



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0141751
(43) 공개일자 2016년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01) C12N 15/87 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/48238 (2013.01)
A61K 31/517 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7028017
(22) 출원일자(국제) 2015년04월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년10월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/024400
(87) 국제공개번호 WO 2015/154059
국제공개일자 2015년10월08일
(30) 우선권주장
61/975,687 2014년04월04일 미국(US)

(71) 출원인
세다르스-신나이 메디칼 센터
미합중국 씨에이 90048-1865 로스앤젤레스 8700베
버리 블레매드
(72) 발명자
메디나-카우, 라리 케이.
미국 캘리포니아주 90048 로스앤젤레스 비버리 블
러바드 8700
심즈, 제시카
미국 캘리포니아주 90048 로스앤젤레스 비버리 블
러바드 8700
(74) 대리인
특허법인아주김장리

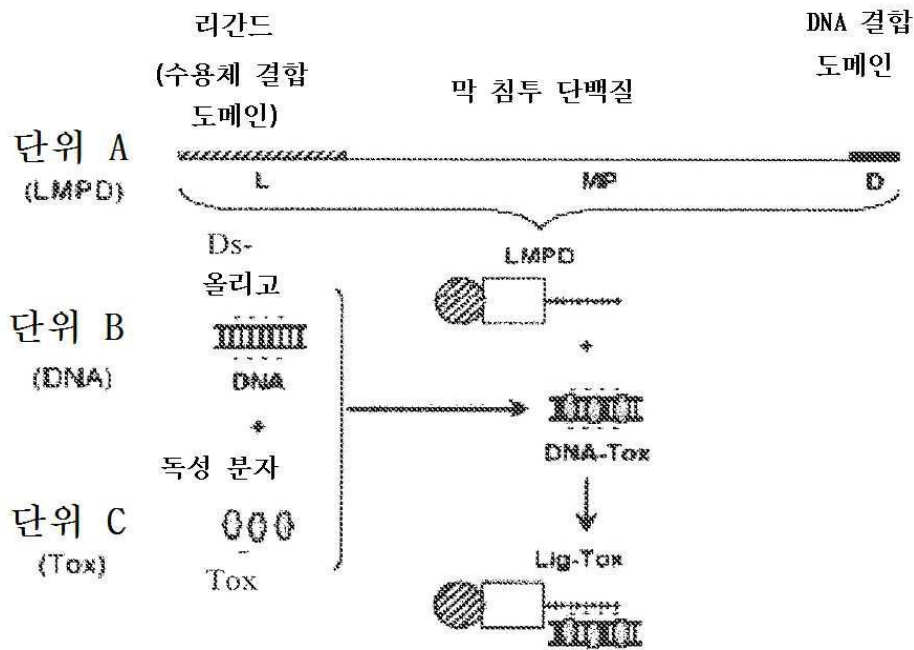
전체 청구항 수 : 총 93 항

(54) 발명의 명칭 HER3-표적화 나노입자를 이용한 트라스트주맙-내성 HER2+ 유방암의 표적화

(57) 요약

본 명세서에서는 환자의 암을 치료하는 방법이 개시되어 있으며, 이 방법은 항-HER2 요법을 이용한 치료에 대해 내성이 있는 환자를 식별하는 단계; 및 약물 전달 분자를 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 정전기 상호작용을 통해서 폴리펩 (뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



타이드 서열에 결합된 핵산 분자; 및 핵산 서열에 비공유 결합된 화학작용제를 포함한다. 또한 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도하는 방법이 개시되어 있으며, 이 방법은 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포를 약물 전달 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다. 추가로 본 명세서에서는 환자의 암을 치료하는 방법이 개시되어 있으며, 이 방법은 항-HER2 요법에 대해 내성이 있는 환자를 식별하는 단계; 및 치료적 유효량의 약물 전달 분자를 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 및 폴리펩타이드 서열에 결합된 설폰화 콜롤 분자를 포함한다. 최종적으로 본 명세서에서는 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도시키는 방법이 개시되어 있으며, 이 방법은 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포를 약물 전달 분자와 접촉시키는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 및 폴리펩타이드 서열에 결합된 설폰화 콜롤 분자를 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/704 (2013.01)

A61K 31/713 (2013.01)

A61K 38/1883 (2013.01)

A61K 39/3955 (2013.01)

A61K 47/48584 (2013.01)

C07K 14/4756 (2013.01)

C12N 15/87 (2013.01)

C07K 2319/33 (2013.01)

C07K 2319/74 (2013.01)

(72) 발명자

타구아임, 마이클

미국 캘리포니아주 90048 로스앤젤레스 비버리 블러바드 8700

한슨, 크리스

미국 캘리포니아주 90048 로스앤젤레스 비버리 블러바드 8700

쿠이, 시아오지앙

미국 캘리포니아주 90048 로스앤젤레스 비버리 블러바드 8700

명세서

청구범위

청구항 1

환자의 암의 치료방법으로서,

항-HER2 요법에 대해 내성이 있는 환자를 식별하는 단계; 및

치료적 유효량의 약물 전달 분자를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 약물 전달 분자는,

소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자;

정전기 상호작용을 통해서 상기 폴리펩타이드 서열에 결합된 핵산 분자; 및

상기 핵산 서열에 비공유 결합된 화학작용제를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항-HER2 요법은 항체 요법을 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항-HER2 요법은 소분자 요법을 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 표적화 리간드를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 양하전된 도메인을 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 재조합 융합 단백질인, 암의 치료방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 재조합 융합 단백질은 Her 세그먼트를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 재조합 융합 단백질은 펜톤 베이스 세그먼트(penton base segment)를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 수용체 결합 도메인을 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 수용체 결합 도메인은 헤레굴린- α 인, 암의 치료방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 엔도솜붕괴성(endosomolytic) 도메인을 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 엔도솜붕괴성 도메인은 Arg-Gly-Asp 모티프를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 엔도솜붕괴성 도메인은 Glu-Gly-Asp 모티프를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 폴리라이신 모티프를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 폴리라이신 모티프는 데카라이신(deca라이신)인, 암의 치료방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 또는 이들의 조합인, 암의 치료방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 서열은 HerPBK 10인, 암의 치료방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드, 암의 치료방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 정전기 상호작용에 의해 상기 제조합 융합 단백질에 결합되는, 암의 치료방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 화학작용제는 화학요법제인, 암의 치료방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 화학작용제는 독소루비신, 또는 이의 약제학적 등가물인, 암의 치료방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 화학작용제가 상기 핵산 분자에 개재되는, 암의 치료방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 유형의 세포는 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포인, 암의 치료방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 HER2+ 유방암 세포는 요법에 반응하는 HER2+ 유방암 세포 상의 표면 HER3의 수준보다 더 높은 표면 HER3의 수준을 갖는, 암의 치료방법.

청구항 25

제2항에 있어서, 상기 항체는 트라스투주맙 또는 퍼투주맙인, 암의 치료방법.

청구항 26

제3항에 있어서, 상기 소분자는 라파티닙인, 암의 치료방법.

청구항 27

제1항에 있어서, 상기 HER2+ 유방암 세포는 상기 항-HER2 요법에 대해서 자연 내성이 있는, 암의 치료방법.

청구항 28

제1항에 있어서, 상기 HER2+ 유방암 세포는 상기 항-HER2 요법에 대해서 획득 내성을 갖는, 암의 치료방법.

청구항 29

제1항에 있어서, 상기 약물 전달 분자와 함께 항-HER2 치료제를 공동-투여하는 단계를 더 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 30

제1항에 있어서, 상기 환자는 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택된 포유동물인, 암의 치료방법.

청구항 31

항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도시키는 방법으로서,

상기 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포를 약물 전달 분자와 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 약물 전달 분자는,

소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자;

정전기 상호작용을 통해서 상기 폴리펩타이드 서열에 결합된 핵산 분자; 및

상기 핵산 서열에 비공유 결합된 화학작용제를 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 접촉은 시험관내에서 이루어지는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 접촉은 생체내에서 이루어지는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 34

제31항에 있어서, 상기 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포는 포유동물 세포인, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 35

제31항에 있어서, 상기 포유동물은 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 36

환자의 암의 치료방법으로서,

항-HER2 요법에 대해 내성이 있는 환자를 식별하는 단계; 및

치료적 유효량의 약물 전달 분자를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 약물 전달 분자는,

소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 및

상기 폴리펩타이드 서열에 결합된 설폰화 콜롤 분자(sulfonated corrole molecule)를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 설폰화 콜룰 분자는 망간(Mn), 철(Fe) 및/또는 갈륨(Ga)을 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 약물 전달 분자는 HerMn, HerFe 또는 HerGa인, 암의 치료방법.

청구항 39

제36항에 있어서, 상기 항-HER2 요법은 항체 요법을 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 40

제36항에 있어서, 상기 항-HER2 요법은 소분자 요법을 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 41

제36항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 표적화 리간드를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 42

제36항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 양하전된 도메인을 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 43

제36항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 재조합 융합 단백질인, 암의 치료방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 재조합 융합 단백질은 Her 세그먼트를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 45

제43항에 있어서, 상기 재조합 융합 단백질은 펜톤 베이스 세그먼트를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 46

제36항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 수용체 결합 도메인을 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 수용체 결합 도메인은 헤레굴린- α 인, 암의 치료방법.

청구항 48

제36항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 엔도솜붕괴성 도메인을 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 엔도솜붕괴성 도메인은 Arg-Gly-Asp 모티프를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 50

제48항에 있어서, 상기 엔도솜붕괴성 도메인은 Glu-Gly-Asp 모티프를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 51

제36항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 폴리라이신 모티프를 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 폴리라이신 모티프는 데카라이신인, 암의 치료방법.

청구항 53

제36항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 또는 이

들의 조합인, 암의 치료방법.

청구항 54

제36항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 서열은 PBK 10인, 암의 치료방법.

청구항 55

제36항에 있어서, 상기 유형의 세포는 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포인, 암의 치료방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 HER2+ 유방암 세포는 요법에 반응하는 HER2+ 유방암 세포 상의 표면 HER3의 수준보다 더 높은 표면 HER3의 수준을 갖는, 암의 치료방법.

청구항 57

제39항에 있어서, 상기 항체는 트라스투주맙 또는 퍼투주맙인, 암의 치료방법.

청구항 58

제40항에 있어서, 상기 소분자는 라파티닙인, 암의 치료방법.

청구항 59

제56항에 있어서, 상기 HER2+ 유방암 세포는 상기 항-HER2 요법에 대해서 자연 내성이 있는, 암의 치료방법.

청구항 60

제56항에 있어서, 상기 HER2+ 유방암 세포는 상기 항-HER2 요법에 대해서 획득 내성을 갖는, 암의 치료방법.

청구항 61

제36항에 있어서, 상기 약물 전달 분자와 함께 항-HER2 치료제를 공동-투여하는 단계를 더 포함하는, 암의 치료방법.

청구항 62

제36항에 있어서, 상기 환자는 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 암의 치료방법.

청구항 63

항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법으로서,

상기 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포를 약물 전달 분자와 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 약물 전달 분자는,

소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 및

상기 폴리펩타이드 서열에 결합된 설폰화 콜롤 분자를 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 설폰화 콜롤 분자는 망간(Mn), 철(Fe) 및/또는 갈륨(Ga)를 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 65

제63항에 있어서, 상기 약물 전달 분자는 HerMn, HerFe 또는 HerGa인, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 66

제63항에 있어서, 상기 항-HER2 요법은 항체 요법을 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 67

제63항에 있어서, 상기 항-HER2 요법은 소분자 요법을 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 68

제63항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 표적화 리간드를 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 69

제63항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 양하전된 도메인을 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 70

제63항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 재조합 융합 단백질인, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 재조합 융합 단백질은 Her 세그먼트를 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 72

제70항에 있어서, 상기 재조합 융합 단백질은 펜톤 베이스 세그먼트를 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 73

제63항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 수용체 결합 도메인을 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 수용체 결합 도메인은 헤레굴린- α 인, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 75

제63항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 엔도솜붕괴성 도메인을 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 엔도솜붕괴성 도메인은 Arg-Gly-Asp 모티프를 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 77

제75항에 있어서, 상기 엔도솜붕괴성 도메인은 Glu-Gly-Asp 모티프를 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 78

제63항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 분자는 폴리라이신 모티프를 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 폴리라이신 모티프는 데카라이신인, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 80

제63항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 또는 이들의 조합인, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 81

제63항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 서열은 PBK 10인, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 82

제63항에 있어서, 상기 유형의 세포는 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포인, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 HER2+ 유방암 세포는 요법에 반응하는 HER2+ 유방암 세포 상의 표면 HER3의 수준보다 더 높은 표면 HER3의 수준을 갖는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 84

제66항에 있어서, 상기 항체는 트라스투주맵 또는 퍼투주맵인, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 85

제67항에 있어서, 상기 소분자는 라파티닙인, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 86

제82항에 있어서, 상기 HER2+ 유방암 세포는 상기 항-HER2 요법에 대해서 자연 내성이 있는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 87

제82항에 있어서, 상기 HER2+ 유방암 세포는 상기 항-HER2 요법에 대해서 획득 내성을 갖는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 88

제63항에 있어서, 상기 약물 전달 분자와 함께 항-HER2 치료제를 공동-투여하는 단계를 더 포함하는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 89

제63항에 있어서, 상기 환자는 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 90

제63항에 있어서, 상기 접촉은 시험관내에서 이루어지는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 91

제63항에 있어서, 상기 접촉은 생체내에서 이루어지는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 92

제63항에 있어서, 상기 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포는 포유동물 세포인, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

청구항 93

제63항에 있어서, 상기 포유동물은 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에 세포자멸사를 유도시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 미국 가출원 일련 번호 제61/975,687호(출원일: 2014년 4월 4일, 발명자: Lali K. MEDINA-KAUWE 등, 및 발명의 명칭: "TARGETING TRASTUZUMAB RESISTANT HER2+ BREAST CANCER WITH A HER3-TARGETING NANOPARTICLE")로부터의 우선권을 주장하며, 이 기초 출원의 전체 개시내용은 도면을 포함하여 참고로 본 명세서에 편입된다.

[0003]

서열 목록

[0004]

본 출원은 EFS-웹을 통해서 ASCII 형식으로 제출된 서열 목록을 포함한다. 2015년 4월 4일에 작성된 상기 ASCII 복사본은 EOS006PCT_SEQLISTING.txt라는 명칭이고 17 킬로바이트 크기이다.

[0005]

정부 권리

[0006]

본 명세서에 개시된 주제는 미국 국립보건원/미국 국립암연구소에 의해 수여된 보조금 NIH/NCI R01 CA140995 및 NIH/NCI R01 CA129822 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 개시된 주제에서 소정의 권리를 지닌다.

[0007]

발명의 기술분야

[0008]

본 발명은 치료법의 분야, 더욱 구체적으로는 암 치료 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0009]

세포 내에서의 HER 수용체의 패밀리, 예를 들어, HER1(EGFR), HER2, HER3 및 HER4 수용체의 과발현이 세포 내에서 강력하고 일정한 증식성 신호전달을 초래하며, 이것은 궁극적으로 소정 유형의 암, 예를 들어, 유방암의 발병을 초래한다는 것이 잘 알려져 있다. HER2-양성 유방암은 거의 침습성 유방암의 1/4를 나타내며, 불량한 환자 생존을 나타낸다. 트라스트주맙은 HER2/neu 수용체를 간섭하는 단클론성 항체이다. 이것은 소정의 유방암의 치료를 위하여 수개의 상표명, 예를 들어, 허셉틴(Herceptin)(등록상표) 하에서 현재 판매되고 있다. 퍼투주맙은 암 치료에 이용되는 다른 단클론성 항-HER2 항체이다. 라파티닙은 유방암에서 치료 효과를 발휘하는 소분자 유기 화합물이다. 이들 요법제는 다른 치료 요법이 실패한 후에 암에 대한 최후의 보루로서 일반적으로 사용된다. 불행하게도, HER2-양성 유방암을 지닌 많은 환자는 이들 항-HER2 치료에 대해서 처음에는 반응하지만, 이들의 상당한 부분이 이들 요법제에 대한 내성을 발달시킨다. 일단 말기 치료에 대한 내성이 발달되면, 치료에 대한 옵션은 참으로 매우 소수로 된다. 따라서, 이들 요법제에 대한 내성으로 되거나 비반응성인 이들 HER2+ 종양에 대항하여 효과적인 신약의 개발에 대한 커다란 요구가 있다.

발명의 내용

[0010] 본 명세서에서는 환자의 암을 치료하는 방법이 개시되어 있으며, 이 방법은 항-HER2 요법을 이용한 치료에 대해 내성이 있는 환자를 식별하는(identifying) 단계; 및 약물 전달 분자를 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 정전기 상호작용을 통해서 폴리펩타이드 서열에 결합된 핵산 분자; 및 핵산 서열에 비공유 결합된 화학작용제를 포함한다. 또한 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도하는 방법이 개시되어 있으며, 이 방법은 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포를 약물 전달 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0011] 추가로 본 명세서에서는 환자의 암을 치료하는 방법이 개시되어 있으며, 이 방법은 항-HER2 요법에 대해 내성이 있는 환자를 식별하는 단계; 및 치료적 유효량의 약물 전달 분자를 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 및 폴리펩타이드 서열에 결합된 설폰화 콜롤 분자(sulfonated corrole molecule)를 포함한다. 최종적으로 본 명세서에서는 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도시키는 방법이 개시되어 있으며, 이 방법은 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포를 약물 전달 분자와 접촉시키는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 및 폴리펩타이드 서열에 결합된 설폰화 콜롤 분자를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 실시형태에 따른 전달 시스템을 도시한 도면이다.

도 2는 본 발명의 실시형태에 따라서 HER2+ 유방암 세포에 Dox를 전달하기 위하여 구성된 전달 시스템을 도시한 도면이다. 단계 (1)은 박테리아에서 재조합 융합 단백질로서 생산되고 정제된 HerPBK10을 예시한다. 단계 (2)는 비공유 개재(혹은 삽입) 상호작용(noncovalent intercalation interaction)에 의해 형성된 DNA-Dox를 예시한다. 단계 (3)은 DNA-Dox가 비공유 전하 상호작용에 의해 HerPBK10에 결합하는(음이온성 DNA 포스파타제가 양이온성 폴리라이신에 친전자적으로 결합하는) 것을 예시한다.

도 3은 (1) 세포막에서의 수용체 결합, (2) 복합체의 내재화, (3) 개재 상호작용을 통해서 dsDNA에 공유 결합된 화학요법제(Dox)의 세포질 방출, 및 (4) 화학요법제 및 dsDNA의 핵 진입을 포함하는, 본 발명의 실시형태에 따른 HER2+ 유방암 세포에 Dox의 전달을 위하여 구성된 전달 시스템의 작용 개략도를 예시한다.

도 4(a)는 DNA-Dox 조립 동안 여과액 중 상대적 Dox를 예시한다. 상보적 30 bp 올리고뉴클레오타이드를 어닐링함으로써 제조된 ds-올리고를 Dox와 1:16 몰비의 DNA:Dox에서 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 유리 Dox를 10 MW 컷오프 회전 칼럼을 통해서 여과에 의해 제거하였다. 첫 번째 Dox 제거 회전(세척 1) 후에, 여과액을 HEPES 완충 식염수(HBS)로 4회 이상 세척하였다(세척 2 내지 5).

도 4(b)는 DNA-Dox 조립 동안 여과액 및 보전물(보전물)의 UV/V 흡광도를 나타낸다.

도 5는 HerDox 조립체를 예시한다. DNA-Dox는 HerPBK10과 9:1 몰비의 HerPBK10:DNA-Dox에서 2시간 동안 얼음 위에서 인큐베이팅하였다. 이 혼합물에 크기 배제 HPLC를 실시하고, SDS-PAGE 및 면역블로팅을 위하여 6 내지 10분에 분획들을 수집하였다. HerDox는 6분 피크로부터 수집되었다. HerDox 중 Dox의 농도는 480nm(Dox 흡광도 파장)에서 흡광도를 측정함으로써 평가되었다. HerDox 분획 1 내지 5의 HPLC 정제는 6 내지 10분에 수집된 샘플에 대응한다. 분획 1 내지 5의 면역블롯은 또한 HerPBK10을 식별하는데 이용된 펜톤 베이스 항체(penton base antibody)에 의해 묘사된다.

도 6(a)는 상이한 보관 조건 하 또는 혈청 중에서 접합체 안정성(conjugate stability)을 예시한다. HerDox는 4℃, 실온 또는 37℃에서 12일까지 인큐베이팅하였다. 샘플을 하루걸러 한외여과 회전 칼럼을 통해서 여과하였다. 보전물 및 여과액 흡광도는 각각 접합체로부터의 상대적 Dox 체류 또는 방출을 결정하기 위하여 480nm에서 측정하였다.

도 6(b)는 배양액 배지에서 세포에 HerDox의 연장된 노출을 모방한다. Ni-NTA 비드 상에 고정된 HerDox는 각 샘플을 펠릿화하기 전에 37℃에서 표시된 시간 동안 DMEM 중에서 소 혈청과 인큐베이팅하였다. 상청액(여과액) 및 비드 용출액(보전물)의 흡광도는 Dox를 검출하기 위하여 480nm에서 측정하였다. 혈청 중 상대적 Dox 방출 또는 체류는 대조군(대응하는 혈청 결여 샘플)에 대해서 정규화되어 표현된다. N=3/시점. 대조군과 비교된 샘플의 T 검정(P<0.05)은 유의한 차이를 보이지 않았다.

도 7은 표적화된 독성을 예시한다. 각 세포주는 완전(즉, 혈청-함유) 배지 중에서 37℃에서 4시간 동안 rHerDox(0.5 μM Dox 콘(cone)), Dox 단독(0.5 μM), 또는 HerPBK10 단독에 노출시키고 나서, 흡인에 의해 유리

접합체를 제거하고, 신선한 배지를 첨가하는 한편 세포는 계속적으로 성장된다. 세포 역가는 대사(즉, MTT) 검증(assay)에 의해 결정하였다. 도 7 상부 패널은 MDA-MB-231(HER2-) 및 MDA-MB-435(HER2+) 세포 생존율에 대한 HerDox의 효과를 예시한다. 상대적 생존 세포수는 대응하는 미처리 세포의 %로서 표현된다. 도 7의 하부 패널은 HER2- 및 HER2+ 세포 생존율에 대한 HerDox, Dox 단독, 또는 HerPBK10 단독의 비교를 예시한다. 상대적 생존율(미처리 세포의 %로서)은 처리(혹은 치료 혹은 처치) 제3일에 대해서 표시된다.

도 8은 수용체 특이성을 예시한다. MDA-MB-435(HER2+) 세포는 유리 리간드(eHRG)와 10배 몰 과잉의 HerDox에서 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 배지를 흡인하여 유리 eHRG를 제거하고, HerDox(0.5 μM)를 함유하는 신선한 배지를 세포에 첨가하였다. 세포 생존율은 MTT 검증에 의해 측정하고, 상대적 미처리 세포수의 %로서 표현하였다.

도 9(a)는 혼합된 세포 배양액 중에서의 표적화를 예시한다. 동등한 수의 MDA-MB-435 및 GFP(+) MDA-MB-231 세포를 Dox 단독(0.5 μM), Her-Dox(0.5 μM Dox를 함유), 또는 HerPBK10(1.2 μg/웰, HerDox 중 HerPBK10에 대해서 증가)으로 처리하였다. 웰들은 GFP 형광(상대적 MDA-MB-231 수를 결정하기 위하여) 및 크리스털 바이올렛 염색(총 세포수를 결정하기 위하여)에 대해서 검정하였다.

도 9(b)는 혼합된 세포 배양액 중의 표적화를 더욱 예시한다. 세포 생존율은 크리스털 바이올렛 염색(총 세포) 및 GFP 형광(MDA-MB-231 세포)에 기초한 대조군(con) 세포에 의해 정규화된 실험(exp) 세포의 상대적 배가 시간(DT)을 계산함으로써 결정하였다. MDA-MB-435의 DT는 총 세포 DT로부터 MDA-MB-231의 DT를 차감함으로써 결정하였다. 상대적 생존율은 처리 제2일에 대해서 표시되어 있다.

도 9(c)는 세포 배양액 중에 안정성이 있는 것을 예시한다. HerDox를 함유하는 배양 배치의 분취량(37℃에서 표시된 시간 동안 인큐베이션 후)은 2% 아가로스 겔 상에서 전기영동시켰다. 혈청을 함유하지 않는 HEPES-완충 식염수 중에서 37℃에서 인큐베이션된 HerDox는 병렬로 처리되었다. Dox 형광은 UV 여기에 의해 가시화되었다. 유리 Dox(Dox 단독)는 겔에 유지되지 않은 반면 HerDox 중에 내포된 Dox는 유지되었다. 형광 밴드를 HerPBK10과 정렬시키고 레인당 로딩을 평가하기 위하여, 겔은 쿠마씨 블루로 염색하였으며, 이것은 배양 배지 샘플로부터 혈청 단백질을 식별시켰다.

도 10은 HER2+ 종양에 대한 GFP-Her의 우선적 표적화를 예시한다. 종양-보유 마우스에게는 꼬리 정맥을 통해서 3 nmol의 GFP-Her를 주사하였다. 주사 후 3.5시간에 조직을 수거하고 제노젠 스몰-애니멀 이미저(Xenogen small-animal imager)를 이용해서 가시화하였다. GFP 형광은 적색 유사색이다(청색 유사색은 형광이 없는 것을 나타내는 반면 GFP 강도는 컬러 막대로 적색을 향한 컬러값 변위예의해 반영된다).

도 11(a)는 HER2+ 종양에 대한 HerDox의 우선 표적화를 예시한다. 종양-보유 마우스에게는 꼬리 정맥을 통해서 0.75 nmol의 HerDox 또는 Dox를 주사하고, 커스텀 스몰 애니멀 이미저로 영상화하였다. 도 11(a)는 HerDox의 IV 전달 후 살아있는 마우스의 이미지를 나타낸다. 종양은 화살표로 표시되어 있다.

도 11(b)는 HER2+ 종양에 대한 HerDox의 우선 표적화를 더욱 예시한다. 종양-보유 마우스에게는 꼬리 정맥을 통해서 0.75 nmol의 HerDox 또는 Dox를 주사하고 커스텀 스몰 애니멀 이미저로 영상화하였다. 도 11(b)는 HerDox 또는 Dox의 주사 후 3시간에 수거한 종양 및 조직의 이미지를 도시한다. Dox로부터의 형광 신호는 컬러 막대에 따라서 유사-착색되어 있고, 100을 향한 이동은 높은 형광 강도를 나타낸다. 도 11(b)는, Dox를 단독으로 투여한 것(우측 패널)과 비교해서 본 발명의 실시형태에 따른 전달 시스템을 이용하여 기타 장기 및 조직에 대한 최소 전달을 가진 HER2+ 유방암 세포에 대한 Dox의 표적화 전달(좌측 패널)의 비교를 예시한다.

도 12(a)는 종양 성장에 대한 HerDox 및 Dox의 비교를 예시한다.

도 12(b)는 동물 중량에 대한 HerDox 및 Dox의 비교를 예시한다.

도 12(c)는 심장 조직에 대한 HerDox 및 Dox의 비교를 예시한다.

도 12(d)는 심장 기능에 대한 HerDox 및 Dox의 비교를 예시한다.

도 13은 마우스 전혈의 안정성을 예시한다. 신선하게 수집한 전혈을 37℃에서 HerDox 또는 Dox로 1시간까지 인큐베이션한 후 10K MW 컷오프 막을 통한 한외여과에 의해 처리하였다. 0.5mM의 EDTA가 항응고제로서 사용됨에 따라서, EDTA 단독(- 혈액) 중 HerDox를 병렬로 처리하였다. 막대들은 보유된(보전물) 또는 방출된(여과액) Dox를 각 샘플의 총 형광 퍼센트로서 나타낸다. Y-축의 척도는 여과액 샘플의 존재를 나타내기 위하여 조절된다. N=3/처리.

도 14(a)는 살아있는 세포에서의 HerDox 및 Dox 세포내 전좌 및 표적화의 비교를 예시한다. MDA-MB-435 세포는 HerDox 또는 유리 Dox($0.5 \mu\text{M}$)와 37°C 에서 인큐베이팅하였다. 살아있는(미고정) 세포는 명시야 및 형광 현미경에 의해 영상화되었다.

도 14(b)는 살아있는 세포에서의 HerDox 및 Dox 세포내 전좌 및 표적화를 예시한다. MDA-MB-435 세포는 HerDox 또는 유리 Dox($0.5 \mu\text{M}$)와 37°C 에서 인큐베이팅하였다. 살아있는(고정되지 않은) 세포는 DIC 및 공초점 형광 현미경에 의해 이미화되었다.

도 15는 유방암 세포에서의 HerDox 트래피킹(trafficking)을 예시한다. HerDox와 37°C 에서 인큐베이팅된 세포를 표시된 시점에서 고정하고 HerPBK10에 대해서 항체를 이용해서 면역 형광을 위하여 처리하였다. 이미지는 형광 및 명시야 하에서 공초점 현미경을 이용해서 캡처하였다. n, 핵; 막대, 대략 8 마이크로.

도 16은 HER2+ 또는 HER2- 유방암환자로부터 인간 혈청 내 MDA-MB-435 세포에 대한 HerPBK10 결합을 예시한다. 세포는, 5 HER2+ 유방암환자 또는 연령 일치된 HER2- 대조군의 각각(둘 다 화학요법 처리 전에 얻어짐)으로부터 인간 혈청을 함유하는 배지에서 HerPBK10($1.2 \mu\text{g}/\text{well}$)으로 처리하였다. 세포는 HerPBK10에서 지향된 항체를 이용해서 ELISA를 위하여 처리되었다. 100배 물 과잉의 경쟁적 리간드 저해제(+ Her)와 함께 혹은 이것 없이 소 혈청을 함유하는 배지에서 HerPBK10을 공급받은 대조군(C) 웰은 백색 막대로 표시되어 있다. 환자 혈청은 세다스-신나이 메디칼 센터(Cedars-Sinai Medical Center)에서 WCRI 조직뱅크에 의해 제공되었다. N=3개 웰/처리.

도 17(a)는 세포 유형에 대한 상대적인 세포 표면 HER 소단위 수준(소단위 수준) 및 세포독성을 예시한다. 세포는 표준 절차를 이용해서 항-HER 소단위 항체에 이어서 HRP-접합된 2차 항체와 인큐베이팅하였다. 상대적인 세포수는 크리스털 바이올렛 염색에 의해 측정하고 590nm에서 크리스털 바이올렛 흡광도를 측정함으로써 정량화하였다. 상대적인 소단위 수준은 상대적인 세포수, 또는 흡광도 450nm/590nm에 의해 정규화된 각 세포 모집단의 ELISA 신호로서 기록된다. 도 17(a)는 ELISA에 의해 측정된 바와 같은 상대적인 세포 표면 HER 소단위 수준의 그래프를 나타낸다.

도 17(b)는 차동 HER2를 나타내는 세포에 대한 독성을 도시한다. 소정 범위의 HerDox 용량으로부터의 세포독성은 대사 검정에 의해 각 세포주에 대해 평가되고, 크리스털 바이올렛 염색에 의해 확인되었다. 로그 척도로 표시된 CD50 값은 과학적 그래프화 프로그램을 이용해서 HerDox 용량 곡선의 비선형 회귀 분석에 의해 결정하고, 계산기를 이용해서 확인하였다. 각 세포주의 상대적인 HER2 수준은 각 CD50 값에 이어서 표시되어 있다.

도 18은 HerPBK10의 최적화를 예시한다. 변형된 단백질인 HerPBrgdK10의 전달 용량은 비바이러스성 유전자 전달 복합체의 맥락에서 시험되었고, 전달 효율은 MDA-MB-453 인간 유방암 세포에서의 트랜스젠(루시페라제) 발현에 의해 평가되었다. 2측 t 검정(2-tailed T test)으로 결정된 HerPBK10의 등가 농도에 비해서 * = $P < 0.005$. 도면은, 단백질의 표적화, 수용체 결합, 세포 진입 및/또는 세포내 트래피킹을 개선하게 될 각종 돌연변이가 도입될 수 있으므로 본 발명이 결코 HerPBK10으로 제한되지 않는 것을 입증한다.

도 19는 DS-올리고 길이가 표적화된 복합체 내로의 Dox의 혼입에 영향을 미치지 않는 것을 입증하는 그래프를 예시한다. 그래프는 30 또는 48개 염기쌍 듀플렉스를 이용해서 Dox 혼입의 감지 가능한 차이가 없다는 것을 입증한다.

도 20(a)는 HerDox가 신경교종 세포에 대해서 독성인 것을 예시한다. 도 20(a)는 U251 인간 신경교종 세포에 대한 HER 면역형광을 나타낸다. 이미지는 레이저 주사 형광 공초점 현미경을 이용해서 캡처하였다.

도 20(b)는 U251 세포에 대한 HerDox 대 Dox 독성의 그래프를 예시한다. 2측 검정에 의해 유의차가 결정되었다.

도 21(A)는 내성이 HerDox 독성을 증대시키는 것을 예시한다. (A) 막 침투 없이 ELISA에 의해 검출된, 친계(parental) 및 트라스트주맵 내성 유방암세포주에 대한 HER3(및 HER2)의 상대적인 표면 수준. N=3. * = $p < 0.05$ (친계 대비).

도 21(B)는 트라스트주맵 단독, 퍼투주맵 단독 및 트라스트주맵-퍼투주맵 병용 처리와 비교해서 (처리 후 48 내지 72시간에) HerDox에 의한 종양 세포 사멸을 예시한다. N=3.

도 22는 HerDox가 생체내에서 트라스트주맵-내성 종양을 사멸하는 것을 나타내는 그래프이다. JIMT-1 종양을 보유하는 암컷 누드 마우스에게는 종양이 대략 100 mm에 도달한 경우 IV(꼬리 정맥) 주사에 의해 표시된 용량으로 표시된 시약을 공급(4 내지 6주 동안 2주마다 주사)하였다. 종양 용적은 캘리퍼스에 의해 측정하였다. 제0일은 첫째날 처리에 대응한다. N=10 종양/처리.

도 23은 트라스트주맵 전처리가 HerDox 독성을 증가시키는 것을 나타낸 그래프이다. 친계 또는 비-내성 세포(A 내지 C) 및 트라스트주맵-내성 세포(D 내지 F)는 HerDox 처리 전 4시간 및 24시간에 표시된 농도(X-축 상부 참조)에서 트라스트주맵으로 처리하고, 처리 48 내지 72시간에 생존을 검정하였다. N=3.

도 24(A)는 비공유, 혈청-안정적 자기-조립체에 의해 형성된 HerDox의 그래픽을 나타내며, 이는 기술된 기능적 도메인을 가진 HerPBK10 및 Dox-개재된 ds-올리고와의 친전자성 결합을 도시한다.

도 24(B)는 HerDox 입자의 CryoEM 이미지를 나타낸다.

도 24(C)는 Dox 흡광도의 용리 프로파일을 나타내는 HerDox의 HPLC 크로마토그램이다. 도 24(C)는 HPCE 수집된 분획의 SDS-PAGE를 더욱 도시한다.

도 24(D)는 HerPBK10에 의한 혈청 뉴클레아제 분해로부터의 ds-올리고의 보호를 예시한다. ds-올리고는 DNA를 가시화하기 위하여 PAGE 및 EtBr 염색 전에 100% 마우스 혈청(앱캄사(Abcam), 미국 매사추세츠주의 케임브리지 시에 소재)에서 20분 동안 인큐베이팅하였다.

도 24(E)는 HerDox가 혈중 안정적인 채로 있는 것을 예시한다. Dox 또는 HerDox는 37°C에서 마우스 혈액에서 1 시간 동안 인큐베이팅하고 나서 복합체(보전물)로부터 임의의 방출된 Dox(여과액)을 분리하기 위하여 한외여과를 행한다. N=3. *, $p < 0.05$ (각각의 보전물에 비해서).

도 25는 HerDox가 종양-표적화된 전달을 시험관내 및 생체내에서 매개하는 것을 도시한다.

도 25-A는 HerDox 또는 Dox(0.5 μ M 최종 Dox 농도)로 처리된 개별의 배양액 중에서 HER2+(MDA-MB-435) 및 HER2-(MDA-MB-231) 세포에 대해서 세포독성을 비교한다. 3일의 처리 시 상대적인 세포 생존율(미처리 세포의 %로서). (+Her), HerDox를 제공받기 전에 수용체-블로킹 리간드(재조합 헤레굴린)와 MDA-MB-435 세포의 사전 인큐베이션. N=3.

도 25-B는 차별적 HER2-3을 발현하는 종양을 가진 마우스에서 HerDox 및 Dox의 생물학적 분배를 비교한다. 조직은 주사 후 표시된 시점에서 안락사시킨 독립적으로 주사된 마우스 및 멀티모드 이미지를 사용해서 획득한 형광강도/조직으로부터 수거하였다.

도 25-C는 MDA-MB-435 세포에서 HerDox 흡수 후 1시간에 HerPBK10 및 Dox 위치를 예시한다. n, 핵. 막대, 약 4 μ M.

