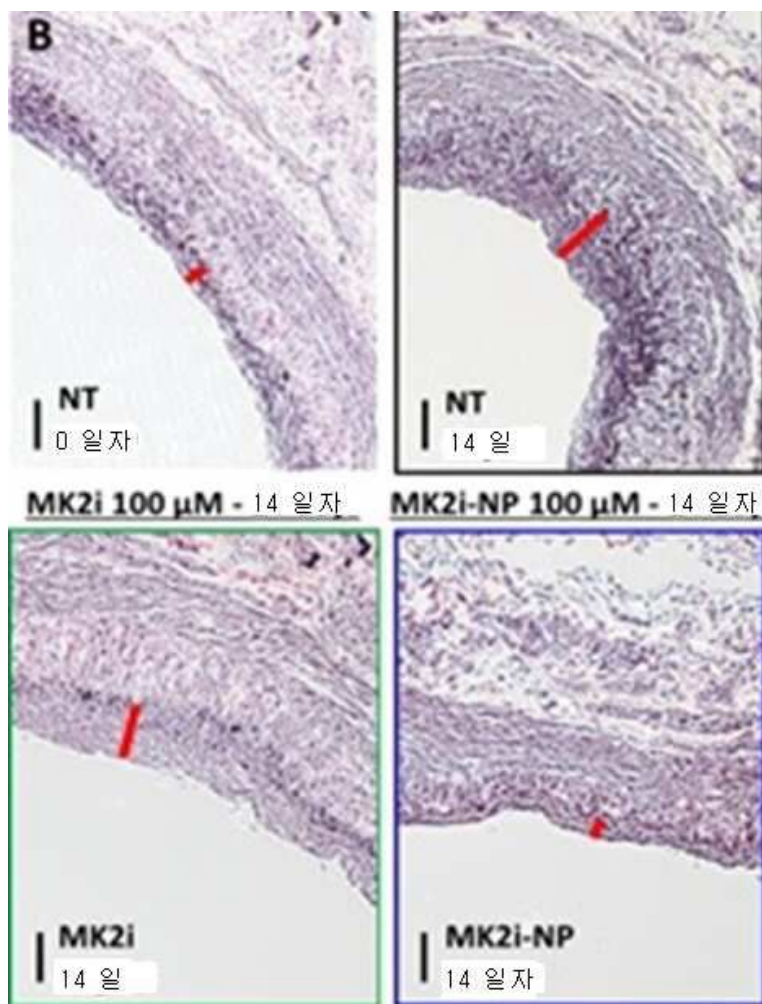
도면24



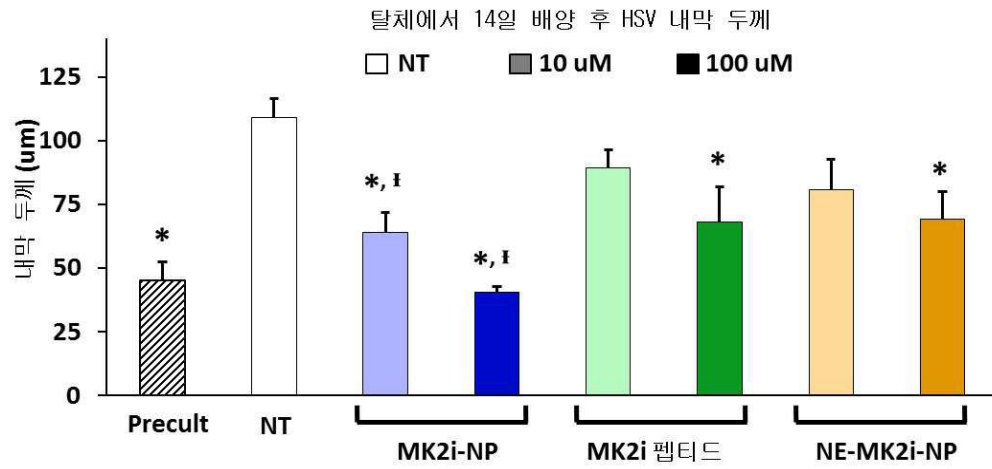
도면25



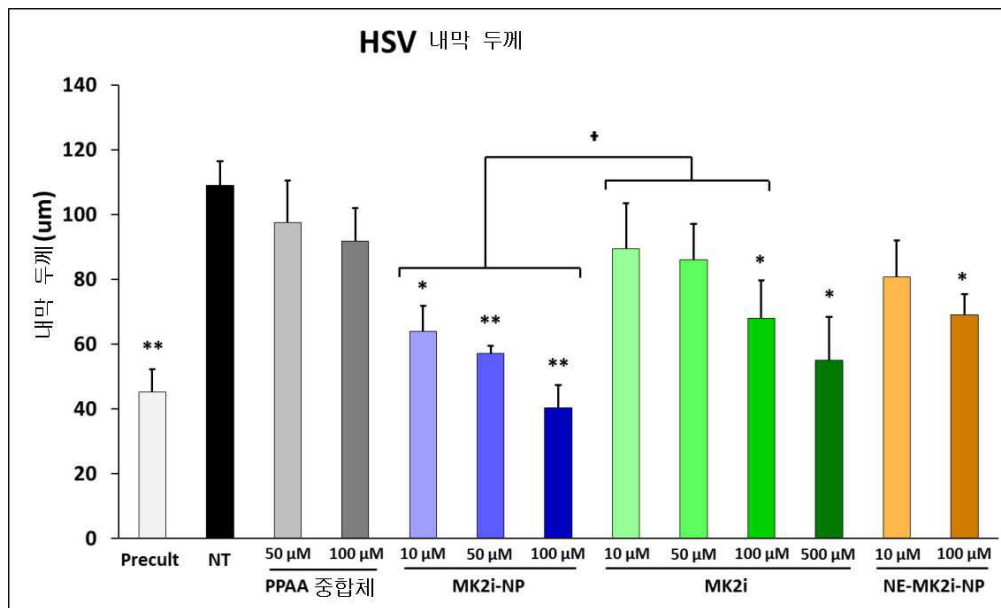
도면26



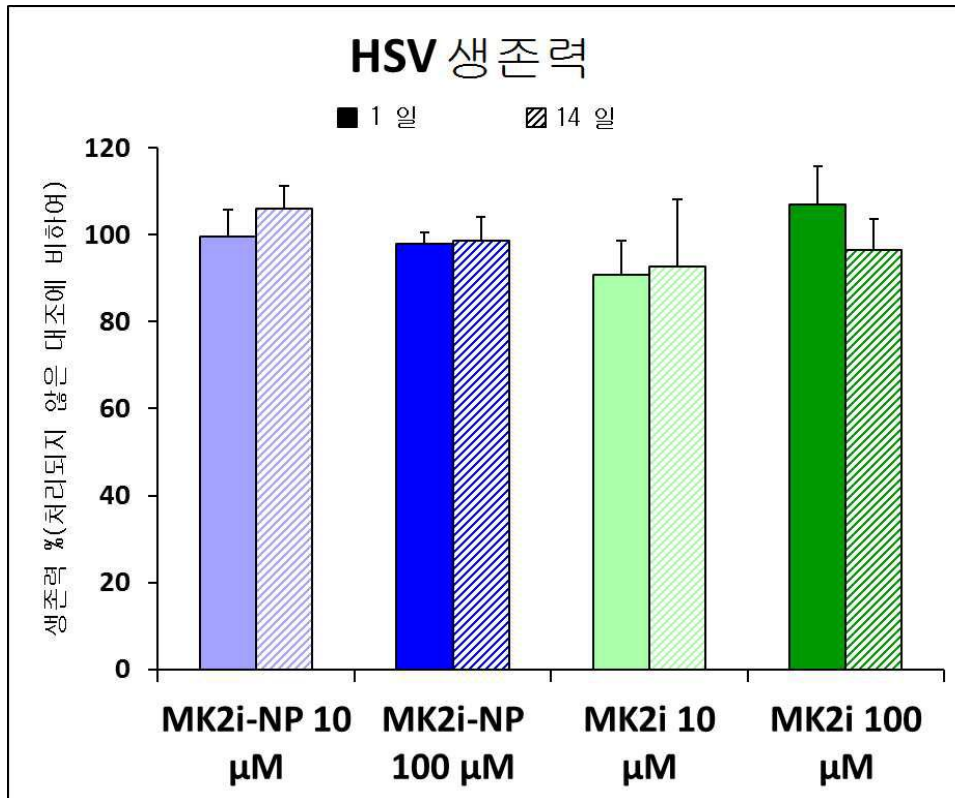
도면27



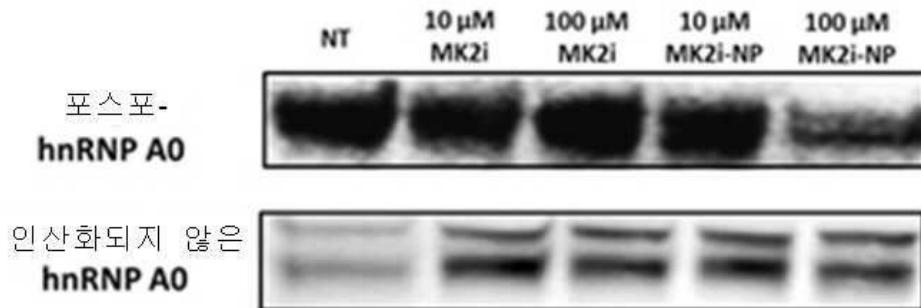
도면28



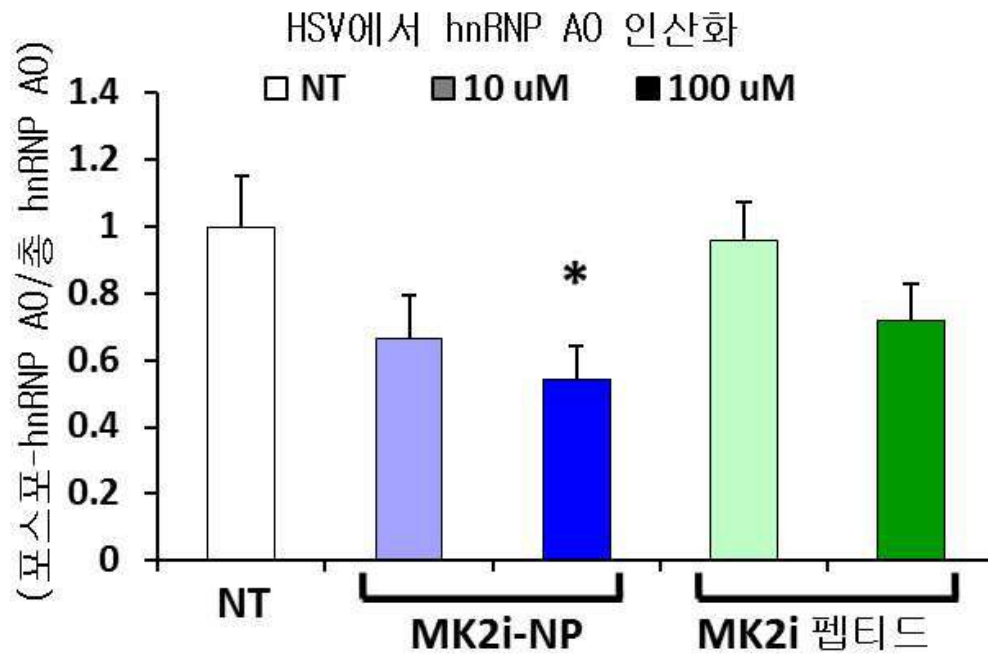
도면29



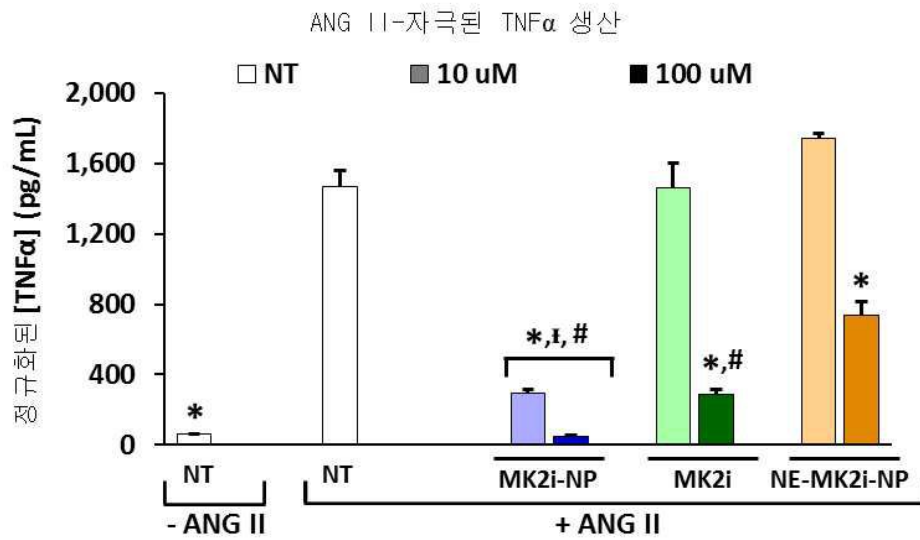
도면30



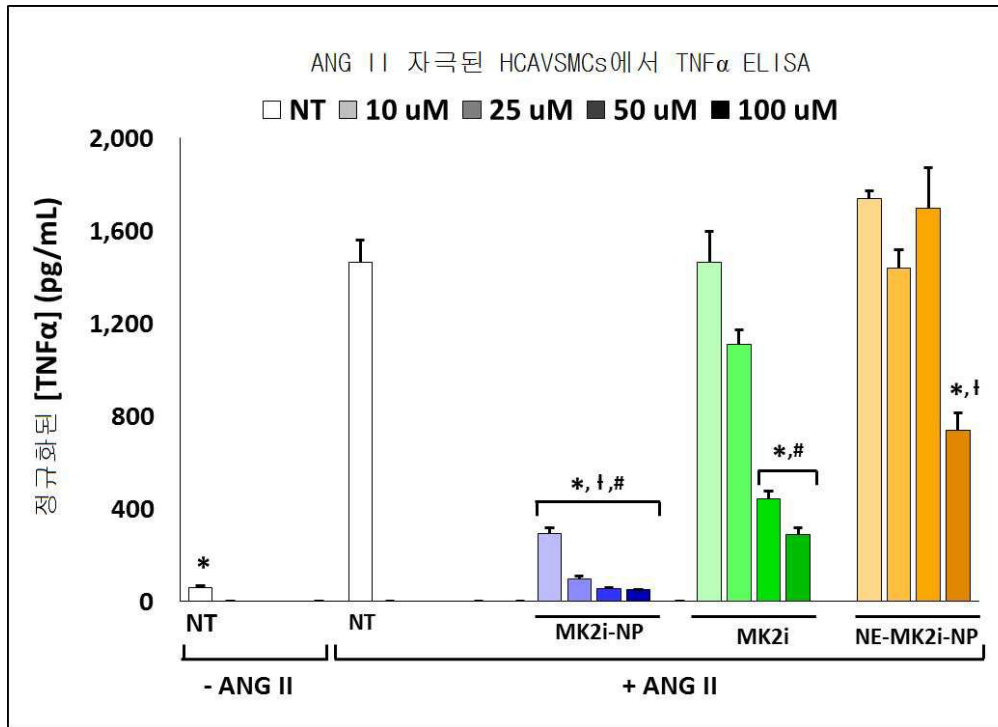
도면31



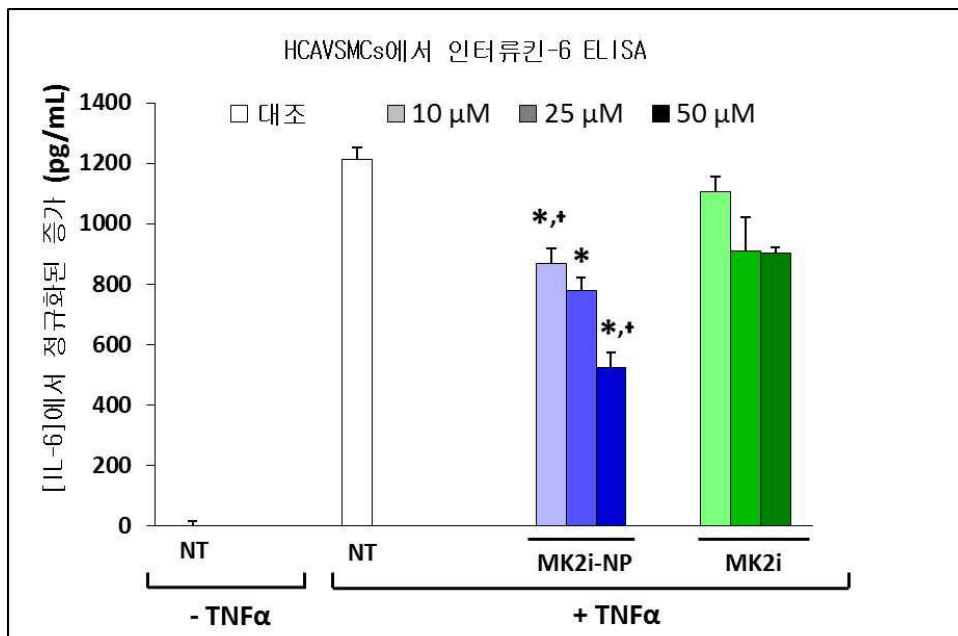
도면32



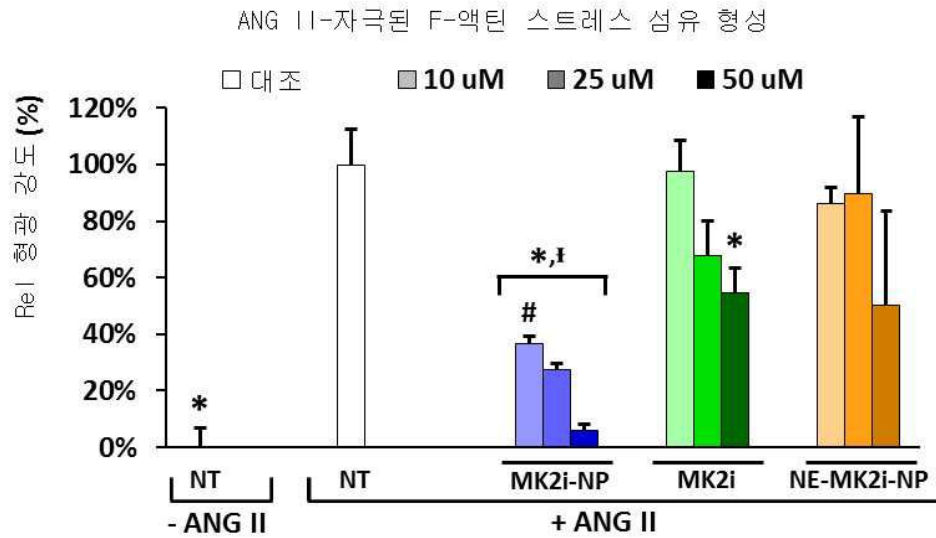
도면33



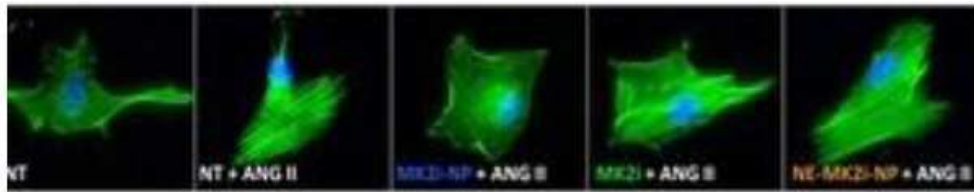
