



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월06일

(11) 등록번호 10-1915699

(24) 등록일자 2018년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/075 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7000726
(22) 출원일자(국제) 2011년06월10일
심사청구일자 2016년06월07일
(85) 번역문제출일자 2013년01월10일
(65) 공개번호 10-2013-0043152
(43) 공개일자 2013년04월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/040053
(87) 국제공개번호 WO 2011/156761
국제공개일자 2011년12월15일
(30) 우선권주장
61/353,652 2010년06월10일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
W02005040333 A2*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 11 항

(73) 특허권자
유니버시티 오브 워싱턴 스루 이츠 센터 포 커머셜라이제이션
미국 워싱턴 98105-4608 시애틀 캠퍼스 박스 354990 스위트 500 노오스이스트 11 애비뉴 4311
(72) 발명자
리이버, 안드레
미국, 워싱턴 98115, 시애틀, 29 애비뉴 노스이스트 7251
왕, 홍지에
미국, 워싱턴 98115, 시애틀, 65 스트리트 노스이스트 5721
(74) 대리인
김순웅

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **데스모글레인 2(디에스쥐2)와 아데노바이러스의 상호작용을 위한 방법 및 시스템**

(57) 요약

본 발명은 상피 조직과 관련된 장애를 치료하는 조성물 및 방법을 제공한다.

(56) 선행기술조사문헌

JP2003514577 A

US07560527 B1

US20020076419 A1

US20110040053 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(30) 우선권주장

61/430,091 2011년01월05일 미국(US)

61/470,663 2011년04월01일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드:

- a) 서열번호 11에 따른 아미노산 서열을 포함하는, 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 측 도메인;
- b) 서열번호 13에 따른 아미노산 서열을 포함하며, 상기 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 측 도메인에 유효하게 결합되고 C-말단에 위치하는, AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 마디 도메인; 및
- c) 상기 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 측 도메인에 유효하게 결합되고 N-말단에 위치하는, 하나 이상의 비-AdB-2/3 유래의 이량체화 도메인;

상기 AdB-2/3는 바이러스 결합을 위한 상피 세포 수용체로서 데스모글레인-2(desmoglein-2, DSG2)를 이용하는 임의의 아데노 바이러스 혈청형인 것을 특징으로 하는 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 이량체화 도메인이 EVSALEK(서열번호 22) 및 KVSALKE(서열번호 23)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 각 측 도메인이 Ad3 섬유 폴리펩타이드 측 도메인, Ad7 섬유 폴리펩타이드 측 도메인, Ad11 섬유 폴리펩타이드 측 도메인, Ad14 섬유 폴리펩타이드 측 도메인, 및 Ad14a 섬유 폴리펩타이드 측 도메인으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 마디 도메인이 Ad3 섬유 폴리펩타이드 마디 도메인, Ad7 섬유 폴리펩타이드 마디 도메인, Ad11 섬유 폴리펩타이드 마디 도메인, Ad14 섬유 폴리펩타이드 마디 도메인, 및 Ad14a 섬유 폴리펩타이드 마디 도메인으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 마디 도메인이 Ad3 섬유 폴리펩타이드 마디 도메인을 포함하고, 상기 각 측 도메인은 Ad3 섬유 폴리펩타이드 측 도메인인 것을 특징으로 하는 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드는 동중삼량체화(homotrimeric)된 것이고, 상기 동중삼량체화된 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드는 이량체화(dimerized)된 것을 특징으로 하는 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산.

청구항 8

제7항의 분리된 핵산을 포함하는 제조합 발현 벡터.

청구항 9

제8항의 제조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 10

a) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 제조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드; 및 b) 약학적 허용성 담체;를 포함하는,

상피 조직과 관련된 장애의 치료요법적 치료의 증진, 또는 상피 조직과 관련된 장애의 진단 또는 상피 조직과 관련된 장애가 존재하는 것으로 여겨지는 상피 조직의 영상화 또는 상피 조직과 관련된 장애의 치료를 위한 약학적 조성물로서,

상기 상피 조직과 관련된 장애가 고형암, Her-2-양성 암, 및 EGFR-양성 암으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 제조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드는 동중삼량체화(homotrimeric)화된 것이고, 상기 동중삼량체화된 제조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드는 이량체화(dimerized)된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조 설명

[0002] 본 출원은 2010년 6월 10일에 출원한 미국 가 특허 출원 61/353,652, 2011년 1월 5일에 출원한 미국 가 특허출원 61/430,091, 및 2011년 4월 1일에 출원한 미국 가 특허 출원 61/470,663의 우선권을 주장하는 출원이며, 이 우선권 출원들은 모두 본원에 전문이 참고 인용된다.

[0003] 정부 권리에 대한 진술

[0004] 본 발명은 미국 국립보건원이 제공한 미국 정부 지원 R01 CA0080192 및 R01 HLA078836에 의해 이루어졌다. 이에 미국 정부는 본 발명에 특정 권리를 갖는다.

배경 기술

[0005] 사람 아데노바이러스(Ad)는 현재 51개 혈청형을 포함하는 6개의 종(A 내지 F)으로 분류되고 있다. 대부분의 Ad 혈청형은 주요 부착 수용체로서 콕사키-아데노바이러스 수용체(coxsackie-adenovirus receptor: CAR)를 이용한다(Bergelson et al., 1997). 하지만, B종의 Ad 혈청형의 경우에는 그렇지 않다. 최근, 본 발명자들은 수용체 용법을 기반으로 하는 새로운 B종 Ad의 그룹화를 제안했다(Tuve et al., 2006). 그룹 1(Ad16, 21, 35, 50)은 수용체로서 CD46을 거의 독점적으로 사용하고; 그룹 2(Ad3, Ad7, 14)는 CD46이 아닌, 임시로 수용체 X라 지칭한 통상의 미확인 수용체(들)를 공유하며; 그룹 3(Ad11)은 CD46과 우선적으로 상호작용하지만, CD46이 차단되어 있으면 수용체 X를 이용한다.

[0006] B종 Ad는 통상적인 사람 병원균이다. 2005년 이후, 다양한 B종 혈청형이 대부분의 미군 훈련소에서 동시 발생한 것이 관찰되었다. 이 혈청형에는 Ad3, Ad6 및 Ad14 혈청형이 포함되었다(Metzgar et al., 2007). 2007년에는 새로운 고병원성 균주이고 아마도 더욱 독성인 Ad14 균주인, Ad14a가 미국과 아시아의 여러 지역에서 발견되었다(Louie et al., 2008; Tate et al., 2009). 본 발명자들은 최근 Ad14a가 수용체 용법과 관련해서 B종 그룹 2 Ad에 속한다는 것을 입증했다(Wang et al., 2009). 종합해서, 수용체 X를 이용하는 혈청형(Ad3, Ad7, Ad14, Ad14a 및 Ad11)은 모두 본원에서 AdB-2/3d로 지칭한다.

[0007] AdB-2/3은 특히 대부분의 고휘암을 나타내는 상피세포 기원의 암에 대한 유전자 전이 벡터(gene transfer vector)로서 큰 관련성이 있다. 상피세포는 여러 개의 세포간 연결(junction) 및 정단(apical)-기저(basal) 극성(polarity)을 유지한다. 상피 세포의 주요 특징은 상피 암 현상과 암 세포주에서 보존된다(Turley et al., 2008). CAR 및 CD46은 둘 다 종종 상피 암세포의 치밀한 부착 연결에 포획되어 있어, 이 부착 수용체들을 이용하는 Ad에 접근할 수 없다(Coyne and Bergelson, 2005; Strauss et al., 2009). 이에 반해, AdB-2/3은 상피 암 세포를 효과적으로 감염시키는데, 이는 상피 대 중간엽 전이(EMT)를 생각나게 하는 과정의 유도를 통해 부분적으로 달성된다(Strauss et al., 2009). AdB-2/3의 다른 독특한 특징은 이의 복제 동안 Ad 섬유와 펜톤 염기로 이루어진 아바이러스성 12면체 입자를 생산하는 능력이다(Norrby et al., 1967). 펜톤-12면체(PtDd)는 전장(full-length)의 펜톤 염기 단백질로부터 조립될 수 없고, 잔기 37과 38 사이의 단백질분해작용에 의한 자발적인 N-말단 절단을 필요로 한다(Fuschiotti et al., 2006). 이와 같이 절단된 부위는 Ad3, Ad7, Ad11 및 Ad14에서는 보존적이지만, Ad2 및 Ad5에는 존재하지 않는다. Ad3의 경우에, PtDd는 감염성 바이러스당 5.5×10^6 PtDd의 큰 초과량으로 형성되고(Fender et al., 2005), PtDd는 세포간 연결을 혼란시켜, 바이러스 확산을 유리하게 하여 Ad3 감염성을 증가시키는 것으로 제안된 바 있다(Walters et al., 2002).

[0008] 수용체 X를 동정하는 최초의 시도들은 1995년으로 거슬러 올라간다. 최근, 수용체 X의 여러 후보들, 예컨대 CD46, CD80 및/또는 CD86이 제안되었다(Fleischli et al., 2007; Short et al., 2004; Short et al., 2006; Sirena et al. 2004). 하지만, 지금까지 어느 누구도 이 단백질들이 AdB-2/3에 대한 고 친화성 수용체로서 작용할 수 있는지를 입증할 수는 없었다(Gaggar et al., 2003b; Gustafsson et al., 2006; Marttila et al., 2005;

Persson et al., 2008; Segerman et al., 2003; Tuve et al., 2006).

- [0009] 발명의 요약
- [0010] 제1 관점으로, 본 발명은 상피 조직과 관련된 장애의 치료요법적 치료 또는 진단을 증진시키고(또는) 상피 조직을 영상화하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 피검체(subject)에게
- [0011] (a) 상기 장애를 치료하기에 충분한 양의 하나 이상의 치료제, 상기 장애를 진단하기에 충분한 양의 진단제 및/또는 상기 상피 조직을 영상화하기에 충분한 양의 조영제; 및
- [0012] (b) 상기 하나 이상의 치료제, 진단제 및/또는 조영제의 효능을 증진시키기에 충분한 양의 AdB-2/3 섬유 다량체(multimer) 또는 이의 기능성 등가물(functional equivalent)을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0013] 이러한 본 발명의 방법은 상피 조직과 관련된 장애를 치료 및/또는 진단하고(또는), 상피 조직, 예컨대 상기 장애가 존재하는 것으로 여겨지는 상피 조직을 영상화하는데 사용될 수 있으며, 이러한 장애로는 비제한적으로 고형암, 과민성대장증후군, 염증성 장 장애, 크론병, 궤양성대장염, 변비, 위식도역류병, 만성폐쇄성폐질환, 천식, 기관지염, 폐기종, 낭성섬유증, 간질성폐질환, 폐렴, 원발성폐고혈압, 폐색전증, 폐사르코이드증, 결핵, 췌장염, 췌장관 장애, 뇌 장애(즉, 상피 혈액-뇌 장벽을 통한 약물 수송의 개선으로부터 이익을 받을 수 있는 임의의 뇌 장애), 담관 폐색, 담낭염, 총담관결석증, 감염(예컨대, 비제한적으로 연조직염, 폐렴 및 신우신염) 및 담석을 포함한다. 바람직한 양태에서, 장애는 고형암, 예컨대 비제한적으로 유방암, 폐암, 결장암, 직장암, 위암(stomach tumor), 전립선암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 신장암, 피부암, 흑색종, 췌장암, 간암, 내분비암, 뇌암, 두경부암, 비인두암, 위암(gastric tumor), 편평세포암종, 선암종, 방광암 및 식도암이다.
- [0014] 본 발명의 임의의 양태의 방법들은 예를 들어 Ad3 섬유 다량체, 및 Ad7 섬유 다량체, Ad11 섬유 다량체, Ad14 섬유 다량체, Ad14a 섬유 다량체, 이의 배합물, 및 이의 기능성 등가물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 AdB-2/3 섬유 다량체를 이용할 수 있다. 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 등가물이다. 또 다른 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 AdB-2/3 비리온, AdB-2/3 캡시드, AdB-2/3 12면체 입자(PtDd), 재조합 AdB-2/3 섬유 다량체 및 이의 기능성 등가물을 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 PtDd 또는 연결 개방자(junction opener)1(JO-1)(서열번호 20)을 포함한다.
- [0015] 이 방법들에는 임의의 적당한 치료제, 진단제 또는 조영제가 사용될 수 있다. 치료제가 사용되는 양태에서, 이 치료제는 비제한적으로 항체, 면역접합체, 백신, 방사성 입자/방사선요법("방사선"), 화학요법, 입양 T 세포 요법 및 수지상 세포 요법과 같은 세포 면역요법, 나노입자, 흡입성 치료제, 유전자 치료 작제물 및 핵산 치료요법 또는 이의 병용요법을 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서, 바람직한 양태에서, 치료제는 화학치료제 또는 항암 모노클로날 항체를 포함한다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 항암 모노클로날 항체의 예로는 비제한적으로 트라스투주마브(trastuzumab), 세툼믹시마브(cetumiximab), 페투주마브(petuzumab), 아포마브(apomab), 코나투주마브(conatumumab), 렉사투주마브(lexatumumab), 베바시주마브(bevacizumab), 데노수마브(denosumab), 자놀리주마브(zanolimumab), 린투주마브(lintuzumab), 에드레콜로마브(edrecolomab), 리툽시마브(rituximab), 티실리주마브(ticilimumab), 토시투모마브(tositumomab), 알렘투주마브(alemtuzumab), 에프라투주마브(epratuzumab), 미투모마브(mitumomab), 겐투주마브 오조가미신(gemtuzumab ozogamicin), 오레고보마브(oregovomab), 펩투모마브 다클리주마브(pemtumomab daclizumab), 파니투주마브(panitumumab), 카툼악소마브(catumaxomab), 오파투주마브(ofatumumab) 및 이브리투모마브(ibritumomab)를 포함한다.
- [0016] 바람직한 한 양태에서, 상피 조직과 관련된 장애는 Her-2 양성 종양을 포함한다. 이 양태 하에 치료될 수 있는 Her-2 양성 종양의 예로는 유방암, 위암, 결장암 및 난소암을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 이 양태에서, 치료제는 트라스투주마브를 포함하는 것이 더욱 바람직하고; 더욱 바람직한 양태에서, 치료제는 추가로 하나 이상의 화학요법제 및/또는 방사선을 포함한다. 이 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 PtDd, JO-1(서열번호 20) 또는 이의 기능성 등가물을 포함하는 것이 더욱 바람직하다. 또 다른 바람직한 양태에서, 치료되는 피검체는 트라스투주마브 요법에 반응하지 않는 피검체이다.
- [0017] 또 다른 바람직한 양태에서, 상피 조직과 관련된 장애는 EGFR-양성암을 포함한다. EGFR-양성암의 예로는 폐암, 결장암, 유방암, 직장암, 두경부암, 및 췌장암을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 이 양태에서, 치료제는 세툽시마브를 포함하는 것이 바람직하고; 또 다른 바람직한 양태에서, 치료제는 추가로 하나 이상의 화학요법제 및/또는 방사선을 포함한다. 이 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 PtDd, JO-1(서열번호 20) 또는 이의 기능성 등가물을 포함하는 것이 더욱 바람직하다. 다른 바람직한 양태에서, 치료되는 피검체는 세툽시마브 요법에 반응하지 않는 피검체이다.

- [0018] 다른 양태에서, 상피 조직과 관련된 장애는 고형암을 포함하고, 치료제는 혈관내피성장인자(VEGF) 억제제를 포함한다.
- [0019] 제2 관점에서, 본 발명은 상피 조직과 관련된 장애를 치료하는 방법으로서, 이러한 치료를 필요로 하는 피검체에게 AdB-2/3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 증가물을 상기 장애를 치료하기에 충분한 양으로 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 이 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 단독요법으로 투여된다. 한 양태에서, 이 방법은 AdB-2/3 바이러스 감염을 치료하는데 사용된다. 다른 양태에서, 치료되는 장애는 고형암이다. 이러한 본 발명의 관점에 의해 치료될 수 있는 고형암의 예로는 유방암, 폐암, 결장암, 직장암, 위암, 진립선암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 신장암, 피부암, 흑색종, 췌장암, 간암, 내분비암, 뇌암, 두경부암, 비인두암, 위암, 편평세포암종, 선암종, 방광암 및 식도암을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 이 관점에서, 사용되는 AdB-2/3 섬유 다량체의 예로는 Ad3 섬유 다량체 및 Ad7 섬유 다량체, Ad11 섬유 다량체, Ad14 섬유 다량체, Ad14a 섬유 다량체, 이의 배합물, 및 이의 기능성 증가물을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 섬유 다량체 및 이의 기능성 증가물이다. 더욱 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 AdB-2/3 비리온, AdB-2/3 캡시드, AdB-2/3 12면체 입자(PtDd), 재조합 AdB-2/3 섬유 다량체 및 이의 기능성 증가물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 다양한 더욱 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 PtDd 또는 연결 개방자 1(J0-1)(서열번호 20)을 포함한다.
- [0020] 제3 관점에서, 본 발명은 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드로서,
- [0021] a) 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 축 도메인(shaft domain) 또는 이의 기능성 증가물;
- [0022] b) 상기 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 축 도메인에 대해 C-말단에 위치하고 유효하게 결합된 (operatively linked) AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 마디(knob) 도메인 또는 이의 기능성 증가물; 및
- [0023] c) 상기 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 축 도메인에 대해 N-말단에 위치하고 유효하게 결합된 하나 이상의 비-AdB-2/3 유래의 이량체화 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0024] 한 양태에서, 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드는 AdB-2/3 꼬리 도메인을 포함하지 않는다. 다른 양태에서, 각 축 도메인은 Ad3 축 도메인, Ad7 축 도메인, Ad11 축 도메인, Ad14 축 도메인, Ad14a 축 도메인, 이의 배합물 및 이의 기능성 증가물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 다른 양태에서, 하나 이상의 축 도메인은 1-22 축 도메인을 포함한다. 다양한 다른 양태에서, 각 축 도메인은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 11 또는 서열번호 12에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 이 서열로 이루어진다. 다른 양태에서, 마디 도메인은 Ad3 마디 도메인, Ad7 마디 도메인, Ad11 마디 도메인, Ad14 마디 도메인, Ad14a 마디 도메인 및 이의 기능성 증가물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 다양한 다른 양태에서, 마디 도메인은 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 13 또는 서열번호 14에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 이 서열로 이루어진다. 다른 양태에서, 이량체화 도메인은 EVSALEK(서열번호 22) 및/또는 KVSALKE(서열번호 23)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 양태에서, 재조합 AdB-2/3 폴리펩타이드는 (a) 각각 Ad3 축 도메인(서열번호 1)을 포함하거나, 이 도메인으로 이루어진 하나 이상의 축 도메인; 및 (b) Ad3 마디 도메인(서열번호 6)을 포함하거나, 이 도메인으로 이루어진 마디 도메인을 포함한다.
- [0025] 다른 바람직한 양태에서, 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드는 J0-1의 아미노산 서열(서열번호 20)을 포함하거나, 이 서열로 이루어진다. 다른 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드는 다량체화되고; 가장 바람직하게는 이량체화된다.
- [0026] 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산; 본 발명의 분리된 핵산을 함유하는 재조합 발현 벡터; 본 발명의 재조합 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포; 및 본원에 기술된 AdB-2/3 다량체를 함유하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0027] 다른 관점에서, 본 발명은 상피 조직으로 화합물의 전달을 향상시키는 방법으로서, 상피 조직을 (a) 상피 조직으로 전달될 하나 이상의 화합물; 및 (b) 상피 조직으로 하나 이상의 화합물의 전달을 증진시키기 위해 충분한 양의 AdB-2/3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 증가물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 이 방법은 상피 세포를 표적으로 하는 임의의 화합물, 예컨대 비제한적으로 진단 화합물 및 영상화 화합물의 개선된 전달을 가능하게 한다. 바람직한 한 양태에서, 상피 조직은 고형암을 포함한다.
- [0028] 또 다른 관점에서, 본 발명은 데스모글레인 2(DSG2)를 발현하는 조직으로 화합물의 전달을 개선시키기 위한 방

법으로서, DSG2를 발현하는 조직을 (a) 이 조직으로 전달될 하나 이상의 화합물; 및 (b) 이 조직으로 하나 이상의 화합물의 전달을 증진시키기에 충분한 양의 AdB-2/3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 증가물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 이 관점에 따른 본 발명의 방법은 DSG2를 발현하는 조직으로 당해의 임의의 화합물의 전달을 향상시키는데 사용될 수 있다.

[0029] 또 다른 관점에서, 본 발명은 조직에서 상피 대 중간엽 전이(EMT)를 유도하는 방법으로서, EMT를 유도하기에 충분한 양의 AdB-2/3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 증가물과 상피 조직을 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0030] 이러한 추가 관점의 각 발명의 바람직한 한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 섬유 다량체, 및 Ad7 섬유 다량체, Ad11 섬유 다량체, Ad14 섬유 다량체, Ad14a 섬유 다량체, 이의 배합물 및 이의 기능성 증가물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 다양한 추가 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 증가물이고; AdB-2/3 섬유 다량체는 AdB-2/3 비리온, AdB-2/3 캡시드, AdB-2/3 12면체 입자(PtDd), 재조합 AdB-2/3 섬유 다량체 및 이의 기능성 증가물로 이루어진 그룹 중에서 선택되고; AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 PtDd를 포함하고; AdB-2/3 섬유 다량체는 연결 개방자 1(JO-1)(서열번호 20)을 포함하고; AdB-2/3 섬유 다량체는 이량체이다.

[0031] 다른 관점에서, 본 발명은 상피 조직과 관련된 장애의 치료, 상피 조직으로 물질의 전달 향상, DSG2를 발현하는 조직으로 물질의 전달 향상, 조직에서 EMT 유도, 및/또는 AdB-2/3 감염 치료 중 하나 이상을 위한 후보 화합물을 동정하는 방법으로, (a) 하나 이상의 시험 화합물의 존재 하에서, DSG2에 대한 다량체 결합을 촉진하는 조건 하에 AdB-2/3 섬유 다량체를 DSG2에 접촉시키는 단계; 및 (b) 대조군 대비 DSG2에 대한 AdB-2/3 섬유 다량체의 결합에 대해 경쟁하는 양성 시험 화합물을 동정하는 단계를 포함하고; 이 양성 시험 화합물은 상피 조직과 관련된 장애 치료, 상피 조직으로 물질의 전달 향상, DSG2를 발현하는 조직으로 물질의 전달 향상, 조직에서 EMT 유도 및/또는 AdB-2/3 감염 치료 중 하나 이상을 위한 후보 화합물인 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1. Ad 부착을 위한 Ad 수용체 동정 및 경쟁 연구 수단.

a) Ad 펜톤의 N-말단의 아미노산 배열. aa 37/38에서 프로테아제 절단 부위는 오렌지색으로 표시되어 있다. b) 본 연구에 사용된 바이러스 입자 및 입자 성분의 모식도. PtDd는 펜톤 염기와 삼량체 섬유를 함유하는 12개 단위를 보유한다. BsDd는 펜톤 염기만을 함유한다. c) Ad3 BsDd, PtDd 또는 항CD46 항체(aCD46)와 예비항온처리 후 HeLa 세포에 대한 ³H-표지된 Ad14, Ad14a, Ad11 및 Ad35 바이러스 부착 경쟁. PBS-처리된 세포에서의 부착은 100%로 간주했다. n=5. 특히, PtDd가 Ad35를 부분적으로 차단한다는 발견은 HeLa 세포에서 DSG2 및 CD46의 물리적 근접성 때문일 수 있다. d) Ad3 섬유 마디 및 BsDd(BsDd + Ad3K)와 항온처리 후 c)에서와 같은 Ad3 부착 연구. Ad3K의 몰 농도는 경쟁에 사용된 PtDd 내의 섬유 마디의 몰 농도와 동등했다. e) Ad3-GFP 벡터의 모식도. 이 벡터는 CMV-GFP-폴리A 발현 카세트를 수용하기 위해 nt 29,892-30,947이 결실된 야생형 Ad를 기반으로 한다. 하단 패널은 예상 단편을 가진 Ad3-GFP 및 wt Ad3의 제한효소 분석을 나타낸다. M: DNA 크기 마커. f 및 g) 재조합 Ad3 섬유 마디에 대한 폴리클로날 토끼 항체의 확인. f) 웨스턴 블롯. Ad 마디(Ad3K, Ad5K, 14K, 14aK, Ad11K, Ad35K) 또는 PtDd는 샘플 변성(B) 하에 및 샘플 변성 없이(UB) PAG 겔에서 분리했다. 필터는 항Ad3K 항혈청 및 항-토끼-HRP 항체와 항온처리했다. g) Ad 부착 억제: ³H-표지된 Ad3, Ad14 및 Ad5 바이러스는 PBS(백색 막대) 또는 토끼 항-Ad3K 혈청(회색 막대)과 얼음 위에서 1시간 동안 항온처리하고, 그 후 부착 연구를 위해 HeLa 세포에 첨가했다.

도 2. Ad3 비리온 및 Ad3 PtDd를 이용한 수용체 X의 동정.

a) Ad3 BsDd, PtDd 또는 Ad 섬유 마디와 예비항온처리한 후의 HeLa 세포에 대한 ³H-표지된 Ad3 및 Ad5 바이러스의 부착 경쟁률. PBS-처리된 세포에서의 부착률은 100%로 간주했다. n=5. 데이터는 평균 +/- SEM로 나타낸다. Ad3-PtDd vs. Ad3 마디P = 0.0033. b) Ad3-GFP 및 Ad35-GFP 바이러스 감염의 경쟁률. HeLa 세포는 농도가 증가하는 Ad3 섬유 마디 또는 PtDd로 예비처리하고, 그 다음 100pfu/세포 MOI의 Ad3-GFP(왼쪽 패널) 또는 Ad35-GFP 바이러스(오른쪽 패널)에 노출시켰다. GFP 발현은 유동 세포 분석법으로 18시간 후에 측정했다. 데이터는 평균으로 표시된다. 표준 편차는 모든 데이터 점마다 10% 미만이었다. c) ³H-표지된 Ad3 및 Ad35 바이러스의 사람 세포주 및 비-사람 세포주에 대한 부착률. Y79 및 Ramos는 각각 망막아세포종 및 림프종 세포이다. CHO 세포는 중국 햄스터 난소 세포이다. MMC 및 TC1 세포는 각각 마우스 유선 암종 및 폐 암종 세포이다. TC1-CD46

세포는 사람 CD46을 발현한다. 바이러스 입자가 세포당 부착된 평균수가 제시된다. n=5. d 및 e) 수용체 X의 친화성 포획 및 MS/MS에 의한 동정. HeLa 세포와 Ramos 세포로부터 막 단백질 분획을 제조했다. 단백질 블롯은 Ad5/35++ 비리온 (d) 및 Ad3 비리온 또는 Ad3 PtDd(e)와 하이브리드화시켰다. 결합물은 Ad35++ 마디(d) 또는 Ad3 마디(e)에 대한 폴리클로날 항체로 가시화했다(도 1f 및 1g도 참조). 용해된 HeLa 세포 막 용해물은 또한 아가로스 및 단백질 A/G로 가교된 DSG2 mAb 6D8로 면역침전시켰다. 면역침전물의 웨스턴 블롯은 DSG2 모노클로날 항체 AH12.2(항DSG2-IP 참조)로 수행했다. f) 160kDa 밴드의 MS/MS 분석. 상단 패널: DSG2의 구조. EC: 세포외 도메인, EA: 병렬막(juxtamembrane) 세포외 정박 도메인, TM: 경막(transmembrane) 도메인. 하단 패널: DSG2의 아미노산 서열. 강조된 부분은 160kDa 밴드의 MS/MS 분석에 의해 포획된 펩타이드 서열이다. DSG2 모식도(상단 패널) 중의 삼각형은 여러 도메인들에 대한 동정된 펩타이드의 국제화를 나타낸다. MS/MS 분석은 높은 신뢰 계수로 14개 펩타이드 DSG2를 검출했다(20.8% 단백질 커버율 및 Sequest 교차 상관관계 점수는 각 펩타이드마다 2.5 내지 5.5 범위임). g-i) 센서칩에 고정된 재조합 사람 DSG2를 이용한 Biacore 플라스몬 표면 공명 연구. ml당 5.10^9 vp의 Ad2, Ad3 및 Ad5(g), 여러 농도의 PtDd(h) 또는 PtDd 및 Ad3 점유 마디(i)는 활성화된 표면 위로 주입하고, 표시된 시간 기간 동안 반응 시그널을 수집했다.

도 3. Ad 수용체로서 DSG2의 확인. "기능 상실(Loss-of-function)" 연구.

a) 재조합 DSG2에 의한 ^3H -표지된 Ad 결합의 경쟁률. ^3H -Ad3, Ad7, Ad14, Ad14a, Ad11, Ad5 및 Ad35 바이러스는 $6\mu\text{g ml}^{-1}$ 재조합 사람 DSG2 단백질과 예비항온처리했다. PBS와 항온처리된 바이러스 입자의 부착률은 100%로 간주했다. Ad11 부착률 분석을 위해, Ad11 바이러스를 첨가하기 전 1시간 동안 얼음 위에서 Ad35K $50\mu\text{gml}^{-1}$ 와 세포를 항온처리하여 CD46을 차단시켰다. b) 재조합 DSG1, DSG2 또는 DSC2 단백질에 의한 Ad 형질도입의 경쟁률. c) DSG2-특이적 항체에 의한 ^3H -Ad 결합 경쟁률. n=5. PBS vs. 6D8: P=0.013; PBS vs. 8E5: P=0.0014. 여러 DSG2 도메인에 대한 mAb의 특이성은 다음과 같다(DSG2의 모식도에서, 도 1f 참조): 20G1(프로펩타이드 영역), 7H9(Pro/EC1), 13B11(EC1/EC2), 10D2(EC1/EC2), 8E5(EC3), 6D8(EC3/EC4). d) 및 e) Ad 부착률(d) 및 형질도입률(e)에 미치는 siRNA-매개의 DSG2 억제조절(downregulation)의 효과. 평균 형광 강도 값으로 표시했다. n=5. 감염 후 18시간째, GFP 수준은 AD35-GFP 및 Ad5/35-GFP에서와 비슷한 바, 향후 연구에 제1 세대 Ad5/35-GFP 벡터의 사용을 가능케 했다. f) 감염 후 7일째 Ad3-GFP 감염된 BT474 세포의 세포용해율. siRNA 감염된 세포는 초기 형질도입률을 비슷하게 하는 조정된 MOI, 즉 DSG2 siRNA 처리된 세포 및 대조용 siRNA 처리된 세포에 대하여 각각 세포당 MOI 1.0 pfu 및 세포당 0.5 pfu로 감염시켰다. 7일 후, 생육성 세포는 크리스탈 바이올렛으로 염색했다. 더 높은 바이러스 용량에도 불구하고, DSG2 siRNA에 의해 형질감염된 세포에서 더 낮은 사멸률이 관찰되었고, 이는 Ad3의 측방 확산에 DSG2의 중요성을 암시한다. g) 감염 후 7일째 Ad3-GFP 감염된 세포의 세포용해율. siRNA 형질감염된 소기도 상피 세포는 조정된 MOI로 감염시켰다. 7일 후, 세포 생육성은 WST-1 분석으로 측정했다. PBS 처리된 세포의 생육성은 100%로 간주했다. n=3. Ad3-GFP/대조군 siRNA vs. Ad3-GFP DSG2 siRNA: P<0.001.

도 4. Ad 수용체로서 DSG2의 확인. "기능 획득(Gain-of-function)" 연구.

a) 다른 DSG2 수준을 발현하는 사람 세포주의 형질도입. 사람 적혈구골수아세포성 백혈병 K562 세포 및 버킷의 B-세포 림프종 BJAB 및 Ramos 세포를 증가하는 MOI 하의 Ad3-GFP 및 Ad5/35-GFP로 감염시키고, GFP 발현은 18 시간 후에 측정했다. N=3. 표준 편차는 모든 데이터 점마다 10% 미만이었다. b) 이소성 DSG2 발현. 사람 조직구성 림프종 U937 세포는 EF1 α 프로모터의 조절 하에 DSG2 cDNA를 운반하는 렌티바이러스 벡터로 감염시켰다. 안정한 DSG2 발현은 렌티바이러스 형질도입된 세포의 98% 초과율에서 유동 세포 분석에 의해 검출되었다. c) Raji, U937 및 DSG2-발현성 U937(U937-DSG2) 세포에 대한 ^3H -Ad3 및 ^3H -Ad35의 부착. Ad35 부착은 CD46을 통해 매개되고 용해성 CD46에 의해 차단될 수 있음을 유념한다(데이터는 미제시). d) U937 및 U937-DSG2 세포의 Ad3-GFP 및 Ad5/35-GFP에 의한 형질도입 후의 GFP 발현. n=3.

도 5. 사람 상피 세포 중의 DSG2 국제화 및 Ad3과의 상호작용.

a) 사람 결장, 포피(foreskin) 및 난소암의 파라핀 절편에 대한 DSG-2 특이적 항체를 이용한 면역조직화학 연구. b) DSG2(녹색) 및 세포간 연결 단백질 Claudin 7(적색)에 대한 극성화된 사람 결장암 T84 세포의 동초점 검경 면역형광 분석. 핵은 청색이다. XY 및 XZ면이 제시되었다. c) DSG2에 대한 Ad3 결합성. T84 세포는 Cy3-표지된 Ad3 입자(적색)와 15분 동안 항온처리하고, 세척한 뒤, 동초점 검경을 실시했다. 상단 XZ 영상은 고배율 영상이다. 2개 이상(녹색)의 DSG2 시그널이 하나의(적색) Cy3-Ad3 시그널과 관련이 있음을 유념한다. d) 정상인

의 소기도 상피 세포(트랜스웰 챔버에서 증식되지 않음)의 동초점 검경. 세포는 Cy5-표지된 PtDd와 15분 동안 항온처리하고 PBS로 세척했다. 상단 XZ 패널은 DSG2(적색) 및 E-카드헤린(녹색)의 공동국재화를 나타낸다. 하단 XZ 패널은 녹색의 E-카드헤린 시그널과 공동국재화된 자주색 Cy5-PtDd 시그널을 나타내는 동일한 영상이다. XY 패널은 자주색 PtDd 및 녹색 E-카드헤린 채널을 나타낸다. 얇은 화살표는 막에 국재화된 PtDd를 표시하고, 두꺼운 화살표는 세포질 DSG2를 표지한 것이다. e) 사람 자궁경부 암종 HeLa 세포(상단 XZ 및 XY 패널 및 Cy3-Ad3과 15분 동안 항온처리된 HeLa 세포(하단 XZ 패널)의 동초점 검경 면역형광 분석. 모든 동초점 검경사진에서 눈금 막대는 20 μ m이다.

도 6. 상피 세포에서 Ad3 비리온 및 PtDd에 의해 유도된 상피 대 중간엽 전이 시그널링

a-d) 유방암 상피 세포에서 PtDd에 의해 유발된 표현형 변화. 1×10^5 BT474 세포를 표시된 시간 동안 PtDd 또는 BsDd 50ng과 항온처리하고, 항체 염색을 수행했다. 모든 ZY 동초점 영상(a, b)에서 눈금 막대는 20 μ m이고, 표준 면역형광 연구(c, d)에서는 40 μ m이다. e) 상승조절된 유전자 및 억제조절된 유전자에 대한 배열 데이터의 그래프성 표현. 각 점은 하나의 유전자를 나타낸다. f) 표시된 농도의 PtDd, BsDd, DSG2-특이적 항체(10D2, 13B11 또는 6D8), 또는 대조용 항체(항-GAPDH)와 BT474 세포의 항온처리 후 6시간째 분석한 ERK1/2-MAPK 및 PI3K 인산화의 웨스턴 블롯 분석. 경로 억제를 위해, 세포는 PtDd를 첨가하기 전에 Erk1/2 억제제 U0126(5 μ M) 또는 PI3K 억제제 Wortmannin(2.5 μ M)과 밤새 처리했다. 특정 경로를 억제하는 약물의 효능은 종래 연구⁸에서 확인되었다. GAPDH는 동일 부하량을 입증하는데 사용된다.

도 7. Ad3 비리온 또는 PtDd와 DSG2와의 상호작용에 의한 상피 유방암 세포에서의 세포간 연결의 개방

a) BT474 세포의 단층을 통한 FITC-텍스트란 확산. 소공 크기가 0.4 μ m인 트랜스웰 챔버에서 배양한 BT474 세포를 0.5 μ gml⁻¹ BsDd, PtDd 또는 ml당 2×10^8 Ad 입자로 처리한 뒤, 4kDa FITC-텍스트란을 정단 구획에 첨가했다. 정단 및 기저 챔버 유래의 분취량에서 세포주위 유량(paracellular flux)을 평가했다. BsDd vs. PtDd: P<0.001. b) PtDd에 의한 ³H-Ad35 흡수 촉진. 왼쪽 패널: T84 세포의 세포간 연결에서 CD46의 구속. CD46과 세포간 연결 단백질 Claudin 7의 공동국재화는 황색 시그널을 초래한다. 오른쪽 패널: ³H-Ad35 부착. BT474 세포는 PtDd 또는 BsDd 및 ³H-Ad35와 얼음 위에서 2시간 동안 항온처리하고, 세척한 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 항온처리했다. 내재화되지 않은 Ad 입자는 트립신 분해로 제거하고, 세포-관련 방사성을 측정했다. c) 피하 ovc316 종양을 보유한 마우스에게 50 μ g PtDd 또는 BsDd를 정맥내로 주사한 뒤, 8시간 후에 1×10^9 pfu의 Ad5/35-bGal을 정맥내 주사했다. 절편은 주사 후 72 시간 후에 X-gal로 염색했다. 눈금 막대는 40 μ m이다. d) Her2/neu-양성 사람 유방암 세포주 BT474에서 Her2/neu 및 Claudin 7의 동초점 검경. 이 세포들은 단층을 형성하지 않는다. PBS 처리된 세포에서는 대부분의 Her2/neu 시그널(녹색)이 Claudin 7(적색)과 공동국재화하여 황색 시그널을 초래한다는 점을 유념한다. PtDd 처리 시, Claudin 7 시그널은 감소하는 반면, Her2/neu 염색은 세포 표면에서 더 많이 나타난다. e) PBS 또는 PtDd 처리 후 2시간 후의 BT474 세포의 동초점 검경. f) Ad3 및 PtDd는 헤르셉틴에 의한 Her2/neu 양성 유방암 세포의 사멸을 증진시킨다. PBS-처리된 세포의 생육성은 100%로 간주했다. n=5, *P<0.05. g) 헤르셉틴 요법의 Ad3 및 PtDd 증진은 DSG2에 의해 매개되고 ERK/MAPK 및 PI3K 경로를 수반한다. BT474 세포는 도 2d에 기술된 바와 같이 DSG2 siRNA 및 대조군으로 형질감염시키고, 48시간 후 g)에 기술된 바와 같이 Ad3 또는 PtDd와 헤르셉틴으로 처리했다. 억제제 연구를 위해, BT474 세포를 표시된 제제와 밤새 항온처리했다. 세포를 세척하고 전술한 바와 같이 PtDd/Ad3 및 헤르셉틴으로 처리했다. n=5, PBS vs. Wortmannin, U0126: P<0.05. h) 생체내 헤르셉틴 요법의 PtDd-매개의 증진. BT474-M1 세포 주사 후 여러 경과일에서의 각 마우스의 종양 체적이 제시된다.

도 8. mAb 요법에 미치는 PtDd의 효과. a) Ad3 및 PtDd는 헤르셉틴에 의한 Her2/neu-음성 MDA-MB-231 유방암 세포의 사멸을 증진시키지 않는다. MDA-MB-231 유방암 세포는 0.5mg/ml의 BsDd 또는 PtDd 또는 2×10^8 마이어스 입자/ml의 uv-불활성화된 Ad5 또는 Ad3과 12시간 동안 항온처리한 뒤, 헤르셉틴(15mg/ml)과 30분 동안 항온처리했다. 세포 생육성은 2시간 후 로쉬 바이오사이언시스의 WST-1 분석으로 측정했다. PBS-처리된 세포의 생육성은 100%로 간주했다. b) Ad3과 PtDd는 Erbitux(항-EGFR)에 의한 EGFR-양성 결장암 세포의 사멸을 증진시킨다. LoVo 세포(EGFR-양성)를 0.5mg/ml의 PtDd와 12시간 동안 항온처리한 뒤, Erbitux(15mg/ml)와 30분 동안 항온처리했다. 세포 생육성은 2시간 후 WST-1 분석으로 측정했다. PBS-처리된 세포의 생육성은 100%로 간주했다. *p<0.05. c) BT474 세포의 부착 연결에 미치는 DSG2 siRNA의 효과. PBS 또는 DSG2 siRNA로 처리 후 2일째

BT474 세포의 클라우딘 7 염색성을 보여준다. 눈금 막대는 40mm이다.

도 9. 키메라성 Ad5/3 벡터의 형질도입에서 DSG2의 역할. A) Ad5/3 벡터의 구조. 이 벡터는 Ad5를 기반으로 하고, E1 및 E3 영역이 결실되어 있다. 두 벡터는 E3 영역에 GFP 발현 카세트가 삽입되어 있다. Ad5/3L-GFP에서, Ad5 섬유 마디 도메인은 Ad3의 섬유 마디 도메인으로 교체된다. Ad5/3S-GFP에서, Ad5 축 및 마디 도메인은 Ad3 유래의 대응 도메인으로 교체된다. Ad3 축 도메인은 6개의 축 모티프를 함유하는 반면, Ad5 축 도메인은 22개의 축 모티프를 함유한다. B) 재조합 DSG2 단백질에 의한 Ad 부착의 차단. ³H-표지된 Ad는 얼음 위에서 재조합 사람 DSG2 단백질 6mg/ml와 1시간 동안 항온처리한 뒤, HeLa 세포에 얼음 위에서 1시간 동안 첨가한다. DSG2 대신에 PBS와 항온처리된 세포에 대한 Ad 부착은 100%로 간주했다. n=3, 즉 3개의 분리 웰. Ad3-GFP는 Ad5/3 벡터에서와 같은 GFP 발현 카세트를 함유하는 Ad3 유래의 벡터이다. C) 재조합 DSG2 단백질에 의한 Ad 부착의 차단. Ad 벡터는 증가 농도의 DSG2 단백질과 실온에서 60분 동안 항온처리했다. 그 다음, HeLa 세포를 100pfu/세포의 MOI로 60분 동안 감염시킨 후, 바이러스를 제거하고 새 배지를 첨가했다. GFP 형광은 유동 세포 분석으로 18시간 후에 측정했다. n=3. 평균값이 제시된다. 표준 편차는 모든 샘플에서 10% 미만이었다. D) Ad3 PtDd에 의한 Ad 감염의 경쟁. HeLa 세포를 증가 농도의 PtDd와 60분 동안 항온처리한 뒤, 100pfu/세포 MOI의 Ad 벡터로 60분 동안 감염시킨 후, 바이러스를 제거하고 새 배지를 첨가했다. GFP 형광은 18시간 후 측정했다. N=3. 평균값이 제시된다. 표준 편차는 모든 샘플에서 10% 미만이었다. E) DSG2 siRNA는 Ad5/3 벡터의 감염을 차단한다. 총 1μg의 siRNA로 1x10⁵ HeLa 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간째 Versene으로 세포를 수집하고 1x10⁵ 세포를 재평판배양했다. 이틀째, 세포는 100 pfu/세포 MOI의 Ad 벡터로 감염시켰다. GFP 형광은 18시간 후에 측정했다.

도 10. Ad3 감염의 차단은 Ad3 섬유 마디의 가교를 필요로 한다. A) N-말단의 His-태그, 6개의 축 모티프(S6) 및 마디 도메인(Kn)을 함유하는 재조합 Ad3 섬유 마디(S6/Kn)의 구조. 추가 섬유 마디 변형체는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 축 모티프를 함유했고, 각각 S5/Kn, S4/Kn, S3/Kn, S2/Kn 및 S/Kn으로 표지했다. B) 재조합 Ad3 섬유 마디의 웨스턴 블롯 분석. 필터는 재조합 DSG2와 항온처리한 뒤, 마우스 모노클로날 항-DSG2 항체 및 항-마우스 IgG HRP 접합체와 항온처리했다. Ad3 섬유 마디의 삼량체 형태가 50 내지 70kDa 범위에서 관찰된다. 삼량체성 S6/Kn, S5/Kn, S4/Kn, S3/Kn, S2/Kn 및 S/Kn의 이론적 분자량은 93.9, 89.7, 84.3, 79.2, 74.4 및 69.3kDa이다. S6/Kn 및 S2/Kn은 다른 마디들보다 더욱 많은 섬유 마디 다량체(>75 kDa)를 형성하여, 이.콜라이에서 봉입체를 생성하는 경향이 있었다. 섬유 마디의 변성은 25 내지 30kDa 단량체를 초래할 것이다(제시되지 않음). C) 프로브로서 Ad3 섬유 마디에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯. D 및 E) Ad3-GFP 형질도입의 경쟁. HeLa 세포는 증가 농도의 PtDd 및 다른 Ad3 섬유 마디와 60분 동안 항온처리한 뒤, 100 pfu/세포 MOI의 Ad3-GFP로 60분 동안 감염시키고, 그 후 바이러스를 제거하고, 새 배지를 첨가했다. GFP 형광은 18시간 후 측정했다. n=3. GFP-양성 세포의 평균값(D) 및 평균 GFP 형광(E)이 제시된다. 표준 편차는 모든 샘플에서 10% 미만이었다. S5/Kn은 분명하게 나타나지 않는다. F) 항-His 항체에 의한 His-태그화된 섬유 마디(S/Kn)의 가교. 항-His mAb은 PBS 또는 S/Kn과 15분 동안 항온처리하고, 미변성 폴리아크릴아미드 겔에서 진행시켰다. 항체는 분자량이 150kDa이다. 이보다 높은 분자량의 추가 밴드는 S/Kn의 존재 하에 나타났고, 이는 두 단백질의 복합체를 암시한다. 마디 단독만은 보이지 않는다. G) Ad3-GFP 형질도입의 억제에 미치는 항-His 항체와 Ad3 섬유 마디의 가교 효과. Ad3 섬유 마디 5mg/ml를 마우스 항-His mAb 20mg/ml와 실온에서 60분 동안 항온처리한 뒤, 1x10⁵ HeLa 세포 위에 첨가했다. 60분간 항온처리한 후, 100 pfu/세포의 Ad3GFP 바이러스를 첨가하고 GFP를 D)에 기술된 바와 같이 분석했다. "마디"와 "마디+항-His" 간의 차이는 모든 Ad3 섬유 마디마다 유의적이었다(P<0.005). 비교를 위해, 또한 Ad35 섬유 마디(비-이량체성)도 본 연구에 포함시켰다. H) Ad35-GFP 형질도입에 미치는 가교된 Ad3 또는 Ad35 섬유 마디의 효과. Ad35-GFP는 CMV-GFP 발현 카세트(33)를 함유하는 Ad35 유래의 벡터이다. Ad3 및 Ad35 섬유 마디는 His-태그, 하나의 축 모티프 및 대응하는 마디(31)를 함유하는 단백질이다(Ad3 마디는 S/Kn과 같은 것이다). 실험은 G)에 기술된 바와 같이 수행했다. "마디" 및 "마디+항-His" 간의 차이는 유의적이지 않았다.

도 11. E-코일/K-코일을 통한 Ad3 섬유 마디 이량체화. A) 하나의 N-말단 His-태그 이량체화 도메인(E-코일 또는 K-코일(37)), 가요성 링커, 2개의 섬유 축 모티프(5번째 및 6번째), 및 Ad3 섬유 마디 도메인의 모식도. Ad3-S2/Kn은 이량체화 도메인이 없는 섬유이다. B) Ad3-GFP 형질도입의 경쟁. HeLa 세포는 증가 농도의 PtDd 및 다른 Ad3 섬유 마디와 60분 동안 항온처리하고, 그 다음 100 pfu/세포 MOI의 Ad3-GFP로 60분 동안 감염시킨 후, 바이러스를 제거하고, 새 배지를 첨가했다. GFP 형광은 18시간 후에 측정했다. n=3. GFP-양성 세포율의 평균값이 제시된다. Ad3-K/S2/Kn + Ad3-E/S2/Kn은 두 섬유 마디의 1:1 혼합물이다. PtDd vs Ad3-E/S2/Kn: p=0.074;

PtDd vs Ad3-K/S2/Kn + Ad3-E/S2/Kn : $P=0.03$; Ad3-K/S2/Kn vs Ad3-K/S2/Kn + Ad3-E/S2/Kn: $p=0.62$. C) 항-His 항체와 Ad3 섬유 마디의 비교. Ad3 섬유 마디 5mg/ml를 마우스 항-His mAb 20mg/ml와 실온에서 60분 동안 항온처리한 뒤, 1×10^5 HeLa 세포 위에 첨가했다. 60분간 항온처리한 후, 100pfu/세포의 Ad3-GFP 바이러스를 첨가하고, GFP를 B)에 기술된 바와 같이 분석했다. "마디"와 "마디+항-His" 간의 차이는 Ad3-E/S2/Kn에서는 유의적이지만($p<0.05$), 다른 샘플에서는 그렇지 않았다.

도 12. 하나의 측 모티프만을 함유하는 이량체성 섬유 마디의 분석. A) 재조합 Ad3 섬유 마디 단백질 Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-E/S/Kn의 모식도. 각 섬유 마디 삼량체의 이론적 분자량은 약 60kDa이다. B) 쿠마시 블루 염색된 겔. 샘플은 Tris/글리신/0.1% SDS 완충액 중의 4 내지 15% 구배 폴리아크릴아미드 겔 위로 진행시켰다. UB - 비등처리되지 않은 샘플, B - 비등처리된 샘플. 램리 완충액에서의 비등처리는 삼량체성 단백질 구조를 붕괴시켜 약 25kDa의 섬유 마디 단량체를 초래한다는 점을 유념한다. C) 정제된 Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-E/S/Kn과 혼합된 Ad3-K/S/Kn의 음성염색 전자검경. 상단 왼쪽 영상은 두 제조물 중의 섬유 마디 이량체를 나타낸다. 섬유 마디 자체는 삼량체임을 유념한다. 하단 영상은 2개보다 많은 섬유 마디를 함유하는 응집체를 보여준다. 오른쪽 패널은 사진의 모식도이다. D) 재조합 Ad3 섬유 마디 또는 PtDd에 의한 ^3H -Ad3 부착의 차단. PBS와 항온처리된 세포에 대한 Ad 부착은 100%로 간주했다. $N=3$. E) 재조합 Ad3 섬유 마디 또는 PtDd에 의한 ^3H -Ad5 부착의 차단. PBS와 항온처리된 세포에 대한 Ad 부착은 100%로 간주했다. $N=3$. F 및 G) Ad3-GFP 형질도입의 경쟁. HeLa 세포는 증가 농도의 섬유 마디 또는 PtDd와 60분 동안 항온처리한 뒤, 100 pfu/세포 MOI의 Ad3-GFP로 60분 동안 감염시키고, 그 후 바이러스를 제거하고 새 배지를 첨가했다. GFP 형광은 18시간 후에 측정했다. $n=3$. GFP 양성 세포율의 평균값(F) 및 평균 GFP 형광(G)을 제시했다. 표준 편차는 모든 샘플에서 10% 미만이었다. H 및 I) F 및 G)에 서와 같은 연구를, Ad3-K/S/Kn 및 2개의 측 모티프를 가진 섬유 마디, Ad3-K/S2/Kn을 이용하여 수행했다.

도 13. DSG2와 Ad3-K/S/Kn + Ad3-E/S/Kn 및 Ad3-K/S/Kn 상호작용의 SPR 분석. A) 비오틴화된 섬유 마디를 스트렙타비딘-결합된 센서칩에 고정시켰다. DSG2는 표시된 농도(3 및 10 mg/ml)로 주입했다. 반응 시그널은 표시된 시간 기간 동안 자동 배경 공제 하에 수집했다. B) DSG2는 센서칩 위에 고정시키고, 배경은 대조용 유동 세포로부터 자동으로 공제되었다. Ad3 섬유 마디(비이량체성), Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-E/S/Kn+Ad3-K/S/Kn은 10mg/ml 및 PtDd는 3mg/ml를 주입하여 모든 반응을 약 100RU로 표준화시킨다(12면체는 12개 섬유를 보유하고 SPR 시그널이 피분석물의 분자량에 의존적인 점을 고려하여). C) B)에 제시된 SPR 데이터 정리 및 주사 완료 후 150초 후 남아 있는 시그널의 계산. D) 상피 결합암 T84 세포에 대한 DSG2 및 Ad3 입자의 동초점 면역형광 분석. 도시된 것은 측면 유래 세포이다. 즉, 적층된 XZ 공초점 영상 층. 세포는 Cy-3 표시된 Ad3 입자에 15분 동안 노출시키고, 세척한 뒤, 고정시키고 항-DSG2 항체(녹색)로 염색했다. Ad3 입자는 적색으로 나타난다. 눈금 막대는 20mm이다. 오른쪽 패널은 2개의 DSG2 단위가 Ad3 입자에 의해 집속되어 있는 동초점 영상의 모식도이다. E) 세포 표면의 XY 절편 및 1mm 더 깊이. 이 영상들은 Ad3이 세포 표면에 노출된 DSG2 분자에 결합한다는 것을 암시한다. DSG2의 대부분은 더 깊게, 즉 밀착 연결의 원거리에 위치한다는 점을 유의한다.

도 14. 상피 연결의 분석. 트랜스웰 챔버에서 20일 동안 배양한 극성 결합암 T84 세포에서 연구를 수행했다. A) 동초점 면역형광 검경. 도시된 것은 대표적인 적층 XZ 영상이다. 상단 패널: DSG2(녹색)는 클라우딘 7(적색)로 표시된 측막 연결의 정단 부위에서 나타난다. 하단 패널: 밀착 연결 마커 ZO-1(적색)은 DSG2(녹색)의 정단 면에 위치한다. 클라우딘 7 염색은 측막에서 DSG2 "선조"의 하위 부분을 은폐하고, ZO-1 염색은 DSG2 시그널의 상위 부분을 커버한다. 눈금 막대는 20mm이다. B) 제시된 것은 세포 표면의 XY 절편이고, DSG2(녹색) 및 ZO-1(적색)에 대해 1mm 더 깊이 염색되었다. C) 세포는 Ad3-K/S/Kn(5mg/ml)으로 처리하고 12시간 후 DSG2 및 ZO-1에 대해 분석했다. D) T84 세포의 연결 영역의 투과전자검경. 세포는 얼음 위에서 1시간 동안 PBS(왼쪽 패널) 또는 Ad3-K/S/Kn(오른쪽 패널)으로 처리하고, 세척한 뒤, 37°C에서 1시간 동안 항온처리했다. 이때, 전자-농후한 염료인 루테늄 레드(1)를 고정제와 함께 첨가했다. 밀착 연결(테스모즘 위)이 막히면, 염료는 첨단 막(흑색선)만을 염색한다. 밀착 연결이 열리면, 염료는 세포 사이를 침투하고 측저막을 염색한다. 눈금 막대는 1mm이다. 배율은 40,000x이다. E) 더 큰 배율(100,000x)을 Ad3-K/S/Kn 처리 후의 테스모즘 붕괴(화살표로 표시)를 나타낸다. 눈금 막대는 0.2mm이다.

도 15. 상피 연결 개방의 기능 분석. A) T84 세포는 밀착 세포간 연결이 형성되었음을 암시하는 경상피 저항이 일정할 때까지 21일 동안 폴리에스테르 막 트랜스웰 삽입구에서 증식시켰다. 도시된 것은 트랜스웰 챔버에서 배양된 극성된 T84 세포를 통한 ^{14}C -PEG-4,000 확산 결과이다. 세포는 PBS 또는 다양한 DSG2 리간드와 15분 동안 항온처리하고, 그 후 내부 챔버에 ^{14}C -PEG-4,000을 첨가했다. 다른 곳(1)에서 설명한 바와 같이 정단 및 기저 챔

버로부터의 분취량에서 세포주위 유량을 평가했다. DSG2의 다른 세포의 도메인(ECD)에 대하여 다음과 같은 모노클로날 항체를 사용했다: 13B11-mAb(ECD 1/2에 대해) 및 6D8-mAb(ECD 3/4에 대해). Ad3-K/S/Kn은 이량체화 형태이다. Ad3-E/S/Kn은 이량체화할 수 없다. B) Her2/neu- 양성 유방암 BT474-M1 세포의 트라스투주마브 사멸에 미치는 DSG2 리간드의 효과. 세포는 100% 융합성으로 2일 동안 배양했다. 리간드를 내부 챔버에 첨가한 뒤, PBS 또는 트라스투주마브를 첨가했다. 세포 생육성은 2시간 후 측정했다(재료 및 방법 참조). 13B11 및 6D8 mAb 외에, 다음과 같은 항-DSG2 항체를 사용했다: 7H9(프로토펙타이드 도메인에 대하여), 10D2(ECD 2에 대하여), 8E5(ECD 3/4dp 대하여). 희석 완충액-처리된 세포의 생육성은 100%로 간주했다. n=5, 즉 5개의 분리 웰. *: 희석 완충액 대비 $p < 0.05$. C) 희석 완충액 또는 Ad3-K/S/Kn으로 처리된 T84 세포에서 CAR의 동초점 검경(적층된 XZ 층). T84 세포를 폴리에스테르 막 트랜스웰 삽입구에서 21일 동안 증식시켰다. Ad3-K/S/Kn(40mg/ml) 또는 희석 완충액을 60분 동안 첨가하고, 그 후 세포를 세척하고 면역형광 분석으로 처리했다. CAR은 녹색 염색으로 나타난다. 핵은 청색이다. 눈금 막대는 20mm이다. D) 극성 T84 세포에서 CAR의 동초점 검경. XY 영상은 세포 표면 및 세포 표면에서 1mm 아래의 층(오른쪽 패널)에서 촬영한 것이다. 실험 조건은 C)에서와 같다. 눈금 막대는 20mm이다. E) T84 세포의 Ad 형질도입. T84 세포는 폴리에스테르 막 트랜스웰 삽입구에서 21일 동안 증식시켰다. Ad3-GFP 및 Ad5-GFP는 250pfu/세포의 MOI로 희석 완충액 또는 Ad3-K/S/Kn(40mg/ml)과 함께 내부 챔버에 첨가했다. 3시간 후, 바이러스는 제거하고 세포는 세척했다. GFP 발현은 항온처리 20시간 후 분석했다. 도시된 것은 대표 영상이다. 정량분석을 위해, 3회 독립 실험의 10가지 독립 영상으로부터 GFP-양성 세포를 계수했다. 눈금 막대는 20mm이다. F) Ad5-GFP 감염된 세포의 유동 세포 분석. T84 세포는 희석 완충액 또는 40mg/ml DSG2 리간드의 존재 하에 E)에 기술된 바와 같이 Ad5-GFP로 감염시켰다. n=3. *: $P < 0.05$ (희석 완충액 대비).

도 16. J0-1에 의한 상피 연결의 일시적 개방. A) Ad3 바이러스 입자의 구조. 왼쪽 패널: 완전한 감염성 Ad3 입자. 캡시드 단백질 섬유 및 펜톤 염기는 각각 녹색과 청색으로 표시되어 있다. 삼량체 섬유 마디는 적색으로 표시되어 있다. 중간 패널: 12개 재조합 펜톤(섬유 + 펜톤 염기)의 자발적 조립에 의해 형성된 Ad3 펜톤12면체(PtDd). 오른쪽 패널: 이량체 섬유 Ad3 섬유(J0-1). B) N-말단 His-태그 이량체화 도메인[K-코일(Zeng et al., 2008)], 가요성 링커, 하나의 섬유 축 모티프 및 동중삼량체 섬유 Ad3 섬유 마디 도메인을 함유하는 J0-1의 모식적 구조. J0-1은 이.콜라이에서 생산하고(약 10mg/l 수율로) Ni-컬럼에서 정제했다. C) 왼쪽 패널: 밀착 연결, 데스모솜 및 부착 연결과 상피 연결의 개략된 구조. DSG2는 데스모솜 단백질이다. 클라우딘 7은 부착 연결 단백질이다. 오른쪽 패널: T84 세포의 동초점 면역형광 검경. 도시된 것은 대표적인 적층 XZ 영상이다. 세포는 J0-1($5 \mu\text{g/ml}$)으로 얼음 위에서 1h 동안 처리했다. J0-1을 제거한 후, 세포는 37°C에서 항온처리하고 0분, 30분 및 60분 후에 분석했다. 상부 패널: DSG2(녹색)는 클라우딘 7(적색)로 표식된 측저막 연결의 정단 부위에서 나타난다. 중간 패널: J0-1을 첨가한 후 30분 내에 클라우딘 7 염색은 증가하고 DSG2 염색은 측세포막의 상부 부분을 따라 가시성이 된다(황색 시그널). 하부 패널: 60분경, 측세포 연결은 시점 "0분"의 연결과 유사하다. 눈금 막대는 40 μm 이다. D) 극성 결장암 T84 세포의 연결 영역의 투과전자검경. 세포는 PBS(왼쪽 패널) 또는 J0-1(오른쪽 패널)로 얼음 위에서 1시간 동안 처리하고, 세척한 뒤, 37°C에서 1h 동안 항온처리했다. 이때, 전자-농후한 염료 루테늄 레드(Amieva et al., 2003)를 고정제와 함께 첨가했다. 밀착 연결(데스모솜 위, 화살표로 표식)이 닫히면, 염료는 정단막(검은 선)만을 염색한다. 밀착 연결이 열리면, 염료는 세포 사이를 통과하여 측저막을 염색한다. 눈금 막대는 1 μm 이다. 배율은 40,000x이다. E) J0-1 또는 항-DSG2 항체(6D8, ECD3/4에 대하여 지향성)를 첨가한 후, 다른 시점에서 T84 세포의 단층을 통한 ^{14}C -PEG-4,000 확산. 세포는 DSG2 리간드와 함께 얼음 위에서 1시간 동안 항온처리했다. 그 다음, 내부 챔버에 ^{14}C -PEG-4,000을 함유하는 새 배지를 첨가했다. 세포주위 유량은 다른 문헌에 기술된 바와 같이(Amieva et al., 2003), 정단 챔버 및 기저 챔버 유래의 분취량에서 평가했다. 실험은 3회 반복했다.

도 17. 생체내 종양에서 J0-1 작용 기전의 분석. 총 4×10^6 사람 유방암 HCC1954 세포를 CB27-SCID/베이지 마우스의 유방 지방 패드에 주입했다. 30일 후, 종양의 체적이 약 200mm³에 이르면, J0-1(200 μl PBS 중의 2mg/kg)을 정맥내로 주입했다. J0-1 주입 후 1h 또는 12h 후에 종양을 수거했다. 대조용 마우스에게는 200 μl PBS를 공급하고, 1h 후 종양을 수거했다. A) 종양 중에 J0-1 축적의 동역학. 왼쪽 패널: 항-His 태그 항체(J0-1의 가시화를 위해)를 이용한 종양 단면의 면역형광 분석. 대표 단면을 도시했다. 눈금 막대는 20 μm 이다. 오른쪽 패널: Ad3-섬유 마디 특이적 항체를 이용한 종양 조직의 웨스턴 블롯 분석(Wang et al., 2011b). J0-1을 나타내는 특정 밴드는 화살표로 표식했다. 대표 영상을 도시했다. 실험은 3회 반복했다. B) 종양 중의 DSG2의 분석. 왼쪽 패널: DSG2 항체(DSG2의 세포의 도메인 3/4에 대하여 mAb 6D8)를 이용한 종양 단면의 면역형광 분석. 삽입도는 더 고

배율을 나타낸다. 오른쪽 패널: 동일한 항-DSG2 항체를 종양 조직의 웨스턴 블롯 분석에 사용했다. C) 생체내 세포내 시그널화. 왼쪽 패널: E-캐드헤린 및 인산화된 E-캐드헤린, Erk 1/2, 인산화된 Erk 1/2, 클라우딘 7 및 비멘틴에 대한 종양 조직의 웨스턴 블롯 분석. 감마-튜불린에 대한 항체는 샘플 부하("부하 대조군")를 평가하는데 사용했다. 오른쪽 패널: E-캐드헤린 및 인산화된 Erk1/2에 대한 항체를 이용한 면역형광 분석. 대표 영상을 도시했다. 실험은 3회 반복했다.

도 18. J0-1은 HCC1954 유방암 종양 현장에서 트라스투주마브의 침투를 개선시킨다. 종양 보유 마우스에게 PBS 또는 J0-1(2mg/kg)을 정맥내 주사한 뒤, 트라스투주마브를 1h 후 주사했다. 트라스투주마브를 주사한 후 1h 또는 12h째 종양을 수거했다. A) 단면을 사람 IgG(즉, 트라스투주마브)로 염색했다. 양성 염색은 녹색을 나타낸다. 대표 단면을 도시했다. 눈금 막대는 20 μ m이다. B) 종양의 사람 IgG(트라스투주마브)에 대한 웨스턴 블롯 분석. 중쇄(HC) 및 경쇄(LC) Ig는 화살표로 표시했다. 막에 블로팅된 총 단백질에 대한 폰소(Ponceau) S 염색은 부하 대조군으로 역할을 한다. 대표 영상을 제시했다.

도 19. J0-1은 표적 수용체가 상피 연결에 포획되어 있는 세포의 mAb 사멸을 증가시킨다. A) 극성 BT474 세포 배양물에 대한 Her2/neu(녹색) 및 DSG2(적색) 염색의 동초점 검경(XY 영상 및 XZ 영상). PBS로 처리한 세포는 왼쪽 패널에 제시했다. 중간 패널 및 오른쪽 패널: 세포는 얼음 위에서 J0-1(20 μ g/ml)로 1h 동안 처리했다. J0-1 제거 후, 세포는 37 $^{\circ}$ C에서 항온처리하고 1h 및 16h 후에 분석했다. XY 영상은 세포 표면(왼쪽) 및 세포 표면 2 μ m 아래의 단면을 나타낸다. 눈금 막대는 40 μ m이다. B) 극성 A549 폐암 세포에 존재하는 EGFR(적색) 및 밀착 연결 단백질 E-캐드헤린(녹색)의 동초점 검경. C) J0-1은 트라스투주마브에 의한 Her2/neu-양성 유방암 세포의 사멸을 증진시킨다. BT474 세포는 J0-1(5 μ g/ml) 또는 PBS와 항온처리했다. 트라스투주마브(15 μ g/ml)는 1h 후에 첨가했다. 세포 생육성은 3h 후 종래 기술된 바와 같이(Wang et al., 2010) WST-1 분석으로 측정했다. PBS-처리된 세포의 생육성은 100%로 간주했다. n=5, 트라스투주마브 vs. J0-1+트라스투주마브에 대해 P<0.05. 대표 영상을 도시했다. 실험은 3회 반복했다. D) J0-1은 EGFR-양성 A549 세포의 세톡시마브 사멸을 증진시킨다. n=5, 세톡시마브 vs. J0-1+세톡시마브에 대해 P<0.05.

도 20. J0-1은 Her2/neu 양성 유방암 모델에서 트라스투주마브 요법을 개선시킨다. A) 총 4x10⁶ BT474-M1 세포(BT474의 종양원성 서브클론)를 CB17-SCID/베이지 마우스의 유방 지방 패드에 주입했다. 29일 후(종양의 체적이 약 100mm³에 이르렀을 때), 마우스에게 50 μ g J0-1(2mg/kg) 또는 PBS를 정맥내 주입하고, 그 다음 10h 후 트라스투주마브(10mg/kg)^{*} 또는 PBS를 복강내 주입했다. 2차 치료 사이클은 36일째(화살표로 표시) 개시했다. 도시한 것은 각 동물의 종양 체적(29일째 처리전 수준에 대비해서)의 증가이다. n=5. 40일째 종양 체적은 트라스투주마브만을 투여한 동물에서보다 J0-1 + 트라스투주마브를 처리한 마우스에서 훨씬 낮았다(P<0.01). ^{*} 이 용량의 트라스투주마브 및 이의 투여 경로는 마우스에서 통용되는 것이다(Beyer et al., 2011). B) 유사한 치료 연료는 HCC1954 Her2/neu-양성 유방암 유래 종양으로 수행했다. 이 종양은 트라스투주마브 치료에 더욱 내성적이다. 총 4x10⁶ HCC1954 세포를 CB17-SCID/베이지 마우스의 유방 지방 패드에 주입했다. 18일 후(종양의 체적이 약 100mm³에 이르렀을 때), 마우스에게 50 μ g J0-1(2mg/kg) 또는 PBS를 정맥내 주사하고, 그 다음 10h 후 트라스투주마브 또는 PBS를 복강내 주사했다. n=5. 트라스투주마브 vs. J0-1 + 트라스투주마브 P<0.001. C) 치료 결과에 미치는 J0-1과 트라스투주마브 주사 간의 다양한 시간 간격의 효과. HCC1954 유방암 종양을 보유한 마우스에게 J0-1과 트라스투주마브의 혼합물, J0-1 및 1h 후 트라스투주마브, J0-1 및 10h 후 트라스투주마브를 주입했다. 주입은 매주 반복했다. n=5 트라스투주마브 vs. J0-1 + 트라스투주마브(10h) P<0.001; 트라스투주마브 vs. J0-1 + 트라스투주마브(1h) P<0.0058; 트라스투주마브 vs. J0-1 + 트라스투주마브(10h) P<0.001; 트라스투주마브 vs. J0-1 + 트라스투주마브(1h) P<0.0058; 트라스투주마브 vs. JP-1 + 트라스투주마브(혼합물) P<0.0074. J0-1 + 트라스투주마브(10h) vs. J0-1 + 트라스투주마브(1h) P<0.17, 유의적이지 않음(ns); J0-1+트라스투주마브(10h) vs. J0-1+트라스투주마브(혼합물) P<0.47, ns.