도 25-D는 종양 성장에 대한 HerDox 및 Dox를 비교한다(N=8-10 종양/처리). 제0일 = 꼬리 정맥 주사 전 3일(7일 동안 매일 주사받은 마우스). 대조군(식염수-주입) 마우스는 IACUC 정책에 따라서 종양 피사로 인해 조기에 안락사시켰다.

도 25-E는 표적을 벗어난 조직에 대한 HerDox 및 Dox를 비교한다. 제0일 = 꼬리 정맥 주사 전 3일(7일 동안 매일 주사받은 마우스). 대조군(식염수-주입) 마우스는 IACUC 정책에 따라서 종양 피사로 인해 조기에 안락사시켰다. 도 25-E에서의 마이크로그래프(20배 확대)는 처리된 마우스로부터의 심근증의 대표적인 H&E 염색 시편 및 간의 면역형광 시편을 나타낸다. 핵 내 녹색 형광은 세포자멸사(양성 TUNEL 염색)를 나타낸다. 상부 그래프, TUNEL 염색의 정량화; 하부 그래프, 주사 후 25일에 초음파심장검진 측정. *, $P < 0.05$ (식염수(모의) 대비).

도 26-A는 고정화된 HER3(인간 ErbB3 세포외 도메인; 전망(Prospec))에 대한 HerPBK10의 ELISA +/- 경쟁적 저해제(HER3 블록)로서 가용성 HER3 펩타이드로 사전-인큐베이션을 도시한다. Un, HerPBK10 없음.

도 26-B는 HER2+ 세포에 대한 HerPBK10 결합의 ELISA +/- 경쟁적 저해제로서 1배 및 10배 물비의 가용성 HER3 펩타이드, 가용성 HER4 펩타이드(ERBB4 펩타이드, 압노바(Abnova)), 베타셀룰린(10 μ g/mL), 또는 퍼투주맵(Pz)으로 사전-인큐베이션을 도시한다. HER3에 대한 HerPBK10 결합은 환자 혈청에 의해 저해되지 않는다.

도 27-A는 내성이 HerDox 독성을 증대시키는 것을 예시한다. 도 27-A는 막 침투 없이 ELISA에 의해 검출된, 친계 및 Tz-내성 유방암세포주에 대한 HER3(및 HER2)의 상대적 표면 수준을 도시한다. N=3. *, $p < 0.05$ (친계 대비).

도 27-B는 내성이 HerDox 독성을 증대시키는 것을 예시한다. 도 27-B는 Tz, Pz, Tz+Pz 및 Dox 단독에 비해서 HerDox에 의한 종양 세포 사멸(처리 후 48 내지 72시간). N=3.

도 27-C는 표적화된 독성에 대한 HER3의 기여를 예시한다. 친계 및 내성 세포주는 HerDox +/- HER3 블로킹 펩타이드(ErbB3 인간; 전망)로 처리하고, 48시간 후 세포 생존율을 시험하였다. 구체적으로, HerDox는 0.1 μ M(JIMT-

1, 트라스트주맵 처리에 대한 자연 내성), 0.125 μ M(BT-474) 또는 1 μ M(SKBR3)의 최종 HerDox 농도에서 세포에 첨가하기 전 1시간 동안 냉PBS 중 등물비의 HER3:HerPBK10에서 HER3 펩타이드로 흡착되었다. 처리는 모의(식염수) 처리와 비교되었다. N=3. *, $p<0.05$ (모의 대비)

도 27-D는 막 침투 없이 ELISA에 의해 검출된, 친계 및 Tz-내성 유방암세포주에 대한 HER3(및 HER2)의 상대적 표면 수준을 예시한다. N=3. *, $p<0.05$ (친계 대비).

도 27-E는 Tz, Pz, Tz+Pz 및 Dox 단독과 비교하여 HerDox에 의한 종양 세포 사멸(처리 후 48 내지 72시간)을 예시한다. N=3.

도 28은 HerDox가 생체내에서 트라스트주맵-내성 종양 성장을 제거하는 것을 입증한다. JIMT-1 종양을 보유하는 암컷 누드 마우스에게는 종양이 대략 100mm³에 도달한 경우 정맥(꼬리 정맥) 주사를 통해 표시된 용량으로 표시된 시약을 공급하였다(4주 동안 주 2회 주입). 종양 용적은 캘리퍼스에 의해 측정하였다. 제0일은 처음 처리일에 상당한다. N=10 종양/처리.

도 29-A는 트라스트주맵 전처리가 HerDox 독성을 증가시키는 것을 예시한다. 도 29-A는 Tz에 의한 HER3의 유도 상승 및 HerPBK10에 의한 결합 증대를 나타낸다. 친계 세포주는 표면 HER3 수준에 대해서 이들 세포를 시험하기 전 24시간 동안 0.5 mg/mL Tz로 전처리하였다.

도 29-B는 트라스트주맵 전처리가 HerDox 독성을 증가시키는 것을 예시한다. 도 29-B는 Tz에 의한 HER3의 상승 유발 및 HerPBK10에 의한 결합 증대를 도시한다. 친계 세포주는 HerPBK10 결합에 대해서 이들 세포를 시험하기 전 24시간 동안 0.5 mg/mL Tz로 전처리하였다.

도 29-C는 트라스트주맵 전처리가 HerDox 독성을 증가시키는 것을 도시한다. SKBR3 친계 세포는 HerDox 처리 전 4 및 24시간에 표시된 농도(상부 X-축 참조)에서 Tz로 처리하고, 처리 후 48 내지 72시간에 생존을 검정하였다. N=3.

도 29-D는 트라스트주맵 전처리가 HerDox 독성을 증가시키는 것을 도시한다. SK-474 친계 세포는 HerDox 처리 전 4 및 24시간에 표시된 농도(상부 X-축 참조)에서 Tz로 처리하고, 처리 후 48 내지 72시간에 생존을 검정하였다. N=3.

도 29-E는 트라스트주맵 전처리가 HerDox 독성을 증가시키는 것을 도시한다. MDA-MB-435 비-내성 세포는 HerDox 처리 전 4 및 24시간에 표시된 농도(상부 X-축 참조)에서 Tz로 처리하고, 처리 후 48 내지 72시간에 생존을 검정하였다. N=3.

도 29-F는 트라스트주맵 전처리가 HerDox 독성을 증가시키는 것을 도시한다. Tz-내성 세포는 HerDox 처리 전 4 및 24시간에 표시된 농도(상부 X-축 참조)에서 Tz로 처리하고, 처리 후 48 내지 72시간에 생존을 검정하였다. N=3.

도 29-G는 트라스트주맵 전처리가 HerDox 독성을 증가시키는 것을 도시한다. Tz-내성 세포는 HerDox 처리 전 4 및 24시간에 표시된 농도(상부 X-축 참조)에서 Tz로 처리하고, 처리 후 48 내지 72시간에 생존을 검정하였다. N=3.

도 29-H는 트라스트주맵 전처리가 HerDox 독성을 증가시키는 것을 도시한다. Tz-내성 세포는 HerDox 처리 전 4 및 24시간에 표시된 농도(상부 X-축 참조)에서 Tz로 처리하고, 처리 후 48 내지 72시간에 생존을 검정하였다. N=3.

도 30-A는 HerPBK10 및 Tz의 세포내 트래피킹 및 생물학적 분배를 비교한다. 도 30-A는 표지된 HerPBK10, Tz, 및 BSA에 의한 생물학적 분배의 제노젠 영상화 및 형광 정량화를 도시한다.

도 30-B는 HerPBK10(녹색) 및 Tz (녹색)에 의한 세포 표면 결합 후 상이한 시점에서 MDA-MB-435 세포의 형광 공초점 현미경 사진을 도시한다. 그래프는 세포 표면 ELISA에 의해 정량화하고 세포 밀도로 정규화된 HER2(좌측 막대) 및 HER3(우측 막대)의 상대적 세포 표면 수준을 도시한다.

도 31-A는 원발성 인간 종양 세포에 대한 결합을 도시한다. HER2+ 환자의 수술 시편으로부터 얻어진 원발성 종양 세포는 세포 표면 수용체 수준을 프로빙하였다.

도 31-B는 인간 종양 세포에 대한 결합을 도시한다. HER2+ 환자의 수술 시편으로부터 얻어진 원발성 종양 세포는 HerPBK10 결합을 프로빙하였다.

도 32-A는 인간(서열번호 13) 및 마우스 HER3(서열번호 14)의 도메인 I-II(헤레굴린-결합 도메인)의 아미노산 서열 정렬이다.

도 32-B는 인간 및 마우스 HER3(1B2E; 셀 시그널링 테크놀로지스사(Cell Signaling Technologies)) 둘 다와 교차 반응하는 항-HER3 항체를 이용해서 (침투 없이) ELISA에 의해 검출된 상이한 세포주에 대한 상대적인 HER3 수준을 비교한다.

도 32-C는 4T1 마우스 유방 종양 세포에 대한 HerPBK10의 결합을 예시한다. N=3. *, $p < 0.05$ (HerPBK10 단독 대비).

도 33-A는 금속화(S2Ga, S2Mn) 및 비금속화(S2FB) 설폰화 콜로이드의 화학적 구조, 및 HerFB, HerGa 및 HerMn으로 각각 지칭되는, 둥근 입자를 형성하기 위하여 HerPBK10과의 비공유 조립체의 개략도를 도시한다. 표는 세 콜로이드 침묵 특성을 요약한다.

도 33-B는 HerGa의 CryoEM 이미지를 나타낸다.

도 33-C는 용액 중 HerMn의 동적 광 산란 측정을 나타낸다. 삽도는 HerMn 입자의 TEM을 나타낸다.

도 34-A는 금속화 콜로이드가 아니라 S2FB가 SOD1을 저해하는 것을 나타낸다. XOD +/- SOD로부터 수퍼옥사이드 생성을 측정하는 시험관내 검정. S2FB($1 \mu\text{M}$)만이 SOD 활성에 영향을 미쳐 약 1/3만큼 저감시킨다.

도 34-B는 S2FB 흡광도 피크가 SOD와의 인큐베이션에 의해 이동(화살표)되는 것을 나타낸다.

도 34-C는 CuCl_2 가 S2FB 형광을 소광시키는 것을 나타낸다.

도 35-A는 돌연변이 펜톤 베이스 라이브러리의 무작위 돌연변이 생성 및 바이오패닝(biopanning)을 요약하는 개략도를 예시한다.

도 35-B는, wt HerPBK10과 정렬하여, 바이오패닝으로부터 단리된 전장 및 절두된 클론의 개략도를 예시한다.

도 35-C는 N-말단 히스티딘 태그에 대하여 항체를 이용해서 검출된 준세포 분획($20 \mu\text{g}/\text{레인}$)의 면역블롯을 도시한다.

도 35-D는 표시된 재조합 단백질($10 \mu\text{g}/\text{웰}$, 12 웰 디쉬)의 30분 흡수에서 MDA-MB-435 세포의 면역형광을 도시한다. 막대, 대략 $10 \mu\text{M}$.

도 36-A는 S2Ga가 TSP0와 상호작용하는 것을 예시한다. 도 36-A는 가용성 재조합 TSP0 단백질이 실온에서 대략 20분 동안 등몰 농도($1 \mu\text{M}$)에서 S2Ga와 인큐베이션되고 나서 유리의 미결합 S2Ga를 제거하기 위하여 한외여과를 실시한 것을 나타낸다. 보전물은 흡광도 및 형광 스펙트럼을 측정함으로써 단백질-결합 콜로이드의 존재를 평가하였다. 표시된 경우, PK11195는 TSP0 상의 포르피린 결합 부위에 대한 경쟁적 저해제로서 이용되었다.

도 36-B는 S2Ga가 TSP0와 상호작용하는 것을 더욱 예시한다. 도 36-B는 가용성 재조합 TSP0 단백질이 실온에서 대략 20분 동안 등몰 농도($1 \mu\text{M}$)에서 S2Ga와 인큐베이션되고 나서 유리의 미결합 S2Ga를 제거하기 위하여 한외여과를 실시한 것을 나타낸다. 보전물은 흡광도 및 형광 스펙트럼을 측정함으로써 단백질-결합 콜로이드의 존재를 평가하였다. 표시된 경우, PK11195는 TSP0 상의 포르피린 결합 부위에 대한 경쟁적 저해제로서 이용되었다.

도 36-C는 동소에서 TSP0와의 HerGa 상호작용의 증거를 도시한다. MDA-MB-435 세포는, 세포를 HerGa으로 처리하기 전 24시간에 플라스미드 발현 외인성 TSP0로 형질감염시키고, 미토콘드리아 내 적색 형광 염료 축적 및 세포질 내 적색 형광 축적의 감소에 의해 입증되는 HerGa-매개 미토콘드리아 붕괴를 조사하였다.

도 36-D는 도 36-C에 나타난 적색 형광의 정량화를 도시한다. *, $p < 0.05$

도 37은 인간 HER2+ 및 HER2- 종양 세포에 대한 HerMn 독성을 도시한다. 각 세포주에게는 표시된 농도의 HerMn 또는 S2Mn을 공급하고 크리스털 바이올렛(CV) 염색을 통해서 24시간 후의 생존을 평가하였다. N=3/3개의 개별의 실험으로부터의 농도.

도 38-A는 HerMn 세포독성의 기전을 도시한다. 공초점 형광 이미지는 MDA-MB-435 세포에 대한 HerMn의 효과를 나타낸다. 척도 막대= $10 \mu\text{M}$. 도 38-A는 $10 \mu\text{M}$ S2Mn 또는 HerMn에 이어서, 24시간 후에 HBSS 중 TMRM(30nM)를 공급받은 세포 중 미토콘드리아 막 전위의 저감을 도시한다. 대조군, PBS-처리됨.

도 38-B는 HerMn 세포독성의 기전을 도시한다. 공초점 형광 이미지는 MDA-MB-435 세포에 대한 HerMn의 효과를

나타낸다. 척도 막대=10 μ M. 도 38-B는 세포에 대한 24시간 인큐베이션 후에 HerMn(5 μ M)에 의한 액틴(적색) 및 튜불린(녹색)의 수퍼옥사이드-매개 붕괴를 도시한다. S2Mn(5 μ M), HerPBK10(HerMn와 등가의 단백질 농도에서) 및 PBS는 대조군으로서 제공되었다. 추가의 세포에게는 HerMn 처리 전에 1시간 동안 티론(Tiron)(5 mM)을 공급하였다.

도 39는 종양-보유 마우스에서의 바이오-분포를 도시한다. 꼬리 정맥 주사 후 Alexa680-표지된 HerMn, Tz 및 BSA(각각 12 nmol)의 제노젠 영상화 및 정량화. 그래프, 평균 형광-/+SEM.

도 40-A는 HerMn의 처리 효능의 예시도이다. 도 40-A는 6일 연속일 동안 1회/1일 HerMn 또는 S2Mn(5 nmol 콜로/주입)의 일일 정맥 주사(꼬리 정맥을 통한)를 공급받은 암컷 누드 마우스에서의 HER2+ MDA-MB-435 종양 성장을 도시한다. 대조군에게는 HerMn과 등가 농도에서 식염수 또는 HerPBK10을 공급하였다. 처리는 대략 200mm³의 평균 종양 용적에서 시작되었다. 종양 용적은 시약 주사 전(제1일), 동안(제3일) 및 후(제8일, 15일 및 제22일)에 측정하였다. N=8-10 종양/군. *p<0.05(일원 분산분석).

도 40-B는 HerMn, S2Mn, HerPBK10 또는 독소루비신(Dox)에 대한 48시간 노출 후의 인간 CDC 생존능을 도시한다. N=3/3개의 개별의 실험으로부터의 농도.

도 41-A는 HerMn이 MRI 조영을 증대시키는 것을 예시한다. 도 41-A는 용액 중 T1 완화 단축을 도시한다.

도 41-B는 HerMn이 생체내에서 MRI 조영을 증대시키는 것을 예시한다. 이미지(좌측)는 신호의 측정을 허용하기 위하여 8일 동안 HerMn 또는 S2Mn(8 nmol/주입)의 매일 전신(IV) 주사 또는 촬영 전에 0.1mmol/kg 가돌리늄 10분의 1회 주사를 공급받은 후의 종양-보유 마우스의 단면도이다. 종양은 박스 영역으로 표시되고, 확대되어 있다(우측).

도 42-A는 막 침투 없이 ELISA에 의해 검출된 친계 및 Tz-내성 유방암세포주에 대한 HER3 및 HER2의 상대적 표면 수준을 도시한다. N=3. *, 친계에 비해서 p<0.05.

도 42-B는 막 침투 없이 ELISA에 의해 검출된 JIMT-1 유방암세포주 상의 HER3 및 HER2의 상대적 표면 수준을 도시한다. N=3. *, p<0.05(친계 대비).

도 42-C는 Tz에 의한 HER3의 상승 유발 및 HerPBK10에 의한 결합 증대를 도시한다. 친계 세포주는 세포 표면 HER3 수준을 측정하기 전 24시간 동안 0.5 mg/mL Tz로 전처리하였다.

도 42-D는 Tz에 의한 HER3의 상승 유발 및 HerPBK10에 의한 결합 증대를 도시한다. 친계 세포주는 HerPBK10을 위하여 이들 세포를 시험하기 전 24시간 동안 0.5 mg/mL Tz로 전처리하였다.

도 42-E는 HER2+ 환자의 수술 시편으로부터 얻어진 원발성 종양 세포에 대한 세포 표면 수용체 수준을 도시한다.

도 42-F는 HER2+ 환자의 수술 시편으로부터 얻어진 원발성 종양 세포에 대한 HerPBK10 결합을 도시한다.

도 43은 HerGa 등과 같은 콜로 나노-생물학적 입자가 시험관내 및 생체내에서 Tz-내성 종양 세포에 대해서 증대된 독성을 나타내는 것을 예시한다.

도 43-A는 막 침투 없이 ELISA에 의해 검출된 친계 및 트라스트주맙 내성 유방암세포주에 대한 HER3의 상대적 표면 수준을 도시한다. N=3. *, p<0.05(친계에 비해서).

도 43-B는 Tz에 비해서 (처리 후 48 내지 72시간만큼) HerGa에 의한 종양 세포 사멸을 도시한다. N=3.

도 43-C는 Tz+Pz 병용 처리에 비해서 (처리 후 48 내지 72시간만큼) HerGa에 의한 종양 세포 사멸을 도시한다. N=3.

도 43-D는 생체내 종양 성장의 제거를 도시한다. BT474 종양을 보유하는 암컷 누드 마우스는 종양이 대략 100mm³에 도달한 경우 정맥 주사(꼬리 정맥)에 의해 표시된 용량에서 표시된 시약을 공급받았다(4 내지 6주 동안 주 2회 주사). 종양 용적은 캘리퍼스로 측정하였다. 제0일은 처음 처리일에 대응한다. N=10개 종양/처리.

도 43-E는 생체내 종양 성장의 제거를 도시한다. BT474 종양을 보유하는 암컷 누드 마우스는 종양이 대략 100mm³에 도달한 경우 정맥 주사(꼬리 정맥)에 의해 표시된 용량에서 표시된 시약을 공급받았다(4 내지 6주 동안 주 2회 주사). 종양 용적은 캘리퍼스로 측정하였다. 제0일은 처음 처리일에 대응한다. N=10개 종양/처리.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 일 양상에 있어서, 본 명세서에는 환자의 암을 치료하는 방법이 개시되어 있으며, 해당 방법은,
- [0014] 항-HER2 요법에 대해 내성이 있는 환자를 식별하는 단계; 및
- [0015] 치료적 유효량의 약물 전달 분자를 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는,
- [0016] 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자;
- [0017] 정전기 상호작용을 통해서 폴리펩타이드 서열에 결합된 핵산 분자; 및
- [0018] 핵산 서열에 비공유 결합된 화학작용제를 포함한다.
- [0019] 본 명세서에 개시된 방법에서 이용되는 약물 전달 분자는 어디엔가 기재되어 있다. 예를 들어, 국제 공보 WO 2009/009441 및 미국 특허 출원 공개 제US 2010/0331273 A1호는 약물 전달 분자의 상세 및 이를 제조하는 방법을 상세히 기술한다. 이들 공보 둘 다의 내용은, 도면을 포함하여 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다. 구체적으로, 공보 제US 2010/0331273 A1호의 단락 [0055] 내지[0094], 도면 및 그들의 상세, 그리고 서열목록은 본 명세서에 참고로 편입된다.
- [0020] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "치료적 유효량"은 암 환자에서 유익한 결과를 얻을 수 있는 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 개인 기반으로 결정될 수 있고, 적어도 부분적으로, 포유동물의 생리적 특징, 이용되는 전달 시스템 또는 치료 수법의 종류 및 질환의 진행에 관한 투여 시간의 고려사항에 기초할 것이다. 유익한 결과는 1) 암성 종양의 크기가 수축될 경우; 2) 암성 종양의 성장이 중단될 경우; 또는 3) 암성 종양의 성장물이 요법의 투여 전의 시간 기간에 비해서 지연될 경우 얻어진다.
- [0021] 몇몇 실시형태에 있어서, 항-HER2 요법은 항체 요법을 포함한다. 이들 실시형태에 있어서, HER2에 대해서 유효한 항체가 환자에게 투여된다. 이들 항체의 예는 트라스트주맙 및 퍼투주맙, 또는 이들의 바이오시밀러(biosimilar)를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 항-HER2 요법은 소분자 요법을 포함한다. 이들 실시형태에 있어서, 작은 유기 분자, 즉, 폴리펩타이드, 핵산 또는 중합체가 아닌 화합물(이 화합물은 HER2에 대해서 유효함)이 환자에게 투여된다. 소분자 요법의 예는 라파티닙이다.
- [0022] 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 표적화 리간드를 포함한다. 소정의 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 양하전된 도메인을 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드는 재조합 융합 단백질이다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 재조합 융합 단백질은 Her 세그먼트를 포함한다. 소정의 실시형태에 있어서, 재조합 융합 단백질은 펜톤 베이스 세그먼트를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 수용체 결합 도메인을 포함하며, 이는 몇몇 실시형태에 있어서 헤레굴린- α 이다. 소정의 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 엔도솜붕괴성(endosomalytic) 도메인을 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 엔도솜붕괴성 도메인은 Arg-Gly-Asp 모티프를 포함하는 한편, 다른 실시형태에 있어서, 엔도솜붕괴성 도메인은 Glu-Gly-Asp 모티프를 포함한다. 소정의 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 폴리라이신 모티프를 포함하며, 이는 몇몇 실시형태에 있어서 데카라이신(deca라이신)(K10)이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 또는 이들의 조합이다. 소정의 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 서열은 HerPBK10이다.
- [0023] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "PB"는 감염의 초기 단계 동안 아데노바이러스 세로타입 5의 세포 결합, 진입 및 사이토졸 침투를 통상적으로 매개하는 펜톤 베이스 세그먼트를 지칭한다. 펜톤 베이스 단백질의 일례는 본 명세서에서 서열번호 10으로서 제공된다. 이 펜톤 베이스 단백질은 통상 RGD 모티프(Arg-Gly-Asp)를 갖는다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "K10"은, 본 명세서에서 서열번호 11로서 제공되는, 친전자성 상호작용에 의해 핵산에 결합하는 능력을 가진 데카라이신 모티프를 지칭한다. HerPBK10을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일례는 본 명세서에서 서열번호 5의 보체 가닥을 가진 서열번호 4로서 제공된다. 유사하게, RGD 모티프의 접돌연변이는 EGD 모티프(Glu-Gly-Asp)를 생성하는데 이용될 수 있으며, 그 결과적으로 (HerPBK10보다는 오히려) HerPBrdK10 폴리펩타이드 분자가 얻어진다.
- [0024] 몇몇 실시형태에 있어서, 핵산 분자는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드이다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 정전기 상호작용에 의해 재조합 융합 단백질에 결합된다.
- [0025] 몇몇 실시형태에 있어서, 화학작용제는 독소이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화학작용제는 화학요법제이고, 이는 소정의 실시형태에 있어서 독소루비신, 또는 이의 약제학적 등가물이다. 소정의 실시형태에 있어서, 화학작용제는 핵산 분자에 개재된다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "개재"란 폴리뉴클레오타이드 서열 등과 같은 기

존의 구조 내로 삽입하는 능력을 지칭한다.

- [0026] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "화학요법제"는, 암 세포 또는 종양의 성장을 파괴, 사멸, 방해하는 능력을 지니고/지니거나 그렇지 않으면 암 세포 또는 종양에 대한 유해 효과를 지니는 제제를 지칭한다. 이들은, 알킬 화제(예컨대, 부설판, 시스플라틴, 카보플라틴, 클로람부실, 사이클로포스파마이드, 이포스파마이드, 다카바진, 메클로레타민, 펠팔란 및 로무스틴), 나이트로소유레아(예컨대, 스트렙토조신, 카무스틴 및 로무스틴), 안트라 사이클린류 및 관련 약물(예컨대, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신 및 미톡산트론), 토포아이스오머라제 I 및 II 저해제(예컨대, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드 및 네티포사이드), 및 유사분열 저해제(예컨대, 파클리 탁셀 및 도세탁셀과 같은 탁산류, 및 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈과 같은 빈카 알칼로이드)를 포함할 수 있지만, 결코 이들로 제한되는 것은 아니다. 기타 화학요법제가 당업자에 의해 이해될 것이고, 통상적인 노 력을 들여 본 명세서에 개시된 대안적인 실시형태와 관련하여 이용될 수 있다.
- [0027] 몇몇 실시형태에 있어서, 상기 유형의 세포는 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포이다. 통상적으로, HER2+ 유 방암 세포는, 예를 들어, 항-HER2 항체, 예컨대 트라스투주맙 또는 퍼투주맙에 의한, 또는 라파티닙과 같은 소 분자에 의한 요법에 반응한다. 요법에 "반응한다"란, 일단 항체가 암 환자에게 전신으로 생체내에 항체를 투여 함으로써, 또는 세포를 항체와 시험관 내에서 접촉시킴으로써 암 세포에 투여되면, 샘플 또는 환자 내 세포의 수가 예를 들어 유도된 세포자멸사를 통해서 감소하거나, 또는 샘플 또는 환자 내 세포의 성장이 지연되거나 저 지되는 것을 의미한다. 환자에서, 이것은, 항체의 투여 전의 소정 시간 기간과 비교해서, 암성 종양의 수축, 종 양의 성장의 결여, 또는 종양의 성장의 지연으로서 나타난다. "항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포"는 항체 또는 소분자에 의한 치료에 반응하지 않는 세포들이다. 이들 세포는 치료제가 투여된 이후에도 계속해서 성장한 다. 일부 세포는 치료에 대해서 고유하게 내성이 있다. 이들 세포는 결코 치료에 반응하지 않는다. 기타 세포는 치료에 대한 내성을 획득한다. 이들 세포는 먼저 치료에 반응하지만, 소정 시간 기간 후 반응을 중지한다. 따라 서, 환자는 치료에 대해서 난치성으로 된다.
- [0028] 몇몇 실시형태에 있어서, HER2+ 유방암 세포는 비-요법-내성(non-therapy-resistant) HER2+ 유방암 세포 상의 표면 HER3의 수준보다 더 높은 표면 HER3의 수준을 갖는다. "비-요법-내성 HER2+ 유방암 세포"란, 항-HER2 항체 또는 소분자와 같은 치료제에 의한 치료에 반응하지만 난치로 되지 않은 HER2+ 암 세포를 의미한다. 다른 실시 형태에 있어서, 상기 내성 유방암 세포는 비-요법-내성 HER2+ 유방암 세포에서 보여지는 바와 같은 동일한 수준 의 표면 HER3 발현을 나타낸다. 소정의 실시형태에 있어서, 항-HER2 항체는 트라스투주맙 또는 퍼투주맙이다. 몇몇 실시형태에 있어서, HER2+ 유방암 세포는 항-HER2 요법에 대해서 자연 내성이 있는 한편, 다른 실시형태에 있어서 HER2+ 유방암 세포는 항-HER2 요법에 대해서 획득 내성을 지닌다.
- [0029] 몇몇 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 방법은 약물 전달 분자와 함께 항-HER2 치료제를 공동-투여하는 단계를 더 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 치료제와 약물 전달 분자는 동시에 투여된다. 실시형태 들 중 몇몇에 있어서, 치료제와 약물 전달 분자 둘 다는 동시에 투여 가능한 투약 형태이다. 다른 실시형태에 있어서, 치료제와 약물 전달 분자는 상이한 시기에 투여된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 환자는 치료제 치료에 대해서 미경험 상태이다. 다른 실시형태에 있어서, 환자는 일부 시간 동안 치료제에 의한 치료를 받았고, 이어 서 약물 전달 분자 치료가 치료 요법에 추가된다.
- [0030] 몇몇 실시형태에 있어서, 환자는 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 실시형태에 있어서, 환자는 인간이다.
- [0031] 다른 양상에 있어서, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도시키는 방법이 개시되어 있으 며, 해당 방법은
- [0032] 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포를 약물 전달 분자와 접촉시키는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는,
- [0033] 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자;
- [0034] 정전기 상호작용을 통해서 폴리펩타이드 서열에 결합된 핵산 분자; 및
- [0035] 핵산 서열에 비공유 결합된 화학작용제를 포함한다.
- [0036] 이 양상의 실시형태들에 있어서, 약물 전달 분자는 위에서 그리고 본 명세서의 어디엔가에서 기재된 바와 같다.
- [0037] 몇몇 실시형태에 있어서, 접촉은 시험관내에서 이루어진다. 예를 들어, 이들 실시형태에 있어서, 세포는 실험실 에서 성장되고, 접촉은 실험실 시험의 일부로서 일어난다.

- [0038] 몇몇 실시형태에 있어서, 접촉은 생체내에서 이루어진다. 이들 실시형태에 있어서, 약물 전달 분자, 또는 이의 전구약물이 환자에게 투여된다. 전구약물이 투여된다면, 그 전구약물은 약물 전달 분자로 전환되고, 접촉은 환자의 신체에서 일어난다.
- [0039] 몇몇 실시형태에 있어서, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포는 포유동물 세포이며, 여기서 포유동물은 임의로 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0040] 제3 양상에 있어서, 본 명세서에는 환자의 암을 치료하는 방법이 개시되어 있으며, 해당 방법은,
- [0041] 항-HER2 요법에 대해 내성이 있는 환자를 식별하는 단계; 및
- [0042] 치료적 유효량의 약물 전달 분자를 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는,
- [0043] 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 및
- [0044] 폴리펩타이드 서열에 결합된 설폰화 콜로 분자를 포함한다.
- [0045] 이 양상의 몇몇 실시형태에 있어서, 설폰화 콜로 분자는 망간(Mn), 철(Fe) 및/또는 갈륨(Ga) 등과 같은 금속을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 실시형태에 있어서, 약물 전달 분자는 HerMn, HerFe 또는 HerGa이다. 일 실시형태에 있어서, 항-HER2 요법은 항체 요법을 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 항체는 트라스트주맙 또는 퍼투주맙이다. 다른 실시형태에 있어서, 항-HER2 요법은 소분자 요법을 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 소분자는 라파티닙이다.
- [0046] 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 표적화 리간드를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 양하전된 도메인을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드는 재조합 융합 단백질이다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 재조합 융합 단백질은 Her 세그먼트를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 재조합 융합 단백질은 펜톤 베이스 세그먼트를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 수용체 결합 도메인을 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 수용체 결합 도메인은 헤레굴린-α이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 엔도솜붕괴성 도메인을 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 엔도솜붕괴성 도메인은 Arg-Gly-Asp 모티프를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 엔도솜붕괴성 도메인은 Glu-Gly-Asp 모티프를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 폴리라이신 모티프를 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 폴리라이신 모티프는 데카라이신이다.
- [0047] 일 실시형태에 있어서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 또는 이들의 조합이다. 일 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 서열은 HerPBK10이다. HerPBK10을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일례는 본 명세서에서 서열번호 5의 보체 가닥을 가진 서열번호 4로서 제공된다.
- [0048] 일 실시형태에 있어서, 세포의 유형은 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포이다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, HER2+ 유방암 세포는 요법에 반응하는 HER2+ 유방암 세포 상의 표면 HER3의 수준보다 더 높은 표면 HER3의 수준을 갖는다. 몇몇 실시형태에 있어서, HER2+ 유방암 세포는 항-HER2 요법에 대해서 자연 내성이 있다. 다른 실시형태에 있어서, HER2+ 유방암 세포는 항-HER2 요법에 대해서 획득 내성을 갖는다.
- [0049] 몇몇 실시형태에 있어서, 환자는 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0050] 제4 양상에 있어서, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도시키는 방법이 개시되어 있으며, 해당 방법은,
- [0051] 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포를 약물 전달 분자와 접촉시키는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는
- [0052] 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 및
- [0053] 폴리펩타이드 서열에 결합된 설폰화 콜로 분자를 포함한다.
- [0054] 이 양상의 몇몇 실시형태에 있어서, 설폰화 콜로 분자는 망간(Mn), 철(Fe) 및/또는 갈륨(Ga) 등과 같은 금속을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 실시형태에 있어서, 약물 전달 분자는 HerMn, HerFe 또는 HerGa이다. 일 실시형태에 있어서, 항-HER2 요법은 항체 요법을 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 항체는 트라스트주맙 또는 퍼투주맙이다. 다른 실시형태에 있어서, 항-HER2 요법은 소분자 요법을 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 소분자는 라파티닙이다.

- [0055] 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 표적화 리간드를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 양하전된 도메인을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드는 재조합 융합 단백질이다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 재조합 융합 단백질은 Her 세그먼트를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 재조합 융합 단백질은 펜톤 베이스 세그먼트를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 수용체 결합 도메인을 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 수용체 결합 도메인은 헤레굴린- α 이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 엔도솜붕괴성 도메인을 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 엔도솜붕괴성 도메인은 Arg-Gly-Asp 모티프를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 엔도솜붕괴성 도메인은 Glu-Gly-Asp 모티프를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 분자는 폴리라이신 모티프를 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 폴리라이신 모티프는 데카라이신이다.
- [0056] 일 실시형태에 있어서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 또는 이들의 조합이다. 일 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 서열은 HerPBK10이다. HerPBK10을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일례가 서열번호 5의 보체 가닥을 가진 서열번호 4로서 본 명세서에서 제공된다.
- [0057] 일 실시형태에 있어서, 상기 유형의 세포는 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포이다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, HER2+ 유방암 세포는 요법에 반응하는 HER2+ 유방암 세포 상의 표면 HER3의 수준보다 더 높은 표면 HER3의 수준을 갖는다. 몇몇 실시형태에 있어서, HER2+ 유방암 세포는 항-HER2 요법에 대해서 자연 내성이 있다. 다른 실시형태에 있어서, HER2+ 유방암 세포는 항-HER2 요법에 대해서 획득 내성을 갖는다.
- [0058] 몇몇 실시형태에 있어서, 환자는 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0059] 몇몇 실시형태에 있어서, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포를 약물 전달 분자와 접촉시키는 단계는 시험관 내에서 이루어진다. 다른 실시형태에 있어서, 상기 접촉은 생체내에서 이루어진다.
- [0060] 몇몇 실시형태에 있어서, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포는 포유동물 세포이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 포유동물은 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0061] 약물 전달 분자
- [0062] 본 명세서에는 세포에 대해서 화학적 작용제를 표적화하기 위한 자기-조립 복합체를 포함하는 전달 시스템이 개시되어 있다. 전달 시스템은 시험관내 및 생체내에서 병든 세포를 표적화할 수 있고, 심장 조직(여기서 바람직하게는 그렇게 하기 위한)을 회피하여, 표적 세포 내로 결합하여 침투한다. 또한, 이 복합체는 비공유적으로 조립되며(즉, 예를 들어, 화학요법제를 표적화된 담체에 화학적 결합할 필요 없이) 이것은 표적화된 단백질 담체 비히클과 약물을 조립하기 위한 브리지로서 작은 핵산 담체를 이용한다.
- [0063] 임의의 수의 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 작은 이중-가닥 핵산이 본 명세서에 기재된 각종 실시형태에 따라서 이용될 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에 있어서, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 또는 이들의 조합은, 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 이중 가닥 핵산으로서 이용된다.
- [0064] 임의의 수의 표적화 리간드가 본 명세서에 기재된 각종 실시형태에 따라서 이용될 수 있다. 예를 들어, PB 자체는 $\alpha v \beta 3$ 과 같은 인테그린을 표적화할 경우 PBK10의 표적화 리간드로서 작용할 수 있다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 인테그린은 각종 유형의 전이성 종양에서 과도하게 발현된다. 따라서, 본 명세서에 기재된 각종 실시형태와 함께, PBK10은 인테그린의 고발현을 가진 전이성 종양 및 세포를 표적화하는데 이용될 수 있다.
- [0065] 개시된 전달 시스템은 각종 투여 경로에 의해 포유동물에게 투여될 수 있는 복합체를 포함하는 한편, 이때 이것은 조영제 또는 치료제 등과 같은 분자를 세포내로 전달하기 위하여 표적 세포(예컨대, 암 세포)에 대해 연마된다. 일 실시형태에 있어서, 복합체는 정상인 건강한 세포에게는 모면하게 하면서 암 세포에게 치료제의 전달을 제공한다.
- [0066] 도 1에 도시된 바와 같이, 개시된 전달 시스템의 일 실시형태는 표적화된 접합체로 자기-조립되는 3가지 성분을 포함한다. 첫 번째 성분("단위 A")은 특정 유형의 세포(들)를 표적화하여 침투하는 고유한 세포-침투 단백질이다. 이것은 리간드(수용체 결합 도메인), 막 침투 도메인 및 DNA 결합 도메인을 포함한다. 두 번째 성분("단위 B")은 정전기 상호작용을 통해서 단위 A에 결합되는 작은 핵산(예컨대, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드)이다. 세 번째 성분("단위 C")은 상호작용을 통해서 단위 B에 결합되는 화학작용제이다. 일 실시형태에 있어서, 화학작용제는 독성 분자이다. 일 실시형태에 있어서, 세포의 유형은 암 세포이고, 화학작용제는 화학요법제이다. 다

른 실시형태에 있어서, 세포의 유형은 HER2+ 유방암 세포이고, 화학작용제는 Dox 또는 이의 약제학적 등가물이다.

