



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0042804
(43) 공개일자 2008년05월15일

(51) Int. Cl.
C07K 14/22 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7002479
(22) 출원일자 2008년01월30일
심사청구일자 없음
번역문제출일자 2008년01월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/028022
국제출원일자 2006년07월19일
(87) 국제공개번호 WO 2007/012004
국제공개일자 2007년01월25일
(30) 우선권주장
11/244,105 2005년10월06일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
더 보드 오브 트러스티즈 오브 더 유니버시티 오브 일리노이
미국, 일리노이주 60612, 시카고, 슈이트 446, 웨스트 폴크 스트리트 1853, 오피스 오브 테크놀로지 매니지먼트
(72) 발명자
홍, 창
미국, 일리노이 60607, 시카고, 아של랜드 애버뉴 901, 아파트먼트 704
야마다, 토루
미국, 일리노이 60148, 롬바드, 이스트 노쓰 브로드웨이스트리트 422
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강명구

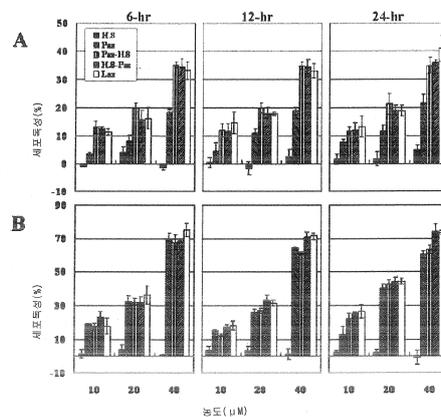
전체 청구항 수 : 총 44 항

(54) 뇌혈관장벽을 통하여 뇌 암세포 내로 침투하는 운반체 및이의 이용 방법

(57) 요약

본 발명에서는 적하 화합물을 뇌 암세포 내로 및/또는 뇌혈관장벽을 통하여 운반하기 위한 방법과 물질을 제시한다. 적하 화합물의 운반은 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질로부터 유래된 단백질 운반 펩티드, 예를 들면, Laz의 이용으로 달성된다. 또한, 본 발명에서는 펜타펩티드 AAEAP로 구성되는 합성 운반 펩티드를 제시한다. 더 나아가, 본 발명에서는 암, 특히, 뇌암 및 다른 뇌-관련된 장애를 치료하는 방법을 제시한다. 이에 더하여, 본 발명에서는 암, 특히, 뇌암을 영상하고 진단하는 방법을 제시한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

피알로, 아르세니오

포르투갈, 리스본 1500-401, 로트 23 3 에스쿠, 프
라세타마에스트로 이보 크루즈

다스 구프타, 타파스

미국, 일리노이 60305, 리버 포레스트, 잭슨 에버
뉴 1317

차카라바티, 아난다

미국, 일리노이 60181, 빌라 파크, 줄리아 드라이
브 206

(30) 우선권주장

60/700,297 2005년07월19일 미국(US)

60/818,510 2006년07월06일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

나이세리아(*Neisseria*)로부터 Laz, Lip 또는 Pan 1의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체이고, 연결된 분자의 포유동물 뇌 암세포 내로 또는 뇌혈관장벽을 통한 침입(entry)을 용이하게 하는 분리된 운반 펩티드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, Laz의 H.8 영역(SEQ ID NO: 24)에 적어도 90% 아미노산 동일성을 갖는 것을 특징으로 하는 분리된 운반 펩티드.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 펩티드는 SEQ ID NO: 24인 것을 특징으로 하는 분리된 운반 펩티드.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 혈류 내에서 펩티드의 반감기를 연장하거나 최적화시키기 위하여 변형되는 것을 특징으로 하는 분리된 운반 펩티드.

청구항 5

Ala-Ala-Glu-Ala-Pro(SEQ ID NO: 25)의 적어도 4개의 불완전 또는 완전 반복으로 구성되는 영역을 포함하고, 상기 영역은 전장당(per total length) 적어도 50% AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복을 보유하는 운반 펩티드.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 반복 영역은 Ala-Ala-Glu-Ala-Pro(SEQ ID NO: 25)의 동수의 반복을 포함하는 펩티드에 적어도 90% 동일한 것을 특징으로 하는 운반 펩티드.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 합성인 것을 특징으로 하는 운반 펩티드.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 혈류 내에서 펩티드의 반감기를 연장하거나 최적화시키기 위하여 변형되는 것을 특징으로 하는 운반 펩티드.

청구항 9

적어도 하나의 적하 화합물과 운반 펩티드를 포함하는 복합체에 있어서, 운반 펩티드는 청구항 5의 펩티드이고, 상기 운반 펩티드는 적하 화합물에 연결되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 10

적어도 하나의 적하 화합물과 운반 펩티드를 포함하는 복합체에 있어서, 운반 펩티드는 청구항 1의 펩티드이고, 상기 운반 펩티드는 적하 화합물에 연결되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 적하 화합물은 아주린(azurin), 플라스토시아닌(plastocyanin), 루스티시아닌(rusticyanin), 슈도아주린(pseudoazurin), 아우라시아닌(auracyanin), 아주린-유사 단백질에서 선택되는 쿠프레독신(cupredoxin)인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 적하 화합물은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 아주린인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 혈류 내에서 펩티드의 반감기를 연장하거나 최적화하기 위하여 변형되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 14

청구항 10에 있어서, 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 15

청구항 10에 있어서, 적하 화합물은 단백질, 지단백, 다당류, 핵산, 염료, 미세입자, 나노입자, 독소, 약제에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 16

청구항 10에 있어서, 적하 화합물은 단백질이고, 운반 펩티드는 적하 화합물에 연결되어 융합 단백질을 형성하는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 적하 화합물은 독소인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 18

청구항 10에 있어서, 적하 화합물은 우울증, 정동 장애, 만성 통증, 간질, 알츠하이머병, 뇌졸중/신경보호, 뇌와 척수 손상, 뇌암, 뇌의 HIV 감염, 다양한 실조증-유발 장애(ataxia-producing disorder), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 헌팅턴병(Huntington disease), 뇌에 영향을 주는 유년기 선천성 유전자 오류(childhood inborn genetic error), 파킨슨병(Parkinson's disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis)에서 선택되는 장애의 치료를 위한 치료제인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 19

청구항 10에 있어서, 적하 화합물은 탐지가능 물질인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 탐지가능 물질은 형광분석법(fluorimetry), 검경(microscopy), X-선 CT, MRI, 초음파에서 선택되는 방법으로 탐지되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 21

제약학적으로 적합한 담체에 담긴 청구항 10의 복합체를 함유하는 제약학적 조성물.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 제약학적으로 적합한 담체는 정맥내 투여(intravenous administration)에 적합한 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 23

청구항 21에 있어서, 제약학적으로 적합한 담체는 뇌실내(intracerebroventricular) 또는 뇌내(intracerebral) 주입에 적합한 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 24

세포를 청구항 10의 복합체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 세포는 중추신경계의 중양으로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

청구항 24에 있어서, 세포는 별아교세포종, 아교모세포종, 수막종, 펩지교종, 펩지성상세포종, 신경교종, 뇌실막세포종, 척수 종양, 신경절교종, 신경세포종, 속질모세포종에서 선택되는 암 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

암 환자를 치료하는 방법에 있어서, 청구항 10의 복합체의 치료 효과량을 환자에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 복합체는 정맥내, 국소, 피하, 근육내, 종양내에서 선택되는 방식으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

청구항 27에 있어서, 다른 암 치료제를 공동-투여하는 단계가 더욱 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

환자에서 암을 영상하는 방법에 있어서, 청구항 19의 복합체를 환자에 투여하고, 환자 내에서 적하 화합물의 위치를 탐지하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 적하 화합물은 X-선 조영제이고, 적하 화합물의 위치는 X-선 CT에 의해 탐지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

청구항 30에 있어서, 적하 화합물은 자기 공명 영상 조영제이고, 적하 화합물의 위치는 MRI에 의해 탐지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

청구항 30에 있어서, 적하 화합물은 초음파 조영제이고, 적하 화합물의 위치는 초음파 영상에 의해 탐지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

암을 진단하는 방법에 있어서, 청구항 19의 복합체를 세포와 접촉시키고, 적하 분자의 세포 위치(cellular location)를 탐지하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

청구항 1의 운반 펩티드를 포함하는 반응물을 포함하는 키트.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 반응물을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 37

청구항 35에 있어서, 반응물의 투여를 위한 운반체(vehicle)를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 38

청구항 1의 운반 펩티드를 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 39

청구항 5의 운반 펩티드를 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 40

청구항 10의 복합체를 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 41

뇌에 관련된 장애를 고통받는 환자를 치료 또는 진단하는 방법에 있어서, 청구항 1의 운반 펩티드 및 적어도 하나의 적하 화합물을 환자에 공동-투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드가 부가적으로 공동-투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

뇌에 관련된 장애를 고통받는 환자를 치료 또는 진단하는 방법에 있어서, 청구항 5의 운반 펩티드 및 적어도 하나의 적하 화합물을 환자에 공동-투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드가 추가로 공동-투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

<1> 관련된 출원

<2> 본 출원은 35 U.S.C. § § 119와 120 하에, 2006년 7월 6일자 제출된 U.S. 가출원 No. 60/818,510, “Transport Agents for Crossing the Blood-Brain Barrier and into Brain Cancer Cells, and Methods of Use Thereof” ; 2005년 7월 19일자 제출된 U.S. 가출원 No. 60/700,297; 2005년 10월 6일자 제출된 U.S. 특허 출원 No. 11/244,105에 우선권을 주장한다. 이들 출원의 전체 내용은 순전히 참조로서 편입된다.

<3> 정부 권리의 진술

<4> 본 출원의 요부는 National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, U.S.A.로부터 연구 기금(Grant Number ES 04050-18)을 지원받았다. 정부는 본 발명에 일부 권리를 주장할 수 있다.

<5> 본 발명의 기술 분야

<6> 본 발명에서는 적하 화합물을 뇌 암세포 내로 및/또는 뇌혈관장벽을 통하여 운반하기 위한 방법과 물질을 제시한다. 적하 화합물의 운반은 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질로부터 유래된 단백질 운반 펩티드, 예를 들면, Laz의 이용으로 달성된다. 또한, 본 발명에서는 펜타펩티드 AAEAP로 구성되는 합성 운반 펩티드를 제시한다. 더 나아가, 본 발명에서는 암, 특히, 뇌암 및 다른 뇌-관련된 장애를 치료하는 방법을 제시한다. 이에 더하여, 본 발명에서는 암, 특히, 뇌암을 영상하고 진단하는 방법을 제시한다.

배경 기술

<7> 뇌에 대한 새로운 약제의 개발은 나머지 신체에 비하여 훨씬 느린 속도로 진행되고 있다. 이러한 느린 진행은 대부분의 약제가 뇌혈관장벽(blood-brain barrier, BBB)을 형성하는 뇌 모세관 벽(brain capillary wall)을 통하여 뇌 내로 침투할 수 없는 상황에 상당 부분 기인한다. 거의 100%의 거대-분자 약제 및 98% 이상의 소형-분자 약제는 BBB를 통과하지 못한다. 극히 일부의 약제, 높은 지질 용해도(lipid solubility) 및 400-500 달톤(dalton) 이하의 분자량(molecular mass)을 보유하는 소형 분자만이 BBB를 실제로 통과한다. 또한, BBB를 통과하는 소형 분자 중에서, 극히 일부만 약학적으로 유의한 양으로 BBB를 통과한다(Pardridge, Molecular Innovations 3:90-103 (2003)).

<8> 소수의 뇌 질환, 예를 들면, 우울증, 정동 장애, 만성 통증, 간질만이 BBB를 통과하는 소형 분자 약제에 반응한

다. 훨씬 많은 뇌 질환, 예를 들면, 알츠하이머병, 뇌졸중/신경보호, 뇌와 척수 손상, 뇌암, 뇌의 HIV 감염, 다양한 실조증-유발 장애(ataxia-producing disorder), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 헌팅턴병(Huntington disease), 뇌에 영향을 주는 유년기 선천성 유전자 오류(childhood inborn genetic error), 파킨슨병(Parkinson's disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis)은 통상적인 지질-용해성 소형 분자량 약제에 반응하지 않는다. 효과적인 소형 분자 약제가 가용한 극소수의 뇌 질환 조차도 새롭고 향상된 약제에 관한 개발과 연구가 더욱 요구된다(*Id.*).

<9> 뇌암은 특히 치료하기 어렵다. 뇌 내에서 암의 통상적인 형태는 아교세포종(glioblastoma) 다형(GBM)과 애너플라스틱(anaplastic) 별아교세포종(astrocytoma)(AA)이다. GBM 환자의 평균 생존(mean survival)은 대략 10 내지 12개월이고, AA 환자의 평균 생존은 3 내지 4년이다. GBM 환자에서 수술은 생존 기간을 수개월 연장시킬 뿐이다(Kufe *et al.*, *Cancer Medicine*, § § 23 and 83, (6th ed. BC Decker, 2003)). GBM 치료가 수술과 국소 방사선에 의해 진행되는 대부분의 사례는 최초 종양 경계부(tumor margin)의 2 내지 4 cm 이내에서 재발을 유발한다(*Id.*).

<10> BBB를 통하여 뇌 내로 침투하지 못하는 약제를 투여하는 현재의 접근방식에는 머리에 구멍을 뚫고 약제를 뇌실 내(intracerebroventricular)(ICV) 또는 뇌내(intracerebral)(IC) 주입으로 투여하는 과정인 두개수술(craniotomy)이 포함된다. IC 투여 시에, 약제는 주사의 침단에서 주입 부위에 머무른다. ICV 투여 시에, 약제는 동측 내실(ipsilateral ventricle)의 상의면(ependymal surface) 정도까지만 분산되고 뇌 실질(brain parenchyma) 내로는 별로 침투하지 못한다. 이런 이유로, ICV와 IC 투여 방법은 뇌 용적(brain volume)의 1%에도 도달하지 못하고, 이런 제한된 침투에 의해 치료될 수 있는 뇌 질환은 거의 없다(*Id.*).

<11> 대조적으로, 약제 운반의 혈관경유 경로(transvascular route)는 뇌의 뉴런의 거의 100%를 치료할 수 있다. 모든 뉴런이 자체 혈관에 의해 관류되기 때문에, 혈관경유로 투여된 약제는 BBB를 통과한 이후 뇌의 모든 뉴런에 도달할 수 있다. 하지만, 약제가 BBB를 통과할 수 있도록 하는 약제-표적화 시스템(drug-targeting system)이 존재하지 않기 때문에, 혈관경유 투여 경로는 대부분의 약제 후보에는 적합하지 않다.

<12> 상당수의 약제와 다른 분자가 BBB를 통과할 수 없다는 사실에도 불구하고, 특정한 세균과 진균/바이러스 병원균은 BBB를 통하여 감염을 유발하는 것으로 알려져 있다(Nassif, *et al.*, *Trends Microbiol.* 10:227-232 (2002)). 이런 세균 병원균은 수막염균(*Neisseria meningitidis*), 폐렴연쇄상구균(*Streptococcus pneumoniae*), 대장균(*Escherichia coli*) K-1과 같은 세포외 병원균, 또는 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*) 또는 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)과 같은 세포내 병원균일 수 있다. 세포내 병원균은 주로, 감염된 백혈구 내에 잠복함으로써 뇌막(brain meninges)을 침입하는 반면, 세포외 병원균은 먼저, 혈류 내에서 확산되고, 이후 뇌 내피(cerebral endothelia)의 루미날 부분(luminal side)과 직접 상호작용하여 뇌 미세혈관 내피 세포(brain microvascular endothelial cell)의 치밀 이음부(tight junction)를 파괴함으로써 중추신경계 내로 침입한다(Nassif *et al.*, *id.*; Drevets & Leenen, *Microbes Infect.* 2:1609-1618 (2000); Kim, *Subcell. Biochem.* 33:47-59 (2000)). 이러한 상호작용은 병원균이 뇌막(brain meninges)에 침입하여 수막염(meningitis)을 유발할 수 있도록 한다. BBB를 통과하는 시험관내 단층과 이중층 모형을 이용하고, 이런 모형 단층 또는 이중층을 통과할 수 없는 세균 변이체를 분리하는 경우에, BBB의 전반적인 침입과 통과에 다양한 세균 단백질이 관여한다(Huang & Jong, *Cell. Microbiol.* 3:277-287 (2001)). 가령, 대장균(*E. coli*) K-1 유전자, 예를 들면, *ibeA*, *ibeB*, *asIA*, *yijP*, *ompA*, 또는 IV형 pili, Opc, Opa 등과 같은 단백질 및 HIV 표면 단백질 gp120과 같은 바이러스 단백질을 인코딩하는 수막염균(*N. meningitidis*) 유전자 모두 BBB의 효과적인 침입과 통과를 가능하게 함으로써 감염을 유발하는 것으로 제안되었다. 세포외 세균 병원균의 경우에, 이들 단백질은 뇌막의 침입을 위한 BBB에 부착과 차후 침입을 가능하게 하는 것으로 생각된다(Nassif *et al.*, *id.*; Huang & Jong, *id.*). 어떤 단일 세균 표면 단백질도 치밀 이음부의 파괴를 용이하게 하여 BBB의 통과를 가능하게 하는 것으로 입증되지 않았다.

<13> 아주린-유사 유전자는 여러 임균(gonococci)과 수막염균(meningococci), 예를 들면, 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)과 수막염균(*N. meningitidis*) 내에 존재한다(Gotschlich & Seiff, *FEMS Microbiol. Lett.* 43:253-255 (1987); Kawula, *et al.*, *Mol. Microbiol.* 1:179-185 (1987)). 아주린은 다수의 병원성 세균에 의해 생산되는데, 이들 유전자 사이에는 현저한 서열 상동성(sequence homology)이 존재한다(Yamada, *et al.*, *Cell. Microbiol.* 7:1418-1431 (2005)). "H.8" 로 지칭되는 단백질 에피토프(protein epitope)는 병원성 나이세리아(*Neisseria*) 종 사이에서 보존되고, H.8로 명명된 단클론 항체의 결합에 의해 탐지된다. 2가지 상이한 임균(gonococcal) 유전자, *laz*와 *lip*는 H.8 단클론 항체와 교차-반응하는 단백질을 인코딩한다(Hayashi & Wu, *J. Bioenerg. Biomembr.* 22:451-471 (1990)).

- <14> 많은 병원균이 아주린-유사 단백질을 보유하긴 하지만, 나이세리아(*Neisseria*)는 H.8 영역이 부착된다는 점에서 독특하다. Laz와 Lip는 세균 효소 신호 펩티다아제(bacterial enzyme signal peptidase) II에 의해 인식되는 신호 펩티드 지단백질 공통 서열을 보유하는 임균 외부막 단백질이고, 상기 효소는 상기 서열을 처리하여 지방산(fatty acid)과 글리세롤(glycerol)로 시스테인 잔기의 N-말단 아실화를 유도한다(Hayashi & Wu, *id.*; Yamada, *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)). 대략 6.3 kDa의 Lip 지단백은 거의 전적으로, 모티프 Ala-Ala-Glu-Ala-Pro(AEAP(SEQ ID NO: 25))의 펜타펩티드 반복으로 구성되는 반면, 대략 17 kDa의 Laz 지단백은 불완전 AEAP(SEQ ID NO: 25) 반복을 보유하는 N-말단에서 39개 아미노산 영역을 포함한다(Gotschlich & Seiff, *id.*; Kawula, *et al.*, *id.*; Woods *et al.*, Mol. Microbiol. 3: 43-48 (1989)). Laz 내에서 이러한 39 아미노산 N-말단 영역을 넘어, 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린에 고도로 상동한 127개 아미노산 영역이 존재한다(Cannon, Clin. Microbiol. Rev. 2:S1-S4 (1989)). Laz는 산화 스트레스(oxidative stress)와 구리 독성(copper toxicity)으로부터 보호에 관여하고, *ex vivo* 일차 인간 외자궁경관 상피 검사(primary human ectocervical epithelial assay)에서 생존을 증가시킨다(Wu, *et al.*, Infect. Immun. 73:8444-8448 (2005)).
- <15> 세 번째 임균(*N. gonorrhoeae*) 외부막 단백질, Pan 1 역시 AEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복 모티프를 보유한다(Hoehn and Clark, Infection and Immunity, 60: 4704-4708 (1992)). Lip의 크기는 상이한 나이세리아(*Neisseria*) 균주에서 달라진다. 균주 FA1090에서, Lip는 13개의 AEAP(SEQ ID NO: 25) 반복 및 이들 반복의 일부가 아닌 6개의 아미노산을 보유하는 71개 아미노산 길이를 갖는다. 균주 R10에서, Lip는 14개의 AEAP(SEQ ID NO: 25) 반복을 보유하는 76개 아미노산 길이를 갖는다(Cannon, *id.*). 정제된 Lip 단백질은 영속화된 인간 내자궁경관 상피 세포(immortalized human endocervical epithelial cell)에 의한 케모킨 인터루킨-8(chemokine interleukin-8, IL-8)과 사이토킨 IL-6의 방출 및 톨-유사 수용체(toll-like receptor) 2로 형질 감염된 인간 태아 신장(human embryonic kidney) 293 세포에 의한 IL-8의 생산과 전사 인자(transcription factor) NF- κ B의 활성화를 유도할 수 있는 강력한 염증성 매개인자(inflammatory mediator)이다(Fisette, *et al.*, J. Biol. Chem. 278:46252-46260 (2003)).
- <16> 전 세계적으로, 심각한 뇌와 척수 질환으로 고통받는 엄청난 수의 환자를 감안할 때, 친수성 분자와 대형 분자를 BBB를 통하여 운반할 수 있는 운반 시스템(transport system)이 요구된다. 적절하게는, 이러한 운반 시스템은 약제가 BBB에 전반적으로 누출되지 않으면서 뇌로 표적될 수 있도록 하는 높은 수준의 특이성(specificity)을 나타낸다. 더 나아가, 성공적인 운반 시스템은 전반적으로 양성이고, 바람직하지 않은 부작용 없이 환자에서 이러한 시스템의 반복적 이용을 가능하게 한다. 일부 사례에서, 성공적인 운반 시스템은 약제를 뇌 전체로 균등하게 운반한다. 다른 사례에서, 이러한 운반 시스템은 약제를 뇌 암세포에 특이적으로 운반한다.
- <17> 본 발명의 요약
- <18> 본 발명에서는 부착되거나 결합된 적하 화합물(cargo compound)의 뇌 암세포 내로 및/또는 뇌혈관장벽(blood brain barrier)을 통한 운반을 용이하게 할 수 있는 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질로부터 유래된 운반 펩티드(transport peptide)를 제시한다. 또한, 운반 펩티드와 이의 적하 화합물의 복합체 및 뇌암과 뇌에 관련된 다른 장애를 진단하고 치료하기 위한 상기 복합체와 운반 펩티드의 이용 방법을 제시한다. 최종적으로, 본 발명에서는 운반 펩티드 및/또는 복합체를 포함하는 키트 및 이들을 인코딩하는 핵산을 제시한다.
- <19> 본 발명의 한 측면은 나이세리아(*Neisseria*)로부터 Laz, Lip 또는 Pan 1의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체이고, 연결된 분자의 포유동물 뇌 암세포 내로 또는 뇌혈관장벽을 통한 침입(entry)을 용이하게 하는 분리된 운반 펩티드이다. Laz의 H.8 영역(SEQ ID NO: 24)은 이들 운반 펩티드에 적어도 90% 아미노산 동일성(amino acid identity)을 갖는다. 일부 구체예에서, 운반 펩티드는 SEQ ID NO: 24이다. 다른 구체예에서, 운반 펩티드는 혈류 내에서 펩티드의 반감기를 연장하거나 최적화시키기 위하여 변형된다.
- <20> 본 발명의 다른 측면은 Ala-Ala-Glu-Ala-Pro(SEQ ID NO: 25)의 적어도 4개의 불완전 또는 완전 반복으로 구성되는 영역을 포함하고, 상기 영역은 전장당(per total length) 적어도 50% AEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복을 보유하는 운반 펩티드이다. 일부 구체예에서, 불완전 또는 완전 반복 영역은 Ala-Ala-Glu-Ala-Pro(SEQ ID NO: 25)의 동수의 반복을 포함하는 펩티드에 적어도 90% 동일하다. 일부 구체예에서, 이들 운반 펩티드는 합성이다. 다른 구체예에서, 이들 운반 펩티드는 혈류 내에서 펩티드의 반감기를 연장하거나 최적화시키기 위하여 변형된다.
- <21> 본 발명의 다른 측면은 Ala-Ala-Glu-Ala-Pro(SEQ ID NO: 25)의 적어도 4개의 불완전 또는 완전 반복으로 구성되는 영역을 포함하는 운반 펩티드에 연결된 적어도 하나의 적하 화합물을 포함하는 복합체인데, 여기서 상기

영역은 상기 펩티드의 50% 이상을 구성한다.

