(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0000385
(43) 공개일자 2019년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7037089(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년05월04일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2012-7031805
원출원일자(국제) 2011년05월04일
심사청구일자 2016년05월03일
(85) 번역문제출일자 2018년12월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/035110
(87) 국제공개번호 WO 2011/140173
국제공개일자 2011년11월10일
(30) 우선권주장
61/331,355 2010년05월04일 미국(US)
61/331,357 2010년05월04일 미국(US)

(71) 출원인
더 브리검 앤드 우먼즈 하스피털, 인크.
미국 02115 메사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리트 75
보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국 78701 텍사스주 오스틴 웨스트 7번 스트리트 210
(72) 발명자
아가월, 샌딥, 케이.
미국 77005 텍사스주 휴스턴 암허스트 스트리트 4215
슈나이더, 다니엘, 제이.
미국 미시간주 앤 아버 렌프류 스트리트 2948
브레너, 마이클, 비.
미국 02459 매사추세츠주 뉴턴 더 렛지스 로드 27
(74) 대리인
양영준, 김영

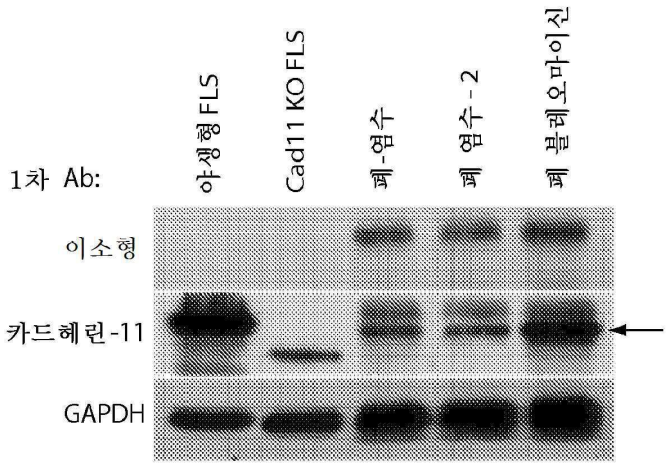
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **섬유증의 검출 및 치료**

(57) 요 약

카드헤린-11 (CDH11) 길항제를 투여하여 섬유증을 갖거나 또는 섬유증의 발병 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법이 제공된다. 상기 치료제는 폐, 간 또는 신장 섬유증, 또는 특발성 폐 섬유증을 비롯한 진피 또는 비-진피 섬유증을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. 대상체 내 CDH11의 수준을 평가하는 방법, 및 섬유증 또는 섬유증의 발병 위험을 결정하는 방법이 또한 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/48 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

섬유증을 치료하기 위한 카드헤린-11 길항제의 사용.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] <관련 출원>

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. §119(e) 하에 미국 가출원 제61/331355호 (2010년 5월 4일 출원, 발명의 명칭 "DETECTION AND TREATMENT OF NON-DERMAL FIBROSIS") 및 미국 가출원 제61/331357호 (2010년 5월 4일 출원, 발명의 명칭 "DETECTION AND TREATMENT OF FIBROSIS")에 대해 우선권을 주장하며, 이들 각각의 전문은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] <연방 지원 연구>

[0004] 본 발명은 미국국립보건원으로부터의 보조금 번호 RO1 AR048114 하에 정부 지원으로 행해졌다. 정부는 본 발명에 대해 일부 권리를 갖는다.

[0005] <발명의 분야>

[0006] 본 발명은, 카드헤린-11 결합을 비롯한 카드헤린-11 활성을 방해하여 섬유증을 진단, 모니터링 및 치료하는 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0007] 오늘날 광범위 증식성 폐 질환으로도 알려진 간질성 폐 질환은 다양한 정도의 폐 섬유증을 특징으로 하는 여러 가지 광범위 실질 폐 질환이다[3]. 폐 섬유증은 다양한 간질성 폐렴의 한 구성요소이다[3]. 상기 장애는, 폐 기능을 손상시키는 폐 구조의 만곡을 초래하는 다양한 정도의 염증, 이상 섬유모세포 증식 및 세포외 기질 침착을 특징으로 한다[3, 4]. 실리카[5], 석탄분[6], 방사선[7] 및 일부 화학요법제[7]와 같은 섬유증-유도제에의 노출을 비롯하여 폐 섬유증의 여러 원인이 존재한다. 폐 섬유증이 널리 퍼져있음에도 불구하고, 이들의 병인은 완전히 알려져 있지 않고, 폐 섬유증의 해결을 위한 치료 선택사항은 없다.

[0008] 간질성 폐 질환의 대략 35%는 특발성 폐 섬유증 (IPF)으로 알려진 병태로 분류될 수 있다[12]. IPF의 발병률을 연구하는 포괄적인 역학 연구 결과, 100,000건 당 대략 20건의 일반적인 유병률이 나타났다[12]. 이러한 발병률은 75세가 넘는 개체에서 더 높았으며, 100,000건 당 175건으로 기록되었다. 보다 최근 연구 결과, 100,000건 당 대략 43건의 유병률 및 100,000 환자년수(patient years) 당 16.3건의 발병률이 입증되었다.[13] 이들 데이터는 IPF의 발병률 및 유병률이 증가 추세에 있음을 제시한다. IPF는 간질성 폐 질환의 만성 및 특히 치명적인 형태이다. 이는 대부분 치료불가능하고, 진단받은 지 3 내지 8년 이내에 사망에 이른다[14]. IPF에 대한 효과적인 질환-조절 치료제가 없다.

발명의 내용

[0009] <발명의 개요>

[0010] 본 발명은, 카드헤린-11이 비-진피 섬유증, 예컨대 폐 섬유증(lung or pulmonary fibrosis)을 포함한 섬유성 병태에 관여하고, 이로 인해 카드헤린-11이 이러한 병태에 대한 진단 마커, 예후 마커 및 치료 표적이 된다는 예상치 못한 발견을 일부 전제로 한다. 본원에서 보다 자세히 기재된 바와 같이, 카드헤린-11은 섬유증에서 상향 조절되는 것으로 밝혀졌고, 카드헤린-11이 결여된 대상체는 실험적으로-유도된 섬유증에 덜 걸리는 것으로 밝혀

졌다. 따라서, 본 발명은, 섬유증을 진단하고, 모니터링하며 치료할 뿐만 아니라 섬유증의 발병 위험을 평가하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 섬유증은, 이들로 한정되지는 않지만, 폐 섬유증을 비롯한 비-진피 섬유증일 수 있다.

[0011] 추가로, 본 발명은, 카드헤린-11이 폐포 대식세포 및 폐포 상피 세포에서 발현되고, 이들 둘 다 기관지폐포세척액 (BAL)에 존재한다는 또 다른 예상치 못한 발견을 일부 전제로 한다. 따라서, 폐 섬유증의 존재 또는 폐 섬유증의 발병 위험은 폐 조직의 생검을 필요로 하기 보다는 BAL 샘플 내 카드헤린-11 수준을 분석함으로써 측정될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이러한 분석은 카드헤린-11을 발현하는 세포를 확인하는 것을 포함할 수 있거나, 포함하지 않을 수 있다.

[0012] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은, 섬유증의 발병 위험이 있는 대상체에게 섬유증을 예방하거나 또는 섬유증과 관련된 증상의 발생을 지연시키기에 효과적인 양의 카드헤린-11 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 섬유증의 발병 위험이 있는 대상체를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 관련 측면에서, 본 발명은 비-진피 섬유증의 발병 위험이 있는 대상체에게 비-진피 섬유증을 예방하거나 또는 비-진피 섬유증과 관련된 증상의 발생을 지연시키기에 효과적인 양의 카드헤린-11 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 비-진피 섬유증의 발병 위험이 있는 대상체를 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 섬유증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 섬유증을 감소시키기에 효과적인 양의 카드헤린-11 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 섬유증을 갖는 대상체를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 섬유증은 진피 섬유증이다. 한 실시양태에서, 대상체는 경피증을 갖는다. 관련 측면에서, 본 발명은, 비-진피 섬유증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 비-진피 섬유증을 감소시키기에 효과적인 양의 카드헤린-11 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 비-진피 섬유증을 갖는 대상체를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 비-진피 섬유증은 폐 섬유증 또는 간 섬유증이다. 몇몇 실시양태에서, 비-진피 섬유증은 폐 섬유증, 보다 구체적으로 특발성 폐 섬유증, 보다 더욱 구체적으로 중증 특발성 폐 섬유증이다.

[0014] 한 실시양태에서, 카드헤린-11 길항제는 카드헤린-11 결합 펩티드이다. 한 실시양태에서, 카드헤린-11 결합 펩티드는 항-카드헤린-11 항체 또는 항원-결합 항체 단편이다. 한 실시양태에서, 카드헤린-11 결합 펩티드는 카드헤린-11 융합 단백질이다. 한 실시양태에서, 카드헤린-11 결합 펩티드는 전장 카드헤린 또는 그의 단편이다.

[0015] 한 실시양태에서, 카드헤린-11 길항제는 카드헤린-11 핵산 길항제이다. 한 실시양태에서, 카드헤린-11 핵산 길항제는 카드헤린-11 siRNA이다. 한 실시양태에서, 카드헤린-11 핵산 길항제는 카드헤린-11 리보자임이다. 한 실시양태에서, 카드헤린-11 핵산 길항제는 카드헤린-11 안티센스 분자이다. 한 실시양태에서, 카드헤린-11 핵산 길항제는 전장 카드헤린-11 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산이다. 한 실시양태에서, 카드헤린-11 핵산 길항제는 압타머이다.

[0016] 한 실시양태에서, 카드헤린-11 길항제는 소분자이다.

[0017] 한 실시양태에서, 카드헤린-11 길항제는 흡입 또는 비강내 투여된다. 한 실시양태에서, 카드헤린-11 길항제는 복강내 투여된다.

[0018] 한 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게 제2 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 제2 치료제는 면역억제제이다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 스테로이드이다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 대상체로부터 수거한 샘플 내 카드헤린-11 수준을 측정하는 단계 및 상기 샘플 내 카드헤린-11 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대상체로부터 수거한 샘플 내 카드헤린-11 수준이 정상 대조군 내 카드헤린-11 수준보다 높은 경우, 섬유증 또는 섬유증의 발병 위험을 나타내는 것인 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 샘플은 피부 또는 진피 샘플이다. 관련 측면에서, 본 발명은, 대상체로부터 수거한 샘플 내 카드헤린-11 수준을 측정하는 단계 및 상기 샘플 내 카드헤린-11 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대상체로부터 수거한 샘플 내 카드헤린-11 수준이 정상 대조군 내 카드헤린-11 수준보다 높은 경우, 비-진피 섬유증 또는 비-진피 섬유증의 발병 위험을 나타내는 것인 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 샘플은 폐 샘플이다. 한 실시양태에서, 샘플은 기관지폐포세척액 (BAL) 샘플이다. 한 실시양태에서, 샘플은 폐포 대식세포 및/또는 폐포 상피 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 샘플은 간 샘플이다.

[0020] 다양한 측면에서, 카드헤린-11 수준은, 예를 들어 샘플 내에서 세포를 용해시키고 이러한 용해물의 내용물을 당업계에 공지된 기술을 이용하여 검정하는 것을 포함하는 샘플의 조작에 의해 측정된다.

[0021] 한 실시양태에서, 카드헤린-11 수준은 카드헤린-11 단백질 수준이다. 한 실시양태에서, 카드헤린-11 수준은 카

드헤린-11 mRNA 수준이다.

[0022] 한 실시양태에서, 정상 대조군은 대상체로부터의 정상 조직 또는 세포의 샘플이다. 한 실시양태에서, 정상 대조군은 대상체 집단 내 카드헤린-11의 수준이다.

[0023] 한 실시양태에서, 카드헤린-11 수준은 면역조직화학을 이용하여 측정된다.

[0024] 한 실시양태에서, 대상체로부터 수거한 샘플 내 카드헤린-11 수준이 정상 대조군보다 높다는 것은 대상체가 섬유증을 갖는다는 것을 나타낸다. 섬유증은 진피 섬유증 또는 비-진피 섬유증, 예컨대 폐 섬유증 또는 간 섬유증일 수 있다.

[0025] 한 실시양태에서, 대상체로부터 수거한 샘플 내 카드헤린-11 수준이 정상 대조군보다 높다는 것은 대상체가 섬유증의 발병 위험이 있다는 것을 나타낸다. 섬유증은 진피 섬유증 또는 비-진피 섬유증, 예컨대 폐 섬유증 또는 간 섬유증일 수 있다.

[0026] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 카드헤린-11 길항제를 이용하여 섬유모세포로부터 근육섬유모세포의 발생 (또는 분화)을 억제하는 방법을 제공한다. 중요 실시양태에서, 섬유모세포에서 근육섬유모세포로의 분화는 섬유증의 발병과 관련된다. 억제의 정도는, 카드헤린-11 길항제와 접촉시킨 후 근육섬유모세포의 절대적 또는 상대적 수를 측정하여 결정될 수 있다. 몇몇 예에서, 억제는 근육섬유모세포 발생 지연 (또는 이들의 운동 지연)을 포함할 수 있다.

[0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상피-중간엽 전이 (EMT)를 억제하는 방법을 제공한다. 중요 실시양태에서, EMT는 섬유증의 발병과 관련된다. 몇몇 예에서, 억제는 EMT 지연 (또는 이들의 운동 지연)을 포함할 수 있다. EMT의 마커에는 표현형 (예를 들어, 상피 세포 극성의 소실, 세포 각각으로의 분리, 성장 인자 (예를 들어, TGF-베타 및 wnt)의 발현, 전사 인자 (예를 들어, SNAILS, SMAD, LEF 및 핵 베타-카테닌)의 발현, 세포 부착 분자 (예를 들어, E-카드헤린)의 발현 등)이 포함된다. 이들 마커는 당업계에 공지되어 있다.

[0028] 상기 개념 및 하기에서 보다 자세히 논의될 추가 개념의 모든 조합 (단, 이러한 개념들은 서로 모순되지 않음)이 본원에 개시된 본 발명의 주제의 일부로서 고려된다는 것을 알아야 한다. 특히, 본 개시내용의 마지막에 나오는 청구된 주제의 모든 조합이 본원에 개시된 본 발명의 주제의 일부로서 고려된다. 또한, 본원에서 명시적으로 사용된 용어 (이는 또한 참조로 포함된 임의의 개시내용에서도 나올 수 있음)는 본원에 개시된 특정 개념과 가장 일관된 의미에 일치하여야 한다는 것을 알아야 한다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도면은 반드시 비율에 맞추어 그려진 것은 아니며, 대신에 본원에 논의된 다양한 개념을 일반적으로 설명하는 것에 중점을 두었다는 것을 이해해야 한다.

도 1. 기관내 경로를 통해 염수 또는 블레오마이신을 투여받은 야생형 마우스의 폐로부터 단백질 용해물을 단리시켰다. 폐를 제12일에 수거하였다. 전기영동에 의해 10% 아크릴아미드 겔 상에서 단백질 용해물을 분리하고, 이어서 이소형 대조군 항체, 항-카드헤린-11 항체 (인비트로젠(Invitrogen)) 또는 항-GAPDH 항체를 이용하는 웨스턴 블롯팅을 위해 막으로 이동시켰다. 카드헤린-11의 발현에 대한 양성 및 음성 대조군으로서 야생형 및 카드헤린-11 널(null) 섬유모세포-유사 윤활막세포를 사용하였다. 블레오마이신 폐에서 카드헤린-11의 수준은 증가하였으나, GAPDH의 수준은 유사하였고, 이는 카드헤린-11이 폐 섬유증의 진행 중에 증가하였음을 나타내었다.

도 2. 기관내 경로를 통해 염수 또는 블레오마이신을 투여받은 야생형 마우스의 폐의 면역조직 화학적 분석. 폐를 제12일에 수거하였다. 블레오마이신을 기관내 투여받은 마우스로부터의 폐 절편은 섬유증 병소를 형성하는 영역에서 섬유모세포-유사 세포에 대한 카드헤린-11의 현저한 염색을 나타내었다 (적색 염색).

도 3. 건강한 대조군 대상체 (n=9)와 비교한 경피증 환자 (n=6)로부터의 피부 생검에서의 증가된 카드헤린-11의 발현. 피부 생검으로부터 전체 RNA를 단리하였고, col1a1 및 CTGF의 수준, 섬유증과 관련된 2개의 유전자, 및 또한 카드헤린-11을 평가하였다.

도 4. 카드헤린-11에 대한 경피증 및 건강한 대조군 피부 생검의 면역조직학적 염색. 피부 생검을 토끼 폴리클로날 항-카드헤린-11 항체로 염색한 후, HRP-접합 2차 항체로 염색하였다. 양성 세포를 적갈색으로 표지하였다. (a) 항-카드헤린-11 항체로 염색된 저배율의 정상 피부. (b) 항-카드헤린-11 항체로 염색된 고배율의 정상 피부. (c) 항-카드헤린-11 항체로 염색된 저배율의 SSC 피부. (d) 및 (e) 항-카드헤린-11 항체로 염색된

고배율의 SSC 피부. 절편은 4개의 대조군 및 4개의 SSC 피부 생검의 대표적인 예이다.

도 5. 헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 블레오마이신 진피 섬유증 모델의 마우스로부터의 대표적인 피부 생검. (a) PBS를 주사한 야생형 마우스 (n=7 마우스), (b) PBS를 주사한 Cad-11 KO 마우스 (n=8 마우스), (c) 블레오마이신을 주사한 야생형 마우스 (n=11 마우스), (d) 블레오마이신을 주사한 Cad-11 KO 마우스 (n=10 마우스).

도 6. 블레오마이신 진피 섬유증 모델에서의 진피 두께 (a) 및 섬유증 (b, 시르콜 검정(Sircol Assay)으로 측정된 콜라겐 함량)의 정량화. PBS를 주사한 야생형 마우스 (n=6), 블레오마이신을 주사한 야생형 마우스 (n=8), PBS를 주사한 cad-11 KO 마우스 (n=7), 블레오마이신을 주사한 cad-11 KO 마우스 (n=8) (n=10 마우스). 데이터는 평균으로 제공되었으며, 오차 바(bar)는 평균의 표준 오차를 나타낸다. P-값은 블레오마이신을 주사한 야생형 및 cad-11 KO 마우스를 비교하는 스튜던트 T-테스트(Student T-test)를 이용하여 측정하였다.

도 7. 폐 조직에서의 Col1a1 및 카드헤린-11의 mRNA 수준은 중증 IPF를 가진 환자에서 증가함. 폐 조직을 폐 조직 리서치 협의회(Lung Tissue Research Consortium)로부터 경증 IPF 및 정상 폐 기능을 가진 8명의 대상체 (대조군, 파란색), 및 중증 IPF 및 이상 폐 기능을 가진 10명의 대상체 (IPF, 적색)로부터 수득하였다. Col1a1을 대조군으로 사용하였고, 이는 중증 IPF를 가진 환자에서 증가하였다. 또한, 카드헤린-11 수준도 중증 IPF를 가진 환자에서 증가하였다. P-값은 스튜던트 T-테스트를 이용하여 측정하였다.

도 8. 경증 IPF 환자 (a) 및 중증 IPF 환자 (b, c)의 폐에서의 카드헤린-11 발현의 면역국소화. 화살표는 폐포 대식세포 (c) 및 증식성 폐포 상피 세포 (b)에 나타난 염색을 나타낸다. 스케일 바 = 100 μm. 나타낸 절편은 경증 IPF (n = 10) 및 중증 IPF (n = 10)의 대표적인 예이다.

도 9. 염수 또는 블레오마이신을 기관내 투여한 야생형 마우스의 폐에서의 카드헤린-11 발현의 면역국소화. 화살표는 증식성 폐포 상피 세포에 나타난 염색을 나타낸다. 스케일 바 = 50 μm. 나타낸 절편은 염수 (n = 12) 및 블레오마이신 (n = 20)의 대표적인 예이다.

도 10. 폐 섬유증에서의 카드헤린-11-의존성 조직병리학. 블레오마이신-유도된 폐 섬유증 모델의 야생형 및 $Cdh11^{-/-}$ 마우스로부터의 폐 조직학적 절편. 3.5U 블레오마이신 점적주입 후 제21일에 마우스로부터 폐를 취하고, 절편화와 H&E 염색을 위해 처리하였다. (a) 염수를 기관내 투여받은 야생형 마우스 (n=6), (b) 염수를 기관내 투여받은 $Cdh11^{-/-}$ 마우스 (n=6), (c) 블레오마이신을 기관내 투여받은 야생형 마우스 (n=13), (d) 염수를 기관내 투여받은 $Cdh11^{-/-}$ 마우스 (n=11). 스케일 바 = 500 μm. 절편은 WT 염수 (n = 6), $Cdh11^{-/-}$ 염수 (n = 6), WT 블레오마이신 (n = 13), $Cdh11^{-/-}$ 블레오마이신 (n = 11)의 대표적인 예이다.

도 11. 폐 섬유증에서의 카드헤린-11-의존성 조직병리학. 블레오마이신-유도된 폐 섬유증 모델의 야생형 및 $Cdh11^{-/-}$ 마우스로부터의 폐 조직학적 절편. 3.5U 블레오마이신 주사 후 제21일에 마우스로부터 폐를 취하고, 절편화 및 마송 삼색 염색(Masson's trichrome stain) (a, b), 또는 근육섬유모세포의 마커인 알파 평활근 액틴의 IHC 분석 (c, d)을 위해 처리하였다. 스케일 바 = 200 μm. 절편은 WT 블레오마이신 (n = 13), $Cdh11^{-/-}$ 블레오마이신 (n = 11)의 대표적인 예이다.

도 12. Cdh11의 유전적 제거와 관련된 정량화가능한 섬유증의 종점. (a) 비색 검정을 통한 BAL 콜라겐 및 (b) H&E 염색된 폐 절편에 대한 애쉬크로프트((Ashcroft) 스코어링을 측정하여 섬유증을 정량화하였다. 스코어를 마우스 폐 1개 당 20개의 이미지로 측정하였다. WT 염수 (n = 6), $Cdh11^{-/-}$ 염수 (n = 6), WT 블레오마이신 (n = 13), $Cdh11^{-/-}$ 블레오마이신 (n = 11). *P ≤ 0.05 대 WT 염수; #P ≤ 0.05 대 WT 블레오마이신.

도 13. 카드헤린-11 차단 항체는 수립된 폐 섬유증을 개선시킴. 이소형 대조군과 비교하여, 카드헤린-11 차단 항체 (23C6 또는 13C2)의 전신 전달과 관련된 블레오마이신-유도된 폐 섬유증에서의 병리조직학적 개선을 주목하였다. 마우스는 블레오마이신 노출 10일 후부터 격일로 항체를 받았다. 이어서, 폐를 제21일에 취하고, 절편화 및 H&E 염색을 위해 처리하였다. 스케일 바 = 500 μm. 절편은 염수 (n = 6), 블레오마이신 + 이소형 (n = 7), 블레오마이신 + 13C2 (n = 8), 및 블레오마이신 + 23C6 (n = 6)의 대표적인 예이다.

도 14. 카드헤린-11 차단 항체는 폐 콜라겐 및 근육섬유모세포를 감소시킴. 블레오마이신과 전신 항체를 받은 마우스 폐를 (a) 콜라겐 침착 (마송 삼색 염색) 및 (b) 근육섬유모세포 (α-SMA 면역조직화학)를 위해 처리하고 염색하였다. 스케일 바 = 200 μm. (c) 비색 검정으로 정량화된 BAL 유체에서의 가용성 콜라겐. 염수 (n =

6), 블레오마이신 + 이소형 (n = 7), 블레오마이신 + 13C2 (n = 8), 및 블레오마이신 + 23C6 (n = 6). *P ≤ 0.05 대 염수; #P ≤ 0.05 대 블레오마이신 + 이소형.

도 15. A549 폐 상피 세포에서의 TGF-β-유도된 EMT 및 *Cdh11* 발현. A549 폐 상피 세포를 TGF-β (10 ng/ml)를 사용하여 자극시키고, 24시간 후에 RNA를 단리하고, 배수 변화 전사체 (대 BSA)를 (a) E 카드헤린, (b) N 카드헤린, (c) α1 pro-콜라겐 및 (d) 카드헤린-11에 대해 측정하였다. *P < 0.05 대 BSA. **P = 0.06 대 BSA. 데이터는 3개의 개별 실험의 대표적인 예이다.

도 16. *Cdh11* 넉다운(knockdown)은 폐 상피 세포의 TGF-β-유도된 EMT를 예방함. A549 폐 상피 세포를 *Cdh11* 또는 대조군 siRNA로 형질감염시키고, 후속적으로 TGF-β로 자극시키고, 24시간 후에 RNA를 단리하고, 배수 변화 전사체 (대 BSA + 대조군 siRNA)를 (a) E 카드헤린, (b) N 카드헤린, (c) α1 pro-콜라겐 및 (d) 카드헤린-11에 대해 측정하였다. 데이터는 3개의 개별 실험의 대표적인 예이다.

도 17. *Cdh11* 넉다운은 폐 상피 세포에서 중간엽 형태로의 TGF-β-유도된 전이를 예방함. A549 폐 상피 세포를 *Cdh11* 또는 대조군 siRNA로 형질감염시키고, 후속적으로 TGF-β로 자극시켰다. 24시간 후에 세포 형태를 위상차 현미경을 사용하여 평가하였다.