도 21. J0-1은 Her2/neu-양성 위암 모델에서 트라스투주마브 요법을 개선시킨다. 왼쪽 패널: Her2/neu-양성 사람 위암 세포(NCI-N87)의 면역형광 검경. 눈금 막대는 20 μ m이다. 오른쪽 패널: 피하 사람 위암(NCI-N87) 이종이식편 종양을 보유하는 마우스의 J0-1/트라스투주마브 치료. n=5, 트라스투주마브 vs. J0-1+트라스투주마브(29일 및 33일): P<0.05.

도 22. J0-1은 폐암 이종이식편 모델의 세톡시마브 요법을 개선시킨다. A) 면역결핍성 CB17-SCID/베이지 마우스에게 1x10⁶ A549 세포를 피하 주사했다. J0-1은 11일째 정맥내(2mg/kg) 또는 복강내(4mg/kg)로 주사한 뒤, 10h 후 세톡시마브 또는 PBS를 복강내 주사했다. 1 그룹에게는 1mg/kg의 J0-1을 정맥내 및 1mg/kg을 종양내로 투여

했다. n=5, 세톡시마브 vs. JO-1 i.v. + i.t. + 세톡시마브 P<0.001; 세톡시마브 vs. JO-1 i.v. + 세톡시마브 P <0.001; 세톡시마브 vs. JO-1 i.p. + 세톡시마브 P<0.001. 다른 JO-1 주입 경로 간의 차이는 유의적이지 않았다. B) 면역결핍성 CB17-SCID/베이지 마우스에게 1×10^6 A549 세포를 피하 주사했다. 11일 후(종양의 체적이 약 100mm³에 이르렀을 때), 마우스에게 2mg/kg PtDd를 정맥내 주입하고, 세톡시마브(10mg/kg) 또는 PBS를 10h 후 복강내 주입했다. 2차 치료 사이클은 15일째 개시했다(화살표로 표시). n=5. 세톡시마브 vs. PtDd+세톡시마브 P<0.001. C) 전이성 폐암 모델. CB17-SCID/베이지 마우스에게 1×10^6 A549 세포를 정맥내 주사했다. 10일 후, 마우스에게 2mg/kg의 JO-1 또는 PBS를 정맥내 주사한 다음, 세톡시마브(10mg/kg) 또는 PBS를 10h 후 복강내 주사했다. 치료는 38일까지 3일마다 반복했다. n=10. 왼쪽 폐널: 각 마우스의 폐는 인디언 핑크로 염색했다. 건강한 조직은 흑색으로 나타난다. 종양 조직은 백색으로 염색된다. 오른쪽 폐널: 폐의 대표 단면은 H&E로 염색했다.

도 23. HCC1854 유방암 모델에서 JO-1 및 릴렉신의 병용 요법. A) 본 실험의 모식도. 치사량의 방사선 조사를 받은 마우스에게 허위 형질도입된 또는 LV-EF1a/Rix 형질도입된 Lin⁻ 조혈 줄기 세포를 공급했다. 6주 후, HSC 접목 후, 마우스의 유방 지방 패드 내로 4×10^6 HCC1854 세포를 주입했다. 릴렉신 발현은 7일 후 독시사이클린에 의해 활성화되었다. 그 다음, 마우스에게 PBS, PBS/트라스투주마브 또는 JO-1/트라스투주마브를 매주 처리한 후 종양 체적을 측정했다. B) 각 마우스의 종양 체적. n=5. 트라스투주마브 vs. JO-1 + 트라스투주마브 P<0.001; Rlx JO-1 + 트라스투주마브 vs. Rlx트라스투주마브 P<0.001; Rlx PBS vs. PBS P<0.001.

도 24. Ad3, Ad7, Ad11, Ad14 및 Ad14a의 섬유 폴리펩타이드 및 이의 도메인 구조를 정렬한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 모든 인용 문헌은 본원에 전문이 참고인용된 것이다. 본 출원 내에서 다른 언급이 없는 한, 이용된 기술들은 다음과 같은 여러 공지된 문헌 중에서 찾아볼 수 있다: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, edited by D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" in Methods in Enzymology (M.P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, CA), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2nd Ed. (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY), Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.), 및 Ambion 1998 Catalog (Ambion, Austin, TX).
- [0034] 본원에 사용된 단위 표현들은 문맥이 분명히 다르게 기술하지 않는 한 복수 지시물을 포함한다. 본원에 사용된 "및"은 다른 분명한 기술이 없는 한 "또는"과 혼용된다.
- [0035] 본원에 사용된 아미노산 잔기는 다음과 같은 약어로 사용된다: 알라민(Ala; A), 아스파라긴(Asn; N), 아스파르트산(Asp; D), 아르기닌(Arg; R), 시스테인(Cys; C), 글루탐산(Glu; E), 글루타민(Gln; Q), 글리신(Gly; G), 히스티딘(His; H), 이소류신(Ile; I), 류신(Leu; L), 리신(Lys; K), 메티오닌(Met; M), 페닐알라닌(Phe; F), 프롤린(Pro; P), 세린(Ser; S), 트레오닌(Thr; T), 트립토판(Trp; W), 타이로신(Tyr; Y) 및 발린(Val; V).
- [0036] 본원에 사용된, 약어 "Ad"는 아데노바이러스를 의미하고, 일반적으로 후속되는 숫자는 아데노바이러스의 혈청형을 나타낸다. 예를 들어, "Ad3"은 아데노바이러스 혈청형 3을 의미한다.
- [0037] 본 발명의 모든 관점의 모든 양태들은 문맥상 분명히 다른 언급이 없는 한 조합해서 사용할 수 있다.
- [0038] 제1 관점에서, 본 발명은 상피 조직과 관련된 장애의 치료요법적 치료, 진단 또는 영상화를 증진시키는 방법으로서, 이를 필요로 하는 피검체에게 (a) 상기 장애를 치료하기에 충분한 양의 하나 이상의 치료제, 상기 장애를 진단하기에 충분한 양의 하나 이상의 진단제 및/또는 상기 상피 조직을 영상화하기에 충분한 양의 하나 이상의 조영제; 및
- [0039] (b) 상기 하나 이상의 치료제, 진단제 및/또는 조영제의 효능을 증진시키기에 충분한 양의 AdB-2/3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 등가물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0040] 이러한 관점의 본 발명의 방법은 상기 치료제, 진단제 및/또는 조영제의 이들의 표적으로의 접근 및 상피 조직의 충분히 및 상피 조직 중의 보급을 개선시켜 상피 조직과 관련된 장애의 치료, 진단 또는 영상화를 증진시키는데 사용될 수 있다. 어떠한 기전으로 한정하려는 것은 아니지만, 본 발명자들은 이것이 다음과 같은 보완적

기전을 통해 일어나는 것으로 생각한다: 측저막에서 정단 세포 표면으로 표적 수용체의 이동, 이에 따라 상피 조직 표적에 모노클로날 항체와 같은 수용체를 표적으로 하는 치료제, 진단제 및/또는 조영제의 접근이 우수해지고, 세포간 연결의 붕괴를 통해 치료제 침투가 우수해진다. 본원에 더 상세히 개시되는 바와 같이, 본 발명자들은 데스모글레인-2(DSG2)가 AdB-2/3의 주요 고 친화성 수용체라는 것을 발견했다. DSG2는 카드헤린 단백질 패밀리에 속하는 칼슘-결합 경막 당단백질이다. 상피 세포에서, DSG2는 세포-세포 접착 구조의 성분이다. 이의 세포질 꼬리는 세포 접착 및 세포간 연결/세포 형태의 조절인자와 직접 접촉하는 일련의 단백질들과 상호작용한다. DSG2는 일련의 상피 악성종양, 예컨대 위암, 편평세포암종, 흑색종, 전이성 전립선암 및 방광암에서 과잉발현되는 것으로 밝혀졌다.

[0041] 특이적인 작용 기전으로 한정하려는 것은 아니지만, 본 발명자들은 DSG2에 대한 AdB-2/3 섬유 다량체 결합이 세포간 연결의 일시적인 DSG2-매개의 개방을 유발시키는 작용을 하고, 이것이 세포간 연결에 적어도 어느 정도는 포획될 수도 있는, 상피 세포의 표적에 결합하는 치료제, 진단제, 조영제 또는 임의의 다른 당해 화합물의 접근을 개선시키는 작용을 한다. 이러한 활성의 구체적인 예는 본원에 제공된다.

[0042] 본 발명의 방법은 DSG2가 상피 세포에서 광범하게 발현되어서 당해의 표적에 대한 접근이 제한될 수 있는 세포간 연결을 포함하는 상피 조직으로 임의의 치료제, 진단제, 조영제 또는 다른 화합물을 전달하는데 광범하게 이용된다. 본원에 사용된, "상피 조직과 관련된 장애"는 상피 세포/상피 조직에(을 따라) 투여된 치료제, 진단제 또는 조영제가 치료, 진단 및/또는 영상화 효능의 개선 여부에 상관없이 환자에게 임상적 이익을 제공하는 임의의 장애이다. 이러한 장애로는 비제한적으로 고형암(즉, 상피 세포 연결을 가진 임의의 종양), 위장 장애(예컨대, 비제한적으로 과민성대장증후군, 염증성 장 장애, 크론병, 궤양성대장염, 변비, 위식도역류병, 바렛 식도 등), 피부 질환(예컨대, 비제한적으로 건선, 피부염), 폐 장애(예컨대, 비제한적으로 만성폐쇄성폐병, 천식, 기관지염, 폐기종, 낭성섬유증, 간질성폐질환, 폐렴, 폐장관 장애, 뇌장애(즉: 혈액-뇌 장벽을 통한 약물 수송의 개선으로부터 이익을 얻을 수 있는 임의의 뇌 장애), 원발성폐고혈압, 폐색전증, 폐사르코이드증, 결핵 등), 신장 장애(예컨대, 비제한적으로 사구체신염), 간 질환(예컨대, 비제한적으로 간염), 내분비 장애(예컨대, 비제한적으로 당뇨병 및 갑상선 장애), 췌장관 장애(예컨대, 비제한적으로 췌장염), 및 담관 장애(예컨대, 비제한적으로 담관 폐색, 담낭염, 총담관결석증, 담석 등) 및 상피 조직의 감염(예컨대, 비제한적으로 연조직염, 폐렴, 간염 및 신우신염)을 포함한다. 바람직한 양태에서, 상피 조직과 관련된 장애는 고형암, 예컨대 비제한적으로 유방암, 폐암, 결장암, 직장암, 피부암, 내분비암, 위암(stomach tumor), 전립선암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 신장암, 흑색종, 췌장암, 간암, 뇌암, 두경부암, 비인두암, 위암(gastric tumor), 편평세포암종, 선암종, 방광암 및 식도암을 포함한다. 당업자라면 이해할 수 있듯이, 이러한 종양들은 원발성 종양, 국소 침습성 종양, 뿐만 아니라 전이된 종양을 포함한다.

[0043] 본원에 사용된 "효능 증진"은 치료제, 진단제 및/또는 영상화 효능이 그 치료제, 진단제 및/또는 조영제 단독 사용 시 관찰할 수 있는 것 이상의 임의의 증가를 의미한다. 예를 들어, 치료 효능의 측정은 치료받는 장애에 따라 달라지지만, 담당의사라면 쉽게 식별한다. 예를 들어, 이러한 효능 증가는 치료제 단독에 의한 치료에 비하여 다음 중 하나 이상이 증가한 것을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다: (a) 장애의 병도 저하; (b) 치료받는 장애(들)의 특징적인 증상들의 발달 제한 또는 방지; (c) 치료받는 장애(들)의 특징적인 증상들의 악화 억제; (d) 이전에 장애(들)를 갖고 있었던 환자의 장애(들) 재발 제한 또는 방지; 및 (e) 이전에 장애(들)의 전조가 있었던 환자의 증상 재발 제한 또는 방지. 한가지 비제한적 예로서, 고형암 치료는 상피 세포의 측저막면으로부터 종양 수용체의 탈출 유도력을 제공하여 종양 접근을 개선시켜 종양의 사멸을 가능하게 한다.

[0044] 암의 경우에는, 종양 반응을 정의하는 기준과 반응을 측정하는 표준 방법이 있다. 그 예에는 종양 크기의 변화 또는 질환의 혈청 마커의 변화를 모니터링하여 측정하는 종양 반응을 포함한다. 부분 반응은 종양의 50% 이상의 감소인 반면, 완전 반응은 종양의 완전한 소멸로서 정의된다. 종양을 측정하는데 사용되는 방법은 의사에게 잘 알려져 있고, 물리적 검사, 방사선학적 시험, 예컨대 CT 스캔, MRI, PET 스캔, X선 뿐만 아니라 혈청 마커, 예컨대 전립선 암을 모니터링하는데 사용되는 전립선 특이적 항원을 포함한다. 암 치료의 치료적 효능을 측정하는 다른 수단으로는 진행 시간, 무진행 생존 시간 및 총 생존 시간의 측정을 포함한다.

[0045] 개선된 진단 효능은 진단제 단독 투여 시와 비교했을 때, 효능의 임의의 개선, 예컨대 비제한적으로 진단 시험의 특이성 및/또는 감도 증가를 포함한다. 개선된 영상화 효능은 조영제 단독 투여 시와 비교했을 때, 효능의 임의의 개선, 예컨대 비제한적으로 특이성, 감도, 재현성, 대비 증진, 더 작은 질병 부위의 검출, 더 정확한 질병의 묘사, 예컨대 종양, 농양 등과 같은 질병의 크기 및 모양.

[0046] 다양한 양태에서, 효능의 증가는 전체 환자 집단에서 치료제, 진단제 및/또는 조영제 단독에 의해 효능과 비교

했을 때 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75%, 100% 또는 그 이상의 효과가 있는 것이다.

- [0047] 임의의 적당한 피검체는 본 발명의 방법을 사용하여 치료할 수 있는데, 사람 피검체인 것이 바람직하다.
- [0048] 본원에 사용된, "AdB-2/3"은 바이러스 결합을 위한 상피 세포 수용체로서 DSG2를 이용하는 임의의 아데노바이러스 혈청형이다. 지금까지, Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, 및 Ad14a 혈청형이 동정되었다. 다른 Ad 혈청형이 동정되면, 당업자는 본원에 개시된 DSG2 결합 분석을 기반으로 하여 AdB-2/3 패밀리에 속하는 것을 쉽게 동정할 수 있다. 예를 들어, 고정된 재조합 DSG2를 함유하는 센서를 이용하는 표면 플라즈몬 공명(SPR) 연구를 DSG2 경쟁 연구와 함께 사용하면, 새로운 Ad 혈청형이 DSG2에 결합하는지 여부를 측정할 수 있다. 추가 예시적 연구, 예컨대 기능 분석의 손익은 실시예 1에 상세하게 설명된다.
- [0049] 아데노바이러스 비리온은 캡시드의 12개 꼭지점 각각의 기저에 위치한 섬유를 특징으로 하는 20면체이다. 비리온의 섬유는 3개의 개별적인 섬유 폴리펩타이드로 이루어진 동중삼량체 구조이다. 각 아데노바이러스 섬유 폴리펩타이드는 캡시드의 펜톤 염기 단백질과 상호작용하고 세포 핵으로 단백질의 수송에 필요한 시그널을 함유하는 N-말단 꼬리; 다수의 15-잔기 반복 단위를 함유하는 축(shaft) 및 수용체 결합에 대한 결정인자를 함유하는 C-말단 마디 도메인으로 이루어진 비대칭 구조이다(J.S.Hong and J.A. Engler, Journal of Virology 70: 7071-7078(1996)). 모든 아데노바이러스는 섬유 말단에 있는 마디 구조를 통해 각각의 수용체에 부착한다.
- [0050] 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, AdB-2/3"섬유 폴리펩타이드"란 용어는 N-말단 꼬리 도메인, 축 도메인 및 C-말단 마디 도메인을 포함하는, AdB-2/3에 의해 발현된 전체 길이의 섬유 폴리펩타이드를 의미한다(예컨대, 서열 번호 15 내지 19, Ad3 섬유 폴리펩타이드(서열번호 15), Ad7 섬유 폴리펩타이드(서열번호 16), Ad11 폴리펩타이드(서열번호 17), Ad14 섬유 폴리펩타이드(서열번호 18) 및 Ad14(a) 섬유 폴리펩타이드(서열번호 19)). 섬유 폴리펩타이드는 "섬유"라 불리는 동중삼량체"로 자발적으로 조립되고, 이는 캡시드의 12개 꼭지점 각각의 기저에 있는 아데노바이러스 비리온의 외측에 위치한다.
- [0051] 본원에 사용된 "AdB-2/3 섬유 다량체"는 AdB-2/3 섬유의 다량체(이량체, 삼량체 등), 또는 이의 기능적 등가물을 포함하는 임의의 작제물이다. 당업자라면 이해할 수 있듯이, AdB-2/3 섬유는 동중삼량체 마디를 함유한다. AdB-2/3 섬유 다량체는 동중삼량체 AdB-2/3 섬유의 다량체, 예컨대 이량체이다. 이하 실시예에 상세하게 개시되는 바와 같이, AdB-2/3 섬유 다량체는 세포간 연결의 일시적인 DSG2-매개의 개방을 유발하는 DSG2에 대한 결합에 필요하며, 이 개방은 세포간 연결에 포획되어 있을 수 있는 치료 표적에 대한 치료제의 접근을 향상시키는 작용을 한다.
- [0052] 한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 섬유 다량체, Ad7 섬유 다량체, Ad11 섬유 다량체, Ad14 섬유 다량체, Ad14a 섬유 다량체, 이의 배합물, 및 이의 기능성 등가물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 바람직한 한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 섬유 다량체이다.
- [0053] 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 다량체(또는 키메라/이의 기능성 등가물)를 함유하는 작제물의 예로는 AdB-2/3 비리온(예컨대, "사멸" 비리온, 예를 들어 UV-처리된 비리온), AdB-2/3 캡시드, AdB-2/3 12면체 입자(PtDd)(복제 동안 AdB-2/3에 의해 생산된 서브바이러스성 12면체 입자), 재조합 AdB-2/3 섬유 다량체(예컨대, 비제한적으로 이하 임의의 양태 또는 양태들의 조합에서 개시된 바와 같은 것) 및 이의 기능성 등가물을 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다. 바람직한 양태에서, 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 다량체는 AdB-2/3 PtDd, 예컨대 Ad3 PtDd를 포함하거나 이것으로 이루어진다. 다른 바람직한 양태에서, 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 다량체는 이하에 기술되는 본 발명의 조성물의 임의의 양태 또는 양태들의 조합을 포함하거나, 이 양태로 이루어진다. 또 다른 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 본원에서 JO-1(연접 개방자-1)(서열번호 1)이라 지칭한 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 등가물을 포함하거나, 이 폴리펩타이드로 이루어진다. 이하 실시예에 제시되는 바와 같이, JO-1(자기 이량체화 Ad3 섬유 유도체로서 실시예에 기술됨)은 단일 체, 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 도메인의 다량체로서, 이 폴리펩타이드는 동정삼량체화를 할 수 있는 마디 도메인을 포함한다. 따라서, JO-1은 본 발명에 따른 AdB-2/3 섬유 다량체이다.
- [0054] 다량의 AdB-2/3 비리온 및 캡시드를 제조하는 방법은 PtDd의 대량 생산 방법처럼 당업계에 공지되어 있다. 이와 마찬가지로, 재조합 폴리펩타이드에 이량체화 도메인의 혼입에 의한 AdB-2/3 섬유 다량체(예컨대, JO-1)의 재조합 생산 방법은 당해 기술 수준 내에서 본원의 교시를 기반으로 하면 충분히 알 수 있는 것이다.
- [0055] 따라서, 본 발명의 방법은 DSG2에 결합하여 세포간 연결의 DSG2-매개의 일시적 개방을 유발할 수 있는 임의의 AdB-2/3 섬유 다량체를 이용하여 수행할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 AdB-2/3 섬유 다량체에 대한 비자연 발생의 변형(결실, 첨가, 치환, 다른 Ad 혈청형 섬유 단백질 및 이의 도메인의 키메라 등)은 AdB-2/3 섬유 다량

체의 "등가물"이고, 이들이 DSG2에 결합하는 기능을 하고 다량체화하여 세포간연접의 DSG2 매개의 개방을 유발할 수 있다면 본 발명의 범위에 속하는 것이다. DSG2에 대한 결합을 시험하고 세포간 연접의 DSG2 매개의 개방을 평가하는 본원의 교시를 기반으로 하면, 상기 AdB-2/3 섬유 다량체의 기능성 등가물을 동정하는 것은 당해 기술 수준에서 충분히 이루어진다. 하나의 비제한적 예로서, 후보 AdB-2/3 섬유 다량체의 존재 하에, 융합성 극성 상피 세포를 통해 표지된 화합물(예컨대, FITC-텍스트란)의 유동을 평가하는 분석법은 이하 실시예 1 및 2에서 증명된다. 다른 비제한적 예로서, 일반적으로 상피 세포 연접(예컨대, CD46, 클라우딘 7 및 ZO-1)으로 인해 접근할 수 없는 단백질에 대한 접근을 평가하기 위한 후보 AdB-2/3 섬유 다량체 존재 하의 분석법은 이하 실시예 1 및 2에서 증명된다. 이러한 다른 분석법도 본원에 개시된다.

[0056] AdB-2/3 섬유 다량체화는 당업자에게 공지된 방법에 따라 측정할 수 있다. 예를 들어, 재조합 AdB-2/3 섬유 자체의 다량체화는 수크로오스 구배 중의 침강, 트립신 단백분해에 대한 내성, 및 폴리알킬아미드 겔에서의 전기영동성 이동성을 포함하는 기준에 따라 평가할 수 있다(Hong and Engler, Journal of Virology 70: 7071-7078(1996)). 전기영동성 이동성과 관련하여, 섬유 다량체는 매우 안정한 복합체이고 샘플을 SDS-PAGE 전에 비등처리하지 않은 경우 다량체와 일치하는 분자량으로 이동할 것이다. 하지만, 비등처리 하면, 다량체 구조는 붕괴되고, 그 후 단백질은 단백질 다량체와 일치하는 크기로 이동한다. 상피 조직을 표적화할 수 있고 상피 조직으로의 전달이 세포간 연접의 일시적 개방에 의해 개선될 수 있는 임의의 치료제, 진단제, 조영제 또는 기타 화합물은 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 한 양태에서, 치료제는 항체, 면역결합체, 나노입자, 핵산 치료제 및 이의 배합물, 화학요법제, 백신, 방사능 입자/방사선 요법("방사선"), 세포 면역요법, 예컨대 입양 T 세포 요법 및 수지상 세포 요법(예: 투여된 T 세포의 중앙내 침투), 흡입성 치료제, 유전자 치료 작제물(예, 비제한적으로 유전자 치료 벡터로서 AdB-2/3 바이러스, 및 Ad5-기반 유전자 치료 벡터와의 공동투여), 다른 핵산 치료요법 또는 이의 병용요법으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0057] 다양한 양태에서, 치료제는 알킬화제, 혈관형성 억제제, 항체, 항대사산물, 항유사분열제, 항증식제, 오토라 키나제 억제제, 아포토시스 촉진제(예컨대, Bcl-xL, Bcl-w 및 Bcl-2) 억제제, 사멸수용체 경로의 활성인자, Bcr-Abl 키나제 억제제, BiTE(Bi-specific T cell Engager) 항체, 생물학적 반응 조절인자, 사이클린-의존적 키나제 억제제, 세포 순환 억제제, 사이클로옥시게나제-2 억제제, 성장인자 억제제, 열충격 단백질(HSP)-90 억제제, 탈메틸화제, 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC) 억제제, 호르몬 요법, 면역제제, 아포토시스 단백질(IAP) 삼입 항생제의 억제제, 키나제 억제제, 라파마이신 억제제의 포유동물 표적, 마이크로RNA의 유사분열원-활성화된 세포외 신호-조절된 키나제 억제제, 다가 결합 단백질, 비-스테로이드성 항염증 약물(NSAID), 폴리 ADP(아데노신 디포스페이트)-리보오스 폴리머라제(PARP) 억제제, 백금 화학요법제, 폴로-유사 키나제(Plk) 억제제, 프로테아좀 억제제, 퓨린 유사체, 피리미딘 유사체, 수용체 티로신 키나제 억제제, 레티노이드/텔타형 식물 알칼로이드, 소형 억제성 리보핵산(siRNA), 토포이소머라제 억제제 및 이의 유사물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0058] 다양한 클래스에 속하는 치료제의 예로는 도세탁셀, 독소루비신, 이리노테칸, 파클리탁셀(Taxol[®]), 파클리탁셀 알부민 결합된 입자(Abraxane[®]), 독소루비신 HCL 리포솜(Doxil[®]), BiTE 항체, 예컨대 아테카투무마브(Micromet MT201), 블리나투모마브(Micromet MT103) 및 이의 유사물, siRNA-기반 치료제, 알킬화제, 예컨대 알트레타민, AMD-473, AP-5280, 아파지퀸, 벤다무스틴, 브로스타리신, 부셀판, 카보퀸, 카무스틴(BCNU), 클로람부실, CLORETAZINE[®] (Iaromustine, VNP 40101M), 사이클로포스파미드, 데카바진, 데시타빈, 5'-아자사이티딘, 에스트라무스틴, 포테무스틴, 글루포스파미드, 이포스파미드, KW-2170, 로무스틴(CCNU), 마포스파미드, 멜팔란, 미토브로니톨, 미토라톨, 니부스틴, 니트로젠 머스타드 N-옥사이드, 라니머스틴, 테모졸로마이드, 티오테파, TREANDA[®] (벤다무스틴), 트레오셀판, 로포스파미드 및 이의 유사물; 혈관형성 억제제, 예컨대 내피세포-특이적 수용체 티로신 키나제(Tie-2) 억제제, 표피 성장인자 수용체(EGFR) 억제제, 인슐린 성장인자-2 수용체(IGF-2) 억제제, 기질 메탈로프로테이나제-2(MMP-2) 억제제, 기질 메탈로프로테이나제-9(MMP-9) 억제제, 혈소판-유래 성장인자 수용체(PDGFR) 억제제, 트롬보스폰딘 유사체, 혈관 내피세포 성장인자 수용체 티로신 키나제(VEGFR) 억제제, 및 이의 유사물; 항대사산물, 예컨대 ALIMTA[®] (페메트렉시드 디소듐, LY231514, MTA), 5-아자시타딘, XELODA[®] (카펙시타빈), 카모퍼, LEUSTAT[®] (클라드리빈), 클로파라빈, 사이타라빈, 사이타라빈 옥포스페이트, 사이토신 아라비노사이드, 데시타빈, 데페록사민, 독시플루리딘, 에플로르니틴, EICAR(5-에티닐-1-베타-D-리보푸라노실이미다졸-4-카복사미드), 에노시타빈, 에티닐사이티딘, 플루다라빈, 5-플루오로우라실 단독물 또는 류코보린과의 병용물, GEMZAR[®] (젠티타빈), 하이드록시우레아, ALKERAN[®] (멜팔란), 머캅토포린, 6-머캅토포린 리보사이드, 메토크세이트, 메토크세이트 유사체(예컨대, 트리메트렉세이트 및 프랄라트렉세이트), 마이코페놀

산, 넬라라빈, 놀라트렉시드, 옥포스페이트, 펠리트렉솔, 펜토스타틴, 랄티트렉시드, 리바비린, 트리아핀, 트리메트렉세이트, S-1, 티아조푸린, 테가파, TS-1, 비다라빈 및 이의 유사물; Bcl-2 단백질 억제제, 예컨대 AT-101 ((-)-고시폴), GENASENSE[®] (G3139 또는 오블리머센(Bcl-2-표적화 안티센스 올리고뉴클레오타이드)), IPI-194, IPI-565, N-(4-(4-((4'-클로로(1,1'-비페닐)-2-일)메틸)피페라진-1-일)벤조일)-4-(((1R)-3-(디메틸아미노)-1-((페닐설파닐)메틸)프로필)아미노)-3-니트로벤젠설포나미드)(ABT-737), N-(4-(4-((2-(4-클로로페닐)-5,5-디메틸-1-사이클로헥스-1-엔-1-일)메틸)피페라진-1-일)벤조일)-4-(((1R)-3-(모르폴린-4-일)-1-((페닐설파닐)메틸)-프로필)아미노)-3-((트리플루오로메틸)설포닐)벤젠설포나미드(ABT-263), GX-070(오바토클락스) 및 이의 유사물; Bcr-Abl 키나제 억제제, 예컨대 DASATINIB[®] (BMS-354825), GLEEVEC[®] (이마티니브) 및 이의 유사물; CDK 억제제, 예컨대 AZD-5438, BMI-1040, BMS-032, B S-387, CVT-2584, 플라보피리돌, GPC-286199, MCS-5A, PD0332991, PHA-690509, 실리시클리브(CYC-202, R-로스코비틴), ZK-304709 및 이의 유사물; EGFR 억제제, 예컨대 ABX-EGF, 항-EGFR 면역리포솜, EGF-백신, EMD-7200, ERBITUX[®] (세툽시마브), HR3, IgA 항체, IRESSA[®] (제피티니브), TARCEVA[®] (에를로티니브 또는 OSi-774), TP-38, EGFR 융합 단백질, TYKERB[®] (라파티니브) 및 이의 유사물; ErbB2 수용체 억제제, 예컨대 CP-724-714, CI-1033(카너티니브), HERCEPTIN[®] (트라스투주마브), TYKERB[®] (라파티니브), OMNITARG[®] (2C4, 페투주마브), TAK-165, GW-572016(요오나파니브), GW-282974, EKB-569, PI-166, dHER2 (HER2 백신), APC-8024 (HER-2 백신), 항-HER/2neu 이중특이(bispecific) 항체, B7.her2lgG3, AS HER2 삼작용기성 이중특이 항체, mAb AR-209, mAb 2B-1 및 이의 유사물; 허스톤 탈아세틸화효소 억제제, 예컨대 로미렙신, LAQ-824, MS-275, 트라포신, 서베로일아닐리드 하이드록삼산(SAHA), TSA, 발프로익 산 및 이의 유사물; HSP-90 억제제, 예컨대 17-AAG-nab, 17-AAG, CNF-101, CNF-100, CNF-2024, 17-DMAG, 젤다나마이신, IPI-504, KOS-953, MYCOGRAB[®] (HSP-90에 대한 사람 재조합 항체), NCS-683664, PU24FC1, PU-3, 라디시콜, SNX-2112, STA-9090 VER49009 및 이의 유사물; 사멸 수용체 경로의 활성인자, 예컨대 TRAIL, 항체 또는 TRAIL 또는 사멸 수용체(예, DR4 및 DR5)를 표적으로 하는 다른 제제, 예컨대 아포마브, 코나투무마브, ETR2-ST01, GDC0145, (렉사투무마브), HGS-1029, LBY-135, PRO-1762 및 트라스투주마브; 백금 화학요법제, 예컨대 시스플라틴, ELOXATIN[®] (옥살리플라틴) 엡타플라틴, 로바플라틴, 네다플라틴, PARAPLATIN[®] (카보플라틴), 사트라플라틴, 피코플라틴 및 이의 유사물; VEGFR 억제제, 예컨대 AVASTIN[®] (베바시주마브), ABT-869, AEE-788, 악시티니브(AG-13736), AZD-2171, CP-547,632, IM-862, MACUGEN(폐갑타미브), NEXAVAR[®] (소라페니브, BAY43-9006), 파조파니브(GW-786034), 바탈라니브(PTK-787, ZK-222584), SUTENT[®] (서니티니브, SU-11248), VEGF 트랩, ZACTIMATHi(반데타니브, ZD-6474) 및 이의 유사물; 수지상 세포 치료법(시플류셀-T, Provenge[®]); 토포이소머라제 억제제, 예컨대 아클라루비신, 9-아미노캄토테신, 아모나파이드, 암사크린, 베카테카린, 벨로테칸, BN-80915, CAMPTOSAR[®] (이리노테칸 염산염), 캄토테신, 텍스라죽신, 디플로모테칸, 에도테카린, ELLENCE[®] 또는 PHARMORUBICIN[®] (에피루비신), 에토포사이드, 엑사테칸, 아브락산, 이레노테칸, 10-하이드록시캄토테신, 지마테칸, 루토테칸, 미톡산트론, 오라테신, 피라르부신, 픽산트론, 루비테칸, 소부죽산, SN-38, 타플루포사이드, 토포테칸 및 이의 유사물; 항체, 예컨대 AVASTIN[®] (베바시주마브), CD40-특이적 항체, chTNT-1/B, 데노수마브, ERBITUX[®] (세툽시마브), HUMAX-CD4[®] (자놀리무마브), IGF I R-특이적 항체, 린투주마브, PANOREX[®] (에드레콜로마브), RENCAREX[®] (WX G250), RITUXAN[®] (리툽시마브), 티실리무마브, 트라스투지마브 및 이의 유사물; 호르몬 요법, 예컨대 ARIMIDEX[®] (아나스트로졸), AROMASIN[®] (엑세메스탄), 아르족시펜, CASODEX[®] (비칼루타미드), CETROTIDE[®] (세트로렐릭스), 데가렐릭스, 데스로렐린, DESOPAN[®] (트리로스탄), 텍사메타손, DROGENIL[®] (플루타미드), EVISTA[®] (칼록시펜), AFEMA[®] (파드로졸), FARESTON[®] (토레미펜), FASLODEX[®] (폴베스트란트), FEMARA[®] (레트로졸), 포메스탄, 글루코코르티코이드, HECTOROL[®] (독서카이시페롤), RENAGEL[®] (세벨라머 카보네이트), 라소폭시펜, 류프롤리드 아세테이트, MEGACE[®] (메가스테롤), MIFEPREX[®] (미페프리스톤), NILANDRON[®] (닐루타미드), NOLVADEX[®] (타모시펜 시트레이트), PLENAXIS[®] (아바렐릭스), 프레드니손, PROPECIA[®] (피나스테라이드), 릴로스탄, SUPREFACT[®] (부세렐린), TRELSTAR[®] (황체형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH)), VANTAS[®] (히스트렐린 임플란트), VETORYL[®] (트리로스탄 또는 모드라스탄), ZOLADEX[®] (포스렐린, 고세렐린) 및 이의 유사물; 면역제제, 예컨대 인터페론 알파, 인터페론-2a, 인터페론-

2b, 인터페론 베타, 인터페론 감마-1a, ACTIMMUNE (인터페론 감마-1b) 또는 인터페론 감마--n1, 이의 배합물 및 이의 유사물을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 다른 제제로는 ALFAFERONE[®] (IFN-알파), BAM-002(산화된 글루타치온), BEROMUIM[®] (타소너민), BEXXAR[®] (토시투모마브), CAMPATH[®] (알렘투주마브), CTLA4(세포독성 림프구 항원 4), 데카바진, 테니류킨, 에프라투주마브, GRANOCYTE[®] (레노그라스탐), 렌티난, 백혈구 알파 인터페론, 이미퀴모드, MDX-010 (항-CTLA-4), 흑색종 백신, 미투모마브, 몰그라모스탐, MYLOTARG.TM. (젬투주마브 오조가미신), NEUPOGEN[®] (필그라스탐), OncoVAC-CL, OVAREX[®] (오레고보마브), 켈투모마브(Y-muHMFG1), PROVENGE[®] (시푸류셀-T), 사가라모스탐, 시조필란, 테셀류킨, THERACYS[®] (바실러스 칼멧-게린), 유베니맥스, VIRULIZIN[®] (면역치료제, Lorus Pharmaceuticals), Z-100(마루야마의 특정 물질(SSM)), WF-10 (테트라클로로데카옥사이드(TCDO)), PROLEUKIN[®] (알데스류킨), ZADAXIN[®] (티말파진), ZENAPAX[®] (다클리주마브), ZEVALIN[®] (90Y-이브리투모마브 티옥세탄) 및 이의 유사물; 오파투무마브; 생물학적 반응 조절인자, 예컨대 크레스틴, 렌티난, 시조푸란, 피시바닐 PF-3512676(CpG-8954), 유베니맥스 및 이의 유사물; 피리미딘 유사체, 예컨대 사이타라빈(ara C 또는 아라비노사이드 C), 사이토신 아라비노사이드, 옥시플루리딘, FLUDARA[®] (플루다라빈), 5-FU(5-플루오로우라실), 플록스우리딘, GEMZAR[®] (젬시타빈), TOMUDEX[®] (라티트렉시드), TROXATYL[®] (트리아세틸우리딘 트록사시타빈) 및 이의 유사물; 퓨린 유사체, 예컨대 LANVIS[®] (티오구아닌) 및 PURI-NETHOL[®] (머캅토피린); 항유사분열제, 예컨대 바타불린, 에포틸론 D(KOS-862), N-(2-((4-하이드록시페닐)아미노)피리딘-3-일)-4-메톡시벤젠설포나미드, 익사베필론(BMS 247550), 파클리탁셀, TAXOTERE[®] (도세탁셀), PNU100940(109881), 파투필론, XRP-9881(라로탁셀), 빈플루린, ZK-EPO(합성 에포틸론) 및 이의 유사물; 및 기타 화학요법제, 예컨대 ABRAXANE[®] (ABI-007), ABT-100(파네실 트란스퍼라제 억제제), ADVEXIN[®] (Ad5CMV-p53 백신), ALTOCOR[®] 또는 MEVACOR[®] (로바스타틴), AMPLIGE[®] (폴리 I:폴리 C12U, 합성 RNA), APTOSYN[®] (엑시술린드), AREDIA[®] (파미드론산), 아르글라빈, L-아스파라기나제, 아타메스탄 (1-메틸-3,17-디온-안드로스타-1,4-디엔), AVAGE[®] (타자로텐), AVE-8062(콤브레아스타틴 유도체), BEC2(미투모마브), 카켄틴 또는 카켄신(종양 괴사 인자), 칸박신(백신), CEAVAC[®] (암 백신), CELEUK[®] (셀모류킨), CEPLENE[®] (히스타민 이염산염), CERVARIX[®] (사람 유두종바이러스 백신), CHOP[®] (C: CYTOXAN[®] (사이클로포스파미드); H: ADRIAMYCIN[®] (하이드록시옥소루비신); O: 빈크리스틴(ONCOVIN[®]); P: 프레드니손), CYPAT[®] (사이프로테론 아세테이트), 콤브레스타틴 A4P, DAB(389)EGF(His-Ala 링커를 통해 사람 표피 성장인자에 융합된 디프테리아 독소의 축매성 및 전위 도메인) 또는 TransMID-107R[®] (디프테리아 독소), 다카바진, 닥티노마이신, 5,6-디메틸잔테논-4-아세트산(DMXAA), 에닐우라실, EVIZON.TM.(스켈아민 락테이트), DIMERICINE[®] (T4N5 리포솜 로션), 디스코데몰라이드, DX-8951f(엑사테칸 메실레이트), 엔자스타우린, EPO906(에피틸론 B), GARDASIL[®] (4가 사람 유두종바이러스(타입 6, 11, 16, 18) 제조합 백신), GASTRIMMUNE[®], GENASENSE[®], GMK(강글리오사이드 접합체 백신), GVAX[®] (전립선암 백신), 할로푸지논, 히스테렐린, 하이드록시카바미드, 이바드론산, IGN-101, IL-13-PE38, IL-13-PE38QQR(신트레데킨 배수도독소), IL-13-슈도모나스 외독소, 인터페론-알파, 인터페론-감마, JUNOVAN[®] 또는 ME PACT[®] (미파무타이드), 로나파니브, 5,10-메틸렌테트라하이드로폴레이트, 밀테포신(헥사데실포스포콜린), NEOVASTAT[®] (AE-941), NEUTREXIN[®] (트리메트렉세이트 글루쿠로네이트), NIPENT[®] (펜토스타틴), ONCONASE[®] (리보뉴클레아제 효소), ONCOPHAGE[®] (흑색종 백신 처리), ONCOVAX[®] (IL-2 백신), ORATHECIN[®] (루비테칸), OSIDEM[®] (항체-기반 세포 약물), OVAREX[®] Mab (쥐 모노클로날 항체), 파클리탁셀, PANDIMEX[®] (20(S)프로토파낙사디올(aPPD) 및 20(S)프로토파낙사트리올(aPPT)을 함유하는 인삼 유래의 아글리콘 사포닌), 파니투무마브, PANVAC[®]-VF(조사용 암 백신), 페가스파르가제, PEG 인터페론 A, 폐녹소디올, 프로카바진, 레비마스태트, REMOVAB[®] (카투막소마브), REVLIMID[®] (레날리도미드), RSR13(에파프록시탈), SOMATULINE[®] LA (란레오타이드), SORIATANE[®] (아시트레틴), 스타우로스포린(스트렙토마이세스 스타우로스포어스), 탈라보스테트(PT100), TARGRETIN[®] (벡사로텐), TAXOPREXIN[®] (DHA-파클리탁셀), TELCYTA[®] (칸포스파미드, TLK286), 테밀리펜, TEMODAR[®] (테모졸로미드), 테스밀리펜, 탈리도미드, THERATOPE[®] (Stn-KLH), 티미태크(2-아미노-3,4-디하이드로-6-메틸-4-

옥소-5-(4-피리딜티오)퀴나졸린 이염산염), TNFERADE[®](아테노벡터: 종양괴사인자-알파의 유전자를 함유하는 DNA 운반체), TRACLEER[®] 또는 ZAVESCA[®](보센탄), 트레티노인(Retin-A), 테트란드린, TRISENOX[®](삼산화비소), VIRULIZIN[®], 유크라인(더 큰 셀란딘 식물 유래의 알칼로이드 유도체), 비탁신(항-알파브베타3 항체), XCYTRIN[®](모텍사핀 가돌리늄), XINLAY[®](아트라센탄), XYOTAX[®](코플리탁셀 폴리글루맥스), YONDELIS[®](트라벡테딘), ZD-6126, ZINECARD[®](텍스라죽산), ZOMETA[®](졸렌드론산), 크리조티니브, 조루비신 및 이의 유사물을 포함한다.

[0059] 다른 바람직한 양태에서, 치료제는 데스모글레인-2에 결합하는 화합물; 바람직하게는 DSG2에 결합하고 밀착 연결을 개방시키는 화합물을 포함한다.

[0060] 다른 양태에서, 치료제는 방사성 입자/방사선 요법을 포함한다. 임의의 적당한 방사성 요법 또는 입자는 주치의가 적당하다고 간주하는 것이면 사용할 수 있으며, 그 예로는 코발트-60, 요오드-131, 이리듐-192, 스트론튬-89, 사마륨 153, 레늄-186 및 납-212가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0061] 바람직한 양태에서, 치료제는 항종양 치료제이며, 본원에 기술된 바와 같은 화학요법제 또는 항-종양 모노클로날 항체를 포함한다. 다른 바람직한 양태에서, 항-종양 치료제는 트라스투주마브, 세투믹시마브, 페투주마브, 아포마브, 코나투무마브, 텍사투무마브, 베바시주마브, 데노수마브, 자눌리루마브, 린투주마브, 에드레콜로마브, 리톡시마브, 티실리루마브, 토시투모마브, 알렘투주마브, 에프라투주마브, 미투모마브, 켄투주마브 오조가미신, 오레고보마브, 팜투모마브 다클리주마브, 파니투무마브, 카투막소마브, 오파투무마브 및 이브리투모마브로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 항체를 포함한다. 유용한 항-종양 mAb 및 이의 특정 용도에 대한 비제한적 예는 표 1에 열거하며, 본원에 참고 인용된 문헌[Campoli, M., et al., Principles & Practice of Oncology 23(1&2):1-19 (2009)]에 더 상세하게 기술되어 있다.

표 1

[0062] 암치료를 위한 종양-항원 특이적 mAb

항체	이소형	표적	질환 증상
SGN-75	사람화된 IgG1	CD70	고형암, 예컨대 신장세포암, CD70+혈액학적 악성종양
트라스투주마브	사람화된 IgG1	HER2/neu	HER2/neu(+) 유방암*
세투믹시마브	키메라성 IgG1	EGFR	EGFR(+) 결장암*
파니투무마브	완전 사람 IgG2	EGFR	EGFR(+) 결장암*
마투주마브	사람화된 IgG1	EGFR	비-편평세포 비소세포 폐암(NSCLC), 두경부 편평세포 암종(HNSCC), 유방 및 췌장 암, 결장암(CC)
퍼투주마브	사람화된 IgG1	EGFR	NSCLC, HNSCC, CC, 유방 및 난소암
이필리루마브(MDX-010)	사람화된 IgG1	CTLA-4	NSCLC, RCC, 전이성 흑색종
트레멜리루마브(CP-675, 206)	사람화된 IgG1	CTLA-4	NSCLC, RCC, 전이성 흑색종
시브로투주마브	사람화된 IgG1	FAP**	NSCLC, CC
DR-4-특이적 마파투무마브(TRM-1, HGS-ETR1)	사람화된 IgG1	TRAIL	NSCLC, CC, 난소암, 다발성 흑색종
DR-5-특이적 텍사투무마브(HGS-ETR2, TRA-8)	사람화된 IgG1	TRAIL	고형암
칸투주마브 머탄신	사람화된 IgG1-메이탄시노이드	CanAg***	CC, 췌장암
베바시주마브(아바스타틴)	사람화된 IgG1	혈관 내피 세포 성장 인자(VEGF)	결장암*, 비편평세포 비소세포 폐암(NSCLC)*, 전이성 유방암*

[0063] 모노클로날 항체 치료제는 임의의 모노클로날 항체 종류, 예컨대 표준 모노클로날 항체, 사람화된 모노클로날,

쥐 또는 다른 근원에서 발생된 완전 사람 항체, 키메라성 모노클로날 및 이의 단편을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. "사람화된 모노클로날 항체"는 비-사람 모노클로날 항체, 예컨대 마우스 모노클로날 항체 유래의 모노클로날 항체를 의미한다. 대안적으로, 사람화된 모노클로날 항체는 비-사람인 모체의 모노클로날 항체의 항원 결합 성질을 보유하거나 또는 실질적으로 보유하지만 사람에게 투여했을 때 모체 모노클로날 항체에 비해 저하된 면역원성을 나타내는 키메라성 항체에서 유래될 수 있다. 예를 들어, 키메라성 모노클로날 항체는 사람 및 쥐의 항체 단편, 일반적으로 사람 불변 영역과 쥐의 가변 영역을 포함할 수 있다. 사람화된 모노클로날 항체는 당업계에서 공지된 다양한 방법으로 제조할 수 있으며, 그 예로는 비제한적으로 (1) 사람 골격 및 불변 영역 위에 비-사람 모노클로날 항체 유래의 상보성 결정 영역의 접목("사람화"), 및 (2) 비-사람 모노클로날 항체 가변 도메인을 이식하되, 표면 잔기를 교체하여 사람-유사 표면으로 "은폐하기"("베니어링") 방법을 포함한다. 이 방법들은 예컨대 다음과 같은 문헌에 개시되어 있다: Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immunol.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immunol.* 31(3):169-217 (1994); and Kettleborough, C. A. et al., *Protein Eng.* 4(7):773-83 (1991). 모노클로날 항체는 통상의 기술로 단편화할 수 있고, 이 단편은 완전 항체에서와 같은 방식으로 유용성에 대해 선별한다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편은 펩신으로 항체를 처리하여 제조할 수 있다. 그 결과 수득되는 F(ab')₂ 단편은 이황화 가교를 환원시키는 처리를 하여 Fab' 단편을 생산할 수 있다. Fab 단편은 IgG 항체를 파파인으로 처리하여 수득할 수 있고; F(ab') 단편은 IgG 항체를 펩신 분해하여 수득할 수 있다. F(ab') 단편은 또한 이하에 기술된 Fab'를 티오에테르 결합 또는 디설파이드 결합을 통해 결합시켜 생산할 수도 있다. Fab' 단편은 F(ab')₂의 힌지 영역의 이황화 결합을 절단하여 수득되는 항체 단편이다. Fab' 단편은 F(ab')₂ 단편을 환원제, 예컨대 디티오프로 처리하여 수득할 수 있다. 항체 단편 펩타이드는 이 펩타이드를 암호화하는 핵산을 제조할 세포에서 발현시켜 생산할 수도 있다(예컨대, Evans et al., *J. Immunol. Meth.* 184: 123-38(1995)). 예를 들어, F(ab')₂ 단편의 일부를 암호화하는 키메라 유전자는 H 사슬의 CH1 도메인 및 힌지 영역을 암호화하는 DNA 서열 및 그 다음 해독 종결 코돈을 포함하여 상기 절두형 항체 단편 분자를 생산할 수 있다. 모노클로날 항체 단편의 비제한 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH I 도메인으로 본질적으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 2개의 Fab 단편이 힌지 영역에서 이황화 가교에 의해 결합되어 있는 2가 단편인, F(ab)₂ 및 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 본질적으로 이루어진 dAb 단편(Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546); 및 (vi) 하나 이상의 분리된 CDR 또는 기능성 파라토프를 포함한다.

[0064]

본 발명의 임의의 양태 또는 양태들의 조합과 배합될 수 있는 바람직한 한 양태에서, 장애는 Her-2 양성 종양을 포함하고, 이 방법은 AdB-2/3 섬유 다량체를 적당한 모노클로날 항체 요법과 함께, 또는 이 항체 요법과 더불어 화학요법제, 방사선 또는 이의 병용요법으로 공동투여하는 것을 포함한다. 또 다른 바람직한 양태에서, 모노클로날 항체는 트라스투주마브이다. 이러한 임의의 양태들과 배합될 수 있는 더욱 바람직한 양태에서, Her-2 양성 종양은 유방암, 위암, 결장암 및 난소암으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 가장 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 PtDd, JO-1 다량체(서열번호 20) 또는 이의 기능성 등가물을 포함한다. 이하 실시예들에 제시되는 바와 같이, AdB-2/3 섬유 다량체와 트라스투주마브의 공동투여는 유방암 모델에서 Her-2 수용체에 대한 트라스투주마브의 접근을 개선시켜, 매우 개선된 트라스투주마브 치료 효능을 초래한다. 또 다른 바람직한 양태에서, 이 방법은 트라스투주마브에 적당히 반응하지 않았던 환자, 예컨대 종양 경감의 결여, 종양 재발, 또는 트라스투주마브에 대한 내성 발생을 나타낸 환자에게 실시된다. 이러한 양태들의 방법은 또한 치료 효능을 수득하는데 필요한 트라스투주마브의 투여량을 줄이는 데에도 사용될 수 있어 부작용(예컨대, 트라스투주마브-관련 심장독성)을 제한하는 작용을 할 수 있다.

[0065]

본 발명의 임의의 양태 또는 양태들의 조합과 배합될 수 있는 다른 바람직한 양태에서, 장애는 EGFR-양성 종양을 포함하고, 이 방법은 AdB-2/3 섬유 다량체를 적당한 모노클로날 항체 요법과 함께, 또는 이 항체 요법과 더불어 화학요법제, 방사선 또는 이의 병용요법을 공동투여하는 것을 포함한다. 다른 바람직한 양태에서, 모노클로날 항체는 세툽시마브이다. 이러한 임의의 양태들과 배합될 수 있는 또 다른 바람직한 양태에서, EGFR-양성 종양은 폐암, 결장암, 유방암, 직장암, 두경부암 및 췌장암으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 가장 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 PtDd, JO-1 다량체(서열번호 20) 또는 이의 기능성 등가물을 포함한다. 이하 실시예에 제시되는 바와 같이, AdB-2/3 섬유 다량체와 세툽시마브의 공동투여는 폐암 모델에서 EGFR 수용체에 대한 세툽시마브의 접근을 개선시켜, 세툽시마브의 치료 효능을 매우 개선시킨다. 또 다른 바람직한 양태에서, 이 방법은 세툽시마브에 적당히 반응하지 않았던 환자, 예컨대 종양 경감의 결여, 종양 재발, 또는 세툽

시마브에 대한 내성 발생을 나타낸 환자에게 실시된다. 이러한 양태들의 방법은 또한 치료 효능을 획득하는데 필요한 세톡시마브의 투여량을 줄이는 데에도 사용될 수 있어 부작용(예컨대, 세톡시마브 치료 동안 종종 일어나는 여드름-유사 발진)을 제한하는 작용을 할 수 있다.

[0066] 본 발명의 임의의 양태 또는 양태들의 조합과 배합될 수 있는 바람직한 한가지 양태에서, 장애는 상피 종양을 포함하고, 이 방법은 AdB-2/3 섬유 다량체를 혈관 내피세포 성장인자(VEGF) 억제제와 함께, 또는 이 억제제와 더불어 다른 화학요법제, 방사선 또는 이의 병용요법을 공동투여하는 것을 포함한다. 임의의 적당한 VEGF 억제제가 사용될 수 있으며, 그 예로는 베바시주마브가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0067] 본원의 임의의 양태 또는 양태들의 조합과 배합될 수 있는 추가 양태에서, 고형암을 수반하는 방법은 추가로 종양 간질 단백질을 분해할 수 있는 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 이하 실시예에 제시된 바와 같이, 이러한 시도(JO-1 다량체(서열번호 20) 및 트라스투주마브와 종양 간질 단백질을 분해하는 화합물의 배합)는 유방암 모델에서 종양을 완전하게 근절시켰다. 종양 간질 단백질을 분해하는 임의의 적당한 화합물이 사용될 수 있으며, 그 예로는 킬렉신, 콜라게나제, 트립신, 디스파제, MMP(메탈로프로테이나제)-1 및 MMP8을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 화합물의 전달은 임의의 적당한 기전에 의해 이루어질 수 있으며, 그 예로는 유전자 요법, AdB-2/3 섬유 다량체와 치료제의 분리 투여, 또는 AdB-2/3 섬유 또는 치료제와 접합체로서의 투여를 포함한다.

[0068] 본원의 임의의 양태 또는 양태들의 조합과 배합될 수 있는 추가 양태에서, 방법은 추가로 다른 연결 개방자와 함께 AdB-2/3 다량체를 투여하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "연접 개방자"는 세포간 연결을 일시적으로 개방시킬 수 있는 화합물이다. 임의의 적당한 연결 개방자가 사용될 수 있다. 비제한적인 한 양태에서, 연결 개방자는 조나 오클루덴스 독소(Zot), 장의 상피 연결을 가역적으로 변경시키는 능력이 있어서 점막 장벽을 통해 거대분자를 통과시킬 수 있게 하는 비브리오 콜레라(V. cholerae)-생산 독소(Fasano et al.(1991) Proc Natl Acad Sci USA 88: 5242-5246)를 포함한다. Zot-유래의 헥사펩타이드(AT-1001)가 개발되었다. 다른 양태에서, 클로스트리움 퍼프린젠스 장독소는 밀착 연결으로부터 클라우딘-3 및 -4를 제거하여 세균 침입을 용이하게 한다(Sonoda N, et al.(1999) J Cell Biol 147: 195-204). 다른 양태에서, 사람 Ad, HPV, HTLV-1에 의해 암호화된 종양단백질은 연결 단백질 ZO-1의 국재화오류(mislocalization)에 의해 상피 연결을 일시적으로 개방시킬 수 있다(Latorre IJ, et al.(2005) J Cell Sci 118: 4283-4293). 다른 양태에서, 여러 사람 바이러스는 밀착 연결 또는 다른 세포 연결 분자에 체결되어 상피 세포 내로 진입한다. 이러한 바이러스 중에는 C형 간염 바이러스(Evans MJ, et al.(2007) Nature 446: 801-805), 레오바이러스(Barton ES, et al.(2001) Cell 104: 441-451) 및 헤르페스 단순 바이러스(Geraghty RJ, et al.(1998) Science 280: 1618-1620)가 있다.

[0069] 다른 양태에서, 치료제는 흡입성 치료제이다. 임의의 적당한 흡입성 치료제가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 다양한 비제한적 양태에서, 흡입성 치료제는 코르티코스테로이드, 기관지확장제, 베타 작용물질, 항콜린 작용제, 알부테롤(PROVENTIL[®]; VENOLIN[®]; ACCUNE[®]; PROAIR[®]), 레브알부테롤(XOPENEX[®]), 퍼부트롤(MAXAIR[®]), 이프라트로프 브로마이드(ATROVENT[®]), 베클로메타손, 부데소나이드, 플루니솔라이드(AEROBID[®]), 플루티카손, 트리암시놀론 아세토나이드, 플루타카손(코르티코스테로이드) 및 살메테롤(ADVAIR[®]), 포모토롤(장기작용성, 베타-작용물질 기관지확장제) 및 부데소나이드(코르티코스테로이드)(SYMICORT[®]), 알부테롤(베타 작용물질) 및 이프라트로프(COMBIVENT[®]; 항콜린작용제)(부데소나이드(PULMICORT RESPULES[®]) 및 티오프로프(SPIRIVA[®]; 항콜린작용성 기관지확장제)으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0070] 다른 양태에서, 화합물은 진단제 또는 조영제를 포함한다. 본 발명의 방법은 당해의 표적에 대한 접근이 제한될 수 있는 세포간 연결을 포함하는 상피 조직으로 임의의 진단제, 조영제 또는 기타 화합물을 전달하는데 광범한 이용성이 있다. 다양한 비제한적 양태에서, 조영제는 검출성 시그널을 직접 또는 간접적으로 생산할 수 있는 임의의 화학적 화합물을 포함할 수 있다. 많은 이러한 조영제는 당업자에게 공지되어 있다. 개시된 방법 및 조성물에 사용하기에 적합한 조영제의 예로는 방사능 동위원소, 형광 분자, 자성 입자(나노입자 포함), 금속 입자(나노입자 포함), 인광 분자, 효소, 항체, 리간드 및 이의 배합물인 반면, 진단제는 상기 조영제에 결합된 특정 상피 장애의 진단 마커인 화합물을 포함할 수 있다. 조영제에 의해 발생하는 시그널을 검출 및 측정하는 방법은 또한 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 방사능 동위원소는 신틸레이션 계수 또는 직접 가시화에 의해 검출할 수 있고; 형광 분자는 형광 분광광도계로 검출할 수 있으며; 인광 분자는 분광광도계로 검출하거나 또는 카메라에 의해 직접 가시화될 수 있으며; 효소는 효소에 의해 촉매된 반응 산물을 검출 또는 가시화하여 검출할 수 있고; 항체는 이 항체에 커플링된 2차 검출 표지를 측정하여 검출할 수 있다. 바람직한 한 양태에서, 조영제

및/또는 진단제는 직접 종양 결합에 의해 또는 종양에 결합할 수 있는 화합물과 조영제 또는 진단제의 커플링에 의해 종양을 검출하는데 사용될 수 있는 것이다.

[0071]

한 예로서, 조영제는 형광 조영제를 포함할 수 있는 반면, 진단제는 형광 조영제에 결합된 특정 상피 장애의 진단 마커인 화합물을 포함할 수 있다. 형광 조영제는 검출가능한 형광 시그널을 가진 임의의 화학적 모이어티이다. 이 조영제는 단독으로 사용하거나 또는 다른 조영제와 함께 사용할 수 있다. 본원에 개시된 조성물과 방법에 사용할 수 있는 적당한 형광제의 예로는 플루오레세인(FITC), 5-카르복시플루오레세인-N-하이드록시석신이미드 에스테르, 5,6-카르복시메틸 플루오레세인, 니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아졸-4-일(NBD), 플루오레스카민, OPA, NDA, 인도시아닌 그린 염료, 시아닌 염료(예, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 및 Cy7), 4-아세트아미도-4'-이소티오시아네이트스틸벤-2,2'-디설포산, 아크리딘, 아크리딘 이소티오시아네이트, 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-설포산(EDANS), 4-아미노-N-[3-비닐설포닐]페닐리나프탈이미드-3,5-디설포네이트, N-(4-아닐리노-1-나프틸)말레이미드, 안트라닐아미드, BODIPY, 브릴리언트 옐로우, 쿠마린, 7-아미노-4-메틸쿠마린(AMC, 쿠마린 120), 7-아미노-4-트리플루오로메틸쿠마린(Coumaran 151), 시아노신, 4',6-디아미니디노-2-페닐인돌(DAPI), 5',5"-디브로모피로갈롤-설포나프탈레인(브로모피로갈롤 레드), 7-디에틸아미노-3-(4'-이소티오시아네이트페닐)-4-메틸쿠마린 디에틸렌트리아민 펜타아세트레이트, 4,4'-디이소티오시아네이트도하이드로-스틸벤-2,2'-디설포산, 4,4'-디이소티오시아네이트스틸벤-2,2'-디설포산, 5-[디메틸아미노]나프탈렌-1-설포닐 클로라이드(DNS, 단설클로라이드), 4-(4'-디메틸아미노페닐아조)벤조산(SABCYL), 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4'-이소티오시아네이트(DABITC), 예오신, 예오신 이소티아시아네이트, 에리쓰로신 B, 에리쓰로신, 이소티오시아네이트, 에티뎀 브로마이드, 에티뎀, 5-카르복시플루레세인(FAM), 5-(4,6-디클로로트리아진-2-일)아미노플루오레세인(DTAF), 2',7'-디메톡시-4'5'-디클로로-6-카르복시플루오레세인(JOE), 플루오레세인 이소티오시아네이트, IR144, IR1446, 말라카이트 그린 이소티오시아네이트, 4-메틸움벨리페론, 오르토 크레솔프탈레인, 니트로티로신, 파라로스아닐린, 페놀 레드, B-피코에리트린, o-프탈디알데하이드, 피렌, 피렌 부티레이트, 석신이미딜 1-피렌 부티레이트, 반응성 레드 4(Cibacron[R] Brilliant Red 3B-A), 6-카르복시-X-로다민(ROX), 6-카르복시로다민(R6G), 리사민 로다민 B 설포닐 클로라이드 로다민(Rhod), 5,6-테트라메틸 로다민, 로다민 B, 로다민 123, 로다민 X 이소티오시아네이트, 설포로다민 B, 설포로다민 101, 설포로다민 101의 설포닐 클로라이드 유도체(Texas Red), N,N,N',N'-테트라메틸-6-카르복시로다민(TAMRA), 테트라메틸로다민, 테트라메틸 로다민 이소티오시아네이트(TRITC), 리보플라빈, 로줄산, 쿠마린-6- 및 이의 유사물, 예컨대 이의 배합물을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 형광 영상화 모이어티는 다양한 시판 급원, 예컨대 Molecular Probes, Eugene, Oreg. and Research Organics(오하이오 클리브랜드 소재)에서 입수할 수 있거나, 또는 당업자에 의해 합성될 수 있다.

[0072]

다른 예에서, 조영제는 자기공명조영제(MRI)를 포함할 수 있는 한편, 진단제는 MRI 제제에 결합된 특정 상피 장애의 진단 마커인 화합물을 포함할 수 있다. MRI 제제는 검출가능한 자기공명 시그널을 보유하거나 또는 다른 제제의 자기공명 시그널에 영향을 미칠 수 있는(예컨대, 증가시키거나 이동시킬 수 있는) 임의의 화학적 모이어티이다. 이러한 종류의 조영제는 단독 사용하거나 또는 다른 조영제와 함께 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 가돌리늄-기반 MRI 제제가 조영제로서 작용할 수 있다. 개시된 조영제에 혼입될 수 있는 적당한 MRI 제제의 예는 가돌리늄에 강하게 결합하는 것으로 알려져 있고 자기공명 조영제로서 임상용으로 승인된 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DTPA)의 접합성 형태인 파라-아미노-벤질 디에틸렌트리아민펜타아세트산(p-NH₂-Bz-DTPA, 화합물 7)이다. 본원에 개시된 바와 같은 수지상 기질과 같은 큰 거대분자에 MRI 제제의 혼입은 T1 이완을 확대시키고(높은 대비), 다수의 제제가 단일 분자 상에 위치할 수 있도록 하여 시그널을 증가시킬 수 있다. MRI 조영제와 예컨대 형광 조영제를 배합하면, 최종 제제는 검출, 영상화 및 MRI를 통한 실시간 분석이 될 수 있다. 다른 조영제로는 18F 또는 64Cu 또는 68Ga의 킬레이터를 첨가하여 제조할 수 있는 PET 제제를 포함한다. 또한, 방사성 핵종을 첨가하여 SPECT 영상화 또는 방사선 용량의 전달을 촉진시킬 수 있는 한편, 진단제는 PET 제제에 결합된 특정 상피 장애의 진단 마커인 화합물을 포함할 수 있다.

[0073]

일부 양태에서, 진단제는 진단 조영제이며, 그 예로는 양전자방출단층촬영(PET) 제제, 컴퓨터단층촬영(CT) 제제, 자기공명영상화(MRI) 제제, 핵자기조영제(NMI), 형광법 제제 및 초음파 조영제를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 진단제로는 다음과 같은 원소들의 동위원소, 예컨대 요오드(I), 예컨대 ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I 등, 바륨(Ba), 가돌리늄(Gd), 테크네튬(Tc), 예컨대 ⁹⁹Tc, 인(P), 예컨대 ³¹P, 철(Fe), 망간(Mn), 탈륨(Tl), 크롬(Cr), 예컨대 ⁵¹Cr, 탄소(C), 예컨대 ¹⁴C 또는 이의 유사물, 형광 표지된 화합물, 또는 이의 복합체, 킬레이트, 첨가생성물 및 접합체를 포함한다. 임의의 적당한 PET 제제가 사용될 수 있고, 그 예로는 탄소-11, 질소-13, 산소-15, 불소-18, 11C-메토미데이트 및 이의 글루코오스 유사체, 예컨대 비제한적으로 플루데옥시글루코오

스(불소-18로 표지된 글루코오스 유사체)를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0074] 다른 양태에서, 진단제는 세포에서 발현 시 쉽게 검출할 수 있는 단백질(예컨대, 비제한적으로 베타-갈락토시다제, 녹색 형광 단백질, 루시페라제 및 이의 유사물)을 암호화하는 마커 유전자 및 표지된 핵산 프로브(예, 방사능표지된 프로브 또는 형광표지된 프로브)이다. 일부 양태에서, 본원에 제공된 AdB-2/3 다량체에 대한 진단제의 공유 접합은 다양한 접합 공정에 따라 달성된다. 다른 양태에서, 진단제는 제공된 AdB-2/3 다량체와 비공유 결합한다.

[0075] 다른 관점에서, 본 발명은 상피 조직에 물질의 전달을 개선시키는 방법으로서, 상피 조직을 (a) 이 상피 조직으로 전달될 하나 이상의 화합물; 및 (b) 상피 조직으로 하나 이상의 화합물의 전달을 증진시키기에 충분한 양의 AdB-2/3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 등가물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 이 관점에서, 화합물은 앞에서 상세하게 설명한 바와 같은 임의의 적당한 화합물일 수 있다. 바람직한 양태에서, 하나 이상의 화합물은 조영제를 포함한다. 다른 바람직한 양태에서, 상피 조직은 고형암, 예컨대 본원에 개시된 바와 같은 임의의 암을 포함한다. 다양한 비제한적 양태에서, 고형암은 유방암, 폐암, 결장암, 직장암, 위암(stomach cancer), 전립선암, 난소암, 자궁암, 피부암, 내분비암, 자궁경부암, 신장암, 흑색종, 췌장암, 간암, 뇌암, 두경부암, 비인두암, 위암(gastric tumor), 편평세포암종, 선암종, 방광암 및 식도암으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0076] 또 다른 관점에서, 본 발명은 데스모글레인 2(DSG2)를 발현하는 세포 또는 조직으로 물질의 전달을 개선시키는 방법으로서, 상기 DSG2를 발현하는 세포 또는 조직을 (a) 이 세포 또는 조직으로 전달될 하나 이상의 화합물; 및 (b) 이 조직에 하나 이상의 화합물의 전달을 증진시키기에 충분한 양의 AdB-2/3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 등가물을 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. DSG2를 발현하는 조직 종류의 예로는 상피 세포/조직(예컨대, 본원에 개시된 것), 사람 혈소판 및 과립구를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 이하 실시예에 제시된 바와 같이, DSG2는 또한 비-극성 세포에서 수용체로서 작용하기도 한다. 따라서, 이 방법은 상피 세포 및 조직에 이용성이 있을 뿐만 아니라, AdB-2/3 병원 및 유전자 요법 목적의 AdB-2/3 벡터의 혈관내 적용에도 관련이 있다.