- <22> 본 발명의 다른 측면은 연결된 분자의 포유동물 뇌 암세포 내로 또는 뇌혈관장벽을 통한 침입을 용이하게 하는, 나이세리아(*Neisseria*)로부터 Laz, Lip 또는 Pan 1의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체에 연결된 적어도 하나의 적하 화합물을 포함하는 복합체이다. 일부 구체예에서, 적하 화합물은 쿠프레독신, 예를 들면, 아주린(azurin), 플라스토시아닌(plastocyanin), 루스티시아닌(rusticyanin), 슈도아주린(pseudoazurin), 아우라시아닌(auracyanin), 아주린-유사 단백질이고, 구체적으로, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 아주린이다. 다른 구체예에서, 복합체는 혈류 내에서 펩티드의 반감기를 연장하거나 최적화하기 위하여 변형된다. 이러한 복합체는 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드를 더욱 포함한다.
- <23> 상기 복합체의 적하 화합물은 단백질, 지단백, 다당류, 핵산, 염료, 미세입자, 나노입자, 독소, 약제이다. 일부 구체예에서, 적하 화합물은 단백질이고, 복합체는 용합 단백질이다. 다른 구체예에서, 적하 화합물은 독소이다. 적하 화합물은 우울증, 정동 장애, 만성 통증, 간질, 알츠하이머병, 뇌졸중/신경보호, 뇌와 척수 손상, 뇌암, 뇌의 HIV 감염, 다양한 실조증-유발 장애(ataxia-producing disorder), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 헌팅턴병(Huntington disease), 뇌에 영향을 주는 유년기 선천성 유전자 오류(childhood inborn genetic error), 파킨슨병(Parkinson's disease) 및/또는 다발성 경화증(multiple sclerosis)의 치료를 위한 치료제일 수 있다. 적하 화합물은 탐지가능 물질, 예를 들면, 형광분석법(fluorimetry), 검경(microscopy), X-선 CT, MRI 및/또는 초음파에 의해 탐지되는 물질일 수도 있다.
- <24> 일부 구체예에서, 복합체는 제약학적으로 적합한 담체에 담겨진다. 제약학적으로 적합한 담체는 정맥내 투여(intravenous administration)에 적합하다. 다른 구체예에서, 제약학적으로 적합한 담체는 뇌실내(intracerebroventricular) 또는 뇌내(intracerebral) 주입에 적합하다.
- <25> 본 발명의 다른 측면은 연결된 분자의 포유동물 뇌 암세포 내로 또는 뇌혈관장벽을 통한 침입을 용이하게 하는, 나이세리아(*Neisseria*)로부터 Laz, Lip 또는 Pan 1의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체에 연결된 적어도 하나의 적하 화합물을 포함하는 복합체를 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이다. 세포는 중추신경계의 종양, 구체적으로, 별아교세포종(astrocytoma), 아교모세포종(glioblastoma), 수막종(meningioma), 뿔지교종(oligodendroglioma), 뿔지성상세포종(oligoastrocytoma), 신경교종(glioma), 뇌실막세포종(ependymoma), 척수종양(spinal cord tumor), 신경절교종(ganglioglioma), 신경세포종(neurocytoma) 또는 속질모세포종(medulloblastoma)으로부터 유래된다.
- <26> 본 발명의 다른 측면은 암 환자를 치료하는 방법인데, 여기서 본 발명의 복합체가 치료 효과량으로 환자에 투여된다. 일부 구체예에서, 복합체는 정맥내, 국소, 피하, 근육내, 또는 세포 또는 종양 내로 투여된다. 다른 구체예에서, 복합체는 다른 암 치료제와 공동-투여된다.
- <27> 본 발명의 다른 측면은 환자에서 암을 영상하는 방법인데, 상기 방법은 탐지가능 적하 화합물과의 복합체를 환자에 투여하고, 환자 내에서 적하 화합물의 위치를 탐지하는 단계를 포함한다. 일부 사례에서, 적하 화합물은 X-선 CT에 의해 탐지되는 X-선 조영제이다. 다른 사례에서, 적하 화합물은 MRI에 의해 탐지되는 자기 공명 영상 조영제이다. 다른 사례에서, 적하 화합물은 초음파 영상에 의해 탐지되는 초음파 조영제이다.
- <28> 본 발명의 다른 측면은 암을 진단하는 방법인데, 상기 방법은 탐지가능 적하 화합물과의 복합체를 세포와 접촉시키고, 적하 분자의 세포 위치(cellular location)를 탐지하는 단계를 포함한다.
- <29> 본 발명의 다른 측면은 나이세리아(*Neisseria*)로부터 Laz, Lip 또는 Pan 1의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체이고, 연결된 분자의 포유동물 뇌 암세포 내로 또는 뇌혈관장벽을 통한 침입을 용이하게 하는 분리된 운반 펩티드를 포함하는 반응물을 포함하는 키트이다. 일부 구체예에서, 키트는 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 반응물을 더욱 포함한다. 다른 구체예에서, 키트는 반응물의 투여를 위한 운반체(vehicle)를 더욱 포함한다.
- <30> 본 발명의 다른 측면은 핵산 분자이다. 일부 구체예에서, 핵산은 나이세리아(*Neisseria*)로부터 Laz, Lip 또는 Pan 1의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체이고, 연결된 분자의 포유동물 뇌 암세포 내로 또는 뇌혈관장벽을 통한 침입을 용이하게 하는 분리된 운반 펩티드를 인코딩한다. 다른 구체예에서, 핵산 분자는 Ala-Ala-Glu-Ala-Pro(SEQ ID NO: 25)의 적어도 4개의 불완전 또는 완전 반복으로 구성되는 영역을 포함하는 운반 펩티드를 인코딩하는데, 여기서 상기 영역은 상기 펩티드의 50% 이상을 구성한다. 다른 구체예에서, 핵산은 운반 펩티드에 연결된 적어도 하나의 단백질 적하 화합물을 포함하는 용합 단백질을 포함하는 복합체를 인코딩한다.
- <31> 본 발명의 다른 측면은 뇌에 관련된 장애를 고통받는 환자를 치료 또는 진단하는 방법인데, 상기 방법은 본 발명의 운반 펩티드 및 적어도 하나의 적하 화합물을 환자에 공동-투여하는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서,

쿠프레독신-유래된 운반 펩티드는 상기 운반 펩티드 및/또는 적하 화합물과 공동-투여된다.

- <32> 서열에 관한 간단한 설명
- <33> SEQ ID NO: 1은 임균(*Neisseria gonorrhoeae*) *laz* 유전자, Genbank Accession No. Y00530의 계놈 DNA 코딩 서열이다.
- <34> SEQ ID NO: 2는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 아주린 유전자의 계놈 DNA 코딩 서열이다.
- <35> SEQ ID NO: 3은 임균(*Neisseria gonorrhoeae*) *laz* 유전자의 H.8 영역의 계놈 DNA 코딩 서열이다.
- <36> SEQ ID NO: 4는 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)의 *Laz*-인코딩 유전자(*laz*)를 PCR 증폭하기 위한 정방향 프라이머이다.
- <37> SEQ ID NO: 5는 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)의 *Laz*-인코딩 유전자(*laz*)를 PCR 증폭하기 위한 역방향 프라이머이다.
- <38> SEQ ID NO: 6은 pUC18-*laz*의 3.1 kb 단편을 PCR 증폭하기 위한 정방향 프라이머이다.
- <39> SEQ ID NO: 7은 pUC18-*laz*의 3.1 kb 단편을 PCR 증폭하기 위한 역방향 프라이머이다.
- <40> SEQ ID NO: 8은 pUC19-*paz*의 0.4 kb 단편을 PCR 증폭하기 위한 정방향 프라이머이다.
- <41> SEQ ID NO: 9는 pUC19-*paz*의 0.4 kb 단편을 PCR 증폭하기 위한 역방향 프라이머이다.
- <42> SEQ ID NO: 10은 pUC19-*paz*의 3.3 kb 단편을 PCR 증폭하기 위한 정방향 프라이머이다.
- <43> SEQ ID NO: 11은 pUC19-*paz*의 3.3 kb 단편을 PCR 증폭하기 위한 역방향 프라이머이다.
- <44> SEQ ID NO: 12는 pUC18-*laz*의 0.13 kb 단편을 PCR 증폭하기 위한 정방향 프라이머이다.
- <45> SEQ ID NO: 13은 pUC18-*laz*의 0.13 kb 단편을 PCR 증폭하기 위한 역방향 프라이머이다.
- <46> SEQ ID NO: 14는 pGEX-5X-3으로부터 GST-인코딩 유전자를 PCR 증폭하기 위한 정방향 프라이머이다.
- <47> SEQ ID NO: 15는 pGEX-5X-3으로부터 GST-인코딩 유전자를 PCR 증폭하기 위한 역방향 프라이머이다.
- <48> SEQ ID NO: 16은 pUC18-*laz*로부터 *laz*의 신호 펩티드와 H.8-인코딩 영역을 PCR 증폭하기 위한 정방향 프라이머이다.
- <49> SEQ ID NO: 17은 pUC18-*laz*로부터 *laz*의 신호 펩티드와 H.8-인코딩 영역을 PCR 증폭하기 위한 역방향 프라이머이다.
- <50> SEQ ID NO: 18은 pUC18-*laz*로부터 H.8-인코딩 영역을 PCR 증폭하기 위한 정방향 프라이머이다.
- <51> SEQ ID NO: 19는 pUC18-*laz*로부터 H.8-인코딩 영역을 PCR 증폭하기 위한 역방향 프라이머이다.
- <52> SEQ ID NO: 20은 pGEX-5X-3-H.8로부터 GST-H.8 융합 영역을 PCR 증폭하기 위한 정방향 프라이머이다.
- <53> SEQ ID NO: 21은 pGEX-5X-3-H.8로부터 GST-H.8 융합 영역을 PCR 증폭하기 위한 역방향 프라이머이다.
- <54> SEQ ID NO: 22는 임균(*Neisseria gonorrhoeae*) 균주 F62 *Laz* 단백질, Genbank Accession No. Y00530의 아미노산 서열이다.
- <55> SEQ ID NO: 23은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 아주린의 아미노산 서열이다.
- <56> SEQ ID NO: 24는 임균(*Neisseria gonorrhoeae*) F62 *Laz* 단백질로부터 H.8 영역의 아미노산 서열이다.
- <57> SEQ ID NO: 25는 펜타펩티드(pentapeptide) 모티프의 아미노산 서열이다.

발명의 상세한 설명

- <65> 정의
- <66> 본 명세서에서, “세포”는 “단일 세포”로서 구체적으로 명시되지 않는 경우에, 상기 용어의 단수와 복수를 모두 포괄한다.
- <67> 본 명세서에서, “폴리펩티드”, “펩티드”, “단백질”은 동일한 의미로서 이용되고, 아미노산 잔기의 중합체

를 지시한다. 상기 용어는 하나이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공적인 화학 유사체인 아미노산 중합체에 적용된다. 상기 용어는 자연 발생 아미노산 중합체에도 적용된다. “폴리펩티드”, “펩티드”, “단백질”은 당화(glycosylation), 지질 부착(lipid attachment), 황화(sulfation), 글루탐산(glutamic acid) 잔기의 감마-카르복실화(gamma-carboxylation), 하이드록실화(hydroxylation), ADP-리보실화(ribosylation)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 변형 역시 포함한다. 폴리펩티드가 항상 완전하게 선형인 것은 아니다. 가령, 폴리펩티드는 유비퀴틴화(ubiquitination)의 결과로써 분지화되고, 일반적으로, 자연적인 처리 현상(natural processing event) 및 자연적으로 발생하지 않고 인간 조작에 의해 유발되는 현상을 비롯한 번역후 현상(post-translation event)의 결과로써 환형(분지화되거나 분지화되지 않음)이다. 환형 폴리펩티드, 분지화된 폴리펩티드, 분지화된 환형 폴리펩티드는 비-번역 자연 과정 및 전적으로 합성 방법에 의해 합성될 수도 있다. 합성 펩티드는 세포 성분의 조력 없이 만들어진 펩티드다. 펩티드를 제조하는 합성 방법은 당분야에 널리 공지되어 있고, 상업적으로 구입가능하다. 더 나아가, 본 발명에서는 본 발명의 단백질의 메티오닌-보유 변이체 및 메티오닌-부재 아미노 말단 변이체의 이용을 고려한다.

- <68> 본 명세서에서, “장애”는 생존 동물 또는 이의 일부분의 정상 상태의 손상을 구성하고, 신체 기능의 수행을 교란시키거나 변화시키는, 정상으로부터 해부학적 이탈과 생리학적 이탈을 포괄한다.
- <69> 본 명세서에서, “세포 성장의 저해”는 세포 분열(cell division) 및/또는 세포 팽창(cell expansion)의 지연 또는 중지를 의미한다. 상기 용어는 세포 발달의 저해 또는 세포 사멸의 증가 역시 의미한다.
- <70> 본 명세서에서, “고통받는”은 현재 장애의 증상을 나타내고, 관찰가능 증상이 없음에도 장애를 앓거나, 장애로부터 회복 중이거나, 또는 장애로부터 회복된 것을 포괄한다.
- <71> 본 명세서에서, “치료”는 치료하려는 장애 또는 이러한 장애와 연관된 증상의 진행 또는 심각도를 예방, 저하, 중단 또는 반전시키는 것을 포괄한다. 따라서, “치료”에는 적절한 의학적, 치료적 및/또는 예방적 투여가 포함된다.
- <72> “치료 효과량”은 치료되는 개체에서 특정한 장애의 발생을 예방, 지연, 중단 또는 반전시키고, 또는 이러한 장애의 기존 증상을 부분적으로 또는 완전하게 완화시키는데 효과적인 양이다. 치료 효과량의 결정은 당업자의 능력 범위 내에 속한다.
- <73> 본 명세서에서, 본 발명의 단백질 또는 다른 세포 산물을 수식하는데 이용되는 “실질적으로 순수한”은 예로써, 다른 단백질 및/또는 활성 저해 화합물이 실질적으로 존재하지 않거나 섞이지 않은 형태로 성장 배지 또는 세포 내용물로부터 분리된 단백질을 지시한다. “실질적으로 순수한”은 분리된 분획물의 건물 중량(dry weight)당 적어도 75%의 인자(factor), 또는 적어도 “75% 실질적으로 순수한” 인자를 의미한다. 더욱 적절하게는, “실질적으로 순수한”은 활성 화합물의 건물 중량당 적어도 85%의 화합물, 또는 적어도 “85% 실질적으로 순수한” 화합물을 의미한다. 가장 적절하게는, “실질적으로 순수한”은 활성 화합물의 건물 중량당 적어도 95%의 화합물, 또는 적어도 “95% 실질적으로 순수한” 화합물을 의미한다. “실질적으로 순수한”은 본 발명의 합성된 단백질 또는 화합물을 수식하는 데에도 이용될 수 있는데, 여기서 예로써, 이러한 합성 단백질은 합성 반응의 반응물과 부산물로부터 분리된다.
- <74> 본 발명의 펩티드 또는 단백질과 관련하여, 본 명세서에서, “ 제약학적 등급(pharmaceutical grade)”은 합성 반응물과 부산물을 비롯한, 자연 상태에서 통상적으로 수반되는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 분리되고, 약제로서 이의 활용을 제약하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 분리된 펩티드 또는 화합물을 지시한다. 가령, “ 제약학적 등급” 펩티드는 임의의 암종(carcinogen)으로부터 분리된다. 일부 사례에서, “ 제약학적 등급”은 조성물을 환자에 대한 정맥내 투여에 부적합하도록 만드는 임의의 물질로부터 실질적으로 또는 본질적으로 분리된 펩티드 또는 화합물을 명시하기 위하여, 의도된 투여 방법, 예를 들면, “정맥내 제약학적 등급 (intravenous pharmaceutical grade)”으로 변경될 수 있다. 가령, “정맥내 제약학적 등급” 펩티드는 SDS와 같은 세정제(detergent) 및 아지드(azide)와 같은 항균제(anti-bacterial agent)로부터 분리된다.
- <75> “분리된”, “정제된” 또는 “생물학적으로 순수한”은 자연 상태에서 통상적으로 수반되는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 존재하지 않는 물질을 지시한다. 따라서, 본 발명에 따른 분리된 펩티드는 가급적, *in situ* 환경에서 이들 펩티드와 통상적으로 연관되는 물질을 포함하지 않는다. “분리된” 영역은 이러한 영역이 유래되는 폴리펩티드의 전체 서열을 보유하지 않는 영역을 의미한다. “분리된” 핵산, 단백질, 또는 이의 개별 단편은 뉴클레오티드 염기서열분석(nucleotide sequencing), 제한 절단(restriction digestion), 특정 부위 돌연 변이유발(site-directed mutagenesis), 핵산 단편에 대한 발현 벡터로의 서브클로닝(subcloning) 및 실질적으

로 순수한 양으로 단백질 또는 단백질 단편의 획득이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 당업자에 의한 조작으로 생체내 환경으로부터 실질적으로 이전된다.

<76> 펩티드와 관련하여, 본 명세서에서, “변이체”는 야생형 폴리펩티드와 비교하여, 아미노산이 치환된, 결실된, 또는 삽입된 아미노산 서열 변이체를 의미한다. 변이체는 야생형 펩티드의 절두(truncation)일 수도 있다. “추가”는 야생형 단백질 내로부터 하나이상의 아미노산의 이동이고, “절두”는 야생형 단백질의 하나이상의 말단으로부터 하나이상의 아미노산의 이동이다. 따라서, 변이체 펩티드는 이러한 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자의 조작으로 만들어진다. 변이체는 폴리펩티드의 근본적인 활성의 적어도 일부에는 변화 없이 기본적인 조성이나 특성을 변화시키므로써 만들어진다. 가령, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드의 “변이체”는 BBB를 통과하고 및/또는 뇌 암세포에 침투하는 능력을 유지하는 돌연변이된 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드일 수 있다. 일부 사례에서, 변이체 펩티드는 비-자연 아미노산, 예를 들면, ε-(3,5-디니트로벤조일)-Lys 잔기로 합성된다 (Ghadiri & Fernholz, J. Am. Chem. Soc., 112:9633-9635 (1990)). 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 20개, 19개, 18개, 17개 또는 16개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다. 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 15개, 14개, 13개, 12개 또는 11개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다. 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 10개, 9개, 8개 또는 7개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다. 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 6개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다. 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 5개 또는 4개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다. 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 3개, 2개 또는 1개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다.

<77> 본 명세서에서, “아미노산”은 임의의 자연-발생 또는 비-자연 발생 또는 합성 아미노산 잔기를 포함하는 아미노산 모이어티(moiety), 다시 말하면, 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 탄소 원자, 전형적으로, 1개의 (α) 탄소 원자에 의해 직접적으로 연결된 적어도 하나의 카르복실 잔기와 적어도 하나의 아미노 잔기를 포함하는 임의의 모이어티를 의미한다.

<78> 펩티드와 관련하여, 본 명세서에서, “유도체”는 표적 펩티드로부터 유래된 펩티드를 의미한다. 유래(derivatation)는 펩티드가 근본적인 활성 중에서 일부를 여전히 유지하도록 하는 상기 펩티드의 화학적 변형을 포함한다. 가령, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드의 “유도체”는 BBB를 통과하고 및/또는 뇌 암세포에 침투하는 능력을 유지하는 화학적으로 변형된 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드일 수 있다. 목적하는 화학적 변형에는 펩티드의 아미드화(amidation), 아세틸화(acetylation), 황화(sulfation), 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 변형, 인산화(phosphorylation) 또는 당화(glycosylation)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이에 더하여, 유도체 펩티드는 화학적 화합물, 예를 들면, 다른 펩티드, 약제 분자 또는 다른 치료제 또는 조제약, 또는 탐지가능 프로브에 폴리펩티드 또는 이의 단편의 융합체(fusion)일 수도 있다.

<79> 본 명세서에서, “아미노산 서열 동일성 비율(%)”은 두 서열을 정렬하는 경우에 후보 서열에서 아미노산 잔기와 일치하는 폴리펩티드에서 아미노산 잔기의 비율로서 정의된다. 아미노산 동일성 비율(%)을 결정하기 위하여, 서열은 정렬하고, 필요한 경우, 최대 서열 동일성 비율(%)을 확보하기 위하여 갭(gap)을 도입한다; 보존성 치환은 서열 동일성의 일부로서 간주되지 않는다. 동일성 비율(%)을 측정하기 위한 아미노산 서열 정렬 절차는 당업자에게 공지되어 있다. 공개적으로 가용한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들면, BLAST, BLAST2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어가 펩티드 서열을 정렬하는데 이용된다. 특정한 구체예에서, Blastp(National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD로부터 입수가능)는 long complexity filter, expect 10, word size 3, existence 11, extension 1의 디폴트 파라미터에서 이용된다.

<80> 아미노산 서열을 정렬하는 경우에, 일정한 아미노산 서열 B에 대한 일정한 아미노산 서열 A(또는, 일정한 아미노산 서열 B에 대한 특정의 아미노산 서열 동일성(%)을 갖거나 포함하는 일정한 아미노산 서열 A)의 아미노산 서열 동일성 비율(%)은 아래와 같이 산정될 수 있다:

<81> 아미노산 서열 동일성 비율(%) = X/Y * 100

<82> 여기서, X는 서열 정렬 프로그램 또는 알고리즘 정렬에 의해 A와 B의 동일한 정합(match)으로 기록되는 아미노산 잔기의 수이고,

<83> Y는 B에서 아미노산 잔기의 총수이다.

<84> 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동등하지 않는 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 비율(%)은 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 비율(%)과 일치하지 않을 것이다. 더욱 짧은 서열에 더욱 긴

서열을 비교하는 경우에, 더욱 짧은 서열은 “B” 서열이 될 것이다. 가령, 상응하는 야생형 폴리펩티드에 절두된 폴리펩티드를 비교하는 경우에, 절두된 펩티드는 “B” 서열이 될 것이다.

<85> **총론**

<86> 본 발명은 적하 화합물을 뇌 암세포 내로 및/또는 뇌혈관장벽(BBB)을 통하여 운반하기 위한 방법과 물질 및 포유동물 뇌암과 뇌와 중추신경계의 다른 장애의 치료를 위한 방법에 관계한다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 모티프 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 반복으로 구성되는 펩티드 영역은 연결되거나 융합된 펩티드와 다른 적하 화합물이 뇌혈관장벽을 통하여 및/또는 포유동물 뇌 암세포 내로 운반될 수 있도록 한다. 더욱 구체적으로, 임균(*Neisseria gonorrhoeae*) 단백질 Laz의 H.8 영역이 연결되거나 융합된 단백질과 다른 적하 화합물을 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통하여 운반하는데 이용될 수 있다. 이에 더하여, AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복의 이용에서 H.8 영역에 유사한 펩티드, 예를 들면, 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)으로부터 Lip 단백질의 일부 또는 전체 및 Pan 1 단백질의 부분 또는 전체가 단백질과 다른 적하 화합물을 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통하여 운반하는데 이용될 수 있다. 본 발명에 의해 운반되는 적하 화합물에는 단백질, 지단백, 다당류, 안티-센스 핵산을 비롯한 핵산, 염료, 형광 태그와 방사성 태그, 미세입자 또는 나노입자, 독소, 유기와 무기 분자, 소형 분자, 약제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 일부 구체예에서, 약제 및/또는 독소는 종양 세포를 죽인다. 다른 구체예에서, 적하 화합물은 뇌의 다양한 장애를 치료한다.

