



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0027971
(43) 공개일자 2016년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. C1.)
A61K 35/74 (2015.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(71) 출원인
시티 오브 호프
미국 91010-3000 캘리포니아주 두아르테 이스트
두아르테 로드 1500

(52) CPC특허분류
A61K 35/74 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)

(72) 발명자
다이아몬드 돈 제이
미국 91741 캘리포니아주 글렌도라 엔. 엘우드 에
비뉴 415
매뉴엘 에드워
미국 91768 캘리포니아주 포모나 파빌리온 드라이
브 1050

(21) 출원번호 10-2016-7001786

(74) 대리인
김진희, 김태홍

(22) 출원일자(국제) 2014년07월01일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2016년01월21일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/045086

(87) 국제공개번호 WO 2015/002969

국제공개일자 2015년01월08일

(30) 우선권주장

61/842,749 2013년07월03일 미국(US)

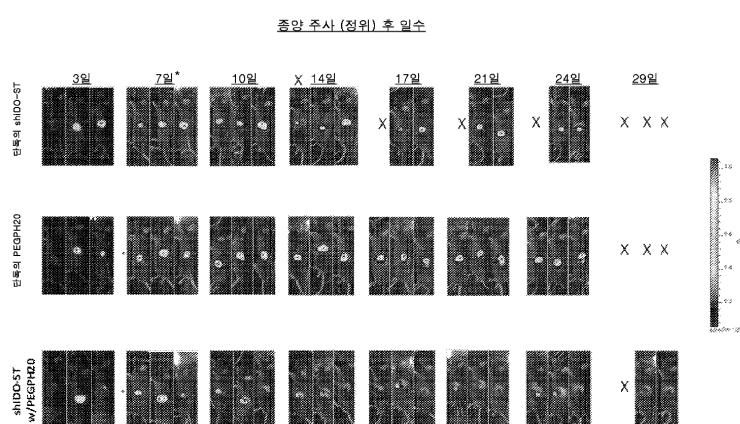
전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **항암 병용제**

(57) 요 약

본원에, 특히, 세균 세포 및 종양 침투 제제를 포함하는 조성물 및 키트가 제공된다. 또한, 대상체에 유효량의 세균 세포 및 종양 침투 제제를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 대상체에서 면역계를 자극하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 유효량의 세균 세포 및 종양 침투 제제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 또한, 종양 세포를 세균 세포, 종양 침투 제제 및 항암제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 항암제의 종양 세포로의 전달을 증진시키는 방법이 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 38/47 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
C12N 15/1137 (2013.01)
C12Y 302/01035 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
C12N 2320/31 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서,
병용 유효량의 세균 세포 및 종양 침투 제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고,
상기 투여는 상기 대상체에서 상기 암을 치료하는, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 병용 유효량이 병용 상승작용적(synergistic) 양인, 방법.

청구항 3

대상체에서 면역계를 자극하는 방법으로서,
병용 유효량의 세균 세포 및 종양 침투 제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고,
상기 세균 세포 및 종양 침투 제제의 투여가 상기 대상체의 면역계를 자극하는, 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 면역 반응이 항암 면역 반응인, 방법

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 청구항에 있어서, 항암제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 항암제가 상기 세균 세포 및 종양 침투 제제의 투여에 후속적으로 투여되는, 방법.

청구항 7

종양 세포로 항암제의 전달을 증진시키는 방법으로서,
상기 종양 세포를 세균 세포, 종양 침투 제제 및 항암제와 접촉시키는 단계를 포함하고,
상기 종양 세포와 세균 세포, 종양 침투 제제 및 항암제의 접촉이 상기 항암제의 전달을 증진시키는, 방법.

청구항 8

청구항 5 내지 7 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 항암제가 소분자, 혼산, 폴리펩타이드 및 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 세균 세포가 살모넬라(*Salmonella*) 세균 세포인, 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 8 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 세균 세포가 살모넬라 *티피미리움*(*Salmonella typhimurium*)의 약독화된 균주인, 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 살모넬라 세균 세포가 YS1646 (ATCC #202165), RE88, LH430, SL7207, X8429, X8431

및 x8468로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 세균 세포가 안티센스 핵산을 포함하는, 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 안티센스 핵산이 대사 효소를 표적화하는, 방법.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 안티센스 핵산이 면역억제 표적물을 표적화하는, 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 면역억제 표적이 STAT3, ID01, ID02, 아르기나아제 1, iNOS, CTLA-4, TGF- β , IL-10, pGE2 또는 VEGF로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 면역억제 표적이 ID01인, 방법.

