(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0148963
(43) 공개일자 2024년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/61 (2017.01) *A61K 47/64* (2017.01)
A61P 43/00 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/61 (2017.08)
A61K 47/64 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2024-7033020(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년07월09일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7002774
원출원일자(국제) 2018년07월09일
심사청구일자 2021년07월01일
(85) 번역문제출일자 2024년10월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/041259
(87) 국제공개번호 WO 2019/010484
국제공개일자 2019년01월10일
(30) 우선권주장
62/530,047 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
첸, 줄리아
미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 홀턴 스트리트 5980 스위트 600 시믹 바이오, 인크. 내
사하, 샤르미스타
미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 홀턴 스트리트 5980 스위트 600 시믹 바이오, 인크. 내
(74) 대리인
양영준, 이상남

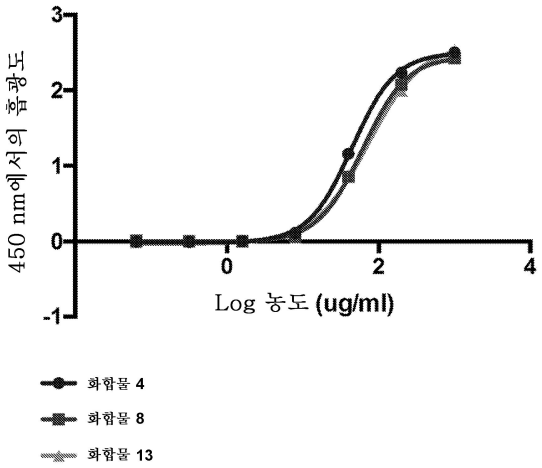
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **합성 생체접합체**

(57) 요 약

백본, 및 스페이서를 통해 그에 공유 결합되는 적어도 1개의 콜라겐-결합 단위를 갖는 적어도 1개의 분지형 또는 비분지형 펩티드를 포함하는 생체접합체 및 그의 사용 방법이 본원에 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 43/00 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
C07K 14/001 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

치료 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. §119(e) 하에 2017년 7월 7일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/530,047의 이익을 주장하며, 이의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 백본, 및 스페이서를 통해 그에 공유 결합되는 적어도 1개의 콜라겐-결합 단위를 갖는 적어도 1개의 분지형 또는 비분지형 펩티드를 포함하는 생체접합체가 본원에 제공된다.

배 경 기 술

[0005] 조직에서, 세포는 다양한 거대분자, 예컨대 생체접합체, 콜라겐, 히알루론산, 라미닌, 피브로넥틴 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, 및 일부 질환 상태에서는, 신체의 특정 영역에서 (예를 들어, 활막 관절, 유리체액, 척추 디스크, 피부 등에서) 세포외 매트릭스가 분해되어 원치않는 증상, 예컨대 다양한 형태의 관절염, 시각 상실 등을 유발할 수 있다. 또한, 일부 조직 손상, 예컨대 혈관 손상, 각막 손상 및 피부 상처는 콜라겐을 포함한 세포외 매트릭스 및/또는 그의 성분의 노출을 발생시킨다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 미국 특허출원 공개공보 제2016-0129076호(2016.05.12)

(특허문헌 0002) 미국 특허출원 공개공보 제2018-0030091호(2018.02.01)

(특허문헌 0003) 미국 특허출원 공개공보 제2020-0078469호(2020.03.12)

발명의 내용

[0007] 놀랍게도, 글리칸과 펩티드 사이에 특정 연결을 갖는 생체접합체가 특정 펩티드의 그의 표적에 대한 결합을 증가시키는 것으로 발견되었다. 또한, 분지형 펩티드를 갖는 것이 결합을 개선시키는 것으로 발견되었다. 구체적으로, 특정 스페이서를 갖는 생체접합체는 증진된 콜라겐 결합 활성을 제공하였다.

[0008] 본 개시내용은 글리칸 및 그에 공유 결합된 적어도 1개의 화학식 (I)의 결합 단위(들):

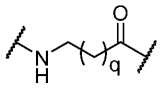
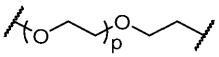
$$((X^1)_mX^2)_nX^3\text{-}L$$

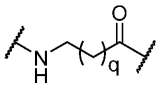
[0009] (I)

[0010] 를 포함하는 생체접합체를 제공하며,

[0011] 여기서

[0012] X^1은 콜라겐-결합 단위를 포함하는 아미노산 서열이고;

[0013] X^2 및 X^3은 독립적으로 부재하거나, 1 내지 15개의 아미노산을 갖는 아미노산 서열이거나; 또는 모이어티  또는  이고, 여기서 p 및 q는 각각 독립적으로 1 내지 10의 정수이고;

[0014] L은 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 및 리신 (K)으로 이루어진 군으로부터 선택된 5 내지 20개의 아미노산의 스페이서이거나, 또는 모이어티  이고, 단 L은 글리칸으로부터 처음 5개의 아미노산 내에 적어도 2개의 아르기닌 (R)을 포함하고, 여기서 L은 추가로 펩티드를 글리칸에 공유 결합시키는 임의적인 연결 모이어티를 포함하고;

[0015] m은 1 또는 2이고;

[0016] n은 1 또는 2이다.

[0017] 한 실시양태에서, L은 GSGKRRGSG (서열식별번호(SEQ ID NO):)가 아니다.

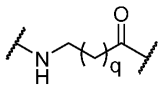
[0018] 한 실시양태에서, X^1은 펩티드의 N-말단에 존재하고, X^3은 펩티드의 C-말단에 존재한다.

[0019] 한 실시양태에서, 화학식 (I)은 RRRKKIQGRSKR (서열식별번호:) 또는 RRGGRKWGSFEG (서열식별번호:)가 아니다.

[0020] 한 실시양태에서, 연결 모이어티는 -NHNH-이다.

[0021] 한 실시양태에서, 하기 화학식의 관능화된 펩티드가 제공되며:

[0022] $L\text{-}NHNH_2$

[0023] 여기서 L은 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 및 리신 (K)으로 이루어진 군으로부터 선택된 5 내지 20개의 아미노산의 스페이서이거나, 또는 모이어티  이고, 단 L은 $-NHNH_2$ 모이어티로부터 처음 5개의 아미노산 내에 적어도 2개의 아르기닌 (R)을 포함한다.

[0024] 한 실시양태에서, L은 -GSGSGSRR-NHNH- (서열식별번호:)이다. 또한, GSGSGSRR (서열식별번호:)을 포함하는 펩티드가 제공된다.

[0025] 본 개시내용은 또한 화학식 (II)의 결합 단위를 제공하며:

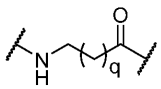
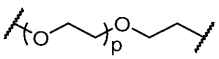
$$((X^1)_mX^2)_nX^3\text{-}L$$

(II)

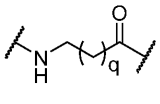
[0026]

[0027] 여기서

[0028] X^1은 콜라겐-결합 단위를 포함하는 아미노산 서열이고;

[0029] X^2 및 X^3은 독립적으로 부재하거나, 1 내지 15개의 아미노산을 갖는 아미노산 서열이거나; 또는 모이어티  또는  이고, 여기서 p 및 q는 각각 독립적으로 1 내지 10의 정수이고;

[0030] L은 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 및 리신 (K)으로 이루어진 군으로부터 선택된 5 내지 20개의 아미노

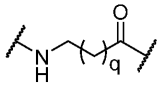
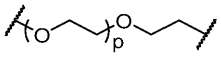
산의 스페이서이거나, 또는 모이어티  이고, 단 L은 말단으로부터 처음 5개의 아미노산 내에 적어도 2개의 아르기닌 (R)을 포함하고, 여기서 L은 추가로 임의적인 연결 모이어티를 포함하고;

[0031] m은 1 또는 2이고;

[0032] n은 1 또는 2이고;

[0033] 단 화학식 (II)는 RRRKKIQGRSKR (서열식별번호:) 또는 RRGGRKWGSFEG (서열식별번호:)가 아니다.

[0034] 특정 실시양태에서, m은 1이고 n은 2이다. 특정 실시양태에서, m은 2이고 n은 1이다. 특정 실시양태에서, m은 2이고 n은 2이다.

[0035] 특정 실시양태에서, X^2 및 X^3은 독립적으로 부재하거나, 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 및 리신 (K)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 15개의 아미노산을 갖는 아미노산 서열이거나, 또는 모이어티  또는  이고, 여기서 p 및 q는 각각 독립적으로 1 내지 10의 정수이다. 특정 실시양태에서, X^2 및 X^3은 독립적으로 부재하거나 또는 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 및 리신 (K)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 15개의 아미노산을 갖는 아미노산 서열이다.

[0036] 특정 실시양태에서, m 및/또는 n이 1 이외의 것인 경우, X^2 및 X^3 중 적어도 1개는 적어도 1개의 아르기닌 (R) 또는 리신 (K)을 포함한다. 특정 실시양태에서, m 및/또는 n이 1 이외의 것인 경우, X^2 및 X^3은 아르기닌 (R) 또는 리신 (K)을 포함하지 않는다.

[0037] 특정 실시양태에서, L은 히드라지드를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0038] 본 개시내용의 특정 측면은 첨부 도면에서 볼 수 있다. 다음이 포함된다:

도 1은 생체접합체 화합물 4, 화합물 8, 및 화합물 13에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다.

도 2는 생체접합체 화합물 4 및 화합물 12에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다.

도 3은 생체접합체 화합물 4 및 화합물 14에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다.

도 4는 생체접합체 화합물 4, 화합물 8, 및 화합물 11에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다.

도 5는 생체접합체 화합물 4, 화합물 9, 및 화합물 10에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다.

도 6은 도 1-5의 생체접합체 중 일부에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여주고, 도 7은 상응하는 EC_{50} 값을 비교한 막대 그래프를 보여준다.

도 8은 생체접합체 화합물 4 및 화합물 11에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다.

도 9는 화합물 16, 화합물 17, 및 화합물 18에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다.

도 10은 생체접합체 화합물 18 및 화합물 19에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다.

도 11은 화합물 20, 화합물 4, 화합물 5, 및 화합물 3에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다.

도 12, 패널 A 및 B는 화합물 1 (패널 A)과 비교하여, 콜라겐에 대한 혈소판 결합에 대한 화합물 10 (패널 B)의 효과를 보여준다.

도 13은 비히클 및 텔미사르탄과 비교하여, 시리우스 레드에 의해 화합물 10을 조직학적으로 측정한 바와 같은, 간에서의 콜라겐 함량을 보여준다.

도 14는 신장 및 방광에서의 형광 표지된 분자의 분포를 보여주는 IVIS 영상을 보여준다. 상부 영상은 IV 주사 5분 후에 취하였고, 하부 영상은 주사 1시간 후에 취하였다. 좌측 영상은 마우스의 복측이고, 우측 영상은 배

측이다.

도 15는 콜라겐 결합 서열 GQLYKSILY (서열식별번호:)에 대한 글리칸 (GAG)으로부터 제1 아르기닌 잔기의 배치의 효과를 보여준다.

도 16은 GQLYKSILY (서열식별번호:) 콜라겐 결합 도메인에 부착된 경우 콜라겐 결합에 대한 스페이서 길이의 효과를 보여준다.

도 17은 GQLYKSILY (서열식별번호:) 콜라겐 결합 도메인에서의 콜라겐 결합에 대한 아미노산 서열 변화의 효과를 보여준다. (A)는 아르기닌 잔기를 리신 또는 D-아르기닌으로 대체한 효과를 보여준다. (B)는 GQLYKSILYGSGSGSRR (서열식별번호:)과 비교하여 GSGSGSRR (서열식별번호:) 스페이서의 콜라겐 결합 친화도를 보여준다. (C)는 스페이서 내에 특정 서열 또는 화학물질을 삽입한 효과를 보여준다. PAPAPRR (서열식별번호:)은 프롤린-알라닌-프롤린-알라닌-프롤린-아르기닌-아르기닌이고, AhxRR은 6-아미노헥산산-아르기닌-아르기닌이고, PEG6RR은 (폴리에틸렌 글리콜)$_6$-아르기닌-아르기닌이고, ahxRRAhx는 6-아미노헥산산-아르기닌-아르기닌-6-아미노헥산산이다.

도 18은 스페이서를 갖지 않는 결합 서열 및 대조군으로서 스페이서 서열과 비교하여 최적화된 스페이서 서열을 갖는 GQLYKSILY (서열식별번호:) 결합 서열의 제2 콜라겐 결합 검정을 보여준다.

도 19는 콜라겐 결합 도메인 WREPSFSALS (서열식별번호:), vWF-2x에 GSGSGSRR (서열식별번호:) 스페이서 서열을 부가한 효과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 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.

[0040] 1. 정의

[0041] 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, "펩티드"에 대한 기재는 다수의 펩티드들을 포함한다.

[0042] 본원에 사용된 하기 용어 및 약어는 하기 의미를 갖는다.

BMPH	N-β-말레이미도프로피온산 히드라지드
DCC	N,N'-디시클로헥실카르보디이미드
DIC	N,N'-디이소프로필카르보디이미드
EDC	1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드
BMC	N-t-부틸-N-메틸카르보디이미드
BEC	N-t-부틸-N-에틸카르보디이미드
BDDC	1,3-비스(2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-일메틸)카르보디이미드
HFA	헥사플루오로아세톤
CDI	카르보닐디이미다졸
HOBt	히드록시벤조트리아졸
PyBOP	벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트
HOAt	1-히드록시-7-아자벤조트리아졸
TBTU	O-(벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트.
HOSu	N-히드록시숙신이미드
Hep	헤파린
DNA	데옥시리보핵산
EDTA	에틸렌디아민테트라아세트산
ELISA	효소-연결 면역흡착 검정
FGF	섬유모세포 성장 인자

[0043]

HEPES	2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일]에탄술폰산
HLB	친수성/친지성/평형
ITC	등온 적정 열량계
kDa	킬로달톤
GAG	글리코사미노글리칸
MES	2-에탄술폰산
ESRD	말기 신질환
K_d	해리 상수
vWF	폰 빌레브란트 인자
MMP	매트릭스 메탈로프로테이나제 효소
CVs	칼럼 부피
TMP	트리메틸 포스페이트
PF-4	혈소판 인자 4
BSA	소 혈청 알부민
DG	탈이온수
PEGDA	폴리에틸렌 글리콜 디아크릴레이트
MOPS	3-(N-모르폴리노)프로판술폰산
PBS	포스페이트 완충 염수
PIPES	피페라진-N,N′-비스(2-에탄술폰산)
SPR	표면 플라즈몬 공명
TAPS	3-[[1,3-디히드록시-2-(히드록시메틸)프로판-2-일]아미노]프로판-1-술폰산
TES	2-[[1,3-디히드록시-2-(히드록시메틸)프로판-2-일]아미노]에탄술폰산
Tris	2-아미노-2-히드록시메틸-프로판-1,3-디올
w/w	중량/중량
w/v	중량/부피
EC50	반수-최대 반응을 도출하는데 필요한 농도

[0044]

[0045]

[0046] 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 물

질적으로 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.

[0047] 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.

[0048] 본원에 사용된 용어 "생체접합체", "펩티도글리칸", 및 "프로테오글리칸", 및 "합성 프로테오글리칸"은 상호교환가능하게 사용되고, 글리칸 및 그에 공유 결합된 하나 이상의 펩티드를 포함하는 합성 접합체를 지칭한다. 글리칸 부분은 합성적으로 제조되거나 또는 동물 공급원으로부터 유래될 수 있다. 펩티드는 특정 실시양태에서 히드라지드-카르보닐 연결 (즉, -C(O)-NH-NH-C(O)-)을 통해 글리칸에 공유 결합된다. 특정 실시양태에서, 히드라지드-카르보닐 연결은 펩티드의 말단 히드라지드 기와 글리칸의 카르보닐 기 사이에 있다. 다른 실시양태에서, 히드라지드-카르보닐 연결은 펩티드의 말단 카르보닐 기와 글리칸의 히드라지드 기 사이에 있다. 일부 실시양태에서, 용어 생체접합체는 펩티도글리칸을 포함한다.

[0049] 본원에 사용된 용어 "글리칸"은 글리코시드에 의해 연결된 수많은 모노사카라이드를 갖는 화합물을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 우론산과 교대 방식으로 연결된 2-아미노당을 포함하고 헤파린, 헤파란 술페이트, 콘드로이틴, 케라틴 및 더마탄과 같은 중합체를 포함하는 글리코사미노글리칸 (GAG)이다. 따라서, 본원에 기재된 실시양태에 사용될 수 있는 글리칸의 비제한적 예는 알기네이트, 아가로스, 덱스트란, 덱스트란 술페이트, 콘드로이틴, 콘드로이틴 술페이트 (CS), 더마탄, 더마탄 술페이트 (DS), 헤파란 술페이트, 헤파린 (Hep), 케라틴, 케라탄 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. 일부 실시양태에서, 글리칸은 변형되지 않는다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 산화적으로 절단된 사카라이드 고리를 함유하지 않고, 따라서 알데히드 관능기를 함유하지 않고 함유하지 않았다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 유도체화된다.

[0050] 본원에 사용된 용어 "유도체화된 글리칸"은 글리칸의 유도체를 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 유도체화된 글리칸은 하나 이상의 화학적 유도체화, 예컨대 비제한적으로, 부분적으로 N-탈황산화된 유도체, 부분적으로 O-탈황산화된 유도체 및/또는 부분적으로 O-카르복시메틸화된 유도체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 사용된 용어 "헤파린"은 헤파린 및 그의 유도체, 예컨대 비제한적으로, 부분적으로 N- 및/또는 부분적으로 O-탈황산화된 헤파린 유도체, 부분적으로 O-카르복시메틸화된 헤파린 유도체, 또는 그의 조합을 포함하는 것으로 의도된다. 특정 실시양태에서, 헤파린은 비-산화된 헤파린이고 (즉, 산화적으로 절단된 사카라이드 고리를 함유하지 않음), 알데히드 관능기를 함유하지 않는다.

[0051] 본원에 사용된 용어 "결합된" 및 "공유 결합된"은 상호교환가능하게 사용될 수 있고, 2개의 원자에 의해 하나 이상의 전자쌍을 공유하는 것을 지칭한다.

[0052] 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, 파지 디스플레이, 친화성 크로마토그래피, 레올로지 또는 면역조직화학을 이용하여 검출될 수 있는 분자간 상호작용을 포함하는 것으로 의도된다. 상기 용어는 또한 분자간 "결합" 상호작용을 포함하는 것으로 의도된다. 결합은 "직접적" 또는 "간접적"일 수 있다. "직접적" 결합은 분자간의 직접적인 물리적 접촉을 포함한다. 분자간의 "간접적" 결합은 하나 이상의 분자와 직접적인 물리적 접촉을 동시에 갖는 분자를 포함한다. 이 결합은 상호작용 분자를 포함하는 "복합체"를 형성할 수 있다. "복합체"는 공유 또는 비공유 결합, 상호작용 또는 힘에 의해 함께 유지되는 2개 이상의 분자의 결합을 지칭한다.

[0053] 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.

[0054] 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. 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.

[0055] 본원에 사용된 용어 "용액"은 관련 기술분야에 널리 공지된 용액, 현탁액, 에멀젼, 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.

[0056] 본원에 사용된 용어 "중합체", "중합체 매트릭스" 또는 "중합체 작용제"는 생체적합성 중합체 물질을 지칭한다. 본원에 기재된 중합체 물질은 예를 들어 당 (예컨대 만니톨), 펩티드, 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 다른 중합체 작용제, 천연 및 합성 둘 다를 포함할 수 있다.

[0057] 특정 실시양태에서, 중합체 매트릭스는 흡수성이며, 예컨대 예를 들어 콜라겐, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 폴리디옥사논 및 카프로락톤이다. 본원에 사용된 용어 "흡수성"은 물질이 신체에 흡수되는 능력을 지칭한다. 다른 실시양태에서, 중합체는 비흡수성이며, 예컨대 예를 들어 폴리프로필렌, 폴리에스테르 또는 나일론이다.