도 18. *Cdh11* 넉다운은 폐 상피 세포에서 TGF-β-유도된 SNAIL2 상향조절을 예방함. A549 폐 상피 세포를 *Cdh11* 또는 대조군 siRNA로 형질감염시키고, 후속적으로 TGF-β로 자극시키고, 24시간 후에 RNA를 단리하고, 배수 변화 전사체 (대 BSA + 대조군 siRNA)를 SNAIL2 (EMT 전사 인자)에 대해 측정하였다. 데이터는 3개의 개별 실험의 대표적인 예이다.

도 19. 인간 카드헤린-11의 뉴클레오티드 서열 (서열 1).

도 20. 인간 카드헤린-11의 아미노산 서열 (서열 2).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명은, 카드헤린-11이 비-진피 섬유증, 예컨대 폐 섬유증을 비롯한 섬유증에서 상향조절되며, 카드헤린-11의 결여가 비-진피 섬유증, 예컨대 폐 섬유증을 비롯한 실험적으로-유도된 섬유증에 대한 상당한 내성을 제공한다는 예상치 못한 발견에 일부 기초한다. 이러한 발견을 기초로, 본 발명은 카드헤린-11 길항제를 사용하여 섬유증을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 고려하며 제공한다. 특히, 동반되는 실시예는, 중증 특발성 폐 섬유증을 갖는 환자로부터의 폐 조직 및 경피증을 갖는 인간 환자로부터의 피부 조직에서 카드헤린-11의 수준이 증가되며, 실험적으로-유도된 폐 및/또는 진피 섬유증을 갖는 마우스 또한 각각의 조직에서 카드헤린-11의 수준이 증가되었다는 것을 입증한다. 가장 두드러지게는, 카드헤린-11이 결여된 마우스 (즉, 카드헤린-11 넉-아웃 마우스)는 상기 동일한 실험 모델에서 조직 섬유증이 감소되었다. 추가적으로, 실시예는 카드헤린-11 길항제, 예컨대 항-카드헤린-11 항체가 심지어 확립된 후에도 섬유증의 치료 (예를 들어, 감소)에 효과적이라는 것을 나타낸다. 특히, 이러한 데이터는 카드헤린-11이 섬유증의 핵심 조절제일 뿐만 아니라 폐 섬유증을 비롯한 섬유증의 치료에서의 치료적 표적이라는 것의 우선적인 증거이다.

[0031] *섬유증:*

[0032] 섬유증은 기관 또는 조직에서의 과도한 섬유상 결합 조직의 발생을 지칭한다. 이는 여러 질환 상태의 기저 징후이다. 섬유증은 여러 조직 또는 기관에서 발생할 수 있다. 이러한 섬유성 병태에는 진피 섬유증 (예를 들어, 경피증 관련 진피 섬유증)이 포함된다. 진피 섬유증은 피부 (또는 진피)에서 나타나는 섬유증이다. 또한, 섬유성 병태에는 비후성 반흔, 켈로이드, 화상, 페이로니 질환(Peyronie's disease) 및 뒤피트랑 구축(Dupuytren's contractures)이 포함된다.

[0033] 또한, 섬유성 병태에는 비-진피 섬유증이 포함된다. 비-진피 섬유증은 피부 (또는 진피) 이외의 기관에서 나타나는 섬유증이다. 비-진피 섬유증의 중요한 예로서 폐 섬유증이 있다. 폐 섬유증은 간질성 폐 질환 및 미만성 증식성 폐 질환과 관련되어 있을 수 있다. 폐 섬유증의 예는 심각한 기도 제한을 갖는 IPF (본원에서 중증 IPF로 지칭됨)를 비롯한 특발성 폐 섬유증 (IPF)이 있다.

[0034] 비-진피 섬유증의 다른 예에는 간(liver/hepatic) 섬유증, 안구 섬유증, 장의 섬유증, 신장(kidney/renal) 섬유증, 췌장 섬유증, 혈관 섬유증, 심장 섬유증, 골수섬유증 등이 포함된다.

[0035] 몇몇 섬유증 형태는 간질성 섬유증으로 지칭되며, 이들에는 진피 또는 비-진피 간질성 섬유증이 포함된다.

[0036] 추가적으로, 섬유증은 그의 병인에 의해 분류될 수 있으며, 이러한 병인의 범위는 알려져 있다. 예를 들어, 섬

유증은 감염 (예를 들어, 바이러스 감염 또는 기생충 감염)과 관련되어 있거나 또는 그로부터 기인할 수 있거나, 또는 약물-유도된 섬유증 (예를 들어, 화학요법)일 수 있거나, 또는 물질 남용 (예를 들어, 알콜-유도된 섬유증)과 관련되어 있거나 또는 그로부터 기인할 수 있거나, 또는 수술 또는 다른 침습성 시술과 관련되어 있거나 또는 그로부터 기인할 수 있거나, 또는 기저 병태 또는 사건 (예를 들어, 심근 경색 또는 당뇨병)과 관련되어 있거나 또는 그로부터 기인할 수 있거나, 또는 방사선 노출 (예를 들어, 암에 대한 방사선 치료)과 관련이 있을 수 있거나 또는 그로부터 기인할 수 있다. 예로는 알콜 섭취, 바이러스 간염 및/또는 주혈흡충증과 관련된 간 섬유증; 심근 경색 후 심장 섬유증; 당뇨병과 관련된 신장 섬유증; 및 염증 후 신장 섬유증이 포함된다.

[0037] 섬유증은 이식-유도된 것일 수 있거나 또는 이식과 무관하게 (즉, 이식을 받지 않은 대상체 및 이식을 필요로 하지 않는 대상체에서) 일어날 수 있다. 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 대상체는 신장 이식을 받지 않으며 이러한 이식을 필요로 하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 심장 이식을 받지 않으며, 이러한 이식을 필요로 하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 염증성 관절 장애, 예컨대 류마티스성 관절염을 갖지 않고/거나 발병할 위험이 증가하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 암을 갖지 않고/거나 발병할 위험이 증가하지 않는다.

[0038] 본 발명의 여러 측면은 섬유증을 갖거나 또는 갖기 쉬운 임의의 대상체에서 섬유증을 검출 (예를 들어, 진단) 및/또는 모니터링 및/또는 치료 (예방 포함)하고자 한다. 대상체는 인간 및 비-인간 대상체일 수 있다. 비-인간 대상체에는 동반 동물 (예를 들어, 개 및 고양이), 농업 또는 경주용 동물 (예를 들어, 소, 말 등)이 포함되지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0039] 본 발명은 세포, 기관 또는 조직에서 비정상적으로 상승된 수준의 카드헤린-11의 존재를 기초로 섬유증을 검출하기 위한 방법을 고려하는 것으로 이해된다. 분석되는 세포, 기관 또는 조직은 부분적으로는 존재하거나 또는 발병하는 것으로 추정되거나 또는 존재하는 것으로 알려진 섬유증의 유형에 따를 것이다. 예를 들어, 세포, 기관 또는 조직은 피부 조직에 상주하는 섬유모세포 또는 섬유모세포-유사 세포를 비롯한 피부 조직 또는 피부 세포일 수 있다. 또 다른 예로서, 세포, 기관 또는 조직은 폐 조직 또는 세포, 예컨대 폐포 대식세포 및 폐포 상피 세포일 수 있다. 상기 세포 유형은 기관지폐포세척액에서 얻을 수 있다. 이러한 방법은 본질적으로 진단법일 수 있거나 (즉, 이들은 단독으로 또는 다른 증상 또는 징후와 함께 대상체가 섬유증을 갖는다는 것을 나타낼 수 있음) 또는 이들은 본질적으로 예후법일 수 있다 (즉, 이들은 단독으로 또는 환자 이력 정보와 함께 대상체가 섬유증이 발병하기 쉽다는 것을 나타낼 수 있음). 추가적으로, 본 발명은 하기 보다 구체적으로 기재되는 것과 같이, 카드헤린-11 길항제를 대상체에게 투여하여 섬유증을 갖거나 또는 발병할 위험이 있는 대상체를 치료하는 것을 고려한다.

[0040] *카드헤린-11:*

[0041] 카드헤린-11은 전형적인 II형 카드헤린이다. 이는 짧은 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및 세포외 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 5개의 서브도메인 (때때로 그 자체를 도메인으로 지칭함)으로 구성되어 있으며, 이들 각각은 약 110개의 아미노산으로 이루어져 있다. 인간 및 마우스 카드헤린-11 유전자는 이전에 단리 및 서열분석되었다 (문헌 [Suzuki S. et al. Cell Reg 2:261 70, 1991]). 또한 인간 카드헤린-11 cDNA에 대한 진뱅크 기탁 번호 NM_001797, 및 예상되는 아미노산 서열 (서열 1 및 서열 2)을 각각 참조한다. 또한, 카드헤린-11은 OB-카드헤린, 조골세포 카드헤린, OSF-4 및 CDH11로도 지칭된다.

[0042] 카드헤린의 주요 기능은 한 세포와 또 다른, 때때로 유사한 세포와의 부착을 촉진하는 것이다. 카드헤린은 배아형성 동안의 세포-대-세포 접촉 및 세포 침윤에 관여한다. 출생 후 조직에서, 이들은 상피 구조에서의 세포-대-세포 접촉을 유지하는 기능을 한다. 유사하게, 카드헤린은 세포-대-세포 부착 이외의 다른 기능을 갖는다. 예를 들어, 실시예에 기재된 것과 같이, 카드헤린-11은 섬유증의 발병 동안의 상피-중간엽 전이 (EMT)에 관여한다. 또한, 실시예에서 나타난 것과 같이, 카드헤린-11은 섬유모세포로부터 근육섬유모세포로의 분화에 관여한다.

[0043] *카드헤린-11 길항제:*

[0044] 본원에서 사용되는 용어 길항제는 또 다른 분자의 기능, 활성 및/또는 발현을 차단, 억제, 감소 또는 중화시키는 임의의 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 펩티드모방체(peptidomimetic), 당단백질, 항체, 항체 단편, 탄수화물, 핵산, 유기 분자, 무기 분자, 거대 분자 또는 소분자를 의미한다. 본원에서 사용되는 카드헤린-11 길항제는 카드헤린-11의 기능, 활성 및/또는 발현을 차단, 억제, 감소 또는 중화시키는 작용제이다. 상기 기재된 것과 같

이, 카드헤린-11은 세포 부착, 상호작용 및/또는 이동에 관여한다. 카드헤린-11은 그 자체에 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이는 동종친화성 또는 동형 결합으로도 지칭된다. 카드헤린-11 길항제는 카드헤린-11 동형 결합 또는 이형 결합 (즉, 카드헤린-11과 카드헤린-11이 아닌 역-수용체와의 결합)을 방해할 수 있다. 카드헤린-11 길항제는 세포에 의해 발현되는 카드헤린-11의 양의 감소 또는 카드헤린-11 (또는 그의 역-수용체)과의 상호작용에 의해 카드헤린-11 기능을 방해하여, 카드헤린-11과 그의 표적과의 상호작용을 방지할 수 있다. 따라서, 카드헤린-11 길항제는 전체적으로 또는 부분적으로 카드헤린 11의 전사 또는 카드헤린-11의 번역을 방해할 수 있거나 (이에 의해 카드헤린-11 발현을 방해함), 또는 또 다른 카드헤린-11 또는 또 다른 카드헤린-11 역-수용체에 결합하는 카드헤린-11의 능력을 방해할 수 있다. 카드헤린-11 길항제는 카드헤린-11 기능 또는 활성을 대조군, 예컨대 PBS에 비하여 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 감소시킬 수 있다. 카드헤린-11 기능 또는 활성을 대략 이러한 양까지 감소시키는 양으로 카드헤린-11 길항제를 사용할 수 있다고 이해될 것이다. 추가적으로, 일부 카드헤린-11 길항제는 바람직하게는 시험관내 사용되지만 다른 것은 본원에서 제공되는 생체내 방법에 보다 적합하다고 이해될 것이다.

[0045] 일부 카드헤린-11 길항제는 카드헤린-11의 세포외 도메인에 결합하며, 일부는 카드헤린-11의 세포외 도메인의 특정 영역에 결합한다. 본원에서 논의되는 것과 같이, 카드헤린-11 세포외 도메인은 각각 크기가 대략 110개 아미노산인 5개의 서브도메인으로 구성되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 7589074 및 문헌 [Yagi et al. Genes and Development, 14:1169-1180, 2000] 참조). 본 발명은 카드헤린-11 EC1 또는 카드헤린-11 EC1의 단편 (예를 들어, EC1 중 대략 처음의 33개 내지 처음의 37개 아미노산을 포함하는 단편), 또는 EC1 (또는 EC1 중 처음의 33개 내지 37개 아미노산)을 포함하는 카드헤린-11의 단편에 결합하는 카드헤린-11 길항제의 사용을 고려한다. 몇몇 실시양태에서, 길항제는 GWVWN QFFVI EEYTG PDPVL VGRLH SDIDS GDGN (서열 3; EC1 중 처음의 34개 아미노산)의 아미노산 서열을 갖는 EC1의 영역에 결합한다. 다르게는 또는 추가적으로, 길항제는 이 아미노산 서열의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다.

[0046] 카드헤린-11 길항제는 펩티드 또는 단백질일 수 있거나, 또는 핵산일 수 있거나, 또는 유기 또는 무기 소분자일 수 있다. 길항제는 천연 또는 비-천연일 수 있다. 이들은 천연 공급원으로부터 단리될 수 있거나 또는 시험관내 합성될 수 있다.

[0047] 카드헤린-11 길항제는 또 다른 작용제, 예컨대 영상화제 또는 세포독성제와 접합될 수 있다. 영상화제를 사용하여 카드헤린-11 발현을 시험관내 (예를 들어, 면역조직화학적 분석) 또는 생체내 (예를 들어, 신체 조영)에서 시각화할 수 있다. 예로는 방사성핵종, 조영제, 및 의학적 영상화에서 일상적으로 사용되는 입자가 포함된다. 세포독성제는 세포에 독성인 작용제이다. 예로는 화학요법제, 독소 등이 포함된다. 카드헤린-11 길항제에 접합되는 이러한 작용제의 사용은 이러한 작용제가 섬유성 조직 및 세포를 표적으로 삼도록 할 것이다. 이 경우에서, 치료적 이점은, 카드헤린-11이 역-수용체에 결합하는 능력을 방해하는 카드헤린-11 길항제 및 세포에 직접적으로 독성인 세포독성제의 조합에 의해 제공될 수 있다.

[0048] *카드헤린-11 결합 펩티드:*

[0049] 천연 펩티드 또는 단백질인 카드헤린-11 길항제는 (1) 전장 카드헤린-11 단백질, (2) 카드헤린-11의 막횡단 도메인, 또는 예를 들어 EC1을 포함하거나 이로 이루어진 단편을 비롯한 세포외 도메인의 단편 (예를 들어, EC1을 포함하는 단편, EC1 및 EC2를 포함하는 단편, EC1 내지 EC3을 포함하는 단편, EC1 내지 EC4를 포함하는 단편, EC1 내지 EC5를 포함하는 단편, EC1 및 EC3을 포함하는 단편, EC1 및 EC4를 포함하는 단편, EC1 및 EC5를 포함하는 단편)을 포함하는, 전장 단백질의 단편, (3) 카드헤린-11 세포외 서브도메인 중 하나 이상 (예를 들어, 카드헤린-11의 5가지 세포외 서브도메인 EC1, EC2, EC3, EC4 또는 EC5, 또는 이들의 임의의 조합)을 포함하는, 전장 단백질의 단편, (4) 전장 카드헤린-11 또는 그의 단편을 포함하는 융합 단백질, 및 (5) 항체 및 그의 단편을 포함한다. 중요 실시양태에서, 카드헤린-11 길항제는 카드헤린-11의 EC1 도메인 또는 그의 단편 (예컨대, 본원에 제공된 서열 3)에 결합하고/거나 이를 포함한다. 천연 펩티드 또는 단백질인 카드헤린-11 길항제는 바람직하게는 카드헤린-11에 우선적으로 (또는 선택적으로) 결합할 것이다. 카드헤린-11에 대한 우선적인 (또는 선택적인) 결합은, 펩티드 또는 단백질이 또 다른 단백질에 보다는 카드헤린-11에 보다 큰 친화도로 결합한다는 것을 의미한다. 일부 경우에, 펩티드 또는 단백질은 카드헤린-11이 아닌 단백질 또는 임의의 다른 잔기에 대한 친화도보다 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 10배, 약 25배, 약 50배, 약 100배, 약 1000배 또는 이보다 더 큰 친화도로 카드헤린-11에 결합한다. 친화도에서의 이러한 차이는 바람직하게는 생체내에서 일어나는 생리적인 조건하에서 명백하다. 일부 실시양태에서, 카드헤린-11 결합 펩티드는 카드헤린-11의 EC1에 결합하고, 임의로 카드헤린-11의 EC1의 처음의 33개, 처음의 34개, 처음의 35개, 처음의 36개 또는 처음의 37개 아미노산을 비롯한 처음의 33개 내지 37개의 아미노산 (본원에 제공된 서열 2에 나타낸 바와 같음)에 결합한다. 카드헤린-

11의 상기 영역에의 결합은, 카드헤린-11의 상기 영역에 결합하는 것으로 공지된 여타 결합제 (예컨대, WO2009/089062에 기재된 것들)를 이용하여 경쟁적인 결합 분석을 통해 측정될 수 있다. 상기 언급한 길항제는 일괄적으로 카드헤린-11 결합 펩티드로서 지칭된다. 카드헤린-11 결합 펩티드는 자연발생적인 공급원으로부터 수거하여 단리될 수 있거나, 또는 합성되어 카드헤린-11에 대한 이들의 결합능에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0050] 펩티드 및 단백질에 관해 본원에 사용된 용어 "단리된"은, 본 발명의 목적 중 임의의 하나를 위해 조작되거나 또는 사용될 수 있도록 충분히 순수한 형태로 그의 원시 환경으로부터 분리된 것을 의미한다.

[0051] 결합 펩티드는 또한 항체 기술 이외의 공급원으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 결합 펩티드는 박테리아 편모충(bacterial flagella) 펩티드 디스플레이 라이브러리 또는 파지 디스플레이 라이브러리로서, 고정된 형태로 용액 중에서 쉽게 제조될 수 있는 다의성(degenerate) 펩티드 라이브러리에 의해 제공될 수 있다. 또한, 조합 라이브러리는 1가지 이상의 아미노산을 함유하는 펩티드를 이용하여 합성될 수 있다. 라이브러리는 또한 펩티드 및 비-펩티드 합성 잔기로 이루어질 수 있다.

[0052] 또한, 카드헤린-11 또는 그의 단편은, 다른 카드헤린-11 결합 펩티드 또는 파트너의 단리에 사용될 수 있다. 결합 파트너의 단리는 널리 공지된 방법에 따라 실행될 수 있다. 예를 들어, 카드헤린-11 또는 그의 단편 (예를 들어, 세포외 단편)은 기질에 부착될 수 있고, 이어서 추정상의 카드헤린-11 결합 펩티드가 상기 기질에 적용될 수 있다. 카드헤린-11 결합 펩티드가 존재하는 경우, 이는 기질-결합된 카드헤린-11에 결합할 것이고, 이는 이어서 단리되어 추가로 분석될 수 있다.

[0053] *전장 카드헤린-11 및 카드헤린-11 단편:*

[0054] 카드헤린-11의 공지되어 있는 뉴클레오티드 및 아미노산 서열에 의거하여, 통상의 기술을 이용함으로써 카드헤린-11의 적합한 단편을 확인하고 생성할 수 있다. 카드헤린-11 뉴클레오티드 및 아미노산 서열 및 단편에 관한 교시가 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제5597725호, 제5639634호, 제5646250호, 제6787136호, 제6946768호, 제7488478호 및 제7589074호, 및 PCT 특허 공보 제WO 93/21302호 및 제WO2009/089062호를 참조할 수 있다.

[0055] 적합한 단편의 예에는, 카드헤린 EC1의 아미노산 1-40, 1-39, 1-38, 1-37, 1-36, 1-35, 1-34, 1-33, 1-32, 1-31 또는 1-30으로 이루어지거나 이들을 포함하는 단편, 또는 카드헤린 EC1의 아미노산 15-34, 15-35, 15-36, 15-37, 15-38, 15-39 또는 15-40으로 이루어지거나 이들을 포함하는 단편이 포함된다. 본원에 제공된 서열 2에서, EC1의 처음의 40개의 아미노산은 밑줄이 그어져 있고, EC1의 처음의 35개의 아미노산은 볼드체로 되어 있다. 적합한 단편의 예는, 서열이 본원에 참조로 포함되는 WO2009/089062 (서열 3, 10, 12 및 13의 아미노산 서열로 나타나며, US 2009/0253200에도 기재되어 있음)에도 제공된다. 다른 단편은 서열 2의 아미노산 1-160 또는 1-259 또는 1-269를 포함할 수 있으며, 임의로 이들은 인간 카드헤린-11의 선두(leader) 및 전-영역(pro-region)을 나타내는 서열 2의 아미노산 1-53이 결핍될 수 있다.

[0056] 또한, 카드헤린-11 결합 펩티드는 전장 카드헤린-11 또는 카드헤린-11 단편의 변이체일 수 있다. 이러한 변이체는 카드헤린-11 아미노산 서열과 소정의 정도만큼 상이할 수 있다. 예를 들어, 변이체는 전장 카드헤린-11 또는 카드헤린-11 단편에 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 동일할 수 있다. 변이체는 단편의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 카드헤린-11 단편 및 추가적인 플랭킹(flanking) 구성물을 포함할 수 있다. 이러한 구성물은 천연 아미노산일 수 있다. 모든 경우에, 변이체는 카드헤린-11에 결합하여, 카드헤린-11 작용 또는 활성을 방해한다.

[0057] 카드헤린-11 결합 펩티드는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110개 아미노산 길이 또는 그보다 긴 길이일 수 있다. 예를 들어, 이들은 대략적으로 또는 적어도 220, 330, 440, 550개 아미노산 길이일 수 있다.

[0058] 일부 중요 실시양태에서, 카드헤린-11 억제제는 기능적으로 동등한 카드헤린-11의 펩티드 유사체이다. 본원에 정의된 용어 "기능적으로 동등한 펩티드 유사체"는, 예를 들어 카드헤린-11 그 자체에 대한 카드헤린-11의 결합을 억제할 수 있는 펩티드 유사체를 지칭한다. 기능적으로 동등한 카드헤린-11의 펩티드 유사체는, 예를 들어 펩티드 유사체가 카드헤린-11 발현 세포 간 또는 단리된 카드헤린-11 단백질 또는 그의 일부 조합 간의 카드헤린-11-매개 부착을 억제하는 능력을 측정하는 시험관내 부착 분석을 이용하여 확인된다. 따라서, 기능적으로 동등한 카드헤린-11의 펩티드 유사체의 예에는, 예를 들어 야생형 서열에 대한 보존적 아미노산 치환체를 포함하는, 전장 카드헤린-11 또는 카드헤린-11 단편의 유사체가 포함된다.

[0059] 또 다른 카드헤린-11 결합 펩티드는, 카드헤린-11 결합 펩티드 및 길항제에 관한 특정 교시가 본원에 참조로 포

함되는 PCT 공보 출원 제WO99/57149호, 제WO2004/048411호 및 제WO2009/089062호에 제공된다.

[0060] *카드헤린-11 융합 단백질:*

[0061] 카드헤린-11 결합 펩티드는 융합 단백질일 수 있다. 본원에 사용된 융합 단백질은, 2가지 이상의 상이한 단백질로부터의 펩티드 영역을 함유하는 단백질이다. 예를 들어, 카드헤린-11 융합 단백질은 카드헤린-11 및 1가지 이상의 비-카드헤린-11 단백질로부터의 아미노산 서열을 함유한다. 이러한 융합 단백질은 보통 뉴클레오티드 수준에서, 카드헤린-11로부터의 코딩 서열을 비-카드헤린-11 단백질로부터의 코딩 서열에 융합함으로써 형성될 수 있다. 카드헤린-11 융합 단백질의 예에는 카드헤린-11 GST 융합 단백질, 카드헤린-11 Fc 융합 단백질, 카드헤린-11 베타-갈락토시다제 융합 단백질, 카드헤린-11 폴리-His 융합 단백질 및 카드헤린-11 GFP 융합 단백질이 포함된다. Fc 융합 단백질은 힌지(hinge) 영역, CH1 도메인, CH2 도메인 및/또는 CH3 도메인 (제한 없음)을 비롯한 Ig 불변 도메인의 영역을 포함할 수 있으며, 이는 임의로 힌지 도메인을 통해 카드헤린-11 단편에 접합된다. Fc 부분은 인간 항체 또는 비-인간 항체로부터 유래할 수 있다. 항체는 IgG1 또는 IgG2일 수 있지만 이들로 한정되지는 않는다. Fc 융합 단백질의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 적어도 EP0464533에 기재되어 있다.

[0062] 일부 실시양태에서, 카드헤린-11 융합 단백질은 카드헤린-11의 세포외 도메인 전체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 카드헤린-11 융합 단백질은 카드헤린-11의 1가지 이상의 세포외 서브도메인, 예컨대 EC1를 포함한다. EC1, EC1/2, EC1-3, EC1-4, EC1/3, EC1/4 및 EC1/5, 또는 EC1의 단편을 포함하는 융합 단백질이 예에 포함된다. 중요 실시양태에서, 융합 단백질은 카드헤린-11의 EC1 도메인에 결합한다. 카드헤린-11 융합 단백질의 예에는 카드헤린-11-EC1-Fc 융합 단백질 (카드헤린-11의 EC1 도메인 포함), 카드헤린-11-EC1/2-Fc 융합 단백질 (카드헤린-11의 EC1 및 EC2 도메인 포함) 및 카드헤린-11-EC1-5-Fc 융합 단백질 (카드헤린-11의 EC1, EC2, EC3, EC4 및 EC5 도메인 포함)이 포함된다. 일부 융합 단백질은 WO 2009/089062에 기재된 카드헤린-11의 EC1 도메인의 1-40, 1-39, 1-38, 1-37, 1-36, 1-35 또는 1-34 아미노산을 포함할 수 있다.