청구항 17

청구항 12 내지 16 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 안티센스 핵산이 shRNA인, 방법.

청구항 18

청구항 12에 있어서, 상기 안티센스 핵산이 서열번호 3 내지 31로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 19

청구항 1 내지 18 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 종양 침투 제제가 하이알루로니다제 폴리펩타이드인, 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드가 변형된 하이알루로니다제 폴리펩타이드인, 방법.

청구항 21

청구항 19에 있어서, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드가 폐길화된, 방법.

청구항 22

청구항 19 내지 21 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드가 서열번호 1을 포함하는, 방법.

청구항 23

청구항 1 내지 22 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 종양 침투 제제가 세균 세포 전 투여되는, 방법.

청구항 24

살모넬라 세균 세포 및 하이알루로니다제 폴리펩타이드를 포함하는 조성물.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 상기 살모넬라 세균 세포가 살모넬라 티피무리움의 약독화된 균주인, 조성물.

청구항 26

청구항 24 또는 25에 있어서, 상기 살모넬라 세균 세포가 YS1646 (ATCC #202165), RE88, LH430, SL7207, x

8429, x8431 및 x8468로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 27

청구항 24 내지 26 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 세균 세포가 안티센스 핵산을 포함하는, 조성물.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 안티센스 핵산이 대사 효소를 표적화하는, 조성물.

청구항 29

청구항 27에 있어서, 상기 안티센스 핵산이 면역억제 표적물을 표적화하는, 조성물.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 상기 면역억제 표적이 STAT3, ID01, ID02, 아르기나아제 1, iNOS, CTLA-4, TGF- β , IL-10, pGE2 또는 VEGF로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 31

청구항 29에 있어서, 상기 면역억제 표적이 ID01인, 조성물.

청구항 32

청구항 27 내지 31 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 안티센스 핵산이 shRNA인, 조성물.

청구항 33

청구항 27에 있어서, 상기 안티센스 핵산이 서열번호 3 내지 31로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 34

청구항 24 내지 33 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드가 변형된 하이알루로니다제 폴리펩타이드인, 조성물.

청구항 35

청구항 24 내지 34 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드가 폐길화된, 조성물.

청구항 36

청구항 24 내지 35 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드가 서열번호 1을 포함하는, 조성물.

청구항 37

청구항 24 내지 36 중 어느 한 청구항에 있어서, 항암제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 항암제가 소분자, 핵산, 폴리펩타이드 및 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 39

청구항 24 내지 38 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 살모넬라 세균 세포 및 하이알루로니다제 폴리펩타이드가 병용 상승작용적 유효량으로 존재하는, 조성물.

청구항 40

살모넬라 세균 세포를 포함하는 제1 조성물, 및 하이알루로니다제 폴리펩타이드를 포함하는 제2 조성물을 포함하는, 키트.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 상기 살모넬라 세균 세포 및 하이알루로니다제 폴리펩타이드가 병용 상승작용적 유효량으로 존재하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2013년 7월 3일자로 출원된 미국 가출원 번호 제61/842,749호에 대한 우선권을 주장하고 이의 전문은 본원에 참조로서 인용된다.

배경 기술

[0003] 배경 기술

[0004] 진행성 췌관선암종(Advanced pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC))은 흔히 수술로 치료할 수 없고 단기 일시적으로 기존의 치료요법에 반응한다. PDAC에서 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO)는 항종양 면역력을 억제함에 의해 질환 진행을 가속화하는데 주요 역할을 수행한다. 현재 IDO 억제제는 부적절하게 면역억제를 반전시키고 전신 개시 표적 효과는 이들의 독성에 기여한다. 따라서, 종양 및 종양 미세환경과 관련된 면역억제 기작을 표적화하는 추가의 암 치료요법을 제공할 필요가 있다. 본원은 당업계에서 이들 및 다른 문제점들에 대한 해결책을 제공한다.

