



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0102900
(43) 공개일자 2017년09월12일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 9/00</i> (2006.01) <i>A61K 38/17</i> (2006.01)
 <i>A61K 47/02</i> (2006.01) <i>A61K 47/26</i> (2017.01)
 <i>A61K 47/32</i> (2017.01) <i>C07K 14/47</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 9/0075</i> (2013.01)
 <i>A61K 38/1709</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7021042</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년01월08일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년07월26일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/012650</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/112292
 국제공개일자 2016년07월14일</p> <p>(30) 우선권주장
 62/101,190 2015년01월08일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 모레 매트릭스 인코포레이티드
 미국 뉴저지주 모리스타운 매디슨 에비뉴 55 슈트 400 (우: 07960)</p> <p>(72) 발명자
 랜더, 신시아
 미국 07945 뉴저지 멘드햄 힐탑 로드 30
 브로피, 폴린
 미국 37209 테네시주 네시빌 아이비 스트리트 6385
 피터슨, 캐린
 미국 92024 캘리포니아 엔시니터스 뎀튼 애비뉴 710</p> <p>(74) 대리인
 특허법인 남앤드남</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **MK2 저해제 펩타이드의 제형**

(57) 요약

기재된 발명은 개선된 안정성 및 생체이용률을 가진 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물을 포함하는 약제학적 제형을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/02 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 47/32 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/0078 (2013.01)

C07K 14/4703 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물의 치료량을 포함하는 약제학적 제형으로서, 상기 제형이 상기 폴리펩타이드의 안정성 및 생체이용률의 보존을 특징으로 하는, 약제학적 제형.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 제형이 미립자 약제학적 제형인, 약제학적 제형.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 제형이 에어로졸화된 약제학적 제형인, 약제학적 제형.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 제형이 분무 건조의 방법에 의해 제조되는, 약제학적 제형.

청구항 5

청구항 2에 있어서, 상기 약제학적 제형이 1% w/w 고형물을 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 6

청구항 2에 있어서, 상기 약제학적 제형이 5% w/w 고형물을 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 7

청구항 2에 있어서 추가로 트레할로오스를 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 상기 폴리펩타이드 또는 상기 이의 기능성 등가물 및 상기 트레할로오스가 각각 80/20의 비율인, 약제학적 제형.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 상기 이의 기능성 등가물 및 상기 트레할로오스가 각각 92.5/7.5의 비율인, 약제학적 제형.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 기능성 등가물이 단백질 형질도입 도메인 (PTD)인 제1 폴리펩타이드와 치료 도메인 (TD)인 제2 폴리펩타이드 사이의 융합으로부터 제조되는, 약제학적 제형.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 단백질 형질도입 도메인 (PTD)이 아미노산 서열 YARAAARQARA (서열 식별 번호: 11), FAKLAARLYR (서열 식별 번호: 16), 및 KAFAKLAARLYR (서열 식별 번호: 17)의 폴리펩타이드, 및 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 2)의 치료 도메인 (TD)인 제2 폴리펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 제형.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 제형이 건조 분말 흡입 디바이스 (DPI)를 통해 대상체에 전달되는, 약제학적 제형.

청구항 13

청구항 3에 있어서 추가로 염수를 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 염수가 NaCl인, 약제학적 제형.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 상기 폴리펩타이드 또는 상기 이의 기능성 증가물이 0.7 mg/mL의 농도인, 약제학적 제형.

청구항 16

청구항 13에 있어서, 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의상기 폴리펩타이드 또는 상기 이의 기능성 증가물이 7.0 mg/mL의 농도인, 약제학적 제형.

청구항 17

청구항 3에 있어서, 상기 기능성 증가물이 단백질 형질도입 도메인 (PTD)인 제1 폴리펩타이드와 치료 도메인 (TD)인 제2 폴리펩타이드 사이의 융합으로부터 제조되는, 약제학적 제형.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 단백질 형질도입 도메인 (PTD)이 아미노산 서열 YARAAARQARA (서열 식별 번호: 11), FAKLAARLYR (서열 식별 번호: 16), 및 KAFAKLAARLYR (서열 식별 번호: 17)의 폴리펩타이드, 및 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 2)의 치료 도메인 (TD)인 제2 폴리펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 제형.

청구항 19

청구항 3에 있어서, 상기 약제학적 제형이 네블라이저를 통해 대상체에 전달되는, 약제학적 제형.

청구항 20

청구항 1에 있어서, 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 증가물 및 나노-폴리플렉스 폴리머의 이온성 복합체를 포함하는 약제학적 제형으로서, 상기 이온성 복합체가 상기 펩타이드의 생체활성 및 안정성이 보존되는 정도로 세포내 pH 조건에 의해 선택된 세포내 구획에서 상기 이온성 복합체의 해리를 특징으로 하는, 약제학적 제형.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 나노-폴리플렉스 폴리머가 음이온성 및 엔도솜분해적인, 약제학적 제형.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 나노-폴리플렉스 폴리머가 폴리(프로필아크릴산) (PPAA)인, 약제학적 제형.

청구항 23

청구항 20에 있어서, 상기 약제학적 제형이 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 및 1:10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 상기 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 증가물 대 PPAA의 전하비 (CR)를 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 전하비 (CR)가 1:3인, 약제학적 제형.

청구항 25

청구항 21에 있어서, 상기 나노-폴리플렉스 폴리머가 폴리(아크릴산) (PAA)인, 억제학적 제형.

청구항 26

청구항 20에 있어서, 상기 기능성 등가물이 단백질 형질도입 도메인 (PTD)인 제1 폴리펩타이드와 치료 도메인 (TD)인 제2 폴리펩타이드 사이의 융합으로부터 제조되는, 억제학적 제형.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 단백질 형질도입 도메인 (PTD)이 아미노산 서열 YARAAARQARA (서열 식별 번호: 11), FAKLAARLYR (서열 식별 번호: 16), 및 KFAKLAARLYR (서열 식별 번호: 17)의 폴리펩타이드, 및 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 2)의 치료 도메인 (TD)인 제2 폴리펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 억제학적 제형.

청구항 28

청구항 20에 있어서, 상기 억제학적 제형이 이식 디바이스를 통해 대상체에 전달되는, 억제학적 제형.

청구항 29

청구항 20에 있어서, 상기 억제학적 제형이 국소로 대상체에 전달되는, 억제학적 제형.

청구항 30

청구항 20에 있어서, 상기 억제학적 제형이 비경구로 대상체에 전달되는, 억제학적 제형.

청구항 31

상기 치료가 필요한 대상체에서 혈관 이식-유도된 내막 과형성의 치료 방법으로서, 상기 방법이 아미노 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물의 치료량, 및 나노-폴리플렉스 폴리머를 포함하는 청구항 20의 상기 억제학적 제형의 투여를 포함하고, 상기 치료량은 하기에 유효한, 방법:

MK2 억제; 및

혈관 이식-유도된 내막 과형성 치료.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 나노-폴리플렉스 폴리머가 음이온성 및 엔도솜분해적인, 방법.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 나노-폴리플렉스 폴리머가 폴리(프로필아크릴산) (PPAA)인, 방법.

청구항 34

청구항 31에 있어서, 상기 억제학적 제형이 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 및 1:10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 상기 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물 대 PPAA의 전하비 (CR)를 포함하는, 방법.

청구항 35

청구항 34에 있어서, 상기 전하비 (CR)가 1:3인, 방법.

청구항 36

청구항 32에 있어서, 상기 나노-폴리플렉스 폴리머가 폴리(아크릴산) (PAA)인, 방법.

청구항 37

청구항 31에 있어서, 상기 기능성 등가물이 단백질 형질도입 도메인 (PTD)인 제1 폴리펩타이드와 치료 도메인 (TD)인 제2 폴리펩타이드 사이의 융합으로부터 제조되는, 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 단백질 형질도입 도메인 (PTD)이 아미노산 서열 YARAAARQARA (서열 식별 번호: 11), FAKLAARLYR (서열 식별 번호: 16), 및 KAFAKLAARLYR (서열 식별 번호: 17)의 폴리펩타이드, 및 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 2)의 치료 도메인 (TD)인 제2 폴리펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 39

청구항 31에 있어서, 상기 투여가 이식 디바이스에 의한, 방법.

청구항 40

청구항 31에 있어서, 상기 투여가 국소 투여에 의한, 방법.

청구항 41

상기 투여가 비경구 투여에 의한, 청구항 31에 따른 약제학적 제형.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원들에 대한 교차참조

[0002] 본 출원은, 2015년 1월 8일 출원된, "MK2 저해제 펩타이드의 제형" 명칭으로, 이의 내용이 참고로 본원에서 그 전체가 편입되는, 미국 가특허 출원 시리즈 번호 62/101,190의 우선권을 주장한다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 기재된 발명은 세포 및 분자 생물학, 폴리펩타이드, 약제학적 제형 및 치료적 사용 방법의 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 키나제

[0006] 키나제는 포스페이트 공여체(보통 아데노신-5'-삼인산(ATP))로부터 수신체 기질로의 포스포릴 이동 반응을 촉매하는 도처에 존재하는 효소 그룹이다. 모든 키나제가 본질적으로 동일한 포스포릴 이동 반응을 촉매하지만, 이들은 이들의 기질 특이성, 구조, 및 이들이 참여하는 경로에서 현저한 다양성을 나타낸다. 모든 이용가능한 키나제 서열(대략 60,000 개 서열)의 최근 분류는 키나제가 25 개의 상동성(공동 선조로부터 유도됨을 의미) 단백질 계열로 그룹화될 수 있음을 시사한다. 이들 키나제 계열은 구조적 폴딩의 유사성에 기반하여 12 개 폴딩 그룹으로 어셈블리된다. 게다가, 25 개 계열 중 22 개(모든 서열의 대략 98.8%)는 구조적 폴딩이 공지된 10 개의 폴딩 그룹에 속한다. 다른 3 개 계열 중, 폴리포스페이트 키나제는 뚜렷이 다른 폴딩 그룹을 형성하며, 나머지 2 개 계열은 모두 내재성 막 키나제이고 최종 폴딩 그룹을 이룬다. 이들 폴딩 그룹에는 일부 가장 널리 분포된 단백질 폴딩, 예컨대 Rossmann-유사 폴딩(β - α - β - α - β 의 위상적 순서로 3 개 또는 그 초과와 평행한 β 가닥이 2 개의 α 나선에 의해 연결됨), 페레독신-유사 폴딩(그 골격을 따라 특징적인 β α β β α β 2 차 구조를 갖는 일반 α + β 단백질 폴딩), TIM-배럴 폴딩(펩타이드 골격을 따라 교대하는 8 개의 α -나선 및 8 개의 평행한 β -가닥으로 구성된 보존된 단백질 폴딩을 의미), 및 역평행 β -배럴 폴딩(베타 배럴이 꼬이고 말려서 제1 가닥이 마지막 가닥으로 수소 결합되는 폐쇄된 구조를 형성하는 큰 베타-시트임)뿐만 아니라 단백질 구조의 모든 주요 클래스(모두 α , 모두 β , α + β , α/β)가 포함된다. 하나의 폴딩 그룹 내에서, 각 계열의 뉴클레오타이드-결합 도메인의 코어는 동일한 구조를 가지며, 단백질 코어의 위상은 동일하거나 순환 치환에 의해 관련된다. 하나의 폴딩 그룹 내 계열 간 상동성이 시사되지는 않는다.

[0007] 그룹 I(23,124 서열) 키나제는 단백질 S/T-Y 키나제, 비정형 단백질 키나제, 지질 키나제, 및 ATP 파악 효소를 편입하며, 추가로 단백질 S/T-Y 키나제, 및 비정형 단백질 키나제 계열(22,074 서열)을 포함한다. 이들 키나제에는 하기가 포함된다: 콜린 키나제(EC 2.7.1.32); 단백질 키나제(EC 2.7.137); 포스포릴라제 키나제(EC

2.7.1.38); 호모세린 키나제(EC 2.7.1.39); I-포스파티딜이노시톨 4-키나제(EC 2.7.1.67); 스트렙토마이신 6-키나제(EC 2.7.1.72); 에탄올아민 키나제(EC 2.7.1.82); 스트렙토마이신 3'-키나제(EC 2.7.1.87); 카나마이신 키나제(EC 2.7.1.95); 5-메틸티오리보스 키나제(EC 2.7.1.100); 비오마이신 키나제(EC 2.7.1.103); [하이드록시메틸글루타릴-CoA 환원효소(NADPH2)] 키나제(EC 2.7.1.109); 단백질-티로신 키나제(EC 2.7.1.112); [이소시트레이트 탈수효소(NADP+)] 키나제(EC 2.7.1.116); [미오신 경쇄] 키나제(EC 2.7.1.117); 하이그로마이신-B 키나제(EC 2.7.1.119); 칼슘/칼모둘린-의존형 단백질 키나제(EC 2.7.1.123); 로돕신 키나제(EC 2.7.1.125); [베타-아드레날린-수용체] 키나제(EC 2.7.1.126); [미오신 중쇄] 키나제(EC 2.7.1.129); [타우 단백질] 키나제(EC 2.7.1.135); 매크로라이드 2'-키나제(EC 2.7.1.136); I-포스파티딜이노시톨 3-키나제(EC 2.7.1.137); [RNA-폴리머라제]-서브유닛 키나제(EC 2.7.1.141); 포스파티딜이노시톨-4,5-비스포스페이트 3-키나제(EC 2.7.1.153); 및 포스파티딜이노시톨-4-포스페이트 3-키나제(EC 2.7.1.154). 그룹 I은 추가로 지질 키나제 계열(321 서열)을 포함한다. 이들 키나제에는 하기가 포함된다: I-포스파티딜이노시톨-4-포스페이트 5-키나제(EC 2.7.1.68); I D-미오-이노시톨-삼인산 3-키나제(EC 2.7.1.127); 이노시톨-테트라키스포스페이트 5-키나제(EC 2.7.1.140); I-포스파티딜이노시톨-5-포스페이트 4-키나제(EC 2.7.1.149); I-포스파티딜이노시톨-3-포스페이트 5-키나제(EC 2.7.1.150); 이노시톨-폴리포스페이트 멀티키나제(EC 2.7.1.151); 및 이노시톨-헥사키스포스페이트 키나제(EC 2.7.4.21). 그룹 I은 추가로 이노시톨-테트라키스포스페이트 I-키나제(EC 2.7.1.134); 피루베이트, 포스페이트 디키나제(EC 2.7.9.1); 및 피루베이트, 물 디키나제(EC 2.7.9.2)가 포함되는 ATP-과약 키나제(729 서열)를 포함한다.

[0008]

그룹 II(17,071 서열) 키나제는 Rossman-유사 키나제를 편입한다. 그룹 II는 P-루프 키나제 계열(7,732 서열)을 포함한다. 이들에는 글루코노키나제(EC 2.7.1.12); 포스포리블로키나제(EC 2.7.1.19); 티미딘 키나제(EC 2.7.1.21); 리보실니코틴아미드 키나제(EC 2.7.1.22); 테포스포-CoA 키나제(EC 2.7.1.24); 아데닐릴설페이트 키나제(EC 2.7.1.25); 판토테네이트 키나제(EC 2.7.1.33); 단백질 키나제(박테리아)(EC 2.7.1.37); 우리딘 키나제(EC 2.7.1.48); 시키메이트 키나제(EC 2.7.1.71); 데옥시시티딘 키나제(EC 2.7.1.74); 데옥시아데노신 키나제(EC 2.7.1.76); 폴리뉴클레오타이드 5'-하이드록실-키나제(EC 2.7.1.78); 6-포스포프루토-2-키나제(EC 2.7.1.105); 데옥시구아노신 키나제(EC 2.7.1.113); 테트라아실디사카라이드 4'-키나제(EC 2.7.1.130); 데옥시뉴클레오사이드 키나제(EC 2.7.1.145); 아데노실코빈아미드 키나제(EC 2.7.1.156); 폴리포스페이트 키나제(EC 2.7.4.1); 포스포메탈로네이트 키나제(EC 2.7.4.2); 아데닐레이트 키나제(EC 2.7.4.3); 뉴클레오사이드-포스페이트 키나제(EC 2.7.4.4); 구아닐레이트 키나제(EC 2.7.4.8); 티미딜레이트 키나제(EC 2.7.4.9); 뉴클레오사이드-삼인산-아데닐레이트 키나제(EC 2.7.4.10); (데옥시)뉴클레오사이드-포스페이트 키나제(EC 2.7.4.13); 사이티딜레이트 키나제(EC 2.7.4.14); 및 우리딜레이트 키나제(EC 2.7.4.22)가 포함된다. 그룹 II는 추가로, 포스포에놀피루베이트 카복시키나제 계열(815 서열)을 포함한다. 이들 효소에는 단백질 키나제(HPr 키나제/포스포타제)(EC 2.7.1.37); 포스포에놀피루베이트 카복시키나제(GTP)(EC 4.1.1.32); 및 포스포에놀피루베이트 카복시키나제(ATP)(EC 4.1.1.49)가 포함된다. 그룹 II는 추가로, 포스포글리세레이트 키나제(1,351 서열) 서열을 포함한다. 이들 효소에는 포스포글리세레이트 키나제(EC 2.7.2.3) 및 포스포글리세레이트 키나제(GTP)(EC 2.7.2.10)가 포함된다. 그룹 II는 추가로, 아스파르토키나제 서열(2,171 서열)을 포함한다. 이들 효소에는 카바메이트 키나제(EC 2.7.2.2); 아스파르테이트 키나제(EC 2.7.2.4); 아세틸글루타메이트 키나제(EC 2.7.2.81); 글루타메이트 5-키나제(EC 2.7.2.1) 및 우리딜레이트 키나제(EC 2.7.4.)가 포함된다. 그룹 II는 추가로, 포스포프루토키나제-유사 키나제 계열(1,998 서열)을 포함한다. 이들 효소에는 6-포스포프루토키나제(EC 2.7.1.11); NAD(+) 키나제(EC 2.7.1.23); I-포스포프루토키나제(EC 2.7.1.56); 디포스페이트-푸루토오스-6-포스페이트 I-인산전달효소(EC 2.7.1.90); 스펡가닌 키나제(EC 2.7.1.91); 디아실글리세롤 키나제(EC 2.7.1.107); 및 세라마이드 키나제(EC 2.7.1.138)가 포함된다. 그룹 II는 추가로, 리보키나제-유사 계열(2,722 서열)을 포함한다. 이들 효소에는 하기가 포함된다: 글루코키나제(EC 2.7.1.2); 케토헥소키나제(EC 2.7.1.3); 프루토키나제(EC 2.7.1.4); 6-포스포프루토키나제(EC 2.7.1.11); 리보키나제(EC 2.7.1.15); 아데노신 키나제(EC 2.7.1.20); 피리독살 키나제(EC 2.7.1.35); 2-데하이드로-3-데옥시글루코노키나제(EC 2.7.1.45); 하이드록시메틸피리미딘 키나제(EC 2.7.1.49); 하이드록시에틸티아졸 키나제(EC 2.7.1.50); I-포스포프루토키나제(EC 2.7.1.56); 이노신 키나제(EC 2.7.1.73); 5-데하이드로-2-데옥시글루코노키나제(EC 2.7.1.92); 타타토스-6-포스페이트 키나제(EC 2.7.1.144); ADP-의존형 포스포프루토키나제(EC 2.7.1.146); ADP-의존형 글루코키나제(EC 2.7.1.147); 및 포스포메틸피리미딘 키나제(EC 2.7.4.7). 그룹 II는 추가로, 티아민 피로포스포키나제(EC 2.7.6.2)가 포함되는 티아민 피로포스포키나제 계열(175 서열)을 포함한다. 그룹 II는 추가로, 글리세레이트 키나제(EC 2.7.1.31)가 포함되는 글리세레이트 키나제 계열(107 서열)을 포함한다.

[0009]

그룹 III 키나제(10,973 서열)은 페레독신-유사 폴딩 키나제를 포함한다. 그룹 III은 추가로, 뉴클레오사이드-

디포스페이트 키나제 계열(923 서열)을 포함한다. 이들 효소에는 뉴클레오사이드-디포스페이트 키나제(EC 2.7.4.6)가 포함된다. 그룹 III은 추가로, HPPK 키나제 계열(609 서열)을 포함한다. 이들 효소에는 2-아미노-4-하이드록시-6-하이드록시메틸디하이드로프테리딘 피로포스포키나제(EC 2.7.6.3)가 포함된다. 그룹 III은 추가로, 구아니도 키나제 계열(324 서열)을 포함한다. 이들 효소에는 구아니도아세테이트 키나제(EC 2.7.3.1); 크레아틴 키나제(EC 2.7.3.2); 아르기닌 키나제(EC 2.7.3.3); 및 롬브리신 키나제(EC 2.7.3.5)가 포함된다. 그룹 III은 추가로, 히스티딘 키나제 계열(9,117 서열)을 포함한다. 이들 효소에는 단백질 키나제(히스티딘 키나제)(EC 2.7.1.37); [피루베이트 탈수소효소(리포아미드)] 키나제(EC 2.7.1.99); 및 [3-메틸-2-옥시부타노에이트 탈수소효소(리포아미드)] 키나제(EC 2.7.1.115)가 포함된다.

[0010] 그룹 IV 키나제(2,768 서열)는 리보뉴클레아제 H-유사 키나제를 편입한다. 이들 효소에는 헥소키나제(EC 2.7.1.1); 글루코키나제(EC 2.7.1.2); 프룩토키나제(EC 2.7.1.4); 람놀로키나제(EC 2.7.1.5); 만노키나제(EC 2.7.1.7); 글루코노키나제(EC 2.7.1.12); L-리불로키나제(EC 2.7.1.16); 자일룰로키나제(EC 2.7.1.17); 에리트 리톨 키나제(EC 2.7.1.27); 글리세롤 키나제(EC 2.7.1.30); 판토테네이트 키나제(EC 2.7.1.33); D-리불로키나제(EC 2.7.1.47); L-푸콜로키나제(EC 2.7.1.51); L-자일룰로키나제(EC 2.7.1.53); 알로스 키나제(EC 2.7.1.55); 2-테하이드로-3-테옥시갈락토노키나제(EC 2.7.1.58); N-아세틸글루코사민 키나제(EC 2.7.1.59); N-아실만노스아민 키나제(EC 2.7.1.60); 폴리포스페이트-글루코스 인산전달효소(EC 2.7.1.63); 베타-글루코시드 키나제(EC 2.7.1.85); 아세테이트 키나제(EC 2.7.2.1); 부티레이트 키나제(EC 2.7.2.7); 분지형-쇄-지방산 키나제(EC 2.7.2.14); 및 프로피오네이트 키나제(EC 2.7.2.15)가 포함된다.

[0011] 그룹 V 키나제(1,119 서열)는 TIM β -배럴 키나제를 편입한다. 이들 효소에는 피루베이트 키나제(EC 2.7.1.40)가 포함된다.

[0012] 그룹 VI 키나제(885 서열)는 GHMP 키나제를 편입한다. 이들 효소에는 갈락토키나제(EC 2.7.1.6); 메발로네이트 키나제(EC 2.7.1.36); 호모세린 키나제(EC 2.7.1.39); L-아라비노키나제(EC 2.7.1.46); 푸코키나제(EC 2.7.1.52); 시키메이트 키나제(EC 2.7.1.71); 4-(시티딘 5'-디포스포)-2-C-메틸-D-에리트리톨 키나제(EC 2.7.1.148); 및 포스포메발로네이트 키나제(EC 2.7.4.2)가 포함된다.

[0013] 그룹 VII 키나제(1,843 서열)는 AIR 합성효소-유사 키나제를 편입한다. 이들 효소에는 티아민-포스페이트 키나제(EC 2.7.4.16) 및 셀레니드, 물 디키나제(EC 2.7.9.3)가 포함된다.

[0014] 그룹 VIII 키나제(565 서열)는 리보플라빈 키나제(565 서열)를 편입한다. 이들 효소에는 리보플라빈 키나제(EC 2.7.1.26)가 포함된다.

[0015] 그룹 IX 키나제(197 서열)는 디하이드록시아세톤 키나제를 편입한다. 이들 효소에는 글리세론 키나제(EC 2.7.1.29)가 포함된다.

[0016] 그룹 X 키나제(148 서열)는 추정 글리세레이트 키나제를 편입한다. 이들 효소에는 글리세레이트 키나제(EC 2.7.1.31)가 포함된다.

[0017] 그룹 XI 키나제(446 서열)는 폴리포스페이트 키나제를 편입한다. 이들 효소에는 폴리포스페이트 키나제(EC 2.7.4.1)가 포함된다.

[0018] 그룹 XII 키나제(263 서열)는 내재성 막 키나제를 편입한다. 그룹 XII는 돌리콜 키나제 계열을 포함한다. 이들 효소에는 돌리콜 키나제(EC 2.7.1.108)가 포함된다. 그룹 XII는 추가로, 운데카프레놀 키나제 계열을 포함한다. 이들 효소에는 운데카프레놀 키나제(EC 2.7.1.66)가 포함된다.

[0019] 키나제는 수많은 세포성 대사 및 신호전달 경로에서 필수적인 역할을 담당하며, 이들은 구조적 수준, 생화학적 수준, 및 세포적 수준에서 가장 잘 연구된 효소에 속한다. 모든 키나제가 동일한 포스페이트 공여체(대개의 경우, ATP)를 이용하며 분명하게 동일한 포스포릴 이동 반응을 촉매한다는 사실에도 불구하고, 이들은 이들의 구조적 폴딩 및 기질 인식 기전에서 현저한 다양성을 나타낸다. 이는 이들 기질의 구조 및 특성의 매우 다양한 성질에 크게 기인할 것이다.

[0020] **미토겐-활성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제(MK2 및 MK3)**

[0021] 상이한 그룹의 MAPK-활성화된 단백질 키나제(MAP-KAPKs)가 미토겐-활성화된 단백질 키나제(MAPKs)의 다운스트림으로 정의되었다. 이들 효소는 MAPK의 직접적인 기질이 아닌 단백질을 표적화하는 신호를 전달하며, 이에 따라 다양한 세포 기능으로 MAPK 캐스케이드를 이용해서 인산화-의존형 신호전달을 전달하는 작용을 한다. 이들 그룹 중 하나는 3 개의 MAPKAPK: MK2, MK3(3pK로도 공지됨), 및 MK5(PRAK로도 명명됨)에 의해 형성된다. 미토겐-활

성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제 2("MAPKAPK2", "MAPKAP-K2", 또는 "MK2"로도 공지됨)는 세린/트레오닌(Ser/Thr) 단백질 키나제 계열의 키나제이다. MK2는 MK3에 대해 매우 상동성(대략 75% 아미노산 동일성)이다. MK2 및 MK3의 키나제 도메인은 칼슘/칼모둘린-의존형 단백질 키나제(CaMK), 포스포릴라제 b 키나제, 및 리보솜 S6 키나제(RSK) 동형체의 C-말단 키나제 도메인(CTKD)과 가장 유사하다(대략 35% 내지 40% 동일성). mk2 유전자는 370 아미노산(MK2A) 및 400 아미노산(MK2B)의 두 대안적으로 스플라이싱된 전사체를 인코딩한다. mk3 유전자는 382 아미노산의 하나의 전사체를 인코딩한다. MK2- 및 MK3 단백질은 매우 상동성이지만, MK2A는 더 짧은 C-말단 영역을 보유한다. MK2B의 C-말단은 더 짧은 MK2A 동형체에 존재하지 않는 기능성 이분 핵 국제화 서열(NLS)(Lys-Lys-Xaa₁₀-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys; 서열식별번호: 23)을 함유하여, 대안적인 스플라이싱이 MK2 동형체의 세포성 국제화를 결정함을 시사한다. MK3은 유사한 핵 국제화 서열을 보유한다. MK2B 및 MK3 둘 다에서 확인된 핵 국제화 서열은 연구에서 MK2B 및 MK3과 p38 α 및 p38 β 의 특이적 상호작용을 매개하는 것으로 나타난 D 도메인(Leu-Leu-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys; 서열식별번호: 24)을 포괄한다. MK2B 및 MK3은 또한 NLS 및 D 도메인에 대해 N-말단에 위치하는 기능성 핵 외수송 신호(NES)를 보유한다. MK2B 내 NES는 랩토마이신 B에 의해 저해될 수 있는 긍정적인 자극 후 핵 외수송을 유발하기 충분하다. MK2 및 MK3에서 촉매 도메인에 대해 N-말단 서열은 프롤린이 풍부하며, 하나(MK3) 또는 두 개의(MK2) 추정 Src 상동성 3(SH3) 도메인-결합 부위를 함유하며, 그 연구에서는 MK2에 있어서 시험관내 c-Ab1의 SH3 도메인에 대한 결합을 매개하는 것으로 나타났다. 최근 연구에서는 이러한 도메인이 MK2-매개된 세포 이동에 관여됨을 시사한다.

[0022] MK2B 및 MK3은 휴지 세포의 핵에 주로 위치하는 반면, MK2A는 세포질에 존재한다. MK2B 및 MK3은 둘 다 스트레스 자극 시 염색체 영역 유지 단백질(CRM1)-의존형 기전을 통해 세포질로 빠르게 외수송된다. MK2B의 핵 외수송은 키나제의 활성화 루프 내 Thr334의 인산모방 돌연변이가 MK2B의 세포질 국제화를 증대시키므로, 키나제 활성화에 의해 매개되는 것으로 나타난다. 이론에 제한되지 않고, MK2B 및 MK3은 항시적 활성 핵 국제화 신호(NLS) 및 인산화-조절된 핵 외수송 신호(NES)를 함유할 수 있는 것으로 여겨진다.

[0023] MK2 및 MK3은, 심장, 폐, 신장, 생식 기관(유선 및 고환), 피부 및 골격 근육 조직에서, 뿐만 아니라 면역-관련 세포 예컨대 백혈구/류코사이트 및 수지상 세포에서 증가된 상대적 발현으로, 도처에 발현되는 것처럼 보인다.

[0024] 활성화

[0025] p38 α 및 p38 β 의 다양한 활성제는 MK2 및 MK3 활성을 강력히 자극한다. p38은 4 개의 프롤린-유도된 부위: Thr25, Thr222, Ser272, 및 Thr334 상에서 MK2의 시험관내 및 생체내 인산화를 매개한다. 이들 부위 중에서, Thr25만 MK3에서 보존되지 않는다. 이론에 제한되지 않고, 인산화된 Thr25의 기능은 공지되어 있지 않지만, 두 SH3 도메인-결합 부위 사이의 그 위치는 이것이 단백질-단백질 상호작용을 조절할 수 있음을 시사한다. MK2에서의 Thr222(MK3에서의 Thr201)는 키나제 도메인의 활성화 루프에 위치하며, MK2 및 MK3 키나제 활성화에 대해 필수적인 것으로 나타났다. MK2에서의 Thr334(MK3에서의 Thr313)는 촉매 도메인의 C-말단에 위치하며 키나제 활성을 위해 필수적이다. MK2의 결정 구조는 해결되었으며 이론에 제한되지 않고, Thr334 인산화가 MK2 핵 내수송 및 외수송에 대한 스위치로 작용할 수 있음을 시사한다. Thr334의 인산화는 또한 촉매 도메인에 대한 MK2의 C 말단의 결합을 약화시키거나 방해하여 NES를 노출시키고 핵 외수송을 촉진할 수 있다.

[0026] 연구에서는 p38이 핵에서 MK2 및 MK3을 활성화할 수 있는 반면, 실험적인 증거는 MK2 및 MK3의 활성화 및 핵 외수송이 또한 p38 안정화 및 국제화를 지시하는 인산화-의존형 형태 스위치에 의해 커플링되며 p38의 세포 위치 자체가 MK2 및 가능하게는 MK3에 의해 제어됨을 시사하는 것으로 나타났다. 추가의 연구에서는 핵 p38이 MK2의 인산화 및 활성화 후 MK2와의 복합체로 세포질로 외수송되는 것으로 나타났다. p38 및 MK2 간 상호작용은 연구에서 p38 수준이 MK2-결핍된 세포에서 낮고 촉매적으로 불활성인 MK2 단백질의 발현이 p38 수준을 회복시킴을 시사하였으므로, p38 안정화를 위해 중요할 수 있다.

[0027] 기질 및 기능

[0028] MK2는 MK3과 많은 기질을 공유한다. 양쪽 효소는 비교할만한 기질 선호도를 갖고 유사한 동력학 상수를 가진 펩타이드 기질을 인산화시킨다. MK2에 의한 효율적인 인산화에 요구된 최소 서열은 Hyd-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-pSer/pThr(서열 식별 번호: 22)인 것으로 밝혀졌고, 여기에서 Hyd는 부피가 큰, 소수성 잔기이다.

[0029] 축적된 연구는 MK2가 다양한 단백질을 인산화시킨다는 것을 보여주었고, 이는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 5-리포옥시게나제(ALOX5), 세포 분할 사이클 25 동족체 B(CDC25B), 세포 분할 사이클 25 동족체 C(CDC25C), 배아 치명적인, 비정상 시력, 드로소필라-유사 1(ELAVL1), 이중 핵 리보핵단백질 A0(HNRNPA0), 열충격 인자

단백질 1 (HSF1), 열충격 단백질 베타-1 (HSPB1), 케라틴 18 (KRT18), 케라틴 20 (KRT20), LIM 도메인 키나제 1 (LIMK1), 림프구-특이적 단백질 1 (LSP1), 폴리아데닐레이트-결합 단백질 1 (PABPC1), 폴리(A)-특이적 리보뉴클레아제 (PARN), CAMP-특이적 3',5'-환식 포스포디에스테라제 4A (PDE4A), RCSD 도메인 함유 1 (RCSD1), 리보솜 단백질 S6 키나제, 90kDa, 폴리펩타이드 3 (RPS6KA3), TGF-베타 활성화된 키나제 1/MAP3K7 결합 단백질 3 (TAB3), 및 트리스테트라프롤린 (TTP/ZFP36).

[0030] 열-충격 단백질 베타-1 (또한 일명 HSPB1 또는 HSP27)은 정상 세포에서 도처에 존재하는 스트레스-유도성 세포질 단백질이고 작은 열-충격 단백질 계열의 구성원이다. HSPB1의 합성은 열충격 및 다른 환경적 또는 병리생리학적 스트레스, 예컨대 UV 방사선, 저산소증 및 허혈에 의해 유도된다. 열저항성에서 그의 추정 이외에, HSPB1은 스트레스성 조건에 노출된 세포의 생존 및 회수에서 관여된다.

[0031] 실험적인 증거는 사이토카인 생합성 및 세포 이동의 조절에서 p38에 대한 역할을 지지한다. 마우스에서 mk2 유전자의 표적화된 결실은 p38이 많은 유사한 키나제의 활성화를 매개하지만, MK2가 이들 p38-의존형 생물학적 공정에 관여되는 핵심 키나제인 것으로 보임을 시사하였다. MK2의 손실은 (i) 사이토카인, 예컨대 종양 괴사 인자 알파(TNF- α), 인터루킨-6(IL-6), 및 감마 인터페론(IFN- γ)의 리포폴리사카라이드(LPS)-유도된 합성에서의 결합 및 (ii) 마우스 배아 섬유아세포, 평활근 세포, 및 중성구의 이동에서의 변화로 이어진다.

[0032] 염증 반응에서 MK2에 대한 역할과 일치되게, MK2-결핍 마우스는 *리스테리아 모노사이토게네스* 감염에 대해 증가된 감수성 및 병소 허혈 후 감소된 염증-매개된 뉴런의 사망을 나타내었다. p38 단백질 수준이 또한 MK2-결핍된 세포에서 유의미하게 감소되므로, 이들 표현형이 MK2의 손실에만 기인하는지 여부를 구별하는 것이 필요하였다. 이를 달성하기 위해, MK2 돌연변이체를 MK2-결핍된 세포에서 발현하였으며, 결과는 MK2의 촉매적 활성이 p38 수준을 회복하기 위해 필요하지는 않지만 사이토카인 생합성을 조절하기 위해 요구됨을 시사하였다.

[0033] MK2의 녹아웃 또는 녹다운 연구에서는 활성화된 MK2가 IL-6 mRNA의 AU-풍부 3' 미번역 영역과 상호작용하는 단백질의 인산화를 통해 IL-6 mRNA의 안정성을 증대시킨다는 강한 지지를 제공하였다. 특히, MK2는 IL-6 RNA를 안정화하는 mRNA-결합 단백질인 hnRNP A0의 인산화에 주요하게 관여되는 것으로 나타났다. 또한, 다양한 염증 질환을 조사하는 몇 개의 추가 연구에서는 친-염증성 사이토카인, 예컨대 IL-6, IL-1 β , TNF- α 및 IL-8의 수준이 안정한 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 환자 또는 담배 흡연자의 폐포 대식구에서 유도된 가래에서 증가되는 것으로 나타났다(Keatings V. 등, *Am J Resp Crit Care Med*, 1996, 153:530-534; Lim, S. 등, *J Respir Crit Care Med*, 2000, 162:1355-1360). 말초 혈액에서 상승된 수준의 친-염증성 사이토카인, 예컨대 인터루킨-8(IL-8) 및 인터루킨-6(IL-6)뿐만 아니라 관련된 다운스트림 세포 접합 분자(CAMs), 예컨대 세포간 접합 분자-1(ICAM-1) 및 혈관 세포 접합 분자-1(VCAM-1), 매트릭스 메탈로프로티나제, 예컨대 매트릭스 메탈로프로티나제-7(MMP-7), 및 신호전달 분자, 예컨대 S100 칼슘-결합 단백질 A12(S100A12, 칼그라눌린 C로도 공지됨)는 특발성 폐 섬유증 환자에서 사망률, 폐 이식-없는 생존, 및 질환 진행과 관련된 것으로 나타났다(Richards 등, *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185: 67-76; Richards, T. 등, *Am J Respir Crit Care Med*, 181: A1120, 2010; Moodley, Y. 등, *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 29(4): 490-498, 2003). 종합해보면, 이들 연구에서는 MK2 활성화에 의해 유도된 상승된 수준의 염증성 사이토카인이 기도 또는 폐 조직 질환의 발병에 관여될 수 있음을 시사하며; 기도 또는 폐 조직 질환, 예컨대 특발성 폐 섬유증 및 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)의 치료를 위한 항-사이토카인 요법에 대한 가능성을 시사한다(Chung, K., *Eur Respir J*, 2001, 18: Suppl. 34: 50-59).

[0034] mRNA 번역의 조절

[0035] MK2 녹아웃 마우스 또는 MK2-결핍된 세포를 이용하는 이전의 연구에서는 MK2가 그의 mRNA의 번역 속도를 증가시킴으로써 TNF- α , IL-1, 및 IL-6을 포함하는 염증성 사이토카인의 생산을 증가시키는 것으로 나타났다. MK2-결핍 마우스에서 TNF- α 의 전사, 가공 및 박리에서는 유의미한 감소를 검출할 수 없었다. p38 경로는 mRNA 안정성 조절에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 공지되어 있으며, MK2는 p38이 이를 통해 상기 기능을 매개하는 가능한 표적을 나타낸다. MK2-결핍 마우스를 이용하는 연구에서는 MK2의 촉매적 활성이 사이토카인 생산 및 이동에 대한 그의 효과를 위해 필요함을 시사하여, 이론에 제한되지 않고 MK2가 mRNA 안정성에 관여되는 표적을 인산화를 시사한다. 이와 일치하게, MK2는 불균질 핵 리보핵단백질(hnRNP) A0, 트리스테트라프롤린, 폴리(A)-결합 단백질 PABP1, 및 HuR, RNA-결합 단백질의 elav(드로소필라 멜라노가스테르에서 가시적인 배아-치명적인 비정상) 계열의 도처에 발현된 구성원에 결합하고/하거나 인산화하는 것으로 나타났다. 이들 기질은 3' 미번역 영역에서 AU-풍부 요소를 함유하는 mRNA에 결합하거나 이를 공동 정제하는 것으로 공지되어, MK2가 AU-풍부 mRNA, 예컨대 TNF- α 의 안정성을 조절할 수 있음을 시사한다. 현재 MK3이 유사한 기능을 수행하는지 여부는 공지되어 있지 않지만, MK2-결핍된 섬유아세포의 LPS 처리는 hnRNP A0 인산화를 완전히 폐지하여, MK3이 MK2의 손

실에 대해 보상할 수 없음을 시사한다.

[0036] MK3은 진핵 연장 인자 2(eEF2) 키나제의 인산화에 MK2와 함께 참여한다. eEF2 키나제는 eEF2를 인산화하고 불활성화한다. eEF2 활성화는 번역 동안 mRNA의 연장을 위해 결정적이며, Thr56 상의 eEF2의 인산화는 mRNA 번역의 종료를 일으킨다. Ser377 상에서 eEF2 키나제의 MK2 및 MK3 인산화는 이들 효소가 eEF2 키나제 활성을 조절할 수 있고, 그렇게 함으로써 mRNA 번역 연장을 조절함을 시사한다.

[0037] **MK2 및 MK3에 의한 전사 조절**

[0038] 많은 MK와 유사한 핵 MK2는 cAMP 반응 요소 결합(CREB), 혈청 반응 인자(SRF), 및 전사 인자 ER81의 인산화에 기여한다. 야생형 및 MK2-결핍된 세포의 비교는 MK2가 스트레스에 의해 유도된 주요 SRF 키나제임을 드러내어 스트레스-매개된 초기 반응에서 MK2에 대한 역할을 시사한다. MK2 및 MK3은 둘 다 생체내 기본 나선-루프-나선 전사 인자 E47과 상호작용하고 시험관내 E47을 인산화한다. E47의 MK2-매개된 인산화는 E47의 전사 활성을 억제하고, 그렇게 함으로써 E47-의존형 유전자 발현을 저해하는 것으로 나타나서, MK2 및 MK3이 조직-특이적 유전자 발현 및 세포 분화를 조절할 수 있음을 시사한다.

[0039] **MK2 및 MK3의 다른 표적**

[0040] 몇몇 다른 MK2 및 MK3 기질이 또한 동정되어, 몇몇 생물학적 공정에서 MK2 및 MK3의 다양한 기능을 반영한다. 스캐폴드화 단백질 14-3-3ζ는 생리적 MK2 기질이다. 연구에서는 14-3-3ζ가 단백질 키나제, 포스포타제, 및 전사 인자를 포함하는 세포 신호전달 경로의 수많은 성분과 상호작용함을 시사한다. 추가의 연구에서는 Ser58 상에서 14-3-3ζ의 MK2-매개된 인산화가 그의 결합 활성을 상쇄하는 것으로 나타나서, MK2가 보통 14-3-3ζ에 의해 조절되는 몇몇 신호전달 분자의 조절에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

[0041] 추가의 연구에서는 MK2가 또한 Ser77 상에서 7 개-구성원 Arp2 및 Arp3 복합체(p16-Arc)의 p16 서브유닛과 상호작용하고 이를 인산화하는 것으로 나타났다. p16-Arc는 액틴 세포골격의 조절에서 역할을 가져서, MK2가 이 공정에서 관여될 수 있음을 시사한다. 추가 연구에서는 작은 열충격 단백질 HSPB1, 림프구-특이적 단백질 LSP-1, 및 비베티닌이 MK2에 의해 인산화되는 것으로 나타났다. HSPB1이 특정한 관심을 받는 것은 분자 샤페론으로서 작용할 수 있고 열충격 및 산화 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있는 큰 올리고머를 형성하기 때문이다. 인산화 시, HSPB1은 큰 올리고머를 형성하는 그의 능력을 잃고 액틴 중합을 블록킹할 수 없어, HSPB1의 MK2-매개된 인산화가 달리 스트레스 동안 탈안정화된 액틴 동역학 조절을 목표로 한 항상성 기능을 제공한다는 것을 시사한다. MK3은 또한 시험관내 및 생체내 HSPB1을 인산화하는 것으로 나타났지만, 그러나 스트레스성 조건 동안 그의 역할은 아직 설명되지 않았다.

[0042] HSPB1이 폴리우비퀴틴화에 그리고 시험관내 및 생체내 26S 프로테아솜에 결합하는 것이 또한 나타났다. 유비퀴틴-프로테아솜 경로는 그의 주요 저해제, I 카파 B-알파 (IκB-알파)의 분해에 의해 전사 인자 NF-카파 B (NF-κB)의 활성화에 관여되고, HSPB1의 과발현이 NF-카파B (NF-κB) 핵 재국재화, DNA 결합, 및 전사 활성 유도된 by 에토포시드, TNF-알파, 및 인터류킨-1 베타 (IL-1β)를 증가시키는 것이 나타났다. 추가로, 이전의 연구에서는, 스트레스 상태하에서, HSPB1이 유비퀴틴화된 단백질, 예컨대 인산화된 I 카파 B-알파 (IκB-알파)의 분해를 선호한다는 것; 및 HSPB1의 상기 기능이 NF-카파 B (NF-κB) 활성화의 향상을 통해 그의 항-세포자멸적 특성을 설명한다는 것이 시사되었다 (Parcellier, A. 등, Mol Cell Biol, 23(16): 5790-5802, 2003).

[0043] MK2 및 MK3은 또한 5-리폭시게나아제를 인산화할 수 있다. 5-리폭시게나아제는 염증성 매개체 류코트리엔의 형성에서 최초 단계를 촉매한다. 티로신 하이드록실라제, 글리코겐 합성효소, 및 Akt가 또한 MK2에 의해 인산화되는 것으로 나타났다. 마지막으로, MK2는 Ser1210 상에서 종양 억제제 단백질 투베린을 인산화하여 14-3-3ζ에 대한 부착 부위를 생성한다. 투베린 및 하마틴은 보통 mTOR-의존형 신호전달의 길항에 의해 세포 성장을 음성적으로 조절하는 기능성 복합체를 형성하여, MK2의 p38-매개된 활성화가 투베린에 대한 14-3-3ζ 결합을 증가시킴으로써 세포 성장을 조절할 수 있음을 시사한다.

[0044] 축적된 연구에서는 p38 MAPK-경로와 전사 3 (STAT3)-매개된 신호-형질도입의 신호 변환체 및 활성제 사이의 상호 혼선이 리포폴리사카라이드 (LPS) 도전 모델에서 연속하여 활성화된 중요한 축을 형성한다는 것이 시사되었다. 상기 축의 균형있는 활성화가 염증성 대식세포 반응의 유도 및 번식 뿐만 아니라 해소기의 제어 모두에 필수적이고, 이는 IL-10 및 지속된 STAT3 활성화에 의해 크게 유도된다는 것이 나타났다 (Bode, J. 등, Cellular Signalling, 24: 1185-1194, 2012). 게다가, 또 다른 연구에서는 MK2가 LPS-유도된 p65 및 IRF3-매개된 신호전달에 관한 MK3의 중화 음성 조절 효과에 의해 STAT3의 LPS-유도성 IFNβ 유전자 발현 및 후속의 IFNβ-매개된 활성화를 제어한다는 것이 보여졌다. 상기 연구에서는 추가로, mk2/3 녹아웃 대식세포에서, IFNβ-의존형 STAT3

활성화가 IL-10으로부터 독립적으로 발생하는 것이, IFN β -와 대조로, 손상된 IL-10 발현이 *mk2/3* 녹아웃 대식 세포에서 MK3의 추가의 결실시 회복되지 않기 때문이라는 것이 보여졌다 (Ehltting, C. 등, J. Biol. Chem., 285(27): 24113-24124).

[0045] **키나제 저해**

[0046] 진핵 단백질 키나제는 이들의 촉매 도메인에 의해 관련되는 상동성 단백질의 최대 수퍼패밀리 중 하나를 이룬다. 가장 크게 관련된 단백질 키나제는 세린/트레오닌 또는 티로신 인산화에 대해 특이적이다. 단백질 키나제는 세포의 자극에 대한 세포 반응에서 통합적 역할을 담당한다. 따라서, 단백질 키나제의 자극은 신호 전달 시스템에서 가장 일반적인 활성화 기전 중 하나로 간주된다. 많은 기질이 여러 단백질 키나제에 의해 인산화를 거치는 것으로 공지되어 있으며, 다양한 단백질 키나제의 촉매 도메인의 일차 서열에 대해 상당한 양의 정보가 공개되었다. 이들 서열은 ATP 결합, 촉매작용, 및 구조적 온전성의 유지에 관여되는 다수의 잔기를 공유한다. 대부분의 단백질 키나제는 잘 보존된 30-32 kDa 촉매 도메인을 보유한다.

[0047] 연구에서는 단백질 키나제의 조절 요소를 동정하고 이용하려고 시도하였다. 이들 조절 요소에는 저해제, 항체, 및 블로킹 펩타이드가 포함된다.

[0048] **저해제**

[0049] 효소 저해제는 효소에 결합함으로써 효소 활성을 감소시키는 분자이다. 저해제의 결합은 기질이 효소의 활성 부위로 들어가는 것을 중지시키고/시키거나 효소가 그의 반응을 촉매하는 것을 방해할 수 있다. 저해제 결합은 가역적 또는 비가역적이다. 비가역적 저해제는 보통 효소와 반응하여 더 이상 그의 반응을 촉매할 수 없도록 이를 화학적으로 변화시킨다(예를 들면, 효소 활성을 위해 필요한 핵심 아미노산 잔기를 변형함으로써). 그에 반해서, 가역적 저해제는 비공유 결합하며, 이들 저해제가 효소, 효소-기질 복합체 또는 둘 모두에 결합하는지 여부에 따라 상이한 저해 유형이 생성된다.

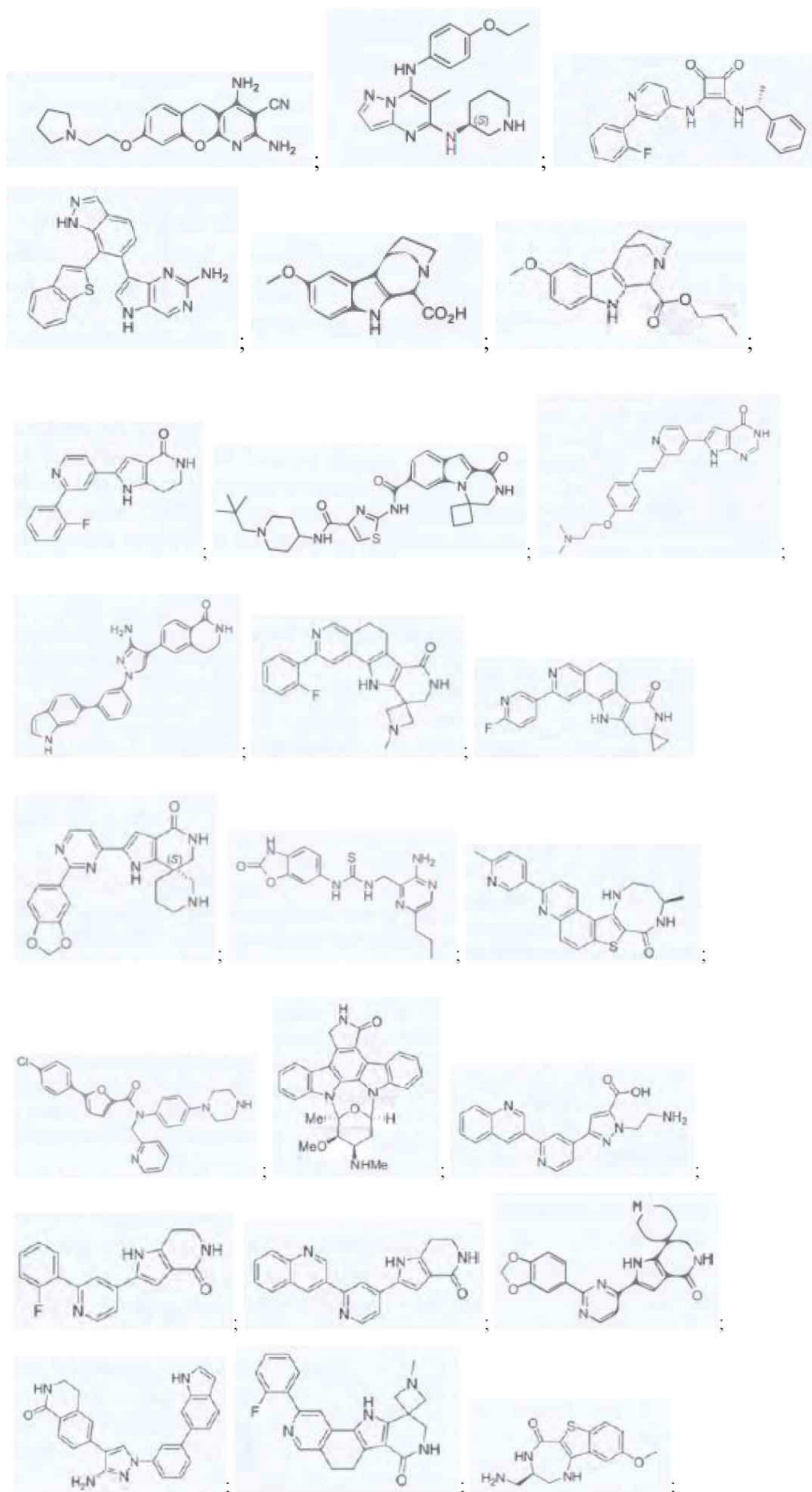
[0050] 효소 저해제는 종종 이들의 특이성 및 효력에 의해 평가된다. 이러한 맥락에서 사용되는 용어 "특이성"은 저해제의 선택적 부착 또는 다른 단백질에 대한 그의 결합 부재를 나타낸다. 용어 "효력"은 본원에서 사용된 바와 같이 저해제의 해리 상수를 나타내며, 이는 효소를 저해하기 위해 필요한 저해제의 농도를 시사한다.

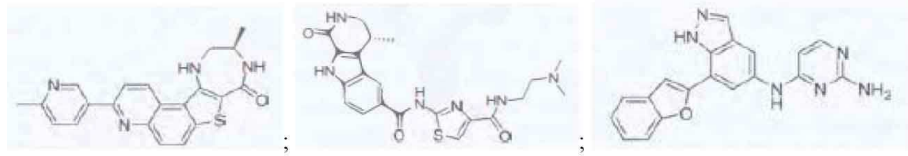
[0051] 단백질 키나제 저해제가 단백질 키나제 활성 조절에서 도구로 사용하기 위해 연구되었다. 저해제는, 예를 들면 사이클린-의존형(Cdk) 키나제, MAP 키나제, 세린/트레오닌 키나제, Src 계열 단백질 티로신 키나제, 티로신 키나제, 칼모듈린(CaM) 키나제, 카세인 키나제, 체크포인트 키나제(Chk1), 글리코젠 합성효소 키나제 3(GSK-3), c-Jun N-말단 키나제(JNK), 미토젠-활성화된 단백질 키나제 1(MEK), 미오신 경쇄 키나제(MLCK), 단백질 키나제 A, Akt(단백질 키나제 B), 단백질 키나제 C, 단백질 키나제 G, 단백질 티로신 키나제, Raf 키나제, 및 Rho 키나제와 사용하기 위해 연구되었다.

[0052] **소분자 MK2 저해제**

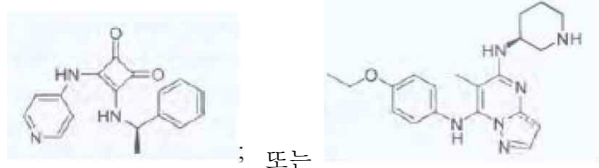
[0053] 다른 키나제에 관하여 적어도 보통의 선택성으로 MK2를 표적하는 개별 억제제가 설계된 반면, 우호적인 용해도 및 투과성을 가진 화합물을 창출하는 것은 어려웠다. 그 결과, 생체내 전-임상 연구에 대해 진전된 생화학적으로 효율적인 MK2 저해제가 상대적으로 극소수이다 (Edmunds, J. and Talanian, MAPKAP Kinase 2 (MK2) as a Target for Anti-inflammatory Drug Discovery. In Levin, J and Laufer, S (Ed.), RSC Drug Discovery Series No. 26, p 158-175, the Royal Society of Chemistry, 2012; 그 전체가 참고로 편입됨).

[0054] 개시된 MK2 저해제의 과반은 결정학적 또는 생화학적 연구에 의해 드러난 바와 같이 고전적 유형 I 저해제이다. 이와 같이, 이들은 키나제의 ATP 부위에 결합하고 따라서 키나제의 인산화 및 활성화를 저해시키기 위해 세포내 ATP (추정된 농도 1 mM- 5 mM)와 경쟁한다. 소분자 MK2 저해제의 대표적인 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다:





[0057]



[0058]

[0059]

블록킹 펩타이드

[0060]

펩타이드는 2 또는 그 초과 아미노산의 쇄로 이루어지며, 이로써 쇄 내 한 아미노산의 카복실 그룹이 다른 것의 아미노 그룹에 펩타이드 결합을 통해 연결되는 화학적 화합물이다. 펩타이드는 특히 단백질 구조 및 기능 연구에서 사용되었다. 합성 펩타이드는 특히 어디서 단백질-펩타이드 상호작용이 일어나는지를 확인하기 위한 프로브로 사용될 수 있다. 저해성 펩타이드는 특히 단백질 키나제, 암 단백질 및 다른 장애의 저해에 대한 펩타이드의 효과를 조사하기 위해 임상 연구에서 사용될 수 있다.

[0061]

몇몇 블록킹 펩타이드의 사용이 연구되었다. 예를 들면, 세포의 신호-조절된 키나제(ERK), MAPK 단백질 키나제는 세포 증식 및 분화를 위해 필수적이다. MAPK의 활성화는 MAPK가 제3 키나제 MAPKKK(MEKK)에 의해 인산화되는 업스트림 MAPKK(MEK)에 의해 인산화되는 캐스케이드 기전을 필요로 한다. ERK 저해성 펩타이드는 ERK에 대한 결합에 의해 MEK 유인물로 기능한다.

[0062]

다른 블록킹 펩타이드에는 오토캅티드-2 관련된 저해성 펩타이드(AIP)가 포함된다. 이러한 합성 펩타이드는 Ca^{2+} /칼모둘린-의존형 단백질 키나제 II(CaMKII)의 상당히 특이적이고 강력한 저해제이다. AIP는 CaMKII에 대해 매우 선택적인 펩타이드 기질인 오토캅티드-2의 인산화-불가능 유사체이다. AIP는 CaMKII를 IC_{50} 100 nM로 저해한다(IC_{50} 은 50% 저해를 수득하기 위해 필요한 저해제 농도임). AIP 저해는 신타이드-2(CaMKII 펩타이드 기질) 및 ATP에 대해 비-경쟁적이지만, 오토캅티드-2에 대해 경쟁적이다. 저해는 Ca^{2+} /칼모둘린의 존재 또는 부재에 의해 영향받지 않는다. CaMKII 활성은 AIP(1 μ M)에 의해 완전 저해되는 반면 PKA, PKC 및 CaMKIV는 영향받지 않는다.

[0063]

다른 블록킹 펩타이드에는 세포 분열 단백질 키나제 5(Cdk5) 저해성 펩타이드(CIP)가 포함된다. Cdk5는 이것이 p25와 연합하는 경우 알츠하이머병-특이적 포스포-에피토프에서 미세소관 단백질 타우를 인산화한다. p25는 끝이 잘린 활성화제이며, 이는 아밀로이드 β 펩타이드에 대한 노출 시 생리적 Cdk5 활성화제 p35로부터 생산된다. CIP로의 뉴런 감염 시, CIP는 p25/Cdk5 활성을 선택적으로 저해하며 피질 뉴런에서 비정상적인 타우 인산화를 억제한다. CIP에 의해 실증된 특이성의 이유는 완전히 이해되지 않고 있다.

[0064]

추가적 블록킹 펩타이드가 세포외-조절된 키나제 2(ERK2), ERK3, p38/HOG1, 단백질 키나제 C, 카세인 키나제 II, Ca^{2+} /칼모둘린 키나제 IV, 카세인 키나제 II, Cdk4, Cdk5, DNA-의존형 단백질 키나제(DNA-PK), 세린/트레오닌-단백질 키나제 PAK3, 포스포이노시티드(PI)-3 키나제, PI-5 키나제, PSTAIRE(cdk 고도 보존 서열), 리보솜 S6 키나제, GSK-4, 종자 중심 키나제(GCK), SAPK(스트레스-활성화된 단백질 키나제), SEK1(스트레스 신호전달 키나제), 및 병소 부착 키나제(FAK)에 대해 연구되었다.

[0065]

단백질 기질-경쟁적 저해제

[0066]

현재까지 개발된 대부분의 단백질 키나제 저해제는 ATP 경쟁자이다. 상기 유형의 분자는 키나제의 ATP 결합 부위에 대하여 경쟁하고 종종 그의 특이성에서 심각한 제한 때문에 부정확한 효과를 나타낸다. 이들 저해제의 낮은 특이성은 ATP 결합 부위가 다양한 단백질 키나제 중에서 고도로 보존된다는 사실 때문이다. 기질 결합 부위가 다양한 단백질 키나제 중에서 특정 정도의 가변성을 가짐에 따라 비-ATP 경쟁적 저해제, 다른 한편으로, 예컨대 기질 경쟁적 저해제는 더욱 특이적인 것으로 예상된다.

[0067]

기질 경쟁적 저해제가 보통 시험관내 표적 효소와 약한 결합 상호작용을 가져도, 연구는 화학 변형이 기질 저해제의 특이적 결합 친화도 및 생체내 효능을 개선할 수 있다는 것을 나타내었다 (Eldar-Finkelman, H. 등,

Biochim, Biophys. Acta, 1804(3):598-603, 2010). 게다가, 기질 경쟁적 저해제는 많은 경우에서 무세포 조건에서보다 세포에서 더 나은 효능을 나타낸다 (van Es, J. 등, Curr. Opin. Gent. Dev. 13:28-33, 2003).

[0068] 단백질 키나제 저해에서 특이성 및 효력을 향상시키기 위한 노력에서, 2기질 저해제는 또한 개발되었다. 2기질 효소의 상이한 결합 부위에 각 표적화된, 2개의 접합된 단편으로 이루어진, 2기질 저해제는, 2개의 천연 기질/리간드를 모방하는 그리고 동시에 주어진 키나제의 2개 영역과 회합하는 단백질 키나제 저해제의 특별한 그룹을 형성한다. 2기질 저해제의 원리 이점은, 단일-부위 저해제와 비교된 경우, 콘주게이트의 개선된 친화도 및 선택성을 초래할 수 있는 표적 효소와 더 많은 상호작용을 발생하는 그의 능력이다. 2기질 저해제의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 뉴클레오타이드-펩타이드 콘주게이트, 아데노신 유도체-펩타이드 콘주게이트, 및 강력한 ATP-경쟁적 저해제와 펩타이드의 콘주게이트.

[0069] **단백질 형질도입 도메인 (PTD)/세포 투과성 단백질 (CPP)**

[0070] 원형질막은 세포에 거대분자의 도입에 대해 엄청난 장벽을 나타낸다. 그의 효과를 발휘하기 위한 거의 모든 치료제에 대하여, 적어도 하나의 세포성 막은 횡단되어야 한다. 전통적 소분자 약제학적 현상은 단백질 기능을 조절하는 능력을 가진 막 투과성 분자의 우연한 발견에 의존한다. 소분자가 우세한 치료적 패러다임에 있어도, 많은 이들 분자는 특이성, 부작용, 및 독성의 부족으로 고통받고 있다. 소분자의 것보다 훨씬 우수한 단백질 조절 기능을 갖는, 정보-풍부 거대분자는 분자성, 세포성, 및 구조적 데이터에 기반된 합리적인 약물 설계를 이용하여 창출될 수 있다. 그러나, 원형질막은 500 Da 초과 크기의 대부분의 분자에 대해 불투과성이다. 따라서, 세포막을 가로지르기 위해 그리고 생체내 거대분자 화물을 전달하기 위해, 펩타이드, 예컨대 전사의 트랜스-활성제 (Tat)의 기본 도메인을 침투하는 세포의 능력은 치료적 단백질, 펩타이드, 및 핵산의 합리적인 설계를 매우 용이하게 할 수 있다.

[0071] 단백질 형질도입 도메인 (PTDs)은 포유동물 세포의 원형질막을 침투할 수 있는 그리고 막을 가로질러 많은 유형 및 분자량의 화합물을 수송할 수 있는 펩타이드의 부류이다. 이들 화합물은 하기를 포함한다: 효과기 분자, 예컨대 단백질, DNA, 접합된 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 및 작은 입자 예컨대 리포좀. PTDs가 다른 단백질에 화학적으로 연결된 또는 융합된 경우, 수득한 융합 펩타이드는 여전히 세포에 진입할 수 있다. 형질도입의 정확한 기전이 미궁지되어도, 이들 단백질의 내재화는 수용체-매개된다거나 또는 수송체-매개된다고 여겨지지 않는다. PTDs는 일반적으로 10-16 아미노산 길이이고 그의 조성물, 예컨대, 예를 들어, 아르기닌 및/또는 라이신이 풍부한 펩타이드에 따라 그룹화될 수 있다.

[0072] 세포에 효과기 분자를 수송할 수 있는 PTDs의 사용은 이들이 화물 분자의 세포성 흡수를 촉진시킴에 따라 약물의 설계에서 점점 더 매력적이게 된다. 일반적으로 그의 서열에 의존하여 양친매성 (극성 및 무극성 말단 모두를 갖는다는 의미) 또는 양이온성 (순 양으로 하전된 원자를 함유함을 의미 또는 이에 관련함)으로 분류된, 이들 세포-침투 펩타이드는 거대분자에 비-침습성 전달 기술을 제공한다. PTDs는 종종 "트로이 펩타이드", "막 전위 서열", 또는 "세포 투과성 단백질(CPPs)"로 불린다. PTDs는 또한 새로운 HSPB1 키나제 저해제가 세포막을 투과하는 것을 보조하기 위해 사용될 수 있다 (2008 년 1 월 10 일에 출원된 미국 출원 시리즈 번호 11/972,459, 명칭 "Polypeptide Inhibitors of HSPB1 Kinase and Uses Therefor", 및 2008 년 8 월 7 일에 출원된 시리즈 번호 12/188,109, 명칭 "Kinase Inhibitors and Uses Thereof" 참고, 각 출원의 내용은 본원에 그 전체가 참고로 편입됨).

[0073] **바이러스 PTD 함유 단백질**

[0074] 형질도입 특성을 갖는 것으로 기재되는 제1 단백질은 바이러스 기원이었다. 이들 단백질은 여전히 PTD 작용에 대하여 가장 통상적으로 허용된 모델이다. 전사 (Tat)의 HIV-1 교차활성인자 및 HSV-1 VP 22 단백질은 최고의 특성규명된 바이러스 PTD 함유 단백질이다.

[0075] Tat(HIV-1 트랜스-활성제 유전자 생성물)는 통합된 HIV-1 게놈의 강력한 전사 인자로 작용하는 86-아미노산 폴리펩타이드이다. Tat는 바이러스 게놈 상에 작용하여 잠복성 감염된 세포에서 바이러스 복제를 자극한다. Tat 단백질의 전위 특성은 휴지 감염된 세포를 활성화할 수 있도록 하며, 사이토카인을 포함하는 많은 세포성 유전자의 조절에 의해 미감염된 세포의 후속 감염에 대한 촉발에 관여될 수 있다. Tat의 최소 PTD는 9 아미노산 단백질 서열 RKRRQR(RR)(TAT49-57; 서열식별번호: 20)이다. Tat의 더 긴 단편을 이용하는 연구에서는 최대 120 kDa의 융합 단백질의 성공적인 형질도입을 실증하였다. 다중 Tat-PTDs 뿐만 아니라 합성 Tat 유도체의 부가 막 전위를 매개하는 것으로 실증되었다. Tat PTD 함유 융합 단백질은 암이 관여된 실험, 세포 내로의 사망-단백질의 수송, 및 신경퇴행성 장애의 질환 모델에서 치료적 모이어티로서 사용되었다.

- [0076] 연구자가 형질도입 뒤에 생물학의 이해를 추구함에 따라, 세포 막을 투과하기 위해 펩타이드 형질도입에 의해 사용된 기전은 최근에 상당한 관심의 대상이 되었다. Tat 형질도입이 비세포내이입 기전에 의해 발생했던 초기 리포트는 다른 세포-침투 펩타이드가 직접적인 막 파괴의 방식으로 섭취되어도 인공물로서 크게 목살되어 왔다. Tat 및 다른 PTDs의 형질도입이 거대음세포작용, 세포내이입의 특화된 형태의 방식으로 발생하는 최근 발견이 이들 펩타이드의 연구에서 새로운 패러다임을 창출하였다. 형질도입의 기전의 향상된 지식은 임상 성공의 최종적인 목표로 형질도입 효율 개선을 도왔다 (Snyder E. and Dowdy, S., Pharm Res., 21(3):389-393, 2004).
- [0077] Tat-매개된 단백질 형질도입용 현행 모델은 세포 표면에 Tat의 결합, 거대음세포작용의 자극, 거대음세포에 Tat 및 화물의 흡수, 및 세포질에 엔도솜 누출을 포함하는 다단계 공정이다. 세포 표면에 결합하는, 제1 단계는 세포 표면 상에서 도처에 존재하는 글리칸 쇄를 통한 것이라고 여겨진다. Tat에 의한 거대음세포작용의 자극은 세포 표면 단백질에 결합을 포함할 수 있는 미공지된 기전에 의해 발생하거나 또는 프로테오글리칸 또는 당지질의 방식으로 발생한다. 모든 세포 유형에 의해 사용된 유체상 세포내이입의 형태인, 거대음세포작용의 방식으로 흡수는 Tat 및 폴리아르기닌 형질도입에 요구된다. Tat 형질도입에서 최종 단계는 거대음세포로부터 세포질로의 누출이고; 상기 공정은, 다른 인자와 함께, Tat에 의한 막의 작은 변화 및 세포질에 Tat 및 그의 화물 (즉 펩타이드, 단백질 또는 약물 등)의 방출을 용이하게 하는 엔도솜에서 pH 하락에 의존하게 될 것 같다 (Snyder E. and Dowdy, S., Pharm Res., 21(3):389-393, 2004).
- [0078] VP22는 HSV 비리온의 구조적 부분인 HSV-1 외피 단백질이다. VP22는 수용체 독립적 전위가 가능하며 핵에 축적된다. VP22의 이러한 특성은 단백질을 CPP 함유 펩타이드로서 분류한다. 전장 VP22를 포함하는 융합 단백질은 원형질막을 통해 효율적으로 전위되었다.
- [0079] **세포간 전위 특성을 갖는 호메오단백질**
- [0080] 호메오단백질은 형태학적 공정에 관여되는 고도로 보존된, 트랜스활성화 전사 인자이다. 이들은 60 아미노산의 특이적 서열을 통해 DNA에 결합한다. DNA-결합 호메오도메인은 호메오단백질의 가장 고도로 보존된 서열이다. 몇몇 호메오단백질은 PTD-유사 활성을 나타내는 것으로 기재되었고; 이들은 세포 유형 특이성 없이 에너지-독립적 및 세포내이입-독립적 방식으로 세포막을 통해 효율적인 전위가 가능하다.
- [0081] 안테나페디아 단백질(Antp)은 세포막에 걸쳐 전위가 가능한 트랜스-활성화 인자이고; 전위가 가능한 최소 서열은 단백질의 호메오도메인(HD)의 제3 나선에 상응하는 16 아미노산 펩타이드이다. 이러한 나선의 내재화가 4°C에서 일어나서, 이러한 공정이 세포내이입 의존형이 아님을 시사한다. AntpHD와의 융합 단백질로서 생산된 최대 100 아미노산의 펩타이드는 세포막을 투과한다.
- [0082] 전위가 가능한 다른 호메오도메인에는 Fushi tarazu(Ftz) 및 Engrailed(En) 호메오도메인이 포함된다. 많은 호메오도메인은 고도로 보존된 제3 나선을 공유한다.
- [0083] **인간 PTDs**
- [0084] 인간 PTDs는 인간 환자 내로의 도입 시 잠재적인 면역원성 사안을 회피할 수 있다. PTD 서열을 갖는 펩타이드는 하기를 포함한다: Hoxa-5, Hox-A4, Hox-B5, Hox-B6, Hox-B7, HOX-D3, GAX, MOX-2, 및 FtzPTD. 이들 단백질은 모두 AntpPTD에서 발견되는 서열을 공유한다. 다른 PTDs는 에너지-, 수용체-, 및 세포내이입-독립적 전위가 가능한 Islet-1, 인터루킨-1 (IL-1), 종양 괴사 인자 (TNF), 및 카포시-섬유아세포 성장 인자 또는 섬유아세포 성장 인자-4 (FGF-4) 신호 펩타이드로부터의 소수성 서열을 포함한다. 확인되지 않은 PTDs는 섬유아세포 성장 인자(FGF) 계열의 구성원을 포함한다. FGFs는 다양한 세포의 증식 및 분화를 조절하는 폴리펩타이드 성장 인자이다. 몇몇 공보는 염기성 섬유아세포 성장 인자 (FGF-2)가 VP-22, Tat, 및 호메오도메인의 것과 유사한 미종래의 내재화를 나타낸다고 보고되었다. 산성 FGF (FGF-1)가 4°C만큼 낮은 온도에서 세포 막을 전위시켰다는 것이 또한 보고되었다. 그러나, 융합 단백질의 내재화 또는 전위 특성을 책임지는 도메인에 대한 확정적인 증거는 존재하지 않는다 (Beerens, A. 등, Curr Gene Ther., 3(5):486-494, 2003).
- [0085] **합성 PTDs**
- [0086] 몇몇 펩타이드는 PTDs가 세포 막을 거쳐 단백질을 수송하는 기전을 설명하기 위한 및 더 강한 PTDs를 창출하기 위한 시도에서 합성되었다. 많은 이들 합성 PTDs는 현존하는 및 양호하게 문서로 기록된 펩타이드에 기반되고, 반면에 다른 것은 PTD 기능에 결정적인 것으로 여겨지는 그의 염기성 잔기 및/또는 양전하로 선택된다. 몇몇의 이들 합성 PTDs는 현존하는 것보다 더 나은 전위 특성을 보여주었다 (Beerens, A. 등, Curr Gene Ther., 3(5):486-494, 2003). 예시적인 Tat-유도된 합성 PTDs는, 예를 들어, 비제한적으로, 하기를 포함한다:

WLRRKAWLRRRIKA (서열 식별 번호: 12); WLRRRIKA (서열 식별 번호: 13); YGRKKRRQRRR (서열 식별 번호: 14); WLRRKAWLRRRI (서열 식별 번호: 15); FAKLAARLYR (서열 식별 번호: 16); KAFAKLAARLYR (서열 식별 번호: 17); 및 HRRKAWLKKI (서열 식별 번호: 18).

[0087] MK2 저해제 펩타이드 치료 도메인 (TD)에 융합된 PTDs를 포함한 조성물

[0088] 몇몇의 MK2 저해제 펩타이드 (TD)는 합성되었다, 합성 PTDs로 융합되었고 그리고 이들 융합된 폴리펩타이드를 포함한 조성물의 사용은 연구되었다. 이들 폴리펩타이드는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: YRAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1; MMI-0100), YRAAARQARAKALNRQLGVA (서열 식별 번호: 19; MMI-0200), FAKLAARLYRKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 3; MMI-0300), KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 4; MMI-0400), HRRKAWLKKIKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 7; MMI-0500), YRAAARDARAKALNRQLAVAA (서열 식별 번호: 23; MMI-0600), 및 YRAAARQARAKALNRQLAVA (서열 식별 번호: 24; MMI-0600-2). 시험관내 및 생체내 연구들 모두는 이들 폴리펩타이드가 다양한 질환, 장애 및 병태의 치료에 유용할 수 있다는 것을 보여주었다. 이들은, 제한 없이, 하기를 포함한다: 과다형성 및 신생물 (미국 특허 번호 8,536,303 및 8,741,849) 염증성 장애 (미국 출원 번호 12/634,476 및 미국 출원 번호 13/934,933), 갑작 (미국 출원 번호 12/582516), 네오스파즘 (neospasm)으로 인한 혈관 이식편의 부전 (미국 출원 번호 13/114,872), 신경돌기 성장 개선 (미국 출원 번호 12, 844,815), 피부 반흔 (미국 출원 번호 13/829,876), 관상동맥 바이패스 혈관 이식편의 부전 (미국 출원 번호 13/700,087) 및 사이질 폐 질환 및 폐 섬유증 (미국 출원 번호 13/445,759).

[0089] 펩타이드 조성물은 제형 과학자에 수많은 특정한 도전을 시사한다 (R. W. Payne and M.C. Manning, "Peptide formulation: challenges and strategies", Innovations in Pharmaceutical Technology, 64-68 (2009)). 첫째, 펩타이드가 반응성 그룹을 격리시킬 수 있는 구상 구조를 갖지 않기 때문에, 펩타이드에서 거의 모든 잔기의 측쇄는 전체적으로 용매 노출되고, 가수분해성 반응, 예를 들어, 산화 및 탈아미드화를 통해 화학 분해를 나타낼 수 있다. 둘째, 수용액내 형태는 수용체에 결합된 경우 발견된 구조와 유사성을 거의 가질 수 없다. 셋째, 많은 펩타이드는 아주 낮은 농도에서 모노머성인 경향이 있지만, 그러나 농도가 증가됨에 따라 자가-조립될 수 있고 크게 관련된 상태인 것처럼 행동할 수 있지만, 이들 구조는 장기 안정성에서 임의의 증가를 제공하기에 너무 일시적 또는 유동적이다. 넷째, 자가-회합하는 펩타이드의 경향은 응집물 형성의 그러한 가능성을 의미하는 그들의 물리적 불안정성과 연결된다. 또한, 펩타이드 제형에 존재하는 부형제는 화학적으로 분해할 수 있거나, 제조 동안 다양한 표면과 상호작용할 수 있거나, 컨테이너 또는 마개와 상호작용할 수 있거나, 또는 펩타이드 자체와 상호작용할 수 있어, 이로써 제조의 결정적 특성에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다 (Lars Hovgaard, and Sven Frokjaer, "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, 2nd Ed., CRC Press (2012) pp. 212-213).

[0090] 기재된 발명은 MK2의 펩타이드-기반 저해제에 융합된 세포-침투 펩타이드를 포함한 유효한 제형을 제공한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0091] 발명의 요약

[0092] 하나의 측면에 있어서, 기재된 발명은 아미노산 서열 YRAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물의 치료량을 포함하는 약제학적 제형을 제공하고, 여기에서 제형은 폴리펩타이드의 안정성 및 생체이용률의 보존을 특징으로 한다.

[0093] 하나의 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 미립자 약제학적 제형이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 에어로졸화된 약제학적 제형이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 제형은 분무 건조의 공정에 의해 제조된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 1% w/w 고형물을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 5% w/w 고형물을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 추가로 트레할로오스를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 아미노산 서열 YRAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 상기 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물 및 트레할로오스는 각각 80/20의 비율이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 MMI-0100 (YRAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 이의 기능성 등가물 및 트레할로오스는 각각 92.5/7.5의 비율이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 건조 분말 흡입 디바이스 (DPI)를 통해 대상체에 전달된다.

[0094] 하나의 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 추가로 염수를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 염수

는 NaCl이다. 또 다른 구현예에 있어서, 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 상기 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물은 0.7 mg/mL의 농도이다. 또 다른 구현예에 있어서, 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 상기 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물은 7.0 mg/mL의 농도이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 네블라이저를 통해 대상체에 전달된다.

[0095] 하나의 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물 및 나노-폴리플렉스 폴리머의 이온성 복합체를 포함하고, 이온성 복합체는 펩타이드의 생체활성 및 안정성이 보존되는 정도로 세포내 pH 조건에 의해 선택된 세포내 구획에서 이온성 복합체의 해리를 특징으로 한다.

[0096] 또 다른 측면에 있어서, 기재된 발명은 상기 치료가 필요한 대상체에서 혈관 이식-유도된 내막 과형성의 치료 방법을 제공하고, 상기 방법은 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물 및 나노-폴리플렉스 폴리머의 이온성 복합체를 포함하는 약제학적 제형의 투여를 포함하고, 이온성 복합체는, 아미노 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물의 치료량, 및 나노-폴리플렉스 폴리머를 포함하는, 펩타이드의 생체활성 및 안정성이 보존되는 정도로 세포내 pH 조건에 의해 선택된 세포내 구획에서 이온성 복합체의 해리를 특징으로 하고, 여기에서 치료량은 MK2 억제; 및 혈관 이식-유도된 내막 과형성 치료에 유효하다.

[0097] 하나의 구현예에 있어서, 상기 나노-폴리플렉스 폴리머는 음이온성 및 엔도솜분해적이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 나노-폴리플렉스 폴리머는 폴리(프로필아크릴산) (PPAA)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 나노-폴리플렉스 폴리머는 폴리(아크릴산) (PAA)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 및 1:10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1의 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물 대 PPAA의 전하비 (CR)를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 전하비 (CR)는 1:3이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 이식 디바이스를 통해 대상체에 전달된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 국소로 대상체에 전달된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 비경구로 대상체에 전달된다.