도면34



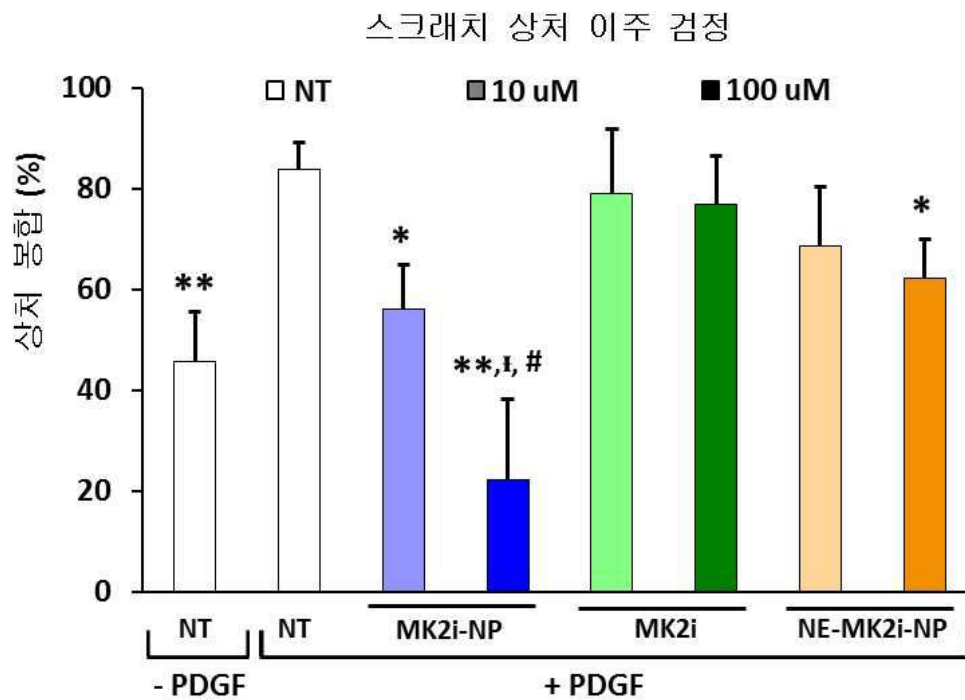
도면37



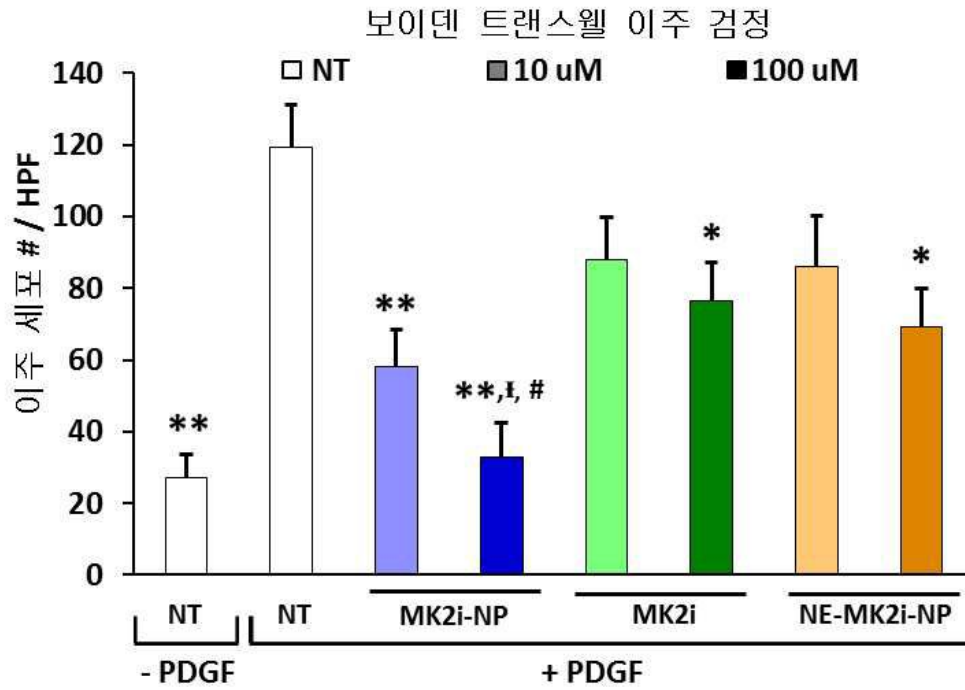
도면38



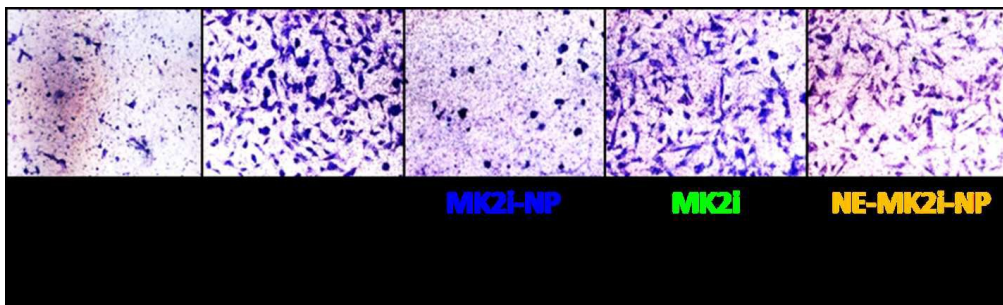
도면39



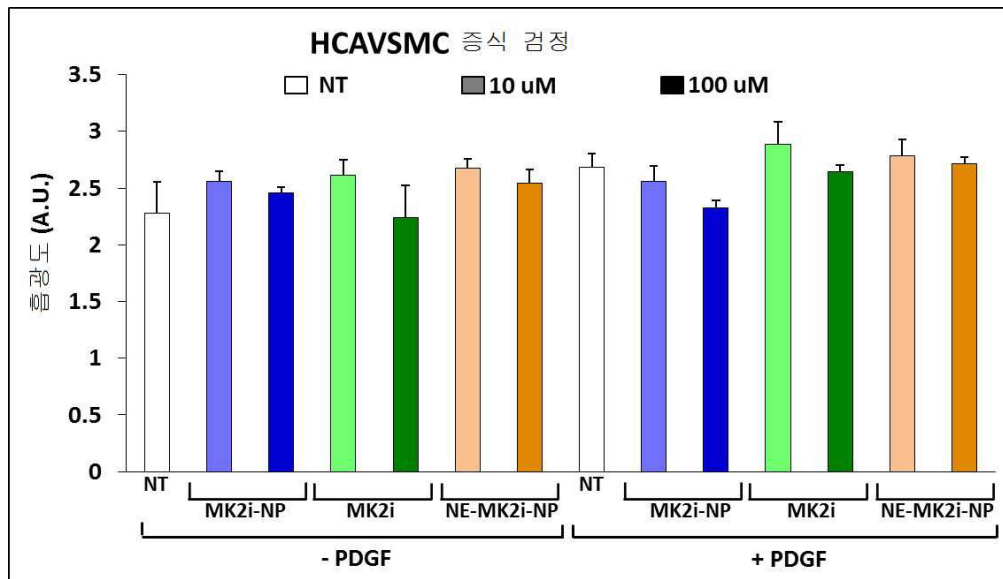
도면40



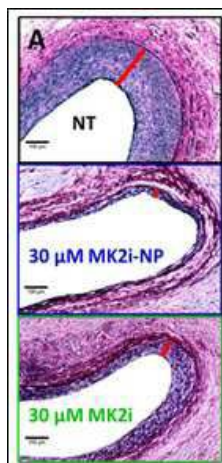
도면41



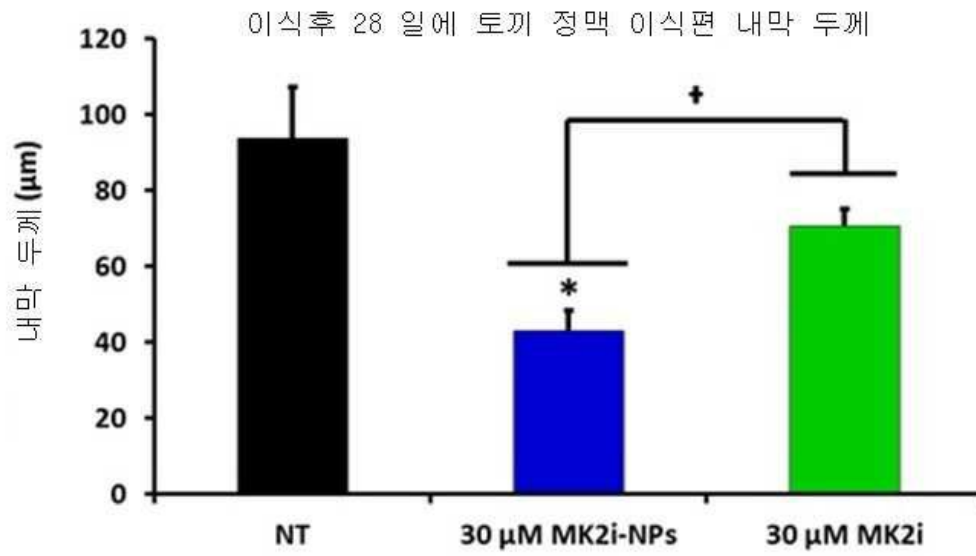
도면42



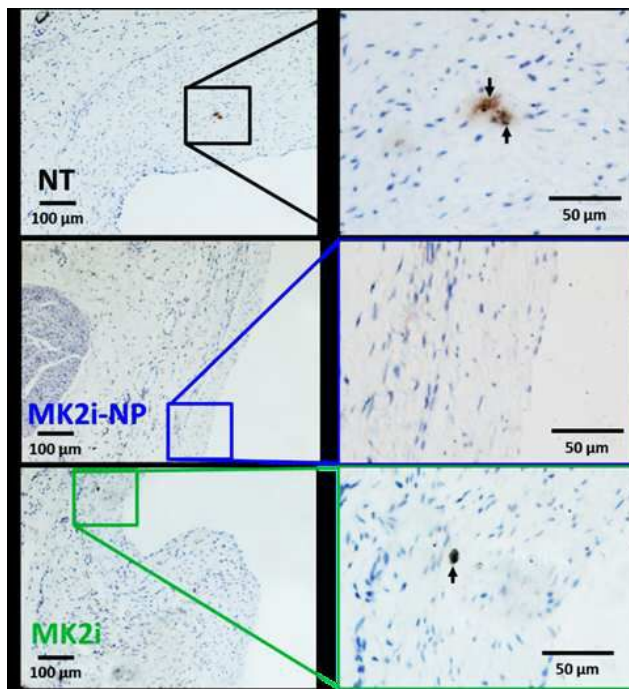
도면43



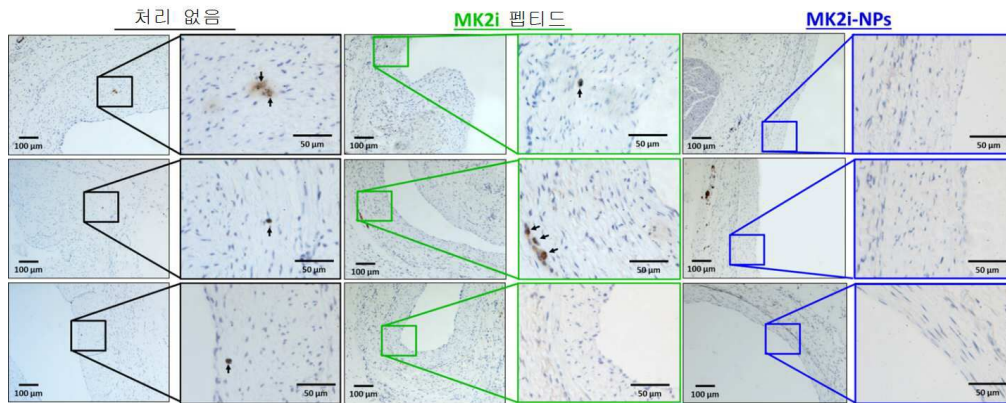
도면44



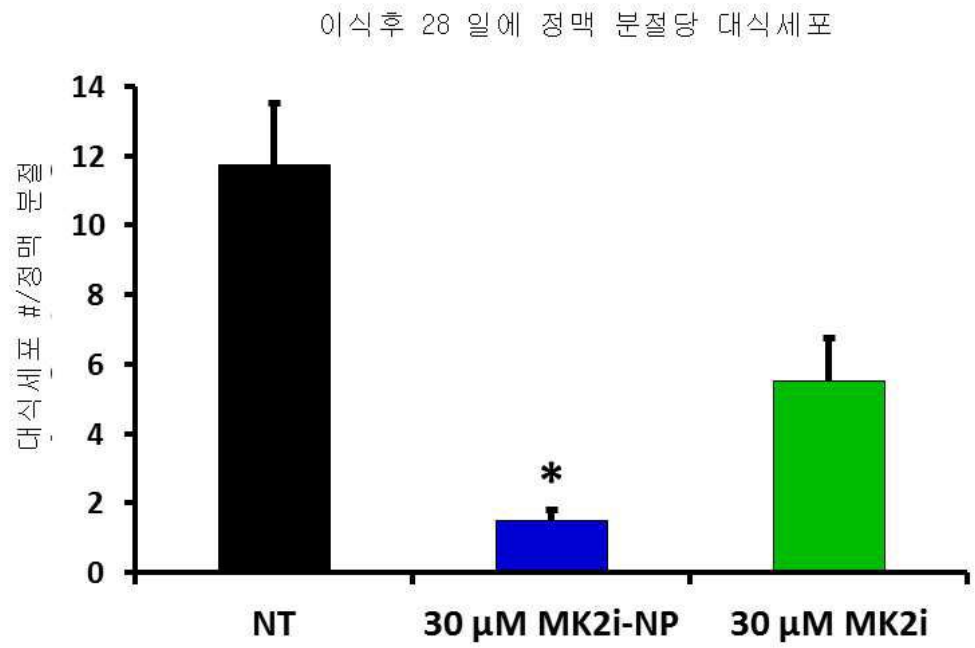
도면45



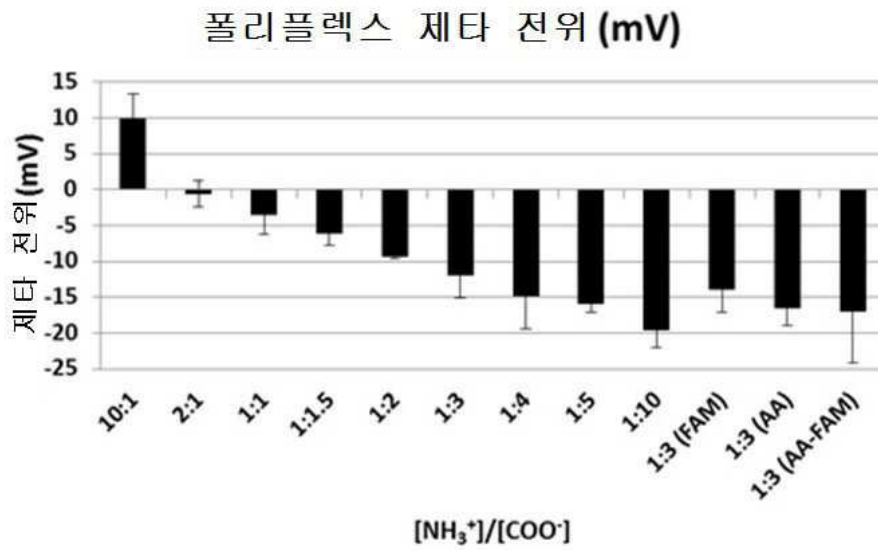
도면46



