



공개특허 10-2020-0026918

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0026918  
(43) 공개일자 2020년03월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 47/61* (2017.01) *A61K 38/08* (2019.01)  
*A61K 38/10* (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)  
*A61K 47/64* (2017.01) *A61L 27/18* (2006.01)  
*A61L 27/54* (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)  
*C08L 67/04* (2006.01)

- (52) CPC특허분류  
*A61K 47/61* (2017.08)  
*A61K 38/08* (2019.01)

(21) 출원번호 10-2020-7002776  
(22) 출원일자(국제) 2018년07월09일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년01월29일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/041280  
(87) 국제공개번호 WO 2019/010490  
국제공개일자 2019년01월10일

(30) 우선권주장  
62/530,066 2017년07월07일 미국(US)

(71) 출원인  
시믹 아이피, 엘엘씨  
미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 홀턴 스트리트  
5980 스위트 600  
(72) 발명자  
파데리, 존 에릭  
미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 홀턴 스트리트  
5980 스위트 600 시믹 바이오, 인크. 내  
프레스트위치, 글렌

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 홀턴 스트리트  
5980 스위트 600 시믹 바이오, 인크. 내  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
양영준, 이상남

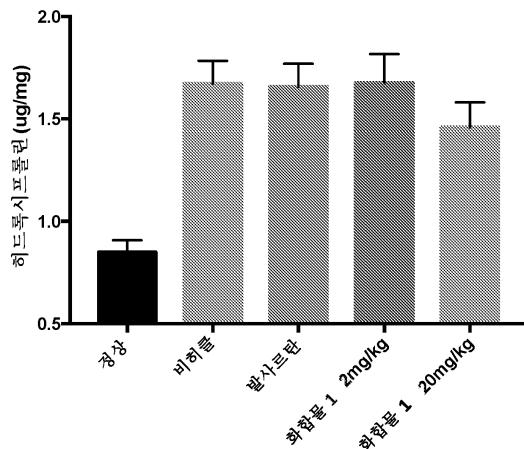
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 **화학적으로 변형된 백본을 갖는 생체접합체**

### (57) 요 약

화학적으로 변형된 글리칸 백본에 공유 결합된 콜라겐-결합 웨티드를 포함하는 합성 생체접합체, 그를 함유하는 조성물, 및 그의 용도가 본원에 제공된다.

**대 표 도** - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 38/10* (2013.01)

*A61K 38/16* (2013.01)

*A61K 47/64* (2017.08)

*A61L 27/18* (2013.01)

*A61L 27/54* (2013.01)

*A61P 1/16* (2018.01)

*C08L 67/04* (2013.01)

*A61L 2400/06* (2013.01)

(72) 발명자

**스튜어트, 캐서린 앤리슨**

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 홀턴 스트리트

5980 스위트 600 시믹 바이오, 인크. 내

**카브라, 하르사**

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 홀턴 스트리트

5980 스위트 600 시믹 바이오, 인크. 내

---

**이콰, 엘비스**

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 홀턴 스트리트  
5980 스위트 600 시믹 바이오, 인크. 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

적어도 1종의 웨티드(들)를 포함하는 생체접합체이며, 여기서 웨티드(들)는 화학적으로 황산화된 글리칸에 공유 결합된 콜라겐-결합 단위를 포함하는 것인 생체접합체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 약 0.5 내지 약 4의 황산화 정도로 화학적으로 황산화된 것인 생체접합체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 디사카라이드당 약 0.5 내지 약 2.5개의 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 생체접합체.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 디사카라이드당 약 2 내지 약 3개의 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 생체접합체.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 모노사카라이드당 약 0.25 내지 약 0.75개의 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 생체접합체.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 약 5 내지 약 1000 kDa의 분자량을 갖는 것인 생체접합체.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 약 25 kDa 초과의 분자량을 갖는 것인 생체접합체.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 150 kDa 초과의 분자량을 갖는 것인 생체접합체.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 약 150 내지 약 750 kDa의 분자량을 갖는 것인 생체접합체.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 약 150 내지 약 350 kDa의 분자량을 갖는 것인 생체접합체.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 약 200 내지 약 400 kDa의 분자량을 갖는 것인 생체접합체.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 화학적으로 황산화된 알기네이트, 화학적으로 황산화된 콘드로이틴, 화학적으로 황산화된 콘드로이틴 술페이트, 화학적으로 황산화된 더마탄, 화학적으로 황산화된 헤파란, 화학적으로 황산화된 헤파로산, 화학적으로 황산화된 헤파란 술페이트, 화학적으로 황산화된 헤파린, 화학적으로 황산화된 텍스트란, 화학적으로 황산화된 텍스트란 술페이트, 화학적으로 황산화된 히알루론산, 또는 그의

유도체인 생체접합체.

### 청구항 13

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 카르복시메틸 유도체인 생체접합체.

### 청구항 14

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 알기네이트, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 콘드로이틴, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 콘드로이틴 슬레이트, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 더마탄, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 헤파란, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 헤파로산, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 헤파란 슬레이트, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 헤파린, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 헤파란 텍스트란, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 텍스트란 슬레이트, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 히알루론산, 또는 그의 유도체인 생체접합체.

### 청구항 15

제1항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 화학적으로 황산화된 헤파로산, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 헤파로산, 화학적으로 황산화된 텍스트란, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 텍스트란, 화학적으로 황산화된 히알루론산, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 히알루론산, 또는 그의 유도체인 생체접합체.

### 청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 웨티드에 의한 약 1 내지 약 75 퍼센트 (%) 관능화를 포함하며, 여기서 웨티드에 의한 퍼센트 (%) 관능화는 웨티드에 의해 관능화된 화학적으로 황산화된 글리칸 상의 디사카라이드 단위의 퍼센트에 의해 결정되는 것인 생체접합체.

### 청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 웨티드에 의한 약 5 내지 약 30 퍼센트 (%) 관능화, 또는 웨티드에 의한 약 10 내지 약 40 퍼센트 (%) 관능화를 포함하는 것인 생체접합체.

### 청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 웨티드에 의한 약 15 퍼센트 (%) 관능화, 또는 웨티드에 의한 약 20 퍼센트 (%) 관능화, 또는 웨티드에 의한 약 25 퍼센트 (%) 관능화, 또는 웨티드에 의한 약 30 퍼센트 (%) 관능화를 포함하는 것인 생체접합체.

### 청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 웨티드(들)의 콜라겐-결합 단위가 약 1 mM 미만의 해리 상수 ( $K_d$ )로 콜라겐에 결합하는 것인 생체접합체.

### 청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 웨티드(들)가 최대 약 120개의 아미노산, 또는 최대 약 100개의 아미노산, 또는 최대 약 50개의 아미노산, 또는 최대 약 40개의 아미노산을 포함하는 것인 생체접합체.

### 청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 웨티드(들)가 최대 약 25개의 아미노산을 포함하는 것인 생체접합체.

### 청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 1 내지 약 25개의 웨티드(들), 또는 약 5 내지 약 150개의 웨티드, 또는 약 75 내지 약 125개의 웨티드, 또는 약 100개의 웨티드를 포함하는 생체접합체.

### 청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적으로 황산화된 글리칸이 산화적으로 절단된 사카라이드 단위는 함유하지 않는 것인 생체접합체.

#### 청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 히드라지드 기가 임의로 스페이서를 통해 웹티드(들) C-말단에 결합된 것인 생체접합체.

#### 청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 히드라지드 기가 임의로 스페이서를 통해 웹티드(들) N-말단에 결합된 것인 생체접합체.

#### 청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 히드라지드 기가 글리신, 알라닌, 아르기닌, 리신 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산을 포함하는 스페이서를 통해 C-말단에 결합된 것인 생체접합체.

#### 청구항 27

제25항에 있어서, 스페이서가 서열 글리신-글리신, 세린-글리신, 리신-아르기닌, 아르기닌-아르기닌, 및 글리신-세린-글리신을 포함하는 것인 생체접합체.

#### 청구항 28

글리칸당 웹티드(들)의 평균 수가 약 50개 초과인 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 생체접합체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 29

글리칸당 웹티드(들)의 평균 수가 약 50 내지 약 150개인 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 생체접합체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 30

글리칸당 웹티드(들)의 평균 수가 약 100개인 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 생체접합체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 31

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 생체접합체 또는 제28항 내지 제30항 중 어느 한 항의 조성물 및 콜라겐-결합 단위를 포함하는 추가의 웹티드를 포함하는 조성물이며, 여기서 추가의 웹티드는 생체접합체에 비-공유 결합되고, 추가로 여기서 조성물은 글리칸 내 디사카라이드 단위의 수에 기초하여 1% 내지 약 200% 웹티드를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 32

제31항에 있어서, 추가의 웹티드가 생체접합체에 이온 결합된 것인 조성물.

#### 청구항 33

화학적으로 황산화된 글리칸을 콜라겐-결합 단위를 포함하는 적어도 1개의 웹티드(들)와 임의로 활성화제의 존재 하에, 커플링 반응 조건 하에 접촉시켜 생체접합체를 제공하는 것을 포함하는, 생체접합체를 제조하는 방법.

#### 청구항 34

제33항에 있어서, 먼저 화학적으로 황산화된 글리칸을 제공하기에 충분한 반응 조건 하에 글리칸을 황산화제와 접촉시킴으로써 화학적으로 황산화된 글리칸을 제공하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 35

제33항에 있어서, 펩티드가 히드라지드 기를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 36

제33항에 있어서, 펩티드(들)가 펩티드 상의 말단 히드라지드 기와 화학적으로 황산화된 글리칸 상의 카르보닐기 사이의 히드라지드-카르보닐 연결을 통해 화학적으로 황산화된 글리칸에 결합된 것인 방법.

#### 청구항 37

제33항에 있어서, 활성화제가 카르보디이미드 시약인 방법.

#### 청구항 38

제33항에 있어서, 활성화제가 N,N'-디시클로헥실카르보디이미드, N,N'-디이소프로필카르보디이미드, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 및 0-(N-숙신이미딜)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 39

제33항에 있어서, 커플링 반응 조건이 유효량의 반응성 친핵체, 예컨대 N-히드록시숙신이미드 (NHS), 히드록시벤조트리아졸 (HOEt), 1-히드록시-1,2,3-벤조트리아졸, HOEt/CuCl<sub>2</sub>, 7-아자-1-히드록시-1,2,3-벤조트리아졸 (HOAt), 3,4-디히드로-3-히드록시-4-옥소-1,2,3-벤조트리아졸 (HOOEt), 및/또는 3-술포-1-히드록시숙신이미드 (S-NHS), 또는 그의 유도체를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 40

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 생체접합체 또는 제28항 내지 제30항 중 어느 한 항의 조성물의 유효량을 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에서 섬유증을 치료하는 방법.

#### 청구항 41

제40항에 있어서, 섬유증이 섬유화 질환의 결과인 방법.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 섬유화 질환이 폐 섬유증, 낭성 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 신섬유증, 간 섬유증, 간경변증, 심장 섬유증, 심방 섬유증, 심내막심근 섬유증, 심근경색, 신경교 반흔, 관절섬유증, 크론병, 듀피트렌 구축, 켈로이드, 종격 섬유증, 골수섬유증, 페이로니병, 신원성 전신 섬유증, 진행성 거대 섬유증, 복막후 섬유증, 경피증, 전신 경화증 및 유착성 피막염으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 43

제42항에 있어서, 섬유화 질환이 특발성 폐 섬유증, 신섬유증, 또는 심장 섬유증인 방법.

#### 청구항 44

제41항에 있어서, 섬유화 질환이 간 섬유증인 방법.

#### 청구항 45

제44항에 있어서, 간 섬유증이 만성 알콜 노출, B형 간염 바이러스 (HBV) 감염, 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 비알콜성 지방간염 (NASH), C형 간염 바이러스 (HCV) 감염, 월슨병, 알파-1-항트립신 결핍, 혈색소증, 원발성 담즙성 간경변증, 원발성 경화성 담관염, 또는 자가면역 간염의 결과인 방법.

#### 청구항 46

제41항에 있어서, 섬유화 질환이 파브리병, 고셔병, 니만-핀병, 또는 헌터 증후군 (뮤코폴리사카라이드증)인 방법.

## 발명의 설명

### 기술분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 35 USC 119(e) 하에 2017년 7월 7일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/530,066의 이익을 주장하며, 이의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 기술분야
- [0004] 화학적으로 변형된 글리칸 백본에 공유 결합된 콜라겐-결합 웨티드를 포함하는 합성 생체접합체, 그를 함유하는 조성물, 및 그의 용도가 본원에 제공된다.

### 배경기술

- [0005] 조직에서, 세포는 다양한 거대분자, 예컨대 생체접합체, 콜라겐, 히알루론산, 라미닌, 피브로네틴 등을 함유하는 세포외 매트릭스 (ECM)에 의해 둘러싸여 있다. 포유동물에서, 생체접합체는 세포외 매트릭스의 주요 성분이며, 여기서 이들은 다른 생체접합체, 히알루론산 및 섬유 매트릭스 단백질 (예컨대 콜라겐) 모두와 큰 복합체를 형성한다. 포유동물이 노화됨에 따라 상처는 지속되고, 일부 질환 상태에서는, 신체의 특정 영역에서 (예를 들어, 활막 관절, 유리체액, 척추 디스크, 피부 등에서) 세포외 매트릭스가 손실되거나 분해되어 바람직하지 않은 증상을 유발할 수 있다. 또한, 일부 조직 손상, 예컨대 혈관 손상, 각막 손상 및 상처는 콜라겐을 포함한 세포외 매트릭스 및/또는 그의 성분의 노출을 발생시킨다.

### 발명의 내용

- [0006] 놀랍게도, 본원에 기재된 생체접합체는 이들이 GAG 분해 효소에 대한 기질인 것으로 발견되지 않아 잘 대사되지 않으며, 이들은 비-황산화된 유도체와 비교하여 감소된 신장 클리어런스와 함께 연장된 반감기를 가지면서 간을 표적화하는 것으로 밝혀졌다. 본 개시내용은 적어도 1개의 웨티드(들)를 포함하는 생체접합체를 제공하며, 여기서 웨티드(들)는 화학적으로 황산화된 글리칸에 공유 결합된 콜라겐-결합 단위를 포함한다.
- [0007] 또한, 본원에 기재된 생체접합체를 포함하는 조성물, 및 그의 사용 방법이 제공된다. 한 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 글리칸에 결합된 웨티드 수는 다양하다. 예를 들어, 조성물은 생체접합체를 포함할 수 있고, 여기서 그에 결합된 웨티드의 수는 평균으로서, 예컨대 글리칸당 약 50 내지 약 150개 웨티드로 계산된다.
- [0008] 또한, 본원에 기재된 생체접합체 또는 그를 함유하는 조성물, 및 1종 이상의 희석제 또는 담체 (예컨대 염수)를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.
- [0009] 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체 및 이를 포함하는 조성물은 폐 섬유증, 낭성 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 신섬유증, 간 섬유증 (예컨대 만성 알콜 노출, B형 간염 바이러스 (HBV) 감염, 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 비알콜성 지방간염 (NASH), C형 간염 바이러스 (HCV) 감염, 월슨병, 알파-1-항트립신 결핍, 혈색소증, 원발성 담즙성 간경변증, 원발성 경화성 담관염, 또는 자가면역 간염의 결과로서의 간 섬유증), 간경변증, 심장 섬유증, 심방 섬유증, 심내막심근 섬유증, 심근경색, 신경교 반흔, 관절섬유증, 크론병, 뒤피트렌 구축, 켈로이드, 종격 섬유증, 골수섬유증, 페이로니병, 신원성 전신 섬유증, 진행성 거대 섬유증, 복막후 섬유증, 경피증, 전신 경화증 및 유착성 피막염을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에서 섬유증을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0010] 또한, 화학적으로 황산화된 글리칸을 콜라겐-결합 단위를 포함하는 적어도 1개의 웨티드(들)와 임의로 활성화제의 존재 하에, 커플링 반응 조건 하에 접촉시켜 생체접합체를 제공하는 것을 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체를 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 먼저, 화학적으로 황산화된 글리칸을 제공하기에 충분한 반응 조건 하에 글리칸을 황산화제와 접촉시킴으로써 화학적으로 황산화된 글리칸을 제공하는 것을 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0011] 본 개시내용의 특정 측면은 첨부 도면에서 볼 수 있다. 다음이 포함된다:

도 1은 화합물 1의 2회 용량의 경우의 간에서의 히드록시프롤린 함량을 보여준다.

도 2는 CCl<sub>4</sub> 모델에서의 간의 시리우스 레드 염색을 보여준다.

도 3은 밸사르탄과 비교하여 화합물 1의 2회 용량의 경우의 시리우스 레드 염색에 의해 조직학적으로 측정된 바와 같은 간에서의 콜라겐 함량을 보여준다.

도 4는 텔미사르탄과 비교하여 화합물 1의 2회 용량의 경우의 시리우스 레드에 의해 조직학적으로 측정된 바와 같은 간에서의 콜라겐 함량을 보여준다.

도 5는 NASH 모델에서 9주령의 동물에서의 간 트리글리세리드 수준을 보여준다.

도 6 및 7은 화합물 1 및 2에 대한 혈소판 억제 및 간 성상 세포 억제 데이터를 보여준다.

도 8은 신장, 방광, 또는 간에서의 형광 표지된 문자 (화합물 1, 화합물 2 및 화합물 3)의 분포를 보여주는 IVIS 영상을 보여준다. 상부 영상은 IV 주사 5분 후에 취하였고, 하부 영상은 주사 1시간 후에 취하였다. 좌측 영상은 마우스의 복측이고, 우측 영상은 배측이다.

도 9는 비관능화된 HA, 황산화된 HA 및 화합물 1의 VEGF189에 대한 결합을 보여준다.

도 10은 화합물 1B, 웨티드 단독, sHA-OPM 및 HA의 경우의 PDGF-AA에 대한 결합 곡선을 보여준다. 파선은 고분자 농도에서의 비-코팅된 웰에 대한 결합을 나타낸다 (비-특이적).

도 11은 화합물 1B, 웨티드 단독, sHA-OPM 및 HA의 경우의 PDGF-BB에 대한 결합 곡선을 보여준다. 파선은 고분자 농도에서의 비-코팅된 웰에 대한 결합을 나타낸다 (비-특이적).

도 12는 화합물 1B, 웨티드 단독, sHA-OPM 및 HA의 경우의 PDGF-CC에 대한 결합 곡선을 보여준다. 파선은 고분자 농도에서의 비-코팅된 웰에 대한 결합을 나타낸다 (비-특이적).

도 13은 화합물 1B, 웨티드 단독, sHA-OPM 및 HA의 경우의 PDGF-DD에 대한 결합 곡선을 보여준다. 파선은 고분자 농도에서의 비-코팅된 웰에 대한 결합을 나타낸다 (비-특이적).

도 14는 증가하는 양의 화합물 1, 웨티드 단독, sHA 비관능화된 것 또는 sHA 관능화된 것 (OPM)의 존재 하에서의 PDGF-BB의 그의 수용체 PDGF-R $\beta$ 에 대한 시험관내 결합을 보여준다.

도 15는 다양한 웨티드 로드의 증가하는 양의 화합물 1의 존재 하에서의 PDGF-BB의 그의 수용체 PDGF-R $\beta$ 에 대한 시험관내 결합을 보여준다.

도 16은 비히클 처리된 동물과 비교하여 높은 섬유증 스코어의 감소된 발생을 보여준다.

도 17은 2주의 시험 물품 투여 후, 30 mg/kg 화합물 1의 처리에 의해 알칼리성 포스파타제 (ALP)의 혈청 수준이 유의하게 감소되었음을 보여준다.

도 18은 간 성상 세포 (HSC) 증식에 대한 다양한 황산화 정도 및 웨티드 로드를 갖는 화합물 1 및 생체접합체의 효과를 입증하는 용량 범위 연구를 보여준다.

도 19는 간 성상 세포 (HSC) 증식에 대한 화합물 1, 백본 (화학적 유도체화, 즉, 황산화 없음), 및 백본 (0개의 웨티드 변형, "sHA-OPM")의 효과를 입증하는 용량 범위 연구를 보여준다.

### **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0012]

본 개시내용이 기재된 특정한 실시양태로 제한되지 않으며, 따라서 물론 달라질 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본 개시내용의 범주는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에, 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 실시양태를 기재하기 위한 목적이며 제한하는 것으로 의도되지 않음을 이해해야 한다.

[0013]

1. 정의

[0014]

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 개시내용이 속한 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함하는 것임을 주목해야 한다. 따라서, 예를 들어, "웨티드"에 대한 기재는 다수의 웨티드들을 포함한다.

[0015]

본원에 사용된 용어 "포함하는" 또는 "포함한다"는, 조성물 및 방법이 인용된 요소를 포함하지만 다른 것들을

배제하는 것은 아님을 의미하는 것으로 의도된다. 조성물 및 방법을 정의하기 위해 사용되는 경우 "로 본질적으로 이루어진"은 명시된 목적을 위해 조합에 대해 임의의 본질적으로 유의한 다른 요소는 배제하는 것을 의미한다. 따라서, 본원에 정의된 요소로 본질적으로 이루어지는 조성물은 청구된 기본적인 신규한 특성(들)에 물질적으로 영향을 미치지 않는 다른 물질 또는 단계는 배제하지 않을 것이다. "로 이루어진"은 다른 성분 및 실질적인 방법 단계의 미미한 요소는 배제하는 것을 의미한다. 이들 이행 용어들 각각에 의해 정의된 실시양태는 본 개시내용의 범주 내에 있다.

- [0016] 용어 "약"은 범위를 포함한 수치적 지정, 예를 들어 온도, 시간, 양 및 농도 앞에 사용될 때 (+) 또는 (-) 10%, 5% 또는 1%만큼 달라질 수 있는 근사치를 나타낸다.
- [0017] 본원에 사용된 용어 "생체접합체", "펩티도글리칸", 및 "프로테오글리칸", 및 "합성 생체접합체"는 상호교환 가능하게 사용되고, 공유 결합된 1개 이상의 펩티드를 갖는 화학적으로 황산화된 글리칸을 포함하는 합성 접합체를 지칭한다.
- [0018] 본원에 사용된 용어 "화학적으로 황산화된 글리칸"은 술페이트 모이어티를 포함하도록 화학적으로 변형된, 글리코시드에 의해 연결된 수많은 모노사카라이드를 갖는 화합물을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 우론산과 교대 방식으로 연결된 2-아미노당을 포함하고 헤파린, 헤파린 술페이트, 콘드로이틴, 캐라틴 및 더마탄과 같은 중합체를 포함하는 글리코사미노글리칸 (GAG)이다. 따라서, 본원에 기재된 실시양태에 사용될 수 있는 글리칸의 비제한적 예는 알기네이트, 아가로스, 텍스트란, 텍스트란 술페이트, 콘드로이틴, 콘드로이틴 술페이트 (CS), 더마탄, 더마탄 술페이트 (DS), 헤파린 술페이트, 헤파린 (Hep), 캐라틴, 캐라탄 술페이트, 및 히알루론산 (HA), 및 그의 유도체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 생체접합체의 효과를 조정하기 위해 글리칸의 분자량을 변화시킨다 (예를 들어, 문헌 [Radek, K. A., et al., Wound Repair Regen., 2009, 17: 118-126; 및 Taylor, K. R., et al., J. Biol. Chem., 2005, 280:5300-5306] 참조). 한 실시양태에서, 글리칸은 산화 및 알칼리성 제거에 의해 분해되어 (예를 들어, 문헌 [Fransson, L. A., et al., Eur. J. Biochem., 1980, 106 :59-69] 참조), 보다 적은 분자량 (예를 들어, 약 10 kDa 내지 약 50 kDa)을 갖는 분해된 글리칸을 생성한다. 또 다른 실시양태에서, 글리칸은 효소적으로, 열에 의해, 초음파에 의해, 가오존분해에 의해, 전단에 의해, 또는 탈중합시키고 글리칸의 분자량을 감소시키는 것으로 공지된 다른 방법에 의해 분해된다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 산화적으로 절단된 사카라이드 고리를 함유하지 않고, 따라서 알데하يد 관능기를 함유하지 않고 함유하지 않았다.
- [0019] 본원에 사용된 용어 "결합된" 및 "공유 결합된"은 상호교환 가능하게 사용될 수 있고, 2개의 원자에 의해 하나 이상의 전자쌍을 공유하는 것을 지칭한다.
- [0020] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 생체접합체는 콜라겐에 직접적으로 또는 간접적으로 결합한다. 본원에 사용된 용어 "결합" 또는 "결합한다"는 예를 들어 혼성화 검정, 표면 플라즈몬 공명, ELISA, 경쟁적 결합 검정, 등온 적정 열량측정법, 과자 디스플레이, 친화성 크로마토그래피, 레올로지 또는 면역조직화학을 이용하여 검출될 수 있는 문자간 상호작용을 포함하는 것으로 의도된다. 상기 용어는 또한 문자간 "결합" 상호작용을 포함하는 것으로 의도된다. 결합은 "직접적" 또는 "간접적"일 수 있다. "직접적" 결합은 문자간의 직접적인 물리적 접촉을 포함한다. 문자간의 "간접적" 결합은 하나 이상의 문자와 직접적인 물리적 접촉을 동시에 갖는 문자를 포함한다. 이 결합은 상호작용 문자를 포함하는 "복합체"를 형성할 수 있다. "복합체"는 공유 또는 비공유 결합, 상호작용 또는 힘에 의해 함께 유지되는 2개 이상의 문자의 결합을 지칭한다.
- [0021] 본원에 사용된 용어 "세포외 매트릭스"는 주변 세포에 대해 구조적 및 생화학적 지지를 제공하는 조직의 세포외 부분을 지칭한다.
- [0022] 본원에 사용된 용어 "조성물"은 적어도 1종의 제약 활성 성분, 예컨대 그의 임의의 고체 형태를 함유하는 치료 목적을 위해 의도된 환자에게 투여하기에 적합한 제제를 지칭한다. 조성물은 화합물의 개선된 제제를 제공하기 위해 적어도 1종의 제약상 허용되는 성분, 예컨대 적합한 담체를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 필름, 겔, 패치 또는 액체 용액으로서 제제화된다. 본원에 사용된 용어 "국소로"는 국부 효과를 위해 치료되는 조직 및/또는 기관의 표면 (내부 또는 일부 경우에는 외부)에 조성물을 비전신적으로 투여하는 것을 지칭한다.
- [0023] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는"은, 합리적으로 신중한 의료 진료의가 사용되는 양 및/또는 치료되는 질환 또는 상태 및 각각의 투여 경로를 고려하여, 지정된 물질이 환자에게의 투여를 회피하게 하는 특성을 갖지 않는 것을 나타낸다. 전형적인 제약상 허용되는 물질은 본질적으로 멸균이다.

- [0024] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 담체"는, 임의의 보충물 또는 조성물, 또는 그의 성분을 한 기관 또는 신체 일부로부터 또 다른 기관 또는 신체 일부로 운반 또는 수송하는 것에 수반되거나, 또는 정맥의 내부 표면으로 작용제를 전달하기 위한, 제약상 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질을 지칭한다.
- [0025] 본원에 사용된 용어 "제제화된" 또는 "제제화"는 1종 이상의 제약 활성 성분을 포함한 상이한 화학 물질을 조합하여 투여 형태를 생산하는 공정을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 2종 이상의 제약 활성 성분은 단일 투여 형태 또는 조합 투여 단위로 공동제제화될 수 있거나, 또는 개별적으로 제제화된 다음 조합 투여 단위로 조합될 수 있다. 지속 방출 제제는 연장된 기간에 걸쳐 신체에 치료제를 천천히 방출하도록 설계된 제제인 반면에, 즉시 방출 제제는 단기간에 걸쳐 신체에 치료제를 신속히 방출하도록 설계된 제제이다.
- [0026] 본원에 사용된 용어 "전달"은 그의 목적하는 치료 효과를 안전하게 달성하기 위해 필요에 따라 신체에서 제약 조성물을 수송하기 위한 경로, 접근법, 제제화, 기술 및 시스템을 지칭한다. 전달 경로는 혈관내, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피부, 피하, 경피, 피내 및 표피내 경로를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 경로일 수 있다.
- [0027] 본원에 사용된 용어 "용액"은 관련 기술분야에 널리 공지된 용액, 혼탁액, 애멸전, 점적제, 연고, 액체 세정제, 스프레이 및 리포솜을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 액체 용액은 소량의 산 또는 염기를 첨가할 때 pH 변화에 저항하는 수성 pH 완충제를 함유한다. 특정 실시양태에서, 액체 용액은 윤활성 증진제를 함유한다.
- [0028] 본원에 사용된 용어 "치료하는"은 혈관 손상 또는 개입 전에, 그 동안에, 및/또는 그 후에 질환 또는 장애의 1종 이상의 임상 증상을 예방, 치유, 역전, 감소, 완화, 최소화, 억제, 저해 및/또는 정지시키는 것을 지칭한다.
- [0029] 2. 생체접합체
- [0030] 본 개시내용은 적어도 1개의 웹티드(들)를 포함하는 생체접합체를 제공하며, 여기서 웹티드(들)는 화학적으로 황산화된 글리칸에 공유 결합된 콜라겐-결합 단위를 포함한다. 놀랍게도, 본원에 기재된 생체접합체는 이들이 GAG 분해 효소에 대한 기질인 것으로 발견되지 않아 잘 대사되지 않으며, 이들은 비-황산화된 유도체와 비교하여 감소된 신장 클리어런스와 함께 연장된 반감기를 가지면서 간을 표적화하는 것으로 밝혀졌다.
- [0031] 본원에 기재된 실시양태에서 사용될 수 있는 화학적으로 황산화된 글리칸은 임의의 화학적으로 황산화된 글리칸 (예를 들어, 글리코사미노글리칸 (GAG)) 일 수 있다. 비제한적 실시예는 화학적으로 황산화된 알기네이트, 화학적으로 황산화된 콘드로이틴, 화학적으로 황산화된 콘드로이틴 술페이트, 화학적으로 황산화된 더마坦, 화학적으로 황산화된 혼파란, 화학적으로 황산화된 혼파로산, 화학적으로 황산화된 혼파란 술페이트, 화학적으로 황산화된 혼파린, 화학적으로 황산화된 텍스트란, 화학적으로 황산화된 텍스트란 술페이트, 화학적으로 황산화된 히알루론산, 또는 그의 유도체를 포함한다. 한 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 화학적으로 황산화된 혼파로산 또는 그의 유도체이다. 한 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 화학적으로 황산화된 텍스트란 또는 그의 유도체이다. 한 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 화학적으로 황산화된 히알루론산, 또는 그의 유도체이다.
- [0032] 특정 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 추가로 유도체화되고, 이는 황산화 전 또는 후에 일어날 수 있다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 황산화 단계 전에 카르복시메틸 치환기를 포함하도록 유도체화된다. 따라서, 특정 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 알기네이트, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 콘드로이틴, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 콘드로이틴 술페이트, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 더마坦, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 혼파란, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 혼파린, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 텍스트란, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 텍스트란 술페이트, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 히알루론산, 또는 그의 유도체이다.
- [0033] 특정 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 화학적으로 황산화된 혼파로산, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 혼파로산, 화학적으로 황산화된 텍스트란, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 텍스트란, 화학적으로 황산화된 히알루론산, 화학적으로 황산화된 카르복시메틸 히알루론산, 또는 그의 유도체이다.
- [0034] 글리칸 상에서의 황산화의 정도는 출발 글리칸 및 최종 생체접합체의 목적하는 특성에 따라 달라질 수 있다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 약 0.5 내지 약 4, 또는 약 0.5 내지 약 3.9, 또는 약 0.5, 또는 약 0.6, 또는 약 0.7, 또는 약 0.8, 또는 약 0.9, 또는 약 1.0, 또는 약 1.1, 또는 약 1.2, 또는 약 1.3, 또는 약 1.4, 또는 약

1.5, 또는 약 1.6, 또는 약 1.7, 또는 약 1.8, 또는 약 1.9, 또는 약 2.0, 또는 약 2.1, 또는 약 2.2, 또는 약 2.3, 또는 약 2.4, 또는 약 2.5, 또는 약 2.6, 또는 약 2.7, 또는 약 2.8, 또는 약 2.9, 또는 약 3.0, 또는 약 3.1, 또는 약 3.2, 또는 약 3.3, 또는 약 3.4, 또는 약 3.5, 또는 약 3.6, 또는 약 3.7, 또는 약 3.8, 또는 약 3.9, 또는 약 4 초과의 황산화 정도를 갖는다. 황산화의 정도는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 계산될 수 있다 (예를 들어, 실시예 1 및 문헌 [Biomacromolecules, 2009, 10, 3290-3297] 참조).

[0035] 특정 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 디사카라이드당 약 0.25 내지 약 4, 약 0.5 내지 약 3, 약 2 내지 약 3, 약 0.5 내지 약 2.5, 또는 약 0.5 내지 약 2개의 술페이트 모이어티, 또는 디사카라이드당 약 0.5, 또는 약 0.6, 또는 약 0.7, 또는 약 0.8, 또는 약 0.9, 또는 약 1.0, 또는 약 1.1, 또는 약 1.2, 또는 약 1.3, 또는 약 1.4, 또는 약 1.5, 또는 약 1.6, 또는 약 1.7, 또는 약 1.8, 또는 약 1.9, 또는 약 2.0, 또는 약 2.1, 또는 약 2.2, 또는 약 2.3, 또는 약 2.4, 또는 약 2.5, 또는 약 2.6, 또는 약 2.7, 또는 약 2.8, 또는 약 2.9, 또는 약 3.0, 또는 약 3.1, 또는 약 3.2, 또는 약 3.3, 또는 약 3.4, 또는 약 3.5, 또는 약 3.6, 또는 약 3.7, 또는 약 3.8, 또는 약 3.9, 또는 약 4개의 술페이트 모이어티를 포함한다. 글리칸이 통상적인 "디사카라이드 단위" (예를 들어, 알긴산)를 함유하지 않는 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 전형적으로 모노사카라이드당 약 0.25 내지 약 0.75, 또는 약 0.3, 또는 약 0.4, 또는 약 0.5, 또는 약 0.6, 또는 약 0.7, 또는 약 0.75, 또는 약 0.8, 또는 약 0.85, 또는 약 0.9, 또는 약 0.95, 또는 약 1, 또는 약 1.25, 또는 약 1.5, 또는 약 1.75, 또는 약 2개의 술페이트 모이어티를 포함한다.