[0058] 본원에 사용된 용어 "pH 완충제"는 소량의 산 또는 염기를 첨가하였을 때 pH 변화에 저항하는 수성 완충제 용액을 지칭한다. pH 완충 용액은 전형적으로 약산 및 그의 짝염기의 혼합물 또는 그 반대의 경우를 포함한다. 예를 들어, pH 완충 용액은 인산염, 예컨대 인산나트륨, 인산이수소나트륨, 인산이수소나트륨 2수화물, 인산수소이나트륨, 인산수소이나트륨 12수화물, 인산칼륨, 인산이수소칼륨 및 인산수소이칼륨; 붕산 및 붕산염, 예컨대, 붕산나트륨 및 붕산칼륨; 시트르산 및 시트르산염, 예컨대 시트르산나트륨 및 시트르산이나트륨; 아세트산염, 예컨대 아세트산나트륨 및 아세트산칼륨; 탄산염, 예컨대 탄산나트륨 및 탄산수소나트륨 등을 포함할 수 있다. pH 조정제는 예를 들어 산, 예컨대 염산, 락트산, 시트르산, 인산 및 아세트산, 및 알칼리성 염기, 예컨대 수산화나트륨, 수산화칼륨, 탄산나트륨 및 탄산수소나트륨 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, pH 완충제는 포스페이트 완충 염수 (PBS) 용액이다 (즉, 인산나트륨, 염화나트륨 및 일부 제제에서는 염화칼륨 및 인산칼륨을 함유함).

[0059] 본원에 사용된 용어 "펩티드" 및 "펩티드 서열"은 펩티드 (또는 아미드) 결합에 의해 연결된 아미노산의 선형 또는 분지형 쇄를 지칭하는 것으로 의도된다. 한 실시양태에서, 펩티드는 약 3 내지 약 120개 아미노산, 또는 약 3 내지 약 110개 아미노산, 또는 약 3 내지 약 100개 아미노산, 또는 약 3 내지 약 90개 아미노산, 또는 약 3 내지 약 80개 아미노산, 또는 약 3 내지 약 70개 아미노산, 또는 약 3 내지 약 60개 아미노산, 또는 약 3 내지 약 50개 아미노산, 또는 약 3 내지 약 40개 아미노산, 또는 약 5 내지 약 120개 아미노산, 또는 약 5 내지 약 100개 아미노산, 또는 약 5 내지 약 90개 아미노산, 또는 약 5 내지 약 80개 아미노산, 또는 약 5 내지 약 70개 아미노산, 또는 약 5 내지 약 60개 아미노산, 또는 약 5 내지 약 50개 아미노산, 또는 약 5 내지 약 40개 아미노산, 또는 약 5 내지 약 30개 아미노산, 또는 약 5 내지 약 20개 아미노산, 또는 약 5 내지 약 10개 아미노산을 포함한다.

[0060] 본원에 기재된 다양한 실시양태에서, 펩티드는 결합 단위에 1개 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 것에 의해 변형될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 바와 같이, 펩티드 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, 펩티드의 활성을 유의하게 변경시키지 않을 것이다. 비보존적 치환이 또한 가능하며, 단 이는 펩티드의 결합 활성에 실질적으로 영향을 미치지 않는다.

[0061] 본원에 사용된 용어 "서열 동일성"은 2개의 펩티드 사이의 또는 2개의 핵산 분자 사이의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 동일성의 수준을 지칭한다. 비교되는 서열에서 소정 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의해 점유된 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다. 펩티드 (또는 폴리펩티드 또는 펩티드 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 적어

도 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 잔기 또는 뉴클레오티드의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환, 결실 또는 부가를 갖는 서열을 포함한다. 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.

[0062] 관련 기술분야에 널리 공지된 바와 같이, 아미노산의 "보존적 치환" 또는 펩티드의 "보존적 치환 변이체"는 1) 펩티드의 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.

[0063] 표 1

하기 아미노산을	하기로 대체함
알라닌	D-Ala, Gly, Aib, β-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, β-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

[0064]

[0065] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 서열은 1개 이상의 글루탐산 잔기(들)를 글루타민으로 및/또는 1개 이상의 아스파르트산 잔기(들)를 아스파라긴으로 대체하도록 변형될 수 있다.

[0066] 콜라겐-결합 단위

[0067] 본원에 사용된 용어 "콜라겐-결합 단위"는 콜라겐에 결합하는 펩티드 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, 펩티드는 콜라겐 상에서 펩티드가 결합하는 관능기를 함유하는 임의의 종과 상호작용할 것이다. 펩티드는 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, 펩티드, 또는 펩티드의 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 (K_d)로 콜라겐에 결합한다. 특정 실시양태에서, 콜라겐-결합 단위는 최대 약 120개의 아미노산을 포함한다.

[0068] 펩티드는 콜라겐 원섬유발생에 정상적으로 수반되는 또는 정상적으로 수반되지 않는 단백질의 일부와 아미노산 상동성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 이들 펩티드는 소형 류신-풍부 생체접합체의 아미노산 서열, 혈소판 수용체 서열, 또는 콜라겐 원섬유발생을 조절하는 단백질과 상동성 또는 서열 동일성을 갖는다. 다양한 실시양태에서, 펩티드는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호:), GELYKSILY (서열식별번호:), RRANAALKAGELYKCILY (서열식별번호:), GELYKCILY (서열식별번호:), RRANAALKAGQLYKSILY (서열식별번호:), GQLYKSILY (서열식별번호:), RRANAALKAGQLYKCILY (서열식별번호:), GQLYKCILY (서열식별번호:), RLDGNEIKR (서열식별번호:), AHEEISTTNEGVM (서열식별번호:), NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPLKRFPVQ (서열식별번호:), CQDSETRTFY (서열식별번호:), TKKTLRT (서열식별번호:), GLRSKSKKFRRPDIQYPDATDEDITSHM (서열식별번호:), SQNPVQP (서열식별번호:), SYIRIADTNIT (서열식별번호:), KELNLVYT (서열식별번호:), GSIT (서열식별번호:), GSITTIDVPWNV (서열식별번호:), GQLYKSILY (서열식별번호:), RRANAALKAGQLYKSILY (서열식별번호:), RVMHGLHLGDDE ("GPVI") (서열식별번호:), CRVMHGLHLGDDEC (시클릭 RVMHGLHLGDDE 또는 "cGPVI") (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 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0069] 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, 펩티드는 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.

[0070] 콜라겐-결합 친화도 (또는 콜라겐-결합 도메인/단위)에 대해 펩티드 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 펩티드 서열은 βAWHCTTKFPHHYCLYBip (서열식별번호:), βAHKCPWHLYTTHYCFTBip (서열식별번호:), βAHKCPWHLYTHYCFT (서열식별번호:) 등 (여기서 Bip는 비페닐알라닌이고, βA는 베타-알라닌임) (문헌 [Abd-Elgaliel, W.R., et al., Biopolymers, 2013, 100(2), 167-173] 참조), GROGER (서열식별번호:), GMOGER (서열식별번호:), GLOGEN (서열식별번호:), GLOGER (서열식별번호:), GLKGEN (서열식별번호:), GFOGERGVEGPOGPA (서열식별번호:) 등 (여기서 O는 4-히드록시프롤린임) (문헌 [Raynal, N., et al., J. Biol. Chem., 2006, 281(7), 3821-3831] 참조), HVWMQAPGGGK (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), STWTWNGSAWTWNEGGK (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), CPGRVMHGLHLGDDEGPC (서열식별번호:) (문헌 [Muzzard, J., et al., PLoS one. 4 (e 5585) I- 10] 참조), KLWLLPK (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.

[0071] 본원에 개시된 생체접합체 및 방법에 사용될 수 있는 콜라겐-결합 친화도 (또는 콜라겐-결합 단위)를 갖는 것으로 제시된 추가의 펩티드 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.

[0072] 특정 실시양태에서, 펩티드는 RVMHGLHLGDDE (서열식별번호:), D-아미노산 EDDGLHLGHMVR (서열식별번호:), RVMHGLHLGNNQ (서열식별번호:), D-아미노산 QNNGLHLGHMVR (서열식별번호:), RVMHGLHLGNNQ (서열식별번호:), GQLYKSILYGSG-4K2K (서열식별번호:) (4-분지 펩티드), GSGQLYKSILY (서열식별번호:), GSGGQLYKSILY (서열식별번호:), KQLNLVYT (서열식별번호:), CVWLWQQC (서열식별번호:), WREPSFSALS (서열식별번호:), GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGYR (서열식별번호:), 및 GHRPLNKKRQQAPSLRPAPPPISGGGYR (서열식별번호:)로 이루어진 군으로부터 선택된 1개의 서열을 포함한다.

[0073] 콜라겐-결합 단위와 유사하게, 콜라겐에 대해 선택된 파지 디스플레이 라이브러리로부터 유래된 펩티드 서열이 생성될 수 있다. 펩티드는 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 펩티드 서열 (예를 들어, $SILY_{비오틴}$)일 수 있다. 스트렙타비딘-발색단을 이용하여 용량 반응 결합 곡선을 생성하여, 펩티드가 콜라겐에 결합하는 능력을 결정할 수 있다.

[0074] 한 실시양태에서, 펩티드는 콜라겐 유형 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII 또는 XIV 중 임의의 1개 이상에 결합하는 1개 이상의 콜라겐-결합 단위를 포함한다. 한 실시양태에서, 펩티드는 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 (K_d)로 유형 I 콜라겐에 결합한다. 한 실시양태에서, 펩티드는 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 (K_d)로 유형 II 콜라겐에 결합한다. 한 실시양태에서, 펩티드는 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 (K_d)로 유형 III 콜라겐에 결합한다. 한 실시양태에서, 펩티드는 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 (K_d)로 유형 IV 콜라겐에 결합한다.

[0075] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 서열은 임의의 1개 이상의 아미노산 (예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산)이 그로부터 부가, 결실 또는 치환되도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열은 임의의 1개 이상의 아미노산이 알라닌으로 대체되도록 변형된다. 일부 실시양태에서, 서열은 임의의 1개 이상의 l-아미노산이 상응하는 d-아미노산 스캔으로 대체되도록 변형된다. 일부 실시양태에서, 서열은 임의의 1개 이상의 발린이 류신으로 대체되고/거나, 임의의 1개 이상의 글루탐산이 글루타민으로 대체되고/거나, 임의의 1개 이상의 아스파르트산이 아스파라긴으로 대체되고/거나, 임의의 1개 이상의 아르기닌이 글루타민으로 대체되도록 변형된다.

[0076] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 콜라겐-결합 단위를 갖는 펩티드는 상기 단락에 기재된 임의의 아미노산 서열 또는 이들 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 합성 생체접합체의 펩티드 성분은 1개 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 것에 의해 변형될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 바와 같이, 펩티드 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, 펩티드의 활성을 유의하게 변경시키지 않을 것이다.

[0077] 펩티드는 또한 콜라겐에의 결합에 대한 양성 선택을 이용하여 파지 디스플레이에 의해 선택될 수 있다. 콜라겐-결합 단위는 콜라겐과 그의 상호작용에 의해 결정될 수 있고, 분자 상호작용을 평가하기 위해 사용되는 기술 중 임의의 것 (예컨대, 표면 플라즈몬 공명, ELISA, 경쟁적 결합 검정, 등온 적정 열량측정법, 친화성 크로마토그래피, 레올로지 및/또는 면역조직화학)에 의해 측정될 수 있다. "콜라겐-결합"으로 고려되는 펩티드는, 상호작용이 공지된 화학적 반응성 기로 인한 것이 아니도록 콜라겐 또는 콜라겐-함유 조직과 상호작용할 수 있다. 상호작용은 펩티드의 아미노산 잔기로부터 생성된 소수성 및 전하 상호작용으로 인한 것일 수 있다. 상호작용은 마이크로플레이트 상에 콜라겐을 고정시키고, 콜라겐-결합 단위와 함께 인큐베이션한 후, 발색단을 사용하는

비오틴-아비딘과 같은 검출 기술에 의해 측정할 수 있다. 상호작용은 또한 콜라겐-결합 단위와 함께 또는 콜라겐-결합 단위 또는 단위들을 함유하는 생체접합체와 함께 인큐베이션한 콜라겐-함유 액체, 겔 또는 조직 상에서 기계적 영향에 의해 측정할 수 있다.

[0078] 생체접합체

[0079] 글리칸 및 그에 공유 결합된 적어도 1개의 화학식 (I)의 결합 단위(들):

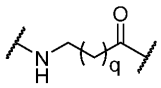
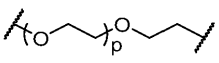
$$((X^1)_mX^2)_nX^3\text{-}L$$

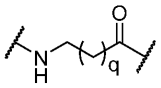
[0080] (I)

[0081] 를 포함하는 생체접합체가 본원에 제공되며,

[0082] 여기서

[0083] X^1은 콜라겐-결합 단위를 포함하는 아미노산 서열이고;

[0084] X^2 및 X^3은 독립적으로 부재하거나, 1 내지 15개의 아미노산을 갖는 아미노산 서열이거나; 또는 모이어티  또는  이고, 여기서 p 및 q는 각각 독립적으로 1 내지 10의 정수이고;

[0085] L은 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 및 리신 (K)으로 이루어진 군으로부터 선택된 3 내지 20개의 아미노산의 스페이서이거나, 또는 모이어티  이고, 단 L은 글리칸으로부터 처음 5개의 아미노산 내에 적어도 2개의 아르기닌 (R)을 포함하고, 여기서 L은 추가로 펩티드를 글리칸에 공유 결합시키는 임의적인 연결 모이어티를 포함하고;

[0086] m은 1 또는 2이고;

[0087] n은 1 또는 2이다.

[0088] 한 실시양태에서, 글리칸 및 그에 공유 결합된 적어도 1개의 화학식 (I)의 결합 단위:

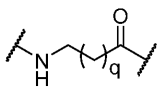
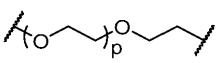
$$((X^1)_mX^2)_nX^3\text{-}L$$

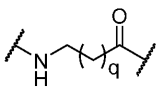
[0089] (I)

[0090] 를 포함하는 생체접합체가 제공되며,

[0091] 여기서

[0092] X^1은 콜라겐-결합 단위를 포함하는 아미노산 서열이고;

[0093] X^2 및 X^3은 독립적으로 부재하거나, 1 내지 15개의 아미노산을 갖는 아미노산 서열이거나; 또는 모이어티  또는  이고, 여기서 p 및 q는 각각 독립적으로 1 내지 10의 정수이고;

[0094] L은 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 및 리신 (K)으로 이루어진 군으로부터 선택된 3 내지 20개의 아미노산의 스페이서이거나, 또는 모이어티  이고, 단 L은 글리칸으로부터 처음 5개의 아미노산 내에 적어도 2개의 아르기닌 (R)을 포함하고, 여기서 L은 추가로 펩티드를 글리칸에 공유 결합시키는 임의적인 연결 모이어티를 포함하고;

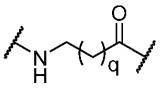
[0095] m은 1 또는 2이고;

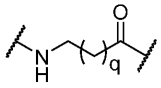
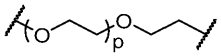
[0096] n은 1 또는 2이다.

[0097] 한 실시양태에서, X^1은 펩티드의 N-말단에 존재하고, X^3은 펩티드의 C-말단에 존재한다.

[0098] 한 실시양태에서, 화학식 (I)은 RRRKKIQGRSKR (서열식별번호:) 또는 RRGGRKWGSFEG (서열식별번호:)가 아니다.

[0099] 특정 실시양태에서, m은 1이고 n은 2이다. 특정 실시양태에서, m은 2이고 n은 1이다. 특정 실시양태에서, m은 2이고 n은 2이다.

[0100] 특정 실시양태에서, L은 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 및 리신 (K)으로 이루어진 군으로부터 선택된 3 내지 20개의 아미노산의 스페이서이거나, 또는 모이어티  이고, 단 L은 말단으로부터 처음 3개의 아미노산 내에 적어도 2개의 아르기닌 (R)을 포함하고, 여기서 L은 추가로 임의적인 연결 모이어티를 포함하는 것으로 고려된다.

[0101] 특정 실시양태에서, X^2 및 X^3은 독립적으로 부재하거나, 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 및 리신 (K)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 15개의 아미노산을 갖는 아미노산 서열이거나, 또는 모이어티  또는  이고, 여기서 p 및 q는 각각 독립적으로 1 내지 10의 정수이다. 특정 실시양태에서, X^2 및 X^3은 독립적으로 부재하거나 또는 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 및 리신 (K)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 15개의 아미노산을 갖는 아미노산 서열이다.

[0102] 특정 실시양태에서, m 및/또는 n이 1 이외의 것인 경우, X^2 및 X^3 중 적어도 1개는 적어도 1개의 아르기닌 (R) 또는 리신 (K)을 포함한다. 특정 실시양태에서, m 및/또는 n이 1 이외의 것인 경우, X^2 및 X^3은 아르기닌 (R) 또는 리신 (K)을 포함하지 않는다.

[0103] 일부 실시양태에서, X^2, X^3과 L은, 집합적으로, 2개 초과의 아르기닌을 포함한다. 일부 실시양태에서, X^3은 2개 이상의 아르기닌을 포함한다. 일부 실시양태에서, L은 2개 초과의 아르기닌을 포함한다.

[0104] 일부 실시양태에서, X^2는 2 내지 5개의 아미노산 길이이고, 여기서 각각의 아미노산은 글리신 및/또는 세린으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서; X^3은 2 내지 5개의 아미노산 길이이고, 여기서 적어도 2개의 아미노산은 독립적으로 아르기닌, 리신, 및/또는 아미드 결합을 형성할 수 있는 측쇄를 갖는 천연 또는 비-천연 아미노산으로부터 선택된다.

[0105] 일부 실시양태에서, X^2는 2 내지 5개의 아미노산이고, 여기서 각각의 아미노산은 글리신 및/또는 세린으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서; X^3은 2 내지 5개의 아미노산이고, 여기서 각각의 아미노산은 글리신 및/또는 세린으로부터 선택된다.

[0106] 일부 실시양태에서, X^2, X^3, 및/또는 L에서 아미노산 잔기의 총수는 6개 이상이다. 일부 실시양태에서, X^2, X^3, 및/또는 L에서 아미노산 잔기의 총수는 8개 이상이다. 일부 실시양태에서, X^2, X^3, 및/또는 L에서 아미노산 잔기의 총수는 6 내지 15개이다.

[0107] 일부 실시양태에서, L은 아미노산 서열 GSGSGSRR (서열식별번호:)을 포함한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 아미노산 서열 GSGSGSRR (서열식별번호:)을 포함하는 아미노산이 제공된다.

[0108] 일부 실시양태에서, L은 아미노산 서열 GSGSRRGS (서열식별번호:)를 포함한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 아미노산 서열 GSGSRRGS (서열식별번호:)를 포함하는 아미노산이 제공된다.

[0109] 일부 실시양태에서, L은 GSGRR (서열식별번호:), GSGSGRR (서열식별번호:), GSGSGSRR (서열식별번호:), GSGSGSGRR (서열식별번호:), GSGSGSGSRR (서열식별번호:), GSGSGSGSGSGRR (서열식별번호:), GSGSGSGSGSGSRR (서열식별번호:), GSGSGSGSGSGSGRR (서열식별번호:), GSRRGS (서열식별번호:), GSGRRGSG (서열식별번호:),

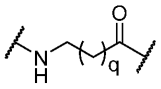
GSGRRRGSG (서열식별번호:), GSGRRR (서열식별번호:), GSGRRRR (서열식별번호:), GSGSGSRRR (서열식별번호:), GSGSGSRRRR (서열식별번호:), GSGSGSRRRRR (서열식별번호:), GSGSGSRRRRRR (서열식별번호:), 및 GSGSGSGSRRR (서열식별번호:)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열이다.

[0110] 또한 글리칸 및 적어도 1개의 화학식 X^1-GSGSGSRR의 결합 단위를 포함하는 생체접합체가 본원에 제공되며, 여기서 X^1은 그에 공유 결합된 콜라겐-결합 단위를 포함하는 아미노산 서열이다.

[0111] 또한 글리칸 및 적어도 1개의 화학식 X^1-GSGSGSRR-NHNH-의 결합 단위를 포함하는 생체접합체가 본원에 제공되며, 여기서 X^1은 그에 공유 결합된 콜라겐-결합 단위를 포함하는 아미노산 서열이다.

[0112] 또한 글리칸 및 적어도 1개의 화학식 X^1-GSGSGSRR의 결합 단위를 포함하는 생체접합체가 본원에 제공되며, 여기서 X^1은 그에 공유 결합된 콜라겐-결합 단위를 포함하는 아미노산 서열이다.

