



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0107152
 (43) 공개일자 2007년11월06일

(51) Int. Cl.

A61K 38/04(2006.01) A61K 48/00(2006.01)
 A61P 35/00(2006.01)

- (21) 출원번호 10-2007-7021855
- (22) 출원일자 2007년09월21일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2007년09월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2006/007013
 국제출원일자 2006년02월27일
- (87) 국제공개번호 WO 2006/091965
 국제공개일자 2006년08월31일
- (30) 우선권주장
 60/656,175 2005년02월25일 미국(US)
 60/752,794 2005년12월22일 미국(US)

(71) 출원인

더 스크립스 리서치 인스티튜트

미국 캘리포니아주 92037 라 줄라 노스 토리 파
 인 로드 10550

(72) 발명자

올레벳치, 리차드, 제이.

미국 92014 캘리포니아주 텔 마 쿠차라 드라이브
 1127

다 실바, 진

미국 92117 캘리포니아주 샌디에고 유닛 #3 카울
 리 3156

한, 지아후아이

미국 92129 캘리포니아주 샌디에고 피펠로 스트리
 트 9213

(74) 대리인

양영준, 양영환

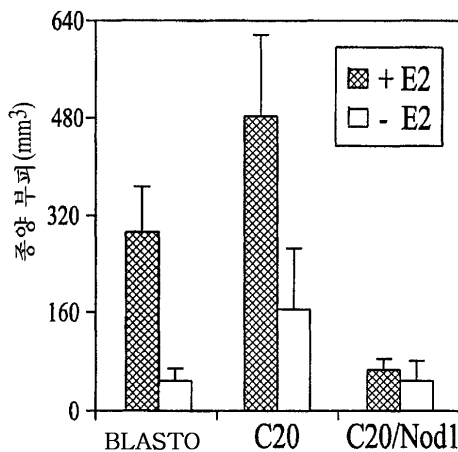
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 항종양제로서의 NOD1

(57) 요약

본 발명은 Nod1의 발현 및/또는 NOD1의 활성을 증가시키는 것을 수반하는, 종양 치료를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

대표도 - 도11B



특허청구의 범위

청구항 1

담체, 및 치료적 유효량의 D-Ala-L-Glu-디아미노피델산 (γ TriDAP), γ -D-글루타미-메소-디아미노피델산 (iE-DAP), γ -D-Gln-DAP (iQ-DAP), D-Ala-L-Glu-디아미노피델산 (γ TriDAP), 또는 이의 조합물을 포함하며, 여기서 치료적 유효량이 종양의 퇴행에 효과적인 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, NOD1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 절편을 포함하는 핵산을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, NOD1 폴리펩티드가 서열 1 또는 서열 3을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, NOD1 폴리펩티드를 코딩하는 절편이 서열 2를 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 핵산이 조절 요소를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 조절 요소가 프로모터, 인핸서, 전사 종결 신호, 또는 이의 조합물인 조성물.

청구항 7

제2항에 있어서, 핵산이 발현 카세트 또는 발현 벡터인 조성물.

청구항 8

제2항에 있어서, 핵산이 유전자 전달 비히클을 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 유효량의 NOD1 폴리펩티드를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 유효량의 종양 괴사 인자 α 를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 유효량의 시클로헥시미드를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 유효량의 호르몬 또는 항-호르몬을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 유효량의 RIP2 키나제 억제제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 종양 또는 암성 조직에의 국소 투여용으로 제형화된 조성물.

청구항 15

포유동물에게 Nod1 발현 또는 NOD1 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 종양 퇴

행을 촉진하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 종양이 뇌, 방광, 경부, 결장, 담낭, 신장, 간, 폐, 췌장, 난소, 전립선, 피부, 위, 또는 갑상선 종양인 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 종양이 에스트로겐-민감성 종양인 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 종양이 유방 종양인 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 작용제가 D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP), γ -D-글루타미-메소-디아미노피멜산 (iE-DAP), γ -D-Gln-DAP (iQ-DAP), D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP), 또는 이의 조합물인 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 작용제가 NOD1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 절편을 포함하는 핵산인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, NOD1 폴리펩티드가 서열 1 또는 서열 3을 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, NOD1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 절편이 서열 2를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 핵산이 조절 요소를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 조절 요소가 프로모터, 인핸서, 전사 종결 신호, 또는 이의 조합물인 방법.

청구항 25

제20항에 있어서, 핵산이 발현 카세트 또는 발현 벡터인 방법.

청구항 26

제20항에 있어서, 핵산이 유전자 전달 비히클을 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제15항에 있어서, 작용제를 NOD1 폴리펩티드인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, NOD1 폴리펩티드가 서열 1 또는 서열 3을 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제15항에 있어서, 작용제를 종양 또는 암성 조직 부위에 국소적으로 투여하는 방법.

청구항 30

제15항에 있어서, 작용제가 지속 방출용으로 제형화된 것인 방법.

청구항 31

제15항에 있어서, 작용제를 유효량의 중양 피사 인자 α 와 함께 투여하는 방법.

청구항 32

제15항에 있어서, 작용제를 유효량의 시클로헥시미드와 함께 투여하는 방법.

청구항 33

제15항에 있어서, 작용제를 RIP2 키나제 억제제와 함께 투여하는 방법.

청구항 34

제15항에 있어서, 작용제를 유효량의 호르몬 또는 항-호르몬과 함께 투여하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 호르몬이 에스트로젠인 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 항-호르몬이 항-에스트로젠인 방법.

청구항 37

제15항에 있어서, 작용제를 유효량의 화학요법 화합물과 함께 투여하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 화학요법 화합물이 알트레타민(Altretamine), 블레오마이신(Bleomycin), 부숄판(Busulphan), 칼슘 폴리네이트(Calcium Folate), 카페시타빈(Capecitabine), 카르보플라틴(Carboplatin), 카르무스틴(Carmustine), 클로람부실(Chlorambucil), 시스플라틴(Cisplatin), 클라드리빈(Cladribine), 크리산타스파스(Crisantaspase), 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 시트라빈(Cytarabine), 다카르바진(Dacarbazine), 닥티노마이신(Dactinomycin), 다우노루비신(Daunorubicin), 도세탁셀(Docetaxel), 독소루비신(Doxorubicin), 에피루비신(Epirubicin), 에토포시드(Etoposide), 플루다라빈(Fludarabine), 플루오로우라실(Fluorouracil), 겐시타빈(Gemcitabine), 히드록시우레아(Hydroxyurea), 이다루비신(Idarubicin), 이포스파미드(Ifosfamide), 이리노테칸(Irinotecan), 리포솜화 독소루비신(Liposomal doxorubicin), 로무스틴(Lomustine), 멜팔란(Melphalan), 메르캅토피린(Mercaptopurine), 메토티렉세이트(Methotrexate), 미토마이신(Mitomycin), 미톡산트론(Mitoxantrone), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(Paclitaxel), 펜토스타틴(Pentostatin), 프로카르바진(Procarbazine), 랄티트렉세드(Raltitrexed), 스트렙토조신(Streptozocin), 테가푸르-우라실(Tegafur-uracil), 테모졸로미드(Temozolomide), 티오테파(Thiotepa), 티오구아닌(Tioguanine/Thioguanine), 토폠테칸(Topotecan), 트레오수판(Treosulfan), 빈블라스틴(Vinblastine), 빈크리스틴(Vincristine), 빈데신(Vindesine), 비노렐빈(Vinorelbine), 및 이의 조합물로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 39

NOD1 활성이 결여된 단리된 $Nod1^{-/-}$ 세포주.

청구항 40

제39항에 있어서, 프로게스테론 수용체가 또한 결여된 단리된 $Nod1^{-/-}$ 세포주.

청구항 41

제39항에 있어서, MCF-7C20 세포를 포함하는 단리된 $Nod1^{-/-}$ 세포주.

청구항 42

제39항에 있어서, 재조합 Nod1 대립유전자를 추가로 포함하는 단리된 Nod1^{-/-} 세포주.

청구항 43

RIP2 효소를 테스트 작용제와 접촉시키고, 테스트 작용제가 RIP2 키나제 활성을 억제하는지 여부를 결정하는 것을 포함하며, 여기서 테스트 작용제에 의한 세포에서의 RIP2 활성의 억제는 테스트 작용제가 화학요법제라는 것을 가리키는 것인, 화학요법제의 확인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 시험관 내에서 수행되는 방법.

청구항 45

제43항에 있어서, 생체 내에서 수행되는 방법.

청구항 46

유방 종양 세포를 유효량의 D-Ala-L-Glu-디아미노피델산 (γ TriDAP)과 접촉시키는 것을 포함하는, 유방 종양 세포에서 세포자멸사를 촉진하는 방법.

청구항 47

Nod1^{-/-} 세포를 테스트 작용제와 접촉시키고, 테스트 작용제가 세포의 세포자멸사를 증가시키는지 여부를 결정하는 것을 포함하는, 세포에서 세포자멸사를 증가시키는 작용제의 확인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 세포자멸사를 증가시키는 테스트 작용제가 화학요법제로서 유용한 것인 방법.

명세서

<1> 본 출원은 미국 특허 가출원 일련 번호 60/656,175 (2005년 2월 25일 출원), 및 미국 특허 가출원 일련 번호 60/752,794 (2005년 12월 22일 출원)을 우선권으로 청구하고, 이들의 내용은 거명에 의해 본원에 포함된다.

<2> **정부 지원**

<3> 본원에 기술된 발명은 미국 국립 보건원(National Institutes of Health)에서 허가 번호 AI15136 하에 수여된 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 출원에 특정 권리를 갖는다.

기술 분야

<4> 본 발명은 Nod1 및 형질전환된 악성 세포의 세포자멸사에서의 이의 기능에 관한 것이다.

배경 기술

<5> 암은 많은 사람을 괴롭히고 인간 및 비-인간 동물에서 사망의 주요 원인인 질환이다. 전형적으로 암은 소수의 세포의 제어되지 않은 분할을 수반하고, 이어서 다수의 새로운 세포가 생성된다. 따라서, 다수의 항암 약물은 세포 성장을 억제하거나 정지시키는 작용제이다. 이같은 화학요법제들이 신생물성 질환이 있는 환자의 생존율을 개선시켰지만, 다수의 화학요법제들과 관련된 심각한 부작용이 화학요법제의 사용을 제한하고, 암으로 이미 약화된 환자의 건강을 손상시킨다. 따라서 암 세포에 대한 증강된 선택성을 나타내거나 종양세포의 증식을 제어할 수 있는 새로운 작용제가 요구된다.

<6> 다수의 항암제의 한 주요 문제점은 이들의 특이성이다. 항암 약물은 암성인 세포와 암성이 아닌 세포를 구별할 필요가 있다. 그러나, 대부분의 항암 약물은 이와 관련하여 무차별적이다. 전형적으로, 항암제에는 음성 혈액학적 효과 (예를 들어, 유사분열의 중지, 및 골수 및 림프 조직에서의 유형 성분의 붕괴), 및 면역억제성 작용 (예를 들어, 저하된 세포수)이 있고, 또한 상피 조직 (예를 들어, 장관 점막), 생식 조직 (예를 들어, 정자발생의 손상), 및 신경계에 대한 심각한 영향이 있을 수 있다. 예를 들어, [P. Calabresi and B. A. Chabner, In: Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Pergamon Press, 8th Edition) (pp. 1209-

1216)] 참조.

<7> 선택된 종양 유형, 또는 바람직하게는 광범위한 종양 유형을 유익하게 치료할 수 있고, 침습성 종양에 특히 적절한 항암제가 요구된다. 또한, 이같은 항암제는 효과적이어야 하면서, 또한 독성이 거의 없거나 없어야 한다.

<8> **발명의 개요**

<9> 본 발명은 Nod1 발현 또는 NOD1 활성을 증가시키는 것을 수반하는, 종양 세포에서의 세포자멸사를 촉진하는 조성물 및 방법을 제공한다.

<10> 따라서, 본 발명의 한 양상은 Nod1 발현 또는 NOD1 활성을 증가시키는 작용제를 포유동물에게 투여하는 것을 수반하는, 포유동물에서 종양 퇴행을 촉진하는 방법이다. 본 발명의 방법으로 치료될 수 있는 종양의 예로는 뇌, 방광, 경부, 결장, 담낭, 신장, 간, 폐, 췌장, 난소, 전립선, 피부, 위, 또는 갑상선 종양이 포함된다. 일부 실시양태에서, 종양은 에스트로겐-민감성 종양 또는 유방 종양이다.

<11> NOD1 활성을 증가시키는 작용제의 예로는 하기의 서열을 갖는 펩티드들이 포함된다: D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP), γ -D-글루타미-메소-디아미노피멜산 (iE-DAP), γ -D-Gln-DAP (iQ-DAP), D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP), 및 이의 조합물. 이러한 펩티드들은 NOD1 단백질을 활성화시킬 수 있고, 따라서 세포자멸사에 이르는 Nod1-의존적 경로를 활성화시킬 수 있다. NOD1 활성을 증가시킬 수 있는 작용제의 또다른 예는 NOD1 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, NOD1 폴리펩티드는 인간 NOD1 폴리펩티드, 예를 들어, 서열 1 또는 서열 3의 인간 NOD1 폴리펩티드이다.

<12> Nod1 발현을 증가시킬 수 있는 작용제의 한 예는 NOD1 폴리펩티드를 코딩하는 절편을 포함하는 핵산이다. NOD1 폴리펩티드에 대한 서열의 예로는 서열 1 또는 서열 3이 포함된다. NOD1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 절편의 한 예는 서열 2를 포함한다. 핵산은 조절 요소, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 전사 종결 신호, 또는 이의 조합물을 추가로 포함할 수 있다. 핵산은 발현 카세트 또는 발현 벡터 또는 유전자 전달 비히클의 일부일 수 있다.

<13> 추가적인 활성 성분이 Nod1 발현 또는 NOD1 활성을 증가시키는 작용제와 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 유효량의 종양 괴사 인자 α 가 이같은 작용제와 함께 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 괴사 인자 α 는 Nod-의존성 세포자멸사 경로를 증강시킬 수 있다. 또한, 유효량의 시클로헥시미드가 Nod1 발현 또는 NOD1 활성을 증가시키는 작용제와 함께 투여될 수 있다. 또한, 1가지 이상의 화학요법 화합물이 작용제와 함께 투여될 수 있다.

<14> 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용될 수 있는 화학요법 화합물의 예로는 알트레타민(Altretamine), 블레오마이신(Bleomycin), 부숄판(Busulphan), 칼슘 폴리네이트(Calcium Folate), 카페시타빈(Capecitabine), 카르보플라틴(Carboplatin), 카르무스틴(Carmustine), 클로람부실(Chlorambucil), 시스플라틴(Cisplatin), 클라드리빈(Cladribine), 크리산타스파스(Crisantaspase), 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 시트라빈(Cytarabine), 다카르바진(Dacarbazine), 닥티노마이신(Dactinomycin), 다우노루비신(Daunorubicin), 도세탁셀(Docetaxel), 독소루비신(Doxorubicin), 에피루비신(Epirubicin), 에토포시드(Etoposide), 플루다라빈(Fludarabine), 플루오로우라실(Fluorouracil), 겐시타빈(Gemcitabine), 히드록시우레아(Hydroxyurea), 이다루비신(Idarubicin), 이포스파미드(Ifosfamide), 이리노테칸(Irinotecan), 리포솜형 독소루비신, 로무스틴(Lomustine), 멜팔란(Melphalan), 메르캅토피린(Mercaptopurine), 메토티렉세이트(Methotrexate), 미토마이신(Mitomycin), 미토산트론(Mitoxantrone), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(Paclitaxel), 펜토스타틴(Pentostatin), 프로카르바진(Procarbazine), 랄티트렉세드(Raltitrexed), 스트렙토조신(Streptozocin), 테가푸르-우라실(Tegafur-uracil), 테모졸로미드(Temozolomide), 티오테파(Thiotepa), 티오구아닌(Tioguanine/Thioguanine), 토폠테칸(Topotecan), 트레오숄판(Treosulfan), 빈블라스틴(Vinblastine), 빈크리스틴(Vincristine), 빈데신(Vindesine), 비노렐빈(Vinorelbine), 및 이의 조합물이 포함된다.

<15> 작용제는 종양 부위에 국소적으로 투여될 수 있고/있거나 지속 방출용으로 제형화될 수 있다.

<16> 본 발명의 또다른 양상은 담체, NOD1 폴리펩티드를 코딩하는 절편을 포함하는 핵산, 및 유효량의 D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP), γ -D-글루타미-메소-디아미노피멜산 (iE-DAP), γ -D-Gln-DAP (iQ-DAP), 또는 D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP)을 포함하고, 종양에의 국소 투여용으로 제형화된 조성물이다. NOD1 폴리펩티드는, 예를 들어, 서열 1 또는 서열 3을 포함할 수 있다. NOD1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 절편의 예는 서열 2이다. 조성물에서 사용된 핵산은 조절 요소, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 전사 종결 신호, 또는 이의 조합물을 포함할 수 있다. 핵산은 발현 카세트 또는 발현 벡터일 수 있다. 핵산은 유전자 전달 비히클을

포함한다. 본 발명의 조성물은 기타 활성 성분, 예를 들어, 유효량의 중양 피사 인자 α 또는 화학요법 화합물을 또한 포함할 수 있다. 조성물은 중양 부위에의 국소 투여용으로 제형화될 수 있고/있거나 지속 방출용으로 제형화될 수 있다.

<17> 본 발명의 또다른 양상은 유방 종양 세포를 유효량의 D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP)과 접촉시키는 것을 포함하는, 유방 종양 세포에서 세포자멸사를 촉진하는 방법이다.

<18> 본 발명의 또다른 양상은 유방 종양 세포를 유효량의 D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP)과 접촉시키는 것을 포함하는, 에스트로겐-민감성 종양 세포에서 세포자멸사를 촉진하는 방법이다.

발명의 상세한 설명

<32> 본 발명에 따르면, 증가된 Nod1 발현 또는 NOD1 활성은 중양 퇴행에 이른다. 따라서, 본 발명은 NOD1 폴리펩티드, Nod1 핵산, 및 Nod1 발현 또는 NOD1 활성을 증가시키는 작용제를 항-중양 치료로서 대상에게 투여하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, Nod1 발현 또는 활성을 증가시키는 작용제에는 NOD1의 펩티드 활성화제 예컨대 γ -D-글루타미-메소-디아미노피멜산 (iE-DAP), γ -D-Gln-DAP (iQ-DAP), D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP), 및 이의 조합물이 포함된다. 본 발명에서 임의 유형의 중양의 치료가 구현되지만, 본 발명의 조성물 및 방법은 에스트로겐-민감성 종양 및/또는 유방암 종양의 치료에 특히 유용할 수 있다.

<33> **NOD1**

<34> 선천성 면역계는 미생물, 바이러스, 비정상/손상 숙주 세포 등의 성분을 인식하고 침입 생물을 제거하고 죽이거나 또는 비전형적인 숙주 세포를 제거하는 숙주 응답을 개시시키는 수용체의 족들로 구성된다. 최근, Nod/모충 족으로 공지된 일족의 세포내 세포질 단백질이 선천성 면역 응답에 연결되었다. 이러한 족의 모든 구성원은 2개의 보존된 도메인을 갖는다; 뉴클레오티드-결합 올리고머화 도메인 (NBD/NOD) 및 카르복실-말단 류신-풍부 반복 (LRR) 영역. 이펙터(effector) 도메인으로 명명된, 족 구성원의 아미노-말단 영역은 카스파제 점증 도메인 (CARD), 피린, BIR 및 기타 도메인을 포함하는 가변성 구조를 함유한다.

<35> Nod/모충 족의 2가지 구성원이 감염에 대한 선천성 면역 응답에 특히 연결되었다. 이러한 구성원들은 NOD1 (CARD4) 및 NOD2 (CARD 15)로 공지되어 있다. NOD1 및 NOD2의 이펙터 도메인은 각각 1개 및 2개의 CARD 도메인으로 구성된다. NOD1 및 NOD2은 박테리아성 지질다당류 (LPS)에 대한 수용체로서 작용하는 세포내 단백질인 것으로 최초로 제안되었다. 이어서, NOD 리간드가 박테리아성 펩티도글리칸 (PGN)으로부터 유도되고, LPS로부터 유도되지 않는다는 것이 발견되었다. 따라서, NOD1 및 NOD2는 감염 동안 박테리아 또는 박테리아 생성물의 세포내 센서로서 기능할 것이다. 그러나, 현재까지 수행된 연구는 NOD1 또는 NOD2가 결핍된 마우스가 감염에 대한 증가된 민감성 또는 면역결핍과 관련된 명백한 표현형을 나타내지 않는다는 것을 가리킨다.

<36> NOD1 및 NOD/모충 족의 다른 구성원에 대한 핵산 및 아미노산 서열을 당업계에서, 예를 들어, NCBI 데이터베이스에서 확인할 수 있다. ncbi.nlm.nih.gov의 웹사이트 참조. 예를 들어, 인간 NOD1에 대한 한 아미노산 서열이 용이한 참조를 위해 하기에 서열 1로서 제공된다 (NCBI 접속 번호 Q9Y239; gi: 20137579).

```

1 MEEQGHSEME IIPSESHPHI QLLKSNRELL VTHIRNTQCL
41 VDNLLKNDYF SAEDAEIVCA CPTQPKVVRK ILDLVQSKGE
81 EVSEFFLYLL QQLADAYVDL RPWLLLEIGFS PSLLTQSKVV
121 VNTDPVSRYT QQLRHHLGRD SKFVLCYAQK EELLLEEIYM
161 DTIMELVGFS NESLGSLSNSL ACLLDHTTGI LNEQGETIFI
201 LGDAGVGKSM LLQRLQSLWA TGRLDAGVKF FFHFRCRMFS
241 CFKESDRLCL QDLLFKHYCY PERDPEEVFA FLLRFPHVAL
281 FTFDGLDELH SLDLRSRVPD SSCPWEPAPL LVLNLANLLSG
321 KLLKGASKLL TARTGIEVPR QFLRKKVLLR GFSPSHLRAY
361 ARRMFPERAL QDRLLSQLEA NPNLCSLCSV PLFCWIIIFRC
401 FQHFRAAFEG SPQLPDCTMT LTDVFLLVTE VHLNRMQPSS
441 LVQRNTRSPV ETLHAGRDTL CSLGQVAHRG MEKSLFVFTQ
481 EEVQASGLQE RDMQLGFLRA LPELPGGDQ QSYEFFHLTL
521 QAFFTAFFLV LDDRVTQEL LRFFQEWMP AGAATTSCYP
561 PFLPFQCLQG SGPAREDLFK NKDHFQFTNL FLCGLLSKAK
601 QKLLRHLVPA AALRRKRKAL WAHLFSSLRG YLKS LPRVQV
641 ESNQVQAMP TFIWMLRCIY ETQSQKVGQL AARGICANYL
681 KLTTCNACSA DCSALSFVLH HFPKRLALDL DNNNLNDYGV
721 RELQPCFSRL TVLRLSVNQI TDGGVKVLSE ELTKYKIVTY
761 LGLYNNQITD VGARYVTKIL DECKGLTHLK LGKNKITSEG
801 GKYLALAVKN SKSISEVGMW GNQVGDEGAK AFAEALRNHP
841 SLTTLASLASN GISTEGGKSL ARALQQNTSL EILWLTQNEL
881 NDEVAESLAE MLKVNQTLKH LWLIQNQITA KGTAQLADAL
921 QSNTGITEIC LNGNLIKPEE AKVYEDEKRI ICF

```

<37>

<38>

인간 Nod1에 대한 뉴클레오티드 서열이 또한 NCBI 접속 번호 BC040339 (gi: 25955660)로 입수가능하고, 용이한 참조를 위해 하기에 서열 2로 복사된다.

```

1 CCCGGCCCCG GCGTCCCCGG ACCATGGCGC TCTCCGGGCT
41 CTTCTCTAGC TCTCAGCGGC TGCGAAGTCT GTAAACCTGG
81 TGGCCAAGTG ATTGTAAGTC AGGAGACTTT CCTTCGGTTT
121 CTGCCTTTGA TGGCAAGAGG TGGAGATTGT GCGGCGGATT
161 ACAGAAAACG TCTGGGAAGA CAAGTTGCTG TTTTATGGG
201 AATCGCAGGC TTGGAAGAGA CAGAAGCAAT TCCAGAAATA

```

<39>

241 AATTGGAAAT TGAAGATTTA AACAAATGTTG TTTTAAAACA
 281 TTCTAACTTC AAAGAATGAT GCCAGAACT TAAAAAGGGG
 321 CTGCGCAGAG TAGCAGGGGC CCTGGAGGGC GCGGCCTGAA
 361 TCCTGATTGC CCTTCTGCTG AGAGGACACA CGCAGCTGAA
 401 GATGAATTTG GGAAAAGTAG CCGCTTGCTA CTTTAACTAT
 441 GGAAGAGCAG GGCCACAGTG AGATGGAAAT AATCCCATCA
 481 GAGTCTCACC CCCACATTCA ATTACTGAAA AGCAATCGGG
 521 AACTTCTGGT CACTCACATC CGCAATACTC AGTGTCTGGT
 561 GGACAACTTG CTGAAGAATG ACTACTTCTC GGCCGAAGAT
 601 GCGGAGATTG TGTGTGCCTG CCCCACCCAG CCTGACAAGG
 641 TCCGAAAAT TCTGGACCTG GTACAGAGCA AGGGCGAGGA
 681 GGTGTCCGAG TTCTTCTCT ACTTGCTCCA GCAACTCGCA
 721 GATGCCTACG TGGACCTCAG GCCTTGGCTG CTGGAGATCG
 761 GCTTCTCCCC TTCCCTGCTC ACTCAGAGCA AAGTCGTGGT
 801 CAACACTGAC CCAGTGAGCA GGTATACCCA GCAGCTGCGA
 841 CACCATCTGG GCCGTGACTC CAAGTTCGTG CTGTGCTATG
 881 CCCAGAAGGA GGAGCTGCTG CTGGAGGAGA TCTACATGGA
 921 CACCATCATG GAGCTGGTTG GCTTCAGCAA TGAGAGCCTG
 961 GGCAGCCTGA ACAGCCTGGC CTGCCTCCTG GACCACACCA
 1001 CCGGCATCCT CAATGAGCAG GGTGAGACCA TCTTCATCCT
 1041 GGGTGATGCT GGGGTGGGCA AGTCCATGCT GCTACAGCGG
 1081 CTGCAGAGCC TCTGGGCCAC GGGCCGGCTA GACGCAGGGG
 1121 TCAAATTCTT CTTCCACTTT CGCTGCCGCA TGTTCAGCTG
 1161 CTTCAAGGAA AGTGACAGGC TGTGTCTGCA GGACCTGCTC
 1201 TTCAAGCACT ACTGCTACCC AGAGCGGGAC CCCGAGGAGG
 1241 TGTTTGCCTT CCTGCTGCGC TTCCCCACG TGGCCCTCTT
 1281 CACCTTCGAT GGCCTGGACG AGCTGCACTC GGACTTGGAC
 1321 CTGAGCCGTG TGCCTGACAG CTCCTGCCCC TGGGAGCCTG
 1361 CCCACCCCTT GGTCTTGCTG GCCAACCTGC TCAGTGGGAA
 1401 GCTGCTCAAG GGGGCTAGCA AGCTGCTCAC AGCCCGCACA
 1441 GGCATCGAGG TCCCGGCCA GTTCTGCGG AAGAAGGTGC
 1481 TTCTCCGGGG CTCTCTCCCC AGCCACCTGC GCGCCTATGC
 1521 CAGGAGGATG TTCCCGAGC GGGCCCTGCA GGACCGCCTG
 1561 CTGAGCCAGC TGGAGGCCAA CCCCACCTC TGCAGCCTGT

1601 GCTCTGTGCC CCTCTTCTGC TGGATCATCT TCCGGTGCTT
 1641 CCAGCACTTC CGTGCTGCCT TTGAAGGCTC ACCACAGCTG
 1681 CCCGACTGCA CGATGACCCT GACAGATGTC TTCCTCCTGG
 1721 TCACTGAGGT CCATCTGAAC AGGATGCAGC CCAGCAGCCT
 1761 GGTGCAGCGG AACACACACA GCCCAGTGGA GACCCTCCAC
 1801 GCCGGCCGGG ACACTCTGTG CTCGCTGGGG CAGGTGGCCC
 1841 ACCGGGGCAT GGAGAAGAGC CTCTTTGTCT TCACCCAGGA
 1881 GGAGGTGCAG GCCTCCGGGC TGCAGGAGAG AGACATGCAG
 1921 CTGGGCTTCC TCGGGGCTTT GCCGGAGCTG GGCCCCGGGG
 1961 GTGACCAGCA GTCCTATGAG TTTTCCACC TCACCCTCCA
 2001 GGCCTTCTTT ACAGCCTTCT TCCTCGTGCT GGACGACAGG
 2041 GTGGGCACTC AGGAGCTGCT CAGGTTCTTC CAGGAGTGGA
 2081 TGCCCCCTGC GGGGGCAGCG ACCACGTCTT GCTATCCTCC
 2121 CTTCTCCCG TTCCAGTGCC TGCAGGGCAG TGGTCCGGCG
 2161 CGGGAAGACC TCTTCAAGAA CAAGGATCAC TTCCAGTTCA
 2201 CCAACCTCTT CCTGTGCGGG CTGTTGTCCA AAGCCAAACA
 2241 GAAACTCCTG CGGCATCTGG TGCCCGGGC AGCCCTGAGG
 2281 AGAAAGCGCA AGGCCCTGTG GGCACACCTG TTTTCCAGCC
 2321 TGCGGGGCTA CCTGAAGAGC CTGCCCGCG TTCAGGTCTGA
 2361 AAGCTTCAAC CAGGTGCAGG CCATGCCAC GTTCATCTGG
 2401 ATGCTGCGCT GCATCTACGA GACACAGAGC CAGAAGGTGG
 2441 GGCAGCTGGC GGCCAGGGGC ATCTGCGCCA ACTACCTCAA
 2481 GCTGACCTAC TGCAACGCCT GCTCGGCCGA CTGCAGCGCC
 2521 CTCTCCTTCG TCCTGCATCA CTTCCCAAG CGGCTGGCCC
 2561 TAGACCTAGA CAACAACAAT CTCAACGACT ACGGCGTGCG
 2601 GGAGCTGCAG CCCTGCTTCA GCCGCCTCAC TGTTCCTCAGA
 2641 CTCAGCGTAA ACCAGATCAC TGACGGTGGG GTAAAGGTGC
 2681 TAAGCGAAGA GCTGACCAA TACAAAATTG TGACCTATTT
 2721 GGGTTTATAC AACAACCAGA TCACCGATGT CGGAGCCAGG
 2761 TACGTCACCA AAATCCTGGA TGAATGCAA GGCCTCACGC
 2801 ATCTTAAACT GGGAAAAAAC AAAATAACAA GTGAAGGAGG
 2841 GAAGTATCTC GCCCTGGCTG TGAAGAACAG CAAATCAATC
 2881 TCTGAGGTTG GGATGTGGGG CAATCAAGTT GGGGATGAAG
 2921 GAGCAAAAAGC CTTGCGAGAG GCTCTGCGGA ACCACCCAG

<41>

2961 CTTGACCACC CTGAGTCTTG CGTCCAACGG CATCTCCACA
 3001 GAAGGAGGAA AGAGCCTTGC GAGGGCCCTG CAGCAGAACA
 3041 CGTCTCTAGA AATACTGTGG CTGACCCAAA ATGAACTCAA
 3081 CGATGAAAGTG GCAGAGAGTT TGGCAGAAAT GTTCAAAGTC
 3121 AACCAGACGT TAAAGCATTT ATGGCTTATC CAGAATCAGA
 3161 TCACAGCTAA GGGGACTGCC CAGCTGGCAG ATGCGTTACA
 3201 GAGCAACACT GGCATAACAG AGATTTGCCT AAATGGAAAC
 3241 CTGATAAAAC CAGAGGAGGC CAAAGTCTAT GAAGATGAGA
 3281 AGCGGATTAT CTGTTTCTGA GAGGATGCTT TCCTGTTTAT
 3321 GGGGTTTTTG CCCTGGAGCC TCAGCAGCAA ATGCCACTCT
 3361 GGGCAGTCTT TTGTGTCAGT GTCTTAAAGG GGCCTGCGCA
 3401 GGCGGGACTA TCAGGAGTCC ACTGCCTCCA TGATGCAAGC
 3441 CAGCTTCCTG TGCAGAAGGT CTGGTCGGCA AACTCCCTAA
 3481 GTACCCGCTA CAATTCTGCA GAAAAAGAAT GTGTCTTGCG
 3521 AGCTGTTGTA GTTACAGTAA ATACACTGTG AAGAGACTTT
 3561 ATTGCCTATT ATAATTATTT TTATCTGAAG CTAGAGGAAT
 3601 AAAGCTGTGA GCAAACAGAG GAGGCCAGCC TCACCTCATT
 3641 CCAACACCTG CCATAGGGAC CAACGGGAGC GAGTTGGTCA
 3681 CCGCTCTTTT CATTGAAGAG TTGAGGATGT GGCACAAAGT
 3721 TGGTGCCAAG CTTCTTGAAT AAAACGTGTT TGATGGATTA
 3761 GTATTATACC TGAAATATTT TCTTCCTTCT CAGCACTTTC
 3801 CCATGTATTG ATACTGGTCC CACTTCACAG CTGGAGACAC
 3841 CGGAGTATGT GCAGTGTGGG ATTTGACTCC TCCAAGGTTT
 3881 TGTGGAAAGT TAATGTCAAG GAAAGGATGC ACCACGGGCT
 3921 TTTAATTTTA ATCCTGGAGT CTCACTGTCT GCTGGCAAAG
 3961 ATAGAGAATG CCCTCAGCTC TTAGCTGGTC TAAGAATGAC
 4001 GATGCCTTCA AAATGCTGCT TCCACTCAGG GCTTCTCCTC
 4041 TGCTAGGCTA CCCTCCTCTA GAAGGCTGAG TACCATGGGC
 4081 TACAGTGTCT GGCCTTGGGA AGAAGTGATT CTGTCCCTCC
 4121 AAAGAAATAG GGCATGGCTT GCCCCTGTGG CCCTGGCATC
 4161 CAAATGGCTG CTTTTGTCTC CTTACCTCG TGAAGAGGGG
 4201 AAGTCTCTTC CTGCCTCCCA AGCAGCTGAA GGGTFACTAA
 4241 ACGGGCGCCA AGACTCAGGG GATCGGCTGG GAACTGGGCC
 4281 AGCAGAGCAT GTTGGACACC CCCACCATG GTGGGCTTGT

<42>

4321 GGTGGCTGCT CCATGAGGGT GGGGGTGATA CTACTAGATC
 4361 ACTTGTCCTC TTGCCAGCTC ATTTGTTAAT AAAATACTGA
 4401 AAACACTAAA AAAAAAAAAA AA

<43>

<44>

NOD1 단백질은 박테리아 인식에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고, 세포내 구획에서 특정 숙주 패턴 인식 수용체로서 기능할 수 있다. 최근의 연구는 NOD1가 디아미노피멜산을 함유하는 박테리아 펩티도글리칸의 숙주 인식에 필수적이라는 것을 나타냈다 ([Chamaillard et al., Nature Immunology, DOI:10.1038/ni945, June 8, 2003]). NOD1에 의해 인식되는 코어(core) 구조는 디펩티드인 γ -D-글루타밀-메소-디아미노피멜산 (iE-DAP로 또한 지칭됨)이다. 이러한 디펩티드는 제한된 숫자의 박테리아 (대장균 및 여러 그람-양성 박테리아, 예컨대 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*))에만 존재

하는 것으로 공지되어 있다.