[0036] 글리칸의 경우 다양한 분자량이 본원에 기재된 생체접합체에서 사용될 수 있지만, 보다 높은 분자량이 증가된 반감기와 같은 특정 이점을 제공할 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸의 분자량은 약 5 내지 약 1000 kDa이다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 적어도 약 20, 또는 약 25, 또는 약 30, 또는 약 35, 약 40, 또는 약 45, 또는 약 50, 또는 약 100, 또는 약 150, 또는 약 200, 또는 약 250, 또는 약 300, 또는 약 350, 또는 약 400, 또는 약 450, 또는 약 500, 또는 약 550, 또는 약 600, 또는 약 650, 또는 약 700, 또는 약 750, 또는 약 800, 또는 약 850, 또는 약 900, 또는 약 950, 또는 약 1000 kDa이다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 약 150 kDa 초과의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 약 150 내지 약 750 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 약 150 내지 약 350 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸은 약 200 내지 약 400 kDa의 분자량을 갖는다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 산화적으로 절단된 사카라이드 고리를 함유하지 않고, 따라서 알데히드 관능기를 함유하지 않고 함유하지 않았다.

[0037] 한 실시양태에서, 생체접합체는 콜라겐 유형 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, 또는 XIV 중 1종 이상에 결합하는 콜라겐-결합 단위를 갖는 웨티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 콜라겐-결합 단위는 콜라겐과 결합시 원섬유발생을 촉진하거나 억제한다. 한 실시양태에서, 콜라겐-결합 단위는 콜라겐과 결합시 원섬유발생을 촉진하거나 억제하지 않는다. 일부 실시양태에서, 웨티드는 유형 I 콜라겐에 결합한다. 다른 실시양태에서, 웨티드는 유형 IV 콜라겐에 결합한다. 특정 실시양태에서, 콜라겐에 대해 명시된 결합 친화도를 갖는 1개 이상의 웨티드(들)가 본원에 기재된 생체접합체에 사용될 수 있다. 예를 들어, 합성 생체접합체는 유형 I 콜라겐에 대해 결합 친화도를 갖는 적어도 1개의 웨티드 및 유형 IV 콜라겐에 대해 결합 친화도를 갖는 적어도 1개의 웨티드를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 웨티드는 유형 I 콜라겐에 대해 결합 친화도를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 웨티드는 유형 IV 콜라겐에 대해 결합 친화도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 웨티드는 유형 III 콜라겐에 대해 결합 친화도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 웨티드는 1종 초과의 유형의 콜라겐에 결합하고, 여기서 각각의 콜라겐 유형에 대한 상대 친화도는 다를 수 있다. 한 실시양태에서, 생체접합체는 약 1 mM 미만, 또는 약 900  $\mu$ M 미만, 또는 약 800  $\mu$ M 미만, 또는 약 700  $\mu$ M 미만, 또는 약 600  $\mu$ M 미만, 또는 약 500  $\mu$ M 미만, 또는 약 400  $\mu$ M 미만, 또는 약 300  $\mu$ M 미만, 또는 약 200  $\mu$ M 미만, 또는 약 100  $\mu$ M 미만의 해리 상수 ( $K_d$ )로 콜라겐에 결합한다.

[0038] 추가로, 본원에 기재된 생체접합체는 1개 초과의 결합 단위를 갖는 웨티드를 포함할 수 있으며, 여기서 결합 단위는 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 웨티드는 2개 이상의 콜라겐-결합 단위를 포함하고, 여기서 콜라겐-결합 단위는 동일하다. 또 다른 실시양태에서, 웨티드는 2개 이상의 콜라겐-결합 단위를 포함하고, 여기서 콜라겐-결합 단위는 상이하다.

[0039] 생체접합체의 목적하는 특성에 따라, 글리칸에 결합되는 웨티드의 총수가 달라질 수 있다. 특정 실시양태에서, 생체접합체에 존재하는 웨티드의 총수는 글리칸당 약 50 내지 약 250, 또는 약 50 내지 약 150, 또는 약 75 내

지 약 125, 또는 약 50, 또는 약 60, 또는 약 70, 또는 약 80, 또는 약 90, 또는 약 100, 또는 약 110, 또는 약 120, 또는 약 130, 또는 약 140, 또는 약 150, 또는 약 160, 또는 약 170, 또는 약 180, 또는 약 190, 또는 약 200, 또는 약 210, 또는 약 220, 또는 약 230, 또는 약 240, 또는 약 250개 웨티드이다.

[0040]

본원에 사용된 웨티드는 선형 또는 분지형일 수 있고, 전형적으로 1 내지 약 120개의 아미노산을 포함하고, 적어도 1개의 콜라겐-결합 단위 (또는 서열)를 갖는다. 한 실시양태에서, 웨티드는 약 3 내지 약 120개의 아미노산, 또는 약 3 내지 약 110개의 아미노산, 또는 약 3 내지 약 100개의 아미노산, 또는 약 3 내지 약 90개의 아미노산, 또는 약 3 내지 약 80개의 아미노산, 또는 약 3 내지 약 70개의 아미노산, 또는 약 3 내지 약 60개의 아미노산, 또는 약 3 내지 약 50개의 아미노산, 또는 약 3 내지 약 40개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 120개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 100개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 90개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 80개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 70개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 60개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 50개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 40개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 30개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 20개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 10개의 아미노산을 포함한다. 이를 웨티드는 또한 "콜라겐-결합 웨티드"로 지칭될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "콜라겐-결합 단위"는 콜라겐에 결합하는 웨티드 내의 아미노산 서열을 지칭하는 것으로 의도된다. "콜라겐-결합"은, 화합물이 콜라겐과 우호적으로 결합 또는 상호작용하도록, 소수성, 이온성 (전하) 및/또는 반 데르 발스 상호작용을 포함할 수 있는, 콜라겐과의 상호작용을 나타낸다. 이러한 결합 (또는 상호작용)은 공유 결합 및 통상적인 관능기와의 비특이적 상호작용과 구별되는 것으로 의도되며, 웨티드는 콜라겐 상에서 웨티드가 결합하는 관능기를 함유하는 임의의 종과 상호작용할 것이다. 웨티드는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 이용하여 콜라겐에 대한 결합에 대해 시험 및 평가될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Li, Y., et al., Current Opinion in Chemical Biology, 2013, 17: 968-975, Helmes, B.A., et al., J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 11683-11685, 및 Petsalaki, E., et al., PLoS Comput Biol, 2009, 5(3): e1000335]을 참조한다. 한 실시양태에서, 웨티드, 또는 웨티드의 콜라겐-결합 단위는 약 1 mM 미만, 또는 약 900 μM 미만, 또는 약 800 μM 미만, 또는 약 700 μM 미만, 또는 약 600 μM 미만, 또는 약 500 μM 미만, 또는 약 400 μM 미만, 또는 약 300 μM 미만, 또는 약 200 μM 미만, 또는 약 100 μM 미만의 해리 상수 (Kd)로 콜라겐에 결합한다.

[0041]

콜라겐-결합 웨티드는 콜라겐 유형 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, 또는 XIV 중 1종 이상에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 콜라겐-결합 웨티드는 유형 IV 콜라겐에 결합하고, 이는 무순상일 수 있거나, 절단될 수 있거나, 또는 분해될 수 있다. 일부 실시양태에서, 콜라겐-결합 웨티드는 유형 I 또는 IIII 콜라겐에 결합하고, 이는 무순상일 수 있거나, 절단될 수 있거나, 또는 분해될 수 있다.

[0042]

다양한 실시양태에서, 유형 I 또는 IIII 콜라겐에 결합하는 웨티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호(SEQ ID NO): ), GELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKCILY (서열식별번호: ), GELYKCILY (서열식별번호: ), RLDGNEIKR (서열식별번호: ), AHEEISTTNEGVM (서열식별번호: ), NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPPLKRFPVQ (서열식별번호: ), CQDSETRTFY (서열식별번호: ), TKKTLRT (서열식별번호: ), GLRSKSKKFRRPDIQYPDATDEDITS (서열식별번호: ), SQNPVQP (서열식별번호: ), SYIRIADTNIT (서열식별번호: ), KELNLVYT (서열식별번호: ), GSIT (서열식별번호: ), GSITTIDVPWNV (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), GQLYKSILYGSGSRR (서열식별번호: ), RRANAALKAGQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 서열이 콜라겐에 결합할 수 있는 한, 그에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성, 또는 적어도 약 83% 서열 동일성, 또는 적어도 약 85% 서열 동일성, 또는 적어도 약 85% 서열 동일성, 또는 적어도 약 90% 서열 동일성, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성, 또는 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0043]

한 실시양태에서, 유형 I 또는 IIII 콜라겐에 결합하는 웨티드는 아미노산 서열 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ) 또는 서열이 콜라겐에 결합할 수 있는 한, 그에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성, 또는 적어도 약 83% 서열 동일성, 또는 적어도 약 85% 서열 동일성, 또는 적어도 약 90% 서열 동일성, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성, 또는 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0044]

한 실시양태에서, 유형 I 또는 IIII 콜라겐에 결합하는 웨티드는 아미노산 서열 GELYKSILY (서열식별번호: ) 또는 서열이 콜라겐에 결합할 수 있는 한, 그에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성, 또는 적어도 약 83% 서열 동일성, 또는 적어도 약 85% 서열 동일성, 또는 적어도 약 90% 서열 동일성, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성, 또는 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0045]

한 실시양태에서, 유형 I 또는 IIII 콜라겐에 결합하는 웨티드는 아미노산 서열 GQLYKSILY (서열식별번호: ) 또는 서열이 콜라겐에 결합할 수 있는 한, 그에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성, 또는 적어도 약 83% 서열 동일

성, 또는 적어도 약 85% 서열 동일성, 또는 적어도 약 90% 서열 동일성, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성, 또는 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0046] 한 실시양태에서, 유형 I 또는 III 콜라겐에 결합하는 웨티드는 아미노산 서열 GQLYSILYGSQGSRR (서열식별번호: ) 또는 서열이 콜라겐에 결합할 수 있는 한, 그에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성, 또는 적어도 약 83% 서열 동일성, 또는 적어도 약 85% 서열 동일성, 또는 적어도 약 90% 서열 동일성, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성, 또는 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0047] 한 실시양태에서, 유형 I 또는 III 콜라겐에 결합하는 웨티드는 아미노산 서열 RRANAALKAGQLYSILY (서열식별번호: ) 또는 서열이 콜라겐에 결합할 수 있는 한, 그에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성, 또는 적어도 약 83% 서열 동일성, 또는 적어도 약 85% 서열 동일성, 또는 적어도 약 90% 서열 동일성, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성, 또는 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0048] 유형 IV 콜라겐에 결합하는 콜라겐-결합 단위의 비제한적 예는 MMP 2 및 9-분해된 기저막 유형 IV 콜라겐에 특이적으로 결합하는 TLTYTWS (서열식별번호: )이다. 마찬가지로, GSG 링커를 추가로 포함하는 TLTYTWSGSG (서열식별번호: )도 또한 절단되거나 분해된 유형 IV 콜라겐에 특이적으로 결합할 수 있다. 또 다른 예는 무순상 유형 IV 콜라겐에 선택적으로 결합하는 KLWVLPK (서열식별번호: )이다.

[0049] 특정 실시양태에서, 각각 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Chiang, T.M., et al., J. Biol. Chem., 2002, 277: 34896-34901, Huizinga, E.G. et al., Structure, 1997, 5: 1147-1156, Romijn, R.A., et al., J. Biol. Chem., 2003, 278: 15035-15039, 및 Chiang, et al., Cardio. & Haemato. Disorders-Drug Targets, 2007, 7: 71-75]에 기재된 바와 같이, 웨티드는 폰 빌레브란트 인자(vWF) 또는 혈소판 콜라겐 수용체의 콜라겐-결합 도메인(들)과 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 83%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 비제한적 예는 vWF로부터 유래된 WREPSFCALS (서열식별번호: )이다.

[0050] 콜라겐-결합 친화도 (또는 콜라겐-결합 도메인/단위)에 대해 웨티드 서열을 스크리닝하는 다양한 방법은 관련 기술분야에서 통상적이다. 본원에 개시된 생체접합체 및 방법에 사용될 수 있는 콜라겐-결합 친화도 (또는 콜라겐-결합 단위)를 갖는 것으로 공지된 다른 웨티드 서열은  $\beta$ AWHCTTKFPHHYCLYBip (서열식별번호: ),  $\beta$ AHKCPWHLYTTHYCFTBip (서열식별번호: ),  $\beta$ AHKCPWHLYTHYCFT (서열식별번호: ) 등 (여기서 Bip는 비페닐알라닌이고,  $\beta$ A는 베타-알라닌임) (문헌 [Abd-Elgalie, W.R., et al., Biopolymers, 2013, 100(2), 167-173] 참조), GROGER (서열식별번호: ), GMOGER (서열식별번호: ), GLOGEN (서열식별번호: ), GLOGER (서열식별번호: ), GLKGEN (서열식별번호: ), GFOGERGVGPQGP (서열식별번호: ) 등 (여기서 O는 4-히드록시프롤린임) (문헌 [Raynal, N., et al., J. Biol. Chem., 2006, 281(7), 3821-3831] 참조), HVWMQAPGGK (서열식별번호: ) (문헌 [Helms, B.A., et al., J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 11683-11685] 참조), WREPSFCALS (서열식별번호: ) (문헌 [Takagi, J., et al., Biochemistry, 1992, 31, 8530-8534] 참조), WYRGRL (서열식별번호: ) 등 (문헌 [Rothenfluh D.A., et al., Nat Mater. 2008, 7(3), 248-54] 참조), WTCSGDEYTWHC (서열식별번호: ), WTCVGDHKTWKC (서열식별번호: ), QWHCTTRFPHHYCLYG (서열식별번호: ) 등 (U.S. 2007/0293656 참조), STWTWNGSAWTNNEGGK (서열식별번호: ), STWTWNGTNWTRNDGGK (서열식별번호: ) 등 (WO/2014/059530 참조), CVWLWEQC (서열식별번호: ) 시클릭 CVWLWENC (서열식별번호: ), 시클릭 CVWLWEQC (서열식별번호: ), (문헌 [Depraetere H., et al., Blood. 1998, 92, 4207-4211, 및 Duncan R., Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(5), 347-360] 참조), CMTSPWRC (서열식별번호: ) 등 (문헌 [Vanhoorelbeke, K., et al., J. Biol. Chem., 2003, 278, 37815-37821] 참조), CPGRVMHGLHLGDEGPC (서열식별번호: ) (문헌 [Muzzard, J., et al., PLoS one. 4 (e 5585) I- 10] 참조), KLWVLPK (서열식별번호: ) (문헌 [Chan, J. M., et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A., 2010, 107, 2213- 2218] 참조), 및 CQDSETRTFY (서열식별번호: ) 등 (U.S. 2013/0243700 참조), H-V-F/W-Q/ M-Q-P/A-P/K (문헌 [Helms, B.A., et al., J. Am. Chem. Soc., 2009, 131(33), 11683-11685] 참조)를 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 상기 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0051] 본원에 개시된 생체접합체 및 방법에 사용될 수 있는 콜라겐-결합 친화도 (또는 콜라겐-결합 단위)를 갖는 것으로 제시된 추가의 웨티드 서열은 LSELRLHEN (서열식별번호: ), LTELHLDNN (서열식별번호: ), LSELRLHNN (서열식별번호: ), LSELRLHAN (서열식별번호: ), 및 LRELHLNNN (서열식별번호: ) (문헌 [Fredrico, S., Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 37, 10980-10984] 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0052] 본원에 개시된 생체접합체 및 방법에 사용될 수 있는 콜라겐-결합 친화도 (또는 콜라겐-결합 단위)를 갖는 것으로 제시된 추가의 웨티드 서열은 RRANAALKAGELYKSILYGC (서열식별번호: ), MIVIELGTNPPLKSSGIENGAFQGMKK (서열

식별번호: ), KELNLVY (서열식별번호: ), DARKSEVQK (서열식별번호: ), HVWMQAP (서열식별번호: ), HWGSLRA (서열식별번호: ) (문헌 [Hendra Wahyudi et al., J Control Release. 2016, 240, 323-331] 참조), 및 GKWH[CTTKFPHHYC]LYBip-CONH<sub>2</sub> (여기서 Bip는 비페닐알라닌임) (문헌 [Wei Chen et al., JACC Cardiovasc Imaging. 2013, 6(3): 373-384] 참조)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0053] 특정 실시양태에서, 웨티드는 RVMHGLHLGDE (서열식별번호: ), D-아미노산 EDDGLHLGHMVR (서열식별번호: ), RVMHGLHLGNQ (서열식별번호: ), D-아미노산 QNNGLHLGHMVR (서열식별번호: ), RVMHGLHLGNQ (서열식별번호: ), GQLYKSILYGS-4K2K (서열식별번호: ) (4-분지 웨티드), GSGQLYKSILY (서열식별번호: ), GSGGQLYKSILY (서열식별번호: ), KQLNLVYT (서열식별번호: ), CVWLWQQC (서열식별번호: ), WREPSFSALS (서열식별번호: ), GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGYR (서열식별번호: ), 및 GHRPLNKKRQQAPSLRPAPPPISGGGYR (서열식별번호: )로 이루어진 군으로부터 선택된 1개의 서열을 포함한다.

[0054] 콜라겐-결합 웨티드와 유사하게, 콜라겐에 대해 선택된 과지 디스플레이 라이브러리로부터 유래된 웨티드가 생성될 수 있다. 웨티드는 합성될 수 있고, SPR, ELISA, ITC, 친화성 크로마토그래피와 같은 임의의 기술, 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 기술에 의해 콜라겐에 대한 결합에 대해 평가될 수 있다. 한 예는 고정된 콜라겐을 함유하는 마이크로플레이트 상에서 인큐베이션된 비오틴 변형된 웨티드 서열 (예를 들어, SILD비오틴)일 수 있다. 스트렙타비딘-발색단을 이용하여 용량 반응 결합 곡선을 생성하여, 웨티드가 콜라겐에 결합하는 능력을 측정할 수 있다.

[0055] 한 실시양태에서, 웨티드는 콜라겐 유형 I, III 또는 IV 중 임의의 1개 이상에 결합하는 1개 이상의 콜라겐-결합 단위를 포함한다. 한 실시양태에서, 웨티드는 약 1 mM 미만, 또는 약 900 μM 미만, 또는 약 800 μM 미만, 또는 약 700 μM 미만, 또는 약 600 μM 미만, 또는 약 500 μM 미만, 또는 약 400 μM 미만, 또는 약 300 μM 미만, 또는 약 200 μM 미만, 또는 약 100 μM 미만의 해리 상수 (Kd)로 유형 I 콜라겐에 결합한다. 한 실시양태에서, 웨티드는 약 1 mM 미만, 또는 약 900 μM 미만, 또는 약 800 μM 미만, 또는 약 700 μM 미만, 또는 약 600 μM 미만, 또는 약 500 μM 미만, 또는 약 400 μM 미만, 또는 약 300 μM 미만, 또는 약 200 μM 미만, 또는 약 100 μM 미만의 해리 상수 (Kd)로 유형 III 콜라겐에 결합한다. 한 실시양태에서, 웨티드는 약 1 mM 미만, 또는 약 900 μM 미만, 또는 약 800 μM 미만, 또는 약 700 μM 미만, 또는 약 600 μM 미만, 또는 약 500 μM 미만, 또는 약 400 μM 미만, 또는 약 300 μM 미만, 또는 약 200 μM 미만, 또는 약 100 μM 미만의 해리 상수 (Kd)로 유형 IV 콜라겐에 결합한다. 한 실시양태에서, 웨티드는 약 1 mM 미만, 또는 약 900 μM 미만, 또는 약 800 μM 미만, 또는 약 700 μM 미만, 또는 약 600 μM 미만, 또는 약 500 μM 미만, 또는 약 400 μM 미만, 또는 약 300 μM 미만, 또는 약 200 μM 미만, 또는 약 100 μM 미만의 해리 상수 (Kd)로 유형 IV 콜라겐에 결합한다.

[0056] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 웨티드 콜라겐-결합 단위는 상기 단락에 기재된 임의의 아미노산 서열 또는 이를 아미노산 서열 중 임의의 것에 대해 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 83%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 100% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 생체접합체의 웨티드 성분은 1개 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 것에 의해 변형될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 바와 같이, 웨티드 중 임의의 비-결정적 아미노산을 보존적 치환에 의해 변경하는 것은, 대체 아미노산의 측쇄가 대체된 아미노산의 측쇄와 유사한 결합 및 접촉을 형성할 수 있어야 하기 때문에, 웨티드의 활성을 유의하게 변경시키지 않을 것이다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "서열 동일성"은 2개의 웨티드 사이의 또는 2개의 핵산 분자 사이의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 동일성의 수준을 지칭한다. 비교되는 서열에서 소정 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의해 점유된 경우, 문자는 그 위치에서 동일하다. 웨티드 (또는 폴리웨티드 또는 웨티드 영역)이 또 다른 서열과 특정 백분율 (예를 들어, 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 65%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 83%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%)의 "서열 동일성"을 갖는다는 것은, 정렬시 2개의 서열을 비교하면 그러한 백분율의 염기 (또는 아미노산)가 동일하다는 것을 의미한다. 본 출원에 개시된 임의의 서열 ("참조 서열")의 경우, 참조 서열과 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 65%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 83%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 서열이 또한 개시내용 내에 있음을 주목한다. 마찬가지로, 본 개시내용은 또한 참조 서열과 비교시 아미노산 잔기의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환, 결실 또는 부가를 갖는 서열을 포함한

다. 특정 실시양태에서, 본원에 명시된 서열 중 어느 1개 이상에서, 서열은 각각으로부터 1, 2 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 가짐으로써 변형될 수 있다.

[0058] 관련 기술분야에 널리 공지된 바와 같이, 아미노산의 "보존적 치환" 또는 웨티드의 "보존적 치환 변이체"는 1) 웨티드의 2차 구조; 2) 아미노산의 전하 또는 소수성; 및 3) 측쇄의 벌크성, 또는 이들 특징 중 임의의 하나 이상을 유지하는 아미노산 치환을 지칭한다. 예시적으로, 널리 공지된 용어 "친수성 잔기"는 세린 또는 트레오닌을 지칭한다. "소수성 잔기"는 류신, 이소류신, 페닐알라닌, 발린 또는 알라닌 등을 지칭한다. "양으로 하전된 잔기"는 리신, 아르기닌, 오르니틴, 또는 히스티딘을 지칭한다. "음으로 하전된 잔기"는 아스파르트산 또는 글루탐산을 지칭한다. "벌키 측쇄"는 페닐알라닌, 트립토판 또는 티로신 등을 지칭한다. 예시적인 보존적 아미노산 치환을 표 1에 제시한다.

표 1

하기 아미노산을	하기로 대체함
알라닌	D-Ala, Gly, Aib, $\beta$ -Ala, L-Cys, D-Cys
아르기닌	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
아스파라긴	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
아스파르트산	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
시스테인	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
글루타민	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
글루탐산	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
글리신	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, $\beta$ -Ala
이소류신	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
류신	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
리신	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
메티오닌	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
페닐알라닌	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
프롤린	D-Pro
세린	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
트레오닌	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
티로신	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
발린	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0060]

[0061] 웨티드(들)는 직접적으로 또는 링커를 통해 글리칸에 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 임의의 적합한 이관능성 링커, 예를 들어, N-[ $\beta$ -말레이미도프로피온산]히드라지드 (BMPH), 3-(2-파리딜디티오)프로피오닐 히드라지드 (PDPH) 등일 수 있다. 본원에 기재된 다양한 실시양태 중 임의의 것에서, 웨티드의 서열은 글리칸 또는 글리칸-링커 접합체에 부착 지점을 제공하기 위해 웨티드의 C-말단에 부착된 글리신-시스테인 (GC) 및/또는 N-말단에 부착된 글리신-시스테인-글리신 (GCG)를 포함하도록 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 N-[ $\beta$ -말레이미도프로피온산]히드라지드 (BMPH)이다. 특정 실시양태에서, 링커는 3-(2-파리딜디티오)프로피오닐 히드라지드 (PDPH)이다.

[0062]

생체접합체의 목적하는 특성에 따라, 글리칸에 결합되는 웨티드의 총수가 달라질 수 있다. 특정 실시양태에서, 생체접합체에 존재하는 웨티드의 총수는 약 50 내지 약 200, 또는 약 50 내지 약 160, 또는 약 50 내지 약 150, 또는 약 50 내지 약 140, 또는 약 60 내지 약 120, 또는 약 70 내지 약 110, 또는 약 80 내지 약 110, 또는 약 90 내지 약 110, 또는 약 50, 또는 약 60, 또는 약 70, 또는 약 80, 또는 약 90, 또는 약 100, 또는 약 110, 또는 약 120, 또는 약 130, 또는

약 140, 또는 약 150, 또는 약 160, 또는 약 170, 또는 약 180, 또는 약 190, 또는 약 200개이다. 다른 실시양태에서, 생체접합체는 약 5 내지 약 200개의 웨티드를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 생체접합체는 약 4 내지 약 180개의 웨티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 200개 미만의 웨티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 180개 미만의 웨티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 150개 미만의 웨티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 100개 미만의 웨티드를 포함한다.

[0063] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 글리칸당 웨티드의 수는 평균이며, 조성물 중 특정 생체접합체는 글리칸당 더 많은 웨티드를 가질 수 있고, 특정 생체접합체는 글리칸당 더 적은 웨티드를 갖는다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 웨티드의 수는 생체접합체의 조성물 중에서의 평균이다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 생체접합체는 글리칸당 웨티드의 평균 수가 약 50 또는 약 50 초과인 조성물이다. 다른 실시양태에서, 글리칸당 웨티드의 평균 수는 약 60, 또는 약 70, 또는 약 80, 또는 약 90, 또는 약 100, 또는 약 110, 또는 약 120, 또는 약 130, 또는 약 140, 또는 약 150, 또는 약 160, 또는 약 170, 또는 약 180, 또는 약 190, 또는 약 200, 또는 약 250, 또는 약 300이다.

[0064] 특정 실시양태에서, 글리칸당 웨티드의 수는, 글리칸 백본에서 웨티드로 관능화된 디사카라이드 단위의 퍼센트에 기초하여 "퍼센트 (%) 관능화"로 기재될 수 있다. 예를 들어, 글리칸 상에 존재하는 이용가능한 디사카라이드 단위의 총수는, 단일 디사카라이드 단위의 분자량 (또는 평균 분자량) (예를 들어, 약 550-800 Da, 또는 약 650-750 Da)을 글리칸의 분자량 (예를 들어, 약 25 kDa 내지 최대 약 70 kDa, 또는 심지어 약 100 kDa)으로 나누어 계산할 수 있다. 글리칸이 통상적인 "디사카라이드 단위" (예를 들어, 알긴산)를 함유하지 않는 실시양태에서, 본원에 제시된 계산에 사용되는 글리칸 상에 존재하는 이용가능한 디사카라이드 단위의 총수는, 단일 디사카라이드 단위의 분자량 (또는 평균 분자량)을 글리칸의 분자량으로 나누고 2를 곱함으로써 계산할 수 있다.

[0065] 따라서, 특정 실시양태에서, 글리칸은 웨티드에 의한 약 1 내지 약 50, 또는 약 5 내지 약 30% 관능화, 또는 웨티드에 의한 약 10 내지 약 30% 관능화, 또는 웨티드에 의한 약 20% 관능화를 포함하며, 여기서 웨티드에 의한 퍼센트 (%) 관능화는 웨티드에 의해 관능화된 글리칸 상의 디사카라이드 단위의 퍼센트에 의해 결정된다. 일부 실시양태에서, 웨티드에 의한 글리칸의 퍼센트 (%) 관능화는 약 1% 내지 약 50%, 또는 약 3% 내지 약 40%, 또는 약 5% 내지 약 30%, 또는 약 10% 내지 약 30%, 또는 약 5%, 또는 약 10%, 또는 약 15%, 또는 약 20%, 또는 약 25%, 또는 약 30%, 또는 약 35%, 또는 약 40%, 또는 약 45%, 또는 약 50%이다.

[0066] 특정 실시양태에서, 웨티드가 (예를 들어, 이온 결합을 통해) 생체접합체에 근접하게 회합되어 있는, 본원에 기재된 생체접합체 및 웨티드를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 실시양태에서, 이로써 생체접합체 응집체가 형성될 수 있다. 생체접합체 응집체 (생체접합체 및 비공유 결합된 웨티드를 포함함)는 웨티드에 의한 1% 내지 200% 관능화 (웨티드로 관능화된 글리칸 상의 디사카라이드 단위의 퍼센트에 의해 결정됨)를 포함할 수 있는 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 생체접합체 응집체에서 웨티드에 의한 퍼센트 (%) 관능화는 약 1% 내지 약 50%, 또는 약 3% 내지 약 40%, 또는 약 5% 내지 약 30%, 또는 약 10% 내지 약 20%, 또는 약 1%, 또는 약 2%, 또는 약 5%, 또는 약 10%, 또는 약 15%, 또는 약 20%, 또는 약 25%, 또는 약 30%, 또는 약 35%, 또는 약 40%, 또는 약 45%, 또는 약 50%, 또는 약 55%, 또는 약 60%, 또는 약 65%, 또는 약 70%, 또는 약 75%, 또는 약 80%, 또는 약 85%, 또는 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 100%이다.

[0067] 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 혜파린 및 약 50 내지 약 150, 또는 약 100개의 웨티드를 포함하며, 여기서 웨티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGS (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYKSILYGS (서열식별번호: ) 중 적어도 1개의 서열을 포함하고, 히드라지드-카르보닐 연결을 통해 혜파린에 결합된다. 특정 실시양태에서, 혜파린은 미분획 혜파린 (UFH) 또는 저분자량 혜파린 (LMWH)이다.

[0068] 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 혜파린 및 웨티드에 의한 약 15 내지 약 30% 관능화를 포함하며, 여기서 웨티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGS (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYKSILYGS (서열식별번호: ) 중 적어도 1개의 서열을 포함하고, 히드라지드-카르보닐 연결을 통해 혜파린에 결합된다.

[0069] 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 혜파린 및 웨티드에 의한 약 15 내지 약 30% 관능화를 포함하며, 여기서 웨티드는 GQLYKSILY (서열식별번호: ), GQLYKSILYGS (서열식별번호: ), CPGRVMHGLHLGDDG (서열식별번호: ), CVWLWEQC (서열식별번호: ), 또는 WREPSFCALS (서열식별번호: ), 또는 각각 그로부터 1, 2, 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 중 적어도 1개의 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 적어도 2개의 상이한 콜라겐-결합 단위를 포함한다.