[0113] 또한 글리칸 및 적어도 1개의 화학식 X^1-GSGSGSRR-NHNH-의 결합 단위를 포함하는 생체접합체가 본원에 제공되며, 여기서 X^1은 그에 공유 결합된 콜라겐-결합 단위를 포함하는 아미노산 서열이다.

[0114] 또한 글리칸 및 본원에 기재된 바와 같은 콜라겐-결합 단위를 포함하는 생체접합체가 본원에 제공되며, 여기서 L은 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 및 리신 (K)으로 이루어진 군으로부터 선택된 5 내지 20개의 아미노산의 스페이서이거나, 또는 모이어티 , 또는 양으로 하전된 모이어티이고, 단 L은 글리칸으로부터 처음 5개의 아미노산 내에 적어도 2개의 양으로 하전된 모이어티를 포함하고, 여기서 L은 추가로 펩티드를 글리칸에 공유 결합시키는 임의적인 연결 모이어티를 포함한다.

[0115] 특정 실시양태에서, 펩티드는 아미노산 서열 X^1을 포함하고, 이는 콜라겐-결합 단위, 및 펩티드 (예를 들어, 선형 또는 분지형임) 내의 결합 단위의 수 및 배열 및 글리칸에의 접합에 대한 각각의 결합 단위 및 아미노산 사이의 거리를 제어하기 위한 X^2, X^3, 및 L 중 적어도 1개를 포함한다.

[0116] 특정 실시양태에서, 화학식 (I)은 글리칸에 대한 -C(O)-NH-NH-C(O)- (즉, 히드라지드-카르보닐) 연결을 포함한다. 특정 실시양태에서, L은 히드라지드를 포함한다. -C(O)-NH-NH-C(O)-는 L의 아미노산으로부터의 카르보닐 -C(O)- 기 및/또는 글리칸으로부터의 카르보닐 -C(O)- 기를 포함할 수 있다.

[0117] 특정 실시양태에서, 글리칸 상에 알데히드 결합 부위를 제공하기 위해 글리칸 백본 내의 사카라이드 고리 중 1개 이상을 절단하는 산화 화학을 이용하여 펩티드를 글리칸, 예컨대 더마탄 술페이트에 결합시킨다. 이어서, 알데히드 결합 부위를 사용하여 펩티드에 (예를 들어, -C(O)-NH-N=C 결합을 통해) 접합시켰다.

[0118] 특정 실시양태에서, 펩티드는 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. 이러한 방식으로 결합된 생체접합체에 의해 발휘되는 유익한 효과 (예컨대, 증가된 결합 친화도)는 적어도 부분적으로 산화적으로 절단된 사카라이드 고리를 함유하지 않는 글리칸으로 인한 것일 수 있는 것으로 고려된다.

[0119] 특정 실시양태에서, 생체접합체는 임의의 단일 단량체 단위 또는 단량체 단위의 조합으로 구성되는 중합체 백본 (예를 들어, 글리칸 이외의 생체적합성 중합체)을 포함할 수 있으며, 단 본원에 기재된 바와 같은 펩티드(들)가 그에 공유 결합될 수 있도록 적어도 1개, 및 일부 경우에, 1 내지 약 50개의 적합한 관능기가 존재한다. 중합체는 선형, 분지형이거나, 측쇄 (예를 들어, 1 내지 50개 펩티드 이외에)를 함유할 수 있다. 중합체는 중성, 양이온성, 음이온성 또는 쯔비터이온성일 수 있다. 특정 실시양태에서, 중합체는 당중합체이다. 중합체는 예를 들어 화학식 A-B-A의 블록 공중합체를 포함한 공중합체일 수 있다. 이러한 중합체를 제공하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 리빙 중합을 포함한다. 한 실시양태에서, 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)이다. 또 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)이 아니다. 특정 실시양태에서, 중합체는 글리칸 또는 나노입자가 아니다. 특정 실시양태에서, 중합체는 글리칸이다.

[0120] 본원에 기재된 생체접합체의 특정 실시양태에서, 글리칸은 알기네이트, 콘드로이틴, 더마탄, 더마탄 술페이트, 헤파란, 헤파란 술페이트, 헤파린, 덱스트란, 덱스트란 술페이트, 또는 히알루노난일 수 있다. 한 실시양태에서, 글리칸은 더마탄 술페이트이다. 한 실시양태에서, 글리칸은 더마탄 술페이트가 아니다. 또 다른 실시양태에서, 글리칸은 콘드로이틴 술페이트이다. 또 다른 실시양태에서, 글리칸은 헤파린이다. 약 650-700 Da의 단일 디사카라이드 단위에서부터 약 50 kDa의 글리칸까지 다양한 분자량의 헤파린이 본원에 기재된 생체접합체에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 헤파린은 약 10 내지 약 20 kDa이다. 일부 실시양태에서, 헤파린은 최대 약 15, 또는 약 16, 또는 약 17, 또는 약 18, 또는 약 19, 또는 약 20 kDa이다.

[0121] 한 실시양태에서, 생체접합체는 콜라겐 유형 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII 또는 XIV 중 하나 이상에 결합하는 콜라겐-결합 단위를 갖는 펩티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 콜라겐-결합 단위는 콜라겐과 결합시 원섬유발생을 촉진하거나 억제한다. 한 실시양태에서, 콜라겐-결합 단위는 콜라겐과 결합시 원섬유발생을 촉진하거나 억제하지 않는다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 유형 I 콜라겐에 결합한다. 다른 실시양태에서, 펩티드는 유형 IV 콜라겐에 결합한다. 특정 실시양태에서, 콜라겐에 대해 명시된 결합 친화도를 갖는 1개 이상의 펩티드(들)가 본원에 기재된 생체접합체에 사용될 수 있다. 예를 들어, 합성 생체접합체는 유형 I 콜라겐에 대해 결합 친화도를 갖는 적어도 1개의 펩티드 및 유형 IV 콜라겐에 대해 결합 친화도를 갖는 적어도 1개의 펩티드를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 펩티드는 유형 I 콜라겐에 대해 결합 친화도를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 펩티드는 유형 IV 콜라겐에 대해 결합 친화도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 펩티드는 유형 II 콜라겐에 대해 결합 친화도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 펩티드는 유형 III 콜라겐에 대해 결합 친화도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 펩티드는 1종 초과의 유형의 콜라겐에 결합하고, 여기서 각각의 콜라겐 유형에 대한 상대 친화도는 다를 수 있다. 한 실시양태에서, 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(K_d)로 콜라겐에 결합한다.

[0122] 생체접합체의 목적하는 특성에 따라, 글리칸에 결합되는 결합 단위의 총수가 달라질 수 있다. 특정 실시양태에서, 생체접합체에 존재하는 결합 단위의 총수는 약 1 내지 약 50, 또는 약 1 내지 약 40, 또는 약 1 내지 약 30, 또는 약 1 내지 약 25, 또는 약 2 내지 약 30, 또는 약 2 내지 약 25, 또는 약 3 내지 약 25, 또는 약 4 내지 약 25, 또는 약 5 내지 약 25, 또는 약 5 내지 약 30, 또는 약 1 내지 약 25, 또는 약 2 내지 약 25, 또는 약 11 내지 약 14, 또는 약 1 내지 약 8, 또는 약 1 내지 약 5, 또는 약 1, 또는 약 2, 또는 약 3, 또는 약 4, 또는 약 5, 또는 약 6, 또는 약 7, 또는 약 8개 결합 단위이다. 일부 실시양태에서, 생체접합체는 약 10 내지 약 40개 결합 단위를 포함한다. 다른 실시양태에서, 생체접합체는 약 5 내지 약 30개 결합 단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 20개 미만의 결합 단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 18개 미만의 결합 단위를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 생체접합체는 약 4 내지 약 18개 결합 단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 15개 미만의 결합 단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 10개 미만의 결합 단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 30개 미만의 결합 단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 25개 결합 단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 5 내지 약 40, 또는 약 10 내지 약 40, 또는 약 5 내지 약 20, 또는 약 4 내지 약 18, 또는 약 10, 또는 약 11, 또는 약 18, 또는 약 20개 결합 단위, 또는 약 25개 결합 단위, 또는 약 30개 결합 단위, 또는 약 40개 결합 단위, 또는 약 50개 결합 단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생체접합체는 약 2개 결합 단위, 약 4개 결합 단위, 또는 약 8개 결합 단위를 포함한다.

[0123] 본원에 기재된 결합 단위는 글리칸에의 접합을 위해 히드라지드 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 히드라지드 기는 임의의 적합한 부착 지점, 예컨대 예를 들어 C-말단, N-말단에서 또는 아미노산 상의 측쇄를 통해 결합 단위에 결합할 수 있다. 예를 들어, 결합 단위가 결합 단위의 아미노산의 측쇄를 통해 글리칸에 결합되는 경우, 측쇄는 글루탐산 또는 아스파르트산이다. 히드라지드는 펩티드 서열의 아미노산에 존재하는 카르보닐 기(예를 들어, C-말단 카르보닐 기)에 결합된 히드라진 ($-NHNH_2$) 사이에 형성될 수 있다.

[0124] 특정 실시양태에서, 화학식 (I)의 결합 단위

$$((X^1)_mX^2)_nX^3\text{-}L$$

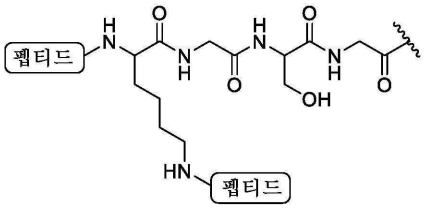
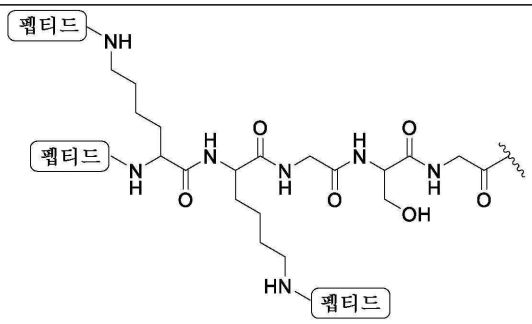
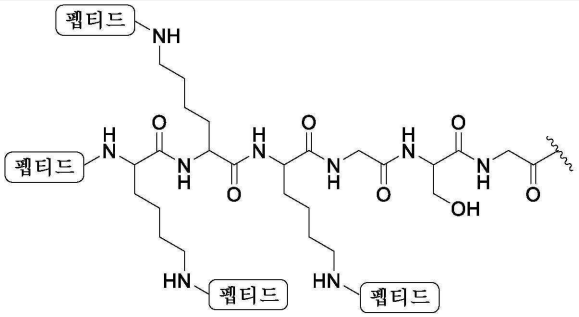
[0125] (I)

[0126] (여기서 X^1 및 L은 본원에 정의된 바와 같음)에 공유 결합된 글리칸을 포함하는 생체접합체는 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 리신 (K), 및 아미드 결합을 형성할 수 있는 측쇄를 갖는 천연 또는 비-천연 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택된 2 내지 약 5개의 아미노산을 포함하는 아미노산 서열 X^2 및/또는 X^3을 포함한다. 예를 들어, X^2 및/또는 X^3은 GS (서열식별번호:), GSG (서열식별번호:), GSGS (서열식별번호:), RG (서열식별번호:), RGS (서열식별번호:), RGSG, RGSGS (서열식별번호:), RR (서열식별번호:), RRG (서열식별번호:), RRS (서열식별번호:), RRGS (서열식별번호:), RRGSG (서열식별번호:), RRGSGS (서열식별번호:), RGR (서열식별번호:), RSR (서열식별번호:), RRR (서열식별번호:) 등과 같은 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

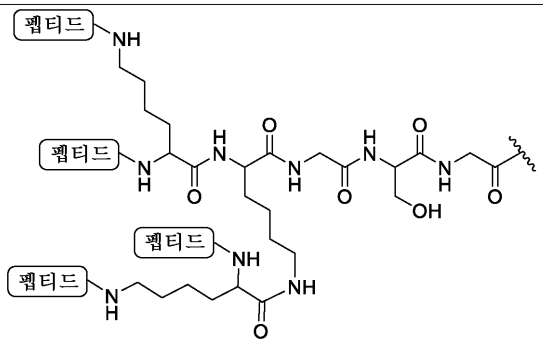
[0127] 특정 실시양태에서, X^2 및/또는 X^3은 1개 초과의 펩티드 서열이 그에 결합되어 분지형 구축물을 생성할 수 있도록 1개 초과의 결합 부위 (선형 또는 분지형일 수 있음)를 포함하는 아미노산 서열이다. 또한, 펩티드가 말단 또는 비-말단 아미노산 모이어티를 통해 글리칸에 결합할 수 있기 때문에, 펩티드가 비-말단 아미노산 모이어티를 통해 글리칸에 결합되는 경우에는 분지형일 것이다. 결합 부위는 동일하거나 상이할 수 있고, 목적하는 펩티드 서열이 (예를 들어 아미드 결합을 통해) 그에 결합할 수 있도록 아민 또는 카르복실산 모이어티와 같은 임의의 적합한 결합 부위일 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, X^2 및/또는 X^3 중 적어도 1개는 1개 이상의 리신, 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기를 함유한다. 예를 들어, X^2 및/또는 X^3 아미노산 서열 예컨대 KGSG (서열식별번호:), KKGSG (서열식별번호:), 또는 KKKGSG (서열식별번호:) 등은 각각 2, 3, 또는 4개의 결합 부위를 제공한다.

[0128] 특정 실시양태에서, X^2 및/또는 X^3은 추가의 펩티드 또는 콜라겐-결합 단위를 연결할 수 있는 측쇄를 함유하는 1개 이상의 아미노산을 포함한다. 이러한 스페이서에 포함되는 예시적인 아미노산은 리신, 글루탐산, 아스파르트산 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, X^2 및/또는 X^3은 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 아미노산 서열의 구체적 예는 KRR, KKK, $(K)_n$GSG, 및 $(KRR)_n$-KGSG를 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 여기서 n은 0 내지 5, 또는 1, 2, 3, 4, 또는 5이다.

[0129] X^2 및/또는 X^3의 개략도를 하기 표에 제시한다.

아미노산 서열	펩티드 수 (즉, 결합 부위)	아미노산 서열의 구조
KGSG	2	
KKGSG	3	
KKKGSG	4	

[0130]

K_2KGSG	4	

[0131]

[0132] 특정 실시양태에서, 히드라지드 기는 펩티드(들) N-말단에 결합된다. 특정 실시양태에서, 히드라지드 기는 펩티드(들) C-말단에 결합된다. 특정 실시양태에서, 히드라지드 기는 펩티드(들)의 아미노산, 예컨대 글루탐산 및/또는 아스파르트산의 측쇄에 결합된다.

[0133] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 글리칸당 펩티드의 수는 평균이며, 조성물 중 특정 생체접합체는 글리칸당 더 많은 펩티드를 가질 수 있고, 특정 생체접합체는 글리칸당 더 적은 펩티드를 갖는다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 펩티드의 수는 생체접합체의 조성물 중에서의 평균이다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 생체접합체는 글리칸당 펩티드의 평균 수가 약 5인 조성물이다. 다른 실시양태에서, 글리칸당 펩티드의 평균 수는 약 6, 또는 약 7, 또는 약 8, 또는 약 9, 또는 약 10, 또는 약 11, 또는 약 12, 또는 약 13, 또는 약 14, 또는 약 15, 또는 약 16, 또는 약 17, 또는 약 18, 또는 약 19, 또는 약 20, 또는 약 25, 또는 약

30이다.

[0134] 특정 실시양태에서, 글리칸당 펩티드의 수는, 글리칸 백본에서 펩티드로 관능화된 디사카라이드 단위의 퍼센트에 기초하여 "퍼센트 (%) 관능화"로 기재될 수 있다. 예를 들어, 글리칸 상에 존재하는 이용가능한 디사카라이드 단위의 총수는, 글리칸의 분자량 (또는 평균 분자량) (예를 들어, 약 25 kDa 내지 최대 약 70 kDa, 또는 심지어 약 100 kDa)을 단일 디사카라이드 단위의 분자량 (예를 들어, 약 550-800 Da, 또는 약 650-750 Da)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, 글리칸의 분자량 (또는 평균 분자량)을 단일 사카라이드 단위의 분자량으로 나누고 2를 곱함으로써 계산할 수 있다.

[0135] 일부 실시양태에서, 글리칸 상에 존재하는 이용가능한 디사카라이드 단위의 수는 약 10 내지 약 80, 또는 약 10 내지 약 70, 또는 약 15 내지 약 70, 또는 약 20 내지 약 70, 또는 약 30 내지 약 70, 또는 약 35 내지 약 70, 또는 약 40 내지 약 70, 또는 약 10 내지 약 75, 또는 약 15 내지 약 75, 또는 약 20 내지 약 75, 또는 약 30 내지 약 75, 또는 약 35 내지 약 75, 또는 약 40 내지 약 75, 또는 약 10 내지 약 50, 또는 약 20 내지 약 50, 또는 약 25 내지 약 50, 또는 약 10 내지 약 35, 또는 약 15 내지 약 35, 또는 약 20 내지 약 35, 또는 약 10 내지 약 30, 또는 약 15 내지 약 30, 또는 약 20 내지 약 30, 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 70이다.

[0136] 따라서, 특정 실시양태에서, 글리칸은 약 1 내지 약 50, 또는 약 5 내지 약 40% 관능화, 또는 약 5 내지 약 30% 관능화, 또는 약 1 내지 약 15% 관능화, 또는 약 1 내지 약 5% 관능화, 또는 약 5 내지 약 15% 관능화, 또는 약 10 내지 약 25% 관능화, 또는 약 25 내지 약 40% 관능화, 또는 약 32% 관능화, 또는 약 25% 관능화, 또는 약 16% 관능화, 또는 약 10% 관능화, 또는 약 8% 관능화, 또는 약 5% 관능화, 또는 약 2.5% 관능화를 포함하며, 여기서 퍼센트 (%) 관능화는 펩티드로 관능화된 글리칸 상의 디사카라이드 단위의 퍼센트에 의해 결정된다. 일부 실시양태에서, 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 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.

[0137] 특정 실시양태에서, 글리칸은 분지형 펩티드로 관능화된다. 일부 실시양태에서 펩티드는 2 내지 4개의 분지를 갖는다. 따라서, 특정 실시양태에서, 글리칸은 약 1 내지 약 50% 관능화, 또는 약 5 내지 약 40% 관능화, 또는 약 5 내지 약 30% 관능화, 또는 약 1 내지 약 15% 관능화, 또는 약 1 내지 약 5% 관능화, 또는 약 5 내지 약 15% 관능화, 또는 약 10 내지 약 25% 관능화, 또는 약 25 내지 약 40% 관능화, 또는 약 2.5% 관능화, 또는 약 5% 관능화, 또는 약 8% 관능화, 또는 약 10% 관능화 또는 약 16% 관능화, 또는 약 32% 관능화를 포함하며, 여기서 퍼센트 (%) 관능화는 펩티드로 관능화된 글리칸 상의 디사카라이드 단위의 퍼센트에 의해 결정된다.

[0138] 특정 실시양태에서, 펩티드가 (예를 들어, 이온 결합을 통해) 생체접합체에 근접하게 회합되어 있는, 본원에 기재된 생체접합체 및 펩티드를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 실시양태에서, 이로써 생체접합체 응집체가 형성될 수 있다. 생체접합체 응집체 (생체접합체 및 비공유 결합된 펩티드를 포함함)는 1% 내지 200% 관능화 (펩티드로 관능화된 글리칸 상의 디사카라이드 단위의 퍼센트에 의해 결정됨)를 포함할 수 있는 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 생체접합체의 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.

[0139] 본원에 기재된 다양한 실시양태에서 알기네이트, 아가로스, 덱스트란, 덱스트란 술페이트, 콘드로이틴, 콘드로이틴 술페이트 (CS), 더마탄, 더마탄 술페이트 (DS), 헤파란 술페이트, 헤파린 (Hep), 케라틴, 케라탄 술페이트, 및 히알루론산 (HA)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 글리칸이 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 글리칸은 자연 발생이거나 또는 화학적으로 유도체화될 수 있고, 예컨대 비제한적으로 부분적으로 N-탈황산화된 유도체, 부분적으로 O-탈황산화된 유도체, 및/또는 부분적으로 O-카르복시메틸화된 유도체가 있다.