[0077] 또 다른 관점에 있어서, 본 발명은 조직에서 상피 대 중간엽 전이(EMT)를 유도하는 방법으로서, 상피 조직을 EMT를 유도하기에 충분한 양의 AdB-2/3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 등가물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. EMT는 상피 세포가 세포간 연결과 같은 특성을 상실하고 중간엽 세포의 성질을 획득하는 세포 전환분화(transdifferentiation) 프로그램이다. EMT는 중간엽 마커의 발현 증가, 세포의 기질 화합물의 발현 증가, 상피 마커의 발현 감소, 전사 인자의 위치 변경 및 키나제의 활성화, 및 세포간 연결의 해리를 특징으로 한다.

[0078] 이러한 추가 관점들 각각에서, 본원에 기술된 화합물 및 AdB-2/3 섬유 다량체의 임의의 양태가 사용될 수 있다. 한가지 비제한적 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 섬유 다량체, Ad7 섬유 다량체, Ad11 섬유 다량체, Ad14 섬유 다량체, Ad14a 섬유 다량체, 이의 배합물 및 이의 기능성 등가물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 다른 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 등가물이다. 다른 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 AdB-2/3 비리온, AdB-2/3 캡시드, AdB-2/3 12면체 입자(PtDd), 제조함 AdB-2/3 섬유 다량체, 및 이의 기능성 등가물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 다양한 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 PtDd 또는 연결 개방자 1(JO-1)(서열번호 20) 다량체(예컨대, 이량체) 또는 이의 기능성 등가물을 포함한다. 이러한 양태들 각각과 배합될 수 있는 또 다른 바람직한 양태로서, AdB-2/3 섬유 다량체는 이량체이다. 임의의 특정 작용 기전으로 한정하려는 것은 아니지만, 이러한 추가 관점은 각각 세포간 연결을 붕괴시키는 작용을 하는 AdB-2/3 섬유 다량체를 이용하는 것을 생각된다.

[0079] 본 발명의 방법의 모든 관점 및 양태에서, 치료제, 진단제 및/또는 조영제는 AdB-2/3 다량체와 함께 투여되거나 또는 같이 투여될 수도 있다. 한 양태에서, 치료제 및 AdB-2/3 다량체는 임의의 적합한 공유 또는 비공유 결합을 통해 부착된다. 한가지 비제한적 양태에서, AdB-2/3 다량체는 고형암 세포를 사멸시키는 독소 또는 다른 약물에 부착될 수 있다.

[0080] AdB-2/3 섬유 다량체 및/또는 치료제는 치료받는 상태에 가장 적당한 투여방식이 국소 방식 또는 전신 방식인지의 여부에 따라, 주치의가 적합한 것으로 생각하는 임의의 방식으로 투여할 수 있다. 본원에 사용된, "전신 전달" 및 "전신 투여"란 용어는 경구 및 비경구 경로, 예컨대 근육내(IM), 피하, 정맥내(IV), 동맥내, 흡입성, 설하, 협측, 국소, 경피, 비측, 직장, 질내 및 다른 의도한 치료 작용의 단일 부위 또는 다중 부위로 전달된 체제를 효과적으로 분산시키는 투여 경로를 포함하려는 것이지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 본 조성물을 전신 전

달하기에 바람직한 경로는 정맥내, 근육내, 피하, 및 흡입성을 포함한다. 바람직한 한 양태에서, 파종 종양의 치료(및 모노클로날 항체 전달)를 위해서는 정맥내 투여를 사용한다. 다른 양태에서, 경구 전달은 예컨대 위장(GI) 상피 장애에 바람직할 수 있다. 다른 양태에서, 비측 또는 에어로졸 전달은 폐 전달, 예컨대 폐 상피 장애 시에 바람직할 수 있다.

[0081] AdB-2/3 섬유 다량체는 효소 분해로부터 폴리캡타이드를 보호하는 지질 또는 리포솜과 같은 다른 분자와 결합된 상태로 도입될 수 있다. 예를 들어, 체내의 효소 가수분해에 대해 특정 단백질을 보호하여 반감기를 연장시키기 위해, 중합체, 특히 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 공유 부착이 사용되고 있다.

[0082] AdB-2/3 섬유 다량체 및/또는 치료제는 원하는 치료 효과 수준을 유지하는 것으로 측정된 간격마다 주기적으로 전신 투여될 수 있다. 예를 들어, 정맥내 주사에 의한 투여는 1일 1회, 주당 1회, 2주 내지 4주마다 또는 그 이상 떨어진 간격으로 실시될 수 있다. 투여량 섭생은 제제의 조합 작용에 영향을 미칠 수 있는 다양한 요인을 고려하여 주치의가 결정할 것이다. 이러한 요인으로는 치료받는 상태의 진행 정도, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 기타 임상 요인을 포함할 것이다. AdB-2/3 섬유 다량체 및/또는 치료제의 투여량은 투여되는 다량체 및/또는 치료제의 함수, 뿐만 아니라 임의의 약물 전달 매개체(예, 지속 방출 전달 매개체)의 존재 및 성질에 따라 달라질 것이다. 또한, 투여량은 투여 빈도의 변동 및 전달된 제제(들)의 약동학적 행동을 감안하여 조정할 수 있다. AdB-2/3 섬유 다량체의 투여량 범위는 일반적으로 0.01 내지 250 mg/kg 사이, 바람직하게는 0.1 내지 10mg/kg 사이, 더욱 바람직하게는 0.10 내지 0.5 mg/kg 사이일 것이다. 승인된 치료제의 투여량은 의학 담당자에 의해 쉽게 확인가능하다. 치료제는 또한 암과 같은 상피 조직에 침투 증진으로 인하여 감소된 용량으로 투여할 수도 있다.

[0083] AdB-2/3 섬유 다량체는 치료제를 투여하기 전에, 투여와 동시에 또는 투여 후에 피검체에게 투여할 수 있다. 바람직한 양태에서, 치료제 및 AdB-2/3 섬유 다량체의 투여는 동시에 실시된다. AdB-2/3 섬유 다량체 대비 치료제의 투여 시기는 최대의 치료 효과를 달성하기 위해 변동시킬 수 있다. 바람직하게는, 치료제는 DSG2에 대한 AdB-2/3 섬유 다량체 결합에 의해 유발되는 세포간 연결의 일시적 개방으로 접촉을 보장하는 시간에 투여한다. 예를 들어, 치료제는 AdB-2/3 섬유 다량체를 각각 투여하기 전이나, 투여와 동시에, 또는 투여한 후 투여할 수 있다. 다른 바람직한 양태에서, 치료제는 AdB-2/3 섬유 다량체를 투여한 후, 예컨대 AdB-2/3 섬유 다량체를 투여한 후 5분, 10분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 18시간, 24시간, 30시간, 36시간, 40시간, 42시간, 48시간, 54시간, 60시간, 66시간, 72시간, 78시간, 84시간, 90시간 또는 심지어 96시간 이내에 투여될 수 있다.

[0084] 다른 관점에서, 본 발명은 상피 조직과 관련된 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 치료를 요하는 피검체에게 상기 장애를 치료하기에 충분한 양의 AdB-2/3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 등가물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 이 양태에서, 다른 치료제는 전달되지 않는다. 비제한적 양태에 따르면, AdB-2/3 바이러스 감염, 고형암, 또는 AdB-2/3 기반의 유전자 전달 벡터를 사용하여 치료할 수 있는 장애로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 장애를 치료하기 위해 단독요법이 사용된다. 예를 들어, 고형암 치료에 있어서, 이 방법은 예컨대 침투(예컨대, 기존 자연 킬러 세포, T 세포 또는 수지상 세포의 종양내 침투)에 의해 장애 부위에 면역계 세포의 접근을 개선시킨다. 이 방법은 또한 표적인 상피 세포에 면역계 세포의 개선된 접근으로 인해 이익을 얻을 수 있는 앞에서 논한 상피 세포와 관련된 임의의 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 바람직한 한 양태에서, 장애는 고형암이고, 이 방법은 종양의 면역계 공격을 개선시킨다. 이 방법은 전술한 임의의 고형암에 사용될 수 있다. 본 발명의 제1 관점의 모든 양태 및 양태들의 조합은 다른 분명한 언급이 없는 한 이러한 제2 관점에도 역시 사용될 수 있다.

[0085] 따라서, 이러한 제2 관점의 다양한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 섬유 다량체, Ad7 섬유 다량체, Ad11 섬유 다량체, Ad14 섬유 다량체 및 Ad14a 섬유 다량체로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 이와 마찬가지로, 이러한 본 발명의 관점에 사용되는 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 다량체(또는 키메라/이의 기능성 등가물)를 함유하는 작제물의 예로는 비제한적으로 AdB-2/3 비리온, AdB-2/3 캡시드, AdB-2/3 12면체 입자(PtDd)(복제 동안 AdB-2/3에 의해 생산된 서브바이러스 12면체 입자), 재조합 AdB-2/3 섬유 다량체(예컨대, 비제한적으로 이하 임의의 양태 또는 양태들의 조합에 개시된 것, 예를 들어 J0-1 다량체, 예컨대 J0-1 이량체), 및 이의 기능성 등가물을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 바람직한 양태에서, 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 다량체는 AdB-2/3 PtDd, 예컨대 Ad3 PtDd를 포함하거나, 구성된다. 다른 바람직한 양태에서, 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 다량체는 이하에 기술되는 본 발명의 조성물의 임의의 양태 또는 양태들의 조합, 예컨대 J0-1 이량체를 포함한다. 또한, 본 발명의 이러한 관점의 방법은 DSG2에 결합할 수 있고 세포간 연결의 일시적인 DSG2-매개의 개방을 유발할 수 있는 임의의 AdB-2/3 섬유 다량체를 사용하여 수행할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 AdB-2/3 섬유 다량체들에

대한 비자연 발생의 변형들(결실, 첨가, 치환, 여러 Ad 혈청형 섬유 단백질 및 이의 도메인의 키메라 등)도, 이들이 DSG2에 결합하여 세포간 연결의 DSG2-매개의 개방을 유발하기만 한다면, 본 발명의 범위에 포함된다. DSG2에 대한 결합을 시험하고 세포간 연결의 DSG2-매개의 개방을 평가하기 위한 본원의 교시를 기반으로 하면, 당업자의 기술 수준에서 그러한 AdB-2/3 섬유 다량체의 기능성 증가물을 충분히 동정할 수 있다.

[0086] 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 축 도메인 또는 이의 기능성 증가물; (b) 상기 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 단백질 축 도메인에 유효하게 결합되고 C-말단에 위치하는, AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 마디 도메인, 또는 이의 기능성 증가물; 및 (c) 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 축 도메인에 유효하게 결합되고 N-말단에 위치하는, 하나 이상의 비-AdB-2/3 유래의 이량체화 도메인을 포함하는 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드를 제공한다.

[0087] 바람직한 양태에서, 재조합 폴리펩타이드는 Ad 섬유 폴리펩타이드 유래의 꼬리 도메인을 포함하지 않는다. 이하에 상세하게 개시되는 바와 같이, 본 발명자들은 섬유 폴리펩타이드 다량체화 및 DSG2에 대한 결합에 필요한 부위를 AdB-2/3 단백질의 축 도메인과 마디 도메인에 국재화시켰다. 따라서, 본 발명의 이러한 관점의 폴리펩타이드를 사용하여, 예컨대 앞서 논한 본 발명의 다양한 방법들에 사용되는 AdB-2/3 섬유 다량체를 형성시킬 수 있다. 이러한 관점에서, 재조합 폴리펩타이드는 임의의 AdB-2/3 바이러스 유래의 축 도메인 및 마디 도메인, 또는 이러한 축 도메인과 마디 도메인에 대한 임의의 돌연변이체(치환, 첨가, 결실, 키메라 등)를 포함할 수 있는 것으로, DSG2에 대한 결합 친화성을 유지하거나 개선시키고, 이량체화 도메인(기능성 증가물)을 통해 다량체(예컨대, 이량체)를 형성할 수 있다. 이러한 돌연변이체의 생성은 당업자의 기술 수준에서 충분히 실시되고, 이러한 돌연변이체의 DSG2 결합 및 결과적인 본 발명의 재조합 폴리펩타이드에 사용 적합성에 대한 시험도 역시 본원에 교시를 기반으로 하여 당업자의 기술 수준에서 충분히 실시되는 것이다. 예를 들어, 고정된 재조합 DSG2를 함유하는 센서를 이용한 표면 플라즈몬 공명(SPR) 연구는 평가되는 재조합 폴리펩타이드가 DSG2에 결합하는지를 측정하기 위해, DSG2 경쟁 연구와 함께 사용될 수 있다. 한가지 비제한적 양태에서, 폴리펩타이드는 면역원성을 감소시키기 위해 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 아미노산 서열을 변화시켜 변형 또는 변이시킬 수 있다. 또 다른 예시적 연구, 예컨대 기능의 상실 및 획득 분석은 실시예 1에 상세하게 설명되어 있다.

[0088] 본원 전반에 사용된 "폴리펩타이드"란 용어는 가장 광범위한 의미로서, 서브유닛 아미노산의 서열을 의미하는 것이다. 본 발명의 폴리펩타이드는 L-아미노산, D-아미노산(생체내 L-아미노산 특이적 프로테아제에 내성적인), 또는 D-아미노산과 L-아미노산의 배합물을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 폴리펩타이드는 화학 합성되거나 재조합 발현될 수 있다. 폴리펩타이드는 생체내 반감기를 연장시키기 위해 다른 화합물에 결합할 수 있으며, 그 예로는 PEG화, HES화, PAS화, 글리코실화할 수 있고, 또는 Fc-융합체로서 또는 탈면역화된 변형체로서 생산될 수 있다. 이러한 결합은 당업자가 알고 있는 공유 또는 비공유 결합일 수 있다.

[0089] 본원에 사용된, "유효하게 결합된"이란 용어는 도메인들이 의도한 목적에 하나의 단위로서 기능하도록 구성된, 구성요소들의 배열을 의미한다. 이 용어는 도메인들이 폴리펩타이드에 직접 인접해 있어야 할 것을 필요로 하지 않으며, 도메인 사이에 스페이서/링커 서열이 존재할 수 있으며, 그 길이는 꽤 다양할 수 있다. 비제한적 한 양태에서, 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드의 임의의 두 도메인 사이의 스페이서 길이는 약 0개 아미노산 내지 약 20개 아미노산 사이일 수 있다. 다양한 다른 비제한적 양태에서, 스페이서 길이는 0-20, 0-19, 0-18, 0-17, 0-16, 0-15, 0-14, 0-13, 0-12, 0-11, 0-10, 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 0-2, 0-1, 1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-20, 4-19, 4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-20, 5-19, 5-18, 5-17, 5-16, 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-20, 6-19, 6-18, 6-17, 6-16, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-20, 7-19, 7-18, 7-17, 7-16, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12, 7-11, 7-10, 7-9, 7-8, 8-20, 8-19, 8-18, 8-17, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 9-20, 9-19, 9-18, 9-17, 9-16, 9-15, 9-14, 9-13, 9-12, 9-11, 9-10, 10-20, 10-19, 10-18, 10-17, 10-16, 10-15, 10-14, 10-13, 10-12, 10-11, 11-20, 11-19, 11-18, 11-17, 11-16, 11-15, 11-14, 11-13, 11-12, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, 12-13, 13-20, 13-19, 13-18, 13-17, 13-16, 13-15, 13-14, 14-20, 14-19, 14-18, 14-17, 14-16, 14-15, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 15-16, 16-20, 16-19, 16-18, 16-17, 17-20, 17-19, 17-18, 18-20, 18-19, 19-20, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 또는 0개의 아미노산 길이일 수 있다.

[0090] 본원에 사용된, "재조합 폴리펩타이드"는 재조합 폴리펩타이드의 도메인들이 하나 이상의 다른 단백질에서 유래

되거나 인공적으로 유도된 서열에서 유래되는 비자연발생의 단백질 산물을 의미한다. 예를 들어, 각 도메인은 다른 자연 발생의 단백질 서열(예: 축 서열은 하나의 AdB-2/3 혈청형에서; 마디 도메인은 다른 AdB-2/3 혈청형에서, 기타 등등)에서 유래될 수 있다. 재조합 폴리펩타이드는 다양한 기작, 예컨대 비제한적으로 표준 DNA 조작 기술 및 재조합 폴리펩타이드 서브유닛 부분을 통한 화학적 조립에 의해 작제할 수 있다. 화학적 조립은 분자 유전자 형태와 동등한 형태를 산출하거나 또는 등가의 기능을 가진 대안적 결합을 산출할 수 있다. 바람직한 양태에서, 재조합 폴리펩타이드는 표준 재조합 DNA 기술로 생산한다. 이러한 재조합체 생산 기술 및 본 발명의 재조합 폴리펩타이드의 분리는 본원의 교시를 기반으로 하여 당해 기술 수준 내에서 충분히 수행될 수 있다.

[0091] 한 양태로서, 각 축 도메인은 Ad3 축 도메인, Ad7 축 도메인, Ad11 축 도메인, Ad14 축 도메인, Ad14a 축 도메인, 이의 배합물 및 이의 기능성 증가물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 축 도메인은 DSG2에 대한 결합 및 그 결과 수득되는 세포간 연결의 일시적 개방에 필요한, 섬유 마디 이량체화에 필요하다. 따라서, 이러한 Ad 바이러스 혈청형의 축 도메인의 기능성 증가물은 이하에 제시되는 실시예를 기반으로 하면 당업자에 의해 쉽게 측정될 수 있다. 예를 들어, 고정된 재조합 DSG2를 함유하는 센서를 이용하는 표면 플라즈몬 공명(SPR) 연구는 DSG2 경쟁 연구와 함께, 평가되는 재조합 폴리펩타이드가 DSG2에 결합하는지를 측정하는데 사용될 수 있다. 또 다른 연구의 예로서, 예컨대 기능 상실 및 획득 분석은 실시예 1에 상세하게 설명되어 있다.

[0092] 재조합 폴리펩타이드는 1 내지 22개의 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 축 도메인을 포함할 수 있다. 따라서, 폴리펩타이드의 다양한 양태는 1-22, 1-21, 1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-22, 3-21, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-22, 4-21, 4-20, 4-19, 4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-22, 5-21, 5-20, 5-19, 5-18, 5-17, 5-16, 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-22, 6-21, 6-20, 6-19, 6-18, 6-17, 6-16, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-22, 7-21, 7-20, 7-19, 7-18, 7-17, 7-16, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12, 7-11, 7-10, 7-9, 7-8, 8-22, 8-21, 8-20, 8-19, 8-18, 8-17, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 9-22, 9-21, 9-20, 9-19, 9-18, 9-17, 9-16, 9-15, 9-14, 9-13, 9-12, 9-11, 9-10, 10-22, 10-21, 10-20, 10-19, 10-18, 10-17, 10-16, 10-15, 10-14, 10-13, 10-12, 10-11, 11-22, 11-21, 11-20, 11-19, 11-18, 11-17, 11-16, 11-15, 11-14, 11-13, 11-12, 12-22, 12-21, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, 12-13, 13-22, 13-21, 13-20, 13-19, 13-18, 13-17, 13-16, 13-15, 13-14, 14-22, 14-21, 14-20, 14-19, 14-18, 14-17, 14-16, 14-15, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 15-16, 16-22, 16-21, 16-20, 16-19, 16-18, 16-17, 17-22, 17-21, 17-20, 17-19, 17-18, 18-22, 18-21, 18-20, 18-19, 19-22, 19-21, 19-20, 20-22, 20-21, 21-22, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22개의 AdB-2/3 섬유 단백질 축 도메인을 포함한다. 1개보다 많은 AdB-2/3 섬유 단백질 축 도메인이 존재하는 경우, 각 축 도메인은 동일할 수 있거나, 또는 축 도메인의 하나 이상의 카피가 단일 재조합 폴리펩타이드에서 다를 수 있다. 바람직한 양태에서, 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드는 하나의 축 도메인을 보유한다.

[0093] 다른 양태에서, 재조합 폴리펩타이드에 존재하는 하나 이상(또는 전체) 축 도메인은 서열번호 11에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 구성된다:

[0094] GVL(T/S)LKC(L/V)(T/N)PLTT(T/A)(G/S)GSLQLKVG(G/S)GLTVD(D/T)T(D/N)G(T/F/S)L(Q/K/E)ENI(G/S/K)(A/V)(T/N)TPL(V/T)K(T/S)(G/N)HSI(G/N)L(S/P)(L/I)G(A/P/N)GL(G/Q)(T/I)(D/E)(E/Q)NKLC(T/S/A)KLG(E/CVN)GLTF(N/D)S(N/S)N(I/S)(C/I)(I/A)(D/N/L)(D/K)N(I/--)NTL. 이 서열 및 본원에 제시된 다른 가변 서열에서, 가변 잔기는 괄호 안에 표시하였고, "-"는 잔기가 존재하지 않을 수 있음을 나타낸다.

[0095] 다른 양태에서, 재조합 폴리펩타이드에 존재하는 하나 이상(또는 전체)의 축 도메인은 서열번호 12에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 구성된다:

[0096] GVLTLKCLPLTTTGGSLQLKVGGLT(V/I)DDTDG(T/F)L(Q/K)ENI(G/S)ATPLVKTGHSIGL(S/P)LG(A/P)GLGT(D/N)ENKLC(T/A)KLG(E/Q)GLTFNSNNICI(D/N)DNINTL

[0097] 또 다른 양태에서, 재조합 폴리펩타이드에 존재하는 하나 이상(또는 전체)의 축 도메인은 서열번호 1(Ad3), 서열번호 2(Ad7), 서열번호 3(Ad11), 서열번호 4(Ad14) 및 서열번호 5(Ad14a)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 구성된다. AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 및 이들의 도메인 구조의 배열은 도 24를 참조한다. 한 양태에서, 재조합 폴리펩타이드에 존재하는 마디 도메인은 Ad3 마디 도메인, Ad7 마디 도메인, Ad11

마디 도메인, Ad14 마디 도메인, Ad14a 마디 도메인 및 이의 기능성 증가물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 마디 도메인은 DSG2에 결합하는데 필요하다. 따라서, 이러한 Ad 바이러스 혈청형의 마디 도메인의 기능성 증가물은 DSG2에 대한 결합을 평가하기 위한 다양한 분석들에 대한 본원의 교시를 기반으로 하여, 당업자라면 쉽게 측정할 수 있다. 예를 들어, 고정된 재조합 DSG2를 함유하는 센서를 이용한 표면 플라즈몬 공명(SPR) 연구는 DSG2 경쟁 연구와 함께 이용하여, 평가되는 재조합 폴리펩타이드가 DSG2에 결합하는지 여부를 측정할 수 있다. 또 다른 예시적 연구, 예컨대 기능 상실 및 획득의 분석은 실시예 1에 상세하게 설명되어 있다.

[0098] 다른 양태에서, 마디 도메인은 서열번호 13에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 구성된다:

[0099] WTG(V/P)(N/K)P(T/)(E/R)ANC(Q/I)(M/I)(M/E)(Y/A/N/D)(S/K)(S/K)(E/Q)(S/N)(N/P)D(C/S)KL(I/T)L(I/T)LVK(T/N)G(A/I)(L/I)V(T/N)(A/G)(F/Y)V(Y/T)(V/L)(I/M)G(V/A)S(N/D)(N/D/Y)(F/V)N(M/T)L(T/F)(T/K)(Y/H/N)(R/K)N(I/V)(N/S)(F/I)(T/N)(A/V)EL(F/Y)FD(S/A)(A/T)G(N/H)(L/I)L(T/P)(S/R/D)(L/S)SSLKT(P/D)L(N/E)(H/L)K(S/Y)(G/K)Q(N/T)(M/--)(A/--)(T/--)(G/--)A(I/L/D)(T/F)(N/S)A(K/R)(S/G)FMPSTTAYPF(--/V)(--/L)(N/P)(N/D/V)(N/A)(S/G)(R/T)(E/H)(N/K/--)(--/E)NYI(Y/F)G(T/Q)C(H/Y)Y(T/K)ASD(H/G)(T/A)(A/L)FP(I/L)(D/E)(I/V)(S/T)VMLN(Q/R/K)R(A/L)(I/L/P)(R/N/D)(A/D/N/S)(D/E/R)TSY(C/V)(I/M)(R/T)(I/V/F)(T/L)WS(W/L)N(T/A)G(D/L/V)APE(G/V/--)(Q/--)T(S/T)(A/Q)(T/A)TL(V/I)TSPFTF(Y/S)YIREDD.

[0100] 추가 양태에서, 마디 도메인은 서열번호 14에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 구성된다:

[0101] WTGVNPT(E/R)ANCQ(M/I)(M/I)(D/N/A)SSESNDCKLILTLVKTGALVTAFFVYVIGVSN(N/D)FNMLTT(Y/H)(R/K)NINFTAELFFDS(A/T)GNLLT(S/R)LSSLKTPLNHKSGQNMTGA(I/L)TNAK(S/G)FMPSTTAYPFN(N/D/V)NSRE(--/K)(-/E)NYIYGTC(H/Y)YTASD(H/R)TAFPIDISVMLN(Q/R)RA(I/L)(R/N)(A/D/N)(D/E)TSYCIR(I/V)TWSWNTG(D/V)APE(G/V)QTSATTLVTSPFTFYIRED

[0102] 또 다른 양태에서, 마디 도메인은 서열번호 6(Ad3), 서열번호 7(Ad7), 서열번호 8(Ad11), 서열번호 9(Ad14) 및 서열번호 10(Ad14a)으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 구성된다. AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 및 이의 도메인 구조의 정렬은 도 24를 참조한다.

[0103] 본원에 사용된 "이량체화 도메인"은 재조합 폴리펩타이드에 함유되어 있는 이량체화를 촉진하는 펩타이드 서열이다. 임의의 적당한 비-AdB-2/3 유래의 이량체화 도메인은 재조합 폴리펩타이드의 이량체화를 허용하여 DSG2에 결합하기만 한다면, 본 발명의 재조합 폴리펩타이드에 사용될 수 있다. 이량체화 도메인은 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드 중의 자연 발생의 도메인이 아니라는 점에서 비-AdB-2/3-유래인 것이다.

[0104] 당업자에게 공지되고 본 발명에 사용하기에 적합한 다수의 이량체화 도메인의 비제한적 예는 하나 이상의 나선을 함유하는 펩타이드 나선 또는 한 나선, 코일 및 다른 나선 등에 의해 형성된 구조, 코일화된 코일 구조, 예컨대 다수의 세포 표면 시그널링 수용체 내의 이량체화 도메인, 항체의 Fc 영역 또는 힌지 영역, 류신 지퍼, STAT 단백질 N 말단 도메인, FK506 결합 단백질, LexA 단백질 C-말단 도메인, 핵 수용체, FkpA N-말단도메인, 에이. 막시마(*A. maxima*) 유래의 오렌지색 카로티노이드 단백질, 인플루엔자 유래의 M1 기질 단백질, 인플루엔자 바이러스 유래의 뉴라미니다제, 이.콜라이 푸콜로오스 알돌라제; 및 이의 유사물을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. (예컨대, O'Shea, Science. 254: 539 (1991), Barahmand-Pour et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 211: 121-128 (1996); Klemm et al., Annu. Rev. Immunol. 16: 569-592 (1998); Klemm et al., Annu. Rev. Immunol. 16: 569-592 (1998); Ho et al., Nature. 382: 822-826 (1996); 및 Pomeranz et al., Biochem. 37: 965 (1998) 참조). 또 다른 예는 소 유두종바이러스 E2 단백질 중의 잔기 325 내지 410을 포함한다(Dostatni, N., et al., EMBO J 7 (1988) 3807-3816; Haugen, T., et al. EMBO J 7 (1988) 4245-4253; McBride, A., et al., EMBO J 7 (1988) 533-539; McBride, A., et al., Proc Natl Acad Sci USA 86 (1989) 510-514), 타입 I 탈요오드효소(D1): DFLVIYI EEAHASDG W(서열번호 24) 또는 ADFL--YI-EAH--DGW(서열번호 25); HIV-1 캡시드 단백질: QGPKEPFRDYVDRFYKTLRA(서열번호 26); 효모 GCN4의 류신 지퍼 이량체화 모티프: HMKQL D VEEL S NYHL N VARL K VGER(서열번호 27); 예세리치아 콜라이 전사 항종결인자 단백질 중의 류신 지퍼; 및 BgIG: GVTQLMREMLQLIKFQFSLNYQE ESLSYQLVLT(서열번호 28)을 포함한다. 바람직한 양태에서, 이량체화 도메인은 EVSALEK(서열번호 22) 및/또는 KVSALKE(서열번호 23)의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0105] 이하 실시예에 2에 개시된 바와 같은 본원의 교시를 기반으로 한 본 발명의 재조합 폴리펩타이드에서 이량체화 도메인 및 이의 돌연변이체로서 작용할 수 있는 적당한 펩타이드 서열을 동정하는 것은 당업자의 기술 수준 내에서 충분하다. 예를 들어, 재조합 AdB-2/3 섬유 폴리펩타이드의 이량체화는 수크로오스 구배에서의 침강, 트립

신 단백질분해에 대한 내성 및 폴리아크릴아미드 겔에서의 전기영동적 이동성을 포함하는 기준에 따라 평가할 수 있다(Hong and Engler, Journal of Virology 70: 7071-7078(1996)).

- [0106] 재조합 폴리펩타이드는 하나 이상의 비-AdB-2/3 유래의 이량체화 도메인을 함유할 수 있다. 즉, 다양한 양태에서, 재조합 폴리펩타이드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 비-AdB-2/3 유래의 이량체화 도메인을 함유한다. 복수의 도메인이 폴리펩타이드에 존재하는 경우, 각 이량체화 도메인은 동일한 것이 바람직하다.
- [0107] 바람직한 양태에서, 스페이서 펩타이드는 이량체화 도메인과 하나 이상의 축 도메인 사이에 위치한다. 또 다른 바람직한 양태에서, 스페이서 펩타이드는 구조 가요성이 있는 펩타이드이다. 사실상 구조 가요성이 모든 펩타이드가 사용될 수 있다. 한 예로서, 가요성 펩타이드는 아미노산 잔기의 반복, 예컨대 Gly-Gly-Gly-Ser, 또는 임의의 다른 아미노산 잔기의 적당한 반복을 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 항체의 힌지 영역이 사용될 수 있다. 스페이서는 재조합 폴리펩타이드가 이량체화하고 DSG2에 대한 재조합 폴리펩타이드의 결합을 유지하는 능력을 유지하는 임의의 적당한 길이일 수 있다.
- [0108] 바람직한 양태에서, 재조합 AdB-2/3 폴리펩타이드는
- [0109] (a) 각각 Ad3 축 도메인(서열번호 1)을 포함하거나, 이 도메인으로 이루어진 하나 이상의 축 도메인; 및
- [0110] (b) Ad3 마디 도메인(서열번호 6)을 포함하거나, 이 도메인으로 이루어진 마디 도메인을 포함한다.
- [0111] 이 바람직한 양태는 본원에 기술된 임의의 양태 또는 양태들의 조합과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 임의의 적당한 이량체화 도메인이 사용될 수 있고, 그 예로는 EVSALEK(서열번호 22) 및/또는 KVSALKE(서열번호 23)의 하나 이상의 카피를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 이와 마찬가지로, 임의의 적당한 스페이서 펩타이드는 이량체화 도메인과 축 도메인 사이 및/또는 축 도메인과 마디 도메인 사이에 사용될 수 있다. 가장 바람직한 양태에서, 재조합 AdB-2/3 폴리펩타이드는 JO-1(서열번호 20) 또는 이의 다량체(예컨대, 이량체)를 포함하거나, 구성된다.
- [0112] 재조합 폴리펩타이드는 추가 도메인, 예컨대 폴리펩타이드의 분리용 도메인 및/또는 검출 도메인을 포함할 수 있고, 예를 들어 실시예 및 서열번호 21에 제시된 His Tag를 가진 JO-1가 있다. 분리 도메인은 예컨대 재조합 폴리펩타이드의 생산 후 폴리펩타이드의 정제/분리를 용이하게 하기 위해 첨가할 수 있다. 임의의 적당한 분리 도메인이 사용될 수 있고, 그 예로는 HIS, CBP, CYD(공유성이나 해리가 가능한 NorpD 펩타이드), Strp II, FLAG, HPC(단백질 C의 중쇄) 펩타이드 태그, GST 및 MBP 친화성 태그를 포함하나, 이에 국한되지는 않는다. 본원에 사용된, "검출 도메인"은 검출될 수 있는 하나 이상의 아미노산 서열을 의미한다. 임의의 적당한 검출 도메인이 사용될 수 있고, 그 예로는 본질적 형광 단백질(예, 녹색 형광 단백질 및 비생물발광성 화충류 중 유래의 형광 단백질), 보조인자-요구성 형광 또는 발광 단백질(예, 피코빌리단백질 또는 루시페라제) 및 특정 항체 다른 특이적 천연 또는 비천연 결합 프로브, 예컨대 비제한적으로 염료, 효소 보조인자 및 조작된 결합 분자(형광 또는 발광 표지된 것)에 의해 인식가능한 에피토프가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0113] 다른 양태에서, 재조합 폴리펩타이드는 다량체 형태, 예컨대 이량체, 삼량체 등이다. 바람직한 양태에서, JO-1(서열번호 20) 다량체는 각 JO-1 동종삼량체(즉: JO-1 폴리펩타이드는 마디 도메인의 삼량체화를 통한 동종삼량체이다) 중의 이량체화 도메인을 통한 이량체화에 의해 형성된 JO-1 이량체를 포함한다. 다량체 형태(예컨대, 이량체)에서, 재조합 폴리펩타이드는 AdB-2/3 섬유 다량체를 포함하고, 앞서 논한 본 발명의 다양한 방법에 사용될 수 있다. 당업자라면 잘 알고 있을 것처럼, 이러한 다량체는 본 발명의 동일한 재조합 폴리펩타이드의 다량체를 포함하거나, 또는 본 발명의 다른 재조합 폴리펩타이드의 다량체를 포함할 수 있다. 한 양태에서, 이량체화 도메인은 다량체의 각 재조합 폴리펩타이드 형성 부분이 동일하다. 다른 양태에서, 이량체화 도메인은 다량체의 각 재조합 폴리펩타이드 형성 부분이 상이하다. 다른 양태에서, 축 및/또는 마디 도메인은 다량체의 각 재조합 폴리펩타이드 형성 부분이 동일하다. 다른 양태에서, 축 및/또는 마디 도메인은 다량체의 각 재조합 폴리펩타이드 형성 부분이 상이하다.
- [0114] AdB-2/3 섬유 다량체화는 당업자에게 공지된 방법에 따라 측정될 수 있다. 예를 들어, 재조합 AdB-2/3 섬유 작제물의 다량체화는 수크로오스 구배에서의 침강, 트립신 단백질분해에 대한 내성 및 폴리아크릴아미드 겔에서의 전기영동적 이동성을 포함하는 기준에 따라 평가할 수 있다(Hong and Engler, Journal of Virology 70: 7071-7078(1996)). 전기영동적 이동성과 관련하여, 섬유 다량체는 매우 안정한 복합체이고, 샘플이 SDS-PAGE 전에 비등처리되지 않으면 다량체와 일치하는 분자량으로 이동할 것이다. 하지만, 비등처리 시, 다량체 구조는 붕괴되고 그 후 단백질은 단백질 단량체와 일치하는 크기로 이동한다.

- [0115] 재조합 폴리펩타이드 또는 이의 다량체 형은 용액으로 보관되거나 또는 동결될 수 있다.
- [0116] 다른 양태에서, 본 발명의 재조합 폴리펩타이드는 상피 조직과 관련된 장애에 대한 하나 이상의 치료제와 배합된다(예컨대, 접합된다). 이러한 접합체는 예컨대 본 발명의 치료 방법에 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드를, 예컨대 공유 결합 또는 화학적 가교에 의해, 당해의 치료제에 접합시키는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 본 발명의 양태에 따른 접합체를 형성하기 위해, 임의의 적당한 치료제, 예컨대 비제한적으로 앞서 개시된 것, 뿐만 아니라 중양 간질 분해 화합물, 예컨대 킬렉신이 사용될 수 있다. 바람직한 양태에서, 치료제는 항종양 치료제이고 본원에 기술된 화학요법제 또는 항종양 모노클로날 항체를 포함한다. 또 다른 바람직한 양태에서, 항종양 치료제는 트라스투주마브, 세투믹시마브, 페투주마브, 아포마브, 코나투무마브, 렉사투무마브, 베바시주마브, 베바시주마브, 데노수마브, 자놀리무마브, 린투주마브, 에드레콜로마브, 리톡시마브, 티실리무마브, 토시투모마브, 알렘투주마브, 에프라투주마브, 미투모마브, 켄투주마브 오조가미신, 오레고보마브, 켄투모마브 다클리주마브, 파니투무마브, 카툼악소마브, 아파투무마브 및 이브리투모마브로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 항체를 포함한다.
- [0117] 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드 또는 임의의 양태를 암호화하는 핵산을 제공한다. 핵산은 RNA 또는 DNA를 포함할 수 있고, 본원의 교시를 기반으로 하여 표준 분자 생물학적 기술로 제조 및 분리할 수 있다. 핵산은 암호화된 단백질의 발현 및/또는 정제를 촉진하는데 유용한 추가 도메인, 예컨대 비제한적으로 폴리A 서열, 변형된 코작 서열, 및 에피토프 태그, 엑스포트 시그널 및 분비 시그널, 핵 국재화 시그널 및 형질막 국재화 시그널을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0118] 추가 관점에서, 본 발명은 프로모터에 유효하게 결합된 본 발명의 임의의 관점의 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. "재조합 발현 벡터"는 유전자 산물의 발현을 유효하게 할 수 있는 임의의 프로모터에 핵산 암호 영역 또는 유전자를 유효하게 결합한 벡터를 포함한다. 개시된 핵산을 포유동물계에서 발현 유도하는데 사용되는 프로모터 서열은 구성형(다양한 임의의 프로모터에 의해 구동되는 것, 예컨대 CMV, SV40, RSV, 액틴, EF, 이에 제한되는 것은 아니다), 또는 유도형(임의의 다수의 유도형 프로모터에 의해 구동되는 것, 예컨대 테트라 사이클린, 엑디손, 스테로이드-반응성, 이에 제한되는 것은 아니다). 원핵생물 세포를 형질감염시키는데 사용되는 발현 벡터의 작제는 또한 당업계에 공지되어 있고, 이에 따라 표준 기술을 통해 수행할 수 있다(예컨대, Sambrook, Fritsch, and Maniatis, in: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J. 및 Ambion 1998 Catalog (Ambion, Austin, TX 참조). 발현 벡터는 에피솜으로서 또는 숙주 염색체 DNA에 통합에 의해 숙주 유기체에서 복제할 수 있으며, 주어진 용도에 적합한 것으로 간주되는 임의의 다른 성분, 예컨대 선택 마커, 예를 들어 항생제 내성 유전자(이에 국한되지 않는다)를 포함할 수 있다.
- [0119] 또 다른 관점에서, 본 발명은 본원에 개시된 재조합 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포 및 이의 자손을 제공하며, 상기 숙주 세포는 원핵성 또는 진핵성일 수 있다. 세포는 일시적으로 또는 안정하게 형질감염될 수 있다. 이와 같이 원핵 세포 또는 진핵 세포 내로 발현 벡터의 형질감염은 당업계에 공지된 임의의 기술, 예컨대 표준 박테리아 형질전환, 인산칼슘 공침전, 전기침투 또는 리포솜 매개-, DEAE 텍스트란 매개-, 폴리양이온 매개-, 바이러스 매개의 형질감염을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다(예컨대, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2nd Ed. (R.I. Freshney, 1987, Liss, Inc. New York, NY 참조). 다량의 폴리펩타이드를 생산하기 위해 발현 벡터로 형질감염된 배양된 세포를 이용하는 기술은 당업계에 공지되어 있다.
- [0120] 다른 관점에서, 본 발명은
- [0121] (a) AdB-2/3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 등가물; 및
- [0122] (b) 약학적 허용성 담체를 함유하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0123] AdB-2/3 섬유 다량체는 본 발명의 임의의 관점, 양태 또는 양태들의 조합에 따라 본원에 기술된 바와 같은 임의의 다량체일 수 있다. 다양한 바람직한 양태에 따르면, AdB-2/3 섬유 다량체는 AdB-2/3 비리온, AdB-2/3 캡시드, AdB-2/3 PtDd, 또는 본 발명의 재조합 AdB-2/3 섬유 다량체 또는 이의 기능성 등가물을 포함한다. 다양한 다른 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 Ad3 섬유 다량체, Ad7 섬유 다량체, Ad11 섬유 다량체, Ad14 섬유 다량체, Ad14a 섬유 다량체 및 이의 배합물 또는 키메라로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 바람직한 양태에서, 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 다량체는 AdB-2/3 PtDd(예컨대, Ad3 PtDd)를 포함하거나 구성된다. 다른

바람직한 양태에서, 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 다량체는 본원에 개시된 본 발명의 조성물의 임의의 양태 또는 양태들의 조합, 예컨대 J0-1(서열번호 20) 이량체를 포함하거나, 구성된다.

[0124] 약학 조성물은 추가로 상피 조직과 관련된 장애를 치료하는 하나 이상의 치료제, 예컨대 비제한적으로 앞서 개시한 것을 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서, 치료제는 항종양 치료제이고 본원에 기술된 바와 같은 화학요법제 또는 항종양 모노클로날 항체를 포함한다. 바람직한 다른 양태에서, 항종양 치료제는 트라스투주마브, 세투믹시마브, 페투주마브, 아포마브, 코나투무마브, 렉사투무마브, 베바시주마브, 베바시주마브, 데노수마브, 자놀리무마브, 린투주마브, 에드레콜로마브, 리톡시마브, 티실리무마브, 토시투모마브, 알렘투주마브, 에프라투주마브, 미투모마브, 켈투주마브 오조가미신, 오레고보마브, 켈투모마브 다클리주마브, 파니투무마브, 카툼악소마브, 아파투무마브 및 이브리투모마브로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 항체를 포함한다.

[0125] 약학적 허용성 담체는 비독성, 생체화합성이고 다량체(및 이와 배합되는 임의의 다른 치료제)의 생물학적 활성에 유해 영향을 미치지 않도록 선택한다. 펩타이드용 약학적 허용성 담체의 예는 미국 특허 5,211,657(Yamada)에 기술되어 있다. 조성물은 고체, 반고체, 젤, 액체 또는 기체 형태의 제제, 예컨대 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 좌약, 흡입제, 및 주사제로 조제되어, 경구, 비경구 또는 외과적 투여에 허용될 수 있다. 주사, 주입 또는 이리게이션(irrigation)을 통한 비경구 전달 및 국소 전달을 위한 적당한 담체는 증류수, 생리학적 인산염완충식염수, 노말 또는 젯산첨가된 링거액, 텍스트로스 용액, 헵크스 용액 또는 프로판디올을 포함한다. 또한, 살균된 고정 오일을 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수도 있다. 이를 위해, 임의의 생체화합성 오일, 예컨대 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 이용할 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산이 주사제 제조에 사용되기도 한다. 담체 및 제제는 액체, 현탁액, 중합성 또는 비중합성 겔, 페이스트 또는 연고로서 혼합될 수 있다. 담체는 또한 제제(들)의 전달을 지속(즉, 연장, 지연 또는 조절)시키거나 또는 치료제(들)의 전달, 흡수, 안정성 또는 약동학을 증진시키는 전달 매개체를 포함할 수 있다. 이러한 전달 매개체는 비제한적 예로서, 단백질, 리포솜, 탄수화물, 합성 유기 화합물, 무기 화합물, 중합체성 또는 공중합체성 하이드로겔 및 중합체성 미셀로 구성된 마이크로입자, 마이크로구, 나노구, 또는 나노입자를 포함할 수 있다. 적당한 하이드로겔 및 미셀 전달 시스템은 국제공개번호 WO 2004/009664 A2에 개시된 PEO:PHB:PEO 공중합체 및 공중합체/사이클로덱스트린 복합체, 및 미국 공개번호 2002/0019369 A1에 개시된 PEO 및 PEO/사이클로덱스트린을 포함한다. 이러한 하이드로겔은 의도한 작용 부위에 국소로 주사될 수 있거나, 또는 지속 방출 저장소(depot)를 형성하도록 피하 또는 근육내로 주사될 수도 있다.

[0126] 척수강내(IT) 또는 뇌실내(ICV) 전달을 위해, 적당한 멸균 전달 시스템(예, 액체; 겔, 현탁액 등)을 사용하여 조성물을 투여할 수 있다. 비-펩타이드성 제제의 경우 투여 시에는 조성물은 수크로오스, 옥수수전분 또는 셀룰로오스와 같은 불활성 충전제 또는 희석제 중에서 운반될 수 있다.

[0127] 본 발명의 조성물은 또한 생체용화성 부형제, 예컨대 분산제 또는 습윤제, 현탁제, 희석제, 완충제, 침투 증진제, 유화제, 결합제, 점증제, 향미제(경구 투여용)를 함유할 수 있다. 제형 예는 물, 오일, 식염수, 글리세롤 또는 에탄올과 같은 멸균 액체일 수 있는 약학적 담체와 생리적 허용성 희석제 중의 다량체 용액 또는 현탁액을 주사 투여량으로서 비경구 투여할 수 있다. 또한, 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 계면활성제, pH 완충 물질 등이 변형 폴리펩타이드를 함유하는 조성물에 존재할 수도 있다. 약학 조성물의 추가 성분은 석유(예컨대, 동물, 식물 또는 합성 기원), 예컨대 대두유 및 광유를 포함한다. 일반적으로, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜이 주사 용액의 바람직한 액체 담체이다.

[0128] 또한, 약학 조성물은 다량체와 다른 치료제(존재하는 경우)를 지속 또는 박동 방출하게 하는 방식으로 조제할 수 있는 저장소 주사 또는 이식 제제 형태로 투여할 수 있다.

[0129] 약학 조성물은 또한 본 발명의 폴리펩타이드 외에 (a) 동결방지제; (b) 계면활성제; (c) 증량제(bulking agent); (d) 긴장성 조정제; (e) 안정제; (f) 보존제 및/또는 (g) 완충액을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 약학 조성물의 완충액은 트리스 완충액, 히스티딘 완충액, 인산염 완충액, 구연산염 완충액 또는 아세트산염 완충액이다. 약학 조성물은 또한 동결방지제, 예컨대 수크로오스, 소르비톨 또는 트레할로스를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 약학 조성물은 보존제, 예컨대 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄, 클로로헥시딘, 페놀, m-크레졸, 벤질 알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로로부탄올, o-크레졸, p-크레졸, 클로로크레졸, 페닐머큐릭 니트레이트, 티메로살, 벤조산 및 이의 다양한 혼합물을 포함한다. 다른 양태에서, 약학 조성물은 증량제, 예컨대 글리신을 포함한다. 또 다른 양태에서, 약학 조성물은 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트-20, 폴리소르베이트-40, 폴리소르베이트-60, 폴리소르베이트-65, 폴리소르베이트-80, 폴리소르베이트-85, 폴록사머-188, 소르비탄 모노라우레이트, 소르비탄 모노팔미테이트, 소르비탄 모노스테아레이트, 소르비탄 모노올레이트, 소르비탄 트리

라우레이트, 소르비탄 트리스테아레이트, 소르비탄 트리올레이트 또는 이의 배합물을 포함한다. 약학 조성물은 또한 긴장성 조정제, 예컨대 사람 혈액과 실질적으로 등장성 또는 등삼투압성인 체형을 제공하는 화합물을 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 약학 조성물은 추가로 안정제, 예컨대 당해의 단백질과 배합 시 동결건조 또는 액체 형태의 당해의 단백질의 화학적 및/또는 물리적 불안정성을 실질적으로 방지하거나 감소시키는 분자를 포함한다. 안정제의 예로는 수크로오스, 소르비톨, 글리신, 이노시톨, 염화나트륨, 메티오닌, 아르기닌 및 아르기닌 염산염을 포함한다.

[0130] 약학 조성물은 임의의 적당한 방식으로 포장될 수 있다. 한 양태에서, 약학 조성물은 AdB-2/3 섬유 다량체의 용기(예, 바이엘)를 함유하는 키트로 포장된다. 바람직한 양태에서, 키트는 추가로 동일 용기 또는 다른 용기(예컨대, 바이엘)에 AdB-2/3 섬유 다량체와 함께 피검체에게 투여할 치료제, 진단제 또는 조정제를 함유한다. 임의의 적당한 AdB-2/3 섬유 다량체가 키트에 사용될 수 있으며; 가장 바람직한 양태에 따르면, AdB-2/3 섬유 다량체가 JO-1의 다량체(예컨대, 이량체)인 것이다.

[0131] 다른 관점으로서, 본 발명은 (a) 본 발명에 따른 하나 이상의 재조합 폴리펩타이드/AdB-2/3 섬유 다량체, 분리된 핵산, 재조합 발현 벡터 및/또는 숙주 세포; 및 (b) 상피 조직과 관련된 장애를 치료하는데 사용되는 지침서를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 추가로 본 발명의 방법에 사용하기 위한 치료제를 포함할 수 있다.

[0132] 다른 관점으로서, 본 발명은 상피 조직과 관련된 장애의 치료, 상피 조직으로 물질 전달의 개선, DSG2를 발현하는 조직으로 물질 전달의 개선, 조직에서 EMT 유도 및/또는 AdB-2/3 감염의 치료 중 하나 이상에 대한 후보 화합물의 동정 방법으로서, (a) AdB-2/3 섬유 다량체를, DSG2에 대한 다량체 결합을 촉진시키는 조건 하에 DSG2에 접촉시키되, 이 접촉은 하나 이상의 시험 화합물의 존재 하에 수행되는 단계; 및 (b) 대조군과 비교하여, DSG2에 대한 결합에 대해 AdB-2/3 섬유 다량체와 경쟁하는 양성 시험 화합물을 동정하는 단계를 포함하고, 상기 양성 시험 화합물이 상피 조직과 관련된 장애의 치료, 상피 조직으로 물질 전달의 개선, DSG2를 발현하는 조직으로 물질 전달의 개선, 조직에서 EMT 유도 및/또는 AdB-2/3 감염의 치료 중 하나 이상에 대한 후보 화합물인 동정방법을 제공한다.

[0133] DSG2에 대한 결합에 있어서 AdB-2/3 섬유 다량체와 경쟁하는 양성 시험 화합물은 DSG2와의 상호작용을 통해 세포간 연결을 일시적으로 개방시키는 후보 화합물이다. DSG2와의 상호작용을 통해 세포간 연결을 일시적으로 개방시키는 화합물의 능력을 입증하는 추적 분석은 이하 실시예에 개시되는 연구를 비롯하여, 이에 국한되지 않는 임의의 적당한 방법에 의해 수행될 수 있다. 이와 같이 상피 조직과 관련된 장애의 치료용, 상피 조직으로 물질의 전달 개선용, DSG2를 발현하는 조직으로 물질의 전달 개선용 또는 조직에서 EMT의 유도용으로 동정된 화합물은 본 발명의 임의의 방법에서 AdB-2/3 다량체의 대체물로서 사용될 수 있다. 또한, AdB-2/3은 기도 감염(약간의 열)과 인두결막염을 유발하는 중요한 사람 병원균을 나타낸다. 따라서, AdB-2/3 감염을 치료할 수 있는 화합물은 유용할 것이다. 본원에 개시된 바와 같이, AdB-2/3에 의해 사용된 주요 고친화성 수용체로서 DSG2 및 이에 따라 DSG2에 대한 AdB-2/3 결합을 감소시킬 수 있는 화합물은 AdB-2/3 감염의 발생을 치료하거나 제한하는 후보 화합물이다.

[0134] 이 관점에서, AdB-2/3 다량체는 임의의 양태 또는 양태의 조합에서 개시된 임의의 AdB-2/3 다량체일 수 있다. 따라서, 다양한 비제한적 양태에서, AdB-2/3 다량체는 AdB-2/3 비리온, AdB-2/3 캡시드, AdB-2/3 12면체 입자(PtDd) (복제 동안 AdB-2/3에 의해 생산된 서브바이러스성 12면체 입자), 재조합 AdB-2/3 섬유 다량체(예컨대 이하 임의의 양태 또는 양태들의 조합에 개시된 것이나, 이에 국한되지는 않음) 및 이의 기능성 증가물일 수 있다. 바람직한 양태에서, 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 다량체는 AdB-2/3 PtDd, 예컨대 Ad3 PtDd를 포함하거나 구성된다. 다른 바람직한 양태에서, 하나 이상의 AdB-2/3 섬유 다량체는 이하에 기술되는 본 발명의 조성물의 임의의 양태 또는 양태들의 조합을 포함하거나, 구성된다. 또 다른 바람직한 양태에서, AdB-2/3 섬유 다량체는 JO-1(서열번호 20) 이량체 또는 이의 기능성 증가물을 포함하거나 구성된다.

[0135] 임의의 적당한 대조군이 사용될 수 있고, 그 예로는 시험 화합물 없이 DSG2에 결합하는 AdB-2/3 다량체가 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0136] 한 양태에서, DSG는 재조합 DSG2를 포함한다. 다른 양태에서, 이 방법은 세포 표면에서 DSG2(내인적 또는 재조합적)를 발현하는 세포를 사용한다.

[0137] 한가지 비제한적 양태에서, 고정된 재조합 DSG2를 함유하는 센서를 사용한 표면 플라즈몬 공명(SPR)은 DSG2 경쟁 연구와 함께, DSG2에 대한 AdB-2/3 섬유 다량체 결합과 경쟁하는 후보 화합물을 동정하는데 사용된다. 추가 예시적 연구, 예컨대 기능 상실 및 획득의 분석은 실시예 1에 상세하게 설명된다.

- [0138] 다른 양태에서, 동정은 실시예 1에 개시된 바와 같이 DSG2를 발현하는 상피 세포를 형질도입시키는 기능성 AdB-2/3 비리온의 능력 감소로서, 시험 화합물의 결합 감소능을 검출하는 형질도입 연구를 포함한다.
- [0139] 다른 양태에서, DSG2-발현성 세포 추출물은 전기영동적으로 분리되어 웨스턴 블로팅되고, 표지된 AdB-2/3 섬유 다량체를 사용하여, 시험 화합물의 존재 하에 웨스턴 블롯을 탐침한다. 다른 양태에서, 점 블롯 분석도 사용할 수 있고, 그 예는 문헌[Wang et al., J. Virology(2007) 81: 12785-12792; 및 Wang et al.(2008) 82: 10567-10579]에 기술되어 있다.
- [0140] AdB-2/3 감염을 치료하기 위한 후보 화합물을 동정하는 기술의 추가 예는 이하 실시예에 제시된다.
- [0141] 시험 화합물이 폴리펩타이드 서열을 포함할 때, 이러한 폴리펩타이드는 화학적으로 합성되거나 재조합 발현될 수 있다. 재조합 발현은 앞서 개시한 바와 같은 당업계의 표준 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 이러한 발현 벡터는 박테리아 발현 벡터 또는 바이러스 발현 벡터를 포함할 수 있고, 이러한 숙주 세포는 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 고체상, 액체상 또는 펩타이드 축합 기술의 공지된 기술, 또는 이의 임의의 조합 기술을 이용하여 제조한 합성 폴리펩타이드는 천연 아미노산 및 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 펩타이드 합성에 사용된 아미노산은 표준 탈보호, 중화, 커플링 및 세척 프로토콜에 사용되는 표준 Boc(Na-아미노 보호된 Na-t-부틸옥시카르보닐)아미노산 수지, 또는 표준 염기-불안정성 Na-아미노 보호된-9-플루오레닐메톡시카르보닐(Fmoc) 아미노산일 수 있다. Fmoc 및 Boc Na-아미노 보호된 아미노산은 모두 시그마, 캠프리지 리서치 바이오 케미컬 또는 당업자에게 익숙한 여타 다른 화학 회사에서 입수할 수 있다. 또한, 폴리펩타이드는 당업자에게 익숙한 다른 Na-보호 기로 합성될 수 있다. 고체상 펩타이드 합성은 당업자에게 익숙한 기술로 수행할 수도 있고, 또는 자동 합성기 등을 사용하여 제공할 수도 있다.
- [0142] 시험 화합물이 항체를 포함하는 경우, 이러한 항체는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 항체는 사람화된 형태, 완전 사람 형태 또는 쥐 형태의 항체일 수 있다. 이러한 항체들은 공지된 방법, 예컨대 문헌 [Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)]에 기술된 방법으로 제조할 수 있다.
- [0143] 시험 화합물이 핵산 서열을 포함하는 경우, 이러한 핵산은 역시 화학적으로 합성되거나 또는 재조합 발현될 수 있다. 재조합 발현 기술은 당업자에게 공지되어 있다(예컨대, Sambrook, et al., 1989, 상기 문헌설명 참조). 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있고, 1본쇄 또는 2본쇄일 수 있다. 마찬가지로, 핵산은 당업계의 표준 기술을 사용하여 수동 또는 자동 반응에 의해 화학적 또는 효소적으로 합성할 수 있다. 화학적으로 또는 시험관내 효소적 합성에 의해 합성된 경우, 핵산은 세포로 도입시키기 전에 정제할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 용매 또는 수지 추출, 침전, 전기영동, 크로마토그래피 또는 이의 조합에 의해 혼합물로부터 정제될 수 있다. 대안적으로, 핵산은 샘플 처리로 인한 손실을 피하기 위해 최소 정제 하에 또는 정제 없이 사용될 수 있다.
- [0144] 시험 화합물이 폴리펩타이드, 항체 또는 핵산 외에 다른 화합물을 포함하는 경우, 이 화합물은 유기 화학적 합성을 수행하는 당업계의 다양한 임의의 방법으로 제조할 수 있다.
- [0145] 실시예 1. 데스모글레인 2는 아데노바이러스 혈청형 3, 7, 11 및 14의 수용체이다.
- [0146] 요약
- [0147] 본 발명자들은 아데노바이러스 (Ad) 혈청형 Ad3, Ad7, Ad11 및 Ad14에 의해 사용된 일차 고친화성 수용체로서 데스모글레인 2 (DSG2)를 동정하였다. 이들 혈청형은 기도 감염을 일으키는 중요한 인간 병원체를 대표한다. 상피 세포에서 DSG2와 결합하는 아데노바이러스는 상피세포에서 중간엽세포로의 전환 과정을 유사하게 진행하여 세포간연접의 일시적 개방을 유도한다. 이것은 수용체 (예, CD46 및 Her2/neu)로의 접근을 촉진하며 세포간연접에 갇힌다. 완전한 비리온이외에도, 재조합 Ad3 PtDd를 이용한 연구에서 밝혀진 바와 같이, 바이러스 복제동안에 과량의 바이러스 펜톤과 섬유에 의해 형성된 12면체 입자 (PtDd)가 DSG2에 의해 매개된 세포간연접의 개방을 일으킬 수 있다. 본 발명자들의 발견은 아데노바이러스 생물학 및 병리학에 새로운 정보를 제공한 것으로 암 치료에 응용될 것으로 전망된다.
- [0148] 소개
- [0149] 인간 아데노바이러스 (Ads)는 현재 55가지의 혈청형을 포함한 여섯 종 (A에서 F까지)으로 분류된다. 대부분의 Ad 혈청형은 일차 부착 수용체로서 콕사키-아데노바이러스-수용체 (CAR)을 이용한다¹. 그러나, 이것은 B종 Ad 혈청의 경우엔 해당하지 않는다. 최근에 본 발명자들은 B종 Ad를 이의 수용체 이용에 근거하여 새로운 그룹화

를 제시하였다². 그룹 1 (Ad16, 21, 35, 50)은 거의 독점적으로 CD46을 수용체로서 이용하고; 그룹 2 (Ad3, Ad7, 14)는 CD46은 아니고 수용체 X로 잠정적으로 명명된 미확인 공통 수용체를 공유하며; 그룹 3 (Ad11)은 CD46과 우선적으로 상호작용하지만 또한 CD46이 차단된 경우 수용체 X를 이용한다.

[0150] B종 Ad는 흔한 인간 병원체이다. 2005년 이후로 혈청형 Ad3, Ad7 및 Ad14를 포함하여 다양한 B종 혈청형의 동시 출현이 관찰되었다. 2007년에 미국 및 아시아에서 Ad14의 새로운 고병원성이고 보다 더 악성인 스트레인으로서 Ad14a가 발견되었다³⁻⁴. 본 발명자들은 최근에 Ad14a가 이의 수용체 이용 관점에서 B종 그룹 2 Ad에 속한다는 것을 증명하였다⁵. 본 발명자들은 총괄하여 모든 수용체 X-이용 혈청형 (Ad3, Ad7, Ad14, Ad14a 및 Ad11)을 AdB-2/3으로 지칭한다.

[0151] AdB-2/3은 특히 상피 기원의 종양과 관련하여 유전자 전달 벡터로서의 잠재성을 갖는다⁶. 상피 세포는 몇 가지 세포간연접 (밀착 연접, 어드헤렌스연접, 갭연접 및 데스모솜)을 유지하며 이의 특징은 흔히 상피암 자체 및 암 세포주에서 보존된다⁷. CAR과 CD46 둘 다는 상피 암 세포의 세포간연접에 간혀 있고 이들 부착 수용체를 이용하는 Ad에 노출되지 않는다⁸⁻⁹. 반대로, AdB-2/3은 상피 암 세포를 효율적으로 감염시키는데, 상피에서 중간엽 세포로의 전환 (EMT)과 유사한 과정의 유도를 통해 부분적으로 완성된다⁸. EMT는 상피 세포가 세포간연접과 같은 특징을 상실하고 중간엽세포들의 특징을 취득하는 세포이형분화 (cellular transdifferentiation) 프로그램이다¹⁰. AdB-2/3의 또 다른 뚜렷한 특징은 이들의 복제 과정에서 Ad 섬유와 펜톤 염기로 구성된 아바이러스 12면체 입자를 생산할 수 있는 능력이다¹¹. 펜톤-12면체 (PtDd)는 완전한 길이의 펜톤 염기 단백질로부터 응집할 수 없지만 아미노산 잔기 37 과 38 사이의 단백질분해에 의한 자발적인 N-말단 절단부를 필요로 한다. 이러한 절단 위치는 Ad3, Ad7, Ad11 및 Ad14에서 보존되어 있지만 Ad2 및 Ad5에서는 존재하지 않는다 (도 1a). Ad3의 경우 PtDd는 과다한 양으로 형성되고 (감염성 바이러스 당 5.5×10^6 PtDd) PtDd가 바이러스 도피와 확산에 기여한다는 가설이 설정되었다¹³.

[0152] 수용체 X를 동정하고자 하는 일차 시도는 1995년으로 거슬러 올라간다. 이들의 최초 연구에 따르면 Ad3의 약 130 kDa 헬라세포 단백질과의 상호작용이 밝혀졌다¹⁴. 최근에 CD46, CD80 및/또는 CD86과 같은 수용체 X에 대한 몇 가지 후보군이 제시되었다¹⁵⁻¹⁸. 그러나, 본 발명자들과 다른 연구자들은 지금까지 그들 단백질이 AdB-2/3의 고친화성 수용체로서 작용할 수 있음을 증명할 수 없었다^{2,19-23}.

[0153] 본 발명자들은 수용체 X의 탐침으로서 Ad3 비리온 및 재조합 Ad3 PtDd를 이용한 현 연구에서 AdB-2/3 혈청형의 고친화성 수용체로서 데스모글레인 2 (DSG2)를 동정하였다. DSG-2 는 캐드헤린 단백질 계열에 속하는 칼슘-결합 횡단막 당단백질이다. 상피 세포에서 DSG-2는 세포-세포 접착 구조의 요소들 중 하나이다²⁴. DSG-2의 세포질 꼬리 부분은 세포 접착과 세포간연접/세포형태의 조절인자와 직접적으로 접촉하는 일련의 단백질들과 상호작용한다²⁵. DSG-2는 위암²⁶, 편평세포암종²⁷, 흑색종²⁸, 전이성 전립선암²⁹ 및 방광암³⁰ 과 같은 일련의 상피 악성 종양에서 과발현된다고 보고되었다.

[0154] 결과

[0155] DSG2는 AdB-2/3 바이러스의 수용체이다. 본 발명자들의 이전 연구에 따르면 Ad3은 고밀도 세포 수용체와 나노물 친화성으로 결합하는 것으로 밝혀졌다². Ad3 결합은 트립신에 민감하였고 EDTA에 의해 차단될 수 있었다. 이것은 결합에 이가 양이온이 필요하다는 것을 암시한다. 일차로 본 발명자들은 세포와의 고친화성 결합을 매개하는 Ad3 캡시드 단백질을 동정하고자 시도하였고 이후 고친화성 수용체 X를 조사하는데 사용하였다. 특히 CAR에 Ad5의 고친화성 결합 및 CD46에 Ad35의 고친화성 결합은 상응하는 섬유 마디에 의해 매개된다³¹. 그러나, 본 발명자들의 이전 연구에서 단일 재조합 타이머 Ad3 마디가 상당한 고농도로 사용되었을 때조차 Ad3 바이러스 결합을 완전히 차단할 수 없음이 밝혀졌으며, 이것은 다른 또는 추가의 캡시드 잔기가 Ad3 결합에 연루되어 있음을 가리킨다³². 결과적으로, 본 발명자들은 Ad3 결합에 대한 경쟁을 위해 Ad3 펜톤 염기로 구성된 재조합 12면체 (BsDd) 또는 Ad3 펜톤 염기와 섬유로 구성된 재조합 12면체 (PtDd)를 사용하였다 (도 1b)³³. 본 발명자들은 PtDd가 세포에 Ad3의 부착을 차단하였으나 BsDd는 차단하지 못했음을 밝혀냈다 (도 2a). 또한, PtDd는 CD46

이 또한 차단되는 경우 다른 AdB-2/3 (예, Ad14, Ad14a, Ad11)의 결합을 차단하였다. 그러나, PtDd는 Ad5의 결합을 억제하지 못했고 단지 Ad35 결합을 부분적으로 차단하였다 (도 2a, 도 1c). PtDd와 함께 세포의 예비배양은 BsDd와 혼합된 Ad3 마디보다 더 양호한 Ad3 결합 억제를 제공하였다 (도 1d). 또한, PtDd가 Ad3과 경쟁하는 능력이 형질도입 연구에서 검증되었는데, PtDd는 Ad3 벡터 (Ad3-GFP)를 효율적으로 차단하였으나 Ad35 벡터 (수용체로서 CD46을 이용하는 Ad35-GFP)의 형질도입을 차단하지 못했다 (도 2b). Ad3-GFP (도 1e) 및 Ad35-GFP³⁴는 E3 영역내로 삽입된 CMV-GFP 발현 카세트를 함유한 야생형 Ad3- 및 Ad35-기본 벡터이다.

[0156] 수용체 X 동정을 위한 최적의 세포주를 선택하기 위해, 본 발명자들은 몇 가지 인간 및 동물 세포주에 대한 Ad3 바이러스 결합을 비교하였다 (도 2c). Ad3은 설치류 세포와 결합하지 않았는데 이것은 수용체 X가 그들 세포에서 발현되지 않거나 Ad3에 접근하지 못한다는 것을 의미한다. 처음 시험된 10종의 인간 세포주 (헬라, K562, SKOV3, 293, HT29, SKHep1, Saos, Y79, 라모스) 가운데 Ad3 결합은 단지 라모스 (인간 Burkitt 림프종) 세포에서만 나타나지 않았다.

