



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0081608
(43) 공개일자 2018년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/39 (2006.01) *A61K 47/69* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/48* (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)
G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/39 (2013.01)
A61K 47/6927 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2018-7017365

(22) 출원일자(국제) 2016년11월18일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2018년06월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/062816

(87) 국제공개번호 WO 2017/087825

국제공개일자 2017년05월26일

(30) 우선권주장

62/257,569 2015년11월19일 미국(US)

(71) 출원인

아스클리픽스 테라퓨틱스, 엘엘씨.
미국 21211 메릴랜드 볼티모어 와이번 파크 드라
이브 810

(72) 발명자

브레슬러, 에릭 앤.

미국 21211 메릴랜드주 볼티모어 와이번 파크 드
라이브 810 아스클리픽스 테라퓨틱스 엘엘씨 내
그린, 조던 제이.

미국 21211 메릴랜드주 볼티모어 와이번 파크 드
라이브 810 아스클리픽스 테라퓨틱스 엘엘씨 내
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이상남

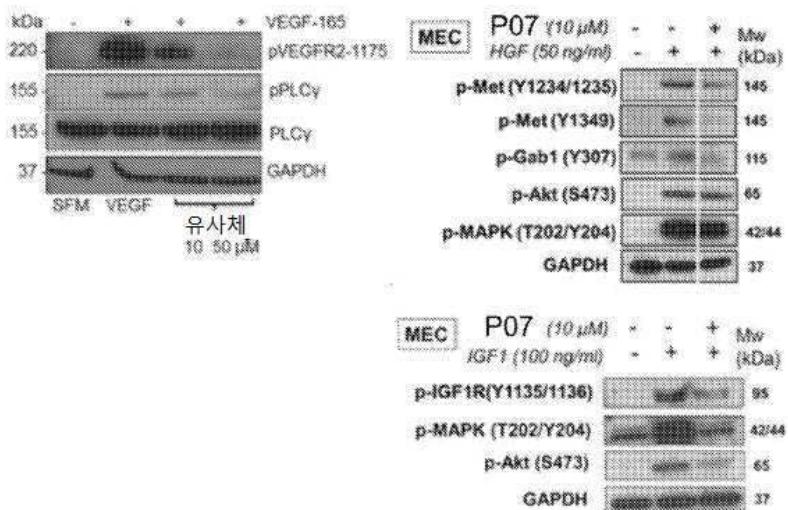
전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 발명의 명칭 항-혈관형성, 항-림프관신생, 및 항-부종성 특성을 가진 펩티드 및 나노입자 제제

(57) 요약

본 발명은 다양한 양상 및 구체예에서, 유형 IV 콜라겐의 α_5 원섬유로부터 유래된 펩티드의 제약학적 조성물, 그리고 의학적 치료를 위한 이들의 이용을 수반한다. 이를 펩티드는 $\alpha_5\beta_1$ 및 $\alpha V\beta 3$ 인테그린을 표적으로 하고, 그리고 복수 수용체를 통한 신호전달을 저해하고, 그리고 혈관 투과성, 혈관형성, 림프관신생을 저해하는데 있어서 용도를 발견한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/6935 (2017.08)

A61K 47/6937 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/48 (2013.01)

C07K 7/08 (2013.01)

G01N 33/56966 (2013.01)

G01N 33/587 (2013.01)

(72) 발명자

웬디, 니란잔 비.

미국 21211 메릴랜드주 볼티모어 와이먼 파크 드라

이브 810 아스클리픽스 테라퓨틱스 엘엘씨 내

포펠, 알렉산더 에스.

미국 21211 메릴랜드주 볼티모어 와이먼 파크 드라

이브 810 아스클리픽스 테라퓨틱스 엘엘씨 내

슈몰리, 론 비.

미국 21211 메릴랜드주 볼티모어 와이먼 파크 드라

이브 810 아스클리픽스 테라퓨틱스 엘엘씨 내

명세서

청구범위

청구항 1

미세혈관 누출을 치료하거나 예방하기 위한 방법에 있어서, 서열 번호:1 내지 6 중에서 한 가지의 아미노산 서열을 갖는 펩티드, 또는 이의 유도체의 효과량을 치료가 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 유도체는 서열 번호: 7 내지 31 중에서 한 가지의 펩티드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 환자는 플루를 앓거나 또는 이의 위험에 처해있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 펩티드는 첫 번째 플루 증상의 3 일 이내에 최초 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 펩티드는 첫 번째 플루 증상 후 최초 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 펩티드는 첫 번째 플루 증상 이전에 최초 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중에서 어느 한 항에 있어서, 펩티드는 폐에서 부종을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 펩티드는 하루 1 내지 5회 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 펩티드는 폐에 국부 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중에서 어느 한 항에 있어서, 환자는 최소한 하나의 항바이러스제 및/또는 항염증제로 치료를 받고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 조절장애된 혈관형성 또는 미세혈관 누출과 연관된 신경병리를 앓고, 이것은 임의선택적으로 MS 또는 PD인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 환자는 알츠하이머병을 앓거나 또는 알츠하이머병의 위험에 처해있는 것으로 확인되고, 그리고 펩티드는 혈액 뇌 장벽의 완전성을 유지시키고, 따라서 알츠하이머병의 개시 또는 진행을 늦추거나 또는 예방하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 환자는 알츠하이머병의 치료를 위한 최소한 하나의 추가 작용제로 치료를 받고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

청구항 11 내지 13 중에서 어느 한 항에 있어서, 웹티드는 하루 1 내지 5회 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 환자는 출혈열을 앓거나 또는 이의 위험에 처해있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 환자는 에볼라 바이러스를 앓는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 환자는 출혈열의 치료를 위해 최소한 하나의 항바이러스제로 치료를 받고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

청구항 15 내지 17 중에서 어느 한 항에 있어서, 웹티드는 하루 1 내지 5회 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

청구항 1에 있어서, 환자는 대뇌 말라리아를 앓는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 웹티드는 대뇌 말라리아와 연관된 대뇌 부종 및/또는 허혈을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

청구항 19에 있어서, 환자는 항말라리아 요법을 받고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

청구항 19에 있어서, 웹티드는 대뇌 말라리아를 앓는 환자에서 혈액 뇌 장벽 및 혈관 완전성을 유지시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

청구항 19 내지 22 중에서 어느 한 항에 있어서, 웹티드는 하루 1 내지 5회 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

암을 치료하기 위한 방법에 있어서, 서열 번호:1 내지 6의 아미노산 서열을 갖는 웹티드, 또는 이의 유도체의 효과량을 면역 체크포인트 저해제로 요법을 받고 있거나 또는 받을 준비를 하고 있는 암 환자에게 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 유도체는 서열 번호: 7 내지 31 중에서 한 가지의 웹티드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

청구항 24에 있어서, 면역 체크포인트 저해제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 또는 항-CTLA-4 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

청구항 24 또는 26 중에서 어느 한 항에 있어서, 암은 비소세포 폐암, 흑색종, 전립선암, 전이성 신장 세포 암에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

청구항 24 내지 27 중에서 어느 한 항에 있어서, 암은 PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4에 대해 양성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

청구항 24 내지 28 중에서 어느 한 항에 있어서, 체크포인트 저해제 요법은 PD-1 및 PD-L1 또는 CTLA-4 및 B7 사이의 상호작용을 저해하는 작용제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

PLGA-PEG 공중합체 및 인테그린을 표적으로 하는 접합된 패티드를 포함하는 나노입자.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 패티드는 서열 번호:1 내지 6 중에서 한 가지의 아미노산 서열, 또는 이의 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 유도체는 서열 번호: 7 내지 31 중에서 한 가지의 패티드인 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 33

청구항 30 내지 32 중에서 어느 한 항에 있어서, 나노입자는 PLGA-PEG-패티드 접합체로부터 형성되는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 나노입자는 혈관형성 및/또는 림프관신생의 저해에 효과적인 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 35

청구항 33에 있어서, 종합체 중에서 최소한 50%는 접합된 패티드를 갖는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 36

청구항 30 내지 35 중에서 어느 한 항에 있어서, 캡슐화된 활성제를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 나노입자는 활성제의 지속된 방출을 제공하는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 38

청구항 36 또는 37에 있어서, 활성제는 화학요법 작용제인 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 39

청구항 36 또는 37에 있어서, 활성제는 패티드 작용제, 또는 표적화된 항암 요법인 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 40

청구항 30 내지 39 중에서 어느 한 항에 있어서, 약 50 nm 내지 약 500 nm, 또는 약 50 nm 내지 약 100 nm 이내에 평균 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 41

청구항 30 내지 40 중에서 어느 한 항에 있어서, 나노입자는 표면에 접합된 추가 약물 또는 표적화 작용제를 내포하는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 42

청구항 40에 있어서, 나노입자는 -10 내지 -40 mV의 범위 내에 제타 전위를 갖는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 43

청구항 30 내지 42 중에서 어느 한 항에 있어서, 나노입자는 구형인 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 44

청구항 30 내지 42 중에서 어느 한 항에 있어서, 입자는 비-구형인 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 45

서열 번호: 1 내지 6 중에서 한 가지의 펩티드, 또는 이의 유도체를 캡슐화하는 마이크로입자에 있어서, 나노입자 또는 마이크로입자는 지속성 저장소를 제공하는 것을 특징으로 하는 마이크로입자.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 유도체는 서열 번호: 7 내지 31 중에서 한 가지의 펩티드인 것을 특징으로 하는 마이크로입자.

청구항 47

청구항 45 또는 46에 있어서, 입자 중합체는 PLGA-PEG 중합체로 본질적으로 구성되는 것을 특징으로 하는 마이크로입자.

청구항 48

청구항 45 또는 47 중에서 어느 한 항에 있어서, 입자는 주 1회 이내 또는 월 1회 이내 투여되는 것을 특징으로 하는 마이크로입자.

청구항 49

청구항 45 내지 48 중에서 어느 한 항에 있어서, 마이크로입자는 약 $1 \mu\text{m}$ 내지 약 $100 \mu\text{m}$ 의 범위에서 평균 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 마이크로입자.

청구항 50

청구항 45 내지 49 중에서 어느 한 항에 있어서, 입자는 구형인 것을 특징으로 하는 마이크로입자.

청구항 51

청구항 45 내지 50 중에서 어느 한 항에 있어서, 입자는 타원체형인 것을 특징으로 하는 마이크로입자.

청구항 52

연령-관련된 황반 변성, 당뇨병성 황반 부종, 망막 정맥 폐색, 또는 당뇨병성 망막병증을 치료하기 위한 방법에 있어서, 청구항 30 내지 51 중에서 어느 한 항의 나노입자 또는 마이크로입자를 치료가 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 나노입자 또는 마이크로입자는 안구내 주사에 의해 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

청구항 52 또는 53에 있어서, 나노입자 또는 마이크로입자는 약 하루 1회 내지 약 월 1회, 내지 약 6 개월마다 1회 주사되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

인테그린의 확인을 위한 방법에 있어서, 청구항 30의 나노입자를 하나 또는 그 이상의 세포와 접촉시키고, 그리고 세포에 나노입자의 결합을 가시화하거나 또는 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

청구항 55에 있어서, 세포는 용해 상태에 있거나 또는 배양 중인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

청구항 55에 있어서, 나노입자가 환자에게 투여되고, 인테그린 과다발현 혈관구조가 영상화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

고형 종양을 치료하는 방법에 있어서, 청구항 30 내지 44 중에서 어느 한 항의 나노입자의 효과량을 치료가 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 고형 종양은 교모세포종 또는 유방암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 유방암인 삼중 음성 유방암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61

혈관형성 또는 혈관 누출에 의해 특징되는 질환을 치료하기 위한 방법에 있어서, 청구항 30 내지 44 중에서 어느 한 항의 나노입자의 효과량을 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 우선권

[0002] 본 출원은 2015년 11월 19일자 제출된 U.S. 가출원 번호 62/257,569에 우선권을 주장하고, 이것은 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다.

배경 기술

[0003] 배경

[0004] 콜라겐 유형 IV로부터 유래된 웨티드는 혈관형성 및 림프관신생을 저해하는 그들의 잠재력에 대해 설명되었다. 유형 IV 콜라겐의 α5 원섬유의 비콜라겐성 도메인으로부터 유래된 웨티드 모티프는 US 특허 9,056,923에서 설명되는데, 이것은 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다. 가령, 모티프 NINNV를 포함하는 웨티드는 인간 배꼽 정맥 내피 세포 (HUVEC)의 증식, 이주 및 소관 형성을 저해하는 것으로 설명된다. Rosca et al., Structure-activity relationship study of collagen derived anti-angiogenic biomimetic peptides, *Chem. Biol. Drug Des.* 80(1):27-37 (2012).

[0005] 제약학적 이용 및 산물 개발을 뒷받침하고 및/또는 주도하기 위해, 이를 웨티드의 생물학적 표적, 생물학적 활성 및 제약학적 성질의 더욱 우수한 이해가 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

간단한 설명

[0007]

본 발명은 다양한 양상 및 구체예에서, 유형 IV 콜라겐의 α_5 원섬유로부터 유래된 웨პ티드의 제약학적 조성물, 그리고 의학적 치료를 위한 이들의 이용을 수반한다. 예시적인 웨პ티드는 아미노산 서열 LRRFSTAPFAFIDINDVINF (서열 번호:2), LRRFSTAPFAFININNVINF (서열 번호:3), LRRFSTAPFAFIDINDVINW (서열 번호:4), FTNINNNVTN (서열 번호:5), 또는 FTDINDVTN (서열 번호:6), 또는 본원에서 설명된 다양한 유도체를 비롯하여, 임의의 전술한 것들의 유도체인 아미노산 서열을 포함한다. 이들 웨პ티드는 $\alpha_5\beta_1$ 및 $\alpha V\beta 3$ 인테그린을 표적으로 하고, 그리고 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR), 간세포 성장 인자 수용체 (HGFR), 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGFR) 및 혈소판 유래 성장 인자 수용체 (PDGFR)를 비롯한 복수 수용체를 통한 신호전달을 저해한다.

[0008]

일부 양상에서, 본 발명은 미세혈관 누출 또는 투과성을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 웨პ티드 작용제의 효과량을 치료가 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 미세혈관 누출이 관련되거나 또는 병리를 악화시킬 수 있는 질환은 그 중에서도 특히, 인플루엔자 (플루), 알츠하이머병, 신경병리 (가령, 다발성 경화증), 출혈열, 대뇌 말라리아, 황반 변성, 황반 부종 (가령, 당뇨병성 황반 부종), 망막 정맥 폐색 (RVO), 당뇨병성 망막병증, 습성 AMD, 급성 호흡 곤란 증후군, 폐부종, 천식, COPD, 호흡기 합포체 바이러스, SARS, 폐렴, 미세혈관 누출, 그리고 조직 또는 장기 이식과 연관된 혈관 투과성을 포함한다.

[0009]

다른 양상에서, 본 발명은 암을 치료하고, 그리고 특히, 체크포인트 저해제 요법을 향상시키기 위한 방법을 제공한다. 구체적으로, 이들 구체예에서 방법은 혈관형성을 저해하고, 그리고 수지상 세포 성숙 및 더욱 견실한 림프구 내피 트래피킹을 허용함으로써 면역 체크포인트 저해제 요법을 향상시킨다. 상기 방법은 상기 웨პ티드의 효과량을 면역 체크포인트 저해제로 요법을 받고 있는 암 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 상기 웨პ티드 또는 제약학적 조성물은 면역 체크포인트 저해제 요법과 함께 (또는 동안) 투여될 수 있다. 대안으로, 환자는 상기 웨პ티드, 그 이후에 면역 체크포인트 저해제 요법으로 1 내지 4 주 동안 치료될 수 있다.

[0010]

웨პ티드는 전신 전달 또는 국부 전달용으로 조제될 수 있고, 그리고 일부 구체예에서, 웨პ티드는 중합성 나노입자 또는 마이크로입자 담체로 조제된다. 일부 구체예에서, 본 발명은 PLGA-PEG 공중합체 및 인테그린을 표적으로 하는 접합된 웨პ티드, 예를 들면, 서열 번호: 1 내지 6 중에서 한 가지의 웨პ티드, 또는 이들의 유도체 및/또는 조합을 포함하는 나노입자를 제공한다. 일부 구체예에서, 나노입자는 상기 웨პ티드, 또는 앞서 설명된 바와 같은 다른 결합 작용제에 공유 연결되는 조정가능한 크기의 폴리(젖산-코-글리콜산) 폴리에틸렌 글리콜 (PLGA-PEG) 블록 공중합체로부터 형성된다. 다양한 비율에서 접합된 및 접합되지 않은 중합체의 혼합물은 표면 상에 표적화 작용제의 원하는 밀도를 갖는 나노입자를 창출할 수 있다. 입자는 순환 성질, 생체분포 및 분해 동역학을 비롯한 원하는 약력학적 이점을 제공하도록 설계될 수 있다. 이런 파라미터는 그 중에서도 특히, 크기, 모양, 표면 전하, 중합체 조성, 리간드 접합 화학, 웨პ티드 접합 밀도를 포함한다.

[0011]

일부 구체예에서, 나노입자는 캡슐화된 활성제를 더욱 포함하는데, 이것은 플루, 알츠하이머병, 출혈열, 대뇌 말라리아, 암, 황반 변성 또는 황반 부종, 장기 또는 조직 이식, 그리고 본원에서 설명된 것들을 비롯하여, 미세혈관 누출에 의해 특징되는 질환의 치료를 위한 본원에서 개시된 활성제일 수 있다. 일부 구체예에서, 캡슐화된 작용제는 본원에서 설명된 웨პ티드이다. 나노입자는 일부 구체예에서 실제적으로 구형이긴 하지만, 임의선택적으로, 소실을 방지하기 위해 세포, 그리고 특히, 면역계 세포와의 상호작용에 영향을 주도록 비-구형일 수 있다.

[0012]

일부 구체예에서, 입자는 약물 화물 (가령, 본원에서 설명된 웨პ티드 및/또는 다른 작용제)을 캡슐화하는 마이크로입자이다. 입자는 표면에 접합된 웨პ티드를 내포하거나 또는 내포하지 않을 수 있다. 이들 구체예에서, 입자는 웨პ티드의 지속된 방출을 제공하기 위한 지속성 약물 저장소를 제공할 수 있다.

[0013]

본 발명의 다른 양상 및 구체예는 다음의 상세한 설명으로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도면의 간단한 설명

도면 1은 P07이 미세혈관 내피 세포에서 VEGF, HGF 및 IGF 신호전달을 저해한다는 것을 보여준다.

도면 2는 P07이 생쥐 모형에서 과도한 혈관 누출에 의해 유발된 망막 박리를 저해한다는 것을 보여준다.

도면 3은 P07이 토끼 눈에서 VEGF 유도된 누출 모형에서 혈관 누출을 저해한다는 것을 보여준다. 누출은 1.0에서 세팅되는 처리되지 않은 것과 비교된다.

도면 4는 P07이 정위 삼중 음성 유방암 (TBNC) 이종이식편의 성장을 용량 의존성 방식으로 저해한다는 것을 보여준다.

도면 5는 P07이 정위 TNBC 이종이식편에서 혈관신생을 저해한다는 것을 보여준다.

도면 6은 P08 접합에 대한 HPLC 결과를 보여주는데, 이것은 P08이 PLGA-PEG-NHS 공중합체에 효율적으로 접합되고 역상 HPLC를 통해 정량되었다는 것을 증명한다.