[0140] 일부 실시양태에서, 글리칸은 변형되지 않는다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 산화적으로 절단된 사카라이드 고리를 함유하지 않으며, 따라서 알데히드 관능기를 함유하지 않는다. 본원에 개시된 바와 같은 생체접합체에 의해 발휘되는 유익한 효과는 적어도 부분적으로 산화적으로 절단된 사카라이드 고리를 함유하지 않는 글리칸으

로 인한 것일 수 있는 것으로 고려된다.

[0141] 이러한 연결은 펩티드 상의 히드라지드 기와 글리칸 상의 카르보닐 기 (예를 들어, 카르복실산 기, 또는 그의 활성화된 유도체)를 커플링함으로써, 또는 대안적으로 글리칸 상의 히드라지드 기와 펩티드 상의 카르보닐 기 (예를 들어, 카르복실산 기, 또는 그의 활성화된 유도체)를 커플링함으로써 생성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 히드라지드-카르보닐 연결은 펩티드(들) 상의 말단 히드라지드 기와 글리칸 상의 카르보닐 기 사이에 존재한다.

[0142] 한 실시양태에서, 글리칸은 헤파린이고, 여기서 헤파린은 헤파린 유도체, 예컨대 비제한적으로 부분적으로 N-및/또는 부분적으로 O-탈황산화된 헤파린 유도체, 부분적으로 O-카르복시메틸화된 헤파린 유도체, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 헤파린은 비-산화된 헤파린이고 (즉, 산화적으로 절단된 사카라이드 고리를 함유하지 않음), 알데히드 관능기를 함유하지 않는다. 헤파린 유도체, 예컨대 부분적으로 N-탈황산화된 헤파린 및/또는 부분적으로 O-탈황산화된 헤파린 (즉, 2-O 및/또는 6-O-탈황산화된 헤파린) 및/또는 헤파린 유도체를 제공하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Kariya et al., J. Biol. Chem., 2000, 275:25949-5958; Lapierre, et al. Glycobiology, 1996, 6(3):355-366] 참조). 또한, 부분적으로 O-카르복시메틸화된 헤파린 (또는 임의의 글리칸) 유도체, 예컨대 프레스트위치(Prestwich) 등 (US 2012/0142907; US 2010/0330143)에 따라 제조될 수 있는 것은 본원에 개시된 생체접합체를 제공하기 위해 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0143] 특정 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). 또 다른 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.

[0144] 한 실시양태에서, 글리칸은 더마탄 술페이트 (DS)이다. DS의 생물학적 기능은 광범위하고, 내피 세포 및 각질세포 증식 및 이동을 촉진하는 성장 인자 FGF-2, FGF-7 및 FGF-10의 결합 및 활성화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 더마탄 술페이트의 중량 범위는 약 10 kDa 내지 약 70 kDa이다. 한 실시양태에서, 더마탄 술페이트의 분자량은 약 46 kDa이다. 또 다른 실시양태에서, 더마탄 술페이트는 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)을 갖는 분해된 더마탄 술페이트를 생성한다.

[0145] 또 다른 실시양태에서, 글리칸은 헤파린이다. 예컨대 약 650-700 Da의 단일 디사카라이드 단위에서부터 약 50 kDa까지 다양한 분자량의 헤파린이 본원에 기재된 생체접합체에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 헤파린은 약 10 내지 약 20 kDa이다. 일부 실시양태에서, 헤파린은 최대 약 15, 또는 약 16, 또는 약 17, 또는 약 18, 또는 약 19, 또는 약 20 kDa이다. 특정 실시양태에서, 헤파린은 사카라이드 고리 중 1개 이상을 절단하지 않는 조건 하에 산화될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Wang, et al. Biomacromolecules 2013, 14(7):2427-2432] 참조).

[0146] 한 실시양태에서, 생체접합체는 글리칸 및 약 5 내지 약 10, 또는 약 5개의 결합 단위를 포함하며, 여기서 결합 단위는 RRANAALKAGELYKSILY (서열식별번호:) 또는 RRANAALKAGELYKSILYGSG (서열식별번호:)의 적어도 1개의 서열을 포함하고, 히드라지드-카르보닐 연결을 통해 글리칸에 결합된다. 결합 단위는 동일하거나 상이한 펩티드 내에 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 히드라지드-카르보닐 연결은 펩티드 상의 말단 히드라지드 기와 글리칸 상의 카르보닐 기 사이에 존재한다. 한 실시양태에서, 글리칸은 헤파린이다. 특정 실시양태에서, 헤파린은 산화적으로 절단된 사카라이드 고리를 함유하지 않고, 따라서 알데히드 관능기를 함유하지 않는다.

[0147] 한 실시양태에서, 생체접합체는 글리칸 및 약 5 내지 약 10, 또는 약 8, 또는 약 5개의 결합 단위를 포함하며, 여기서 결합 단위는 GQLYKSILY (서열식별번호:)의 적어도 1개의 서열을 포함하고, 히드라지드-카르보닐 연결을 통해 글리칸에 결합된다. 한 실시양태에서, 생체접합체는 글리칸 및 약 5 내지 약 10, 또는 약 8, 또는 약 5개의 결합 단위를 포함하며, 여기서 결합 단위는 GQLYKSILYGSGSGSRR (서열식별번호:)의 적어도 1개의 서열을 포함하고, 히드라지드-카르보닐 연결을 통해 글리칸에 결합된다. 한 실시양태에서, 생체접합체는 글리칸 및 약 5 내지 약 10, 또는 약 8, 또는 약 5개의 결합 단위를 포함하며, 여기서 결합 단위는 GQLYKSILYGSGSGSRR-NHNH- (서열식별번호:)의 적어도 1개의 서열을 포함하고, 히드라지드-카르보닐 연결을 통해 글리칸에 결합된다. 특정 실시양태에서, 히드라지드-카르보닐 연결은 결합 단위 상의 말단 히드라지드 기와 글리칸 상의 카르보닐 기 사이에 존재한다. 한 실시양태에서, 글리칸은 헤파린이다. 특정 실시양태에서, 헤파린은 산화적으로 절단된 사카라이드 고리를 함유하지 않고, 따라서 알데히드 관능기를 함유하지 않는다.

[0148] 콜라겐 결합 단위 GQLYKSILY의 C-말단에의 아미노산의 부가는 증가된 결합 친화도와 양으로 상관되는 것으로 확인되었다 (도 17). 글리칸과 결합 부위 사이의 거리를 증가시키는 것은 결합된 복합체의 영역 사이에 입체 장애를 감소시킬 수 있는 것으로 고려된다. 스페이서가 결합된 복합체의 영역 사이의 입체 반발력을 감소시키기에 충분한 길이에 도달하면 스페이서를 추가로 증가시키는 효과가 감소될 수 있다. 이러한 역치를 넘어서 스페이서 길이를 증가시키는 것은 결합력을 심지어 감소시킬 수 있다.

[0149] 스페이서 서열에서 아르기닌 잔기의 배치가 또한, 도 15에 제시된 바와 같이, 결합 친화도에 영향을 미친다. 제1 아르기닌을 글리칸 백본에 더 가까이 배치하는 것은 결합 친화도를 증가시킨다. 이는 음으로 하전된 백본으로부터 결합 부위를 차폐하는 양전하로 인한 것일 수 있다.

[0150] 일부 실시양태에서, 콜라겐 결합 단위는 서열 GQLYKSILY (서열식별번호:)를 포함하며, 여기서 1개의 아미노산은 합성 또는 자연 발생 D- 또는 L-아미노산 잔기에 의해 치환된다. 일부 실시양태에서, 콜라겐 결합 단위는 서열 XQLYKSILY (서열식별번호:); GXLYKSILY (서열식별번호:); GQXYKSILY (서열식별번호:); GQLXKSILY; GQLYXSILY; GQLYKXILY (서열식별번호:); GQLYKSXLY (서열식별번호:); GQLYKSIXY (서열식별번호:); 또는 GQLYKSILX (서열식별번호:)를 포함하며, 여기서 X는 임의의 아미노산 잔기, D 또는 L일 수 있다. 각각의 이들 서열에 이어서 본원에 열거된 임의의 실시양태의 스페이서가 뒤따를 수 있다. 일부 실시양태에서, X는 L-알라닌이다. 일부 실시양태에서 스페이서는 GSGSGSRR (서열식별번호:)이다.

[0151] 일부 실시양태에서, 결합 단위 및 스페이서는 서열 LKAGQLYKSILYHHLHSGSGSGSRR (서열식별번호:), KAGQLYKSILYHHLHSYGSGSGSRR (서열식별번호:), GQLYKSILYHHLHSYQNSKPGSGSGSRR (서열식별번호:)을 포함한다.

[0152] 일부 실시양태에서, 결합 단위 및 스페이서는 서열 GQLYKSILYGQLYKSILYGSGSGSRR (서열식별번호:), GQLYKSILYGSGQLYKSILYGSGSGSRR (서열식별번호:), GQLYKSILY-Ahx-GQLYKSILYGSGSGSRR (서열식별번호:), 또는 $(GQLYKSILY)_2$KGSGSGSRR (서열식별번호:)을 포함한다.

[0153] 2. 생체접합체의 합성

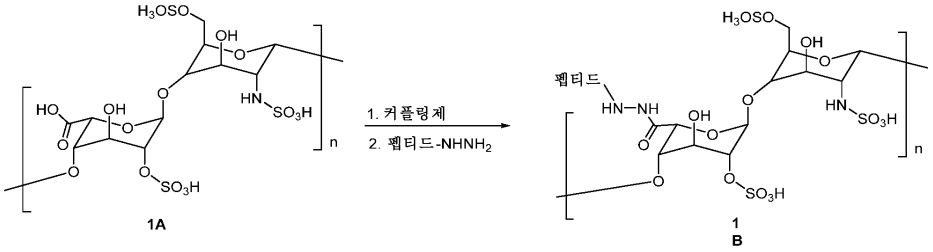
[0154] 본원에 사용되는 바와 같은 펩티드는 상업적 공급원으로부터 구입할 수 있거나, 관련 기술분야에 널리 공지된 방법 (예를 들어, 화학적 및/또는 생명공학적 방법)을 이용하여 부분적으로 또는 완전히 합성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 관련 기술분야에 널리 공지된 고체 상 펩티드 합성 프로토콜에 따라 펩티드를 합성한다. 또 다른 실시양태에서, 널리 공지된 Fmoc 프로토콜에 따라 고체 지지체 상에서 펩티드를 합성하고, 트리플루오로아세트산을 이용하여 지지체로부터 절단하고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 방법에 따라 크로마토그래피에 의해 정제한다. 다른 실시양태에서, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 생명공학 방법을 이용하여 펩티드를 합성한다. 한 실시양태에서, 목적하는 펩티드에 대한 아미노산 서열 정보를 코딩하는 DNA 서열을 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 발현 플라스미드 (예를 들어, 펩티드의 친화도 정제를 위해 친화성 태그를 혼입한 플라스미드)에 라이게이션하고, 플라스미드를 발현을 위해 숙주 유기체에 형질감염시킨 다음, 예를 들어 친화도 정제에 의해 펩티드를 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.

[0155] 반응식 1에 제시된 바와 같이, 본원에 기재된 바와 같은 펩티드를 카르복실산 모이어티를 통해 글리칸 (예를 들어, 헤파린) 1A에 공유 결합시켜 본원에 개시된 바와 같은 생체접합체 1B를 제공할 수 있다. 펩티드 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), 무수물 (예를 들어, 대칭, 혼합 또는 시클릭 무수물), 활성화된 에스테르 (예를 들어, 페닐 활성화된 에스테르 유도체, p-히드록삼산 활성화된 에스테르, 헥사플루오로아세톤 (HFA) 등), 아실라졸 (CDI를 이용하는 아실이미다졸, 아실벤조트리아졸 등), 아실 아지드, 산 할라이드, 포스포늄 염 (HOBt, PyBOP, HOAt 등), 아미늄/우로늄 염 (예를 들어, 테트라메틸 아미늄 염, 비스피롤리디노 아미늄 염, 비스피페리디노 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).

[0156] 한 실시양태에서, 펩티드 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 O-아실이소우레아 중간체를 형성함으로써 활성화된 글리칸 중간체를 통해 진행된다. 이러한 카르보디이미드 화학은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 적합한 커플링제는 상업적 공급원으로부터 구입할 수 있다. O-아실이소우레아 중간체와 목적하는 펩티드를 접촉시켜 생체접합체를 수득한다. 글리칸은 펩티드보다 먼저 또는 펩티드의 존재 하에 활성화제와 접촉될 수 있다. 일부 실시양태에서, N-히드록시숙신이미드 (NHS) 또는 그의 유도체의 존재 하에 반응이 수행된다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열은 글리칸 또는 그의 O-아실이소우레아 중간체와의 커플링 반응을 보조하기 위해 반응성 모이어티 (예를 들어, 히드라지드 관능기)를 포함하도록 변형될 수 있다. 또한, 펩티드의 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, 아미노헥산산)와 조합되어 사용될 수 있다.

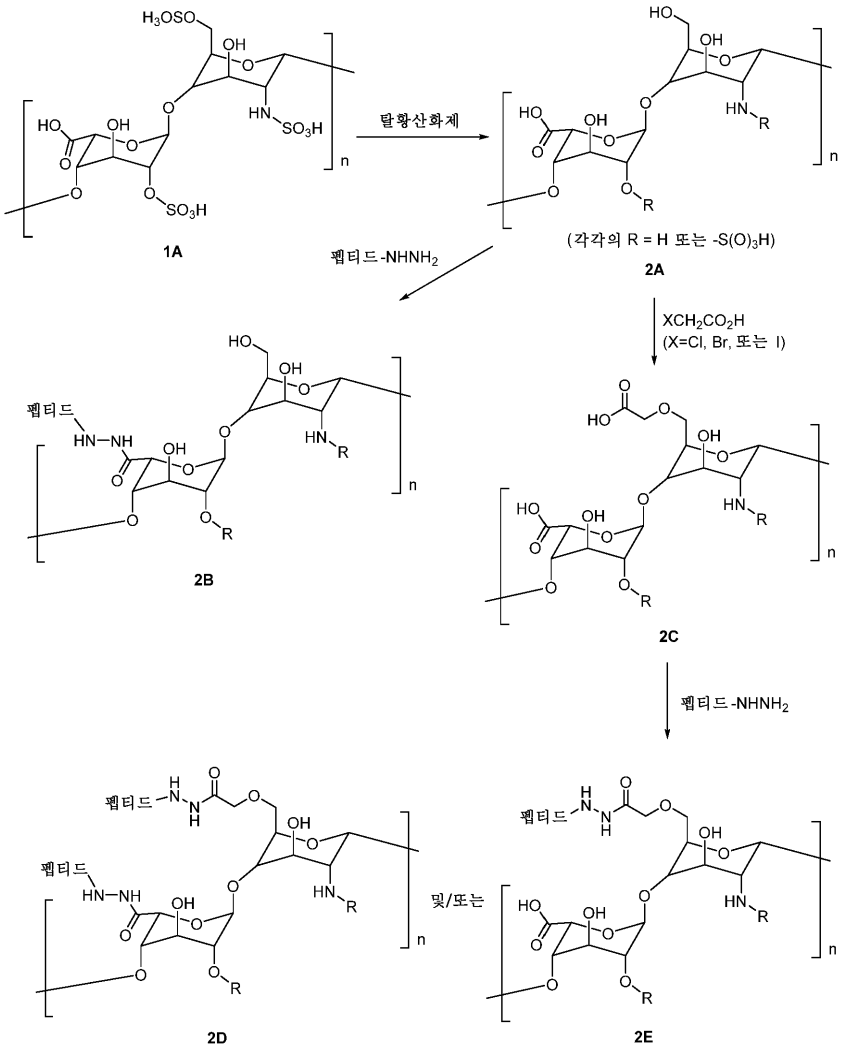
[0157] 반응식 1. 생체접합체의 합성



[0158]

[0159] 특정 실시양태에서, 생체접합체는 변형된 글리칸 유도체 (예를 들어, 헤파린)로부터 유래된다 (반응식 2). 본원에 기재된 생체접합체에서 사용하기에 적합한 다양한 글리칸 유도체가 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예컨대 부분적으로 N-탈황산화된 헤파린 및 부분적으로 O-탈황산화된 헤파린이 있다 (즉, 2-O 및/또는 6-O-탈황산화된 헤파린, 예를 들어, 문헌 [Kariya et al., J. Biol. Chem., 2000, 275:25949-5958; Lapierre, et al. Glycobiology, 1996, 6(3):355-366] 참조). 예시적인 방법이 하기 반응식 2에 제시된다. 반응식 2에 제시된 바와 같이, 글리칸 (예를 들어, 헤파린) 1A를 적합한 탈황산화제, 예컨대 예를 들어 염기 (예를 들어, NaOH) 또는 실릴화 시약 (예를 들어, N,O-비스(트리메틸실릴)아세트아미드 (BTSA), N-메틸-N-(트리메틸실릴)트리플루오로 아세트아미드 (MTSTFA) 등)과 반응시켜 1개 이상의 탈황산화된 글리칸 유도체(들) 2A를 제공할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 글리칸 유도체 2A는 부분, 완전 또는 혼합물인 탈황산화된 글리칸 유도체(들) 2A를 수득할 수 있도록 사용되는 시약 및 반응 조건에 따라 조정될 수 있다. 이어서, 상기 반응식 1에 기재된 바와 같이 임의로 커플링제의 존재 하에, 전형적인 펩티드 커플링 반응 조건 하에 탈황산화된 글리칸 유도체(들) 2A를 펩티드와 반응시켜 생체접합체 2B를 제공할 수 있다. 또한, 반응식 2에 제시된 바와 같이, 적어도 1개의 히드록실 기를 갖는 글리칸 유도체 (예를 들어, 6-O-탈황산화된 헤파린)를 O-카르복시메틸화된 글리칸 유도체(들) (예를 들어, 6-O-카르복시메틸화된 헤파린) 2C로 전환시킬 수 있다 (예를 들어, 프레스트위치 등의 US 2012/0142907 및 US 2010/0330143 참조). 상기 반응식 1에 기재된 바와 같이 임의로 커플링제의 존재 하에, 전형적인 펩티드 커플링 반응 조건 하에 2C와 펩티드를 반응시켜 생체접합체 2D 및/또는 2E를 제공할 수 있다.

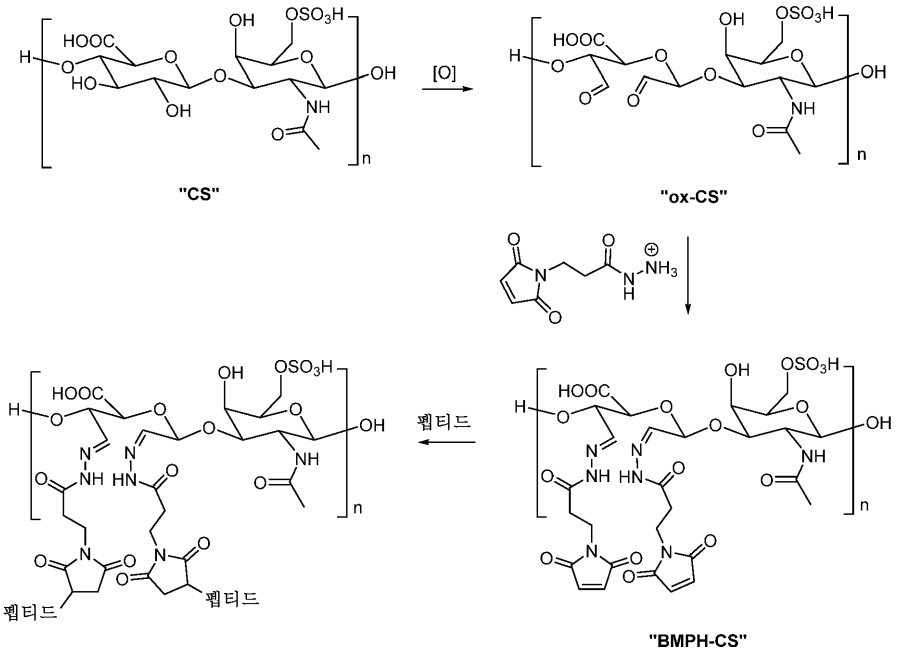
[0160] 반응식 2. 생체접합체의 대안적 합성



[0161]

[0162] 특정 실시양태에서, 생체접합체는 반응식 3에 따라 제조할 수 있다. 반응식 3에 제시된 바와 같이, 글리칸 (예를 들어, 콘드로이틴 술페이트 "CS")을 과아이오딘산염 시약, 예컨대 과아이오딘산나트륨을 이용하여 산화시켜, 글리칸에 펩티드를 공유 결합시키기 위한 글리칸 상의 알데히드 관능기를 제공할 수 있다 (예를 들어, "ox-CS"). 이어서, 산화된 글리칸 (예를 들어, "ox-CS")의 알데히드 관능기를 N-[β-말레이미도프로피온산]히드라지드 (BMPH)와 반응시켜 글리칸 중간체 (예를 들어, "BMPH-CS")를 형성하고, 글리칸 중간체를 적어도 1개의 유리 티올 기 (즉, -SH 기)를 함유하는 펩티드와 추가로 반응시켜, 펩티드를 글리칸 (예를 들어, 콘드로이틴 술페이트 "CS")에 공유 결합시킴으로써, 합성 펩티도글리칸을 수득한다.

