



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0098957  
(43) 공개일자 2017년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/00 (2006.01) A61K 38/14 (2006.01)  
A61K 47/54 (2017.01) C07K 16/18 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 16/00 (2013.01)  
A61K 38/14 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-7022702  
(22) 출원일자(국제) 2016년01월15일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2016년08월14일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/013668  
(87) 국제공개번호 WO 2016/115500  
국제공개일자 2016년07월21일  
(30) 우선권주장  
62/104,653 2015년01월16일 미국(US)

(71) 출원인  
시티 오브 호프  
미국 91010-3000 캘리포니아주 두아르테 이스트  
두아르테 로드 1500  
(72) 발명자  
허만 안드레아스  
미국 91101 캘리포니아주 패서디나 사우스 엘 몰  
리노 500  
유 화  
미국 91741 캘리포니아주 글렌도라 사우스 오크하  
트 드라이브 123  
(74) 대리인  
김진희, 김태홍

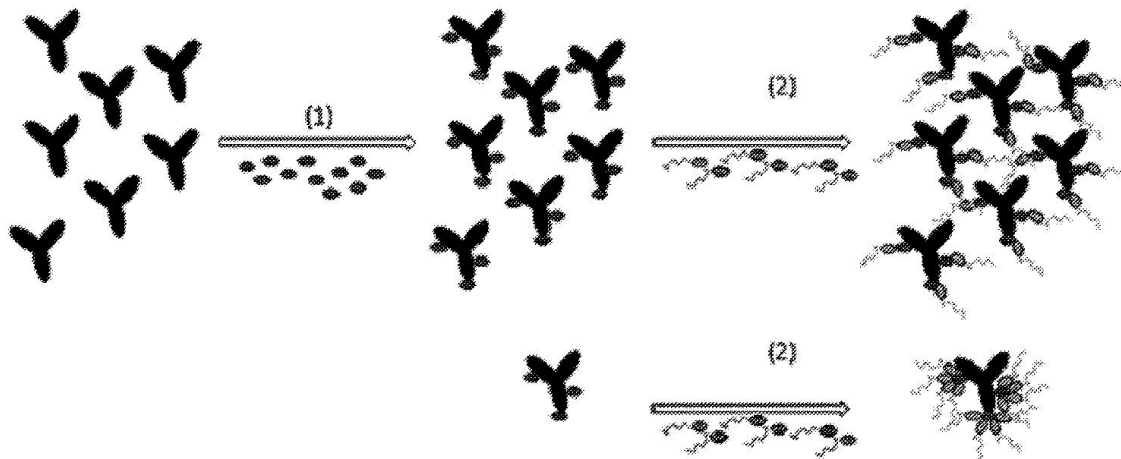
전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 세포 침투성 항체

(57) 요약

본원은 세포 침투성 접합체를 제공한다. 접합체는 바이오틴 결합 도메인 및 바이오틴 도메인을 포함하는 비공유 링커를 통해 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 부착된 세포 비침투성 단백질을 포함하고, 여기서 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 세포 비침투성 단백질의 세포 내 전달을 향상시킨다. 또한 접합체를 포함하는 조성물 및 키트를 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

**A61K 47/549** (2017.08)

**C07K 16/18** (2013.01)

C07K 2317/74 (2013.01)

C07K 2317/77 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

세포 침투성 접합체로서,

(i) 세포 비침투성 단백질;

(ii) 포스포로티오에이트 핵산; 및

(iii) 상기 포스포로티오에이트 핵산을 상기 세포 비침투성 단백질에 부착시키는 비공유 링커로서, 상기 비공유 링커는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착된 바이오틴 결합 도메인을 포함하는 것인 비공유 링커

를 포함하고,

상기 포스포로티오에이트 핵산은 상기 세포 비침투성 단백질의 세포내 전달을 향상시키는 것인 세포 침투성 접합체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바이오틴 결합 도메인은 아비딘 도메인인 세포 침투성 접합체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 바이오틴 결합 도메인은 스트렙타비딘 도메인인 세포 침투성 접합체.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 스트렙타비딘 도메인은 복수의 바이오틴 도메인에 결합하는 것인 세포 침투성 접합체.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 스트렙타비딘 도메인은 약 4개 바이오틴 도메인에 결합하는 것인 세포 침투성 접합체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이오틴 결합 도메인은 상기 세포 비침투성 단백질에 공유적으로 부착되는 것인 세포 침투성 접합체.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 바이오틴 결합 도메인이 상기 세포 비침투성 단백질에 부착되는 것인 세포 침투성 접합체.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이오틴 도메인은 상기 포스포로티오에이트 핵산에 부착되는 것인 세포 침투성 접합체.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 바이오틴 도메인은 상기 포스포로티오에이트 핵산에 공유적으로 부착되는 것인 세포 침투성 접합체.

#### 청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 복수의 포스포로티오에이트 핵산이 상기 바이오틴 도메인에 부착되는 것인 세포 침투성 접합체.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포스포로티오에이트 핵산은 길이가 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 또는 그 이상의 핵산 잔기인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 포스포로티오에이트 핵산은 길이가 약 10 내지 약 30개 핵산 잔기인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 13

제11항에 있어서, 상기 포스포로티오에이트 핵산은 길이가 약 20개 핵산 잔기인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 비침투성 단백질은 분자량이 25 kD을 넘는 것인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 비침투성 단백질은 분자량이 약 25 kD 내지 약 750 kD인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 비침투성 단백질은 항체인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 상기 항체는 IgG 항체인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 18

제16항에 있어서, 상기 항체는 IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 19

제16항에 있어서, 상기 항체는 Fv 단편인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 인간화 항체인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합하는 것인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 상기 세포내 표적은 자가면역 질환, 염증성 질환, 대사 장애, 발달 장애, 심혈관 질환, 간 질환, 장 질환, 감염성 질환, 내분비 질환, 신경학적 장애, 및 암으로 이루어진 군에서 선택된 질환의 표적인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 세포내 표적은 신호전달 분자 또는 전사 인자인 세포 침투성 집합체.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 상기 신호전달 분자는 포스포타제 또는 키나제인 세포 침투성 집합체.



**청구항 25**

제21항에 있어서, 상기 세포내 표적은 암 표적인 세포 침투성 접합체.

**청구항 26**

제21항에 있어서, 상기 세포내 표적은 STAT3, 및 Src로 이루어진 군에서 선택되는 것인 세포 침투성 접합체.

**청구항 27**

제21항에 있어서, 상기 세포내 표적은 인산화된 Src인 세포 침투성 접합체.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 비침투성 단백질을 상기 단백질에 부착된 표지, 소형 분자 또는 기능성 핵산을 더 포함하는 것인 세포 침투성 접합체.

**청구항 29**

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 침투성 접합체는 세포내 표적에 결합되는 것인 세포 침투성 접합체.

**청구항 30**

세포 침투성 접합체를 형성시키는 방법으로서, 상기 방법은 세포 비침투성 단백질을 포스포로티오에이트 핵산과 접촉시키는 단계로서, 상기 세포 비침투성 단백질은 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원에 부착되고 상기 포스포로티오에이트 핵산은 상기 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원에 부착되는 것인 단계를 포함하고, 이에 의해 바이오틴 도메인과 바이오틴 결합 도메인 사이에 비공유 결합을 포함하는 세포 침투성 접합체를 형성하는 것인 형성 방법.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 상기 바이오틴 결합쌍의 상기 제1 구성원은 바이오틴 결합 도메인인 형성 방법.

**청구항 32**

제30항에 있어서, 상기 바이오틴 결합쌍의 상기 제2 구성원은 바이오틴 도메인인 형성 방법.

**청구항 33**

제30항에 있어서, 상기 바이오틴 결합쌍의 상기 제1 구성원은 바이오틴 도메인인 형성 방법.

**청구항 34**

제30항에 있어서, 상기 바이오틴 결합쌍의 상기 제2 구성원은 바이오틴 결합 도메인인 형성 방법.

**청구항 35**

제30항에 있어서, 상기 포스포로티오에이트 핵산은 공유결합 반응성 모이어티를 포함하는 것인 형성 방법.

**청구항 36**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 세포 침투성 접합체를 포함하는 세포.

**청구항 37**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 세포 침투성 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산을 제2 세포 비침투성 단백질에 부착시키는 제2 비공유 링커를 포함하는 제2 세포 비침투성 단백질을 더 포함하는 약학 조성물.

#### 청구항 39

제38항에 있어서, 상기 비공유 링커는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착된 바이오틴 결합 도메인을 포함하는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 40

제38항에 있어서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합하는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 41

제40항에 있어서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 제21항 내지 제27항 중 어느 한 항의 상기 세포 비침투성 단백질에 비해 세포내 표적 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포내 표적에 결합하는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 43

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 항체인 약학 조성물.

#### 청구항 44

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 세포 침투성 접합체 또는 제37항의 약학 조성물 및 사용 설명서를 포함하는 키트.

#### 청구항 45

제44항에 있어서, 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산을 제2 세포 비침투성 단백질에 부착시키는 제2 비공유 링커를 포함하는 제2 세포 비침투성 단백질을 더 포함하는 키트.

#### 청구항 46

제45항에 있어서, 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 상기 접합체 및 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 별개 용기에 존재하는 것인 키트.

#### 청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 세포 비침투성 단백질에 비해 세포내 표적 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 키트.

#### 청구항 48

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포내 표적에 결합하는 것인 키트.

#### 청구항 49

제45항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포 비침투성 단백질 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물로서 제제화되는 것인 키트.

#### 청구항 50

제45항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 세포 비침투성 단백질은 항체인 키트.

#### 청구항 51

세포 비침투성 단백질을 세포에 전달하는 방법으로서, 세포를 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 상기 세포 침투성 접합체와 접촉시키는 단계를 포함하는 전달 방법.

#### 청구항 52

제51항에 있어서, 상기 세포 비침투성 단백질은 세포질 내 핵 단백질에 결합하여 세포 비침투성 단백질-핵 단백질 복합체를 형성하는 것인 전달 방법.

#### 청구항 53

제52항에 있어서, 상기 세포 비침투성 단백질-핵 단백질 복합체는 세포의 핵으로 진입할 수 없는 것인 전달 방법.

#### 청구항 54

질환의 치료를 필요로 하는 피험체에서 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 피험체에게 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 세포 침투성 접합체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 상기 피험체에서 질환을 치료하는 것인 치료 방법.

#### 청구항 55

제54항에 있어서, 피험체에게 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산을 제2 세포 비침투성 단백질에 부착시키는 제2 비공유 링커를 포함하는 제2 세포 비침투성 단백질을 투여하는 단계를 더 포함하는 치료 방법.

#### 청구항 56

제55항에 있어서, 상기 비공유 링커는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착된 바이오틴 결합 도메인을 포함하는 것인 치료 방법.

#### 청구항 57

제56항에 있어서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 접합체에 비해 세포내 표적 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 치료 방법.

#### 청구항 58

제57항에 있어서, 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포내 표적에 결합하는 것인 치료 방법.

#### 청구항 59

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 접합체 및 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 동시에 투여되는 것인 치료 방법.

#### 청구항 60

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 상기 접합체 및 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 순차적으로 투여되는 것인 치료 방법.

#### 청구항 61

제55항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 항체인 치료 방법.

#### 청구항 62

제55항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 치료제를 피험체에게 투여하는 단계를 더 포함하는 치료 방법.

#### 청구항 63

제55항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환은 자가면역 질환, 발달 장애, 염증성 질환, 대사 장애, 심혈관 질환, 간 질환, 장 질환, 감염성 질환, 내분비 질환, 신경학적 장애, 및 암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 치료 방법.

#### 청구항 64

제63항에 있어서, 질환은 암인 치료 방법.

#### 청구항 65

제55항에 있어서, 접합체의 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합하고, 세포내 표적은 STAT3 또는 Src인 치료 방법.

#### 청구항 66

제55항에 있어서, 접합체의 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합하고 세포내 표적은 인산화된 Src인 치료 방법.

#### 청구항 67

제55항에 있어서, 접합체의 세포 비침투성 단백질은 STAT3에 특이적으로 결합하는 항체이고 제2 세포 비침투성 단백질은 STAT3의 다른 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체인 치료 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

- [0001] 관련 출원에 관한 교차 참조
- [0002] 본 출원은 2015년 1월 16일에 출원된, 미국 가출원 제62/104,653호의 이득을 청구하며, 이 전체를 참조로 본원에 편입시킨다.
- [0003] 연방 정부 지원 연구 및 개발 하에 수행된 발명에 관한 권리의 진술
- [0004] 본 발명은 미국립 보건원에서 수여하는 교부 번호 CA122976 하의 지원금을 사용해 수행되었다. 정부는 본 발명에 대해 일정 권리를 갖는다.
- [0005] 기술분야
- [0006] 본 발명은 세포 침투성 항체에 관한 것이다.

#### 배경 기술

- [0007] 항체는 다른 유형의 약물 예컨대 소형 분자 약물에 비해 이의 쉬운 생성, 특이성 및 생체-내구성 때문에 효과적인 약물 양식으로 입증되었다. 현재 항체 요법은 오직 세포외 분자만을 표적으로 삼을 수 있다. 그러나, 질환 치료 및 질환 진단을 위한 수많은 중요한 표적들이 세포내에 있다. 예를 들어, 많은 전사 인자들, 예컨대 STAT3은 그 중에서도 암 요법을 위해 가장 핵심적이지만 도전적인 표적이다. 본원은 당분야에서 이러한 요구들 및 다른 요구들에 대한 해결책을 제공한다.

#### 발명의 내용

- [0008] 일 측면에서, 세포 침투성 접합체를 제공한다. 세포 침투성 접합체는 (i) 세포 비침투성 단백질, (ii) 포스포로티오에이트 핵산 및 (iii) 포스포로티오에이트 핵산을 세포 비침투성 단백질에 부착시키는 비공유 링커를 포함한다. 비공유 링커는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착된 바이오틴 결합 도메인을 포함하고, 포스포로티오에이트 핵산은 세포 비침투성 단백질의 세포내 전달을 향상시킨다.
- [0009] 다른 측면에서, 세포 침투성 접합체를 형성시키는 방법이 제공된다. 이 방법은 세포 비침투성 단백질을 포스포로티오에이트 핵산과 접합시키는 단계로서, 상기 세포 비침투성 단백질은 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원에 부착되고 포스포로티오에이트 핵산은 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원에 부착되는 것인 단계를 포함하고, 이에 의해 바이오틴 도메인과 바이오틴 결합 도메인 사이에 비공유 결합을 포함하는 세포 침투성 접합체를 형성한다.
- [0010] 다른 측면에서, 이의 실시형태를 포함하는 본원에서 제공하는 세포 침투성 접합체를 포함하는 세포가 제공된다.
- [0011] 다른 측면에서, 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공되는 세포 침투성 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물이 제공된다.
- [0012] 다른 측면에서, 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공되는 세포 침투성 접합체 또는 이의 실시형태를 포함하는

본원에 제공되는 바와 같은 약학 조성물 및 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.

[0013] 다른 측면에서, 세포 침투성 단백질을 세포에 전달하는 방법을 제공한다. 이 방법은 세포를 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공되는 바와 같은 세포 침투성 접합체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0014] 다른 측면에서, 이를 필요로 하는 피험체에서 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 세포 침투성 접합체의 유효량을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 피험체에서 질환을 치료한다.

### 도면의 간단한 설명

[0015] 도 1: 접합 계획: 항체/펩티드에 아비딘 및 아비딘에 바이오틴-올리고. (1)IgG의 아비딘화; (2) 바이오틴화된 전달 독립체(즉, PS-올리고머)를 첨가. 아비딘 대신, 스트렙타비딘(또는 아비딘 유도체)을 사용할 수 있고, 스트렙타비딘은 4개 바이오틴을 수용할 기회를 제공하는 한편, 아비딘은 단지 1개 바이오틴을 수용한다. PS, 포스포티오에이트

도 2: 정제 계획: 아비딘/바이오틴 유도된 접합은 변형된 항체를 정제할 수 있게 분자량을 증가시킨다.

도 3: 항체 단백질에 대한 아비딘-바이오틴을 통한 DNA-올리고의 비공유 연결은 항체/단백질 세포 침투성/항원 인식을 할 수 있게 한다. 인간 신경교종 U251 세포는 10 mg/mL에서 1시간 동안 표시된 바와 같이 변형된 항-STAT3 항체와 항온반응시켰다. 전체 세포 용해물을 준비하고 아가로스 비드를 첨가하기 전에 세포 찌거기를 제거하고 진탕하면서 4°C에서 밤새 용해물과 항온반응시켰다. 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 니트로셀룰로스로 막으로 전달하고, 항체로 STAT3 단백질을 탐색하였다. Av, 아비딘; SAv, 스트렙타비딘; B, 바이오틴; PO, 포스페이트; PS, 포스포티오에이트.

도 4a 및 도 4b: 세포 침투 및 세포내 표적 인식에 대해 바이오틴-아비딘/스트렙타비딘을 통한 항체 단백질과의 PEG화 대비 포스포티오에이트화 DNA-올리고의 부착의 직접 비교. 항체 단백질에 대한 아비딘-바이오틴을 통한 DNA-올리고의 비공유 연결은 항체 PEG화보다 우수하다. 인간 신경교종 U251 세포는 10 mg/mL에서 1시간 동안 표시된 바와 같이 변형된 항-STAT3 항체(토끼)와 항온반응시켰다. 도 4a, 단일 세포 현탁물을 준비하고 토끼 IgG는 유세포분석을 통해 분석된 세포내 염색 절차를 통해 평가하였다. 도 4b, 전체 세포 용해물을 준비하고 아가로스 비드를 첨가하기 전에 세포 찌거기를 제거하고 용해물과 4°C에서 밤새 진탕하면서 항온반응시켰다. 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 니트로셀룰로스로 막으로 전달하고, STAT3 단백질을 탐색하였다. - PEG, 폴리에틸렌 글리콜.

도 5a 및 도 5b: 항체에 대한 DNA-올리고의 비공유 연결. 비 DNA 올리고 단백질이 비닐 설폰 화학에 의해 유도된 공유 연결보다 우수하다. 표시된 바와 같이 10 µg/mL 항체를 1시간 동안 U251 세포와 항온반응시키고(A, 6웰 플레이트; BC, 12웰 플레이트), PBS로 세척하고 용해물을 준비하였으며, 아가로스 비드를 투명한 용해물에 첨가하고 WB를 수행하였다.

도 6: 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 PS-DNA 올리고에 접합된 변형된 항-STAT3 항체는 세포 침투 및 표적 인식을 할 수 있다.

도 7a 및 도 7b: 트랩타비딘/바이오틴을 통해 PS-DNA 올리고(20량체)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체는 세포 침투에서 가장 효율적이다.

도 8a 및 도 8b: 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 PS-DNA 올리고(20량체)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체는 세포 침투할 수 있다.

도 9a 및 도 9b: 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 PS-DNA 올리고(20량체)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체는 세포 침투할 수 있다.

도 10: 변형된 항-T-Bet 항체로 처리 시 마우스 B16 흑색종의 종양 성장.  $1 \times 10^5$  B16 종양 세포를 0일에 C57/BL6 마우스에게 피하 주사한 후, 7일부터 시작하여 비히클(PBS), 변형된 대조군(IgG) 및 T-bet 항체(10 µg/용량)의 국소 투여를 후속하였다. 항체 처리는 2일마다 하였다. 도시된 SD; T-검정: \*\*\*)  $P < 0.001$ .

도 11: 변형된 T-Bet 항체는 종양에서 IFN  $\gamma$ -발현 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 향상시켰다. B16 종양 연관된 림프구는 CTL 성숙 및 Th1 개체군을 비롯하여 CD4+ T 세포에 의한 T-bet 발현에 대해 유세포분석법으로 분석되었다.

도 12a 및 도 12b: T-Bet 항체는 종양 부위에서 DC 기능을 촉진시킨다. PBS, 비변형된 T-Bet, PO 또는 PS 변형

된 T-Bet 항체 처리한 CD3<sup>+</sup> 또는 CD3<sup>-</sup> 종양 연관 림프구에서 T-Bet 항체 흡수(도 12a), 및 이들 군의 CD11c<sup>+</sup> DC에서 CD86, MHC II 발현(도 12b)의 유세포측정 분석.

도 13: 세포 침투 FoxP3 항체의 특이성. 10  $\mu$ g/mL 변형된 항체(이소타입 또는  $\alpha$ Foxp3)를 Foxp3-GFP 형질전환 마우스로부터 신선하게 단리한 비장 세포( $2 \times 10^6$ /mL)와 2시간 동안 배양하고, 모든 세포를 수집하여 유세포측정 분석을 수행하였다.

도 14: 세포 침투성 항체에 의한 FoxP3 표적화는 종양-연관 Treg 및 종양 성장을 감소시킨다. 이십만 B16 종양 세포를 s.c.로 주사한 후, 1일 후에 변형된 대조군(IgG) 및 Foxp3 항체(10  $\mu$ g/마우스)의 i.v 투여를 하였다. 4 이상의 항체 처리를 11일까지 2일마다 전신으로 하였다(주: 11일 후 더 이상의 처리 없음). 20일에, 모든 동물을 안락사시키고 종양 림프구는 농도구배 원심분리를 통해 분리하였다. 다음으로, 종양 침윤성 림프구를 고정시키고 FoxP3 및 CTLA4의 세포내 염색을 위해 투과시켰다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 정의
- [0017] 본 발명의 다양한 실시형태 및 측면들을 본원에서 도시하고 설명하지만, 그러한 실시형태 및 측면들이 단지 예로서 제공된다는 것은 당업자에게 자명하다. 다양한 변이, 변화, 및 치환이 본 발명을 벗어나지 않고 당업자에게 이제 일어날 수 있다. 본원에 기술된 본 발명의 실시형태에 관한 다양한 대안이 본 발명을 실시하면서 적용될 수 있음을 이해해야 한다.
- [0018] 본원에서 사용되는 표제 부문은 단지 구성상의 목적을 위한 것이고 기술된 대상 주제를 한정하려는 것으로 이해해서는 안된다. 제한없이, 특허, 특허 출원, 논문, 책, 매뉴얼, 및 조약을 포함한 본 출원에서 인용하는 모든 문헌, 또는 문헌이 일부는 임의 목적을 위해 그들 전체로 참조하여 명백하게 본원에 편입시킨다.
- [0019] 본원에서 사용되는 약어는 화학 및 생물학 분야에서 그들의 통상적인 의미를 갖는다. 본원에 기재된 화학 구조 및 화학식은 화학 분야에 공지된 화학 원자의 표준 규칙에 따라 구성되었다.
- [0020] 달리 정의하지 않으면, 본원에서 사용되는 기술 및 과학 용어는 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, 문헌 [Singleton et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994)]; [Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)]을 참조한다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 또는 균등한 임의의 방법, 장비 및 재료는 본 발명의 실시에서 사용될 수 있다. 이하의 정의는 본원에서 빈번하게 사용되는 일정 용어들의 이해를 용이하게 하기 위해 제공되며 본원의 범주를 한정하려는 것이 아니다.
- [0021] "핵산" 또는 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드" 또는 본원에서 사용되는 문법적 동의어는 함께 공유적으로 연결된 적어도 2개 뉴클레오타이드를 의미한다. 용어 "핵산"은 단일 가닥 형태 또는 이중 가닥 형태, 또는 이의 상보체로서 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이의 중합체를 의미한다. 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드의 선형 서열을 의미한다. 용어 "뉴클레오타이드"는 전형적으로 폴리뉴클레오타이드의 단일 단위, 즉 단량체를 의미한다. 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 또는 이의 변형된 형태를 의미한다. 본원에서 고려하는 폴리뉴클레오타이드의 예는 단일 가닥 및 이중 가닥 DNA, 단일 및 이중 가닥 RNA(siRNA 포함), 및 단일 및 이중 가닥 DNA 및 RNA의 혼합물을 갖는 하이브리드 분자를 포함한다. 이 용어는 또한 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 기준 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는, 합성, 천연 발생, 및 비천연 발생인 기지의 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형된 골격 잔기 또는 연결을 함유하는 핵산을 포함한다. 이러한 유사체의 예는 제한없이, 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 및 2-O-메틸 리보뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0022] 용어 "포스포로티오에이트 핵산"은 1 이상의 뉴클레오타이드간 연결이 포스포로티오에이트 모이어티 (티오포스페이트) 모이어티를 통한 것인 핵산을 의미한다. 포스포로티오에이트 모이어티는 모노티오포스페이트( $-P(O)_3(S)^{3-}$ ) 또는 디티오포스페이트( $-P(O)_2(S)_2^{3-}$ )일 수 있다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 모이어티는 모노티오포스페이트( $-P(O)_3(S)^{3-}$ )이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산은 모노티오포스페이트 핵산이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산의 뉴클레오시드의 1 이상은 포스포로티오에이트 모이어티(예를 들어, 모노티오포

스페이트) 모이어티를 통해 연결되고, 나머지 뉴클레오시드는 포스포디에스테르 모이어티( $-P(O)_4^{3-}$ )를 통해 연결된다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산의 뉴클레오시드의 1 이상은 포스포로티오에이트 모이어티(예를 들어, 모노티오포스페이트) 모이어티를 통해 연결되고, 나머지 뉴클레오시드는 메틸포스포네이트 연결을 통해 연결된다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산의 뉴클레오시드 전부는 포스포로티오에이트 모이어티(예를 들어, 모노티오포스페이트) 모이어티를 통해 연결된다.

[0023] 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드(포스포로티오에이트 핵산)는 전형적으로 길이가 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드, 길이가 최대 약 100개 뉴클레오타이드이다. 포스포로티오에이트 핵산은 또한 길이가 더 길수도 있으며, 예를 들어, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10,000개 등일 수 있다. 상기에 기술된 바와 같이, 일정 실시형태에서, 본원의 포스포로티오에이트 핵산은 1 이상의 포스포디에스테르 결합을 함유한다. 다른 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산은 대체 골격(예를 들어, 당분야에 공지된 포스포디에스테르의 모방체 또는 유사체, 예컨대, 보라노포스페이트, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 또는 0-메틸포스포로아미다이트 연결(예를 들어, 문헌 [Eckstein, Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach, Oxford University Press] 참조))을 포함한다. 포스포로티오에이트 핵산은 또한 당분야에 공지된 1 이상의 핵산 유사체 단량체, 예컨대, 펩티드 핵산 단량체 또는 중합체, 잠금 핵산 단량체 또는 중합체, 몰폴리노 단량체 또는 중합체, 글리콜 핵산 단량체 또는 중합체, 또는 트레오스 핵산 단량체 또는 중합체를 포함한다. 다른 유사체 핵산은 미국 특허 제5,235,033호 및 제5,034,506호, 및 6장 및 7장, [ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Sanghui & Cook, eds.]에 기술된 것들을 포함해, 비이온성 골격, 및 비리보스 골격을 갖는 것을 포함한다. 1 이상의 탄소환 당을 함유하는 핵산이 또한 핵산의 정의 내에 포함된다. 리보스-포스페이트 골격의 변형은 다양한 이유, 예를 들어, 생리적 환경에서 그러한 분자의 안정성 및 반감기를 증가시키거나 또는 바이오칩 상의 프로브로서, 수행될 수 있다. 천연 발생 핵산 및 유사체의 혼합물을 만들 수 있고, 대안적으로, 상이한 핵산 유사체의 혼합물, 및 천연 발생 핵산 및 유사체의 혼합물을 만들 수 있다. 포스포로티오에이트 핵산 및 포스포로티오에이트 중합체 골격은 선형 또는 분지형일 수 있다. 예를 들어, 분지형 핵산은 반복적으로 분지되어 고도의 구조 예컨대 덴드리머 등을 형성한다.

[0024] 본원에서 사용시, "포스포로티오에이트 중합체 골격"은 적어도 2개의 포스포로티오에이트 연결(예를 들어, 모노티오포스페이트)(예를 들어, 당 서브유닛, 환형 서브유닛 또는 알킬 서브유닛을 함께 연결)과의 화학 중합체이다. 포스포로티오에이트 중합체 골격은 펜토스 당의 1 이상(또는 전부)이 핵산에 정상적으로 존재하는 염기(뉴클레오타이드)가 결합된 포스포로티오에이트 핵산인, 포스포로티오에이트 당 중합체일 수 있다. 포스포로티오에이트 중합체 골격은 2 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함할 수 있다. 포스포로티오에이트 중합체 골격은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 30, 40, 50개 또는 그 이상의 연결을 포함하고, 최대 약 100개 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 포스포로티오에이트 중합체 골격은 또한 많은 수의 연결, 예를 들어, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10,000개 등을 함유할 수도 있다.

[0025] 포스포로티오에이트 핵산 및 포스포로티오에이트 중합체 골격은 부분적으로 또는 완전하게 포스포로티오에이트 화될 수 있다. 포스포로티오에이트 핵산의 뉴클레오타이드간 연결의 50% 이상이 포스포로티오에이트 연결이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산의 뉴클레오타이드간 연결의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 포스포로티오에이트 연결이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산의 뉴클레오타이드간 연결의 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 포스포로티오에이트 연결이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산의 뉴클레오타이드간 연결의 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 포스포로티오에이트 연결이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산의 뉴클레오타이드간 연결의 90%, 95%, 또는 99%가 포스포로티오에이트 연결이다. 실시형태에서, 나머지 뉴클레오타이드간 연결이 포스포디에스테르 연결이다. 실시형태에서, 나머지 뉴클레오타이드간 연결이 메틸포스포네이트 연결이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산의 뉴클레오타이드간 연결의 100%가 포스포로티오에이트 연결이다. 유사하게, 포스포로티오에이트 중합체 골격 내 당사이 연결의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 포스포로티오에이트 연결이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 중합체 골격 내 당사이 연결의 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 포스포로티오에이트 연결이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 중합체 골격 내 당사이 연결의 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 포스포로티오에이트 연결이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 중합체 골격 내 당사이 연결의 90%, 95%, 또는 99%가 포스포로티오에이트 연결이다. 실시형태에서, 나머지 뉴클레오타이드간 연결은 포스포디에스테르 연결이다. 실시형태에서, 나머지 뉴클레오타이드간 연결은 메틸포스포네이트 연결이다. 실시



형태에서, 포스포로티오에이트 중합체 골격의 당사이 연결의 100%가 포스포로티오에이트 연결이다.