<45> 본 발명가들은 NOD1이 세포를 TNF α-유도 세포자멸사에 대해 감작시키고, NOD1-특이적 리간드가 임의의 다른 공지된 세포자멸사 촉발제의 부재 하에서 종양 세포에서의 세포자멸사를 유도한다는 것을 발견하였다. 동물 모델을 사용한 생체내 연구는 NOD1이 종양 퇴행에서 갖는 역할을 설명하였고 이를 강조하였다. 특히, 본원에서 나타난 바와 같이, SCID 마우스에 놓인 MCF-7 유방 종양 세포의 이중이식편은 전형적으로 종양을 형성한다. 그러나, 잠시 후에, 항-종양 치료 없이도, 이러한 종양이 전형적으로 퇴행된다. 그러나, Nod1^{-/-} MCF-7 종양 세포가 마우스 내로 이식되면, 종양이 퇴행되지 않고, 대신 계속 성장한다 (도 10 참조). NOD1 기능이 Nod1^{-/-} MCF-7 종양 세포에 다시 첨가되면 (적합한 유전자 구축물의 형질감염에 의해), 이러한 NOD1-발현 세포를 이식함으로써 생성된 종양이 퇴행될 것이다. 따라서, NOD1 발현이 종양 세포 성장을 제어하는 것을 도울 수 있고, 종양 세포의 세포자멸사에 이를 수 있다.

<46> 본 발명은 세포자멸사 활성이 유지된 NOD1 돌연변이체 (V41Q) 폴리펩티드를 또한 제공한다. 이러한 V41Q 돌연변이체 NOD1 폴리펩티드가 하기에 서열 3으로 제공되고, V41Q 돌연변이는 진하게 밑줄로 표시된다.

```

1 MEEQGHSEME IIPSESHPHI QLLKSNRELL VTHIRNTQCL
41 QDNLLKNDYF SAEDAEIVCA CPTQPKVRK ILDLVQSKGE
81 EVSEFFLYLL QQLADAYVDL RPWLEIGFS PSLLTQSKVV
121 VNTDPVSRYT QQLRHHLGRD SKFVLCYAQK EELLLLEEIYM
161 DTIMELVGFS NESLGSLNSL ACLLDHTTGI LNEQGETIFI
201 LGDAGVGKSM LLQRLQSLWA TGRLDAGVKF FFHFRCRMFS
241 CFKESDRCL QDLLFKHYCY PERDPEEVFA FLLRFPHVAL
281 FTFDGLDELH SLDLRSRVPD SSCPWEP AHP LVLLANLLSG
321 KLLKGASKLL TARTGIEVPR QFLRKKVLLR GFSPSHLRAY
361 ARRMFPERAL QDRLLSQLEA NPNLCSLCSV PLFCWIIIFRC
401 FQHFRAAFEG SPQLPDCTMT LTDVFLLVTE VHLNRMQPSS
441 LVQRNTRSPV ETLHAGRDTL CSLGQVAHRG MEKSLFVFTQ
481 EEVQASGLQE RDMQLGFLRA LPELGGGDQ QSYEFFHLTL
521 QAFFTAFFLV LDDRVTQEL LRFFQEWMP AGAATTSCYP
561 PFLPFQCLQG SGPAREDLFK NKDHFQFTNL FLCGLLSKAK
601 QKLLRHLVPA AALRRKRKAL WAHLFSSLRG YLKS LPRVQV
641 ESFNQVQAMP TFIWMLRCIY ETQSQKVGQL AARGICANYL
681 KLYCNACSA DCSALSFVLH HFPKRLALDL DNNNLNDYGV
721 RELQPCFSRL TVLRLSVNQI TDGGVKVLSE ELTKYKIVTY
761 LGLYNNQITD VGARYVTKIL DECKGLTHLK LGKNKITSEG
801 GKYLALAVKN SKSISEVGMW GNQVGDEGAK AFAEALRNHP
841 SLTTLASLANS GISTEGGKSL ARALQQNTSL EILWLTQNEL
881 NDEVAESLAE MLKVNQTLKH LWLIQNQITA KGTAQLADAL
921 QSNTGITEIC LNGNLIKPEE AKVYEDEKRI ICF
    
```

<47> 돌연변이 V41Q는 Nod1의 CARD 도메인에서 발생하고, 카스파제 9가 Nod1에 결합하는 것을 파괴하는 것으로 이전에 보고되었다. 그러나, V41Q 돌연변이가 Nod1-의존적 세포자멸사를 억제한다는 것을 가리키는 기존의 결과와 대조적으로, 본 발명가들에 의해 수행된 연구는 V41Q 돌연변이체 폴리펩티드가 세포자멸사 경로에서 활성이라는 것을 나타낸다 (도 4).

<48> **종양**

<49> 본 발명의 조성물 및 방법은 에스트로젠-민감성 종양, 뿐만 아니라 유방, 방광, 경부, 결장, 담낭, 신장, 간, 폐, 췌장, 난소, 전립선, 피부, 위, 갑상선 등의 종양이 포함되지만 이에 한정되지 않는 다양한 암 및 종양의 치료에서 유용하다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 방광, 뇌, 결장, 신장, 간, 폐 (소세포 폐암

포함), 식도, 담낭, 난소, 췌장, 위, 경부, 갑상선, 전립선, 및 피부 (편평세포 암종 포함)와 같은 암종; 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 림프모세포성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨(Hodgkin) 림프종, 비-호지킨 림프종, 모발상 세포 림프종 및 버켓(Burkett) 림프종이 포함되는, 림프구 계통의 조혈 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군 및 전골수구성 백혈병이 포함되는, 골수 계통의 조혈 종양; 섬유육종 및 횡문근육종이 포함되는 중간엽 기원의 종양; 별아교세포종, 신경모세포종, 신경아교종 및 신경초종이 포함되는, 중추 및 말초 신경계의 종양; 흑색종, 정상피종, 기형암종, 골육종, 색소성 건피증, 각질가시세포종, 갑상선 소포암 및 카포시 육종이 포함되는 기타 종양을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 유방 암 및 종양을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

<51> 예를 들어, NOD1 폴리펩티드, Nod1 핵산, NOD1 발현 또는 활성을 증가시킬 수 있는 작용제, 또는 이의 조합물이 종양 내로 또는 종양에 인접하게, 단독으로 또는 다른 인자 예컨대 TNF와 함께 주사되어, 종양 세포에 세포자멸사가 진행되도록 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법은 암을 치료하는데 사용될 수 있다.

<52> **NOD1 발현 및 활성의 조정**

<53> 본 발명에 따르면, 증가된 NOD1 발현 및/또는 NOD1 활성은 종양의 퇴행을 촉진한다. 따라서, 본 발명은 포유동물에게 NOD1 폴리펩티드, Nod1 핵산, NOD1 발현 및/또는 활성을 증가시키는 작용제, 또는 이의 조합물을 투여함으로써 포유동물에서 종양 성장을 치료 및 예방하는 방법을 제공한다. NOD1 발현 또는 활성을 증가시키는 작용제에는 NOD1의 전사, 번역 또는 활성을 증가시킬 수 있는 임의의 작용제가 포함된다.

<54> 따라서, NOD1 폴리펩티드 (예를 들어 서열 1), NOD1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 (예를 들어 서열 2를 포함하는 핵산)을 투여함으로써 종양 퇴행의 발생이 증가 또는 촉진될 수 있다. NOD1을 코딩하는 핵산은 용이한 조작, 발현 및 복제를 위해 발현 카세트 내에 놓일 수 있고/있거나 벡터 내에서 유지될 수 있다. NOD1을 코딩하고 NOD1 폴리펩티드를 발현할 수 있는 핵산의 생성 방법이 하기에 더욱 상세하게 기술된다.

<55> NOD1 발현 또는 활성을 증가시키는 작용제에는 NOD1 활성을 증강시키는 소형 펩티드 리간드가 포함된다. 예를 들어, γ -D-글루타미-메소-디아미노피멜산 (iE-DAP), γ -D-Gln-DAP (iQ-DAP), D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP), 및 이의 조합물이 NOD1 발현 또는 활성을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 오직 γ -D-글루타미-메소-디아미노피멜산 (iE-DAP), 또는 오직 γ -D-Gln-DAP (iQ-DAP), 또는 오직 D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP)만이 사용되거나 투여된다. 또다른 실시양태에서, γ -D-글루타미-메소-디아미노피멜산 (iE-DAP), γ -D-Gln-DAP (iQ-DAP), 및/또는 D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP)의 조합물이 사용되거나 투여된다.

<56> 본 발명은 대상의 NOD1 활성을 변화시킬 수 있는 작용제를 제공하는 단계; 및 작용제를 대상의 NOD1 활성이 변화될 수 있는 조건 하에 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상에서 NOD1 활성을 조정하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 작용제를 대상에게 투여한 결과 대상 내의 종양이 퇴행된다. 본 발명은 특정 화합물에 한정되지 않는다. 실제로, D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP)을 포함하는 펩티드, 글루타민-디아미노피멜산 디펩티드, 및 글루탐산-디아미노피멜산 디펩티드를 포함하는 펩티드 (예를 들어, iE-DAP, iQ-DAP, iE-DAP 또는 iQ-DAP의 유사체, 또는 iE-DAP 또는 iQ-DAP의 소형 분자 모방체)가 포함되지만 이에 한정되지 않는 다양한 화합물이 구현된다.

<57> **조합 치료**

<58> 본 발명에서 NOD1-촉진제와 또다른 입수가능한 항-종양 치료제의 조합물을 사용하는 조성물 및 방법이 구현된다. 통상적인 항종양제의 투여량은 종종 가능한 한 낮게 유지되는데, 더 높은 투여량에서 부작용이 관찰될 수 있기 때문이다. 본 발명에 따르면, NOD1 및/또는 NOD1 발현 또는 활성을 증가시키는 작용제와 입수가능한 항종양제의 조합물은 이러한 항종양제가 효과적인 암의 범위를 개선시킬 수 있고, 이러한 항종양제의 필요한 투여량을 감소시킬 수 있다. 따라서, 본 발명에서는 본 발명의 NOD1-관련 작용제와 1가지 이상의 항-종양 또는 제암 작용제의 조합이 구현된다. 당업자에게 입수가능한 임의의 항-종양 및 제암 작용제를 본 발명의 NOD1-관련 작용제와 함께 사용할 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 선택된 항-종양 또는 제암 작용제들은 작용 메커니즘이 상이하거나, 약간 다른 유형의 암 또는 종양에 대해 작용한다. 예를 들어, 본 발명의 NOD1-관련 작용제가 제암제 또는 면역 활성화제와 조합되어, NOD1의 세포자멸사-유발성(pro-apoptotic) 효과가 제암제의 항-신생물성 효과 및/또는 면역 활성화제에 의해 유도되는 면역유발성(pro-immune) 응답과 조합될 수 있다. 또한, 일부 경우에, 이러한 방법들에 추가적으로 방사선요법 또는 수술 치료가 수행되어, 치료 효과를 개선시킬 수 있다.

<59> 본 발명의 NOD1-관련 작용제와 함께 사용될 수 있는 화학요법제의 예로는 알트레타민, 블레오마이신, 부술판,

칼슘 폴리네이트, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 크리산타스파스, 시클로포스파미드, 시트라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 플루다라빈, 플루오로우라실, 켄시타빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 리포솜형 독소루비신, 로무스틴, 멜팔란, 메르캅토피린, 메토티렉세이트, 미토마이신, 미톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 펜토스타틴, 프로카르바진, 랄티트렉세드, 스트렙토조신, 테가푸르-우라실, 테모졸로미드, 티오테파, 티오구아닌, 토포테칸, 트레오술판, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, 및 이의 조합물이 포함된다.

<60> 일부 실시양태에서, NOD1-관련 작용제는 1가지 이상의 호르몬과 함께 투여된다. 예를 들어, NOD1-관련 작용제는 1가지 이상의 안드로젠, 프로게스테론, 에스트로젠 또는 항-에스트로젠제와 함께 투여될 수 있다. 항-에스트로젠제는 에스트로젠에 대해 응답성인 세포 또는 조직에 대해 길항 효과를 발휘함으로써, 또는 세포 표면 상에 위치하는 수용체 부위와의 접근에 대해 에스테로젠과 경쟁함으로써 작용한다. 예를 들어, 약물 타목시펜(상표명: 놀바텍스(Nolvadex)) 또는 아리미덱스(Arimidex) (아나스트로졸(Anastrozole))가 사용될 수 있는 항-에스트로젠제이다. 타목시펜은 유방암의 치료에서, 그리고 위험도가 높은 여성에서 유방암 발생을 감소시키기 위해 사용되었다. 본원에 나타난 바와 같이, 타목시펜의 첨가는 γ TriDAP-Nod1 유도 세포 사멸을 부분적으로 차단하였다. 따라서, 일부 예에서, 본 발명의 NOD1 조성물에서 타목시펜이 사용되지 않을 수 있다. 그러나, 또다른 실시양태에서, NOD1 작용제의 투여를 포함하는 치료 요법에 포함되는 경우, 타목시펜이 유용할 수 있다.

<61> 또다른 실시양태에서, 본 발명의 NOD1-관련 작용제는 종양 괴사 인자 α (TNF α)와 함께 투여된다. TNF α 는, 예를 들어, Pro-Spec Tany TechnoGene Ltd. (이스라엘)로부터 시판된다. 종양 괴사 인자의 서열을 ncbi.nlm.nih.gov의 NCBI 데이터에서 확인할 수 있다. 인간 TNF α 의 서열의 한 예가 하기에서 서열 4로 제공된다.

```

1 MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRRC LFLSLFSLI
41 VAGATTLFCL LHFVIGVIGPQR EESPRDLCLI SPLAQAVRSS
81 SRTPSDKPVA HVVANPQAEG QLQWLNRRAN ALLANGVELR
121 DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPTHV LLTHTISRIA
161 VSYQTKVNLL SAIKSPCQRE TPEGAEAKPW YEPIYLGGVF
201 QLEKGDRLSA EINRPDYLDL AESGQVYFGL IAL
    
```

<62>

<63> **세포자멸사**

<64> 본원에 기술된 바와 같이, NOD1은 종양 세포의 세포자멸사를 촉진할 수 있다. 종양 성장을 치료 또는 예방하기 위해, 당업자는 항종양제를 본원에 기술된 NOD1-관련 작용제와 조합하여 사용하는 것을 선택할 수 있다. 본 발명의 NOD1-관련 작용제와 함께 다양한 항종양제를 함유하는 조성물을 당업자에게 입수가 가능한 다양한 방식으로 테스트하여, 이러한 조성물들이 종양 퇴행 및/또는 종양 세포의 세포자멸사를 최적으로 촉진하는지 여부를 확인할 수 있다.

<65> 예를 들어, 세포자멸사 동안 생산된 DNA 단편의 3'-OH 유리 말단의 TUNEL (TdT-매개 dUTP Nick(nick)-말단 표지화) 표지화를 검출함으로써 세포자멸사를 분석할 수 있다 ([Gavrieli et al. (1992) J. Cell Biol. 119:493]). TUNEL 분석법은 180-bp (염기쌍) 올리고머 DNA 단편의 3'-OH 말단에 단편을 검출하기 위하여 색소원 시스템 또는 형광 태그(tag)에 접합된 뉴클레오티드를 촉매적으로 부가하는 것으로 일반적으로 구성된다. 180-bp 올리고머의 DNA 래더의 존재는 세포자멸사를 가리킨다. TUNEL 방법을 기초로 하는, 세포 사멸을 검출하기 위한 절차는, 예를 들어, Boehringer Mannheim (Cell Death Kit)) 및 Oncor (Apoptag Plus)로부터 시판된다.

<66> 현재 입수가 가능한 또다른 세포자멸사 마커는 상표명 APOPTEST™으로 판매되는 아넥신이다. 아넥신 마커는 "Apoptosis Detection Kit"에서 사용되고, 이러한 키트 또한, 예를 들어, R&D Systems에서 시판된다. 세포자멸사 동안, 인지질이 외부 막 상에 노출되도록 세포막의 인지질 비대칭이 변화된다. 아넥신은 칼슘의 존재 하에 인지질에 결합하는 단백질의 상동성 균이다. 아넥신을 검출하는 시약과 함께 제2의 시약인 프로피듐 요오다이드 (PI)가 사용될 수 있고, 이는 DNA 결합 형광색소이다. 세포 집단이 양쪽 시약 모두에 노출되었을 때, 세포자멸사성 세포는 아넥신에 대해 양성으로, PI에 대해 음성으로 염색되고, 괴사성 세포는 양쪽 모두에 대해 양성으로 염색되는 반면, 살아 있는 세포는 양쪽 모두에 대해 음성으로 염색된다. 세포자멸사를 테스트하는 또다른 방법들이 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다.

- <67> 동물 모델, 예를 들어, 당업자에게 입수가 가능한 임의의 동물 모델 또는 본원에 기술 및 설명된 이중이식 모델을 사용함으로써 종양 퇴행을 평가할 수 있다.
- <68> **이중이식 모델**
- <69> 본 발명은 마우스에서 종양을 형성할 수 있는 세포주를 포함하는 이중이식 모델을 또한 제공한다. 마우스에게 이러한 이중이식 세포를 접종했을 때, 종양이 나타난다. 본 발명의 이중이식 세포주는 Nod1 기능이 결여되고, 본원에서 때때로 Nod1^{-/-} 세포로 지칭된다. 놀랍게도, 무반응(null) Nod1 대립유전자와 대조적인 야생형의 존재를 제외하고는 유전 배경이 동일한 세포는 신속하게 퇴행되는 종양을 형성한다. Nod1 기능이 결여된 Nod1^{-/-} 세포만이 계속 성장하는 종양을 형성한다. 본 발명에 따르면, 이러한 단리된 Nod1^{-/-} 세포는 종양 및 종양 퇴행을 연구하는데 유용하다. 따라서 본 발명의 Nod1^{-/-} 세포를 사용하여, 화학요법제를 개발하고 종양 발생의 메커니즘을 조사할 수 있다.
- <70> 본 발명의 단리된 Nod1^{-/-} 세포주의 한 예는 MCF-7 C20 세포주이다. 본 발명가들은 C20 클론이 수컷 마우스에게 이식되었을 때 더욱 강한 종양 성장을 관찰하였다. 중합효소 연쇄 반응 증폭 연구로 프로게스테론 수용체가 MCF-7 C20 세포 및 기능성 Nod1 대립유전자가 재조합적으로 도입된 MCF-7 C20 세포 (즉, MCF-7 C20Nod1 세포)에서 결손되어 있다는 것이 결정되었다. 추가적인 PCR 연구는 에스트로겐 수용체 알파가 각각의 모든 3종의 MCF7 세포 유형 (야생형 MCF-7 세포, MCF-7 C20 세포 및 MCF-7 C20Nod1 세포)에 존재하였음을 나타냈다.
- <71> **Nod1 발현 카세트 및 벡터**
- <72> 본 발명에 따르면, NOD1 폴리펩티드가 재조합적으로 생산된 후, 정제되어, 대상에게 항종양제로서 투여될 수 있다. 또다른 실시양태에서, NOD1를 코딩하는 핵산이 발현 카세트 및/또는 발현 벡터 내에 놓일 수 있다. 이러한 Nod1 발현 카세트 및 발현 벡터가 또한 항종양제로서 대상에게 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 Nod1 발현 카세트 및 Nod1 발현 벡터를 제공한다.
- <73> NOD1 폴리펩티드의 포유류 발현은 [Dijkema et al., EMBO J. (1985) 4: 761], [Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79: 6777], [Boshart et al., Cell (1985) 41: 521] 및 미국 특허 4,399,216에 기술된 바와 같이 이루어질 수 있다. 포유류 발현의 다른 특색은 [Ham and Wallace, Meth. Enz. (1979) 58: 44], [Barnes and Sato, Anal. Biochem. (1980) 102: 255], 미국 특허 4,767,704, 4,657,866, 4,927,762, 4,560,655, WO 90/103430, WO 87/00195, 및 미국 특허 RE 30,985에 기술된 바와 같이 용이해질 수 있다. 이같은 Nod1 핵산의 사용은 내인성 Nod1 유전자의 발현을 증대시키거나 또는 대체할 수 있다.
- <74> Nod1 핵산은 선형 또는 원형 분자 내에 놓일 수 있다. 이는 자가 복제 분자 내에 또는 복제 서열이 없는 분자 내에 놓일 수 있다. 이는, 당업계에 공지된 바와 같이, 자신에 의해 또는 다른 조절 서열에 의해 조절될 수 있다. NOD1을 코딩하는 핵산 구축물은, 세포 내에서의 Nod1 서열의 전사를 제어하기 위해, 전사 조절 요소, 예컨대 프로모터 요소, 인핸서 또는 UAS 요소, 및 전사 종결인자 신호를 포함할 수 있다.
- <75> Nod1 mRNA, 전장(全長) NOD1 단백질, NOD1 융합 단백질, NOD1 폴리펩티드, 또는 NOD1 폴리펩티드의 단편을 세포, 바람직하게는 진핵생물 세포 내로 전달하기 위한 목적으로, Nod1 핵산이 발현 카세트 또는 유전자 전달 비히클에서 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 유전자 전달 비히클은, 예를 들어, 네이키드(naked) 플라스미드 DNA, 바이러스 발현 벡터, 또는 리포솜 또는 축합제와 접합된 본 발명의 Nod1 핵산일 수 있다.
- <76> 당업계에서 입수가 가능한 다양한 기술, 예컨대 트랜스페린-다가양이온-매개 DNA 전달, 네이키드 또는 캡슐화 핵산으로의 형질감염, 리포솜-매개 DNA 전달, DNA-코팅 라텍스 비드(bead)의 세포내 운송, 원형질체 융합, 바이러스 감염, 전기천공, 핵산 미세발사(microprojectile) 절차의 사용 및 인산칼슘-매개 형질감염을 사용하여 Nod1 핵산을 적절한 숙주 세포 내로 도입할 수 있다.
- <77> 본 발명의 한 실시양태에서, 유전자 전달 비히클은 프로모터 및 NOD1-코딩 핵산을 포함한다. 사용될 수 있는 프로모터의 예로는 조직-특이적 프로모터, 및 세포 증식에 의해 활성화되는 프로모터, 예컨대 티미딘 키나제 및 티미딜레이트 합성효소 프로모터가 포함된다. 기타 바람직한 프로모터에는 바이러스로의 감염에 의해 활성화되는 프로모터, 예컨대 α- 및 β-인터페론 프로모터, 및 에스트로겐과 같은 호르몬에 의해 활성화될 수 있는 프로모터가 포함된다. 사용될 수 있는 기타 프로모터에는 몰로니(Moloney) 바이러스 LTR, CMV 프로모터, 및 마우스 알부민 프로모터가 포함된다.

- <78> 유전자 전달 비히클은 바이러스 서열, 예컨대 바이러스 복제 기원 또는 패키징(packaging) 신호를 포함할 수 있다. 이러한 바이러스 서열은 아스트로바이러스, 코로나바이러스, 오르쏘믹소바이러스, 파포바바이러스, 파라믹소바이러스, 파르보바이러스, 피코르나바이러스, 폭스바이러스, 레트로바이러스, 토가바이러스 또는 아데노바이러스와 같은 바이러스로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 전달 비히클은 재조합 레트로바이러스 벡터이다. 재조합 레트로바이러스 및 이의 다양한 용도가 [Mann et al., Cell 33:153, 1983], [Cane and Mulligan, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:6349, 1984], [Miller et al., Human Gene Therapy 1:5-14, 1990], 미국 특허 4,405,712, 4,861,719, 및 4,980,289, 및 PCT 출원 WO 89/02,468, WO 89/05,349, 및 WO 90/02,806이 예를 들어 포함되는 다수의 참조문헌에 기술되었다. EP 0,415,731; WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; 미국 특허 5,219,740; WO 9311230; WO 9310218; [Vile and Hart, Cancer Res. 53:3860-3864, 1993]; [Vile and Hart, Cancer Res. 53:962-967, 1993]; [Ram et al., Cancer Res. 53:83-88, 1993]; [Takamiya et al., J. Neurosci. Res. 33:493-503, 1992]; [Baba et al., J. Neurosurg. 79:729-735, 1993] (미국 특허 4,777,127, GB 2,200,651, EP 0,345,242 및 WO91102805)에 기술된 것들이 예를 들어 포함되는 다수의 레트로바이러스 유전자 전달 비히클이 본 발명에서 사용될 수 있다.
- <79> 사용될 수 있는 레트로바이러스의 예로는 조류 백혈증 바이러스 (ATCC No. VR-535 및 VR-247), 소 백혈병 바이러스 (VR-1315), 마우스 백혈병 바이러스 (MLV), 밍크-세포 포커스-유도 바이러스 ([Koch et al., J. Vir. 49:828, 1984]; 및 [Oliff et al., J. Vir. 48:542, 1983]), 마우스 육종 바이러스 (ATCC No. VR-844, 45010 및 45016), 세망내피증 바이러스 (ATCC No. VR-994, VR-770 및 45011), 라우스 육종 바이러스, 메이슨-화이자 (Mason-Pfizer) 원숭이 바이러스, 비비원숭이 내인성 바이러스, 내인성 고양이과 레트로바이러스 (예를 들어, RD114), 및 레트로바이러스 벡터로 사용되는 마우스 또는 래트 gL30 서열이 포함된다. 재조합 레트로바이러스가 생성될 수 있는 MLV의 균주로는 4070A 및 1504A ([Hartley and Rowe, J. Vir. 19:19, 1976]), 에이벌슨 (Abelson) (ATCC No. VR-999), 프렌드(Friend) (ATCC No. VR-245), 그라피(Graffi) ([Ru et al., J. Vir. 67:4722, 1993]; 및 [Yantchev Neopksma 26:397, 1979]), 그로스(Gross) (ATCC No. VR-590), 커스텐(Kirsten) ([Albino et al., J. Exp. Med. 164:1710, 1986]), 하비(Harvey) 육종 바이러스 ([Manly et al., J. Vir. 62:3540, 1988]; 및 [Albino et al., J. Exp. Med. 164:1710, 1986]) 및 라우셔(Rauscher) (ATCC No. VR-998), 및 몰로니(Moloney) MLV (ATCC No. VR-190)가 포함된다. 사용될 수 있는 비-마우스 레트로바이러스는 라우스 육종 바이러스, 예를 들어, 브라스티슬라바(Bratislava) ([Manly et al., J. Vir. 62:3540, 1988]; 및 [Albino et al., J. Exp. Med. 164:1710, 1986]), 브라이언(Bryan) 고-역가 (예를 들어, ATCC No. VR-334, VR-657, VR-726, VR-659, 및 VR-728), 브라이언 표준 (ATCC No. VR-140), 카르-질버(Carr-Zilber) ([Adgighitov et al., Neoplasma 27:159, 1980]), 엔켈브레쓰-홀름(Engelbreth-Holm) ([Laurent et al., Biochem Biophys Acta 908:241, 1987]), 해리스(Harris), 프라하(Prague) (예를 들어, ATCC No. VR-772, 및 45033), 또는 슈미트-루핀(Schmidt-Ruppin) (예를 들어 ATCC No. VR-724, VR-725, VR-354) 바이러스이다.
- <80> 본원에 제공된 개시내용 및 표준 재조합 기술 (예를 들어, [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989)], [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition (2001)], 및 [Kunkle, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:488, 1985]) 하에 레트로바이러스 유전자 전달 비히클을 조립 또는 구축하기 위하여 임의의 상기 레트로바이러스를 쉽게 사용할 수 있다. 레트로바이러스 발현 벡터의 일부는 상이한 레트로바이러스로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 LTR은 마우스 육종 바이러스로부터, tRNA 결합 부위는 라우스 육종 바이러스로부터, 패키징 신호는 마우스 백혈병 바이러스로부터, 그리고 두번째 가닥 합성 기원은 조류 백혈증 바이러스로부터 유래될 수 있다. 이러한 재조합 레트로바이러스 벡터를 사용하여, 이를 적합한 패키징 세포주 내로 도입함으로써 형질도입 수용성 레트로바이러스 벡터 입자를 생성시킬 수 있다 (일련 번호 071800,921 (1991년 11월 29일 출원) 참조).
- <81> 재조합 레트로바이러스 게놈이 숙주 세포 DNA의 특정 영역 내로 부위-특이적으로 통합되도록 하는 재조합 레트로바이러스가 생산될 수 있다. 이같은 부위-특이적 통합은 내인성 NOD1 유전자를 돌연변이시키거나 대체하는데 유용하다. 부위-특이적 통합은 레트로바이러스 입자 내로 혼입된 키메라성 인테그라제(integrase)에 의해 매개될 수 있다 (일련 번호 08/445,466 (1995년 5월 22일 출원) 참조). 재조합 바이러스 유전자 전달 비히클이 복제-결손 재조합 바이러스인 것이 바람직하다.
- <82> 상기 기술된 레트로바이러스 유전자 전달 비히클과 사용하기에 적절한 패키징 세포주를 쉽게 제조할 수 있고 (WO 92/05266 참조), 재조합 바이러스 입자의 생산을 위한 프로듀서(producer) 세포주 (벡터 세포주 또는 "VC L"로 또한 명명됨)를 생성시키는데 사용할 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 패키징 세포주는 인간 (예를 들어, HT1080 세포) 또는 밍크 어버이 세포주로부터 제조됨으로써, 인간 혈청에 의한 불활성화에서 살아남을

수 있는 재조합 레트로바이러스 유전자 전달 비히클이 생산되도록 한다. 이같은 재조합 레트로바이러스 유전자 전달 비히클의 구축은 WO 91/02805에 상세하게 기술되어 있다. 이러한 재조합 레트로바이러스 유전자 전달 비히클을 사용하여, 적합한 패키징 세포주 내로 이를 도입함으로써 형질도입 수용성 레트로바이러스 입자를 생성시킬 수 있다. 유사하게, 아데노바이러스 유전자 전달 비히클을 또한 쉽게 제조할 수 있고, 본원에 제공된 개시내용 하에 사용할 수 있다 (또한 [Berkner, *Biotechniques* 6:616-627, 1988], 및 [Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434, 1991], WO 93/07283, WO 93/06223, 및 WO 93/07282 참조).