[0098] 하나의 구현예에 있어서, 상기 기능성 등가물은 단백질 형질도입 도메인 (PTD)인 제1 폴리펩타이드와 치료 도메인 (TD)인 제2 폴리펩타이드 사이의 융합으로부터 제조된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 단백질 형질도입 도메인 (PTD)은 아미노산 서열 YARAAARQARA (서열 식별 번호: 11), FAKLAARLYR (서열 식별 번호: 16), 및 KAFAKLAARLYR (서열 식별 번호: 17)의 폴리펩타이드, 및 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 2)의 치료 도메인 (TD)인 제2 폴리펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

- [0099] 도 1은 수포 링딩 - 푸쉬 쓰루의 기술적 특징을 보여준다.
- 도 2는 Formpack® - 4PLY의 기술적 특징을 보여준다.
- 도 3은 MMI-0100 5% 고형물 제형에 대하여 동적 증기 흡착 등온선을 보여준다.
- 도 4는 MMI-0100 작업 표준의 크로마토그램을 보여준다.
- 도 5는 EPIC 흡입기 디바이스를 보여준다. 좌측에는 조립된 디바이스 (부착된 유동 채널을 가진 기본 유니트)가 있다. 흡입기는 전자장치를 포함한 (우측상에 묘사된) 외부 구동 박스로 테더링된다.
- 도 6은 1 mg 및 2 mg에서 MMI-0100 5% 제형에 대하여 초기 에어로졸 성능 결과의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.
- 도 7은 (최적화 이후) MMI-0100 1% 고형물 제형에 대하여 최대 10 mg 중량 충전물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.
- 도 8은 5 내지 10 mg의 MMI-0100 1% 고형물 제형으로부터 미세 입자 용량 (FPD)의 선형성 플롯을 보여준다.
- 도 9는 MMI-0100/트레할로오스 변이체 제형의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.
- 도 10은 40°C/75% RH에서 수포내 4 주 보관 이후 MMI-0100 1% 고형물 제형의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.
- 도 11은 MMI-0100 1% 고형물 제형에 대하여 40°C/75% 상대 습도 (RH)에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을

보여준다.

도 12는 MMI-0100 1% 고형물 제형에 대하여 25℃/60% RH에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

도 13은 MMI-0100 1% 고형물 제형에 대하여 4 주에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

도 14는 MMI-0100 5% 고형물 제형에 대하여 40℃/75% 상대 습도 (RH)에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

도 15는 MMI-0100 5% 고형물 제형에 대하여 25℃/60% RH에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

도 16은 MMI-0100 5% 고형물 제형에 대하여 4 주에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

도 17은 MMI-0100 1% 고형물, 7.5% 트레할로오스 제형에 대하여 40℃/75% 상대 습도 (RH)에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

도 18은 MMI-0100 1% 고형물, 7.5% 트레할로오스 제형에 대하여 25℃/60% RH에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

도 19는 MMI-0100 1% 고형물, 7.5% 트레할로오스 제형에 대하여 4 주에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

도 20은 MMI-0100 1% 고형물, 20% 트레할로오스 제형에 대하여 40℃/75% 상대 습도 (RH)에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

도 21은 MMI-0100 1% 고형물, 20% 트레할로오스 제형에 대하여 25℃/60% RH에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

도 22는 MMI-0100 1% 고형물, 20% 트레할로오스 제형에 대하여 4 주에서 회수된 약물의 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

도 23은 샘플 용매의 크로마토그램을 보여준다.

도 24는 정량 한계 (LOQ)의 크로마토그램을 보여준다.

도 25는 11 µg/mL 작업 표준 (전체 스케일)의 크로마토그램을 보여준다.

도 26은 11 µg/mL 작업 표준 (팽창된 스케일)의 크로마토그램을 보여준다.

도 27은 레이저 회절 디바이스의 도식을 보여준다.

도 28은 0.5, 1, 2, 3 및 4 시간의 추출 시간 이후 MMI-0100의 퍼센트 회수를 나타내는 막대 그래프이다.

도 29는 충전된 약물 양과 네블라이저 유형 1을 이용하여 분무된 전달된 용량 (DD) (호흡가능한 용량 <5 µm) 사이의 선형 상관관계를 보여준다.

도 30은 충전된 약물 양과 네블라이저 유형 2를 이용하여 분무된 전달된 용량 (DD) (호흡가능한 용량 <5 µm) 사이의 선형 상관관계를 보여준다.

도 31은 네블라이저 유형 1 및 네블라이저 유형 2를 이용하여 분무된 상이한 충전 용적 및 농도의 분무화 시간을 나타내는 막대 그래프를 보여준다.

도 32는 네블라이저 유형 1 및 네블라이저 유형 2를 이용하여 분무된 상이한 충전 용적 및 농도의 전달된 용량을 나타내는 막대 그래프를 보여준다.

도 33은 네블라이저 유형 1 및 네블라이저 유형 2를 이용하여 분무된 호흡가능한 용량 <5 µm의 상이한 충전 용적 및 농도를 나타내는 막대 그래프를 보여준다.

도 34는 p38-MK2 경로의 도식을 보여준다.

도 35는 MMI-0100 (MK2i)-NP 합성 및 특성규명을 보여준다. a) MK2i-NP 합성 반응식. b) MK2i-NPs는 세포내로 엔도솜 누출 및 펩타이드 치료제 방출을 매개하기 위해 설계되었고 최적화되었다. c) 치료 비교 요약: MK2i-NPs는 엔도솜분해적 PPAA 폴리머로 제형화되었고 반면에 NE-MK2i-NPs는 PPAA에 구조적으로 유사한 그러나 더 낮은 pKa 때문에 엔도솜분해적이지 않은 PAA 폴리머로 제형화되었다. 양쪽 MK2i-NPs 및 NE-MK2i-NPs는 나타낸 서열을 가진 MK2i 펩타이드로 만들어진 (적색 = 변형된 TAT 모방체 세포 침투 펩타이드 서열, 녹색 = MK2 저

해 서열). d) 상이한 전하비 ($[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-]$)에서 제조된 폴리플렉스의 제타 전위. 화상형성 및 흡수 연구를 위하여, Alexa NPs는 Alexa-488 형광단으로 표지된 MK2i 펩타이드로부터 제형화되었다. NE-NPs는 비-엔도솜분해적 (NE) PAA 폴리머로 제형화된다. 나타낸 값은 적어도 3 독립적인 측정의 평균이다. e) MK2i-NPs는 DLS 분석에 의해 입증된 바와 같이 엔도솜 pH 범위에서 pH-유발된 디스어셈블리를 경험한다.

도 36은 MMI-0100 (MK2i)-NP 제형이 세포성 흡수를 증가시키고, 세포내 체류를 확대시키고, 그리고 MK2i의 엔도-리소좀 공국재화를 감소시키는 것을 보여준다. a) 형광 표지된 MMI-0100 (MK2i), MK2i-NPs, 및 NE-MK2i-NPs의 세포성 흡수 및 체류의 유세포측정 정량화. $n=3$. b) 대표적인 유동 히스토그램은 증가된 세포성 흡수 및 MK2i-NPs를 통해 전달된 형광 표지된 MK2i 펩타이드의 더 긴 세포내 체류를 입증한다. c) 적혈구 용혈 검정은 MK2i-NPs가 PPAA 폴리머에 유사한 pH-의존형 막 분열성 활성을 갖고 반면에 NE-MK2i-NPs 및 MK2i 펩타이드의 막 파괴가 시험된 범위에서 무시해도 좋다는 것을 보여준다. d) 2 시간의 치료 이후 Lysotracker 적색 24 시간을 갖는 Alexa-488 표지된 MK2i 공국재화의 대표적인 공초점 현미경검사 이미지는 MK2i-NPs가 엔도-리소좀 공국재화를 감소시켰다는 것을 입증한다. 기준자 = 20 μm . e) 치료 이후 엔도리소좀 염료 Lysotracker 적색 0, 12, 및 24 시간을 갖는 MK2i 펩타이드 공국재화의 정량화, $n \geq 3$ 독립 이미지.

도 37은 MK2-NPs를 이용한 생체외 치료가 신생내막 형성을 감소시키고 인간 복재 정맥에서 MK2의 다운스트림으로 분자의 인산화를 변경한다는 것을 보여준다. a) MK2i-NP 제형은 생체외 HSV 조직에 Alexa 568-MK2i의 전달을 증가시켰다, 기준자 = 200 μm . b) Verhoeff Van-Gieson (VVG)의 대표적인 현미경검사 이미지는 2 시간 동안 치료되었고 14 일 동안 장기 배양액에서 유지되었던 인간 복재 정맥 부문을 염색시켰다. MK2i-NPs는 신생내막 형성을 강력하게 블록킹하였다. 적색 막대는 내막 두께를 구분한다. 기준자 = 100 μm . c) VVG 염색된 조직학적 부분으로부터 내막 두께의 정량화; 측정은 분리된 공여체로부터 적어도 3 정맥 고리에서 6-12개의 방사상으로 평행한 측정의 평균이다. d) MK2 기질 hnRNP A0, CREB, 및 HSP27의 인산화를 보여주는 대표적인 웨스턴 블랏. e-g) MK2i-NPs가 이동 및 염증에 연루된 MK2의 다운스트림으로 활성화된 몇 개의 인자의 MK2i 매개된 저해를 향상시켰음을 증명하는 $n \geq 3$ 분리된 공여체로부터 웨스턴 블랏 분석의 정량화.

도 38은 MMI-0100 (MK2i)-NP 제형이 HCAVSMCs에서 MMI-0100 (MK2i) 생체활성을 향상시킨다는 것을 보여준다. a) MK2i-NP 치료는 ANG II로 자극된 HCAVSMCs에서 TNF α 생산을 블록킹하였다. 모든 데이터는 (보충 도 11에서 보여진 데이터) 세포 수로 정규화된다. NT = 치료 없음, $n=4$. b) MK2i-NP 치료는 스크래치 상처의 형성 24 시간 이후 화학유인물질 PDGF-BB (50 ng/mL)로 자극된 인간 관상동맥 혈관 평활근 세포 (HCAVSMCs)에서 이동을 블록킹하였다, $n = 3$. c) MK2i-NPs는 막 상에 씨딩 8 시간 이후 Boyden 챔버 검정에서 화학유인물질 PDGF-BB에 대하여 세포 이동을 저해시켰다, $n = 7$. d) 염색된 트랜스웰의 대표적인 현미경검사 이미지는 각 치료 그룹에 대하여 막을 삽입한다.

도 39는 MMI-0100 (MK2i)-NPs를 이용한 수술중 치료가 이식된 정맥 이식편에서 생체내 대식세포 지속성 및 신생내막 형성을 감소시키는 것을 보여준다. a) MK2i-NP 치료는 정맥 이식편의 Verhoeff Van Gieson 염색된 조직학적 부분의 대표적인 이미지에서 나타낸 바와 같이 신생내막 형성을 감소시켰다. b) 관류에서 내막 두께의 정량화는 28 일 수술후 경정맥 삽입 이식편을 고정시켰다. $n \geq 7$ 이식편 / 치료 그룹. c) MK2i-NP 치료는 또한 정맥 이식편 상에서 RAM-11 면역조직화학을 이용하여 나타난 바와 같이 신생내막에서 대식세포의 지속성을 감소시켰다. 화살표는 양성으로 염색된 세포를 표시한다. 좌측 칼럼 기준자 = 100 μm , 우측 칼럼 줌조절된 시각 기준자 = 50 μm . d) 4 정맥 세그먼트 / 치료 그룹으로부터 경정맥 이식편 부분, $n = 16$ 조직학적 이미지에서 RAM-11 양성 대식세포 염색의 정량화.

도 40은 HPLC-정제된 CPP-MMI-0100 (MK2i) 융합 펩타이드 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1), MW = 2283.67 g/mol)에 대하여 전기분무-이온화 질량 분광분석법 (ESI-MS) 질량 스펙트럼을 보여준다. 질량 스펙트럼은 전체 펩타이드 서열의 단편화에 각각 상응하는 3개의 주요 피크를 보여준다.

도 41은 D₂MSO에서 A) 폴리(아크릴산) (PAA) 및 B) 폴리(프로필아크릴산) (PPAA) 호모폴리머의 ¹H NMR 스펙트럼을 보여준다. 분자량은 아크릴산/프로필아크릴산 관련된 피크 (즉 PAA에 대하여 피크 a 및 PPAA에 대하여 피크 c)와 사슬 전달체와 관련된 피크 (즉 PAA에 대하여 피크 c,d 및 PPAA에 대하여 피크 b)의 면적 비교에 의해 결정되었다: PAA 중합도 = 106, PPAA 중합도 = 190.

도 42는 DMF에서 A) 폴리(아크릴산) (PAA): 중합도 = 150, PDI = 1.27, $d_n/dc = 0.09$ (mL/g) 및 B) 폴리(프로필아크릴산) (PPAA): 중합도 = 193, PDI = 1.471, $d_n/dc = 0.087$ (mL/g) 폴리머의 겔 투과 크로마토그래피 (GPC) 크로마토그램을 보여준다. 미량은 중합에서 이용된 4-시아노-4-(에틸설파닐티오)카보닐 설퍼닐브렌탄산

(ECT) 사슬 전달제에 존재하는 트리티오카보네이트 모이어티의 특징적인 흡수 피크 (310 nm)에서 UV 흡광도를 보여준다.

도 43은 우라닐 아세테이트 대조염색된 MMI-0100 (MK2i)-NPs의 **A)** 동적 광 산란 분석 및 **B)** 대표적인 TEM 이미지를 보여준다. 기준자 = 100 nm.

도 44는 pH-의존형 적혈구 막 파괴에 대하여 전체 데이터 세트를 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 적혈구 용혈 검정은 MMI-0100 (MK2i)-NPs가 PPAA 폴리머에 유사한 pH-의존형 및 용량-의존형 막 분열성 활성을 갖지만 NE-MK2i-NPs 및 MK2i 펩타이드 단독은 갖지 않는다는 것을 보여준다.

도 45는 상이한 펩타이드 체형을 이용한 치료 24 시간 이후 MMI-0100 (MK2i)을 함유한 세포내 구획의 평균 크기를 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 구획 면적은 ImageJ 소프트웨어로 정량화되었다. * $p < 0.001$ 대 MK2 및 NE-MK2i-NPs, 적어도 3 상이한 이미지로부터 $n = 50$ 소표.

도 46은 적어도 3 상이한 공여체로부터 2 시간 동안 치료된 및 그 다음 14 일, $n \geq 3$ 동안 장기 배양액에서 유지된 인간 복제 정맥 (HSV) 외식편의 내막 두께 측정의 전체 용량 반응 데이터 세트를 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 무 치료 대조군 (NT)에 비교된 * $p \leq 0.01$, NT에 비교된 ** $p \leq 0.001$, ¹ $p \leq 0.05$.

도 47은 MTT 검정을 통해 평가된 경우 2 시간 동안 치료된 및 1 또는 14 일 동안 장기 배양액에서 유지된 HSV 고리에서 조직 생존력을 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 적어도 3 분리된 공여체로부터 $n \geq 3$ 정맥 고리.

도 48은 6 시간 동안 ANG II로 자극된, 2 시간 동안 MMI-0100 (MK2i)-NPs, NE-MK2i-NPs, 또는 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 단독으로 치료된 및 24 시간 동안 새로운 배지에서 배양된 HCAVSMCs에서 TNF α 생산을 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 모든 데이터는 세포 수로 정규화된다. NT = 무 치료. NT + TNF α 그룹에 비교된 * $p < 0.05$, 동일한 농도에서 MK2i에 비교된 ¹ $p < 0.05$, 동일한 농도에서 NE-MK2i-NPs에 비교된 # $p < 0.05$, $n = 4$.

도 49는 HCAVSMCs에서 IL-6 생산의 TNF α -유도된 증가를 부분적으로 블록킹하는 MMI-0100 (MK2i)-NPs를 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 세포는 6 시간 동안 TNF α 로 자극되었고, 2 시간 동안 MK2i-NPs 또는 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 단독으로 치료되었고, 24 시간 동안 새로운 배지에서 배양되었다. 모든 데이터는 세포 수로 정규화된다. NT = 무 치료. NT + TNF α 그룹에 비교된 * $p < 0.05$, 동일한 농도에서 MK2i에 비교된 ¹ $p < 0.05$, $n = 4$.

도 50은 6 시간 동안 10 μ M ANG II로 자극된, 2 시간 동안 MMI-0100 (MK2i)-NPs, NE-MK2i-NPs, 또는 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 단독으로 치료된 및 24 시간 동안 새로운 배지에서 배양된 HCAVSMCs에서 세포 생존력을 나타내는 막대 그래프이다. NT = 무 치료, $n = 4$.

도 51은 6 시간 동안 TNF α 로 자극된, 2 시간 동안 MMI-0100 (MK2i)-NPs 또는 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 단독으로 치료된, 및 24 시간 동안 새로운 배지에서 배양된 HCAVSMCs에서 세포 생존력을 나타내는 막대 그래프를 보여준다. $n = 4$.

도 52는 30 분 동안 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 단독, MK2i-NPs, 또는 NE-MK2i-NPs로 자극 치료된 및 24 시간 50 ng/mL PDGF-BB 있거나 (+) 또는 없이 (-) 새로운 배지에서 배양된 HCAVSMCs에서 세포 증식을 나타내는 막대 그래프를 보여준다. NT = 무 치료, $n = 4$.

도 53은 각 치료 그룹에 대하여 토끼 경정맥 이식술 외식편의 대표적인 RAM-11 염색 이미지를 보여준다. 화살표는 양성으로 염색된 세포를 표시한다. 좌측 칼럼 기준자 = 100 μ m, 우측 칼럼 축소된 시각 기준자 = 50 μ m.

도 54는 (A) HCAVSMC 흡수의 유세포측정 정량화 및 형광 표지된 MK2i, MK2i-NPs, 및 NE-MK2i-NPs의 체류를 보여준다. 데이터는 평균 \pm SEM ($n = 3$)이다. P 값은 단일 인자 ANOVA에 의해 결정된다. (B) 치료 제거 0 및 5 일 이후 세포내 펩타이드 형광의 지수형 감쇠 비선형 회귀 분석에 의한 세포내 MK2i 반감기 ($t_{1/2}$)의 정량화. (C 및 D) 자유 MK2i, MK2i-NPs, 또는 NE-MK2i-NPs를 이용한 치료의 제거 이후 MK2i 내재화에 대하여 HCAVSMCs 양성의 백분율을 계산하기 위해 사용된 세로 정량화 (C) 및 대표적인 유동 히스토그램 및 서브셋 (D). 데이터는 평균 \pm SEM ($n = 3$)이다. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ 대 MK2i; ¹ $P < 0.01$, ¹ $P < 0.001$ 대 NE-MK2i-NPs; 단일 인자 ANOVA.

도 55는 형광 표지된 MK2i, MK2i-NPs, 및 NE-MK2i-NPs의 내피 세포 흡수의 (A 및 B) 유세포측정 정량화 (A) 및 대표적인 유동 히스토그램 (B)을 보여준다. 데이터는 평균 \pm SEM ($n = 3$)이다. P 값은 단일 인자 ANOVA에 의해 결정된다. (C) 치료 제거 직후 내피 세포 이동의 정량화 및 대표적인 이미지는 Boyden 트랜스웰 이동 검정에 의

해 결정된다. (D) 화학유인물질 PDGF-BB의 존재하에 MK2i-치료된 VSMC 이동의 정량화. 이동은 시험관내 스크래치 상처 적용 24 시간 이후 퍼센트 상처 봉합을 계산함으로써 결정되었다. (C 및 D) 데이터는 평균 \pm SEM ($n = 3$)이다. P 값은 단일 인자 ANOVA에 의해 결정된다.

도 56은 경시적으로 혈관 평활근 및 내피 단백질 화학유인물질 단백질-1 (MCP-1) 생산에 관한 MK2i-NP 및 MK2i 치료 효과를 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 양쪽 (A) 혈관 평활근 세포 (VSMCs) 및 (B) 내피 세포 (ECs)에서 미처리된 대조군에 비하여 경시적으로 MCP-1 생산의 정량화. 세포는 2 시간 동안 처리되었고 그 다음 MK2i 치료 제거 이후 신선한 배지에서 배양되었다. 3 또는 5 일후 세포는 24 시간 동안 20 ng/ml TNF α 로 자극되었고 상청액은 사이토카인 분석에 대하여 수집되었다. 모든 치료는 MK2i의 10 μ M 용량을 사용하였다. 데이터는 평균 \pm SEM ($n = 4$)이다. P 값은 단일 인자 ANOVA에 의해 결정된다.

도 57은 MK2i-NP 내재화를 나타내는 막대 그래프를 보여준다. MK2i-NP 내재화는 트립판 블루로 켄칭된 세포의 형광을 가졌고/가졌거나 치료 제거 이후 임의의 세포와 NPs를 제거하기 위해 세포 스크립 버퍼로 광범위하게 세정된 혈관 평활근 세포 (VSMCs)에서 MK2i-NP 흡수의 최소 차이에 의해 나타낸 바와 같이 막 결합된 NPs에 의해 영향을 받지 않는다.

도 58은 (A) 치료 0, 12, 및 24 시간 후 엔도리소좀 염료 Lysotracker 적색을 이용한 MK2i 펩타이드 공국재화의 정량화, $n \geq 3$ 독립적인 이미지; (B) 상이한 펩타이드 제형을 이용한 치료 24 시간 이후 MK2i를 함유한 세포내 구획의 평균 크기를 보여준다. 구획 면적은 ImageJ 소프트웨어로 정량화되었다. 적어도 3 상이한 이미지로부터 $n=50$ 소포.

도 59는 하기를 보여준다: (a) Alexa-568 표지된 MK2i, MK2i-NPs, 또는 NE-MK2i-NPs (적색)으로 치료된 및 α -평활근 액틴을 이용한 MK2i-NP 공국재화를 보여주는 혈관 평활근 마커 α -평활근 액틴 (녹색)에 대하여 염색된 인간 복재 정맥 단면의 면역형광 현미경검사 이미지; (b) (a)에서 이미지로부터 증조절된 삽입물; (c) Alexa-568 표지된 MK2i, MK2i-NPs, 또는 NE-MK2i-NPs (적색)으로 치료된 및 내피 세포를 이용한 MK2i 공국재화를 증명하는 내피 마커 CD31(녹색)에 대하여 염색된 인간 복재 정맥의 증조절된 면역형광 현미경검사 이미지; (d) 모든 치료 그룹에 대하여 혈관 벽에 MK2i 침투를 보여주는 증조절된 삽입물; (e) MK2i-NPs으로 치료된 혈관에서 증가된 MK2i 흡수 (적색 채널)을 증명하는 (a)에서 보여준 이미지의 픽셀 강도 분포.

도 60은 하기를 보여준다: Alexa-568 표지된 MK2i, MK2i-NPs, 또는 NE-MK2i-NPs (적색)으로 치료된 및 α -평활근 액틴을 이용한 MK2i-NP 공국재화를 보여주는 혈관 평활근 세포 마커 α -평활근 액틴 (녹색)에 대하여 염색된 인간 복재 정맥의 (a-b) 면역형광 현미경검사 이미지; (c) MK2i 및 NE-MK2i-NP 치료된 혈관에 비하여 혈관 벽속에 MK2i-NPs의 증가된 흡수 및 침투의 증명의 면역형광 현미경검사.

도 61은 하기를 보여준다: (a) 막상에 씨딩 8 시간 이후 Boyden 챔버 검정에서 화학유인물질 PDGF-BB에 대해 MK2i-NPs 저해된 혈관 평활근 세포 이동. NT = 무 치료; (b) 막상에 씨딩 8 시간 이후 Boyden 챔버 검정에서 화학유인물질 VEGF에 대해 MK2i-NPs 저해된 내피 세포 이동; (c) ANG II로 자극된 HCAVSMCs에서 TNF α 생산 블록킹된 MK2i-NP 치료 (모든 데이터는 세포 수로 정규화된다); (d) MK2i-NP 치료는 양쪽 혈관 평활근 및 내피 세포에서 MCP-1의 TNF α 자극된 생산의 지속된 저해를 보여주었고 반면에 자유 MK2i 또는 NE-MK2i-NPs를 이용한 치료는 그렇지 않았다; (e) MK2i-NPs는 치료 제거 5 일 이후 화학유인물질 PDGF-BB에 대해 혈관 평활근 세포 이동의 지속된 저해를 보여주었다.

도 62는 하기를 보여준다: (a) 정맥 이식편의 Verhoeff Van Gieson 염색된 조직학적 부분의 대표적인 이미지에서 나타낸 바와 같이 신생내막 형성이 감소된 MK2i-NP 치료; (b) 수술 28 일 후 관류 고정된 경정맥 삽입 이식편에서 내막 두께의 정량화. $n \geq 7$ 이식편 / 치료 그룹; (c) 정맥 이식편상에서 ki67 면역조직화학을 이용하여 나타낸 바와 같이 내막 세포의 증식이 감소된 MK2i-NP 치료; (d) 내막 핵 수로 정규화된 경정맥 이식편 부분에서 ki67 양성 핵 염색의 정량화; (e) 수축성 마커 α -평활근 액틴의 더 높은 내막 발현이 유지된 MK2i-NP 치료; (f) 내막 핵 수로 정규화된 경정맥 이식편 부분에서 내막 α -평활근 액틴 양성 염색의 정량화; (g) 합성 혈관 평활근 표현형 마커 비멘틴의 내막 발현이 감소된 MK2i-NP 치료; (h) 내막 핵 수로 정규화된 경정맥 이식편 부분에서 내막 비멘틴 양성 염색의 정량화.

도 63은 하기를 보여준다: (a) 각 치료 그룹에 대하여 토끼 경정맥 이식술 외식편의 대표적인 RAM-11 염색 이미지. 화살표는 양성으로 염색된 세포를 표시한다. 좌측 칼럼 기준자 = 100 μ m, 우측 칼럼 증조절된 시각 기준자 = 50 μ m; (b) 토끼 경정맥 외식편의 신생내막에서 양성 RAM-11 염색을 정량화하기 위해 이용된 색상 디콘볼루션 방법으로부터 예 이미지; (c) 경정맥 이식편 부분에서 내막 RAM-11 양성 대식세포 염색의 정량화, 4 정맥 세

그먼트 / 치료 그룹으로부터 $n = 16$ 조직학적 이미지

도 64는 HPLC-정제된 (A) MK2i 펩타이드 (서열: YARAAARQARA-KALARQLGVAA, MW = 2283.7 g/mol) 및 (B) p-HSP20 펩타이드 (서열: YARAAARQARA-WLRRAsAPLPGLK, MW = 2731 g/mol)에 대하여 전기분무-이온화 질량 분광분석법 (ESI-MS) 질량 스펙트럼을 보여준다. 질량 스펙트럼은 전체 펩타이드 서열의 단편화에 각각 상응하는 3개의 주요 피크를 보여준다.

도 65는 하기를 보여준다: (A) 상이한 전하비 ($CR = [NH_3^+]_{MK2i} : [COO^-]_{PPAA}$)에서 제조된 MK2i-NPs의 Z-평균 직경 (막대) 및 제타 전위 (원형). 별표 (*)는 단봉 크기 분포를 표시하고 백색 막대는 최소 크기 및 다분산도를 가진 단봉 크기 분포를 수득하는 MK2i-NP 제형을 나타낸다; (B) 선도 MK2i-NP 제형 ($CR = 1:3$)의 대표적인 DLS 미량; (C) 우라닐 아세테이트 염색된 MK2i-NPs의 대표적인 TEM 이미지, 기준자 = 200 nm; (D) 선도 MK2i-NP 제형에 대한 합성 및 특성규명 요약. CR = 전하비, D_h = 유체역학적 직경, ζ = 제타 전위.

도 66은 하기를 보여준다: **A)** 상이한 전하비 ($CR = [NH_3^+]_{p-HSP20} : [COO^-]_{PPAA}$)에서 제조된 p-HSP20-NPs의 Z-평균 직경 (막대) 및 제타 전위 (원형). 별표 (*)는 단봉 크기 분포를 표시하고, 백색 막대는 최소 크기 및 다분산도를 가진 단봉 크기 분포를 수득한 p-HSP20-NP 제형을 나타낸다; (B) 선도 p-HSP20-NP 제형 ($CR = 3:1$)의 대표적인 DLS 미량; (C) 우라닐 아세테이트 염색된 p-HSP20-NPs의 대표적인 TEM 이미지, 기준자 = 200 nm (D) 선도 p-HSP20-NP 제형에 대한 합성 및 특성규명 요약. CR = 전하비, D_h = 유체역학적 직경, ζ = 제타 전위.

도 67은 NP 세포적합성을 나타내는 막대 그래프를 보여준다. MK2i-NPs 및 p-HSP20-NPs의 세포독성은 HCAVSMCs에서 자유 펩타이드의 상응하는 용량에 비교되었다. 세포는 2 시간 동안 치료되었고 그 다음 세포독성 검정 실시 예 앞서 24 시간 동안 신선한 배지에서 인큐베이션하게 되었다. * $p < 0.05$ 대 NT, $n=4$ 평균 \pm 표준오차.

도 68은 NP 흡수 및 체류를 보여준다. 치료 30 분 이후 펩타이드의 10 μM 용량에서 (A) MK2i-NPs 대 MK2i 및 (B) p-HSP20-NPs 대 HSP20의 펩타이드 흡수 및 체류의 유세포측정 정량화. MK2i-NPs는 동일한 농도에 펩타이드 흡수에서 ~70 배수 증가를 달성하였고 반면에 p-HSP20-NPs는 흡수에서 ~35 배수 증가를 달성하였고; (C,D) 치료 직후 HCAVSMCs의 대표적인 유동 히스토그램 및 (E,F) 신선한 배지 후처리에서 배양의 3 일후 NPs 증가된 펩타이드 세포성 체류에 제형을 증명하는 대표적인 유동 히스토그램. A-B 상에서 겹쳐쓴 백분율은 0 일 후처리에 비하여 3 일에서 % 체류를 나타낸다.

도 69는 NP 엔도솜 누출 및 세포질 펩타이드 전달을 보여준다. (A) 디기토닌 세미-투과화를 이용한 혈관 평활근 세포 사이토솔 및 세포내 세포소기관의 분리용 실험 설계. 세미-투과화용 조건은 도 70에서 나타난 바와 같이 최적화되었고; (B) 엔도-리소솜 마커 초기 엔도솜 항원 1 (EEA1) 및 리소솜-관련된 단백질 1 (LAMP1)로부터 세포질 단백질 미토겐-활성화된 단백질 키나제 키나제 1/2 (MEK1/2) 및 글리세르알데하이드 3-인산염 탈수소효소 (GAPDH)의 최적화된 디기토닌 세미-투과화 절차 확인된 분리의 웨스턴 블랏 검증; (C 및 D) 단독으로 전달된 경우 또는 NP 제형의 증가된 세포질 전달을 증명하는 나노-폴리플렉스로 제형화된 경우 (C) MK2i 및 (D) p-HSP20 펩타이드의 세포내 분포의 비교. 엔도솜 산성화 저해제 바필로마이신이 부가된 경우 NP 매개된 세포질 펩타이드 전달의 유의미한 저해는 NPs의 pH-의존형 엔도솜 누출 기전을 확인하였다.

도 70는 디기토닌 세미-투과화 최적화를 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 세포내 세포소기관 (즉, 엔도-리소솜 구획)으로부터 세포질 성분을 분리시키기 위한 디기토닌 세미-투과화 절차용 조건은 100 RPM으로 작동하는 회전식 진탕기상에서 0 $^{\circ}C$ 에 다양한 농도의 디기토닌으로 10 분의 인큐베이션 이후 LDH 방출에 기반하여 최적화되었다. 25 $\mu g/mL$ 디기토닌은 세포질 LDH의 방출에서 유의미한 증가가 더 높은 농도에서 보이지 않았음에 따라 최적의 조건으로서 선택되었다.

도 71은 혈관 평활근 세포에서 F-액틴 스트레스 섬유 형성의 저해를 보여준다. (A) 1 시간 p-HSP20-NPs, 자유 p-HSP20 펩타이드, MK2i-NPs 또는 자유 MK2i로 전처리된 및 그 다음 2 시간 동안 ANG II로 자극된 HCAVSMCs에서 F-액틴 스트레스 섬유 정량화. 세포 당 스트레스 섬유의 수는 각 치료 그룹, 동일한 농도에서 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 대 NT + ANG II; $I_p < 0.1$, $II_p < 0.01$, $III_p < 0.001$ 대 자유 펩타이드에 대하여 $n \geq 12$ 상이한 세포로부터 $n \geq 36$ ROIs로부터 세포성 극성을 가로지른 축으로부터 취해진 3개의 강도 프로파일로부터 계산되었고; (B) ANG II-자극된 HCAVSMCs에서 F-액틴 스트레스 섬유 형성의 대표적인 형광 현미경검사 이미지 그리고 이미지에서 보여진 라인으로부터 유도된 상응하는 강도 프로파일. 별표는 나타난 강도 프로파일의 좌측을 표시한다. 이득 셋팅은 수득된 모든 이미지에 대하여 일정하게 유지되었다.

도 72는 MK2i-NPs에 의한 F-액틴 스트레스 섬유 형성의 저해를 보여준다. (A) 1 시간 동안 MK2i-NPs 또는 자유 MK2i로 전처리된 및 그 다음 2 시간 동안 ANG II로 자극된 HCAVSMCs에서 F-액틴 스트레스 섬유 정량화. 데이터는 2 분리된 실험으로부터 $n \geq 12$ 세포를 나타낸다: 동일한 농도에서 * $p < 0.05$ 대 NT + ANG II ** $p < 0.001$ 대 NT + ANG II, $I_p < 0.05$ 대 MK2i; (B) 자유 MK2i 또는 MK2i-NPs로 1 시간 처리 이후 ANG II-자극된 HCAVSMCs에서 F-액틴 스트레스 섬유 형성의 대표적인 형광 현미경검사 이미지.

도 73은 p-HSP20-NPs에 의한 F-액틴 스트레스 섬유 형성의 저해를 보여준다. (A) 1 시간 동안 p-HSP20-NPs 또는 자유 p-HSP20으로 전처리된 및 그 다음 2 시간 동안 ANG II로 자극된 HCAVSMCs에서 F-액틴 스트레스 섬유 정량화. 데이터는 2 분리된 실험으로부터 $n \geq 12$ 세포를 나타낸다: 동일한 농도에서 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 대 NT + ANG II, $I_p < 0.05$, $I_{I_p} < 0.001$ 대 p-HSP20; (B) 자유 p-HSP20 또는 p-HSP-20-NPs로 1 시간 처리 이후 ANG II-자극된 HCAVSMCs에서 F-액틴 스트레스 섬유 형성의 대표적인 형광 현미경검사 이미지.

도 74는 MK2i-NP & p-HSP20-NP 치료가 혈관수축을 저해하고 혈관이완을 향상시키는 것을 보여준다. (A) 수축 연구의 저해에 대한 실험 설계: HSV 고리는 PE로 초기에 수축되었고 그 다음 이완되었다. NPs, 자유 펩타이드, 또는 대조군으로 치료의 2 시간 이후, 후처리 수축이 측정되고; (B) MK2i 및 MK2i-NP의 정량화는 수축의 저해를 매개하였다. 최고 용량의 MK2i-NPs에 대한 PPAA 폴리머 등가물은 비히클 대조군으로서 포함되었고; (C) p-HSP20 및 p-HSP20-NP의 정량화는 수축의 저해를 매개하였고; (D) 혈관이완 연구용 실험 설계: HSV 고리는 PE로 초기에 수축되고 그 뒤에 SNP로 이완된다. HSV 고리는 그 다음 2 시간 동안 NPs, 자유 펩타이드, 또는 대조군으로 처리되고 동일한 조건 하에서 수축 및 이완되어 후처리 대 전처리 완화를 비교하고; (E) MK2i 및 MK2i-NP의 정량화는 혈관이완을 향상시켰다. 최고 용량의 MK2i-NPs에 대한 PPAA 폴리머 등가물은 비히클 대조군으로서 포함되었고; (F) p-HSP20 및 p-HSP20-NP의 정량화는 혈관이완을 향상시켰다. B,C,E,F에 대하여: $I_p < 0.05$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$ 대 NT, $n \geq 3$ 분리된 공여체; (G) 100 μ M MK2i 또는 MK2i-NPs, 500 μ M p-HSP20 또는 p-HSP20-NPs로 전처리된 및 NP 제형으로 처리된 샘플에서 감소된 F-액틴의 가시화를 가능하게 한 ANG-II로 그 뒤에 자극된 단일 공여체 ($n=1$)로부터 수득된 인간 복제 정맥 외식편의 Alexa-488 팔로이딘 염색된 동결절편에서 F-액틴 가시화.

도 75는 액틴 매개된 혈관수축 및 혈관이완에서 MAPKAP 키나제 2 (MK2) 및 열충격 단백질 20 (HSP20)의 작용 기전의 도식을 보여준다. MK2는 p38 MAPK를 통해 세포성 스트레스 (예를 들면 기계적 트라우마, 사이토카인, 산화 스트레스, 등)에 의해 활성화된다. 인산화된 MK2는 수많은 다운스트림 효과기를 활성화시킨다: 1) 열충격 단백질 27 (HSP27)의 인산화가 섬유상 액틴의 캡핑을 초래하여 이로써 액틴 해중합 및 혈관이완을 저해시킨다. 2) Lim 키나제 (LIMK)의 인산화는 액틴 분해를 예방하고 혈관이완을 저해하는 코필린의 인산화 및 탈활성화를 초래한다. MK2 저해된 펩타이드 (MK2i)는 이들 다운스트림 효과기의 활성화를 예방하는 및 혈관이완을 촉진하는 MK2에 결합한다. HSP20은 14-3-3 단백질로부터 인산화된 코필린의 변위 및 이에 대한 결합을 초래하는 환형 뉴클레오타이드-의존형 단백질 키나제 (PKA 및 PKG)에 의해 인산화된다. 이러한 변위는 포스파타제 예컨대 슬링샷에 의해 코필린이 탈인산화되게 하여, 코필린의 활성화 및 섬유상 액틴의 수반되는 코필린-매개된 해중합을 초래한다. 포스포-HSP20 펩타이드 모방체 (p-HSP20)는 인산화된 HSP20의 활성을 반복하여, 궁극적으로 혈관이완으로 이어진다.

도 76은 엔도솜분해적 나노-폴리플렉스 세포질 펩타이드 전달의 기전의 도식을 보여준다.

도 77은 1 mg/mL (B)에서 희석제 (A) 및 MMI-0100 표준의 HPLC 크로마토그램을 보여준다.

도 78은 MMI-0100 농도 (mg/mL) 대 피크 면적의 선형성 플롯을 보여준다.

도 79는 25°C에서 MMI-0100 검정 회수 및 불순물 성장의 요약이다. (A) 7 일 및 14 일에서 pH 대 퍼센트 (%) 회수; (B) 7 일 및 14 일에서 pH 대 속도 (퍼센트 (%) 불순물 성장 / 일).

도 80은 40°C에서 MMI-0100 검정 회수 및 불순물 성장의 요약이다. (A) 1 일, 2 일, 7 일 및 14 일에서 pH 대 퍼센트 (%) 회수; (B) 1 일, 2 일, 7 일 및 14 일에서 pH 대 속도 (퍼센트 (%) 불순물 성장 / 일).

도 81은 60°C에서 MMI-0100 검정 회수 및 불순물 성장의 요약이다. (A) 1 일, 2 일 및 7 일에서 pH 대 퍼센트 (%) 회수; (B) 1 일, 2 일 및 7 일에서 pH 대 속도 (퍼센트 (%) 불순물 성장 / 일).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

발명의 상세한 설명

[0100]

- [0101] 용어
- [0102] 용어 "활성"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 의도된 치료적 효과를 책임지는 본 발명의 조성물의 구성요소, 성분 또는 요소를 지칭한다. 용어 "활성 구성요소" ("AI", "활성 약제학적 구성요소", "API", 또는 "별크 활성")은 약제학적으로 활성인 약물내 물질이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구 "추가 활성 구성요소"는, 약리적, 또는 임의의 다른 유익한 활성을 발휘하는, 기재된 조성물의 화합물 이외의, 제제를 지칭한다.
- [0103] 용어 "실제의 표지된 청구 (ALC)"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 제형의 효력 및 표적 충전 중량에 기반된, 존재한 약물 물질의 실제 양을 지칭하고; $[(\text{효력, \%})/100\%] \times (\text{표적 충전 중량, mg}) \times (1,000 \mu\text{g/mg})$ 와 동일하다.
- [0104] 용어 "구동"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 추진의 행위; 움직임 또는 작용을 지칭한다.
- [0105] 용어 "혼합물" 또는 "블렌드"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 2 이상의 상이한 성분의 물리적 조합을 일반적으로 지칭한다.
- [0106] 용어 "투여하다" 또는 "투여"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 *생체내* 투여, 뿐만 아니라 직접적으로 생체의 조직에 투여를 제공 또는 적용을 의미하고, 이를 포함한다. 일반적으로, 투여는 전신, 예를 들면, 흡입 또는 취입에 의해 (즉, 입을 통해 또는 코를 통해), 경구로, 구강으로, 비경구로, 국소로, 바라던 대로 종래의 비독성 약제학적으로 허용가능한 캐리어, 아췌반트, 및 비히클을 함유한 복용 유니트 제형으로 직장으로, 또는 예컨대, 비제한적으로, 주입, 이식, 그래프팅, 국소 적용에 의해 국소로, 또는 비경구로일 수 있다.
- [0107] 용어 "제제"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 지속성 제형에 또는 제형상에 함유되는 화합물을 일반적으로 지칭한다. 제제는 항체 또는 핵산 또는 부형제 또는, 더욱 일반적으로, 지속성 제형으로 임의의 부가제를 포함할 수 있다. "제제"는 단일 상기 화합물을 포함하고 복수의 상기 화합물을 포함하도록 또한 의도된다.
- [0108] 용어 "효능제"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 약리적 반응을 유도하기 위해 수용체를 활성화시킬 수 있는 화학 물질을 지칭한다. 수용체는, 생물학적 반응의 자극 또는 저해를 초래하는, 내인성 또는 외인성 효능제 및 길항제에 의해 활성화 또는 불활성화될 수 있다. 생리적 효능제는 동일한 신체 반응을 창출하는, 그러나 동일한 수용체에 결합하지 않는 물질이다. 특정한 수용체용 내인성 효능제는 그 수용체에 결합하고 수용체를 활성화시키는 신체에 의해 천연적으로 생산된 화합물이다. 초효능제는 표적 수용체에 대하여 내인성 효능제보다 더 큰 최대 반응을 생산할 수 있는, 및 따라서 100% 초과 효율을 갖는 화합물이다. 이는 내인성 효능제보다 더 강하다는 것을 필연적으로 의미하지 않지만, 그러나 다소 수용체 결합 이후 세포 내부에서 생산될 수 있는 최대 가능한 반응의 비교이다. 전체 효능제는, 그러한 수용체에서 전체 효능을 표시하는, 수용체를 결합시키고 활성화시킨다. 부분 효능제는 또한 주어진 수용체를 결합시키고 활성화시키지만, 그러나 전체 효능제에 비하여 수용체에서 단지 부분 효능을 갖는다. 역효능제는 그러한 수용체용 효능제로서 동일한 수용체 결합-부위에 결합하고 수용체의 구성적 활성을 반대로 하는 제제이다. 역효능제는 수용체 효능제의 반대 약리적 효과를 발휘한다. 비가역적 효능제는 수용체가 영구적으로 활성화되는 그와 같은 방식으로 수용체에 영구적으로 결합하는 효능제의 유형이다. 수용체에 효능제의 회합이 가역적이라는 점에서 단순한 효능제와 상이하고, 반면에 수용체에 비가역적 효능제의 결합이 비가역적인 것으로 여겨진다. 이는 화합물을 효능제 활성의 단순 분출, 그 다음 수용체의 탈민감화 및 내재화를 발생시키고, 이는 장기 치료와 함께 길항제와 더욱 유사한 효과를 발생시킨다. 선택적 효능제는 한 특정 유형의 수용체에 특이적이다.
- [0109] 용어 "안데르센 캐스케이드 충격기 (Andersen Cascade Impactor; ACI)"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 흡입된 생성물의 시험에 사용된 충격기를 지칭한다. 캐스케이드 충격기는 관성 충돌의 원리에 따라 작동한다. 충격기의 각 단계는 샘플 가득한 공기가 빼내져서, 그 특정한 단계를 위하여 수집 플레이트의 표면에 대해 임의의 공기 중의 샘플을 유도하는 일련의 노즐 또는 젯트를 포함한다. 특정한 입자가 그 단계에 영향을 주는지는 그의 공기역학적 직경에 의존한다. 충분한 관성을 갖는 입자는 그 특정한 단계 수집 플레이트에 영향을 줄 것이고, 반면에 더 작은 입자는 공기 스트림에서 비탈동반된 채로 남을 것이고 공정이 반복되는 다음 단계로 통과한다. 단계들은 입자 크기의 감소를 위하여 더미 또는 일열로 정상적으로 조립된다. 젯트가 더 작아짐에 따라, 공기 속도는 더 작은 입자가 수집되는 정도로 증가한다. 시험의 마지막에, 각 단계에 관련한 입자 질량은 적합한 용매를 이용하여 회수되고 그 다음 실제로 존재한 약물의 양을 결정하기 위해 보통 HPLC를 이용하여 분석된다.
- [0110] 용어 "길항제"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 또 다른 물질의 효과를 방해하는 물질을 지칭한다. 기능성 또는 생리적 길항작용은 2개 물질이 동일한 생리적 기능에 관해 반대 효과를 생성하는 경우 발생한다. 화학 길항작용 또는 불활성화는 그의 효과를 중화시키기 위한 2개 물질 사이의 반응이다. 성향상 길항작용은 물질의 성향

(그의 흡수, 생체내 변화, 분포, 또는 배출)의 변경이어서 이로써 달성하는 제제가 적어져 표적 또는 그의 지속성이 감소된다. 물질용 수용체에서 길항작용은 동일한 부위에 대하여 경쟁하는 적절한 길항제로 길항제의 효과의 봉쇄를 수반한다.

- [0111] 용어 "생체활성제"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 치료적 효과의 일부 형태를 제공하기 위해 또는 생물학적 반응 또는 활성의 일부 유형을 유도하기 위해 약제학적 또는 약효 목적으로 사용되는 약제학적 제형 또는 복용 형태상에서 또는 그 안에서 함유된 관심 화합물을 지칭한다. "생체활성제"는 단일 상기 제제를 포함하고 또한, 예를 들어, 2 이상의 생체활성제의 조합을 포함하는 복수의 생체활성제를 포함하도록 의도된다.
- [0112] 용어 "생체이용성"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 활성 성분이 약물 생성물로부터 흡수되는 및 작용 부위에서 이용가능해지는 속도 및 정도를 지칭한다.
- [0113] 용어 "생체적합성"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 수령체에 일반적으로 무독성인 및 대상체에 임의의 유의미한 유해한 효과를 보유하지 않는 및, 추가로, 물질의 임의의 대사물 또는 분해 생성물이 대상체에 무독성인 물질을 지칭한다. 전형적으로 "생체적합성"인 물질은 살아있는 조직에 임상적으로 관련된 조직 자극, 상해, 독성 반응, 또는 면역학적 반응을 유발시키지 않는다.
- [0114] 용어 "생분해성"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 가용성 종으로 침식할 또는, 대상체에 자체, 무독성 (생체적합성)인 및 대상체에 의해 대사작용, 제거, 또는 배출될 수 있는 더 작은 유니트 또는 화학 종으로 생리적 조건 하에서 분해할 물질을 지칭한다.
- [0115] 용어 "생체모방"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 살아있는 유기체에 의해 만들어진 천연 물질을 흉내내거나 또는 "모방하는" 물질, 물체, 디바이스, 공정, 또는 시스템을 지칭한다.
- [0116] 용어 "수포" 또는 "수포 팩"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 하나 이상의 개별적인 용량을 함유한 형성된 공동으로부터 통상적으로 작제된 유니트 용량 패키지를 지칭한다.
- [0117] 용어 "% 수포 청소능"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이, $[(\text{초기 중량} - \text{최종 중량}) / \text{충전 중량}] * 100\%$ 와 동일한, %, 구동 동안 수포로부터 발광된 분말의 백분율을 지칭한다.
- [0118] 용어 "캐리어"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 유기체에 유의미한 자극을 유발시키지 않는 및 기재된 발명의 조성물의 펩타이드의 생물학적 활성 및 특성을 폐지하지 않는 물질을 지칭한다. 캐리어는 이들을 치료받는 포유 동물에 대한 투여에 적합하게 만들기 위해 충분히 고순도 및 충분히 저독성이어야 한다. 캐리어는 불활성일 수 있거나, 또는 약제학적 이점을 보유할 수 있다. 용어 "부형제", "캐리어", 또는 "비히클"은 본원에서 기재된 약제학적으로 허용가능한 조성물의 제형 및 투여에 적합한 캐리어 물질을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 본원에서 유용한 캐리어 및 비히클은 비독성인 및 다른 성분과 상호작용하는 당해 기술에서 공지된 임의의 상기 물질을 포함한다.
- [0119] 용어 "성분"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 구성 부분, 요소 또는 구성요소를 지칭한다.
- [0120] 용어 "조성물"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 모든 활성 및 불활성 성분을 포함하는 기재된 발명의 생성물을 지칭한다.
- [0121] 용어 "병태"는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 다양한 건강 상태를 지칭하고 건강한 조직 및 기관의 임의의 기저 기전 또는 장애, 상해, 및 촉진에 의해 야기된 장애 또는 질환을 포함하는 의미이다.
- [0122] 용어 "접촉" 및 모든 그의 문법적 형태는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 감촉 또는 즉각적인 또는 국부 근접의 상태 또는 병태를 지칭한다.
- [0123] 용어 "제어된 방출"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 제형으로부터 약물 방출의 방식 및 프로파일이 조절되는 임의의 약물-함유 제형을 지칭한다. 이는 즉각적인 뿐만 아니라 비-즉각적인 방출 제형을 지칭하고, 비-즉각적인 방출 제형은, 비제한적으로, 지속된 방출 및 지연된 방출 제형을 포함한다.
- [0124] 용어 "지연된 방출"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 그의 종래의 의미에서 제형의 투여와 그로부터 치료제의 방출 사이에서 시간 지연이 있는 제형을 지칭한다. "지연된 방출"은 장시간에 걸쳐 치료제의 점진적인 방출을 포함할 수 있거나 또는 포함하지 않을 수 있고, 따라서 "지속된 방출"일 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다.
- [0125] 용어 "전달된 용량 (DD)"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이, mg 또는 μg 으로, 예를 들어, 용량 샘플링 장치 (DSA), 용량 균일성 샘플링 장치 (DUSA), 안테르센 캐스케이드 충격기 (ACI), 또는 차세대 약제학적 충격기

(NGI)의 추출로부터 회수된 약물 물질의 양을 지칭한다. 약물 물질 엑스-디바이스의 양과 동등하다 (즉, 수포 및/또는 유동 채널에서 유지된 약물 물질의 양을 포함하지 않는다).

- [0126] 용어 "유도된 전달된 용량 (DDD)"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 전달된 용량 균일성 (DDU) 시험으로부터 수득된 약물 엑스-디바이스의 양과는 대조적으로, 충격기 시험으로부터 수득된 약물 엑스-디바이스의 양을 지칭한다.
- [0127] 용어 "% 전달된 용량"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 실제의 표지 청구 (ALC)의 백분율을 지칭하고; $(DD/ALC) \times 100\%$ 와 동일하다.
- [0128] 용어 "질환" 또는 "장애"는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 건강의 손상 또는 비정상 기능화의 병태를 지칭한다.
- [0129] 용어 "배치된"은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 특정한 방식으로 배치된, 배열된 또는 분포된 것을 지칭한다.
- [0130] 용어 "약물"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 질환의 예방, 진단, 완화, 치료, 또는 치유에서 사용된, 음식 이외의, 치료제 또는 임의의 물질을 지칭한다.
- [0131] 용어 "건조 분말 흡입기" 또는 "DPI"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 정량 흡입기와 유사한 디바이스를 지칭하지만, 그러나 여기에서 약물은 분말 형태이다. 환자는 전체 호흡을 내쉬고, 마우스피스 주변에 입술을 배치하고, 그 다음 분말로 빠르게 호흡한다. 건조 분말 흡입기는 MDIs와 필요한 타이밍 및 협응을 요구하지 않는다.
- [0132] 용어 "유효한 양"은 원하는 생물학적 효과를 실현시키기에 필요한 또는 충분한 양을 지칭한다.
- [0133] 용어 "부형제"는 생체활성제가 아닌 지속성 제형에서 함유될 수 있는 임의의 다른 제제 또는 화합물을 포함하기 위해 본원에서 사용된다. 이와 같이, 부형제는 약제학적으로 또는 생물학적으로 허용가능 또는 관련되어야 한다 (예를 들어, 부형제는 대상체에 일반적으로 무독성이어야 한다). "부형제"는 단일 상기 화합물을 포함하고 복수의 상기 화합물을 포함하도록 또한 의도된다.
- [0134] 용어 "충전 중량"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 구동 이전 각 수포 속으로 계량된 (예를 들면, mg 또는 μ g으로) 분말의 실제 양을 지칭한다.
- [0135] 용어 "최종 중량"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 구동 이후 밀봉된 수포 및 분말의 중량을 지칭한다.
- [0136] 용어 "미세 입자 용량 (FPD)"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 충격기 (예를 들면, ACI 또는 NGI)의 특정된 컷-오프 직경 미만으로 회수된 (예를 들면, mg 또는 μ g으로) 약물 물질의 양을 지칭하고; 호흡가능한 용량과 동등하다.
- [0137] 용어 "미세 입자 분획 (실제의)"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 폐쇄된 수포(들)에 존재한 약물의 이론적 양으로 정규화된 FPD를 지칭하고; $(FPD)/[(\text{충전 중량}) \times (\text{효력})] \times 100\%$ 와 동등하다.
- [0138] 용어 "미세 입자 분획 (명목 표지 청구)"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 NLC로 정규화된 FPD를 지칭하고; $[(FPD)/(NLC) \times 100\%]$ 와 동일하다.
- [0139] 용어 "미세 입자 분획 (전달된 용량)"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 DD로 정규화된 FPD를 지칭하고; $[(FPD)/(DD) \times 100\%]$ 와 동일하다.
- [0140] 용어 "제형"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 특이적 절차, 식 또는 규칙에 따라 제조된 혼합물을 지칭한다.
- [0141] 용어 "기능성 등가물" 또는 "기능성으로 등가물"은 유사한 또는 동일한 효과 또는 용도를 갖는 물질, 분자, 폴리뉴클레오타이드, 단백질, 펩타이드, 또는 폴리펩타이드를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)에 기능성으로 등가물인 폴리펩타이드는, 예를 들어, 생물학적 활성, 예를 들면, 저해된 활성, 동력학 파라미터, 염 저해, 보조인자-의존형 활성, 및/또는 서열 식별 번호: 1의 발현된 폴리펩타이드와 실질적으로 유사한 또는 동일한 기능성 유니트 크기를 가질 수 있다.
- [0142] YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)에 기능성으로 등가물인 폴리펩타이드의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 아미노산 서열 FAKLAARLYRKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 3)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 4)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLAVA (서열 식별 번호: 5)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVA (서열 식별 번호: 6)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 7)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열

YARAAARQARAKALNRQLGVA (서열 식별 번호: 19)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 YARAAARDARAKALNRQLAVAA (서열 식별 번호: 23)의 폴리펩타이드 및 아미노산 서열 YARAAARQARAKALNRQLAVA (서열 식별 번호: 24)의 폴리펩타이드.

- [0143] 본 발명에서 기재된 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 MMI-0100 펩타이드는 치료적 효능을 향상시키기 위해 단백질 형질도입 도메인 (PTD; YARAAARQARA; 서열 식별 번호: 11)이 치료 도메인 (KALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 2)에 작동가능하게 연결되는 융합 단백질을 포함한다.
- [0144] 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 치료 도메인 (TD; KALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 2)에 기능성으로 등가물인 폴리펩타이드의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 아미노산 서열 KALARQLAVA (서열 식별 번호: 8)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 KALARQLGVA (서열 식별 번호: 9)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 10)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 KALNRQLAVAA (서열 식별 번호: 25)의 폴리펩타이드 및 아미노산 서열 KALNRQLAVA (서열 식별 번호: 26)의 폴리펩타이드.
- [0145] 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 단백질 형질도입 도메인 (PTD; YARAAARQARA; 서열 식별 번호: 11)에 기능성으로 등가물인 폴리펩타이드의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 아미노산 서열 WLRRIKAWLRIKA (서열 식별 번호: 12)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 WLRRIKA (서열 식별 번호: 13)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 YGRKKRRQRRR (서열 식별 번호: 14)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 WLRRIKAWLRI (서열 식별 번호: 15)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 FAKLAARLYR (서열 식별 번호: 16)의 폴리펩타이드, 아미노산 서열 KAFAKLAARLYR (서열 식별 번호: 17)의 폴리펩타이드, 및 아미노산 서열 HRRIKAWLKKI (서열 식별 번호: 18)의 폴리펩타이드.
- [0146] 용어 "유전자 전달 비히클"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 세포에서 폴리펩타이드의 발현용 코딩 서열의 세포에 전달을 용이하게 하는 성분을 지칭한다. 유전자 전달 비히클은 세포, 예를 들어, 리포좀, 바이러스 입자, 또는 발현 벡터에 유전자 또는 cDNA의 전달을 달성할 수 있는 임의의 성분 또는 비히클일 수 있다.
- [0147] 용어 "기하학적 표준 편차 (GSD)"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 질량 중앙 공기역학적 직경 (MMAD)과 직경 크기 분포의 84% 또는 16% (예를 들면, MMAD = 2 μ m; 84% = 4 μ m; GSD = $4/2 = 2.0$) 사이에서 비율과 동등한 무차원 수를 지칭한다. MMAD는, GSD와 함께, 입자 크기 분포를 기재한다.
- [0148] 용어 "과립화"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 이로써 작은 적색, 그레인-유사 주요성이 치유의 공정에서 원 표면상에 형성하는 공정을 지칭한다.
- [0149] 용어 "친수성"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 극성 물질, 예컨대 물에 대하여 친화도를 갖는 물질 또는 물체를 지칭한다. 용어 "친유성"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 극성 또는 수성 환경과 비교된 무극성 환경에 대한 친화도를 선호하는 또는 소유하는 물질 또는 물체를 지칭한다.
- [0150] 용어 "흡입"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 호흡을 이용한 약물 증기로 들이쉬는 행동을 지칭한다.
- [0151] 용어 "흡입 전달 디바이스"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 액체 또는 건조 분말 에어로졸 제형으로부터 작은 액적 또는 에어로졸을 생산하는 임의의 디바이스를 지칭하고, 예를 들면, 용액, 분말, 등으로 약물의 폐 투여를 달성하기 위해 입을 통한 투여에 사용된다. 흡입 전달 디바이스의 예는, 비제한적으로, 네블라이저, 정량 흡입기, 및 건조 분말 흡입기 (DPI)를 포함한다.
- [0152] 용어 "취입"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 신체의 공동 또는 챔버에 압력 하에서 공기, 가스, 또는 분말 전달의 행동을 지칭한다. 예를 들어, 비강 취입은 코를 통해 압력 하에서 공기, 가스, 또는 분말 전달의 행동에 관련한다.
- [0153] 용어 "저해하는", "저해하다" 또는 "저해"는 공정의 양 또는 속도 감소, 전적으로 공정의 정지, 또는 이의 작용 또는 기능 감소, 제한, 또는 블록킹을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 저해는 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%만큼 물질의 양, 속도, 작용 기능, 또는 공정의 감소 또는 축소를 포함할 수 있다.
- [0154] 용어 "저해제"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 이로써 제1 분자의 활성을 감소시키는 제1 분자에 결합하는 제2 분자를 지칭한다. 효소 저해제는 이로써 효소 활성을 감소시키는 효소에 결합하는 분자이다. 저해제의 결합은 효소의 활성 부위 진입으로부터 기질을 멈출 수 있고/있거나 그의 반응 촉매화로부터 효소를 방해할 수 있다. 저해제 결합은 가역적 또는 비가역적이다. 비가역적 저해제는 보통 효소와 반응하고, 예를 들어, 효소 활

성에 필요한 주요 아미노산 잔기를 변경시킴으로써 화학적으로 변할 수 있다. 그에 반해서, 가역적 저해제는 비-공유적으로 결합하고 이들 저해제가 효소, 효소-기질 복합체, 또는 양쪽을 결합시키는데 의존하여 상이한 유형의 저해를 생산한다. 효소 저해제는 종종 그의 특이성 및 효력에 의해 평가된다.

- [0155] 용어 "초기 중량"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 (예를 들면, mg으로) 작동 이전 스케일링된 수포 및 분말의 중량을 지칭한다.
- [0156] 용어 "상해"는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 물리적 또는 화학적일 수 있는, 외부 제제 또는 힘에 의해 야기된 신체의 구조 또는 기능에 손상 또는 손해를 지칭한다.
- [0157] 용어 "단리된"은, 하기인, 물질, 예컨대, 비제한적으로, 핵산, 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다: (1) 그의 천연 발생 환경에서 발견된 바와 같이 정상적으로 수반하는 또는 이와 상호작용하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 것. 용어 "실질적으로 없는" 또는 "본질적으로 없는"은 상당히 또는 유의미하게 없는, 또는 약 95% 초과 없는, 또는 약 99% 없는 것을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 단리된 물질은 그의 천연 환경에서 물질로 발견되지 않은 물질을 선택적으로 포함하거나; 또는 (2) 물질이 그의 천연 환경에 있으면, 물질은 그 환경에서 발견된 물질에 원상태가 아닌 세포 (예를 들면, 계능 또는 세포하 세포소기관)내 한 위치에서 배치되고/되거나 조성물에 의도적인 인간 개입에 의해 합성으로 (비-천연적으로) 변경되었다. 합성 물질을 수득하기 위한 변경은 그의 천연 상태 내의 물질 상에서 수행될 수 있거나, 또는 이로부터 제거될 수 있다.
- [0158] 용어 "LPM" 또는 "L/분"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 리터 / 분을 지칭한다.
- [0159] 용어 "질량 밸런스"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 예를 들어, 흡입기에서, 남아있는 양을 포함하여, 추출의 각 성분으로부터 회수된 약물 물질의 총 양을 지칭한다. 질량 밸런스는 [(정량) / (실제의 충전 중량 x 효력)] x 100%와 동일한 실제의 충전 중량의 백분율로서 표현될 수 있다.
- [0160] 용어 "질량 중앙 공기역학적 직경 (MMAD)"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 입자의 중량 및 크기에 기반된, 통계적으로 입자 크기 분포를 지칭한다. 예를 들어, 입자의 50 중량%는 중앙 직경보다 더 작을 것이다 (그리고 입자의 50%는 중앙 직경보다 더 클 것이다).
- [0161] 용어 "정량"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 표적에 약물의 특정 양의 전달을 지칭한다. 예를 들어, 폐에 에어로졸화된 약물의 전달.
- [0162] 용어 "정량 흡입기", "MDI", 또는 "퍼핑기"는 본원에서 사용된 바와 같이 환자의 폐로 특정한 양의 의약("정량")을 전달하기 위해 추진제를 사용하는 가압된, 휴대용 디바이스를 나타낸다. 용어 "추진제"는 본원에서 사용된 바와 같이 보통 수렴되는, 분기식 노즐을 통해 기체 압력에 의해 물질을 배출하기 위해 사용되는 물질을 나타낸다. 압력은 압축된 기체, 또는 화학적 반응에 의해 생산된 기체로부터 얻어질 수 있다. 배기 물질은 기체, 액체, 혈장, 또는 화학 반응 전, 고체, 액체 또는 겔일 수 있다. 가압된 정량 흡입기에서 사용되는 추진제는 액화된 기체, 전통적으로 클로로플루오로카본(CFCs) 및 추가로 하이드로플루오로알칸(HFAs)이다. 적합한 추진제에는, 예를 들면 클로로플루오로카본(CFC), 예컨대 트리클로로플루오로메탄(추진제 11로도 불림), 디클로로디플루오로메탄(추진제 12로도 불림), 및 1,2-디클로로-1,1,2,2-테트라플루오로에탄(추진제 114로도 불림), 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본(HFC), 예컨대 1,1,1,2-테트라플루오로에탄(추진제 134a, HFC-134a, 또는 HFA-134a로도 불림) 및 1,1,1,2,3,3,3-헵타플루오로프로판(추진제 227, HFC-227, 또는 HFA-227로도 불림), 이산화탄소, 디메틸 에테르, 부탄, 프로판, 또는 이들의 혼합물이 포함된다. 다른 구현예에서, 추진제에는 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본, 또는 이들의 혼합물이 포함된다. 다른 구현예에서, 하이드로플루오로카본이 추진제로서 사용된다. 다른 구현예에서, HFC-227 및/또는 HFC-134a가 추진제로서 사용된다.
- [0163] 용어 "MK2 키나제" 또는 "MK2"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 세린/트레오닌 (Ser/Thr) 단백질 키나제 계열의 구성원인, 미토겐-활성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (또한 일명 "MAPKAPK2", "MAPKAP-K2", "MK2")를 지칭한다.
- [0164] 용어 "MMI-0100", "MMI-0100 펩타이드", "MMI-0100 폴리펩타이드", "MK2 저해제", "MK2i", "MK2i 펩타이드", "MK2i 폴리펩타이드" 등등은 아미노산 서열 YAAAAARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0165] 용어 "네블라이저"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 폐 속에 흡입된 연무의 형태로 액체 약물을 투여하기 위

해 사용된 디바이스를 지칭한다.

- [0166] 용어 "명목 표지 청구 (NLC)"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 표적 효력 및 표적 수포 충전 중량에 기반된 구동 당 존재하는 약물 물질의 의도된 양을 지칭한다.
- [0167] 용어 "핵산"은 본원에서 사용되어 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 폴리머를 나타내며, 다르게 제한되지 않는 한, 이들이 천연 발생 뉴클레오타이드(예를 들면, 펩타이드 핵산)와 유사한 방식으로 단일가닥 핵산에 혼성화한다는 점에서 천연 뉴클레오타이드의 본질적인 성질을 갖는 공지된 유사체를 포괄한다.
- [0168] 용어 "뉴클레오타이드"는 본원에서 사용되어 헤테로사이클릭 염기, 당, 및 하나 이상의 포스페이트 그룹으로 구성되는 화학적 화합물을 나타낸다. 가장 일반적인 뉴클레오타이드에서, 염기는 퓨린 또는 피리미딘의 유도체이며, 당은 펜토스 데옥시리보스 또는 리보스이다. 뉴클레오타이드는 핵산의 모노머이며, 3 개 또는 그 초과가 핵산을 형성하기 위해 함께 결합한다. 뉴클레오타이드는 RNA, DNA, 및 비제한적으로 CoA, FAD, DMN, NAD, 및 NADP를 포함하는 몇몇 보조인자의 구조적 유니트이다. 퓨린에는 아데닌(A), 및 구아닌(G)이 포함되며; 피리미딘에는 시토신(C), 티민(T), 및 우라실(U)이 포함된다.
- [0169] 하기 용어는 본원에서 사용되어 2 개 또는 그 초과 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드 간 서열 관계를 설명한다: (a) "참조 서열", (b) "비교 윈도우", (c) "서열 동일성", (d) "서열 동일성 퍼센트", 및 (e) "실질적인 동일성".
- [0170] (a) 용어 "참조 서열"은 서열 비교를 위한 기반으로 사용되는 서열을 나타낸다. 참조 서열은 명시된 서열의 서브셋 또는 전체; 예를 들면, 전장 cDNA 또는 유전자 서열의 세그먼트, 또는 전체 cDNA 또는 유전자 서열일 수 있다.
- [0171] (b) 용어 "비교 윈도우"는 폴리뉴클레오타이드 서열의 인접 및 명시된 세그먼트를 나타내며, 상기 폴리뉴클레오타이드 서열이 참조 서열과 비교될 수 있고, 비교 윈도우에서 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열(부가 또는 결실을 포함하지 않음)에 비해 부가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 일반적으로, 비교 윈도우는 적어도 20 인접 뉴클레오타이드 길이이며, 임의로 적어도 30 인접 뉴클레오타이드 길이, 적어도 40 인접 뉴클레오타이드 길이, 적어도 50 인접 뉴클레오타이드 길이, 적어도 100 인접 뉴클레오타이드 길이이거나, 더 길 수 있다. 당해분야의 숙련가는 폴리뉴클레오타이드 서열 내 갭의 도입으로 인한 참조 서열에 대한 높은 유사성을 회피하기 위해, 갭 페널티가 전형적으로 도입되고 매치 수로부터 공제됨을 이해한다.
- [0172] 비교를 위한 서열 정렬 방법은 당해기술에 널리 공지되어 있다. 비교를 위한 최적 서열 정렬은 [Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘; [Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘; [Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444 (1988)]의 유사성 검색 방법; 비제한적으로 Intelligenetics, Mountain View, Calif.에 의한 PC/Gene 프로그램의 CLUSTAL; Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., USA의 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 및 TFASTA를 포함하는 이들 알고리즘의 컴퓨터화된 실행에 의해 수행될 수 있고; CLUSTAL 프로그램은 [Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989); Corpet 등, *Nucleic Acids Research* 16:10881-90 (1988); Huang 등, *Computer Applications in the Biosciences*, 8:155-65 (1992), 및 Pearson 등, *Methods in Molecular Biology*, 24:307-331 (1994)]에 의해 잘 설명된다. 데이터베이스 유사성 검색을 위해 사용될 수 있는 프로그램의 BLAST 계열에는 하기가 포함된다: 뉴클레오타이드 데이터베이스 서열 대비 뉴클레오타이드 쿼리 서열을 위한 BLASTN; 단백질 데이터베이스 서열 대비 뉴클레오타이드 쿼리 서열을 위한 BLASTX; 단백질 데이터베이스 서열 대비 단백질 쿼리 서열을 위한 BLASTP; 뉴클레오타이드 데이터베이스 서열 대비 단백질 쿼리 서열을 위한 TBLASTN; 및 뉴클레오타이드 데이터베이스 서열 대비 뉴클레오타이드 쿼리 서열을 위한 TBLASTX. [*Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 19, Ausubel 등, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)]를 참고하라.
- [0173] 다르게 언급되지 않으면, 본원에 제공된 서열 동일성/유사성 값은 디폴트 파라미터를 사용해서 프로그램의 BLAST 2.0 suite를 이용해서 수득된 값을 나타낸다[Altschul 등, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)]. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 공공연하게, 예를 들면 National Center for Biotechnology-Information을 통해 이용가능하다. 이러한 알고리즘에는 먼저 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어와 정렬된 경우 일부 양의-값의 역치 스코어 T를 만족하거나 매치되는 쿼리 서열 내 길이 W의 짧은 단어를 확인함으

로써 높은 스코어링 서열 쌍(HSPs)을 확인하는 것이 관여된다. T는 근접 단어 스코어 역치로 불린다(Altschul 등, 상기 문헌). 이들 최초 근접 단어 히트가 이들을 포함하는 더 긴 HSP를 찾기 위한 검색 개시용 씨드로서 작용한다. 이어서 단어 히트는 누적 정렬 스코어가 증가될 수 있는 범위까지 각각의 서열에 따라 양 방향으로 연장된다. 누적 스코어가 뉴클레오타이드 서열에 있어서 파라미터 M(한 쌍의 매치되는 잔기에 대한 보상 스코어; 항상>0) 및 N(미스매치 잔기에 대한 페널티 스코어; 항상<0)을 이용해서 계산된다. 아미노산 서열에 있어서, 스코어링 매트릭스가 사용되어 누적 스코어를 계산한다. 각 방향으로의 단어 히트의 연장은 다음과 같은 경우 정지된다: 누적 정렬 스코어가 그의 최대 달성 값으로부터 양 X만큼 떨어진 경우; 누적 스코어가 하나 이상의 음성-스코어링 잔기 정렬의 축적으로 인해 0 이하가 되는 경우; 또는 어느 한 서열의 말단에 도달된 경우. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T, 및 X는 정렬의 민감성 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오타이드 서열에 있어서)은 디폴트로 단어 길이(W) 11, 기대치(E) 10, 컷오프 100, M=5, N=-4, 및 두 가닥 비교를 이용한다. 아미노산 서열에 있어서, BLASTP 프로그램은 디폴트로 단어 길이(W) 3, 기대치(E) 10, 및 BLOSUM62 스코어링 매트릭스를 이용한다(Henikoff & Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 참고).

[0174] 서열 동일성 퍼센트 계산에 부가하여, BLAST 알고리즘은 또한 두 서열 간 유사성의 통계 분석을 수행한다(예를 들면, [Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877 (1993)] 참고). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성의 하나의 척도는 최소 합계 확률(P(N))로, 이는 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 간 매치가 우연히 일어날 확률의 표시를 제공한다. BLAST 검색은 단백질이 랜덤 서열로 모델링될 수 있다고 가정한다. 그러나 많은 실제 단백질은 단독중합체 경로, 단-기간 반복체, 또는 하나 이상의 아미노산이 풍부한 영역일 수 있는 비랜덤 서열 영역을 포함한다. 단백질의 다른 영역이 전혀 유사하지 않더라도 이러한 저-복합성 영역이 관련없는 단백질 간에 정렬될 수 있다. 수많은 저-복합성 필터 프로그램이 이러한 저-복합성 정렬을 감소시키기 위해 이용될 수 있다. 예를 들면, SEG(Wooten and Federhen, *Comput. Chem.*, 17:149-163 (1993)) 및 XNU(Claverie and States, *Comput. Chem.*, 17:191-201 (1993)) 저-복합성 필터가 단독으로 또는 병용하여 이용될 수 있다.

[0175] (c) 용어 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 두 핵산 또는 폴리펩타이드 서열의 맥락에서 본원에서 사용되어 명시된 비교 윈도우에 걸쳐 최대 관련성에 대해 정렬된 경우 동일한 두 서열 내 잔기를 나타낸다. 서열 동일성 퍼센트가 단백질에 대해 사용되는 경우, 동일하지 않은 잔기 위치는 종종 보존적 아미노산 치환에 의해 상이함, 즉 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성(예를 들면 전하 또는 소수성)을 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환되어 분자의 기능성 특성을 변화시키지 않음이 인지된다. 서열이 보존적 치환으로 상이한 경우, 서열 동일성 퍼센트는 치환의 보존적 성질에 대해 교정하기 위해 상향 조정될 수 있다. 이러한 보존적 치환에 의해 상이한 서열은 "서열 유사성" 또는 "유사성"을 갖는 것으로 불린다. 이러한 조정의 수행 수단은 당해분야의 숙련자에게 잘 공지되어 있다. 전형적으로 여기에는 전체 미스매치보다는 부분으로서의 보존적 치환의 스코어링이 관여되며, 그렇게 함으로써 서열 동일성 퍼센트를 증가시킨다. 따라서 예를 들면, 동일한 아미노산에 스코어 1이 주어지고 비-보존적 치환에 스코어 0이 주어지는 경우, 보존적 치환에는 0 내지 1의 스코어가 주어진다. 보존적 치환의 스코어링은, 예를 들면 프로그램 PC/GENE(Intelligenetics, Mountain View, Calif., USA)에서 시행되는 바와 같이 [Meyers and Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.*, 4:11-17 (1988)]의 알고리즘에 따라 계산된다.

[0176] (d) 용어 "서열 동일성 퍼센트"는 본원에서 사용되어 비교 윈도우에 걸쳐 최적 정렬된 두 서열을 비교함으로써 결정된 값을 의미하며, 상기 비교 윈도우에서 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열(부가 또는 결실을 포함하지 않음)에 비해 부가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 퍼센트는 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 두 서열에서 모두 나타나는 위치의 수를 결정하여 매칭된 위치의 수를 산출하고, 매칭된 위치의 수를 비교 윈도우에서 위치의 총 수로 나누고, 결과에 100을 곱해서 서열 동일성 퍼센트를 산출함으로써 계산된다.

[0177] (e) 용어 폴리뉴클레오타이드 서열의 "실질적인 동일성"은 폴리뉴클레오타이드가 표준 파라미터를 사용하여 기재된 정렬 프로그램 중 하나를 이용하여 참조 서열에 비해 적어도 70% 서열 동일성, 적어도 80% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성 및 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다는 것을 의미한다. 숙련가는 이들 값이 코돈 축퇴, 아미노산 유사성, 해독률 배치 등을 고려하여 두 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 단백질의 상응하는 동일성을 결정하기 위해 적절하게 조정될 수 있음을 인지할 것이다. 이들 목적을 위한 아미노산 서열의 실질적인 동일성은 보통 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 의미한다. 뉴클레오타이드 서열이 실질적으로 동일하다는 또 다른 표시는 두 분자가 엄격한 조건 하에 서로 혼성화하는 경우이다. 그러나, 엄격한 조건 하에 서로 혼성화하지 않는 핵산도 이들이 인코딩하는 폴리펩타이드가 실질적으로 동일한 경우, 여전히 실질적으로 동일하다. 이는, 예를 들면 핵산 카피가 유전자 코드

에 의해 허용되는 최대 코돈 축퇴를 이용해서 생성되는 경우 일어날 수 있다. 두 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 하나의 표시는 제1 핵산이 인코딩하는 폴리펩타이드가 제2 핵산에 의해 인코딩되는 폴리펩타이드와 면역학적으로 교차 반응성인 것이다.

- [0178] 용어 "작동가능하게 연결된"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 2 이상의 단백질 도메인 또는 펩타이드가 재조합 DNA 기술 또는 화학 반응을 통해 결합 또는 배합되어 이로써 수득한 융합 펩타이드의 각 단백질 도메인 또는 폴리펩타이드가 그의 최초 기능을 유지하는 연결을 지칭한다. 예를 들어, 서열 식별 번호: 1은 단백질 형질도입 도메인 (서열 식별 번호: 26)을 치료 도메인 (서열 식별 번호: 2)과 작동가능하게 연결시킴으로써 작제되고, 이로써 서열 식별 번호: 26의 세포 침투 기능 및 서열 식별 번호: 2의 MK2 키나제 저해제 기능 둘 모두를 보유하는 융합 펩타이드를 창출한다.
- [0179] 용어 "입자"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 전체의 또는 부분적으로 적어도 하나의 치료제를 본원에서 기재된 바와 같이 함유할 수 있는 극도로 작은 요소, 예를 들면, 나노입자 또는 극미립자)를 지칭한다. 용어 "극미립자"는 크기 약 10 nm 내지 2000 마이크로미터 (2 밀리미터)를 갖는 다양한 실질적으로 구조를 일반적으로 지칭하기 위해 본원에서 사용되고 마이크로캡슐, 마이크로구형체, 나노입자, 나노캡슐, 나노구형체 뿐만 아니라, 일반적으로, 약 2000 마이크로미터 (2 밀리미터) 미만인 입자를 포함한다. 입자는 코팅에 의해 둘러싸인 코어에서 치료제(들)을 함유할 수 있다. 치료제(들)은 또한 입자 전반에 걸쳐 분산될 수 있다. 치료제(들)은 또한 입자 속으로 흡착될 수 있다. 입자는, 0차 방출, 1차 방출, 2차 방출, 지연된 방출, 지속된 방출, 즉각적인 방출, 등, 및 임의의 이들의 조합을 포함한, 임의의 차수 방출 동력학일 수 있다. 입자는, 치료제(들)에 더하여, 비제한적으로, 침식가능, 비침식가능, 생분해성, 또는 비생분해성 물질 또는 이들의 조합을 포함한, 약학 및 의학의 당해 기술에서 일상적으로 사용된 임의의 물질을 포함할 수 있다. 입자는 용액 또는 반-고형 상태로 활성제를 함유하는 마이크로캡슐일 수 있다. 입자는 사실상 임의의 형상일 수 있다.
- [0180] 용어 "약제학적으로 허용가능한 염"은, 건전한 의료 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알러지성 반응 등 없이 인간 및 하등 동물의 조직과 접촉하여 사용에 적합한 및 합리적인 이점/위험 비율에 상응하는 염을 의미한다.
- [0181] 용어 "약제학적 제형" 또는 "약제학적 조성물"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 표적 병태 또는 질환을 예방, 강도 감소, 치유 또는 달리 치료하는데 이용되는 제형 또는 조성물을 지칭한다.
- [0182] 용어 "예방하다"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 일어남, 발생, 또는 생김으로부터 사건, 행동 또는 작용의 유지, 방해 또는 회피를 지칭한다.
- [0183] 용어 "프로드러그"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 불활성 형태인 및 대상체에 투여 이후 생물학적 전환에 의해 활성 형태로 전환되는 펩타이드 또는 유도체를 의미한다.
- [0184] 용어 "재조합"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 유전공학에 의해 생산된 물질을 지칭한다.
- [0185] 용어 "감소하다", "감소된", "감소시키기 위해" 또는 "감소하는"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 정도, 강도, 한도, 크기, 양, 밀도 또는 수의 축소, 감소, 감쇠 또는 저감을 지칭한다.
- [0186] 용어 "유사한"은, 공통으로 특성 또는 특징을 갖는 것을 의미하는, 용어 유사한, 비교할만한, 또는 닮은과 상호 교환적으로 사용된다.
- [0187] 약제학적 생성물의 용어 "안정성"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 그의 물리적, 화학적, 미생물학적, 치료적 및 독물학적 명세 내에서 남아있는 특정한 제형의 능력을 지칭한다.
- [0188] 용어 "민감한"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 위험에 처한 집단의 구성원을 지칭한다.
- [0189] 용어 "대상체" 또는 "개체" 또는 "환자"는, 비제한적으로, 하기를 포함하는, 포유동물 기원의 동물 종의 구성원을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다: 마우스, 랫트, 고양이, 염소, 양, 말, 햄스터, 흰담비, 오리너구리, 돼지, 개, 기니아 피그, 토끼 및 영장류, 예컨대, 예를 들어, 원숭이, 유인원, 또는 인간.
- [0190] 어구 "필요로 하는 대상체"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구의 문맥 및 용법이 달리 지시하지 않는 한, (i) 적어도 하나의 치료적 펩타이드 제제를 함유한 제형이 투여될, (ii) 적어도 하나의 치료적 펩타이드 제제를 함유한 제형을 받는; 또는 (iii) 적어도 하나의 치료제를 함유한 제형을 받은 환자를 지칭한다.
- [0191] 용어 "지속된 방출" (또한 일명 "확장된 방출")은 확장된 기간에 걸쳐 치료제의 점진적인 방출을 제공하는, 및 바람직하게는, 필연적이지 않아도, 확장된 기간에 걸쳐 제제의 실질적으로 일정한 수준을 초래하는 약물 제형을

지칭하기 위해 그의 종래의 의미로 본원에서 사용된다.