도면 7은 N07이 대략 70-80 nm의 Z-평균 직경을 전시한다는 것을 보여준다. 약간의 크기 증가가 접합된 P07이 나노입자 상에 존재하는 표본에서 목격된다.

도면 8은 N07이 탈이온수에서 음성 제타 전위를 전시한다는 것을 보여주는데, 이것은 PEG 상에서 상이한 말단기를 이용하여 -25 mV 주변에서 아주 약간 조정가능하다. 중성은 메톡시-종결된 PEG이다. 음성은 카르복시-종결된 PEG이다.

도면 9는 인테그린 $\alpha v\beta 3$ 및 $\alpha 5\beta 1$ 에 입자의 결합을 보여준다.

도면 10은 다양한 펩티드로부터 경쟁 하에 인테그린 $\alpha v\beta 3$ 에 입자의 결합을 보여준다.

도면 11은 MDA-MB-231 및 MEC 세포에 N07 입자의 결합을 보여준다.

도면 12는 N07로 사전 처리된 평판에 세포의 부착을 계측하는 부착 저해 검정 결과를 보여준다. %는 접합된 P07을 갖는 PLGA-PEG 분자의 양을 지칭한다. "+" 또는 "-"는 캡슐화된 P07의 존재 또는 부재를 지칭한다.

도면 13은 MEC 세포의 증식에 대한 N07의 저해 효과를 보여준다. %는 접합된 P07을 갖는 PLGA-PEG 분자의 양을 지칭한다. "+" 또는 "-"는 캡슐화된 P07의 존재 또는 부재를 지칭한다.

도면 14는 P07로 사전 처리된 평판에 세포의 부착을 계측하는 부착 검정 결과를 보여준다.

도면 15는 이종 유체 기술을 이용하여, M07로 또한 불리는, 85/15 PLGA 및 P07로 만들어진 마이크로입자 (MPs)를 보여준다. 동결건조된 표본은 SEM으로 영상화되었다. (A) 0% 부하; (B) 중량으로 0.6% 최종 펩티드 부하; (C) 1% 최종 부하. 도시된 척도는 10 μ M이다.

도면 16은 2.25x 신장된 M07을 보여준다. 동결건조된 표본은 SEM으로 영상화되었다. (A) 블랭크 MPs; (B) M07; (C) 확대된 블랭크 MPs; (D) 확대된 M07.

도면 17은 비신장된 (왼쪽) 또는 2x 신장된 (오른쪽) 펩티드 부하된 NPs의 TEM 이미지를 보여준다.

도면 18은 신장된 MPs에서 P07 부하의 Gel 정량을 보여준다. 은 염색 및 펩티드 표준을 이용하여 정량됨. 최종 P07 w/w 비율 ~1%, 이것은 ~1%의 프리-신장 P07 w/w 비율에 필적한다.

도면 19는 P07로 부하된 65/35 PLGA 마이크로입자로부터 P07의 방출을 보여준다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 상세한 설명

본 발명은 다양한 양상 및 구체예에서, 유형 IV 콜라겐의 $\alpha 5$ 원섬유로부터 유래된 펩티드의 제약학적 조성물, 그리고 의학적 치료를 위한 이들의 이용을 수반한다. 예시적인 펩티드는 아미노산 서열 LRRFSTAPFAFIDINDVINF (서열 번호:2), LRRFSTAPFAFININNVINF (서열 번호:3), LRRFSTAPFAFIDINDVINW (서열 번호:4), FTNINNVNTN (서열 번호:5), 또는 FTDINDVTN (서열 번호:6), 또는 임의의 전술한 것들의 유도체인 아미노산 서열을 포함한다. 다양한 유도체가 본원에서 개시된다. 이들 펩티드는 $\alpha 5\beta 1$ 및 $\alpha V\beta 3$ 인테그린을 표적으로 하고, 그리고 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR), 간세포 성장 인자 수용체 (HGFR), 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGFR) 및 혈소판 유래 성장 인자 수용체 (PDGFR)를 비롯한 복수 수용체를 통한 신호전달을 저해한다.

인테그린을 표적으로 하는 펩티드는 US 9,056,923에서 설명된 것들을 포함하는데, 이것은 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다. 가령, 다음의 개시에 따른 펩티드는 아미노산 서열 LRRFSTXPXXXNINNVXNF (서열 번호:1)를 포함하는 펩티드를 포함하고, 여기서 X는 표준 아미노산 또는 비유전적으로 인코딩된 아미노산이다. 일부 구체예

에서, 위치 7에서 X는 M, A, 또는 G이고; 위치 9에서 X는 F, A, Y, 또는 G이고; 위치 10에서 X는 M, A, G, dA, 또는 Nle이고; 위치 11에서 X는 F, A, Y, G, 또는 4-ClPhe이고; 위치 12 및 위치 18에서 X는 Abu, G, S, A, V, T, I, L 또는 알릴-Gly에서 독립적으로 선택된다. 다양한 구체예에서, 상기 웨티드는 약 30개 아미노산 또는 그 이하, 또는 약 25개 아미노산 또는 그 이하, 또는 약 24개 아미노산, 또는 약 23개 아미노산, 또는 약 22개 아미노산, 또는 약 21개 아미노산, 또는 약 20개 아미노산을 내포한다. 또 다른 구체예에서, 서열 번호:1의 1개 내지 10개 아미노산, 예를 들면, 1개, 2개 또는 3개의 아미노산이 결실된다. 가령, N 말단으로부터 아미노산이 일부 구체예에서 결실된다.

[0018] 일부 구체예에서, 상기 웨티드는 아미노산 서열 LRRFSTAPFAFIDINDVINF (서열 번호:2), 또는 LRRFSTAPFAFINNVINF (서열 번호:3), 또는 LRRFSTAPFAFIDINDVINW (서열 번호:4), 또는 FTNINNVNTN (서열 번호:5), 또는 FTDINDVTN (서열 번호:6), 또는 임의의 전술한 것들의 유도체인 아미노산 서열을 포함한다. 본원에서 서열 번호:2의 웨티드는 P07로서 또한 지칭된다. 본원에서 서열 번호:3의 웨티드는 P06으로서 또한 지칭된다. 본원에서 서열 번호:4의 웨티드는 P08로서 또한 지칭된다. 본원에서 서열 번호:5의 웨티드는 P05로서 또한 지칭된다. 본원에서 서열 번호:6의 웨티드는 P09로서 또한 지칭된다. 서열 번호:2의 웨티드 (서열 번호:1과 비교하여)는 위치 13 및 16에서 아스파르트산을 갖는데, 이것은 생물학적 활성에 부정적인 충격을 주지 않으면서 웨티드의 물리적 성질을 향상시킨다. 서열 번호:2 내지 4의 웨티드의 유도체는 서열 번호:2, 3 또는 4에 대하여 1 내지 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실 (가령, 집합적으로 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실)을 갖는 웨티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 서열 DINDV 또는 NINNV는 유도체에서 유지된다. 아미노산 치환은 임의선택적으로, 서열 번호:1의 상응하는 위치에서 X에 의해 점유된 위치에 있을 수 있다. 웨티드는 일반적으로, 최소한 8개의 아미노산을 갖는다. 서열 번호: 5 또는 6의 웨티드의 유도체는 서열 번호: 5 또는 6의 서열에 대하여 1, 2 또는 3개의 아미노산 치환을 갖는 서열을 포함하는 웨티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 아미노산 치환은 보존성 또는 비보존성 치환에서 독립적으로 선택된다. 이를 또는 다른 구체예에서, 웨티드는 어느 한쪽 또는 양쪽 말단에 부가된 1 내지 10개의 아미노산을 포함한다 (집합적으로). N- 및/또는 C- 말단은 임의선택적으로, 다른 화학적 기 (아민 또는 카르복시 이외에, 예를 들면, 아미드 또는 티올)에 의해 점유될 수 있고, 그리고 본원에서 더욱 상세하게 설명된 바와 같이, PEG 또는 PLGA-PEG 공중합체를 비롯한 다른 모이어티의 접합에 유용할 수 있다. 웨티드는 일부 구체예에서 제약학적으로 허용되는 염의 형태로 제공되거나, 또는 특정 조직에 표적화된 또는 지속된 전달을 위해 다른 성분과 복합화되거나 또는 입자 내에 캡슐화될 수 있다.

[0019] 보존성 치환은 예로서, 관련된 아미노산 잔기의 극성, 전하, 크기, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성 성질에서 유사성의 기초에서 만들어질 수 있다. 20개의 유전적으로 인코딩된 아미노산은 다음의 6가지 표준 아미노산 기로 군화될 수 있다:

[0020] (1) 소수성: Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0021] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr; Asn, Gln;

[0022] (3) 산성: Asp, Glu;

[0023] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0024] (5) 사슬 배향정위에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro; 그리고

[0025] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0026] 본원에서 이용된 바와 같이, "보존성 치환"은 상기 도시된 6가지 표준 아미노산 기의 동일한 군 내에 열거된 다른 아미노산에 의한 아미노산의 교체로서 규정된다. 가령, Glu에 의한 Asp의 교체는 이렇게 변형된 폴리웨티드에서 하나의 음성 전하를 유지한다. 이에 더하여, 글리신 및 프롤린은 α -나선을 교란하는 그들의 능력에 근거하여 서로 대신할 수 있다. 상기 6가지 군 내에 일부 바람직한 보존성 치환은 다음의 하위군 내에 교체이다: (i) Ala, Val, Leu 및 Ile; (ii) Ser 및 Thr; (iii) Asn 및 Gln; (iv) Lys 및 Arg; 그리고 (v) Tyr 및 Phe.

[0027] 본원에서 이용된 바와 같이, "비보존성 치환"은 상기 도시된 6가지 표준 아미노산 기 (1 내지 6)의 상이한 군에서 열거된 다른 아미노산에 의한 아미노산의 교체로서 규정된다.

[0028] 다양한 구체예에서, 웨티드 작용제는 서열 번호:2, 3, 4, 5 또는 6의 약 8 내지 약 30개 아미노산, 또는 약 10 내지 약 20개 아미노산의 웨티드이고, 그리고 최소한 4개, 최소한 5개, 또는 최소한 6개의 인접한 아미노산을 갖는다. 일부 구체예에서, 웨티드는 최소한 1개, 최소한 2개, 또는 최소한 3개의 D-아미노산을 내포한다. 일부

구체예에서, 웨티드는 1 내지 약 5개 (가령, 1, 2 또는 3개)의 비유전적으로 인코딩된 아미노산을 내포하고, 이들은 임의선택적으로, 2-아미노부티르산 (Abu), 노르류신 (N1e), 4-클로로페닐알라닌 (4-ClPhe) 및 알릴글리신 (알릴Gly)에서 선택된다.

- [0029] 본 발명에 따른 서열 번호: 2 내지 6의 웨티드의 유도체일 수 있는 예시적인 웨티드 작용제는 다음을 포함한다:
- [0030] LRRFSTMPFMF(Abu)NINNV(Abu)NF (서열 번호:7),
- [0031] LRRFSTMPAMF(Abu)NINNV(Abu)NF (서열 번호:8),
- [0032] LRRFSTMPFAF(Abu)NINNV(Abu)NF (서열 번호:9),
- [0033] LRRFSTMPFMA(Abu)NINNV(Abu)NF (서열 번호:10),
- [0034] LRRFSTMPF(N1e)F(Abu)NINNV(Abu)NF (서열 번호:11),
- [0035] LRRFSTMPFM(4-ClPhe)(Abu)NINNV(Abu)NF (서열 번호:12),
- [0036] LRRFSTMPFMFSNINNVSNF (서열 번호:13),
- [0037] LRRFSTMPFMFANINNVANF (서열 번호:14),
- [0038] LRRFSTMPFMFININNVINF (서열 번호:15),
- [0039] LRRFSTMPFMFTNINNVTNF (서열 번호:16),
- [0040] LRRFSTMPFMF(A11yGly)NINNV(A11yGly)NF (서열 번호:17),
- [0041] LRRFSTMPFMFVNINNVNF (서열 번호:18),
- [0042] LRRFSTMPFdAFININNVINF (서열 번호:19),
- [0043] LRRFSTMPFAFININNVINF (서열 번호:20),
- [0044] LRRFSTAPFAFININNVINF (서열 번호:21),
- [0045] LRRFSTAPFdAFIDINDVINF (서열 번호:22),
- [0046] F(Abu)NINNV(Abu)N (서열 번호:23),
- [0047] FTNINNVTN (서열 번호:24),
- [0048] FININNVINF (서열 번호:25),
- [0049] FSNINNVSNF (서열 번호:26),
- [0050] FANINNVANF (서열 번호:27),
- [0051] F(A11yGly)NINNV(A11yGly)NF (서열 번호:28),
- [0052] FVNINNVNF (서열 번호:29),
- [0053] A(Abu)NINNV(Abu)NF (서열 번호:30), 또는
(4-ClPhe)(Abu)NINNV(Abu)NF (서열 번호:31).
- [0055] 본원에서 설명된 다양한 양상 및 구체예에서, 웨티드는 표면에 접합되거나 또는 캡슐화된 나노입자 및 마이크로입자 제제의 형태에서 전달될 수 있다. PLGA-PEG 중합체에 근거된 예시적인 입자 제제는 본원에서 상세하게 설명된다.
- [0056] 웨티드 작용제는 널리 공지된 기술, 예를 들면, 고체상 합성을 이용하여 화학적으로 합성되고 정제될 수 있다. US 9,051,349를 참조하고, 이것은 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다.
- [0057] 본원에서 설명된 웨티드는 $\alpha 5\beta 1$ 및 $\alpha V\beta 3$ 인테그린을 표적으로 하고, 그리고 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR), 간세포 성장 인자 수용체 (HGFR), 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGFR) 및 혈소판 유래된 성장 인자 수용체 (PDGFR)를 비롯한 복수 수용체를 통한 신호전달을 저해한다. 인테그린은 세포-세포 및 세포-세포외 기질 (ECM) 상호작용에 대한 가교인 막경유 수용체이다. 인테그린으로부터 신호전달은 ECM의 화학적 조성 및 기계적 상태에 영향을 주는데, 이것은 다양한 생물학적 반응, 예를 들면, 세포 주기, 세포 모양 및/또는 운동성의

조절; 또는 세포막에 추가되는 새로운 수용체를 제어한다. 이것은 세포 표면에서 사건에 대한 신속하고 유연한 반응을 허용한다. 여러 유형의 인테그린이 있고, 그리고 세포는 자신의 표면 상에 여러 유형을 가질 수 있다. 인테그린은 다른 수용체, 예를 들면, 카드헤린, 면역글로불린 상과 세포 부착 분자, 셀렉틴 및 신데칸과 함께 작동하여 세포-세포 및 세포-기질 상호작용을 매개한다. 인테그린에 대한 리간드는 섬유결합소, 비트로넥틴, 콜라겐 및 라미닌을 포함한다.

[0058] 일부 양상에서, 본 발명은 미세혈관 누출 또는 투과성을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 서열 번호:1 내지 6 중에서 한 가지의 아미노산 서열을 갖는 웨티드, 또는 설명된 바와 같은 이들의 유도체 및/또는 조합의 효과량을 치료가 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 종종 모세혈관 투과성 또는 미세혈관 투과성의 형태에서 혈관 투과성은 혈관 안팎으로 소형 분자 (이온, 물, 영양소) 또는 심지어 전체 세포의 유동을 허용하는 혈관 벽의 능력을 특징짓는다. 혈관 벽은 단일 층의 내피 세포가 줄지어 있다. 치밀 이름으로서 알려져 있는, 내피 세포 사이에 깁은 조직의 유형 및 생리학적 상태에 따라 엄격하게 조절된다. 혈관 투과성에서 증가는 신체의 공동 또는 조직에서 집합하는 과정의 유체에 의해 특징되는 질환인 부종을 유발할 수 있다.

[0059] 미세혈관 내피는 염증 자극 및 다른 자극에 반응하는데, 이들은 많은 의학적 상태의 병리에서 중심적인 역할을 수행할 수 있다. 가용성 인자 및 세포 수용체를 비롯하여, 혈관 투과성의 잠재력 매개체, 그리고 이들의 잠재적 역할 및 상호작용은 복잡하고, 그리고 조직 및 특정 병리에 의존할 수 있다. 가령, 미세혈관 누출은 그 중에서도 특히, 인플루엔자 (플루), 알츠하이머병, 출혈열, 대뇌 말라리아, 황반 변성, 황반 부종, 망막 정맥 폐색, 당뇨병성 망막병증, 급성 호흡 곤란 증후군, 폐부종, 천식, COPD, 호흡기 합포체 바이러스, SARS, 폐렴, 또는 장기 또는 조직 이식 또는 암과 연관된 혈관 투과성의 병리에서 일정한 역할을 수행할 수 있다. 본원에서 설명된 웨티드는 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR), 간세포 성장 인자 수용체 (HGFR), 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGFR) 및 혈소판 유래된 성장 인자 수용체 (PDGFR)를 비롯하여, 미세혈관 투과성에 관련된 복수 수용체를 통한 신호전달을 저해함으로써 이를 질환을 치료하는데 도움을 줄 수 있다. 도면 1을 참조한다.

[0060] 일부 구체예에서, 본원에서 설명된 웨티드 또는 조성물은 미세혈관 누출 또는 투과성을 예방하거나 또는 감소시키기 위해 폐, 피부 또는 눈에 국부 투여된다.

[0061] 일부 구체예에서, 환자는 플루를 앓거나 또는 이의 위험에 처해있다. 인플루엔자 ("플루")는 인플루엔자 바이러스에 의해 유발된 감염성 질환이다. 증상은 높은 열병, 코감기, 인두통, 근육 통증, 두통, 기침 및 피로를 포함한다. 이들 증상은 전형적으로, 상기 바이러스에 노출 후 2 일에 시작된다. 감염은 인후, 객담 또는 코를 상기 바이러스의 존재에 대해 시험함으로써 확증될 수 있다. 인플루엔자에 대항하여 연 1회 예방접종이 높은 위험에 처해 있는 사람들에 대해 세계 보건 기구에 의해 권장되고, 그리고 백신은 전형적으로, 3가지 또는 4가지 유형의 인플루엔자에 대항하여 효과적이다. 항바이러스성 약물, 예를 들면, 뉴라미니다제 저해제 (가령, 그 중에서도 특히, 오셀타미비르)가 인플루엔자를 치료하는데 이용되고 있고, 그리고 이들은 근소한 유익성을 보여주긴 하지만, 유익성을 제공하기 위해 감염 초기에 (가령, 증상이 나타난 직후에) 이용되어야 한다. 인플루엔자를 앓는 사람들 중에서 거의 33%는 무증상성이다. 인플루엔자의 증상은 감염 후 대략 1 내지 2일에 상당히 갑작스럽게 시작될 수 있다. 통상적으로, 첫 번째 증상은 오한 또는 오한 감각이지만, 열병 역시 감염 초기에 통상적이다. 항바이러스성 치료는 비록 때때로 근소한 유익성을 제공하긴 하지만, 바이러스 내성의 위험을 안고 있는데, 이것은 강력한 범유행성 계통에서 특히 문제가 될 수 있을 것이다.

