



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년06월27일
(11) 등록번호 10-1279580
(24) 등록일자 2013년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
C07K 14/515 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7027406
(22) 출원일자(국제) 2009년05월05일
심사청구일자 2010년12월06일
(85) 번역문제출일자 2010년12월06일
(65) 공개번호 10-2011-0055484
(43) 공개일자 2011년05월25일
(86) 국제출원번호 PCT/ES2009/000236
(87) 국제공개번호 WO 2009/138533
국제공개일자 2009년11월19일
(30) 우선권주장
P200801291 2008년05월06일 스페인(ES)
(56) 선행기술조사문헌
US20080058922 A1
WO2006110813 A2
WO2006134203 A1

(73) 특허권자
베넷 페러스, 데이비드
스페인, 상 키르제 델 팔레스 이-08192, 28, 씨/몬체니
프레토 가르시아, 호르헤 알베르토
베네수엘라, 시티 피티오 오르다스, 에도 볼리바르, 하우스 13, 울브 엘 티아모 컨트리 클럽 스트리트 2비
코르코스테규 구라야, 프란시스코 데 보르자
스페인, 상 키르제 델 팔레스 이-08192, 28, 씨/몬체니
(72) 발명자
베넷 페러스, 데이비드
스페인, 상 키르제 델 팔레스 이-08192, 28, 씨/몬체니
코르코스테규 구라야, 프란시스코 데 보르자
스페인, 상 키르제 델 팔레스 이-08192, 28, 씨/몬체니
프레토 가르시아, 호르헤 알베르토
베네수엘라, 시티 피티오 오르다스, 에도 볼리바르, 하우스 13, 울브 엘 티아모 컨트리 클럽 스트리트 2비
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 **혈관신생억제 분자의 세트 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 VEGF 165의 안티센스 핵산 분자, 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인의 안티센스 핵산 분자 및 VAP-1의 안티센스 핵산 분자, VEGF 165의 특이적 항체 분자, 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인에 특이적인 항체 분자 및 VAP-1의 특이적 항체 분자 및/또는 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 분자 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 혈관신생억제 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 약제의 생산을 위한 상기 분자의 용도를 보호한다.

특허청구의 범위

청구항 1

혈관 증식이 일어나는 과정의 치료에 사용되는, 하기 i), ii) 및 iii)을 약학적으로 허용가능한 양으로 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관신생억제용 약학적 조성물:

- i) 하나 또는 다수의 VEGF 165의 안티센스 핵산 분자, 또는 하나 또는 다수의 VEGF 165에 특이적인 항체 분자;
- ii) 하나 또는 다수의 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인의 안티센스 핵산 분자, 또는 하나 또는 다수의 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인에 특이적인 항체 분자; 및
- iii) 하나 또는 다수의 VAP-1의 안티센스 핵산 분자, 또는 하나 또는 다수의 VAP-1에 특이적인 항체 분자.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항의 조성물을 포함하는, 혈관 증식의 병리학적 과정이 일어나는 노인성 황반 변성, 당뇨병성 망막증, 황반 부종, 포도막염 및 암으로 구성된 군으로부터 선택된 질환의 치료용 약학적 조성물..

청구항 4

제 1항의 조성물을 포함하는, 장기적인 치료 효과를 갖는, 망막 신생 혈관 형성의 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 유리체내 경로에 의해 투여되는 것을 특징으로 하는 혈관신생억제용 약학적 조성물.

청구항 6

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 혈관 질환의 치료 분야에 포함되고, 구체적으로는 혈관신생억제 활성 분자군 및 혈관 질환에서 이의 용도에 관한 것이며, 더 구체적으로는 암 및/또는 안 질환에서 이들의 용도에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 혈관신생억제 활성을 갖는 분자 세트(set)를 포함하는 약학적 조성물 및 항암 및/또는 안 치료에 유용한 약제의 생산에서 상기 조성물의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 혈관신생은 이미 존재하는 관에서 새로운 혈관이 형성되는 것으로 구성된 생리학적 과정이다. 혈관신생은 배아 발생, 신체 성장 및 상처를 치유하는 동안에 정상적으로 일어나는 현상이다. 하지만, 이는 악성 변환 및 암이 성장하는 사이에도 일어나는 일차적 과정이다.