- [0070] 웹티드는 합성될 수 있고, SPR, ELISA, ITC, 친화성 크로마토그래피와 같은 임의의 기술, 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 기술에 의해 콜라겐에 대한 결합에 대해 평가될 수 있다. 한 예는 고정된 콜라겐을 함유하는 마이크로플레이트 상에서 인큐베이션된 비오틴 변형된 웹티드 서열 (예를 들어, SILD비오틴)일 수 있다. 스트렙타비딘-발색단을 이용하여 용량 반응 결합 곡선을 생성하여, 웹티드가 콜라겐에 결합하는 능력을 결정할 수 있다. 본원에 기재된 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 웹티드는 1개 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 것에 의해 변형될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 바와 같이, 웹티드 중 임의의 비-결정적 아미노산을 보존적 치환에 의해 변경하는 것은, 대체 아미노산의 측쇄가 대체된 아미노산의 측쇄와 유사한 결합 및 접촉을 형성할 수 있어야 하기 때문에, 웹티드의 활성을 유의하게 변경시키지 않을 것이다. 비보존적 치환이 또한 가능하며, 단 이는 웹티드의 결합 활성 (즉, 콜라겐-결합 친화도)에 실질적으로 영향을 미치지 않는다.
- [0071] 따라서, 일부 실시양태에서, 글리칸 상에 알데히드 결합 부위를 제공하기 위해 글리칸 백본 내의 사카라이드 고리 중 1개 이상을 절단하는 산화 화학을 이용하여 웹티드를 글리칸, 예컨대 더마탄 술레이트에 결합시킨다. 이어서, 알데히드 결합 부위를 사용하여 웹티드에 (예를 들어, -C(0)-NH-N=C 결합을 통해) 접합시킨다.
- [0072] 일부 실시양태에서, 웹티드는 -C(0)-NH-NH-C(0)- (즉 히드라지드-카르보닐) 연결을 통해 글리칸에 공유 결합될 수 있다. 여기서, 웹티드는 히드라지드-카르보닐 연결을 통해 글리칸에 결합되고, 여기서 히드라지드-카르보닐의 카르보닐 기는 글리칸 상에 존재하는 엑소시클릭 카르보닐 기이다. 엑소시클릭 카르보닐 기는 천연 글리칸에 존재할 수 있거나, 또는 대안적으로 글리칸은 이러한 관능기를 포함하도록 변형될 수 있다. 이러한 방법은 이후에 추가로 설명된다. 본원에 개시된 바와 같은 생체접합체에 의해 빌휘되는 유익한 효과 (예컨대, 증가된 결합 친화도)는 적어도 부분적으로 산화적으로 절단된 사카라이드 고리를 함유하지 않는 글리칸으로 인한 것일 수 있는 것으로 고려된다.
- [0073] 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 웹티드는 웹티드에의 접합을 위해 히드라지드 모이어티를 추가로 포함한다. 히드라지드 기는 임의의 적합한 부착 지점, 예컨대 예를 들어 C-말단, N-말단에서 또는 아미노산 상의 측쇄를 통해 웹티드(들)에 결합할 수 있다. 예를 들어, 웹티드가 웹티드의 아미노산의 측쇄를 통해 글리칸에 결합되는 경우, 측쇄는 글루탐산 또는 아스파르트산이다. 히드라지드는 웹티드 서열의 아미노산에 존재하는 카르보닐 기 (예를 들어, C-말단 카르보닐 기)에, 또는 존재하는 경우 스페이서에 결합된 히드라진 (-NHNH<sub>2</sub>) 사이에 형성될 수 있다.
- [0074] 특정 실시양태에서, 웹티드(들)는 스페이서를 통해 글리칸 (또는 존재하는 경우, 링커)에 결합된다. 본원에 사용된 용어 "스페이서"는 웹티드 (또는 결합 단위)를 존재하는 경우 링커에, 또는 글리칸에 (이는 직접 결합될 수 있음) 연결시키는 생체접합체의 임의적인 부분을 지칭하는 것으로 의도된다. 본원에 기재된 실시양태 중 임의의 것에서, 웹티드 중 임의의 하나 이상은 1 내지 약 15개의 아미노산을 포함하는 선형 또는 분지형 스페이서 서열을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 스페이서는 1개 이상, 또는 1 내지 20, 또는 10 내지 20, 또는 5 내지 15, 또는 5 내지 10, 또는 1 내지 10, 또는 1 내지 5, 또는 1 내지 3개의 아미노산을 포함한다. 스페이서 서열이 웹티드의 의도된 결합을 유의하게 방해하지 않는 한, 천연 또는 비천연인 임의의 아미노산이 스페이서 서열에 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 일부 경우에, 아미노산은 비-극성 아미노산, 예컨대 알라닌, 시스테인, 글리신, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 티로신 및 발린이다. 특정 실시양태에서, 아미노산은 글리신, 알라닌, 아르기닌 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0075] 예시적인 스페이서는, 임의로 시스테인 (예를 들어, GC, GCG, GSGC (서열식별번호: ), 또는 GGC) 및/또는 세린 (예를 들어, GSG, SGG, GSGSG (서열식별번호: ) 또는 GSGSGS (서열식별번호: ))을 포함하는 1 내지 5개의 글리신 단위 (예를 들어, G, GG, GGG, GGGG (서열식별번호: ), 또는 GGGGG (서열식별번호: )), 1 내지 5개의 아르기닌 단위 (예를 들어, R, RR, RRR 등), 또는 그의 조합 (예를 들어, GSGRR (서열식별번호: ), GSGSRR (서열식별번호: ), GSGSGRR (서열식별번호: ) 또는 GSGSGSRR (서열식별번호: ))을 포함하는 짧은 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 스페이서는 또한 추가의 아미노산 스페이서의 존재 또는 부재 하의 비-아미노산 모이어티, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 6-아미노헥산산, 숙신산, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 웹티드 서열은 GSG-NHNH<sub>2</sub> 모이어티를 추가로 포함한다. 전형적으로, GSG-NHNH<sub>2</sub> 모이어티는 C- 또는 N-말단에 결합된다.
- [0076] 특정 실시양태에서, 스페이서는 1개 초과의 웹티드 서열이 그에 결합되어 분지형 구축물을 생성할 수 있도록 1개 초과의 결합 부위를 포함한다 (여기서 스페이서는 선형 또는 분지형일 수 있음). 또한, 웹티드가 말단 또는 비-말단 아미노산 모이어티를 통해 글리칸에 결합할 수 있기 때문에, 웹티드가 비-말단 아미노산 모이어티를 통

해 글리칸에 결합되는 경우에는 분지형일 것이다. 스페이서 상의 결합 부위는 동일하거나 상이할 수 있고, 목적하는 웨티드 서열이 (예를 들어 아미드 결합을 통해) 그에 결합할 수 있도록 아민 또는 카르복실산 모이아티와 같은 임의의 적합한 결합 부위일 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 스페이서는 1개 이상의 리신, 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기를 함유한다. 특정 실시양태에서, 스페이서는 2 내지 6개의 아미노산, 또는 3 또는 4개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 스페이서는 화학식 KXX의 1개 이상의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 각각의 X는 독립적으로 천연 또는 비천연 아미노산이다. 분지형 구축물을 제조하기 위해 단독으로 또는 조합되어 사용될 수 있는 스페이서의 구체적 예는 KRR, KKK, (K)<sub>n</sub>GSG, 및 (KRR)<sub>n</sub>-KGSG를 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 여기서 n은 0 내지 5, 또는 1, 2, 3, 4, 또는 5이다. 한 실시양태에서, 스페이서는 또는 GSGKRRGSG (서열식별번호: )이다.

[0077]

이러한 구축물은 화학식 P<sub>n</sub>L의 1개 초과의 단위를 갖는 웨티드를 제공할 수 있고, 여기서 적어도 1개의 P는 콜라겐-결합 단위이고, L은 스페이서이고, n은 2 내지 약 10, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 6, 또는 2 내지 5, 또는 2 내지 4, 또는 2, 또는 3, 또는 4, 또는 5, 또는 6, 또는 7, 또는 8, 또는 9, 또는 10의 정수이다. 예를 들어, 스페이서 L은 KGSG (서열식별번호: ), KKGSG (서열식별번호: ), K<sub>2</sub>KGSG (서열식별번호: ), 또는 KKKGSG (서열식별번호: ) 등과 같은 아미노산 서열일 수 있으며, 여기서 웨티드는 N-말단 및 측쇄 질소에 결합하여 각각 2, 3, 및 4개의 결합 부위를 제공할 수 있다. 웨티드에 결합된 이들 스페이서의 개략도를 하기 표에 제시한다.

스페이서	웨티드 수 (즉, 결합 부위)	스페이서의 구조
KGSG	2	
KKGSG	3	
KKKGSG	4	
K <sub>2</sub> KGSG	4	

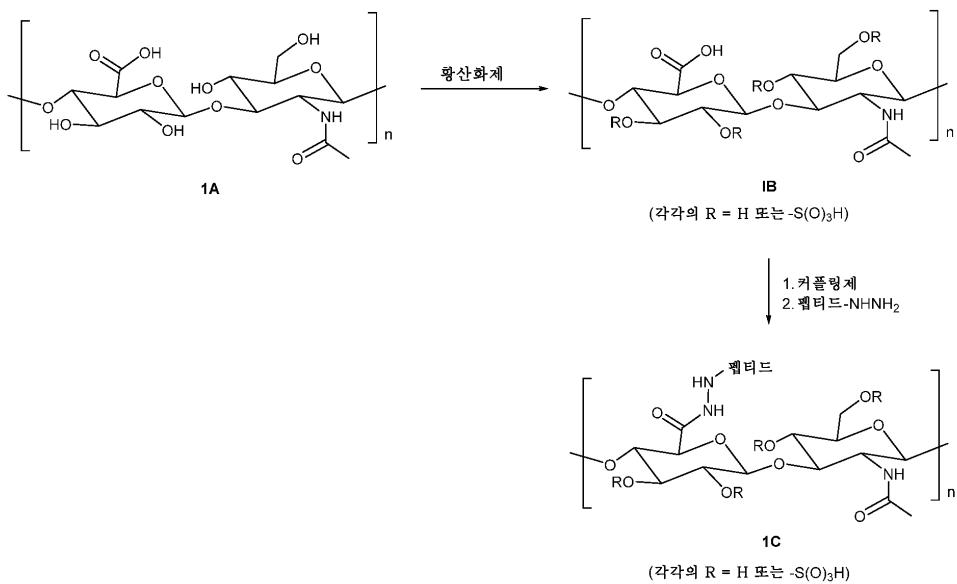
[0078]

- [0079] 일부 실시양태에서, 웨티드 서열은 1개 이상의 글루탐산 잔기(들)를 글루타민으로 및/또는 1개 이상의 아스파르트산 잔기(들)를 아스파라긴으로 대체하도록 변형된다.
- [0080] 예시적인 분지형 콜라겐-결합 구축물은  $(GELYKSILYGS)_2K$  (서열식별번호: ),  $(GELYKSILYGS)_2KGSG$  (서열식별번호: ),  $(GELYKSILYGS)_3KK$  (서열식별번호: ),  $(GELYKSILYGS)_3KKGSG$  (서열식별번호: ),  $(GELYKSILYGS)_4KKK$  (서열식별번호: ),  $(GELYKSILYGS)_4KKKGSG$  (서열식별번호: ),  $(GQLYKSILYGS)_2K$  (서열식별번호: ),  $(GQLYKSILYGS)_2KGSG$  (서열식별번호: ),  $(GQLYKSILYGS)_3KKGSG$  (서열식별번호: ),  $(GQLYKSILYGS)_4K_2K$  (서열식별번호: ),  $(GQLYKSILYGS)_4K_2KGSG$  (서열식별번호: ),  $(GQLYKSILYGS)_4KKK$  (서열식별번호: ),  $(GQLYKSILYGS)_4KKKGSG$  (서열식별번호: ),  $(GQLYKSILYGS)_4-(KRR)_2-K$  (서열식별번호: ), 및  $(GQLYKSILYGS)_4-(KRR)_2-KGSG$  (서열식별번호: )를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0081] 한 실시양태에서, 히드라지드 기는 글리신, 알라닌, 아르기닌 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산을 포함하는 스페이서를 통해 C-말단에 결합된다. 한 실시양태에서, 스페이서는 글리신, 글리신-글리신, 및 글리신-세린-글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다양한 실시양태에서, 웨티드는 글리신-세린-글리신 (GSG), GSGSGSRR (서열식별번호: ), KRRGSG (서열식별번호: ), 또는 GSGKRRGSG (서열식별번호: )와 같은 아미노산 스페이서를 포함한다.
- [0082] 3. 생체접합체의 합성
- [0083] 본원에 사용되는 바와 같은 웨티드는 상업적 공급원으로부터 구입할 수 있거나, 관련 기술분야에 널리 공지된 방법 (예를 들어, 화학적 및/또는 생명공학적 방법)을 이용하여 부분적으로 또는 완전히 합성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 관련 기술분야에 널리 공지된 고체 상 웨티드 합성 프로토콜에 따라 웨티드를 합성한다. 또 다른 실시양태에서, 널리 공지된 Fmoc 프로토콜에 따라 고체 지지체 상에서 웨티드를 합성하고, 트리플루오로아세트산을 이용하여 지지체로부터 철단하고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 방법에 따라 크로마토그래피에 의해 정제한다. 다른 실시양태에서, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 생명공학 방법을 이용하여 웨티드를 합성한다. 한 실시양태에서, 목적하는 웨티드에 대한 아미노산 서열 정보를 코딩하는 DNA 서열을 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 발현 플라스미드 (예를 들어, 웨티드의 친화도 정제를 위해 친화성 태그를 혼입한 플라스미드)에 라이케이션하고, 플라스미드를 발현을 위해 숙주 유기체에 형질감염시킨 다음, 예를 들어 친화도 정제에 의해 웨티드를 숙주 유기체 또는 성장 배지로부터 단리한다. 재조합 DNA 기술 방법은 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001)]에 기재되어 있고, 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.
- [0084] 하기 반응식 1에 제시된 바와 같이, 본원에 기재된 생체접합체는 화학적으로 황산화된 글리칸 유도체 (예를 들어, 황산화된 히알루론산)로부터 합성된다. 본원에 기재된 생체접합체에 사용하기에 적합한 다양한 글리칸 유도체는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여, 예컨대 글리칸 백본을 따라 히드록실의 친핵성 치환을 통해 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Biomacromolecules, 2009, 10, 3290-3297] 참조). 반응식 1에 제시된 바와 같이, 글리칸 (예를 들어, 히알루론산) 1A를 적합한 황산화제, 예컨대  $SO_3/DMF$  복합체와 반응시켜 1종 이상의 화학적으로 황산화된 글리칸 유도체(들) 1B를 제공할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 화학적으로 황산화된 글리칸 유도체 1B는 부분, 완전 또는 혼합물인 황산화된 글리칸 유도체(들) 1B를 수득할 수 있도록 사용되는 시약 및 반응 조건에 따라 조정될 수 있다. 이어서, 임의로 커플링제의 존재 하에, 전형적인 웨티드 커플링 반응 조건 하에 화학적으로 황산화된 글리칸 유도체 1B를 웨티드와 반응시켜 생체접합체 1C를 제공할 수 있다.
- [0085] 웨티드 커플링 반응에서 전형적인 바와 같이, 활성화제를 이용하여 반응을 용이하게 할 수 있다. 적합한 커플링제 (또는 활성화제)는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 카르보디이미드 (예를 들어, N,N'-디시클로헥실카르보디이미드 (DCC), N,N'-디시클로펜틸카르보디이미드, N,N'-디이소프로필카르보디이미드 (DIC), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDC), N-t-부틸-N-메틸카르보디이미드 (BMC), N-t-부틸-N-에틸카르보디이미드 (BEC), 1,3-비스(2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-일메틸)카르보디이미드 (BDDC) 등), 테트라메틸플루오로포름아미디늄 혼합물 (예를 들어, 대칭, 혼합 또는 시클릭 혼합물), 활성화된 에스테르 (예를 들어, 폐닐 활성화된 에스테르 유도체, p-히드록삼산 활성화된 에스테르, 혼합물), 활성화된 에스테르 (예를 들어, 폐닐 활성화된 에스테르 유도체, p-히드록삼산 활성화된 에스테르, 혼합물), 혼합물 (HFA) 등), 아실라졸 (CDI를 이용하는 아실이미다졸, 아실벤조트리아졸 등), 아실 아지드, 산 할라이드, 포

스포늄 염 (BOP, AOP, PyAOP, BOP-CI, Brop, PyBrop, PyOxim, HOBt, PyBOP, HOAt 등), EEDQ, IIDQ, CIP, DPPA, 아미늄/우로늄 염 (예를 들어, HATU, HBTU, COMU, 테트라메틸 아미늄 염, 비스페놀리디노 아미늄 염, 비스페페리디노 아미늄 염, 이미다졸륨 우로늄 염, 피리미디늄 우로늄 염, N,N,N'-트리메틸-N'-페닐우레아로부터 유래된 우로늄 염, 모르폴리노-기반 아미늄/우로늄 커플링 시약, 안티모니에이트 우로늄 염 등), 유기인 시약 (예를 들어, 포스핀산 및 인산 유도체), 유기황 시약 (예를 들어, 술폰산 유도체), 트리아진 커플링 시약 (예를 들어, 2-클로로-4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진, 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4 메틸모르폴리늄 클로라이드, 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4 메틸모르폴리늄 테트라플루오로보레이트 등), 피리디늄 커플링 시약 (예를 들어, 무카이야마(Mukaiyama) 시약, 피리디늄 테트라플루오로보레이트 커플링 시약 등), 중합체-지지된 시약 (예를 들어, 중합체-결합된 카르보디이미드, 중합체-결합된 TBTU, 중합체-결합된 2,4,6-트리클로로-1,3,5-트리아진, 중합체-결합된 HOBt, 중합체-결합된 HOSu, 중합체-결합된 IIDQ, 중합체-결합된 EEDQ 등) 등을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [El-Faham, et al. Chem. Rev., 2011, 111(11): 6557-6602; Han, et al. Tetrahedron, 2004, 60:2447-2467] 참조).

한 실시양태에서, 웨티드 커플링 반응은 글리칸의 카르복실산 모이어티와 커플링제 (예를 들어, 카르보디이미드 시약, 예컨대 비제한적으로, N,N'-디시클로헥실카르보디이미드 (DCC), N,N'-디이소프로필카르보디이미드 (DIC), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDC) 등)를 반응시켜 0-아실이소우레아 중간체를 형성함으로써 활성화된 글리칸 중간체를 통해 진행된다. 이러한 카르보디이미드 화학은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 적합한 커플링제는 상업적 공급원으로부터 구입할 수 있다. 0-아실이소우레아 중간체와 목적하는 웨티드를 접촉시켜 생체접합체를 수득한다. 글리칸은 웨티드보다 먼저 또는 웨티드의 존재 하에 활성화제와 접촉될 수 있다.

### 반응식 1. 생체접합체의 합성



특정 실시양태에서, 웨티드 서열은 글리칸 또는 그의 0-아실이소우레아 중간체와의 커플링 반응을 보조하기 위해 반응성 모이어티 (예를 들어, 히드라지드 관능기)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 웨티드 서열은 결합 단위와 말단 아미노산 (예를 들어, 종결 글리신) 또는 반응성 모이어티 (즉, 히드라지드 관능기) 사이에서 스페이서로서 작용하는 1개 이상의 아미노산 잔기를 포함한다. 또한, 웨티드의 1개 이상의 아미노산이 반응성 관능기 (예를 들어, 카르복실산 측쇄)를 함유하는 특정 경우에, 표준 보호기 화학을 이용하여 1개 이상의 측쇄를 보호함으로써 커플링 반응을 용이하게 할 수 있다. 또한, 비-아미노산 스페이서는 단독으로 또는 아미노산 스페이서 (예를 들어, 아미노헥산)와 조합되어 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 화학적으로 황산화된 글리칸 유도체 1B는 0-카르복시메틸화된 글리칸 유도체(들)로부터 제조되고 (즉, 여기서 적어도 1개의 R은  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 임), 이는 이어서 임의로 커플링제의 존재 하에 웨티드와 추가로 반응하여 대안적 생체접합체를 제공할 수 있다. 특정 실시양태에서, 적어도 1개의 유리 히드록실 기를 갖는 화학적으로 황산화된 글리칸 유도체 1B 유도체는 0-카르복시메틸화된 글리칸 유도체(들)로 전환될 수 있고, 이는 이어서 임의로 커플링제의 존재 하에 웨티드와 추가로 반응하여 대안적 생체접합체를 제공할 수 있다.

- [0090] 일부 실시양태에서, 반응은 반응성 친핵체, 예컨대 N-히드록시숙신이미드 (NHS), 및/또는 히드록시벤조트리아졸 (HOBT) N-히드록시숙신이미드 (NHS), 히드록시벤조트리아졸 (HOBt), 1-히드록시-1,2,3-벤조트리아졸, HOBt/CuCl<sub>2</sub>, 7-아자-1-히드록시-1,2,3-벤조트리아졸 (HOAt), 3,4-디히드로-3-히드록시-4-옥소-1,2,3-벤조트리아졸 (HOOBt), 및/또는 3-술포-1-히드록시숙신이미드 (S-NHS), 또는 그의 유도체의 존재 하에 수행된다.
- [0091] 4. 사용 방법
- [0092] a. 섬유증의 치료
- [0093] 한 실시양태에서, 섬유증을 예방 및/또는 치료하기 위한 생체접합체 및 방법이 본원에 제공된다. 섬유증은 염증 세포가 조직 및 기관으로 이동하여 반흔형성을 일으키는 세포 반응을 초래하는 염증성 질환이다. 섬유증은 전형적으로 염증 또는 손상의 결과로서 신체 내 많은 조직에서 발생할 수 있다. 염증 세포 혈관외유출을 방지함으로써, 섬유증을 약화시키거나 예방할 수 있다.
- [0094] 한 실시양태에서, 본원에 제공되는 생체접합체 및 방법은 폐 섬유증을 예방 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다. 폐에서, 섬유증의 유형은 폐 섬유증, 예컨대 낭성 섬유증 및 특발성 폐 섬유증을 포함한다. 폐 섬유증은 반흔이 폐 조직에서 형성된 호흡기 질환으로, 이는 심각한 호흡 문제를 일으킨다. 반흔 형성은 벽의 비후를 초래하고, 혈액 내 산소 공급을 감소시킨다. 그 결과, 환자는 영속적인 숨가쁨을 앓게 된다.
- [0095] 한 실시양태에서, 본원에 제공되는 생체접합체 및 방법은 간 섬유증을 치료하는데 사용될 수 있다. 간 섬유증은 만성 알콜 노출, B형 간염 바이러스 (HBV) 감염, 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 비알콜성 지방간염 (NASH), C형 간염 바이러스 (HCV) 감염, 월슨병, 알파-1-항트립신 결핍, 혈색소증, 원발성 담즙성 간경변증, 원발성 경화성 담관염, 및 자가면역 간염을 포함한 매우 다양한 상태로부터 발생할 수 있다. 만성 HCV는 만성 간 질환의 주요 기여자이고, 간은 섬유성 조직의 형성 및 간에서의 반흔형성을 특징으로 하는 지속적인 염증 및 섬유증을 유발한다. NAFLD 및 NASH도 또한 간에서 염증 및 섬유증을 유발한다.
- [0096] 간경변증은 간이 장기간 손상으로 인해 적절하게 기능하지 않는 간에서의 섬유증이다. 전형적으로, 질환은 수 개월 또는 수년에 걸쳐 천천히 발생한다. 초기에는, 종종 증상이 없다. 질환이 악화됨에 따라, 사람은 피로해질 수 있거나, 쇠약해질 수 있거나, 가려워질 수 있거나, 하퇴에 종창이 생길 수 있거나, 황색 피부가 발생할 수 있거나, 쉽게 타박상이 발생할 수 있거나, 복부에 체액이 축적될 수 있거나, 또는 피부에 거미-유사 혈관이 발생할 수 있다. 복부에의 체액 축적은 자발적으로 감염될 수 있다. 다른 합병증은 간성 뇌병증, 식도 내 확장된 정맥 또는 확장된 위 정맥으로부터의 출혈, 및 간암을 포함한다. 간성 뇌병증은 혼란 및 가능하게는 무의식을 초래한다. 간경변증은 간 기능장애를 초래할 수 있다. 하기 증상 또는 특색은 간 기능장애의 직접적인 결과이고, 따라서 또한 본원에 개시된 조성물 및 방법에 의해 치료 또는 개선될 수 있다.
- [0097] 간 성상 세포 (HSC) 및 종양 세포 사이의 직접적인 상호작용은 다중 메카니즘을 통해 종양 성장을 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 그의 종양-지지 역할을 감소시키거나 제거하기 위해 HSC를 표적화하는 것은 간세포성 암종 (HCC)을 예방, 억제 또는 치료하기 위한 잠재적 치료 전략을 제시한다. 특정 실시양태에서, 간세포성 암종 (HCC)의 발생의 예방 또는 억제를 필요로 하는 환자에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체를 투여하는 것을 포함하는, 간세포성 암종의 발생의 예방 또는 억제를 필요로 하는 환자에서 간세포성 암종의 발생을 예방 또는 억제하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 간세포성 암종 (HCC)의 발생은 간 경변증의 결과이다. 특정 실시양태에서, 방법은 간 성상 세포 증식 및/또는 섬유화 표현형 전이를 억제하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 예컨대 경관 동맥 화학색전술 (TACE) 시술 동안 간에 국부로 투여된다.
- [0098] 거미 혈관종 또는 거미 모반은 많은 보다 작은 혈관으로 둘러싸인 중심 세동맥으로 이루어진 혈관성 병변이며, 이는 에스트라디올의 증가로 인해 발생한다. 수장 홍반은 또한 증가된 에스트로겐의 결과로서 손바닥의 무지구 및 소지구 용기에서의 발적이다. 암성이 아닌, 남성에서의 여성형유방증 또는 유방선 크기의 증가는 증가된 에스트라디올에 의해 유발되고, 환자의 최대 3분의 2에서 발생할 수 있다. 생식선기능저하증, 성 호르몬의 감소는 발기부전, 불임, 성적 충동의 상실, 및 고환 위축으로 나타나고, 원발성 생식선 손상 또는 시상하부/뇌하수체 기능의 억제로부터 초래될 수 있다. 생식선기능저하증은 알콜중독 및 혈색소증으로 인한 간경변증과 연관된다. 간 크기는 간경변증을 가진 사람에서 비대될 수 있거나, 정상일 수 있거나, 또는 수축될 수 있다.
- [0099] 한 실시양태에서, 본원에 제공되는 생체접합체 및 방법은 신섬유증을 예방 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다. 신섬유증은 신장에 대한 급성 또는 지속적 손상으로부터 초래될 수 있다. 손상은 세포외 매트릭스의 과도한 침착으로 이어질 수 있다. 시간의 경과에 따라, 이는 신부전을 초래할 수 있고, 이는 환자가 투석 또는 신장 이

식을 받을 것을 필요로 한다.

[0100] 복막강 내에 체액이 축적된 것인 복수는 측복부 둔탁을 일으킨다. 이는 복위의 증가로 가시적일 수 있다. 간 성 악취는 증가된 디메틸 슬퍼드로 인한 곰팡이성 호흡 냄새이다. 황달은 증가된 빌리루빈으로 인한 피부 및 점막의 황색 변색이다. 또한, 간 경변증은 문맥 정맥계에서 혈류 및 보다 높은 압력에 대한 저항성을 증가시켜, 문맥 고혈압을 초래한다.

[0101] 한 실시양태에서, 본원에 제공되는 생체접합체 및 방법은 심장 내의 섬유증을 예방 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다. 심장 내의 섬유증은 심방 섬유증, 심내막심근 섬유증, 또는 심근경색의 형태로 존재한다. 신경교 반흔은 뇌 내의 섬유증이다. 섬유증의 다른 유형은, 비제한적으로, 관절섬유증 (무릎, 어깨, 다른 관절), 크론병 (장), 들피트렌 구축 (손, 손가락), 켈로이드 (피부), 종격 섬유증 (종격의 연부 조직), 골수섬유증 (골수), 폐 이로니병 (음경), 신원성 전신 섬유증 (피부), 진행성 거대 섬유증 (폐), 복막후 섬유증 (복막후강의 연부 조직), 경피증/전신 경화증 (피부, 폐), 및 일부 형태의 유착성 피막염 (어깨)을 포함한다.

[0102] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 이들 질환 중 임의의 것 또는 이들 질환과 연관된 증상 또는 특색을 예방 및/ 또는 치료하는데 적합한 것으로 고려된다. 섬유증의 발생은 클라렌 및 글리코사미노글리칸을 포함한 결합 조직에 위치한 자극된 세포를 수반한다. 본 개시내용의 생체접합체는 클라렌 또는 글리코사미노글리칸과 상호작용 할 수 있고, 따라서 이러한 과도한 결합 조직의 형성을 파괴할 수 있다. 생체접합체는 또한 내피 장벽을 보호 할 수 있다. 이는 미세혈관 손상으로 인한 노출된 세포와 매트릭스와 상호작용함으로써 이루어질 수 있다. 내피 장벽을 보호하는 것은 염증 세포가 조직 내로 혈관의 유출하여 섬유화 조직을 초래하는 과도한 ECM 침착을 유발하는 것을 방지한다. 따라서, 생체접합체는 섬유증을 예방, 억제, 지연, 및/또는 역전시킬 수 있다.

[0103] 특정 실시양태에서, 섬유증은 허혈 후, 감염 후, 또는 특발성 (예를 들어, 신장, 간, 심장, 폐) 섬유증이다. 예를 들어, 문헌 [Guerrot, D., et al. Fibrogenesis & tissue repair 5.Supp1 (2012): S15, 및 Yamaguchi, I., et al. Nephron Experimental Nephrology 120.1 (2012): e20-e31]을 참조한다. 특정 실시양태에서 섬유증은 복막후 섬유증이다. 특정 실시양태에서, 섬유증은 피부 섬유증 (예를 들어, 경피증)이다. 예를 들어, 문헌 [Maurer, B., et al. Annals of the rheumatic diseases (2013): annrheumdis-2013]을 참조한다.

[0104] 한 실시양태에서, 질환은 급성 세뇨관 괴사, 당뇨병성 만성 신부전, 루푸스 신염, 신섬유증, 또는 급성 사구체 신염이 아니다. 한 실시양태에서, 질환은 특발성 폐 섬유증 (IPF), 만성 폐쇄성 폐 질환, 천식, 또는 기종이 아니다.

[0105] 특정 실시양태에서, 섬유증은 파브리병, 고서병, 니만-퍄병, 및 헌터 증후군 (뮤코폴리사카라이드증)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 리소솜 축적 장애에 의해 유발되거나, 또는 달리 그와 관련된다. 따라서, 특정 실시 양태에서, 리소솜 축적 장애에 의해 유발되거나 또는 달리 그와 관련된 섬유증의 예방을 필요로 하는 환자에서 리소솜 축적 장애에 의해 유발되거나 또는 달리 그와 관련된 섬유증을 예방하는 방법이 본원에 제공된다.

[0106] 한 실시양태에서, 섬유증의 예방 또는 치료를 위한 본원에 개시된 생체접합체(들)의 용도가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 섬유증의 예방 또는 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 생체접합체(들)의 용도가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 간 섬유증의 예방 또는 치료를 위한 본원에 개시된 생체접합체(들)의 용도가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 생체접합체는 황산화된 히알루론산 및 약 50 내지 약 150개, 또는 약 100개의 웨티드를 포함하고, 여기서 웨티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGS (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYKSILYGS (서열식별번호: ), CPGRVMHGLHLGDDEGPC (서열식별번호: ), CVWLWEQC (서열식별번호: ), 또는 WREPSFCALS (서열식별번호: ), 또는 각각 그로부터 1, 2, 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 중 적어도 1개의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 웨티드(들)는 히드라지드-카르보닐 연결을 통해 헤파린 또는 다른 글리 칸에 결합된다. 한 실시양태에서, 생체접합체는 황산화된 히알루론산 및 웨티드에 의한 약 15 내지 약 30% 관 능화를 포함하며, 여기서 웨티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGS (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYKSILYGS (서열식별번호: ) 중 적어도 1개의 서열을 포함 한다. 한 실시양태에서, 웨티드(들)는 히드라지드-카르보닐 연결을 통해 헤파린에 결합된다.

[0107] 한 실시양태에서, 간 섬유증 또는 폐 섬유증의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자에게 GQLYKSILYGS (서 열식별번호: ) 또는 GQLYKSILY (서열식별번호: )를 포함하는 약 50 내지 약 150개, 또는 약 100개의 웨티드에 결합된 황산화된 히알루론산을 포함하는 생체접합체의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 간 섬유증 또는 폐 섬

유증의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자에서 간 섬유증 또는 폐 섬유증을 예방 또는 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 간 섬유증 또는 폐 섬유증의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자에서 간 섬유증 또는 폐 섬유증의 예방 또는 치료를 위한 본원에 개시된 생체접합체(들)의 용도가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, GQLYKSILYGSQGSRR (서열식별번호: )을 포함하는 약 50 내지 약 150개, 또는 약 100개의 웹티드에 결합된 황산화된 히알루론산을 포함하는 생체접합체의 유효량이 투여된다.

[0108] 또한, 혈관염을 예방 및/또는 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 혈관염은 혈관 벽의 염증으로 정의되고, 다양한 군의 개별 질환 실체의 병리학적 토대를 형성한다. 혈관염은 자가면역 질환에서 통상적으로 관찰되는 난치성 병리학적 상태 중 하나이고, 그의 많은 경우는 스테로이드 및 면역억제제와 같은 통상적으로 사용되는 치료 방법에 대해 불응성이다. 혈관염 종후군에서, 염증은 다양한 크기의 동맥에서 생기고, 열, 근육 및 관절에서의 통증, 혈관 폐쇄, 피부 궤양, 및 다발성 단일신경염이 발생할 수 있다. 상기 방법은 대혈관 혈관염 (LVA), 중혈관 혈관염 (MVA), 소혈관 혈관염 (SVA), 가변 혈관 혈관염 (VVA), 단일-기관 혈관염 (SOV), 전신 질환과 연관된 혈관염, 및/또는 개연성 있는 병인과 연관된 혈관염을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 대혈관 혈관염 (LV V)의 비제한적 예는 다카야스 동맥염 (TAK) 및 거대 세포 동맥염 (GCA)을 포함한다. 중혈관 혈관염 (MVA)의 비제한적 예는 항호중구 세포질 항체 (ANCA)-연관 혈관염 (AAV), 현미경적 다발혈관염 (MPA), 다발혈관염을 동반한 육아종증 (베게너) (GPA), 다발혈관염을 동반한 호산구성 육아종증 (체그-스트라우스) (EGPA), 면역 복합체 SVA, 항-사구체 기저막 (항-GBM) 질환, 한랭글로불린혈증성 혈관염 (CV), IgA 혈관염 (헤노호-쇤라인) (IgAV), 및 저보체혈증성 두드러기성 혈관염 (HUV) (항-C1q 혈관염)을 포함한다. 가변 혈관 혈관염 (VVA)의 비제한적 예는 베체트 병 (BD) 및 코간 증후군 (CS)을 포함한다. 단일-기관 혈관염 (SOV)의 비제한적 예는 피부 백혈구파괴성 혈관염, 피부 동맥염, 원발성 중추 신경계 혈관염, 및 단리된 대동맥염을 포함한다. 전신 질환과 연관된 혈관염의 비제한적 예는 루푸스 혈관염, 류마티스 혈관염, 및 사르코이드 혈관염을 포함한다. 개연성 있는 병인과 연관된 혈관염의 비제한적 예는 C형 간염 바이러스-연관 한랭글로불린혈증성 혈관염, B형 간염 바이러스-연관 혈관염, 매독-연관 대동맥염, 약물-연관 면역 복합체 혈관염, 약물-연관 ANCA-연관 혈관염, 및 암-연관 혈관염을 포함한다. 혈관염의 다른 예는 항인지질 증후군, 버거병 (폐쇄성 혈전혈관염), 한랭글로불린혈증, 크리오피린-연관 자가염증성 증후군 (CAPS) (소아), 굿페스쳐병, 국부 경피증 (소아), 류마티스성 다발근육통, 레이노 현상, 경피증, 쇼그렌 증후군, 및 전신 홍반성 루푸스를 포함한다. 본원에 개시된 생체접합체 및 방법은 혈관염의 억제 및/또는 치료에 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0109] 한 실시양태에서, 혈관 혈관염을 예방 및/또는 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 항호중구 세포질 항체 (ANCA)-연관 혈관염 (AAV), 현미경적 다발혈관염 (MPA), 다발혈관염을 동반한 육아종증 (베게너) (GPA), 다발혈관염을 동반한 호산구성 육아종증 (체그-스트라우스) (EGPA), 면역 복합체 SVA, 항-사구체 기저막 (항-GBM) 질환, 한랭글로불린혈증성 혈관염 (CV), IgA 혈관염 (헤노호-쇤라인) (IgAV), 및/또는 저보체혈증성 두드러기성 혈관염 (HUV) (항-C1q 혈관염)을 포함한 소혈관 혈관염을 예방 및/또는 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 질환은 소혈관 (예를 들어, 매우 작은 동맥, 세동맥, 모세혈관, 및 작은 정맥)에 영향을 미친다.