[0062] 상기 바이러스를 치료하는 매력적인 대안은 숙주 반응을 치료하는 것인데, 이것은 약물에 대한 내성을 야기할 가능성이 훨씬 적고, 그리고 상기 질환의 더욱 진행된 단계의 치료를 허용함에 있어서 더욱 큰 효력 원도우를 제공할 수 있다. 숙주에 의한 주요 반응 중에서 한 가지는 때때로, 호흡 부전으로 이어지는 폐 미세혈관 누출 및 폐 손상을 유발하는 염증 반응이다. 미세혈관 누출을 저해하는 항부종성 작용제는 플루의 증상을 개선할 수 있었다.

[0063] 일부 구체예에서, 상기 웨티드 또는 이를 포함하는 제약학적 조성물은 플루 증상의 출현 이전에 최초 투여된다. 가령, 환자는 환자 표본에서 상기 바이러스의 존재를 검출하는 실험실 검사를 이용하여 플루를 앓는 것으로 진단될 수 있거나, 또는 환자는 상기 바이러스에 노출된 후 플루의 위험에 처해있다. 노출은 감염된 및/또는 증후성 개체와의 밀접한 접촉에 의해 결정될 수 있다.

[0064] 다른 구체예에서, 상기 웨티드 또는 제약학적 조성물은 첫 번째 플루 증상이 나타난 후 최초 투여된다. 일부 구체예에서, 상기 웨티드 또는 제약학적 조성물은 첫 번째 플루 증상의 출현 후 1 내지 4일 (가령, 1 또는 2일) 이내에 투여된다.

- [0065] 본 발명의 이러한 양상에 따라서, 상기 웨티드는 폐에서 인플루엔자 바이러스와 연관된 부종을 감소시키고, 따라서 상기 질환의 증상 및/또는 심각도를 개선한다. 일부 구체예에서, 상기 질환의 전반적인 길이는 1, 2, 3, 4 일 또는 그 이상 감소될 수 있고 및/또는 심각도 및 불편함이 실제적으로 감소될 수 있다.
- [0066] 플루를 앓거나 또는 이의 위험에 처해있는 환자의 치료를 위해, 본원에서 설명된 웨티드 또는 제약학적 조성물은 하루 약 1 내지 약 5회, 예를 들면, 하루 약 1 내지 약 3회 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 웨티드 또는 제약학적 조성물은 예로서, 분말 또는 용액 에어로졸에 의해 폐에 국부 투여되거나, 또는 다른 구체예에서 전신 투여된다.
- [0067] 일부 구체예에서, 상기 웨티드는 별개의 약물 제제로서 또는 공동조제된 산물로서, 인플루엔자에 대항하여 활성인 하나 또는 그 이상의 항바이러스제와 함께 투여되거나, 또는 대안으로, 하나 또는 그 이상의 항염증제와 함께 투여된다. 예시적인 항바이러스제는 타미플루 (오셀타미비르 인산염), 리렌자 (자나미비르), 라피bam (페라미비르), 아만타딘 및 리만타딘을 포함한다. 항염증제는 NSAIDs, 예를 들면, 아스피린, 이부프로펜, 아세트아미노펜 및 나프록센을 포함한다.
- [0068] 다른 구체예에서, 상기 웨티드 또는 제약학적 조성물은 알츠하이머병을 치료하거나, 또는 이의 진행을 늦추기 위해 투여된다. 혈액 뇌 장벽 (BBB)은 정상적인 뉴런 기능 및 정보 처리에 필수적인 뇌 내로 혈액-유래된 산물, 병원체 및 세포의 진입을 제한한다. 사후 조직 분석은 알츠하이머병에서 BBB 손상을 지시한다. 하지만, BBB 파괴의 시기선택은 여전히 달성하기 어렵다. 살아있는 인간 뇌에서 영역 BBB 투과성을 정량하는 높은 공간 및 시간 분해능을 갖는 진전된 동적 대조-증강된 MRI는 AD 초기에 영향을 받는 학습 및 기억에 결정적인 영역인 해마에서 연령-의존성 BBB 파괴를 보여주었다. 이를 데이터는 BBB 파괴가 노화하는 인간 뇌에서 해마에서 시작되는 초기 사건이고, 그리고 인지 장애에 기여할 수 있다는 것을 암시한다. 따라서, 혈액-뇌 피해 및 결과의 증가된 투과성을 저해하는 작용제는 알츠하이머병의 진행의 속도를 늦출 수 있을 것이다. 본원에서 설명된 웨티드 또는 조성물의 투여는 일부 구체예에서, 혈액 뇌 장벽의 완전성을 유지시키고, 따라서 알츠하이머병의 개시 또는 진행을 늦추거나 또는 예방한다.
- [0069] 일부 구체예에서, 환자는 알츠하이머병의 치료를 위한 최소한 하나의 추가 작용제로 치료를 받고 있는데, 상기 작용제는 아세틸콜린에스테라제 저해제 (타크린, 리바스티그민, 갈란타민 및 도네페질) 또는 메만틴에서 선택될 수 있다.
- [0070] 알츠하이머병, 특히 초기 단계 질환의 잠재적 증상을 보여주는 환자의 치료를 위해, 본원에서 설명된 웨티드 또는 제약학적 조성물은 상기 질환의 개시 또는 진행을 늦추기 위해 하루 약 1 내지 약 5회, 예를 들면, 하루 약 1 내지 약 3회 투여될 수 있다. 초기 단계 질환은 종종, 학습 및 기억의 증가하는 장애로서 관찰될 수 있는데, 이것은 확정적인 진단을 궁극적으로 야기한다. 일부에서, 언어, 실행 기능, 지각 (실인증), 또는 움직임의 이행 (실행증)에서 어려움이 기억 문제보다 더욱 두드러진다. 언어 문제는 구어 및 문어의 전반적인 빈곤화를 야기하는 축소되는 어휘 및 감소된 단어 유창성에 의해 특징된다.
- [0071] 일부 구체예에서, 상기 웨티드 또는 제약학적 조성물은 초기 단계 알츠하이머병을 앓는 환자 또는 알츠하이머병이 발달할 위험에 처해있는 (유전적으로 소인이 있거나, 또는 AD와 연관된 하나 또는 그 이상의 생물마커에 대해 양성인) 환자에 투여되고, 여기서 상기 웨티드 요법은 뇌에서 순환을 정상화시켜 질환 진행을 늦추거나 또는 예방한다.
- [0072] 일부 구체예에서, 환자는 혈관형성 또는 혈관 누출의 조절장애와 연관된 신경병리, 예를 들면, 다발성 경화증 (MS) 또는 파킨슨병 (PD)을 앓는다. 일부 구체예에서, 상기 웨티드 또는 제약학적 조성물은 질환 진행을 예방하거나 또는 자연시키거나, 또는 질환 증상을 개선하기 위해 하루 1 내지 3회 투여된다.
- [0073] 다른 구체예에서, 환자는 출혈열 또는 증후군을 앓거나 또는 이의 위험에 처해있는데, 이것은 출혈성 바이러스에 의해 유발된다. 이를 중에서 가장 악명 높은 것은 에볼라 및 마르부르크 바이러스이다. 출혈은 또한, 뎅기열 또는 라사열을 앓는 사람들에서 일어난다. 에볼라에서 이러한 출혈성 증후군은 질환에서 다소 후기에, 전형적으로 사망 전 24 내지 48 시간에 발생한다. 출혈이 있는 사례는 극적일 수 있고, 그리고 신체의 코, 입 및 다른 구멍으로부터 발생할 수 있다. 출혈을 야기하는 기전은 광범위한 아웃라인에서 알려져 있다: 상기 바이러스는 간에 의해 생산되는 응고 인자의 상향조절을 유발하고, 응고 인자의 증가된 숫자는 응고가 작은 혈관에서 형성되도록 유발하고, 간에 의해 생산된 응고 인자의 공급은 간이 상기 바이러스에 의한 공격 하에 있기 때문에 고갈되고, 과다활성화된 면역계는 혈관이 출혈을 시작하도록 유발하는 염증성 단백질의 생산을 증가시키고, 응고 인자의 불가용성은 출혈이 저지될 수 없다는 것을 의미한다. 많은 사망자가 심지어 출혈이 없는 경우에도 발생

하지만, 출혈이 있는 환자는 매우 높은 사망률을 갖는다. 첫 번째 증상이 나타난 후 투여된 작용제는 만약 그렇지 않으면, 계속 진행하여 출혈성 증후군을 전시할 환자에서 미세혈관계로부터 출혈을 중단시킬 수 있었다.

[0074] 일부 구체예에서, 환자는 에볼라 바이러스 또는 마르부르크 바이러스를 앓는다. 가령, 환자는 출혈열의 초기 징후, 예를 들면, 열병 및 출혈에 대한 증가된 감수성 및/또는 얼굴 및 흉부의 홍조, 작은 적색 또는 자주색 스팟(점상 출혈)을 앓을 수 있다. 출혈열의 다른 징후 및 증상은 권태감, 근육 통증, 두통, 구토 및 설사를 포함한다. 일부 구체예에서, 에볼라 바이러스 또는 다른 출혈열 바이러스의 존재는 환자 표본에서 확증된다. 일부 구체예에서, 환자는 출혈열의 치료를 위한 최소한 하나의 항바이러스제 또는 항염증제, 예를 들면, 정맥내 리바비린으로 치료를 받고 있다. 출혈열을 앓거나 또는 이의 위험에 처해있는 환자의 치료를 위해, 본원에서 설명된 웹티드 또는 제약학적 조성물은 상기 질환의 진행을 늦추기 위해, 하루 약 1 내지 약 5회, 예를 들면, 하루 약 1 내지 약 3회 투여될 수 있다.

[0075] 또 다른 구체예에서, 환자는 대뇌 말라리아 (CM)를 앓거나 또는 이의 위험에 처해있다. CM은 열대열원충 (*Plasmodium falciparum*) 말라리아의 가장 치명적인 합병증 중에서 한 가지이고, 그리고 말라리아-관련된 사망의 큰 분율을 차지한다. 세계 보건 기구 (WHO)는 CM을 무성 열대열원충 (*P. falciparum*) 기생충 혈증의 존재에서 및 뇌병증의 다른 원인의 존재 없이, 저혈당증에 대한 발작 또는 교정의 종결 후 최소한 1 시간에서 존속하는 혼수 (고통스러운 자극의 위치를 찾아내는 능력 없음 또는 Blantyre 혼수 점수 ≤ 2)로서 규정한다. CM-관련된 사망 중에서 최대 75%가 입원 24 시간 이내에 일어난다. 다중모드 자기 공명 기술, 예를 들면, 영상화, 확산, 관류, 혈관조영술, 분광법은 혈액 뇌 장벽 붕괴 및 출혈을 비롯한 혈관 손상이 CM에서 일어난다는 것을 보여주었다. 이들 효과는 염증성 과정에 기인하는 것으로 생각된다. Penet 등 (*J Neurosci*. 2005 Aug 10;25(32):7352-8)은 CM의 생쥐 모형을 이용하여, 주요 부종 형성뿐만 아니라 감소된 뇌 관류가 CM에서 일어나고, 그리고 높은-에너지 인산염의 감소 및 상승된 뇌 젖산염으로 허혈성 대사 프로필을 동반한다는 것을 보여주었다. 이들은 또한, 혈관조영술을 이용하였는데, 주요 혈류역학 기능장애에 대한 설득력 있는 증거를 제공하였다. 중요하게는, 이들은 부종이 대뇌 동맥을 압박하여, 궁극적으로 사망 원인인 혈류의 붕괴를 차후 야기함으로써 허혈을 더욱 악화시킨다는 것을 발견하였다. 이들 조사 결과는 염증성 및 허혈성 병변의 공존을 보여주고, 그리고 실험적 대뇌 말라리아의 치명적인 결과에서 부종의 주요 역할을 입증한다. 뇌에서 부종 및/또는 허혈을 저해하는 작용제는 이들 환자의 치료를 향상시키기 위해 상기 기생충을 직접적으로 표적으로 하는 항-말라리아 작용제와 조합으로 이용될 수 있었다. 일부 구체예에서, 환자는 클로로퀸, 메플로퀸, 독시사이클린, 또는 아토바쿠온 및 프로구아닐 염산염의 조합 (말라론)에서 선택되는 항-말라리아 요법을 제공받는다.

[0076] 이들 구체예에서, 상기 웹티드는 대뇌 말라리아를 앓는 환자에서 혈액 뇌 장벽 및 혈관 완전성을 유지시킨다. 대뇌 말라리아를 앓거나 또는 이의 위험에 처해있는 환자의 치료를 위해, 본원에서 설명된 웹티드 또는 제약학적 조성물은 상기 질환의 진행을 늦추고 및/또는 사망을 예방하기 위해, 하루 약 1 내지 약 5회, 예를 들면, 하루 약 1 내지 약 3회 투여될 수 있다.

[0077] 다른 양상에서, 본 발명은 암을 치료하거나, 또는 종양 미세환경을 정상화하고, 그리고 특히, 면역 체크포인트 저해제 요법을 향상시키기 위한 방법을 제공한다.

[0078] 상기 방법은 서열 번호:1 내지 6 중에서 한 가지의 아미노산 서열을 갖는 웹티드, 또는 이의 유도체 또는 조합의 효과량을 면역 체크포인트 저해제로 요법을 받고 있는 (또는 요법을 준비 중인) 암 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 혈관형성은 암을 치료하기 위한 약물 표적이다. VEGF 및 이의 수용체 VEGFR2는 혈관형성의 중요한 매개체이다. 인간 VEGF를 격리하는 항체인 베바시주맙, 그리고 VEGFR2를 저해하는 다른 소형 분자 티로신 키나아제 저해제가 다양한 유형의 암을 위해 개발되었다. 널리 공지된 친혈관형성 활성에 더하여, VEGF는 또한, 수지상 세포의 성숙을 저해함으로써 면역 억제인자로서 기능한다. 종양은 신생혈관을 유인할 뿐만 아니라, 성숙 면역 세포의 숫자를 감소시키고 램프구 내피 트래피킹을 조정함으로써 면역계를 억제하기 위해 VEGF를 생산하는 것으로 생각된다.

[0079] 종양은 면역계를 결집시켜 그들의 자체 성장을 증진한다. 지난 몇 년에 걸쳐, 종양이 면역계를 억제하는 기전 중에서 많은 수가 해독되었다. 많은 유형의 종양 세포는 종양에 침입하여 이들을 정지 상태로 만드는 T-세포 상에서 수용체와 상호작용하는 표면 분자, 예를 들면, PD-L1 및 CTLA-4를 발현한다. 이들 발견은 암 약물로서 이른바 "체크포인트 저해제", 예를 들면, 이플리무맙, 트레멜리무맙, 니볼루맙 및 펜브로리주맙의 개발을 허용하였다. 이들 약물은 세포독성 T 세포에 종양 세포의 결합을 방해하고, 따라서 이들을 억제로부터 자유롭게 하고 이들이 종양 세포를 사멸시키도록 허용하는 항체이다.

[0080] 베바시주맙 및 CTLA-4를 차단하는 항체인 이플리무맙을 합동하는 최소한 하나의 연구가 진행된 흑색종을 앓는

환자에서 수행되었다 (*Cancer Immunol Res.* 2014 Jul;2(7):632-42). 염증 상에서 VEGF를 차단하는 효과에 더하여; 림프구 트래피킹 및 면역 조절 또한 명확하였다. 이들 연구에 근거하여, 베마시주맙 및 다른 항신생혈관제, 예를 들면, 소형 분자 티로신 키나아제 저해제를 체크포인트 저해제와 합동하는 추가 임상 시험이 시작되었다.

[0081] 본 발명의 웨티드 및 조성물이 상승적으로 작동할 수 있는 체크포인트 저해제에 대한 표적은 LAG-3, KIR, OX40L, IDO-1 및 TIM-3을 포함한다.

[0082] 게다가, 본원에서 개시된 바와 같이, $\alpha 5\beta 1$ 및 $\alpha V\beta 3$ 인테그린에 대한 웨티드 (가령, 서열 번호 1 내지 6개, 그리고 유도체)의 특이성은 암 요법에서 웨티드에 대한 다른 의학적으로 중요한 역할을 암시한다. 이들 수용체는 $\alpha 5\beta 1$ 및 $\alpha V\beta 3$ 인테그린으로서 확인되었다. 인테그린은 많은 상이한 성장 인자 수용체에 대한 공동수용체로서 기능한다. 본원에서 설명된 웨티드 및 이들의 유도체는 그 중에서도 특히, 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR2), 간세포 성장 인자 수용체 (c-met) 및 인슐린-유사 성장 인자 수용체로부터 신호전달을 저해한다. P07은 예로서, 망막 및 맥락막 혈관신생 및 혈관 누출의 생쥐 모형에서 VEGF 유도된 혈관신생 및 누출을 강하게 저해한다. 혈관형성을 증진하는 것에 더하여, VEGF는 또한, 자신에 대한 면역 반응을 축소시키기 위해 종양에 의해 활용되는 면역억제를 유발한다. P07이 VEGF에 의한 신호전달을 차단하기 때문에, 이것은 면역계 부스터로서 효과적으로 행동하고, 그리고 따라서, 면역계에 의한 종양에 대한 공격을 증진할 수 있었다. 이들 데이터는 P07 (뿐만 아니라 본원에서 개시된 다른 웨티드 및 유도체)이 체크포인트 저해제와 합동으로 충분히 작동할 수 있었다는 것을 암시한다. 이것은 체크포인트 저해제가 침윤성 세포독성 T-세포가 종양 세포를 사멸시키도록 허용할 수 있도록, 혈관형성을 저해할 뿐만 아니라, 수지상 세포 성숙 및 더욱 견실한 림프구 내피 트래피킹을 가능하게 함으로써 종양에 대한 면역 반응을 강화하는데 도움을 줄 것이다.

[0083] 일부 구체예에서, 면역 체크포인트 저해제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 또는 항-CTLA-4 항체이다. 이들 방법이 면역 체크포인트 요법이 효과적인 임의의 암에 대항하여 유용할 수 있긴 하지만, 일부 구체예에서 암은 생식계열 종양, 중추신경계의 종양, 유방암, 전립선암, 자궁경부암, 자궁암, 폐암, 난소암, 고환암, 갑상선암, 성상세포종, 신경교종, 췌장암, 위암, 간암, 결장암, 흑색종 (진행된 흑색종 포함), 신장암, 방광암, 식도암, 후두의 암, 이하선의 암, 담도의 암, 직장암, 자궁내막암, 편평상피 세포 암종, 선암종, 소세포 암종, 신경모세포종, 중피종, 부신 피질 암종, 상피 암종, 데스모이드 종양, 결합조직형성 작은 원형 세포 종양, 내분비 종양, 유잉 육종 폐밀리 종양, 생식 세포 종양, 간모세포종, 간세포 암종, 림프종, 흑색종, 비-횡문근육종 연조직 육종, 골육종, 말초 원시 신경외배엽 종양, 망막모세포종, 횡문근육종 및 월름 종양에서 선택되는 육종, 암종 또는 고형 종양 암이다. 일부 구체예에서, 암은 비소세포 폐암, 흑색종, 전립선암, 전이성 신장 세포 암이다. 일반적으로, 암은 PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4에 대해 양성이고, 그리고 체크포인트 저해제 요법은 PD-1 및 PD-L1 또는 CTLA-4 및 B7 사이의 상호작용을 저해하는 작용제이다.