[0063] 카드헤린-11 융합 단백질의 합성 방법은 적어도, 카드헤린-11 융합 단백질에 관한 교시가 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제5597725호, 제5639634호, 제5646250호, 제6787136호, 제6946768호, 제7488478호 및 제7589074호, 및 PCT 특허 공보 제WO 93/21302호 및 제WO2009/089062호 (예를 들어, 서열 6 및 7, 인간 카드헤린-11-EC1-hIgG2-Fc 융합 단백질의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열 참조)에서 발견할 수 있다.

[0064] *카드헤린-11 항체 및 항체 단편:*

[0065] 카드헤린-11 결합 펩티드인 카드헤린-11 길항제는 항체 또는 항원-결합 항체 단편일 수 있다. 항체는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체일 수 있다. 이들은 인간화된 항체를 포함하는 키메라 항체일 수 있다. 이들은 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄로 이루어진 4개 쇄의 항체일 수 있거나, 또는 이들은 2개 쇄의 항체, 예컨대 2개의 중쇄로 이루어진 것 (예컨대, 카멜리드(camelid) 항체) 또는 1개의 경쇄에 연결된 1개의 중쇄로 이루어진 것 (예컨대, 단쇄 Fv)일 수 있다. 이들은 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 임의의 클래스 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스의 것일 수 있다. 하기 논의되는 바와 같이, 이러한 다양한 항체 형태는 통상의 방법론에 따라 제조될 수 있다. 항체 및 항체 단편은 자연발생적이거나 또는 비-자연발생적 (예를 들어, 재조합적으로 생성된 항체 및 단편 포함)일 수 있다.

[0066] 중요하게는, 당업계에 널리 공지되어 있는 바와 같이, 항체 분자의 작은 부분인 파라토프(paratope)만이 에피토프(epitope)에 대한 항체의 결합에 관여한다 (일반적으로 문헌 [Clark, W.R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., New York]; [Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford] 참조). pFc' 및 Fc 영역은, 예를 들어 보체 캐스케이드의 이펙터이지만, 항원 결합에는 관여하지 않는다. pFc' 영역이 효소적으로 절단된 항체 또는 pFc' 영역 없이 생성된 항체 ($F(ab')_2$ 단편으로 표시됨)는 무손상 항체의 항원 결합 부위 둘 모두를 보유한다.

유사하게, Fc 영역이 효소적으로 절단된 항체 또는 Fc 영역 없이 생성된 항체 (Fab 단편으로 표시됨)는 무손상 항체 분자의 항원 결합 부위 중 하나를 보유한다. 추가적으로, Fab 단편은 공유결합된 항체 경쇄, 및 항체 중쇄의 일부분 (Fd로 표시됨)으로 이루어진다. Fd 단편은 항체 특이성의 주요한 결정자이고 (하나의 단일 Fd 단편은 항체 특이성을 변화시키지 않으면서 10개 이하의 상이한 경쇄와 연관될 수 있음), Fd 단편은 단리시 에피토프-결합능을 보유한다.

[0067] 용어 Fab, Fab', Fc, Fd, pFc', $F(ab')_2$, Fv 및 dAb는 표준의 면역학적 의미로 사용된다 (문헌 [Klein, Immunology (John Wiley, New York, NY, 1982)]; [Clark, W.R. (1986) The Experimental Foundations of

Modern Immunology (Wiley & Sons, Inc., New York)]; [Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., (Blackwell Scientific Publications, Oxford)] 참조). 널리 공지되어 있는 기능적 활성 항체 단편에는 항체의 $F(ab')_2$, Fab, Fv 및 Fd 단편이 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다. 무손상 항체의 Fc 단편이 결핍된 이러한 단편은 순환으로부터 보다 신속하게 제거되며, 무손상 항체보다 더 적은 비-특이적 조직 결합을 가질 수 있다 (문헌 [Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)] 참조). 예를 들어, 단일-쇄 항체는 미국 특허 제4,946,778호 (Ladner et al.)에 기재된 방법에 따라 구성될 수 있다. 이러한 단일-쇄 항체는 유동성 있는 링커 잔기에 의해 합쳐진 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 포함한다. 또한, 단리된 가변 중쇄 단일 도메인을 포함하는 단일 도메인 항체 ("Fd")의 수득 방법이 보고되었다 (예를 들어, 그에 결합하는 표적 에피토프에 대한 충분한 친화도를 갖는 단리된 형태의 항체 중쇄 가변 영역 (V_H 단일 도메인 항체)을 확인하기 위해 스크리닝하는 방법을 개시하는 문헌 [Ward et al., Nature 341:644-646 (1989)] 참조). 공지된 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 기초로 재조합 Fv 단편을 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제4,462,334호 (Moore et al.)에 기재되어 있다. 항체 단편의 사용 및 생성을 기재하는 기타 문헌에는, 예를 들어 Fab 단편에 관한 문헌 (문헌 [Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevieer, Amsterdam, 1985)]), Fv 단편에 관한 문헌 (문헌 [Hochman et al., Biochemistry 12: 1130 (1973)]; [Sharon et al., Biochemistry 15: 1591 (1976)]; 미국 특허 제4,355,023호 (Ehrilch et al.)) 및 항체 분자의 일부분에 관한 문헌 (미국 특허 제4,470,925호 (Audilore-Hargreaves))이 포함된다. 따라서, 당업자는 항체의 특이성을 파괴하지 않으면서 무손상 항체의 다양한 부분으로부터 항체 단편을 구성할 수 있다.

[0068] 당업계에 널리 공지되어 있는 바와 같이, 항체의 항원-결합 부분 내에, 항원의 에피토프와 직접 상호작용하는 상보성 결정 영역 (CDR) 및 파라토프의 3차 구조를 유지하는 프레임워크 영역 (FR)이 존재한다 (일반적으로 문헌 [Clark, 1986; Roitt, 1991] 참조). IgG 이뮤노글로불린의 중쇄 Fd 단편 및 경쇄 둘 모두에, 3가지 상보성 결정 영역 (CDR1에서 CDR3까지)에 의해 각각 분리되는 4가지 프레임워크 영역 (FR1에서 FR4까지)이 있다. CDR, 특히 CDR3 영역, 보다 특히 중쇄 CDR3이 주로 항체 특이성을 담당한다.

[0069] 포유동물 항체의 비-CDR 영역이 본래 항체의 에피토프 특이성을 보유하면서 동종특이적 또는 이종특이적 항체의 유사한 영역으로 대체될 수 있다는 것은 현재 당업계에서 널리 확립되어 있다. 이는, 기능적인 항체를 생성하기 위한, 비-인간 CDR이 인간 FR 및/또는 Fc/pFc' 영역에 공유결합으로 합쳐진 "인간화된" 항체의 개발 및 사용에 있어서 가장 명확히 나타난다. 따라서, 예를 들어 PCT 국제 공보 제WO 92/04381호 및 공개된 유럽 특허 출원 제EP 0239400호는 뮤린 FR 영역의 적어도 일부분이 인간 기원의 FR 영역에 의해 대체된 인간화된 뮤린 항체의 생성 및 사용을 교시한다. 항원-결합능을 갖는 무손상 항체의 단편을 비롯한 이러한 항체는 흔히 "키메라" 항체로서 지칭된다. 특이적 뮤린 항체 영역으로부터 인간화된 항체를 상업적으로 합성할 미국 내 독립체, 예컨대 프로틴 디자인 랩스(Protein Design Lab) (미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재), 아브제닉스(Abgenix) 및 메다렉스(Medarex)가 존재한다.

[0070] 따라서, 당업자에게 명백할 바와 같이, 본 발명은 또한 $F(ab')_2$, Fab, Fv 및 Fd 단편; Fc 및/또는 FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 경쇄 CDR3 영역이 상동성의 인간 또는 비-인간 서열에 의해 대체된 키메라 항체; FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 경쇄 CDR3 영역이 상동성의 인간 또는 비-인간 서열에 의해 대체된 키메라 $F(ab')_2$ 단편 항체; FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 경쇄 CDR3 영역이 상동성의 인간 또는 비-인간 서열에 의해 대체된 키메라 Fab 단편 항체; 및 FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 영역이 상동성의 인간 또는 비-인간 서열에 의해 대체된 키메라 Fd 단편 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 단일 쇄 항체를 포함한다.

[0071] 또한, 인간 모노클로날 항체는 당업계에 공지되어 있는 임의의 방법, 예컨대 보레베크(Borrebaeck) 등에 허여된 미국 특허 제5,567,610호, 오스트베르크(Ostberg)에 허여된 미국 특허 제565,354호, 베이커(Baker) 등에 허여된 미국 특허 제5,571,893호, 문헌 [Kozber, J. Immunol. 133: 3001 (1984)], [Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, new York, 1987)] 및 문헌 [Boerner et al., J. Immunol., 147: 86-95 (1991)]에 개시된 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체를 제조하기 위한 통상의 방법 이외에, 이러한 항체는 또한 인간 항체를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물을 면역화하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., PNAS USA, 90: 2551 (1993)], [Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993)], [Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993)] 및 론베르크(Lonberg)에게 허여된 미국 특허 제5,569,825호 참조).

[0072] 예시적인 카드헤린-11 항체 및 이러한 항체의 제조 방법은, 카드헤린-11 항체에 관한 교시가 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제5597725호, 제5639634호, 제5646250호, 제6787136호, 제6946768호, 제7488478호 및 제

7589074호, 및 PCT 특허 공보 제WO 93/21302호 및 제WO2009/089062호에 기재되어 있다. 카드헤린-11 항체의 예에는 23C6, 13C2, 27F3, 5F82 (라이프스팬 사이언스(Lifespan Science)로부터 시판됨), H1M1 항체 (ATCC 수탁번호 PTA-9699를 갖는 하이브리도마(hybridoma) H1M1에 의해 생성된 카드헤린-11 EC1 특이적 항체), H14 항체 (ATCC 수탁번호 PTA-9701을 갖는 하이브리도마 H14에 의해 생성된 카드헤린-11 EC1 특이적 항체), BM5096/1A6 (아크리스 안티바디즈 게엠베하(Acris Antibodies GmbH)로부터 시판됨), 283416 (알앤디 시스템즈(R&D Systems)로부터 시판됨) 및 MAB2014 (밀리포어(Millipore)로부터 시판됨)가 포함된다. 카드헤린-11 항체 단편의 예에는 항체 23C6, 13C2, 27F3, 5F82, H1M1 항체, H14 항체, BM5096/1A6, 283416 및 MAB2014의 Fab 단편이 포함된다. 항체 또는 항체 단편은 H1M1 또는 H14 항체와 같은 공지된 항체로부터의 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다 (CDR의 개시내용이 본원에 참조로 포함되는 US 2009/0253200에 기재된 바와 같음).

[0073] 카드헤린-11의 EC1 도메인에 결합하는 항체 및 항체 단편은 미국 제2009/0253200호 및 제WO2009/089062호에 기재되어 있으며, 이러한 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0074] 또한, 카드헤린-11 항체는 이들의 상이한 항원-결합 부위로 인해 2가지 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 이중특이적 또는 이중작용성 항체일 수 있다.

[0075] 또 다른 카드헤린-11 항체는 PCT 공보 제WO 94/04678호 및 미국 특허 공보 제20080124324호에 기재된 카멜리드 항체이며, 이들의 유도체는 미국 특허 제5759808호에서와 같은 카멜리드 나노바디(nanobody)의 형태이다. 카멜리드 항체 및 카멜리드 나노바디는 아블린쓰(Ablynx) (벨기에 소재)와 같은 공급사로부터 시판된다. 카드헤린-11 카멜리드 항체는 다른 항체 유형에 대해 본원에 기재된 바와 유사한 방식으로 인간화될 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0076] *카드헤린-11 핵산 길항제:*

[0077] 카드헤린-11 길항제는 또한 핵산일 수 있다. 이러한 길항제는, (1) 카드헤린-11 폴리펩티드 또는 그의 단편을 코딩하고; (2) 상기 핵산 분자의 전사 또는 번역을 억제하는 카드헤린-11 안티센스 분자이며; (3) 카드헤린-11 억제성 RNA (예를 들어, siRNA 또는 shRNA)이며; (4) 카드헤린-11 리보자임이며; (5) 천연 핵산이지만 카드헤린-11에 결합하여, 결합 펩티드가 또 다른 카드헤린-11 또는 또 다른 카드헤린-11 반대-수용체(counter-receptor)에 대한 카드헤린-11의 결합을 방해하는 압타머인 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 카드헤린-11 길항제는, (1) 엄격한 조건하에 서열 1의 서열을 갖는 핵산과 혼성화되며, (2) 카드헤린-11에 특이적으로 결합할 수 있는 카드헤린-11 폴리펩티드 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산이다.

[0078] *카드헤린-11 코딩 핵산:*

[0079] 카드헤린-11 길항제는 카드헤린-11 및 카드헤린-11의 단편을 코딩하는 핵산을 포함한다. 카드헤린-11 전장 뉴클레오티드 서열은 서열 1로서 제공된다. 서열 1의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산은 한 예로서 길항제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 카드헤린-11 길항제는 또한 서열 1의 서열을 포함하는 핵산 분자의 상동체 및 대립유전자를 포함한다.

[0080] 카드헤린-11 핵산 길항제는 가용성 카드헤린-11 폴리펩티드 또는 막 결합 폴리펩티드, 또는 카드헤린-11 단편, 예컨대 EC1 또는 그의 단편 (예를 들어, EC1의 처음의 33-37 아미노산)으로 이루어지거나 이를 포함하는 단편인 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 가용성 카드헤린-11 폴리펩티드는 막횡단 도메인이 결핍되어 있고, 최적으로 폴리펩티드에 가용성을 부여하는 추가 아미노산을 함유한다 (예를 들어, 카드헤린-11의 또 다른 카드헤린-11로의 결합을 억제하는, 카드헤린-11의 전체 또는 일부를 함유하는 융합 단백질). 막 결합 (또는 막 회합)인 카드헤린-11 단편은 바람직하게는 막횡단 도메인을 함유한다.

[0081] 카드헤린-11 핵산 길항제는 추가로 서열 2 (또는 예를 들어 서열 3)의 아미노산 서열을 갖는 카드헤린-11 단백질을 코딩하나, 유전자 코드의 다의성으로 인해 서열 1의 서열과 상이할 수 있는 핵산 분자를 포함한다.

[0082] 특정 카드헤린-11 핵산 길항제는 통상적인 기술에 의해, 예를 들어 카드헤린-11을 코딩하고 엄격 조건 하에 서열 1의 서열을 갖는 핵산 분자에 혼성화되는 핵산 서열을 확인함으로써 확인될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "엄격 조건"은 당업계에 익숙한 파라미터를 지칭한다. 보다 구체적으로, 본원에서 사용된 바와 같은 엄격 조건은 65℃에서 혼성화 완충제 (3.5 x SSC, 0.02% 포름아미드, 0.02% 폴리비닐 피롤리돈, 0.02% 소 혈청 알부민, 2.5 mM NaH_2PO_4 (pH 7), 0.5% SDS, 2 mM EDTA) 중에서의 혼성화를 지칭한다. SSC는 0.15 M 염화나트륨/0.15 M 시트르산나트륨, pH 7이고; SDS는 나트륨 도데실 술페이트이고; EDTA는 에틸렌-디아민-테트라-아세트산이다. 혼성화 후, DNA가 이동되는 막은 2x SSC에서 실온에서 세척된 후, 0.1x SSC/0.1x SDS에서 65℃에서

세척된다.

[0083] 유사한 정도의 엄격도를 가져오는, 사용될 수 있는 다른 조건, 시약 등이 존재한다. 당업자는 이러한 조건에 익숙할 것이고, 따라서 이는 본원에 제공되지 않는다. 그러나, 당업자는 본 발명의 핵산 분자의 상동체 및 대립유전자의 명확한 확인을 허용하는 방식으로 조건을 조작할 수 있을 것이라는 것이 이해될 것이다. 당업자는 또한 단리되고 서열분석될 수 있는 추가 핵산 분자의 발현을 위한 라이브러리 및 세포를 스크리닝하는 방법에 익숙하다. 카드헤린-11 서열의 스크리닝에서, 예를 들어, 방사성 프로브와 함께 상기 조건을 이용하여 써던 블롯이 수행될 수 있다. DNA가 마지막으로 이동되는 막을 세척한 후, 방사성 신호를 검출하기 위해 x선 필름에 대해 막을 위치시킬 수 있다.

[0084] 일반적으로, 카드헤린-11 상동체 및 대립유전자는 전형적으로 서열 1과 적어도 70% 뉴클레오티드 동일성을 공유할 것이고, 일부 경우에 적어도 75% 뉴클레오티드 동일성을 공유할 것이고, 또 다른 경우에 적어도 80% 뉴클레오티드 동일성을 공유할 것이다. 상기 핵산의 왓슨-크릭 상보체가 또한 본 발명에 포함된다. 바람직한 카드헤린-11 상동체는 서열 1과 적어도 85% 서열 상동성을 갖는다. 더욱 바람직하게는 카드헤린-11 상동체는 서열 1과 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95% 서열 상동성을 갖는다. 상동성은 인터넷을 통해 얻을 수 있는, NCBI (미국 메릴랜드주 베데스다)에 의해 개발된 다양한 공개적으로 이용가능한 소프트웨어 도구를 이용하여 계산될 수 있다. 예시적인 도구로는 NCBI 웹사이트에서 이용가능한 BLAST 시스템이 포함된다. 쌍별 및 클러스탈더블유(ClustalW) 정렬 (BLOSUM30 매트릭스 셋팅) 및 또한 카이트 둘리틀 수치요법 분석은 맥벡터(MacVector) 서열 분석 소프트웨어 (옥스포드 몰레큘라 그룹(Oxford Molecular Group))를 이용하여 얻을 수 있다.

[0085] 본 발명은 또한 예를 들어, 인간 카드헤린-11 폴리펩티드를 코딩하는 천연 발생 핵산에 존재하는 것에 대한 대안적인 코돈을 포함하는 다의성 핵산을 포함한다. 당업계에 공지된 바와 같이, 및 한 예로서, 세린 잔기는 코돈 TCA, AGT, TCC, TCG, TCT 및 AGC에 의해 코딩된다. 6개의 코돈 각각은 세린 잔기의 코딩 목적에 대해 등가이다. 따라서, 세린 잔기를 혼입하기 위해 시험관내 또는 생체내에서 단백질 합성 기구로 지정하는데 세린-코딩 뉴클레오티드 코돈 중 임의의 것이 사용될 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 유사하게, 다른 아미노산 잔기를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 트리플릿(triplet)은 CCA, CCC, CCG 및 CCT (프롤린 코돈); CGA, CGC, CGG, CGT, AGA 및 AGG (아르기닌 코돈); ACA, ACC, ACG 및 ACT (트레오닌 코돈); AAC 및 AAT (아스파라진 코돈); 및 ATA, ATC 및 ATT (이소류신 코돈)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다른 아미노산 잔기는 유사하게 다중 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다.

[0086] 핵산에 대해 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단리된"은 (i) 예를 들어, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 시험관내에서 증폭된; (ii) 클로닝에 의해 재조합 방식으로 생성된; (iii) 절단 및 겔 분리에 의해 정제된; 또는 (iv) 예를 들어, 화학적 합성에 의해 합성된을 의미한다. 단리된 핵산은 당업계에 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 쉽게 조작가능한 것이다. 따라서, 5' 및 3' 제한 효소 부위가 공지되어 있거나 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 프라이머 서열이 개시된 벡터에 함유된 뉴클레오티드 서열은 단리된 것으로 고려되나, 그의 천연 숙주 중에 그의 천연 상태로 존재하는 핵산 서열은 아니다. 단리된 핵산은 실질적으로 정제될 수 있으나 정제될 필요가 있는 것은 아니다. 예를 들어, 클로닝 또는 발현 벡터 내에 단리된 핵산은 그것이 존재하는 세포 내에 오직 아주 적은 백분율의 물질을 포함할 수 있다는 점에서 순수하지 않다. 그러나, 상기 용어가 본원에서 사용되는 바와 같이, 이러한 핵산은 당업자에게 공지된 표준 기술에 의해 쉽게 조작가능하기 때문에 단리된다.

[0087] 한 실시양태에서, 카드헤린-11 핵산 길항제는 세포, 예컨대 진핵 세포 내에 카드헤린-11 핵산 길항제의 발현을 지정하는 유전자 발현 서열에 작동가능하게 연결된다. "유전자 발현 서열"은 작동가능하게 연결된 카드헤린-11 핵산 길항제의 효율적인 전사 및 번역을 용이하게 하는 임의의 조절성 뉴클레오티드 서열, 예컨대 프로모터 서열 또는 프로모터-인핸서 조합이다. 유전자 발현 서열은 예를 들어, 포유동물 또는 바이러스 프로모터, 예컨대 구성적 또는 유도가능한 프로모터일 수 있다. 구성적 포유동물 프로모터는 하기 유전자를 위한 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 하이포크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HPTR), 아데노신 데아미나제, 피루베이트 키나제, 베타-액틴 프로모터 및 다른 구성적 프로모터. 진핵 세포에서 구성적으로 기능하는 예시적인 바이러스 프로모터에는 예를 들어, 원숭이 바이러스, 유두종 바이러스, 아데노바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 라우스 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스로부터의 프로모터, 몰로니 백혈병 바이러스 및 다른 레트로바이러스의 장쇄 말단 반복부 (LTR), 및 단순 포진 바이러스의 티미딘 키나제 프로모터가 포함된다. 다른 구성적 프로모터가 당업자에게 공지되어 있다. 본 발명의 유전자 발현 서열로서 유용한 프로모터는 또한 유도가능한 프로모터를 포함한다. 유도가능한 프로모터는 유도제의 존재 하에 발현된다. 예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터는 특정 금속 이온의 존재 하에 전사 및 번역을 촉진시키도록 유도된다. 다른 유도가능한 프로모터

가 당업자에게 공지되어 있다.

[0088] 일반적으로, 유전자 발현 서열은 필요하다면, 각각 전사 및 번역의 개시에 관여된 5' 비-전사 및 5' 비-번역 서열, 예컨대 TATA 박스, 캡핑 서열, CAAT 서열 등을 포함할 수 있다. 특히, 이러한 5' 비-전사 서열은 작동가능하게 연결된 카드헤린-11 핵산 길항제의 전사 제어를 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 영역을 포함할 것이다. 유전자 발현 서열은 임의로 필요하다면 인핸서 서열 또는 상류 활성자 서열을 포함한다.

[0089] 카드헤린-11 핵산 길항제는 생체내 및 시험관내 방법 양자 모두에서 사용될 수 있다. 본 발명의 핵산 분자는 시험관내에서 세포로 도입될 수 있으며, 그 후 세포가 섬유증의 부위로 이동된다. 핵산 분자가 도입된 세포는 섬유증 부위 (예를 들어, 섬유모세포)로부터 수거될 수 있거나, 또는 이는 정상적으로 염증 부위에 존재하지 않는 세포일 수 있다. 특정 조직 (또는 세포), 예를 들어 폐에서 핵산의 발현을 허용하는 서열은 조직 (또는 세포)에서 선택적으로 전사 활성이어서 이에 의해 조직 (또는 세포)에서 핵산의 발현을 유발시키는 것이다. 당업자는 본원에서 언급된 바와 같이 폐 조직, 간 조직, 신장 조직 등에서 이러한 핵산 분자를 발현할 수 있는 대안적인 프로모터를 용이하게 확인할 수 있을 것이다. 대안적으로, 카드헤린-11 핵산 길항제가 형질도입된 세포는 카드헤린-11 단백질 길항제를 생산하기 위해 시험관내에서 배양될 수 있거나, 또는 시험관내 스크리닝 검정에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 유전자 발현 서열은 카드헤린-11을 본질적으로 발현하지 않는 세포에서 카드헤린-11을 발현하는데 사용될 수 있다.

[0090] 본 발명의 핵산 분자 서열 및 유전자 발현 서열은 유전자 발현 서열의 영향 또는 제어 하에 핵산 길항제 (예를 들어, 카드헤린-11 코딩 서열)의 전사 및/또는 번역을 위치시키는 방식으로 공유결합으로 연결된 경우에 "작동가능하게 연결된"이라고 지칭된다. 핵산 분자가 기능적 단백질로 번역되는 것이 바람직한 경우, 2개의 DNA 서열은, 5' 유전자 발현 서열에서 프로모터의 유도가 핵산 분자의 전사를 초래하는 경우, 및 2개의 DNA 서열 사이에 연결부의 성질이 (1) 프레임시프트(frame-shift) 돌연변이의 도입을 초래하지 않거나, (2) 핵산 분자의 전사를 지정하는 프로모터 영역의 능력을 방해하지 않거나, 또는 (3) 폴리펩티드로 변역되는 상응하는 RNA 전사체의 능력을 방해하지 않는 경우, 작동가능하게 연결되었다고 지칭된다. 따라서, 유전자 발현 서열은, 생성된 전사체가 원하는 폴리펩티드로 번역될 수 있도록 유전자 발현 서열이 상기 핵산 분자의 전사를 수행할 수 있는 경우 핵산 분자에 작동가능하게 연결될 것이다.