- [0003] 혈관신생이 일어나기 위해서는, 혈관내피세포가 조직 주위에 침윤하고 새로운 모세혈관의 아펙스(apex)에서 증식해야 한다. 침윤 및 증식의 두 과정은 새로운 모세관망(capillary network)이 완전히 구축될 때까지 순차적으로 반복된다. 처음에, 특정 내피 세포는 그 기본 막이 분해되고 혈관 주위 결합 조직에 침투하는 매우 작은 버드(buds)를 형성한다. 이러한 버드(buds)는 내피 세포가 아펙스(apex)로 전이되거나 다른 내피 세포가 아펙스(apex) 수준 아래로 전이됨을 통해 형성된다. 버드가 신장됨으로, 루멘(lumen)은 안쪽에서 점차 형성된다. 이러한 방식으로, 중공성 관이 형성되고, 각각이 문합되고, 모세관 고리가 형성되어 혈액 순환이 시작될 수 있다. 새롭게 형성된 모세관에 새로운 버드가 생겨나면서, 결국에 모세관망이 완성되게 된다[Hanahan D., Weinberg R.A. *The hallmarks of cancer. Cell* 100:57-70, 2000; Hobson B., Denekamp J. *Endothelial 증식 in tumours and normal tissue: continuous labelling studies. Br. J. Cancer* 49:405-13, 1984; Hanahan D., Folkman J. *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell* 86:353-64, 1996; Carmeliet P. *Mechanisms of \square and arteriogenesis. Nat. Med.* 6:389-95, 2000].
- [0004] 모세혈관은 내피세포와 혈관주피세포로 구성된다. 이러한 두 종류의 세포는 모세관망(capillary network)의 구성을 완성하기에 충분하다. 특이적인 혈관신생 분자들은, 특이적인 억제제들에 의해 중단될 수 있는 이러한 과정을 시작할 수 있다. 주어진 시기에 더 중요한 생리학적 요구조건들에 따라, 반대되는 기능을 갖는 이러한 분자들은 지속적으로 한 방향 또는 반대 방향에서 공동작용하는 방식으로 작용한다. 따라서, 그것들이 병이 진행되지 않는 상태에서 혈관망(vascular network)을 유지하는 것과 같은 방법으로, 그것들은 또한, 예를 들어 상처가 치유되는 동안 일어나는 것처럼, 급격한 혈관 내피세포의 증식을 유발할 수도 있다. 혈관신생 과정이 일어날지 아닐지의 여부는 긍정적인 신호와 부정적인 신호 사이의 정교한 균형의 결과이다.
- [0005] 혈관신생은 상처 치유, 골절 치유, 생리 주기, 등을 포함하는 많은 생리학적 과정들에 관여된다. 반면에, 류머티스 관절염(rheumatic arthritis), 건선(psoriasis), 마르토펠라증(bartonellosis), 이식된 장기의 거부반응, 출혈(hemorrhages) 및, 예를 들어 노인성 황반 변성, 당뇨병성 망막증, 황반 부종 및 포도막염과 같은 시각 신혈관 형성(맹목의 가장 흔한 원인 중의 하나)과 같은 많은 병리들이 혈관신생에 의존적이다. 또한, 혈관신생은 종양의 진행적인 성장 및 전이적인 분포에 중요한 역할을 한다. 종양은 자라기 위하여 지속적으로 새로운 모세관의 성장을 자극할 필요가 있다. 게다가, 종양 내의 새로운 혈관은 악성 세포들에게 그것들이 순환에 들어가서 먼 부위들에서 전이를 형성할 수 있는 경로를 제공한다[Hanahan D., Weinberg R.A. *The hallmarks of cancer. Cell* 100:57-70, 2000; Hobson B., Denekamp J. *Endothelial 증식 in tumours and normal tissue: continuous labelling studies. Br. J. Cancer* 49:405-13, 1984; Hanahan D., Folkman J. *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell* 86:353-64, 1996; Carmeliet P. *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat. Med.* 6:389-95, 2000; Maltepe E., Simon M.C. *The role of HIF-1 and ARNT proteins in blood vessel development. In: angiogenesis in health and disease (Rubany G.M., Ed.), Marcel Dekker, New York, pp 133-144; Kaban K., Herbst R.S. angiogenesis as a target for cancer therapy. Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 16:1125-71, 2002; Rakic J.M., Maillard C., Jost M., Bajou K., Masson V., Devy L., Lambert V., Foidart J.M., Noel A. *Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. Cell Mol. Life Sci.* 60:463-73, 2003; Bazzoni G., Dejana E., Lampugnani M.G. *Endothelial adhesion molecules in the development of the vascular tree. Curr. Opin. Cell Biol.* 11:573-81, 1999; Lafleur M.A., Forsyth P.A., Atkinson S.J., Murphy G., Edwards D.R. *Perivascular cells regulate endothelial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:463-73, 2001; Folkman J. *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin. Oncol.* 29(suppl.16):15-8, 2002].
- [0006] 특히 시각 병리 분야에서 최근 몇 년 동안, 몇 년 전에 이미 밝혀진 시각 신혈관 형성에 관여하는 인자인 VEGF 165(Vascular Endothelial Growth Factor)와 같이, 눈에 존재하는 혈관신생 인자에 대한 특이적 억제제의 개발을 가능하게 하는 현저한 진보가 있어왔다[Napoleone Ferrara & Robert S. Kerbel, *Angiogenesis as a therapeutic target, Nature* 438:967-971, 15 December 2005]. 이러한 인자는 그 합성 및 상기 인자들의 생성을 위해 이전 단계에서 필요한, 새로운 혈관 생성을 충분히 활성화할 수 있는 보조 인자들이 필요하다. 상기