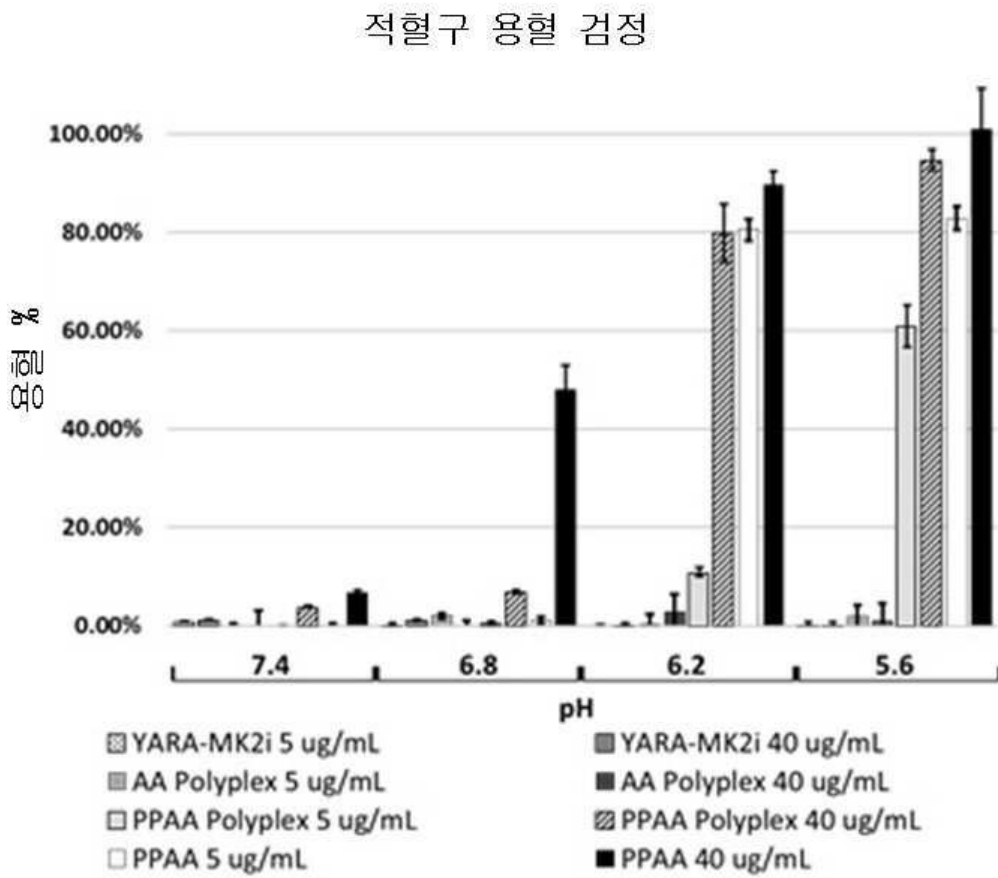
도면47



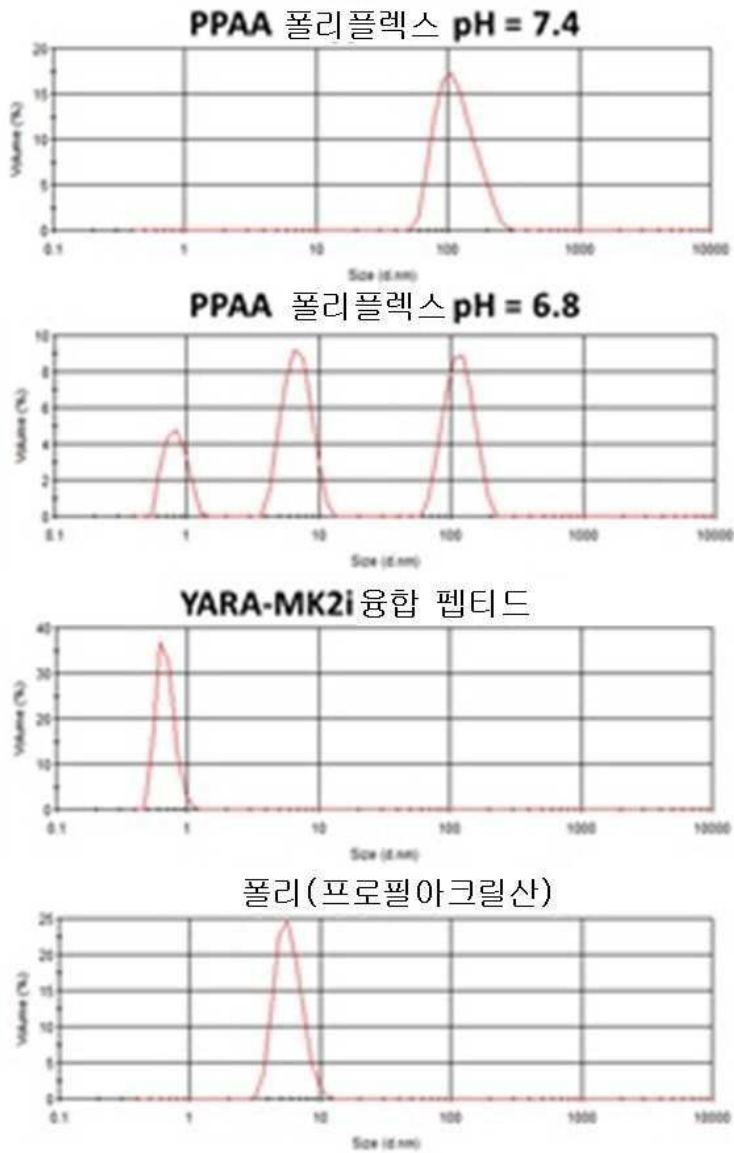
도면48



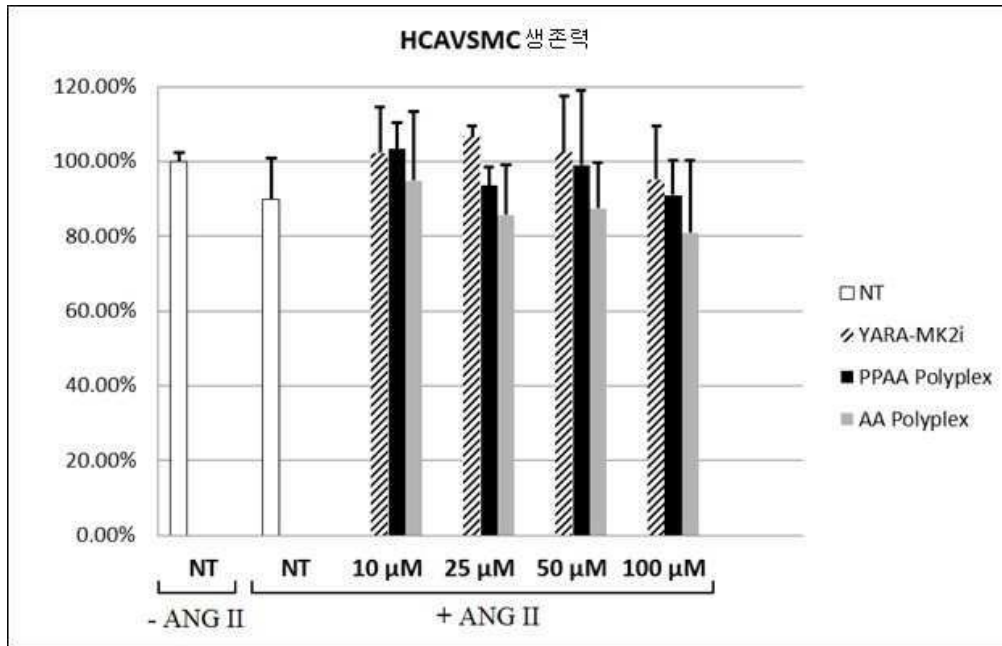
도면49



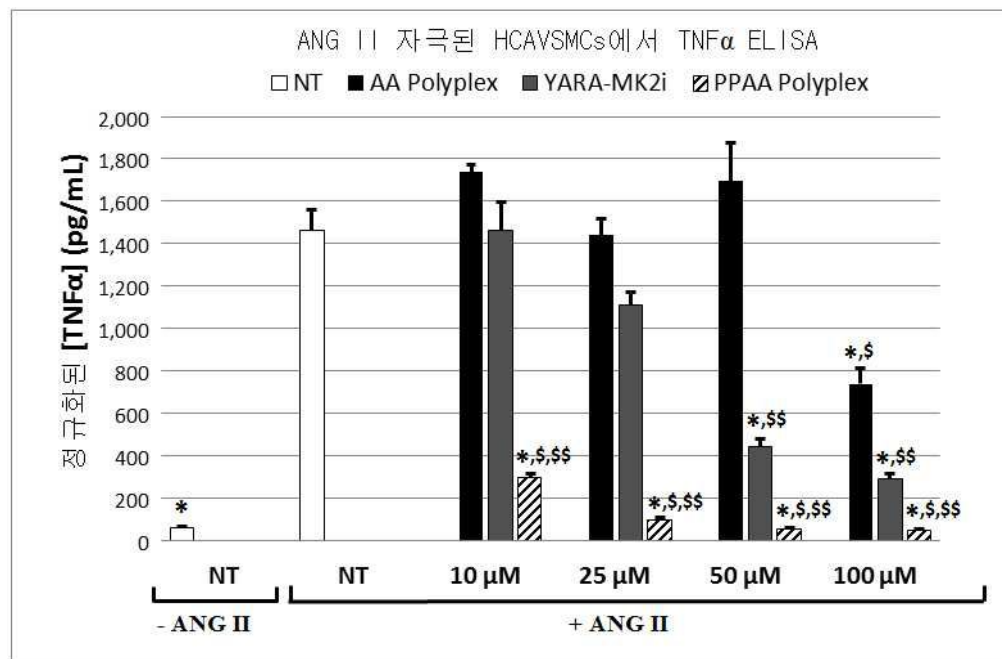
도면50



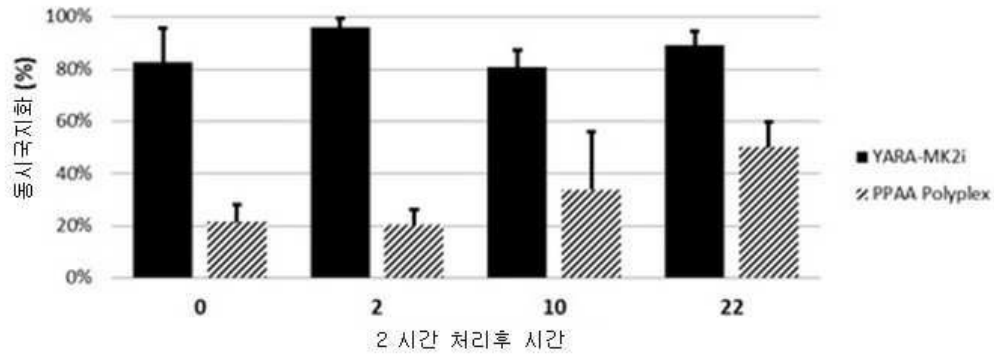
도면51



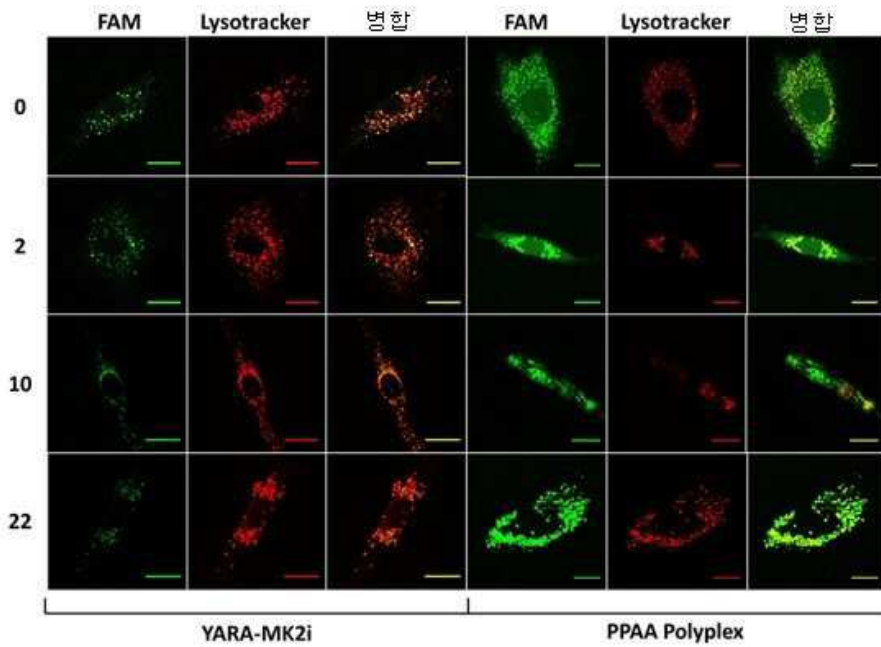
도면52



도면53



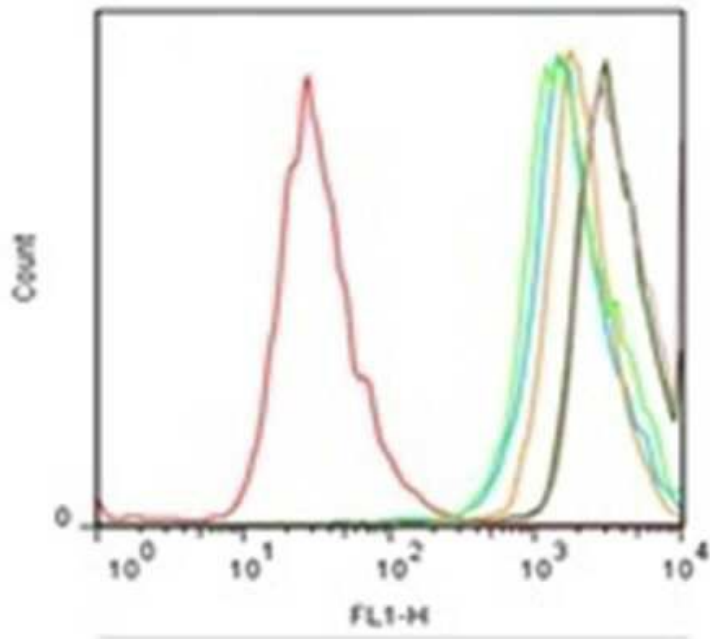
도면54



도면55



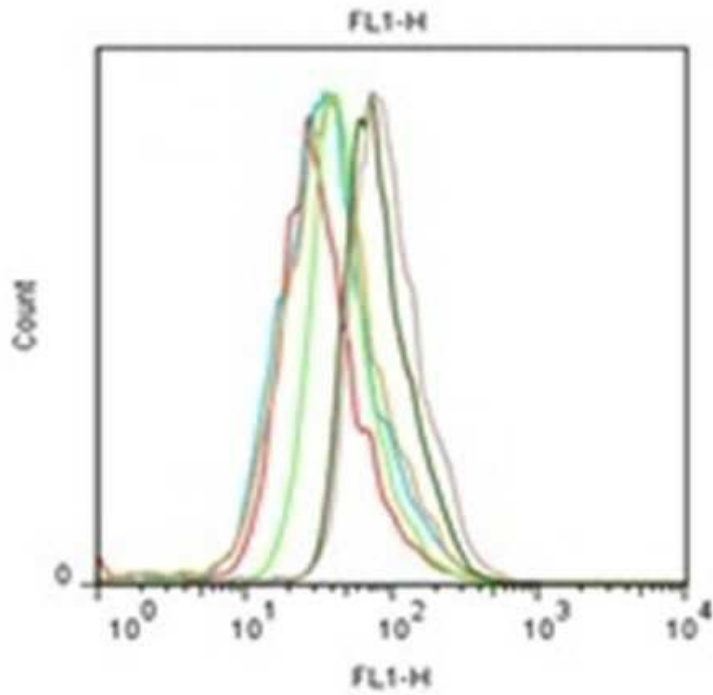
도면56



도면57



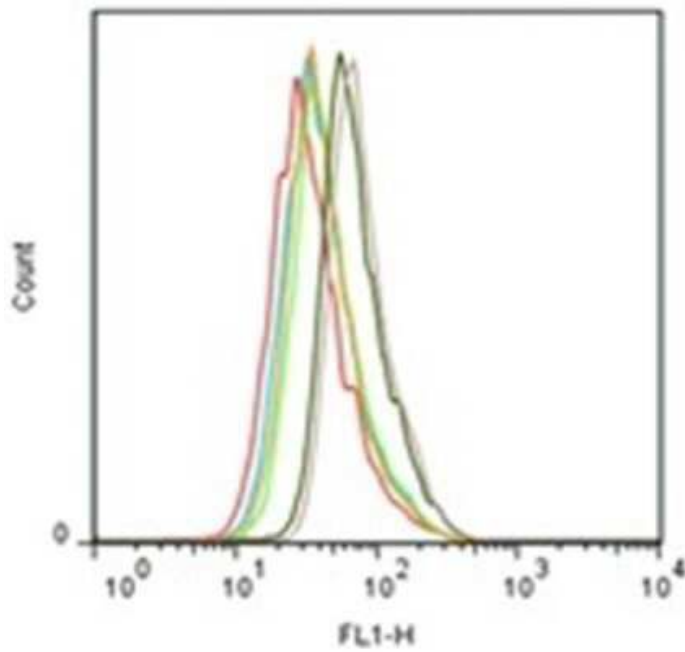
도면58



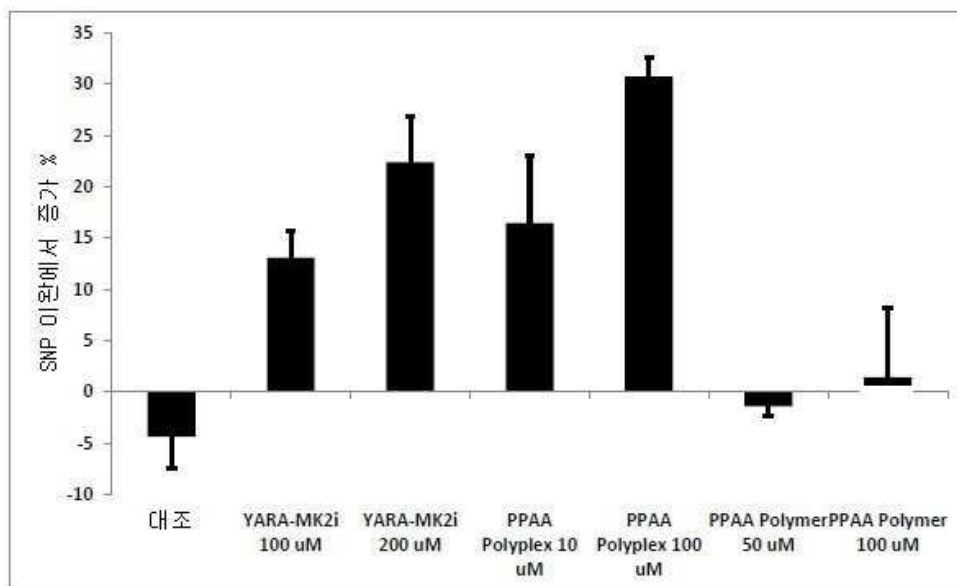
도면59



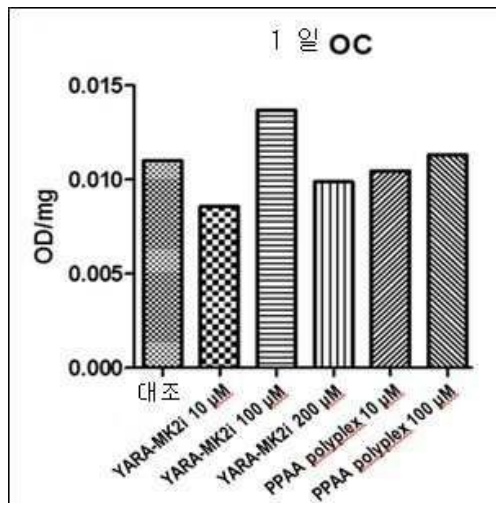