- [0192] 용어 "증상"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 특정한 질환 또는 장애로부터 발생하고 이를 수반하는 및 이의 표시로서 제공하는 현상을 지칭한다.
- [0193] 용어 "증후군"은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 일부 질환 또는 병태를 표시하는 증상의 패턴을 지칭한다.
- [0194] 용어 "치료제"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 치료적 효과를 제공하는 약물, 분자, 핵산, 단백질, 조성물 또는 다른 물질을 지칭한다. 용어 "치료제" 및 "활성제"는 상호교환적으로 사용된다.
- [0195] 용어 "치료적 성분"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 집단의 백분율로 특정한 질환 징후의 진행을 제거, 감소, 또는 예방하는 치료적으로 유효한 복용량 (즉, 투여의 용량 및 빈도)을 지칭한다. 통상적으로 사용된 치료적 성분의 예는 집단의 50%에서 특정한 질환 징후에 치료적으로 유효한 특정한 복용량으로 용량을 설명하는 ED₅₀이다.
- [0196] 용어 "치료적 효과"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 치료의 결과를 지칭하고, 이의 결과는 바람직한 및 유익한 것으로 판단된다. 치료적 효과는, 직접적으로 또는 간접적으로, 질환 징후의 휴지, 감소, 또는 제거를 포함할 수 있다. 치료적 효과는 또한, 직접적으로 또는 간접적으로, 질환 징후의 진행의 휴지, 감소 또는 제거를 포함할 수 있다.
- [0197] 하나 이상의 활성제의 용어 "치료적으로 유효한 양" 또는 "유효한 양"은 치료의 의도된 이점을 제공하기에 충분한 양이다. 이용될 수 있는 활성제의 유효한 양은 일반적으로 0.1 mg/kg 체중 및 약 50 mg/kg 체중 범위이다. 그러나, 복용량 수준은, 하기를 포함한, 다양한 인자에 기반된다: 상해의 유형, 환자의 연령, 체중, 성별, 의료 병태, 병태의 중증도, 투여의 경로, 및 이용된 특정한 활성제. 따라서 복용량 요법은 널리 다양할 수 있지만, 표준 방법을 이용하여 외과의사에 의해 일상적으로 결정될 수 있다.
- [0198] 용어 "치료한다" 또는 "치료하는"은 하기를 포함한다: 질환, 병태, 장애 또는 상해의 진행의 폐기, 실질적으로 저해, 저속화 또는 반전, 질환, 병태, 장애 또는 상해의 임상 또는 미적 증상의 실질적으로 완화, 질환, 병태, 장애 또는 상해의 임상 또는 미적 증상의 외관의 실질적으로 예방, 및 유해한 또는 성가신 증상의 보호. 용어 "치료한다" 또는 "치료하는"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 추가로 하나 이상의 하기 수반을 지칭한다: (a) 질환, 병태, 장애 또는 상해의 중증도의 감소; (b) 치료받는 질환, 병태, 장애 또는 상해의 증상 특징의 발달 제한; (c) 치료받는 질환, 병태, 장애 또는 상해의 증상 특징의 악화 제한; (d) 이전에 질환, 병태, 장애 또는 상해를 가졌던 환자에서 질환, 병태, 장애 또는 상해의 재발 제한; 및 (e) 이전에 질환, 병태, 장애 또는 상해에 대한 증상이었던 환자에서 증상의 재발 제한.
- [0199] 용어 "변이체", "돌연변이체", 및 "유도체"는 본원에서 사용되어 참조 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열과 실질적인 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열을 나타낸다. 서열에서의 차이는 순서 또는 구조의 천연 또는 설계에 의한 변화의 결과일 수 있다. 천연 변화는 특정한 핵산 서열의 성질 상 정상 복제 또는 중복 과정 동안 일어날 수 있다. 설계된 변화는 특정한 목적을 위해 서열 내로 특이적으로 설계되고 도입될 수 있다. 이러한 특정한 변화는 다양한 돌연변이유발 기술을 이용하여 시험관내 수행될 수 있다. 특이적으로 생성된 이러한 서열 변이체는 원래 서열의 "돌연변이체" 또는 "유도체"로 불릴 수 있다.
- [0200] 숙련가는 마찬가지로 단일 또는 다중 아미노산 치환, 결실, 부가 또는 대체를 갖지만 서열식별번호: 1과 기능성으로 등가인 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA(서열식별번호: 1)의 폴리펩타이드 변이체를 생산할 수 있다. 이들 변이체에는 특히 하기가 포함될 수 있다: (a) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존적 또는 비-보존적 아미노산으로 치환된 변이체; (b) 하나 이상의 아미노산이 부가된 변이체; (c) 적어도 하나의 아미노산에 치환체 그룹이 포함된 변이체; (d) 하나의 종으로부터의 아미노산 잔기가 또 다른 종에서의 상응하는 잔기에 대해 보존된 또는 비-보존된 위치에서 치환된 변이체; 및 (d) 표적 단백질이 또 다른 펩타이드 또는 폴리펩타이드, 예컨대 융합 파트너, 단백질 태그 또는 표적 단백질에 유용한 특성을 부여할 수 있는 다른 화학적 모이어티, 예를 들면 항체에 대한 에피토프에 융합된 변이체. 비제한적으로 유전적(억제, 결실, 돌연변이 등), 화학적, 및 효소적 기술을 포함하는 이러한 변이체의 수득 기술은 숙련가에게 공지된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "돌연변이"는 친계 유형에서 확인되지 않는 새로운 특성 또는 속성의 생성을 일으키는 유기체의 유전자 또는 염색체 내 DNA 서열의 변화, 또는 그와 같은 변화가 유전자를 코딩하는 DNA의 뉴클레오타이드 서열 변형을 통해 또는 염색체의 물리적 배열 변화를 통해 염색체에서 일어나는 공정을 나타낸다. 돌연변이의 3 가지 기전에는 치환(하나의 염기쌍의 또 다른 것으로의 변화), 부가(하나 이상의 염기의 서열 내로의 삽입), 및 결실(하나 이상

의 염기쌍의 손실)이 포함된다.

- [0201] 용어 "비히클"은 본원에서 사용된 바와 같이 약물 또는 이와 혼합되는 다른 물질의 사용을 촉진하는 물질을 나타낸다.
- [0202] 하나의 구현예에 있어서, 기재된 발명은 MK2 키나제의 저해제를 포함한 억제학적 제형을 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 MK2 저해제는 폴리펩타이드이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 폴리펩타이드는, 비제한적으로, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)) 또는 그의 기능성 증가물을 포함한다.
- [0203] 하나의 구현예에 있어서, 상기 억제학적 제형은 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물, 5% w/w 고형물을 포함한 순량 분무 건조된 분산물을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 억제학적 제형은 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물, 1% w/w 고형물을 포함한 순량 분무 건조된 분산물을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 억제학적 제형은 80/20 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물/트레할로오스를 포함한 분무 건조된 분산물을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 억제학적 제형은 92.5/7.5 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물/트레할로오스를 포함한 분무 건조된 분산물을 포함한다.
- [0204] 분무 건조된 분산물 (SDD)은 폴리머 매트릭스에서 약물의 단일-상, 비정질 분자 분산물이다. 고형 매트릭스에서 분자적으로 "용해된" 화합물 (예를 들면, 약물)을 가진 고형 용액이다. SDDs는 용액을 얻기 위해 유기 용매에서 약물 및 폴리머의 용해 및 그 다음 용액의 분무-건조에 의해 수득된다. 억제학적 적용을 위하여 분무 건조의 사용은 생물학적 약제학 분류 시스템 (BCS) 부류 II (높은 투과성, 낮은 용해도) 및 부류 IV (낮은 투과성, 낮은 용해도) 약물의 증가된 용해도를 가진 비정질 분산물을 초래한다. 제형 및 공정 조건은 용매가 액적으로부터 빠르게 증발시켜, 따라서 상 분리 또는 결정화에 불충분한 시간을 허용하도록 선택된다. SDDs는 장기 안정성 및 제조가능성을 입증하였다. 예를 들어, 2 년 초과 유통 기한은 SDDs로 일반되게 입증하였다. SDDs의 이점은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 저조하게 수용성인 화합물의 향상된 경구 생체이용률, 전통적 고형 복용 형태 (예를 들면, 정제 및 캡슐)를 이용한 전달, 재생가능한, 통제가능한 및 확장가능한 제조 공정 및 광범위한 물리적 특성을 가진 구조적으로 다양한 불용성 화합물에 대한 넓은 적용가능성.
- [0205] 하나의 구현예에 있어서, 상기 억제학적 제형은 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물 및 0.9% NaCl (염수)를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 억제학적 제형은 7 mg/mL, 6 mg/mL, 5 mg/mL, 4 mg/mL, 3 mg/mL, 2 mg/mL, 또는 1 mg/mL MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형은 0.9 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.2 mg/mL, 또는 0.1 mg/mL MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물을 포함한 상기 제형은 액체 제형이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 액체 제형은 에어로졸화된다.
- [0206] 하나의 구현예에 있어서, 상기 억제학적 제형은 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물 및 글리세린을 포함한다.
- [0207] 하나의 구현예에 있어서, 상기 억제학적 제형은 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물 및 나노-폴리플렉스 폴리머를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 나노-폴리플렉스 폴리머는 폴리(아크릴산) (PAA)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 나노-폴리플렉스 폴리머는 폴리(프로필아크릴산) (PPAA)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 억제학적 제형은 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 및 1:10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물 대 PPAA ($[\text{NH}_3^+]_{\text{MK21}}:[\text{COO}^-]_{\text{PPAA}}$)의 전하비 (CR)를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 억제학적 제형은 1:3의 MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 증가물 대 PPAA ($[\text{NH}_3^+]_{\text{MK21}}:[\text{COO}^-]_{\text{PPAA}}$)의 전하비를 포함한다.
- [0208] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (MMI-0100; 서열 식별 번호: 1)의 상기 기능성 증가물은 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)에 실질적인 서열 동일성을 갖는다.

- [0209] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (MMI-0100; 서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)에 적어도 80 퍼센트 서열 동일성을 갖는다. 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (MMI-0100; 서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)에 적어도 90 퍼센트 서열 동일성을 갖는다. 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (MMI-0100; 서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)에 적어도 95 퍼센트 서열 동일성을 갖는다.
- [0210] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (MMI-0100; 서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 아미노산 서열 YARAAARQARAKALNRQLGVA (MMI-0200; 서열 식별 번호: 19)의 폴리펩타이드이다.
- [0211] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (MMI-0100; 서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 아미노산 서열 FAKLAARLYRKALARQLGVAA (MMI-0300; 서열 식별 번호: 3)의 폴리펩타이드이다.
- [0212] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 아미노산 서열 KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (MMI-0400; 서열 식별 번호: 4)의 폴리펩타이드이다.
- [0213] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLAVA (서열 식별 번호: 5)의 폴리펩타이드이다.
- [0214] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVA (서열 식별 번호: 6)의 폴리펩타이드이다.
- [0215] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 아미노산 서열 HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (MMI-0500; 서열 식별 번호: 7)의 폴리펩타이드이다.
- [0216] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 아미노산 서열 YARAAARQARAKALNRQLAVAA (MMI0600, 서열 식별 번호: 23)의 폴리펩타이드이다.
- [0217] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 아미노산 서열 YARAAARQARAKALNRQLAVA (MMI0600-2, 서열 식별 번호: 24)의 폴리펩타이드이다.
- [0218] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 제2 폴리펩타이드에 작동가능하게 연결된 제1 폴리펩타이드를 포함한 융합 펩타이드이고, 여기에서 제1 폴리펩타이드는 아미노산 서열 YARAAARQARA (서열 식별 번호: 11)이고, 제2 폴리펩타이드는 서열이 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 2)에 실질적인 동일성을 갖는 치료 도메인을 포함한다.
- [0219] 또 다른 구현예에 있어서, 제2 폴리펩타이드는 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 2)에 적어도 70 퍼센트 서열 동일성을 갖고, 억제학적 제형은 미토겐-활성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (MK2)의 키나제 활성을 저해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 제2 폴리펩타이드는 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 2)에 적어도 80 퍼센트 서열 동일성을 갖고, 억제학적 제형은 미토겐-활성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (MK2)의 키나제 활성을 저해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 제2 폴리펩타이드는 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 2)에 적어도 90 퍼센트 서열 동일성을 갖고, 억제학적 제형은 미토겐-활성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (MK2)의 키나제 활성을 저해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 제2 폴리펩타이드는 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 2)에 적어도 95 퍼센트 서열 동일성을 갖고, 억제학적 제형은 미토겐-활성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (MK2)의 키나제 활성을 저해한다.
- [0220] 또 다른 구현예에 있어서, 제2 폴리펩타이드는 아미노산 서열 KALARQLAVA (서열 식별 번호: 8)의 폴리펩타이드이다.
- [0221] 또 다른 구현예에 있어서, 제2 폴리펩타이드는 아미노산 서열 KALARQLGVA (서열 식별 번호: 9)의 폴리펩타이드이다.
- [0222] 또 다른 구현예에 있어서, 제2 폴리펩타이드는 아미노산 서열 KALNRQLAVAA (서열 식별 번호: 25)의 폴리펩타이드이다.
- [0223] 또 다른 구현예에 있어서, 제2 폴리펩타이드는 아미노산 서열 KALNRQLAVA (서열 식별 번호: 26)의 폴리펩타이드이다.
- [0224] 또 다른 구현예에 있어서, 제2 폴리펩타이드는 하기이다: 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 10)의

폴리펩타이드; 참조, 예를 들면, 미국 공개 출원 번호 2009-0196927, 미국 공개 출원 번호 2009-0149389, 및 미국 공개 출원 No2010-0158968 (이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 참조로 편입된다).

- [0225] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)의 기능성 등가물은 제2 폴리펩타이드에 작동가능하게 연결된 제1 폴리펩타이드를 포함한 융합 펩타이드이고, 여기에서 제1 폴리펩타이드는 YARAAARQARA (서열 식별 번호: 11)에 기능성으로 등가물인 단백질 형질도입 도메인을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 아미노산 서열 KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 2)이다.
- [0226] 또 다른 구현예에 있어서, 제1 폴리펩타이드는 아미노산 서열 WLRIKAWLRIKA (서열 식별 번호: 12)의 폴리펩타이드이다.
- [0227] 또 다른 구현예에 있어서, 제1 폴리펩타이드는 아미노산 서열 WLRIKA (서열 식별 번호: 13)의 폴리펩타이드이다.
- [0228] 또 다른 구현예에 있어서, 제1 폴리펩타이드는 아미노산 서열 YGRKKRRQRRR (서열 식별 번호: 14)의 폴리펩타이드이다.
- [0229] 또 다른 구현예에 있어서, 제1 폴리펩타이드는 아미노산 서열 WLRIKAWLRI (서열 식별 번호: 15)의 폴리펩타이드이다.
- [0230] 또 다른 구현예에 있어서, 제1 폴리펩타이드는 아미노산 서열 FAKLAARLYR (서열 식별 번호: 16)의 폴리펩타이드이다.
- [0231] 또 다른 구현예에 있어서, 제1 폴리펩타이드는 아미노산 서열 KAFAKLAARLYR (서열 식별 번호: 17)의 폴리펩타이드이다.
- [0232] 또 다른 구현예에 있어서, 제1 폴리펩타이드는 아미노산 서열 HRRIKAWLKKI (서열 식별 번호: 18)의 폴리펩타이드이다.
- [0233] 일부 구현예에 있어서, 비-표적 조직에서 폴리펩타이드 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 등가물의 축적을 예방하기 위해 및 약물 효능을 향상시키기 위해, 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1) 또는 그의 기능성 등가물의 본 발명의 폴리펩타이드는, 특이적 세포 유형 또는 조직에 폴리펩타이드를 유도하는, 표적화 모이어티와 연결 또는 관련될 수 있다. 표적화 모이어티의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: (i) 공지된 또는 미공지된 수용체용 리간드 또는 (ii) 특이적 분자 표적, 예를 들면, 특이적 세포 유형의 표면상에서 발현된, 펩타이드 또는 탄수화물에 결합하는 화합물, 펩타이드, 또는 단클론성 항체.
- [0234] 일부 구현예에 있어서, 기재된 발명의 폴리펩타이드는 화학적으로 합성된다. 고상, 액상, 또는 펩타이드 축합 기술, 또는 임의의 이들의 조합의 잘 알려진 기술을 이용하여 제조된, 그와 같은 합성 폴리펩타이드는 천연 및 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 펩타이드 합성에 사용된 아미노산은 하기일 수 있다: Merrifield (1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154)의 최초 고상 절차의 표준 탈보호, 중화, 커플링 및 세정 프로토콜을 이용한 표준 Boc (N- α -아미노 보호된 N- α -t-부틸옥시카보닐) 아미노산 수지, 또는 Carpino 및 Han (1972, *J. Org. Chem.* 37:3403-3409)에 의해 최초로 기재된 염기-불안정적인 N- α -아미노 보호된 9-플루오렌메톡시카보닐 (Fmoc) 아미노산. Fmoc 및 Boc N- α -아미노 보호된 아미노산 둘 모두는 Sigma, Cambridge Research Biochemical, 또는 당해분야의 숙련가에 익숙한 다른 화학 회사로부터 취득될 수 있다. 게다가, 폴리펩타이드는 당해분야의 숙련가에 익숙한 다른 N- α -보호 그룹으로 합성될 수 있다. 고상 펩타이드 합성은 당해분야의 숙련가에 익숙한 기술에 의해 달성될 수 있고, 예를 들어, Stewart 및 Young, 1984, *Solid Phase Synthesis*, Second Edition, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.; Fields and Noble, 1990, *Int. J. Pept. Protein Res.* 35:161-214에서, 또는 자동화 합성기를 이용하여 제공될 수 있고, 각각은 본원에서 그 전체가 참고로 편입된다.
- [0235] 일부 구현예에 있어서, 본 발명의 폴리펩타이드는 특별한 특성을 전달하기 위해 (생체내 L-아미노산-특이적 프로테아제에 내성있는) D-아미노산, D- 및 L-아미노산의 조합, 및 다양한 "설계자" 아미노산 (예를 들면, β -메틸 아미노산, C- α -메틸 아미노산, 및 N- α -메틸 아미노산, 등)을 포함한다. 합성 아미노산 치환의 예는 라이신 용 오르니틴, 및 류신 또는 이소류신용 노르류신을 포함한다.
- [0236] 일부 구현예에 있어서, 폴리펩타이드는 생체내 증가된 반감기를 촉진시키기 위해 다른 화합물, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 또는 텍스트란에 연결될 수 있다. 상기 연결은 당해분야의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이 공유 또는 비-공유일 수 있다. 일부 다른 구현예에 있어서, 폴리펩타이드는 교질입자, 예컨대 폴리(에틸렌글리콜)-블

록-폴리(폴리프로필렌글리콜) 또는 폴리(에틸렌글리콜)-블록-폴리락타이드로 만들어진 교질입자에서 캡슐화될 수 있다. 일부 다른 구현예에 있어서, 폴리캡타이드는, 비제한적으로, 폴리락트산, 폴리글라이콜라이드, 및 폴리카프로락톤을 포함한 분해성 폴리에스테르로 구성된 분해성 나노- 또는 마이크로-입자에서 캡슐화될 수 있다.

[0237] 하나의 구현예에 있어서, 기재된 발명의 약제학적 제형은 흡입 디바이스에 의해 투여될 수 있다. 약제학적 제형 투여에 사용될 수 있는 흡입 디바이스의 예는, 비제한적으로, 네블라이저, 정량 흡입기, 건조 분말 흡입기 및 수성 액적 흡입기를 포함한다.

[0238] 액체 제형을 활동적으로 에어로졸화하고 일단 장입되면 연속적으로 작동하는, 네블라이저는 압축된 공기 또는 전기 공급이 필요하다. 예시적인 네블라이저는, 진동 메쉬 네블라이저, 젯트 네블라이저 (아토마이저로도 공지됨) 및 초음파 네블라이저를 포함한다. 예시적인 진동 메쉬 네블라이저는, 비제한적으로, Respironics i-Neb, Omron MicroAir, Beurer Nebulizer IH50 and Aerogen Aeroneb, Acorn-I, Acorn-II, AquaTower, AVA-NEB, Cirrus, Dart, DeVilbiss 646, Downdraft, Fan Jet, MB-5, Misty Neb, Salter Labs 8900, Sidestream, Updraft-II를 포함하고, Whisper Jet는 젯트 네블라이저의 예이다. 예시적인 초음파 네블라이저는, 비제한적으로, Omron NE-U17 네블라이저 및 Beurer 네블라이저 IH30을 포함한다.

[0239] 정량 흡입기 (MDI)는 분무의 형태로 환자에 액체 용액 또는 현탁액의 고정된 용적을 전달하기 위해 추진제를 이용한다.

[0240] 건조 분말 흡입기 (DPI)는 약물이 부착하는 훨씬 더 큰 입자 (예를 들면, 락토오스)를 함유한 부형제와 혼합된 활성 약물을 함유한다. 분무주입법 동안, 활성 약물은 캐리어로부터 박리되고 흡입되고 그 동안 캐리어 입자는 입 및 목에 영향을 주고 섭취된다. DPIs는 흡입과 약물 전달을 동기화한다.

[0241] 하나의 구현예에 따르면, 기재된 발명의 조성물은 흡입 또는 취입(각각 입을 통해 또는 코를 통해)에 의한 전달을 위한 분산성 건조 분말의 형태일 수 있다. 건조 분말 조성물은 당해기술에 공지된 공정, 예컨대 그의 개시내용이 참고로 편입된 국제 특허 공개 WO 91/16038 및 미국 특허 번호 6,921,527에 개시된 동결건조 및 제트 밀링에 의해 제조될 수 있다. 기재된 발명의 조성물은 대상체에 유니트 투여량 치료를 제공하기 충분한 양으로 적합한 투여량 소켓 내에 배치된다. 투여량 소켓은 적합한 흡입 디바이스 내에 핏팅되어 건조 분말 조성물의 기류 내로의 분산에 의한 에어로졸화를 허용하여 에어로졸을 형성한 다음 이렇게 생산된 에어로졸을 치료를 필요로 하는 대상체에 의한 차후의 흡입을 위해 부착된 마우스피스에 갖는 챔버 내에 포획하는 것이다. 그와 같은 투여량 소켓에는 당해기술에 공지된 조성물을 봉입하는 임의의 혈관, 예컨대 기류(예를 들면 공기)가 혈관 내로 유도되어 건조 분말 조성물을 분산할 수 있도록 하는 제거가능 부분을 갖는 젤라틴 또는 플라스틱 캡슐이 포함된다. 이러한 컨테이너는 미국 특허 번호 4,227,522; 미국 특허 번호 4,192,309; 및 미국 특허 번호 4,105,027에 나타낸 것들에 의해 예시된다. 적합한 용기에는 또한 Glaxo의 Ventolin® Rotohaler 브랜드 분말 흡입기 또는 Fison의 Spinhaler® 브랜드 분말 흡입기와 함께 사용되는 것들이 포함된다. 우수한 수분 배리어를 제공하는 또 다른 적합한 유니트-용량 용기는 알루미늄 포일 플라스틱 라미네이트로부터 형성된다. 약제학적-기반 분말은 형성가능한 포일 내 오목부에 중량 당 또는 용적 당 충전되고 커버하는 포일-플라스틱 라미네이트로 수분 밀봉된다. 분말 흡입 디바이스와 함께 사용하기 위한 그와 같은 용기는 미국 특허 번호 4,778,054에 기재되며 Glaxo의 Diskhaler®(미국 특허 번호 4,627,432; 4,811,731; 및 5,035,237)와 함께 사용된다. 이들 참조문헌은 모두 그의 전체가 본원에 참고로 편입된다.

[0242] 수성 액적 흡입기 (ADI)는 추진제의 사용 없이 액체 제형의 사전-정량을 전달한다. ADIs는 미세 입자의 소프트 미스트를 생산하는 액체를 활동적으로 에어로졸화한다. Berodual Respimat® (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.)은 예시적인 수성 액적 흡입기이다.

[0243] 하나의 구현예에 있어서, 기재된 발명의 폴리캡타이드는 분무화 용액의 형태일 수 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 분무화 제형은 만니톨을 함유하지 않는다. 하나의 구현예에 있어서, 분무화 용액은 네블라이저에 의해 전달된다.

[0244] 또 다른 구현예에 있어서, 폴리캡타이드는 고형 형태 (과립, 분말 또는 좌약 포함) 또는 액체 형태 (예를 들면, 용액, 현탁액, 또는 에멀전)로 제조될 수 있다.

[0245] 또 다른 구현예에 있어서, 기재된 발명의 폴리캡타이드는 나노-폴리플렉스의 형태일 수 있다. 하나의 구현예에 있어서, 난-폴리플렉스 폴리머는 음이온성이다. 또 다른 구현예에 있어서, 나노-폴리플렉스 폴리머는 엔도솜분해적 폴리머이다. 예시적인 나노-폴리플렉스 폴리머는, 비제한적으로, 키토산, 폴리에틸렌이민 (PEI), 폴리에틸렌 옥사이드 (PEO), 폴리(오르가노포스-파젠), 폴리(아크릴산) (PAA) 및 폴리(프로필아크릴산) (PPAA)을 포함한

다.

- [0246] 하나의 구현예에 있어서, 기재된 발명의 제형은 생물의학 디바이스의 임플란팅에 의해 전달될 수 있다. 생물의학 디바이스는, 비제한적으로, 이식편을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 제형은 이식편 상에 또는 그 안에 배치될 수 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 이식편은, 비제한적으로, 혈관 이식편을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 제형은 비경구로 전달될 수 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 제형은 국소로 전달될 수 있다.
- [0247] 또 다른 구현예에 있어서, 기재된 발명의 제형은 캐리어를 포함한다. 캐리어는, 비제한적으로, 방출 제제, 예컨대 지속된 방출 또는 지연된 방출 캐리어를 포함할 수 있다. 상기 구현예에 있어서, 캐리어는 더욱 효율적인 투여를 제공하기 위해 폴리펩타이드의 지속된 또는 지연된 방출이 가능한, 예를 들면, 폴리펩타이드의 덜 빈번한 및/또는 감소된 복용량을 초래하는, 취급의 편의성을 개선하는, 및 질환, 장애, 병태, 증후군, 등등에 관한 효과를 확장 또는 지연하는 임의의 물질일 수 있다. 상기 캐리어의 비-제한 예는 리포솜, 마이크로스펀지, 마이크로구형체, 또는 천연 및 합성 폴리머의 마이크로캡슐 등등을 포함한다. 리포솜은, 비제한적으로, 콜레스테롤, 스테아릴아민 또는 포스파티딜콜린을 포함한, 다양한 인지질로부터 형성될 수 있다.
- [0248] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 폴리펩타이드는 다양한 용액에 적용될 수 있다. 적합한 제형은 멸균되고, 충분한 양의 치료적 폴리펩타이드를 용해시키고, 치료적 폴리펩타이드의 안정성을 보존하고, 제안된 적용에 유해하지 않는다. 예를 들어, 기재된 발명의 조성물은 수성 현탁액으로서 제형화될 수 있고 여기에서 활성 성분(들)은 수성 현탁액의 제조에 적합한 부형제와 혼합물이다.
- [0249] 이러한 부형제에는 비제한적으로 현탁제(예를 들면, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시-프로필메틸셀룰로스, 나트륨 알기네이트, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸쓰검, 및 아카시아검), 분산제 또는 수화제, 예컨대 천연 발생 포스파티드(예를 들면, 레시틴), 또는 알킬렌 옥사이드와 지방산의 축합 생성물(예를 들면, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트), 또는 에틸렌 옥사이드와 장쇄 지방족 알코올의 축합 생성물(예를 들면, 헵타데카에틸-엔옥시세탄올), 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨로부터 유도된 부분 에스테르의 축합 생성물(예를 들면, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레에이트), 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨 무수물에서 유도된 부분 에스테르의 축합 생성물(예를 들면, 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레에이트)이 포함된다.
- [0250] 기재된 발명의 조성물은 또한 식물성 오일(예를 들면, 낙화생 오일, 올리브 오일, 참깨 오일 또는 코코넛 오일) 또는 미네랄 오일(예를 들면, 액체 파라핀) 중에 활성 성분을 현탁하여 오일성 서스펜션으로 제형화될 수 있다. 오일성 서스펜션은 증점제(예를 들면, 밀랍, 경질 파라핀 또는 세틸 알코올)를 함유할 수 있다.
- [0251] 기재된 발명의 조성물은 또한 물의 부가에 의해 수성 서스펜션의 제조에 적합한 분산성 분말 및 과립의 형태로 제형화될 수 있다. 이러한 분말 및 과립 중 활성 성분은 분산제 또는 수화제, 현탁제, 및 하나 이상의 보존제와의 혼합물로 제공된다. 적합한 분산제 또는 수화제 및 현탁제는 이미 상기 언급된 것들에 의해 예시된다. 추가 부형제도 존재할 수 있다.
- [0252] 기재된 발명의 조성물은 또한 에멀전의 형태일 수 있다. 에멀전은 두 비혼화성 액체 캐리어의 조합에 의해 제조되는 2-상 시스템이며, 이들 중 하나는 다른 것을 통해 균일하게 분포되고, 최대 콜로이드성 입자 이상의 직경을 갖는 소구로 구성된다. 소구 크기가 중추적이며, 이로써 시스템이 최대 안정성을 달성해야 한다. 보통, 제3 물질, 유화제가 편입되지 않는 한, 2 상의 분리는 일어나지 않을 것이다. 따라서, 기본 에멀전은 적어도 3 개 성분, 2 개의 비혼화성 액체 캐리어 및 유화제를 활성 성분과 함께 함유한다. 대부분의 에멀전은 수성상을 비-수성상 내로(또는 그 반대로) 편입한다. 그러나 기본적으로 비수성인 에멀전, 예를 들어 비-수성 비혼화성 시스템 글리세린 및 올리브 오일의 음이온성 및 양이온성 계면활성제를 제조할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 수중유 에멀전의 형태일 수 있다. 오일상은 식물성 오일, 예를 들면 올리브 오일 또는 낙화생 오일, 또는 미네랄 오일, 예를 들면 액체 파라핀, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 유화제는 천연 발생 검, 예를 들면, 아카시아검 또는 트라가칸쓰검, 천연 발생 포스파티드, 예를 들면 대두, 레시틴, 및 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유도된 에스테르 또는 부분 에스테르, 예를 들면 소르비탄 모노올레에이트, 및 부분 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들면 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트일 수 있다.
- [0253] 일부 구현예에 있어서, 기재된 발명의 약제학적 제형은 미토겐-활성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (MK2)의 키나제 활성을 저해할 수 있다. 일부 구현예에 있어서, 기재된 발명의 약제학적 제형은 MK2 키나제의 키나제 활성의 적어도 50%를 저해한다. 일부 구현예에 있어서, 기재된 발명의 약제학적 제형은 MK2 키나제의 키나제 활성의 적어도 55%를 저해한다. 일부 구현예에 있어서, 기재된 발명의 약제학적 제형은 MK2 키나제의 키나제 활성의 적어도 60%를 저해한다. 일부 구현예에 있어서, 약제학적 제형 또는 기재된 발명은 MK2 키나제의 키

키나제 활성 및 BDNF/NT-3 성장 인자 수용체 (TrkB)의 키나제 활성을 저해하는데 유효하다.

- [0259] 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 미토겐-활성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (MK2)의 키나제 활성, 칼슘/칼모둘린-의존형 단백질 키나제 I (CaMKI)의 키나제 활성, 및 BDNF/NT-3 성장 인자 수용체 (TrkB)의 키나제 활성을 저해하는데 유효하다.
- [0260] 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 미토겐-활성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (MK2)의 키나제 활성의 적어도 65% 및 칼슘/칼모둘린-의존형 단백질 키나제 I (CaMKI)의 키나제 활성의 적어도 65%를 저해한다.
- [0261] 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 미토겐-활성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (MK2)의 키나제 활성의 적어도 65% 및 BDNF/NT-3 성장 인자 수용체 (TrkB)의 키나제 활성의 적어도 65%를 저해한다.
- [0262] 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 미토겐-활성화된 단백질 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (MK2)의 키나제 활성의 적어도 65%, 칼슘/칼모둘린-의존형 단백질 키나제 I (CaMKI)의 키나제 활성의 적어도 65%, 및 BDNF/NT-3 성장 인자 수용체 (TrkB)의 키나제 활성의 적어도 65%를 저해한다.
- [0263] 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은, 본원에서 표 1에 열거된 나머지 그룹으로부터 하나 이상의 다른 선택된 키나제의 활성의 실질적으로 저해 없이, MK2, MK3, CaMKI, TrkB의 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 키나제의 키나제 활성을 저해한다.

표 1. 키나제 프로파일링 검정

	MMI-0100 (서열 식별 번호: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (서열 식별 번호: 19) (100 μ M)	MMI-0300 (서열 식별 번호: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (서열 식별 번호: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (서열 식별 번호: 7) (100 μ M)
Abl(h)	136	107	69	84	16
Abl (H396P) (h)	130	121	101	105	51
Abl (M351T)(h)	128	119	90	121	61
Abl (Q252H) (h)	105	107	82	98	40
Abl(T315I)(h)	98	108	97	105	16
Abl(Y253F)(h)	104	102	86	78	29
ACK1(h)	106	97	104	95	64
ALK(h)	118	95	19	16	12
ALK4(h)	124	152	140	130	81
Arg(h)	89	82	72	84	22
AMPK α 1(h)	107	108	71	87	35
AMPK α 2(h)	121	88	54	58	9
ARK5(h)	108	93	78	69	20
ASK1(h)	100	101	80	69	-4
오로라-A(h)	120	107	92	119	110
오로라-B(h)	94	166	128	150	5
Axl(h)	81	99	52	41	12
Bmx(h)	62	76	N/D	26	45
BRK(h)	70	127	35	18	41
BrSK1(h)	100	93	67	76	72
BrSK2(h)	129	102	83	86	84
BTK(h)	112	100	102	94	18
BTK(R28H)(h)	91	104	74	24	10
CaMKI(h)	13	21	1	0	-1
CaMKII β (h)	58	53	2	11	3
CaMKII γ (h)	106	94	5	3	3
CaMKI δ (h)	59	47	10	17	0
CaMKII δ (h)	89	2	1	2	1
CaMKIV(h)	87	71	17	18	-1
CDK1/사이클린 B(h)	96	115	73	74	57
CDK2/사이클린 A(h)	97	114	86	92	87
CDK2/사이클린 E(h)	106	112	94	83	19
CDK3/사이클린 E(h)	106	104	94	92	8
CDK5/p25(h)	114	97	89	92	66
CDK5/p35(h)	94	92	79	76	59
CDK6/사이클린 D3(h)	103	100	86	85	23
CDK7/사이클린 H/MAT1(h)	89	67	65	47	15
CDK9/사이클린 T1(h)	228	103	91	235	6
CHK1(h)	97	115	91	87	65
CHK2(h)	104	105	66	54	13
CHK2(I157T)(h)	97	85	43	41	3
CHK2(R145W)(h)	97	81	33	31	3
CK1 γ 1(h)	110	98	111	116	109
CK1 γ 2(h)	119	104	123	114	119
CK1 γ 3(h)	105	96	125	115	114
CK1 δ (h)	115	92	92	93	78
CK2(h)	90	83	90	101	93
CK2 α 2(h)	104	88	105	96	103

[0264]

	MMI-0100 (시열 식별 번호: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (시열 식별 번호: 19) (100 μ M)	MMI-0300 (시열 식별 번호: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (시열 식별 번호: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (시열 식별 번호: 7) (100 μ M)
CLK2(h)	88	97	103	116	116
CLK3(h)	108	76	61	84	76
cKit(h)	95	110	53	43	45
cKit(D816V)(h)	117	118	60	35	30
cKit(D816H)(h)	79	106	126	143	194
cKit(V560G)(h)	94	115	102	124	198
cKit(V654A)(h)	69	113	134	150	223
CSK(h)	70	33	49	16	2
c-RAF(h)	97	115	107	102	19
cSRC(h)	70	32	26	14	30
DAPK1(h)	97	113	46	36	0
DAPK2(h)	41	92	32	16	3
DCAMKL2(h)	146	131	81	70	56
DDR2(h)	105	104	94	95	79
DMPK(h)	60	66	59	54	12
DRAK1(h)	47	34	14	14	8
DYRK2(h)	99	142	155	195	127
eEF-2K(h)	113	136	91	43	43
EGFR(h)	95	83	21	16	-1
EGFR(L858R)(h)	76	120	N/D	52	26
EGFR(L861Q)(h)	53	74	25	22	15
EGFR(T790M)(h)	106	113	100	106	70
EGFR(T790M,L858R)(h)	93	108	85	78	53
EphA1(h)	114	136	73	61	40
EphA2(h)	58	95	31	17	N/D
EphA3(h)	107	117	6	12	33
EphA4(h)	110	127	88	65	48
EphA5(h)	110	123	18	24	42
EphA7(h)	193	220	159	222	189
EphA8(h)	181	133	93	146	337
EphB2(h)	68	128	18	22	70
EphB1(h)	99	95	44	58	37
EphB3(h)	109	128	62	47	79
EphB4(h)	62	131	44	28	38
ErbB4(h)	73	82	40	0	2
FAK(h)	98	110	111	96	94
Fer(h)	117	101	130	108	196
Fes(h)	44	74	20	16	23
FGFR1(h)	120	97	55	59	18
FGFR1(V561M)(h)	108	72	74	74	113
FGFR2(h)	49	73	14	18	12
FGFR2(N549H)(h)	95	104	116	112	105
FGFR3(h)	73	208	102	0	10
FGFR4(h)	67	75	28	19	3
Fgr(h)	54	71	60	47	109
Flt1(h)	109	96	69	48	27
Flt3(D835Y)(h)	120	115	80	71	65
Flt3(h)	104	99	84	18	17
Flt4(h)	135	105	83	89	73
Fms(h)	89	92	45	37	14

[0265]

	MMI-0100 (서열 식별 번호: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (서열 식별 번호: 19) (100 μ M)	MMI-0300 (서열 식별 번호: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (서열 식별 번호: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (서열 식별 번호: 7) (100 μ M)
Fms(Y969C)(h)	126	88	72	91	N/D
Fyn(h)	71	75	74	54	83
GCK(h)	98	99	70	66	30
GRK5(h)	117	135	136	131	116
GRK6(h)	131	132	147	141	174
GRK7(h)	111	124	122	100	93
GSK3 α (h)	183	119	157	164	175
GSK3 β (h)	113	132	205	202	238
Haspin(h)	127	71	48	36	25
Hck(h)	354	107	72	72	78
Hck(h) 활성화된	58	100	82	81	67
HIPK1(h)	94	115	74	91	47
HIPK2(h)	98	102	73	90	38
HIPK3(h)	105	105	93	105	85
IGF-1R(h)	102	49	119	90	117
IGF-1R(h), 활성화된	126	94	80	77	45
IKK α (h)	108	104	93	87	50
IKK β (h)	105	109	84	84	71
IR(h)	112	90	96	85	95
IR(h), 활성화된	127	105	79	59	90
IRR(h)	85	69	8	8	10
IRAK1(h)	97	101	95	93	5
IRAK4(h)	100	110	59	59	3
Itk(h)	99	98	77	63	7
JAK2(h)	89	131	133	119	49
JAK3(h)	150	117	121	122	95
JNK1 α 1(h)	91	106	97	98	109
JNK2 α 2(h)	114	109	98	96	81
JNK3(h)	104	90	89	70	171
KDR(h)	100	110	101	94	15
Lck(h)	346	113	-2	228	359
Lck(h) 활성화된	106	90	243	216	76
LIMK1(h)	103	109	88	92	87
LKB1(h)	111	99	101	89	51
LOK(h)	37	67	37	18	7
Lyn(h)	113	98	69	3	31
MAPK1(h)	108	97	107	100	102
MAPK2(h)	98	105	98	93	60
MAPKAP-K2(h)	19	35	5	5	9
MAPKAP-K3(h)	27	39	3	7	9
MEK1(h)	86	116	77	77	21
MARK1(h)	109	102	132	120	110
MELK(h)	74	59	16	17	0
Mer(h)	47	90	52	50	17
Met(h)	104	71	65	62	27
Met(D1246H)(h)	99	139	125	68	150
Met(D1246N)(h)	114	149	82	31	90
Met(M1268T)(h)	114	143	255	265	239
Met(Y1248C)(h)	77	141	84	36	73
Met(Y1248D)(h)	87	118	102	31	218

[0266]

	MMI-0100 (시열 식별 번호: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (시열 식별 번호: 19) (100 μ M)	MMI-0300 (시열 식별 번호: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (시열 식별 번호: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (시열 식별 번호: 7) (100 μ M)
Mett(Y1248H)(h)	88	153	117	63	126
MINK(h)	96	103	48	52	5
MKK6(h)	74	98	48	44	18
MKK7 β (h)	137	117	100	94	102
MLCK(h)	85	103	2	1	0
MLK1(h)	77	84	40	33	43
Mnk2(h)	94	106	89	86	6
MRCK α (h)	98	103	104	97	5
MRCK β (h)	103	102	83	71	-10
MSK1(h)	52	50	32	28	8
MSK2(h)	105	88	56	52	14
MSSK1(h)	82	100	77	75	22
MST1(h)	85	72	14	6	3
MST2(h)	98	104	19	11	2
MST3(h)	104	95	45	36	4
mTOR(h)	102	110	91	93	135
mTOR/FKBP12(h)	117	118	145	125	140
MuSK(h)	85	106	93	93	27
NEK2(h)	102	97	78	61	0
NEK3(h)	100	100	92	85	20
NEK6(h)	109	98	82	85	49
NEK7(h)	97	96	84	87	89
NEK11(h)	102	95	53	33	2
NLK(h)	100	106	87	90	19
p70S6K(h)	89	84	35	33	3
PAK2(h)	71	69	65	59	44
PAK4(h)	92	98	94	89	86
PAK3(h)	N/D	50	140	121	102
PAK5(h)	97	100	110	117	125
PAK6(h)	121	105	104	100	107
PAR-1B α (h)	62	110	113	109	97
PASK(h)	81	60	29	28	9
PDGFR α (h)	104	108	65	40	40
PDGFR α (D842V)(h)	103	107	114	118	170
PDGFR α (V561D)(h)	58	106	82	100	146
PDGFR β (h)	116	137	81	53	40
PK1(h)	144	143	135	159	178
PhK γ 2(h)	62	86	46	38	16
Pim-1(h)	44	18	8	7	0
Pim-2(h)	117	74	76	92	46
Pim-3(h)	98	94	80	80	37
PKA(h)	138	110	119	119	118
PKB α (h)	140	110	57	67	30
PKB β (h)	284	250	84	98	21
PKB γ (h)	105	103	20	41	20
PKC α (h)	94	100	89	86	3
PKC β I(h)	88	98	78	78	1
PKC β II(h)	102	100	82	75	3
PKC γ (h)	94	101	89	79	6
PKC δ (h)	100	101	101	90	61

[0267]

	MMI-0100 (서열 식별 번호: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (서열 식별 번호: 19) (100 μ M)	MMI-0300 (서열 식별 번호: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (서열 식별 번호: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (서열 식별 번호: 7) (100 μ M)
PKC ϵ (h)	102	98	79	59	23
PKC η (h)	105	101	103	98	45
PKC ι (h)	110	97	68	46	7
PKC μ (h)	79	73	22	14	10
PKC θ (h)	102	101	88	76	62
PKC ζ (h)	82	98	81	75	7
PKD2(h)	84	78	33	25	10
PKG1 α (h)	82	70	64	58	25
PKG1 β (h)	71	57	50	53	24
Plk1(h)	109	128	115	119	104
Plk3(h)	107	107	127	129	122
PRAK(h)	159	115	128	118	95
PRK2(h)	72	74	33	27	7
PrKX(h)	84	112	61	76	57
PTK5(h)	135	108	132	129	96
Pyk2(h)	113	127	47	34	46
Ret(h)	108	96	140	145	174
Ret (V804L)(h)	113	100	79	73	20
Ret(V804M)(h)	92	105	95	87	36
RIPK2(h)	92	98	97	98	30
ROCK-I(h)	99	117	79	73	17
ROCK-II(h)	102	85	74	77	2
Ron(h)	117	120	93	79	46
Ros(h)	107	86	95	99	150
Rse(h)	109	88	88	89	63
Rsk1(h)	86	102	46	54	34
Rsk2(h)	65	101	51	38	14
Rsk3(h)	76	109	76	71	23
Rsk4(h)	99	125	90	91	29
SAPK2a(h)	110	107	90	85	52
SAPK2a(T106M)(h)	101	100	97	99	32
SAPK2b(h)	99	95	81	82	42
SAPK3(h)	106	97	84	79	24
SAPK4(h)	98	106	96	91	48
SGK(h)	128	115	48	54	2
SGK2(h)	103	119	56	98	-1
SGK3(h)	95	58	10	8	-3
SIK(h)	113	102	66	68	40
Snk(h)	94	109	114	131	122
Src(1-530)(h)	95	75	23	19	21
Src(T341M)(h)	98	56	70	76	59
SRPK1(h)	69	93	90	96	80
SRPK2(h)	92	100	106	97	80
STK33(h)	99	98	45	52	16
Syk(h)	45	36	24	9	5
TAK1(h)	116	124	122	177	N/D
TAO1(h)	99	105	82	73	24
TAO2(h)	95	93	70	74	15
TAO3(h)	45	102	77	67	12
TBK1(h)	106	98	37	39	16

[0268]

	MMI-0100 (서열 식별 번호: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (서열 식별 번호: 19) (100 μ M)	MMI-0300 (서열 식별 번호: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (서열 식별 번호: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (서열 식별 번호: 7) (100 μ M)
Tec(h) 활성화된	100	77	56	29	33
Tie2(h)	28	53	26	21	22
Tie2(R849W)(h)	102	89	117	108	106
Tie2(Y897S)(h)	99	85	83	87	80
TLK2(h)	113	129	114	151	133
TrkA(h)	74	N/D	25	17	24
TrkB(h)	4	7	5	8	12
TSSK1(h)	99	98	79	79	46
TSSK2(h)	107	91	98	94	92
Txk(h)	87	98	48	37	10
ULK2(h)	123	132	122	131	124
ULK3(h)	142	164	167	147	177
WNK2(h)	95	94	64	54	8
WNK3(h)	100	97	77	74	9
VRK2(h)	112	109	161	185	169
Yes(h)	49	93	67	14	N/D
ZAP-70(h)	79	58	75	33	1
ZIPK(h)	80	67	28	13	1
N/D: % 활성은 복제물로서 결정될 수 있다.					
MMI-0100: YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)					
MMI-0200: YARAAARQARAKALNRQLGVA (서열 식별 번호: 19)					
MMI-0300: FAKLAARLYRKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 3)					
MMI-0400: KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 4)					
MMI-0500: HRIKAWLKKIKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 7)					

[0269]

[0270]

일부 구현예에 있어서, 생체내 MMI-0100 (서열 식별 번호: 1) 및 그의 기능성 등가물의 저해된 프로파일은 복용량, 투여의 경로, 및 저해제에 반응하는 세포 유형에 의존한다.

[0271]

일부 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 65 % 미만을 저해한다. 일부 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 60 % 미만을 저해한다. 일부 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 55 % 미만을 저해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 50 % 미만을 저해한다. 일부 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 45 % 미만을 저해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 40 % 미만을 저해한다. 일부 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 35 % 미만을 저해한다. 일부 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 30 % 미만을 저해한다. 일부 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 25 % 미만을 저해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 20 % 미만을 저해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 15 % 미만을 저해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 10 % 미만을 저해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제(들)의 키나제 활성의 5 % 미만을 저해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형은 다른 선택된 키나제의 키나제 활성을 증가시킨다.

[0272]

직접 단락의 구현예에 있어서, 실질적으로 저해되지 않는 하나 이상의 다른 선택된 키나제는 하기의 군으로부터 선택된다: Ca²⁺/칼모둘린-의존형 단백질 키나제 II (CaMKII, 그의 소유니트 CaMKII δ 포함), 원종양유전자 세린/트레오닌-단백질 키나제 (PIM-1), 세포성-육종 (c-SRC), 비장 티로신 키나제 (SYK), c-Src 티로신 키나제 (CSK), 및 인슐린-유사 성장 인자 1 수용체 (IGF-1R).

[0273]

일부 구현예에 있어서, 본 발명의 적어도 하나의 MMI 저해제 (즉, 적어도 하나의 MMI-0100 (서열 식별 번호: 1), MMI-0200 (서열 식별 번호: 19), MMI-0300 (서열 식별 번호: 3), MMI-0400 (서열 식별 번호: 4), 및 MMI-0500 (서열 식별 번호: 7))에 의해 실질적으로 저해되는 키나제 (즉, 키나제 활성이 적어도 65%만큼 저해되는 키나제)는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 아벨슨 췌장 백혈병 바이러스 종양유전자 동족체 1 (Ab1), 아벨슨 췌장 백혈병 바이러스 종양유전자 동족체 1 (T3151) (Ab1 (T3151)), 아벨슨 췌장 백혈병 바이러스 종양유전자 동족체 1 (Y253F) (Ab1 (Y253F)), 역형성 림프종 키나제 (알크), 아벨슨-관련 유전자 (Arg), 5'-AMP-활성화된 단백질 키나제 촉매적 소유니트 알파-1 (AMPK α 1), 5'-AMP-활성화된 단백질 키나제 촉매적 소유니트 알파-

2 (AMPK α 2), AMPK-관련 단백질 키나제 5 (ARK5), 세포자멸사 신호 조절 키나제 1 (ASK1), 오로라 (Aurora) 키나제 B (오로라-B), AXL 수용체 티로신 키나제 (Axl), 염색체 X 단백질 (Bmx)내 골수 티로신 키나제 유전자, 유방 종양 키나제 (BRK), 브루톤 티로신 키나제 (BTK), 브루톤 티로신 키나제 (R28H) (BTK (R28H)), Ca^{2+} /칼모둘린-의존형 단백질 키나제 I (CaMKI), Ca^{2+} /칼모둘린-의존형 단백질 키나제 II β (CaMKII β), Ca^{2+} /칼모둘린-의존형 단백질 키나제 II γ (CaMKII γ), Ca^{2+} /칼모둘린-의존형 단백질 키나제 δ (CaMKI δ), Ca^{2+} /칼모둘린-의존형 단백질 키나제 II δ (CaMKII δ), Ca^{2+} /칼모둘린-의존형 단백질 키나제 IV (CaMKIV), 세포 분열 키나제 2 (CDK2/사이클린E), 세포 분열 키나제 3 (CDK3/사이클린E), 세포 분열 키나제 6 (CDK6/사이클린D3), 세포 분열 키나제 7 (CDK7/사이클린H/MAT1), 세포 분열 키나제 9 (CDK9/사이클린 T1), 체크포인트 키나제 2 (CHK2), 체크포인트 키나제 2 (1157T) (CHK2 (1157T)), 체크포인트 키나제 2 (R145W) (CHK2 (R145W)), 원종양유전자 티로신-단백질 키나제 cKit (D816V) (cKit (D816V)), C-src 티로신 키나제 (CSK), Raf 원종양유전자 세린/트레오닌 단백질 키나제 (c-RAF), 원종양유전자 티로신-단백질 키나제 (cSRC), 사망-관련된 단백질 키나제 1 (DAPK1), 사망-관련된 단백질 키나제 2 (DAPK2), 근긴장성 이영양증-단백질 키나제 (DMPK), DAP 키나제-관련 세포자멸사-유도 단백질 키나제 1 (DRAK1), 상피 성장 인자 수용체 (EGFR), 상피 성장 인자 수용체 (EGFR L858R), 상피 성장 인자 수용체 L861Q (EGFR (L861Q)), Eph 수용체 A2 (EphA2) (EphA2), Eph 수용체 A3 (EphA3), Eph 수용체 A5 (EphA5), Eph 수용체 B2 (EphB2), Eph 수용체 B4 (EphB4), 적아세포성 백혈병 바이러스 종양유전자 동족체 4 (ErbB4), c-Fes 단백질 티로신 키나제 (Fes), 섬유아세포 성장 인자 수용체 2 (FGFR2), 섬유아세포 성장 인자 수용체 3 (FGFR3), 섬유아세포 성장 인자 수용체 4 (FGFR4), Fms-유사 티로신 키나제 수용체-3 (Flt3), FMS 원종양유전자 (Fms), 반수체 세균 세포-특이적 핵 단백질 키나제 (Haspin), 인슐린 수용체-관련 수용체 (IRR), 인터류킨-1 수용체-관련된 키나제 1 (IRAK1), 인터류킨-1 수용체-관련된 키나제 4 (IRAK4), IL2-유도성 T-세포 키나제 (Itk), 키나제 삽입 도메인 수용체 (KDR), 림프구 세포-특이적 단백질-티로신 키나제 (Lck), 림프구-배향된 키나제 (LOK), Lyn 티로신 단백질 키나제 (Lyn), MAP 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (MK2), MAP 키나제-활성화된 단백질 키나제 3 (MK3), MEK1, 모계 배아 류신 지퍼 키나제 (MELK), c-Mer 원종양유전자 티로신 키나제 (Mer), c-Met 원종양유전자 티로신 키나제 (Met), c-Met 원종양유전자 티로신 키나제 D1246N (Met (D1246N)), c-Met 원종양유전자 티로신 키나제 Y1248D (Met Y1248D), Misshapen/NIK-관련 키나제 (MINK), MAP 키나제 키나제 6 (MKK6), 미오신 경쇄 키나제 (MLCK), 혼합된 계통 키나제 1 (MLK1), MAP 키나제 신호-통합 키나제 2 (Mnk2), 근긴장성 이영양증 키나제-관련 CDC42-결합 키나제 알파 (MRCK α), 근긴장성 이영양증 키나제-관련 CDC42-결합 키나제 베타 (MRCK β), 미토겐- 및 스트레스-활성화된 단백질 키나제 1 (MSK1), 미토겐- 및 스트레스-활성화된 단백질 키나제 2 (MSK2), 근육-특이적 세린 키나제 1 (MSSK1), 포유동물 STE20-유사 단백질 키나제 1 (MST1), 포유동물 STE20-유사 단백질 키나제 2 (MST2), 포유동물 STE20-유사 단백질 키나제 3 (MST3), 근육, 골격 수용체 티로신-단백질 키나제 (MuSK), 네버 인 유사분열 A-관련 키나제 2 (NEK2), 네버 인 유사분열 A-관련 키나제 3 (NEK3), 네버 인 유사분열 A-관련 키나제 11 (NEK11), 70 kDa 리보솜 단백질 S6 키나제 1 (p70S6K), PAS 도메인 함유 세린/트레오닌 키나제 (PASK), 포스포릴라제 키나제 소유니트 감마-2 (PhK γ 2), Pim-1 키나제 (Pim-1), 단백질 키나제 B 알파 (PKB α), 단백질 키나제 B 베타 (PKB β), 단백질 키나제 B 감마 (PKB γ), 단백질 키나제 C, 알파 (PKC α), 단백질 키나제 C, 베타1 (PKC β 1), 단백질 키나제 C, 베타 II (PKC β II), 단백질 키나제 C, 감마 (PKC γ), 단백질 키나제 C, 엡실론 (PKC ϵ), 단백질 키나제 C, 아이오타 (PKC ι), 단백질 키나제 C, 뮤 (PKC μ), 단백질 키나제 C, 제타 (PKC ζ), 단백질 키나제 D2 (PKD2), cGMP-의존형 단백질 키나제 1 알파 (PKG1 α), cGMP-의존형 단백질 키나제 1 베타 (PKG1 β), 단백질-키나제 C-관련 키나제 2 (PRK2), 프롤린-풍부 티로신 키나제 2 (Pyk2), 원종양유전자 티로신-단백질 키나제 수용체 Ret V804L (Ret (V804L)), 수용체-상호작용 세린-트레오닌 키나제 2 (RIPK2), Rho-관련된 단백질 키나제 I (ROCK-I), Rho-관련된 단백질 키나제 II (ROCK-II), 리보솜 단백질 S6 키나제 1 (Rsk1), 리보솜 단백질 S6 키나제 2 (Rsk2), 리보솜 단백질 S6 키나제 3 (Rsk3), 리보솜 단백질 S6 키나제 4 (Rsk4), 스트레스-활성화된 단백질 키나제 2A T106M (SAPK2a, T106M), 스트레스-활성화된 단백질 키나제 3 (SAPK3), 혈청/글루코코르티코이드 조절된 키나제 (SGK), 혈청/글루코코르티코이드 조절된 키나제 2 (SGK2), 혈청/글루코코르티코이드-조절된 키나제 3 (SGK3), 원종양유전자 티로신-단백질 키나제 Src 1-530 (Src, 1-530), 세린/트레오닌-단백질 키나제 33 (STK33), 비장 티로신 키나제 (Syk), 싸우전드 앤드 원 (Thousand and one) 아미노산 단백질 1 (TA01), 싸우전드 앤드 원 아미노산 단백질 2 (TA02), 싸우전드 앤드 원 아미노산 단백질 3 (TA03), 탱크-결합 키나제 1 (TBK1), Tec 단백질 티로신 키나제 (Tec), 혈관 내막 내피 세포 키나제 2 (Tie2), 티로신 키나제 수용체 A (TrkA), BDNF/NT-3 성장 인자 수용체 (TrkB), TXK 티로신 키나제 (Txk), WNK 라이신 결합된 단백질 키나제 2 (WNK2), WNK 라이신 결합된 단백질 키나제 3 (WNK3), 야마구찌 육종 바이러스 종양유전자 동족체 1 (Yes), 제타-쇄 (TCR) 관련된 단백질 키나

제 70kDa (ZAP-70), 및 ZIP 키나제 (ZIPK).

[0274] 일부 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 적어도 2개의 MMI 저해제 (즉, 적어도 2개의 MMI-0100 (서열 식별 번호: 1), MMI-0200 (서열 식별 번호: 19), MMI-0300 (서열 식별 번호: 3), MMI-0400 (서열 식별 번호: 4), 및 MMI-0500 (서열 식별 번호: 7))만큼 실질적으로 저해되는 키나제 (즉, 키나제 활성이 적어도 65%만큼 저해되는 키나제)는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 역형성 림프종 키나제 (ALK), 유방 종양 키나제 (BRK), 브루톤 티로신 키나제 (BTK), Ca^{2+} /칼모둘린-의존형 단백질 키나제 I (CaMKI δ 포함), Ca^{2+} /칼모둘린-의존형 단백질 키나제 II (CaMKII, CaMKII β , CaMKII δ 및 CaMKII γ 포함), Ca^{2+} /칼모둘린-의존형 단백질 키나제 IV (CaMKIV), 체크포인트 키나제 2 (CHK2 (R145W)), 원종양유전자 티로신-단백질 키나제 cKit (D816V) (cKit (D816V)), C-src 티로신 키나제 (CSK), 원종양유전자 티로신-단백질 키나제 (cSRC), 사망-관련된 단백질 키나제 1 (DAPK1), 사망-관련된 단백질 키나제 2 (DAPK2), DAP 키나제-관련 세포자멸사-유도 단백질 키나제 1 (DRAK1), 상피 성장 인자 수용체 (EGFR), 상피 성장 인자 수용체 L861Q (EGFR (L861Q)), Eph 수용체 A2 (EphA2), Eph 수용체 A3 (EphA3), Eph 수용체 A5 (EphA5), Eph 수용체 B2 (EphB2), 적아세포성 백혈병 바이러스 종양유전자 동족체 4 (ErbB4), c-Fes 단백질 티로신 키나제 (Fes), 섬유아세포 성장 인자 수용체 2 (FGFR2), 섬유아세포 성장 인자 수용체 3 (FGFR3), 및 섬유아세포 성장 인자 수용체 4 (FGFR4), Fms-유사 티로신 키나제 수용체-3 (Flt3), 인슐린 수용체-관련 수용체 (IRR), 림프구-배향된 키나제 (LOK), Lyn 티로신 단백질 키나제 (Lyn), MAP 키나제-활성화된 단백질 키나제 2 (MK2), MAP 키나제-활성화된 단백질 키나제 3 (MK3), 모계 배아 류신 지퍼 키나제 (MELK), 미오신 경쇄 키나제 (MLCK), 미토젠- 및 스트레스-활성화된 단백질 키나제 (MSK1), 포유동물 STE20-유사 단백질 키나제 1 (MST1), 포유동물 STE20-유사 단백질 키나제 2 (MST2), 네버 인 유사분열 A-관련 키나제 11(NEK11), 70 kDa 리보솜 단백질 S6 키나제 1 (p70S6K), PAS 도메인 함유 세린/트레오닌 키나제 (PASK), Pim-1 키나제 (Pim-1), 단백질 키나제 B, 감마 (PKB γ), 단백질 키나제 C, 뮤 (PKC μ), 단백질 키나제 D2 (PKD2), 단백질-키나제 C-관련 키나제 2 (PRK2), 혈청/글루코코르티코이드-조절된 키나제 3 (SGK3), 원종양유전자 티로신-단백질 키나제 Src (Src), 비장 티로신 키나제 (Syk), Tec 단백질 티로신 키나제 (Tec), 혈관 내막 내피 세포 키나제 2 (Tie2), 티로신 키나제 수용체 A (TrkA), BDNF/NT-3 성장 인자 수용체 (TrkB), 제타-쇄 (TCR) 관련 단백질 키나제 70kDa (ZAP-70), 및 ZIP 키나제 (ZIPK).

[0275] 일부 구현예에 있어서, 약제학적 제형은, 비제한적으로, 하기를 포함하는, MK2의 소-분자 저해제를 포함한다:

[0276] 화학식 삽입 바람, 영문 80쪽, 81쪽,

[0277] 일부 구현예에 있어서, 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1) 및 그의 기능성 등가물의 폴리펩타이드는 TGF- β 발현의 수준, 면역조절 세포의 침윤, 또는 둘 모두를 감소시키는데 유효하다.

[0278] 또 다른 구현예에 있어서, 기재된 발명의 약제학적 제형은, 상처속에, 제한 없이, 단핵구, 섬유세포, 대식세포, 림프구, 및 비만 또는 수지상 세포를 포함한, 염증성 또는 줄기 세포의 하나 이상의 유형의 침윤을 감소시키는데 유효하다.

[0279] 또 다른 구현예에 있어서, 세포 유형은, 제한 없이, CD4 및/또는 CD8을 포함한 세포 표면 마커(들)의 발현을 특징으로 한다.

[0280] 일부 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료량은 약 0.000001 mg/kg 체중 내지 약 100 mg/kg 체중의 양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제 펩타이드의 치료량은 약 0.00001 mg/kg 체중 내지 약 100 mg/kg 체중의 양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제 펩타이드의 치료량은 약 0.0001 mg/kg 체중 내지 약 100 mg/kg 체중의 양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제 펩타이드의 치료량은 약 0.001 mg/kg 체중 내지 약 10 mg/kg 체중의 양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제 펩타이드의 치료량은 약 0.01 mg/kg 체중 내지 약 10 mg/kg 체중의 양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제 펩타이드의 치료량은 약 0.1 mg/kg (또는 100 μ g/kg) 체중 내지 약 10 mg/kg 체중의 양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제 펩타이드의 치료량은 약 1 mg/kg 체중 내지 약 10 mg/kg 체중의 양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제 펩타이드의 치료량은 약 10 mg/kg 체중 내지 약 100 mg/kg 체중의 양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제 펩타이드의 치료량은 약 2 mg/kg 체중 내지 약 10 mg/kg 체중의 양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제 펩타이드의 치료량은 약 3 mg/kg 체중 내지 약 10 mg/kg 체중의 양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제 펩타이드의 치료량은 약 4 mg/kg 체중 내지 약 10 mg/kg 체중의 양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제 펩타이드의 치료량은

[illegible]

[0281] 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 1 μg/kg/일 내지 25 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 1 μg/kg/일 내지 2 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 2 μg/kg/일 내지 3 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 3 μg/kg/일 내지 4 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학 적의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 4 μg/kg/일 내지 5 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있 어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 5 μg/kg/일 내지 6 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 6 μg/kg/일 내지 7 μg/kg/ 일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 7 μg/kg/ 일 내지 8 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 8 μg/kg/일 내지 9 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 9 μg/kg/일 내지 10 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제 형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 1 μg/kg/일 내지 5 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있 어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 5 μg/kg/일 내지 10 μg/kg/일 범위이다. 일 부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 10 μg/kg/일 내지 15 μ g/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 15 μg/kg/일 내지 20 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드 의 치료적 용량은 25 μg/kg/일 내지 30 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치 료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 30 μg/kg/일 내지 35 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 35 μg/kg/일 내지 40 μg/kg/일 범위이다. 일부 다 른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 40 μg/kg/일 내지 45 μg/kg/ 일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 45 μ g/kg/일 내지 50 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 50 μg/kg/일 내지 55 μg/kg/일 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 치료적

억제제 펩타이드의 치료적 용량은 55 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 60 $\mu\text{g/kg/일}$ 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 60 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 65 $\mu\text{g/kg/일}$ 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 65 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 70 $\mu\text{g/kg/일}$ 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 70 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 75 $\mu\text{g/kg/일}$ 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 75 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 80 $\mu\text{g/kg/일}$ 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 80 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 85 $\mu\text{g/kg/일}$ 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 85 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 90 $\mu\text{g/kg/일}$ 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 90 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 95 $\mu\text{g/kg/일}$ 범위이다. 일부 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 95 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 100 $\mu\text{g/kg/일}$ 범위이다.

[0282] 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 1 $\mu\text{g/kg/일}$ 이다.

[0283] 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 2 $\mu\text{g/kg/일}$ 이다.

[0284] 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 3 $\mu\text{g/kg/일}$ 이다.

[0285] 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 4 $\mu\text{g/kg/일}$ 이다.

[0286] 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 5 $\mu\text{g/kg/일}$ 이다.

[0287] 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 6 $\mu\text{g/kg/일}$ 이다.

[0288] 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 7 $\mu\text{g/kg/일}$ 이다.

[0289] 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 8 $\mu\text{g/kg/일}$ 이다.

[0290] 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 9 $\mu\text{g/kg/일}$ 이다.

[0291] 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 제형의 치료적 억제제 펩타이드의 치료적 용량은 10 $\mu\text{g/kg/일}$ 이다.

[0292] 아미노산 서열 YARAAARQARAKALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1) 또는 이의 기능성 증가물의 폴리펩타이드는 억제학적으로 허용가능한 염의 형태로 투여될 수 있다. 의약에서 사용될 때 염은 억제학적으로 허용가능해야 하지만, 비-억제학적으로 허용가능한 염은 이의 억제학적으로 허용가능한 염을 제조하는데 편리하게 사용될 수 있다. 상기 염은, 비제한적으로, 하기 산으로부터 제조된 것을 포함한다: 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, p-톨루엔 설푼산, 타르타르산, 시트르산, 메탄 설푼산, 포름산, 말론산, 석신산, 나프탈렌-2-설푼산, 및 벤젠 설푼산. 또한, 상기 염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 염, 예컨대 카복실산 그룹의 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 염으로서 제조될 수 있다. 억제학적으로 허용가능한 염은 공지된다. 예를 들어, P. H. Stahl, 등은 "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" (Wiley VCH, Zurich, Switzerland: 2002)에서 상세히 억제학적으로 허용가능한 염을 기재한다. 그 염은 기재된 발명 내에서 기재된 화합물의 최종 단리 및 정제 동안 제자리에서 제조될 수 있거나 또는 적합한 유기 산과 유리 염기 관능기를 개별적으로 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 대표적인 산 부가 염은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 시트레이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트, 바이설페이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 디글루코네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 푸마레이트, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로아이오다이드, 2-하이드록시에탄설포네이트(이세티오네이트), 락테이트, 말레에이트, 메탄설포네이트, 니코티네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 옥살레이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 석시네이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 인산염, 글루타메이트, 바이카보네이트, p-톨루엔설포네이트 및 운데카노에이트. 또한, 염기성 질소-함유 그룹은 하기 같은 제제로 사원화될 수 있다: 저급 알킬 할라이드 예컨대 메틸, 에틸, 프로필, 및 부틸 염화물, 브로마이드 및 아이오다이드; 디메틸, 디에틸, 디부틸 및 디아밀 설페이트 같은 디알킬 설페이트; 장쇄 할라이드 예컨대 데실, 라우릴, 미리스틸 및 스테아릴 염화물, 브로마이드 및 아이오다이드; 벤질 및 펜에틸 브로마이드 같은 아릴알킬 할라이드 및 다른 것. 수용해성 또는 오일용해성 또는 분산성 생성물은 이로써 수득된다. 억제학적으로 허용가능한 산 부가 염을 형성하는데 이용될 수 있는 산의 예는 염산, 브롬화수소산, 황산 및 인산과 같은 무기 산 및 옥살산, 말레산, 석신산 및 시트르산 같은 유기 산을 포함한다. 염기성 부가 염은 카복실산-함유 모이어티를 적합한 염기 예컨대 억제학적으로 허용가능한 금속 양이온의 하이드록사이드, 카보네이트 또는 바이카보네이트와 또는 암모니아 또는 유기 1차, 2차 또는 3차 아민과 반응시킴으로써 본 발명 내에서 기재된 화합물의 최종 단리 및 정제 동안 제자리에서 제조될 수 있다. 억제학적으로 허용가능한 염은, 비제한적으로, 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속 예컨

대 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄 염 등등 및 비독성 4차 암모니아에 기반된 양이온 및 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 디에틸아민, 에틸아민 등등을 포함한 아민 양이온을 포함한다. 염기 부가 염의 형성에 유용한 다른 대표적인 유기 아민은 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페리딘, 피페라진 등등을 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 염은 또한 당해 기술에서 잘 알려진 표준 절차를 이용하여, 예를 들어 충분히 염기성 화합물 예컨대 아민을 생리적으로 허용가능한 음이온을 제공하는 적합한 산과 반응시킴으로써 취득될 수 있다. 카복실산의 알칼리 금속 (예를 들어, 나트륨, 칼륨 또는 리튬) 또는 알칼리토 금속 (예를 들어 칼슘 또는 마그네슘) 염은 또한 제조될 수 있다.

[0293] 제형은 유니트 복용 형태로 편리하게 시사될 수 있고 제약의 당해 기술에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 방법은 치료제(들), 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 ("활성 화합물")을 하나 이상의 부속 제제를 구성하는 캐리어와 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성제를 액체 캐리어 또는 미분된 고형 캐리어 또는 둘 모두와 균일하게 및 친밀하게 회합시킴 및 그 다음, 필요하면, 생성물을 원하는 제형으로 성형시킴에 의해 제조된다.

[0294] 일부 구현예에 있어서, 캐리어는 제어된 방출 캐리어이다. 용어 "제어된 방출"은 제형으로부터 약물 방출의 방식 및 프로파일이 제어되는 임의의 약물-함유 제형을 지칭하도록 의도된다. 이는 즉각적인 뿐만 아니라 비-즉각적인 방출 제형을 포함하고, 비-즉각적인 방출 제형은, 비제한적으로, 지속된 방출 및 지연된 방출 제형을 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 제어된 방출은 온도의 변화에 의해 매개된다. 일부 다른 구현예에 있어서, 약제학적 제형의 제어된 방출은 pH의 변화에 의해 매개된다.

[0295] 주입가능 데포 형태는 생분해성 폴리머 예컨대, 비제한적으로, 폴리에스테르 (폴리글라이콜라이드, 폴리락트산 및 이들의 조합), 폴리에스테르 폴리에틸렌 글리콜 코폴리머, 폴리아미노-유도된 생고분자, 폴리무수물, 폴리오르토에스테르, 폴리포스파젠, 수크로오스 아세테이트 이소부티레이트 (SAIB), 광중합성 생고분자, 천연 발생 생고분자, 단백질 폴리머, 콜라겐, 및 다당류에서 치료제/약물의 마이크로캡슐화된 매트릭스를 형성함으로써 제조될 수 있다. 약물 대 폴리머의 비율 및 이용된 특정한 폴리머의 성질에 의존하여, 약물 방출의 속도는 제어될 수 있다. 상기 지효성 제형은 적합한 폴리머 또는 소수성 물질 (예를 들어 허용가능한 오일내 에멀전으로서) 또는 이온교환수지로, 또는 난용성 유도체, 예를 들어, 난용성 염으로서 제형화될 수 있다. 데포 주입가능 제형은 또한 신체 조직과 양립가능한 리포솜 또는 마이크로에멀전에서 약물의 포획에 의해 제조된다.

[0296] 일부 구현예에 있어서, 캐리어는 지연된 방출 캐리어이다. 또 다른 구현예에 있어서, 지연된 방출 캐리어는 생분해성 폴리머를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 생분해성 폴리머는 합성 폴리머이고, 또 다른 구현예에 있어서, 생분해성 폴리머는 천연 발생 폴리머이다.

[0297] 일부 구현예에 있어서, 캐리어는 지속된 방출 캐리어이다. 또 다른 구현예에 있어서, 지속된-방출 캐리어는 생분해성 폴리머를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 생분해성 폴리머는 합성 폴리머이다. 또 다른 구현예에 있어서, 생분해성 폴리머는 천연 발생 폴리머이다.

[0298] 일부 구현예에 있어서, 캐리어는 단기 방출 캐리어이다. 용어 "단기" 방출은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 임플란트가 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 또는 23 시간 동안 활성 성분의 치료적 수준을 전달하기 위해 작제 및 배열되는 것을 의미한다. 일부 다른 구현예에 있어서, 상기 단기 방출 캐리어는 약 1, 2, 3, 또는 4 일 동안 활성 성분의 치료적 수준을 전달한다.

[0299] 일부 구현예에 있어서, 캐리어는 장기 방출 캐리어이다. 용어 "장기" 방출은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 임플란트가 적어도 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 또는 60 일 동안 활성 성분의 치료적 수준을 전달하기 위해 작제 및 배열되는 것을 의미한다. 또 다른 구현예에 있어서, 장기-방출 캐리어는 생분해성 폴리머이다. 또 다른 구현예에 있어서, 생분해성 폴리머는 합성 폴리머이다.

[0300] 일부 구현예에 있어서, 캐리어는 입자를 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 제형은 본원에서 기재된 바와 같이 입자에 함유된다. 일부 구현예에 있어서, 제형은 본원에서 기재된 바와 같이 입자상에 함유된다. 일부 구현예에 있어서, 제형은 본원에서 기재된 바와 같이 입자에 및 입자상에 함유된다.

[0301] 제형은 또한, 제한 없이, 보조제 제제, 습윤제, 유화제, 및 분산제를 포함하는, 적절한 아조반트를 함유할 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 등등에 의해 보장될 수 있다. 또한 등장제, 예를 들어, 당, 염화나트륨 등등을 포함하는 것이 바람직할 수

있다. 주입가능 약제학적 형태의 장기적인 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 유발될 수 있다.

- [0302] 일부 구현예에 있어서, 본 발명의 폴리펩타이드는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 폴리머 쇄에 공유결합될 수 있다. 일부 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 폴리펩타이드는 안정적인 알파-나선 구조를 형성할 수 있는 탄화수소-스테이플화된 펩타이드를 발생시키기 위해 탄화수소로 스테이플화된다 (Schafmeister, C. 등, J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 5891-5892, 그 전체가 본 명세서에 참조로 편입됨).
- [0303] 일부 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 폴리펩타이드는 마이크로구형체, 나노캡슐, 리포솜, 또는 마이크로에멀전 속으로 캡슐화 또는 포착되거나, 또는 안정성을 증가시키기 위해, 전달을 늘리기 위해, 또는 펩타이드의 활성을 변경시키기 위해 d-아미노산을 포함한다. 이들 기술은 시간 내지 일만큼 안정성 및 방출을 동시에 늘릴 수 있거나, 또는 근처 세포에 의한 약물의 흡수를 지연시킬 수 있다.
- [0304] 치료제(들)의 제형은, 약제학적으로 허용가능한 농도의 염, 완충제, 보존제, 양립가능한 캐리어, 아췌반트, 및 선택적으로 다른 치료적 성분을 일상적으로 함유할 수 있는, 약제학적으로 허용가능한 용액에 투여될 수 있다.
- [0305] 일부 구현예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 추가로 적어도 하나의 추가의 치료제를 포함한다.
- [0306] 일부 상기 구현예에 있어서, 추가의 치료제는 하기를 포함한다: EXC001 (연결 조직 성장 인자 (CTGF)에 대한 안티-센스 RNA), AZX100 (열충격 단백질 20 (HSP20)의 포스포펩타이드 유사체), PRM-151 (재조합 인간 혈청 아밀로이드 P/펩타신 2), PXL01 (인간 락토페린으로부터 유도된 합성 펩타이드), DSC127 (안지오텐신 유사체), RXI-109 (연결 조직 성장 인자 (CTGF)를 표적하는 자가-전달 RNAi 화합물), TCA (트리클로로아세트산), 보툴리눔 독소 유형 A, 또는 이들의 조합.
- [0307] 또 다른 구현예에 있어서, 추가의 치료제는 항-염증제이다.
- [0308] 일부 구현예에 있어서, 항-염증제는 스테로이드 항-염증제이다. 용어 "스테로이드 항-염증제"는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 17-탄소 4-고리계를 함유한 수많은 화합물 중 임의의 하나를 지칭하고 스테롤, (단백동화 스테로이드로서) 다양한 호르몬, 및 글리코사이드를 포함한다. 스테로이드 항-염증성 약물의 대표적인 예는, 제한 없이, 하기를 포함한다: 코르티코스테로이드 예컨대 하이드로코르티손, 하이드록실트리암시놀론, 알파-메틸 텍사메타손, 텍사메타손-인산염, 베클로메타손 디프로피오네이트, 클로베타솔 발레레이트, 데소나이드, 데스옥시메타손, 데스옥시코르티코스테론 아세테이트, 텍사메타손, 디클로리손, 디플루코르톨론 발레레이트, 플루아드레놀론, 플루클로롤론 아세토나이드, 플루메타손 피발레이트, 플루오시놀론 아세토나이드, 플루오시노나이드, 플루코르틴 부틸에스테르, 플루오코르톨론, 플루프레드니텐 (플루프레드닐리텐) 아세테이트, 플루안드레놀론, 할시노나이드, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손 부티레이트, 메틸프레드니솔론, 트리암시놀론 아세토나이드, 코르티손, 코르토독손, 플루세토나이드, 플루드로코르티손, 디플루오로손 디아세테이트, 플루르아드레놀론, 플루드로코르티손, 디플로로손 디아세테이트, 플루르아드레놀론 아세토나이드, 메드라이손, 암시나켈, 암시나파이드, 베타메타손 및 그의 에스테르의 밸런스, 클로로프레드니손, 클로로프레드니손 아세테이트, 클로코르텔론, 클레스시놀론, 디클로리손, 디플루르프레드네이트, 플루클로로나이드, 플루니솔라이드, 플루오로메탈론, 플루페롤론, 플루프레드니솔론, 하이드로코르티손 발레레이트, 하이드로코르티손 사이클로펜틸프로피오네이트, 하이드로코르타메이트, 메프레드니손, 파라메타손, 프레드니솔론, 프레드니손, 베클로메타손 디프로피오네이트, 트리암시놀론, 및 이들의 혼합물.
- [0309] 또 다른 구현예에 있어서, 항-염증제는 비스테로이드 항-염증제이다. 용어 "비-스테로이드 항-염증제"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 비제한적으로, 이부프로펜 (Advil®), 나프록센 나트륨 (Aleve®), 및 아세트아미노펜 (Tylenol®)을 포함한, 그의 작용에서 아스피린-유사인 큰 그룹의 제제를 지칭한다. 기재된 발명의 문맥에서 사용가능한 비-스테로이드 항-염증제의 추가의 예는, 제한 없이, 하기를 포함한다: 옥시감, 예컨대 피록시감, 이속시감, 테녹시감, 수독시감, 및 CP-14,304; 디스알시드, 베노틸레이트, 트릴리세이트, 사파프린, 솔프린, 디플루니살, 및 펜도살; 아세트산 유도체, 예컨대 디클로페낙, 펜클로페낙, 인도메타신, 설린단, 톨메틴, 이소크세팍, 푸로페낙, 티오피낙, 지도메타신, 아세마타신, 펜티아작, 조메피락, 클린다나, 옥세피낙, 펠비낙, 및 케토락; 페나메이트, 예컨대 메페남산, 메클로페남산, 플루페남산, 니플롬산, 및 톨페남산; 프로피온산 유도체, 예컨대 베낙사프로펜, 플루르바이프로펜, 케토프로펜, 페노프로펜, 펜부펜, 인도프로펜, 파이프프로펜, 카프로펜, 옥사프로진, 프라노프로펜, 미로프로펜, 티옥사프로펜, 수프로펜, 알미노프로펜, 및 티아프로펜산; 피라졸, 예컨대 페닐부타존, 옥시펜부타존, 페프라존, 아자프로파존, 및 트리메타존. 이들 비-스테로이드 항-염증제, 뿐만 아니라 이들 제제들의 피부과로 허용가능한 염 및 에스테르의 혼합물은 또한 이용될 수 있다.

예를 들어, 에토펜아메이트, 플루페남산 유도체는 국소 적용에 특히 유용하다.