[0067] 일 실시형태에 있어서, HerPBK10은 개재된 독소루비신(Dox)을 함유하는 작은 30-염기쌍 이중-가닥 핵산(ds-올리고)과 혼합된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이것은 한외여과 동안 Dox를 보유하는 저온EM(도 24B)에 의해 관찰된, 10 내지 50nm 직경의 둥근 입자의 비공유 조립체로 되고, HPLC(도 24C)에 의해 상이한 온도에서 연장된 저장을 가지며, 혈청(도 24D) 및 혈액(도 24E)에서 약물 방출을 저지한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, ds-올리고의 서열은 Dox 장입에 대한 보유를 가지지 않고, 보다 긴 ds-올리고, 예컨대 48-bp 단편은, 반드시 개선했던 장입 능력을 보이지 않는다. 몇몇 실시형태에 있어서, 하나의 30-bp 올리고는 50개 분자의 독소루비신까지를 포함하여 결합할 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 단백질, DNA 및 Dox를 포함하는 조립된 나노입자는 10개 분자의 단백질 복합체 HerPBK10까지를 포함하여 결합된다. 다른 실시형태에 있어서, 조립된 입자의 UV/Vis 분광 분석은 각각의 ds-올리고 단편이 약 5, 6, 7, 8 또는 그 이상의 분자의 HerPBK10 및 약 10 내지 40개 분자의 Dox에 결합하는 것을 실증하고 있다. 이것은 DNA를 중화시키고 이를 개재된 Dox로 포화시키는데 필요로 되는 예측된 물비와 일치한다.

[0068] 몇몇 실시형태에 있어서, HerDox는 시험관내 및 생체내에서 HER2+ 세포에 대한 수용체-의존적 표적화를 나타낸다. 이들 실시형태 중 하나에 있어서, 도 25-A에 예시된 바와 같이, HerDox 입자는 개별적으로(도 25-A) 그리고 혼합된 세포 배양액(도 9) 둘 다에서 HER2- 세포가 아니라 HER2+에 우선적으로 독성이 있다. 다른 실시형태에 있어서, HerDox 입자는 HER3을 과발현시키는 3중 음성 유방암(TNBC) 세포 등과 같은 HER2- 세포에 대해서 독성이다. 세포독성은 수용체-블로킹에 의해 저해된다. 도 25-B는, HerDox가 생체내에서 보다 낮은 수용체 수준에 비해서, 보다 높은 종양 세포에 우선적인 생물학적 분배를 표시하는 것을 나타낸다. 도 25-C에 도시된 일 실시형태에 있어서, 종양 표적화 및 세포내 트래피킹 연구는 세포 진입후까지(이 시점에서 Dox가 신속하게 핵에 축적되는 한편 HerPBK10은 핵 주변에 남음) HerDox 입자로부터의 방출을 나타내지 않는 것을 제시한다. 도 25-D 및 도 25-E는 생체내 전신 전달이 HER2+ 종양 세포 사멸을 매우 낮은 약리학적 용량(0.004 mg/kg의 Dox)을 나타내는 한편 간 및 심장 독성을 회피하는 것을 도시한다. 이것은 간 조직 및 심근 손상을 일으키면서 유사한 종양 독성을 나타내기 위하여 더 높은 용량을 필요로 하는 표적화되지 않은 Dox와 대조적이다.

[0069] 일 실시형태에 있어서, HER2 저해에 대한 내성은 종양이 특히 HerDox 공격을 하게 만든다. 그럼에도 불구하고, 내성은 HerDox 효능에 대한 전제조건은 아니고-HerDox는 트라스트주맙 감수성 및 내성 종양 세포 둘 다에 유효하며, 둘 다, 특히 내성 세포에 대한 신호 저해에 비해 이점을 가진다.

[0070] 각종 실시형태에 있어서, 개시된 전달 시스템은 임의의 투여 경로를 통한 전달을 위해 제형화될 수 있는 약제학적 조성물에 혼합된다. "투여 경로"는, 에어로졸, 비강, 경구, 경점막, 경피 또는 비경구를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아닌 당업계에 공지된 임의의 투여 경로를 지칭할 수 있다. "비경구"는 안와내, 주입, 동맥내, 관절내, 심장내, 진피내, 근육내, 복강내, 폐내, 척수내, 흉골내, 척추강내, 자궁내, 정맥내, 지주막하, 피막하, 피하, 경점막 또는 경기관을 포함하는, 주사와 일반적으로 관련된 투여경로를 지칭한다. 비경구 경로를 통해, 조성물은 주입용 또는 주사용 용액 또는 현탁액의 형태이거나 또는 동결건조된 분말의 형태일 수 있다.

[0071] 몇몇 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 또한 임의의 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는, 하나의 조직, 장기 또는 신체의 부분으로부터 다른 조직, 장기 또는 신체의 일부까지 관심 대상의 화합물을 운반하거나 또는 수송하는데 연루되는 약제학적으로 허용 가능한 물질, 조성물, 또는 비히클을 지칭한다. 예를 들어, 담체는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질 또는 이들의 조합물일 수 있다. 담체의 각각의 구성성분은 "약제학적으로 허용 가능"하여야 하며, 즉, 제형의 다른 성분과 양립가능하여야 한다. 또한 해당 구성성분이 접촉될 수 있는 임의의 조직 또는 장기와 접촉 시 사용에 적합하여야 하는데, 이는 구성성분이 독성, 자극, 알레르기 반응, 면역원성 또는 그의 치료적 이점보다 지나치게 더 큰 임의의 다른 합병증의 위험을 보유하지 않아야 한다.

[0072] 몇몇 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 경구 투여를 위한 에멀전 또는 시럽으로 캡슐화, 정제화 또는 제제화된다.

[0073] 약제학적으로 허용 가능한 고체 또는 액체 담체는 조성물을 증대 또는 안정화시키기 위해, 또는 조성물의 제조를 용이하게 하기 위해 첨가될 수 있다. 액체 담체는 시럽, 땅콩유, 올리브유, 글리세린, 식염수, 알코올 및 물을 포함한다. 고체 담체는 전분, 락토스, 황산칼슘, 2수화물, 백토, 스테아르산 마그네슘 또는 스테아르산, 텔크, 펙틴, 아카시아, 한천 또는 젤라틴을 포함한다. 담체는 또한 단독으로 또는 왁스와 함께 지속 방출 물질, 예컨대 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 다이스테아레이트를 포함할 수 있다.

- [0074] 약제학적 제제는, 정제 형태에 대해, 필요하다면, 분쇄, 혼합, 과립화 및 압축; 또는 경질 젤라틴 캡슐 형태를 제조하기 위하여 분쇄, 혼합 및 충전될 수반하는 통상적인 수법에 따라 제조된다. 액체 담체가 사용될 경우, 제제는 시럽, 엘릭시르, 에멀전 또는 수성 또는 비수성 현탁액의 형태일 것이다. 이러한 액체 제형은 직접적으로 경구로 투여되거나 또는 연질 젤라틴 캡슐에 충전될 수 있다.
- [0075] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 치료적 유효량으로 전달될 수 있다. 정확한 치료적 유효량은 주어진 대상체에서 치료 효능의 관점에서 가장 효과적인 결과를 수득하게 될 조성물의 양이다. 이 양은 치료 화합물의 특징(활성, 약동학, 약력학 및 생체활성을 포함), 대상체의 생리적 조건(연령, 성별, 질환 유형 및 병기, 일반적인 신체 건강상태, 주어진 투약량에 대한 반응 및 의학의 유형을 포함함), 제형 내 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 담체들의 속성, 및 투여 경로를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다수의 인자에 따라서 다를 것이다. 임상 및 약리학 분야에서 당업자는, 예를 들어, 화합물의 투여에 대한 대상체의 반응을 모니터링하고 그에 따라 투약량을 조절함으로써 일상적인 실험을 통해 치료적 유효량을 결정할 수 있을 것이다. 추가적인 안내를 위해, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA) (2000)] 참조.
- [0076] 개시된 전달 시스템, 더욱 구체적으로는, 치료제(예컨대, 화학요법제), 특히 Dox, 및/또는 이에 의해 전달된 조영제의 전형적인 투약량은 공지된 치료 화합물 또는 조영제가 이용되는 경우 제조업자가 권장하는 범위 내이고, 또한 동물 모델에서 시험관내 반응 또는 반응들에 의해 당업자에게 표시된 바와 같다. 실제 투약량은 전문의의 판단, 환자의 병태, 및 치료 방법의 효과에 따라서 좌우될 것이다.
- [0077] 또한 질환을 치료하는데 적합한 치료제를 포함하는 치료적 유효량의 개시된 전달 시스템을 이를 필요로 하는 포유동물에게 투여함으로써 질환을 치료하는 방법이 개시되어 있다. 일 실시형태에 있어서, 질환은 암이고, 치료제는 화학요법제이다. 다른 실시형태에 있어서, 질환은 유방암 및/또는 HER2+ 유방암이고, 치료제는 Dox이다.
- [0078] 약물의 전달
- [0079] 일 실시형태에 있어서, 본 명세서에 개시된 약물 전달 분자는 기존의 화합물의 종양 부위에서의 전달을 진전시킨다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 본 명세서에 개시된 약물 전달 분자는 치료 효능을 나타내는 것으로 공지된 화합물의 전달을 개선시키기 위하여 이용된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 질환의 치료를 위하여 미국 식약청(FDA)에 의해 승인되어 있다. 소정의 실시형태에 있어서, FDA-승인된 약물은 승인받은 항목 이외의 사용(off-label use)을 위하여 이용된다. 일 실시형태에 있어서, 약물은 독소루비신이다. 몇몇 실시형태에 있어서, HerDox 복합체 내 약물의 안정적인 포획은 약물 전달 분자 내 약물의 효능 및 안전성에 기여한다. 이 접근법은, 확산에 의한 누설 경향이 있는 캡슐 내로 약물을 장입하는 것 또는 활성 및 역가에 영향을 미치는 경향이 있는 공유 접합을 통해 약물을 화학적으로 변형시키는 것에 비해서 유리하다.
- [0080] HER2 저해제에 대한 비교.
- [0081] HER2 및 EGFR 저해에 대한 내성과 연관된 HER3 상승은 HER3을 통한 신호전달을 억제하기 위하여 항-HER3 항체의 발달의 원동력이 된다. HerDox는 이러한 저해제에 비해서 수개의 이점을 갖는다. 일 실시형태에 있어서, HerPBK10은 그의 치료 활성을 위하여 신호 감쇠에 의존하지 않지만, 대신에 종양 세포 내로 신속하게 흡수되어 독성 분자의 전달을 통해 이것 내로부터 세포를 사멸시키는 포탈로서 HER3을 사용한다. 몇몇 실시형태에 있어서는, HerPBK10과는 달리, 항체는 흡수를 촉발시키지 않는다. 대신에 항체는 수동으로, 서서히 그리고 낮은 수준에서 내재화된다.
- [0082] 일례로서, HerDox와 트라스트주맵-접합된 엠탄신(T-DM1)(이것은 최근 임상 용도로 승인되었음) 간에 중요한 차이가 있다. 첫 번째로, T-DM1은 HER2로 표적화되고, 따라서 HER2 저해에 대해서 내성이 있는 종양을 목적으로 하지 않고 있다. 두 번째로, T-DM1이 유사분열 저해제인 엠탄신의 전달을 위하여 내재화되도록 의도되어 있는 한편, 그 자체 상의 HER2는 흡수하지 않지만 대신에 HER3-결합된 리간드와 수용체 전환 또는 공동 흡수에 의한 수동 세포 진입에 의존한다. 따라서, 트라스트주맵(Tz) 접합체의 흡수는 HER-리간드 결합에 의해 촉발된 강인한 진입과는 대조적으로 (수 시간 단위로) 지연되고, 비교적 낮다. 이 결과는 HerPBK10 흡수를 Tz 흡수와 비교하는 도 30에 표시되어 있다. 세 번째로, T-DM1에 대한 내성은 HER3 및 약물 유출물 운반체의 도입에 의해 매개된다. 한편, Dox는 핵을 향한 트래피킹 및 세포 흡수 후까지 HerDox 입자에서 보호된 채로 있으며, 이때 약물은 핵 축적을 위하여 방출된다. 이 입자 트래피킹은 약물 유출물 운반체를 모면한다.
- [0083] HerDox와 다른 항체 간의 작용 기전의 이들 차이는 치료 효능을 필요로 하는 투약량에 영향을 미친다. 일례로서, 본 발명자들은 약 0.004 mg/kg HerDox가 마우스의 심장 및 간 등과 같은 정상 조직을 할애하는 한편

종양 성장을 표적화하고 제거하는 것을 제시한 바 있다. 이것은, 표적을 벗어난 조직에 대한 잘 알려진 부작용을 유발하는, 환자(약 1 내지 5 mg/kg) 및 마우스(0.04 mg/kg 초과)에서 Dox를 표적화하지 않고 T-DM1(약 3.6 mg/kg)을 필요로 하는 치료적 용량과 대조적이다.

[0084] 일 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 암의 치료 방법은 삼중 음성 유방암(TNBC)의 치료에서 이용된다. TNBC는 고유하게 HER2-내성이다. 이들 종양 상에서의 에스트로겐, 프로게스테론 및 HER2 수용체의 결여는 이용될 수 있는 표적화된 요법의 유형을 제한한다. 최근의 연구는 TNBC가 HER3을 발현하는 것을 제시한다. EGF-R 저해제는 이들 종양을 탐구해왔으나, 이러한 저해제에 대한 내성은 또한 상승된 HER3에 의해 용이해진다. 본 명세서에 기재된 암의 치료 방법은 이러한 고유한 HER2-내성 종양에 적용 가능하다. 마찬가지로 본 명세서에 기재된 방법은 또한 유방, 위, 결장, 폐 및 난소의 종양에도 적용 가능하며, 여기서 HER3 상향 조절은 EGFR, HER2 및 PI3K 키나제 저해제에 반응하여 식별된다.

[0085] HerDox 작용 기전

[0086] 몇몇 실시형태에 있어서, HER2 저해제에 대한 획득 내성을 가진 HER2+ 종양은 (i) HER3-매개 표적화, (ii) 입자 엔도사이토시스(endocytosis) 및 엔도솜분해에 의한 하향 조절 및 수용체 격리, 및/또는 (iii) 페이로드 보호 및 약물 유출의 회피를 제공하는 입자 및 엔도솜으로 인해 HerDox에 감수성이다.

[0087] 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, HerDox에 의해 유도된 HER3 클러스터링(clustering), 엔도사이토시스 및 엔도솜분해는 HER3을 HER2 활성화로부터 격리시키고, 신호전달 엔도솜을 둔화시킨다. 일 실시형태에 있어서, 내성 세포에 대한 표적화를 용이하게 하는 상승된 HER3에 부가해서, HerPBK10 나노입자의 다원자가는 HER3 호모-올리고머화와, HER2(및 임의의 다른 티로신 키나제)로부터 멀리 격리를 유발시키고, 따라서 HER3 인산화 및 활성화를 방지한다. 다른 실시형태에 있어서, HER3 상승은 또한 리간드-유도 HER3 호모-올리고머의 형성을 용이하게 하고, 따라서 이러한 현상은 내성 세포에 특별하다. 게다가, 세포질 내로의 진입을 가능하게 하는, 엔도솜 분해에 의해 수용체 격리된 소낭의 파괴는 엔도솜 신호전달을 없애는 한편, 독성의 세포내 표적에 Dox의 전달을 뒷받침하므로, 전체적인 세포독성에 기여한다.

[0088] 몇몇 실시형태에 있어서, 엔도솜 및 입자 트래피킹은 약물 유출물로부터 페이로드를 보호한다. 식작용 전달, HerPBK10에 의한 약물 캡슐화 및 핵 주변으로의 HerDox 이송의 조합은 약물 유출물의 회피에 기여한다. 몇몇 실시형태에 있어서, HerDox는 병용 요법에 비해서 HER2 저해제에 대해서 획득 내성을 가진 HER2+ 종양에 대한 표적화된 독성을 생기게 한다. 이들 HER2 단일 요법 및 병용 치료는 Tz, Tz-Pz, Tz-Lp 및 T-DM1을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0089] 몇몇 실시형태에 있어서, HER2-저해제의 효능은 미경험 HER2+ 종양에 대한 HerDox 요법에 대해서 보조제로서 이용될 경우 증가된다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, HER2-저해제는 HER3을 유발하고 생체내에서 HerDox에 대해서 미경험 종양을 감작시킨다. 다른 실시형태에 있어서, HerPBK10은 HER2+ 환자로부터 HER3을 통해서 종양 조직에 결합된다. 일 실시형태에 있어서, HER2-저해는 인간 CDC에 대한 HerDox 독성을 유발하지 않는다.

[0090] 본 명세서에 기재된 몇몇 실시형태에 있어서, TNBC를 포함하는 HER2-유방 종양은, HER3을 통해서 HerDox에 의해 표적화 가능하고, EGF-R 저해제를 이용한 보조제 치료에 의해 더욱 감작화된다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, EGF-R 저해제는 HER3 상승을 유발하고 시험관내에서 HerDox에 대해서 TNBC 세포를 감작시킨다. 몇몇 실시형태에 있어서, HerDox는 전이성 및 면역적격 세팅 둘 다에서 TNBC 모델에 대해 치료적으로 유효하다.

[0091] 신규한 페이로드의 콜롤

[0092] 콜롤은, 당업계에서, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제US 2014/03350251 A1에서 정의되고 기술되어 있으며, 이 문헌의 전체 개시내용은 도면을 포함하여, 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0093] 본 명세서에는 환자의 암을 치료하는 방법이 개시되어 있으며, 해당 방법은, 항-HER2 요법에 대해 내성이 있는 환자를 식별하는 단계; 및 치료적 유효량의 약물 전달 분자를 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 및 폴리펩타이드 서열에 결합된 설폰화 콜롤 분자를 포함한다. 또한, 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도시키는 방법이 개시되어 있으며, 해당 방법은 항-HER2 요법 내성 HER2+ 유방암 세포를 약물 전달 분자와 접촉시키는 단계를 포함하되, 약물 전달 분자는 소정 유형의 세포를 표적화하고/하거나 침투하도록 적응된 폴리펩타이드 분자; 및 폴리펩타이드 서열에 결합된 설폰화 콜롤 분자를 포함한다.

[0094] 콜롤은 포르피린과 구조적으로 유사하다. 몇몇 실시형태에 있어서, 콜롤은 설폰화 콜롤이다. 몇몇 실시형태에

있어서, 설폰화 콜롤은 양친매성이고/이거나 생리적 용액에 가용성이고/이거나 비공유 상호작용을 통해서 폴리펩타이드에 결합한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 비공유 상호작용은 정전기 상호작용이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드는 재조합 단백질이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 재조합 단백질은 재조합 융합 단백질이다. 음이온성 설포네이트기는 음하전된 세포막에 의한 반발로 인해 비특이적 세포 진입을 방지함으로써, 콜롤 전달을 캐리어 단백질을 통해서 표적 세포로 지향시킨다.

[0095] 몇몇 실시형태에 있어서, 콜롤은 금속성 화학 원소를 포함한다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 금속은 전이 금속이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 금속은 철(Fe), 망간(Mn) 또는 갈륨(Ga)이다. 다른 실시형태에 있어서, 콜롤은 비금속화되어 있다. 금속화된 콜롤과 비금속화된 콜롤은 무시 가능한 해리로 단백질 포켓에 결합된다. 하나의 예시적인 예로서, 도 33에 기재된 HerGa는, HerPBK10과 조립된 설폰화 갈륨(III) 콜롤(S2Ga)로 구성된다. HerGa는 시험관내 및 생체내에서 혈청 단백질로의 콜롤 전달을 저지한다. HerPBK10과의 콜롤 조립체는 25 내지 35개 콜롤/단백질을 생성하고, 결과적으로 고속 한외여과를 견디는 10 내지 20nm의 둥근 입자로 된다(도 33-B). 다른 예시적인 예로서, HerPBK10과 조립되는 HerMn인 설폰화 망간(III) 콜롤(S2Mn)은 약 20nm의 둥근 입자를 형성한다(도 33-C).

[0096] 일 실시형태에 있어서, HerGa는, 강력하게 형광성인 것에 부가해서, 심장을 포함하는 가장 통상적인 조직을 우회하여 전신 전달 후에 생체내에서 종양-우선적 표적화를 나타내고, 매우 낮은 약리학적 용량(0.008 mg/kg)에서 종양 성장 제거를 유발시킨다. 다른 실시형태에 있어서, HerMn은 생체내에서 유사한 종양 우선적 표적화 및 성장 제거를 나타내고, 자기 공명(MR)을 통해서 더욱 임상적으로 관련된 영상화를 가능하게 한다. 이들 실시형태의 둘 다에 있어서, HerGa 및 HerMn은 ROS-매개 세포골격 및 미토콘드리아 분열을 초래한다. HerGa 등(이것으로 제한되지 않음)과 같은 콜롤은 세포내 항상성 및 종양 유지에 중요한 미토콘드리아 TSP0 단백질을 표적화하고/하거나 이에 결합한다. 마찬가지로, 강력하게 형광성이기도 한 설폰화 비금속화 유리-염기 콜롤(S2FB)(도 33-C)은, SOD1와 직접 상호작용할 수 있고(도 34-B), 효소로부터의 금속 리간의 킬레이트화(도 4C)에 의해 SOD 활성(도 34-A)을 저해한다.

[0097] 일 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 HerPBK10-콜롤 입자는 pH에 반응하여 그의 형광 수명을 변경한다. 따라서 콜롤 입자는 그의 바로 근방에 미세 환경 조건을 진단 프로브 방출으로서 제공한다. 이 특징은 트래피킹 경로 또는 세포 아래 위치를 연구하는 등과 같은 세포 수준에서 유용하다. 이 특성은 또한 종양 성장의 부위를 확인하는 등과 같이 조직 수준에서 유용하다. 하나의 비제한적인 예로서, HerGa의 형광 수명은 생체의 및 생체내 둘 다에서 종양 또는 간 조직에 있는지에 따라서 다르며, 따라서 광학 영상화에 의해 종양과 비종양 조직 간의 구별을 가능하게 한다. 다른 비제한적인 예로서, HerMn은 HerMn 입자가 용액 중 물 분자와의 콜롤 상호작용을 방지하는 한편 종양 진입이 T1 완화 단축 및 콜롤-증대 조영을 개선시키기 때문에 종양 검출에 유용하며, 이는 조직 흡수 후 입자로부터 S2Mn 콜롤 방출을 연상시킨다. 제3의 비제한적인 예로서, HerGa는 IT 주사 후이지만 피하 주사 후 곧 비종양 조직으로부터 세정된 연장된 기간(30일까지를 포함함) 동안 종양에서 유지되고 검출 가능하다. HerPBK10에 의해 부분적으로 용이하게 될 수 있는 이 특징은, HerGd가 주사 후 신속하게 세정되기 때문에 HerGd(Gd = 가돌리늄)에 비해서 HerMn이 가질 수 있는 가능한 이점에 기여한다.

[0098] 다른 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 HerPBK10-콜롤 입자는 광감제로서 작용한다. S2Ga의 최대 형광 파장에서의 광여기는 HerGa를 흡수한 세포에 신속한 손상을 유발하는 일중항 산소를 발생한다. HerGa가 조사 없이 충분한 종양 독성을 이미 발휘한 한편, 424nm에서의 광여기는 HerGa의 IC50을 시험관내에서 백 내지 천배 실질적으로 저감시켰다. 2차 흡광도 피크(약 620nm)에서의 여기는 거의 효과적인 세포 사멸로서 생기며, 따라서 더 깊은 조직 내로의 침투를 지지하는 조사용의 더 긴 파장의 사용을 가능하게 한다.

[0099] 다른 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 콜롤 나노생물학적 약물은 약물-내성 암 세포에 대처한다. HER2 저해에 대한 내성을 용이하게 하는 HER3 상승은 이들 종양을 특히 종양-표적화된 콜롤 치료하기 쉽게 만든다. 따라서, T2와 같은 HER2 저해제는, HER3 상승을 유발함으로써 콜롤 나노요법에 종양을 감작시키는 보조제로서 작용한다.

[0100] 몇몇 실시형태에 있어서, 종양-표적화된 콜롤의 치료 효능은 다수의 세포내 표적에 대해서 HER3-매개 수용체 하향 조절, 입자 트래피킹, 및 콜롤-매개 독성의 조합으로 인해 저해제-내성 종양 세포에 대해 증대된다.

[0101] 일 실시형태에 있어서, 콜롤 입자에 의해 유발된 HER3 클러스터링, 엔도사이토시스 및 엔도솜분해는 HER3을 HER2 활성화로부터 격리시키고 신호전달 엔도솜을 둔화시킨다. 내성 세포에 대한 표적화를 용이하게 하는 상승된 HER3에 부가해서, HerPBK10 나노입자의 다원자가는 HER3 호모-올리고머화를 유도시키고 HER2(및 임의의 다른 티로신 키나제)로부터 멀리 격리시키고, 따라서 HER3 인산화 및 활성화를 방지한다. HER3 상승은 리간드-유도

HER3 호모-올리고머의 형성을 용이하게 하고, 이러한 현상은 내성 세포에 특별하다. 게다가, 세포질 내로의 진입을 가능하게 하는, 엔도솜 분해에 의해 수용체 격리된 소낭의 파괴는 엔도솜 신호전달을 없애는 한편, 독성의 세포내 표적에 Dox의 전달을 뒷받침하므로, 전체적인 세포독성에 기여한다. 이것은 HerPBK10 단독이 신호-자극 리간드로부터의 그의 유도에도 불구하고 시험관내 또는 생체내에서 종양 세포 증식을 유도하지 않는다는 본 발명자들의 관찰과 일치한다.

[0102] 다른 실시형태에 있어서, 콜롤은 세포질 진입 후 세포 단백질로의 신속한 전달에 의해 약물 유출을 회피한다. HerGa 형광은 소낭이 벗어난 후에 생세포 내 세포질을 통해서 확산되는 한편 HerPBK10은 핵 주변에서 축적된다. 게다가, HerMn 입자가 아니라 유리 S2Mn은 용액 중 유의한 T1 완화 단축을 나타내는 한편, HerMn은 조직 흡수 시 개선된 T1 단축을 나타낸다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 용어 "T1 완화"는, 회전-격자 완화를 지칭한다. 또한, 낮은 pH는 HerPBK10으로부터 S2Ga를 방출시키지 않는다. 이들 지점은 함께 콜롤이 pH-독립적 기전을 통해서 세포질 진입 후에 HerPBK10으로부터 방출되는 것을 예시한다. 또한, ROS 발생의 근접을 필요로 하는, 세포골격 및 미토콘드리아에 대한 산소 라디칼-유도 손상의 광범위한 효과는, 콜롤이 전반적인 방식으로 세포 소기관에 부착하여 이를 손상시키는 것을 예시한다. 따라서, 콜롤은 세포 흡수 후에 세포내 단백질로 신속하게 전달되어, 약물 유출물 운반체로부터 격리된 콜롤을 유지시키는 것을 돕는다.

[0103] 다른 실시형태에 있어서, 독성 및 영상화는 상보적 콜롤 활성을 조합함으로써 증가된다. S2FB-매개 SOD 저해, S2Ga 또는 S2Mn 매개 ROS 상승, 및 S2Ga-매개 TSPO 저해의 조합은, 상보적 활성들을 조합함으로써 독성을 증가시킨다. 이러한 접근법은 또한 형광 및 MRI 등과 같은 상이한 검출 양식을 조합한다.

[0104] 몇몇 실시형태에 있어서, 종양-귀소성 콜롤은 생체내 HER2 저해를 저지하는 HER2+ 종양을 표적화한다.

[0105] 이들 실시형태 중 하나에 있어서, 생체내에서 내성 종양에 대한 입자 분포는 HER3과 상관이 있다. HER2-저해제 내성 종양(예컨대, BT-474R 및 JIMT-1)은 상승된 HER3으로 인한 친계 종양(예컨대, BT-474)에 비해서 더 높은 비율의 입자-축적을 나타낸다. 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, 생체내 종양 표적화는 HER3에 의해 매개된다.

[0106] 다른 실시형태에 있어서, 콜롤 입자는 병용 요법에 비해서 HER2 저해제에 대한 획득 및 기존 내성을 가진 HER2+ 종양에 대해서 개선된 표적화된 독성을 산출해낸다. 다른 실시형태에 있어서, HER2 신호-블로킹 저해제는 최적화된 Her-표적화된 콜롤 나노입자 매개 요법을 위한 보조제로서 작용한다.

[0107] 몇몇 실시형태에 있어서, 종양-귀소성 콜롤은 파종성 암의 면역적격 세팅에서 HER3을 통해 TNBC 종양을 표적화한다.

[0108] 이들 실시형태 중 몇몇에 있어서, EGF-R 저해제는 HER3 상승을 유도하고 시험관내에서 콜롤 입자에 대해서 TNBC 세포를 감작시킨다. 일 실시형태에 있어서, HerPBK10은 마우스 4T1 세포 상의 HER3과 결합하고, HER3 수준은 인간 BT-549 세포에 대해서 훨씬 더 높으며, 이는 최적화된 Her-표적화된 콜롤 나노입자가 이들 TNBC 세포주에 대해서 표적화된 독성을 초래하는 것을 예시한다. 또한, TNBC15에 대한 EGF-R 저해에 대한 내성과 연관된 HER3의 상승은, 이러한 저해제가 이들 세포에 대한 독성 및 최적화된 Her-표적화된 콜롤 나노입자를 증가시키는 것을 예시한다.

[0109] 다른 실시형태에 있어서, 콜롤 입자는 전이성 및 면역적격 세팅 둘 다에서 TNBC 모델에 대해서 치료상 효과적이다. BALB/c-4T1 모델은 TNBC 및 파종성 암의 모델로서 통상적으로 이용된다. 마우스 유선 내로 이식된 경우, 4T1 세포는 폐 및 뇌로 전이되는 종양을 형성하고, 이는 제IV기 유방암 모델을 나타낸다. 이 동질유전자적 모델은 파종성 종양에 대한 표적화된 독성을 나타내고, 온전한 면역 환경의 존재에서 최적화된 Her-표적화된 콜롤 나노입자의 치료 효능을 평가한다.

[0110] 실시예

[0111] 이하의 실시예는 청구된 본 발명을 더 잘 설명하기 위해 제공되며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 구체적 물질이 언급되는 한, 이는 단지 예시적 목적을 위한 것이며, 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 당업자라면 본 발명의 능력의 행사 없이도 그리고 청구된 발명의 범위로부터 벗어나는 일 없이 동등한 수단 또는 반응물을 개발할 수 있다.

[0112] 실시예 1: HER2+ 유방암 세포에 대한 화학요법의 표적화된 전달

[0113] 개시된 수법은 시험관내 및 생체내에서 HER2+ 유방암 세포에 대해서 시험되었다. 도 2에 예시된 바와 같이, HER2+ 유방암을 표적화하기 위하여 약물 전달 분자를 공학적으로 조작하기 위하여, 단위 A는 문헌[L. K. Medina-Kauwe et al. Gene Therapy, 8:1753-1761 (2001)](그의 전문이 본 명세서에 참고로 편입됨)에 기재된

방법에 의해 생성된 HerPBK10이라 불리는 단백질을 포함한다. HerPBK10은 카복시 (C)-말단 데카라이신에 의해 변형된 아데노바이러스 펜톤 베이스 단백질을 침투하는 세포에 융합된 헤레굴린의 수용체 결합 도메인을 함유한다. HerPBK10의 'Her' 세그먼트는 구체적으로 HER2/HER3 또는 HER2/HER4 소단위 헤테로다имер에 결합하는 헤레굴린- α 의 수용체 결합 도메인으로부터 얻어진다. 헤레굴린은 HER2가 아니라 HER3 또는 HER4와 직접 상호작용하지만, 리간드 친화성은 HER2에 의해 크게 증대된다. 따라서, HER2(즉, HER2+ 종양 세포)를 과발현하는 종양 세포는 헤레굴린-지향된 표적화를 위하여 양호한 후보자인 것으로 여겨진다.

[0114] 아데노바이러스 혈청형 5(Ad5) 펜톤 베이스 단백질의 막 침투 활성은 표적 세포 내로의 침투를 용이하게 하기 위하여 HerPBK10의 'PB' 세그먼트 내로 편입된다. 'K10' 세그먼트는 10개의 라이신 잔기를 포함하고, 그의 양전하는 친전자성 상호작용에 의해 핵산 등과 같은 음하전 분자의 수송을 용이하게 한다.

[0115] 단위 B는 작은 이중-가닥 핵산을 형성하기 위하여 함께 어닐링된 2개의 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 단위 C는 화학요법제로 구성된다. 3개의 성분이 실온에서 인큐베이션에 의해 2단계에서 함께 조립된다. 단계 1에서, 단위 B DNA가 단위 C Dox와 인큐베이션되어 DNA-Dox 조립체(즉, 단위 B + 단위 C)를 형성한다. 이것은 DNA 염기쌍들 사이에 Dox 분자의 개재에 의해 형성된다. 단계 2에서, DNA-Dox 조립체는 HerPBK10과 인큐베이션되어 HerDox(즉, 단위 A + 단위 B + 단위 C)라 불리는 최종 복합체를 형성한다. 이 상호작용은 HerPBK10의 양하전 폴리라이신 꼬리에 음하전 DNA 포스페이트 골격의 친전자성 결합에 의해 형성된다.

[0116] 도 3은 이러한 특정 실시형태에서 개시된 전달 시스템의 동작의 개략도를 예시하고, 도 11-b는 Dox의 통상적인 투여에 비해서, 생체내에서 그의 성공적인 적용을 예시한다. 개시된 전달 시스템의 사용을 통해서, Dox의 전달은 암성 세포에 표적화되었고, 상대적으로 높은 양의 약물이 통상적으로 전달된 Dox에 비해서 암성 세포에 전달되고, 비교적 낮은 양의 약물이 표적이 아닌 건강한 조직에 도달하였다.

[0117] 실시예 2: HerDox는 조립 동안 고도로 안정적이다

[0118] HerDox는 3가지 성분, 즉, Dox; 작은 이중-가닥 핵산(직접 Dox를 운반하는 담당); 및 표적화된 단백질인 HerPBK10으로 구성되어 있다. HerDox는 2개의 단계로 조립된다. 먼저, Dox는 DNA와 혼합되어 DNA 개재에 의해 DNA-Dox 쌍을 형성한다. 이어서, DNA-Dox 쌍이 HerPBK10과 혼합되어 친전자성 상호작용에 의해 HerDox를 형성한다. DNA-Dox를 유리 Dox로부터 분리시키기 위하여, 이 혼합물에 한외여과 원심분리를 실시하였다. 본 발명자들은 DNA에 부가된 Dox의 95%를 넘는 양이 한외여과 회전 동안 DNA로부터 방출되지 않았던 것을 발견하였으며, 이것은 고속 회전 동안에도 약물의 높은 체류를 나타낸다(도 4(a)). 이 회전으로부터 보전물 및 여과액의 흡광도 스펙트럼은 보전물의 최대 흡광도가 비여과(unfiltered) Dox와 일치한 반면, 여과액에서는 이러한 흡광도가 검출 가능하지 않음을 확인해준다(도 4(b)). 이어서, 보전물은 HerPBK10과 인큐베이션되고, 얻어지는 HerDox 복합체가 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 크기 배제 분리에 의해 유리 성분으로부터 분리되었다. 여기서 본 발명자들은 Dox 흡광도가 용리 분획의 SDS-PAGE에 의해 확인되는 바와 같이(도 5), HerPBK10과 거의 공유리된 것(도 5)을 제시하고 있다.