#### 조합 요법

[0111] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 섬유증을 예방 또는 치료하는데 유용한 제2 작용제와 조합되어 사용될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 개시내용의 임의의 조성물 및 1종 이상의 이러한 제2 작용제를 포함하는 조합물, 조성물, 패키지 또는 키트가 제공된다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 임의의 치료 방법은 1종 이상의 이러한 제2 작용제의 투여를 추가로 포함한다.

[0112] 제2 작용제는 섬유증의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 또는 달리 개선시키는데 유용한 임의의 제약학적 또는 생물학적 작용제일 수 있다. 비제한적 예는 스테로이드, 예컨대 프레도닌, 환원제, 예컨대 N-아세틸시스테인, 항섬유화 약물, 예컨대 피르페니돈 및 닌테다닙, 면역억제 약물, 예컨대 코르티코스테로이드, 시클로포스파미드, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 페니실라민, 및 시클로스포린 A 및 FK506, 및 다른 작용제, 예컨대 콜키신, IFN-γ 및 미코페놀레이트 모페틸을 포함한다.

[0113] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 혈관염을 예방 또는 치료하는데 유용한 제2 작용제와 조합되어 사용될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 개시내용의 임의의 조성물 및 1종 이상의 이러한 제2 작용제를 포함하는 조합물, 조성물, 패키지 또는 키트가 제공된다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 임의의 치료 방법은 1종 이상의 이러한 제2 작용제의 투여를 추가로 포함한다.

- [0114] 제2 작용제는 혈관염의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 또는 달리 개선시키는데 유용한 임의의 제약학적 또는 생물학적 작용제일 수 있다. 비제한적 예는 프레드니손, 시클로포스파미드 (시톡산), 메틸프레드니솔론, 메토트렉세이트 소듐, 메드롤 (Pak), 메드롤, 텍사메타손, 프레드니솔론, DexPak, 멜타손, 코르티손, 프레드니손 인텐솔, 텍사메타손 인산나트륨, 오라프레드 ODT, 트렉살, 류마트렉스, 메토트렉세이트 소듐 (PF), 베리프레드 20, 텍사메타손 인텐솔, 프레드니솔론 인산나트륨, 폐디아프레드, 밀리프레드, 레이오스, 밀리프레드, 및 더블렉스를 포함한다.
- [0115] b. 관상 동맥 질환 (CAD) 및 말초 동맥 질환 (PAD)
- [0116] 본 개시내용의 한 실시양태는 외과적 우회로 시술의 성공률을 개선시키고/거나 실패를 감소시키기 위한 방법 및 연관 조성물을 제공한다. 우회로 이식은 관상 동맥 질환 (CAD) 및 말초 동맥 질환 (PAD) 둘 다에서 동맥 차단 치료의 한 형태로서 사용된다. 미국에서 연간 대략 500,000건의 관상 동맥 우회로 이식 (CABG) 시술 및 70,000 건 초과의 말초 우회로 이식 시술이 수행된다. 가장 통상적으로는, 자가 혈관 이식편을 종종 복제 정맥으로부터 수확한다.
- [0117] 혈류를 복구하기 위해 자가 정맥 이식편을 이용하는 외과적 우회로의 보급에도 불구하고, CAD 및 PAD 둘 다에서 수많은 정맥 이식 실패 (VGF)가 존재한다. 말초 단독의 경우, 정맥 이식 실패율이 5년 내에 50% 실패 수준에 이르렀다. 5% 내지 10%의 정맥 이식편이 기술적인 요인 및 급성 혈전증으로 인해 이식 직후에 실패한 한편, 20% 내지 30%의 또 다른 사례에서 중기 실패 (3 내지 24개월)가 발생할 수 있고, 많은 비용이 드는 감시, 재개입 시술 및 절단을 초래할 수 있다. CLI 환자 (n = 1219)에서 정맥 이식 실패의 12-개월 발생률은 브리검 여성 병원(Brigham and Women's Hospital)에서 20년의 경험 동안 29%였다. 정맥 이식 실패의 결과는 종종 재발성 혈栓증, 쇠약 수술 및 사지 손실을 포함하여 환자에게 심각하다. 지금까지, 약물요법 및 기술 혁신은 정맥 이식 실패를 감소시키는데 거의 영향을 미치지 못하였다.
- [0118] 정맥 이식편 수확, 보존 배지, 우회로를 위한 준비 중 과도한 조작, 또는 혈관 및 재판류 손상에 의해 초래되거나 아니건 간에, 정맥 이식편 도관의 약한 내피 층에 대한 손상은 이식 후 혈관 벽 내에서 혈소판 매개된 염증 반응을 일으키는 것으로 고려된다. 이러한 내피 손상 및 ECM-혈소판 활성화 캐스케이드는 급성 염증 및 혈전증을 통한 초기 VGF, 또는 신생내막 증식증을 통한 지연된 VGF를 일으킬 수 있다. 따라서, 이식 후 정맥 이식편 내피하 매트릭스가 순환 중인 혈소판에 노출되는 것을 제한하면, 급성 혈관 벽 염증을 감소시키고, 재상피화를 개선시키고, 혈관 폐쇄 및 VGF를 초래할 수 있는 과도한 신생내막 증식증을 제한하는데 도움이 될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체는 자가 정맥 이식편을 이용하여 외과적 우회로를 받고 있는 심혈관 질환을 가진 환자를 위한 정맥 이식편 보존 용액으로서 사용될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체 및 그를 포함하는 조성물을 이용하여, 관상 동맥 질환 및/또는 말초 동맥 질환의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에서 관상 동맥 질환 및/또는 말초 동맥 질환을 치료 및/또는 예방할 수 있다.
- [0119] 따라서, 본 개시내용의 한 실시양태에 따라, 혈관 절편의 내벽을 개시내용의 합성 생체접합체를 함유하는 용액과 접촉시킴으로써 혈관 이식편 (예를 들어, 정맥 이식편)을 제조하는 방법이 제공된다. 접촉을 구현하는 하나의 방법은 절편을 용액에 침지시키는 것이다. 이러한 접촉을 위한 조건은 합성 생체접합체의 농도 및 혈관의 특징에 따라 달라질 수 있지만, 적합한 양의 합성 생체접합체가 내벽에 결합하도록 용이하게 결정될 수 있다. 이러한 방법으로 제조된 혈관 이식편 또한 본 개시내용의 범주 내에 있다.
- [0120] 이식편이 제조되면, 그를 필요로 하는 환자에게 이식할 수 있다. 외과적 우회로 시술은 의료 전문가에 의해 용이하게 수행될 수 있다. 이식되면, 이식편의 내벽에 결합된 합성 생체접합체가 급성 혈관 벽 염증을 감소시키고, 이식편의 재상피화를 개선시키고, 이식편의 과도한 신생내막 증식증을 제한하여, 이식 실패를 감소시키는데 도움이 될 수 있다.
- [0121] 한 실시양태에서, 우회로 시술 동안 또는 그 후에 이식편을 상기 기재된 바와 같은 합성 생체접합체로 처리한 경우에는, 합성 생체접합체가 이식편의 내벽에 결합하도록 합성 생체접합체의 용액을 이식편의 내강에 주사할 수 있다. 한 측면에서, 혈류가 이식편을 통해 복구되거나 개시되기 전에 주사를 수행한다. 또 다른 측면에서, 혈류가 복구 또는 개시된 직후에 (예를 들어, 10분 내에, 5분 내에, 또는 1분 내에) 주사를 수행한다.
- [0122] 일부 실시양태에서, 방법은 혈관의 부정적인 재형성을 억제하는데 효과적이다. 혈관성 또는 관상동맥 심장 질환으로도 공지된 관상 동맥 질환은, 관상 동맥 (심장 근육으로 혈액을 공급하는 동맥) 내부의 평활한 탄성 내층의 일부에서 심장으로의 혈류를 실제적으로 제한하는 아테롬성동맥경화증이 진행된 경우에 발생한다. 아테롬성 동맥경화증 또는 동맥 경화로도 공지된 말초 동맥 질환은, 순환계의 동맥에서 발생하는 장애이다. 부정적인 재

형성은 혈관 직경 및 내강 직경의 감소를 일으키는 자극에 대한 혈관의 생리학적 또는 병리학적 반응을 포함한다. 이러한 자극은 예를 들어 혈류의 변화 또는 혈관성형술 시술에 의해 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 생체접합체 및 그를 포함하는 조성물의 주사는 주사하지 않은 혈관 직경에 비해 혈관 직경을 약 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 95%, 또는 그 초과 중 임의의 것만큼 증가시킨다. 부정적인 재형성은 예를 들어 혈관조영술에 의해 병변 부위 (또는 질환 부위)에서의 퍼센트 직경 협착으로서 정량화될 수 있다. 재형성 정도를 측정하는 또 다른 방법은 혈관내 초음파 (IVUS)를 이용하여 변병내 외부 탄성판 면적을 측정하는 것을 포함한다. IVUS는 외부 탄성판뿐만 아니라 혈관 내강을 영상화할 수 있는 기술이다. 일부 실시양태에서, 부정적인 재형성은 혈관 개입 시술, 예컨대 혈관성형술, 스텐팅 또는 아테롬절제술과 연관된다. 따라서, 본원에 기재된 생체접합체 및 그를 포함하는 조성물을 혈관 개입 시술 전에, 그 동안에 및/또는 그 후에 주사할 수 있다. 특정 실시양태에서, 풍선 혈관성형술 전에, 그 동안에 및/또는 그 후에 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체 또는 그를 포함하는 조성물의 유효량을 포함하는 용액을 내강의 내벽에 적용하는 것을 포함하는, 대퇴슬와부 동맥 내부의 협착 또는 폐쇄의 치료를 필요로 하는 환자에서 대퇴슬와부 동맥 내부의 협착 또는 폐쇄를 치료하는 방법이 제공된다.

[0123]

따라서, 본 개시내용은 혈관 벽 또는 혈관 벽을 둘러싸는 조직에 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체 또는 그를 포함하는 조성물의 유효량을 주사하는 것을 포함하는, 혈관 (예를 들어, 동맥) 내에서의 부정적인 재형성의 억제를 필요로 하는 개체에서 혈관 (예를 들어, 동맥) 내에서의 부정적인 재형성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 생체접합체 또는 조성물을 잠재적인 또는 실제의 부정적인 재형성 부위에 또는 그에 인접하여 (예컨대, 부위로부터 약 2, 1 또는 0.5 cm 이하로 떨어져서) 주사한다. 일부 실시양태에서, 나노입자 조성물을 잠재적인 또는 실제의 부정적인 재형성 부위로부터 멀리 (예를 들어, 부위로부터 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 cm 중 임의의 것만큼 떨어져서) 주사한다. 일부 실시양태에서, 주사는 바늘을 가진 카테터를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, 부위는 관상 동맥 또는 말초 동맥이다. 일부 실시양태에서, 동맥은 신동맥, 대뇌 동맥, 폐 동맥 및 하지 동맥으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 동맥은 풍선 손상된 동맥이다. 추가의 예는 복부 대동맥, 전경골 동맥, 대동맥궁, 궁상 동맥, 액와 동맥, 상완 동맥, 경동맥, 복강 동맥, 회선 비골 동맥, 총간 동맥, 총장골 동맥, 심부 대퇴 동맥, 심부 수장축 동맥궁, 배측 가락 동맥, 배측 중족골 동맥, 외경 동맥, 외장골 동맥, 안면 동맥, 대퇴 동맥, 하장간막 동맥, 내장골 동맥, 장 동맥, 외측하슬 동맥, 외측상슬 동맥, 수장축 가락 동맥, 비골 동맥, 슬와 동맥, 후경골 동맥, 대퇴 심부 동맥, 폐동맥, 요골 동맥, 신동맥, 비장 동맥, 쇄골하 동맥, 표재 수장축 동맥궁, 상장간막 동맥, 상척골 측부 동맥 및/또는 척골 동맥을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 동맥은 관상 혈관계의 일부이다.

[0124]

한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 황산화된 히알루론산 및 펩티드에 의한 약 15 내지 약 30% 판능화를 포함하며, 여기서 펩티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGSGL (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYKSILYGSGLSRR (서열식별번호: ), CGPRVMHGLHLGDEGPC (서열식별번호: ), CVWLWEQC (서열식별번호: ), 또는 WREPSFCALS (서열식별번호: ), 또는 각각 그로부터 1, 2, 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 중 적어도 1개의 서열을 포함한다.

[0125]

### c. 혈관 치료

[0126]

본원에 기재된 생체접합체 및 조성물을 사용하여 혈관 손상 또는 개입 전에, 그 동안에 및/또는 그 후에 환자의 혈관을 치료할 수 있다. 혈관 개입은 스텐트를 사용하거나 사용하지 않는 혈관성형술, 이식 혈관, 아테롬절제술 및 혈관 통로 기능장애, 또는 다른 외과적 시술을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0127]

본원에 기재된 다양한 실시양태에서, 생체접합체 또는 그의 조성물을, 혈전증, 벗겨진 내피의 노출된 콜라겐에 대한 혈소판 결합, 내피가 노출됨으로 인한 염증, 내막 증식증 또는 혈관연축에 수반되는 것과 같은, 혈소판 활성화를 억제하는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여할 수 있다.

[0128]

다양한 실시양태에서, 생체접합체는 예를 들어 정맥내로 또는 근육으로 투여될 수 있다. 비경구 투여를 위한 다른 적합한 경로는 혈관내, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피부, 피하, 경피, 피내 및 표피내 전달을 포함한다. 비경구 투여를 위한 적합한 수단은 바늘 (미세바늘 포함) 주사기, 주입 기술, 및 카테터-기반 전달을 포함한다. 카테터-기반 전달은 풍선 상의 코팅으로서, 다공성 풍선을 통한, 또는 스텐트 상의 코팅으로서 생체접합체를 전달하는 것을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 생체접합체는 전신으로 전달될 수 있다 (즉, 표적 혈관으로 직접 전달되는 것이 아니라, 비경구 투여에 의해 전달됨).

- [0129] 이를 생체접합체는 물리적 펩티드-콜라겐 상호작용을 통해 노출된 콜라겐에 국부로 결합한다. 콜라겐에 결합하면, 생체접합체는 1) 혈소판 부착/활성화에 대한 장벽으로서 작용하는 것, 2) MMP 접근을 억제함으로써 분해로부터 콜라겐을 보호하는 것, 및 3) 성장 인자 FGF-2, FGF-7 및 FGF-10을 격리시켜 내피 및 상피 세포 증식 및 이동을 촉진하는 것을 포함한 수많은 기능을 갖는다.
- [0130] 생체접합체는 콜라겐 상에서 혈소판 결합 부위에 대해 경쟁하여 혈소판 결합 및 활성화를 막을 수 있다. 생체접합체의 글리칸 백본은 음으로 하전될 수 있고, 물 분자와 결합하여 혈소판 및 단백질 부착을 방지하는 콜라겐 표면 상의 친수성 장벽을 생성할 수 있다. 정상 혈소판 기능을 억제하는 것이 아니라 노출된 콜라겐을 차폐함으로써, 생체접합체는 염증 및 내막 증식증으로의 캐스케이드에서 초기 단계를 다루는 국부 치료를 제공할 수 있다.
- [0131] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 혈액투석을 받는 환자에서 혈관 통로 기능장애의 미충족 필요를 다루는 새로운 접근법을 제공한다. 한 실시양태에서, 접근법은 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체로부터 설계된 혈관 내강 코팅의 생성을 수반한다. 동정맥루 (AVF)에서, 예를 들어 신생내막 증식증은 AVF의 정맥 부분에서 대부분 발생한다. 내막 증식증의 초기 메카니즘이 동맥 및 정맥에서 유사하지만, 생성된 병변에는 차이가 있다. 말초 혈관 질환 세팅에서 정맥 신생내막 증식증은 동맥 내막 증식증보다 더 공격적인 병변을 갖는 경향이 있고, 혈관성 형술에 대해 보다 불량한 반응을 갖는다. 개시된 생체접합체가 동맥 손상에서 혈소판 결합 및 내막 증식증을 예방하는 능력은 신생내막 증식증을 감소 또는 예방하는 그의 능력에 기여하는 것으로 고려된다.
- [0132] 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 혈액투석을 필요로 하는 환자에서 동정맥루 (AVF)의 성숙을 개선시키거나, 또는 대안적으로 AVF에서 개존성을 개선시키거나, 정맥의 내부 직경을 확대시키거나, 협착을 감소시키거나, 신생내막 증식증을 감소시키거나, 혈류역학 스트레스를 감소시키거나, 내피 또는 평활근 세포 손상을 감소시키거나, 혈관 통로 기능장애를 감소시키거나, 또는 응고 또는 염증을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 AVF 내강의 내벽에 용액을 적용하고; AVF에서 혈류를 복구 또는 개시하는 것을 수반하며, 여기서 용액은 본 개시내용의 생체접합체이거나 또는 용액은 유효량의 본 개시내용의 생체접합체를 포함한다.
- [0133] 노출된 콜라겐에 특이적으로 결합하는 합성 중합체 내강 코팅을 사용하는 국부 치료가 개시되며, 여기서 코팅은 혈관 벽에 대한 혈소판 부착을 차단하여, 혈전증 및 내막 증식증에서 개시 사건을 억제할 수 있다. 추가적으로, 코팅은 혈관 벽의 신속한 재내피화를 촉진하여 보다 빠른 치유를 일으킬 수 있다. 생성 동안 개시된 생체접합체를 본래의 AV 누공에 적용하면 유의하게 적은 협착 및 더 큰 직경을 갖는 누공을 생성할 것으로 고려된다.
- [0134] 일부 실시양태에서, 혈류가 개시되기 전에 새로이 생성된 AVF의 경우, 혈류가 개시되기 약 10분 미만 전에 용액을 적용한다. 일부 실시양태에서, 혈류가 개시되기 약 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2분, 또는 60, 45, 30, 20, 10 또는 5초 미만 전에 용액을 적용한다. 일부 실시양태에서, 혈류가 개시되기 적어도 1분 또는 적어도 2, 3, 4, 5분 전에 용액을 적용한다. 일부 실시양태에서, 혈류가 복구되고 적어도 1분 또는 적어도 2, 3, 4, 5분 후에 용액을 적용한다. 일부 실시양태에서, 혈류가 개시된 다음, 용액의 전달이 가능하도록 이를 정지시킨다. 일부 실시양태에서, 문합 생성 전에, 문합 생성 동안, 또는 그 후에 용액을 혈관에 적용한다. 일부 실시양태에서, 문합 생성 전에, 문합 생성 동안, 및 그 후에 용액을 혈관에 적용한다.
- [0135] 일부 실시양태에서, 예를 들어 바늘, 카테터 또는 다른 약물-전달 기기를 이용하여 AVF를 통해 용액을 풀려싱한다. 한 실시양태에서, 방법은 AVF를 용액으로 풀려싱한 후에 AVF를 밀폐시키는 것을 추가로 수반한다. 일부 실시양태에서, 상기 기재된 바와 같이 용액을 적용하는 것에 더하여, 또는 대안적으로, 수립된 AVF의 근위 및 정맥 및 동맥을 클램핑하여 생성된 밀폐된 내강으로 용액을 주사한다.
- [0136] 한 실시양태에서, 정맥의 내부 직경을 확대시키는데 이용되는 AVF의 정맥 부분의 정맥 확장 또는 문지름 후 약 5분 내에 (또는 대안적으로 10, 9, 8, 7, 6, 4, 3 또는 2분 내에) 용액을 적용한다. 정맥 내부의 기계적으로 확장되거나 문지른 표면에 용액을 적용하면, 문지르는 동안 표면 상의 생체접합체의 손실을 감소시킬 수 있다.
- [0137] 추가로, 개시된 조성물 및 방법은, 혈관 통로의 혈관 벽에 개시내용의 용액을 적용하고; 혈관 통로에서 혈류를 복구 또는 개시하는 것을 수반할 수 있는, 환자에서 혈관 통로를 수립하는데 이용될 수 있는 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 벽은 혈관의 내벽이지만, 임의의 혈관의 외벽일 수도 있다.
- [0138] 일부 실시양태에서, 혈관 통로는 동정맥루 (AVF), 동정맥 이식편 (AVG), 또는 비경구 영양, 화학요법, 또는 혈장분리반출술에 사용되는 내구성 있는 혈관 통로이다. 용액은 혈관 벽이 혈소판에 노출되는 것을 감소시키는 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 혈관 벽은 손상 또는 외과적 시술로 인해 혈류에 노출된 세포 또는 조직

을 포함한다. 용액의 적용은 혈관 통로, 예컨대 AVF 및 AVG에서 개존성을 개선시키거나, 생존을 개선시키거나, 혈류를 개선시키거나, 혈관 내부 직경을 확대시키거나, 또는 협착을 감소시키는 것으로 제시된다.

[0139] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 혈액투석을 필요로 하는 환자에서 동정맥루 (AVF)의 성숙을 개선시키거나, 또는 대안적으로 AVF에서 개존성을 개선시키거나, 정맥의 내부 직경을 확대시키거나, 협착을 감소시키거나, 신생내막 증식증을 감소시키거나, 혈류역학 스트레스를 감소시키거나, 내피 또는 평활근 세포 손상을 감소시키거나, 혈관 통로 기능장애를 감소시키거나, 또는 응고 또는 염증을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 AVF 내강의 내벽에 용액을 적용하고; AVF에서 혈류를 복구 또는 개시하는 것을 수반하며, 여기서 용액은 유효량의 본 개시내용의 생체접합체를 포함한다.

[0140] 생체접합체는 경피로 또는 정맥내로 환자의 혈관 내부에 투여될 수 있는 것으로 고려된다. 경피 또는 정맥내 전달은 외과적 누공 생성 후에 환자의 치료를 가능하게 한다. 생체접합체는 혈관의 치료, 혈관의 유지, 또는 누공 실패의 예방을 위해 전달될 수 있다.

[0141] 일부 실시양태에서, 방법은 1종 이상의 유지 적용, 예컨대 풍선-보조된 성숙, 풍선 혈관성형술, 아테롬절제술, 또는 혈병제거 시술을 수행하는 것을 추가로 포함한다. 또한, 일부 실시양태에서, 혈액투석 시점에, 특히 시술 후에, 특히 높은 유속이 내피 및 이식편 또는 누공으로의 주사를 손상시키는 경우에는 예방적 전달이 협착의 유지 및 예방에 유익한 것으로 고려된다.

[0142] 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 황산화된 히알루론산 및 펩티드에 의한 약 15 내지 약 30% 관능화를 포함하며, 여기서 펩티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGS (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYKSILYGSGSRR (서열식별번호: ), CGPRVMHGLHLGDEGPC (SEQ ID NO ), CVWLWEQC (서열식별번호: ), 또는 WREPSFCALS (서열식별번호: ), 또는 각각 그로부터 1, 2, 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 중 적어도 1개의 서열을 포함한다.

#### d. 혈관 개입

[0144] 혈관 개입, 예컨대 경피 관상동맥 개입은 콜라겐-결합 합성 생체접합체의 투여 전에, 그 동안에 또는 그 후에 임의의 통상적인 시술에 의해 수행할 수 있다. 본 발명의 방법과 함께 사용하기 위해 고려되는 혈관 개입 시술의 예는 스텐팅, 아테롬절제술, 및 혈관성형술, 예컨대 풍선 혈관성형술을 포함한다. 혈관 개입 시술은 혈관을 일시적으로 폐쇄시키는 것을 수반하는 것일 수 있거나 (예를 들어, 풍선 혈관성형술), 또는 혈관을 일시적으로 폐쇄시키는 것을 수반하지 않는 것일 수 있다 (예를 들어, 비-풍선 혈관성형술 시술, 풍선 혈관성형술을 수반하지 않는 스텐팅 시술 등). 예시적인 전달 방식은 카테터, 비경구 투여, 풍선 상의 코팅, 다공성 풍선을 통하는 것, 코팅된 스텐트, 및 그의 임의의 조합 또는 혈관 개입 시술 동안 약물 전달의 임의의 다른 공지되어 있는 방법을 포함할 수 있다.

[0145] 또 다른 예시적 실시양태에서, 혈관 개입 시술 동안, 보존적 아미노산 치환을 갖는 이를 생체접합체 중 임의의 것은 벗겨진 내피의 노출된 콜라겐에 대한 혈소판 결합, 혈소판 활성화, 혈전증, 내피가 노출됨으로 인한 염증, 내막 증식증, 및/또는 혈관연축을 억제할 수 있거나, 또는 내피 세포 증식을 자극할 수 있거나, 또는 벗겨진 혈관에서 콜라겐에 결합할 수 있다. 또 다른 예시적 실시양태에서, 혈관 개입 시술 동안, 본 단락에 기재된 보존적 아미노산 치환을 갖는 생체접합체 중 임의의 것은 벗겨진 내피의 노출된 콜라겐에 대한 혈소판 결합, 혈소판 활성화, 내막 증식증, 및/또는 혈관연축을 억제할 수 있거나, 또는 벗겨진 혈관에서 콜라겐에 결합할 수 있다.

[0146] 본원에 기재된 다양한 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 환자 (예를 들어, 혈전증, 벗겨진 내피의 노출된 콜라겐에 대한 혈소판 결합, 혈전증, 내피가 노출됨으로 인한 염증, 내막 증식증 또는 혈관연축에 수반되는 것과 같은, 혈소판 활성화를 억제하는 치료를 필요로 하는 환자)에게 투여될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 예를 들어 정맥내로 또는 근육으로 투여될 수 있다. 비경구 투여를 위한 적합한 경로는 혈관내, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피부, 피하, 경피, 피내 및 표피내 전달을 포함한다. 비경구 투여를 위한 적합한 수단은 바늘 (미세바늘 포함) 주사기, 주입 기술, 및 카테터-기반 전달을 포함한다. 예시적 실시양태에서, a) 콜라겐-결합 합성 생체접합체의 제약 활성 양; b) 약 pH 4.5 내지 약 pH 9의 범위의 pH를 제공하기 위한 제약상 허용되는 pH 완충제; c) 약 0 내지 약 300 밀리몰의 농도 범위의 이온 강도 개질제; 및 d) 약 0.25% 내지 약 10% 총 화학식량의 농도 범위의 수용성 점도 개질제 또는 a), b), c), 또는 d)의 임의의 개별 성분 또는 a), b), c) 및 d)의 임의의 조합을 포함하는, 비경구 투여 또는 카테터-기반 전달을 위해 콜라겐-결합 합성 생체접합체와 함께 사용하기 위한 제약 제제가 제공된다.

[0147]

본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 임의의 적합한 방식으로 환자의 혈관내로 (예를 들어, 동맥 또는 정맥으로) 투여될 수 있다. 본원에 기재된 다양한 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 혈관 개입 전에, 그 동안에 또는 그 후에 환자의 혈관에 투여될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 혈관 개입, 예컨대 경피 관상동맥 개입 (PCI)은 예를 들어 스텐팅, 아테롬절제술, 그라프팅, 및 혈관성형술, 예컨대 풍선 혈관성형술을 포함할 수 있다. 예시적으로, 혈관 개입은 동맥, 예컨대 관상 동맥 또는 정맥을 일시적으로 폐쇄시키는 것을 수반하는 것일 수 있거나 (예를 들어, 풍선 혈관성형술), 또는 동맥 또는 정맥을 일시적으로 폐쇄시키는 것을 수반하지 않는 것일 수 있다 (예를 들어, 비-풍선 혈관성형술 시술, 풍선 혈관성형술을 수반하지 않는 스텐팅 시술 등). 예시적인 전달 방식은 카테터, 비경구 투여, 풍선 상의 코팅, 다공성 풍선을 통하는 것, 코팅된 스텐트, 및 그의 임의의 조합 또는 혈관 개입 시술 동안 약물을 전달하는 임의의 다른 공지된 방법을 포함할 수 있다. 하나의 예시적 실시양태에서, 표적 혈관은 본래의 관상 동맥뿐만 아니라 예를 들어 초기 관상 동맥 우회로 시술에서 환자에게 그라프팅된 것을 포함한 관상 동맥, 예를 들어 환자의 심장 조직으로 혈액을 공급하는 임의의 혈관을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체가 투여되고 혈관 개입 시술이 수행되는 표적 혈관은 차단, 예컨대 협착, 또는 혈관을 통한 혈류의 감소를 초래하는 일부 다른 형태의 완전한 또는 부분적인 차단을 함유할 수 있다. 따라서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 카테터 (예를 들어, 확장 카테터, 오버-더-와이어 혈관성형술 풍선 카테터, 주입 카테터, 신속 교환 또는 모노레일 카테터, 또는 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 카테터)를 통해 혈관에 전달될 수 있으며, 이는 환자에게 경피로 삽입되고, 환자의 혈관을 통해 표적 혈관으로 흐른다. 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 7,300,454에 기재된 것을 포함한 다양한 카테터-기반 기기가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 카테터가 사용되는 본원에 기재된 다양한 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체를 전달하기 위해 사용되는 카테터는 혈관 개입이 수행되는 카테터와 동일할 수 있거나, 또는 상이한 카테터 (예를 들어, 동일하거나 상이한 피부 절개부를 통해 환자에게 경피로 삽입되고/거나 동일하거나 상이한 경로를 통해 환자의 혈관을 거쳐 표적 혈관으로 흐르는 상이한 카테터)일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 표적 혈관에 직접 주사될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 전신 전달될 수 있다 (즉, 표적 혈관으로 직접 전달되는 것이 아니라, 카테터-기반 전달 없이 비경구 투여에 의해 전달됨).

[0148]

혈관이 차단 (예를 들어, 협착)을 함유하는 경우에는, 콜라겐-결합 합성 생체접합체를 표적 혈관으로 차단 부위에 또는 차단에서 원위에 또는 둘 다에 직접 전달함으로써 투여를 수행할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 차단에서 근위인 1개 이상의 부위에 전달될 수 있다. 예시적으로, 콜라겐-결합 합성 생체접합체가 전달되는 동안 카테터 팁을 고정하여 유지시킬 수 있거나, 또는 콜라겐-결합 합성 생체접합체가 전달되는 동안 카테터 팁을 이동시킬 수 있다 (예를 들어, 처음에는 차단으로부터 원위인 위치에서부터, 차단으로 또는 그를 통해, 또는 차단에 근위인 위치까지 근위 방향으로).

[0149]

상기 나타낸 바와 같이, 한 실시양태에서, 혈관 개입, 예를 들어 경피 관상동맥 개입 전의 시점에 콜라겐-결합 합성 생체접합체를 환자의 혈관에 직접 투여할 수 있다. 예를 들어, 콜라겐-결합 합성 생체접합체의 전달은 혈관 개입 직전에 (예를 들어, 혈관 개입 전 약 1시간 내에, 예컨대 약 30분 내에, 약 15분 내에 및/또는 약 5분 내에) 수행될 수 있다. 임의로, 표적 혈관으로의 콜라겐-결합 합성 생체접합체의 직접 전달은 모든 또는 일부 혈관 개입 시술 동안에 및/또는 이러한 시술의 완료에 후속하여 계속될 수 있거나, 또는 표적 혈관으로의 콜라겐-결합 합성 생체접합체의 직접 전달은 혈관 개입 시술의 개시 전에 정지시킬 수 있고, 그 후 권장되지 않을 수 있다. 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체의 전달은 계속적일 수 있거나, 또는 단일 또는 다중 투여를 통해 이루어질 수 있다. 콜라겐-결합 합성 생체접합체를 표적 혈관에 투여하기 전에, 그 동안에 및/또는 그 후에, 동일한 콜라겐-결합 합성 생체접합체 또는 1종 이상의 상이한 콜라겐-결합 합성 생체접합체를 투여할 수 있다.

[0150]

한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 황산화된 히알루론산 및 펩티드에 의한 약 15 내지 약 30% 관능화를 포함하며, 여기서 펩티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGS (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYKSILYGSGSRR (서열식별번호: ), CGPRVMHGLHLDDEGPC (서열식별번호: ), CVWLWEQC (서열식별번호: ), 또는 WREPSFCALS (서열식별번호: ), 또는 각각 그로부터 1, 2, 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 중 적어도 1개의 서열을 포함한다.

[0151]

e. 내피 기능장애

[0152]

한 실시양태에서, 본 개시내용은 내피 기능장애와 연관된 질환을 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 조성물 및 방

법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 본 개시내용의 합성 콜라겐 결합 생체접합체를 포함한다.

[0153] 본원에서 콜라겐 결합 생체접합체가 급성 및 만성 질환 둘 다에서 내피 기능장애 또는 손상의 염증성 영향을 감소시킬 수 있음이 발견되었다. 이러한 생체접합체는 기능장애 내피로의 혈소판 결합을 억제 또는 감소시키고, 따라서 혈소판-매개된 염증을 감소시키는 것으로 고려된다. 염증은 혈소판 프로세스, 예컨대 혈소판-혈소판 결합, 혈소판-백혈구 결합, 백혈구 누출의 촉진, 또는 국부적 및 지역적 시토카인의 혈소판으로부터의 단순 방출을 통해 활성화될 수 있다.

[0154] 또한, 콜라겐 결합 생체접합체가 노출된 내피 세포에서의 염증유발 시토카인 분비 및 E-셀렉틴 및 P-셀렉틴의 발현을 감소시키는 것으로 발견되었다. 더욱이, 이들 생체접합체는 내피 세포 증식 및 이동을 증가시킬 수 있고, 심지어 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF)의 존재 하에서도, IL-6 분비 및 혈관 손상 마커의 생산을 약화시킬 수 있다. 콜라겐 결합 생체접합체의 투여에 의해 발생하는 이들 효과의 일부 또는 모두는 기능장애 내피에서의 염증 감소에 기여하는 것으로 고려된다.

[0155] 또한, 일부 실시양태에서, 내피 기능장애가 있는 혈관 부위에서 염증을 예방 또는 감소시키는 방법이 제공된다. 방법은 그 부위에 본 개시내용의 합성 콜라겐 결합 생체접합체를 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 수반한다.

