

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-525988
(P2004-525988A)

(43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int.Cl.⁷

A61K 38/00
A61K 39/395
A61K 45/00
A61P 17/00
A61P 43/00

F 1

A 61 K 37/02
A 61 K 39/395
A 61 K 39/395
A 61 K 45/00
A 61 P 17/00

D

N

テーマコード(参考)

4 C 08 4
4 C 08 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-588889 (P2002-588889)	(71) 出願人	503334769 リジエナークス・バイオファーマスティ
(86) (22) 出願日	平成14年5月16日 (2002.5.16)		カルズ・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月14日 (2003.11.14)		アメリカ合衆国、20814 メリーラン
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/015394		ド州、ベセズダ、ベセズダ・メトロ・セン
(87) 国際公開番号	W02002/091969		ター、3、スイート・700
(87) 国際公開日	平成14年11月21日 (2002.11.21)	(74) 代理人	100064746
(31) 優先権主張番号	60/291,326		弁理士 深見 久郎
(32) 優先日	平成13年5月17日 (2001.5.17)	(74) 代理人	100085132
(33) 優先権主張国	米国(US)		弁理士 森田 俊雄
		(74) 代理人	100083703
			弁理士 仲村 義平
		(74) 代理人	100096781
			弁理士 堀井 豊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】サイモシンβ4を用いる表皮水疱症(Epidermolysis Bullosa)の治療

(57) 【要約】

表皮水疱症に関連付けられる水疱、びらんまたは皮膚変性は、サイモシン 4、サイモシン 4 のアイソフォームまたは酸化サイモシン 4 等のアクチン重合抑制ペプチドを投与することにより治療または予防される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

表皮水疱症に関連付けられる水疱、びらんまたは皮膚変性の治癒または予防を促進するための治療方法であって、このような治療を必要とする被験体に対して、アミノ酸配列 L K K T E T または、その、表皮水疱症抑制活性を有する保存的な変異型を含む表皮水疱症抑制ポリペプチドを含有する有効な量の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記ポリペプチドは、前記被験体の皮膚弾性の向上を含む、皮膚状態の改善を促進する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ポリペプチドは、サイモシン 4 (T 4)、T 4 の N - 末端変異型、T 4 の C - 末端変異型、T 4 のアイソフォーム、酸化 T 4、または T 4 スルホキシドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記組成物は全身投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記組成物は局所投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記組成物は、ゲル、クリーム、泥膏、ローション、噴霧液、懸濁液、分散液、軟膏、ヒドロゲルまたは軟膏剤の製剤の形である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

治療されるべき部位への、T 4 の放出を遅延させるかまたは浸透を高める、少なくとも 1 つの製剤をさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ポリペプチドは組換えまたは合成である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ポリペプチドは抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体はポリクローナルまたはモノクローナルである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

表皮水疱症に関連付けられる水疱、びらんまたは皮膚変性の治癒または予防を促進するための治療方法であって、このような治療を必要とする被験体に対して、アミノ酸配列 L K K T E T または、その、表皮水疱症抑制活性を有する保存的な変異型を含む表皮水疱症抑制ポリペプチドの生成を促進する製剤を含有する有効な量の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 12】

前記ポリペプチドはサイモシン 4 である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記製剤はサイモシン 4 のアンタゴニストである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

表皮水疱症に関連付けられる水疱、びらんまたは皮膚変性の治癒または予防を促進するのに用いるための組成物であって、アミノ酸配列 L K K T E T または、その、表皮水疱症抑制活性を有する保存的な変異型を含む表皮水疱症抑制ポリペプチドを含有する有効な量の組成物を含む、組成物。

【請求項 15】

前記組成物は、L K K T E T の N - 末端変異型または C - 末端変異型を含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記組成物は、K L K K T E T または L K K T E T Q を含む、請求項 14 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

前記ポリペプチドは、T 4、T 4のアイソフォーム、酸化T 4、またはT 4スルホキシドを含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項 18】

ゲル、クリーム、泥膏、ローション、噴霧液、懸濁液、分散液、軟膏、ヒドロゲル、または軟膏剤の製剤を含む、請求項14に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

発明の背景

10

関連する出願の相互参照

本出願は、2001年5月17日に出願された、米国仮出願連続番号第60/291,326号の利益を主張する。

【0002】**1. 発明の分野**

この発明は、表皮水疱症およびそのすべてのサブタイプが原因で発症する、皮膚および周辺組織の炎症性変性疾患、免疫学的疾患および他の疾患を治すかまたは予防する分野に関する。

【背景技術】**【0003】****2. 背景技術の説明**

表皮水疱症(EB)と称される現象は、すべての人種および民族群を苦しめる稀な遺伝的疾患である。EBは、皮膚への軽い外傷後に起こる水疱形成により特徴付けられる疾患群である。これは、開放性びらん、潰瘍および瘢痕に繋がるおそれがある。このファミリーの疾患の重症度は、皮膚についての、軽度なものから、重篤な能力障害を生じたり、切断したり、生命を脅かしたりするような疾病にまで及ぶ。熱傷とは違い、これらの病気は時として決して完治しないことがある。最も重篤な症例の場合、ライフスタイルを大幅に変える必要がある。通常の子供の遊びでも慢性的なびらんが生じるので、この疾患を患う小児は、自転車に乗ったり、スケートをしたり、スポーツに参加したりすべきではない。このようなびらんは小児の身体の75%までも覆う可能性がある。水疱形成および瘢痕化が口および食道にも発生する。したがって、しばしば流動食または軟食しか取ることができない。瘢痕化はまた、手足の指を融合させ、機能を著しく制限する変形を残す。彼らの生活のうち大部分が、治療、輸血、生検および外科手術のために病院に拘束される。目には、しばしば、何日も視界を妨げる水疱が形成される。慢性的な貧血によりエネルギーが減じ、成長が遅れる。EBを患う個人の寿命は、通常30年未満である。