도면60



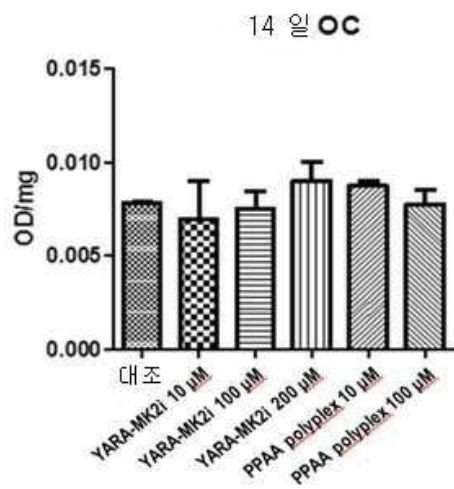
도면61



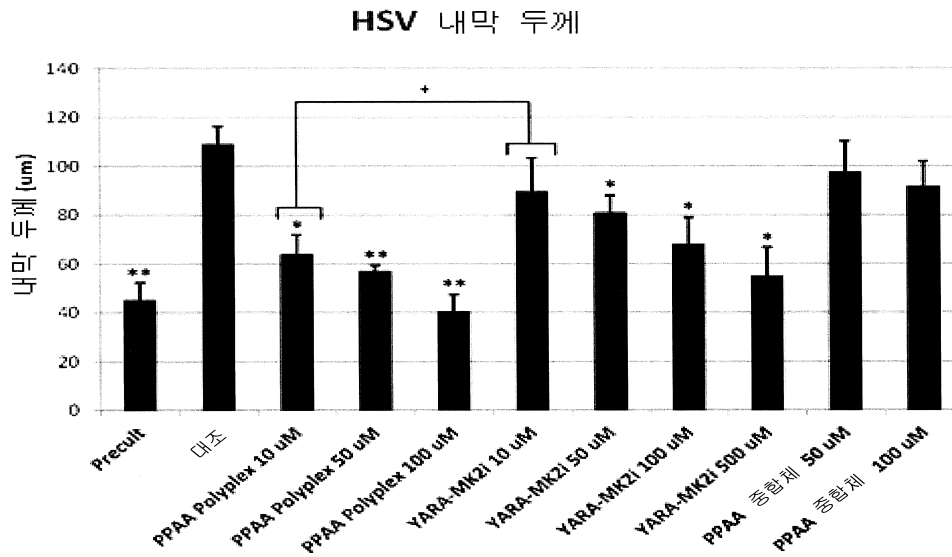
도면62



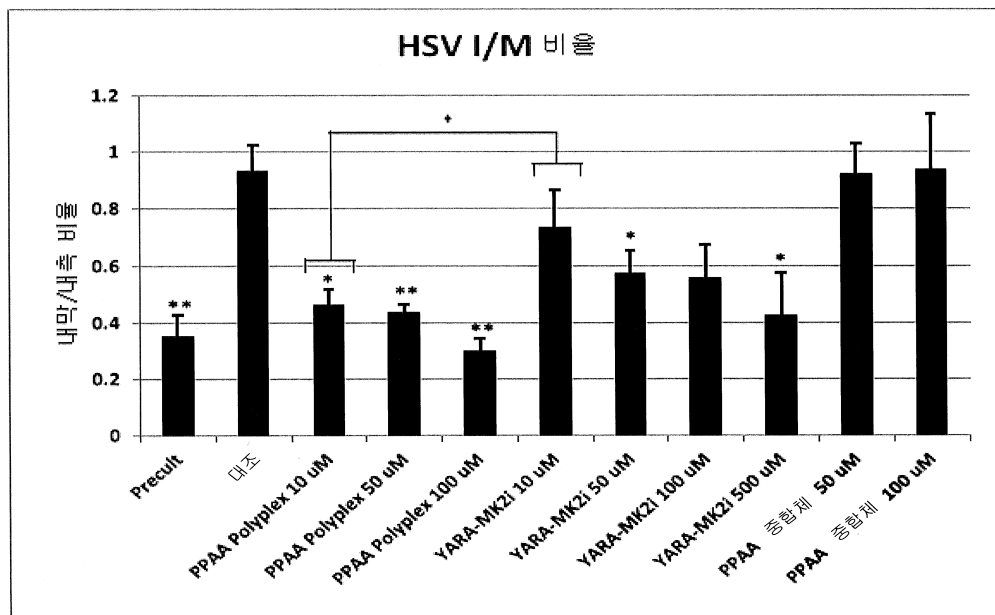
도면63



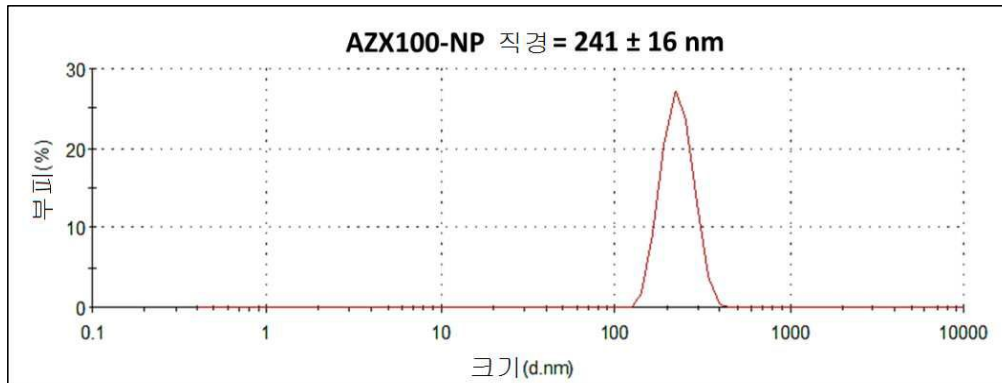
도면64



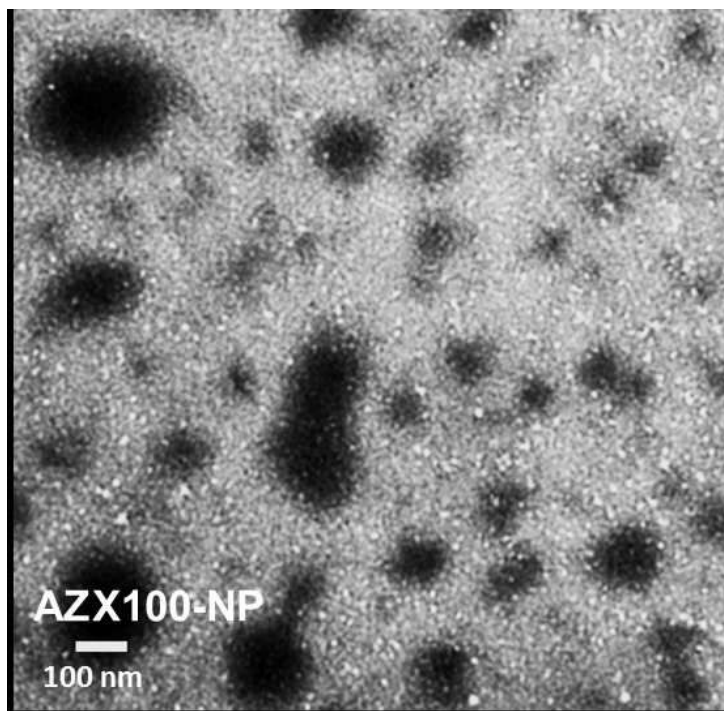
도면65



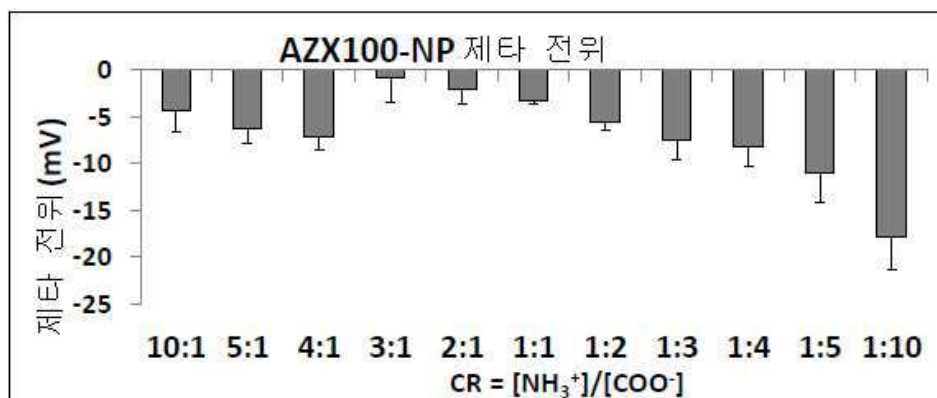
도면66



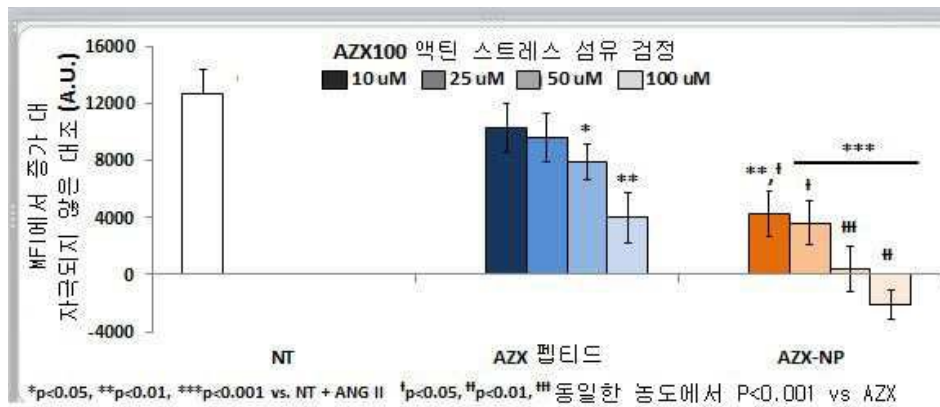
도면67



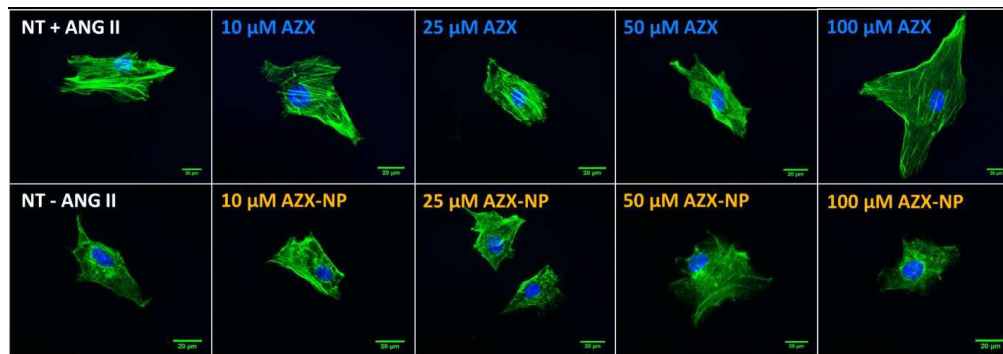
도면68



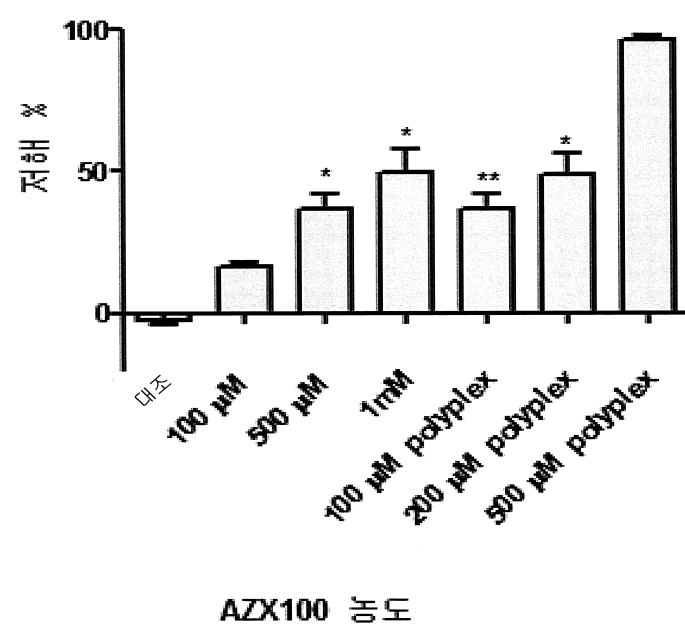
도면69



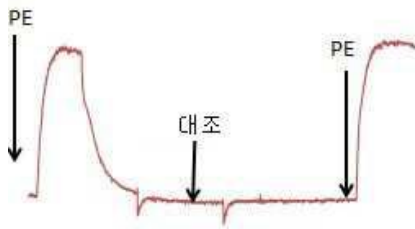
도면70