- [0026] 핵산은 비특이적 서열을 포함할 수 있다. 본원에서 사용 시, 용어 "비특이적 서열"은 임의의 다른 핵산 서열에 상보적이거나 또는 오직 부분적으로 상보적이라도 디자인되지 않은 일련의 잔기를 함유하는 핵산 서열을 의미한다. 예로서, 비특이적 핵산 서열은 세포 또는 유기체와 접촉시 억제성 핵산으로서 기능하지 않는 핵산 잔기의 서열이다. "억제성 핵산"은 표적 핵산(예를 들어, 단백질로 번역될 수 있는 mRNA)과 결합할 수 있고 표적 핵산(예를 들어, DNA로부터의 mRNA)의 전사를 감소시키거나 또는 표적 핵산(예를 들어, mRNA)의 번역을 감소시키거나 또는 전사물 스플라이싱(예를 들어, 단일 가닥 몰폴리노 올리고)을 변경시킬 수 있는 핵산(예를 들어, DNA, RNA, 뉴클레오타이드 유사체의 중합체)을 의미한다.
- [0027] "표지된 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드"는 링커 또는 화학 결합을 통해 공유적으로, 또는 이온 결합, 반 데르 발스, 정전기력, 또는 수소 결합을 통해 비공유적으로 표지에 결합되어, 핵산의 존재가 그 핵산에 결합된 검출 가능한 표지의 존재를 검출하여 검출될 수 있는 것이다. 다르게, 높은 친화성 상호작용을 사용하는 방법은 결합 파트너의 쌍 중 하나가 다른 것, 예를 들어 바이오틴, 스트렙타비딘에 결합하는 경우에 동일한 결과를 달성할 수 있다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 본원에 개시되고 당 분야에 일반적으로 공지된 바와 같은 검출가능한 표지를 포함한다.
- [0028] 단어 "상보적" 또는 "상보성"은 제2 폴리뉴클레오타이드의 다른 핵산과 염기쌍을 형성하는 폴리뉴클레오타이드의 핵산의 능력을 의미한다. 예를 들어, 서열 A-G-T는 서열 T-C-A와 상보적이다. 상보성은 오직 일부의 핵산만이 염기쌍 형성에 따라 일치되는 경우에 부분적이거나, 또는 모든 핵산이 염기쌍 형성에 따라 일치되는 경우, 완전할 수 있다.
- [0029] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 위치되는 경우 "작동적으로 연결된"다. 예를 들어, 프리서열(presequence) 또는 분비 리더에 대한 DNA는 폴리펩티드의 분비에 관여하는 프리단백질로서 발현되면 폴리펩티드에 대해 DNA에 작동적으로 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 그것이 서열의 전사에 영향을 미치면 코딩 서열에 작동적으로 연결된 것이거나, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 위치되면 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, "작동적으로 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 서로 근방인 것을 의미하고, 분비 리더의 경우에는 인접하고 리딩 상에 있는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 결찰을 통해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않으면, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커는 통상의 관례에 따라 사용된다.
- [0030] 용어 "유전자"는 단백질을 생산하는데 관여하는 DNA의 절편을 의미하고, 개별 코딩 절편(엑손) 사이의 개재 서열(인트론)을 비롯하여 코딩 영역을 선행하고 후속하는 영역을 포함한다. 리더, 트레일러를 비롯한 인트론은 유전자의 전사 및 번역 동안 필요한 조절 성분을 포함한다. 또한, "단백질 유전자 생성물"은 특정 유전자에서 발현되는 단백질이다.
- [0031] 유전자와 관련하여 본원에서 사용하는 단어 "발현" 또는 "발현되는"은 유전자의 전사 및/또는 번역 생성물을 의미한다. 세포에서 DNA 분자의 발현도는 세포에 존재하는 상응하는 mRNA의 양 또는 세포에 의해 생산되는 DNA에 의해 코딩된 단백질의 양을 기준으로 결정할 수 있다. 비코딩 핵산 분자(예를 들어, siRNA)의 발현도는 당분야에 공지된 표준 PCR 또는 노던 블롯 방법으로 검출할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook *et al.*, 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 18.1-18.88]을 참조한다.
- [0032] 예를 들어, 세포, 또는 핵산, 단백질, 또는 벡터와 관련하여 사용시 용어 "재조합"은 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종성 핵산 또는 단백질의 도입 또는 천연 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되거나, 또는 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유도된 것을 의미한다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 천연(비재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나, 또는 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 상태 하에서 그렇지 않으면 비정상적으로 발현되는 천연 유전자를 발현한다. 형질전환 세포 및 식물은 전형적으로 재조합 방법의 결과로서, 이종성 유전자 또는 코딩 서열을 발현하는 것이다.
- [0033] 핵산 부분과 관련하여 사용시 용어 "이종성"은 핵산이 자연계에서 서로 동일한 관계로 존재하지 않는 2 이상의 하위서열을 포함하는 핵산을 의미한다. 예를 들어, 핵산은 전형적으로 예를 들어 한 공급원에서 유래된 신규한 기능성 핵산, 및 다른 공급원에서 유래된 코딩 영역을 만들도록 배열된 미관련 유전자 유래의 2 이상의 서열을 갖는 것을 재조합적으로 생산한다. 유사하게, 이종성 단백질은 자연계에서 서로 동일한 관계로 발견되지 않는 2 이상의 하위서열을 포함하는 단백질을 의미한다(예를 들어, 융합
- [0034] 용어 "외생성"은 소정 세포 또는 유기체 밖에서 기원하는 분자 또는 물질(예를 들어, 화합물, 핵산 또는



단백질)을 의미한다. 예를 들어, 본원에서 언급시 "외생성 프로모터"는 그것이 발현되는 식물에서 기원하지 않은 프로모터이다. 반대로, 용어 "내생성" 또는 "내생성 프로모터"는 소정 세포 또는 유기체 내에서 기원하거나, 또는 그에 천연적인 분자 또는 물질을 의미한다.

[0035] 핵산 또는 단백질에 적용시 용어 "단리된"은 핵산 또는 단백질이 천연 상태에서 회합된 다른 세포 성분이 본질적으로 없는 것을 의미한다. 예를 들어, 동중성 상태이고 건조 또는 수용액일 수 있다. 순도 및 동중성은 전형적으로 분석 화학 기술 예컨대 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액상 크로마토그래피를 사용해 결정한다. 조제물에 존재하는 미세한 종인 단백질이 실질적으로 정제된다.

[0036] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 언급하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 실시형태에서 중합체는 아미노산으로 이루어지지 않은 모이어티에 접합될 수 있다. 이 용어는 1 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산의 인조 화학 모방체인 아미노산 중합체를 비롯하여, 천연 발생 아미노산 중합체 및 비천연 발생 아미노산 중합체에 적용된다. "융합 단백질"은 단일 모이어티로서 재조합적으로 발현된 2 이상의 개별 단백질 서열을 코딩하는 키메라 단백질을 의미한다.

[0037] 용어 "펩티드" 및 "펩티드 모이어티"는 1가 펩티드를 의미한다.

[0038] 용어 "아미노산"은 천연 발생 및 합성 아미노산을 비롯하여, 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 의미한다. 천연 발생 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩되는 것들을 비롯하여, 이후에 변형된 아미노산, 예를 들어 히드록시프롤린,  $\gamma$ -카복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉 수소, 카복실 기, 아미노 기, 및 R 기에 결합된  $\alpha$  탄소를 갖는 화합물, 예를 들어 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폭시드, 메티오닌 메틸 설포늄을 의미한다. 그러한 유사체는 변형된 R 기(예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 골격을 갖지만, 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반 화학 구조와는 상이하지만, 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 구조를 갖는 화학 화합물을 의미한다. 용어 "비천연 발생 아미노산" 및 "비천연 아미노산"은 자연계에서 발견되지 않는 아미노산 유사체, 합성 아미노산, 및 아미노산 모방체를 의미한다.

[0039] 아미노산은 그들의 일반적으로 알려진 3글자 기호 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회에서 권고하는 1글자 기호로 본원에서 언급할 수 있다. 유사하게, 뉴클레오티드는 그들의 통상적으로 허용되는 1글자 코드에 의해 언급될 수 있다.

[0040] "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 둘 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열과 관련하여, "보존적으로 변형된 변이체"는 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 의미한다. 유전자 코드의 축퇴성때문에, 수많은 핵산 서열은 임의의 소정 단백질을 코딩하게 된다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 코돈에 의해 알라닌이 명시된 모든 위치에서, 코돈은 코딩된 폴리펩티드를 변경하지 않고 기술된 상응하는 임의 코돈으로 변경될 수 있다. 그러한 핵산 변이를 "침묵 변이"라고 하고, 보존적으로 변형된 변이의 한 종이다. 폴리펩티드를 코딩하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 기술한다. 당업자는 핵산의 각 코돈(일반적으로 오직 메티오닌만의 코돈인 AUG, 및 일반적으로 오직 트립토판에 대한 코돈인 TGG 제외)이 기능적으로 동일한 분자를 산출하도록 변형될 수 있다는 것을 인식한다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 각각의 기술된 서열에 내포된다.

[0041] 아미노산 서열과 관련하여, 당업자는 코딩된 서열에서 단일 아미노산 또는 아미노산의 작은 비율을 변경, 첨가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질 서열에 대한 개별 치환, 결실 또는 첨가는 변경이 화학적으로 유사한 아미노산으로의 아미노산 치환을 야기하는 "보존적으로 변형된 변이체"라는 것을 이해하게 된다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표가 당분야에 잘 알려져 있다. 그러한 보존적으로 변형된 변이체는 또한 본 발명의 다형성 변이체, 중간 상동체, 및 대립유전자를 배제하지 않는다.

[0042] 하기의 8군은 각각 서로에 대해 보존적 치환인 아미노산을 함유한다:

[0043] 1)알라닌 (A), 글리신 (G);

[0044] 2)아스파르트산 (D), 글루탐산 (E);

[0045] 3)아스파라긴 (N), 글루타민 (Q);

- [0046] 4)아르기닌 (R), 리신 (K);
- [0047] 5)이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V);
- [0048] 6)페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W);
- [0049] 7)세린 (S), 트레오닌 (T); 및
- [0050] 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M)
- [0051] (예를 들어, 문헌 [Creighton, Proteins (1984)] 참조).
- [0052] 2 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여, 용어 "동일한" 또는 "동일성" 비율은 이하에 기술된 디폴트 변수로 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교를 사용하거나, 또는 수동 정렬 및 육안 검사(예를 들어, NCBI web site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 참조)에 의해 측정시 동일하거나 또는 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 특정 비율(즉, 비교창 또는 지정 영역에 대한 최대 대응도로 비교 및 정렬 시 특정 영역에 대해 약 60% 동일성, 바람직하게 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 동일성)을 갖는 2 이상의 서열 또는 하위서열을 의미한다. 그러한 서열은 "실질적으로 동일"하다고 한다. 이러한 정의는 또한 시험 서열의 찬사를 의미하거나, 또는 그에 적용될 수도 있다. 정의는 또한 결실 및/또는 첨가를 갖는 서열을 비롯하여, 치환을 갖는 것을 포함한다. 하기에 기술하는 바와 같이, 바람직한 알고리즘은 갭 등을 설명할 수 있다. 바람직하게, 동일성은 길이가 적어도 약 25개 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역, 또는 보다 바람직하게 길이가 50-100개 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역에 대해 존재한다.
- [0053] "항체"는 항원에 특이적으로 결합하여 인식하는 면역글로불린 유전자 또는 이의 단편에서 유래하는 프레임워크 영역을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 인식된 면역글로불린 유전자는 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론, 및 뮤 불변 영역 유전자를 비롯하여, 무수한 면역글로불린 가변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류되었다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론으로 분류되고, 결과적으로 각각 면역글로불린 부류 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 한정한다. 전형적으로, 항체의 항원-결합 영역은 결합 특이성 및 친화성에서 가장 핵심적이게 된다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항체의 단편은 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 낙타 등을 포함한, 상이한 유기체에서 유래될 수 있다. 본 발명의 항체는 항체의 바람직한 기능(예를 들어, 당화, 발현, 항원 인식, 이펙터 기능, 항원 결합, 특이성 등)을 개선시키거나 또는 조정하기 위해 1 이상의 아미노산 위치에서 변형되거나 또는 돌연변이된 항체를 포함해도 된다.
- [0054] 예시적인 면역글로불린(항체) 구조 단위는 사량체를 포함한다. 각각의 사량체는 폴리펩티드 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 하나의 "경"쇄(약 25 kD) 및 하나의 "중"쇄(약 50-70 kD)를 갖는다. 각 사슬의 N-말단은 항원 인식을 주로 담당하는 약 100 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 한정한다. 용어 가변 경쇄(VL) 및 가변 중쇄(VH)는 각각 이들 경쇄 및 중쇄를 의미한다. Fc(즉, 단편 결정가능 영역)는 면역글로불린의 "베이스" 또는 "꼬리부"이고 전형적으로 항체의 부류에 의존적으로 2 또는 3개의 불변 도메인에 기여하는 2개 중쇄로 구성된다. 특이적 단백질과의 결합에 의해, Fc 영역은 각각의 항체가 소정 항원에 대한 적절한 면역 반응을 생성시키는 것을 보장한다. Fc 영역은 또한 다양한 세포 수용체, 예컨대 Fc 수용체, 및 다른 면역 분자, 예컨대 보체 단백질에 결합한다.
- [0055] 항체는 예를 들어, 온전한 면역글로불린으로서 또는 다양한 펩티다제를 사용한 분해에 의해 생성된 수많은 잘 특징규명된 단편으로 존재한다. 따라서, 예를 들어, 펩신은 항체를 힌지 영역에 이황화 연결 아래에서 분해시켜 그 자체가 이황화 결합에 의해 VH-CH1에 연결된 경쇄인 Fab의 이량체, F(ab)'2를 생성시킨다. F(ab)'2는 온화한 상태 하에서 환원되어 힌지 영역의 이황화 연결을 파괴하여, F(ab)'2 이량체를 Fab' 단량체로 전환시킨다. Fab' 단량체는 본질적으로 힌지 영역의 일부분을 갖는 항원 단정 부분이다(예를 들어, 문헌 [Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993)] 참조). 다양한 항체 단편이 온전한 항체의 분해 관점에서 정의되지만, 당업자는 그러한 단편이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론을 사용하여 새롭게 합성될 수 있다는 것을 이해하게 된다. 따라서, 본원에서 사용시, 용어 항체는 또한 전체 항체의 변형에 의해 생성된 항체 단편, 또는 재조합 DNA 방법론을 사용해 새롭게 합성된 것(예를 들어, 단쇄 Fv) 또는 파지 디스플레이 라이브러리를 사용해 동정된 것(예를 들어, 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)] 참조)을 포함한다.
- [0056] 단쇄 가변 단편(scFv)은 전형적으로 10 내지 약 25개 아미노산의 짧은 링커 펩티드와 연결된 면역글로불린의 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)의 가변 영역의 융합 단백질이다. 링커는 일반적으로 가용성을 위한 세린 또는 트레오닌을 비롯하여, 유연성을 위한 글리신이 풍부할 수 있다. 링커는 VH의 N-말단이 VL의 C-말단과 연결될 수 있거나, 또

는 그 반대일 수 있다.

[0057] 본 발명의 적합한 항체의 제조를 위해 그리고 본 발명에 따른 사용을 위해, 예를 들어 재조합 단일클론 또는 다클론 항체를 위해, 당분야에 공지된 많은 기술들을 사용할 수 있다(예를 들어, 하기 문헌들 참조: [Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)]; [Kozbor et al., *Immunology Today* 4: 72 (1983)]; [Cole et al., pp. 77-96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985)]; [Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991)]; [Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)]; 및 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed. 1986)]). 관심 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자는 세포로부터 클로닝될 수 있고, 예를 들어, 단일클론 항체를 코딩하는 유전자를 하이브리도마로부터 클로닝할 수 있으며 재조합 단일클론 항체를 생산하기 위해 사용할 수 있다. 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자 라이브러리가 또한 하이브리도마 또는 형질 세포로부터 만들어질 수 있다. 중쇄 및 경쇄 생성물의 무작위 조합은 상이한 항원 특이성을 갖는 항체의 거대 풀을 생성시킨다(예를 들어, 문헌 [Kuby, *Immunology* (3rd ed. 1997)] 참조). 단일 사슬 항체 또는 재조합 항체의 생산을 위한 기술(미국 특허 제4,946,778호, 미국 특허 제4,816,567호)을 본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체를 생산하도록 적합화시킬 수 있다. 또한, 형질전환 마우스, 또는 다른 유기체 예컨대 다른 포유동물을 인간화 또는 인간 항체를 발현시키는데 사용해도 된다(예를 들어, 하기 문헌들 참조: 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,661,016호, [Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)]; [Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994)]; [Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994)]; [Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996)]; [Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996)]; 및 [Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)]). 대안적으로, 파지 디스플레이 기술은 선택된 항체에 특이적으로 결합하는 항체 및 이중체 Fab 단편 및 항체를 동정하는데 사용될 수 있다(예를 들어, 하기 문헌 참조: [McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990)]; [Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783 (1992)]). 항체는 또한 이중특이적으로 만들 수 있고, 다시 말해서 2종의 상이한 항원을 인식할 수 있다(예를 들어, WO 93/08829, [Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991)]; 및 [Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)] 참조). 항체는 또한 이중접합체, 예를 들어, 2종의 공유적으로 연결된 항체, 또는 면역독소일 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,676,980호, WO 91/00360; WO 92/200373; 및 EP 03089 참조).

[0058] 비인간 항체를 인간화 또는 영장류화하기 위한 방법은 당 분야에서 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호; 제5,530,101호; 제5,859,205호; 제5,585,089호; 제5,693,761호; 제5,693,762호; 제5,777,085호; 제6,180,370호; 제6,210,671호; 및 제6,329,511호; WO 87/02671; 유럽 특허 출원 제0173494호; [Jones et al. (1986) *Nature* 321:522]; 및 [Verhoyen et al. (1988) *Science* 239:1534] 참조). 인간화 항체는 예를 들어, 문헌 [Winter and Milstein (1991) *Nature* 349:293]에 더욱 기술되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비인간인 공급원에서 유래된 것에 도입된 1 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비인간 아미노산 잔기는 종종 이입 잔기라고 언급되며, 전형적으로 이입 가변 도메인으로부터 시작된다. 인간화는 본질적으로 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열로 치환시켜서, Winter 및 동료들의 방법에 따라서 수행될 수 있다(예를 들어, 하기 문헌들 참조: [Morrison et al., *PNAS USA*, 81:6851-6855 (1984)], [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988)]; [Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988)], [Verhoeven et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)] 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)], [Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991)]; [Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994)]). 따라서, 그러한 인간화 항체는 키메라 항체(미국 특허 제4,816,567호)이고, 여기서 온전한 인간 가변 도메인보다 실질적으로 적은 것이 비인간 종 유래의 상응하는 서열에 의해 치환되었다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위 유래의 잔기에 의해 치환된 인간 항체이다. 예를 들어, 인간화 면역글로불린 프레임워크 영역을 코딩하는 제1 서열 및 바람직한 면역글로불린 상보성 결정 영역을 코딩하는 제2 서열 세트를 포함하는 폴리뉴클레오티드는 합성적으로 또는 적절한 cDNA 및 게놈 DNA 절편을 조합하여 생산될 수 있다. 인간 불변 영역 DNA 서열은 다양한 인간 세포로부터 잘 알려진 절차에 따라 분리될 수 있다.

[0059] "키메라 항체"는 (a) 불변 영역, 또는 이의 일부가 변경, 치환 또는 교체되어서 항원 결합 부위(가변 영역)가 상이하거나 또는 변경된 부류, 이펙터 기능 및/또는 종의 불변 영역, 또는 키메라 항체에 새로운 특성을 부여하는 전체적으로 상이한 분자, 예를 들어 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 약물 등에 연결되거나; 또는 (b) 가변 영역, 또는 이의 일부가 상이하거나 또는 변경된 항원 특이성을 갖는 가변 영역으로 변경되거나, 치환되거나 또는 교환된 항체 분자이다. 본 발명에 따르면, 그에 따라 이용하기 위한 바람직한 항체는 인간화 및/또는 키메라

단일클론 항체를 포함한다.

- [0060] 항체에 치료제를 접합하기 위한 기술은 잘 알려져 있다(예를 들어, 하기 문헌들 참조: [Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]; [Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery" in Controlled Drug Delivery (2<sup>nd</sup> Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)]; [Thorpe, "Antibodies Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)]; 및 [Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)]). 본원에서 사용시, 용어 "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"는 항체에 접합되거나 또는 아니면 공유적으로 결합된 치료제를 의미한다. 본원에서 사용시 "치료제"는 질환 예컨대 암을 치료하거나 또는 예방하는데 유용한 조성물이다.
- [0061] 단백질 또는 펩티드를 언급 시, 어구 항체"에 특이적으로(또는 선택적으로 결합하다" 또는 "특이적으로(또는 선택적으로) 면역 반응하다"는 종종 단백질 및 다른 생물 체제의 이종성 개체군 내에서, 단백질의 존재를 결정하는 결합 반응을 의미한다. 따라서, 지정된 면역검정 상태 하에서, 특정한 항체는 배경값보다 적어도 2배, 보다 전형적으로 배경값보다 10 내지 100배 이상으로 특정 단백질에 결합한다. 이러한 상태 하에서 항체와의 특이적 결합은 특정 단백질에 대한 이의 특이성에 대해 선택된 항체를 필요로 한다. 예를 들어, 다클론 항체는 선택된 항원과 특이적으로 면역 반응하지만 다른 단백질과는 반응하지 않는 항체의 서브셋만을 획득하도록 선택할 수 있다. 이러한 선택은 다른 분자와 교차 반응하는 항체를 빼서 획득될 수 있다. 다양한 면역검정 형식이 특정 단백질과 특이적으로 면역반응하는 항체를 선택하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 고체상 ELISA 면역검정법은 단백질과 특이적으로 면역반응하는 항체를 선택하는데 통상적으로 사용된다(예를 들어, 문헌 [Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998) for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity] 참조).
- [0062] "리간드"는 수용체에 결합할 수 있는, 작용제, 예를 들어 폴리펩티드 또는 다른 분자를 의미한다.
- [0063] "표지" 또는 "검출가능한 모이어티"는 분광분석, 광화학, 생화학, 면역화학, 화학 또는 다른 물리적 수단에 의해 검출할 수 있는 조성물이다. 예를 들어, 유용한 표지는 32P, 형광발광 염료, 전자-밀도 시약, 효소(예를 들어, ELISA에서 통상적으로 사용되는 것과 같음), 바이오틴, 디옥시게닌, 또는 헵텐 및 단백질 또는 예를 들어, 표적 펩티드와 특이적으로 반응하는 펩티드 또는 항체에 방사능표지를 도입시킴으로써, 검출가능하게 만들 수 있는 다른 독립체를 포함한다. 표지에 항체를 접합시키기 위한 당분야에 공지된 임의의 적절한 방법은 예를 들어 문헌 [Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego]에 기술된 방법을 사용해 적용해도 된다.
- [0064] 본원에서 제공시 용어 "바이오틴"은 테트라히드로티오펜 고리와 융합된 우레이도 (테트라히드로이미디잘론) 고리를 특징으로 하는 화합물을 의미한다. 본원에서 제공시 "바이오틴"은 5-[(3aS,4S,6aR)-2-옥소헥사히드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일]펜탄산을 의미하고, 통상의 의미로, CAS 등록 번호 제58-85-5호를 의미한다. 본원에서 사용시 "바이오틴 결합 도메인"은 바이오틴에 결합할 수 있는 단백질 도메인이다. 바이오틴 결합 도메인의 비제한적인 예는 아비딘, 스트렙타비딘 및 뉴트라비딘을 포함한다.
- [0065] 본원에서 제공시 용어 "아비딘" 또는 "스트렙타비딘"은 천연 발생 형태의 활성을 유지(예를 들어, 천연 단백질과 비교하여 적어도 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이내 활성)하는 임의의 아비딘 또는 스트렙타비딘 천연 발생 형태, 상동체, 변이체 또는 유도체(예를 들어, 뉴트라비딘)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 변이체는 천연 발생 형태와 비교하여 전체 서열 또는 서열의 일부분(예를 들어, 50개, 100개, 150개 또는 200개 연속하는 아미노산 부분)에 걸쳐 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는다.
- [0066] "접촉하는"은 이의 분명한 일상적인 의미에 따라 사용되고 적어도 2종의 별개 중(예를 들어, 생체분자를 포함한 화학적 화합물 또는 세포)이 반응하거나, 상호작용하거나 또는 물리적으로 당도록 충분히 근접하게 될 수 있게 하는 과정을 의미한다. 그러나, 최종 반응 생성물은 첨가된 시약들 간 반응으로부터 또는 반응 혼합물에서 생성될 수 있는 첨가된 시약 중 1 이상으로부터의 중간체로부터 직접 생성될 수 있음을 이해해야 한다.
- [0067] 용어 "접촉하는"은 2종이 반응하거나, 상호작용하거나, 또는 물리적으로 당도록 하는 것을 포함해도 되고, 여기서 상기 2종은 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 바이오틴 도메인 및 바이오틴 결합 도메인일 수 있다. 실시



형태에서 접촉하는은 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 바이오틴 도메인이 바이오틴 결합 도메인과 상호작용하도록 하는 것을 포함한다.

[0068] "대조군" 샘플 또는 값은 시험 샘플과 비교를 위해서, 기준, 일반적으로 기지의 기준으로서 제공되는 샘플을 의미한다. 예를 들어, 시험 샘플은 예를 들어, 시험 화합물 존재 하에서, 시험 상태에서부터 취할 수 있고, 기지 상태, 예를 들어 시험 화합물 부재(음성 대조군) 하에서, 또는 기지 화합물 존재(양성 대조군) 하에서, 샘플을 비교할 수 있다. 대조군은 또한 수많은 시험 또는 결과로부터 모아진 평균 값을 나타낸다. 당업자는 임의의 수의 변수의 평가에 대해 대조군을 디자인할 수 있음을 인식하게 된다. 예를 들어, 대조군은 약학 데이터(예를 들어, 반감기) 또는 치료적 측정(예를 들어, 부작용의 비교)을 기반으로 치료 이득을 비교하기 위해 고안될 수 있다. 당업자는 대조군이 소정 상황에서 가치있고 대조군 값의 비교를 기반으로 데이터를 분석할 수 있음을 이해하게 된다. 대조군은 또한 데이터의 유의성을 결정하기 위해서도 가치있다. 예를 들어, 소정 변수에 대한 값이 대조군에서 광범위하게 변동적이면, 시험 샘플의 변동은 유의한 것으로 간주하지 않게 된다.

[0069] "환자" 또는 "이를 필요로 하는 피험체"는 본원에서 제공하는 바와 같은 조성물 또는 약학 조성물의 투여에 의해 치료될 수 있는 질환 또는 병태를 앓거나 또는 그러한 경향이 있는 생존 유기체를 의미한다. 비제한적인 예는 인간, 다른 포유동물, 소, 래트, 마우스, 개, 원숭이, 염소, 양, 소, 사슴, 및 다른 비포유동물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 환자는 인간이다.

[0070] 용어 "질환" 또는 "병태"는 본원에서 제공하는 화합물, 약학 조성물, 또는 방법으로 치료될 수 있는 환자 또는 피험체의 상태 또는 건강 상태를 의미한다. 실시형태에서, 질환은 암(예를 들어, 폐암, 난소암, 골육종, 방광암, 자궁경부암, 간암, 신장암, 피부암(예를 들어, 메르켈 세포 암종), 고환암, 백혈병, 림프종, 두경부암, 직결장암, 전립선암, 췌장암, 흑색종, 유방암, 신경아세포종)이다. 질환은 자가면역, 염증성, 암, 감염성, 물질 대사성, 발달성, 심혈관, 간, 장, 내분비, 신경, 또는 다른 질환일 수 있다.

[0071] 본원에서 사용시, 용어 "암"은 백혈병, 림프종, 흑색종, 신경내분비 종양, 암종 및 육종을 포함한, 포유동물에서 발견되는 모든 유형의 암, 신생물 또는 악성 종양을 의미한다. 본원에서 제공하는 화합물, 약학 조성물, 또는 방법으로 치료될 수 있는 예시적인 암은 림프종, 육종, 방광암, 골암, 뇌 종양, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 위암, 두경부암, 신장암, 흑색종, 갑상선암, 백혈병, 전립선암, 유방암(예를 들어, 삼중 음성, ER 양성, ER 음성, 화학요법 내성, 허셉틴 내성 HER2 양성, 독소루비신 내성, 타목시펜 내성, 관성 암종, 소엽 암종, 원발성, 전이성), 난소암, 췌장암, 간암(예를 들어, 간세포 암종), 폐암(예를 들어, 비소세포 폐 암종, 편평 세포 폐 암종, 선암종, 거대 세포 폐 암종, 소세포 폐 암종, 유암종, 육종), 다형성 교아세포종, 신경교종, 흑색종, 전립선 암, 거세-내성 전립선암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 교아세포종, 난소암, 폐암, 편평 세포 암종(예를 들어, 머리, 목, 또는 식도), 직결장암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 림프종, B 세포 림프종, 또는 다발성 흑색종을 포함한다. 추가의 예는 갑상선암, 내분비계의 암, 뇌암, 유방암, 자궁경관암, 결장암, 머리 및 목의 암, 식도암, 간암, 신장암, 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 중피종, 난소암, 육종, 위암, 자궁암 또는 수아 세포종, 호지킨 질환, 비호지킨 림프종, 다발성 흑색종, 신경아세포종, 신경교종, 다형성 교아세포종, 난소암, 횡문근육종, 원발성 혈소판 증가증, 원발성 마크로글로불린혈증, 원발성 뇌 종양, 암, 악성 췌장 인슐린종, 악성 유암종, 방광암, 전악성 피부 병변, 고환암, 림프종, 갑상선암, 신경아세포종, 식도암, 비뇨생식관암, 악성 고칼슘혈증, 자궁내막암, 부신피질암, 내분비 또는 외분비 췌장의 신생물, 수질 갑상선암, 수질 갑상선 암종, 흑색종, 직결장암, 유두상 갑상선암, 간세포 암종, 유두의 파제트 질환, 가엽 종양, 소엽 암종, 관성 암종, 췌장 성상 세포의 암, 간성상 세포의 암, 또는 전립선암을 포함한다.