[0119] 실시예 3: HerDox는 보관 동안 그리고 혈청 중에서 고도로 안정적이다

[0120] 본 발명자들은 상이한 보관 온도, 즉, 40°C, 실온 또는 37°C 하에서 12일에 걸쳐서 HerDox의 안정성을 시험하였다. 각 일자에, 샘플에 한외여과를 실시하고 나서, 여과액과 보전물을 측정하여 복합체로부터 어떠한 Dox가 방출되었는지의 여부의 판정하였다. 4°C에서, 100%의 생성물이 12일까지 온전하게 유지되었으며, 흥미롭게도, 실온 및 37°C는 HerDox 생성물로의 약물의 혼입을 증대시키는 것을 나타냈다(도 6-a 및 6-b). 전체적으로 보아, 이들 지점은 HerDox가 상이한 온도 하에서 연장된 보관 후에 안정적인 채로 유지되고 Dox를 방출하지 않는 것을 시사한다. 본 발명자들은 또한 혈청-함유 배지에서 37°C에서 HerDox 안정성을 조사하였다. HerDox는 비드가 펠릿화되고 상청액이 Dox 방출을 위하여 측정되기 전에 상이한 시간 기간 동안 (조직 배양 조건을 모방하기 위하여) 완전(즉, 10% 소태아 혈청-함유) 배지에서 37°C에서 인큐베이션된 (HerPBK10 히스티딘 태그를 통해서) 니켈 세파로스 상에 고정되었다. 접합체 중의 Dox 체류는 또한 각 시점에서 비드로부터 접합체를 용리시킴으로써 평가되었다. 본 발명자들은 혈청이 접합체로부터 Dox의 유의한 방출을 일으키지 않았으며, 이는 '(+) 혈청' 샘플에서 Dox 여과액 흡광도의 증가에 의해 검출되고(도 6-b, 상부 패널), Dox가 각 시점에서 접합체에 의해 완전히 유지된 것(도 6-b, 하부 패널)을 관찰하였다.

[0121] 실시예 4: HerDox가 표적화된 독성을 생성하는 한편 Dox 단독은 그러하지 않다

[0122] 본 발명자들은 개별의 디쉬에서 HER2+ 및 HER2- 유방암 세포에 대한 등가 용량(Dox 농도에 관하여 0.5 μ M)에서의 HerDox 또는 Dox 단독의 효과를 비교하였다. 3일에, HerDox가 HER2+ 세포수를 75% 넘게 저감시킨 반면

HER2- 세포 생존율은 영향받지 않았다(도 7). 등가 농도의 Dox 단독은 HER2+ 및 HER2- 세포 둘 다를 동일 차수 만큼 저감시켰다(도 7). 이들 지점은 미표적화된 약물이 표적이 아닌(즉, HER2-) 세포에 영향을 미치는 것을 나타냄으로써 표적화의 중요성을 강조한다. 중요하게는, HerDox 중 등가 농도의 단백질(0.1 μM)에서 단백질 담체인 HerPBK10 단독은 증식 유발의 결여를 포함하여 세포주에 하등의 효과를 지니지 않았다(도 7), 수용체 표적화를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 경쟁적 저해제로서 유리 헤레굴린 리간드(Her 또는 eHRG)를 사용하였다. 유리 리간드는 HerDox에 의한 세포 사멸을 완전히 저해하였고(도 8), 이것은 HerDox가 헤레굴린 수용체를 통해서 결합되어 세포에 진입하는 것을 나타낸다. 최종 시험관내 도전으로서, 본 발명자들은 HerDox가 HER2+ 및 HER2- 유방암 세포의 혼합 배양액 중에서 HER2+ 세포에 특이적으로 독성을 유발하는지의 여부를 시험하였다. 이것을 행하기 위하여, 본 발명자들은 혼합 배양액 중에서 세포 식별을 위하여 녹색 형광 단백질(GFP)로 태그된 HER2- 세포주를 생성하였다(도 9-a). 본 발명자들은 HerDox가 비-GFP(HER2+) 세포 증식을 거의 완전히 저감시킨 반면 GFP(HER2-) 세포 성장은 변화되지 않은 것을 발견하였다(도 9-b). 전체적으로 보아, 이들 지점은 HerDox가 HER2+ 세포에 대해서 독성을 우선적으로 표적화하는 능력을 가진 것을 나타낸다. 중요하게는, 이들 실험은 모두 완전(즉, 혈청-함유) 배지에서 수행되었으며, 따라서 HerDox가 혈청 단백질의 존재에도 불구하고 세포를 표적화하는 것을 나타낸다. 게다가, HER2+ 및 HER2- 세포의 혼합 배양액 중 HER2+ 세포의 우선적 세포 사멸은, 표적 세포의 사멸 및 용해 후, 이들 세포 내로 방출된 Dox가 HER2- 세포에 독성을 계속 유발할 수 없다는 것을 의미한다. 세포 배양액 중 HerDox의 안정성을 더욱 확인하기 위하여, HerDox는 표시된 시점에서 개별의 실험에서 배양 배지로부터 회수하여 아가로스 겔 상에서 전기영동시키고, 이어서 UV로 조사하여 Dox를 검출하고, 쿠마씨 블루로 염색하여 HerPBK10 단백질을 검출하였다(도 9-c). 겔이 유리 Dox를 유지하지 않으므로 시간 경과에 따른 Dox 형광의 손실은 접합체가 Dox를 방출한 것을 나타낸다. 혈청-함유 배지에서, HerDox로부터의 이러한 손실은 검출 가능하지 않다. 혈청-없는 조건 하에서, Dox 형광이 1시간에 감소된 것으로 나타났지만, 쿠마씨 블루 염색은 감소된 형광이 겔 레인 내로 장입된 더 적은 샘플에 기인하는 것을 나타낸다. HerPBK10 밴드의 공동 이동은 접합체가 세포 배지에 온전하게 유지된 것을 더욱 입증하였다. 초기에 설명된 혈청-안정성 검정과 함께, 이들 지점은 접합체가 세포 배양액(적어도 10%의 혈청을 통상적으로 함유함) 중에서 연장된 인큐베이션 동안 온전하게 유지되는 것을 나타낸다.

[0123] 실시예 5:GFP -Her는 생체내 표적화 지수를 제공한다

[0124] 생체내에서 리간드의 표적화 능력의 감지를 얻고 생체내 표적화 지수를 확립하기 위하여, 본 발명자들은 녹색 형광 단백질(GFP)-태그된 리간드(GFP-Her)를 사용하였다. 중요하게는, 이 리간드는 HerPBK10의 'Her' 도메인과 동일하다. 이들은 6 내지 8주령의 암컷 누드 마우스에서 MDA-MB-435 세포의 양쪽 옆구리 주사를 통해서 HER2+ 종양을 확립하였다. 종양이 250 내지 300mm³(종양 세포 이식 후 -3 내지 4주)에 도달하면, 3 nmol의 GFP-Her을 꼬리 정맥을 통해서 주사하였다. 모의 주사된 마우스는 식염수 단독을 공급받았다. 표시된 조직은 주사 후 3.5 시간에 수거하고, 제노젠 IVIS 3-차원 스몰-애니멀 생체내 영상화 시스템(제노젠사, 캘리포니아주의 알라메다시에 소재)을 이용해서 GFP를 영상화하였다. GFP 형광의 우선적 축적은 다른 조직에 비해서 종양에서 검출되었다(도 10). 낮은 내지 무시할만한 수준의 형광은 간 및 근육에서 검출되는 한편, GFP 형광은 심장을 포함하는 다른 조직에서는 검출될 수 없었다(도 10). 모의-처리된 동물로부터의 조직은 형광을 보이지 않았다.

[0125] 실시예 6:HerDox는 HER2+ 유방암 세포를 생체내에서 표적화한다

[0126] Dox는 HerDox의 전신 전달 후 생물학적 분배를 검출하는데 이용되는, 적절한 파장 여기 시 적색 형광을 발광한다. 4주령의 종양(대략 700 내지 800 mm³)을 보유하는 마우스에게는 Dox 또는 HerDox(Dox 콘에 대해서 0.008 mg/mL)의 단일 꼬리 정맥 주사를 공급하였고, 살아있는 마우스의 이미지는 실시간으로 캡처하거나 또는 주사 후 3시간에 수확한 그의 장기/조직은 맞춤화 마이크로조명 및 검출 시스템을 이용해서 획득하였다. 형광은 HerDox 주사 후 10분에 신체를 통해서 명백하였고, 이어서 20분만에 종양에 신속하게 축적되어 주사 후 100분까지 종양에서 검출 가능한 채로 유지되었다(도 11(a)). HerDox 주사 후 대략 3시간에 수확한 조직 및 종양은 종양 내에 강력한 형광을 나타낸 한편 실질적으로 낮은 수준의 형광이 간에서 검출 가능하였다(도 11(b)). 일부 형광은 신장에서 가까스로 검출 가능한 반면 심장, 비장, 폐 및 골격근을 포함하는 다른 조직은 어떠한 형광도 나타내지 않았다. 이와 대조적으로, 등가량의 Dox가 주입된 마우스로부터 수확한 조직은 간, 종양 및 신장에서 검출 가능한 형광을 나타내었다. 낮은 수준의 형광이 또한 폐 및 골격근에서 검출 가능하지 않았다.

[0127] 생체내 종양 독성을 평가하기 위하여, 3 내지 4주 양측 옆구리 종양을 보유하는 마우스에게 Dox 또는 HerDox(Dox 콘에 대해서 0.004 mg/kg), HerPBK10 단독(HerDox에 대한 등가의 단백질 농도에서) 또는 식염수를 7일 연속일 동안 매일 꼬리 정맥 주사를 공급하였다. 종양은, 꼬리 정맥 주사 전 2주에 시작하여, 종양 성장 전체를 통하여 측정되었고, Dox가 종양 성장을 지연시키는 동안, HerDox는 종양 성장을 본질적으로 방지한 한편

HerPBK10 단독 및 식염수는 효과를 지니지 않았던 것을 나타낸다(도 12(a)). 처리된 마우스 또는 대조군 마우스에서는 시간 경과에 따라서 감지 가능한 중량 손실이 관찰되지 않았다(도 12(b)).

[0128] 주사 후 25일에, 종양 및 장기가 수확되었고 조직화학을 위하여 가공처리하였다. Dox가 급성 및 장기간 심장독성을 유발할 수 있는 것이 확립되었고, 따라서, 본 발명자들은 HerDox 또는 Dox로 처리된 마우스의 심장을 조사하였다. Dox 처리된 마우스로부터의 심장은 HerDox 및 식염수-처리된 마우스로부터의 심장에 대해서 다소 확대되고 팽창된 것으로 나타났으며(도시 생략), 이것은 Dox 독성과 연관된 팽창된 심근증을 연상시킨다. 식염수-처리된 마우스로부터의 심근증은 정상 심장의 형태학을 보였던 반면, Dox-처리된 마우스로부터의 것들은 초점 변성, 근원섬유 손실, 증가된 세포질 공포형성 및 핵 응축 또는 분해, 전형적인 Dox-유도 심장독성을 나타낸다. 반면, HerDox-처리된 마우스로부터의 심근은, 식염수-처리된 마우스와 유사한 형태를 보였다(도 12-c). 이들 지견과 일치하여, 처리된 마우스에서 심장 기능을 평가하기 위하여 얻어진 초음파심장진단도는 HerDox-처리된 마우스에서는 검출 가능하지 않은 Dox-유도 기능장애의 징후를 보이고; Dox는 뇌졸중 용적, 심장 출력, 그리고 좌심실 내부 치수 및 용적의 보통의 내지 현저한 저감을 유도하는 한편, HerDox는 이들 측정에 효과를 지니지 않았으며 모의(식염수)-처리된 마우스와 유사하게 보였다(도 12-d).

[0129] 생체내 안정성을 측정하는 실험 가능성을 평가하기 위하여, 본 발명자들은 마우스로부터 신선하게 회수한 전혈 중 등가 농도에서 HerDox(0.12 mg/mL 최종 Dox 콘에서) 또는 유리 Dox를 인큐베이팅하고 이 혼합물을 1시간까지 37°C에서 인큐베이팅하였다. 항응고제로서, 0.5mM EDTA가 혈액 회수 시 존재하였고, 병행 샘플을 EDTA 단독에서 37°C에서 인큐베이팅하였다. 투입 HerDox(혈중 인큐베이션 전)를 나타내는 샘플은 HEPES-완충 식염수 중에서 37°C에서 인큐베이팅하였다. 모든 샘플은 이어서 1 OK MW 컷오프 필터를 통해서 원심분리하고, Dox 형광을 보전물 및 여과액 중에서 측정하였다(분자칼라 디바이시스사(Molecular Devices)로부터의 스펙트라맥스 M2(SpectraMax M2)). 이 결과는, 특히 HBS 또는 EDTA, 또는 유리 Dox에서 인큐베이팅된 HerDox와 비교해서, HerDox의 여과액 형광의 검출 가능한 증가의 부족에 의해 입증되는 바와 같이, 접합체로부터의 Dox의 검출 가능한 손실이 없는 것을 나타낸다(도 13). 마찬가지로, 식염수 또는 EDTA 단독에서 인큐베이팅된 것과 비교해서 혈중에서 인큐베이팅된 샘플로부터의 HerDox 보전물로부터의 Dox의 감지 가능한 손실이 없다(도 13). 생물학적 이미지 결과를 종합하면, 이들 지견은 HerDox가 혈중에서 온전한 채로 남아 있고 생체내 안정성을 유지하는 한편 종양 표적을 향해서 이동되는 것을 나타낸다.

[0130] 실시예 7: HerDox 기전: 세포질에서의 Dox 방출 및 핵 내 축적

[0131] HerPBK10 단독은 세포 사멸을 유발하지 않고(도 7), 따라서 이것은 HerDox에 의해 세포 사멸을 용이하게 하는 세포 내로 Dox의 전달이다. HerDox -매개 종양 세포 사멸의 기전을 이해하기 위하여, 본 발명자들은 세포내 위치를 검출하기 위하여 Dox 형광을 이용해서 HerDox에 의한 처리 후에 현미경으로 HER2+ 세포를 조사하였다. 투여 후 초기에(흡수 0분에), HerDox는 세포 주변에서 거의 보이며, 이는 접합체가 세포 표면에서 세포 표면에서 결합하지만 아직 내재화되지 않은 나타낸다(도 14a). 이와 대조적으로, 유리 Dox는 핵 주변에서 세포 내부에서 이미 발견된다(도 14a). 60분에, 헤레굴린-표적화된 단백질의 대부분이 진입된 세포를 가질 경우, Dox는 유리 Dox와 유사한 핵에 축적된다(도 14a). 이들 역학은, 초기 표적화 결과에 부가해서, 수용체-매개 HerDox 진입 기전을 뒷받침한다. HerPBK10에 의해 전달된 경우 Dox의 핵내 패턴도 유리 Dox와는 상이하다. 미표적화된 Dox가 세포 핵에 축적되는 한편, HerDox가 일부 세포질 형광이 여전히 가시적인 상태에서 핵(nucleolar) 구조에 우선적으로 축적된다(도 14b).

[0132] Dox가 흡수 동안 HerPBK10에 부착된 채로 있는지의 여부를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 HerPBK10에 대한 면역-형광을 사용하였다. 15분의 흡수에서, HerPBK10은 Dox와 거의 동일 위치에 있으며, 이것은 Dox의 일부 핵 축적이 이미 가시적이지만(도 15), HerDox의 실질적인 모집단이 여전히 온전하다는 것을 시사한다. 30분 및 60분에, 증가된 수준의 Dox는 핵 내 축적되는 한편 대부분의 HerPBK10은 세포질 내에 잔류한다(도 15). 고정된 세포에서, 핵인 축적은 생세포에서와 같이 검출 가능하지 않았다(도 14(b)). 전체적으로 보아, 이들 지견은 HerPBK10이 세포 내로 Dox를 전달하고 Dox를 세포내 방출하고 이때 핵 축적이 일어나는 것을 나타내며, 이것은 절단 기전과 일치한다(도 11-b).

[0133] 실시예 8: 인간 혈청은 세포 결합에 대한 현저한 효과를 지니지 않는다

[0134] HerPBK10이 혈청 내에 존재할 수 있는 순환 리간드와 경쟁하는지의 여부를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 HER2+ 환자로부터 얻어진 인간 혈청에서 HER2+ 유방암 세포에 대한 HerPBK10 결합을 시험하였다. 세다스-신나이사의 여성 암 연구소는 가끔 제한된 양의 환자 혈청을 획득하며, 이중 HER2+ 환자로부터의 혈청은 훨씬 작은 소수집단을 포함한다. 현저하게는, 본 명세서에서 이용된 인간 혈청은 HER2+ 및 연령-일치된 HER2- 환자의 수집된

전혈로부터 분리된 혈청 및 관련된 단백질의 실질적인 부분이다. 초기의 실험은 HerDox가 10% 소 혈청을 함유하는 완전 배지에서 세포 표적에 결합하고, 이 결합이 과잉의 유리 리간드에 의해 경쟁적으로 억제되는 것을 입증하고 있다. 여기서, 본 발명자들은 특히 HER2+ 환자로부터의 인간 혈청이 세포 결합을 저해하는지의 여부를 평가하기 위하여 통상의 배양 배지 내 소 혈청을 획득한 환자 샘플로부터 얻어진 인간 혈청으로 교체하였다. 본 발명자들은 세포가 처리 전의 인간 혈청에 상당히 노출된 것(2시간, 이것은 임의의 순환 리간드의 수용체 결합을 위한 충분한 시간을 제공함)을 확보하였다. HER2+ 환자, HER2- 환자로부터의 혈청, 또는 소 혈청 내 세포 결합의 대접전 비교(head-to-head comparison)는 유의차를 보이지 않으며(도 16), 이것은 여기서 시험된 인간 혈청이 표적 세포에 대한 HerPBK10 결합을 간섭하지 않았던 것을 나타낸다. 100x 헤레굴린 리간드(+Her)에 의한 경쟁적 저해는 대조군 결합 활성이 헤레굴린 수용체에 대해서 특이적인 것을 확인해준다.

[0135] 실시예 9:제한된 세포 유형에 대한 HER 소단위 수준 및 cy 독성

[0136] 앞서 기재된 수준과 같이, 본 명세서에 기재된 각종 세포주 및 유형에 대한 HER 소단위의 본 발명자들에 의해 측정된 세포 표면 수준은, 이용된 입수 가능한 세포에서의 실제 수준을 반영할 수 없다. 본 발명자들은 ATCC 및 NIH/NCI로부터의 표시된 세포주를 획득하고 HER 소단위 수준에 관하여 이들을 프로파일링하였다(도 17(a)). HerDox가 HER2 수준에 따라서 독성을 유발하는지의 여부를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 비교적 높은 수준(SKBR3), 적절한 수준(MDA-MB-435, MDA-MB-453, HeLa) 및 낮은 내지 검출 불가능한(MDA-MB-231) 수준에서 HER2를 나타내는 세포주를 선택하고, 세포독성 용량 곡선을 수행하였다. 본 발명자들은 HerDox CD50이 이들 선택된 세포주에 대한 세포 표면 HER2 수준과 역상관 관계에 있으며: 비교적 높은 HER2를 나타내는 세포주는 HerDox에 대해서 비교적 더 높은 감수성을 보이는 한편, 낮은 HER2를 나타내는 세포주는 낮은 감수성을 발휘하고 중간 HER2 수준을 나타내는 세포주는 마찬가지로 중간 감수성을 발휘하는 것을 관찰하였다(도 17(b); CD50은 로그 척도 상에 표시됨).

[0137] 실시예 10

표 1

세포주에 대한 세포독성

세포주	HER2*	EC50** (uM HerDox)
MDA-MB-231	0.06 ± 0.006	7.2e5 ± 0.11
MDA-MB-435	0.52 ± 0.08	0.74 ± 0.07
T47D	1.03 ± 0.26	0.64 ± 0.04
SKOV3	1.79 ± 0.19	0.18 ± 0.03

* ELISA에 의해 결정된 상대적 세포 표면 수준(평균 ± 1 SD). N = 3개의 웰.

** HerDox 용량 곡선의 비선형 회귀 분석에 의해 결정된, 세포 생존의 50% 저감을 얻는 농도(평균 ± 1SD). N = 3개의 처리된 웰/용량.

[0138]

[0139] 실시예 11:HerPBK10의 최적화

[0140] HerPBK10 단백질이 아데노바이러스 펜톤 베이스 단백질로부터 유래되므로, 그의 천연 결합 표적은 알파-v 인테그린이고, 본 발명자들은 Arg-Gly-Asp (RGD) 인테그린 결합 모티프의 돌연변이가 세포 내로 카고를 전달하도록 단백질의 용량을 개선하는지의 여부를 평가하였다. 이전의 연구는 펜톤 베이스에 대한 헤레굴린 수용체 결합 리간드의 부속물이 헤레굴린 수용체에 대해서 거의 배타적으로 이를 재지향시키는 것을 나타내는 한편(경쟁적 저해 검정에 의해 입증됨), HerPBK10이 상이한 세포내 경로로 단백질을 재지향시키거나 단백질 자체 상의 결합 부위와 경쟁할 수 있는 인테그린 수용체를 여전히 끌어들이 수 있는 것이 가능해진다. 점 돌연변이에 의해 RGD 모티프를 EGD에 부여하는 것은 인테그린 결합을 가능하지 않게 한다. 따라서 돌연변이 단백질인 HerPBrgdK10은 이 돌연변이를 보유하는 것이 생성되고, 친계 HerPBK10과 비교하여 유전자 전달을 시험하였다. 등가의 단백질 농도에서, HerPBrgdK10은 유전자 전달의 보통(대략 1.8배) 내지 극적(대략 18배) 증대를 발휘하였으며(도 18), 이것은 증대된 수용체 결합 또는 결합후 활성을 반영할 수 있다.

- [0141] 실시예 12: DNA 작제물
- [0142] 본 발명자들은 pJM1 7 아데노바이러스 게놈 주형으로부터 야생형 및 라이신-태그된 펜톤 서열 둘 다를 증폭시키기 위하여 서열 5'-ATCGAAGGATCCATGCGGCGCGGCGATGTAT-3'(서열번호 12)을 포함하는 통상의 5' 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하였다. 3' 프라이머의 서열은 PB: 5'-GCATCAGAATTCTCAAAAAGTGGGCTCGATAG-3'(서열번호 1) 및 PBK10 5'-CATGAATTCA(TTT)₁₀AAAAGTGGGCTCGATAGGA-3'(서열번호 2)이다. BamHI 제한 부위는 5' 프라이머 내에 도입되었고, EcoRI 제한 부위는 야생형 및 라이신-태그된 펜톤 둘 다의 pRSET-A 박테리아 발현 플라스미드(인비트로젠사(Invitrogen), 미국 캘리포니아주의 칼스배드시에 소재) 내로의 프레임내 삽입을 위하여 3' 프라이머에 도입되었다. 이 플라스미드는 니켈 킬레이트 친화성 크로마토그래피에 의한 친화성 정제를 위하여 N-말단 히스티딘-태그된 융합으로서 제조할 단백질을 발현한다.
- [0143] 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭은 PBK10의 아미노(N)-말단에 짧은 폴리글리신 링커를 암호화하는 서열을 부가하는데 이용되었다. 이 링커를 암호화하는 서열은 추가의 클로닝을 위하여 50cII 제한 부위를 포함한다. 헤레굴린 표적화 리간드는 PBK10을 이용한 프레임내 클로닝을 위하여 BamHI 부위를 포함하는 5' 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 SacI 부위를 포함하는 3' 프라이머를 이용해서 헤레굴린 유전자29의 상피 성장 인자(EGF)-유사 도메인의 PCR 증폭에 의해 생산되었다. 표적화 리간드는 단지 N-말단의 PCR 산물을 PBK10에 결합함으로써 HerPBK10을 생산하기 위하여 라이신-태그된 작제물에 부가되었다. Her 및 GFP-Her의 작제는 앞서 기술되어 있었다(Medina-Kauwe L.K., et al, BioTechniques 2000, 29: 602-609). HerK10은 5' Her 프라이머(Medina-Kauwe L.K., et al, BioTechniques 2000, 29: 602-609) 및 서열 5'-ATGAATTCA(TTT)₁₀AGATCTACTTCCACCACTTCCACC-3'(서열번호 3)을 포함하는 3' 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용한 Her 작제물의 PCR 증폭에 의해 생성되었다.
- [0144] 실시예 13: DS-올리고 길이는 표적화된 복합체 내로의 Dox 혼입에 영향을 미치지 않는다
- [0145] DS-올리고 듀플렉스는 상보적인 30 bp 서열, LLAA-5(서열번호 6) 및 LLAA-3(서열번호 7) 또는 48 bp 서열, BglIIHis-5(서열번호 8) 및 BglIIHis-3(서열번호 9)으로부터 형성되었다. Dox는 10mM Tris/HCl 완충액(pH 8.0) 중에서 실온에서 30분 동안 1:10, 1:20, 또는 1:40 몰비의 듀플렉스:Dox(20, 40 또는 80 μM의 최종 Dox 농도에 서)에서 각 세트의 어닐링된 듀플렉스에 부가되었다. 이어서 이 혼합물을 한외여과막(마이크로콘 울트라셀(Microcon Ultracel) YM10; 밀리포어사(Millipore))을 통해서 10,000 x g에서 원심분리하여 혼입된 Dox로부터 유리 Dox를 분리시켰다. 보전물과 여과액을 개별적으로 수집하고, 각각의 흡광도를 스펙트라맥스 M2 플레이트 리더(몰레큘러 디바이시스사)를 사용해서 480nm에서 측정하였다. 그 결과(도 19)는 30 또는 48 bp 듀플렉스를 이용해서 Dox 혼입의 인식 가능한 차이가 없는 것을 나타낸다.
- [0146] 실시예 14: HerDox는 신경교종 세포에 대해서 독성이다
- [0147] U251 인간 신경교종 세포는 비침투화 면역조직화학에 의해서 HER 소단위 수준을 평가하여 상대적으로 현저한 수준의 세포 표면 HER2, HER3 및 HER4를 나타내는 것을 판명되었다(도 20(a)).
- [0148] 디쉬에서 성장 중인 U251 세포는 HerDox 또는 Dox(0.5 μM 또는 1 μM)와 배양액 배지 중에서 37℃, 5% CO₂에서 4 시간 동안 인큐베이션하고, 그 후 신선한 완전 배지를 첨가하여 최종 배양액 용적을 대략 4배로 증가시키고, 세포를 37℃, 5% CO₂에서 4일 동안 유지하였다. 세포를 트립신화하고 마지막 날에 계수하였다.
- [0149] 본 발명자들의 결과는, HerDox가 증가 농도의 Dox보다 U251 세포에 대해서 8 내지 10배 많은 독성을 나타내고, 마찬가지로 10배 적은 HerDox는 Dox와 같은 독성을 나타내는 것을 제시하고 있다(도 20(b)).
- [0150] 실시예 15: 생체내 HER2+ 종양에 대한 표적화 및 치료 효능을 위하여 변형된 캡시드 단백질, ds-올리고, 및 DNA 삽입제(intercalator)를 포함하는 최적화된 복합체를 시험.
- [0151] 내성 종양 세포는 상승된 HER3 및 HerDox에 대한 증가된 감수성을 나타낸다. 트라스트주맵에 대한 획득 내성을 가진 HER2+ 유방암세포주는, 친계 세포주(BT474 및 SKBR3)에 비해서 HER3의 상승된 세포 표면 수준을 나타내고(도 21-A), 이것은 HER3 상승이 내약성과 연관된 것을 나타내는 다른 곳에서의 연구와 일치한다. HerDox 처리는 배양액 중 BT474 및 SKBR3 친계 및 트라스트주맵-내성 세포주에 대한 트라스트주맵 및 트라스트주맵+퍼투주맵 병용 요법과 비교되었다. 각 치료제는 치료 효능을 유도하기 위하여 이전에 확립된 농도 범위에서 투여되었다. 트라스트주맵(Tz)은 친계 BT474 세포 생존율을 50%만큼 저감시켰고, 퍼투주맵(Pz)의 첨가는 세포 사멸을 유의하게 증가시키지 못하였다(도 21B). 두 요법 모두 BT474 내성 세포에 대해서 효과적이지 못했다. HerDox는 BT474 친계 세포에 대해서 Tz 및 Tz+Pz에 비해서 더 높은 세포 사멸을 나타내었고, BT474 내성 세포를 완전히 사멸시

켰다. SKBR3에 대한 지견은 유사하였는데, 즉, 친계 및 내성 세포 둘 다 Tz 단독 또는 병용 요법(Tz+Pz)에 대해서 약간 반응을 보였다(도 21B). 이와 대조적으로, HerDox는 친계 SKBR3에 대해서 50% 세포 사멸을, 그리고 SKBR3 내성 세포에 대해서 80% 미만의 세포 사멸을 유도하였다.

[0152] HerDox의 효능은 또한 기존의 내성을 가진 세포주에 대해서 조사되었다. JIMT-1 세포주는 트라스트주맙 치료에 결코 반응하지 않았던 종양으로부터 유래되었다. 이들 세포는 넓은 농도 범위에 걸쳐서 Tz 및 Tz+Pz에 대해서 반응하지 않은 채 유지되었다(도 21-C). 이와 대조적으로, HerDox는 용량-의존적 세포 사멸을 초래하였고 세포의 90%까지를 사멸시켰다(도 21-C). 또한, JIMT-1 종양을 보유하는 마우스에 대한 HerDox의 전신 전달은 Tz 및 Dox 단독과 대조적으로 종양 성장을 제거하였다(도 22).

[0153] 트라스트주맙 전처리하는 HER2+ 세포를 HerDox에 대해 감작시킨다. 이전의 연구는 HER3가 라파티닙 또는 유전자 침묵에 의해, HER2 저해 후 바로 4시간에 전사적으로 그리고 해석학적으로 상승되는 것을 나타내었다. 친계 세포에 비해서 Tz-내성 세포에 대한 HerDox의 증대된 효능은 트라스트주맙이 내성 세포에 대한 HerDox의 귀소성을 증가시키기 위하여 HER3 상승을 유도하는 HerDox용의 보조제로서 작용할 수 있는 것을 시사한다. 이것을 시험하기 위하여, 친계 및 내성 세포주는 HerDox 처리 전 4 내지 24시간 동안 트라스트주맙으로 전처리하였다. HerDox는 친계 SKBR3 세포 상의 트라스트주맙에 비해서 개선된 세포 사멸을 이미 나타낸 반면, 전처리는 시험된 최고 투약량에서 더욱 독성을 40 내지 50% 증가시켰다(도 23A). 친계 BT474 세포에 대한 HerDox 독성은 트라스트주맙에 비해서 적당히 개선되었지만, 트라스트주맙을 이용한 4시간 전처리는 HerDox 독성을 50% 이상 증대시켰고, 24시간 전처리는 독성의 거의 75% 증대를 가능하게 하였다(도 23B). HerDox에 대해서 이미 감수성인 HER2-3-발현 MDA-MB-435 세포도, 트라스트주맙을 용한 24시간 전처리 시 독성의 적절한 증대를 보였다(도 23C). 다른 한편, Tz-내성 세포주는, HerDox에 대한 강력한 감수성을 이미 나타내었으며, 따라서 전처리는 대부분은 불필요하였다(도 23D 내지 F). 특히 Tz-내성 BT474 세포는 시험된 모든 HerDox 농도에서 완전한 세포 사멸을 겪었다(도 23E). 따라서, HerDox 농도는 트라스트주맙 전처리가 어떠한 효과를 갖는지의 여부를 평가하기 위하여 저감시켰다. 5배 낮은 HerDox 농도는 세포 생존율에 대한 강력한 효과를 여전히 갖고, 트라스트주맙 전처리는 세포독성을 더욱 향상시켰다(도 23F). 전체적으로 보아, 이들 지견은 트라스트주맙이 HerDox 치료를 위하여 유용한 보조제로서 작용할 수 있는 것을 시사한다.

[0154] 실시예 16: HerPBK10은 HER3에 대해서 특이적이다.

[0155] 도 26은 HerPBK10이 인간 HER3의 세포외 도메인을 포함하는 고정화된 펩타이드에 결합되어 시험관내 유리 HER3 펩타이드를 가진 HerPBK10의 사전 흡착에 의해 억제되기 때문에 HerPBK10가 HER3에 대해서 특이적인 것을 예시한다(도 26-A). 동일한 사전 흡수는 또한 배양액 중 HER2+ 세포에 대한 HerPBK10 결합을 억제하였다(도 26-B). 중요하게는, HER3과 HER2의 이량체화는 HerPBK10 결합을 위하여 요구되지 않는데, 그 이유는 헤테로다이머-블로킹 항체인 퍼투주맙(Pz)이 HER2+ 세포 상에 그의 수용체에 대한 HerPBK10 결합을 방지하기 때문이다(도 26-B). 결합은 HER4 펩타이드 또는 베타셀룰린(HER4를 블로킹함)에 의해 또한 억제되지 않았다(도 26-B).

[0156] 실시예 17: 수용체 결합은 환자 혈청에 의해 저해되지 않는다.

[0157] 5개의 HER2+ 환자 및 연령-일치 대조군으로부터의 혈청은 배양액 중 HER2+ 세포에 대한 HerPBK10 결합을 방지하지 않았고 서로 간에 유의차를 보이지 않았다. 따라서, 수용체 결합은 환자 혈청에 의해 억제된다. 면역적격 마우스에서 치료제 및 10배 높은 수준에서 HerPBK10의 반복 투약은 단백질에 대한 항체를 형성 가능한 중화 항체 형성을 얻지 못하였다.

[0158] 실시예 18: 내성 종양 세포는 HerDox에 대해서 증가된 감수성 및 상승된 HER3을 나타낸다.

[0159] 도 27(A)는 (증가하는 농도의 HER2 저해제를 가진 장기 배양액의 표준 요법을 이용해서) 트라스트주맙에 대한 획득 내성을 가진 HER2+ 유방암세포주가 친계 세포주에 비해서 HER3의 상승된 세포 표면 수준을 나타내는 것을 예시한다(BT474 및 SKBR3). 이 결과는 HER3 상승이 내약성과 연관된다는 당업계에 공지된 지식과 일치한다.

[0160] HerDox의 암 세포에 대한 효과는 (i) 트라스트주맙, 및 (ii) 트라스트주맙(Tz)과 퍼투주맙(Pz)의 병용 요법과 비교되었다. 실험은 배양액 중 BT474 및 SKBR3 친계 및 트라스트주맙-내성 세포주에 대해서 수행되었다. 각 치료제는 치료 효능을 유발하기 위하여 당업계에 공지되거나 미리 확립된 농도 범위에서 투여되었다. Tz는 친계 BT474 세포 생존율을 50%만큼 저감시키고; Pz의 첨가가 세포 사멸을 유의하게 증가시키지 않았다(도 27-B). 두 요법은 BT474 내성 세포에 대해서 효과적이지 않았다. 다른 한편, HerDox는 BT474 친계 세포에 대한 Tz 및 Tz+Pz의 더 높은 세포 사멸을 보였고, BT474 내성 세포를 효과적으로 제거하였다.

[0161] 유사한 결과가 또한 SKBR3 세포주에 대해서 얻어졌다. 친계 및 내성 세포 둘 다는 Tz 단독 또는 병용 요법

(Tz+Pz)에서 약간의 반응을 보였다(도 27-B). 이와 대조적으로, HerDox는 50%의 친계 SKBR3 세포 사멸, 그리고 SKBR3 내성 세포 상에서의 80% 미만의 세포 사멸을 유발하였다. 따라서, 이들 결과는 내성 종양 세포가 HerDox에 대한 증가된 감수성을 나타내는 것을 제시한다.

[0162] 표적화된 독성에 대한 HER3의 기여는 HER3 블로킹된 세포독성의 리간드-결합 도메인을 포함하는 펩타이드와 함께 HerDox를 사전 흡착할지의 여부를 평가하기 위하여 평가되었다. HerDox가 친계 및 내성 세포주에 대해서 유의한 세포 사멸을 유발하는 한편, 이것은 HER3 펩타이드에 의해 저해되었고(도 27-C), 이것은 세포 사멸이 Dox 페이로드의 리간드-지향 전달을 통해서 일어나는 것을 나타낸다. 도 27 (E)는 기존의 내성을 가진 세포주에 대한 HerDox의 효능을 나타낸다. JIMT-1 세포주는 트라스트주맙 처리에 결코 반응하지 않았던 HER2+ 종양으로부터 유래되었다. 이들 세포는 Tz 및 Tz+Pz에 반응하지 않은 채로 있고, 넓은 농도 범위에 비해서 Dox에 대해서 단지 부분적으로 반응성이다. 이와 대조적으로, HerDox는 용량-의존적 세포 사멸을 나타내고, 90%까지의 세포를 제거하였다(도 27-E). 마지막으로, JIMT-1 종양을 보유하는 마우스에 대한 HerDox의 전신 전달은 HerDox와 동일한 약물 용량(0.004 mg Dox/kg/주사)에서 Tz 및 Dox 단독과는 대조적으로 종양 성장을 제거하였다. 사실상, 종양 성장에 대한 Tz 또는 Dox 단독의 영향은 모의 식염수 처리에 비해서 단지 약간일 뿐이다(도 28). 따라서, 이들 결과는 HerDox가 내성 종양 세포에 대한 유의한 세포 사멸을 유발하는 것을 나타낸다.

[0163] 실시예 19: 트라스트주맙은 HER2+ 세포를 HerDox에 대해서 감작시킨다.