- <83> 유전자 전달 비히클은 또한 재조합 아데노바이러스 유전자 전달 비히클일 수 있다. 이같은 비히클을 쉽게 제조할 수 있고, 본원에 제공된 개시내용 및 당업계에서 입수가 가능한 정보 하에 사용할 수 있다 (예를 들어, [Berkner, *Biotechniques* 6:616, 1988], 및 [Rosenfeld et al., *Science* 252:431, 1991], WO 93/07283, WO 93/06223, 및 WO 93/07282 참조). 아데노-연관 바이러스 유전자 전달 비히클을 또한 구축할 수 있고, 본 발명의 단백질 또는 핵산을 시험관 내에서 또는 생체 내에서 세포에 전달하는데 사용할 수 있다. 시험관 내에서의 아데노-연관 바이러스 유전자 전달 비히클의 용도가 [Chattejee et al., *Science* 258: 1485-1488 (1992)], [Walsh et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 89: 7257-7261 (1992)], [Walsh et al., *J. Clin. Invest.* 94: 1440-1448 (1994)], [Flotte et al., *J. Biol. Chem.* 268: 3781-3790 (1993)], [Ponnazhagan et al., *J. Exp. Med.* 179: 733-738 (1994)], [Miller et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 91: 10183-10187 (1994)], [Einerhand et al., *Gene Ther.* 2: 336-343 (1995)], [Luo et al., *Exp. Hematol.* 23: 1261-1267 (1995)], 및 [Zhou et al., *Gene Therapy* 3: 223-229 (1996)]에 기술되어 있다. 이러한 비히클의 생체내 용도가 [Flotte et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 90: 10613-10617(1993)], 및 [Kaplitt et al., *Nature Genet.* 8:148-153 (1994)]에 기술되어 있다.
- <84> 본 발명의 또다른 실시양태에서, 유전자 전달 비히클은 토가바이러스로부터 유래된다. 이같은 토가바이러스에는 미국 특허 일련 번호 08/405,627 (1995년 3월 15일 출원), WO 95/07994에 기술된 것들과 같은 알파바이러스가 포함된다. 신드비스(Sindbis) 및 ELVS 바이러스가 포함되는 알파 바이러스는 본 발명의 핵산에 대한 유전자 전달 비히클일 수 있다. 알파 바이러스가 WO 94/21792, WO 92/10578 및 WO 95/07994에 기술되어 있다. 본 발명에 따라 세포에 핵산을 전달하는데 여러 상이한 알파바이러스 유전자 전달 비히클 시스템을 구축하여 사용할 수 있다. 이같은 시스템의 전형적인 대표적인 예로는 미국 특허 5,091,309 및 5,217,879에 기술된 것들이 포함된다. 일부 실시양태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 알파바이러스 유전자 전달 비히클에는 WO 95/07994에 기술된 것들이 포함된다.
- <85> 또한 재조합 바이러스 비히클은 신드비스 바이러스를 기초로 하는 재조합 알파바이러스 바이러스 비히클일 수 있다. 신드비스 구축물, 뿐만 아니라 다수의 유사한 구축물은 쉽게 제조될 수 있다. 신드비스 바이러스 유전자 전달 비히클은 신드비스 바이러스 전사를 개시시킬 수 있는 5' 서열, 신드비스 비-구조적 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 단편 전사를 방지하도록 불활성화된 바이러스 접합 영역, 및 신드비스 RNA 중합효소 인식 서열을 전형적으로 포함한다. 임의로, 핵산 전사가 감소되거나, 증가되거나 또는 유지되도록 바이러스 접합 영역이 변형될 수 있다. 당업자가 인식할 바와 같이, 다른 알파바이러스로부터의 상응하는 영역이 상기 기술된 것들 대신 사용될 수 있다.
- <86> 알파바이러스-유래 유전자 전달 비히클의 바이러스 접합 영역은 핵산의 전사를 방지하기 위해 불활성화된 제1 바이러스 접합 영역 및 핵산 전사가 감소되도록 변형된 제2 바이러스 접합 영역을 포함할 수 있다. 알파바이러스-유래 비히클은 cDNA로부터 바이러스 RNA의 합성을 개시시킬 수 있는 5' 프로모터, 및 전사 종결을 제어하는 3' 서열을 또한 포함할 수 있다.
- <87> 본 발명에서 사용될 수 있는 또다른 재조합 토가바이러스 유전자 전달 비히클에는 쉘리키 포레스트(Semliki Forest) 바이러스 (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), 미들베르그(Middleberg) 바이러스 (ATCC VR-370), 로스 리버(Ross River) 바이러스 (ATCC VR-373; ATCC VR-1246), 베네주엘라 말 뇌염 바이러스 (ATCC VR923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532)로부터 유래된 것들, 및 미국 특허 5,091,309 및 5,217,879, 뿐만 아니라 WO 92/10578에 기술된 것들이 포함된다.
- <88> 본 발명에서 사용하기에 적절한 또다른 바이러스 유전자 전달 비히클에는, 예를 들어, 폴리오바이러스 ([Evans et al., *Nature* 339:385, 1989], 및 [Sabin et al., *J. Biol. Standardization* 1:115, 1973]) (ATCC VR-58); 리노바이러스 ([Arnold et al., *J. Cell. Biochem.* L401, 1990]) (ATCC VR-1110); 폭스바이러스, 예컨대 카나리아 폭스바이러스 또는 우두 바이러스 ([Fisher-Hoch et al., *PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A.* 86:317, 1989]; [Flexner et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86, 1989]; [Flexner et al., *Vaccine* 8:17, 1990]; 미국 특허

4,603,112 및 4,769,330; WO 89/01973) (ATCC VR-111; ATCC VR-2010); SV40 ([Mulligan et al., Nature 277:108, 1979]) (ATCC VR-305), ([Madzak et al., J. Gen. Vir. 73:1533, 1992]); 인플루엔자 바이러스 ([Luytjes et al., Cell 59:1107, 1989]; [McMicheal et al., The New England Journal of Medicine 309:13, 1983]; 및 [Yap et al., Nature 273:238, 1978]) (ATCC VR-797); 파르보바이러스 예컨대 아데노-연관 바이러스 ([Samulski et al., J. Vir. 63:3822, 1989], 및 [Mendelson et al., Virology 166:154, 1988]) (ATCC VR-645); 단순 헤르페스 바이러스 ([Kit et al., Adv. Exp. Med. Biol. 215:219, 1989]) (ATCC VR-977; ATCC VR-260); [Nature 277: 108, 1979]); 인간 면역결핍 바이러스 (EPO 386,882, [Buchsachacher et al., J. Vir. 66:2731, 1992]); 홍역 바이러스 (EPO 440,219) (ATCC VR-24); A (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), 아우라(Aura) (ATCC VR-368), 베바루(Bebaru) 바이러스 (ATCC VR-600; ATCC VR-1240), 카바소우(Cabassou) (ATCC VR-922), 치쿤구니야(Chikungunya) 바이러스 (ATCC VR-64; ATCC VR-1241), 포트 모르간(Fort Morgan) (ATCC VR-924), 게타(Getah) 바이러스 (ATCC VR-369; ATCC VR-1243), 키질라가츠(Kyzylagach) (ATCC VR-927), 마야로(Mayaro) (ATCC VR-66), 무캄보(Mucambo) 바이러스 (ATCC VR-580; ATCC VR-1244), 엔두무(Ndumu) (ATCC VR-371), 픽수나(Pixuna) 바이러스 (ATCC VR-372; ATCC VR-1245), 토네이트(Tonate) (ATCC VR-925), 트리니티(Trinititi) (ATCC VR-469), 우나(Una) (ATCC VR-374), 와타로아(Whataraoa) (ATCC VR-926), Y-62-33 (ATCC VR-375), 오농(O'Nyong) 바이러스, 동부 뇌염 바이러스 (ATCC VR-65; ATCC VR-1242), 서부 뇌염 바이러스 (ATCC VR-70; ATCC VR-1251; ATCC VR-622; ATCC VR-1252). 및 코로나바이러스 ([Hamre et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121:190, 1966]) (ATCC VR-740)로부터 유래된 것들이 포함된다.

<89> 또한 본 발명의 핵산이 축합제와 조합되어 유전자 전달 비히클이 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 축합제는 다가양이온, 예컨대 폴리라이신, 폴리아르기닌, 폴리오르니틴, 프로타민, 스퍼민, 스퍼미딘, 및 푸트레신이다. 축합제와 핵산 사이에 결합을 만들기 위한 많은 적절한 방법이 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 일련번호 08/366,787 (1994년 12월 30일 출원) 참조).

<90> 별법적인 실시양태에서, Nod1 핵산 또는 NOD1 폴리펩티드가 리포솜과 회합되어 유전자 전달 비히클이 형성된다. 리포솜은 지질 2층으로 둘러싸인 수성 구획으로 구성된 소형 지질 소포이고, 전형적으로 직경이 수백 앙스트롬인 구형 또는 약간 길쭉한 구조이다. 적합한 조건 하에, 리포솜은 세포의 형질막, 또는 리포솜이 내재된 세포 내의 세포내이입 소포의 막과 융합됨으로써, 내용물을 세포질 내로 방출할 수 있다. 그러나, 세포 표면과의 상호작용 전에, 리포솜 막은 리포솜의 내용물을 예를 들어 분해 효소로부터 격리시키고 보호하는, 비교적 불투과성인 배리어로 작용한다. 추가적으로, 리포솜이 합성 구조물이기 때문에, 바람직한 특색이 혼입된 특별하게 디자인된 리포솜을 제조할 수 있다. [Stryer, Biochemistry, pp. 236-240, 1975 (W. H. Freeman, San Francisco, Calif)]; [Szoka et al., Biochim. Biophys. Acta 600:1, 1980]; [Bayer et al., Biochim. Biophys. Acta. 550:464, 1979]; [Rivnay et al., Meth. Enzymol. 149:119, 1987]; [Wang et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 84:7851, 1987], [Plant et al., Anal. Biochem. 176:420, 1989], 및 미국 특허 4,762,915 참조. 리포솜은 DNA, RNA, 플라스미드, 본 발명에 개시된 것들과 같은 핵산을 포함하는 발현 구축물, 및 NOD1 폴리펩티드가 포함되는 다양한 핵산 및 폴리펩티드 분자를 캡슐화할 수 있다.

<91> 본 발명에서 사용하기 위한 리포솜 제제에는 양이온성 (양성 전하), 음이온성 (음성 전하) 및 중성 제제가 포함된다. 양이온성 리포솜은 기능성 형태의 플라스미드 DNA ([Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7416, 1987]), mRNA ([Malone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6077-6081, 1989]), 및 정제된 전사 인자 ([Debs et al., J. Biol. Chem. 265:10189-10192, 1990])의 세포내 전달을 매개하는 것으로 나타났다. 양이온성 리포솜은 쉽게 입수가 가능하다. 예를 들어, N[1-2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리에틸암모늄 (DOTMA) 리포솜은 상표명 Lipofectin™으로 GIBCO BRL (Grand Island, N.Y.)로부터 입수가 가능하다. 또한 [Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5148-5152, 1994] 참조. 또다른 시판되는 리포솜에는 Transfectace (DDAB/DOPE) 및 DOTAP/DOPE (Boehringer)가 포함된다. 또다른 양이온성 리포솜을 당업계에서 입수가 가능한 기술을 사용하여 쉽게 입수가 가능한 재료들로부터 제조할 수 있다. 예를 들어, DOTAP (1,2-비스(올레일 옥시)-3-(트리메틸암모니오)프로판) 리포솜 합성의 설명에 대해서 [Szoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4194-4198, 1978]; 및 WO 90/11092 참조.

<92> 유사하게, 음이온성 및 중성 리포솜이 Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala.)로부터와 같이 쉽게 입수가 가능하거나, 또는 쉽게 입수가 가능한 재료들로부터 용이하게 제조할 수 있다. 이같은 재료에는 포스파티딜 콜린, 콜레스테롤, 포스파티딜 에탄올아민, 디올레일포스파티딜 콜린 (DOPC), 디올레일포스파티딜 글리세롤 (DOPG), 디올레일포스파티딜 에탄올아민 (DOPE) 등이 포함된다. 또한 이러한 재료들을 적합한 비율로 DOTMA 및 DOTAP 출발 재료와 혼합할 수 있다. 이러한 재료들을 사용하여 리포솜을 제조하는 방법은 당업계에 주지되어 있다.

- <93> 리포솜은 다층 소포 (MLV), 소형 단층 소포 (SUV), 또는 대형 단층 소포 (LUV)를 포함할 수 있다. 다양한 리포솜-핵산 복합체가 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조된다. 예를 들어, [Straubinger et al., METHODS OF IMMUNOLOGY (1983), Vol. 101, pp. 512-527]; [Szoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414, 1990]; [Papahadjopoulos et al., Biochim. Biophys. Acta 394:483, 1975]; [Wilson et al., Cell 17:77, 1979]; [Deamer and Bangham, Biochim. Biophys. Acta 443:629, 1976]; [Ostro et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 76:836, 1977]; [Fraleley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3348, 1979]; [Enoch and Strittmatter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:145, 1979]; [Fraleley et al., J. Biol. Chem. 255:10431, 1980]; [Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:145, 1979]; 및 [Schaefer-Ridder et al., Science 215:166, 1982] 참조.
- <94> 또한, 지질단백질이 세포에의 전달을 위해 본 발명의 핵산과 함께 포함될 수 있다. 이같은 지질단백질의 예로는 키로마이크론, HDL, IDL, LDL, 및 VLDL이 포함된다. 이러한 단백질들의 돌연변이체, 단편 또는 융합물 또한 사용될 수 있다. 천연 발생 지질단백질의 변형물, 예컨대 아세틸화 LDL이 또한 사용될 수 있다. 이러한 지질단백질은 핵산의 전달을 지질단백질 수용체를 발현하는 세포에 표적화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 지질단백질이 핵산과 함께 포함되는 경우, 다른 표적화 리간드가 조성물에 포함되지 않는다.
- <95> 특정 조직에 대한 Nod1 핵산의 수용체-매개 표적화 전달을 또한 사용할 수 있다. 수용체-매개 DNA 전달 기술은, 예를 들어, [Findeis et al. (1993), Trends in Biotechnol. 11, 202-05]; [Chiou et al. (1994), GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J. A. Wolff, ed.)]; [Wu & Wu (1988), J. Biol. Chem. 263, 621-24]; [Wu et al. (1994), J. Biol. Chem. 269, 542-46]; [Zenke et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3655-59]; [Wu et al. (1991), J. Biol. Chem. 266, 338-42]에 기술되어 있다.
- <96> 또다른 실시양태에서, 예를 들어, WO 90/11092 및 미국 특허 5,580,859에 기술된 바와 같이, 네이키드 핵산 분자가 유전자 전달 비히클로 사용된다. 이같은 유전자 전달 비히클은 DNA 또는 RNA일 수 있고, 특정 실시양태에서는 죽은 아데노바이러스에 연결된다. [Curiel et al., Hum. Gene. Ther. 3:147-154, 1992]. 또다른 적절한 비히클에는 DNA-리간드 ([Wu et al., J. Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989]), 지질-DNA 조합물 ([Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413 7417, 1989]), 리포솜 ([Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84:7851-7855, 1987]) 및 미세발사체 ([Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:2726-2730, 1991])가 포함된다.
- <97> 핵산을 생분해성 라텍스 비드 상에 코팅함으로써 세포 내로의 네이키드 핵산 흡수 효율을 증가시킬 수 있다. 이러한 접근법은 라텍스 비드가 배양 중인 세포와 함께 인큐베이션되었을 때 효율적으로 수송되어 세포의 핵주위 영역 내에 농축된다는 관찰의 장점을 취한다. 근육 내로 주사되는 경우, 비드는 세포 내로 수송될 것이다. 핵산이 코팅된 라텍스 비드는 라텍스 비드에 의해 세포내이입이 개시된 후 세포 내로 효율적으로 수송될 것이고, 따라서 유전자 전달 및 발현 효율을 증가시킬 것이다. 비드의 소수성이 증가되도록 비드를 처리함으로써 엔도솜의 파괴 및 세포질 내로의 핵산 방출을 촉진하는 것에 의해 이러한 방법이 추가로 개선될 수 있다.
- <98> NOD1-코딩 핵산이 유사한 방식으로 세포 내로 도입될 수 있다. 기계적 방법, 예컨대 미세주사, 리포솜-매개 형질감염, 전기천공, 또는 인산칼슘 침전을 사용하여, 세포자멸사 및/또는 중앙 세포 사망을 촉진하기 위해 NOD1 핵산 구축물을 세포 내로 도입할 수 있다. 별법적으로, 세포가 DNA 구축물을 안정적으로 유지하는 것을 원하는 경우, 당업계에 공지된 바와 같이, 구축물을 플라스미드 상에 공급하여 별도의 요소로 유지시키거나 또는 세포의 계놈 내로 통합시킬 수 있다.
- <99> DNA 구축물을 포함하는 상동성 재조합 세포가 형성되도록 상동성 재조합에 의해 NOD1 표적화 서열, 조절 서열, 엑손 및 쌍을 이루지 않은 스플라이스 도너 부위를 포함하는 DNA 구축물을 내인성 Nod1 유전자와 인-프레임(in-frame)으로 도입함으로써 세포 내에서의 내인성 Nod1 유전자의 발현이 또한 변화될 수 있다. 새로운 전사 단위를 사용하여 Nod1 유전자를 원하는 대로 키거나 끌 수 있다. 내인성 유전자 발현에 영향을 미치는 이러한 방법이 미국 특허 5,641,670에 교시되어 있다.
- <100> 전달된 NOD1 핵산이 조직 또는 세포주의 계놈 내로 통합되는 것을 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 전달된 NOD1 핵산의 써던(Southern) 블롯팅을 수행할 수 있다. 전달된 핵산의 단편의 크기에서의 변화는 통합을 가리킨다. 전달된 핵산의 복제는 NOD1 프로브에의 혼성화와 조합된 표지된 뉴클레오티드의 혼입을 검출함으로써 특히 모니터링할 수 있다. NOD1 핵산의 발현은 전달된 핵산에 혼성화하는 NOD1 mRNA의 생산을 검출함으로써 또는 NOD1 단백질을 검출함으로써 모니터링할 수 있다. NOD1 단백질은 면역

학적으로 검출할 수 있다.

<101> **RIP2 조정인자**

<102> 본 발명에 따르면, "키나제-결핍" RIP2가 세포에서 발현될 때 세포가 세포자멸사에 감작된다. 본원에서 사용된 "키나제-결핍" RIP2는 키나제 기능이 실질적으로 없는 RIP2 폴리펩티드를 의미한다. 따라서, 본 발명은 키나제 활성이 없는 RIP2 폴리펩티드, RIP2 키나제 억제제, 뿐만 아니라 키나제-결핍 RIP2 발현용 발현 카세트 및 발현 벡터를 제공한다.

<103> RIP2는 카르복실 말단에 CARD 도메인을 함유하는 세린/트레오닌 키나제이고, 과발현 시스템에서 NF- κ B 활성화를 유도하는 것으로 나타났다. 또한 RIP2는 선천성 및 적응성 면역 응답 모두를 조절하는데 있어서 역할을 하는 것으로 나타났다. Rip2가 결핍된 마우스에서는 Toll형 수용체 작동제 예컨대 지질다당류 (LPS)에 대해 약독화된 면역 응답만이 개시되었다

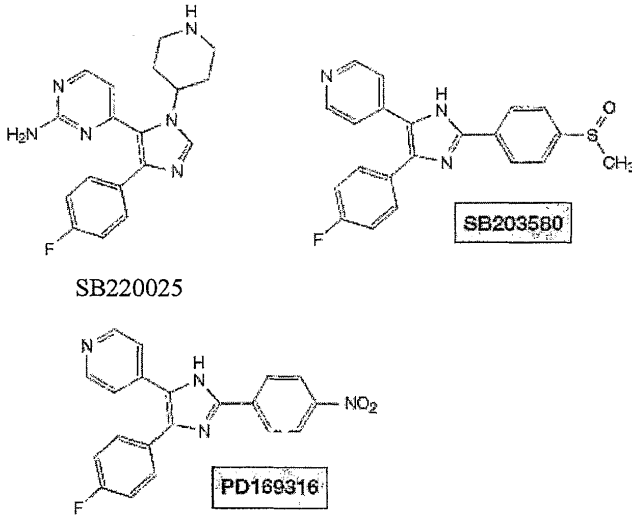
<104> RIP2에 대한 서열이, 예를 들어, NCBI 데이터베이스에서 제공된다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov 참조. 예를 들어, 인간 RIP2에 대한 한 아미노산 서열이 하기에 용이한 참조를 위해 서열 5 (NCBI 접속 번호 AAC27722; gi: 3342910)로 제공된다.

```

1  MNGEAICSAL PTIPYHKLAD LRYLSRGASG TVSSARHADW
41  RVQVAVKHLH IHTPLLDSEK KDVLREAAIL HKARFSYILP
81  ILGICNEPEF LGIVTEYMPN GSLNELLHRK TEYPDVAWPL
121 RFRILHEIAL GVNYLHNMTF PLLHHDLKTQ NILLDNEFHV
161 KIADFGLSKW RMMSLSQSRS SKSAPEGGTI IYMPPEYEP
201 GQKSRASIKH DIYSYAVITW EVLSRKQPFK DVTNPLQIMY
241 SVSQGHRPVI NEESLPYDIP HRARMISLIE SGWAQNPDER
281 PSFLKCLIEL EPVLRTFEEI TFLEAVIQLK KTKLQSVSSA
321 IHLCDKCKME LSLNIPVNHG PQEESCGSSQ LHENSGSPET
361 SRSLPAPQDN DFLSRKAQDC YFMKLHHCPCG NHSWDSTISG
401 SQRAAFCDHK TTPCSSAIIN PLSTAGNSER LQPGIAQQWI
441 QSKREDIVNQ MTEACLNQSL DALLSRDLIM KEDYELVSTK
481 PTRTSKVRQL LDTTDIQGEE FAKVIVQKLE DNKQMGLEPY
521 PEILVVSRSF SLNLLQNKSM
    
```

<105> 상기에서 지시되고, 실시예에서 더욱 상세하게 기술되는 바와 같이, 키나제-결핍 RIP2를 발현하는 세포는 RIP2의 다른 도메인 및 기능 (예를 들어 CARD 도메인)이 대부분 기능성일 때 세포자멸사에 대해 감작된다. 따라서, 본 발명은 세포를 RIP2 키나제를 억제할 수 있는 작용제와 접촉시킴으로써 세포자멸사에 대해 세포를 감작시키는 방법에 관한 것이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 포유동물에게 치료적 유효량의 RIP2 키나제 억제제를 투여함으로써 동물에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 또한 RIP2 키나제 억제제는 NOD1 폴리펩티드 또는 Nod1 핵산, 또는 NOD1 활성을 조정하는 작용제와 함께 투여될 수 있다.

<107> 임의의 입수가능한 RIP2 억제제를 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, p38 억제제를 사용하여 RIP2 키나제 기능을 억제할 수 있다. 예를 들어, RIP2를 억제하는데 사용될 수 있는 p38 억제제에는 2-(4-클로로페닐)-4-(4-플루오로페닐)-5-피리딘-4-일-1,2-디히드로피라졸-3-온, SC68376, SB203580(요오도), SB202190, SB203580, SB203580 (솔폰), PD169316, SB220025, SKF-86002, SB239063, 또는 ML3163이 포함된다. SB220025, SB203580 및 PD169316의 구조식이 하기에 제공된다.



<108>

<109>

이러한 억제제들은 p38을 억제하는데 사용되는 것과 유사한 농도로 사용될 수 있다.

<110>

또다른 실시양태에서, 본 발명은 테스트제가 RIP2 키나제 활성을 억제할 수 있는지 여부를 관찰함으로써 RIP2 억제제를 확인하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 시험관내에서 또는 생체내에서 수행될 수 있다. RIP2 분석이 테스트제의 부재 하에 수행되는 대조군이 포함될 수 있다. 테스트제의 존재하에서의 RIP2의 감소된 활성은 테스트제가 RIP2 억제제라는 것을 가리킨다.

<111>

조성물

<112>

세포자멸사 및 종양 퇴행을 촉진하거나, NOD1 활성을 조정하거나, 또는 암성 용태 또는 부적합한 세포 성장과 관련된 기타 질환과 관련된 1가지 이상의 증상에서의 감소를 달성하기 위해 NOD1 폴리펩티드 및 NOD1 리간드 (이들의 염 포함), 뿐만 아니라 NOD1 핵산 및/또는 RIP2 키나제 억제제가 투여된다. 항종양제, 화학요법제, TNF, RIP2 키나제 억제제, RIP2 키나제-결핍 폴리펩티드, RIP2 키나제-결핍 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 등과 같은 또다른 작용제들이 본원에 기술된 바와 같이 포함될 수 있다.

<113>

원하는 효과(들)를 달성하기 위해, NOD1 폴리펩티드, 리간드, 핵산, 및 이들과 다른 작용제들과의 조합물이 단일 투여량 또는 분할 투여량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, NOD1 폴리펩티드, 리간드 및 핵산은 체중 1 kg 당 적어도 약 0.01 mg/kg 내지 약 500 내지 750 mg/kg, 적어도 약 0.01 mg/kg 내지 약 300 내지 500 mg/kg, 적어도 약 0.1 mg/kg 내지 약 100 내지 300 mg/kg, 또는 적어도 약 1 mg/kg 내지 약 50 내지 100 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있지만, 또다른 투여량이 이로운 결과를 제공할 수 있다. 투여되는 양은 선택된 폴리펩티드, 리간드 또는 핵산, 질환, 체중, 신체 상태, 건강, 포유동물의 연령, 예방 또는 치료가 달성되는지 여부, 및 폴리펩티드, 리간드 또는 핵산이 화학적으로 변형되었는지 여부가 포함되지만 이에 한정되지 않는 다양한 인자에 따라 변할 것이다. 이같은 인자는 동물 모델을 사용하는 임상 또는 당업계에서 입수가 가능한 또다른 테스트 시스템에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

<114>

본 발명에 따른 치료제의 투여는, 예를 들어, 수용자의 생리학적 상태, 투여 목적이 치료 또는 예방인지 여부, 및 숙련된 실행자에게 공지된 기타 인자에 따라, 단일 용량, 다중 용량, 또는 연속 또는 간헐 방식일 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드, 리간드, 핵산 및 기타 작용제의 투여는 본질적으로 미리 선택된 기간에 걸쳐 연속적일 수 있거나, 또는 일련의 간격 용량일 수 있다. 국소 및 전신 투여 모두 구현된다.

<115>

조성물을 제조하기 위해, 폴리펩티드, 리간드, 핵산 및 작용제를 합성하거나 다른 방식으로 수득하고, 필요하거나 원한다면 정제한 후, 동결건조 및 안정화시킨다. 그 후, 폴리펩티드, 리간드, 또는 핵산을 적합한 농도로 조정하고, 임의로 또다른 작용제들과 조합한다. 단위 용량 내에 포함된 소정의 폴리펩티드, 리간드, 또는 핵산의 절대 중량은 광범위하게 변할 수 있다. 예를 들어, 약 0.01 내지 약 2 g, 또는 약 0.1 내지 약 500 mg의 1가지 이상의 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 항체, 또는 다수의 폴리펩티드, 리간드, 및 핵산이 투여될 수 있다. 별법적으로, 단위 투여량은 약 0.01 g 내지 약 50 g, 약 0.01 g 내지 약 35 g, 약 0.1 g 내지 약 25 g, 약 0.5 g 내지 약 12 g, 약 0.5 g 내지 약 8 g, 약 0.5 g 내지 약 4 g, 또는 약 0.5 g 내지 약 2 g으로 다양할 수 있다.

<116>

본 발명의 폴리펩티드, 리간드, 또는 핵산의 1일 용량 또한 다양할 수 있다. 이같은 1일 용량은, 예를 들어,

약 0.1 g/일 내지 약 50 g/일, 약 0.1 g/일 내지 약 25 g/일, 약 0.1 g/일 내지 약 12 g/일, 약 0.5 g/일 내지 약 8 g/일, 약 0.5 g/일 내지 약 4 g/일, 및 약 0.5 g/일 내지 약 2 g/일 범위일 수 있다.

- <117> 따라서, 본 발명의 치료용 폴리펩티드, 리간드, 또는 핵산을 포함하는 1개 이상의 적절한 단위 투약 제형이 경구, 비경구 (피하, 정맥내, 근육내 및 복강내 포함), 직장, 피부, 경피, 흉부내, 폐내 및 비강내 (호흡기) 경로가 포함되는 다양한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, NOD1 폴리펩티드, 리간드 또는 핵산은 종양 또는 암 부위에 국소적으로 투여된다.
- <118> 또한 치료제는 지속 방출용으로 제형화될 수 있다 (예를 들어, 마이크로캡슐화 사용, WO 94/07529, 및 미국 특허 4,962,091 참조). 적합한 경우, 제형이 개별적인 단위 투약 제형으로 편리하게 제시될 수 있고, 제약 업계에 주지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 이같은 방법은 치료제를 액체 담체, 고체 매트릭스, 반-고체 담체, 미세 분할 고체 담체 또는 이들의 조합물과 혼합하는 단계, 및 이어서 필요한 경우 제품을 원하는 전달 시스템 내로 도입하거나 성형하는 단계를 포함할 수 있다.
- <119> 본 발명의 치료제가 경구 투여용으로 제조되는 경우, 일반적으로 이는 제약상 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 혼합되어 제약 제형, 또는 단위 투약 제형을 형성한다. 경구 투여를 위해, 치료제는 분말, 과립 제형, 용액, 현탁액, 에멀션으로서, 또는 씹임검(chewing gum)으로부터 활성 성분의 섭취를 위해 천연 또는 합성 중합체 또는 수지 내에 존재할 수 있다. 또한 치료제는 볼루스(bolus), 연약 또는 페이스트(paste)로 존재할 수 있다. 경구 투여되는 본 발명의 치료제는 지속 방출용으로 제형화될 수 있고, 예를 들어, 치료제가 코팅되거나, 마이크로캡슐화되거나, 또는 지속 전달 장치 내에 놓일 수 있다. 이같은 제형 내의 전체 활성 성분은 제형의 0.001 내지 99.9 중량%를 이룬다.
- <120> "제약상 허용가능한"은 제형의 다른 성분과 상용성이고 이의 수용자에게 해롭지 않은 담체, 희석제, 부형제 및/또는 염을 의미한다.
- <121> 본 발명의 치료제를 함유하는 제약 제형은 주지되고 쉽게 입수가 가능한 성분들을 사용하여 당업계에 공지된 절차에 의해 제조할 수 있다. 예를 들어, 치료제를 통상적인 부형제, 희석제 또는 담체와 배합하여, 정제, 캡슐, 용액, 현탁액, 분말, 에어로졸 등으로 형성시킬 수 있다. 이같은 제형에 적절한 부형제, 희석제, 및 담체의 예로는 완충액, 뿐만 아니라 충전제 및 증량제 예컨대 전분, 셀룰로스, 당, 만니톨 및 규산 유도체가 포함된다. 결합제 예컨대 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 및 기타 셀룰로스 유도체, 알기네이트, 젤라틴, 및 폴리비닐-피롤리돈이 또한 포함될 수 있다. 보습제 예컨대 글리세롤, 붕해제 예컨대 탄산칼슘 및 중탄산나트륨이 포함될 수 있다. 용해를 지연시키는 작용제 예컨대 파라핀이 또한 포함될 수 있다. 흡수 가속화제 예컨대 4차 암모늄 화합물이 또한 포함될 수 있다. 계면활성제 예컨대 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트가 포함될 수 있다. 흡착성 담체 예컨대 카올린 및 벤토나이트가 첨가될 수 있다. 윤활제 예컨대 탈크, 칼슘 및 마그네슘 스테아레이트, 및 고체 폴리에틸 글리콜이 또한 포함될 수 있다. 방부제가 또한 첨가될 수 있다. 본 발명의 조성물은 증점제 예컨대 셀룰로스 및/또는 셀룰로스 유도체를 또한 함유할 수 있다. 조성물은 검 예컨대 잔탄, 구아 또는 카르보 검 또는 아라비아 검, 또는 별법적으로 폴리에틸렌 글리콜, 벤톤 및 몬모릴로나이트 등을 또한 함유할 수 있다.
- <122> 예를 들어, 본 발명의 치료제를 함유하는 정제 또는 캡슐릿(caplet)은 완충제 예컨대 탄산칼슘, 산화마그네슘 및 탄산마그네슘을 포함할 수 있다. 캡슐릿 및 정제는 불활성 성분 예컨대 셀룰로스, 예비젤라틴화 전분, 이산화규소, 히드록시 프로필 메틸 셀룰로스, 스테아르산마그네슘, 미세결정질 셀룰로스, 전분, 탈크, 이산화티탄, 벤조산, 시트르산, 옥수수 전분, 미네랄 오일, 폴리프로필렌 글리콜, 인산나트륨, 스테아르산아연 등을 또한 포함할 수 있다. 1가지 이상의 본 발명의 치료제를 함유하는 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐은 불활성 성분 예컨대 젤라틴, 미세결정질 셀룰로스, 소듐 라우릴 술페이트, 전분, 탈크, 및 이산화티탄 등, 뿐만 아니라 액체 비히클 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 식물성 오일을 함유할 수 있다. 또한, 위에서의 붕해를 견뎌내고 십이지장의 더욱 중성 내지 알칼리성인 환경에서 용해되도록 1가지 이상의 본 발명의 치료제를 함유하는 장용-코팅 캡슐릿 또는 정제가 디자인된다.
- <123> 본 발명의 치료제는 간편한 경구 투여를 위해 엘릭시르(elixir) 또는 용액으로서, 또는 예를 들어 근육내, 피하, 복강내 또는 정맥내 경로에 의한 비경구 투여에 적합한 용액으로서 또한 제형화될 수 있다. 본 발명의 치료제의 제약 제형은 수성 또는 무수 용액 또는 분산액의 형태, 또는 별법적으로 에멀션 또는 현탁액 또는 연고의 형태를 또한 취할 수 있다.
- <124> 따라서, 치료제는 비경구 투여용으로 제형화될 수 있고 (예를 들어, 주사, 예를 들어 볼루스 주사 또는 연속 주

입에 의해 투여), 앰풀, 프리-필드(pre-filled) 주사기, 소형 부피의 주입 컨테이너 또는 다중-용량 컨테이너 내의 단위 투약 제형으로 제시될 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 방부제가 첨가되어 투약 제형의 보관 기간을 유지하는 것을 도울 수 있다. 활성 폴리펩티드, 핵산 또는 항체 및 기타 성분은 오일성 또는 수성 비히클 내의 현탁액, 용액 또는 에멀션을 형성할 수 있고, 배합 작용제 예컨대 현탁, 안정화 및/또는 분산 작용제를 함유할 수 있다. 별법적으로, 활성 폴리펩티드, 핵산 또는 항체 및 기타 성분은 사용 전 적절한 비히클, 예를 들어, 발열원이 없는 멸균수와와의 구성을 위한, 멸균 고체의 무균 단리 또는 용액으로부터의 동결건조에 의해 수득된 분말 형태일 수 있다.