30

【0004】

EBには3つの主要な種類、すなわち、単純型表皮水疱症(EB Simplex)、栄養障害型表皮水疱症(Dystrophic EB)(優性または劣性)、および接合部型表皮水疱症(Junctional EB)がある。これらの種類によって症状の重症度は異なる。一般的には、EBにより、特定の部位、たとえば手または足に制限される可能性のある、または身体の広範な部位を冒す可能性のある水疱が生じる。軽症である場合、水疱は、通常皮膚に永久的な損傷を残さずに治癒する。他の種類の場合、水疱が治癒しても皮膚に永久的な変化をもたらす可能性のある瘢痕が残り、たとえば、指が融合し、手が収縮して運動が減じられるおそれがある。接合部型表皮水疱症のうちいくつかの種類は、乳児期においては生命にかかわるものとなる。

40

【0005】

EBは、皮膚の生理学的、生化学的および免疫学的特性における有害な変化に起因する。すべての種類のEBは元々遺伝的なものであり、いくつかの異なるサブタイプの症状の原因である遺伝子が現在知られている。この遺伝的欠陥により、皮膚層が互いに適切に癒着せず、構造的に弱い部位が生じることとなる。この脆弱な皮膚は、特に、軽い摩擦から損

50

傷を受けやすく、この症状の特徴的な特性である水疱を生ずる。皮膚は、感染に対する重要なバリアであり、免疫系を防御する第一線である。E Bに冒された人の脆弱な皮膚はこの重要な防御機構を失う。血管系におけるこのような変化により、損傷を修復する能力が減じられ、扁平上皮癌等の皮膚癌になりやすくなり、感染のリスクが増す。加えて、口腔および消化管腔における開放性びらんは、脱水および栄養不良の進行につながるおそれがある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

E Bを治療しようとする多くの試みがなされたが、いずれもE Bの予防または治療に実質的な効果はなかった。さまざまな成長因子、人工皮膚、抗生物質および他の治療法では、適切および効果的にE Bを治療することができなかった。E Bが遺伝病であるとはいえ、びらんをより迅速にまたはより良く治し得る治療が極めて重要である。さらに、予防的治療は、実質的な、おそらくは命を救う恩恵を患者に明確にもたらすだろう。

10

【0007】

多くの医薬的、栄養補助的または美容的な処方が、E Bまたはその影響を減じるかまたはなくすよう提案されている。

【0008】

E Bに関連付けられる水疱およびびらんを治すかまたは予防するための改善された方法および組成物が、当該技術において依然として必要とされる。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の概要

この発明に従えば、E Bに関連付けられる水疱、びらんまたは皮膚変性の治癒または予防を促進するための治療方法は、このような治療を必要とする被験体または患者に対して、アミノ酸配列L K K T E Tまたは、その、E B抑制活性を有する保存的な変異型を含むE B抑制ペプチドを含有する有効な量の組成物を投与することを含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

発明の詳細な説明

この発明は、サイモシン4(T4)等のアクチン重合抑制ペプチド、およびアミノ酸配列L K K T E Tまたはその保存的な変異型を含む他のアクチン重合抑制ペプチドまたはペプチドフラグメントが、表皮水疱症に関連付けられる水疱、びらん、および皮膚変性の治癒または予防を促進するという発見に基づく。K L K K T E TおよびL K K T E T Q等のN-末端変異型またはC-末端変異型が含まれる。いかなる特定の理論にも束縛されることなく、これらのペプチドは、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(錆型非依存性DNAポリメラーゼ)を誘導し、1つまたはそれ以上の炎症性サイトカインまたはケモカインのレベルを下げ、内皮細胞に対して走化性因子および/または脈管形成因子として作用する能力を有することにより、修復、治癒および予防を促進する能力を有し得、これにより、たとえE Bが遺伝による欠陥によってもたらされるものであるとしても、E Bに冒された患者の皮膚における退行性変化を治しつつ予防し得る。

30

【0011】

サイモシン4は当初は、インビトロでの内皮細胞の遊走および分化中にアップレギュレートされるタンパク質として同定された。サイモシン4は元々胸腺から単離されており、43アミノ酸、すなわち、種々の組織において同定される4.9kDaの偏在的なポリペプチドである。内皮細胞の分化および遊走、T細胞分化、アクチン重合抑制ならびに血管新生における役割を含むいくつかの役割は、このタンパク質に起因している。

40

【0012】

1つの実施形態に従えば、この発明は、E Bに関連付けられる水疱、びらんおよび皮膚変性の治癒および予防を促進するための治療方法であり、このような治療を必要とする被験

50

体に対して、アミノ酸配列 L K K T E T または、その、 E B 抑制活性を有する保存的な変異型を含む E B 抑制ペプチド、好ましくはサイモシン 4、サイモシン 4 のアイソフォーム、酸化サイモシン 4、サイモシン 4 スルホキシドまたはサイモシン 4 のアンタゴニストを含有する有効な量の組成物を投与することを含む。