[0164] 도 29(A)는 Tz 전처리가 친계 세포 내에서 HER3을 상승시키고(도 29-A), 이들 세포에 대한 HerPBK10 결합을 증가시키고(도 29-B), 이들 세포에 대한 HerDox 독성을 증대시키는 것(도 29-C, 29-D)을 나타낸다. 친계 및 내성 세포주는 HerDox 처리 전 4 또는 24시간 전에 Tz로 전처리하였다. HerDox는 친계 SKBR3 세포에 대한 Tz에 비해서 개선된 세포 사멸을 이미 나타낸 반면, 전처리는 더욱 시험된 최고 용량에서 독성을 40 내지 50% 증가시켰다(도 29-C). 친계 세포에 비해서 Tz-내성 세포에 대한 HerDox의 증대된 효능은 트라스트주맙이 HerDox에 대한 보조제로서 작용하여, 내성 세포에 대한 HerDox의 귀소성을 증가시키도록 HER3 상승을 유도하는 것을 나타낸다.

[0165] 친계 BT474 세포에 대한 HerDox 독성은 Tz에 비해서 적절하게 개선되었지만, 트라스트주맙에 의한 4시간 전처리는 HerDox 독성을 50% 이상 증대시켰으며, 24시간 전처리는 독성의 거의 75% 증대를 가능하게 하였다(도 29-D). 이미 HerDox에 감수성이 있는 HER2-3-발현 MDA-MB-435 세포도, Tz에 의한 24시간 전처리 시 독성의 적절한 증대를 나타내었다(도 29-E). 다른 한편, Tz-내성 세포주는 이미 HerDox에 대해서 강력한 감수성을 나타내었고 따라서 전처리는 대부분 불필요하였다(도 29-F, 29-G). Tz-내성 BT474 세포는 특히 시험된 모든 HerDox 농도에서 완전한 세포 사멸을 겪었다(도 29-G). 따라서, HerDox 농도는 트라스트주맙 전처리가 임의의 효과를 지녔는지의 여부를 평가하기 위하여 저감되었다. 5배 더 낮은 HerDox 농도는 세포 생존율에 대한 강력한 효과를 여전히 지녔고, Tz 전처리는 세포독성을 더욱 증대시켰다(도 29-H). 대체로, 이들 지견은 Tz가 HerDox 처리를 위한 유용한 보조제로서 작용하는 것을 입증한다. 마찬가지로, 퍼투주맙, 라파티닙, T-DM1은 또한 HerDox 처리를 위한 보조제로서 작용한다.

[0166] 실시예 20. HerPBK10 흡수는 트라스트주맙에 비해서 더욱 신속하고 효과적이다.

[0167] 형광-표지된 HerPBK10은 표지된 Tz에 비해서 그의 바이오-분포 및 세포 흡수를 평가하기 위하여 준비되었다. 각 시약의 등가 용량이 HER2+ 종양 보유 마우스의 꼬리 정맥에 주사되었다. 조직은 영상화를 위하여 주사 후 4시간에 수거되었다. 두 시약은 모두 표지된 비표적화된 단백질인 BSA와 비교되었다. HerPBK10 및 Tz는 심장, 비장 및 근육에의 전달이 거의 없고, 등가 수준의 종양 축적(둘 다 BSA보다 더 높음)을 보였다(도 30-A). 그러나, 다른 비종양 조직, 예컨대, 간, 폐 및 신장으로의 전달은 HerPBK10보다 Tz에 대해서 더 높았다. Tz와 대조적으로, HerPBK10은 폐 전달을 보이지 않았다(도 30-A).

[0168] HER2+ MDA-MB-435 세포의 흡수가 또한 평가되었다. 이들 세포 내 세포 표면 수용체 수준은 도 30-B의 그래프에 표시되어 있다. HerPBK10은 세포 표면 클러스터링에 이어서 세포 흡수 후 45분 이내에 유의한 엔도사이토시스를 나타내었다(도 30-B). 이와 대조적으로, 이들 세포에 대한 HER3과 비교해서 상승된 HER2 수준에도 불구하고, Tz는 세포 결합 후 2시간까지 세포 상의 영역을 성기게 반점 상태로 남아 있는 세포 표면 상의 성긴 결합을 나타내었다(도 30-B).

[0169] 이들 결과는 HerPBK10 흡수가 Tz에 비해서 더욱 신속하고 효과적인 것을 나타낸다.

[0170] 실시예 21: HerPBK10은 HER2에 비해서 상승된 HER3을 발현하는 환자 종양 조직에 대해서 트라스트주맙보다 더 높은 결합을 나타낸다.

[0171] 본 출원에 기재된 나노입자가 인간 조직 상의 HER3을 인식할 수 있는지의 여부를 결정하기 위하여, 유방 종양

조직이 HER2+ 환자의 수술 시편으로부터 얻어졌다. 조직은 HerPBK10이 HER3을 통해서 이 조직에 결합하는지의 여부를 결정하기 위하여 조사되었다. 도 31은 HerPBK10 및 Tz가 둘 다 이 종양 샘플로부터 분해된 세포에 농도-의존적 결합을 나타내고, HerPBK10가 Tz보다 큰 결합을 나타내는 것(도 31-B)을 도시한다. 이 결합 곡선은 종양 세포 표면 상에서 측정된 상승된 HER3 및 매우 낮은 HER2와 상관이 있었다(도 31-A).

[0172] 실시예 22: HerPBK10은 마우스 HER3을 인식한다.

[0173] BALB/c 마우스 유방 종양으로부터 얻어진 마우스 4T1 세포는 삼중-음성이고, BALB/c 마우스에서 동질유전자적 TNBC 모델로서 사용되었다. HER3은 유의한 수준에서 4T1의 세포 표면 상에서 발현되고(도 32-B), HerPBK10에 의해 인식되며(도 32-C), 인간 HER3 펩타이드에 의해 경쟁적으로 저해된다(도 32-C). 마우스 HER3에 대한 HerPBK10의 수용체-특이적 결합은 마우스 및 인간 HER3 간의 높은 수준의 아미노산 서열 동질성을 반영한다: 전체 단백질에 대해서 91% 동질성 그리고 헤레굴린-결합 영역에서 94%(세포외 도메인 I 및 II)(도 32-A). 이들 지견은 BALB/c-4T1 모델이 면역적 세팅에서의 표적화를 시험하는데 이용될 수 있다. 또한, HerPBK10에 의한 마우스 HER3의 인식은 이중이식 모델에서의 본 발명자들의 기존의 지견의 임상적 관련을 높인다: HerDox는 마우스에서의 내인성 HER3을 인식할 경우에도 우선적인 종양-표적화된 독성을 나타낸다. 중요하게는, 또한 TNBC로부터 유도된 인간 BT-549 세포는, 세포 표면 상의 상승된 HER3을 나타내고(도 32-B), 표적에 대한 추가의 TNBC 세포주를 제공한다.

[0174] 실시예 23: 펜톤 베이스 도메인은 사이토졸 내로의 침투를 필요로 한다.

[0175] PB 도메인을 결합하는 HerPBK10의 결실 돌연변이는, 세포의 세포질 내로의 S2Ga의 전달을 실패하였다. 이것은 HerPBK10의 펜톤 베이스 도메인이 수용체-매개 흡수 후에 엔도솜 막 침투를 필요로 하는 것을 입증한다.

[0176] 실시예 24: 세포내 트래피킹 돌연변이는 지향된 진화에 의해 발생된다.

[0177] 지향된 진화 및 파지 표시 바이오패닝은 잠재적으로 증가된 세포내 트래피킹 활성을 가진 펜톤 베이스 도메인의 단백질 변이체를 분리시키는데 적용되었다. 이 수법은 재조합 펜톤 베이스 유전자의 무작위 돌연변이 생성, T7 박테리오파지 상의 얻어지는 돌연변이 라이브러리의 발현 및 배양액 중 HeLa 세포(펜톤 베이스를 흡수함) 상의 파지 라이브러리의 선별을 동반한다. "선택적 압력"은 증가된 사이토졸 및/또는 핵 분할을 나타내는 돌연변이체를 분리시키는 것으로 구성된 선별에 적용되었으며, 이것은 단백질이 세포 내로의 완전한 침투, 및 소망의 세포 이하 구획으로의 트래피킹을 용이하게 한 것을 나타낸다(도 35-A). 수개의 절두된 및 전장 변이체는 HerPBK10으로 클로닝된 점돌연변이로 분리되어 펜톤 베이스 도메인을 대체하였다(도 35-B). 이들 2가지 전장 돌연변이체(111C 및 333F)는 친체 단백질(wt HerPBK10)에 비해서 사이토졸, 세포골격, 및 핵 구획으로의 증대된 분할을 나타내는 한편(도 35-C), 절두된 변이체(즉, TM)는 엔도솜을 벗어나지 않을 수 있었다(도 35-D).

[0178] 실시예 25: S2Ga는 TSP0와 상호작용한다.

[0179] 콜룰 독성의 기전을 프로빙하는 연구는 HerGa가 미토콘드리아 막 침투성뿐만 아니라 세포골격에 대한 수퍼옥사이드-매개 손상을 일으켜 세포자멸적 사멸을 초래하는 것을 밝혔다. 도 36-A 및 도 36-B는 S2Ga가 미토콘드리아 외부막 단백질인 TSP0과 직접 결합하는 것을 나타낸다(도 36A 및 B). TSP0는 가공처리를 위하여 포르피린 및 기타 대사산물을 미토콘드리아 내로 전좌시킬 뿐만 아니라, 미토콘드리아 침투성전이 가공 복합체의 성분과 상호작용하고, 세포 항상성을 위하여 중요한데, 그 이유는 TSP0의 Nick-out이 마우스에서 미발달 치사로 되기 때문이다. S2Ga는 구체적으로 S2Ga 결합이 PK11195에 의해 경쟁적으로 저해되어 TSP0에 대한 포르피린 결합을 저해하기 때문에 TSP0 상의 포르피린-결합 부위를 인식한다(도 36A 및 B). MDA-MB-435 세포 내 재조합 가용성 TSP0의 과발현은 미토콘드리아 막 전위의 HerGa-매개 파괴를 방지하며(도 36C 및 D), 이것은 HerGa가 동소에서 TSP0와 상호작용하는 것을 입증한다.

[0180] 실시예 26: HerMn은 표적화된 독성 및 MR 검출을 가능하게 한다.

[0181] HerGa의 형광 속성이 조영제로서 콜룰의 사용을 확립시킨 반면, 광학 영상화의 임상적 적용 가능성은 여기 과장 및 재발광 파장의 제한된 침투 깊이에 의해 제한된다. 따라서, HerPBK10과 병용될 경우, HerGa와 같이 세포독성이지만 자기공명 영상화(MRI) 등과 같은 임상적으로 관련된 양상을 이용해서 검출을 가능하게 하기 위하여 충분한 대조 특성을 보유하는 대안적인 금속화 콜룰이 사용되었다. HerMn은 배양액 중 HER2- 종양 세포가 아니라 HER2+에 대한 표적화된 독성을 나타내는 한편 S2Mn은 세포 생존율에 대한 효과를 지니지 않는다(도 37). HerMn은 미토콘드리아 막 전위(도 38-A) 및 세포골격을 수퍼옥사이드 상승을 통해서 붕괴시킨다(도 38-B). HerMn은 심장을 포함하는 가장 통상적인 조직을 우회하는 전신 전달 후에 종양으로 생체내로 귀소하고(도 39), 유리 S2Mn, HerPBK10 단독 또는 식염수 처리와 대조적으로 매우 낮은 약리학적 용량(0.008 mg/kg)에서 종양 성장을

제거한다(도 40-A). 용액 중, HerMn 입자는 유리 S2Mn에 비해서 제한된 T1(회전-격자) 완화 단축을 나타내며(도 41-A), 이는 단백질 입자의 캡슐화가 물 분자에 대한 접근을 방지하는 것을 시사한다. 그러나, HerMn의 생체내 전달은 유리 S2Mn 및 Gd와의 비교를 포함하여, 종양의 현저한 T1 완화 저감 및 MRI 대비 강화를 나타내며(도 40-B), 이는 조직 흡수 후 입자로부터 콜로이드 방출되는 것을 시사한다. 종양 조직 내 콜로이드의 연장된 체류는 HerMn이 Gd의 신속한 청소소에 비해서 보다 긴 지속적인 조영제로서 역할할 수 있는 것을 나타낸다.

[0182] 실시예 27: HerGa 및 HerMn은 인간 심장공-유래 세포(cardiosphere-derived cell: CDC)에 대해서 비독성이다.

[0183] 전환성(translatibility)을 평가하기 위하여, HerGa 및/또는 HerMn의 존재 하의 인간 심장공-유래 세포(CDC)의 생존능이 조사되었다. HerGa, HerMn 및 개별적인 성분(HerPBK10 단독, S2Ga 단독 및 S2Mn 단독)의 상승 농도는 공지된 심장독성을 가진 Dox와 대조적으로 CDC 생존능에 대한 검출 가능한 효과를 지니지 않는다(도 40-B).

[0184] 실시예 28: 내성 종양 세포는 상승된 HER3 및 HerPBK10에 대한 증가된 결합을 나타낸다.

[0185] Tz에 대해서 획득 내성을 가진 HER2+ 유방암세포주(HER2 저해제의 농도 증가에 따른 장기 배양액의 표준 요법을 사용)는 친계 세포주(BT474 및 SKBR3)에 비해서 HER3의 상승된 세포 표면 수준을 나타내며(도 42-A, 43-A), 이것은 HER3 상승이 내약성과 연관된다는 당업계의 지식과 일치한다. Tz 처리에 결코 반응하지 않았던 HER2+ 종양으로부터 유래된 JIMT-1 유방암 세포주는, 또한 HER2에 비해서 상승된 HER3을 나타내었다(도 42-B). HER3은, Lp 또는 유전자 침묵에 의해, HER2 저해 후 바로 4시간에 전사적으로 그리고 해독적으로 상승되었다. 친계 세포주는 24시간 동안 Tz에 노출되고 나서, 미처리 친계 세포와 비교하여 세포 표면 HER3 수준을 측정하였다. Tz-처리가 상승된 HER3 수준을 나타낼 뿐만 아니라 이들 세포에 대한 HerPBK10 결합은 비례적으로 증가되었다(도 42-C, 42-D). 본 명세서에 기재된 나노입자가 인간 조직에 대한 HER3을 인식 가능한지의 여부를 평가하는 수단으로서, 유방 종양 조직은 HER2+ 환자의 수술 시편으로부터 얻어졌고, HerPBK10이 HER3을 통해서 이 조직에 결합할 수 있는지의 여부를 조사하였다. HerPBK10 및 Tz 둘 다가 이 종양 샘플로부터 분해된 세포에 대해서 농도-의존적 결합을 나타내었고, HerPBK10이 Tz보다 큰 결합을 나타낸 것으로 판명되었다(도 42-F). 이 결합 곡선은 종양 세포 표면에서 측정된 상승된 HER3 및 매우 낮은 HER2와 상관이 있었다(도 42-E).

[0186] 실시예 29: HerGa는 시험관내 및 생체내 Tz-내성 종양 세포에 대한 증대된 독성을 나타낸다.

[0187] Tz 및 병용 요법(Tz+Pz)에 대한 HerGa의 효과는 BT474 친계 및 Tz-내성 세포주에 대해서 비교되었다. 각 치료제는 치료 효능을 나타내기 위하여 당업계에 공지된 농도 범위에서 투여되었다. Tz는 친계 BT474 세포 생존율을 50%만큼 저감시켰고(도 42-B), Pz의 첨가는 세포 사멸을 유의하게 증가시키지 못하였다(도 43-C). HerGa는 친계 세포에 대해서 유사한 결과를 나타내었다(도 43-B, 43-C). Tz 및 Tz+Pz는 BT474 내성 세포에 대해서 효과적이지 않았다(도 43-B, 43-C). 이와 대조적으로, HerGa는 BT474 내성 세포를 완전히 제거하였다(도 43-B). Tz+Lp 내성 BT474 세포에 대한 지견은, Tz가 효능을 나타내지 않은 한편 HerGa가 거의 완전한 세포 사멸을 나타낸 점에서 유사하였다.

[0188] BT474 Tz-내성 종양을 보유한 마우스에 대한 HerGa(0.008 mg/kg/주입)의 전신 전달은 S2Ga 및 HerPBK10 단독과 대조적으로 종양 성장을 제거하였다(도 43-D). 이들 마우스가 내성을 지속시키기 위하여 Tz의 투약 유지를 제공하지 않으므로, 감수성 to Tz에 대한 감수성은 생체내에서 복귀되지만, 이들 종양은 궁극적으로 Tz 처리에 대해서 내성으로 되고, Tz의 치료적 용량에도 불구하고 크기의 성장을 개시하였다(도 43-E). 이들 마우스에게 HerGa의 정맥내 전달은 이들 종양의 크기를 저감시켰다(도 43-E).

[0189] 본 발명은 소정의 실시형태 및 실시예의 맥락에서 개시되었지만, 당업자라면 본 발명의 실시형태가 구체적으로 개시된 실시형태를 넘어서 다른 대안적인 실시형태 그리고/또는 그의 용도와 변형 및 등가물까지 확대된다는 것을 이해할 것이다.

[0190] 많은 변화 및 대안적인 요소들이 본 발명의 실시형태에서 개시되어 있다. 추가의 변화 및 대안적인 요소들이 당업자에게 명백할 것이다. 이들 변화는 제한 없이 본 발명의 조성물과, 이에 의해 진단, 예측 또는 치료될 수 있는 질환 및 기타 임상적 병태를 위한 구성 모듈의 선택이다. 본 발명의 각종 실시형태는 이들 변화 또는 요소의 어느 것인가를 구체적으로 포함하거나 배제할 수 있다.

[0191] 몇몇 실시형태에 있어서, 본 발명의 소정의 실시형태를 기술하고 청구하는데 이용되는 성분의 양, 농도 반응 조건 등과 같은 특성 등을 표현하는 수치는 몇몇 경우에 "약"이라는 용어에 의해 수식되는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 몇몇 실시형태에 있어서, 기재된 설명 및 첨부된 청구범위에 기술된 수치 파라미터는 특정 실시형태에 의해 얻어지도록 추구되는 바람직한 특성에 따라서 달라질 수 있는 근사치이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 수치 파라미터는 보고된 유효 숫자의 수를 감안하여 그리고 통상의 사사오입 수법을 적용함으로써 해석되어야 한다.

본 발명의 몇몇 실시형태의 넓은 범위를 기술하는 수치 범위 및 파라미터가 근사치임에도 불구하고, 특정 실시예에 기재된 수치는 가능한 한 실시 가능하게 정확하게 보고되어 있다. 본 발명의 몇몇 실시형태에서 제시된 수치들은 이들 각각의 시험 측정치에서 발견되는 표준 편차로부터 필연적으로 기인되는 소정의 오차를 포함할 수 있다.

[0192] 몇몇 실시형태에서, 단수 표현 용어 및, 본 출원의 특정 실시형태를 기술하는 맥락에서(특히, 첨부된 청구범위의 특정 맥락에서) 사용된 유사한 언급은 단수 및 복수 둘 다를 포괄하는 것으로 해석될 수 있다. 본 명세서에서 값들의 범위에 대한 설명은 단지, 상기 범위 내의 각각의 개별 값을 개별적으로 언급하는 약식으로서 기능하는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 달리 언급되지 않는 한, 각각의 개별 값은 마치 본 명세서에서 개별적으로 인용된 것처럼 본 명세서에 포함된다. 본 명세서에서 달리 지시되거나 또는 문맥상 명백하게 부인되지 않는 한, 본 명세서에 개시된 모든 방법은 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본 명세서의 특정 실시형태에서 제공된 임의의 모든 예 또는 예시적인 언어(예를 들면, "~와 같은")의 사용은 단지 본 발명을 더욱 잘 조명하기 위한 의도이며, 달리 청구된 본 발명의 범위에 제한을 부가하는 것은 아니다. 본 명세서의 언어는, 본 발명의 실시예 필수적인 임의의 비청구 요소를 가리키는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0193] 본 명세서에 개시된 본 발명의 대안적인 요소들 또는 실시형태들의 그룹화는 제한으로서 해석되어서는 안 된다. 각 그룹의 구성원은 개별적으로 또는 그 그룹의 다른 구성원 또는 본 명세서에서 발견되는 다른 요소와 임의의 조합으로 지칭되고 청구될 수 있다. 하나의 그룹의 하나 이상의 구성원은, 편의상 및/또는 특허 가능성의 이유로 하나의 그룹 내에 포함되거나 이로부터 삭제될 수 있다. 임의의 이러한 포함 또는 삭제가 일어날 경우, 명세서는 변형된 바와 같은 그 그룹을 포함하도록 본 명세서에서 간주되므로, 첨부된 청구범위에 이용된 모든 마쿠시 군의 기재된 설명에 들어가게 된다.

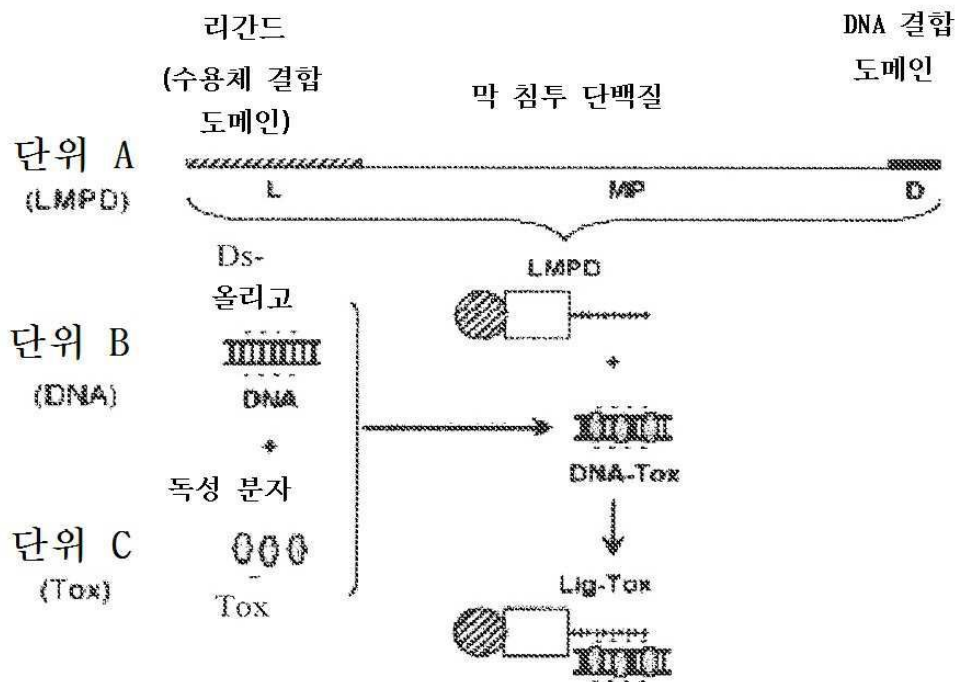
[0194] 본 발명의 바람직한 실시형태가 본 발명을 수행하기 위하여 본 발명자들에게 알려진 최상의 모드를 비롯하여 본 명세서에 기술된다. 이들 바람직한 실시형태에 대한 변형은 이상의 설명을 읽게 되면 당업자에게 명백해질 것이다. 당업자라면 적절한 경우 이러한 변형을 이용할 수 있고 본 발명은 본 명세서에 구체적으로 기재된 것 이외에 달리 실행될 수도 있는 것이 상정된다. 따라서, 본 발명의 많은 실시형태는 적용 가능한 법률이 허용되는 바와 같이 본 명세서에 첨부된 청구범위에 기술된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 게다가, 모든 가능한 변형 내에서의 상기 기술된 요소들의 임의의 조합은 달리 본 명세서에 나타내거나 달리 문맥에 의해 명백히 모순되지 않는 한 본 발명에 의해 망라된다.

[0195] 또한, 수 많은 참조가 본 명세서를 통해서 특허 및 간행물에 대해서 이루어져 있다. 위에서 인용된 문헌 및 간행물의 각각은 그들의 전문이 참고로 본 명세서에 개별적으로 편입된다.

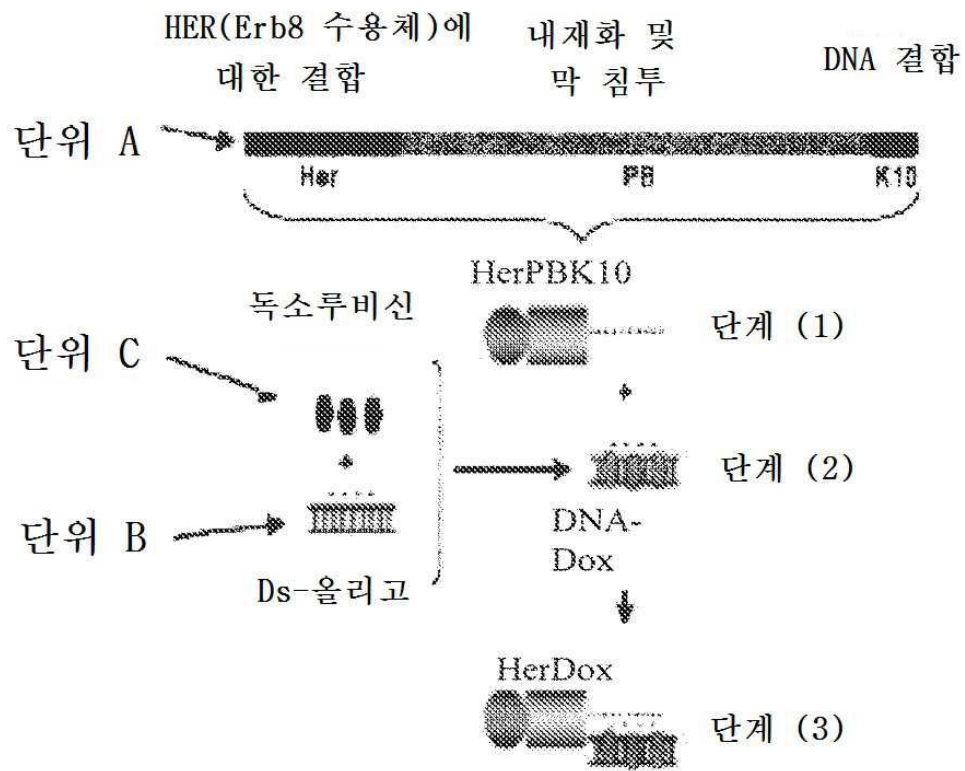
[0196] 마지막으로, 본 명세서에 개시된 본 발명의 실시형태는 본 발명의 원리를 예시하는 것으로 이해되어야 한다. 이용될 수 있는 기타 변형은 본 발명의 범위 내에 들어갈 수 있다. 따라서, 예로서, 제한 없이, 본 발명의 대안적인 구성이 본 명세서의 교시에 따라서 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 실시형태들은 정확하게 도시되고 기술된 것으로 제한되는 것은 아니다.

도면

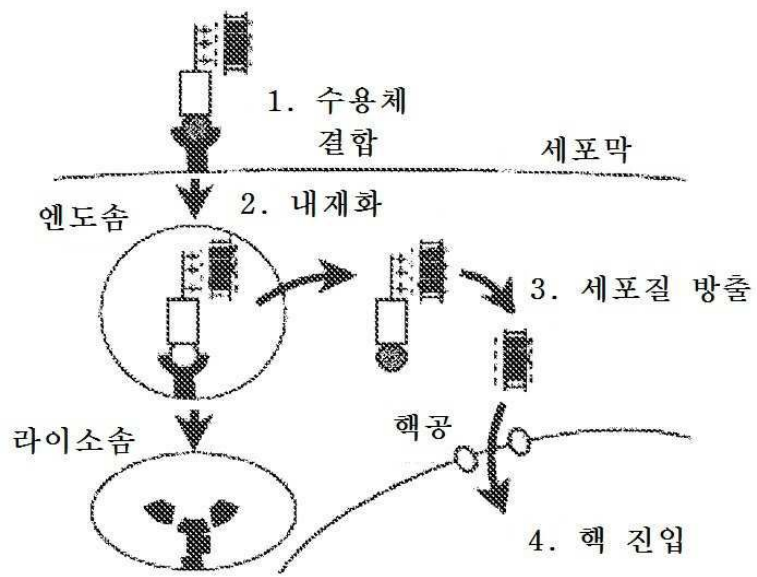
도면1



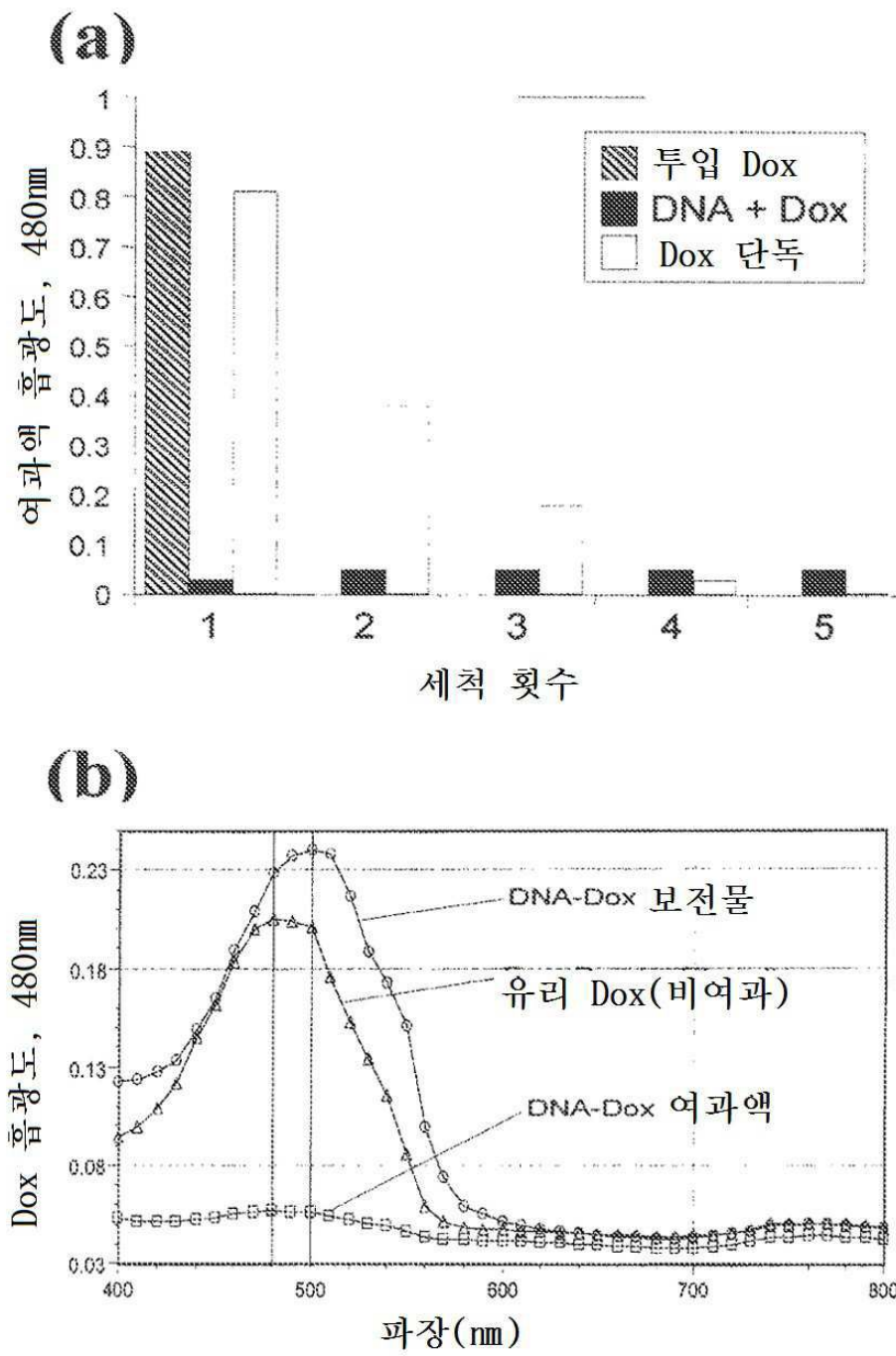
도면2



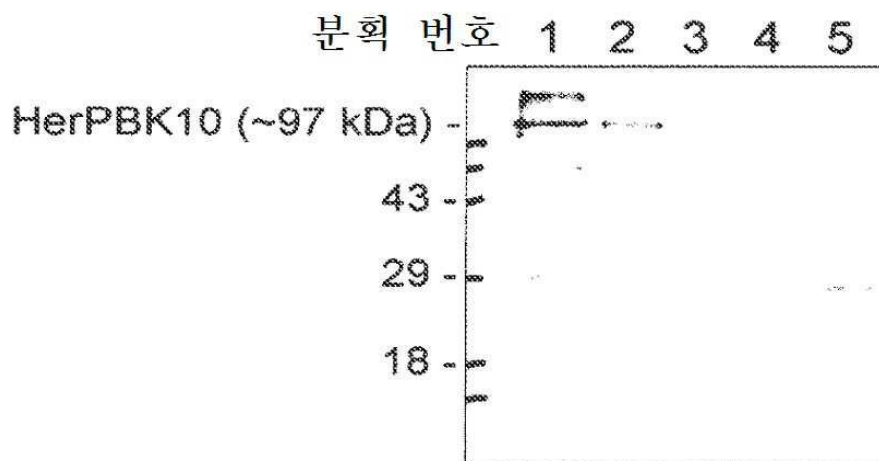
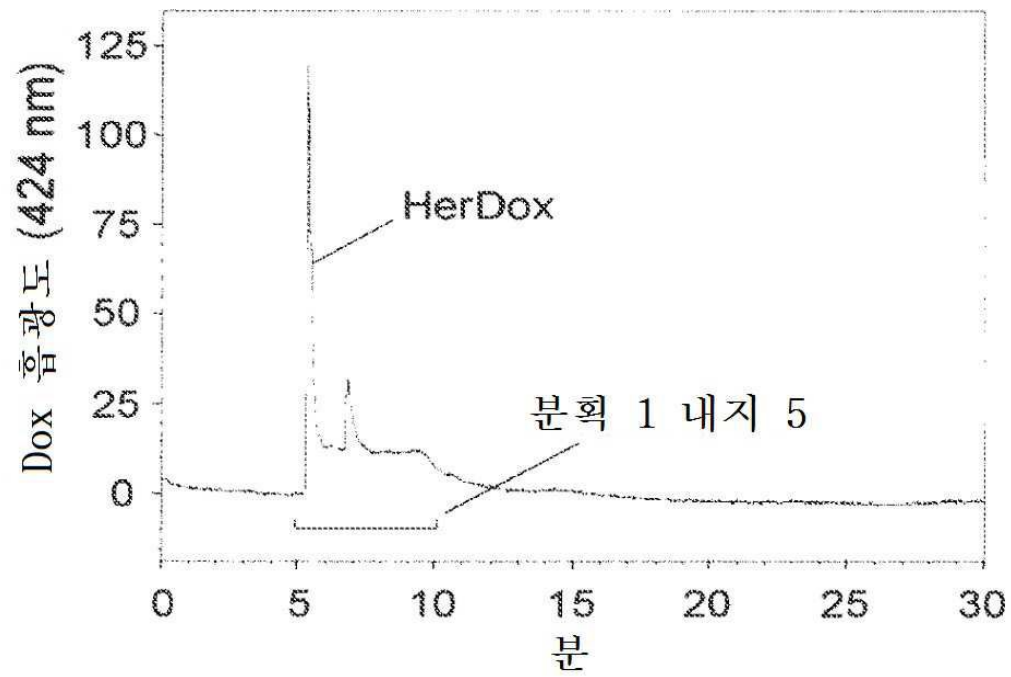
도면3