[0156] 용어 "내피 기능장애"는 또한 "내피 세포 (EC) 기능장애," "기능장애 내피," 또는 "기능장애 내피 세포"로도 지칭된다. 내피 기능장애는 내피 세포의 세포 표면 상의 ICAM 및 VCAM 수용체 또는 셀렉틴 수용체의 비차폐 또는 노출에 의해 결정될 수 있다. P-셀렉틴 및 E-셀렉틴은 손상 및 염증으로 인해 세포 표면 상에서 일시적으로 발현되고 기능장애 내피에서 만성적으로 발현되는 노출된 셀렉틴 수용체의 예이다.

[0157] 일부 실시양태에서, 내피 기능장애는 투과된 내피 내층 또는 손상된 내피 세포를 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 내피 기능장애는 글리코칼리克斯의 손실을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 내피 기능장애는 내피 세포의 표면 상에서 발현되고 순환에 노출된 셀렉틴 단백질을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 그러한 부위에 염증이 있다.

[0158] 한 측면에서, 혈관 부위는 물리적 수단에 의해 벗겨지지 않고, 혈관 개입 시술로부터의 회복이 진행되지 않고 있다. 혈관 개입 시술의 비제한적 예는 경피 관상동맥 개입 (PCI)을 포함한다.

[0159] "기능장애 내피 세포" 또는 "내피 세포 (EC) 기능장애"는 내피 세포의 세포 표면 상의 ICAM 및 VCAM 수용체, 뿐만 아니라 셀렉틴 수용체의 비차폐 또는 노출을 의미한다. P-셀렉틴 및 E-셀렉틴은 손상 및 염증으로 인해 세포 표면 상에서 일시적으로 발현되고 기능장애 내피에서 만성적으로 발현되는 노출된 셀렉틴 수용체의 예이다. 만성 기능장애 내피 세포를 갖는 질환 상태의 예는 당뇨병이다.

[0160] 내피 세포는 기능적 모세혈관의 유지에 참여하기 때문에, 내피의 기능장애는 광범위한 질환의 발병기전에서 중요한 역할을 한다.

[0161] 예를 들어, 내피는 말초 혈관 질환, 출중, 심장 질환, 당뇨병, 인슐린 저항성, 만성 신부전, 종양 성장, 전이, 정맥 혈전증, 및 중증 바이러스 감염성 질환에 직접 수반된다 (Rajendran et al., Int. J. Biol. Sci., 9:1057-1069, 2013).

[0162] 본원에 사용된 "내피 기능장애와 연관된 질환"은 내피 기능장애에 의해 적어도 부분적으로 유발되거나 내피 기능장애를 유도하는 인간 질환 또는 상태를 지칭한다. 따라서, 내피 기능장애와 연관된 질환을 치료하는 것은 기능장애 내피를 회복시키거나 또는 기능장애 내피로 인해 발생하는 상태 또는 증상, 예컨대 염증, 내막 증식증 및 혈전증을 예방 또는 개선시킴으로써 질환을 치료하는 것을 지칭한다.

[0163] 본 발명자들은 콜라겐 결합 생체접합체가 인간 환자의 임의의 기관으로 효과적으로 전달될 수 있다는 것을 입증하였다. 따라서, 콜라겐 결합 생체접합체를 사용하여, 임의의 기관에서 발생한, 하기 질환 또는 상태 중 임의의 것과 연관된 내피 기능장애를 치료할 수 있다.

[0164] 혈관 질환. 콜라겐 결합 생체접합체에 의해 적합하게 치료될 수 있는 혈관 질환은, 비제한적으로, 아테롬성동 맥경화성 질환 (말초 동맥 질환, 관상 동맥 질환, 출중, 경동맥 질환, 신장 동맥 협착), 정맥 혈전성 질환 (심부 또는 얇은 정맥 혈전증), 및 의인성 대혈관 손상 (혈관성형술, 스텐트 설치술을 이용하는 혈관성형술, 아테롬절제술, 혈전절제술, 투석 통로 생성, 우회로를 위한 정맥 수확, 뇌동맥류 또는 대동맥류의 치료)을 포함한다.

- [0165] 신장 질환. 콜라겐 결합 생체접합체에 의해 적합하게 치료될 수 있는 신장 질환은, 비제한적으로, 급성 세뇨관괴사, 당뇨병성 만성 신부전, 루푸스 신염, 신섬유증 및 급성 사구체신염을 포함한다.
- [0166] 폐 질환. 콜라겐 결합 생체접합체에 의해 적합하게 치료될 수 있는 폐 질환은, 비제한적으로, 특발성 폐 섬유증 (IPF), 만성 폐쇄성 폐 질환, 천식 및 기종을 포함한다.
- [0167] 혈액 질환. 콜라겐 결합 생체접합체에 의해 적합하게 치료될 수 있는 혈액 질환은, 비제한적으로, 혈전성 혈소판감소성 자반증 (TTP), 파종성 혈관내 응고 (DIC), 및 용혈성 요독성 증후군 (HUS)을 포함한다.
- [0168] 추가적으로, 피부 질환 예컨대 전신 경화증, 혈관염성 장애를 포함한 류마티스 질환 (루푸스), 류마티스 관절염 및 다른 염증성 관절염 (통풍), 염증성 장 질환을 포함한 위장 질환, 간염, 및 간 섬유증, 종양 성장, 종양 전이, 바이러스 및 박테리아성 폐혈증을 포함한 감염성 질환, 다발성 경화증을 포함한 신경계 질환, 치매, 및 근위축성 측삭 경화증, 황반 변성, 녹내장, 및 포도막염을 포함한 안과 질환, 내분비 질환 예컨대 당뇨병, 및 복합 부위 통증 증후군 (CRPS)이 또한 본 개시내용의 콜라겐 결합 생체접합체에 의해 치료될 수 있다.
- [0169] 치료될 질환 및 이환된 기능장애 내피의 위치에 따라 최적화된 치료를 위해 웨티드 아이덴티티, 글리칸에 부착된 웨티드의 수, 및 GAG 백본 아이덴티티와 관련하여 생체접합체를 조정할 수 있는 것으로 고려된다. 따라서, 수많은 분자 설계 파라미터를 조작하여 목표 효과를 최적화할 수 있다.
- [0170] 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 황산화된 히알루론산 및 웨티드에 의한 약 15 내지 약 30% 관능화를 포함하며, 여기서 웨티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGS (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYKSILYGSGSRR (서열식별번호: ), CPGRVMHGLHLGDDEGPC (서열식별번호: ), CVWLWEQC (서열식별번호: ), 또는 WREPSFCALS (서열식별번호: ), 또는 각각 그로부터 1, 2, 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 중 적어도 1개의 서열을 포함한다.
- [0171] f. 조직 유착
- [0172] 본 발명의 방법은 조직 유착, 예컨대 심장, 복부 또는 골반 유착과 관련된 다양한 적용에 유용하다. 본 발명의 방법은 이를 지속적인 결합 또는 재발성 손상을 치료 및/또는 예방하는데 유용할 것으로 고려된다.
- [0173] 특정 실시양태에서, 개시내용은 기관의 부자연스럽게 노출된 조직에 제약 조성물을 적용하는 것을 포함하는, 복부 또는 골반 유착의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에서 복부 또는 골반 유착을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 조성물은 글리칸에 결합된 약 1 내지 약 80개 콜라겐 결합 웨티드(들)를 갖는 글리칸을 포함하는 생체접합체를 포함한다. "노출된 조직"은 정상인 건강한 상태 하에 보이는 새로운 환경에 노출된 조직 또는 표면, 또는 정상인 건강한 상태 하에 상이한 기관의 세포 또는 조직에 노출되지 않았으나 질환 또는 손상으로 인해 또는 의학적 시술 동안에 노출된 조직 (즉, "부자연스럽게 노출된 조직")을 지칭할 수 있다.
- [0174] 유착은 정상적으로는 연결되지 않은 조직 및/또는 기관에 비정상적으로 결합한 섬유성 반흔 조직의 띠이다. 유착은 다양한 유형의 손상 또는 조직 장애, 예를 들어 예컨대 수술, 외상, 감염, 화학요법, 방사선, 이물, 또는 암에 반응하여 발생한다.
- [0175] 복부 및 골반 유착은 복부의 외과적 시술의 흔한 합병증이다. 복부 유착은 중증의 임상 문제 및/또는 통증을 유발할 수 있다. 예를 들어, 복부 유착-관련된 임상 문제는 소장 폐쇄, 속발성 여성 불임, 자궁외 임신, 만성 복부 및 골반통, 및 어렵고 위험한 재수술을 포함할 수 있다 (Diamond, M. P., Freeman, M. L. Eur. Soc. Human. Repro. Embryo. 2001; 7(6): 567-576). 복부 유착은 정상적으로는 연결되지 않은 조직 및/또는 기관을 테더링하고 신경의 견인을 유발함으로써 통증을 유발할 수 있다. 장이 폐쇄되기 시작하면, 팽창은 통증을 유발할 것이다. 따라서, 복부 유착은 장 장애 및 장 폐쇄 또는 차단을 유발할 수 있다. 극단적 경우에, 복부 유착은 혈류를 압박하여 조직 사멸을 초래하는, 장의 분절 둘레에 섬유성 띠를 형성할 수 있다.
- [0176] 상기 임상 문제 및/또는 통증을 유발하는 복부 및 골반 유착의 표준 치료는 외과적 개입이다. 그러나, 외과적 개입은 추가의 복부 유착 및 추가의 합병증 위험을 수반한다. 따라서, 복부 유착을 위한 대안적인 치료 및/또는 예방 옵션은 복부 유착의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에서 복부 유착을 치료 및/또는 예방하는데 유익할 것이다.
- [0177] 한 측면에서, 복부 조직 또는 기관에 대한 외상은 복부 조직 및/또는 기관 사이에 섬유성 조직 띠 형성을 야기

한다. 본원에 기재된 방법이 상기 복부 유착을 치료 및/또는 예방하는데 유용할 것으로 고려된다.

[0178] 본원에 제공된 합성 생체접합체는 통증을 최소화하고, 복부 조직 및/또는 기관 콜라겐을 분해로부터 보호하고, 상피 이동 및 상피 증식을 촉진하기 위해 보호성 수화 층을 제공할 것으로 고려된다.

[0179] 특정 실시양태에서, 개시내용은 복부 기관의 노출된 조직에 제약 조성물을 적용하는 것을 포함하는, 복부 유착의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에서 복부 유착을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 한 실시 양태에서, 조성물은 글리칸에 결합된 약 1 내지 약 80개의 콜라겐 결합 웨티드(들)를 갖는 글리칸을 포함하는 생체접합체를 포함한다.

[0180] 특정 실시양태에서, 개시내용은 부자연스럽게 노출된 건 및/또는 건초에 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체 또는 조성물을 적용하는 것을 포함하는, 건 - 건초 유착의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에서 건 - 건초 유착을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0181] 특정 실시양태에서, 개시내용은 부자연스럽게 노출된 심장 조직에 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체 또는 조성물을 적용하는 것을 포함하는, 심장 유착의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에서 심장 유착을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0182] 일부 측면에서, 조직은 수술, 외상, 감염, 화학요법, 방사선, 이물 또는 암으로 인해 노출된다. 한 측면에서, 조직은 외과적으로 노출된다.

[0183] 일부 측면에서, 조성물을 스프레이로서 적용된다. 일부 측면에서, 조직은 복막 조직이다.

[0184] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 또한 예컨대 손 또는 손가락 수술 동안 정형외과적 유착을 감소 또는 예방하는데 유용한 것으로 고려된다.

[0185] 일부 실시양태에서, 방법은 유착을 감소 또는 예방하는데 있어서 관련 기술분야에 공지된 다른 방법, 예컨대 조직을 둘러싸는 메쉬의 사용을 추가로 포함할 수 있다.

[0186] 본원에 제공된 생체접합체를 사용하여, 복부 조직 및/또는 기관의 세포외 매트릭스 성분을 표적화하는 합성 생체접합체를 복부 유착의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에게 투여함으로써, 복부 유착의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에서 복부 유착을 치료 및/또는 예방할 수 있다. 복부 조직 혈관화를 촉진하기 위해 웨티드 아이덴티티, 글리코사미노글리칸 (GAG) 백본에 부착된 웨티드의 수, 및 GAG 백본 아이덴티티와 관련하여 본원에 제공된 합성 생체접합체를 조정할 수 있는 것으로 고려된다. 따라서, 수많은 문자 설계 파라미터를 조작하여 목표 효과를 최적화할 수 있다.

[0187] 본원에 제공된 생체접합체는 조직 유착을 예방 또는 감소시키기 위해 수술시 보조물로서 사용될 수 있다. 수술 동안, 합성 생체접합체를 잠재적으로 유착성인 조직 또는 기관에 전달할 수 있다. 이러한 투여는 수술후 유착을 예방 및/또는 감소시키는데 도움이 될 것으로 고려된다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 합성 생체접합체를 수술 부위에 전달하는 것을 포함하는, 수술후 유착을 감소 또는 예방하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 생체접합체는 복부 시술, 예컨대 복강경 복부 수술에 유용할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 본원에 제공된 생체접합체를 잠재적으로 유착성인 조직 또는 기관에 복강경을 통해 전달 할 수 있다. 생체접합체에 의한 치료는 손상 영역에 결합하고, 통증을 최소화하기 위해 보호성 수화 층을 제공하고, 복부 조직 및/또는 기관 콜라겐을 분해로부터 보호하고, 상피 이동 및 상피 증식을 촉진함으로써 복부 유착을 치료 및/또는 예방할 것으로 고려된다. 또한, 하루에 다수회의 치료가 필요하지 않도록 생체접합체는 손상된 영역에서 지속될 것으로 고려된다.

[0188] 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 황산화된 히알루론산 및 웨티드에 의한 약 15 내지 약 30% 관능화를 포함하며, 여기서 웨티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGS (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYKSILYGSGSRR (서열식별번호: ), CGPRVMHGLHLGDDEGPC (서열식별번호: ), CVWLWEQC (서열식별번호: ), 또는 WREPSFCALS (서열식별번호: ), 또는 각각 그로부터 1, 2, 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 중 적어도 1개의 서열을 포함한다.

[0189] 본 개시내용의 조성물은 개방 수술 동안 또는 복강경을 통해 또는 수술 부위로의 접근을 허용하는 임의의 장비를 통해 투여될 수 있다.

[0190] g. 위-식도 손상

- [0191] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 환자에서 위-식도 손상의 치료 또는 예방의 미충족 필요를 다루는 새로운 접근법을 제공한다. 일반적으로, 새로운 접근법은 본 개시내용의 합성 콜라겐-결합 생체접합체를 포함하는 제약 조성물을 손상된 위-식도 조직 또는 세포에 적용하는 것을 수반한다.
- [0192] 조성물의 이러한 적용은 합성 콜라겐-결합 생체접합체의 코팅을 생성할 수 있다. 합성 콜라겐-결합 생체접합체는 물리적 펩티드-콜라겐 상호작용을 통해 식도 조직 상의 노출된 콜라겐에 결합할 수 있다. 콜라겐에 결합하면, 생체접합체는 1) 혈소판 부착/활성화에 대한 장벽으로서 작용하는 것, 2) MMP 접근을 억제함으로써 분해로부터 콜라겐을 보호하는 것, 및 3) 성장 인자 FGF-2, FGF-7 및 FGF-10을 격리시켜 내피 및 상피 세포 증식 및 이동을 촉진함으로써 조직 복구 및 회복을 이끄는 것을 포함한 수많은 기능을 갖는다.
- [0193] 한 실시양태에서, 콜라겐-결합 생체접합체는 공유 부착된 콜라겐-결합 펩티드를 갖는 폴리사카라이드 백본을 포함한다. 합성 생체접합체는 콜라겐 상에서 혈소판 결합 부위에 대해 경쟁하고, 혈소판 결합 및 활성화를 막는다. 글리칸 백본은 음으로 하전될 수 있고, 물 분자와 결합하여 혈소판 및 단백질 부착을 방지하는 콜라겐 표면 상의 친수성 장벽을 생성할 수 있다. 정상 혈소판 기능을 억제하는 것이 아니라 노출된 콜라겐을 차폐함으로써, 생체접합체는 염증 및 내막 증식증으로의 캐스케이드에서 초기 단계를 다루는 국부 치료를 제공할 수 있다.
- [0194] 이러한 새로운 접근법은 GERD 또는 의인성 개입에 의해 유발되는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 위-식도 손상을 치료하는데 유용한 것으로 고려된다. 하기 카테고리의 환자는 이러한 접근법으로부터 이익을 얻을 수 있는 것으로 추가로 고려된다: A) 식도위십이지장 내시경검사 (EGD) 절제를 필요로 하는 GERD 연관 식도 병변; B) EGD 확장을 필요로 하는 식도 협착; 및 C) EGD 치료를 필요로 하는 소화성 궤양 질환 (PUD).
- [0195] 제약 조성물을 손상된 위-식도 조직의 하나 이상의 병변에 국소로 적용할 수 있다. 조직의 제한된 접근성 때문에, 전달 기기의 사용이 유익한 것으로 고려된다. 예를 들어, 조성물을 식도위십이지장 내시경검사 (EGD) 시술 동안 또는 식도위십이지장 내시경을 사용하여 전달할 수 있다.
- [0196] 팔리페르민은 구강 점막염의 치료에 유용한 각질세포 성장 인자이다. 본 개시내용의 생체접합체는 콜라겐에 결합하고, 또한 내인성 또는 외인성 성장 인자, 예컨대 팔리페르민에 결합한다. 따라서, 이러한 제제는 팔리페르민의 표적화된 전달을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 팔리페르민을 전달하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 방법은 생체접합체 및 팔리페르민을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 적용하는 것을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 생체접합체 및 팔리페르민을 포함하는 조성물을 구강 점막염의 치료를 필요로 하는 환자에게 적용하는 것을 포함하는, 구강 점막염의 치료를 필요로 하는 환자에서 구강 점막염을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0197] 손상된 위-식도 조직의 회복을 촉진하기 위해 펩티드 아이덴티티, 글리칸에 부착된 펩티드의 수, 및 GAG 백본 아이덴티티와 관련하여 용액으로 제공되는 생체접합체를 조정할 수 있는 것으로 고려된다. 따라서, 수많은 분자 설계 파라미터를 조작하여 목표 효과를 최적화할 수 있다.
- [0198] 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 황산화된 히알루론산 및 펩티드에 의한 약 15 내지 약 30% 관능화를 포함하며, 여기서 펩티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGS (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYKSILYGSGSRR (서열식별번호: ), CPGRVMHGLHLGDEGPC (서열식별번호: ), CVWLWEQC (서열식별번호: ), 또는 WREPSFCALS (서열식별번호: ), 또는 각각 그로부터 1, 2, 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 중 적어도 1개의 서열을 포함한다.
- [0199] h. 상처 치유
- [0200] 본원에 기재된 방법 및 조성물을 사용하여, 조직의 완전성이 손상된 임의의 상태, 예컨대 만성 상처 및 급성 상처, 결합 조직에서의 상처, 및 균육, 골 및 신경 조직에서의 상처를 치료할 수 있다. 본원에 사용된 "상처"는 외과적 절개, 화상, 산 및 알칼리 화상, 저온 화상 (동상), 일광 화상, 궤양, 육창, 자상, 찰과상, 열상, 신체적 외상에 의해 초래된 상처, 선천성 장애에 의해 초래된 상처, 치주 질환에 의해 또는 치과 수술후 초래된 상처, 및 암성 조직 또는 종양과 연관된 상처를 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이, 상처는 급성 또는 만성 상처를 포함할 수 있다.
- [0201] 급성 상처는 무손상 피부에 대한 외부 손상에 의해 유발되고, 외과적 상처, 물린 상처, 화상, 자상, 열상, 찰과상 등을 포함한다. 만성 상처는 예를 들어 피부 또는 상피 조직의 완전성을 손상시키는 내인성 메카니즘에 의

해 유발된 상처, 예를 들어 하지 궤양, 족부 궤양 및 욕창을 포함한다. 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 상처 치유를 촉진하거나 또는 반흔 형성을 감소시키는 조성물을 임의의 시점에 사용하여 만성 또는 급성 상처를 치료할 수 있다. 예를 들어, 외과적 절개와 연관된 급성 상처를 수술 전에, 수술 동안에, 또는 수술 후에 치료하여, 환자에서 상처 치유를 촉진하고/거나 반흔 형성을 감소시킬 수 있다. 다양한 예시적 측면에서, 상처 치유를 촉진하고/거나 반흔 형성을 감소시키기 위해 필요에 따라 본원에 기재된 바와 같은 조성물을 환자에게 1회 용량 또는 다중 용량으로 투여할 수 있다.

- [0202] 본원에 사용된 "반흔 형성의 감소"는 반흔의 극한 인장 강도의 증가 및/또는 가시적인 반흔 길이의 감소를 포함한다. 본원에 사용된 반흔 형성의 감소는 또한 환자에서 반흔 형성의 완전한 억제 또는 가시적인 반흔의 완전한 제거를 포함한다.
- [0203] 본원에 사용된 "상처 치유의 촉진"은 만성 또는 급성 상처의 부분적 또는 완전한 치유를 일으키거나 또는 급성 또는 만성 상처에 의해 초래된 임의의 증상을 감소시키는 것을 의미한다. 이러한 증상은 통증, 출혈, 조직괴사, 조직 궤양화, 반흔 형성, 및 급성 또는 만성 상처으로 인한 것으로 공지된 임의의 다른 증상을 포함한다.
- [0204] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 상처 치유를 촉진하는 방법이 제공된다. 방법은 콜라겐-결합 합성 생체접합체를 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 환자에서 상처의 치유를 촉진한다. 본원에 기재된 임의의 다양한 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 콜라겐 원섬유발생을 정상적으로 조절하는 생체접합체의 아미노산 서열의 부분에 대해 아미노산 상동성을 갖는 이상 콜라겐-결합 합성 생체접합체 또는 원섬유발생 콜라겐-결합 합성 생체접합체일 수 있다.
- [0205] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 반흔 형성을 감소시키는 방법이 제공된다. 방법은 콜라겐-결합 합성 생체접합체를 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 환자에서 반흔 형성을 감소시킨다. 본원에 기재된 임의의 다양한 실시양태에서, 콜라겐-결합 합성 생체접합체는 콜라겐 원섬유발생을 정상적으로 조절하는 생체접합체의 아미노산 서열의 부분에 대해 아미노산 상동성을 갖는 이상 콜라겐-결합 합성 생체접합체 또는 원섬유발생 콜라겐-결합 합성 생체접합체일 수 있다.
- [0206] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 상처 치유의 촉진 및/또는 반흔 형성의 감소를 위한 조성물을 상처에의 조성물의 전달에 적합한 임의의 물질, 예컨대 목화, 종이, 부직물, 직조 직물, 및 편성 직물, 모노필라멘트, 필름, 겔, 스폰지 등에 함침시킬 수 있다. 예를 들어, 외과용 봉합사 (모노필라멘트, 꼬인 실 또는 편성사), 흡수제 패드, 경피 패치, 붕대, 화상 드레싱, 및 목화, 종이, 부직물, 직조 직물, 편성 직물, 필름 및 스폰지 형태의 패킹이 사용될 수 있다.
- [0207] 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 황산화된 히알루론산 및 웨პ티드에 의한 약 15 내지 약 30% 관능화를 포함하며, 여기서 웨პ티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGS (서열식별번호: ), GQLYKSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYKSILYGS (서열식별번호: ), CPGRVMHGLHLDGEGPC (서열식별번호: ), CVWLWEQC (서열식별번호: ), 또는 WREPSFCALS (서열식별번호: ), 또는 각각 그로부터 1, 2, 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 중 적어도 1개의 서열을 포함한다.
- [0208] i. 각막 상처
- [0209] 본 발명의 방법은 각막 상처 치유와 관련된 다양한 적용에 유용하다. 한 실시양태에서, 치료를 필요로 하는 각막 상처 상태는 각막에 대한 외상성 손상의 결과이다 (Chiapella, A. P., Rosenthal, A. R. British Journal of Ophthalmology, 1985; 69: 865-870). 또 다른 실시양태에서, 치료를 필요로 하는 상처 상태는 안과적 시술에 의해 초래되고, 예컨대 에피-라식(Epi-Lasik)은 각막 손상을 유도한다 (Tuft, S.J., et al. Br J Ophthalmol. 1993; 77: 243-247). 일부 경우에, 지속적인 결함 또는 재발성 손상은 치유의 부족 또는 불완전한 치유로 인해 발생할 수 있다 (Kenyon, K. R. Cornea and Refractive Atlas of Clinical Wisdom. Eds. S.A. Melki and M. A. Fava. SLACK, Inc.: New Jersey, US, 2011; pp. 39). 본 발명의 방법은 이들 지속적인 결함 또는 재발성 손상을 치료하는데 유용할 것으로 고려된다.
- [0210] 한 측면에서, 각막 상피에 대한 손상은 각막 장벽 기능을 파괴시키고, 본원에 기재된 방법은 상기 손상을 치료하는데 유용할 것으로 고려된다.
- [0211] 본원에 제공된 생체접합체를 사용하여, 각막 상처 치유에 관련된 특정 세포외 매트릭스 성분을 표적화하는 생체접합체를 각막 상처 치유를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써, 각막 상처 치유를 필요로 하는 환자에서 각막 상처 치유를 촉진할 수 있다. 각막 상처 치유를 촉진하기 위해 웨პ티드 아이덴티티, 글리칸에 부착된 웨პ티드의

수, 및 글리칸 아이덴티티와 관련하여 본원에 제공된 생체접합체를 조정할 수 있는 것으로 고려된다. 따라서, 수많은 분자 설계 파라미터를 조작하여 목표 효과를 최적화할 수 있다.

[0212] 황산화된 히알루론산, 및 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호: ), RRANAALKAGELYKSILYGS (서열식별번호: ), GQLYSILY (서열식별번호: ), 또는 GQLYSILYGS (서열식별번호: ), CPGRVMHGLHLGDDEGPC (서열식별번호: ), CVWLWEQC (서열식별번호: ), 또는 WREPSFCALS (서열식별번호: ), 또는 각각 그로부터 1, 2, 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 중 적어도 1개의 서열을 포함하는 웨티드에 의한 약 15 내지 약 30% 관능화를 포함하는 생체접합체에 의한 치료는 손상 영역에 결합하고/거나, 통증을 최소화하기 위해 보호성 수화 층을 제공하고/거나, 각막 콜라겐을 분해로부터 보호하고/거나, 상피 이동 및/또는 상피 증식을 촉진함으로써 각막 상처 치유를 증진시킬 것으로 고려된다. 또한, 하루에 다수회의 치료가 필요하지 않도록 생체접합체는 손상된 영역에서 지속될 것으로 고려된다.

## 5. 조성물

[0214] 한 실시양태에서, 생체접합체는 조성물로 투여된다. 본 개시내용은 생체접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 물 또는 염수를 포함한, 사용될 수 있는 제약상 허용되는 담체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 성분뿐만 아니라 그의 상대량은 의도되는 용도 및 전달 방법에 의해 결정된다. 조성물에 사용되는 희석제 또는 담체는 이들이 생체접합체의 목적하는 효과를 감소시키지 않도록 선택될 수 있다. 적합한 조성물의 예는 수용액, 예를 들어 등장성 염수, 5% 글루코스 중 용액을 포함한다. 다른 널리 공지된 제약상 허용되는 액체 담체, 예컨대 알콜, 글리콜, 에스테르 및 아미드가 이용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 부형제, 예컨대 비제한적으로 이온 강도 조정제, 용해도 증진제, 당, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨, pH 완충제, 계면활성제, 안정화 중합체, 보존제 및/또는 공-용매를 추가로 포함한다.

[0215] 특정 실시양태에서, 조성물은 수용액이다. 수용액은 제제화의 용이성뿐만 아니라, 용액 점적주입 수단에 의한 이러한 조성물의 투여 용이성에 기초하여 조성물 제제에 사용하기에 적합하다. 특정 실시양태에서, 조성물은 혼탁액, 점성 또는 반점성 젤, 또는 다른 유형의 고체 또는 반고체 조성물이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 관련 기술분야에 매우 널리 공지된 밸포체, 연고, 액체 세정제, 젤, 스프레이 및 리포솜 형태이다. 대안적으로, 국소 투여는 제공된 생체접합체를 펌프-카테터 시스템, 지속적 또는 선택적 방출 기기, 또는 부착 장벽으로부터 선택된 기기를 통해 치료 부위에 주입하는 것이다. 특정 실시양태에서, 조성물은 정맥 또는 동맥의 내벽에 직접 적용되거나 그와 접촉하는 용액이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 중합체 매트릭스를 포함한다. 다른 실시양태에서, 조성물은 흡수성이다. 특정 실시양태에서, 조성물은 pH 완충제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 윤활성 증진제를 함유한다.

[0216] 특정 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 중합체 물질은 조성물을 위한 제약상 허용되는 담체 또는 지지체로서 사용된다. 본원에 기재된 중합체 물질은 천연 또는 비천연 중합체, 예를 들어 예컨대 당, 웨티드, 단백질, 라미닌, 콜라겐, 히알루론산, 이온성 및 비이온성 수용성 중합체; 아크릴산 중합체; 친수성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 옥시드, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체, 및 폴리비닐알콜; 셀룰로스 중합체 및 셀룰로스 중합체 유도체, 예컨대 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 프탈레이트, 메틸 셀룰로스, 카르복시메틸 셀룰로스, 및 에테르화 셀룰로스; 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 락트산과 글리콜산의 공중합체, 또는 천연 및 합성 둘 다의 다른 중합체 작용체를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물은 필름, 젤, 밸포체 또는 및 다른 투여 형태로 제제화된다.

[0217] 적합한 이온 강도 조정제는 예를 들어 글리세린, 프로필렌 글리콜, 만니톨, 글루코스, 텍스트로스, 소르비톨, 염화나트륨, 염화칼륨, 및 다른 전해질을 포함한다.

[0218] 특정 실시양태에서, 생체접합체의 용해도를 증진시키는 것이 필요할 수 있다. 이러한 경우에, 적절한 제제화 기술, 예컨대 용해도-증진 조성물, 예컨대 만니톨, 에탄올, 글리세린, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 폴록사미, 및 관련 기술분야에 공지된 다른 것의 혼입을 이용하여 용해도를 증가시킬 수 있다.

[0219] 특정 실시양태에서, 조성물은 윤활성 증진제를 함유한다. 본원에 사용된 윤활성 증진제는 제약상 허용되는 담체의 점도를 변형시킬 수 있는 1종 이상의 제약상 허용되는 중합체 물질을 지칭한다. 적합한 중합체 물질은 이온성 및 비이온성 수용성 중합체; 히알루론산 및 그의 염, 콘드로이틴 술레이트 및 그의 염, 텍스트란, 젤라틴, 키토산, 젤란, 다른 생체접합체 또는 폴리사카라이드, 또는 그의 임의의 조합; 셀룰로스 중합체 및 셀룰로스 중

합체 유도체, 예컨대 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 프탈레이트, 메틸 셀룰로스, 카르복시메틸 셀룰로스, 및 에테르화 셀룰로스; 콜라겐 및 변형된 콜라겐; 갈락토만난, 예컨대 구아 검, 로커스트 빙 검 및 타라 검, 뿐만 아니라 주요 구조적 성분으로서 만노스 및/또는 갈락토스 모이어티를 함유하는 상기 천연 검 및 유사한 천연 및 합성 검으로부터 유래된 폴리사카라이드 (예를 들어, 히드록시프로필 구아); 검, 예컨대 트라가칸트 및 크산탄 검; 젤란 검; 알기네이트 및 알긴산나트륨; 키토산; 비닐 중합체; 친수성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 옥시드, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체, 및 폴리비닐알콜; 카르복시비닐 중합체 또는 가교된 아크릴산 중합체 예컨대 중합체의 "카르보머" 패밀리, 예를 들어 카르보폴(Carbopol)<sup>TM</sup> 상표 하에 상업적으로 입수 가능한 카르복시폴리알킬렌; 및 다양한 다른 점성 또는 점탄성 물질을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 윤활성 증진제는 히알루론산, 더마탄, 콘드로이틴, 혼파린, 혼파란, 캐라틴, 텍스트란, 키토산, 알기네이트, 아가로스, 젤라틴, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 프탈레이트, 메틸 셀룰로스, 카르복시메틸 셀룰로스, 및 에테르화 셀룰로스, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐피롤리디논, 포비돈, 카르보머 941, 카르보머 940, 카르보머 971P, 카르보머 974P, 또는 그의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 윤활성 증진제는 생체접합체와 공동으로 적용된다. 대안적으로, 한 실시양태에서, 윤활성 증진제는 생체접합체와 순차적으로 적용된다. 한 실시양태에서, 윤활성 증진제는 콘드로이틴 슬레이트이다. 한 실시양태에서, 윤활성 증진제는 히알루론산이다. 윤활성 증진제는 조성물의 점도를 변화시킬 수 있다.

[0220]

일부 실시양태에서, 생체접합체는 미네랄, 아미노산, 당, 펩티드, 단백질, 비타민 (예컨대 아스코르브산), 또는 라미닌, 콜라겐, 피브로넥틴, 히알루론산, 피브린, 엘라스틴, 또는 성장 인자 예컨대 표피 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자, 형질전환 성장 인자 베타, 또는 섬유모세포 성장 인자, 및 글루코코르티코이드 예컨대 텍사메타손 또는 점탄성 변경제, 예컨대 이온성 및 비이온성 수용성 중합체; 아크릴산 중합체; 친수성 중합체 예컨대 폴리에틸렌 옥시드, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체, 및 폴리비닐알콜; 셀룰로스 중합체 및 셀룰로스 중합체 유도체 예컨대 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 프탈레이트, 메틸 셀룰로스, 카르복시메틸 셀룰로스, 및 에테르화 셀룰로스; 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 락트산과 글리콜산의 공중합체, 또는 천연 및 합성 둘 다의 다른 중합체 작용제와 조합될 수 있다.