<87> 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 아주린과 같은 많은 쿠프레독신 단백질은 다양한 유형의 포유동물 암 세포에 특이적으로 침투하고 이들을 죽이는 능력을 가진 것으로 알려져 있다(Yamada *et al.*, Cell. Biol. 7:1418-1431 (2005); Hiraoka *et al.*, PNAS 101:6427-6432 (2004); Hiraoka *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 338:1284-1290 (2005)). 또한, 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린은 뇌 암세포, 예를 들면, 아교모세포종 세포에 대한 세포독성을 나타내지 않는 것으로 알려져 있다(실시예 2 참조). 놀랍게도, 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)과 다른 나이세리아(*Neisseria*) 종으로부터 아주린-유사 단백질, Laz 단백질은 아교모세포종 세포와 같은 뇌 암세포 및 다른 종양에 특이적으로 침투하고 이들을 죽일 수 있는 것으로 알려져 있다(실시예 2와 7 참조). 더 나아가, Laz 단백질의 H.8 영역은 N-말단 또는 C-말단에 융합되는 경우에, 아교모세포종 세포에 침투하고 이들을 죽이는 능력을 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린에 공여할 수 있는 것으로 알려져 있다(실시예 2와 3 참조).

<88> 또한, 놀랍게도, H.8 영역은 아주린과 같은 공동-투여된 단백질에 물리적으로 부착될 필요 없이, 교아세포종(glioblastoma) 세포에 침투하는 능력을 상기 단백질에 공여하는 것으로 알려져 있다(실시예 5 참조). H.8 및 GST의 N-말단에 융합된 H.8 둘 모두 아주린 단독에 비하여 물리적으로 부착되지 않은 아주린의 아교모세포종 세포 내로 침투를 증가시키는 반면, GST의 C-말단에 융합된 H.8은 무효하였다. 더 나아가, 아주린과 공동-투여된 H.8 및 GST의 N-말단에 융합된 H.8 둘 모두 아교모세포종 세포에 대한 아주린의 세포독성을 강화시켰다(실시예 5 참조).

<89> 놀랍게도, Laz의 H.8 도메인은 살아있는 생쥐에서 뇌혈관장벽을 통과하고 뇌로 집중되는 능력을 자신이 융합된 단백질에 공여하는 것으로 알려져 있다(실시예 6 참조).

<90> 최종적으로, H.8 영역은 대장균(*E. coli*) 내에서 융합 단백질의 표면 전시(surface display)를 주도하는 것으로 알려져 있다(실시예 7 참조). GST 및 H.8이 C-말단에 융합된 GST 둘 모두 그들을 발현하는 대장균(*E. coli*)의 주변세포질 공간 내에 축적되는 반면, H.8이 N-말단에 융합된 GST는 대장균(*E. coli*) 세포의 표면으로 운반된다. 특정 작용 이전에 한정됨 없이, 융합된 단백질의 세균 세포의 표면으로의 운반을 유도하는 H.8 영역의 능력은 융합된 단백질이 BBB를 통과할 수 있도록 하는 H.8 영역의 능력에 관련되는 것으로 생각된다. 수막염균(*N. meningitidis*)과 같은 수막염균(meningococci)은 BBB를 통하여 뇌막 내로 침투하는데(Nassif, *et al.*, *id.*; Huang & Jong, *id.*), 이런 세균은 표면-노출된 세포 성분을 이용하여 BBB를 파괴한다. 수막염균(*N. meningitidis*)의 IV형 pili는 뇌 미세융모-유사 막 돌출(brain microvilli-like membrane protrusion)의 형성에 관여하고, 이런 pili의 퇴축(retraction)은 나이세리아(*Neisseria*)와 인간 세포 사이의 상호작용에서 핵심적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Pujol *et al.*, PNAS 96:4017-4022 (1999); Merz *et al.*, Nature 407: 98-102 (2002)). 하지만, IV형 pili는 다른 세포와의 pili-매개된 접촉 형성 이후 퇴축하는 것으로 알려져 있고, 수막염균(*N. meningitidis*)의 부가적인 미지의 표면 성분이 BBB 통과를 주도하는 것으로 생각된다(Nassif *et al.*, *id.*). 이런 이유로, 표면-전시된 H.8 영역은 나이세리아(*Neisseria*)가 BBB를 통과하고 인간 뇌 암세포와 상호작용하도록 하는데 직접적으로 관여할 수도 있다.

<91> Laz H.8 영역은 Laz의 N-말단에서 39개 아미노산 영역인데, 이는 불완전 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복을 보유한다. 이러한 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 반복 단위는 적하 화합물을 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통하여

운반하는 펩티드를 설계하는데 이용될 수 있을 것으로 고려된다. 더 나아가, AAEAP(SEQ ID NO: 25) 반복을 보유하는, 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)과 수막염균(*Neisseria meningitis*)으로부터 다른 외부막 단백질의 아미노산 서열이 적하 화합물을 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통하여 운반하는 펩티드를 설계하는데 이용될 수 있을 것으로 고려된다. 주목되는 다른 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질에는 Lip과 Pan 1이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다(Trees *et al.*, J. Clin. Microbiol. 38:2914-2916 (2000); Hoehn and Clark, Infection and Immunity 60:4704-4708 (1992)).

<92> 본 발명은 적하 화합물을 뇌혈관장벽을 통하여 뇌 내로 및/또는 뇌 암세포 내로 운반하기 위한 방법과 물질에 관계한다. 본 발명에 따른 적하 화합물의 운반은 적절한 운반 펩티드의 이용으로 달성된다. 본 발명의 한 구체예에서, 적하 화합물은 본 발명의 나이세리아(*Neisseria*) 또는 AAEAP 운반 펩티드에 연결된다. 다른 구체예에서, 적하 화합물은 본 발명의 나이세리아(*Neisseria*) 또는 AAEAP 운반 펩티드와 공동-투여된다. 다른 구체예에서, 적하 화합물은 본 발명의 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드 및 나이세리아(*Neisseria*) 또는 AAEAP 운반 펩티드에 연결된다.

<93> 한 구체예에서, 적하 화합물은 암 세포, 예를 들면, 뇌 암세포 내에서 세포 성장을 저해하기 위하여 운반된다. 이런 암 세포는 예로써, 별아교세포종, 아교모세포종, 수막종, 핍지교종, 핍지성상세포종, 신경교종, 뇌실막세포종, 척수 종양, 신경절교종, 신경세포종, 속질모세포종으로부터 유래될 수 있다. 가령, 적하 화합물은 세포 주기 조절 단백질(cell cycle control protein), 예를 들면, p53; 사이클린-의존성 키나아제 저해물질(cyclin-dependent kinase inhibitor), 예를 들면, p16, p21 또는 p27; 자살 단백질(suicide protein), 예를 들면, 티미딘 키나아제(thymidine kinase) 또는 니트로리덕타제(nitroreductase); 사이토킨(cytokine) 또는 다른 면역 조절 단백질(immunomodulatory protein), 예를 들면, 인터루킨 1, 인터루킨 2 또는 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF); 또는 독소(toxin), 예를 들면, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 외독소 A이다. 일부 구체예에서, 상기한 부류의 화합물 중에서 한가지의 생물학적 활성 단편이 운반된다. 다른 구체예에서, 적하 화합물은 표적 조직의 영상을 산출하기 위하여 운반된다. 가령, 표적 조직은 암이고, 적하 화합물은 X-선 전산화 단층촬영(CT), 자기 공명 영상(MRI), 초음파에 의한 탐지를 위한 영상을 산출하는데 통상적으로 이용될 수 있는 화합물일 수 있다. 이들 구체예에서, 적하 화합물은 감마선(gamma ray) 또는 양전자 방출 방사성동위원소(positron emitting radioisotope), 자기 공명 영상 조영제(magnetic resonance imaging contrast agent), X-선 조영제(X-선 contrast agent) 및/또는 초음파 조영제(ultrasound contrast agent)이다. 다른 구체예에서, 적하 화합물은 뇌에 관련된 장애를 치료하기 위하여 운반된다.

<94> **나이세리아(*Neisseria*)와 AAEAP 운반 펩티드**

<95> 본 발명에서는 연결되거나 결합된 적하 화합물을 BBB를 통하여 및/또는 포유동물 뇌 암세포 내로 운반하지만, 이들 화합물을 비-암성 세포 내로 운반하지 않는 운반 펩티드를 제시한다. Laz와 같은 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질은 단백질 운반 도메인(Transit Domain), H.8 도메인을 포함하는 것으로 밝혀졌는데, 상기 도메인은 연결된 적하 화합물의 포유동물 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통한 침투를 용이하게 한다. 본 발명에서는 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질로부터 유래된 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드를 제시한다. 더 나아가, 본 발명에서는 연결되거나 결합된 적하 화합물을 포유동물 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통하여 운반하는데 이용될 수 있는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드의 반복을 포함하는 중성 또는 합성 운반 도메인을 제시한다.

<96> “나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드”는 적하 화합물의 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통한 침투에 요구되는 아미노 서열을 보유하는 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질의 전체 또는 단편을 지칭한다. 적절한 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질에는 임균(*N. gonorrhoeae*)으로부터 Laz, Lip 또는 Pan이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 특히, 수막염균(*N. meningitidis*)과 임균(*N. gonorrhoeae*)으로부터 Laz가 주목된다. 어떤 외부막 단백질이 적하 화합물의 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통한 침투에 요구되는 아미노 서열을 보유하는지의 결정은 뇌 암세포 내로 또는 BBB를 통한 침투에 요구되는 펩티드를 확인하는 임의의 방법으로 수행될 수 있다. 이와 같은 한가지 방법에서, 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질의 전체 또는 단편이 마커 물질에 연결되고, 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질의 전체 또는 단편이 뇌 암세포 내로 침투하고 및/또는 BBB를 통과하는지를 결정하기 위한 검사가 수행된다. 적절한 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질 또는 이의 단편을 확인하는데 이용될 수 있는 방법은 실시예 4와 7에서 확인된다.

<97> 본 발명에 이용될 수 있는 적절한 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질에는 H.8 항체에 의해 인식되고 및/또는

AAEAP(SEQ ID NO: 25) 모티프의 여러 완전 또는 불완전 반복으로 구성되는 나이세리아(*Neisseria*) 종의 외부막 단백질이 포함된다. 일부 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드는 H.8 항체에 의해 인식된다. 단백질 또는 펩티드가 H.8 항체에 의해 인식되는 지를 결정하는 방법과 파라미터는 Cannon *et al.*, *Infection and Immunity* 43:994-999 (1984)에 기술된다.

<98> 또한, 본 발명에서는 AAEAP 운반 펩티드를 제시하는데, 이들 펩티드는 연결되거나 결합된 적하 화합물을 포유동물 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통하여 운반하는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 모티프의 복수의 완전 또는 불완전 반복으로 구성되는 펩티드이다. 본 명세서에서, “불완전” 반복은 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드의 반복으로 정의되는데, 여기서 5개 아미노산의 적어도 하나는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 모티프의 일부가 아니다. 다른 구체예에서, 불완전 반복은 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드의 일부가 아닌 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산을 포함한다. 일부 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드는 Laz 단백질(SEQ ID NO: 24)의 아미노산 1 내지 39이다. 일부 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드는 적어도 20개 아미노산, 적어도 40개 아미노산, 적어도 60개 아미노산, 또는 적어도 80개 아미노산 길이를 갖는다. 다른 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드는 40개 이하의 아미노산, 100개 이하의 아미노산, 200개 이하의 아미노산, 또는 400개 이하의 아미노산 길이를 갖는다. 일부 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드는 나이세리아(*Neisseria*) 외부막 단백질, 예를 들면, SEQ ID NO: 22와 적어도 90% 아미노산 서열 동일성, 적어도 95% 아미노산 서열 동일성 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는다.

<99> “AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드”는 완전 및/또는 불완전 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복의 영역으로 구성되는 펩티드를 지칭한다. AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드는 표준 방법으로 합성되거나, 또는 세포-기초된 발현 시스템(cell-based expression system)에 의해 재생된다. 일부 구체예에서, AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드는 적어도 2개의 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 적어도 4개의 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 적어도 6개의 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 적어도 8개의 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 적어도 10개의 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 적어도 15개의 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복 또는 적어도 20개의 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복으로 구성된다. 일부 구체예에서, AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드는 10개 이하의 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 20개 이하의 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 30개 이하의 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 또는 40개 이하의 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복으로 구성된다. 일부 구체예에서, AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드는 완전 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 불완전 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 또는 완전과 불완전 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복의 혼합물로 구성된다.

<100> 일부 구체예에서, AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복으로만 구성된다. 다른 구체예에서, AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드는 전장당(per total length) 적어도 95% AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 전장당 적어도 90% AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 전장당 적어도 80% AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복, 전장당 적어도 50% AAEAP(SEQ ID NO: 25) 펜타펩티드 반복으로 구성된다. 일부 구체예에서, 반복 영역은 동수의 Ala-Ala-Glu-Ala-Pro(SEQ ID NO: 25) 반복을 포함하는 펩티드에 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일하다.

<101> 일부 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 및/또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드는 연결된 적하 화합물의 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통한 선택적인 운반을 용이하게 하는데 이용될 수 있다. 다른 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 및/또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드는 공동-투여된 적하 화합물을 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통하여 운반하는데 이용될 수 있다.

<102> **나이세리아(*Neisseria*) 또는 AAEAP 운반 도메인의 변형**

<103> 본 발명의 다른 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드는 적하 화합물을 뇌 암세포 내로 또는 BBB를 통하여 운반하는 능력을 유지하는 변이체와 유도체를 생산하기 위하여 화학적으로 변형되거나 유전적으로 변화될 수 있다.

<104> 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 변이체는 표준 기술에 의해 합성될 수 있다. 유도체는 직접적으로, 또는 변형이나 부분적인 치환에 의해 고유 아미노산으로부터 형성되는 아미노산 서열이다. 변이체는 고유 화합물과 유사하지만 특정 구성요소 또는 측쇄(side chain)의 측면에서 구별되는 구조를 보유하는 아미노산 서열인 유사체일 수 있다. 유사체는 상이한 진화적 기원으로부터 합성되거나 유래될 수 있다. 변이체는 이러한 유도체 또는 유사체가 변형된 아미노산을 보유하는 경우에, 전장이거나 또는 전장이 아닐 수 있다.

- <105> 본 발명에서는 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드의 아미노산 서열 변이체를 제시하는데, 이들 변이체는 야생형 폴리펩티드와 비교하여 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다. 본 명세서에서, “절두”는 폴리펩티드 서열의 적어도 한쪽 말단으로부터 적어도 하나의 아미노산 잔기의 이동으로 발생하는 펩티드이다. 일부 구체예에서, 절두 펩티드는 폴리펩티드 서열의 한쪽 또는 양쪽 말단으로부터 적어도 1개의 아미노산 잔기, 적어도 5개의 아미노산 잔기, 적어도 10 아미노산 잔기, 적어도 50 아미노산 잔기, 적어도 100 아미노산 잔기, 적어도 120 아미노산 잔기 또는 적어도 150 아미노산 잔기의 이동으로 발생된다. 일부 구체예에서, 조성물은 전장 이하의 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드인 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드의 한 영역으로 구성되는 펩티드를 함유한다. 일부 구체예에서, 조성물은 절두된 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드의 대략 10개 이상의 잔기, 대략 15개 이상의 잔기 또는 대략 20개 이상의 잔기로 구성되는 펩티드를 함유한다. 일부 구체예에서, 조성물은 절두된 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드의 대략 100개 이하의 잔기, 대략 70개 이하의 잔기, 대략 50개 이하의 잔기, 대략 40개 이하의 잔기, 또는 대략 30개 이하의 잔기로 구성되는 펩티드를 함유한다.
- <106> 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 변이체에는 동일한 크기의 아미노산 서열과 비교하여 또는 상동성 알고리즘(homology algorithm)에 의한 정렬된 서열과 비교하여, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드(SEQ ID NO: 24) 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드와 적어도 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성으로 현저하게 상동한 영역을 보유하는 분자가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드 및 후보 서열 사이에 “아미노산 서열 동일성 비율(%)”은 두 서열을 정렬할 때, 후보 서열 내에 아미노산 잔기와 동일한, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드 내에 아미노산 잔기의 비율로서 정의된다.
- <107> 변이체에는 자연적으로 발생하지 않는 합성 아미노산으로 만들어진 펩티드 역시 포함된다. 가령, 비-자연 발생 아미노산은 혈류(bloodstream) 내에서 조성물의 반감기(half-life)를 연장하거나 최적화하기 위하여 변이체 펩티드 내로 편입된다. 이런 변이체에는 D,L-펩티드(부분입체이성질체(diastereomer))(Futaki *et al.*, J. Biol. Chem. 276(8):5836-40(2001); Papo *et al.*, Cancer Res. 64(16):5779-86(2004); Miller *et al.*, Biochem. Pharmacol. 36(1):169-76, (1987)), 특수한 아미노산을 보유하는 펩티드(Lee *et al.*, J. Pept. Res. 63(2):69-84(2004)), 탄화수소 스테이플링(hydrocarbon stapling)이 수행하는 올레핀-보유 비-자연 아미노산(가령, Schafmeister *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892(2000); Walenski *et al.*, Science 305:1466-1470(2004)), ϵ -(3,5-디니트로벤조일)-Lys 잔기를 포함하는 펩티드가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <108> 다른 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 유도체이다. 운반 펩티드의 이들 유도체는 이러한 펩티드가 근본적인 활성 중에서 일부를 여전히 유지하도록 하는 상기 펩티드의 화학적 변형이다. 가령, 운반 펩티드의 “유도체”는 BBB를 통과하고 및/또는 뇌 암세포에 침투하는 능력을 유지하는 화학적으로 변형된 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드일 수 있다. 변형된 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP 운반 펩티드 활성을 결과하는 유도(derivation)는 활성에서 이와 같은 손실이 인지가능하지 않으면 본 발명의 일부로서 고려된다. 본 명세서에서, “인지가능 손실(appreciable loss)”은 변형되지 않은 펩티드와 비교하여 대략 50% 이상의 활성이다. 목적하는 화학적 변형에는 펩티드의 아미드화(amidation), 아세틸화(acetylation), 황화(sulfation), 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 변형, 인산화(phosphorylation) 또는 당화(glycosylation)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이에 더하여, 유도체 펩티드는 화학적 화합물, 예를 들면, 다른 펩티드, 약제 분자 또는 다른 치료제 또는 조제약, 또는 탐지가능 프로브에 운반 펩티드, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체의 융합체(fusion)일 수도 있다.
- <109> 목적 유도체는 예로써, 원형화된 펩티드(Monk *et al.*, BioDrugs 19(4):261-78,(2005); DeFreest *et al.*, J. Pept. Res. 63(5):409-19(2004)), N-과 C-말단 변형(Labrie *et al.*, Clin. Invest. Med. 13(5):275-8,(1990)), 탄화수소 스테이플링(hydrocarbon stapling)이 수행하는 올레핀-보유 비-자연 아미노산의 통합(Schafmeister *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892(2000); Walenski *et al.*, Science 305:1466-1470(2004))이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 당업자에게 널리 공지된 여러 방법에 의해, 혈류 내에서 본 발명의 펩티드와 조성물의 반감기가 연장되거나 최적화될 수 있는 화학적 변형을 보유한다.
- <110> 본 발명의 운반 펩티드는 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 변이체, 유도체 및/또는 구조적 등가체일 수 있다. 가령, 이들 펩티드는 PEG화된 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드의 절두이고, 따라서, 변이체와 유도체가 모두 가능하다. 한 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 올레핀-보유 사슬(olefin-bearing tether)을 보유하고, 루테늄(ruthenium) 촉매된 올레핀 메타세시스(olefin metathesis)에 의한 전체-탄화수소 “주요소(staple)”가 수행하는 α, α -이중치환된 비-자연 아미노산으로 합

성된다(Scharmeister *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892(2000); Walensky *et al.*, Science 305:1466-1470(2004)). 부가적으로, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드의 구조적 등가체인 펩티드는 다른 펩티드에 융합되고, 따라서, 구조적 등가체와 유도체가 모두 가능한 펩티드를 산출한다. 이들 실험은 본 발명을 예시할 뿐이며 한정하지 않는다.

<111> 적하 화합물을 뇌 암세포 내로 및/또는 BBB를 통하여 운반하는 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 능력을 무력화시키지 않는, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 아미노산 서열 내에서 변형을 유도하는 변화가 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드 내로 도입될 수 있다. “비-필수” 아미노산 잔기는 적하 화합물을 세포 내로 및/또는 BBB를 통하여 운반하는 능력을 무력화시키지 않으면서 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 서열로부터 변형될 수 있는 잔기인 반면, “필수” 아미노산 잔기는 이런 생물학적 활성에 반드시 필요하다.

<112> 보존성 치환이 달성될 수 있는 아미노산은 당분야에 널리 공지되어 있다. 유용한 보존성 치환은 표 1, “바람직한 치환” 에 도시된다. 한 부류의 아미노산이 동일 유형의 다른 아미노산으로 치환되는 보존성 치환은 이런 치환이 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드의 활성을 무력화시키지 않는다면, 본 발명의 범위 내에 속한다. 변형된 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드 활성을 결과하는 이런 교환은 활성에서 이와 같은 손실이 인지가능하지 않으면 본 발명의 일부로서 고려된다. 본 명세서에서, “인지가능 손실(appreciable loss)” 은 변형되지 않은 펩티드와 비교하여 대략 50% 이상의 활성이다.

표 1

<113> 바람직한 치환

최초 잔기	전형적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro(P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucine	Leu

<114> (1) 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들면, β-시트 또는 α-나선 구조, (2) 전하, (3) 소수성, 또는 (4) 표적 부위 측쇄의 크기에 영향을 주는 “비-보존성 치환” 은 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드 기능을 변화시킬 수 있다. 잔기는 표 2에 제시된 바와 같이, 공통적인 측쇄 특성에 기초하여 여러 군으로 구분된다. 비-보존성 치환은 한 부류의 구성원을 다른 부류의 구성원으로 교체하는 과정을 수반한다.

<115> 한 부류의 아미노산이 상이한 유형의 다른 아미노산으로 치환되는 비-보존성 치환은 이런 치환이 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 활성을 무력화시키지 않는다면, 본 발명의 범위 내에 속한다. 변화된 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드 활성을

결과하는 이런 변화는 활성에서 이와 같은 손실이 인지가능하지 않으면 본 발명의 일부로서 고려된다.

표 2

<116> 아미노산 부류

부류	아미노산
소수성	Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile
중성 친수성	Cys, Ser, Thr
산성	Asp, Glu
염기성	Asn, Gln, His, Lys, Arg
교란된 사슬 구조	Gly, Pro
방향족	Trp, Tyr, Phe

<117> 다른 구체예에서, 본 발명에서는 임균(*Neisseria gonorrhoea*) Laz 아미노산 잔기 1 내지 39(SEQ ID NO: 24)에 현저한 구조적 유사성(structural similarity)을 갖는, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 구조적 등가체를 고려한다. 구체적으로, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드의 구조적 등가체와 임균(*Neisseria gonorrhoea*) Laz 아미노산 잔기 1 내지 39(SEQ ID NO: 24) 사이에 현저한 구조적 상동성은 VAST 알고리즘을 이용함으로써 결정된다(Gibrat *et al.*, *Curr Opin Struct Biol* 6:377-385(1996); Madej *et al.*, *Proteins* 23:356-3690(1995)). 특정한 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 구조적 등가체와 임균(*Neisseria gonorrhoea*) Laz 아미노산 잔기 1 내지 39(SEQ ID NO: 24)의 구조적 비교(structural comparison)로부터 VAST p 값은 대략 10^{-3} 이하, 대략 10^{-5} 이하, 또는 대략 10^{-7} 이하이다. 다른 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드의 구조적 등가체와 임균(*Neisseria gonorrhoea*) Laz 아미노산 잔기 1 내지 39(SEQ ID NO: 24) 사이에 현저한 구조적 상동성은 DALI 알고리즘을 이용함으로써 결정될 수 있다(Holm & Sander, *J. Mol. Biol.* 233:123-138 (1993)). 특정한 구체예에서, 쌍별 구조적 비교(pairwise structural comparison)에 대한 DALI Z 스코어는 적어도 3.5, 적어도 7.0, 또는 적어도 10.0이다.