보조인자들은 새로운 혈관의 증식과 분열 신호의 해석에 중요한 역할을 하는, 세포의 부착, 이동 및 증식을 매개할 수 있는 이질역학 막 단백질인 인테그린(integrin)이라 불리는 것을 포함하는 소위 부착 분자들이다. 간접적인 증거들이 인테그린(integrin) 알파(alpha)-3/베타(beta)-1의 억제가 VEGF를 억제한다는 것을 제시한다. 마찬가지로, 인테그린(integrin) 알파(alpha)-5/베타(beta)-5, 알파(alpha)-5/베타(beta)-1 및 알파(alpha)-4/베타(beta)-1이 혈관신생에 관여한다는 것 또한 알려져 왔다. 그것의 일부로서, SSAO(*Human Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase*)라고도 불리는 혈관 부착 단백질 1(vascular adhesion protein 1, VAP-1)은 구리를 포함하고, 효소적 기능 및 부착 기능을 모두 가지는 아민 산화효소이다. VAP-1은 각각의 알데하이드(aldehyde)의 생성 및 과산화수소와 암모니아의 방출을 일으키면서, 1차 아민의 산화적 탈아민화를 촉매한다. 막-연결 VAP-1은 염증을 일으킨 혈관 내에서 백혈구와 활성화된 내피 세포 간의 상호작용을 매개하는 염증-유도성 내피 세포-부착 분자이다. 직접적인 부착 기능과 효소적 기능은 모두 부착 일련단계(cascade)에 관여하는 것으로 보인다.