[0157] Ad 수용체 후보군을 동정하기 위해, 헬라 세포막 단백질을 용해시키고, 폴리아크릴아미드 겔에서 분리하여 블롯팅하였다. 블롯을 바이러스 입자와 혼성화시키고 바이러스 섬유 마디 특이적 항체로 결합을 가시화하였다. 특정 겔 밴드를 절개하고 이중질량 분광분석기 (MS/MS)로 분석하였다. 일차로, 본 발명자들은 이 검정이 공지된 Ad 수용체 CD46을 검출할 수 있는지 여부를 시험하였다. 필터를 CD46-표적 Ad5/35++ 비리온³⁵와 배양했을 때, CD46과 일치하는 단일 밴드가 발견되었다 (도 2d). Ad3 비리온과 필터의 배양으로 160 kDa 및 90 kDa의 분자량을 갖는 두개의 밴드가 나타났다 (도 2e). 이들 두 밴드 이외에, Ad3 PtDd가 또한 130 kDa의 범위에 있는 헬라 단백질과 반응하였다. 160과 190 kDa 둘 다는 라모스 세포, 즉 Ad3과 결합하지 않는 세포에 존재하지 않았다. 약 130 kDa PtDd-결합 밴드가 헬라 세포와 라모스 세포 모두에서 나타났으며, 이것은 그 밴드가 Ad3 바이러스 수용체가 아님을 가리킨다. 160 kDa 밴드의 MS/MS 분석 결과 인간 데스모글레인 2 (DSG2)와 일치하는 14종의 펩타이드가 동정되었다 (도 2f). 헬라 막단백질의 IP/웨스턴 분석은 160 및 90 kDa 밴드 둘 다 DSG2-특이적 항체에 의해 인지되었음을 증명하였다 (도 2e, 우측 패널). 이 결과는 이전의 웨스턴 블롯 연구와 일치하는 것으로 160 kDa 밴드가 완전한 크기의 DSG2를 나타내고 90 kDa 밴드가 세포내 도메인, 횡단막 도메인 및 막근접 세포외 앵커 도메인이 없는 DSG2 변이체임을 보여준다³⁶⁻³⁷.

[0158] 고정된 제조합 인간 DSG2를 함유한 센서를 이용한 BIAcore 표면 플라스몬 공명 (SPR) 연구는 Ad3 비리온이 DSG2와 상호작용하였으나 Ad2 또는 Ad5는 그렇지 못했음을 증명하였다 (도 2g). 제조합 PtDd는 DSG2와 결합하였으나 BsDd 입자는 결합하지 않았다 (도 2h). PtDd-DSG2 상호작용의 K_D (평형해리상수)는 2.5 nM이었다. 고정된 DSG2와의 PtDd 결합은 가용성 DSG2가 PtDd와 경쟁한 사실에 의해 증명되는 바와 같이 특이적이었다 (데이터 제시되지 않음). 또한, 결합 역학의 SPR 분석은 Ad3 섬유 마디가 DSG2로부터 해리됨을 보여주었는데, 이것은 섬유 축내에 추가적인 DSG2 결합 부위의 존재 및/또는 DSG2와의 고친화성 결합을 위한 섬유 다량체화의 필요성을 제시한다 (도 2i 및 도 1d).

[0159] 세포주에 대해 기능손실 및 기능획득 연구를 수행하여 AdB-2/3 결합/감염에 대한 중요 수용체로서 DSG2를 평가하였다. 제조합 DSG2 단백질은 헬라세포에 Ad3뿐만 아니라 다른 AdB2/3 Ad (즉, Ad7, Ad14a 및 Ad11)의 결합을 차단하였으나 Ad5 및 Ad35의 결합을 차단하지 못했다 (도 3a). Ad3-GFP 감염은 DSG2 단백질에 의해 효율적으로 억제되었으나 캐드헤린 상위계열의 다른 구조적으로 연관된 일원 (데스모글레인 1-DSG1 및 데스모콜린 1-DSC1)에 의해 억제되지 않았다³⁸ (도 3b). 또한, 이 연구는 DSG2 단백질이 CD46-표적 벡터 (Ad35-GFP)에 의한 형질도입에 영향을 미치지 않았음을 보여주었다. 세포의 도메인 3 및 4에 대한 모노클로날 항체 (mAb)에 의한 Ad3 부착의 유의적인 억제가 관찰되었다 (도 3c) (DSG2의 경우 도 2f 참조). DSG2-특이적 siRNA의 풀에 의한 헬라세포의 형질도입은 표면 DSG2 수준의 약 7배 억제조절을 제공하였다 (데이터 제시되지 않음). Ad3 부착은 대조군 siRNA-처리된 세포에 비하여 DSG2-siRNA 처리된 헬라세포에서 3배 더 낮았다 ($p < 0.001$) (도 3d). Ad3-GFP로의 감염 후 GFP 발현 수준은 대조군 siRNA 형질감염 세포에서보다 DSG2-siRNA 형질감염 세포에서 13.9배 더 낮았다 (도 3e). DSG2-특이적 siRNA는 CAR-표적 벡터 Ad5-GFP에 의한 형질도입에 영향을 미치지 않았다. 그러나, DSG2-siRNA 형질감염은 또한 CD46-특이적 벡터 Ad35-GFP 및 Ad5/35-GFP와의 결합 및 이에 의한 형질도입을 감소시켰다. DSG2-siRNA는 헬라세포에서 CD46 수준을 감소시키지 않았다. 이 시점에서 본 발명자들은 이 현상을 설명할 수 없다. 그러나, 헬라세포에 대해 특이적인 것으로 보인다. DSG2-siRNA로 형질감염된 293 세포 또는 유방암 BT474 세포에서 Ad35-GFP 또는 Ad5/35-GFP 형질도입의 감소는 검출되지 않았다 (데이터 제시되지 않음).

- [0160] siRNA 매개된 DSG2 억제조절은 또한 바이러스 세포용해를 감소시켰고 세포당 한개의 Ad3-GFP pfu의 MOI로 100% 단일층으로 감염된 세포에서 확산되었다. 감염후 16시간에서 비슷한 GFP 발현율을 달성하기 위해 조절된 다중 감염도 (MOI)를 사용하여 본 발명자들은 시간 경과에 따른 바이러스 세포용해를 추적하였고 감염후 7일째에서 DSG2 siRNA-형질감염 세포에서보다 대조군 siRNA에서 보다 큰 용해 플라그를 발견하였다. 이것은 조직배양 웰에 부착되어 있는 생존 세포, 즉 바이러스 감염으로 인한 세포병변효과를 발생하지 못한 세포의 크리스탈타이올렛 염색에서 나타난다 (도 3f). 세포 생존성의 정량분석은 대조군 siRNA 처리 세포에 비하여 DSG2가 siRNA에 의해 억제조절된 세포에서 유의적으로 감소된 세포 사멸을 보였다 (도 3g).
- [0161] 기능획득 연구에서, 본 발명자들은 상이한 DSG2 발현 수준을 갖는 일련의 세포주를 선택하고 Ad3-GFP 형질도입을 측정하였다 (도 4a). DSG2 발현이 결실된 모든 세포주 (림프종 라모스, 라지, 미노 및 HH 세포)는 Ad3-GFP 형질도입에 어려움이 있었으나 CD46 표적 Ad5/35-GFP 벡터에 의해 형질도입될 수 있었다 (그 이유는 이들 세포에서 CD46이 발현되기 때문이다³⁹).
- [0162] 한편, DSG2-양성 K562 세포는 Ad3-GFP로 효율적으로 형질도입될 수 있었다. BJAB 세포의 약 70%는 DSG2 양성이고, 상응하게 GFP-양성 세포는 약 50%에서 안정기에 도달하였다. 결론적으로 본 발명자들은 Ad3 감염에서 DSG2의 중요 역할을 증명하기 위하여 Ad3-GFP 형질도입이 어려운 조직구 림프종 세포주 U937에서 렌티바이러스 벡터 유전자 전이를 통해 DSG2의 이소적 발현을 유도하였다 (도 4b). U937-DSG2 세포에서의 이소적 DSG2 발현은 효율적인 Ad3 부착 및 형질도입을 제공한 반면 Ad35 부착 및 Ad5/35-GFP 형질도입은 이들 세포에서 영향을 받지 않았다 (도 4c 및 4d).
- [0163] 세포주내의 DSG2 위치: 예상한 바와 같이 본 발명자들은 정상 상피 조직 (포피 및 결장)의 세포막 및 상피암 (유방암 및 난소암)의 세포막에서 DSG2를 발견하였다 (도 5a). 극성 결장암 T84 및 CaCo-2 세포의 공초점 면역형광 현미경 연구는 DSG2와 세포간연접 단백질 클라우딘 7의 위치를 증명하였다 (도 5b). 적층 XZ 이미지 섹션 (도 5b) 또는 세포층의 다른 깊이에서 취득된 XY 섹션 (데이터 제시되지 않음)에서, DSG2는 세포간연접의 원위부에 위치한다. 극성 세포에 Cy3-표지 Ad3을 첨가한 후 15분 경과하여 연접에 위치한 DSG2와 결합한 바이러스 입자가 검출되었다 (도 5c). Cy5-PtDd, DSG2 및 E-캐드헤린의 삼중 표지에서 밝혀진 바와 같이 15분간 PtDd와 배양된 정상적인 소기도 상피세포에서 유사한 결과가 수득되었다 (도 5d, 상위 패널). PtDd 시그널이 세포막 (도 5d, 하위 패널, 얇은 화살표) 및 세포질 (넓은 화살표)에서 나타났으며 이것은 확실히 입자의 내부 위치를 반영한다.
- [0164] 극성 상피세포주와 대조적으로, 헬라 세포와 같은 비극성 세포에서 세포간연접 (즉, 막-위치 클라우딘 7 및 E-캐드헤린 시그널)이 존재하지 않았다. DSG2 및 Ad3이 세포 표면상에 분산되어 있는 것으로 발견되었다 (도 5e).
- [0165] 헬라 세포의 Ad3 감염에 대한 본 발명자들의 연구 (도 2 및 3)은 DSG2가 또한 비극성 세포에서 수용체로서 작용한다는 것을 가리킨다. 이러한 맥락에서 본 발명자들이 인간 혈소판 및 과립구에서 DSG2 및 Ad3 결합/형질도입을 검출하였다는 점은 괄목할만한 것이다 (데이터 제시되지 않음). 비록 이들 발견이 Ad3 발병 및 유전자요법 목적을 위한 Ad3 벡터의 혈관내 주입과 연관이 있지만 본 발명자들은 이 연구를 극성 상피세포에서의 Ad3-DSG2 상호작용에 대한 결론을 분석하는데 집중하였다.
- [0166] DSG2와의 Ad3 상호작용은 EMT를 유도한다. 최근에 본 발명자들은 상피 난소암 세포와의 AdB-2/3 상호작용이 EMT를 유도하였음을 발견하였다. EMT는 특징적으로 중간엽세포 마커의 발현 증가, 세포외 매트릭스 화합물의 발현 증가, 상피세포 마커의 발현 감소, 전사 인자의 위치 변경 및 키나제의 활성화로서 나타난다⁷. 본 발명자들은 DSG2와의 Ad3 상호작용이 EMT-유사 과정을 유도를 증명하고자 하였다. 세포 형태에 미치는 바이러스 유전자 발현의 잠재적 부작용을 피하기 위하여 연구는 자외선 (UV)-불활성화된 Ad 입자와 재조합 Ad3 PtDd를 이용하였다. 전체적으로 입자의 양 유형에 대한 결과는 비슷하였다. PdDd (도 6) 또는 UV-불활성화된 Ad3 (제시되지 않음)와 함께 상피 암세포의 배양은 막/연접-위치 클라우딘 7 (도 6a) E또는 E-캐드헤린 시그널 (도 6b)의 감소로 나타난 바와 같이 연접의 재구성을 일으켰다. DSG2와의 PtDd 상호작용으로 유도된 세포내 시그널전달 경로를 동정하기 위해 본 발명자들은 mRNA 발현 프로필을 연구하였다. PBS, BsDd 또는 PtDd와 함께 극성 BT474의 배양 후 12시간 경과하여 Affymetrix 인간 ST 유전자 어레이를 사용하여 mRNA 발현을 분석하였다. 본 발명자들은 PtDd 처리가 PBS-처리된 세포와 비교했을 때 430 유전자의 1.5배 이하의 상승조절 및 352 유전자의 1.5배 이하의 억제조절을 제공하였음을 발견하였다 (도 6e). 변형 유전자들은 경로-발현 소프트웨어로 추가 처리되었다⁴⁰. 이와 같은 컴퓨터처리 결과, PtDd가 포스포티딜이노시톨 (PI), 미토겐 활성화 단백질 키나제 (MAPK aka

ERK), Wnt, 어드레렌 연결, 초점접착역 및 액틴 세포골격 시그널전달 경로를 포함하여 EMT에 연관된 많은 시그널전달 경로의 뚜렷한 활성화를 매개한 것으로 밝혀졌다.

[0167] 인산화-특이적 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석은 PtDd가 EMT에 연루된 핵심 키나제인 PI3K 및 MAPK/ERK1/2의 활성화를 유도하였으나 BsDd는 유지하지 않았음을 나타냈다 (도 6f). 또한, 이들 경로의 활성화는 DSG2-특이적 mAb (6D8 및 좀더 적은 정도로서 10D2 및 13B11)에 의해 유도되었으나 CD46에 대한 항체에 의해서는 유도되지 않았다. PtDd의 경로 활성화는 DSG2에 의해 매개되었는데 그 이유는 MAPK/ERK1/2 및 PI3K 인산화가 DSG2 siRNA로 형질감염된 세포에서 감소되었으나 대조군 siRNA 처리된 세포에서는 감소되지 않았기 때문이다. 마지막으로, PtDd-유도된 키나제 인산화는 세포가 ERK1/2 억제제 U0126 (상위 패널) 또는 PI3K 억제제 보르트만닌 (하위 패널)으로 예비처리되었을 때 일어나지 않았다. 총괄적으로 본 발명자들의 데이터는 DSG2와의 Ad3 결합 또는 Ad3PtDd 결합이 상피세포에서 EMT를 유도함을 제시한다.

[0168] Ad3 및 PdDd는 세포간연접에 갇힌 수용체로의 접근을 증가시킨다. Ad3 비리온- 또는 Ad3 PtDd-유도된 EMT가 또한 세포간연접의 개방을 유도하는지를 시험하기 위해 본 발명자들은 상피 세포의 단층에서의 장벽 특성을 연구하였다. 일차로 본 발명자들은 트랜스웰 챔버에서 배양된 단층의 극성 BT474 세포를 통한 4 kDa FITC-텍스트란의 유입을 측정하였다 (도 7a). 본 발명자들은 PtDd 배양이 인산염 완충 염수 (PBS)와 비교하여 투과계수를 유의적으로 증가시켰으나 BsDd는 증가시키지 않았음을 발견하였다. 이어서, 본 발명자들은 Ad3 또는 PtDd-유도된 EMT 및 일시적 연결-개방이 상피 세포 연결에 의해 정상적으로 접근하지 못하는 단백질로의 접근을 증가시키는 가하는 여부를 시험하였다. 그러한 연결-위치 수용체의 예는 Ad35 및 Ad5/35의 고친화성 수용체인 CD46이다⁸. 본 발명자들은 다수의 CD46 분자들이 BT474 세포의 연결에 위치한다는 것을 확인하였다 (도 7b, 좌측 패널). PtDd 전처리된 BsDd 처리와 비교했을 때 BT474에 ³H-Ad35의 결합을 유의적으로 증가시켰다 (도 7b, 우측 패널). CD46-표적 Ad 벡터의 형질도입에 미치는 PtDd의 증가 효과가 또한 피하 상피 종양에서 생체내 입증되었다 (도 7c). Ad5/35-bGal의 주입하기 8시간 전에 PtDd의 정맥내 주사는 바이러스 형질도입을 증가시켰다. Ad 주사 후 3일 경과하여 종양 용해물에서 측정된 베타-갈락토시다제 활성은 모의주사, BsDd 동시주사 및 PtDd 동시주사된 마우스에서 각각 $2.3(+/-0.2) \times 10^5$ rlu/ug 단백질, $2.7(+/-0.6) \times 10^5$ rlu/ug, $38(+/-3.5) \times 10^5$ rlu/ug으로 나타났다.

[0169] 유방암 세포 배양물의 다른 실험에서, 본 발명자들은 폭넓게 사용되는 모노클로날 항체 헤르셉틴 (트라스투주마브)의 수용체인 Her2/neu가 세포간연접 단백질 클라우딘 7과 동시염색되었음을 발견하였다 (도 7d). 이것은 모든 Her2/neu 분자들이 헤르셉틴에 접근하지 않음을 가리킨다. PtDd와의 Her2/neu-양성 유방암 세포주 BT474의 배양은 세포 표면으로의 Her2/neu의 위치변동을 유도하였다. 이 관찰을 확립하기 위하여 본 발명자들은 Ad3 또는 Ad3PtDd가 헤르셉틴에 의한 BT474 세포 사멸을 촉진하는지를 시험하였다. 이전의 연구와 일치하게 헤르셉틴은 BT474 세포의 약 25%를 사멸시켰다 (도 7f). UV-불활성화된 Ad3 입자 또는 PtDd와 함께 BT474의 예비배양은 헤르셉틴 세포독성을 2배 이상 증가시켰다. UV-불활성화된 Ad5 입자 또는 BsDd와의 배양은 헤르셉틴 사멸에 영향을 미치지 않았다. 또한, 헤르셉틴 및 PtDd/헤르셉틴은 Her2/neu-음성 유방암 세포주 MDA-MB-231에 대한 세포독성 영향이 없었다 (도 8a). PtDd 및 Ad3이 BT474 세포의 헤르셉틴 사멸에 미치는 영향 증가는 DSG2 siRNA에 의한 BT474 세포내의 DSG2의 억제조절이 그러한 영향을 제거함에 따라 DSG2에 의해 매개되었다 (도 7g). 또한 본 발명자는 EMT에 연루된 핵심 경로의 억제가 헤르셉틴 세포독성에 대한 PtDd의 영향 증가에 영향을 미치는지 여부를 연구하였다. 이들 연구 결과, 보르트만닌에 의한 PI3K의 억제뿐만 아니라 U0126에 의한 MAPK/ERK의 억제가 헤르셉틴 치료의 PtDd 증가를 상쇄시킨 것으로 나타났다 (도 7g). 중요한 것은 헤르셉틴 치료전에 BT474-M1-종양-함유 마우스내로 PtDd (2 mg/kg)의 정맥내 주사 결과로서 종양이 제거되었는데, 이 결과는 헤르셉틴 주사만으로는 달성될 수 없는 것이었다 (도 7h). 또한, PtDd 예비처치는 EGFR-특이적 mAb Erbitux (세록시마브)의 치료 효과가 발휘되도록 하였는데 그 이유는 PtDd 예비처치가 시험관내에서 그러한 항체에 의한 EGFR-양성 결장암 LoVo 세포의 사멸을 증가시켰기 때문이다 (도 8b).

[0170] 논의

[0171] 본 연구에서 본 발명자들은 두 가지 주요 발견을 제공한다: i) DSG2는 범 병원체이고 중요한 생물의학 도구인 일련의 인간 아데노바이러스의 감염에 중요한 수용체이고; ii) DSG2와의 Ad 상호작용은 세포간연접의 개방을 유도하고 그 결과로 세포간연접에 갇힌 수용체로의 접근을 증가시킨다.

[0172] DSG2는 Ad 결합 수용체이다. 수용체 탐침으로서 완전한 Ad3 입자 또는 PtDd의 용도는 Ad3, Ad7, Ad11 및 Ad14의 결합 수용체로서 DSG2의 동정에 중요하였다. 유인물로서 Ad3 섬유 마디 도메인을 이용한 이전 시도는 중요한 수용체 후보군을 제공하지 못했다³². 본 발명자들의 경쟁 및 도 2에 제시된 표면 플라스몬 공명 연구는 Ad3

내의 DSG2 상호작용 도메인이 바이러스 입자에 존재하는 공간 위치에서만 섬유에 의해 형성됨을 가리킨다. 이것은 지금까지 섬유 마디와 세포 수용체 (즉, CAR 또는 CD46)사이의 고친화성 상호작용만이 연루된 것으로 고려된 Ad 결합 기전에 대한 우리의 이해를 넓혀주는 것임은 분명하다.

[0173] 바이러스 확산에서 DSG2와의 Ad3 및 PtDd 상호작용의 역할. Ad5의 복제과정에서 섬유의 과다 생성은 연결의 유지에 중요한 CAR 이량체화를 차단하거나 세포간연접의 재구성을 유도하는 세포내 시그널전달을 유도함으로써 상피세포 연결을 붕괴시킨다⁴²⁻⁴³. 또한 두 기전 모두 Ad3 비리온/DSG2- 및 Ad3 PtDd/DSG2-매기된 세포간연접 개방에 연루될 수 있었다. 본 발명자들은 상피 세포에서 DSG2와의 Ad3 및 PtDd 결합에 의해 유도된 세포내 시그널전달을 지지하는 실험 자료를 갖고 있다. 면역형광, PI3K/MAPK 인산화, mRNA 발현 어레이 및 대사경로 억제 데이터는 Ad3 및 PtDd가 상피 세포에서 EMT를 유도하고 결과적으로 세포간연접을 일시적으로 개방시킨다는 것을 증명한다. DSG2와의 Ad3 입자 또는 재조합 PtDd의 상호작용에 의해 매개된 세포간연접 개방은 추가적으로 세포 투과성의 증가 및 세포간연접에 갇힌 수용체 (CD46 및 Her2/neu)로의 접근 증가에 의해 지원된다. 이와 더불어 최근 연구는 DSG2의 세포의 도메인에 대한 항체가 CaCo-2 세포 단층에서 세포간연접의 개방을 유도하였음을 증명하였다⁴⁴.

[0174] Ad3 비리온- 및 PtDd-유도된 EMT, 즉 세포간연접의 분리는 중요한 생물학적 역할을 하는 것으로 보인다. 본 발명자들은 특이적으로 바이러스 감염동안에 PtDd의 과다생성 및 이의 DSG2와의 상호작용이 상피세포에서의 측면 바이러스 확산을 촉진하며 잠재적으로는 아상피세포층 및 혈류내로의 Ad의 침투를 촉진한다는 것으로 추정한다.

[0175] Ad 병리에 대한 연관성. DSG2가 바이러스 확산을 촉진하는 결합 수용체라는 본 발명자들의 발견은 기도 상피의 Ad3 감염 기전을 밝힌 것이다. 게다가, Ad3이 혈소판 및 과립구상의 DSG2와 결합한다는 관찰은 바이러스가 혈류로 유입된 후의 바이러스의 전신 확산과 잠재적인 연관성이 있다. 비록 마우스 DSG2가 인간 DSG2와 76%의 상동성을 갖고 있지만⁴⁵, 마우스 세포가 Ad3-GFP 감염에 어려움이 있음을 보여주는 본 발명자들의 데이터는 마우스 DSG2가 AD3 수용체로서 작용할 수 없음을 가리킨다. AdB-2/3 혈청형의 병리를 연구하기 위하여, 인간과 유사한 양상 및 수준으로 DSG2 발현을 제공하는 적절한 내인성 조절 요소의 조절하에 인간 DSG2를 발현하는 트랜스제닉 마우스는 중요한 도구이다.

[0176] 암 치료에 대한 연관성. DSG2는 상피 종양의 마커로서 제시되어 왔다⁴⁶. 암세포의 상피 표현형 및 물리적 장벽을 형성하는 능력은 종양 부위에 약물, 항체, 종양분해 바이러스 또는 면역세포의 접근을 제한함으로써 그러한 치료제의 효능을 감소시키는 기전을 나타낸다⁴⁷. 본 발명자들은 본원에서 세 가지 예 (Ad5/35 벡터, 헤르셉틴 및 에르비투스)를 통해 암 치료에서 이와 같은 중요한 문제가 아마도 DSG2-상호작용 Ad3 성분의 사용에 의해 해결될 수 있음을 증명하였다.

[0177] 결론적으로, 본 발명자들은 일련의 범 인간 Ad의 고친화성 수용체의 발견을 공개한다. 본 발명자들의 연구는 Ad가 상피 조직으로의 접근을 달성하기 위해 세포 과정을 어떻게 유도하는가에 대한 이해에 기여한다.

[0178] 방법

[0179] 단백질 및 항체. Ad3, Ad5 및 Ad35의 마디 도메인은 공지된 바와 같이 이. 콜라이에서 생성하였다⁴⁸. 재조합 Ad3 펜톤-12면체 (PtDd) 및 염기 12면체 (BsDd)는 공지된 바와 같이 곤충 세포에서 생성하고 정제하였다³³. 정제된 재조합 Ad3 및 Ad35K++ 마디에 대한 폴리클로날 토끼 항체는 PickCell Laboratories B.V. (Amsterdam, The Netherlands)에서 생성하였다. DSG2-특이적 모노클로날 항체 20G1, 7H9, 13B11, 10D2 및 8E5⁴⁹는 하이브리도마 배양 상청액으로부터 정제하였다.

[0180] 세포주. 세포는 SI에 기술된 바와 같이 배양하였다. BT474는 상피 세포 특징을 갖는 Her2/neu-양성 유방암 세포주이다. 세포의 극성을 달성하기 위하여 1.4×10^5 BT474, T84 및 CaCo-2 세포를 콜라겐-피복된 6.5 mm 트랜스웰 삽입구 (0.4 μ m 공극)(Costar Transwell Clears)에서 상피투과저항이 안정될때까지 10일간 배양하였다.

[0181] 아데노바이러스. 야생형 Ad3 (GB 스트레인), Ad7p (Gomen 스트레인), Ad11p (Slobitski 스트레인), Ad14 (DeWit 스트레인) 및 Ad35 (Holden 스트레인)은 ATCC로부터 입수하였다. Ad14a는 Ad14의 새로운 게놈 변이체이다⁵. Ad의 증식, 메틸-3H 티미딘 표지, 정제 및 역가검정은 공지된 바와 같이 수행하였다². Ad5/35-GFP 및 Ad5-GFP는 AD35 및 Ad5 섬유 및 CMV-GFP 발현 카세트를 함유하는 Ad5 벡터이다⁵⁰. Ad3-GFP 및 Ad35-GFP는 E3

영역내로 삽입된 CMV-GFP 발현 카세트를 함유하는 야생형 Ad3- 및 Ad35-기본 벡터이다. Ad3-GFP의 작제는 SI에 기술되어 있다. Ad35-GFP는 공지되어 있다³⁴. 형질도입 연구를 위해 세포는 1시간 동안 표기된 MOI로 AD 벡터에 노출하고 세척한 다음 GFP 발현을 18시간 후 유세포분석으로 측정하였다.

- [0182] 막 단백질 제조. 헬라 세포 막 단백질은 공지된 바와 같이 제조하였다⁵¹. 요약하면, 헬라 세포 펠렛을 빙냉 균질화 완충액 (20 mM Hepes, 1.5 MgCl₂, 5 mM KCl, 150 mM NaCl, 15% 글리세롤, 0.25 M 수크로즈, 0.1 mM EDTA, 2 mM β-머캅토에탄올, 1 mM PMSF)에 재현탁시켰다. 3 ml 주사기 및 21G 침으로 분쇄 후 용해물을 400 x g로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 2배 용량의 PBS로 희석하고 Beckman 한외원심분리기에서 1시간 동안 35,000 rpm으로 원심분리하였다. 막 단백질 펠렛을 가용화 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 150 mM NaCl, 15% 글리세롤, 0.25 M 수크로즈, 0.1 mM EDTA, 2 mM β-머캅토에탄올, 1 mM PMSF, 0.5% Brij 96V (Fluka, St Louis, MO)에서 재현탁시켰다. 세정제로서 Brij96V의 사용은 데스모솜 단백질이 고도로 불용성이기 때문에 중요한 역할을 하였다.
- [0183] Ad3 및 PtDd의 웨스턴 블롯. 질량분석기에 대한 기술적 세부내용은 공지되어 있다⁵¹. 용해성 조 막단백질 제제로부터 DSG2를 면역침전시키기 위해 DSG2-특이적 mAb 6D8 및 피어스 크로스링크 면역침전 키트 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)를 사용하였다. 헬라세포의 조 막 단백질을 0.5% 세정제 Brij 96V로 용해시키고, 대조 수지와 함께 4℃에서 3시간 동안 예비배양하여 비특이적 결합을 감소시킨 다음, DSG2 항체가 교된 단백질 A/G 아가로스과 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 결합된 단백질은 제조사의 지침에 따라 용출시켰다.
- [0184] 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 분석. 데이터 취득은 BIAcore 3000 장비에서 실행하였다. 2 mM CaCl₂가 보충된 HBS-N (GE-Healthcare, Pittsburgh, PA)을 모든 실험에서 5 ul/분의 유속으로 완충용액으로서 사용하였다. CM4 센서칩 (BIAcore)상의 고정용 EDC-NHS 활성화 유동셀에 10분간 주입된 10 mM 나트륨 아세테이트 완충액 (pH 4.2)에 희석된 0.1 mg/ml의 DSG2 (Leinco Technology, Inc.)를 사용하여 실시하였다. 대조 유동셀은 EDC-NHS에 의해 활성화하고 에탄올아민으로 불활성화하였다. PtDd, BsDd, Ad3 섬유 마디의 다른 농도를 5분간 주사한 후 3분간의 분해 시간에 이어서 시그널을 에탄올아민 불활성화된 EDC-NHS 유동셀의 배경으로부터 자동 공제하였다. 아데노바이러스 결합 실험을 위해 야생형 Ad2, Ad3 및 Ad5를 ml당 5x10⁹으로 주사하면서 유사한 프로토콜을 사용하였다.
- [0186] siRNA 연구. DSG2 특이적 siRNA 세트를 Dharmacon (Thermo Scientific)으로 합성하였다. 표적 서열은 CAAUUAUACCUAGUAGUAGAA (서열번호 29), GAGAGGAUCUGUCCAAGAA (서열번호 30), CCUAGAGCUACGCAUUA (서열번호 31) 및 CCAGUGUUCUACCUAAAUA (서열번호 32)이었다. 대조 siRNA는 Qiagen (Valencia, CA)로부터 구입하였다. siRNA 형질감염은 HyperFect 형질감염 시약 (Qiagen)을 사용하여 실시하였다.
- [0187] DSG2 발현 U937 세포. Capital Biosciences (Rockville, MD)의 DSG2 cDNA (등록번호 BC099657)를 EF1α 프로모터하에 렌티바이러스 벡터 pRRL-SIN⁵²내로 클로닝하였다. VSVG-위형 렌티바이러스 벡터를 공지된 바와 같이 제조하고 적정하였다⁵³.
- [0188] 동물 연구: 동물을 포함한 모든 실험은 워싱턴 대학에 의해 제시된 연구지침에 따라 실시하였다. 마우스는 특정 무병원균 시설에 수용하였다. CB17 SCID-베이지 마우스의 유방 지방 패드내로 매트릭셀종의 암세포 (1:1 용량/용량)를 주입함으로써 유방암 이종이식편을 설정하였다. 헤르셉틴은 10 mg/kg/ml 용량으로 복강내 주사하였다. PtDd는 2 mg/kg의 용량으로 정맥내 주입하였다. 종양 체적은 공지된 바와 같이 측정하였다⁵⁴.
- [0189] 실시예 1과 관련된 참조문헌:
- [0190] 1. Bergelson, J.M., *et al.* Isolation of a common receptor for Cocksackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275,1320-1323. (1997).
- [0191] 2. Tuve, S., *et al.* A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. *J Virol* 80, 12109-12120 (2006).
- [0192] 3. Louie, J.K., *et al.* Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat? *Clin Infect Dis* 46,421-425 (2008).

- [0193] 4. Tate, J.E., *et al.* Outbreak of severe respiratory disease associated with emergent human adenovirus serotype 14 at a US air force training facility in 2007. *J Infect Dis* 199, 1419-1426 (2009).
- [0194] 5. Wang, H., Tuve, S., Erdman, D.O. & Lieber, A. Receptor usage of a newly emergent adenovirus type 14. *Virology* 387,436-441 (2009).
- [0195] 6. Yamamoto, M. & Curiel, D.T. Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses. *Mol Ther* 18, 243-250 (2010).
- [0196] 7. Turley, E.A., Veiseth, M., Radisky, D.C. & Bissell, M.J. Mechanisms of Disease: epithelial-mesenchymal transition-does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol* (2008).
- [0197] 8. Strauss, R., *et al.* Epithelial phenotype of ovarian cancer mediates resistance to oncolytic adenoviruses. *Cancer Research* 15, 5115-5125 (2009).
- [0198] 9. Coyne, C.B. & Bergelson, J.M. CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 869-882 (2005).
- [0199] 10. Thiery, J.P. & Sleeman, J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142 (2006).
- [0200] 11. Norrby, E., Nyberg, B., Skaaret, P. & Lengyel, A. Separation and characterization of soluble adenovirus type 9 components. *J Virol* 1, 1101-1108 (1967).
- [0201] 12. Fuschiotti, P., *et al.* Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. *J Mol Biol* 356, 510-520 (2006).
- [0202] 13. Fender, P., Boussaid, A., Mezin, P. & Chroboczek, J. Synthesis, cellular localization, and quantification of penton-dodecahedron in serotype 3 adenovirus-infected cells. *Virology* 340,167-173 (2005).
- [0203] 14. Di Guilmi, A.M., Barge, A., Kitts, P., Gout, E. & Chroboczek, J. Human adenovirus serotype 3 (Ad3) and the Ad3 fiber protein bind to a 130-kDa membrane protein on HeLa cells. *Virus Res* 38, 71-81 (1995).
- [0204] 15. Fleischli, c., *et al.* Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor. *J Gen Virol* 88, 2925-2934 (2007).
- [0205] 16. Short, J.J., *et al.* Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology* 322, 349-359 (2004).
- [0206] 17. Short, J.J., Vasu, c., Holterman, M.J., Curiel, D.T. & Pereboev, A. Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. *Virus Res* 122, 144-153 (2006).
- [0207] 18. Sirena, D., *et al.* The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J Virol* 78, 4454-4462 (2004).
- [0208] 19. Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M. & Lieber, A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 9,1408-1412 (2003).
- [0209] 20. Marttila, M., *et al.* CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol* 79, 14429-14436 (2005).
- [0210] 21. Segerman, A., Arnberg, N., Erikson, A., Lindman, K. & Wadell, G. There are two different species B adenovirus receptors: sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR, exclusively used by species B2 adenoviruses. *J Virol* 77, 1157-1162 (2003).
- [0211] 22. Gustafsson, D.J., Segerman, A., Lindman, K., Mei, V.F. & Wadell, G. The Arg279Gln [corrected] substitution in the adenovirus type IIp (Ad11p) fiber knob abolishes EDTA-resistant binding to A549 and CHO-CD46 cells, converting the phenotype to that of Ad7p. *J Virol* 80, 1897-1905 (2006).

- [0212] 23. Persson, B.D., *et al.* An arginine switch in the species B adenovirus knob determines high-affinity engagement of the cellular receptor CD46. *J Virol* (2008).
- [0213] 24. Chitaev, N.A. & Troyanovsky, S.M. Direct Ca^{2+} -dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 138, 193-201 (1997).
- [0214] 25. Cowin, P. Unraveling the cytoplasmic interactions of the cadherin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 91,10759-10761 (1994).
- [0215] 26. Biedermann, K., *et al.* Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer. *J Pathol* 207, 199-206 (2005).
- [0216] 27. Harada, H., Iwatsuki, K., Ohtsuka, M., Han, G.W. & Kaneko, F. Abnormal desmoglein expression by squamous cell carcinoma cells. *Acta Derm Venereol* 76, 417-420 (1996).
- [0217] 28. Schmitt, C.J., *et al.* Homo-and heterotypic cell contacts in malignant melanoma cells and desmoglein 2 as a novel solitary surface glycoprotein. *J Invest Dermatol* 127, 2191-2206 (2007).
- [0218] 29. Trojan, L., *et al.* Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* 25,183-191 (2005).
- [0219] 30. Abbod, M.F., Hamdy, F.C, Linkens, D.A. & Catto, J.W. Predictive modeling in cancer: where systems biology meets the stock market. *Expert Rev Anticancer Ther* 9, 867-870 (2009).
- [0220] 31. Leopold, P.L. & Crystal, R.G. Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Adv Drug Deliv Rev* 59,810-821 (2007).
- [0221] 32. Tuve, S., *et al.* Role of cellular heparan sulfate proteoglycans in infection of human adenovirus serotype 3 and 35. *PLoS Pathog* 4, e1000189 (2008).
- [0222] 33. Fender, P., Ruigrok, R.W., Gout, E., Buffet, S. & Chroboczek, J. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat Biotechnol* 15, 52-56 (1997).
- [0223] 34. Gao, W., Robbins, P.D. & Gambotto, A. Human adenovirus type 35: nucleotide sequence and vector development. *Gene Ther* 10,1941-1949 (2003).
- [0224] 35. Wang, H., *et al.* In vitro and in vivo properties of adenovirus vectors with increased affinity to CD46. *J Virol* 82, 10567-10579 (2008).
- [0225] 36. Nava, P., *et al.* Desmoglein-2: a novel regulator of apoptosis in the intestinal epithelium. *Mol Biol Cell* 18, 4565-4578 (2007).
- [0226] 37. Kowalczyk, A.P., *et al.* Structure and function of desmosomal transmembrane core and plaque molecules. *Biophys Chern* 50, 97-112 (1994).
- [0227] 38. Getsios, S., Huen, A.C & Green, K.J. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 271-281 (2004).
- [0228] 39. Wang, H., *et al.* A recombinant adenovirus type 35 fiber knob protein sensitizes lymphoma cells to rituximab therapy. *Blood* 115, 592-600 (2010).
- [0229] 40. Khatri, P., *et al.* New Onto-Tools: Promoter-Express, nsSNPCounter and Onto-Translate. *Nucleic Acids Res* 34, W626-631 (2006).
- [0230] 41. Bostrom, I., *et al.* Variants of the antibody herceptin that interact with HER2 and VEGF at the antigen binding site. *Science* 323,1610-1614 (2009).
- [0231] 42. Walters, R.W., *et al.* Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110, 789-799 (2002).
- [0232] 43. Coyne, C.B., Shen, L., Turner, I.R. & Bergelson, I.M. Cocksackievirus entry across epithelial tight

junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe* 2,181-192 (2007).

- [0233] 44. Schlegel, N., *et al.* Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298, G774-783 (2010).
- [0234] 45. Mahoney, M.G., Simpson, A., Aho, S., Uitto, J. & Pulkkinen, L. Interspecies conservation and differential expression of mouse desmoglein gene family. *Exp Dermatol* 11, 115-125 (2002).
- [0235] 46. Schafer, S., Koch, P.J. & Franke, W.W. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* 211,391-399 (1994).
- [0236] 47. Green, S.K., Karlsson, M.C., Ravetch, J.V. & Kerbel, R.S. Disruption of cell-cell adhesion enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity: implications for antibody-based therapeutics of cancer. *Cancer Res* 62,6891-6900 (2002).
- [0237] 48. Wang, H., *et al.* Identification of CD46 binding sites within the adenovirus serotype 35 fiber knob. *J Virol* 81, 12785-12792 (2007).
- [0238] 49. Keim, S.A., Johnson, K.R., Wheelock, M.J. & Wahl, L.K., 3rd. Generation and characterization of monoclonal antibodies against the proregion of human desmoglein-2. *Hybridoma (Larchmt)* 27, 249-258 (2008).
- [0239] 50. Shayakhmetov, D.M., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G. & Lieber, A. Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J Virol* 74, 2567-2583 (2000).
- [0240] 51. Gaggar, A., Shayakhmetov, D. & Lieber, A. Identifying functional adenovirus-host interactions using tandem mass spectrometry. *Methods Mol Med* 131,141-155 (2007).
- [0241] 52. Seppen, J., Barry, S.C., Harder, B. & Osborne, W.R. Lentivirus administration to rat muscle provides efficient sustained expression of erythropoietin. *Blood* 98, 594-596 (2001).
- [0242] 53. Li, Z., *et al.* Toward a stem cell gene therapy for breast cancer. *Blood* 113, 5423-5433 (2009).
- [0243] 54. Tuve, S., *et al.* Combination of tumor site-located CTL-associated antigen-4 blockade and systemic regulatory T-cell depletion induces tumor-destructive immune responses. *Cancer Res* 67,5929-5939 (2007).
- [0244] 실시예 2. 아데노바이러스 혈청형 3 섬유 마디 도메인의 다량체화는 데스모글레인 2에 바이러스의 효율적인 결합 및 이후의 상피세포 연결 개방을 위해 필요하다.
- [0245] 요약
- [0246] 실시예 1에서, 본 발명자들은 인간 집단에서 폭넓게 분포하고 있는 혈청형인 Ad3을 포함한 B종 아데노바이러스 (Ad)의 그룹에 대한 주요 수용체로서 데스모글레인 2 (DSG2)를 동정하였다. 본 실시예에서는 본 발명자들은 DSG2와의 Ad3 상호작용에 대한 구조적 세부내용을 기술하고자 한다. CAR- 및 CD46-상호작용 Ad 혈청형의 경우, 세포와의 결합은 과량의 재조합 섬유 마디 단백질에 의해 완전히 차단될 수 있는 한편, 가용성 Ad3 섬유 마디는 Ad3 감염을 단지 비효율적으로 차단한다. 본 발명자들은 Ad3 내의 DSG2 상호작용 도메인이 바이러스 입자에 존재하는 공간 위치에 자리잡아야 하는 몇 가지 섬유 마디 도메인에 의해 형성된다는 것을 발견하였다. 이러한 발견을 근거로, 본 발명자들은 Ad3 섬유 마디를 함유한 작은 재조합 자가-이량체화 단백질(Ad3-K/S/Kn)을 생성하였다. Ad3-K/S/Kn은 DSG2와 고친화성으로 결합하고 Ad3 감염을 차단하였다. 본 발명자들은 공초점 면역형광 및 투과전자현미경 분석에 의해 Ad3-K/S/Kn이 DSG2와의 결합을 통해 상피세포에서 세포간연접의 일시적 개방을 유도하였음을 증명하였다. Ad3-K/S/Kn으로 상피세포의 예비처리는 상피세포연접에 위치하거나 은폐되어 있는 수용체 (예, CAR 또는 Her2/neu)로의 접근을 증기시켰다. Ad3-K/S/Kn 처리는 밀착 연접으로부터 CAR을 방출시켰고 그 결과로 혈청형 Ad5-기본 벡터에 의한 상피세포의 형질도입을 증가시켰다. 또한, Ad3-K/S/Kn으로 Her2/neu-양성 유방암 세포의 예비처리는 Her2/neu-표적 모노클로날 항체 트라스투주마브 (헤르셉틴)에 의한 암 세포의 사멸을 증가시켰다. 이 연구는 Ad가 이들의 수용체에 어떻게 고도의 결합활성을 달성하고 상피조직을

감염시키는 것에 대한 우리의 이해를 넓혀준다. 작은 재조합 단백질 Ad3-K/S/Kn은 상피암의 치료법 및 정상 상피조직으로의 유전자/약물 전달과 실질적인 연관성이 있다.

[0247] 소개

[0248] 돌출 섬유는 일차 결합 수용체와의 고친화성 결합을 매개하는 Ad 캡시드내에 존재하는 잔기이다. 각 Ad 캡시드는 펜톤 염기에 연결된 12개의 섬유를 갖고 있다. 각 섬유는 펜톤 염기내에 고정된 꼬리 도메인, β -시트를 형성하는 아미노산 14개 이하의 반복체로 구성된 축도메인 (다른 혈청형에서는 반복체의 수가 6 내지 23개에 달한다) 및 C-말단 단독삼량체 마디 도메인으로 구성된다. CAR- 및 CD46-상호작용 Ad의 경우, 마디 도메인은 수용체와 고친화성으로 결합하고 가용성 섬유 마디는 감염을 완전히 차단한다.

[0249] 이 연구에서, 본 발명자들은 DSG2와의 Ad3 상호작용에 대한 구조적 세부내용을 밝히고자 시도하였다. 본 발명자들은 삼량체 Ad3 섬유 마디의 다량체가 고친화성 DSG2 결합을 위해 필요하다는 것을 공개한다. 이 내용은 감염을 달성하기 위해 CAR- 및 CD46-상호작용 Ad 혈청형의 전략과 명백히 상이하다. Ad3-DSG2 상호작용의 그와 같은 특정 방식은 이것이 상피세포연접의 개방을 가능케하는 것이기 때문에 Ad3에게 기능상 중요한 것이다.

[0250] 재료 및 방법

[0251] 단백질 및 항체. 재조합 인간 DSG2 단백질은 Leinco Technologies, Inc. (St. Louis, MO)로부터 입수하였다. 재조합 Ad3 섬유는 공지된 바와 같이 pQE30 발현벡터 (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 N-말단 6-His 태그를 갖는 이. 콜라이에서 생성하고 N-NTA 아가로스 크로마토그래피로 정제하였다 (34). 재조합 Ad3 펜톤-12면체 (PtDs)는 공지된 바와 같이 곤충 세포에서 생성하고 정제하였다 (8).

[0252] 면역형광 연구를 위해 다음의 항체를 사용하였다: 폴리클로날 염소 항-DSG2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, NM), 마우스 mAb 항-DSG2 (클론 6D8) (Cell Sciences, Canton, MA), 토끼 항-클라우딘 7 (abcam, Cambridge, MA), FITC 결합된 염소 항-아데노바이러스 (Millipore Billerica, MA), 모노클로날 항-6xHis (Serotec, MCA1396), 토끼 항-ZO-1 항체 (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA). 정제된 재조합 Ad3 마디에 대한 폴리클로날 토끼 항체는 PickCell Laboratories B.V. (Amsterdam, The Netherlands)에 의해 생산되었다. 모노클로날 항-DSG2 항체 20G1, 7H9, 13B11, 10D2 및 8E5 (12)는 하이브리도마 배양 상청액으로부터 정제되었다.

[0253] 재조합 Ad3 섬유 마디. 재조합 Ad3 섬유 마디 S/Kn, S2/Kn, S3/Kn, S4/Kn, S5/Kn 및 S6/Kn은 주형으로서 Ad3 게놈 DNA를 사용하여 PCR로 제조하였다. 이어서, PCR 생성물은 BclI/HindIII 또는 BamHI/HindIII 단편으로서 이.콜라이 발현벡터 pQE30내로 클로닝하였다. 아래의 프라이머를 사용하였다:

[0254] S6/Kn-정방향: 5'-CTGATGAATCTTGATCAGGGGTTTAAAGTCTTAAATGTGTTAATCC-3' (서열번호 33)

[0255] S5/Kn-정방향: 5'-TTACTGATGAATCTTGATCA GGCTCCCTCCAACCTAAAGTGGGAAGTGGT-3' (서열번호 34)

[0256] S4/Kn-정방향: 5'-TTACTGATGAATCTGGATCC TTAGAAGAAAACATCAAGTTAACAC-3' (서열번호 35)

[0257] S3/Kn-정방향: 5'-TTACTGATGAATCTGGATCC CATTCTATAAATTACCAATAGGAAACGGT-3' (서열번호 36)

[0258] S2/Kn-정방향: 5'-TTACTGATGAATCTGGATCC AACAACTTTGCAGTAACTCGGAAATGG-3' (서열번호 37)

[0259] S/Kn-정방향: 5'-ACCATCAGGATCCAATTCTATTGCACTGAA-3' (서열번호 38)

[0260] 모든 작제물에서의 역방향: 5'-AGCTAATTAAGCTTAGTCATCTTCTCTAATATAGG-3' (서열번호 39)

[0261] Ad3 섬유 마디를 함유하는 K- 또는 E-코일을 생성하기 위해 아래의 올리고뉴클레오타이드를 어닐링하고 BamHI 단편으로서 pQE30내로 클로닝하였다.

[0262] pQE30-K-코일의 경우:

[0263] 5' ATCAAAGGTAAGCGCTTTAAAGGAGAAAGTTTCAGCACTTAAAGAAAAGGTATCCGCTTTAAAGGAGAAAG TTTCAGCACTTAAAGAAAAGTGTCCGCTCTGAAAGAAG-3' (서열번호 40) 및

[0264] 5' GATCCTTCTTTTCAGAGCGGACACTTTTCTTTAAGTGCTGAAACTTTCTCCTTTAAAGCGGATACCTTT AAGTGCTGAAACTTTCTCCTTTAAAGCGCTTACCTTT-3' (서열번호 41)

[0265] pQE30-E-코일의 경우:

- [0266] 5' ATCAGAGGTAAGCGCTTTAGAGAAAGAAGTTTCAGCACTTGAGAAGGAGGTATCCGCTTTAGAGAAAGAA GTTTCAGCACTTGAGAAGGAAGTGCCGCTCTGAAAAAG-3' (서열번호 42) 및
- [0267] 5' GATCCTTTTTCCAGAGCGGACACTTCCTTCTCAAGTGCTGAAACTCTTTCTCTAAAGCGGATACCTCCTCTC AAGTGCTGAAACTCTTTCTCTAAAGCGCTTACCTCT-3' (서열번호 43)
- [0268] Ad3-E/S2/Kn 및 Ad3-K/S2/Kn을 생성하기 위해 다음의 프라이머를 사용하였다:
- [0269] 정방향:
- [0270] 5' ATCTAGGATCCGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCTCCGGTGGCGGTTCTAACAACTTTGCAGTAAACTCGGA AATGGTCTTACATTGACT-3' (서열 번호 44)
- [0271] 역방향:
- [0272] 5' AGCTAATTAAGCTTAGTCATCTTCTCTAATATAGG-3' (서열번호 45)
- [0273] 이어서, PCR 생성물을 pQE30-K-코일 및 pQE30-E-코일의 BamHI/HindIII 부위내로 클로닝하였다.
- [0274] Ad3-E/S/Kn 및 Ad3-K/S/Kn을 생성하기 위해, 다음의 프라이머를 사용하였다:
- [0275] 정방향:
- [0276] 5' TTATTGCTACTGGATCCGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCTCCGGTGGCGGTTCTAATTCTATTGCACTGAAAA ATAACAC-3' (서열번호 46)
- [0277] 역방향:
- [0278] 5' AGCTAATTAAGCTTAGTCATCTTCTCTAATATAGG-3' (서열번호 47)
- [0279] 이어서, PCR 생성물을 pQE30-K-코일 및 pQE30-E-코일의 BamHI/HindIII 부위내로 클로닝하였다.
- [0280] 세포주. 293 (Microbix, Toronto, Ontario, Canada), 헬라 (American Type Culture Collection, ATTC)는 10% 태아 소 혈청 (FCS), 2 mmol/L L-글루타민 (Glu), 100 단위/ml 페니실린 및 100 um/mL 스트렙토마이신 (P/S)이 보충된 돌베코 변형 이글 배지 (DMEM)에서 배양하였다. BT474-M1 세포 (16)는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토 마이신 및 L-글루타민을 포함한 DMEM/F:12에서 배양하였다. 결합암 T84 세포 (ATCC CCL-248)은 햄 F12 배지와 DMEM의 1:1 혼합물, 10% FBS, Glu 및 P/S에서 배양하였다. 세포 극성화를 달성하기 위해 1.4×10^5 T84 세포를 6.5 mm 트랜스웰 삽입구 (0.4 um 공극)(Costar Transwell Clears)에서 상피투과저항이 안정될때까지 20일 이상 동안 배양하였다.
- [0281] 아데노바이러스. Ad의 증식, 메틸-³H 티미딘 표지, 정제 및 역가검정을 공지된 바와 같이 실시하였다 (31). Ad5/35-GFP 및 Ad5-GFP는 Ad35 및 Ad5 섬유 및 CMV-GFP 발현 카세트를 함유한 AD5 벡터이다 (24). Ad3-GFP는 E3 영역내로 삽입된 CMV-GFP 발현 카세트를 함유한 야생형 Ad3-기본 벡터이다. Ad5/3L-GFP 및 Ad5/3S-GFP는 E3 영역내로 삽입된 동일한 CMV-GFP 발현 카세트를 함유한 E1/E3 결실되고 Ad5-기본 벡터이다. 키메라 Ad 벡터 의 작제는 공지된 프로토콜에 따라 실시하였다 (23). 키메라 섬유 유전자를 작제하기위해 사용된 프라이머 서 열은 다음과 같다:
- [0282] Ad5/3L-GFP의 경우
- [0283] SF (5'-GACACGGAACCGGTCCTCCAACGTGTCCTTTTCTTACTCC-3') (서열번호 48),
- [0284] SR (5'-GCAGTTGGCTTCTGGTTTTGGACCTGTCCACAAAGTTAGCTTATCATTATTTTGTGTTCC-3' (서열번호 49),
- [0285] KF (5'-GGAAACAAAATAATGATAAGCTAACTTTGTGGACAGGTCCAAAACCAGAAGCCAACCTGC-3' (서열번호 50),
- [0286] KR (5'-TGAAAAATAAACACGTTGAAACATAACACAAGTCTTTATTCTTGGGCATTTTAGTCATCTTCTC
- [0287] TAATATAGGAAAAGGTAAATG-3' (서열번호 51),
- [0288] R1 (5'-CATTTACCTTTTCCTATATTAGAGAAGATGACTAAAAATGCCCAAGAATAAAGAACTAGTTGTGTTATG
- [0289] TTTCAACGTGTTTATTTTCA-3') (서열번호 52) 및
- [0290] R2 (5'-ATACTTAGGGTACCAATCGATATGGCCACGTGGGTTCTGTGGTCCC-3') (서열번호 53).

- [0291] Ad5/3S-GFP의 경우,
- [0292] SF (5'-ACGGAAACCGTCTCCAACCTGTGCCTTTTCTTACTCTCCCTTTGTATCCCCCAATGGGTTTCAAGAGA
- [0293] GTCCCCCTGGGGTTTAAAGTCTTAAATGTG-3') (서열번호 54),
- [0294] KR (5'-GAAAAATAAACACGTTGAAACATAACACACTCGAGTCTTTATTCTTGGGCATTTTAGTCATCTTCTCTAA
- [0295] TATAGGAAAAGGTAAATG-3') (서열번호 55),
- [0296] R1 (5'-CATTTACCTTTTCTATATTAGCTAAAATGCCAAGAATAAAGACTCGAGTGTGTTATGTTTCAACGTG
- [0297] TTTATTTTT-3') (서열번호 56) 및
- [0298] R2 (5'-ATACTTAGGTACCAATCGATATGGCCACGTGGGTTCTGTGGTCCC-3') (서열번호 57).
- [0299] Ad5/3L-GFP 또는 Ad5/3S-GFP를 위한 섬유 정지 코돈 뒤에 각각 SpeI 또는 XhoI 제한부위를 도입하였다. 완전한 E1/E3-결합된 벡터 게놈을 생성하기 위해, 키메라 섬유 유전자 및 GFP 발현 카세트를 함유한 상응하는 서플라스미드를 이.콜라이 BJ1583내에서 상동 재조합에 의해 pAdHM4내로 삽입하였다. 생성된 플라스미드 pAd5/3L-GFP 및 pAd5/3S-GFP는 제한분석 및 서열분석으로 분석하였다. 상응하는 바이러스를 생성하기 위해, pAd5/3L-GFP 및 pAd5/3S-GFP를 PacI로 분해시켜 바이러스 게놈을 방출시키고 공지된 바와 같이 293 세포내로 형질감염시켰다. 재조합 바이러스는 표준 방법으로 293 세포내에서 증식시키고 정제하였다.
- [0300] Ad 입자 (바이러스 입자, VP) 농도는 260 nm의 흡광도 (OD_{260})를 측정함으로써 분광광도계로 결정하고 플러그 역가검정 (플러그 형성 단위, pfu)을 공지된 바와 같이 293 세포를 사용하여 실시하였다 (24). VP 대 pfu의 비율은 모든 바이러스 제제에서 20:1이었다.
- [0301] 결합 및 형질도입 검정. 흡착 세포를 Versene와 함께 배양하여 배양 접시로부터 분리시키고 PBS로 세척하였다. 총 1.8×10^5 세포/튜브를 세포당 8000 VP의 감염다중도 (MOI)로 ^3H -표지 Ad를 함유한 빙냉 흡착 완충액 100 μ l 중에 재현탁시켰다. 4°C에서 1시간 배양한 후 세포를 펠렛하고 0.5 ml의 빙냉 세척 완충액 (PBS, 1% FBS)으로 2회 세척하였다. 마지막 세척 후 상청액을 제거하고 세포-연관된 방사성을 섬광계수기로 결정하였다. 비리온 특이적 방사성 및 세포수를 사용함으로써 세포당 결합된 바이러스 입자 (VP)의 수를 계산하였다. 경쟁 연구를 위해, 4.5 μ g의 경쟁인자 (PtDd, 섬유 마디, 항체)를 흡착 4°C하에 완충액중에서 60분간 흡착하도록 두고 비결합된 경쟁인자는 세포를 PBS로 2회 세척하여 제거한 후 세포를 ^3H -표지 Ad가 함유된 흡착 완충액에 재현탁시켰다. 형질도입 연구를 위해 세포를 표기된 MOI로 Ad 벡터에 1시간 노출시키고, 18시간 후에 20000 세포중의 GFP 발현을 유세포분석으로 측정하였다.
- [0302] Ad5 감염 연구. 헬라의 모든 형질도입 연구에서 본 발명자들은 형질도입의 직선 범위내에서 사전에 최적화 조성된 조건 (MOI, 바이러스 농도, 노출 시간)을 사용하였다 (33).
- [0303] 웨스턴 블롯: 미니-PROTEAN 프리캐스트 겔 (BIO-RAD, Hercules, CA)를 4-15% 구배 폴리아크릴아미드와 함께 사용하였다. 도 2B에서 제시된 연구에서, 총 0.5 μ g의 단백질을 2배 로딩 완충액 (10 mM 트리스-HCl, pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 20% 글리세롤, 0.2% 브로모페놀 블루)과 혼합하였다. 샘플을 5분간 끓이거나 (B) 끓이지 않고 로딩하였다 (UB). 다음의 분리 완충액을 사용하였다: 25 mM 트리스, 0.192 M 글리신, 0.1% SDS, pH 8.3. 전기천공 후 단백질을 니트로셀룰로스로 옮기고 공지된 바와 같이 항-DSG2 항체 또는 항-Ad3 마디 항체와 함께 배양하였다 (33).
- [0304] 천연 폴리아크릴아미드 겔 전기영동. 도 2F에 제시된 연구에서, 총 0.4 μ g의 단백질을 2x 샘플 완충액 (62.5 mM 트리스-HCl, pH 6.8, 40% 글리세롤, 0.01% 브로모페놀 블루)와 혼합하고 끓이지 않고 25 mM 트리스, pH 8.3, 0.192 M 글리신에서 분리하였다.
- [0305] 투과율 검정. 총 5×10^5 T84 세포를 12 mm 트랜스웰 삽입구 (PET 막, 0.4 μ m 공극 (Corning, NY))에 접종하고 상피투과저항이 안정될때까지 20일간 이상 배양하였다. 배양 배지를 2-3일마다 교체하였다. 세포를 실온하에 15분 동안 흡착 배지 (DMEM, 1% FBS, 2 mM $MgCl_2$, 20 mM HEPES)중에서 DSG2 리간드 (20 μ g/ml)에 노출시켰다. 이어서, DMEM/K12 배지로 희석된 1 mCi의 [^{14}C]폴리에틸렌 글리콜-4000 (PEG-4000)(Perkin Elmer, Covina CA)을 내부 챔버에 첨가하였다. 15분 및 30분에서 내부 및 외부 챔버로부터 배지 분취물을 수확하고 섬광계수기로 측

정하였다. 투과율을 공지된 바와 같이 계산하였다 (36).

- [0306] 트라스투주마브 세포독성 검정. 5×10^4 BT474-M1 세포/웰을 3개 쌍의 96웰 평판에 도말하고 단층으로 성장시켰다. Ad3 섬유 마디 또는 모노클로날 항체 (5 ug/ml)를 내부 챔버에 첨가하였다. 1시간 후 트라스투주마브 (Genentech, San Francisco, CA) (150 ug/ml)를 첨가하고 2시간 후에 세포 생존율을 WST-1 검정법 (Roche San Francisco)으로 측정하였다. 3회 별도 연구를 수행하였다.
- [0307] 면역형광 분석. 세포를 8개 챔버 유리 슬라이드 (BD Falcon)에서 배양하고 빙냉 PBS로 2회 세척한 다음, 4℃에서 15분간 메탄올/아세톤 (1:1 용량/용량) 또는 4℃에서 30분간 4% 파라포름알데하이드로 고정시켰다. 고정 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 500 ul PBS/2% 분유 분말로 실온에서 20분간 차단시켰다. 항체 염색을 37℃하에 또는 4℃하에 밤새 90분간 100 ul PBS에서 수행하였다. 필요한 경우, 적당한 숙주에 대한 이차 항체를 실온에서 45분간 PBS로 3회 세척 후 적용하였다. PBS로 3회 세척 후 DAPI를 갖는 VECTASHIELD (Vector Labs)를 사용하여 유리 슬라이드를 올려놓았다. Leica DFC300FX 디지털 카메라로 사진을 촬영하였다. 40배 또는 100배 오일 렌즈 및 Zeiss 510 소프트웨어 (Zeiss Microimaging, Thornwood, NY)를 사용하여 Zeiss META 공초점 현미경으로 공초점 이미지를 획득하였다.
- [0308] 전자현미경. 트랜스웰 챔버내의 극성 세포를 농도를 반으로 줄인 Karnovsky 고정액 (2% 파라포름알데하이드, 2.5% 글루타르알데하이드, 0.2 M 카코딜레이트 완충액)으로 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 내부 챔버내의 고정액은 0.2% 루테늄 레드를 함유하였다. 루테늄 레드 (암모니아화 루테늄 (III) 클로라이드 옥사이드)는 Alfa Sesar (Ward Hill, MA)에서 구입하였다. 1% OsO₄-인산염 완충액으로 후고정을 수행하였다. 이어서, 트랜스웰 챔버로부터 막을 절단하고 메드캐스트 (Ted Pella, Redding, CA)에 함입시켰다. 초박편을 우라닐 아세테이트 및 납 시트레이트로 염색하였다. 가공 그리드를 JEOL JEM1200EXII 투과전자현미경으로 평가하였다. 올림퍼스 SIS Morada 디지털 CCD 카메라 및 이미지 처리용 iTEM 소프트웨어를 사용하여 이미지를 획득하였다.
- [0309] siRNA 연구. DSG2 특정 siRNA 세트를 Dharmacon (Thermo Scientific)으로 합성하였다. 표적 서열은 CAAUAUACCUAGUAGUAGAA (서열번호 29), GAGAGGAUCUGUCCAAGAA (서열번호 30), CCUAGAGCUACGCAUUA (서열번호 31) 및 CCAGUGUUCUACCUAAAUA (서열번호 32)이었다. 대조 siRNA는 Qiagen (Valencia, CA)에서 구입하였다. siRNA 형질감염은 HyperFect 형질감염 시약 (Qiagen)을 사용하여 실시하였다. 총 1×10^5 헬라를 1 ug의 DSG2 siRNA 또는 대조 siRNA로 형질감염시켰다. siRNA 형질감염 후 48시간 경과하여, 세포를 Versene로 수집하고 ³H-Ad3 또는 ³H-Ad35 바이러스의 결합을 상기한 바와 같이 분석하였다. siRNA 형질감염 후 48시간 경과하여 세포를 Ad 벡터로 50 pfu/세포의 MOI로 형질감염시키고 18시간 후 GFP 발현을 분석하였다.
- [0310] 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 분석. 데이터 취득은 BIAcore 3000 장비에서 실행하였다. 2 mM CaCl₂가 보충된 HBS-N (GE-Healthcare, Pittsburgh, PA)을 모든 실험에서 5 ul/분의 유속으로 완충용액으로서 사용하였다. CM4 센서칩 (BIAcore) 상에 고정은 DEC-NHS 활성화 유동셀상에 10분간 주입된 10 mM 나트륨 아세테이트 완충액 pH 4.2중에 희석된 0.1 ug/ml로 DSG2 (Leinco Technology, Inc.)를 사용하여 실시하였다. 대조 유동셀은 에틸 (디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 (EDC)/N-하이드록시석신이미드 (NHS)로 활성화시키고 에탄올아민으로 불활성화시켰다. Ad4 섬유 마디 또는 PtDs의 다른 농도를 5분 결합을 위해 주입한 후 3분 분리 시간을 두었다. 시그널은 에탄올아민 불활성화 EDC-NHS 유동셀의 배경으로부터 자동 통제되었다.
- [0311] 바이오티닐화 리간드를 사용한 실험에서, CM4 센서칩의 두개 유동셀을 상기한 바와 같이 활성화시킨 다음 스트렙타비딘 (아세테이트 완충액 pH 4.1중의 0.1 ug/ml)을 5분간 주사하여 피복시켰다. 이어서, 바이오티닐화 리간드를 이들 두 유동셀중 하나에 5분간 분리 완충액중의 0.1 ug/ml로 주입하고 다른 하나는 분리동안에 배경 통제를 위해 사용하였다. 그런 다음, 분리 완충액중의 가용성 DSG2의 다른 농도를 이들 유동셀상에 주입하고 배경을 자동 통제하였다.
- [0312] 음성 염색 전자현미경. 제조함 섬유 마디 단백질을 음성-염색 EM으로 가시화하여 그들의 응집 상태를 평가하였다. 표준 마이카/카본 제제를 0.1 mg/ml의 단백질과 함께 사용하였다. 샘플을 1%(w/v) 나트륨 실리코팅스테이트 (pH 7.0)을 사용하여 염색하고 필립스 CM12 전자현미경으로 100 kV에서 가시화하였다.
- [0313] 통계분석: 모든 결과는 평균 +/- 표준편차로 표시하였다. 필요한 경우 윌콕슨 부호순위 검정을 적용하였다. 0.05 미만의 p-값을 유의적으로 것으로 판단하였다.
- [0314] 결과

[0315] Ad3 섬유를 함유한 키메라 Ad5는 수용체로서 DSG2를 사용한다. 본 발명자들의 예비 연구는 Ad3 내의 DSG2 상호작용 도메인이 바이러스 입자 (즉, Ad4 비리온 또는 PtDd)에 존재하는 공간 위치에서만 섬유 또는 섬유/펜톤에 의해 형성된다는 것을 밝혔다. DSG2와의 결합에서 PtDs에 존재하는 Ad3 펜톤의 잠재적 역할을 평가하기 위해 본 발명자들은 Ad3 섬유를 함유하지만 Ad5로부터 유래된 모든 다른 캡시드 단백질 (펜톤을 포함)을 갖는 Ad 벡터 (Ad5/3S-GFP)를 생성하였다. Ad3 섬유축이 Ad3-DSG2 상호작용에 중요한 역할을 하는지를, 예를 들어 DSG2 추가의 결합 부위를 함유하고 있는지를 평가하기 위해, 본 발명자들은 또한 Ad3 축이 Ad5 축으로 치환된 키메라 Ad5/3 벡터 (Ad5/3L-GFP)를 생성하였다 (도 9A). 주목할 것은, Ad3 섬유축은 6개의 축 반복 모티프를 함유하는 한편 Ad5 축은 더 길고 22개의 축 모티프를 함유한다. 비교를 위해 본 발명자들은 Ad5/3 벡터와 동일한 GFP 발현 카세트를 포함하는 Ad3 벡터 (Ad3-GFP)를 사용하였다 (33). 본 발명자들은 Ad5/3S-GFP 및 Ad5/3L-GFP 벡터가 감염을 위해 DSG2를 사용하는지를 분석하였다. 헬라 세포에 ³H-표지 Ad 벡터의 결합은 Ad3-GFP, Ad5/3S-GFP 및 Ad5/3L-GFP의 경우 동일한 정도로 재조합 DSG2 단백질에 의해 차단되었다 (도 9B). 예상한 바와 같이, 재조합 DSG2는 또한 헬라세포의 감염 후 18시간 경과하여 GFP 세기를 기준으로 측정된 결과 세가지 모든 벡터의 형질도입을 차단하였다. Ad 비리온내의 DSG2 상호작용 도메인에 대한 경쟁인자로서 사용된 PtDd는 비슷한 수준으로 Ad3-GFP, Ad5/3S-GFP 및 Ad5/3L-GFP 형질도입을 차단하였다 (도 9D). Ad3 및 Ad5/3 벡터의 감염에서 DSG2의 중대한 역할을 증명하기 위해 본 발명자들은 헬라세포를 DSG2 mRNA에 특이적인 siRNA 또는 대조 siRNA로 형질감염시켰다. siRNA의 형질감염 후 48시간이 경과하여 평균 형광 DSG2 세기는 헬라세포로 형질감염된 DSG2 siRNA 및 대조 siRNA의 경우 각각 22.1 및 195였으며, 이것은 DSG2 siRNA에 의한 DSG2 발현의 효율적인 억제를 가리킨다. DSG2 mRNA 녹다운은 Ad3-GFP, Ad5/3S-GFP 및 Ad5/3L-GFP 형질도입을 유의적으로 감소시켰다 ($p < 0.001$) (도 9E). 흥미로운것은 DSG2의 녹다운은 Ad3 섬유를 함유한 벡터 (Ad3-GFP 및 Ad5/3S-GFP)의 형질도입에 비하여 적은 정도로 Ad5/3L-GFP 형질도입을 감소시켰다 ($p < 0.01$). 본 발명자들은 Ad5/3L-GFP가 DSG2와의 다른 수용체를 이용할 수 있음을 가정한다. 종합해 보면 이들 연구는 i) Ad5/3 벡터가 DSG2를 수용체로 사용한다는 것을 보여준다. 이것은 Ad5/3 벡터가 환자에게 사용되기 때문에 임상 연구와 연관성이 있으며 (14,35) ii) Ad3의 DSG2 상호작용 도메인이 섬유내에 위치한다. Ad 펜톤 (PtDd 또는 Ad5 및 Ad4 비리온내)은 단순히 DSG2와의 상호작용을 위한 Ad3 섬유 마디의 정확한 공간 위치를 위해 스캐폴드를 제공하는 듯하다.