- [0310] 또 다른 구현예에 있어서, 항-염증제는, 제한 없이, 형질전환 성장 인자-베타3 (TGF- β 3), 항종양 괴사 인자-알파 (TNF- α) 제제, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0311] 일부 구현예에 있어서, 추가 제제는 진통제이다. 일부 구현예에 있어서, 진통제는 의식의 방해 또는 다른 감각 양식의 변경 없이 통증 역치의 상승에 의해 통증을 완화시킨다. 일부 상기 구현예에 있어서, 진통제는 비-오피오이드 진통제이다. "비-오피오이드 진통제"는 통증을 감소시키지만 오피오이드 진통제가 아닌 천연 또는 합성 물질이다. 비-오피오이드 진통제의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 에토돌락, 인도메타신, 설린단, 톨메틴, 나부메톤, 피복시캄, 아세트아미노펜, 페노프로펜, 플루르바이프로펜, 이부프로펜, 케토프로펜, 나프록센, 나프록센 나트륨, 옥사프로진, 아스피린, 콜린 마그네슘 트리살리실레이트, 디플루니살, 메클로페남산, 메페남산, 및 페닐부타존. 일부 다른 구현예에 있어서, 진통제는 오피오이드 진통제이다. "오피오이드 진통제", "오피오이드", 또는 "마약 진통제"는, 효능제 작용을 생산하는, 중추신경계에서 오피오이드 수용체에 결합하는 천연 또는 합성 물질이다. 오피오이드 진통제의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 코데인, 펜타닐, 하이드로모르폰, 레보르파놀, 메페리딘, 메타돈, 모르핀, 옥시코돈, 옥시모르폰, 프로폭시펜, 부프레노르핀, 부토르파놀, 데조신, 날부핀, 및 펜타조신.
- [0312] 또 다른 구현예에 있어서, 추가 제제는 항-감염제이다. 또 다른 구현예에 있어서, 항-감염제는 항생제 제제이다. 용어 "항생제 제제"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 감염성 질환의 치료에서 주로 사용된, 박테리아, 및 다른 미생물을 파괴하기 위한, 또는 이의 성장을 저해하기 위한 수용력을 갖는 화학 물질의 임의의 그룹을 의미한다. 항생제 제제의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 페니실린 G; 메티실린; 나프실린; 옥사실린; 클록사실린; 디클록사실린; 암피실린; 아목시실린; 티카실린; 카르베니실린; 메즐로실린; 아즐로실린; 피페라실린; 이미페넴; 아스트레오남; 세팔로틴; 세파클로르; 세폭시틴; 세푸록심; 세포니시드; 세프메타졸; 세포탄; 세프프로질; 로라카르베프; 세페타메트; 세포페라존; 세포타심; 세프티죽심; 세프트리악손; 세프타지딤; 세페팜; 세픽심; 세프포독심; 세프셀로딘; 플레록사신; 날리딕산; 노르플록사신; 시프로플록사신; 오픈록사신; 에녹사신; 로메플록사신; 시녹사신; 독시사이클린; 미노사이클린; 테트라사이클린; 아미카신; 겐타마이신; 카나마이신; 네틸마이신; 토브라마이신; 스트렙토마이신; 아지트로마이신; 클라리트로마이신; 에리트로마이신; 에리트로마이신 에스톨레이트; 에리트로마이신 에틸 석시네이트; 에리트로마이신 글루코헵토네이트; 에리트로마이신 락토바이오네이트; 에리트로마이신 스테아레이트; 반코마이신; 테이코플라닌; 클로르암페니콜; 클린다마이신; 트리메토프림; 설파메톡사졸; 니트로푸란토인; 리팜핀; 무피로신; 메트로니다졸; 세팔렉신; 록시트로마이신; 코-아목시클라부아네이트; 피페라실린 및 타조박탐의 조합; 및 그의 다양한 염, 산, 염기, 및 다른 유도체. 항균 항생제 제제는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 페니실린, 세팔로스포린, 카바세팜, 세파마이신, 케바페넴, 모노박탐, 아미노글리코사이드, 글리코펩타이드, 퀴놀론, 테트라사이클린, 매크로라이드, 및 플루오로퀴놀론.
- [0313] 적어도 하나의 추가의 치료제의 다른 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 장미 열매 오일, 비타민 E, 5-플루오로우라실, 블레오마이신, 양파 추출물, 펜톡시파일린, 프롤릴-4-하이드록실라제, 베라파밀, 타크롤리무스, 타목시펜, 트레티노인, 콜히친, 칼슘 길항제, 트라닐스트, 아연, 항생제, 및 이들의 조합.
- [0314] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 당해분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서 기재된 것과 유사한 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 또한 기재된 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있어도, 바람직한 방법 및 물질은 이제 기재된다. 본원에서 언급된 모든 공보는 공보가 인용되는 것과 관련하여 방법 및/또는 물질을 개시 및 기재하기 위해 본 명세서에 참조로 편입된다.
- [0315] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥이 명확히 달리 지시하지 않는 한 하한의 유니트의 10분의 1까지, 그 범위의 상한과 하한 사이의 각 개입 값 및 그 언급된 범위에서 임의의 다른 언급된 또는 개입 값이 본 발명 내에 포함되는 것이 이해된다. 더 작은 범위에서 독립적으로 포함될 수 있는 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 본 발명 내에 또한 포함되고, 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 제외된 한계 처리된다. 언급된 범위가 한계들의 한 쪽 또는 양쪽을 포함하는 경우, 그 포함된 한계들의 각각 양쪽을 배제한 범위는 본 발명에서 또한 포함된다.
- [0316] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 및 첨부된 청구범위에서, 문맥이 명확히 달리 지시하지 않는 한 단수 형태는 복수의 참조를 포함한다는 것이 주목되어야 한다. 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 동일한 의미를 갖는다.

- [0317] 이들의 내용은 본 명세서에 참조로 편입된, 본 명세서에서 논의된 공보들은 본 출원의 출원일에 앞서 그의 개시 내용에 대하여 단독으로 제공된다. 기재된 발명이 선행 발명의 덕으로 상기 공보를 앞선 일자로 하도록 자격이 주어지지 않는다는 인정으로서 해석되는 것은 본원에서 없다. 추가로, 제공된 공보의 일자는 독립적으로 확인될 필요가 있는 실제 공개일과 상이할 수 있다.
- [0318] 기재된 발명은 이의 취지 또는 필수적인 속성으로부터 이탈 없이 다른 특이적 형태로 형체화될 수 있고, 따라서, 본 발명의 범위를 나타내는 경우, 진술한 명세서보다 첨부된 청구범위를 참조해야 한다.
- [0319] **실시예**
- [0320] 하기 실시예는 당해분야의 숙련자에게 본 발명의 제조 및 사용 방법의 완벽한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제시되고, 발명자들이 그의 발명으로서 여기는 범위를 제한하도록 의도되지 않고 아래 실험이 수행된 모든 또는 단지 실험이라는 것을 이들이 나타내도록 의도되지 않는다. 사용된 숫자 (예를 들면 양, 온도, 등)에 관하여 정확도를 보장하기 위해 노력하였지만, 일부 실험적 오차 및 편차는 설명되어야 한다. 달리 명시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨온도이고, 그리고 압력은 대기압 또는 그 근처이다.
- [0321] **물질 및 방법**
- [0322] A. MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1)의 건조 분말 제형
- [0323] **MMI-0100 제형:**
- [0324] MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1), 동결건조 (American Peptide, Inc., Sunnyvale CA) 로트 번호 100429, 제조일자 2010년 6월 29일, 500 mg.
- [0325] 순량 분무 건조된 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1), 5% w/w 고형물 (Bend Research, Bend OR) 로트 번호 BREC 00708-003A, 제조일자 2012년 7월 27일, 1 g.
- [0326] 순량 분무 건조된 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1), 1% w/w 고형물 (Bend Research, Bend OR) 로트 번호 BREC 00708-003B, 제조일자 2012년 7월 27일, 1 g.
- [0327] 분무 건조된 80/20 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1)/트레할로오스 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas TX), 1% w/w 고형물 (Bend Research, Bend OR) 로트 번호 BREC 00708-011C, 제조일자 w/c 2012년 9월 10일, 500 mg.
- [0328] 분무 건조된 92.5/7.5 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1)/트레할로오스 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas TX), 1% w/w 고형물 (Bend Research, Bend OR) 로트 번호 BREC 00708-011F, 제조일자 w/c 2012년 9월 10일, 500 mg.
- [0329] **급속 HPLC 및 NGI 샘플 추출 방법**
- [0330] **물질 및 장비**
- [0331] 물, Millipore 또는 등가물
- [0332] 아세토니트릴, HPLC 등급
- [0333] 메탄올, HPLC 등급
- [0334] 트리플루오로아세트산
- [0335] Tween 20
- [0336] MMI-0100 순량 동결건조된 약물 물질
- [0337] 미량천칭 (메틀러-톨레도, Columbus OH)
- [0338] 차세대 충격기 (NGI) (MSP Corp, Shoreview MN)
- [0339] 용량 유닛 샘플링 장치 (Copley, Nottingham UK)
- [0340] TPK 컨트롤러 (Copley, Nottingham UK)

- [0341] HPLC 시스템
- [0342] 온도조절된 칼럼 구획 또는 칼럼 오븐 및 샘플 구획을 갖는 HPLC 기기 (Waters Alliance 2695, Milford MA)
- [0343] 칼럼: Supelco, Ascentis Express® Peptide ES-C18, 50 x 4.6 mm (Sigma-Aldrich, St Louis MO)
- [0344] 유량: 1.5 mL/분
- [0345] 주입 용량: 40 ILL
- [0346] 칼럼 온도: 40 °C
- [0347] 샘플 온도: 5 °C
- [0348] 검출기 파장: 215 nm
- [0349] 이동상 A: 물내 0.1% IT A (72%)
- [0350] 이동상 B: 1:1 메탄올 : 아세토니트릴내 0.1% TFA (28%)
- [0351] 운영 시간: 3 분. MMI-0100의 체류 시간은 약 2.35 분이다.
- [0352] **용액 제조**
- [0353] 이동상 A: 물내 0.1% TFA
- [0354] 2 L 매스 플라스크에서 1000 mL의 물속에 2.0 mL의 TFA를 피펫으로 옮기고 물로 용적에 희석시킨다. 혼합시키고 탈기시킨다. 대안 용적은 제조될 수 있고 단 비율은 동등하게 유지된다.
- [0355] 이동상 B: 1:1 메탄올 : 아세토니트릴내 0.1% TFA
- [0356] 1 L 매스 플라스크에서 500 mL의 메탄올속에 1.0 mL의 TFA를 피펫으로 옮기고 메탄올로 용적에 희석시킨다. 혼합시키고 탈기시킨다. 대안 용적은 제조될 수 있고 단 비율은 동등하게 유지된다. 1 L 매스 플라스크에서 500 mL의 아세토니트릴속에 1.0 mL의 TFA를 피펫으로 옮기고 아세토니트릴로 용적에 희석시킨다. 혼합시키고 탈기시킨다. 대안적 용적은 제조될 수 있고 단 비율은 동등하게 유지된다. 상기 제조된 용액을 2,000 mL의 이동상에 대하여 혼합시킨다.
- [0357] 샘플 용매: 물내 0.02% Tween 20
- [0358] 눈금있는 입구가 큰 TC 피펫을 이용하여 대략 3,000 mL의 물을 함유한 4,000 mL 매스 플라스크에 0.8 mL의 Tween 20을 이동시킨다. Tween 20은 점성이다. 반드시 몇 번 플라스크에 물로 피펫을 린스하여 피펫 밖으로 Tween 20을 플러싱한다. 물로 용적에 희석시킨다. 양호하게 혼합시킨다.
- [0359] 코팅 용액: 메탄올내 5% Tween 20
- [0360] 눈금있는 입구가 큰 TC 피펫을 이용하여 대략 75 mL의 메탄올을 함유한 100.0 mL 매스 플라스크에 5 mL의 Tween 20을 이동시킨다. Tween 20은 점성이다. 몇 번 플라스크에 메탄올로 피펫을 린스하여 피펫 밖으로 Tween 20을 플러싱한다. 메탄올로 용적에 희석시킨다. 양호하게 혼합시킨다.
- [0361] 주석: MMI-0100은 흡습성이다. 순량 약물 물질의 모든 취급은 5% 상대 습도에 유지된 글러브 박스에서 수행되어야 한다.
- [0362] 주석: 동결건조된 MMI-0100은 -10 °C와 -20 °C 사이 보관된다. 사용에 앞서, 동결건조된 MMI-0100은 적어도 2시간 동안 5% 상대 습도에 유지된 데시케이터 또는 글러브 박스에서 해동되어야 한다.
- [0363] 표준 모액 - 1.1 mg/mL
- [0364] 적절한 계량 용기 속에, 11 mg의 순수한 MMI-0100까지 MMI-0100 등가물의 양을 계량한다. 필요한 실제 중량은 분석 증명서에서 보고된 순도 지수로 11 mg 분할에 의해 계산될 수 있다. 실제로 계량된 MMI-0100의 양은 상기 계산된 중량의 ± 0.250 mg 이내이어야 한다. MMI-0100 (있는 그대로) 플러스 계량 용기의 중량을 W_i 로서 기록한다. MMI-0100을 10.0 mL 매스 플라스크에 이동시킨다. 비어있는 계량 용기를 천칭에 배치하고 중량 (W_f)을 기록한다. 표준 양은 $W_i - W_f$ 와 같다. 대략 6 mL의 샘플 용매를 부가한다. 매스 플라스크를 선회시켜 샘플 용매로 용적에 용해 및 희석시킨다. 양호하게 혼합시키고 폴리프로필렌 원심관에 용액을 이동시킨다. 표준 모액 체크를

위하여 제2 용액을 제조한다.

[0365] 작업 표준 용액 - 110 $\mu\text{g/mL}$

[0366] 5.0 mL의 표준 모액을 50-mL 매스 플라스크에 피펫으로 옮긴다. 샘플 용매로 용적에 희석시키고 용액을 폴리프로필렌 원심관에 즉시 이동시킨다. 최종 농도: 110 $\mu\text{g/mL}$.

[0367] 작업 표준 용액 - 11 $\mu\text{g/mL}$

[0368] 5.0 mL의 표준 모액을 50-mL 매스 플라스크에 피펫으로 옮긴다. 샘플 용매로 용적에 희석시킨다. 최종 농도: 11 $\mu\text{g/mL}$.

[0369] 정량한계 (LOQ) 용액의 한계

[0370] 1.0 mL의 110 $\mu\text{g/mL}$ 작업 표준 용액을 50-mL 매스 플라스크에 피펫으로 옮긴다. 샘플 용매로 용적에 희석시킨다. 최종 농도: 2.2 $\mu\text{g/mL}$.

[0371] 절차

[0372] 안정적인 신호가 달성된 때까지 이동상으로 HPLC를 평형화시킨다. 적절한 경우 하기 순서 중 하나를 이용하여 시스템 적합성 및 샘플 주입을 수행한다.

[0373] 주석: HPLC 자동시료주입기 온도는 5°C에 유지된다. MMI-0100 샘플 용액은 제조 직후 HPLC에 이동되어야 하고 주입에 앞서 적어도 10-15 분 동안 열적으로 평형화시켜야 된다.

[0374] 주석: 우리는 용액으로부터 MMI-0100 펩타이드를 흡수할 것이다. 단지 폴리프로필렌 HPLC 바이알이 분석용으로 사용되어야 한다.

[0375] NGI 샘플

[0376] 샘플 용매 (1x)

[0377] LOQ 용액 (6x)

[0378] 11 $\mu\text{g/mL}$ 작업 표준 (5x)

[0379] 11 $\mu\text{g/mL}$ 체크 표준 (1x)

[0380] NGI 샘플 - 1 복제, MOC까지 수포 (1 x 각)

[0381] 11 $\mu\text{g/mL}$ 작업 표준 (1x)

[0382] NGI 샘플의 추가의 복제

[0383] 11 $\mu\text{g/mL}$ 작업 표준 (각 NGI 복제 이후 1 x)

[0384] 하기 표적 요건이 충족되면 시스템 적합성은 달성된다.

[0385] 샘플 용매 피크: MMI-0100의 체류 시간에서 아무것도 검출되지 않음

[0386] LOQ 용액: n=6 주입에 대하여 %RSD (상대 표준 편차)는 $\leq 10\%$ 이어야 한다

[0387] 작업 표준의 제1 n=5 주입 :

[0388] %RSD는 $\leq 1.5\%$ 이어야 한다

[0389] 테일링 지수는 ≤ 2.0 이어야 한다

[0390] k'는 > 2.0 이어야 한다. 보이드 시간에 대해 용매 프론트에서 제1 피크를 이용한다.

[0391] 이론적 플레이트는 정보만을 위하여 기록되어야 한다.

[0392] 체크 표준: 98.0-102.0%

[0393] 운영 동안 작업 표준 주입: 모든 작업 표준 주입의 %RSD는 $\leq 2.0\%$ 이어야 한다

[0394] NGI 샘플 제조

[0395] NGI 분석용 수포는 연구에서 사용된 흡입기용 정상 사용 지침에 따라 복용되어야 한다.

[0396] 수포, 유동 채널, 목, 및 NGI 임팩션 컵은 표 2에서 열거된 추출 용적으로 단계에 대하여 정상 실험실 실시를 이용한 샘플 용매로 추출되어야 한다.

[0397] 표 2. 시험 용액의 요약

시험 용액	용량 (mL)
수포	20.0
유동 채널	5.0
목	20.0
사전분리기 삽입부	10.0
사전분리기 최하부	10.0
임팩션 컵 1 내지 3	10.0
임팩션 컵 4 내지 6	20.0
임팩션 컵 7	10.0
마이크로오리피스 콜렉터 (MOC)	5.0

[0398]

[0399] NGI 임팩션 컵은 혼합할 때 커버될 필요가 없다. 혼합 시간은 3 분이어야 한다.

[0400] 사전분리기 추출

[0401] 사전분리기는 용적측정 유리그릇 속에서 추출되지 않는다.

[0402] 사전분리기 최상부: 사전분리기 최상부는 추출되지 않는다.

[0403] 사전분리기 삽입부: 사전분리기 삽입부는 투약 동안 중심 컵에 부가된 10.0 mL의 샘플 용매를 가질 것이다. 상기 용액은 추가의 희석 없이 HPLC 바이알에 이동에 앞서 중심 컵에서 피펫에 의해 간단히 혼합될 것이다.

[0404] 사전분리기 최하부: 사전분리기 최하부를 스톱퍼로 단단히 닫는다. 최하부의 평탄 부분에 10.0 mL 샘플 용매를 부가한다. 피펫으로 몇 번 평탄 부분의 전체 표면적을 린스한다. 상기 동일 샘플 용액을 이용하여, 최하부의 줄기의 내벽을 린스한다. 샘플 용액을 피펫으로 혼합시킨다.

[0405] 계산

[0406] 하기 방정식을 이용하여 체크 표준 정확도를 계산한다:

[0407]
$$(A_{\text{체크 표준}})(C_{\text{표준}})(100\%)/(A_{\text{표준}})(C_{\text{체크 표준}})$$

[0408] 식 중:

[0409] $A_{\text{체크 표준}}$ = 체크 표준 용액에서 MMI-0100 피크의 피크 면적

[0410] $C_{\text{표준}}$ = 작업 표준 용액에서 MMI-0100의 농도

[0411] $A_{\text{표준}}$ = 작업 표준 용액의 제1 오 (5) 주입에서 MMI-0100 피크의 평균 피크 면적

[0412] $C_{\text{체크 표준}}$ = 체크 표준 용액에서 MMI-0100의 농도

[0413] 하기 방정식을 이용하여 μg 으로 개별 시험 용액에서 MMI-0100의 양을 계산한다:

[0414]
$$(A_{\text{샘플}})(C_{\text{표준}})(V_{\text{샘플}})(P)/(A_{\text{표준}})$$

[0415] 식 중:

[0416] $A_{\text{샘플}}$ = 시험 용액에서 MMI-0100 피크의 피크 면적

[0417] $C_{\text{표준}}$ = 작업 표준 용액에서 MMI-0100의 농도

[0418] P = (적용가능하면) 참조 물질의 효력 지수

[0419] $A_{\text{표준}}$ = 작업 표준 용액의 제1 오 (5) 주입에서 MMI-0100 피크의 평균 피크 면적

[0420] 표 3에서 열거된 수포 및 디바이스 파라미터는 에어로졸 성능의 최적화를 위하여 개시점으로서 사용되었다.

표 3. 수포, 디바이스 및 시험 조건 (최종 조건)

수포 정보	
수포 설계	Rohrer 750 장비가 구비된 MDTx (Monmouth Junction NJ)에서 제조된 4.5 mm 평탄-상부 수포
충전 정보	주위 실온 및 <5% 상대습도에서 글러브 박스 내부의 수포 충전
충전 중량	표적 충전 중량 $\pm 5\%$ (95%-105% 표적)
포일: 수포, 리딩	수포 리딩 물질 및 수포 형성 물질: Alcan (Shelbyville KY) (도 1 및 도 2)
밀봉 파라미터	ST3 밀봉제 밀봉 온도: 136°C 밀봉 시간: 0.5 초 100 psi에서 설정된 압력 진공 냉각 시간: 5 초
밀봉 정보	ST3 밀봉제는 미량천칭이 구비된 글러브 박스에 함유되었고; 수포는 충전 직후 밀봉되었다
수포 스탬핑	Arbor Press를 이용하여 15 mm 가장자리에 스탬핑된 수포
수포 높이 측정	Ames Pneumatic AG-698 (Ames IA) 공기 게이지 범위: 4.48-4.63 mm
디바이스 정보	
플랫폼 #(s)	EPIC S0361F-24
유동 채널	S0619
전자기기	함수 발생기
구동 개략	F1=39.8 kHz, F2=54.0 kHz, 100 Hz 변조, 90/10 듀티 사이클
구동 전압	240 V
변환기 온-타임	2 x 2 초
천공 도구 #	A0101A-5 (스퀘어 패턴내 4 x 0.011" OD 뮌
유동 속도	25 L/분

[0421]

- [0422] B. MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1)의 네블라이저 제형
- [0423] **MMI-0100 제형:**
- [0424] 제형 A: 7 mg/mL; 200 mL의 0.9% 염수를 함유한 매스 플라스크 속으로 계량된 1.8 g의 동결건조된 펩타이드.
- [0425] 제형 B: 0.7 mg/mL; 200 mL의 0.9% 염수를 함유한 매스 플라스크 속으로 계량된 0.18 g의 동결건조된 펩타이드.
- [0426] **기기:**
- [0427] Malvern MasterSizer X V2.15; Malvern Instruments GmbH, Muenchen II
- [0428] 칼럼 오븐, 2487 이중 흡광도 검출기를 갖춘 HPLC Alliance 2695 및
- [0429] 크로마토그래피 데이터 시스템 (Empower 3); Waters
- [0430] 질량 흐름 제어기 0-30 l/분, 예를 들면 PR4000; MKS
- [0431] 상대 습도 및 온도용 측정 시스템, 예를 들면 testo 645
- [0432] 디지털 마노미터, 예를 들면 testo 525
- [0433] 정확 천칭, 예를 들면 Excellence XS603S DR, 메틀러 톨레도
- [0434] 컨디셔닝 시스템
- [0435] 거품 유량계, 예를 들면 Gilibrator2, Gillian
- [0436] 호흡 시뮬레이터 Z
- [0437] 필터 패드 (폴리프로필렌)
- [0438] 필터 케이싱
- [0439] 실험실 진탕기 예를 들면 3015, IKA Werke
- [0440] 온도-/습도 센서, 예를 들면 Testo 645, Testo
- [0441] 가스 계량기, G4, Elster Instromet
- [0442] 피펫 연구 1000, 에펜도르프
- [0443] 멀티피펫 스트립, 에펜도르프
- [0444] 중탕, 예를 들면 F12; Julabo
- [0445] 자석 교반기, 예를 들면 IKA RCT basic
- [0446] 유량계, 예를 들면 Rheostress1, Haake
- [0447] 표면장력계, 예를 들면 science line t60, Sita Messtechnik
- [0448] Osmomat, 예를 들면 Gonotec auto
- [0449] C. MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1)의 나노-폴리플렉스 제형
- [0450] *세포 침투제 MK2 저해된 펩타이드의 합성*
- [0451] MK2 저해된 펩타이드 (MK2i) MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1)은 표준 Fmoc 화학을 이용하여 PS3 펩타이드 합성기 (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ)상에서 합성되었다. N-메틸피롤리돈 (NMP, Fischer Scientific)은 모든 펩타이드 합성에서 용매로서 이용되었다. HCTU (1H-벤조트리아졸륨 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-5클로로-, 헥사플루오로인산염 (1-), 3-옥사이드)는 N-메틸모폴린의 존재하에서 활성화제 (Chempep, Wellington, FL)로서 이용되었다. 모든 아미노산은 수율 및 순도를 최대화하기 위해 이중 커플링되었다. 펩타이드는 트리플루오로아세트산 (TFA)/페놀/H₂O/트리이소프로필실란 (88/5/5/2)에서 절단/탈보호되었다. 펩타이드는 그 다음 확장된 유동 키트, Waters 2489 UV/가시광 검출기, 및 phenomenex Luna C18(2) AXIA 충전 칼럼 (100A, 250 x 21.2 mm, 5 마이크론)이 구비된 Waters 1525 2원 HPLC 펌프 상에서 역상 HPLC에 의해 추가로 정제되었다. A) 0.05% 포름산을 가진 HPLC 등급 물 및 B) HPLC 등급 아세트ونی트릴은 이동상으로서 사용되었고, 펩타이드

는 25 분 (16 mL/분)에 걸쳐 90% A 내지 90% B 구배를 이용하여 정제되었다. 아세토니트릴은 회전식 증발기로 정제된 분획으로부터 제거되었고, 정제된 분획은 그 다음 동결건조되었다. 펩타이드 순도는 Waters Synapt ESI-MS 상에서 전기분무 이온화 질량 분광분석법 (ESI-MS)을 통해 확인되었다.

[0452] 모노머 및 폴리머 합성

[0453] 모든 시약은 Sigma로부터 구매되었고 달리 언급되지 않는 한 분석적 등급이었다. 2-프로필아크릴산은 전구체로서 디에틸 프로필말로네이트 (Alfa Aesar)를 이용하여 Ferrito 등 (Macromolecular Syntheses 11,59-62 (1992))에 의해 개관된 절차에 따라 합성되었다. 4-시아노-4-(에틸설파닐티오카보닐) 설파닐브펜탄산 (ECT) 사슬 전달 제제 (CTA)는 Convertine 등 (J. Control Release 133,221-229 (2009))에 의해 기재된 바와 같이 합성되었다. 폴리(프로필아크릴산) (PPAA) 호모폴리머의 가역적 부가-단편화 사슬 전달 (RAFT) 중합은 자유 라디칼 개시제로서 2,2'-아조-비스-이소부티릴니트릴 (AIBN)을 이용하여 48 시간 동안 70°C에서 질소 분위기하에 벌크에서 수행되었다. 반응 혼합은 3 냉동-진공-해동 사이클을 통해 실시되었고 중합에 앞서 30 분 동안 질소로 퍼지되었다. 사슬 전달 제제 (CTA) 대 AIBN의 몰 비율은 1 대 1이었고, 모노머 대 CTA 비율은 190의 중합도 (DP)는 100% 전환율로 달성되도록 설정되었다. 중합 이후, 수득한 폴리머는 디메틸포름아미드 (DMF)에서 용해되었고 진공에서 밤새 건조 전에 에테르 속에 5회 침전되었다. 폴리(아크릴산) (PAA) 호모폴리머의 RAFT 중합은 자유 라디칼 개시제로서 AIBN을 이용하여 18 시간 동안 70°C에서 질소 분위기하에 증류된 디옥산에서 수행되었다. 반응 혼합은 중합에 앞서 30 분 동안 질소로 퍼지되었다. CTA 대 AIBN의 몰 비율은 5 대 1이었고 모노머 대 CTA 비율은 150의 중합도는 100% 전환율로 달성되도록 설정되었다. 중합 이후, 수득한 폴리머는 디옥산에서 용해되었고 진공에서 밤새 건조 전에 에테르 속에 5회 침전되었다. 겔 투과 크로마토그래피 (GPC, Agilent)는 이동상으로서 60°C에서 0.1% LiBr을 함유한 HPLC-등급 DMF를 이용하여 PPAA 및 PAA 호모폴리머의 분자량 및 다분산도 (M_w/M_n , PDI)를 측정하기 위해 사용되었다. 분자량 계산은 ASTRA V 소프트웨어 (Wyatt Technology)로 수행되었고 굴절률 검출기를 통해 폴리머의 오프라인 주입을 통해 결정된 실험적으로-결정된 dn/dc 값에 기반되었다 (계산된 PPAA dn/dc = 0.087 mL/g, DP = 193 (GPC), PDI = 1.47 (GPC); 계산된 PAA dn/dc = 0.09 mL/g, DP = 150 (GPC), PDI = 1.27 (GPC)). 폴리머 순도 및 분자량은 용매로서 D_6MSO 를 이용하는 NMR 분광법을 통해 확인되었다 (PPAA DP = 190 (H^1 NMR); PAA DP = 106 (H^1 NMR)).

[0454] MMI-0100 나노-폴리플렉스 (MK2i-NP) 및 포스포르-HSP20 나노-플렉스 (HSP20-NP) 합성 및 특성규명

[0455] PPAA는 1 M NaOH에서 용해되고 인산염 버퍼 (pH 8)로 희석되어 모액을 수득하였다. 정제된 MMI-0100 펩타이드는 인산염 버퍼 (pH 8)에서 용해되었다. MMI-0100 펩타이드 및 PPAA 폴리머는 $[NH_3^+]:[COO^-] = 10:1$ 내지 1:10의 전하비 (CRs)의 범위에서 혼합되어 MK2i-NPs를 형성하였다. 수득한 폴리플렉스는 0.45 μm 폴리테트라플루오로에틸렌 (PTFE) 필터를 통해 시린지 여과되었고, 유체역학적 직경 및 ζ -포텐셜은 재사용가능한 침지 세포 키트 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U.K.)가 있는 Malvern Zetasizer Nano-ZS 상에서 특성규명되었다.

[0456] 1:3의 CR은 그 다음 최적의 MK2i-NP 제형으로서 선택되었고, 반면에 3:1의 전하비는 선두 p-HSP20-NP 제형으로서 선택되었다. 이들 제형은 후속의 시험관내, 생체외, 및 생체내 연구에서 사용되었다. 비-엔도솜분해적 폴리머 PAA (즉, NE-MK2i-NPs)으로 동일한 CR에서 제형화된 나노-폴리플렉스는 동적 광 산란 (DLS)에 의해 분석되었고 모든 후속의 연구에서 비히클 대조군으로서 사용되었다. DLS 분석에 의해 나타낸 크기를 증명하기 위해, MK2i-NPs 및 HSP20-NPs는 투과 전자 현미경검사 (TEM) 화상형성을 통해 시각화되었다. TEM 샘플은 수성 폴리플렉스 현탁액 (1 mg/mL)의 20 μL 액적상에 탄소 필름-지원된 구리 그리드 (Ted Pella)를 전하시킴으로써 제조되었고 건성으로 블롯팅되었다. 모든 샘플은 그 다음 3% 우라닐 아세테이트의 20 μL 액적상에 전하되었고 2 분 동안 염색되었다. 샘플을 건성으로 블롯팅 이후, 샘플은 200 kV에서 작동하는 Philips CM20 시스템상에서 화상형성에 앞서 2 시간 동안 진공에서 건조되었다. 이미지는 AMT 이미지 캡처 엔진 소프트웨어 (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA)를 갖춘 전하-커플링된 디바이스 (CCD) 카메라를 이용하여 수집되었다. 1:3의 CR에서 폴리플렉스의 pH-의존형 크기 변화는 그 다음 PBS내 다양한 pH 값 +/- (즉 pH 7.4, 6.8, 6.2, 및 5.6)에서 DLS 분석에 의해 정량화되었다.

[0457] pH-의존형 막 파괴 용혈 검정

[0458] MK2i-NPs의 엔도솜 분열성 포텐셜을 평가하기 위해, 적혈구 용혈 검정은 지질 이중층의 MK2i-NP pH-의존형 파괴를 측정하기 위해 Henry 등 (Biomacromolecules 7,2407-2414 (2006))에 의해 이전에 기재된 바와 같이 이용되

었다. 전체의 인간 혈액은 익명의 공여체로부터 뽑아졌고, 혈청은 원심분리 및 염수 세정으로 제거되었다. 나머지 적혈구는 150 mM NaCl로 3회 세정되었고 생리적 (pH 7.4), 초기 엔도솜 (pH 6.8), 초기/후기 엔도솜 (pH 6.2), 및 후기 엔도솜/리소솜 (pH 5.8) 환경에 상응하는 인산염 버퍼에 재현탁되었다. MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 단독 (1-40 $\mu\text{g/mL}$), PBS (음성 대조군), 또는 1% 트리톤 X-100 (양성 대조군)은 적혈구 현탁액에 부가되었고 1 시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 인큐베이션되었다. 온전한 적혈구는 원심분리를 통해 펠렛화되었고, 상청액은 새로운 96-웰 플레이트에 이동되었다. 상청액 내의 헤모글로빈 함량은 그 다음 541 nm에서 흡광도를 통해 측정되었다. 퍼센트 용혈은 트리톤 X-100 및 PBS 대조군에 비하여 결정되었다.

[0459] 세포 배양

[0460] 원발성 인간 관상동맥 혈관 평활근 세포 (HCAVSMCs)는 Lonza로부터 획득되었다. HCAVSMCs는 완벽한 성장 배지 [5% FBS, 인간 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF, 5 ng/mL), 인간 인슐린 (5 $\mu\text{g/mL}$), 아스코르브산 (50 $\mu\text{g/mL}$), L-글루타민 (10 mM), 인간 상피 성장 인자 (EGF, 5 ng/mL), 및 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보강된 혈관 세포 기초 배지 (ATCC)]에서 배양되었다.

[0461] 모든 배양물은 이틀에 한번 공급된 세포 배양 배지로 37 $^{\circ}\text{C}$ 및 5% CO_2 환경에서 75 cm^2 폴리스티렌 조직 배양 플라스크에서 유지되었다. 세포는 수확 및 통과에 앞서 80-90% 합류까지 성장되었다. 모든 세포는, 각 특정 실험에 대하여 요구되는 바와 같이, 20,000-30,000 세포/ cm^2 의 밀도에서 씨딩되었다. 초기 통과로부터의 세포만이 (수 3-8) 실험에 사용되었다.

[0462] 염증성 사이토카인 분석

[0463] (10,000 세포/웰로) 200 μL 의 세포 현탁액은 96-웰 플레이트상에 씨딩되어 대략 70% 합류 / 웰을 획득하였다. 세포는 밤새 플레이트에 부착하게 되었다.

[0464] 종양 괴사 인자- α ELISA

[0465] HCAVSMCs는 4 시간 동안 10 μM ANG-II로 낮은 혈청 배지 (DMEM, 1% FBS, 및 1% P/S, 세포성 휴지기를 달성하기 위해)에서 처리되었고 그 다음 2 시간 동안 MK2i-NPs, MK2i, 또는 NE-MK2i-NPs로 처리되었다. 처리 이후, 각 웰은 신선한 배지로 흡인 및 보강되었다. 24 시간 이후, 사이토카인 분석이 수행된 때까지 100 μL 의 상청액은 수집 및 냉동되었다. 인간 TNF- α (cat#900-K25) ELISA 현상 키트 (Peprotech; Rocky Hill, NJ)는 제조자의 프로토콜에 따라 처리된 세포로부터 수집된 상청액에서 사이토카인 수준을 측정하기 위해 사용되었다. 간단히, 미세적정 플레이트 (Nunc MaxiSorp, cat. # 439454)는 인산염-완충된 염수 (PBS; Gibco BRL, cat. # 14200-075) (1X, pH 7.20)로 다클론성 포착 항체를 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석시킴 및 미세적정 플레이트의 각 웰에 100 μL 의 희석된 포착 항체 부가에 의해 제조되었다. 플레이트는 실온에서 밤새 밀봉 및 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 웰들은 흡인되었고 300 μL 의 세정 완충액 (PBS내 0.05% Tween-20 (Sigma, cat. # P7949)) / 웰로 4회 세정되었다. 다음으로, 300 μL 의 블로킹 완충액 (PBS내 1% 소 혈청 알부민 (BSA; Sigma, cat. # A-7030))은 각 웰에 부가되었고 미세적정 플레이트는 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 웰들은 흡인되었고 300 μL 의 세정 완충액 / 웰로 4회 세정되었다. 다음으로, TNF- α 표준은 희석제 (PBS내 0.05% Tween-20, 0.1% BSA)에서 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 부터 0 $\mu\text{g/mL}$ 까지 연속으로 희석되었다. 희석된 표준 및 샘플은 미세적정 플레이트에 삼중으로 (100 μL /웰) 부가되었고 플레이트는 실온에서 2 시간 인큐베이션되었다. 웰들은 흡인되었고 플레이트는 세정 완충액으로 4회 세정되었다. 세정 이후, 100 μL 의 바이오티닐화된 검출 항체 (0.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서; 희석제내 500 ng/mL)는 각 웰에 부가되었고 미세적정 플레이트는 실온에서 2 시간 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 웰들은 흡인되었고 세정 완충액으로 4회 세정되었다. 아비딘-HRP 칸주에이지 (conjugate) (Sigma, cat. # A-7419)는 희석제에서 1:2000 희석되었고 플레이트의 각 웰에 (100 μL /웰) 부가되었다. 플레이트는 실온에서 30 분 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 웰들은 흡인되었고 플레이트는 세정 완충액으로 4회 세정되었다. 다음으로, 100 μL 의 ABTS 액체 기질 용액 (Sigma, cat. # A3219)은 각 웰에 부가되었고 플레이트는 색상 현상을 위하여 실온에서 인큐베이션되었다. 플레이트는 405 nm (650 nm 파장 정정)에서 플레이트 리더 (Molecular Devices)로 판독되었다. 모든 데이터는 그 다음 제조자의 프로토콜에 따라 CytoTox-ONETM 균질 막 완전성 검정 (Promega)에 의해 결정된 세포 생존력으로 정규화되었다. 간단히, 200 μL 의 HCAVSMC 세포 현탁액은 96-웰 플레이트 상에 (10,000 세포/웰로) 씨딩되어 대략 70% 합류 / 웰을 획득하였다. 세포는 밤새 플레이트에 부착하게 되었다. 다음으로, 플레이트는 대략 30 분 동안 22 $^{\circ}\text{C}$ 로 평형화되었다. 평형 이후, 200 μL 의 YtoTox-ONETM 시약은 각 웰에 부가되었고, 플레이트는 30 초 동안 진탕되었고 그 다음 22 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 100 μL 의 중단 용액은 각 웰에 부가되었고, 플레이트는 10 초 동안 진탕되었

고 형광은 플레이트 리더 (Molecular Devices)를 이용하여 560 nm의 여기 파장 및 590 nm의 방출 파장에서 기록되었다.

[0466] 인터류킨-6 ELISA

[0467] HCAVSMCs는 4 시간 동안 20 ng/mL TNF- α 로 낮은 혈청 배지에서 처리되었고 그 다음 2 시간 동안 MK2i-NPs, MMI-0100 (MK2i), 또는 NE-MK2i-NPs로 처리되었다. 처리 이후, 각 웰은 신선한 배지로 흡인 및 보강되었다. 24 시간 이후, 사이토카인 분석이 수행될 수 있을 때까지 100 μ L의 상청액은 수집되었고 -80°C에서 냉동되었다. 인간 IL-6 (cat#900-K16) ELISA 현상 키트 (Peprotech; Rocky Hill, NJ)는 제조자의 프로토콜에 따라 처리된 세포로부터 수집된 상청액에서 사이토카인 수준을 측정하기 위해 사용되었다. 간단히, 미세적정 플레이트 (Nunc MaxiSorp, cat. # 439454)는 인산염-완충된 염수 (PBS; Gibco BRL, cat. # 14200-075) (1X, pH 7.20)로 다클론성 포착 항체를 1 μ g/mL의 농도로 희석 및 미세적정 플레이트의 각 웰에 100 μ L의 희석된 포착 항체 부가에 의해 제조되었다. 플레이트는 밀봉되었고 실온에서 밤새 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 웰들은 흡인되었고 300 μ L의 세정 완충액 (PBS내 0.05% Tween-20 (Sigma, cat. # P7949)) / 웰로 4회 세정되었다. 다음으로, 300 μ L의 블로킹 완충액 (PBS내 1% 소 혈청 알부민 (BSA; Sigma, cat. # A-7030))은 각 웰에 부가되었고 미세적정 플레이트는 실온에서 1 시간 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 웰들은 흡인되었고 300 μ L의 세정 완충액 / 웰로 4회 세정되었다. 다음으로, IL-6 표준은 희석제 (PBS내 0.05% Tween-20, 0.1% BSA)에서 0.01 μ g/mL부터 0 μ g/mL까지 연속으로 희석되었다. 희석된 표준 및 샘플은 미세적정 플레이트에 삼중으로 부가되었고 (100 μ L/웰) 플레이트는 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션되었다. 웰들은 흡인되었고 플레이트는 세정 완충액으로 4회 세정되었다. 세정 이후, 100 μ L의 바이오티닐화된 검출 항체 (0.5 μ g/mL의 농도에서; 희석제내 500 ng/mL)는 각 웰에 부가되었고 미세적정 플레이트는 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 웰들은 흡인되었고 세정 완충액으로 4회 세정되었다. 아비딘-HRP 캔주에이지 (Sigma, cat. # A-7419)는 희석제에서 1:2000 희석되었고 플레이트의 각 웰에 (100 μ L/웰) 부가되었다. 플레이트는 실온에서 30 분 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 웰들은 흡인되었고 플레이트는 세정 완충액으로 4회 세정되었다. 다음으로, 100 μ L의 ABTS 액체 기질 용액 (Sigma, cat. # A3219)은 각 웰에 부가되었고 플레이트는 색상 현상을 위하여 실온에서 인큐베이션되었다. 플레이트는 405 nm (650 nm 파장 정정)에서 플레이트 리더 (Molecular Devices)로 판독되었다. 모든 데이터는 그 다음 제조자의 프로토콜에 따라 CytoTox-ONE 균질 막 완전성 검정 (Promega)에 의해 결정된 세포 생존력으로 정규화되었다.

[0468] 단핵구 화학유인물질 단백질-1(MCP-1) ELISA

[0469] HCAVSMCs는 2 시간 동안 MK2i-NPs, MK2i, 또는 NE-MK2i-NPs로 낮은 혈청 배지에서 처리되었다. 처리 이후, 각 웰은 흡인되었고 신선한 배지로 보강되었다. 3 또는 5 일 이후, 세포는 24 시간 동안 TNF- α (20 ng/ml)로 자극되었다. 자극 이후, 100 μ L의 상청액은 수집되었고 사이토카인 분석이 수행될 수 있을 때까지 -80°C에서 냉동되었다. 인간 단핵구 화학유인물질 단백질-1 (cat#EH2MCP1) ELISA 현상 키트 (ThermoFisher Scientific/Pierce Biotechnology; Rockford, IL)는 제조자의 프로토콜에 따라 처리된 세포로부터 수집된 상청액에서 사이토카인 수준을 측정하기 위해 사용되었다. 간단히, 50 μ L의 표준 희석제는 항-인간 MCP-1 사전코팅된 96-웰 스트립 플레이트의 각 웰에 부가되었다. 다음으로, 50 μ L의 표준 또는 샘플은 스트립 플레이트에 반복하여 부가되었고, 스트립 플레이트는 접착제 플레이트 밀봉기로 피복되었고 1 시간 동안 실온에서 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 스트립 플레이트는 세정 완충액으로 3회 세정되었다. 세정 이후, 100 μ L의 바이오티닐화된 항체 시약은 스트립 플레이트의 각 웰에 부가되었고, 플레이트는 접착제 플레이트 밀봉기로 피복되었고 1 시간 동안 실온에서 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 스트립 플레이트는 세정 완충액으로 3회 세정되었다. 다음으로, 100 μ L의 스트렙타비딘-HRP 용액은 스트립 플레이트의 각 웰에 부가되었고, 스트립 플레이트는 접착제 플레이트 밀봉기로 피복되었고 30 분 동안 실온에서 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 스트립 플레이트는 세정 완충액으로 3회 세정되었다. 세정 이후, 100 μ L의 TMB 기질 용액은 스트립 플레이트의 각 웰에 부가되었고 스트립 플레이트는 20 분 동안 실온에서 현상되었다. 다음으로, 100 μ L의 중단 용액은 스트립 플레이트의 각 웰에 부가되었다. 흡광도는 450 nm (550 nm 파장 정정)에 플레이트 리더 (Molecular Devices)상에서 측정되었고 결과는 곡선-적합화 통계적인 소프트웨어를 이용하여 계산되었다.

[0470] 이동 검정

[0471] 스크래치 상처 화학운동성 검정

[0472] HCAVSMCs는 250 μ L 낮은 혈청 성장 배지에서 20,000 세포/웰의 밀도로 Lab-TEK II 8-웰 챔버화된 커버유리에서 씨딩되었고 거의 융합성 (90-95%) 단일층을 달성하기 위해 밤새 부착하게 되었다. 세포는 30 분 동안 MK2i-NPs,

NE-MK2i-NPs, MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 또는 PBS -/-으로 처리되었다. 처리 이후, 스크래치 상체는 각 세포 단일층의 중간을 통해 10 μ L 피펫 팁으로 만들어졌다. 배지는 그 다음 30 분 동안 제조자의 프로토콜에 따라 CellTracker™ Green BODIPY® 염료 (Invitrogen)를 함유한 낮은 혈청 성장 배지로 대체되어 이동 세포의 가시화를 가능하게 하였다. 염료로 처리 이후, 배지는 50 ng/ml 혈소판-유도된 성장 인자-BB (PDGF-BB)를 함유한 낮은 혈청 성장 배지로 (또는 음성 대조군에 대하여 PBS -/-로) 대체되었다. 스크래치 상처 영역은 그 다음 NIS Elements 화상형성 소프트웨어를 가진 Nikon Eclipse Ti 전화된 형광 현미경 (Nikon Instruments Inc, Melville, NY)을 이용하여 0,3,6,12, 및 24 시간에서 화상형성되었다. 상처 봉합은 최초 스크래치 상처 영역으로 정규화된 세포의 이동의 주변 근처에서 스크래치 상처 영역의 정량화에 의해 imageJ 소프트웨어로 계산되었다. 각 치료 그룹에 대한 스크래치 상처 검정은 3 독립적인 실험에서 수행되었다.

[0473]

Boyden 챔버 화학주성 검정

[0474]

HCAVSMCs는 낮은 혈청 배지 (DMEM, 1% FBS, 및 1% P/S)에서 30,000 세포/웰의 밀도로 24 웰 플레이트에서 씨딩되었고 밤새 부착하게 되었다. 세포는 MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, MMI-0100 (MK2i) 펩타이드, 또는 PBS로 30 분 동안 처리되었다. 처리 이후, 각 웰은 PBS -/-로 2x 세정되었고, 트립신화되었고, 100 μ L 낮은 혈청 성장 배지에서 재현탁되었고, 하부 챔버에서 50 ng/ml PDGF-BB (또는 음성 대조군에 대하여 PBS-/-)를 함유한 600 μ L 낮은 혈청 성장 배지로 24 웰 플레이트에서 6.5 mm, 8 μ m 기공 폴리카보네이트 삽입물 (Corning)상에 플레이팅되었다. 세포는 8 시간 동안 이동하게 되었고, 그 다음 각 삽입물의 상부측상에서 세포는 면 면봉으로 부드럽게 제거되었다. 각 삽입물의 하부측상에서 세포는 그 다음 고정되었고 Modified Giemsa Differential Quik Stain Kit (Polysciences)를 이용하여 염색되었다. 삽입물은 적어도 10 초 동안 용액 A에서 고정되었고, 용액 B에서 5회 침지되었고, 그 다음 용액 C에서 5회 침지되었다. 염색 이후, 4 이미지는 각 삽입물의 4개 사분면으로부터 취해졌고, 세포 / 고출력장의 수는 ImageJ에서 각 이미지의 역치화 및 세포의 수작업으로 계수에 의해 정량화되었다. 각 처리는 삼중으로 수행되었고, 평균 세포 # / 장은 계산되었다.

[0475]

세포 증식 검정

[0476]

HCAVSMCs는 낮은 혈청 배지 (DMEM, 1% FBS, 및 1% P/S)에서 10,000 세포/웰로 96 웰 플레이트에서 씨딩되었고 밤새 부착하게 되었다. 세포는 30 분 동안 MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 또는 PBS -/- (양성 및 음성 대조군에 대하여)으로 처리되었다. 각 처리는 그 다음 흡인되었고 100 μ L 낮은 혈청 성장 배지 \pm 50 ng/mL PDGF-BB로 대체되었다. 인큐베이션의 24 시간 이후, CellTiter 96® 수성 비-방사성 세포 증식 검정 (Promega)은 제조자의 프로토콜에 따라 수행되었다. 간단히, 100 μ L 펜아진 메토설페이트 (PMS) 용액은 2.0 ml MTS 용액에 부가되었고 혼합되었다. 20 μ L의 PMS/MTS 용액은 그 다음 100 μ L 배지를 함유한 96 웰 플레이트의 각 웰에 부가되었고, 플레이트는 가습된, 5% CO₂ 분위기에서 37°C에 4 시간 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 각 웰의 흡광도는 TECAN 무한 M1000 Pro 플레이트 리더로 490 nm에서 기록되어 모든 처리 그룹의 상대적 증식 속도를 결정하였다.

[0477]

세포성 흡수 및 세포내 이동조절의 미세 분석

[0478]

아민-반응성 Alexa-488 석신이미딜 에스테르는 DMSO에서 용해되었고 100 mM 중탄산나트륨 완충액 (pH = 8.3)에서 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드와 1 대 3 몰 비율로 혼합되었다. 미반응된 형광단 및 유기 용매는 PD-10 miditrap G-10 탈염 칼럼을 이용하여 제거되었고, 형광 표지된 펩타이드는 동결건조되었다. PPAA 및 PAA 폴리머는 [NH₃⁺]/[COO⁻] = 1:3의 CR로 형광 표지된 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드와 혼합되었고 0.45 μ m PTFE 필터를 통해 시린지 여과되어 형광 MK2i-NPs 및 대조군 NE-MK2i-NPs, 각각을 형성하였다. 형광 MK2i-NP 및 NE-MK2i-NP 유체역학적 직경 및 표면 전하는 DLS 및 제타 전위 분석, 각각에 의해 측정되었다. 형광 MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, 또는 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 단독은 1% FBS 및 1% P/S로 보충된 DMEM 배지에서 10 μ M MMI-0100 (MK2i) 펩타이드의 농도로 Lab-Tek II 8-웰 챔버화된 커버유리 (Thermo Scientific Nunc) 상에서 성장된 HCAVSMCs에 적용되었다. 세포는 2 시간 동안 처리되었고, PBS -/-로 2x 세정되었고, 배지는 대체되었다. 세포는 그 다음 새로운 배지에서 추가의 0, 2, 4, 10, 또는 22 시간 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션의 최종 2 시간 동안, 50 nM Lysotracker 적색 DND-99 (Invitrogen)는 세포 내에서 산성 엔도/리소좀 소포를 시각화하기 위해 각 웰에 부가되었다. 인큐베이션 이후, 세포는 1 분 동안 0.1% 트립판 블루로 세정되어 세포의 형광을 퀀칭하였고 그 다음 PBS -/-로 2 추가 세정하였다. 세포는 그 다음 ZEN 화상형성 소프트웨어 (Carl Zeiss Thornwood, NY)가 있는 LSM 710 META 형광 현미경을 이용하여 화상형성되었다. 이득 셋팅은 모든 획득된 이미지에 대하여 일정하게 유지되었다.

[0479] 모든 이미지는 ImageJ를 이용하여 가공되었고 공국재화는 Just Another Colocalization Plugin (JACoP)(62)를 이용하여 분석되었다. 맨더스 (Mander's) 중첩 계수 (양쪽 형광 채널에서 양성 픽셀 값을 가진 픽셀의 분획)는 그 다음 각 치료 그룹에 대하여 $n \geq 3$ 별도 이미지로 계산되어 공국재화를 정량화하였다. 펩타이드가 발견되는 구획의 크기에 관한 치료 효과를 달성하기 위해, ImageJ에서 자유 손 선택 도구가 사용되어 각 치료 그룹에 대하여 $n \geq 50$ 개별적인 세포내 구획을 요약하였고, 각각의 영역은 정량화 및 평균화되었다.

[0480] 세포내 흡수 및 체류의 유세포측정 정량화

[0481] HCAVSMCs는 80-90% 합류로 성장되었고, 수확되었고, 24 웰 플레이트에서 20,000 세포/웰로 씨딩되었고 낮은 혈청 배지 (DMEM, 1% FBS, 및 1% P/S)에서 밤새 부착하게 되었다. 형광 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드, MK2i-NPs, 및 NE-MK2i-NPs는 현미경검사 분석을 위하여 전술한 바와 같이 합성되었고, HCAVSMCs는 2 시간 동안 10 μ M MMI-0100 (MK2i)의 농도에서 처리되었다. 처리 이후, 세포는 PBS -/-로 세정되었고, 10분 동안 실온에서 CellScrub 완충액 (Genlantis)으로 세정되어 세포의 폴리플렉스 및/또는 펩타이드를 제거하였고, PBS -/-에서 2x 세정되었고, 새로운 완전 성장 배지가 주어졌다. 세포는 그 다음 추가의 0, 12, 24, 72, 또는 120 시간 동안 인큐베이션되었다. 세포는 그 다음 PBS -/-로 세정되었고, 트립신화되었고, BD CellQuest™ Pro 소프트웨어 (V 5.2)가 있는 FACSCalibur 유세포측정기 (Becton Dickinson)상에서 분석을 위하여 PBS (-/-)내 0.1% 트립판 블루에서 재현탁되었다. 데이터는 수출되었고 FlowJo 소프트웨어 (V 7.6.4)로 분석되었다. 모든 샘플은 삼중으로 운영되었다.

[0482] MK2i-NP 및 HSP20-NP 연구에 대하여, 아민-반응성 Alexa-488 석신이미딜 에스테르 (Life Technologies)는 DMSO에서 용해되었고 100 mM 중탄산나트륨 완충액 (pH = 8.3)에서 MK2i 또는 p-HSP20 펩타이드와 1 대 3 몰 비율로 혼합되었고 3 시간 동안 반응하게 되었다. 미반응된 형광단 및 유기 용매는 PD-10 miditrap G-10 탈염 칼럼을 이용하여 제거되었고, 형광 표지된 MK2i 및 p-HSP20 펩타이드는 동결건조되었다. PPAA 폴리머는 $[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-] = 1:3$ 의 CR로 형광 표지된 MK2i 펩타이드와 혼합되었고 0.45 μ m PTFE 필터를 통해 시린지 여과되어 형광 MK2i-NPs를 형성하였다. 유사하게, PPAA는 $[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-] = 1:3$ 의 CR로 형광 표지된 p-HSP20과 혼합되었고 0.45 μ m PTFE 필터를 통해 시린지 여과되어 형광 HSP20-NPs를 형성하였다. HCAVSMCs는 80-90% 합류로 성장되었고, 수확되었고, 24 웰 플레이트에서 20,000 세포/웰로 씨딩되었고 밤새 부착하게 되었다. HCAVSMCs는 30 분 동안 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 Opti-MEM 배지에서 10 μ M 펩타이드의 농도로 대조군으로서 형광 MK2i 펩타이드, MK2i-NPs, p-HSP20 펩타이드, p-HSP20-NPs, 또는 PBS로 처리되었다. 처리 이후, 세포는 PBS에서 2x 세정되었고, 추가의 72 시간 동안 완벽한 성장 배지에서 즉시 수확 또는 인큐베이션되었다. 세포는 0.05% 트립신-EDTA로 수확되었고, 원심분리되었고, BD CellQuest™ Pro 소프트웨어 (V 5.2)가 있는 FACSCalibur 유세포측정기 (Becton Dickinson)상에서 분석을 위하여 PBS (-/-)내 0.1% 트립판 블루에서 현탁되었다. 데이터는 수출되었고 FlowJo 소프트웨어 (V 7.6.4)로 분석되었다. 모든 샘플은 삼중으로 운영되었다.

[0483] 세포내 MK2i 반감기 ($t_{1/2}$)는 하기에 의해 계산되었다: 지수형 감쇠 기능을 이용하여 치료 제거 이후 0 및 5 일에서 세포내 펩타이드 형광의 지수형 감쇠 비선형 회귀 분석 [여기에서 N = 세포내 형광 및 λ = 감퇴율]:

[0484]
$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t} \quad (eq.S1)$$

[0485] 및 아래와 같이 각 지수형 감쇠 기능의 지연 상수로부터 $t_{1/2}$ 계산:

$$t_{1/2} = \ln(2)/\lambda \quad (eq.S2)$$

[0486]

[0487] 인간 복제 정맥 (HSV)

[0488] HSV의 검증되지 않은, 버려진 세그먼트는 관상동맥 또는 말초혈관 바이패스 수술을 경험하는 승낙한 환자로부터 수집되었다. 외과용 절제 이후, HSV 세그먼트는 수술 과정의 마지막까지 염수 용액에서 보관되었고, 그 시간에 이들은 차가운 이식 수확 완충액 (100 mM 칼륨 락토바이오네이트, 25 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgSO_4 , 30 mM 라피노오스, 5 mM 아데노신, 3 mM 글루타티온, 1 mM 알로푸리놀, 50 g/L 하이드록시에틸 전분, pH 7.4)에 배치되었다. 모든 HSV 세그먼트는 수확 24 시간 이내에 사용되었다. 멸균된 배양 후드에서 멸균된 기술을 이용하여, HSV 세그먼트는 60 mm 펠트리 접시에 이동되었다. 각 세그먼트 (0.5 mm)의 말단은 칼날로 제거되었고, 과잉의 외막 및 지방

질 조직은 최소 조작으로 제거되었다. HSV 세그먼트는 대략 1.0 mm의 폭으로 연속적인 고리 속에 절단되어 장기 배양 실험에서 이용되게 하였다. 각 세그먼트로부터 2개 고리는 30분 동안 37℃에서 10% 포르말린에 즉시 고정되어 사전-배양 내막 두께 측정을 수득하였다.

[0489] 실험에 앞서, HSV 생존력은 확인되었다. HSV 고리는 계량되었고 그의 길이는 기록되었다. HSV 고리는 그 다음 37℃에서 95% O₂ 및 5% CO₂로 평형화된 바이카보네이트 완충액 (120mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.0 mM MgSO₄, 1.0 mM NaH₂PO₄, 10 mM 글루코오스, 1.5 mM CaCl₂, 및 25 mM Na₂HCO₃, pH 7.4)를 함유한 근육 배스에서 현탁되었다. 고리는 신장되었고 최대 긴장이 수득된 49 때까지 길이는 점진적으로 조정되었다. 정규화된 반응성은 각 혈관 세그먼트에 대하여 수동적인 길이-긴장 관계의 측정으로 수득되었다. 고리는 1 g의 안정된 긴장에서 유지되었고, 이는 이전에 결정된 바와 같이 수축성 효능제에 최대 반응을 생산하고, 완충액에서 2시간 동안 평형화되었다. 힘 측정은 파워랩(Powerlab) 데이터 수집 시스템 및 랩차트(LabChart) 소프트웨어 (AD Instruments, Colorado Springs, CO)로 접속된 라드노티 유리 기술 (Radnoti Glass Technology) (Monrovia, CA) 힘 변환기 (159901A)를 이용하여 수득되었다.

[0490] HSV 고리는 110 mM KCl로 (바이카보네이트 완충액에서 NaCl의 등물 대체로) 초기에 같은크기로 수축되었고, 생성된 힘은 측정되었다. 110 mM KCl은 막 탈분극을 유발시켜, 기능성으로 실행가능한 평활근을 함유한 혈관의 수축을 초래한다. 혈관 생존력이 다중 KCl 도전으로 확인된 이후, 추가의 고리는 절단되어 평활근 생리학 실험에서 및 F-액틴 염색을 위하여 이용되었다.

[0491] HSV 평활근 생리학 연구

[0492] HSV 수축의 저해

[0493] 실행가능한 HSV 고리는 세정되었고, 30 분 동안 바이카보네이트 용액에서 평형화하게 되었고, 그 다음 페닐에프린 (PE, 1 μM)으로 수축되었다. 모든 고리는 세정되었고 신선한 완충액에서 평형화되었고 기준선 수축이 달성된 때까지 이완하게 되었다. 고리는 그 다음 2 시간 동안 MK2i 펩타이드, MK2i-NPs, p-HSP20 펩타이드, p-HSP20-NPs, 또는 완충액 단독으로 인큐베이션되었다. 처리된 HSV 고리는 그 다음 동일한 용량의 PE로 수축되었고, 생성된 힘은 재차 기록되었다. 측정된 힘은 고리 중량 및 길이에 대하여 정규화되었고 수축의 퍼센트 저해는 전처리 수축성 힘으로 후처리 수축성 힘을 분할함으로써 계산되었고; 1 μM PE으로 생성된 전처리 힘은 100% 수축으로서 설정되었다. 데이터는 n ≥ 3 별도 환자로부터 HSV에서 수득되었다.

[0494] 향상된 HSV 혈관이완

[0495] 실행가능한 HSV 고리는 세정되었고 30 분 동안 바이카보네이트 용액에서 평형화하게 되었고, 그 다음 페닐에프린 (PE, 1 μM)으로 수축되었다. 고리는 누적 로그 용량의 나트륨 니트로프루시드 (SNP, 0.1-10 μM), 산화질소 공여체로 이완되었고, 수축성 힘에서 수득한 감소는 경시적으로 기록되었다. 모든 고리는 재차 세정되었고 15 분 동안 완충액에서 평형화되었다. 고리는 그 다음 2 시간 동안 MK2i 펩타이드, MK2i-NPs, p-HSP20, p-HSP20-NPs, 또는 완충액 단독으로 인큐베이션되었고, 그 다음 동일한 용량의 PE 및 SNP로 처리되었다. 생성된 힘은 재차 기록되었고, 측정된 힘은 고리 중량 및 길이를 위하여 정규화되었고 퍼센트 이완은 계산되었고; 100 μM PE로 생성된 힘은 0% 이완으로서 설정되었다. 데이터는 n ≥ 3 별도 환자로부터 HSV에서 수득되었다.

[0496] 안지오텐신 II 자극된 HSV의 액틴 염색

[0497] 실행가능한 HSV 고리는 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 배지의 24 웰 플레이트에서 배치되었고 몇 시간 동안 37℃ 및 5% CO₂에 인큐베이터에서 평형화하게 되었다. HSV 고리는 그 다음 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 Opti-MEM 배지에서 30 분 동안 음성 대조군으로서 100 μM MK2i 펩타이드, 100 μM MK2i-NPs, 500 μM p-HSP20, 또는 500 μM p-HSP20-NPs 또는 PBS -/-으로 처리되었고 그 다음 PBS -/-에서 2x 세정되었다. 그 뒤에, 처리된 HSV 고리는 2 시간 동안 10 μM 안지오텐신 II로 자극되었고 그 다음 PBS -/-에서 2x 세정되었다. HSV 고리는 그 다음 37℃에서 4 시간 동안 4% 파라포름알데하이드에서 즉시 고정되었다. HSV 고리는 그 다음 1x PBS -/-내 30% 수크로오스에서 밤새 인큐베이션되었다. HSV 고리는 PBS -/-에서 2x 세정되었고, OCT에서 포매되었고 냉동되었다. 10 마이크론 동결절편은 각 HSV 고리의 중간부분으로부터 제거되었고 SuperFrost 플러스 현미경 슬라이드 (Fisher Scientific)상에 배치되었다. 슬라이드는 그 다음 상기 F-액틴 스트레스 섬유 검정 부문에서 언급된 절차에 따라 염색 및 화상형성되었다. 전체 HSV 부문은 NIS Elements 소프트웨어에서 이미지 스티칭 능력을 통해 컴파일링되었다.

[0498] 생체의 내막 과형성 (IH)을 위한 HSV 장기 배양 및 검정

- [0499] 장기 배양 실험에 앞서, HSV 생존력은 확인되었다. HSV 고리는 계량되었고 그의 길이는 기록되었다. HSV 고리는 그 다음 37 °C에서 95% O₂ 및 5% CO₂로 평형화된 바이카보네이트 완충액 (120mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.0 mM MgSO₄, 1.0 mM NaH₂PO₄, 10 mM 글루코오스, 1.5 mM CaCl₂, 및 25 mM Na₂HCO₃, pH 7.4)를 함유한 근육 배스에서 현탁되었다. 고리는 신장되었고 최대 긴장이 수득된 때까지 길이는 점진적으로 조정되었다. 정규화된 반응성은 각 혈관 세그먼트에 대하여 수동적인 길이-긴장 관계의 결정으로 수득되었다. 고리는 1 g의 안정시의 긴장에서 유지되었고, 이는 이전에 결정된 바와 같이 수축성 효능제에 최대 반응을 생산하고, 완충액에서 2 시간 동안 평형화하였다. 힘 측정은 파워랩 데이터 수집 시스템 및 랩차트 소프트웨어 (AD Instruments, Colorado Springs, CO)로 접속된 라드노티 유리 기술 (Monrovia, CA) 힘 변환기 (159901A)를 이용하여 수득되었다.
- [0500] HSV 고리는 110 mM KCl로 (바이카보네이트 완충액에서 NaCl의 등물 대체로) 초기에 수축되었고, 생성된 힘은 측정되었다. 110 mM KCl은 막 탈분극을 유발시켜, 기능성으로 실행가능한 평활근을 함유한 혈관의 수축을 초래한다. 혈관 생존력이 다중 KCl 도전으로 확인된 이후, 추가의 고리는 절단되었고 24 웰 플레이트에 배치되었고 공기 중 5% CO₂의 분위기에서 37 °C에 14 일 동안 30% FBS, 1% L-글루타민 및 1% 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640 배지에서 유지되었다. 고리는 미처리되었고, 2 시간 동안 MK2i-NPs, NE-MK2i-NPs, MMI-0100 (MK2i) 펩타이드, 또는 완충액 단독으로 처리되었고, 세정되었고, 새로운 배지가 주어졌다. 처리 없이 배양 배지는 14 일 동안 매 2일마다 대체되었다.
- [0501] HSV 생존력
- [0502] 치료가 조직 생존력에 영향을 주지 않았다는 것을 확인하기 위해, 세포 생존력 평가용 MTT 검정 (Life Technologies)은 치료 이후 1 및 14 일에 HSV 고리 상에서 수행되었다. HSV 고리는 제조되었고 전술한 바와 같이 처리되었고, 그리고 장기 배양의 1 또는 14 일 이후, HSV 고리는 계량되었고 그 다음 DPBS에서 용해된 250 µL의 0.01% 메틸 테트라졸륨에 배치되었다. 고리는 1 시간 동안 37°C 인큐베이터에 배치되었다. 반응은 증류수에 고리 배치에 의해 중단되었다. 고리는 그 다음 1 mL의 셀로솔브에 배치되었고 밤새 37°C에 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 고리는 용액에서 혼합되었고, 셀로솔브는 추출되었고 570 nm에서 광학 밀도가 결정된 큐벳에 배치되었다. 상대 생존력 계산은 고리의 습윤 중량으로 정규화된 광학 밀도에 기반되었다.
- [0503] 혈관 형태계측
- [0504] 장기 배양의 14 일후, 정맥 세그먼트는 30분 동안 37°C에 0.5 mL의 10% 포르말린에서 고정되었고 부문을화하여 파라핀에서 포매되었다. 각 고리의 중간부분에서 시작하여, 5 µm 떨어져 이격된, 5 횡행 부분은 각 시료로부터 절단되었다. 부분은 그 다음 Verhoeff-van Gieson 염색으로 염색되었다. 조직학 부분은 Nikon Eclipse Ti 역전된 형광 현미경 (Nikon Instruments Inc, Melville, NY)을 이용하여 화상형성되었고, 내막 및 내측 두께의 6 방사상 평행한 측정은 NIS Elements 화상형성 소프트웨어를 이용하여 각 부분으로부터 무작위로 취해졌다 (고리 당 6-12 측정의 합계, 별도 공여체로부터 n≥3 고리 / 치료 그룹). 내막은 내부 탄성 판의 내강 측상의 조직 또는 그안에 함유된 세포의 혼돈 조직으로서 정의되었고, 반면에 내측 층은 내막 층과 외부 탄성 판 사이에 함유되었다. 내막 및 내측 증점은 현미경 컴퓨터화된 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 10x 배율로 각 부분에 대하여 측정되었다.
- [0505] HSV에 MK2i 전달의 미세 분석
- [0506] 생존력 증명 이후, HSV 고리는 30 분 동안 Alexa-568 표지된 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드, MK2i-NPs, 또는 NE-MK2i-NPs로 처리되었고, PBS +/-에서 2x 세정되었고, 최적의 절단 온도 (OCT) 화합물 (Fisher Scientific)에서 즉시 포매되었고 드라이아이스로 냉동되었다. 5 µm 동결절편은 각 치료된 혈관의 중간에서 절단되었고 혈관 벽 속에 펩타이드 전달의 분석을 위하여 현미경 슬라이드상에 실장되었다. 면역형광 염색은 그 다음 CD31 및 α-SMA 1차 항체 및 FAM 표지된 2차 항체로 수행되었다. 현미경검사 이미지는 ZEN 화상형성 소프트웨어 (Carl Zeiss Thornwood, NY)를 가진 Nikon Eclipse Ti 역전된 형광 현미경 또는 LSM 710 META 형광 현미경을 이용하여 수득되었다. 이득 셋팅은 모든 치료 그룹에 대하여 획득된 모든 이미지에 대하여 일정하게 유지되었고, 이미지는 Adobe Photoshop에서 함께 합쳐져서 HSV 고리의 전체 부문의 거시적 이미지를 제공하였다.
- [0507] 웨스턴 블랏 분석
- [0508] MMI-0100 (MK2i) 펩타이드로 치료의 2 시간 이후, 처리된 HSV 고리의 부분은 액체 질소로 스냅-냉동되었고, 분쇄되었고, 우레아-DTT-CHAPS 완충액을 이용하여 균질화되었다. 이중 핵 리보핵단백질 A0 (hnRNP A0) 인산화의 분석을 위하여, 처리된 HSV 고리는 균질화에 앞서 24 시간 동안 새로운 배지내 장기 배양액에서 유지되었다.

CREB 및 HSP27 인산화의 분석을 위하여, HSV 고리는 2 시간 처리 이후 냉동되었다. 용해물은 원심분리되었고 (6000 g, 20 분), 상청액은 hnRNP A0, cAMP 반응 인자-결합 (CREB) 단백질, 및 열충격 단백질 27 (HSP27) 인산화의 평가를 위하여 수집되었다. 동등량의 단백질 (20 µg / 레인)은 15, 10, 또는 4-20% SDS-PAGE 겔상에 장입되었고; 단백질은 전기영동으로 분리되었고, 그 다음 Immobilon 막 (Millipore, Billerica, MA)에 이동되었다. hnRNP A0 인산화에 대하여, 막은 포스포-hnRNP A0 (Millipore) 및 미인산화된 hnRNP A0 (Santa Cruz)에 대하여 1차 항체로 4°C에서 밤새 탐색되었다. CREB 인산화를 위하여, 막은 포스포-CREB (abcam) 및 미인산화된 CREB (abcam)에 대하여 1차 항체로 4°C에서 밤새 탐색되었다. HSP27 인산화를 위하여 막은 포스포-HSP27 (Epitomics) 및 미인산화된 HSP27 (Santa Cruz)에 대하여 1차 항체로 4°C에서 밤새 탐색되었다. 세정 이후, 막은 실온에서 1 시간 적절한 2차 항체 (Li-Cor)로 인큐베이션되었다. 2차 항체는 오딧세이 직접 적외선 형광 화상형성 시스템 (Li-Cor)을 이용하여 화상형성되었고 800 및 680 nm 파장에서 LiCor 오딧세이 소프트웨어 v2.1로 농도계로 정량화되었다. 각 생물학적 복제에 대하여, 모든 처리된 샘플은 미처리된 대조군 조직으로 정규화되었다.

[0509] MK2i-NP 및 HSP20-NP 연구에 대하여, 디기토닌 세미-투과화 절차로부터 세포질 및 세포소기관 분획의 웨스턴 블랏 분석은 수행되었다. 간단히, 세포질 및 세포소기관 분획은 Vivacon 500 DNA 농축기 (2000 MWCO)를 이용하여 원심분리기 상에서 농축되었다. 동등량의 단백질 (20 µg / 레인)은 4-20% SDS-PAGE 겔상에 장입되었고; 단백질은 전기영동으로 분리되었고 그 다음 Immobilon 막에 이동되었다. 막은 그 다음 세포질 단백질 미토겐-활성화된 단백질 키나제 키나제 1/2 (MEK1/2) 및 글리세르알데하이드 3-인산염 탈수소효소 (GAPDH) 및 the 엔도-리소좀 마커 초기 엔도솜 항원 1 (EEA1) 및 리소솜-관련 단백질 1 (LAMP1)에 대하여 1차 항체로 4°C에서 밤새 탐색되었다. 모든 항체는 세포 신호전달 기술로부터 취득되었다. 세정 이후, 막은 실온에서 1 시간 적절한 2차 항체 (Li-Cor)로 인큐베이션되었다. 2차 항체는 오딧세이 직접 적외선 형광 화상형성 시스템을 이용하여 화상형성되었고 800 및 680 nm 파장에서 LiCor 오딧세이 소프트웨어 v2.1로 농도계로 정량화되었다.

[0510] 토끼 양측성 경정맥 이식편 삽입 모델

[0511] 숫컷 뉴질랜드 백색 토끼 (3.0-3.5 kg; $n = 24$)는 케타민 하이드로클로라이드 (1.4 mg/kg) 및 크실라진 (0.2 mg/kg)을 이용한 근육내 주입으로 마취되었다. 마취는 기관내삽관으로 유지되었고 이소플루란 (2.0-5.0%)이 흡입되었다. 고-용량 IV 헤파린 볼러스 (250 U/kg)는 경동맥 크로스 클램프 직전에 투여되었다. 작동 절차는 광학 적 배율 (배율 x2.5)하에 무균성 기술로 수행되었다.

[0512] 정맥 바이패스 이식술은 Jiang 등 (Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 286,H240-245 (21004)에 의해 기재된 바와 같이 문합 커프 기술로 작제되었다. 간단히, 2.0-mm 바디 루프로 이루어진 폴리머 커프는 4-Fr 삽입기 덮개 (Terumo Medical, Elkton, MD)로부터 만들어졌다. 더 작은 지류 혈관의 결찰 이후, 외부 경정맥은 총경동맥에 삽입 이식편의 창출을 위하여 수확되었다 (3.0-4.0 cm 길이). 경정맥 말단은 커프를 통해 통과되었고, 외번되었고, 6-0 실크로 고정되었다. 정맥 이식편은 그 뒤에 30 µM MK2i-NP, 30 µM MMI-0100 (MK2i) 펩타이드, 또는 PBS (무 처리)를 함유한 2 mL의 헤파린 Plasma-Lyte 용액에서 30 분 동안 처리되었다. 처리 이후, 목동맥 내강은 2.0-cm 동맥절개술로 노출되었고, 커프된, 역전된 정맥 말단은 삽입되었다. 3-0 실크는 커프 주변의 동맥을 지키기 위해 사용되었다. 마지막으로, 목동맥 뒷벽의 1.0 cm는 커프 사이에서 절단제거되어 정맥 이식편 확대를 허용하였다.

[0513] 토끼는 후-작동가능하게 28 일에서 안락사되었고, 정맥 이식편은 롤러 펌프를 이용하여 ~50 mm Hg 압력하에 10% 중성 완충된 포르말린으로 제자리 고정된 관류이었다. 정맥 이식편은 그 뒤에 절개되었고 이식편의 길이를 따라 형태적 변동의 평가를 허용하기 위해 커프위에 가로놓인 조직을 피하는 4 세그먼트로 절단되었다. 조직학적 부분은 제조되었고, 내막 및 내측 두께는 각 혈관 부분의 각 사분면 (12 측정/세그먼트 = 48 측정/이식편)으로부터 3 측정을 택함으로써 정량화되었다. 분리된 부분은 토끼 대식세포 항체 RAM-11 (Dako)로 염색되어 각 이식편의 내막 속에 면역 세포의 침윤에 관한 치료 효과를 평가하였다. 내막에서 대식세포 양성 염색은 염색된 이식편 부분의 내막에서 양성으로 염색된 세포의 수를 수작업으로 계수함으로써 정량화되었다. 4 상이한 이식편 부분으로부터 16 조직학적 이미지는 각 치료 그룹을 위하여 분석되었다.

[0514] 세포독성 검증

[0515] 200 µL의 세포 현탁액 (10,000 세포/웰)은 96-웰 플레이트에 씨딩되어 대략 70% 합류 / 웰을 획득하였다. 세포는 밤새 플레이트에 부착하게 되었다. 세포는 그 다음 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 Opti-MEM 배지에서 2 시간 동안 대조군 치료로서 MK2i-NPs, p-HSP20-NPs, MK2i 펩타이드, p-HSP20 펩타이드, 또는 PBS의 10, 50, 100, 및 500 µM 용량으로 처리되었다. 처리는 그 뒤에 제거되었고 세포는 24 시간 동안 새로운 완전 성장 배지에서 배양되었다. 세포는 그 다음 PBS +/-로 2x 세정되었고 세포 생존력은 그 다음 제조자의 프로토콜에 따

라 CytoTox-ONE 균질 막 완전성 검정 (Promega)에 의해 결정되었다. 간단히, 100 μ l의 Ambion KDAlert 세포용 해 버퍼는 각 웰에 추가되었고, 그 다음 100 μ l의 새롭게 제조된 CytoTox-ONE 시약은 각 웰에 추가되었다. 인큐베이션의 10 분후, 50 μ l의 중단 용액은 추가되었고, 각 웰의 형광 (λ_{ex} = 560 nm, λ_{em} = 590 nm)은 TECAN 무한 M1000 Pro 플레이트 리더로 결정되었다.

[0516] F-액틴 스트레스 섬유 검정

[0517] HCAVSMCs는 15,000 세포/웰로 Lab-Tek II 8-웰 챔버화된 커버유리 (Thermo Scientific Nunc)에서 씨딩되었고 밤새 부착하게 되었다. 세포는 그 다음 1 시간 동안 MK2i-NPs, p-HSP20-NPs, MK2i 펩타이드, p-HSP20 펩타이드로, 또는 10, 25, 및 50 μ M의 농도 (대조군으로서 PBS -/-)로 낮은 혈청 배지 (Optimem, 1% FBS, 및 1% P/S)에서 처리되었다. 처리 이후, 세포는 PBS -/-로 2x 세정되었고 그 뒤에 2 시간 동안 1 μ M 안지오텐신 II (Sigma Aldrich) 또는 PBS -/- (음성 대조군)으로 처리되었다. ANG-II 자극 이후 세포는 PBS로 2x 세정되었고, 5 분 동안 4% 파라포름알데하이드에서 고정되었고, 10분 동안 0.4% 트리톤-X 100으로 투과되었고, 그리고 15 분 동안 PBS -/-에서 1% BSA로 블로킹되었다. 세포는 그 다음 10분 동안 Hoechst 용액으로 염색되었고 (PBS -/-에서 1/5000 희석) 그 다음 제조자의 지침에 따라 30 분 동안 Alexa-488-Phalloidin (Life Technologies)으로 염색되었다. 염색된 커버슬립은 그 다음 ProLong Gold Antifade 중첩 배지 (Invitrogen)로 유리 커버 슬라이드 상에서 역전되었다. 슬라이드는 밀봉 및 화상형성에 앞서 24 시간 동안 건성으로 되었다. 처리된 세포는 NIS Elements 화상형성 소프트웨어가 있는 Nikon Eclipse Ti 역전된 형광 현미경 (Nikon Instruments Inc, Melville, NY)을 이용하여 화상형성되었다. 이득 셋팅 및 노출 시간은 택한 모든 이미지에 대하여 일정하게 유지되었다. 세포 당 스트레스 섬유의 수는 이전에 기재된 바와 같이⁴⁸ 정량화되었다. 간단히, NIS elements 소프트웨어에서, 3 분리된 강도 프로파일은 세포의 극성에 수직인 염색된 세포의 축을 거쳐 생성되었다. 이미지 분석에 앞서, 각 이미지로부터 백그라운드 노이즈는 70 픽셀의 반경을 가진 롤링 볼 배경 차분화 필터를 이용하여 제거되었다. 염색된 세포 외부의 배경 형광이 결코 상기 값보다 더 크지 않았음에 따라 2000 RFU의 형광 수준은 양성 F-액틴 섬유 염색에 대하여 역치로서 설정되었다. 세포 당 스트레스 섬유는 그 다음 각 치료 그룹에 대하여 2 별도 실험으로부터 $n \geq 6$ 세포에서 3 강도 프로파일의 평균 (각 치료 그룹에 대하여 총 $n \geq 36$ ROIs)으로부터 정량화되었다. 세포성 F-액틴 함량의 상대 정량화는 개별 세포를 자유 손 선택하기 위해 및 각 치료 그룹에 대하여 2 별도 실험으로부터 $n \geq 12$ 세포의 상대 형광 강도를 계산하기 위해 imageJ 소프트웨어를 이용하여 추가로 정량화되었다.

[0518] 세미-투과화를 통한 세포질 대 세포소기관 결합된 펩타이드의 정량화

[0519] MK2i 및 HSP20 펩타이드의 세포질 생체이용률을 정량화하기 위해 세포질 및 세포소기관 결합된 (즉 엔도솜, 리소솜, 골지, 등) 펩타이드의 분리 방법은 Liu 등⁴⁰에 의해 개발된 방법으로부터 적용되었다. 절차는 100 RPM에서 작동하는 회전식 진탕기에서 10분 동안 얼음상의 완충액 (150 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 2 mM DTT 및 2 mM MgCL₂)에서 다양한 농도의 디기토닌 (Calbiochem)으로 처리된 HCAVSMCs로부터 LDH 방출시에 기반된 본 실험에 대하여 최적화되었다 (보충 도 3). 25 μ g/mL의 농도는 그 다음 HCAVSMC 막의 선택적 세미-투과화를 위하여 최적의 디기토닌 농도로서 선택되었고 그 뒤에 세포내 펩타이드 분포의 분석에 사용되었다.