발명의 내용

발명의 요약

[0006] 본원에서 세균 세포 및 종양 침투 제제를 포함하는 조성물 및 키트가 제공된다. 또한, 본원에서 대상체에 유효량의 세균 세포 및 종양 침투 제제를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 대상체에서 면역 시스템을 자극하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 유효량의 세균 세포 및 종양 강화제를 대상체에게 투여함을 포함한다. 또한, 종양 세포를 세균 세포, 종양 침투 제제 및 항암제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 항암제의 종양 세포로의 전달을 증진시키는 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0007] 도 1은 정위 KPC-luc 모델 마우스에서 shIDO-ST, PEGPH20TM, 및 shIDO-ST와 PEGPH20TM의 병용 효과를 입증하는 일련의 이미지를 보여준다. 마우스는 종양 이식 후 지정된 시점에서 생존기간 이미지화 시스템(IVIS)를 사용하여 이미지화하였다. 종양 감소는 shIDO-ST와 PEGPH20TM의 병용 치료를 사용하여 관찰되었다.

도 2a 및 2b는 상이한 투여 용법하에 shIDO-ST와 PEGPH20TM의 병용 치료 효과를 입증하는 일련의 이미지를 보여준다. 마우스는 종양 이식 후 지정된 시점에서 생존기간내 이미지화 시스템(IVIS)을 사용하여 이미지화하였다. shIDO-ST (5M cfu) 와 PEGPH20TM (45 μ g)의 조합은 억제된 종양 성장을 유도하였고 3마리의 마우스 중 2마리에서 KPC-luc 췌장 종양이 완전히 제거되었다. PEGPH20TM, 억제 세균, shScr-ST의 병용은 또한 조기 시점에서 상당한 종양 성장 억제를 나타냈지만, 모든 마우스는 결국 종양 진행에 굴복하였다.

도 3은 도 2a 및 도 2b에 대한 IVIS의 정량을 보여주는 그래프이다. 도 2에서 이미지화된 마우스로부터 방출된 광자를 정량하였다. 각각의 특정 용량에서 shIDO-ST와 PEGPH20TM로 처리된 마우스 기원의 종양은 모든 다른 그룹 보다 상당히 우수하게 억제된다.

도 4는 KPC-luc 종양에 대한 shIDO-ST와 PEGPH20TM, shScr-ST와 PEGPH20TM, 겔시타빈과 PEGPH20TM 및 단독의 제제의 효과를 입증하는 일련의 이미지를 보여준다. 상당한 종양 감소는 shIDO-ST와 PEGPH20TM으로 치료된 마우스

에서 관찰되었지만, 모든 다른 치료 용법은 신속한 종양 진행과 관련되어 있다.

도 5는 도 4에 대한 IVIS의 정량을 보여주는 그래프이다. 도 4에서 이미지화된 마우스로부터 방출된 광자들을 정량하였다. shIDO-ST와 PEGPH20TM로 치료된 마우스 기원의 종양은 모든 다른 그룹에 비해 상당히 우수하게 억제되었고 실험 종료 시점에도 생존하였다.

도 6은 치료가 마우스 체중을 상당히 변화시키지 않음을 보여주는 그래프이다. 도 4에서 마우스는 각각의 이미지화 시점에 체중을 달았다. 어느 그룹에 대해서도 마우스 체중의 감소가 관찰되지 않았다.

도 7은 정위 KPC-luc 모델 마우스에서 shArg-ST 또는 대조군 shScr-ST와 함께 PEGPH20TM의 효과를 입증하는 일련의 이미지를 보여준다. 마우스는 종양 이식 후 지정된 시점에서 생존기간 이미지화 시스템(IVIS)을 사용하여 이미지화하였다. 종양 감소는 shArg-ST와 PEGPH20TM의 병용 치료 및 shScr-ST와 PEGPH20TM의 병용 치료에서 관찰되었다.

도 8은 상이한 투여 용법하에 shArg-ST와 PEGPH20TM을 사용한 병용 치료의 효과를 입증하는 일련의 이미지를 보여준다. 마우스는 종양 이식 후 지정된 시점에서 생존기간 이미지화 시스템(IVIS)을 사용하여 이미지화하였다. shIDO-ST와 PEGPH20TM의 병용은 종양 성장을 억제하였다. PEGPH20TM, 억제 세균, shScr-ST의 병용은 다시 종양 성장의 쇠약을 보여주었다.

도 9는 shIDO-AT와 PEGPH20TM의 병용 치료 효과를 입증하는 일련의 이미지를 보여준다. 마우스는 종양 이식 후 지정된 시점에서 생존기간 이미지화 시스템(IVIS)을 사용하여 이미지화하였다. shIDO-ST와 PEGPH20TM의 병용은 종양 억제를 유도하였고 마우스의 생존을 연장시켰다.