[0221]

본원의 조성물에 사용하기에 적합한 pH 완충제는 예를 들어 아세테이트, 보레이트, 카르보네이트, 시트레이트 및 포스페이트 완충제, 뿐만 아니라 염산, 수산화나트륨, 산화마그네슘, 인산일칼륨, 비카르보네이트, 암모니아, 탄산, 염산, 시트르산나트륨, 시트르산, 아세트산, 인산수소이나트륨, 보락스, 봉산, 수산화나트륨, 디에틸 바르비투르산, 및 단백질, 뿐만 아니라 다양한 생물학적 완충제, 예를 들어, TAPS, 비신, 트리스, 트리신, HEPES, TES, MOPS, PIPES, 카코딜레이트 또는 MES를 포함한다. 특정 실시양태에서, 적절한 완충제 시스템 (예를 들어, 인산나트륨, 아세트산나트륨, 시트르산나트륨, 봉산나트륨 또는 봉산)은 저장 조건 하에 pH 변동을 방지하기 위해 조성물에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 완충제는 포스페이트 완충 염수 (PBS) 용액 (즉, 인산나트륨, 염화나트륨을 함유하고, 일부 제제에서는, 염화칼륨 및 인산칼륨을 함유함)이다. 특정한 농도는 사용되는 작용제에 따라 달라질 것이다. 특정 실시양태에서, pH 완충제 시스템 (예를 들어, 인산나트륨, 아세트산나트륨, 시트르산나트륨, 봉산나트륨 또는 봉산)은 pH를 약 pH 4 내지 약 pH 8, 또는 약 pH 5 내지 약 pH 8, 또는 약 pH 6 내지 약 pH 8, 또는 약 pH 7 내지 약 pH 8의 범위 내에 유지시키기 위해 첨가된다. 일부 실시양태에서, 완충제는 pH를 약 pH 4 내지 약 pH 8의 범위 내에 유지시키기 위해 선택된다. 일부 실시양태에서, pH는 약 pH 5 내지 약 pH 8이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 염수 완충제이다. 특정 실시양태에서, pH는 약 pH 4 내지 약 pH 8, 또는 약 pH 3 내지 약 pH 8, 또는 약 pH 4 내지 약 pH 7이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 중합체 매트릭스, pH 완충제, 윤활성 증진제 및 생체접합체를 포함하는 필름, 젤, 패치 또는 액체 용액의 형태이고, 여기서 조성물은 임의로 보존제를 함유하고; 여기서 상기 조성물의 pH는 약 pH 4 내지 약 pH 8 범위내이다.

[0222]

보다 높은 농도의 생체접합체를 전달하기 위해 계면활성제가 조성물에 사용된다. 계면활성제는 억제제를 가용화시키고, 콜로이드 분산액, 예컨대 미셀 용액, 마이크로에멀젼, 에멀젼 및 혼탁액을 안정화시키는 기능을 한다. 적합한 계면활성제는 폴리소르베이트, 폴록사며, 폴리오실 40 스테아레이트, 폴리옥실 피마자 오일, 텔록사풀, 트리톤, 및 소르비탄 모노라우레이트를 포함한다. 한 실시양태에서, 계면활성제는 12.4 내지 13.2 범위의 친수성/친유성/평형 (HLB)을 갖고, 트리톤X114 및 텔록사풀과 같은 것은 안과적 용도로 허용된다.

[0223]

특정 실시양태에서, 안정화 중합체, 즉, 완화제가 조성물에 첨가된다. 안정화 중합체는 이온성/하전된 예, 보

다 구체적으로 물리적 안정성을 위해 (-)10~50 mV의 제타-전위를 나타낼 수 있도록 그의 표면 상에 음전하를 보유하는 중합체이어야 하고, 물에서 분산액을 형성할 수 있어야 한다 (즉, 수용성). 한 실시양태에서, 안정화 중합체는 가교된 폴리아크릴레이트의 패밀리, 예컨대 카르보머 및 페뮬렌(Pemulen)®, 구체적으로 카르보머 974p (폴리아크릴산)로부터의 다가전해질 또는 다가전해질들 (1종 초파인 경우)을 약 0.1% 내지 약 0.5% w/w 범위로 포함한다.

[0224] 한 실시양태에서, 조성물은 혈관의 세포외 매트릭스에 대해 생체접합체의 투과성을 증가시키는 작용제를 포함한다. 바람직하게는 투과성을 증가시키는 작용제는 벤즈알코늄 클로라이드, 사포닌, 지방산, 폴리옥시에틸렌 지방 에테르, 지방산의 알킬 에스테르, 피롤리돈, 폴리비닐피롤리돈, 피루브산, 피로글루탐산 또는 그의 혼합물로부터 선택된다.

[0225] 생체접합체는 내독소 및 감염원을 포함하나 이에 제한되지는 않는 원치않는 오염물을 제거하기 위해 멸균될 수 있다. 생체접합체의 구조 및 생물향성 특성에 불리한 영향을 미치지 않는 멸균 기술이 이용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 프로필렌 옥시드 또는 에틸렌 옥시드 처리, 멸균 여과, 기체 플라즈마 멸균, 감마 방사선, 전자 빔 및/또는 과산, 예컨대 과아세트산에 의한 멸균을 포함한 통상적인 멸균 기술을 이용하여 소독 및/또는 멸균될 수 있다. 한 실시양태에서, 생체접합체는 1종 이상의 멸균 공정에 적용될 수 있다. 대안적으로, 생체접합체는 플라스틱 랩 또는 호일 랩을 포함한 임의의 유형의 용기 내에 랩핑될 수 있고, 추가로 멸균될 수 있다.

[0226] 일부 실시양태에서, 사용하는 동안 미생물 오염을 방지하기 위해 보존제가 조성물에 첨가된다. 조성물에 첨가되는 적합한 보존제는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조산, 알킬 파라벤, 알킬 벤조에이트, 클로로부탄올, 클로로크레졸, 세틸 알콜, 지방 알콜 예컨대 헥사데실 알콜, 수은의 유기금속 화합물 예컨대 아세테이트, 페닐수은 니트레이트 또는 보레이트, 디아졸리디닐 우레아, 디이소프로필 아디페이트, 디메틸 폴리실록산, EDTA의 염, 비타민 E 및 그의 혼합물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 보존제는 벤즈알코늄 클로라이드, 클로로부탄올, 벤조도데시늄 브로마이드, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 페닐에틸 알콜, 에텐테이트 이나트륨, 소르브산, 또는 폴리쿼터늄-1로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 보존제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 보존제는 약 0.001% 내지 약 1.0% w/v의 수준으로 사용된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 보존제를 함유하지 않고, 이는 "비보존된 것"으로 지칭된다. 일부 실시양태에서, 단위 용량 조성물은 멸균되었지만, 비보존된 것이다.

[0227] 일부 실시양태에서, 조성물의 전달을 용이하게 하기 위해 생체접합체 및 다른 작용제의 개별 또는 순차적 투여가 필요하다. 특정 실시양태에서, 생체접합체 및 다른 작용제는 상이한 투여 빈도 또는 간격으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 생체접합체는 매일 투여될 수 있는 반면에, 다른 작용제는 덜 빈번하게 투여될 수 있다. 추가적으로, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 생체접합체 및 다른 작용제는 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로를 이용하여 투여될 수 있다.

[0228] 생체접합체를 투여하기 위해 임의의 효과적인 요법이 이용될 수 있다. 예를 들어, 생체접합체는 단일 용량 또는 다중 용량 매일 요법으로 투여될 수 있다. 추가로, 매일 치료의 대안으로서 시차를 둔 요법, 예를 들어 1주에 1 내지 5일이 이용될 수 있다.

[0229] 다양한 실시양태에서, 생체접합체는 국소로, 예컨대 필름, 젤, 패치 또는 액체 용액에 의해 투여될 수 있다. 실시양태 중 일부에서, 조성물은 완충된 멸균 수용액 중에 제공된다. 특정 실시양태에서, 용액은 약 1 내지 약 100 센티포아즈 (cps), 또는 약 1 내지 약 200 cps, 또는 약 1 내지 약 300 cps, 또는 약 1 내지 약 400 cps의 점도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 용액은 약 1 내지 약 100 cps의 점도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 용액은 약 1 내지 약 200 cps의 점도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 용액은 약 1 내지 약 300 cps의 점도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 용액은 약 1 내지 약 400 cps의 점도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 용액은 주사 가능한 액체 용액의 형태이다. 다른 실시양태에서, 조성물은 점성, 즉, 수백 내지 수천 cps의 점도의 액체, 젤 또는 연고로서 제제화된다. 이들 실시양태에서, 생체접합체는 적절한 제약상 허용되는 담체 중에 분산 또는 용해된다.

[0230] 카테터-기반 전달을 위해 생체접합체와 함께 사용하기 위한 예시적인 조성물은 a) 본원에 기재된 바와 같은 합성 생체접합체; b) 제약상 허용되는 담체; c) 중합체 매트릭스; d) 약 pH 4 내지 약 pH 8 범위의 pH를 제공하는 pH 완충제; 및 e) 약 0.25% 내지 약 10% 총 화학식량의 농도 범위의 수용성 윤활성 증진제, 또는 임의의 개별 성분 a), b), c), d) 또는 e), 또는 a), b), c), d) 또는 e)의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0231] 예시적인 제제는 a) 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체; b) 제약상 허용되는 담체; c) 중합체 매트릭스; 및

d) 약 pH 4 내지 약 pH 8 범위의 pH를 제공하는 pH 완충제를 포함할 수 있고, 여기서 상기 용액은 액체 용액의 경우 약 3 내지 약 30 cps의 점도를 갖는다.

[0232] 주사에 의한 투여를 위해 본 개시내용에 의해 또한 고려될 수 있는 예시적인 조성물은 참깨 오일, 옥수수 오일, 목화씨 오일, 또는 땅콩 오일, 뿐만 아니라 엘릭시르, 만니톨, 텍스트로스, 또는 멸균 수용액, 및 유사한 제약 비히클을 함유하는 수성 또는 오일 혼탁액 또는 에멀젼을 포함한다. 염수 중의 수용액 또한 주사를 위해 통상적으로 사용되지만, 본 개시내용의 문맥에서는 덜 바람직하다. 에탄올, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등 (및 그의 적합한 혼합물), 시클로덱스트린 유도체, 및 식물성 오일이 또한 사용될 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 폐놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 이루어질 수 있다.

[0233] 멸균 주사가능한 용액은 적절한 용매 중에 필요한 양의 성분을 필요에 따라 상기 열거한 다양한 다른 성분과 함께 혼입한 다음, 여과 멸균함으로써 제조된다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멸균 활성 성분을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 이전에 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분 플러스 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 수득하는 진공-건조 및 동결-건조 기술이다.

[0234] 본원에 기재된 생체접합체를 포함하는 제약 조성물의 제조 시, 활성 성분은 통상적으로 부형제 또는 담체에 의해 희석되고/거나 캡슐, 사쉐, 종이 또는 다른 용기의 형태일 수 있는 담체 내에 동봉한다. 부형제가 희석제로 작용하는 경우, 이는 활성 성분을 위한 비히클, 담체 또는 매질로 작용하는 고체, 반고체 또는 액체 물질 (상기와 같음)일 수 있다. 따라서, 조성물은 필름, 젤, 폐치, 분말, 로젠지, 사쉐, 카쉐, 엘릭시르, 혼탁액, 에멀젼, 용액, 시럽, 에어로졸 (고체로서 또는 액체 매질 중), 예를 들어 활성 화합물을 최대 10 중량% 함유하는 연고, 연질 및 경질 젤라틴 필름, 젤, 폐치, 멸균 주사가능한 용액, 및 멸균 포장 분말의 형태일 수 있다.

[0235] 적합한 부형제의 일부 예는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 검, 인산칼슘, 알기네이트, 트라가칸트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정질 셀룰로스, 폴리비닐파리돈, 셀룰로스, 멸균수, 시럽, 및 메틸 셀룰로스를 포함한다. 제제는 추가적으로 윤활제 예컨대 활석, 스테아르산마그네슘, 및 미네랄 오일; 습윤제; 유화제 및 혼탁화제; 보존제 예컨대 메틸- 및 프로필히드록시-벤조에이트; 감미제; 및 향미제를 포함한다.

[0236] 약물 전달을 위해 사용되는 필름은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 침출성 불순물이 없는 비-독성 비-자극 중합체, 예컨대 폴리사카라이드 (예를 들어, 셀룰로스, 말토덱스트린 등)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 친수성이다. 다른 실시양태에서, 중합체는 소수성이다. 필름은 그것이 적용되는 조직에 부착되고, 약 1주의 기간에 걸쳐 신체에 천천히 흡수된다. 본원에 기재된 박막 투여 형태에 사용되는 중합체는 흡수성이고, 관련 기술분야에 널리 공지된 바와 같이 충분한 박리, 전단 및 인장 강도를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 필름은 주사가능하다. 특정 실시양태에서, 필름은 외과적 개입 전에, 그 동안에 또는 그 후에 환자에게 투여된다.

[0237] 본원에 사용되는 젤은 연질 및 약성 내지 경질 및 강성 범위의 특성을 가질 수 있는 고체, 젤리-유사 물질을 지칭한다. 관련 기술분야에 널리 공지된 바와 같이, 젤은 유체에 의해 그의 전체 부피에 걸쳐 팽창되는 비-유체 콜로이드성 네트워크 또는 중합체 네트워크이다. 허드로겔은 친수성인 중합체 쇄의 네트워크를 포함하는 젤의 유형이며, 때때로 물이 분산 매질인 콜로이드성 젤로서 발견된다. 허드로겔은 고도로 흡수성이고, 고도의 물, 예컨대 예를 들어 90% 초과의 물을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 젤은 친연 또는 합성 중합체 네트워크를 포함한다. 일부 실시양태에서, 젤은 친수성 중합체 매트릭스를 포함한다. 다른 실시양태에서, 젤은 소수성 중합체 매트릭스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 젤은 친연 조직과 매우 유사한 정도의 가요성을 보유한다. 특정 실시양태에서, 젤은 생체적합성이고 흡수성이다. 특정 실시양태에서, 젤은 외과적 개입 전에, 그 동안에 또는 그 후에 환자에게 투여된다.

[0238] 본원에 사용되는 바와 같은 액체 용액은 관련 기술분야에 널리 공지된 용액, 혼탁액, 에멀젼, 점적제, 연고, 액체 세정제, 스프레이, 리포솜을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 액체 용액은 소량의 산 또는 염기의 첨가시 pH 변화에 저항하는 수성 pH 완충제를 함유한다. 특정 실시양태에서, 액체 용액은 외과적 개입 전에, 그 동안에 또는 그 후에 환자에게 투여된다.

[0239] 예시적인 제제는 a) 본원에 기재된 바와 같은 1종 이상의 생체접합체; b) 제약상 허용되는 담체; 및 c) 매트릭

스 네트워크로서 친수성 중합체를 포함할 수 있고, 여기서 상기 조성물은 점성, 즉, 수백 내지 수천 cps의 점도의 액체, 젤 또는 연고로서 제제화된다. 이들 실시양태에서, 생체접합체는 적절한 제약상 허용되는 담체 중에 분산 또는 용해된다.

[0240] 특정 실시양태에서, 생체접합체 또는 그를 포함하는 조성물은 제제화 전에, 그 동안에, 또는 그 후에 동결건조된다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체 또는 그를 포함하는 조성물을 포함하는 동결건조된 조성물이 또한 본원에 제공된다.

#### 6. 투약

[0242] 생체접합체의 적합한 투여량은 표준 방법에 의해, 예를 들어 실험 동물 모델에서 또는 임상 실험에서 용량-반응 곡선을 수립함으로써 결정될 수 있고, 환자 상태, 치료할 질환 상태, 투여 경로 및 조직 분포, 및 다른 치료적 치료의 공동-사용 가능성에 따라 유의하게 달라질 수 있다. 환자에게 투여되는 유효량은 체표면적, 환자 체중 또는 질량, 및 환자 상태의 의사 판단에 기초한다. 다양한 예시적 실시양태에서, 용량은 약 0.01  $\mu\text{g}$  내지 약 10 g의 범위이다. 예를 들어, 전신 전달의 경우, 용량은 약 10 g, 또는 약 5 g, 또는 약 1 g일 수 있다. 다른 예시적 실시양태에서, 유효 용량은 용량당 약 100  $\mu\text{g}$  내지 약 10 g, 또는 용량당 약 100  $\mu\text{g}$  내지 약 1 g, 또는 용량당 약 100  $\mu\text{g}$  내지 약 500 mg, 용량당 약 0.01  $\mu\text{g}$  내지 약 100 mg, 또는 용량당 약 100  $\mu\text{g}$  내지 약 50 mg, 또는 용량당 약 500  $\mu\text{g}$  내지 약 10 mg, 또는 용량당 약 1 mg 내지 10 mg, 또는 용량당 약 1 mg 내지 약 100 mg, 또는 용량당 약 1 mg 내지 500 mg, 또는 용량당 약 1 mg 내지 200 mg, 또는 용량당 약 10 mg 내지 100 mg, 또는 용량당 약 10 mg 내지 75 mg, 또는 용량당 약 10 mg 내지 50 mg, 또는 용량당 약 10 mg, 또는 용량당 약 20 mg, 또는 용량당 약 30 mg, 또는 용량당 약 40 mg, 또는 용량당 약 50 mg, 또는 용량당 약 60 mg, 또는 용량당 약 70 mg, 또는 용량당 약 80 mg, 또는 용량당 약 90 mg, 또는 용량당 약 100 mg 범위이다. 본원에 기재된 다양한 실시양태 중 임의의 것에서, 유효 용량은 용량당 약 0.01  $\mu\text{g}$  내지 약 1000 mg, 용량당 1  $\mu\text{g}$  내지 약 100 mg, 약 100  $\mu\text{g}$  내지 약 1.0 mg, 약 50  $\mu\text{g}$  내지 약 600  $\mu\text{g}$ , 약 50  $\mu\text{g}$  내지 약 700  $\mu\text{g}$ , 약 100  $\mu\text{g}$  내지 약 200  $\mu\text{g}$ , 약 100  $\mu\text{g}$  내지 약 600  $\mu\text{g}$ , 약 100  $\mu\text{g}$  내지 약 500  $\mu\text{g}$ , 약 200  $\mu\text{g}$  내지 약 600  $\mu\text{g}$ , 또는 용량당 약 100  $\mu\text{g}$  내지 약 50 mg, 또는 용량당 약 500  $\mu\text{g}$  내지 약 10 mg 또는 용량당 약 1 mg 내지 약 10 mg 범위이다.

[0243] 일부 실시양태에서, 조성물은 다중용량 형태로 포장된다. 따라서, 사용하는 동안 미생물 오염을 방지하기 위해 보존제가 필요하다. 특정 실시양태에서, 상기 기재된 바와 같은 적합한 보존제가 조성물에 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 보존제를 함유한다. 특정 실시양태에서, 보존제는 약 0.001% 내지 약 1.0% w/v의 수준으로 사용된다. 일부 실시양태에서, 단위 용량 조성물은 멸균되었지만, 비보존된 것이다.

#### 실시예

##### 실시예 1: 황산화된 히알루론산 (sHA)의 제조 및 특징화

[0246] 히알루론산 (HA)의 나트륨 염은 유기 용매에 가용성이 아니기 때문에, HA를 황산화하기 전에 그의 테트라부틸암모늄 염을 제조할 필요가 있다. 3.74 g (9.31 mmol)의 HA (나트륨 염)를 400 mL의 증류수에 용해시켰다. 다음 엑스-50WX8 비드 (75.74 g)를 1.4 L의 증류수로 3회 세척하였다. 이어서, 산성 다우엑스 비드를 HA 용액에 첨가하고, 실온에서 30분 동안 교반하였다. 용액을 여과하여 수지를 제거하고, 테트라부틸암모늄 히드록시드 ( $\text{H}_2\text{O}$  중 1 M)로 pH = 6.5까지 처리하였다.

[0247] 테트라부틸암모늄 HA 염 (HA-TBA)을 동결건조시키고, 백색 고체 (5.76 g, 99% 수율)로서 수득하였다.

[0248] 황산화된 HA의 제조:<sup>1</sup> 질소 하의 건조 3구 플라스크에서, HA-TBA (5.7622 g, 9.28 mmol, 323kDa HA)를 무수 DMF (1050 mL) 중에 용해시키고, 밤새 용해되게 하였다. 질소 하의 또 다른 건조 3구 플라스크에서,  $\text{SO}_3$ -피리딘 복합체 (38.890 g, 244.3 mmol, 1:26.3 비 HA-TBA: $\text{SO}_3$ )를 무수 DMF (432 mL) 중에 용해시키고, HA-TBA 용액에 첨가하였다. 반응물을 실온에서 20분 동안 교반하였다. 20분 후, 냉수 (500 mL)를 신속하게 첨가하고, 반응 혼합물을 비커로 옮겼다. 아세트산나트륨으로 포화된 차가운 에탄올 (2L)을 첨가한 후 침전물이 관찰되었다. 여과한 후, 침전물을 물 (1 L) 중에 용해시킨 후, TFF에 의해 5 CV의 0.5 M NaCl에 이어서 8 CV의 물로 정제하였다. 이어서, 생성물을 3일 동안 동결건조시키고, 베이지색 고체를 회수하였다 (3.21 g, 58% 수율).

[0249] sHA의 특징화: 질소 및 황 함량의 원소 분석에 의해 황산화 정도를 수득하였다. 일단 수득되면, 하기 계산을 수행하여 황산화 정도 (DS)를 결정하였다:

$$DS = \frac{\% \text{ 황}}{\% \text{ 질소}} \times \frac{32.065}{14.0067}$$

[0250]

[0251] 샘플을 또한 D<sub>2</sub>O 중 <sup>1</sup>H NMR 분석에 의해 분석하여 테트라부틸암모늄 및/또는 피리디늄 착물로부터의 임의의 미량 불순물을 그의 독특한 피크에 의해 결정하였다.

[0252] 황산화 정도는 HA:SO<sub>3</sub>-피리딘의 몰비 뿐만 아니라 사용된 초기 HA의 분자량에 기초하여 계산하였고, 이는 디사카라이드 단위당 술레이트의 수로 제시된다. 하기 표는 이들 차이를 도시한다.

초기 MW HA	비 HA:SO <sub>3</sub> -피리딘	황산화 정도
20 kDa	1:13.2	1.5
	1:19.8	1.9
136 kDa	1:13.2	1.5
323 kDa	1:13.2	1.5
	1:26.3	2.4
738 kDa	1:13.2	1.3
	1:26.3	1.7

[0253]

[0254] <sup>1</sup> Biomacromolecules, 2009, 10, 3290-3297

[0255] 실시예 2: 화합물 합성

[0256] 반응 완충제 제조: 8.0 M 우레아, 0.6% NaCl을 함유하는 pH 5.5의 0.064 M MES (2-(N-모르폴리노)에탄올론산)를 반응 전 6시간 내에 제조하였다. 8 M 우레아는 하기와 같은 용질 부피 변화 계산을 필요로 한다는 것에 주목한다. 반응 완충제를 하기 식에 의해 제제화하였다:

[0257] • V<sub>0.1 M MES, 0.9% NaCl</sub> (mL) = V<sub>최종</sub> (mL) × 0.64

[0258] • 우레아 (g) = V<sub>0.1 M MES, 0.9% NaCl</sub> (mL) × 0.7443

[0259] • 여기서 V<sub>최종</sub> = 우레아 첨가 후 목표 최종 부피

[0260] 이어서, 반응 완충제를 0.2 μm 필터를 통해 여과시켰다. pH가 pH4.75 내임을 확인하였고, 필요한 경우 1M HCl 또는 0.5M NaOH로 조정하였다.

[0261] TFF 완충제 제조: 8.0 M 우레아, 0.6% NaCl을 함유하는 pH 7.0-7.8의 TFF 완충제 10 mM 인산나트륨을 정제 전 12시간 내에 제조하였다. 8 M 우레아는 하기와 같은 용질 부피 변화 계산을 필요로 한다는 것에 주목한다. 반응 완충제를 하기 식에 의해 제제화하였다:

[0262] • V<sub>15.6 mM 인산나트륨</sub> (mL) = V<sub>최종</sub> (mL) × 0.64

[0263] • V<sub>100 mM 일염기성 인산나트륨</sub> (mL) = V<sub>최종</sub> (mL) × 0.06

[0264] • V<sub>100 mM 일염기성 인산나트륨</sub> (mL) = V<sub>최종</sub> (mL) × 0.04

[0265] • V<sub>물</sub> (mL) = V<sub>15.6 mM 인산나트륨</sub> (mL) - (V<sub>100 mM 일염기성 인산나트륨</sub> (mL) + V<sub>100 mM 일염기성 인산나트륨</sub> (mL))

[0266] • 우레아 (g) = V<sub>15.6 mM 인산나트륨</sub> (mL) × 0.7443

[0267] 여기서 V<sub>최종</sub> = 우레아 첨가 후 목표 최종 부피. 이어서, 반응 완충제를 0.2 μm 필터를 통해 여과시켰다. pH 가 pH7-7.8 내임을 확인하였고, 필요한 경우 1M HCl 또는 0.5M NaOH로 조정하였다.

[0268] 반응 계산: 반응 몰비는 다음과 같다: GAG 디사카라이드당 EDC 2 몰, GAG 디사카라이드당 웹티드 0.12 몰, 및

GAG 20 kDa당 비오틴 및/또는 형광 태그 CF633 1 몰. 반응 비는 GAG:펩티드:EDC로 나타내어진다. 예를 들어 300 kDa 2.5 황산화 정도의 sHA의 반응은 1:55:916의 반응 몰비를 산출할 것이다.

[0269] 반응: 접합체 합성은 EDC 화학을 통해 백본 상의 카르복실 기의 활성화 (GAG 활성화)를 통해 히드라지드 관능화된 펩티드를 GAG 백본에 그라프팅하여 활성화된 카르복실 기가 펩티드의 N 말단의 히드라지드 단부와 반응하게 하는 것을 수반한다.

[0270] sHA를 반응 완충제 중에 20 mg/ml로, 히드라지드 관능화된 펩티드를 3 mg/ml로, 검출 태그 (비오틴 및/또는 CF633)를 각각 3 mg/ml로, 및 EDC를 75 mg/ml로 용해시켰다. GAG는 반응 4시간 전에 용해시킬 수 있다. 가용화된 EDC를 첨가하기 전에 펩티드를 GAG 및 태그와 혼합하였다.

[0271] EDC는 그것을 가용화된 GAG, 펩티드 및 태그를 함유하는 반응 혼합물에 첨가하기 직전에 용해되어야 한다. 반응 혼합물을 교반하거나 진탕시키면서 25°C에서 2시간 동안 반응이 진행되게 하였다. 이어서, 0.5 M NaOH를 사용하여 pH를 8로 상승시키고 30분 동안 진탕/교반함으로써 반응물을 켄칭하였다.

[0272] TFF 정제: 스펙트럼 랩스(Spectrum labs)로부터 구입한 스펙트럼 KR2i TFF 시스템을 사용하여 TFF 정제를 수행하였다. 스펙트럼 랩스로부터 구입한 30kD 분자량 컷오프를 갖는 변형된 폴리에테르술폰 (mPES) 필터 카트리지를 사용하였다. 필터 표면적은 배치 크기에 따라 달라질 것이다. TFF 완충제를 TFF 시스템에서 10분 동안 순환시켜 시스템을 평형화한 다음, TFF 라인을 새로운 완충제로 대체하였다. 이어서, 합성 반응 용기를 TFF 시스템에 연결하고, TFF를 100 mL/분을 사용하여 수행하였고, TMP를 18 psi로 조정하였다. 반응물을 6 정제 부피 (CV)의 TFF 완충제에 이어 16CV의 물 (여기서 CV는 반응 부피 플러스 TFF 체류 부피와 동등함)로 투석여과하였다.

[0273] 하기 생체접합체를 상기 요약된 절차를 통해, 표 (표 2)에 제시된 다양한 분자량의 황산화된 HA 백본 및 히드라지드 관능화된 펩티드를 사용하여 제조하였다.

[0274] 표 2

화합물	백본	펩티드
화합물 1 (약 8% 펩티드 관능화)	sHA, MW = 163	GQLYKSILYGSGSGSRRNHNH <sub>2</sub>
화합물 1B (약 8% 펩티드 관능화)	sHA, MW = 163	비오틴GQLYKSILYGSGSGSRRNHNH <sub>2</sub>
화합물 2 (약 8% 펩티드 관능화)	sHA, MW = 323	GQLYKSILYGSGSGSRRNHNH <sub>2</sub>
화합물 2B (약 8% 펩티드 관능화)	sHA, MW = 323	비오틴GQLYKSILYGSGSGSRRNHNH <sub>2</sub>
화합물 3 (약 8% 펩티드 관능화)	sHA, MW = 28	GQLYKSILYGSGSGSRRNHNH <sub>2</sub>

[0275]

[0276] 펩티드를 글리칸당 약 30개의 펩티드의 비로 반응시킴으로써 화합물 1 및 화합물 1B를 합성하였다. 이러한 비를 사용하는 경우, 글리칸에 접합된 펩티드의 평균 수는 글리칸당 약 20-25개의 펩티드이고 이는 약 8, 또는 약 8-12% 변형에 상응하는 것으로 고려된다. 표 2에 제시된 다양한 분자량의 sHA 접합체의 경우, 펩티드 접합의

정도는 웨티드 대 백본 길이의 비가 일정하도록 선형으로 스케일링되었다. 구체적으로, 화합물 2 및 화합물 2B의 경우 글리칸에 접합된 웨티드의 평균 수는 글리칸당 약 70-80개 웨티드이고, 화합물 3의 경우 글리칸에 접합된 웨티드의 평균 수는 글리칸당 약 6개 웨티드이며, 이는 모두 약 8, 또는 약 8-12% 변형에 상응하는 것으로 고려된다.

[0277] 실시예 3: 간 성상 세포 (HSC) 시험관내 검정

[0278] 세포 증식 검정. 단일 공여자 인간 간으로부터 단리된 정상 인간 간 원발성 간 성상 세포 (HSC)를 사이언셀 리서치 래보러토리즈(Sciencell Research Laboratories) (캘리포니아주 샌디에고)로부터 구입하였다. 초기 계대 배양 HSC (P2)를 0.5% 태아 소 혈청 (인비트로젠(Invitrogen)), 1%의 성상 세포 성장 보충제 (사이언셀 리서치 래보러토리즈), 100 U/ml 폐니실린 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드), 및 100 U/ml 스트렙토마이신 (인비트로젠)이 보충된 성상 세포 배지 (SteCM; 사이언셀 리서치 래보러토리즈) 중의 원섬유성 콜라겐 코팅된 플레이트 상에서 6000개 세포/웰 시딩 밀도로 성장시켰다. 원발성 HSC를 배양물 중에서 10 ng/mL의 TGF- $\beta$ 1 (바이오-테크네 코포레이션(Bio-Techne Corporation), 미네소타주 미네아폴리스)에 의한 밤샘 처리에 의해 활성화시켰다. 이어서, 세포를 1000-0.0001  $\mu$ g/mL의 농도 범위의 비오틴-표지된 화합물 1B 또는 2B를 함유하는 저혈청 배지에 30시간 동안 노출시켰다. HSC의 증식에 대한 각각의 처리의 효과를 시콴트(CyQUANT) 직접 세포 증식 검정 키트 (인비트로젠)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 평가하였다.

[0279] HSC 활성화 및 알파 평활근 액틴에 대한 면역염색에 대한 효과. 초기 계대배양 HSC (P2)를 이전에 기재된 바와 같이 원섬유성 콜라겐 코팅된 플레이트 상에서 6000개 세포/웰 시딩 밀도로 성장시키고, 배양물 중에서 10 ng/mL의 TGF- $\beta$ 1에 의한 밤샘 처리에 의해 활성화시켰다. 이어서, 세포를 6000-0.0001  $\mu$ g/mL의 농도 범위의 화합물 1B 또는 화합물 2B를 함유하는 저혈청 배지에 30시간 동안 노출시켰다. 30시간 처리 후, 세포를 4% 포름알데히드로 10분 동안 고정시키고, PBS로 세척한 다음, 0.1% 트리톤 X-100으로 7분 동안 투과화하였다. 이어서, 세포를 1% BSA, 10% 정상 염소 혈청, 0.1% PBS-트윈 중 0.3 M 글리신으로 밤새 차단하였다. 알파 평활근 액틴 염색을 위해, 모든 샘플을 200배 희석된 항-알파 평활근 액틴 항체 (암캡(Abcam))와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 PBS로 각각 5분 동안 4회 세척하였다. 이어서, 샘플을 알렉사 플루오르 633 2차 항체를 사용하여 2시간 동안 대조염색한 다음, PBS로 각각 5분 동안 4회 세척하였다. 이어서, EVOS 형광 현미경 (써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific))을 사용하여 세포를 영상화하였다.

[0280] 혈소판 유동 검정. 아이비디(Ibidi)  $\mu$ -슬라이드 VI 0.1 (아이비디) 채널을 원섬유성 유형 I 콜라겐 (크로노-로그 코포레이션(Chrono-Log Corp)) 100  $\mu$ g/mL로 1시간 동안 코팅하였다. 이어서, 채널을 PBS로 세정하였다. 승인된 IRB 프로토콜에 따라 동의한 공여자로부터 검정을 위해 사용되는 인간 혈액을 시트르산나트륨 바큐테이너에 수집하였다. 새로이 수집한 혈액을 400배 희석된 칼세인 AM (인비트로젠)을 사용하여 30분 동안 염색하였다. 화합물 1B 또는 화합물 2B를 사전-염색된 혈액에 100  $\mu$ g/mL로 첨가하고, 혈액을 각각의 채널을 통해 1000<sup>-1s</sup>의 전단 속도로 10분 동안 유동시켰다. 유동 후, 채널에서 모든 가시적인 미량의 혈액을 세정하고, EVOS 형광 현미경 (써모피셔 사이언티픽)을 사용하여 영상화하였다.

[0281] 결과

[0282] 세포 증식 검정. 시험된 최고 농도 1 mg/mL에서, 화합물 1B 및 화합물 2B의 경우 HSC 증식을 대략 60% 억제하였다. 둘 다의 접합체는 용량 의존적 방식으로 증식을 억제하였다.

[0283] HSC 활성화 및 알파 평활근 액틴에 대한 면역염색에 대한 효과. 만성 간 질환에서 TGF- $\beta$ 1은 HSC의 근섬유모세포 표현형으로의 활성화를 위한 우세한 자극제이다. 활성화된 HSC는 대조군에 대한 영상에 제시된 바와 같이 알파 평활근 액틴의 발현에 의해 확인할 수 있다. 시험된 최고 농도 6 mg/mL에서, 활성화된 HSC를 화합물 1B 및 화합물 2B로 처리하면 알파 평활근 액틴 염색이 감소되었다 (도 7).