[0091] 카드헤린-11 siRNA:

[0092] 본 발명은 카드헤린-11 길항제로서 RNA 간섭제, 예컨대 siRNA 및 shRNA의 사용을 고려한다. siRNA는 포유동물 세포를 포함하는 세포에서 특정 유전자의 방해 및 따라서 전사후 침묵을 초래할 수 있는 RNA 분자이다. siRNA는 길이가 전형적으로 약 5-50개 염기 쌍, 보다 전형적으로 10-40개 염기 쌍, 및 훨씬 더욱 전형적으로 15-30개 염기 쌍인 이중 가닥 영역을 포함한다. siRNA는 길이가 20-50, 25-50 또는 30-40개 염기 쌍일 수 있다. 이들 siRNA는 RNase III 다이서(Dicer)에 의해 소화되어, 길이가 19-28개 염기 쌍, 예를 들어 19개 염기 쌍, 21개 염기 쌍, 23개 염기 쌍, 25개 염기 쌍 및 27개 염기 쌍의 범위인 더 작은 siRNA를 수득할 수 있다. 표적 RNA 분해 및/또는 이로부터의 임의의 단백질 번역의 억제의 순 결과로 상기 크기 범위의 siRNA가 혼입되고 RNA-유도 침묵 복합체 (RISC)라고 불리는 효소 복합체에 의해 작동될 수 있다는 것이 공지되어 있다. 유사한 방식으로, 다른 조절성 기능을 갖는 이중 가닥 RNA, 예컨대 마이크로RNA (miRNA)가 또한 사용될 수 있다. siRNA 및 또한 siRNA의 제조 방법에 대한 더 상세한 사항에 대해서는 문헌 [Bass, Nature 411: 428-29 (2001)]; [Elbashir et al., Nature 411: 494-98 (2001)]; [Fire et al., Nature 391: 806-11 (1998)]; WO 01/75164호 및 미국 특허 6506559호, 7056704호, 7078196호, 7432250호를 참조할 수 있다. 카드헤린-11에 대한 siRNA는 다마콘(Dharmacon)과 같은 공급원으로부터 시판된다.

[0093] siRNA 형태, 예컨대 R-형태 및 L-형태는 한쪽 또는 양쪽 말단 상에 오버행(overhang)을 가질 것이다. 본원에서 논의된 바와 같이, R-형태 siRNA는 그의 안티센스 가닥 상에 3' 오버행을 갖는다. 이는 그의 다른 말단이 평활할 수 있고/거나, 그의 다른 말단 상에 DNA 잔기를 포함하는 오버행을 포함하는 3' 오버행을 가질 수 있다. 대안적으로, L-형태 siRNA는 그의 센스 가닥 상에 3' 오버행을 갖는다. 이는 그의 다른 말단 상이 평활할 수 있고/거나, 그의 다른 말단 상에 DNA 잔기를 포함하는 오버행을 포함하는 3' 오버행을 가질 수 있다.

[0094] siRNA는 리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 데옥시리보뉴클레오티드의 조합으로 이루어질 수 있다 (일부 경우에 하나 또는 둘 모두의 변형된 버전을 포함). 예를 들어, 비-천연 발생 염기 (천연 발생 염기 대신에)를 함유하는 리보뉴클레오티드, 예컨대 5-위치에서 변형된 유리딘 및/또는 시티딘, 예를 들어 5-(2-아미노)프로필 유리딘, 5-브로모 유리딘, 또는 8-위치에서 변형된 아데노신 및/또는 구아노신, 예를 들어 8-브로모 구아노신, 또는 데아자 뉴클레오티드, 예를 들어 7-데아자-아데노신, 또는 O- 및 N-알킬화된 뉴클레오티드, 예를

들어 N6-메틸 아데노신이 siRNA로 혼입될 수 있다. 또 다른 예로서, H, OR, R, 할로, SH, SR, NH_2, NHR, NR_2 또는 CN으로부터 선택된 기에 의해 대체된 2' OH-기를 갖는 당-변형된 리보뉴클레오티드 (여기서, R은 C_1-C_6 알킬, 알케닐 또는 알키닐이고, 할로는 F, Cl, Br 또는 I임). 또 다른 예로서, 주쇄는 포스포로티오에이트를 포함하나 이에 제한되지 않는 변형된 주쇄 연결부를 포함하도록 변형될 수 있다. siRNA는 다양한 이러한 변형을 포함하는, 염기, 당 및/또는 주쇄에서의 변형을 포함할 수 있다.

[0095] 따라서, siRNA 분자는 1종 이상의 형태로서 제공되고/거나 이로부터 유래될 수 있다 (예를 들어, 1종 이상의 단리된 작은-간섭 RNA (siRNA) 이중 가닥 이중나선으로서, 더 긴 이중 가닥 RNA (dsRNA)로서, 또는 DNA 플라스미드에서 전사 카세트로부터 전사된 siRNA 또는 dsRNA로서 포함). siRNA 분자는 오버행 (예를 들어, 문헌 [Elbashir et al., Genes Dev., 15:188 (2001)] 또는 [Nykanen et al., Cell, 107:309 (2001)]에 기재된 바와 같은 3' 또는 5' 오버행)을 가질 수 있거나, 또는 오버행이 결핍될 수 있다 (즉, 평활 말단을 가질 수 있다). 당업자는 이러한 출발 공급원이 어떻게 본원에 기재된 R-형태 및 L-형태에 도달하기 위해 변형될 수 있는가를 알고 이해할 것이다.

[0096] siRNA는 그의 이중나선 (또는 이중 가닥)의 뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부가 표적화 유전자, 예컨대 카드헤린-11의 뉴클레오티드 서열에 대해 상보적인 경우, 생체내 또는 시험관내에서 유전자로 표적화된다. siRNA는 단백질 또는 다른 유전자 생성물을 코딩하는 핵산의 공지된 (또는 예측된) 뉴클레오티드 서열을 기초로 하여 합성될 수 있다. 서열은 표적 내의 번역 또는 비번역 서열에 대해 상보적일 수 있다. 충분한 동일성이 표적-특이적 침묵을 매개하는 표적에 존재하는 한, siRNA와 표적 간의 상보성 정도는 100% 또는 100% 미만일 수 있다. 당업계는 그의 표적에 대해 100% 미만 상보적인 효능이 있는 siRNA에 익숙하다.

[0097] 침묵 또는 방해의 수준은 mRNA 종 및/또는 단백질 종의 정량화를 포함하는 임의의 수많은 방법으로 측정될 수 있다. 일부 경우에, mRNA 정량화는 특히 단백질이 세포내 또는 관찰 및/또는 검정하기에 곤란한 다른 곳에 존재하는 경우에 바람직하다. mRNA 수준은 한 예로서 RT-PCR 또는 RACE를 이용하여 측정될 수 있다. 단백질 수준은 면역조직화학적 염색을 이용하여 측정될 수 있다. mRNA 또는 단백질 수준은 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 심지어 100%만큼 감소될 수 있다. 적용에 따라, 외인적으로 적용되는 siRNA의 부재 하의 수준과 비교하여 부분적인 감소 (즉, 100% 미만이 충분할 수 있음). 일부 실시양태에서, 수준은 외인적으로 적용되는 siRNA에 노출되지 않은 대조군과 비교하여 80% 또는 80% 초과만큼 감소된다.

[0098] 카드헤린-11 리보자임:

[0099] 카드헤린-11 리보자임은 카드헤린-11 RNA의 특이적 절단을 촉매할 수 있는 효소 RNA 분자이다. 카드헤린-11 리보자임은 서열 특이적 방식 (즉, 서열 특이적 혼성화를 통해)으로 카드헤린-11 RNA에 결합하고, 그 후 카드헤린-11 RNA의 엔도뉴클레오티드분해 절단이 뒤이어 온다. 리보자임의 예로는 조작된 헤어핀 또는 해머헤드 모티프 리보자임이 포함된다. 표적, 예컨대 카드헤린-11에 대해 상보적인 리보자임 서열은 리보자임 절단 부위 (예를 들어, GUA, GUU 및 GUC)에 대한 표적을 스캐닝한 후, 절단 부위를 스패닝하는 약 15-20개 리보뉴클레오티드를 갖는 서열을 생성시킴으로써 확인될 수 있다.

[0100] 카드헤린-11 안티센스:

[0101] 카드헤린-11 핵산 길항제는 안티센스 분자 (또는 올리고뉴클레오티드)일 수 있다. 카드헤린-11 폴리펩티드 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산 분자에 선택적으로 결합하여 카드헤린-11 활성 또는 기능을 감소시키는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 본 발명에 포함된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드" 또는 "안티센스"는 생리적 조건하에 특정 유전자를 포함하는 DNA 또는 상기 유전자의 mRNA 전사체로 혼성화되고 이에 의해 상기 유전자의 전사 및/또는 상기 mRNA의 번역을 억제하는, 올리고리보뉴클레오티드, 올리고데옥시리보뉴클레오티드, 변형된 올리고리보뉴클레오티드 또는 변형된 올리고데옥시리보뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 안티센스 분자는 표적 유전자 또는 전사체와의 혼성화시 표적 유전자의 전사 또는 번역을 방해하도록 디자인된다. 당업자는, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 정확한 길이 및 그의 표적과의 그의 상보성 정도가, 해당 서열을 포함하는 표적 및 특정 염기의 서열을 포함하는, 선택된 특이적 표적에 좌우될 것이라는 것을 인식할 것이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 생리적 조건하에 표적과 선택적으로 결합하도록, 즉 생리적 조건하에 표적 세포 내의 임의의 다른 서열보다 표적 서열로 실질적으로 더 많이 혼성화되도록 구축 및 배열되는 것이 바람직하다. 서열 1 또는 대립유전자 또는 상동성 게놈 및/또는 cDNA 서열에 기초하여, 당업자는 본 발명에 따라 사용하기 위한 임의의 수많은 적절한 안티센스 분자를 용이하게 선택 및 합성할 수 있다. 특정 경

우에 길이가 7개 염기만큼 짧은 변형된 올리고뉴클레오티드가 안티센스 올리고뉴클레오티드로서 성공적으로 사용되었으나 (문헌 [Wagner et al., Nat. Med. 1(11):1116-1118, 1995]), 억제에 대해 충분히 선택적이고 강력하게 하기 위해, 이러한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 표적에 대해 상보적인 적어도 10개, 및 더욱 바람직하게는 적어도 15개 연속적인 염기를 포함해야 한다. 가장 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 20-30개 염기의 상보적 서열을 포함한다.

[0102] 유전자 또는 mRNA 전사체의 임의의 영역에 대해 안티센스인 올리고뉴클레오티드가 선택될 수 있으나, 바람직한 실시양태에서 안티센스 올리고뉴클레오티드는 N-말단 또는 5' 상류 부위, 예컨대 번역 개시, 전사 개시 또는 프로모터 부위에 상응한다. 또한, 3'-비번역 영역은 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의해 표적화될 수 있다. mRNA 스플라이싱 부위로의 표적화가 또한 당업계에서 사용되어 왔으나, 대안적인 mRNA 스플라이싱이 발생한 경우에 덜 바람직할 수 있다. 또한, 안티센스는 바람직하게는 mRNA 2차 구조가 예상되지 않고 단백질이 결합할 것으로 예상되지 않는 부위로 표적화된다 (예를 들어, 문헌 [Sainio et al., Cell Mol. Neurobiol. 14(5):439-457, 1994] 참조). 마지막으로, 서열 1이 cDNA 서열을 개시하나, 당업자는 용이하게 상기 서열에 상응하는 게놈 DNA를 유도할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 서열 1에 상응하는 게놈 DNA에 대해 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 유사하게, 대립유전자 또는 상동성 카드헤린-11 또는 대안적으로, 카드헤린-11 계수기-수용체 cDNA 및 게놈 DNA에 대한 안티센스가 과도한 실험 없이 가능하게 된다.

[0103] 한 세트의 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 "천연" 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 즉, 한 천연 뉴클레오티드의 5' 말단 및 또 다른 천연 뉴클레오티드의 3' 말단은 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결부를 통해 천연 시스템으로서 공유결합으로 연결될 수 있다. 이들 올리고뉴클레오티드는 수동으로 또는 자동화된 합성기에 의해 수행될 수 있는 당업계에서 인식하고 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 이는 또한 벡터에 의해 재조합 방식으로 제조될 수 있다.

[0104] 바람직한 실시양태에서, 그러나, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 또한 "변형된" 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 즉, 올리고뉴클레오티드는 그의 표적으로의 혼성화를 방지하지 않을 뿐만 아니라 그의 안정성 또는 표적화를 증진시키거나 또는 이와 달리 그의 치료 효과를 증진시키는 수많은 방식으로 변형될 수 있다.

[0105] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "변형된 올리고뉴클레오티드"는 (1) 그의 뉴클레오티드 중 적어도 2개가 합성 뉴클레오시드간 연결부 (즉, 한 뉴클레오티드의 5' 말단과 또 다른 뉴클레오티드의 3' 말단 사이의 포스포디에스테르 연결부가 아닌 연결부)를 통해 공유결합으로 연결되고/거나, (2) 핵산과 정상적으로 회합하지 않는 화학적 기가 올리고뉴클레오티드에 공유결합으로 부착된, 올리고뉴클레오티드를 기술한다. 바람직한 합성 뉴클레오시드간 연결부는 포스포로티오에이트, 알킬포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 포스페이트 에스테르, 알킬포스포노티오에이트, 포스포르아미데이트, 카르바메이트, 카르보네이트, 포스페이트 트리에스테르, 아세트아미데이트, 카르복시메틸 에스테르 및 펩티드이다.

[0106] 용어 "변형된 올리고뉴클레오티드"는 또한 공유결합 변형된 염기 및/또는 당을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 변형된 올리고뉴클레오티드는 3' 위치의 히드록실 기가 아니고 5' 위치의 포스페이트 기가 아닌 저분자량 유기 기에 공유결합으로 부착된 주쇄 당을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 따라서 변형된 올리고뉴클레오티드는 2'-O-알킬화된 리보스 기를 포함할 수 있다. 또한, 변형된 올리고뉴클레오티드는 리보스 대신에 아라비노스와 같은 당을 포함할 수 있다.

[0107] 카드헤린-11 길항제의 전달:

[0108] 핵산 길항제는 단독으로 또는 벡터와 함께 대상체에 전달될 수 있다. 그의 넓은 의미로, "벡터"는 (1) 표적 세포로의 핵산 분자의 전달 및/또는 (2) 표적 세포에 의한 핵산 분자의 흡수를 용이하게 할 수 있는 임의의 비히클이다. 바람직하게는, 벡터는 벡터의 부재 하에 초래되는 분해 정도에 비해 감소된 분해로 카드헤린-11 핵산 길항제를 표적 세포로 수송한다. 임의로, "표적화 리간드"는 그의 표면 상에 표적화 리간드를 위한 동족 수용체를 발현하는 세포로 벡터를 선택적으로 전달하기 위해 벡터에 부착될 수 있다. 표적화 방법에는 미국 특허 5,391,723호에 기재된 바와 같은 접합체가 포함된다. 일부 경우에, 본 발명의 핵산 분자는 섬유증 조직, 예컨대 병든 폐, 간, 신장 등으로의 전달을 위해 표적화된다.

[0109] 일반적으로, 본 발명에서 유용한 벡터는 2개의 클래스: 생물학적 벡터 및 화학적/물리적 벡터로 나뉜다. 생물학적 벡터는 표적 세포로의/표적 세포에 의한 핵산의 전달/흡수에 유용하다. 생물학적 벡터에는 플라스미드, 파지미드, 바이러스, 본 발명의 핵산 서열, 및 본 발명의 핵산 서열에 부착될 수 있는 추가의 핵산 단편 (예를

들어, 인핸서, 프로모터)의 삽입 또는 혼입에 의해 조작된, 바이러스 또는 박테리아 공급원으로부터 유래된 다른 비히클이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 바이러스 벡터는 바람직한 유형의 생물학적 벡터이고, 다음 바이러스: 아데노바이러스; 아데노-관련 바이러스; 레트로바이러스, 예컨대 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스; 하비 뮤린 육종 바이러스; 뮤린 유방 종양 바이러스; 라우스 육종 바이러스; SV40-유형 바이러스; 폴리오마 바이러스; 엡스타인-바 바이러스; 유두종 바이러스; 헤르페스 바이러스; 백시니아 바이러스; 폴리오 바이러스; 및 RNA 바이러스, 예컨대 레트로바이러스로부터의 핵산 서열을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 당업자는 명칭은 없으나 당업계에 공지된 다른 벡터를 쉽게 이용할 수 있다.

[0110] 특정 적용을 위한 특히 바람직한 바이러스는 이중 가닥 DNA 바이러스인 아데노-관련 바이러스이다. 아데노-관련 바이러스는 광범위한 범위의 세포 유형 및 종을 감염시킬 수 있고, 복제-결핍되도록 조작될 수 있다. 이는 추가로 이점, 예컨대 열 및 지질 용매 안정성, 조혈 세포를 포함하는 다양한 계통의 세포 내의 높은 형질도입 빈도, 및 중복감염 억제의 결핍을 가지며, 따라서 형질도입의 다중 시리즈를 허용한다. 전하는 바에 따르면, 아데노-관련 바이러스는 부위-특이적 방식으로 인간 세포의 DNA로 통합하여, 이에 의해 삽입 돌연변이유발의 가능성 및 삽입된 유전자 발현의 가변성을 최소화할 수 있다. 또한, 야생형 아데노-관련 바이러스 감염은 선택적 압력의 부재 하에 100번 초과의 계대를 위한 조직 배양에 뒤이어 오며, 이는 아데노-관련 바이러스 게놈 통합이 비교적 안정적인 사건임을 함축한다. 아데노-관련 바이러스는 또한 염색체외 방식으로 기능할 수 있다.

[0111] 일반적으로, 다른 바람직한 바이러스 벡터는 비필수 유전자가 관심 유전자로 대체된 비-세포변성 진핵 바이러스를 기초로 한다. 비-세포변성 바이러스에는 레트로바이러스가 포함되며, 그의 생애 주기는 숙주 세포의 DNA로의 후속적 프로바이러스 통합으로 DNA로의 게놈 바이러스 RNA의 역전사에 관여한다. 아데노바이러스 및 레트로바이러스는 인간 유전자 요법 시도에 대해 승인되었다. 일반적으로, 레트로바이러스는 복제-결핍이다 (즉, 원하는 단백질의 합성을 지정할 수 있으나 감염성 입자를 제조할 수 없다). 이러한 유전적으로 변경된 레트로바이러스 발현 벡터는 생체내 유전자의 고효율 형질도입에 대한 일반적인 유용성을 갖는다. 복제-결핍된 레트로바이러스의 제조를 위한 표준 프로토콜 (플라스미드로의 외인성 유전학 물질의 혼입 단계, 플라스미드에 의한 패키징 세포주의 형질감염 단계, 패키징 세포주에 의한 재조합 레트로바이러스의 생성 단계, 조직 배양 배지로부터의 바이러스 입자의 수집 단계, 및 바이러스 입자에 의한 표적 세포의 감염 단계 포함)은 문헌 [Kriegler, M., "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual," W.H. Freeman C.O., New York (1990)] 및 [Murry, E.J. Ed. "Methods in Molecular Biology," vol. 7, Humana Press, Inc., Cliffton, New Jersey (1991)]에 제공된다. 또 다른 바람직한 레트로바이러스 벡터는 문헌 [Nabel, E.G., et al., Science, v. 249, p. 1285-1288 (1990)]에 기재된 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스로부터 유래된 벡터이다.

[0112] 생물학적 벡터 이외에, 화학적/물리적 벡터가 표적 세포로의/표적 세포에 의한 핵산 또는 폴리펩티드의 전달/흡수에 유용하다. 본원에서 사용된 바와 같이, "화학적/물리적 벡터"는 카드헤린-11 길항제를 세포로 전달할 수 있는, 박테리아 또는 바이러스 공급원으로부터 유래된 것이 아닌 천연 또는 합성 분자를 지칭한다.

[0113] 본 발명의 바람직한 화학적/물리적 벡터는 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로이드성 분산 시스템은 수중유 에멀젼, 미셀, 혼합된 미셀 및 리포좀을 비롯한 지질-기재의 시스템을 포함한다. 본 발명의 바람직한 콜로이드성 시스템은 리포좀이다. 리포좀은 생체내 또는 시험관내에서 전달 벡터로서 유용한 인공 막 관이다. 이는 크기가 0.2 내지 4.0 μm의 범위인 거대한 단층 혈관 (LUV)이 큰 거대분자를 캡슐화할 수 있음을 보여준다. RNA, DNA, 및 무손상 비리온은 수성 내부물질 내에 캡슐화될 수 있고, 생물학적으로 활성 형태로 세포로 전달될 수 있다 (문헌 [Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., v. 6, p. 77 (1981)]). 리포좀이 효율적인 유전자 전달 벡터가 되기 위해, 하기 특징들 중 하나 이상이 제공되어야 한다: (1) 생물학적 활성을 보유하면서 고효율로 관심 유전자의 캡슐화; (2) 비-표적 세포와 비교하여 표적 세포에의 우선적이고 실질적인 결합; (3) 고효율로 소포 수성 내용물의 표적 세포 세포질로의 전달; 및 (4) 유전자 정보의 정확하고 효과적인 발현.

[0114] 리포좀은 특이적 리간드, 예컨대 모노클로날 항체, 당, 당지질, 또는 특정 조직 또는 세포 유형에 특이적인 단백질에 커플링됨으로써 특정 조직에 표적화될 수 있다. 추가로, 벡터는 핵 표적화 펩티드에 커플링될 수 있으며, 이는 카드헤린-11 조절 핵산 분자를 숙주 세포의 핵으로 유도할 것이다.

[0115] 리포좀은 깁코 비알엘(Gibco BRL)로부터, 양이온성 지질, 예컨대 N-[1-(2,3 디올레일옥시)-프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA) 및 디메틸 디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB)로 형성되는, 예를 들어 리포펙틴(LIPOFECTIN)™ 및 리포펙타세(LIPOFECTACE)™로서 시판된다. 리포좀의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있고, 많은 간행물에 기재되어 있다. 리포좀은 또한 그레고리아디스, 쥐.(Gregoriadis, G.)에 의한 문헌 [Trends in Biotechnology, V. 3, p. 235-241 (1985)]에서 검토된다.

[0116] 일반적으로, 카드헤린-11 핵산 길항제는, 현재 인간의 유전자 요법 (예를 들어, 아데노바이러스-매개 유전자 요법)에서 사용되는 것과 동일한 투여 방식을 사용하여 대상체 (임의의 포유류 수용자)에게 투여될 수 있다. 생체외 유전자 요법을 수행하는 특허받은 절차는 공개적으로 이용가능한 자료인 미국 특허 제5,399,346호 및 상기 특허의 파일 기록에 제출된 증거물들에 개략되어 있다. 일반적으로, 생체외 유전자 요법은 유전자 또는 그의 단편의 기능적 복제물을 대상체의 세포(들)로 시험관내 도입하고, 유전자 조작된 세포(들)을 대상체에 복귀시키는 것을 포함한다. 유전자 또는 그의 단편의 기능적 복제물은, 유전자 조작된 세포(들)에서 유전자의 발현을 가능케 하는 조절성 요소의 조작가능한 제어하에 있다. 수많은 형질감염 및 형질도입 기술, 및 또한 적절한 발현 벡터는 당업자에게 익히 공지되어 있고, 이 중 일부는 PCT 출원 제WO95/00654호에 기재되어 있다.

[0117] 예시적인 예로서, 핵산 분자를 함유하는 벡터는 이러한 유전자 요법에 대한 후보자인 대상체의 섬유증 부위로 전달된다. 이어서, 벡터는 예를 들어 카드헤린-11을 코딩하는 DNA로 섬유증 환경에서 하나 이상의 세포 유형을 유전자 변형시킨다. 이러한 유전자 변형된 세포는 또 다른 카드헤린-11에의 카드헤린-11 결합을 막을 것으로 기대된다.

[0118] 대안적인 실시양태에서, 1차 인간 세포는 이러한 유전자 요법에 대한 후보자인 대상체로부터 획득할 수 있다. 이어서, 상기 세포는 예를 들어 전장 카드헤린-11을 코딩하는 DNA로 생체외에서 유전자 조작될 수 있다. 이러한 재조합 세포는 생체내 카드헤린-11 매개된 부착을 억제할 것으로 기대된다. 또 다른 예에서, 카드헤린-11을 발현하지 않는 또 다른 세포 유형은 시험관내에서 유전자 조작되어 카드헤린-11 길항제를 발현한 다음 섬유증 부위 내로 도입될 수 있다.

[0119] 표적 세포에 의한 핵산의 시험관내 흡수를 용이하게 하는데 사용될 수 있는 예시적인 조성물은 인산칼슘 및 다른 화학적 세포내 수송 매개자, 미세주입 조성물, 전기천공 및 상동성 재조합 조성물 (예를 들어, 표적 세포 염색체 내 미리 선택된 위치로 핵산을 통합시키기 위함)을 포함한다.

[0120] *제약 조성물, 제제, 유효량:*

[0121] 본 발명은 추가로 카드헤린-11 길항제를 포함하는 제약 조성물 (즉, 제약 제제)을 제공한다. 조성물은 제약상 허용되는 담체 및 카드헤린-11 길항제를 포함한다.