도 10은 종양 이식 후 상이한 시점에서 종양 과증을 정량하는 그래프이다. 구체적으로, 도 9에 나타낸 마우스 그룹의 IVIS 이미지화로부터 방출된 광자를 정량하였다. shIDO-ST와 PEGPH20TM의 병용은 통계학적으로 유의적인 종양 억제를 유발하였고 모든 다른 그룹은 지속적인 억제를 나타내지 않았다.

도 11은 그래프에 지정된 각각의 시점에서 도 9에 나타낸 마우스 그룹의 체중을 보여주는 그래프이다. 도 11은 shIDO-ST와 PEGPH20TM 병용 치료요법을 사용한 PDAC 종양 제거가 체중 손실을 유발하지 않았음을 보여준다.

도 12는 PEGPH20TM으로 치료된 종양 함유 마우스의 하이알루로난(HA) 염색의 이미지를 보여준다. PEGPH20TM으로 치료한지 48시간 후, 상당한 하이알루로난의 고갈이 관찰되었다.

도 13은 PEGPH20TM로 치료된 마우스의 종양에서 개방 혈관의 이미지를 보여준다. PEGPH20TM로 치료되거나 치료되지 않은 마우스의 14일 종양으로부터의 분절을 항-CD31 항체로 염색하여 종양 매쓰내 혈관의 횡단 분절을 위치화하였다. 많은 보다 개방된 혈관은 PEGPH20TM으로 치료된 마우스의 종양에서 관찰되었다.

도 14는 shIDO-ST 및 PEGPH20TM 병용 치료요법으로 치료된 종양으로 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium* (ST)) 및 호중구(PMN)의 유입 이미지를 보여준다.

도 15는 PEGPH20TM/shScr-ST 또는 PEGPH20TM/shIDO-ST을 사용한 치료 96시간 후 PMN에 대해 분석된 수술적으로 제거된 종양의 이미지를 보여준다.

도 16은 shIDO-ST/PEGPH20TM 병용 치료요법 치료된 종양의 코어에서 종양 세포의 괴사를 보여주는 이미지를 보여준다.

도 17은 12주째에 shIDO-ST/PEGPH20TM 병용 치료요법으로 치료된 정상 BL/6 마우스 또는 KPC-Brca1 마우스로부터 취한 비장 및 췌장의 이미지를 보여준다.

도 18은 shIDO-ST/PEGPH20TM 병용 치료가 자발적 췌장 종양을 억제하는데 효능을 갖는지를 결정하기 위한 KPC-Brca1 마우스 치료 계획을 보여준다.

도 19는 PEGPH20TM/shScr-ST 또는 PEGPH20TM/shIDO-ST로 치료된 마우스 또는 대조군 한배 새끼로부터의 췌장 이

미지를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0008] 발명의 상세한 설명

[0009] 본원에서 세균 세포 및 종양 침투 제제를 포함하는 조성물 및 키트가 제공된다. 또한 유효량의 세균 세포 및 종양 침투 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공되고, 여기서, 투여는 대상체에서 암을 치료한다.

[0010] 본원에서 대상체에서 면역계를 자극하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 유효량의 세균 세포 및 종양 침투 제제를 대상체에게 투여함을 포함하고, 상기 투여는 대상체에서 면역계를 자극한다. 또한 종양 세포를 세균 세포, 종양 침투 제제 및 항암제와 접촉시키는 단계를 포함하는 항암제의 종양 세포로의 전달을 증진시키는 방법이 제공되고, 여기서, 상기 종양 세포와 세균 세포 및 종양 침투 제제와의 접촉은 항암제의 종양 세포로의 전달을 증진시킨다.