[0163] 반응식 3. CS-BMPH-펩티드$_n$의 합성



[0164]

[0165] 3. 사용 방법

[0166] 3.1 이식 실패

[0167] 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. 본원에 사용된 용어 "치료하는"은 질환 또는 장애의 1종 이상의 임상 증상을 예방, 치유, 역전, 감쇠, 완화, 최소화, 억제, 저해 및/또는 정지시키는 것을 지칭한다. 미국에서 연간 대략 500,000건의 관상 동맥 우회로 이식 (CABG) 시술 및 70,000건 초과의 말초 우회로 이식 시술이 수행된다. 가장 통상적으로는, 자가 혈관 이식편을 종종 복재 정맥으로부터 수확한다.

[0168] 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 허혈 증상, 쇠약 수술 및 사지 손실을 포함하여 환자에게 심각하다. 지금까지, 약물요법 및 기술 혁신은 정맥 이식 실패를 감소시키는데 거의 영향을 미치지 못하였다.

[0169] 정맥 이식편 수확, 보존 배지, 우회로를 위한 준비 중 과도한 조작, 또는 허혈 및 재관류 손상에 의해 초래되건 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.

[0170] 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 하나

의 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.

[0171] 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.

[0172] 한 실시양태에서, 우회로 시술 동안 또는 이후에 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.

[0173] 일부 실시양태에서, 방법은 혈관의 부정적인 재형성을 억제하는데 효과적이다. 허혈성 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. 아테롬성동맥경화증 또는 동맥 경화로도 공지된 말초 동맥 질환은, 순환계의 동맥에서 발생하는 장애이다. 부정적인 재형성은 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.

[0174] 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 수장측 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, 수장측 가락 동맥, 비골 동맥, 슬와 동맥, 후경골 동맥, 대퇴 심부 동맥, 폐동맥, 요골 동맥, 신동맥, 비장 동맥, 쇄골하 동맥, 표재 수장측 동맥궁, 상장간막 동맥, 상척골 측부 동맥 및/또는 척골 동맥을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 동맥은 관상 혈관계의 일부이다.

[0175] 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 헤파린 및 약 5 내지 약 10, 또는 약 5개 펩티드를 포함하고, 여기서 펩티드는 GQLYKSILYGSGSGSRR (서열식별번호:)의 적어도 1개의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 헤파린 및 약 5 내지 약 10, 또는 약 5개 펩티드를 포함하고, 여기서 펩티드는 GQLYKSILYGSGSGSRR (서열식별번호:)의 적어도 1개의 서열을 포함하고, 히드라지드-카르

보닐 연결을 통해 헤파린에 결합된다.

[0176] 3.2 섬유증

[0177] 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.

[0178] 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.

[0179] 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, 윌슨병, 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 유도한다. NAFLD 및 NASH도 또한 간에서 염증 및 섬유증을 유발한다.

[0180] 간경변증은 간이 장기간 손상으로 인해 적절하게 기능하지 않는 간에서의 섬유증이다. 전형적으로, 질환은 수개월 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.

[0181] 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.

[0182] 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 융기에서의 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.

[0183] 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 이식을 받을 것을 필요로 한다.

[0184] 복막강 내에 체액이 축적된 것인 복수는 측복부 둔탁을 일으킨다. 이는 복위의 증가로 가시적일 수 있다. 간성 악취는 증가된 디메틸 술피드로 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.

[0185] 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), 듀피트렌 구축 (손, 손가락), 켈로이드 (피부), 종격 섬유증 (종격의 연부 조직), 골수섬유증 (골수), 폐이로니병 (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.

[0186] 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 콜라겐 및 글리코사미노글리칸을 포함한 결합 조직에 위치한 자극된 세포를 수반한다. 본 개시내용의 생체접합체는 콜라겐 또는 글리코사미노글리칸과 상호작용할 수 있고, 따라서 이러한 과도한 결합 조직의 형성을 파괴할 수 있다. 생체접합체는 또한 내피 장벽을 보호할 수 있다. 이는 미세혈관 손상으로 인한 노출된 세포외 매트릭스와 상호작용함으로써 이루어질 수 있다. 내피 장벽을 보호하는 것은 염증 세포가 조직 내로 혈관외유출하여 섬유화 조직을 초래하는 과도한 ECM 침착을 유발하는 것을 방지한다. 따라서, 생체접합체는 섬유증을 예방, 억제, 지연, 및/또는 역전시킬 수 있다.

[0187] 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.Suppl 1 (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.

[0188] 한 실시양태에서, 질환은 급성 세뇨관 괴사, 당뇨병성 만성 신부전, 루푸스 신염, 신섬유증, 또는 급성 사구체신염이 아니다. 한 실시양태에서, 질환은 특발성 폐 섬유증 (IPF), 만성 폐쇄성 폐 질환, 천식, 또는 기종이 아니다.

[0189] 특정 실시양태에서, 섬유증은 파브리병, 고셔병, 니만-픽병, 및 헌터 증후군 (뮤코폴리사카라이드증)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 리소솜 축적 장애에 의해 유발되거나, 또는 달리 그와 관련된다. 따라서, 특정 실시양태에서, 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.

[0190] 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, 폐 섬유증의 예방 또는 치료를 위한 본원에 개시된 생체접합체(들)의 용도가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 헤파린 및 약 5 내지 약 10개, 또는 약 5개의 펩티드를 포함하고, 여기서 펩티드는 GQLYKSILYGSGSGSRR (서열식별번호:), 또는 각각 그로부터 1, 2, 또는 3개의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 중 적어도 1개의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 기재된 방법에 사용되는 생체접합체는 헤파린 및 약 5 내지 약 10개, 또는 약 5개의 펩티드를 포함하고, 여기서 펩티드는 GQLYKSILYGSGSGSRR (서열식별번호:)의 적어도 1개의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 펩티드(들)는 히드라지드-카르보닐 연결을 통해 헤파린 또는 다른 글리칸에 결합된다.

[0191] 한 실시양태에서, 간 섬유증 또는 폐 섬유증의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자에게 헤파린 및 약 5 내지 약 10개, 또는 약 5개의 펩티드를 포함하는 생체접합체의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 간 섬유증 또는 폐 섬유증의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자에서 간 섬유증 또는 폐 섬유증을 예방 또는 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 펩티드는 GQLYKSILYGSGSGSRR (서열식별번호:)의 적어도 1개의 서열을 포함한다. 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, 생체접합체의 유효량이 투여된다.

[0192] 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 증후군에서, 염증은 다양한 크기의 동맥에서 생기고, 열, 근육 및 관절에서의 통증, 혈관 폐쇄, 피부 궤양, 및 다발성 단일신경염이 발생할 수 있다. 상기 방법은 대혈관 혈관염 (LVV), 중

혈관 혈관염 (MVV), 소혈관 혈관염 (SVV), 가변 혈관 혈관염 (VVV), 단일-기관 혈관염 (SOV), 전신 질환과 연관된 혈관염, 및/또는 개연성 있는 병인과 연관된 혈관염을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 대혈관 혈관염 (LVV)의 비제한적 예는 다카야스 동맥염 (TAK) 및 거대 세포 동맥염 (GCA)을 포함한다. 중혈관 혈관염 (MVV)의 비제한적 예는 결절성 다발동맥염 (PAN) 및 가와사키병 (KD)을 포함한다. 소혈관 혈관염 (SVV)의 비제한적 예는 항호중구 세포질 항체 (ANCA)-연관 혈관염 (AAV), 현미경적 다발혈관염 (MPA), 다발혈관염을 동반한 육아종증 (베게너) (GPA), 다발혈관염을 동반한 호산구성 육아종증 (처그-스트라우스) (EGPA), 면역 복합체 SVV, 항-사구체 기저막 (항-GBM) 질환, 한랭글로불린혈증성 혈관염 (CV), IgA 혈관염 (헤노흐-쇤라인) (IgAV), 및 저보체혈증성 두드러기성 혈관염 (HUV)) (항-C1q 혈관염)을 포함한다. 가변 혈관 혈관염 (VVV)의 비제한적 예는 베체트병 (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), 굿패스쳐병, 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.

[0193] 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 (처그-스트라우스) (EGPA), 면역 복합체 SVV, 항-사구체 기저막 (항-GBM) 질환, 한랭글로불린혈증성 혈관염 (CV), IgA 혈관염 (헤노흐-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.

[0194] 조합 요법

[0195] 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.

[0196] 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.

[0197] 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.

[0198] 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, 덱사메타손, 프레드니솔론, DexPak, 델타손, 코르티손, 프레드니손 인텐솔, 덱사메타손 인산나트륨, 오라프레드 ODT, 트렉살, 류마트렉스, 메토트렉세이트 소듐 (PF), 베리프레드 20, 덱사메타손 인텐솔, 프레드니솔론 인산나트륨, 페디아프레드, 밀리프레드, 레이오스, 밀리프레드, 및 더블덱스를 포함한다.

[0199] 4. 조성물

[0200] 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.

[0201] 특정 실시양태에서, 조성물은 수용액이다. 수용액은 제제화의 용이성뿐만 아니라, 용액 점적주입 수단에 의한 이러한 조성물의 투여 용이성에 기초하여 조성물 제제에 사용하기에 적합하다. 특정 실시양태에서, 조성물은 현탁액, 점성 또는 반점성 겔, 또는 다른 유형의 고체 또는 반고체 조성물이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 관련 기술분야에 매우 널리 공지된 발포체, 연고, 액체 세정제, 겔, 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.

[0202] 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, 펩티드, 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 작용제를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물은 필름, 겔, 발포체 또는 및 다른 투여 형태로 제제화된다.

[0203] 적합한 이온 강도 조정제는 예를 들어 글리세린, 프로필렌 글리콜, 만니톨, 글루코스, 덱스트로스, 소르비톨, 염화나트륨, 염화칼륨, 및 다른 전해질을 포함한다.

[0204] 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, 폴록사머, 및 관련 기술분야에 공지된 다른 것의 혼입을 이용하여 용해도를 증가시킬 수 있다.

[0205] 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 술페이트 및 그의 염, 덱스트란, 젤라틴, 키토산, 겔란, 다른 생체접합체 또는 폴리사카라이드, 또는 그의 임의의 조합; 셀룰로스 중합체 및 셀룰로스 중합체 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 빈 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; 겔란 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)™ 상표 하에 상업적으로 입수가능한 카르복시폴리알킬렌; 및 다양한 다른 점성 또는 점탄성 물질을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 윤활성 증진제는 히알루론산, 더마탄, 콘드로이틴, 헤파린, 헤파란, 케라틴, 덱스트란, 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 증진제

는 콘드로이틴 술페이트이다. 한 실시양태에서, 윤활성 증진제는 히알루론산이다. 윤활성 증진제는 조성물의 점도를 변화시킬 수 있다.

[0206] 상기 윤활성 증진제의 구조, 화학적 특성 및 물리적 특성과 관련하여 보다 상세한 설명에 대해서는, 예를 들어, U.S. 5,409,904, U.S. 4,861,760 (겔란 검), U.S. 4,255,415, U.S. 4,271,143 (카르복시비닐 중합체), WO 94/10976 (폴리비닐 알콜), WO 99/51273 (크산탄 검), 및 WO 99/06023 (갈락토만난)을 참조한다. 전형적으로, 제제의 목적하는 pH를 달성하는 것을 용이하게 하기 위해 비-산성 윤활성 증진제, 예컨대 중성 또는 염기성 작용제가 이용된다.

[0207] 일부 실시양태에서, 생체접합체는 미네랄, 아미노산, 당, 펩티드, 단백질, 비타민 (예컨대 아스코르브산), 또는 라미닌, 콜라겐, 피브로넥틴, 히알루론산, 피브린, 엘라스틴, 또는 아그레칸, 또는 성장 인자 예컨대 표피 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자, 형질전환 성장 인자 베타, 또는 섬유모세포 성장 인자, 및 글루코코르티코이드 예컨대 덱사메타손 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.

[0208] 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, 붕산, 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, 붕산나트륨 또는 붕산)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, 붕산나트륨 또는 붕산)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, 겔, 패치 또는 액체 용액의 형태이고, 여기서 조성물은 임의로 보존제를 함유하고; 여기서 상기 조성물의 pH는 약 pH 4 내지 약 pH 8 범위 내이다.

[0209] 보다 높은 농도의 생체접합체를 전달하기 위해 계면활성제가 조성물에 사용된다. 계면활성제는 억제제를 가용화시키고, 콜로이드 분산액, 예컨대 미셀 용액, 마이크로에멀젼, 에멀젼 및 현탁액을 안정화시키는 기능을 한다. 적합한 계면활성제는 폴리소르베이트, 폴록사머, 폴리오실 40 스테아레이트, 폴리옥실 피마자 오일, 틸록사폴, 트리톤, 및 소르비탄 모노라우레이트를 포함한다. 한 실시양태에서, 계면활성제는 12.4 내지 13.2 범위의 친수성/친유성/평형 (HLB)을 갖고, 트리톤X114 및 틸록사폴과 같은 것은 안과적 용도로 허용된다.

[0210] 특정 실시양태에서, 안정화 중합체, 즉, 완화제가 조성물에 첨가된다. 안정화 중합체는 이온성/하전된 예, 보다 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 페물렌(Pemulen)®, 구체적으로 카르보머 974p (폴리아크릴산)로부터의 다가전해질 또는 다가전해질들 (1종 초과인 경우)을 약 0.1% 내지 약 0.5% w/w 범위로 포함한다.

[0211] 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.

[0212] 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.

[0213] 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, 에덴테이트 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.

[0214] 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.

[0215] 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.

[0216] 다양한 실시양태에서, 생체접합체는 국소로, 예컨대 필름, 겔, 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, 겔 또는 연고로서 제제화된다. 이들 실시양태에서, 생체접합체는 적절한 제약상 허용되는 담체 중에 분산 또는 용해된다.

[0217] 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.

[0218] 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.

[0219] 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, 덱스트로스, 또는 멸균 수용액, 및 유사한 제약 비히클을 함유하는 수성 또는 오일 현탁액 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 항진균

제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 이루어질 수 있다.

[0220] 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.

[0221] 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, 겔, 패치, 분말, 로젠지, 사쉐, 카쉐, 엘릭시르, 현탁액, 에멀젼, 용액, 시럽, 에어로졸 (고체로서 또는 액체 매질 중), 예를 들어 활성 화합물을 최대 10 중량% 함유하는 연고, 연질 및 경질 젤라틴 필름, 겔, 패치, 멸균 주사가능한 용액, 및 멸균 포장 분말의 형태일 수 있다.

[0222] 적합한 부형제의 일부 예는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 검, 인산칼슘, 알기네이트, 트라가칸트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 멸균수, 시럽, 및 메틸 셀룰로스를 포함한다. 제제는 추가적으로 윤활제 예컨대 활석, 스테아르산마그네슘, 및 미네랄 오일; 습윤제; 유화제 및 현탁화제; 보존제 예컨대 메틸- 및 프로필히드록시-벤조에이트; 감미제; 및 향미제를 포함한다.

[0223] 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.

[0224] 본원에 사용되는 겔은 연질 및 약성 내지 경질 및 강성 범위의 특성을 가질 수 있는 고체, 젤리-유사 물질을 지칭한다. 관련 기술분야에 널리 공지된 바와 같이, 겔은 유체에 의해 그의 전체 부피에 걸쳐 팽창되는 비-유체 콜로이드성 네트워크 또는 중합체 네트워크이다. 히드로겔은 친수성인 중합체 쇄의 네트워크를 포함하는 겔의 유형이며, 때때로 물이 분산 매질인 콜로이드성 겔로서 발견된다. 히드로겔은 고도로 흡수성이고, 고도의 물, 예컨대 예를 들어 90% 초과의 물을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 겔은 천연 또는 합성 중합체 네트워크를 포함한다. 일부 실시양태에서, 겔은 친수성 중합체 매트릭스를 포함한다. 다른 실시양태에서, 겔은 소수성 중합체 매트릭스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 겔은 천연 조직과 매우 유사한 정도의 가요성을 보유한다. 특정 실시양태에서, 겔은 생체적합성이고 흡수성이다. 특정 실시양태에서, 겔은 외과적 개입 전에, 그 동안에 또는 그 후에 환자에게 투여된다.

[0225] 본원에 사용되는 바와 같은 액체 용액은 관련 기술분야에 널리 공지된 용액, 현탁액, 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.

[0226] 예시적인 제제는 a) 본원에 기재된 바와 같은 1종 이상의 생체접합체; b) 제약상 허용되는 담체; 및 c) 매트릭스 네트워크로서 친수성 중합체를 포함할 수 있고, 여기서 상기 조성물은 점성, 즉, 수백 내지 수천 cps의 점도의 액체, 겔 또는 연고로서 제제화된다. 이들 실시양태에서, 생체접합체는 적절한 제약상 허용되는 담체 중에 분산 또는 용해된다.

[0227] 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.

[0228] 5. 투약

[0229] 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 μg 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 μg 내지 약 10 g, 또는 용량당 약 100 μg 내지 약 1 g, 또는 용량당 약 100 μg 내지 약 500 mg, 용량당 약 0.01 μg 내지 약 100 mg, 또는 용량당 약 100 μg 내지 약 50 mg, 또는 용량당 약 500 μg 내지 약 10 mg, 또는 용량당 약 1 mg 내지 10 mg, 또는 용량당 약 1 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 μg 내지 약 1000 mg, 용량당 1 μg 내지 약 100 mg, 약 100 μg 내지 약 1.0 mg, 약 50 μg 내지 약 600 μg, 약 50 μg 내지 약 700 μg, 약 100 μg 내지 약 200 μg, 약 100 μg 내지 약 600 μg, 약 100 μg 내지 약 500 μg, 약 200 μg 내지 약 600 μg, 또는 용량당 약 100 μg 내지 약 50 mg, 또는 용량당 약 500 μg 내지 약 10 mg 또는 용량당 약 1 mg 내지 약 10 mg 범위이다.

[0230] 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.

[0231] 실시예

[0232] 실시예 1. 생체접합체의 합성

[0233] 생체접합체를 하기 프로토콜에 따라 제조할 수 있다. 적절한 농도의 카오트로픽제, 예컨대 부탄올, 에탄올, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 아세트산리튬, 염화마그네슘, 페놀, 프로판올, 소듐 도데실 술페이트, 티오우레아, 또는 우레아 (예를 들어, 약 5 M 내지 약 10 M 우레아)를 사용하여 적합한 반응 완충제 (예를 들어, 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 (MES))를 제조하였다. 1 N HCl을 사용하여 최종 pH를 약 4.5 내지 약 6의 pH로 조정하였다.

[0234] 히드라지드 관능화된 펩티드 (예를 들어, 표 2의 펩티드 1-20)를 반응 완충제 중에 3 mg/mL로 용해시켰다. 펩티드 용액을 커플링 반응 전에 새롭게 제조하였다. 상응하는 비오티닐화된 펩티드를 반응 완충제 중에 3 mg/mL로 용해시켰다. 생성된 비오틴-표지된 펩티드 용액을 커플링 반응 전에 새롭게 제조하였다. 글리칸 (예를 들어, 헤파린 (MW_{avg} = 16 kDa))을 반응 완충제 중에 20 mg/mL로 용해시키고 -20℃에서 저장하거나 또는 커플링 반응 전에 새롭게 제조하였다. 글리칸에 첨가하기 직전에 EDC (1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드)를 반응 완충제 중에 75 mg/mL로 용해시켰다. 대안적으로, 비표지된 펩티드만을 사용하여 생체접합체를 합성할 수 있고, 비오틴 히드라지드를 사용하여 임의로 표지화할 수 있다.