- <125> 이러한 제형은 당업계에 주지된 제약상 허용가능한 담체, 비히클 및 보조제를 함유할 수 있다. 예를 들어, 물에 더하여, 아세트, 에탄올, 이소프로필 알콜, 글리콜 에테르 예컨대 명칭 "Dowanol"로 판매되는 제품, 폴리글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜, 단쇄 산의 C₁-C₄ 알킬 에스테르, 에틸 또는 이소프로필 락테이트, 지방산 트리글리세리드 예컨대 명칭 "Miglyol"로 판매되는 제품, 이소프로필 미리스테이트, 동물성, 미네랄 및 식물성 오일, 및 폴리실록산으로부터 선택된 생리학적 관점에서 허용가능한 1가지 이상의 유기 용매(들)를 사용하여 용액을 제조할 수 있다.
- <126> 원한다면, 항산화제, 계면활성제, 기타 방부제, 필름 형성성, 각질용해성 또는 면포용해성 작용제, 향수, 방향제 및 착색제로부터 선택된 추가적인 성분들을 첨가할 수 있다. 항산화제 예컨대 t-부틸히드로퀴논, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔 및 α-토코페롤 및 이의 유도체가 첨가될 수 있다.
- <127> 추가적으로, 폴리펩티드, 리간드 및 핵산은 자연 방출 투약 제형 등으로서의 제형에 상당히 적합하다. 제형은 치료제를, 예를 들어, 소장 또는 호흡관의 특정 부위에, 가능하게는 일정 기간의 시간에 걸쳐 방출하도록 구성될 수 있다. 코팅, 외피, 및 보호성 매트릭스가, 예를 들어, 중합체성 물질, 예컨대 폴리락티드-글리콜레이트, 리포솜, 마이크로에멀션, 미세입자, 나노입자, 또는 왁스로부터 제조될 수 있다. 이러한 코팅, 외피 및 보호성 매트릭스는 내재 장치, 예를 들어, 스텐트, 카테터, 복막 투석 튜빙(tubing), 배출 장치 등을 코팅하는데 유용하다.
- <128> 국소 투여를 위해, 표적 영역으로의 직접적인 적용을 위해 당업계에 공지된 바와 같이 치료제가 제형화될 수 있다. 국소 적용용으로 주로 컨디셔닝된 제형은, 예를 들어, 크림, 유액, 젤, 분산액 또는 마이크로에멀션, 다소 증점된 로션, 함침(impregnated) 패드, 연고 또는 스틱, 에어로졸 제형 (예를 들어, 스프레이 또는 포말체), 비누, 세제, 비누 케익 또는 로션의 형태를 취할 수 있다. 이러한 목적을 위한 또다른 통상적인 형태에는 상처 드레싱(dressing), 코팅 붕대 또는 기타 중합체 덮개, 연고, 크림, 로션, 페이스트, 젤리, 스프레이 및 에어로졸이 포함된다. 따라서, 본 발명의 치료제는 피부 투여를 위해 패치 또는 붕대를 통해 전달될 수 있다. 별법적으로, 폴리펩티드, 리간드 및/또는 핵산은 접착성 중합체, 예컨대 폴리아크릴레이트 또는 아크릴레이트/비닐 아세테이트 공중합체의 일부이도록 제형화될 수 있다. 장기(長期) 적용을 위해, 피부의 수화 또는 짓무름이 최소화될 수 있도록 다공성 및/또는 통기성 지지(backing) 적층물을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 지지 층은 원하는 보호성 및 지지 기능을 제공할 임의의 적합한 두께일 수 있다. 적절한 두께는 일반적으로 약 10 내지 약 200 마이크로일 것이다.
- <129> 연고 및 크림은, 예를 들어, 적절한 증점제 및/또는 젤화제의 첨가와 함께 수성 또는 오일성 베이스(base)와 함께 제형화될 수 있다. 로션은 수성 또는 오일성 베이스와 함께 제형화될 수 있고, 일반적으로 1가지 이상의 유화제, 안정화제, 분산제, 현탁화제, 증점제, 또는 착색제를 또한 함유할 것이다. 치료제는, 예를 들어, 미국 특허 4,140,122; 4,383,529; 또는 4,051,842에 개시된 바와 같이, 이온도입법을 통해 또한 전달될 수 있다. 국소 제형 내에 존재하는 본 발명의 치료제의 중량 백분율은 다양한 인자에 좌우될 것이지만, 일반적으로 제형의 전체 중량의 0.001% 내지 95%일 것이고, 전형적으로 0.01-85 중량%일 것이다.
- <130> 점적액, 예컨대 점안액 또는 점비액이 1가지 이상의 분산제, 가용화제 또는 현탁화제를 또한 포함하는 수성 또는 비-수성 베이스 내에서 1가지 이상의 치료제와 함께 제형화될 수 있다. 액체 스프레이는 가압 팩(pack)으로부터 편리하게 전달된다. 점적액은 단순한 안구 점적기가 캡핑된(capped) 병을 통해, 또는 특별한 형상의 마개를 통해 액체 내용물을 점적적으로 전달하도록 개조된 플라스틱 병을 통해 전달될 수 있다.
- <131> 치료제는 입 또는 인후에서의 국소 투여를 위해 추가로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 활성 성분은 품미 베이스, 일반적으로 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸트를 추가로 포함하는 로진지(lozenge); 불활성 베이스 예컨대 젤라틴 및 글리세린 또는 아카시아 내의 조성물을 포함하는 향정(pastille); 및 적절한 액체 담체 내의 본 발명의 조성물을 포함하는 구강세정액으로 제형화될 수 있다.

- <132> 본 발명의 제약 제형은, 선택적 성분으로서, 제약상 허용가능한 담체, 희석제, 가용화제 또는 유화제, 및 당업계에서 입수가능한 유형의 염을 포함할 수 있다. 이같은 물질의 예로는 생리식염수 예컨대 생리학적으로 완충된 염수 용액 및 물이 포함된다. 본 발명의 제약 제형에서 유용한 담체 및/또는 희석제의 비-제한적인 특정 예로는 물 및 생리학적으로 허용가능한 완충 염수 용액 예컨대 pH 7.0-8.0의 포스페이트 완충 염수 용액이 포함된다.
- <133> 본 발명의 치료제는 호흡관에 또한 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 에어로졸 제약 제형 및 투약 제형을 또한 제공한다. 일반적으로, 이같은 투약 제형은 특정 압, 종양, 적응증 또는 관련 질환의 임상 증상을 치료 또는 예방하는데 효과적인 상당한 양의 1가지 이상의 본 발명의 작용제를 포함한다. 본 발명의 방법에 따라 치료된 암의 1가지 이상의 증상의 임의의 통계학적으로 유의한 약화가 본 발명의 범주 내의 이같은 암의 치료인 것으로 간주된다.
- <134> 별법적으로, 흡입 또는 취입에 의한 투여를 위해, 조성물은 건조 분말, 예를 들어, 치료제 및 적절한 분말 베이스 예컨대 락토스 또는 전분의 분말 혼합물의 형태를 취할 수 있다. 분말 조성물은 단위 투약 제형, 예를 들어, 캡슐 또는 카트리지, 또는, 예를 들어, 젤라틴 또는 블리스터(blister) 팩 내에 존재할 수 있고, 이러한 팩으로부터 흡입기, 취입기 또는 계량-용량 흡입기의 보조로 분말이 투여될 수 있다 (예를 들어, [Newman, S. P., Aerosols and Lung. Clarke, S. W. and Davia, D. eds., pp. 197-224, Butterworths, London, England, 1984]에 개시된 건조 분말 흡입기 및 가압 계량 용량 흡입기 (MDI) 참조).
- <135> 또한 본 발명의 치료제는 에어로졸 또는 흡입 형태로 투여되는 경우 수성 용액으로 투여될 수 있다. 따라서, 또다른 에어로졸 제약 제형은, 예를 들어, 약 0.1 ml/mg 내지 약 100 ml/mg의 치료될 적응증 또는 질환에 특이적인 1가지 이상의 본 발명의 치료제를 함유하는 생리학적으로 허용가능한 완충 염수 용액을 포함할 수 있다. 액체에 용해 또는 현탁되지 않은 미세 분할된 고체 폴리펩티드, 리간드, 또는 핵산 입자 형태의 건조 에어로졸이 또한 본 발명의 실행에 유용하다. 본 발명의 폴리펩티드, 리간드 또는 핵산은 살포 분말로 제형화될 수 있고, 평균 입자 크기가 약 1 내지 5 μm , 별법적으로 2 내지 3 μm 인 미세 분할 입자를 포함할 수 있다. 미세 분할된 입자는 당업계에 주지된 기술을 사용하여 분말화 및 스크린 여과에 의해 제조할 수 있다. 입자는 분말의 형태일 수 있는 미리 정해진 양의 미세 분할된 재료를 흡입함으로써 투여될 수 있다. 필요한 유효량이 다수의 투약 단위의 투여에 의해 도달될 수 있기 때문에 각각의 투약 제형의 개별적인 에어로졸 용량 내에 함유된 활성 성분(들)의 단위 함량은 특정 감염, 적응증 또는 질환을 치료하기 위한 유효량을 자체적으로 구성할 필요는 없다는 것이 이해될 것이다. 또한, 개별적으로 또는 일련의 투여로 투약 형태 내의 용량보다 적게 사용하여 유효량이 달성될 수 있다.
- <136> 흡입에 의한 상부 (비강) 또는 하부 호흡관의 투여를 위해, 본 발명의 치료제가 연무기 또는 가압 팩, 또는 에어로졸 스프레이를 전달하는 기타 편리한 수단으로부터 편리하게 전달될 수 있다. 가압 팩은 적절한 추진제 예컨대 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적절한 기체를 포함할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투여량 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 연무기에는 미국 특허 4,624,251; 3,703,173; 3,561,444; 및 4,635,627에 기술된 것들이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 본원에 개시된 유형의 에어로졸 전달 시스템은 Fisons Corporation (Bedford, Mass.), Schering Corp. (Kenilworth, NJ) 및 American Pharmoseal Co. (Valencia, CA)이 포함되는 다수의 시판되는 공급원으로부터 입수가능하다. 비강내 투여를 위해, 치료제는 점비액, 액체 스프레이를 통해, 예컨대 플라스틱 병 분무기 또는 계량-용량 흡입기를 통해 또한 투여될 수 있다. 전형적인 분무기는 Mistometer (Wintrop) 및 Medihaler (Riker)이다.
- <137> 또한, 활성 성분이 기술된 용태 또는 일부 다른 용태를 위해 또다른 치료제, 예를 들어, 통증 완화제, 항염증제, 항히스타민제, 항균제, 기관지확장제 등과 함께 사용될 수 있다.
- <138> 본 발명은 Nod1 발현을 조정하기 위한 패키지형 제약 조성물 예컨대 키트 또는 기타 용기에 관한 것이다. 키트 또는 용기는 Nod1 유전자 발현을 조정하기 위한 치료적 유효량의 제약 조성물, 및 Nod1 유전자 발현을 조정하기 위한 제약 조성물을 사용하기 위한 사용설명서를 보유한다. 제약 조성물은 Nod1 유전자 발현이 조정되도록 하는 치료적 유효량으로 1가지 이상의 본 발명의 Nod1 핵산을 포함한다. 조성물은 항종양제 또는 화학요법제를 또한 함유할 수 있다.
- <139> 또다른 실시양태에서, 본 발명은 NOD1 활성을 조정하기 위한 패키지형 제약 조성물을 제공한다. 키트 또는 용기는 NOD1 활성을 조정하기 위한 치료적 유효량의 제약 조성물, 및 NOD1 활성을 조정하기 위한 제약 조성물을 사용하기 위한 사용설명서를 보유한다. 제약 조성물은 NOD1 활성이 조정되도록 하는 치료적 유효량으로 1가지

이상의 본 발명의 NOD1 폴리펩티드 또는 NOD1 리간드를 포함한다.

<140> 본 발명의 하기의 상세한 실시예를 참조로 추가로 기술될 것이고, 이는 본 발명의 설명을 위해 제공되고, 본 발명을 한정하는 것으로 의도되지 않는다.

실시예

<141> **실시예 1: NOD1 유도는 중앙 퇴행에 이른다**

<142> 본 실시예는 Nod1이 세포를 TNF α-유도 세포자멸사에 대해 감작시킨다는 것 및 NOD1-특이적 리간드가 임의의 다른 공지된 세포자멸사 유발제의 부재 하에 MCF-7 유방암 세포에서 세포자멸사를 유도한다는 것을 설명한다. 생체내 동물 모델을 사용하여 중앙 퇴행에서의 NOD1의 역할을 증명하였고, SCID 마우스로 수행된 이종이식편이 수반되었다. 이러한 데이터는 Nod1이 중앙 세포 성장을 제어하는데 중요한 역할을 한다는 것을 가리킨다.

<143> **재료 및 방법**

<144> **세포 배양.** 인간 유방암 세포주 MCF-7 및 SKBR3를 10 % 소 태아 혈청, 2 mM 글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 10 µg/ml 스트렙토마이신이 보충된 돌베코 변형 이글 배지에서 유지시켰다.

<145> **포유류 발현 구축물 및 부위-지정 돌연변이유발.** 인간 FLAG-Nod1, FLAG-Nod2 cDNA를 Gabriel Nuez 박사로부터 취득하였고, 이는 [Y. Ogura et al., J. Biol. Chem. 276, 4812 (2001)]에 기술되어 있다. 인간 Myc-RIP2 wt 및 Myc-RIP2 (K47A)는 C. Vincenz 박사 (University of Michigan Medical School)로부터 취득하였다. Nod1 돌연변이체 (V41Q 및 K208R)는 부위-지정 돌연변이유발에 의해 구축하였다. Myc-RIP2 ΔCARD은 카르복시-말단 CARD 도메인의 결실 및 pcDNA4/Myc/His 플라스미드 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 내로의 클로닝에 의해 생성되었다. 뉴클레오티드 서열을 DNA 서열분석에 의해 모두 확인하였다.

<146> **레트로바이러스 형질감염.** 본 연구에서 사용된 다양한 유전자들을 pMSCV-Blasto, pBabe-Puro 또는 pBabe-Neo 레트로바이러스 벡터 내로 클로닝하였다. MCF-7 세포를 입수가 가능한 절차를 사용하여 안정적으로 형질감염시켰다. 간략하게, 양생(amphotropic) 293 세포를 선택된 Nod1, Nod2 및 기타 단백질을 코딩하는 레트로바이러스 벡터로 형질감염시켰다. 형질감염 24시간 후, 세포를 32°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션하여, 바이러스 입자가 생산되었다. 표적 세포를 다음날 재조합 레트로바이러스 입자를 함유하는 바이러스-함유 293 세포 상청액으로 감염시켰다. 10 µg/ml 블라스티시딘 S (Calbiochem EMD Biosciences Inc., San Diego, CA), 500 µg/ml 젠타마이신 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 또는 5 µg/ml 푸로마이신 (Calbiochem)으로 세포를 선별하였다. 모든 구축물의 발현을 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인하였다. 17β-에스트라디올 (Calbiochem)의 효과를 결정하기 위해, 세포를 5 % 숏이 스트리핑된(stripped) FCS가 보충된, 페놀 레드가 없는 DMEM에서 배양하였다. 세포를 다양한 농도의 17β-에스트라디올 (E₂)이 있는 96웰 플레이트에 24시간 동안 과중하고, 3^H-티미딘 (1 µCi/웰, MP Biomedicals, Irvine, CA)으로 펠싱하였다. 세포를 유리 섬유 필터 상에서 수확하고, 방사선활성을 액체 섬광에 의해 측정하였다.

<147> **웨스턴 블롯 분석 및 면역침전.** 세포를 광범위하게 세정하고, 50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % 글리세롤, 1 % Nonidet P-40, 14 µM 웨스타틴 A, 100 µM 류펩틴, 3 mM 벤즈아미딘, 1 mM PMSF, 1 mM 피로인산나트륨, 10 mM 오르토바나듐산나트륨, 100 U/ml 아프로티닌 및 100 mM 플루오르화나트륨을 함유하는 용해 완충액을 사용하여 용해시켰다. 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 세포 용해물을 원심분리하고 (14000 rpm, 10분, 4°C), 상청액을 회수하였다. 면역침전을 위해, 세포 용해물을 3시간 동안 4°C에서 지속적으로 진탕하면서 5 µg의 항체와 혼합하였다. 하룻밤 동안 면역 복합체가 20 µl 단백질 A-세파로스 비드에 결합되도록 하고, 비드를 용해 완충액으로 3회 세정하였다. 면역침전물을 SDS-PAGE 상에서 분리시키고, PVDF 막으로 옮겼다.

<148> **세포 생존율 분석.** 프로피듐 요오다이드 배제 분석법: 세포를 지시된 바와 같이 2일 동안 자극하였다. 이어서, 세포를 수확하고, FACS 완충액 (1 % FCS 및 0.1 % Na₃I를 함유하는 PBS)에서 2회 세정하고, 프로피듐 요오다이드 (PI)-함유 FACS 완충액 (4 µg/ml)에 재현탁시켰다. 세포 사망 정도를 FACSCalibur 유동 세포 측정기 (Becton Dickinson, Mountain View, CA)로 분석하였다. **DAPI 염색:** MCF-7 세포를 챔버 슬라이드에 플레이팅하고, 2일 동안 자극하였다. 세포를 PBS로 세정하고, 세포자멸사성 핵을 1 µg/ml DAPI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)로 염색하였다. 세포를 4 % 파라포름알데히드에 고정시키고, 형광 현미경에 의해 시험하였다.

<149> **TUNEL 염색:** 세포를 γTriDAP로 처리하고, 세포자멸사성 핵을 TUNEL (TdT-매개 UTP Nick-말단 표지화) 분석에 의

해 제조업자의 사용설명서 (ROCHE, Indianapolis, IN)에 따라 모니터링하였다.

<150> **IL-8 ELISA.** 형질감염된 HeLa 세포의 배양 상청액 내의 IL-8의 농도를 ELISA에 의해 96-웰 Immunlon 플레이트 (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA)를 사용하여 측정하였다. ELISA는 포착을 위해 mAb MAB208를, 검출을 위해 비오틴화 폴리클로날 토끼 항-인간 IL-8 Ab (R&D Systems, Minneapolis, MN)에 이어서 스트렙타비딘 HRP을 사용하여 수행하였다.

<151> **누드(nude) 마우스에서의 인간 이종이식.** MCF-7 Blasto, MCF-7 C20 및 MCF-7 C20/Nod1 세포를 트립신처리하고, PBS로 1회 세정하고, $1.5 \times 10^7/ml$ 의 농도로 재현탁시켰다. 200 μl 의 각각의 현탁액을 흉선이 없는 SCID/SCID 또는 SCID/Nod(비-비만형 당뇨병) 암컷 마우스의 옆구리 내로 피하 접종하였다. 종양 크기를 1 주일에 한번 평가하였다. 종양 부피를 계산하였다.

<152> **결과**

<153> **Nod1은 TNF α - 및 Nod1 리간드-유도 세포자멸사에서 역할이 있다.** 유방암 상피 세포주 MCF-7는 생물학적 신호 예컨대 TNF α 또는 세포독성 약물에 의해 유도된 세포자멸사를 연구하는데 널리 사용되어 왔다. MCF-7 세포주는 에스트로겐 양성 유방암을 연구하는 모델로 또한 사용되어 왔다 ([Simstein et al., Exp. Biol. Med. 228:995-1003 (2003)]).

<154> TNF α -유도 세포 사망에 필요한 유전자를 확인하기 위하여 레트로바이러스-매개 돌연변이유발을 사용하는 유전자 스크린에서 MCF-7 세포를 먼저 사용하였다. MCF-7 세포를 레트로바이러스 구축물에 노출시킨 후, 클론을 TNF α 저항성에 대해 선별한 후, 돌연변이된 유전자를 TNF α -저항성 클론에서 확인하였다. 저항성 클론 중 하나가 파괴된 Nod1 유전자를 함유하였다; 이러한 TNF α 저항성 클론의 세포주를 MCF7-C20으로 명명하였다. 레트로바이러스 구축물로부터의 pDisrup 삽입은 Nod1 유전자의 3' 부분에 류신-풍부 영역 9 및 10 내에 맵핑되었다 (LRR9-10; 도 1A 참조). 이러한 삽입은 블라스티시딘 오픈 리딩 프레임을 Nod1 코딩 영역 내에 놓았다. 블라스티시딘-Nod1 융합 mRNA의 개략도가 도 1A에 개략적으로 제시된다. 항-인간 Nod1 모노클로날 항체를 사용한 웨스턴 블롯을 수행하여 NOD1 단백질이 MCF7-C20 세포에서 발현되는지를 테스트하였다. 내인성 NOD1 단백질이 어버이 MCF-7 세포 용해물 ("wt"로 표지됨)에서 검출되었지만, MCF-7 C20 세포 용해물의 웨스턴 블롯은 Nod1의 검출가능한 발현을 나타내는데 실패하였고, 이는 MCF-7C20 내의 기능성 Nod1 대립유전자가 파괴되었음을 가리킨다 (도 1B).

<155> MCF-7 C20 세포주를 부다페스트 조약에 따라 2006년 2월 23일에 또는 이날 즈음에 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, Va., 20110-2209 USA (ATCC))에 ATCC 수탁 번호 ATCC 번호 PTA-7401 로 기탁하였다.

<156> Nod1 기능의 상실은 세포자멸사에 대해 유의한 효과가 있었다. 특히, MCF-7 C20 세포 (Nod1 발현 없음)는 Nod1을 발현한 어버이 MCF-7 세포에 비해 TNF α -유도 세포자멸사에 대해 유의하게 더욱 저항성이었다 (도 1C). 이러한 데이터는 Nod1이 MCF-7 세포 내의 TNF α 경로에서 민감화제로서 존재한다는 것과 Nod1이 MCF-7 유방암 세포에서 세포자멸사를 촉진한다는 것을 시사한다.

<157> 세포자멸사에서의 Nod1의 역할을 추가로 연구하기 위해, 다양한 세포 유형을 Nod1 리간드인 D-Ala-L-Glu-디아미노피멜산 (γ TriDAP)과 함께 인큐베이션하였고, 이는 Nod1을 특이적으로 활성화시킨다. 테스트된 세포 유형에는 어버이 MCF-7 세포주, Nod1-결핍 MCF-7C20 클론, 및 Nod1이 과발현되도록 추가적인 인간 Nod1 대립유전자를 함유하도록 조작된 세포주 (MCF-7Nod1)가 포함되었다. γ TriDAP-유도 세포자멸사에 대한 C20 세포의 저항성이 Nod1의 부재로부터 초래되었는지 여부를 결정하기 위해, Nod1-충분 C20 세포 (C20/Nod1)가 생성되도록 인간 Nod1이 MCF-7 C20 세포에서 안정적으로 발현되었다. 또다른 대조군으로서, 어버이 MCF-7 세포주가 빈 레트로바이러스 벡터로 형질감염되어 MCF-7 Blasto가 생성되었다. 세포를 시클로헥시미드 (CHX)의 존재 또는 부재 하에 γ TriDAP로 처리한 후 세포 사망을 프로피듐 요오다이드 염색 및 유동 세포측정법에 의해 결정하였다.

<158> 시클로헥시미드의 존재 하에서의 γ TriDAP에 대한 야생형 MCF-7 세포의 노출은 약 25%의 세포 사망을 유도하였다 (도 2A, 상부 좌측 패널, 빗금 막대). 시클로헥시미드 단독 (백색 막대) 또는 γ TriDAP 단독으로 처리된 야생형 세포에서는 세포 사망이 관찰되지 않았다. 반면에, MCF-7C20 (Nod1 발현 없음) 세포는 γ TriDAP 더하기 시클로헥시미드의 효과에 대해 전적으로 저항성이었고, 이러한 세포에서는 세포자멸사에서의 실질적인 증가가 관찰되지 않았다 (도 2A, 상부 우측 패널). Nod1의 MCF-7C20 세포 내로의 재도입은 γ TriDAP-유도 세포자멸사에 대한 이러한 세포의 완전한 민감도를 복원시켰다 (도 2A, 하부 우측 패널). 시클로헥시미드 및 γ TriDAP의 조합은 Nod1을 안정적으로 과발현한 MCF-7 세포에서 광범위한 세포 사망을 유도하였다 - 이러한 MCF-7Nod1 세포

에서의 세포 사멸은 48시간 처리 후 거의 60%에 도달하였다 (도 2A, 하부 우측 패널).

- <159> Nod1 리간드인 γ TriDAP가 최적의 세포자멸사 유도에 필요하였다. 메소DAP가 Glu에 γ 위치가 아니라 α 위치에서 결합된, α TriDAP로 명명된 불활성 대조군 트리펩티드는 시클로헥시미드의 존재 하에 MCF-7 세포와 함께 인큐베이션되었을 때 세포 사멸을 유도하지 않았다 (도 2A의 α Tri).
- <160> 대조군으로서, 매질 ("Med")을 γ TriDAP 또는 α TriDAP 대신 사용하였다. 매질의 첨가는 세포자멸사에 대해 실질적으로 효과가 없었다. MCF-7 Blasto 및 MCF-7Nod1 세포에서의 내인성 Nod1의 발현 및 Nod1의 과발현을 면역침전 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인하였다 (도 2B). 이같은 발현이 MCF-7 C20 세포에서는 나타나지 않았다 (도 2B). 이러한 데이터는 γ TriDAP 존재 하에서의 Nod1이 MCF-7 유방암 세포를 세포자멸사에 대해 감각시킨다는 것을 나타낸다.
- <161> 그러나, γ TriDAP 단독으로의 세포의 처리는 야생형 세포에서 세포자멸사를 유도하지 않았다. 대신, γ TriDAP 및 시클로헥시미드 모두의 첨가가 세포자멸사가 관찰되기 전에 필요하였다. 세포자멸사 유발제 예컨대 시클로헥시미드가 세포자멸사가 관찰되기 전에 종종 필요하였다. 그러나, MCF-7 세포에서 주목된 γ TriDAP 또는 TNF α 에 대한 민감도에서의 변화가 독시루비신 및 캄포토테신이 포함되는 또다른 세포자멸사성 자극으로는 나타나지 않았고, 이때 어버이 및 C20 세포는 세포 사멸에 대해 동등하게 민감하였다 (데이터는 제시되지 않음).
- <162> γ TriDAP로 처리된 MCF-7 세포의 광학현미경 관찰은 세포자멸사의 특징이고 괴사에서는 나타나지 않는 형태학적 변화를 나타냈다 (도 2C, 패널 a-b). 그러나, γ TriDAP에 의해 유도된 세포 사멸이 실제로 세포자멸사임을 확인하기 위해, DAPI 및 TUNEL 염색을 수행하였다. 도 2C에 나타난 바와 같이, TUNEL 염색 (패널 e-f)에 의해 관찰되는 바와 같은 핵 단편화와 함께, MCF-7 세포 핵은 DAPI 염색 (패널 c-d)에 의해 나타나는 바와 같이 γ TriDAP로의 처리 후 농축된 크로마틴을 함유하였다. 처리되지 않은 세포에서는 핵 염색이 검출가능하지 않았다.
- <163> γ TriDAP가 세포자멸사를 유도한다는 것의 추가적인 확인을 2개의 광범위한 스펙트럼의 카스파제 억제제인 z-VAD-FMK 및 Boc-D-FMK를 사용하여 수득하였다. z-VAD-FMK 및 Boc-D-FMK 모두 γ TriDAP-유도 세포 사멸을 폐기하였다 (도 2D). 마지막으로, γ TriDAP를 MCF-7 세포에 첨가한 결과 폴리(ADP-리보스)중합효소 (PARP) 및 카스파제 6, 7, 8 및 9가 단백질분해성으로 절단되었지만, 불활성 대조군 트리펩티드인 α TriDAP로는 절단되지 않았다 (도 3, 9B). MCF-7 세포는 카스파제 3이 결여된 것으로 공지되어 있고, 어버이 MCF-7 세포 또는 MCF-7 C20 세포에서의 카스파제 3의 발현은 γ TriDAP에 대한 응답 패턴을 변화시키지 않았다 (데이터는 제시되지 않음).
- <164> 따라서, 여러 계통의 증거가 Nod1에 대한 동족 리간드인 γ TriDAP에 의해 MCF-7 세포에서 유도되는 특정한 세포자멸사성 경로가 있고, 이러한 경로가 NOD1 단백질의 존재를 필요로 한다는 것을 가리킨다.
- <165> γ TriDAP-유도 세포자멸사에 대한 MCF-7C20 세포의 저항성이 Nod1의 부재로부터 초래된다는 것을 추가로 입증하기 위해, 인간 Nod1을 MCF-7C20 세포에서 안정적으로 발현시켜, Nod1-발현 MCF-7C20 세포 (MCF-7C20/Nod1)를 생성시켰다. 이러한 Nod1-결핍 세포 내로의 Nod1의 재도입은 γ TriDAP에 대한 이러한 세포의 완전한 민감도를 복원시켰고 (도 2A), 카스파제 및 PARP 절단에 이르렀다 (도 3).
- <166> Nod1-의존성 세포자멸사가 다른 인간 세포주에서 발생하는지를 결정하기 위해, Nod1 경로의 활성화에 대한 민감도가 증강되도록 Nod1이 안정적으로 발현된 일련의 상피 세포주를 시험하였다. 세포를 CHX (C)의 존재 또는 부재 하에 TNF α (T) 및 γ TriDAP (γ)로 처리하고, 세포자멸사의 척도로서 PI 염색에 의해 생존율에 대해 모니터링하였다 (표 1).

표 1

TNF α 및 γ TriDAP 처리 후의 세포 생존율

세포주	세포자멸사							IL-8 생산			
	Ctrl	T	γ	γ/C	T/C	γ/T	$\gamma/T/C$	Ctrl	T	γ/C	γ/T
SK-BR3	-	-	-	-	+	-	+++	-	++	++	++
A431	-	+	-	-	+	-	++	-	+	+++	+++
293	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
HT29	-	++	-	-	+++	++	+++	++	++	++	+++
CaCo2	-	+	-	-	++	+	++	-	+	-	++

<167>

<168>

테스트된 세포주 중에서, SK-BR3 및 A431 세포 모두 Nod1-의존성 세포자멸사 경로를 나타냈다. 그러나, MCF-7 세포주와는 대조적으로, 이러한 세포들에서는 γ TriDAP가 TNF α 및 CHX와 함께 첨가되었을 때에만 세포자멸사가 진행되었다. CaCo2 및 HT29 세포에서는 TNF α 및 CHX에 응답하여 세포자멸사가 진행되었지만, Nod1 경로가 γ TriDAP에 의해 동시에 활성화되었을 때 상승작용성 효과가 관찰되지 않았다. 293 세포와 같은 또다른 세포주는 TNF α 및 CHX가 첨가되었을 때에도 γ TriDAP-유도 세포 사멸에 대해 저항성이었다. Nod1을 발현하는 293 세포가 Nod1 리간드에 응답하여 IL-8을 방출하기 때문에, Nod1-의존성 세포자멸사의 결여는 γ TriDAP가 NOD1을 활성화시키지 못하는 것의 결과가 아니다. HT29 및 CaCo2 세포는 NOD1 단백질의 존재에도 불구하고 세포자멸사 및 IL-8 방출 분석 모두에서 γ TriDAP에 대해 불량하게 응답성이었고, 이는 1가지 이상의 양성 조절인자가 부재하거나, 또는 강력한 음성 조절 경로가 존재한다는 것을 시사한다. 수반되는 복합적인 상호작용에도 불구하고, Nod1-의존성 세포자멸사가 SK-BR3 및 A431 세포주가 포함되는 여러 상피 세포주에서 명백하다.

<169>

NOD1은 SKBR3 인간 유방암 세포주에서 발현되고, 상기 지시된 바와 같이, 이러한 암 세포에서 세포자멸사를 또한 조절한다. SKBR3 야생형 세포는, Nod1를 과발현하는 SKBR3보다, TNF α 또는 γ TriDAP 농도의 함수로서 세포자멸사를 덜 나타낸다 (도 9A). 또한, 세포자멸사성 SKBR3 세포의 백분율은 배양 조건에 따라 변한다 (도 9B). 도 9B에 나타난 바와 같이, SKBR3 세포의 세포자멸사는 세포가 γ TriDAP (γ Tri) + TNF α (TNF) 및 시클로헥시미드 (CHX)에 노출되었을 때 최고이다. 불활성 γ TriDAP 유사체인 α TriDAP (α Tri)로의 치환은 감소된 세포자멸사에 이르렀다. 이러한 작용제들에 노출된 SKBR3 세포의 용해물의 웨스턴 분석은 폴리(ADP-리보스)중합효소 (PARP) 및 카스파제 3, 7, 및 8에 단백질분해성 절단이 진행되었음을 나타냈다. 도 9C는 SKBR3 세포를 여러 작용제의 존재 하에 배양한 후 관찰된 세포자멸사성 야생형, NOD1-발현 및 CLARP-발현 SKBR3 세포의 백분율을 그래프로 도해한다. 지시된 바와 같이, SKBR3 세포의 세포자멸사는 시클로헥시미드 (CHX 또는 C), TNF α (TNF 또는 T) 및 γ TriDAP (γ Tri)가 존재할 때 (즉, "gTC" 조합) 최고이다. 그러나, CLARP 발현은 다양한 배양 조건 하에 세포자멸사를 증가시키지 않았다.

<170>

인간 Nod1의 기존의 구조-기능 연구는 P-루프(loop) 잔기 (K208)가 일시적으로 과발현된 NOD1 단백질이 293 세포에서 NF- κ B를 활성화시키는데 필요하다는 것을 가리킨다. 또다른 연구는 K208의 돌연변이가 뉴클레오티드-결합/올리고머화 (NBD/NOD) 도메인에 의해 매개되는 올리고머화에 요구되는 입체구조성 변화를 차단한다는 것을 가리킨다. 또한 Nod1의 CARD 도메인에서의 돌연변이 V41Q가 카스파제 9가 Nod1에 결합하는 것을 파괴하여, 293 세포에서의 일시적인 형질감염 연구 동안 Nod1-의존성 세포자멸사가 억제되는 것으로 나타났다.