【 0 0 1 3 】

この発明に従って用いることのできる組成物は、サイモシン 4 (T 4)、T 4 アイソフォーム、酸化 T 4、サイモシン 4 スルホキシド、アクチン結合ドメインを有するポリペプチドまたは他のアクチン重合抑制もしくは束化タンパク質、または、アミノ酸配列 L K K T E T もしくは、その、 E B 抑制活性を有する保存的な変異型を含むか、もしくは本質的にそれからなるペプチドフラグメントを含む。引用によりこの明細書中に援用される、国際出願連続番号 P C T / U S 9 9 / 1 7 2 8 2 は、この発明に従って有用であり得る T 4 のアイソフォーム、ならびに、この発明で利用することのできるアミノ酸配列 L K K T E T および、その、 E B 抑制活性を有する保存的な変異型を開示する。引用によりこの明細書中に援用される、国際出願連続番号 P C T / G B 9 9 / 0 0 8 3 3 (W O 9 9 / 4 9 8 8 3) は、この発明に従って利用することのできる酸化サイモシン 4 を開示する。この発明は、主として、T 4 および T 4 アイソフォームに関して以下に記載されるが、以下の記載が、アミノ酸配列 L K K T E T 、 L K K T E T またはその、 E B 抑制活性を有する保存的な変異型を含むかまたは本質的にそれからなるペプチドおよびフラグメント、ならびに酸化サイモシン 4 に等しく適用できることが意図されることを理解すべきである。

【 0 0 1 4 】

1つの実施形態では、この発明は、T 4 または T 4 アイソフォームを含有する、 E B の抑制に有効な量の組成物を皮膚に接触させることにより、被験体の皮膚の水疱およびびらんを治しかつ予防するための方法を提供する。この接触は局所的または全身的であり得る。局所投与の実施例には、たとえば、T 4 を含むローション、軟膏、ゲル、クリーム、泥膏、噴霧液、懸濁液、分散液、ヒドロゲル、軟膏剤または油剤を、単独で、または、治療されるべき部位への T 4 の浸透を高めるかまたは T 4 ペプチドの放出を遅延もしくは減速させる少なくとも 1 つの製剤と組合せて、皮膚に接触させることが含まれる。全身投与には、たとえば、T 4 または T 4 アイソフォームなどを含有する組成物の静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射もしくは皮下注射、吸入、または経皮投与もしくは経口投与が含まれる。被験体は、哺乳類、好ましくはヒトであり得る。

【 0 0 1 5 】

T 4 またはその類似体、アイソフォームもしくは誘導体は、好適な E B 抑制量で投与され得る。たとえば、T 4 は、T 4 の約 0.1 ~ 50 μ g の範囲内の用量で、より好ましくは約 1 ~ 25 μ g の量で投与され得る。

【 0 0 1 6 】

この発明に従った組成物は、単回投与で、またはたとえば 1 日に 2、3、4 回以上の複数回投与で、毎日、隔日などで投与され得る。

【 0 0 1 7 】

T 4 アイソフォームは、公知の T 4 のアミノ酸配列に対して約 70 %、約 75 %、または約 80 % 以上の相同性を有することが同定されている。このようなアイソフォームは、たとえば、T 4^{a1a}、T 9、T 10、T 11、T 12、T 13、T 14 および T 15 を含む。T 4 と同様に、T 10 および T 15 アイソフォームはアクチンを重合抑制することが明らかにされた。T 4、T 10 および T 15、ならびにこれらの他のアイソフォームは、アクチン重合抑制または結合の媒介に関与していると思われるアミノ酸配列、すなわち L K K T E T を共有する。いかなる特定の理論にも束縛されないことを望むが、T 4 アイソフォームの活性は、ある程度、アクチンの重合を調節する能力によるものであり得る。たとえば、T 4 は皮膚におけるアクチンの重合を調節し得る(たとえば、- サイモシンは、遊離 G - アクチンを重合抑制することにより F - アクチンを脱重合すると思われる)。したがって、アクチンの重合を調節する T 4 の能

10

20

30

40

50

力は、すべてまたはある程度まで、LKKTE_T配列を介して、アクチンに結合するかまたはアクチンを重合抑制するというその能力によるものであり得る。こうして、T₄と同様に、アクチンを結合もしくは重合抑制するか、またはアクチンの重合を調節する他のタンパク質は、アミノ酸配列LKKTE_Tを有するT₄アイソフォームを含んでおり、この明細書中に述べられるように、単独でまたはT₄と組合されて、EBを緩和する可能性がある。

【0018】

したがって、T_{4^{a1a}}、T₉、T₁₀、T₁₁、T₁₂、T₁₃、T₁₄およびT₁₅等の公知のT₄アイソフォーム、ならびに依然として同定されていないT₄アイソフォームが、この発明の方法において有用であることが特に企図される。そのような訳で、T₄アイソフォームは、被験体において実施される方法を含む、この発明の方法において有用である。したがって、この発明は、さらに、T₄、ならびにT₄アイソフォーム、T_{4^{a1a}}、T₉、T₁₀、T₁₁、T₁₂、T₁₃、T₁₄およびT₁₅を含む医薬組成物と、医薬的に許容される担体とを提供する。

【0019】

加えて、アクチン重合抑制もしくは結合能力を有するか、または、アクチンを可動化し得るかもしくはアクチンの重合を調節し得る他のタンパク質は、適切な重合抑制、結合、可動化もしくは重合検定において示されるように、または、アクチン結合を媒介する、LKKTE_T等のアミノ酸配列の存在により同定されるように、たとえば、この発明の方法において同様に用いることができる。このようなタンパク質は、たとえば、ゲルソリン、ビタミンD結合タンパク質(DBP)、プロフィリン、コフィリン、アドセベルチン、プロポミオシン、フィンシリン、デパクチン、D_nアーゼI、ビリン、フラグミン、セベリン、キャッピングタンパク質、-アクチニンおよびアクメンチンを含む。このような方法は被験体において実施される上述の方法を含むので、この発明はさらに、この明細書中に述べられるように、ゲルソリン、ビタミンD結合タンパク質(DBP)、プロフィリン、コフィリン、デパクチン、D_nアーゼI、ビリン、フラグミン、セベリン、キャッピングタンパク質、-アクチニンおよびアクメンチンを含む医薬組成物を提供する。こうして、この発明は、(一次アミノ酸配列内にあり得る)アミノ酸配列LKKTE_T、およびその保存的な変異型を含むEB抑制ペリペチドの使用を含む。