[0520] MK2i 및 p-HSP20 펩타이드의 세포내 분포를 정량화하기 위해, HCAVSMCs는 20,000 세포/cm²의 밀도로 96 웰 플레이트에 씨딩되었고 완벽한 성장 배지에서 밤새 부착하게 되었다. 세포의 부분은 30 분 동안 500 nM 바필로마이신 A1 (Sigma)으로 전처리되었고, 바필로마이신은 후속의 펩타이드/NP 치료에서 그리고 후처리 인큐베이션 시기에서 포함되어 엔도솜 산성화를 억제시켰다. 세포는 그 다음 30 분 동안 500 nM 바필로마이신 A1 있거나 없이 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 Opti-MEM 배지에서 10 μ M 펩타이드 (또는 대조군으로서 PBS -/-)의 농도에 Alexa-488 표지된 MK2i 펩타이드, MK2i-NPs, p-HSP20 펩타이드, p-HSP20-NPs로 처리되었다. 처리는 제거되었고 세포는 6 시간 동안 500 nM 바필로마이신 A1 있거나 없이 신선한 배지에서 인큐베이션되었다. 각 웰은 그 다음 병행된 PBS +/-로 1x 세정되었고 그 다음 그 뒤에 10분 동안 100 RPM에서 작동하는 회전식 진탕기에서 (빙상에서) 0°C에 20 μ L의 25 μ g/mL 디기토닌 용액으로 인큐베이션되었다. 각 웰로부터 상층액은 그 다음 새로운 96 웰 플레이트에 이동되었고, 각 웰은 디기토닌 (세포질) 분획을 함유한 96 웰 플레이트에 그 다음 이동되는 80 μ L 병행된 PBS +/-로 세정되었다. PBS -/-내 100 μ L의 1% 트리톤 X-100은 그 다음 각 웰에 추가되어 모든 비-세포질 (즉 세포소기관 결합된) 세포성 성분을 함유한 96 웰 플레이트를 수득하였고, 각 웰의 형광 (λ_{ex} = 495 nm, λ_{em} = 519 nm)은 TECAN 무한 M1000 Pro 플레이트 리더로 결정되었다. 관독은 제조자의 프로토콜에 따라 CytoTox-ONE 균질 막 완전성 검정 (Promega)에 의해 결정된 바와 같이 세포 수 및 세포질 함량으로 정규화

되었다 (부문 4.5).

[0521] 통계

[0522] 통계적인 분석은 실험적 그룹을 비교하기 위해 일방식 ANOVA 그 다음 터키식 사후 검정으로 수행되었다. 분석은 OriginPro 8 소프트웨어 (Originlab, Northampton, MA) 또는 Minitab 16 소프트웨어 (State College, PA)로 실시되었다. 통계적 유의도는 95% 신뢰 한계 내에서 허용되었다. 결과는 산술 평균 \pm SEM으로서 그래프로 나타내었고 p-값은 도 내에서 또는 도 범례에서 포함된다.

[0523] 실시예 1. MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1)의 건조 분말 제형

[0524] 1 및 2 mg의 순량 분무 건조된 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 5% 고형물 제형으로 충전된 수포의 중량측정 청소능 시험은 에어로졸 성능을 최적화 및 결정하기 위해 사용되었다. 수포는 4-5% 상대 습도로 글러브 박스 내부에서 충전되었다. 수포의 밀봉은 벤치톱 열 밀봉기를 이용하여 글러브 박스 내부에서 발생하였다. EPIC 스타일 흡입기는 기능 발생제와 커플링되어 모든 에어로졸 시험을 수행하였다. 표 3은 최종 (최적의) 수포, 디바이스 및 시험 조건에 관한 정보를 함유한다.

[0525] 분무 건조된 제형에 의한 물의 흡수는 조사되었다. 동적 증기 수착 (DVS) 등온은 % 상대 습도 (RH)로서 분무 건조된 제형에서 물의 급속 흡수가 경시적으로 증가되었음을 확인하였다 (도 3). 제형에서 3% 미만 물을 유지하기 위해, DVS는 물질이 20% RH 미만에서 조작되어야 함을 나타내었다 (도 3). 게다가, 제어된 전하 소멸 유닛은 글러브 박스 내부에서 설치되어 양으로 하전된 충전소를 중화시켰다 (즉, 글러브 박스의 폴리카보네이트 작제 때문에). 음이온은 양전하를 중화시키기 위해 충전의 부근 주위에서 펄스화된 DC 컨트롤러로 방출되었다.

[0526] 급속 HPLC 방법은, 예를 들어, 제형에서 함유된 MMI-0100의 제형 불순물 및 농도를 결정하기 위해 개발되었다. 간단히, Supelco Ascentis Express® Peptide ES-C18 칼럼이 사용되었다. 유량, 칼럼 온도, 및 이동상은 3 분의 실시 시간을 제공하기 위해 조정되었다. 급속 HPLC 방법의 선형성의 평가는 10.8 μ g/mL 작업 표준에 대하여 평균 반응 지수의 % 반응 지수 (평균 반응 지수의 97.0 내지 101.4%)에 기반된 6.5 내지 32 mg/mL에서 허용가능한 선형성을 나타내었다. 선형성의 감소는 2.2 μ g/mL에서 관측되었지만, 그러나, 상기 감소는 낮은 침착 차세대 충격기 (NGI) 단계 (예컨대 마이크로오리피스 콜렉터 (MOC))를 정량화하기 위해 정량화 (LOQ)의 한계에 대하여 허용가능한 수준이었다. 작업 표준의 예 크로마토그램은 도 4에서 보여진다. 최종 HPLC 방법 파라미터의 요약은 아래 열거된다:

[0527] 칼럼: Supelco Ascentis Express® Peptide ES-C18, 50 x 4.6 mm, 2.7 μ m

[0528] 유량: 1.5 mL/분

[0529] 주입 용량: 40 μ L

[0530] 칼럼 온도: 40 $^{\circ}$ C

[0531] 샘플 온도: 5 $^{\circ}$ C

[0532] 검출기 파장: 215 nm

[0533] 이동상 A: 물내 0.1% TFA (72%)

[0534] 이동상 B: 1:1 메탄올: 아세트니트릴내 0.1% TFA (28%).

[0535] 차세대 충격기 (NGI) 방법은 개발되었다. NGI 컵은 메탄올내 5% Tween 20으로 코팅되었다. 제형 순량 분무 건조된 MMI-0100 5% w/w 고형물로 충전된 수포는 표 3에서 개괄된 바와 같이 EPIC 디바이스를 이용하여 15 L/분으로 복용되었다. 사전분리기의 사용이 비-락토오스 기반 제형에 전형적으로 요구되지 않아도, 가능한 큰 응집물을 수집하는 것이 포함되었다. 모든 NGI 성분은 샘플 용매로서 물에서 10 mL의 0.02% Tween 20으로 초기에 추출되었다. 추출 용적으로 조정은 충격기에 복용된 MMI-0100의 충전 중량 및 양에 기반된 프로젝트 내내 다양하였다. 회수는 평가되었고 방법 변경은 85% 초과 회수를 유지하기 위해 개발되었다.

[0536] 에어로졸 성능은 도 5에서 보이는 디바이스에 유사한 EPIC 흡입기를 이용하여 평가 및 최적화되었다. 드라이브 반응식 개발에서 더 큰 가요성을 제공하는 기능 발생제 설정이 사용되었다. 1 및 2 mg의 5% 고형물 및 2 mg의 1% 고형물 제형으로 충전된 수포는 중량측정 청소능에 대하여 평가되어 수포 및 디바이스로부터 분말 청소능을 평가하였다. 2.0 초 지속시간의 단일 펄스로 이루어진 드라이브 반응식은 표준 EPIC 유동 채널을 가진 EPIC 흡입기와 함께 사용되었다. 기준선 청소능 결과가 허용가능하기 때문에 (수포로부터 청소된 >80% 질량), NGI 시험

은 공기역학적 입자 크기 분포 (PSD)를 평가하기 위해 수행되었다. 표 4는 에어로졸 결과 요약에 포함한다. 도 6은 입자 크기 분포 플롯을 보여준다.

표 4. 초기 에어로졸 성능 결과

5% 고형물 - 분무건조된 MMI-0100 5% w/w 고형물	
<p>1.0 mg 충전 중량</p> <ul style="list-style-type: none"> - 중량측정 청소능=88.3% - 장입된 용량=775 µg - 전달된 용량=500 µg - 미세 입자 용량 (FPD)≤5.0 µm=379 µg - FPD≤3.0 µm=206 µg - 질량 중앙 공기역학적 직경 (MMAD)=3.2 µm 	<p>2.0 mg 충전 중량</p> <ul style="list-style-type: none"> - 중량측정 청소능=83.0% - 장입된 용량=1563 µg - 전달된 용량=1105 µg - FPD≤5.0 µm=650 µg - FPD≤3.0 µm=305 µg - MMAD=3.8 µm
1% 고형물 - 분무건조된 MMI-0100 1% w/w 고형물	
<p>1.0 mg 충전 중량</p> <p>시험되지 않음 (더 높은 충전 중량은 FPD를 최대화하기 위해 선호되었다)</p>	<p>2.0 mg 충전 중량</p> <ul style="list-style-type: none"> - 중량측정 청소능=88.3% - 장입된 용량=1580 µg - 전달된 용량=1183 µg - FPD≤5.0 µm=508 µg - FPD≤3.0 µm=352 µg - MMAD=3.6 µm

[0537]

[0538]

초기 에어로졸 성능 시험의 결과는 5% 및 1% 고형물 제형이 양호한 효율로 흡입기로부터 분배될 수 있음 및 2 µm의 표적에 더 근접한 MMAD 값을 감소시키는 최적화에 대하여 양호한 개시점이 제공될 수 있음을 나타냈다. 1.0 mg 충전 중량에서 결과는 3.2 µm에서 표적 MMAD에 가장 근접하였다. 2 mg 용량 수준에서, 1% 고형물 제형은 더 많은 미세 입자 용량 (FPD) < 3.0 µm에 의해 보여진 바와 같이 더 미세한 분포를 제공하였고 입자 크기 분포는 NGI의 단계 5에 집중하였다 (도 6). 추가의 최적화와 함께, 1% 고형물 제형은 프로젝트의 개시에서 정의된 바와 같이 에어로졸 성능 표적을 더욱 충족시킬 것 같았고 따라서 앞으로 이동하는 선두 제형으로서 선택되었다.

[0539]

2 mg 초과 충전 중량을 증가시키기 위한 노력에서, 수포의 뚫린 구멍에 대해 공기 속도를 증가시키기 위해 흡입기의 현존하는 유동 채널이 변형되었다. 이론에 의한 구속됨 없이, 공기 속도의 증가는 수포로부터 입자의 청소능의 속도를 증가시킨다고 여겨진다. 최대 10 mg의 1% 고형물 제형으로 충전된 수포의 중량측정 청소능은 25 L/분의 유량에서 허용가능한 (>90%) 것으로 밝혀졌다. 3개 NGI 시험은 5 및 8 mg의 충전 중량으로 수행되었고, 단일 NGI는 투약 10 mg의 실행성을 평가하기 위해 수행되었다. 이들 결과는 표 5 및 도 7에서 요약된다. 오차 막대는 5 및 8 mg 충전 중량에 대하여 포함된다. 5 mg 에어로졸 성능 시험은 고도로 재생가능하였다.

표 5. 최적화 이후 최대 10 mg 충전 중량에서 에어로졸 성능 결과

충전 중량 (mg)	% 청소능	전달된 용량 (μg)	FPD ≤5.0 μm (μg)	FPF≤5.0 μm (전달된의 %)	FPD ≤3.0 μm (μg)	FPF≤3.0 μm (전달된의 %)	MMAD (μm)
5	92.1	3135	2791	89.0	2362	75.3	2.1
8	94.9	5249	4615	87.9	3675	70.0	2.2
10	95.3	6575	5839	88.8	4658	70.8	2.2

*FPF = 미세 입자 분획

[0540]

[0541]

디바이스 최적화는 증가된 미세 입자 용량 (FPD), 감소된 MMAD, 및 감소된 목 및 사전-분리기 체류에 의해 언급된 바와 같이 효율적인 제형 분산을 허용하였다. 2.1 내지 2.2 μm의 수득한 MMADs는 프로젝트 표적을 충족시켰고 10 mg의 제형의 성공적인 전달은 4.7 mg의 미세 입자 용량 < 3.0 μm을 초래한다. 5 내지 10 mg으로부터 결과는 또한 요구된 임상 용량을 달성하기 위해 충전 중량 및 수포의 수 모두의 조정을 허용할 용량 선형성을 나타낸다 (참고 선형성 플롯에 대하여 도 8).

[0542]

동일한 디바이스 조건을 이용하여, 7.5 및 20% 트레할로오스로 건조된 제형 공-분무 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas TX)는 5 mg의 충전 중량으로 각각에 대하여 단일 NGI 수행에 의해 에어로졸 성능으로 스크리닝되었다. 결과는 표 6 및 도 9에서 5 mg으로 순량 제형에 비교되고 요약된다.

표 6. 5 mg의 충전 중량에서 트레할로오스 변이체를 이용한 에어로졸 성능 결과

% 트레할로 오스	% 청소능	전달된 용량 (μg)	FPD ≤5.0 μm (μg)	FPF≤5.0 μm (전달된의 %)	FPD ≤3.0 μm (μg)	FPF≤3.0 μm (전달된의 %)	MMAD (μm)
0 (순량)	92.1	3135	2791	89.0	2362	75.3	2.1
7.5	90.4	2812	2370	84.3	2087	74.2	2.0
20	91.6	2423	2248	92.8	1967	81.2	2.0

[0543]

[0544]

7.5 및 20%의 백분율에서 트레할로오스 변이체는 동일한 충전 중량으로 순량 제형에 비교된 매우 유사한 에어로졸 분포를 보여주었다. 이는 MMI-0100이 트레할로오스로 성공적으로 공-분무 건조될 수 있고 순량 제형에 대해 성능에서 거의 변화 없이 흡입기로부터 효율적으로 분산될 수 있다는 것을 입증하였다.

[0545]

2개 안정성 연구는 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1) 제형의 에어로졸 성능 및 불순물에 관한 다양한 조건의 효과를 평가하기 위해 수행되었다. 수포는 5 mg의 각각의 4개 제형 (순량 분무 MMI-0100 5% w/w 고형물; 순량 분무 MMI-0100 1% w/w 고형물; 분무 건조된 80/20 MMI-0100/트레할로오스 1% w/w 고형물; 분무 건조된 92/5/7.5 MMI-0100/트레할로오스 1% w/w 고형물)으로 충전되었다. 수포는 1 x 5 수포 홀더에 배치되었고 알루미늄 파우치 속에 밀봉되었다. 파우치 수포는 보관되었고, 인출되었고 표 7에 따라 에어로졸 성능 (인출 조건 당 n=3 NGI 시험)에 대하여 시험되었다.

표 7. 수포 안정성 보관 및 인출 계획

보관 조건	0 (초기)	2 주	4 주
주위	X	N/A	N/A
40°C/75% 상대습도	N/A	X	X
25°C/60% 상대습도	N/A	X	X
2-8°C	N/A	N/A	X

[0546]

[0547]

수포에서 화학 안정성은 5% 고형물 순량 MMI-0100 제형을 이용하여 시험되었다. 수포는 10 mg으로 충전되었고, 1 x 5 수포 홀더에 배치되었고 알루미늄 파우치에 밀봉되었다. 파우치 수포는 40°C/75% 상대 습도에서 보관되었고, 2 및 4 주에서 인출되었고, 검정 및 불순물에 대하여 시험되었다.

[0548]

멸크 안정성은 대략 50 mg의 1% 및 5% 고형 MMI-0100 제형을 이용하여 시험되었다. 제형은 앰버 유리 바이알에 이동되었고, 캡은 파라필름으로 랩핑되었고 전체 바이알은 알루미늄 오버랩 파우치에 배치되었고 밀봉되었다. 트레할로오스 변이체를 위하여, 본래의 유리 병은 유사한 방식으로 처리되었다. 각 바이알은 40°C/75% 상대 습도에서 안정성 챔버에 배치되었고 검정 및 불순물 시험을 위하여 4 주후 인출되었다.

[0549]

5 mg 충전 중량에서 오버랩 파우치를 이용하여 단위 용량 수포로 보관된 모두 4개의 제형에 대하여 에어로졸 성능 (n=3 NGI)에 관한 안정성 결과는 표 8, 표 9, 및 표 10에 나타난다.

표 8. 2-8°C 에서 수포내 4 주 보관 이후 제형에 대한 안정성 결과

	MMI-0100 1% w/w 고형물	MMI-0100 5% w/w 고형물	92.5/7.5 MMI- 0100/트레할로오 스 1% w/w 고형물	80/20 MMI- 0100/트레할로오스 1% w/w 고형물
분무건조시 불내 % 고형물	1	5	1	1
% 트레할로오스	0	0	7.5	20
평균 이론적 약물 장입 (µg)	3948	3913	3647	3162
% 중량측정 청소능	95.8	95.8	95.4	94.8
유도 전달된 용량 (DDD) (µg)	3260	3292	2976	2599
초기의 % DDD	96.8	93.6	99.5	99.6
FPD≤5.0 µm (µg)	2886	2613	2634	2344
FPD≤5.0 µm (µg) (초기의 %)	97.5	93.4	101.0	99.7
FPD≤3.0 µm (µg)	2437	1769	2230	2032
FPD≤3.0 µm (µg) (초기의 %)	98.4	95.2	100.8	100.7
MMAD (µm)	2.1	2.7	2.1	2.0
기하학적 표준 편차 (GSD)	1.6	1.6	1.6	1.5

[0550]

표 9. 25°C/60% RH 에서 수포내 4 주 보관 이후 제형에 대한 안정성 결과

	MMI-0100 1% w/w 고형물	MMI-0100 5% w/w 고형물	92.5/7.5 MMI- 0100/트레할로오 스 1% w/w 고형물	80/20 MMI- 0100/트레할로오스 1% w/w 고형물
분무건조시 물내 % 고형물	1	5	1	1
% 트레할로오스	0	0	7.5	20
평균 이론적 약물 장입 (μg)	3982	3925	3578	3077
% 중량측정 청소능	95.2	95.4	95.8	95.7
유도 전달된 용량 (DDD) (μg)	3256	3402	2941	2525
초기의 % DDD	96.7	96.8	98.4	96.7
FPD≤5.0 μm (μg)	2840	2720	2522	2291
FPD≤5.0 μm (μg) (초기의 %)	95.9	97.2	96.7	97.4
FPD≤3.0 μm (μg)	2375	1783	2134	1978
FPD≤3.0 μm (μg) (초기의 %)	95.9	95.9	96.4	98.0
MMAD (μm)	2.1	2.7	2.1	2.0
기하학적 표준 편차 (GSD)	1.6	1.5	1.7	1.5

[0551]

표 9. 25°C/60% RH 에서 수포내 4 주 보관 이후 제형에 대한 안정성 결과

	MMI-0100 1% w/w 고형물	MMI-0100 5% w/w 고형물	92.5/7.5 MMI- 0100/트레할로오 스 1% w/w 고형물	80/20 MMI- 0100/트레할로오스 1% w/w 고형물
분무건조시 물내 % 고형물	1	5	1	1
% 트레할로오스	0	0	7.5	20
평균 이론적 약물 장입 (μg)	3982	3925	3578	3077
% 중량측정 청소능	95.2	95.4	95.8	95.7
유도 전달된 용량 (DDD) (μg)	3256	3402	2941	2525
초기의 % DDD	96.7	96.8	98.4	96.7
FPD≤5.0 μm (μg)	2840	2720	2522	2291
FPD≤5.0 μm (μg) (초기의 %)	95.9	97.2	96.7	97.4
FPD≤3.0 μm (μg)	2375	1783	2134	1978
FPD≤3.0 μm (μg) (초기의 %)	95.9	95.9	96.4	98.0
MMAD (μm)	2.1	2.7	2.1	2.0
기하학적 표준 편차 (GSD)	1.6	1.5	1.7	1.5

[0552]

표 10. 40°C/75% RH 에서 수포내 4 주 보관 이후 제형에 대한 안정성 결과

	MMI-0100 1% w/w 고형물	MMI-0100 5% w/w 고형물	92.5/7.5 MMI- 0100/트레할로오스 1% w/w 고형물	80/20 MMI- 0100/트레할로오스 1% w/w 고형물
분무건조시 물내 % 고형물	1	5	1	1
% 트레할로오스	0	0	7.5	20
평균 이론적 약물 장입 (μg)	3925	3914	3606	3145
% 중량측정 청소능	95.2	94.4	94.2	94.3
유도 전달된 용량 (DDD) (μg)	3223	3333	2939	2532
초기의 % DDD	95.7	94.8	98.3	97.0
FPD≤5.0 μm (μg)	2742	2499	2472	2222
FPD≤5.0 μm (μg) (초기의 %)	92.6	89.3	94.8	94.5
FPD≤3.0 μm (μg)	2309	1695	2096	1890
FPD≤3.0 μm (μg) (초기의 %)	93.3	91.1	94.7	93.6
MMAD (μm)	2.1	2.7	2.1	2.1
기하학적 표준 편차 (GSD)	1.7	1.7	1.8	1.6

[0553]

[0554]

결과는 5% 고형물 제형 (10.7% 변화)을 제외하고 모든 제형 변이체에 대하여 초기 시점부터 에어로졸 성능에서 10% 미만 변화를 나타낸다. 1% 고형물을 함유한 3개 MMI-0100 제형은 오버랩 파우치에 배치된 경우 주위 조건에서 3-4 개월의 유효한 유통 기한을 제공하는 40 °C / 75% RH에서 최대 4 주 동안 안정적이다. 에어로졸 성능에 관하여, 7.5% 또는 20% 변이체를 가진 제형에 트레할로오스의 부가로부터 성능의 차이는 본질적으로 없었다. 40 °C / 75% RH에서 4 주 보관 이후 1% 고형물 / 0% 트레할로오스 제형으로부터 대표적인 입자 크기 분포 플롯은 도 10에서 보여진다. 0, 2, 및 4 주에서 각 안정성 조건으로 각각의 제형에 대한 입자 크기 분포 뿐만 아니라 에어로졸 결과의 완벽한 열거는 아래에서 발견될 수 있다: 도 11-22. 5% 고형물 제형에 대한 불순물 및 MMI-0100 함량은 40°C / 75% RH에서 2 및 4 주 이후 포일 오버랩 파우치 내에서 단위 용량 수포로 보관 이후 또한 평가되었다. 5% 제형은 물질의 이용가능한 잔류 공급에 기반된 상기 연구에 사용되었다. 결과는 표 11에서 요약된다.

표 11. 단일 용량 수포 -5% 고형물 제형에 대한 불순물 및 함량 요약

불순물			검정
샘플	총 피크	총 불순물 함량 (% 면적)	% 함량
초기			
초기	6	0.9	100.6
2 주			
40°C/75% RH	6	0.9	100.0
25°C/60% RH	6	0.9	100.9
2-8°C	N/A	N/A	N/A
4 주			
40°C/75% RH	7	1.2	99.4
25°C/60% RH	7	0.9	100.2
2-8°C	6	0.8	100.4

[0555]

[0556]

불순물 프로파일에서 검출된 한 추가의 미확인된 피크로 4 주후 40°C /75% RH에서 검정 함량의 약간 감소 (100.6에서 99.4%)가 있었다. 불순물 프로파일 및 % 함량은 모든 다른 시점 및 조건에서 안정적이었다. 상기 데이터는 또한 5% 고형물 제형에 대하여 주위 조건에서 3-4 개월의 유효한 유통 기한을 뒷받침한다.

[0557]

40°C /75% RH에서 4 주 보관 이후 유리 병에서 벌크로 보관된 제형의 검정 및 불순물 프로파일은 표 12에서 요약된다. (시점 이후 충전 및 투약 수포에 의해) 벌크로 보관된 샘플의 에어로졸 성능을 결정하기 위한 충분한 이용가능한 제형은 없었다. 재차, 제형의 제한된 스톡 때문에, 트레할로오스 함유 제형은 초기 시점에서 평가되지 않았다. 순량 제형에 대한 초기 결과는 검정/불순물 방법의 방법 이동 동안 결정되었다. 샘플은 동일한 방식으로 조작/제조되었다.

표 12. 40°C/75% RH 에서 4 주 동안 유리에 보관된 제형에 대한 불순물 및 함량 요약

불순물			검정
샘플	총 피크	총 불순물 함량 (% 면적)	% 함량
초기			
92.5/7.5 MMI-0100/트레할로오스 1% w/w 고형물	N/A	N/A	N/A
80/20 MMI-0100/트레할로오스 1% w/w 고형물	N/A	N/A	N/A
MMI-0100 1% w/w 고형물	6	0.9	100.5
MMI-0100 5% w/w 고형물	6	0.9	100.6
4 주			
92.5/7.5 MMI-0100/트레할로오스 1% w/w 고형물	6	1.0	96.2
80/20 MMI-0100/트레할로오스 1% w/w 고형물	6	1.0	97.2
MMI-0100 1% w/w 고형물	6	1.1	100.4
MMI-0100 5% w/w 고형물	7	1.4	98.7

[0558]

[0559]

유리 병에 보관된 1% 고형물 제형에 대한 안정성 결과는 초기 결과로부터 거의 변화를 나타내지 않았다. 5% 고형물 제형은 100.6에서 98.7%로 검정 함량에서 상응하는 증가와 함께 0.9에서 1.4%로 불순물 함량에서 일부 증가, 및 관측된 피크의 수에서 증가 (6에서 7)를 보여주었다. 트레할로오스 함유 제형은 초기에 시험되지 않았지만, 4 주 이후 결과는, 총 불순물 및 피크의 수에 관하여, 1% 순량 제형에 대하여 수득된 결과의 범위이다. 이론에 의한 구속됨 없이, 유리에서 벌크로 보관된 경우 1% 순량 제형의 개선된 안정성에 기반하여, (수포내 5% 순량 제형에 대한 데이터에 기반된) 화학 안정성에 관하여, 1% 제형이 또한 수포에서 안정적이라는 것이 가능하다.

[0560]

실시예 2. MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1)의 네블라이저 제형

[0561]

본 연구에서, 2개 농도에서 MMI-0100 흡입 제형의 분무주입법은 기공 크기 3 μm 및 4 μm (유형 1 및 유형 2, 각각)의 진동 메쉬를 함유한 전자 네블라이저를 이용하여 특성규명되었다. 레이저 회절 측정은 액적 크기 분포를 결정하기 위해 사용되었다. 호흡 시뮬레이션 실험은 전달된 용량 및 분무화 시간을 결정하기 위해 수행되었다. 게다가, 물리화학 파라미터 (예를 들면, 점도, 표면 장력, 오스몰농도 및 밀도)는 결정되었다. 연구 설계는 표 13에서 개괄된다.

표 13. 네블라이저 제형 연구 설계

업무	업무의 설명
1	동결건조된 MMI-0100 펩타이드 MMI-0100 용액의 2 개 농축물은 0.9% NaCl (염수)에서 동결건조된 MMI-0100 펩타이드를 용해시킴으로써 제조되었다: 제형 A: 5-200 µg/kg 의 이론적 전달된 용량의 범위를 포함하기 위해 7 mg/mL; 제형 B: 0.7 mg/mL
2	물리화학적 특성규명은 하기에 관해 모든 제형에서 수행되었다: -점도 -표면 장력 -오스몰농도 -밀도
3	네블라이저 유형 1 및 네블라이저 유형 2 로 분무시 MMI-0100 제형의 레이저 회절 측정. 각각의 네블라이저 유형에 대하여, 3 개는 이중으로 분석되었다 (= 24 측정에 대하여 농축물 당 12 측정) 표적 충전 용적은 제형 A 및 B 각각의 2 mL 이었다 상기 실험으로부터 수득된 정보는 하기를 포함하였다: -질량 중앙 직경 (MMD (µg)) -호흡가능한 분획 (RF (액적 <5 µm (%))) -기하학적 표준 편차 (GSD) -총 산출 속도 (TOR (mg/분))
4	네블라이저 유형 1 및 네블라이저 유형 2)를 이용한 각각의 제형 (제형 A 및 제형 B)의 MMI-0100 의 두 (2) 충전 용적 (1mL 및 4 mL)의 분무시 호흡 자극. 각각의 네블라이저 유형에 대하여, 3 개는 이중으로 분석되었다 (=48 측정). 성인 호흡 패턴이 적용되었다: 1 회호흡량 =500 mL; 빈도=15 호흡/분; 들숨/날숨 비율=1 수득된 결과는 하기이었다: -분무 시간 (분) -호흡가능한 용량 (RD (액적 <5 µm 로 µg)=레이저 회절 측정 및 호흡 자극으로부터 산출된) 폐에 도달한다고 예상되는 용량 호흡 자극 실험으로부터 샘플은 HPLC 를 이용하여 분석되었다 호흡 자극 실험에 앞서, 방법 정량화용 필터 회수 시험은 수행되었다 (n=3)

[0562]

[0563]

기하학적 액적 크기 분포의 평가는 레이저 회절 (Malvern MasterSizerX)에 의해 수행되었다. 도 27은 레이저 회절 시험 설정의 도식을 보여준다. 충전 용적은 각 시험 용액에 대하여 2 mL이었다. 제형의 시험 이전, 네블라이저는 0.9% NaCl (염수) 용액으로 시험되었다. 레이저 회절 측정의 결과는 표 14에서 표시된다.

표 14. 시험된 MMI-0100 제형 및 0.9% 염수 용액에 대한 레이저 회절 측정의 값의 비교

제형	결과					
		MMD (μm)	GSD	RF<5 μm (%)	RF<3.3 μm (%)	TOR (mg/mL)
B (0.7 mg/mL)	네블라이저 유형 1					
	평균	3.30	1.51	83.79	50.09	353.17
	SD	0.07	0.00	1.28	1.91	17.79
	RSD	2.15	0.19	1.53	3.82	5.04
	네블라이저 유형 2					
	평균	4.39	1.63	61.90	28.34	900.50
	SD	0.23	0.10	6.17	1.26	193.39
	RSD	5.27	6.18	9.96	4.46	21.48
A (7.0 mg/mL)	네블라이저 유형 1					
	평균	3.03	1.53	86.40	57.12	352.33
	SD	0.07	0.01	1.26	2.00	44.16
	RSD	2.37	0.68	1.46	3.50	12.53
	네블라이저 유형 2					
	평균	4.03	1.65	67.58	35.15	797.17
	SD	0.10	0.02	1.61	1.57	35.92
	RSD	2.55	0.93	2.38	4.46	4.51
0.9% 염수	네블라이저 유형 1					
	평균	3.26	1.56	82.33	50.99	370
	SD	0.04	0.01	0.78	0.95	54
	RSD	1.2	0.5	0.9	1.9	14.7
	네블라이저 유형 2					
	평균	4.44	1.68	59.70	28.95	922
	SD	0.21	0.06	4.12	1.72	79
	RSD	4.7	3.8	6.9	6.0	8.5

TOR=총 산출 속도 (mg/mL); 분 당 전달된 에어로졸의 질량;

SD=표준 편차; RSD=상대 표준 편차

[0564]

[0565]

필터 회수는 흡입 필터로부터 샘플 추출용 0.9% 염수를 이용하여 결정되었다. 간단히, 대략 1,000 mg의 제형 A (7.0 mg/mL)는 흡입 필터 (n=3)상에서 분무되었고 반면에 일정한 기류는 펌프로 필터에 적용되었다. 제형 A의 적용 이후, 필터 패드는 30 mL의 0.9% 염수를 함유한 50 mL 원뿔형 튜브에서 배치되었고 최대 4 시간 동안 250 rpm으로 진탕되었다. 샘플 (대략 800 μL)은 0.5, 1, 2, 3 및 4 시간 이후 수집되었다. 필터 회수 실험의 결과는 표 15에서 표시되고 도 28에서 그래프로 나타낸다.

표 15. 0.9% 염수로 증가하는 추출 시간 이후 여과 추출로부터 MMI-0100 회수 (%)

필터 번호	상이한 추출 시간 이후 MMI-0100 의 회수 (%)				
	0.5 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
#1	97.1	97.0	99.2	97.2	96.0
#2	94.3	93.6	95.1	94.9	92.9
#3	96.5	96.2	97.5	97.0	96.0
평균	96.0	95.6	97.2	96.4	95.0
SD	1.2	1.5	1.7	1.1	1.5

SD=표준 편차

[0566]

[0567]

최대 거의 96% 회수율은 0.5 시간 추출 시간 이후 달성되었다. 더 긴 추출 시간 (1, 2, 3 및 4 시간)은 회수를 개선하지 않았다.

[0568]

호흡 시뮬레이션은 성인 호흡 패턴 (1회 호흡량: 500 mL, 호흡 / 분: 15; 흡입/방출 비율: 50:50)을 이용하여 수행되었다. 표 16은 5-200 $\mu\text{g/kg}$ 의 원하는 호흡가능한 용량 (70 kg의 평균 중량 평가)을 충족시키기 위해 선택된 충전 용적을 함유한다.

표 16. 제형 A 및 제형 B에 대한 충전 용적

제형	A		B	
농도	7 mg/mL		0.7 mg/mL	
충전 용적	1 mL	4 mL	1 mL	4 mL

[0569]

[0570]

충전 용적은 만곡 펌프에 연결된 네블라이저의 약물 컵에 장입되었다. 들숨 필터는, 마우스피스와 펌프를 포함하는, 네블라이저 사이에서 설치되었고, 고무 컨넥터로 고정되었다. 제형으로 충전된 네블라이저는 자동 블록킹이 디바이스를 중지시킨 때까지 유도되었다. MMI-0100-함유 에어로졸은 흡입 폴리프로필렌 흡입 필터상에서 수집되었다. 분무화 이후, 흡입 필터는 겹자가 있는 필터 케이싱으로부터 제거되었고 플라스틱 스크류 캡이 있는 유리 바이알에 넣어졌다. 필터 케이싱은 0.9% 염수로 린스되었고 염수는 50 mL 원뿔형 튜브에서 수집되었다. 상응하는 필터는 0.9% 염수를 함유한 원뿔형 튜브에 이동되었고 0.5 시간 동안 250 rpm으로 진탕되었다. 0.5 시간 이후, HPLC 분석은 필터로부터 추출된 MMI-0100을 결정하기 위해 사용되었다. 네블라이저는 0.9% 염수로 몇 번 린스되었고 염수는 유리 비이커에서 수집되었다.

[0571]

염수 샘플의 펩타이드 함량은 선형 표준 보정을 가진 구매 HPLC에 의해 결정되었다. HPLC 기기 및 셋팅은 아래와 같았다:

[0572]

칼럼 온분, UV 검출기 및 크로마토그래피 데이터 시스템을 가진 HPLC;

[0573]

Zorbax 300SB, 3.5 μm , 150 x 3.0mm (L x ID) 칼럼 (또는 등가물);

[0574]

칼럼 온도: 25°C;

[0575]

샘플 온도: 4°C;

[0576]

유동: 0.5 mL/분;

- [0577] 이동상 A: 물내 0.1% 트리플루오로아세트산 (TFA);
- [0578] 이동상 B: 아세토니트릴/메탄올 (50:50)내 0.1% TFA;
- [0579] 주입 용량: 20 μ L;
- [0580] 실시 시간: 15 분; 및
- [0581] 검출기 파장: 215 nm.
- [0582] 사용된 HPLC 구배는 표 17에서 보여진다.

표 17. 구배 표

시간 (분)	유동 (mL/분)	% 단계 A	% 단계 B	곡선
0.00	0.50	68.0	32.0	6
5.00	0.50	63.0	37.0	6
6.00	0.50	10.0	90.0	6
9.00	0.50	10.0	90.0	6
10.00	0.50	68.0	32.0	6
15.00	0.50	68.0	32.0	6

[0583]

- [0584] 회수에 의한 정확도 및 방법 정확성 실험은 수행되었다. MMI-0100은 계량되었고 0.9% 염수에서 용해되었고 기재된 HPLC 방법에 의해 결정되었다. 회수 실험에 의해 정확도로부터 샘플 2 및 4는 여섯 (6) 바이알 각각에 분할되었고 방법 정확성 실험에서 사용되었다. 이들 실험의 결과는 표 18 및 19에서 보여진다. 상기 HPLC 방법은 12-600 μ g/mL의 범위에서 MMI-0100 펩타이드 함량을 결정할 수 있었다.

표 18. 회수에 의한 정확성

샘플	농도 (표적) (μ g/mL)	농도 (실제) (μ g/mL)	회수 (%)
1	600.43	589.53	98.18
2	300.22	286.53	95.44
3	120.09	123.78	103.08
4	48.03	49.60	103.25
5	24.02	24.69	102.80
평균			100.55
SD			3.55
RSD (%)			3.5

SD=표준 편차

RSD=상대 표준 편차

[0585]

표 19. 방법 정밀

바이알 번호	샘플 2 농도 (μg/mL)	샘플 4 농도 (μg/mL)
바이알 1	284.62	49.62
바이알 2	285.72	49.76
바이알 3	285.86	49.6
바이알 4	287.09	49.63
바이알 5	288.24	49.77
바이알 6	287.67	49.19
평균	286.53	49.60
SD	1.36	0.21
RSD	0.48	0.43

[0586]

[0587] 호흡 시뮬레이션 실험의 결과는 표 20 및 21 및 도 29-33에서 요약된다.

표 20. 네블라이저 유형 1 에 대하여 요약된 호흡 시뮬레이션 데이터

제형		B: MMI-0100 (0.7 mg/mL)		A: MMI-0100 (7.0 mg/mL)	
라벨 청구		700 µg/mL		7000 µg/mL	
충전 용적	mL	1 mL	4 mL	1 mL	4 mL
복제의 수		n=6	n=6	n=6	n=6
(제형의 결정된 값에 기반된) 충전된 약물 양	mg	0.72	2.84	6.93	27.68
분무된 제형의 증착					
DD	mg	0.43	1.81	5.13	20.07
SD		0.03	0.05	0.24	0.57
DD	%	59.8	63.6	74.0	72.5
SD		3.5	1.6	3.4	2.0
잔량	%	0.0	6.3	5.0	7.3
SD		0.0	0.8	0.7	0.8
분무 시간					
시간	분	3.34	11.39	3.40	15.81
SD		0.33	1.28	0.57	1.96
계산된 값					
RD<5 µm	mg	0.36	1.51	4.43	17.34
SD		0.02	0.06	0.24	0.69
RD<5µm	%	50.07	53.28	63.96	62.66
SD		2.94	2.19	3.55	2.49
RD<3.3 µm	mg	0.22	0.91	2.93	11.47
SD		0.02	0.07	0.19	0.63
RD<3.3 µm	%	29.92	31.87	42.29	41.43
SD		2.19	2.32	2.80	2.28

DD=전달된 용량

SD=표준 편차

RD=호흡가능한 용량

[0588]

표 21. 네블라이저 유형 2에 대하여 요약된 호흡 시뮬레이션 데이터

제형		B: MMI-0100 (0.7 mg/mL)		A: MMI-0100 (7.0 mg/mL)	
라벨 청구		700 µg/mL		7000 µg/mL	
충전 용적	mL	1 mL	4 mL	1 mL	4 mL
복제의 수		n=6	n=6	n=6	n=6
(제형의 결정된 값에 기반된) 충전된 약물 양	mg	0.71	2.84	6.97	27.59
분무된 제형의 증착					
DD	mg	0.34	1.50	4.71	17.62
SD		0.01	0.07	0.38	0.57
DD	%	48.1	52.7	67.6	63.9
SD		1.6	2.3	5.6	2.3
잔량	%	2.6	17.4	15.1	17.1
SD		6.4	2.8	5.1	3.0
분무 시간					
시간	분	1.16	3.99	1.28	4.37
SD		0.09	0.23	0.14	0.36
계산된 값					
RD<5 µm	mg	0.21	0.93	3.19	11.91
SD		0.03	0.11	0.40	1.16
RD<5µm	%	29.81	32.69	45.74	43.19
SD		3.61	3.93	5.79	4.42
RD<3.3 µm	mg	0.10	0.42	1.66	6.20
SD		0.01	0.03	0.21	0.60
RD<3.3 µm	%	13.63	14.95	23.82	22.47
SD		0.94	1.07	3.12	2.28

DD=전달된 용량

SD=표준 편차

RD=호흡가능한 용량

[0589]

[0590]

전달된 용량 (DD [mg] 또는 [%])은 특정된 호흡 패턴을 추정하는 환자에 전달된 MMI-0100의 양을 나타낸다. 호흡가능한 용량 < x pm (RD <x µm [mg] 또는 [%])은 액적 < x pm의 부분에서 함유된 MMI-0100의 양을 제공한다. 에어로졸 집단내 입자가 쌓일 것 같은 액적 크기가 규정한다. 이론에 의한 구속됨 없이, 치료적으로 유효하게, 입자가 폐에서 쌓이도록 1-5 µm의 범위이어야 한다고 추정된다. 그에 반해서, >5 µm의 입자는 일반적으로 구인두에서 영향을 미칠 것이고 삼켜질 것이고, 반면에 < 1 µm 아래 입자는 공기 스트림에서 비말동반 되고 내쉬게 될 것이다. 호흡가능한 용량은 레이저 회절 측정에 의해 결정된 호흡가능한 분획 (RF [%])의 백분율과 DD [mg]의 곱셈으로 계산된다.

[0591]

도 29 및 30은 충전된 약물 양과 전달된 약물의 양 (DD [mg]) 뿐만 아니라 호흡가능한 용량 < 5 µm (RD <5 µm)으로서 주어진 폐 속에 호흡된 양 사이에서 선형 상관관계가 있다. 선형성은 양쪽 네블라이저 디바이스 (네블라이저 유형 1 및 네블라이저 유형 2)에 대하여 주어진다. 결과에 기반하여, 분무화 성능은 제형 농도에 독립적인 것으로 보여진다.

[0592] 물리화학 특성규명은 오스몰농도, 점도, 표면 장력 및 밀도에 관해 모든 MMI-0100 제형에서 수행되었다. 각 실험의 결과는 표 22에서 보여진다.

표 22. 제형 A 및 제형 B의 물리화학적 특성규명

제형		A	B
농도	mg/mL	7.0	0.7
오스몰농도	Osmol/kg	0.297 (SD 0.001)	0.286 (SD 0.001)
동적 점도 (20°C)	mPa's	1.04 (SD 0.01)	0.99 (SD 0.01)
표면 장력	mN/m	65.0 (SD 0.2)	67.5 (SD 0.1)
밀도 (23.8°C)	g/cm ³	1.0047	1.0031

SD=표준 편차

[0593]

[0594] 이들 실험의 결과는 제형 A (네블라이저 유형 1=3.0 μm; 네블라이저 유형 2=4.0 μm)에 대한 질량 중앙 직경 (MMD)이 제형 B (네블라이저 유형 1=3.3 μm; 네블라이저 유형 2=4.4 μm)의 것보다 약간 미만이었던 것을 나타낸다. 이들 값은 순수한 0.9% 염수에 대하여 결정된 데이터에 필적하였다. 마찬가지로, 기하학적 표준 편차 (GSD), 호흡가능한 분획 (RF) 및 총 출력 속도 (TOR) 값은 제형 B에 비교된 경우 제형 A에 대하여 또한 약간 덜했다. 선형 상관관계는 전달된 용량 (호흡가능한 용량 <5 μm)과 충전된 MMI-0100 양 사이에서 존재하는 것이 밝혀졌다. 이론에 의한 구속됨 없이, 상기 상관관계는 네블라이저 디바이스를 통해 환자에 투여된 MMI-0100의 양을 계산하기 위해 사용될 수 있다.

[0595] 실시예 3. MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1)의 나노-폴리플렉스 (NP) 제형

[0596] MMI-0100 (MK2i)-NPs의 합성 및 물리화학 특성규명

[0597] 음이온성, 엔도솜분해적 폴리머 폴리(프로필아크릴산) (PPAA)와 양으로 하전된, CPP-기반 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드의 제형은 펩타이드 엔도리소솜 누출 및 치료적 효력의 향상 방법으로서 개념화되었다. 상기 접근법은, 흡수 및 엔도솜 누출을 향상시키기 위해 음이온성 핵산과 양으로 하전된 CPP 서열, 지질, 또는 폴리머 형질감염제 사이에서 폴리플렉스의 정전기 형성에 기반되는, 핵산의 비바이러스 전달용 관행에 의해 고무되었다 (K. A. Mislick 등, Proc Natl Acad Sci USA 93, 12349-12354 (1996); J. P. Richard 등, J Biol Chem 280, 15300-15306 (2005); C. E. Nelson 등, ACS Nano 7, 8870-8880 (2013)).

[0598] MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; 서열 식별 번호: 1)는 고상 합성을 통해 합성되었고 순도는 전기분무-이온화 질량 분광분석법을 통해 확인되었다 (도 40). 가역적 부가 단편화 사슬 전달 (RAFT) 중합은 폴리(아크릴산) (PAA) [DP = 150 (GPC), DP = 106 (H¹ NMR), PDI = 1.27 (GPC) 도 41A 및 42A] 및 폴리(프로필아크릴산) (PPAA) [DP = 193 (GPC), DP = 190 (H¹ NMR), PDI = 1.47 (GPC) 도 41B 및 42B]를 합성하는데 이용되었다. NPs는, PPAA 폴리머에서 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 및 카복실산 모이어티에 존재하는 1차 아민인 pKa 값 사이에 있는, pH 8.0에서 PBS내 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드와 PAA 또는 PPAA 호모폴리머의 단순 혼합에 의해 형성되었고; 이는 모든 분자상에 최적의 용해도 및 순전하를 보장한다 (도 35A). PPAA는 하기 때문에 이용되었다: 그의 명확한 pH-의존형 막 분열성 활성 (R. A. Jones 등, Biochem J 372, 65-75 (2003); C.A. Lackey 등, Bioconjugate Chemistry 13, 996-1001 (2002); N. Murthy 등, J Control Release 61, 137-143 (1999); S. Foster 등, Bioconjug Chem 21, 22015-2212 (2010)) 및 동물 모델에서 이전의 안전한 용도 (S. Foster 등, Bioconjug Chem 21, 2205-2212 (2010); E. Crownover 등, J Control Release 155, 167-174 (2011) (도 35B)). PPAA에 구조적 유사성을 가진 음이온성 폴리머임에 따라 벡터 대조군으로서 PAA는 이용되었지만 그의 더 낮은 pKa (pKa~4.3) 때문에 생리적으로 관련된 범위에서 pH-반응이 부족하다 (도 35C).

[0599] 최적의 나노입자 제형 조건을 결정하기 위해, MK2i-NPs의 라이브리리는 전하비 [즉 CR = ([NH₃⁺]_{MK2i}: [COO⁻]_{PPAA})]의 범위에서 제조되었고, 크기 분포 및 입자 표면 전하는 동적 광 산란 (DLS) 및 ζ-포텐셜 분석, 각각을

통해 특성규명되었다. 표 23은 DLS 분석에 의해 결정된 바와 같이 상이한 전하비로 제조된 MMI-0100 (MK2i)-NPs의 크기 요약에 포함한다. 예상대로, MK2i-NP ζ-포텐셜은, CR ~ 2:1에서 명백한 등전점으로, CR에 직접적으로 비례하였다 (도 35D). CR은 또한 유의미하게 MMI-0100 (MK2i)-NP 크기에 영향을 미쳤고, CRs의 단지 협소한 범위는 단봉 크기 분포를 수득하였다 (즉 CR = 1:2 및 1:3, 보충 표 1). 1:3의 CR은 상기 비율이 일관되게 최소 입자 크기 및 다분산도 ($d_h=119 \pm 28$ nm, $\zeta = -11.9 \pm 3.2$ mV)를 갖는 단봉 크기 분포를 수득함에 따라 최적의 제형으로서 선택되었다. 비-엔도솜분해적 MK2i 나노-폴리플렉스 (NE-MK2i-NPs)는 생물학적 연구용 비히클 대조군으로서 PAA로 제형화되었다. PAA와 CR=1:3로 제조된 NE-MK2i-NPs는 엔도솜분해적 MK2i-NPs ($d_h=114 \pm 38$ nm, $\zeta = -16.4 \pm 5.1$ mV)와 통계적으로 등가인 크기 및 ζ-포텐셜을 가졌다. 형광 MMI-0100 (MK2i)-NPs 및 NE-MK2i-NPs는 세포내 추적에 가능하게 하기 위해 1:3의 CR에서 Alexa-488 접합된 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드로 제조되었고 비표지된 NPs와 유사한 크기 및 전하가 수득되었다. CR = 1:3에서 제조된 NPs는 TEM 화상형성을 통해 또한 특성규명되었고 (도 43), 이는 DLS 결과와 일치되었다. PPAA-MK2i 제형은 순 음으로 하전된 NPs를 수득하였다.

표 23. 상이한 전하비에서 제조된 MMI-0100 (MK2i)-NPs의 크기 요약

NH2:COOH	Z-평균 직경 (nm)
10:1	$10.32 \pm 2.63^*$
2:1	$52.1 \pm 46.86^*$
1:1	970.6 ± 662.4
1:1.5	$465.1 \pm 138.4^*$
1:2	474.2 ± 32.59
1:3	118.8 ± 26.76
1:4	$607.4 \pm 285.2^*$
1:5	$213.0 \pm 67.95^*$
1:10	$21.57 \pm 9.89^*$
1:3 (Alexa)	168.5 ± 24.63
1:3 (NE)	113.7 ± 14.47
1:3 (NE Alexa)	197.4 ± 12.85

*다중봉크기 분포 (다중 피크)를 나타낸다.

1:3 (Alexa) 폴리플렉스는 세포성 흡수 연구에서 사용하기 위해 Alexa488-접합된 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드로 제형화되었다. 1:3 (NE) 폴리플렉스는 비히클 대조군으로서 엔도솜 pH 범위에서 pH-의존형 막 분열성 활성을 나타내지 않는 비-엔도솜분해적 (NE) 폴리(아크릴산) 폴리머로 제형화되었다.

엔도리소솜 조건 하에서 MMI-0100 (MK2i)-NP 인젝팅은 pHs의 범위에서 DLS를 이용하여 평가되었고 pH로서 해리된 MK2i-NPs가, 초기 엔도솜 조건에 또한 상관하는, PPAA에서 카복실산 (pH~6.7)의 pKa에 대해 세포의 pH로부터 낮아진다는 것이 드러났다 (A. Sorkin 등, Nat Rev Mol Cell Biol 3, 600-614 (2002)) (도 35E). 이론에 의한 구속됨 없이, 더 낮은 pH에서, PPAA 폴리머가 양성자화/탈이온화되고, 펩타이드 상의 순 양전하가 MK2i-NPs의 정전기 반발 및 디스어셈블리를 유발시킨다는 것이 가정된다. 초기 엔도솜-유사 조건 하에서 NP 디스어셈블리는 펩타이드 생체활성 및/또는 PPAA 엔도솜 막 분열성 기능이 폴리머-펩타이드 상호작용에 의해 입체적으로 방해받는 가능성을 감소시킨다.

- [0603] MMI-0100 (MK2i)-NP 세포 내재화, 엔도솜 누출, 및 세포내 체류
- [0604] MMI-0100 (MK2i)-NP 흡수 및 세포내 체류의 양은 경시적으로 2 시간 동안 처리된 인간 관상동맥 혈관 평활근 세포 (HCAVSMCs)의 유세포측정 분석을 통해 평가되었고, 세정되었고, 5 일 동안 신선한 배지에서 유지되었다. 펩타이드 흡수에서 자릿수 이상의 증가가 NE-MK2i-NPs 및 MMI-0100 (MK2i)에 비교된 MK2i-NP 처리된 세포에서 측정되었다 (도 36A 및 도 54A). NE-MK2i-NP 흡수가 자유 펩타이드에 등가이기 때문에, 이들 데이터는 세포 내재화에서 차이가 NP 제형 때문이고 입자 형태학 및 전하에 독립적이라는 것을 나타낸다. MK2i-NP 제형을 통한 향상된 펩타이드 전달은 이것이 세포 유형-특이적 관찰이 아니라는 것을 시사하는 내피 세포에 관한 유사한 연구에서 또한 검출되었다 (도 56). 반감기 계산 (도 54B)은 MK2i-NPs가 4 일 내지 58 일 자릿수 초과 만큼 MK2i 펩타이드의 세포내 반감기를 증가시켰음을 보여주었다. 추가로, MMI-0100 (MK2i)-NPs로 처리된 HCAVSMCs는, 세포 밖으로 엔도리소솜 경로 및/또는 토세포적 재순환에서 펩타이드 분해의 더 높은 속도 때문일 것 같은, NE-MK2i-NP 및 MK2i 처리된 세포에 비교된 더 긴 펩타이드 세포내 체류를 입증하였다 (I.R. Ruttekkolk 등, Mol Pharmaceut 9, 1077-1086 (2012)) (도 36B). 흥미롭게도, MK2i-NPs는 처리/세정 이후 인큐베이션의 제1 72 시간 동안 형광의 증가를 보여주었다. 상기 효과가 세포의 외막에 결합된 MK2i-NPs의 지연된 내재화 때문이 아니라 형광의 상기 증가가 Alexa-488 자가-켄칭 기전 때문이라는 것이 확인되었고 (W. H. t. Humphries 등, Anal Biochem 424, 178-183 (2012)); 증가된 형광은 경시적으로 MMI-0100 (MK2i)이 NPs로부터 세포내로 미포장됨에 따라 줄어드는 켄칭에 기인될 수 있다 (도 57).
- [0605] MMI-0100 (MK2i)-NPs를 통해 전달된 펩타이드의 개선된 세포내 체류의 기전에 선명성을 얻기 위해, 적혈구 용혈 검정 (B. C. Evans 등, J Vis Exp, e50166 (2013)) 및 현미경검사/공국재화 연구는 MK2i-NPs의 pH-의존형 막 분열성 활성 및 엔도솜 누출을 평가하기 위해 사용되었다. PPAA는 그의 pKa (~6.7) 또는 미만 pHs에서 적혈구 막을 방해한다 (도 36C). 세포외 (7.4) 및 초기 엔도솜 (6.8) pH에서, MK2i-NPs는 막 분열성 활성을 거의 보여주지 않았다. 그러나, 후기 엔도솜 (6.2) 및 리소솜 (5.6)을 대표하는 pH에서, 용혈의 유의미한 증가는 관측되었다. 후기 엔도솜 / 리소솜 pH에서 MK2i-NPs의 용혈성 거동은 폴리머 농도에 직접적으로 비례하였고 (도 44), >90% 적혈구 용해는 pH 5.6에서 40 µg/mL MK2i-NPs로 발생하였다. NPs로 제형이 pH 6.8에서 자유 PPAA에 비해 막 분열성 활성을 부분적으로 마스킹하였어도, MK2i-NPs는 PPAA 폴리머의 고유한 막 분열성 활성을 유지한다. 예상대로, MK2i 펩타이드 단독이나 비-엔도솜분해적 NE-MK2i-NP 제형 모두는 엔도리소솜 pH 범위에서 임의의 막 분열성 활성을 표시하지 않았다.
- [0606] MK2i-NP 엔도솜 누출은 HCAVSMCs에서 화상형성되었고 시험관내 정량화되었다 (도 36D). MK2i의 대략 90%가 자유 펩타이드로서 또는 Lysotracker 염료로 공국재화된 NE-MK2i-NPs를 통해 전달하였고, 반면에 MK2i-NP 제형은 MK2i 엔도리소솜 공국재화를 유의미하게 감소시켰다. 2시간 처리 및 세정 이후 MK2i/Lysotracker 공국재화의 세로 정량화는 모든 시점에서 MK2i-NP 제형에 대하여 유의미하게 감소된 MK2i/Lysotracker 공국재화를 드러냈다 (도 36E). 흥미롭게도, 구획 크기의 정량화는 NE-MK2i-NP 또는 MK2i 처리된 세포가 엔도솜을 대표하는 더 작은 소포 내에서 MK2i 국재화를 보였고, 반면에 MK2i-NPs를 통해 전달된 MK2i가 사이토졸 또는 파괴된 소포를 잠재적으로 대표하는 더 큰 구획 내에서 발견되었다는 것을 드러냈다 (도 45 및 58B).
- [0607] NP 제형은 자유, CPP-기반 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드에 비해 혈관 평활근 세포 (VSMCs)에 의한 펩타이드 흡수를 유의미하게 증가시켰다 (도 36A). 이론에 의한 구속됨 없이, 도 35에서 보이는 MMI-0100 (MK2i)-NPs 및 NE-MK2i-NPs의 시험관내 비교는 MK2i-NP 세포 내재화의 높은 수준이 NP 형태학 및 표면 전하에 의해 순수하게 지시된 것 보다는, PPAA의 특이적 제형에 의존하였음을 시사한다. 프로필 모이어티의 α-알킬 치환은 PPAA를 아크릴 산에 비해 더욱 친유성/소수성이도록 만들어, 흡수의 관측된 차이가 세포 막과 MMI-0100 (MK2i)-NPs의 증가된 소수성 상호작용의 결과일 수 있다는 것을 시사한다. 소수성 상호작용은 MK2i-NP 세포 내재화를 비특이적으로 유발시킬 수 있거나, 또는 MK2i-NP 내재화는 혈관 스트레스의 셋팅에서 상향조절되는 및 음으로 하전된/소수성 입자 (예를 들면, LDL)를 내부화하는 VSMC 포착제 수용체에 의해 매개될 수 있다.
- [0608] 효율적인 세포 내재화에 더하여, 엔도리소솜 분해 및 세포외 재순환의 회피는 치료적 효력 최적화 및 세포질적으로-활성 펩타이드의 작용의 장수에 매우 중요하다 (C. L. Duval 등, Mol Pharm 7, 468-476 (2010)). 상기 지속된 치료적 효과는 단일, 수술중 치료가 이식후 염증성 및 치유 단계 전반에 걸쳐 장기적인 생체활성을 달성해야 하는 경우 펩타이드-기반 정맥 이식술 치료에 특정한 중요성이다. 이를 위해, MK2i-NP 제형은 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드의 세포내 체류를 유의미하게 개선하였다 (도 36A 및 B). 상기 향상된 체류는, 엔도리소솜 누출 유도를 위하여 이상적으로 맞춰지는, PPAA의 pH-의존형 막 분열성 활성을 통해 달성된다 (도 36C-E). 세포 화상형성 연구는 PPAA의 엔도솜분해적 기능을 지지하였고 MK2i-NPs를 통해 전달된 펩타이드가 엔도리소솜 염료로 공국재화를 유의미하게 감소시켰다는 것을 보여주었다 (도 36D,E). 엔도솜 포착 회피는 세포내 펩타이드 체류의

증가된 장수와 관련되었다. 치료 제거 이후 0 및 5 일에서 세포내 펩타이드 형광의 지수형 감쇠 비선형 회귀 분석에 기반한 MMI-0100 (MK2i)의 세포내 반감기 ($T_{1/2}$)의 추정치는 세포내 $T_{1/2}$ 가 MK2i-NPs에 편입에 의해 14-배 증가되었음을 드러냈다 (MK2i-NP $T_{1/2}$ = 57.8 일 대 MK2i $T_{1/2}$ = 4.1 일) (데이터 도시되지 않음).

[0609] MMI-0100 (MK2i)-NPs는 용량 반응 곡선의 시프팅에 기반한 펩타이드 효력을 개선시켰다 (즉, 대부분의 검정에서 ~10-배 증가된 효력, 도 38). 그러나, NP 제형을 통한 MK2i 펩타이드의 더 긴 세포내 반감기는 또한 작용의 우수한 장수를 가능하게 할 수 있고, 예를 들어, 장기 이식 개방성을 개선할 수 있다. 이론에 의한 구속됨 없이, p38 MAPK 경로에 의해 매개된 TGF- β -매개된 전환분화 및 세포 이동이 35 일 이식후까지 병리적 정맥 이식 리모델링에 기여한다고 밝혀짐에 따라, NPs를 통해 전달된 MMI-0100 (MKi)의 세포내 반감기는 치료적으로 관련되는 것으로 예상된다 (A. V. Bakin 등, J Cell Sci 115, 3193-3206 (2002)). 토끼 및 갯과 모델에서 내막 과형성 (IH) 발병의 동력학에 관한 다른 연구는 첫 주 동안 세포성 증식, 이어서 주 12까지 정상 상태에 도달하는 연속된 이식 적응에서 초기 분출을 검출하였다 (M. Kalra 등, J Vasc Res 37, 576-584 (2000); R. M. Zwolak 등, J Vasc Surg 5, 126-136 (1987)). MK2i-NPs로 달성된 확장된 반감기는, 기저 신호전달 경로 저해 및 염증의 분해능 그리고 정상상태 조건에 도달하는데 요구된 시간의 촉진에 의해, 예를 들어, 이식에 앞서 단일 치료 이후 유의미하게 개선된 장기 성능을 수득한다고 예상된다.

[0610] 온전한 인간 복재 정맥 (HSV)에 펩타이드의 MK2i-NP 전달은 또한 평가되었다. 상기 실험의 결과는 흡수가 내피 및 평활근 세포 모두에서 발생한다는 것을 시사하였다. 예상대로, MK2i-NPs 및 대조군은 확산 장벽으로서 작용하는 외막 표면 및 내강에서 더욱 농축된 흡수를 보여주었다 (도 59). 내막 및 내측 층에 MK2i 침투는 평활근 마커 α -SMA로 공국제화에 의해 확인되었다 (도 60 a-b). 더욱이, *시험관내* 결과에 있어서, MK2i-NPs는 혈관벽 내에서 전체 펩타이드 흡수를 증가시켰다 (도 60c; 도 59e).

[0611] *내막 과형성의 저해 (인간 복재 정맥 (HSV)에서 IH)*

[0612] 3차원 인간 혈관 이식편 조직에서 효율적인 전달 및 MMI-0100 (MK2i)-NP 생체활성을 확인하기 위해, 정맥 IH의 *생체외* 장기 배양 모델은 인간 복재 정맥 (HSV)을 이용하여 완료되었다. HSV 고리는 근육 배스에서 KCl 도전에 대한 수축성 반응에 기반하여 실행가능하다는 것이 확인된 HSV 샘플로부터 절단되었다. 고리는 2 시간 동안 처리되었고, 세정되었고, 신생내막 형성을 촉진시키는 고 혈청 조건에서 유지되었다. Alexa-568 접합된 MK2i 펩타이드는 치료 직후 혈관 벽에 펩타이드 전달을 시각화하는데 사용되었고, 시험관내 결과와 유사하게, MMI-0100 (MK2i)-NPs는 자유 MMI-0100 (MK2i)에 비해 펩타이드 전달을 일관되게 증가시켰다 (도 37A). 배양액에서 14 일 이후, 탄성 염색의 Verhoeff-Van Gieson (VVG) 염색은 조직 부문에서 수행되었다 (도 37B). 다중 인간 공여체로부터 샘플의 내막 두께의 정량화는 MK2i-NPs가 용량-의존형 방식에서 그리고 자유 MMI-0100 (MK2i)보다 더 낮은 펩타이드 용량의 자릿수로 IH를 유의미하게 저해시켰음을 드러냈다 (도 37C 및 도 46). 더욱이, 100 μ M MK2i에서 MK2i-NP 요법은, 수확 ($p=0.49$) 직후 조직학을 위하여 제조된 대조군 조직에 통계적으로 등가인 내막 두께를 수득하는, IH를 전체적으로 폐지한 유일한 치료이었다. MTT 검정은 1 및 14 일 후처리가 수행되었고 장기 배양 결과가 조직 생존력에 관한 치료 효과에 의해 영향을 받지 않았다는 것이 입증되었다 (도 47). 100 μ M MK2i-NPs로 인간 복재 정맥의 치료는 IH의 *생체외* 장기 배양 모델에서 2 주에 걸쳐 신생내막 성장을 완전히 폐지하였다.

[0613] *MMI-0100 (MK2i)-NP 생체활성의 기계론적인 설명*

[0614] MK2i-NPs가 인간 정맥에서 IH를 감소시킨 기전을 설명하기 위해, hnRNP A0 및 CREB의 인산화는 웨스턴 블랏 분석을 이용하여 최초로 평가되었다. MK2, hnRNP A0의 다운스트림은 mRNA를 안정화시키고 염증성 사이토카인의 번역을 증가시키고 (S. Rousseau 등, EMBO J 21, 6505-6514 (2002); N. Ronkina 등, Biochem Pharmacol 80, 1915-1920 (2010); E. Hitti 등, Mol Cell Biol 26, 2399-2407 (2006)), 그리고 CREB는 하기를 유도하는 유전자의 발현을 촉진시키기 위해 cAMP-반응 요소에 결합한다: 평활근 세포 이동 (S. Jalvy 등, Circulation Research 100, 1292-1299 (2007); H. Ono 등, Arterioscl Throm Vas 24, 1634-1639 (2004)), 증식 (P. Molnar 등, J Cell Commun Signal 8, 29-37 (2014); K. Nakanishi 등, Journal of Vascular Surgery 57, 182-U254 (2013)), 및 염증성 사이토카인 예컨대 IL-6의 생산 (G. L. Lee 등, Arterioscl Throm Vas 32, 2751-(2012)). MMI-0100 (MK2i)-NPs는 HSV에서 hnRNP A0 및 CREB 인산화 모두를 유의미하게 감소시켰다 (도 37D,E). 상기 기전의 추가 지지에서, MK2i-NPs는 또한 안지오텐신-II 자극된 HCAVSMCs에서 *시험관내* 1차 hnRNP A0 표적 TNF α (S. Rousseau 등, EMBO J 21, 6505-6514 (2002))의 분비를 유의미하게 저해시켰다 (도 38A, 도 48). 상기 연구에서, MK2i-NPs는 NE-MK2i-NP에 등가인 TNF α 저해를 달성하였고 더 낮은 용량 (즉 100 μ M MMI-0100 (MK2i))에 등가인 효과를 생산한 10 μ M MMI-0100 (MK2i))의 자릿수에서 MK2i, 및 100 μ M MK2i-NPs는 안지오텐신 II-자

극된 TNF α 생산을 전체적으로 폐지하였다. MK2i-NPs가 TNF α -자극된 HCAVSMCs에서 IL-6, CREB 표적 유전자 (G. L. Lee 등, *Arterioscl Throm Vas* 32, 2751-+(2012))의 생산을 유의미하게 감소시켰음이 또한 확인되었다. 상기 연구는 또한 MK2i-NPs가 자유 MK2i보다 유의미하게 더욱 생물활성이었음을 보여주었다 (도 49). *시험관내* 치료의 어느 것도 미처리된 대조군에 비교된 1 및 14 일 후처리에서 조직 생존력에 의해 평가된 바와 같이 유의미한 독성을 초래하지 않았다 (도 50 및 51).

[0615] MK2i-NPs가, CREB와 함께, IH의 병리적 혈관 평활근 세포 이동 특징을 촉진시킨다고 여겨지는, HSP-27 (도 37D, F)의 인산화를 유의미하게 감소시켰음이 또한 확인되었다 (T. Zarubin 등, *Cell Res* 15, 11-18 (2005); H. F. Chen 등, *Mol Cell Biochem* 327, 1-6 (2009); L. B. Lopes 등, *J Vasc Surg* 52, 1596-1607 (2010)).

[0616] 케모카인 PDGF-BB의 존재하에 HCAVSMC 이동에 관한 MK2i-NPs의 효과는 스크래치 상처 케모카인성 및 Boyden 챔버 화학주성 이동 검정 모두를 이용하여 또한 *시험관내* 조사되었다 (도 38B, -D). MK2i-NPs는 세포 이동을 유의미하게 저해시켰고 자유 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드보다 더 낮은 용량의 자릿수에서 그렇게 하였다. MK2i-NPs는 HCAVSMC 증식에 유의미하게 영향을 미치지 않아, 이들 결과가 세포 성장에 관한 치료 효과에 기인되지 않았다는 것을 확인하였다(도 52). 추가로, MK2i-NPs는 혈관 평활근 (VSMC) 및 내피 세포 (EC) 이동 모두를 강력하게 저해시켰고(도 61a-d), MK2i-NPs는 자유 MK2i 펩타이드에 비교된 VSMC 이동 저해에서 유의미하게 더 강하였다(도 61a). 이들 결과는 인간 혈관 조직에서 검출된 HSP27 인산화 및 CREB의 MK2i-NP 저해와 상관하였다.

[0617] HSV에서 IH의 생체외 장기 배양 모델은 MK2i-NPs가 용량- 의존형 방식으로 그리고 자유 MK2i보다 더 낮은 펩타이드 용량의 자릿수에서 실행내막 형성을 유의미하게 저해시켰음이 또한 드러났다 (도 37b 및 c; 도 48-51).

[0618] 이들 연구는 MMI-0100 (MK2i)-NPs의 넓은 항-염증성 및 항-이동성 작용 기전을 또한 입증하였고(도 38) 다중 인자 기저 IH 발병을 저해하기 위해 p38-MK2 경로 표적화의 유용성을 확인하였다. MK2i-NPs는 MK2의 전-염증 매개체 활성화된 다운스트림 예컨대 hnRNP A0 및 CREB를 조절하는 것으로 보여졌다. MMI-0100 (MK2i)-NP는 인간 조직에서 hnRNP A0 인산화를 감소시켰고, 이는 *시험관내* 전-염증 사이토카인 TNF- α 및 IL-6의 안지오텐신-II 자극된 생산에서 감소에 상관하였다. MK2i-NPs는, 이동성 및 섬유성 근섬유아세포 표현형에 VSMC 전이를 유발하고 정맥 이식편 혈관수축을 일으키는, HSP27의 감소된 인산화에 의해 입증된 바와 같이, 인간 조직에서 이동-관련 경로를 조절하는 것으로 또한 보여졌다. HSP27의 효과는 세포골격 동력학의 조절을 통해 매개되고, 이는 병리적으로 관련된 자극 예컨대 안지오텐신 II 및 PDGF에 대해 이동에 영향을 미친다. 추가로, MK2i-NPs는 CREB 전사 인자의 인산화를 감소시켰고, 이는 VSMC 이동에 기인한다고 또한 공지되고 IH의 병리적 VSMC 표현형 특징으로 이어진다 (참고, 예를 들면, H.F. Chen 등, *Mol Cell Biochem* 327, 1-6 (2009); K. Nakanishi 등, *Journal of Vascular Surgery* 57, 182-U254 (2013); G. L. Lee 등, *Arterioscl Throm Vas* 32, 2751-+ (2012); L. C. Fuchs 등, *Am J Physiol-Reg I* 279, R492-R498 (2000)). HSP27 및 CREB의 활성화의 저해는 *시험관내* PDGF에 대해 감소된 VSMC 이동에 상관하였다.

[0619] MK2i의 세포내 반감기가 MK2i-NPs를 통해 전달된 경우 유의미하게 더 높았기 때문에, *시험관내* 생체활성 검정은 3 및 5 일 후처리에서 또한 수행되어 펩타이드 치료적 작용의 장수에 관한 NP 제형의 영향을 평가하였다. 세포내 반감기 계산에 따라서, 단백질 화학유인물질 단백질-1의 생산을 저해하는 자유 MK2i 펩타이드의 능력 (MCP-1, 양쪽 hnRNP A0를 통해 및 TNF α 에 의해 상향조절되는 것 (Rousseau S, Morrice N, Pegg M, Campbell DG, Gaestel M, Cohen P. sapk2a/p38의 저해는 mapkap-k2 및 사이토카인 mrnas와 이의 상호작용에 의해 hnRNP A0 인산화를 예방한다. *EMBO J.* 2002;21:6505-6514; Mueller L, von Seggern L, Schumacher J, Goumas F, Wilms C, Braun F, Broering DC. Tnf-알파는 결합조직 간 전이 및 정상 간 섬유아세포로부터 섬유아세포에서 il-6 및 MCP-1을 유사하게 유도시킨다. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;397:586-591) 및 정맥 이식편 내막 과다형성 (IH)에서 연루된 것 (Stark VK, Hoch JR, Warner TF, Hullett DA. 단백질 화학주성 단백질-1 발현은 정맥 이식편 내막 과다형성의 발달과 관련된다. *Arterioscl Throm Vas.* 1997;17:1614-1621)은 양쪽 혈관 평활근 세포 (VSMC) 및 내피 세포 (EC)에서 3 및 5 일 후처리에 유의미하게 감소되었다 (도 61f-g). 그에 반해서, MK2i-NPs는 양쪽 세포 유형에서 5 일 후처리에 지속된 저해 생체활성을 입증하였다. 또한, MK2i-NPs는 VSMC 이동 5 일 후처리의 유의미한 저해를 입증하였고 반면에 자유 MK2i 또는 NE-MK2i-NPs는 최소 효과를 보여주었다 (도 61h-i). 일 3 및 5 사이에서 항-염증성 및 항-이동성 활성의 감소는 자유 MK2i 펩타이드의 계산된 세포내 반감기와 상응하였다.

[0620] 이들 결과는 온전한, 인간 혈관 조직에서 MK2와 다운스트림 전-염증 및 프로-이동성 인자 hnRNP A0, CREB, 및 HSP27 사이의 관계를 확립한다. MK2i-NPs의 집단적인 항-염증성 및 항-이동성 작용은, 예를 들어, IH처럼, 세포 증식, 이동, 염증, 및 기질 합성의 복잡한 상호작용을 관여하는, 다인성 공정에 대해 상기 요법의 유용성을 강

조한다. (단순 혼합에 의해 형성된; 복잡한 합성, 콘주게이션, 또는 정제가 요구되지 않는) 상기 번역적으로-관련된 MK2i-NP 제형이 IH에서 관여된 다중 인자를 포괄적으로 표적하기 때문에, 더욱 좁은 작용 기전으로 선행 치료적 후보자의 부족분을 극복하는 포텐셜을 갖는다.

[0621] 토끼 정맥 이식 삽입 모델에서 생체내 생체활성

[0622] 생체내 MMI-0100 (MK2i)-NPs의 치료적 이점은 난류 혈류를 유도하기 위해 이식 IH를 촉진시키기 위해 폴리머 커프 방법을 사용하는 토끼 양측성 경정맥 이식편 삽입 이식 모델에서 평가되었다. 상기 모델에서, 경정맥 이식편은 생체의 30 분 동안 비히클 대조군에 주여지거나 또는 처리되었고, 이는 인간 혈관재생 절차 동안 이식편이 외식되는 시간의 양을 나타낸다. 이식편은 후-작동가능하게 28 일에서 수확되었고, VVG 염색된 조직학적 부분은 내막 두께 정량화를 위하여 사용되었다 (도 39A 및 도 62a). 30 μ M MMI-0100 (MK2i)-NPs로 처리는, 시험된 30 μ M 용량에서 비히클 대조군에 비해 신생내막 형성에서 임의의 유의미한 변화를 생산하지 않았던, 미처리된 대조군 및 자유 MMI-0100 (MK2i) 펩타이드 모두에 비교된 신생내막 형성을 유의미하게 저해시켰다 (도 39B 및 도 62b).

[0623] MK2i-NP 매개된 저해의 기저를 이루는 신생내막 증점체의 생체내 세포-기반 기전을 평가하기 위해, 증식 세포 핵 항원 (PCNA), α -평활근 액틴 (α -SMA), 및 비넨틴 염색된 조직학적 부분은 세포성 증식 및 혈관 평활근 세포 표현형을 분석하는데 사용되었다. 내막 PCNA 염색은 MK2i-NPs로 처리된 이식편에서 ~17배 만큼 유의미하게 감소되었고, 반면에 자유 MK2i로 처리는 미처리된 이식편에 유사하였다 (도 62c-d). MK2i-NP 처리된 이식편은, 미처리된 이식편 또는 자유 MK2i로 처리된 이식편에 비하여, 수축성 SMC 표현형에 대한 마커인, α -SMA에 대하여 증가된 염색 강도를 또한 입증하였다 (Rensen SSM, Doevendans PAFM, van Eys GJJM. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J.* 2007;15:100-108) (도 62f). α -SMA 면역염색된 부분의 이미지는 미처리된 및 자유 MK2i 치료 그룹이 여분의 내막 염색 (도 62e)을 보여주었음을 드러냈고, 수축성 VSMC 표현형의 손실 및/또는 세포의 기질 단백질의 과잉의 생산을 나타내고, 이 둘 모두는 정맥 이식편 IH에서 연루된다. 증가된 수축성 마커 발현에 따라서, 합성 VSMC 마커 비넨틴의 내막 발현은 MK2i-NP 처리된 이식편에서 또한 감소되었지만 자유 MK2i 펩타이드로 처리된 이식편에서는 아니었다 (도 62g-h).

[0624] 28-일 이식후 정맥 이식편의 내막에 존재하는 잔류 염증성 세포의 수는 토끼 대식세포 특이적 항체, RAM-11을 이용하여 조직 부분에서 평가되었다 (도 39C, 도 53 및 도 63). 유의미하게 덜한 내막 대식세포는 MK2i-NP 처리된 이식편에서 검출되었고, MK2i-NPs가 국부 대식세포 동원 및/또는 지속성을 둔화시켰음을 시사하였다 (도 39D). 상기 기전은 대식세포 염증성 단백질 2 (MIP-2, CXCL2로도 공지됨) 및/또는 단핵구 화학유인물질 단백질-1 (MCP-1)의 감소된 분비를 통해 잠재적으로 매개되고 (A. Muto 등, *Vascul Pharmacol* 56, 47-55 (2012)), 이 둘 모두는 염증성 세포를 유인하고 hnRNP A0를 통해 직접적으로 또는 간접적으로 상향조절된다 (S. Rousseau 등, *EMBO J* 21, 6505-6514 (2002); L. Mueller 등, *Biochem Biophys Res Commun* 397, 586-591 (2010); R. N. Mitchell 등, *Circ Res* 100, 967-978 (2007)). MK2i-NPs가 평활근 및 내피 세포 모두에서 MCP-1 생산을 저해하였음을 보여주는 우리의 시험관내 연구 결과는 상기 기전을 뒷받침한다. 염증성 반응이 28-일에 모든 샘플에서 두드러지게 분할되었어도, 미처리된 샘플에서 대식세포 지속성은 MCP-1이 정맥 그래프팅 이후 심지어 8 주에서 상승될 있다는 이전의 관찰과 일치하여, IH의 발병 및 단핵구의 국부 동원을 초래한다 (V. K. Stark 등, *Arterioscl Throm Vas* 17, 1614-1621 (1997)). 100 μ M MK2i-NPs를 이용한 치료는 토끼 이식 모델에서 2 주에 걸쳐 신생내막 성장을 완전히 폐지하였다. 30 μ M MK2i-NPs를 이용한 수술중 치료는 4 주 이식후 이식편에서 대식세포의 수 및 IH의 정도를 유의미하게 감소시켰다 (도 39).

[0625] 실시예 4. MK2i-NPs 및 p-Hsp20-NPs의 합성, 특성규명 및 최적화

[0626] 서열 YARAAARQARA-KALARQLGVAA (서열 식별 번호: 1)을 가진 MK2i 펩타이드 및 서열 YARAAARQARA-WLRRAsAPLPGLK (서열 식별 번호: 27)을 가진 p-HSP20 펩타이드는 고상 합성을 통해 합성되었고, 순도는 전기분무-이온화 질량 분광분석법을 통해 확인되었다 (도 64). 가역적 부가 단편화 사슬 전달 (RAFT) 중합은 폴리(프로필아크릴산) (PPAA) [DP = 193 (GPC), DP = 190 (1 H NMR), PDI = 1.47 (GPC)]을 합성하는데 이용되었다. NPs는, 펩타이드상에 존재하는 1차 아민 (아미노산 잔기에 따라 pKa~9-12)과 PPAA 폴리머내 카복실산 모이어티 (pKa~6.7)의 pKa 값 사이인, pH 8.0에서 PBS내 p-HSP20 펩타이드 또는 MK2i와 PPAA 호모폴리머의 단순 혼합에 의해 형성되었고; 이는 정전기 착화를 용이하게 하기 위해 양쪽 분자 상에서 최적의 용해도 및 순전하를 보장한다.

[0627] 나노입자 제형 조건의 영향을 평가하기 위해, 일련의 MK2i-NPs 및 p-HSP20-NPs는 전하비 [ζ CR = ($[\text{NH}_3^+]_{\text{MK2i}}$ /

p-HSP20-[COO⁻]_{PPAA})의 범위에서 제조하였고, 크기 분포 및 입자 표면 전하는 동적 광 산란 (DLS) 및 ζ-포텐셜 분석, 각각을 통해 특성규명되었다. 예상대로, MK2i-NP 및 p-HSP20-NP ζ-포텐셜은 CR에 직접적으로 비례하였다 (도 65A, 66A). CR은 NP 크기에 또한 유의미하게 영향을 미쳤고, CRs의 협소한 범위는 단봉 크기 분포 (즉 MK2i-NPs에 대하여 CR = 1:2 및 1:3 (표 24) 및 p-HSP20-NPs에 대하여 CR = 3:1, (표 25)를 수득하였다. 1:3의 CR은 MK2i-NP 제형에 대하여 후속의 연구에서 이용되었고, 3:1의 CR은 p-HSP20-NP 제형에 대하여 이용되었고; 이들 전하비는 최소 입자 크기 및 다분산도를 가진 단봉 크기 분포 (MK2i-NP $d_h=119 \pm 28$ nm, $\zeta = -11.9 \pm 3.2$ mV, 도 65B; p-HSP20-NP $d_h=141 \pm 6$ nm, $\zeta = -7.5 \pm 2.8$ mV, 도 66B)를 일관되게 수득하였다. 2개 펩타이드 사이에서 단봉 입자를 생산한 전하비에서 상기 차이는 펩타이드 크기, 전하 분포, 서열 소수성, 또는 2차 구조에서 차이에 기인될 수 있고, 펩타이드의 더 넓은 라이브러리의 미래의 분석은 이들 제형의 구조-기능 관계를 더 양호하게 이해하는데 요구될 것이다. 흥미롭게도, 모든 최적의 NP 제형은 음성 ζ-포텐셜을 입증하였고, 양이온성 펩타이드가 나노폴리플렉스의 코어에서 격리되고 음이온성 PPAA 폴리머가 입자 표면에 더욱 우선적으로 국재화되는 것을 나타낸다. 선도적인 MK2i-NP 및 p-HSP20-NP 제형은, DLS 결과에 있어서 크기 분포를 가진 나노-구조의 존재를 확인한, TEM 화상형성 (도 65C, 66C)을 통해 또한 특성규명되었다. 후속의 시험관내 및 생체외 연구를 위하여, 이들 선도 NP 제형 (도. 65D, 66D)은 상응하는 자유 펩타이드에 비교되었다.