[0084] 다양한 구체예에서, 환자는 초기 단계 암 (가령, I 기 또는 II)을 앓거나, 또는 추후 시기 (III 기 또는 IV 기)에 있을 수 있다. I 기 암은 하나의 신체 부위에 국지화된다. II 기 암은 III 기 암이 그러한 것처럼 국부 진행된다. 암이 II 기 또는 III 기로서 지정되는 거의 여부는 암의 특정한 유형에 의존할 수 있다. 가령, II 기는 횡격막의 단지 한쪽 측면에서만 영향을 받은 림프절을 나타낼 수 있고, 반면 III 기는 횡격막 위아래로 영향을 받은 림프절을 나타낸다. II 기 및 III 기에 대한 특정한 규준은 이런 이유로, 진단에 따라 다르다. IV 기 암은 종종, 다른 장기로 또는 신체 전반에서 전이되거나 또는 확산한다.

[0085] 일부 구체예에서, 암은 비-질제가능하다. 비-질제가능한 암은 다수의 전이성 초점으로 인해, 또는 이것이 외과적 위험 구역 내에 있기 때문에 외과적으로 제거될 수 없는 악성이다.

[0086] 일부 구체예에서, 환자는 면역 체크포인트 저해제 단독에 무반응성이거나 또는 단지 부분적으로 반응성이다. 상기 웨티드 또는 제약학적 조성물이 면역 체크포인트 저해제 요법과 함께 (또는 동안) 투여될 수 있긴 하지만, 일부 구체예에서 환자는 상기 웨티드, 그 이후에 면역 체크포인트 저해제 요법으로 1 내지 4 주 동안 치료된다.

[0087] 일부 구체예에서, 상기 웨티드 또는 제약학적 조성물은 장기 또는 조직 이식과 연관된 미세혈관 누출 또는 혈관 투과성 또는 림프관신생을 감소시키고, 그리고 따라서, 급성 또는 초급성 거부 반응의 발생을 감소시키기 위해 투여된다. 가령, 상기 웨티드는 급성 또는 초급성 거부 반응에 대한 위험에 처해있는, 피부 이식, 각막 동종이식, 신장, 폐 또는 심장 이식, 또는 다른 장기 또는 조직 이식의 수용자에 투여될 수 있다. 가령, 상기 웨티드는 1 내지 8 주, 또는 1 내지 4 주 동안 최소한 하루 1회 투여될 수 있다.

[0088] 앞서 설명된 다양한 구체예에서, 웨티드는 원하는 루트 및/또는 용량에 따라 다양한 형태에서 투여될 수 있다.

[0089] 웨티드는 제약학적으로 허용되는 염으로서 전달될 수 있고, 그리고 당해 분야에서 공지된 수많은 담체를 포함할

수 있다. 용어 "제약학적으로 허용되는 염"은 상대적으로 비독성 산 또는 염기로 제조되는 염을 포함한다. 본원에서 이용된 바와 같이, "제약학적으로 허용되는 담체"는 물, 식염수, 텍스트로스 용액, 인간 혈청 알부민, 리포솜, 하이드로겔, 마이크로입자 및 나노입자를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 것으로 의도된다.

[0090] 치료되는 특정한 질환에 따라, 웨티드 작용제는 액체 또는 고체 약형으로 조제될 수 있고, 그리고 전신 또는 국부 투여될 수 있다. 이를 작용제는 예로서, 당업자에게 공지된 바와 같은 시간 맞춰진- 또는 지속된-낮은 방출 형태로 전달될 수 있다. 조제 및 투여를 위한 기술은 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000)에서 발견될 수 있다. 적합한 루트는 경구, 협측, 흡입 스프레이에 의한, 설하, 직장, 경피, 질, 경점막, 코 또는 장관 투여; 근육내, 피하, 척수내 주사뿐만 아니라 척수강내, 직접적인 심실내, 정맥내, 낭내, 흉골내, 활막내, 간내, 병소내, 두개내, 복강내, 비내 또는 안구내 주사를 비롯한 비경구 전달, 또는 다른 전달 방식을 포함할 수 있다.

[0091] 투여의 형태 및/또는 루트가 변할 수 있긴 하지만, 일부 구체예에서 상기 웨티드 또는 제약학적 조성물을 비경구 투여되거나 (가령, 피하, 정맥내 또는 근육내 투여에 의해), 또는 일부 구체예에서 폐에 직접적으로 투여된다. 폐에 국부 투여는 용액 에어로졸 또는 분말 에어로졸일 수 있는 제약학적 에어로졸을 비롯한 다양한 조제 전략을 이용하여 달성될 수 있다. 분말 제제는 전형적으로, 작은 입자를 포함한다. 적합한 입자는 당해 분야에서 공지된 임의의 수단, 예를 들면, 에어제트 제분기, 볼 제분기 또는 진동기 제분기에서 분쇄, 체질, 미량침전, 분무 건조, 동결건조 또는 제어된 결정화를 이용하여 제조될 수 있다. 전형적으로, 입자는 직경에서 약 10 마이크론 또는 그 이하일 것이다. 분말 제제는 임의선택적으로, 당업자에게 공지된 최소한 하나의 미립자 제약학적으로 허용되는 담체를 내포할 수 있다. 적합한 제약학적 담체의 실례는 단당류, 이당류, 다당류를 비롯한 사카라이드, 그리고 당 알코올, 예를 들면, 아라비노스, 글루코오스, 프룩토오스, 리보오스, 만노오스, 수크로오스, 트레할로스, 락토오스, 말토오스, 전분, 텍스트란, 만니톨 또는 소르비톨을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 대안으로, 용액 에어로졸은 당업자에게 공지된 임의의 수단, 예를 들면, 계량된 용량의 조성물을 전달하도록 조정된 벨브가 제공된 에어로졸 바이알을 이용하여 제조될 수 있다. 활성 성분의 흡입가능 형태가 분무가능 수성, 유기 또는 수성/유기 분산액인 경우에, 흡입 장치는 분무기, 예를 들면, 전통적인 공기 분무기, 예를 들면, 에어제트 분무기, 또는 초음파 분무기, 이것은 예로서, 1 내지 50 ml, 통상적으로 1 내지 10 ml의 분산액을 내포할 수 있다; 또는 더욱 작은 분무 용적, 예를 들면, 10 μl 내지 100 μl을 허용하는 손바닥크기 분무기일 수 있다.

[0092] 주사의 경우에, 본 발명의 작용제는 수성 용액, 예를 들면, 생리학적으로 양립성 완충액, 예를 들면, Hank 용액, 링거액, 또는 생리 식염수 완충액에서 조제되고 희석될 수 있다.

[0093] 본 발명의 실시를 위한 본원에서 개시된 화합물을 전신 투여에 적합한 용량으로 조제하기 위한 제약학적으로 허용되는 비활성 담체의 이용은 본 발명의 범위 안에 있다. 담체 및 적합한 제조 관행의 적절한 선택으로, 본 발명의 조성물, 특히, 용액으로서 조제된 것들은 비경구, 예를 들면, 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있다. 이들 화합물은 당해 분야에서 널리 공지된 제약학적으로 허용되는 담체를 이용하여 경구 투여에 적합한 용량으로 쉽게 조제될 수 있다. 이런 담체는 본 발명의 화합물이 치료되는 개체 (가령, 환자)에 의한 경구 섭취를 위한 정제, 알약, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 혼탁액 등으로서 조제될 수 있게 한다.

[0094] 코 또는 흡입 전달을 위해, 본 발명의 작용제는 또한, 당업자에게 공지된 방법에 의해 조제될 수 있고, 그리고 예로서 하지만 제한 없이, 가용화, 희석, 또는 분산 물질, 예를 들면, 식염수, 보존제, 예를 들면, 벤질 알코올, 흡수 증진제 및 탄화플루오르의 실례를 포함할 수 있다.

[0095] 일부 구체예에서, 상기 웨티드는 중합성 나노입자 또는 마이크로입자 담체로 조제된다. 가령, 일부 구체예에서, 마이크로입자 또는 나노입자는 하나 또는 그 이상의 분해성 연쇄, 예를 들면, 에스테르 연쇄, 이황화 연쇄, 아미드 연쇄, 무수물 연쇄, 그리고 효소적 분해에 감수성인 연쇄를 갖는 물질을 포함한다. 특정한 구체예에서, 마이크로입자 또는 나노입자는 폴리(젖산-코-글리콜산) (PLGA), 폴리(베타-아미노 에스테르) (PBAE), 폴리카프로락톤 (PCL), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리유산 (PLA), 폴리(아크릴산) (PAA), 폴리-3-히드록시부티레이트 (P3HB) 및 폴리(히드록시부티레이트-코-히드록시발레르산염)으로 구성된 군에서 선택되는 생물분해성 중합체 또는 중합체의 블렌드를 포함한다. 다른 구체예에서, 당해 분야에서 이용되는 비분해성 중합체, 예를 들면, 폴리스티렌이 공중합체 시스템을 창출하기 위해 상기로부터 분해성 중합체 또는 중합체들과 혼합된다. 따라서, 일부 구체예에서, 비분해성 중합체는 생물분해성 중합체와 혼합된다.

[0096] 일부 구체예에서, 본 발명은 PLGA-PEG 공중합체 및 인테그린을 표적으로 하는 접합된 웨티드를 포함하는 나노입자를 제공한다. 접합된 웨티드는 서열 번호:1 내지 31 중에서 임의의 한 가지 또는 그 이상의 웨티드, 또는 이

의 유도체일 수 있다. 가령, N07은 항-혈관형성 및 항-종양형성 성질을 갖는 P07에 근거된 펩티드-접합된 나노입자에 대해 본원에서 이용된 명칭이다. N07은 시험관내에서 항-혈관형성 및 항-종양형성 활성, 인테그린 $\alpha V\beta 3$ 복합체에 특이적 결합, 그리고 캡슐화된 약물 화물을 운반하는 능력을 갖는다.

[0097] 일부 구체예에서, 나노입자는 표면에 접합된 추가 약물 또는 표적화 작용제를 내포한다. 가령, 나노입자는 PLGA-PEG-X 및 PLGA-PEG-Y 중합체로부터 만들어질 수 있고, 여기서 X는 상기 펩티드이고 Y는 다른 약물 또는 표적화 작용제이다. 표적화 작용제는 조직 선택적 표적화 작용제일 수 있거나, 또는 암 세포에 대해 선택적일 수 있다. 이들 구체예에서 나노입자 (접합된 펩티드, 그리고 임의선택적으로 추가 표적화 작용제를 갖는)는 앞서 설명된 바와 같은 고형 종양을 포함하고, 그리고 교모세포종 또는 유방암 (삼중 음성 유방암 포함)을 포함하는 암의 치료에서 이용될 수 있다.

[0098] 다른 표적 결합 작용제가 부가적으로 또는 대안으로 이용될 수 있고 (대안적 인테그린 결합 모이어티 포함), 그리고 이들은 항체 및 이들의 항원 결합 부분을 포함한다. 표적 결합에 대한 다양한 형식은 본원에 전체적으로 참조로서 편입된 US 특허 번호 또는 특허 공개 번호 US 7,417,130, US 2004/132094, US 5,831,012, US 2004/023334, US 7,250,297, US 6,818,418, US 2004/209243, US 7,838,629, US 7,186,524, US 6,004,746, US 5,475,096, US 2004/146938, US 2004/157209, US 6,994,982, US 6,794,144, US 2010/239633, US 7,803,907, US 2010/119446 및/또는 US 7,166,697에서 설명된 바와 같이, 단일-도메인 항체, 재조합 중쇄-단독 항체 (VHH), 단일 사슬 항체 (scFv), 상어 중쇄-단독 항체 (VNAR), 마이크로단백질 (시스테인 매듭 단백질, 크노틴), DARPin, 테트라넥틴, 어피바디; 트랜스바디, 안티칼린, 아드넥틴, 아필린, 미세소체, 펩티드 앱타머, 필로머, 스트라도바디, 맥시바디, 에비바디, 피노머, 아르마딜로 반복 단백질, 쿠니츠 도메인, 아비머, 아트리머, 프로바디, 이뮤노바디, 트리오맙, 트로이바디, 펩바디, 백시바디, 유니바디, 듀오바디, Fv, Fab, Fab', F(ab')2, 펩티드 모방 문자, 또는 합성 문자를 포함한다. 또한, Storz MAbs. 2011 May-Jun; 3(3): 310-317을 참조한다.

[0099] 일부 구체예에서, 나노입자는 상기 펩티드 (가령, 서열 번호:1 내지 6 중에서 한 가지의 서열, 또는 이의 유도체를 포함), 또는 앞서 설명된 바와 같은 다른 결합 작용제에 공유 연결되는 조정가능한 크기의 폴리(젖산-코글리콜산)) 폴리에틸렌 글리콜 (PLGA-PEG) 블록 공중합체로부터 합성된다. 임의의 비율에서 접합된 및 접합되지 않은 중합체의 혼합물은 표면 상에 표적화 작용제의 원하는 밀도를 갖는 나노입자를 창출하는데 이용될 수 있다. 상기 입자의 조정가능한 특징에 관한 설명은 표 1에서 발견될 수 있다.

[0100] 일부 구체예에서, 상기 입자에 접합된 펩티드는 서열 번호:1, 서열 번호:2, 서열 번호:3, 서열 번호:4, 서열 번호:5 또는 서열 번호:6의 아미노산 서열, 또는 설명된 바와 같은 이의 유도체 (가령, 서열 번호:7-31의 펩티드를 포함)를 갖는다. 나노입자는 일부 구체예에서, PLGA-PEG-펩티드 접합체로부터 형성되거나, 또는 다른 구체예에서, 펩티드는 미리 형성된 입자에 접합된다.

[0101] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "나노입자"는 1 nm 및 1000 nm 사이에 임의의 정수 값 (약 1, 2, 5, 10, 20, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500 및 1000 nm, 그리고 중간에 모든 정수 및 분획성 정수 포함)을 포함하는 약 1 nm 내지 약 1000 nm의 범위에서 최소한 하나의 치수를 갖는 입자를 지칭한다. 일부 구체예에서, 나노입자는 최소한 하나의 치수, 예를 들면, 약 50 내지 약 100 nm의 직경을 갖는다. 일부 구체예에서, 나노입자는 약 70 내지 100 nm의 직경을 갖는다.

[0102] 일부 구체예에서, 상기 입자는 마이크로입자이다. 용어 "마이크로입자"는 최소한 약 1 마이크로미터 (μm)의 범위에서 최소한 하나의 치수를 갖는 입자를 포함한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "입자"는 나노입자 및 마이크로입자를 포함하는 것으로 의미된다.

[0103] 이를 입자는 순환 성질, 생체분포 및 분해 동역학을 비롯한 원하는 약력학적 이점을 제공하도록 설계될 수 있다. 이런 파라미터는 그 중에서도 특히, 크기, 표면 전하, 중합체 조성, 리간드 접합 화학, 펩티드 접합 밀도를 포함한다. 가령, 일부 구체예에서, 입자는 PLGA 중합체 코어, 그리고 PLGA-PEG 공중합체의 PEG 부분에 의해 형성된 친수성 껍질을 갖는데, 여기서 PLGA-PEG 중합체의 부분은 상기 펩티드의 말단 부착을 갖는다. 친수성 껍질은 기능기에 대하여 비활성인 에스테르-말단캡 PLGA-PEG 중합체, 예를 들면, PLGA-PEG-MeOH 중합체를 더욱 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 접합되지 않은 중합체 중에서 일부 또는 전부는 표면 성질의 미세 조정을 제공하기 위해 다른 말단기 (가령, 카르복시)를 갖는다.

[0104] 본원에서 설명된 펩티드는 임의의 가용한 과정을 이용하여 이를 입자에 화학적으로 접합될 수 있다. 펩티드 접합을 위한 기능기는 PEG-COOH, PEG-NH₂, PEG-SH를 포함한다. 가령, Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, New York, 1996을 참조한다. 활성화 기능기는 알킬 및 아실 할로겐화물, 아민, 숤피드릴, 알데

히드, 불포화된 결합, 히드라지드, 이소시안산염, 이소티오시안산염, 케톤, 그리고 화학 결합을 위해 활성화되는 것으로 알려져 있는 다른 기를 포함한다. 대안으로, 웨터드는 소형 분자-연계 시약의 이용을 통해 접합될 수 있다. 연계 시약의 무제한적 실례는 카르보디이미드, 말레이미드, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 비스클로로에틸아민, 이중기능성 알데히드, 예를 들면, 글루타르알데히드, 무수물 등을 포함한다.

[0105] 한 예시적인 구체예에서, 나노입자는 생체내에서 특정한 생체내분해 비율 (PLGA 중합체의 LA:GA 비율 및/또는 분자량을 조정함으로써)에 대해 조정될 수 있는 코어 (PLGA)를 갖는다. 일부 구체예에서, PLGA는 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 25/75, 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 50/50, 55/45, 60/40, 65/35, 70/30, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10, 또는 95/5의 L/G의 조성을 비롯하여, 20:1 내지 1:20의 LA:GA 비율에 근거된다. PLGA는 이의 에스테르 연쇄의 가수분해에 의해 분해된다. PLGA의 분해를 위해 필요한 시간은 단위체의 비율에 관련된다: 글리콜리드 단위의 함량이 더욱 높을수록, 지배적으로 락티드 단위와 비교하여 분해에 필요한 시간이 더욱 작다. 이에 더하여, 에스테르 (유리 카르복실산과는 대조적으로)로 말단캡핑된 중합체는 더욱 긴 분해 반감기를 갖는다.

[0106] 일부 구체예에서, 나노입자를 가공하기 위한 PLGA 중합체는 조정가능한 입자 크기를 제공하기 위해, 약 10K 내지 약 70K, 예를 들면, 약 20K, 약 25K, 약 30K, 약 40K, 약 50K, 약 60K, 또는 약 70K의 범위에서 분자량을 갖는다. 일부 구체예에서, 마이크로입자를 가공하는데 이용된 PLGA 중합체는 약 20K 내지 약 200K, 예를 들면, 100K 내지 약 200K의 범위에서 분자량을 갖는다. 상기 중합체의 PEG 부분은 일반적으로, 2K 내지 5K의 범위에 있다. 다양한 구체예에서, PLGA-PEG-웨터드 및 접합되지 않은 PLGA-PEG의 비율은 약 1:20 내지 약 20:1, 예를 들면, 약 1:15 내지 약 15:1, 또는 약 1:10 내지 약 10:1, 또는 약 1:5 내지 약 5:1, 또는 약 1:2 내지 약 2:1의 범위에 있다. 일부 구체예에서, PLGA-PEG-웨터드 및 접합되지 않은 공중합체의 비율은 약 1:1이다. 일부 구체예에서, 이들 중합체 중에서 최소한 50%는 접합된 웨터드를 갖는다. 일부 구체예에서, 나노입자는 약 50 내지 약 200 nm의 범위 내에, 또는 약 50 내지 약 100 nm의 범위 내에 크기 (평균 직경)를 갖는다. 일부 구체예에서, 나노입자는 탈이온수에서 약 -5 mV 내지 약 -40 mV, 그리고 일부 구체예에서, 약 -10 mV 내지 약 -30 mV (가령, 약 -20, 약 -25, 또는 약 -30 mV)의 범위 내에 제타 전위를 갖는다.