[0011] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "종양 침투 제제"는 종양 및/또는 종양 세포를 침투할 수 있는 제제를 지칭한다. 따라서, 종양 침투 제제는 종양 세포 자체를 침투할 수 있거나 종양 세포 주변 영역, 예를 들어, 세포외 매트릭스를 침투할 수 있다. 예를 들어, 종양 침투 제제는 종양 세포 주변 세포외 매트릭스를 파괴하거나 분해시킴에 의해 종양에 침투한다. 대안적으로, 종양 침투 제제는 종양 세포 자체에 진입함에 의해 종양에 침투한다. 제공된 조성물 및 방법에 사용하기 위한 종양 침투 제제의 예는 하이알루로니다제 폴리펩타이드, 피르페니돈, 사리테기브 (IPI-926), 나노입자, 알부민 나노입자, 엑스트란, 리포좀, 및 세포 침투 웨بت이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 상기 제제들을 제조하고 사용하는 방법을 포함하는 상기 종양 침투 제제는 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[참조: 미국 특허 제7,767,429호; 제7,829,081호; 제7,846,431호; 제7,871,607호; 제8,105,586호; 제8,202,517호; 제8,257,699호; 제8,431,380호; 및 제8,450,470호; Kozono et al., Cancer Res. 73(7):2345-56 (2013); Olive et al., Science 324(5933):1457-61 (2009); Marrache, et al., Curr. Med. Chem. 20(28):3500-14 (2013); Jung, et al., Curr. Med. Chem. 20(28):3488-3499 (2013); Mattheolabakis et al., Nanomedicine (London) 7(10):1577-1590 (2012); Malam, et al., Trends Pharmacol. Sci., 30(11):592-599 (2009); Varshoaz, Expert Opin. Drug Deliv., 9(5):509-23 (2012); MacEwan and Chilkoti, Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol., 5(1):31-48 (2013), 이들의 전문이 본원에 참조로 인용됨]에 기재되어 있다. 임의로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2 또는 이의 단편을 포함한다. 임의로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 변형된 하이알루로니다제 폴리펩타이드이다. 임의로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 폐길화되어 있다. 임의로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 PEGPH20TM (Halozyme, Inc., San Diego, CA)이다.

[0012] "핵산"은 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 또는 이의 중합체, 및 이의 상보체를 지칭한다. 상기 용어는 합성, 천연 및 비-천연이고 표준 핵산과 유사한 결합 성질을 갖고 표준 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 공지된 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형된 골격 잔기 또는 연결체를 함유하는 핵산을 포괄한다. 상기 유사체의 예는 제한 없이 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 웨بت이드-핵산 (PNA)을 포함한다.

[0013] 달리 지정되지 않는 경우, 특정 핵산 서열은 또한 함축적으로 명백하게 지적된 서열 뿐만 아니라 보존적으로 변형된 이의 변이체(예를 들어, 축퇴성 코돈 치환) 및 상보적 서열을 포괄한다. 특이적으로, 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 3번째 위치가 혼합 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기들로 치환된 서열을 합성함에 의해 성취될 수 있다(문헌참조: Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). 상기 용어 핵산은 유전자, cDNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드와 상호교환적으로 사용된다.

[0014] 특정 핵산 서열은 또한 함축적으로 "스플라이스 변이체"를 포괄한다. 유사하게, 핵산에 의해 암호화된 특정 단백질은 함축적으로 상기 핵산의 스플라이스 변이체에 의해 암호화된 임의의 단백질을 포괄한다. 명칭이 시사하는 바와 같이, "스플라이스 변이체"는 유전자의 대안적인 스플라이싱의 생성물이다. 전사 후, 초기 핵산 전사체는 상이한(대안적인) 핵산 스플라이스 생성물이 상이한 폴리펩타이드를 암호화하도록 스플라이스될 수 있다. 스플라이스 변이체를 생성하기 위한 기작은 다양하지만 엑손의 대안적인 스플라이싱을 포함한다. 판독 전사에 의해 동일한 핵산으로부터 유래된 대안적인 폴리펩타이드는 또한 본 정의에 의해 포함된다. 재조합 형태의 스플라이스 생성물을 포함하는, 스플라이싱 반응의 임의의 생성물은 상기 정의에 포함된다. 칼륨 채널 스플라이스 변

이체의 예는 문헌[참조: Leicher, et al., J. Biol. Chem. 273(52):35095-35101 (1998)]에서 논의된다.

[0015] 핵산은 이것이 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 위치되는 경우 "작동적으로 연결된 것이다". 예를 들어, 프리서열 또는 분비 리더에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 관여하는 프리단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA로 작동적으로 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 이것이 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 암호화 서열에 작동적으로 연결되거나; 리보솜 결합 부위는 이것이 해독을 촉진시키도록 위치되는 경우 암호화 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, "작동적으로 연결된"은 연결된 DNA 서열이 서로 인접해 있고 분비 리더의 경우 연속 및 관독상에 있음을 의미한다. 그러나, 인핸서는 연속성이 필요는 없다. 연결은 간편한 제한 부위에서의 결합에 의해 성취된다. 상기 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어탭터 또는 링커는 통상적인 관행에 따라 사용된다.