[0316] Ad3 섬유 마디의 가교는 DSG2와의 효율적인 결합을 위해 필요하다. 본 발명자들은 Ad3 섬유에 관심을 집중하였다. 본 발명자들은 섬유 마디 및 Ad3 축 반복체의 숫자를 늘려서 함유하는 (1개 반복체에서 6개 반복체) 일련의 재조합 Ad3 섬유 마디 단백질을 이. 콜라이에서 생성하였다 (도 10A). DSG2 또는 항Ad3 섬유 마디 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석은 모든 재조합 섬유 마디가 삼량체를 형성하였음을 나타냈다 (도 10 B,C). 이전에 관찰된 바와 같이 (33), Ad3 섬유 마디 + 한 개의 축 도메인 (S/Kn)은 웨스턴 블롯 분석에 DSG2와 결합하지 않았는데, 이것은 축 모티프가 Ad3 마디 구조에 미치는 잠재적인 입체 영향을 가리킨다. 6개의 축 모티프 (S6/Kn)을 함유한 단백질은 응집체를 형성하는 성향이 있었고 이에 따라 추가의 연구에 사용하지 않았다. 경쟁 연구에서 사용했을 때, 모든 재조합 섬유 마디 단백질은 PtDd에 비하여 유의적으로 더 적게 Ad3-GFP 형질도입을 억제하였다 (도 10, D,E). 본 발명자들은 Ad3 섬유 마디 이량체화가 DSG2 결합을 증가시키는지 시험하고자 하였다. 모든 재조합 섬유 마디는 단백질 정제를 위해 사용된 N-말단 His 태그를 함유하였기 때문에, 본 발명자들은 Ad3 섬유 마디를 His 태그에 대한 항체와 혼합하여 이들의 가교를 달성하였다. 항-His 태그 항체와 섬유 마디사이의 복합체 형성은 천연 폴리아크릴아미드 겔로 전기영동하여 증명되었다 (도 10F). 항-His 항체 가교된 섬유 마디를 경쟁자로서 사용했을 때 Ad3-GFP 형질도입의 유의적인 억제 (대조 IgG와 혼합된 섬유 마디와 비교하여)가 관찰되었다 (도 10G). 이것은 Ad3 섬유 마디의 이량체가 DSG2 결합을 위해 필요하다는 것을 제시한다. 이것은 Ad3에서만 이루어지는 새로운 Ad 결합 전략으로 보였다. 그 이유는 Ad35 섬유 마디의 항-His 항체 가교가 CD46-상호작용 벡터 Ad35-GFP에 의한 감염에 영향을 미치지 않았기 때문이다 (도 10H).

[0317] Ad3 섬유 마디 이량체는 Ad3 감염을 차단한다. 항체와의 가교는 야생형 Ad3 섬유 마디보다 적은 수의 축 모티프를 함유하는 Ad3 섬유 마디의 차단 효과를 증가시켰다. 연결 개방제로서 Ad3 섬유 마디의 잠재적인 치료 용도를 위해 본 발명자들은 최소 수의 축 모티프 (즉, S2/Kn)를 갖는 섬유 마디 변이체를 평가함으로써 분자 크기를 감소시키는 것에 대한 연구에 추가로 집중하였다. 섬유 마디 가교가 DSG2와의 결합을 증가시킨다는 발견을 근거로, 본 발명자들은 이량체화 도메인을 삽입시킴으로써 S2/Kn의 이량체를 생성하였다. 이. 콜라이에서 생성하는 동안에 자발적인 섬유 마디 이량체화 및 봉입체의 잠재적 형성을 피하기 위하여 본 발명자들은 고친화성으로 서로 상호작용하는 E-코일과 K-코일 펩타이드로 구성된 헤테로-이량체 시스템을 이용하였다 (17). EVSALKE (서열번호 22)(K-코일) 및 KVSALKE (서열번호 23)(E-코일)의 반복체 5개를 각각 함유하고, G/S 풍부한-탄력성 도메인 및 이어서 2개의 축 모티프 및 단독삼량체 섬유 마디 도메인을 함유하는 2개의 마디 변이체를 생성하였

다 (도 11A). Ad3-K/S2/Kn 및 Ad3-E/S2/Kn를 이.콜라이에서 별도로 생성하고 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. 이량체화를 위해 정제된 양 단백질을 1:1 농도비로 혼합하였다. Ad3-K/S2/Kn과 Ad3-E/S2/Kn의 혼합물은 PtDd만큼 효율적으로 Ad3 감염을 차단하였다 (도 11B). 흥미롭게도, Ad3-K/S2/Kn 단독은 양 펩타이드의 혼합물과 동일한 경쟁 세기를 나타낸 한편, Ad3-E/S2/Kn 단독은 감염을 비효율적으로 차단하였다. 이것은 Ad3-K/S2/Kn이 단독이량체화할 수 있는 한편 Ad3-E/S2/Kn은 할 수 없다는 것을 제시한다. 이를 지지하는 것으로 본 발명자들은 항-His 항체와의 가교는 Ad2-E/S2/Kn의 차단 효과를 증가시켰으나 ($p < 0.05$) Ad3-K/S2/Kn의 차단 효과는 증가시키지 못한다는 것을 발견하였다 (도 11C).

[0318] DSG2에 최소 이량체 Ad3 섬유 마디 단백질의 결합. 본 발명자들은 K-코일 또는 E-코일 이량체화 도메인, 단지 하나의 축 모티프 및 단독삼량체 Ad3 섬유 마디를 함유하는 가장 작은 Ad3 섬유 마디 이량체 (Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-E/S/Kn)를 생성하였다 (도 12A). 이러한 단백질은 좀더 작은 크기때문에 혈관으로부터 배출 및 조직 침투에 잠재적인 치료 이점을 가지며 또한 좀더 적은 면역원 에피토프를 함유한다. Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-E/S/Kn은 이. 콜라이에서 생성하고 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의한 분석은 Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-E/S/Kn의 대부분은 삼량체 (약 65 내지 70 kDa)로 존재함을 나타냈다 (도 12B). Ad3-K/S/Kn 단독 및 이의 Ad3-E/S/Kn과의 배합을 음성 염색 전자현미경으로 분석하여 이들의 응집 상태를 평가하였다 (도 12C). 섬유 마디의 이량체 및 이의 응집체가 Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn 모두에서 발견되었으나 좀더 큰 응집체가 Ad3-K/S/Kn 제제에서 좀더 적었다. Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn 둘 다는 PtDd와 비슷한 수준으로 헬라세포와의 Ad3 결합을 차단시켰다 (도 12D). Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn와 함께 헬라세포의 예비배양은 Ad5 결합에 영향을 미치지 못했다 (도 12 F,G). 두개 및 한개의 축 모티프를 갖는 섬유 마디의 일대일 비교는 이들이 Ad3 감염을 차단하는 능력에서 유의적인 차이를 보여주지 못했다 (도 12 H,I).

[0319] DSG2와 결합하는 이량체 Ad3 섬유 마디의 SPR 분석. DSG2와 Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn의 상호작용을 좀 자세히 연구하기 위해, 본 발명자들은 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 연구를 실시하였다. 본 발명자들은 먼저 DSG2 분자가 고정 섬유 마디와 결합하도록 하는 결합 실험을 디자인하였다 (도 13A). 고정을 위해, 섬유 마디를 바이오티닐화하고 스트렙타비딘을 통해 센서칩에 연결시켰다. 역학 분석은 Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn 둘 다가 DSG2를 주사 종점에서 저해리로 비슷하게 인식하였음을 보여주었다. 명백한 것은 섬유에 가용성 DSG2의 결합은 세포 표면과 바이러스사이의 생리학적 상호작용을 단지 열악하게 모사한다. 따라서, 본 발명자들은 수용체 DSG2를 센서칩 표면에 고정시키고 Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn 및 비교용으로 PtDd 및 (단량체) Ad3 섬유 마디를 유사한 SPR 반응을 제공하는 농도로 주입하였다 (도 13B). 이들 연구의 결과는 섬유 마디의 Ad3 수가에 의해 좌우되며, 섬유 마디 (단량체)의 경우 삼량체이고, Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn의 경우 2x 삼량체이며, PtDd의 경우 12x 삼량체이다. 또한, PtDd내의 모든 섬유가 DSG2와 동시에 상호작용할 수 없다는 사실에 의해 복잡다단하다. 섬유 마디 이량체의 결합은 유사한 한편 (도 13C "결합 종점에서의 결합"), 해리 행동에는 뚜렷한 차이가 있었다. Ad3 섬유 마디 (공지된 (33) 비이량체화)("Ad3 마디")은 다른 세계의 리간드보다 더 빠르게 해리하였다. PtDd 및 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn의 경우 해리는 거의 관찰되지 않았다. Ad3-K/S/Kn 해리는 Ad3 섬유 마디의 해리와 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn의 해리사이에 있다. 비록 복잡하지만, 이들 데이터는 이량체 Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn가 Ad3 섬유 마디보다 DSG2로부터 더 느리게 해리한다는 것을 명백히 보여준다. 이것은 항체 결합 기전으로 설명될 수 있으며 Ad3-K/S/Kn 및 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn가 수개의 DSG2 분자와 결합함을 내포하며, 이러한 기전은 전체 낮은 해리 속도와 고도의 안정한 결합을 달성하도록 해준다. 주목할 것은 비록 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn의 모든 이량체가 Ad3-K/S/Kn에 의해 형성되는 것이 가능하지만 해리 속도의 차이가 논쟁의 소지가 있다. 이를 자세히 증명하기 위해서 추가의 연구가 필요하다.

[0320] 몇 가지의 DSG2 분자와 Ad3의 상호작용은 상피 세포의 면역형광 분석에 의해 지지된다 (도 13 D 및 E). Cy3-표지된 Ad3 비리온을 사용한 이들 연구는 하나의 비리온이 이의 주변에서 수 가지의 DSG2 단백질과 클러스터를 형성한다. 아래에 요약된 바와 같이 본 발명자들은 수용체의 그러한 특정 클러스터 형성이 세포내 시그널전달의 유도 및 상피연접의 개방에 관한 기능상 결과를 나타낸다는 가설을 제기한다. 특히 실시예 1에서 본 발명자들은 DSG2와의 PtDd 결합이 상피세포에서 상피세포로부터 중간엽세포로의 전환 (EMT)을 유도하고 그 결과 세포간 연접의 일시적인 개방을 제공한다는 것을 제시하였다.

[0321] 다량체 DSG2 리간드 (Ad3 비리온, PtDd, Ad3-K/S/Kn)은 상피세포연접의 개방을 유도한다. 상피세포는 수 가지의 세포간연접 (밀착 연접, 어드헤런스연접, 갭연접 및 데스모솜)을 유지하며 이의 특징은 흔히 상피암 자체 및 암세포주에 보존된다 (29). 도 14A는 극성 결장 암종 T84 세포의 공초점 면역형광 현미경 이미지를 보여준다.

측면으로부터 세포 (즉, 적재된 XZ-층)이 나타나 있다. 세포간연접은 긴 수직 줄무늬로 나타나 있고 흡착 연접 단백질 클라우딘 7과 테스모즘 단백질 DSG2가 표시되어 있다. DSG2 (녹색)이 클라우딘 7 시그널의 정점에 위치하고 있다. 밀착 연접 단백질 ZO-1은 DSG2의 정점에서 발견될 수 있다 (하위 패널). 또한, 후자가 XY 이미지에 나타나 있고 밀착 연접의 치킨-와이어 네트워크를 보여주며 정점 세포 표면에 ZO-1이 표시되어 있다. 반면에 1 μ m 더 깊은 부분은 DSG2 염색을 보여준다 (도 14B). 중요한 것은 Ad3-K/S/Kn에 T84 세포의 노출은 상피연접의 부분 해리를 유도하였고, 이것은 비처리 세포 (도 14A, 하위 패널)와 비교하여 DSG2 및 ZO1의 감소 염색으로 나타났다 (도 14C).

[0322] Ad3-K/S/Kn에 의한 상피연접의 개방은 또한 전자현미경 (EM) 연구에 의해 검증되었다. 비처리 상피세포의 EM 이미지는 기저측 공간으로부터 정점에 적용된 염료 루테늄 레드의 배제에 의해 판단되는 바와 같이 완전한 밀착 연접 및 테스모즘 연접을 보여준다 (도 14D, 좌측 패널). 염료는 세포막 표면을 따라 고전자밀도 라인으로 나타난다. Ad3-K/S/Kn과 함께 상피세포의 배양은 Ad3-K/S/Kn 첨가의 1시간 내에 측면 공간 안쪽으로 루테늄 레드의 누출 결과로 나타났다 (도 14D, 우측 패널). Ad3-K/S/Kn 처리된 세포에서 테스모즘 (화살표로 표시)의 부분 분해가 도 14E에서 뚜렷이 나타나 있다. Ad3-K/S/Kn 이외에, Ad3 비리온, PtDd 및 Ad3-K/S/Kn+Ad3-E/S/Kn의 공초점 면역형광 및 EM 연구에서 상피연접의 개방이 관찰되었다 (데이터 제시되지 않음). Ad3 섬유 마디 (비이량체화) 또는 Ad3-E/S/Kn, 즉 다량체화할 수 없는 DSG2 리간드에 세포의 노출은 상피연접에 영향을 미치지 않았다 (데이터 제시되지 않음).

[0323] 루테늄 레드의 누출 연구이외에, 본 발명자들은 세 가지의 기능상 검정을 사용하여 Ad3-K/S/Kn에 의한 상피연접의 개방을 증명하였다: i) Ad3-K/S/Kn에 극성 상피세포의 노출은 ^{14} C-PEG-4000 연속유동 연구에서 나타난 바와 같이 30분 내에 상피투과성을 증가시켰다 (도 15A). 중요하게는, 비이량체화 Ad3-E/S/Kn 섬유 마디 또는 G2의 세포외 도메인의 다른 영역에 대한 mAb와 함께 배양한 후의 투과성이 Ad3-K/S/Kn과의 배양 후보다 5배 이상 더 낮았다. ii) 이전의 연구는 극성 유방암 BT474-M1 세포에서 헤르셉틴/트라스투주마브의 표적인 Her2/neu가 상피연접에 갇혀있고 Ad3 PtDd와 함께 BT474-M1 세포의 배양이 Her2/neu로의 접근을 증가시키고 암세포의 트라스투주마브 사멸을 증가시킨다는 것을 나타냈다 (33). 본 발명자들은 이 검정을 사용하여 트라스투주마브 세포 독성에 미치는 추가적인 DSG2 리간의 영향을 연구하였다 (도 15B). 본 발명자들은 Ad3-K/S/Kn이 트라스투주마브에 의한 BT474-M1 세포의 사멸을 유의적으로 증가시켰음을 발견하였다. 대조적으로, 이량체화할 수 없는 DSG2 리간드, 즉 Ad3-E/S/Kn 및 일련의 항-DSG2 항체는 트라스투주마브 사멸에 유의적인 영향을 미치지 않았다. 특히, 세포의 도메인 3/4에 대한 항-DSG2 항체중 하나 (mAb 6D8)은 종양 세포 증식을 자극하는 것으로 나타났다. iii) Ad5의 수용체인 CAR은 극성 T84 상피세포의 밀착 연접에 위치한다 (3). 이것은 T84 세포에서 공초점 면역형광 현미경으로 관찰된다 (도 15C, 상위 패널 및 도 15D, 상위 패널). Ad3-K/S/Kn과 함께 이들 세포의 배양은 CAR 염색을 상당히 증가시켰으며 그러한 염색은 측막 (도 15C 하위 패널)을 따라서 및 세포 표면 (도 15D 하위 패널)에서 나타난다. 본 발명자들은 이것이 밀착 연접의 분해 및 T84 세포의 정단에 적용된 항-CAR 항체에 CAR의 보다 양호한 접근성의 결과인 것으로 추정하였다. 밀착 연접의 분해 및 CAR 접근성에 대한 다른 잠재적 검정은 CAR-표적 Ad 벡터의 형질도입이다. 250 pfu/세포의 MOI로 Ad5-GFP에 의한 극성 T84 세포 (정단면)의 감염이 세포의 8(+/-2)%의 형질도입을 제공하였다 (감염 후 20시간 경과하여 계수된 GFP-양성 세포를 기준으로)(도 15E). Ad3-K/S/Kn의 존재하에 Ad5-GFP는 GFP-양성 세포의 38(+/-9)%를 제공하였다. 희석 완충액 또는 Ad3-K/S/Kn의 존재하에 Ad3-GFP는 T84 세포의 17(+/-6)% 또는 68(+/-17)%를 각각 형질도입시켰다. 후자는 Ad3이 극성 상피세포를 Ad5보다 더 효율적으로 감염시키는 결과를 보여주는 이전의 연구 (28)와 일치한다. 이것은 확실히 Ad3-K/S/Kn이 DSG2와 결합하고 연접의 개방을 유도하는 능력에 기인한다. Ad3-K/S/Kn은 Ad3-GFP 형질도입을 증가시켰다. 본 발명자들은 상대적으로 작은 Ad3-K/S/Kn 단백질 및 이의 고농도가 Ad3 비리온보다 더 DSG2 수용체에 도달함으로써 밀착 연접의 개방을 증가시키는 것으로 추정한다. 도 15E에 나타난 모든 세팅에서, 단층 (즉, 밀착 연접없이 내부 챔버의 벽과 접촉하는 세포)의 주변에 있는 대부분의 세포는 GFP-양성이었다. 따라서, 본 발명자들은 트랜스웰의 중앙에 위치한 GFP-양성 세포를 계수하였다. 후자는 희석 완충액 또는 Ad3-K/S/Kn의 존재하에 Ad5-GFP 감염 후 GFP 발현의 유세포 분석의 해석내에서 판단되어야 한다 (도 15F). 비록 배경 GFP 형광 수준이 비교적 높았지만 Ad3-K/S/Kn의 존재는 Ad5-GFP 감염 후 GFP 발현 수준을 유의적으로 증가시켰으나 Ad3-E/S/Kn 또는 항-DSG2 mAb의 존재는 그렇지 않았다. 종합하면 본 발명자들의 기능 연구는 Ad3-K/S/Kn이 상피연접의 개방을 유도할 수 있는 한편 다량체화할 수 없는 리간드는 연접에 영향을 미치지 않음을 보여주었다.

[0324] 논의

[0325] 이 연구에서, 본 발명자들은 두 가지 발견을 제시한다: i) Ad3 섬유 마디의 다량체화는 DSG2와의 고친화성 및

안정한 결합을 달성하는데 필요하고 ii) Ad3-섬유 마디/DSG2 상호작용의 다량체 모드는 상피연접의 개방을 유도한다.

[0326] CAR-상호작용 Ad5, DSG2-상호작용 Ad3 및 CD46-상호작용 Ad35에 의한 감염을 포함한 대부분의 Ad 감염 (22)은 기도 상피를 표적으로 한다. 수용체와의 고 활성 결합을 저해리와 함께 달성하는 것은 바이러스와 표적 세포간의 접촉을 유지하고, 더 중요하게는 바이러스가 상피 장벽을 분해시키고 표적 세포로 유입하여 표적 조직내에서 증식케하는 일련의 과정을 유도하는데 Ad 감염에 중요한 역할을 하는 듯하다. CAR- 및 CD46-결합 Ad의 경우 고 활성 결합은 삼량체 섬유 마디와 3개의 수용체 단위간의 상호작용을 통해 달성된다. 게다가, Ad11과 CD46간의 상호작용에서 보는 바와 같이, 수용체와의 초기 Ad 결합은 수용체에 구조 변화를 유도하여 결합을 안정화시킬 수 있다 (21). 그러나, 후자 기전은 Ad11외에 다른 Ad에 의해 사용되는 것으로 나타나는 여지는 남아 있다. CAR- 및 CD46-상호작용 Ad의 경우, 결합은 섬유 마디와 수용체를 포함하며 과량의 가용성 섬유 마디에 의해 완전히 차단될 수 있다. 이것은 DSG2-결합 Ad3의 경우와 다르다. 본 발명자들은 Ad3 결합 및 감염의 완전한 억제 물리적 연결 및 확실히 둘 이상의 섬유 마디의 특이적 공간 위치를 필요로 한다는 것을 제시해 왔다. 이것은 Ad 비리온, Ad3 PtDd 또는 이량체 Ad3-K/S/Kn으로 달성된다. 이들 리간드는 몇 개의 DSG2 분자와의 동시적인 결합을 달성하는 듯하며, 한편으로는 고결합활성을 제공하고 다른 한편으로는 상피연접의 개방과 기능적으로 연관성이 있다. 본 발명자들은 Ad3-DSG2 상호작용에 관한 우리의 발견을 추가로 지지하기 위하여 결정 구조 및 돌연변이유발 연구를 실시중에 있다.

[0327] 많은 병원체는 감염을 개시하기 위하여 연접형태를 붕괴시키는 기전을 진화시켜 왔다. 비브리오 콜레라는 조나 오클루덴 독소 (Zot)를 생성하며 이 독소는 장 상피연접을 가역적으로 변형시키는 능력을 제공함으로써 점막관문을 통해 거대분자가 통과되도록 한다 (6). 클로스트리디움 퍼프린젠 내독소는 밀착 연접으로부터 클라우딘-3 및 -4를 제거하여 세균 침입을 촉진시킨다 (25). 게다가, 인간 Ad, HPV, HTLV-1에 의해 암호화된 종양단백질은 연접단백질 ZO-1의 위치를 바꿈으로써 상피연접을 일시적으로 개방시킬 수 있다 (15). 바이러스에 의해 사용된 후자 기전은 간접적인 바이러스 확산에 기여하는 듯하다. 그러나, 효율적인 초기 감염의 위해 바이러스의 결합은 상피연접의 개방을 유도하는 것과 연결되어야 한다.

[0328] 면역형광, PI3K/MAPK 인산화, mRNA 발현 배열 및 대사 경로 억제 방법을 이용하는 실시예 1에서, 본 발명자들은 Ad3 비리온 및 Ad3 PtDd에 의한 DSG2의 결합이 상피 세포에서의 상피로부터 중간엽으로의 전환을 유도하여 세포간 연접의 일시적인 개방을 제공한다는 것을 제시하였다. DSG2와 AD3 입자 또는 재조합 PtDd의 상호작용에 의해 매개된 세포간 연접 개방은 추가로 상피세포 투과성의 증가 및 세포간연접에 갇혀있는 수용체 (예, Her2/neu)로의 접근 증가에 의해 지지되었다. 본 발명의 연구에서, 본 발명자들은 Ad3-K/S/Kn이 또한 연접 개방을 유도한다는 것을 보여주는 형태상 (공초점 면역형광, EM) 및 기능상 (투과성, 트라스투주마브 사멸, Ad5 감염) 데이터를 제공한다. 중요한 것은, 단량체 Ad3-E/S/Kn 또는 DSG2의 다른 영역에 대한 모노클로날 항체와 같이 DSG2와 다량체화하고 클러스터를 형성할 수 없는 다른 DSG2 리간드는 연접을 효율적으로 개방할 수 없었다. 그러나, Ad3이 DSG2/테스모좀의 정단면에 위치한 밀착 연접을 어떻게 통과할 수 있는가에 관한 의문은 남아 있다. 본 발명자들은 Ad-DSG2 매개된 연접 개방이 수분내에 일어남으로써 감염 부위에 존재하는 바이러스 입자에 연접에 갇힌 DSG2를 노출시키기 때문에 양성 피드포워드 기전을 통해 효율적인 감염이 이루어진다고 추정한다.

[0329] Ad3 감염 기전의 논의에서, Ad3 복제 동안에 PtDd가 감염성 바이러스당 다량의 5.5×10^6 PtDd로 형성된다는 것은 주목할만하다. 이것은 PtDd 형성이 Ad3에게 기능상 중요하며, 즉 AD3의 증식 또는 잔류에 유리하다는 것을 제시한다. 유사한 기전이 Ad5에 의한 상피세포의 감염에서 일어나는 듯하다. Ad5의 복제 동안에, 섬유의 과다 생성은 CAR 이량체화를 간접함으로써 또는 세포간 연접의 재구성을 유도하는 세포내 시그널전달을 유도함으로써 상피연접을 분해시킨다 (4, 32). 최근에, CD46이 극성 상피 호흡 세포의 정상에서 노출됨으로써 생체내 초기 감염을 위한 Ad 수용체로서 작용할 가능성 더 높다는 것이 제시되어 왔다 (시험관내 연구를 근거로 하여)(9). 본 발명자들은 그러한 제안을 인간 CD46 트랜스제닉 마우스에서 검증할 수 없었으며 CD46 발현 양상이 Ad 형질 도입과 상관성이 없다 (9). 게다가, 극성 상피 암 배양에서, 본 발명자들은 세포간 연접에 갇혀있고 세포 표면에 적용된 Ad35에 접근하지 못하는 CD46을 발견하였다 (33). 이 시점에서 본 발명자들은 CD46-결합 Ad가 상피 장벽을 어떻게 분해시키는 가에 대한 질문은 여전히 답변이 필요한 것으로 믿는다.

[0330] Ad3-K/S/Kn이 연접 개방을 유도한다는 발견은 세포간 연접이 항암 치료제의 접근 및 종양내 분산에 대한 물리적 장애를 나타내기 때문에 실질적인 연관성이 있다 (26-27). 상피 연접 개방제는 상피연접에 갇혀 있는 종양-연관 항원에 대한 모노클로날 항체 (예, Her2/neu 또는 EGFR1)를 이용한 암치료와 연관성이 있을 수 있다 (33).

연접 개방제는 또한 적응 T-세포 요법의 효능을 향상시킬 수 있거나 (5) 리포솜 화학요법 약물로의 치료를 개선시킬 수 있다 (10). 마지막으로, Ad3-K/S/Kn은 Ad5-기본 유전자 치료 벡터에 의한 정상 또는 악성 조직의 형질 도입의 효능을 증가시킬 수 있다. Ad3-K/S/Kn의 생명공학 응용성이 또한 그의 생산 및 정제의 용이성 및 그것이 자발적으로 단독이량체화한다는 사실에 의해 강조된다.

- [0331] 결론적으로, 본 발명자들의 연구는 상피세포의 Ad3 감염에 대한 기전을 밝혀준다. 작은 재조합 단백질인 Ad3-K/S/Kn이 상피연접의 개방을 유도한다는 사실은 암치료 및 상피조직내로의 약물 전달과 연관성이 있다.
- [0332] 실시예 2와 관련된 참조문헌
- [0333] 1. Arnberg, N. 2009. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Viro* 19:16S-17S.
- [0334] 2. Chitaev, N. A., and S. M. Troyanovsky. 1997. Direct Ca²⁺-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Bio* 138:193-201.
- [0335] 3. Coyne, C. B., and J. M. Bergelson. 2005. CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* 57:869-882.
- [0336] 4. Coyne, C. B., L. Shen, J. R. Turner, and J. M. Bergelson. 2007. Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and RabS. *Cell Host Microbe* 2:181-192.
- [0337] 5. Disis, M. L. 2009. Enhancing cancer vaccine efficacy via modulation of the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 15:6476-6478.
- [0338] 6. Fasano, A., B. Baudry, D. W. Pumphlin, S. S. Wasserman, B. D. Tall, J. M. Ketley, and J. B. Kaper. 1991. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5242-5246.
- [0339] 7. Fender, P., A. Boussaid, P. Mezin, and J. Chroboczek. 2005. Synthesis, cellular localization, and quantification of penton-dodecahedron in serotype 3 adenovirus-infected cells. *Virology* 340:167-173.
- [0340] 8. Fender, P., R. W. RUIgrok, E. Gout, S. Buffet, and J. Chroboczek. 1997. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat Biotechnol* 15:52-56.
- [0341] 9. Granio, O., I. J. Ashbourne Excoffon, P. Henning, P. Melin, C. Norez, G. Gonzalez, P. H. Karp, M. K. Magnusson, N. Habib, L. Lindholm, F. Becq, P. Boulanger, J. Zabner, and S. S. Hong. 2010. Adenovirus 5-fiber 35 chimeric vector mediates efficient apical correction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defect in cystic fibrosis primary airway epithelia. *Hum Gene Ther* 21:251-269.
- [0342] 10. Harper, B. W., A. M. Krause-Heuer, M. P. Grant, M. Manohar, K. B. Garbutcheon-Singh, and J. R. Aldrich-Wright. 2010. Advances in platinum chemotherapeutics. *Chemistry* 16:7064-7077 .
- [0343] 11. Kalin, S., B. Amstutz, M. Gastaldelli, N. Wolfrum, K. Boucke, M. Havenga, F. DiGennaro, N. Liska, S. Hemmi, and U. F. Greber. 2010. Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35. *J Virol* 84:5336-5350.
- [0344] 12. Keim, S. A., K. R. Johnson, M. J. Wheelock, and J. K. Wahl, 3rd. 2008. Generation and characterization of monoclonal antibodies against the proregion of human desmoglein-2. *Hybridoma (Larchmt)* 27:249-258.
- [0345] 13. Kirby, I., E. Davison, A. J. Beavil, C. P. Soh, T. J. Wickham, P. W. Roelvink, I. Kovesdi, B. J. Sutton, and G. Santis. 2000. Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. *J Virol* 74:2804-2813.
- [0346] 14. Koski, A., L. Kangasniemi, S. Escutenaire, S. Pesonen, V. Cerullo, I. Diaconu, P. Nokisalmi, M.

Raki, M. Rajewski, K. Guse, T. Ranki, M. Oksanen, S. L. Holm, E. Haavisto, A. Karioja-Kallio, L. Laasonen, K. Partanen, M. Ugolini, A. Helminen, E. Karli, P. Hannuksela, T. Joensuu, A. Kanerva, and A. Hemminki. 2010. Treatment of cancer patients with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus expressing GMCSF. *Mol Ther* 18:1874-1884.

- [0347] 15. Latorre, I. J., M. H. Roh, K. K. Frese, R. S. Weiss, B. Margolis, and R. T. Javier. 2005. Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *J Cell Sci* 118:4283-4293.
- [0348] 16. Lee, C., J. Dhillon, M. Y. Wang, Y. Gao, K. Hu, E. Park, A. Astanehe, M. C. Hung, P. Eirew, C. J. Eaves, and S. E. Dunn. 2008. Targeting YB-1 in HER-2 overexpressing breast cancer cells induces apoptosis via the mTOR/STAT3 pathway and suppresses tumor growth in mice. *Cancer Res* 68:8661-8666.
- [0349] 17. Litowski, J. R., and R. S. Hodges. 2002. Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils. Effects of hydrophobicity and alpha-helical propensity on protein folding, stability, and specificity. *J Bioi Chem* 277:37272-37279.
- [0350] 18. Lortat-Jacob, H., E. Chouin, S. Cusack, and M. J. van Raaij. 2001. Kinetic analysis of adenovirus fiber binding to its receptor reveals an avidity mechanism for trimeric receptor-ligand interactions. *J Bioi Chem* 276:9009-9015.
- [0351] 19. Ni, S., A. Gaggar, N. Di Paolo, Z. Y. Li, Y. Liu, R. Strauss, P. Sova, J. Morihara, Q. Feng, N. Kiviat, P. Toure, P. S. Sow, and A. Lieber. 2006. Evaluation of adenovirus vectors containing serotype 35 fibers for tumor targeting. *Cancer Gene Ther* 13:1072-1081.
- [0352] 20. Norrby, E., B. Nyberg, P. Skaaret, and A. Lengyel. 1967. Separation and characterization of soluble adenovirus type 9 components. *J Viro* 11:1101-1108.
- [0353] 21. Persson, B. D., D. M. Reiter, M. Marttila, Y. F. Mei, J. M. Casasnovas, N. Arnberg, and T. Stehle. 2007. Adenovirus type 11 binding alters the conformation of its receptor CD46. *Nat Struct Mol Bioi* 14:164-166.
- [0354] 22. Sanchez, M. P., D. D. Erdman, T. J. Torok, C. J. Freeman, and B. T. Matyas. 1997. Outbreak of adenovirus 35 pneumonia among adult residents and staff of a chronic care psychiatric facility. *J Infect Dis* 176:760-763.
- [0355] 23. Shayakhmetov, D. M., and A. Lieber. 2000. Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J Virol* 74:10274-10286.
- [0356] 24. Shayakhmetov, D. M., T. Papayannopoulou, G. Stamatoyannopoulos, and A. Lieber. 2000. Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J Virol* 74:2567-2583.
- [0357] 25. Sonoda, N., M. Furuse, H. Sasaki, S. Yonemura, J. I{atahira, Y. Horiguchi, and S. Tsukita. 1999. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Bioi* 147:195-204.
- [0358] 26. Strauss, R., and A. Lieber. 2009. Anatomical and physical barriers to tumor targeting with oncolytic adenoviruses in vivo. *Curr Opin Mol Ther* 11:513-522.
- [0359] 27. Strauss, R., P. Sova, Y. Liu, Z.-Y. Li, S. Tuve, D. Pritchard, P. Brinkkoetter, T. Moller, O. Wildner, S. Pesonen, A. Hemminki, N. Urban, C. Drescher, and A. Lieber. 2009. Epithelial phenotype of ovarian cancer mediates resistance to oncolytic adenoviruses. *Cancer Research* 15:5115-5125.
- [0360] 28. Strauss, R., P. Sova, Y. Liu, Z. Y. Li, S. Tuve, D. Pritchard, P. Brinkkoetter, T. Moller, O. Wildner, S. Pesonen, A. Hemminki, N. Urban, C. Drescher, and A. Lieber. 2009. Epithelial phenotype confers resistance of ovarian cancer cells to oncolytic adenoviruses. *Cancer Res* 69:5115-5125.
- [0361] 29. Turley, E. A., M. Veiseh, D. C. Radisky, and M. J. Bissell. 2008. Mechanisms of Disease: epithelial-mesenchymal transition-does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat elin Pract*

Oncol.

- [0362] 30. Tuve, S., H. Wang, J. D. Jacobs, R. C. Yumul, D. F. Smith, and A. Lieber. 2008. Role of cellular heparan sulfate proteoglycans in infection of human adenovirus serotype 3 and 35. *PLoS Pathog* 4:e1000189.
- [0363] 31. Tuve, S., H. Wang, C. Ware, Y. Liu, A. Gaggar, K. Bernt, D. Shayakhmetov, Z. Li, R. Strauss, D. Stone, and A. Lieber. 2006. A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. *J Virol* 80:12109-12120.
- [0364] 32. Walters, R. W., P. Freimuth, T. O. Moninger, I. Ganske, J. Zabner, and M. J. Welsh. 2002. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110:789-799.
- [0365] 33. Wang, H., Z. Y. Li, Y. Liu, J. Persson, I. Beyer, T. Moller, D. Koyuncu, M. R. Drescher, R. Strauss, X. B. Zhang, J. K. Wahl, 3rd, N. Urban, C. Drescher, A. Hemminki, P. Fender, and A. Lieber. 2011. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med* 17:96-104.
- [0366] 34. Wang, H., Y. C. Liaw, D. Stone, O. Kalyuzhniy, I. Amiraslanov, S. Tuve, C. L. Verlinde, D. Shayakhmetov, T. Stehle, S. Roffler, and A. Lieber. 2007. Identification of CD46 binding sites within the adenovirus serotype 35 fiber knob. *J Virol* 81:12785-12792.
- [0367] 35. Yang, S. W., J. J. Cody, A. A. Rivera, R. Waehler, M. Wang, K. J. Kimball, R. A. Alvarez, G. P. Siegal, J. T. Douglas, and S. Ponnazhagan. 2011. Conditionally Replicating Adenovirus Expressing TIMP2 for Ovarian Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 17:538-549.
- [0368] 36. Yang, Z., M. Horn, J. Wang, D. D. Shen, and R. J. Ho. 2004. Development and characterization of a recombinant madin-darby canine kidney cell line that expresses rat multidrug resistance-associated protein 1 (rMRP1). *AAPS J* 6:77-85.

[0369] 실시예 3 재조합 상피연접 개방제는 모노클로날 항체 항암요법을 촉진한다.

[0370] 요약

[0371] 암 치료를 위한 모노클로날 항체 (mAb)의 치료 효능은 상피 종양을 서로 밀접하게 연결시키는 세포간 연접에 의해 제한된다. 본 발명자들은 상피 연접 단백질 데스모글레인 2 (DSG2)와 결합하는 작은 재조합 아데노바이러스 혈청형 3 유래 단백질인 연접 개방제 1 (JO-1)을 생성하였다. 본 발명자들은 Her/neu- 및 EGFR-양성 인간 암세포주로부터 유래된 종양을 갖는 마우스 모델에서 JO-1이 정맥내 주사 후 1시간내에 세포간 연접에서 DSG2 이량체의 분해를 중재할뿐만 아니라 밀착 연접 단백질 E-캐드헤린의 수준 감소를 유도하는 세포내 시그널전달 경로의 활성화를 매개함을 증명한다. 상피 연접에서의 JO-1-유도된 변화는 항-Her2/neu mAb 트라스투주마브 (헤르셉틴)의 보다 양호한 종양내 침투를 가능하게 해 줄 수 있을뿐만 아니라 연접내에 부분적으로 갇혀있는 표적 수용체 Her2/neu로의 접근을 향상시켜 줄 수 있었다. 이것은 Her2/neu-양성 유방암, 위암 및 난소암 세포를 이용한 이중이식편 모델에서 트라스투주마브의 보다 양호한 치료 효능으로 직접 해석된다. 게다가, EGFR-표적 mAb 세툽시마브 (Erbix)와 JO-1의 조합은 전이성 EGFR-양성 폐암의 모델에서 치료능을 상당히 향상시켰다. JO-1/트라스투주마브 치료와 종양 기질 단백질의 일시적 분해를 허용하는 추가의 방법과의 조합은 완전한 종양 제거를 제공하였다. 암 치료에 대한 임상 연관성 이외에, 본 연구는 또한 상피 세포의 아데노바이러스 혈청형 3 감염의 기전을 밝혀준다.

[0372] 소개

[0373] 모노클로날 항체 (mAb)는 새로운 항암치료제의 한 부류로서 자리매김해 왔다. 지금까지 암치료제로서 21종의 mAb가 시판되고 있고 현재 수백종 이상이 임상 개발중에 있다. 시판되고 있는 mAb 가운데는 트라스투주마브 (헤르셉틴) 및 세툽시마브 (에르비투스)가 있다. 트라스투주마브는 인간 상피 성장 인자 수용체 2 (Her2/ErbB-2)를 표적으로 한다. 세툽시마브의 수용체는 인간 상피 성장 인자 수용체 1 (Her1/ErbB-1)이다. 양 수용체는 티로신 키나제 수용체 계열에 속하며 세포 생존 및 증식을 촉진하는 몇 가지 경로를 통한 시그널전달을 개시한다 (Harari et al., 2007). 트라스투주마브는 Her2/neu 양성 유방암 환자를 위한 일차항암요법으로서 사용되며 또한 전이성 Her/neu 양성 위암을 위해 승인되어 왔다. 현재 FDA가 승인한 세툽시마브에 의한 증세는 대장암,

두경부암, 폐암 및 췌장암을 포함한다 (Wheeler et al., 2010). 초기 유방암 또는 대장암의 대부분 환자는 트라스투주마브 및 세툽시마브 요법에 대해 측정가능한 종양 반응을 나타낸다. 그러나, 진전되었거나 재발된 질환을 앓고 있는 환자에서 이들 mAb에 대한 반응율은 불과 8% 내지 10%이다 (Adams and Weiner, 2005).

[0374] 트라스투주마브 및 세툽시마브 작용 기전은 항체-의존 또는 보체-의존 세포독성의 활성화 및 종양 세포 생존에 필요한 티로신 키나제 수용체 시그널전달의 간섭을 포함한다 (Wheeler et al., 2010). 이들 기전가운데 공통된 관점은 종양 세포 성장 억제제가 mAb의 상응하는 수용체와의 결합에 의존한다는 것이다. 따라서, 혈관으로부터 악성 세포로의 수용체의 종양내 수송을 물리적으로 억제하거나 차단시킴으로써 수용체로의 접근 및 수용체와의 결합을 방지하는 분자는 트라스투주마브와 세툽시마브 활성을 차단할 것으로 예상된다 (Lesniak et al., 2009). 이러한 분자중에는 콜라겐 또는 라미닌과 같은 종양 기질 단백질이 있다 (Li et al., 2004). 최근 연구에서 본 발명자들은 그러한 기질 단백질의 일시적 분해가 트라스투주마브 요법을 유의적으로 향상시켰음을 증명하였다 (Beyer et al., 2011).

[0375] 종양 기질 단백질에 의해 형성된 장애에 추가하여, 암세포의 상피 표현형은 암치료의 물리적 장벽을 형성한다 (Strauss and Lieber, 2009; Strauss et al., 2009). 몇몇 연구는 상피 단백질의 발현 또는 상소조절이 유방암과 대장암의 트라스투주마브 요법(Fessler et al., 2009) 및 세툽시마브 요법(Oliveras-Ferraro et al., 2011)에 대한 내성 증가와 각각 상관성이 있음을 증명하였다. 상피 세포는 몇몇 세포간연접 (밀착 연접, 어드헤렌스연접, 갭연접 및 데스모솜)을 유지해 주며 이의 특징은 흔히 상피암 자체에서 및 암세포주에서 관찰된다 (Turley et al., 2008). 상피 연접은 2개의 이웃 세포로부터 유래된 캐드헤린 분자로 이루어진 접착성 이량체로 구성되어 있다 (Koeser et al., 2003). 데스모글레인 1, 2 및 3 (DSG1-3) 및 데스모콜린 1, 2 및 3 (DSC1-3)은 캐드헤린의 아류이다. DSC2 및 DSG2는 폭넓게 발현되고 상피세포의 기저층의 데스모솜에서 함께 발견된다. 데스모솜 캐드헤린의 세포질 꼬리는 플라코글로빈, 데스모플라킨 및 플라코필린을 포함한 단백질 복합체를 통해 혈장막을 세포골격에 연결시킨다. 데스모글레인 2 (DSG2)는 유방암 (Wang et al., 2011b)(도 1), 난소암 (Wang et al., 2011b)(도 1), 폐암 (Wang et al., 2011b), 위암 (Biedermann et al., 2005), 편평세포암 (Harada et al., 1996), 흑색종 (Schmitt et al., 2007), 전이성 전립선암 (Trojan et al., 2005) 및 방광암 (Abbod et al., 2009)를 포함한 일련의 상피 악성에서 과발현된다.

[0376] 실시예 1에서, 본 발명자들은 인간 아데노바이러스 (Ad)의 그룹 (Ad 혈청형 3, 7, 11 및 14)이 DSG2를 세포 감염을 위한 일차 결합 수용체로서 사용한다는 것을 증명하였다. 중요한 것은 상피세포에서 DSG2와의 Ad3 결합은 시그널전달 경로의 활성화를 유도하고 그 결과로 상피연접의 일시 개방을 제공하였다는 점이다. 연접의 개방은 상피투과성의 증가로 나타나고 밀착 연접에 갇힌 단백질 (예, 콕사키-아데노바이러스 수용체 또는 조놀라 오클루덴스-1 단백질)의 노출로 나타난다. 상피연접의 개방은 또한 12개의 Ad3 섬유이 이들의 펜톤 염기에 연결되어 구성된 펜톤-12면체 (PtDd)와 같은 재조합 아바이러스 입자로 달성되었다 (Fuschiotti et al., 2006; Norrby et al., 1967). 이어서, 본 발명자들은 두 개의 섬유 마디 도메인에 의해 형성된 최소 Ad3-유래된 DSG2 리간드를 생성하였다. 약 50 kDa의 분자량을 갖는 이 단백질은 이. 콜라이에서 생성하고 쉽게 정제할 수 있다. 일련의 기능 연구에서 본 발명자들은 이 단백질이 연접의 개방을 효율적으로 유도한다는 것을 증명하였다. 이에 따라 이후 연구에서 본 발명자들은 그 단백질을 연접 개방제 (JO-1)이라 명칭한다.

[0377] 이 연구에서, 본 발명자들은 JO-1-매개된 연접 개방의 생체내 기전을 일부 상세히 제시하였다. 본 발명자들은 Her2/neu 및 EGFR이 이중이식편 종양의 세포간연접에 갇혀있음을 제시한다. JO-1 처리는 종양에서 mAb의 침투를 상당히 증가시켰고 일련의 이중이식편 종양 모델에서 트라스투주마브 및 세툽시마브의 효능을 유의적으로 증가시켰다.

[0378] 결과

[0379] JO-1은 상피연접의 개방을 유도한다. 상기 실시예에서, 본 발명자들은 Ad3 입자 또는 재조합 Ad3 펜톤-12면체 (PtDd)(도 16A)가 DSG2와 결합하고 상피연접의 일시적 개방을 유도함으로써 트라스투주마브에 의한 Her2/neu 양성 BT474 유방암 세포의 사멸을 증가시킨다는 것을 제시하였다. 크기가 큰 Ad3 또는 PtDd 입자는 혈관으로부터의 배출 및 조직 침투에 영향을 미칠 수 있음에 따라 본 발명자들은 상피연접 개방제로서 기능상 활성을 나타내는 좀더 작은 Ad3-유래된 DSG2를 생성하였다. 본 발명자들은 DSG2와의 고친화성 결합 및 후속적인 연접 개방이 Ad3 섬유 이량체를 필요로 한다는 것을 발견하였다. 이러한 발견을 근거로 하여, 본 발명자들은 연접 개방제 1 (JO-1)이라고 명명한 작은 자가이량체화 Ad3 섬유 유도체를 설계하였다 (도 16 A,B). JO-1은 분자량이 약 50 kDa이고 이. 콜라이에서 생성한 후 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 것이다.

[0380] JO-1의 기능 활성은 극성 대장암 T84 세포에서 시험하였다. 이 시험은 클라우딘 및 DSG2의 공초점 현미경에 의

해 밝혀진 바와 같이, JO-1과 세포의 배양이 상피 연결의 재구성을 유도하였음을 증명하였다. 데스모솜 단백질 DSG2는 클라우딘 7로 표시된 어드헤렌스 연결과 중첩된다. JO-1이 DSG2와 결합한 후 30내에 클라우딘 7 염색이 증가하며 이것은 심중팔구 클라우딘 7 (트랜스웰 배양의 내부 챔버, 즉 극성 상피세포의 정단면에 적용된다)에 항체의 보다 양호한 접근성의 결과이다. 데스모솜 및 부착 연결의 정상에 위치하는 밀착 연결의 개방이 전자현미경에 의해 확인되고 있다 (도 16D). 비처리 상피세포의 현미경사진은 기저공간으로부터 정부투여된 염료 루테늄 레드의 제거에 의해 판단되는 것처럼 완전한 밀착 연결을 보여준다. 1시간 동안 JO-1과 상피세포의 배양은 밀착 연결의 분해 및 기저공간으로의 루테늄 레드의 누출을 제공하였다 (도 16D, 우측 패널). 또한, JO-1에 극성 상피세포의 누출은 분자량이 4000 Da인 ¹⁴C-PEG-4000의 이동으로 알 수 있듯이 상피투과성을 증가시켰다 (도 16E). 중요하게는, DSG2의 세포의 도메인의 다른 영역에 대한 모노클로날 항체는 상피투과성을 유의적으로 증가시키지 못했다. 본 발명자들은 몇몇 DSG2 분자의 연결이 연결의 개방을 유도하는데 필요하다고 추정한다. 현미경 및 투과성 연구는 JO-1이 수분내에 연결 개방을 유도함을 보여준다. JO-1의 효과는 JO-1 펄스 처리의 제거 후 60분 경과하여 연결 구조 및 투과성이 정상적인 형태로 복원된다는 사실로부터 입증되는 바와 같이 일시적이다. JO-1이 세포에 남아있을 때 상피연접의 형태변화는 JO-1의 최초 첨가 후 24시간까지 지속될 수 있었다 (데이터 제시되지 않음).

[0381] JO-1은 생체내 상피 종양에서 세포내 시그널전달을 유도하고 mAb의 침투를 증가시킨다. 생체내 상피연접에 미치는 JO-1의 효과를 연구하기 위해 유방암 이종이식편 모델을 사용하였다. 인간 유방암 HCC1954 세포를 CB17-SCID/베이지 마우스의 유방 지방 패드내로 주입하였다. 생성된 종양은 사람의 유방암 조직과 닮았다 (Li et al., 2004). 즉 종양이 혈관을 형성하고 상피연접에 의해 함께 응어리져 있고 세포의 매트릭스가 둘러싸여 있는 상피세포 덩이를 함유하였다. 종양이 약 200 mm³의 체적에 도달했을 때 JO-1을 정맥내 주입하였다. JO-1은 종양에서 주입 후 1시간내에 면역형광 현미경으로 검출할 수 있었다. JO-1은 주사 후 12시간 정도에 면역형광의 증가로부터 알 수 있듯이 종양에 축적되었다 (도 17A, 좌측 3개 패널). 이것은 또한 종양 용해물의 웨스턴 블롯 분석에 의해 검증된다 (도 17A, 우측 패널). PBS 처리 동물에서 면역형광 현미경에 의한 종양 단편의 DSG2 분석은 막에 위치한 시그널을 보여주었다 (도 17B, 좌측 패널). JO-1 주입 후 1시간 경과하여, DSG2 분자는 대부분 종양 세포의 세포질내에서 발견되었다 (두번째 패널). 12시간까지 DSG2의 막위치는 부분적으로 회복되는 것으로 나타났다 (세번째 패널). DSG2의 세포의 도메인에 대한 항-DSG2 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석은 1시간 시점에서 아마도 단백질분해에 의해 생성된 DSG2 세포의 도메인 (ECD)의 좀더 작은 단편을 보였다 (도 17B, 우측 패널). 이들 데이터를 종합하면 JO-1이 DSG2 ECD내의 분해 및 DSG2 내재화를 유도한다. 본 발명자들은 이것이 두 이웃하는 상피 종양 세포간의 DSG2 이량체를 분해시키고 측면 연결의 재구성에 기여한다고 추정한다. JO-1 처리 동물에서 위장 또는 기도의 정상 상피조직에 대한 유해한 부작용이나 변화는 관찰되지 않았다.

[0382] 상기 실시예에 따라, 상피세포의 DSG2와의 AD3 결합이 상피로부터 중간엽으로의 전환 (EMT)에 연루된 경로를 포함한 세포내 시그널전달을 유도하였음이 시험관내 연구에서 발견되었다. EMT는 배발생에 연루되어 있으나 종양 전이에도 연루된 제프로그래밍 과정이다. EMT의 특징가운데는 상피 마커의 발현 감소, 전사 인자의 위치 변경 및 Erk1/2 (MAPK)의 활성화가 포함된다 (Turley et al., 2008). 이종이식편 종양을 이용한 연구에서 본 발명자들은 JO-1의 정맥내 주사 후 12시간 경과하여 종양에서 E-캐드헤린의 더 적은 비인산화 형태 및 인산화 형태를 발견하였다 (도 17C, 좌측 패널). E-캐드헤린의 변화에 앞서 발생한 것은 인산화된 Erk1/2의 증가였다 (도 17C, pErk1/1 PBS 대 JO-1의 비교 (1시간)). ERK1/2 활성화가 EMT 동안에 E-캐드헤린 발현과 인산화를 감소시킨다는 것은 잘 확립되어 있다 (Andarawewa et al., 2007; Larsen et al., 2003; Turley et al., 2008). JO-1의 주입시 E-캐드헤린의 감소 및 인산화 Erk1/2 시그널의 증가가 또한 면역형광 현미경에 의해 관찰되었다 (도 17C, 우측 패널). 종합해 보면, 이들 연구는 JO-1이 생체내에서 Erk1/2 경로의 활성화를 유도한다는 것을 가리킨다. 이를 기초로 본 발명자들은 DSG2에 JO-1의 결합에 의한 상피연접의 개방이 적어도 두 가지의 기전과 연관성이 있음을 가설로 제기한다: i) DSG2 ECD의 절단 및 DSG2 이량체의 분해에 이은 내재화; 및 ii) Erk1/2의 활성화를 통한 EMT-유사 과정의 유도.

[0383] 이어서, 본 발명자들은 JO-1에 의해 유도된 종양내 상피연접의 개방이 이종이식편 종양내로 모노클로날 항체의 침투를 증가시키는지 시험하였다. 인간화 IgG1 mAb인 트라스투주마브가 본 연구에 처음 사용되었다. 이전 연구에서와 같이, 트라스투주마브는 10 mg/kg의 용량으로 복강내 주사되었다. 트라스투주마브는 인간 IgG에 특이적인 항체와 함께 종양내에서 가시화되었다. 종양 박편 및 웨스턴 블롯 분석에서 트라스투주마브는 주사 후 1시간 경과하여 검출되었고 주사 후 12시간 경과하여 보다 높은 수준으로 검출되었다 (도 18). 트라스투주마브의 투여 1시간 전에 JO-1의 정맥내 주사는 종양에서 트라스투주마브의 양을 가시적으로 증가시켰으며, 이것은

혈관으로부터의 보다 양호한 배출, 보다 양호한 종양내 침투 및/또는 좀더 긴 종양내 반감기를 가리킨다.

- [0384] mAb 표적은 상피연접에 간혀있다. 유방암 이종이식편 및 배양된 유방암 세포에서, 본 발명자들은 Her2/neu 및 부착 연접 단백질 클라우딘 7의 공동 염색을 발견하였다 (도 19A). 유방암 BT474 세포의 공초점 현미경은 측부 연접에서 Her2/neu의 포획을 보여주었다. 이것은 초기 연구와 일치하는 것이며 Her2/neu는 밀착 연접이 분해되었을때만 정단면 표면으로부터 접근이 가능한 기저단백질을 증명한다 (Vermeer et al., 2003). J0-1과 Her2/neu 양성 유방암 세포주 BT474의 배양 (도 19) 또는 HCC1954의 배양 (제시되지 않음)은 1시간내에 측부 상피연접의 구성물을 변화시켰다. 이러한 결과로서, 세포 표면에서의 Her/neu 염색은 더 강하게 나타났 한편 세포 표면에서 멀리 떨어진 영역에서는 색이 발했다. 이것은 J0-1 매개된 연접 개방이 측막으로부터 세포 표면으로 Her2/neu의 위치이동을 유도하였음을 제시한다. 측부 연접에 대한 J0-1의 영향은 일시적이었고 세포 형상은 J0-1 펄스 처리 후 16시간 경과하여 대조 세포의 형상으로 돌아갔다. 또한 상피 연접에 간혀있는 것은 EGFR 및 밀착 연접 단백질 E-카드헤린의 공동염색이 제시한 바와 같이 EGFR1 (세툽시마브/에르비투스의 표적)과 같은 다른 암요법의 표적에 대한 문제점인 것으로 보인다 (도 19B). 세툽시마브를 이용한 연구에서 본 발명자들은 대부분의 대장암 세포주가 세툽시마브에 내성을 제공하는 K-ras에서 돌연변이를 갖고 있음에 따라 (Karamouz et al., 2007) 폐암 모델 (A549 세포)에 집중하였다. 본 발명자들이 Her2/neu에서 관찰한 바와 유사하게, J0-1과 A549 세포의 배양은 세포 표면으로 EGFR의 위치이동을 제공하였다.
- [0385] 갇힌 mAb 수용체의 방출은 트라스투주마브 및 세툽시마브에 의한 암 세포의 증가된 사멸에 의해 지지된다. 트라스투주마브 및 세툽시마브에 의한 BT474 유방암 및 A549 폐암 세포의 각 시험관내 사멸은 비효율적이었다 (도 19C 및 D). J0-1으로 이들 세포의 예비처리는 상응하는 세포주에서 두 항체의 시험관내 세포독성을 유의적으로 증가시켰다.
- [0386] 총괄적으로 이들 연구는 J0-1이 연접 개방을 매개함으로써 mAb의 보다 양호한 종양내 침투를 가능케할 뿐만 아니라 연접내에 갇힌 표적 수용체로의 접근을 향상시킴을 가리킨다. 이를 기초로 본 발명자들은 J0-1 예비처리가 이종이식편 모델에서 mAb의 치료 효능을 향상시킬 수 있는지를 연구하기 위해 일련의 생체내 연구를 실시하였다.
- [0387] J0-1은 생체내 트라스투주마브 요법을 향상시킨다. J0-1에 의한 트라스투주마브 요법의 잠재적 향상은 Her2/neu 양성 BT474-M1 세포를 기반으로 한 정위 유방암 모델에서 시험하였다. J0-1 주사 단독으로는 종양 성장에 유의적인 영향을 미치지 않았다 (도 20A). BT474-M1 종양은 초기에는 트라스투주마브에 잘 반응하였다. 그러나, J0-1의 예비주사는 트라스투주마브의 치료효능을 유의적으로 증가시켰다 (도 20A). 이러한 발견은 동일 모델에서 PtDd를 이용한 연구와 일치한다. J0-1 예비처리에 의한 효과 증가는 장기간 (136일간) 마우스를 처치했을때 보다 명백하게 나타났다. 트라스투주마브 단독요법을 받은 동물의 60%는 100일즈음에 재발한 한편, J0-1+트라스투주마브로 처치된 동물은 어떠한 것도 종양의 재성장을 보이지 않았다 (데이터 제시되지 않음).
- [0388] 이차 유방암 모델은 HCC1954 세포를 포함하였다. 이들 세포로부터 유래된 종양은 trastuzumab에 대해 더 내성을 보인다 (도 20B). BT474-M1 모델에서 보는 바와 같이, J0-1 예비처리는 트라스투주마브 요법을 유의적으로 향상시켰고 종양 성장을 지연시켰다. J0-1의 증진 효과는 PtDd의 것과 유사하였다 (데이터 제시되지 않음). PtDd를 이용한 연구를 기초로 본 발명자들은 J0-1과 트라스투주마브 주입사이에 10시간의 간격을 선택하였다. 이 처방은 종양내 J0-1 축적의 역학 및 E-카드헤린 감소의 역학에 의해 지지된다 (도 17A 및 C 참조). 한편, 연접 개방과 연관이 있는 것으로 보이는 과정 (즉, DSG2 절단 또는 Erk1/2 활성화)은 J0-1 주입 후 1시간 내에 이미 일어난다. 따라서, 본 발명자들은 J0-1/트라스투주마브의 동시 주입 및 J0-1 주입 후 1시간 지나 트라스투주마브의 주입이 치료 결과에 어떻게 영향을 미치는 가를 연구하였다 (도 20C). 이 연구에서, 처음 사용된 치료 방법 (J0-1 주입 후 10시간 지난 트라스투주마브 주입)과 비교했을 때 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 본 발명자들은 이것이 종양내에 단백질의 비교적 느린 축적에 기인하는 것으로 추정한다.
- [0389] 트라스투주마브를 위한 보조치료제로서 J0-1의 임상 관련성을 좀더 확립하기 위해, 본 발명자들은 Her2/neu-양성 위암 (NCI-N87) 모델에서 효능 연구를 실시하였다 (도 21). 유방암 모델과 유사하게, 본 발명자들은 NCI-N87 배양물 및 이종이식편 종양에서 Her2/neu 및 클라우딘 7의 공동염색을 발견하였고, 이것은 상피 연접에 Her2/neu가 갇혀있음을 제시한다. 위암 이종이식편 모델을 설정하기 위해, NCI-N87 세포를 피하 주사하였다. J0-1로 종양-함유 마우스의 예비처리는 지연된 종양 성장으로 반영된 바와 같이 트라스투주마브 요법을 유의적으로 향상시켰다.
- [0390] J0-1은 생체내에서 cetuzimab 요법을 향상시킨다. 처음에 A549 폐암 세포로부터 유래된 피하 종양을 갖는 이종 이식편 모델을 사용하였다. 예비설정된 A549 종양을 갖는 마우스의 세툽시마브 처치는 PBS의 처치와 비교했을

때 종양 성장의 유의적인 지연 결과를 제공하지 못했다. J0-1을 정맥내 또는 복강내로 주사한 후 12 시간 후에 세톡시마브를 주사하였다. 양 처치 방법은 유의적인 치료 효과를 제공하였고 종양 체적의 감소 결과를 유도하였다 (도 22A). 연접 개방제의 종양내 주입과 함께 정맥내 주사된 J0-1의 추가적인 병용은 치료 효능을 더 증가시키지 않았다. 유방암 모델에서 나타난 바와 같이, J0-1 처치 단독으로는 유의적인 항종양 효과를 발휘하지 못했다. J0-1 예비처치는 PtDd의 사용에서 나타난 바와 비슷한 정도로 세톡시마브 요법을 증진시켰다 (도 22B).

[0391] 이어서, 정위 폐암 모델에서 병용요법을 시험하였다. 이 모델을 설정하기 위하여 A549 세포를 정맥내 주사하였다. 이 모델에서, 폐에 종양이 우점적으로 위치하도록 종양 세포를 이식한 후 37일내에 마우스는 발병되었다 (도 22C, "PBS" 그룹). 마우스의 처치는 10일째에, 즉 대조군의 동물이 연구의 종점에 도달하기 27일전에 개시하였다. 모든 동물은 40일째에 치사시켰다. 폐 전이가 대조군, J0-1 군뿐만 아니라 세톡시마브 처리된 동물에서 뚜렷이 나타난 한편, J0-1+세톡시마브-처리된 동물의 폐에서 85%는 현미경으로 관찰했을 때 무종양 상태였다. 폐박편의 현미경검사는 PBS 처리된 동물에서 종양 세포가 거의 전체적으로 정상 폐조직을 대체하였고 또한 세기관지를 채웠다 (도 22C, 우측 폐널). 세기관지로의 침입은 세톡시마브 주사된 동물에서 좀 약하게 나타났다. 중요한 것은 세톡시마브 처리된 동물은 상당한 종양 성장 및 침윤을 나타낸 한편, J0-1_세톡시마브 주사된 동물의 대다수는 미소전이만을 보였다.

[0392] 조합된 종양 기질 단백질 분해 및 연접 개방. 본 발명자들은 최근에 암환자 및 이중이식편으로부터 유래된 종양 박편의 면역조직 연구에서 종양 기질을 형성하는 세포외 매트릭스 단백질이 악성 유방암 및 대장암 세포의 등지 주위에 밀집해 있는 것을 제시하여 왔다 (Li et al., 2009). 펩타이드 호르몬 렐락신의 종양내 발현에 의한 종양 기질 단백질의 일시적 분해는 트라스투주마브 요법을 유의적으로 향상시켰다 (Beyer et al., 2011). 여기서, 본 발명자들은 HCC1954 모델을 사용하여 추가적인 일시 종양 기질 단백질 분해가 트라스투주마브 요법에 미치는 J0-1의 효과를 더 증가시키는 지를 시험하였다 (도 23A). 렐락신 유전자를 종양에 전달하기 위해 본 발명자들은 조혈줄기세포 (HSC)를 기초로 한 방법을 사용하였다 (Li et al., 2009). 이 방법은 종양 세포가 많은 케모카인을 분비하는 관찰을 활용하는데, 그러한 케모카인은 골수로부터 골수 전구세포를 활발하게 이동시켜 종양 기질로 집합시킴으로써 여기서 골수 전구세포가 종양-연관된 대식세포 (TAM)로 분화되도록 한다. TAM은 이들이 종양 성장, 신생혈관형성, 면역회피 및 기질발생을 유도/지지는 인자를 생성하기 때문에 종양 생존에 중요하다. 이 방법은 독시사이클린 (Dox)-유도성 전사 카세트의 조절하에 형질유전자를 발현하는 렌티바이러스 벡터로 골수 유래된 HSC를 생체의 형질도입하고 이들 세포를 골수-조성된 수혜동물내로 이식함으로써 그들 세포가 골수에 착상하여 종양을 형성하게 되는 유전자 변형 세포의 장기 근원을 제공하는 것을 포함하였다. 이 연구 (도 23B)는 렐락신 발현 단독이 종양성장을 유의적으로 지연시켰고 트라스투주마브 요법을 향상시켰음을 보여주었다. 렐락신 발현과 J0-1 치료의 병용은 종양 성장을 정지시켰다. 렐락신 + trastuzumab 또는 J0-1 + 트라스투주마브 요법을 받은 그룹과 대조적으로 치료가 중단되었을때 종양이 재성장하지 않았다. 관찰 기간 말미에 J0-1/렐락신/트라스투주마브 그룹에서 남아있는 덩어리를 조직 분석했을때 단지 연결 조직만 나타났다. 반대로, 다른 그룹에서 외식된 종양은 종양 세포를 함유하였고 이들 종양 세포는 프로테아제로 분해시켰을 때 시험관내에서 배양될 수 있었다. 특히 주목할 것은 세가지 병합 치료 (J0-1/렐락신/트라스투주마브)를 받은 마우스에서 유해한 부작용이 전혀 관찰되지 않았다. 본 발명자들의 데이터는 종양에서의 물리적 장애가 트라스투주마브 요법에 대한 내성을 매개하는데 연루되어 있음을 강하게 제시한다.

[0393] 시험관내 세포독성 검정에 대한 J0-1에 대한 항체의 존재의 영향. Ad3은 폭넓게 분포하는 병원체이다. 그럼으로써 J0-1은 잠재적으로 면역원성일 수 있고 반복 투여 후 그의 치료 활성을 방해할 수 있는 바이러스 단백질이다. 유방암 환자로부터 유래된 30개 혈청 샘플중 10개는 중화 Ad3 항체에 대해 양성으로 판명되었다 (데이터 제시되지 않음). 이것은 사람 (10세 이하)의 경우 중화 항-Ad3 항체에 대한 출현율이 약 40%라는 보고 (Sakamoto et al., 1995)와 일치한다. 그러나, 본 발명자들은 항-Ad3 항체-양성 인간 혈청이 J0-1과 반응하지 않았음을 제시한다 (데이터 제시되지 않음). 이것은 대부분의 중화 항체가 Ad 핵소에 대한 것이기 때문에 놀라운 것은 아니다 (Sumida et al., 2005). 항-J0-1 양성 혈청을 획득하기 위하여, 마우스를 J0-1로 접종하였다 (데이터 제시되지 않음). 시험관내 세포독성 연구에서, Her2/neu-항성 BT474 세포의 트라스투주마브 사멸에 미치는 J0-1의 증진 효과를 갖는 항-J0-1 항체에 대해 장애가 전혀 발견되지 않았다 (데이터 제시되지 않음). 이와 관련하여, 건강한 지원자 또는 유방암 환자로부터 수집한 사람 혈청 또한 J0-1의 기능을 방해하지 않았다.

[0394] 논의

[0395] 신규한 보조치료제로서의 J0-1. mAb의 치료 효능은 많은 영역에서의 성공에도 불구하고 제한적이고 불과 소수의 환자만이 그들 치료제에 단독요법으로서 반응한다. 트라스투주마브 및 세톡시마브를 포함한 많은 항암 mAb

의 작용은 종양 세포상의 상응하는 표적 수용체와의 결합을 포함한다. 표적 수용체 차폐 또는 mAb의 종양내 보급 억제제는 암 세포에 대한 잠재적인 차단 및 회피 기전이다 (Lesniak et al., 2009). 콜라겐 또는 라미닌과 같은 종양 기질 단백질에 의해 형성된 장벽이외에, 상피암의 상피 표현형은 또한 mAb 요법에 대한 장애를 형성한다. 최근 연구는 뮤신 1과 같은 상피 특징의 발현이 트라스투주마브 내성과 상관성이 있음을 보고하였다 (Fessler et al., 2009). 게다가, E-카드헤린의 상승조절은 대장암의 세특시마브 요법에 대한 내성에 기여하였다 (Oliveras-Ferreros et al., 2011).

[0396] 종양 침입 및 전이가 EMT를 수반한다는 것은 오래전부터 알려져 온 한편으로, 최근 연구는 이 과정이 중간엽에서 상피로의 전환 (MET)으로 역전될 수 있음을 제시하였다 (Thiery and Sleeman, 2006). 상피 연결을 포함한 상피 특징을 재획득하는 것은 항암 치료로부터 자신을 차단하는 종양의 방어 기전을 나타내는 듯하다 (Brennan et al., 2010; Strauss et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006). 이러한 맥락에서, 본 발명자들은 원발성 난소암에 관한 연구에서 화학내성의 획득 및 추정암 줄기세포의 형성이 MET를 연상시키는 과정과 연루되어 있음을 발견하였다 (Strauss et al., 2011).