[0235] 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDC) (물 중에 75 mg/mL로 용해된 59.3 mg 또는 0.79 mL)를 50 몰 과량으로 헤파린에 첨가하여 헤파린을 활성화시켰다. 출발 물질을 실온에서 약 5분 동안 반응시켰다. 이어서, 비오틴-표지된 펩티드를 활성화된 헤파린에 1:1 몰비 (헤파린:표지된 펩티드) (반응 완충제 중 3 mg/mL로 15.3 mg 또는 5.1 mL)로 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 약 5분 동안 실온에서 진탕시켰다. 진탕시키는 동안, 비표지된 펩티드를 주어진 몰비 (헤파린:펩티드, 세부사항에 대해서는 표 2 참조)로 반응 완충제 중에 첨가하였다. 이어서, 성분을 진탕시키면서 실온에서 약 2시간 동안 반응되게 하였다. 할당된 시간 후, 진탕시키면서 실온에서 약 30분 동안 0.5 M NaOH (대략 4.5 mL)를 사용하여 pH를 8로 상승시킴으로써 반응물을 켄칭시켰다.

[0236] 생성된 생체접합체를 투석필터 (스펙트럼 - 미디크로스(Spectrum - MidiKros) mPES 10 K 중공 튜브 필터)를 통해, 대략 15 psi의 TMP 하에 5 칼럼 부피 (CV)의 반응 완충제 (대략 250 mL)에 이어 10 CV의 물 (대략 500 mL)을 35 mL/분의 유속으로 사용하여 정제하였다. 이어서 최종 생성물인 보유물을 -80℃에서 동결시켰다. 임의로, 최종 생성물을 건조 상태로 동결건조시켰다. 상기 약술된 절차를 사용하여 약 5개의 펩티드를 글리칸에 접합시켰다.

[0237] 상기 기재된 바와 같은 헤파린 및 표 (표 2)에 제시된 히드라지드 관능화된 펩티드로부터 하기 생체접합체를 제

조하였다.

[0238] 표 2

화합물	히드라지드 관능화된 펩티드
화합물 1 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	RRANAALKAGELYKSILYGSG-$NHNH_2$ (펩티드 1)
화합물 2 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	RRANAALKAGELYKSILYGSGRRGSG-$NHNH_2$ (펩티드 2)
화합물 3 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYGSG-$NHNH_2$ (펩티드 3)
화합물 4 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYGSGRRGSG-$NHNH_2$ (펩티드 4)
화합물 5 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYGSGSGSGS-$NHNH_2$ (펩티드 5)
화합물 6 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYGSRGRGSG-$NHNH_2$ (펩티드 6)
화합물 7 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYGRSGRGSG-$NHNH_2$ (펩티드 7)
화합물 8 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYGSRGSG-$NHNH_2$ (펩티드 8)
화합물 9 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYRRGSGSGS-$NHNH_2$ (펩티드 9)
화합물 10 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYGSGSGSRR-$NHNH_2$ (펩티드 10)
화합물 11 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYGSRRGS-$NHNH_2$ (펩티드 11)

[0239]

화합물	히드라지드 관능화된 펩티드
화합물 12 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYGSGRRRGSG-$NHNH_2$ (펩티드 12)
화합물 13 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYGSGRGSGSGSG-$NHNH_2$ (펩티드 13)
화합물 14 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYGSGKKGSG (펩티드 14)
화합물 15 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	GQLYKSILYAhxRRAhx-$NHNH_2$ (펩티드 15)*
화합물 16 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	RVMHGLHLGDDEGSG$NHNH_2$ (펩티드 16)
화합물 17 (1:8, 글리칸 대 펩티드)	CPGRVMHGLHLGDDEGPCGSG-$NHNH_2$ (펩티드 17)
화합물 18 (1:8 또는 1:12, 글리칸 대 펩티드)	CPGRVMHGLHLGDDEGPCGSGRRGSG-$NHNH_2$ (펩티드 18)
화합물 19 (1:4, 글리칸 대 펩티드)	(RVMHGLHLGDDEGSG)2-KRRGSG-$NHNH_2$ (펩티드 19)
화합물 20 (1:6, 글리칸 대 펩티드)	H_2NNH-숙신산-GSGGQLYKSILY (펩티드 20)

[0240]

[0241] * Ahx = 6-아미노헥산산

[0242] 화합물 1-17 및 20은 펩티드를 글리칸당 약 1:8 또는 약 1:6 펩티드의 비로 반응시켜 합성하였고, 글리칸에 접합된 펩티드의 평균 수는 글리칸당 약 5개 펩티드로, 약 22% 펩티드 관능화에 상응하는 것으로 고려된다. 화합물 18은 펩티드를 글리칸당 약 1:8, 또는 약 1:9, 또는 약 1:12 펩티드의 비로 반응시켜 합성하였고, 글리칸에 접합된 펩티드의 평균 수는 글리칸당 약 8개 펩티드로, 약 33% 펩티드 관능화에 상응하는 것으로 고려된다. 화합물 19는 펩티드를 글리칸당 약 1:4 또는 약 1:3 펩티드의 비로 반응시켜 합성하였고, 글리칸에 접합된 펩티드의 평균 수는 글리칸당 약 3개 펩티드로, 약 11% 펩티드 관능화에 상응하는 것으로 고려된다.

[0243] 실시예 2. 콜라겐-결합 플레이트 검정

[0244] 하기 방법을 이용하여 콜라겐에 대한 본원에 개시된 생체접합체의 결합 친화도를 평가하였다.

[0245] 생체접합체 변이체의 콜라겐-결합을 96-웰 플레이트 상에 콜라겐이 코팅된 플레이트-검정에 의해 비교하였다. 콜라겐을 실온에서 1시간 동안 0.02 N 아세트산 중 50 μg/mL로 고결합 플레이트 상에 코팅하였다. 미결합 콜라겐을 1X PBS pH 7.4로 세정하였다. 이어서, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 1X PBS 용액 중 1% 우유로 차단하였다.

[0246] 비오티닐화 펩티드를 함유하는 생체접합체 변이체를 1X PBS pH 7.4 중 1% 우유 중 1 mg/mL의 최종 농도로 용해시켰다. 이 용액으로부터, 10X 연속 희석을 수행하였다. 이어서, 분자를 차단된 콜라겐-코팅된 플레이트 상에서 인큐베이션하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 1% BSA 및 0.2% 트윈20 중 1X PBS로 3회 세정하였다.

[0247] 결합된 분자를 스트렙타비딘-HRP에 의해 검출하고, 이를 1% BSA 및 0.2% 트윈20을 함유하는 1X PBS 중에 1:500으로 희석하고, 200 μL/웰로 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 스트렙타비딘 용액을 플레이트로부터

0.2% 트윈20을 함유하는 1X PBS를 사용하여 3회 세정하였다. 이어서, TMB 기질 용액을 실온에서 15분 동안 각 웰에 100 μL/웰로 첨가하고, 100 μL 황산 용액 (0.16 M)을 이용하여 색 발현을 정지시켰다. 이어서, 웰에서 450 nm에서의 흡광도를 측정하고, 결합 친화도를 흡광도 대 농도별 용량-반응으로 플롯팅하였다.

[0248] 이러한 방법을 사용하여 EC_{50} 값을 비교함으로써 다양한 콜라겐-결합 생체접합체의 콜라겐 결합 친화도를 비교하였다. 보다 구체적으로, 각각의 생체접합체에 대한 EC_{50} 값을 화합물 4에 대한 EC_{50}과 비교하였다.

[0249] 도 1은 생체접합체 화합물 4, 화합물 8, 및 화합물 13에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다. 도 1은 아르기닌의 수를 감소시키는 것이 EC_{50}을 증가시킨다는 것을 보여준다.

[0250] 도 2는 생체접합체 화합물 4 및 화합물 12에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다. 도 2는 아르기닌의 수를 증가시키는 것이 EC_{50}을 감소시킨다는 것을 보여준다.

[0251] 도 3은 생체접합체 화합물 4 및 화합물 14에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다. 도 3은 아르기닌을 또 다른 양으로 하전된 아미노산 (특히, 리신)으로 치환시키는 것은 결합 EC_{50}에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다.

[0252] 도 4는 생체접합체 화합물 4, 화합물 8, 및 화합물 11에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다. 도 4는 아미노산의 수를 감소시키는 것이 EC_{50}을 약간 증가시킨다는 것을 보여준다.

[0253] 도 5는 생체접합체 화합물 4, 화합물 9, 및 화합물 10에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다. 도 5는 아르기닌 잔기를 글리칸에 더 가까이 위치시키는 것이 EC_{50}을 감소시킨다는 것을 보여준다.

[0254] 도 1-5는 생체접합체의 펩티드 부분에서 양으로 하전된 아미노산 잔기의 양 및 위치 (글리칸과 관련함)에 상관관계가 존재한다는 것을 나타낸다.

[0255] 도 6은 도 1-5의 생체접합체 화합물 4 (2개의 배치), 화합물 6, 화합물 7, 화합물 8, 및 화합물 10에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여주고, 도 7은 그의 상응하는 EC_{50} 값을 비교한 막대 그래프를 보여준다.

[0256] 도 8은 생체접합체 화합물 4 및 화합물 15에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다. 도 8은 GSG의 6-아미노-1-헥산산으로의 치환이 EC_{50}에 유의하게 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주며, 이는 그러한 결합이 펩티드의 이러한 영역의 길이에 좌우되며 특정한 서열에 좌우되지 않는다는 것을 나타낸다.

[0257] 도 9는 선형 생체접합체 (화합물 16), 시클릭 생체접합체 (화합물 17), 및 화합물 18에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다. 화합물 18은 콜라겐-결합 친화도에서 유의한 증가를 보여주었다 (보다 낮은 EC_{50}).

[0258] 도 10은 생체접합체 화합물 18 및 화합물 19에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다. 화합물 19는 콜라겐 결합 친화도에서 증가를 보여주었다 (보다 낮은 EC_{50}).

[0259] 도 11은 화합물 4, 화합물 5 (2개의 배치), 및 화합물 3에 대한 콜라겐 결합의 비교를 보여준다. 화합물 4는 화합물 5 및 화합물 3과 비교하여 콜라겐 결합 친화도에서 유의한 증가를 보여주었다 (보다 낮은 Kd).

[0260] 실시예 3. 혈소판 응집

[0261] 유형 I 원섬유성 콜라겐을 2-8℃에서의 밤샘 인큐베이션에 의해 아이비디(Ibidi) μ-슬라이드에 흡착시켰다. 아이비디 μ-슬라이드를 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 세정한 다음, 1x PBS 중 1% BSA로 차단시켰다. 화합물 10 (도 12B에 제시됨) 및 화합물 1, 2mg/mL (12A에 제시됨)를 아이비디 μ-슬라이드에 적용하고, 인큐베이션되게 하였다. 1시간 후, 과량의 접합체를 1x PBS로 세정하였다. 새로 채취한 인간 전혈을 칼세인 AM (라이브 형광 세포 마커)으로 사전 염색하였다. 10분 동안 시린지 펌프를 사용하여 1000 s-1의 전단 속도로 채널을 가로질러 혈액을 펌핑하였다. 혈액이 아이비디 μ-슬라이드를 가로지름에 따라, 형광 현미경을 사용하여 응집된 형광 표지된 혈소판의 영상을 취하였다. 도 12는 화합물 10 (패널 12B)이 유형 I 원섬유성 콜라겐에 대한 혈소판 결합을 억제한다는 것을 보여준다.

[0262] 실시예 4: 신생내막 증식증 또는 말초 동맥 질환 (PAD)의 치료 또는 예방을 위한 생체접합체

[0263] 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체를 전달한 토끼 혈관성형술 모델에서 신생내막 증식증을 평가하였다. 다수의 (예를 들어, 6마리의) 토끼를 연구에 등록하였다. 각각의 동물에게 우측 및 좌측 장골 동맥 둘 다로 풍선 혈관성형술-매개된 손상을 가하였다. 동물들을 시험군 (헤파린-SILY) 또는 비히클 대조군 (1xPBS)으로 나누었

다. 각각의 군에서, 둘 다의 장골 동맥을 손상시키고, 풍선 손상 직후에 시험 물품 또는 대조군으로 처리하였다.

[0264] 손상후 주어진 시간 (예를 들어, 28일) 후, 동물을 안락사시키고, 동맥 절편을 조직학적으로 평가하였다. 전형적으로 각각의 혈관으로부터 가장 중증의 신생내막 반응을 갖는 몇몇 (예를 들어, 3개의) 조직학적 절편을 형태측정을 위해 선택하였다. 외부 탄성판 (EEL), 내부 탄성판 (IEL), 및 내강의 단면적을 모바트(Movat) 염색된 슬라이드로부터 디지털 형태측정 (아이피랩(IPLab) 소프트웨어, 매릴랜드주 록빌)을 이용하여 측정하였다. 신생내막 두께는 최소 및 최대 부위에서 IEL에서 내강까지의 길이로서 측정한 다음, 평균하였다. 단면적을 이용하여 하기를 계산하였다:

[0265] • 내측 면적 = EEL 면적 - IEL 면적

[0266] • 신생내막 면적 = IEL 면적 - 내강 면적

[0267] • 내측-내막 면적 = EEL 면적 - 내강 면적

[0268] • % 협착 = [1 - (내강 면적/IEL 면적)] * 100

[0269] 변수의 평균을 분산 분석 (ANOVA)을 이용하여 비교하였다. 0.05 미만의 p-값이 전형적으로 통계적으로 유의한 것으로 고려된다.

[0270] 본원에 기재된 바와 같은 생체접합체는 신생내막 증식증을 억제하는데 효과적일 것이고, 따라서 말초 동맥 질환(PAD)을 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0271] 실시예 5: 비-알콜성 지방간염 (NASH) 모델

[0272] 간 섬유증에 영향을 미치는 화합물의 능력을 비-알콜성 지방간염 (NASH)의 마우스 모델에서 시험하였다. C57BL/6 마우스에게 출생 후 200 μg의 스트렙토조토신을 단일 피하 주사하였다. 4주령에서 시작하여, 동물에게 고지방 식이를 공급하였다. 제5주에 시작하고 제9주까지 4주 동안 계속하여, 동물을 염수 또는 화합물 10으로 3X/주 정맥내 처리하였다. 별개의 동물 군에게는 동일한 기간 동안 텔미사르탄을 매일 경구 투여하였다. 동물을 9주령에 희생시키고, 조직학적 및 생화학적 분석을 위해 간을 수집하였다.

[0273] 시리우스 레드 염색을 사용하여 콜라겐 함량에 대한 간의 조직학적 분석을 수행하였다. 염색을 정량화하여 이를 도 13에 제시하였다. 텔미사르탄 또는 화합물 10을 사용한 처리는 비히클 처리군과 비교하여 간에서 콜라겐의 수준을 감소시켰다.

[0274] 생체내 영상화 시스템에 의한 분포

[0275] 화합물을 형광 표지와 함께 합성하였다. 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 14는 주사 5 또는 60분 후의 화합물의 국재화를 보여준다. 화합물은 신장 및 방광에서 국재화되는 것으로 보였다.

[0276] 실시예 6: 콜라겐 결합 검정 2

[0277] GQLYKSILYGSGSGSRR (서열식별번호:) (화합물 10)을 스페이서가 없는 GQLYKSILYGSG (서열식별번호:) (펩티드 X) 결합 도메인 및 스페이서 서열 단독, GSGSGSRR (서열식별번호:) (스페이서 A)에 대한 결합 친화도에 대해 평가하였고, 결과를 도 18에 제시한다. 스페이서의 부가는 단리된 상태의 결합 도메인 또는 스페이서보다 더 큰 결합 친화도를 발생시켰다.

[0278] 콜라겐 상의 폰 빌레브란트 결합 부위에 대한 그의 결합으로 인해 vWF-2x로도 공지되어 있는 WREPSFSALS (서열식별번호:)를 GSGSGSRR (서열식별번호:) 스페이서의 존재 및 부재 하에 결합 친화도에 대해 평가하였다. WREPSFSALSGSGSGSRR (서열식별번호:) WREPSFSALS (서열식별번호:) 및 GSGSGSRR (서열식별번호:)을 도 19, 우측 상부에 제시한다. 콜라겐 결합 검정은 스페이서 서열의 부가 시 결합 친화도에서의 증가를 보여주었다.

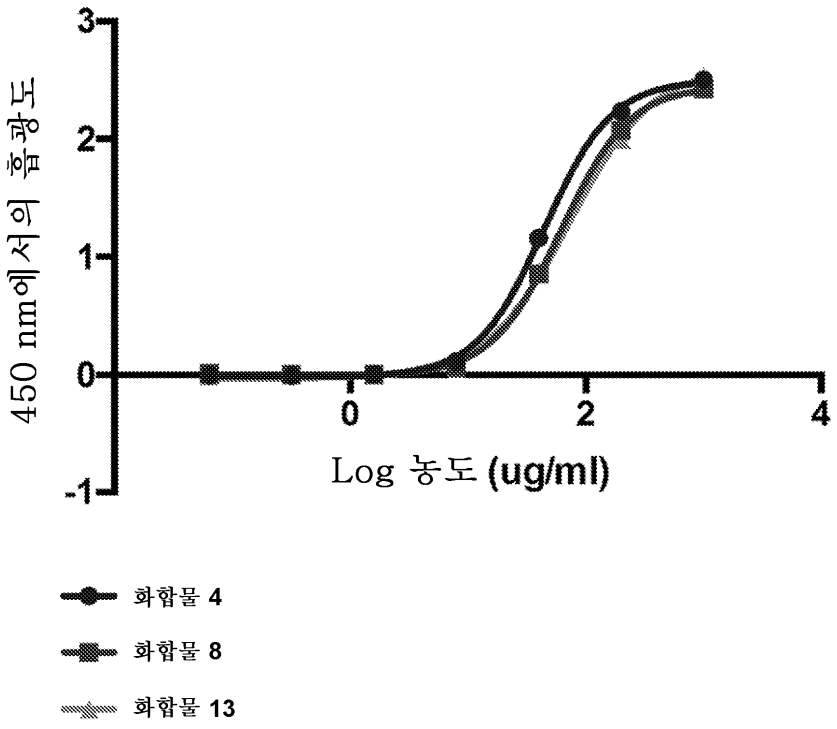
[0279] 콜라겐 유형 I의 50 μg/ml를 밤샘 인큐베이션에 의해 고결합 플레이트에 흡착시켰다. 이어서, 플레이트를 PBS로 세척하고, PBS 중 1% 탈지유를 사용하여 1시간 동안 차단하였다. PBS 중 1% BSA 중에서 분자 희석물을 제조한 다음, 1시간 동안 25℃에서 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS로 세척하

였다. 1% BSA PBS 중 스트렙타비딘-HRP의 1:500 희석물을 제조하고, 20분 동안 플레이트에 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 PBS로 세척하고, 색 발현을 위해 TMB 용액을 10분 동안 첨가하였다. 0.16 M 황산을 사용하여 색 발현을 정지시키고, 플레이트 판독기를 사용하여 450 mm에서 흡광도를 측정하였다. 화합물 10을 모든 EC_{50} 결과에 대한 참조 표준물로서 사용하였다.