[0284] 혈소판 유동 검정. 형광 영상은 전혈 유동 하에 100  $\mu$ g/mL의 화합물 1B 및 화합물 2B에 의한 혈소판-결합 및 억제를 보여준다. 어떠한 처리도 없었던 채널 1 (비억제 대조군)은 결합된 혈소판에 의해 거의 완전히 덮인 반면에, 접합체로 처리된 채널은 결합된 혈소판의 수가 유의하게 감소되었다 (도 6).

[0285] 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체는 놀랍게도 간 성상 세포에 대한 항섬유화 및 항증식 효과를 보여주었고, 이는 술페이트 및 웨티드에 의한 화학적 변형이 생물학적 효과를 유의하게 감소시키지 않는다는 것을 보여준다.

[0286] 실시예 4: 사염화탄소 모델

[0287] 독성 손상으로서 사염화탄소 ( $CCl_4$ )를 사용한 마우스 모델에서 본원에 기재된 화합물이 간 섬유증에 영향을 미치

는 능력을 시험하였다. C57BL/6 마우스에게 미네랄 오일 중 5% CCl<sub>4</sub> 100 μL를 총 4주 동안 1주에 2회 복강내 투여하였다. 동일한 4주 기간 동안, 동물에게 염수 (비히클) 또는 시험 물품 (화합물 1)을 1주 3회 정맥내 투여하였다. 1개의 군의 동물에게 밸사르탄을 매일 경구 투여하였다. 마지막으로, 어떠한 시험 물품 또는 CCl<sub>4</sub> 도 제공받지 않은 건강한 동물 군을 정상 대조군으로서 제공하였다.

[0288] 4-주 기간 말미에, 동물을 희생시키고, 생화학적 및 조직학적 분석을 위해 간을 수집하였다. 히드록시프롤린 수준을 도 1에 제시한다. CCl<sub>4</sub> 투여는 정상인 건강한 동물과 비교하여 히드록시프롤린 수준을 증가시켰다. 20 mg/kg의 화합물 1에 의한 처리는 히드록시프롤린 수준을 통계적으로 유의한 정도로 감소시켰다 ( $p<0.05$ ). 시리우스 레드 염색을 사용하여 콜라겐 함량에 대한 간의 조직학적 분석을 수행하였다. 도 2는 간 절편의 대표적인 영상을 보여주며, 정상인 건강한 동물과 비교하여 비히클 처리군에서 콜라겐 염색이 증가하였고, 화합물 처리에 의해 콜라겐 염색이 감소하였다. 염색을 정량화하여 이를 도 3에 제시하였다. CCl<sub>4</sub>는 시리우스 레드에 의해 조직학적으로 측정된 바와 같이 간에서 콜라겐의 수준을 증가시켰다. 화합물 1을 사용한 처리는 비히클 대조군과 비교하여 콜라겐 염색을 유의하게 감소시켰다.

#### [0289] 실시예 5: 비-알콜성 지방간염 (NASH) 모델

[0290] 본원에 기재된 화합물이 간 섬유증에 영향을 미치는 능력을 비-알콜성 지방간염 (NASH)의 마우스 모델에서 시험하였다. C57BL/6 마우스에게 출생 후 200ug의 스트렙토조토신을 단일 피하 주사하였다. 4주령에서 시작하여, 동물에게 고지방 식이를 공급하였다. 제5주에 시작하고 제9주까지 4주 동안 계속하여, 동물을 염수 또는 화합물 1로 3X/주 정맥내 처리하였다. 별개의 동물 군에게는 동일한 기간 동안 텔미사르탄을 매일 경구 투여하였다. 동물을 9주령에 희생시키고, 조직학적 및 생화학적 분석을 위해 간을 수집하였다.

[0291] 시리우스 레드 염색을 사용하여 콜라겐 함량에 대한 간의 조직학적 분석을 수행하였다. 염색을 정량화하여 이를 도 4에 제시하였다. 텔미사르탄 또는 화합물 1을 사용한 처리는 비히클 처리군과 비교하여 간에서 콜라겐의 수준을 감소시켰다.

[0292] 간 트리글리세리드를 도 5에 제시한다. 텔미사르탄 및 화합물 1에 의한 처리는 연구 동안 간 트리글리세리드를 감소시켰다.

#### [0293] 생체내 영상화 시스템에 의한 분포

[0294] 분자를 합성하고 형광 표지하였다. 구체적으로, CF633을 히드라지드를 통해 백본에 1:1 염료 대 백본의 합성 몰비로 연결시켰다. 분자를 누드 마우스에 10 mg/kg으로 정맥내로 투여하고, 생체내 영상화 시스템 (IVIS)을 사용하여 영상화하였다. 상이한 시점에, 동물을 마취시키고, IVIS를 사용하여 영상화하여 표지된 화합물의 생체분포를 결정하였다. 도 8은 주사 5 또는 60분 후의 화합물의 국재화를 보여준다. 신장, 방광, 또는 간에서의 국재화는 화합물의 분자량에 의존하는 것으로 입증되었다.

[0295] 화합물의 분포에서의 차이는 sHA 백본의 분자량과 관련이 있었다. 저분자량 sHA (28 kDa) 백본 (화합물 3)이 신장, 방광, 뿐만 아니라 간에서 관찰되었다. 대조적으로, 보다 고분자량의 sHA (323 kDa) 백본 (화합물 2)은 오직 간 내에서만 국재화되는 것으로 발견되었고, 방광 또는 신장에서는 어떠한 신호도 나타나지 않았다. 163 kDa의 sHA 백본 (화합물 1)은 주로 간 내에서 국재화되는 것으로 발견되었지만, 또한 방광 내에서도 약한 신호가 나타났다. 이들 결과는 sHA 백본의 분자량과 IV 투여시 분자의 분포 사이의 놀라운 상관관계를 입증하며, 대략 150 kDa 분자량 sHA는 주로 신장으로부터 배제되고 대신에 간 내에서 주로 국재화된다. 간 내에서의 sHA-펩티드 접합체의 국재화는 또한, 모 HA 백본에 대한 황산화 및 펩티드 접합에 의한 화학적 변형의 미지의 속성을 고려하면 예상외의 발견이었다. 다른 조직 또는 기관에서의 비교적 낮은 분포와 함께 간 내에서의 국재화는 예상되는 낮은 전신 효과로 간의 질환을 표적화하는 고유한 기회를 제공한다.

#### [0296] 실시예 6: VEGF 성장 인자 결합

[0297] 각각의 웰에 1x PBS 중 1 μg/ml 용액 75 μl를 첨가하고 밤새 4°C에서 인큐베이션함으로써 VEGF189 (알앤디 시스템즈(R&D Systems), 8147-VE)를 96-웰 플레이트 (코닝(Corning), 9018) 상에 코팅하였다. 플레이트를 300 μL의 PBST (0.02% 트윈 20을 함유하는 1x PBS)를 사용하여 3회 세척하였다. 이어서 플레이트를 PBS 중 1% BSA로 실온에서 1시간 동안 차단시켰다. 이어서, 비오티닐화된 분자를 PBST 중 1% BSA 중에 100 μg/mL로 용해시키고, 최종 농도가 0.1 ng/mL에 도달할 때까지 1:10의 연속 희석을 수행하였다. 이어서, 50 μL 샘플을 플레이트 상에서 37°C에서 1시간 동안 인큐ベ이션하였다. 이어서 플레이트를 PBST 중 1% BSA로 3회 세척하고, 1% BSA PBST 중 1:500 스트렙타비딘-HRP (써모 N504) 100 μL와 함께 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 이어

서, 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (압캡 ab171527) 100  $\mu$ L을 사용하여 실온에서 10분 동안, 빛으로부터 보호하면서 색을 발현시켰다. 100  $\mu$ L 0.16 M 황산을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 450 nm에서의 흡광도를 플레이트 판독기 상에서 10분 내에 판독하였다.

[0298] 디사카라이드당 2.5개의 슬레이트 기로 황산화된 HA (s2.5HA, 163 kDa)를 VEGF189에의 결합에 대해 시험하였고, 대략 1 nM의 EC<sub>50</sub>이 관찰되었다 (도 9). 동일한 황산화된 HA 백본을 웨티드 (화합물 1)와 접합시켰을 때 유사한 EC<sub>50</sub> 값이 관찰되었다. 그러나, 황산화되지 않은 유사한 MW의 HA는 VEGF189에 결합하지 않았다. 동일한 경향은 FGF2 결합을 시험한 검정에서 또한 관찰되었다. 이들 데이터는 HA의 황산화가 성장 인자에 대한 결합을 증진시키고, 놀랍게도 황산화된 경우 HA의 웨티드와의 접합은 이러한 결합을 감소시키지 않는다는 것을 입증한다.

[0299] 실시예 7: PDGF 성장 인자 결합

[0300] 하기 검정 (성장 인자 결합 및 수용체 결속)은 다양한 황산화된 HA 백본이 재조합 PDGF-BB에 결합하고 그의 수용체 결속을 방해하는 능력을 평가한다. PDGF-BB는 세포 표면 상의 그의 수용체, PDGF-R $\beta$  와 상호작용함으로써 세포 신호전달을 촉발하는, 섬유증에서 발견되는 주요 염증 매개체이다.

[0301] PDGF-BB의 주요 역할은 HSC의 이동 및 증식을 촉진하는 것이다. 또한, 마우스 및 인간 둘 다에서 활성화된 HSC (근섬유모세포)는 PDGF-R $\beta$ 의 고도로 상향조절된 발현을 갖는 것으로 나타났다. 활성화된 HSC는 또한 PDGF-BB를 생산하여, 자가분비 섬유화유발 루프를 생성한다. 마지막으로, PDGF-BB/PDGF-R $\beta$  신호전달은 TGF- $\beta$ 의 섬유화유발 신호전달을 상승작용적으로 조절한다. PDGF 및 TGF- $\beta$  둘 다는 간 섬유증을 매개하는 중요한 성장 인자를 구성한다.

[0302] 본원에 제공된 데이터는 화합물 1이 현저한 성장 인자 이소형 (PDGF-BB) 및 수용체 (PDGF-R $\beta$ ) 결속을 억제한다는 것을 입증한다. 또한, 화합물 1은 또한 다른 이소형 PDGF-AA, PDGF-CC, 및 PDGF-DD에 결합한다. 이러한 데이터에 기초하면, 화합물 1은 모든 PDGF 이성질체에 결합하고 이를 격리시킴으로써 이들에 의한 수용체 결속을 억제할 것으로 고려된다.

[0303] 성장 인자 결합 검정 방법

[0304] 화합물 1이 PDGF의 모든 이성질체에 결합하는 능력을 시험관내 결정하기 위해, 알앤디 시스템즈로부터의 재조합 PDGF (AA, BB, CC, 및 DD)를 사용하는 ELISA를 개발하였다. 간략하게, PDGF의 모든 4종의 이성질체를 제조업체의 프로토콜에 따라 재구성하고, 코스타 하이 바인드(Costar High Bind) 플레이트 상에 1  $\mu$ g/mL의 코팅 농도로 개별적으로 흡착시켰다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 1X PBS 트윈 (0.02%) 세척 완충제로 세정하여 임의의 미결합 PDGF를 제거하였다. 이어서, 플레이트를 1X PBS 중 1% BSA로 25°C에서 1시간 동안 차단시켰다. 화합물 1B (웨티드 로드 및 비오틴을 갖는 관능화된 sHA), 0 웨티드 변형 글리칸 백본 (sHA-OPM), 또는 웨티드 단독-모두 검출을 위해 비오틴으로 표지됨-을 1% BSA 1X PBS 트윈 (0.02%) 중에서 100  $\mu$ g/mL에서 0.0001  $\mu$ g/mL로 연속 희석하였다. 이어서, 문자 희석물을 PDGF-코팅된 웰에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 1% BSA 1X PBS 트윈 (0.02%)으로 3회 세정하여 임의의 미결합 문자를 제거하였다. 이어서, 비오틴 표지를 갖는 결합된 문자를 양고추냉이 페옥시다제 (HRP)와 접합된 스트렙타비딘으로 프로빙하였다. 세척 후, 테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질을 사용하여 플레이트를 발색시키고, 반응을 산 용액으로 정지시켰다. 플레이트 웰 흡광도를 바이오텍 시너지(Biotek Synergy) H4 멀티방식 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

[0305] 화합물 1B가 이러한 시험관내 검정에서 PDGF의 모든 이소형에 다양한 정도로 결합하는 것이 관찰되었다 (도 10-13 참조).

[0306] 놀랍게도 시험된 화합물은 표 3에 표로 나타낸 EC<sub>50</sub>에 의해 나타내어진 바와 같이, 특정 이소형에 대해 선택성을 나타낸다는 것이 발견되었다. 요약하면, 화합물 1B는 각각의 PDGF-BB, PDGF-DD, 및 PDGF-CC보다 더 우수하게 PDGF-AA에 결합하였다. 또한, sHA-OPM은 PDGF-BB 및 PDGF-DD보다 더 우수하게 PDGF-AA에 결합하는 것으로 관찰되었다. PDGF-CC 결합은 본 검정에서 검출되지 않았다. 이러한 연구에 기초하면, 비-황산화된 HA 및 웨티드 단독은 시험관내에서 임의의 PDGF 이소형에 결합하지 않는다. 또한, sHA에의 웨티드의 접합은 관능화된 sHA-OPM과 비교하여 PDGF-CC 및 PDGF-DD에 대한 결합을 개선시킨다.

[0307] 표 3: 시험관내 다양한 PDGF 이소형에 대한 EC<sub>50</sub> ( $\mu$ M) 값.

분자	PDGF-AA	PDGF-BB	PDGF-CC	PDGF-DD
화합물 1B	0.00068	0.0012	0.069	0.0059
sHA-OPM	0.00029	0.0007	-	0.16
펩티드 단독	-	-	-	-
HA	-	-	-	-

## [0308] 성장 인자 수용체 결속

[0310] PDGF-R $\beta$ 에 대한 PDGF-BB 결합의 억제를 측정하기 위해 설계된 경쟁적 ELISA 검정에서, 상이한 황산화 정도 및/ 또는 펩티드 로드를 갖는 화합물 1 또는 관능화된 글리칸 백본 (본원에서 접합체로 지칭됨)을 시험하였다. 재조합 인간 PDGF-R $\beta$  Fc 키메라 단백질 및 비오틴 표지된 PDGF-BB (알앤디 시스템즈)를 제조업체의 프로토콜에 따라 재구성하였다. PDGF-R $\beta$  Fc 키메라 단백질을 코스타 하이 바인드 플레이트 상에 1nM의 코팅 농도로 4°C에서 밤새 흡착시켰다. 1X PBS 트윈 (0.02%) 세척 완충제로 세정하여 미결합 PDGF-R $\beta$  Fc를 제거하고, 이어서 플레이트를 1X PBS 중 1% BSA를 사용하여 25°C에서 1시간 동안 차단시켰다. 화합물 1 및 접합체를 1% BSA 1X PBS 트윈 (0.02%) 중 2X 농도로 제조하였다 (하기 결과 1 및 2의 경우 4000  $\mu$ g/mL에서 0.002  $\mu$ g/mL 범위의 연속 희석물, 결과 3의 경우 2mg/mL 단일 농도 (검정된 유효 웰 농도 = 1 mg/mL)). PDGF-BB 원액을 또한 20 ng/mL의 2X 농도로 제조하였다. 접합체 및 PDGF-BB를 실온에서 30분 동안 각각의 동등 부피로 인큐베이션함으로써 1:1로 함께 혼합하였다. 이어서, 사전-인큐베이션된 용액을 PDGF-R $\beta$  Fc 코팅된 플레이트에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 결합되게 하였다. 이어서, 플레이트를 1% BSA 1X PBS 트윈 (0.02%)으로 3회 세정하였다. 결합된 비오틴 표지된 PDGF-BB를 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 접합된 스트렙타비딘을 사용하여 검출하였다. 세척 후, 테트라메틸벤자린 (TMB) 기질을 웰에 첨가하여 색을 발현시켰다. 산 용액으로 반응을 정지시키고, 바이오텍 시너지 H4 멀티방식 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 억제가 보다 클수록, 보다 적은 PDGF-BB가 플레이트 상의 수용체에 결합될 것이고, 따라서 신호 판독이 저하될 것이다. 참조 대비 접합체에 대한 흡광도의 비를 결과 3에 기록하였다.

[0311] 화합물 1 (대략 8, 또는 8-12% 펩티드 관능화를 생성하는, 30개의 펩티드 로드를 갖는 관능화된 sHA)은 PDGF-BB (리간드)의 그의 수용체, PDGF-R $\beta$ 에 대한 결합을 시험관내 억제한다 (도 14). 글리칸에 접합된 펩티드의 평균 수는 "펩티드 로드" 하에 표시된 것보다 적은 것으로 고려된다. 예를 들어, 30PM 접합체에서 글리칸에 접합된 펩티드의 평균 수는 글리칸당 약 20-25개의 펩티드일 수 있고, 이는 약 8-12% 변형에 상응하는 것으로 여겨진다. 놀랍게도, sHA (관능화 또는 비관능화된 것)는 이를 억제하지 않는다. 이전에, 도 11에서, 관능화된 sHA-OPM은 PDGF-BB에 시험관내 결합하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, sHA-OPM의 PDGF-BB에 대한 결합은 도 14의 데이터에 기초하면 그의 수용체 상호작용을 방해하는 것으로 보이지 않는다.

[0312] 또한, 관능화된 sHA에 대해 펩티드 로드를 증가시키는 것은 PDGF-BB가 그의 수용체에 시험관내 결합하는 것을 억제하는 그의 능력을 증가시키는 것으로 밝혀졌다 (도 15).

[0313] 이를 결과는 관능화된 HA의 황산화 정도가 시험관내 검정에서 PDGF-BB의 수용체 결속을 방해하는 그의 능력에 영향을 미친다는 것을 보여준다. 일반적으로, 동일한 펩티드 로드에서 황산화 정도를 증가시키는 것은 PDGF-BB의 그의 수용체에 대한 시험관내 결합의 억제를 증가시킨다. 하기 표로 제시된 바와 같이, 2.3-2.4의 황산화 정도를 갖는 화합물에 의한 억제는 1.4 또는 0의 황산화 정도를 갖는 화합물에 의한 억제를 초과하였다.

[0314] 또한, 펩티드 로드가 증가함에 따라, PDGF-BB의 그의 수용체에 대한 결합의 억제가 개선되는 것으로 발견되었고, 이는 상기 발견을 추가로 확증하였다.

[0315] 표 4는 흡광도 450 접합체/흡광도 450 참조물의 비를 보여준다. 볼드체의 엔트리는 반응에서 유사한 양의 참조 화합물 1과 비교했을 때 수용체에 대한 PDGF-BB의 유사하거나 더 우수한 결합을 보여준다. 음영처리된 셀은 수용체에 대한 PDGF-BB의 결합의 보다 높은 억제 또는 감소된 결합을 나타낸다.

[0316]

표 4

펩티드 로드	HA108 백본				HA163 백본
	HA	s1.4HA	s2.3HA	s2.4HA	s2.5HA
EDU 없음	-	-	-	-	12.49
0PM	<b>17.27</b>	12.66	11.46	11.36	<b>16.40</b>
10PM	<b>16.96</b>	<b>15.05</b>	7.18	7.46	4.82
20PM	<b>16.33</b>	12.83	<b>5.17</b>	4.11	-
30PM	14.18	13.33	<b>2.64</b>	5.18	-
50PM	9.31	13.42	1.48	<b>1.52</b>	-
60PM	-	-	-	-	0.53

[0317]

[0318]

## 실시예 8: 티오아세트아미드 (TAA) 모델

[0319]

독소 티오아세트아미드에 의해, 1주에 3회 IP로 총 8주 동안 100 내지 150 mg/kg의 농도로 투여하여 래트에서 중증 간 섬유증을 유도하였다. 제5주에 시작하여, 화합물 1의 3종의 상이한 용량 또는 sHA-OPM (펩티드 없음)의 시험 물품 투여를 개시하였고, IV로 1주에 1회 전달하였다. 8주의 말미에 동물을 회생시켰다. 혈장을 수집하고, 간 바이오마커에 대해 측정하였다. 헤드록시프롤린에 의해 측정되는 바와 같은 총 콜라겐의 생화학적 분석을 위해 간을 분리하거나, 또는 시리우스 레드 염색에 의해 섬유증을 평가하기 위한 조직학을 위해 프로세싱하였다.

[0320]

섬유증을 0-6의 척도를 사용하여 조직학적으로 스코어링하였고, 여기서 0은 섬유증이 없음을 나타내고, 6은 중증 섬유증을 나타낸다. 비히를 대조군으로 처리된 동물의 70%가 가장 높은 수준의 섬유증으로 순위화되었고, 이는 모델의 중증도를 나타낸다. 화합물에 의한 처리는 비히를 처리된 동물과 비교하여 높은 섬유증 스코어의 발생을 감소시켰다 (도 16). 이러한 섬유증의 감소는 시험된 화합물 1의 모든 용량에서 발생하였고, 일반적인 경향은 역 용량 반응이었다. sHA-OPM의 투여는 섬유증 스코어에서 일부 감소를 발생시켰지만, 화합물 1에 비해 낮았다. 추가적으로, 아스피린을 혈소판 억제에 대한 양성 대조군으로서 사용하였고, 그의 사용은 섬유증 스코어를 감소시켰다.

[0321]

또한, 연구 동안 알칼리성 포스파타제 (ALP)의 혈청 수준을 측정하였다. ALP는 전형적으로 담즙정체성 또는 대사성 간 손상의 척도로서 사용된다. 시험 물품 투여 2주 후, ALP는 30 mg/kg 화합물 1의 처리에 의해 유의하게 감소되었지만 (도 17), 보다 낮은 용량의 화합물 1은 ALP에 대해 유의한 효과를 갖지 않았다. sHA-OPM은 ALP를 유의하게 더 낮췄다. ALP에 대한 이러한 효과는 치료 기간 동안 발생하였지만, 이러한 중증 모델에서는 연구 내내 지속해서 유지되지 않았다. ALP 수준의 감소는 모델에서 예상되는 결과가 아니었다. 추가적으로, 연구 동안 ALP 수준에서의 용량 의존적 효과는 예상외로, 연구 종점에 섬유증 스코어에서 발견된 역 용량 반응과 상반된다.

[0322]

추가의 섬유증 데이터는 콜라겐 염색의 조직학적 정량화를 통해, 또는 간 내 콜라겐의 생화학적 분석에서 섬유증의 양을 정량화하는 것을 포함할 수 있다. 화합물 1은 콜라겐의 이들 측정치를 감소시킬 것으로 예상된다. 추가적으로, 화합물 1은 또한 다른 보다 경도의 섬유증 모델 (사염화탄소 모델)에서 화합물 1의 처리에 의해 관찰된 바와 같이, 콜라겐의 mRNA 수준뿐만 아니라 프로-콜라겐 III의 혈청 수준을 감소시킬 수 있다. 또한, 화합물 1은 섬유증의 다른 바이오마커, 예컨대 PDGFRb, 알파 평활근 액틴, 또는 섬유증과 연관된 것으로 공지된 임의의 다른 마커를 감소시킬 수 있다.

[0323]

## 실시예 9: 황산화 연구

[0324]

## 콜라겐 I 결합 검정

[0325]

래트 꼬리 단량체 콜라겐 I (코닝)을 0.2 N 빙초산을 사용하여 50 µg/mL의 작업 농도로 회석하였다. 코스타하이 바인드 플레이트를 회석된 래트 꼬리 콜라겐 I과 함께 4°C에서 밤새 두었다. 1X PBS 트윈 (0.05%) 세척 완충제로 세정하여 미결합 콜라겐을 제거하고, 이어서 플레이트를 1X PBST (0.05%) 중 1% BSA를 사용하여 25°C에서 1시간 동안 차단시켰다. 다양한 황산화 정도 및 웨티드 로드 (표 5)를 갖는 화합물 1 및 생체접합체의 연

속 희석물을 1% BSA 1X PBST (0.05%) 중에서 4000  $\mu\text{g/mL}$  내지 0.064  $\mu\text{g/mL}$  범위의 2X 농도로 제조하였다. 비오틴 태그부착된 화합물 1B 원액을 또한 8  $\mu\text{g/mL}$ 의 2X 농도로 제조하였다. 시험 생체접합체 및 화합물 1B를 1:1 부피 비로 조합하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 사전-인큐베이션한 용액을 콜라겐 코팅된 플레이트에 첨가하고, 25°C에서 15분 동안 결합되게 하였다. 플레이트를 1X PBST (0.05%)로 3회 세정하고, 1X PBST (0.05%) 중 5% BSA로 25°C에서 1시간 동안 차단시켰다. 화합물 1B를 양고추냉이 페옥시다제 (HRP)와 접합된 스트렙타비딘을 사용하여 검출하였다. 세척 후, 테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질을 웰에 첨가하여 색을 발현시켰다. 산 용액으로 반응을 정지시키고, 바이오텍 시너지 H4 멀티방식 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0326] 표 5

펩티드 로드					
DOS	0	10	20	30	50
0	27.78	14.76	2.82	13.41	7.49
1.4	1000	161.28	1000	1.96	1000
2.3	53.88	1000	4.90	0.79	0.80
2.4	42.19	1000	0.50	0.43	0.25

[0327] [0328] 상기 표 5는 경쟁적 콜라겐 I 결합 검정으로부터의  $\text{IC}_{50}$ 샘플/ $\text{IC}_{50}$  화합물 1의 비를 보여준다. 비  $\leq 1$ 은 화합물 1과 유사하거나 그보다 더 강한 결합을 입증한다. 비  $> 1$ 은 화합물 1보다 더 약한 콜라겐에 대한 결합을 입증한다. 데이터는 펩티드 로드가 증가함에 따라 콜라겐 결합이 증가하고, 황산화 정도 2.3 및 2.4의 경우 백본당 펩티드를 증가시키는 것이 화합물 1에 의해 관찰되는 것과 유사한 콜라겐에 대한 결합을 입증한다는 것을 보여준다. 이는 황산화 정도 (DOS) 및 펩티드 로드 둘 다가 콜라겐에 대한 결합을 결정하는데 있어서 상승작용적 역할을 한다는 것을 입증한다.

[0329] 간 성상 세포 증식 검정 A

[0330] 본 연구는 간 성상 세포 (HSC) 증식에 대한 다양한 황산화 정도 및 펩티드 로드를 갖는 화합물 1 및 생체접합체의 효과를 입증한다. 원발성 인간 간 성상 세포 (HSC)를 사이언셀 리서치 랩스 (미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 입수하였다. 이들 세포는 계대 1에서 제공되었고, 따라서 활성화된 표현형을 나타내었다. 세포를 폴리-L-리신 코팅된 T-75 플라스크에서 95% 공기, 5%  $\text{CO}_2$ 를 함유하는 가습 분위기에서 2% 소 태아 혈청을 함유하는 사이언셀 리서치 랩스에 의해 제공된 배지에서 확장시켰다. 세포를 75-80% 전면생장률로 성장시키고, 모든 실험에서 사용하기 위해 P2에서 동결보존하였다.

[0331] 조직 배양물 처리된 96 웰  $\mu\text{-플레이트}$  (아이비디)를 크로노-파(Chrono-Par) 원섬유성 콜라겐 I 50  $\mu\text{g/mL}$ 로, 95% 공기, 5%  $\text{CO}_2$ 를 함유하는 가습 분위기에서 2시간 동안 코팅하였다. 2시간 인큐베이션 후에 플레이트를 멀균 1X PBS로 수동 세정하여 임의의 과량의 원섬유성 콜라겐을 제거하였다. 이어서, 플레이트를 0.5% 소 태아 혈청을 함유하는 사이언셀 리서치 랩스에 의해 제공된 웰당 30  $\mu\text{L}$ 의 배지와 함께 사전-인큐베이션하였다. P2 동결보존된 세포를 해동시키고, 실험을 위해 동일한 저혈청-함유 배지에서 재구성하였다. 세포를 원섬유성 콜라겐 코팅된 웰에 웰당 30  $\mu\text{L}$  중 6000개 세포의 시딩 밀도로 시딩하고, 2-3시간 동안 부착되게 하였다. 레이카(Leica) 위상 대조 현미경을 사용한 영상화에 의해 세포 부착을 확인하였다. TGF- $\beta$  (알엔디 시스템즈)를 제조업체의 프로토콜에 따라 재구성하였다. 이어서, 30 ng/mL의 TGF- $\beta$ 를 웰당 30  $\mu\text{L}$ 로 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 95% 공기, 5%  $\text{CO}_2$ 를 함유하는 가습 분위기에서 밤새 인큐베이션하였다. 다양한 황산화 정도 및 펩티드 로드를 갖는 화합물 1 및 접합체의 원액을 1000, 100, 10, 및 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 제조하였다. 20시간의 TGF- $\beta$  자극 후, 배지를 웰당 80  $\mu\text{L}$ 의 제조된 희석물로 교체하였다. 음성 대조군 웰을 웰당 80  $\mu\text{L}$ 의 저혈청 배지로 처리하였다. 세포를 95% 공기, 5%  $\text{CO}_2$ 를 함유하는 가습 분위기에서 48시간 동안 성장되게 하였다. 세포 증식을 48시간째에 시판트 직접 검정 키트를 사용하여 평가하였다. 몰레클라 디바이시스(Molecular Devices) M5 다중모드 플레이트 판독기를 사용하여 형광 강도 측정치를 기록하였다.

[0332] 0 (s0HA), 1.4 (s1.4HA), 2.3 (s2.3HA), 및 2.4 (s2.4HA) 범위의 황산화 정도를 갖는 HA 백분을 합성하고, 펩티드 로드 0, 10, 20, 30, 또는 50으로 접합시켰다. 화합물 1은 2.5의 황산화 정도 및 30개 펩티드 로드를 갖는 HA 백분으로 이루어졌다. 도 18에서 볼 수 있는 바와 같이, 황산화 정도 및 펩티드 로드 둘 다는 HSC의 증식을 억제하는데 상승작용적 효과를 갖는다. 낮은 황산화 정도 및 낮은 펩티드 로드는 화합물 1만큼 억제하지 않는 반면에, 보다 낮은 황산화 정도를 갖는 접합체에 펩티드 로드를 증가시키는 것은 증식을 억제하는 그의 능력을 회복시킨다.

[0333] 표 6은 1000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 시험된, 다양한 황산화 정도 (DOS) 및 펩티드 로드를 갖는 화합물 1 및 생체접합체에 의한 HSC 증식의 퍼센트 억제를 보여준다.

[0334] 표 6

		펩티드 로드				
DOS	0	10	20	30	50	
0	9.57	21.25	20.51	29.46	25.53	
1.4	36.69	44.11	34.10	27.20	29.52	
2.3	33.66	38.89	39.31	48.82	53.70	
2.4	38.96	42.12	47.51	51.62	52.85	
2.5	x	x	x	64.25	x	

[0335]

[0336] 데이터는 HA 백분의 황산화 정도를 증가시키는 것이 HSC 증식의 백분 매개된 억제를 증가시킨다는 것을 보여준다. 황산화 정도 2.3 및 2.4의 경우, 펩티드 로드를 증가시키는 것은 화합물 1에 의해 관찰된 것과 유사한 HSC 증식의 억제를 발생시켰다. 이는 황산화 정도 및 펩티드 로드 둘 다가 생물학적 활성을 결정하는데 있어서 상승작용적 역할을 한다는 것을 입증한다.

[0337] 간 성상 세포 증식 검정 B

[0338] 본 연구는 화학적 변형을 갖지 않는 백분 (비-황산화된 HA)이 화합물 1과 유사하게 HSC 증식을 억제한다는 것을 보여준다. 원발성 인간 HSC는 사이언셀 리서치 랩스 (미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 입수하였다. 이들 세포는 계대 1에서 제공되었고, 따라서 활성화된 표현형을 나타내었다. 세포를 폴리-L-리신 코팅된 T-75 플라스크에서 95% 공기, 5%  $\text{CO}_2$ 를 함유하는 가습 분위기에서 2% 소 태아 혈청을 함유하는 사이언셀 리서치 랩스에 의해 제공된 배지에서 확장시켰다. 세포를 75-80% 전면생장률로 성장시키고, 모든 실험에서 사용하기 위해 P2에서 동결보존하였다.