[0072] 용어 "백혈병"은 혈액-형성 장기의 진행성, 악성 질환을 광범위하게 의미하고, 일반적으로 혈액 및 골수에서 백혈구의 기형적인 증식 및 발생을 특징으로 한다. 백혈병은 일반적으로 (1) 질환-급성 또는 만성의 지속기간 및 특질; (2) 관여되는 세포의 유형; 골수성(골수형성성), 림프성(림프형성성), 또는 단핵구성; 및 (3) 혈액-백혈병성 또는 비백혈병성(아백혈병성)에서 비정상적인 세포수의 증가 또는 미증가를 기반으로 임상적으로 분류된다. 본원에서 제공하는 화합물, 약학 조성물, 또는 방법으로 치료해도 되는 예시적인 백혈병은, 예를 들어 급성 비림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 과립구성 백혈병, 만성 과립구성 백혈병, 급성 전골수구성 백혈병, 성인 T-세포 백혈병, 비백혈병성 백혈병, 림프구성 백혈병, 호염기성 백혈병, 아세포 백혈병, 소백혈병, 만성 골수구성 백혈병, 진피 백혈병, 배아 백혈병, 호산성 백혈병, 그로스 백혈병, 모발 세포 백혈병, 조혈세포 백혈병, 혈구아세포 백혈병, 조식구 백혈병, 줄기 세포 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 백혈구감소성 백혈병, 림프성 백혈병, 림프아구성 백혈병, 림프구성 백혈병, 림프형성성 백혈병, 림프성 백혈병, 림프육종 세포 백혈병, 비만 세포 백혈병, 거핵세포 백혈병, 소골수아구성 백혈병, 단핵구성 백혈병, 골수아구성 백혈병, 골수구성 백혈병, 골수성 과립구성 백혈병, 골수단핵구성 백혈병, 내젤리형 백혈병, 형질 세포 백혈병, 다발성

흑색종, 형질구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 라이더 세포 백혈병, 실링 백혈병, 줄기 세포 백혈병, 아백혈병성 백혈병, 또는 비분화 세포 백혈병을 포함한다.

[0073] 용어 "육종"은 일반적으로 배아 결합 조직과 같은 물질로 구성되고 일반적으로 미소섬유 또는 균질 물질에 내포된 밀접하게 충전된 세포로 구성된 종양을 의미한다. 본원에서 제공하는 화합물, 약학 조성물, 또는 방법으로 치료해도 되는 육종은 연골육종, 섬유육종, 림프육종, 흑색육종, 점액육종, 골육종, 애버메티 육종, 지방질 육종, 지방육종, 포상 연부 육종 육종, 범랑아세포 육종, 포도상 육종, 녹색종 육종, 용모 암종, 배아 육종, 빌름종양 육종, 자궁내막 육종, 기질 육종, 유잉 육종, 근막 육종, 섬유아세포 육종, 거대 세포 육종, 과립구성 육종, 호지킨 육종, 특발성 다발성 색소침착성 출혈성 육종, B-세포의 면역아세포 육종, 림프종, T-세포의 면역아세포 육종, 엔센 육종, 카포시 육종, 쿠퍼 세포 육종, 혈관육종, 백혈육종, 악성 중간엽종 육종, 방골 육종, 망상내피 육종, 루이스 육종, 혈청낭 육종, 활액막 육종, 또는 혈관확장성 육종을 포함한다.

[0074] 용어 "흑색종"은 피부 및 다른 장기의 멜라닌세포계로부터 발생된 종양을 의미하기 위해 사용된다. 본원에서 제공하는 화합물, 약학 조성물, 또는 방법으로 치료해도 되는 흑색종은 예를 들어, 말단 흑자 흑색종, 무색소성 흑색종, 양성 소아 흑색종, 클라우드만 흑색종, S91 흑색종, 하딩-파세이 흑색종, 소아 흑색종, 악성 검정사마귀 흑색종, 악성 흑색종, 결절성 흑색종, 손발톱밑 흑색종, 또는 표재 확산성 흑색종을 포함한다.

[0075] 용어 "암종"은 주변 조직을 침윤하고 전이를 일으키는 경향이 있는 상피로 구성된 악성 신규 성장을 의미한다. 본원에 제공된 화합물, 약학 조성물, 또는 방법으로 치료해도 되는 예시적인 암종은 예를 들어, 수질 갑상선 암종, 가족성 수질 갑상선 암종, 소엽 암종, 세엽 암종, 선낭 암종, 선양낭 암종, 선암종, 부신피질의 암종, 폐포 암종, 폐포 세포 암종, 기저 세포 암종, 기저세포 암종, 기저세포양 암종, 기저편평 세포 암종, 세기관지폐포 암종, 세기관지 암종, 기관지 암종, 대뇌모양 암종, 담관세포 암종, 용모막 암종, 교질 암종, 먼포 암종, 코퍼스 암종, 사상형 암종, 흉부 갑옷 암종, 피각 암종, 원주상피 암종, 원주 세포 암종, 관 암종, 관성 암종, 경성 암종, 배아 암종, 뇌질모양 암종, 표피모양 암종, 상피 선양 암종, 외장성 암종, 궤양성 암종, 섬유 암종, 젤라틴상 암종, 젤라틴성 암종, 거대 세포 암종, 거대세포 암종, 샘암종, 과립세포 암종, 모발-매트릭스 암종, 혈액양 암종, 간세포 암종, 허슬 세포 암종, 히알린 암종, 고신장형 암종, 유아 배아 암종, 원위치 암종, 표피내 암종, 상피내 암종, 크롬페치 암종, 쿨키츠키-세포 암종, 거대 세포 암종, 수정체 암종, 수정체 암종, 지방종성 암종, 소엽 암종, 림프상피 암종, 수질 암종, 수질 암종, 흑색종 암종, 연성 암종, 뮤신성 암종, 점액 암종, 점액 세포 암종, 점막표피양 암종, 점액 암종, 점액성 암종, 점액성 암종, 비인두 암종, 연맥 세포 암종, 골화성 암종, 골양 암종, 유두상 암종, 문맥 주위 암종, 침습전 암종, 가시 세포 암종, 수상 암종, 신장의 신장 세포 암종, 저장 세포 암종, 육종성 암종, 슈나이더 암종, 섬유질 암종, 음낭 암종, 인환 세포 암종, 단순 암종, 소 세포 암종, 슬라노이드 암종, 회전타원체 세포 암종, 스핀들 세포 암종, 해면양 암종, 편평 암종, 편평 세포 암종, 스트링 암종, 혈관확장성 암종, 모세혈관 확장성 암종, 이행 세포 암종, 결절 암종, 관상 암종, 결절상 암종, 우상 암종, 또는 용모 암종을 포함한다.

[0076] 본원에서 사용시, 용어 "전이", "전이성" 및 "전이성 암"은 상호교환적으로 사용할 수 있고 하나의 장기 또는 다른 비인접 장기 또는 신체 부분으로부터, 증식성 질환 또는 질병, 예를 들어 암의 확산을 의미한다. 암은 발원 부위, 예를 들어, 유방에서 일어나고, 그 부위를 원발성 종양, 예를 들어, 원발성 유방암이라고 한다. 발원 부위 또는 원발성 종양에서의 일부 암 세포는 국소 영역에서 주변 정상 조직을 침투하여 침윤하는 능력 및/또는 체내에서 다른 부위 및 조직으로 전이를 통해 순환하는 림프계 또는 혈관계의 벽을 침투하는 능력을 획득한다. 원발성 종양의 암 세포로부터 형성된 2차적인 임상적으로 검출가능한 종양을 전이성 또는 속발성 종양이라고 한다. 암 세포가 전이될 때, 전이성 종양 및 이의 세포는 본래 종양의 것과 유사한 것으로 추정된다. 따라서, 폐암이 유방으로 전이되면, 유방 부위에서의 속발성 종양은 비정상적인 폐 세포로 이루어지고 비정상적인 유방 세포가 아니다. 이러한 유방에서의 속발성 종양을 전이성 폐암이라고 한다. 따라서, 어구 전이성 암은 피험체가 원발성 종양을 갖거나 또는 가졌고 1 이상의 속발성 종양을 갖는 질환을 의미한다. 어구 비전이성 암 또는 전이성이 아닌 암을 갖는 피험체는 피험체가 원발성 종양을 갖지만 1 이상의 속발성 종양은 갖지 않는 질환을 의미한다. 예를 들어, 전이성 폐암은 원발성 폐 종양을 갖거나 또는 그러한 이력을 갖고 제2 부위 또는 다수 부위, 예를 들어 유방에 1 이상의 속발성 종양을 갖는 피험체의 질환을 의미한다.

[0077] 본원에서 사용시, "자가면역 질환"은 예를 들어 피험체의 체내에 정상적으로 존재하는 물질 조직 및/또는 세포에 대항하여, 피험체의 면역계에 의해 변경된 면역 반응으로 발생된 질환 또는 질병을 의미한다. 자가면역 질환은 제한없이, 관절염, 류마티스성 관절염, 건선성 관절염, 소아 특발성 관절염, 경피증, 전신 경피증, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루푸스(SLE), 중증 근무력증, 소아 시작 당뇨병, 1형 진성 당뇨병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 뇌염, 하시모토 갑상선염, 강직성 척수염, 건선, 쇄센 증후군, 혈관염, 사구체신염, 자가면역 갑상선

염, 베체트 질환, 크론 질환, 궤양성 결장염, 수포성 유천포창, 유육종증, 건선, 어린선, 그레이브스 안병증, 염증성 장 질환, 애디슨 질환, 백반증, 천식, 및 알레르기성 천식을 포함한다.

- [0078] 본원에서 사용시, "염증성 질환"은 비정상적이거나 또는 변경된 염증과 연관된 질환 또는 질병을 의미한다. 염증은 병원체, 손상된 세포 또는 조직 또는 자극물에 대응하는 치유 과정의 일부로서 면역계에 의해 개시되는 생물학적 반응이다. 만성 염증은 다양한 질환을 초래할 수 있다. 염증성 질환은 제한없이, 아테롬성 동맥경화증, 알레르기, 천식, 류마티스성 관절염, 이식 거부, 셀리악 질환, 만성 전립선염, 염증성 장 질환, 골반 염증성 질환, 및 염증성 근육병증을 포함한다.
- [0079] 본원에서 사용시, "대사 장애"는 예를 들어, 탄수화물, 아미노산, 유기산을 포함한, 다양한 분자 및 물질의 비정상적인 물질대사가 관여하는 질환 또는 질병을 의미한다. 대사 장애는 제한없이, 탄수화물 물질대사의 질병, 예를 들어, 글리코겐 저장 질환, 아미노산 물질대사의 질병, 예를 들어, 페닐케톤뇨증, 단풍당 뇨질환, 1형 글루타르산혈증, 우레아 회로 장애 또는 우레아 회로 결함, 예를 들어, 카바모일 포스페이트 신췌타제 I 결핍증, 유기산 물질대사(유기 산성뇨)의 질병, 예를 들어, 알칼톤뇨증, 지방산 산화 및 미토콘드리아 물질대사의 질병, 예를 들어, 중쇄 아실-조효소 A 디히드로게나제 결핍증, 포르피린 물질대사의 질병, 예를 들어, 급성 간헐성 포르피린증, 퓨린 또는 피리미딘 물질대사의 장애, 예를 들어, 레쉬-니한 증후군, 스테로이드 물질대사 장애, 예를 들어, 선천성 지질 부신 과다형성증, 선천성 부신 과다형성증, 미토콘드리아 기능 장애, 예를 들어, 컨스-세이어 증후군, 퍼옥시좀 기능 장애, 예를 들어, 젤웨어 증후군, 및 리소좀 저장 장애, 예를 들어, 고셔 질환, 및 니만 피크 질환을 포함한다.
- [0080] 본원에서 사용시, "발달 장애"는 언어 장애, 학습 장애, 운동 장애 및 신경발달 장애와 연관된 아동기에 종종 발원하는 질환 또는 질병을 의미한다. 예에는 제한없이, 자폐 스펙트럼 장애 및 주의력 결핍 장애가 포함된다.
- [0081] 본원에서 사용시, "심혈관 질환"은 심장, 혈관 또는 둘 모두와 연관된 질환을 의미한다. 심혈관 질환은 제한없이, 관상동맥 심장 질환, 심근병증, 고혈압성 심장 질환, 심부전, 부정맥, 염증성 심장 질환, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 질환 및 염증성 심장 질환을 포함한다.
- [0082] 본원에서 사용시, "간 질환"은 간 및/또는 간 기능의 이상과 연관된 질환을 의미한다. 간 질환은 제한없이, 간염, 알콜성 간 질환, 지방 간 질환, 간경변, 버드-키아리 증후군, 길버트 증후군 및 암을 포함한다.
- [0083] 본원에서 사용시, 용어 "장 질환"은 장(소장 또는 대장)의 이상과 연관된 질환 또는 질병을 의미한다. 장 질환은 제한없이, 위장염, 결장염, 회장염, 맹장염, 셀리악 질환, 크론 질환, 장내 바이러스, 과민성 장 증후군, 및 게실 질환을 포함한다.
- [0084] 본원에서 사용시, 용어 "내분비 질환"은 내분비선 분비감퇴, 내분비선 과분비 및 종양을 포함한 내분비계의 질환 또는 질병을 의미한다. 내분비 질환은 제한없이, 애디슨 질환, 당뇨병, 콘 증후군, 쿠싱 증후군, 글루코코르티코이드 치유성 알도스테론증, 저혈당증, 갑상선 기능 항진증, 갑상선 기능 저하증, 갑상선염, 뇌하수체 기능 저하증, 생식선 기능 저하증 및 부갑상선 장애를 포함한다.
- [0085] 본원에서 사용시, 용어 "신경학적 장애"는 구조적, 생화학적 또는 전기적 이상을 포함한 신체 신경계의 질환 또는 질병을 의미한다. 신경학적 장애는 제한없이, 뇌 손상, 뇌 기능장애, 척수 장애, 말초 신경병증, 뇌신경 장애, 자율 신경계 장애, 발작 장애, 운동 장애, 예를 들어, 파킨슨 질환 및 다발성 경화증, 및 중추 신경병증을 포함한다.
- [0086] 본원에서 사용시, 용어 "감염성 질환"은 숙주 피험체에서 병원체의 감염, 존재 및/또는 성장과 연관된 질환 또는 질병을 의미한다. 감염성 병원체는 제한없이, 바이러스, 박테리아, 진균, 원충, 다세포 기생충 및 비정상 단백질, 예를 들어 프리온을 포함한다. 감염성 질환과 연관된 바이러스는 제한없이, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 엡스테인-바 바이러스, 바리셀라-조스터 바이러스, 헤르페스 바이러스, 수포성 구내염 바이러스, 간염 바이러스, 리노바이러스, 코로나바이러스, 인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 폴리오마바이러스, 인간 파필로마바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 아데노바이러스, 콕사키 바이러스, 뎅구 바이러스, 볼거리 바이러스, 폴리오바이러스, 광견병 바이러스, 루이스 육종 바이러스, 황열 바이러스, 에볼라 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스를 포함한다. 감염성 질환과 연관된 박테리아는 제한없이, 엠. 튜버쿨로시스(*M. tuberculosis*), 살모넬라(*Salmonella*) 종, 이. 콜라이(*E. coli*), 클라미디아(*Chlamydia*) 종, 스탕필로코커스(*Staphylococcus*) 종, 바실러스(*Bacillus*) 종, 및 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종을 포함한다.
- [0087] 질환(예를 들어, 당뇨병, 암(예를 들어, 전립선암, 신장암, 전이성암, 흑색종, 거세-내성 전립선암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 교아세포종, 난소암, 폐암, 편평 세포 암종(예를 들어, 머리, 목, 또는 식도), 직결장암, 백혈

병, 급성 골수성 백혈병, 림프종, B 세포 림프종, 또는 다발성 흑색종))과 연관된 물질 또는 물질 활성 또는 기능과 관련하여 용어 "연관되는" 또는 "~와 연관되는"은 질환(예를 들어, 폐암, 난소암, 골육종, 방광암, 자궁경부암, 간암, 신장암, 피부암(예를 들어, 메르켈 세포 암종), 고환암, 백혈병, 림프종, 두경부암, 직결장암, 전립선암, 췌장암, 흑색종, 유방암, 신경아세포종)이 (전체로 또는 일부) 야기되거나, 또는 질환의 증상이 (전체로 또는 일부) 물질 또는 물질 활성 또는 기능에 의해 야기되는 것을 의미한다.

[0088] 본원에서 사용시 용어 "비정상"은 정상과 다른 것을 의미한다. 효소 활성을 설명하는데 사용시, 비정상은 정상 대조군 또는 정상 비질환 대조군 샘플의 평균보다 크거나 또는 적은 활성을 의미한다. 비정상 활성은 질환을 야기하는 활성량을 의미할 수도 있고, 비정상 활성의 정상 또는 비질환-연관 양(본원에서 설명하는 방법을 사용하여)으로 복귀는 질환 또는 1 이상의 질환 증상의 감소를 야기한다.

[0089] 본원에서 사용시, 용어 "세포 침투성" 또는 "세포 침투"는 유의하거나 또는 효과적인 양으로 세포의 환경으로부터 세포를 통과하는 분자(예를 들어, 단백질)의 능력을 의미한다. 따라서, 세포 침투성 접합체는 세포의 환경으로부터, 막을 통하여, 세포로 통과하는 분자이다.

[0090] 본원에서 사용시, 용어 "세포 비침투성" 또는 "비세포 침투"는 유의하거나 또는 효과적인 양으로 세포의 환경으로부터 세포로 통과하는 분자의 불능성을 의미한다. 따라서, 세포 비침투성 펩티드 또는 단백질은 일반적으로 세포 개체군, 장기 또는 유기체에 대해 유의한 생물학적 효과를 획득하기 위해 세포의 환경으로부터, 세포막을 통해서, 세포로 통과할 수 없다. 이 용어는 소량의 펩티드 또는 단백질 중 1 이상의 세포로 들어갈 수도 있다는 것을 배제하지 않는다. 그러나, 이 용어는 일반적으로 유의한 정도로 세포의 환경으로부터 세포로 들어갈 수 없는 분자를 의미한다. 세포 비침투성 분자 및 물질의 예는 제한없이, 거대 분자, 예컨대, 예를 들어, 고분자량 단백질을 포함한다. 펩티드 또는 단백질은 당업자에게 공지된 방법을 사용해 세포 비침투성인지를 결정할 수 있다. 예로서, 펩티드 또는 단백질은 형광발광 표지될 수 있고 세포의 환경으로부터 세포로 통과하는 펩티드 또는 단백질의 능력은 유세포분석법 또는 공초점 현미경을 통해 시험관내에서 결정할 수 있다. 일부 실시형태에서, "세포 비침투성 단백질"은 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 부착된 동일한 단백질보다 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 10,000 또는 100,000배 적게 세포를 침투하는 단백질을 의미한다. 일부 실시형태에서, "세포 비침투성 단백질"은 세포를 측정가능하게 침투하지 않는 단백질을 의미한다.

[0091] 본원에서 사용시, "분자량"(M.W.) 또는 "분자 질량"은 분자의 모든 원자의 원자량의 합을 의미한다. 분자와 관련하여, 분자량이 높은 분자는 전형적으로 분자량이 25 kDa 또는 그 이상이다. 예로서, 고분자량 단백질은 약 25 kDa 내지 1000 kDa 또는 그 이상의 M.W.를 가질 수 있다.

[0092] 본원에서 사용시, 용어 "세포내"는 세포 내부를 의미한다. 본원에서 사용시, "세포내 표적"은 세포의 내부에 위치하는 표적, 예를 들어, 핵산, 폴리펩티드 또는 다른 분자(예를 들어, 탄수화물)이고 본원에서 제공하는 세포 비침투성 단백질이 결합하는 표적이다. 결합은 직접적 또는 간접적일 수 있다. 실시형태에서, 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 선택적으로 결합한다. 선택적으로 결합하다, 선택적으로 결합, 또는 특이적으로 결합은 다른 작용제를 부분적으로 또는 완전하게 배제하여 하나의 작용제(예를 들어, 세포내 표적)에 결합하는 작용제(예를 들어, 세포 비침투성 단백질)를 의미한다. 결합은 검정 방법의 배경값의 적어도 약 1.5배의 검출가능한 결합을 의미한다. 선택적 또는 특이적 결합의 경우, 그러한 검출가능한 결합은 소정 작용제에 대해 검출할 수 있지만 대조군에 대해서는 아니다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 결합의 검출은 하류 분자 또는 사건의 존재를 검정하여 결정할 수 있다.

[0093] 본원에서 사용시, 용어 "접합체"는 원자 또는 분자 사이의 회합을 의미한다. 회합은 직접 또는 간접일 수 있다. 예를 들어, 핵산과 단백질 사이의 접합체는 예를 들어, 공유 결합에 의해 직접적이거나, 또는 예를 들어, 비공유 결합(예를 들어, 정전기 상호작용(예를 들어, 이온 결합, 수소 결합, 할로젠 결합), 반 데르 발스 상호작용(예를 들어, 쌍극자-쌍극자, 쌍극자-유도 쌍극자, 런던 분산), 고리 적층( $\pi$  효과), 소수성 상호작용 등)에 의해 간접적일 수 있다. 실시형태에서, 접합체는 제한없이, 친핵성 치환(예를 들어, 아실 할라이드, 활성 에스테르와 아민 및 알콜의 반응), 친전자성 치환(예를 들어, 엔아민 반응) 및 탄소-탄소 및 탄소-이종원자 다수 결합에 첨가(예를 들어, 마이클(Michael) 반응, 디스-알드(Diels-Alder) 첨가 반응)를 포함한 접합체 화학을 사용해 형성된다. 이들 및 다른 유용한 반응은 예를 들어, 하기 문헌들에 기술되어 있다: [March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985]; [Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996]; 및 [Feeney et al., MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982]. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산, 포



스포로티오에이트 골격 중합체 또는 세포 비침투성 단백질은 포스포로티오에이트 핵산, 포스포로티오에이트 골격 중합체(예를 들어, 모노티오포스페이트) 또는 세포 비침투성 단백질의 성분 및 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인의 성분(예를 들어, 아미노산) 사이의 비공유 화학 반응을 통해 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착된다. 다른 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산, 포스포로티오에이트 골격 중합체 또는 세포 비침투성 단백질은 본원에 기술된 바와 같이, 1 이상의 반응성 모이어티, 예를 들어 공유 결합 반응성 모이어티(covalent reactive moiety)(예를 들어, 아미노산 반응성 모이어티 예컨대 비닐 설폰 모이어티( $-S(O)_2CH=CH_2$ ))를 포함한다.

- [0094] 본원에서 화학물의 접합을 위해 사용되는 공유결합 반응성 모이어티 또는 작용기를 포함한 유용한 반응성 모이어티는, 예를 들어,
- [0095] (a) 제한없이, N-히드록시숙신이미드 에스테르, N-히드록시벤조트리아졸 에스테르, 산 할라이드, 아실 이미다졸, 티오에스테르, p-니트로페닐 에스테르, 알킬, 알케닐, 알키닐 및 방향족 에스테르를 포함한 카복실기 및 이의 다양한 유도체;
- [0096] (b) 에스테르, 에테르, 알데히드 등으로 전환될 수 있는 히드록실 기;
- [0097] (c) 할로알킬 기로서, 여기서 할라이드는 이후에 친핵성 기 예컨대, 예를 들어, 아민, 카복실레이트 음이온, 티올 음이온, 카바니온, 또는 알콕시드 이온으로 치환되어서, 할로겐 원자의 부위에서 신규한 기의 공유 부착을 일으킬 수 있는 것인 기;
- [0098] (d) 딜스-알더 반응에 참여할 수 있는 친디엔체 예컨대, 예를 들어, 말레이미도 기;
- [0099] (e) 카보닐 유도체 예컨대, 예를 들어, 이민, 히드라존, 세미카바존 또는 옥심의 형성을 통해서, 또는 그리냐드 첨가 또는 알킬리튬 첨가와 같은 기전을 통해서 후속 유도체화가 가능한 알데히드 또는 케톤 기;
- [0100] (f) 예를 들어, 설포아미드를 형성하도록, 아민과 후속 반응을 위한 설포닐 할라이드 기;
- [0101] (g) 이황화물로 전환될 수 있거나, 아실 할라이드와 반응할 수 있거나, 또는 금속 예컨대 금과 결합할 수 있는, 티올 기;
- [0102] (h) 예를 들어, 아실화, 알킬화 또는 산화될 수 있는, 아민 또는 설프히드릴 기;
- [0103] (i) 예를 들어, 환부가, 아실화, 마이클 첨가 등을 겪을 수 있는, 알켄;
- [0104] (j) 예를 들어, 아민 및 히드록실 화합물과 반응할 수 있는 에폭시드;
- [0105] (k) 포스포르아미다이트 및 핵산 합성에 유용한 다른 표준 작용기;
- [0106] (l) 금속 규소 옥시드 결합;
- [0107] (m) 예를 들어, 포스페이트 디에스테르 결합을 형성하기 위한 반응성 인 기(예를 들어, 포스핀)와 결합하는 금속; 및
- [0108] (n) 설폰, 예를 들어, 비닐 설폰
- [0109] 을 포함한다.
- [0110] 반응성 작용기는 그들이 본원에 기술된 단백질의 화학 안정성에 참여하거나, 또는 방해하지 않도록 선택될 수 있다. 예로서, 핵산은 비닐 설폰 또는 다른 반응성 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 비닐 설폰 반응성 모이어티를 갖는 핵산은 S-S-R 모이어티를 갖는 핵산으로 부터 형성될 수도 있고, 여기서 R은  $-(CH_2)_6-OH$ 이다. 비닐 설폰을 갖는 핵산은 말단 포스페이트(PS)를 갖는 핵산으로부터 더욱 형성될 수도 있다.
- [0111] "대조군" 또는 "표준 대조군"은 시험 샘플, 측정, 또는 값과의 비교를 위해, 기준, 일반적으로 기지의 기준으로서 제공되는 샘플, 측정, 또는 값을 의미한다. 예를 들어, 시험 샘플은 소정 질환(예를 들어, 자가면역 질환, 염증성 자가면역 질환, 암, 감염성 질환, 면역 질환, 또는 다른 질환)을 갖는 것으로 의심되는 환자로부터 채취되어 기지의 정상(비질환) 개체(예를 들어, 표준 대조군 피험체)와 비교될 수 있다. 표준 대조군은 또한 소정 질환을 갖지 않는 유사한 개체군(예를 들어, 표준 대조군 피험체), 예를 들어 유사한 의학적 배경, 동일 연령, 체중 등의 건강한 개체의 개체군(즉, 표준 대조군 개체군)으로부터 모은 평균 측정 또는 값을 나타낼 수도 있다. 표준 대조군 값은 또한 동일한 개체군, 예를 들어 질환 개시 전 환자로부터의 초기-획득 샘플에서 얻을 수도 있다. 당업자는 표준 대조군이 임의의 수의 변수(예를 들어, RNA 수준, 단백질 수준, 특정 세포 유형, 특정

체액, 특정 조직, 활막 세포, 활액, 활액 조직, 섬유아세포-유사 활막세포, 마크로파지 유사 활막세포 등)의 평가를 위해 디자인될 수 있음을 이해하게 된다.

[0112] 당업자는 표준 대조군이 소정 상황에서 가장 적절하고 표준 대조군 값과의 비교를 기반으로 데이터를 분석할 수 있다는 것을 이해하게 된다. 표준 대조군은 또한 데이터의 유의성(예를 들어, 통계적 유의성)을 결정하는데 가치있다. 예를 들어, 소정 변수에 대한 값이 표준 대조군에서 광범위하게 변동적이면, 시험 샘플에서의 변동은 유의한 것으로 간주되지 않을 것이다.

[0113] 용어 "진단"은 질환(예를 들어, 자가면역, 염증성 자가면역, 암, 감염성, 면역, 또는 다른 질환)이 피험체에 존재하는 상대적인 가능성을 의미한다. 유사하게, 용어 "예후"는 일정 향후 결과가 질환 상태와 관련하여 피험체에서 일어날 수도 있는 상대적인 가능성을 의미한다. 예를 들어, 본 발명에 있어서, 예후는 개체가 질환(예를 들어, 자가면역, 염증성 자가면역, 암, 감염성, 면역, 또는 다른 질환), 또는 질환의 가능한 중증도(예를 들어, 질환의 지속기간)가 발생할 가능성을 의미한다. 이 용어는 의학 진단 분야의 숙련가 중 한명이 이해하게 되는 바와 같이, 절대적인 것을 의도하지 않는다.

[0114] "생물학적 샘플" 또는 "샘플"은 피험체 또는 환자로부터 획득하거나 또는 유도된 재료를 의미한다. 생물학적 샘플은 조직학적 목적을 위해 채취된 조직 절개부 예컨대 생검 및 검시 샘플, 및 냉동 절개부를 포함한다. 이러한 샘플은 체액 예컨대 혈액 및 혈액 분획 또는 생성물(예를 들어, 혈청, 혈장, 혈소판, 적혈구 세포 등), 객담, 조직, 배양 세포(예를 들어, 원발성 배양물, 외식물, 및 형질전환 세포), 대변, 소변, 활액, 관절 조직, 활액 조직, 활막세포, 섬유아세포-유사 활막세포, 마크로파지-유사 활막세포, 면역 세포, 조혈 세포, 섬유아세포, 마크로파지, T 세포 등을 포함한다. 생물학적 샘플은 전형적으로 진핵생물 유기체, 예컨대 포유동물 예컨대 영장류 예를 들어, 침팬지 또는 인간; 소; 개; 고양이; 설치류, 예를 들어, 기니 피그, 래트, 마우스; 토끼; 또는 조류; 파충류; 또는 어류로부터 획득된다.