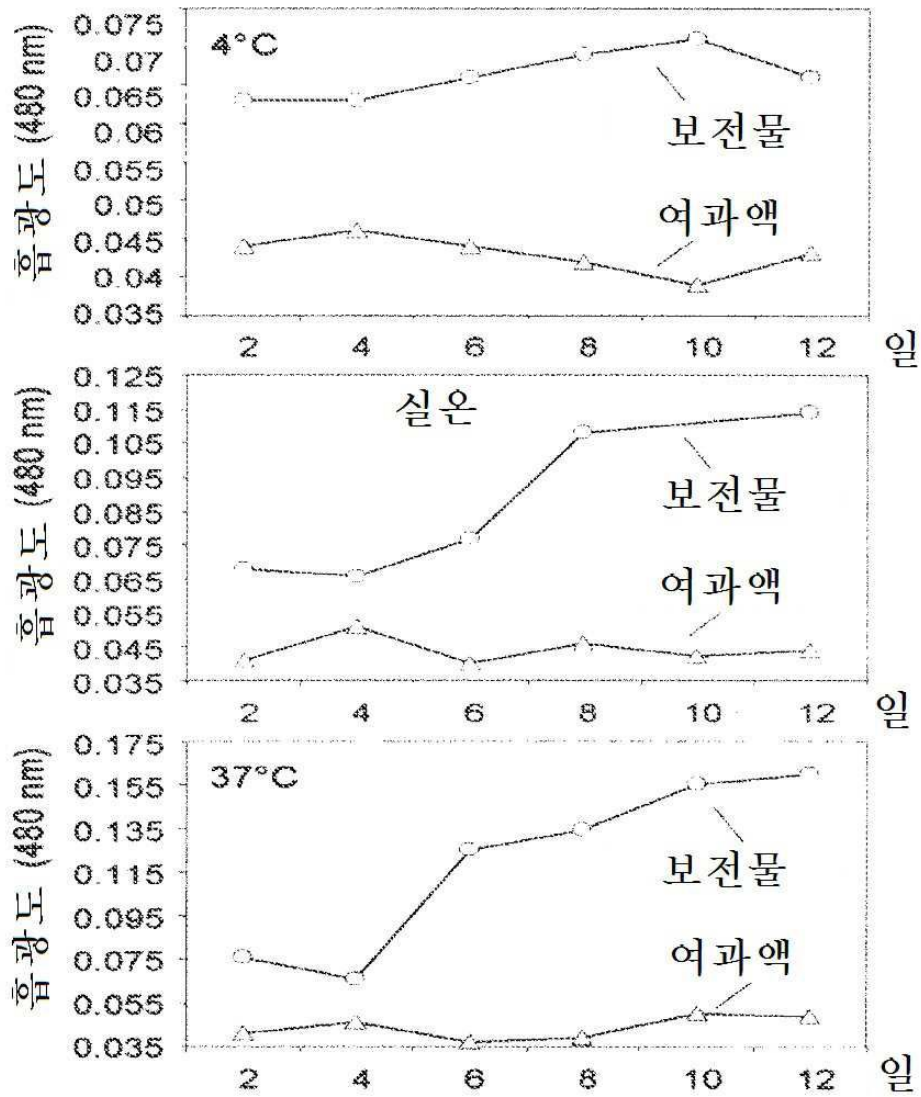
도면4



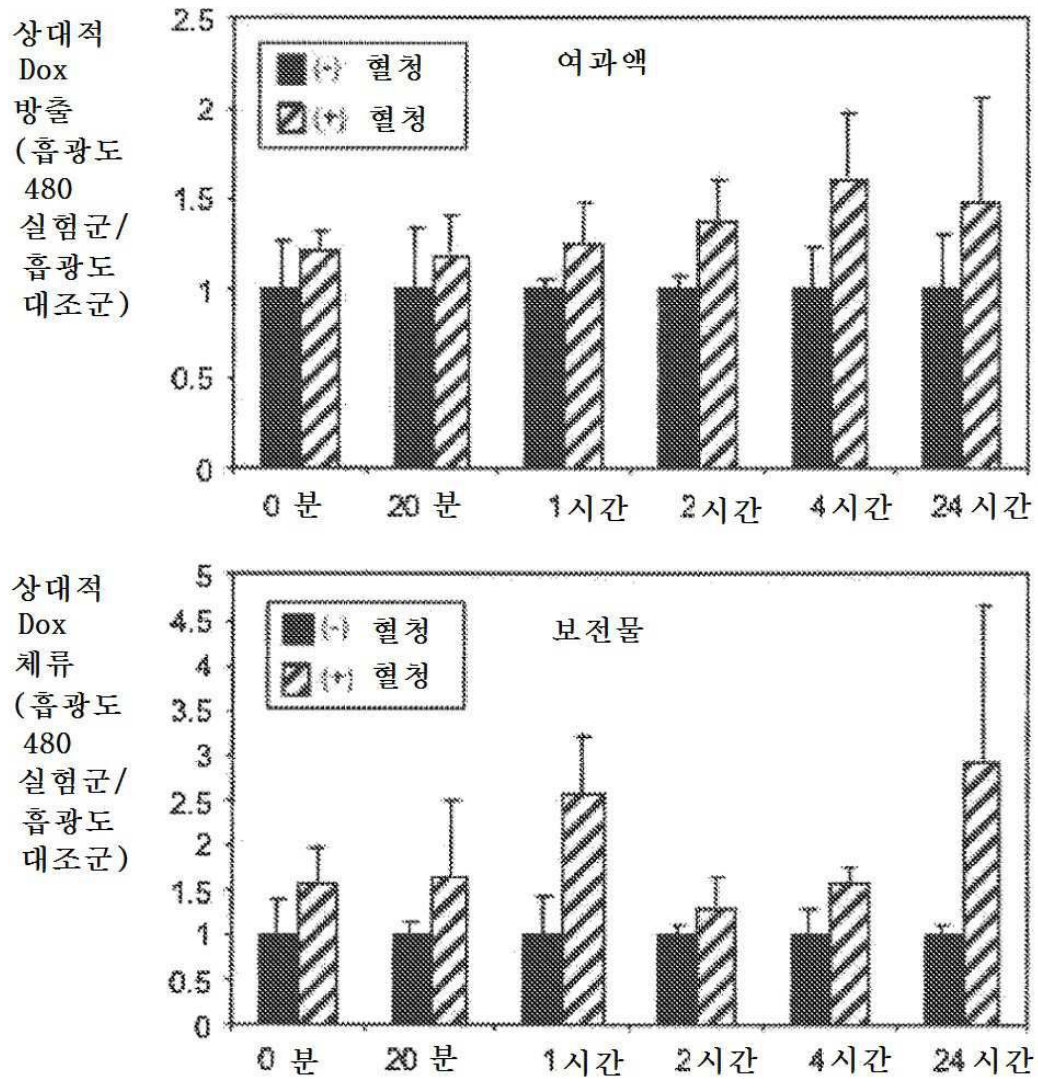
도면5



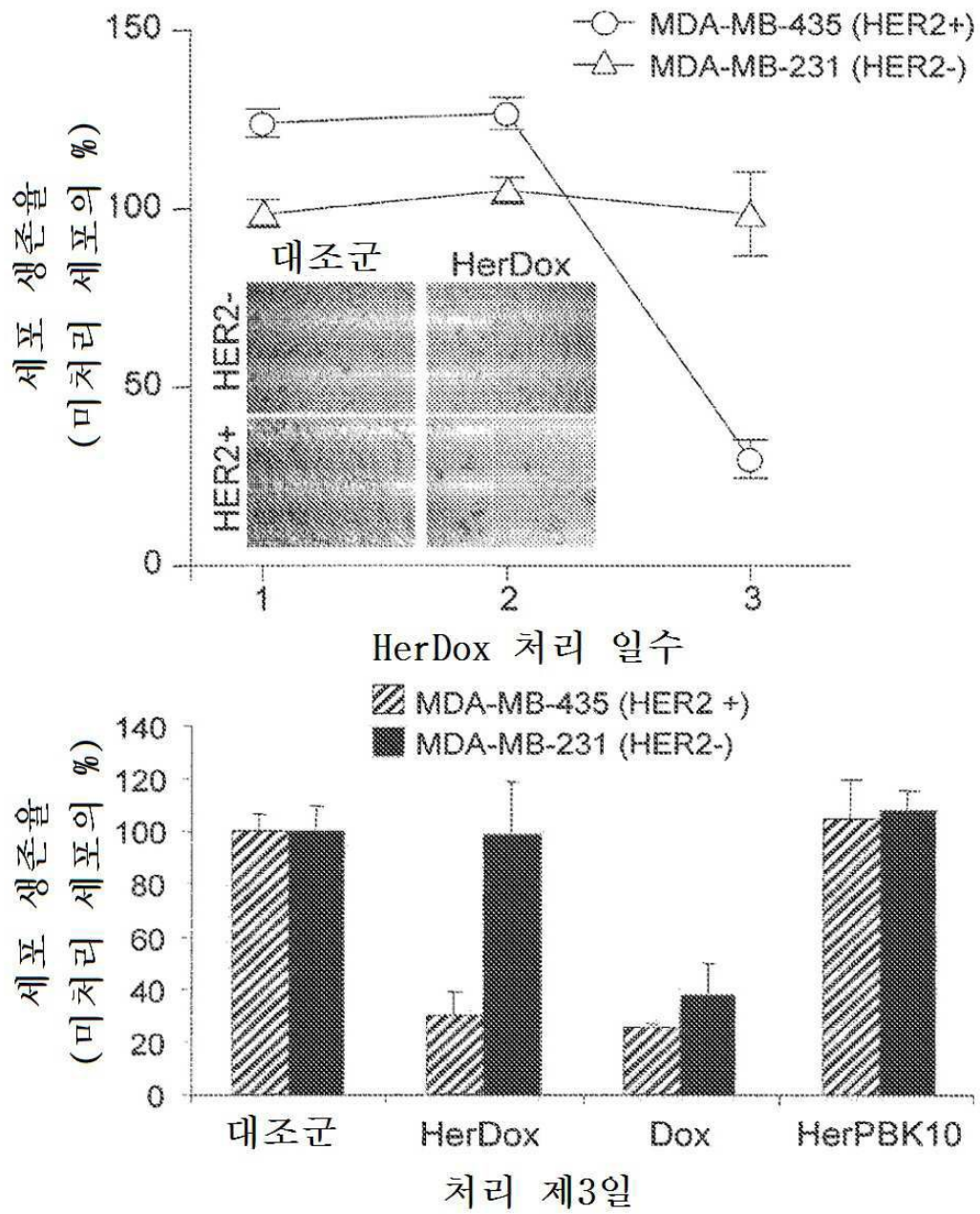
도면6a



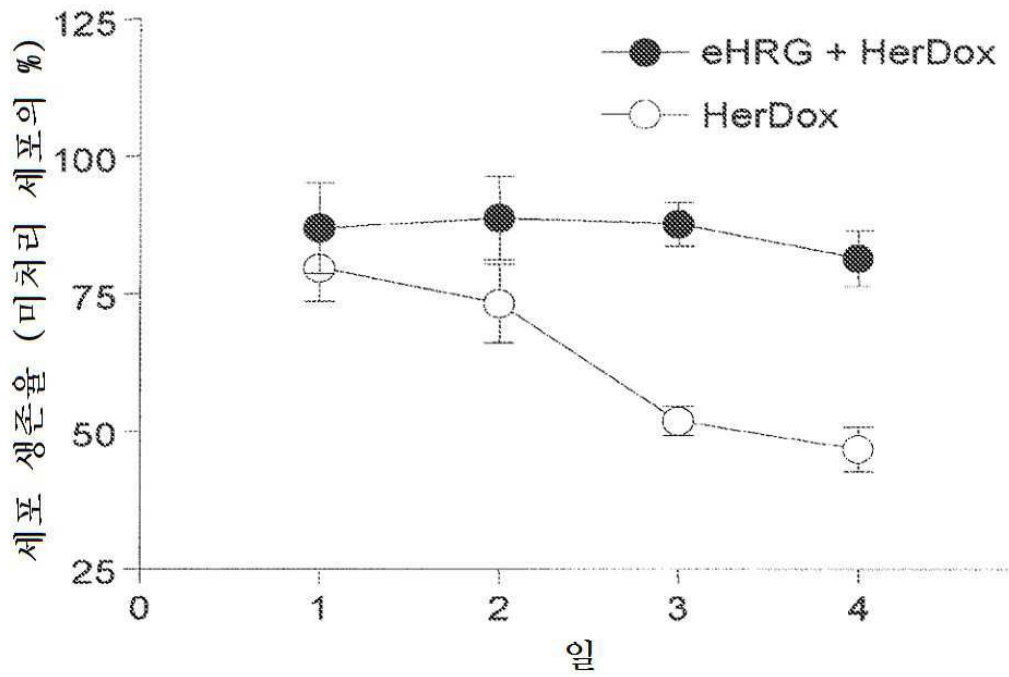
도면6b



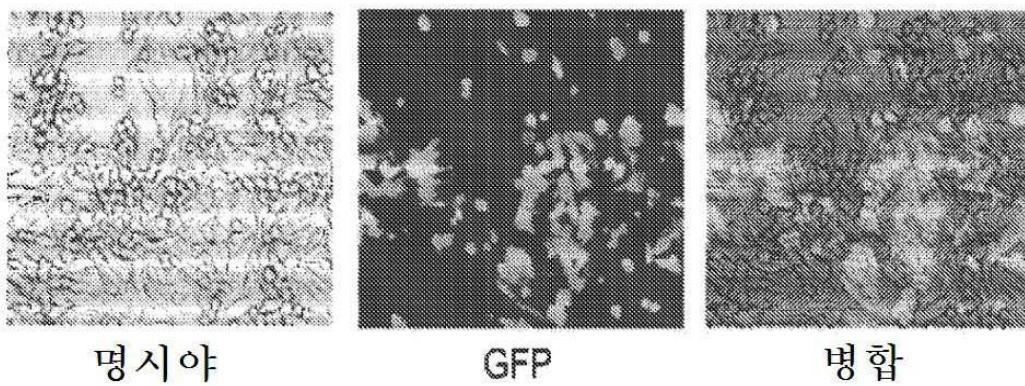
도면7



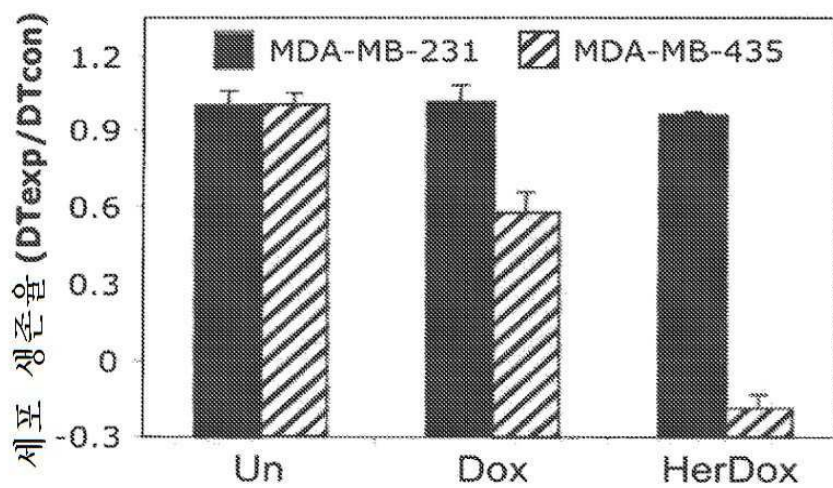
도면8



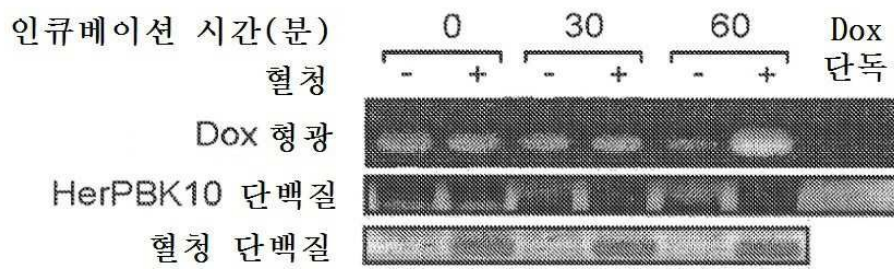
도면9a



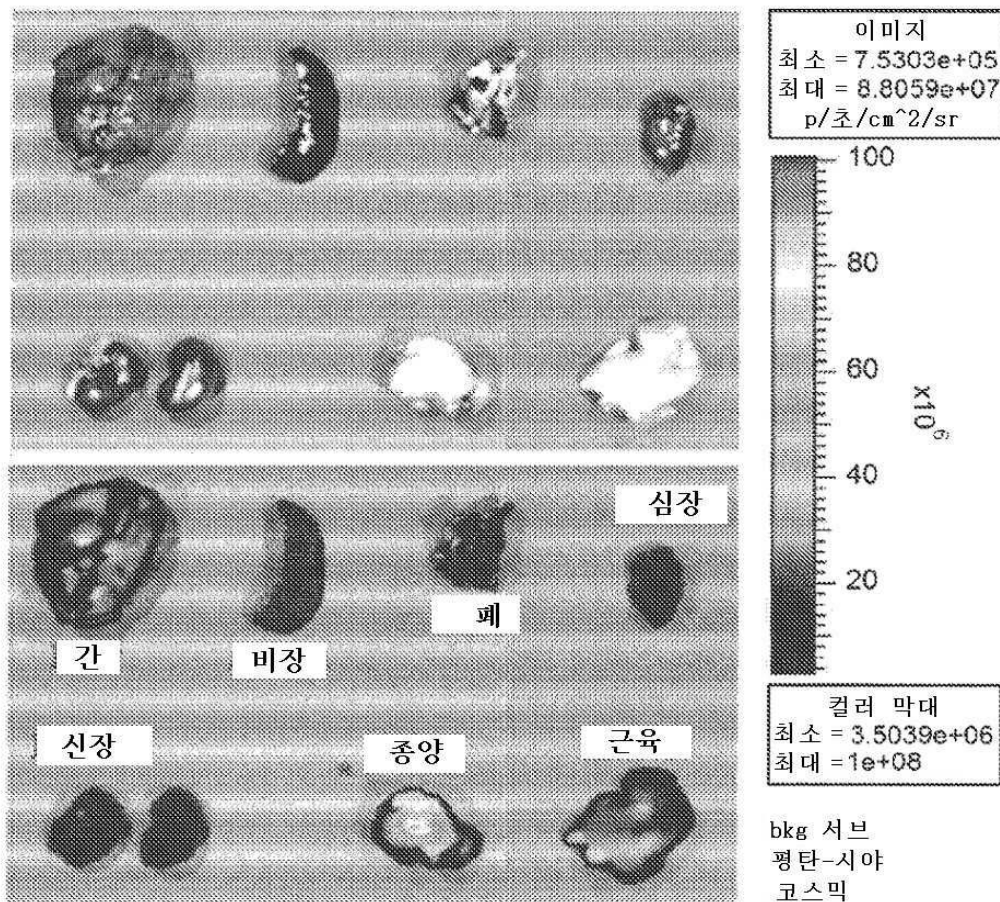
도면9b



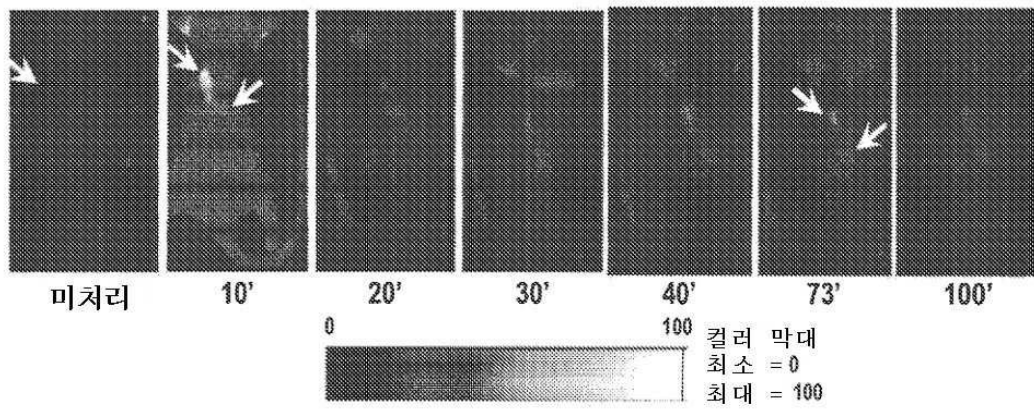
도면9c



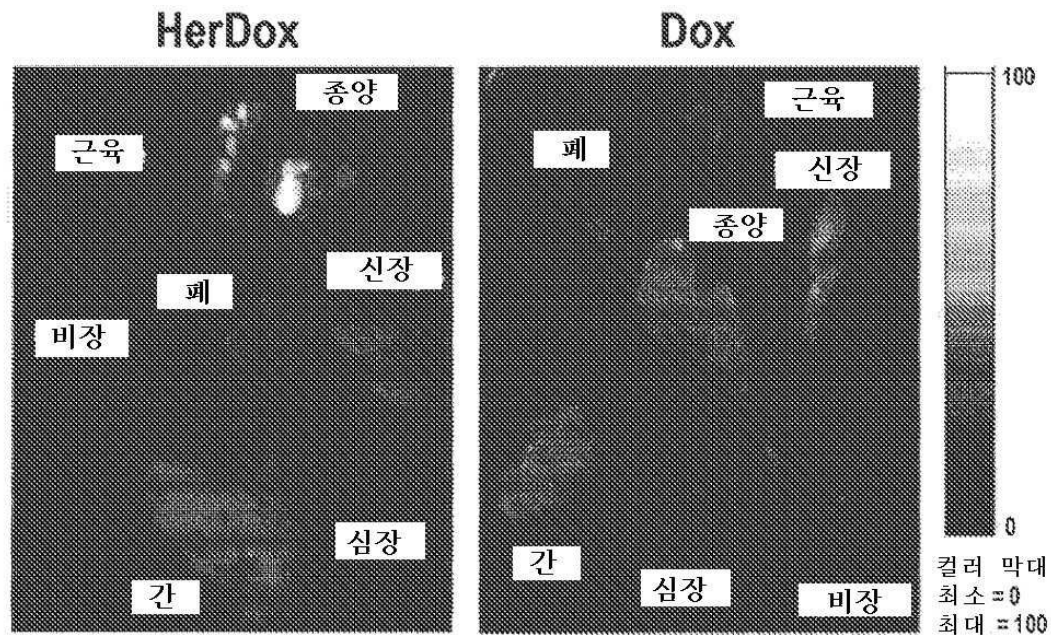
도면10



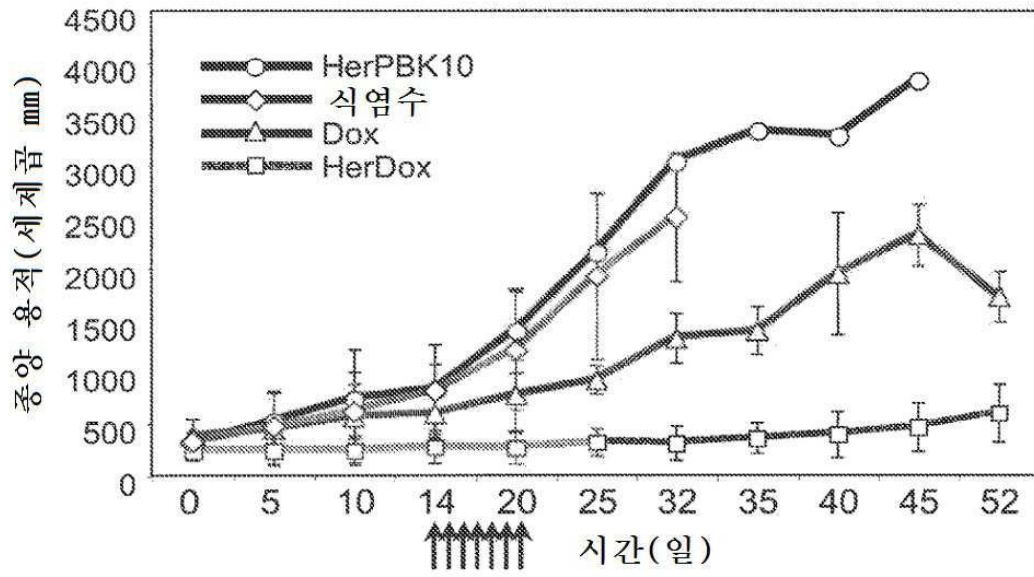
도면11a



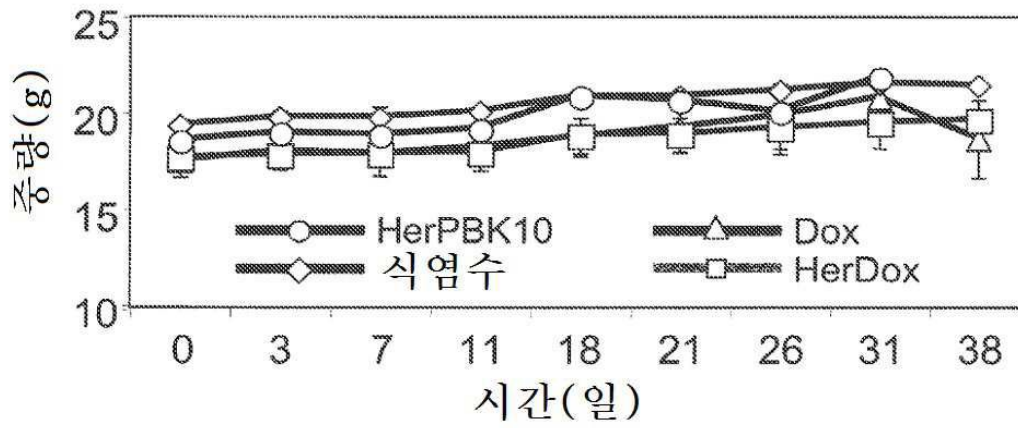
도면11b



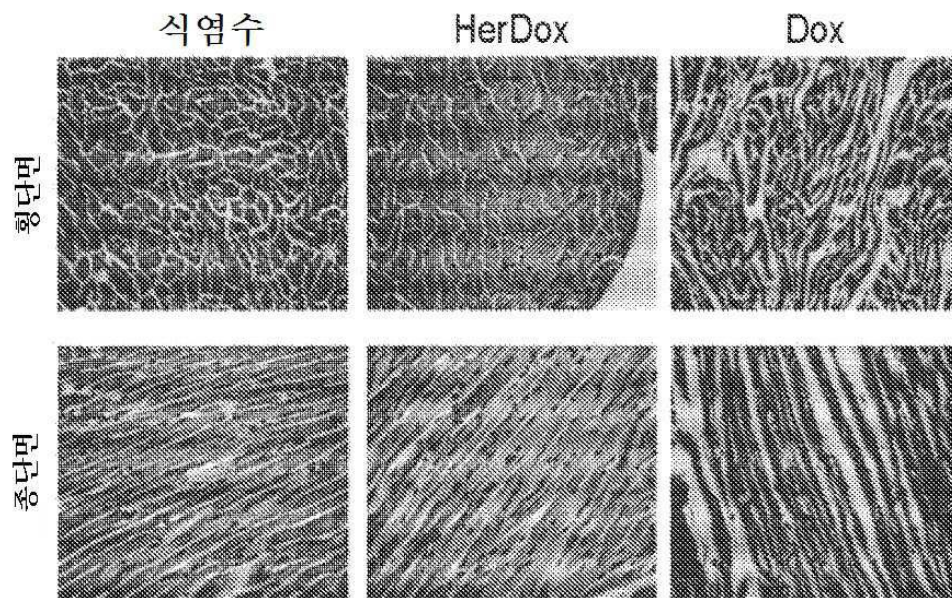
도면12a



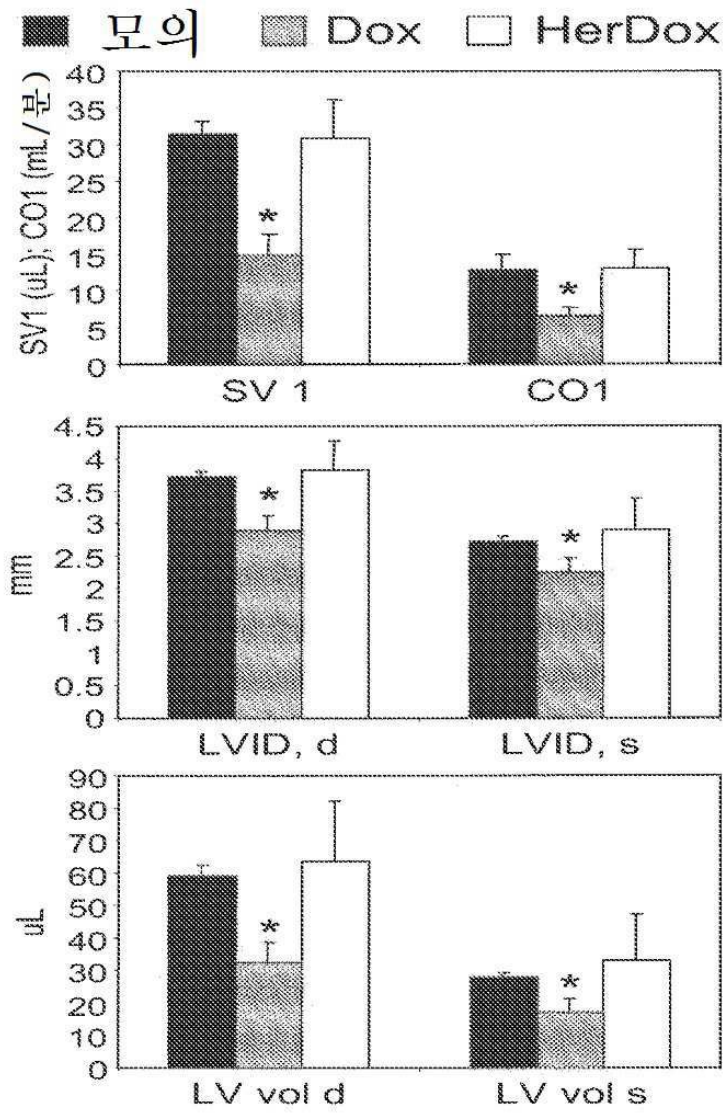
도면12b



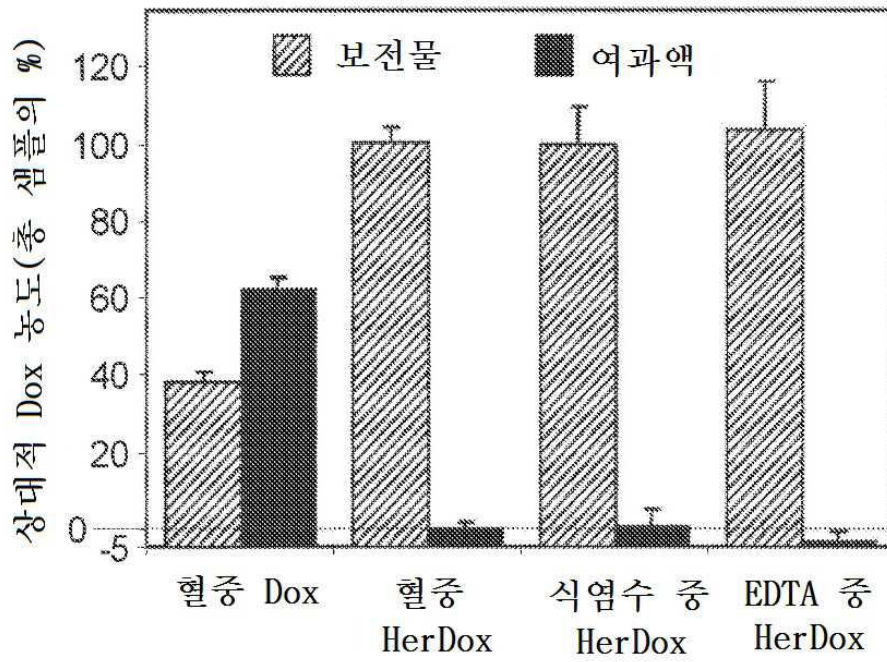
도면12c



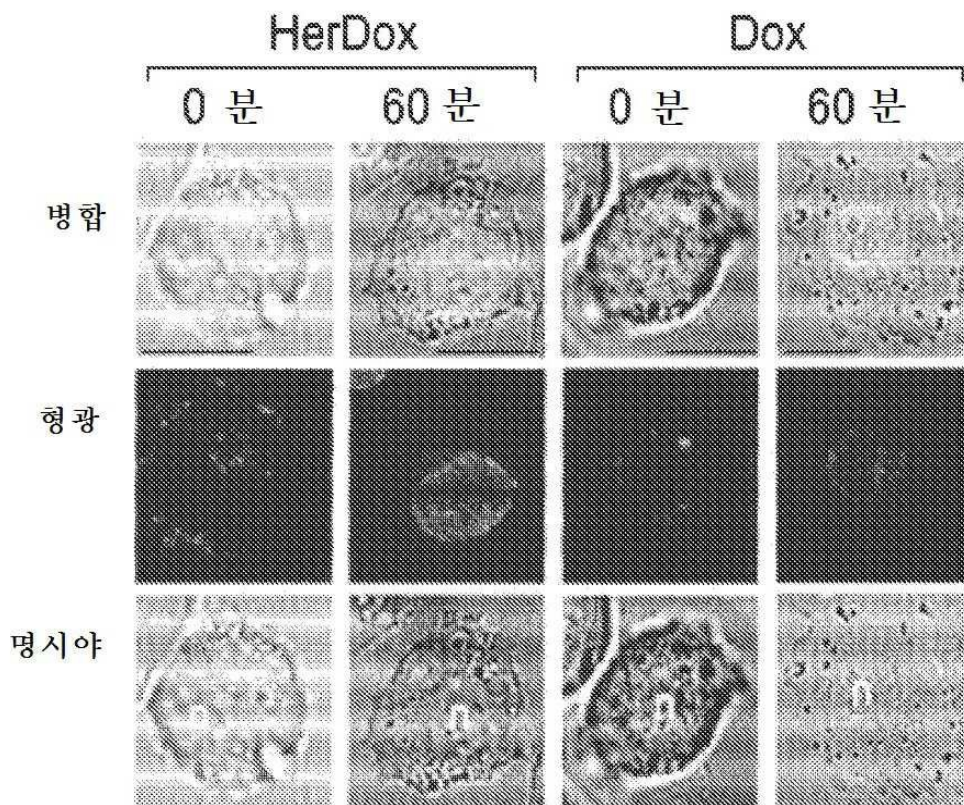
도면12d



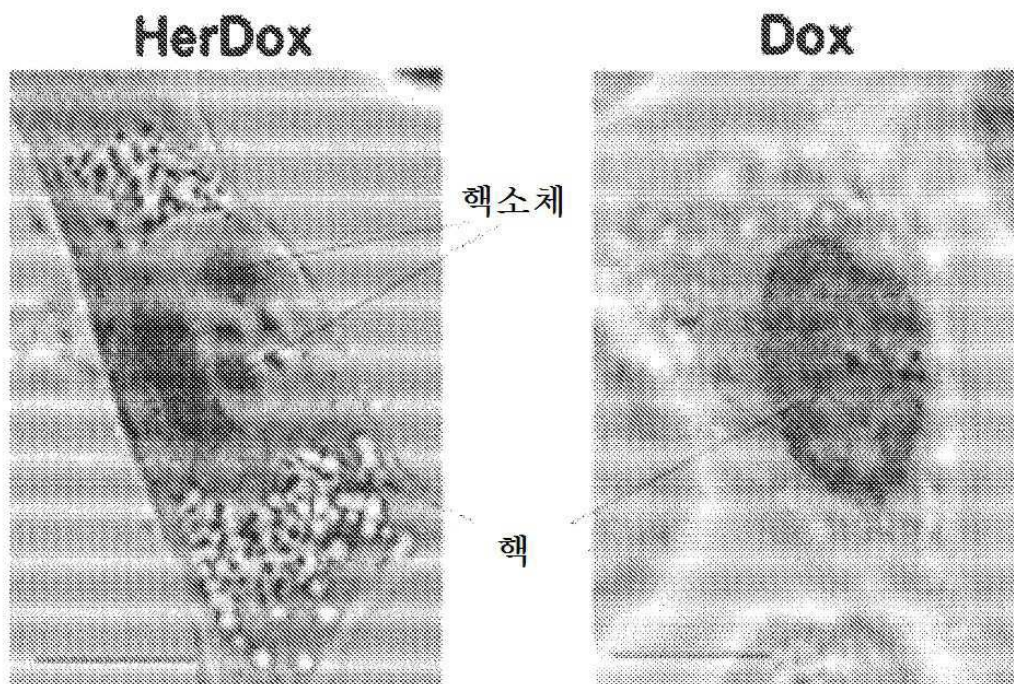
도면13



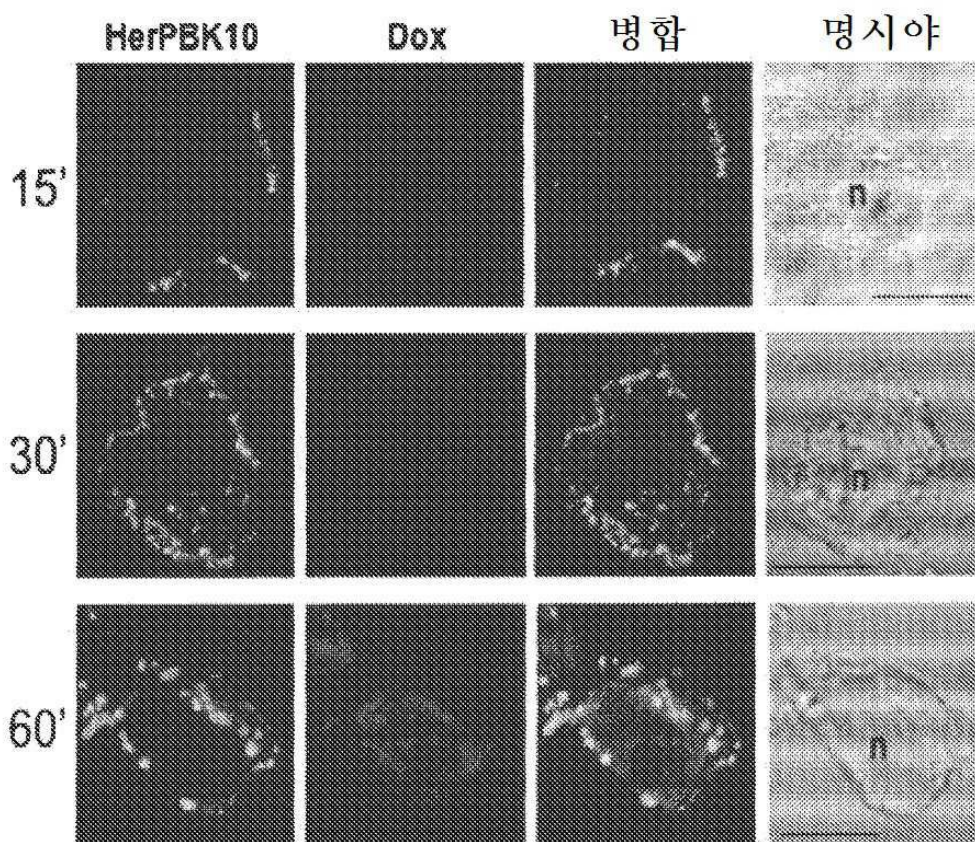
도면14a



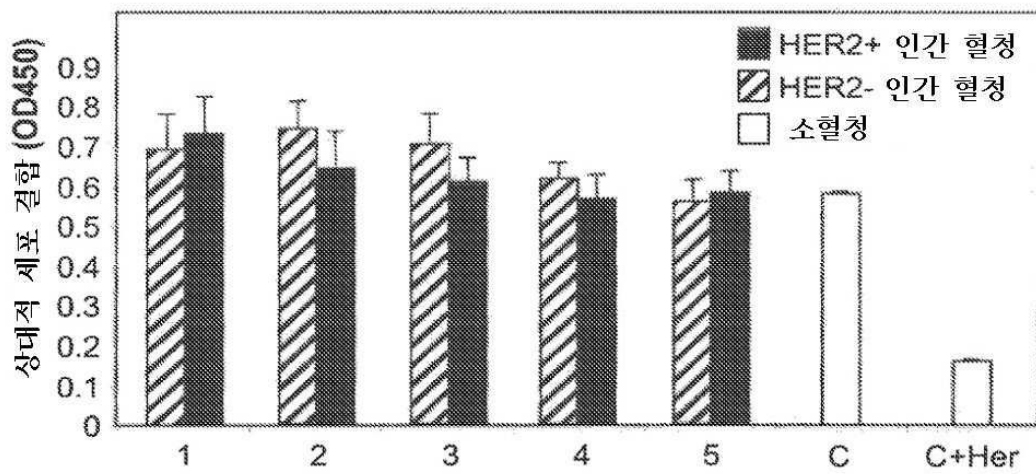
도면14b



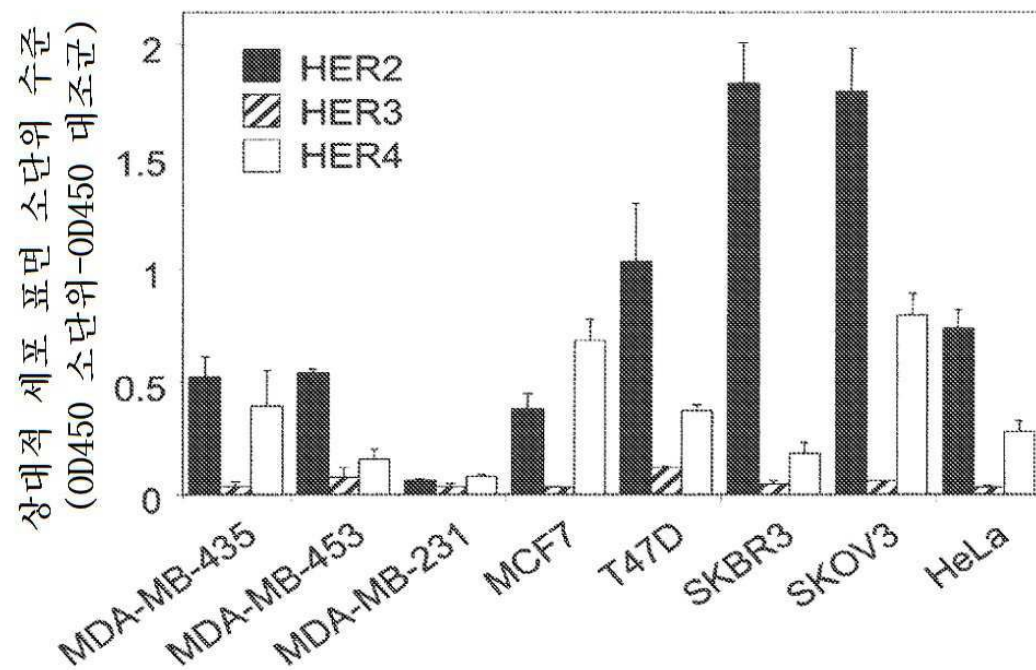
도면15



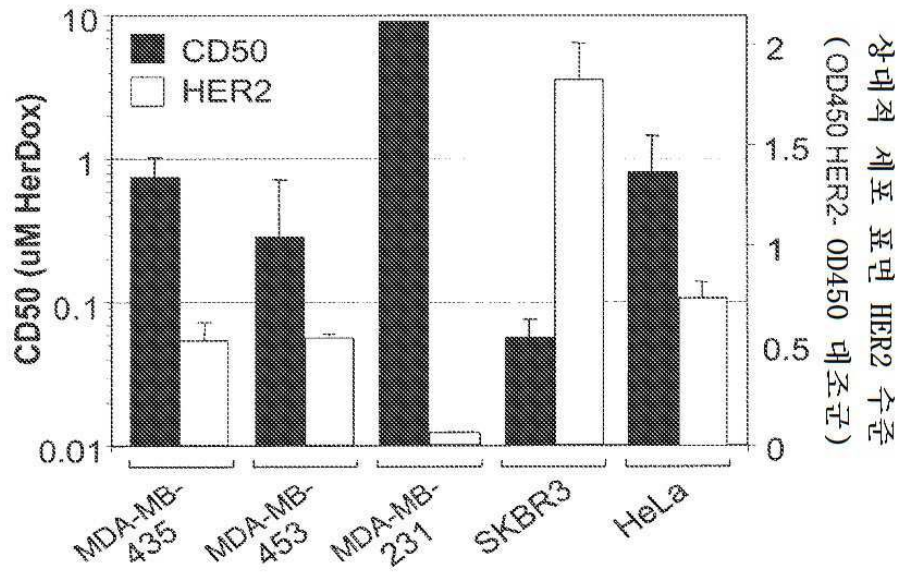
도면16



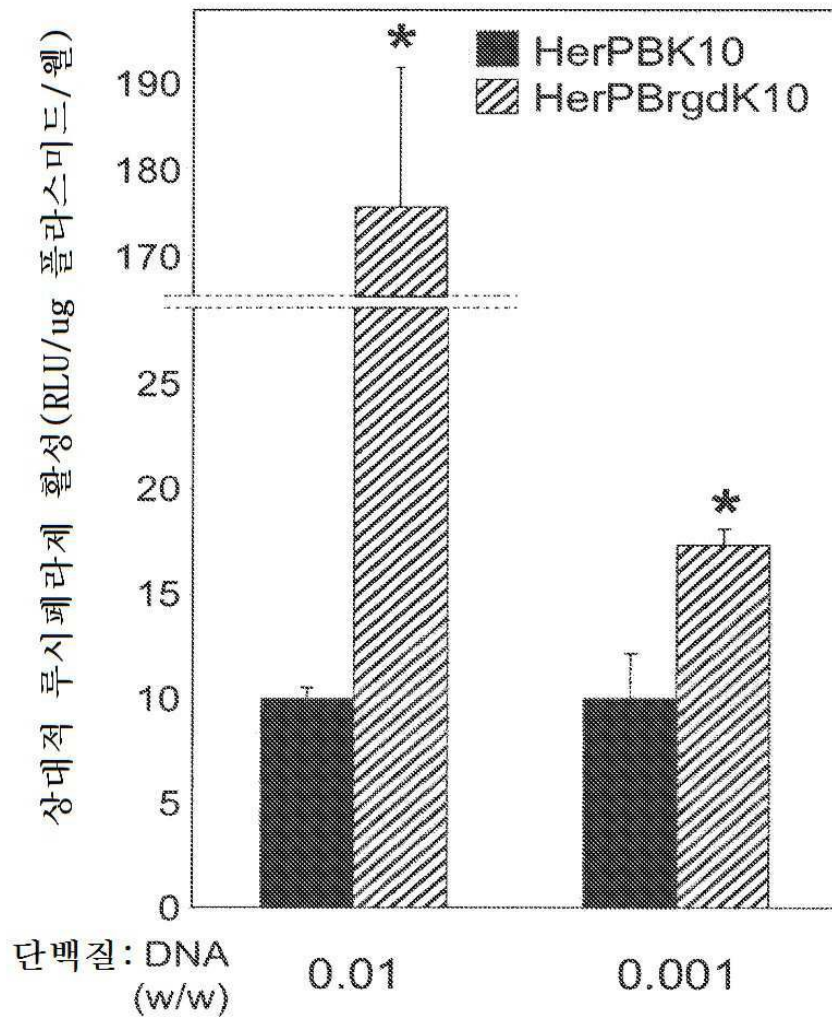
도면17a



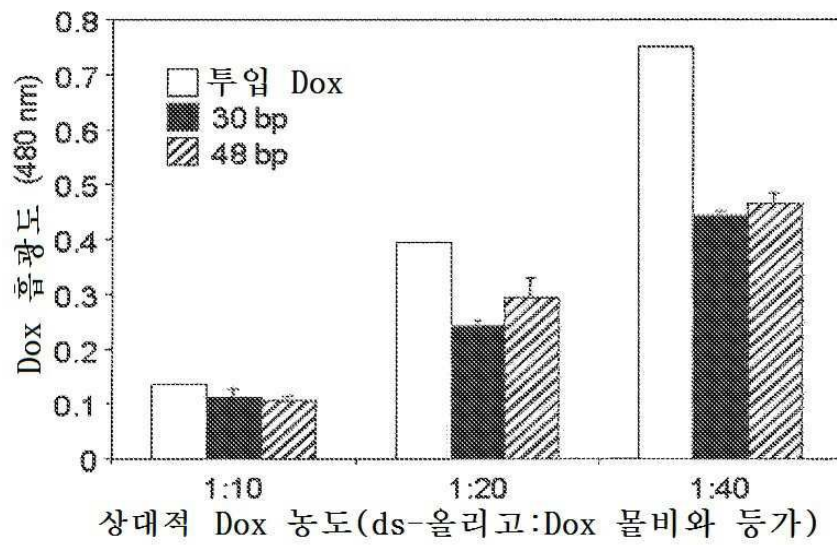
도면17b



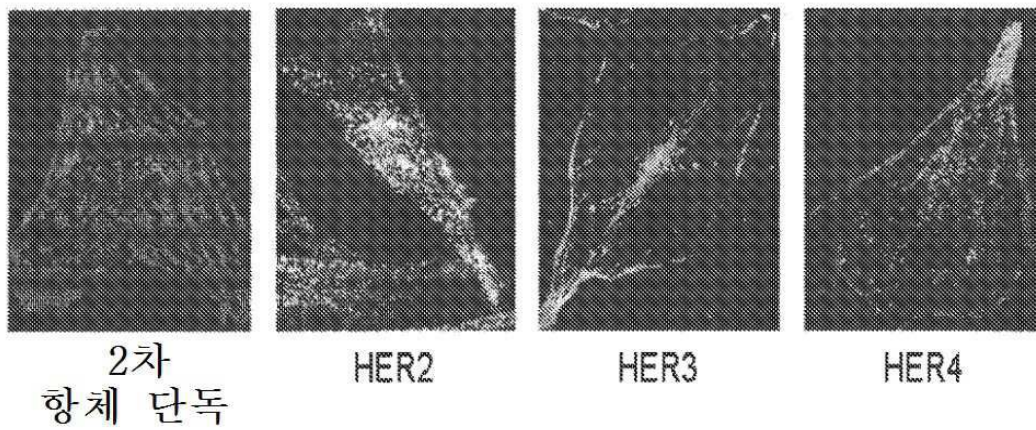
도면18



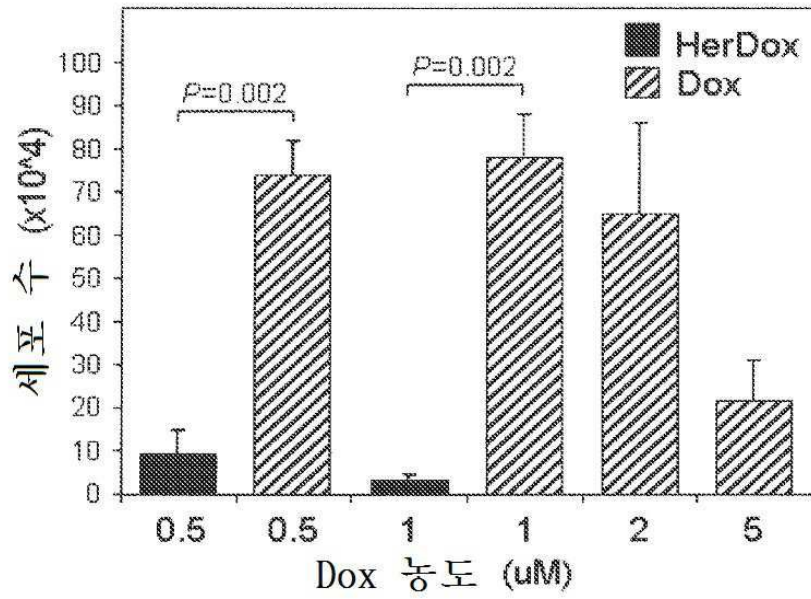
도면19



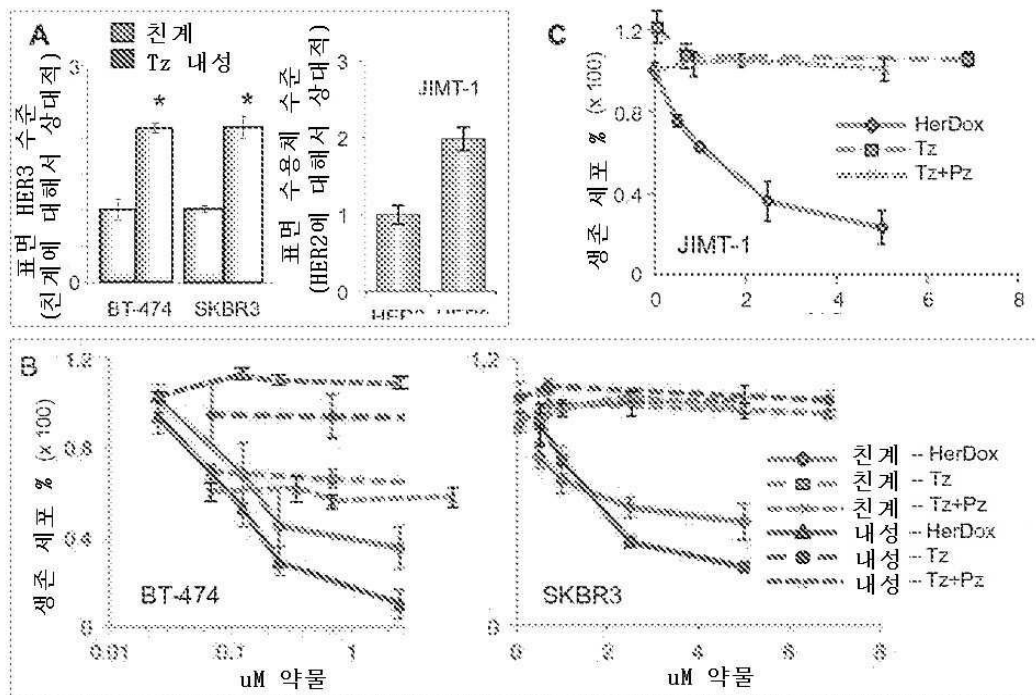
도면20a



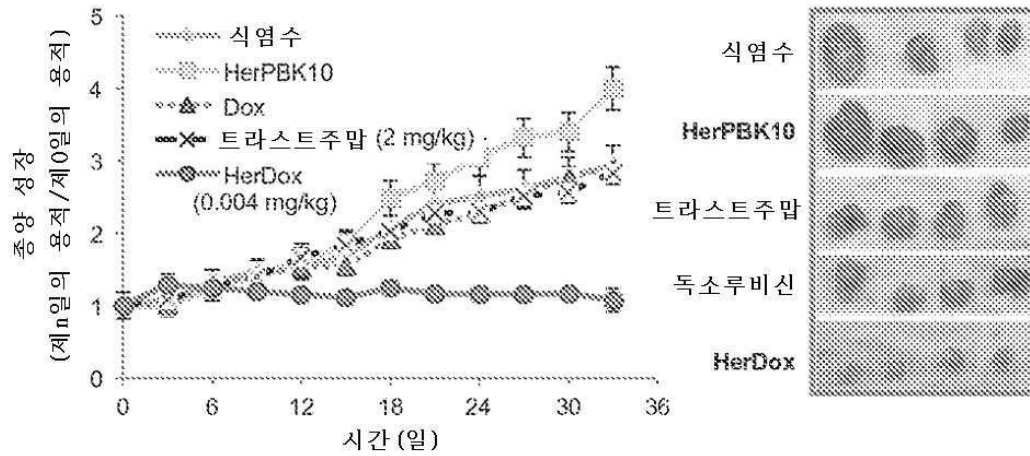
도면20b



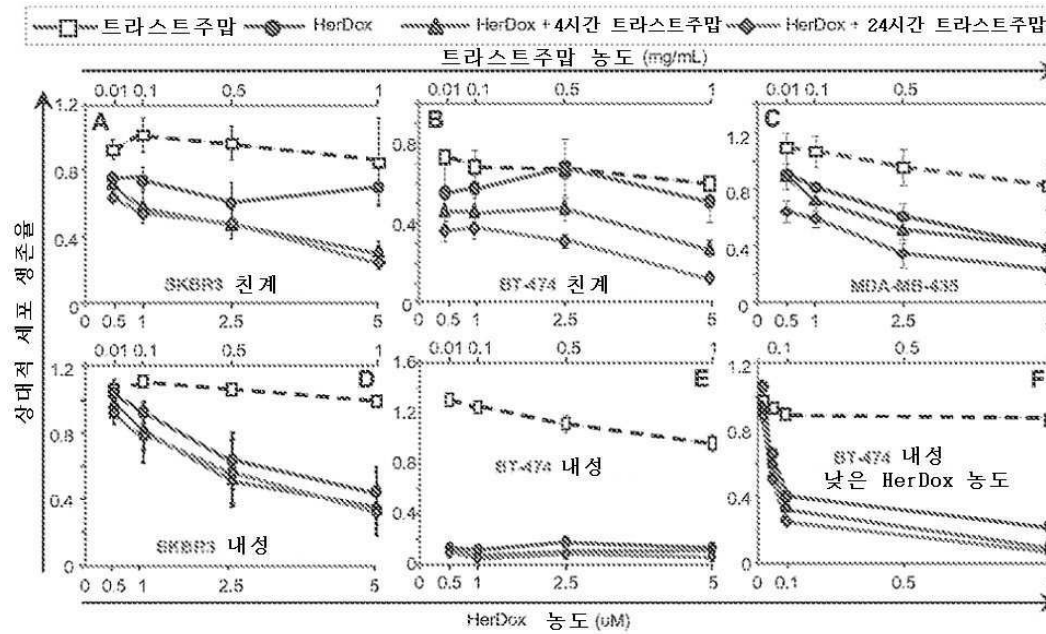
도면21



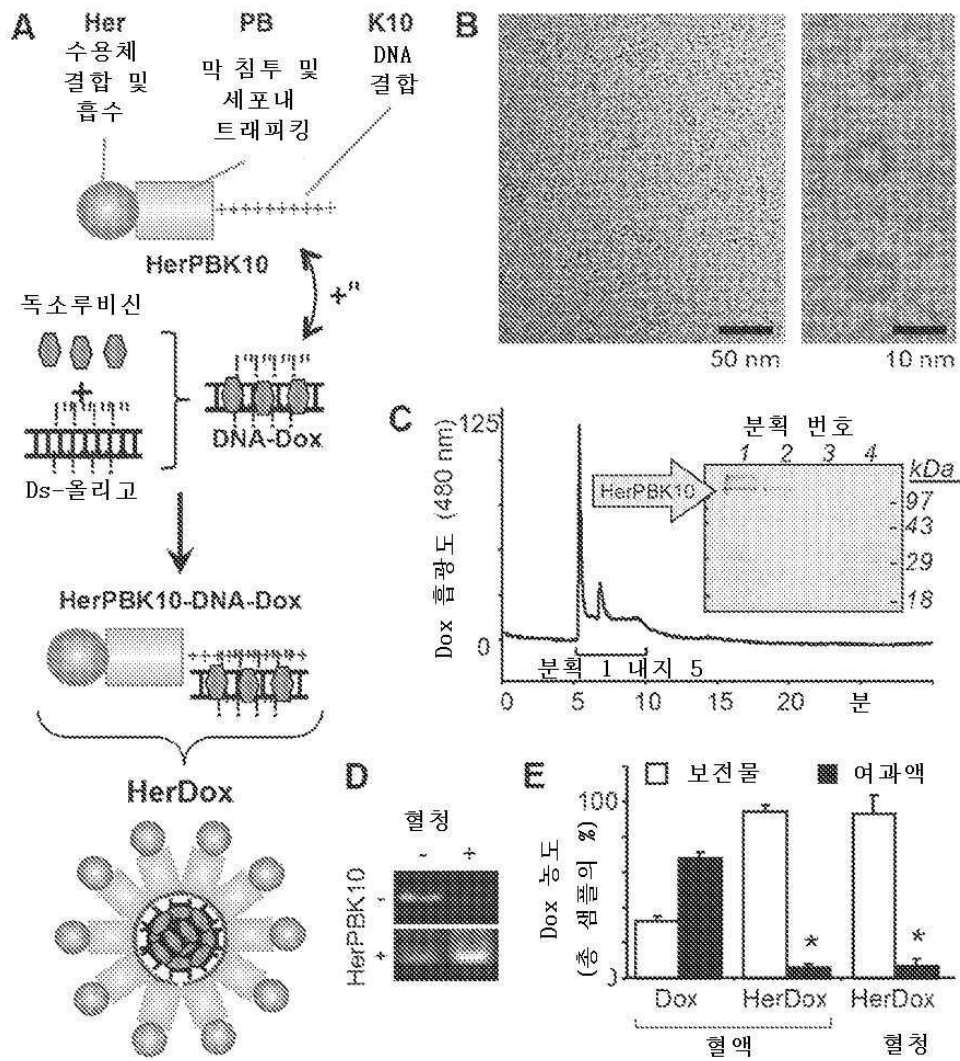
도면22



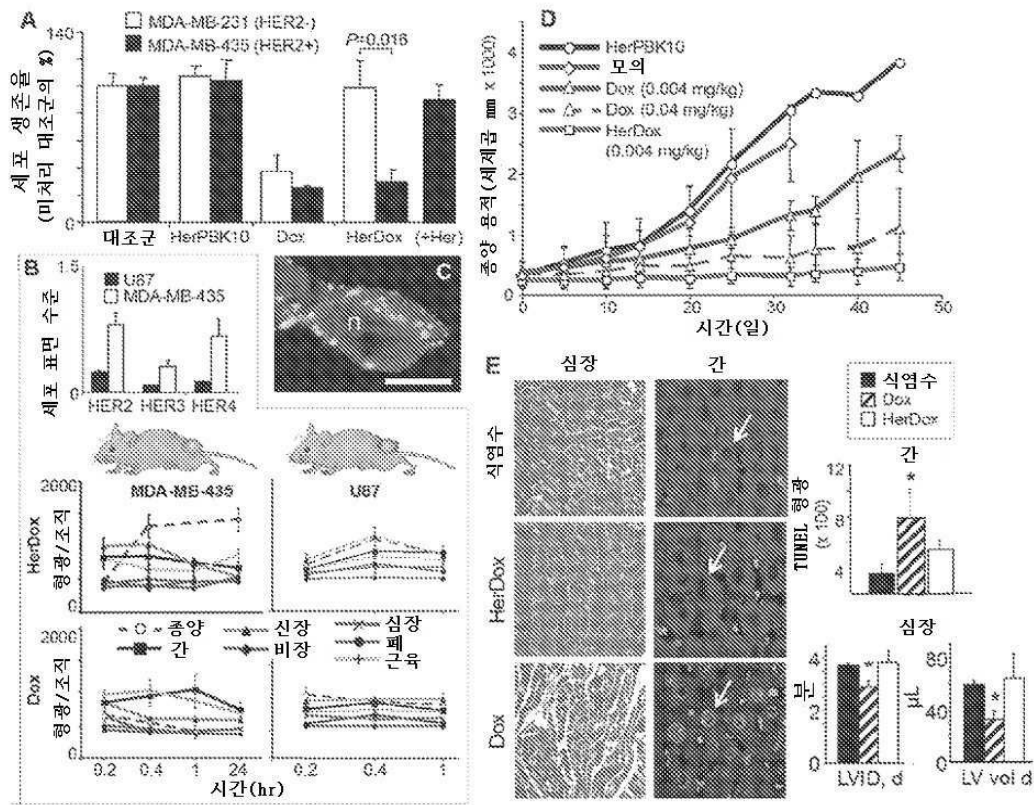
도면23



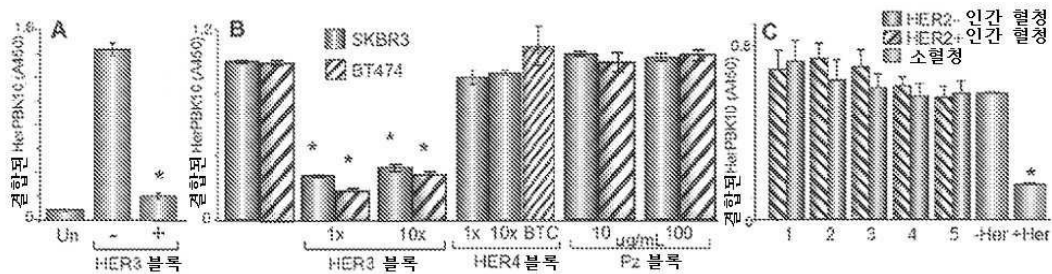
도면24



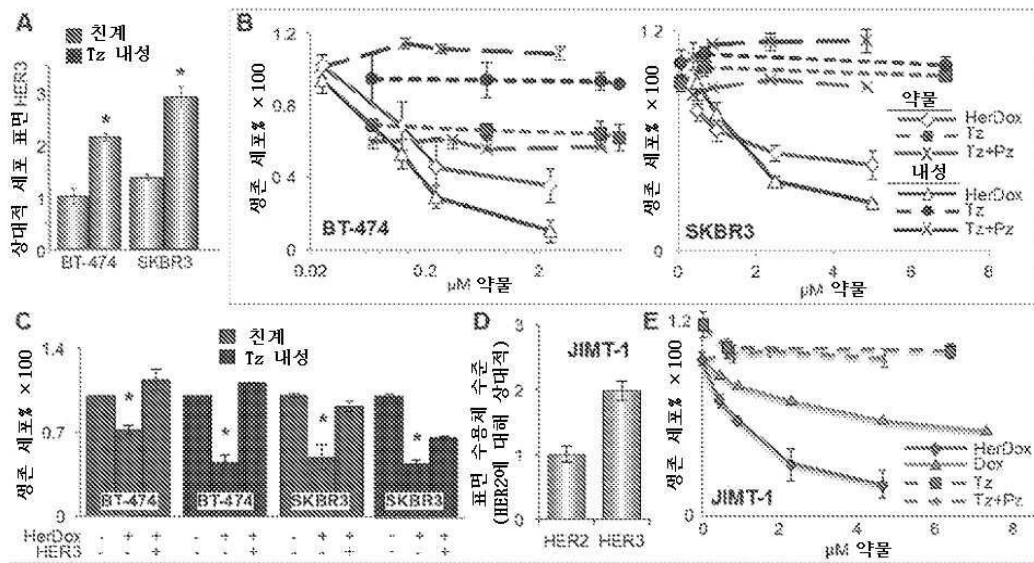
도면25



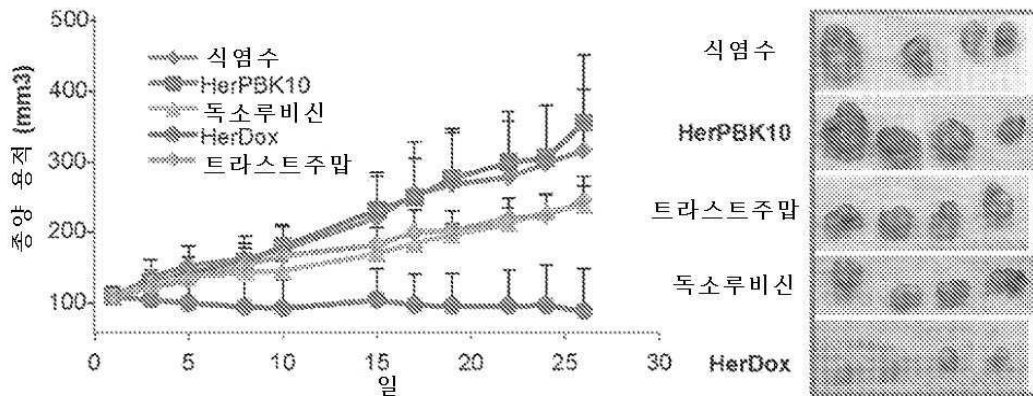
도면26



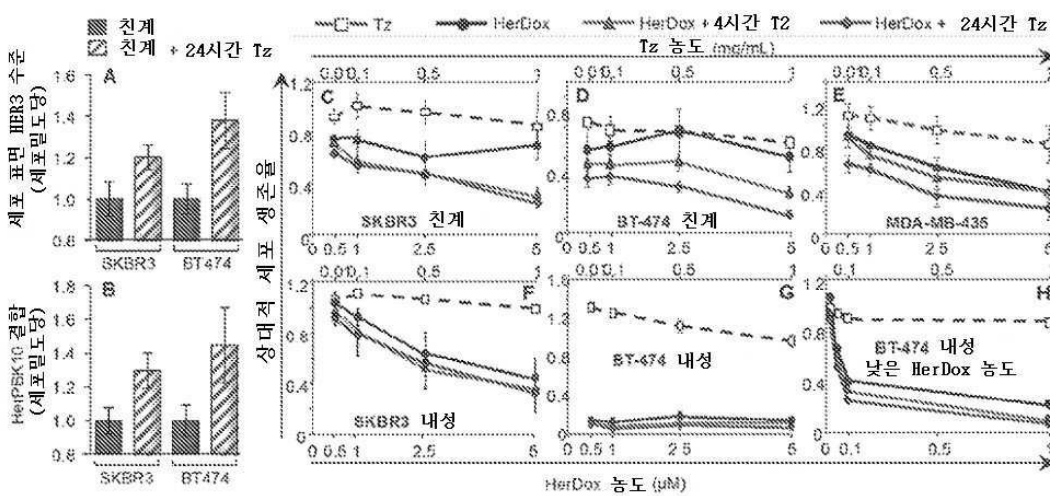
도면27



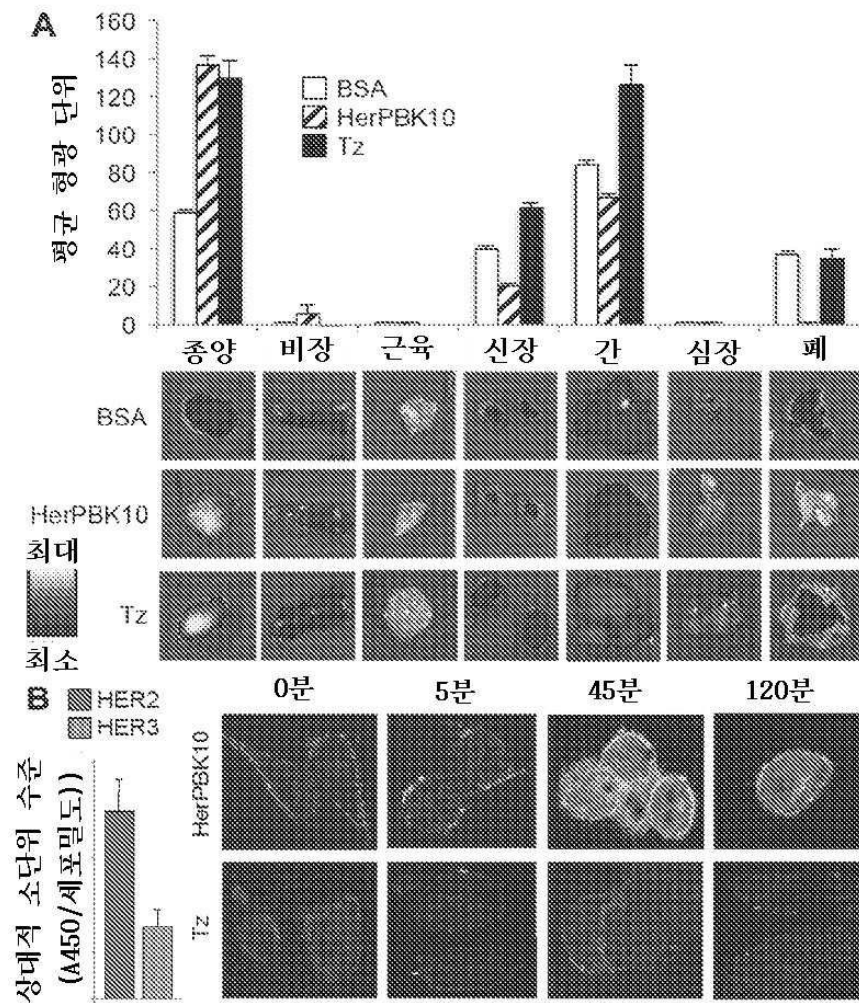
도면28



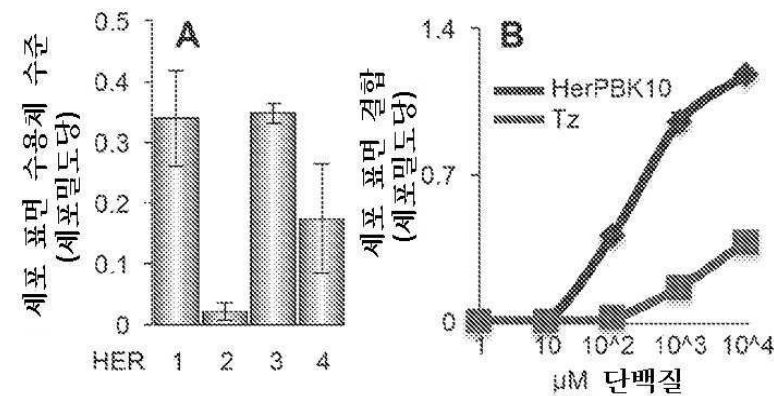
도면29



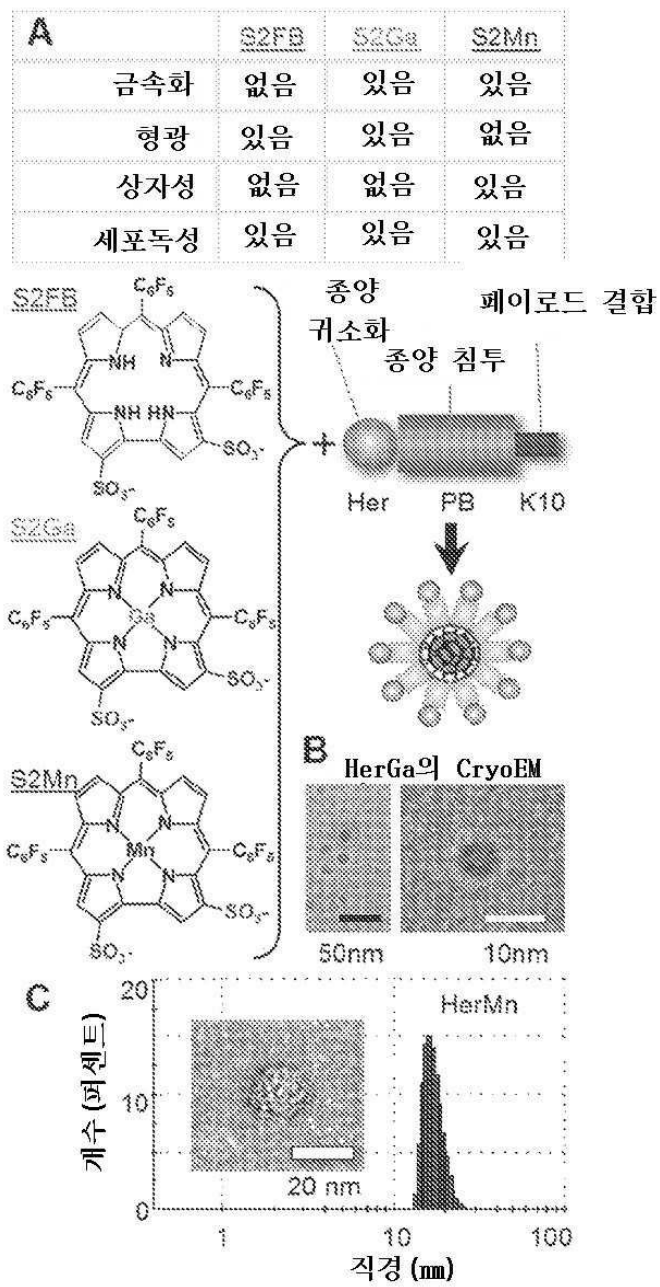
도면30



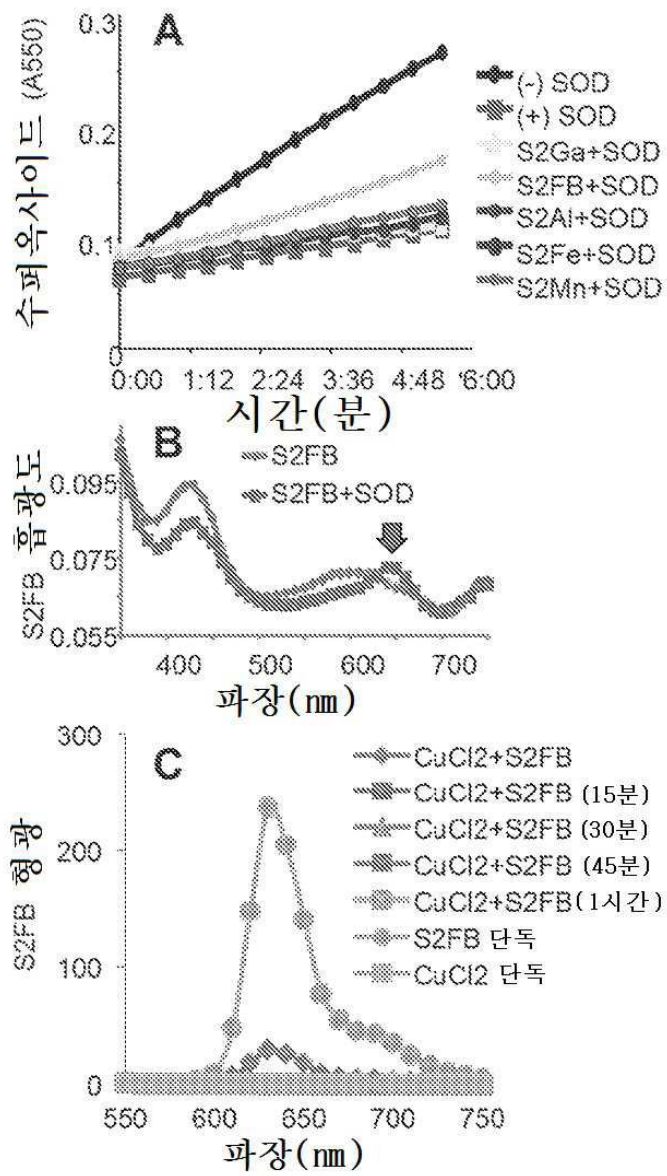
도면31



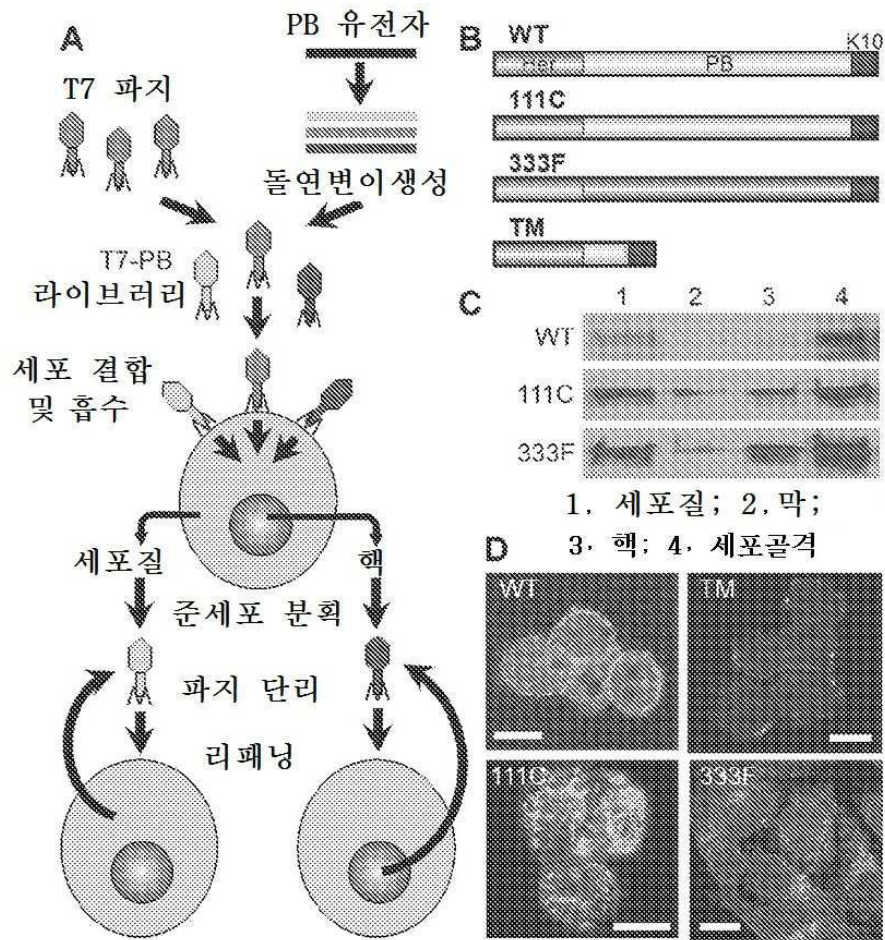
도면33



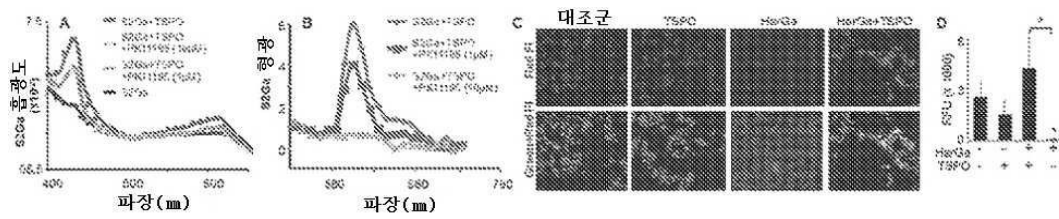
도면34



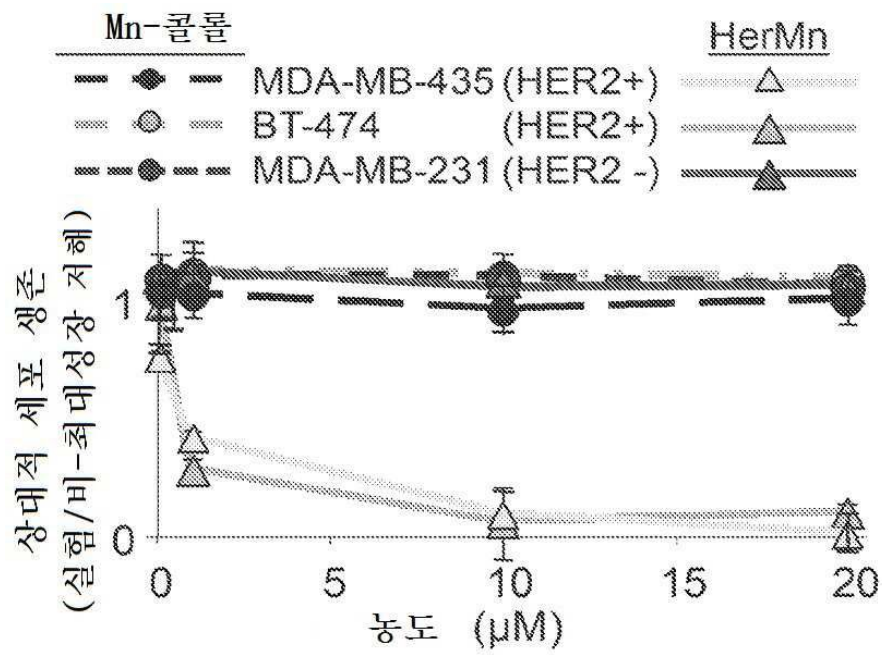
도면35



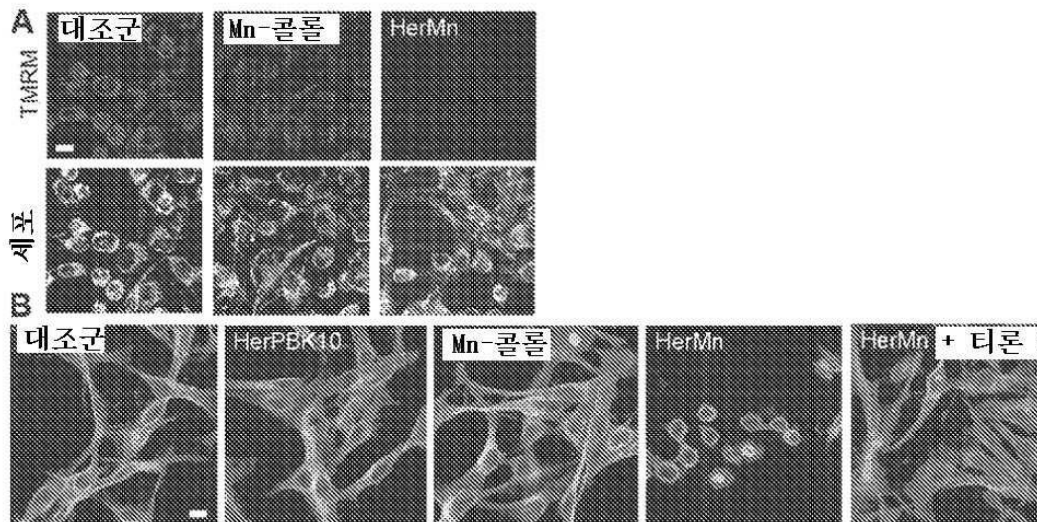
도면36



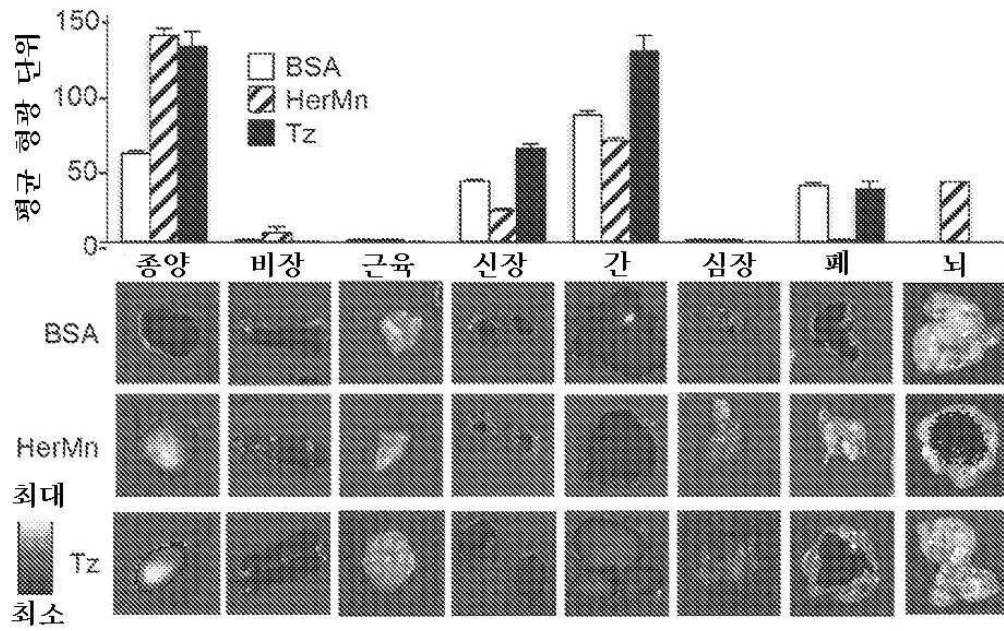
도면37



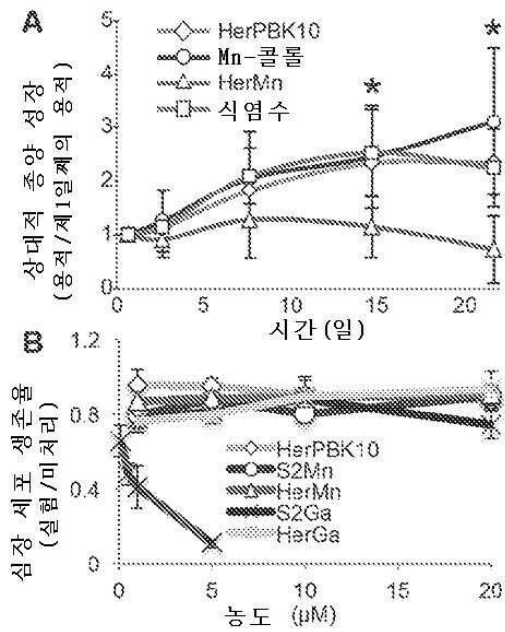
도면38



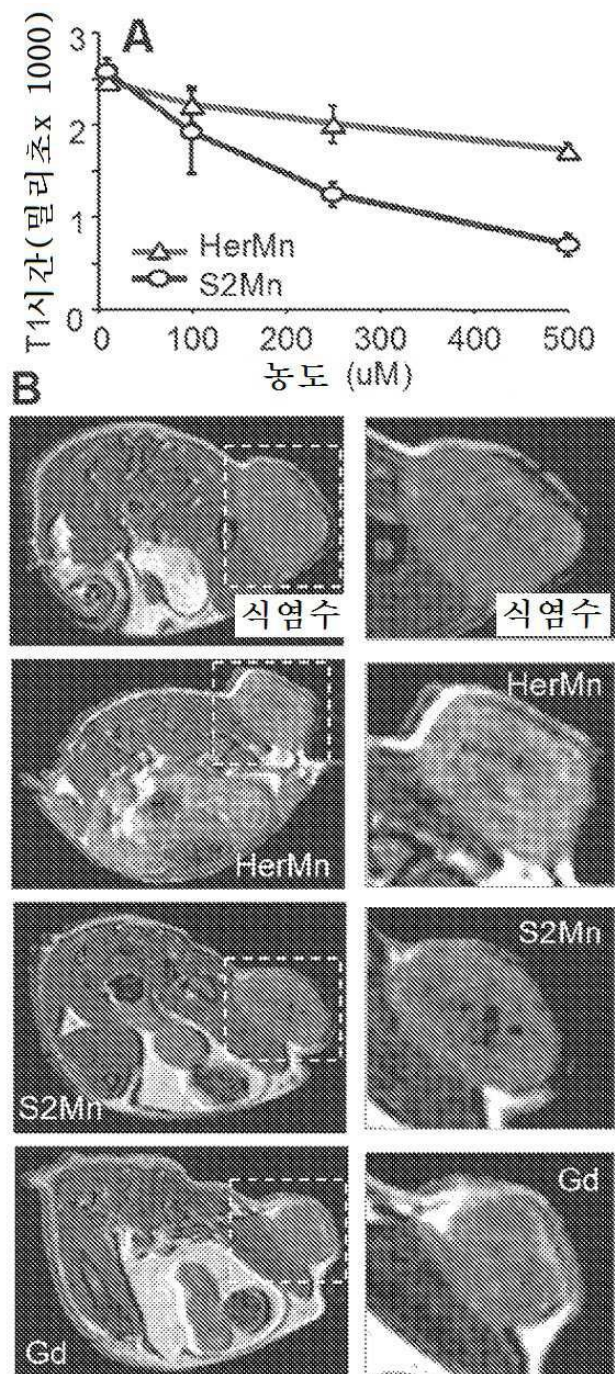
도면39



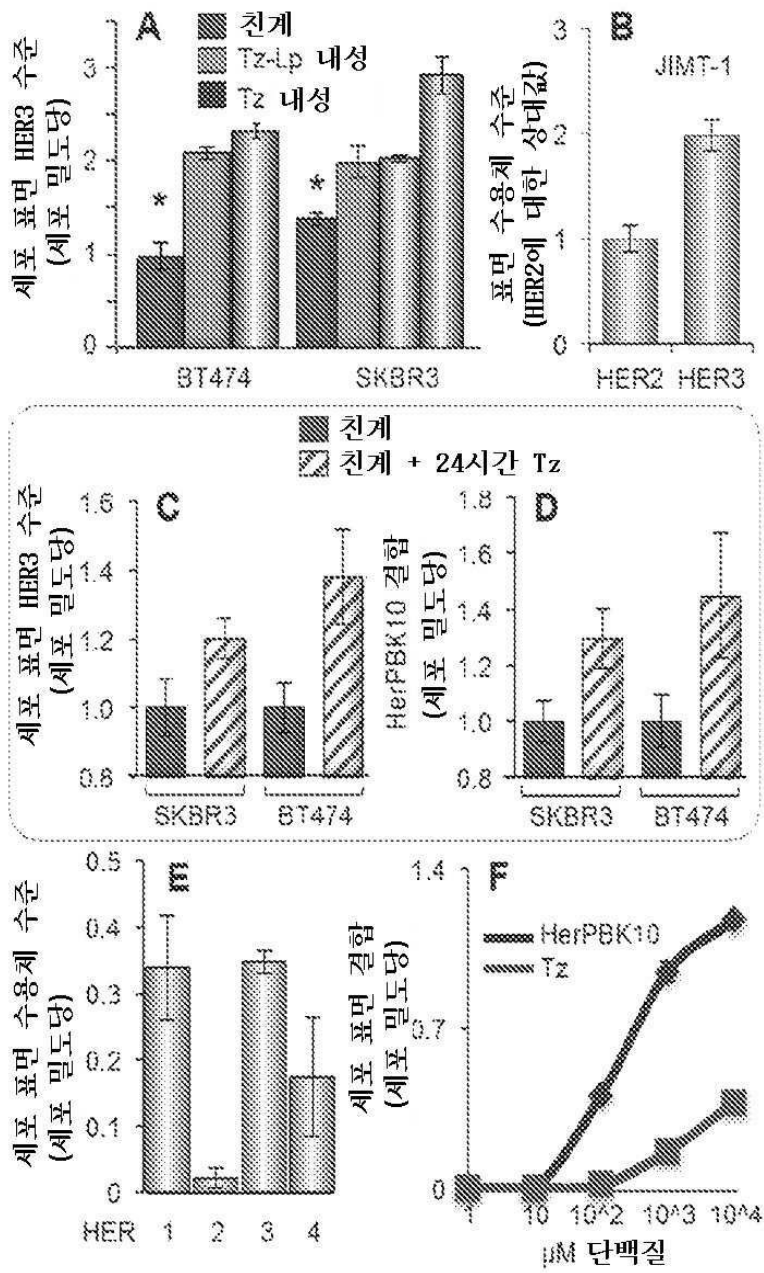
도면40



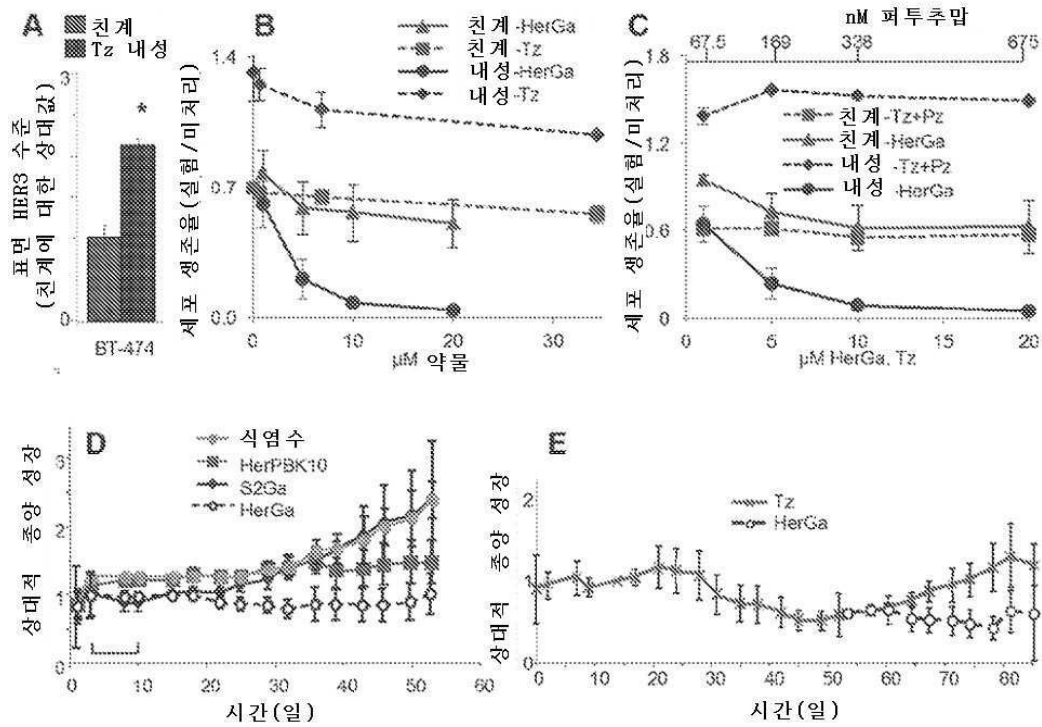
도면41



도면42



도면43



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER
- <120> TARGETING TRASTUZUMAB-RESISTANT HER2+ BREAST CANCER WITH A
HER3-TARGETING NANOPARTICLE
- <130> WO2015/154059
- <140> PCT/US2015/024400
- <141> 2015-04-04
- <150> US 61/975,687
- <151> 2014-04-04
- <160> 14
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 33
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

gcatcagaat tctcaaaaag tgcggctcga tag

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

catgaattca tttttttttt tttttttttt tttttttttt aaaagtgcgg ctcgatagga 60

<210> 3

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgaattcat tttttttttt tttttttttt ttttttttta gatctacttc caccacttcc 60

acc 63

<210> 4

<211> 2382

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ttgcctcccc gattgaaaga gatgaaaagc caggaatcgg ctgcaggttc caaactagtc 60

cttcggtgtg aaaccagttc tgaatactcc tctctcagat tcaagtgggt caagaatggg 120

aatgaattga atcgaaaaaa caaaccacaa aatatcaaga tacaaaaaaa gccagggaag 180

tcagaacttc gcattaacaa agcatcactg gctgattctg gagagtatat gtgcaaagtg 240

atcagcaaat taggaaatga cagtgcctct gccaatatca ccatcgtgga atcaaacgag 300

atcatcactg gtatgccagc ctcaactgaa ggagcatatg tgtcttcaga gtctccatt 360

agaatatcag tatccacaga aggagcaaat acttcttcat ctacatctac atccaccact 420

gggacaagcc atcttgtaaa atgtgcggag aaggagaaaa ctttctgtgt gaatggaggg 480

gagtgttca tggtgaaaga ctttcaaac ccctcgagat acttgtgcaa gtgccaacct 540

ggattcactg gagcaagatg tactgagaat gtgcccatga aagtccaaaa ccaagaaaag 600

gcggaggagc tgtacggtgg aagtgggtga agtggatcca tgcggcgcgc ggcgatgtat 660

gaggaaggtc ctctccctc ctacgagagt gtggtgagcg cggcgccagt ggcggcggcg 720

ctgggttctc cttcgaatgc tccctggac ccgccgtttg tgcctccgcg gtacctgcgg 780

cctaccgggg ggagaaacag catccgttac tctgagttgg caccctatt cgacaccacc 840

cgtgtgtacc tgggtggacaa caagtcaacg gatgtggcat ccctgaacta ccagaacgac 900
 cacagcaact ttctgaccac ggtcattcaa aacaatgact acagcccggg ggaggcaagc 960

 acacagacca tcaatcttga cgaccggtcg cactggggcg gcgacctgaa aaccatcctg 1020
 cataccaaca tgccaaatgt gaacgagttc atgtttacca ataagtttaa ggcgcggggtg 1080
 atggtgtcgc gcttgcctac taaggacaat caggtggagc tgaaatacga gtgggtggag 1140
 ttcacgctgc ccgagggcaa ctactccgag accatgacca tagaccttat gaacaacgcg 1200
 atcgtggagc actacttgaa agtgggcaga cagaacgggg ttctggaaag cgacatcggg 1260
 gtaaagtttg acacccgcaa cttcagactg gggtttgacc ccgtcactgg tcttgtcatg 1320
 cctgggggtat atacaaacga agccttccat ccagacatca ttttgctgcc aggatgcggg 1380

 gttgacttca cccacagccg cctgagcaac ttgttgggca tccgaagcg gcaacccttc 1440
 caggagggtt ttaggatcac ctacgatgat ctggagggtg gtaacattcc cgcactgttg 1500
 gatgtggacg cctaccaggc gagcttgaag gatgacaccg aacagggcgg ggggtggcga 1560