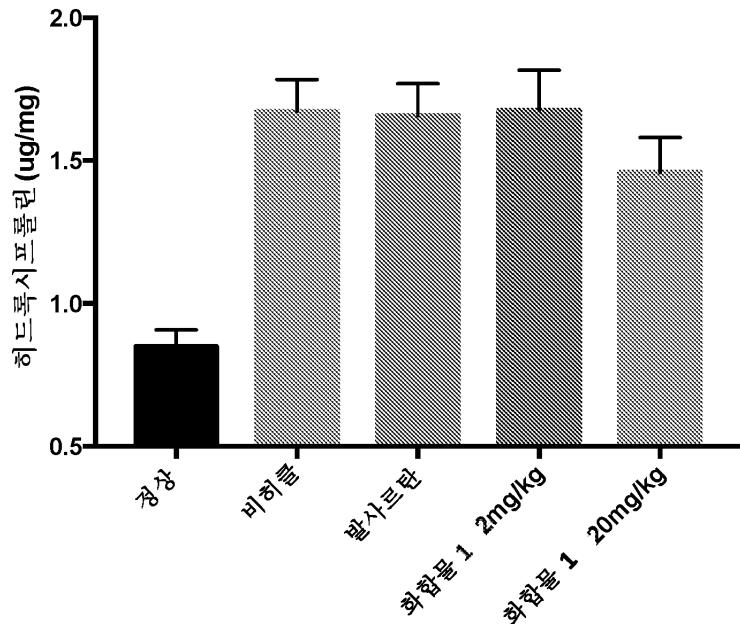
[0339] 조직 배양물 처리된 코스타 96 웰을 크로노-파 원섬유성 콜라겐 I 50  $\mu\text{g/mL}$ 로, 95% 공기, 5%  $\text{CO}_2$ 를 함유하는 가습 분위기에서 2시간 동안 코팅하였다. 2시간 인큐베이션 후에 플레이트를 멸균 1X PBS로 수동 세정하여 임의의 과량의 원섬유성 콜라겐을 제거하였다. 이어서, 플레이트를 0.5% 소 태아 혈청을 함유하는 사이언셀 리서치 랩스에 의해 제공된 웰당 100  $\mu\text{L}$ 의 배지와 함께 사전-인큐베이션하였다. P2 동결보존된 세포를 해동시키고, 실험을 위해 동일한 저혈청-함유 배지에서 재구성하였다. 세포를 원섬유성 콜라겐 코팅된 웰에 웰당 100  $\mu\text{L}$  중 6000개 세포의 시딩 밀도로 시딩하고, 2-3시간 동안 부착되게 하였다. 레이카 위상 대조 현미경을 사용한 영상화에 의해 세포 부착을 확인하였다. TGF- $\beta$  (알앤디 시스템즈)를 제조업체의 프로토콜에 따라 재구성하였다. 이어서, 30 ng/mL의 TGF- $\beta$ 를 웰당 100  $\mu\text{L}$ 로 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 95% 공기, 5%  $\text{CO}_2$ 를 함유하는 가습 분위기에서 밤새 인큐베이션하였다. 화합물 1 및 변형된 백분 및 비 변형 백분의 원액을 1000 내지 0.001  $\mu\text{g/mL}$  범위의 농도로 제조하였다. 20시간의 TGF- $\beta$  자극 후, 배지를 웰당 200  $\mu\text{L}$ 의 제조된 희석물로 교체하였다. 음성 대조군 웰을 웰당 200  $\mu\text{L}$ 의 저혈청 배지로 처리하였다. 세포를 95% 공기, 5%  $\text{CO}_2$ 를 함유하는 가습 분위기에서 48시간 동안 성장되게 하였다. 세포 증식을 48시간째에 시판트 직접 검정 키트를 사용하여 평가하였다. 몰레큘라 디바이시스 M5 다중모드 플레이트 판독기를 사용하여 형광 강도 측정치를 기록하였다.

[0340]

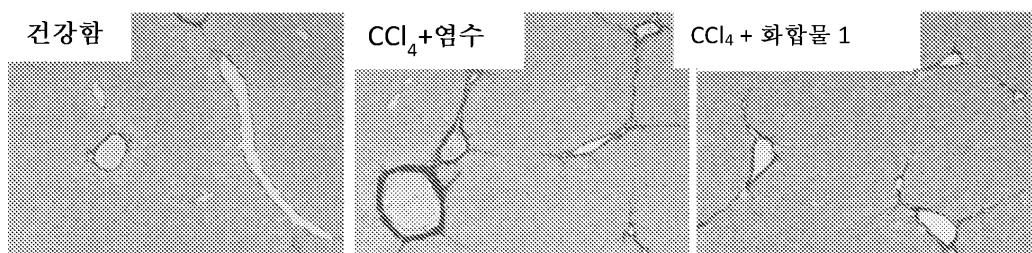
도 19는 간 성상 세포 (HSC) 증식에 대한 화합물 1, 백본 (화학적 유도체화, 즉, 황산화 없음), 및 백본 (0개의 펩티드 변형, "sHA-OPM")의 효과를 입증하는 용량 범위 연구를 보여준다. 어떠한 화학적 변형도 갖지 않는 백본은 화합물 1과 유사하게 HSC 증식을 억제하였다. HA 백본의 황산화는 HSC 증식을 억제하는 그의 능력을 감소시켰다. 황산화된 백본에 펩티드를 부가하는 것은 (예를 들어, 화합물 1) 생물학적 활성의 손실을 회복시켰다. 따라서, HA 백본의 펩티드 로드 및 황산화 정도 둘 다는 HSC 증식을 억제하는데 있어서 상승작용적 역할을 한다.

## 도면

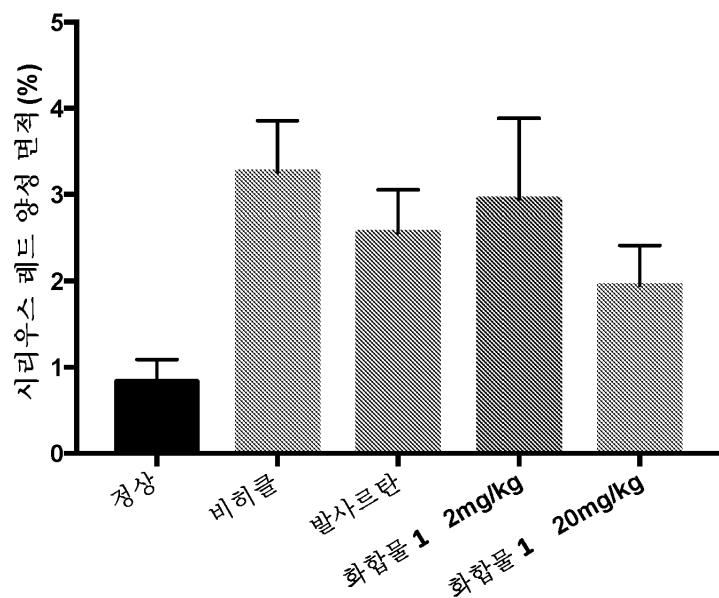
### 도면1



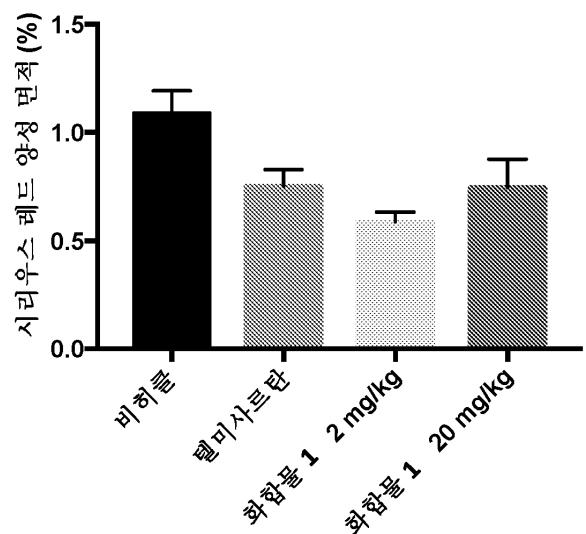
### 도면2



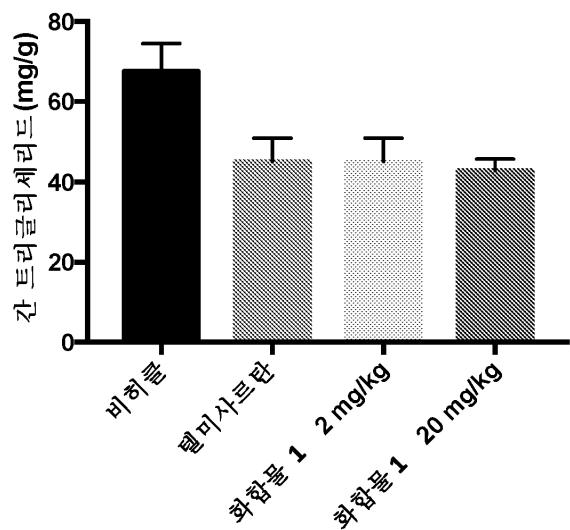
도면3



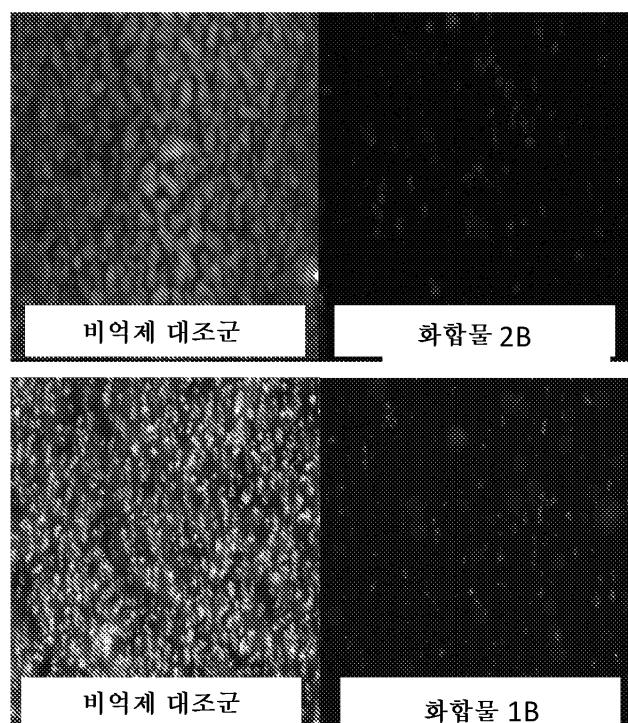
도면4



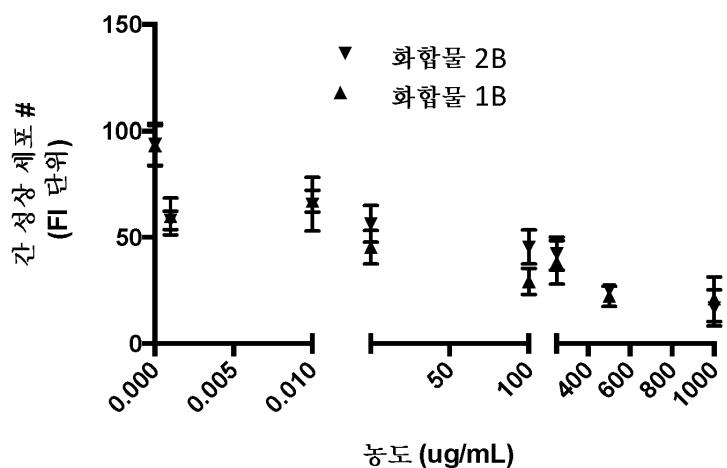
도면5



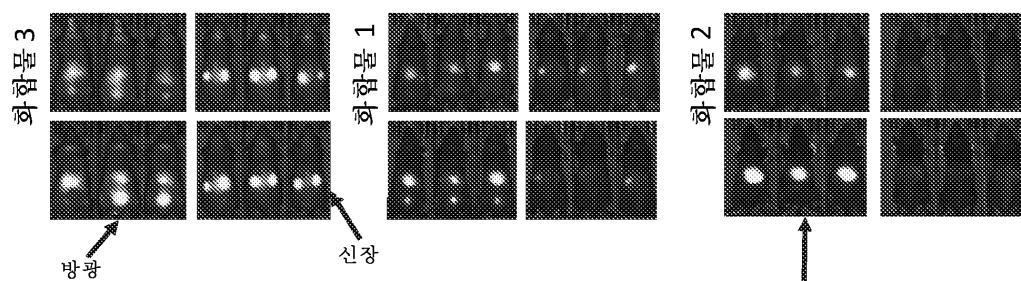
도면6



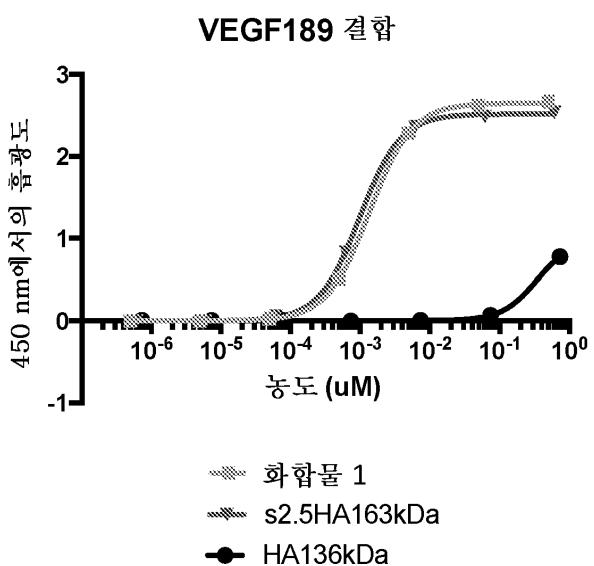
도면7



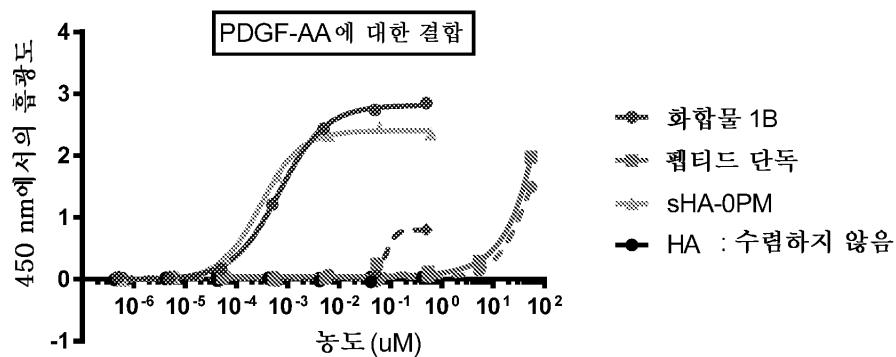
도면8



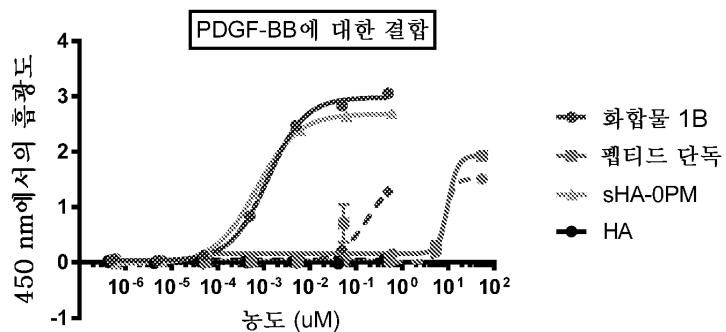
도면9



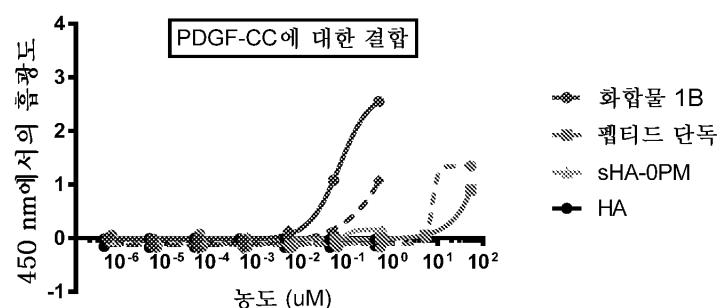
도면10



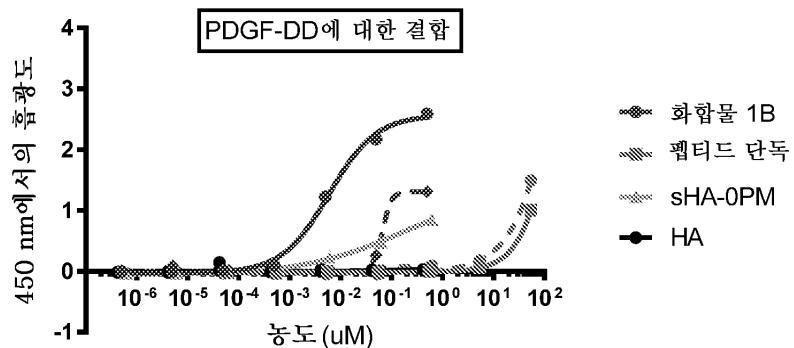
도면11



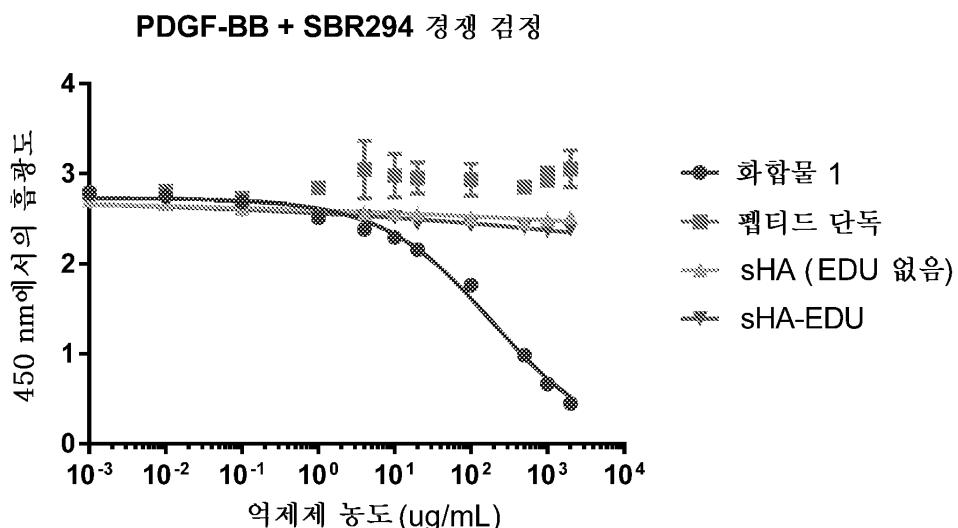
도면12



도면13

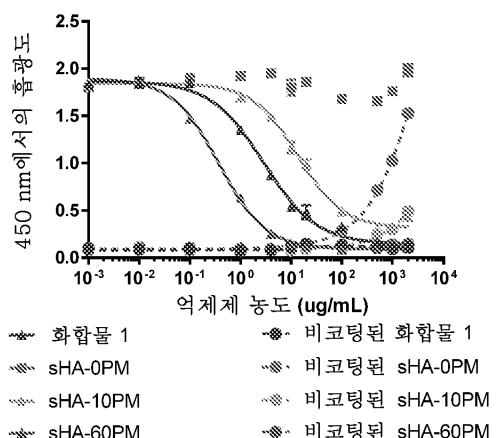


도면14

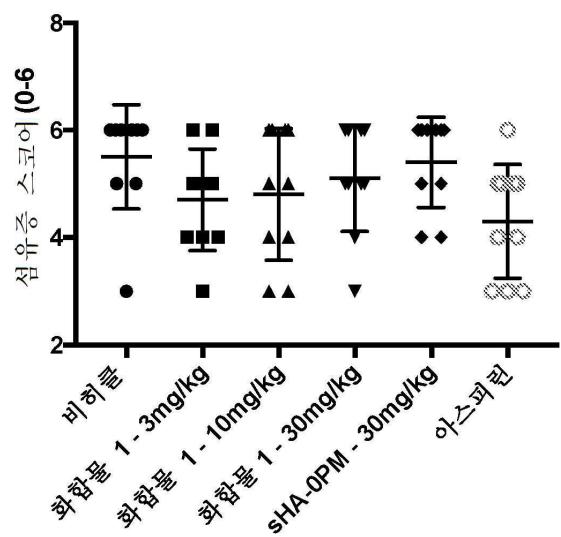


도면15

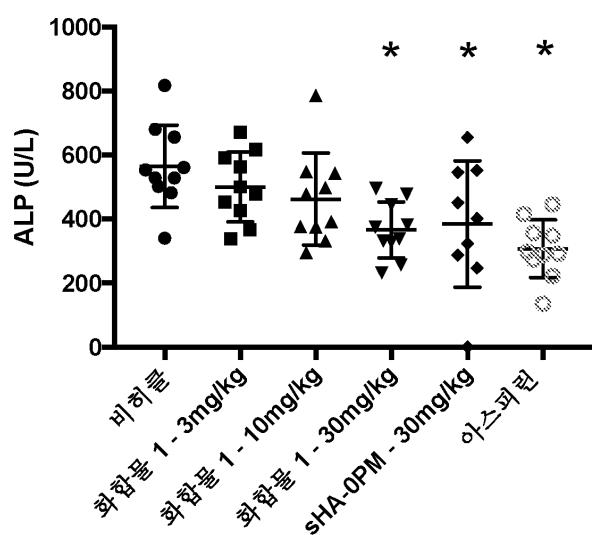
PDGF-BB + SBR-294 0, 10, 30, 60 펩티드 로드



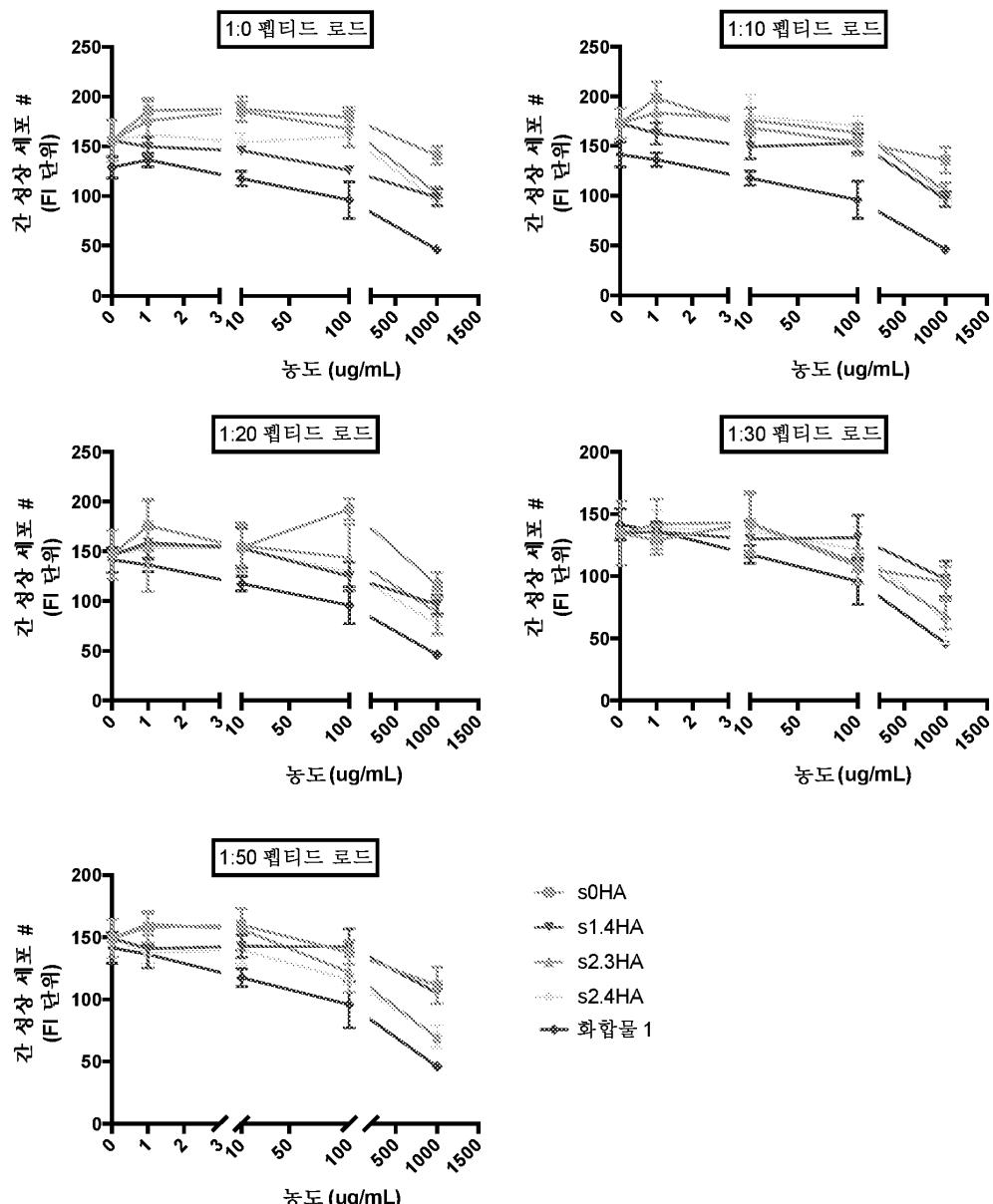
도면16



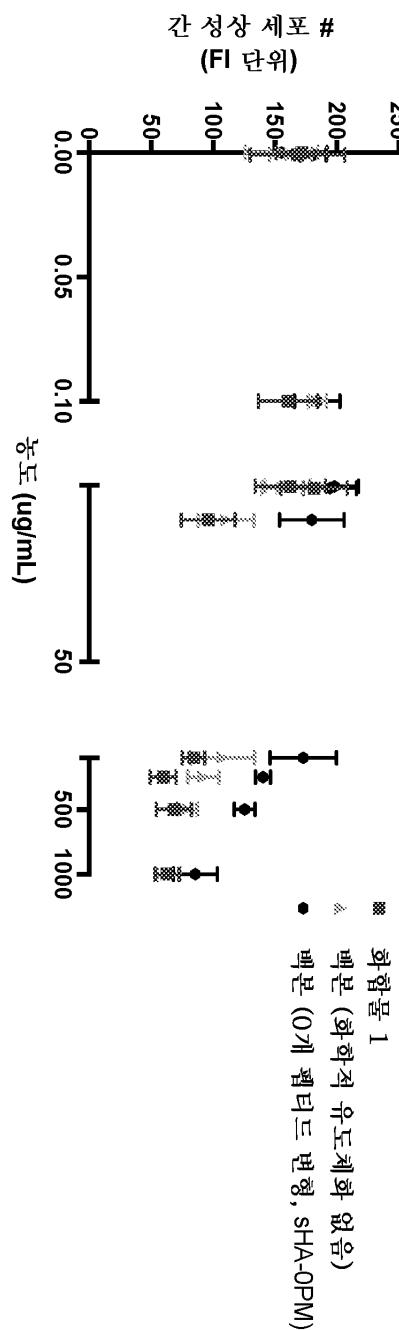
도면17



## 도면18



## 도면19



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; SYMIC IP, LLC

&lt;120&gt; BIOCONJUGATES WITH CHEMICALLY MODIFIED BACKBONES

&lt;130&gt; 38FE-253694-WO

&lt;140&gt; PCT/US2018/041280

&lt;141&gt; 2018-07-09

<150> 62/530,066

<151> 2017-07-07

<160> 85

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 1

Arg Arg Ala Asn Ala Ala Leu Lys Ala Gly Glu Leu Tyr Lys Ser Ile

1

5

10

15

Leu Tyr

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 2

Gly Glu Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr

1

5

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 3

Arg Arg Ala Asn Ala Ala Leu Lys Ala Gly Glu Leu Tyr Lys Cys Ile

1

5

10

15

Leu Tyr

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 4

Gly Glu Leu Tyr Lys Cys Ile Leu Tyr

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 5

Arg Leu Asp Gly Asn Glu Ile Lys Arg

1 5

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 6

Ala His Glu Glu Ile Ser Thr Thr Asn Glu Gly Val Met

1 5 10

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 7

Asn Gly Val Phe Lys Tyr Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Tyr Lys His Ala

1

5

10

15

Tyr Phe Tyr Pro Pro Leu Lys Arg Phe Pro Val Gln

20

25

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 8

Cys Gln Asp Ser Glu Thr Arg Thr Phe Tyr

1

5

10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 9

Thr Lys Lys Thr Leu Arg Thr

1

5

<210> 10

<211> 28

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 10

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

1

5

10

15

Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr Ser His Met

20 25

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 11

Ser Gln Asn Pro Val Gln Pro

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 12

Ser Tyr Ile Arg Ile Ala Asp Thr Asn Ile Thr

1 5 10

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 13

Lys Glu Leu Asn Leu Val Tyr Thr

1 5

<210> 14

<211> 4

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 14

Gly Ser Ile Thr

1

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 15

Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val

1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 16

Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr

1 5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 17

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

1 5 10 15

Arg

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

&lt;400&gt; 18

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

1 5 10 15

Leu Tyr

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

&lt;400&gt; 19

Thr Leu Thr Tyr Thr Trp Ser

1 5

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

&lt;400&gt; 20

Thr Leu Thr Tyr Thr Trp Ser Gly Ser Gly

1 5 10

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 21

Lys Leu Trp Val Leu Pro Lys

1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 22

Trp Arg Glu Pro Ser Phe Cys Ala Leu Ser

1 5 10

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Beta-Alanine

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Biphenylalanine

<400> 23

Ala Trp His Cys Thr Thr Lys Phe Pro His His Tyr Cys Leu Tyr Xaa

1 5 10 15

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Beta-Alanine

<220><221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> Biphenylalanine

<400> 24

Ala His Lys Cys Pro Trp His Leu Tyr Thr Thr His Tyr Cys Phe Thr

1                   5                   10                   15

Xaa

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Beta-Alanine

<400> 25

Ala His Lys Cys Pro Trp His Leu Tyr Thr His Tyr Cys Phe Thr

1                   5                   10                   15

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 4-Hydroxyproline

<400> 26

Gly Arg Pro Gly Glu Arg

1 5

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 4-Hydroxyproline

<400> 27

Gly Met Pro Gly Glu Arg

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 4-Hydroxyproline

<400> 28

Gly Leu Pro Gly Glu Asn

1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (3)..(3)

&lt;223&gt; 4-Hydroxyproline

&lt;400&gt; 29

Gly Leu Pro Gly Glu Arg

1 5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

&lt;400&gt; 30

Gly Leu Lys Gly Glu Asn

1 5

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (3)..(3)

&lt;223&gt; 4-Hydroxyproline

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (12)..(12)

&lt;223&gt; 4-Hydroxyproline

&lt;400&gt; 31

Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Glu Gly Pro Pro Gly Pro Ala

1 5 10 15

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 32

His Val Trp Met Gln Ala Pro Gly Gly Gly Lys

1 5 10

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 33

Trp Tyr Arg Gly Arg Leu

1 5

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 34

Trp Thr Cys Ser Gly Asp Glu Tyr Thr Trp His Cys

1 5 10

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 35

Trp Thr Cys Val Gly Asp His Lys Thr Trp Lys Cys

1 5 10

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 36

Gln Trp His Cys Thr Thr Arg Phe Pro His His Tyr Cys Leu Tyr Gly

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

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 37

Ser Thr Trp Thr Trp Asn Gly Ser Ala Trp Thr Trp Asn Glu Gly Gly

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

Lys

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 38

Ser Thr Trp Thr Trp Asn Gly Thr Asn Trp Thr Arg Asn Asp Gly Gly

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

Lys

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 39

Cys Val Trp Leu Trp Glu Gln Cys

1 5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 40

Cys Val Trp Leu Trp Glu Asn Cys

1 5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 41

Cys Met Thr Ser Pro Trp Arg Cys

1 5

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 42

Cys Pro Gly Arg Val Met His Gly Leu His Leu Gly Asp Asp Glu Gly

1 5 10 15

Pro Cys

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 43

Lys Leu Trp Leu Leu Pro Lys

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 44

Leu Ser Glu Leu Arg Leu His Glu Asn

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 45

Leu Thr Glu Leu His Leu Asp Asn Asn

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 46

Leu Ser Glu Leu Arg Leu His Asn Asn

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 47

Leu Ser Glu Leu Arg Leu His Ala Asn

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 48

Leu Arg Glu Leu His Leu Asn Asn Asn

1 5

<210> 49

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 49

Arg Arg Ala Asn Ala Ala Leu Lys Ala Gly Glu Leu Tyr Lys Ser Ile

1 5 10 15

Leu Tyr Gly Cys

20

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

&lt;400&gt; 50

Met Ile Val Ile Glu Leu Gly Thr Asn Pro Leu Lys Ser Ser Gly Ile

1 5 10 15

Glu Asn Gly Ala Phe Gln Gly Met Lys Lys

20 25

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

&lt;400&gt; 51

Lys Glu Leu Asn Leu Val Tyr

1 5

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

&lt;400&gt; 52

Asp Ala Arg Lys Ser Glu Val Gln Lys

1 5

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 53

His Val Trp Met Gln Ala Pro

1 5

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 54

His Trp Gly Ser Leu Arg Ala

1 5

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> Biphenylalanine

<400> 55

Gly Lys Trp His Cys Thr Thr Lys Phe Pro His His Tyr Cys Leu Tyr

1 5 10 15

Xaa

<210> 56

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 56

Arg Val Met His Gly Leu His Leu Gly Asp Asp Glu

1 5 10

<210> 57

<211> 12

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(12)

<223> D-amino acid

<400> 57

Glu Asp Asp Gly Leu His Leu Gly His Met Val Arg

1 5 10

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 58

Arg Val Met His Gly Leu His Leu Gly Asn Asn Gln

1 5 10

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(12)

<223> D-amino acid

&lt;400&gt; 59

Gln Asn Asn Gly Leu His Leu Gly His Met Val Arg

1 5 10

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

&lt;400&gt; 60

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

1 5 10

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

&lt;400&gt; 61

Gly Ser Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

&lt;400&gt; 62

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

1 5 10

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt;

&gt; PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 63

Lys Gln Leu Asn Leu Val Tyr Thr

1 5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 64

Cys Val Trp Leu Trp Gln Gln Cys

1 5

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 65

Trp Arg Glu Pro Ser Phe Ser Ala Leu Ser

1 5 10

<210> 66

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 66

Gly His Arg Pro Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg

1 5 10 15

Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg

20 25

<210> 67

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 67

Gly His Arg Pro Leu Asn Lys Lys Arg Gln Gln Ala Pro Ser Leu Arg

1 5 10 15

Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg

20 25

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 68

Ser Ile Leu Tyr

1

<210> 69

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 69

Arg Arg Ala Asn Ala Ala Leu Lys Ala Gly Glu Leu Tyr Lys Ser Ile

1 5 10 15

Leu Tyr Gly Ser Gly

20

<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 70

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 71

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 72

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 72

Gly Ser Gly Cys

1

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<

<400> 73

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 74

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 74

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 75

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 75

Gly Ser Gly Arg Arg

1 5

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 76

Gly Ser Gly Ser Arg Arg

1 5

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 77

Gly Ser Gly Ser Gly Arg Arg

1 5

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 78

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg

1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> This region may encompass 0-5 residues

<400> 79

Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Gly

1 5

<210> 80

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 80

Lys Gly Ser Gly

1

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

&lt;400&gt; 81

Gly Ser Gly Lys Arg Arg Gly Ser Gly

1 5

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

&lt;400&gt; 82

Lys Lys Gly Ser Gly

1 5

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

&lt;400&gt; 83

Lys Lys Lys Gly Ser Gly

1 5

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 84

Gly Glu Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr Gly Ser Gly

1                    5                    10

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 85

Lys Arg Arg Gly Ser Gly

1                    5