표 24. DLS 분석에 의해 측정된 바와 같이 상이한 전하비 ([NH₃⁺]/[COO⁻])에서 제조된 MK2i-NPs의 크기 요약

NH ₃ ⁺ :COO ⁻	Z-평균 직경 (nm)	PDI
10:1	10.32 ± 2.63*	0.314
2:1	52.1 ± 46.86*	0.297
1:1	970.6 ± 662.4*	0.41
1:1.5	465.1 ± 138.4*	0.5465
1:2	474.2 ± 32.59	0.239
1:3	118.8 ± 26.76	0.271
1:4	607.4 ± 285.2*	0.662
1:5	213.0 ± 67.95*	0.407
1:10	21.57 ± 9.89*	0.355

별표 (*)는 다중봉 크기 분포 (존재한 다중 피크)를 나타낸다.

1:3의 CR은 선두 MK2i-NP 제형으로서 선택되었다.

[0628]

표 25. DLS 분석에 의해 측정된 바와 같이 상이한 전하비

($[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-]$)에서 제조된 p-HSP20-NPs의 크기 요약

$\text{NH}_3^+:\text{COO}^-$	Z-평균 직경 (nm)	PDI
10:1	$659.4 \pm 293.7^*$	0.594
5:1	$238.3 \pm 38.13^*$	0.574
4:1	$169.1 \pm 2.501^*$	0.591
3:1	141.0 ± 5.783	0.207
2:1	$369.3 \pm 69.83^*$	0.554
1:1	$1018 \pm 786.6^*$	0.903
1:2	$1321 \pm 1430^*$	0.662
1:3	$1369 \pm 255.9^*$	0.750
1:4	$1772 \pm 513^*$	0.470
1:5	$1496 \pm 602.9^*$	0.429
1:10	4246 ± 4428	0.741

별표(*)는 다중봉 크기 분포 (존재한 다중 피크)를 나타낸다.

3:1의 CR은 선두 p-HSP20-NP 제형으로서 선택되었다.

[0629]

[0630]

실시예 5. NP 시험관내 생체적합성, 흡수, 체류, 이동조절 및 생체활성

[0631]

선도 후보자 MK2i-NP 및 HSP20-NP 제형의 생체적합성은 시험관내 인간 관상동맥 혈관 평활근 세포 (HCAVSMCs)에서 용량 (10 - 500 μM 펩타이드)의 범위로 상응하는 자유 펩타이드에 비교되었다. HCAVSMCs는 2 시간 동안 처리되었고 그 다음 세포독성 검정의 실시예 앞서 24 시간 동안 신선한 배지에서 인큐베이션되었다. 유의미한 세포독성은 시험된 모든 농도에서 MK2i-NPs에 대하여 명백하지 않았고, 반면에 자유 MK2i 펩타이드는 시험된 최고 용량에서 온화한 독성을 입증하였다 (500 μM 에서 76% 세포 생존력, 도 67). HSP20-NPs 및 HSP20 펩타이드는 500 μM 에서 검출된 온화한 세포독성을 예외로 생체적합성이라는 것이 밝혀졌다 (p-HSP20-NPs 및 자유 p-HSP20 펩타이드, 각각에 대하여 60% 및 77% 생존력).

[0632]

MK2i-NP 및 p-HSP20-NP 흡수 및 세포내 체류의 양은 경시적으로 30 분 동안 처리된 HCAVSMCs의 유세포측정 분석을 통해 평가되었고, 세정되었고, 0 또는 3 일 동안 신선한 배지에서 유지되었다. 흡수에서 자릿수 이상의 증가 (MK2i 흡수에서 ~70-배수 증가 및 p-HSP20 흡수에서 ~35-배수 증가)는 NPs에 편입된 경우 모든 펩타이드에 대하여 검출되었다 (도 68). 모든 NP 제형의 음성 ζ -포텐셜이 PPAA 폴리머가 NP 표면에서 주로 노출되는 것을 나타내기 때문에, 흡수에서 상기 증가는 pH-반응성 폴리머에 의해 용이하게 될 것 같다. 더 구체적으로, 프로필 모이어티의 α -알킬 치환은 친유성/소수성 특징을 PPAA에 부여하여, 흡수에서 관측된 차이가 세포 막과 NPs의 증가된 소수성 상호작용의 결과일 수 있다는 것을 시사한다. 증가된 흡수에 더하여, MK2i-NPs 또는 p-HSP20-NPs로 처리된 HCAVSMCs는 자유 MK2i 또는 p-HSP20 펩타이드에 비교된 치료 제거 3 일 이후 증가된 세포내 펩타이드 체류를 입증하였다 (MK2i-NPs 대 자유 MK2i에 대하여 잔류하는 초기 흡수의 82% 대 54%, 도 4A, E; p-HSP20-NPs 대 자유 p-HSP20의 70% 대 35% 체류, 도 68B, F). 생물활성 화물의 세포내 체류는 온전한 펩타이드의 토세포현상 감소 및/또는 산성 엔도-리소좀 구획 18, 35에서 펩타이드의 분해 감소에 의해 개선될 수 있다. PPAA 폴리머가 명확한 pH-의존형 엔도솜분해적 활성 36, 37을 가짐에 따라, 동물 모델 38에서 생체적합성을 이전에 입증하였음에 따라, 그리고 스트렙타비딘 링커 39를 통해 펩타이드에 PPAA 폴리머의 다단계 바이오콘주게이션을 통한 세포자멸 유도 항암 펩타이드의 세포내 전달에 적용됨에 따라, 이들 최적화된 NP 제형은 세포질 펩타이드 전달을 용이하게 하기 위해 엔도-리소좀 이동조절 경로에서 마주치는 감소된 pH에 반응하도록 의도적으로 설계된다. 따라서, 간소화한 정전기 착화 접근법은 이들 연구에서 치료적 엔도솜 누출 및 체류를 용이하게 하기 위해 PPAA 폴리머를 편입하여 이용되었다: PPAA는 생리적 pH에서 이온화된, 팽창된 형태부터 산성/엔도솜 조건에서 붕괴된, 소수성 구상 형태까지 전이를 경험한다. 상기 전이는 엔도솜 막 및 궁극적으로 엔도솜 누출에서 지질과 소수성 상호작용을 초래하고 치료적 펩타이드 화물의 세포내 체류 및 생체활성을 개선하였다.

[0633]

NP 제형을 통해 전달된 펩타이드의 증가된 펩타이드 세포내 체류와 엔도솜 누출 사이의 연결을 조사하기 위해, 디기토닌-기반된, 세미-투과화 기술 40은 NP 및 자유 펩타이드 처리된 HCAVSMCs에 대하여 세포질 및 소포-결합된 펩타이드의 상대량 측정에 적용되었고 최적화되었다 (도 69A). 디기토닌은, 최적화된 조건 하에서, 세포 막

의 선택적 세미-투과화를 초래하면서 세포내 세포소기관 (예를 들면, 엔도솜 및 리소솜)을 온전하게 이탈시키는 비-이온성 세제이다. 최적화된 세미-투과화 절차는 병상에서 10분 동안 디기토닌의 농도 범위로 인큐베이션된 HCAVSMCs로부터 "세포질" 및 "세포소기관" 분획에서 (사이토솔에 국재화되도록 공지된) LDH 양을 측정함으로써 결정되었다. (도 70). 최적화된 세미-투과화 프로토콜을 이용하여 수집된 세포질 및 세포소기관 분획의 웨스턴 블랏 분석은 엔도-리소솜 마커 초기 엔도솜 항원 1 (EEA1) 및 리소솜-관련된 단백질 1 (LAMP1, 도 69B)로부터 세포질 단백질 미토젠-활성화된 단백질 키나제 키나제 1/2 (MEK1/2) 및 글리세르알데하이드 3-인산염 탈수소효소 (GAPDH)의 유효한 분리를 확인하였다. 형광 표지된 MK2i 및 p-HSP20 펩타이드의 이용은 그의 유리 형태에서 대 NP 제형을 통해 전달 이후 모든 펩타이드의 세포내 분포의 정량화를 허용하였다. 상기 분석은 NPs로 제형이 펩타이드 흡수를 증가시켰을 뿐만 아니라 사이토솔에서 내재화된 펩타이드의 분획을 유의미하게 증가시켰음을 확인하였고; 순 효과는 세포질 MK2i 전달에서 대략 8-배수 증가 및 세포질 p-HSP20 전달에서 ~29-배수 증가이었다 (도 69C, D). 증가된 세포질 펩타이드 전달이 NP 제형에서 PPAA의 pH-의존형 막 분열성 활성화에 의해 용이하게 되는 것을 확인하기 위해, 세포는 엔도-리소솜 산성화를 예방하기 위해 액포-유형 H+ ATPase 저해제 바필로마이신 A1의 존재하에 NPs로 처리되었다. 엔도솜 산성화 예방은 모든 NP 제형에 대하여 사이토솔에서 내재화된 펩타이드의 분획을 현저하게 감소시켰고, 엔도솜으로부터 NP 누출의 기전이 pH-의존형이라는 것을 확인하였다 (도 69C, D). 바필로마이신 치료는 내재화된 자유 MK2i 또는 p-HSP20 펩타이드의 세포질 분획에 관해 무시해도 좋은 효과를 갖는다는 것이 밝혀졌다 (데이터 도시되지 않음: MK2i: $9.64\% \pm 8.17\%$ 세포질, p-HSP20: $7.36\% \pm 8.28\%$ 세포질).

[0634] F-액틴 스트레스 섬유 형성의 MK2i-NP 및 p-HSP20-NP 매개된 저해의 효능은 안지오텐신-II (ANG II) 자극된 HCAVSMCs에서 정량화되었다. 모든 NP 제형은 세포 당 스트레스 섬유의 평균 수에서 유의미한 감소에 의해 측정된 바와 같이 펩타이드 기능성 생체활성을 향상시켰다 (도 71A). 정성적으로, NP 제형 및 ANG II로 처리된 HCAVSMCs는 미자극된 대조군 세포와 일치된 세포 형태학 및 염색을 표시하였고, 반면에 자유 펩타이드로 처리된 HCAVSMCs는 ANG II-자극된 대조군 세포에 유사한 스트레스 섬유 형성을 입증하였다 (도 71B). 세포 당 F-액틴의 총 양은, 섬유상 그러나 구상이 아닌 액틴에 선택적으로 결합하는 염색인, Alexa-488 팔로이딘을 이용하여 또한 정량화되었다 (도 72 및 73). 상기 분석은 세포 당 스트레스 섬유의 수의 정량화와 일치하였고 NPs로 제형이 모든 펩타이드의 스트레스 섬유 저해된 활성을 유의미하게 향상시켰음이 드러났다.

[0635] 실시예 6. 인간 혈관 조직에서 평활근 생리학에 관한 NP 효과

[0636] 인간 혈관 조직에서 평활근 생리학에 관한 MK2i-NP 및 p-HSP20-NP 제형의 효과는 혈관경련용 잠재적 치료로서 이들 제형을 평가하기 위해 사정되었다. 이들 연구를 위하여, 인간 복재 정맥 (HSV)은 바이패스 이식술 수술을 경험하는 동의한 환자로부터 수집되었고 고리로 절단되었다. 근육 배스에서 KCL 도전을 통한 생존력 확인 이후, 페닐에프린 (PE) 유도된 혈관수축을 저해하기 위한 각 NP 제형의 능력은 힘 변환기가 구비된 장기 수조 시스템을 이용하여 HSV 고리에서 측정되었다. 혈관이 수축, 이완, 처리, 및 그 다음 재차 수축되는 실험 설계에서, 미처리된 대조군 HSV 고리는 초기 수축에 비해 PE 유도된 수축의 제2 라운드에서 변화 없음을 표시하였다. 그러나, MK2i 또는 p-HSP20 펩타이드로 중간 처리는 제2 PE-유도된 HSV 수축을 유의미하게 저해시켰다 (도 74A-C). *시험관내* F-액틴 스트레스 섬유 결과와 일치로, NP 제형을 통해 전달된 펩타이드의 동등 용량은 자유 펩타이드에 비교된 수축의 유의미하게 향상된 펩타이드-매개된 저해를 입증하였다 (도 74C). 현저히, 투여된 최고 NP 용량에 등가인 자유 PPAA 폴리머의 용량으로 처리는 향상된 저해된 활성이 펩타이드 생체활성의 향상을 통해 매개되고 엔도솜분해적 폴리머 캐리어의 비-특이적 효과가 아니라는 것을 나타내는 PE-유도된 HSV 수축 (도 74B)에 관한 무시해도 좋은 효과를 보여주었다. 혈관수축을 강력하게 저해하는 펩타이드-NPs의 상기 능력은 적용 예컨대 관상동맥 또는 주변 바이패스 이식술에서 혈관경련을 예방하기 위한 예방적 접근법으로서 이들 제형의 번역 포텐셜을 입증한다.

[0637] 예방적 요법으로서 이들 NP 제형의 효능의 시험에 더하여, 나트륨 니트로프루시드 (SNP) 유도된 혈관이완을 향상시키는 MK2i- 및 p-HSP20-NPs의 능력은 실행가능한 HSV 외식편에서 (예를 들면, SAH 유도된 혈관경련을 치료하기 위한) 포텐셜 유익한 치료적 개입으로서 평가되었다 (도 74D). 재차, 모든 NP 제형은 시험된 모든 농도에서 SNP-유도된 혈관이완을 촉진시키는 향상된 능력을 입증하였지만 (도 74E, F) 반면에 PPAA 폴리머 단독으로 처리된 미처리된 HSV 또는 HSV는 혈관이완에서 무시해도 좋은 차이를 보여주었다 (도 74E). MK2i-NP 및 p-HSP20-NP 제형이 별도 분자 기전을 통해 혈관이완을 유발시키기 때문에, NP 제형에 모든 펩타이드의 조합이 미래의 연구에 대하여 유망한 접근법을 나타내는 것은 더 낮은 펩타이드 용량에서 치료적 이점을 생산하는 상승작용 효과를 달성할 수 있기 때문이다.

[0638] 인간 조직에서 평활근 생리학 결과와 F-액틴 스트레스 섬유 형성의 상관관계를 정성적으로 사정하기 위해, HSV

고리는 자유 펩타이드 또는 NP 제형으로 전처리되었고 그 다음 Alexa-488 팔로이딘으로 F-액틴 염색에 앞서 ANG II로 자극되었다 (도 74G). 평활근 생리학 결과에 따라, NP 제형으로 처리된 HSV 고리는 자유 펩타이드로 처리된 HSV와 비교하여 줄어든 팔로이딘 염색을 보여주었다. 전적으로, 이들 결과는 MK2i- 및 p-HSP20-NPs가 인간 평활근 조직에서 액틴 동력학을 조절함으로써 혈관이완을 촉진시키는 및 혈관수축을 저해하는 MK2i 및 p-HSP20 펩타이드의 능력을 유의미하게 향상시키는 것을 나타낸다.

[0639] 상기 제시된 실험의 결과는 세포 및 조직 전달, 생체활성, 및 치료적 펩타이드 예컨대 MMI-0100 (MK2i)의 세포 내 약동학을 향상시키는 나노기술의 잠재적 용도를 확립한다. 일반적으로, CPPs는 고도로 양이온성이고, 따라서, PPAA와 착화는 치료적 펩타이드의 세포내 전달을 용이하게 하는 일반화된 플랫폼 생명공학으로서 잠재적으로 작용할 수 있다.

[0640] **실시예 7. 용액내 MMI-0100의 검정 및 순도 결정용 HPLC 방법**

[0641] 본 연구의 목적은, 다른 것 중에서, 칼럼 세정 단계, 용출 구배, 정확성 (주입 반복성) 및 선형성을 평가함으로써 용액내 MMI-0100의 검정 및 순도 결정용 HPLC 방법을 평가 및 최적화하는 것이었다.

[0642] 사용된 HPLC 방법 조건은 표 26에서 열거된다.

표 26. HPLC 방법 조건

칼럼	Grace, Vydec C18, 5 μ m, 300 Å, 4.6 x 250 mm, 폴리머성, PN: 사전-칼럼 필터를 가진 218TP54		
이동상 (MP)	MP A: DI 수내 0.1% TFA MP B: 1:1 메탄올: 아세토니트릴 (v/v)내 0.1% TFA (0.8 μ m 막을 통해 여과된 MP A)		
구배	시간 (분)	% MP A	% MP B
	0	85	15
	5.5	78	22
	35	57	43
	40	57	43
	42	10	90
	45	10	90
	47	85	15
	55	85	15
유속	1.0 mL/분		
검출 파장	자외선 (UV): 215 nm		
컬럼 온도	25°C		
샘플 온도	5°C		
주입 용량	20 μ L		
운영 시간	64 min		
HPLC 표준 및 샘플 희석제 (“희석제”)	물내 Tween 20, 0.02% (v/v)		

[0643]

[0644] 다수의 제형을 가진 깨끗한 칼럼을 유지하기 위해, 칼럼 세정 단계 (42-45 분)는 7분만큼 확장되었다 (42에서 52분). 따라서, 칼럼 평형 단계는 2분만큼 증가되었다 (47-55분에서 54-64분). MMI-0100 용출하는 용출 조건은 변화되지 않았다 (예를 들면 0-40분). 최적화된 구배는 표 27에 열거된다.

표 27. 최적화된 HPLC 구배

최적화된 구배	시간 (분)	% MP A	% MP B
	0	85	15
	5.5	78	22
	35	57	43
	40	57	43
	42	10	90
	52	10	90
	54	85	15
	64	85	15

1 mg/mL에서 회석제 및 MMI-0100 표준의 대표적인 HPLC 크로마토그램은 도 77 A 및 B 각각에서 보여진다.

정확성

정확성 (또는 주입 반복성)은 총 6 연속 주입에 대하여 HPLC상에 0.02% Tween 20에서 1.1 mg/mL MMI-0100을 함유한 용액을 주입함으로써 평가되었다. MMI-0100 피크용 체류 시간 (RT), 피크 면적, 테일링 인자 및 이론적 플레이트는 각 주입에 대하여 기록되었고 그의 각각의 상대 표준 편차 (RSDs)는 계산되었다. 정확성 시험 결과는 표 28에서 보여진다. RT에 대한 RSD 및 6개 주입으로부터 반응 인자는 2% 미만이었고, 방법이 정확성/주입 반복성 시험 기준을 충족시키는 것을 나타낸다.

표 28. 정밀 (주입 반복성) 시험 결과

Inj #	RT	PA	RF	테일링 (USP)	이론적 플레이트 (1/2 폭 방법)
1	25.21	12296	11032	2.588	21997
2	25.21	12283	11020	2.617	22756
3	25.19	12262	11002	2.584	21606
4	25.17	12228	10971	2.602	22301
5	25.16	12190	10937	2.625	22287
6	25.15	12191	10938	2.582	22272
AVG	25.18	12242	10983	2.600	22203
RSD (%)	0.1	0.4	0.4	0.7	1.7

선형성

선형성 시험 용액은 일련의 회석을 가진 MMI-0100의 모액을 이용하여 제조되었다. MMI-0100의 모액은 1.9 mg/mL (1.1 mg/mL의 명목 농도의 167%)에서 제조되었다.

실제의 스톱 제조:

(24.0 mg의 MMI-0100) * (CoA 0.774로부터 펩타이드 함량) / (10 mL 매스 플라스크).

선형성 용액 제조는 표 29에서 설명된다. 선형성 시험 결과는 표 30 및 도 78에서 보여진다. 도 78은 MMI-0100 농도 대 피크 면적의 선형성 플롯을 나타낸다. Y-절편 바이어스는 식 $(y-int)/(100\% \text{ 명목 농도에 대한 평균 피크 면적}) \times 100$ ($62.339/12242 \times 100 = 0.5\%$)을 이용하여 0.5%인 것으로 계산되었다. 선형성에 대하여, 허용가능한 상관관계 계수 (R^2) 값은 정의된 범위에서 > 0.995 이고 y-절편 바이어스는 명목 농도에서 수득된 피크 면적의 $\leq 5\%$ 이어야 한다. 수득된 선형성 시험 결과는 R^2 및 y-절편 시험 기준을 충족시킨다 (표 30 및 도 78).

표 29. 선형성 용액 제조

ID #	전달된 용액	용액 용적 (mL)	총 용적 (mL)	농도 (mg/mL)	% 명목
스톡				1.86	167
선형성 #1	스톡	4	5	1.49	133
선형성 #2	스톡	3	5	1.11	100
선형성 #3	선형성 #1	3	5	0.89	80
선형성 #4	선형성 #3	3	5	0.53	48
선형성 #5	선형성 #4	1	2	0.27	24

표 30.

농도 (mg/mL)	% 명목	RT	PA	반응 지수	명목 농도로부터 RF 차이 (%)
0.27	24	25.59	2822	10550	96
0.53	48	25.45	5795	10983	100
0.89	80	25.30	9837	11032	100
1.11	100	25.18	12242	10983	100
1.49	133	25.06	16167	10879	99
1.86	167	24.95	19958	10744	98

실시예 8. pH 범위 4-8의 다양한 완충액에서 MMI-0100의 열-가속화된 안정성 연구

본 연구의 목적은 pH-안정성 프로파일 MMI-0100을 생성하는 것, 선택 완충액에서 5.5. mg/mL에 MMI-0100의 용해도를 결정하는 것, pH_{max} (MMI-0100이 가장 안정적인 pH)를 결정하는 것, pH_{max}에서 불순물 프로파일을 생성하는 것, 실온 및 2-8℃에서 장기 예측 또는 동결건조가 안정성을 유지하는데 필요한지를 결정하는 것, MMI-0100에 대하여 더 나은 용해도 및 안정성을 제공하는 것을 결정하기 위해 완충된 용액과 DI수를 비교하는 것 및 5.5 mg/mL에서 MMI-0100의 임의의 겔보기 점도 변화 또는 겔화를 관찰하는 것이었다.

제조된 및 시험된 MMI-0100 제형은 표 31에서 열거된다.

표 31. MMI-0100 제형

ID	사용된 완충액 스톡	표적 pH	MMI-0100 (% w/w)	최종 완충액 농도 (% w/w)	완충액 IIL 한계* (% w/w)
T-1	100 mM 시트르산	4	0.55	0.11	0.44
T-2	100 mM 시트르산	5	0.55	0.11	0.44
T-3	100 mM 시트르산	6	0.55	0.11	0.44
T-4	100 mM 시트르산	6.5	0.55	0.11	0.44
T-5	pH 조정용 DI 수 + NaOH/HCl	7	0.55	NA	NA
T-6	pH 조정용 50 mM 인산 + NaOH	7	0.55	0.05	NA
T-7	pH 조정용 0.9% NaCl + NaOH/HCl	7	0.55	NA	NA
T-8	L-라이신 일수화물	8	0.55	0.08	5.25

0.4 mL의 각 MMI-0100 제형은 HPLC 바이알 (총 5 바이알 / 각 조성물)에 충전되었고 표 32에 기재된 바와 같이 안정성있게 배치되었다.

표 32. 안정성 조건

조건	바이알 #	시험 계획
2-8°C	1	“초기”로서 시험
2-8°C (여과된 0.22 μm)	2	24 시간 동안 2-8°C 에서 보관; 0.22 μm SpinX 를 이용한 여과; HPLC 에 의해 시험된 여과물
25°C	3	7 및 14 일
40°C	4	1, 2, 7 및 14 일
60°C	5	1, 2 및 7 일

[0662]

[0663]

안정성 샘플의 시험은 pH (초기 단독), 외관, HPLC 검정 및 불순물을 포함하였다. 결과는 표 33-49에서 나타난다. CC = 맑은 및 무색.

표 33. 초기 pH 및 외관

제형 ID	초기 pH	외관			
		초기	2-8°C (여과된), 24 hr	25°C x 7d	25°C x 14d
T-1	4.1	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-2	5.0	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-3	6.0	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-4	6.6	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-5	7.0	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-6	6.9	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-7	7.1	CC 액체	변화 없음	약간 흐림	약간 흐림
T-8	7.9	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음

표 34. 외관

제형 ID	외관				
	초기	40°C x 1d	40°C x 2d	40°C x 7d	40°C x 14d
T-1	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-2	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-3	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-4	CC 액체	변화 없음	변화 없음	약간 흐림	약간 흐림
T-5	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-6	CC 액체	변화 없음	변화 없음	약간 갈색	약간 갈색
T-7	CC 액체	변화 없음	변화 없음	약간 흐림	약간 흐림
T-8	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음

표 35. 외관

제형 ID	외관			
	초기	60°C x 1d	60°C x 2d	60°C x 7d
T-1	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-2	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-3	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-4	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-5	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-6	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음
T-7	CC 액체	변화 없음	변화 없음	약간 흐림
T-8	CC 액체	변화 없음	변화 없음	변화 없음

[0664]

표 36. 검정 농도

제형 ID	검정 (농도 (mg/mL))			
	초기	2-8°C 여과된	25°C 7d	25°C 14d
T-1	5.45	5.42	5.41	5.39
T-2	5.64	5.66	5.49	5.55
T-3	5.57	5.57	5.48	5.50
T-4	5.48	5.42	5.32	5.25
T-5	6.05	6.07	5.98	5.92
T-6	5.72	5.66	5.49	4.93
T-7	5.38	5.27	0.98	0
T-8	5.50	5.44	5.36	5.04

표 37. 검정 농도

제형 ID	검정 (농도 (mg/mL))				
	초기	40°C 1d	40°C 2d	40°C 7d	40°C 14d
T-1	5.45	5.48	5.45	5.23	5.14
T-2	5.64	5.76	5.55	5.48	5.48
T-3	5.57	5.56	5.58	5.33	5.35
T-4	5.48	5.49	5.38	4.49	3.64
T-5	6.05	6.04	6.08	6.12	6.00
T-6	5.72	5.70	5.72	0	0
T-7	5.38	5.21	5.21	5.04	5.00
T-8	5.50	5.26	5.46	5.13	5.03

표 38. 검정 농도

제형 ID	검정 (농도 (mg/mL))			
	초기	60°C 1d	60°C 2d	60°C 7d
T-1	5.45	5.42	5.35	4.73
T-2	5.64	5.69	5.55	5.08
T-3	5.57	5.53	5.47	5.06
T-4	5.48	5.36	5.28	4.98
T-5	6.05	6.02	5.91	5.64
T-6	5.72	5.38	5.55	5.18
T-7	5.38	5.37	5.19	4.68
T-8	5.50	5.14	5.12	3.79

표 39. 검정 회수

제형 ID	검정 회수 (% 농도 over 초기 농도)			
	초기	2-8°C Filtered	25°C 7d	25°C 14d
T-1	100	99	99	99
T-2	100	100	97	99
T-3	100	100	98	99
T-4	100	99	97	96
T-5	100	100	99	98
T-6	100	99	96	87
T-7	100	98	18	0
T-8	100	99	97	92

[0665]

표 40. 검정 회수

제형 ID	검정 회수 (% 농도 대 초기 농도)				
	초기	40°C 1d	40°C 2d	40°C 7d	40°C 14d
T-1	100	100	100	96	95
T-2	100	102	98	97	98
T-3	100	100	100	96	96
T-4	100	100	98	82	67
T-5	100	100	101	101	100
T-6	100	100	100	0	0
T-7	100	97	97	94	93
T-8	100	96	99	93	91

표 41. 검정 회수

제형 ID	검정 회수 (% 농도 대 초기 농도)			
	초기	60°C 1d	60°C 2d	60°C 7d
T-1	100	100	98	87
T-2	100	101	98	90
T-3	100	99	98	91
T-4	100	98	96	91
T-5	100	99	98	93
T-6	100	97	97	91
T-7	100	100	96	87
T-8	100	94	93	69

표 42. pH 4 에 대한 불순물 프로파일

RT (min)	RRT	T=0	여과물	T=1d		T=2d		T=7d			T=14d	
				40°C	60°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C	25°C	40°C
25.14	1.00	99.07	99.06	98.66	97.47	98.17	96.40	98.63	96.44	91.31	98.00	94.84
18.36	0.69	ND	ND	ND	ND	0.31	ND	0.35	1.63	ND	0.77	2.20
21.61	0.83	ND	ND	0.35	0.29	0.32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22.78	0.90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.23	ND	ND
23.76	0.94	0.23	0.34	0.34	0.37	0.24	0.27	0.27	0.32	0.32	0.28	0.25
26.44	1.06	0.04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26.74	1.07	0.16	0.16	ND	0.18	0.10	0.14	0.18	0.19	ND	0.16	0.10
27.34	1.10	0.17	0.21	0.16	0.19	0.17	0.23	0.13	0.15	0.18	0.16	0.18
28.21	1.14	0.14	0.12	0.23	0.23	0.14	0.45	0.23	0.15	0.77	0.17	0.38
28.52	1.15	0.20	0.11	ND	ND	0.17	0.37	ND	0.15	0.37	ND	0.29
28.78	1.16	ND	ND	0.26	0.26	ND	ND	0.21	ND	ND	0.21	ND
29.99	1.21	ND	ND	ND	0.19	ND	0.53	ND	ND	ND	ND	ND
30.23	1.22	ND	ND	ND	0.81	0.36	1.61	ND	0.97	6.82	0.25	1.76
총 불순물		0.93	0.94	1.34	2.53	1.83	3.60	1.37	3.56	8.69	2.00	5.16

[0666]

표 43. pH 5 에 대한 불순물 프로파일

RT (분)	RRT	T=0	여과물	T=1d		T=2d		T=7d			T=14d	
				40°C	60°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C	25°C	40°C
25.20	1.00	99.09	98.86	98.86	98.22	98.44	97.68	98.84	97.71	94.25	98.01	96.63
18.41	0.70	ND	ND	ND	ND	0.24	ND	0.20	0.37	ND	0.41	0.95
21.63	0.84	ND	ND	ND	0.39	0.20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22.79	0.90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.35	ND	ND
23.83	0.95	0.29	0.32	0.34	0.38	0.28	0.31	0.28	0.29	0.37	0.28	0.30
26.80	1.06	0.14	0.20	0.19	ND	0.19	0.19	0.10	0.26	0.11	0.16	0.11
27.40	1.09	0.19	0.22	0.16	0.15	0.16	0.22	0.17	0.18	0.21	0.20	0.18
28.25	1.12	ND	0.18	0.24	ND	ND	ND	ND	0.27	ND	ND	ND
28.59	1.13	0.12	0.22	0.21	0.13	0.23	0.28	0.16	0.29	0.31	0.27	0.36
28.69	1.16	0.16	ND	ND	0.17	0.25	0.18	0.24	ND	0.15	0.33	0.22
29.89	1.21	ND	ND	ND	0.12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30.15	1.22	ND	ND	ND	0.44	ND	1.14	ND	0.63	4.24	0.35	1.25
총 불순물		0.94	1.14	1.14	1.78	1.56	2.32	1.16	2.29	5.75	1.99	3.37

표 44. pH 6 에 대한 불순물 프로파일

RT (분)	RRT	T=0	여과물	T=1d		T=2d		T=7d			T=14d	
				40°C	60°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C	25°C	40°C
25.26	1.00	99.05	98.88	98.67	98.44	98.46	97.99	98.81	97.90	96.72	98.94	96.73
18.28	0.69	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.57	ND	ND	1.19
21.65	0.83	ND	ND	0.34	0.35	0.46	0.30	ND	ND	ND	ND	0.29
22.84	0.90	ND	ND	ND	0.27	ND	0.42	ND	ND	0.69	ND	0.31
23.85	0.94	0.33	0.24	0.32	0.33	0.24	0.41	0.50	0.47	0.63	0.23	0.40
26.90	1.07	0.16	0.18	0.20	ND	0.20	0.18	0.15	0.16	0.08	ND	0.15
27.43	1.10	0.21	0.26	0.11	0.31	0.24	0.37	0.17	0.25	0.59	0.24	0.21
28.32	1.14	0.12	0.22	0.15	ND	0.22	0.20	0.20	0.39	0.32	0.26	0.38
28.63	1.15	0.13	0.22	0.21	0.31	0.17	0.13	0.17	0.25	0.24	ND	0.34
28.30	1.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.33	ND
29.83	1.23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.74	ND	ND
총 불순물		0.95	1.12	1.33	1.56	1.54	2.01	1.19	2.10	3.28	1.06	3.27

표 45. pH 6.5 에 대한 불순물 프로파일

RT (분)	RRT	T=0	여과물	T=1d		T=2d		T=7d			T=14d	
				40°C	60°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C	25°C	40°C
25.10	1.00	98.94	98.96	98.62	98.77	98.11	98.08	99.04	90.73	96.80	98.44	85.07
9.19	0.27	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.45	ND	ND	ND
9.97	0.31	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.92	ND	ND	4.79
14.93	0.54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.76
15.63	0.57	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.63	ND	ND	0.78
16.74	0.62	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.34	ND	ND	0.64
17.36	0.65	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.16	ND	ND	0.77
18.42	0.69	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.27	ND	0.53	ND
20.54	0.79	ND	ND	ND	ND	0.22	ND	ND	0.45	ND	ND	ND
21.66	0.83	ND	ND	0.34	ND	0.22	0.26	ND	ND	ND	ND	ND
22.82	0.90	ND	ND	ND	ND	ND	0.32	ND	0.58	0.76	ND	1.21
23.80	0.94	0.29	0.32	0.32	0.34	0.63	0.40	0.41	2.83	0.73	0.29	3.72
26.14	1.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.12	ND	ND
26.70	1.07	0.11	0.17	0.13	0.14	0.17	0.17	0.15	0.26	0.06	0.12	ND
27.29	1.10	0.34	0.11	0.26	0.33	0.21	0.50	0.17	0.09	1.03	0.13	0.44
28.09	1.14	0.23	0.23	0.17	0.19	0.22	0.12	0.11	1.13	0.28	0.27	1.82
28.50	1.16	0.09	0.22	0.16	0.23	0.20	0.15	0.12	0.16	0.23	0.22	ND
총 불순물		1.06	1.04	1.38	1.23	1.89	1.92	0.96	9.27	3.20	1.56	14.93

[0667]

표 46. H₂O 내 pH 7 에 대한 불순물 프로파일

RT (분)	RRT	T=0	여과물	T=1d		T=2d		T=7d			T=14d	
				40°C	60°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C	25°C	40°C
25.04	1.00	98.79	98.40	98.80	98.93	98.91	98.96	99.02	98.90	97.88	98.91	98.23
18.48	0.70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.17	0.16	0.12	0.44
21.80	0.83	ND	0.53	0.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23.72	0.94	0.39	0.33	0.33	0.28	0.29	0.31	0.24	0.33	0.19	0.26	0.39
24.08	0.96	ND	ND	ND	ND	ND	0.08	ND	ND	ND	ND	ND
25.97	1.05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.07	ND	ND
26.67	1.07	0.19	0.16	0.14	0.16	0.17	0.20	0.16	0.13	0.06	0.14	0.12
27.24	1.10	0.18	0.21	0.25	0.30	0.26	0.21	0.15	0.25	0.59	0.15	0.25
28.09	1.14	0.20	0.17	0.18	0.17	0.16	0.10	0.20	0.12	0.28	0.22	0.30
28.48	1.16	0.26	0.21	0.13	0.15	0.21	0.15	0.23	0.11	0.27	0.20	0.26
총 불순물		1.21	1.60	1.20	1.07	1.09	1.04	0.98	1.10	2.12	1.09	1.77

표 47. H₃PO₄ 내 pH 7 에 대한 불순물 프로파일

RT (분)	RRT	T=0	여과물	T=1d		T=2d		T=7d*		T=14d	
				40°C	60°C	40°C	60°C	25°C	60°C	25°C	40°C
25.13	1.00	98.76	98.48	98.53	98.82	98.91	98.96	98.68	94.79	95.95	
18.23	0.69	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.44	
21.85	0.83	ND	0.40	0.39	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
22.61	0.90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.07	0.40	
23.82	0.94	0.33	0.34	0.34	0.34	0.29	0.31	0.40	0.96	2.23	
24.08	0.96	ND	ND	ND	ND	ND	0.08	ND	ND	ND	
25.91	1.05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.44	ND	
26.73	1.07	0.14	0.18	0.16	0.15	0.17	0.20	0.13	0.07	0.11	
27.26	1.10	0.19	0.18	0.27	0.37	0.26	0.21	0.20	1.45	0.20	
28.16	1.14	0.23	0.20	0.15	0.17	0.16	0.10	0.33	0.56	0.38	
28.47	1.15	0.36	0.22	0.16	0.14	0.21	0.15	0.27	0.66	0.30	
총 불순물		1.24	1.52	1.47	1.18	1.09	1.04	1.32	5.21	4.05	

* 7 및 14 일에서 40°C 에 H₃PO₄ 내 pH 7 용액에 대하여 피크는 관찰되지 않았다

표 48. 0.9% NaCl 내 pH 7 에 대한 불순물 프로파일

RT (분)	RRT	T=0	여과물	T=1d		T=2d		T=7d			T=14d	
				40°C	60°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C	25°C	40°C
25.10	1.00	98.78	98.39	98.52	98.76	98.79	98.51	38.60	97.96	96.44		97.37
18.36	0.69	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.26	ND		0.59
20.49	0.79	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.18	ND		ND
21.73	0.83	ND	0.34	0.33	ND	ND	ND	57.88	ND	ND		ND
22.75	0.88	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.49	ND	0.54		ND
23.75	0.94	0.27	0.31	0.38	0.39	0.42	0.31	2.90	0.66	1.46		0.79
26.22	1.05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.14	ND	0.72		ND
26.70	1.07	0.17	0.22	0.15	0.19	0.12	0.11	ND	0.07	0.05		0.10
27.27	1.10	0.29	0.18	0.20	0.27	0.24	0.51	ND	0.40	1.51		0.56
28.18	1.14	0.25	0.22	0.20	0.18	0.23	0.26	ND	0.25	0.39		0.23
28.41	1.15	0.24	0.34	0.22	0.21	0.20	0.30	ND	0.22	0.89		0.35
총 불순물		1.22	1.61	1.48	1.24	1.21	1.49	61.40	2.04	5.56		2.63

*14 일에서 25°C 에 0.9% NaCl 내 pH 7 용액에 대해 피크는 관찰되지 않았다

[0668]

표 49. pH 8 에 대한 불순물 프로파일

RT (분)	RRT	T=0	여과물	T=1d		T=2d		T=7d			T=14d	
				40°C	60°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C	25°C	40°C
25.14	1.00	98.35	98.26	98.75	97.80	98.45	93.68	99.34	97.50	81.21	98.65	95.09
19.89	0.77	ND	ND	ND	ND	ND	0.45	ND	ND	1.16	ND	0.25
20.40	0.79	ND	ND	ND	ND	ND	0.26	ND	ND	0.86	ND	0.25
20.84	0.81	ND	ND	ND	ND	ND	0.08	ND	ND	0.31	ND	ND
21.74	0.83	ND	0.53	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21.61	0.85	ND	ND	ND	ND	ND	0.24	ND	ND	0.68	ND	ND
23.04	0.91	ND	ND	ND	0.24	ND	0.68	ND	0.50	2.43	ND	0.79
23.79	0.94	0.32	0.43	0.26	0.48	0.40	0.61	ND	0.61	1.49	0.57	1.05
23.91	0.95	ND	ND	ND	0.23	ND	0.69	ND	ND	3.22	ND	ND
24.62	0.99	ND	ND	ND	ND	ND	0.23	ND	ND	0.77	ND	ND
25.92	1.05	ND	ND	ND	ND	ND	0.92	ND	ND	2.57	ND	0.47
26.75	1.07	0.14	0.19	0.13	0.13	0.19	0.10	0.12	0.13	ND	0.13	ND
27.31	1.10	0.24	0.16	0.26	0.34	0.28	0.53	0.22	0.35	1.39	0.21	0.59
28.23	1.14	0.25	0.21	0.31	0.28	0.32	0.43	0.15	0.38	1.03	0.22	0.51
28.49	1.15	0.21	0.21	0.27	0.50	0.37	0.92	0.18	0.53	2.85	0.23	1.01
총 불순물		1.15	1.74	1.25	2.20	1.55	6.14	0.66	2.50	18.79	1.35	3.39

[0669]

[0670]

시트레이트로 pH 6.5, 인산염으로 pH 7, 0.9% NaCl로 pH 7 및 L-라이신으로 pH 8의 MMI-0100 제형 용액은 침전물의 존재를 나타내는 흐릿함을 보였다.

[0671]

도 79 A 및 B는 25°C에서 검정 회수 및 불순물 성장을 요약한다. 도 80 A 및 B는 40°C에서 검정 회수 및 불순물 성장을 요약한다. 도 81 A 및 B는 60°C에서 검정 회수 및 불순물 성장을 요약한다.

[0672]

상기 연구의 결과는 하기를 나타냈다:

[0673]

i. MMI-0100은 pH 7에서 가장 안정적이다;

[0674]

ii. pH 7에서 MMI-0100의 인산염 및 NaCl 유도된 침전;

[0675]

iii. pH 6.5에서 MMI-0100의 시트레이트 유도된 침전;

[0676]

iv. 시트레이트에서, MMI-0100은 pH 6에서 가장 안정적이다;

[0677]

v. MMI-0100에 대하여 pH_{max} 는 pH 7이고 DI수 (즉 무 완충액)은 최고 용액이었다;

[0678]

vi. T-5에서, 초기 (T=0) 시험에서 검출된 0.2% 초과하는 5 불순물이 있었다;

[0679]

vii. T-5 (완충액 없이 pH 7)에서, 검정 회수는 40°C에서 14 일 이후 100% 근처이었고 60°C에서 7 일 이후 93% 이었고, (T_{90} 으로 정의된) 유통 기한은 25°C에서 2 년 또는 5°C에서 2 년이 될 것 같다;

[0680]

viii. T-5가 T_{90} (예를 들면 10% 검정 손실)을 달성하는 경우, 7 불순물은 0.1%를 초과하도록 성장할 수 있다 (최상부 3 불순물은 하기이었다: RRT=1.14, RRT=0.94 및 RRT=0.70);

[0681]

ix. T-5에서 60°C에 7 일 이후, 검정 손실은 7%이었고 총 불순물은 2.12%이었고, 불순물이 215 nm의 검출 파장에서 더 낮은 소멸 계수를 가질 수 있다는 것을 나타낸다; 및

[0682]

x. 이론에 의해 제한됨 없이, RRT=1.14, RRT=0.94 불순물이 탈아미노화 생성물 (Gln⁸ 및 Gln¹⁷)이고 RRT=0.70 불순물이 가수분해 생성물인 것으로 의심된다.

[0683]

실시예 9. 다양한 삼투 물질 및/또는 동결건조보호제를 함유한 DI수에서 pH 7에 몇 개의 MMI-0100 제형 용액의 안정성의 평가

[0684]

본 연구의 목적은 pH 7에서 물내 비-완충된 0.7 mg/mL 및 7 mg/mL 용액의 삼투압 결정, 안정성에 기반된 삼투 물질(들) 선택, 이소-삼투압을 달성하는데 필요한 삼투 물질(들)의 농도 계산이다 (예를 들면, 흡입용 글리세린 IIL 한계는 7.3%이고; 흡입용 락토오스 IIL 한계는 9%이다).

[0685] MMI-0100 제형 용액은 표 50에 기재된 바와 같이 제조되었다.

표 50. MMI-0100 제형 용액

성분	F-1	F-2	F-3	F-4
MMI	0.7	7	7	7
글리세린	0	0	등장성에 필요한 양	0
락토오스	0	0	0	등장성에 필요한 양
DI-수, qs	qs	qs	qs	qs
NaOH/HCl 로 7 로 pH 조정	7 ± 0.1	7 ± 0.1	7 ± 0.1	7 ± 0.1

[0686]

[0687] 5g의 각 MMI-0100 제형 용액은 제조되었다. 0.7 mL의 각 제형 용액은 HPLC 유리 바이알 (5 바이알 각각)에 부가되었다. 하나의 HPLC 바이알은 T = 0으로서 사용되었다. 나머지 4 HPLC 바이알은 60°C에서 보관되었고 0, 1, 2 및 4 주에서 시험되었다. 결과는 표 51-59에서 나타난다.

표 51. 외관

제형 ID	외관			
	초기	60°C 에서 1 주	60°C 에서 2 주	60°C 에서 4 주
F-1	투명, 무색 액체	변화 없음	변화 없음	
F-2	투명, 무색 액체	변화 없음	변화 없음	
F-3	투명, 무색 액체	변화 없음	변화 없음	
F-4	투명, 무색 액체	변화 없음	변화 없음	

표 52. 삼투압 조정

제형 ID	삼투압 변형제	초기 삼투압 (mOsm)	부가된 변형제의 양 (% w/w)	최종 삼투압 (mOsm)
F-1	없음	13	0	13
F-2	없음	24	0	24
F-3	글리세린	35 (글리세린 부가 이전)	2.2%	286
F-4	락토오스	31 (락토오스 부가 이전)	7.6%	299

[0688]

표 53. pH

제형 ID	pH			
	초기	60°C 에서 1 주	60°C 에서 2 주	60°C 에서 4 주
F-1	7.0	8.3	8.1	
F-2	7.1	6.9	7.1	
F-3	7.1	7.0	7.1	
F-4	7.0	6.6	6.3	

표 54. 농도

제형 ID	MMI-001 농도 (mg/mL)			
	초기	60°C 에서 1 주	60°C 에서 2 주	60°C 에서 4 주
F-1	0.65	0.49	0.35	
F-2	6.65	6.84	6.47	
F-3	6.45	6.59	6.17	
F-4	6.04	5.03	4.02	

표 55. 검정 농도 (퍼센트 농도 대 초기 농도)

제형 ID	검정 (% 농도 대 초기 농도)			
	초기	60°C 에서 1 주	60°C 에서 2 주	60°C 에서 4 주
F-1	100	75	54	
F-2	100	103	97	
F-3	100	102	96	
F-4	100	83	67	

표 56. F-1 에 대한 불순물 프로파일 (피크 면적 %)

RT (분)	RRT	T=0	T= 60°C 에서 1 주	T=60°C 에서 2 주
24.364	1.00	97.21	76.65	53.59
6.791	0.28	2.44	2.82	2.75
19.706	0.79	ND	1.15	2.16
20.246	0.81	ND	0.96	2.04
20.644	0.83	ND	0.42	1.18
21.836	0.88	ND	0.84	4.56
22.432	0.90	ND	1.53	1.39
22.749	0.91	ND	2.47	5.09
22.955	0.94	0.34	1.49	3.62
23.633	0.95	ND	3.48	6.92
24.451	0.98	ND	0.77	2.18
25.784	1.04	ND	2.42	5.25
26.763	1.07	ND	1.26	2.66
27.767	1.12	ND	1.04	2.00
28.102	1.13	ND	2.70	4.61
총 불순물		2.79	23.35	46.41

ND = 검출되지 않음

[0689]

표 57. F-2 에 대한 불순물 프로파일 (피크 면적 %)

RT (분)	RRT	T=0	T=1 주	T=2 주	T=4 주
			60°C	60°C	60°C
24.40	1.00	99.56	98.17	96.29	
23.00	0.94	0.44	0.62	1.11	
26.77	1.08	ND	1.21	2.60	
총 불순물		0.44	1.83	3.71	

ND = 검출되지 않음

표 58. F-3 에 대한 불순물 프로파일 (피크 면적 %)

RT (분)	RRT	T=0	T=1 주	T=2 주	T=4 주
			60°C	60°C	60°C
24.41	1.00	100	98.07	93.95	
23.38	0.94	ND	0.50	1.12	
26.05	1.04	ND	ND	1.47	
26.80	1.08	ND	1.43	3.05	
28.25	1.13	ND	ND	0.41	
총 불순물		0	1.93	6.05	

ND = 검출되지 않음

표 59. F-4 에 대한 불순물 프로파일 (피크 면적 %)

RT (분)	RRT	T=0	T=1 주	T=2 주	T=4 주
			60°C	60°C	60°C
24.47	1.00	97.60	84.26	72.31	
23.04	0.94	0.26	ND	0.85	
23.94	0.95	ND	ND	0.60	
24.39	0.98	ND	11.11	19.45	
25.42	1.04	2.14	3.81	4.88	
26.78	1.07	ND	0.81	1.91	
총 불순물		2.40	15.74	27.69	

ND = 검출되지 않음

본 연구의 결과는 하기를 나타냈다:

i. 완충액 없이 pH 7에서 MMI-0100 제형 용액은 고 농도 (7mg/mL)에서 7로 그의 pH를 유지할 수 있었고, 반면에 pH는 더 낮은 농도 (0.7 mg/mL)에서 최대 약 8까지 이동되었고, 7 mg/mL 강도에서, pH 완충액이 필요없음을 나타냈다;

ii. 락토오스의 부가는 pH 이동을 초래하였고 (약 6까지 하락) MMI-0100의 더 많은 분해를 유발하는 것으로 보였다;

iii. 글리세린의 부가는 고 농도 제형에서 pH 이동을 유발시키지 않았고, 따라서, 글리세린은 락토오스에 대해 바람직하다;

iv. MMI-0100 제형 용액에 글리세린의 부가는 삼투 물질 (F-2) 없이 제형 용액보다 MMI-0100 (F-3)의 약간 더 분해를 또한 야기하였고, 따라서, 등삼투 제형이 필요없으면, F-2 제형 용액이 바람직할 것이다.

기재된 발명이 이들의 특정한 구현예를 참조하여 기재되었으나, 당해분야의 숙련가에게는 본 발명의 진정한 사상 및 범위로부터 벗어나지 않고 다양한 변화가 제조되고 등가물로 치환될 수 있음이 이해되어야 한다. 게다가, 기재된 발명의 목적 사상 및 범위에 대해 많은 변형이 특정한 상황, 물질, 물질 조성, 공정, 공정 단계 또는 단계들을 채택하여 수행될 수 있다. 이러한 모든 변형은 본원에 첨부된 청구범위의 범위 내인 것으로 의도된다.

도면

도면1

Technical Data Sheet

Blister Lidding – Push Through

Alcan Packaging Pharma Center
6850 Midland Industrial Drive
Shelbyville, 40065

2004

Product Code: 10038

CRIPTI

Push-through blister lidding allows product removal by simply pushing the blister's contents through the foil lidding material.

KEY PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- Can be processed on all conventional blister lines
- Total barrier to light, moisture, oxygen and other gases
- This foil is available coated white, 1-side printed and 2-side printed
- Heat sealable to PVC and to laminates such as PVC-PVdC and PVC-Aclar®

STRUCTURE (from the outside to the inside)

Material	Thickness		Basis Weight	
			g/m ²	
Primer	–	–		0.92
Aluminum Foil - Hard - Matte Side (μ)			54.00	33.70
Heat Seal Coating 4508	–	–		4.30

Descriptive Property	Value			
Total Basis Weight	63.40	g/m ²	5.90	g/m ²
Yield	15.77	m ² /kg	± 1.47	m ² /kg
				lbs/ream
				in ² /lb

REGULATORY INFORMATION

- The heat seal coating on this blister foil conforms to 21 CFR 175.300 and to the Council of Europe Resolution AP(96)
- Proprietary information concerning this blister foil is disclosed in DMF 0684 and 15087.
- Equivalent blister foils are also manufactured in Europe.

Please notice: This data sheet is for basic product information and is not a product specification. Please contact your APPC representative for current approved specification

도면2

Technical Data Sheet

Formpack® - 4 PLY

Alcan Packaging Pharma Center
6850 Midland Industrial Drive
Shelbyville, KY 40065

June 15, 2004

Product Code: 90256

DESCRIPTION

Patented FORMPACK® cold-formable aluminum-plastic laminates are suited for applications requiring forming, while maintaining the highest possible barrier protection. FORMPACK® 4-PLY combines aluminum foil for barrier protection with a PVC sealant on both sides for added support and rigidity.

KEY PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- Cold-formable
- Retains barrier properties at ICH conditions
- Post forming pinhole-free integrity
- Highest barrier to moisture, UV, oxygen and other gases. Total barrier to light
- Allows use of common lidding materials with standard heatseal coatings
- High rigidity after cold forming; stays flat for easy packing

STRUCTURE (from the outside in the inside)

Material	Thickness		Basis Weight	
	[µm]	[mils]	[g/m²]	[lb/ream]
PVC	60	2.4	78.00	47.88
Adhesive	—	—	4.00	2.46
cPA	25	1	28.75	17.65
Adhesive	—	—	3.50	2.15
Aluminum "Primed" • Matte Side 0	60	2.36	164.00	100.68
Adhesive	—	—	4.00	2.46
PVC	60	2.4	78.00	47.88

Descriptive Property	Value			
Total Basis Weight	390.25 g/m²	±	36.2 g/m²	221.15 lb/ream
Yield	2.78 m²/kg	±	0.28 m²/kg	1951.6 m²/b

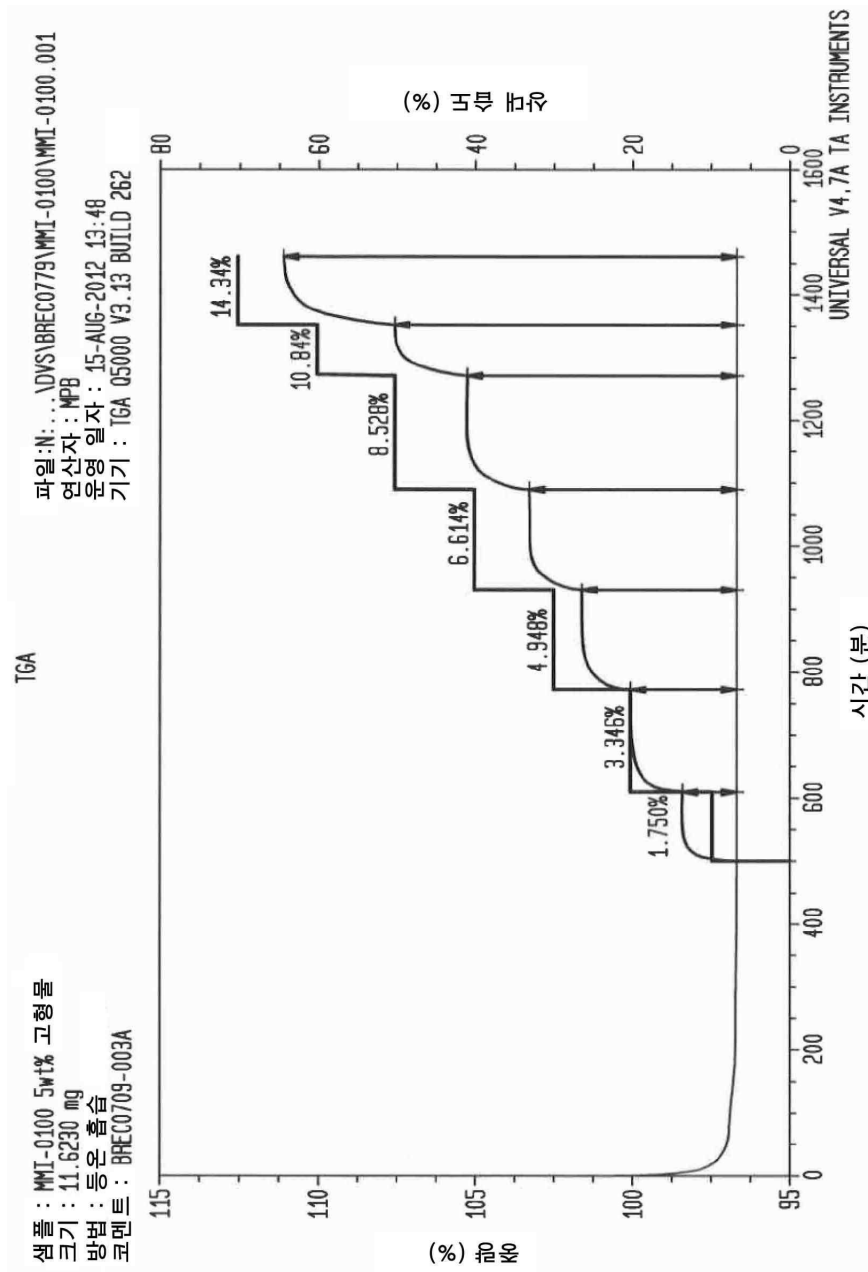
PACKAGING DESIGN

It is critical that proper attention is given to the design of tooling used to form the laminate in any packaging process. When considering a design, Alcan Packaging Pharma Center Technical Support will assist the customer in the cavity (package) design and can offer Technical Services which will aid all customers in maintenance of a pinhole-free package during final production on the packaging line.

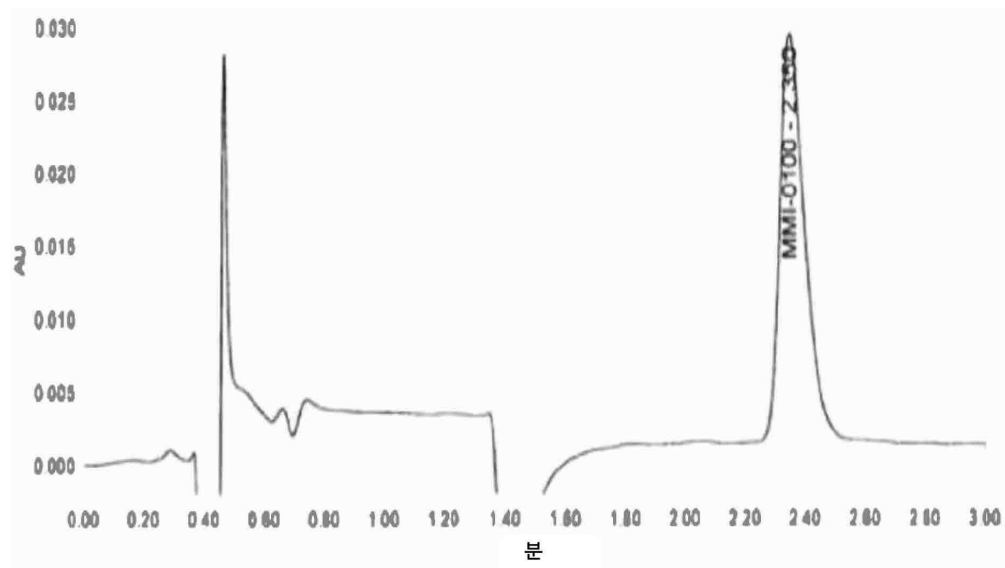
By using proven computer assisted measurement technologies, Alcan Packaging Pharma Center can assure the customer that:

- A package concept is formulated into an efficient package design
- A package design does not compromise the theoretical limitations of the materials