[0115] 본원에서 사용시 "세포"는 이의 게놈 DNA를 보존하거나 또는 복제하기에 충분한 물질대사 또는 다른 기능을 수행하는 세포를 의미한다. 세포는 예를 들어, 온전한 막의 존재, 특정 염료에 의한 염색, 자손 생성 능력, 또는 생식 세포의 경우, 생존 자손을 생성하기 위해 제2 생식세포와 조합하는 능력을 포함한 당분야에 잘 알려진 방법으로 동정될 수 있다. 세포는 원핵생물 및 진핵생물 세포를 포함해도 된다. 원핵생물 세포는 제한없이 박테리아를 포함한다. 진핵생물 세포는 제한없이, 효모 세포 및 식물과 동물, 예를 들어 포유동물, 곤충(예를 들어, 스포둡테라(spodoptera) 및 인간 세포에서 유도된 세포를 포함한다. 세포는 그들이 천연적으로 비부착성이거나 또는 예를 들어 트립신처리에 의해 표면에 부착되지 않도록 처리된 경우일 수도 있다.

[0116] 세포 침투성 접합체

[0117] 본원은 그 중에서도, 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 부착된 세포 비침투성 단백질(예를 들어, 항체)을 포함하는 세포 침투성 접합체를 제공한다. 세포 비침투성 단백질은 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원 및 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원을 포함하는, 비공유 링커를 통해서 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 부착된다. 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원은 바이오틴 결합 도메인(예를 들어, 아비딘, 스트렙타비딘) 또는 바이오틴 도메인(예를 들어, 바이오틴)일 수 있다. 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원은 바이오틴 결합 도메인(예를 들어, 아비딘, 스트렙타비딘) 또는 바이오틴 도메인(예를 들어, 바이오틴)일 수 있다. 비공유 링커는 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원 및 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원 사이의 비공유 결합을 통해 형성된다. 실시형태에서, 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원은 바이오틴 결합 도메인(예를 들어, 아비딘, 스트렙타비딘)이고 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원은 바이오틴 도메인(예를 들어, 바이오틴)이다. 실시형태에서, 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원은 바이오틴 도메인(예를 들어, 바이오틴)이고, 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원은 바이오틴 결합 도메인(예를 들어, 아비딘, 스트렙타비딘)이다.

[0118] 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원 및 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원은 세포 비침투성 단백질, 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 공유적으로 또는 비공유적으로 부착될 수도 있다. 실시형태에서, 세포 비침투성 단백질은 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원(예를 들어, 아비딘, 스트렙타비딘)에 공유적으로 부착되고 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원(예를 들어, 바이오틴)에 공유적으로 부착된다. 비공유 링커를 통한 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격의 부착은 침투를 통해 세포로 들어갈 수 있는 본원에 기술된 세포 비침투성 단백질을 형성한다. 본원에 제공된 접합체는 특히 치료 및 진단 목적을 위한 항체의 세포내 전달 및 세포내 표적(예를 들어, 신호전달 단백질)의 표적화를 위해 유용하다.

- [0119] 일 측면에서, 세포 침투성 접합체가 제공된다. 세포 침투성 접합체는 (i) 세포 비침투성 단백질, (ii) 포스포로티오에이트 핵산 및 (iii) 포스포로티오에이트 핵산을 세포 비침투성 단백질에 부착시키는 비공유 링커를 포함한다. 비공유 링커는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착된 바이오틴 결합 도메인을 포함하고 포스포로티오에이트 핵산은 세포 비침투성 단백질의 세포내 전달을 향상시킨다.
- [0120] 세포 비침투성 단백질은 비공유 링커를 통해 포스포로티오에이트 중합체 골격에 부착될 수도 있다. 따라서, 다른 측면에서, 세포 침투성 접합체가 제공된다. 세포 침투성 접합체는 (i) 세포 비침투성 단백질, (ii) 포스포로티오에이트 중합체 골격 및 (iii) 포스포로티오에이트 중합체 골격을 세포 비침투성 단백질에 부착시키는 비공유 링커를 포함한다. 비공유 링커는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착시킨 바이오틴 결합 도메인을 포함하고, 포스포로티오에이트 중합체 골격은 세포 비침투성 단백질의 세포내 전달을 향상시킨다. 상기에 기술된 바와 같이, 중합체 골격은 중합체 골격이 핵산 서열에 정상적으로 존재하는 염기가 결여된 것을 제외하고 핵산 서열과 동일한 구조를 함유(즉, 함께 연결된 2 이상의 당 잔기 사슬을 함유)한다. 또한 세포 침투성 접합체를 포함하는 세포를 제공한다.
- [0121] 실시형태에서, 바이오틴 결합 도메인은 아비딘 도메인이다. 실시형태에서, 바이오틴 결합 도메인은 스트렙타비딘 도메인이다. 실시형태에서, 스트렙타비딘 도메인은 복수의 바이오틴 도메인에 결합한다. 실시형태에서, 스트렙타비딘 도메인은 약 4개의 바이오틴 도메인에 결합한다. 실시형태에서, 바이오틴 결합 도메인은 세포 비침투성 단백질에 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 결합 도메인은 세포 비침투성 단백질에 공유적으로 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 결합 도메인은 세포 비침투성 단백질에 비공유적으로 부착된다. 실시형태에서, 복수의 바이오틴 결합 도메인이 세포 비침투성 단백질에 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 결합 도메인은 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 결합 도메인은 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 공유적으로 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 결합 도메인은 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 비공유적으로 부착된다. 실시형태에서, 복수의 바이오틴 결합 도메인은 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 결합 도메인은 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착되어, 비공유 링커를 형성한다.
- [0122] 실시형태에서, 바이오틴 도메인은 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 도메인은 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 공유적으로 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 도메인은 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 비공유적으로 부착된다. 실시형태에서, 복수의 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 바이오틴 도메인에 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 도메인은 세포 비침투성 단백질에 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 도메인은 세포 비침투성 단백질에 공유적으로 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 도메인은 세포 비침투성 단백질에 비공유적으로 부착된다. 실시형태에서, 복수의 바이오틴 도메인은 세포 비침투성 단백질에 부착된다. 실시형태에서, 바이오틴 도메인은 바이오틴 결합 도메인에 비공유적으로 부착되어, 비공유 링커를 형성한다.
- [0123] 상기에 기술된 바와 같이, 핵산, 예를 들어, 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 바이오틴 결합 도메인(예를 들어, 아비딘 또는 스트렙타비딘) 및 바이오틴 도메인을 포함하는 비공유 링커를 통해 세포 비침투성 단백질에 부착된다. 핵산, 예를 들어, 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 다양한 기전을 통해 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 부착시켜도 된다. 유사하게, 세포 비침투성 단백질은 다양한 기전을 통해 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 부착되어도 된다. 포스포로티오에이트 핵산, 포스포로티오에이트 중합체 골격 또는 세포 비침투성 단백질은 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 공유적으로 또는 비공유적으로 부착될 수 있다. 세포 비침투성 단백질은 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 공유적으로 결합되어도 된다. 세포 비침투성 단백질이 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 공유적으로 결합되는 경우, 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인은 단백질의 아미노산에 공유적으로 결합된다. 실시형태에서, 세포 비침투성 단백질은 공유결합 반응성 모이어티(상기에 기술된 바와 같음)를 포함하고, 반응성 모이어티는 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인과 반응성이다. 실시형태에서, 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인은 공유결합 반응성 모이어티를 포함하고, 반응성 모이어티는 세포 비침투성 단백질과 반응성이다.
- [0124] 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 공유결합 반응성 모이어티를 포함하고 반응성 모이어티는 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인과 반응성이다. 상기에 기술된 바와 같이, 공유결합 반응성 모이어티는 단백질의 리신, 아르기닌, 시스테인 또는 히스티딘(예를 들어, 아미노산 측

쇄)과 반응성일 수 있다. 실시형태에서, 공유결합 반응성 모이어티는 시스테인과 반응성이다. 공유결합 반응성 모이어티는 비닐 설폰이어도 된다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 화학식 S-S-R(여기서 R은 보호기임)을 갖는 반응성 모이어티를 포함한다. 실시형태에서, R은 핵산올(1가 치환기)이다. 본원에서 사용시, 용어 핵산올은 화학식  $C_6H_5OH$ 의 화합물을 포함하고, 1-핵산올, 2-핵산올, 3-핵산올, 2-메틸-1-펜탄올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 2-메틸-2-펜탄올, 3-메틸-2-펜탄올, 4-메틸-2-펜탄올, 2-메틸-3-펜탄올, 3-메틸-3-펜탄올, 2,2-디메틸-1-부탄올, 2,3-디메틸-1-부탄올, 3,3-디메틸-1-부탄올, 2,3-디메틸-2-부탄올, 3,3-디메틸-2-부탄올, 및 2-에틸-1-부탄올을 포함한다. 실시형태에서, R은 1-핵산올이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산은 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 공유적으로 결합된다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산은 반응성 모이어티를 포함한다. 실시형태에서, 반응성 모이어티는 상기술된 바와 같이, 화학식 S-S-R을 갖는 비닐 설폰 또는 반응성 모이어티이다. 실시형태에서, R은 핵산올, 예를 들어, 1-핵산올이다.

[0125] 실시형태에서, 복수의 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격이 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 부착되는 경우, 그 복수의 각각은 공유적으로 또는 비공유적으로 부착될 수 있다. 실시형태에서, 복수의 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인이 세포 비침투성 단백질에 부착되는 경우, 그 복수의 각각은 공유적으로 또는 비공유적으로 부착될 수 있다. 포스포로티오에이트 핵산, 포스포로티오에이트 중합체 골격 또는 세포 비침투성 단백질은 포스포로티오에이트 핵산, 포스포로티오에이트 중합체 골격 또는 세포 비침투성 단백질과 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인의 부착을 촉진하는, 반응성 모이어티, 예를 들어, 아미노산 반응성 모이어티 또는 공유결합 반응성 모이어티를 포함해도 된다. 따라서, 포스포로티오에이트 핵산, 포스포로티오에이트 중합체 골격 또는 세포 비침투성 단백질은 본원에 기술된 바와 같이 반응성 모이어티를 통해 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 부착될 수 있다.

[0126] 본원은 바이오틴 도메인에 비공유적으로 결합된 바이오틴 결합 도메인(예를 들어, 아비딘 또는 스트렙타비딘)을 포함하는 비공유 링커를 통해 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 부착된 세포 비침투성 단백질을 포함하는 복수의 세포 침투성 접합체를 제공한다. 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 비공유 링커의 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 공유적으로 또는 비공유적으로 부착된다. 실시형태에서, 그 다수는 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 공유적으로 부착된 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격을 포함하고 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 비공유적으로 부착된 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인을 포함하지 않는다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착되고 그 다수는 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격에 공유적으로 부착되는 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 그 다수는 비공유적으로 부착된 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격을 포함하는 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인 중 1 이상, 및 공유적으로 부착된 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격을 포함하는 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인 중 1 이상을 포함한다. 따라서, 그 다수는 비공유적으로 그리고 공유적으로 부착된 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격을 포함하는 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인을 포함할 수 있다.

[0127] 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 길이가 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 또는 그 이상의 핵산 잔기이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 길이가 약 10개 내지 약 30개 핵산 잔기이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격 산은 길이가 약 20개 핵산 잔기이다. 실시형태에서, 각각의 핵산 또는 중합체 골격의 길이는 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, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100개 또는 그 이상의 핵산 잔기 또는 당 잔기 길이이다. 실시형태에서, 각각의 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 독립적으로 5 내지 50개, 10 내지 50개, 15 내지 50개, 20 내지 50개, 25 내지 50개, 30 내지 50개, 35 내지 50개, 40 내지 50개, 45 내지 50개, 5 내지 75개, 10 내지 75개, 15 내지 75개, 20 내지 75개, 25 내지 75개, 30 내지 75개, 35 내지 75개, 40 내지 75개, 45 내지 75개, 50 내지 75개, 55 내지 75개, 60 내지 75개, 65 내지 75개, 70 내지 75개, 5 내지 100개, 10 내지 100개, 15 내지 100개, 20 내지 100개, 25 내지 100개, 30 내지 100개, 35 내지 100개, 40 내지 100개, 45 내지 100개, 50 내지



100개, 55 내지 100개, 60 내지 100개, 65 내지 100개, 70 내지 100개, 75 내지 100개, 80 내지 100개, 85 내지 100개, 90 내지 100개, 95 내지 100개, 또는 그 이상의 잔기 길이이다. 실시형태에서, 각각의 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 10 내지 15개, 10 내지 20개, 10 내지 30개, 10 내지 40개, 또는 10 내지 50개 잔기 길이이다.

[0128] 실시형태에서, 하나의 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격의 길이는 다른 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격과 상이하다. 예로서, 2종의 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격이 비공유 링커를 통해 세포 비침투성 단백질에 부착되면, 제1 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 한가지 길이(예를 들어, 22개 잔기)일 수 있고 제2 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 다른 길이(예를 들어, 25개 잔기)일 수 있다. 따라서, 복수의 포스포로티오에이트 핵산 및 포스포로티오에이트 중합체 골격이 비공유 링커를 통해 세포 비침투성 단백질에 부착되면, 포스포로티오에이트 핵산 및 포스포로티오에이트 중합체 골격은 예를 들어, 10 내지 30개 잔기 길이 범위인, 수많은 상이한 길이를 가질 수 있다.

[0129] 실시형태에서, 복수의 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착된 바이오틴 결합 도메인을 포함하는 복수의 비공유 링커를 통해 세포 비침투성 단백질에 부착된다. 실시형태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25개, 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 단백질에 부착된다. 실시형태에서, 복수의 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 비공유 링커의 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 부착된다. 실시형태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25개, 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 핵산 또는 포스포로티오에이트 중합체 골격은 비공유 링커의 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인에 부착된다. 실시형태에서, 복수의 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인은 단백질에 부착된다. 실시형태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25개, 또는 그 이상의 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인은 단백질에 부착된다.

[0130] 실시형태에서, 세포 비침투성 단백질은 25 kD이 넘는 분자량을 갖는다. 실시형태에서, 세포 비침투성 단백질은 약 25 kD 내지 약 750 kD의 분자량을 갖는다. 따라서, 세포 비침투성 단백질은 적어도 약 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750 킬로달톤(kD), 또는 그 이상의 킬로달톤의 분자량을 갖는다. 실시형태에서, 세포 비침투성 단백질은 적어도 약 25 내지 100 kD, 적어도 약 25 내지 150 kD, 적어도 약 25 내지 200 kD, 적어도 약 25 내지 250 kD, 적어도 약 25 내지 300 kD, 적어도 약 25 내지 350 kD, 적어도 약 25 내지 400 kD, 적어도 약 25 내지 450 kD, 적어도 약 25 내지 500 kD, 적어도 약 25 내지 550 kD, 적어도 약 25 내지 600 kD, 적어도 약 25 내지 650 kD, 적어도 약 25 내지 700 kD 또는 적어도 약 25 내지 750 kD의 분자량을 갖는다.

[0131] 실시형태에서, 세포 비침투성 단백질은 항체이다. 상기에 보다 상세하게 기술한 바와 같이, 항체는 전체 길이 항체 예컨대 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 실시형태에서, 항체는 IgG 항체 또는 이의 단편이다. 실시형태에서, 항체는 IgG 항체 또는 이의 단편이다. 실시형태에서, 항체는 Fv 단편 또는 인간화 항체이다. 실시형태에서, 항체는 IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체이다. 실시형태에서, 항체는 Fv 단편이다. 실시형태에서, 항체는 인간화 항체이다. 따라서, 바이오틴 결합 도메인 및 바이오틴 도메인을 포함하는 비공유 링커를 통해 포스포로티오에이트 핵산 또는 중합체 골격에 부착된 항체를 제공하고, 여기서 포스포로티오에이트 핵산 또는 중합체 골격은 세포로 항체의 전달을 향상시킨다. 실시형태에서, 항체는 치료 항체, 즉 질환의 치료에 사용되는 항체이다. 따라서, 본원은 또한 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산 또는 중합체 골격에 부착된 치료 항체를 제공하고, 여기서 항체는 세포내 표적에 결합한다.

[0132] 실시형태에서, 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합한다. 세포내 표적은 치료 표적 또는 진단 표적 또는 세포내에 위치하는 다른 관심 표적, 예를 들어 공초점 현미경을 통해 영상화되는, 예를 들어 표적 또는 구조, 예를 들어, 히스톤일 수 있다. 따라서, 세포내 표적에 결합된 세포 침투성 집합체를 제공한다. 실시형태에서, 세포내 표적은 자가면역 질환, 염증성 질환, 대사 장애, 발달 장애, 심혈관 질환, 간 질환, 장 질환, 감염성 질환

환, 내분비 질환, 신경학적 장애, 및 암으로 이루어진 군에서 선택된 질환의 표적이다. 세포내 표적의 예는 제한없이 STAT3, Myc, NFkB, AP1, HIF, 돌연변이체 p53을 포함한 발암성 전사 인자; 제한없이 Ras, Raf, MAPK, PI3 키나제, AKT, BTK, JAK, SRC 패밀리 구성원을 포함하는 종양 단백질; FOXp3, T-BET, GATA3, STAT1, 2, 3, 4, 5, 6을 포함한 면역조절 분자를 포함한다. 질환의 표적은 진단 표적 또는 치료 표적 또는 질환과 연관된 다른 관심 표적일 수 있다. 예시적인 암의 세포내 표적은 제한없이, STAT(예를 들어, STAT3), NF-κB, PKB/Akt, Myc 패밀리 구성원, 스테로이드 호르몬 수용체(예를 들어, 에스트로겐 수용체), 스테로이드 호르몬 수용체의 리간드(예를 들어, 사이클린 D1), 수용체 티로신 키나제(RTK), EGFR, VEGFR, PDGFR, Src 패밀리 구성원, Ras, Abl, BCR-Abl, NPM-A1k, 야누스 키나제 키나제(JAKs), 브루틴 티로신 키나제(BTK), 및 바이러스 종양단백질(예를 들어, EBV 단백질, 또는 HPV 단백질, 예를 들어, E6 및 E7)을 포함한다. 실시형태에서, 감염성 질환의 세포내 표적은 바이러스 단백질 또는 바이러스 전사물이다. 따라서, 세포내 표적은 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인플루엔자 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 엡스테인-바 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 인간 파필로마 바이러스, 또는 간염 바이러스의 바이러스 단백질 또는 바이러스 전사물일 수 있다. 실시형태에서, 세포내 표적은 제한없이, 전사 인자, 전사 인핸서, 전사 억제인자, 히스톤 또는 번역후 변형된 히스톤을 포함하는 DNA 결합 단백질이다. 실시형태에서, 세포내 표적은 후생유전학적으로 변형된 DNA, 예를 들어, 메틸화 또는 히드록시메틸화 시토신(5mC 또는 5hmC), 5-포르밀시토신 (5fC) 및 5-카복실시토신(5caC)이다. 실시형태에서, 세포내 표적은 핵산, 예를 들어, RNA 전사물 또는 핵산이다. 예를 들어, 세포내 표적은 감염성 병원체, 예를 들어, 기생충, 바이러스 또는 박테리아의 핵산이어도 된다. 실시형태에서, 세포내 표적은 신호전달 분자 또는 전사 인자이다. 실시형태에서, 신호전달 분자는 포스포타제 또는 키나제이다. 실시형태에서, 세포내 표적은 암 표적이거나 또는 암 세포 내에 위치한다. 실시형태에서, 세포내 표적은 STAT, 예를 들어, STAT3 또는 엑스포틴 7이다. 실시형태에서, 세포내 표적은 STAT3, 엑스포틴 7 및 Src로 이루어진 군에서 선택된다. 실시형태에서, 세포내 표적은 인산화된 Src이다. 실시형태에서, 세포내 표적은 FOXp3이다. 실시형태에서, 세포내 표적은 T-BET이다. 실시형태에서, 세포 비침투성 단백질은 단백질에 부착된 표지, 소형 분자 또는 기능성 핵산을 더 포함한다. 실시형태에서, 세포 침투성 접합체는 세포내 표적에 결합된다.

[0133] 세포 조성물

[0134] 다른 측면에서, 이의 실시형태를 포함하는 본원에서 제공하는 세포 침투성 접합체를 포함하는 세포가 제공된다. 제공된 세포 침투성 접합체의 1 이상을 포함하는 세포가 제공되고, 예를 들어, 세포는 복수의 세포 침투성 접합체를 포함해도 된다. 실시형태에서, 세포는 암 세포이다. 실시형태에서, 세포는 비암 세포이다. 실시형태에서, 세포는 T 세포이다. 실시형태에서, 세포는 조절성 T 세포이다. 실시형태에서, 접합체는 세포 내에서 세포내 표적에 결합된다. 예로서, 세포는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 결합된 바이오틴 결합 도메인을 포함하는 비공유 링커를 통해 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산 또는 중합체 골격에 부착된 제1 세포 비침투성 단백질 및 제2 세포 비침투성 단백질을 포함할 수 있다. 제1 및 제2 세포 비침투성 단백질은 세포 내에서 세포내 표적에 결합할 수도 있다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 제1 세포 비침투성 단백질과는 상이한 세포내 표적상의 에피토프에 결합한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포내 표적에 결합한다. 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 세포 비침투성 단백질은 항체이다. 따라서, 제1 및 제2 세포 비침투성 단백질은 동일한 단백질 또는 상이한 단백질일 수 있다.

[0135] 약학 조성물

[0136] 본원은 세포 침투성 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 제공된 조성물은 그 중에서도 시험관내 또는 생체내 투여 및 제제에 적합하다. 적합한 담체 및 부형제 및 그들의 제제는 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005)]에 기술되어 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 생물학적이거나 또는 아니면 바람직하지 않은 재료를 의미하고, 다시 말해서, 그 재료는 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기하지 않거나 또는 그것이 함유된 약학조성물의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용없이 피험체에게 투여된다. 피험체에게 투여하면, 담체는 경우에 따라 활성 성분의 분해를 최소화하고 피험체에서 부정적인 부작용을 최소화하도록 선택된다.

[0137] 본 발명에 의해 제공되는 약학 조성물은 조성물을 포함하고 여기서 활성 성분(예를 들어, 실시형태 또는 예를 포함하는, 본원에 기술된 조성물)은 치료적으로 유효한 양, 즉 이의 의도하는 목적을 획득하는데 효과적인 양으로 함유된다. 특정 용도에 효과적인 실제량은 그 중에서도, 치료하려는 병태에 의존적이게 된다. 질환을 치료하기 위한 방법에서 투여되는 경우, 본원에 기술된 재조합 단백질은 원하는 결과, 예를 들어 표적 분자의 활성 조정, 및/또는 질환 증상의 진행을 감소, 제거, 또는 완화시키는 것을 획득하는데 효과적인 활성 성분의 양을 함유하게 된다. 본 발명의 화합물의 치료적 유효량의 결정은 특히 본원의 상세한 설명을 고려하여, 당업자의 능력

내에서 충분하다.

- [0138] 다른 측면에서, 이의 실시형태를 포함한 본원에 제공된 세포 침투성 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 실시형태에서, 약학 조성물은 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산을 제2 세포 비침투성 단백질에 부착시키는 제2 비공유 링커를 포함하는 제2 세포 비침투성 단백질을 더 포함한다. 실시형태에서, 비공유 링커는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착된 바이오틴 결합 도메인을 포함한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 세포 비침투성 단백질과 상이한 세포내 표적 상의 에피토프에 결합한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포내 표적에 결합한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 항체이다.
- [0139] 제공된 조성물은 단일 작용제 또는 1종이 넘는 작용제를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 바이오틴 도메인에 비공유적으로 결합된 바이오틴 결합 도메인을 포함하는 비공유 링커를 통해 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산 또는 중합체 골격에 부착된 제2 세포 비침투성 단백질을 더 포함한다. 따라서, 본원은 제1 바이오틴 도메인에 비공유적으로 결합된 제1 바이오틴 결합 도메인을 포함하는 제1 비공유 링커를 통해 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산 또는 중합체 골격에 부착된 제1 세포 비침투성 단백질을 포함하는 제1 세포 침투성 접합체 및 제2 바이오틴 도메인에 비공유적으로 결합된 제2 바이오틴 결합 도메인을 포함하는 제2 비공유 링커를 통해 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산 또는 중합체 골격에 부착된 제2 세포 비침투성 단백질을 포함하는 제2 세포 침투성 접합체를 포함하는 조성물을 제공한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 제1 세포 비침투성 단백질과 상이한 세포내 표적 상의 에피토프에 결합한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포내 표적에 결합한다. 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 세포 비침투성 단백질은 항체이다. 제1 및 제2 세포 비침투성 단백질은 동일한 단백질이거나 또는 상이한 단백질일 수 있다.
- [0140] 투여용 조성물은 통상적으로 약학적으로 허용되는 담체, 바람직하게 수성 담체에 용해되는 본원에 기술된 바와 같은 작용제를 포함하게 된다. 다양한 수성 담체는 예를 들어 완충된 염수 등이 사용될 수 있다. 이들 용액은 멸균되고 일반적으로 바람직하지 않은 물질이 없다. 이들 조성물은 통상의, 잘 알려진 멸균 기술을 통해 멸균시켜도 된다. 조성물은 비슷한 생리학적 병태에 필요한 약학적으로 허용되는 보조 물질, 예컨대 pH 조정제 및 완충제, 독성 조정제 등, 예를 들어, 나트륨 아세테이트, 나트륨 클로라이드, 칼륨 클로라이드, 칼슘 클로라이드, 나트륨 락테이트 등을 함유해도 된다. 이들 제제에서 활성제의 농도는 광범위하게 다양할 수 있고, 선택된 특정 투여 방식 및 피험체의 요구에 따라서 제액량, 점도, 체중 등을 기준으로 주로 선택하게 된다.
- [0141] 유리 염기 또는 약학적으로 허용되는 염으로서 활성 화합물의 용액은 계면 활성제, 예컨대 히드록시프로필셀룰로스와 적합하게 혼합하여 물에서 제조할 수 있다. 분산물은 또한 글리세롤, 액상 폴리에틸렌 글리콜, 및 이의 혼합물 및 오일 중에서 제조할 수도 있다. 일반적인 저장 및 사용 조건 하에서, 이들 조제물은 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유할 수 있다.
- [0142] 약학 조성물은 비내 또는 흡입 용액 또는 스프레이, 에어로졸 또는 흡입제를 통해 전달될 수 있다. 점비액은 액적 또는 스프레이로 비강에 투여되도록 디자인된 수용액일 수 있다. 점비액은 그들이 많은 면에서 코 분비물과 유사하도록 제조될 수 있다. 따라서, 수성 점비액은 일반적으로 등장성이고 pH 5.5 내지 6.5를 유지하도록 약간 완충된다. 또한, 필요하다면, 안과 조제물 및 적절한 약물 안정제에서 사용되는 것과 유사한, 항미생물 보존제가 제제에 포함되어도 된다. 다양한 상업적인 코 조제물이 알려져 있고, 예를 들어 항생제 및 항히스타민제를 포함할 수 있다.
- [0143] 경구 제제는 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 마그네슘 카보네이트 등의 약학 등급으로서 부형제를 포함할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁물, 정제, 알약, 캡슐, 서방형 제제 또는 분말의 형태를 취할 수 있다. 일부 실시형태에서, 경구 약학 조성물은 불활성 희석제 또는 동화가능 식용 담체를 포함하게 되거나, 또는 경질 또는 연질 껍질 젤라틴 캡슐에 내장되어도 되거나, 또는 그들은 정제로 압착되어도 되거나, 또는 그들은 식이 식품과 직접 도입되어도 된다. 경구 치료 투여를 위해, 활성 화합물은 부형제와 함께 도입될 수 있고 삼킬 수 있는 정제, 구강 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현탁물, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 그러한 조성물 및 조제물은 적어도 0.1%의 활성 화합물을 함유해야만 한다. 조성물 및 조제물의 비율은 물론 가변적일 수 있고 편리하게는 약 2 내지 약 75 중량%의 단위, 또는 바람직하게 25-60%일 수 있다. 그러한 조성물 내 활성 화합물의 양은 적합한 용량이 획득될 수 있게 존재한다.
- [0144] 수용액으로 비경구 투여를 위해, 예를 들어, 용액은 적합하게 완충되어야만 하고 액체 희석제가 먼저 충분한 염

수 또는 포도당으로 등장성이 되게 해야 한다. 수용액, 구체적으로, 멸균 수성 매질이 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여를 위해 특히 적합하다. 예를 들어, 1 용량은 1 mL의 등장성 NaCl 용액에 용해시킬 수 있고 1000 mL의 피하 주사액에 부가되거나 또는 제안된 주입 부위에 주사될 수 있다.

[0145] 멸균 주사 용액은 적절한 용매에 필요한 양의 활성 화합물 또는 구성체를 도입시킨 후 여과 멸균하여 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산물은 염기성 분산 매질을 함유하는 멸균 비히클에 다양한 멸균된 활성 성분을 도입시켜 제조된다. 활성 성분과 그에 더해 임의의 추가적인 바람직한 성분들을 산출하는, 진공 건조 및 냉동 건조 기술이 멸균 주사 용액의 재구성용 멸균 분말을 제조하는데 사용될 수 있다. 직접 주사를 위한 보다 많거나, 또는 고도의, 농축된 용액의 제조가 또한 고려된다. DMSO는 소용액으로 활성제의 고농도를 극도로 신속하게 침투, 전달시키기 위한 용매로서 사용될 수 있다.

[0146] 화합물의 제제는 단위-용량 또는 복수-용량 밀봉 용기, 예컨대 앰플 및 바이알에 존재할 수 있다. 따라서, 조성물은 단위 제형으로 존재할 수 있다. 그러한 형태에서 조제물은 활성 성분의 적절한 분량을 함유하는 단위 용량으로 세분된다. 따라서, 조성물은 투여 방법에 따라서 다양한 단위 제형으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여용으로 적합한 단위 제형은 제한없이, 분말, 정제, 알약, 캡슐 및 로젠지를 포함한다.