【0020】

この明細書で用いられるように、「保存的な変異型」という用語、またはその文法的な変形は、アミノ酸残基を別の生物学的に類似の残基に置換することを示す。保存的な変異型の実施例は、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニン等の疎水性残基を別のものと置換すること、極性残基を別のものと置換すること、たとえば、リシンをアルギニンに、アスパラギン酸をグルタミン酸に、アスパラギンをグルタミン酸に置換すること等を含む。

【0021】

T₄はいくつかの組織および細胞タイプに局在しており、このため、T₄の生成を促進する製剤は、組織および/または細胞からのT₄生成をもたらす組成物に添加され得るか、またはこれを含み得る。このような製剤は、インスリン様成長因子(IGF-1)、血小板由来成長因子(PDGF)、表皮成長因子(EGF)、型トランスフォーミング成長因子(TGF- α)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、サイモシン1(T-1)、および血管内皮成長因子(VEGF)等の成長因子のファミリーのメンバーを含む。より好ましくは、この製剤は、型トランスフォーミング成長因子(TGF- β)、またはTGF- β スーパーファミリーの他のメンバーである。この発明のT₄組成物は、細胞外基質沈着、細胞遊走、および皮膚の血管新生を通じて、結合組織の成長を実現することにより、EBの影響を緩和し得る。

【0022】

1つの実施形態に従えば、被験体は、上述に規定されるように、被験体内でのEB抑制ペチドの生成を促進する製剤で治療される。

10

20

30

40

50

【0023】

加えて、E B の緩和を助けるか促す製剤が、T 4 または T 4 アイソフォームとともに組成物に加えられ得る。このような製剤は、脈管形成剤、成長因子、細胞の分化を導く製剤、細胞の遊走を促進する製剤、および皮膚における細胞外基質物質の供給を促進する製剤を含む。たとえば、限定のためではないが、T 4 または T 4 アイソフォームは、単独でまたは組合されて、以下の製剤のうちの1つまたはそれ以上の製剤と組合せて添加され得る。すなわち、有効な量の V E G F 、 K G F 、 F G F 、 P D G F 、 T G F 、 I G F - 1 、 I G F - 2 、 I L - 1 、プロサイモシン およびサイモシン 1 である。

【0024】

この発明はまた、医薬的に許容される担体における、治療上有効な量の T 4 または T 4 アイソフォームを含有する医薬組成物を含む。このような担体は、非経口投与に関して上に列挙されるものを含む。 10

【0025】

E B に関する水疱、びらんおよび皮膚変性を治すかまたは予防する試薬、製剤または組成物の実際の用量は、被験体の大きさおよび健康状態を含む多くの要因に依存し得る。しかしながら、当業者は、上述の P C T / U S 9 9 / 1 7 2 8 2 およびそこで引用される参考文献に開示されるような、臨床用量を決定するための方法および技術を記載する教示を用いて、使用すべき適切な用量を決定することができる。

【0026】

好適な局所的製剤は、約 0 . 0 0 1 ~ 1 0 重量 % の範囲内の濃度、より好ましくは約 0 . 0 1 ~ 0 . 1 重量 % の範囲内の濃度、最も好ましくは約 0 . 0 5 重量 % の濃度の T 4 または T 4 アイソフォームを含む。 20

【0027】

この明細書中に記載される治療上の方策は、この発明の T 4 または他の化合物を含有する試薬または組成物のさまざまな投与経路または送達経路を含み、被験体に対する従来のいかなる投与技術（たとえば、しかしこれに限定されないが、局所投与、局所注射、吸入または全身投与）をも含む。この発明の T 4 または他の化合物を用いるかまたは含む方法および組成物は、医薬的に許容される非毒性賦形剤または担体との混合により、調合されて医薬組成物となり得る。 30

【0028】

この発明は、T 4 ベプチドまたはその機能フラグメントと相互作用する抗体の使用を含む。異なるエピトープの特異性を備える、貯留されたモノクローナル抗体を本質的に含む抗体、ならびに別個のモノクローナル抗体製剤が提供される。モノクローナル抗体は、上述の P C T / U S 9 9 / 1 7 2 8 2 に開示されるような、当業者には周知の方法によって、タンパク質のフラグメントを含む抗原から作られる。この発明で用いられる抗原という用語は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含むことを意味する。

【0029】

さらなる別の実施形態では、この発明は、T 4 遺伝子発現を調節する、有効な量の製剤を投与することにより、被験体を治療する方法を提供する。「調節」という用語は、T 4 が過剰に発現した場合の T 4 発現の抑制または抑圧を意味し、T 4 が十分に発現しない場合の発現の誘導を意味する。「有効な量」という用語は、T 4 遺伝子発現を調節して、結果として T 4 関連の E B の症状を緩和するのに有効な T 4 製剤の量を意味する。T 4 または T 4 アイソフォーム遺伝子発現を調節する製剤は、たとえばポリヌクレオチドであり得る。ポリヌクレオチドは、アンチセンス、三重らせん物質、またはリボザイムであり得る。たとえば、T 4 の構造遺伝子領域またはプロモータ領域に向けられるアンチセンスが利用され得る。 40