[0107] 일부 구체예에서, 나노입자는 캡슐화된 활성제를 더욱 포함하는데, 이것은 플루, 알츠하이머병, 출혈열, 대뇌말라리아, 암, 급성 거부반응의 예방, 그리고 본원에서 설명된 다른 것들을 비롯하여, 미세혈관 누출에 의해 특징되는 질환의 치료를 위한 본원에서 개시된 활성제일 수 있다. 이들 구체예에서, 나노입자는 활성제의 지속된 방출을 제공한다. 가령, 일부 구체예에서, 활성제는 화학요법 작용제, 예를 들면, 아미노글루테티미드, 암사크린, 아나스트로졸, 아스파라기나아제, 비칼루타미드, 블레오마이신, 부세페린, 부설판, 캄프토페신, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 클로드로네이트, 콜하친, 시클로포스파미드, 시프로테론, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 디에네스트를, 디에틸스틸베스트롤, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에스트라무스틴, 에토포시드, 엑세메스테인, 필그라스팀, 플루다라빈, 플루드로콜티손, 플루오로우라실, 플루오시메스테론, 플루타미드, 젠시타빈, 제니스테인, 고세렐린, 히드록시요소, 이다루비신, 이포스파미드, 이미티닙, 이리노테칸, 이로노테칸, 레트로졸, 류코보린, 류프롤라이드, 레바미솔, 로무스틴, 메클로르에타민, 메드록시프로게스테론, 메게스트롤, 멜팔란, 메르캅토푸린, 메스나, 메토트렉사트, 미토마이신, 미토탄, 미톡산트론, 널루타미드, 노코다졸, 옥트레오티드, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 파미드로네이트, 펜토스타틴, 폴리카마이신, 포르피며, 프로카르바진, 랄티트렉시드, 라파마이신, 리툭시맙, 스트렙토조신, 수라민, 타크롤리무스, 타목시펜, 테모졸로미드, 테니포시드, 테스토스테론, 티오구아닌, 티오텐파, 티타노센 이염화물, 토포테칸, 트라스투주맙, 트레티노인, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 및 비노렐빈 중에서 한 가지 또는 그 이상이다.

[0108] 나노입자가 실제적으로 구형이긴 하지만, 일부 구체예에서 나노입자는 임의선택적으로, 비-구형일 수 있다.

[0109] 물질이 생물학적 시스템과 어떻게 상호작용하는 지에 영향을 줄 수 있는 다양한 물리적 및 화학적 성질이 있다. 마이크로입자 및 나노입자 기초된 물질의 경우에, 물질의 선택, 크기 분포 및 입자의 모양 분포 모두 입자의 활성에 영향을 주는 결정적인 파라미터이다. 입자의 크기 및 모양 둘 모두 입자가 신체의 다양한 세포와 상호작용하는 방식에 영향을 줄 수 있는 것으로 이전에 밝혀졌다. 가령, 입자의 모양은 다양한 세포 유형이 입자를 얼마나 잘 흡수할 수 있는 지에 영향을 줄 수 있는데, 여기서 타원체형 입자는 통상적으로, 구형 입자보다 세포가 흡수하기 더욱 어렵다. 입자의 모양을 신장시키는 것은 이런 이유로, 예로서 면역계 세포에 의한 입자의 원치 않는 흡수를 감소시키고, 따라서 체내에서 입자의 반감기를 연장할 수 있다. 입자의 크기 또한, 세포가 입자를 흡수하고 이들과 상호작용하는 능력에 영향을 줄 수 있다. 입자 기초된 시스템의 활성의 최적화는 이런 이유로, 입자의 크기 및 모양 분포를 조율함으로써 달성될 수 있다.

- [0110] 일부 구체예에서, 나노입자의 차원 및/또는 이들 입자를 신장하기 위한 과정은 WO 2013/086500에서 개시된 바와 같고, 이것은 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다.
- [0111] 특정한 구체예에서, 3차원 마이크로입자 또는 나노입자는 장형 타원체를 포함하고, 여기서 (a) x 축을 따라서 치수는 (b) y 축을 따라서 치수보다 크고, 그리고 여기서 (b) y 축을 따라서 치수는 (c) z-축을 따라서 치수와 실제적으로 동등하고, 따라서 상기 장형 타원체는 방정식 $a > b = c$ 에 의해 설명될 수 있다. 다른 구체예에서, 타원체는 3축 타원체인데, 여기서 (a) x 축을 따라서 치수는 (b) y 축을 따라서 치수보다 크고, 그리고 여기서 (b) y 축을 따라서 치수는 (c) z-축을 따라서 치수보다 크고, 따라서 상기 3축 타원체는 방정식 $a > b > c$ 에 의해 설명될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 타원체는 편평 타원체인데, 여기서 (a) x 축을 따라서 치수는 (b) y 축을 따라서 치수와 동등하고, 그리고 여기서 (b) y 축을 따라서 치수는 (c) z-축을 따라서 치수보다 크고, 따라서 상기 편평 타원체는 방정식 $a = b > c$ 에 의해 설명될 수 있다. 본원에서 개시된 비대칭 입자는 하지만, $a = b = c$ 인 구체예를 포함하지 않는다.
- [0112] 또 다른 구체예에서, 마이크로입자 또는 나노입자는 약 1.1 내지 약 5의 범위에서 변하는 형상비를 갖는다. 다른 구체예에서, 형상비는 약 5 내지 약 10의 범위를 갖는다. 일부 구체예에서, 형상비는 약 1.5 내지 약 3.5의 범위를 갖는다.
- [0113] 일부 구체예에서, 상기 입자는 약물 화물 (가령, 본원에서 설명된 웨티드 및/또는 다른 작용제)을 캡슐화하는 마이크로입자이다. 입자는 이들 구체예에서, 표면에 접합된 웨티드를 내포하거나 또는 내포하지 않을 수 있다. 이들 구체예에서, 입자는 웨티드의 지속된 방출을 제공하는 지속성 약물 저장소를 제공할 수 있다. 예시적인 입자 형식은 WO 2014/197892에서 설명된 것들을 포함하는데, 이것은 본원에 참조로서 편입된다. 일부 구체예에서, 입자는 폴리(베타-아미노 에스테르) (PBAE)를 통합하지 않고, 그리고 따라서, 중합체는 PLGA-PEG 블록 공중합체로 본질적으로 구성된다. 이들 입자는 예로서, 황반 변성 (가령, 습성 또는 건성 연령-관련된 황반 변성) 또는 당뇨병성 황반 부종에 대한 치료제로서 안구내 주사에 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 화물은 활성제의 조합이 원하는 부위로 전달되도록 허용한다. 일부 구체예에서, 나노입자는 암의 치료용으로 투여된다. 이들 또는 다른 구체예에서, 입자는 1 μm 내지 500 μm 의 범위에서, 예를 들면, 약 1 μm 내지 약 250 μm 의 범위에서 크기 (평균 직경)를 갖는다. 입자는 지속된 웨티드 또는 약물 방출의 지속 기간에 따라, 약 하루 1회 내지 약 6 개월마다 1회, 또는 약 주 1회 또는 약 월 1회 주사될 수 있다.
- [0114] 다른 양상에서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 세포 상에서 인테그린의 발현을 확인하기 위한 방법을 제공한다. 가령, 일부 구체예에서 상기 방법은 표면에 접합된 서열 번호:1, 서열 번호:2, 서열 번호:3, 서열 번호:4, 서열 번호:5, 또는 서열 번호:6의 웨티드 (또는 서열 번호:7 내지 31의 웨티드를 비롯하여, 설명된 바와 같은 서열 번호:1-6 중에서 한 가지의 유도체) (앞서 설명된 바와 같음)를 갖는 나노입자 또는 마이크로입자를 하나 또는 그 이상의 세포와 접촉시키고, 그리고 세포에 상기 나노입자의 결합을 가시화하거나 또는 검출하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 나노입자는 검출 가능한 표지, 예를 들면, 형광 표지, 빌광 표지, 효소 표지, 또는 방사성 표지를 더욱 포함하는데, 이것은 PLGA-PEG 중합체의 부분에 접합되거나, 나노입자 내에 캡슐화되거나, 또는 다른 모이어티를 통해 간접적으로 결합될 수 있다. 세포는 일부 구체예에서, 용해 상태에 있거나 또는 배양 중일 수 있다. 시험관내 적용의 경우에, 결합은 결합된 입자의 직접적인 가시화, 유세포분석법, 또는 용액으로부터 세포의 풀다운에 의해 결정될 수 있다. 일부 구체예에서, 자성 입자는 중합성 입자와는 대조적으로, 표적화된 인테그린을 발현하는 세포를 분리하기 위한 편의한 방법을 허용하는데 이용된다.
- [0115] 또 다른 구체예에서, 나노입자가 환자에 투여되고, 그리고 인테그린 과다발현 혈관구조가 예로서, 종양의 인근에서 영상화된다.
- [0116] 실시예
- [0117] 실시예 1: P07은 VEGF, HGF 및 IGF의 신호전달을 저해한다
- [0118] P07의 표적은 $\alpha 5\beta 1$ 및 $\alpha V\beta 3$ 인테그린인 것으로 확인되었다. 인테그린은 많은 성장 인자 수용체, 예를 들면, VEGFR, 간세포 성장 인자 수용체 (HGFR 또는 c-met), 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGFR) 및 혈소판 유래된 성장 인자 수용체 (PDGFR)에 대한 공동수용체로서 기능한다. 이러한 기전과 일관하게, P07은 이들 수용체로부터 신호전달을 저해하는 것으로 밝혀졌다 (도면 1).
- [0119] 이들 수용체 등은 혈관형성 및 미세혈관 투과성에 관련된다. 이러한 다인성 저해는 아마도, 복수 기전을 수반하는 질환이 P07 및 이의 유도체로 효과적으로 치료될 수 있도록 만든다.

[0120] 실시예 2: P07은 복수 눈 모형에서 혈관신생을 저해한다

P07은 망막에서 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 인간 형태를 과다발현하는 유전자도입 생쥐에서 혈관 누출을 저해하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 모형에서 혈관 누출은 망막 뒤에 모이는 혈액이 망막 박리를 유발할 만큼 심각하다. 이러한 모형에서, P07은 망막 박리를 거의 완전하게 차단하였다 (**도면 2**).

[0122] P07은 또한, 토끼 눈에서 부종의 모형에서 시험되었다. 이러한 모형에서 인간 VEGF는 눈 내로 직접적으로 주사되어 국부 혈관구조에서 누출을 유발하였다. 이러한 누출의 정도는 VEGF 주사 후 3일에 정맥내 투여된 나트륨 플루오레세인의 누출로부터 발생하는 눈에서 형광의 양을 계측함으로써 사정되었다. P07이 VEGF 주사에 앞서 눈에서 약 50 μg 으로 존재할 때, 혈관 누출이 극적으로 저해되었다 (**도면 3**). 이를 결과는 P07이 생체내에서 강력한 항부종성 작용제라는 것을 암시한다.

[0123] 실시예 3: P07은 암 조직 성장을 저해한다

P07은 정위 삼중 음성 유방암 (TNBC) 이종이식편 (**도면 4**), 그리고 소세포 폐암 (SCLC) 및 교모세포종 이종이식편 (도시되지 않은)의 성장을 저해한다. 반응하는 종양은 극적으로 축소된 혈관구조를 갖는다 (**도면 5**).

[0125] 이를 결과는 P07이 면역 체크포인트 저해제와 합동될 때 상승 효과를 가질 수 있다는 것을 지시한다. P07 및 면역 체크포인트 저해제는 혈관형성을 저해할 뿐만 아니라, 수지상 세포 성숙 및 더욱 견실한 림프구 내피 트래피킹을 가능하게 함으로써 종양에 대한 면역 반응을 강화할 수 있고, 그리고 체크포인트 저해제는 침윤성 세포독성 T-세포가 종양 세포를 사멸시키도록 허용할 것이다.

[0126] 실시예 4: P07-접합된 나노입자 (N07)의 성질

N07은 항-혈관형성 및 항-종양형성 성질을 갖는 펩티드-접합된 나노입자이다. N07은 인테그린 $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ 복합체에 특이적으로 결합하고, 그리고 캡슐화된 약물 화물을 운반하는 능력을 갖는다.

[0128] N07은 N07과 공유적으로 접합되는 조정가능한 크기의 폴리(젖산-코-글리콜산)) 폴리에틸렌 글리콜 (PLGA-PEG) 블록 공중합체로부터 합성되었다. 임의의 비율에서 접합된 및 접합되지 않은 중합체의 혼합물은 표면 상에 P07의 원하는 밀도를 갖는 나노입자를 창출하는데 이용될 수 있다. 상기 입자의 조정가능한 특징에 관한 설명은 표 1에서 도시된다.

[0129] 표 1

표 1

조정가능한 파라미터	적용가능한 범위
PLGA의 분자량	10 kDa - 70 kDa
PEG의 분자량	2 kDa - 5 kDa
펩티드에 접합된 중합체의 퍼센트	0 - 100%

[0131] N07은 P07 펩티드 및 PLGA-PEG 블록 공중합체로부터 합성되었다. P07은 New England Peptide에서 고체 상태 합성에 의해 생산되고, 그리고 이의 순도는 HPLC/MS에 의해 사정되었다. 상기 펩티드는 N 말단에서 아민 및 C 말단에서 아미드를 갖는다. PLGA-PEG 블록 공중합체는 PolySciTech®로부터 구입되었고, 그리고 순도 및 분자량이 겔 투과 크로마토그래피 (GPC) 및 푸리에 변환 적외선 분광법 (FTIR)에 의해 사정되었다.

[0132] 접합을 위해, P07은 DMSO에서 100 mg/ml로 용해되고 DMF에서 170 mg/ml NHS-기능화된 PLGA-PEG (PLGA-PEG-NHS)에 첨가되었다. 40 몰 과잉의 디이소프로필에틸아민 (DIPEA)이 혼합물에 첨가되고 실온에서 하룻밤 동안 교반되었다. 혼합물은 이후, 에테르 및 메탄올의 차가운 혼합물에 방울방울 첨가되고 22,000 x g에서 스핀다운되었다. 펠렛은 이후, 반응하지 않은 펩티드를 제거하기 위해 메탄올로 반복적으로 세척되고 스핀다운되었다. 상층액은 폐기되었고, 그리고 펠렛은 진공 하에 수 시간 동안 건조되도록 방치되어 고체 PLGA-PEG-SP2043이 산출되었다. 다른 화물, 예를 들면, 약물 및 염료 또한 유사한 과정을 통해 PLGA-PEG에 접합될 수 있다.

[0133] PLGA-PEG-P07 및 PLGA-PEG의 혼합물은 DMF에서 10 mg/ml로 용해되고, 그리고 나노침전으로 불리는 과정 동안, 자성 교반 하에 탈이온수에 방울방울 첨가되어 나노입자가 형성되었다. 원하는 화물이 나노침전에 앞서 DMF 혼합물에 첨가되었는데, 이것은 부하된 화물이 소수성 PLGA 코어 내에 있는 나노입자를 유발하였다. 수 시간의 교반 후, 이를 입자는 Ultra 원심분리 칼럼 (EMD Millipore, UFC810096)으로 여과되고 농축되었다.

[0134] HPLC가 P07에 PLGA-PEG-NHS의 접합의 효율을 사정하는데 이용되었다. 일부 경우에, c-말단 F는 W 잔기로부터 흡광도 및 형광의 판독을 허용하기 위해 W로 대체되었다. 에테르 및 메탄올에서 침전에 앞서 반응 혼합물로부터 PLGA-PEG-P07이 DMSO에서 회색되고 물-아세토니트릴 이동상에서 Agilent Poroshell 300 칼럼을 통해 이동되었다. 웹티드는 220 nm (웹티드 중추) 및 280 nm (트립토판, W)에서 흡광도를 통해, 그리고 295/348 nm 여기/방출 (트립토판)에서 형광을 통해 검출되었다. 반응하지 않은 P07의 양은 유리 P07 피크의 통합을 통해 결정되었다. PLGA-PEG-P07 반응 혼합물은 PLGA-PEG-P07을 형성하는 반응을 겪지 않을 PLGA-PEG-COOH 또는 PLGA-mPEG 및 P07의 대조 반응 혼합물과 비교되었다. 반응된 P07은 유리 P07 피크에 기여하지 않을 것이고, 따라서 대조 반응에 비하여 P07 피크에서 감소는 PLGA-PEG-NHS 공중합체에 접합을 지시한다. 결과는 모든 통합 값이 웹티드 농도의 선형 범위에 들어가도록 담보하기 위해, 유리 웹티드의 표준 곡선과 비교되었다. 결과는 표 2 및 도면 6에서 도시된다.

[0135] 표 2

표 2

정량을 위한 신호	접합 효율
형광 (295/348 nm)	0.869
흡광도 (280 nm)	0.920
흡광도 (220 nm)	0.854

[0137] LavaPep™ 특징화: LavaPep™ 웹티드 정량 키트 (Gel Company, LP022010)가 N07의 표면 상에서 웹티드를 직접적으로 검출하는데 이용되었다. 초고순도 물에서 3-5 mg/ml에서 입자가 어둠 하에 1 시간 동안, 96-웰 평판에서 LavaPep 작업 용액과 함께 배양되었다. LavaPep 작업 용액에서 에피코크코논 염료는 웹티드 상에서 Arg 잔기와 상호작용하여 고도로 형광이 되었다. 형광은 Biotek HT Synergy 평판판독기에서 530/590 nm에서 판독되었다. 나노입자로부터 신호는 공지된 양의 유리 웹티드의 표준 회색 곡선과 비교되었다. 정량 결과는 표 3에서 도시되는데, 이것은 SP2043이 PLGA-PEG-NHS 공중합체에 효율적으로 접합되고 나노입자 내로 통합된다는 것을 증명하였다.

[0138] 표 3

표 3

표면 백분율 SP2043	평균 신호	상응하는 웹티드 (μg)	웹티드 표준 편차 (μg)	접합 효율
100	1992	14.80	0.538	0.889
50	1432	7.01	0.249	0.842
0	0	0	-	-

[0140] 크기 특징화: N07은 물에서 1 mg/ml로 혼탁되고 Malvern Zetasizer Nano ZS90을 이용하여 분석되었다. Z-평균 직경 및 강도-기초된 크기 분포가 계측되고 기록되었다. 결과는 표 4 및 도면 7에서 도시되는데, 이들은 N07이 대략 70-80 nm의 Z-평균 직경을 전시하고, 그리고 약간의 크기 증가가 접합된 P07이 나노입자 상에 존재하는 표본에서 목격된다는 것을 증명하였다.

[0141] 표 4

표 4

표본	Z-평균 (d. nm)	PDI
PLGA-PEG-COOH	68.24 ± 0.26	0.23
PLGA-PEG-COOH/P07 (50/50)	73.39 ± 1.03	0.18
PLGA-PEG-P07	77.59 ± 2.65	0.29

[0143] 제타 전위: N07은 초고순도 물에서 1 mg/ml로 혼탁되고 Malvern Zetasizer Nano ZS90을 이용하여 분석되었다. 표면 제타 전위가 계측되고 기록되었다. 결과는 도면 8에서 도시되는데, 이것은 N07이 PEG 상에서 상이한 말단 기를 이용하여 25 mV 주변에서 아주 약간 조정가능한, 탈이온수에서 음성 제타 전위를 전시한다는 것을 증명한

다. 도면 8에서, 중성은 메톡시-종결된 PEG이고 음성은 카르복시-종결된 PEG이다.