[0016] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열과 관련된 용어 "동일한" 또는 "% 동일성"은 하기된 디폴트 파라미터를 갖는 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교 알고리즘을 사용한 측정시 또는 수동 정렬 및 육안 검사에 의한 측정시 동일하거나, 동일한 특정 %의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드(즉, 비교창 또는 지정된 영역 상의 최대 상응성으로 비교되고 정렬되는 경우, 약 60% 동일성, 바람직하게는 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성)를 갖는 2개 이상의 서열 또는 서브서열을 지칭한다(문헌참조: 예를 들어, NCBI 웹 사이트 등). 이어서 이러한 상기 서열은 "실질적으로 동일한" 것으로 일컬어진다. 이러한 정의는 또한 시험 서열의 상보체를 지칭하거나 이에 적용될 수 있다. 상기 정의는 또한 치환을 갖는 것들 뿐만 아니라 결실 및/또는 침가를 갖는 서열을 포함한다. 하기된 바와 같이, 바람직한 알고리즘은 캡 등을 고려할 수 있다. 바람직하게, 동일성은 길이가 적어도 약 25개 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역 상에 또는 보다 바람직하게 길이가 50 내지 100개 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역상에 존재한다.

[0017] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 표준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 시험 및 표준 서열은 컴퓨터에 입력하고, 필요한 경우 서브서열 코디네이트를 지정하고 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 바람직하게, 디폴트 프로그램 파라미터가 사용될 수 있거나 대안적인 파라미터가 지정될 수 있다. 이어서 상기 서열 비교 알고리즘은 프로그램 파라미터를 기준으로 표준 서열에 상대적인 시험 서열에 대한 % 서열 동일성을 계산한다.

[0018] 본원에 사용된 바와 같은 "비교 창"은 서열이 2개의 서열이 최적으로 정렬된 후 동일한 수의 연속 위치들의 표준 서열과 비교될 수 있는 20 내지 600개, 일반적으로 약 50 내지 약 200개, 보다 일반적으로 약 100 내지 약 150개로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 다수의 연속 위치들 중 어느 하나의 분절에 대한 지칭을 포함한다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은 예를 들어, 문헌[참조: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)]의 국부 상동성 알고리즘, 문헌[참조: Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘, 문헌[참조: Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)]의 유사성 방법에 대한 검색, 문헌[참조: (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)]에서 상기 알고리즘의 컴퓨터화된 실행, 또는 수동 정렬 및 육안 검사[문헌참조: 예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)]에 의해 수행될 수 있다.

[0019] % 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하기 위해 적합한 알고리즘의 바람직한 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이고, 이는 각각 문헌[참조: Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977) and Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]에 기재되어 있다. BLAST 및 BLAST 2.0은 본원에 기재된 파라미터와 함께 사용하여 핵산 및 단백질에 대한 % 서열 동일성을 결정한다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 당업계에 공지된 바와 같이 기관[National Center for Biotechnology Information]을 통해 대중에게 가용하다. 상기 알고리즘은 먼저 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어로 정렬되는 경우 일부 양성-값 역치 스코어 T와 일치하거나 이를 만족시키는, 탐색 서열에서 길이의 약어 W를 동정함에 의해 고도의 스코어링 서열 쌍(HSP)을 동정함을 포함한다. T는 이웃 단어 스코어 역치로서 지칭된다(문헌참조: Altschul et al., supra). 이를 초기 이웃 단어 히트는 이들을 함유하는 보다 긴 HSP를 발견하는 검색을 개시하기 위한 씨드로서 작용한다. 상기 단어 히트는 누적 정렬 스코어가 증가될 수 있는 한 각각의 서열을 따라 양 방향으로 연장된다. 누적 스코어는 뉴클레오타이드 서열에 대해 파라미터 M (한쌍의 매칭 잔기에 대한 보상 스코어; 항상 > 0) 및 N (미쓰매칭 잔기에 대한 폐널티 스코어; 항상 < 0)을 사용하여 계산한다. 아미노산 서열에 대해, 스코어링 매트릭스를 사용하여 누적 스코어를 계산한다. 각각의 방향에서 단어 히트의 연장은 누적 정렬 스코어가 이의 최대 성취된 값으로부터 정량 X에 의해 벗어나는 경우; 상기 누적 스코어가 하나 이상의 네가티브-스코어링 잔기 정렬의 누적으로 인해 제로 이하가 되는 경우; 또는 서열 중 하나의 말단에 도달하는 경우 중지된다. 상기 BLAST 알고리즘 파라미터