【0030】

別の実施形態では、この発明は、T 4 活性を調節する化合物を利用するための方法を提供する。T 4 活性に影響を及ぼす化合物（たとえば、アンタゴニストおよびアゴニスト）は、ペプチド、ペプチドミメティック、ポリペプチド、化学的化合物、亜鉛等の鉱物、 50

および生物学的製剤を含む。

【 0 0 3 1 】

いかなる特定の理論にも束縛されないが、この発明は、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（鑄型非依存性DNAポリメラーゼ）を誘導して、1つまたはそれ以上の炎症性サイトカインまたはケモカインのレベルを減じ、内皮細胞に対して走化性因子として作用し、これにより、表皮水疱症または他の退行性因子もしくは環境的因子によってもたらされる皮膚における退行性変化の治癒または予防を促進することにより、表皮水疱症に関連付けられる水疱、びらん、および皮膚変性の治癒または予防を促進し得る。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/091969 A1(51) International Patent Classification⁵: A61F 13/00

A61F 13/00

(21) International Application Number: PCT/US02/15394

(22) International Filing Date: 16 May 2002 (16.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/291,326 17 May 2001 (17.05.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): REGENEREX BIOPHARMACEUTICALS, INC. (US/US); 3 Bethesda Metro Center, Bethesda, MD 20814 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GOLDSTEIN, Alan, L. (US/US); 800 25th Street, N.W., Apartment 1005, Washington DC 20037 (US); FINKELSTEIN, Jack, Jr. (US/US); 3703 Taylor Street, Chevy Chase, MD 20815 (US).

(81) Designated States (national): AI, AG, AI, AM, AT, AU,

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,

GM, IIR, IIU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PI, PT, RO, RU, SD, SE, SG,

SI, SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,

VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BH, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:
*with international search report
 before the expiration of the time limit for amending the
 claims and to be republished in the event of receipt of
 amendments*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



A1

WO 02/091969

(54) Title: TREATING EPIDERMOLYSIS BULLOSA WITH THYMOGIN BETA 4

(57) Abstract: Blister, sores or skin degradation associated with Epidermolysis Bullosa is treated or prevented by administration of a actin-sequestering peptide such as Thymosin β 4, an isoform of Thymosin β 4 or oxidized Thymosin β 4.

WO 02/091969

PCT/US02/15394

"TREATING EPIDERMOLYSIS BULLOSA WITH THYMOSIN BETA 4"

BACKGROUND OF THE INVENTIONCROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

The present application claims the benefit of U.S. Provisional Application Serial No. 60/291,326, filed May 17, 2001.

5 1. FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the field of healing or preventing inflammatory degenerative, immunological and other disorders of the skin and surrounding tissue that occur due to Epidermolysis Bullosa, and all of its subtypes.

10 2. DESCRIPTION OF THE BACKGROUND ART

The phenomenon called Epidermolysis Bullosa (EB) is a rare genetic disorder that afflicts all ethnic and racial groups. EB is a group of diseases characterized by blister formation after minor trauma to the skin. This may lead to open sores, ulcerations and scars. This family of disorders range in severity from mild to the severely disabling, mutilating and life threatening diseases of the skin. Unlike burns, these afflictions sometimes never go away. The most severe cases require great lifestyle adjustments. Afflicted children should never ride a bike, skate, or participate in sports, because the normal play of children causes chronic sores. Such sores may cover as much as 75 percent of the child's body. Blistering and scarring also occur in the mouth and esophagus. Therefore, frequently a diet of only liquids or soft foods is possible. Scarring also causes the fingers and toes to fuse, leaving deformities which severely limit function. Much of their life is tied to hospitals for treatment, blood transfusions, biopsies and surgeries. The eyes often blister preventing sight for days. Chronic anemia reduces energy, and growth is retarded. The life span for an individual afflicted with EB is usually not longer than 30 years.

15 25 There are three main types of EB: EB Simplex, Dystrophic EB (dominant or recessive) and Junctional EB. The severity of symptoms varies between these types. In general terms, EB causes blisters which may be restricted to specific areas, for example hands or feet, or may affect large areas of the body. In the milder forms the blisters heal normally without leaving permanent damage to the skin. In the other forms, the blisters

WO 02/091969

PCT/US02/15394

heal with scarring which can result in permanent change to the skin, for example fingers may fuse and hands contract, reducing movement. Some forms of Junctional EB are life threatening in infancy.

5 EB results from deleterious changes in the physiological, biochemical and immunological properties of the skin. All forms of EB are genetic in origin and the genes responsible for several different subtypes of the condition are now known. The genetic defects result in the skin layers not adhering properly to each other, causing areas of structural weakness. This fragile skin is particularly vulnerable to damage from mild friction, causing the blisters which are the characteristic feature of the condition. Skin is 10 an important barrier to infection, it is the first line of defense of the immune system. The fragile skin of those afflicted with EB loses this important defense mechanism. Such changes in vasculature decrease capacity to repair damage, increase propensity for skin cancers such as squamous cell carcinoma, and increase risk of infection. In addition, the open sores in the oral and digestive cavity can lead to increased dehydration and 15 malnutrition.

15 There have been many attempts to treat EB, but none have had a substantial impact on prevention or treatment of EB. Various growth factors, synthetic skins, antibiotics and other therapies have failed to adequately and effectively treat EB. While EB is a genetic disease, treatment that would more rapidly heal or better heal the sores 20 would be extremely important. Further, preventative therapy would clearly confer substantial, perhaps life-saving benefit to the patient.