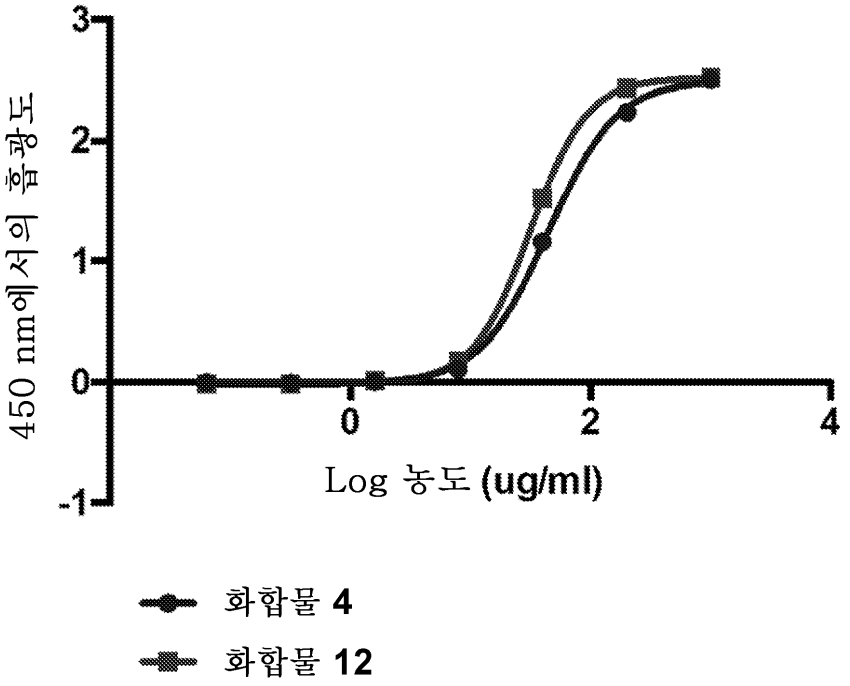
[0280] 스페이서 길이 및 화학 구조는 전체 분자의 콜라겐 결합 친화도에 영향을 미친다. 스페이서는 일반적으로 주로 글리신 및 세린의 펩티드 서열로 구성되고, 일부 아르기닌 잔기를 갖는다. 글리신 및 세린 서열 GSG는 아미노헥산산 (Ahx)으로 대체될 수 있다. 아르기닌 잔기의 위치는 결합 친화도에서 유의한 역할을 한다. GAG에 보다 가까이 아르기닌 잔기를 위치시키는 것은 콜라겐 결합을 개선시킨다. (도 15) 추가적으로, 다중 아르기닌 잔기를 갖는 것은 콜라겐 결합 친화도를 증가시킨다. 스페이서 길이는 보다 높은 결합 친화도에 양으로 상응한다 (도 16).

도면

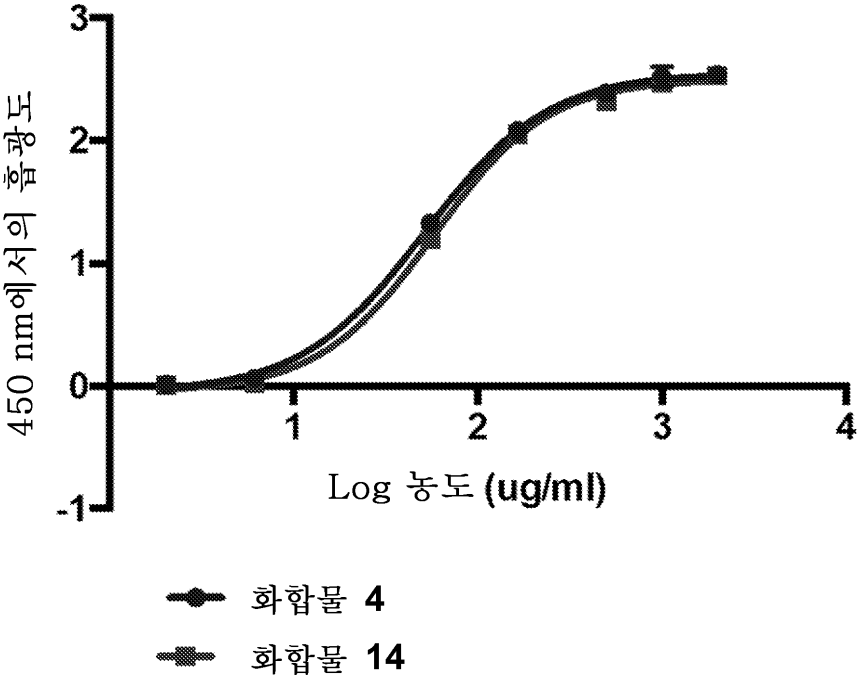
도면1



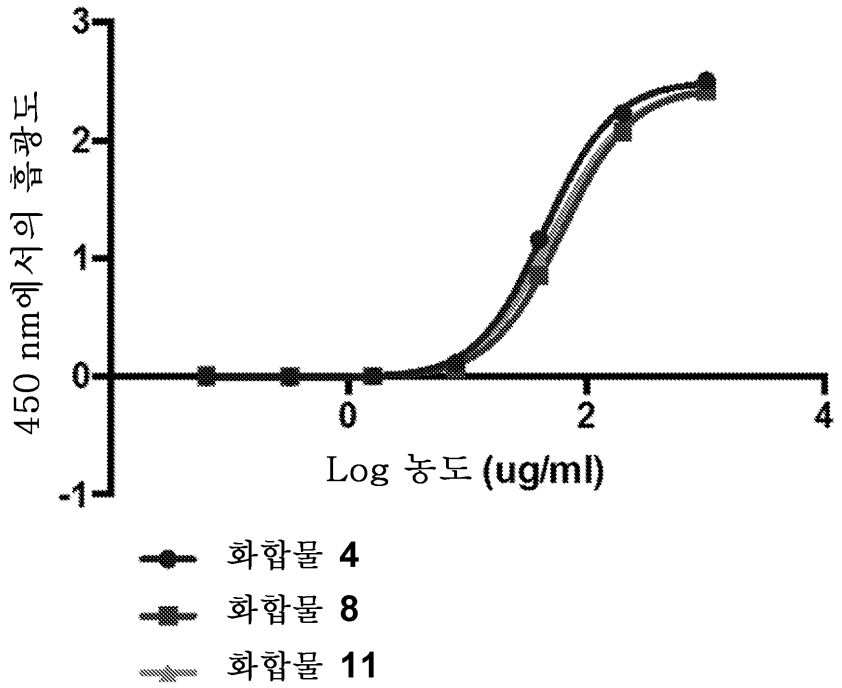
도면2


3
2
1
0
-1
450 nm에서의 흡광도
0
2
4
Log 농도 (ug/ml)
화합물 4
화합물 12

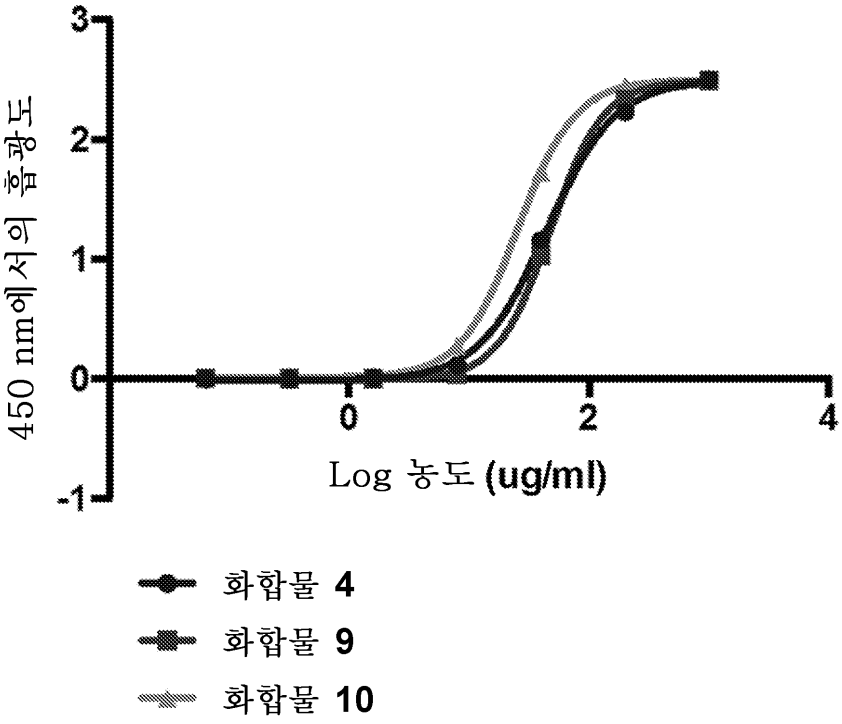
도면3


3
2
1
0
-1
450 nm에서의 흡광도
1
2
3
4
Log 농도 (ug/ml)
화합물 4
화합물 14

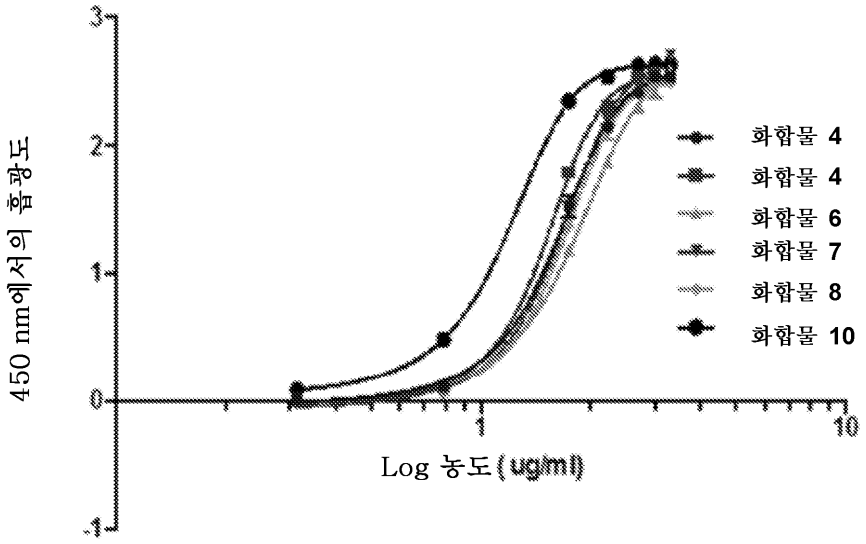
도면4


3
2
1
0
-1
450 nm에서의 흡광도
0
2
4
Log 농도 (ug/ml)
화합물 4
화합물 8
화합물 11

도면5

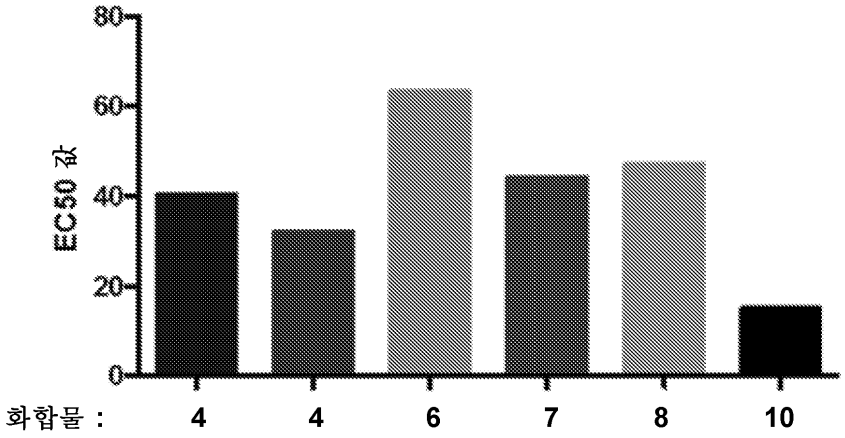

3
2
1
0
-1
450 nm에서의 흡광도
0
2
4
Log 농도 (ug/ml)
화합물 4
화합물 9
화합물 10

도면6

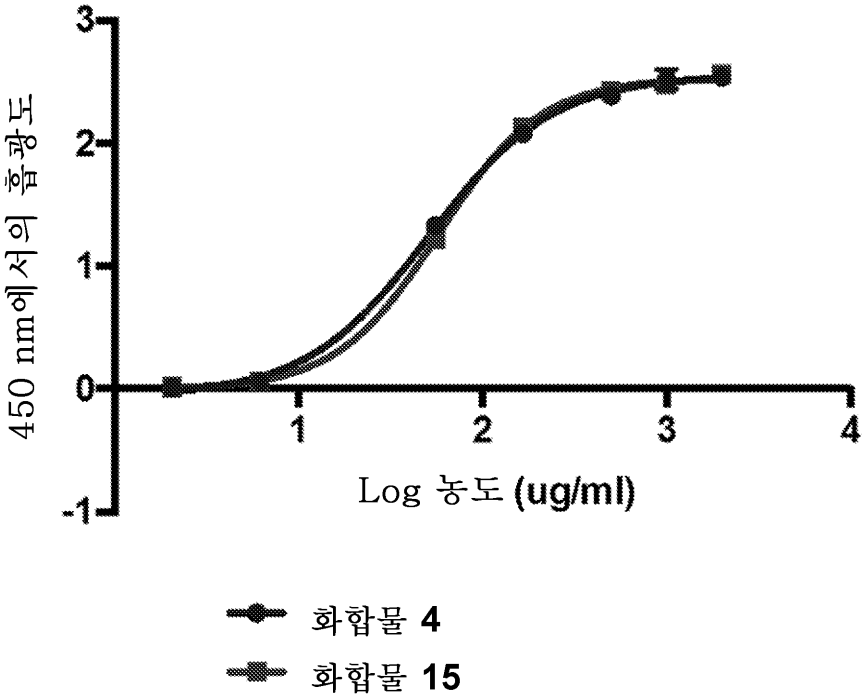


	EC50
화합물 4	40.37
화합물 4	32.06
화합물 6	63.34
화합물 7	44.17
화합물 8	47.15
화합물 10	15.04

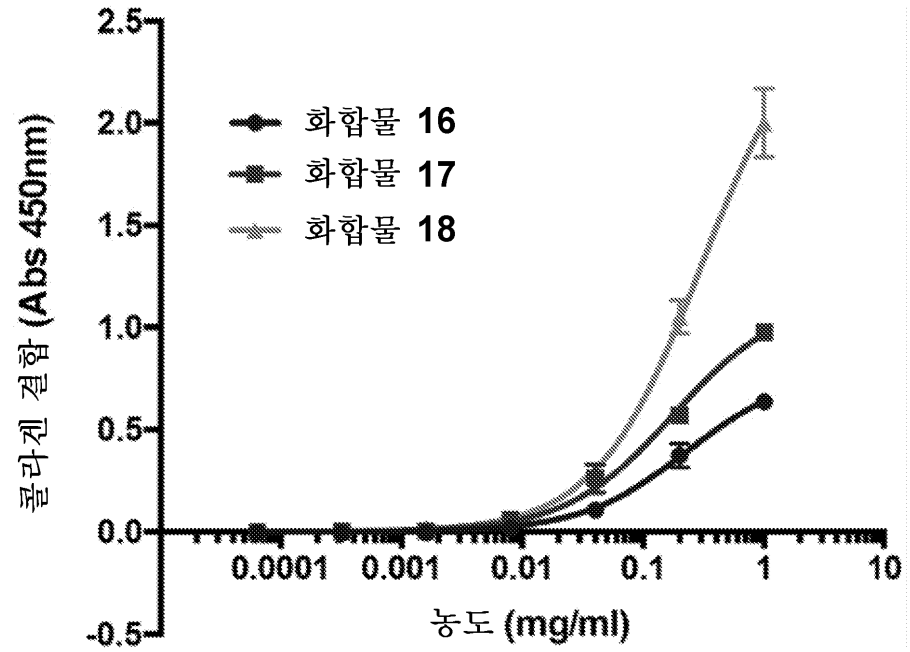
도면7



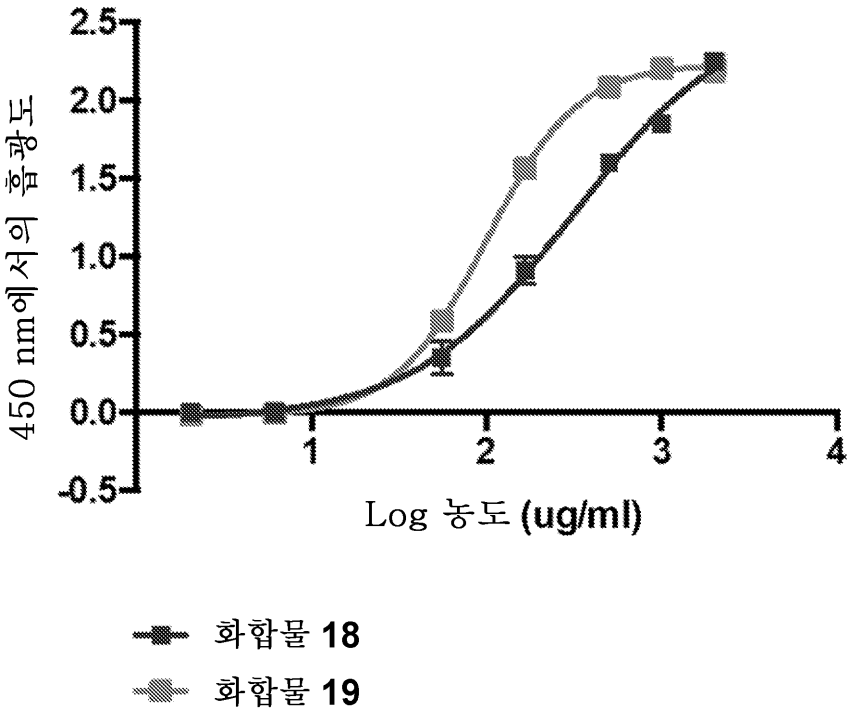
도면8


450 nm에서의 흡광도
3
2
1
0
-1
1
2
3
4
Log 농도 (ug/ml)
화합물 4
화합물 15

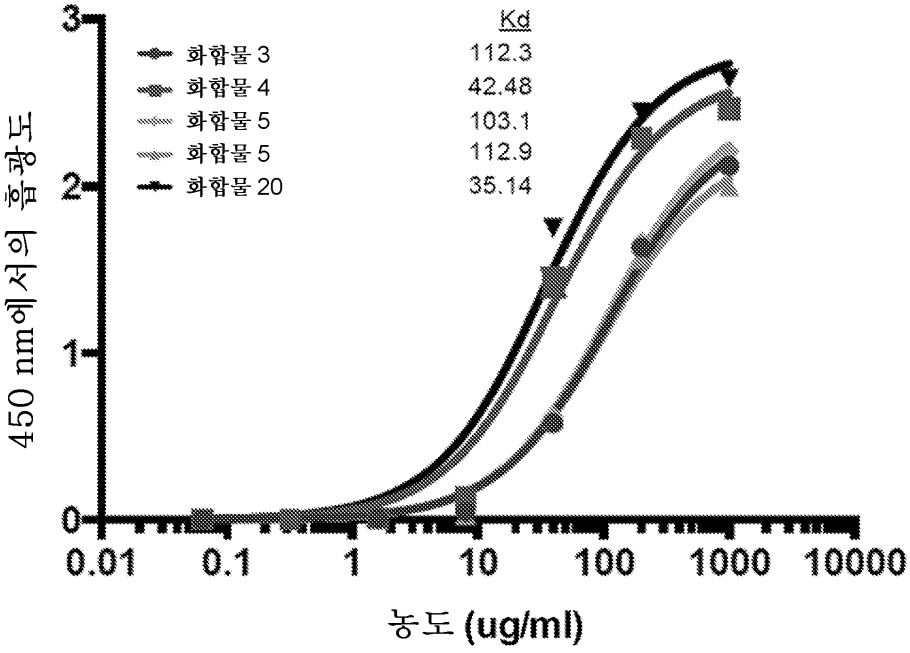
도면9


콜라겐 결합 (Abs 450nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
농도 (mg/ml)
화합물 16
화합물 17
화합물 18

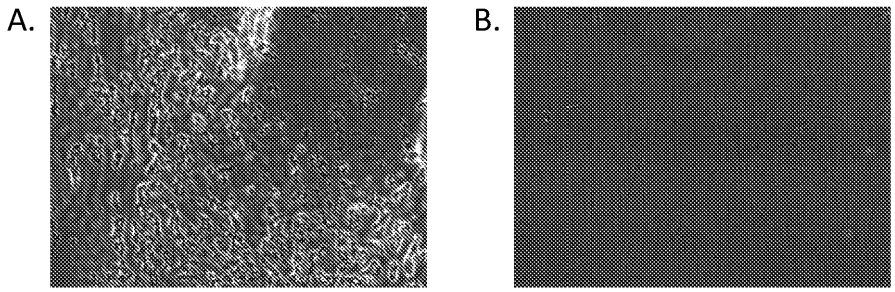
도면10


2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
450 nm에서의 흡광도
1
2
3
4
Log 농도 (ug/ml)
화합물 18
화합물 19