[0007] 안티센스 전략들이 개발된 것처럼, 치료제로서 핵산 분자를 이용하는 아이디어가 몇 년 전에 발상되었다. 안티센스 화합물은 원리적으로 암호화하는 mRNA에 서열-의존적인 혼성화를 통하여 표적 단백질의 합성을 방해하는 단일-사슬 핵산이다. 핵산 앵타머(aptamers)에 기반한 작용 기작은 전혀 다르다. 앵타머는 표적 단백질에 대한 고-친화성 연결을 결정하는 앵타머의 특이적인 3차 구조로의 접힘을 통하여 단백질 기능을 직접적으로 억제하는 단일-사슬 핵산이다.

[0008] 지금까지 공개된 모든 최신의 지식을 고려할 때, 단일클론 항체의 개별적인 이용만이 VEGF 165의 순환을 억제하는 것이라 평가되었다. 따라서, 본 발명자들은 VEGF 165의 최대량을 차단하기 위한 가장 적절한 방법이, 혈관신생을 야기하는 여러 인자들, 이 경우에는 다른 항체(항-VEGF, 항-VAP1 및 항-알파9) 및 상기 인자들의 항-siRNA(siRNA-항-VEGF, siRNA-항-VAP1 및 siRNA-항-알파9)의 조합을 포함하는 약학적 조성물의 이용에 의한 것임을 결정하였고, 이러한 측면은 최신 기술에 기반한 전문가들에게도 자명하지 않다.

[0009] 상기에 기재된 모든 것에 따르면, 비록 혈관 문제들이 수년간 광범위하게 연구되었음에도 불구하고, 혈관신생 과정으로부터 유래되는 혈관 질환의 치료를 위한 치료적 대체제에 대한 요구는 여전히 존재한다는 점을 유의하여야 한다. 따라서, 최신에 이미 개제된 치료법들에 대한 대안으로서 효과적인 치료법을 제공함으로써, 암 및/또는 안 질환과 같은 질환을 유발하는 혈관 변형을 원상대로 되돌릴 수 있는 혈관신생억제능(antiangiogenic capacity)을 지닌 분자를 발굴하기 위한 요구는 오늘날에도 여전히 존재한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명의 목적은 약학적으로 허용가능한 양의 VEGF 165의 안티센스 핵산 분자, 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인의 안티센스 핵산 분자 및 VAP-1의 안티센스 핵산 분자, VEGF 165 특이적 항체 분자, 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인에 특이적인 항체 분자, 및 VAP-1 특이적 항체 분자 및/또는 이의 조합으로 구성된 균으로부터 선택된 적어도 하나의 분자 및 약학적으로 허용가능한 담체(vehicle)를 포함하는 혈관신생억제 약학적 조성물이다.

[0011] 본 발명의 바람직한 실시태양에 따르면, 상기 조성물은 VEGF 165의 안티센스 핵산 분자, 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인의 안티센스 핵산 분자, 및 VAP-1의 안티센스 핵산 분자로 구성된 균으로부터 선택된 적어도 두 개의 분자를 포함한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시태양에 따르면, 상기 조성물은 VEGF 165의 안티센스 핵산 분자 및 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인의 안티센스 핵산 분자를 포함한다.