<171>

추가적인 실험을 수행하여 어떤 NOD1 구조 도메인이 세포자멸사에 필요한지를 결정하였다. 도 4A에 나타난 바와 같이, K208R 돌연변이는 γ TriDAP + 시클로헥시미드의 효과를 폐지시켰고, V41Q 돌연변이는 유의한 효과가 거의 없거나 없었다. 이러한 돌연변이 NOD1 폴리펩티드들은 도 4B에 묘사된 웨스턴 블롯에 나타난 바와 같이 효율적으로 발현되었다. 따라서, 이러한 폴리펩티드들의 상이한 효과는 발현 수준에서의 차이로 인한 것이 아니었다. 대신, 이러한 데이터는 올리고머화에 요구되는 입체구조성 변화를 매개하는 뉴클레오티드-결합/올리고머화 (NBD/NOD) 도메인이 Nod1 세포자멸사에 필요하다는 것을 가리킨다.

<172>

추가적인 실험은 γ TriDAP-유도 IL-8 생산이 MCF-7C20 세포에서 억제되었다는 것을 나타냈고 (데이터는 제시되지 않음), 야생형 Nod1이 MCF7-C20Nod1 세포에서 발현되었을 때 (도 5C), 또는 V41Q Nod1 돌연변이체가 MCF-7C20 (즉, MCF-7C20V41Q) 세포에서 발현되었을 때 (데이터는 제시되지 않음), 이같은 IL-8 생산이 복원되었다. 그러나, MCF-7C20 세포에서의 K208R Nod1 돌연변이 폴리펩티드의 발현 (즉, MCF-7C20K208R)으로는 γ TriDAP-유

도 세포자멸사가 복원되지 않았다.

<173> Nod2 활성화는 MCF-7 세포에서 세포자멸사를 유도하지 않는다

<174> Nod2의 특이적 활성화제인 무라미딘 디펩티드 (MDP)에 의한 Nod2의 활성화가 어버이 MCF-7 세포 또는 Nod2를 과발현하는 MCF-7 세포 (MCF-7 Nod2)에서 세포자멸사를 개시시키는지 여부를 확인하기 위해 실험을 또한 수행하였다. 따라서, γ TriDAP 또는 MDP를 각각의 이러한 세포주에 첨가하고, 세포자멸사 (도 5A) 및 IL-8 생산 (도 5C)을 측정하였다. MDP + CHX로 처리된 MCF-7 Nod2 세포에서는 증가된 세포자멸사가 진행되지 않았다. 대조적으로, γ TriDAP 첨가는 예상대로 세포 사멸을 일으켰다. MDP 처리로는 MCF-7 Nod2 세포에서 IL-8 분비가 초래되지 않았다 (도 5C). 안정적인 MCF-7 형질감염체에서의 Nod1 및 Nod2의 발현이 면역블롯팅에 의해 확인되었다 (도 5B). Nod2로의 MCF-7 C20 세포의 보완으로는 MDP 또는 γ TriDAP 첨가 후 세포자멸사가 초래되지 않았다 (테이타는 제시되지 않음).

<175> Nod1-의존성 세포자멸사에서의 카스파제 관여

<176> 특정 카스파제에 의해 개시되는 독특한 세포내 경로의 활성화에 이어서 세포자멸사가 발생하는 것으로 현재 이해된다. Nod1-의존성 경로에서의 개시 카스파제에 관한 정보를 획득하기 위해, 카스파제에 대한 특이성이 다양한 약리학적 및 생물학적 억제제들을 사용하였다. 광범위한 스펙트럼의 억제제인 z-VAD는 γ TriDAP-유도 세포자멸사를 거의 완전히 차단하였다 (도 6A). 대조적으로, 카스파제 1, 2, 6, 및 7의 특이적 억제제는 세포자멸사에 대해 단지 최소의 효과만이 있었다 (도 6A). 그러나, 카스파제 9 억제제 LEHD 및 카스파제 8 억제제 IETD에는 z-VAD로 나타난 것과 유사한 억제 수준으로 억제 효과가 현저하였다 (도 6A). 이러한 테이타는 γ TriDAP-유도 세포자멸사의 개시에서의 카스파제 8 및 9에 대한 가능한 역할을 시사한다.

<177> 2가지 주요 세포자멸사 경로가 기술되었다; 내인성 (미토콘드리아, 스트레스 유도) 및 외인성 (수용체 매개) 경로. 세포자멸사에 참여하는 카스파제는, 카스파제 9 및 카스파제 8가 각각 내인성 및 외인성 경로에서 상류 개시인자이면서, 계층성 캐스케이드 내로 조직화되는 것으로 여겨진다. 이러한 경로들을 구별하기 위해, 여러 단백질 억제제들이 사용되었고, 이들은 형질감염에 의해 세포 내로 도입되었다.

<178> 먼저, CLARP (Flip) 형질감염체들을 테스트하였다. CLARP는 카스파제 8의 특이적 억제제인 것으로 여겨지고, 2개의 사망 이펙터 도메인 (DED)을 갖고, 불활성 카스파제 도메인을 갖는다. CLARP는 카스파제 8 및 FADD와 상호작용함으로써 Fas, TNF α 및 TRAIL을 포함하는 다양한 리간드-수용체 쌍에 의해 유도되는 세포자멸사를 특이적으로 억제하는 것으로 알려져 있다. γ TriDAP-유도 세포 사멸에 대한 CLARP의 효과를 결정하기 위해, 단독으로 또는 Nod1의 존재 하에 CLARP를 안정적으로 발현하는 MCF-7 세포주 (MCF-7 CLARP)를 구축하였다. MCF-7CLARP 세포가 γ TriDAP/CHX와 함께 인큐베이션되었을 때, 세포 사멸이 전적으로 억제되었고, 이는 Nod1-유도 세포자멸사성 경로가 카스파제 8에 의해 개시되는 경로와 중첩된다는 것을 시사한다 (도 6C, 상부 패널).

<179> 또다른 항-세포자멸사성 단백질인 Bcl-2가 미토콘드리아로부터 사이토크롬 c의 방출을 억제함으로써 Apaf1/카스파제 9 복합체의 활성화를 차단하는 것으로 나타났다. Bcl-2를 과발현하는 안정적인 MCF-7 세포주가 생성되었고, Nod1 활성화 시 이러한 Bcl-2-발현 MCF-7 세포에서 세포 사멸을 평가하였다. 도 6C에 제시된 바와 같이 (하부 패널), Bcl-2의 과발현은 γ TriDAP-유도 세포 사멸을 부분적으로만 방지하였다.

<180> MCF-7 세포는 카스파제 III이 결여된 것으로 알려져 있다. 본 발명가들에 의한 추가적인 연구로 어버이 MCF-7 또는 MCF-7C20 세포에서의 카스파제 III의 발현이 Nod1 리간드 γ TriDAP에 대한 이러한 세포의 응답 패턴을 변화시키지 않았다는 것이 결정되었다 (테이타는 제시되지 않음). 이러한 실험은 카스파제 8이 MCF-7 세포에서 γ TriDAP-유도 세포자멸사를 개시시키는데 우세한 역할을 한다는 것을 가리킨다. 간접적이긴 하지만, 카스파제 9와 상호작용하는데 실패한 Nod1의 V41Q 돌연변이체가 γ TriDAP 유도 세포자멸사 (도 4A) 및 IL8 생산 (테이타는 제시되지 않음)을 지지하는데 있어서 야생형 Nod1와 동등하였다는 발견으로부터 추가적인 지지가 유래되었다.

<181> 키나제 활성이 아니라 CARD 도메인이 Nod1-유도 세포자멸사에 필요하다.

<182> RIP2는 CARD 도메인을 함유하는 단백질 키나제이다. RIP2는 NF- κ B 활성화에 이르는 Nod1 신호전달에서 중요한 것으로 나타났다 ([Kobayashi et al., Nature 416:194-99 (2002)]; [Chin et al., Nature 416:190-94 (2002)]). CARD 도메인이 결여된 RIP2가 Nod1 신호전달의 우성 음성 억제제로서 작용하기 때문에 CARD-CARD 상호작용을 통해 RIP2가 Nod1에 결합하는 것이 NF- κ B 활성화에 필수적인 것으로 여겨진다.

<183> γ TriDAP-유도 세포자멸사에서 RIP2 키나제 활성의 역할을 평가하기 위해 여러 RIP2 돌연변이체가 MCF-7 세포에

서 안정적으로 발현되었다. CARD 도메인이 결여된 RIP2의 발현은 Nod1-유도 세포 사망을 완전하게 폐지시켰다 (도 7A). 대조적으로, 야생형 RIP2 또는 촉매적으로 불활성인 RIP2 (RIP2 KD)의 발현은 정상 수준의 Nod1을 발현한 어버이 MCF-7 Blasto에서 나타난 세포자멸사 수준에 비해 세포자멸사의 정도를 증가시켰다 (도 7A, 13A). 야생형 RIP2 및 RIP2 KD 구축물을 발현하는 세포는 더 낮은 농도의 γ TriDAP에 대해 민감성이었고, Nod1만을 발현하는 세포 (도 13C) 또는 어버이 MCF-7 Blasto (데이터는 제시되지 않음)보다 더 빨리 사망하였다. 또한, MDP는 RIP2 KD를 발현하는 세포에서 높은 수준의 세포자멸사를 유도하는데 효과적이었지만, 야생형 RIP2 또는 RIP2 Δ CARD를 발현하는 세포에서는 효과적이지 않았다 (도 13A). 또한 MDP는 RIP2 KD 세포에서 Nod1-발현 세포에서보다 높은 수준의 세포자멸사를 유도하였다 (도 13C). 그러나, TNF α 는 야생형 RIP2, RIP2 KD 및 RIP2 Δ CARD를 발현한 세포에서 유사한 수준의 세포자멸사를 유도하였다 (도 13B). γ TriDAP-유도 IL-8 분비는 야생형 RIP2를 발현하는 세포에서 최고였다 (도 13D). 각각의 연구된 형질감염된 세포주들은 대략 동일한 양의 야생형 또는 돌연변이 RIP2를 발현하였고 (도 7B), 이는 발현 수준이 세포 사망에서의 차이의 원인이 아니었음을 가리킨다. 따라서, Nod1-의존성 세포자멸사 경로는 RIP2 CARD 도메인을 필요로 하지만, 놀랍게도, RIP2 키나제 활성을 필요로 하지 않는다.

<184> γ TriDAP-유도 JNK 인산화에 대한 RIP2 발현의 효과를 또한 시험하였다 (도 7C). 야생형 RIP2 또는 RIP2 KD를 발현하는 MCF-7 세포가 시클로헥시미드의 존재 하에 2시간 동안 γ TriDAP에 노출되면, JNK의 인산화가 유도되었다 (도 7C). 그러나, γ TriDAP 및 시클로헥시미드는 RIP2 Δ CARD 세포에 대해 이같은 효과가 없었다.

<185> 따라서, Nod1은 에스트로젠-민감성 종양 성장을 조절하기 위해 RIP2 (스캐폴드(scaffold) 단백질 키나제)를 필요로 한다. 그러나, 에스트로젠-민감성 종양 성장의 Nod1-RIP2 조절이 RIP2 CARD 도메인을 필요로 하지만, Nod1-의존성 세포자멸사 및 종양 성장의 억제 모두를 위한 적합한 하류 신호를 제공하기 위해 RIP2 키나제 활성을 필요로 하지 않는다. 유사한 결과가 p38으로 획득되었다 (데이터는 제시되지 않음). IL-1이 모든 형질전환체에서 JNK 인산화를 강하게 유도하였기 때문에, RIP2 Δ CARD 세포에서의 MAPK 활성화의 부재는 변화된 MAPK 키나제 신호전달로 인한 것이 아니었다. 따라서, MCF-7 세포에서의 γ TriDAP의 활성화는 RIP2를 필요로 하지만, 키나제 활성은 필요로 하지 않는다.

<186> 이러한 데이터는 우성 음성 형태의 RIP2의 발현이 γ TriDAP-유도 세포 사망을 폐지시켰기 때문에 Nod1 하류의 단백질 키나제인 RIP2/RICK가 Nod1 세포자멸사 유발성 경로의 필수적인 성분일 수 있다는 것을 가리킨다.

<187> **Nod1은 종양 형성을 제어한다.** Nod1-의존성 세포자멸사 경로는 종양 세포 성장 조절, 및 종양발생에 이르는, 세포 사망으로 진행되지 못하는 악성 세포를 포함하는 다수의 생물학적 프로세스에서 중요할 수 있다. SCID 마우스에서의 종양 성장의 이종이식 모델을 사용하여, 종양 성장 및 종양 거부에서의 Nod1의 역할을 시험하였다. MCF-7 Blasto, MCF-7C20 세포 및 MCF-7C20Nod1 세포 (각각 합계 약 3×10^6 개의 세포)를 개별적으로 암컷 마우스의 옆구리 내로 피하 주사하여, SCID/SCID 또는 SCID/Nod1 마우스에서 종양 성장을 유도하였다. 주사후 8주까지 일주일에 한번씩 종양 형성에 대해 동물들의 점수를 매겼다.

<188> 3가지 모두의 세포 집단에서 주사 후 처음 몇주 동안 종양이 동등하게 성장하여, 주사 15일 후, 계산된 종양 부피는 모든 마우스에서 대략 10 mm³였다. 따라서, MCF-7 Blasto, MCF-7C20 세포 및 MCF-7C20Nod1 세포는 모두 마우스 내로의 도입 후 약 15일까지 종양을 발생시킬 수 있었다.

<189> 그러나, MCF-7 Blasto 및 MCF-7C20Nod1 세포로부터 형성된 종양은 8주 실험의 나머지 기간에 걸쳐 거의 사라졌다. MCF-7Blasto 및 MCF-7C20Nod1 세포에 의해 생산된 초기 종양은 신속하게 크기가 감소되고 퇴행되었다 (도 10). MCF-7C20 세포의 주사만이 퇴행되지 않고 계속 성장한 커다란 원형 종양을 주사 부위에 생산하였다. 이러한 결과는 Nod1의 부재가 종양이 성장되도록 하고, Nod1의 존재는 종양 퇴행에 이끈다는 것을 가리킨다.

<190> 이러한 연구가 SCID 마우스에서 수행되었기 때문에, 이종이식편의 종양 성장에서의 면역계의 역할은 무시할 수 있을 정도였다. 또한, MCF-7Blasto, MCF-7Nod1, MCF-7C20 및 MCF-7C20Nod1을 발현하는 세포주들을 포함하여 각각의 연구된 MCF-7 세포주들이 조직 배양 조건 및 연질-한천 콜로니 형성 분석에서 동일한 성장 특징을 가졌기 때문에 (데이터는 제시되지 않음), MCF-7Blasto 및 MCF-7C20Nod1 세포가 이식된 동물에서의 종양의 부재는 감소된 증식 잠재력으로 인한 것이 아니었다.

<191> 3가지 별도의 실험의 결과의 요약이 표 2에서 제공되고, 이때 SCID/SCID 마우스가 실험 1 및 2에서 사용되었고, SCID/Nod1 마우스가 실험 3에 사용되었다.

표 2

MCF-7 세포주에 의해 유도된 종양의 발생률

세포주	실험 1	실험 2	실험 3	전체
야생형 MCF-7	2/8	0/8	0/6	2/22
MCF-7 C20	7/8	4/8	5/6	16/22
MCF-7 C20 Nod1	1/8	1/8	0/6	2/22

<192>

<193>

이러한 결과는 Nod1 기능의 손실 (MCF-7 C20 세포가 사용된 경우와 같음)이 종양이 퇴행되지 않을 가능성을 증가시킨다는 것을 나타낸다. Nod1 기능의 복원 (MCF-7 C20 Nod1 세포가 사용된 경우와 같음), 또는 Nod1 발현의 유도는 종양이 퇴행할 가능성을 증가시킨다.

<194>

한 실험을 또한 수행하였고, 3.5주 전에 MCF-7C20 및 MCF-7C20Nod1 세포가 주사된, 종양이 있는 SCID/SCID 마우스로부터 종양을 수확하였다. 그 후, 종양 조직을 잘게 썰고, 조직 배양 플라스크 내에 놓았다. 약 1주일 후, 임의의 잔존하는 고체 종양 조직을 제거하고, 10 µg/ml 블라스티시딘을 첨가하였다. 그 후 파종된 세포를 블라스티시딘의 존재 하에 6 계대 동안 표준 조건 하에 유지시켰다. 그 후 이러한 세포를 사용하여 비처리 (naive) SCID 마우스에 주사하고, 종양 부피에서의 경시적인 변화를 60일 기간 동안 측정하였다.

<195>

종양-유래 MCF-7C20 또는 MCF-7C20Nod1 세포를 함유하는 마우스에서 종양이 성장하기 시작하였다. 주사 후 15 일까지, 양쪽 세포 유형 모두에서 약 50 mm³의 계산된 종양 부피가 발생되었다. 이러한 실험의 나머지 40일 동안, MCF7-C20Nod1 세포로부터 형성된 종양은 최소한도로 검출가능한 크기 (<10 mm³)로 퇴행된 반면, MCF-7C20 세포에 의해 생산된 종양은 200-270 mm³의 최대 부피로 성장하였다 (도 11 A-C).

<196>

이러한 결과는 종양 세포에서의 Nod1 발현이 종양 세포 세포자멸사 및 종양 퇴행에 이를 수 있다는 것을 추가로 확증한다.

<197>

MCF-7 세포에서 TNF α에 응답하여 세포자멸사가 진행되기 때문에, 마우스 TNF α를 중화시키는 햄스터 모노클로날 항체 ([Bancroft et al., J. Immunol. 143:127-30 (1989)])를 사용하여 Nod1-유도 세포자멸사에 대한 TNF α의 효과를 추가로 시험하였다. MCF-7 Blasto 또는 MCF-7 Nod1 세포가 접종되었을 때 종양이 형성되지 않았기 때문에 이러한 항체의 존재는 세포자멸사를 억제하지 않았다. 또한, 기존의 실험에서 관찰된 바와 같이, MCF-7 C20 세포가 마우스 내로 주사되었을 때 종양이 성장하였다.

<198>

또다시, 각각의 연구된 MCF-7 세포주들이 배양 및 연질-한천 콜로니 형성 분석에서 동일한 성장 특징을 가졌기 때문에, Nod1-발현 종양 세포를 주사한 후 종양의 부재는 MCF-7 C20 세포와 비교하여 MCF-7 Blasto 및 MCF-7 C20/Nod1 세포의 감소된 증식 속도로 인한 것이 아니었다. 또한, CLARP (c-FLIP)가 카스파제 8의 특이적 억제제이기 때문에 다른 인자에 의한 세포자멸사의 단순한 차단이 종양 성장을 발생시킨 메커니즘일 것 같지 않았고, MCF-7 c-FLIP/CLARP 세포는 누드 마우스에서 종양을 형성할 수 없었다 (데이터는 제시되지 않음).

<199>

에스트로겐의 역할

<200>

예비 실험에서, C20 클론이 수컷 마우스 내로 이식되었을 때 더욱 강건한 종양 성장이 관찰되었고, 이는 종양 퇴행에서의 암컷-관련 호르몬의 역할을 시사한다. 다양한 유전자 표적의 중합효소 연쇄 반응 증폭에 의한 추가적인 연구로, 프로그스테론 수용체가 C20 세포주에 부재하는 반면, 수용체가 야생형 세포, 및 더욱 중요하게는 C20Nod1 세포에 존재한다는 것이 관찰되었다. 또한, PCR 분석으로 에스트로겐 수용체 알파가 각각의 3가지 MCF7 세포 유형에 존재하였다는 것이 또한 드러났다.

<201>

대부분의 연구에서, MCF-7 세포에 의한 종양 형성은, 고농도로 세포가 접종되는 경우에도, 누드 마우스에서의 종양발생을 위해 에스트로겐의 보충을 필요로 한다. 종양발생에서의 에스트로겐의 역할을 추가로 시험하기 위해, 3가지 세포주 모두를 에스트로겐 펠렛과 함께 마우스 내로 주사하였다 (도 11B). 예상대로, 에스트로겐이 존재할 때 MCF-7 Blasto가 주사된 마우스에서 종양이 성장하였다. MCF-7 C20 세포가 주사된 마우스에서는 에스트로겐 펠렛이 존재할 때 더 크게 성장한 종양이 생산되었다. 흥미롭게도, MCF-7 C20/Nod1이 주사된 마우스에

서는 에스트로겐 펠렛의 존재 하에 종양이 성장하지 않았다. 이러한 데이터는 Nod1이 에스트로겐-의존성 종양 성장을 억제한다는 것을 가리킨다.

- <202> 종양 성장에서의 Nod1 경로의 역할을 더욱 지지하기 위해, RIP2의 우성 음성 대립유전자 (RIP2 Δ CARD)의 발현을 연구하여, 이러한 대립유전자가 종양을 성장시키는 MCF-7 세포의 능력을 또한 방해할 수 있는지를 결정하였다. 도 11C는 MCF-7 C20 세포에서 관찰된 종양보다 종양이 작긴 하지만, 이러한 RIP2 Δ CARD 세포가 종양을 성장시켰다는 것을 나타낸다. 취합되어, 이러한 데이터는 Nod1이 종양 성장에서 중요한 역할을 한다는 것과 Nod1의 존재가 에스트로겐-의존성 종양 성장에 대한 브레이크로서 작용한다는 것을 가리킨다.
- <203> 이러한 가설에 대한 추가적인 지지를 수득하기 위해, 에스트로겐-유도 증식에 대한 MCF-7 세포주의 민감도를 세포가 배양 배지 내의 에스트로겐의 부재 하에 성장되는 조건 하에 관찰하였다. 이러한 조건 하에, MCF-C20 세포 뿐만 아니라 MCF-7 RIP2 Δ CARD 세포에서 첨가된 에스트로겐에 대한 강한 증식성 응답이 진행되었지만, 어버이 또는 MCF-7 C20/Nod1 세포주는 증식하도록 자극되지 않았다 (도 11D). 그러나, MCF-7 C20 세포에 대해 관찰된 에스트로겐-유도 증식이 배양 배지 내의 타목시펜의 첨가에 의해 차단되었다 (데이터는 제시되지 않음).
- <204> 에스트로겐의 존재가 Nod1-유도 세포자멸사성 경로를 조절하는지를 결정하기 위해, 숯-처리 혈청을 함유하는 배지에서 세포를 배양하였다. 에스트로겐은 C20 세포에서의 세포자멸사에 대해 효과가 거의 없거나 없었고, 이는 Nod1를 실질적으로 발현하지 않고, 세포자멸사를 실질적으로 나타내지 않았다 (도 12A, 중간 패널). C20/Nod1 및 Blasto는 스테로이드의 부재 하에 배양되었을 때 γ TriDAP-유도 세포자멸사에 더욱 저항성이었다 (C20/Nod1 세포는 스테로이드의 부재 하에 10% 세포자멸사 대 스테로이드의 존재 하에 80%를 나타냈다; 도 12A, 하부 패널). 따라서, 세포자멸사가 에스트로겐 농도에 용량-의존성 방식으로 증가되도록 세포자멸사에 대한 저항성이 에스트로겐의 첨가에 의해 반전되었다 (도 12A). 반대로, 타목시펜의 첨가는 γ TriDAP-유도 세포 사멸을 부분적으로 차단하였다 (도 12B). 마지막으로, Nod1의 과발현은 로딩 대조군으로 사용된 ERK2의 발현에 영향을 미치지 않으면서 내인성 에스트로겐 수용체- α (ER α)의 발현을 현저하게 감소시켰다 (도 12C). 유사하게, ER α 발현에서의 감소가 종양으로부터 단리된, 재-배양된 세포에서 관찰되었다 (도 12C, 우측 패널). 이러한 데이터는 Nod1 경로가 ER α 발현 수준에 영향을 미치고, 따라서 종양을 발달시키는 MCF-7 유방암 세포의 민감성에 영향을 미친다는 것을 가리킨다.
- <205> 본원에 언급된 모든 특허 및 간행물은 본 발명이 속하는 업계의 당업자의 기술 수준을 가리키고, 각각의 이같은 인용된 특허 또는 간행물은 개별적으로 전체적으로 거명에 의해 포함되거나 전체적으로 본원에 기재된 것과 동일한 정도로 거명에 의해 본원에 포함된다. 출원인은 임의의 이같은 인용된 특허 또는 간행물로부터의 임의의, 그리고 모든 재료 및 정보를 본 명세서 내로 실제로 포함시킬 권리를 갖는다.
- <206> 본원에 기술된 특정 방법 및 조성물은 바람직한 실시양태를 대표하고 전형적이며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 또다른 목적, 양상 및 실시양태가 본 명세서를 고려하여 당업자에게 발생할 것이고, 청구항의 범주에 의해 한정되는 본 발명의 취지 내에 포함된다. 본 발명의 범주 및 취지를 벗어나지 않으면서 다양한 치환 및 변형이 본원에 개시된 본 발명에 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 본원에 설명적으로 기술된 본 발명은 필수적인 것으로 구체적으로 본원에 개시되지 않은 임의의 요소(들) 또는 제한(들)의 부재 하에 적절하게 실행될 수 있다. 본원에 설명적으로 기술된 방법 및 공정은 상이한 순서의 단계들로 적절하게 실행될 수 있고, 본원 또는 청구항에 지시된 단계들의 순서로 제한될 필요가 없다. 본원 및 첨부된 청구항에서 사용된 단수형 정관사 및 부정관사는 문맥이 명백하게 지시하지 않는 한 다수의 복수의 언급을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "항체"는 복수의 이같은 항체 (예를 들어, 항체들의 용액 또는 일련의 항체 제제) 등을 포함한다. 어떠한 상황에서도 본 특허는 본원에 구체적으로 개시된 특정 예 또는 실시양태 또는 방법에 제한되는 것으로 해석되지 않을 수 있다. 어떠한 상황에서도, 본 특허는 특허청의 임의의 심사관 또는 임의의 공무원 또는 고용인에 의해 이루어진 임의의 주장에 의해, 이같은 주장이 구체적으로, 그리고 무조건적으로 명백하게 출원인에 의한 의견서에서 채택되지 않는 한, 제한되는 것으로 해석되지 않을 수 있다.
- <207> 사용된 용어 및 표현은 제한이 아니라 기술(記述)의 용어로 사용되고, 이같은 용어 및 표현의 사용에는 제시 및 기술된 특색 또는 이의 일부의 임의의 등가물을 배제하려는 의도가 없고, 청구된 바와 같은 본 발명의 범주 내에서 다양한 변형이 가능한 것으로 인정된다. 따라서, 본 발명이 바람직한 실시양태 및 선택적인 특색에 의해 구체적으로 개시되었지만, 본원에 개시된 개념의 변형 및 변화가 당업자에 의해 재분류될 수 있고, 이같은 변형 및 변화가 첨부된 청구항에 의해 정의되는 바와 같은 본 발명의 범주 내인 것으로 간주된다는 것이 이해될 것이다.
- <208> 본 발명이 광범위하게, 그리고 일반적으로 본원에 기술되었다. 포괄적인 개시내용 내에 속하는 각각의 더 한정

된 종 및 아속 분류 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 이는 삭제된 물질이 본원에 구체적으로 열거되는지 여부와 상관없이, 종류로부터 임의의 대상을 제거하는 조건 또는 음성 제한이 있는 본 발명의 포괄적인 기술을 포함한다.

<209> 또다른 실시양태들이 하기의 청구항 내에 존재한다. 또한, 본 발명의 특색 또는 양상이 마쿠시(Markush) 군의 방식으로 기술되는 경우, 당업자는 본 발명이 이에 의해 마쿠시 군의 임의의 개별적인 구성원 또는 구성원들의 아군에 관하여 또한 기술된다는 것을 이해할 것이다.

도면의 간단한 설명

<19> 도 1A-C는 TNF-유도 세포자멸사에서 Nod1 관여를 도해한다. 도 1A는 TNF α-저항성 표현형을 발생시키고, 블라스티시딘 (*blast*) 유전자가 삽입된 Nod1 돌연변이체로 추후에 확인된 돌연변이된 유전자의 개략도를 제공한다. 이러한 Nod1 돌연변이를 지니는 세포주는 MCF7-C20 세포주이다. pDisrup 레트로바이러스 구축물로부터의 삽입이 *Nod1* 유전자에 맵핑(mapping)되었다. *Nod1* 유전자에 융합된 블라스티시딘의 접합은 *Nod1* 유전자의 3' 말단에서 류신-풍부 영역 8 (LRR8)과 류신-풍부 영역 9 (LRR9) 사이에서 발생하였다. 따라서, LRR9 및 LRR10 영역은 블라스티시딘 삽입에 대해 3'이다. 도 1B는 NOD1 단백질이 MCF-7 C20 세포에서 검출가능한 양으로 존재하지 않는다는 것을 나타낸다. MCF-7 어버이 세포 ("wt"으로 칭해짐) 및 MCF-7 C20 세포로부터의 세포 추출물을 제조하였고, 모노클로날 항-NOD1 항체로 면역침전시키거나 (상부 패널), 또는 SDS-PAGE 젤 상에 직접 로딩하고 (하부 패널), 이어서 PVDF 막으로 옮겼다. 동일한 항-NOD1 항체를 사용하는 면역블롯팅에 의해 블롯 (blot)을 분석하였다. 도 1C는 MCF-7 세포가 MCF-7 C20 세포보다 TNF-유도 세포자멸사에 더욱 저항성이라는 것을 나타낸다. MCF-7 및 MCF-7 C20 세포를 증가하는 농도의 TNF (0-40 ng/ml)로 20시간 동안 처리하였다. 세포 생존율을 프로피디움 요오다이드 (PI) 배제 분석법 및 유동세포측정법에 의해 결정하였다. 그래프는 MCF-7 C20 세포에서 세포자멸사가 유의하게 더 진행될 것 같다는 것을 나타낸다.

<20> 도 2A-D는 γTriDAP 처리 시 MCF-7 세포에 세포자멸사가 일어난 것을 나타낸다. 도 2A는 NOD1이 γTriDAP-유도 세포 사멸에 필요하다는 것을 도해한다. 정상 수준의 NOD1을 발현하는 MCF-7 Blasto, NOD1을 거의 발현하지 않거나 발현하지 않는 MCF-7 C20 세포, 또는 NOD1을 과발현하는 MCF-7 Nod1 세포를 48시간 동안 시클로헥시미드 (CHX) (3 μg/ml)의 존재 (빛금 막대) 또는 부재 (백색 막대) 하에 γTriDAP 또는 αTriDAP (각각 50 μg/ml)로 처리하였다. 대조군 분석에서는 γTriDAP 또는 αTriDAP 대신 배지 (Med)를 제공하였다. 48시간 인큐베이션 후, 세포를 수확하고, 프로피디움 요오다이드 (PI) (4 μg/ml)와 함께 인큐베이션하였다. 세포 생존율을 유동 세포측정법 분석에 의해 측정하였다. 제시된 데이터는 4회 이상의 독립적인 실험 중 대표적인 실험이다. 도 2B는 벡터 단독으로 형질감염된 MCF-7 Blasto, 내인성 *Nod1* 유전자가 파괴된 MCF-7 C20 세포 또는 NOD1을 과발현하도록 조작된 MCF-7 Nod1 세포에서의 NOD1 발현 수준을 나타낸다. MCF-7 Blasto, MCF-7 C20 및 MCF-7 Nod1 세포에서의 NOD1의 발현을 모노클로날 항-NOD1 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅(western blotting)에 의해 분석하였다. 도 2C는 γTriDAP-처리 MCF-7 Nod1 세포에서의 형태학적 변화를 도해한다. 세포를 4-웰 챔버 슬라이드에 파종하고, γTriDAP/시클로헥시미드 (CHX) (패널 b, d, f) 또는 CHX 단독 (패널 a, c, e)으로 처리하였다. 세포를 DAPI (패널 c, d) 또는 TUNEL (패널 e, f)로 염색하고, 고정시키고, 위상차 (패널 a, b) 또는 형광 (패널 c-f) 현미경 하에 관찰하였다. 도 2D는 MCF-7 Nod1 세포에서의 γTriDAP-유도 세포자멸사가 2 가지 광범위한 스펙트럼의 카스파제 억제제인 z-VAD-FMK 및 Boc-D-FMK에 의해 감소 또는 폐지되었음을 나타낸다. MCF-7 Nod1 세포를 z-VAD 또는 Boc-D-FMK 카스파제 억제제 (각각 50 μM)로 30분 동안 예비처리한 후, γTriDAP/CHX를 48시간 동안 첨가하였다. 세포를 프로피디움 요오다이드 (PI)와 함께 인큐베이션하고, 세포 자멸사성 세포 사멸을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다.

<21> 도 3은 γTriDAP를 MCF-7 세포에 첨가한 결과 폴리(ADP-리보스)중합효소 (PARP) 및 카스파제 6, 7, 8 및 9가 단백질분해성으로 절단되었지만 불활성 대조군인 트리-펩티드 αTriDAP로는 절단되지 않았음을 웨스턴 분석에 의해 도해한다. PARP 및 다양한 카스파제의 절단이 24시간 동안의 CHX (0.5 μg/ml)의 존재 또는 부재 하에서의 γTriDAP, αTriDAP 또는 배지 (대조군)로의 자극 후에 MCF-7 Blasto, MCF-7 C20 세포 및 MCF-7 Nod1 세포의 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출되었다. 세포를 수확하여, 웨스턴 블롯팅하였고, PARP, 카스파제, p20, p41/43 및 p35가 이와 반응성인 항체로 검출되었다.