[0144] 실시예 5: 인테그린 $\alpha v\beta 3$ 및 인테그린 $\alpha 5\beta 1$ 표적에 PLGA-PEG-P07의 결합

입자는 앞서 설명된 바와 같이 제조되고, 완전히 PLGA-PEG-P07 또는 PLGA-mPEG로만 만들어졌다. 인테그린 $\alpha v\beta 3$, 인테그린 $\alpha 5\beta 1$, 그리고 인간 혈청 알부민은 제조업체의 사용설명서에 따라서, Alexafluor 488 TFP-에스테르로 표지화되었다. 입자는 입자 없이 PBS에서 인테그린 또는 HSA를 갖는 대조 표본과 나란히, PBS에서 인테그린과 함께 실온에서 하룻밤 동안 배양되었다. 입자는 이후, 세파크릴 S-500 HR 배지를 이용한 SEC 원심 스픈 칼럼을 통해 유리 인테그린 또는 HSA 단백질로부터 분리되었다. 분리 후, 이들 입자에 의해 SEC 배지를 통해 제공된 인테그린의 양을 사정하기 위해, 형광 신호가 Bioteck Synergy HT 마이크로평판 판독기에서 계측되었다. 결과는 도면 9에서 도시된다.

[0146] 상기 프로토콜은 경쟁 표본의 첨가를 제외하고, 인테그린 $\alpha v\beta 3$ 에 결합에 대해 반복되었다. 간단히 말하면, 다양한 웹티드 (P07 및 비활성인 것으로 밝혀진 P07의 서열의 부분적인 스크램블)가 표적화된 입자 및 100배 과잉에서 Alexafluor 488-표지화된 유리 인테그린의 용액에 첨가되고 실온에서 하룻밤 동안 배양되었다. 이들 용액은 세파크릴 S-500 HR 배지를 이용한 SEC 원심 스픈 칼럼을 통해 분리되었다. 앞에서와 같이, 형광이 이들 입자에 의해 SEC 배지를 통해 제공된 인테그린의 양을 사정하는데 이용되었다. 결과는 도 10에 도시된다.

[0147] 나노입자는 MDA-MB-231 및 미세혈관 내피 세포 (MEC) 세포에 결합에 대해 시험되었다. 입자는 중량으로 1% TAMRA 염료의 첨가를 제외하고, 상기와 같이 제조되었다. 나노침전 후, 이들 입자는 Amicon 초원심분리 필터 (MWCO 100,000)로 농축되고, 그리고 유리 TAMRA 염료 또는 다른 유리 중합체 또는 웹티드 물질을 제거하기 위해 세파크릴 S-500 HR 배지를 이용한 SEC 원심 스픈 칼럼으로 여과되었다. 세포는 이후, 100,000 세포/ml에서 나노입자 및 1 mg/ml 입자와 함께 배양되었다. 나노입자는 표적화된 PLGA-PEG-P07 중합체 또는 표적화되지 않은 PLGA-mPEG 중합체로부터 만들어졌다. 37 °C에서 1 시간 배양 후, 세포는 원심분리기에서 스픈다운되었고, 그리고 상층액이 제거되었다. 세포는 PBS에서 재현탁되었고, 그리고 결과의 신호는 세포와 함께 떨어진 형광 입자의 양을 사정하기 위해 Bioteck Synergy HT 마이크로평판 판독기에서 판독되었다. 결과는 도 11에 도시된다.

[0148] 입자는 MB-MDA-231 세포 및 미세혈관 내피 세포 (MEC)의 부착을 저해하는 그들의 능력에 대해 시험되었다. 시험 판내 검정에서 이용에 앞서, 입자는 초원심분리 칼럼을 이용하여 초고순도 물로부터 적절한 배지로 이전되고, 배지에서 10 mg/ml로 농축되고, 96-웰 평판에 첨가되었다. 배지 단독, 그리고 100 μM 및 25 μM AXT201 (부착의 공지된 저해제)을 갖는 배지가 양성 및 음성 대조로서 평판에 첨가되었다. MDA-MB-231 또는 MEC 세포가 20,000 세포/웰에서 이들 입자, 웹티드 및 배지에 첨가되었다. 96-웰 평판은 37 °C 및 5% CO₂에서 대략 2 시간 동안 배양되었다. 웰은 이후, Ca²⁺ 및 Mg²⁺를 포함하는 DPBS로 2회 세척되고, 그리고 이후, 4 μg/ml 칼세인 AM 염료를 내포하는 배지로 충전되었다. 평판은 이후, 30 분 동안 배양되고, 그리고 Ca²⁺ 및 Mg²⁺를 포함하는 DPBS로 다시 한 번 세척되었다. 이후, 형광이 웰의 표면에 부착된 세포의 숫자를 정량하기 위해 485/528 nm 여기/방출에서 Bioteck Synergy HT에서 판독되었다. 결과는 도면 12에서 도시되는데, 이것은 N07이 MDA-MD-231 종양 세포 및 MEC 세포에 대항하여 부착방지 활성을 갖는다는 것을 증명한다. 도면 12에서, %는 접합된 P07를 갖는 PLGA-PEG 분자의 양을 지칭한다. "+" 또는 "-"는 캡슐화된 P07의 존재 또는 부재를 지칭한다.

[0149] 입자는 MEC 증식의 저해에 대해 시험되었다. MTT Vybrant 검정 키트를 이용한 비색 기초된 증식 검정이 MEC 세포에서 실행되었다. 2000 세포/웰이 96-웰 평판에서 폐놀 레드-없는 ECM-2MV 배지에서 도말되고 18-20 시간에 걸쳐 부착하도록 허용되었다. 입자가 없는 최초 배지는 배지에서 5 mg/ml로 혼탁된 N07 입자 또는 배지에서 AXT201 웹티드 또는 배지 단독으로 대체되었다. 4 일 후, 배지는 제조업체의 권고에 따라 100 uL MTT 시약으로 대체되었다. 4 시간 후, 100 uL의 SDS 용액이 각 웰에 첨가되고 다른 4 시간 동안 37 °C에서 배양되었다. 생존 세포에서 미토콘드리아 환원 효소에 의한 MTT로부터 포르마잔으로의 변화를 포착하기 위해, 흡광도가 Bioteck Synergy HT 평판판독기에서 570 nm에서 판독되었다. 결과는 도면 13에서 도시되는데, 이것은 N07이 MEC 세포에 대항하여 항-증식 활성을 갖는다는 것을 증명한다. 도면 13에서, %는 접합된 P07을 갖는 PLGA-PEG 분자의 양을 지칭한다. "+" 또는 "-"는 캡슐화된 P07의 존재 또는 부재를 지칭한다.

[0150] 부착을 저해하는 PEG-P07 접합체의 능력이 시험되었다. NHS-기능화된 PEG 8 및 PEG 24는 DMF에서 대략 150 mg/ml로 용해되었다. 웹티드는 40 배 몰 과잉의 DIPEA와 함께, DMSO에서 1:1 몰 비율에서 100 mg/ml로 첨가되었다. 혼합물은 차가운 에테르 및 메탄올에서 침전되고, 그리고 DIPEA, 용매 및 유리 PEG를 제거하기 위해 수회 세척되었다. 결과의 혼합물은 이후, 양성 및 음성 대조와 나란히, 앞서 설명된 바와 같이 MDA-MB-231 세포를 이용한 부착 검정에서 이용되었다. 결과는 도면 14에서 도시되는데, 이것은 PEG-P07의 부착 활성을 증명한다.

[0151] 실시예 6: 펩티드-접합된 입자의 신장

[0152] 입자의 크기 및 모양은 이를 입자의 활성의 최적화를 위해 조작되었다. 이를 입자는 성공적으로 만들어지고 신장되었다. 펩티드는 과정 내내 안정된 상태로 남아있고, 펩티드 부하는 신장 프로토콜 전후에 동일하게 남아있다.

[0153] 마이크로입자 형성: 폴리(락티드-코-글리콜리드), PLGA는 먼저, 시험관에서 디클로로메탄, DCM 내로 20 mg/mL로 용해되고, 그리고 완전히 용해되도록 와동되었다. 디메틸су포시드, DMSO에서 P07의 펩티드 스톡 (20 mg/mL)은 PLGA/DCM 용액으로 미량피펫팅되었다. 펩티드 대 PLGA의 초기 질량비는 변할 수 있다; 가령, 1:50 및 1:20 펩티드:PLGA. 블랭크 마이크로입자의 경우에, 동등 부피의 DMSO만 피펫팅되었다. 혼합물은 얼음 위에서 시험관과 함께 초음파처리되었다. 초음파처리는 대략 5-10 W와 대등한 '30'의 진폭 세팅으로 20 초 동안 수행되었다. 이러한 일차 유제는 50 mL의 1% 폴리(비닐 알코올), PVA, 용액 내로 즉시 부어지고 3.6-3.8 krpm에서 1 분 동안 균질화되었다. 전체 용적은 이후, 100 mL의 0.5% PVA 용액으로 이전되고 캐미칼 후드에서 약 3.5 시간 동안 교반되었다. 3회 세척 단계가 이후, 수행되었다. 각 세척 단계의 경우에, 마이크로입자 용액이 4 °C, 4 krpm에서 5 분 동안 원심분리되었고, 그리고 이후, 상층액이 제거되었다. 차후에, 40 mL의 냉장된 Milli-Q 물이 첨가되었고, 마이크로입자 펠렛이 재현탁되었고, 그리고 세척 단계가 반복되었다. 마지막 원심분리 단계 후, 표본을 재현탁하기 위해 5 mL의 물이 첨가되었다. 표본은 액체 질소에서 즉시 동결되고 동결건조기 내에 즉시 배치되었다. 동결건조 이후에, 모든 마이크로입자는 -20 °C에서 보관되었다.

[0154] 나노입자 형성: PLGA는 먼저, 시험관에서 DCM 내로 원하는 농도 (통상적으로 20 mg/mL 또는 40 mg/mL)로 용해되고, 그리고 완전히 용해되도록 와동되었다. DMSO에서 펩티드 스톱, 예를 들면, P07 (20 mg/mL)은 PLGA/DCM 용액으로 미량피펫팅되었다. 펩티드 대 PLGA의 질량비는 변할 수 있다. 예시적인 제제는 1:50 펩티드:PLGA이다. 블랭크 나노입자의 경우에, 동등 부피의 DMSO만 피펫팅되었다. 혼합물은 얼음 위에서 시험관과 함께 초음파처리되었다. 초음파처리 (Misonix)는 대략 5-10 W와 대등한 '30'의 진폭 세팅으로 20 초 동안 수행되었다. 이러한 일차 유제는 50 mL의 1% PVA 용액 내로 즉시 부어지고 얼음 위에서 2 분 동안 '30'으로부터 '100'까지 그 어딘가의 진폭 세팅에서 초음파처리되었다. 전체 용적은 이후, 100 mL의 0.5% PVA 용액으로 이전되고 캐미칼 후드에서 ~3.5 시간 동안 교반되었다. 3회 세척 단계가 이후, 수행되었다. 각 세척 단계의 경우에, 나노입자 용액은 4 °C, 17 krpm에서 10 분 동안 원심분리되었고, 그리고 이후, 상층액이 제거되었다. 차후에, 30 mL의 냉장된 Milli-Q 물이 첨가되었고, 나노입자 펠렛이 재현탁되었고, 그리고 세척 단계가 반복되었다. 최종 원심분리 단계 후, 표본을 재현탁하기 위해 5 mL의 물이 첨가되었다. 표본은 액체 질소에서 즉시 동결되고 동결건조기 내에 즉시 배치되었다. 동결건조 이후에, 모든 나노입자는 -20 °C에서 보관되었다.

[0155] 마이크로입자 신장: 동결건조된 PLGA 입자는 10% PVA/ 2% 글리세롤 용액에서 2.5 mg/mL의 농도로 용해되었고, 그리고 10 mL의 이러한 용액은 직사각형 페트리 접시 내로 넣어지고 하룻밤 동안 건조되었다. 결과의 필름은 크기에 맞춰 절단되고, 2개의 알루미늄 마운트 중간에 부하되고, 90 °C까지 가열되었다. 필름 길이가 계측되었고, 그리고 맞춤 제작된 신장 장치를 이용하여 원하는 배수의 스트레치 (가령, 2 배 신장된 타원체형 입자)를 산출하기 위해 필름이 천천히 신장되었다. 필름은 이후, 실온으로 식도록 허용되었고 알루미늄 블록으로부터 제거되었다. PVA 필름은 물에서 용해되었고, 그리고 결과의 입자 현탁액은 3x 세척되었다. 이를 입자는 이용에 앞서 동결건조되었다.

[0156] SEM 및 TEM 특징화: 주사 전자 현미경 (SEM)을 위해, 동결건조된 입자는 알루미늄 마운트 상에 배치된 카본 테이프 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) 상에 배치되었다. 표본은 금-팔라듐이 증착되었고, 그리고 SEM 영상화는 the JHU School of Medicine MicFac에서 LEO/Zeiss FESEM으로 수행되었다. 마이크로입자 표본의 크기산정은 SEM 이미지의 ImageJ 분석으로 수행되었다. 결과는 도 15에 도시된다. 신장된 입자는 도면 16에서 도시된다.

[0157] 투과 전자 현미경검사 (TEM)를 위해, 나노입자는 먼저, 물에서 1mg/mL로 재현탁되었다. 10 uL의 표본이 탄소 코팅된 구리 격자 위에 떨어지고, 그리고 캐미칼 후드에서 2 시간 동안 건조될 때까지 방치되었다. 염색되지 않은 TEM 영상화는 이후, Philips CM120 시스템을 이용하여 수행되었다. 결과는 도면 17에서 도시되는데, 이것은 비신장된 (왼쪽) 또는 2x 신장된 (오른쪽) 펩티드 부하된 NPs를 보여준다.

[0158] 마이크로입자 부하 및 방출 정량: 부하를 계측하기 위해, 공지된 질량의 마이크로입자가 DMSO에서 용해되었다. 펩티드 부하된 마이크로입자 및 상응하는 블랭크 마이크로입자의 경우에, 젤 전기이동 (Bio-Rad Mini-PROTEAN 시스템) 및 은 염색 분석을 이행함으로써 정량이 수행되었다. 12-웰 10-20% Mini-PROTEAN 트리스-트리신 젤이 Milli-Q 물에서 1x로 희석된 10x 트리스/트리신/SDS 작업 완충액과 함께 이용되었다. 각 젤은 공지된 양의 펩티드

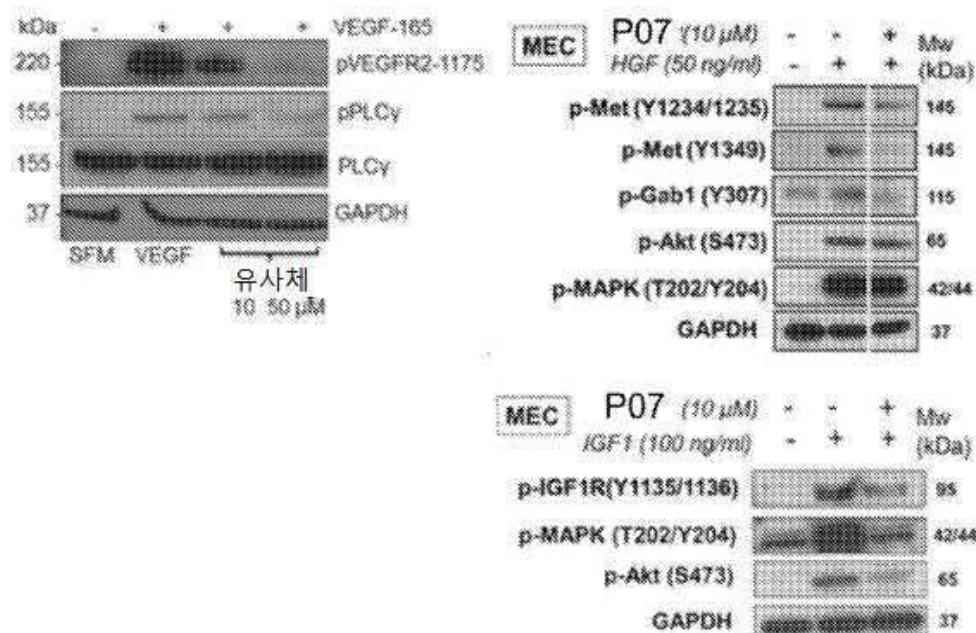
드의 표준 계열을 내포하였다. 이들 웨프티드 표준 계열은 웰마다 0, 62.5, 125, 250 및 500 ng의 웨프티드를 포함하였다. 나머지 웰은 단백질 표준, 그리고 마이크로입자 표본 (웨프티드 부하된 및 블랭크 둘 모두)을 대조로서 포함하였다. DMSO 표본은 표본 완충액과 부피로 1:1 혼합되었다. 표본 완충액은 1x PBS에서 24% 글리세롤로 만들어졌다. 겔 전기이동은 단백질 표준의 2.5 kDa 띠가 겔 아래쪽으로 대략 2/3쯤 이동할 때까지 이행되었다. 은 염색 프로토콜이 겔 염색을 위해 추종되었다. 현상 단계를 위해, 일단 가장 낮은 웨프티드 표준 (이 경우에 있어서 62.5 ng)이 나타나기 시작하면 정지액이 첨가되었다. 겔 이미지는 디지털 카메라로 포착되고 겔 띠 강도 정량 기능성을 이용하여 ImageJ로 분석되었다. 결과는 도면 18에서 도시된다.

[0159]

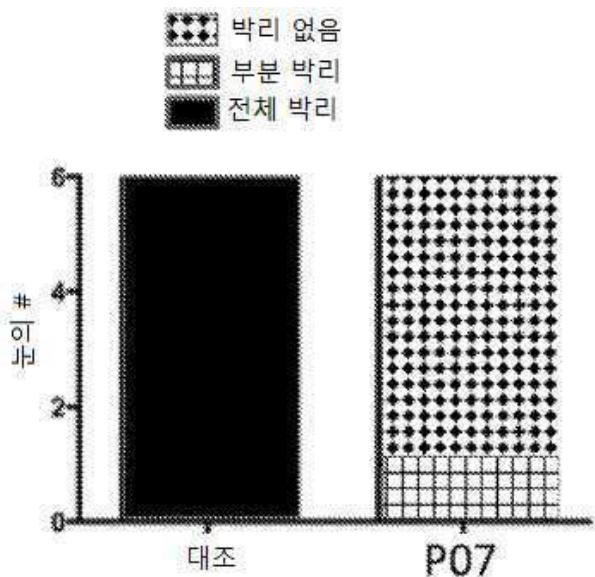
방출을 계측하기 위해, 공지된 질량의 마이크로입자가 1x PBS에서 혼탁되고, 37 °C 오븐에서 진탕기 상에 배치되었다. 다양한 시점에서, 표본은 ~2.5 krcf에서 5 분 동안 원심분리되었다. 상층액은 수집되고 -80 °C에서 보관되고, 그리고 신선한 PBS가 표본에 첨가되었다. 상층액 내로 방출된 웨프티드의 정량은 겔 전기이동, 은 염색, 그리고 겔 띠 분석을 이행함으로써 수행되었다. 결과는 도 19에 도시된다.