<118> 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드에 대한 변형은 당분야에 공지된 방법, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드-매개된(특정 부위) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝, PCR 돌연변이유발을 이용하여 달성될 수 있다. 특정 부위 돌연변이유발(Carter, *Biochem J.* 237:1-7(1986); Zoller and Smith, *Methods Enzymol.*, 154:329-50(1987)), 카세트 돌연변이유발(cassette mutagenesis), 제한 선별 돌연변이유발(restriction selection mutagenesis)(Wells *et al.*, *Gene* 34:315-23 (1985)), 또는 다른 공지된 기술을 클론된 DNA에서 수행하여 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드 변이체 인코딩 핵산을 산출할 수 있다. 이에 더하여, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드 변이체를 인코딩하는 뉴클레오티드는 당분야에 널리 공지된 방법으로 합성될 수 있다.

<119> 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드 적하 화합물 복합체

<120> 본 발명의 다른 측면에서, 운반 펩티드-적하 복합체가 제시되는데, 여기서 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP 운반 펩티드는 적어도 하나의 적하 화합물과 복합된다. 이들 복합체의 운반 펩티드는 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드, AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체이다. 본 발명에 의해 운반되는 적하 화합물에는 단백질, 지단백, 다당류, 안티-센스 핵산을 비롯한 핵산, 염료, 미세입자 또는 나노입자, 독소, 유기와 무기 분자, 소형 분자, 약제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이들 운반 펩티드-적하 복합체는 치료 목적으로 뇌 및/또는 뇌 암세포와 암세포 내로 약제를 운반하는데 이용되고, 진단 목적으로 조영 화합물(imaging compound)을 뇌 암세포와 암 세포로 운반하는데 이용되고, 뇌 및/또는 뇌 암세포 내로 특정 화합물의 운반을 요하는 임의의 다른 목적으로 이용될 수 있다. 적하 화합물은 운반 펩티드의 C-말단 또는 N-말단에 부착될 수 있다.

<121> 일부 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*) 운반 펩티드 또는 AAEAP 운반 펩티드는 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드와 복합된다. 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드는 2005년 10월 6일자 제출된 U.S. Patent Appln. No. 11/244,105에서 기술된다. 일부 구체예에서, 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 아주린 50-77 아미노산 영역이거나, 이러한 영역을 포함하거나, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체

이다.

- <122> 본 명세서에서, “복합된,” “복합체” 또는 “연결된” 복합되는 구성요소 사이에 형성되는 물리적 결합(physical association)을 지칭한다. 일부 사례에서, 이러한 물리적 결합은 직접적이지 않고 연결 기(linking group) 또는 다른 구성요소에 의해 매개된다. 구성요소는 특히, 단백질, 다른 유기 분자 또는 무기 분자이다. 구성요소 사이에 물리적 결합은 공유 결합(covalent bond), 소수성 결합(hydrophobic bond) 및/또는 판 데르 발스 힘(van der waals force), 또는 이들 구성요소를 물리적 결합 상태로 유지시키는 임의의 다른 수단에 의해 이루어진다.
- <123> 본 발명의 다양한 구체예에서, 적하 화합물은 암 세포에 대한 세포독성을 나타내는 쿠프레독신, 예를 들면, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 아주린(SEQ ID NO: 24)(“Wt-아주린”); 시아노박테리아 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*)으로부터 플라스토시아닌; 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*)로부터 루스티시아닌; 아크로모박터 시클로클라스테스(*Achromobacter cycloclastes*)로부터 슈도아주린; 슈도모나스 시링가(*Pseudomonas syringae*), 수막염균(*Neisseria meningitidis*), 장염 비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*), 보르데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*)로부터 아주린; 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*) 또는 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)으로부터 아우라시아닌 A와 B를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 적하 화합물은 시토크롬 c, 예를 들면, 녹농균(*P. aeruginosa*)으로부터 시토크롬 c₅₅₁이다. 다른 구체예에서, 적하 화합물은 암 세포에 대한 세포독성(cytotoxicity)을 유지하는 상기한 화합물의 변이체이다.
- <124> 한 구체예에서, 적하 화합물은 탐지가능 물질이다, 가령, 녹색 형광 단백질과 같은 형광 물질; 발광 물질; β-갈락토시다아제와 같은 효소; 또는 방사성표지된 또는 비오틴화된 단백질이 탐지가능 표현형을 세포로 공여하기 위하여 운반된다. 이와 유사하게, 탐지가능 물질, 예를 들면, 형광 물질로 표지된 미세입자 또는 나노입자가 운반될 수 있다. 적합한 나노입자의 한 가지 실례는 2002년 5월 7일자로 허여된 U.S. Pat. No. 6,383,500에서 확인된다. 이들 탐지가능 물질은 당업자에게 공지되어 있다.
- <125> 일부 구체예에서, 적하 화합물은 X-선 전산화 단층촬영(CT), 자기 공명 영상(MRI), 초음파 영상 또는 방사성핵종 섬광계수법(radionuclide scintigraphy)에 적합한 탐지가능 물질이다. 이들 구체예에서, 적하 화합물은 진단 목적으로 환자에 투여된다. 조영제(contrast agent)는 X-선 CT, MRI, 초음파에 의해 획득되는 영상을 강화시키기 위한 적하 화합물로서 투여된다. 다양한 구체예에서, 적하 화합물은 감마선(gamma ray) 또는 양전자 방출 방사성동위원소(positron emitting radioisotope), 자기 공명 영상 조영제(magnetic resonance imaging contrast agent), X-선 조영제(X-ray contrast agent) 및/또는 초음파 조영제(ultrasound contrast agent)이다.
- <126> 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드와 함께 또는 이러한 펩티드 없이, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드를 통하여 뇌종양 조직을 표적하는 방사성핵종 적하 화합물의 투여는 방사성핵종 섬광계수법에 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드는 적하 화합물과 함께 또는 이런 화합물 없이, 방사성핵종을 포함한다. U.S. Pat. Pub. No. 2006/0039861에서는 방사성핵종 조영제로서 이용되는 펩티드-표지된 다중결합 조영제를 제시한다. X-선 영상(X-ray imaging)에 적합한 상업적으로 가용한 적하 화합물에는 GE Healthcare(Chalfont St. Giles, United Kingdom)로부터 구입가능한 Visipaque(iodixanol), Omnipaque(iohexol), Imagopaque이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <127> 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드와 함께 또는 이러한 펩티드 없이, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드를 통하여 뇌종양 조직을 표적하는 초음파 조영제 적하 화합물의 투여는 초음파 영상에 이용될 수 있다. 적하 화합물로서 적합한 초음파 조영제에는 생체적합성 가스의 미세거품(microbubble), 액체 담체, 계면활성 마이크로스피어가 포함되지만 이들에 국한되지 않는데, 이들 조영제는 표적 모이어티(targeting moiety)와 미세거품 사이에 선택적인 연결 모이어티(linking moiety), L_n을 추가로 포함한다. 목적 미세거품에는 표 3에 열거된 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이런 배경에서, 액체 담체는 수용액을 의미하고, 계면활성제는 용액 내에 경계면 장력(interfacial tension)에서 감소를 유도하는 임의의 양쪽친화성 물질을 의미한다. 계면활성 마이크로스피어를 형성하는데 적합한 계면활성제의 목록은 EP0727225A2에서 기술된다. 계면활성 마이크로스피어에는 나노스피어(nanosphere), 리포솜, 소포 등이 포함된다. 일부 구체예에서, 초음파 조영제는 리포솜 또는 텍스트란이다. 생체적합성 가스는 공기, 또는 불화탄소(fluorocarbon), 예를 들면, C₃-C₅ 과플루오르알칸(perfluoroalkane)인데, 이는 에코발생도(echogenicity)에서 차이 및 결과로써, 초음파 영상에서 조영을 제공한다. 상기 가스는 선택적으로, 연결기를 통하여 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드가

부착된 마이크로스피어 내에 피포되거나 내포된다. 이러한 부착은 공유 결합, 이온 결합, 판 데르 발스 힘에 의해 이루어질 수 있다.

표 3

<128> 초음파 조영제로서 이용되는 미세거품과 이들의 조성.

미세거품	가스	안정화 껍질 (Stabilizing shell)
1세대, 비-경폐 혈관		
미세거품 없음	공기	없음
Echovist (SHU 454)	공기	없음
2세대, 경폐 혈관, 짧은 반감기(< 5 min)		
Albunex	공기	알부민
Levovist (SHU 508 A)	공기	팔미트산
3세대, 경폐 혈관, 더욱 긴 반감기(> 5 min)		
Aerosomes (Definity, MRX115, DMP115)	과플루오르프로판	인지질
Echogen (QW3600)	도데카플루오르펜탄	계면활성제
Optison (FSO 69)	옥타플루오르프로판	알부민
PESDA	과플루오르부탄	알부민
Quantison	공기	알부민
QW7437	과플루오르탄소	계면활성제
Imavist (Imagent, AF0150)	과플루오르헥산	계면활성제
Sonovue (BR1)	육불화황	인지질
장기-특이적 단계(간, 비장)와 경폐		
BR14	과플루오르부탄	인지질
Levovist (SHU 508 A)	공기	팔미트산
Sonavist (SHU 563 A)	공기	시아노아크릴레이트
Sonazoid (NC100100)	과플루오르탄소	계면활성제

<129> 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드와 함께 또는 이러한 펩티드 없이, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드를 통하여 뇌종양 조직을 표적하는 X-선 조영제 적하 화합물의 투여는 X-선 전산화 단층촬영 및 다른 형태의 X-선 영상에 이용될 수 있다. 적하 화합물로서 적합한 현재 상업적으로 가용한 X-선 조영제는 2가지 종류로 분류될 수 있다: 1) 이온 카르복실기(ionic carboxyl group)를 보유하는 이온 조영제(ionic contrast agent) 및 2) 이온 기(ionic group)를 보유하지 않는 비-이온 조영제(non-ionic contrast agent). 상업적으로 가용한 이온 조영제의 실례에는 Hypaque(Diatrizoate)와 Hexabrix(Ioxaglate)이 포함되고, 비-이온 조영제에는 Omnipaque(Iohexol), Isovue(Iopamidol), Optiray(Ioversol), Visipaque(Iodixanol)가 포함된다. 적하 화합물로서 적합한 다른 X-선 조영제에는 한가지이상의 X-선 흡수 원자(absorbing atom) 또는 원자 번호 20 이상의 “중원자(heavy atom)”가 포함되지만 이들에 국한되지 않는데, 상기 조영제는 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드와 X-선 흡수 원자 사이에 선택적인 연결 모이어티, L_n을 추가로 포함한다. X-선 조영제에서 빈번하게 사용되는 중원자는 요오드(iodine)이다. 최근에, 금속 킬레이트로 구성되는 X-선 조영제(참조: U.S. Pat. No. 5,417,959) 및 복수의 금속 이온으로 구성되는 폴리킬레이트(polychelate)(참조: U.S. Pat. No. 5,679,810)가 보고되었다. 더욱 최근에, 다핵 클러스터 복합체(multinuclear cluster complex)가 X-선 조영제로서 보고되었다(참조: U.S. Pat. No. 5,804,161, PCT W091/14460, PCT WO 92/17215). 다른 X-선 조영제는 당업자에게 널리 공지되어 있고, 본 발명에서 적하 화합물로서 효과적으로 이용될 수 있다.

<130> 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드와 함께 또는 이러한 펩티드 없이, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드를 통하여 뇌종양 조직을 표적하는 MRI 조영제 적하 화합물의 투여는 MRI 영상에 이용될 수 있다. 적하 화합물로서 적합한 MRI 조영제에는 하나이상의 상자성 금속 이온(paramagnetic metal ion)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는데, 상기 조영제는 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드와 상자성 금속 이온 사이에 선택적인 연결 모이어티, L_n을 포함한다. 금속 킬레이트 화합물(metal chelate)의 금속 이온은 상자성 이온일 수 있다. 적절한 금속 이온에는 22-29(포괄적), 42, 44, 58-70(포괄적)의 원자 번호를 갖는 것들

이 포함되는데, 이들 금속 이온은 +2 또는 +3의 산화 상태(oxidation state)를 보유한다. 이런 금속 이온의 실례는 크롬(III), 망간(II), 철(II), 철(III), 코발트(II), 니켈(II), 구리(II), 프라세오디움(praseodymium)(III), 네오디뮴(neodymium)(III), 사마륨(samarium)(III), 가돌리늄(gadolinium)(III), 테르븀(terbium)(III), 디스프로슘(dysprosium)(III), 홀뮴(holmium)(III), 에르븀(erbium)(III), 이테르븀(ytterbium)(III)이다. 적하 화합물로서 적합한 상업적으로 가용한 MRI 조영제에는 GE Healthcare(Chalfont St. Giles, United Kingdom)로부터 구입가능한 Omniscan(gadodiamide)과 Teslascan이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<131> 다른 구체예에서, 적하 화합물은 세포, 예를 들면, 뇌 암세포 또는 다른 암 세포를 죽이거나 이들 세포의 성장을 저해하기 위하여 운반된다. 가령, 적하 화합물은 세포 주기 조절 단백질(cell cycle control protein), 예를 들면, p53; 사이클린-의존성 키나아제 저해물질(cyclin-dependent kinase inhibitor), 예를 들면, p16, p21 또는 p27; 자살 단백질(suicide protein), 예를 들면, 티미딘 키나아제(thymidine kinase) 또는 니트로리덕타제(nitroreductase); 사이토킨(cytokine) 또는 다른 면역조절 단백질(immunomodulatory protein), 예를 들면, 인터루킨 1, 인터루킨 2 또는 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF); 또는 독소(toxin), 예를 들면, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 외독소 A이다. 다른 구체예에서, 상기한 부류의 화합물 중에서 한가지의 생물학적 활성 단편이 운반될 수도 있다.

<132> 또 다른 구체예에서, 적하 화합물은 암을 치료하는데 사용되는 약제이다. 이런 약제에는 예로써, 5-플루오로우라실(fluorouracil); 인터페론 α; 메토트렉세이트(Methotrexate); 타목시펜(Tamoxifen); 빈크리스틴(Vincristine)이 포함된다. 암을 치료하는데 적합한 다른 적하 화합물에는 알킬화제, 예를 들면, 질소 겨자(nitrogen mustard), 알킬 설포네이트(alkyl sulfonate), 니트로소우레아(nitrosourea), 에틸렌아민(ethylenimine), 트리아젠(triazene); 대사길항물질(antimetabolite), 예를 들면, 엽산염 길항제(folate antagonist), 퓨린 유사체(purine analogue), 피리미딘 유사체(pyrimidine analogue); 항생제, 예를 들면, 안트라사이클린(anthracycline), 블레오마이신(bleomycin), 미토마이신(mitomycin), 닥티노마이신(dactinomycin), 플리카마이신(pliicamycin); 효소, 예를 들면, L-아스파라기나아제; 파르네실(farnesyl)-단백질 이전효소 저해물질; 5알파-환원효소 저해물질; 17베타.-하이드록시스테로이드 디하이드로게나아제(hydroxysteroid dehydrogenase) 타입 3의 저해물질; 호르몬제, 예를 들면, 글루코코르티코이드(glucocorticoid), 에스트로겐(estrogen)/항에스트로겐(antiestrogen), 안드로젠(androgen)/항안드로젠(antiandrogen), 프로제스틴(progestin), 황체 형성 호르몬-방출 호르몬 길항제(luteinizing hormone-releasing hormone) 길항제, 옥트레오티드 아세테이트(octreotide acetate); 미세소관-교란제(microtubule-disruptor agent), 예를 들면, 액티나시딘(ecteinascidin) 또는 이들의 유사체와 유도체; 미세소관-안정화제(microtubule-stabilizing agent), 예를 들면, 파클리탁셀(paclitaxel)(Taxol™), 도세탁셀(docetaxel)(Taxotere™), 이들의 유사체와 같은 탁산(taxane) 및 에포틸론(epothilone) A-F와 이들의 유사체와 같은 에포틸론; 식물-유래된 산물, 예를 들면, 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid), 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 탁산; 위상이성질화효소(topoisomerase) 저해물질; 프레닐(prenyl)-단백질 이전효소 저해물질; 기타 약제, 예를 들면, 하이드록시우레아(hydroxyurea), 프로카르바진(procarbazine), 미토탄(mitotane), 헥사메틸멜라민(hexamethylmelamine), 백금 배위 착화물(platinum coordination complex), 예를 들면, 시스플라틴(cisplatin)과 카보플라틴(carboplatin); 항암제와 세포독성제로서 이용되는 다른 약제, 예를 들면, 생물 반응 조절제(biological response modifier), 성장 인자(growth factor); 면역조절제(immune modulator)와 면역 항체(monoclonal antibody)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<133> 이들 부류의 항암제와 세포독성제의 대표적인 실례에는 메클로레타민 하이드로클로라이드(mechlorethamine hydrochloride), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 클로람부실(chlorambucil), 멜팔란(melphalan), 이포스파마이드(ifosfamide), 부셀판(busulfan), 카르무스틴(carmustin), 로무스틴(lomustine), 세무스틴(semustine), 스트렙토조신(streptozocin), 티오테파(thiotepa), 다카르바진(dacarbazine), 메토트렉세이트(methotrexate), 티오구아닌(thioguanine), 메르캅토피린(mercaptopyrine), 플루다라빈(fludarabine), 펜타스타틴(pentastatin), 클라드리빈(cladribin), 시타라빈(cytarabine), 플루오로우라실(fluorouracil), 독소루비신 하이드로클로라이드(doxorubicin hydrochloride), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 블레오마이신 설페이트(bleomycin sulfate), 미토마이신(mitomycin) C, 악티노마이신(actinomycin) D, 사프라신(safracin), 사프라마이신(saframycin), 퀴노카르신(quinocarcin), 디스코데르몰리드(discodermolide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 비노렐빈 주석산염(vinorelbine tartrate), 에토포시드(etoposide), 에토포시드 인산염(etoposide phosphate), 테니포시드(teniposide), 파클리탁셀(paclitaxel), 타목시펜(tamoxifen), 에스트라무스틴(estramustine), 에스트라무스틴 인산염 나트륨(estramustine phosphate)

sodium), 플루타마이드(flutamide), 부세렐린(buserelin), 레우프롤리드(leuprolide), 프테리딘(pteridine), 디에네세스(diynesese), 레바미솔(levamisole), 아플라콘(aflacon), 인터페론(interferon), 인터루킨(interleukin), 알데스루킨(aldesleukin), 필그라스티움(filgrastim), 사르그라모스티움(sargramostim), 리투시맙(rituximab), BCG, 트레티노인(tretinoin), 이리노테칸 하이드로클로라이드(irinotecan hydrochloride), 베타메타손(betamethosone), 겐시타빈 하이드로클로라이드(gemcitabine hydrochloride), 알트레타민(altretamine), 토폠테카(topoteca), 이들의 유사체 또는 유도체가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<134> 적하 화합물로서 유용한 항암제와 다른 세포독성제의 실례는 German Patent No. 4138042.8; WO 97/19086, WO 98/22461, WO 98/25929, WO 98/38192, WO 99/01124, WO 99/02224, WO 99/02514, W099/03848, WO 99/07692, WO 99/27890, WO 99/28324, WO 99/43653, WO 99/54330, WO 99/54318, WO 99/54319, WO 99/65913, WO 99/67252, WO 99/67253, WO 00/00485에 기술된 에포틸론(epothilone) 유도체; WO 99/24416(참조: U.S. Pat. No. 6,040,321)에 기술된 사이클린 의존성 키나아제(cyclin dependent kinase) 저해물질; WO 97/30992와 WO 98/54966에 기술된 프레닐-단백질 이전효소 저해물질; U.S. Pat. No. 6,011,029(상기 U.S. 특허의 화합물은 특히, 암의 치료에서 임의의 NHR 조절제, 예를 들면, AR 조절제, ER 조절제 또는 LHRH 조절제와 함께 이용될 수 있다)에 전반적으로/구체적으로 기술된 것들과 같은 약제 등이다.

<135> 적하 화합물의 다른 실례는 뇌로 유리하게 운반될 수 있는 화합물이다. 이런 적하 화합물에는 뇌에 관련된 장애를 치료하기 위한 약제와 다른 치료제가 포함된다. 이와 같은 뇌-관련된 장애에는 우울증, 정동 장애, 만성 통증, 간질, 알츠하이머병, 뇌졸중/신경보호, 뇌와 척수 손상, 뇌암, 뇌의 HIV 감염, 다양한 실조증-유발 장애(ataxia-producing disorder), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 헌팅턴병(Huntington disease), 뇌에 영향을 주는 유년기 선천성 유전자 오류(childhood inborn genetic error), 파킨슨병(Parkinson's disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<136> 우울증과 정동 장애를 치료하는 적하 화합물로서 이용되는 항우울제에는 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressant), 예를 들면, 노르트립틸린(nortriptyline), 벤라팍신(venlafaxine)(Effexor), 네파자돈(nefazadone)(Serzone); 선택적인 세로토닌 재흡수 저해물질(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI), 예를 들면, 플루옥세틴(flouxetine)(Prozac), 세르트랄린(sertraline)(Zoloft), 플루복사민(flvoxamine)(Luvox), 파록세틴(paroxetine)(Paxil), 시탈로프람(citalopram)(Celexa), 진정성 미르타제핀(sedating mirtazepine)(Remeron), 더욱 높은 활성의 부프로피온(bupropion)(Wellbutrin)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 또한, 에르고타민(ergotamine), 디하이드로에르고타민(dihydroergotamine), 케토프로펜(ketoprofen), 프로프라놀롤(propranolol), 티몰롤(timolol), 아테놀롤(atenolol), 메토프로롤(metoprolol), 나돌롤(nadolol)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 두통과 편두통 약제가 주목된다.

<137> 만성 통증을 치료하는 적하 화합물로서 이용될 수 있는 약제에는 통상적인 통증 완화제(pain reliever), 예를 들면, 아세트아미노펜(acetaminophen)(Tylenol); 소염제, 예를 들면, 아스피린(aspirin); 비-스테로이드성 소염제(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID), 예를 들면, 이부프로펜(ibuprofen)(Advil, Motrin)과 나프록센(naproxen)(Aleve); 오피오이드 통증 약제(opioid pain medication), 예를 들면, 모르핀-유사 오피오이드(morphine-like opioid); 항-경련제(anti-seizure medication)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<138> 간질을 치료하는 적하 화합물로서 이용될 수 있는 약제에는 페노바르비탈(phenobarbital), 디페닐히단토인(diphenylhydantoin), 트리메타디온(trimethadione)(Tridione), 디아제팜(diazepam)(Valium), 카르바마제핀(carbamazepine)(Tegretol), 밸프로산(valproic acid)(Depakene), Emeside(ethosuximide), Zarontin(ethosuximide), 트릴렙탈(trileptal), 카르바마제핀(carbamazepine), Kepra(levetiracetam), 라믹탈(lamictal), 아세타졸라미드(acetazolamide), 트리아가빈(triagabine), 나트륨 밸프로에이트(sodium valproate), 프레가발린(pregabalin), 클로나제팜(clonazepam), 카르바마제핀(carbamazepine), 토피라메이트(topiramate), 밸프로산(valproic acid), 라모트리진(lamotrigine), 에토숙시미드(ethosuximide), 클로바잠(clobazam), 비가바트린(vigabatrin), 레벤티라세탐(levetiracetam), 가바펜틴(gabapentin), 조니사마이드(zonisamide), 프리미돈(primidone), 페니토인(phenytoin), 옥스카르바제핀(oxcarbazepine)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<139> 알츠하이머병을 치료하는 적하 화합물로서 이용될 수 있는 약제에는 콜린에스테라아제 저해물질(cholinesterase inhibitor), 예를 들면, Razadyne(이전에, Reminyl)(galantamine), Exelon(rivastigmine), Aricept(donepezil), Cognex(tacrine), N-메틸 D-아스파르트산염(NMDA) 길항물질, Namenda(memantine)가 포함

되지만 이들에 국한되지 않는다.