 ggcggcagca acagcagtg cagcggcgcg gaagagaact ccaacgcggc agccgcggca 1620
 atgcagccgg tggaggacat gaacgatcat gccattcgcg gcgacacctt tgccacacgg 1680
 gctgaggaga agcgcgctga ggccgaagca gcggccgaag ctgccgcccc cgctgcgcaa 1740
 cccgaggtcg agaagcctca gaagaaaccg gtgatcaaac ccctgacaga ggacagcaag 1800

 aaacgcagtt acaacctaat aagcaatgac agcaccttca cccagtaccg cagctggtac 1860
 cttgcataca actacggcga ccctcagacc ggaatccgct catggaccct gctttgcaat 1920
 cctgacgtaa cctgcggctc ggagcaggtc tactggctgt tgccagacat gatgcaagac 1980
 cccgtgacct tccgctccac gcgccagatc agcaacttcc cgggtgggtgg cgccgagctg 2040
 ttgccctgac actccaagag cttctacaac gaccaggccg tctactcca actcatccgc 2100
 cagtttacct ctctgaccca cgtgttcaat cgttttcccg agaaccagat tttggcgcg 2160
 ccgccagccc ccaccatcac caccgtcagt gaaaacgttc ctgctctcac agatcacggg 2220

 acgtaccgc tgcgcaacag catcgaggga gtccagcgag tgaccattac tgacgccaga 2280
 cgccgcacct gccctacgt ttacaaggcc ctgggcatag tctcgccgcg cgtcctatcg 2340
 agccgcactt ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2382

 <210> 5
 <211> 2382
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

tttttttttt tttttttttt tttttttttt aaaagtgcgg ctcgatagga cgcgcggcga	60
gactatgccc agggccttgt aaacgtaggg gcaggtgcgg cgtctggcgt cagtaatggt	120
cactcgttgg actcctccga tgctgttgcg cagcggtagc gtcccgtgat ctgtgagagc	180
aggaacgttt tcactgacgg tggatgatgtt gggggctggc gggcgcgcca aaatctgggt	240
ctcgggaaaag cgattgaaca cgtgggtcag agaggtaaac tggcggatga gttgggagta	300
gacggcctgg tcgttgtaga agctcttggg gtgcacgggc aacagctcgg cccccaccac	360
cggaaagtgt ctgatctggc gcgtggagcg gaaggtcacg gggctcttga tcatgtctgg	420
caacgaccag tagacctgt ccgagccgca ggttacgtca ggagtcaaa gcagggtcca	480
tgagcggatt ccggtctgag ggtcggcgtt gttgtatgca aggtaccagc tcgggtactg	540
ggtgaagggt ctgtcattgc ttattagggt gtaactgcgt ttcttgcgtt cctctgtcag	600
gggtttgatc accggtttct tctgaggctt ctgcacctcg ggttgcgcag cgggggcggc	660
agcttcggcc gctgcttcgg cctcagcgcg ctctctctca gcccggtgtg caaaggtgtc	720
gccgcgaatg gcatgatcgt tcatgtcttc caccggctgc attgccgcgg ctgccgcgtt	780
ggagtctctt tccgcgcgcg tgccactgct gttgctgccg cctgcgccac ccccgccctg	840
ttcggtgtca tctttcaagc tcgcctggta ggcgtccaca tccaacagt cgggaatgtt	900
accaccctcc agatcatcgt aggtgatect aaagccctcc tggaagggtt gccgcttgcg	960
gatgccaac aagtgtctca ggcggctgtg ggtgaagtcc accccgcac cttggcagcaa	1020
aatgatgtct ggatggaagg ctctgtttgt atatacccca ggcatgacaa gaccagtac	1080
ggggtcaaac ccagttctga agttcgggt gtcaaaacttt accccgatgt cgctttccag	1140
aaccccgctt tgcttgccca ctttcaagta gtgctccacg atcgcgttgt tcataaggtc	1200
tatggatcat gtctcggagt agttgccctc ggcagcgtg aactccacc actcgtatct	1260
cagctccacc tgattgtcct tagtaggcaa gcgcgacacc ataccgcgc ccttaaaactt	1320
attggtaaac atgaactcgt tcacatttgg catgttggtg tgcaggatgg ttttcaggtc	1380
gccgccccag tgcgaccggt cgtcaagatt gatggtctgt gtgcttgctt cccccgggt	1440
glagtcatgt ttttgaatga ccgtgggtcag aaagttgctg tggctgttct ggtagttcag	1500
ggatgccaca tccgttgact tgttgtccac caggtacaca cgggtgggtg cgaatagggg	1560
tgccaactca gactaacgga tgctgtttct cccccggta ggccgcaggt accgcggagg	1620
cacaaacggc ggggtccagg gagcatcgaa gggagaaccc agcgcgcgcg cactggcgc	1680
cgcgctcacc acactctcgt aggagggagg aggaccttcc tcatacatcg ccgcgcgcg	1740
catggatcca ctccaccac ttccaccgta cagctcttcc gccttttctt ggttttggac	1800

tttcatgggc acattctcag tacatcttgc tccagtgaat ccaggttggc acttgcacaa 1860

glatctcgag gggtttgaaa ggtctttcac catgaagcac tcccctccat tcacacagaa 1920

agttttctcc ttctccgcac attttacaag atggcttgtc ccagtgggtg atgtagatgt 1980

agatgaagaa gtatttgctc cttctgtgga tactgatatt ctaatgggag actctgaaga 2040

cacatatgct ctttcagttg aggcctggcat accagtgatg atctcgtttg attccacgat 2100

ggtgatattg gcagaggcac tgtcatttcc taatttgctg atcactttgc acatatactc 2160

tccagaatca gccagtgatg ctttgttaat gcgaagtctt gacttccctg gctttttttg 2220

tatcttgata ttttgtgggt tgttttttcg attcaattca ttccattct tgaaccactt 2280

gaatctgaga gaggagtatt cagaactggt ttcacaccga aggactagt tggaaacctgc 2340

agccgattcc tggtttttca tctctttcaa tcggggaggc aa 2382

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

cgctgagca acgcggcggg catccgcaag 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cttgcgatg cccgccgct tgcctaggcg 30

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gactacagat ctcatcatca tcatcatcat gagctcaagc aggaattc 48

<210> 9

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gaattcctgc ttgagctcat gatgatgatg atgatgagat ctgtagtc

48

<210> 10

<211> 571

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Arg Arg Ala Ala Met Tyr Glu Glu Gly Pro Pro Pro Ser Tyr Glu

1 5 10 15

Ser Val Val Ser Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala Leu Gly Ser Pro Phe

20 25 30

Asp Ala Pro Leu Asp Pro Pro Phe Val Pro Pro Arg Tyr Leu Arg Pro

35 40 45

Thr Gly Gly Arg Asn Ser Ile Arg Tyr Ser Glu Leu Ala Pro Leu Phe

50 55 60

Asp Thr Thr Arg Val Tyr Leu Val Asp Asn Lys Ser Thr Asp Val Ala

65 70 75 80

Ser Leu Asn Tyr Gln Asn Asp His Ser Asn Phe Leu Thr Thr Val Ile

85 90 95

Gln Asn Asn Asp Tyr Ser Pro Gly Glu Ala Ser Thr Gln Thr Ile Asn