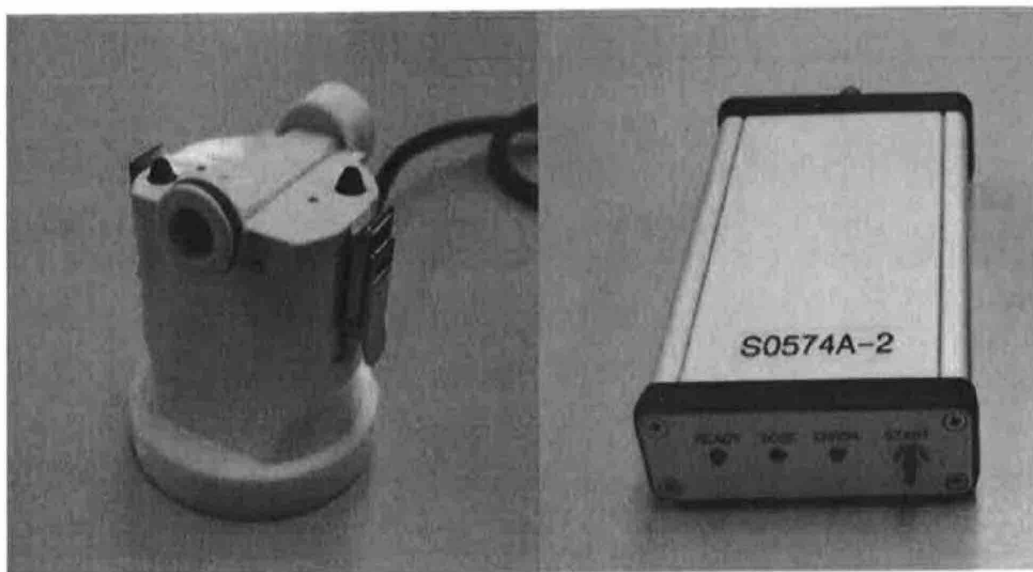
도면3



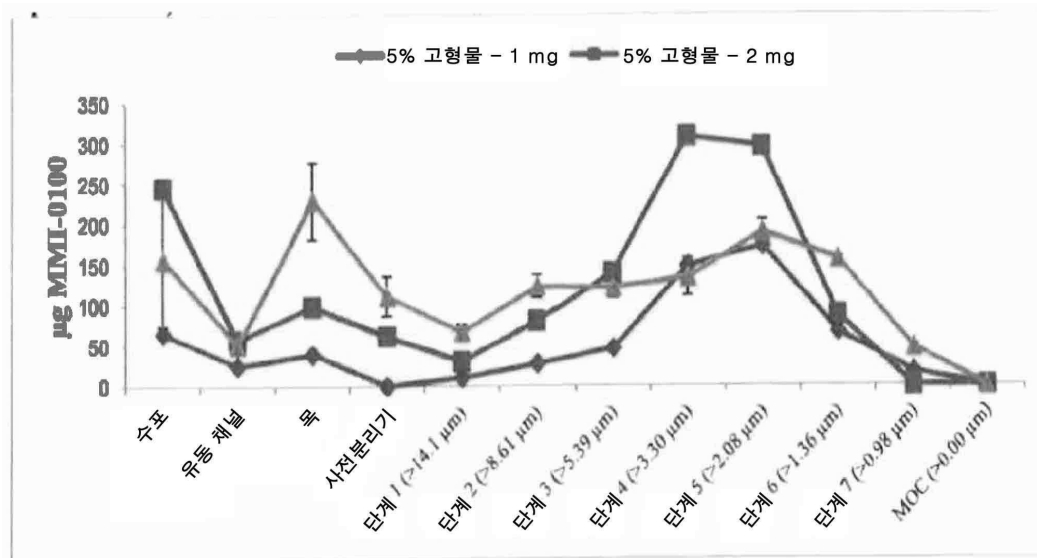
도면4



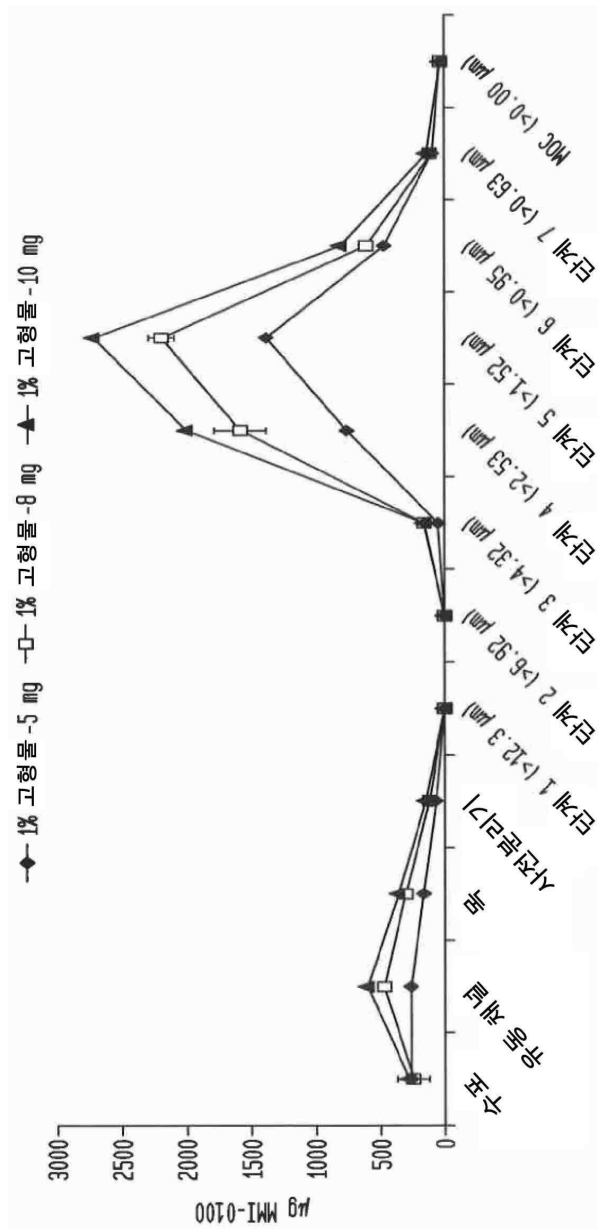
도면5



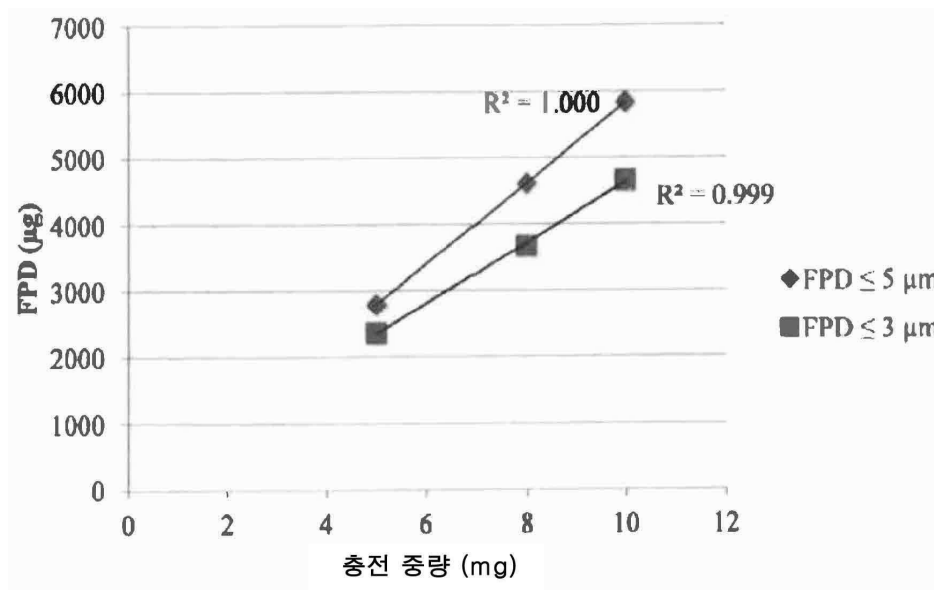
도면6



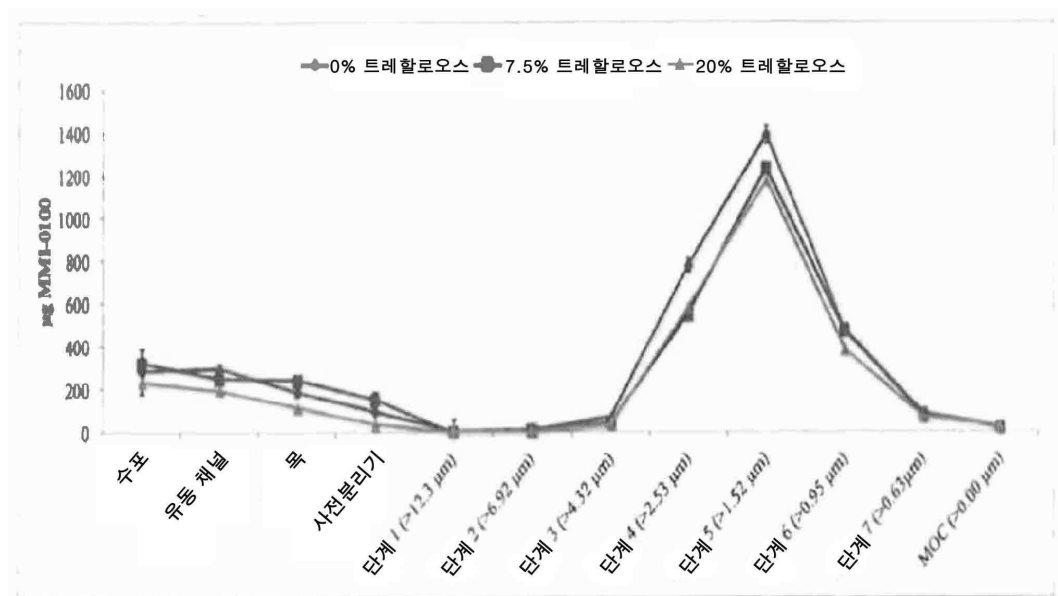
도면7



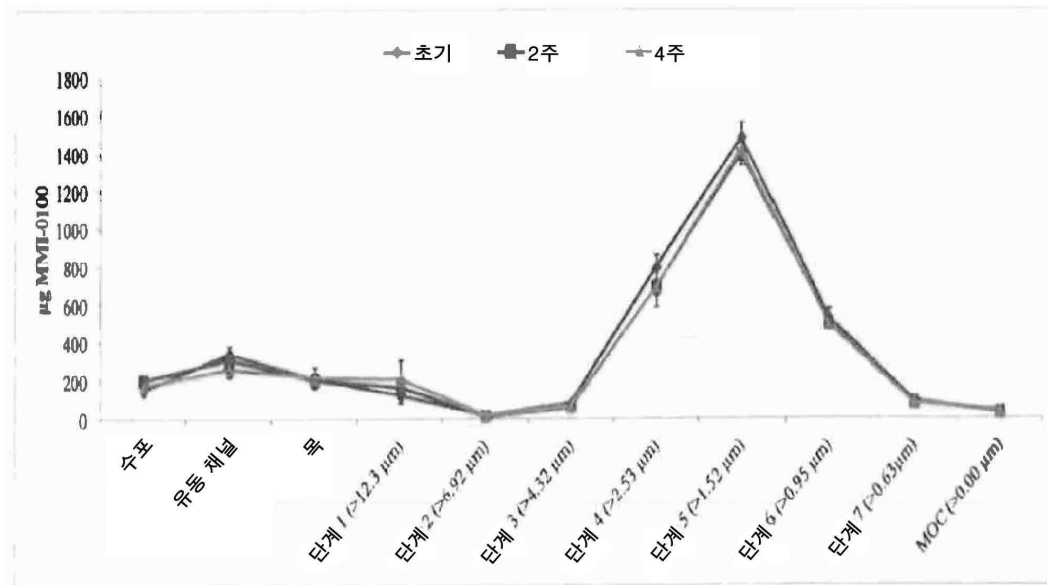
도면8



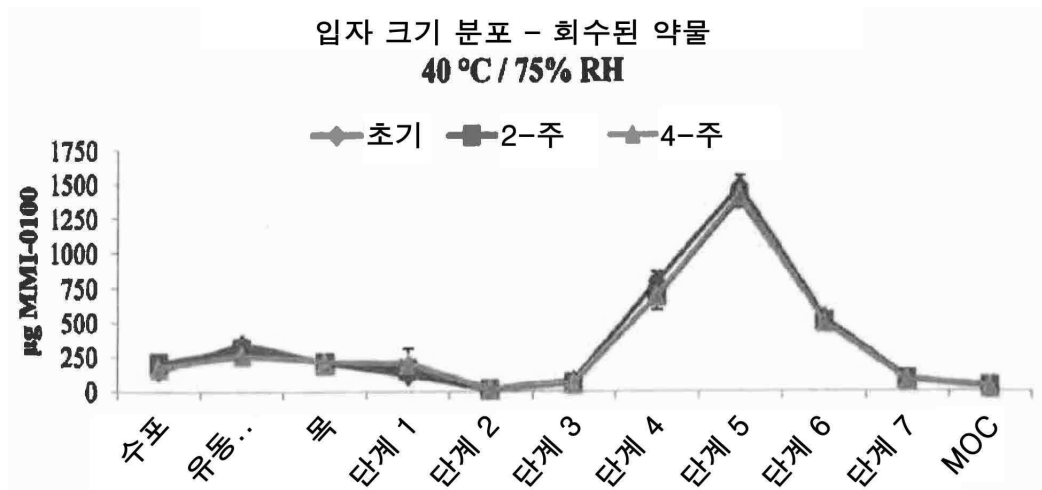
도면9



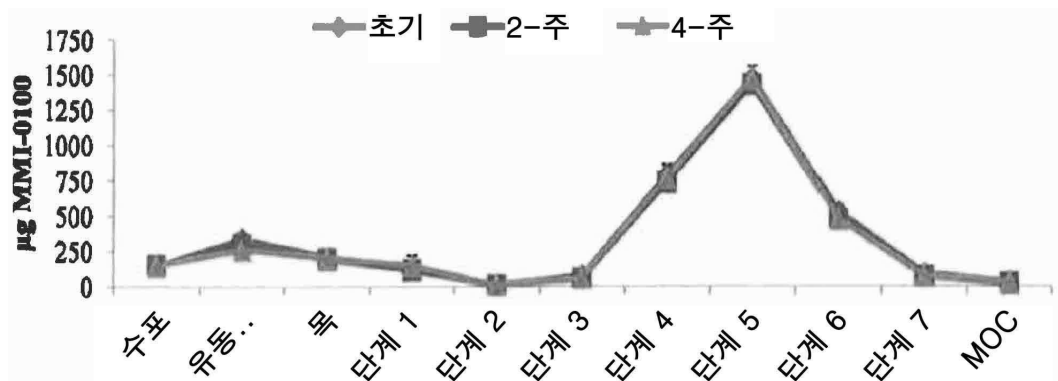
도면10



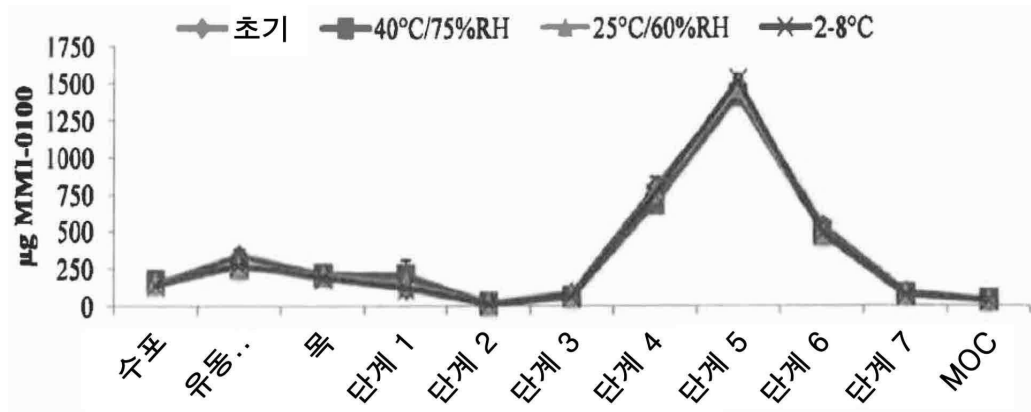
도면11



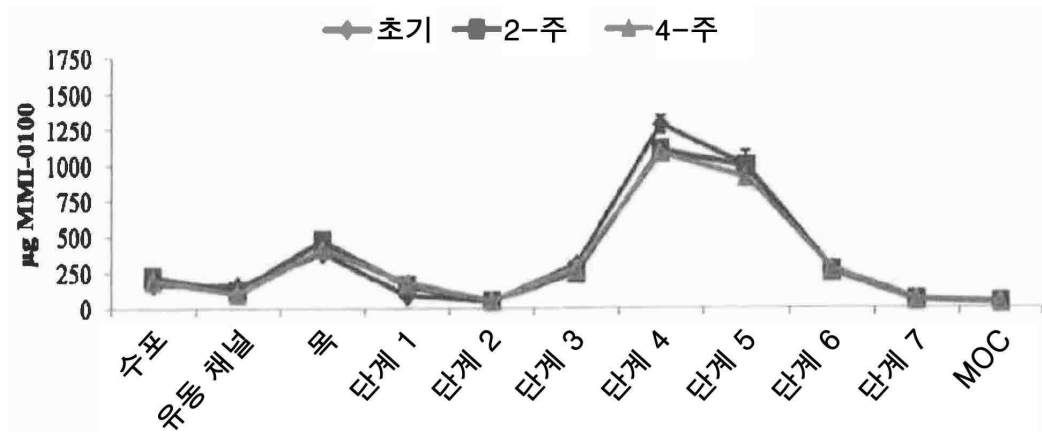
도면12



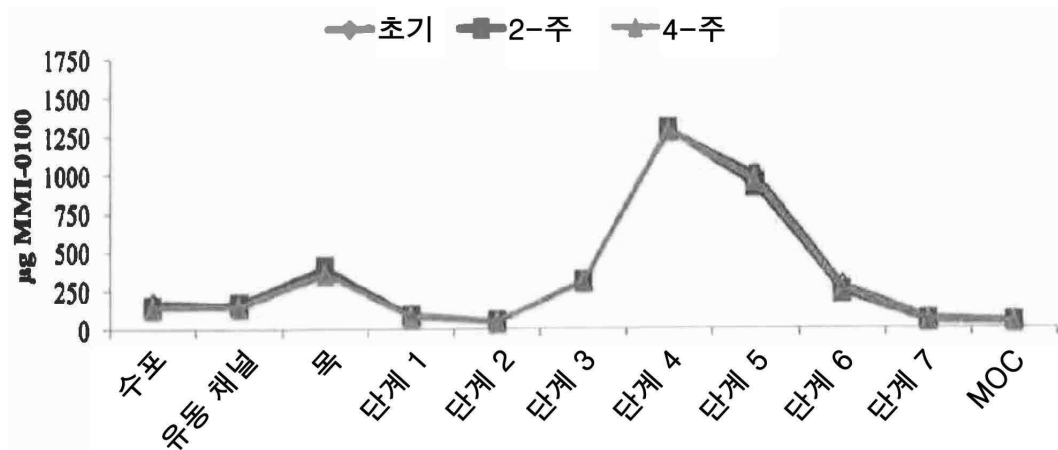
도면13



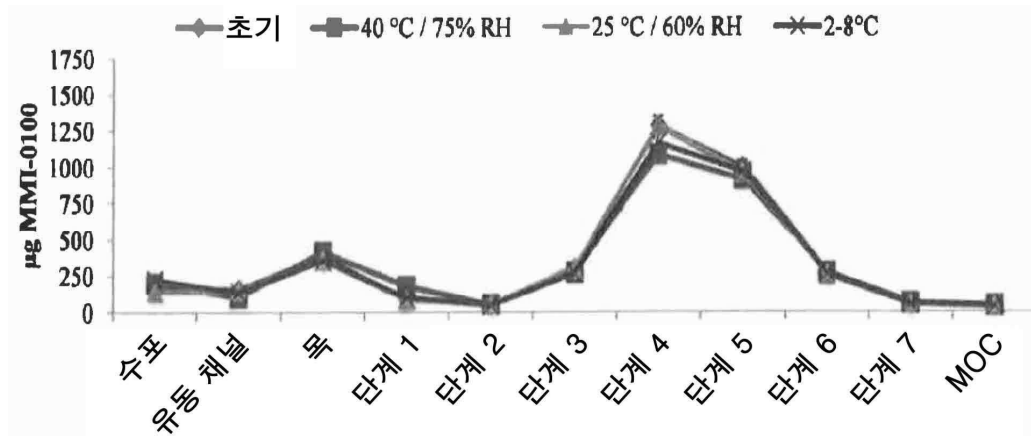
도면14



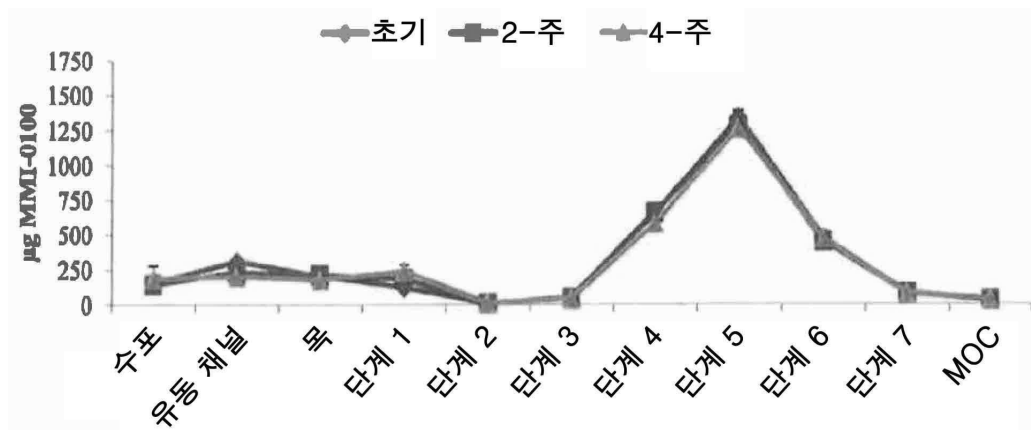
도면15



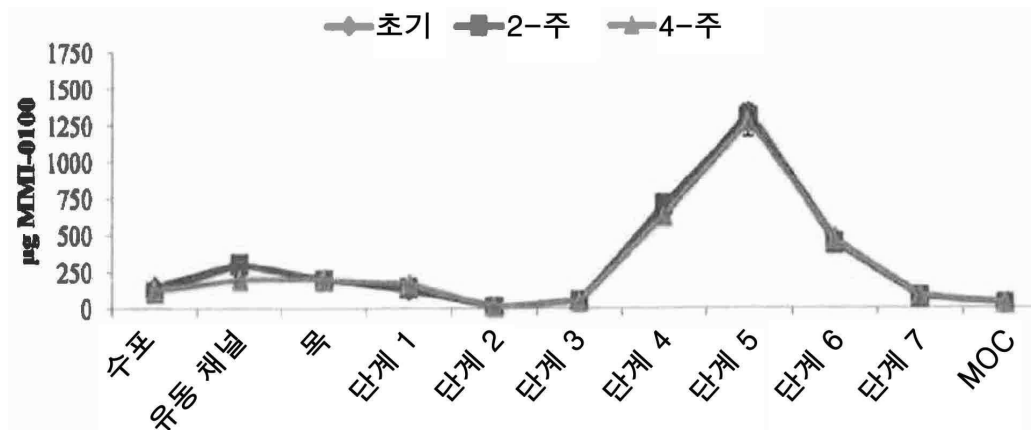
도면16



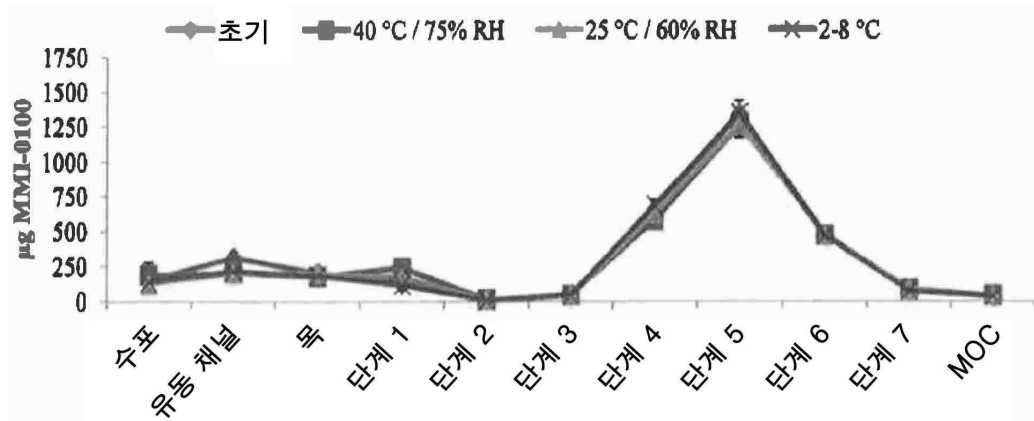
도면17



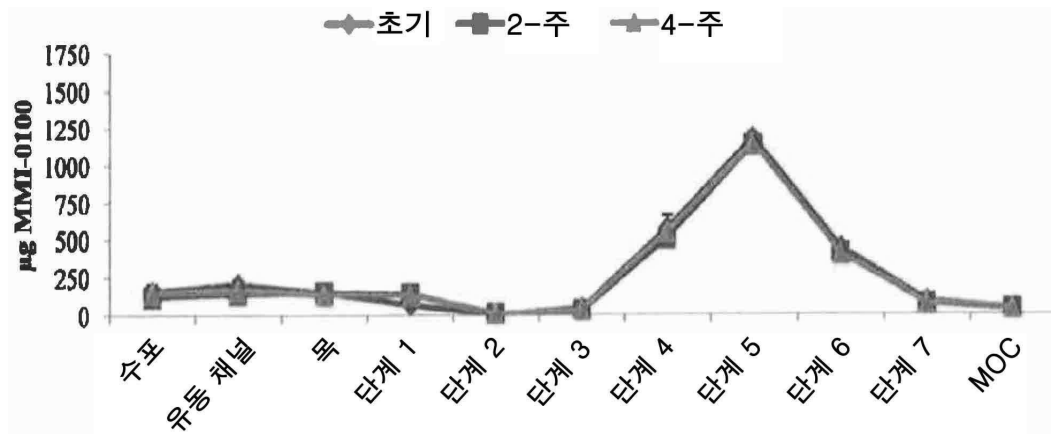
도면18



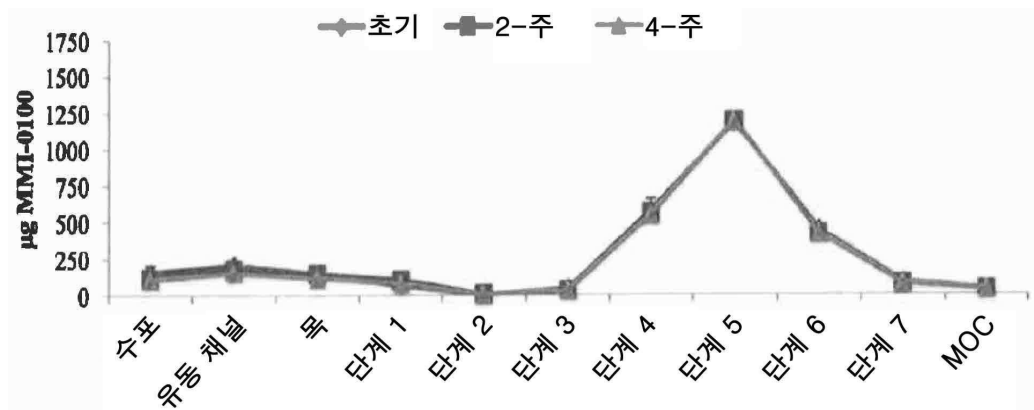
도면19



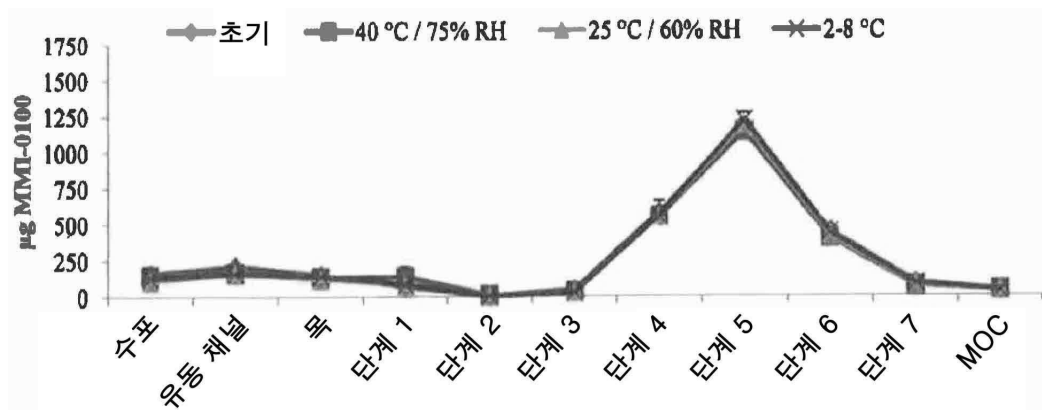
도면20



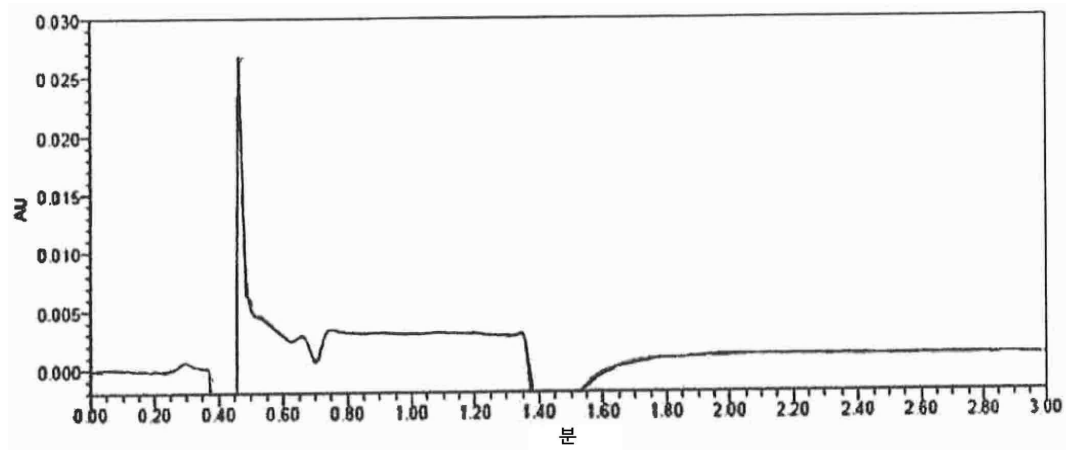
도면21



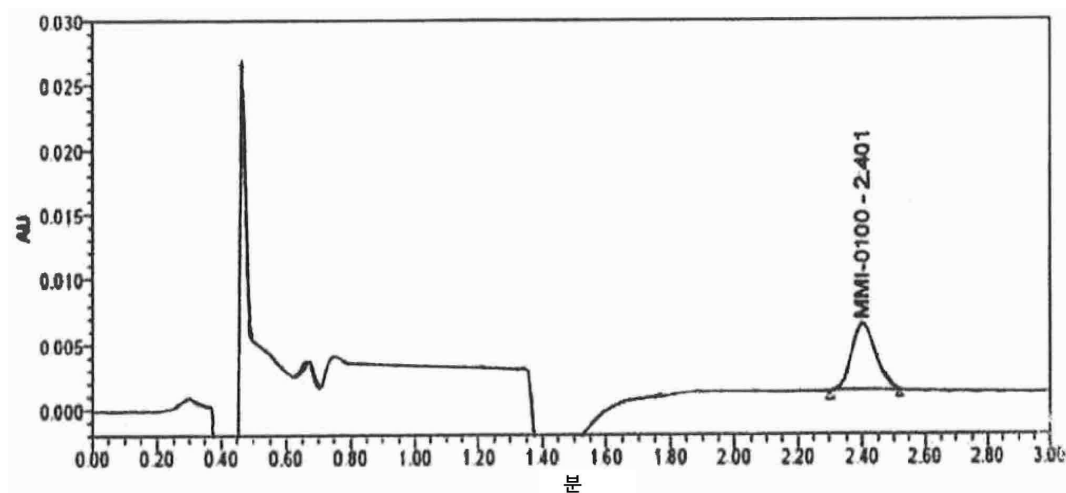
도면22



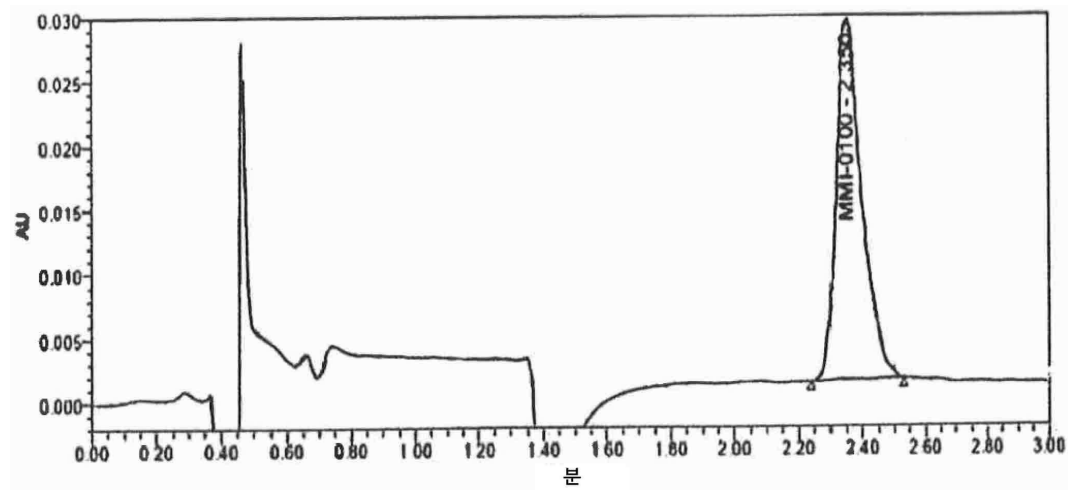
도면23



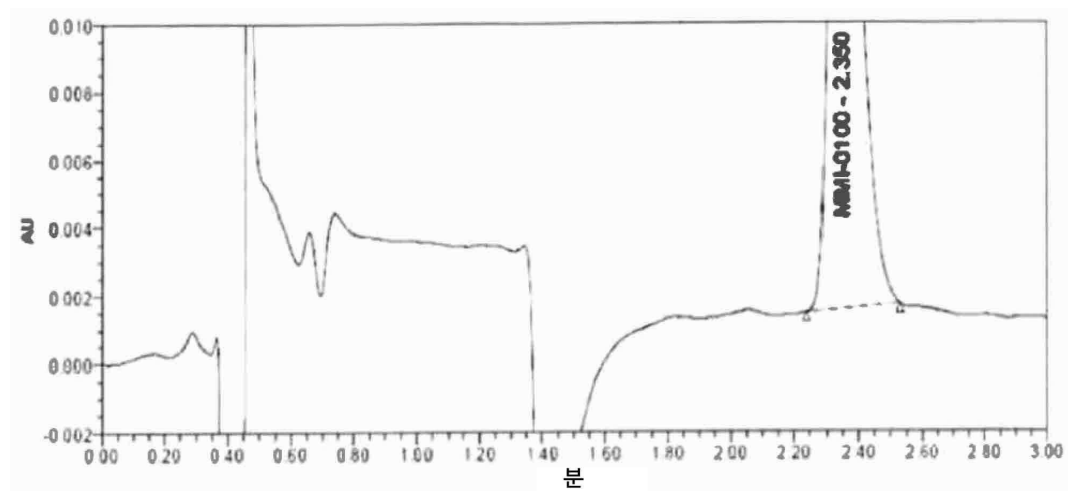
도면24



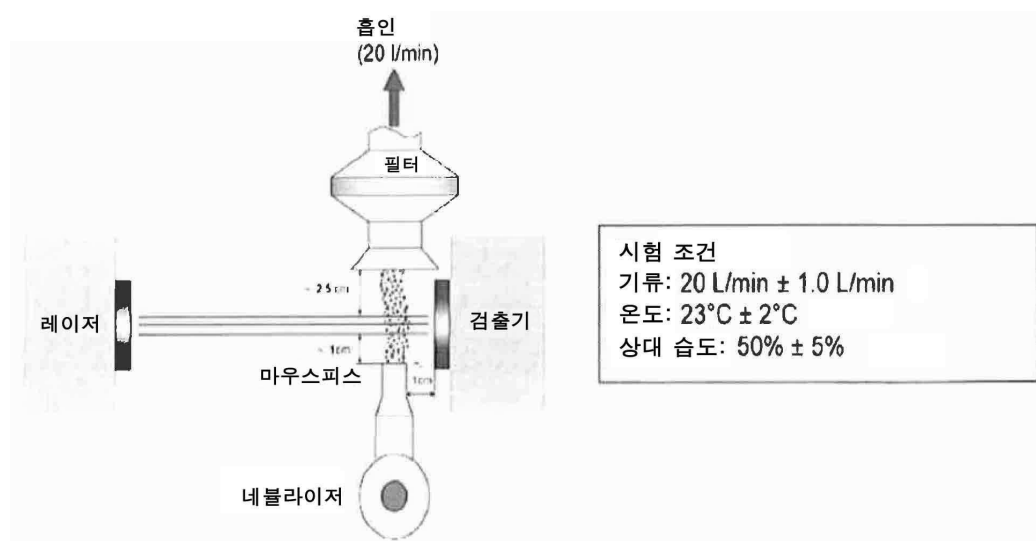
도면25



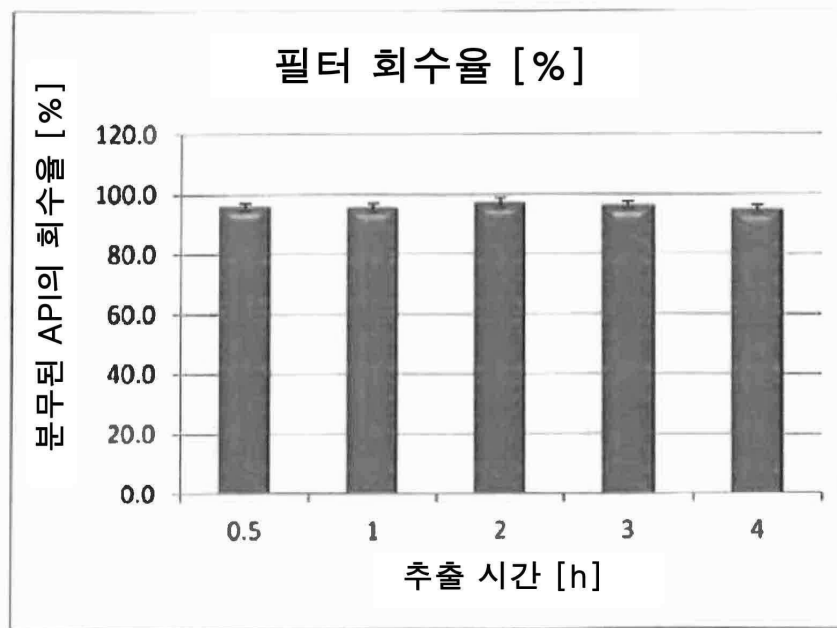
도면26



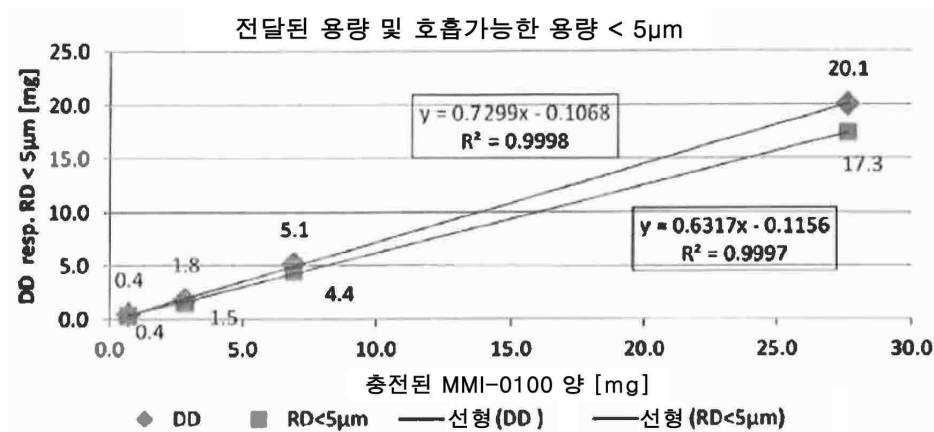
도면27



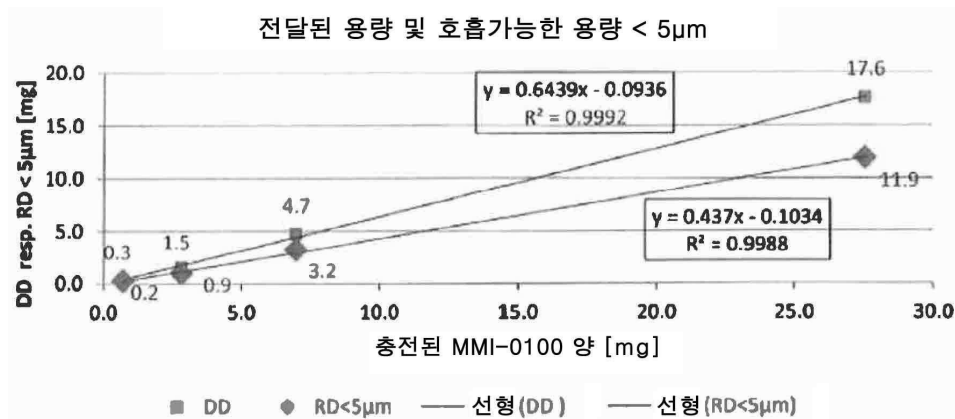
도면28



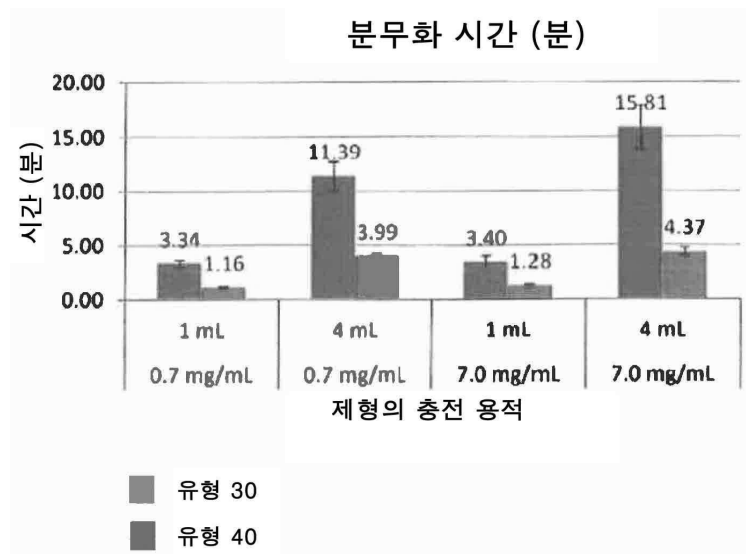
도면29



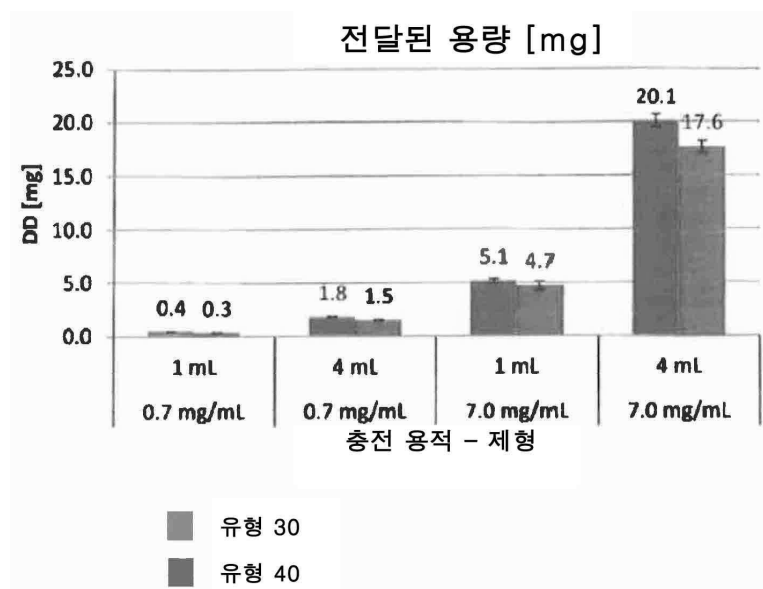
도면30



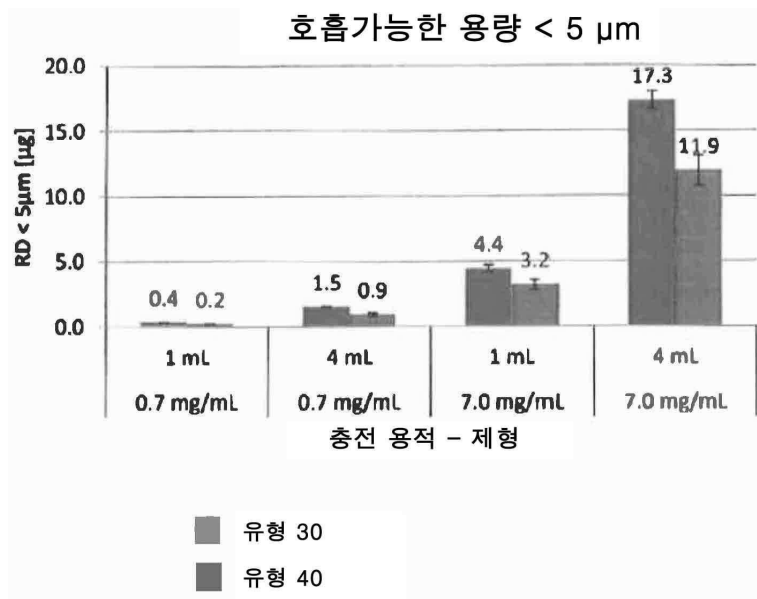
도면31



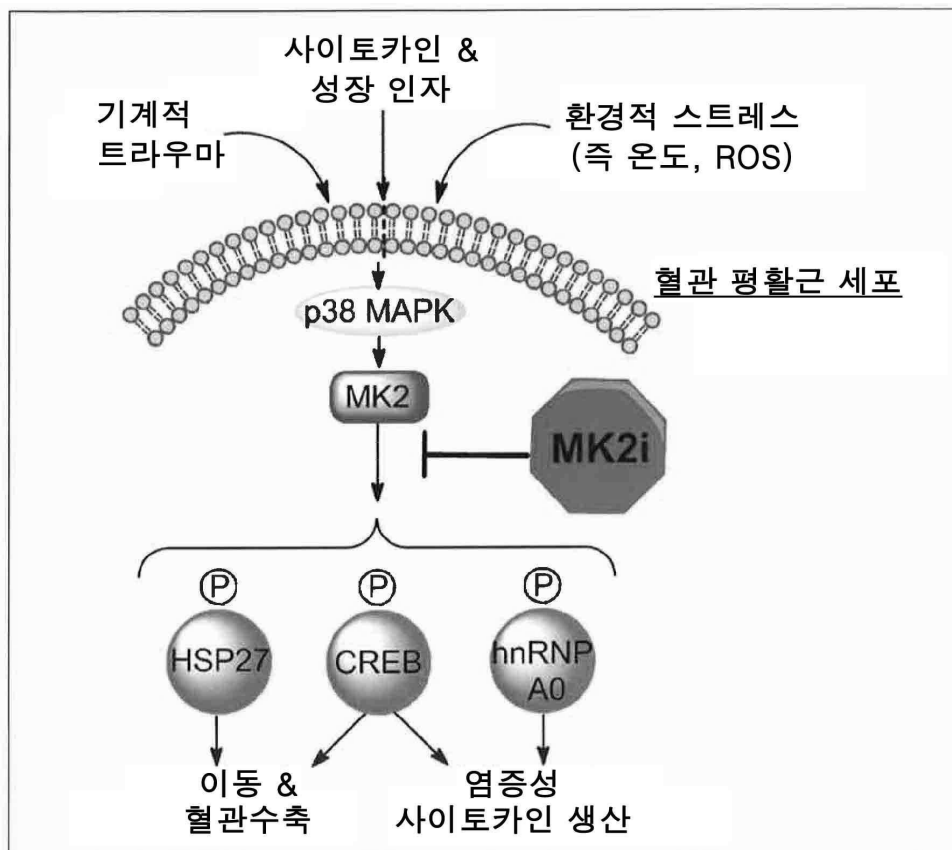
도면32



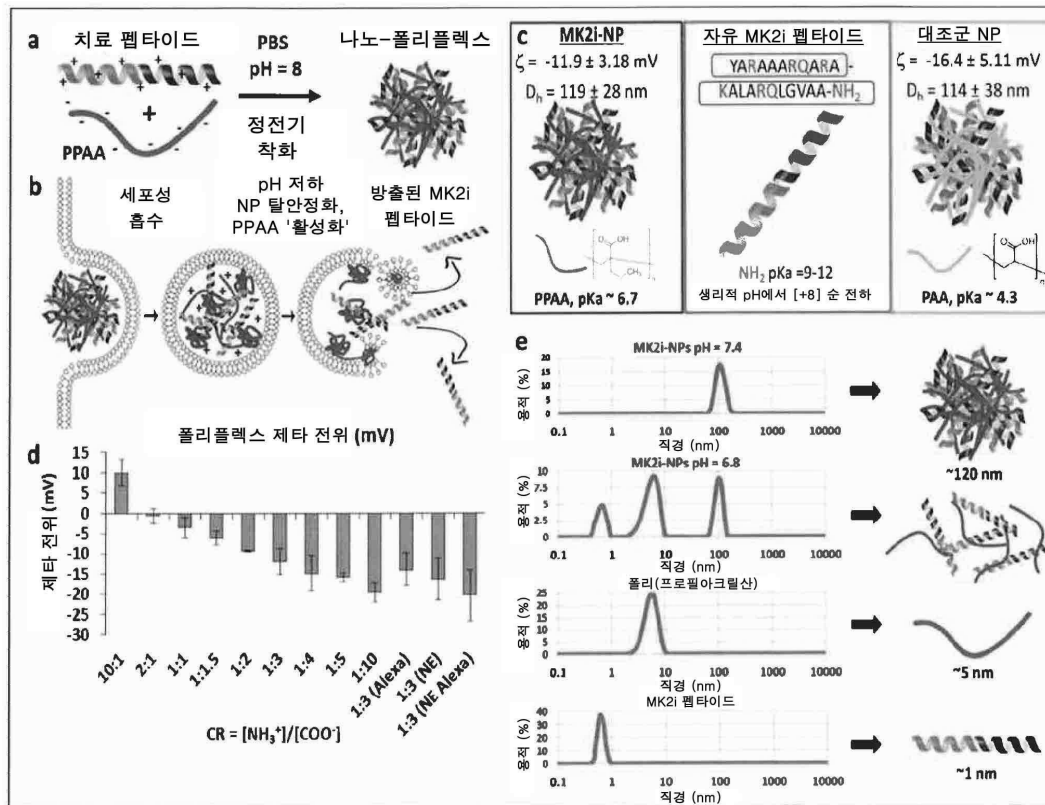
도면33



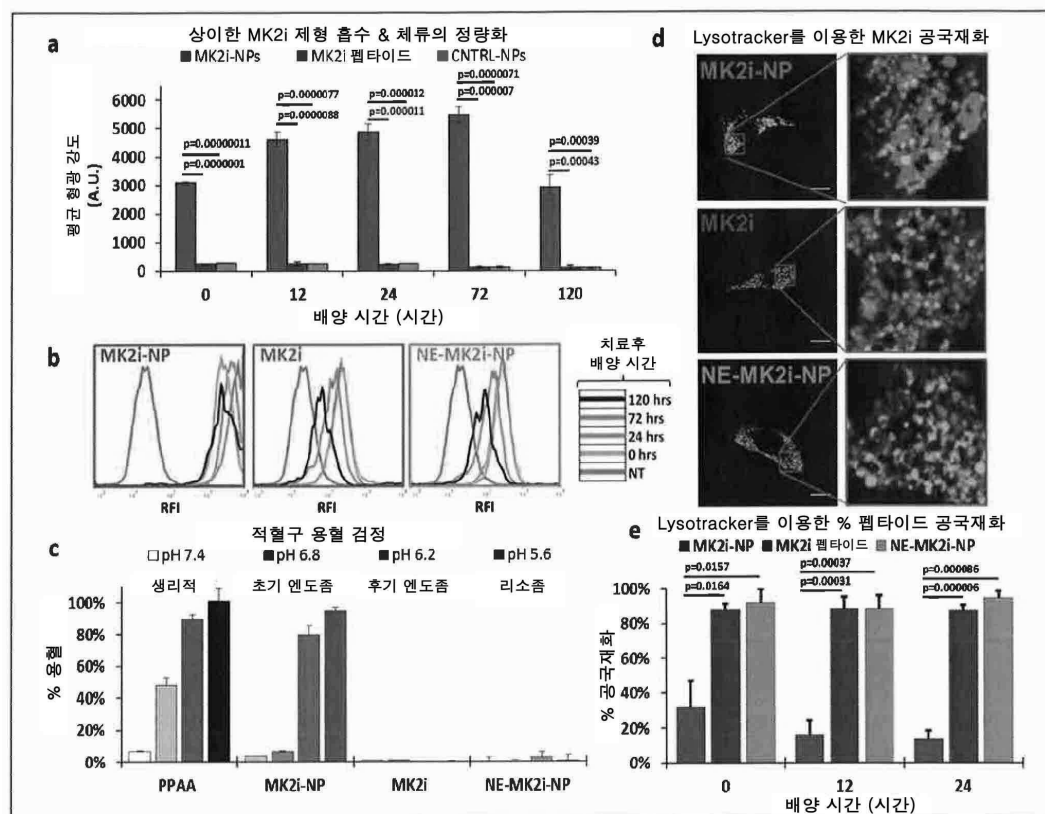
도면34



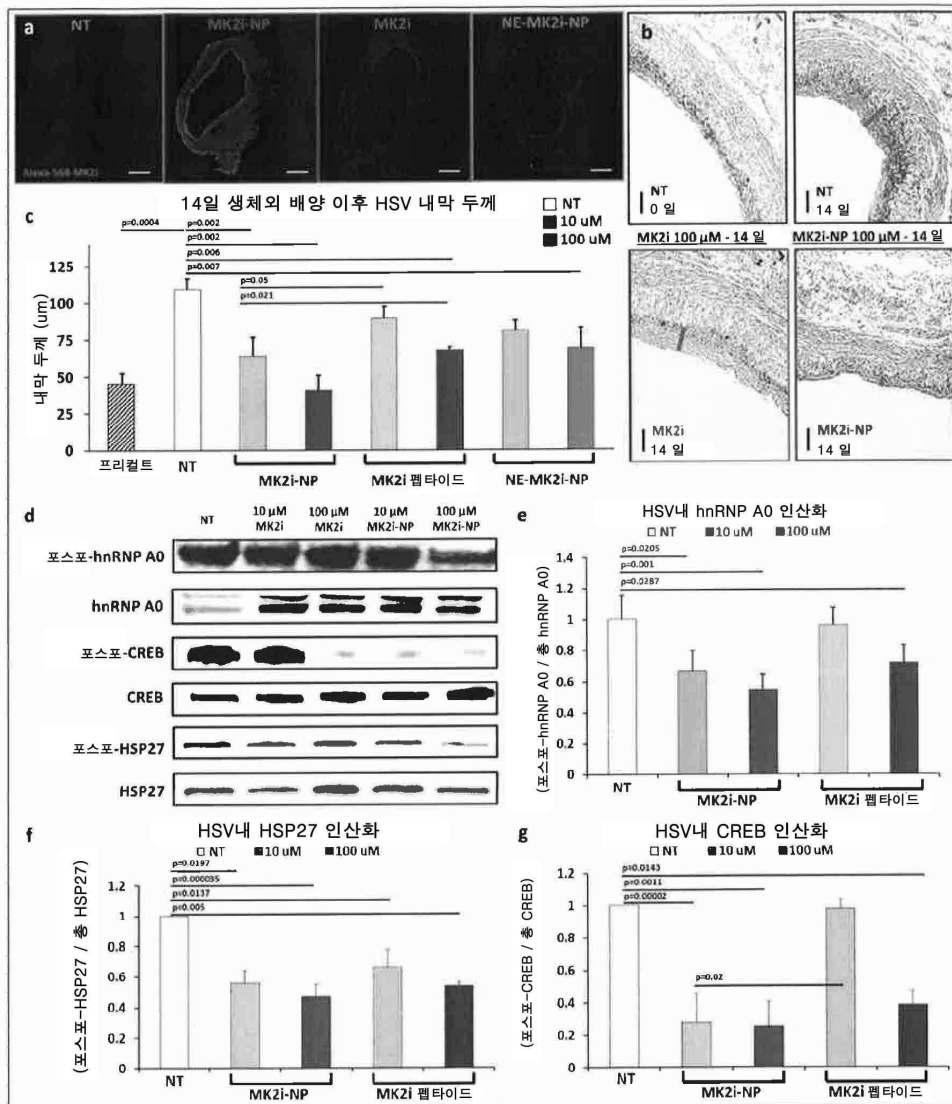
도면35



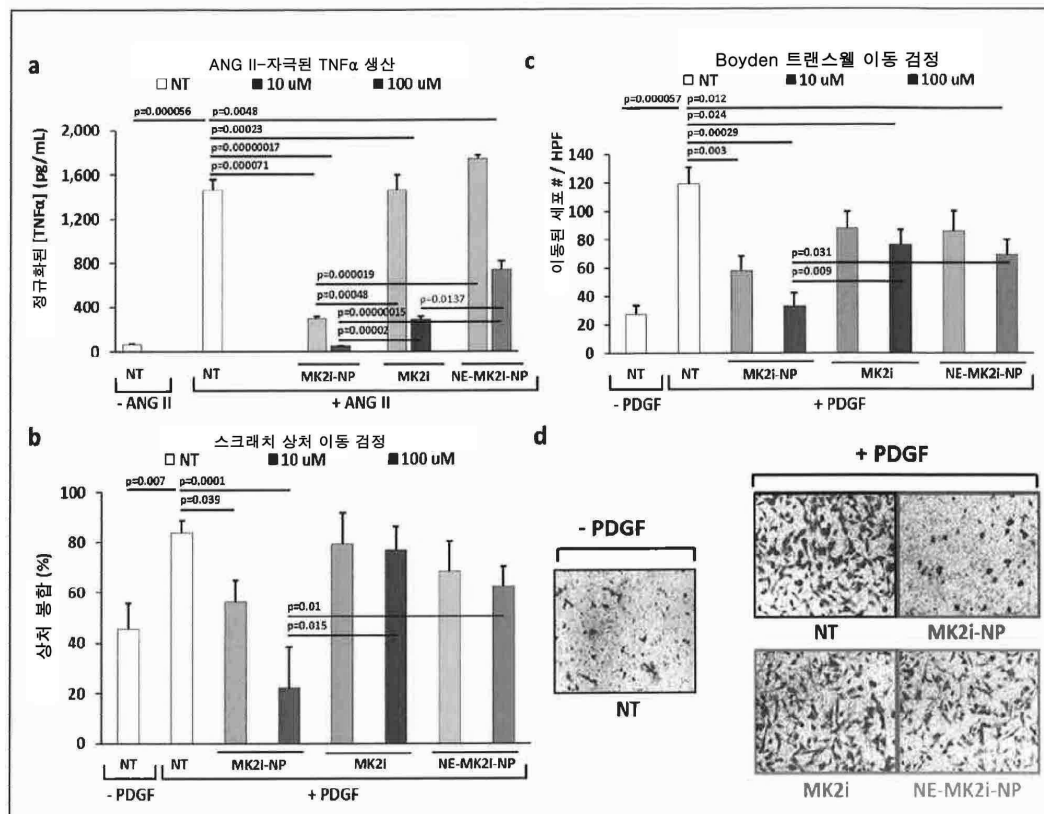
도면36



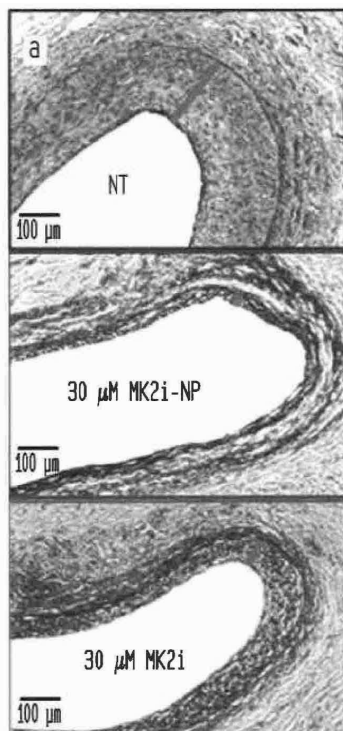
도면37



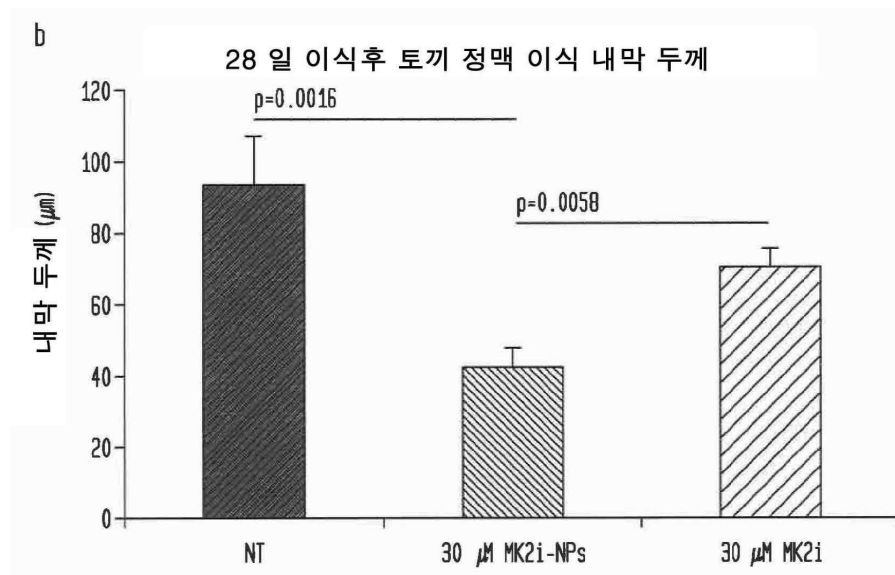
도면38



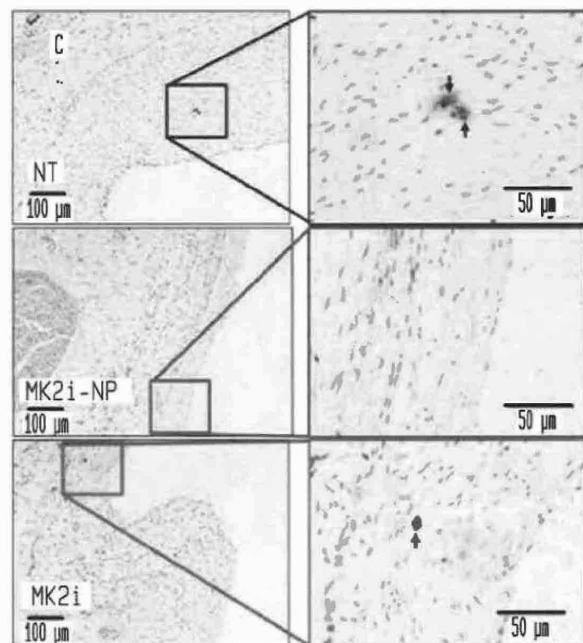
도면39a



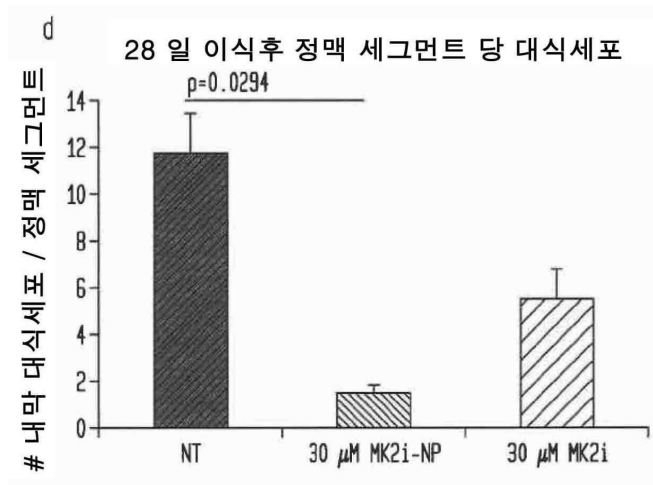
도면39b



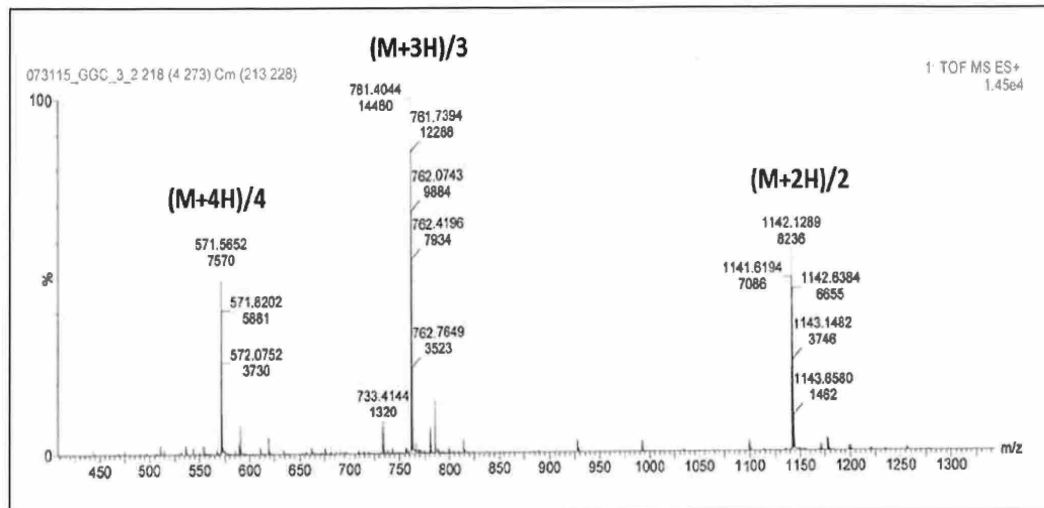
도면39c



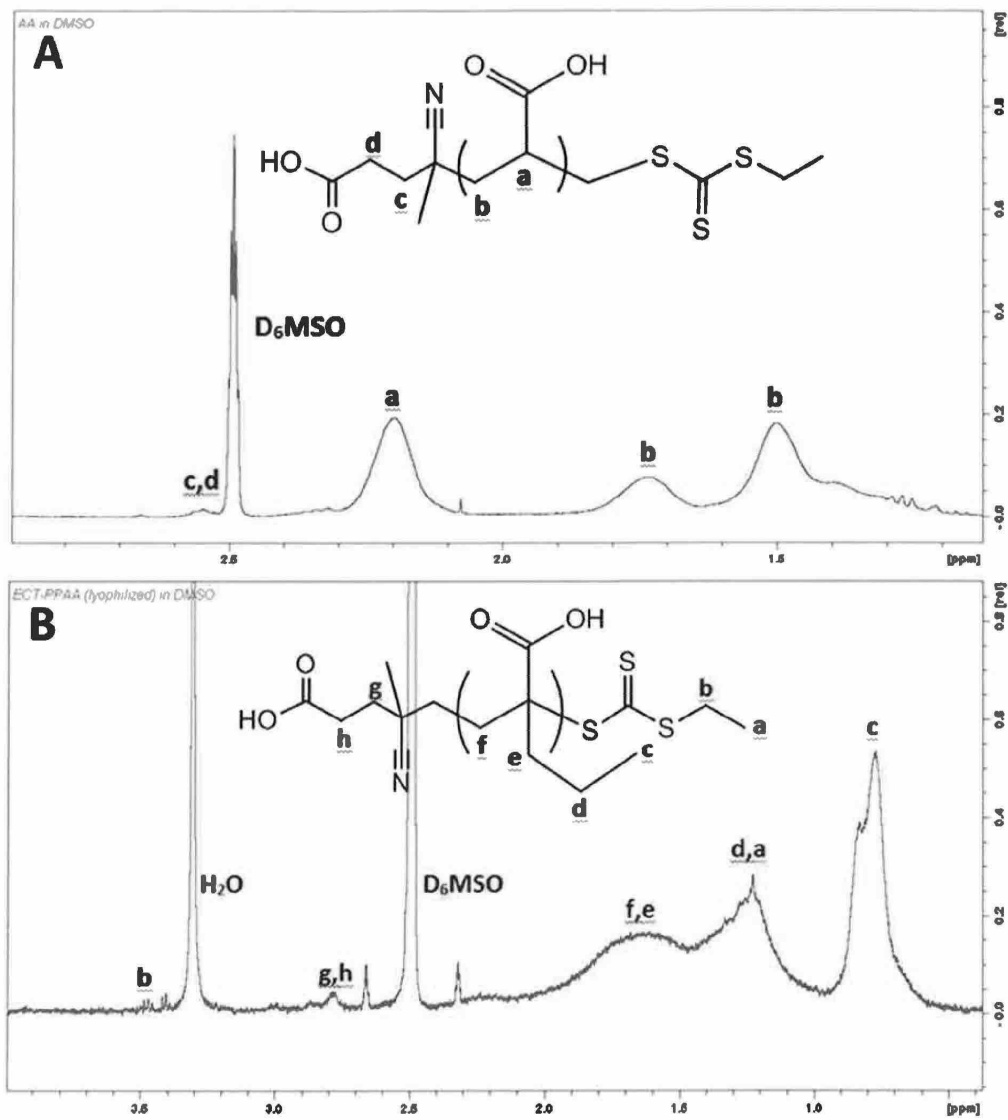
도면39d



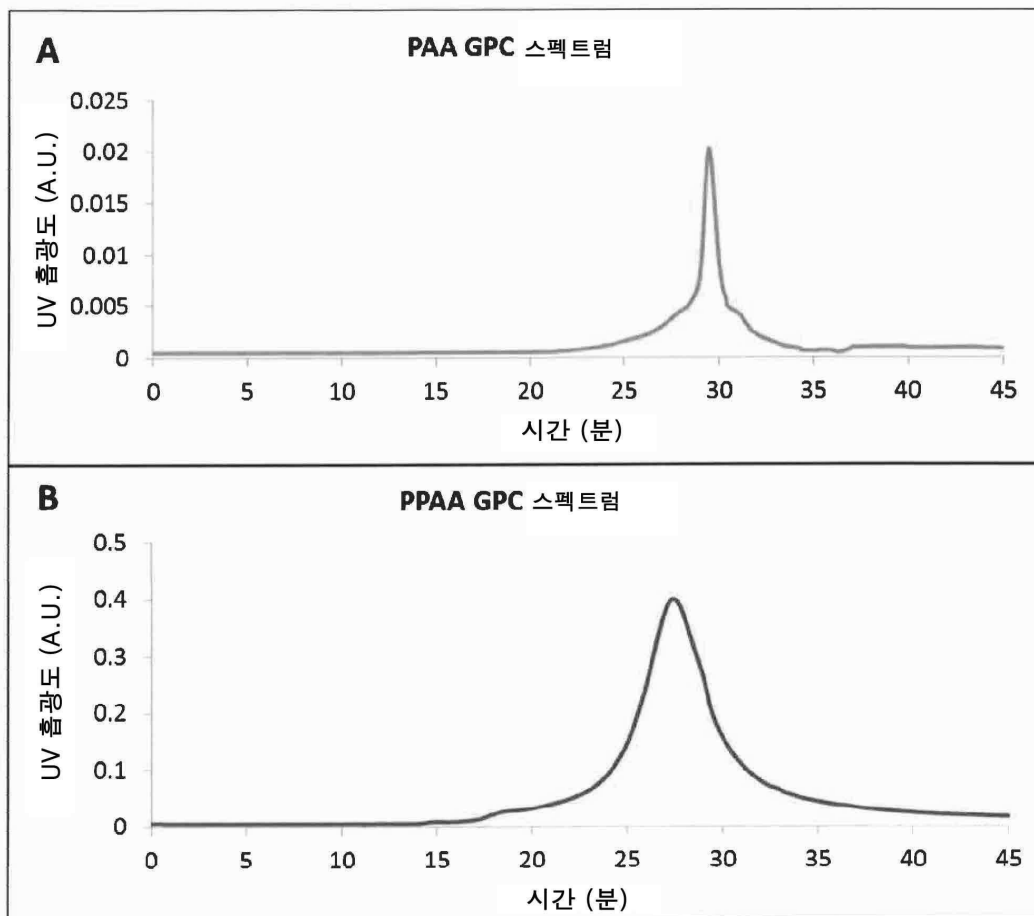
도면40



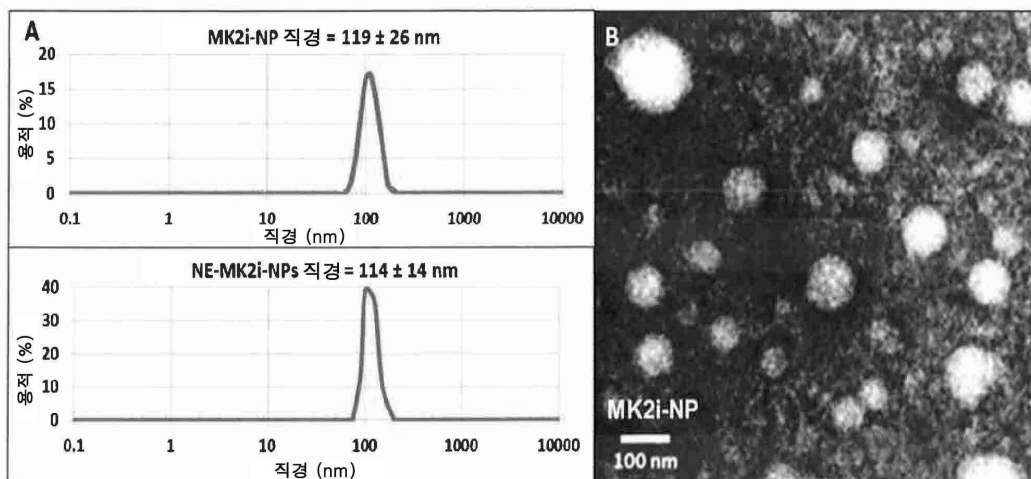
도면41



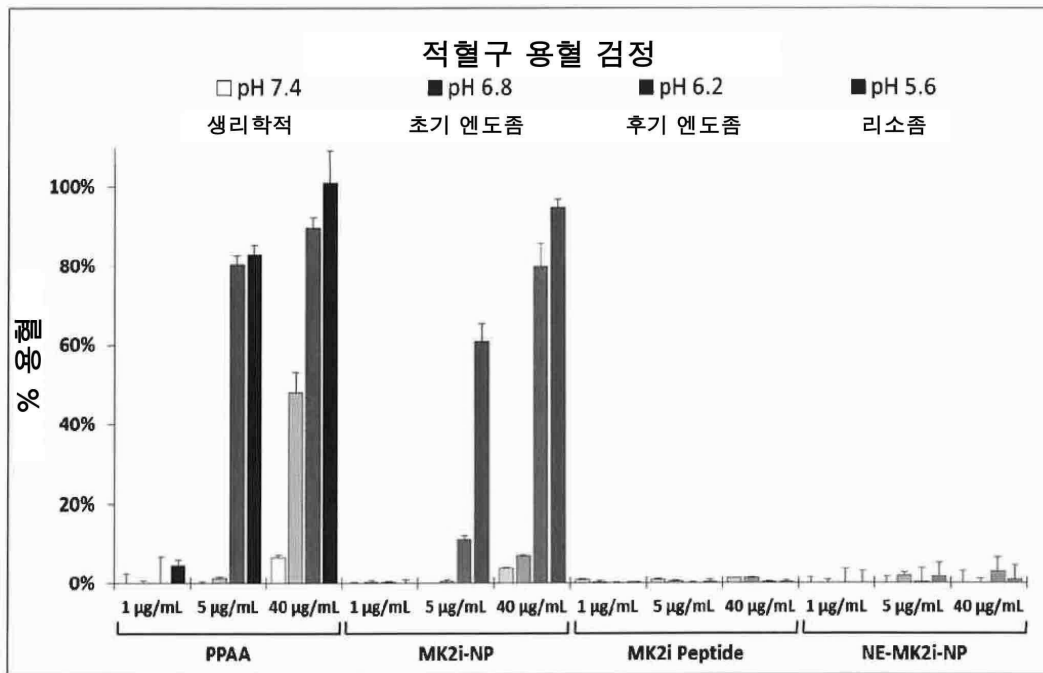
도면42



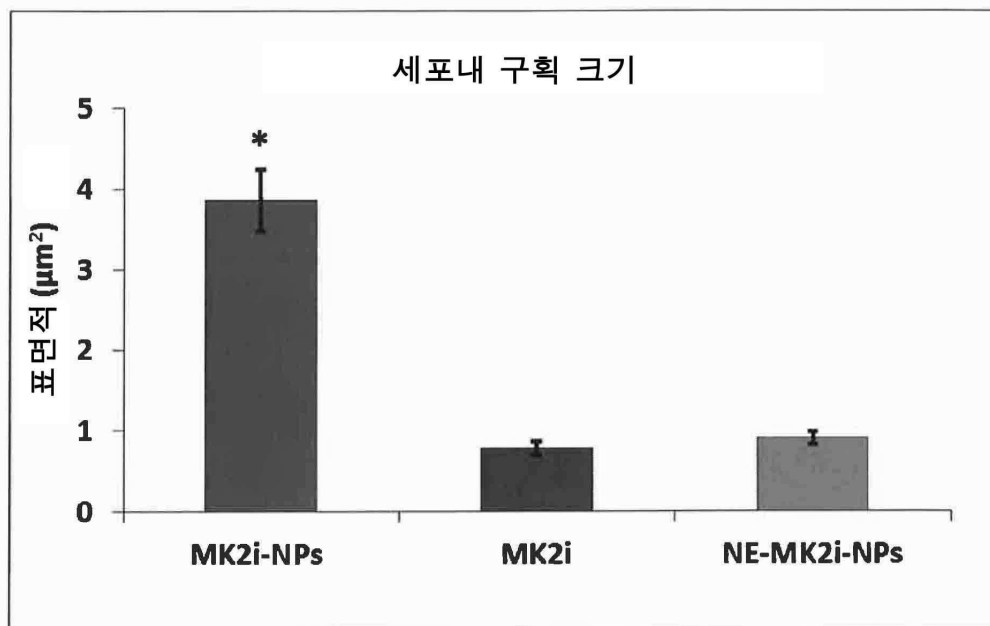
도면43



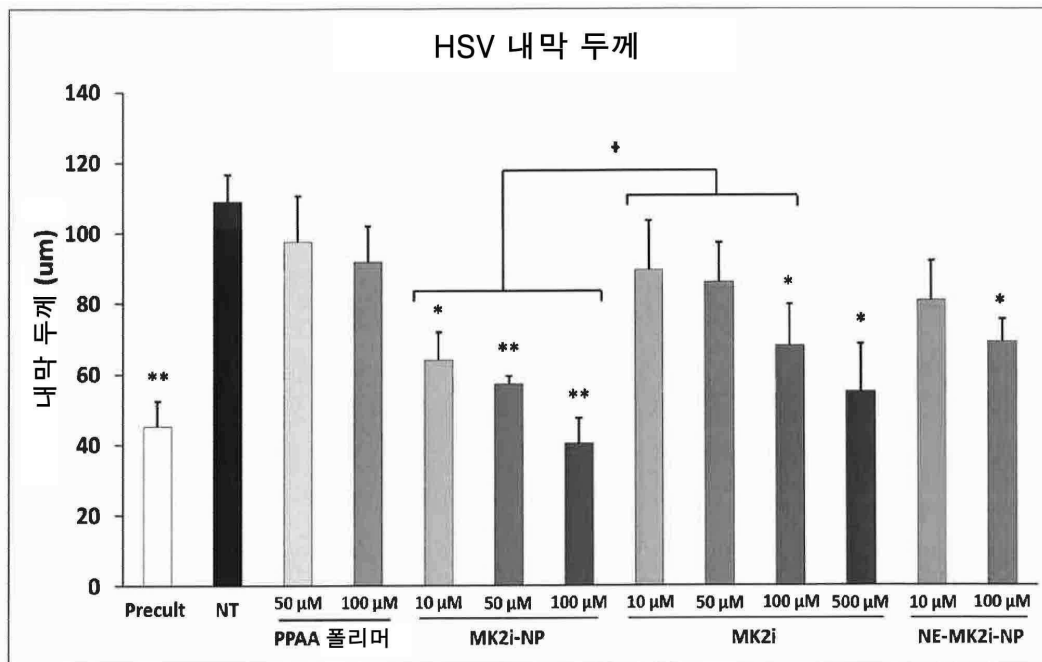
도면44



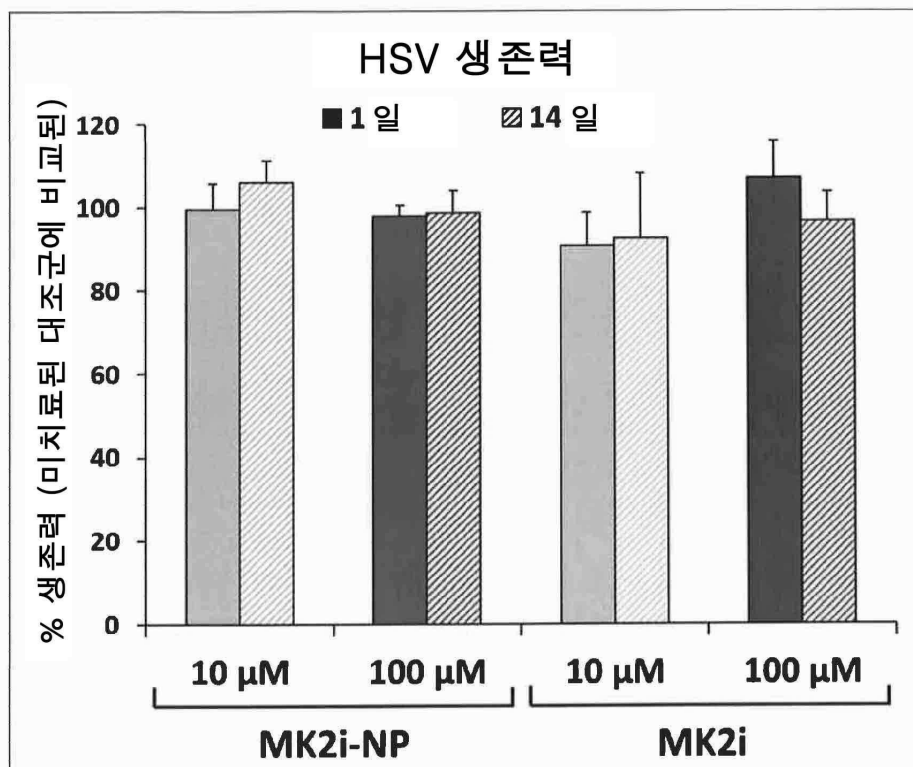
도면45



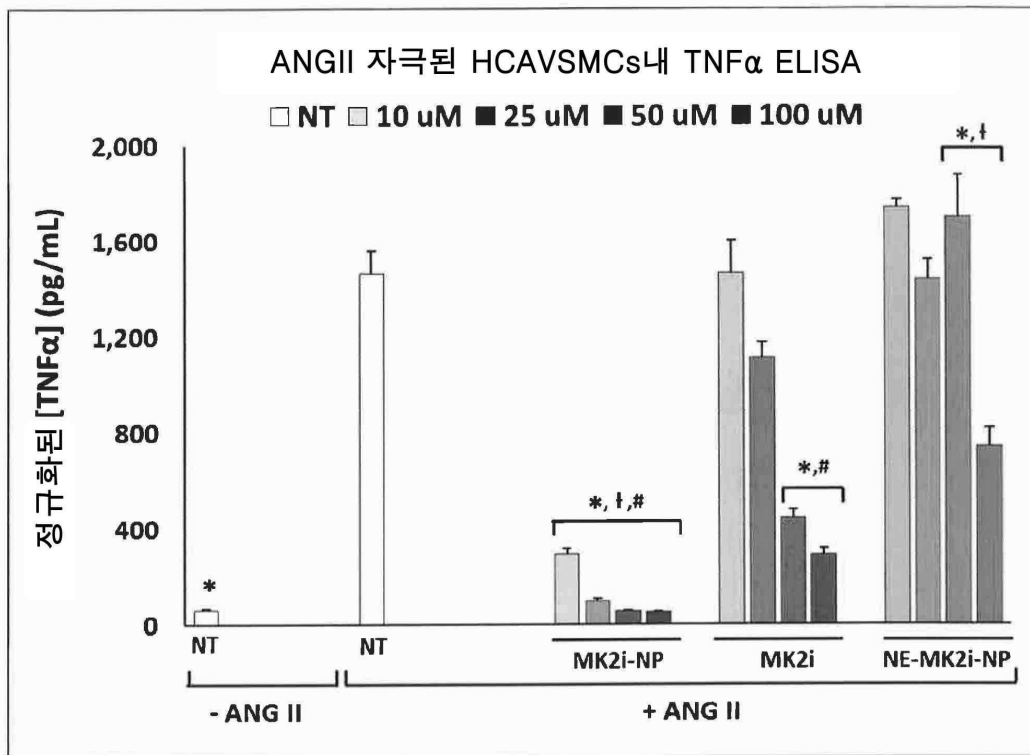
도면46



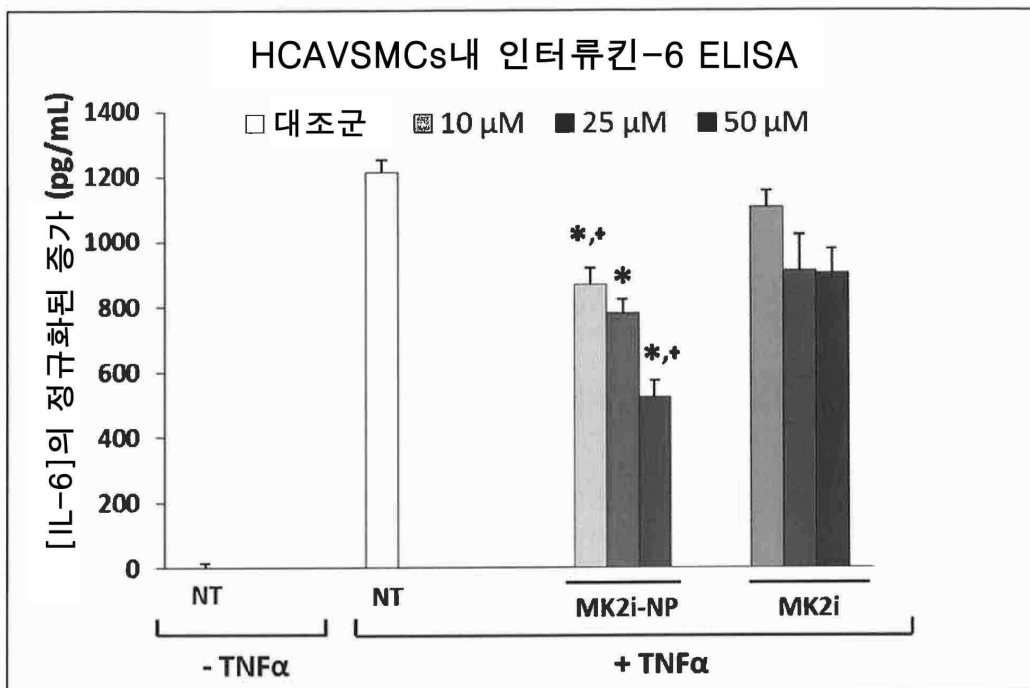
도면47



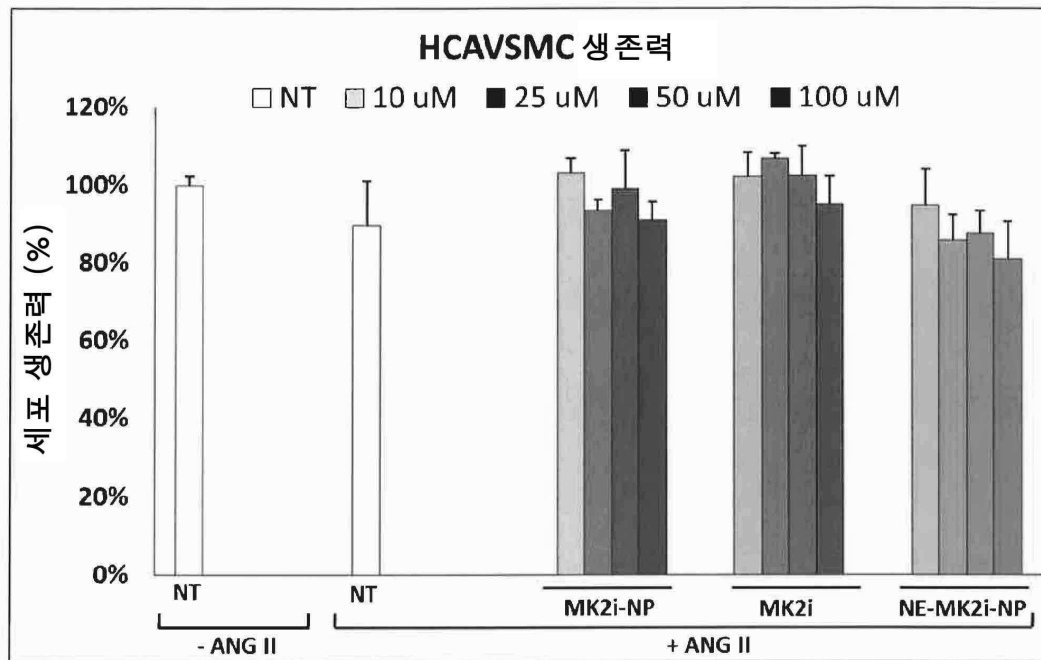
도면48



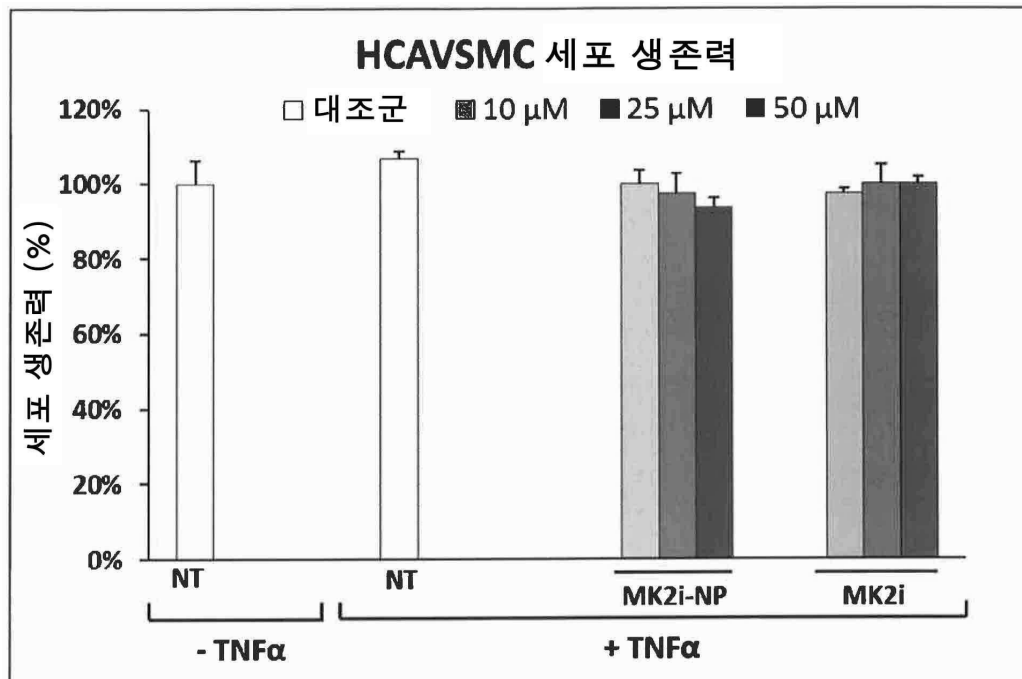
도면49



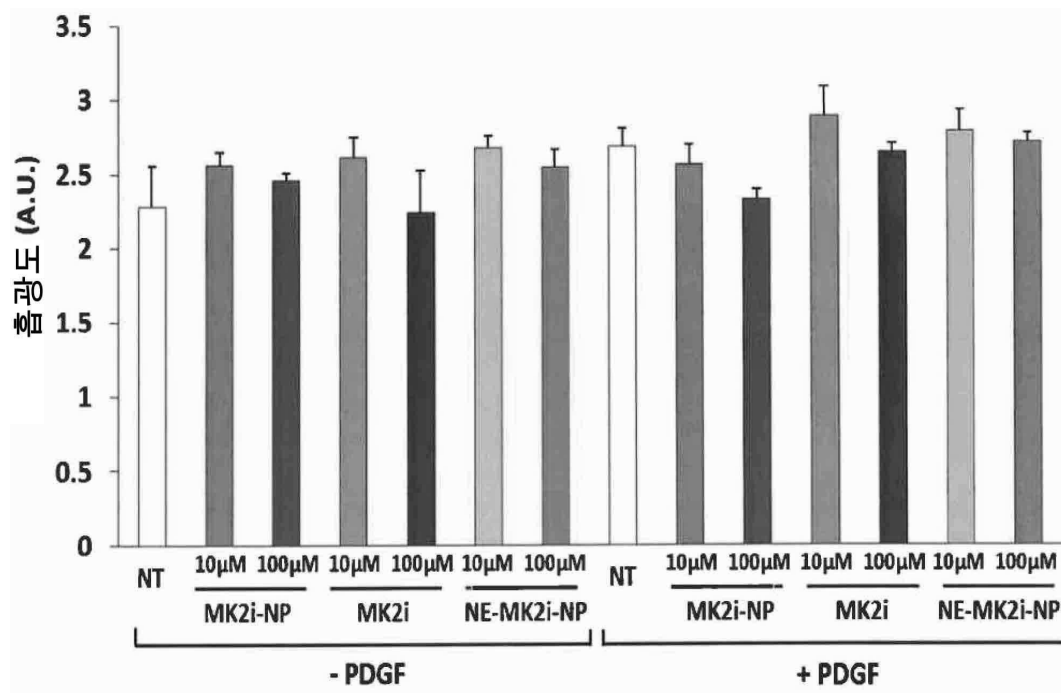
도면50



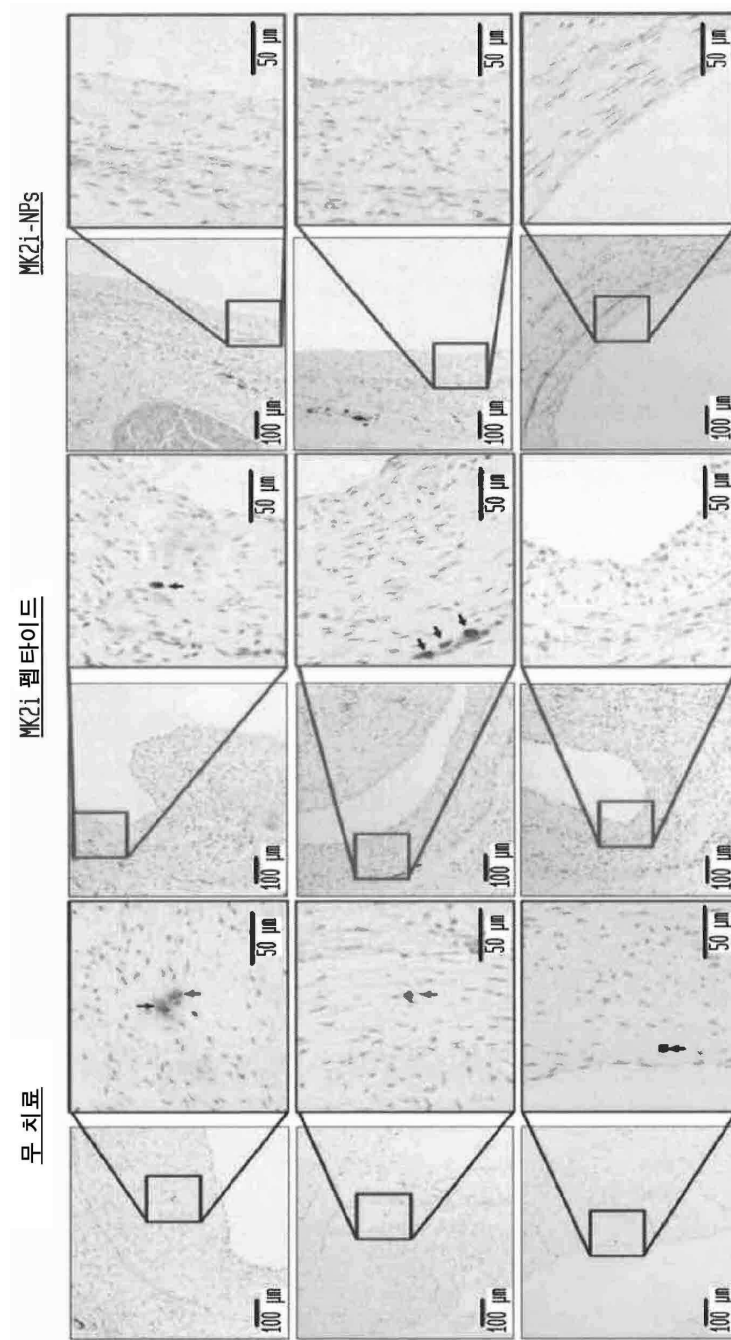
도면51



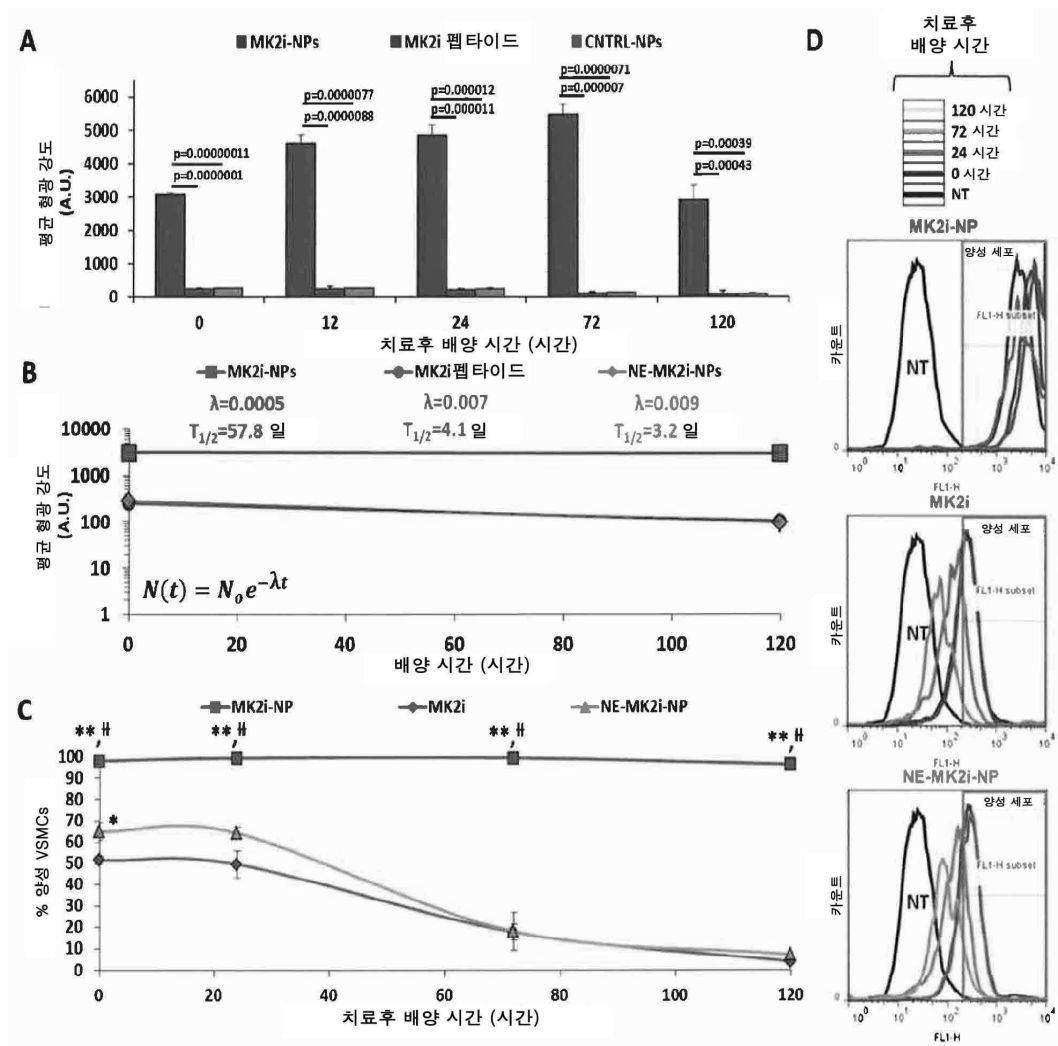
도면52



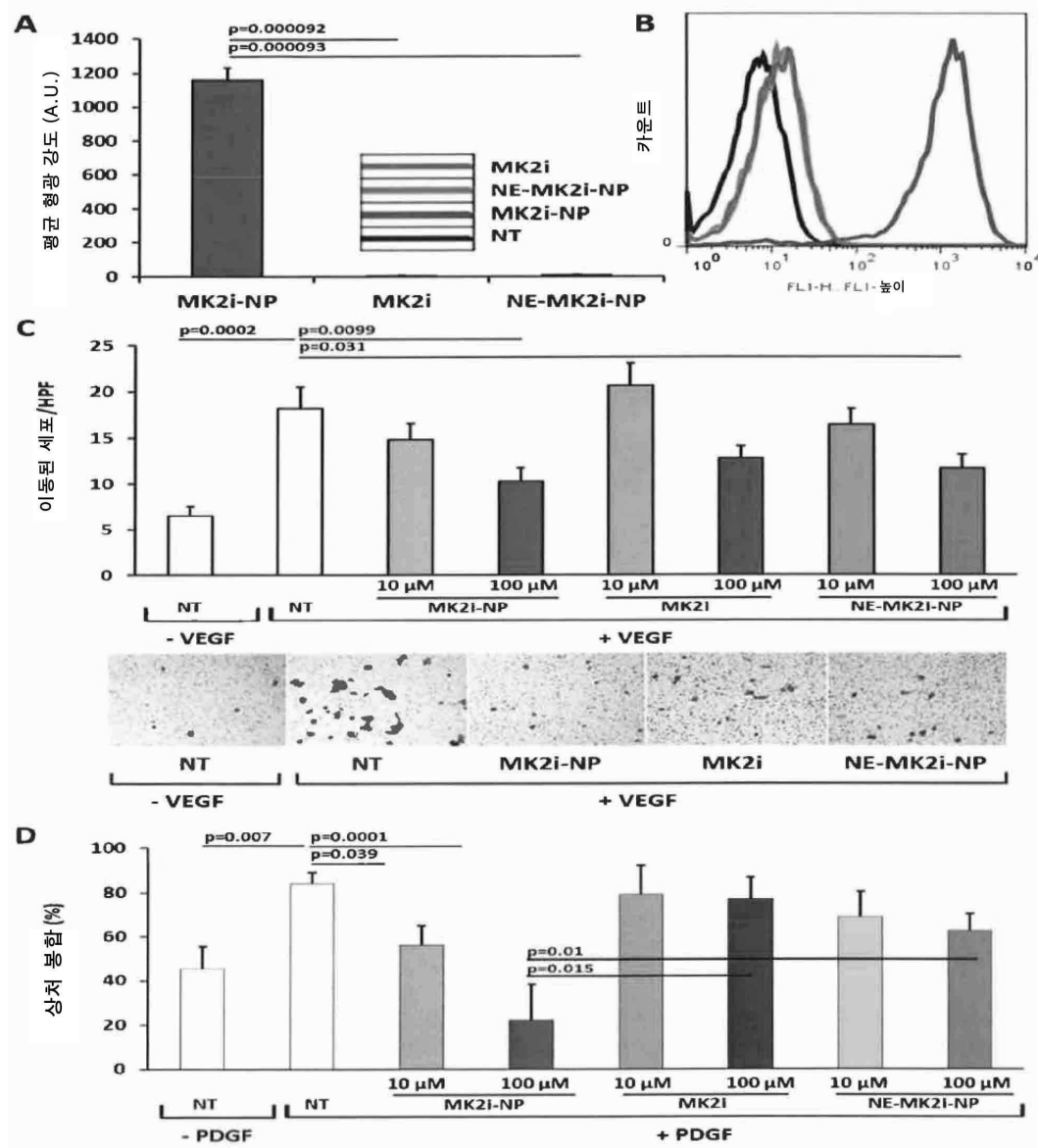
도면53



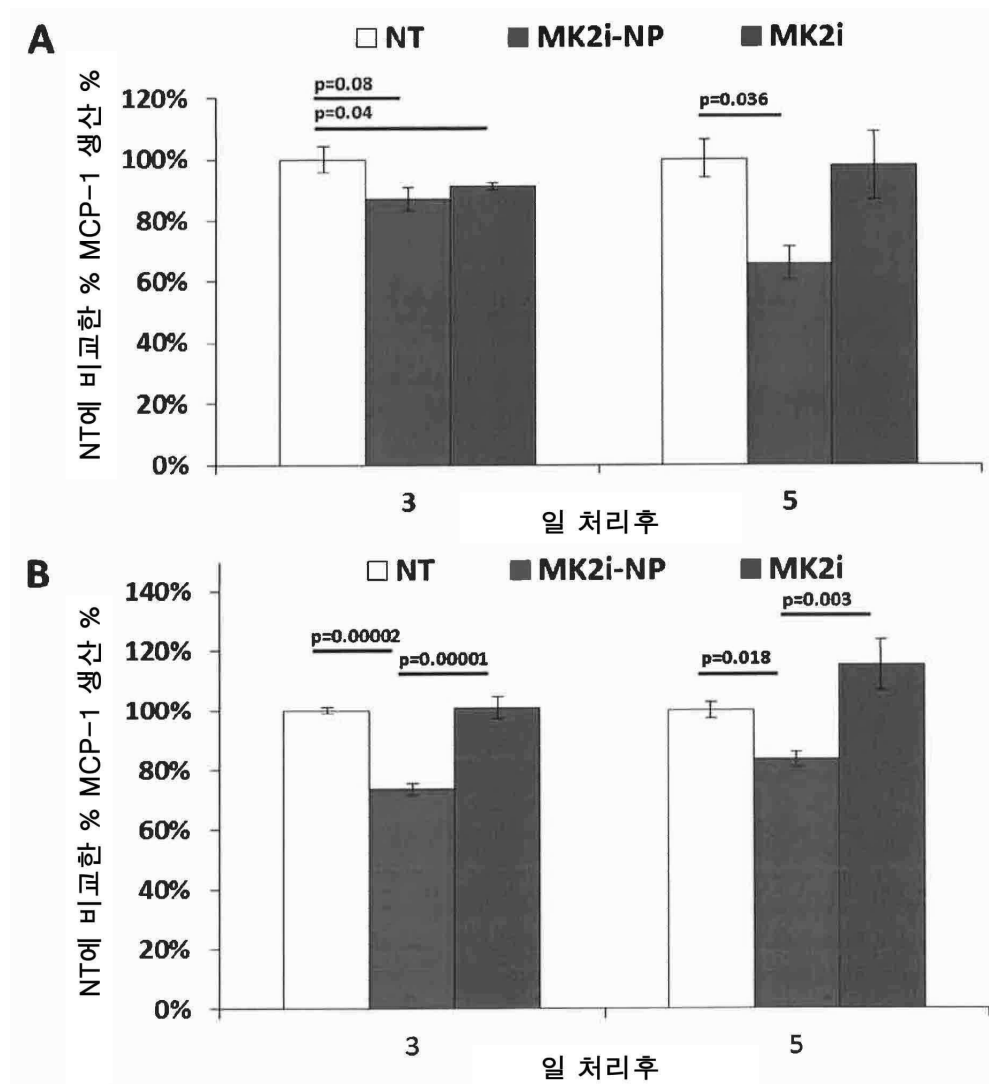
도면54



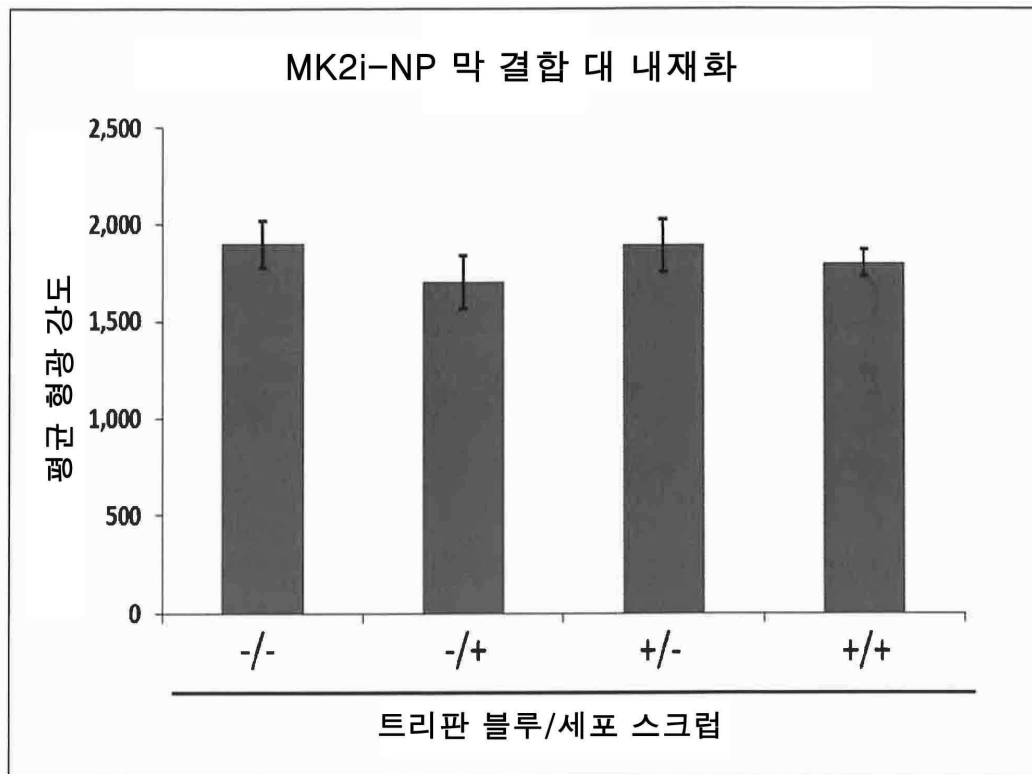
도면55



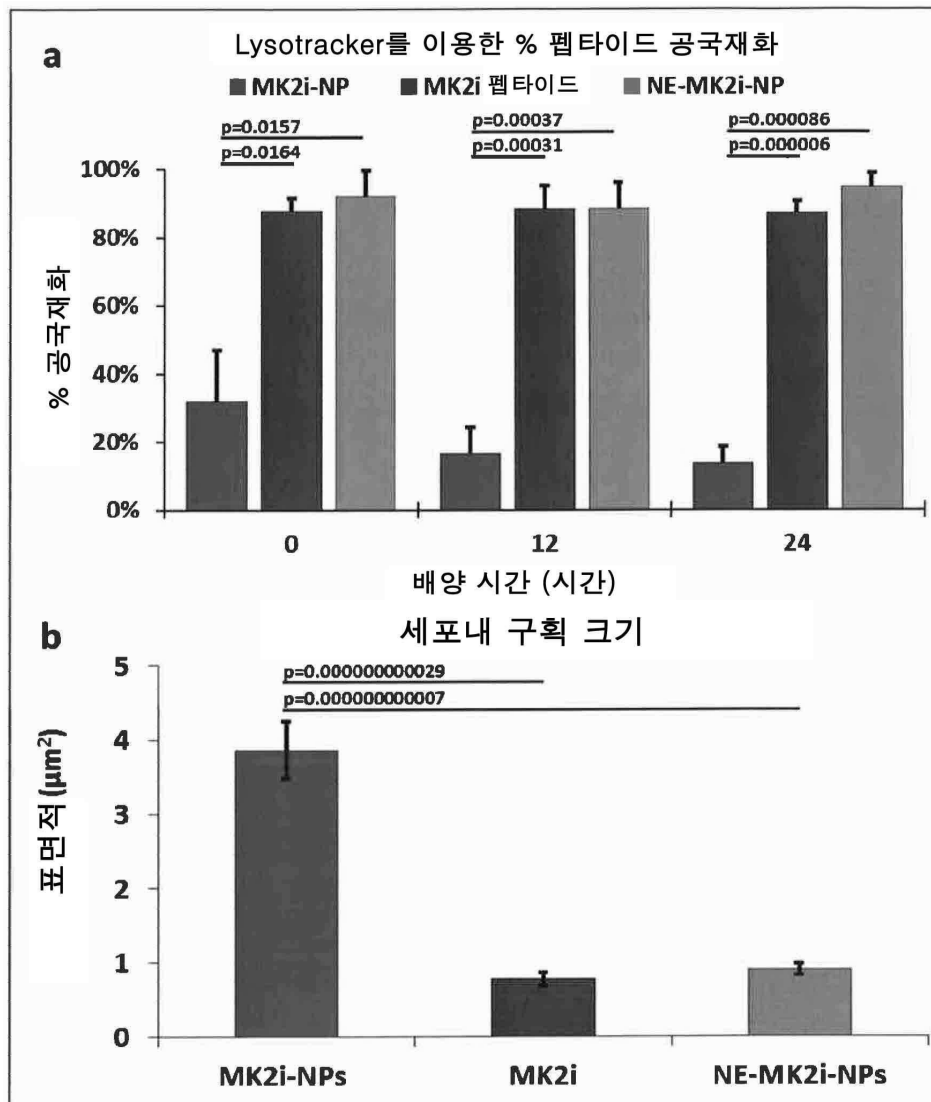
도면56



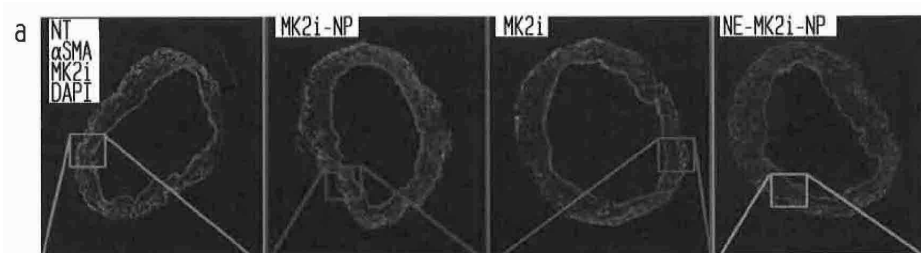
도면57



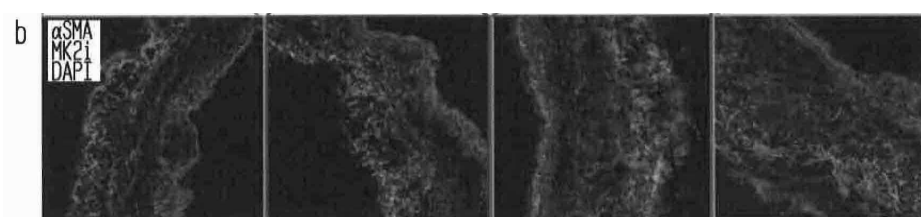
도면58



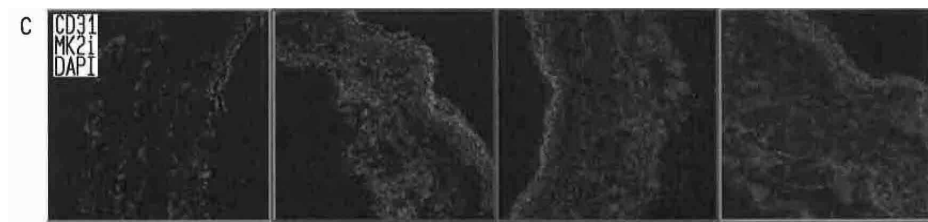
도면59a



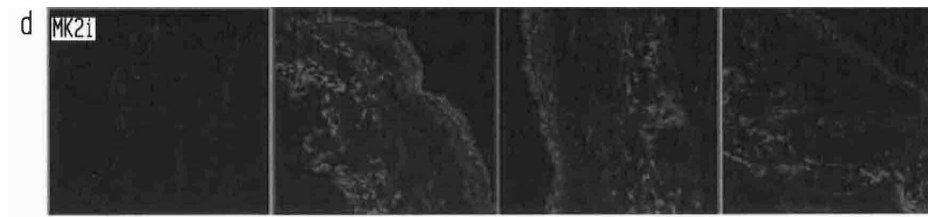
도면59b



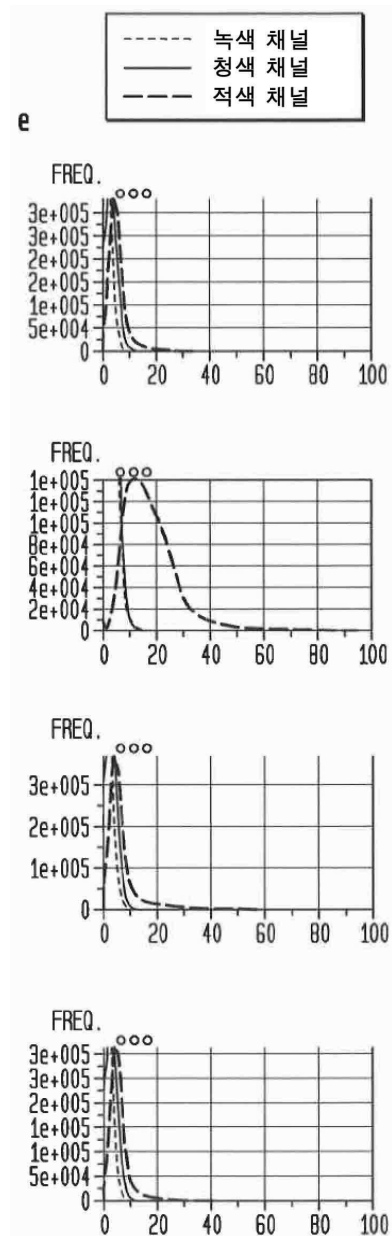
도면59c



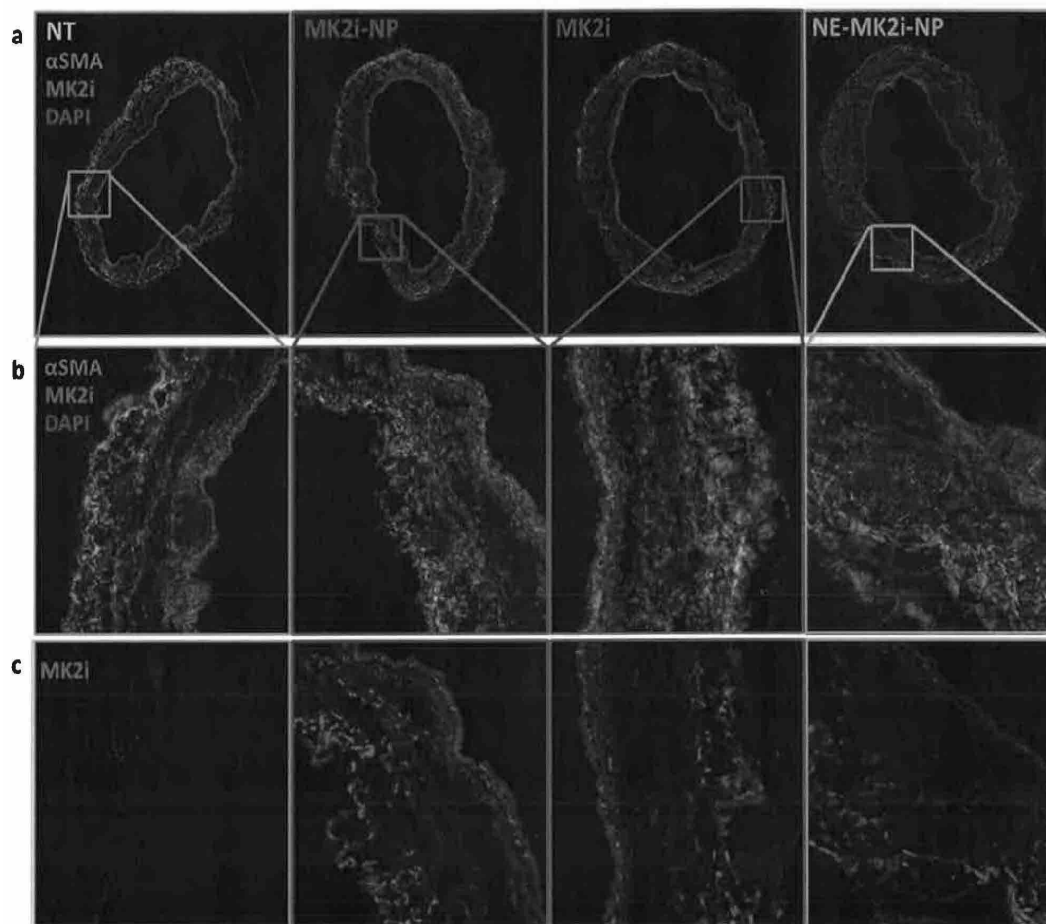
도면59d



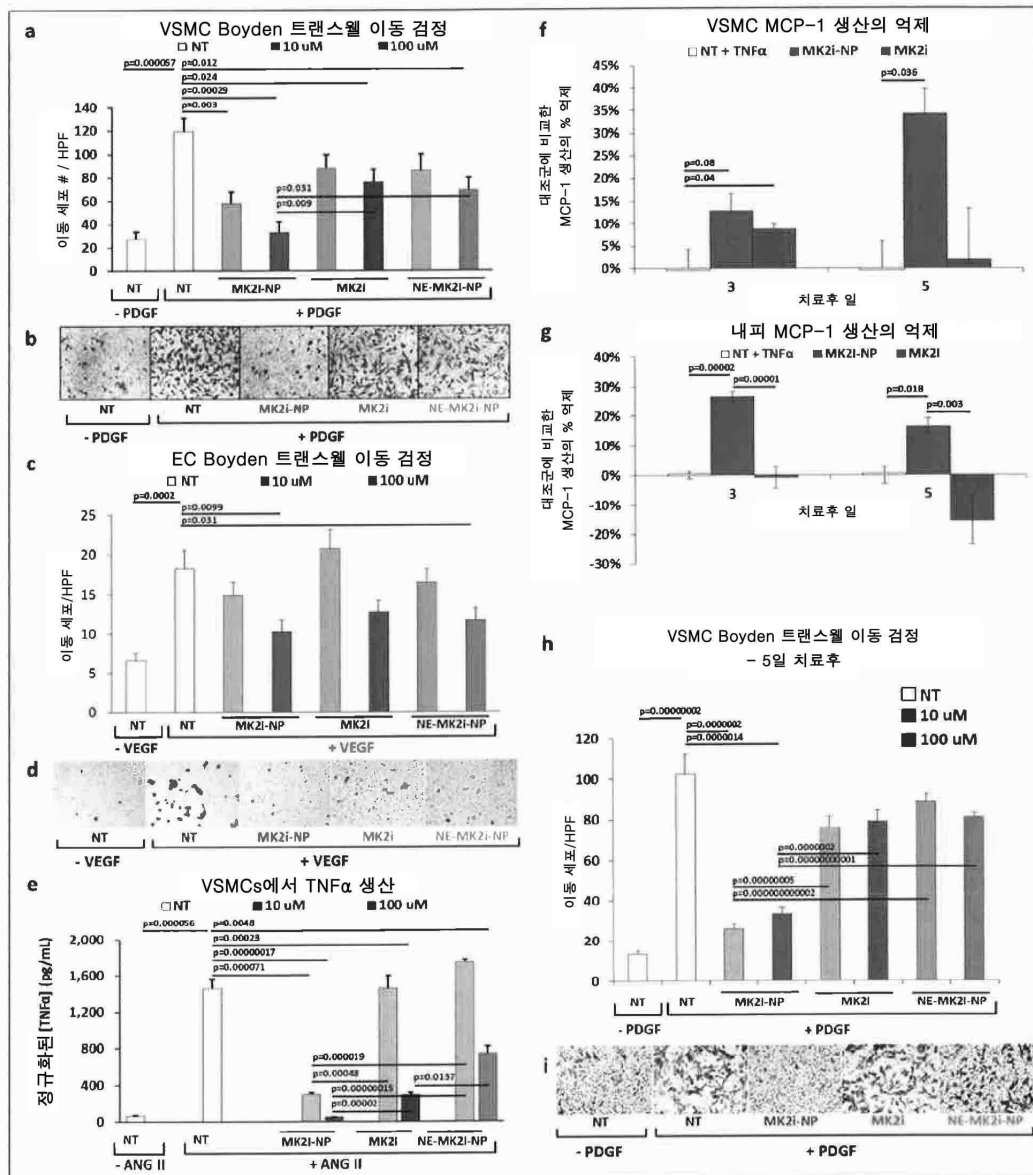
도면59e



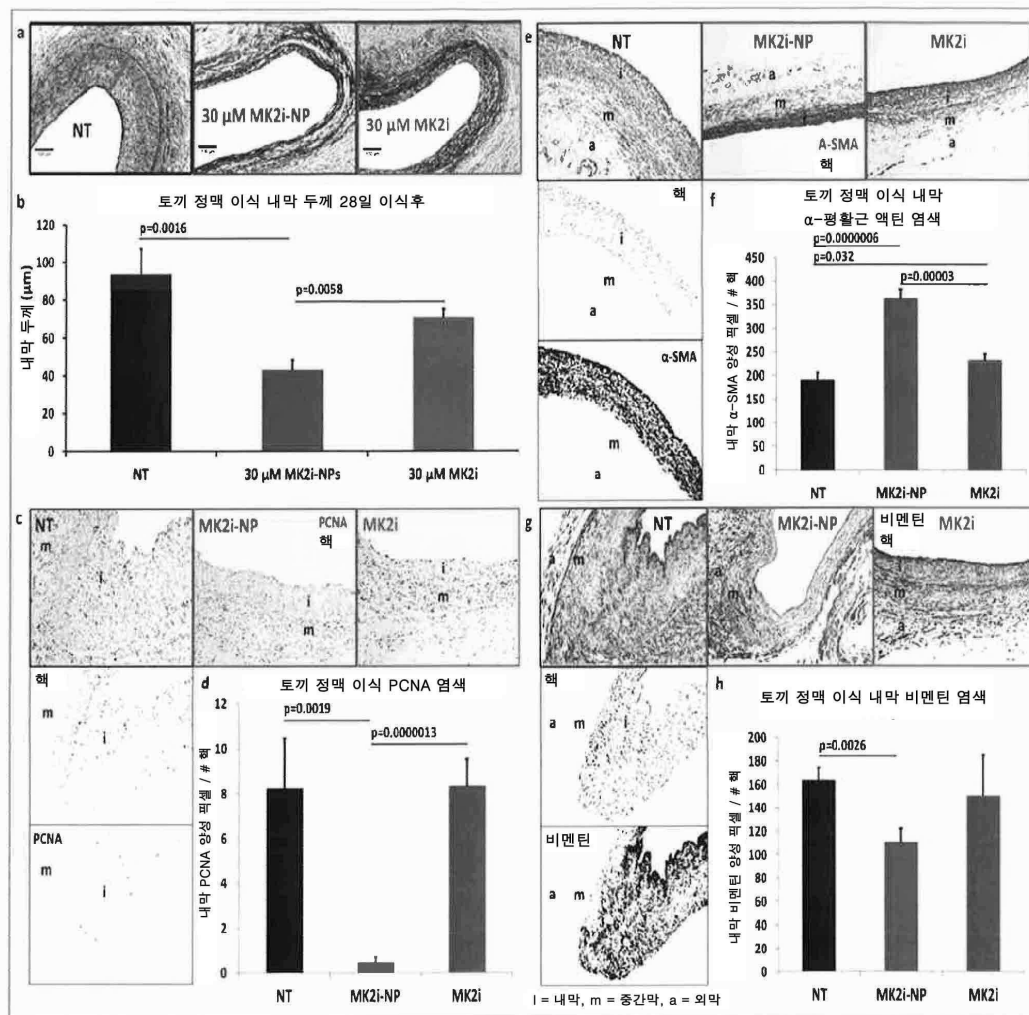
도면60



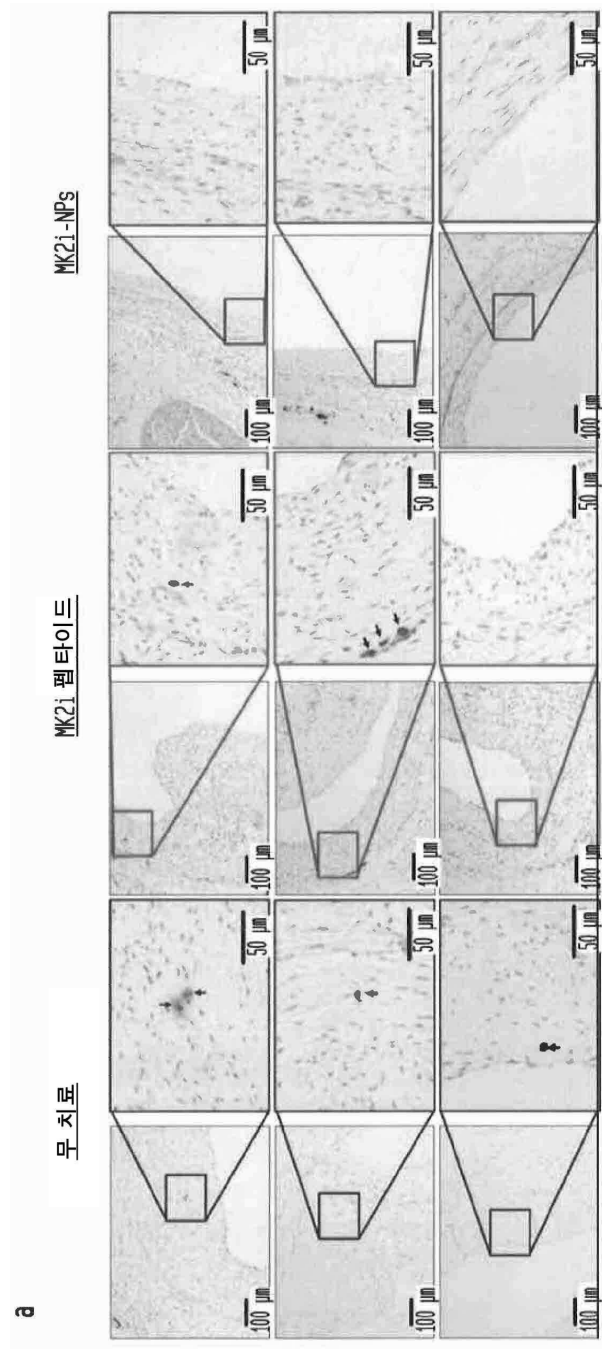
도면61



도면62



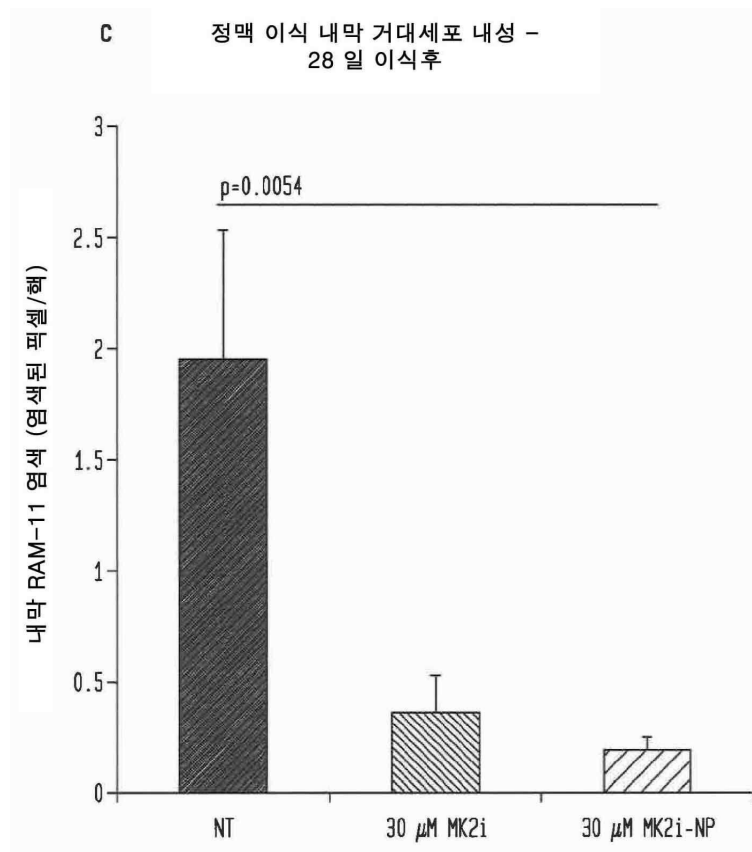
도면63a



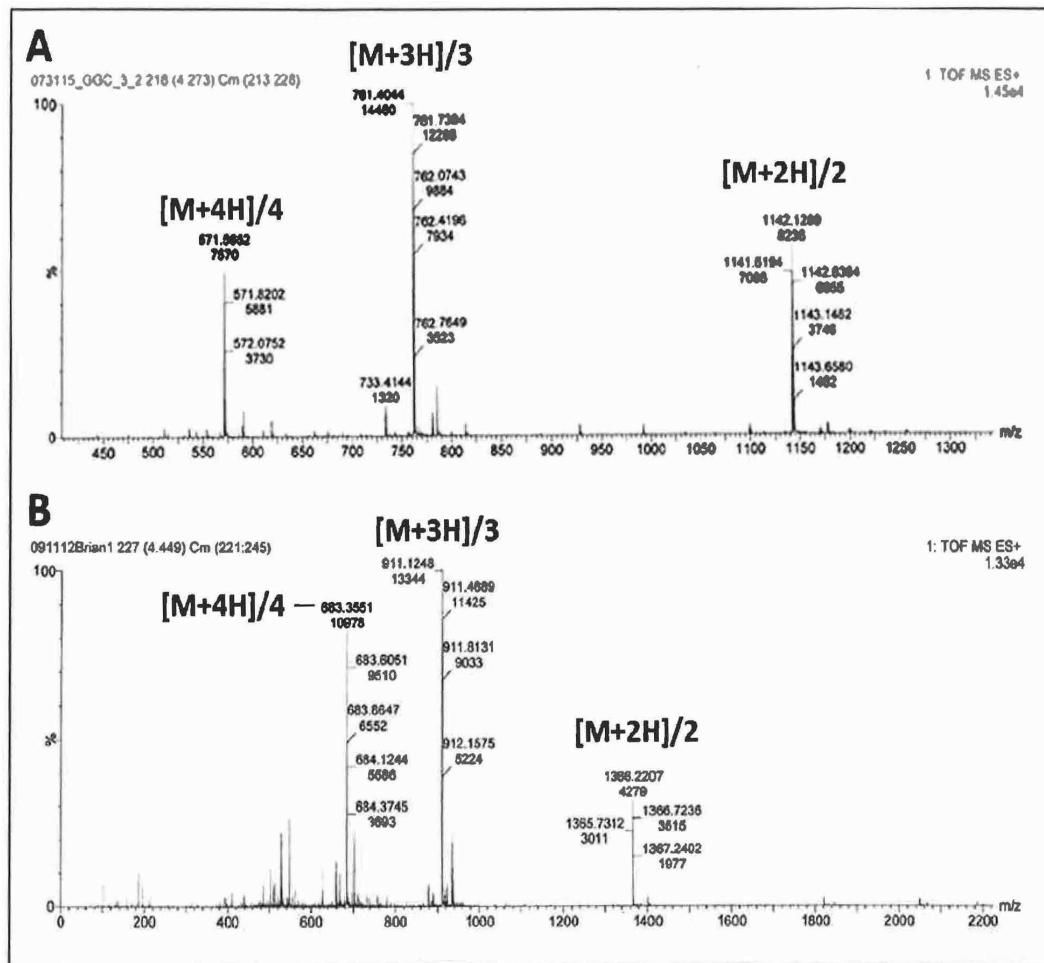
도면63b



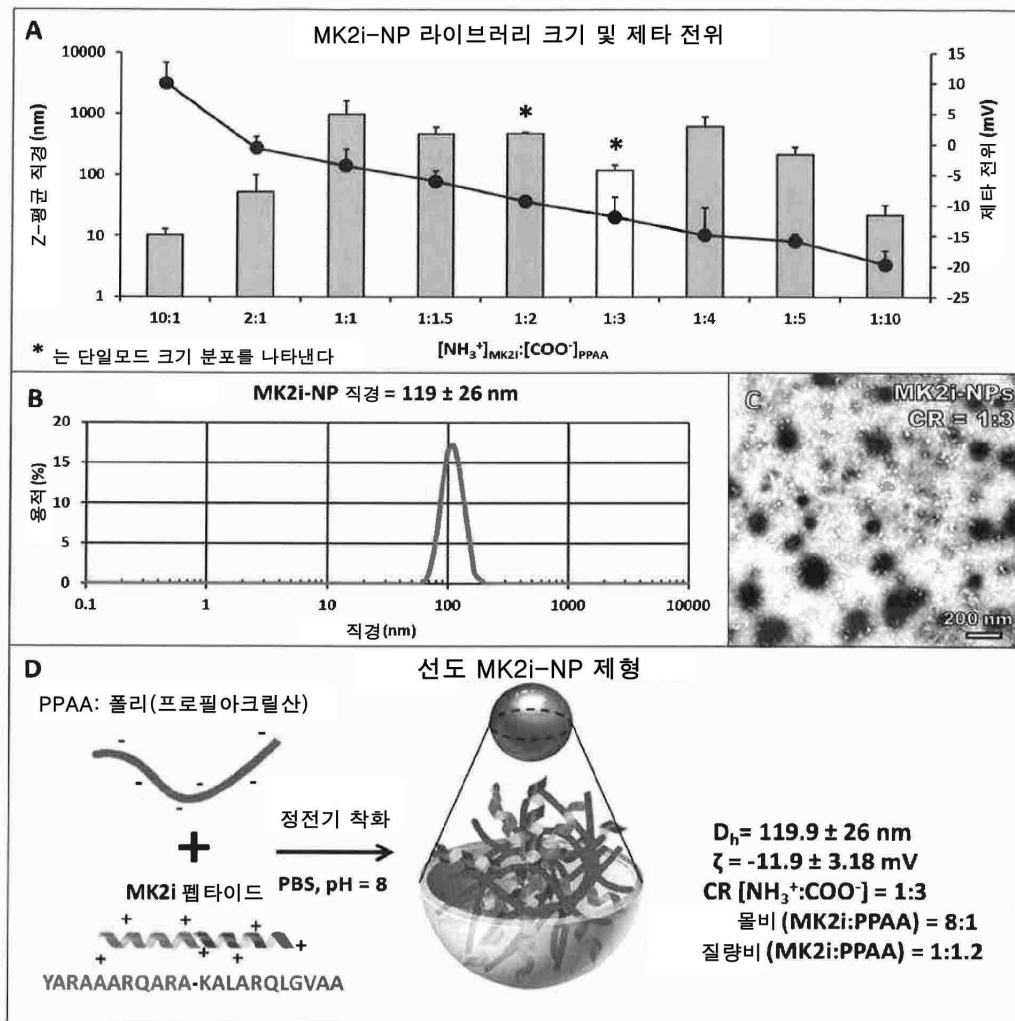
도면63c



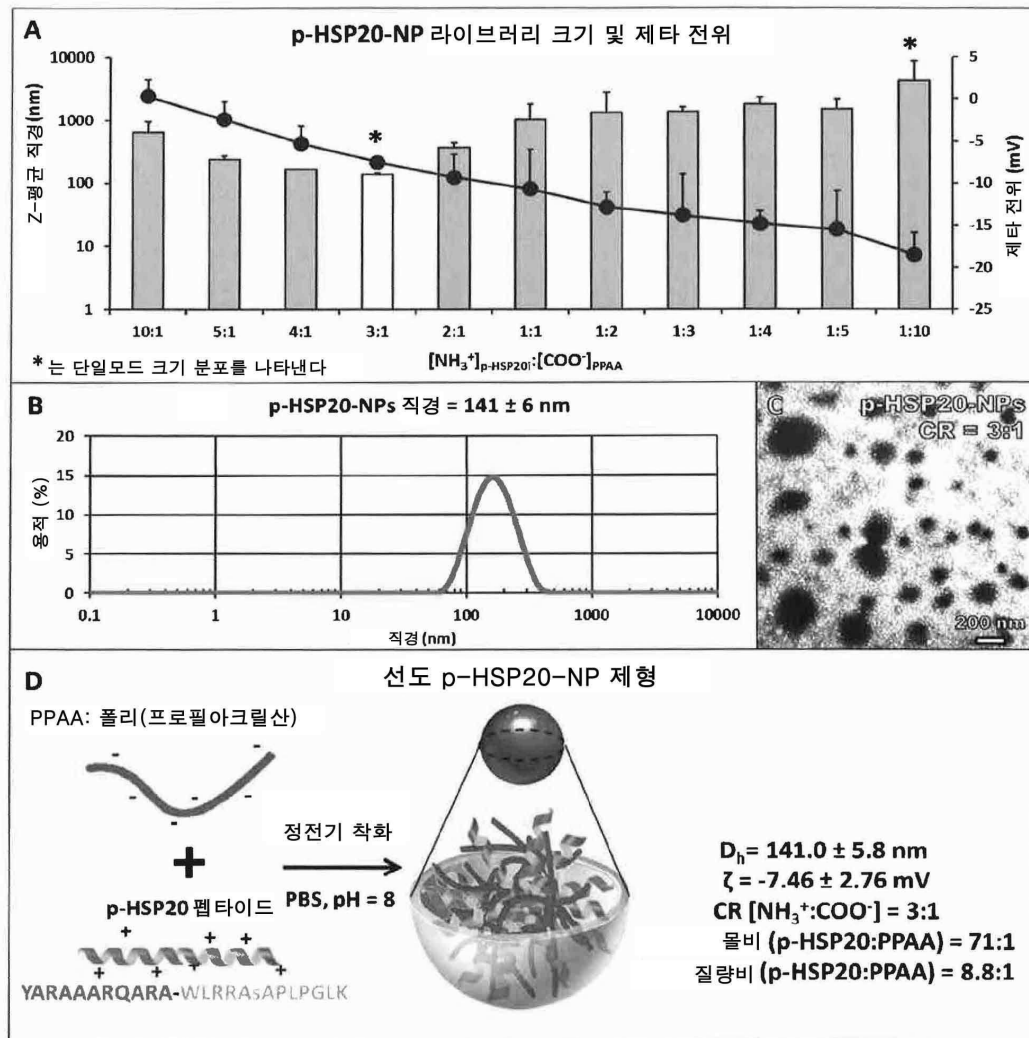
도면64



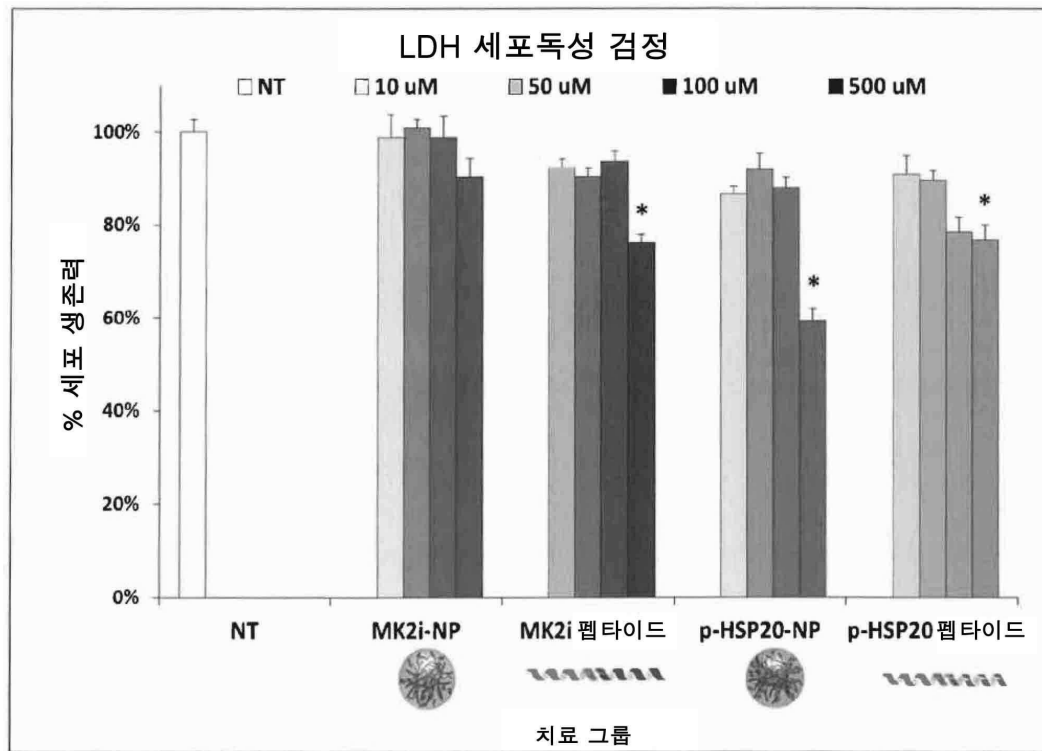
도면65



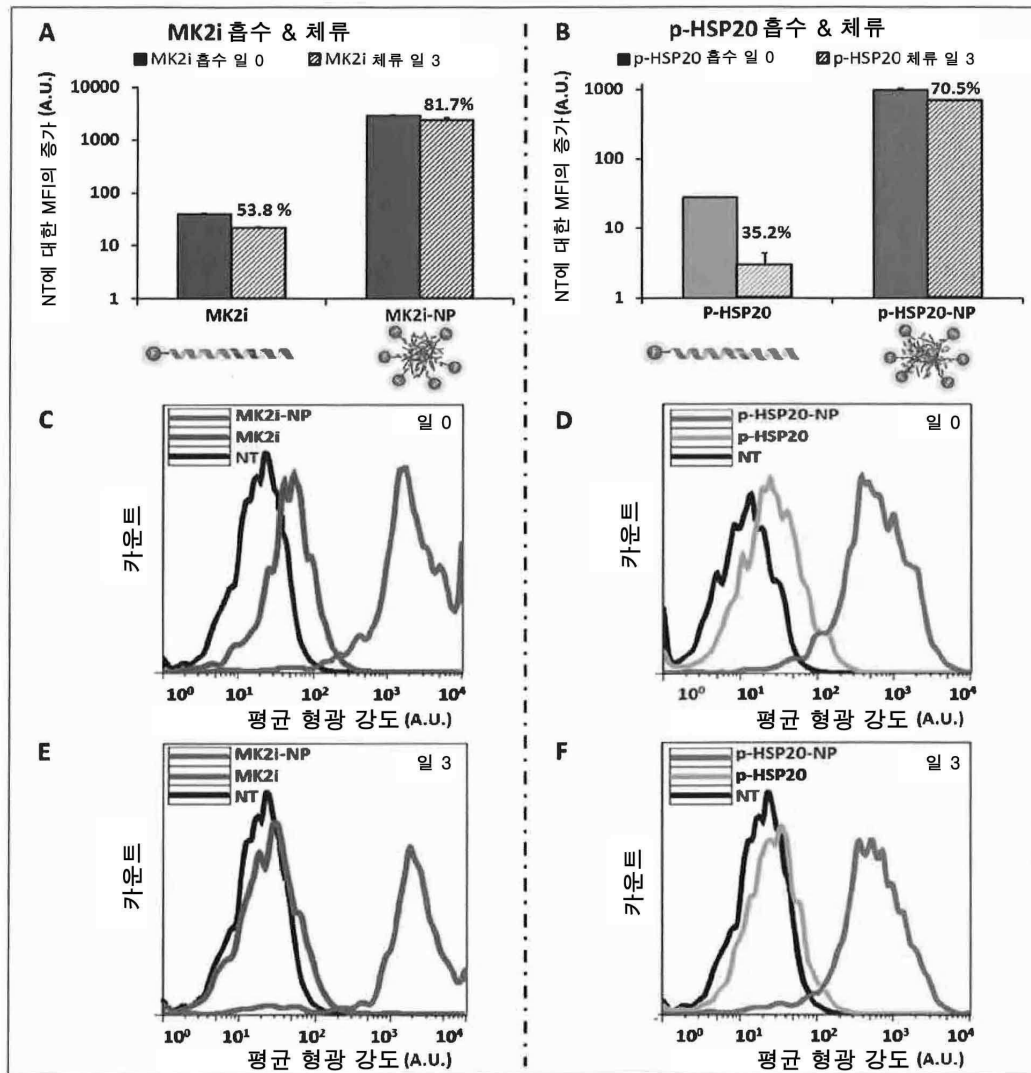
도면66



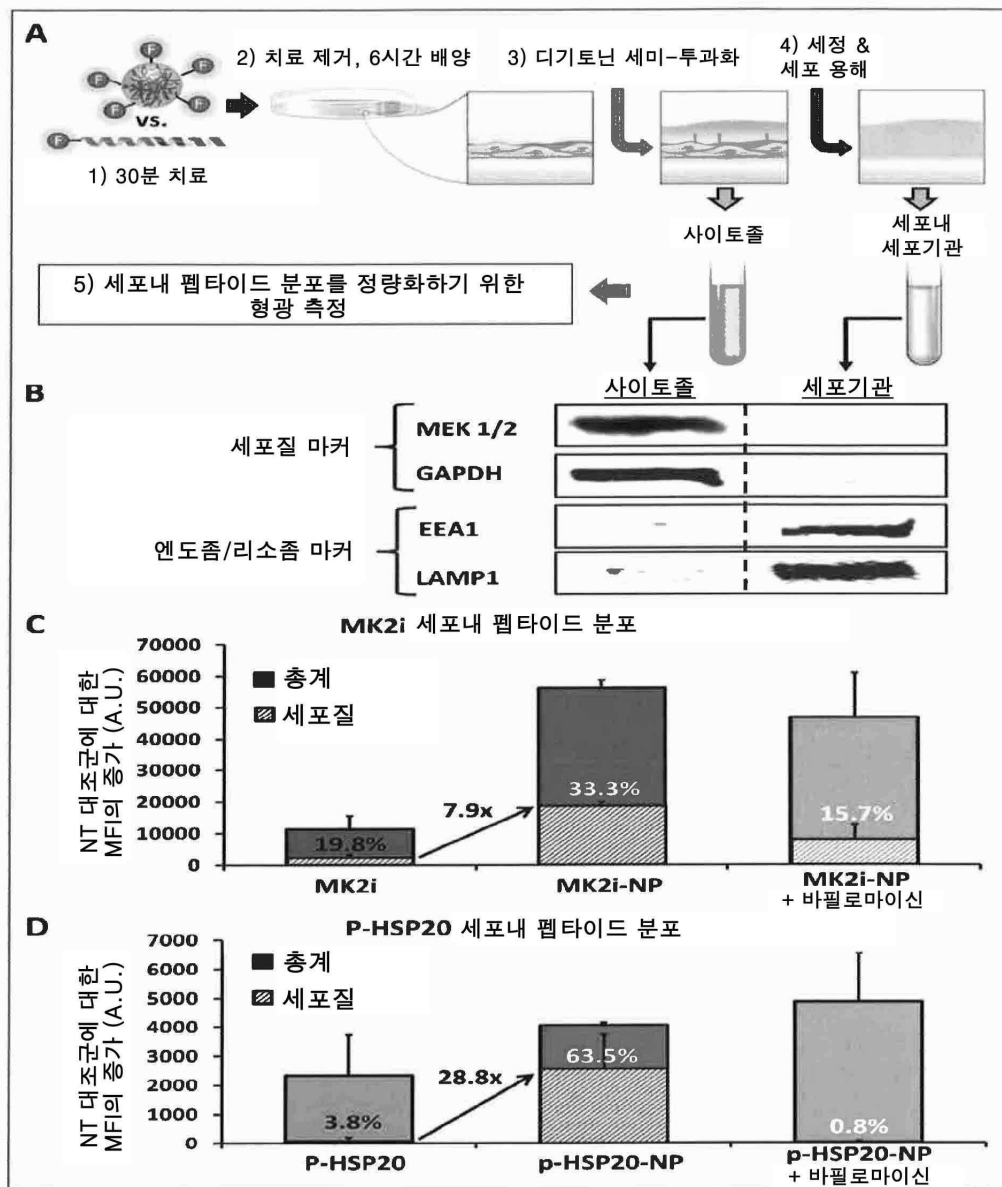
도면67



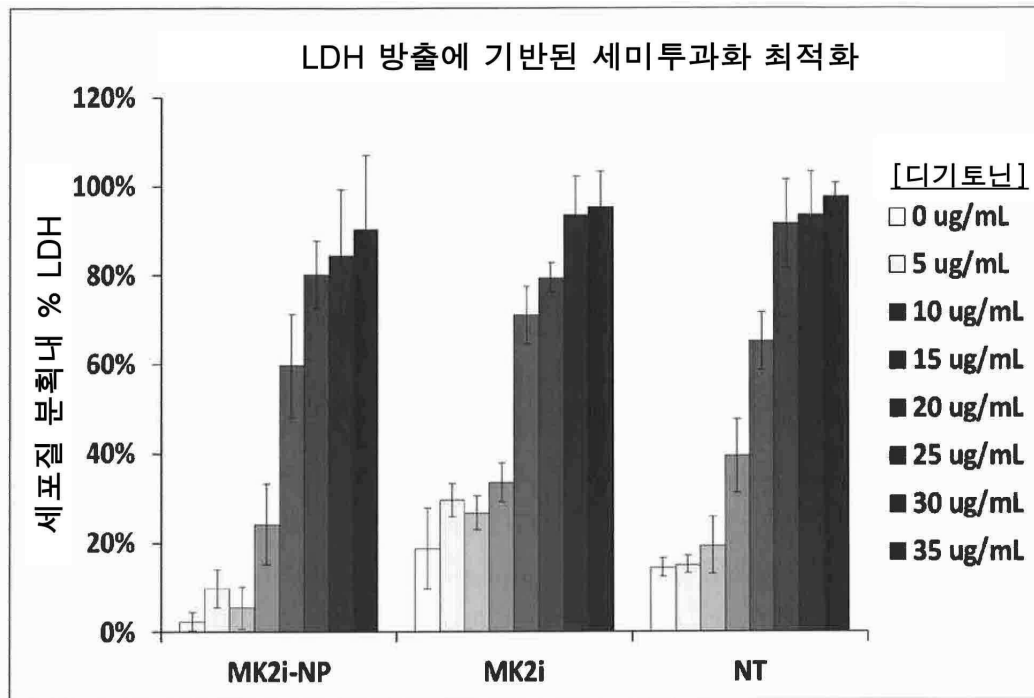
도면68



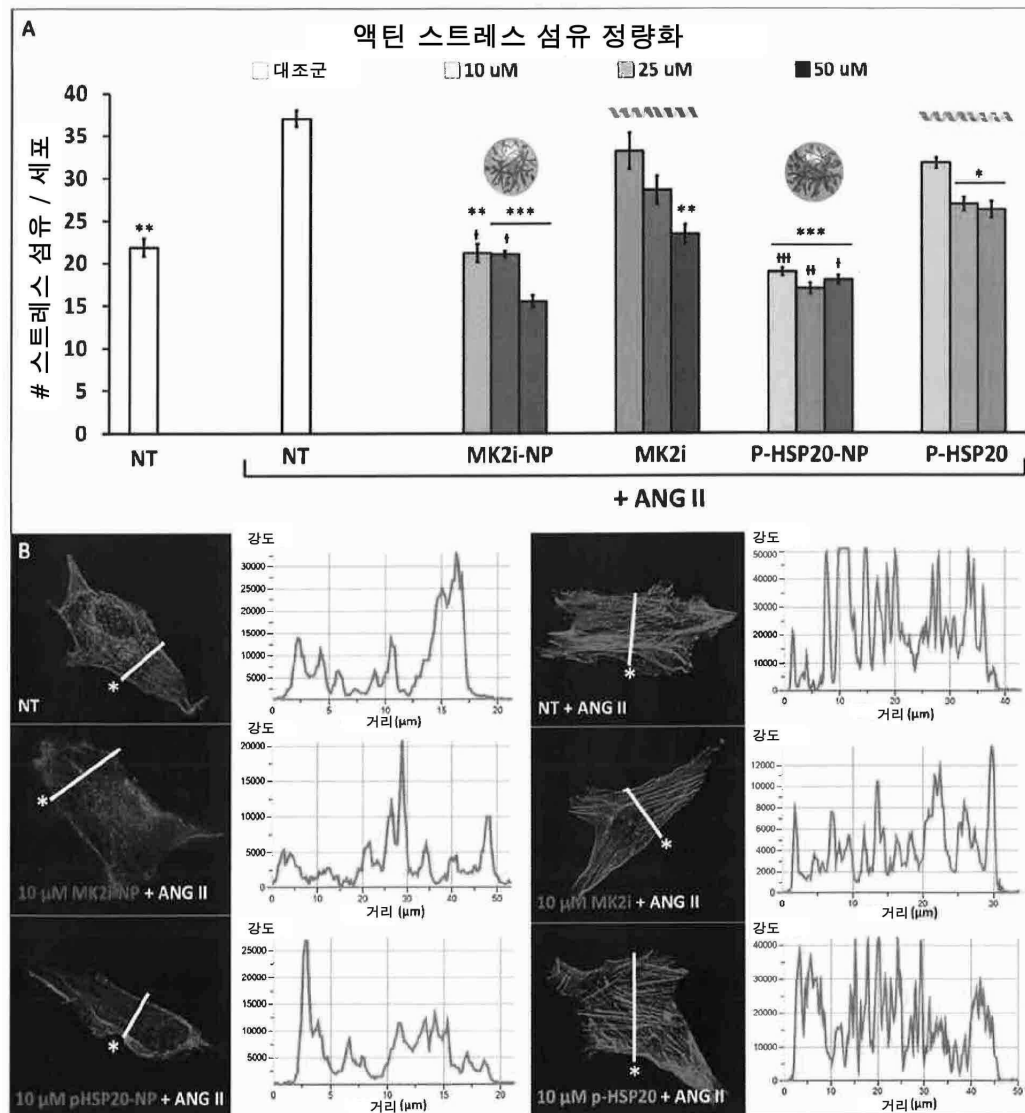
도면69



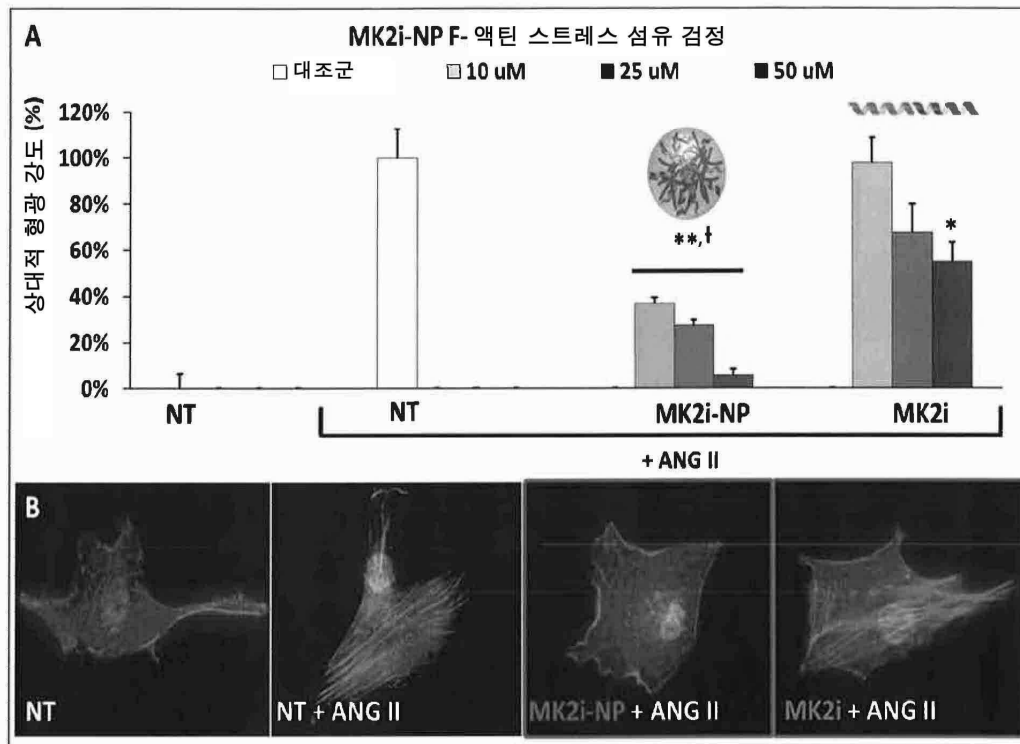
도면70



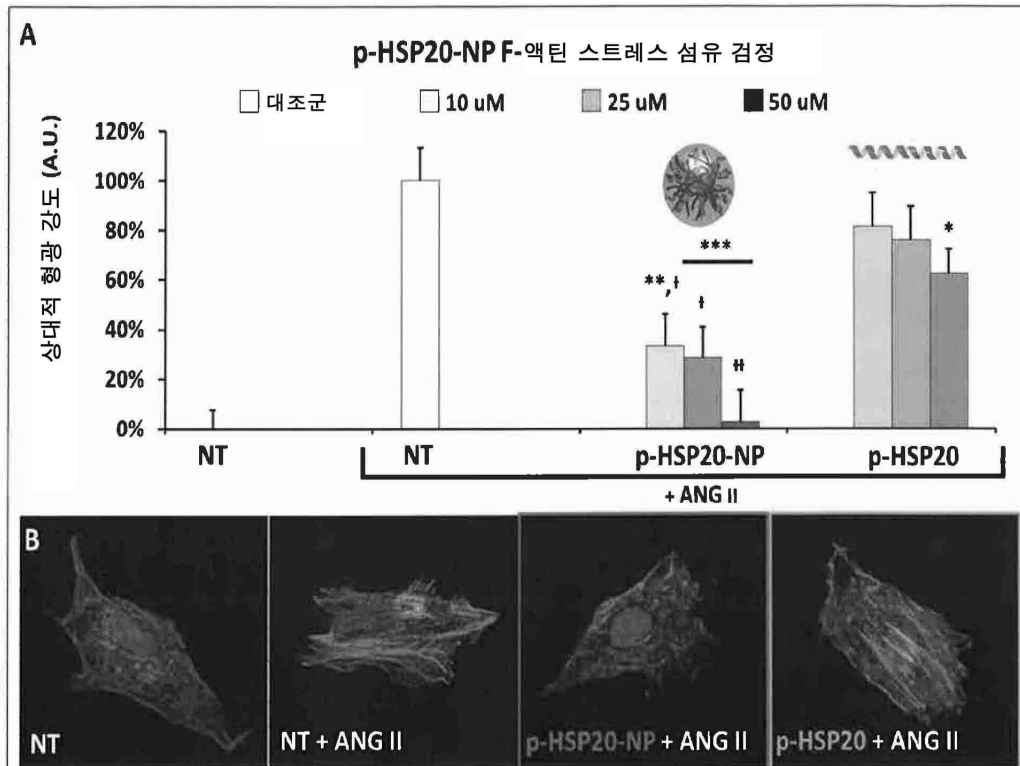
도면71



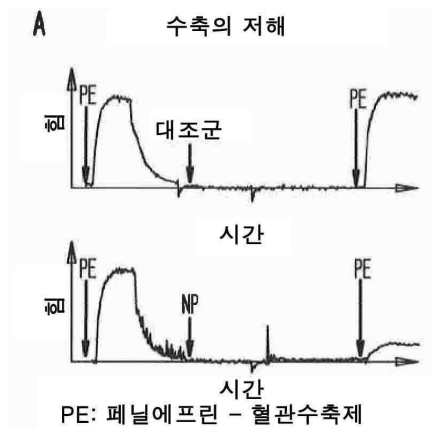
도면72



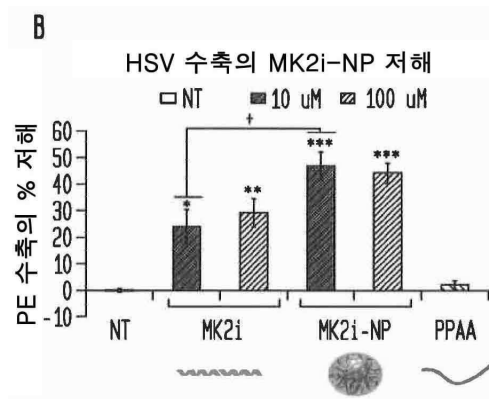
도면73



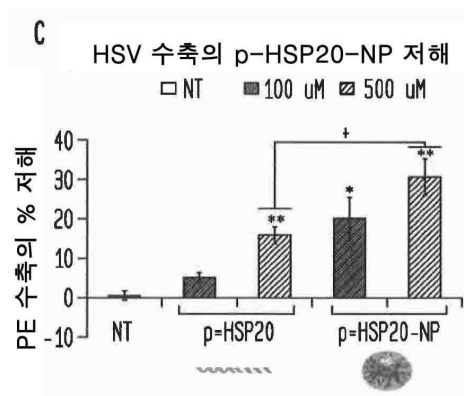
도면74a



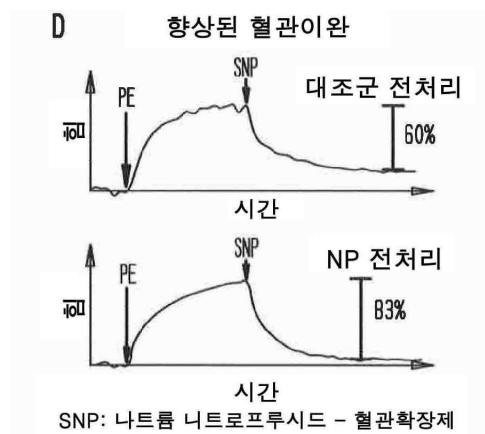
도면74b



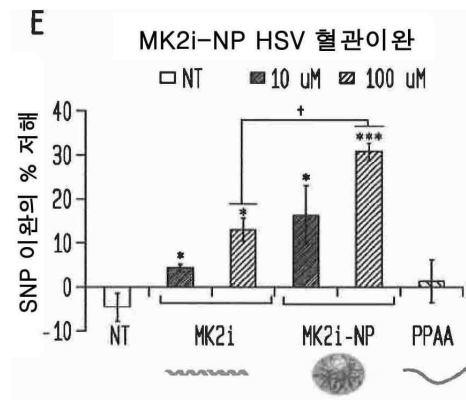
도면74c



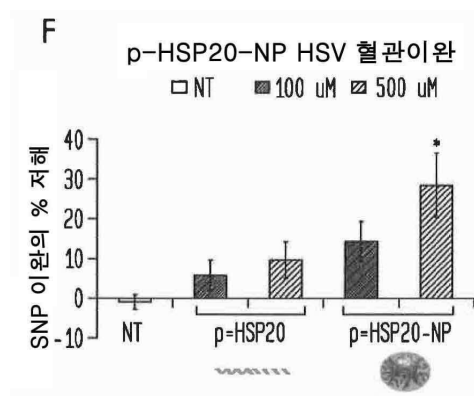
도면74d



도면74e



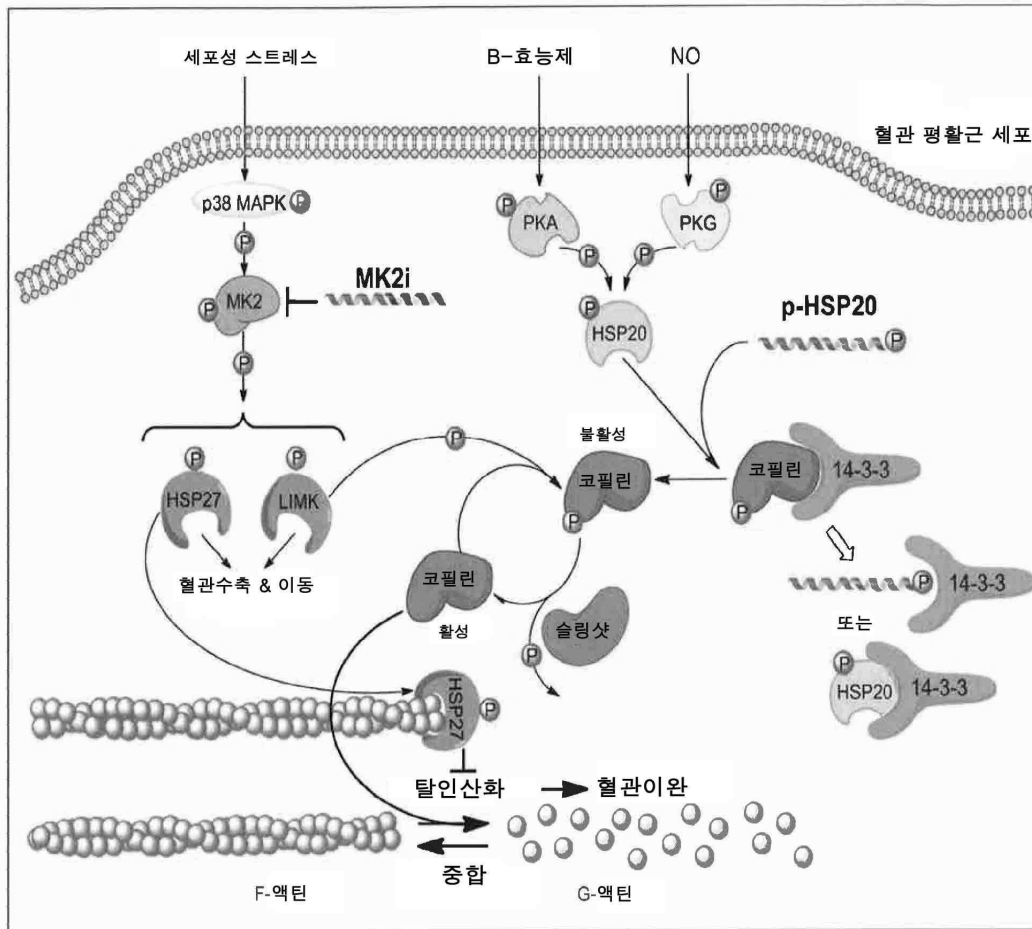
도면74f



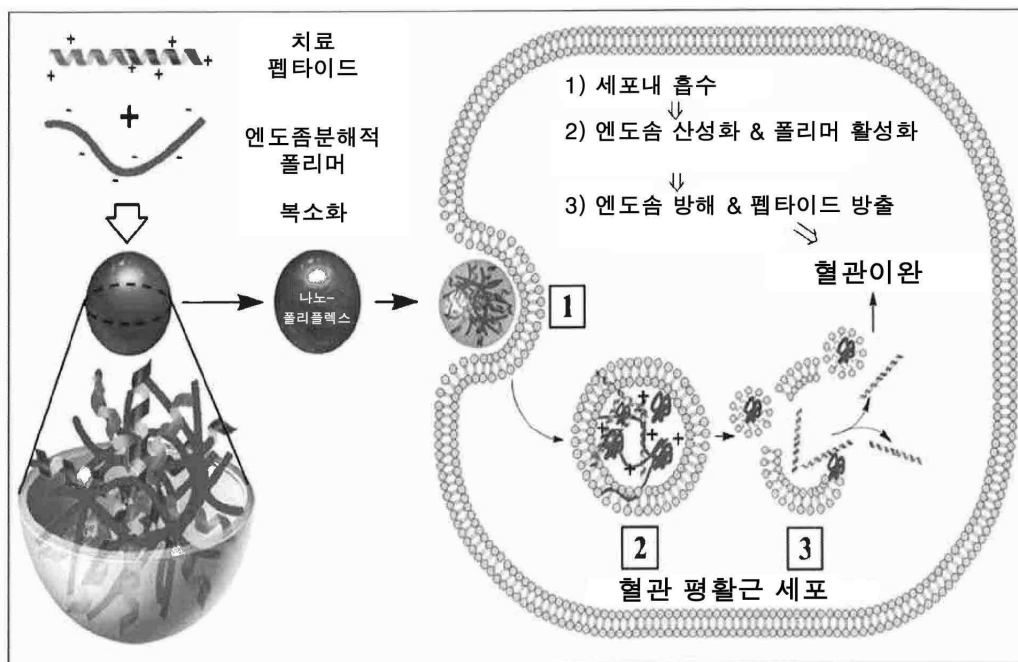
도면74g



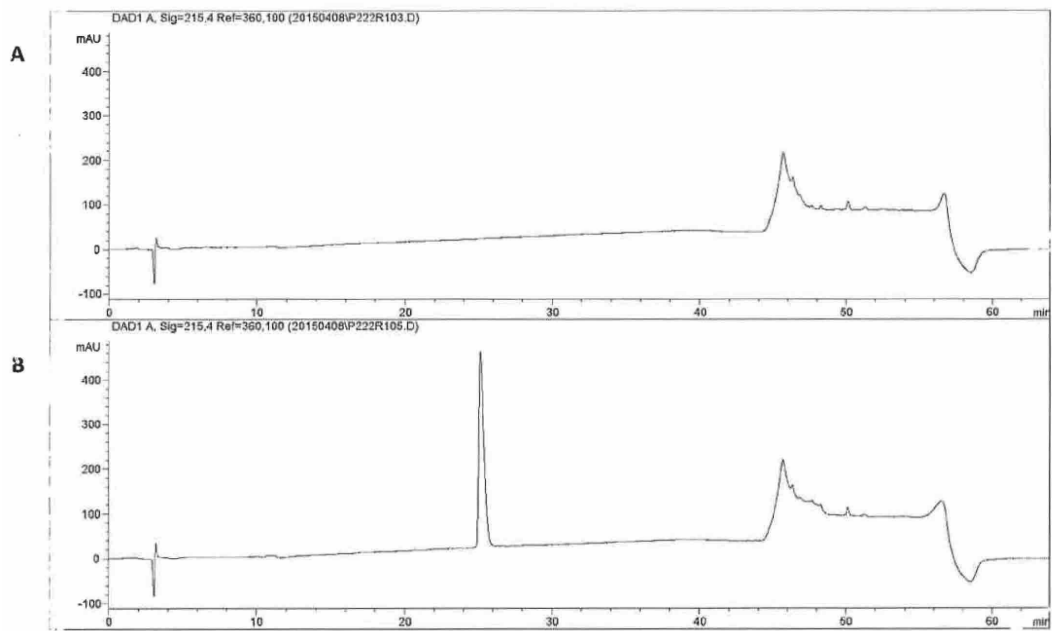
도면75



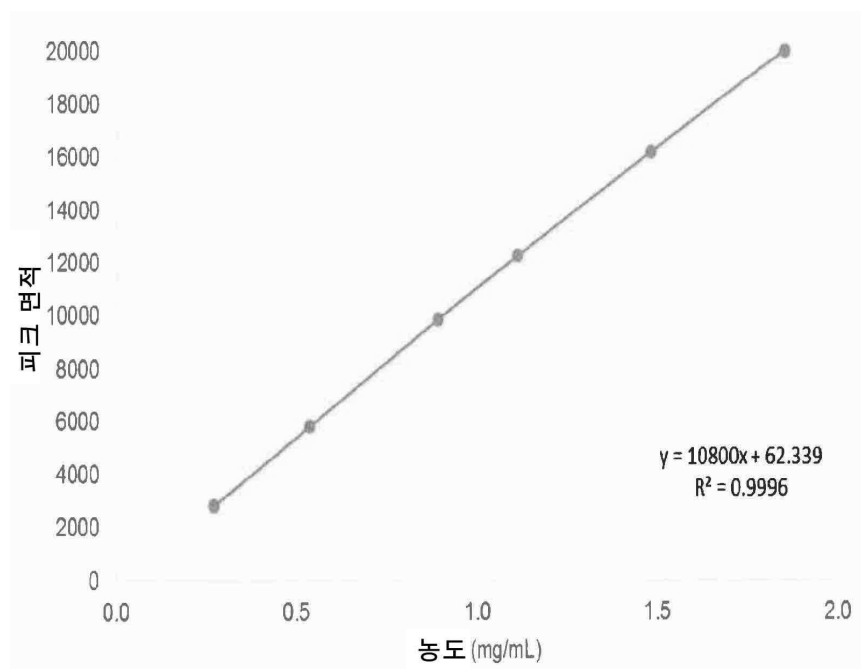