도면

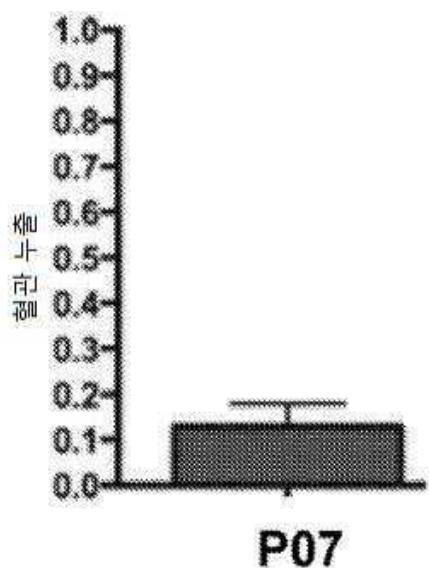
도면1



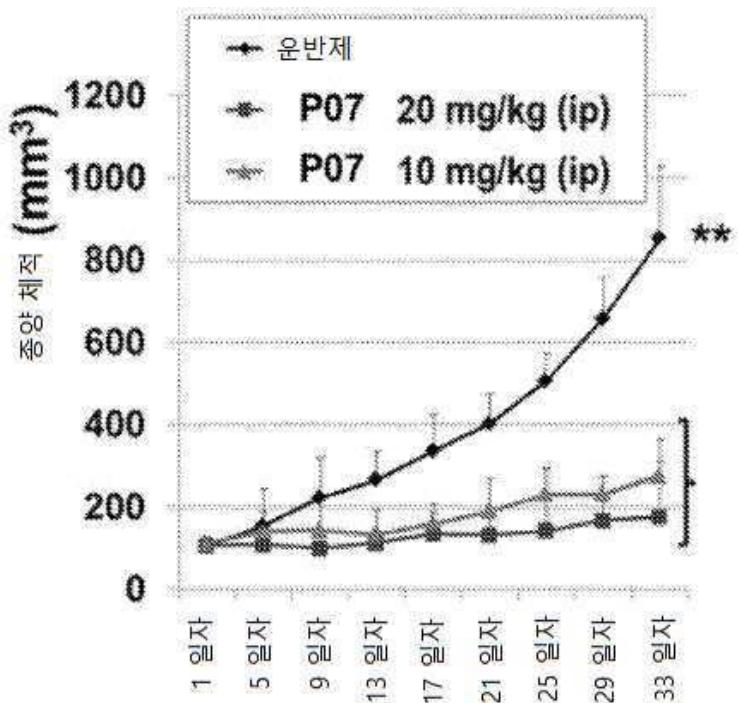
도면2



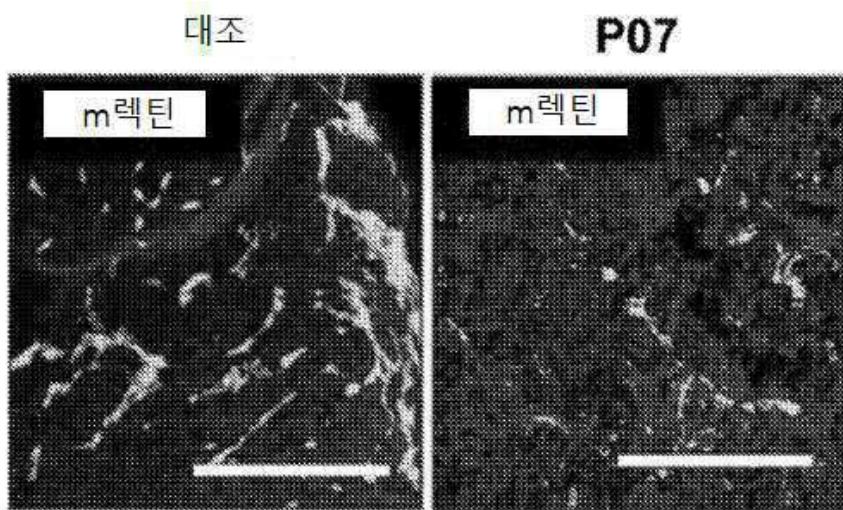
도면3



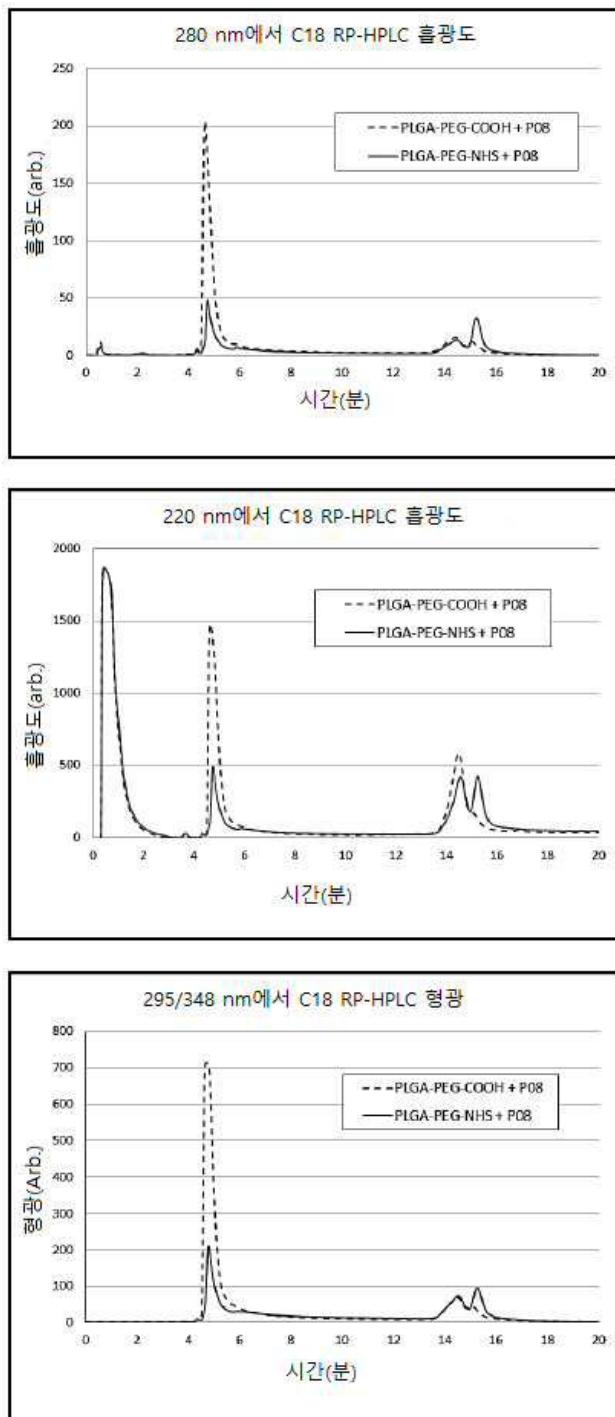
도면4



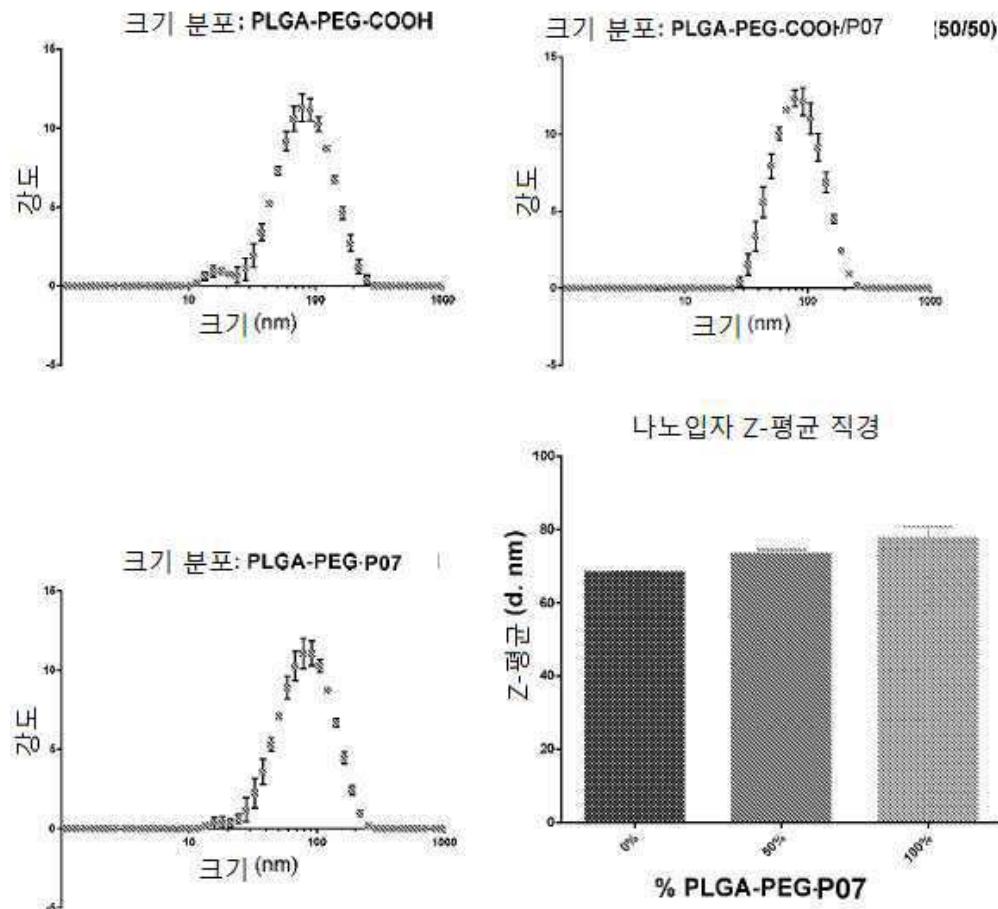
도면5



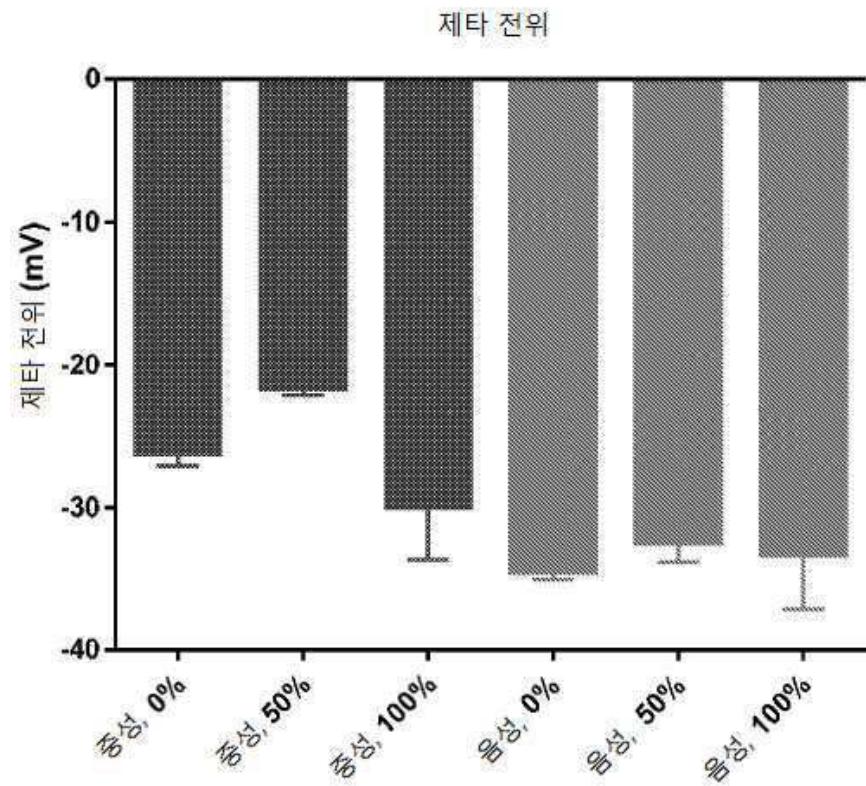
도면6



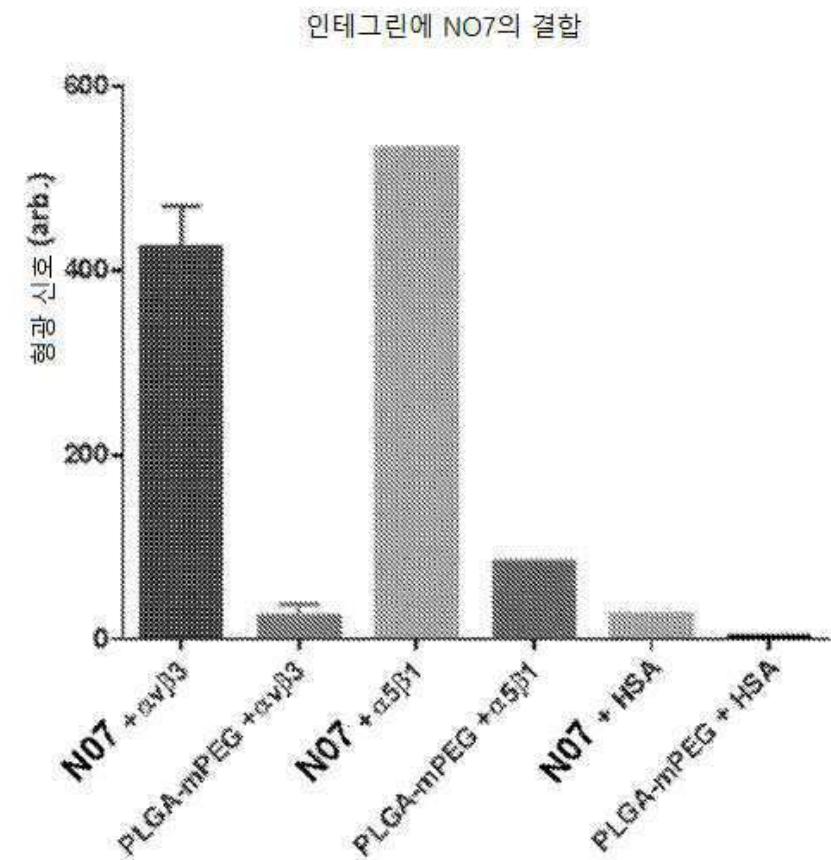
도면7



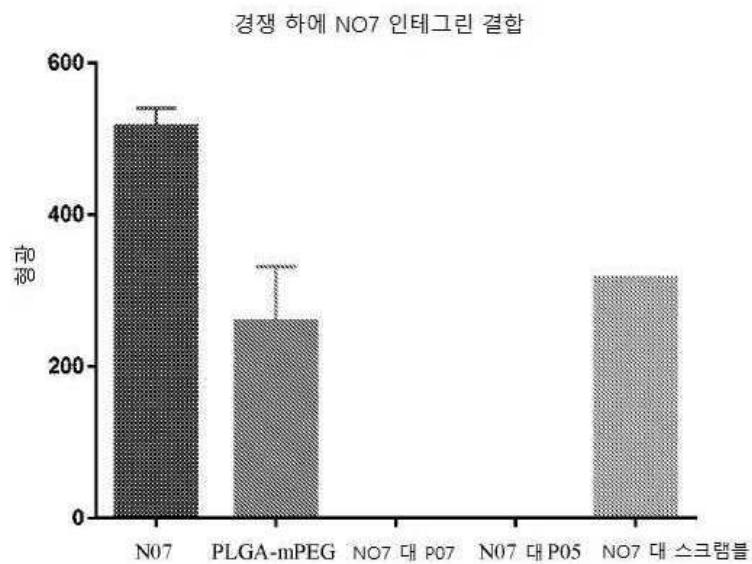
도면8



도면9

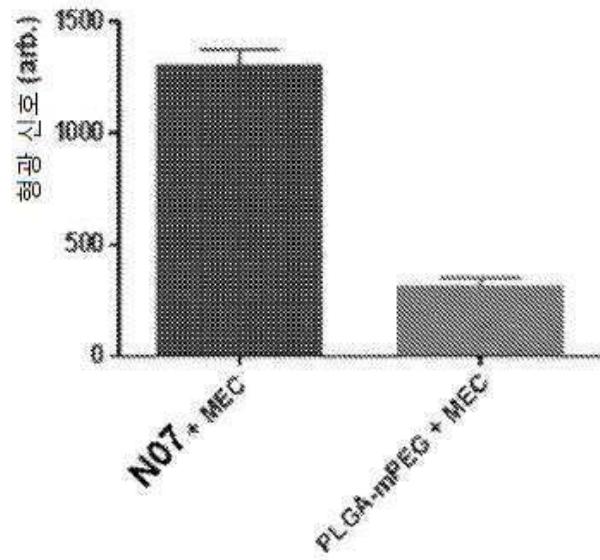


도면10

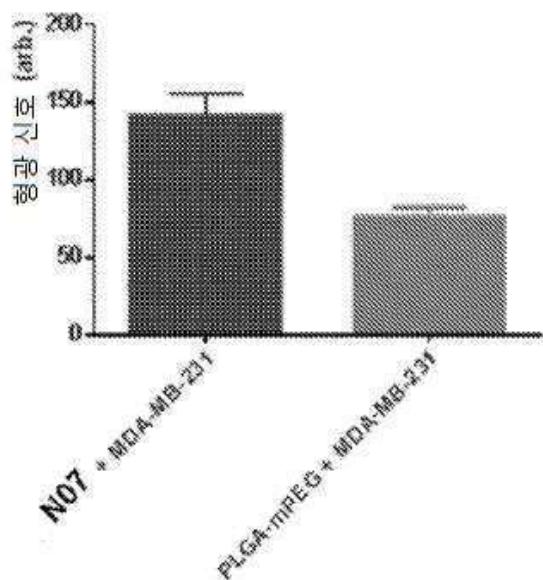


도면11

MEC 세포에 NO7의 결합

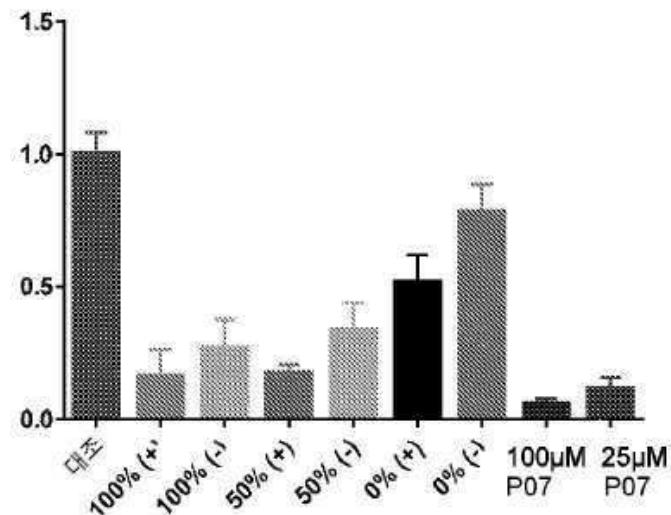


MDA-MB-231 세포에 NO7의 결합

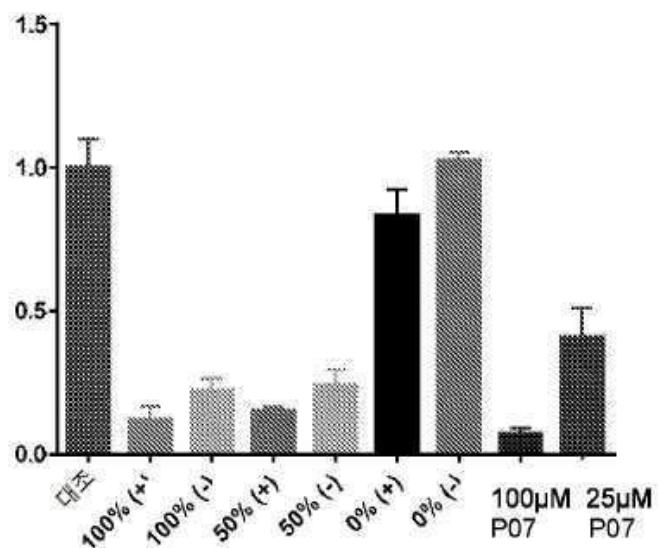


도면12

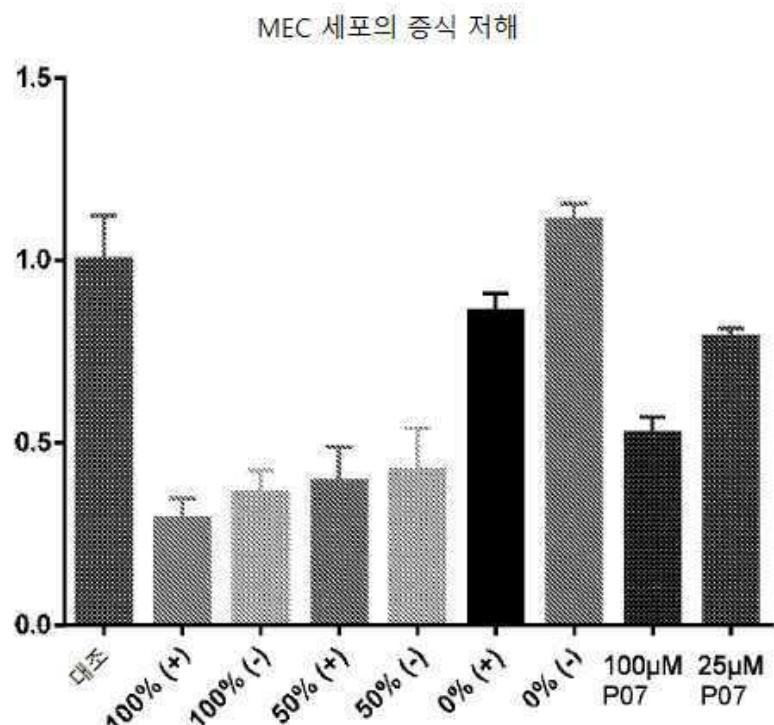
MB-MDA-231 세포의 부착 저해



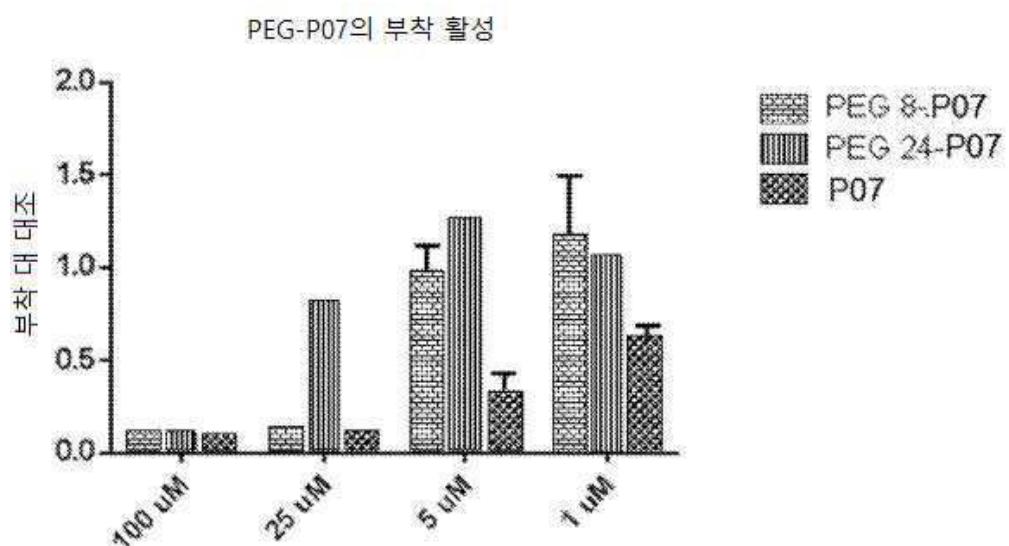
MEC 세포의 부착 저해



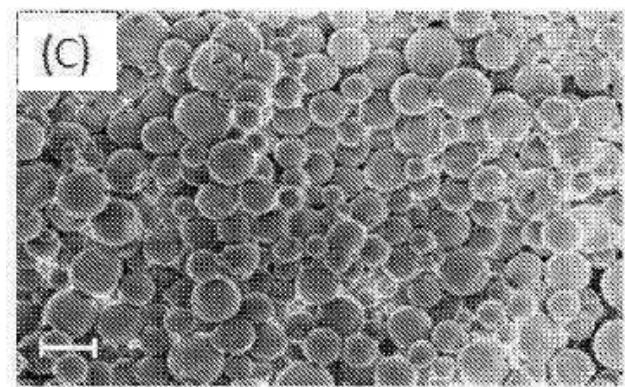
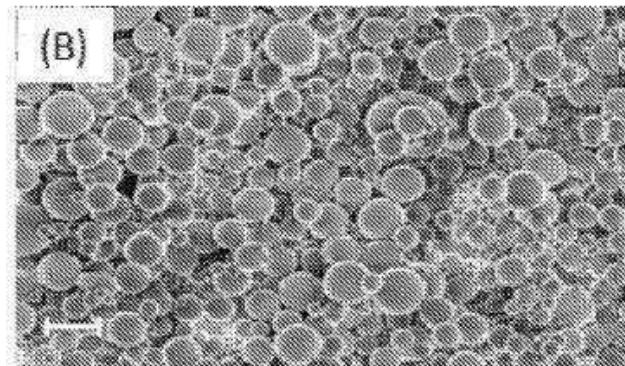
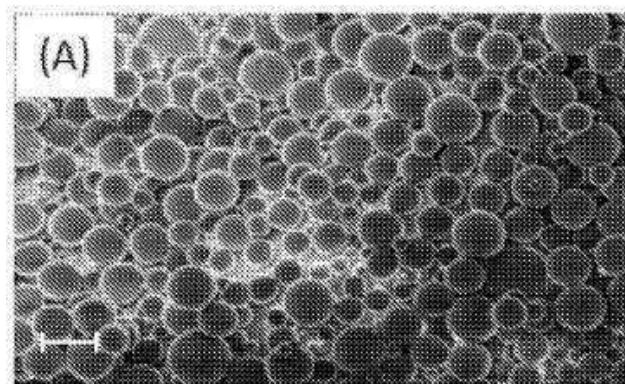
도면13



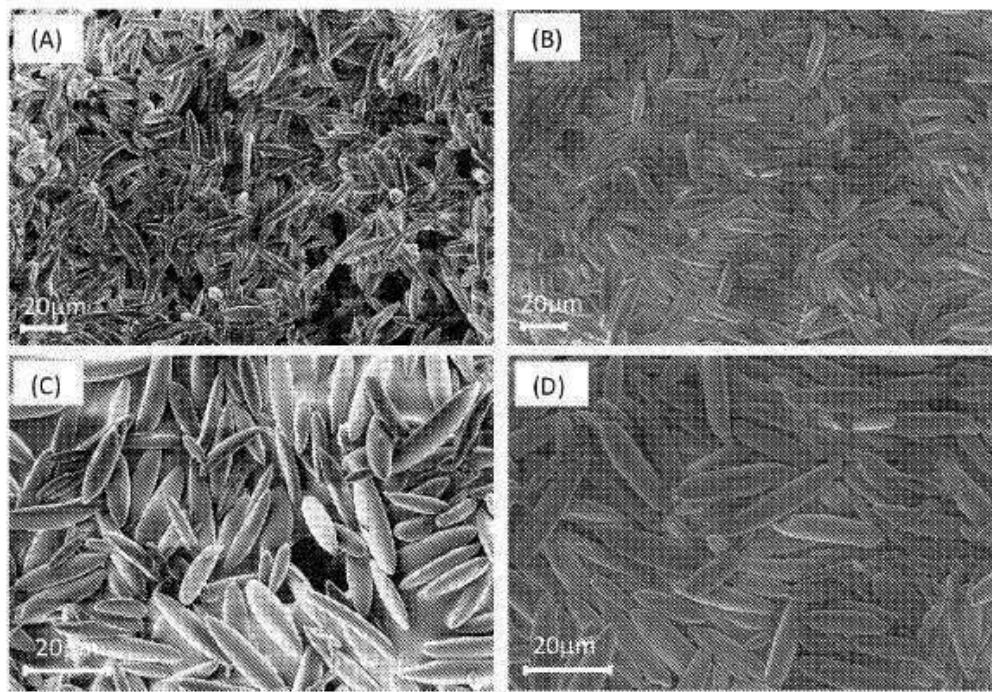
도면14



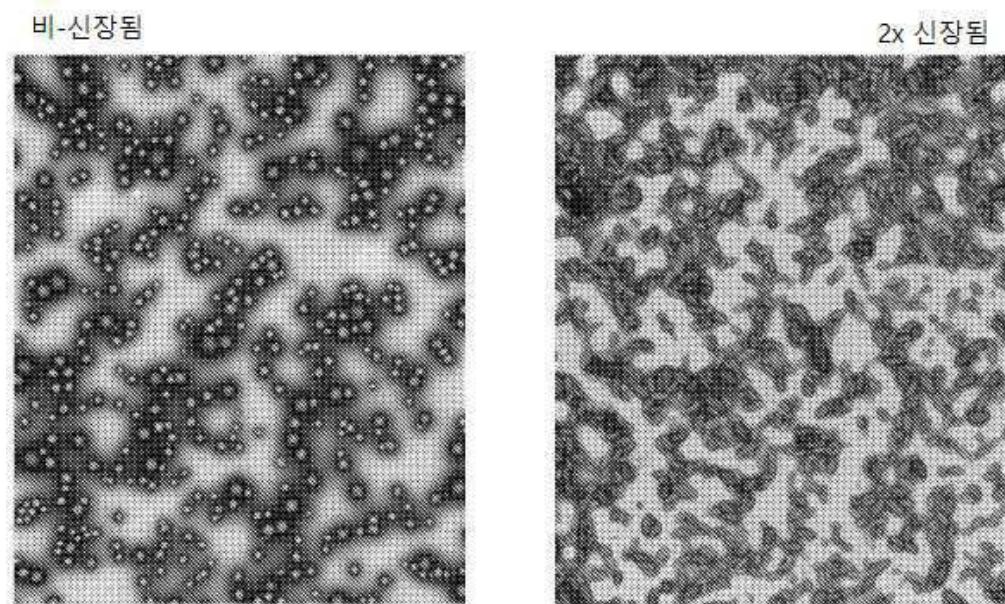
도면15



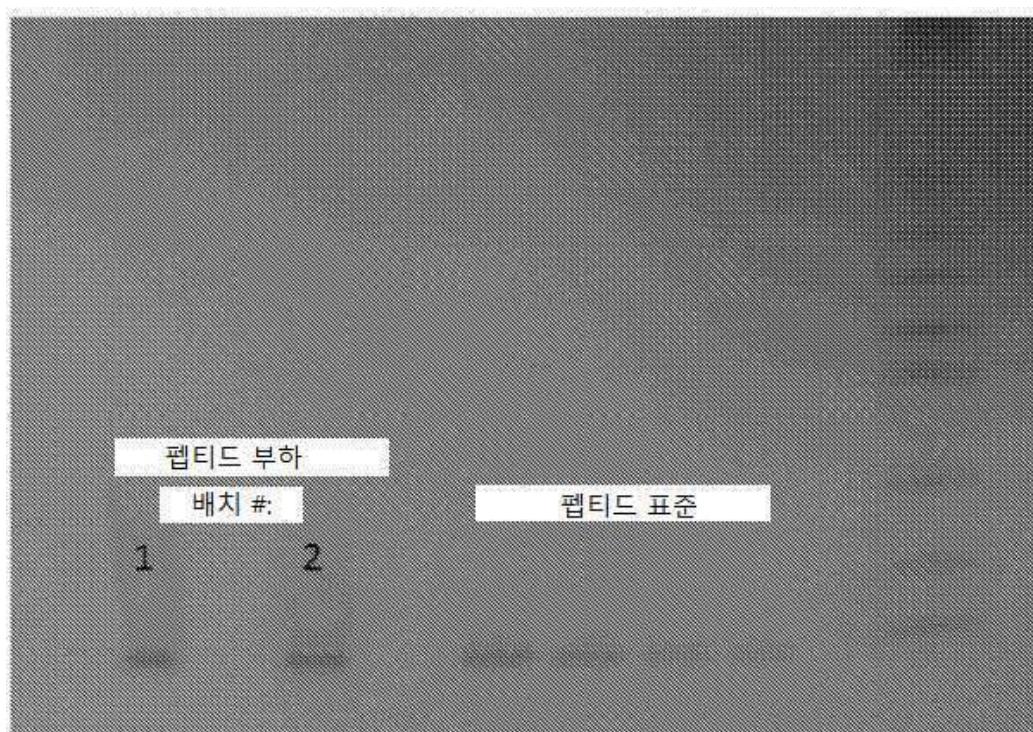
도면16



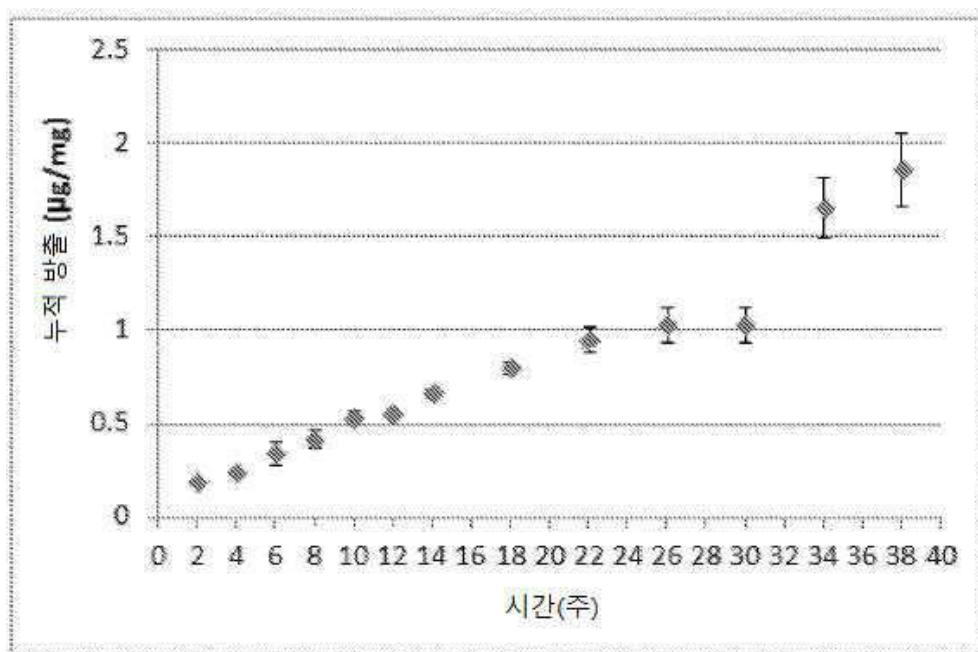
도면17



도면18



도면19



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ASCLEPIX THERAPEUTICS, LLC

BRESSLER, ERIC

GREEN, JORDAN

PANDEY, NIRANJAN

POPEL, ALEKSANDER

SHMUELI, RON

<120> PEPTIDES WITH ANTI-ANGIOGENIC, ANTI-LYMPHANGIOGENIC, AND
ANTI-EDEMIC PROPERTIES AND NANOPARTICLE FORMULATIONS

<130> ASX-001PC

<140> PCT/US16/62816

<141> 2016-11-18

<150> 62/257,569

<151> 2015-11-19

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or non-genetically
encoded amin acid

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(12)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or non-genetically
encoded amin acid

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or non-genetically
encoded amin acid

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or non-genetically

encoded amino acid

<400> 1

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe

20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 2

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asp Ile Asn Asp

1 5 10 15

Val Ile Asn Phe

20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 3

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Ile Asn Phe

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 4

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asp Ile Asn Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Ile Asn Trp

20

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 5

Phe Thr Asn Ile Asn Asn Val Thr Asn

1	5		
---	---	--	--

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 6

Phe Thr Asp Ile Asn Asp Val Thr Asn

1	5		
---	---	--	--

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-genetically encoded amin acid

<222> (12)..(12)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<220><221> Non-genetically encoded amin acid

<222> (18)..(18)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<400> 7

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Xaa Asn Ile Asn Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Xaa Asn Phe

20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (12)..(12)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (18)..(18)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<400> 8

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Ala Met Phe Xaa Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe

20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (12)..(12)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (18)..(18)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<400> 9

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Ala Phe Xaa Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe

20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (12)..(12)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (18)..(18)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<400> 10

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Ala Xaa Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe

20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (10)..(10)

<223> Nle (norleucine)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (12)..(12)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (18)..(18)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<400> 11