- <140> 뇌졸중을 치료하거나 신경보호를 위한 적하 화합물로서 이용될 수 있는 약제에는 Gavestinel, 에리스로포이에틴(erythropoietin)(EPO), 트롬보포이에틴(thrombopoietin), TNF-알파, 에스트로겐(estrogen), 멜라토닌(melatonin), 카나비노이드(cannabinoid)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <141> 뇌의 HIV 감염을 치료하는 적하 화합물로서 이용될 수 있는 약제에는 비-뉴클레오시드 역전사효소 저해물질(non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NNRTI), 예를 들면, 델라비리딘(delavirdine), 에파비렌즈(efavirenz), 네비라핀(nevirapine); 뉴클레오시드 역전사효소 전해물질(nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI), 예를 들면, 아바카비르(abacavir), 라미부딘(lamivudine), 아바카비르(abacavir), 라미부딘(lamivudine), 지도부딘(zidovudine), 디다노신(didanosine), 엠트리시타빈(emtricitabine), 엠트리시타빈(emtricitabine), 테노포비르(tenofovir) DF, 라미부딘(lamivudine), 라미부딘(lamivudine), 지도부딘(zidovudine), 스타부딘(stavudine), 테노포비르(tenofovir) DF, 잘시타빈(zalcitabine), 지도부딘(zidovudine); 프로테아제 저해물질(PI), 예를 들면, 암프리나비르(amprinavir), 아타자나비르(atazanavir), 포삼프레나비르(fosamprenavir), 인디나비르(indinavir), 로피나비르(lopinavir), 리토나비르(ritonavir), 넬피나비르(nelfinavir), 사퀴나비르(saquinavir), 티프라나비르(tipranavir); 융합 저해물질(fusion inhibitor), 예를 들면, 엔푸비르티드(enfuvirtide)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <142> 근위축성 측삭 경화증(ALS)을 치료하는 적하 화합물로서 이용될 수 있는 약제에는 크레아틴(creatine), Myotrophin, Celebrex, Neotrogin, NAALADase, 뉴로덱스(neurodex), Rilutek, 옥산드롤론(oxandrolone), 조효소 Q10, 토피라메이트(topiramate)(Topamax), 살리프로덴(xaliproden), 인디나비르(indinavir), 미노사이클린(minocycline), 부스피론(buspiron)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <143> 헌팅턴병을 치료하는 적하 화합물로서 이용될 수 있는 약제에는 항정신병약(antipsychotic drug), 예를 들면, 할로페리돌(haloperidol), 또는 다른 약제, 예를 들면, 클로나제팜(clonazepam); 항우울제, 예를 들면, 플루옥세틴(flouxetine), 세르트랄린(sertraline), 노르트립틸린(nortriptyline); 신경안정제(tranquilizer)와 리튬(lithium); 미노사이클린(minocycline), 시탈로프람(citalopram), 에틸-EPA(Miraxion)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <144> 파킨슨병을 치료하는 적하 화합물로서 이용될 수 있는 약제에는 항콜린작용약(anticholinergic) 또는 아만타딘(amantadine), 레보도파(levodopa)(L-dopa), 브로모크립틴(bromocriptine), 페르골리드(pergolide), 프라미펙솔(pramipexole), 로피니롤(ropinirole), 셀레길린(selegiline), 아만타딘(amantadine)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <145> 다발성 경화증을 치료하는 적하 화합물로서 이용될 수 있는 약제에는 부신피질자극호르몬(adrenocorticotropic hormone)(일명, ACTH), 프레드니손(prednisone), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론(methylprednisolone), 베타메타손(betamethasone), 덱사메타손(dexamethasone), 베타 인터페론(beta interferon)(Avonex, Betaseron, Rebif), 알파 인터페론(alpha interferon), Novantrone(mitoxantrone), 사이클로스포린(cyclosporine)(Sandimmune), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide)(Cytoxan), 메토트렉세이트(methotrexate), 아자티오프린(azathioprine)(Imuran), 클라드리빈(cladribine)(Leustatin)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <146> 또 다른 구체예에서, 적하 화합물은 상기한 부류의 화합물 중에서 한가지를 코딩하는 핵산이다.
- <147> 상기한 실례는 설명의 목적으로만 제공되고, 이와 같은 많은 다른 화합물이 당업자에게 널리 공지되어 있다.
- <148> **나이세리아(Neisseria) 운반 도메인 또는 AAEAP 운반 도메인을 코딩하거나, 또는 적하 화합물에 연결된 핵산**
- <149> 다른 측면에서, 본 발명에서는 나이세리아(Neisseria)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드와 이의 변이체, 또는 적하 화합물(여기서, 적하 화합물은 단백질이다)에 연결된 나이세리아(Neisseria)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 제시한다. 본 발명에 따른 핵산 분자는 당분야에 공지된 기술의 조합으로 만들어질 수 있다. 이들 핵산에 이용되는 코딩 서열은 특정 펩티드를 인코딩하는 고유 게놈 DNA에서 확인되거나, 또는 공지된 코돈(codon)으로부터 설계될 수 있다. 이들 코딩 서열은 상기 펩티드가 발현되는 생물체의 대안적 코돈 선호도(alternate codon usage)와 바람직한 코돈 선호도(preferred codon usage)를 고려하여 설계될 수도 있다. 나이세리아(Neisseria)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드와 운반 펩티드-적하 복합체에 대한 핵산 서열은 화학적 합성(chemical synthesis) 또는 클로닝(cloning)에 의해 개별적으로 제조

될 수 있다. 이후, 핵산 서열은 리가아제(ligase)로 서로 결합시켜 목적하는 핵산 분자를 제공한다.

<150> 나이세리아(*Neisseria*) 또는 AAEAP 운반 도메인을 이용하여 적하 화합물을 운반하는 방법

<151> 본 발명의 조성물은 예로써, 세포 유형의 탐지 또는 영상(imaging), 암(특히, 중추신경계와 뇌에서)의 치료, 또는 뇌에 관련된 장애의 치료에 이용될 수 있다. 이들 조성물은 치료 효과량으로 투여된다. 전형적으로, 숙주 생물체는 포유동물, 예를 들면, 인간 또는 동물이다.

<152> 일부 구체예에서, 적하 화합물은 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드에 복합되어 운반되고, 다른 구체예에서, 적하 화합물은 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드와 공동-투여되지만 이에 복합되지 않는다. 하나이상의 적하 화합물이 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드와 공동-투여될 수 있다. 적하 화합물의 공동-투여는 동일한 제약학적 제제에서, 또는 운반 펩티드를 투여하고 대략 1시간 이내에 투여되는 다른 제약학적 제제에서 운반 펩티드의 투여와 동시성(contemporaneous)일 수 있다. 이에 더하여, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드와 적하 화합물의 공동-투여는 적하 화합물의 투여로부터 대략 1시간 이상이지만 대략 2시간, 4시간, 6시간, 12시간 또는 24시간 이내에 진행되는, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 투여를 수반한다. 일부 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드, 적하 화합물, 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드가 공동-투여된다. 다른 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드는 적하 화합물과 복합되는 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드와 공동-투여된다.

<153> 본 발명의 다양한 다른 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드는 시험관내에서 (*in vitro*), 탈체에서(*ex vivo*) 또는 생체내에서(*in vivo*) 적하 화합물을 세포 내로 운반한다. 가령, 운반은 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드와 적하 화합물의 복합체를 세포 배양액, 예를 들면, 생검물(biopsy)에 추가함으로써 시험관내에서 달성된다. 대안으로, 운반은 이러한 복합체를 환자로로부터 떼어낸 샘플, 예를 들면, 혈액, 조직, 또는 골수에 추가하고, 처리된 샘플을 환자로 환원함으로써 탈체에서 달성된다. 운반은 또한, 복합체를 환자에 직접 투여함으로써 달성될 수도 있다. 본 발명의 방법은 치료, 예방, 진단 또는 연구 목적으로 이용될 수 있다.

<154> 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드를 포함하는 복합체를 비롯한 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드를 함유하는 조성물은 임의의 적절한 경로에 의해, 예를 들면, 경구, 협측, 흡입, 설하, 직장, 질, 경요도(transurethral), 비강, 국소, 경피, 다시 말하면, 경피 또는 비경구(정맥내, 근육내, 피하, 관상동맥내 포함), 또는 뇌실내(intracerebroventricular) 또는 뇌내(intracerebral) 주입에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물과 이의 제약학적 제제는 의도된 목적을 달성하는 효과량으로 투여될 수 있다. 암을 치료하거나, 또는 임의의 다른 장애에 요구되는 치료를 제공하기 위하여 투여되는 경우에, 조성물은 치료 효과량으로 투여된다. 다양한 적하 화합물의 용량(dosage)과 투약 일정(administration schedule)에 대한 보도(guidance)는 치료 또는 진단에서 이런 화합물의 용도를 기술하는 다수의 참고문헌, 예를 들면, the Physicians' Desk Reference(PDR)로부터 입수되거나, 또는 당업자에 의해 결정될 수 있다.

<155> 본 발명의 조성물은 널리 공지된 통상적인 멸균 기술로 멸균되거나, 또는 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수용액은 원상태로 포장되거나, 또는 냉동 건조되는데, 이러한 냉동 건조된 제조물은 투여에 앞서 무균 용액과 혼합된다.

<156> 본 발명에 따른 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드, 적하 화합물 및/또는 운반 펩티드-적하 화합물 복합체를 정맥내 방식으로 투여하는 경우에, 이러한 투여는 정맥내 점적주입(intravenous drip) 또는 간헐적 주입(intermittent infusion)으로 달성된다.

<157> 정확한 제제, 투여 경로, 용량은 환자의 상태를 고려하여 주치의 또는 담당 의사에 의해 결정된다. 용량과 휴지기는 치료 효과를 유지할 만큼 충분한 혈장 수준의 본 발명의 조성물을 제공하기 위하여 개별적으로 조정될 수 있다. 일반적으로, 원하는 조성물은 의도된 투여 경로와 표준 제약학적 관례에 따라 선택된 제약학적 담체와의 혼합물로 투여된다.

<158> 적절한 용량은 예로써, 이용된 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드를 보유하는 화합물, 적하 화합물, 호스트(host), 투여 방식, 치료되거나 진단되는 질환의 특성과 심각도에 따라 달라질 것이다. 하지만, 본 발명의 방법의 한 구체예에서, 인간에서 만족스런 치료 결과는 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드 또는 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드 복합체를 보유하는 화합물의 체중 kg당 대략 0.01 내지 20 mg의 일일 용량(daily dosage)에서 달성되는 것으로 지정된다. 한 구체예에서, 인간에서 치료

를 위하여 지정된 일일 용량은 예로써, 1일 분량, 1주일 분량, 1개월 분량 및/또는 연속 투약(continuous dosing)으로 편의하게 투여되는 대략 0.7 mg 내지 1400 mg 범위의 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드 또는 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드 복합체를 보유하는 화합물이다. 1일 분량은 1일 1회 내지 12회 또는 그 이상으로 불연속적으로 투약될 수 있다. 대안으로, 분량은 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 1주일마다, 이와 유사하게 최대 31일 이상까지 하루씩 증가하여 투약될 수 있다. 투약은 정제, 패치, i.v. 투여 등을 비롯한 임의의 적용가능한 투약 형태(dosing form)를 이용하는 연속적, 간헐적 또는 단일 투약일 수 있다. 더욱 구체적으로, 조성물은 치료 효과량으로 투여된다. 특정한 구체예에서, 치료 효과량은 체중 kg당 대략 0.01-20 mg이다. 특정한 구체예에서, 용량 수준은 대략 10 mg/kg/day, 대략 15 mg/kg/day, 대략 20 mg/kg/day, 대략 25 mg/kg/day, 대략 30 mg/kg/day, 대략 35 mg/kg/day, 대략 40 mg/kg/day, 대략 45 mg/kg/day 또는 대략 50 mg/kg/day이다.

- <159> 이러한 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드(s) 또는 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드 복합체를 함유하는 조성물을 환자에 도입하는 방법은 일부 구체예에서, 암을 치료하는 것으로 알려져 있는 다른 약제와의 공동-투여(co-administration)이다. 이들 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 특정한 구체예에서, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드 또는 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드 복합체를 함유하는 조성물은 암을 치료하는 다른 약제를 포함하는 칵테일의 일부이거나, 또는 이들 약제와 공동-투여된다. 이들 약제는 암의 치료를 위한 본 명세서에 기술된 임의의 적하 화합물을 포함한다.
- <160> 본 발명의 조성물을 함유하는 제약학적 조성물은 이러한 조성물의 가공을 용이하게 하는 부형제와 보조성분; 이러한 조성물의 분비를 저해하거나 촉진하는 활성 물질, 또는 이들의 혼합물을 함유하는 한가지이상의 생리학적 으로 허용되는 담체를 이용한 통상적인 방식으로, 치료에 이용될 수 있는 제제로 조제될 수 있다.
- <161> 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드, 또는 운반 펩티드와 적하 화합물 및/또는 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드를 통합하는 융합 단백질(fusion protein)을 인코딩하는 핵산 분자는 벡터 내로 삽입되고, 유전자 요법 벡터(gene therapy vector)로서 이용될 수 있다. 유전자 요법 벡터는 예로써, 정맥내 주사, 국소 투여(U.S. Patent No. 5,328,470), 또는 정위 주입(stereotactic injection)(Chen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 91:3054-57 (1994))에 의해 개체에 운반될 수 있다. 유전자 요법 벡터의 제약학적 제제는 허용되는 희석제를 함유하거나, 또는 유전자 운반 운반체가 끼워 넣어드는 지연 방출 매트릭스(slow release matrix)를 포함할 수 있다. 대안으로, 제조할 세포, 예를 들면, 레트로바이러스 벡터로부터 원형으로 완전한 유전자 운반 벡터가 생산될 수 있는 경우에, 제약학적 제제는 이러한 유전자 운반 시스템을 생산하는 하나이상의 세포를 포함할 수 있다.
- <162> 한 측면에서, 조성물은 DNA로서 운반되고, 이러한 복합체가 *in situ*에서 산출된다. 한 구체예에서, DNA는 예로써, Ulmer *et al.*, Science, Vol.259, pp-1745-49(1993)에 기술되고 Cohen, Science, vol.259, pp-1691-92(1993)에서 검토된 바와 같이 “나신(naked)”이다. 나신 DNA의 흡수는 DNA를 담체, 예를 들면, 세포 내로 효과적으로 운반되는 생물분해성 비드 상에 코팅함으로써 증가될 수 있다. 이런 방법에서, DNA는 핵산 발현 시스템, 세균 발현 시스템, 바이러스 발현 시스템을 비롯한 당업자에게 공지된 다양한 운반 시스템 내에 존재한다. DNA를 이런 발현 시스템 내로 통합하는 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다(참조: WO90/11092, WO93/24640, WO93/17706, U.S. Pat. No. 5,736,524).
- <163> 생물체로부터 생물체로 유전 물질을 이동시키는데 사용되는 벡터는 크게 2가지 부류로 구분될 수 있다: 클로닝 벡터는 적합한 숙주 세포 내에서 증식에 필수적이고 외래 DNA가 삽입될 수 있는 영역을 보유하는 복제 플라스미드 또는 파지이다; 외래 DNA는 벡터의 구성요소인 것처럼 복제되고 증식된다. 발현 벡터(가령, 플라스미드, 효모 또는 동물 바이러스 계통)는 외래 DNA, 예를 들면, 본 발명의 조성물의 DNA를 전사하고 번역하기 위하여 숙주 세포 또는 조직 내로 외래 유전물질을 도입하는데 이용된다. 발현 벡터에서, 도입된 DNA는 삽입된 DNA를 전사하도록 숙주 세포에 신호하는 프로모터와 같은 요소에 작동가능하게 연결된다. 특정 인자에 대응하여 유전자 전사를 조절하는 유도성 프로모터와 같은 일부 프로모터가 특히 유용하다. 조성물 폴리뉴클레오티드를 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결하면, 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드 조성물 폴리펩티드 또는 단편의 발현을 조절할 수 있다. 고전적인 유도성 프로모터의 실례는 α -인터페론, 열 충격, 중금속 이온 및 스테로이드, 예를 들면, 글루코코르티코이드(Kaufman, Methods Enzymol. 185:487-511 (1990))와 테트라사이클린에 반응하는 프로모터이다. 다른 바람직한 유도성 프로모터는 이러한 구조체가 삽입되는 세포에 내인성이 아니지만 유도 인자(induction agent)가 외부로부터 공급되면 이들 세포에서 반응하는 프로모터이다. 일반적으로, 유용한 발현 벡터는 주로 플라스미드이다. 하지만, 다른 형태의 발현 벡터, 예를 들면, 바이러스 벡터(가령, 복

제 결합성 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관된 바이러스) 역시 고려된다.

<164> 벡터 선택은 이용되는 생물체 또는 세포 및 벡터의 원하는 목적에 좌우된다. 일반적으로, 벡터는 신호 서열, 복제 기점, 마커 유전자, 인헨서 요소, 프로모터, 전사 종결 서열을 포함한다.

<165> **나이세리아(Neisseria) 운반 도메인을 함유하는 제약학적 조성물**

<166> 나이세리아(Neisseria)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드, 또는 적하 화합물에 연결된 나이세리아(Neisseria)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 복합체를 함유하는, 본 발명의 제약학적 조성물은 임의의 통상적인 방식, 예를 들면, 통상적인 혼합, 분해, 과립화, 당의정-만들기, 에멀전화, 캡슐화, 포획, 또는 냉동 건조 과정으로 제조될 수 있다. 이러한 나이세리아(Neisseria)/AAEAP 운반 펩티드 복합체는 당분야에 공지된 제약학적으로 허용되는 담체와 용이하게 혼합될 수 있다. 이들 담체는 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로의 제조를 가능하게 한다. 적절한 담체 또는 부형제에는 예로써, 충전제와 셀룰로오스 제조물이 포함될 수 있다. 적절한 부형제에는 예로써, 충전제와 셀룰로오스 제조물 역시 포함된다. 다른 부형제에는 예로써, 향료, 착색제, 디태크피어(detackifier), 농후제(thickness) 및 다른 허용되는 첨가제, 어쥬번트 또는 결합제가 포함될 수 있다.

<167> 다양한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 담체와 부형제(완충제, 탄수화물, 만니톨, 단백질, 폴리펩티드 또는 아미노산(가령, 글리신), 향산화제, 세균발육 저해제, 킬레이트화제, 현탁제, 농후제 및/또는 보존제 포함), 물, 오일, 염수 용액, 수성 텍스트로스와 글리세롤 용액, 생리 조건을 근사하기 위하여 요구되는 다른 제약학적으로 허용되는 보조 물질(가령, 완충제, 긴장도 조절제(tonicity adjusting agent), 적심제(wetting agent) 등)를 함유한다. 당업자에게 공지된 임의의 적절한 담체가 본 발명의 조성물을 투여하는데 이용될 수 있긴 하지만, 담체의 유형은 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 화합물은 널리 공지된 기술을 이용하여 리포솜 내에 피포될 수도 있다. 생물분해성 마이크로스피어 역시 본 발명의 조성물에 대한 담체로서 이용될 수 있다. 적절한 생물분해성 마이크로스피어는 예로써, U.S. Patent No. 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883; 5,853,763; 5,814,344; 5,942,252에서 기술된다. 본 명세서에서 “화합물”은 본 발명의 펩티드, 아미노산 서열, 적하 화합물과 복합체, 핵산을 포괄한다.

<168> 나이세리아(Neisseria)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드, 적하, 운반 펩티드-적하 복합체, 핵산을 투여하기 위한 제약학적 조성물을 제조하는데 이용되는 정맥액은 결정질(crystalloid) 또는 콜로이드(colloid)로 구성될 수 있다. 본 명세서에서 결정질은 무기 염 또는 다른 수용성 분자의 수용액이다. 본 명세서에서 콜로이드에는 젤라틴(gelatin)과 같은 대형 불용성 분자가 포함된다. 정맥액은 무균이다.

<169> 정맥내 투여에 이용되는 결정질액(crystalloid fluid)에는 표 4에 기술된 바와 같이, 정상 염수(0.9% 농도에서 염화나트륨 용액), 링거 락테이트(Ringer's lactate) 또는 링거액(Ringer's solution), 물에 녹인 5% 텍스트로스 용액(일명, D5W)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

표 4

<170> **공통 결정질 용액의 조성**

용액	다른 명칭	[Na ⁺]	[Cl ⁻]	[글루코오스]
D5W	5% 텍스트로스	0	0	252
2/3 & 1/3	3.3% 텍스트로스/ 0.3% 염수	51	51	168
반-정상 염수	0.45% NaCl	77	77	0
정상 염수	0.9% NaCl	154	154	0
링거 락테이트*	링거액	130	109	0

<171> *링거 락테이트는 28 mmol/l 락테이트, 4 mmol/l K⁺, 3 mmol/l Ca²⁺ 역시 함유한다.

<172> 본 발명의 조성물의 혈류에서 반감기는 원형화된 펩티드(circularized peptide)(Monk et al., BioDrugs 19(4):261-78, (2005); DeFreest et al., J. Pept. Res. 63(5):409-19 (2004)), D,L-펩티드(부분입체이성질체)(Futaki et al., J. Biol. Chem. Feb 23;276(8):5836-40 (2001); Papo et al., Cancer Res. 64(16):5779-86 (2004); Miller et al, Biochem. Pharmacol. 36(1):169-76, (1987)), 특수한 아미노산을 보유하는 펩티드

(Lee et al., J. Pept. Res. 63(2):69-84 (2004)), N-과 C-말단 변형(Labrie et al., Clin. Invest. Med. 13(5):275-8, (1990))을 비롯한 당업자에게 널리 공지된 여러 방법으로 연장되거나 최적화될 수 있다. 특히, d-이성질화(isomerization)(치환) 및 D-치환 또는 L-아미노산 치환에 의한 펩티드 안정성(peptide stability)의 변형이 주목된다.

<173> 주사로 투여되는 경우에, 조성물은 수용액, 바람직하게는, 생리 적합성 완충제, 예를 들면, Hanks 용액, 링거액, 또는 생리 식염수 내에서 제조된다. 용액은 제제 약물(formulatory agent), 예를 들면, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유한다. 대안으로, 조성물은 사용에 앞서, 적절한 운반제, 예를 들면, 발열원 없는 무균 수로 구성(constitution)을 위한 분말 형태로 조제된다.

<174> 흡입으로 투여되는 경우에, 조성물은 적절한 추진제(propellant), 예를 들면, 디클로로디플루오르메탄, 트리클로로플루오르메탄, 이산화탄소 또는 다른 적절한 가스를 이용한, 가압된 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 운반된다. 가압된 에어로졸의 경우에, 투약 단위(dosage unit)는 정량을 운반하는 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 예로써, 흡입기 또는 취입기에 이용되는 젤라틴의 캡슐과 카트리지는 단백질 및 적절한 분말 기부(base), 예를 들면, 락토오스 또는 전분의 분말 혼합물을 함유하도록 제조된다.

<175> 국소 투여되는 경우에, 조성물은 당분야에 널리 공지된 바와 같이, 용액, 겔, 연고, 크림, 현탁액 등으로 제조된다. 일부 구체예에서, 투여는 경피 패치에 의해 달성된다. 좌약(가령, 직장 또는 질)으로 투여되는 경우에, 조성물은 통상적인 좌약 기부(suppository base)를 함유하는 조성물 형태로 제조된다.

<176> 경구 투여되는 경우에, 조성물은 당분야에 널리 공지된 제약학적으로 허용되는 담체와의 조합으로 용이하게 제조될 수 있다. 고형 담체, 예를 들면, 만니톨, 락토오스, 스테아르산마그네슘 등이 이용된다; 이들 담체는 이러한 화학주성물질(chemotaxin)이 치료되는 개체에 의한 경구 섭취용으로 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 제조될 수 있도록 한다. 경구 고형 제제, 예를 들면, 분말, 캡슐, 정제에 적합한 부형제에는 충전제(가령, 당), 셀룰로오스 제조물, 과립화제, 결합제 등이 포함된다.

<177> 당분야에 널리 공지된 다른 통상적인 담체에는 다가 담체, 예를 들면, 세균 캡슐 다당류, 텍스트란 또는 유전자 조작된 백터 역시 포함된다. 이에 더하여, 이러한 조성물을 함유하는 서방 제제는 연장된 기간 동안 상기 조성물을 방출하는데, 이런 서방 제제가 없는 경우에 조성물은 치료 효과를 유도하거나 강화하기에 앞서, 예로써 프로테아제 및 간단한 가수분해에 의해 개체의 조직으로부터 제거되고 및/또는 분해된다.