[0122] 상기 기재된 바와 같은 제약 제제는 유효량으로 투여된다. 치료 용도에 대해, 이는 일반적으로, 의학적으로 바람직한 결과를 달성하기에 충분한 양이다. 일반적으로, 치료적 유효량은 치료될 특정 증상의 발병을 지연시키거나 그의 진행을 억제시키거나, 또는 완전히 중지시키기 위해 필요한 양이다. 예로서, 유효량은 치료 또는 예방될 장애의 증상 (예를 들어, 통증, 염증 등)을 줄이거나, 경감시키거나 또는 그의 발병을 지연시키는 작용을 하는 양일 수 있다. 유효량은 투여 방식, 치료될 특정 증상 및 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 이는 또한 증상의 단계, 증상의 중증도, 치료될 대상체의 연령 및 신체 조건, 동시 요법의 특성 (필요하다면), 치료 기간, 특정 투여 경로, 및 의학적 전문인의 지식 및 경험에 속한 유사 요인에 따라 달라질 것이다. 예방 용도에 대해, 이는 예방될 특정 증상의 발병을 지연시키거나 그의 진행을 억제시키거나, 또는 완전히 중지시키기에 충분한 양이며, 증상의 발병을 막기 위해 요구되는 양에 의해 결정될 수 있다.

[0123] 일반적으로, 본 발명의 활성 화합물의 투여량은 하루 이상 동안 매일 1회 이상의 용량 투여로, 1일 약 0.01 mg/kg 내지 1일 1000 mg/kg, 바람직하게는 약 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 가장 바람직하게는 약 0.2 mg/kg 내지 약 20 mg/kg이다. 1-500 mg/kg 범위의 용량, 바람직하게는 1-100 mg/kg 범위의 용량, 훨씬 더 바람직하게는 1-50 mg/kg 범위의 용량이 적합할 것으로 기대된다. 바람직한 양은 작용제의 최적의 투여량 수준을 결정하는 표준 지침에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로 바람직하게는, 사용되는 카드헤린-11 길항제의 최대 용량은 안전 의료 평가에 따른 최고 수준의 안전한 용량이다.

[0124] 카드헤린-11 길항제는 섬유증을 치료하기 위한 동시 요법과 함께 상기 치료가 필요한 대상체에게 투여될 수 있다. 동시 요법은 침윤성 또는 비-침윤성 (예를 들어, 약물 요법)일 수 있다. 섬유증에 대한 약물 요법의 예는 메티아졸, 파이퍼롱구민, 안티마이신 a, 티오스트렙톤, 벤즈브로마론, 루테올린, 톨페남산, 시클로피록스 에탄올아민, (r)-(-)-아포모르핀 칼시페롤, GBR 12909, 하르몰, 하이칸톤, 플루페남산, 할로판트린 및 자르다베린 (미국 특허 공개 제20100093613호에 기재된 바와 같음)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 면역억제제 또한 섬유증의 치료에서 사용되어 왔다. 예로는 라파마이신, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 시클로스포린, FK-506, CDK 억제제, 및 스테로이드 및 코르티코스테로이드, 예컨대 코르티손, 덱사메타손, 히드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손 및 트리암시놀린이 포함된다. 사용될 수 있는 다른 작용제는 항염증제, 예컨대 NSAID를 포함한다. 이들 약물 요법은 당업자에게 익히 공지되어 있고, 당업자에게 공지된 방식에 의해 투

여된다. 약물 요법은 카드헤린-11 길항제와 함께, 생리적 목표를 달성하기에 효과적인 양으로 투여된다. 따라서, 일부 경우, 약물 요법은 약물 요법이 단독으로 투여되는 경우 섬유증의 생리적 결과를 예방 또는 감소시키지는 못하지만, 카드헤린-11 길항제와 함께 투여되는 경우 상기 결과를 감소시킬 수 있는 양으로 투여될 수 있는 것으로 고려된다. 카드헤린-11 길항제는 이러한 2차 치료제와 함께 제제화될 수 있거나, 또는 이들은 개별적으로 제제화될 수 있다. 이들은 동시에 또는 개별적 시간에 투여될 수 있다. 예를 들어, 카드헤린-11 길항제는 2차 치료제 이전에 및/또는 함께 및/또는 이후에 투여될 수 있다. 별법으로, 2차 치료제는 카드헤린-11 길항제 이전에 및/또는 함께 및/또는 이후에 투여될 수 있다.

[0125] 카드헤린-11 길항제는 단독으로, 또는 제약 조성물의 부분으로서 상기 기재된 약물 요법과 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 제약 조성물은 당업계에 공지된 임의의 표준 생리적 및/또는 제약상 허용되는 담체와 함께 카드헤린-11 길항제를 포함할 수 있다. 조성물은 멸균되어야 하고, 환자에게 투여하기에 적합한 중량 또는 부피 단위로 치료적 유효량의 카드헤린-11 조절제를 함유해야 한다.

[0126] 본원에서 사용되는 용어 "제약상 허용되는 담체"는, 인간 또는 다른 동물에게 투여하기에 적합한 1종 이상의 상용가능한 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 용어 "제약상 허용되는"은 활성 성분의 생물학적 활성의 효과를 방해하지 않는 무독성 물질을 의미한다. 제약상 허용되는은 추가로 세포, 세포 배양물, 조직 또는 유기체와 같은 생물학적 시스템과 상용가능한 무독성 물질을 의미한다. 용어 "담체"는 적용을 용이하게 하기 위해 활성 성분과 결합되는 천연 또는 합성의 유기 또는 무기 성분을 나타낸다. 담체의 특성은 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 제약 조성물의 성분들은 또한, 원하는 제약 효능을 실질적으로 손상시키는 상호작용이 일어나지 않도록 하는 방식으로 본 발명의 작용제와 함께 그리고 서로 함께 혼합될 수 있다. 제약상 허용되는 담체는 생체내 투여를 위해 멸균되어야 한다. 생리학적 및 제약상 허용되는 담체는 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용화제, 및 당업계에 잘 알려진 다른 물질을 포함한다.

[0127] 편의상 비경구 투여에 적합한 조성물은, 바람직하게는 수용자의 혈액과 등장성인 카드헤린-11 조절제의 멸균 수성 제제를 포함한다. 이러한 수성 제제는 적합한 분산화제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 공지된 방법에 따라 제제화될 수 있다. 멸균의 주사가능한 제제는 또한 비경구적으로 허용되는 무독성의 희석제 또는 용매 중의, 예를 들어 1,3-부탄 디올 중의 용액으로서의 멸균의 주사액제 또는 현탁액제일 수 있다. 사용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매로는 물, 링거액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균의 고정유는 용매 또는 현탁화 매질로서 통상적으로 사용된다. 상기 목적상, 합성 모노- 또는 디-글리세리드를 비롯한 임의의 무자극 고정유가 사용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산이 주사가능한 제제의 제조에서 사용될 수 있다. 경구, 피하, 정맥내, 근육내 등의 투여에 적합한 담체 제제는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA]에서 발견될 수 있다.

[0128] 다양한 투여 경로가 이용가능하다. 선택되는 특정 방식은 물론, 치료될 섬유증의 특정 유형, 치료될 상태의 중증도, 및 치료 효능에 요구되는 용량에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 본 발명의 방법은 의학적으로 허용되는 임의의 투여 방식을 사용하여 실시될 수 있으며, 이는 임상적으로 허용되지 않는 부작용을 유발하지 않으면서 활성 화합물의 효과적인 수준을 야기하는 임의의 방식을 의미한다. 이러한 투여 방식은 국소, 경구, 직장, 비측, 비내, 흡입 또는 비경구 경로를 포함한다. 용어 "비경구"는 피하, 정맥내, 근육내, 복강내 또는 주입을 포함한다.

[0129] 제약 조성물은 편의상 단위 투여 형태로 제공될 수 있고, 약학 분야에서 익히 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 모든 방법은 카드헤린-11 길항제를 1종 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 조성물은 카드헤린-11 길항제를 액체 담체, 미분된 고체 담체, 또는 둘 다와 균일하고 치밀하게 결합시킨 후, 필요한 경우, 생성물을 성형시켜 제조한다. 경구 투여에 적합한 조성물은, 소정량의 카드헤린-11 길항제를 함유하는 분리된 단위, 예컨대 캡슐제, 정제, 로젠지제로 존재할 수 있다. 다른 조성물은 수성 액체 또는 비수성 액체 중의 현탁액, 예컨대 시럽제, 엘릭시르제 또는 에멀젼을 포함한다.

[0130] 일 특정 실시양태에서, 카드헤린-11 길항제의 전달에 바람직한 비히클은, 대상체 내로의 이식에 적합한 생체적합성 마이크로입자 또는 임플란트이다. 본 발명에 따라 유용한 예시적인 생체침식가능한 임플란트는 PCT 국제 출원 제PCT/US/03307호 (공보 제WO 95/24929호, 명칭 "중합체 유전자 전달 시스템", 1994년 3월 15일자 출원된 미국 특허 출원 제213,668호에 대해 우선권을 주장함)에 기재되어 있다. PCT/US/03307은 적절한 프로모터의 제어하에 외인성 유전자를 함유하기 위한 생체적합성, 바람직하게는 생분해성 중합체 매트릭스를 기재한다. 중합체 매트릭스는 대상체에서 외인성 유전자의 지속적인 방출을 달성하기 위해 사용된다. 본 발명에 따르면, 본원에 기재된 카드헤린-11 조절제는 캡슐화되거나, 또는 PCT/US/03307에 개시되어 있는 생체적합성, 바람직하게는

생분해성 중합체 매트릭스 내부에 분산된다. 중합체 매트릭스는 바람직하게는 마이크로입자 형태, 예컨대 미소구 (여기서, 예를 들어, 카드헤린-11 억제제는 고체 중합체 매트릭스 전반에 걸쳐 분산됨) 또는 마이크로캡슐 (여기서, 예를 들어, 카드헤린-11 억제제는 중합체 쉘의 코어 내에 저장됨)이다. 카드헤린-11 조절제를 함유하기 위한 다른 형태의 중합체 매트릭스는 필름, 코팅, 겔, 임플란트 및 스텐트를 포함한다. 중합체 매트릭스 장치의 크기 및 조성은 매트릭스 장치가 이식된 조직에서 유리한 방출 속도를 야기하도록 선택된다. 중합체 매트릭스 장치의 크기는 추가로, 예를 들어 에어로졸에 의해 비측 및/또는 폐 부위로의 현탁액의 투여를 비롯한 사용되는 전달 방법에 따라 선택된다. 중합체 매트릭스 조성물은 유리한 분해 속도를 가지고 또한 생체결합성인 물질로 구성되도록 선택될 수 있다. 매트릭스 조성물은 또한 분해되지 않고 오히려 연장된 기간의 시간에 걸쳐 확산에 의해 방출되도록 선택될 수 있다.

[0131] 비-생분해성 및 생분해성 중합체 매트릭스는 둘 다 카드헤린-11 길항제를 대상체에 전달하기 위해 사용될 수 있다. 생분해성 매트릭스가 바람직하다. 이러한 중합체는 천연 또는 합성 중합체일 수 있다. 합성 중합체가 바람직하다. 중합체는 방출이 요구되는 기간, 일반적으로 대략 수시간 내지 1년 또는 그 이상의 기간을 기준으로 선택된다. 전형적으로, 수시간에서부터 3 내지 12개월의 범위의 시간에 걸친 방출이 가장 바람직하다. 중합체는 임의로 물 중에서 그의 중량의 최대 약 90%를 흡수할 수 있는 히드로겔 형태이고, 추가로, 임의로는 다가 이온 또는 다른 중합체와 가교된다.

[0132] 일반적으로, 카드헤린-11 길항제는 생체침식가능한 임플란트를 사용하여 확산에 의해, 또는 더욱 바람직하게는 중합체 매트릭스의 분해에 의해 전달된다. 생분해성 전달 시스템을 형성하기 위해 사용될 수 있는 예시적인 합성 중합체로는 폴리아미드, 폴리카르보네이트, 폴리알킬렌, 폴리알킬렌 글리콜, 폴리알킬렌 옥시드, 폴리알킬렌 테레프탈레이트, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 에테르, 폴리비닐 에스테르, 폴리비닐 할라이드, 폴리비닐피롤리돈, 폴리글리콜라이드, 폴리실록산, 폴리우레탄 및 그의 공중합체, 알킬 셀룰로스, 히드록시알킬 셀룰로스, 셀룰로스 에테르, 셀룰로스 에스테르, 니트로 셀룰로스, 아크릴산 및 메타크릴산 에스테르의 중합체, 메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스, 히드록시부틸 메틸 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트, 셀룰로스 프로피오네이트, 셀룰로스 아세테이트 부티레이트, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 카르복실에틸 셀룰로스, 셀룰로스 트리아세테이트, 셀룰로스 술페이트 나트륨 염, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(에틸 메타크릴레이트), 폴리(부틸메타크릴레이트), 폴리(이소부틸 메타크릴레이트), 폴리(헥실메타크릴레이트), 폴리(이소데실 메타크릴레이트), 폴리(라우릴 메타크릴레이트), 폴리(페닐 메타크릴레이트), 폴리(메틸 아크릴레이트), 폴리(이소프로필 아크릴레이트), 폴리(이소부틸 아크릴레이트), 폴리(옥타데실 아크릴레이트), 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(에틸렌 옥시드), 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 폴리(비닐 알콜), 폴리비닐 아세테이트, 폴리 비닐 클로라이드, 폴리스티렌 및 폴리비닐피롤리돈이 포함된다.

[0133] 생분해성 중합체의 예로는 합성 중합체, 예컨대 락트산 및 글리콜산의 중합체, 폴리무수물, 폴리(오르토)에스테르, 폴리우레탄, 폴리(부트산), 폴리(발레르산) 및 폴리(락타이드-코-카프로락톤), 및 천연 중합체, 예컨대 알기네이트 및 다른 폴리사카라이드 (덱스트란 및 셀룰로스 포함), 콜라겐, 그의 화학적 유도체 (화학적 기, 예를 들어 알킬, 알킬렌의 치환, 부가, 히드록실화, 산화, 및 당업자에 의해 통상적으로 행해지는 다른 변형), 알부민 및 다른 친수성 단백질, 제인(zein) 및 다른 프롤라민 및 소수성 단백질, 이들의 공중합체 및 혼합물이 포함된다. 일반적으로, 이들 물질은 생체내에서 효소적 가수분해 또는 물에의 노출에 의해, 표면 또는 벌크 부식에 의해 분해된다.

[0134] 특별히 관심의 대상인 생체결합성 중합체는 생체침식가능한 히드로겔 (문헌 [H.S. Sawhney, C.P. Pathak and J.A. Hubell in Macromolecules, 1993, 26, 581-587]에 기재되어 있고, 그의 교시내용은 본원에 도입됨), 폴리하이알루론산, 카세인, 젤라틴, 글루틴, 폴리무수물, 폴리아크릴산, 알기네이트, 키토산, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(에틸 메타크릴레이트), 폴리(부틸메타크릴레이트), 폴리(이소부틸 메타크릴레이트), 폴리(헥실메타크릴레이트), 폴리(이소데실 메타크릴레이트), 폴리(라우릴 메타크릴레이트), 폴리(페닐 메타크릴레이트), 폴리(메틸 아크릴레이트), 폴리(이소프로필 아크릴레이트), 폴리(이소부틸 아크릴레이트) 및 폴리(옥타데실 아크릴레이트)를 포함한다.

[0135] 비-생분해성 중합체의 예로는 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리(메트)아크릴산, 폴리아미드, 이들의 공중합체 및 혼합물이 포함된다.

[0136] 다른 전달 시스템은 지속 방출, 지연 방출 또는 지속적 방출 전달 시스템을 포함할 수 있다. 이러한 시스템은 상기 기재된 카드헤린-11 길항제의 반복 투여를 피할 수 있어, 대상체 및 의사의 편의를 증가시킨다. 수많은 유형의 방출 전달 시스템이 이용가능하고 당업자에게 공지되어 있다. 이들은 상기 기재된 중합체 시스템, 및

또한 중합체 기재 시스템, 예컨대 폴리(락타이드-글리콜라이드), 코폴리옥살레이트, 폴리카프로락톤, 폴리에스테르아미드, 폴리오르토에스테르, 폴리히드록시부티르산 및 폴리무수물을 포함한다. 약물을 함유하는 상기 중합체의 마이크로캡슐은 예를 들어 미국 특허 제5,075,109호에 기재되어 있다. 전달 시스템은 또한 비-중합체 시스템, 즉, 스테롤, 예컨대 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르 및 지방산 또는 중성 지방, 예컨대 모노-, 디- 및 트리-글리세리드를 비롯한 지질; 히드로겔 방출 시스템; 실라스틱(silastic) 시스템; 펩티드 기재 시스템; 왁스 코팅제; 통상적인 결합제 및 부형제를 사용한 압착 정제; 부분적으로 융합된 임플란트 등을 포함한다. 구체적인 예는 (a) 카드헤린-11 조절제가 매트릭스 내부에 하나의 형태로 함유된 부식 시스템, 예컨대 미국 특허 제4,452,775호, 동 제4,675,189호 및 동 제5,736,152호에 기재된 것, 및 (b) 활성 성분이 중합체로부터 제어된 속도로 침투하는 확산 시스템, 예컨대 미국 특허 제3,854,480호, 동 제5,133,974호 및 동 제5,407,686호에 기재된 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 일부가 이식에 대해 적합화된 펌프-기재의 하드웨어 전달 시스템이 사용될 수 있다.

[0137] 장기 지속적 방출 임플란트의 사용이 만성 증상의 치료를 위해 특히 적합할 수 있다. 본원에서 사용되는 장기 방출이란, 임플란트가 적어도 30일, 바람직하게는 60일 동안 치료적 수준의 활성 성분을 전달하도록 구축되고 배열된 것을 의미한다. 장기 지속적 방출 임플란트는 당업자에게 익히 공지되어 있고, 상기 기재된 방출 시스템을 일부 포함한다.

[0138] *카드헤린-11 수준의 검출 및 카드헤린-11 수준의 측정:*

[0139] 본원에서 논의된 바와 같이, 본 발명은 대상체가 섬유증을 가지고 있는지 (섬유증의 진단을 초래함) 또는 대상체에서 섬유증이 발생될지를 (섬유증의 예후를 초래함) 결정하기 위해, 대상체의 조직 또는 세포에서의 카드헤린-11 수준을 검출하는 것을 고려한다. 또한 상기 논의된 바와 같이, 진단 또는 예후는 다른 인자, 예컨대 섬유증과 동시에 발생하는 증상, 가족력 또는 환자 병력 (섬유증의 원인이 되거나 섬유증을 유발하는 것으로 공지된 병인학 인자에 대한 정보 포함)의 고려를 수반할 수 있다.

[0140] 카드헤린-11 수준의 검출은 카드헤린-11 게놈 DNA 수준, mRNA 수준, miRNA 수준 및/또는 단백질 수준을 검출하는 것을 포함할 수 있다. 상기 중 임의의 것을 검출하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, PCR, RT-PCR, 면역조직화학, FACS 분석, ELISA, 써던 분석, 노던 분석, 웨스턴 분석, 마이크로어레이 분석 등을 포함한다. 섬유증의 진단 및/또는 예후는 관심 조직 또는 세포 중에 비정상적으로 증가된 카드헤린-11 수준의 존재에 의해 제시될 수 있다. 비정상적으로 증가된 수준은, 비-섬유증인 정상적인 조직 (또는 조직의 절편) 또는 세포에서의 수준보다 높은 수준으로 정의된다. 따라서, 카드헤린-11의 수준이 비정상적으로 증가되었는지를 결정하기 위해, 전형적으로, 이를 정상적인 (비-섬유증) 조직 (또는 조직의 비-섬유증 영역) 또는 세포에서의 카드헤린-11 수준, 또는 카드헤린-11의 예정된 정상적인 수준과 비교한다. 주어진 조직에 대한 카드헤린-11의 예정된 정상적인 수준은 집단 연구 또는 다른 기왕 자료를 기초로 하여 얻을 수 있다. 따라서, 비교는 대상체의 조직 또는 세포에 엄격히 적용될 필요는 없다.

[0141] 대상체의 카드헤린-11 수준은 전형적으로, 대상체로부터 수거된 샘플로부터 측정된다. 샘플의 특성은 전형적으로 실재 또는 발생하기 쉽거나, 또는 실재하는 것으로 공지된 섬유증의 유형에 따라 좌우될 것이다. 예를 들어, 섬유증이 진피 섬유증인 경우, 샘플은 피부 샘플일 수 있다. 피부 "펀치(punch)" 샘플이 당업계에서 통상적이다. 또 다른 예로서, 섬유증이 폐 섬유증인 경우, 샘플은 예를 들어, 폐 생검, 절제된 폐 조직일 수 있거나 또는 기관지폐포세척액 (BAL) 샘플일 수 있다. 본 발명은 특히, 폐 섬유증을 가진 대상체에서, 카드헤린-11 발현 세포가 BAL 샘플에서 수득될 수 있는 폐포 대식세포 및 폐포 상피 세포를 포함한다는 예기치 않은 발견을 제공하였다. 이러한 샘플의 수거는 당업계에 공지되어 있다.

[0142] 카드헤린-11의 비정상적으로 증가된 수준은 정상 대조군 샘플에서의 수준보다 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 약 100% 높은 수준일 수 있다. 카드헤린-11 수준이 증가된 정도는 질환의 정도를 나타낼 수 있으므로, 낮은 증가된 수준은 질환 발병의 지표일 수 있고 높은 증가된 수준은 질환 확립의 지표일 수 있다.

[0143] 카드헤린-11은 본원에 기재된 카드헤린-11 길항제를 사용하여 검출되고 측정될 수 있는 것으로 이해되며, 이는 당업자에게 매우 명백할 것이다.

[0144] 하기 실시예는 예시 목적을 위해 도입된 것이지, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0145] **실시예**

[0146] *실시예 1:*

[0147] 카드헤린-11 수준이 폐 섬유증의 진행 중에 상향조절되었는지를 연구하기 위해, 블레오마이신-유도된 폐 섬유증 모델을 사용하였다. 야생형 마우스 (C57BL/6)에 기관내 경로를 통해 염수 (대조군) 또는 블레오마이신을 투여하였다. 블레오마이신 또는 염수를 투여한지 12일 후, 마우스를 인도적으로 희생시키고, 폐를 조직학 및 웨스턴 블롯 분석을 위해 처리하여 카드헤린-11이 상기 마우스 모델에서 폐 섬유증 동안에 증가하였는지를 측정하였다. 단백질 용해물을 전기영동에 의해 10% 아크릴아미드 겔 상에서 분리한 후, 이소형 대조군 항체, 항-카드헤린-11 항체 (인비트로젠) 또는 항-GAPDH 항체를 이용하는 웨스턴 블롯팅을 위해 막으로 이동시켰다. 야생형 및 카드헤린-11 널 섬유모세포-유사 윤활막세포를 카드헤린-11의 발현에 대한 양성 및 음성 대조군으로서 사용하였다. 블레오마이신 폐에서 카드헤린-11의 수준은 증가하였으나, GAPDH의 수준은 유사하였다 (도 1). 이들 데이터는, 카드헤린-11이 폐 섬유증의 진행 중에 증가하였음을 제시한다.

[0148] 카드헤린-11 염색의 세포내 국소화를 측정하기 위해, 조직을 조직학적 분석을 위해 처리하고, 카드헤린-11 또는 이소형 대조군에 대한 토끼 폴리클로날 항체를 사용하여 염색하였다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 블레오마이신을 기관내 투여받은 마우스로부터의 폐 절편은 섬유증 병소를 형성하는 영역에서 섬유모세포-유사 세포에 대한 카드헤린-11의 현저한 염색을 나타내었다 (적색 염색). 염수가 투여된 폐 절편에서는, 상기 영역 내에 카드헤린-11의 염색이 존재하지 않았다.

[0149] 이들 데이터들은 함께, 카드헤린-11 수준이 블레오마이신 유도된 폐 섬유증 모델의 섬유증 폐에서 초기에 (제12일) 증가하였음을 나타내고, 카드헤린-11이 섬유증의 발생에 관여할 수 있고 치료 표적으로서 작용할 수 있음을 강하게 시사한다.

[0150] *실시예 2:*

[0151] 이 실시예는 카드헤린-11 수준이 경피증 환자로부터의 피부 생검 및 특발성 폐 섬유증을 앓는 환자로부터의 폐에서 증가하였음을 입증한다. 유전적으로 카드헤린-11이 부족한 마우스 및 피부 및 폐 섬유증의 마우스 모델을 사용함으로써, 본 발명자들은 또한 카드헤린-11이 피부 및 폐에서의 섬유증의 중요한 매개자임을 입증하였다. 이들 데이터는 카드헤린-11이 피부 섬유증 및 폐 섬유증에 대한 치료 표적임을 나타낸다.

[0152] **방법:**

[0153] 인간 대상체. RNA 단리를 위해서, SSc 환자 및 자가면역 질환 병력이 없는 대조군 환자로부터 임상적으로 무관한 피부의 피부 생검 표본을 얻었다. 모든 SSc 환자는 SSc에 대한 미국 류마티스 학회(American College of Rheumatology) 기준을 충족시켰다.[16] 면역조직학 연구를 위한 피부 생검은 미국 국립 질환 연구 교류(National Disease Research Interchange)로부터 경피증 대상체 4명 및 경피증 없는 대상체 4명의 파라핀 매립 피부 생검으로서 얻었다.

[0154] 수술적 폐 생검 조직 샘플은 폐 조직 연구 연합(Lung Tissue Research Consortium)에서 얻었다. 폐활량측정, 병리적 조사 및 고해상도 CT 스캐닝에 따라 환자를 경증 IPF 및 중증 IPF로 분류하였다. 기관지폐포세척액 (BAL) 유체는, IPF 또는 섬유성 폐 질환 환자의 평가시에 통상의 임상적 목적을 위해 얻은 폐기된 BAL에서 구하였다. 본 연구는 휴스턴 소재 유니버시티 오브 텍사스 헬쓰 사이언스 센터(University of Texas Health Science Center)의 피험자 보호 위원회(Committee for the Protection of Human Subjects)의 승인을 받았다.