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Xaa Phe Xaa Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe

20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (11)..(11)

<223> 4-ClPhe (4-chlorophenylalanine)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (12)..(12)

<

223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (18)..(18)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<400> 12

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Xaa Xaa Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe

20

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 13

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Ser Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Ser Asn Phe

20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 14

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Ala Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Ala Asn Phe

20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 15

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Ile Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Ile Asn Phe

20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 16

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Thr Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Thr Asn Phe

20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (12)..(12)

<223> AllylGly (Allylglycine)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (18)..(18)

<223> AllylGly (Allylglycine)

<400> 17

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Xaa Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe

20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 18

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Val Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Val Asn Phe

20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (10)..(10)

<223> d Alanine

<400> 19

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Xaa Phe Ile Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Ile Asn Phe

20

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 20

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Ala Phe Ile Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Ile Asn Phe

20

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 21

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Ile Asn Phe

20

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (10)..(10)

<223> d Alanine

<400> 22

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Xaa Phe Ile Asp Ile Asn Asp

1 5 10 15

Val Ile Asn Phe

20

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non_Genetically encoded amin acid

<222> (2)..(2)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<220><221> Non_Genetically encoded amin acid

<222> (8)..(8)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<400> 23

Phe Xaa Asn Ile Asn Asn Val Xaa Asn

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 24

Phe Thr Asn Ile Asn Asn Val Thr Asn

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 25

Phe Ile Asn Ile Asn Asn Val Ile Asn Phe

1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 26

Phe Ser Asn Ile Asn Asn Val Ser Asn Phe

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

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 27

Phe Ala Asn Ile Asn Asn Val Ala Asn Phe

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

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (2)..(2)

<223> AllylGly (Allylglycine)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (8)..(8)

<223> AllylGly (Allylglycine)

<400> 28

Phe Xaa Asn Ile Asn Asn Val Xaa Asn Phe

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

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 29

Phe Val Asn Ile Asn Asn Val Val Asn Phe

1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (2)..(2)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (8)..(8)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<400> 30

Ala Xaa Asn Ile Asn Asn Val Xaa Asn Phe

1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (1)..(1)

<223> 4-ClPhe (4-chlorophenylalanine)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (2)..(2)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<220><221> Non-Genetically encoded amin acid

<222> (8)..(8)

<223> Abu (2-Aminobutyric acid)

<400> 31

Xaa Xaa Asn Ile Asn Asn Val Xaa Asn Phe

1 5 10