[0397] 본 발명자들은 상피연접의 일시적 분해를 유도하는 방법이 트라스투주마브 및 세특시마브와 같은 mAb의 치료 효능을 향상시킬 수 있음을 가설로 제시하였다. 기초적인 아데노바이러스 연구와 관련하여, 본 발명자들은 작은 제조합 단백질 JO-1을 설계하였다. DSG2와의 JO-1 결합은 밀착 연결의 일시적인 개방을 제공하였다. 이것은 종양에서 트라스투주마브의 침투를 증가시켰고 mAb 표적 수용체로의 양호한 접근을 제공하였으며, 그 결과로 인간 상피 종양 세포를 포함한 일련의 이중이식편 모델에서 mAb 요법을 촉진시켰다. 잠재적으로, 트라스투주마브 및 세특시마브와 JO-1의 병용은 이들 mAb의 유효량을 감소시킬 수 있고, 그럼으로써 중대한 부작용, 즉 트라스투주마브-연관된 심장독성 및 세특시마브 요법 동안에 흔히 일어나는 좌창-유사 발진을 감소시킬 수 있다.

[0398] JO-1은 이. 콜라이에서 고수율로 생성할 수 있기때문에 개발에 매력적인 치료제이다. 주목할 것은, DSG2에 대한 모노클로날 항체와 같이 DSG2와 클러스터를 형성할 수 없는 DSG2 리간드는 본 연구에서 사용된 종양 모델에서 연결 개방에 비효율적이다. 본 발명자들의 지식에 따르면, DSG2와 결합하고 종양을 mAb에 대해 감작시킬 수 있는 것으로 개발중에 있는 다른 치료법은 없다. 일련의 병원체는 연결 구조를 붕괴시키는 기전을 진화시켜 왔다. 예를 들어, 비브리오 콜레라 균주는 조나 오클루텐 독소 (Zot)를 생성하며, 이 독소는 장상피연접을 가역적으로 변형시키는 능력을 보유함으로써 거대분자들이 점막 장벽을 통과하도록 유도한다 (Fasano et al., 1991). Zot-유도된 핵사펩타이드 (AT-1001)이 개발되었으나, 만성소화장애 환자의 임상 시험이 안전성 우려 및 효능 상실로 인해 최근에 중단되었다.

[0399] 작용 기전. 본 발명자들의 데이터는 JO-1이 잠재적으로 연관된 두 가지 기전을 통해 상피 종양에서 연결 개방을 유도한다는 것을 제시한다: 세포간 연결에서 DSG2 이량체의 분해 및/또는 E-카드헤린의 감소 및 잠재적으로 다른 연결 단백질의 감소를 유도하는 세포내 시그널전달. 카드헤린은 이웃하는 세포사이에 이량체를 형성하기 때문에 많은 병원체들은 카드헤린의 세포의 도메인내에서 절단을 유도하는 기전을 진화시켜 왔다. 위장관을 통해 혈류로 침입할 수 있는 유기체인 캔디다 알비칸스는 E-카드헤린과 결합하고 E-카드헤린의 세포내 및 세포의 도메인 둘 다의 분해를 유도함으로써 인접한 상피세포사이의 동형 상호작용을 붕괴시킨다 (Frank and Hostetter, 2007). 게다가, 박테로이데스 프라질리스 내독소 및 포르파이로모나스 진지발리스 진지파인은 E-카드헤린의 분해와의 연관성이 제기되어 왔다 (Katz et al., 2000; Wu et al., 1998). 이들 연구 모두는 E-카드헤린의 분해가 특정 세균 프로테아제에 원인이 있음을 제시하였다. 본 발명자들의 데이터는 Ad3이 기도에서 상피 장벽을 천공시키는 유사한 기전을 이용함을 제시한다. 본 발명자들은 DSG2 분해의 기전을 현재 연구중에 있다. 진행중에 있는 연구에서 본 발명자들은 JO-1 결합이 DSG2내의 형상 변화를 유도하는지를 결정하고자 하고 있다. DSG2 이량체의 분해는 차례로 최근에 논의된 바와 같이 보다 더 정단면에 위치한 밀착 연결을 붕괴시킬 수 있었다 (Koeser et al., 2003).

[0400] 상기 시험관내 연구에 비추어, DSG2와의 Ad3 결합은 Erk1/2의 활성화 및 EMT에 연관된 다른 경로의 활성화를 유도한다. 이 연구는 정맥내 JO-1 주사 후 1시간 내에 Erk1/2가 종양에서 활성화된다는 것을 제시한다. 본 발명자들의 발견은 카드헤린이 수용체 티로신 키나제와의 쌍방향 시그널전달에 참여하여 세포간 연결을 조절한다는 것을 보여주는 이전 보고서와 일치한다 (Klessner et al., 2009). 본 발명자들은 현재 여러 가지 DSG2 녹아웃 모델 및 절삭/돌연변이된 DSG2 변이체를 제조하여 상피연접을 유지하는데 있어서의 DSG2의 역할을 좀더 자세히 밝히고자 한다.

[0401] 정상 상피조직에 미치는 부작용. 사람 및 비인간 영장류에서, DSG2는 위장관 및 기도에서 발현된다 (Li et al., 2011). DSG2의 마우스 상동체는 Ad3 또는 JO-1에 의해 인지되지 않음에 따라 (Wang et al., 2011b), 정

상 마우스에서의 안전성 연구는 비교적 부적절하다. 따라서, 본 발명자들은 인간 DSG2 유전자좌를 함유한 트랜스제닉 마우스를 생성하였다. 이들 동물에서 인간 DSG2의 발현 양상 및 수준은 사람에서 발견된 것과 비슷하였다. 게다가, 본 발명자들은 트랜스제닉 마우스 상피세포에서 인간 DSG2와의 J0-1 결합이 연접 개방을 인간 세포에서 관찰된 데이터와 비슷한 정도로 유도하였음을 제시하였다. DSG2-트랜스제닉 마우스를 이용한 예비 연구에서 본 발명자들은 정맥내 J0-1 주사 (2 mg/kg)의 중대한 부작용을 발견하지 못했다 (Li et al., 2011). 본 발명자들은 정상 상피 세포내의 DSG2가 정맥내 주입된 J0-1에 쉽게 접근할 수 없을 것으로 추정한다. 한편, 종양-연관된 혈관의 좀 더 큰 누설 및 엄격한 세포 극성화의 상실은 상피 종양이 더 J0-1에 반응하도록 할 수 있었다. J0-1 리간드의 정맥 주사 후 무독성은 또한 Ad3 섬유를 함유한 아데노바이러스를 이용한 연구에 의해 이해된다. 이들 바이러스는 DSG2와 결합하고 J0-1과 동일한 방식으로 연접에 작용한다. 사람에게 Ad5/3 또는 Ad3 종양용해 벡터의 정맥 주사는 안전한 것으로 밝혀졌다 (Hemminki et al., 2010; Koski et al., 2010). 본 발명자들은 현재 J0-1의 안전한 치료제로서의 잠재성을 평가하기 위하여 비인간 영장류 및 DSG2-트랜스제닉 마우스를 대상으로 상세한 독성 연구를 수행중에 있다.

[0402] J0-1 면역원성. J0-1은 바이러스 단백질이기 때문에, 사람에게서 특히 반복 주사 후에 입양 면역반응이 발생할 수 있다. 그러나, 이것은 임상 문제가 아닐 수 있다. Her2/neu-양성 전이성 유방암의 일차 치료는 화학요법 약물 (독소루비신, 사이클로포스파미드, 파클리탁셀 또는 도세탁셀)과 병용하는 트라스투주마브가다. 또한 세톡시마브가 비소세포 폐암 환자에게 화학치료제 (비노렐빈 + 시스플라틴)와 병용하여 사용된다. 면역억제 화학요법은 J0-1에 대한 면역 반응을 억제하는 듯하다. 이러한 추정은 종양용해 아데노바이러스 벡터를 이용한 연구에 의해 지지된다. 이들 연구에서, 면역억제는 반복된 벡터 주입을 허용하였다 (Thomas et al., 2008). 한편, J0-1이 면역적격 암 환자에 사용될 수 있다면 유익할 수 있다. 예를 들어, J0-1은 기존 또는 이식된 항종양 T-세포의 접근 및 종양내 침투를 증가시킴으로써 면역자극 단독요법으로서 이론상 작용할 수 있다. 종양-특이적 T-세포는 비처리된 유방암 환자에서 고빈도로 발견되며 질병의 후기에서조차도 그러하고, 이들 세포의 마우스로의 전이는 이종이식된 자가 종양을 거부하는 것으로 나타났다 (Beckhove et al., 2004; Disis et al., 1994; Disis et al., 2000; Feuerer et al., 2001; Toso et al., 1996). 따라서, 본 발명자들은 보다 자세하게 J0-1 면역원성을 연구하기 시작했다. 사람의 약 1/3이 Ad3에 대한 중화 항체를 갖는다는 사실에도 불구하고, 본 발명자들의 연구는 이들 항체가 J0-1과 상호작용하지 않았음을 제시하였다 (도 5). 마우스의 백신화에 의해 생성된 항-J0-1 항체는 시험관내에서의 트라스투주마브 사멸에 미치는 J0-1의 증진 효과에 영향을 미치지 못했다. 이것은 J0-1-DSG2 상호작용의 고친화성에 기인하는 것이 확실하다 (Wang et al., 2011a). 현재 본 발명자들은 hu-DSG2-트랜스제닉 마우스에 동계 종양을 설정하여 항-J0-1 면역 반응이 이의 효능에 어떻게 영향을 미치는지를 연구하고 있다.

[0403] 종양 침투 및 전이를 증가시키는 잠재적 위험. 다른 연구 (Wang et al., 2011b), (Biedermann et al., 2005), (Harada et al., 1996), (Schmitt et al., 2007), (Trojan et al., 2005), (Abbod et al., 2009)와 일치하는 것으로, 본 발명자들은 주변의 정상 상피 조직에서 보다 악성 조직에서 보다 높은 DSG2 발현을 발견하였다. 게다가, 편평세포 자궁경부암에 대한 최근의 연구는 모든 다른 데스모솜 단백질과 대조적으로 DSG2가 침습성 암에서 상승조절된다는 것을 증명하였다. 그러나, 침습성 췌장암 또는 위암에서 DSG2의 양 감소를 보고하는 연구들이 있다 (Ramani et al., 2008; Yashiro et al., 2006). 후자뿐만 아니라 J0-1이 EMT-유사 시그널전달을 유도한다는 발견은 J0-1이 전이를 촉진하는지의 여부에 대한 의문을 일으킬 수 있다. 주목할 것은, 본 연구에서 사용된 모든 모델에서, 본 발명자들은 J0-1 단독으로 처리된 동물에서의 종양 성장의 자극 또는 전이의 확대경/현미경적 징후를 보지 못했다. 종양 침투 및 전이는 EMT 경로의 일시적 활성화 이상을 필요로 한다. 종양 세포의 상피암으로부터의 이탈 및 이동은 악성 세포와 종양 미세환경사이의 장기간 크로스토크 후에만 가능하고 그 결과로 종양 기질이 변하고 상피세포가 중간엽세포로의 표현형 재프로그래밍이 일어난다 (Guarino, 2007).

[0404] 요약하면, 상피 연접 개방제 J0-1은 효능 및 안정성 양쪽 측면에서, 즉 mAb 치료 용량을 낮추는 것이 가능함으로써 mAb 함양요법을 증진시키는 잠재성을 갖는다. 또한, 본 연구는 상피 세포의 Ad3 감염에 대한 기전을 밝혀준다.

[0405] 재료 및 방법

[0406] 단백질 및 항체. J0-1 (또한 Ad3-K/S/Kn으로도 알려져 있음)의 생성은 공지되어 있다 (Wang et al., 2011a). J0-1은 pQE30 발현 벡터를 사용하여 이. 콜라이에서 생성하고 (Qiagen, Valencia, CA) 공지된 바와 같이 Ni-NTA 아가로스 크로마토그래피로 정제하였다 (Wang et al., 2007). 재조합 Ad3 펜톤-12면체 (PtDd) 단백질 복합체는 곤충 세포에서 생성하고 공지된 바와 같이 정제하였다 (Fender et al., 1997).

- [0407] 면역형광 연구 또는 웨스턴 블롯을 위해 다음의 항체가 사용되었다: 폴리클로날 염소 항-DSG2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), 마우스 mAb 항-DSG2 (클론 6D8)(Cell Sciences, Canton, MA), 토끼 항-클라우딘 7 (Abcam, Cambridge, MA), 항-인간 IgG-FIFC (Santa Cruz), 토끼 항-EGFR (Abcam), 마우스 항-Her2/neu (Abcam), 마우스 항-E-캐드헤린 (Cell Signaling), 마우스 항-인간 IgG Fc (R&D Systems), 포스포p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204)에 대한 마우스 mAb(Cell Signaling), 마우스 항-Erk1/2 (Cell Signaling), 마우스 항-포스포-E-캐드헤린 (pS838/840)(Epitomics, Inc.), 마우스 항-6-His (Quigen).
- [0408] 세포주. BT474-M1 세포는 10% FBS, 1% Pen/Strep 및 2 mM L-글루타민을 포함한 DMEM/F12에서 배양하였다. HCC1954 유방암, A549 폐암 및 NCI-N87 세포는 10% FBS 및 1% Pen/Strep을 포함한 RPMI에서 배양하였다. SKOV3-ip1 세포는 MEM 배지에서 배양하였다. 대장암 T84 세포는 10% FBS, Glu 및 Pen/Strep이 첨가된 Ham의 F12 배지 및 DMEM의 1:1 혼합물에서 배양하였다. 세포 극성화를 달성하기 위하여, 1.4×10^5 T84 세포를 콜라겐-피복된 6.5 mm 트랜스웰 삽입구 (0.4 μ m 공극)(Costar Transwell Clears)에 상피내성이 안정해질때까지 14 내지 20일간 배양하였다 (Wang et al., 2011b).
- [0409] 면역형광 분석. 세포를 챔버 유리 슬라이드 (BD Falcon)에서 배양하고, 빙냉 PBS로 2회 세척한 다음, 메탄올/아세톤 (1:1 용적/용적)으로 4℃에서 15분간 또는 4% 파라포름알데하이드로 4℃에서 30분간 고정시켰다. 고정 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 이어서 2% 분유 분말 (BioRad)를 함유 PBS로 실온에서 20분간 차단시켰다. 항체를 PBS (클라우딘 7 1:100, DSG2 1:100, Her2/neu 1:50, EGFR 1:50, E-캐드헤린 1:100, 인간 IgG 1:400, 포스포-p44/42 MAPK 1:400, 펜타-His 1:500)에 희석하고 세포를 실온에서 90분간 또는 4℃에서 밤새 염색하였다. 필요한 경우, 실온에서 30분간 PBS로 3회 세척한 후 적절히 유도된 이차 항체를 적용하였다. 유리 슬라이드는 DAPI (Vector Labs)를 갖는 VECTASHIELD를 사용하여 올려놓았다. 사진은 라이카 DFC300FX 디지털 카메라로 촬영하였다. 공초점 이미지는 40x 또는 100x 오일 렌즈를 이용한 Zeiss META 공초점 현미경 및 Zeiss 510 소프트웨어로 공초점 이미지를 수집하였다 (Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY).
- [0410] 조직. 인간 유방암의 파라핀 박편을 탈파라핀화하고 재수화하였다. 항원 복구는 벡터 항원 노출 용액 (pH 6.0) (Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA)으로 수행하였다. 마우스 항-DSG2 항체 (3G132)(Abcam)은 1:10으로 희석시켰다. 면역조직화학은 Polink-2 HRP Broad Kit (Golden Bridge International, Inc., Mukilteo, WA) 및 기질로서 DAB를 사용하여 수행하였다.
- [0411] 웨스턴 블롯. 이중이식편 종양 조직을 절단하고 수작업으로 균질화한 다음 (조직 분쇄기) 빙상의 단백질 용해 완충액 [20 mM Hepes (pH 7.5), 2 mM EGTA, 10% 글라이신, 1% 트리톤x100, 150 mM NaCl (모두 Sigma-Aldrich로부터 입수) 및 프로테아제/포스파타제 억제제 (완전 프로테아제 억제제 콕테일 및 PhosSTOP, Roche)]에서 30분간 배양하였다. 단층 배양된 세포를 빙냉 PBS로 2회 세척하고 빙상의 단백질 용해 완충액에서 30분간 용해시켰다. 샘플을 펠렛화하고 (10분, 4℃, 15,000 RPM) 단백질 함유 상청액을 -80℃에 저장하였다. 총 80 μ g의 단백질을 웨스턴 블롯 과정에 사용하였다. 단백질을 끓이고 (95℃에서 5분) 10% Bis-Tris 겔 및 MOPS 완충액 (Novex, Invitrogen)을 사용하여 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE)으로 분리한 다음, 제조사의 프로토콜 (iBlot, Invitrogen)에 따라 니트로셀룰로즈 막으로 옮겼다. 막은 0.1% 트윈 20 (PBS-T, Sigma) 및 5% 분유 분말을 함유한 PBS에서 봉쇄시켰다. 일차 및 이차 항체에 대한 배양 시간은 각각 4℃에서 16시간 및 실온에서 1시간이었다. 항체는 PBS-T 및 5% 분유 분말중에 희석하였다 [인간 IgG 1:1000, DSG2 1:500, Ad3-K 혈청 1:2000, p-E-캐드헤린 1:2000, E-캐드헤린 1:1000, 클라우딘7 1:500, 비멘틴 1:2000, 포스포-p44/42 MAPK (E가/2) 1:2000, Erk1/2 1:2000]. 막은 항체 배양사이에서 PBS-T에서 5회 세척하였고 필름은 ECL 플러스 (Amersham) 또는 오디세이 시스템 (LI-COR Biosciences)를 사용하여 전개하였다.
- [0412] DSG2 mRNA PCR: Quantitect 역전사 키트 (Qiagen)를 사용하여 1 μ g의 총 RNA에 대해 역전사를 수행하여 유방암 내의 DSG2의 발현 수준을 평가하였다. 항존 유전자 GAPDH의 발현을 참조로 이용하였다. 7900HT 고속 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems/Life Technologies)에서 SensiMix SYBR 키트 (Quantace)를 사용하여 정량 PCR (qPCR)을 3회 실시하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다:
- [0413] DSG2 QT-PCR fw 5'-ATG ACG GCT AGG AAC ACC AC-3' (서열번호 58)
- [0414] DSG2 QT-PCR rev 5'-TCA GGT ACA TTG GAA ACA TGA AA-3' (서열번호 59)
- [0415] GAPDH QT-PCR fw 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3' (서열번호 60)
- [0416] GAPDH QT-PCR rev 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3' (서열번호 61).

- [0417] qPCR은 다음의 조건하에서 실시하였다: 95℃하의 최초 10분 효소 활성화 단계 후 40회 증폭주기를 실시하였다. 각 주기는 95℃에서 15초 및 60℃에서 1분으로 구성된다. 마지막으로, 최종 신장 단계를 60℃에서 2분간 수행하였다.
- [0418] 투과성 검정. 총 5×10^5 T84 세포를 12 mm 트랜스웰 삽입구에 접종하고 [0.4 μ m의 공극을 갖는 PET 막 (Corning, NY)] 상피내성이 안정하게 될때까지 14-20일간 배양하였다. 배양 배지는 2-3일마다 교환하였다. 세포를 실온하에서 15분동안 흡착 배지 (DMEM, 1% FBS, 2 mM $MgCl_2$, 20 mM HEPES)에서 DSG2 리간드 (20 μ g/ml)에 노출시켰다. 이어서, DMEM/F12 배지로 희석된 1 mCi의 [^{14} C]폴리에틸렌 글리콜-4000 (PEG-4000)(Perkin Elmer, Covina CA)를 내부 챔버에 첨가하였다. 15분 및 30분 경과하여 내부 및 외부 챔버로부터 배지 분취량을 수확하고 섬광계수기로 측정하였다. 투과성을 공지된 바와 같이 계산하였다 (Yang et al., 2004).
- [0419] 트라스투주마브 및 세톡시마브 세포독성 검정. BT474 또는 A549 세포를 3개의 96-웰 평판에 5×10^4 세포/웰의 밀도로 도말하고 단일층을 성장시켰다. 배지에 J0-1 (500 ng/ml)을 첨가하였다. 12시간 후 트라스투주마브 또는 세톡시마브 (15 μ g/ml)를 첨가하고 2시간 후에 WST-1 검정 (Roche, San Francisco, CA)으로 세포 생존율을 측정하였다. 독립적으로 3회 연구를 실시하였다.
- [0420] 전자현미경. 트랜스웰 챔버내의 극성 세포를 실온하에 1시간동안 반세기 Karnovsky 고정제 (2% 파라포름알데하이드, 2.5% 글루타르알데하이드 및 0.2 M 카코딜레이트 완충액)로 고정시켰다. 내부 챔버내의 고정제는 0.2% 루테늄 레드를 함유하였다. 루테늄 레드 [암모니아화 루테늄(III) 클로라이드 옥사이드]는 Alfa Aesar (Ward Hill, MA)로부터 구입하였다. 후고정은 1% OSO_4 -인산염 완충액으로 수행하였다. 막은 트랜스웰 챔버로부터 절단하고 메드캐스트 (Ted Pella, Redding, CA)에 함입시켰다. 초박편은 우라닐 아세테이트 및 납 시트레이트로 염색하였다. 가공 그리드는 JEOL JEM1200EXII 투과전자현미경으로 평가하였다. 이미지는 올림퍼스 SIS Morada 디지털 CCD 카메라 및 이미지 처리용 iTEM 소프트웨어를 사용하여 획득하였다.
- [0421] 동물 연구: 동물을 포함한 모든 실험은 워싱턴 대학에 의해 제시된 연구지침에 따라 실시하였다. 마우스는 특정 무병원균 시설에 수용하였다. CB17 SCID-베이지 마우스의 유방 지방 패드내로 매트리젤중의 암세포 (1:1 용량/용량)를 주입함으로써 유방암 이종이식편을 설정하였다. 트라스투주마브는 10 mg/kgdml 용량으로 복강내 (i.p.) 주사하였다. PtDd 또는 J0-1은 2 mg/kg의 용량으로 정맥내 (i.v.) 주입하였다. 종양 체적은 공지된 바와 같이 측정하였다 (Tuve et al., 2007). 마우스는 종양 체적이 1,000 mm³에 도달하였거나 케양이 동반된 경우 치사시켰다. 폐암 이종이식편은 4×10^6 A549를 CB17 SCID 베이지의 우측 옆구리에 피하 (s.c.) 주사하여 설정하였다. 세톡시마브는 12일째에 J0-1을 정맥내 주사한 후 10시간 경과하여 10 mg/kg으로 복강 주사하고 3일 후 반복하였다. 접종된 폐 종양 모델을 위해, 8주령 숫컷 CB17 SCID-베이지 마우스에 1일째에 2×10^6 A549 세포를 정맥 주사하였다. J0-1 (2 mg/kg i.v.) 및 세톡시마브 (10 mg/kg i.p.)의 처치는 10일째에 시작해서 3일마다 반복하였다. 동물을 체중감소 및 호흡장애 징후에 대해 모니터링하였다. 비처리군의 첫번째 마우스가 빈사 상태에 있을때 동물을 치사시켰다. 폐를 제거하기전에 인디아 잉크 (PBS중의 15%)를 기관지내로 주사하였다. 전이는 검은 정상 조직과 대조적으로 비염색 상태 (백색)으로 나타났다. 항-J0-1 항체를 생성하기 위해 공지된 바와 같이 마우스에 프로인트 보조제와 혼합한 J0-1을 경피 주사하였다 (Li et al., 2009).
- [0422] HSC-기본 텔락신 발현: 프로토콜은 공지되어 있다 (Beyer et al., 2011). 요약하면, 이식체 수용자는 10주령 암컷 CB17 SCID-베이지 마우스였으며, 근치사량 350 cGy로 조사한 직후 5-FU-처리된 마우스로부터 유래된 6×10^5 렌티바이러스 벡터-형질도입된 골수 세포를 꼬리 정맥에 주사하였다. 수용자 골수에 세포의 이식을 확인한 후, 총 4×10^6 HCC1954를 유방 지방 패드내로 주사하였다. 독시사이클린 (Dox)의 조절하에 텔락신을 발현하는 렌티바이러스 벡터는 공지된 것이다 (Beyer et al., 2011).
- [0423] 중화 항체 검정: 암 환자에게 화학요법을 받기전에 혈청 샘플을 채집하였다. 요약하면, 293 세포를 웰당 4×10^4 세포로 96-웰 평판에 도말하고 37℃에서 배양하였다. 다음날 혈청 샘플을 30분간 56℃로 열처리하여 불활성화시키고 2% FCS를 함유한 MEM에 1:2에서 1:1로 연속 희석시켰다. MEM 10 μ l중의 야생형 Ad5 또는 Ad11의 세포당 총 20 플라그 형성 단위 (PFU)를 100 μ l의 각 혈청 희석액과 37℃에서 1시간동안 배양하였다. 전날 도말된 세포로부터 배지를 제거하고 세포에 55 μ l의 바이러스-함유 혈청을 45 μ l의 293 성장 배지와 함께 첨가하였다. 추가적으로 100 μ l의 293 성장 배지를 세포에 감염 후 3 및 6일째에 첨가하였다. 감염 후 8일째에, 세포를 세포병변효과 (CPE)의 존재에 대해 분석하고, CPE가 1:2 이상의 희석에서 관찰되지 않은 경우 혈청 샘플에 중화

항체의 존재에 대해 양성 점수를 부여하였다.

- [0424] 통계 분석: 모든 결과는 평균 $\pm$ SD로서 표시하였다. 복수 시험에서 필요한 경우 스튜던트 t-시험 또는 2-Way ANOVA가 적용되었다. p -값 < 0.05 는 유의적으로 판정하였다.
- [0425] 실시예 3과 관련된 참조문헌
- [0426] Abbod, M.F., F.C. Hamdy, D.A. Linkens, and J.W. Catto. 2009. Predictive modeling in cancer: where systems biology meets the stock market. *Expert Rev Anticancer Ther* 9:867-870.
- [0427] Adams, G.P., and L.M. Weiner. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23:1147-1157.
- [0428] Amieva, M.R., R. Vogelmann, A. Covacci, L.S. Tompkins, W.J. Nelson, and S. Falkow. 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300:1430-1434.
- [0429] Andarawewa, K.L., A.C. Erickson, W.S. Chou, S.V. Costes, P. Gascard, J.D. Mott, M.J. Bissell, and M.H. Barcellos-Hoff. 2007. Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res* 67:8662-8670.
- [0430] Beckhove, P., M. Feuerer, M. Dolenc, F. Schuetz, C. Choi, N. Sommerfeldt, J. Schwendemann, K. Ehlert, P. Altevogt, G. Bastert, V. Schirmacher, and V. Umansky. 2004. Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J Clin Invest* 114:67-76.
- [0431] Beyer, I., Z. Li, J. Persson, Y. Liu, R. van Rensburg, R. Yumul, X.B. Zhang, M.C. Hung, and A. Lieber. 2011. Controlled extracellular matrix degradation **in** breast cancer tumors improves therapy by trastuzumab. *Mol Ther* 19:479-489. Biedermann, K., H. Vogelsang, I. Becker, S. Plaschke, J.R. Siewert, H. Hofler, and G. Keller. 2005. Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated **in** familial and sporadic gastric cancer. *J Pathol* 207:199-206. Brennan, K., G. Offiah, E.A. McSherry, and A.M. Hopkins. 2010. Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer? *J Biomed Biotechnol* 2010:460607.
- [0432] Disis, M.L., E. Calenoff, G. McLaughlin, A.E. Murphy, W. Chen, B. Groner, M. Jeschke, N. Lydon, E. McGlynn, R.B. Livingston, and et al. 1994. Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein **in** patients with breast cancer. *Cancer Res* 54:16-20.
- [0433] Disis, M.L., K.L. Knutson, K. Schiffman, K. Rinn, and D.G. McNeel. 2000. Pre-existent immunity to the HER-2/neu oncogenic protein **in** patients with HER-2/neu overexpressing breast and ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* 62:245-252.
- [0434] Fasano, A., B. Baudry, D.W. Pumphlin, S.S. Wasserman, B.D. Tall, J.M. Ketley, and J.B. Kaper. 1991. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5242-5246.
- [0435] Fender, P., R.W. Ruigrok, E. Gout, S. Buffet, and J. Chroboczek. 1997. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat Biotechnol* 15:52-56.
- [0436] Fessler, S.P., M.T. Wotkowicz, S.K. Mahanta, and C. Bamdad. 2009. MUC1* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance **in** breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 118:113-124.
- [0437] Feuerer, M., P. Beckhove, L. Bai, E.F. Solomayer, G. Bastert, I.J. Diel, C. Pedain, M. Oberniedermayr, V. Schirmacher, and V. Umansky. 2001. Therapy of human tumors **in** NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med* 7:452-458.
- [0438] Frank, C.F., and M.K. Hostetter. 2007. Cleavage of E-cadherin: a mechanism for disruption of the intestinal epithelial barrier by *Candida albicans*. *Transl Res* 149:211-222.

- [0439] Fuschiotti, P., G. Schoehn, P. Fender, C.M. Fabry, E.A. Hewat, J. Chroboczek, R.W. Ruigrok, and J.F. Conway. 2006. Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. *J Mol Biol* 356:510-520.
- [0440] Guarino, M. 2007. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 39:2153-2160.
- [0441] Harada, H., K. Iwatsuki, M. Ohtsuka, G.W. Han, and F. Kaneko. 1996. Abnormal desmoglein expression by squamous cell carcinoma cells. *Acta Derm Venereol* 76:417-420.
- [0442] Harari, P.M., G.W. Allen, and J.A. Bonner. 2007. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Onco*/25:4057-4065.
- [0443] Hemminki, O., G. Bauerschmitz, S. Hemmi, A. Kanerva, V. Cerullo, S. Pesonen, and A. Hemminki. 2010. Preclinical and clinical data with a fully serotype 3 oncolytic adenovirus Ad3-hTERT-E1A in the treatment of advanced solid tumors .. *Molecular Therapy* 18:574.
- [0444] Karamouzis, M.V., J.R. Grandis, and A. Argiris. 2007. Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas. *JAMA* 298:70-82.
- [0445] Katz, J., V. Sambandam, J.H. Wu, S.M. Michalek, and D.F. Balkovetz. 2000. Characterization of Porphyromonas gingivalis-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infect Immun* 68:1441-1449.
- [0446] Klessner, J.L., B.V. Desai, E.V. Amargo, S. Getsios, and K.J. Green. 2009. EGFR and ADAMs cooperate to regulate shedding and endocytic trafficking of the desmosomal cadherin desmoglein 2. *Mol Biol Cell* 20:328-337.
- [0447] Koeser, J., S.M. Troyanovsky, C.Grund, and W.W. Franke. 2003. De novo formation of desmosomes in cultured cells upon transfection of genes encoding specific desmosomal components. *Exp Cell Res* 285:114-130.
- [0448] Koski, A., L. Kangasniemi, S. Escutenaire, S. Pesonen, V. Cerullo, I. Diaconu, P. Nokisalmi, M. Raki, M. Rajacki, K. Guse, T. Ranki, M. Oksanen, S.L. Holm, E. Haavisto, A. Karioja-Kallio, L. Laasonen, K. Partanen, M. Ugolini, A. Helminen, E. Karli, P. Hannuksela, T. Joensuu, A. Kanerva, and A. Hemminki. 2010. Treatment of Cancer Patients With a Serotype 5/3 Chimeric Oncolytic Adenovirus Expressing GMCSF. *Mol Ther*
- [0449] Kurzen, H., I. Munzing, and W. Hartschuh. 2003. Expression of desmosomal proteins in squamous cell carcinomas of the skin. *J Cutan Pathol*/30:621-630. Larsen, M., M.L. Tremblay, and K.M. Yamada. 2003. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:700-711.
- [0450] Lesniak, D., Y. Xu, J. Deschenes, R. Lai, J. Thoms, D. Murray, S. Gosh, J.R. Mackey, S. Sabri, and B. Abdulkarim. 2009. Betal-integrin circumvents the anti proliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. *Cancer Res* 69:8620-8628.
- [0451] Li, Z., Y. Liu, S. Tuve, Y. Xun, X. Fan, L. Min, Q. Feng, N. Kiviat, H.P. Kiem, M.L. Disis, and A. Lieber. 2009. Toward a stem cell gene therapy for breast cancer. *Blood* 113:5423-5433.
- [0452] Li, Z., I Persson, H. Wang, H. Song, I. Beyer, R. Yumul, and A. Lieber. 2011. Biodistribution of DSG2 in humans, macaques, and DSG2 transgenic mice. *in preparation*
- [0453] Li, Z.Y., S. Ni, X. Yang, N. Kiviat, and A. Lieber. 2004. Xenograft models for liver metastasis: Relationship between tumor morphology and adenovirus vector transduction. *Mol Ther* 9:650-657.
- [0454] Norrby, E., B. Nyberg, P. Skaaret, and A. Lengyel. 1967. Separation and characterization of soluble adenovirus type 9 components. *J Viro*/1:1101-1108.
- [0455] Oliveras-Ferraros, c., A. Vazquez-Martin, S. Cufi, B. Queralt, L. Baez, R. Guardeno, X. Hernandez-Vague, B. Martin-Castillo, J. Brunet, and J.A. Menendez. 2011. Stem cell property epithelial-to-

mesenchymal transition is a core transcriptional network for predicting cetuximab (Erbix) efficacy in KRAS Wild-type tumor cells. *J Cell Biochem* 112:10-29.

- [0456] Ramani, V.c., L. Hennings, and R.S. Haun. 2008. Desmoglein 2 is a substrate of kallikrein 7 in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 8:373.
- [0457] Sakamoto, M., N. Yazaki, N. Katsushima, K. Mizuta, H. Suzuki, and Y. Numazaki. 1995. Longitudinal investigation of epidemiologic feature of adenovirus infections in acute respiratory illnesses among children in Yamagata, Japan (1986-1991). *Tohoku J Exp Med* 175:185-193.
- [0458] Schmitt, C.J., W.W. Franke, S. Goerdts, B. Falkowska-Hansen, S. Rickelt, and W.K. Peitsch. 2007. Homo- and heterotypic cell contacts in malignant melanoma cells and desmoglein 2 as a novel solitary surface glycoprotein. *J Invest Dermatol* 127:2191-2206.
- [0459] Strauss, R., Z.Y. Li, Y. Liu, I. Beyer, J. Persson, P. Sova, T. Moller, S. Pesonen, A. Hemminki, P. Hamerlik, C. Drescher, N. Urban, J. Bartek, and A. Lieber. 2011. Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One* 6:e16186. Strauss, R., and A. Lieber. 2009. Anatomical and physical barriers to tumor targeting with oncolytic adenoviruses in vivo. *Curr Opin Mol Ther* 11:513-522. Strauss, R., P. Sova, Y. Liu, Z.Y. Li, S. Tuve, D. Pritchard, P. Brinkkoetter, T. Moller, O. Wildner, S. Pesonen, A. Hemminki, N. Urban, C. Drescher, and A. Lieber. 2009. Epithelial phenotype confers resistance of ovarian cancer cells to oncolytic adenoviruses. *Cancer Res* 69:5115-5125. Sumida, S.M., D.M. Truitt, A.A. Lemckert, R. Vogels, J.H. Custers, M.M. Addo, S. Lockman, T. Peter, F.W. Peyerl, M.G. Kishko, 5.5. Jackson, D.A. Gorgone, M.A. Lifton, M. Essex, B.D. Walker, J. Goudsmit, M.J. Havenga, and D.H. Barouch. 2005. Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *J. Immuno* 174:7179-7185.
- [0460] Thiery, J.P., and J.P. Sleeman. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131-142.
- [0461] Thomas, M.A., J.F. Spencer, K. Toth, J.E. Sagartz, N.J. Phillips, and W.S. Wold. 2008. Immunosuppression enhances oncolytic adenovirus replication and antitumor efficacy in the Syrian hamster model. *Mol Ther* 16:1665-1673.
- [0462] Toso, H., C. Dei, F. Oshidari, J. Tartaglia, E. Paoletti, H.K. Lyster, S. Talib, and K.J. Weinhold. 1996. MAGE-1-specific precursor cytotoxic T-lymphocytes present among tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with breast cancer: characterization and antigen-specific activation. *Cancer Res* 56:16-20.
- [0463] Trojan, L., A. Schaaf, A. Steidler, M. Haak, G. Thalmann, T. Knoll, N. Gretz, P. Aiken, and M.S. Michel. 2005. Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* 25:183-191.
- [0464] Turley, E.A., M. Veiseh, D.C. Radisky, and M.J. Bissell. 2008. Mechanisms of Disease: epithelial-mesenchymal transition-does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol*
- [0465] Tuve, S., B.M. Chen, Y. Liu, T.L. Cheng, P. Toure, P.S. Sow, Q. Feng, N. Kiviat, R. Strauss, S. Ni, Z.Y. Li, S.R. Roffler, and A. Lieber. 2007. Combination of tumor site-located CTL-associated antigen-4 blockade and systemic regulatory T-cell depletion induces tumor-destructive immune responses. *Cancer Res* 67:5929-5939.
- [0466] Vermeer, P.D., L.A. Einwalter, T.O. Moninger, T. Rokhlina, J.A. Kern, J. Zabner, and M.J. Welsh. 2003. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature* 422:322-326.
- [0467] Wang, H., Z. Li, R. Yumul, S. Lara, A. Hemminki, P. Fender, and A. Lieber. 2011a. Multimerization of adenovirus serotype 3 fiber knob domains is required for efficient binding of virus to desmoglein 2

and subsequent opening of epithelial junctions. *J Virol*

- [0469] Wang, H., Z.Y. Li, Y. Liu, J. Persson, I. Beyer, T. Moller, D. Koyuncu, M.R. Drescher, R. Strauss, X.B. Zhang, J.K. Wahl, 3rd, N. Urban, C. Drescher, A. Hemminki, P. Fender, and A. Lieber. 2011b. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med* 17:96-104.
- [0470] Wang, H., Y.c. Liaw, D. Stone, O. Kalyuzhniy, I. Amiraslanov, S. Tuve, C.L. Verlinde, D. Shayakhmetov, T. Stehle, S. Roffler, and A. Lieber. 2007. Identification of CD46 binding sites within the adenovirus serotype 35 fiber knob. *J Virol* 81:12785-12792.
- [0471] Wang, H., Y. Liu, Z.Y. Li, X. Fan, A. Hemminki, and A. Lieber. 2010. A recombinant adenovirus type 35 fiber knob protein sensitizes lymphoma cells to rituximab therapy. *Blood* 115:592-600.
- [0472] Wheeler, D.L., E.F. Dunn, and P.M. Harari. 2010. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 7:493-507.
- [0473] Wu, S., K.C. Lim, J. Huang, R.F. Saidi, and C.L. Sears. 1998. Bacteroides fragilis enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14979-14984.
- [0474] Yang, Z., M. Horn, J. Wang, D.D. Shen, and R.J. Ho. 2004. Development and characterization of a recombinant madin-darby canine kidney cell line that expresses rat multidrug resistance-1 associated protein 1 (rMRP1). *AAPS J* 6:77-85.
- [0475] Yashiro, M., N. Nishioka, and K. Hirakawa. 2006. Decreased expression of the adhesion molecule desmoglein-2 is associated with diffuse-type gastric carcinoma. *Int J Cancer* 118:2397-2403.
- [0476] Zeng, Y., M. Pinard, J. Jaime, L. Bourget, P. Uyen Le, M.D. O'Connor-McCourt, R. Gilbert, and B. Massie. 2008. A ligand-pseudoreceptor system based on de novo designed peptides for the generation of adenoviral vectors with altered tropism. *J Gene Med* 10:355-367.

도면

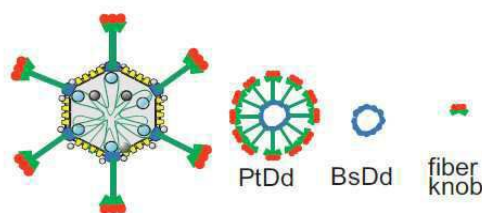
도면1a

```

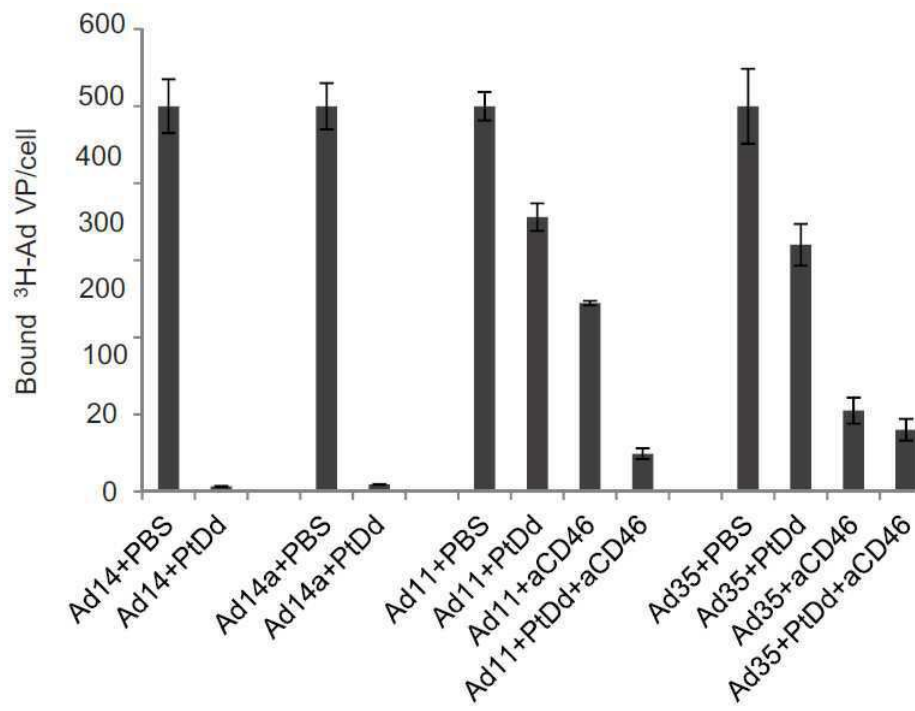
Ad5  1 -mrr-----aamyeeegpppsyesvvsaaapvaaalgspfdapldppfvpprylrptggrns
Ad2  1 -mqr-----aamyeeegpppsyesvvsaaapvaaalgspfdapldppfvpprylrptggrns
Ad3  1 mrrravlggavvypegpppsyesvmqqq--aamiqppllea---pfvpprylaptegrns
Ad7  1 mrrravlggavvypegpppsyesvmqqq--aamiqppllea---pfvpprylaptegrns
Ad14 1 -mrrvlggavvypegpppsyesvmqqqqatavmqspilea---pfvpprylaptegrns
Ad11 1 -mrrvlggavvypegpppsyesvmqqqqatavmqspilea---pfvpprylaptegrns

```

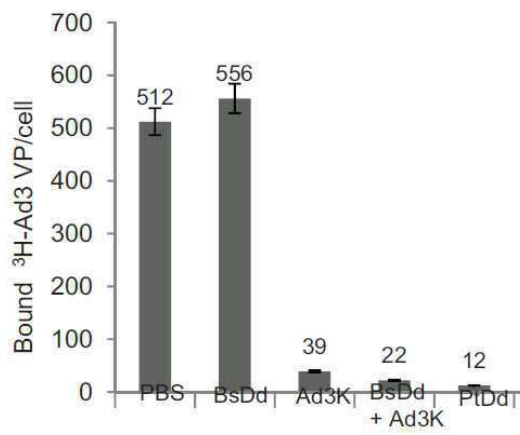
도면1b



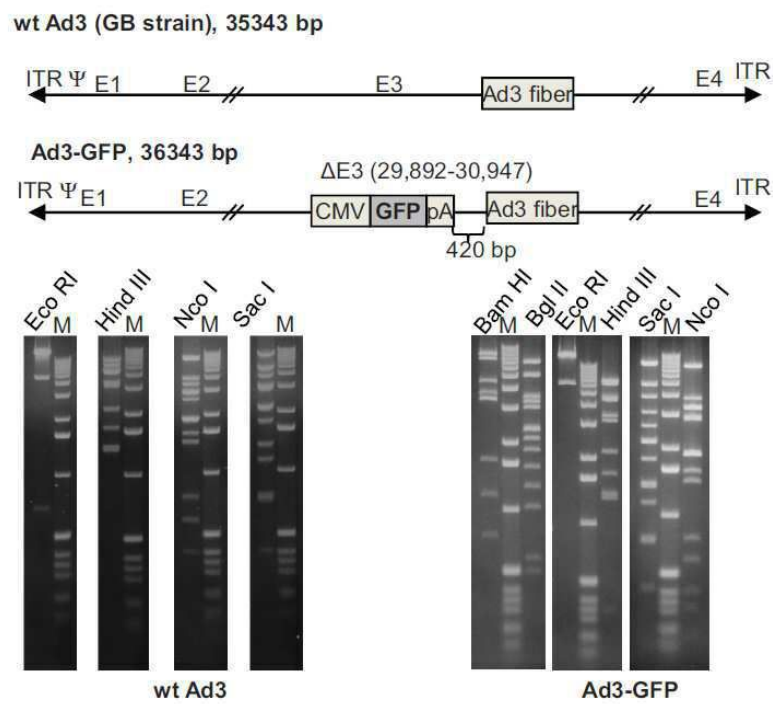
도면1c



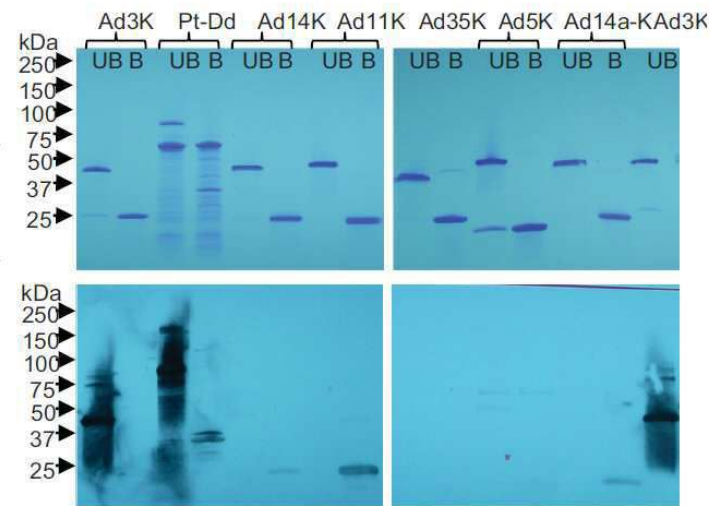
도면1d



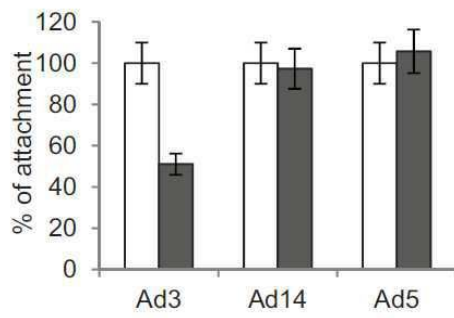
도면1e



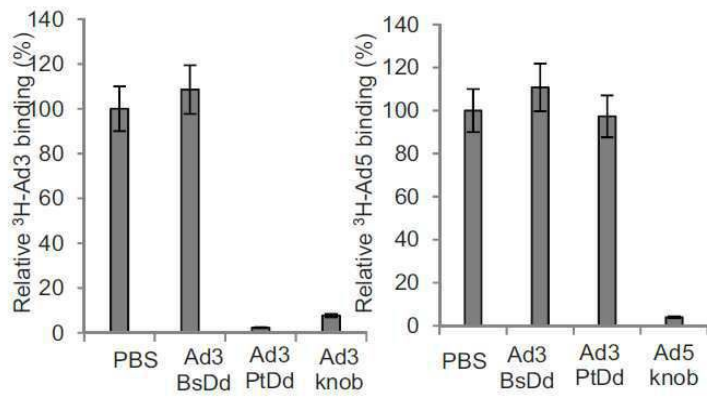
도면1f



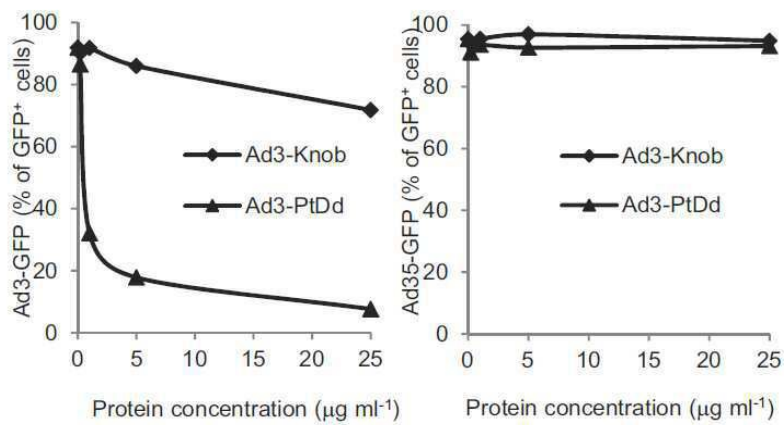
도면1g



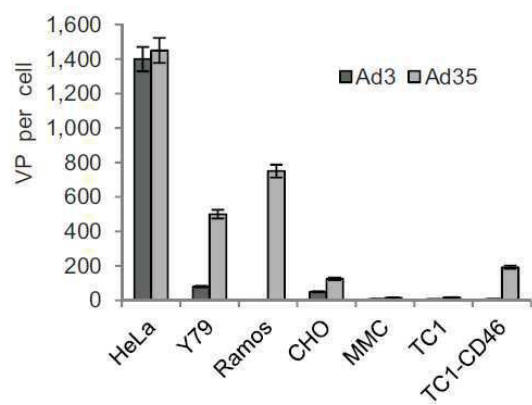
도면2a



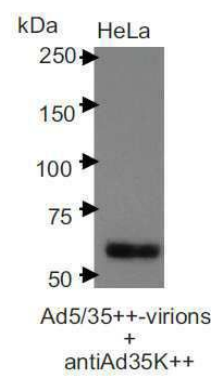
도면2b



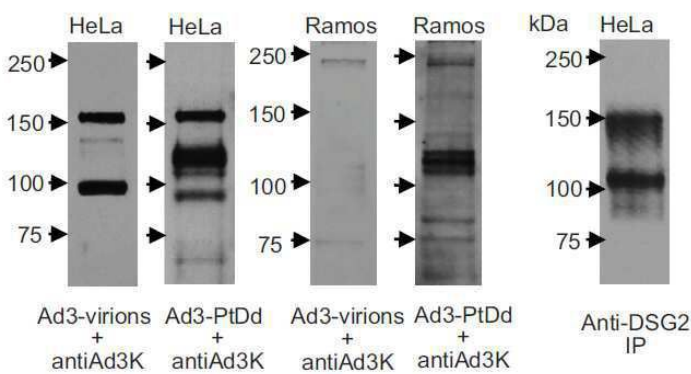
도면2c



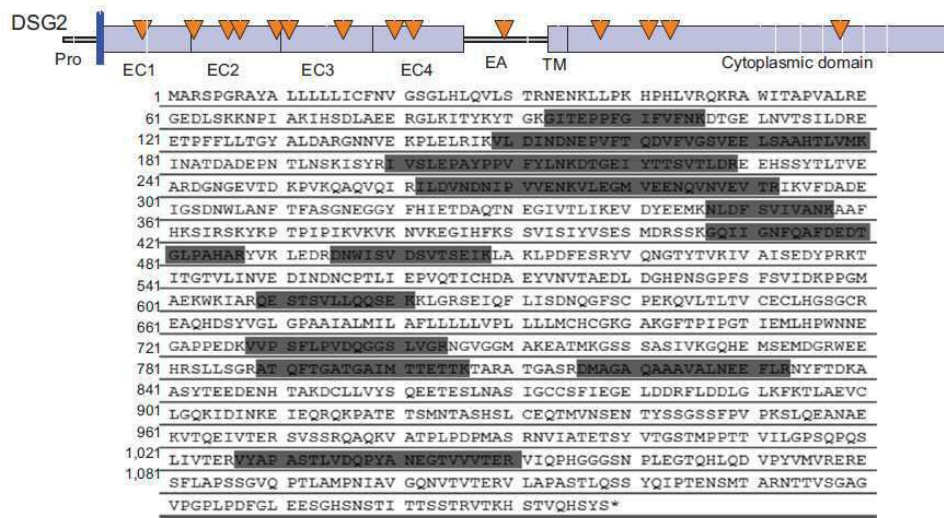
도면2d



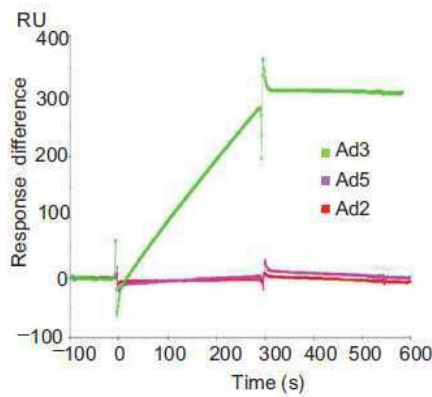
도면2e



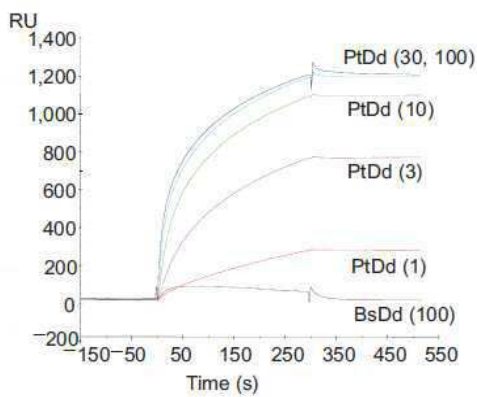
도면2f



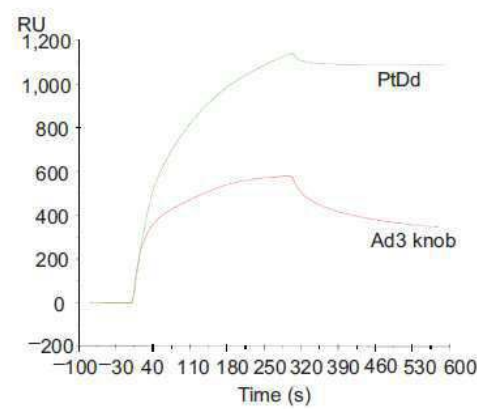
도면2g



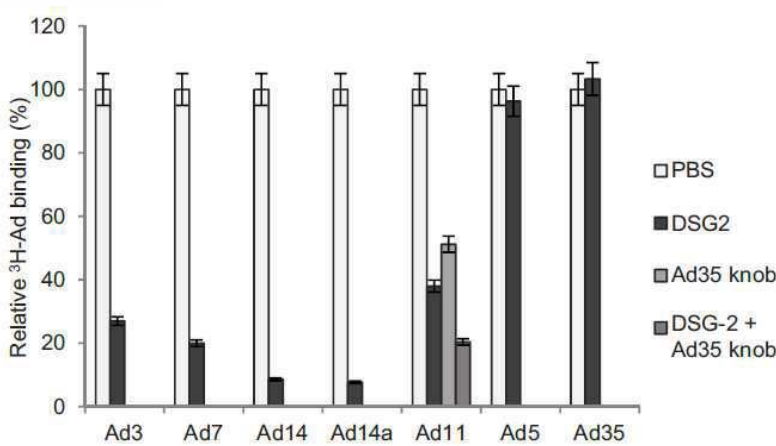
도면2h



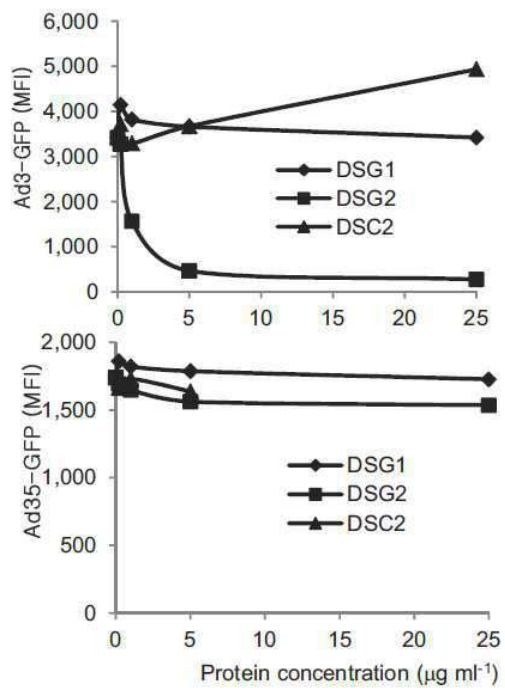
도면2i



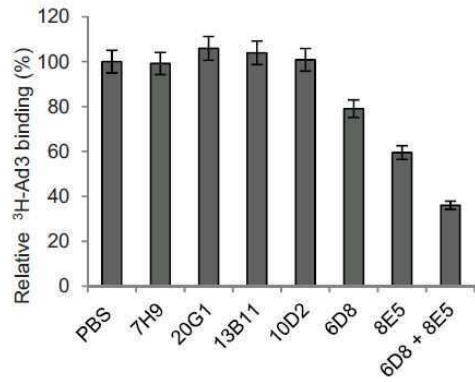
도면3a



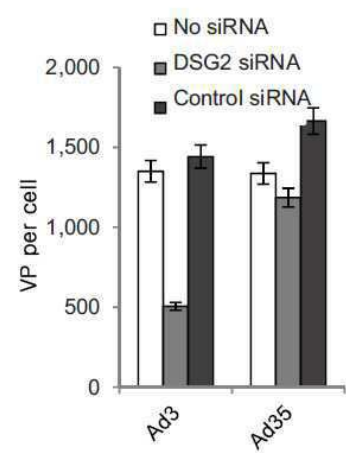
도면3b



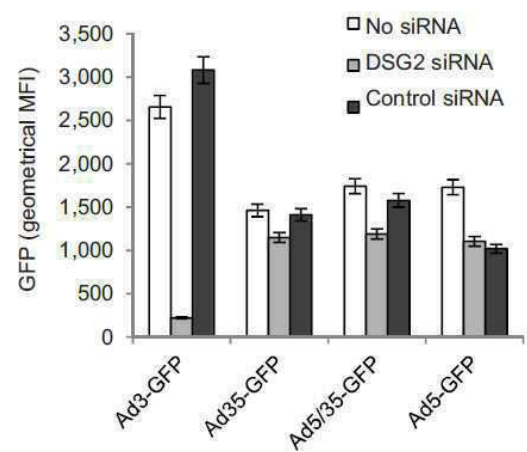
도면3c



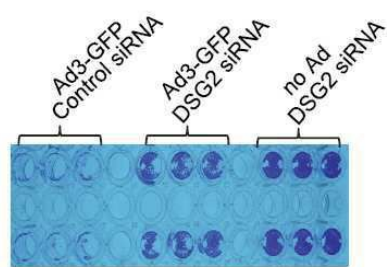
도면3d



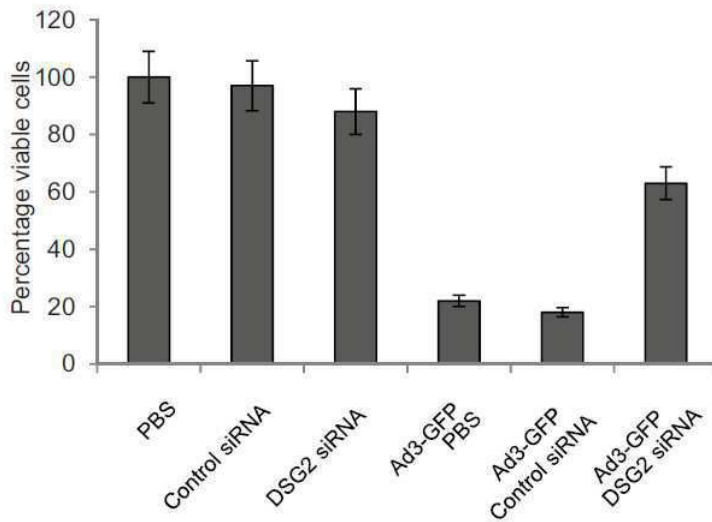
도면3e



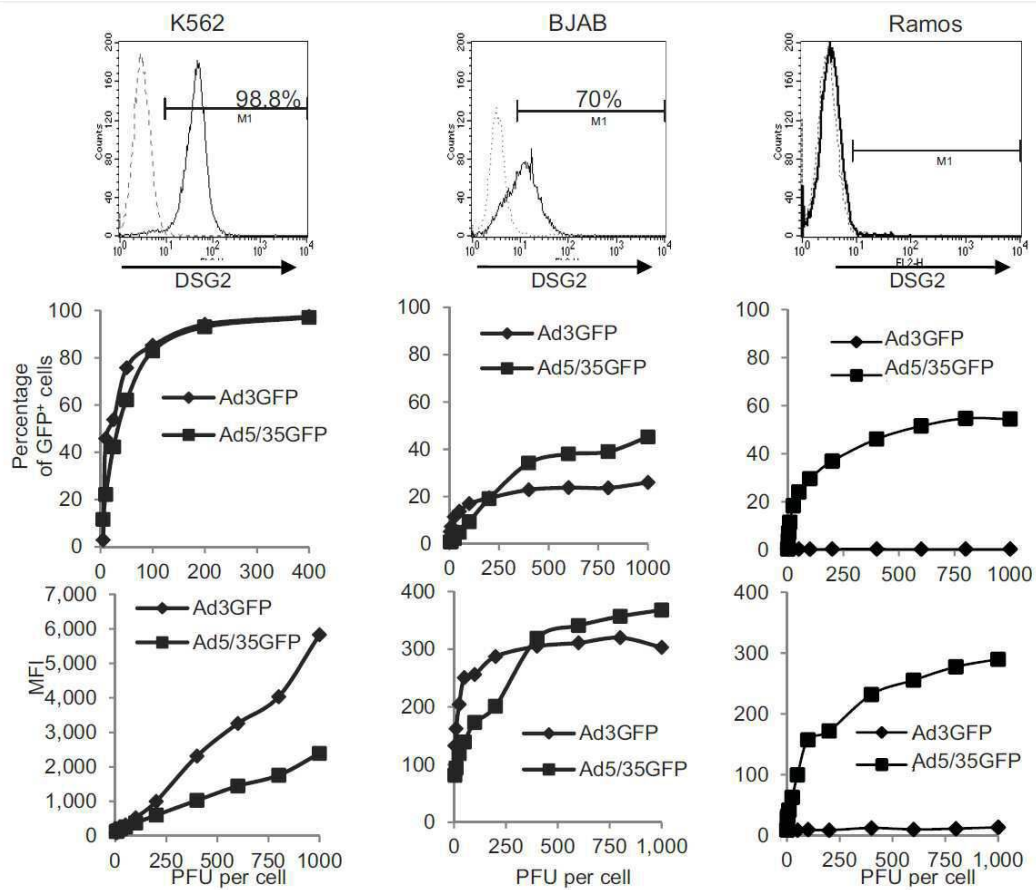
도면3f



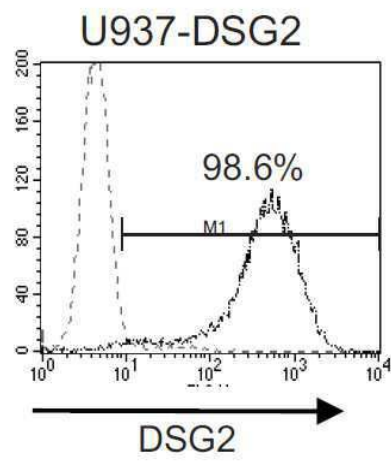
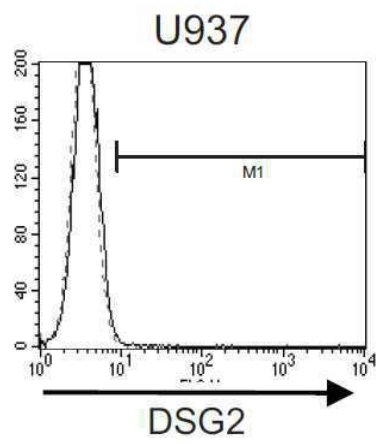
도면3g