W, T, 및 X는 정렬 민감성 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오타이드 서열에 대한)은 디폴트로서 11의 단어길이(W), 10의 예상치(E), M=5, N=4 및 양 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열에 대해, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 단어길이 및 10의 예상치(E) 및 50의 BLOSUM62 스코어링 매트릭스 (문헌참조: Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) 정렬 (B), 10의 예상치 (E), M=5, N=4, 및 양 가닥의 비교를 사용한다.

[0020]

"억제 핵산"은 표적 핵산(예를 들어, PTPRS로 해독될 수 있는 mRNA)에 결합할 수 있고 표적 핵산(예를 들어, DNA로부터 mRNA)의 전사를 감소시킬 수 있거나 표적 핵산(예를 들어, mRNA)의 해독을 감소시킬 수 있거나 억제 핵산의 부재인 경우와 비교하여 전사체 스플라이싱(예를 들어, 단일 가닥의 모르폴리노 올리고)를 변화시킬 수 있는 핵산(예를 들어, DNA, RNA, 뉴클레오타이드 유사체의 중합체)이다. "모르폴리노 올리고"는 대안적으로 "모르폴리노 핵산"으로서 지칭될 수 있고 당업계에서 통상적으로 공지된 모르풀린-함유 핵산 핵산(예를 들어, 포스포르아미네이트 모르풀리노 올리고 또는 PMO)을 지칭한다. 문헌[Marcos, P., Biochemical and Biophysical Research Communications 358 (2007) 521-527]을 참조한다. 일부 양태에서, 상기 "억제성 핵산"은 표적 핵산(예를 들어, RPTPS로 해독될 수 있는 mRNA)에 결합할 수 있고 (예를 들어, 하이브리드화 할 수 있고) 표적 핵산의 해독을 감소시킬 수 있는 핵산이다. 상기 표적 핵산은 억제 핵산이 결합하는(예를 들어, 하이브리드화하는) 하나 이상의 표적 핵산 서열이거나 이를 포함한다. 따라서, 억제 핵산은 전형적으로 표적 핵산 서열에서 적어도 표적 핵산의 일부와 하이브리드화할 수 있는 서열(또한 본원에서 "안티센스 핵산 서열"로서 지칭됨)이거나 이를 포함한다. 억제 핵산의 예는 안티센스 핵산이다. 억제 핵산의 또 다른 예는 siRNA 또는 RNAi (뉴클레오타이드 유사체와 같은 이들의 유도체 또는 전구체를 포함하는)이다. 추가의 예는 shRNA, miRNA, shmiRNA, 또는 특정 이들의 유도체 또는 전구체를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 억제 핵산은 단일 가닥이다. 다른 양태에서, 상기 억제 핵산은 이중 가닥이다.

[0021]

"안티센스 핵산"은 특정 표적 핵산(예를 들어, 표적 핵산 서열), 예를 들어, mRNA 분자(예를 들어, 표적 mRNA 분자)(문헌참조: 예를 들어, Weintraub, Scientific American, 262:40 (1990))의 적어도 일부와 적어도 부분적으로 상보적인 핵산(예를 들어, DNA, RNA 또는 이의 유사체), 예를 들어, 안티센스, siRNA, shRNA, shmiRNA, miRNA (microRNA)이다. 따라서, 안티센스 핵산은 표적 핵산(예를 들어, 표적 mRNA)에 하이브리드화할 수 있다(예를 들어, 선택적으로 하이브리드화할 수 있다). 일부 양태에서, 상기 안티센스 핵산은 엄중 하이브리드화 조건하에서 표적 핵산 서열(예를 들어, mRNA)과 하이브리드화한다. 일부 양태에서, 상기 안티센스 핵산은 적당한 엄중 하이브리드화 조건하에서 표적 핵산(예를 들어, mRNA)과 하이브리드화한다. 안티센스 핵산은 예를 들어, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트 및 -아노머 당-포스페이트, 골격 변형된 뉴클레오타이드와 같은 천연의 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. "항PTPRS 안티센스 핵산"은 PTPRS의 적어도 일부를 암호화하는 mRNA 분자와 같은 표적 핵산 서열의 적어도 일부와 적어도 부분적으로 상보적인 안티센스 핵산이다. 일부 양태에서, 안티센스 핵산은 모르풀리노 올리고이다. 일부 양태에서, 모르풀리노 올리고는 당업계에 공지된 바와 같이 단일 가닥의 안티센스 핵산이다. 일부 양태에서, 모르풀리노 올리고는 표적의 단백질 발현을 저하시키거나, 표적 mRNA의 해독을 감소시키거나 표적 mRNA의 해독 개시를 감소시키거나 전사체 스플라이싱을 변형시킨다. 일부 양태에서, 상기 모르풀리노 올리고는 세포 침투성 모이어티(예를 들어, 웹타이드)에 접합된다. 안티센스 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥의 핵산일 수 있다.