20 Numerous pharmaceutical, nutriceutical or cosmeceutical formulations have been proposed to reduce or reverse EB or its affects.

25 There remains a need in the art for improved methods and compositions for healing or preventing the blisters and sores associated with EB.

SUMMARY OF THE INVENTION

In accordance with the present invention, a method of treatment for promoting 30 healing or prevention of blisters, sores or skin degeneration associated with EB involves administration to a subject or patient in need of such treatment an effective amount of a composition comprising an EB-inhibiting polypeptide comprising amino acid sequence LKKTET or a conservative variant thereof having EB-inhibiting activity.

WO 02/091969

PCT/US02/15394

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is based on a discovery that actin-sequestering peptides such as thymosin β 4 (T β 4) and other actin-sequestering peptides or peptide fragments containing amino acid sequence LKKTET or conservative variants thereof, promote 5 healing or prevention of blisters, sores and skin degeneration associated with Epidermolysis Bullosa. Included are N- or C-terminal variants such as KLKKTET and LKKTETQ. Without being bound to any particular theory, these peptides may have the capacity to promote repair, healing and prevention by having the ability to induce terminal deoxynucleotidyl transferase (a non-template directed DNA polymerase), to decrease the 10 levels of one or more inflammatory cytokines or chemokines, and to act as a chemotactic and/or angiogenic factor for endothelial cells and thus heal and prevent degenerative changes in the skin of patients with afflicted EB, even though EB is the result of an inherited defect.

Thymosin β 4 was initially identified as a protein that is up-regulated during 15 endothelial cell migration and differentiation *in vitro*. Thymosin β 4 was originally isolated from the thymus and is a 43 amino acid, 4.9 kDa ubiquitous polypeptide identified in a variety of tissues. Several roles have been ascribed to this protein including a role in a endothelial cell differentiation and migration, T cell differentiation, actin sequestration and vascularization.

20 In accordance with one embodiment, the invention is a method of treatment for promoting healing and prevention of blisters, sores and skin degradation associated with EB comprising administering to a subject in need of such treatment an effective amount of a composition comprising an EB-inhibiting peptide comprising amino acid sequence LKKTET, or a conservative variant thereof having EB-inhibiting activity, preferably 25 Thymosin β 4, an isoform of Thymosin β 4, oxidized Thymosin β 4, Thymosin β 4 sulfoxide, or an antagonist of Thymosin β 4.

Compositions which may be used in accordance with the present invention include 30 Thymosin β 4 (T β 4), T β 4 isoforms, oxidized T β 4, Thymosin β 4 sulfoxide, polypeptides or any other actin sequestering or bundling proteins having actin binding domains, or peptide fragments comprising or consisting essentially of the amino acid sequence 35 LKKTET or conservative variants thereof, having EB-inhibiting activity. International Application Serial No. PCT/US99/17282, incorporated herein by reference, discloses isoforms of T β 4 which may be useful in accordance with the present invention as well as amino acid sequence LKKTET and conservative variants thereof having EB-inhibiting activity, which may be utilized with the present invention. International Application Serial

WO 02/091969

PCT/US02/15394

No. PCT/GB99/00833 (WO 99/49883), incorporated herein by reference, discloses oxidized Thymosin β 4 which may be utilized in accordance with the present invention. Although the present invention is described primarily hereinafter with respect to T β 4 and T β 4 isoforms, it is to be understood that the following description is intended to be equally applicable to amino acid sequence LKKTET, peptides and fragments comprising or consisting essentially of LKKTET, conservative variants thereof having EB-inhibiting activity, as well as oxidized Thymosin β 4.

In one embodiment, the invention provides a method for healing and preventing blisters and sores of skin in a subject by contacting the skin with an EB-inhibiting effective amount of a composition which contains T β 4 or a T β 4 isoform. The contacting may be topically or systemically. Examples of topical administration include, for example, contacting the skin with a lotion, salve, gel, cream, paste, spray, suspension, dispersion, hydrogel, ointment, or oil comprising T β 4, alone or in combination with at least one agent that enhances T β 4 penetration, or delays or slows release of T β 4 peptides into the area to be treated. Systemic administration includes, for example, intravenous, intraperitoneal, intramuscular or subcutaneous injections, or inhalation, transdermal or oral administration of a composition containing T β 4 or a T β 4 isoform, etc. A subject may be a mammal, preferably human.

T β 4, or its analogues, isoforms or derivatives, may be administered in any suitable EB-inhibiting amount. For example, T β 4 may be administered in dosages within the range of about 0.1-50 micrograms of T β 4, more preferably in amounts of about 1-25 micrograms.

A composition in accordance with the present invention can be administered daily, every other day, etc., with a single administration or multiple administrations per day of administration, such as applications 2, 3, 4 or more times per day of administration.

T β 4 isoforms have been identified and have about 70%, or about 75%, or about 80% or more homology to the known amino acid sequence of T β 4. Such isoforms include, for example, T β 4^a, T β 9, T β 10, T β 11, T β 12, T β 13, T β 14 and T β 15. Similar to T β 4, the T β 10 and T β 15 isoforms have been shown to sequester actin. T β 4, T β 10 and T β 15, as well as these other isoforms share an amino acid sequence, LKKTET, that appears to be involved in mediating actin sequestration or binding. Although not wishing to be bound to any particular theory, the activity of T β 4 isoforms may be due, in part, to the ability to regulate the polymerization of actin. For example, T β 4 can modulate actin polymerization in skin (e.g. β -thymosins appear to depolymerize F-actin by sequestering free G-actin). T β 4's ability to modulate actin polymerization may therefore be due to all,

WO 02/091969

PCT/US02/15394

or in part, its ability to bind to or sequester actin via the LKKTET sequence. Thus, as with T β 4, other proteins which bind or sequester actin, or modulate actin polymerization, including T β 4 isoforms having the amino acid sequence LKKTET, are likely to reduce EB, alone or in a combination with T β 4, as set forth herein.