[0147] 포유동물에게 투여되는 용량 및 빈도(단일 또는 복수 용량)는 다양한 인자들, 예를 들어 포유동물이 다른 질환을 앓는지 여부, 이의 투여 경로; 수용자의 크기, 연령, 성별, 건강, 체중, 체질량 지수, 및 식이; 치료되는 질환의 증상(예를 들어, 암의 증상 및 그러한 증상의 중증도)의 성질 및 정도, 동시 치료의 종류, 치료되는 질환에 의한 합병증 또는 다른 건강-관련 문제들에 의존적으로 가변적일 수 있다. 다른 치료 계획 또는 치료제는 본 발명의 방법 및 화합물과 함께 사용될 수 있다. 확립된 용량의 조정 및 조작(예를 들어, 빈도 및 지속기간)은 당업자의 능력 내에서 충분하다.

[0148] 본원에 기술된 임의의 조성물(예를 들어, 제공된 세포 침투성 접합체)의 경우, 치료적으로 유효한 양은 세포 배양 검정으로 초기에 결정할 수 있다. 표적 농도는 본원에 기술되거나 또는 당분야에 공지된 방법들을 사용해 측정시, 본원에 기술된 방법을 달성할 수 있는 활성 화합물(들)의 농도이게 된다. 당분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, 인간에서 사용하기에 효과적인 양은 동물 모델로부터 또한 결정할 수 있다. 예를 들어, 인간을 위한 용량은 동물에서 효과적인 것으로 확인된 농도를 획득하도록 제제화될 수 있다. 인간에서 용량은 상기에 기술한 바와 같이, 효과를 모니터링하고 상향으로 또는 하향으로 조정하여 조정할 수 있다. 상기 기술된 방법 및 다른 방법을 기반으로 인간에서 최대 효능을 획득하도록 용량을 조정하는 것은 당업자의 능력 내에서 충분하다.

[0149] 용량은 환자의 요건 및 적용되는 화합물에 따라 가변적이어도 된다. 본 발명과 관련하여, 환자에 투여되는 용량은 시간 경과에 따라 환자에서 유익한 치료 반응에 영향을 미치기에 충분해야만 한다. 또한 용량의 크기는 임의의 부정적인 부작용의 존재, 성질, 및 정도에 의해 결정되게 된다. 특정 상황을 위해 적절한 용량의 결정은 의사의 역량 내이다. 일반적으로, 치료는 화합물의 최적 용량보다 낮은 보다 적은 용량으로 시작된다. 이후에, 상황 하에서 최적 효과에 도달할 때까지 소량의 증분으로 증가된다.

[0150] 용량 및 간격은 치료되는 특정 임상 징후에 효과적인 투여되는 화합물의 수준을 제공하도록 개별적으로 조정될 수 있다. 이는 개별 질환 상태의 중증도와 적합한 치료 계획을 제공하게 된다.

[0151] 본원에 제공된 교시를 활용하여, 실질적인 독성을 야기하지 않고 여전히 특정 환자에 의해 보여지는 임상 증상을 치료하는데 효과가 있는, 효과적인 예방적 또는 치료적 치료 계획을 계획할 수 있다. 이러한 계획은 예컨대 화합물 역가, 상대적 생체이용률, 환자 체중, 부정적인 부작용의 존재 및 중증도 등과 같은 인자들을 바람직하게 고려하여, 활성 화합물의 신중한 선택을 포함해야만 한다.

[0152] "약학적으로 허용되는 부형제" 및 "약학적으로 허용되는 담체"는 피험체에 활성제의 투여 및 피험체에 의한 흡수를 보조하고 환자에 유의하게 부정적인 독성학적 효과를 야기하지 않고 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 물질을 의미한다. 약학적으로 허용되는 부형제의 비제한적인 예는 물, NaCl, 규정 염수액, 락테이트와 링커, 규정 수크로스, 규정 포도당, 결합제, 충전제, 붕해제, 윤활제, 코팅제, 감미제, 풍미제, 염 용액(예컨대 링거액), 알콜, 오일, 젤라틴, 탄수화물 예컨대 락토스, 아밀로스 또는 전분, 지방산 에스테르, 히드록시메틸셀룰로스, 폴리비닐 피롤리딘, 및 착색제 등을 포함한다. 그러한 조제물은 멸균될 수 있고, 바람직하다면 본 발명의 화합물과 유해하게 반응하지 않는 보조제 예컨대 윤활제, 보존제, 안정제, 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 위한 염, 완충제, 착색제, 및/또는 방향족 물질 등과 혼합될 수 있다. 당업자는 다른 약학 부형제가 본 발명에서 유용하다는 것을 인지하게 된다.

[0153] 용어 "약학적으로 허용되는 염"은 당분야에 잘 알려져 있는 다양한 유기 및 무기 반대 이온에서 유도된 염을 의



미하고, 오직 예로서, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 암모늄, 테트라알킬암모늄 등; 분자가 염기 작용성을 함유하는 경우, 유기산 또는 무기산, 예컨대 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 타르테이트, 메실레이트, 아세테이트, 말레에이트, 옥살레이트 등의 염을 포함한다.

[0154] 용어 "조제물"은 이후 그와 회합되는, 담체에 의해 활성 성분이 다른 담체와 함께 또는 없이, 둘러싸인, 캡슐을 제공하는 담체로서 캡슐화 재료와 함께 활성 화합물의 제제를 포함하고자 한다. 유사하게, 사체 및 로젠지가 포함된다. 정제, 분말, 캡슐, 알약, 사체, 및 로젠지가 경구 투여용으로 적합한 고형 제형으로서 사용될 수 있다.

[0155] 접합체를 형성하는 방법

[0156] 다른 측면에서, 세포 침투성 접합체를 형성시키는 방법이 제공된다. 상기 방법은 세포 비침투성 단백질을 포스포로티오에이트 핵산과 접촉시키는 단계로서, 여기서 세포 비침투성 단백질은 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원에 부착되고 포스포로티오에이트 핵산은 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원에 부착되는 것인 단계를 포함하고, 이에 의해 바이오틴 도메인 및 바이오틴 결합 도메인 사이에 비공유 결합을 포함하는 세포 침투성 접합체를 형성한다. 상기에 기술된 바와 같이, 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원은 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인일 수 있고, 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원은 바이오틴 결합 도메인 또는 바이오틴 도메인일 수 있다. 실시형태에서, 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원은 바이오틴 결합 도메인이다. 실시형태에서, 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원은 바이오틴 도메인이다. 실시형태에서, 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원은 바이오틴 도메인이다. 실시형태에서, 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원은 바이오틴 결합 도메인이다. 실시형태에서, 포스포로티오에이트 핵산은 공유결합 반응성 모이어티를 포함한다. 실시형태에서, 바이오틴 도메인에 비공유적으로 결합되는 바이오틴 결합 도메인은 비공유 링커를 형성한다.

[0157] 전달 방법

[0158] 다른 측면에서, 세포 비침투성 단백질을 세포로 전달하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 세포 침투성 접합체와 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 실시형태에서, 세포 비침투성 단백질은 세포질에서 핵 단백질에 결합하여 세포 비침투성 단백질-핵 단백질 복합체를 형성한다. 실시형태에서, 세포 비침투성 단백질-핵 단백질 복합체는 세포의 핵으로 들어갈 수 없다.

[0159] 실시형태에서, 세포 침투성 접합체는 피험체에서 질환을 진단하기 위해 사용된다. 따라서, 본원에 기술된 세포 침투성 접합체 또는 세포 침투성 접합체를 포함하는 조성물의 유효량을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 피험체에서 질환을 진단하는 방법을 제공한다. 접합체의 투여는 피험체에서 질환 또는 질환의 1 이상의 증상을 진단한다. 개시된 방법은 생체마커, 예를 들어 질환의 세포내 표적의 수준 또는 활성을 대조군 샘플에 대해 시험 샘플을 비교하는 단계를 포함한다. 상기에 기술한 바와 같이, 대조군 샘플 또는 값은 시험 샘플과의 비교를 위한, 기준, 일반적으로 기지의 기준으로서 제공되는 샘플을 의미한다. 대조군은 또한 유사한 개체, 예를 들어 유사한 의학 배경, 동일 연령, 체중 등의 건강한 개체 또는 암 환자의 개체군으로부터 모아진 평균값을 나타낼 수 있다. 대조군 값은 또한 질환 전, 또는 치료 전에, 동일한 개체, 예를 들어 보다 초기에 획득한 샘플로부터 얻을 수 있다. 상기에서 역시 기술된 바와 같이, 진단은 질환(예를 들어, 자가면역, 염증성 자가면역, 암, 감염성, 면역, 또는 다른 질환)이 피험체에 존재하는 상대적 가능성을 의미한다.

[0160] 질환 위험 인자의 결정과 관련하여, 용어 비교하는, 상관있는 및 연관있는은 개체에서 위험 인자의 존재 또는 양(예를 들어, 질환의 세포내 표적의 양)을 질환을 앓는 것으로 알려져 있거나, 또는 질환 위험성이 있는 것으로 알려져 있는 개인에서, 또는 질환이 없는 것으로 알려진 개인에서 그의 존재 또는 양과 비교하고, 검정 결과(들)를 기반으로 개체에 대해 질환의 발병/보유의 증가 또는 감소 가능성을 지정하는 것을 의미한다.

[0161] 검출 방법

[0162] 본원은 또한 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 세포 침투성 접합체와 세포를 접촉시키는 단계 및 세포내 표적에 대한 세포 침투성 접합체의 결합을 검출하는 단계를 포함하는, 세포에서 세포내 표적을 검출하는 방법을 제공한다. 세포는 고정 세포이거나 또는 생존 세포일 수 있다. 실시형태에서, 세포는 시험관내 또는 생체내에 위치된다. 결합은 직접적으로 또는 간접적으로 검출할 수 있다. 수많은 방법들이 그의 세포내 표적에 대한 세포 침투성 접합체의 결합을 검출하는데 사용될 수 있음을 이해하고 고려한다. 예를 들어, 결합은 세포 침투성 접합체와 그의 세포내 표적 사이의 커플링을 검정하여 직접적으로 검출할 수 있다. 결합은 예를 들어, 이하에 기술된 바와 같이, 공동면역침전 검정법, 공극재화 검정법, 또한, 형광 편광 검정법으로 이루어진 군에서 검정법을 선택하여 결정할 수 있다. 이러한 검정법들은 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold

Spring Harbor, NY (2001)]; [Dickson, Methods Mol. Biol. 461:735-44 (2008); Nickels, Methods 47(1):53-62 (2009)]; 및 [Zinchuk et al., Acta Histochem. Cytochem. 40(4):101-11 (2007)]을 참조한다.

[0163] 실시형태에서, 결합은 영상화 방법 또는 시스템에 의해 결정된다. 따라서, 이의 실시형태를 포함하는 본원에서 제공하는 세포 침투성 접합체는 또한 세포내 표적 수준 및/또는 활성을 분석하기 위한 영상화 용도 또는 다른 용도에서 사용될 수도 있다. 예를 들어, 제공된 세포 침투성 접합체는 관심 세포내 표적의 시험관내 또는 생체내 영상화를 위해 사용될 수 있다. 실시형태에서, 세포 침투성 접합체는 생존 세포 영상화를 위해 사용된다. 예를 들어, 생존 세포 영상화는 살아있는 세포 내부에서 세포내 표적 분포 및/또는 역학을 모니터링하는데 사용될 수 있고, 또한 표적 상호작용을 모니터링하는데 적용될 수 있다. 예를 들어, 세포 침투성 접합체는 세포, 실시형태에서, 살아있는 세포에서 단백질-단백질 상호작용을 연구하기 위한 면역침전 및 공면역침전 검증법에서 사용할 수 있다. 실시형태에서, 세포 침투성 접합체는 유세포 측정법에 의한 세포내 표적의 분석에 사용된다. 영상화 용도에서, 세포 침투성 접합체는, 실시형태에서, 사용되는 용도에 적절하게 표지된다. 상기에 기술된 바와 같이, 표지 또는 검출가능한 모이어티는 분광분석, 광화학, 생화학, 면역화학, 화학, 또는 다른 물리학 수단에 의해 검출가능한 조성물이다. 유용한 표지는 제한없이, 32P, 형광발광 염료, 전자-밀집 시약, 효소(예를 들어, ELISA에서 통상적으로 사용되는 바와 같음), 바이오틴, 디옥시게닌, 또는 헵텐 및 단백질 또는 예를 들어 표적 펩티드와 특이적으로 반응하는 펩티드 또는 항체에 방사능표지를 도입하여 검출가능하게 만들 수 있는 다른 독립체를 포함한다. 표지에 항체를 접합시키기 위해 당분야에 공지된 임의의 방법은, 예를 들어 문헌 [Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego]에 기술된 방법을 사용해 적용해도 된다.

[0164] 치료 방법

[0165] 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 세포 침투성 접합체 및 이의 실시형태를 포함하는 본원에 기술된 바와 같은 세포 침투성 접합체를 포함하는 조성물은 예방적 및 치료적 치료 둘 모두에 유용하다. 예방적 용도의 경우, 본원에 기술된 작용제의 치료적으로 유효한 양이 초기 개시(예를 들어, 자가면역 질환의 초기 징후 및 증상) 전 또는 그 동안 피험체에게 투여된다. 치료적 치료는 질환의 진단 또는 발병 후 본원에 기술된 작용제의 치료적으로 유효한 양을 피험체에게 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 다른 측면에서, 이를 필요로 하는 피험체에서 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 세포 침투성 접합체의 유효량을 피험체에게 투여하는 단계, 그리하여 피험체에서 질환을 치료하는 단계를 포함한다.

[0166] 실시형태에서, 상기 방법은 제2 세포 비침투성 단백질에 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산을 부착시키는 제2 비공유 링커를 포함하는 제2 세포 비침투성 단백질을 피험체에게 투여하는 단계를 포함한다. 실시형태에서, 비공유 링커는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착되는 바이오틴 결합 도메인을 포함한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 접합체와 상이한 세포내 표적 상의 에피토프에 결합한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포내 표적에 결합한다. 실시형태에서, 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 접합체 및 제2 세포 비침투성 단백질은 동시에 투여된다. 실시형태에서, 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 접합체 및 제2 세포 비침투성 단백질은 순차적으로 투여된다.

[0167] 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 항체이다. 실시형태에서, 상기 방법은 피험체에게 제2 치료제를 투여하는 단계를 포함한다. 실시형태에서, 질환은 자가면역 질환, 발달 장애, 염증성 질환, 대사 장애, 심혈관 질환, 간 질환, 장 질환, 감염성 질환, 내분비 질환, 신경학적 장애, 및 암으로 이루어진 군에서 선택된다. 실시형태에서, 질환은 자가면역 질환이다. 실시형태에서, 질환은 발달 장애이다. 실시형태에서, 질환은 염증성 질환이다. 실시형태에서, 질환은 대사 장애이다. 실시형태에서, 질환은 심혈관 질환이다. 실시형태에서, 질환은 간 질환이다. 실시형태에서, 질환은 장 질환이다. 실시형태에서, 질환은 감염성 질환이다. 실시형태에서, 질환은 내분비 질환이다. 실시형태에서, 질환은 신경학적 장애이다. 실시형태에서, 질환은 암이다. 실시형태에서, 접합체의 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합하고 세포내 표적은 STAT3, 엑스포틴 7, 또는 Src이다. 실시형태에서, 접합체의 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합하고 세포내 표적은 인산화된 Src이다. 실시형태에서, 접합체의 세포 비침투성 단백질은 STAT3에 특이적으로 결합하는 항체이고, 제2 세포 비침투성 단백질은 엑스포틴 7에 특이적으로 결합하는 항체이다. 실시형태에서, 접합체의 세포 비침투성 단백질은 STAT3에 특이적으로 결합하는 항체이고, 제2 세포 비침투성 단백질은 STAT3의 다른 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체이다.

[0168] 제공되는 치료 방법에서, 치료되는 질환에 적합한 추가적인 치료제가 사용될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 제공되는 치료 방법은 피험체에게 제2 치료제를 투여하는 단계를 더 포함한다. 적합한 추가적인 치료제는 제한없이, 진통제, 마취제, 소생제, 코르티코스테로이드, 항콜린제, 항콜린에스터라제, 항경련제, 항신생물제, 알로스테릭 억제제, 동화작용 스테로이드, 항류마티스제, 정신요법제, 신경 차단제, 항염증제, 구충제, 항생제,

항응고제, 항진균제, 항히스타민제, 항무스카린제, 항마이코박테리아제, 항원충제, 항바이러스제, 도파민제, 혈액학적 작용제, 면역학적 작용제, 무스카린, 프로테아제 억제제, 비타민, 성장 인자, 및 호르몬으로 이루어진 군에서 선택되는 치료제를 포함한다. 작용제 및 용량의 선택은 치료되는 소정 질환을 기초로 당업자가 쉽게 결정할 수 있다.

[0169] 작용제 또는 조성물의 조합을 동시발생적으로(예를 들어, 혼합물로서), 개별적이지만 동시에(예를 들어, 개별 정맥내 라인을 통해) 또는 순차적으로(예를 들어, 하나의 작용제를 먼저 투여한 후 제2 작용제의 투여를 후속함) 투여할 수 있다. 따라서, 용어 조합은 2 이상의 작용제 또는 조성물의 동시발생적, 동시적 또는 순차적 투여를 의미하기 위해 사용된다. 치료 과정은 피험체의 구체적인 특질 및 선택된 치료 유형에 의존적으로 개별 기준에 따라 최고로 결정된다. 치료, 예컨대 본원에 개시된 것들은 1일 1회, 1일 2회, 격주, 1개월 단위로, 또는 치료적으로 효과적인 임의의 적용가능한 기준에 따라 피험체에게 투여될 수 있다. 치료는 단독으로 또는 본원에 개시되거나 또는 당분야에 공지된 임의의 다른 치료와 조합하여 투여될 수 있다. 추가 치료는 제1 치료와 동시에, 상이한 시점에, 또는 완전히 상이한 치료 스케줄(예를 들어, 제1 치료는 날마다 할 수 있는 한편, 추가 치료는 주마다 함)로 투여될 수 있다.

[0170] 본원에 제공된 방법에 따라서, 피험체는 본원에 제공된 1 이상의 작용제의 유효량을 투여받는다. 용어 유효량 및 유효 용량은 상호교환적으로 사용된다. 용어 유효량은 원하는 생리학적 반응(예를 들어, 염증의 감소)을 생산시키는데 필요한 임의량으로 정의된다. 작용제를 투여하기 위한 유효한 양 및 스케줄은 당업자가 경험적으로 결정할 수 있다. 투여를 위한 용량 범위는 질환 또는 질병의 1 이상의 증상이 영향받는(예를 들어, 감소 또는 지연되는) 바람직한 효과를 생산하기에 충분하게 큰 것이다. 용량은 실질적으로 부정적인 부작용, 예컨대 원치 않는 교차 반응 과민 반응 등을 야기할 정도로 너무 크지 않아야 한다. 일반적으로, 용량은 연령, 병태, 성별, 질환 유형, 질환 또는 질병의 정도, 투여 경로, 또는 계획에 포함되는 다른 약물의 유무에 따라 가변적이게 되고, 당업자에게 결정할 수 있다. 용량은 임의의 급기 사건의 경우에 개별 의사가 조정할 수 있다. 용량은 가변적일 수 있고, 1일 또는 며칠 동안, 날마다 1 이상의 투여로 투여될 수 있다. 소정 부류의 약학 제품의 적절한 용량에 관한 지침은 문헌에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 소정 변수의 경우, 유효량은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 또는 적어도 100%의 증가 또는 감소를 보여주게 된다. 효능은 또한 "배" 증가 또는 감소로 표현될 수 있다. 예를 들어, 치료적으로 유효한 양은 대조군에 비해 적어도 1.2배, 1.5배, 2배, 5배, 또는 그 이상의 효과를 가질 수 있다. 정확한 용량 및 제제는 치료의 목적에 따라 좌우될 것이고, 공지된 기술을 사용해 당업자가 확인가능하게 된다(예를 들어, 하기 문헌들 참조: [Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992)]; [Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999)]; [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Gennaro, Editor (2003), and Pickar, Dosage Calculations (1999)]).

[0171] 본원은 개시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있거나, 그와 함께 사용될 수 있거나, 또는 그의 제조에 사용될 수 있거나, 또는 그의 제품인 재료, 조성물 및 성분을 개시한다. 이들 및 다른 재료를 본원에서 개시하고, 이들 재료의 조합, 서브셋, 상호작용, 군이, 이들 화합물의 각각의 다양한 개별적 및 집합적 조합 및 치환에 관한 특별한 인용을 명확하게 개시하지 않으면서 개시되는 경우, 각각은 본원에서 특별하게 고려되고 기술된다는 것을 이해한다. 예를 들어, 방법이 개시되고 기술되며 그 방법을 포함하는 수많은 분자에 만들어질 수 있는 많은 변형들이 기술되면, 방법의 각각 및 모든 조합과 치환, 및 가능한 변형들은 반대로 특별히 표시되지 않으면 특별히 고려된다. 유사하게, 이들의 임의의 서브셋 또는 조합이 또한 특별히 고려되고 개시된다. 이러한 개념은 제한없이, 개시된 조성물을 사용하는 방법에서의 단계들을 포함한 이러한 설명의 모든 측면들에 적용된다. 따라서, 수행할 수 있는 다양한 추가 단계들이 존재하면, 이들 추가 단계 각각이 임의의 특정 방법 단계들 또는 개시된 방법의 방법 단계들의 조합과 함께 수행될 수 있고, 각각의 이러한 조합 또는 조합의 서브셋이 특별하게 고려되고 개시된 것으로 고려되어야 함을 이해한다.

[0172] 용어 "피험체," "환자," "개체" 등은 제한하려는 의도가 아니고 일반적으로 상호교환될 수 있다. 즉, "환자"로서 기술된 개체는 반드시 소정 질환을 갖지 않지만, 단지 진찰을 원할 수도 있다.

[0173] 본원에서 사용시, 병태, 질환 또는 질병 또는 병태, 질환 또는 질병과 연관된 증상의 "치료" 또는 "치료하는"은 임상 결과를 포함한, 유익하거나 또는 바람직한 결과를 얻기 위한 접근법을 의미한다. 유익하거나 또는 바람직한 임상 결과는 부분적이건 또는 전체적이건, 제한없이, 1 이상의 증상 또는 병태의 완화 또는 개선, 병태, 질병 또는 질환의 경감, 병태, 질병 또는 질환 상태의 안정화, 병태, 질병 또는 질환의 발병의 예방, 병태, 질병 또는 질환의 확산의 예방, 병태, 질병 또는 질환 진행의 지연 또는 완화, 병태, 질병 또는 질환 개시의 지연 또는 완화, 병태, 질병 또는 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화, 및 차도를 포함한다. "치료하는"은 또한 치료



부제 하에서 예상되는 것 이상의 피험체의 연장된 생존을 또한 의미한다. "치료하는"은 또한 병태, 질병 또는 질환의 진행 억제, 병태, 질병 또는 질환의 진행의 일시적인 완화를 의미할 수 있지만, 일부 예에서, 병태, 질병 또는 질환의 진행의 영구적 중단을 포함한다. 본원에서 사용시, 용어 치료, 치료하다, 또는 치료하는은 프로테아제의 발현을 특징으로 하는 질환 또는 병태의 증상 또는 프로테아제의 발현을 특징으로 하는 질환 또는 병태의 1 이상의 증상의 효과를 감소시키는 방법을 의미한다. 따라서, 개시된 방법에서, 치료는 확립된 질환 또는 병태의 중증도, 또는 질환 또는 병태의 증상의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 감소를 의미한다. 예를 들어, 질환을 치료하기 위한 방법은 대조군과 비교하여 피험체에서 질환의 1 이상의 증상에서 10% 감소가 존재하면 치료인 것으로 간주한다. 따라서, 감소는 천연 또는 대조군 수준과 비교하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 또는 10% 내지 100% 사이의 임의 비율의 감소일 수 있다. 치료는 질환, 병태, 또는 질환 또는 병태의 증상의 치유 또는 완전한 제거를 반드시 의미하는 것은 아님을 이해한다. 또한, 본원에서 사용시, 축소, 감소, 또는 억제에 대한 언급은 대조군 수준과 비교하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 보다 큰 변화를 포함하고 이러한 용어는 완전한 제거를 포함할 수 있지만 반드시 포함할 필요는 없다.

[0174] 병용 치료가 고려되는 경우, 본원에 기술된 작용제(즉, 리보핵산 화합물)는 그 조합의 특정 성질에 의해 제한하려는 의도는 없다. 예를 들어, 본원에 기술된 작용제는 단순 혼합물을 비롯하여 화학 하이브리드로서 조합하여 투여될 수 있다. 후자의 예는 작용제가 표적 담체 또는 활성 약제에 공유적으로 연결된 경우이다. 공유 결합은 많은 방식으로, 예컨대 제한없이, 상업적으로 입수할 수 있는 가교제의 사용으로 수행될 수 있다.

[0175] 본원에서 사용시, 용어 "약학적으로 허용되는"은 "생리학적으로 허용되는" 및 "약물학적으로 허용되는"과 동의어로 사용된다. 약학 조성물은 일반적으로 저장시 보존 및 완충을 위한 작용제를 포함하게 되고, 투여 경로에 따라서, 적절한 전달을 위한 완충제 및 담체를 포함할 수 있다.

[0176] "유효량"은 명시된 목적을 달성(예를 들어, 투여하여, 질환 치료, 효소 활성 감소, 질환 또는 병태의 1 이상의 증상 감소의 효과를 성취)하기에 충분한 양이다. "유효량"의 예는 증상 또는 질환의 증상의 치료, 예방, 또는 감소에 기여하기에 충분한 양이고, 이는 또한 "치료적으로 유효한 양"이라고도 할 수 있다. 증상 또는 증상들의 "감소"(및 이러한 어구의 문법적 균등어)는 증상(들)의 중증도 또는 빈도의 감소, 또는 증상(들)의 제거를 의미한다. 약물의 "예방학적으로 유효한 양"은 피험체에게 투여시, 피험체, 의도하는 예방학적 효과, 예를 들어 손상, 질환, 병상 또는 병태의 개시(또는 재발)를 예방 또는 지연시키거나, 또는 손상, 질환, 병상, 또는 병태, 또는 그들의 증상의 개시(또는 재발)의 가능성을 감소시키는 약물의 양이다. 완전한 예방학적 효과는 한 용량의 투여에 의해 반드시 일어날 필요는 없고, 일련의 용량의 투여 후에만 일어날 수도 있다. 따라서, 예방학적으로 유효한 양은 1 이상의 투여로 투여될 수 있다. 본원에서 사용시, "활성 감소량"은 길항제의 부제와 비교해 효소 또는 단백질의 활성을 감소시키는데 요구되는 길항제의 양을 의미한다. 본원에서 사용시 "기능 파괴량"은 길항제의 부제와 비교해 효소 또는 단백질의 기능을 파괴하는데 요구되는 양을 의미한다. 소정 약학 제품 부류에 대해 적절한 용량에 관한 지침은 문헌에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 소정 변수의 경우, 유효량은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 또는 적어도 100%의 증가 또는 감소를 보여주게 된다. 효능은 또한 "배" 증가 또는 감소로 표현될 수 있다. 예를 들어, 치료적으로 유효한 양은 대조군과 비교해 적어도 적어도 1.2배, 1.5배, 2배, 5배, 또는 그 이상의 효과를 가질 수 있다. 정확한 양은 치료의 목적에 따라 좌우될 것이고, 공지 기술을 사용해 당업자가 확인가능하게 된다(예를 들어, 하기 문헌들 참조: [Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992)]; [Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999)]; [Pickar, *Dosage Calculations* (1999)]; 및 [Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins]).

[0177] 본원에서 사용시, 용어 "투여하는"은 피험체에 대한, 경구 투여, 좌제로서 투여, 국소 접촉, 정맥내, 복강내, 근육내, 병변내, 척추강내, 비내 또는 피하 투여, 또는 서방형 장비, 예를 들어 미니삼투압 펌프의 이식을 의미한다. 투여는 비경구 및 경점막(예를 들어, 구강, 설하, 구개, 치은, 코, 질, 직장, 또는 경피)을 포함한, 임의 경로에 의한다. 비경구 투여는 예를 들어, 정맥내, 근육내, 세동맥내, 피내, 피하, 복강내, 심실내, 및 두개내를 포함한다. 다른 전달 방식은 제한없이, 리포솜 제제, 정맥내 주입, 경피 패치 등의 사용을 포함한다. "공동투여하다"는 본원에 기술된 조성물이 1 이상의 추가 요법, 예를 들어 암요법 예컨대 화학요법, 호르몬 요법, 방사선요법, 또는 면역요법의 투여와 동시에, 그 직전에, 또는 그 직후에 투여되는 것을 의미한다. 본 발명의 화합물은 단독으로 투여될 수 있거나 또는 환자에게 공동투여될 수 있다. 공동투여는 개별적으로 또는 조합하여(1 종이 넘는 화합물) 화합물의 동시 또는 순차 투여를 포함하는 것을 의미한다. 따라서, 조합물은 또한 바람직하다면, 다른 활성 물질과 조합될 수 있다(물질 대사 분해를 감소시키기 위함). 본 발명의 조성물은 경피적으로,

국소 경로에 의해, 도포용 스틱, 용액, 현탁제, 에멀션, 젤, 크림, 연고, 페이스트, 젤리, 페이트, 분말, 및 에어로졸로서 제제화되어 전달될 수 있다.