[0155] 마우스. 본 연구에는 6주 내지 10주령의 암컷 마우스를 사용했다. 카드헤린-11 널 마우스 및 대조군 B6:129 F1 이종교배 마우스를 휴스턴 소재 유니버시티 오브 텍사스 헬쓰 사이언스 센터의 동물 보호실에서 유지시켰다.[17] C57BL/6 야생형 마우스를 잭슨 래보러토리즈(Jackson Laboratories) (미국 메인주 바 하버)에서 구하였다. 모든 동물 프로토콜은 휴스턴 소재 유니버시티 오브 텍사스 헬쓰 사이언스 센터 동물 실험 관리 위원회의 승인을 받았다.

[0156] 블레오마이신 진피 섬유증 마우스 모델. 본 실험에는 6주 내지 10주령의 암컷 마우스를 사용했다. 28일 동안 마우스 1 마리 당 인산염 완충 염수 (PBS) 중에 용해한 필터-멸균 블레오마이신 0.02 u (테바 패렌터럴 메디슨즈(Teva Parenteral Medicines), 미국 캘리포니아주 어빈) 또는 PBS를 마우스의 면도된 등에 27-게이지 바늘로 매일 피하 주사 투여하였다. 실험 종료시에, 마우스를 인도적으로 희생시키고, 병변 피부에 분석을 위한 처리를 실시하였다.

[0157] 블레오마이신 폐 섬유증 모델. 본 실험에는 8주 내지 10주령의 암컷 마우스를 사용했다. 마우스를 아버틴

(250 mg/kg, 복강내)으로 마취시키고, 멸균 염수 50 ㎕ 중에 희석한 3.5 U/kg 블레오마이신 (테바 패렌터럴 메디슨즈, 미국 캘리포니아주 어빈) 또는 염수 단독을 기관내 점적주입하였다. 제21일에, 마우스를 인도적으로 희생시키고, 폐를 수거하여 분석하였다. 폐 수거 전에, PBS 0.4 ml의 3회 세척액으로 기관지폐포세척액을 얻었다. 이어서, 25 cm 압력에서 폐에 10% 완충 포르말린을 주입하고 4℃에서 밤새 고정시켰다.

[0158] 면역조직화학. 미국 국립 질환 연구 교류 (미국 펜실바니아주 필라델피아)로부터 4명의 SSc 환자 및 자가면역 질환의 공지된 병력이 없는 4명의 정상 대상체로부터의 피부 생검을 얻었다. 5 ㎛ 절편을 파라핀제거하여 재수화시키고 TBS-T 완충제 (트리스-완충 염수 및 0.1% Tween 20)에 담궈 표적 재생 용액 (다코(DAKO), 미국 캘리포니아주 카르핀테리아)으로 95℃에서 10분 동안 처리하였다. 카드헤린-11에 대한 토끼 폴리클로날 1차 항체 (인비트로젠 인크) 또는 이소형 매치된 대조군 항체 (에이비캠 인크.(Abcam Inc.), 미국 매사추세츠주 캠브릿지)를 사용하였다. 결합된 항체는 다코 사이토메이션 엔비젼 시스템(Dako Cytomation Envision System)-HRP (3,3-디아미노벤지딘 테트라히드로클로라이드)의 2차 항체를 사용하여 검출하였다. 절편을 헤마톡실린으로 대조염색하였다.

[0159] RNA 단리 및 정량적 실시간 PCR. RNALater (퀴아젠(Qiagen), 미국 캘리포니아주 발렌시아)에서 냉동시킨 조직 생검을 RNA 단리에 사용하였다. RNeasy 파이브로우스 티슈 미니 키트(Fibrous Tissue Mini Kit)를 제조업체 (퀴아젠, 미국 캘리포니아주 발렌시아)의 지침에 따라 사용하여 RNA를 단리하였다. RNA 농도 및 순도는 나노드랍(Nanodrop) 방법으로 결정하였다. 퀀티텍트(Quantitect) 역전사 키트를 제조업체 (퀴아젠, 미국 캘리포니아주 발렌시아)의 지침에 따라 사용하여, 1 마이크로그램의 전체 RNA로 cDNA를 합성하였다. 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)은 특정 관심 유전자에 대해 검증된 태크만(TaqMan) 유전자 발현 검정을 이용하여 수행하였고, 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 7900HT 패스트 리얼-타임 PCR 시스템(Fast Real-Time PCR System) (어플라이드 바이오시스템즈 인크(Applied Biosystems Inc))에서 시클로필린 (어플라이드 바이오시스템즈 인크)에 표준화하였다. 시클로필린을 내인성 대조군으로 사용하여 각 샘플의 전체 RNA의 전사체 수준을 표준화하였다. 데이터는 비교용 CT 방법 (2-ddCT 방법)을 이용하여 SDS 2.3 소프트웨어로 분석하였다. 변화 배수를 2ddCT로서 계산하였다.

[0160] 카드헤린-11 siRNA 넉다운. A549 세포 (ATCC)를 96웰 플레이트에 접종하고, 10% FBS 및 1% 항생제를 함유하는 DMEM 중에서 밤새 성장시켰다. Cdh11의 siRNA 넉다운을 위해서, 세포를 항생제 무함유 배지로 세척한 후에 리포펙타민(Lipofectamine) RNAiMax (인비트로젠) 및 비-표적화 siRNA 또는 인간 Cdh11 siRNA (안티센스 서열: 5'-UUUGAAUGGAGUCAUAAGGUU) (서열 4) (다르마콘 RNAi 테크놀로지스(Dharmacon RNAi Technologies), 써모(Thermo)) 함유 옵티멤(Optimem) (인비트로젠)과 48시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 트립신처리하고 항생제 무함유 배지에 재접종했다. 6시간 후, 세포를 0.1% BSA를 함유하는 DMEM 중에서 밤새 혈청-고갈시켰다. 이어서, 세포를 24시간 동안 0.1% BSA를 함유하는 DMEM 중 10 ng/ml의 TGF-β로 자극하거나 이것 없이 두었다. 셀 투 씨티(Cell to Ct) 시약 (앰비온(Ambion))을 제조업체의 지침에 따라 사용하여 RNA를 단리하였다. CDH11, COL1A1, N 카드헤린 (Cdh2) 및 E 카드헤린 (Cdh1)의 전사체를 상응하는 태크만 프로브 (어플라이드 바이오시스템즈)로 수득하고, 대조군과 비교한 평균 변화 배수로서 제시하였다. BX60 역위 위상차 현미경 (올림푸스(Olympus))으로 A549 세포의 영상화를 수행하여 세포 형태를 결정하였다.

[0161] **결과:**

[0162] 경피증 피부에서의 카드헤린-11 상향조절. 카드헤린-11이 건강한 대조군 대상체에서보다 경피증 환자의 피부 생검에서 더 높은 수준으로 발현하는지의 여부를 결정하기 위해서, 6명의 경피증 환자 및 9명의 건강한 대조군 대상체 팔 윗쪽의 3 mm 피부 생검으로부터 RNA를 단리하였다. 카드헤린-11 및 2가지 섬유증 관련 유전자 (Col1a1 및 CTGF)의 발현 수준을 정량적 실시간 PCR로 결정하였다. 예상대로, 경피증 생검은 건강한 대조군 생검에 비해 Col1a1 및 CTGF의 수준이 더 높았다 (도 3 참조). 본 발명자들의 가설과 동일하게, 카드헤린-11의 발현 수준 또한 건강한 대조군 대상체에 비해 경피증 피부 생검에서 증가되었다. 이러한 데이터는 카드헤린-11 발현이 경피증 환자의 피부에서 증가된다는 것을 입증한다.

[0163] 이러한 데이터는 면역조직학적 연구에서 카드헤린-11에 특이적인 항체를 사용한 피부 생검의 염색으로 확대되고 확인되었다 (도 4 참조). 도 4에 나타난 바와 같이, 건강한 대조군의 피부 생검 염색은 정상 피부 진피의 섬유모세포에서는 카드헤린-11 염색이 일어나지 않음을 보여주었다 (도 4a는 저배율의 정상 피부, 도 4b는 보다 고배율의 정상 피부). 반대로, 경피증 환자의 피부 진피에 위치한 섬유모세포에서는 카드헤린-11 발현이 나타났다 (적갈색 색상) (도 4c는 저배율의 경피증 피부, 도 4d, e는 보다 고배율의 경피증 피부). 이러한 데이터를 종합하면, 카드헤린-11 발현이 건강한 대조군 피부에 비해 경피증 피부에서 증가되고, 이러한 발현이 경피증 생

검의 진피 섬유모세포에 주로 국소화된다는 것이 입증된다.

[0164] 카드헤린-11 결핍 마우스에서는 진피 섬유증이 덜 발병함. 경피증 피부에서 카드헤린-11의 발현이 증가하였기 때문에, 이제 본 발명자들은 카드헤린-11이 진피 섬유증의 발병에서 중대한 역할을 수행하는지의 여부를 결정하고자 하였다. 블레오마이신 유도된 진피 섬유증 모델은 널리 수용되는 피부 섬유증 모델로서, 피부 섬유증 및 경피증의 발병에 관한 추가의 이해를 위해 사용되었다. 카드헤린-11 결핍 마우스는 브리검 앤드 우먼즈 하스피털(Brigham and Women's Hospital)의 허가하에 구하였다 (마이클 브레너(Michael Brenner)의 실험실). 상기한 방법 섹션에 기재한 바와 같이, 이들 마우스에게 블레오마이신 또는 PBS를 28일 동안 피하 주사하였다. 제28일에는 마우스를 인도적으로 희생시키고, 피부에 조직학 연구 및 정량적 연구를 위한 처리를 수행하여 진피 섬유증 및 세포외 매트릭스 침착의 정도를 결정하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 블레오마이신을 28일 동안 주사한 야생형 마우스 (Wt) (도 5a)에서는 PBS를 주사한 Wt 마우스 (도 5c)보다 진피 층 두께가 증가했다 (화살표). 흥미롭게도, 블레오마이신을 주사한 카드헤린-11 (cad-11 KO) 마우스 (도 5d)에서는 블레오마이신을 주사한 PBS 주사된 야생형 마우스에 비해 진피 두께의 증가가 감쇠되었다. 이러한 데이터는, 피부 생검마다 5군데 무작위 영역에서 진피 두께를 측정하여 도 6a에 정량하여 나타냈다. 조직학 사진과 유사하게, 이러한 데이터는 블레오마이신을 28일 동안 매일 주사한 경우에 카드헤린-11 결핍 마우스에서는 Wt 마우스보다 진피 섬유증이 덜 발병한다는 것을 입증한다. 마지막으로, 차이를 추가로 정량하기 위해서, 진피 섬유증의 중요 세포외 매트릭스 성분인 콜라겐의 양을 시르콜 검정으로 정량하였다. 도 6b에 나타난 바와 같이, 블레오마이신 주사는 야생형 마우스에서 콜라겐의 양을 증가시켰고, 카드헤린-11 결핍 마우스에서는 블레오마이신의 피부 주사시에 진피 콜라겐 함량의 증가가 두드러지게 감쇠되었다. 이러한 데이터는 진피 섬유증의 발병시에 카드헤린-11이 피부에서 발현되는 중대한 분자임을 설득력있게 입증한다.

[0165] 도 3 내지 도 6의 데이터를 종합하면, 경피증 환자의 피부에서 카드헤린-11 발현이 증가하고 카드헤린-11은 경피증의 마우스 모델에서 진피 섬유증의 중대한 매개자라는 것이 입증된다. 이러한 데이터는 카드헤린-11이 진피 섬유증 및 경피증의 치료 표적임을 강력하게 뒷받침한다.

[0166] 폐 섬유증. 간질성 폐 질환 환자에서의 카드헤린-11 발현 및 국소화. 경피증 환자의 피부에서와 유사하게 폐 섬유증 환자의 폐에서도 카드헤린-11 발현이 증가되는지 여부를 결정하기 위해서, 중증 기도 제한을 갖는 특발성 폐 섬유증 (IPF) 환자 및 정상적인 폐 기능의 IPF 환자 (경증 IPF 폐를 "대조군"으로 사용함)의 폐에서 전체 RNA를 단리하고 카드헤린-11 mRNA 수준을 평가하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, 중증 IPF 환자의 폐 조직에서는 섬유증 세포외 매트릭스의 주요 성분인 유형 I 콜라겐 (Col1a1)의 수준이 증가했다. 본 발명자들의 가설과 일치하게, 중증 IPF 환자의 폐 조직에서는 카드헤린-11의 수준이 증가하였다.

[0167] 토끼 폴리클로날 항-카드헤린-11 항체로 면역국소화를 수행하여 IPF 환자의 폐에서 카드헤린-11을 발현하는 세포형을 결정하였다. 경증 IPF 환자 (도 6a)에서는 카드헤린-11이 오직 폐포 대식세포에서만 발현되었다. 중증 IPF 환자에서 확인된 카드헤린-11 발현 세포형은 폐포 대식세포 (도 8c)였으나, 또한 섬유증 밀집부에 인접한 증식성 폐포 상피 세포 (AEC)에서도 매우 현저하게 발현되었다 (도 8b). 도 7 및 8의 데이터를 종합하면, 카드헤린-11 발현은 질환 중증도와 관련이 있으며, 이것은 질환에 걸린 환자의 폐에서 증식성 AEC 및 폐포 대식세포 둘다에서 발현됨을 나타낸다.

[0168] 폐 섬유증의 블레오마이신-유도 마우스 모델에서의 카드헤린-11 발현. 기관내 블레오마이신 모델은 폐 섬유증 및 특발성 폐 섬유증의 메카니즘 연구를 위해 통상 사용되는 동물 모델이다. 이 모델에서의 카드헤린-11 역할을 조사하기 위한 초기의 특징규명은, 기관내 염수 또는 블레오마이신이 투여된 야생형 마우스에서 카드헤린-11에 대한 면역국소화를 이용하여 수행되었다. IPF 인간 대상체와 유사하게, 블레오마이신이 투여된 마우스 폐에서의 면역조직화학은 증식성 AEC 및 폐포 대식세포에서 카드헤린-11 발현이 현저함을 보여주었다 (도 9). 이러한 결과는 상기 마우스 모델과 인간 사이의 유사성을 입증하고, 카드헤린-11-의존성 섬유증의 메카니즘 연구에 있어서 이들 세포형의 분석을 뒷받침한다.

[0169] 폐 섬유증에 대한 카드헤린-11의 기여. 중증 IPF 폐 및 블레오마이신 폐 섬유증 모델의 폐에서 카드헤린-11의 발현이 증가하였기 때문에, 이제 본 발명자들은 카드헤린-11이 폐 섬유증의 발병에 관여하는지의 여부를 결정하고자 하였다. 폐 섬유증에 대한 카드헤린-11의 기여를 조사하기 위해서, 카드헤린-11 결핍 마우스 ($Cdh11^{-/-}$)에게 기관내 블레오마이신을 투여하고 블레오마이신을 투여한 야생형 마우스와 비교하였다. 모든 종점은 블레오마이신 또는 염수 점적주입 후 제21일에 평가하였다. H&E 염색 결과, 염수가 투여된 야생형 (WT) 마우스와 $Cdh11^{-/-}$ 마우스 사이에는 폐 조직학상 검출가능한 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 10a 및 b). 블레오마이신이 투여된 야생형 (WT) 마우스의 폐 절편 조사는 염증, 섬유증 밀집부 및 정상적인 폐포 구조의 파괴를 비롯하

여 폐 섬유증과 일치하는 표준 조직병리학적 특징을 나타냈다 (도 10c). 이러한 조직학적 종점은 Cdh11 $^{-/-}$ 마우스에서 실질적으로 감소되었다 (도 10d).

[0170] 조직학적 절편의 마송 삼색 염색 (매트릭스는 청색으로 염색되고, 세포는 적색으로 염색됨)은 콜라겐 침착이 블레오마이신이 투여된 야생형 마우스에서는 증가되고 블레오마이신이 투여된 Cdh11 $^{-/-}$ 마우스에서는 감소됨을 입증한다 (도 11a 및 b). 근육섬유모세포의 마커인 알파-평활근 액틴의 IHC 분석도 수행하였다. 근육섬유모세포는 섬유증 발병에 있어서 핵심적인 세포 매개자로 염증성 시토카인 및 세포외 매트릭스를 생성한다. 블레오마이신이 투여된 야생형 마우스에서는 알파-평활근 액틴 염색 세포의 수가 증가되었지만 (도 11c), Cdh11 $^{-/-}$ 마우스의 알파-평활근 액틴 염색 세포 수 (도 11d)는 야생형 마우스에 비해 두드러지게 감소되었다. 도 11의 데이터는 카드헤린-11이 이러한 마우스 모델의 폐 섬유증에서 중대한 매개자라는 가설을 뒷받침한다.

[0171] 기관내 블레오마이신이 투여된 Cdh11 $^{-/-}$ 마우스에서의 폐 섬유증 감쇠를 추가로 정량하기 위해서, 염수 또는 블레오마이신이 투여된 야생형 및 Cdh11 $^{-/-}$ 마우스의 기관지폐포 (BAL) 유체에서 시르콜 검정을 이용하여 콜라겐 수준을 결정하였다. 도 12a에 나타난 바와 같이, 기관내 블레오마이신은 야생형 마우스의 BAL 유체에서 콜라겐 양을 유의하게 증가시켰다. 반대로, 블레오마이신이 투여된 Cdh11 $^{-/-}$ 마우스의 BAL 유체에서는 야생형 마우스에 비해 콜라겐 함량이 통계적으로 유의하게 감소되었다. 마지막으로, 본 발명자들은 상기 모델에서 폐의 H&E 염색된 절편에 대한 폐 섬유증의 양 정량에 통상 이용되는 스코어링 방법인 애쉬크로프트 스코어를 이용하였다. 도 12b에 나타난 바와 같이, 기관내 블레오마이신이 유의하게 투여된 야생형 마우스의 폐는 블레오마이신이 투여된 Cdh11 $^{-/-}$ 마우스의 폐에 비해 스코어가 유의하게 더 높았다. 도 10 내지 12의 데이터를 종합하면, 카드헤린-11이 폐 섬유증의 중대한 매개자임이 명확하게 입증된다. 인간 IPF 폐에서 카드헤린-11의 수준이 증가했기 때문에, 이러한 데이터는 카드헤린-11이 폐 섬유증에 대한 치료 표적임을 뒷받침한다.

[0172] CDH11 차단 항체의 전신 전달은 수립된 폐 섬유증을 개선시킴. 도 10 내지 12의 데이터는 블레오마이신 유도된 섬유증 모델에서 Cdh11 $^{-/-}$ 마우스의 폐 섬유증 반응이 감쇠되었음을 명확하게 입증한다. 야생형 및 Cdh11 $^{-/-}$ 마우스의 폐에 육안으로는 조직학적 차이가 없지만, 카드헤린-11의 차단이 또한 폐 섬유증을 감소시키는지의 여부를 결정하는 것은 중요하다. 추가로, Cdh11 $^{-/-}$ 마우스 연구로 뒷받침된 바와 같이, 카드헤린-11 차단이 폐 섬유증의 치료에 효과적인지, 섬유증의 발병 예방에만 효과적인 것이 아닌지의 여부를 결정하는 것도 관심이 있다. 블레오마이신 모델에서의 폐 섬유증은 블레오마이신 점적주입 후 적어도 7일이 지난 후에 수립된 것이다 (문헌 [A. Moeller et al., Int Journal of Biochem and Cell Biol. 2008]). 따라서, 수립된 섬유증을 갖는 마우스가 카드헤린-11의 표적화에 의해 성공적으로 치료될 수 있는지의 여부를 결정하기 위해서, 야생형 마우스에게 블레오마이신을 점적주입하고 10일이 지난 후에 시작하여 2종의 전신 카드헤린-11 차단 항체 (클론 23C6 또는 13C2) 중 하나를 투여했다.

[0173] 야생형 마우스에게 기관내 블레오마이신을 투여했다. 제10일에, 섬유증이 이미 수립된 경우에는 마우스에게 23C6, 13C2 또는 이소형 대조군 항체를 복강내 경로로 500 ㎍ 투여한 후에 항체 100 ㎍을 제21일까지 격일로 IP 투여했다. 마우스를 희생시키고, 폐에 조직학을 위한 처리를 실시하였다. H&E 염색된 폐 절편 (도 13)은 폐 섬유증이 블레오마이신 및 이소형 항체가 투여된 야생형 마우스에서 발병하였고, 블레오마이신 및 이후 제10일에 출발하여 23C6 또는 13C2를 IP 투여한 야생형 마우스에서는 두드러지게 감쇠되었음을 입증하였다.

[0174] 이러한 실험에서의 추가 분석은, 블레오마이신 모델에서 23C6 및 13C2가 기존의 폐 섬유증 치료 능력을 가짐을 확인시켜주었다. 도 14에 나타난 바와 같이, 마송 삼색으로 염색된 폐 절편은 세포외 매트릭스의 현저한 침착 증가가 블레오마이신 및 이소형 항체가 투여된 야생형 마우스의 폐에서 발생하였고, 블레오마이신 및 이후 제10일에 출발하여 23C6 또는 13C2를 IP 투여한 야생형 마우스에서는 두드러지게 감쇠되었음을 입증하였다. 추가로, 근육섬유모세포의 마커인 알파 평활근 액틴의 염색은 항-카드헤린-11 모노클로날 항체 13C2 및 23C6이 이소형 대조군 항체에 비해 기관내 블레오마이신이 투여된 마우스의 폐에서 근육섬유모세포의 수를 효과적으로 감소시킨다는 것을 입증하였다. 마지막으로, 13C2 또는 23C6 항-카드헤린-11 모노클로날 항체 처치된 마우스의 BAL 유체에 대한 시르콜 검정으로 결정했을 때, 가용성 콜라겐 수준은 이소형 대조군 항체가 투여된 마우스에 비해 유의하게 감소되었다. 이러한 결과는 Cdh11 $^{-/-}$ 마우스에서 CDH11이 폐 섬유증에 기여한다는 발견을 확인시켜 주며, 블레오마이신 유도된 섬유증 모델에서 카드헤린-11 차단 항체의 전신 전달이 수립된 폐 섬유증을 성공적으로 치료함을 입증한다.

[0175] 상피-중간엽 전이 (EMT). EMT는 섬유증 발병과 관련이 있고, TGF베타는 이러한 전이 과정에서 소정의 역할을 수행할 수 있다. EMT 동안에 E-카드헤린의 발현이 감소되고/되거나 사라진다는 것은 공지되어 있다. 도 15는 TGF베타가 폐 상피 세포주인 A549 세포에서 카드헤린-11의 발현을 증가시킨다는 것을 보여준다. 추가로, Col1a1의 발현은 증가되고, E-카드헤린의 발현은 감소되고 (예상한 바와 같음), N-카드헤린의 발현 또한 증가된다. 도 16 및 17은 예를 들어 카드헤린-11 특이적 siRNA를 사용하여 카드헤린-11 발현을 A549 세포에서 차단시킨 경우에는 상기 세포가 TGF베타에 의해 자극되어 TGF베타에 의한 Col1a1 발현의 상향조절이 매우 크게 감소된다는 것을 보여준다. 추가로, 위상차 현미경검사를 이용하면, siRNA를 사용한 카드헤린-11 넉다운이 TGF베타에 의해 유도된 중간엽 표현형의 발생을 예방한다는 것이 명확하다. TGF베타의 존재하에, A549 세포는 세포-세포 접촉을 상실하고 방추형이 되며 퍼진다. siRNA를 사용한 카드헤린-11의 수준 감소는 이러한 표현형 변화를 줄이며, 이는 카드헤린-11 siRNA가 EMT를 차단하고 카드헤린-11이 EMT에 관여하며 EMT를 잠재적으로 매개한다는 것을 뒷받침한다. 도 18은 카드헤린-11이 또한 핵심적인 EMT 전사 인자인 SNAIL2의 TGF베타-유도된 상향조절을 차단한다는 것을 추가로 보여준다.

[0176] **참고문헌**

1. Mayes MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. Arthritis Rheum 2003; 48(8):2246-2255.
2. Wilson L. Cost-of-illness of scleroderma: the case for rare diseases. Semin Arthritis Rheum 1997; 27(2):73-84.
3. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, III, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. Annu Rev Med 2004; 55:395-417.
4. Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. Clin Immunol 2001; 99(3):308-319.
5. Wagner GR. Asbestosis and silicosis. Lancet 1997; 349(9061):1311-1315.
6. Vanhee D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C, Tonnel AB. Mechanisms of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis. Increased production of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor type I, and transforming growth factor beta and relationship to disease severity. Am J Respir Crit Care Med 1994; 150(4):1049-1055.
7. Abid SH, Malhotra V, Perry MC. Radiation-induced and chemotherapy-induced pulmonary injury. Curr Opin Oncol 2001; 13(4):242-248.
8. Steen VD, Owens GR, Fino GJ, Rodnan GP, Medsger TA, Jr. Pulmonary involvement in systemic sclerosis (scleroderma). Arthritis Rheum 1985; 28(7):759-767.
9. Majumdar S, Li D, Ansari T et al. Different cytokine profiles in cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis: a quantitative study of open lung biopsies. Eur Respir J 1999; 14(2):251-257.
10. Lewis MJ, Lewis EH, III, Amos JA, Tsongalis GJ. Cystic fibrosis. Am J Clin Pathol 2003; 120 Suppl:S3-13.
11. Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma. J Clin Invest 2003; 111(3):291-297.
12. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. Am J Respir Crit Care Med 1994; 150(4):967-972.
13. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2006; 174(7):810-816.