<178> **나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 도메인을 포함하는 키트**

<179> 다른 측면에서, 본 발명에서는 포장 또는 용기 내에 (1) 적하 화합물에 연결된 나이세리아(*Neisseria*) 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드의 복합체를 함유하는 반응물; (2) 제약학적으로 허용되는 어쥬번트 또는 부형제를 함유하는 반응물; (3) 투여용 운반기(vehicle), 예를 들면, 주사기; (4) 투약을 위한 사용설명서 중에서 한가지 이상을 포함하는 키트를 제시한다. 구성요소 (1)-(4) 중에서 2가지 이상이 동일 포장 또는 용기 내에서 발견되는 구체예 역시 고려된다. 다른 구체예에서, 키트 구성요소는 나이세리아(*Neisseria*) 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드를 함유하는 반응물 및 적하 화합물을 함유하는 별개의 반응물을 포함한다. 다른 구체예에서, 키트는 나이세리아(*Neisseria*) 또는 AAEAP(SEQ ID NO: 25) 운반 펩티드를 함유하는 반응물을 포함하지만, 적하 화합물을 함유하는 반응물을 포함하지 않는다. 다른 구체예에서, 이들 반응물은 정맥내 투여(intravenous administration) 용으로 제조되고 및/또는 정맥내 투여를 위하여 투여 운반제가 적합하다. 일부 구체예에서, 키트는 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드, 구체적으로, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 아주린을 포함한다. 다른 구체예에서, 키트는 적하 화합물을 나이세리아(*Neisseria*)/AAEAP 운반 펩티드, 또는 쿠프레독신-유래된 운반 펩티드에 연결하기 위한 반응물을 포함한다.

<180> 키트가 공급되는 경우에, 조성물의 서로 다른 구성요소는 별개의 용기 내에 포장되고 사용 직전에 혼합될 수 있다. 이들 구성요소의 이와 같은 개별 포장은 활성 구성요소의 기능 상실 없이 장기적인 저장을 가능하게 한다.

<181> 키트에 포함되는 반응물은 일정한 용기에 담아 공급함으로써, 서로 다른 구성요소의 수명이 보존되고 용기 재료에 의해 흡수되거나 변화되지 않도록 한다. 가령, 밀봉된 유리 앰플은 냉동 건조된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드, 또는 중성의 비-활성 가스, 예를 들면, 질소 하에 포장된 완충제를 포함한다. 앰플은 임의의 적절한 재료, 예를 들면, 유리, 유기 중합체(가령, 폴리카보네이트, 폴리스티렌 등), 세라믹, 금속, 또는 유사한 반응물을 유지시키는데 전형적으로 이용되는 임의의 다른 물질로 구성된다. 적절한 용기의 다른 실례는 앰플과 유사한 물질로부터 제조되는 간단한 병 및 알루미늄이나 합금과 같은 박을 입힌 내부를 보유하는 덮개이다. 다른 용기에는 검사 튜브, 바이알, 플라스크, 병, 주사기 등이 포함된다. 용기는 무균 접근 포트(access port), 예를 들

면, 피하 주사 바늘이 관통할 수 있는 마개가 달린 병을 보유한다. 다른 용기는 용이하게 제거가능하고 제거 이후에 구성요소들이 혼합될 수 있도록 하는 막에 의해 분리되는 2개의 구획(compartment)을 보유한다. 제거가능 막은 유리, 플라스틱, 고무 등이다.

<182> 키트에는 사용설명서 역시 제공될 수 있다. 사용설명서는 종이 또는 다른 기질에 인쇄되고 및/또는 전자-판독가능 매체, 예를 들면, 플로피 디스크, CD-ROM, DVD-ROM, Zip 디스크, 비디오테이프, 오디오테이프, 플래시 메모리 장치 등으로 제공될 수 있다. 상세한 사용설명서는 키트에 물리적으로 부착되지 않을 수도 있다; 대신에, 사용자는 이러한 키트의 제조업체 또는 유통업체에 의해 특정된 인터넷 웹 사이트를 안내받거나, 또는 사용설명서를 전자 메일로서 제공받을 수도 있다.

<183> 본 발명의 더욱 완전한 이해는 아래의 구체적인 실시예를 참조함으로써 달성될 수 있다. 이들 실시예는 예시의 목적으로만 기술되고, 본 발명의 범위를 한정하지 않는다. 형태에서 변화 및 등가물의 치환은 편법으로 간주된다. 본 명세서에서 특정한 용어가 이용되고 있긴 했지만, 이들 용어는 설명을 목적으로 하고 본 발명을 제한하지 않는다. 본 발명의 기술적 사상과 범주를 벗어나지 않는 본 발명의 개변이 가능하고, 따라서, 본 발명은 첨부된 특허청구범위에 의해서만 한정된다.

실시예

<184> **실시예 1. Laz와 H.8-아주린 융합 유전자의 클로닝과 발현**

<185> 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)으로부터 *laz* 유전자는 공지된 서열(SEQ ID NO: 1)에 기초하여 클론하였다(도 1A). *paz*(도 1B)로 지칭되는 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 유전자(SEQ ID NO: 2) 및 임균(*N. gonorrhoeae*)으로부터 *laz*의 H.8 에피토프의 서열(SEQ ID NO: 3)은 아래 기술된 바와 같이, H.8-*paz*(도 1C)를 산출하기 위하여 *paz*의 5'-말단 내에, 또는 *paz*-H.8(도 1D)을 산출하기 위하여 *paz*의 3'-말단 내에 H.8 에피토프 유전자를 인 프레임(in frame) 클론하는데 이용되었다.

<186> **세포주와 반응물.** 인간 암 세포, 세균 균주 및 플라스미드는 표 5에 열거된다. 인간 유방암 MCF-7 세포와 뇌종양 LN-229 세포는 Department of Surgical Oncology, University of Illinois at Chicago(UIC)의 균주 보관 컬렉션(stock culture collection)로부터 획득된다. 이들 세포는 2 mM L-글루타민, 0.1 mM MEM 필수 아미노산을 포함하고 10% 열-불활화된 태아 소 혈청, 100 unit/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신으로 보충된 Eagle 염(Eagle's salt)과 함께, MEM 내에서 배양하였다. 모든 세포는 37°C에서 5% CO₂ 하에 성장시켰다 (Yamada, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002); Punj, *et al.*, Oncogene 23:2367-2378 (2004)).

표 5

<187> 암 세포, 세균 균주 및 유전자 구조체

세포/균주/플라스미드	상대적 특징*	참고문헌
LN-229	인간 뇌 아교모세포종	Ishii, <i>et al.</i> , Brain Pathol. 9:469-479 (1999)
MCF-7	인간 유방 선암종	Soule, <i>et al.</i> , J. Natl. Cancer. Inst. 51:1409-1416 (1973); Punj, <i>et al.</i> , Oncogene 23:2367-2378 (2004)
녹농균(<i>P. aeruginosa</i>) PAO1	원형양체, FP- (성별 인자 마이너스)	Holloway, <i>et al.</i> , Microbiol. Rev. 43:73-102 (1979)
대장균(<i>E. coli</i>) JM109	클로닝과 아주린 발현 균주	Yanisch-Perron, <i>et al.</i> , Gene 33:103-119 (1985)
대장균(<i>E. coli</i>) BL21 (DE3)	GST 발현 균주	Novagen
임균(<i>N. gonorrhoeae</i>) F62	DNA 분리에 이용되는 원형양체 (Prototroph)	American Type Culture Collection
pUC18	일반적인 클로닝 벡터, Ap ^r	Yanisch-Perron, <i>et al.</i> , <i>id.</i>
pUC19	일반적인 클로닝 벡터, Ap ^r	Yanisch-Perron, <i>et al.</i> , <i>id.</i>

pUC18- <i>laz</i>	pUC18 내로 클론된 임균(<i>N. gonorrhoeae</i>) F62의 게놈 DNA로부터 1 kb PCR 단편	본 명세서
pUC19- <i>paz</i>	<i>HindIII</i> 와 <i>PstI</i> 절단된 pUC19내로 클론된 녹농균(<i>P. aeruginosa</i>) PA01로부터 0.55 kb PCR 단편, Ap ^r	Yamada, <i>et al.</i> , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002); Yamada, <i>et al.</i> , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:4770-4775 (2004)
pUC18-H.8- <i>paz</i>	임균(<i>N. gonorrhoeae</i>)으로부터 H.8 및 녹농균(<i>P. aeruginosa</i>) PA01로부터 아주린을 인코딩하는 융합 플라스미드, Ap ^r	본 명세서
pUC19- <i>paz</i> -H.8	녹농균(<i>P. aeruginosa</i>) PA01로부터 아주린 및 임균(<i>N. gonorrhoeae</i>)으로부터 H.8을 인코딩하는 융합 플라스미드, Ap ^r	본 명세서
pGEX-5X-3	GST 유전자 융합 벡터, Ap ^r	Amersham
pET29a	대장균(<i>E. coli</i>) 발현 벡터, Km ^r	Novagen
pET29a- <i>gst</i>	<i>gst</i> 유전자를 보유하는 pET29a 유도체, Km ^r	본 명세서
pET29a-H.8- <i>gst</i>	H.8- <i>gst</i> 유전자를 보유하는 pET29a 유도체, Km ^r	본 명세서
pGEX-5X-3-H.8	H.8-인코딩 영역을 보유하는 pGEX-5X-3 유도체, Ap ^r	본 명세서
pET29a- <i>gst</i> -H.8	<i>gst</i> -H.8 유전자를 보유하는 pET29a 유도체, Km ^r	본 명세서

<188> *Ap, 암피실린; Km, 카나마이신; GST, 글루타티온 S-전이효소.

<189> ***paz*와 *laz* 유전자의 클로닝과 발현.** 아주린 유전자의 클로닝과 과다발현(hyperexpression)은 기존 문헌(Yamada, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103(2002); Punj, *et al.*, Oncogene 23:2367-2378(2004))에서 기술되었다. 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)의 *Laz*-인코딩 유전자(*laz*)는 임균(*N. gonorrhoeae*) 균주 F62의 게놈 DNA를 주형 DNA로 하는 PCR로 증폭하였다. 이용된 정방향과 역방향 프라이머는 5'-CCGGAATTCGGCAGGGATGTTGTAATATCCG-3'(SEQ ID NO: 4)과 5'-GGGGTACCGCCGTGGCAGGCATACAGCATTTCAATCCG-3'(SEQ ID NO: 5)인데, 여기서 *EcoRI*와 *KpnI* 부위의 부가적으로 도입된 제한 부위는 각각 밑줄로 표시된다. *EcoRI*와 *KpnI*로 절단된 1.0 kb의 증폭된 DNA 단편은 pUC18 벡터(Yanisch-Perron, *et al.*, Gene 33:103-119(1985))의 상응하는 부위 내로 삽입하여 *laz* 유전자를 lac 프로모터의 하류에 배치함으로써 발현 플라스미드 pUC18-*laz*를 산출하였다(표 5, 도 1).

<190> 임균(*N. gonorrhoeae*) *Laz*의 H.8과 녹농균(*P. aeruginosa*)의 아주린(*Paz*)의 융합체를 발현하는 플라스미드는 pUC19-*paz*와 pUC18-*laz*를 주형으로 하는 PCR로 작제하였다. H.8-*Paz* 융합체의 경우에, 3.1 kb 단편은 주형으로서 pUC18-*laz* 및 프라이머, 5'-(인산화된)GGCAGCAGGGCTTCGGCAGCATCTGC-3'(SEQ ID NO: 6)과 5'-CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCG-3'(SEQ ID NO: 7)으로 증폭하였는데, 여기서 *SalI* 부위는 밑줄로 표시된다. PCR 증폭된 0.4 kb 단편은 주형으로서 pUC19-*paz* 및 프라이머, 5'-(인산화된)GCCGAGTGTCGGTGGACATCCAGG-3'(SEQ ID NO: 8)과 5'-TACTCGAGTCACTTCAGGGTCAGGGTG-3'(SEQ ID NO: 9)으로부터 획득하였는데, 여기서 *XhoI* 부위는 밑줄로 표시된다. pUC18-*laz*로부터 *SalI* 절단된 PCR 단편 및 pUC19-*paz*로부터 *XhoI* 절단된 PCR 단편을 클론하여 발현 플라스미드 pUC18-H.8-*paz*를 산출하였다(표 5, 도 1).

<191> *Paz*-H.8 융합체의 경우에, 3.3 kb 단편은 주형으로서 pUC19-*paz* 및 프라이머, 5'-CTTCAGGGTCAGGGTGCCTTCATC-3'(SEQ ID NO: 10)과 5'-CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCG-3'(SEQ ID NO: 11)으로 증폭하였는데, 여기서 *BamHI* 부위는 밑줄로 표시된다. 0.13 kb 단편은 주형으로서 pUC18-*laz* 및 프라이머, 5'-(인산화된)TGCTCTAAGAACCTGCCGCGCTGC-3'(SEQ ID NO: 12)과 5'-TAGGATCCTAGGCAGCAGGGCTTCGGCAGCATCTGC-3'(SEQ ID NO: 13)로 증폭하였는데, 여기서 *BamHI* 부위는 밑줄로 표시되고, 세균 유전자 종결 코돈(stop codon)에 해당하는 부가적으로 도입된 TTA는 이탈릭체로 표시된다. 2개의 *BamHI* 절단된 PCR 단편은 클론하여 발현 플라스미드 pUC19-*paz*-H.8을 산출하였다(표 5).

<192> 대장균(*E. coli*) JM109는 아주린과 이의 유도체 유전자의 발현을 위한 숙주 균주(host strain)로서 이용하였다.

제조합 대장균(*E. coli*) 균주는 37°C에서 16시간동안, 100 µg/ml 암피실린, 0.1 mM IPTG, 0.5 mM CuSO₄를 포함하는 2 X YT 배지에서 배양하여 이들 아주린 단백질을 생산하였다.

- <193> **융합 GST 단백질에 대한 플라스미드 작제.** 글루타티온 S-전이효소(GST)-인코딩 유전자는 pGEX-5X-3(GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ)을 주형 DNA로 하는 PCR로 증폭하였다. 이용된 정방향과 역방향 프라이머는 5'-CGAGCTCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGG-3'(SEQ ID NO: 14)과 5'-CCCAAGCTTTCAGGGGATCCCACGACCTTCGATCAGATCC-3'(SEQ ID NO: 15)인데, 여기서 *SacI*과 *HindIII*의 부가적으로 도입된 제한 부위(restriction site)는 밑줄로 표시되고, 세균 유전자 종결 코돈에 해당하는 부가적으로 도입된 TCA는 이탤릭체로 표시된다. *SacI*과 *HindIII*으로 절단된 1.0 kb의 증폭된 DNA 단편은 pET29a 벡터의 상응하는 부위 내로 삽입하여 발현 플라스미드 pET29a-*gst*(표 5)를 산출하였다.
- <194> H.8-GST 융합체의 경우에, *laz*의 신호 펩티드와 H.8-인코딩 영역은 pUC18-*laz*를 주형 DNA로 하는 PCR로 증폭하였다. 이용된 정방향과 역방향 프라이머는 5'-GGAATTCATATGAAAGCTTATCTGGC-3'(SEQ ID NO: 16)과 5'-CCGGAATTCGGCAGCAGGGGCTTCGGC-3'(SEQ ID NO: 17)인데, 여기서 *NdeI*과 *EcoRI* 부위의 부가적으로 도입된 제한 부위는 각각, 밑줄로 표시된다. *NdeI*과 *EcoRI*로 절단된 0.14 kb의 증폭된 DNA 단편은 pET29a-*gst* 벡터의 해당 부위 내로 삽입하여 발현 플라스미드 pET29a-H.8-*gst*(표 5)를 산출하였다.
- <195> GST-H.8 융합체의 경우에, H.8-인코딩 영역은 pUC18-*laz*를 주형 DNA로 하는 PCR로 증폭하였다. 이용된 정방향과 역방향 프라이머는 5'-CGGGATCCCCTGCTCTCAAGAACCTGCCGCGCC-3'(SEQ ID NO: 18)과 5'-CGGAATTCCTAGGCAGCAGGGGCTTCGGCAGCATCTGCAGG-3'(SEQ ID NO: 19)인데, 여기서 *BamHI*과 *EcoRI*의 부가적으로 도입된 제한 부위는 밑줄로 표시되고, 도입된 세균 유전자 종결 코돈 TTA는 이탤릭체로 표시된다. *BamHI*과 *EcoRI*로 절단된 0.14 kb의 증폭된 DNA 단편은 pGEX-5X-3 벡터의 해당 부위 내로 삽입하여 pGEX-5X-3-H.8을 산출하였다. 이후, GST-H.8 융합 영역은 pGEX-5X-3-H.8을 주형 DNA로 하는 PCR로 증폭하였다. 이용된 정방향과 역방향 프라이머는 5'-CGAGCTCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGG-3'(SEQ ID NO: 20)과 5'-CCGCTCGAGTCAGGCAGCAGGGGCTTCGGCAG-3'(SEQ ID NO: 21)인데, 여기서 *SacI*과 *XhoI* 부위의 부가적으로 도입된 제한 부위는 밑줄로 표시되고, 세균 유전자 종결 코돈은 이탤릭체로 표시된다. *SacI*과 *XhoI*로 절단된 1.1 kb의 증폭된 DNA 단편은 pET29a 벡터의 해당 부위 내로 삽입하여 발현 플라스미드 pET29a-*gst*-H.8(표 5)을 산출하였다.
- <196> 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)은 *gst*와 이의 융합 유도체의 발현을 위한 숙주 균주(host strain)로서 이용하였다.
- <197> 아주린에서 기술된 바와 같이, 이들 플라스미드를 보유하는 대장균(*E. coli*) 균주를 IPTG의 존재에서 성장시키고, 세포를 용해시키고, 단백질을 정제하는 경우에(Yamada, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002); Punj, *et al.*, Oncogene 23:2367-2378 (2004); Yamada, *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)), 기존 문헌(Cannon *et al.*, *id.*; Fiset *et al.*, *id.*)에서 보고된 바와 같이, 변칙적인 이동을 보이는 H.8 보유 단백질(대략 17 kDa)을 제외하고, 다양한 아주린 유도체가 SDS-PAGE 상에서 단일 성분으로서 이동하였다(도 1E).
- <198> **실시예 2. H.8은 아교모세포종 세포에 대한 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린의 세포독성을 강화시키지만 유방암 세포에 대해서는 이런 효과를 나타내지 않는다.**
- <199> 암 세포에 대한 Paz의 차별적인 침투(Yamada, *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)) 및 인간 흑색종(Yamada, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002))과 유방암(Punj, *et al.*, Oncogene 23:2367-2378 (2004))에 대한 이의 시험관내와 생체내 세포독성이 보고되었다. 하지만, 뇌종양, 예를 들면, 아교모세포종에 대한 Paz 또는 Laz의 효과는 알려져 있지 않다. 여기에서, 아교모세포종(LN-229 세포주)과 유방암(MCF-7 세포주) 세포에 대한 Paz, Laz, H.8-Paz(Paz의 N-말단 내에서 H.8 에피토프), Paz-H.8(Paz의 C-말단 내에서 H.8 에피토프)의 효과를 조사하였다.
- <200> **단백질의 제조.** 녹농균(*P. aeruginosa*)의 아주린(Paz), 임균(*N. gonorrhoeae*)의 Laz, Paz-H.8, H.8-Paz는 기존 문헌(Yamada, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002); Punj, *et al.*, Oncogene 23:2367-2378 (2004); Yamada, *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005))에서 기술된 바와 같이 정제하였다. 모든 제조합 GST 융합 유도체는 기존 문헌(Yamada, *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005))에서 기술된 바와 같이 정제하였다. 화학적으로-합성된 39-아미노산 H.8 펩티드는 구입하였다.
- <201> **세포독성 검사.** 암 세포에 대한 세포독성을 결정하기 위하여 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일-2,5-디페닐) 테트라졸륨 브롬화물(MTT) 측정검사를 수행하였다. 세포 (5x10³/웰)는 37°C에서 5% CO₂ 하에 100:1의 배지 내에서 96-웰 배

양 평판 내에 접종하였다. 하룻밤동안 배양한 이후, 상층액을 제거하고, 다양한 명시된 농도에서 단백질을 포함하는 새로운 배지를 부착된 세포에 추가하였다. 이들 세포는 명시된 다양한 기간 동안 배양하고, 이후 배양액에 10 μ l의 5 mg/ml MTT(Sigma-Aldrich, St. Louis MO) 용액을 추가하고 37°C에서 2시간동안 배양함으로써 생존 세포의 총수를 MTT 측정검사로 측정하였다. MTT 반응은 이소프로판올에 녹인 100 μ l의 40 mM HCl를 추가함으로써 종결시켰다. 형성된 MTT 포르마잔(formazan)은 Mosmann(J. Immunol. Methods 65:55-63 (1983))에 의해 기술된 방법에 따른 분광광도법으로 측정하였다.

<202> 합성 H.8 펩티드는 아교모세포종 LN-229(도 2A) 또는 유방암 MCF-7(도 2B) 세포에 대한 세포독성을 거의 나타내지 않았다. 아주린(Paz)의 효과는 비록 낮은 하지만, 아교모세포종(도 2A)에서 용량 의존적인 반면, 유방암(도 2B) 세포에서는 아주린 농도가 10 에서 40 로 상승됨에 따라 독성이 증가하였다. 세포독성은 6시간 배양 기간 이후에도 극히 미미하게 증가하였다. 아교모세포종과 유방암 세포 내에서 Paz, Paz-H.8, H.8-Paz, Laz의 세포독성에서 차이가 가장 주목되었다. Paz, Paz-H.8, H.8-Paz, Laz가 상이한 배양 기간 동안 MCF-7 세포 내에서 모든 용량에서 본질적으로 동일한 세포독성을 나타내긴 하지만(도 2B), Paz는 특히, 더욱 짧은 배양 기간(6 h)에서 아교모세포종 세포에 대한 Paz-H.8, H.8-Paz 또는 Laz보다 훨씬 낮은 세포독성을 나타냈다. 따라서, H.8 모이어티는 자체의 세포독성이 없지만, 아교모세포종에 대해서만 Paz의 세포독성을 강화시키고 유방암 세포에 대해서는 이런 효과를 나타내지 못하는 것으로 보인다.

<203> **실시예 3. Paz 또는 Laz 내에 존재하는 H.8 에피토프는 아교모세포종 세포 내에서 아주린의 흡수를 용이하게 한다.**

<204> Paz와 비교하여 아교모세포종 세포에 대한 Paz-H.8, H.8-Paz, Laz의 강화된 세포독성은 H.8 모이어티가 아교모세포종 세포 내에서 아주린의 흡수를 다소간 용이하게 하는 지에 관한 의문을 발생시켰다. Alexa fluor 568-표지된 적색 형광 단백질(Invitrogen-Molecular Probes Corp., Carlsbad CA)을 이용하여 아교모세포종과 유방암 세포 내에서 이들 단백질의 내재화(internalization)를 결정하였다. 이러한 기술은 MCF-7 세포에서 아주린의 내재화를 입증하기 위하여 앞서 이용되었다(Punj, *et al.*, Oncogene 23:2367-2378 (2004); Yamada, *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)).

<205> **공초점 검경.** 현미경 샘플의 제조를 위하여, 세포는 37°C에서 5% CO₂ 하에 커버슬립 상에서 하룻밤동안 배양하였다. 미리-데워진 37°C 새로운 배지는 적색 형광-표지된 (Alexa fluor 568) 아주린 또는 GST 융합 유도체와 혼합하고, 지정된 시간 동안 상기 세포와 함께 배양하였다. 이들 세포는 PBS로 세척하고, -20°C에서 5분간 메탄올로 고정시켰다. PBS로 3회 세척하고, 핵을 염색하기 위한 1.5 mg/ml 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)을 포함하는 포매제(mounting media)(VECTASHIELD, Vector Laboratories, Burlingame CA)의 추가한 이후, Carl Zeiss LSM510 레이저 주사 공초점 현미경(laser scanning confocal microscope)을 이용하여 영상을 촬영하였다(Yamada, *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)).