100 105 110

Leu Asp Asp Arg Ser His Trp Gly Gly Asp Leu Lys Thr Ile Leu His

115 120 125

Thr Asn Met Pro Asn Val Asn Glu Phe Met Phe Thr Asn Lys Phe Lys

130 135 140

Ala Arg Val Met Val Ser Arg Leu Pro Thr Lys Asp Asn Gln Val Glu

145 150 155 160

Leu Lys Tyr Glu Trp Val Glu Phe Thr Leu Pro Glu Gly Asn Tyr Ser

165 170 175

Glu Thr Met Thr Ile Asp Leu Met Asn Asn Ala Ile Val Glu His Tyr

180 185 190

Leu Lys Val Gly Arg Gln Asn Gly Val Leu Glu Ser Asp Ile Gly Val

195 200 205
 Lys Phe Asp Thr Arg Asn Phe Arg Leu Gly Phe Asp Pro Val Thr Gly
 210 215 220

 Leu Val Met Pro Gly Val Tyr Thr Asn Glu Ala Phe His Pro Asp Ile
 225 230 235 240
 Ile Leu Leu Pro Gly Cys Gly Val Asp Phe Thr His Ser Arg Leu Ser
 245 250 255
 Asn Leu Leu Gly Ile Arg Lys Arg Gln Pro Phe Gln Glu Gly Phe Arg
 260 265 270
 Ile Thr Tyr Asp Asp Leu Glu Gly Gly Asn Ile Pro Ala Leu Leu Asp
 275 280 285

 Val Asp Ala Tyr Gln Ala Ser Leu Lys Asp Asp Thr Glu Gln Gly Gly
 290 295 300
 Gly Gly Ala Gly Gly Ser Asn Ser Ser Gly Ser Gly Ala Glu Glu Asn
 305 310 315 320
 Ser Asn Ala Ala Ala Ala Ala Met Gln Pro Val Glu Asp Met Asn Asp
 325 330 335
 His Ala Ile Arg Gly Asp Thr Phe Ala Thr Arg Ala Glu Glu Lys Arg
 340 345 350

 Ala Glu Ala Glu Ala Ala Ala Glu Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gln Pro
 355 360 365
 Glu Val Glu Lys Pro Gln Lys Lys Pro Val Ile Lys Pro Leu Thr Glu
 370 375 380
 Asp Ser Lys Lys Arg Ser Tyr Asn Leu Ile Ser Asn Asp Ser Thr Phe
 385 390 395 400
 Thr Gln Tyr Arg Ser Trp Tyr Leu Ala Tyr Asn Tyr Gly Asp Pro Gln
 405 410 415

 Thr Gly Ile Arg Ser Trp Thr Leu Leu Cys Thr Pro Asp Val Thr Cys
 420 425 430
 Gly Ser Glu Gln Val Tyr Trp Ser Leu Pro Asp Met Met Gln Asp Pro
 435 440 445

Val Thr Phe Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Asn Phe Pro Val Val Gly
450 455 460

Ala Glu Leu Leu Pro Val His Ser Lys Ser Phe Tyr Asn Asp Gln Ala
465 470 475 480

Val Tyr Ser Gln Leu Ile Arg Gln Phe Thr Ser Leu Thr His Val Phe
485 490 495

Asn Arg Phe Pro Glu Asn Gln Ile Leu Ala Arg Pro Pro Ala Pro Thr
500 505 510

Ile Thr Thr Val Ser Glu Asn Val Pro Ala Leu Thr Asp His Gly Thr
515 520 525

Leu Pro Leu Arg Asn Ser Ile Gly Gly Val Gln Arg Val Thr Ile Thr
530 535 540

Asp Ala Arg Arg Arg Thr Cys Pro Tyr Val Tyr Lys Ala Leu Gly Ile
545 550 555 560

Val Ser Pro Arg Val Leu Ser Ser Arg Thr Phe
565 570

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5 10

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atcgaaggat ccatgcggcg cgcggcgatg tat

33

<210> 13

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr Leu Asn Gly

1 5 10 15

Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr Leu Tyr Lys

20 25 30

Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu Ile Val Leu

35 40 45

Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile Arg Glu Val

50 55 60

Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr Leu Pro Leu

65 70 75 80

Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp Gly Lys Phe

85 90 95

Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser His Ala Leu

100 105 110

Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser Gly Gly Val

115 120 125

Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr Ile Asp Trp

130 135 140

Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val Lys Asp Asn

145 150 155 160

Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly Arg Cys Trp

165 170 175

Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr Ile Cys Ala

180 185 190

Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn Gln Cys Cys

195 200 205

His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln

210 215 220

<210> 14

<211> 220

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 14

Ser Glu Met Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr Leu Asn Gly

1 5 10 15

Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Asp Asn Gln Tyr Gln Thr Leu Tyr Lys

20 25 30

Leu Tyr Glu Lys Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu Ile Val Leu

35 40 45

Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile Arg Glu Val

50 55 60

Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Val Leu Pro Leu

65 70 75 80

Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp Gly Lys Phe

85 90 95

Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser His Ala Leu

100 105 110

Arg Gln Leu Arg Phe Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Leu Gly Gly Val

115 120 125

Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr Ile Asp Trp

130 135 140

Arg Asp Ile Val Arg Val Pro Asp Ala Glu Ile Val Val Lys Asn Asn

145 150 155 160

Gly Gly Asn Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly Arg Cys Trp

165 170 175

Gly Pro Gly Pro Glu Asp Cys Gln Ile Leu Thr Lys Thr Ile Cys Ala

180 185 190

Pro Gln Cys Asn Gly Arg Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn Gln Cys Cys

195 200 205

His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln

210 215 220