[0177]

14. Panos RJ, Mortenson RL, Niccoli SA, King TE, Jr. Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: causes and assessment. Am J Med 1990; 88(4):396-404.
15. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Ann Intern Med 2001; 134(2):136-151.
16. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Arthritis Rheum 1980; 23(5):581-590.
17. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. Science 2007; 315(5814):1006-1010.

[0178]

[0179] **등가물**

[0180] 본 발명의 여러 실시양태를 본원에 기재하고 예시하였지만, 당업자는 기능을 수행하고/거나 본원에 기재된 결과

및/또는 하나 이상의 이득을 얻기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 쉽게 계획할 것이며, 이러한 변화 및/또는 변형 각각은 본원에 기재된 본 발명의 실시양태의 범위 내에 속하는 것으로 간주된다. 보다 일반적으로, 당업자는 본원에 기재된 모든 파라미터, 치수, 물질 및 배열이 예시를 위한 것이며, 실제의 파라미터, 치수, 물질 및/또는 배열은 본 발명의 교시내용이 이용되는 특정 용도(들)에 따라 달라질 것임을 쉽게 인지할 것이다. 당업자는 일상적인 실험의 한도 내에서 이를 이용하여 본원에 기재된 본 발명의 특정 실시양태의 다수의 동등물들을 이해하거나 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 전술한 실시양태는 단지 예로서 제시된 것이며, 본 발명의 실시양태는 첨부된 특허청구범위 및 동등물의 범위 내에서 구체적으로 기재 및 청구된 것 이외에 다른 방식으로도 실행될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 본 개시내용의 발명의 실시양태는 본원에 기재된 각각의 개별 특징, 시스템, 용품, 물질, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 둘 이상의 이러한 특징, 시스템, 용품, 물질, 키트 및/또는 방법의 임의의 조합은, 이러한 특징, 시스템, 용품, 물질, 키트 및/또는 방법이 상호 모순되지 않는 경우에 본 개시내용의 발명의 범위 내에 포함된다.

[0181] 본원에서 정의되고 사용된 바와 같이, 모든 정의는 사전적 정의, 참고로 포함되는 문헌에서의 정의 및/또는 정의된 용어의 통상적 의미 전반에서 의미되는 것으로 이해되어야 한다.

[0182] 본원에 개시된 모든 참조문헌, 특허 및 특허 출원은 각각이 인용된 해당 내용과 관련하여 참고로 포함되고, 일부 경우에는 문헌 전체가 포함될 수 있다.

[0183] 본원에서 본 명세서 및 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 부정 관사 "a" 및 "an"은 명확하게 반대로 표시되지 않는 경우에 "하나 이상"을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0184] 본원에서 본 명세서 및 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 어구 "및/또는"은 언급된 구성요소 중 "하나 또는 둘다", 즉 어떤 경우에는 함께 존재하고 다른 경우에는 따로 존재하는 구성요소를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "및/또는"과 함께 열거된 다수의 구성요소는 동일한 방식으로, 즉 언급된 구성요소 중 "하나 이상"으로 해석되어야 한다. 다른 구성요소는, 구체적으로 확인되는 구성요소와 관련이 있든 없든 간에 임의로 "및/또는" 절에 의해 구체적으로 확인되는 구성요소 이외의 것일 수 있다. 따라서, 비제한적인 예로서, "A 및/또는 B"라는 언급은 개방형 술어, 예컨대 "포함하는"과 함께 사용되는 경우에 한 실시양태에서는 오직 A만 언급 (B 이외의 구성요소를 임의로 포함함)하고 또 다른 실시양태에서는 오직 B만 언급 (A 이외의 구성요소를 임의로 포함함)하고 또 다른 실시양태에서는 A와 B 둘다를 언급 (다른 구성요소를 임의로 포함함)하는 식일 수 있다.

[0185] 본원에서 본 명세서 및 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, "또는"은 상기 정의된 바와 같은 "및/또는"과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록에서 항목들을 분리하는 경우에 "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인 것으로, 즉 하나 이상을 포함하는 것 뿐만이 아니라 하나 초과의 수 또는 구성요소 목록, 및 임의로는 열거되지 않은 추가 항목을 포함하는 것으로 해석될 것이다. 명확하게 반대로 지시되는 용어, 예컨대 "~ 중 오직 하나" 또는 "~ 중 정확히 하나", 또는 특허청구범위에서 사용되는 경우에는 "~로 이루어진"은 수 또는 구성요소 목록 중 정확히 하나의 구성요소를 포함한다는 것을 의미할 것이다. 일반적으로, 본원에 사용된 바와 같이 용어 "또는"은, 배타성이 있는 용어, 예컨대 "둘 중 하나", "~ 중 하나", "~ 중 오직 하나" 또는 "~ 중 정확히 하나"가 이어지는 경우에 배타적 대안 (즉, "둘 중 특정 하나 또는 다른 하나이지만 둘다는 아님")을 나타내는 것으로만 해석될 것이다. "본질적으로 ~로 이루어진"은 특허청구범위에서 사용되는 경우에 이것이 특허법 분야에서 사용되는 바와 같은 통상적 의미를 가질 것이다.

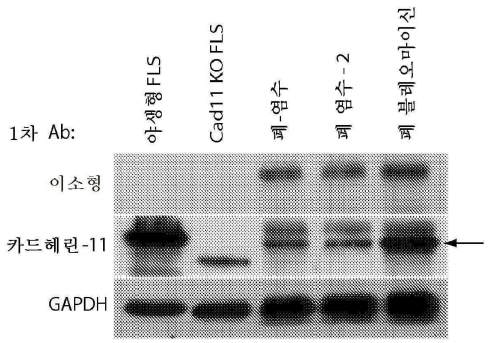
[0186] 본원에서 본 명세서 및 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 하나 이상의 구성요소 목록을 언급하며 사용된 어구 "하나 이상"은 그 구성요소 목록에서 구성요소 중 임의의 하나 이상으로부터 선택된 하나 이상의 구성요소를 의미하지만, 그 구성요소 목록 내에 구체적으로 열거된 각각의 모든 구성요소 중 하나 이상을 반드시 포함하는 것은 아니며, 구성요소 목록 내 구성요소의 어떠한 조합도 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 상기 정의는 어구 "하나 이상"이 지칭하는 구성요소 목록 내에서 구체적으로 확인되는 구성요소 이외의 구성요소가 구체적으로 확인되는 구성요소와 관련이 있든 없든 간에 임의로 존재할 수 있게 한다. 따라서, 비제한적인 예로서, "A 및 B 중 하나 이상" (또는 동등하게는 "A 또는 B 중 하나 이상", 또는 동등하게는 "A 및/또는 B 중 하나 이상")은 한 실시양태에서는 하나 이상 (임의로 하나 초과 포함)의 A (B는 존재하지 않음) (및 B 이외의 구성요소를 임의로 포함함)를 언급하고 또 다른 실시양태에서는 하나 이상 (임의로 하나 초과 포함)의 B (A는 존재하지 않음) (및 A 이외의 구성요소를 임의로 포함함)를 언급하고 또 다른 실시양태에서는 하나 이상 (임의로 하나 초과 포함)의 A 및 하나 이상 (임의로 하나 초과 포함)의 B (및 다른 구성요소를 임의로 포함함)를 언급하는 식일 수 있다.

[0187] 또한, 반대로 명확하게 나타내지 않는 한, 하나 초과의 단계 또는 실시를 포함하는 본원 청구의 임의의 방법에서는 그 방법의 단계 또는 실시의 순서가 반드시 상기 방법의 단계 또는 실시가 언급된 순서로만 제한될 필요가 없음을 이해해야 한다.

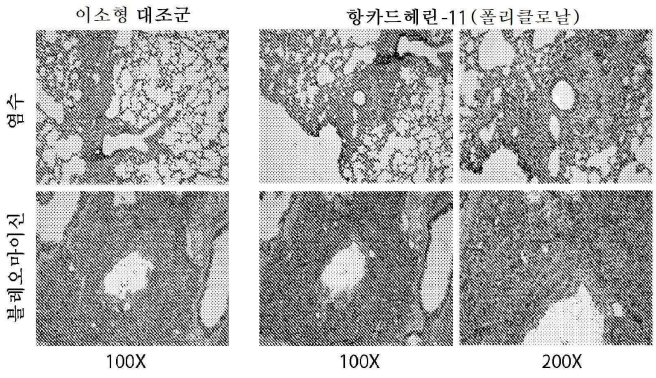
[0188] 특허청구범위 및 또한 상기 명세서에서, "포함하는", "비롯한", "보유한", "갖는", "함유하는", "수반하는", "보유하는", "~으로 된" 등과 같은 모든 연결 어구는 개방형, 즉 이러한 것들을 포함하지만 그에 제한되지 않는 것을 의미한다는 것을 이해해야 한다. 미국 특허청 특허 심사 절차 매뉴얼, 섹션 2111.03에 기재된 바와 같이, 오직 "~으로 이루어진" 및 "본질적으로 ~으로 이루어진"의 연결 어구만이 각각 폐쇄형 또는 반-폐쇄형 연결 어구이다.

도면

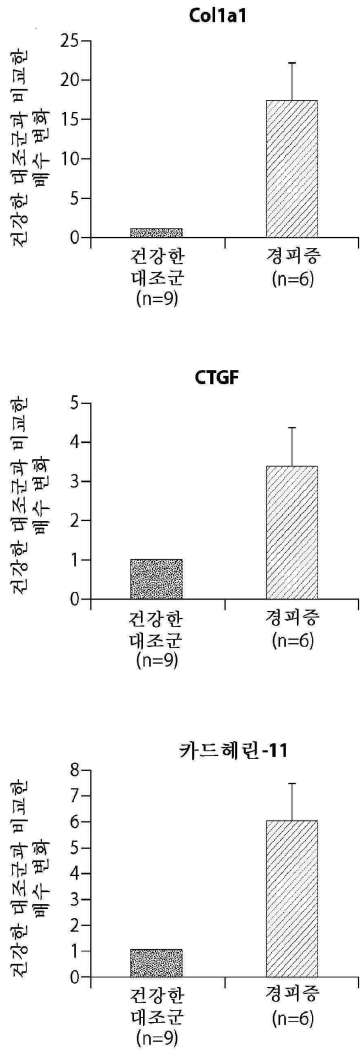
도면1



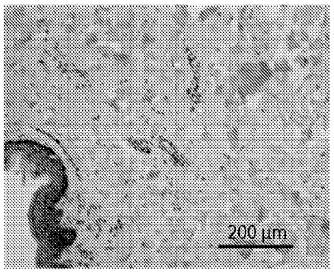
도면2



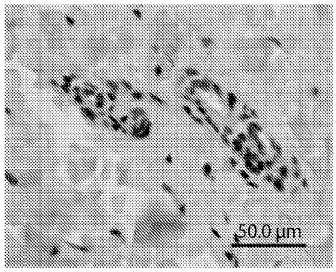
도면3


Col1a1
건강한 대조군과 비교한 배수 변화
25
20
15
10
5
0
건강한 대조군 (n=9)
경피증 (n=6)
CTGF
건강한 대조군과 비교한 배수 변화
5
4
3
2
1
0
건강한 대조군 (n=9)
경피증 (n=6)
카드헤린-11
건강한 대조군과 비교한 배수 변화
8
7
6
5
4
3
2
1
0
건강한 대조군 (n=9)
경피증 (n=6)