[0178] 본 발명의 조성물은 추가적으로 지속 방출성 및/또는 편안함을 제공하기 위한 성분을 포함해도 된다. 그러한 성분은 고분자량, 음이온성 점막모방성 중합체, 겔화 다당류 및 미분 약물 담체 물질을 포함한다. 이들 성분은 미국 특허 제4,911,920호; 제5,403,841호; 제5,212,162호; 및 제4,861,760호에 더 많이 상세하게 기술되어 있다. 이들 특허의 전체 내용을 모든 목적을 위해 그들 전체로 참조로 본원에 편입시킨다. 본 발명의 조성물은 또한 체내에서 느린 방출을 위한 미세구로서 전달될 수도 있다. 예를 들어, 미세구는 피하에서 서서히 방출되는, 약물-함유 미세구의 피내 주사(문헌 [Rao, *J. Biomater Sci. Polym. Ed.* 7:623-645, 1995] 참조)를 통해서, 생분해성 및 주사용 겔 제제(예를 들어, 문헌 [Gao *Pharm. Res.* 12:857-863, 1995] 참조)로서, 또는 경구 투여용 미세구(예를 들어, 문헌 [Eyles, *J. Pharm. Pharmacol.* 49:669-674, 1997] 참조)로서 투여될 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 조성물의 제제는 세포막과 융합되는 리포솜의 사용에 의해 또는 세포내이입, 즉 세포내이입을 초래하는 세포의 표면막 단백질 수용체에 결합하는, 리포솜에 부착되는 수용체 리간드의 적용에 의해 전달될 수 있다. 리포솜을 사용하여, 특히 리포솜이 표적 세포에 특이적인 수용체 리간드를 운반하거나, 또는 아니면 특정 장기에 우선적으로 지정되는 경우, 생체내 표적 세포로 본 발명의 조성물의 전달에 집중할 수 있다(예를 들어, 문헌 [Al-Muhammed, *J. Microencapsul.* 13:293-306, 1996]; [Chonn, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:698-708, 1995]; [Ostro, *Am. J. Hosp. Pharm.* 46:1576-1587, 1989] 참조). 본 발명의 조성물은 또한 나노입자로서 전달될 수 있다.

[0179] 본원에 제공된 교지들을 활용하여, 실질적인 독성을 야기하지 않지만 특정 환자에 의해 보여지는 임상 증상을 치료하는데 효과가 있는 효과적인 예방적 또는 치료적 치료 계획을 계획할 수 있다. 이러한 계획은 인자들 예컨대 화합물 역가, 상대적 생체이용률, 환자 체중, 부정적인 부작용의 존재 및 중증도, 바람직한 투여 방식 및 선택된 작용제의 독성 프로파일을 고려한 활성 화합물의 신중한 선택을 포함해야 한다.

[0180] "항암제"는 이의 명백한 일반 의미에 따라 사용되고 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 항신생물성 특성 또는 능력을 갖는 조성물(예를 들어, 화합물, 약물, 길항제, 억제제, 조정제)을 의미한다. 실시형태에서, 항암제는 화학요법제이다. 실시형태에서, 항암제는 암을 치료하는 방법에서 활용성을 갖는 본원에서 동정된 작용제이다. 실시형태에서, 항암제는 암을 치료하기 위해, FDA 또는 USA 이외의 다른 국가의 유사 규제 기관에 의해 승인된 작용제이다.

[0181] 키트

[0182] 다른 측면에서, 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 세포 침투성 접합체 또는 이의 실시형태를 포함하는 본원에서 제공하는 바와 같은 약학 조성물 및 사용 설명서를 포함하는 키트가 제공된다. 실시형태에서, 상기 키트는 제2 세포 비침투성 단백질에 1 이상의 포스포티오에이트 핵산을 부착시키는 제2 비공유 링커를 포함하는 제2 세포 비침투성 단백질을 포함한다. 실시형태에서, 제2 비공유 링커는 제2 바이오틴 도메인에 비공유적으로 결합되는 제2 바이오틴 결합 도메인을 포함한다. 실시형태에서, 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 접합체 및 제2 세포 비침투성 단백질은 개별 용기에 존재한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 세포 비침투성 단백질과 상이한 세포내 표적 상의 에피토프에 결합된다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포내 표적에 결합한다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포 비침투성 단백질 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물로서 제제화된다. 실시형태에서, 제2 세포 비침투성 단백질은 항체이다. 실시형태에서, 키트는 질환의 1 이상의 증상을 치료 또는 예방하기 위한 1 이상의 추가 작용제를 포함한다. 실시형태에서, 키트는 조성물을 투여하는 수단, 예컨대, 예를 들어, 시린지, 바늘, 도관, 카테터, 패치 등을 포함한다. 키트는 또한 사용전 멸균 및/또는 희석에 필요한 제제 및/또는 재료를 포함해도 된다.

[0183] 실시예

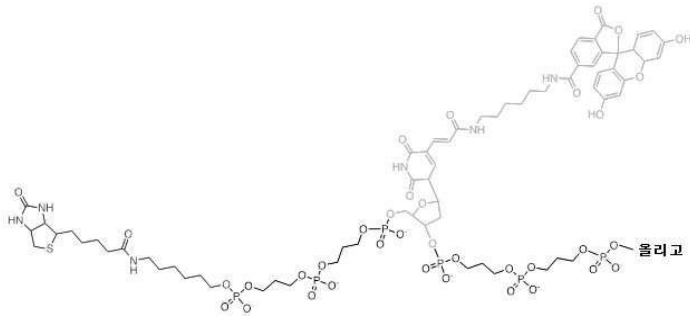
[0184] 실시예 1

[0185] 출원인은 20량체 길이의 포스포티오에이트화(PS)된 DNA 올리고머가 항체를 생존 세포에 침투시킬 수 있고 의도된 항원을 인식할 수 있음을 입증한다. 포스포티오에이트화는 DNA 올리고의 당포스페이트 골격에서 일어난다. 출원인은 PS DNA 올리고의 부착이 항체 세포내 전달을 비롯한 표적 인식을 효율적으로 촉진하며, 20량체 PS DNA 올리고가 매우 효율적임을 입증한다. DNA 올리고의 PEG화에 의한 접합, 2'플루오로-, 2'메틸A-, 또는 2'메틸G-변형은 항체 세포내 흡수를 촉진시키지 않고 PS RNA 올리고의 부착은 세포내 전달을 촉진시키지 않는다. 상기

연급된 다양하게 변경된 DNA 올리고, 및 PS 변경된 RNA(20량체)는 바이오틴 부착시켜 합성하였고, 항체는 항체와 올리고의 비공유 연결이 가능하도록 아비딘/스트렙타비딘으로 표지화하였다.

[0186] 제공된 방법 및 조성물은 이의 실시형태를 포함하는 본원에 제공된 세포 침투성 접합체의 정제를 위해 유용하다. 바이오틴 도메인에 비공유적으로 결합되는 바이오틴 결합 도메인을 포함하는 부착된 비공유 링커는 비공유 링커의 부재와 비교해 접합체의 분자량 증가를 야기시킨다. 따라서, 본원에 제공되는 접합체는 당분야에서 일반적으로 알려진 표준 크기 배제 방법론을 사용해 편리하게 정제될 수 있다.

[0187] 구조



[0188]

[0189] 5'-바이오틴 올리고: 적색 = 바이오틴, 흑색 = C3 및 녹색 = 플루오레세인 dT 단위

[0190] 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 PS-DNA 올리고에 접합된 변형된 항-STAT3 항체는 세포 침투할 수 있다. 도 4a는 2차 항체를 사용하여, 전달된 항체, 항체-항원 복합체를 검출하기 위한 유세포 측정 분석을 보여준다. U251 세포(인간 신경교종 줄기 세포)는 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 PO-DNA 올리고(20량체)(적색선), PS-DNA 올리고(20량체)(적색 영역), 1k PEG(청색선) 및 30k PEG(파선)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체로 처리하였다. U251 세포를 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 특정 변형된 항-STAT3 항체로 처리하였고 1시간 동안 37°C에서 항온반응시켰다. 세척 단계(PBS/1% BSA) 후, 세포를 회수하고 500  $\mu\text{L}$ 의 2% 파라포름알데히드(15분)로 고정시킨 후, 세척 단계(PBS/1% BSA)를 후속하고 500  $\mu\text{L}$ 의 메탄올(10분)로 진행하였다. 세척(PBS/1% BSA) 후, 세포를 PBS/1% BSA/1% 마우스 혈청으로 1시간 동안 4°C에서 차단하였다. 이후에, 세포를 세척(PBS/1% BSA)하고 2차 항체(PBS 중 항-토끼 AF647 1:4,000)로 30분간 암실에서 염색하였다. 유세포 분석을 3회 최종 세척 단계(PBS/1% BSA) 및 300  $\mu\text{L}$ 의 세척 완충제에 세포를 수집한 후 수행하였다. 미염색된 U251을 블랭크 대조군(회색 영역)으로 사용하였다.

[0191] 도 4b는 전달된 항체-항원 복합체를 검출하기 위한 대안적인 웨스턴 블롯팅 분석을 보여준다. U251 세포는 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 PO-DNA 올리고(20량체)(제1 라인), PS-DNA 올리고(20량체)(제2 라인), PEG-1k-DNA 올리고(제3 라인) 및 PEG-30k-DNA 올리고(제4 라인)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체로 처리하였다. U251 세포는 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 표시된 변형된 항-STAT3 항체로 처리하고 1시간 동안 37°C에서 항온반응시켰다. 항온반응 및 PBS(2 mL)로 세척 단계 후 세포를 500  $\mu\text{L}$ 의 RIPA 완충액 중 얼음 상에서 항온반응(30분) 후, 강한 와류를 통해 용해시켰다. 전체 세포 용해물을 원심분리 단계(10분, 13,000rpm, 4°C) 후 상등액을 수집하여 회수하였다. 각각의 전체 세포 용해물에, 30  $\mu\text{L}$ 의 재조합 단백질 G 아가로스 비드를 부가하고 밤새 4°C에 진탕 플랫폼 상에서 항온반응시켰다. 비드를 펠렛화(2분, 2,400rpm, 4°C)하고, 2회 500  $\mu\text{L}$ 의 빙냉 PBS로 세척하였다. 건조된 아가로스 비드를 30  $\mu\text{L}$  램리(Laemmli) 완충액으로 채우고 95°C에서 5분간 항온반응시켰다. 20  $\mu\text{L}$ 를 10% SDS-PAGE(나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동)에 로딩하고 125V에서 러닝시켰다. 겔을 니트로셀룰로스 블롯팅막(0.45  $\mu\text{m}$ ) 상에 블롯팅한 후, 막을 10% BSA/TBS-T(0.1% Tween20)를 사용해 1시간 동안 실온에서 진탕 플랫폼 상에서 차단하였다. 이후, 막을 1차 항체(TBS-T 중 항-STAT3 1:1,000)와 밤새 4°C에서 진탕 플랫폼 상에서 항온반응시켰다. TBS-T로 3회 세척 단계(TBS-T로 15분, 10분, 10분) 후, 막을 ECLTM 항-토끼 IgG, 홀스래디쉬 퍼옥시다제(TBS-T 중 1:10,000)와 4°C에서 진탕 플랫폼 상에서 2-4시간 동안 항온반응시켰다. 검출은 4회 마지막 세척 단계(TBS-T로 각각 5분) 후 SuperSignal® 웨스트 듀라 익스텐디드 검출 키트를 사용해 수행하였다.

[0192] 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 PS-DNA 올리고에 접합된 변형된 항-STAT3 항체는 세포 침투 및 표적 인식할 수 있다. 도 6은 전달된 항체-항원 복합체를 검출하기 위한 대안적인 웨스턴 블롯팅 분석을 보여준다. U251 세포는 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 PO-2'플루오로-올리고(제1 라인), PO-2'메틸A-올리고(제2 라인), PO-2'메틸G-올리고(제3 라인), PO-올리고 DNA(20량체)(제4 라인), PS-올리고 DNA(20량체)(제5 라인) 및 비변형된 항체(제6 라인)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체로 처리하였다. U251 세포는 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 표시된 변형된 항-STAT3 항체로



처리하였고 1시간 동안 37℃에서 항온반응시켰다. 항온반응 및 PBS(2 mL)로 2회 세척 단계 후, 세포를 500  $\mu$ L RIPA 완충액 중 얼음에서 항온반응(30분)과 이후, 강력한 와류를 통해 용해시켰다. 전체 세포 용해물은 원심분리 단계(10분, 13,000rpm, 4℃) 이후에 상등액을 수집하여 회수하였다. 각각의 완전한 세포 용해물에 30  $\mu$ L의 재조합 단백질 G 아가로스 비드를 부가하고 밤새 4℃에 진탕 플랫폼 상에서 항온반응시켰다. 비드를 펠렛화(2분, 2,400rpm, 4℃)하였고, 2회 500  $\mu$ L 빙냉 PBS로 세척하였다. 건조된 아가로스 비드에 30  $\mu$ L의 램리 완충액을 채우고 95℃에서 5분간 항온반응시키고, 20  $\mu$ L를 10% SDS-PAGE(나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동)에 로딩하고 125V에서 러닝하였다. 겔을 니트로셀룰로스 블롯팅막(0.45  $\mu$ m) 상에 블롯팅한 후, 그 막을 10% BSA/TBS-T(0.1% Tween20)를 사용해 1시간 동안 실온에서 진탕 플랫폼 상에서 차단시켰다. 이후 막을 1차 항체(TBS-T 중 항-STAT3 1:1,000)와 밤새 4℃에 진탕 플랫폼 상에서 항온반응시켰다. TBS-T로 3회 세척 단계(TBS-T로 15분, 10분, 10분) 후, 막을 ECLTM 항-토끼 IgG, 홀스래디쉬 퍼옥시다제(TBS-T 중 1:10,000)와 4℃에 진탕 플랫폼 상에서 2-4시간 동안 항온반응시켰다. 검출은 SuperSignal® 웨스트 듀라 익스텐디드 검출 키트를 사용해 4회 최종 세척 단계(TBS-T로 각각 5분) 후 수행하였다.

[0193] 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 PS-DNA 올리고(20량체)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체가 세포 침투에서 가장 효율적이다. 도 7a 윗쪽 패널은 항-토끼 항체를 사용한, 전달된 항체를 검출하기 위한 유세포측정 분석을 보여준다. U251 세포(인간 신경교종 줄기 세포)를 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 표시된 PS-DNA-올리고(80량체)(점선), PS-올리고 DNA (40량체)(파선) 및 PS-올리고 DNA(20량체)(적색 영역)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체(토끼)로 처리하였다. 도 7a 아래 패널은 도 7a와 동일한 것을 보여주지만, PS-올리고 DNA(20량체)(적색 영역), PS-올리고 DNA(10량체)(청색선), PS-올리고 DNA(5량체)(적색선) PS-올리고 DNA(3량체)(오렌지색선), PS-올리고 DNA(2량체)(연녹색선) 및 PS-올리고 DNA(단량체)(진녹색선)에 접합시킨 변형된 항-STAT3 항체로 처리하였다. U251 세포를 10  $\mu$ L/mL의 표시된 변형된 항-STAT3 항체(토끼)로 처리하고 1시간 동안 37℃에서 항온반응시켰다. 세척 단계(PBS/1% BSA) 후, 세포를 회수하고 500  $\mu$ L의 2% 파라포름알데히드(15분)로 고정시킨 후, 세척 단계(PBS/1% BSA)를 후속하고 500 빙냉 메탄올(10분)로 진행하였다. 세척(PBS/1% BSA) 후, 세포를 PBS/1% BSA/1% 마우스 혈청으로 1시간 동안 4℃에서 차단하였다. 이후, 세포를 세척(PBS/1% BSA)하였고 2차 항체(회색선, 위 및 아래 패널(PBS 중  $\alpha$ Rb AF647 1:4,000)로 30분간 암실에서 염색하였다. 유세포 분석은 3회 최종 세척 단계(PBS/1% BSA) 후에 수행하였고, 300  $\mu$ L의 세척 완충액에 세포를 수집하였다. 미염색된 U251을 블랭크 대조군(회색 영역, 위 및 아래 패널)으로 사용하였다.

[0194] 도 7b는 전달된 항체-항원 복합체를 검출하기 위한 대안적인 웨스턴 블롯팅 분석을 보여준다. U251 세포는 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 PS-DNA 올리고 DNA(80량체)(제1 라인), PS-올리고 DNA(40량체)(제2 라인), PS-올리고 DNA(20량체)(제3 라인), PS-올리고 DNA(10량체)(제4 라인), PS-올리고 DNA(5량체)(제5 라인), PS-올리고 DNA(3량체)(제6 라인), PS-올리고 DNA(2량체)(제7 라인) 및 PS-올리고 DNA(단량체)(제8 라인)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체로 처리하였다. U251 세포는 10  $\mu$ L/mL의 표시된 변형된 항-STAT3 항체로 처리하였고 1시간 동안 37℃에서 항온반응하였다. 항온반응 및 PBS(2 mL)로 2회 세척 단계 후 세포를 500  $\mu$ L의 RIPA 완충액 중에 얼음 상에서 항온반응(30분) 후, 강력한 와류를 통해 용해시켰다. 전체 세포 용해물은 원심분리 단계(10분 13,000rpm, 4℃) 후 상등액을 수집하여 회수하였다. 각각의 전체 세포 용해물에 30  $\mu$ L의 재조합 단백질 G 아가로스 비드를 부가하고 밤새 4℃에 진탕 플랫폼 상에서 항온반응하였다. 비드를 펠렛화(2분, 2,400rpm, 4℃)하였고, 2회 500  $\mu$ L 빙냉 PBS로 세척하였다. 건조된 아가로스 비드에 30  $\mu$ L의 램리 완충액을 채우고 95℃에서 5분간 항온반응시키고, 20  $\mu$ L를 10% SDS-PAGE(나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동)에 로딩하고 125V에서 러닝하였다. 겔을 니트로셀룰로스 블롯팅막(0.45  $\mu$ m) 상에 블롯팅한 후, 막을 10% BSA/TBS-T(0.1% Tween20)로 1시간 동안 실온에 진탕 플랫폼 상에서 차단하였다. 이후, 막을 1차 항체(TBS-T 중 항-STAT3 1:1,000)와 밤새 4℃에 진탕 플랫폼 상에서 항온반응시켰다. TBS-T로 3회 세척 단계(TBS-T 사용 15분, 10분, 10분) 후, 막을 ECLTM 항-토끼 IgG, 홀스래디쉬 퍼옥시다제(TBS-T 중 1:10,000)와 4℃에서 진탕 플랫폼 상에서 2-4시간 동안 항온반응시켰다. 검출은 SuperSignal® 웨스트 듀라 익스텐디드 검출 키트를 사용해 4회 최종 세척 단계(TBS-T로 각각 5분) 후에 수행하였다.

[0195] 스트렙타비딘/바이오틴을 통해 PS-DNA 올리고(20량체)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체는 세포 침투할 수 있다. 도 8a: 스트렙타비딘/바이오틴을 통한 PS-올리고 DNA(20량체)(제1 라인) 및 PS-올리고 RNA(20량체)(제2 라인)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체로 처리된 U251 세포의 대안적인 웨스턴 블롯팅 분석. U251 세포를 10  $\mu$ L/mL의 표시된 변형된 항-STAT3 항체로 처리하고 1시간 동안 37℃에서 항온반응시켰다. 항온반응 및 PBS(2 mL)로 2회 세척 단계 후, 세포를 500  $\mu$ L의 RIPA 완충액 중에 얼음 상에서 항온반응(30분) 이후, 강력한 와류를 통해 용해시켰다. 전체 세포 용해물은 원심분리 단계(10분 13,000rpm, 4℃) 후 상등액을 수집하여 회수하였다. 각각의 전체 세포 용해물에 30  $\mu$ L의 재조합 단백질 G 아가로스 비드를 첨가하고 밤새 4℃에 진탕 플랫폼 상에서 항온반응시

켰다. 비드를 펠렛화(2분, 2,400rpm, 4℃)하였고, 2회 500  $\mu$ l의 빙냉 PBS로 세척하였다. 건조된 아가로스 비드에 30  $\mu$ l 램리 완충액을 채우고 95℃에서 5분간 항온반응시키고, 20  $\mu$ l를 10% SDS-PAGE(나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동)에 로딩하고 125V에서 러닝하였다. 겔을 니트로셀룰로스 블롯팅막(0.45  $\mu$ m) 상으로 블롯팅시킨 후, 그 막을 10% BSA/TBS-T(0.1% Tween20)로 1시간 동안 실온에 진탕 플랫폼 상에서 차단시켰다. 이후, 막을 1차 항체(TBS-T 중 항-STAT3 1:1,000)와 밤새 4℃에 진탕 플랫폼 상에서 항온반응시켰다. TBS-T로 3회 세척 단계(TBS-T로 15분, 10분, 10분 with TBS-T) 후, 막을 ECLTM 항-토끼 IgG, 홀스래디쉬 퍼옥시다제(TBS-T 중 1:10,000)와 4℃에 진탕 플랫폼 상에서 2-4시간 동안 항온반응시켰다. 검출은 SuperSignal® 웨스트 듀라 익스텐디드 검출 키트를 사용해 3회 최종 세척 단계(TBS-T로 각각 5분) 후에 수행하였다.

[0196]

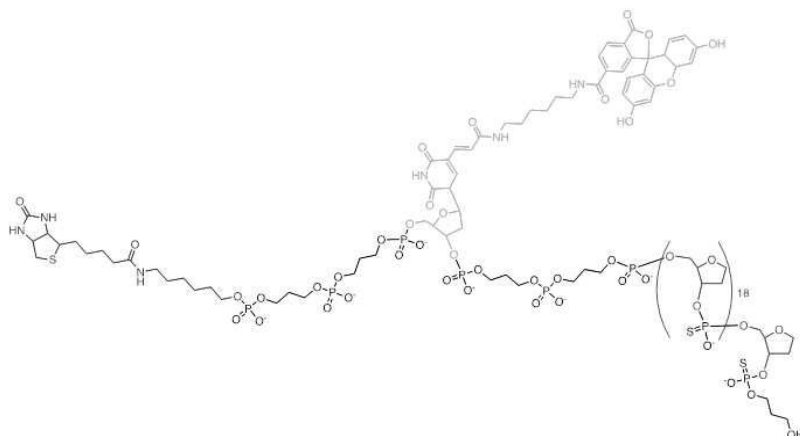
도 8b: 스트렙타비딘/바이오틴을 통한 PS-RNA 올리고(20량체)(흑색선) 및 PS- DNA 올리고(20량체)(적색 영역)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체로 처리된 U251 세포(인간 신경교종 줄기 세포)의 유세포 측정 분석. U251 세포를 10  $\mu$ l/mL의 표지된 변형된 항-STAT3 항체로 처리하고 1시간 동안 37℃에서 항온반응시켰다. 세척 단계(PBS/1% BSA) 후, 세포를 회수하고 500  $\mu$ l의 2% 파라포름알데히드(15분)로 고정시킨 후, 세척 단계(PBS/1% BSA)를 후속하고 500 빙냉 메탄올(10분)로 진행하였다. 세척(PBS/1% BSA) 후, 세포를 PBS/1% BSA/1% 마우스 혈청을 사용해 1시간 동안 4℃에서 차단하였다. 이후, 세포를 세척(PBS/1% BSA)하고 2차 항체(회색선)(PBS 중  $\alpha$ Rb AF647 1:4,000)로 30분간 암실에서 염색하였다. 유세포측정은 3회 최종 세척 단계(PBS/1% BSA) 후 수행하였고, 세포를 300  $\mu$ l의 세척 완충액에 수집하였다. 미염색된 U251을 블랭크 대조군(회색 영역)으로 사용하였다.

[0197]

5'-바이오틴 무염기 올리고의 구조

[0198]

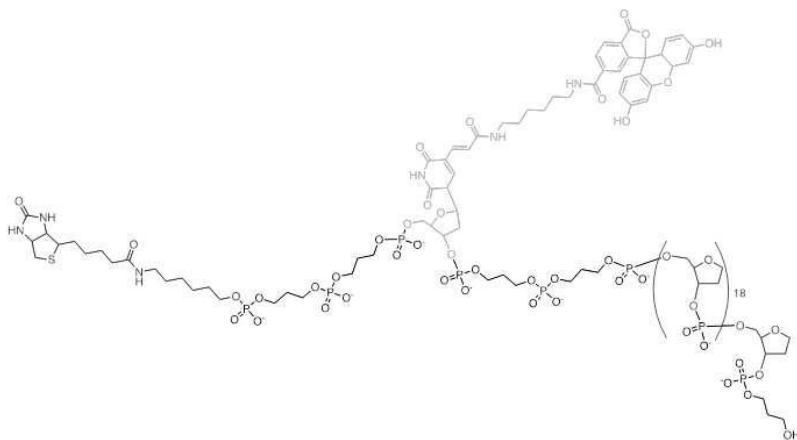
dR 사이의 PS 연결:



[0199]

[0200]

dR 사이의 PO 연결



[0201]

[0202]

도 9a는 스트렙타비딘/바이오틴을 통한 PO-중합체(20량체)(파선), PS-중합체(20량체)(흑색선), PS-올리고 DNA(20량체)(적색 영역)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체로 처리된 U251 세포(인간 신경교종 줄기 세포)의 유세포측정 분석을 도시한다. U251 세포는 10  $\mu$ l/mL의 특정 변형된 항-STAT3 항체로 처리하였고 1시간 동안 37℃에



서 항온반응시켰다. 세척 단계(PBS/1% BSA) 후에, 세포를 회수하고 500  $\mu$ l의 2% 파라포름알데히드(15분)로 고정시킨 후 세척 단계(PBS/1% BSA)를 후속하고 500 빙냉 메탄올(10분)을 진행하였다. 세척(PBS/1% BSA) 후, 세포를 PBS/1% BSA/1% 마우스 혈청으로 1시간 동안 4℃에서 차단하였다. 이후, 세포를 세척(PBS/1% BSA)하고, 2차 항체(회색선)(PBS 중  $\alpha$ Rb AF647 1:4,000)로 30분간 암실에서 염색하였다. 유세포 분석을 3회 최종 세척 단계(PBS/1% BSA) 및 300  $\mu$ l의 세척 완충액에 세포를 수집한 후 수행하였다. 미염색된 U251을 블랭크 대조군(회색 영역)으로 사용하였다.

[0203] 도 9a는 스트렙타비딘/바이오틴을 통한 PS-올리고 DNA(20량체)(제1 라인), PS-올리고 RNA(20량체)(제2 라인), PO-중합체(20량체)(제3 라인) 및 PS-중합체(20량체)(제4 라인)에 접합된 변형된 항-STAT3 항체로 처리한 U251 세포의 대안적인 웨스턴 블롯팅 분석을 도시한다. U251 세포를 10  $\mu$ l/mL의 특정 변형된 항-STAT3 항체로 처리하였고 1시간 동안 37℃에서 항온반응시켰다. 항온반응 후, 세포를 500  $\mu$ l의 RIPA 완충액 중 얼음에서 항온반응(30분) 후, 강력한 와류를 통해 용해시켰다. 전체 세포 용해물은 원심분리 단계(10분 13,000rpm, 4℃) 후 상등액을 수집하여 회수하였다. 각각의 전체 세포 용해물에 30  $\mu$ l의 재조합 단백질 G 아가로스 비드를 첨가하였고 밤새 4℃에 진탕 플랫폼 상에서 항온반응시켰다. 비드를 펠렛화(2분, 2,400rpm, 4℃)시키고 500  $\mu$ l의 빙냉 PBS로 2회 세척하였다. 건조된 아가로스 비드를 30  $\mu$ l의 램리 완충액으로 채우고 95℃에서 5분간 항온반응시키고, 20  $\mu$ l를 10% SDS-PAGE(나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동)에 로딩하고 125V에서 러닝하였다. 겔을 니트로셀룰로스 블롯팅막(0.45  $\mu$ m) 상에 블롯팅시키고, 그 막을 10% BSA/TBS-T(0.1% Tween20)로 1시간 동안 실온에서 진탕 플랫폼 상에서 차단시켰다. 이후, 막을 1차 항체(TBS-T 중 항-STAT3 1:1,000)와 밤새 4℃에 진탕 플랫폼 상에서 항온반응시켰다. TBS-T로 3회 세척 단계(TBS-T로 15분, 10분, 10분) 후, 막을 ECLTM 항-토끼 IgG, 홀스래디쉬 퍼옥시다제(TBS-T 중 1:10,000)와 4℃에 진탕 플랫폼 상에서 2-4시간 동안 항온반응시켰다. 검출은 SuperSignal® 웨스트 듀라 익스텐디드 검출 키트를 사용해 4회 최종 세척 단계(TBS-T로 각각 5분) 후에 수행하였다.

## [0204] 실시예 2

[0205] 항-T-Bet 세포 침투성 항체를 통한 Th1 면역성 조정

[0206] T-bet(T-box 전사 인자 TBX21(TBX21))은 Th1 분화에 핵심적인 전사 인자이다. T-Bet의 억제제는 2형 당뇨병, 비만 및 다른 염증성 질환을 치료할 수 있다. 대조적으로, T-bet의 자극은 항종양 및 항바이러스 면역성을 활성화시킬 수 있다. 그러나, T-bet 조정인자는 존재하지 않는다. 여기서, 본 출원인은 특정 T-bet 항체가, 변형된 경우(아비딘/스트렙타비딘을 통해 20량체인 포스포티오에이트화(PS) DNA 올리고머에 비공유적으로 연결), 효과적인 T-bet 효현제로서 제공되어, Th1 면역 반응을 자극하고, 수지상 세포의 자극을 통해 종양에 CD8<sup>+</sup> T 세포를 동원하고, 종양 성장을 억제함을 보여주었다.

[0207] 세포 침투성 T-Bet 항체 치료는 마우스 흑색종 발생을 제한한다.

[0208] 변형된 세포 침투성 T-Bet 항체의 치료적 효능을 시험하기 위해, B16 마우스 흑색종 종양을 국소적으로 10  $\mu$ g/용량으로 이틀마다 처리하고 종양 성장을 모니터링하였다. PBS 처리군(비히클 대조군) 또는 변형된 비표적 IgG 처리군과 비교하여, 변형된 항-T-Bet 항체의 투여는 유의한 종양 성장 제한을 야기하였다(도 10).

[0209] 변형된 T-Bet 항체는 항-종양 획득 면역 반응을 활성화시킨다.

[0210] T-Bet은 상이한 유형의 면역 세포, 특히 T 세포, B 세포 및 수지상 세포(DC)에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 종양 침윤성 림프구는 도 10의 범례에 언급된 바와 같이 처리된 B16 마우스 흑색종으로부터 단리하였고, 유세포 측정 분석을 수행하였다. T-Bet 항체의 처리는 Th1 면역 반응을 비롯하여 기능성 세포독성 T 림프구를 유의하게 향상시켰다(IFN  $\gamma$ -발현 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포에서 증가). 또한, T-Bet 항체의 생체내 처리는 CD4<sup>+</sup> T 세포에서 T-Bet 발현을 촉진시켜, Th1 면역 반응을 자극시키는 T-bet 효현제로서 제공됨을 시사한다(도 11).