- [0013] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시태양에 따르면, 상기 조성물은 VEGF 165의 안티센스 핵산 분자 및 VAP-1의 안티센스 핵산 분자를 포함한다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시태양에 따르면, 상기 조성물은 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인의 안티센스 핵산 분자 및 VAP-1의 안티센스 핵산 분자를 포함한다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시태양에 따르면, 상기 조성물은 VEGF 165의 안티센스 핵산 분자, 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인의 안티센스 핵산 분자, 및 VAP-1의 안티센스 핵산 분자를 포함한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시태양에 따르면, 상기 조성물은 VEGF 165에 특이적인 항체 분자, 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인에 특이적인 항체 분자, VAP-1에 특이적인 항체 분자로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 두 개의 분자를 포함한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시태양에 따르면, 상기 조성물은 VEGF 165에 특이적인 항체 분자 및 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인에 특이적인 항체 분자를 포함한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시태양에 따르면, 상기 조성물은 VEGF 165에 특이적인 항체 분자 및 VAP-1에 특이적인 항체 분자를 포함한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시태양에 따르면, 상기 조성물은 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인에 특이적인 항체 분자, 및 VAP-1에 특이적인 항체 분자를 포함한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시태양에 따르면, 상기 조성물은 VEGF 165에 특이적인 항체 분자, 인테그린(integrin) 알파(alpha)-9/베타(beta)-1을 형성하는 알파(alpha)-9 도메인에 특이적인 항체 분자, 및 VAP-1에 특이적인 항체 분자를 포함한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은 혈관 증식이 일어나는 병리학적 과정의 치료용 약제의 제조를 위한 상기 언급한 약학적 조성물의 용도이다. 더 구체적으로, 노인성 황반 변성, 당뇨병성 망막증, 황반 부종, 포도막염 또는 암에서 일어나는 혈관 증식의 병리학적 과정의 치료용 약제의 생산에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 목적은 장기적인 치료 효과를 갖는 망막 신혈관 형성의 치료용 약제의 제조를 위한 상기 약학적 조성물의 용도, 및 유리체내 경로에 의한 상기 약학적 조성물의 용도이다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 언급된 약학적 조성물을 환자에 투여하는 것으로 구성된 혈관 증식이 일어나는 병리학적 과정의 치료 방법이다.
- [0024] 본 발명의 분자는 상기 기재된 질환에 존재하는 새로운 혈관의 조절 및 생성에 대한 조절제로서 유용하다. 따라서, 상기 안티센스 핵산 분자로, 새로운 혈관의 생산은 상기 기재된 인자의 메신저 RNA를 통해 차단되고, 상기 특이적 단백질 항체 분자로, 상기 순환 인자가 차단된다.

[0025] 이러한 분자들은 조합하거나 또는 개별적으로 동일하게 이용될 수 있다. 따라서, 환자는 상기 기재된 인자의 메신저 RNA의 차단을 통한 새로운 혈관의 생성을 차단하기 위해 안티센스 핵산 분자(siRNA-항-VEGF, siRNA-항-VAP1 및 siRNA-항-ALPHA9)의 조합, 혈류내에서 상기 순환 인자를 차단하는 특이적 단클론 항체 분자(항-VEGF, 항-VAP1 및 항-ALPHA9)의 조합 또는 안티센스 핵산 분자 및 단클론 항체 분자(siRNA-항-VEGF, siRNA-항-VAP1, siRNA-항-ALPHA9, 항-VEGF, 항-VAP1 및 항-ALPHA9)의 조합 중 어느 하나로 치료될 수 있다.

[0026] 본 발명의 상기 안티센스 핵산 분자들은 최신 알려진 고전적인 유전 공학 기술에 의해 얻어질 수 있다.

[0027] 이러한 부분에서, 본 발명의 특정 단클론 항체 분자는 혼성 세포주(hybridoma cell line)로부터 전형적인 단백질의 펩티드와 접합하고, 상기 세포주에 융합하고 확장한 후, 썬브클로닝(subcloning)함으로써 얻을 수 있다.

[0028] 실시예

[0029] 하기에 제공되는 구체적인 실시예는 본 발명의 특성을 나타낸다. 이러한 실시예들은 단지 목적을 설명하는 데만 포함되고, 본 문서에 청구된 본 발명을 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0030] 실시예 1: 안티센스 핵산 분자로 혈관신생 인자의 발현 차단

[0031] 안티센스 핵산 분자의 세트(set)를 이용하여 혈관신생 인자의 발현을 차단하기 위하여, 상기 세트의 효과적인 양을 피험자에 투여하고, 핵산을 측정하는 기술을 이용하여 발현 저해의 정도를 측정하였다.

[0032] 실시예 2: 특이적 단클론 항체 분자로 혈관신생 인자의 순환 차단

[0033] 특이적 단클론 항체 분자의 세트를 이용하여 혈관신생 인자의 순환을 차단하기 위하여, 상기 세트의 효과적인 양을 투여하고, 단백질질을 측정할 수 있는 기술을 이용하여 상기 인자의 순환 정도를 측정하였다.