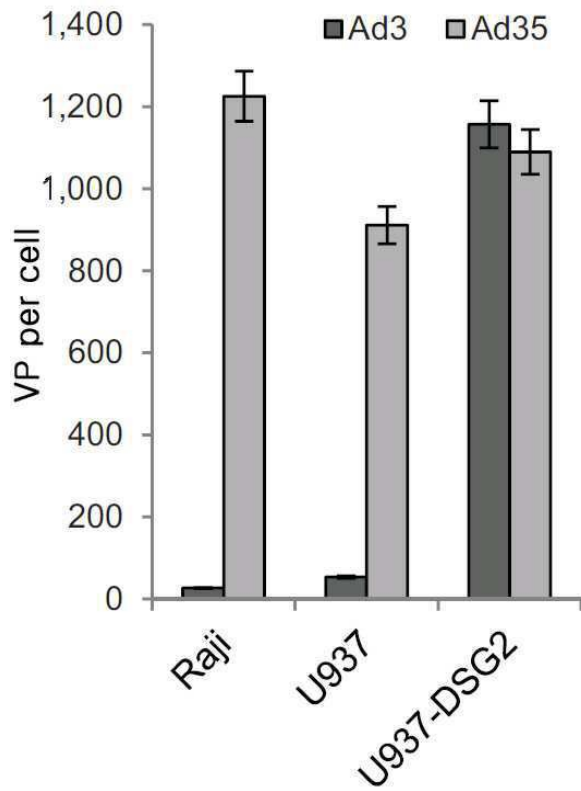
도면4a



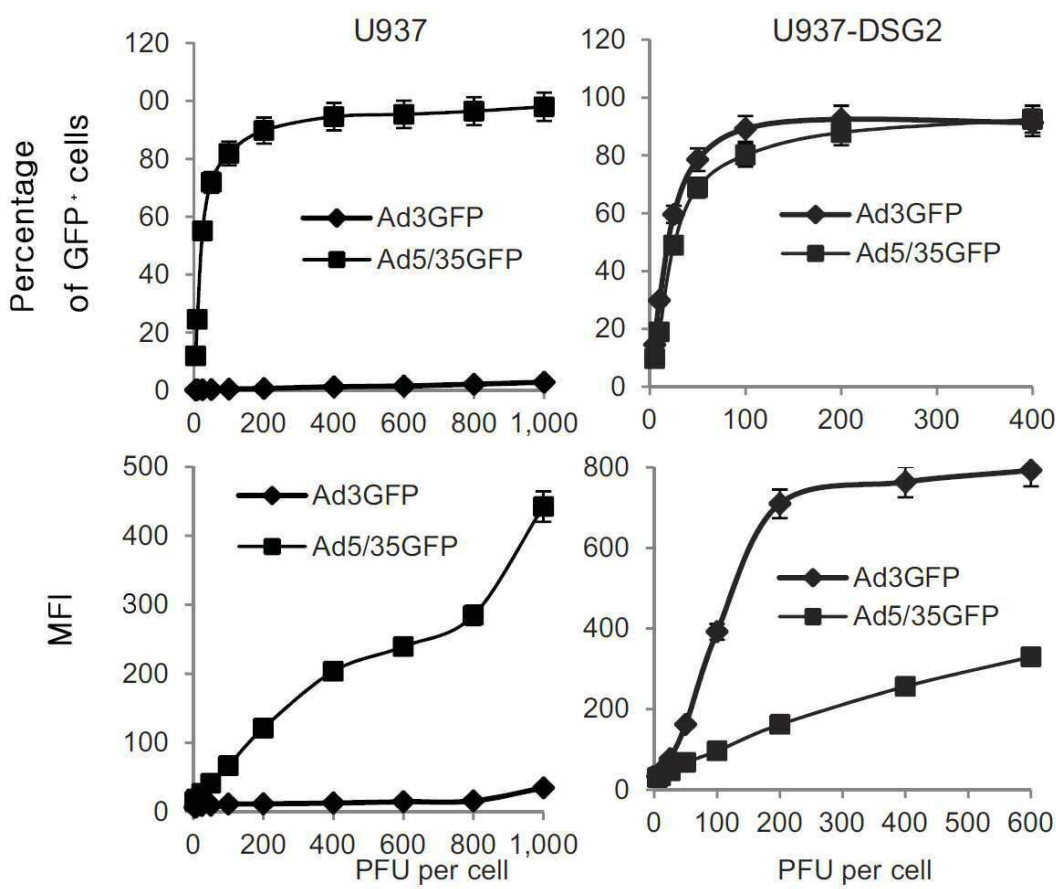
도면4b



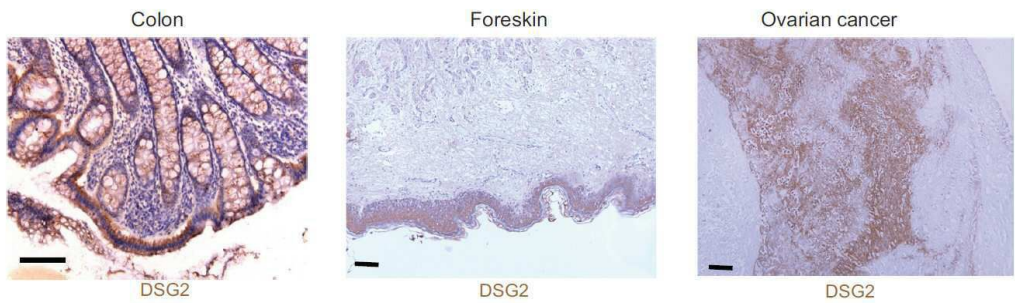
도면4c



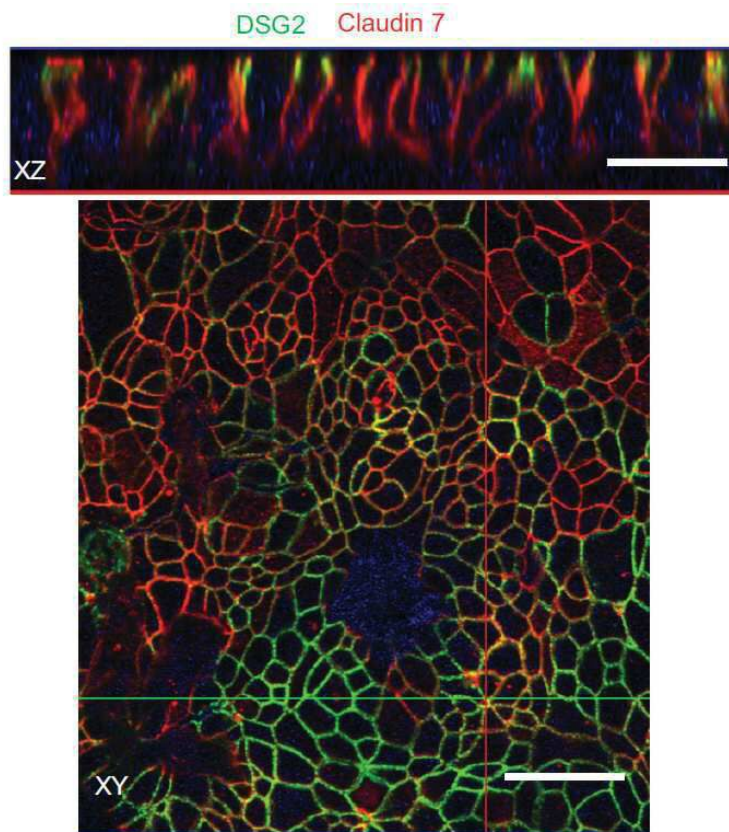
도면4d



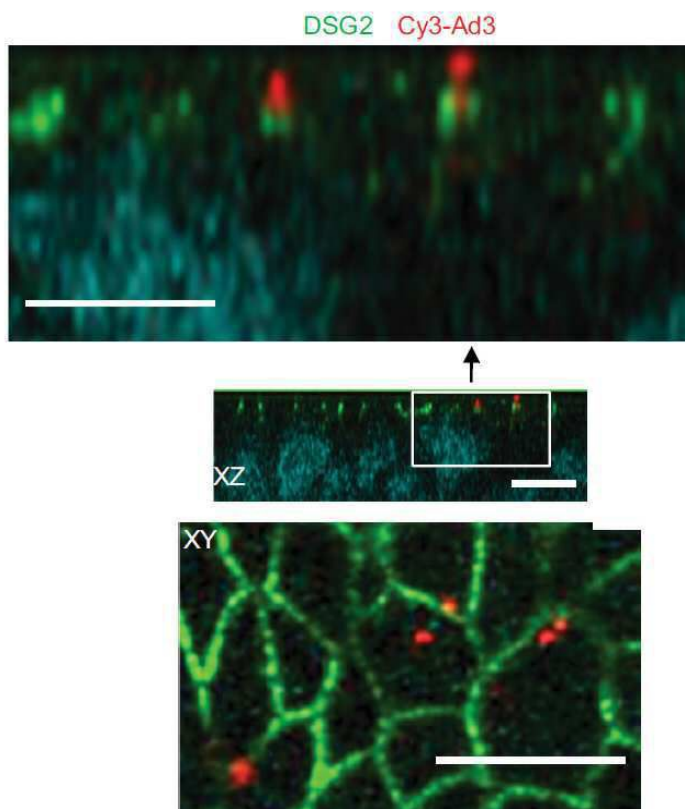
도면5a



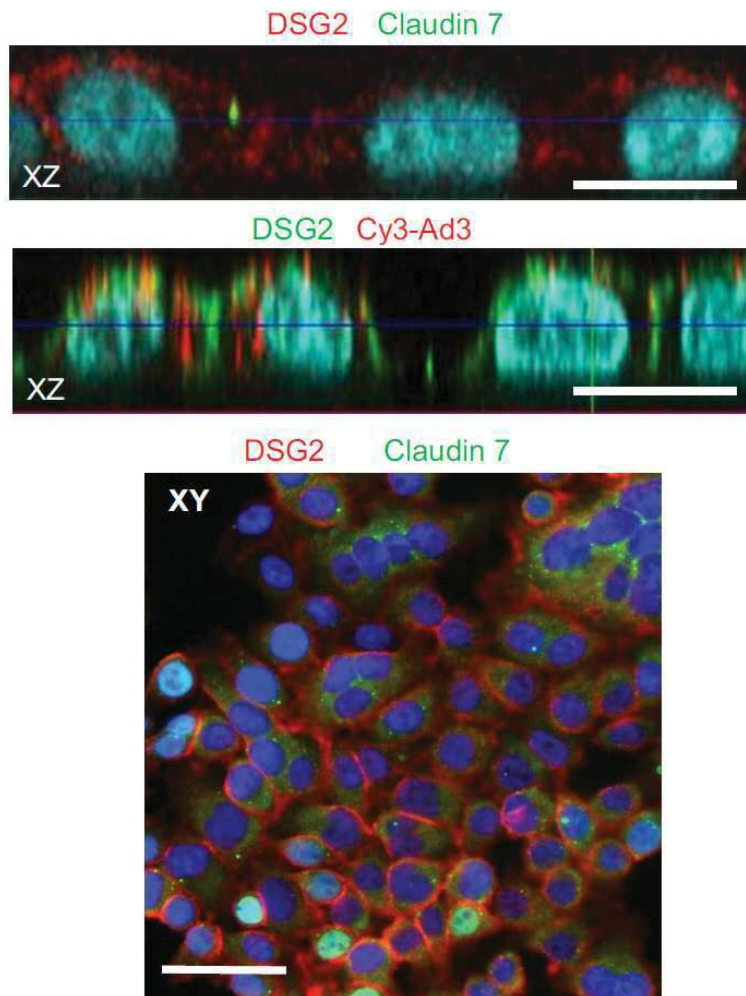
도면5b



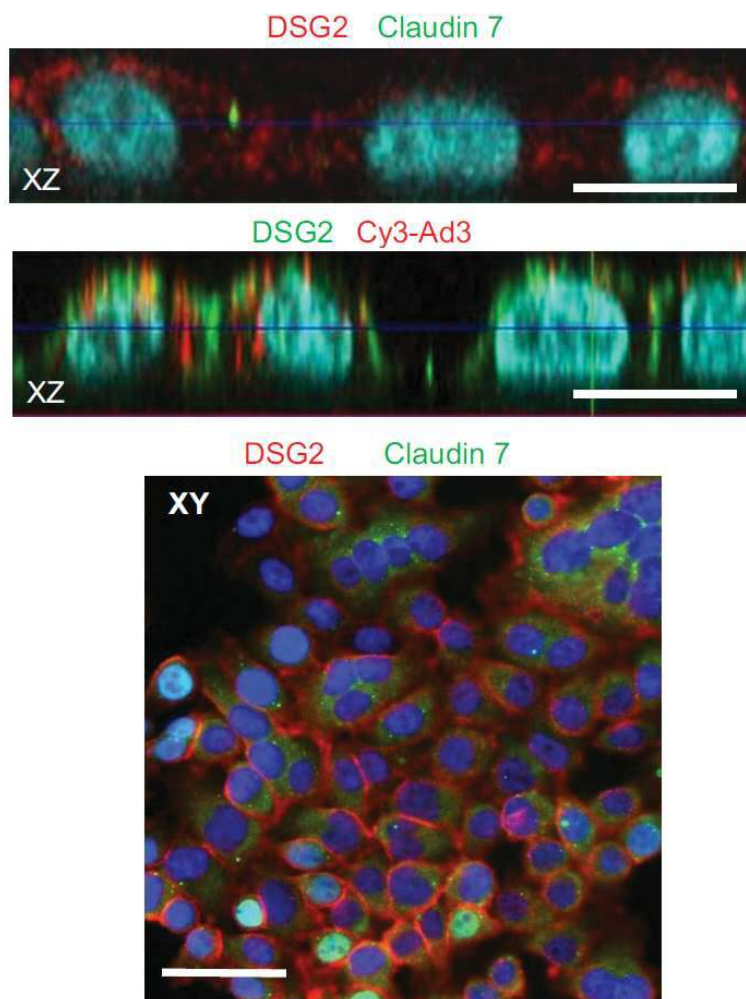
도면5c



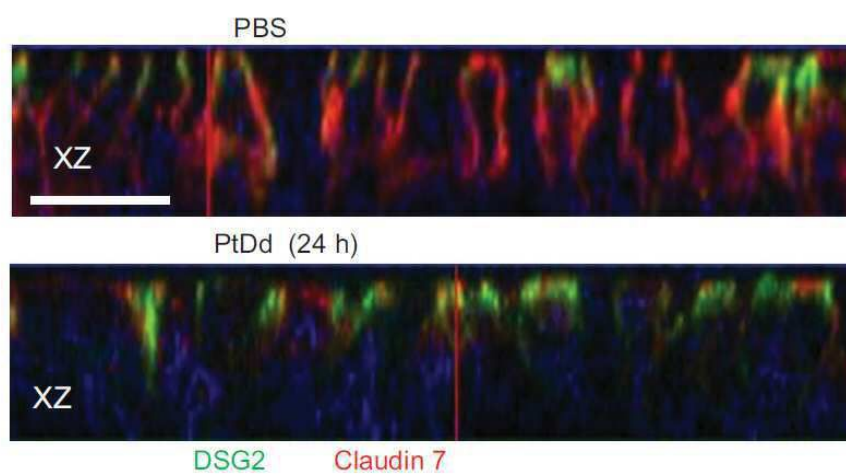
도면5d



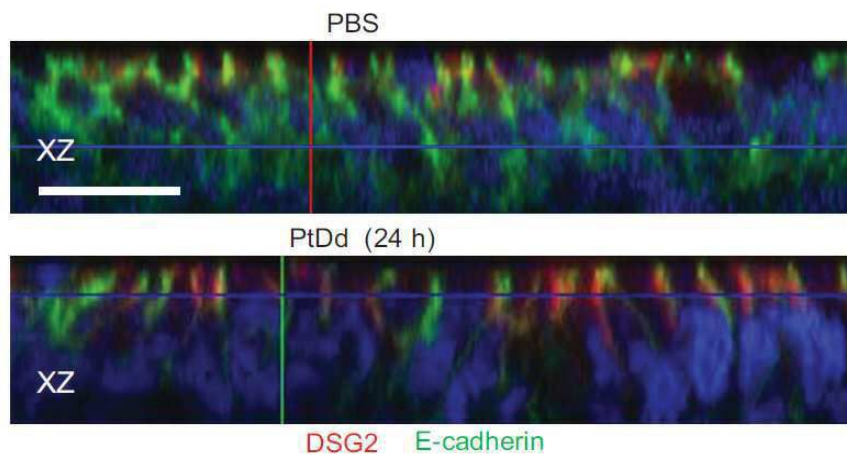
도면5e



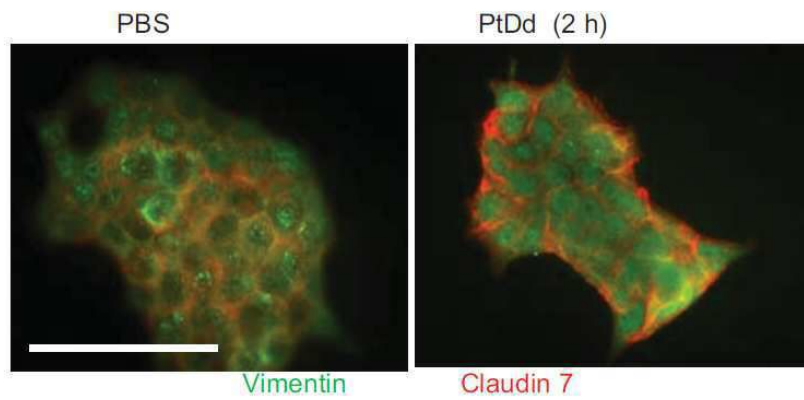
도면6a



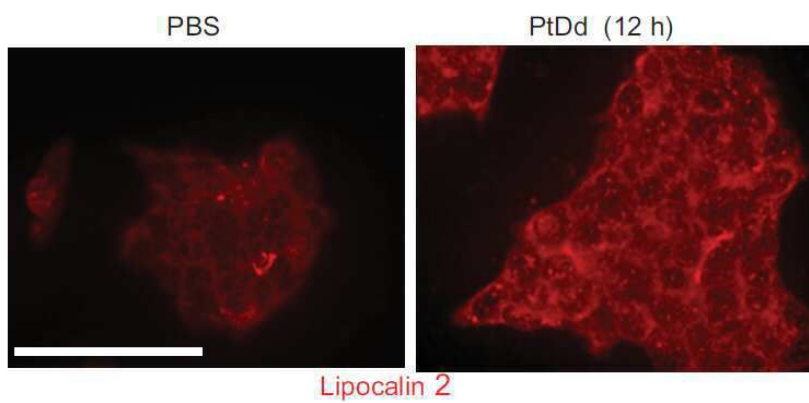
도면6b



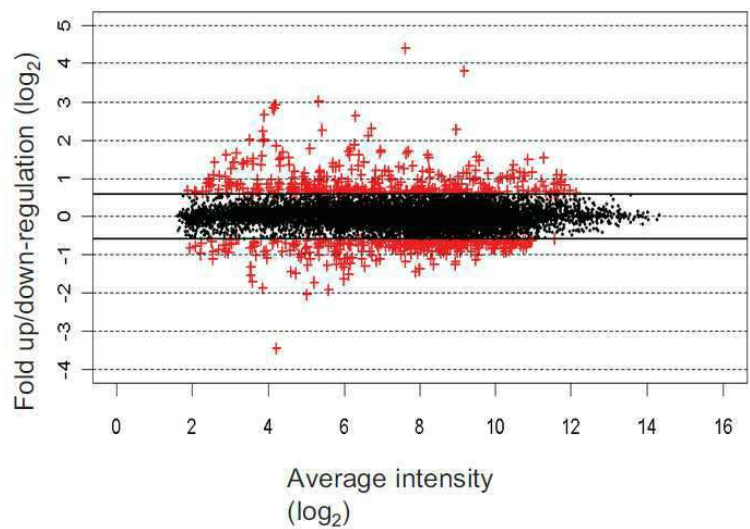
도면6c



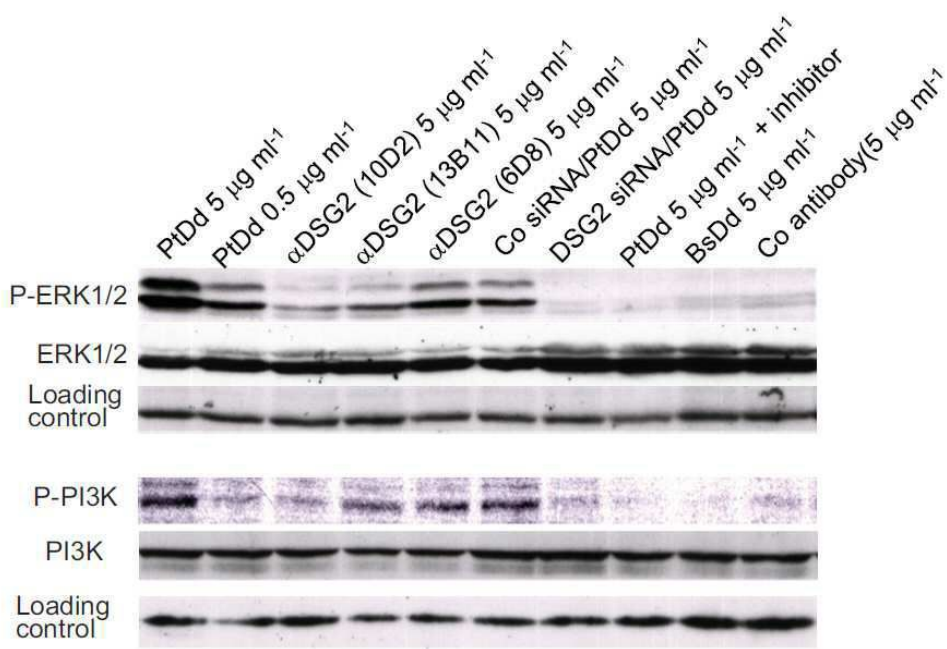
도면6d



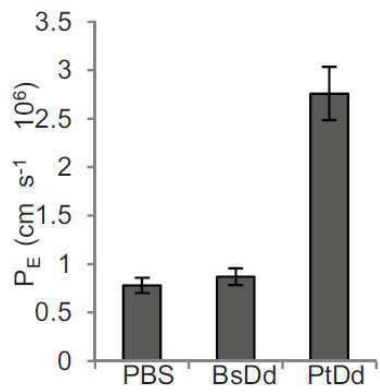
도면6e



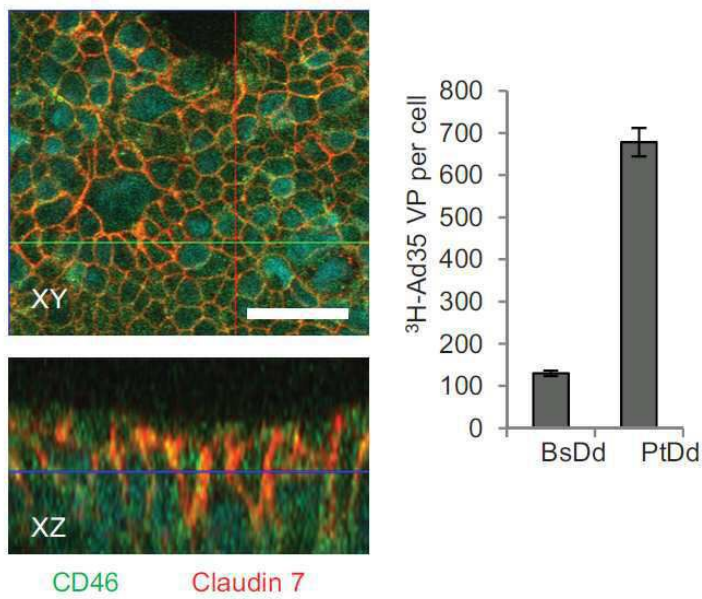
도면6f



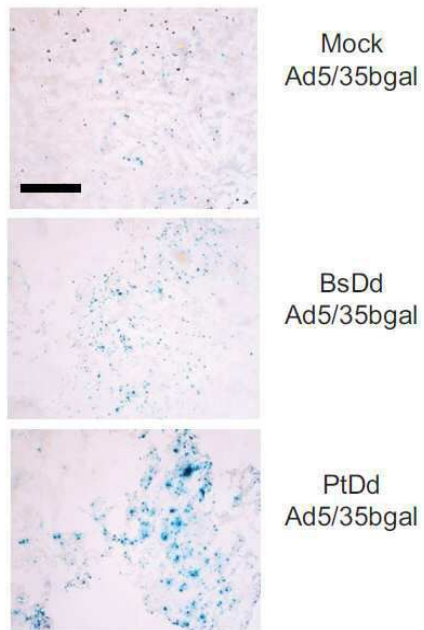
도면7a



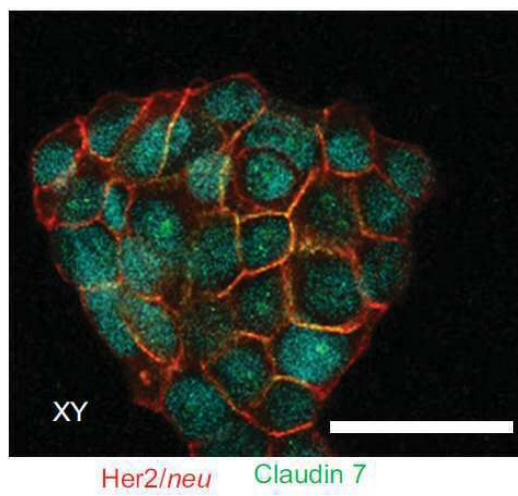
도면7b



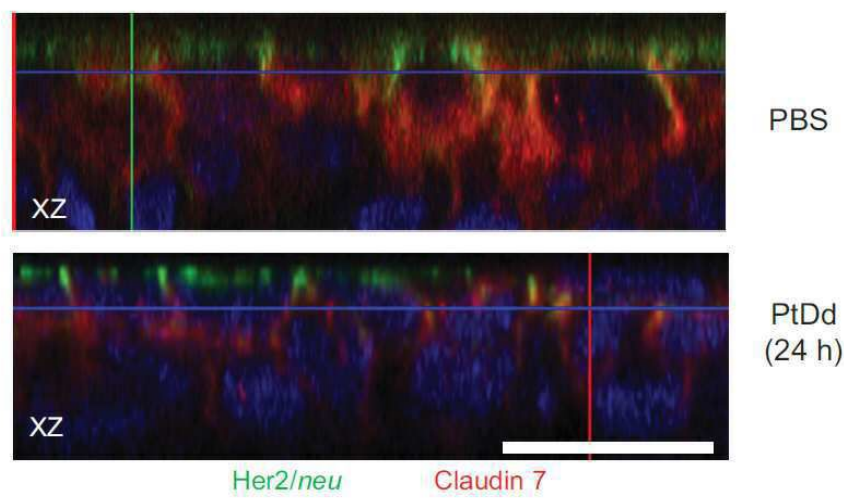
도면7c



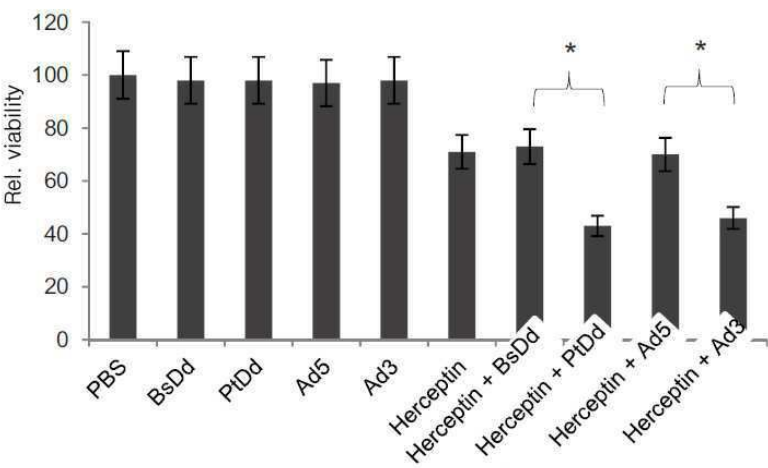
도면7d



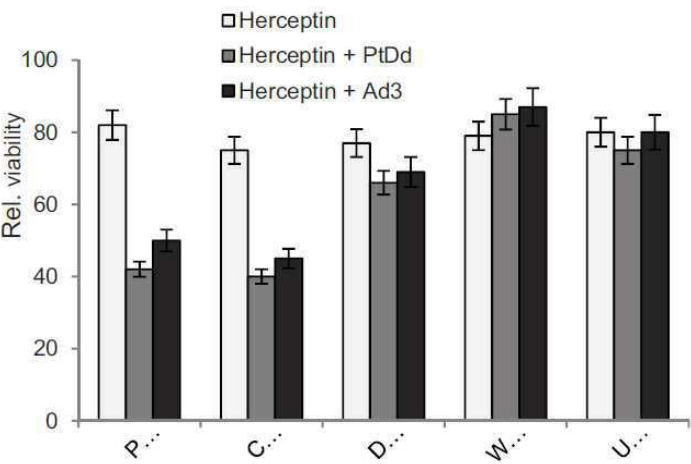
도면7e



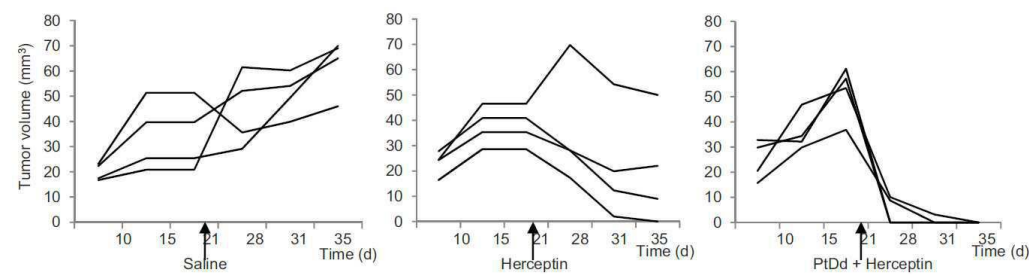
도면7f



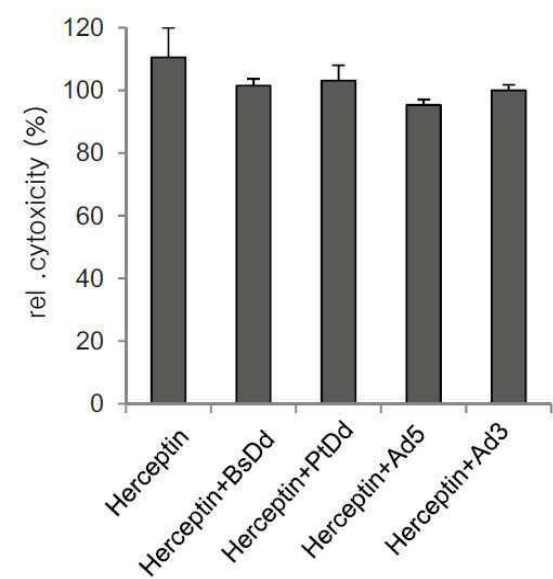
도면7g



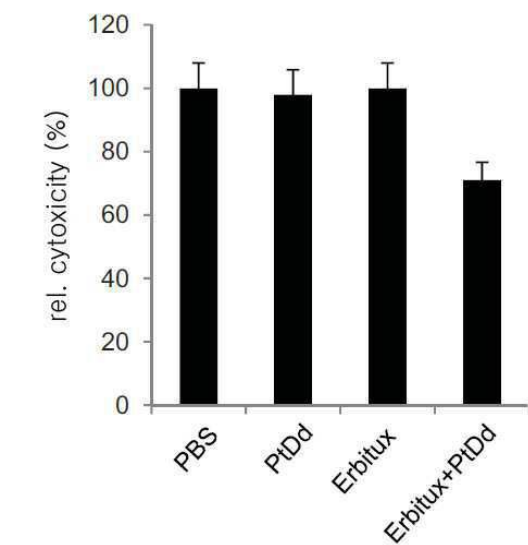
도면7h



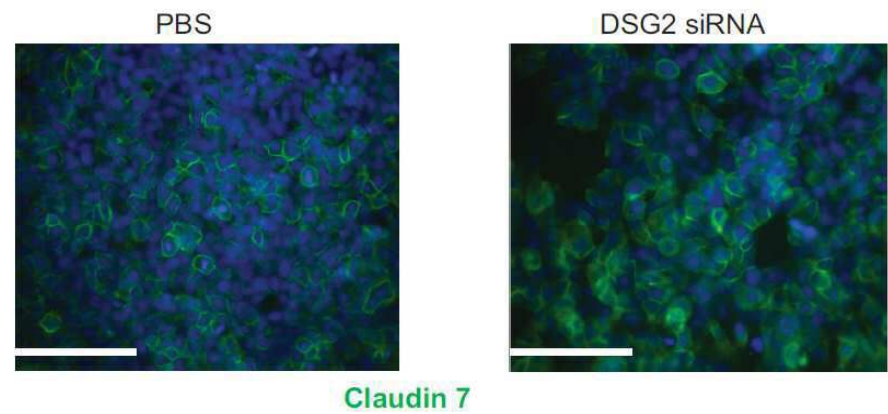
도면8a



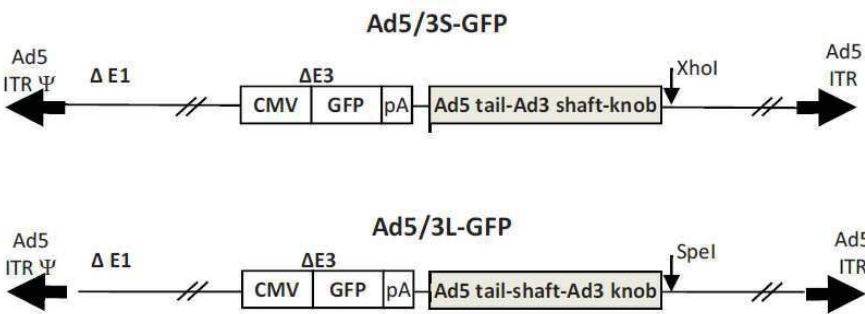
도면8b



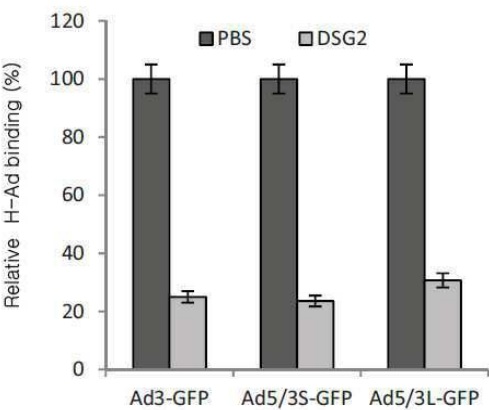
도면8c



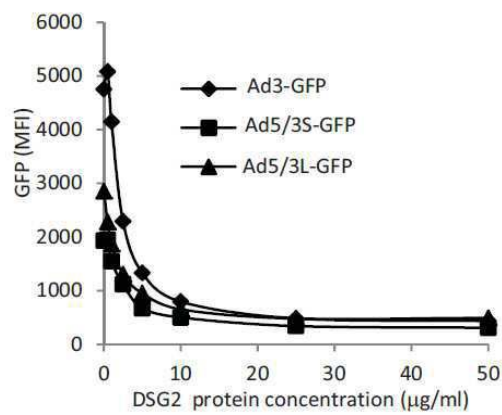
도면9a



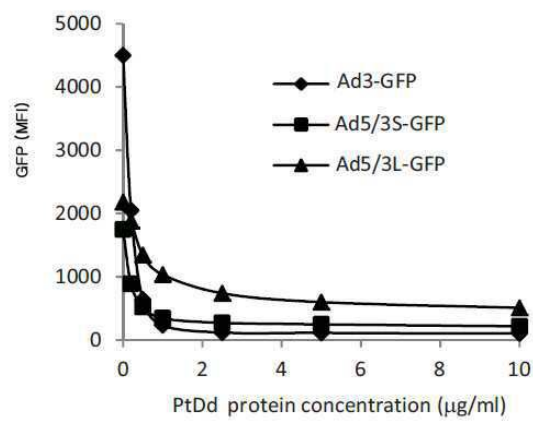
도면9b



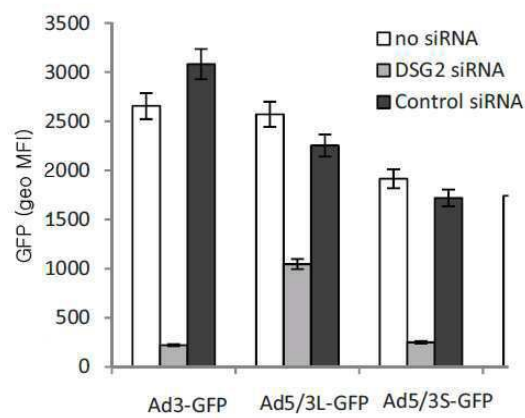
도면9c



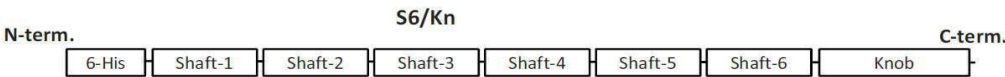
도면9d



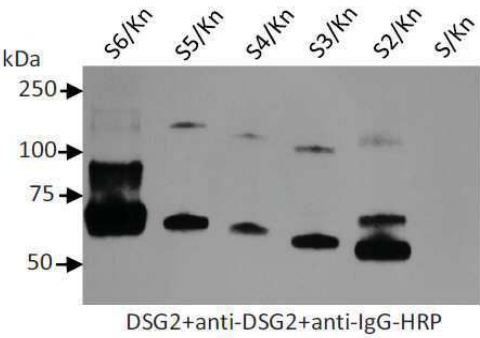
도면9g



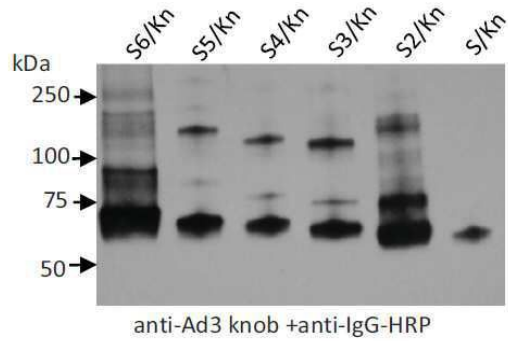
도면10a



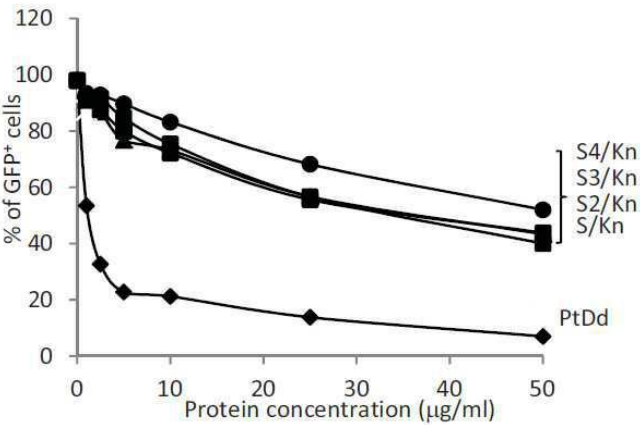
도면10b



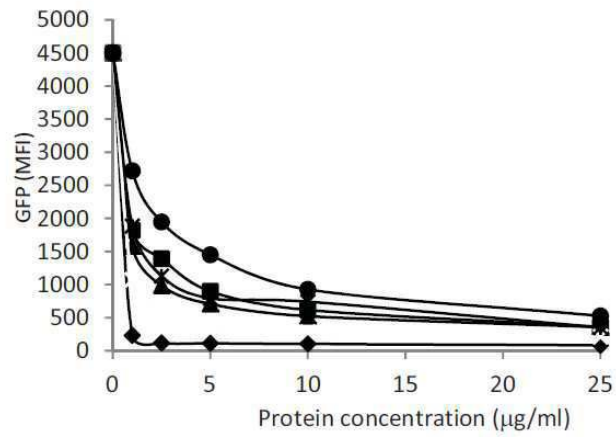
도면10c



도면10d



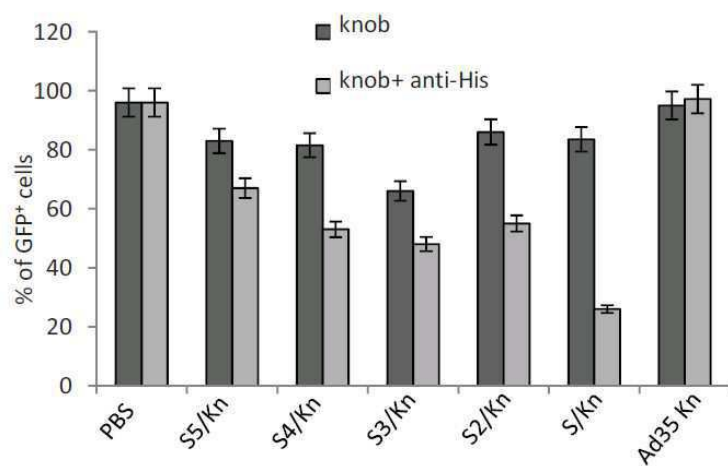
도면10e



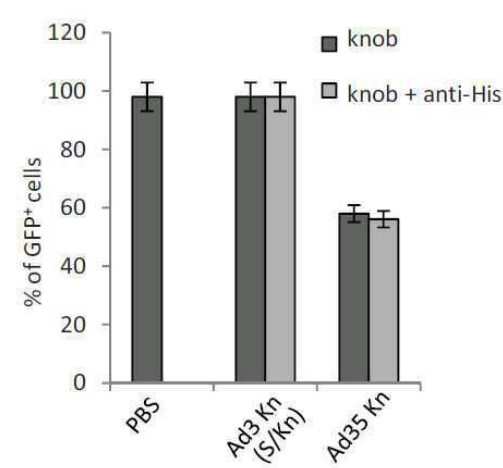
도면10f



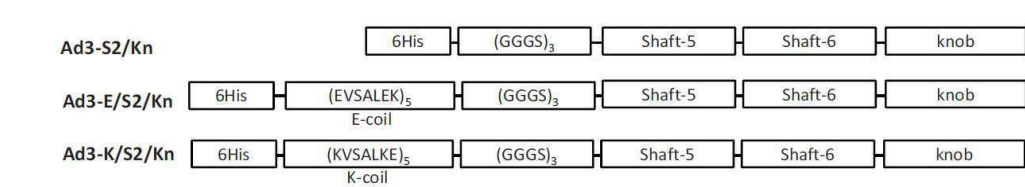
도면10g



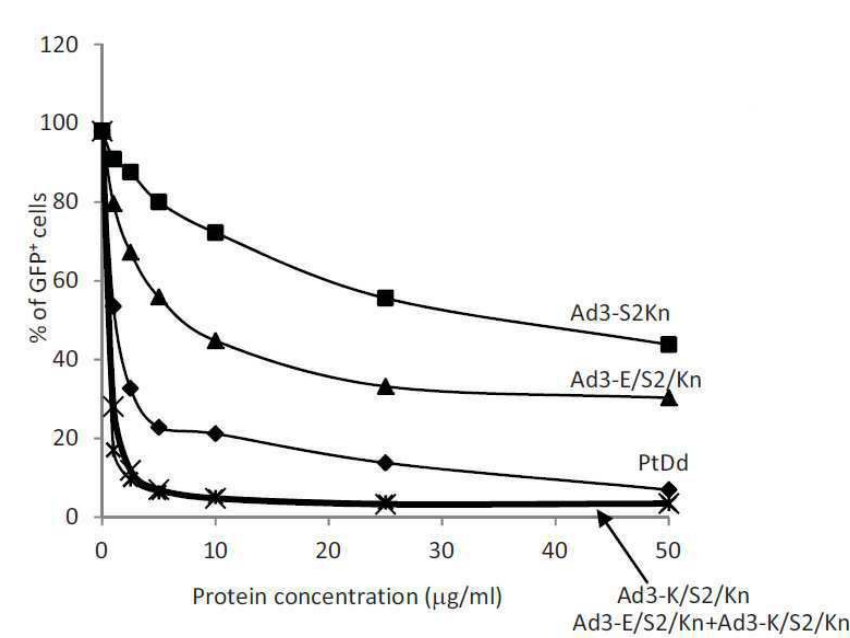
도면10h



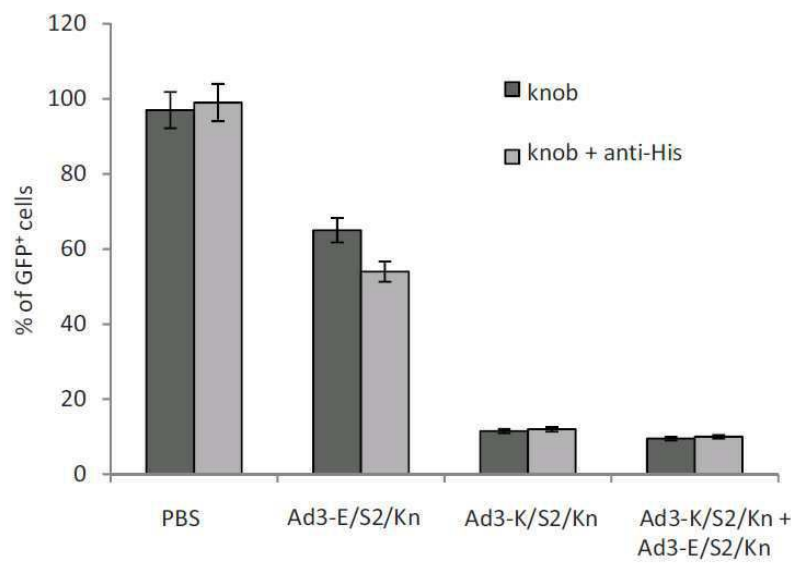
도면11a



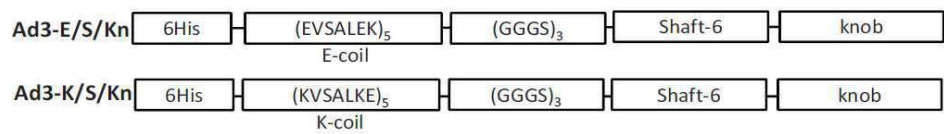
도면11b



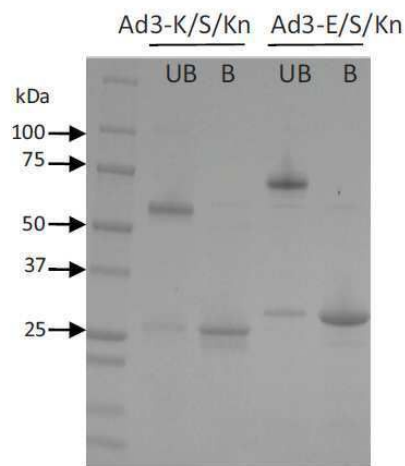
도면11c



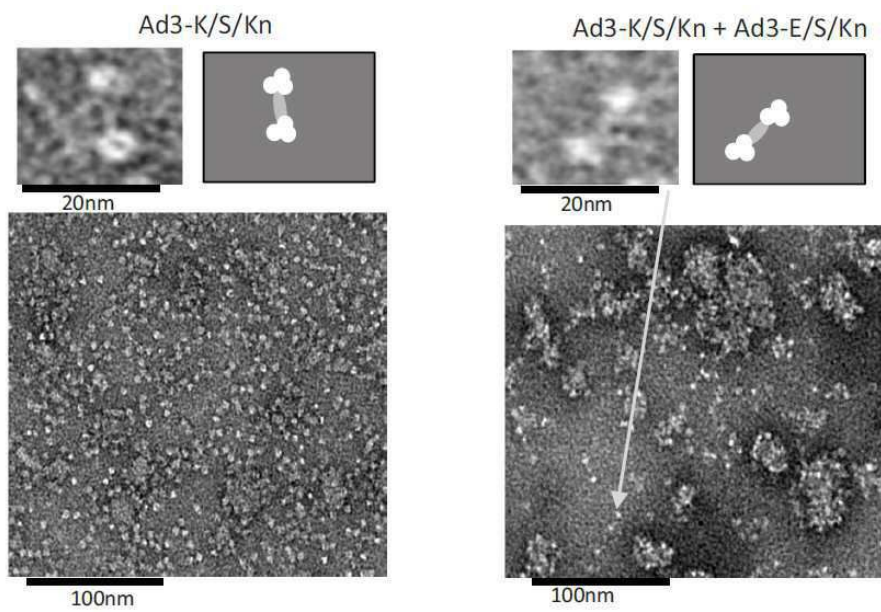
도면12a



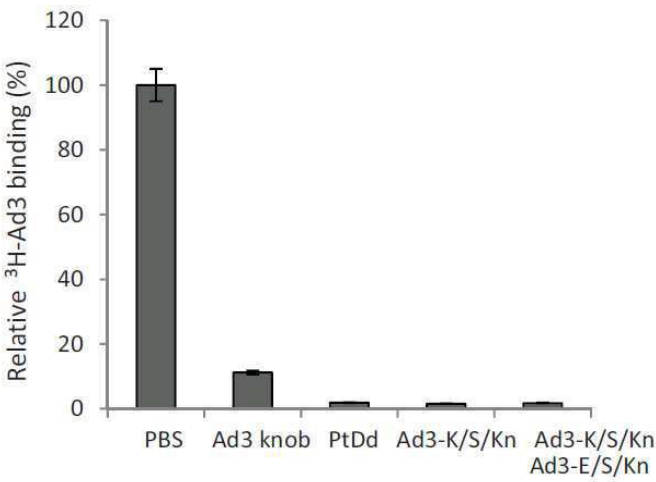
도면12b



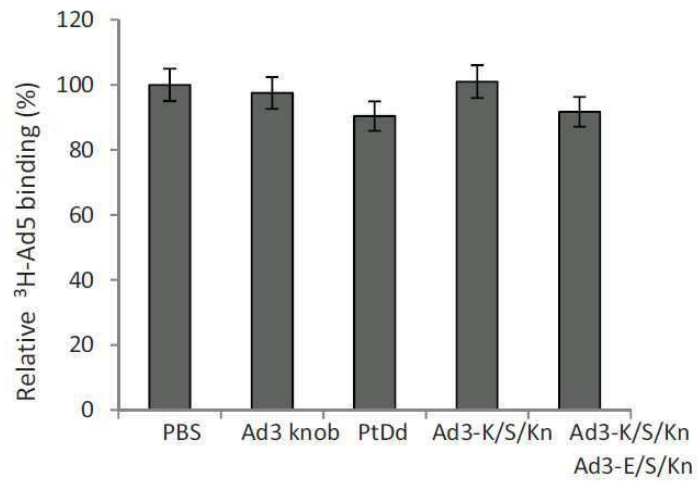
도면12c



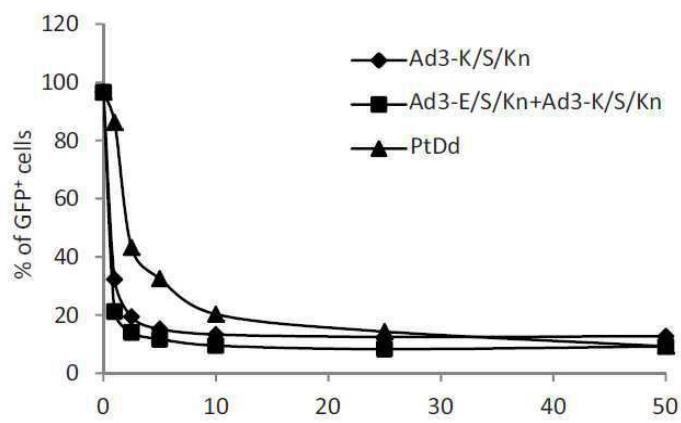
도면12d



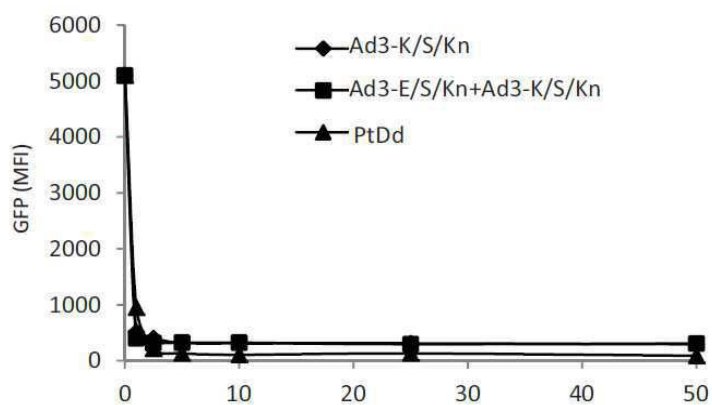
도면12e



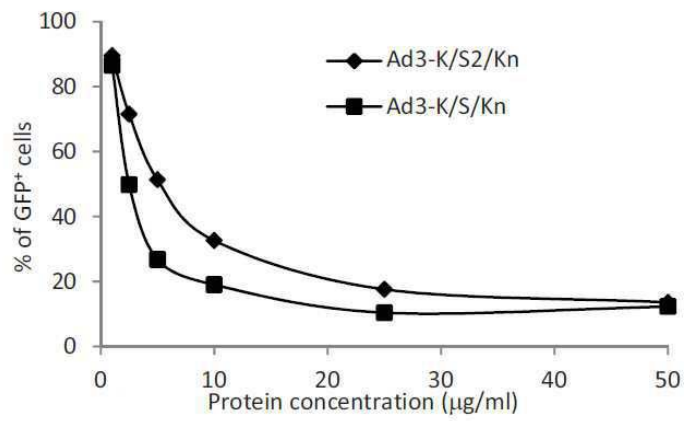
도면12f



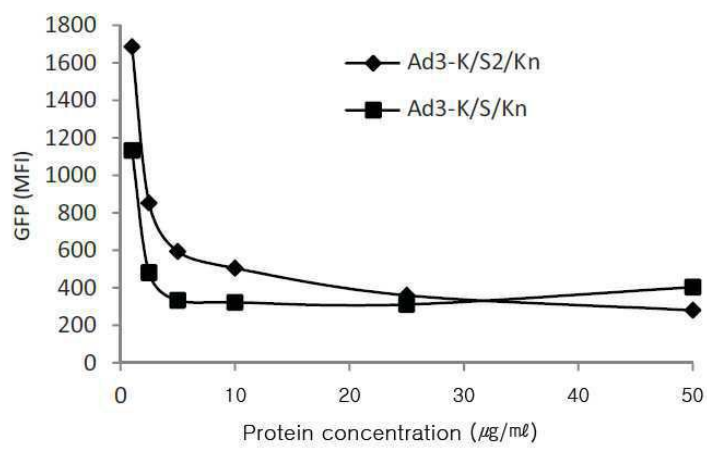
도면12g



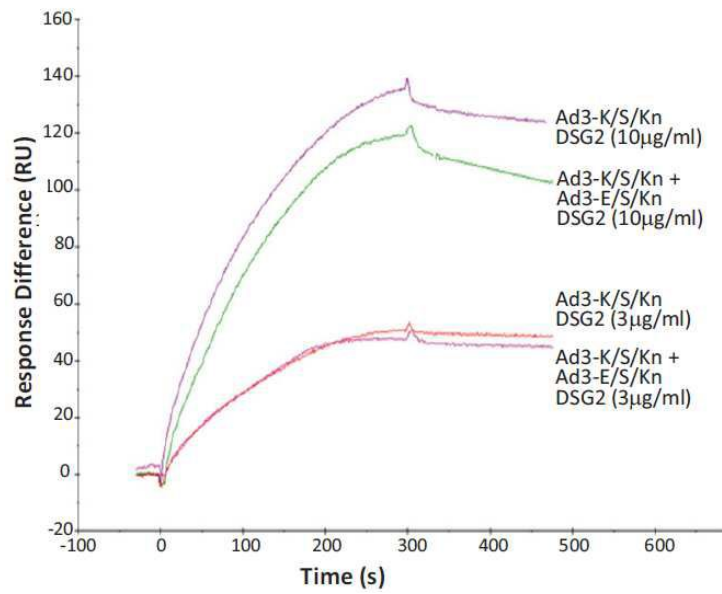
도면12h



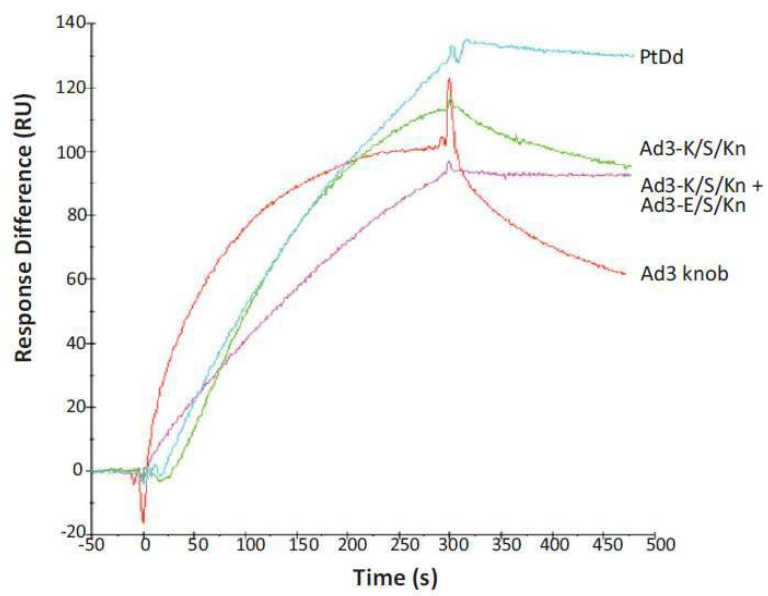
도면12i



도면13a



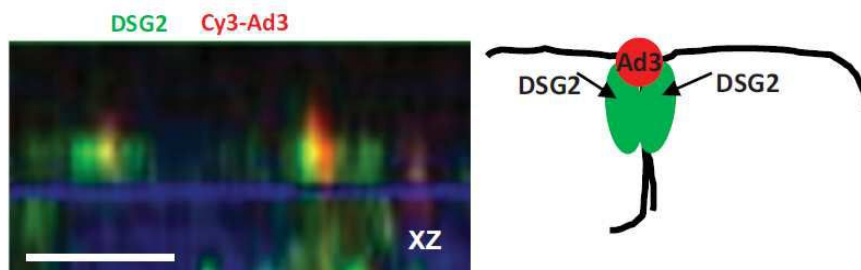
도면13b



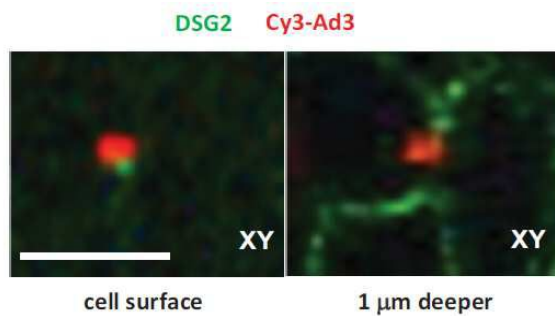
도면13c

	Binding at the end of association	Remaining binding after 150s dissociation	% of remaining binding after 150s
Ad3 knob	101.4	64.1	63.2
Ad3-K/S/Kn + Ad3-E/S/Kn	93.7	92.6	98.8
Ad3-K/S/Kn	112.8	96.9	85.9
PtDd	133.1	130.5	98.0