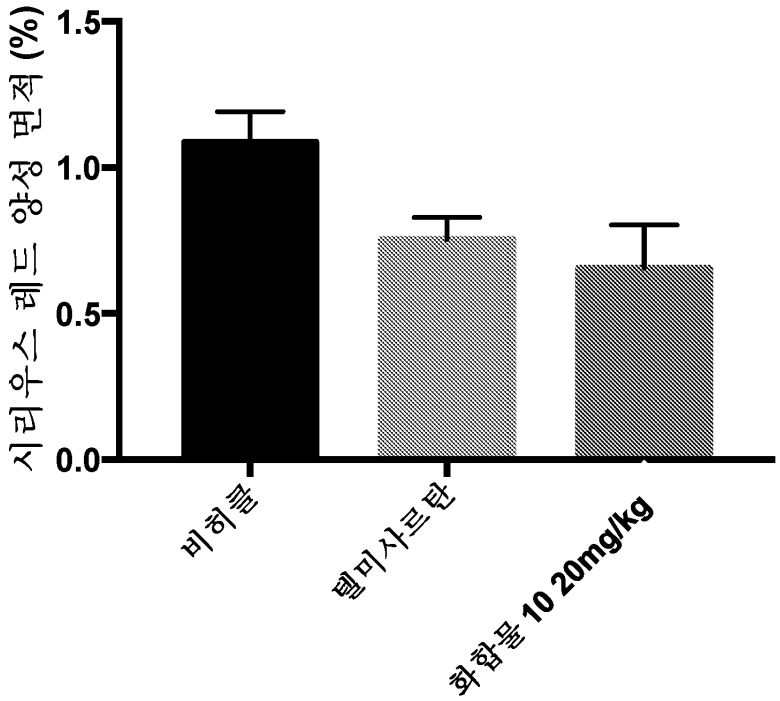
도면11


3
2
1
0
450 nm에서의 흡광도
화합물 3
화합물 4
화합물 5
화합물 5
화합물 20
Kd
112.3
42.48
103.1
112.9
35.14
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
농도 (ug/ml)

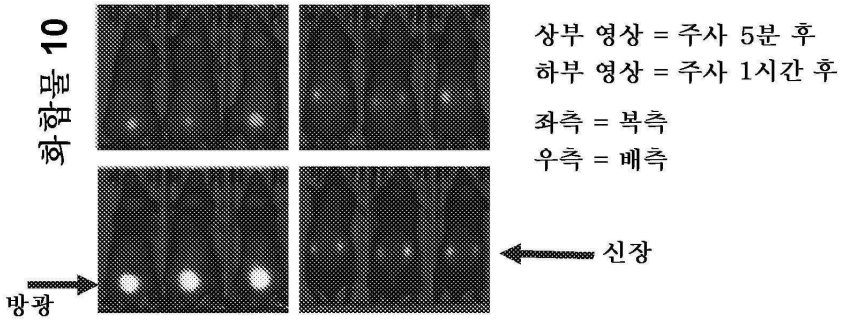
도면12



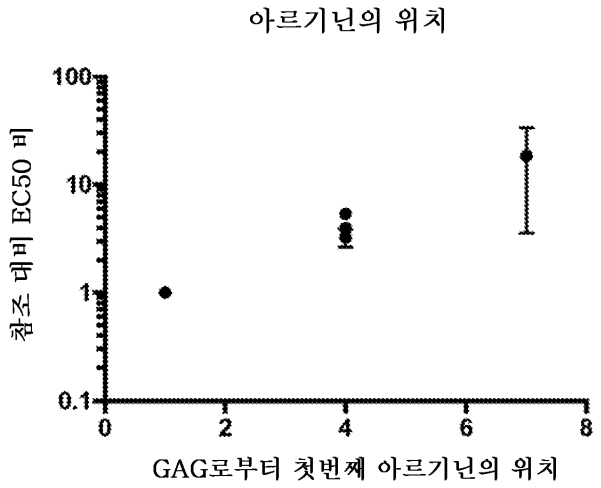
도면13



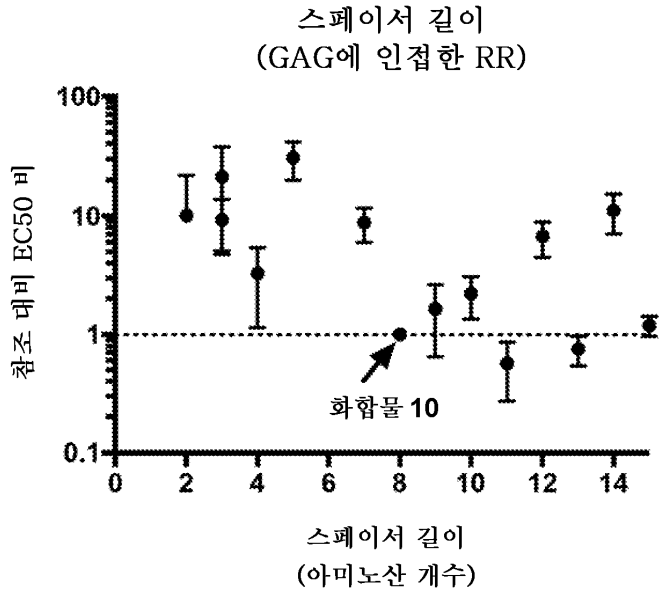
도면14



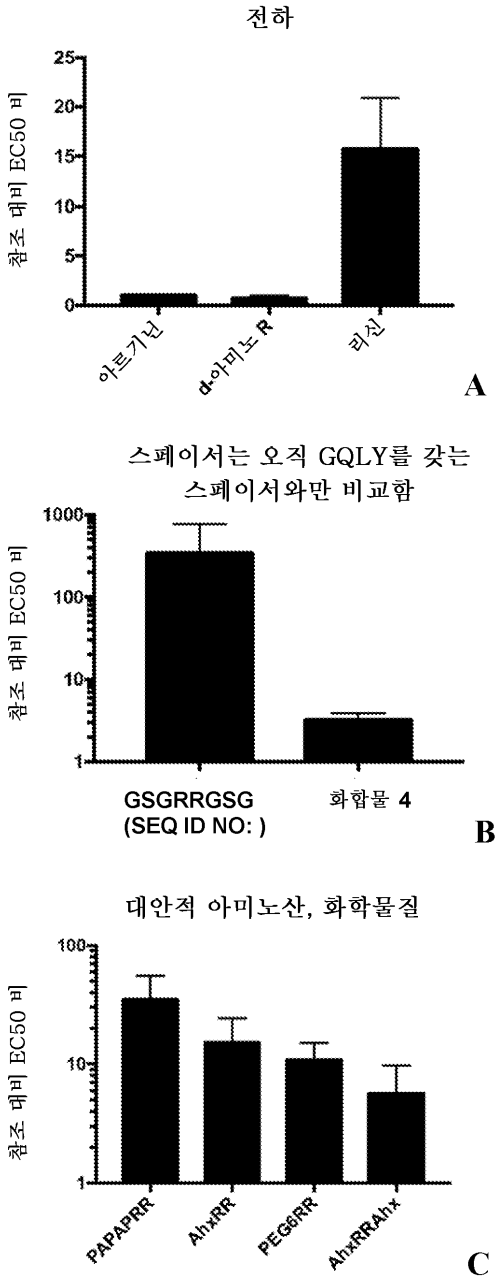
도면15


아르기닌의 위치
100
10
1
0.1
참조 대비 EC50 비
0
2
4
6
8
GAG로부터 첫번째 아르기닌의 위치

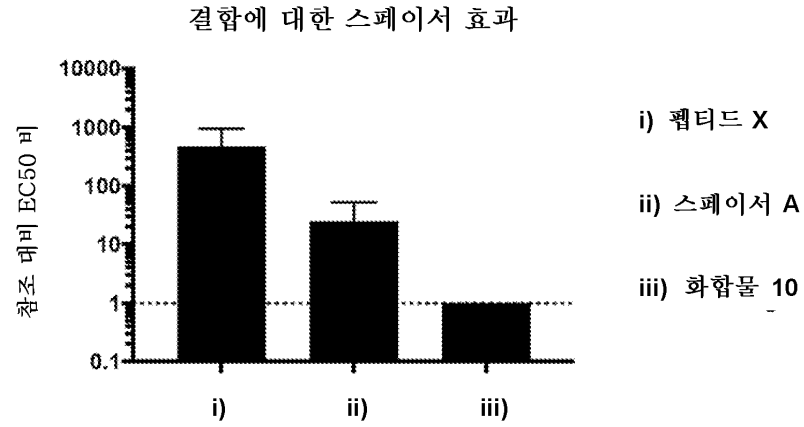
도면16


스페이서 길이
(GAG에 인접한 RR)
100
10
1
0.1
참조 대비 EC50 비
화합물 10
0
2
4
6
8
10
12
14
스페이서 길이
(아미노산 개수)

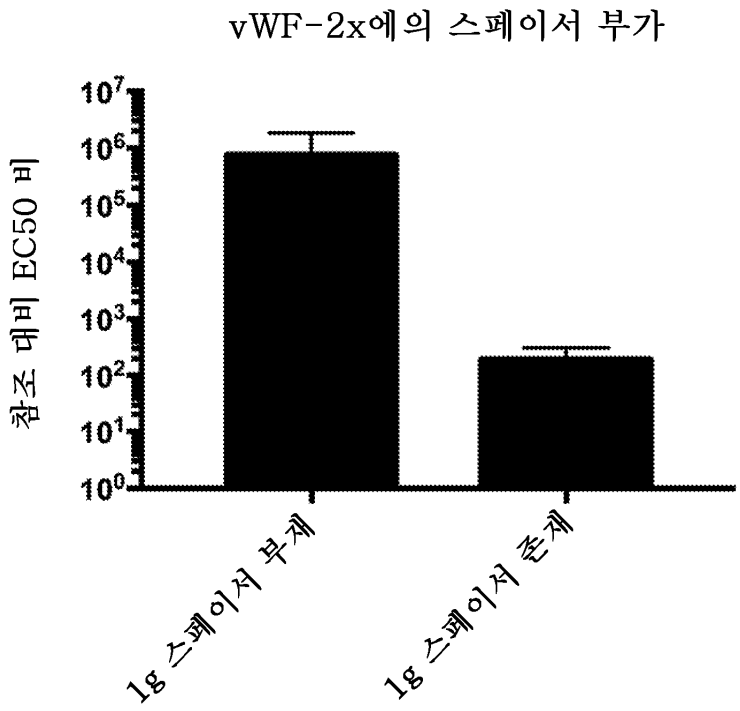
도면17


전하
참조 대비 EC50 비
25
20
15
10
5
0
아르기닌
d-아미노 R
리신
A
스페이서는 오직 GQLY를 갖는
스페이서와만 비교함
참조 대비 EC50 비
1000
100
10
1
GSGRRGSG
(SEQ ID NO:)
화합물 4
B
대안적 아미노산, 화학물질
참조 대비 EC50 비
100
10
1
PAPAPRR
AhxRR
PEG6RR
AhxRRAhx
C

도면18



도면19



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SYMIC IP, LLC

<120> SYNTHETIC BIOCONJUGATES

<130> 38FE-248645-WO

<140> PCT/US2018/041259

<141> 2018-07-09

<150> 62/530,047

<151> 2017-07-07

<160> 132

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

Gly Ser Gly Lys Arg Arg Gly Ser Gly
1 5

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 2

Arg Arg Arg Lys Lys Ile Gln Gly Arg Ser Lys Arg
1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

Arg Arg Gly Gly Arg Lys Trp Gly Ser Phe Glu Gly
1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 4

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 5

Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 6

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

1 5 10 15

Arg

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 7

Pro Ala Pro Ala Pro Arg Arg

1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 8

Trp Arg Glu Pro Ser Phe Ser Ala Leu Ser

1 5 10

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 9

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

1 5 10 15

Leu Tyr

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 10

Gly Glu Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr

1 5

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

Arg Arg Ala Asn Ala Ala Leu Lys Ala Gly Glu Leu Tyr Lys Cys Ile
1 5 10 15
Leu Tyr

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

Gly Glu Leu Tyr Lys Cys Ile Leu Tyr
1 5

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

Arg Arg Ala Asn Ala Ala Leu Lys Ala Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile
1 5 10 15
Leu Tyr

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

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

1 5 10 15

Leu Tyr

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 15

Gly Gln Leu Tyr Lys Cys Ile Leu Tyr

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

Arg Leu Asp Gly Asn Glu Ile Lys Arg

1 5

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

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

1 5 10

<210> 18

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 18

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> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 19

Cys Gln Asp Ser Glu Thr Arg Thr Phe Tyr

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 20

Thr Lys Lys Thr Leu Arg Thr

1 5

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 21

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> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 22

Ser Gln Asn Pro Val Gln Pro
1 5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 23

Ser Tyr Ile Arg Ile Ala Asp Thr Asn Ile Thr
1 5 10

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 24

Lys Glu Leu Asn Leu Val Tyr Thr
1 5

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 25

Gly Ser Ile Thr

1

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 26

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

1 5 10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 27

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

1 5 10

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 28

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

1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 29

Trp Arg Glu Pro Ser Phe Cys Ala Leu Ser

1 5 10

<210> 30

<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> 30

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

1 5 10 15

<210> 31

<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> 31

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

1 5 10 15

Xaa

<210> 32

<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> 32

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

1 5 10 15

<210> 33

<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> 33

Gly Arg Pro Gly Glu Arg

1 5

<210> 34

<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> 34

Gly Met Pro Gly Glu Arg

1 5

<210> 35

<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> 35

Gly Leu Pro Gly Glu Asn

1 5

<210> 36

<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> 36

Gly Leu Pro Gly Glu Arg

1 5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 37

Gly Leu Lys Gly Glu Asn

1 5

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> 4-Hydroxyproline

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> 4-Hydroxyproline

<400> 38

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

1 5 10 15

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 39

His Val Trp Met Gln Ala Pro Gly Gly Gly Lys

1 5 10

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 40

Trp Tyr Arg Gly Arg Leu

1 5

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 41

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

1 5 10

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 42

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

1 5 10

<210> 43

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 43

Gln Trp His Cys Thr Thr Arg Phe Pro His His Tyr Cys Leu Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 44

Ser Thr Trp Thr Trp Asn Gly Ser Ala Trp Thr Trp Asn Glu Gly Gly
1 5 10 15

Lys

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 45

Ser Thr Trp Thr Trp Asn Gly Thr Asn Trp Thr Arg Asn Asp Gly Gly
1 5 10 15

Lys

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 46

Cys Val Trp Leu Trp Glu Gln Cys

1 5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 47

Cys Val Trp Leu Trp Glu Asn Cys

1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 48

Cys Met Thr Ser Pro Trp Arg Cys

1 5

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 49

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

1 5 10 15

Pro Cys

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 50

Lys Leu Trp Leu Leu Pro Lys

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 51

Leu Ser Glu Leu Arg Leu His Glu Asn

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 52

Leu Thr Glu Leu His Leu Asp Asn Asn

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 53

Leu Ser Glu Leu Arg Leu His Asn Asn

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 54

Leu Ser Glu Leu Arg Leu His Ala Asn

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 55

Leu Arg Glu Leu His Leu Asn Asn Asn

1 5

<210> 56

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 56

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

1 5 10

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 57

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

1 5 10

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 58

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

1 5 10

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 59

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

1 5 10

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 60

Gly Ser Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr

1 5 10

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 61

Gly Ser Gly Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr
1 5 10

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 62

Lys Gln Leu Asn Leu Val Tyr Thr
1 5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 63

Cys Val Trp Leu Trp Gln Gln Cys
1 5

<210> 64

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 64

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> 65

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 65

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> 66

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 66

Ser Ile Leu Tyr

1

<210> 67

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 67

Gly Ser Gly Ser

1

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 68

Arg Gly Ser Gly

1

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 69

Arg Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 70

Arg Arg Gly Ser

1

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 71

Arg Arg Gly Ser Gly

1 5

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 72

Arg Arg Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 73

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 73

Lys Gly Ser Gly

1

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 74

Lys Lys Gly Ser Gly

1 5

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 75

Lys Lys Lys Gly Ser Gly

1 5

<210> 76

<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> 76

Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Gly

1 5

<210> 77

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 77

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> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Any amino acid

<400> 78

Xaa Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr

1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Any amino acid

<400> 79

Gly Xaa Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid

<400> 80

Gly Gln Xaa Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid

<400> 81

Gly Gln Leu Xaa Lys Ser Ile Leu Tyr

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Any amino acid

<400> 82

Gly Gln Leu Tyr Xaa Ser Ile Leu Tyr

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Any amino acid

<400> 83

Gly Gln Leu Tyr Lys Xaa Ile Leu Tyr

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Any amino acid

<400> 84

Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Xaa Leu Tyr

1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Any amino acid

<400> 85

Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Xaa Tyr

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Any amino acid

<400> 86

Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Xaa

1 5

<210> 87

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 87

Leu Lys Ala Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr His His Leu His
1 5 10 15

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg
20 25

<210> 88

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 88

Lys Ala Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr His His Leu His Ser
1 5 10 15

Tyr Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg
20 25

<210> 89

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 89

Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr His His Leu His Ser Tyr Gln
1 5 10 15

Asn Ser Lys Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg
20 25

<210> 90

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 90

Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile
1 5 10 15

Leu Tyr Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg
20 25

<210> 91

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 91

Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr Gly Ser Gly Gln Leu Tyr Lys
1 5 10 15

Ser Ile Leu Tyr Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg
20 25

<210> 92

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> 6-aminohexanoic acid

<400> 92

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

1 5 10 15

Ile Leu Tyr Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg

20 25

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 93

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg

1 5

<210> 94

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 94

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 Arg Arg Gly Ser Gly

20 25

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 95

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

1 5 10 15

Gly

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 96

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

1 5 10 15

Ser

<210> 97

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400

> 97

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

1 5 10 15

Gly

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 98

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

1 5 10 15

Gly

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 99

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

1 5 10 15

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 100

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

1 5 10 15

Ser

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 101

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

1 5 10 15

<210> 102

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 102

Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr Gly Ser Gly Arg Arg Arg Gly
1 5 10 15

Ser Gly

<210> 103

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 103

Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr Gly Ser Gly Arg Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Gly Ser Gly
20

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 104

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

1 5 10 15

Gly

<210> 105

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<220><221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-aminohexanoic acid
<220><221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> 6-aminohexanoic acid
<400> 105
Gly Gln Leu Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr Xaa Arg Arg Xaa
1 5 10
<210> 106
<211> 15
<212> PRT
<
213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 106
Arg Val Met His Gly Leu His Leu Gly Asp Asp Glu Gly Ser Gly
1 5 10 15
<210> 107
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 107
Cys Pro Gly Arg Val Met His Gly Leu His Leu Gly Asp Asp Glu Gly
1 5 10 15

Pro Cys Gly Ser Gly
20
<210> 108
<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 108

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

1 5 10 15

Pro Cys Gly Ser Gly Arg Arg Gly Ser Gly

20 25

<210> 109

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 109

Lys Arg Arg Gly Ser Gly

1 5

<210> 110

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 110

Trp Arg Glu Pro Ser Phe Ser Ala Leu Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10 15

Arg Arg

<210> 111

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 111

Gly Ser Gly Arg Arg

1 5

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 112

Gly Ser Gly Ser Gly Arg Arg

1 5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 113

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Arg

1 5

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 114

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg

1 5 10

<210> 115

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 115

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Arg

1 5 10

<210> 116

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 116

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg

1 5 10

<210> 117

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 117

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Arg

1 5 10 15

<210> 118

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 118

Gly Ser Arg Arg Gly Ser

1 5

<210> 119

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 119

Gly Ser Gly Arg Arg Gly Ser Gly

1 5

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 120

Gly Ser Gly Arg Arg Arg Gly Ser Gly

1 5

<210> 121

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 121

Gly Ser Gly Arg Arg Arg

1 5

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 122

Gly Ser Gly Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 123

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg Arg

1 5

<210> 124

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 124

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

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

<400> 125

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 126

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 126

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 127

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 127

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 128

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 128

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 Ser Gly Ser Arg Arg

20 25

<210> 129

<211> 26

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 129

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

1 5 10 15

Leu Tyr Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Arg

20 25

<210> 130

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 130

Lys Ser Gly Ser Arg Arg

1 5

<210> 131

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 131

Gly Gln Leu Tyr

1

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 132

Gly Ser Gly Ser Arg Arg Gly Ser

1 5