<206> 아주린(Paz)은 Paz-H.8, H.8-Paz, Laz보다 감소된 효율로 내재화되었는데, 이는 아교모세포종 LN-229 세포 내에서 Paz 침투에 대한 장벽을 입증한다(도 3A와 4A). 대조적으로, Paz는 앞서 보고된 바와 같이, Paz-H.8, H.8-Paz 또는 Laz와 동등하거나 다소간 높은 효율로 유방암 MCF-7 세포 내에서 효과적으로 내재화되었다(도 3B와 4B)(Punj, *et al.*, Oncogene 23:2367-2378 (2004); Yamada, *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)). LN-229 세포 내에서 Laz 침투의 용량 의존성(dose dependency)은 37°C에서 30분 배양 기간 동안 대략 16 의 최적 농도를 나타내지만(도 3C와 4C), 이 기간이후에 추가적인 강화는 관찰되지 않았다(데이터 제시되지 않음). 10 농도에서, Laz의 대부분은 대략 10분 내지 20분 이내에 LN-229 세포에 내재화되지만(도 3D와 4D), Paz의 내재화는 이들 조건 하에서 최소이었는데(도 3E), 이는 Paz 내재화가 LN-229 세포에서 본질적으로 무효하다는 것을 암시한다. LN-229 세포(도 3A와 4A)에서 Laz와 유사하지만 Paz와 대조적으로, Paz-H.8과 H.8-Paz의 현저한 내재화는 Paz의 N-말단 또는 C-말단에서 H.8 모이어티의 상대적인 위치가 아교모세포종 세포 내에서 Paz 모이어티의 내재화를 촉진하는 능력에 영향을 주지 않는다는 것을 암시하는 것으로 보인다.

<207> **실시예 4. H.8 모이어티는 아교모세포종에서 Paz 침투를 촉진하지만 유방암 세포에서는 이런 효과를 나타내지 못한다.**

<208> H.8 에피토프가 Laz에서처럼 Paz의 일부이어야 하는 지, 또는 H.8 에피토프가 아교모세포종 세포 내로 Paz 침투를 단독으로 촉진할 수 있는 지를 결정하기 위하여, H.8 단독 이외에 다양한 H.8 융합 단백질을 이용하였다. 39-아미노산 합성 H.8 모이어티와 같은 소형 펩티드가 용액에서 낮은 안정성을 보유하기 때문에, Paz-H.8 또는 H.8-Paz와 유사하게, H.8을 GST의 N-말단 내에 통합하거나(H.8-GST), 또는 GST의 C-말단 내에 통합하는(GST-H.8) H.8 모이어티와 글루타티온 S-전이효소(GST) 융합체를 작제하였다. GST 융합 펩티드의 작제는 실시예 1에

서 기술된다.

- <209> 적색 형광을 내는 Alexa fluor 568-공액된 Paz는 대조로서 인산염-완충액(PBS)과 함께, 개별적으로, 표지되지 않은 합성 H.8 펩티드, GST, GST-H.8, H.8-GST 융합 단백질과 함께 배양하고, 37°C에서 30분간 배양후 LN-229 세포에서 20 Paz 혼합물의 내재화를 결정하였다. 합성 H.8 펩티드는 Paz와 함께, 개별적으로 도입되는 경우에, PBS(도 5E), GST(도 5B) 또는 GST-H.8(도 5C)에 비하여 Paz 내재화(도 5A)를 강화시켰다. 형광의 정량에서, H.8 펩티드는 Paz 침투를 2.1 배 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 하지만, H.8-GST의 존재는 Paz의 내재화를 현저하게(3배 이상) 강화시켰다(도 5D). 다른 한편, GST-H.8은 경미한 촉진을 보였다(도 5C). Paz는 자체로써, 아교모세포종 세포 내에 완만하게 침투하는데(도 5E), 이는 뇌종양 세포 내에 이러한 침투가 H.8에 의해 매개된다는 것을 입증하였다. H.8 단독은 아교모세포종 세포(도 3A) 내에 침투하지 않지만, Paz(도 5A)의 내재화를 촉진하는 능력은 뇌종양 세포 내로 단백질의 침투를 용이하게 하는 이의 능력을 반영한다.
- <210> **실시예 5. 아교모세포종 세포 내에 H.8-GST의 존재에서 Paz의 강화된 내재화는 이들 세포에서 더욱 높은 세포독성을 유도한다.**
- <211> 합성 H.8 펩티드, GST, GST-H.8, H.8-GST 단백질(각각 20)은 20 Paz의 존재 또는 부재에서, LN-229 세포와 함께 24시간 동안 배양하고, 24시간후 MTT 측정검사로 생존가능 아교모세포종 세포를 측정함으로써 세포독성의 정도를 결정하였다. Paz의 부재에서, H.8 펩티드, GST 또는 GST 융합 단백질 중에서 어느 것도 현저한 세포독성을 나타내지 않았다(도 5F, - Paz). 자체로써, H.8 펩티드 또는 PBS의 존재에서 낮은 세포독성을 나타내는 20 Paz의 존재(도 5F, + Paz)에서, 세포독성의 상당한 강화는 GST 자체 또는 GST-H.8이 세포독성의 상당한 강화를 나타내긴 하지만(도 5F, + Paz), H.8-GST에서만 관찰되었다(도 5F, + Paz). 종합하면, 이들 데이터는 H.8 모이어티가 Paz와 같은 단백질의 일부로써 존재하거나, 또는 상기 단백질의 존재에서 Paz의 세포 내부로의 운반을 용이하게 함으로써 강화된 세포독성을 결과한다는 것을 암시한다.
- <212> **실시예 6. H.8은 BBB 통과를 매개하여 뇌 내로 침투를 가능하게 한다.**
- <213> 아교모세포종 LN-229 세포(도 3A, 4A, 5D) 내에서 융합 단백질 또는 개별 단백질의 강화된 내재화를 가능하게 하는 H.8 에피토프의 능력은 H.8-Paz 또는 Laz의 N-말단의 일부로서 H.8이 BBB 통과를 촉진하고 말초 순환(peripheral circulation)으로부터 뇌 소정맥(brain venule)으로 이들 단백질의 운반을 가능하게 하는 지에 관한 의문을 발생시켰다.
- <214> **Odyssey 측정검사.** 모든 단백질은 제조업체에 의해 권장된 조건 하에 IRDye 800CW(LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska)를 이용하여 표지하였다. IRDye 800CW와 공액된 500 μ g의 Paz, H.8-Paz, Laz를 누드 생쥐(nude mice)에서 복강내 주입하였다. 24시간후, 이들 생쥐는 희생시키고, 뇌를 적출하고, LI-COR Odyssey 적외선 영상 시스템(Infrared Imaging System)(84 μ m 해상도, 1 mm 오프셋(offset))으로 뇌 영상을 탐지하였다. 이후, 생쥐 뇌는 가로로 절단하고, 표지된 단백질의 존재를 탐지하기 위하여 부리모양 중간뇌(rostral mesencephalon) 영역 영상을 촬영하였다.
- <215> **아주린 단백질에서 형광의 정량.** 형광의 정량은 아래와 같이 Adobe Photoshop을 이용하여 측정하였다: 한 세포는 Photoshop의 Lasso Tool로 선택하고, 영상 메뉴(image menu)의 레드 히스토그램(red histogram)으로부터 평균 수치를 획득하였다. 한 샘플에 대하여 적어도 3가지 상이한 세포를 측정하고, 표준 편차(standard deviation)를 산정하였다.
- <216> 적외선 염료 IRDye 800 CW(LI-COR Bioscience)로 표지된 500 μ g의 Paz, H.8-Paz, Laz 단백질을 살아있는 누드 생쥐에서 복강내 주입하였다. 24시간후, 생쥐는 희생시키고, 뇌를 분리하고, LI-COR Odyssey 적외선 영상 시스템을 이용하여 영상을 촬영하였다. Paz는 소량으로 뇌 소정맥 내로 침투하는 것으로 밝혀진 반면, 이런 조건 하에 훨씬 많은 Laz, 특히, H.8-Paz(4배 이상)가 뇌 내에서 탐지되었는데(도 6), 이는 융합 단백질의 뇌 내로의 침투를 가능하게 하는 H.8 에피토프의 분명한 역할을 입증한다.
- <217> **실시예 7. H.8 에피토프는 N-말단에 존재하면, 주변세포질 단백질의 세균 표면 전시를 가능하게 한다.**
- <218> Laz 내에서 H.8 에피토프의 N-말단 국소화가 이의 표면 전시(surface display)에 기여하는 지를 조사하기 위하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이, GST(도 5)와 Paz(도 2 및 도 3A/B와 4A/B)의 N-말단과 C-말단에서 H.8 융합 유도체를 작제하였다.
- <219> **대장균(E. coli) 내에서 표면-노출된 단백질의 국소화.** pET29a-gst, pET29a-H.8.gst 또는 pET29a-gst-H.8을 보유하는 대장균(E. coli) 균주 BL21(DE3) 및 pUC19-paz, pUC19-paz-H.8, pUC18-H.8-paz 또는 pUC18-laz를 보유

하는 대장균(*E. coli*) 균주 JM109는 37°C에서 0.4 mM 이소프로필 β-D-티오갈락토시드(IPTG)와 함께 배양하였다. 1 ml의 이들 각 세균 배양액은 원심분리하고, 생성된 덩어리는 수집하였다. PBS로 2회 세척한 이후, GST 유도체의 경우에 항-GST 항체(1:2000) 또는 아주린 유도체의 경우에 항-아주린 항체(1:500)를 포함하는 1 ml 1% FBS-PBS를 추가하였다. 세포 현탁액은 얼음 위에서 1시간동안 배양하고, 이후 PBS로 2회 세척하였다. GST 유도체의 경우에 FITC-공액된 항-토끼 IgG 또는 아주린 유도체의 경우에 FITC-공액된 항-토끼 항체를 적용하고 얼음 위에서 30분간 배양하였다. 결합되지 않은 항체를 제거하기 위하여, 세포는 PBS로 2회 세척하고, 얼음 위에서 에탄올로 고정시켰다. 이후, DAPI로 처리된 대장균(*E. coli*) 샘플을 공초점 현미경 하에서 관찰하였다.

<220> H.8 융합 단백질은 정제하였다(도 1E와 도 7A). GST 및 N-과 C-말단 내에서 2가지 H.8 융합체(H.8-GST와 GST-H.8)의 세포 국소화는 도 7B에 도시된다. 항-GST 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅(Western blotting)으로 탐지하는 경우에, 3가지 단백질 모두 대장균(*E. coli*) 내에서 과다-발현되고 대장균(*E. coli*)의 전체 세포 용해질 내에 존재하였다(도 7B). 대장균(*E. coli*)으로부터 주변세포질 분획물을 분리하고 3가지 단백질의 존재를 검사했을 때, GST와 GST-H.8 단백질은 상당한 양으로 탐지되지만(도 7B, 주변세포질 분획물 아래 레인 1과 3) H.8-GST는 이런 주변세포질 분획물 내에서 극히 소량만 탐지될 수 있었다(도 7B, 주변세포질 분획물 아래 레인 2).

<221> H.8-GST 융합 단백질의 나머지가 대장균(*E. coli*) 세포의 표면으로 운반될 수 있는 지를 조사하기 위하여, 이들 3가지 단백질을 과다발현하는 세포를 성장시키고 수확하고, 세척하고, 표면-노출된 GST에 결합하는 항-GST 항체로 처리하고, 다시 세척하고, FITC-공액된 이차 항체로 처리하였다. GST가 표면-노출되면, 항-GST 항체는 FITC-공액된 이차 항체에 의해 탐지될 수 있는 것들에 결합할 것이다. 실제로, H.8-GST를 보유하는 대장균(*E. coli*) 세포만 FITC 발생된 녹색 형광을 나타내는데(도 7C, H.8-GST), 이는 GST의 N-말단에서 H.8 에피토프의 존재가 세포 표면으로 이의 운반을 촉진한다는 것을 암시한다. GST 자체뿐만 아니라 GST의 C-말단 내에 H.8 모이 어티의 존재(GST-H.8)는 표면 전시 없이, 거의 주변세포질과 세포내에서 관찰되었다(도 7C, GST, GST-H.8).

<222> 앞서 기술된 바와 동일한 기술을 이용하여, Paz와 Paz-H.8은 세포내에 존재하는 반면(도 7D, Paz와 Paz-H.8), H.8-Paz와 Laz는 표면 전시를 나타내는데, 이는 아마도, 리피데이션(lipidation)을 위하여 유리 시스테인(free cysteine)을 요구하는 N-말단에서 H.8의 존재가 융합 단백질의 외부막을 통한 운반이 표면에 도달하는데 중요하다는 것을 입증한다.

<223> **실시예 8. 암으로 고통받는 환자의 치료**

<224> 암으로 고통받는 환자에서 H.8-Paz 융합체(연구 약제)의 임상 I/II 시험이 수행된다. 구체적으로, H.8 도메인은 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)의 Laz-인코딩 유전자(*laz*)로부터 유래되고, 적하 화합물은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 아주린(*paz*)이고, 따라서 융합 단백질 “H.8-paz”가 산출된다. 상기 융합 단백질은 실시예 1에 예시된 바와 같이 작제된다.

<225> 현재 가용한 FDA-승인된 화학 치료제와 섭생에 의한 적절한 치료이후 임상적/방사선사진적 진행이나 재발을 보이고 뇌암이 조직학적으로 확인된 49명의 성인 환자가 연구 약제를 투여하는 개방 전향적 연구(open-label prospective study)에 참가한다. 본 연구에 참가하는 모든 환자는 화학치료 섭생의 승인된 과정의 완결이후, 측정가능 종양의 양이 증가한다. 지속적인 전이성 종양(metastatic deposit) 및/또는 크기 또는 양에서 지속적인 증가의 증거가 조직학적으로 확증되어야 한다. 이런 조직학적 증거는 미세 침 흡인(fine needle aspiration, FNA) 생검으로 획득될 수 있다.

<226> 치료 프로그램은 Institutional Review Board of the University of Illinois, Chicago와 FDA에 따라 모든 환자로부터 서면 동의를 받은 이후에 실시된다. 이들 환자는 다른 악성 종양, 이전 악성 종양의 병력, 혈액이온화증(blood dyscrasias), 인슐린 의존성 당뇨, 또는 제안된 치료의 효과의 적절한 평가를 간섭하는 다른 심각한 심혈관 질환과 같은 병발성 질환(intercurrent illness)이 없다. 치료의 시작에 앞서, 간 기능 연구(LFT)를 비롯한 기준 혈액 작업(baseline blood work)(일반 혈액 검사(Complete Blood Count)[CBC]와 혈액 화학 검사(Serum Chemistry))이 수행된다. 모든 유자격 환자는 임상 시험 동안 임의의 암 화학치료제를 동시에 복용하지 않아야 한다.

<227> 연구 약제는 12주 동안 연구 약제의 제약학적으로 허용되는 체제의 매일 정맥내 주사로 투여되고, 개체는 용량 제한 독성(dose limiting toxicity)이 관찰된다. 10 mg/kg/day에서 시작하여 50 mg/kg/day의 최대량까지 5 mg/kg/day씩 증가하는 7가지 용량 수준이 존재한다. 각 용량 수준의 효능은 진전된 측정가능 암을 갖는 7명의 환자에서 기록된다.

- <228> 반응은 2가지 척도(a와 b)에서 측정가능 종양을 측정함으로써 평가된다. 1) 표적 종양의 완전 소멸은 완전 반응(CR)로서 간주된다; 2) 75% 감소는 우수한 부분 반응(PR)으로 간주된다; 3) 우수한 반응(PR)은 치료이후 크기에서 50% 감소이다. 4) 크기에서 25% 감소는 불변(stable disease, SD)으로 간주되고, 5) < 25%는 무반응(no response, NR)으로 간주된다. 질병이 진전된 환자는 치료를 중단하고 추가로 12주 동안 추적한다.
- <229> 완전 소멸 및 표적 종양의 크기 감소는 H.8-아주린 치료가 암 치료에 유효하다는 것을 암시한다. H.8-아주린 치료가 유효하다는 다른 표시는 새로운 뇌종양의 발생률 감소 및 종양과 연관된 혈관신생(angiogenesis)의 감소이다.
- <230> 본 발명의 범위와 기술적 사상을 벗어나지 않는, 앞서 기술된 실시예와 시스템의 다양한 개변은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명이 특정 구체예와 관련하여 기술되긴 했지만, 본 발명은 이들 특정 구체예에 부당하게 한정되지 않는다. 실제로, 관련 분야의 당업자에게 명백한, 본 발명을 수행하기 위한 앞서 기술된 양식의 다양한 변형은 아래의 특허청구범위의 범위 내에 포함된다.

도면의 간단한 설명

- <58> 도 1에서는 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)으로부터 *laz*(A) 및 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 *paz*(B)의 개요도를 도시한다. 대장균(*E. coli*) 내에서 클로닝과 과다발현을 위한 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 유전자는 아주린 유전자 자체(*paz*) 및 이의 주변세포질 위치(periplasmic location)를 결정하는 신호 펩티드(*nsp*) 서열(B)로 구성되었다. *laz*의 H.8 영역은 나이세리아(*Neisseria*) 신호 서열 *nsp*를 보유하는 *paz* 유전자(C)의 5'-말단에 인 프레임(in frame) 클론되거나(pUC18-H.8-*paz*), 또는 *paz* 유전자(D)의 3'-말단에 인 프레임(in frame) 클론되었다(pUC19-*paz*-H.8). 이들 구조체를 제조하는 상세한 절차는 실시예 1에 제시된다. *naz*, *laz* 유전자 내에 존재하는 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)의 아주린-유사 서열; *nsp*, 나이세리아(*Neisseria*) 신호 펩티드 서열. 양쪽 사례에서 신호 펩티드 서열은 성숙 Paz(주변세포질)와 Laz(표면-노출됨) 단백질을 생산하기 위하여 격리된다. (E), Laz, Paz 및 융합 단백질의 SDS-PAGE. H.8 융합 단백질, 예를 들면, Laz, H.8-Paz 또는 Paz-H.8(이들 모두 대략 17 kDa)의 변칙적인 이동이 라피데이션(lapidation)된 H.8-보유 단백질에서 앞서 확인되었다(Cannon, Clin. Microbiol. Rev. 2:S1-S4 (1989); Fiset, et al., J. Biol. Chem. 278:46252-46260 (2003)).
- <59> 도 2에서는 다양한 암 세포에 대한 H.8-Paz 융합 단백질의 세포독성 정도를 예측하는 그래프를 도시한다. (A) 아교모세포종 LN-229 세포에 대한 합성 H.8 펩티드, Paz, Laz, Paz의 카르복시 말단 단부에서 H.8 융합체(Paz-H.8) 및 Paz의 아미노 말단에서 H.8 융합체(H.8-Paz)의 세포독성. 세포는 6시간, 12시간, 24시간 동안, 3가지 상이한 농도(10, 20, 40)에서 이들 단백질로 처리하였다. MTT 측정검사를 수행하여 생존 세포의 정도를 측정하고 세포독성(세포 사멸 비율)을 예측하였다. 세포독성 비율(percentage cytotoxicity)을 산정하기 위하여, 처리되지 않은 생존 세포의 수치를 100%로 간주하고, Paz, Laz, H.8-융합 단백질-처리된 생물 내에서 생존 세포의 총수를 측정하였다. 이후, 죽은 세포의 총수로부터 세포독성의 정도(%)를 결정하였다. (B) 인간 유방암 MCF-7 세포에 대한 H.8 펩티드, Paz, Paz-H.8, H.8-Paz, Laz의 세포독성. 모든 처리 조건은 상기 (A)에서와 유사하다.
- <60> 도 3에서는 아교모세포종 LN-229와 유방암 MCF-7 세포 내로 다양한 형광 표지된 아주린-관련된 단백질의 침투를 도시한다. (A) Alexa fluor 568로 공액된 H.8 펩티드, Paz, Paz-H.8, H.8-Paz, Laz(20 각각)는 37°C에서 30분간 커버슬립 상에서 LN-229 세포와 함께 배양하고, 이후 영상을 촬영하였다. (B) 공초점 검경(confocal microscopy)으로 가시화되고 (A)에 기술된 바와 같이, Alexa fluor 568로 공액된 다양한 단백질의 MCF-7 세포 내로의 내재화(internalization). (C) Laz의 내재화는 공초점 검경으로 가시화되었다. 다양한 농도(2, 4, 8, 16)의 형광-표지된 Laz는 37°C에서 30분간 LN-229 세포와 함께 배양하였다. 핵은 DAPI(4,6-디아미디노-2-페닐인돌)로 청으로 표지된다. (D) Alexa fluor 568로 공액된 Laz(10)는 37°C에서 다양한 시간(5, 10, 20, 30분) 동안 LN-229 세포와 함께 배양하였다. 이러한 내재화는 공초점 검경으로 가시화되었다. (E) Alexa fluor 568로 공액된 Paz(10)는 37°C에서 다양한 시간 동안 커버슬립 상에서 LN-229 세포와 함께 배양하고, 이후 영상을 촬영하였다. (E)에서 측정가능 형광이 거의 관찰되었다.
- <61> 도 4에서는 도 3A-D에서 공초점 현미경 영상 내에서 관찰되는 형광의 정량을 지시하는 막대그래프를 도시한다. (A) 도 3A에서 영상 내에서 형광의 정량. 아주린 단백질 내에서 형광의 정량은 Adobe Photoshop을 이용하여 수행하였다. 오차 막대(error bar)는 단일 샘플 내에서 3가지 상이한 세포에서 형광의 표준편차(standard deviation)를 나타낸다. (B) 도 3B에서 영상 내에서 형광의 정량. 정량은 도 4A에서처럼 수행되었다. (C) 도 3C

에서 영상 내에서 형광의 정량. 정량은 도 4A에서처럼 수행되었다. (D) 도 3D에서 영상 내에서 형광의 정량. 정량은 도 4A에서처럼 수행되었다.

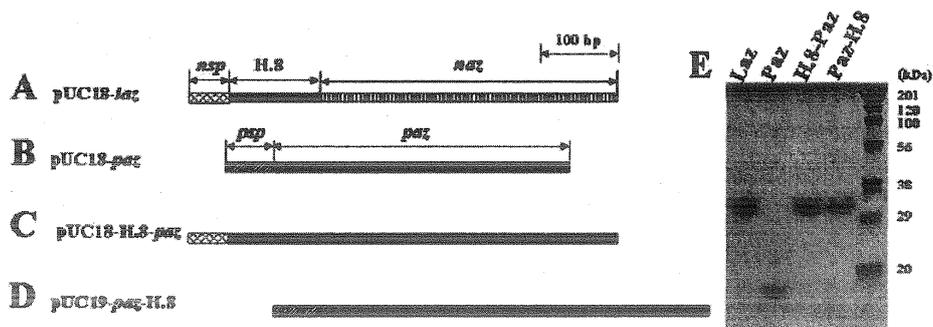
<62> 도 5. H.8-GST 융합 단백질과의 통합 치료(combined treatment)는 아교모세포종 LN-229 세포 내에서 Alexa fluor 568-표지된 Paz의 흡수를 조장한다. 표지되지 않은 20 (A) H.8, (B) GST, (C) GST-H.8, (D) H.8-GST, (E) PBS 완충액 및 Alexa fluor 568과 공액된 20 Paz는 37°C에서 30분간 LN-229 세포와 함께 배양하였다. 이러한 내재화는 공초점 검경으로 가시화되었다. (F) Paz와 함께 또는 Paz 없이, 합성 H.8 펩티드, GST, GST-H.8/H.8-GST 융합 유도체의 세포독성. 대략 5×10^3 개의 LN-229 세포를 96-웰 배양 평판 내로 도말하고, 20 Paz와 함께(+Paz) 또는 Paz 없이(-Paz), 24시간 동안 각각 20 의 H.8 펩티드, GST, GST-H.8, H.8-GST 또는 동일한 부피의 PBS로 처리하였다.