<22> 도 4A-C는 NOD1 돌연변이체 V41Q가 γTriDAP에 응답성이고 세포자멸사 경로에서 여전히 기능성인 반면, NOD1 돌연변이체 K208R은 γTriDAP에 응답성이 없고 세포자멸사 경로에서 활성이 없다는 것을 나타낸다. 도 4A는 배지 (Med., 대조군) 또는 γTriDAP로의 처리 후 여러 세포주에서의 세포자멸사성 세포의 백분율을 그래프로 도해한다. NOD1 V41Q 및 K208R 돌연변이체는 부위-지정 돌연변이유발에 의해 구축하였다. V41Q 돌연변이는 NOD1

의 CARD 도메인 내에 존재하고, K208R 돌연변이는 Nod/NBD 도메인에 의해 매개되는 올리고머화에 필요한 입체구조성 변화를 차단하는 것으로 생각된다. 이러한 NOD1 V41Q 및 K208R 돌연변이체 폴리펩티드를 코딩하는 구축물을 MCF-7 C20 세포 내로 형질감염시키고, 세포자멸사 분석을 수행하였다. 나타난 바와 같이, V41Q 돌연변이체에서는 NOD1 활성이 유지되지만, K208R 돌연변이체에서는 유지되지 않는다. 도 4B는 NOD1 돌연변이체 및 야생형 폴리펩티드의 발현 수준이 실질적으로 동일하였음을 나타낸다. 도 4C는 MCF-7 세포에서의 NOD1 발현이 PARP 및 카스파제 6, 7, 8 및 9의 단백질분해성 절단에 필요하다는 것을 웨스턴 분석에 의해 도해한다. PARP 및 다양한 카스파제의 절단이 NOD1을 발현하지 않는 MCF-7 C20 세포 및 Nod1 구축물이 MCF-7 C20 세포 내로 재조합에 의해 도입된 MCF-7 C20 Nod1 세포의 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출되었다. 세포를 24시간 동안 시클로헥시미드 (CHX) (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 존재 또는 부재 하에 γ TriDAP 또는 배지 (대조군)으로 자극하였다. 그 후, 세포를 수확하고, 웨스턴 블롯팅하였다. PARP, 카스파제, p20, p41/43 및 p35가 이와 반응성인 항체로 검출되었다.

<23> 도 5A-C는 Nod2가 MCF-7 세포에서 세포자멸사를 유도하지 않는다는 것을 도해한다. 도 5A에서, MCF-7 Blasto, MCF-7 Nod1 및 MCF-7 Nod2를 48시간 동안 CHX의 존재 또는 부재 하에 NOD1 리간드 γ TriDAP 또는 Nod2 리간드 무라밀 디펩티드 (MDP) (각각 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였다. 그 후, 세포를 PI와 함께 인큐베이션하고, 세포자멸사성 세포 사망을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 나타난 바와 같이, γ TriDAP는 세포자멸사를 자극하지만, NOD2 리간드는 자극하지 않는다. 도 5B에서, NOD1 및 NOD2의 발현이 재조합 단백질의 검출을 위한 항-Myc 항체를 사용하는 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다. 도 5C는 MCF-7 Nod2 세포가 인터류킨-8 (IL-8) 분비에 의해 검출되는 바와 같이 MDP에 응답한다는 것을 나타낸다. MCF-7 Blasto, MCF-7 Nod1 세포 및 MCF-7 Nod2 세포를 24시간 동안 CHX (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 존재 또는 부재 하에 γ TriDAP 또는 MDP로 자극하였다. 그 후, 세포 상청액을 수확하고, IL-8 분비에 대해 분석하였다.

<24> 도 6A-D는 카스파제 8 및 카스파제 9가 γ TriDAP-유도 세포자멸사에 필요하다는 것을 도해한다. 도 6A는 γ TriDAP-유도 세포자멸사에 대한 여러 카스파제 억제제의 효과를 나타낸다. MCF-7 Nod1 세포를 도 6A의 x축에 열거된 카스파제 억제제로 30분 동안 예비처리한 후, γ TriDAP/CHX로 48시간 동안 자극하였다. 그 후, 세포를 프로피듐 요오다이드와 함께 인큐베이션하고, 세포 생존율을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 모든 억제제들을 100 μM 농도로 사용하였다. 도 6B는 Nod 1이 카스파제 9와 동시발현될 때 고분자량 형태의 NOD1이 검출된다는 것을 나타내고, 이는 NOD1이 카스파제 9와 상호작용한다는 것을 가리킨다. 이러한 실험에서, 293 세포가 빈 벡터, Myc-NOD1, 또는 Myc-NOD2의 존재 하에 FLAG-카스파제 9를 코딩하는 벡터와 동시-형질감염되었다. 세포 추출물을 항-FLAG 항체로 면역침전 (IP)시켰고, 동시-침전된 단백질을 폴리클로날 항-Myc 항체를 사용하여 면역블롯팅 (WB)에 의해 나타냈다. 도 6C는 CLARP가 γ TriDAP-유도 세포자멸사를 완전하게 방지한 반면, Bc12는 γ TriDAP-유도 세포자멸사를 부분적으로만 억제하였음을 나타낸다. MCF-7 CLARP, MCF-7 CLARP/Nod1, MCF-7 Bc12 및 MCF-7 Bc12/Nod1 세포를 48시간 동안 CHX (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 존재 또는 부재 하에 γ TriDAP로 처리하거나 처리하지 않았다. 그 후, 세포를 프로피듐 요오다이드와 함께 인큐베이션하고, 세포자멸사성 세포 사망을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 도 6D는 CLARP, Bc12 및 NOD1이 MCF-7 세포에서 발현되는 것을 도해하는 웨스턴 블롯을 나타내고, 이는 도 6C에서 관찰된 결과가 CLARP와 Bc12의 발현 수준에서의 차이보다는 이러한 두 단백질 간의 기능성 차이로 인한 것이라는 것을 가리킨다.

<25> 도 7A-C는 야생형 RIP2 및 RIP2의 키나제-결핍 (KD) 돌연변이체 모두가 NOD1 세포자멸사 경로에서 기능성이라는 것을 도해한다. 그러나, CARD 도메인이 결여된 RIP2는 NOD1 신호전달의 우성 음성 억제제로서 작용한다. 도 7A는 야생형 RIP2, RIP2 KD 및 RIP2 Δ CARD 세포의 집단에서 세포자멸사성인 세포의 백분율을 그래프로 도해한다. MCF-7 세포를 야생형 Myc-RIP2, Myc-RIP2 KD, 및 Myc-RIP2 Δ CARD로 안정적으로 형질감염시켰고, 처리하지 않고 방치하거나 또는 48시간 동안 CHX (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 존재 또는 부재 하에 γ TriDAP로 처리하였다. 세포를 PI와 함께 인큐베이션하고, 세포자멸사성 세포 사망을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 도 7B는 폴리클로날 항-Myc 항체로의 세포 추출물의 면역침전 및 모노클로날 항-Myc 9E10 항체를 사용하는 면역블롯팅에 의해 확인된 바와 같이 RIP2 폴리펩티드가 발현되었음을 나타낸다. 도 7C는 RIP2 야생형, MCF-7 RIP2 KD, 및 RIP2 Δ CARD 세포에서의 JNK의 인산화의 γ TriDAP-유도를 도해한다. 나타난 바와 같이, 야생형 RIP2 또는 RIP2 KD를 발현하는 세포를 2시간 동안 시클로헥시미드의 존재 하에 γ TriDAP에 노출시키면 JNK의 인산화가 유도되었다. 그러나, 동일한 방식으로 처리된 RIP2 Δ CARD 세포에서는 이같은 JNK의 인산화가 관찰되지 않았다.

<26> 도 8A-D는 NOD1와 TNF α 사이에 상승작용성 관계가 존재한다는 것을 도해한다. 도 8A는 NOD1의 농도가 0.0에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가하고 TNF α 의 농도가 0.5 ng/ml에서 1 ng/ml으로 증가함에 따라 세포자멸사성 세포의 백분율이 용량-특이적 방식으로 증가한다는 것을 그래프로 도해한다. 도 8B는 시클로헥시미드의 농도가 0.0에서 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 증가하고 TNF α 의 농도가 0.5 ng/ml에서 1 ng/ml으로 증가함에 따라 세포자멸사성 세포의 백분율이 용량

-특이적 방식으로 증가한다는 것을 그래프로 도해한다. 도 8C는 γ TriDAP이 TNF α 의 존재 하에 세포자멸사를 증가시키는 반면, 불활성 대조군 트리펩티드 α TriDAP는, 심지어 더 높은 용량의 TNF α 에서도, 세포자멸사를 실제로 억제할 수 있다는 것을 그래프로 도해한다. 도 8D는 MCF-7 세포를 TNF α 에 노출시킨 후 다양한 시점에서의 NOD1 발현을 도해한다.

<27> 도 9A-C는 또다른 인간 유방암 세포주인 SKBR3 암 세포주에서의 NOD1 발현을 도해한다. 도 9A (상부)는 세포자멸사성 SKBR3 야생형 및 SKBR3 Nod1 세포의 백분율을 TNF α 농도의 함수로서 그래프로 도해한다. 도 9A (하부)는 세포자멸사성 SKBR3 야생형 및 SKBR3 Nod1 세포의 백분율을 γ TriDAP 농도의 함수로서 그래프로 도해한다. 도 9B (상부)는 프로피둠 요오다이드 (PI) 또는 Dioc6에 의한 상이한 조건 하에 관찰된 세포자멸사성 SKBR3 세포의 백분율을 그래프로 도해한다. 사용된 조건이 웨스턴 블롯 아래에 지시된다. 사용된 약자는 하기와 같다: CHX (시클로헥시미드), TNF (TNF α), γ Tri (γ TriDAP), α Tri (α TriDAP). 도 9B2는 폴리(ADP-리보스)중합효소 (PARP) 및 카스파제 3, 7, 및 8의 단백질분해성 절단을 도해하는 웨스턴 분석을 제공한다. PARP 및 다양한 카스파제의 절단이 웨스턴 블롯 아래에 상술된 조건 하에서의 자극 후에 MCF-7 세포의 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출되었다. 세포를 수확하고, 웨스턴 블롯팅하였고, PARP, 카스파제, p20, p41/43 및 p35가 이와 반응성인 항체로 검출되었다. 도 9C는 막대 그래프 아래에 지시된 조건 하에 관찰된 세포자멸사성 야생형, NOD1-발현 및 CLARP-발현 SKBR3 세포의 백분율을 그래프로 도해한다. 사용된 약자는 하기와 같다: CHX (시클로헥시미드), TNF (TNF α), gTri (γ TriDAP), gTC (γ TriDAP + CHX), aTC (α TriDAP + CHX).

<28> 도 10A, B 및 C는 각각 야생형 MCF-7 유방암 세포, NOD1 녹아웃(knockout) MCF-7 세포 및 NOD1-형질감염 MCF-7 세포가 접종된 마우스의 이미지를 제공한다. 3×10^6 개의 인간 유방암 세포를 마우스에게 피하 접종하였다. 화살표는 피하 종양을 가리키고, 이의 근접 이미지가 도 10B의 오른쪽에 제시된다.

<29> 도 11A-D는 Nod1의 존재가 SCID 마우스에서 종양 성장을 억제한다는 것을 도해한다. 도 11A는 MCF-7 C20 (좌측) 및 MCF-7 C20/Nod1 (우측) 세포가 주사된 마우스에서의 종양 부피를 시간의 함수로서 그래프로 도해한다. 세포 (3×10^6 개의 세포/마우스)를 암컷 SCID 마우스의 옆구리에 주사하였다. 종양 크기를 1주일에 한번 측정하고, 식 ($W \times L$)/2에 따라 부피를 결정하였다. 각각의 선은 1마리의 마우스에서 관찰된 종양 성장을 나타낸다 ($n = 4$). 도해된 바와 같이, Nod1 발현 종양 세포 (C20/Nod1)가 주사된 마우스에서 종양 부피가 감소하였다. 반면에, Nod1을 발현하지 않은 종양 세포 (C20 세포)가 주사된 마우스에서는 종양 부피가 증가하였다. 도 11B는 MCF-7 Blasto, MCF-7 C20 및 MCF-7 C20/Nod1 세포 (3×10^6 개의 세포/마우스)의 주사 전에 마우스 내로 에스트로겐 펠릿을 이식하는 것이 종양 세포가 Nod1을 발현하는 경우 (C20/Nod1 세포)를 제외하고는 종양 성장을 증가시킨다는 것을 그래프로 도해한다. 빗금 막대는 에스트로겐 펠릿이 이식된 마우스에서 수득된 결과를 나타내고, 백색 막대는 에스트로겐 펠릿이 이식되지 않은 마우스로부터 수득된 결과를 나타낸다. 종양 부피는 상기 기술된 바와 같이 결정하였다. 도 11C는 MCF-7 Blasto, MCF-7 C20 세포 및 MCF-7 RIP2 Δ CARD 세포가 주사된 마우스에서의 시간에 따른 종양 부피를 도해한다. 나타난 바와 같이, MCF-7 RIP2 Δ CARD 세포가 주사된 마우스 (*)에서의 종양 부피가 약간의 Nod1을 발현하는 마우스 (Blasto, 흑색 다이아몬드)에서보다 높았지만, Nod1을 발현하지 않는 마우스 (C20, 흑색 사각형)에서보다는 낮았다. 도 11D는 종양 세포 성장을 에스트로겐 농도의 함수로서 그래프로 도해한다. 나타난 바와 같이, Nod1을 발현하지 않는 종양 세포 (MCF-7 C20 세포) 및 돌연변이 RIP2를 발현하는 종양 세포 (MCF-7 RIP2 Δ CARD 세포)는 에스트로겐에 대해 더욱 민감적이고, 증가된 세포 성장을 나타낸다. MCF-7 Blasto, MCF-7 C20, MCF-7 C20/Nod1 및 MCF-7 RIP2 Δ CARD 세포를 증가하는 농도의 17 β -에스트라디올에 노출시키고, 3 H-티미딘으로 펄싱(pulsing)하고, 세포 성장을 액체 섬광에 의해 결정하였다. 데이터는 3회 이상의 독립적인 실험을 대표한다.

<30> 도 12A-C는 다양한 MCF-7 종양 세포주에서 에스트로겐이 γ TriDAP-유도 세포자멸사를 증가시키고, 타목시펜이 γ TriDAP-유도 세포자멸사를 억제한다는 것을 도해한다. 도 12A는 증가하는 양의 에스트로겐, 및 시클로헥시미드 (CHX) 또는 CHX + γ TriDAP (γ Tri)에서 배양된 MCF-7 Blasto, MCF-7 C20 세포 및 MCF-7 C20/Nod1 세포에서의 세포자멸사 백분율을 그래프로 도해한다. 도 12B는 증가하는 양의 타목시펜, 및 시클로헥시미드 (CHX) 또는 CHX + γ TriDAP (γ Tri)에서 배양된 MCF-7 Blasto, MCF-7 C20 세포 및 MCF-7 C20/Nod1 세포에서의 세포자멸사 백분율을 그래프로 도해한다. 에스트로겐 연구를 위해, MCF-7 세포를 솟으로 처리된 배지에서 배양하고, 증가하는 농도의 에스트로겐 (E2)의 존재 하에 γ TriDAP/CHX로 자극하고, 세포 생존율을 프로피둠 요오다이드 (PI) 배제에 의해 측정하였다. 타목시펜 연구를 위해, 세포를 타목시펜으로 처리한 후 γ TriDAP/CHX를 첨가하고, 세포 생존율을 PI 배제에 의해 측정하였다. 도 12C는 시험관내 배양된 세포 (좌측) 및 생체내 종양 세포 (우측)로부터의 세포 용해물의 면역블롯을 나타내고, 이는 에스트로겐 수용체의 발현이 Nod1을 발현하는 세포에서 감

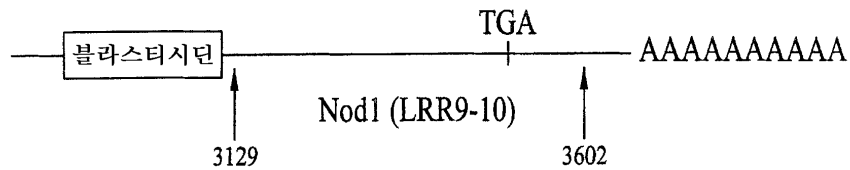
소된다는 것을 도해한다. MCF-7 Blasto, MCF-7 C20 및 MCF-7 C20/Nod1 세포, 및 종양으로부터 단리된 세포로부터의 전체 단백질 추출물을 에스트로젠 수용체 (ER α)에 대한 항체, 및 로딩 대조군으로서의 ERK2를 사용하여 면역블롯팅에 의해 분석하였다.

<31>

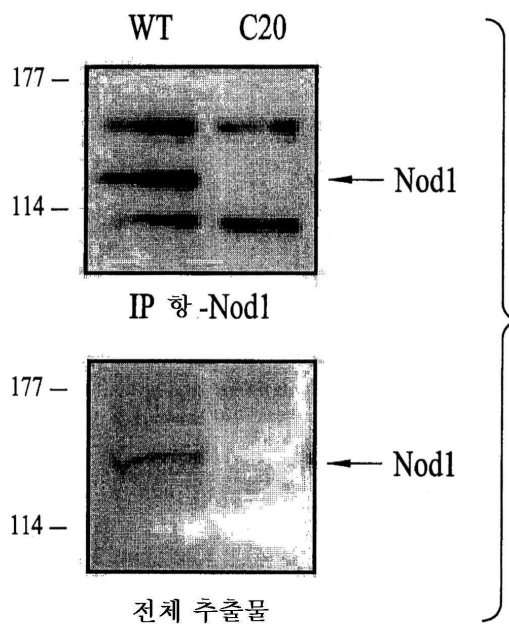
도 13A-D는 RIP2가 Nod1 세포자멸사성 경로의 중요한 성분이라는 것을 도해한다. 도 13A는 종양 세포주에서의 키나제-결핍 RIP2 (RIP2 KD)의 안정적인 발현이 이러한 세포를 Nod1 또는 Nod2 활성화제에 의해 유도된 세포자멸사성 세포 사망에 대해 감작시킨다는 것을 나타낸다. MCF-7 세포가 Myc-Nod1, Myc-RIP2 (야생형), Myc-RIP2 KD, 및 Myc-RIP2 Δ CARD로 안정적으로 형질감염되었다. 이어서 테스트 세포를 48시간 동안 CHX (3 μ g/ml)의 존재 또는 부재 하에 γ TriDAP, α TriDAP 및 MDP (각각 20 μ g/ml)로 처리하였고, 대조군 세포는 이러한 작용제들로 처리하지 않았다. 그 후, 세포를 프로피듐 요오다이드 (PI)와 함께 인큐베이션하고, 세포자멸사성 세포 사망을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 도 13B는 도 13A에 기술된 동일한 MCF-7 세포주에서의 세포자멸사에 대한 TNF의 효과를 도해한다. 이러한 세포주들을 TNF (10 ng/ml)로 18시간 동안 처리하고, 세포자멸사성 세포 사망을 도 13A에 기술된 바와 같이 평가하였다. TNF는 테스트된 모든 세포주에서 세포자멸사를 증가시켰다. 도 13C는 MCF-7 RIP2 KD 세포가 MCF-7 Nod1 세포보다 증가된 γ TriDAP-유도 세포자멸사를 나타냈다는 것을 나타낸다. 세포를 48시간 동안 CHX의 존재 하에 증가하는 농도의 γ TriDAP 또는 MDP의 존재 하에 인큐베이션하고, 세포자멸사성 세포 사망을 도 13A에 기술된 바와 같이 평가하였다. 도 13D는 TNF 또는 CHX (0.5 ml/mg) 존재 하에서의 γ TriDAP로의 자극 후의 MCF-7 Blasto, MCF-7 Nod1 세포 및 MCF-7 RIP2 야생형 세포에 의한 IL-8 분비를 나타낸다. 인큐베이션 후, 세포 상청액을 수확하고, IL-8 분비에 대해 분석하였다.