[0034] 실시예 3: 망막에 대한 독성 평가

[0035] 본 연구의 목적은 뉴질랜드 화이트 종(NZW) 토끼에 유리체내 경로를 통해 개별 및 조합하여 투여되는 세 개의 치료제([표 1]의 치료제 1, 2 및 3)에 의해 유발되는 가능한 망막 독성 효과를 평가하는 것이었다.

[0036] 상기 실험된 세 개의 치료제는 전달자를 포함한, 합성 펩티드 및 합성 간섭 RNAs(siRNA)를 갖는 다양한 단클론 항체의 조합이다. 본 실시예에서, 표에서 이용된 이름은 항원에 대한 것이다, 예: 항-VEGF, 항-VAP1 및 항-알파(alpha)-9.

표 1

치료제	항체	siRNA	전달자
1	항-VEGF-165	siRNA-항-VEGF-165	SD 1205
2	항-VAP1	siRNA-항-VAP1	SD 1205
3	항-알파(ALPHA)9	siRNA-항-알파(ALPHA)9	SD 1205

[0038] 모든 분석은 각 눈에 0.75 ug 양의 항체를, 각 눈에 0.05 ul의 부피로 유리체내 경로를 통해 투여함으로써, 수행되었다.

- [0039] 본 연구에서 그 생존력의 확인을 위해 예비 검안경 검사가 각각의 모든 동물에서 이루어졌다.
- [0040] 다양한 항체의 투여 후에, 투여 후 1, 5, 8, 12 및 33일에 검안경 검사를 연속적으로 수행하였다.
- [0041] 각각의 검안경 시험 후에, 각 군으로부터 얻은 한 마리 동물을 희생시키고, 그 두 눈을 적출하고 10% 포르말린 (formalin)에 넣어, 차갑게 보관하였다.
- [0042] 본 연구의 목적은 뉴질랜드 화이트 종(NZW) 토끼에 유리체내 경로를 통해 개별 및 조합하여 투여되는 세 개의 치료제([표 1]의 치료제 1, 2 및 3)에 의해 유발되는 전위된 망막 독성 효과를 평가하는 것이었다.
- [0043] 물질을 조합하여 투여하는 것은 더 장기적인 치료 효과를 갖는 망막 신혈관 형성에 대한 치료제를 얻기 위함이다.
- [0044] 상기 유리체내 경로는 인간과 함께 사용할 수 있는 경로이기 때문에 선택되었다.
- [0045] 투여 경로 및 양:
- [0046] 상기 치료제는 오른쪽 눈에 50 ml 용액의 양으로 유리체내 경로를 통해 투여하였다(이 경로는 인간에 사용될 수 있을 것으로 예상되기 때문에 이용되었다).
- [0047] 상기 분석에서 각각에 투여된 양은 한쪽 눈당 0.75 ug이었다. 대조군은 다양한 치료제 시료의 제조에 사용된 것과 같은 담체인, 50 ul의 담체(주사가 가능한 물에 넣은 PBS)를 오른쪽 눈에 같은 경로로 투여하였다.
- [0048] 조성물의 제조:
- [0049] 상기 조성물 각각에 들어있는 항체의 농도는 하기와 같다(표 2 참조):

표 2

치료제	항체	항체 농도
1	항-VEGF-165	~1.5 mg/ml
2	항-VAP1	~0.75 mg/ml
3	항-ALPHA9	~1.5 mg/ml

- [0050]
- [0051] 항체의 농도에 따라서, PBS에서 15 ug/ml의 용액이 제조되고, 최종 조합에서 각각의 양은 두 가지 물질(항체 + siRNA)을 혼합하여 얻어진다. 이러한 방식에서, 10 ml 부피의 최종 용액이 하기와 같이 얻어진다(표 3 참조):
- [0052] 각 동물은 각각의 눈에 0.75 ug 양의 항체가 투여되었고, 최종 부피가 한쪽 눈당 0.05 ul이 되었다.