[0211] 세포 침투성 T-Bet 항체는 또한 DC를 표적으로 하고 그들의 항원-제시 기능을 향상시킨다.

[0212] 상이한 면역 세포에서 T-Bet 항체 흡수의 상세한 분석은 이 항체가 또한 출원인들이 CD11c<sup>+</sup> DC로서 더욱 동정한, CD3<sup>-</sup> 세포에 의해서도 흡수됨을 밝혔다(데이터 도시하지 않음). 변형된 T-Bet 항체의 처리는 CD86 및 MHC II의 발현을 통해, DC의 항원-제시 기능을 촉진할 수 있었다(도 12a 및 도 12b).

## [0213] 실시예 3

- [0214] 세포 침투성 항체에 의한 FoxP3 차단은 종양 Treg 및 종양 진행을 저해한다.
- [0215] Treg(조절성 T 세포)는 항-종양/바이러스 면역 반응을 억제하여, 다양한 면역요법을 방해한다. Treg를 감소시키기 위한 신규한 면역요법제를 개발하는 것이 매우 중요하다. FoxP3은 Treg의 유지 및 기능에 필수적이다. 그러나, FoxP3은 이의 세포내 분포로 인해 약물 표적화가 불가능한 것으로 여겨진다. 여기서 본 출원인은 PS-변형된 FoxP3 항체가 우선적으로 FoxP3-양성 세포를 표적으로 삼을 수 있고, FoxP3 및 하류 이펙터, CTLA4의 수준을 억제할 수 있음을 보여준다. 보다 중요하게, 변형된 FoxP3 항체의 전신 투여는 종양-침윤성 Treg 및 종양 성장을 감소시킬 수 있다.
- [0216] 세포 침투성 FoxP3 항체는 Treg에 의해 우선적으로 유지된다.
- [0217] 변형된 세포 침투성 FoxP3 항체의 특이성을 평가하기 위해, FoxP3-GFP-Tg 마우스로부터 신선하게 분리한 비장 세포를 10  $\mu$ l/mL의 변형된 FoxP3 항체 또는 대조군으로 제공된 10  $\mu$ l/mL의 변형된 IgG와 함께 배양하였다. 2시간 후 세포를 수집하고, 세척하고 항체에 접합된 PS 올리고를 표지하기 위해 사용된, Cy5의 검출을 위한 유세포 측정 분석을 수행하였다. 특히, FoxP3+ Treg는 비-Treg보다 훨씬 더 많이 변형된 FoxP3 항체를 유지할 수 있었다. 그리고 FoxP3 항체는 대조군 변형된 IgG 군에서 보다 훨씬 더 Treg에서 더욱 검출가능하였다(도 13).
- [0218] 변형된 FoxP3 항체를 사용한 전신 치료는 FoxP3-양성 및 CTLA4-양성 CD4+ T 세포(Treg)를 감소시키고 흑색종 성장을 저지한다.
- [0219] T 세포 상에서 변형된 FoxP3의 효과를 조사하기 위해, 변형된 IgG 또는 FoxP3 항체(10  $\mu$ g/마우스)를 11일까지 2일마다, B16 종양 세포 접종 후 우측에, C57BL/6 마우스에게 전신으로 투여하였다. 종양 부피는 매일 또는 2일마다 모니터링하였고 모든 동물은 19일 후에 안락사시켰다. 다음으로 종양을 수집하고 종양 침윤성 림프구는 FoxP3 및 CTLA4 양성 T 세포를 검출하기 위한 추가 유세포측정 분석을 위해 분리하였다. 변형된 비표적화 IgG와 비교하여, 변형된 항-FoxP3 항체의 전신 투여는 유의하게 흑색종 진행을 감소시켰다. 종양-침윤성 림프구의 추가 분석은 FoxP3-양성 및 CTLA4-양성 CD4+ T 세포의 비율이 감소되어, 변형된 FoxP3 항체에 의한 종양 Treg의 차단을 시사함을 보여주었다(도 14).
- [0220] 실시형태
- [0221] 실시형태 1.
- [0222] (i) 세포 비침투성 단백질;
- [0223] (ii) 포스포로티오에이트 핵산; 및
- [0224] (iii) 상기 포스포로티오에이트 핵산을 상기 세포 비침투성 단백질에 부착시키는 비공유 링커로서, 상기 비공유 링커는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착된 바이오틴 결합 도메인을 포함하는 것인 비공유 링커
- [0225] 를 포함하고, 여기서 상기 포스포로티오에이트 핵산은 상기 세포 비침투성 단백질의 세포내 전달을 향상시키는 것인 세포 침투성 접합체.
- [0226] 실시형태 2. 실시형태 1의 세포 침투성 접합체로서, 상기 바이오틴 결합 도메인은 아비딘 도메인이다.
- [0227] 실시형태 3. 실시형태 1의 세포 침투성 접합체로서, 상기 바이오틴 결합 도메인은 스트렙타비딘 도메인이다.
- [0228] 실시형태 4. 실시형태 3의 세포 침투성 접합체로서, 상기 스트렙타비딘 도메인은 복수의 바이오틴 도메인에 결합한다.
- [0229] 실시형태 5. 실시형태 4의 세포 침투성 접합체로서, 상기 스트렙타비딘 도메인은 약 4개 바이오틴 도메인에 결합한다.
- [0230] 실시형태 6. 실시형태 1-5 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체로서, 상기 바이오틴 결합 도메인은 상기 세포 비침투성 단백질에 공유적으로 부착된다.
- [0231] 실시형태 7. 실시형태 1-6 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체로서, 복수의 바이오틴 결합 도메인이 상기 세포 비침투성 단백질에 부착된다.
- [0232] 실시형태 8. 실시형태 1-7 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체로서, 상기 바이오틴 도메인은 상기 포스포로티오에이트 핵산에 부착된다.
- [0233] 실시형태 9. 실시형태 8의 세포 침투성 접합체로서, 상기 바이오틴 도메인은 상기 포스포로티오에이트 핵산에

공유적으로 부착된다.

- [0234] 실시형태 10. 실시형태 8 또는 9의 세포 침투성 접합체로서, 복수의 포스포로티오에이트 핵산은 상기 바이오틴 도메인에 부착된다.
- [0235] 실시형태 11. 실시형태 1-10 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체로서, 상기 포스포로티오에이트 핵산은 길이가 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 또는 그 이상의 핵산 잔기이다.
- [0236] 실시형태 12. 실시형태 11의 세포 침투성 접합체로서, 상기 포스포로티오에이트 핵산은 길이가 약 10개 내지 약 30개 핵산 잔기이다.
- [0237] 실시형태 13. 실시형태 11의 세포 침투성 접합체로서, 상기 포스포로티오에이트 핵산은 길이가 약 20개 핵산 잔기이다.
- [0238] 실시형태 14. 실시형태 1 내지 12 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체로서, 상기 세포 비침투성 단백질은 25 kD 이 넘는 분자량을 갖는다.
- [0239] 실시형태 15. 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체로서, 상기 세포 비침투성 단백질은 약 25 kD 내지 약 750 kD의 분자량을 갖는다.
- [0240] 실시형태 16. 실시형태 1 내지 15 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체로서, 상기 세포 비침투성 단백질은 항체이다.
- [0241] 실시형태 17. 실시형태 16의 세포 침투성 접합체로서, 상기 항체는 IgG 항체이다.
- [0242] 실시형태 18. 실시형태 16의 세포 침투성 접합체로서, 상기 항체는 IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체이다.
- [0243] 실시형태 19. 실시형태 16의 세포 침투성 접합체로서, 상기 항체는 Fv 단편이다.
- [0244] 실시형태 20. 실시형태 16 내지 19 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체로서, 항체는 인간화 항체이다.
- [0245] 실시형태 21. 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체로서, 상기 세포 비침투성 단백질은 세포 내 표적에 결합한다.
- [0246] 실시형태 22. 실시형태 21의 세포 침투성 접합체로서, 상기 세포내 표적은 자가면역 질환, 염증성 질환, 대사 장애, 발달 장애, 심혈관 질환, 간 질환, 장 질환, 감염성 질환, 내분비 질환, 신경학적 장애, 및 암으로 이루어진 군에서 선택된 질환의 표적이다.
- [0247] 실시형태 23. 실시형태 21 또는 22의 세포 침투성 접합체로서, 상기 세포내 표적은 신호전달 분자 또는 전사 인자이다.
- [0248] 실시형태 24. 실시형태 23의 세포 침투성 접합체로서, 상기 신호전달 분자는 포스파타제 또는 키나제이다.
- [0249] 실시형태 25. 실시형태 21의 세포 침투성 접합체로서, 상기 세포내 표적은 암 표적이다.
- [0250] 실시형태 26. 실시형태 21의 세포 침투성 접합체로서, 상기 세포내 표적은 STAT3, 및 Src로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0251] 실시형태 27. 실시형태 21의 세포 침투성 접합체로서, 상기 세포내 표적은 인산화된 Src이다.
- [0252] 실시형태 28. 실시형태 1 내지 27 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체로서, 상기 세포 비침투성 단백질은 상기 단백질에 부착되는 표지, 소형 분자 또는 기능성 핵산을 더 포함한다.
- [0253] 실시형태 29. 실시형태 1 내지 28 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체로서, 상기 세포 침투성 접합체는 세포내 표적에 결합된다.
- [0254] 실시형태 30. 세포 침투성 접합체를 형성하는 방법으로서, 상기 방법은 세포 비침투성 단백질을 포스포로티오에이트 핵산과 접촉시키는 단계로서, 상기 세포 비침투성 단백질은 바이오틴 결합쌍의 제1 구성원에 부착되고 상기 포스포로티오에이트 핵산은 상기 바이오틴 결합쌍의 제2 구성원에 부착되는 것인 단계를 포함하고, 이에 의해 바이오틴 도메인과 바이오틴 결합 도메인 사이에 비공유 결합을 포함하는 세포 침투성 접합체를 형성한다.
- [0255] 실시형태 31. 실시형태 30의 방법으로서, 상기 바이오틴 결합쌍의 상기 제1 구성원은 바이오틴 결합 도메인이다.

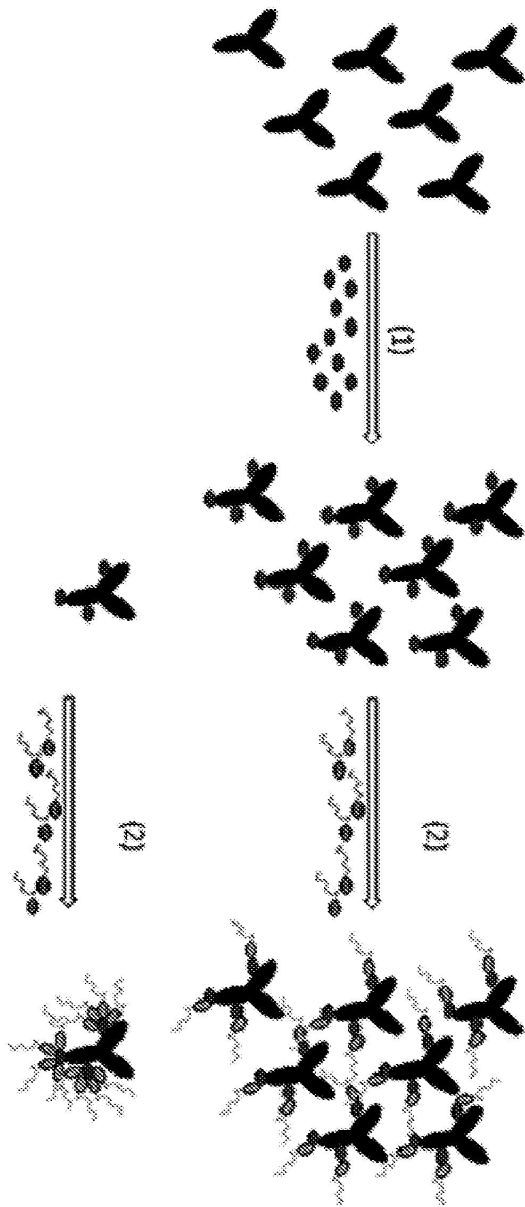
- [0256] 실시형태 32. 실시형태 30의 방법으로서, 상기 바이오틴 결합쌍의 상기 제2 구성원은 바이오틴 도메인이다.
- [0257] 실시형태 33. 실시형태 30의 방법으로서, 상기 바이오틴 결합쌍의 상기 제1 구성원은 바이오틴 도메인이다.
- [0258] 실시형태 34. 실시형태 30의 방법으로서, 상기 바이오틴 결합쌍의 상기 제2 구성원은 바이오틴 결합 도메인이다.
- [0259] 실시형태 35. 실시형태 30의 방법으로서, 상기 포스포로티오에이트 핵산은 공유결합 반응성 모이어티를 포함한다.
- [0260] 실시형태 36. 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체를 포함하는 세포.
- [0261] 실시형태 37. 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0262] 실시형태 38. 실시형태 37의 약학 조성물로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질에 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산을 부착시키는 제2 비공유 링커를 포함하는 제2 세포 비침투성 단백질을 더 포함한다.
- [0263] 실시형태 39. 실시형태 38의 약학 조성물로서, 상기 비공유 링커는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착되는 바이오틴 결합 도메인을 포함한다.
- [0264] 실시형태 40. 실시형태 38의 약학 조성물로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합한다.
- [0265] 실시형태 41. 실시형태 40의 약학 조성물로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 실시형태 21 내지 27 중 어느 하나의 상기 세포 비침투성 단백질과 상이한 세포내 표적 상의 에피토프에 결합한다.
- [0266] 실시형태 42. 실시형태 41의 약학 조성물로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포내 표적에 결합한다.
- [0267] 실시형태 43. 실시형태 38 내지 42 중 어느 하나의 약학 조성물로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 항체이다.
- [0268] 실시형태 44. 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체 또는 실시형태 37의 약학 조성물 및 사용 설명서를 포함하는 키트.
- [0269] 실시형태 45. 실시형태 44의 키트로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질에 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산을 부착시키는 제2 비공유 링커를 포함하는 제2 세포 비침투성 단백질을 더 포함한다.
- [0270] 실시형태 46. 실시형태 45의 키트로서, 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 상기 접합체 및 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 개별 용기에 존재한다.
- [0271] 실시형태 47. 실시형태 45 또는 46의 키트로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 세포 비침투성 단백질과 상이한 세포내 표적 상의 에피토프에 결합한다.
- [0272] 실시형태 48. 실시형태 45 내지 47 중 어느 하나의 키트로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포내 표적에 결합한다.
- [0273] 실시형태 49. 실시형태 45 내지 48 중 어느 하나의 키트로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포 비침투성 단백질 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물로서 제제화된다.
- [0274] 실시형태 50. 실시형태 45 내지 49 중 어느 하나의 키트로서, 제2 세포 비침투성 단백질은 항체이다.
- [0275] 실시형태 51. 세포를 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 상기 세포 침투성 접합체와 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 비침투성 단백질을 세포로 전달시키는 방법.
- [0276] 실시형태 52. 실시형태 51의 방법으로서, 상기 세포 비침투성 단백질은 세포질 내 핵 단백질에 결합하여 세포 비침투성 단백질-핵 단백질 복합체를 형성시킨다.
- [0277] 실시형태 53. 실시형태 52의 방법으로서, 상기 세포 비침투성 단백질-핵 단백질 복합체는 세포의 핵으로 들어갈 수 없다.
- [0278] 실시형태 54. 이를 필요로 하는 피험체에서 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 세포 침투성 접합체의 유효량을 피험체에게 투여하여, 상기 피험체에서 질환을 치료하는 단계를 포함한다.

- [0279] 실시형태 55. 실시형태 54의 방법으로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질에 1 이상의 포스포로티오에이트 핵산을 부착시키는 제2 비공유 링커를 포함하는 제2 세포 비침투성 단백질을 피험체에게 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0280] 실시형태 56. 실시형태 55의 방법으로서, 상기 비공유 링커는 바이오틴 도메인에 비공유적으로 부착된 바이오틴 결합 도메인을 포함한다.
- [0281] 실시형태 57. 실시형태 56의 방법으로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 접합체와 상이한 세포내 표적 상의 에피토프에 결합한다.
- [0282] 실시형태 58. 실시형태 57의 방법으로서, 제2 세포 비침투성 단백질은 제2 세포내 표적에 결합한다.
- [0283] 실시형태 59. 실시형태 55 내지 58 중 어느 하나의 방법으로서, 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 접합체 및 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 동시에 투여된다.
- [0284] 실시형태 60. 실시형태 55 내지 58 중 어느 하나의 방법으로서, 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 상기 접합체 및 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 순차적으로 투여된다.
- [0285] 실시형태 61. 실시형태 55 내지 60 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 제2 세포 비침투성 단백질은 항체이다.
- [0286] 실시형태 62. 실시형태 55 내지 61 중 어느 하나의 방법으로서, 제2 치료제를 피험체에게 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0287] 실시형태 63. 실시형태 55 내지 62 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 질환은 자가면역 질환, 발달 장애, 염증성 질환, 대사 장애, 심혈관 질환, 간 질환, 장 질환, 감염성 질환, 내분비 질환, 신경학적 장애, 및 암으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0288] 실시형태 64. 실시형태 63의 방법으로서, 상기 질환은 암이다.
- [0289] 실시형태 65. 실시형태 55의 방법으로서, 접합체의 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합하고 세포내 표적은 STAT3 또는 Src이다.
- [0290] 실시형태 66. 실시형태 55의 방법으로서, 접합체의 세포 비침투성 단백질은 세포내 표적에 결합하고 세포내 표적은 인산화된 Src이다.
- [0291] 실시형태 67. 실시형태 55의 방법으로서, 접합체의 세포 비침투성 단백질은 STAT3에 특이적으로 결합하는 항체이고 제2 세포 비침투성 단백질은 STAT3의 다른 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체이다.