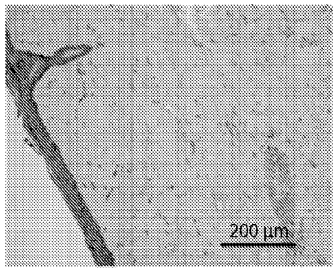
도면4a


200 μm

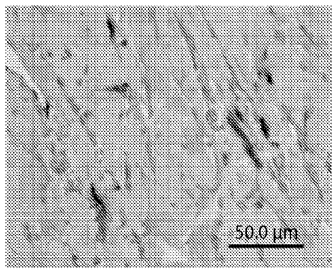
도면4b



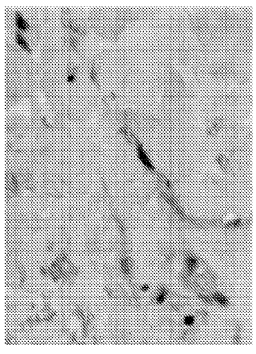
도면4c



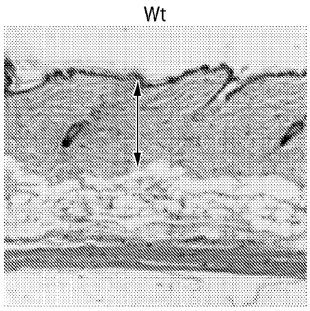
도면4d



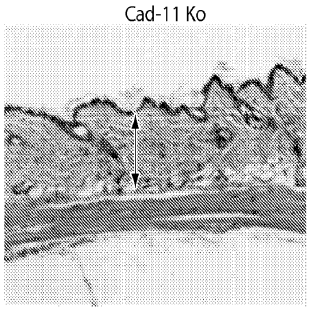
도면4e



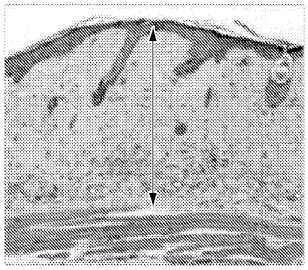
도면5a



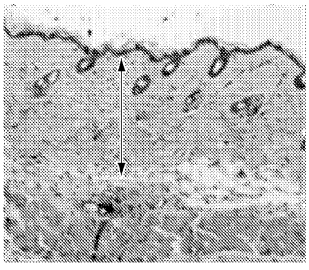
도면5b



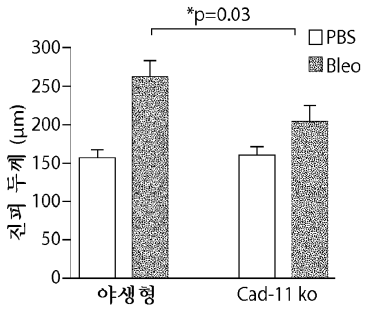
도면5c



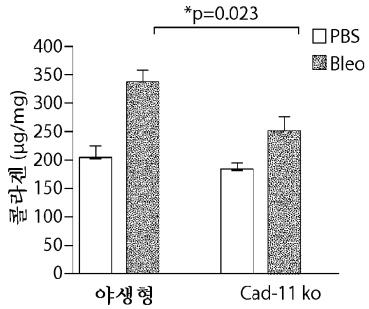
도면5d



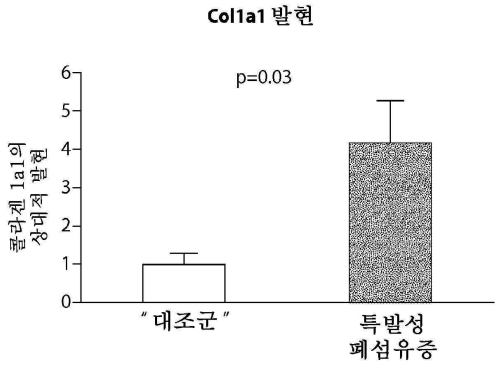
도면6a

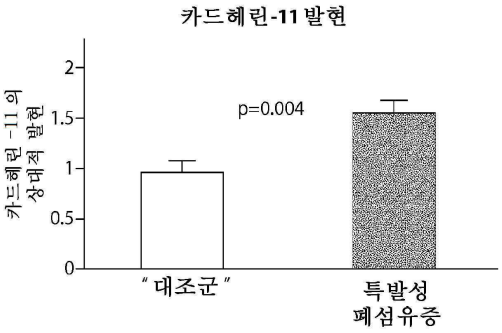


도면6b

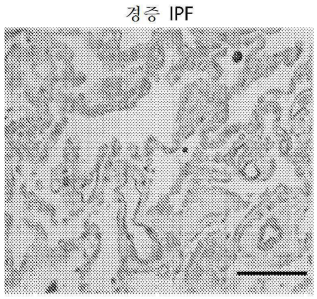


도면7

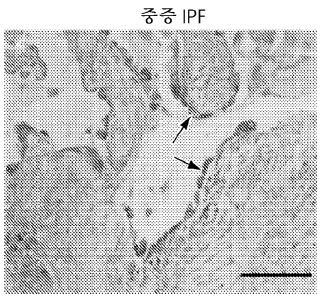




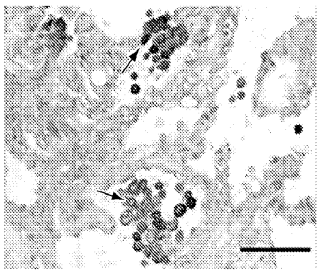
도면8a



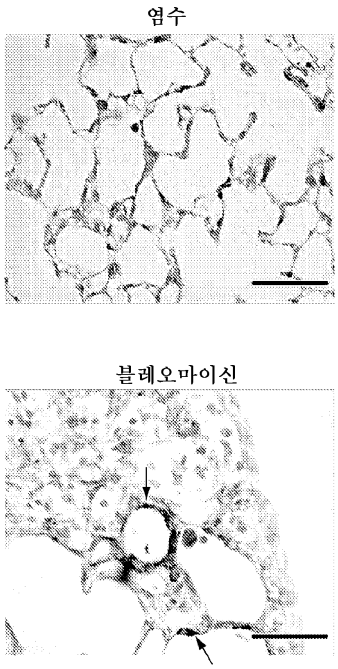
도면8b



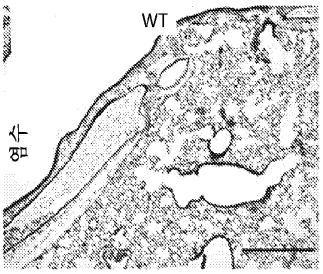
도면8c



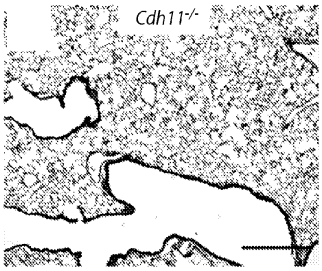
도면9



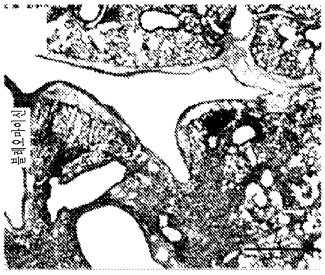
도면10a



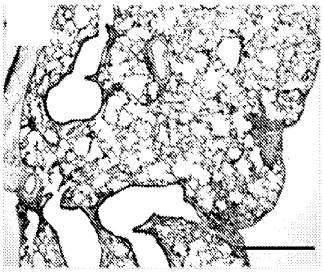
도면10b



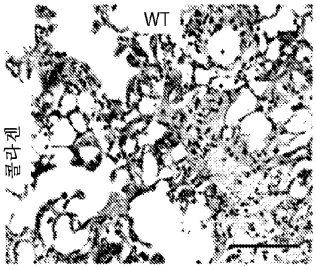
도면10c



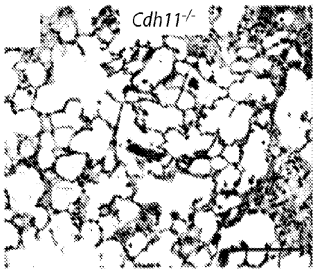
도면10d



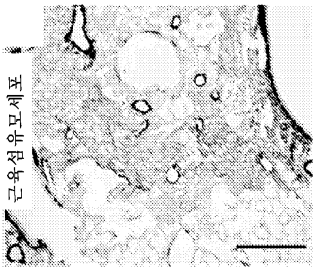
도면11a



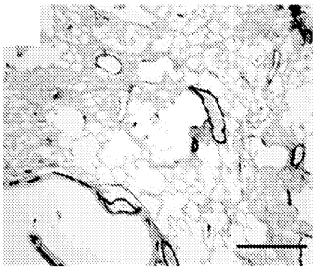
도면11b



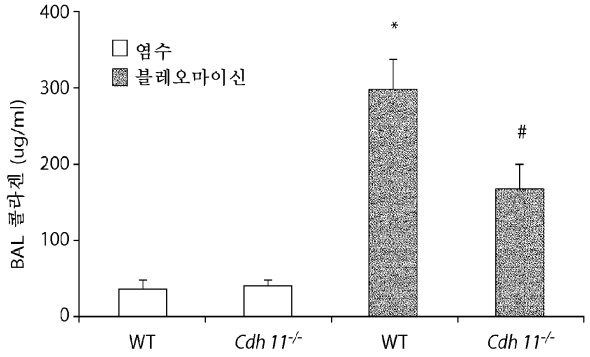
도면11c



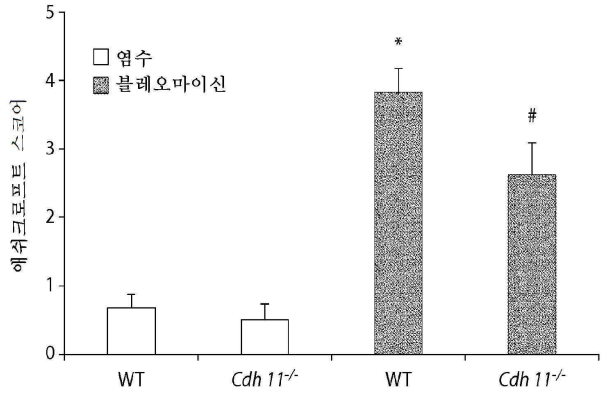
도면11d



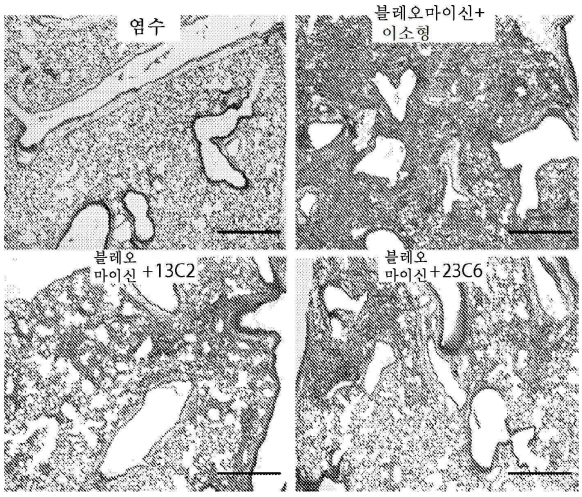
도면12a



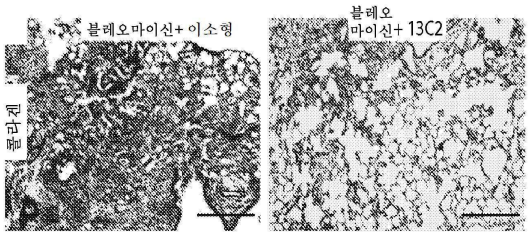
도면12b



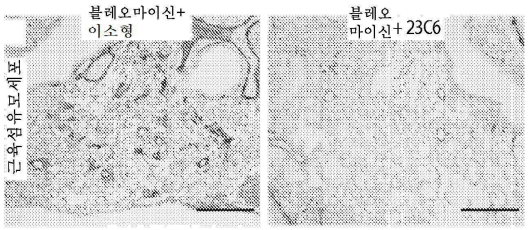
도면13



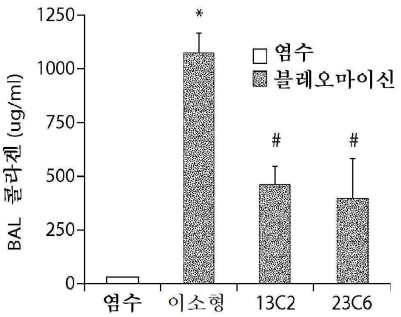
도면14a



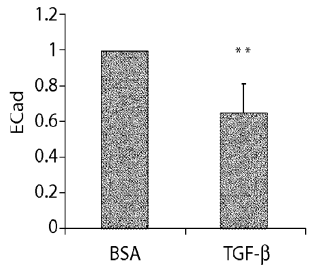
도면14b



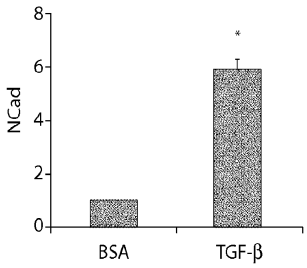
도면14c



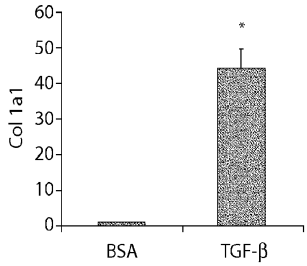
도면15a



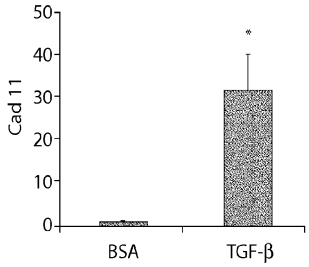
도면15b



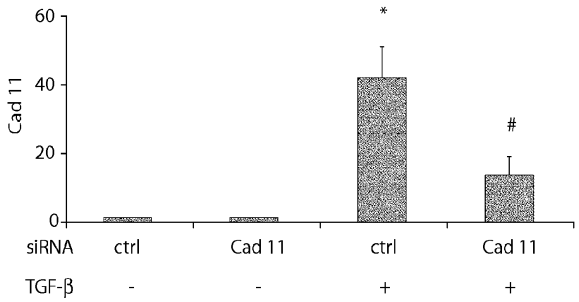
도면15c



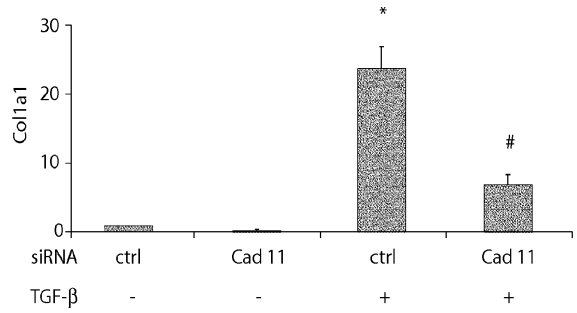
도면15d



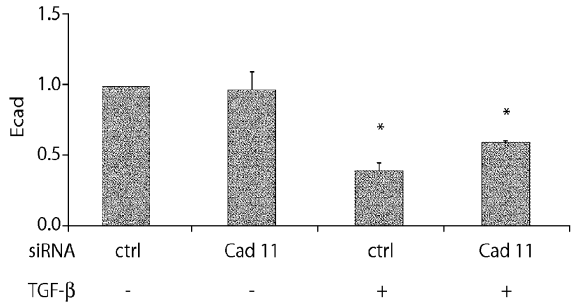
도면16a



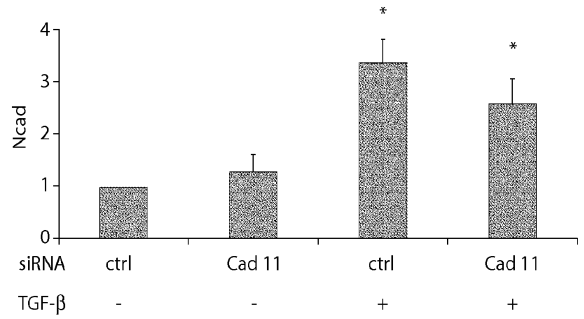
도면16b



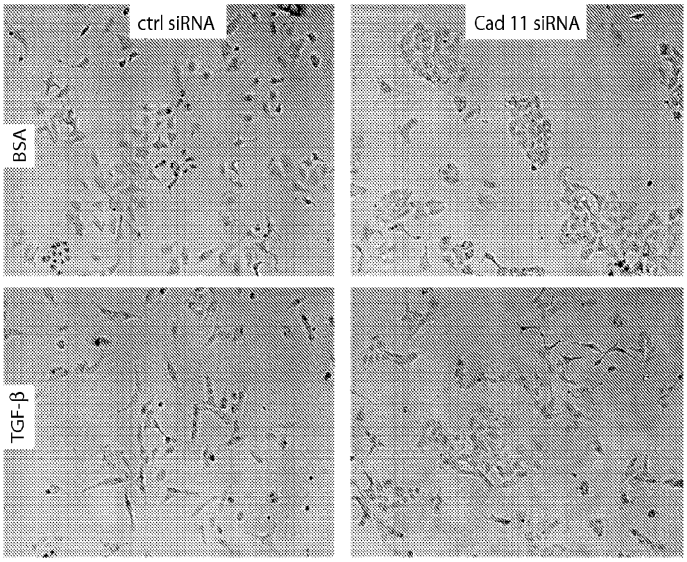
도면16c



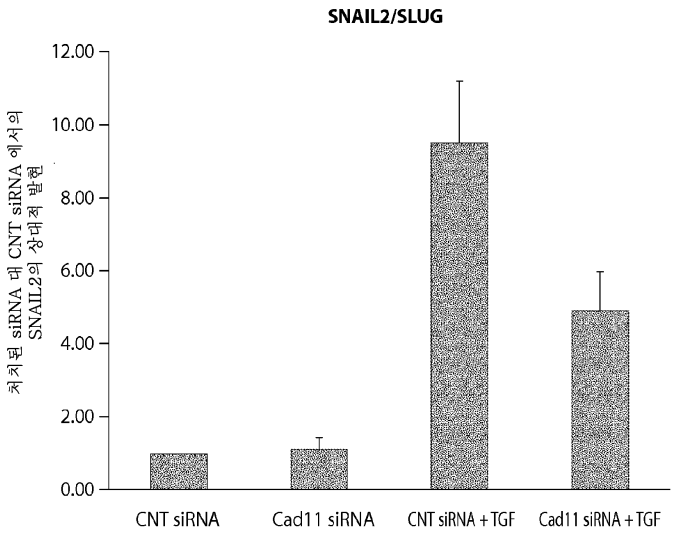
도면16d



도면17


ctrl siRNA
Cad 11 siRNA
BSA
TGF-β

도면18


SNAIL2/SLUG
처치된 siRNA 대 CNT siRNA 에서의 SNAIL2의 상대적 발현
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
CNT siRNA
Cad11 siRNA
CNT siRNA + TGF
Cad11 siRNA + TGF

도면19

서열 1

```
   1 agatgccgcg ggggccgctc gcagccgccg ctgacttgtg aatgggaccg ggactggggc
  61 cgggactgac accgcagcgc ttgccctgcg ccagggactg gcggctcgga ggttgcgtcc
 121 accctcaagg gccccagaaa tcactgtgtt ttcagctcag cggccctgtg acattccttc
 181 gtgttgtcat ttgttgagtg accaatcaga tgggtggagt gtgttacaga aattggcagc
 241 aagtatccaa tgggtgaaga agaagctaac tggggacgtg ggcagccctg acgtgatgag
 301 ctcaaccagc agagacattc catcccaaga gaggtctgcg tgacgcgtcc gggaggccac
 361 cctcagcaag accaccgtac agttggtgga aggggtgaca gctgcattct cctgtgccta
 421 ccacgtaacc aaaaatgaag gagaactact gtttacaagc cgccctggtg tgcctgggca
 481 tgctgtgcca cagccatgcc tttgccccag agcggcgggg gcacctgcgg ccctccttcc
 541 atgggcacca tgagaagggc aaggaggggc aggtgctaca gcgctccaag cgtggctggg
 601 tctggaacca gttcttcgtg atagaggagt acaccgggcc tgaccccgtg cttgtgggca
 661 ggcttcattc agatattgac tctggtgatg ggaacattaa atacattctc tcaggggaag
 721 gagctggaac cattttgtg attgatgaca aatcagggaa cattcatgcc accaagacgt
 781 tggatcgaga agagagagcc cagtacacgt tgatggctca ggcggtggac agggacacca
 841 atcggccact ggagccaccg tcggaattca ttgtcaaggt ccaggacatt aatgacaacc
 901 ctccggagtt cctgcacgag acctatcatg ccaacgtgcc tgagaggtcc aatgtgggaa
 961 cgtcagtaat ccaggtgaca gcttcagatg cagatgaccc cacttatgga aatagcgcca
1021 agttagtgta cagtatcctc gaaggacaac cctatttttc ggtggaagca cagacaggta
1081 tcatcagaac agccctaccc aacatggaca gggaggccaa ggaggagtac cacgtggtga
1141 tccaggccaa ggacatgggt ggacatatgg gcggactctc agggacaacc aaagtgacga
1201 tcacactgac cgatgtcaat gacaacccac caaagtttcc gcagagcgta taccagatgt
1261 ctgtgtcaga agcagccgtc cctggggagg aagtaggaag agtgaaagct aaagatccag
1321 acattggaga aaatggctta gtcacataca atattgttga tggagatggt atggaatcgt
1381 ttgaaatcac aacggactat gaaacacagg agggggtgat aaagctgaaa aagcctgtag
1441 attttgaaac caaaagagcc tatagcttga aggtagaggc agccaacgtg cacatcgacc
1501 cgaagtttat cagcaatggc cctttcaagg acactgtgac cgtcaagatc tcagtagaag
1561 atgctgatga gccccctatg ttcttggccc caagttacat ccacgaagtc caagaaaatg
1621 cagctgctgg caccgtggtt gggagagtgc atgccaaaga ccctgatgct gccaacagcc
1681 cgataaggta ttccatcgat cgtcacactg acctcgacag atttttcact attaatccag
1741 aggatggttt tattaaaact acaaaacctc tggatagaga ggaaacagcc tggctcaaca
1801 tcactgtctt tgcagcagaa atccacaatc ggcatcagga agccaaagtc ccagtggcca
1861 ttagggtcct tgatgtcaac gataatgctc ccaagtttgc tgccccttat gaaggtttca
1921 tctgtgagag tgatcagacc aagccacttt ccaaccagcc aattgttaca attagtgcag
1981 atgacaagga tgacacggcc aatggaccaa gatttatctt cagcctaccc cctgaaatca
2041 ttcacaatcc aaatttcaca gtcagagaca accgagataa cacagcaggc gtgtacgccc
2101 ggcgtggagg gttcagtcgg cagaagcagg acttgtacct tctgcccata gtgatcagcg
2161 atggcggcat cccgcccatg agtagcacca acaccctcac catcaaagtc tgcgggtgcg
2221 acgtgaacgg ggcactgctc tcctgcaacg cagaggccta cattctgaac gccggcctga
2281 gcacaggcgc cctgatcgcc atcctcgcct gcatcgtcat tctcctggtc attgtagtat
2341 tgtttgtgac cctgagaagg caaaagaaag aaccactcat tgtctttgag gaagaagatg
2401 tccgtgagaa catcattact tatgatgatg aagggggtgg ggaagaagac acagaagcct
2461 ttgatattgc caccctccag aatcctgatg gtatcaatgg atttatcccc cgcaaagaca
2521 tcaaacctga gtatcagtac atgcctagac ctgggctccg gccagcgccc aacagcgtgg
2581 atgtcgatga cttcatcaac acgagaatac aggaggcaga caatgacccc acggctcctc
2641 cttatgactc cattcaaatc tacggttatg aaggcagggg ctcagtggcc gggtccctga
2701 gctccctaga gtcggccacc acagattcag acttggacta tgattatcta cagaactggg
2761 gacctcgttt taagaaacta gcagatttgt atggttccaa agacactttt gatgacgatt
2821 cttaacaata acgatacaaa tttggcctta agaactgtgt ctggcgttct caagaatcta
2881 gaagatgtgt aaacaggtat ttttttaaat caaggaaagg ctcatttaaa acaggcaaag
2941 ttttacagag aggatacatt taataaaact gcgaggacat caaagtggta aatactgtga
3001 aatacctttt ctcacaaaaa ggcaaatatt gaagttgttt atcaacttcg ctagaaaaaa
3061 aaaacacttg gcatacaaaa tatttaagtg aaggagaagt ctaacgctga actgacaatg
3121 aagggaaatt gtttatgtgt tatgaacatc caagtctttc ttctttttta agttgtcaaa
3181 gaagcttcca caaaattaga aaggacaaca gttctgagct gtaatttcgc cttaaactct
3241 ggacactcta tatgtagtgc atttttaaac ttgaaatata taatattcag ccagcttaaa
3301 cccatacaat gtatgtacaa tacaatgtac aattatgtct cttgagcatc aatcttgtta
3361 ctgctgattc ttgtaaatct ttttgcttct actttcatct taaactaata cgtgccagat
3421 ataactgtct tgtttcagtg agagacgccc tatttctatg tcatttttaa tgtatctatt
3481 tgtacaattt taaagttctt attttagtat acgtataaat atcagtattc tgacatgtaa
3541 gaaaatgtta cggcatcaca cttatatttt atgaacattg tactgttgct ttaatatgag
3601 cttcaatata agaagcaatc tttgaaataa aaaaagattt ttttttaaaa aaaa
```

도면20

서열 2

MKENYCLQAALVCLGMLCHSHAFAPERRGHLRPSFHGHHEKGKE

GQVLQRSKR**GWVWNQFFVIEEYTGPDPVLVGRLHSDIDSGDGNI**KYILSGEGAGTIFV

IDDKSGNIHATKTLDREERAQYTLMAQAVDRDTNRPLEPPSEFIVKVQDINDNPPEFL

HETYHANVPERSNVGTSVIQVTASDADDPTYGNSAKLVYSILEGQPYFSVEAQTGIIR

TALPNMDREAKEEYHVVIQAKDMGGHMGGLSGTTKVTITLTDVNDNPPKFPQSVYQMS

VSEAAVPGEEVGRVKAKDPDIGENGLVTYNIVDGDGMESFEITTDYETQEGVIKLKKP

VDFETKRAYSLKVEAANVHIDPKFISNGPFKDTVTVKISVEDADEPPMFLAPSYIHEV

QENAAAGTVVGRVHAKDPDAANSPIRYSIDRHTDLDRFFTINPEDGFIKTTKPLDREE

TAWLNITVFAAEIHNRHQEAKVPVAIRVLDVNDNAPKFAAPYEGFICESDQTKPLSNQ

PIVTISADDKDDTANGPRFIFSLPPEIIHNPNFTVRDNRDNTAGVYARRGGFSRQKQD

LYLLPIVISDGGIPPMSSTNTLTIKVCGCDVNGALLSCNAEAYILNAGLSTGALIAIL

ACIVILLVIVVLFVTLRRQKKEPLIVFEEEDVRENIITYDDEGGGEEDTEAFDIATLQ

NPDGINGFIPRKDIKPEYQYMPRPGLRPAPNSVDVDDFINTRIQEADNDPTAPPYDSI

QIYGYEGRGSVAGSLSSLESATTDSDLDYDYLQNWGPRFKKLADLYGSKDTFDDDS

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.

Board of Regents, The University of Texas System

Agarwal, Sandeep K.

Schneider, Daniel J.

Brenner, Michael B.

<120> DETECTION AND TREATMENT OF FIBROSIS

<130> B0801.70366WO00

<140> Not Yet Assigned

<141> 2011-05-04

<150> US 61/331,355

<151> 2010-05-04

<150> US 61/331,357

<151> 2010-05-04

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3654

<212> DNA

<213> H. sapiens

<400> 1

agatgccgcg ggggccgctc gcagccgccg ctgacttgtg aatgggaccg ggactggggc 60

cgggactgac accgcagcgc ttgccctgcg ccagggactg gcggctcgga ggttgcgtcc 120

accctcaagg gccccagaaa tcactgtgtt ttcagctcag cggccctgtg acattccttc 180

gtgttgtcat ttgttgagtg accaatcaga tgggtggagt gtgttacaga aattggcagc 240

aagtatccaa tgggtgaaga agaagctaac tggggacgtg ggcagccctg acgtgatgag 300

ctcaaccagc agagacattc catcccaaga gaggtctgcg tgacgcgtcc gggaggccac 360

cctcagcaag accaccgtac agttggtgga aggggtgaca gctgcattct cctgtgccta 420

ccacgtaacc aaaaatgaag gagaactact gtttacaagc cgccctggtg tgcctgggca 480

tgctgtgcca cagccatgcc tttgccccag agcggcgggg gcacctgcgg ccctccttcc 540

atgggcacca tgagaagggc aaggaggggc aggtgctaca gcgctccaag cgtggctggg 600

tctggaacca gttcttcgtg atagaggagt acaccgggcc tgaccccgtg cttgtgggca 660

ggcttcattc agatattgac tctggtgatg ggaacattaa atacattctc tcaggggaag 720

gagctggaac catttttgtg attgatgaca aatcagggaa cattcatgcc accaagacgt 780

tggatcgaga agagagagcc cagtacacgt tgatggctca ggcggtggac agggacacca 840

atcggccact ggagccaccg tcggaattca ttgtcaaggt ccaggacatt aatgacaacc 900

ctccggagtt cctgcacgag acctatcatg ccaacgtgcc tgagaggtcc aatgtgggaa 960

cgtcagtaat ccaggtgaca gcttcagatg cagatgaccc cacttatgga aatagcgcca 1020

agttagtgta cagtatcctc gaaggacaac cctatttttc ggtggaagca cagacaggta 1080

tcatcagaac agccctaccc aacatggaca gggaggccaa ggaggagtac cacgtggtga 1140

tccaggccaa ggacatgggt ggacatatgg gcggactctc agggacaacc aaagtgacga 1200

tcacactgac cgatgtcaat gacaacccac caaagtttcc gcagagcgta taccagatgt 1260

ctgtgtcaga agcagccgtc cctggggagg aagtaggaag agtgaaagct aaagatccag 1320

acattggaga aaatggctta gtcacataca atattgttga tggagatggt atggaatcgt 1380

ttgaaatcac aacggactat gaaacacagg agggggtgat aaagctgaaa aagcctgtag 1440

attttgaaac caaaagagcc tatagcttga aggtagaggc agccaacgtg cacatcgacc 1500

cgaagtttat cagcaatggc cctttcaagg acactgtgac cgtcaagatc tcagtagaag 1560

atgctgatga gccccctatg ttcttggccc caagttacat ccacgaagtc caagaaaatg 1620

cagctgctgg caccgtggtt gggagagtgc atgccaaaga ccctgatgct gccaacagcc 1680

cgataaggta ttccatcgat cgtcacactg acctcgacag atttttcact attaatccag 1740

aggatggttt tattaaaact acaaaacctc tggatagaga ggaaacagcc tggctcaaca 1800

tcactgtctt tgcagcagaa atccacaatc ggcatcagga agccaaagtc ccagtggcca 1860

ttagggtcct tgatgtcaac gataatgctc ccaagtttgc tgccccttat gaaggtttca 1920

tctgtgagag tgatcagacc aagccacttt ccaaccagcc aattgttaca attagtgcag 1980

atgacaagga tgacacggcc aatggaccaa gatttatctt cagcctaccc cctgaaatca 2040

ttcacaatcc aaatttcaca gtcagagaca accgagataa cacagcaggc gtgtacgccc 2100

ggcgtggagg gttcagtcgg cagaagcagg acttgtacct tctgcccata gtgatcagcg 2160

atggcggcat cccgcccatg agtagcacca acaccctcac catcaaagtc tgcgggtgcg 2220

acgtgaacgg ggcactgctc tcctgcaacg cagaggccta cattctgaac gccggcctga 2280

gcacaggcgc cctgatcgcc atcctcgcct gcatcgtcat tctcctggtc attgtagtat 2340

tgtttgtgac cctgagaagg caaaagaaag aaccactcat tgtctttgag gaagaagatg 2400

tccgtgagaa catcattact tatgatgatg aagggggtgg ggaagaagac acagaagcct 2460

ttgatattgc caccctccag aatcctgatg gtatcaatgg atttatcccc cgcaaagaca 2520

tcaaacctga gtatcagtac atgcctagac ctgggctccg gccagcgccc aacagcgtgg 2580

atgtcgatga cttcatcaac acgagaatac aggaggcaga caatgacccc acggctcctc 2640

cttatgactc cattcaaatc tacggttatg aaggcagggg ctcagtggcc gggtccctga 2700

gctccctaga gtcggccacc acagattcag acttggacta tgattatcta cagaactggg 2760

gacctcgttt taagaaacta gcagatttgt atggttccaa agacactttt gatgacgatt 2820

cttaacaata acgatacaaa tttggcctta agaactgtgt ctggcgttct caagaatcta 2880

gaagatgtgt aaacaggtat ttttttaaat caaggaaagg ctcatttaaa acaggcaaag 2940

ttttacagag aggatacatt taataaaact gcgaggacat caaagtggta aatactgtga 3000

aataccttt ctcacaaaaa ggcaaatatt gaagttgttt atcaacttcg ctagaaaaaa 3060

aaaacacttg gcatacaaaa tatttaagtg aaggagaagt ctaacgctga actgacaatg 3120

aagggaaatt gtttatgtgt tatgaacatc caagtctttc ttctttttta agttgtcaaa 3180

gaagcttcca caaaattaga aaggacaaca gttctgagct gtaatttcgc cttaaactct 3240

ggacactcta tatgtagtgc atttttaaac ttgaaatata taatattcag ccagcttaaa 3300

cccatacaat gtatgtacaa tacaatgtac aattatgtct cttgagcatc aatcttgtta 3360

ctgctgattc ttgtaaatct ttttgcttct actttcatct taaactaata cgtgccagat 3420

ataactgtct tgtttcagtg agagacgccc tatttctatg tcatttttaa tgtatctatt 3480

tgtacaattt taaagttctt attttagtat acgtataaat atcagtattc tgacatgtaa 3540

gaaaatgtta cggcatcaca cttatatttt atgaacattg tactgttgct ttaatatgag 3600

cttcaatata agaagcaatc tttgaaataa aaaaagattt ttttttaaaa aaaa 3654

<210> 2

<211> 796

<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 2

Met Lys Glu Asn Tyr Cys Leu Gln Ala Ala Leu Val Cys Leu Gly Met

1 5 10 15

Leu Cys His Ser His Ala Phe Ala Pro Glu Arg Arg Gly His Leu Arg

20 25 30

Pro Ser Phe His Gly His His Glu Lys Gly Lys Glu Gly Gln Val Leu

35 40 45

Gln Arg Ser Lys Arg Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu

50 55 60

Glu Tyr Thr Gly Pro Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp

65 70 75 80

Ile Asp Ser Gly Asp Gly Asn Ile Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Glu Gly

85 90 95

Ala Gly Thr Ile Phe Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala

100 105 110

Thr Lys Thr Leu Asp Arg Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr Leu Met Ala

115 120 125

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

130 135 140

Phe Ile Val Lys Val Gln Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Glu Phe Leu

145 150 155 160

His Glu Thr Tyr His Ala Asn Val Pro Glu Arg Ser Asn Val Gly Thr

165 170 175

Ser Val Ile Gln Val Thr Ala Ser Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly

180 185 190

Asn Ser Ala Lys Leu Val Tyr Ser Ile Leu Glu Gly Gln Pro Tyr Phe

195 200 205

Ser Val Glu Ala Gln Thr Gly Ile Ile Arg Thr Ala Leu Pro Asn Met

210 215 220

Asp Arg Glu Ala Lys Glu Glu Tyr His Val Val Ile Gln Ala Lys Asp

225 230 235 240

Met Gly Gly His Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Lys Val Thr Ile

245 250 255

Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Lys Phe Pro Gln Ser Val

260 265 270

Tyr Gln Met Ser Val Ser Glu Ala Ala Val Pro Gly Glu Glu Val Gly

275 280 285

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

290 295 300

Tyr Asn Ile Val Asp Gly Asp Gly Met Glu Ser Phe Glu Ile Thr Thr

305 310 315 320

Asp Tyr Glu Thr Gln Glu Gly Val Ile Lys Leu Lys Lys Pro Val Asp

325 330 335

Phe Glu Thr Lys Arg Ala Tyr Ser Leu Lys Val Glu Ala Ala Asn Val

340 345 350

His Ile Asp Pro Lys Phe Ile Ser Asn Gly Pro Phe Lys Asp Thr Val

355 360 365

Thr Val Lys Ile Ser Val Glu Asp Ala Asp Glu Pro Pro Met Phe Leu

370 375 380

Ala Pro Ser Tyr Ile His Glu Val Gln Glu Asn Ala Ala Ala Gly Thr

385 390 395 400

Val Val Gly Arg Val His Ala Lys Asp Pro Asp Ala Ala Asn Ser Pro

405 410 415

Ile Arg Tyr Ser Ile Asp Arg His Thr Asp Leu Asp Arg Phe Phe Thr

420 425 430

Ile Asn Pro Glu Asp Gly Phe Ile Lys Thr Thr Lys Pro Leu Asp Arg

435 440 445

Glu Glu Thr Ala Trp Leu Asn Ile Thr Val Phe Ala Ala Glu Ile His

450 455 460

Asn Arg His Gln Glu Ala Lys Val Pro Val Ala Ile Arg Val Leu Asp

465 470 475 480

Val Asn Asp Asn Ala Pro Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Glu Gly Phe Ile

485 490 495

Cys Glu Ser Asp Gln Thr Lys Pro Leu Ser Asn Gln Pro Ile Val Thr

500 505 510

Ile Ser Ala Asp Asp Lys Asp Asp Thr Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ile

515 520 525

Phe Ser Leu Pro Pro Glu Ile Ile His Asn Pro Asn Phe Thr Val Arg

530 535 540

Asp Asn Arg Asp Asn Thr Ala Gly Val Tyr Ala Arg Arg Gly Gly Phe

545 550 555 560

Ser Arg Gln Lys Gln Asp Leu Tyr Leu Leu Pro Ile Val Ile Ser Asp

565 570 575

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

580 585 590

Cys Gly Cys Asp Val Asn Gly Ala Leu Leu Ser Cys Asn Ala Glu Ala

595 600 605

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

610 615 620

Ala Cys Ile Val Ile Leu Leu Val Ile Val Val Leu Phe Val Thr Leu

625 630 635 640

Arg Arg Gln Lys Lys Glu Pro Leu Ile Val Phe Glu Glu Glu Asp Val

645 650 655

Arg Glu Asn Ile Ile Thr Tyr Asp Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp

660 665 670

Thr Glu Ala Phe Asp Ile Ala Thr Leu Gln Asn Pro Asp Gly Ile Asn

675 680 685

Gly Phe Ile Pro Arg Lys Asp Ile Lys Pro Glu Tyr Gln Tyr Met Pro

690 695 700

Arg Pro Gly Leu Arg Pro Ala Pro Asn Ser Val Asp Val Asp Asp Phe

705 710 715 720

Ile Asn Thr Arg Ile Gln Glu Ala Asp Asn Asp Pro Thr Ala Pro Pro

725 730 735

Tyr Asp Ser Ile Gln Ile Tyr Gly Tyr Glu Gly Arg Gly Ser Val Ala

740 745 750

Gly Ser Leu Ser Ser Leu Glu Ser Ala Thr Thr Asp Ser Asp Leu Asp

755 760 765

Tyr Asp Tyr Leu Gln Asn Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp

770 775 780

Leu Tyr Gly Ser Lys Asp Thr Phe Asp Asp Asp Ser

785 790 795

<210> 3

<211> 34

<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 3

Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly Pro

1 5 10 15

Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp

20 25 30

Gly Asn

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220><223> human Cdh11 siRNA

<400> 4

uuugaaugga gucauaaggu u 21