도면76



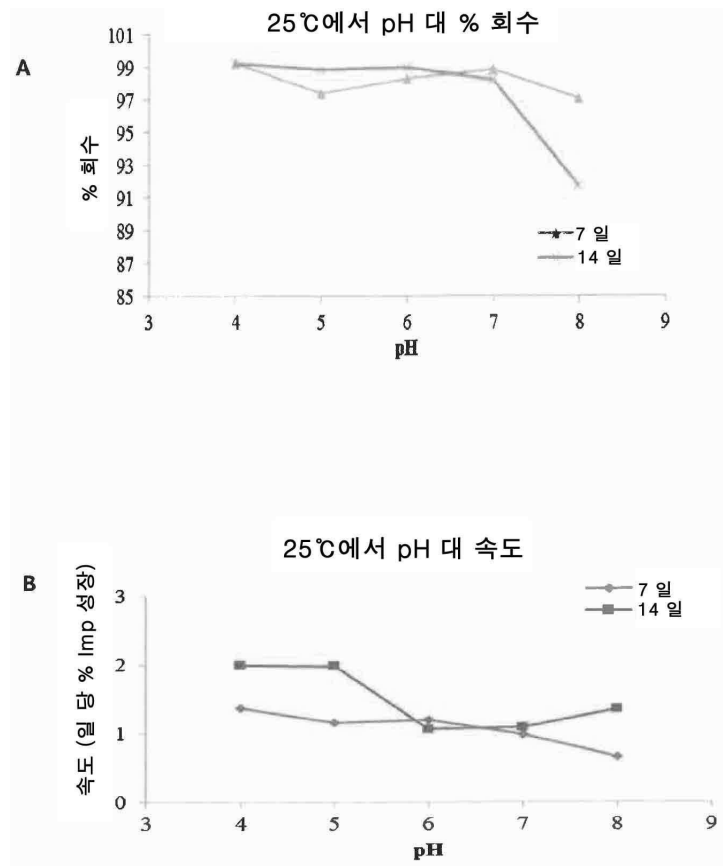
도면77



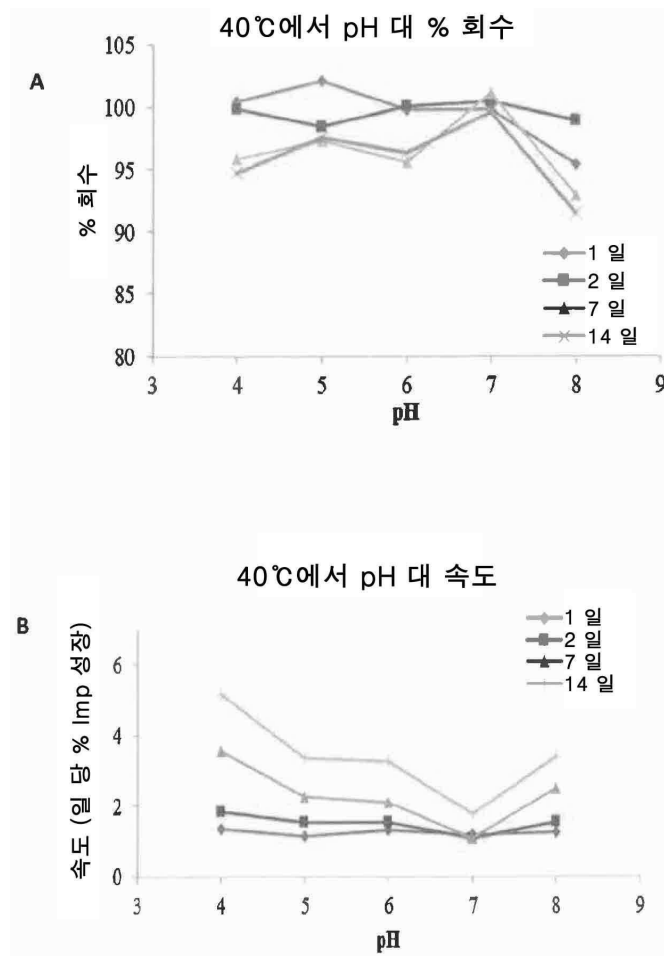
도면78



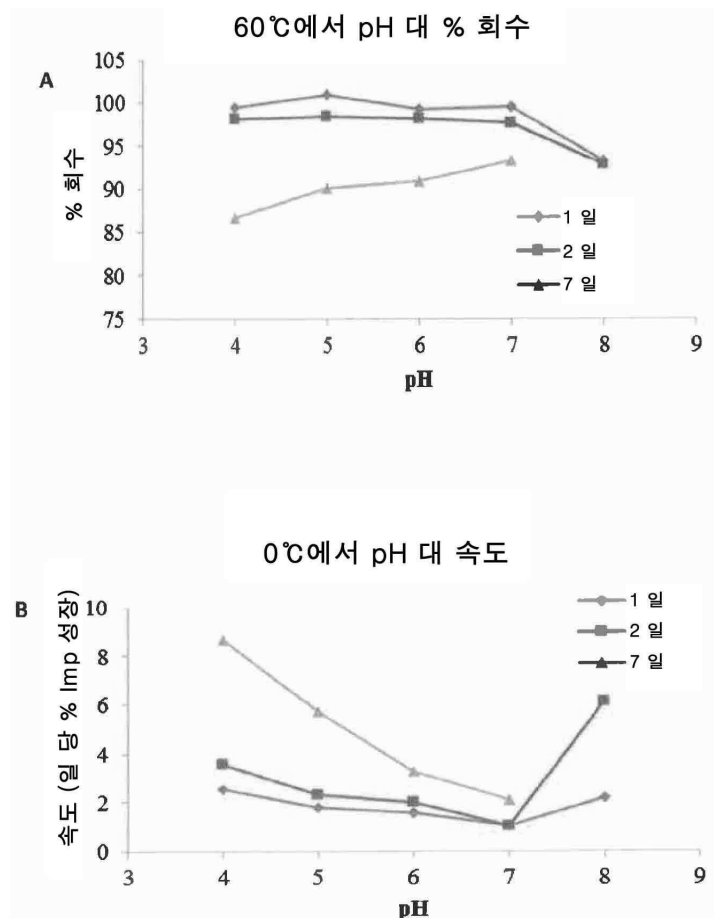
도면79



도면80



도면81



서열 목록

- <110> Moerae Matrix, Inc.
- Lander, Cynthia
- Brophy, Colleen
- Peterson, Caryn
- <120> Formulation of MK2 Inhibitor Peptides
- <130> 17456.0077
- <140> PCT/US2016/012650
- <141> 2016-01-08
- <150> US 62/101,190
- <151> 2015-01-08
- <160> 27
- <170> Kopatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 1

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

1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala Ala

20

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 2

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala

1 5 10

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 3

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

1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Ala

20

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 4

Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala

1 5 10 15

Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala

20

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 5

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

1 5 10 15

Gln Leu Ala Val Ala

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 6

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

1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala

20

<210> 7

<211> 22

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 7

His Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Lys Lys Ile Lys Ala Leu Ala Arg

1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala Ala

20

<210> 8

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Mammalian
 <400> 8

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Mammalian
 <400> 9

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala
 1 5 10

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Mammalian
 <400>

10

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala
 1 5 10

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Mammalian
 <400> 11

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
 1 5 10

<210> 12
 <211> 14
 <212> PRT

<213> Unknown
 <220><223> Mammalian
 <400> 12
 Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala
 1 5 10

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Mammalian
 <400> 13
 Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala
 1 5

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Mammalian
 <400> 14
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Mammalian
 <400> 15
 Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile
 1 5 10

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 16

Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 17

Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 18

His Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Lys Lys Ile

1 5 10

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 19

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

1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala

20

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 20

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 21

<211

> 17

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(12)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 21

Lys Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Arg Arg Lys

1 5 10 15

Lys

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 22

Leu Leu Lys Arg Arg Lys Lys

1 5

<210> 23

<211> 22

<212> PRT

<213

> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 23

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Asp Ala Arg Ala Lys Ala Leu Asn Arg

1 5 10 15

Gln Leu Ala Val Ala Ala

20

<210> 24

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 24

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

1 5 10 15

Gln Leu Ala Val Ala

20

<210

> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 25

Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Ala Val Ala Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 26

Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Ala Val Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 27

Trp Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu Lys

1

5

10