5 Thus, it is specifically contemplated that known T β 4 isoforms, such as T β 4^{aa}, T β 9, T β 10, T β 11, T β 12, T β 13, T β 14 and T β 15, as well as T β 4 isoforms not yet identified, will be useful in the methods of the invention. As such T β 4 isoforms are useful in the methods of the invention, including the methods practiced in a subject. The invention therefore further provides pharmaceutical compositions comprising T β 4, as well as T β 4 isoforms T β 4^{aa}, T β 9, T β 10, T β 11, T β 12, T β 13, T β 14 and T β 15, and a pharmaceutically acceptable carrier.

10 In addition, other proteins having actin sequestering or binding capability, or that can mobilize actin or modulate actin polymerization, as demonstrated in an appropriate sequestering, binding, mobilization or polymerization assay, or identified by the presence 15 of an amino acid sequence that mediates actin binding, such as LKKTET, for example, can similarly be employed in the methods of the invention. Such proteins include gelsolin, vitamin D binding protein (DBP), profilin, cofilin, adsevertin, propomyosin, fincillin, depactin, DnaseI, vilin, fragmin, severin, capping protein, β -actinin and acumentin, for example. As such methods include those practiced in a subject, the invention further 20 provides pharmaceutical compositions comprising gelsolin, vitamin D binding protein (DBP), profilin, cofilin, depactin, DnaseI, vilin, fragmin, severin, capping protein, β -actinin and acumentin as set forth herein. Thus, the invention includes the use of an EB-inhibiting polypeptide comprising the amino acid sequence LKKTET (which may be within its primary amino acid sequence) and conservative variants thereof.

25 As used herein, the term "conservative variant" or grammatical variations thereof denotes the replacement of an amino acid residue by another, biologically similar residue. Examples of conservative variations include the replacement of a hydrophobic residue such as isoleucine, valine, leucine or methionine for another, the replacement of a polar residue for another, such as the substitution of arginine for lysine, glutamic for aspartic 30 acids, or glutamine for asparagine, and the like.

30 T β 4 has been localized to a number of tissue and cell types and thus, agents which stimulate the production of T β 4 can be added to or comprise a composition to effect T β 4 production from a tissue and/or a cell. Such agents include members of the family of growth factors, such as insulin-like growth factor (IGF-1), platelet derived growth 35 factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor beta (TGF- β),

WO 02/091969

PCT/US02/15394

basic fibroblast growth factor (bFGF), thymosin α 1 (T α 1) and vascular endothelial growth factor (VEGF). More preferably, the agent is transforming growth factor beta (TGF- β) or other members of the TGF- β superfamily. T β 4 compositions of the invention may reduce the affects of EB by effectuating growth of the connective tissue through extracellular

5 matrix deposition, cellular migration and vascularization of the skin.

In accordance with one embodiment, subjects are treated with an agent that stimulates production in the subject of an EB-inhibiting peptide as defined above.

10 Additionally, agents that assist or stimulate EB reduction may be added to a composition along with T β 4 or a T β 4 isoform. Such agents include angiogenic agents, growth factors, agents that direct differentiation of cells, agents that promote migration of cells and agents that stimulate the provision of extracellular matrix material in the skin. For example, and not by way of limitation, T β 4 or a T β 4 isoform alone or in combination can be added in combination with any one or more of the following agents: VEGF, KGF, FGF, PDGF, TGF β , IGF-1, IGF-2, IL-1, prothymosin α and thymosin α 1 in an effective amount.

15 The invention also includes a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of T β 4 or a T β 4 isoform in a pharmaceutically acceptable carrier. Such carriers include those listed above with reference to parenteral administration.

20 The actual dosage or reagent, formulation or composition that heals or prevents blisters, sores and skin degeneration associated with EB may depend on many factors, including the size and health of a subject. However, persons of ordinary skill in the art can use teachings describing the methods and techniques for determining clinical dosages as disclosed in PCT/US99/17282, *supra*, and the references cited therein, to determine the appropriate dosage to use.

25 Suitable topical formulations include T β 4 or a T β 4 isoform at a concentration within the range of about 0.001 - 10% by weight, more preferably within the range of about 0.01 - 0.1% by weight, most preferably about 0.05% by weight.

30 The therapeutic approaches described herein involve various routes of administration or delivery of reagents or compositions comprising the T β 4 or other compounds of the invention, including any conventional administration techniques (for example, but not limited to, topical administration, local injection, inhalation, or systemic administration), to a subject. The methods and compositions using or containing T β 4 or other compounds of the invention may be formulated into pharmaceutical compositions by admixture with pharmaceutically acceptable non-toxic excipients or carriers.

WO 02/091969

PCT/US02/15394

The invention includes use of antibodies which interact with T β 4 peptide or functional fragments thereof. Antibodies which consists essentially of pooled monoclonal antibodies with different epitopic specificities, as well as distinct monoclonal antibody preparations are provided. Monoclonal antibodies are made from antigen containing fragments of the protein by methods well known to those skilled in the art as disclosed in PCT/US99/17282, *supra*. The term antibody as used in this invention is meant to include monoclonal and polyclonal antibodies.