도면

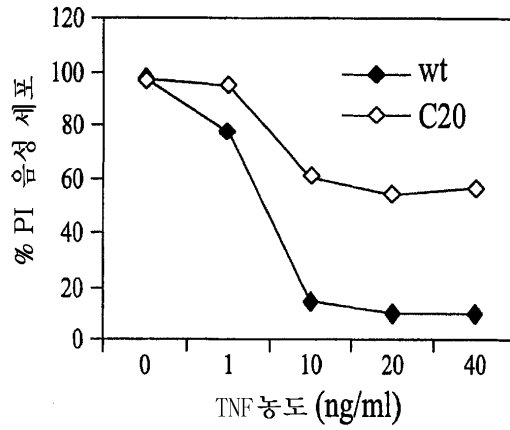
도면1A



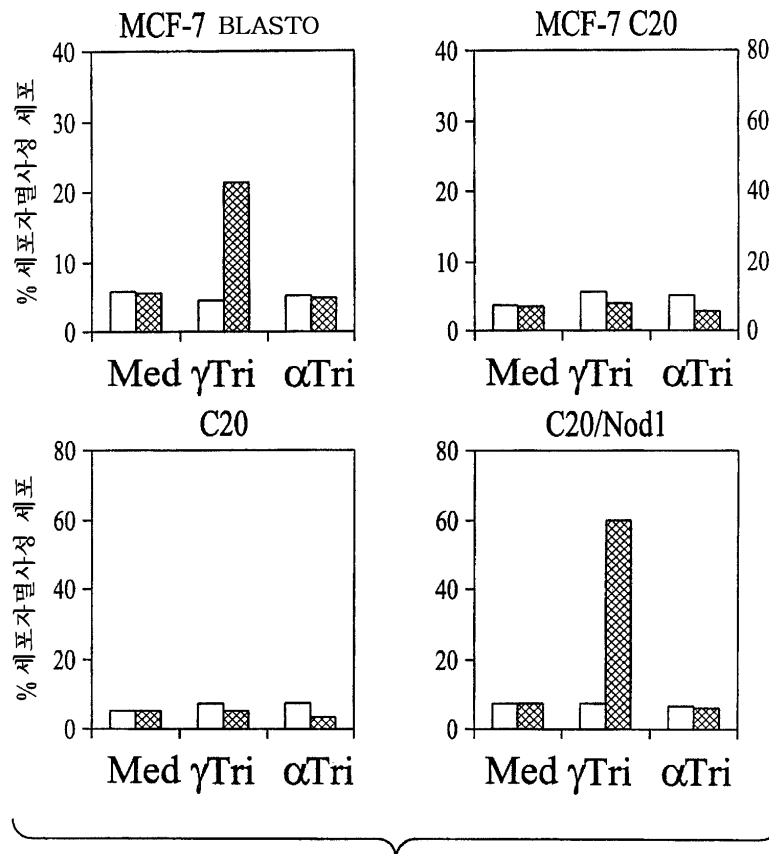
도면1B



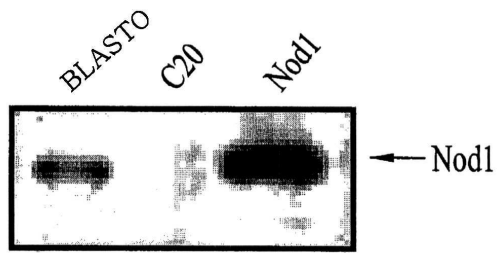
도면1C



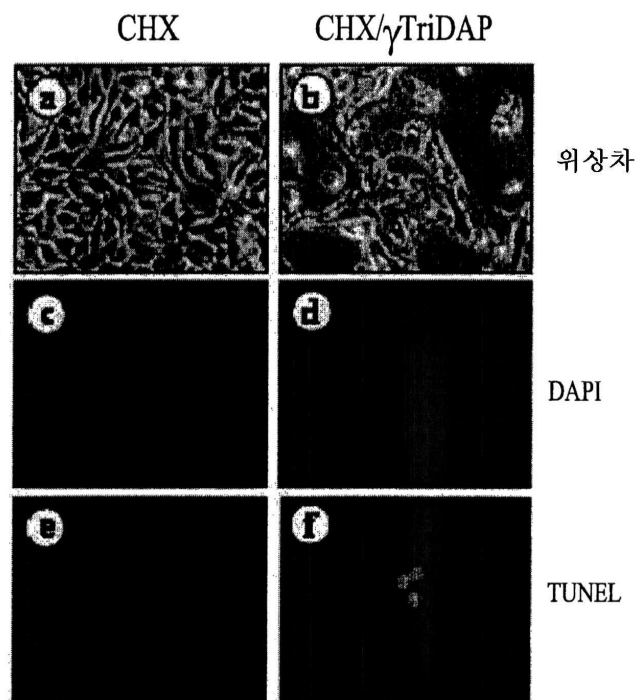
도면2A



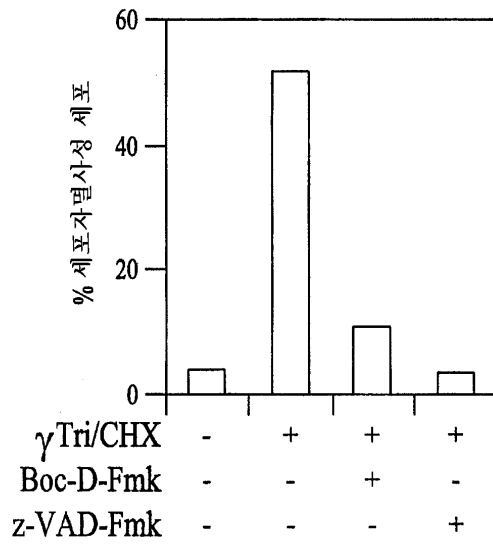
도면2B



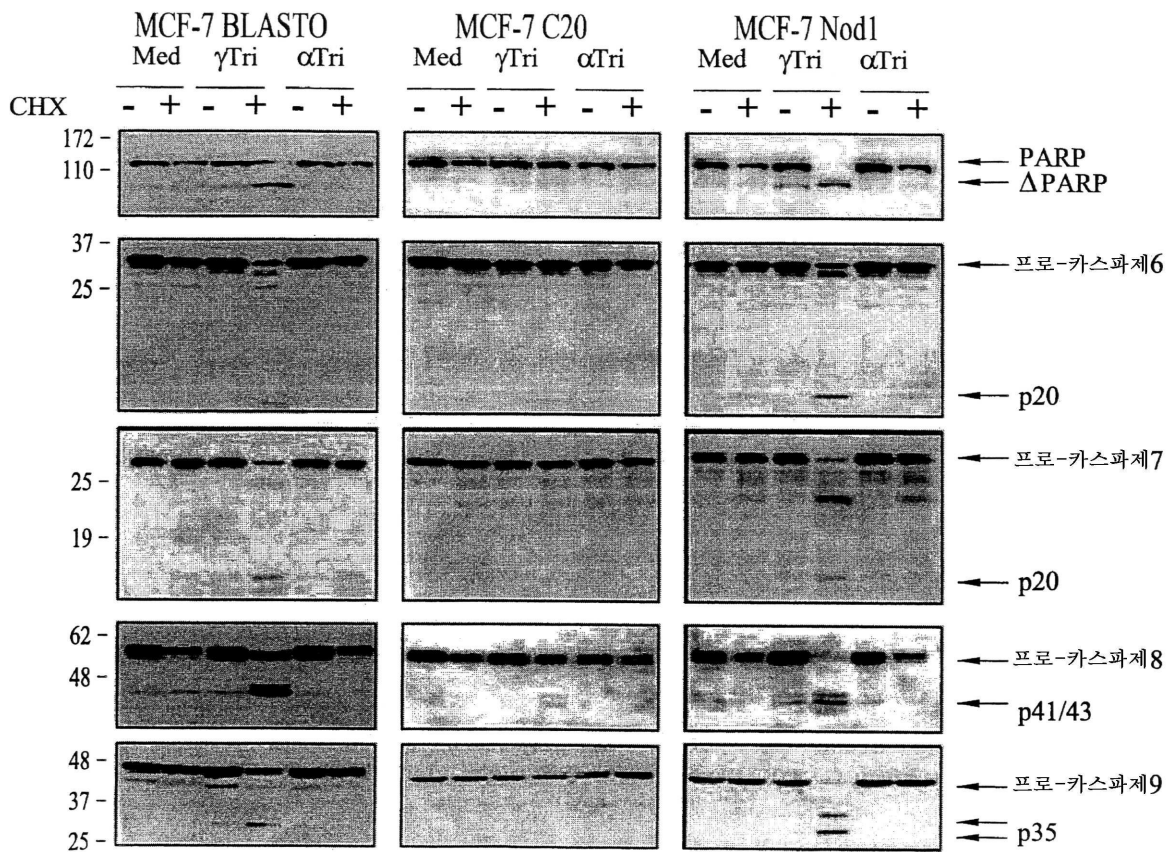
도면2C



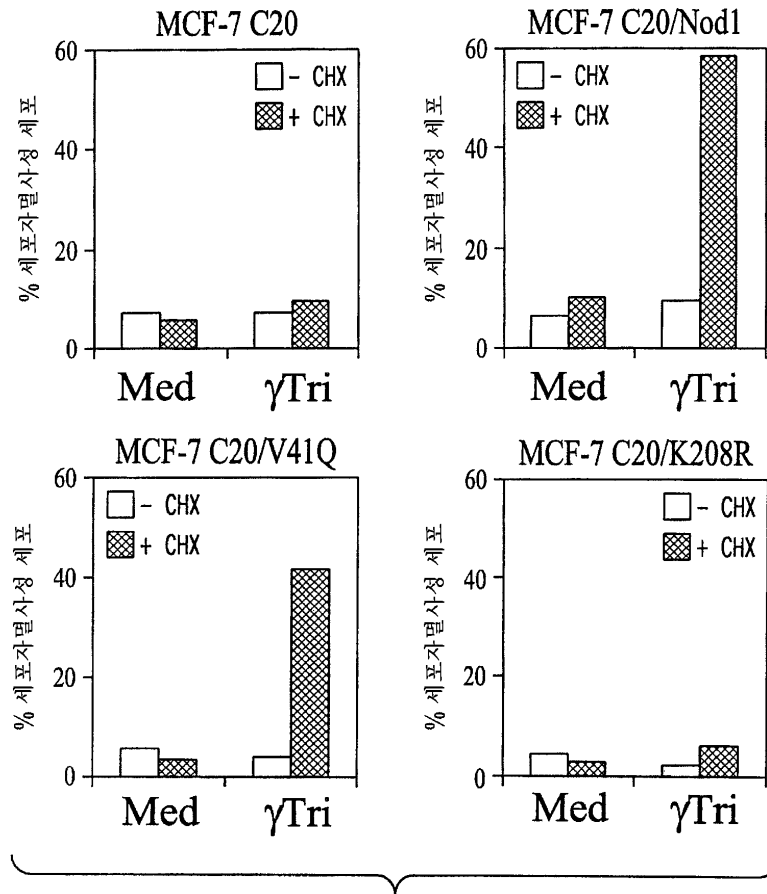
도면2D



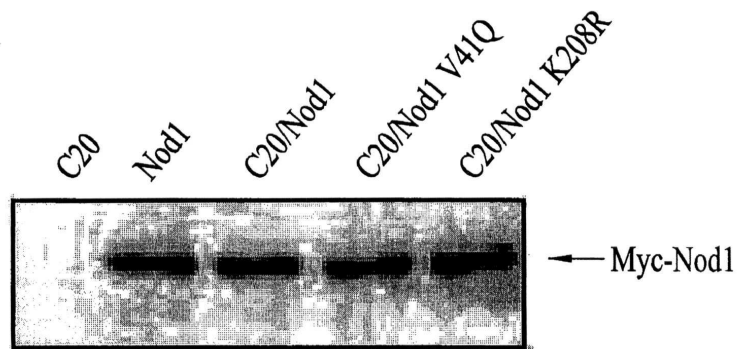
도면3



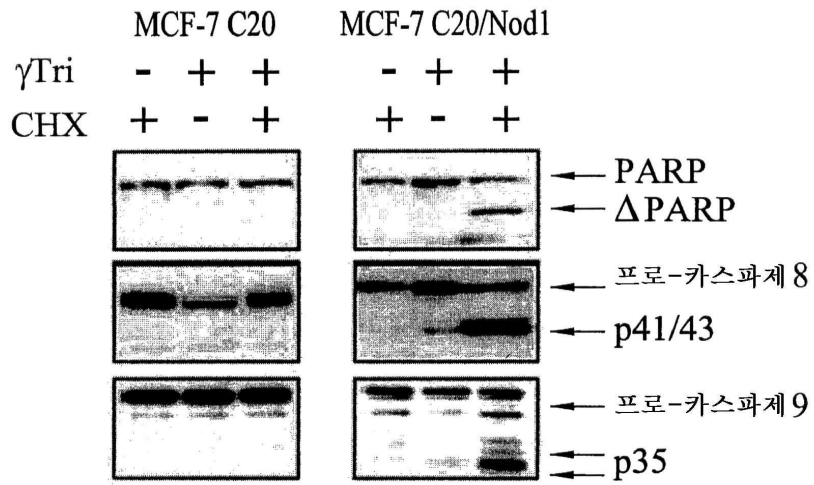
도면4A



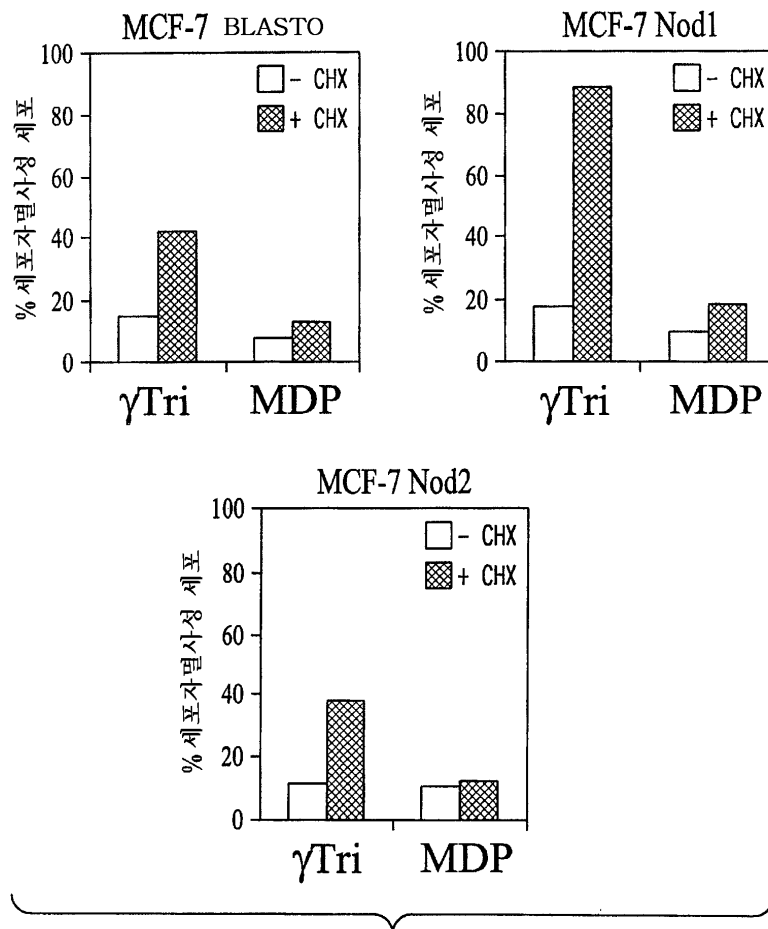
도면4B



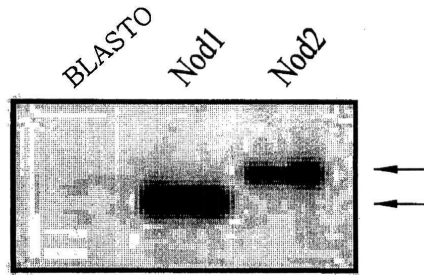
도면4C



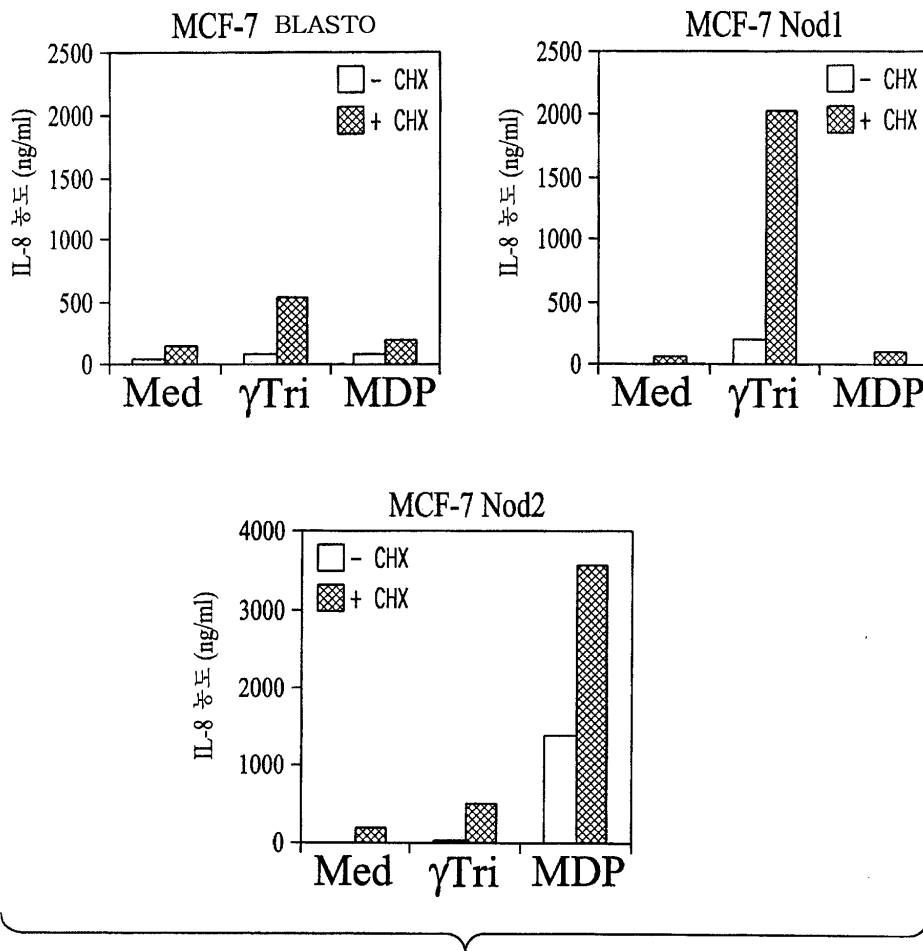
도면5A



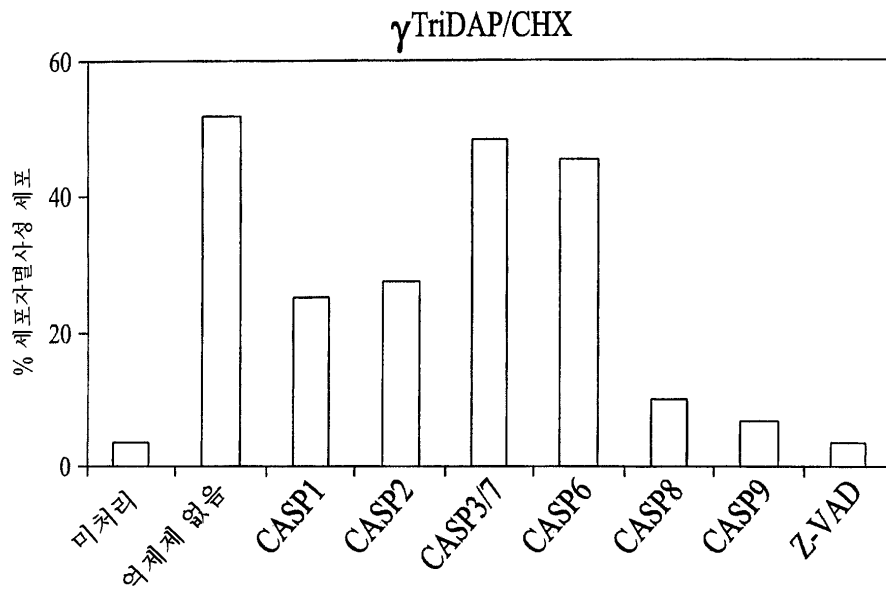
도면5B



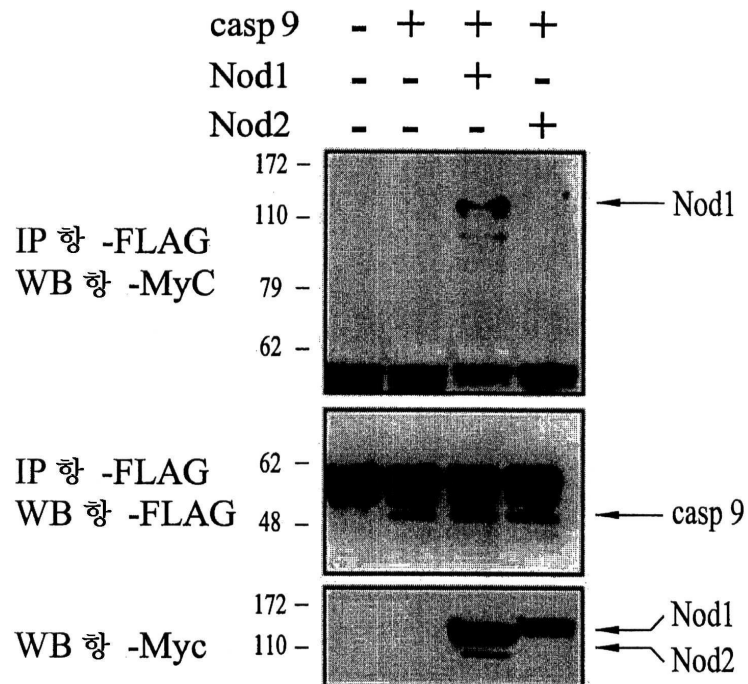
도면5C



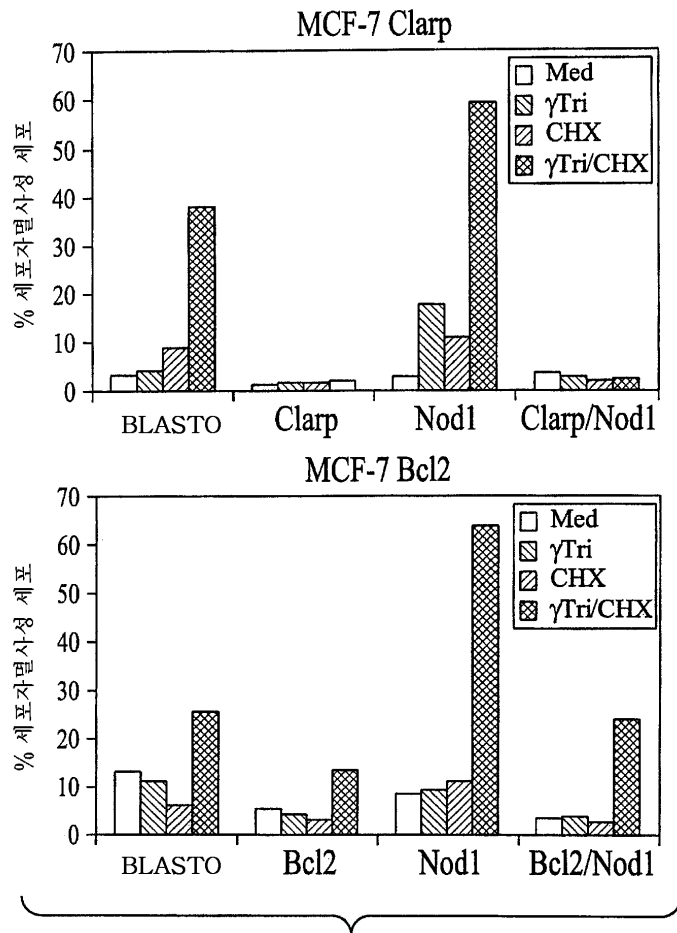
도면6A



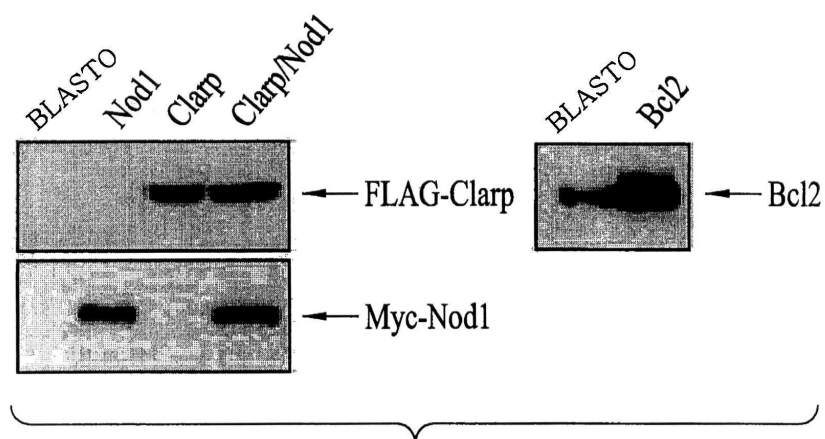
도면6B



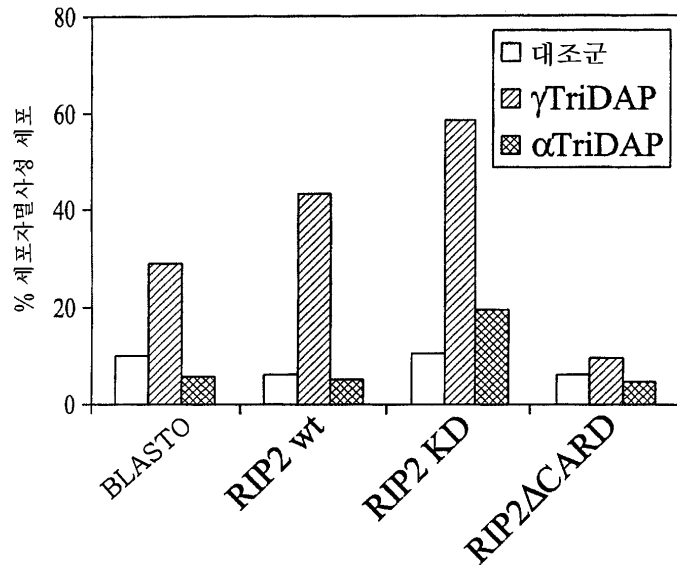
도면6C



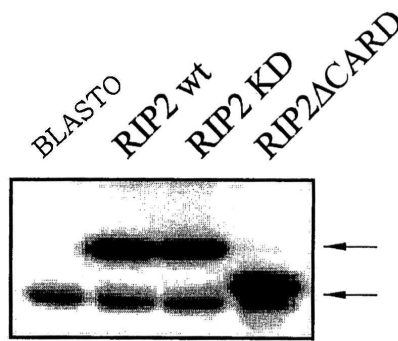
도면6D



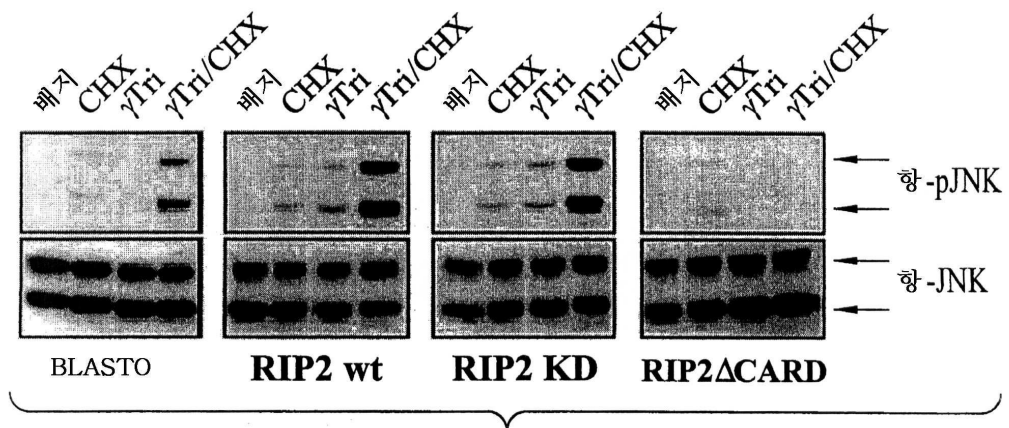
도면7A



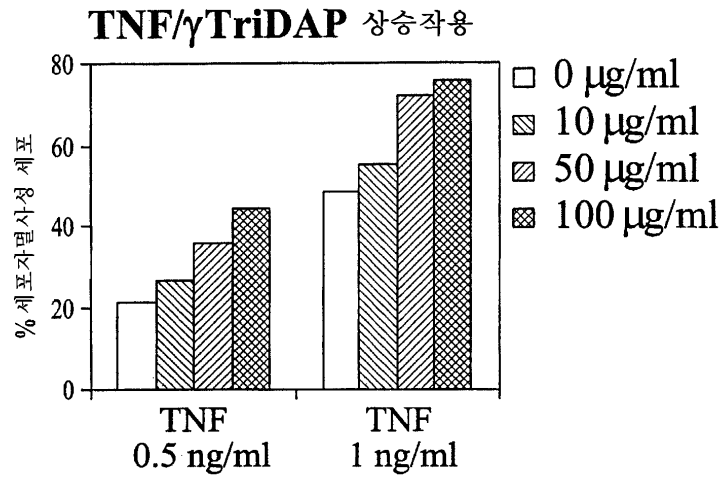
도면7B



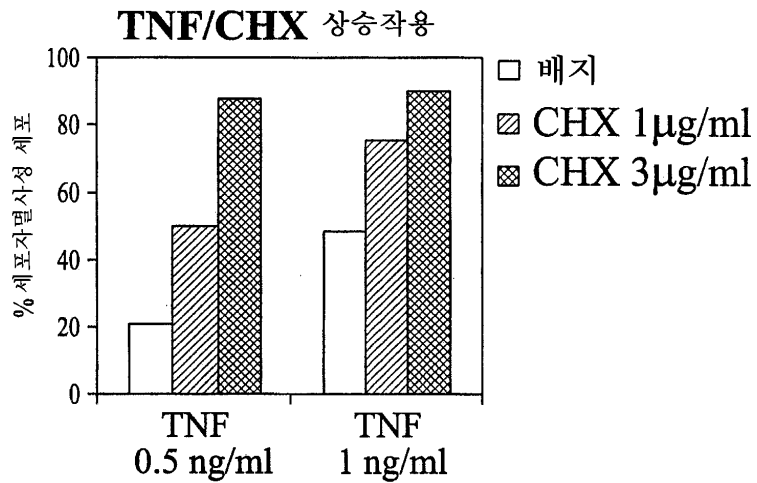
도면7C



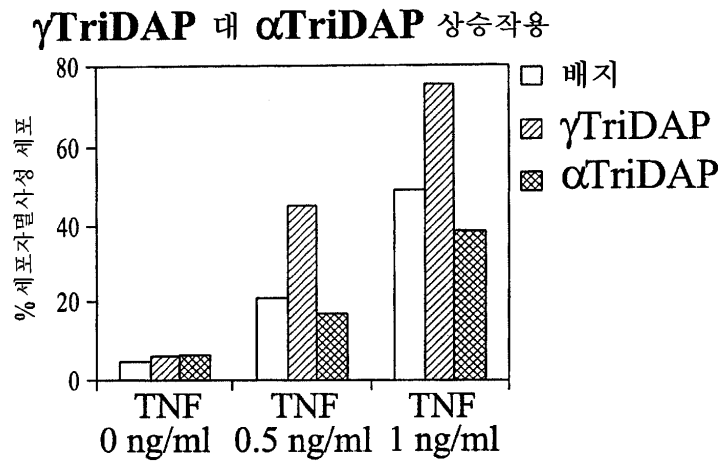
도면8A



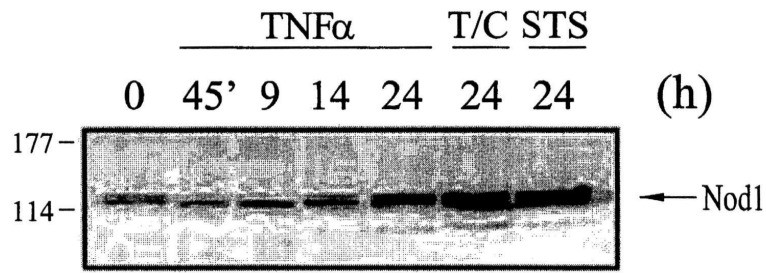
도면8B



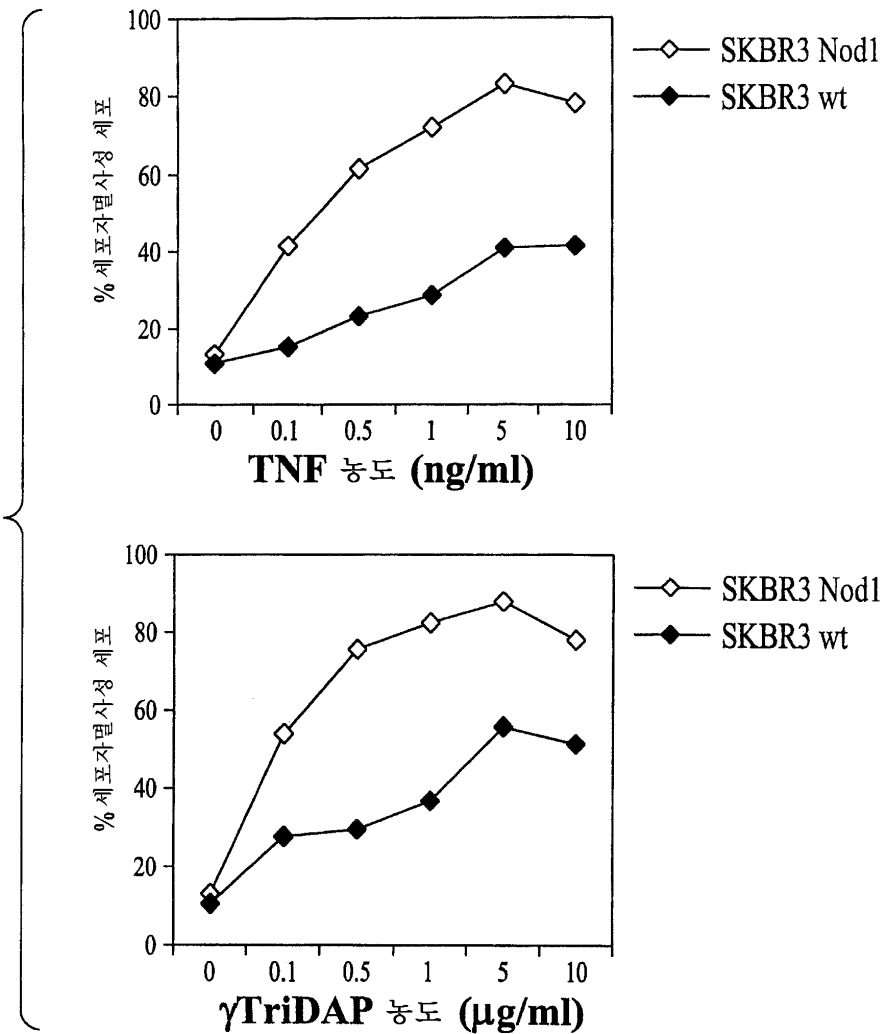
도면8C



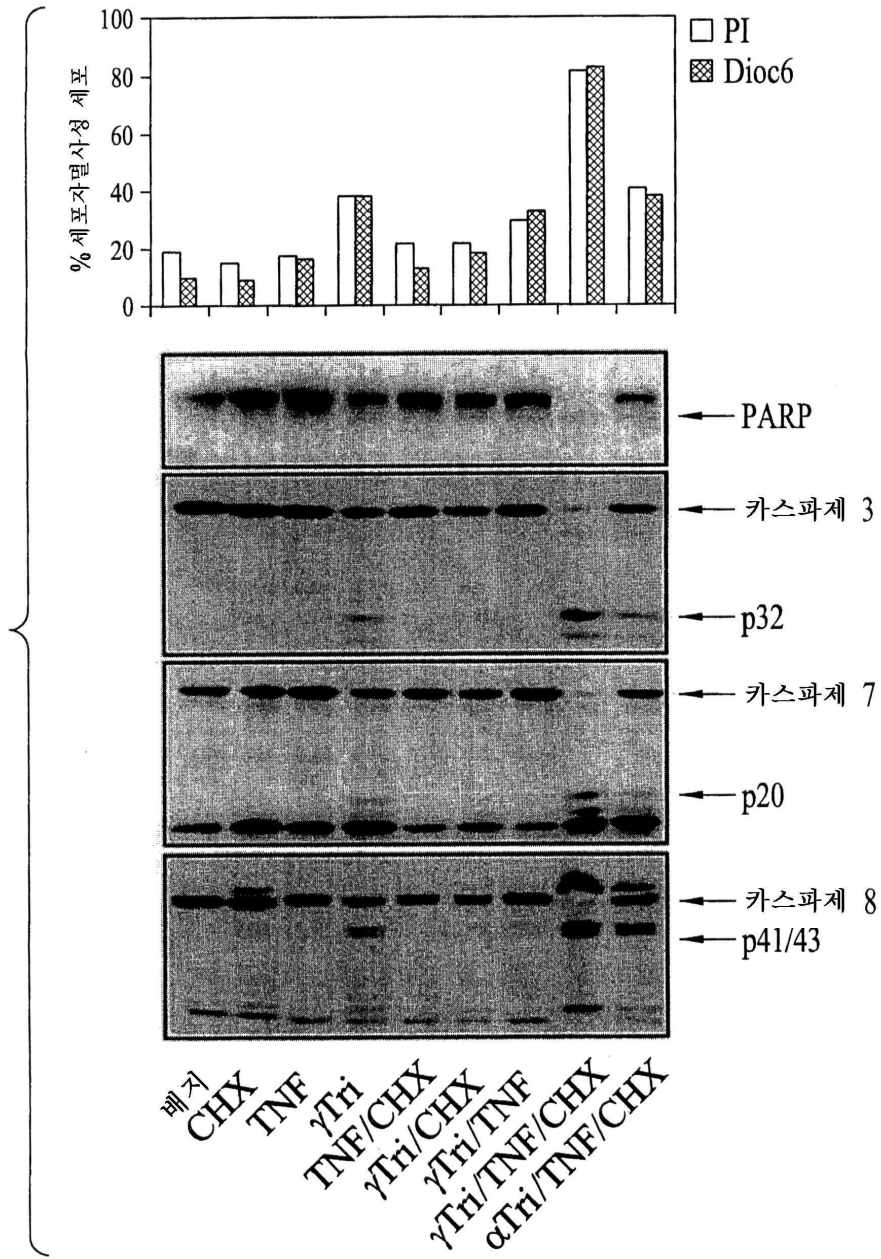
도면8D



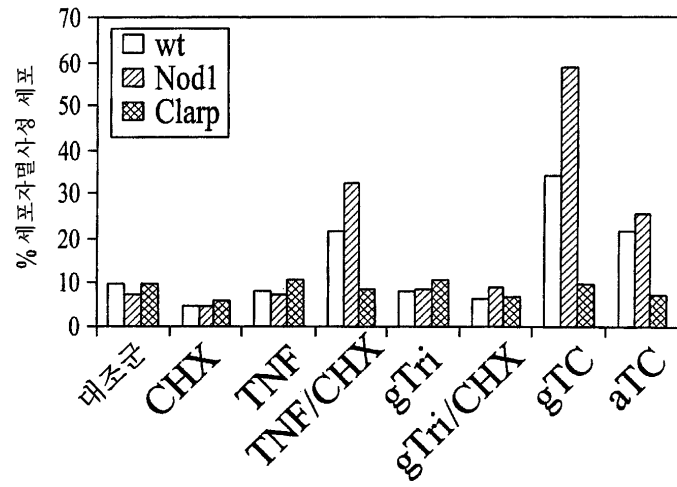
도면9A



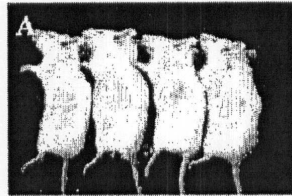
도면9B



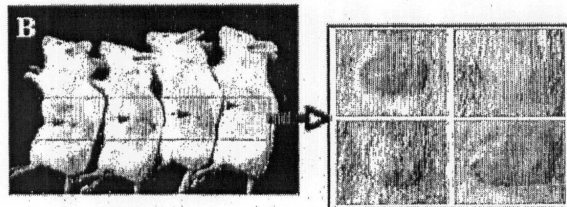
도면9C



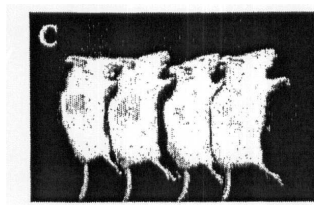
도면10A



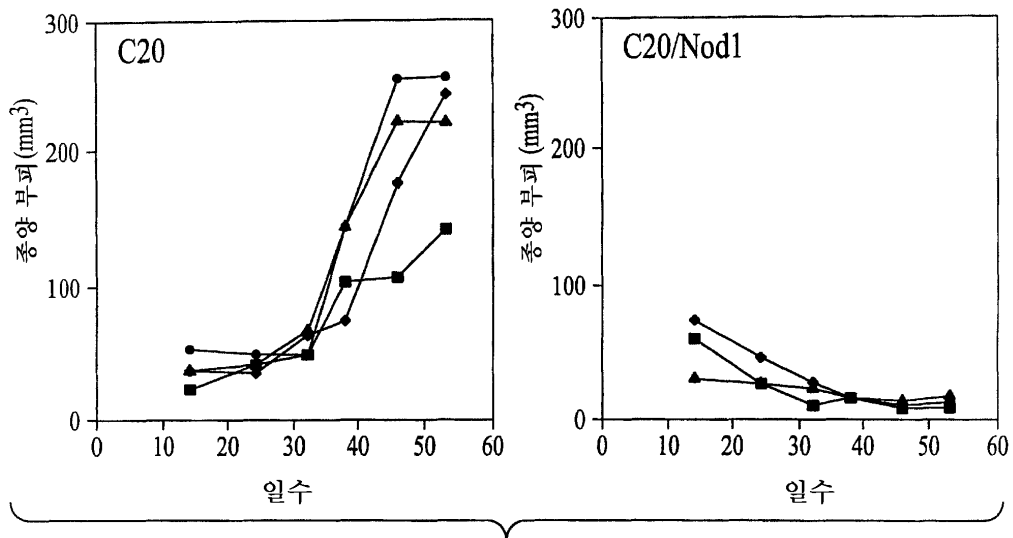
도면10B



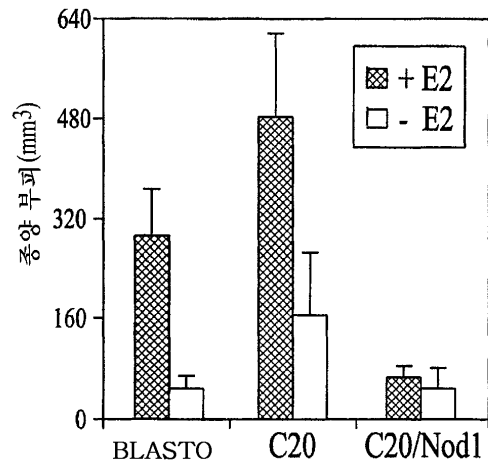
도면10C



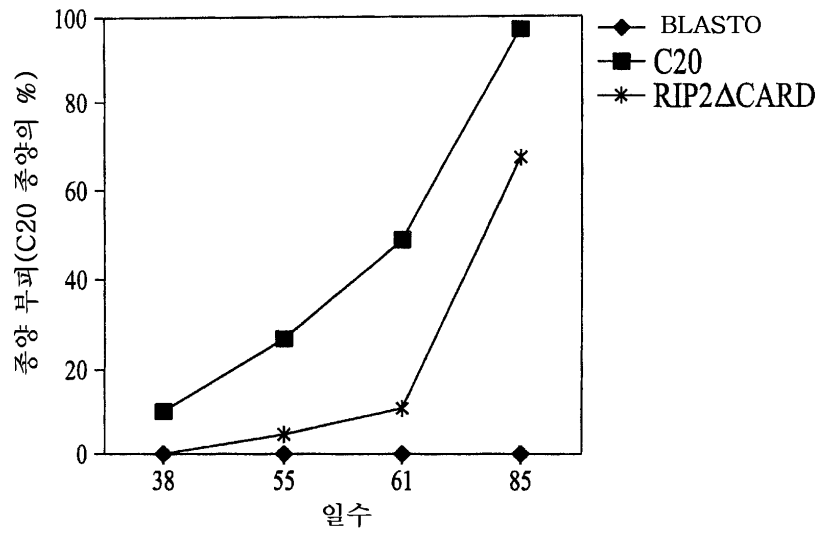
도면11A



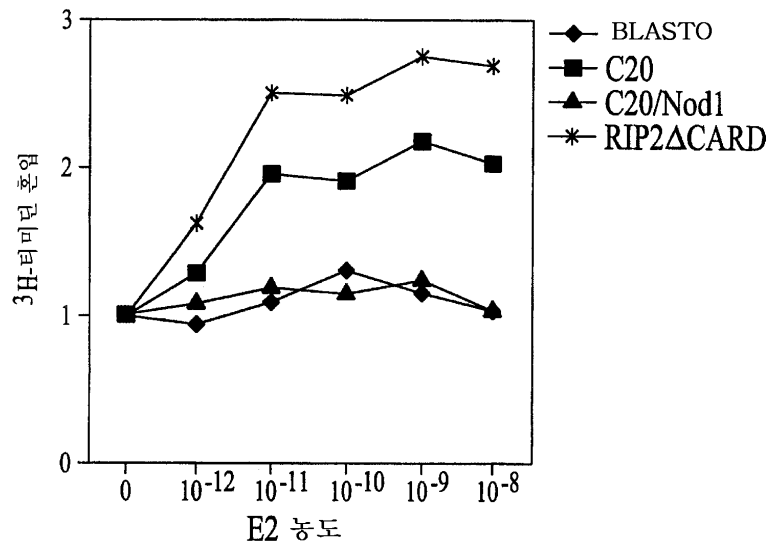
도면11B



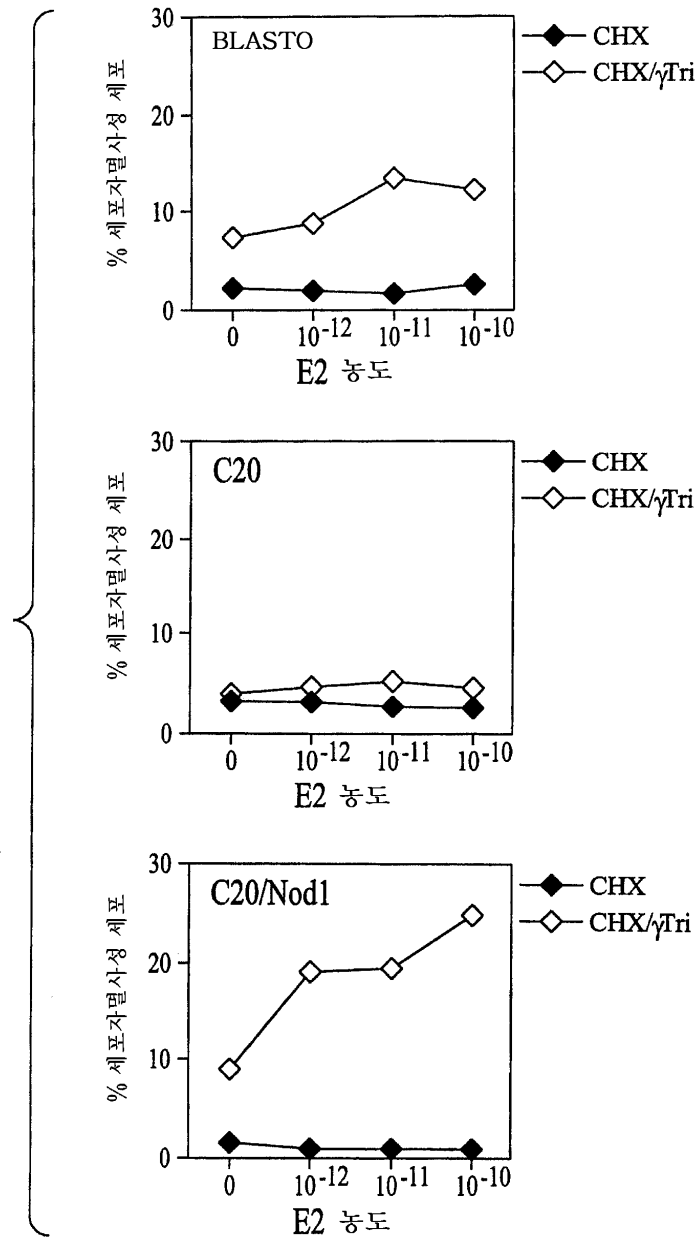
도면11C



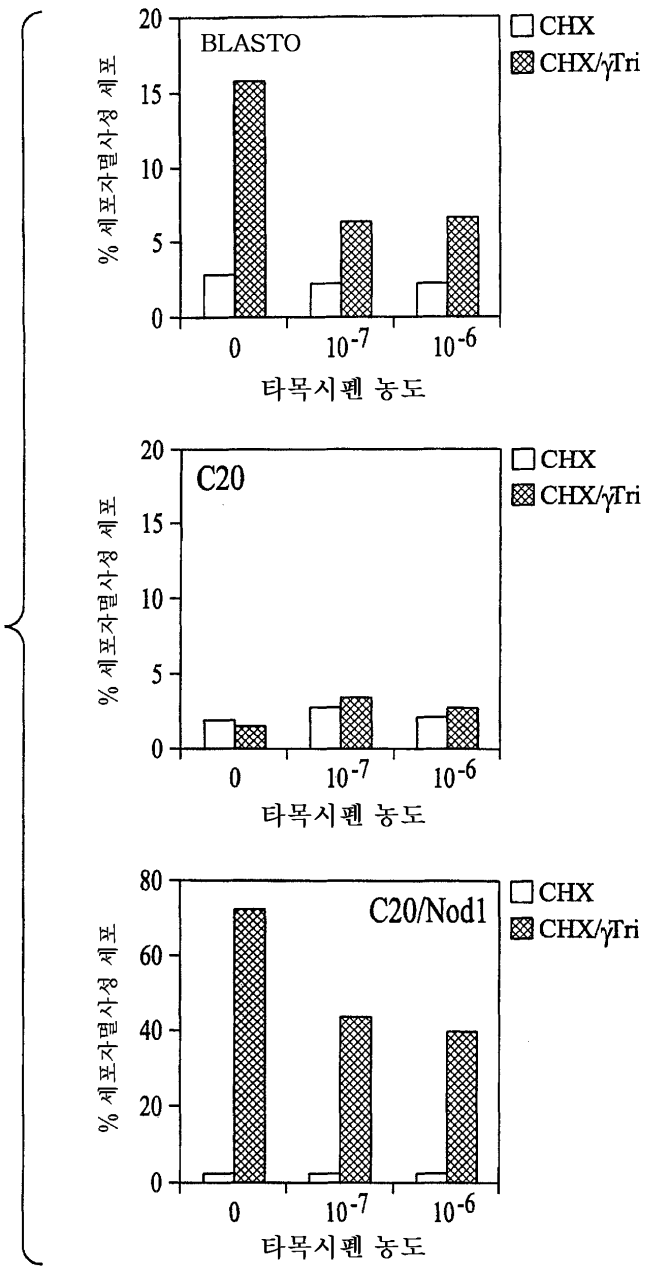
도면11D



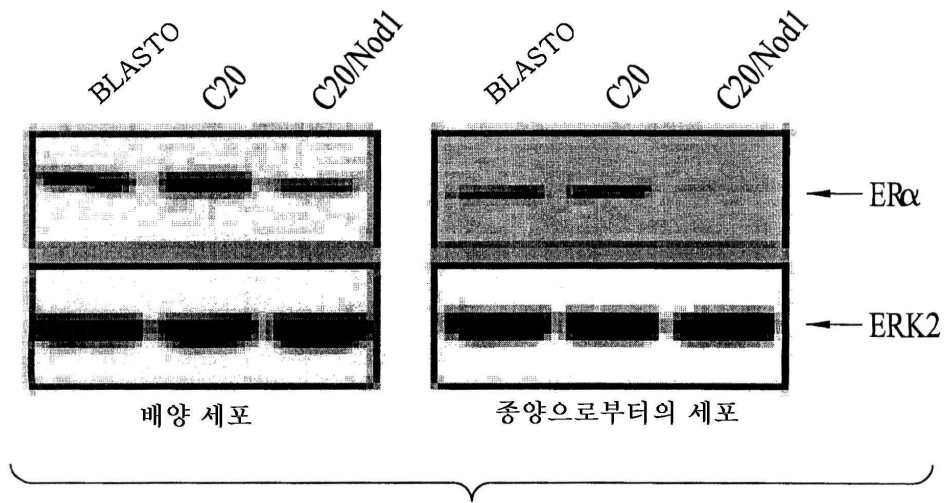
도면12A



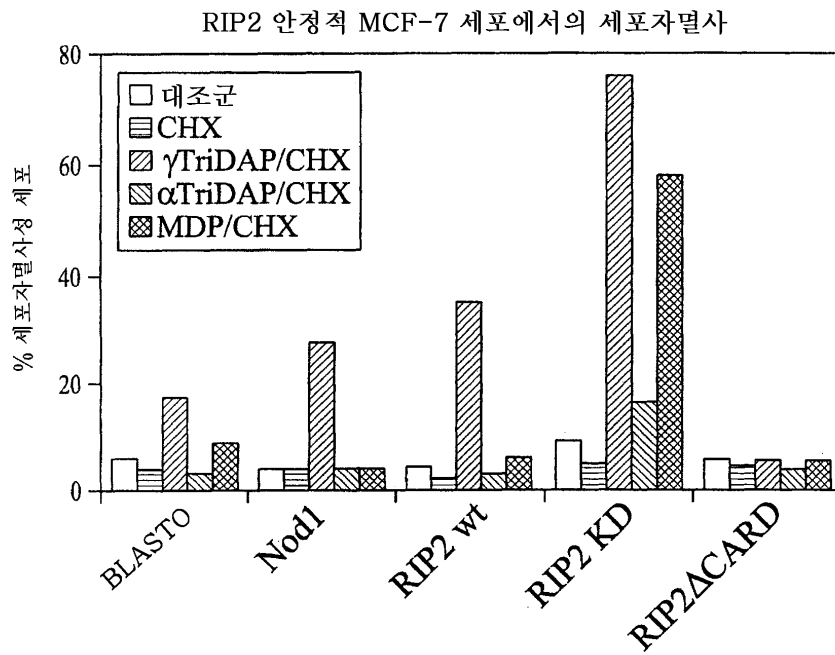
도면12B



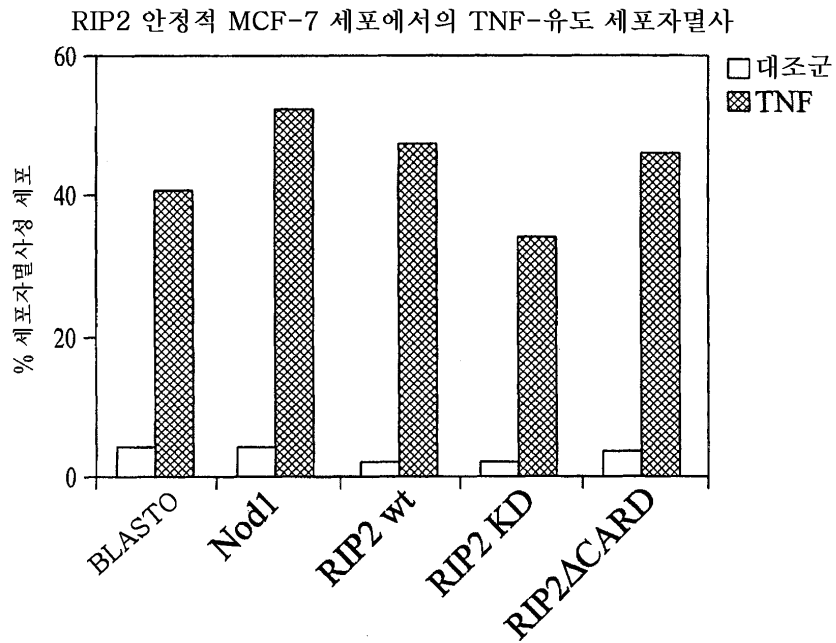
도면12C



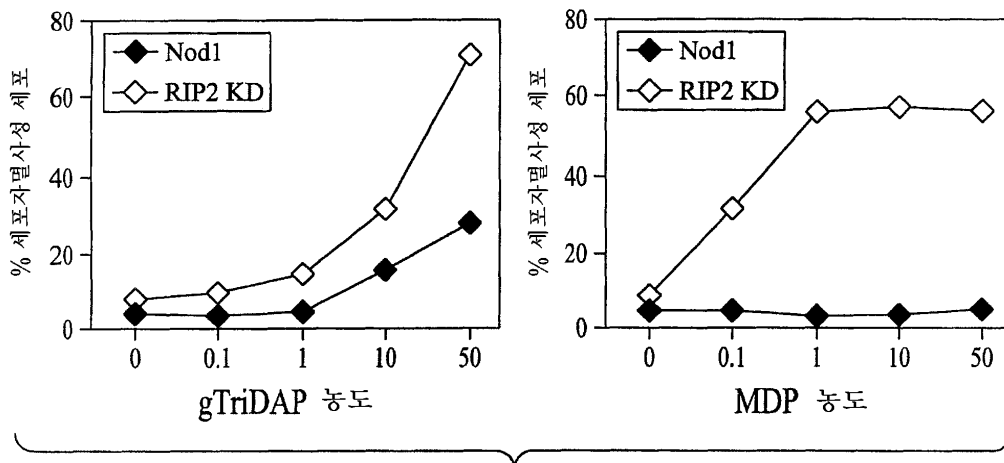
도면13A



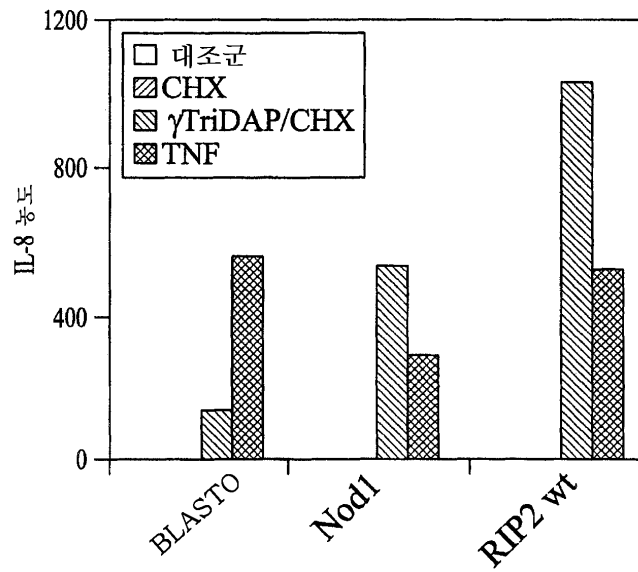
도면13B



도면13C



도면13D



서열목록

<110> The Scripps Research Institute
 Ulevitch, Richard J.
 da Silva, Jean
 Han, Jiahuai

<120> NOD1 AS AN ANTI-TUMOR AGENT

<130> 1361.057W01

<150> US 60/656,175

<151> 2005-02-25

<150> US 60/752,794

<151> 2005-12-22

<160> 5

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 953

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Glu Glu Gln Gly His Ser Glu Met Glu Ile Ile Pro Ser Glu Ser
 1           5           10           15
His Pro His Ile Gln Leu Leu Lys Ser Asn Arg Glu Leu Leu Val Thr
           20           25           30
His Ile Arg Asn Thr Gln Cys Leu Val Asp Asn Leu Leu Lys Asn Asp
           35           40           45
Tyr Phe Ser Ala Glu Asp Ala Glu Ile Val Cys Ala Cys Pro Thr Gln
 50           55
           60
Pro Asp Lys Val Arg Lys Ile Leu Asp Leu Val Gln Ser Lys Gly Glu
65           70           75           80
Glu Val Ser Glu Phe Phe Leu Tyr Leu Leu Gln Gln Leu Ala Asp Ala
           85           90           95
Tyr Val Asp Leu Arg Pro Trp Leu Leu Glu Ile Gly Phe Ser Pro Ser
100           105           110

Leu Leu Thr Gln Ser Lys Val Val Val Asn Thr Asp Pro Val
Ser Arg
           115           120           125
Tyr Thr Gln Gln Leu Arg His His Leu Gly Arg Asp Ser Lys Phe Val
130           135           140
Leu Cys Tyr Ala Gln Lys Glu Glu Leu Leu Leu Glu Glu Ile Tyr Met
145           150           155           160 Asp Thr Ile Met Glu Leu Val Gly
Phe Ser Asn Glu Ser Leu Gly Ser
           165           170           175
Leu Asn Ser Leu Ala Cys
Leu Leu Asp His Thr Thr Gly Ile Leu Asn
           180           185           190
Glu Gln Gly Glu Thr Ile Phe Ile Leu Gly Asp Ala Gly Val Gly Lys
           195           200           205
Ser Met Leu Leu Gln Arg Leu Gln Ser Leu Trp Ala Thr Gly Arg Leu
210           215           220
Asp Ala Gly Val Lys Phe Phe Phe His Phe Arg Cys Arg Met Phe Ser
225           230           235           240

Cys Phe Lys Glu Ser Asp Arg Leu Cys Leu Gln Asp Leu Leu Phe Lys
           245           250           255
His Tyr Cys Tyr Pro Glu Arg Asp Pro Glu Glu Val Phe Ala Phe Leu
260           265           270
Leu Arg Phe Pro His Val Ala Leu Phe Thr Phe Asp Gly Leu Asp Glu
275           280           285
Leu His Ser Asp Leu Asp Leu Ser Arg Val Pro Asp Ser Ser Cys Pro
290           295           300

Trp Glu Pro Ala His Pro Leu Val Leu Leu Ala Asn Leu Leu Ser Gly
305           310           315           320

Lys Leu Leu Lys Gly Ala Ser Lys Leu Leu Thr Ala Arg Thr Gly Ile
           325           330           335
Glu Val Pro Arg Gln Phe Leu Arg Lys Lys Val Leu Leu Arg Gly Phe
           340           345           350
Ser Pro Ser His Leu Arg Ala Tyr Ala Arg Arg Met Phe Pro Glu Arg

```


cgcaatactc agtgtctggt ggacaacttg ctgaagaatg actacttctc ggccaagat 600
 gcggagattg tgtgtgcctg ccccaccag cctgacaagg tccgcaaat tctggacctg 660
 gtacagagca agggcgagga ggtgtccgag ttcttctctt acttgcctca gcaactcgca 720
 gatgcctacg tggacctcag gccttggctg ctggagatcg gcttctcccc ttcctgtctc 780
 actcagagca aagtcgtggt caacactgac ccagtgagca ggtataccca gcagctgcga

840
 caccatctgg gccgtgactc caagttcgtg ctgtgctatg ccagaagga ggagctgctg 900
 ctggaggaga tctacatgga caccatcatg gagctggttg gcttcagcaa tgagagcctg 960
 ggcagcctga acagcctggc ctgcctcctg gaccacacca ccggcatcct caatgagcag 1020
 ggtgagacca tcttcatcct ggggtgatgt ggggtgggca agtccatgct gctacagcgg 1080
 ctgcagagcc tctgggccac gggccggcta gacgcagggg tcaaatctt cttccacttt 1140
 cgctgccgca tgttcagctg cttaaggaa agtgacaggc tgtgtctgca ggacctgtct 1200
 ttcaagcact actgtctacc agagcgggac cccgaggagg tgtttgcctt cctgtctgcg

1260
 ttcccccaag tggccctctt caccttcgat ggcctggacg agctgcactc ggacttggac 1320
 ctgagccgtg tgcctgacag ctctgcccc tgggagcctg cccaccctt ggtcttctg 1380
 gccaacctgc tcagtgggaa gctgctcaag ggggctagca agctgctcac agcccgcaca 1440
 ggcacatgagg tcccgcgcca gttcctcggg aagaagggtc ttctccgggg cttctcccc 1500
 agccacctgc gcgcctatgc caggaggatg ttccccgagc gggccctgca ggaccgctg 1560
 ctgagccagc tggaggccaa ccccaacctc tgcagcctgt gctctgtgcc cctcttctgc 1620
 tggatcatct tccggtgctt ccagcacttc cgtgtctgct ttgaaggctc

accacagctg 1680
 cccgactgca cgatgacct gacagatgct ttctcctggt tctactgaggt ccatctgaac 1740
 aggatgcagc ccagcagcct ggtgcagcgg aacacacaca gccagtgga gaccctccac 1800
 gccggccggg acactctgtg ctgcctgggg caggtggccc accggggcat ggagaagagc 1860
 ctctttgtct tcaccagga ggaggtgcag gcctccgggc tgcaggagag agacatgcag 1920
 ctgggcttcc tgcgggcttt gccggagctg ggccccgggg gtgaccagca gtctatgag 1980
 tttttccacc tcacctcca ggccttcttt acagccttct tctctgtgct ggacgacagg 2040
 gtgggcactc aggagctgct caggttcttc caggagtgga

tgccccctgc gggggcagcg 2100
 accacgtcct gctatctcc cttcctccc ttccagtgc tgcagggcag tggctccggcg 2160
 cgggaagacc tcttcaagaa caagatcac ttccagtcca ccaacctctt cctgtgcggg 2220
 ctgttgtcca aagccaaaca gaaactcctg cggcatctgg tccccgcggc agccctgagg 2280
 agaaagcga aggcctgtg ggcacacctg ttttccagcc tgcggggcta cctgaagagc 2340
 ctgcccccg ttcaggtcga aagcttcaac caggtgcagg ccatgcccac gttcatctgg 2400
 atgtgcgct gcactacga gacacagagc cagaagggtg ggcagctggc ggccaggggc 2460
 atctgcgcca actacctca gctgacctac

tgcaacgct gctcggcca ctgcagcgc 2520
 ctctcttctg tctgcatca ctcccccaag cggctggccc tagacctaga caacaacaat 2580
 ctcaacgact acggcgtgag ggagctgcag ccctgcttca gccgcctcac tgttctcaga 2640
 ctacagctaa accagatcac tgacggtggg gtaaagggtc taagcgaaga gctgaccaa 2700
 tacaaaattg tgacctattt gggtttatac aacaaccaga tcaccgatgt cggagccagg 2760
 tacgtacca aaatcctgga tgaatgcaa ggcctcacgc atcttaact gggaaaaaac 2820
 aaaatacaa gtgaaggagg gaagtatctc gccctggctg tgaagaacag caaatcaatc 2880
 tctgaggttg ggatgtgggg

caatcaagtt ggggatgaag gagcaaaagc cttcgagag 2940
 gctctgcgga accacccag ctgaccacc ctgagctttg cgtccaacgg catctccaca 3000
 gaaggaggaa agagccttg gaggccctg cagcagaaca cgtctctaga aatactgtg 3060
 ctgacccaaa atgaactcaa cgatgaagtg gcagagagtt tggcagaat gttgaaagtc 3120
 aaccagacgt taaagcattt atggcttacc cagaatcaga tcacagctaa ggggactgcc 3180
 cagctggcag atgcttaca gagcaacct ggcataacag agatttgctt aaatggaac 3240
 ctgataaac cagaggaggc caagtctat gaagatgaga agcggattat ctgtttctga 3300
 gaggatgctt

tctgttcat ggggttttg ccctggagcc tcagcagcaa atgccactct 3360
 gggcagcttt ttgtgctagt gctttaaagg ggcctgcgca ggcgggacta tcaggagtcc 3420
 actgcctcca tgatgcaagc cagcttctg tgcagaaggc ctggctggca aactccctaa 3480
 gtaccgcta caattctgca gaaaagaat gtgtcttgcg agctgttcta gttacagtaa 3540

atacactgtg aagagacttt attgcctatt ataattatit ttatctgaag cttagaggaat 3600
 aaagctgtga gcaaacagag gaggccagcc tcacctcatt ccaacacctg ccatagggac 3660
 caacgggagc gagttggtca ccgctctttt cattgaagag ttgaggatgt ggcacaaagt 3720
 tggtgccaag
 cttcttgaat aaaactgttt tgatggatta gtattatacc tgaatatit 3780
 tcttcttct cagcacttcc ccatgtattg atactggtec cacttcacag ctggagacac 3840
 cggagtatgt gcagtgtggg atttgactcc tccaaggttt tgtgaaagt taatgtcaag 3900
 gaaaggatgc accacgggct ttaatttta atcctggagt ctactgtct gctggcaaag 3960