<63> 도 6에서는 IRdye 800CW(LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebraska)로 공액된 Paz, H.8-Paz, Laz가 주입된 생쥐의 뇌의 영상을 도시한다. (A) 생존 생쥐로부터 뇌 영상. IRdye 800CW로 공액된 500 μ g의 Paz, H.8-Paz, Laz를 생존 누드 생쥐의 복강내 주입하였다. 24시간후, 생쥐는 희생시키고, 뇌는 적출하고, 형광은 탐지하고 LI-COR Odyssey 적외선 영상 장치(Infrared Imaging System)로 측정하였다. (B) (A)에서처럼 처리된 누드 생쥐 뇌의 중뇌 부리(rostral mesencephalon) 영역 영상. 생쥐 뇌는 가로로 절단하고 영상을 촬영하였다.

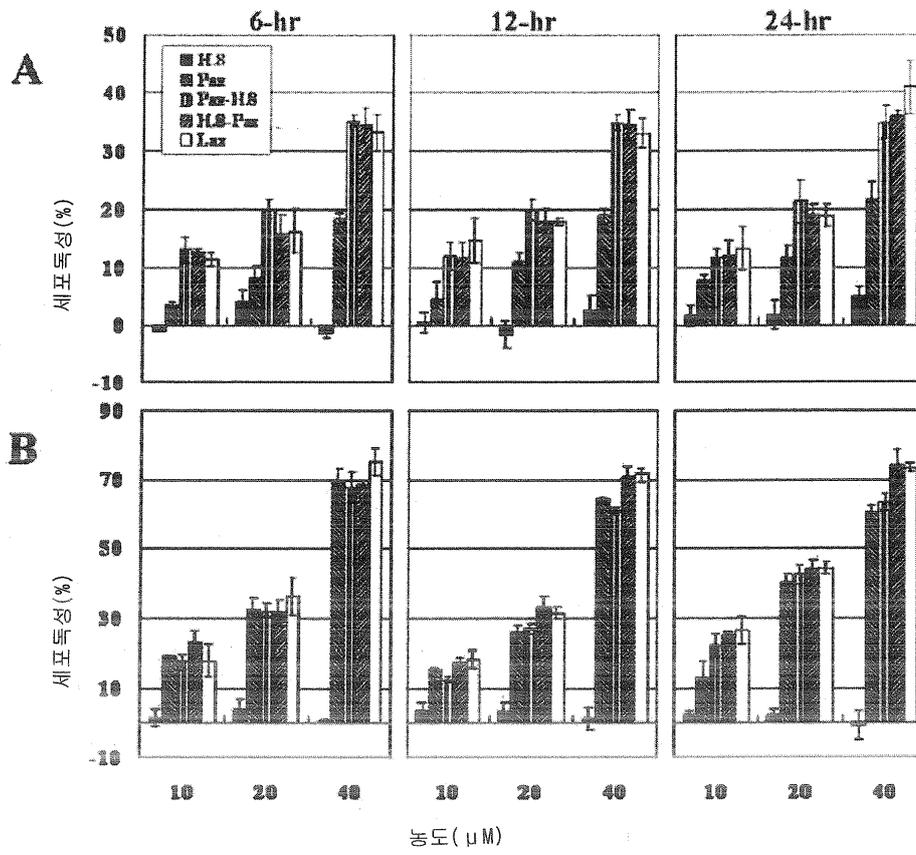
<64> 도 7에서는 대장균(*E. coli*) 내에서 H.8-Gst 융합 단백질의 국소화의 SDS-PAGE, 웨스턴 블랏팅(Western blotting), 공초점 현미경 영상을 도시한다. (A) 클론된 *gst*, H.8-*gst* 또는 *gst*-H.8 유전자를 보유하는 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) 세포는 37°C에서 0.1 mM IPTG와 함께 배양하였다. 세포 펠릿은 PBS로 2회 세척하고, 전체 세포 용해질(whole cell lysate)은 SDS-PAGE에서 이동시켰다. 이들 단백질의 검출에 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색이 이용되었다. (B) 상기한 절차가 반복되지만 전체 세포 용해질과 주변세포질 공간의 내용물이 개별적으로 분리되고 SDS-PAGE(20 μ g 단백질)에서 이동되며, 이들 단백질의 전체 농도와 주변세포질 농도를 결정하기 위하여 GST 또는 GST-H.8 융합 단백질이 단클론 항-GST 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅(Western blotting)으로 탐지되었다. (C). 클론된 *gst*, H.8-*gst* 또는 *gst*-H.8 유전자를 보유하는 대장균(*E. coli*) 균주 BL21(DE) 세포 (표 5)는 37°C에서 0.4 mM IPTG와 함께 배양하였다. 각 1 ml의 이들 세균 배양액은 원심분리하고, 생성된 세균 덩어리는 수집하였다. PBS로 2회 세척한 이후, 항-GST 항체를 포함하는 1 ml의 1% FBS-PBS(1:2000)를 가하였다. 세포 현탁액은 1시간 동안 배양하고, 이후 PBS로 2회 세척하였다. 세균 세포는 30분간, 1% FBS-PBS에 담긴 FITC-공액된 항-토끼 IgG와 함께 배양하였다. 결합하지 않은 항체를 제거하기 위하여, 세포는 다시 세척하고, 얼음 상에서 에탄올로 고정시켰다. DAPI(푸른 색채 제공)로 처리된 대장균(*E.*) 샘플은 공초점 현미경(x100 배율) 하에 관찰하고, 단일 세포는 사진 촬영하였다. (D). pUC19-*paz*(녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린), pUC19-*laz*(나이세리아(*Neisseria*)), pUC18-H.8-*paz* 또는 pUC18-*paz*-H.8을 보유하는 대장균(*E. coli*) 세포는 37°C에서 하룻밤동안, 0.1 mM IPTG의 존재에서 배양하였다. 0.5 ml의 이들 배양액은 원심분리하고, 생성된 세균 덩어리는 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 1 ml의 1% FBS-PBS에 담긴 항-아주린 항체(1:500)를 추가하고, 얼음 위에서 1시간동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 이후, FITC-공액된 항-토끼 항체를 추가하고, 얼음 위에서 30분간 배양하고, PBS로 2회 세척하고, 차가운 에탄올로 고정시켰다. 세균 샘플은 공초점 현미경(x100 배율)으로 관찰되었다.

도면

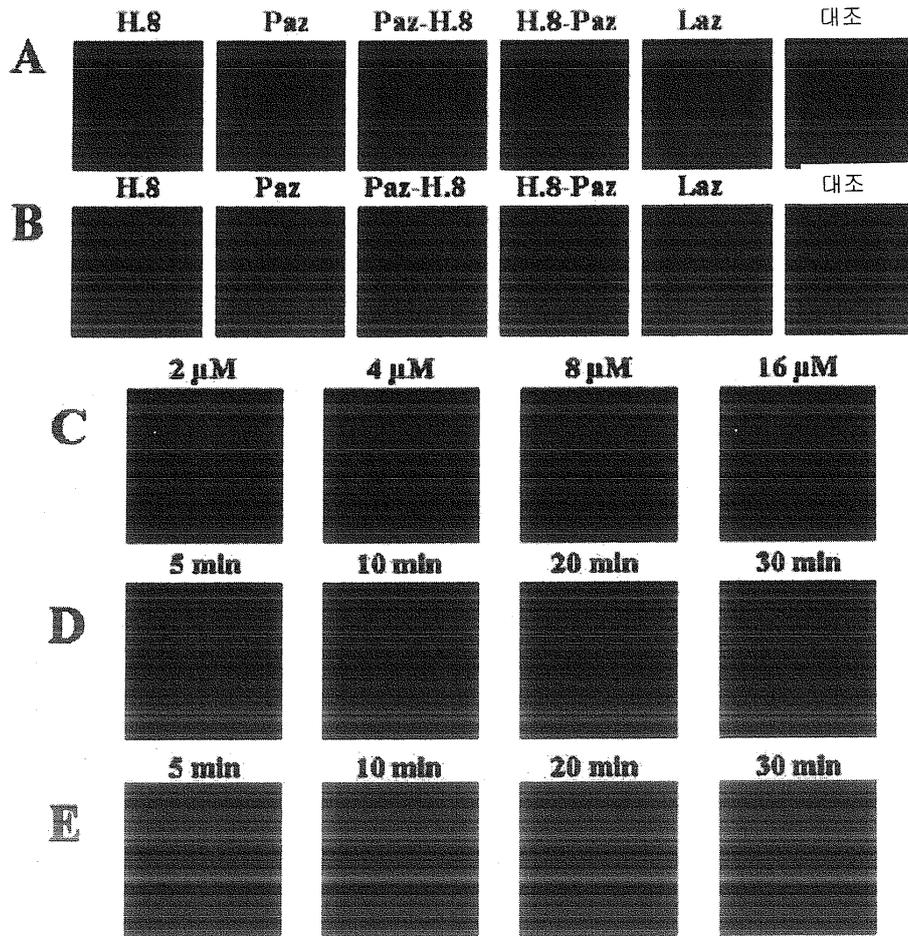
도면1



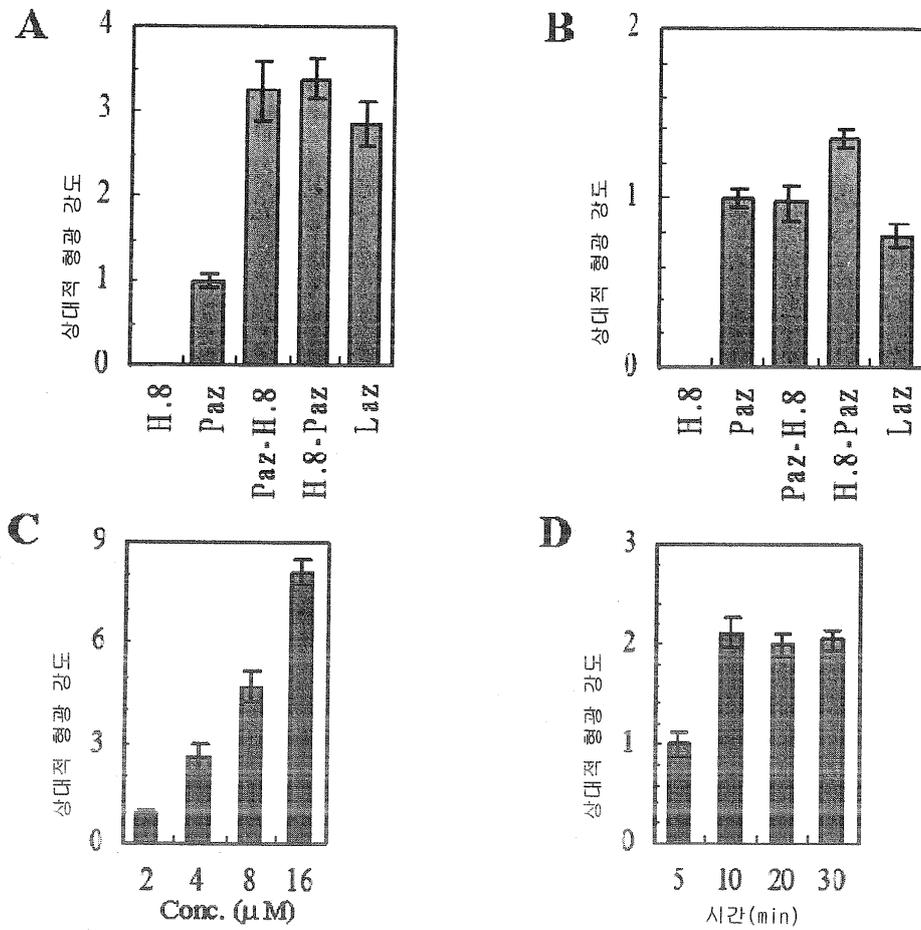
도면2



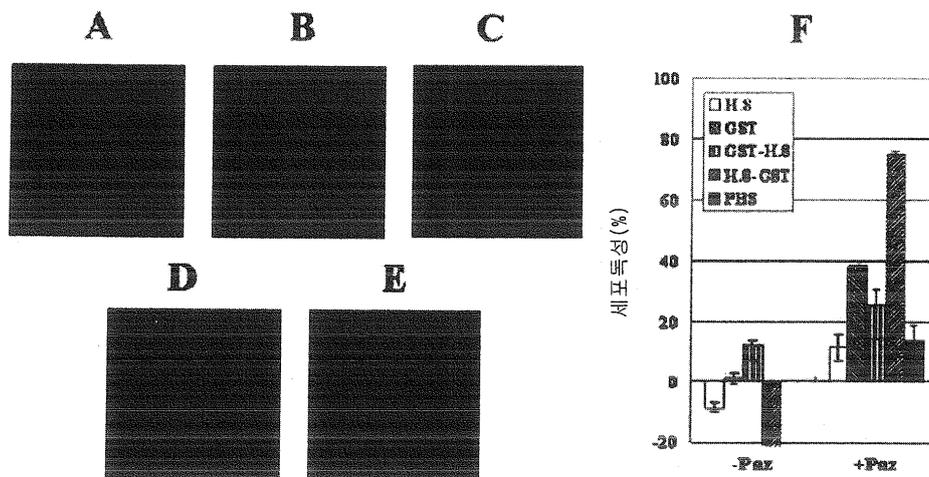
도면3



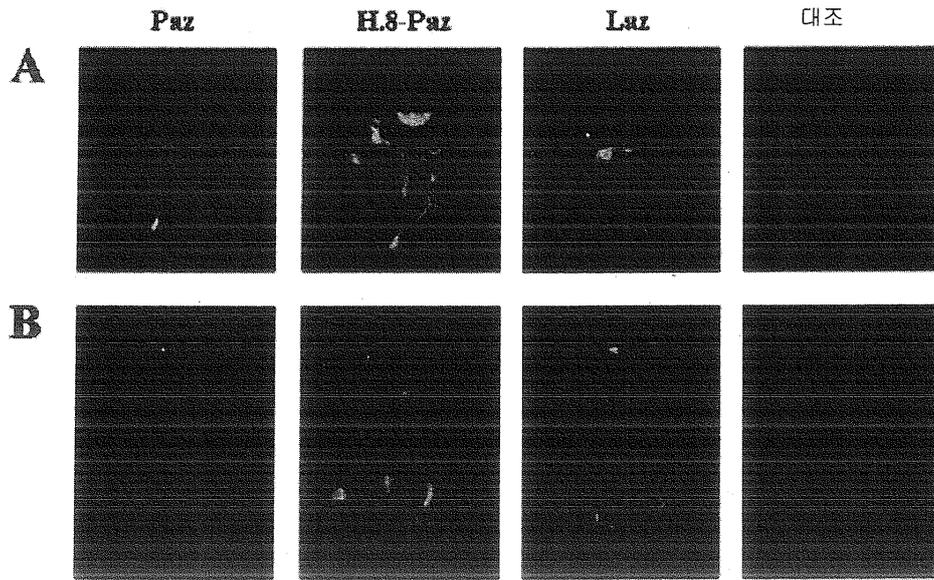
도면4



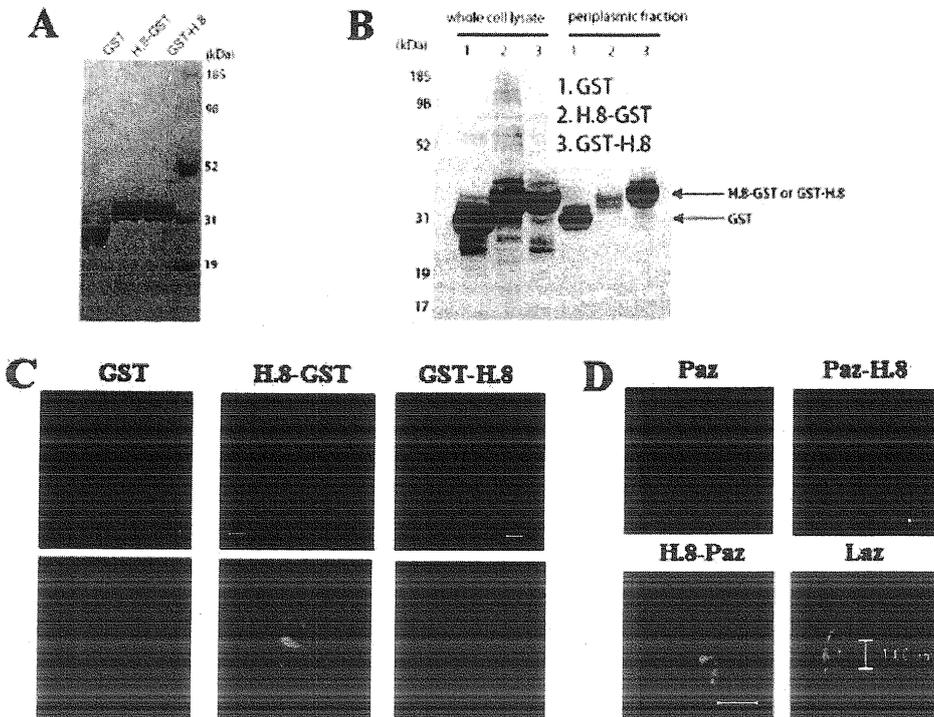
도면5



도면6



도면7



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Board of Trustees of the University of Illinois
 Hong, Chang Soo
 Yamada, Tohru
 Fialho, Arsenio M.

Das Gupta, Tapas
Chakrabarty, Ananda M.

<120> Transport Agents for Crossing the Blood-Brain Barrier and into
Brain Cancer Cells, and Methods of Use Thereof

<130> 51282-00062

<150> 11/244,105

<151> 2005-10-06

<150> 60/700,297

<151> 2005-07-19

<160> 25

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1140

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 1

ctggcaggct tgacgcttcg atacgctctg tttcggtcag gctgggccg aaaccgaaa 60

aaccgccgaa aaccaatacc ctgcatttga gtaaggctgc gctggagagt ttcggttcgg 120

cggcggcaaa gtiggaaaaa cggcatcccg aattggcggg ggcatggca aacttggtta 180

gaaggcatgg cgcataaaat gtatacggga atttgtgtaa acatccgta atattaagaa 240

gtaaaggata atgggtctaa tactaaagaa ataggttcgg ggtaaaattg cccctttaa 300

agtaaacgat tgtaacttg cagacaggct ttgatttcaa atgaaattg tagcaaatg 360

ccgccccgaa acatctgttt gtgcaacgcg gcggaatctt tttcaaggtt ttgttaatgg 420

cggttgcaact ttgatttctg taaaaccgaa tattatttta tcgattggag atttaccatg 480

aaagcttatac tgctctgat ttctgccgc gttatcgggt tggtgcctg ctctcaagaa 540
 cctgccgcgc ctgctgccga ggcaactect gctgctgaag caccgccttc cgaagegcct 600
 gccgccgaag ctgctcctgc agatgctgcc gaagcccctg ctgccggcaa ttgtgcggca 660
 actgtcgaat ccaacgacaa tatgcagttc aacaccaaag acatccaagt cagcaaagca 720
 tgtaaagagt ttaccatcac tctgaacat accggtacgc aacccaaagc cagcatgggt 780
 cacaaccttg tgattgcca agctgaagac atggacggcg tattaaga cggcgtaggt 840
 gctgccgata ccgactatgt caaacctgac gatgcgcgcg ttgttgcca caccaaactg 900
 atcggcggcg gcaagagtc ttcctgact ctggatcctg ccaaattggc tgacggcgac 960
 taaaaattg cctgcacttt cccgggtcac ggtgctttga tgaacggcaa agtgactttg 1020
 gtcgattaat ccgcttaaag tctcaaaaga cggacagcct gctttgtgca ggctgtttta 1080
 ttataaatg actgctttaa aagtcccccg ttgagaacga aaacatgaat cegtttgaaa 1140

<210> 2
 <211> 540
 <212> DNA
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 2
 ctttttcattg cagcggatcg ctgcgcctc acttcagggt cagggtgccc ttcattcagcg 60
 cggagtggcc cgggaagggt cagaagaaca tgtactgctc gccttccttc agcttgagaa 120
 cgtcgaaggt caccgagtc ttctgcccc agccgatcag cttggtgtgg gcgatgacac 180
 ggctgtcgtc gggttcagg taatccttgt ccaggccgga agccatgccg tcggtgacca 240
 cgccctgcat gtcggcggcg gtgctcagta cccagttgtg gcccatgacg ttcttcgcca 300
 ggttgccggg gtgggacagg ttgacgggtg actgcttga gctcttctg acgggtgatgg 360

catttggtgtt gaactgcatc tggtegttac cctggatgtc caccgagcac teggcagcca 420

gcagtggcgc actgagcagg gacagcaggg ataccgcagc gagtttacgt agcatggagc 480

agcctcctag gcaggttggg cgatgaatcc taaaagagca gactgcccga tcgggcaccg 540

<210> 3

<211> 117

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 3

tgctctcaag aacctgccgc gcctgctgcc gaggcaactc ctgccggtga agcaccgct 60

tccgaagcgc ctgcccccga agctgctcct gcagatgctg ccgaagcccc tgctgcc 117

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for Laz

<400> 4

ccggaattcc ggcagggatg ttgtaaatat ccg 33

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

ggggtaccgc cgtggcaggc atacagcatt tcaatcgg 38

<210> 6

<211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 6
 ggcagcaggg gcttcggcag catctgc 27

<210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 7
 ctgcaggtcg actctagagg atcccg 26

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 8
 gccgagtgct cggtggacat ccagg 25

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 9
 tactcgagtc acttcagggt cagggtg 27

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 10
cttcagggtc aggtgcct tcate 25

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 11
ctgcaggctc actctagagg atcccg 26

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 12
tgctctcaag aacctgccgc gcctgc 26

<210> 13
<211> 38
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 13
taggatcctt aggcagcagg ggcttcggca gcatctgc 38

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 14
cgagctcatg tccctatac taggtattg g 31

<210> 15
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 15
ccaagcttt caggggatcc cagaccttc gatcagatcc 40

<210> 16
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 16
ggaattcata tgaagctta tctggc 26

<210> 17
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 17

ccggaattcg gcagcagggg cttcggc

27

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 18

cgggatcccc tgctctcaag aacctgccgc gcc

33

<210> 19

<211> 41

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 19

cggaattctt aggcagcagg ggcttcggca gcatctgcag g

41

<210> 20

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 20

cgagctcatg tcccctatac taggttattg g

31

<210> 21

<211> 32
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 21
 ccgctcgagt caggcagcag gggcttcggc ag

32

<210> 22
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 22

Cys Ser Gln Glu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Ala Pro Ala Ser Glu Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala Asp
 20 25 30

Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala Gly Asn Cys Ala Ala Thr Val Glu Ser
 35 40 45

Asn Asp Asn Met Gln Phe Asn Thr Lys Asp Ile Gln Val Ser Lys Ala
 50 55 60

Cys Lys Glu Phe Thr Ile Thr Leu Lys His Thr Gly Thr Gln Pro Lys
 65 70 75 80

Ala Ser Met Gly His Asn Leu Val Ile Ala Lys Ala Glu Asp Met Asp
 85 90 95

Gly Val Phe Lys Asp Gly Val Gly Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val Lys
 100 105 110

Pro Asp Asp Ala Arg Val Val Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Gly Gly
 115 120 125

Glu Glu Ser Ser Leu Thr Leu Asp Pro Ala Lys Leu Ala Asp Gly Asp
 130 135 140

Tyr Lys Phe Ala Cys Thr Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Asn Gly
 145 150 155 160

Lys Val Thr Leu Val Asp
 165

<210> 23

<211> 128

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 23

Ala Glu Cys Ser Val Asp Ile Gln Gly Asn Asp Gln Met Gln Phe Asn
 1 5 10 15

Thr Asn Ala Ile Thr Val Asp Lys Ser Cys Lys Gln Phe Thr Val Asn
 20 25 30

Leu Ser His Pro Gly Asn Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp
 35 40 45

Val Leu Ser Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met
 50 55 60

Ala Ser Gly Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp Ser Arg Val
 65 70 75 80

Ile Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Ser Gly Glu Lys Asp Ser Val Thr
 85 90 95

Phe Asp Val Ser Lys Leu Lys Glu Gly Glu Gln Tyr Met Phe Phe Cys

100

105

110

Thr Phe Pro Gly His Ser Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Thr Leu Lys
 115 120 125

<210> 24

<211> 39

<212> PRT

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

<400> 24

Cys Ser Gln Glu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Ala Pro Ala Ser Glu Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala Asp
 20 25 30

Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala
 35

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> repeat sequence

<400> 25

Ala Ala Glu Ala Pro
 1 5