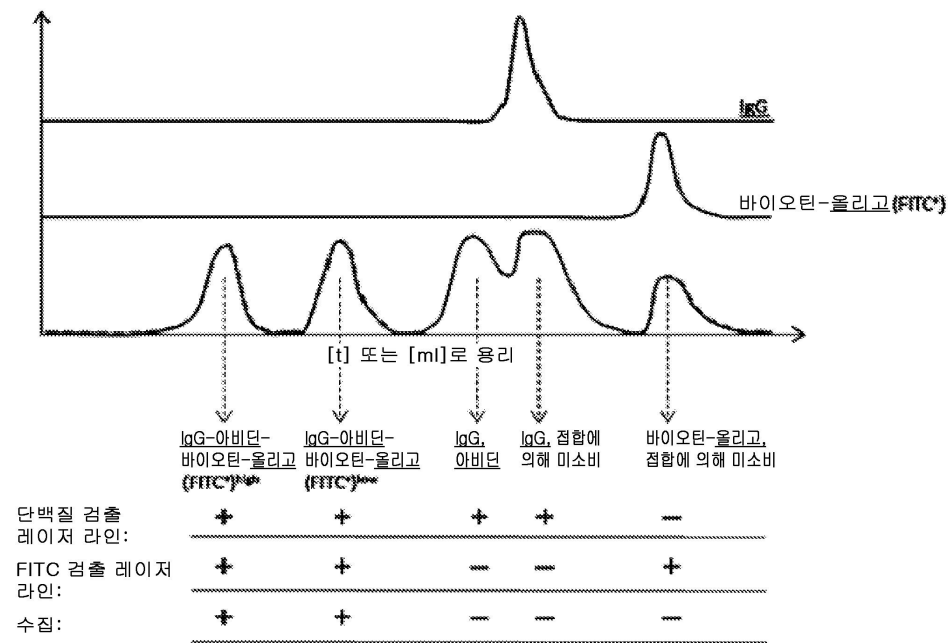


도면

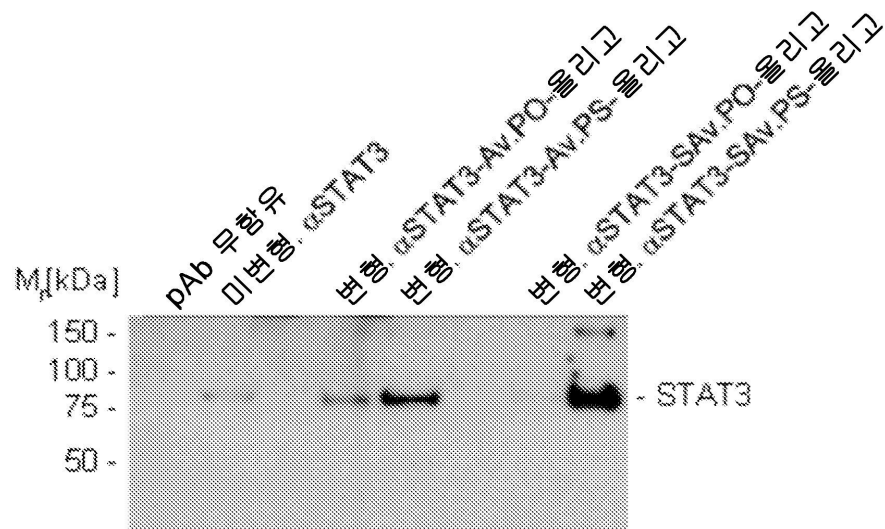
도면1



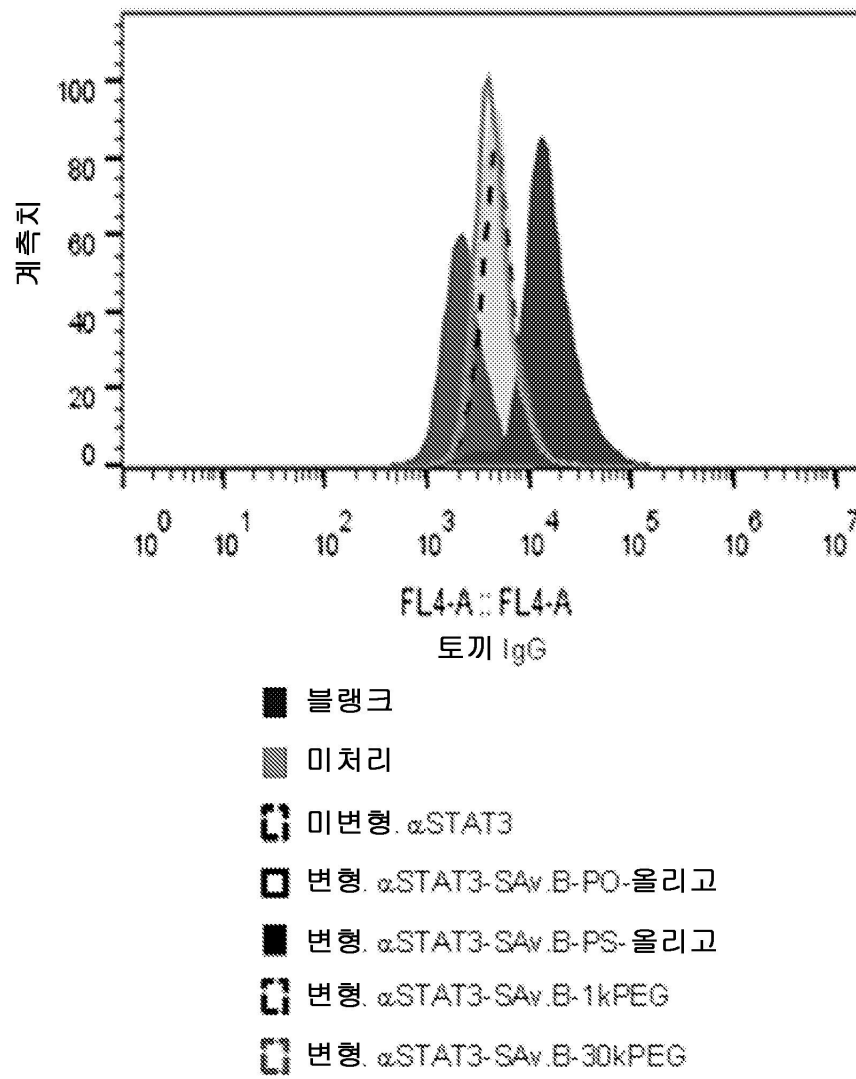
도면2



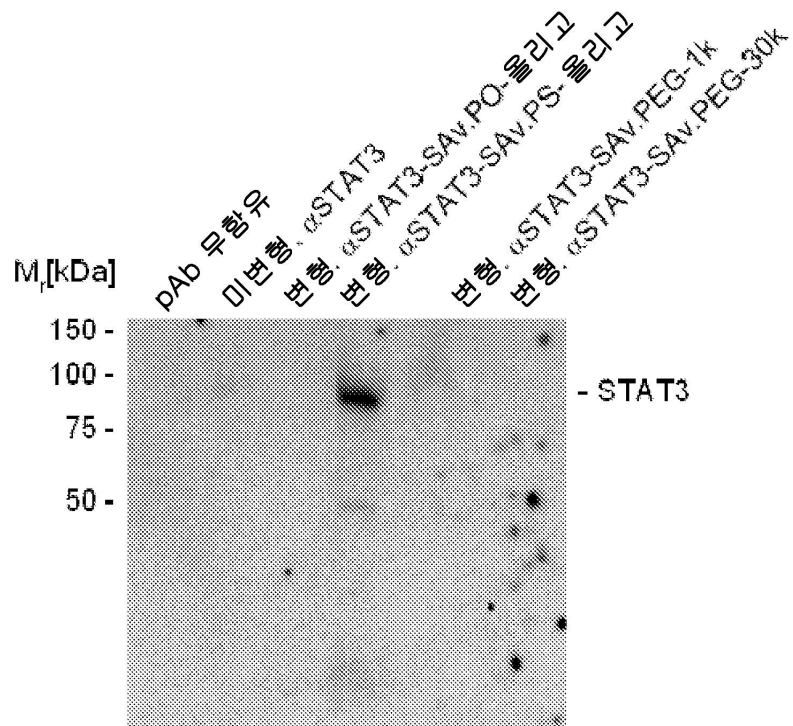
도면3



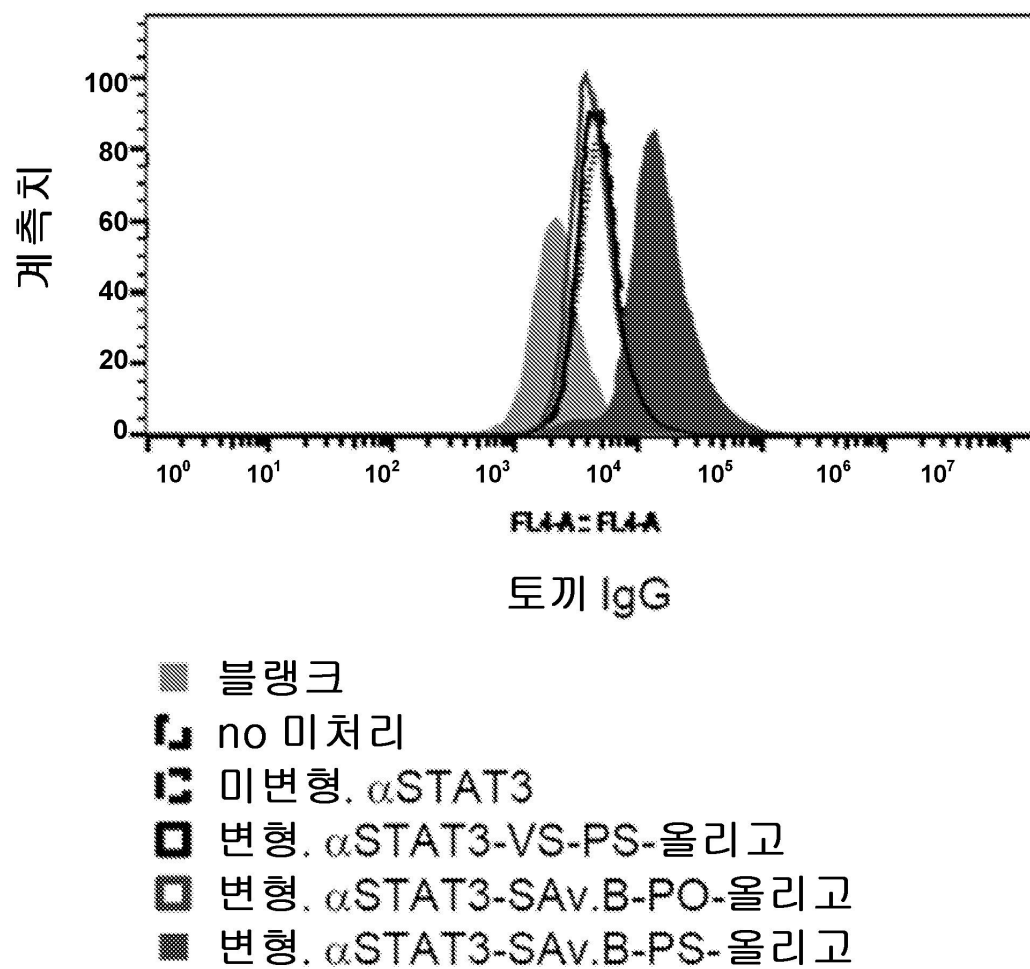
도면4a



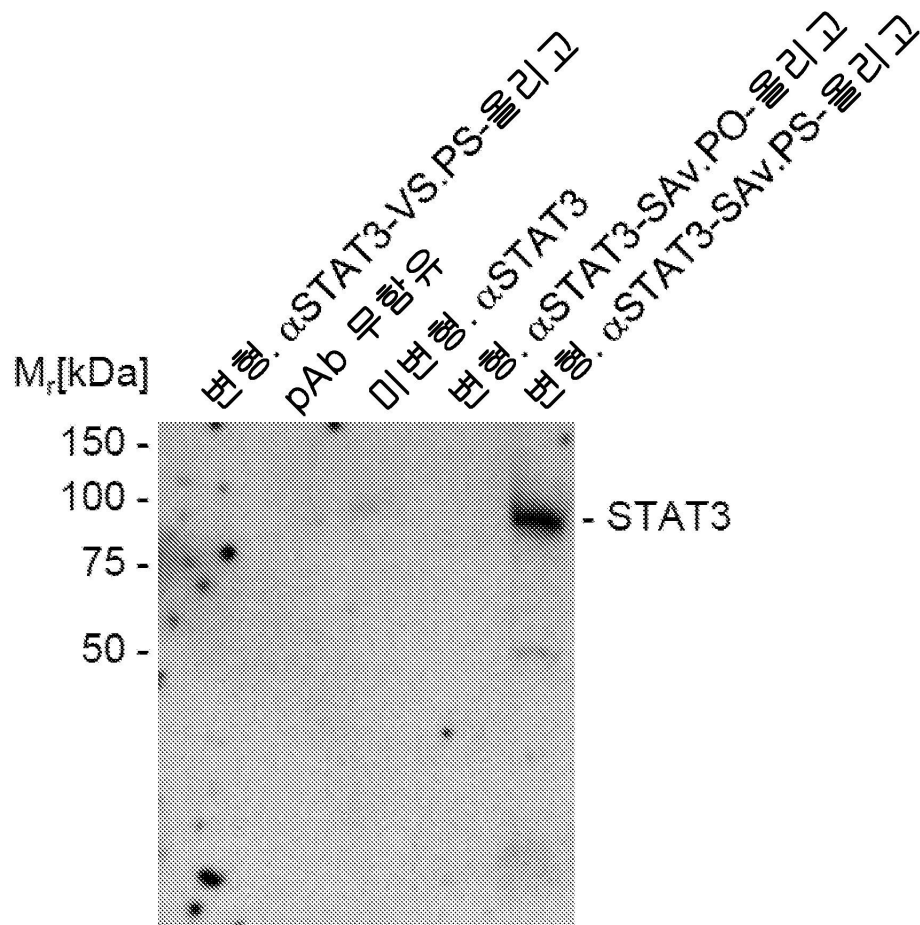
도면4b



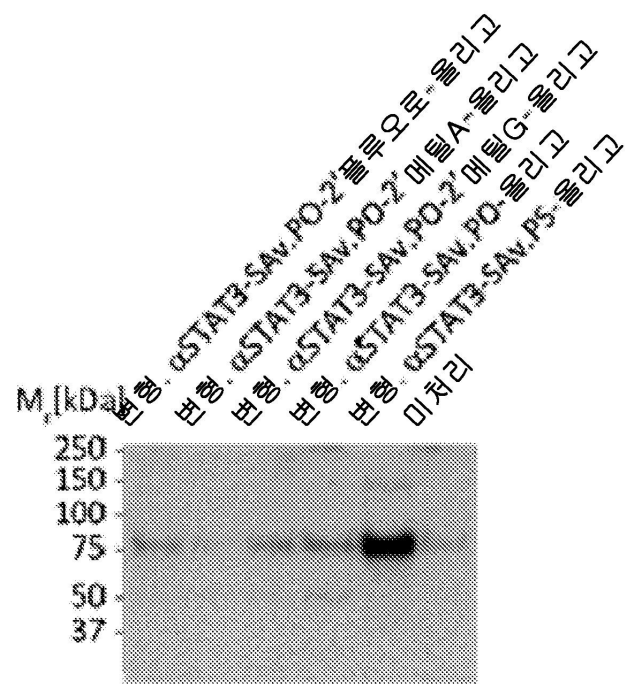
도면5a



도면5b

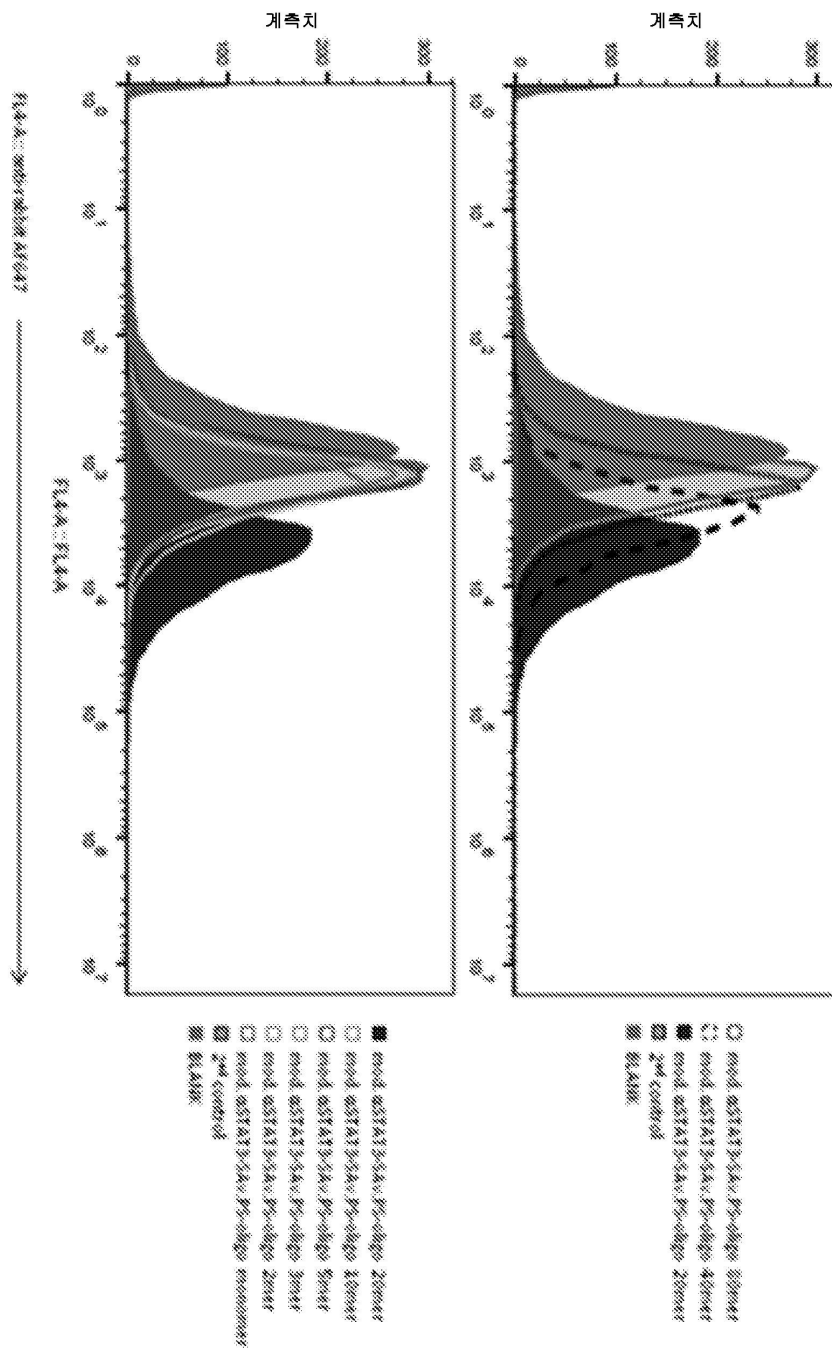


도면6

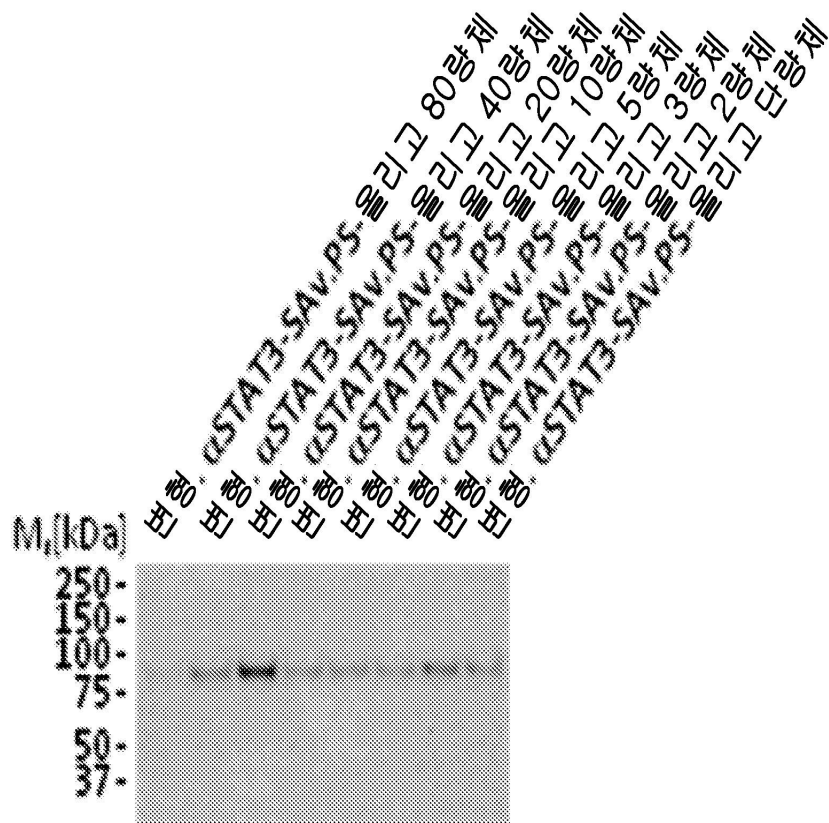




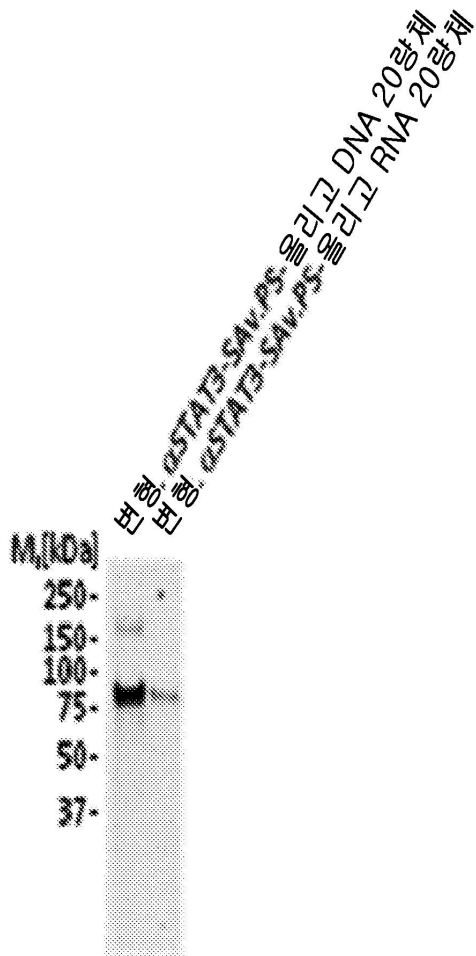
도면7a



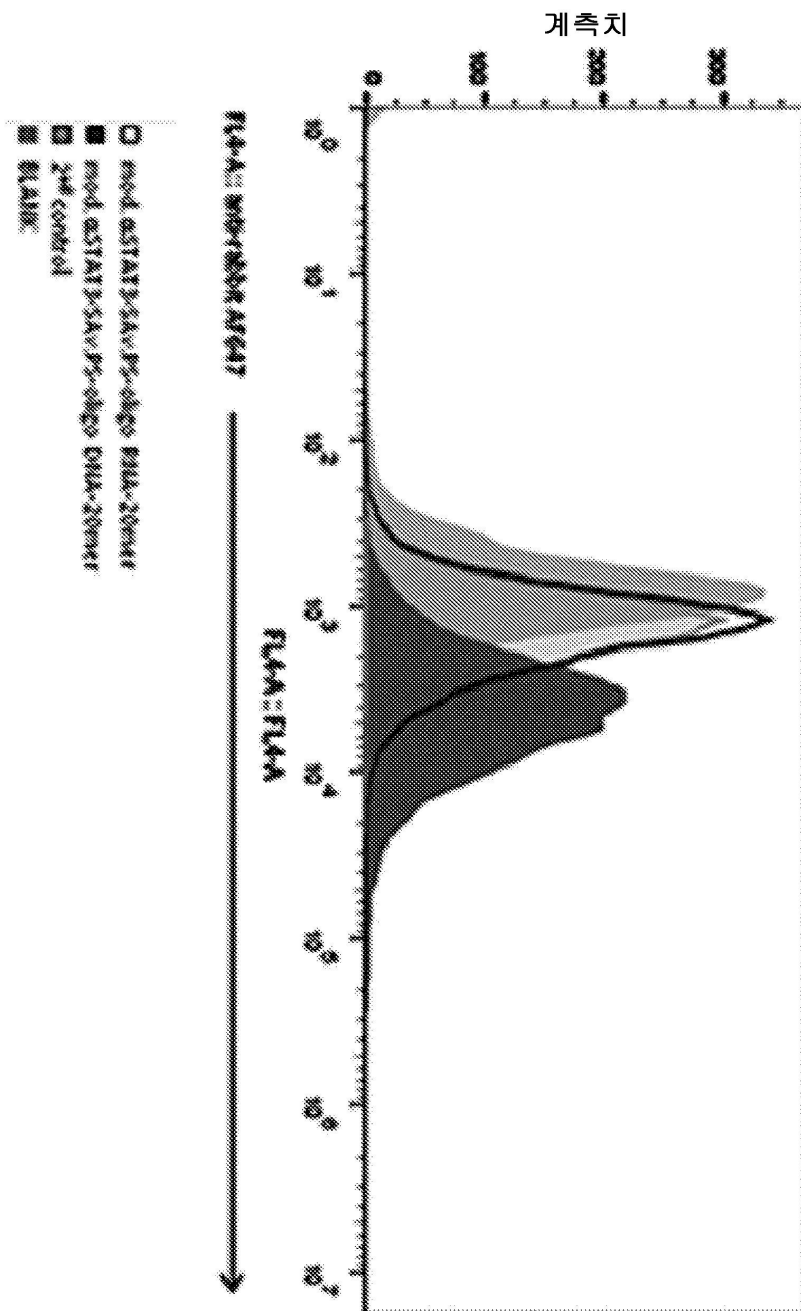
도면7b



도면8a

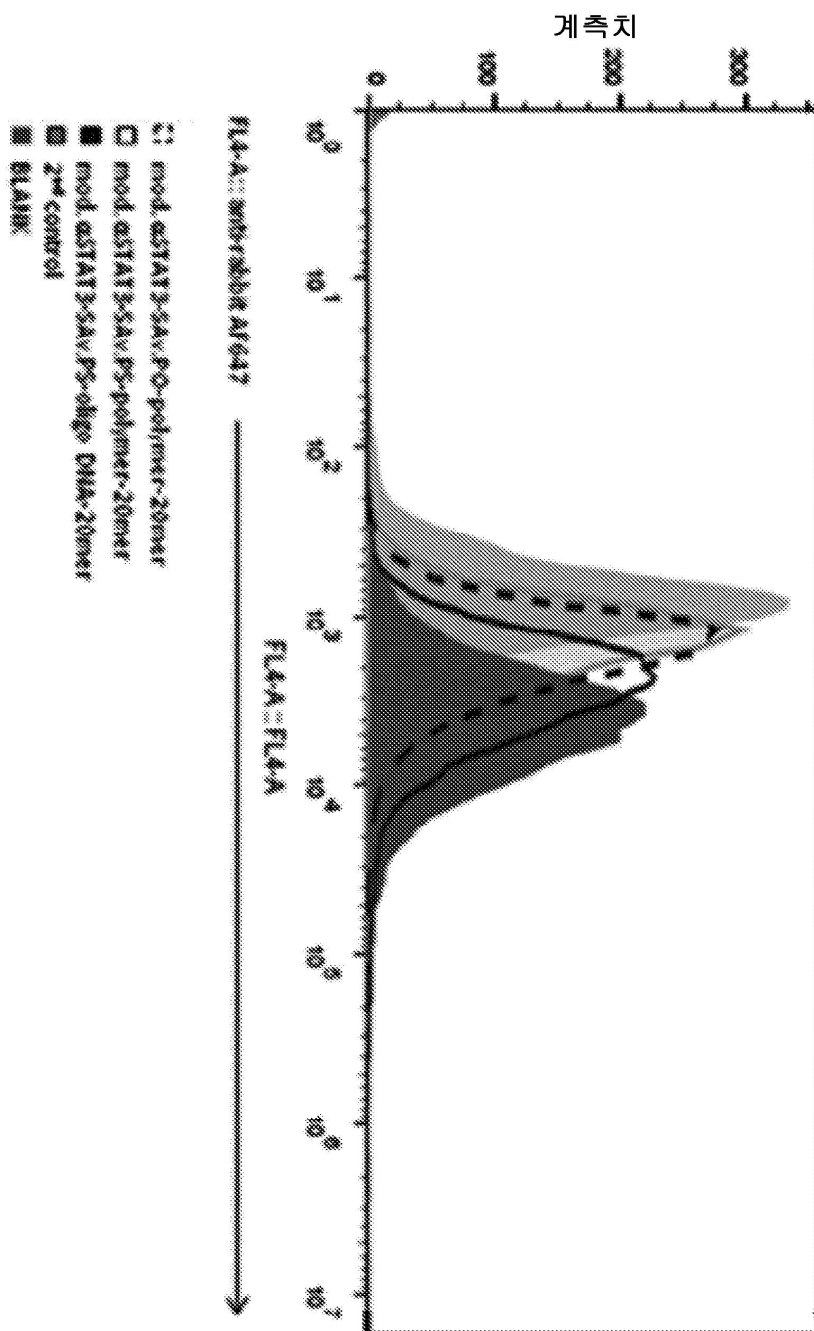


도면8b

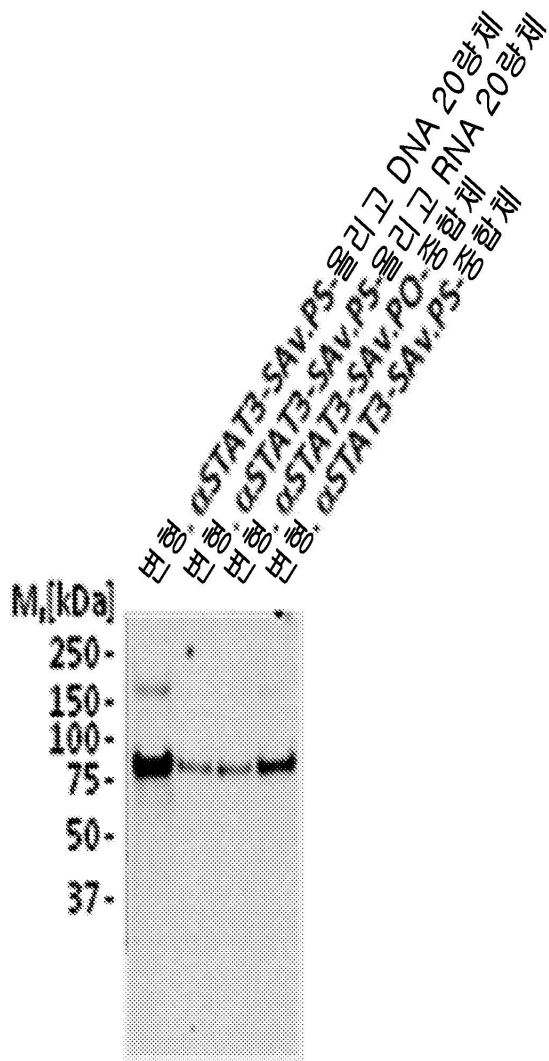




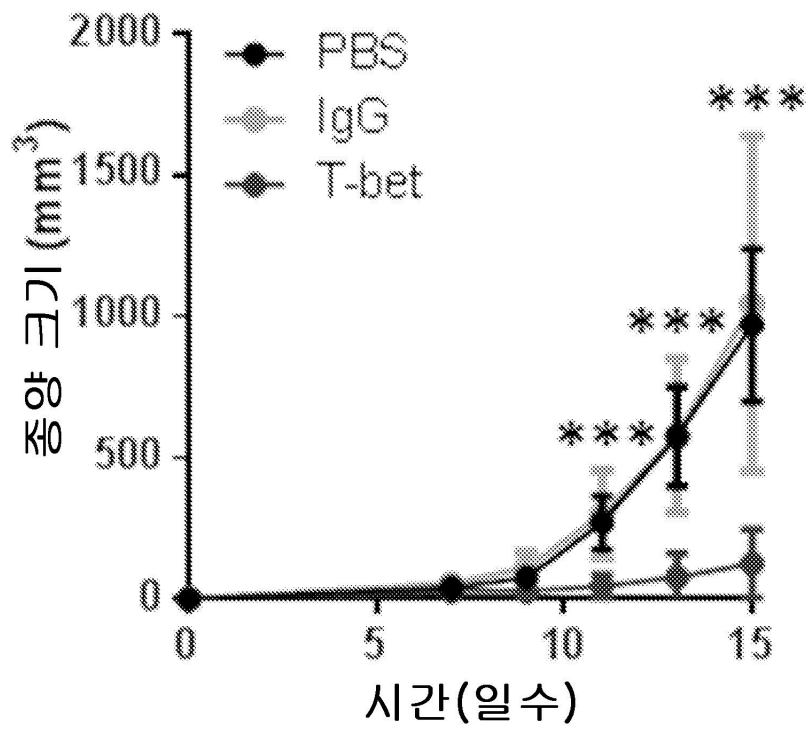
도면9a



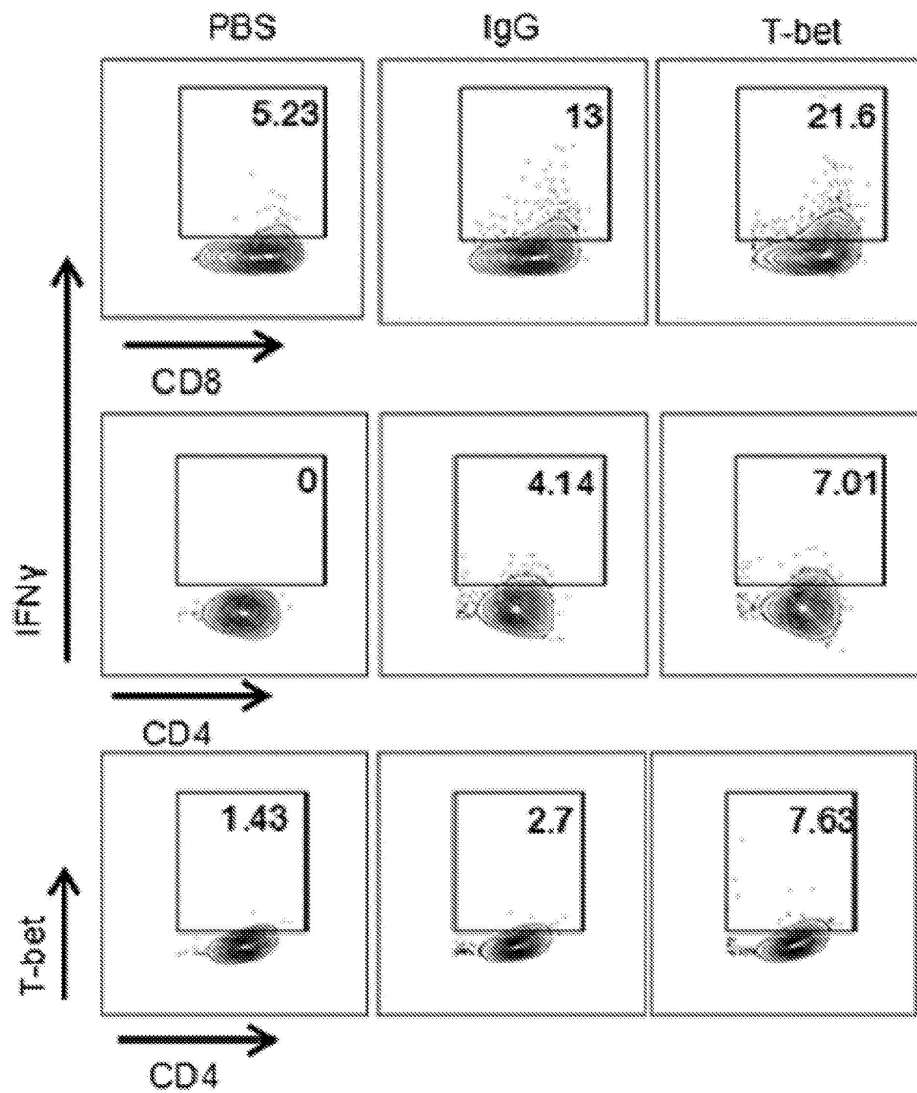
도면9b



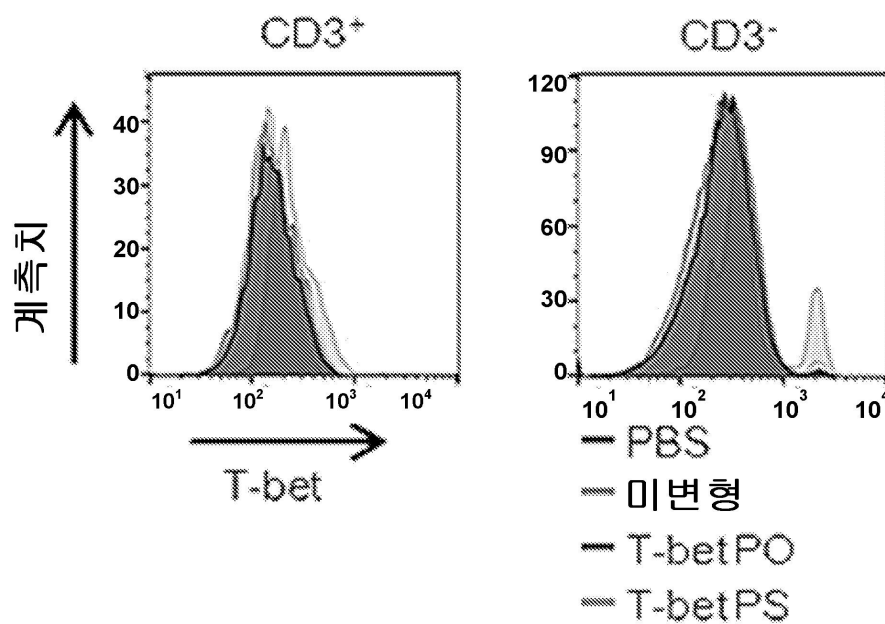
도면10



도면11

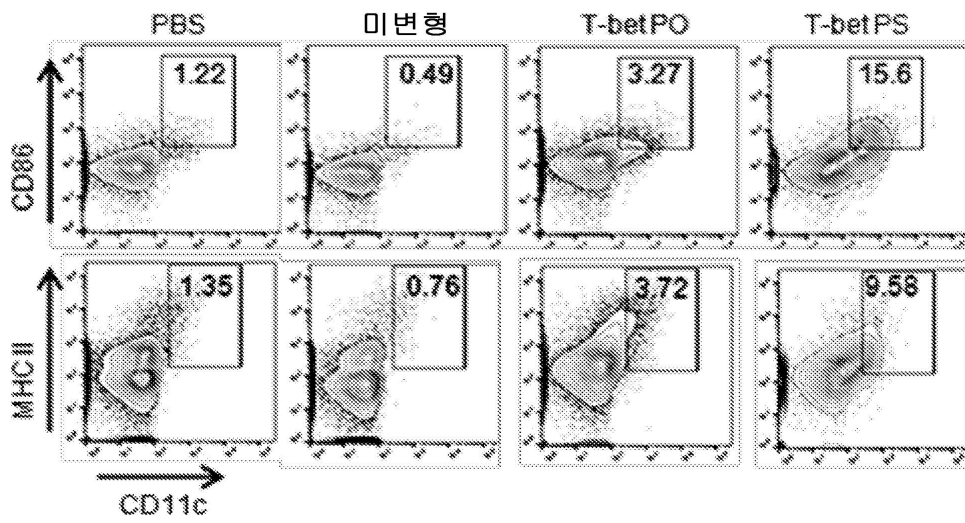


도면12a

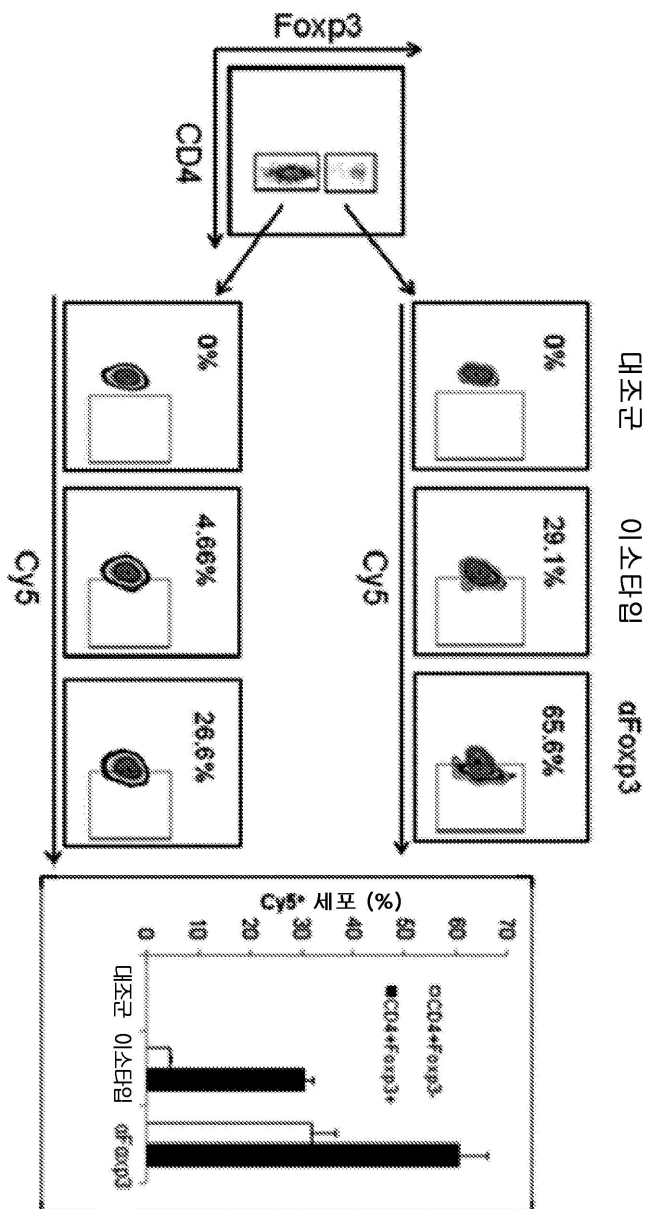




도면12b



도면13



도면14