 atagagaatg ccctcagctc ttagctggtc taagaatgac gatgccttca aaatgctgct 4020
 tccactcagg gcttctctc tgetaggeta ccctccteta gaaggctgag taccatgggc 4080
 tacagtgtct ggccttggga agaagtgatt ctgtccctcc aaagaaatag ggcatggctt 4140
 gccctgtgg
 ccctggcacc caaatggctg cttttgtctc ccttacctcg tgaagagggg 4200
 aagtctcttc ctgctccca agcagctgaa ggggtactaa acgggcgcca agactcaggg 4260
 gatcggctgg gaactgggcc agcagagcat gttggacacc cccaccatg gtgggcttgt 4320
 ggtggctgct ccatgagggt gggggtgata ctactagatc acttgtctc ttgccagctc 4380
 atttgttaat aaaatactga aaacactaaa aaaaaaaaaa aa 4422

<210> 3

<211> 953

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic NOD1 mutant

<400> 3

Met	Glu	Glu	Gln	Gly	His	Ser	Glu	Met	Glu	Ile	Ile	Pro	Ser	Glu	Ser
1			5					10						15	
His	Pro	His	Ile	Gln	Leu	Leu	Lys	Ser	Asn	Arg	Glu	Leu	Leu	Val	Thr
			20				25						30		
His	Ile	Arg	Asn	Thr	Gln	Cys	Leu	Gln	Asp	Asn	Leu	Leu	Lys	Asn	Asp
		35				40						45			
Tyr	Phe	Ser	Ala	Glu	Asp	Ala	Glu	Ile	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Thr	Gln
	50					55									
				60											
Pro	Asp	Lys	Val	Arg	Lys	Ile	Leu	Asp	Leu	Val	Gln	Ser	Lys	Gly	Glu
65				70						75				80	
Glu	Val	Ser	Glu	Phe	Phe	Leu	Tyr	Leu	Leu	Gln	Gln	Leu	Ala	Asp	Ala
				85						90				95	
Tyr	Val	Asp	Leu	Arg	Pro	Trp	Leu	Leu	Glu	Ile	Gly	Phe	Ser	Pro	Ser
			100						105					110	
Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Lys	Val	Val	Val	Asn	Thr	Asp	Pro	Val	Ser	
Arg															
			115					120						125	
Tyr	Thr	Gln	Gln	Leu	Arg	His	His	Leu	Gly	Arg	Asp	Ser	Lys	Phe	Val
			130				135						140		
Leu	Cys	Tyr	Ala	Gln	Lys	Glu	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Glu	Ile	Tyr	Met
145					150					155					160

Asp Thr Ile Met Glu Leu Val Gly Phe Ser Asn Glu Ser Leu Gly Ser
 165 170 175
 Leu Asn Ser Leu Ala Cys Leu Leu Asp His Thr Thr Gly Ile Leu Asn
 180 185 190
 Glu Gln Gly Glu Thr Ile Phe Ile Leu Gly Asp Ala Gly Val Gly Lys
 195 200 205
 Ser Met Leu Leu Gln Arg Leu Gln Ser Leu Trp Ala Thr Gly Arg Leu
 210 215 220

 Asp Ala Gly Val Lys Phe Phe Phe His Phe Arg Cys Arg Met Phe Ser
 225 230 235 240

 Cys Phe Lys Glu Ser Asp Arg Leu Cys Leu Gln Asp Leu Leu Phe Lys
 245 250 255
 His Tyr Cys Tyr Pro Glu Arg Asp Pro Glu Glu Val Phe Ala Phe Leu
 260 265 270
 Leu Arg Phe Pro His Val Ala Leu Phe Thr Phe Asp Gly Leu Asp Glu
 275 280 285
 Leu His Ser Asp Leu Asp Leu Ser Arg Val Pro Asp Ser Ser Cys Pro
 290 295 300

 Trp Glu Pro Ala His Pro Leu Val Leu Leu Ala Asn Leu Leu Ser Gly
 305 310 315 320

 Lys Leu Leu Lys Gly Ala Ser Lys Leu Leu Thr Ala Arg Thr Gly Ile
 325 330 335
 Glu Val Pro Arg Gln Phe Leu Arg Lys Lys Val Leu Leu Arg Gly Phe
 340 345 350
 Ser Pro Ser His Leu Arg Ala Tyr Ala Arg Arg Met Phe Pro Glu Arg
 355 360 365
 Ala Leu Gln Asp Arg Leu Leu Ser Gln Leu Glu Ala Asn Pro Asn Leu
 370 375 380

 Cys Ser Leu Cys Ser Val Pro Leu Phe Cys Trp Ile Ile Phe Arg Cys
 385 390 395 400

 Phe Gln His Phe Arg Ala Ala Phe Glu Gly Ser Pro Gln Leu Pro Asp
 405 410 415
 Cys Thr Met Thr Leu Thr Asp Val Phe Leu Leu Val Thr Glu Val His
 420 425 430
 Leu Asn Arg Met Gln Pro Ser Ser Leu Val Gln Arg Asn Thr Arg Ser
 435 440 445
 Pro Val Glu Thr Leu His Ala Gly Arg Asp Thr Leu Cys Ser Leu Gly
 450 455 460

 Gln Val Ala His Arg Gly Met Glu Lys Ser Leu Phe Val Phe Thr Gln
 465 470 475 480

 Glu Glu Val Gln Ala Ser Gly Leu Gln Glu Arg Asp Met Gln Leu Gly
 485 490 495
 Phe Leu Arg Ala Leu Pro Glu Leu Gly Pro Gly Gly Asp Gln Gln Ser
 500 505 510
 Tyr Glu Phe Phe His Leu Thr Leu Gln Ala Phe Phe Thr Ala Phe Phe
 515 520 525
 Leu Val Leu Asp Asp Arg Val Gly Thr Gln Glu Leu Leu Arg Phe Phe
 530 535 540

Gln Glu Trp Met Pro Pro Ala Gly Ala Ala Thr Thr Ser Cys Tyr Pro
 545 550 555 560

Pro Phe Leu Pro Phe Gln Cys Leu Gln Gly Ser Gly Pro Ala Arg Glu
 565 570 575

Asp Leu Phe Lys Asn Lys Asp His Phe Gln Phe Thr Asn Leu Phe Leu
 580 585 590

Cys Gly Leu Leu Ser Lys Ala Lys Gln Lys Leu Leu Arg His Leu Val
 595 600 605

Pro Ala Ala Ala Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ala Leu Trp Ala His Leu
 610 615 620

Phe Ser Ser Leu Arg Gly Tyr Leu Lys Ser Leu Pro Arg Val Gln Val
 625 630 635 640

Glu Ser Phe Asn Gln Val Gln Ala Met Pro Thr Phe Ile Trp Met Leu
 645 650 655

Arg Cys Ile Tyr Glu Thr Gln Ser Gln Lys Val Gly Gln Leu Ala Ala
 660 665 670

Arg Gly Ile Cys Ala Asn Tyr Leu Lys Leu Thr Tyr Cys Asn Ala Cys
 675 680 685

Ser Ala Asp Cys Ser Ala Leu Ser Phe Val Leu His His Phe Pro Lys
 690 695 700

Arg Leu Ala Leu Asp Leu Asp Asn Asn Asn Leu Asn Asp Tyr Gly Val
 705 710 715 720

Arg Glu Leu Gln Pro Cys Phe Ser Arg Leu Thr Val Leu Arg Leu Ser
 725 730 735

Val Asn Gln Ile Thr Asp Gly Gly Val Lys Val Leu Ser Glu Glu Leu
 740 745 750

Thr Lys Tyr Lys Ile Val Thr Tyr Leu Gly Leu Tyr Asn Asn Gln Ile
 755 760 765

Thr Asp Val Gly Ala Arg Tyr Val Thr Lys Ile Leu Asp Glu Cys Lys
 770 775 780

Gly Leu Thr His Leu Lys Leu Gly Lys Asn Lys Ile Thr Ser Glu Gly
 785 790 795 800

Gly Lys Tyr Leu Ala Leu Ala Val Lys Asn Ser Lys Ser Ile Ser Glu
 805 810 815

Val Gly Met Trp Gly Asn Gln Val Gly Asp Glu Gly Ala Lys Ala Phe
 820 825 830

Ala Glu Ala Leu Arg Asn His Pro Ser Leu Thr Thr Leu Ser Leu Ala
 835 840 845

Ser Asn Gly Ile Ser Thr Glu Gly Gly Lys Ser Leu Ala Arg Ala Leu
 850 855 860

Gln Gln Asn Thr Ser Leu Glu Ile Leu Trp Leu Thr Gln Asn Glu Leu
 865 870 875 880

Asn Asp Glu Val Ala Glu Ser Leu Ala Glu Met Leu Lys Val Asn Gln
 885 890 895

Thr Leu Lys His Leu Trp Leu Ile Gln Asn Gln Ile Thr Ala Lys Gly
 900 905 910

Thr Ala Gln Leu Ala Asp Ala Leu Gln Ser Asn Thr Gly Ile Thr Glu

915 920 925
 Ile Cys Leu Asn Gly Asn Leu Ile Lys Pro Glu Glu Ala Lys Val Tyr
 930 935 940

Glu Asp Glu Lys Arg Ile Ile Cys Phe
 945 950

<210> 4

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
 20 25 30
 Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
 35 40 45
 Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Ser Pro
 50 55
 60
 Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
 65 70 75 80
 Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
 85 90 95
 Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
 100 105 110
 Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro
 Ser
 115 120 125
 Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
 130 135 140
 Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
 165 170 175
 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
 180 185 190
 Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
 195 200 205
 Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
 210 215 220
 Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 225 230

<210> 5

<211> 540

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

Met Asn Gly Glu Ala Ile Cys Ser Ala Leu Pro Thr Ile Pro Tyr His
 1           5           10           15
Lys Leu Ala Asp Leu Arg Tyr Leu Ser Arg Gly Ala Ser Gly Thr Val
           20           25           30
Ser Ser Ala Arg His Ala Asp Trp Arg Val Gln Val Ala Val Lys His
           35           40           45
Leu His Ile His Thr Pro Leu Leu Asp Ser Glu Arg Lys Asp Val Leu
 50           55
           60
Arg Glu Ala Glu Ile Leu His Lys Ala Arg Phe Ser Tyr Ile Leu Pro
65           70           75           80
Ile Leu Gly Ile Cys Asn Glu Pro Glu Phe Leu Gly Ile Val Thr Glu
           85           90           95
Tyr Met Pro Asn Gly Ser Leu Asn Glu Leu Leu His Arg Lys Thr Glu
           100          105          110
Tyr Pro Asp Val Ala Trp Pro Leu Arg Phe Arg Ile Leu His Glu
Ile
           115           120           125
Ala Leu Gly Val Asn Tyr Leu His Asn Met Thr Pro Pro Leu Leu His
           130          135          140
His Asp Leu Lys Thr Gln Asn Ile Leu Leu Asp Asn Glu Phe His Val
           145          150          155          160

Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Trp Arg Met Met Ser Leu Ser
           165          170          175
Gln Ser Arg Ser Ser Lys Ser Ala Pro Glu Gly Gly Thr Ile Ile Tyr
           180          185          190
Met Pro Pro Glu Asn Tyr Glu Pro Gly Gln Lys Ser Arg Ala Ser Ile
           195          200          205
Lys His Asp Ile Tyr Ser Tyr Ala Val Ile Thr Trp Glu Val Leu Ser
           210          215          220

Arg Lys Gln Pro Phe Glu Asp Val Thr Asn Pro Leu Gln Ile Met Tyr
           225          230          235          240

Ser Val Ser Gln Gly His Arg Pro Val Ile Asn Glu Glu Ser Leu Pro
           245          250          255
Tyr Asp Ile Pro His Arg Ala Arg Met Ile Ser Leu Ile Glu Ser Gly
           260          265          270
Trp Ala Gln Asn Pro Asp Glu Arg Pro Ser Phe Leu Lys Cys Leu Ile
           275          280          285
Glu Leu Glu Pro Val Leu Arg Thr Phe Glu Glu Ile Thr Phe Leu Glu
           290          295          300

Ala Val Ile Gln Leu Lys Lys Thr Lys Leu Gln Ser Val Ser Ser Ala
           305          310          315          320

Ile His Leu Cys Asp Lys Lys Lys Met Glu Leu Ser Leu Asn Ile Pro

```