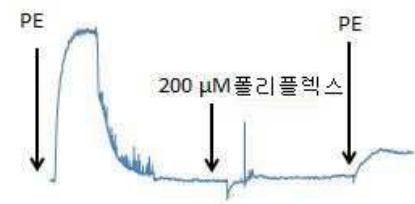
도면71



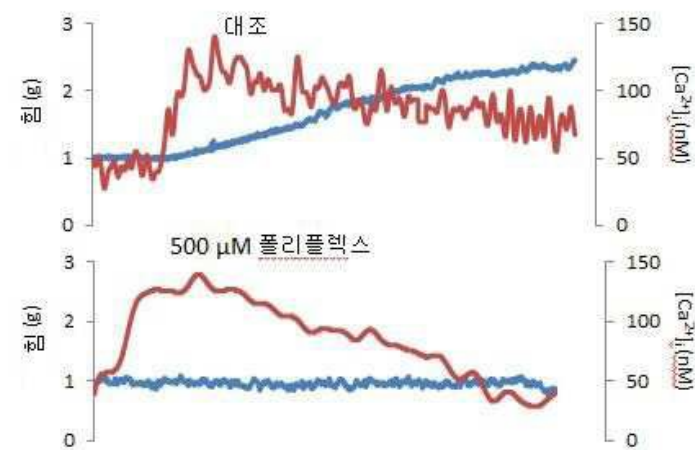
도면72



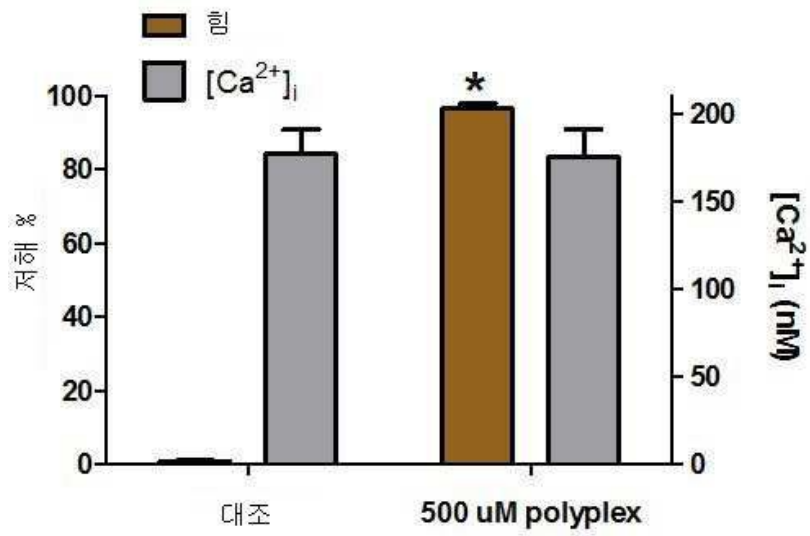
도면73



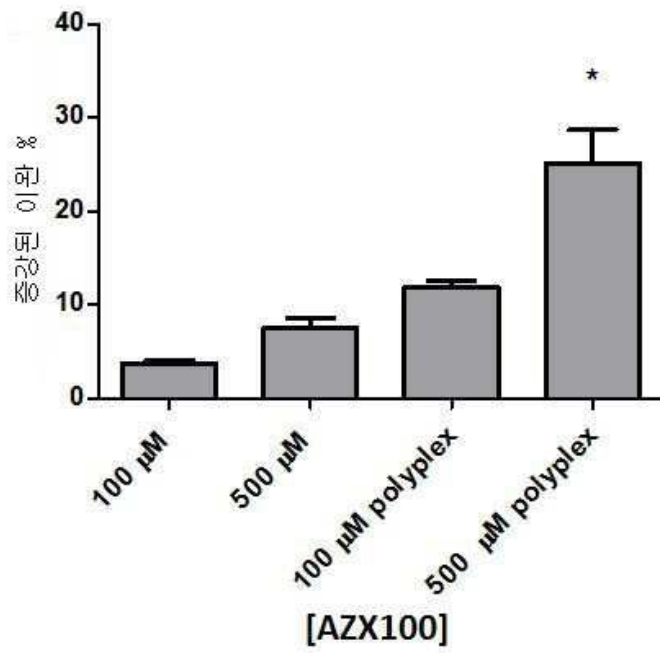
도면74



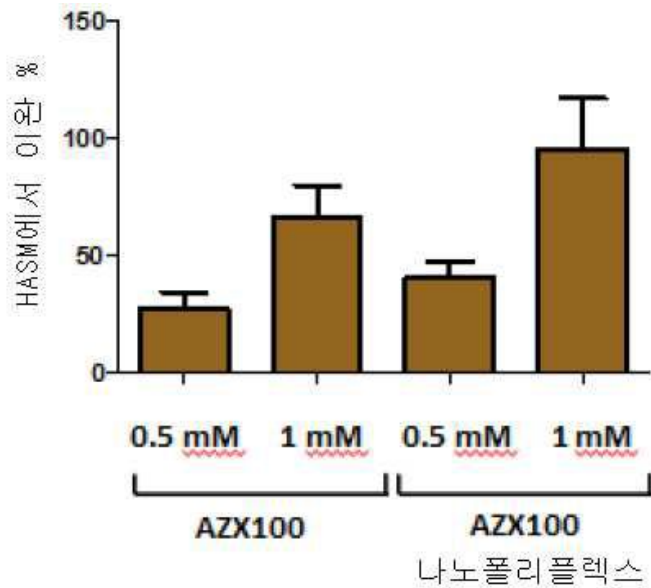
도면75



도면76

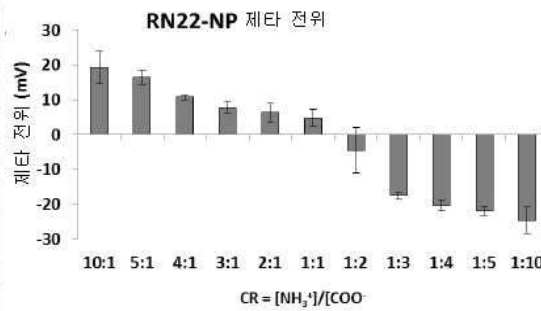


도면77



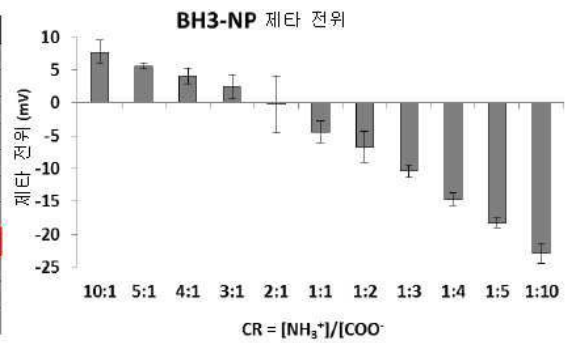
도면78

NH ₂ :COOH	Z-평균 직경 (nm)	PDI
10 to 1	27180 ± 25330 nm	1
5 to 1	1335 ± 94.78 nm	0.483
4 to 1	730.8 ± 821.2 nm*	0.656
3 to 1	11750 ± 6316 nm	1
2 to 1	3604 ± 1559 nm	0.567
1 to 1	10990 ± 3748 nm	1