표 3

[0053]

최종 농도 (10 ml 최종 부피)		
처리	항체 농도	siRNA + 전달자 농도
1	0.05 ml 항-VEGF-165	0.05 ml siRNA-항-VEGF-165 + SD 1205
2	0.1 ml 항-VAP1	0.1 ml siRNA-항-VAP1 + SD 1205
3	0.05 ml 항-ALPHA9	0.05 ml siRNA-항-ALPHA9 + SD 1205
조합:		
4	0.05 ml 항-VEGF-165 + 0.1 ml 항-VAP1 + 0.05 ml 항-ALPHA9	0.05 ml siRNA-항VEGF-165 + SD 1205 + 0.1 ml siRNA-항-VAP1 + SD 1205 + 0.05 ml siRNA-항-ALPHA9 + SD 1205

[0054] 실험 설계:

[0055] 모든 동물에 유리체내 경로에 의해 각 치료제를 투여하기 전에, 본 연구의 생존력을 확인하기 위해 예비 검안경 검사를 수행하였다. 이러한 연구는 0.5% 트로픽아미드(tropicamide)가 포함된 2.5% 페닐에프린(phenylephrine)의 국소적인 눈 투여를 통해 동공이 확대되는 현상을 유도한 후에 고해상도의 현미경을 이용하여 수행되었다. 동물들은 케타민 염산염(ketamine hydrochloride)(50 mg/kg) 및 실라신 염산염(xilacine hydrochloride)(5 mg/kg)을 테트라카인(tetracaine)(0.1%) 및 옥시부프로카인(oxybuprocaine)(0.4%)를 포함한 국소 마취 조합과 함께 조합하여 마취시켰다.

[0056] 상기 치료제는 오른쪽 눈에 50 µl 용액으로 유리체내 경로를 통해 투여하였다(이 경로는 인간에 사용될 수 있을 것으로 예상되기 때문에 이용되었다).

[0057] 상기 분석에서 각각에 투여된 양은 한쪽 눈당 0.75 µg이었다. 대조군은 다양한 치료제 시료의 제조에 사용된 것과 같은 담체인, 50 µl의 담체(주사가능한 물에 넣은 PBS)를 오른쪽 눈에 같은 경로로 투여하였다.

[0058] 다양한 치료제의 투여 후에, 투여 후 1, 5, 8, 12 및 33일에 다양한 검안경 검사를 수행하였다.

[0059] 각각의 검안경 시험 후에, 각 군으로부터 얻은 한 마리 동물을 페노바르비탈나트륨(sodium phenobarbital)을 과량 사용하여 희생시키고, 각각의 동물로부터 두 눈을 적출하고 10% 포르말린(formaline)에 넣어, 차갑게 보관하였다. 포르말린(formaline) 용액 속에 넣은 즉시, 내부의 포르말린화를 위하여 30G 바늘로 홍채 아래에 즉시 구멍을 뚫었다.

[0060] 본 연구기간 동안 동물들의 무게를 비교하였을 때 변칙적인 값이 관찰되지 않았다. 추가로, 검안경 평가동안 관찰된 변형을 제외하고, 본 연구기간 동안 동물의 행동 또는 동물의 건강 상태의 변화가 관찰되지 않았다.

[0061] 물질을 조합하여 투여하는 것은 더 장기적인 치료 효과를 갖는 망막 신혈관 형성에 대한 치료제를 얻기 위함이다.

[0062] 얻어진 결과들은 각각의 siRNA + 전달자(Transporter)와 함께 각 항체를 투여하거나 그들의 조합을 투여하는 것은 모두 망막의 독성을 유발하지 않고, 따라서, 개별적으로 또는 조합으로 질병의 치료를 위해 이용될 수 있음을 나타낸다.