In yet another embodiment, the invention provides a method of treating a subject by administering an effective amount of an agent which modulates T β 4 gene expression. The term "modulate" refers to inhibition or suppression of T β 4 expression when T β 4 is over expressed, and induction of expression when T β 4 is under expressed. The term "effective amount" means that amount of T β 4 agent which is effective in modulating T β 4 gene expression resulting in reducing the symptoms of the T β 4 associated EB. An agent which modulates T β 4 or T β 4 isoform gene expression may be a polynucleotide for example. The polynucleotide may be an antisense, a triplex agent, or a ribozyme. For example, an antisense directed to the structural gene region or to the promoter region of T β 4 may be utilized.

In another embodiment, the invention provides a method for utilizing compounds that modulate T β 4 activity. Compounds that affect T β 4 activity (e.g., antagonists and agonists) include peptides, peptidomimetics, polypeptides, chemical compounds, minerals such as zincs, and biological agents.

While not be bound to any particular theory, the present invention may promote healing or prevention of blisters, sores and skin degeneration associated with Epidermolysis Bullosa by inducing terminal deoxynucleotidyl transferase (a non-template directed DNA polymerase), to decrease the levels of one or more inflammatory cytokines, or chemokines, and to act as a chemotactic factor for endothelial cells, and thereby promoting healing or preventing degenerative changes in skin brought about by Epidermolysis Bullosa or other degenerative or environmental factors.

WO 02/091969

PCT/US02/15394

CLAIMS

1. A method of treatment for promoting healing or prevention of blisters, sores or skin degeneration associated with Epidermolysis Bullosa, comprising administering to a subject in need of such treatment an effective amount of a composition comprising an Epidermolysis Bullosa-inhibiting polypeptide comprising amino acid sequence LKKTET, or a conservative variant thereof having Epidermolysis Bullosa-inhibiting activity.
2. The method of claim 1 wherein said polypeptide promotes a skin condition improvement including an increase in skin elasticity of said subject.
3. The method of claim 1 wherein said polypeptide comprises Thymosin β 4 (T β 4), an N-terminal variant of T β 4, a C-terminal variant of T β 4, an isoform of T β 4, oxidized T β 4 or T β 4 sulfoxide.
4. The method of claim 1 wherein said composition is administered systemically.
5. The method of claim 1 wherein said composition is administered topically.
6. The method of claim 5 wherein said composition is in the form of a gel, creme, paste, lotion, spray, suspension, dispersion, salve, hydrogel or ointment formulation.
7. The method of claim 6, further including at least one agent that delays release or enhances penetration of T β 4 into an area to be treated.
8. The method of claim 1 wherein said polypeptide is recombinant or synthetic.
9. The method of claim 1 wherein said polypeptide is an antibody.
10. The method of claim 9 wherein said antibody is polyclonal or monoclonal.
11. A method of treatment for promoting healing or prevention of blisters, sores or skin degeneration associated with Epidermolysis Bullosa comprising administering to a subject in need of such treatment an effective amount of a composition comprising an agent that stimulates production of an Epidermolysis Bullosa-inhibiting polypeptide

WO 02/091969

PCT/US02/15394

comprising amino acid sequence LKKTET, or a conservative variant thereof having Epidermolysis Bullosa-inhibiting activity.

12. The method of claim 11 wherein said polypeptide is Thymosin β 4.

13. The method of claim 11 wherein said agent is an antagonist of Thymosin β 4.

14. A composition for use in promoting healing or prevention of blisters, sores or skin degeneration associated with Epidermolysis Bullosa comprising an effective amount of a composition including an Epidermolysis Bullosa-inhibiting polypeptide comprising amino acid sequence LKKTET or a conservative variant thereof having Epidermolysis Bullosa-inhibiting activity.

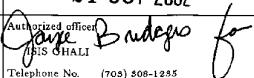
15. The composition of claim 14 wherein said composition comprises an N- or C-terminal variant of LKKTET.

16. The composition of claim 14 wherein said composition comprises KLKKTET or LKKTETQ.

17. The composition of claim 14 wherein said polypeptide comprises T β 4, an isoform of T β 4, oxidized T β 4 or T β 4 sulfoxide.

18. The composition of claim 14, comprising a gel, creme, paste, lotion, spray, suspension, dispersion salve, hydrogel or ointment formulation.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/16564
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) A61P 13/00 US CL. 424/440, 448 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/440, 448		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST SEARCH TERMS: topical, epidermolysis bullosa, thymosin.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,087,341 A (KHAVARI et al.) 11 July 2000, abstract; col. 6, lines 62-67; col. 7, lines 19-25, 44-48; col. 8, lines 59-69; col. 26, lines 51-53.	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 31 JULY 2002		Date of mailing of the international search report 21 OCT 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3250		Authorized officer  Telephone No. (703) 308-1255

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

A 61 P 43/00 111

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74) 代理人 100098316

弁理士 野田 久登

(74) 代理人 100109162

弁理士 酒井 將行

(72) 発明者 ゴールドスタイン, アラン・エル

アメリカ合衆国、20037 ワシントン・ディ・シィ、エヌ・ダブリュ、トゥエンティフィフス
・ストリート、800、アパートメント・1005

(72) 発明者 フィンケルスタイン, ジャック, ジュニア

アメリカ合衆国、20815 メリーランド州、チェビィ・チェイス、テーラー・ストリート、3
703

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA17 BA01 BA02 BA19 BA44 CA53 CA59 DA07

MA13 MA21 MA23 MA28 MA52 MA63 NA14 ZA892 ZB012 ZC412

4C085 AA13 AA14