1 to 2	660.5 ± 54.13 nm	0.242
1 to 3	155.4 ± 14.65 nm	0.251
1 to 4	193.0 ± 46.75 nm*	0.313
1 to 5	392.5 ± 91.81 nm*	0.458
1 to 10	261.8 ± 35.51 nm*	0.583



도면79

NH ₂ :COOH	Z-평균 직경 (nm)	PDI
10 to 1	3255 ± 1413	0.761
5 to 1	7809 ± 4860*	0.753
4 to 1	4554 ± 1662	0.958
3 to 1	5024 ± 2651	0.794
2 to 1	3888 ± 200*	0.803
1 to 1	1955 ± 929.7	0.452
1 to 2	230.8 ± 35.82	0.432
1 to 3	159.8 ± 9.405	0.298
1 to 4	197.6 ± 12.99*	0.465
1 to 5	202.9 ± 47.63*	0.784
1 to 10	1352 ± 798.5*	0.647



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Vanderbilt University

Duval, Craig

Evans, Brian C

Brophy, Colleen

Hocking, Kyle

<120> Polyplexes

<130> 11672N/13109W

<150> US 61/811,078

<151> 2013-04-11

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MK2i Sequence

<400> 1

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg

1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala Ala

20

<210

> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AZX-100 Sequence

<400> 2

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Trp Leu Arg Arg Ala

1 5 10 15

Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu Lys

20

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RN22 Sequence

<400> 3

Arg Arg Arg Lys Phe Val Arg Ser Arg Arg Pro Arg Thr Ala Ser Cys

1 5 10 15

Ala Leu Ala Phe Val Asn

20

<210> 4

<21.1> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Penetratin-Bak-BH3 Sequence

<400> 4

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

Met Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn

20 25 30

Arg Arg Tyr

35