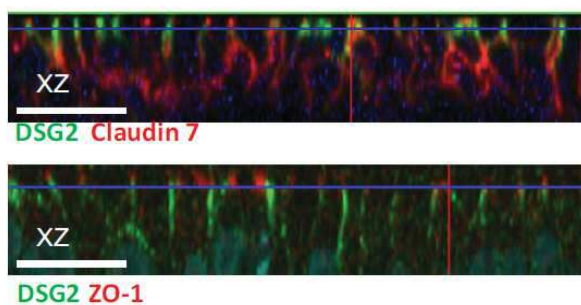
도면13d



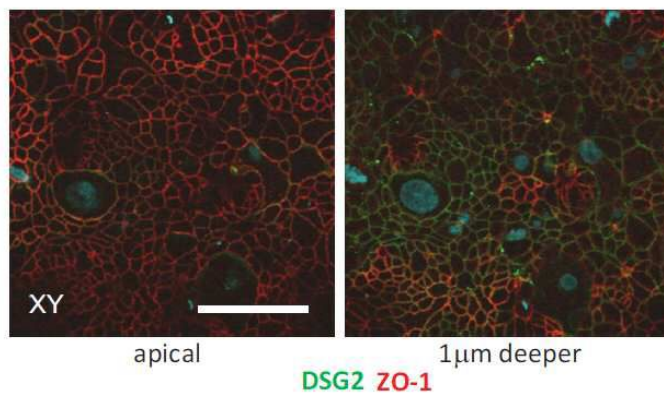
도면13e



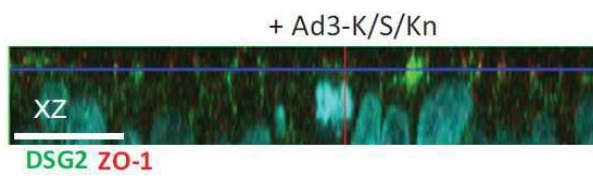
도면14a



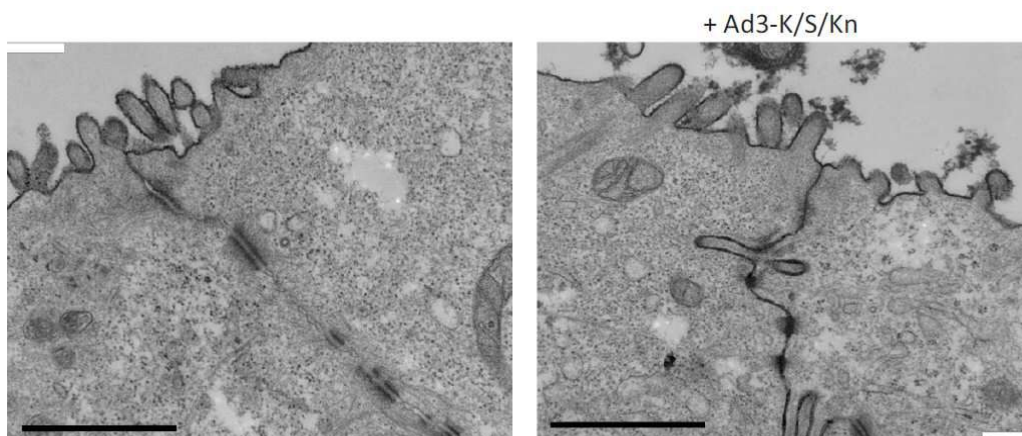
도면14b



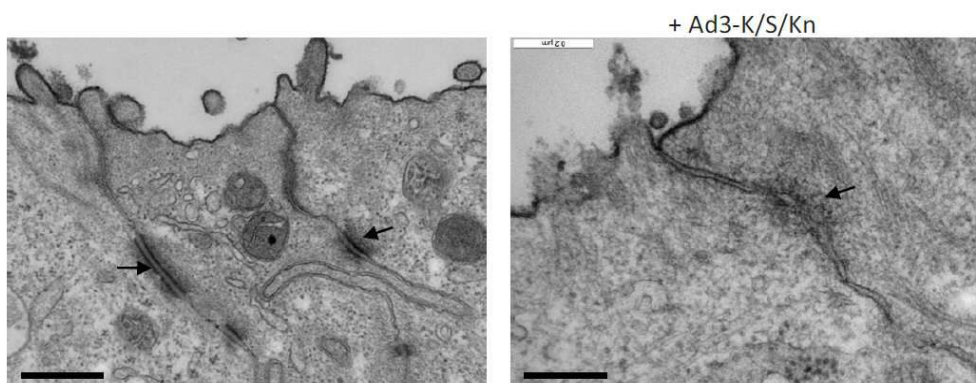
도면14c



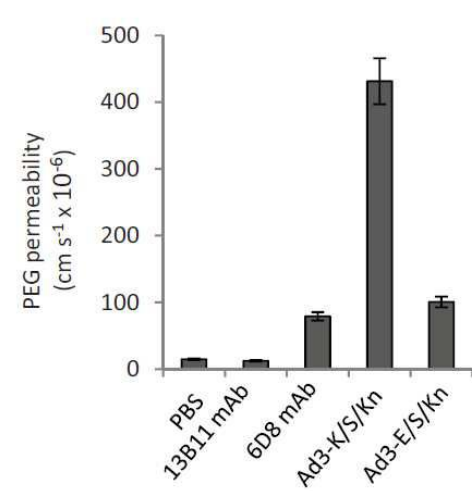
도면14d



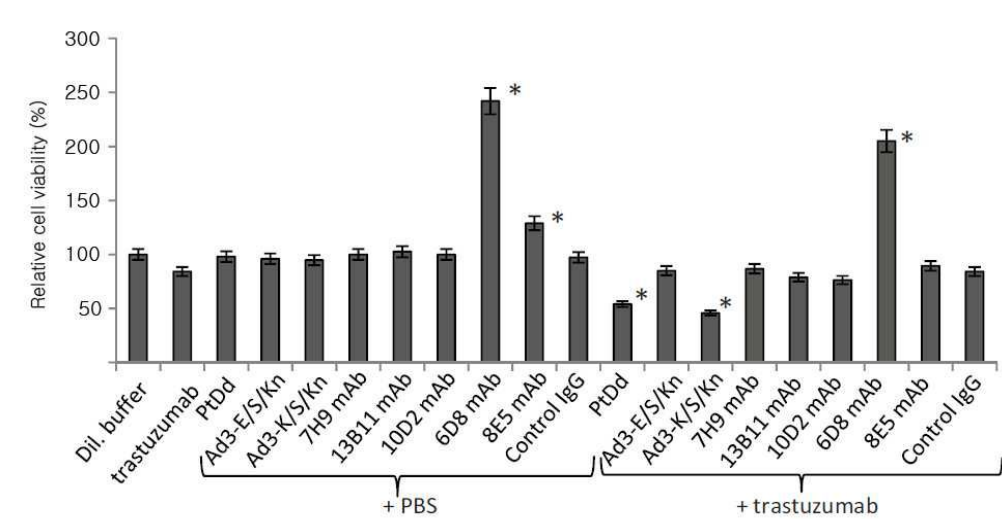
도면14e



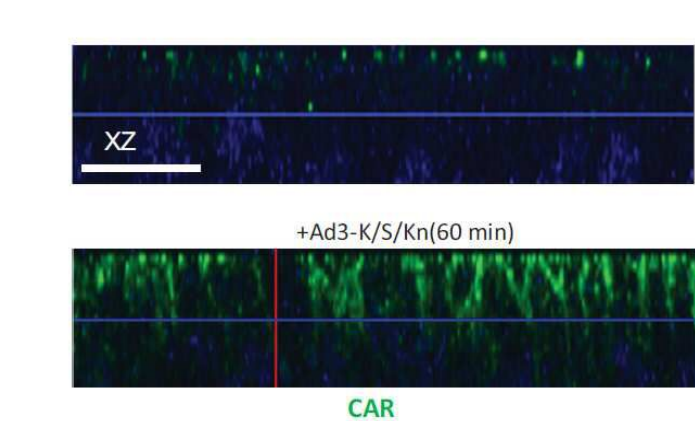
도면15a



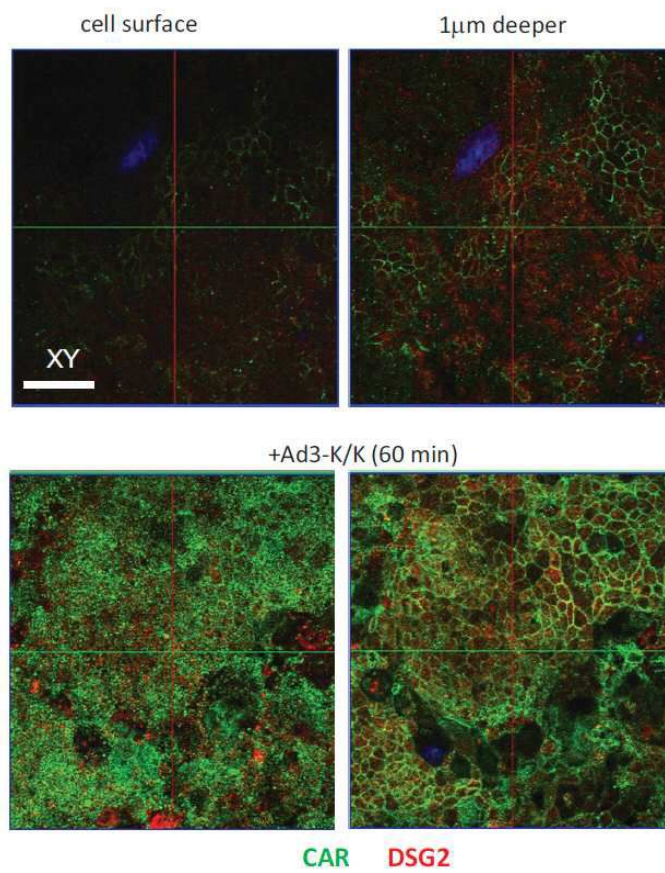
도면15b



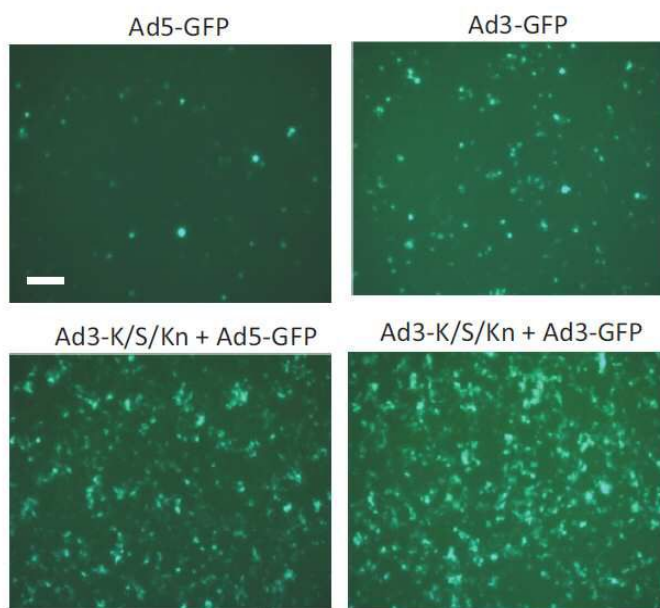
도면15c



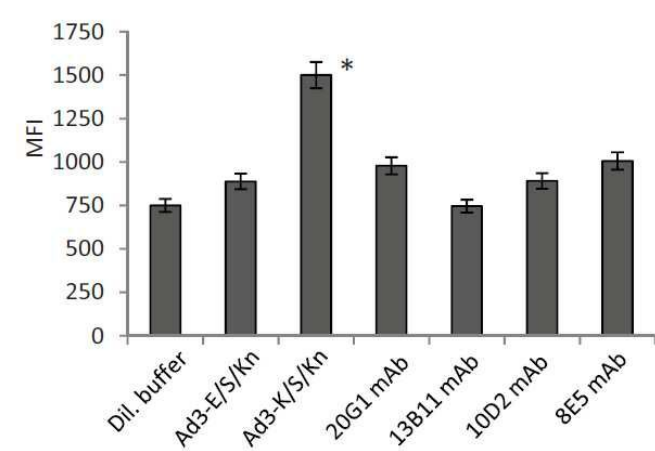
도면15d



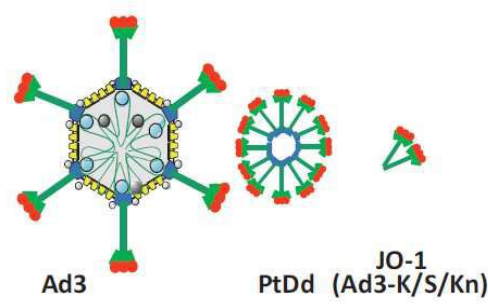
도면15e



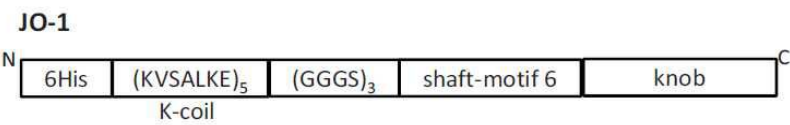
도면15f



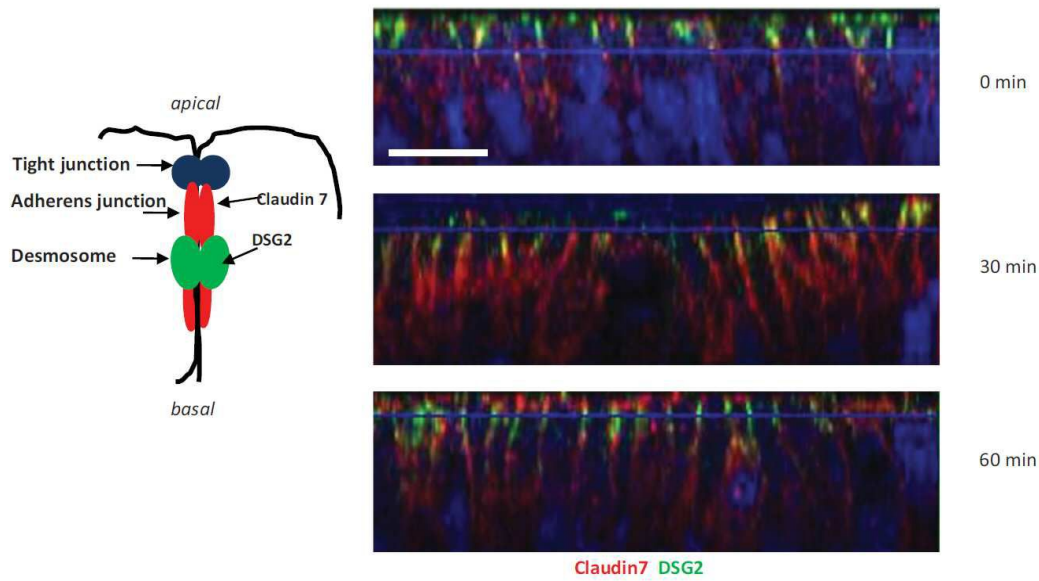
도면16a



도면16b



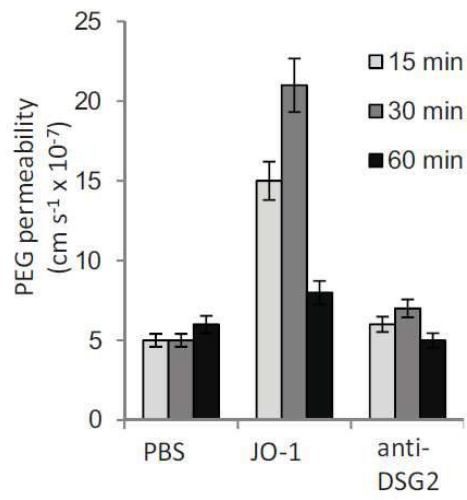
도면16c



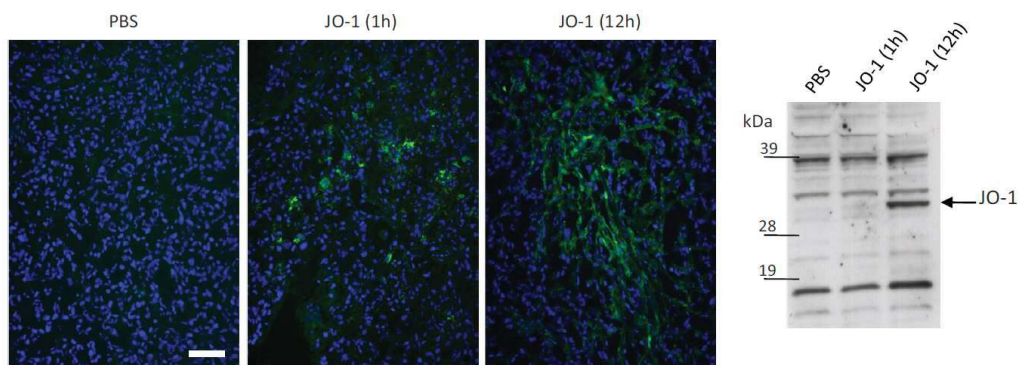
도면16d



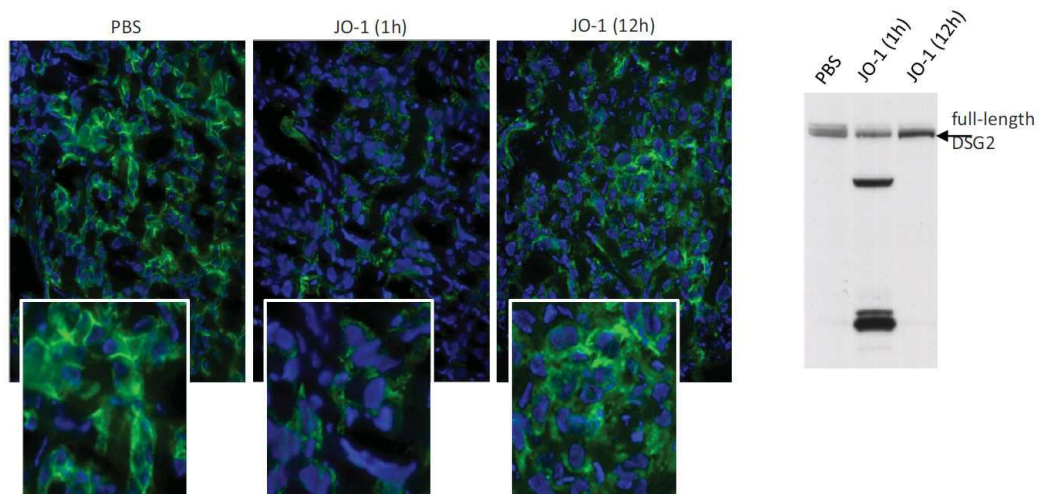
도면16e



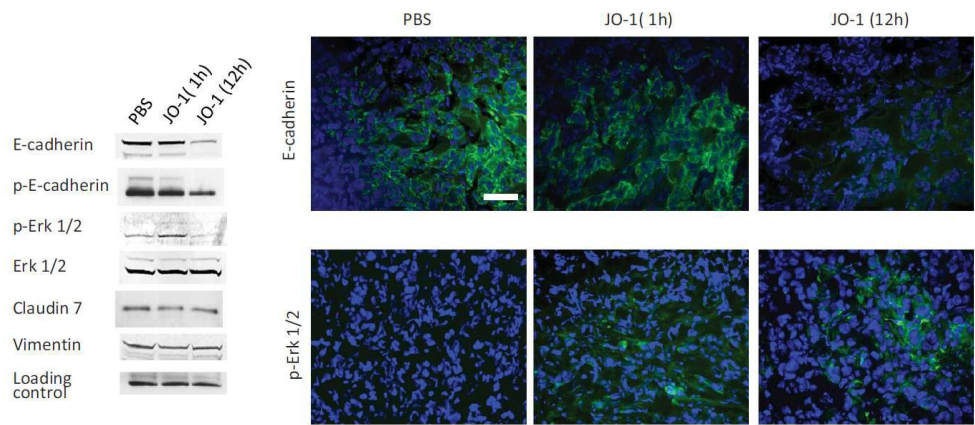
도면17a



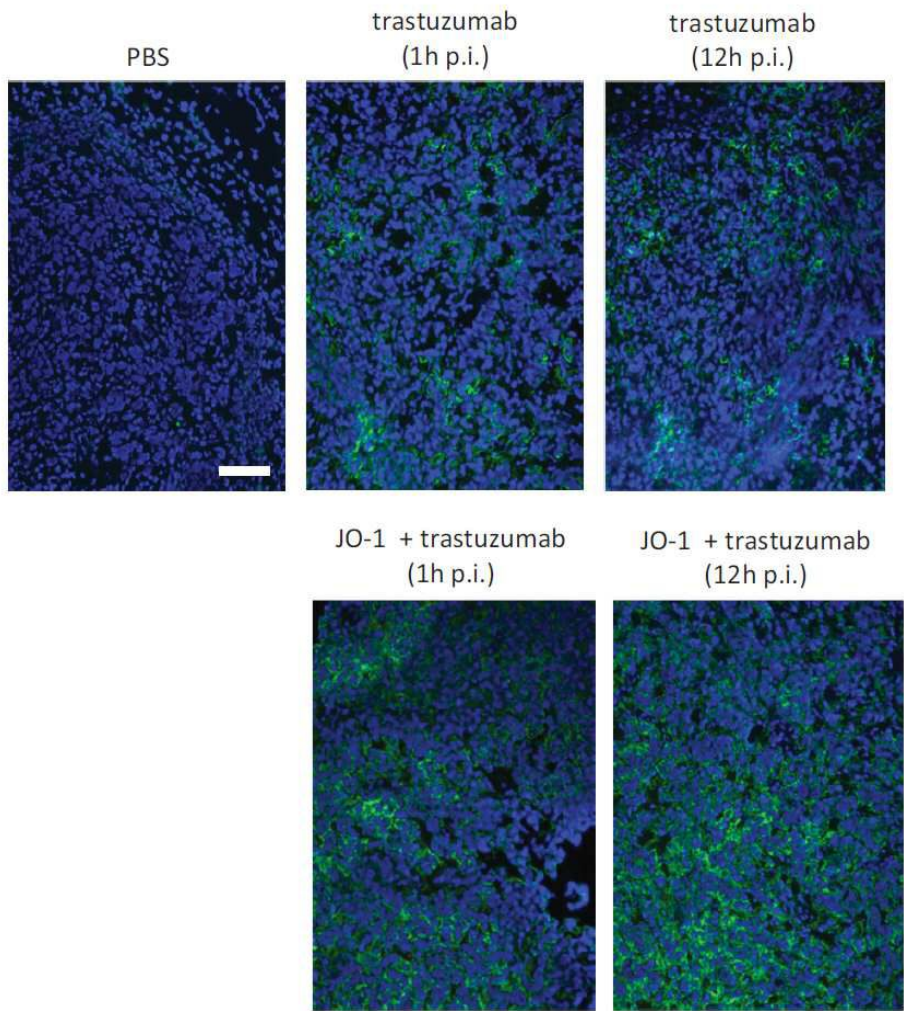
도면17b



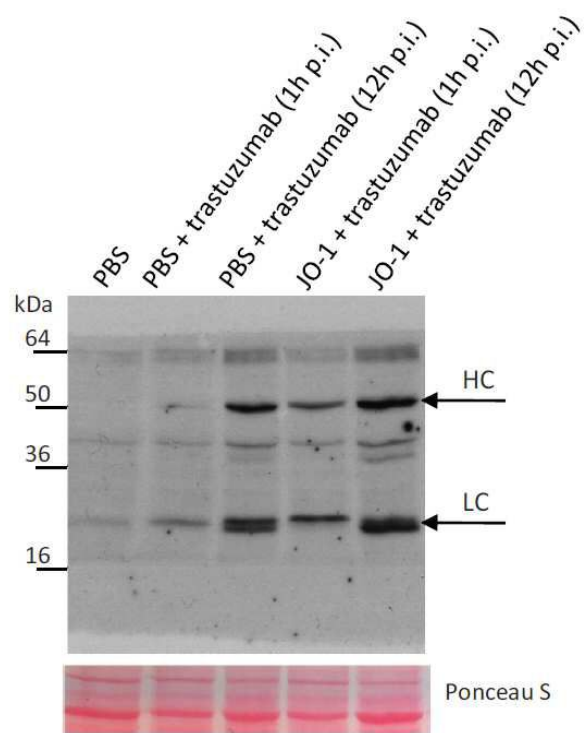
도면17c



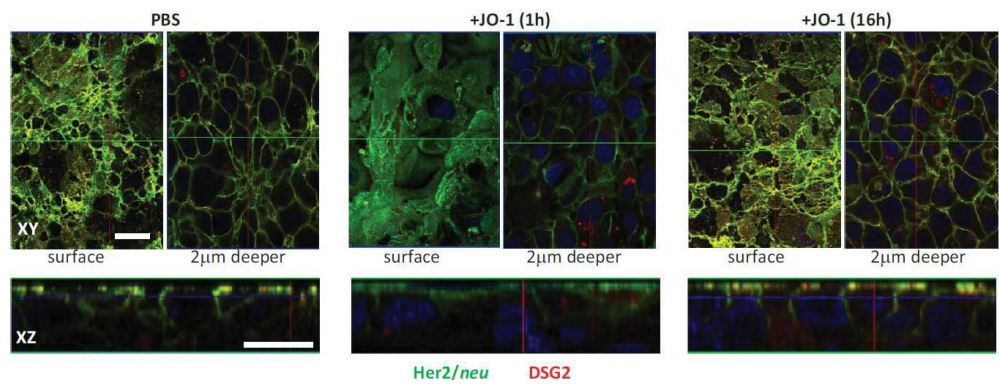
도면18a



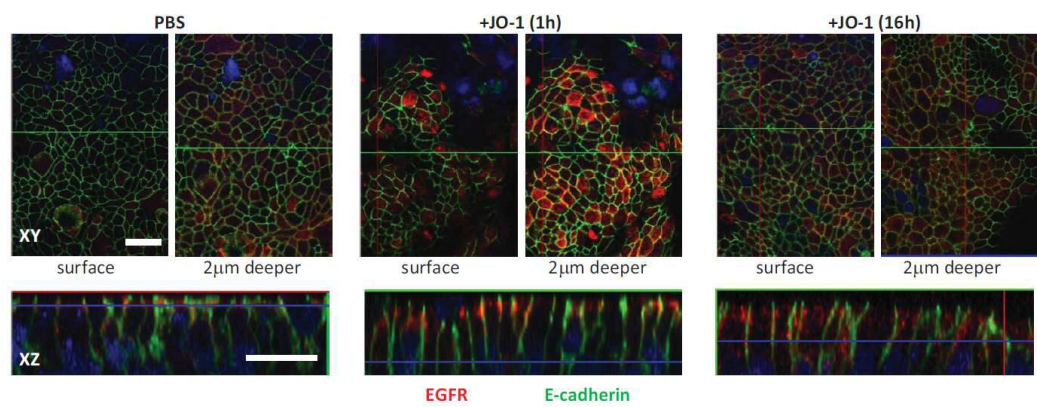
도면18b



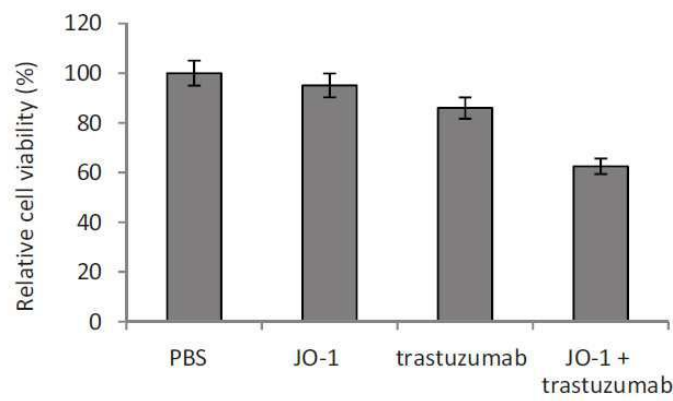
도면19a



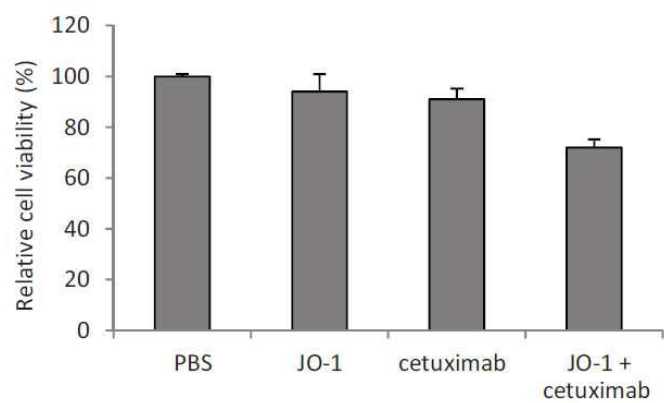
도면19b



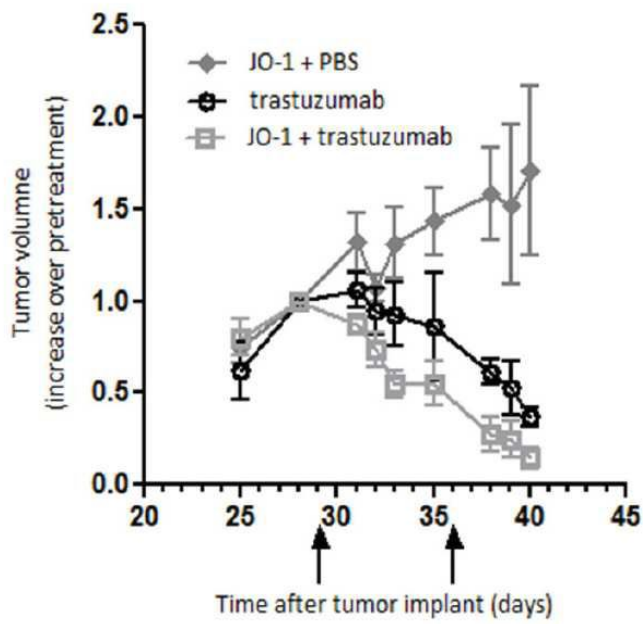
도면19c



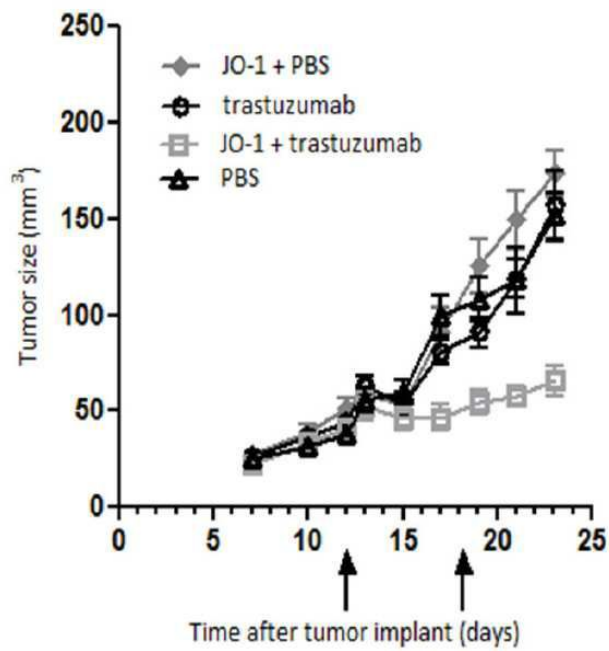
도면19d



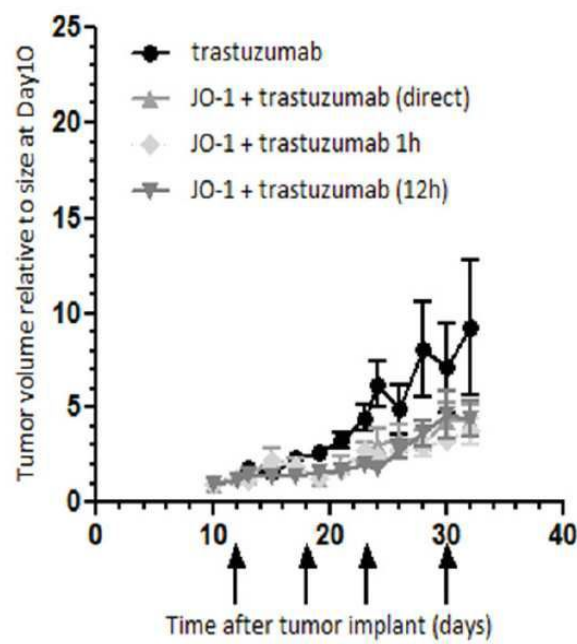
도면20a



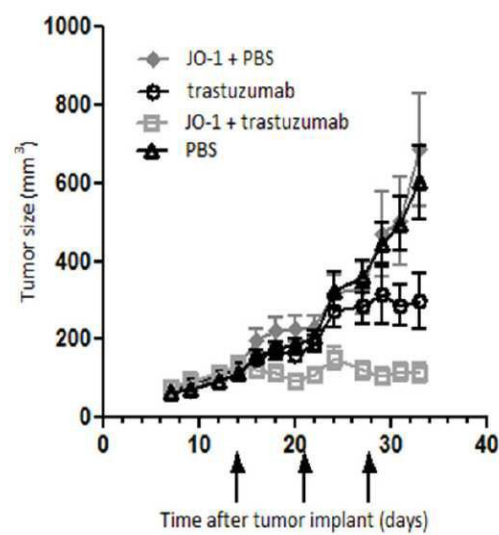
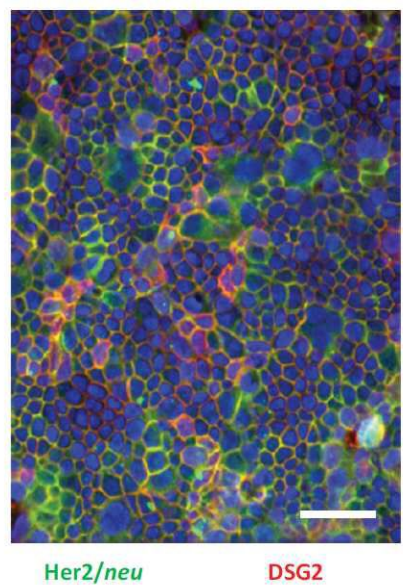
도면20b



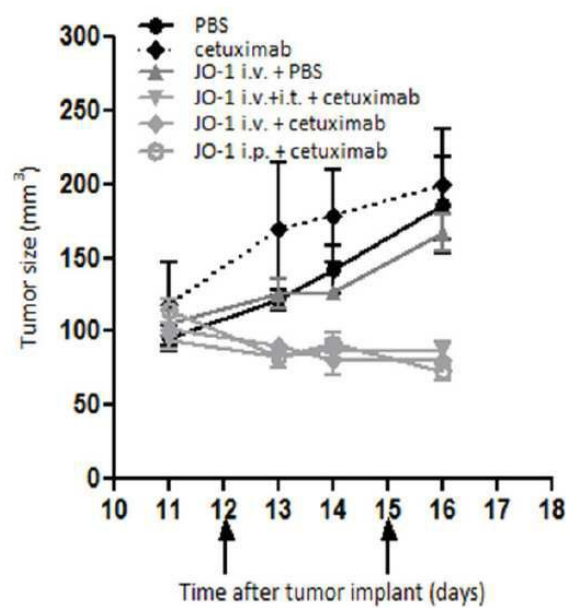
도면20c



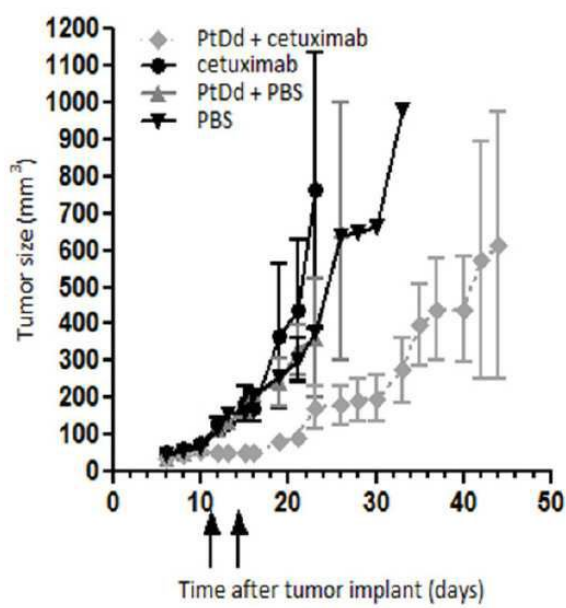
도면21



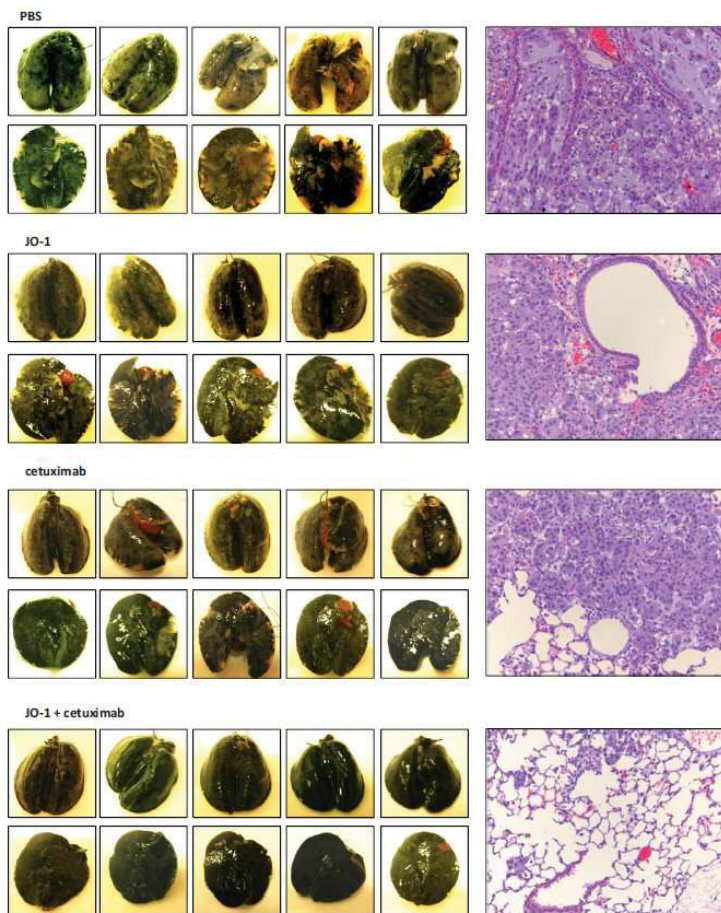
도면22a



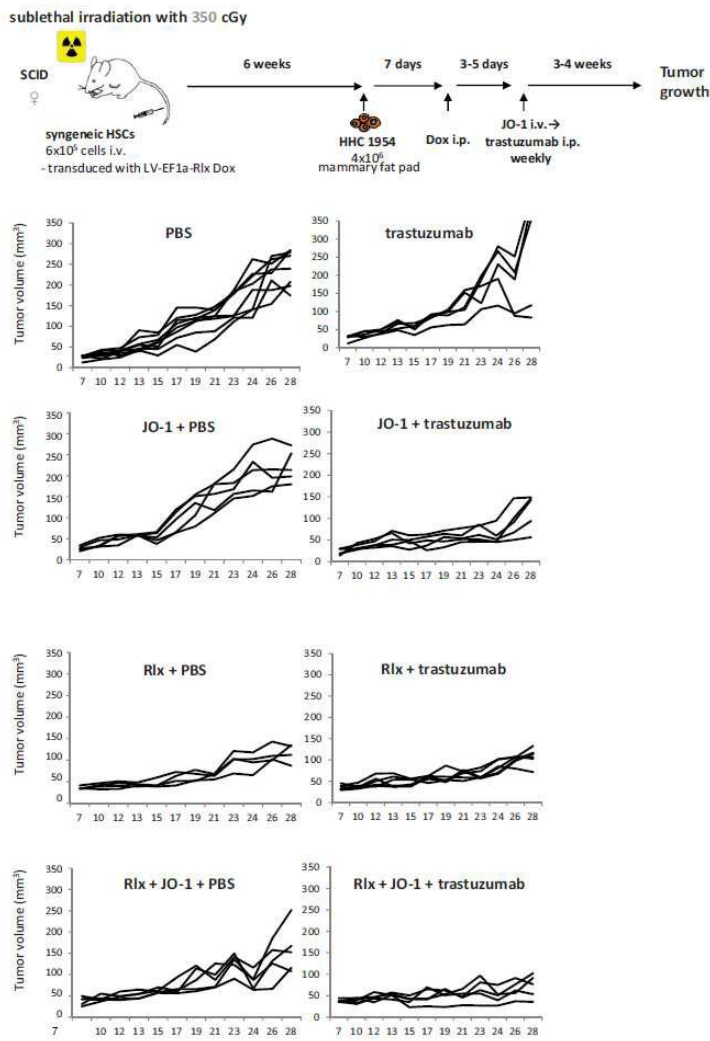
도면22b



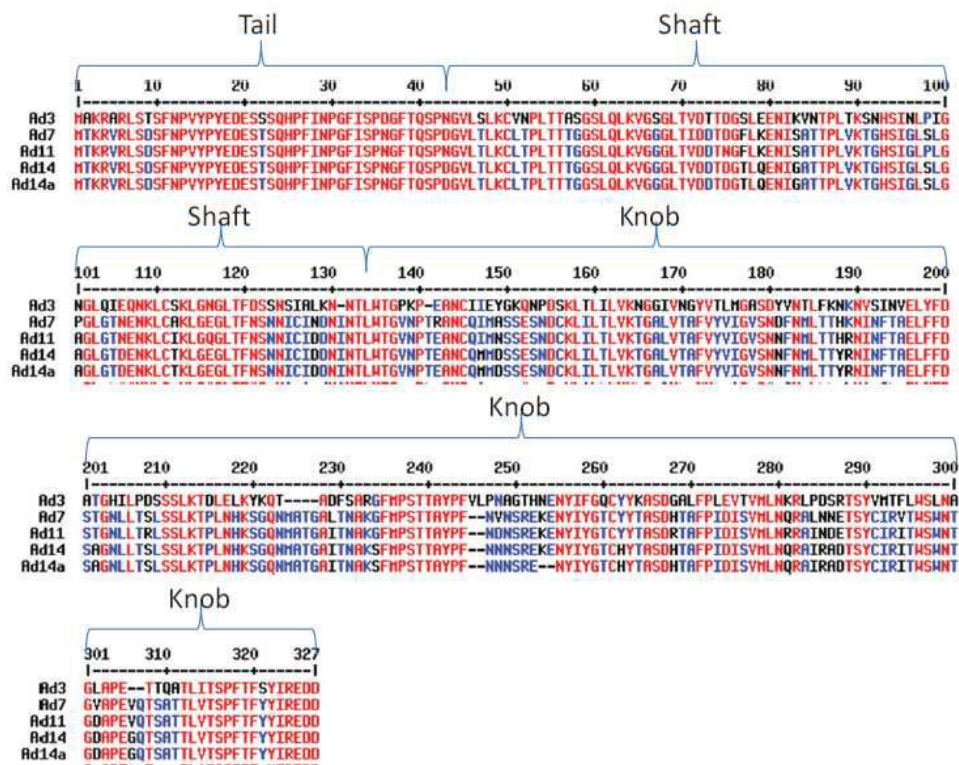
도면22c



도면23



도면24



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Lieber, Andre

Wang, Hongjie

<120> Compositions And Methods For Increasing The Efficacy Of
Monoclonal Antibody Therapy And Other Antitumor Therapies

<130> 11-741-PCT

<150> 61/430,091

<151> 2011-01-05

<150> 61/470,663

<151> 2011-04-01

<150> 61/353,652

<151> 2010-06-10

<160> 61

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asn Gly Val Leu Ser Leu Lys Cys Val Asn Pro Leu Thr Thr Ala Ser

1 5 10 15
Gly Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Ser Gly Leu Thr Val Asp Thr Thr

20 25 30
Asp Gly Ser Leu Glu Glu Asn Ile Lys Val Asn Thr Pro Leu Thr Lys

35 40 45
Ser Asn His Ser Ile Asn Leu Pro Ile Gly Asn Gly Leu Gln Ile Glu

50 55 60
Gln Asn Lys Leu Cys Ser Lys Leu Gly Asn Gly Leu Thr Phe Asp Ser

65 70 75 80
Ser Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu

85 90

<210> 2

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Gly Val Leu Thr Leu Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly

1 5 10 15
Gly Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Gly Gly Leu Thr Ile Asp Asp Thr

20 25 30
Asp Gly Phe Leu Lys Glu Asn Ile Ser Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys

35 40 45
Thr Gly His Ser Ile Gly Leu Ser Leu Gly Pro Gly Leu Gly Thr Asn

50 55 60
Glu Asn Lys Leu Cys Ala Lys Leu Gly Glu Gly Leu Thr Phe Asn Ser

65 70 75 80
Asn Asn Ile Cys Ile Asn Asp Asn Ile Asn Thr Leu

85 90

<210> 3

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Gly Val Leu Thr Leu Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly

1 5 10 15
Gly Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr

20 25 30
Asn Gly Phe Leu Lys Glu Asn Ile Ser Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys

35 40 45
Thr Gly His Ser Ile Gly Leu Pro Leu Gly Ala Gly Leu Gly Thr Asn

50 55 60
Glu Asn Lys Leu Cys Ile Lys Leu Gly Gln Gly Leu Thr Phe Asn Ser

65 70 75 80
Asn Asn Ile Cys Ile Asp Asp Asn Ile Asn Thr Leu

85 90

<210> 4

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Gly Val Leu Thr Leu Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly

1 5 10 15
Gly Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr

20 25 30
Asp Gly Thr Leu Gln Glu Asn Ile Gly Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys

35 40 45
Thr Gly His Ser Ile Gly Leu Ser Leu Gly Ala Gly Leu Gly Thr Asp

50 55 60
Glu Asn Lys Leu Cys Thr Lys Leu Gly Glu Gly Leu Thr Phe Asn Ser

65 70 75 80

Asn Asn Ile Cys Ile Asp Asp Asn Ile Asn Thr Leu

85

90

<210> 5

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Gly Val Leu Thr Leu Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly

1

5

10

15

Gly Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr

20

25

30

Asp Gly Thr Leu Gln Glu Asn Ile Gly Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys

35

40

45

Thr Gly His Ser Ile Gly Leu Ser Leu Gly Ala Gly Leu Gly Thr Asp

50

55

60

Glu Asn Lys Leu Cys Thr Lys Leu Gly Glu Gly Leu Thr Phe Asn Ser

65

70

75

80

Asn Asn Ile Cys Ile Asp Asp Asn Ile Asn Thr Leu

85

90

<210> 6

<211> 186

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr Gly Lys

1

5

10

15

Gln Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn Gly Gly

20

25

30

Ile Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr Val Asn

35

40

45

Thr Leu Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu Tyr Phe

50

55

60

Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys Thr Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg Gly Phe
 85 90 95
 Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala Gly Thr

 100 105 110
 His Asn Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala Ser Asp
 115 120 125
 Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys Arg Leu
 130 135 140
 Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser Leu Asn
 145 150 155 160
 Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr Ser Pro

 165 170 175
 Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
 180 185
 <210> 7
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Trp Thr Gly Val Asn Pro Thr Arg Ala Asn Cys Gln Ile Met Ala Ser
 1 5 10 15
 Ser Glu Ser Asn Asp Cys Lys Leu Ile Leu Thr Leu Val Lys Thr Gly
 20 25 30
 Ala Leu Val Thr Ala Phe Val Tyr Val Ile Gly Val Ser Asn Asp Phe

 35 40 45
 Asn Met Leu Thr Thr His Lys Asn Ile Asn Phe Thr Ala Glu Leu Phe
 50 55 60
 Phe Asp Ser Thr Gly Asn Leu Leu Thr Ser Leu Ser Ser Leu Lys Thr
 65 70 75 80
 Pro Leu Asn His Lys Ser Gly Gln Asn Met Ala Thr Gly Ala Leu Thr

85 90 95
Asn Ala Lys Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Asn Val

100 105 110
Asn Ser Arg Glu Lys Glu Asn Tyr Ile Tyr Gly Thr Cys Tyr Tyr Thr

115 120 125
Ala Ser Asp His Thr Ala Phe Pro Ile Asp Ile Ser Val Met Leu Asn

130 135 140
Gln Arg Ala Leu Asn Asn Glu Thr Ser Tyr Cys Ile Arg Val Thr Trp

145 150 155 160
Ser Trp Asn Thr Gly Val Ala Pro Glu Val Gln Thr Ser Ala Thr Thr

165 170 175
Leu Val Thr Ser Pro Phe Thr Phe Tyr Tyr Ile Arg Glu Asp Asp

180 185 190

<210> 8

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Trp Thr Gly Val Asn Pro Thr Glu Ala Asn Cys Gln Ile Met Asn Ser

1 5 10 15

Ser Glu Ser Asn Asp Cys Lys Leu Ile Leu Thr Leu Val Lys Thr Gly

20 25 30

Ala Leu Val Thr Ala Phe Val Tyr Val Ile Gly Val Ser Asn Asn Phe

35 40 45

Asn Met Leu Thr Thr His Arg Asn Ile Asn Phe Thr Ala Glu Leu Phe

50 55 60

Phe Asp Ser Thr Gly Asn Leu Leu Thr Arg Leu Ser Ser Leu Lys Thr

65 70 75 80

Pro Leu Asn His Lys Ser Gly Gln Asn Met Ala Thr Gly Ala Ile Thr

85 90 95

Asn Ala Lys Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Asn Asp

100 105 110
 Asn Ser Arg Glu Lys Glu Asn Tyr Ile Tyr Gly Thr Cys Tyr Tyr Thr
 115 120 125
 Ala Ser Asp Arg Thr Ala Phe Pro Ile Asp Ile Ser Val Met Leu Asn
 130 135 140
 Arg Arg Ala Ile Asn Asp Glu Thr Ser Tyr Cys Ile Arg Ile Thr Trp
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Thr Gly Asp Ala Pro Glu Val Gln Thr Ser Ala Thr Thr
 165 170 175
 Leu Val Thr Ser Pro Phe Thr Phe Tyr Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
 180 185 190

<210> 9

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Trp Thr Gly Val Asn Pro Thr Glu Ala Asn Cys Gln Met Met Asp Ser
 1 5 10 15
 Ser Glu Ser Asn Asp Cys Lys Leu Ile Leu Thr Leu Val Lys Thr Gly

20 25 30
 Ala Leu Val Thr Ala Phe Val Tyr Val Ile Gly Val Ser Asn Asn Phe
 35 40 45
 Asn Met Leu Thr Thr Tyr Arg Asn Ile Asn Phe Thr Ala Glu Leu Phe
 50 55 60
 Phe Asp Ser Ala Gly Asn Leu Leu Thr Ser Leu Ser Ser Leu Lys Thr
 65 70 75 80
 Pro Leu Asn His Lys Ser Gly Gln Asn Met Ala Thr Gly Ala Ile Thr

85 90 95
 Asn Ala Lys Ser Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Asn Asn
 100 105 110
 Asn Ser Arg Glu Lys Glu Asn Tyr Ile Tyr Gly Thr Cys His Tyr Thr
 115 120 125

Ala Ser Asp His Thr Ala Phe Pro Ile Asp Ile Ser Val Met Leu Asn
130 135 140
Gln Arg Ala Ile Arg Ala Asp Thr Ser Tyr Cys Ile Arg Ile Thr Trp
145 150 155 160
Ser Trp Asn Thr Gly Asp Ala Pro Glu Gly Gln Thr Ser Ala Thr Thr
165 170 175
Leu Val Thr Ser Pro Phe Thr Phe Tyr Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
180 185 190
<210> 10
<211> 189
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10
Trp Thr Gly Val Asn Pro Thr Glu Ala Asn Cys Gln Met Met Asp Ser
1 5 10 15
Ser Glu Ser Asn Asp Cys Lys Leu Ile Leu Thr Leu Val Lys Thr Gly
20 25 30
Ala Leu Val Thr Ala Phe Val Tyr Val Ile Gly Val Ser Asn Asn Phe
35 40 45
Asn Met Leu Thr Thr Tyr Arg Asn Ile Asn Phe Thr Ala Glu Leu Phe
50 55 60
Phe Asp Ser Ala Gly Asn Leu Leu Thr Ser Leu Ser Ser Leu Lys Thr
65 70 75 80
Pro Leu Asn His Lys Ser Gly Gln Asn Met Ala Thr Gly Ala Ile Thr
85 90 95
Asn Ala Lys Ser Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Asn Asn
100 105 110
Asn Ser Arg Glu Asn Tyr Ile Tyr Gly Thr Cys His Tyr Thr Ala Ser
115 120 125
Asp His Thr Ala Phe Pro Ile Asp Ile Ser Val Met Leu Asn Gln Arg
130 135 140

Ala Ile Arg Ala Asp Thr Ser Tyr Cys Ile Arg Ile Thr Trp Ser Trp
145 150 155 160
Asn Thr Gly Asp Ala Pro Glu Gly Gln Thr Ser Ala Thr Thr Leu Val
 165 170 175
Thr Ser Pro Phe Thr Phe Tyr Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
 180 185

<210> 11
<211> 91
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X is T or S
<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)
<223> X is L or V
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X is T or N
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X is T or A
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X is G or S
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> X is G or S
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> X is D or T
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> X is D or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> X is T, F or S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> X is Q, K or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> X is G, S or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> X is A or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (42)..(42)

<223> X is T or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (46)..(46)

<223> X is V or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (48)..(48)

<223> X is T or S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(49)

<223> X is G or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222

> (53)..(53)

<223> X is G or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (55)..(55)

<223> X is S or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(56)

<223> X is L or I

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (58)..(58)
 <223> X is A, P or N
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (61)..(61)
 <223> X is G or Q
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (62)..(62)
 <223> X is T or I
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (63)..(63)
 <223> X is D or E
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (64)..(64)
 <223> X is E or Q

 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (69)..(69)
 <223> X is T, S, or A
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> X is E, Q, or N
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (78)..(78)
 <223> X is N or D
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (80)..(80)
 <223> X is N or S
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (82)..(82)
 <223> X is I or S
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (83)..(83)
 <223> X is C or I
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (84)..(84)

<223> X is I or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222

> (85)..(85)

<223> X is D, N or L

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (86)..(86)

<223> X is D or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (88)..(88)

<223> X is I or is absent

<400> 11

Gly Val Leu Xaa Leu Lys Cys Xaa Xaa Pro Leu Thr Thr Xaa Xaa Gly

1 5 10 15

Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Xaa Gly Leu Thr Val Asp Xaa Thr Xaa

20 25 30

Gly Xaa Leu Xaa Glu Asn Ile Xaa Xaa Xaa Thr Pro Leu Xaa Lys Xaa

35 40 45

Xaa His Ser Ile Xaa Leu Xaa Xaa Gly Xaa Gly Leu Xaa Xaa Xaa Xaa

50 55 60

Asn Lys Leu Cys Xaa Lys Leu Gly Xaa Gly Leu Thr Phe Xaa Ser Xaa

65 70 75 80

Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Asn Thr Leu

85 90

<210> 12

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (28)..(28)

<223> X is V or I

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)
 <223> X is T or F
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (36)..(36)
 <223> X is Q or K
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (40)..(40)
 <223> X is G or S
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X is S or P
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (58)..(58)
 <223> X is A or P
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (63)..(63)
 <223> X is D or N
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (69)..(69)
 <223> X is T or A

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> X is E or Q
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (85)..(85)
 <223> X is D or N
 <400> 12

Gly Val Leu Thr Leu Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Gly Gly Leu Thr Xaa Asp Asp Thr Asp
 20 25 30
 Gly Xaa Leu Xaa Glu Asn Ile Xaa Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys Thr
 35 40 45

Gly His Ser Ile Gly Leu Xaa Leu Gly Xaa Gly Leu Gly Thr Xaa Glu
50 55 60

Asn Lys Leu Cys Xaa Lys Leu Gly Xaa Gly Leu Thr Phe Asn Ser Asn
65 70 75 80

Asn Ile Cys Ile Xaa Asp Asn Ile Asn Thr Leu
85 90

<210> 13

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X is V or P

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (5)..(5)

<223> X is N or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X is T or absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X is E or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> X is Q or I

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> X is M or I

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> X is M or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> X is Y, A, N or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> X is S or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> X is S or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> X is E or Q

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> X is S or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> X is N or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> X is C or S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> X is I or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> X is I or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> X is T or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> X is A or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> X is L or I

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (36)..(36)
 <223> X is T or N
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (37)..(37)
 <223> X is A or G
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(38)
 <223> X is F or Y
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (40)..(40)
 <223> X is Y or T
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (41)..(41)
 <223> X is V or L
 <220><221> MISC_FEATURE

 <222> (42)..(42)
 <223> X is I or M
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (44)..(44)
 <223> X is V or A
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (46)..(46)
 <223> X is N or D
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (47)..(47)
 <223> X is N, D or Y
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (48)..(48)
 <223> X is F or V
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(50)
 <223> X is M or T
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (52)..(52)
 <223> X is T or F
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> X is T or K

 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (54)..(54)
 <223> X is Y, H or N
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X is R or K
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (57)..(57)
 <223> X is I or V
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (58)..(58)
 <223> X is N or S
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (59)..(59)
 <223> X is F or I
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (60)..(60)
 <223> X is T or N
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (61)..(61)
 <223> X is A or V
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (64)..(64)

 <223> X is F or Y
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (67)..(67)
 <223> X is S or A
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (68)..(68)
 <223> X is A or T
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (70)..(70)
 <223> X is N or H
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (71)..(71)
 <223> X is L or I
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> X is T or P
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (74)..(74)
 <223> X is S, R or D
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (75)..(75)
 <223> X is L or S
 <220><221> MISC_FEATURE

 <222> (81)..(81)
 <223> X is P or D
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (83)..(83)
 <223> X is N or E
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (84)..(84)
 <223> X is H or L
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (86)..(86)
 <223> X is S or Y
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (87)..(87)
 <223> X is G or K
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(89)

<223> X is N or T
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (90)..(90)
 <223> X is M or absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (91)..(91)
 <223> X is A or absent

 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (92)..(92)
 <223> X is T or absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (93)..(93)
 <223> X is G or absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (95)..(95)
 <223> X is I, L or D
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (96)..(96)
 <223> X is T or F
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(97)
 <223> X is N or S
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(99)
 <223> X is K or R
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (100)..(100)
 <223> X is S or G
 <220><221> MISC_FEATURE

 <222> (111)..(111)
 <223> X is V or absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (112)..(112)

<223> X is L or absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (113)..(113)
 <223> X is N or P
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (114)..(114)
 <223> X is N, D or V
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (115)..(115)
 <223> X is N or A
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (116)..(116)
 <223> X is S or G
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (117)..(117)
 <223> X is R or T
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (118)..(118)

 <223> X is E or H
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (119)..(119)
 <223> X is N, K or absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (120)..(120)
 <223> X is E or absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (124)..(124)
 <223> X is Y or F
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (126)..(126)
 <223> X is T or Q
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (128)..(128)
 <223> X is H or Y

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (130)..(130)

<223> X is T or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (134)..(134)

<223> X is H or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (135)..(135)

<223> X is T or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (136)..(136)

<223> X is A or L

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (139)..(139)

<223> X is I or L

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (140)..(140)

<223> X is D or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (141)..(141)

<223> X is I or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (142)..(142)

<223> X is S or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (147)..(147)

<223> X is Q, R or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (149)..(149)

<223> X is A or L

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (150)..(150)

<223> X is I, L or P

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (151)..(151)
 <223> X is R, N or D
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (152)..(152)
 <223> X is A, D, N or S
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (153)..(153)
 <223> X is D, E or R
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (157)..(157)
 <223> X is C or V
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (158)..(158)
 <223> X is I or M
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (159)..(159)

 <223> X is R or T
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (160)..(160)
 <223> X is I, V or F
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (161)..(161)
 <223> X is T or L
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (164)..(164)
 <223> X is W or L
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (166)..(166)
 <223> X is T or A
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (168)..(168)
 <223> X is D, L or V
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (172)..(172)

<223> X is G, V or absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (173)..(173)

<223> X is Q or absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (175)..(175)

<223> X is S or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (176)..(176)

<223> X is A or Q

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (177)..(177)

<223> X is T or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (180)..(180)

<223> X is V or I

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (187)..(187)

<223> X is Y or S

<400> 13

Trp Thr Gly Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Ala Asn Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Lys Leu Xaa Leu Xaa Leu Val Lys Xaa Gly

20 25 30

Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Xaa

35 40 45

Asn Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Leu Xaa

50 55 60

Phe Asp Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Ser Ser Leu Lys Thr

65 70 75 80

Xaa Leu Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa

85 90 95
Xaa Ala Xaa Xaa Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Xaa Xaa
100 105 110
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Tyr Ile Xaa Gly Xaa Cys Xaa
115 120 125
Tyr Xaa Ala Ser Asp Xaa Xaa Xaa Phe Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Val Met
130 135 140
Leu Asn Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa
145 150 155 160
Xaa Trp Ser Xaa Asn Xaa Gly Xaa Ala Pro Glu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa
165 170 175
Xaa Thr Leu Xaa Thr Ser Pro Phe Thr Phe Xaa Tyr Ile Arg Glu Asp
180 185 190
Asp

<210> 14

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X is E or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(14)

<223> X is M or I

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> X is D, N or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (47)..(47)

<223> X is N or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(54)

<223> X is Y or H
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X is R or K
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (68)..(68)
 <223> X is A or T
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (74)..(74)
 <223> X is S or R
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (95)..(95)
 <223> X is I or L
 <220><221> MISC_FEATURE

 <222> (100)..(100)
 <223> X is S or G
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (112)..(112)
 <223> X is N, D or V
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (117)..(117)
 <223> X is K or absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (118)..(118)
 <223> X is E or absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (126)..(126)
 <223> X is H or Y
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (132)..(132)
 <223> X is H or R
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (145)..(145)
 <223> X is Q or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (148)..(148)

<223> X is I or L

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (149)..(149)

<223> X is R or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (150)..(150)

<223> X is A, D or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (151)..(151)

<223> X is D or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (158)..(158)

<223> X is I or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (166)..(166)

<223> X is D or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (170)..(170)

<223> X is G or V

<400> 14

Trp Thr Gly Val Asn Pro Thr Xaa Ala Asn Cys Gln Xaa Xaa Xaa Ser

1	5	10	15
Ser	Glu	Ser	Asn
Asp	Cys	Lys	Leu
Ile	Leu	Thr	Leu
Val	Lys	Thr	Gly
20	25	30	
Ala	Leu	Val	Thr
Ala	Phe	Val	Tyr
Val	Ile	Gly	Val
Ser	Asn	Xaa	Phe
35	40	45	
Asn	Met	Leu	Thr
Thr	Xaa	Xaa	Asn
Ile	Asn	Phe	Thr
Ala	Glu	Leu	Phe
50	55	60	
Phe	Asp	Ser	Xaa
Gly	Asn	Leu	Leu
Thr	Xaa	Leu	Ser
Ser	Leu	Lys	Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

Pro Leu Asn His Lys Ser Gly Gln Asn Met Ala Thr Gly Ala Xaa Thr
85 90 95
Asn Ala Lys Xaa Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Asn Xaa
100 105 110
Asn Ser Arg Glu Xaa Xaa Asn Tyr Ile Tyr Gly Thr Cys Xaa Tyr Thr
115 120 125
Ala Ser Asp Xaa Thr Ala Phe Pro Ile Asp Ile Ser Val Met Leu Asn
130 135 140
Xaa Arg Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Ser Tyr Cys Ile Arg Xaa Thr Trp
145 150 155 160
Ser Trp Asn Thr Gly Xaa Ala Pro Glu Xaa Gln Thr Ser Ala Thr Thr
165 170 175
Leu Val Thr Ser Pro Phe Thr Phe Tyr Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
180 185 190
<210> 15
<211> 319
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15
Met Ala Lys Arg Ala Arg Leu Ser Thr Ser Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15
Tyr Glu Asp Glu Ser Ser Ser Gln His Pro Phe Ile Asn Pro Gly Phe
20 25 30
Ile Ser Pro Asp Gly Phe Thr Gln Ser Pro Asn Gly Val Leu Ser Leu
35 40 45
Lys Cys Val Asn Pro Leu Thr Thr Ala Ser Gly Ser Leu Gln Leu Lys
50 55 60
Val Gly Ser Gly Leu Thr Val Asp Thr Thr Asp Gly Ser Leu Glu Glu
65 70 75 80
Asn Ile Lys Val Asn Thr Pro Leu Thr Lys Ser Asn His Ser Ile Asn
85 90 95
Leu Pro Ile Gly Asn Gly Leu Gln Ile Glu Gln Asn Lys Leu Cys Ser

100 105 110
Lys Leu Gly Asn Gly Leu Thr Phe Asp Ser Ser Asn Ser Ile Ala Leu
115 120 125

Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile
130 135 140
Ile Glu Tyr Gly Lys Gln Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu
145 150 155 160
Val Lys Asn Gly Gly Ile Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala
165 170 175
Ser Asp Tyr Val Asn Thr Leu Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn
180 185 190

Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser
195 200 205
Ser Leu Lys Thr Asp Leu Glu Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe
210 215 220
Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu
225 230 235 240
Pro Asn Ala Gly Thr His Asn Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr
245 250 255

Tyr Lys Ala Ser Asp Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met
260 265 270
Leu Asn Lys Arg Leu Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe
275 280 285
Leu Trp Ser Leu Asn Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr
290 295 300
Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
305 310 315

<210> 16

<211> 325

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Thr Lys Arg Val Arg Leu Ser Asp Ser Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

Tyr Glu Asp Glu Ser Thr Ser Gln His Pro Phe Ile Asn Pro Gly Phe

20 25 30

Ile Ser Pro Asn Gly Phe Thr Gln Ser Pro Asp Gly Val Leu Thr Leu

35 40 45

Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly Gly Ser Leu Gln Leu Lys

50 55 60

Val Gly Gly Gly Leu Thr Ile Asp Asp Thr Asp Gly Phe Leu Lys Glu

65 70 75 80

Asn Ile Ser Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys Thr Gly His Ser Ile Gly

85 90 95

Leu Ser Leu Gly Pro Gly Leu Gly Thr Asn Glu Asn Lys Leu Cys Ala

100 105 110

Lys Leu Gly Glu Gly Leu Thr Phe Asn Ser Asn Asn Ile Cys Ile Asn

115 120 125

Asp Asn Ile Asn Thr Leu Trp Thr Gly Val Asn Pro Thr Arg Ala Asn

130 135 140

Cys Gln Ile Met Ala Ser Ser Glu Ser Asn Asp Cys Lys Leu Ile Leu

145 150 155 160

Thr Leu Val Lys Thr Gly Ala Leu Val Thr Ala Phe Val Tyr Val Ile

165 170 175

Gly Val Ser Asn Asp Phe Asn Met Leu Thr Thr His Lys Asn Ile Asn

180 185 190

Phe Thr Ala Glu Leu Phe Phe Asp Ser Thr Gly Asn Leu Leu Thr Ser

195 200 205

Leu Ser Ser Leu Lys Thr Pro Leu Asn His Lys Ser Gly Gln Asn Met

210 215 220

Ala Thr Gly Ala Leu Thr Asn Ala Lys Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr

225 230 235 240

Ala Tyr Pro Phe Asn Val Asn Ser Arg Glu Lys Glu Asn Tyr Ile Tyr

245 250 255

Gly Thr Cys Tyr Tyr Thr Ala Ser Asp His Thr Ala Phe Pro Ile Asp

260 265 270

Ile Ser Val Met Leu Asn Gln Arg Ala Leu Asn Asn Glu Thr Ser Tyr

275 280 285

Cys Ile Arg Val Thr Trp Ser Trp Asn Thr Gly Val Ala Pro Glu Val

290 295 300

Gln Thr Ser Ala Thr Thr Leu Val Thr Ser Pro Phe Thr Phe Tyr Tyr

305 310 315 320

Ile Arg Glu Asp Asp

325

<210> 17

<211> 325

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Thr Lys Arg Val Arg Leu Ser Asp Ser Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

Tyr Glu Asp Glu Ser Thr Ser Gln His Pro Phe Ile Asn Pro Gly Phe

20 25 30

Ile Ser Pro Asn Gly Phe Thr Gln Ser Pro Asn Gly Val Leu Thr Leu

35 40 45

Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly Gly Ser Leu Gln Leu Lys

50 55 60

Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr Asn Gly Phe Leu Lys Glu

65 70 75 80

Asn Ile Ser Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys Thr Gly His Ser Ile Gly

85 90 95

Leu Pro Leu Gly Ala Gly Leu Gly Thr Asn Glu Asn Lys Leu Cys Ile

100 105 110

Lys Leu Gly Gln Gly Leu Thr Phe Asn Ser Asn Asn Ile Cys Ile Asp
 115 120 125
 Asp Asn Ile Asn Thr Leu Trp Thr Gly Val Asn Pro Thr Glu Ala Asn
 130 135 140
 Cys Gln Ile Met Asn Ser Ser Glu Ser Asn Asp Cys Lys Leu Ile Leu
 145 150 155 160
 Thr Leu Val Lys Thr Gly Ala Leu Val Thr Ala Phe Val Tyr Val Ile
 165 170 175
 Gly Val Ser Asn Asn Phe Asn Met Leu Thr Thr His Arg Asn Ile Asn
 180 185 190
 Phe Thr Ala Glu Leu Phe Phe Asp Ser Thr Gly Asn Leu Leu Thr Arg
 195 200 205
 Leu Ser Ser Leu Lys Thr Pro Leu Asn His Lys Ser Gly Gln Asn Met
 210 215 220
 Ala Thr Gly Ala Ile Thr Asn Ala Lys Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr
 225 230 235 240
 Ala Tyr Pro Phe Asn Asp Asn Ser Arg Glu Lys Glu Asn Tyr Ile Tyr
 245 250 255
 Gly Thr Cys Tyr Tyr Thr Ala Ser Asp Arg Thr Ala Phe Pro Ile Asp
 260 265 270
 Ile Ser Val Met Leu Asn Arg Arg Ala Ile Asn Asp Glu Thr Ser Tyr
 275 280 285
 Cys Ile Arg Ile Thr Trp Ser Trp Asn Thr Gly Asp Ala Pro Glu Val
 290 295 300
 Gln Thr Ser Ala Thr Thr Leu Val Thr Ser Pro Phe Thr Phe Tyr Tyr
 305 310 315 320
 Ile Arg Glu Asp Asp
 325
 <210> 18
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Met Thr Lys Arg Val Arg Leu Ser Asp Ser Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

Tyr Glu Asp Glu Ser Thr Ser Gln His Pro Phe Ile Asn Pro Gly Phe

20 25 30

Ile Ser Pro Asn Gly Phe Thr Gln Ser Pro Asp Gly Val Leu Thr Leu

35 40 45

Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly Gly Ser Leu Gln Leu Lys

50 55 60

Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr Asp Gly Thr Leu Gln Glu

65 70 75 80

Asn Ile Gly Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys Thr Gly His Ser Ile Gly

85 90 95

Leu Ser Leu Gly Ala Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asn Lys Leu Cys Thr

100 105 110

Lys Leu Gly Glu Gly Leu Thr Phe Asn Ser Asn Asn Ile Cys Ile Asp

115 120 125

Asp Asn Ile Asn Thr Leu Trp Thr Gly Val Asn Pro Thr Glu Ala Asn

130 135 140

Cys Gln Met Met Asp Ser Ser Glu Ser Asn Asp Cys Lys Leu Ile Leu

145 150 155 160

Thr Leu Val Lys Thr Gly Ala Leu Val Thr Ala Phe Val Tyr Val Ile

165 170 175

Gly Val Ser Asn Asn Phe Asn Met Leu Thr Thr Tyr Arg Asn Ile Asn

180 185 190

Phe Thr Ala Glu Leu Phe Phe Asp Ser Ala Gly Asn Leu Leu Thr Ser

195 200 205

Leu Ser Ser Leu Lys Thr Pro Leu Asn His Lys Ser Gly Gln Asn Met

210 215 220

Ala Thr Gly Ala Ile Thr Asn Ala Lys Ser Phe Met Pro Ser Thr Thr

225 230 235 240

Ala Tyr Pro Phe Asn Asn Asn Ser Arg Glu Lys Glu Asn Tyr Ile Tyr
245 250 255

Gly Thr Cys His Tyr Thr Ala Ser Asp His Thr Ala Phe Pro Ile Asp
260 265 270

Ile Ser Val Met Leu Asn Gln Arg Ala Ile Arg Ala Asp Thr Ser Tyr
275 280 285

Cys Ile Arg Ile Thr Trp Ser Trp Asn Thr Gly Asp Ala Pro Glu Gly
290 295 300

Gln Thr Ser Ala Thr Thr Leu Val Thr Ser Pro Phe Thr Phe Tyr Tyr
305 310 315 320

Ile Arg Glu Asp Asp
325

<210> 19

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Thr Lys Arg Val Arg Leu Ser Asp Ser Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15
Tyr Glu Asp Glu Ser Thr Ser Gln His Pro Phe Ile Asn Pro Gly Phe
20 25 30

Ile Ser Pro Asn Gly Phe Thr Gln Ser Pro Asp Gly Val Leu Thr Leu
35 40 45

Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly Gly Ser Leu Gln Leu Lys
50 55 60

Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr Asp Gly Thr Leu Gln Glu

65 70 75 80
Asn Ile Gly Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys Thr Gly His Ser Ile Gly
85 90 95

Leu Ser Leu Gly Ala Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asn Lys Leu Cys Thr
100 105 110

Lys Leu Gly Glu Gly Leu Thr Phe Asn Ser Asn Asn Ile Cys Ile Asp

115 120 125
Asp Asn Ile Asn Thr Leu Trp Thr Gly Val Asn Pro Thr Glu Ala Asn

130 135 140
Cys Gln Met Met Asp Ser Ser Glu Ser Asn Asp Cys Lys Leu Ile Leu
145 150 155 160

Thr Leu Val Lys Thr Gly Ala Leu Val Thr Ala Phe Val Tyr Val Ile
165 170 175

Gly Val Ser Asn Asn Phe Asn Met Leu Thr Thr Tyr Arg Asn Ile Asn
180 185 190

Phe Thr Ala Glu Leu Phe Phe Asp Ser Ala Gly Asn Leu Leu Thr Ser

195 200 205
Leu Ser Ser Leu Lys Thr Pro Leu Asn His Lys Ser Gly Gln Asn Met

210 215 220
Ala Thr Gly Ala Ile Thr Asn Ala Lys Ser Phe Met Pro Ser Thr Thr

225 230 235 240
Ala Tyr Pro Phe Asn Asn Asn Ser Arg Glu Asn Tyr Ile Tyr Gly Thr

245 250 255
Cys His Tyr Thr Ala Ser Asp His Thr Ala Phe Pro Ile Asp Ile Ser

260 265 270
Val Met Leu Asn Gln Arg Ala Ile Arg Ala Asp Thr Ser Tyr Cys Ile

275 280 285
Arg Ile Thr Trp Ser Trp Asn Thr Gly Asp Ala Pro Glu Gly Gln Thr

290 295 300
Ser Ala Thr Thr Leu Val Thr Ser Pro Phe Thr Phe Tyr Tyr Ile Arg

305 310 315 320
Glu Asp Asp

<210> 20

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys

1 5 10 15

Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser

20 25 30

Ala Leu Lys Glu Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

35 40 45

Gly Ser Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr Gly Pro

50 55 60

Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr Gly Lys Gln Asn Pro Asp

65 70 75 80

Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn Gly Gly Ile Val Asn Gly

85 90 95

Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr Val Asn Thr Leu Phe Lys

100 105 110

Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala Thr Gly

115 120 125

His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys Thr Asp Leu Glu Leu Lys

130 135 140

Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro Ser Thr

145 150 155 160

Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala Gly Thr His Asn Glu Asn

165 170 175

Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala Ser Asp Gly Ala Leu Phe

180 185 190

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

195 200 205

Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser Leu Asn Ala Gly Leu Ala

210 215 220

Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr Phe Ser

225 230 235 240

Tyr Ile Arg Glu Asp Asp

245

<210> 21

<211> 257

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 21

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Lys Val Ser Ala

1 5 10 15

Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys

20 25 30

Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Gly

35 40 45

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ile

50 55 60

Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn

65 70 75 80

Cys Ile Ile Glu Tyr Gly Lys Gln Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu

85 90 95

Ile Leu Val Lys Asn Gly Gly Ile Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met

100 105 110

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

115 120 125

Ile Asn Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp

130 135 140

Ser Ser Ser Leu Lys Thr Asp Leu Glu Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala

145 150 155 160

Asp Phe Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe

165 170 175

Val Leu Pro Asn Ala Gly Thr His Asn Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln

180 185 190

Cys Tyr Tyr Lys Ala Ser Asp Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr

195 200 205
Val Met Leu Asn Lys Arg Leu Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met
210 215 220
Thr Phe Leu Trp Ser Leu Asn Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln
225 230 235 240
Ala Thr Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp
245 250 255

Asp

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu

1 5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

Asp Phe Leu Val Ile Tyr Ile Glu Glu Ala His Ala Ser Asp Gly Trp

1 5 10 15

<210>

> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(6)

<223> X can be any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> X can be any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(14)

<223> X can be any amino acid

<400> 25

Ala Asp Phe Leu Xaa Xaa Tyr Ile Xaa Glu Ala His Xaa Xaa Asp Gly

1 5 10 15

Trp

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys

1 5 10 15

Thr Leu Arg Ala

20

<210> 27

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

His Met Lys Gln Leu Asp Val Glu Glu Leu Ser Asn Tyr His Leu Asn

1 5 10 15
Val Ala Arg Leu Lys Val Gly Glu Arg
 20 25

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

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

1 5 10 15

Phe Ser Leu Asn Tyr Gln Glu Glu Ser Leu Ser Tyr Gln Arg Leu Val

20 25 30

<210> 29

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

caauauaccu guaguagaa 19

<210> 30

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

gagaggau cu guccaagaa 19

<210> 31

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

ccuuagagcu acgcauuaa	19
<210> 32	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 32	
ccaguguucu accuaaaaua	19
<210> 33	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 33	
ctgatgaatt ctgatcagg ggttttaagt cttaaatttg ttaatcc	47
<210> 34	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 34	
ttactgatga attcttgatc aggcctccctc caacttaaag tgggaagtgg t	51
<210> 35	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 35	
ttactgatga attcttgatc cttagaagaa aacatcaaag ttaacac	47
<210> 36	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic

<400> 36

ttactgatga attctggatc ccattctata aatttaccaa taggaaacgg t 51

<210> 37

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

ttactgatga attctggatc caacaaactt tgcagtaaac tcggaaatgg 50

<210> 38

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

accatcacgg atccaattct attgcactga a 31

<210> 39

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

agctaattaa gcttagtcat cttctcta atagg 35

<210> 40

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

atcaaaggta agcgctttaa aggagaaagt ttcagcactt aaagaaaagg tatccgcttt 60

aaaggagaaa gtttcagcac ttaaagaaaa agtgtccgct ctgaaagaag 110

<210> 41

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic

<400> 41

gacccctctt tcagagcgga cactttttct ttaagtctg aaactttctc ctttaaagcg 60

gatacctttt ctttaagtgc tgaaactttc tcctttaaag cgcttacctt t 111

<210> 42

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

atcagaggta agcgcttttag agaaagaagt ttcagcactt gagaaggagg tatccgcttt 60

agagaaagaa gtttcagcac ttgagaagga agtgtccgct ctggaaaaag 110

<210> 43

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Synthetic

<400> 43

gacccctttt ccagagcgga cacttccttc tcaagtctg aaactttctt ctctaaagcg 60

gatacctcct tctcaagtgc tgaaacttct ttctctaaag cgcttacctc t 111

<210> 44

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

atctaggatc cggtggcggg tctggcgggt gctccgggtg cggttctaac aaactttgca 60

gtaaactcgg aaatggtctt acatttgact 90

<210> 45

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic

<400> 45

agctaattaa gcttagtcat cttctctaata atagg 35

<210> 46

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

ttattgctac tggatccggt ggcggttctg gcggtggctc cgggtggcgt tctaattcta 60

ttgcactgaa aaataacac 79

<210> 47

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

agctaattaa gcttagtcat cttctctaata atagg 35

<210> 48

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

gacacggaaa ccggtcctcc aactgtgcct tttcttactc c 41

<210> 49

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 49

gcagttggct tctggttttg gacctgtcca caaagttagc ttatcattat tttgtttcc 60

<210> 50
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 50
 ggaaacaaaa ataatagataa gctaactttg tggacaggtc caaaaccaga agccaactgc 60

<210> 51
 <211> 89
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 51
 tgaaaaataa acacgttgaa acataacaca actagttctt tattcttggg cattttagtc 60
 atcttctcta atataggaaa aggtaaatg 89

<210> 52
 <211> 89
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 52
 catttacctt ttcttatatt agagaagatg actaaaatgc ccaagaataa agaactagtt 60
 gtgttatgtt tcaacgtgtt tatttttca 89

<
 210> 53
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 53
 atacttaggg taccaatcga tatggccacg tgggttctgt ggtccc 46

<210> 54
 <211> 100
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 54

acggaaaccg gtccccaac tggcctttt cttactctc ctttgtatc cccaatggg 60

tttcaagaga gtccccctgg ggttttaagt cttaatgtg 100

<210> 55

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 55

gaaaaataaa cagttgaaa cataacacac tcgagtctt attcttgggc attttagtca 60

tcttctctaa tataggaaaa ggtaaatg 88

<210> 56

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 56

catttacctt ttcttatatt agagaagatg actaaaatgc ccaagaataa agactcgagt 60

gtgttatgtt tcaacgtgtt tatttttc 88

<210> 57

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<

400> 57

atacttaggg taccaatcga tatggccacg tgggttctgt ggtccc 46

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 58	
atgacggcta ggaacaccac	20
<210> 59	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 59	
tcaggtacat tggaaacatg aaa	23
<210> 60	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<	
220><223> Synthetic	
<400> 60	
tgcaccacca actgcttagc	20
<210> 61	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 61	
ggcatggact gtggtcatga	20