[0022]

상기 세포에서, 안티센스 핵산은 표적 mRNA에 하이브리드화하여 이중 가닥의 분자를 형성할 수 있다. 상기 안티센스 핵산은 세포가 이중 가닥의 mRNA를 해독하지 못하기 때문에 상기 mRNA의 해독을 방해한다. 유전자의 시험관내 해독을 억제하기 위한 안티센스 방법의 사용은 당업계에 널리 공지되어 있다(문헌참조: Marcus-Sakura, Anal. Biochem., 172:289, (1988)). DNA에 직접 결합하는 안티센스 분자가 사용될 수 있다.

[0023]

억제 핵산은 주사, 흡입 또는 경구 주입에 의한 것을 포함하는, 당업계에 공지된 임의의 적당한 방법을 사용하여 대상체에 전달될 수 있다. 또 다른 적합한 전달 시스템은 예를 들어, 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드, 및 수중유 에멀젼, 마이셀, 혼합 마이셀 및 리포좀을 포함하는 지질 기반 시스템과 같은 콜로이드성 분산 시스템이다. 본 발명의 콜로이드성 시스템의 예는 리포좀이다. 리포좀은 시험관내 및 생체내 전달 비히클로서 유용한 인공 막 소포체이다. RNA 및 DNA를 포함하는 핵산은 리포좀내에 있고 생물학적 활성 형태로 세포로 전달된다(문헌참조: Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). 리포좀은 당업계에 공지된 임의의 수단을 사용하여 특정 세포 유형 또는 조직으로 표적화될 수 있다. 억제 핵산(예를 들어, 안티센스 핵산, 모르풀리노 올리고)은 세포 침투가능한 전달 시스템(예를 들어, 세포 침투가능한 웹타이드)을 사용하여 세포로 전달될 수 있다. 일부 양태에서, 억제 핵산은 바이러스 벡터 또는 바이러스를 사용하여 특정 세포 또는 조직으로 전달된다.

[0024]

"siRNA"는 이중 가닥의 RNA를 형성하는 핵산을 지칭하고, 상기 이중 가닥의 RNA는 siRNA가 유전자 또는 표적 유전자로서 동일한 세포에 존재하는(예를 들어, 발현되는) 경우 유전자 또는 표적 유전자의 발현을 감소시키거나 억제하는 능력을 갖는다. 상기 siRNA는 전형적으로 길이가 약 5 내지 약 100개의 뉴클레오타이드, 보다 전형적으로는 길이가 약 10 내지 약 50개의 뉴클레오타이드, 보다 전형적으로는 길이가 약 15 내지 약 30개의 뉴클레오타이드, 가장 전형적으로는 약 20 내지 30개 염기 뉴클레오타이드 또는 길이가 약 20 내지 25개 또는 약 24 내지 29개 뉴클레오타이드, 예를 들어, 길이가 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오타이드이다. siRNA 분자 및 이들을 제조하는 방법은 예를 들어, 문헌[참조: Bass, 2001, *Nature*, 411, 428-429; Elbashir et al., 2001, *Nature*, 411, 494-498; WO 00/44895; WO 01/36646; WO 99/32619; WO 00/01846; WO 01/29058; WO 99/07409; and WO 00/44914]에 기재되어 있다. dsRNA 또는 siRNA(예를 들어, 헤파린 듀플렉스 로서)를 전사하는 DNA 분자는 또한 RNAi를 제공한다. dsRNA를 전사하기 위한 DNA 분자는 문헌[참조: 미국 특허 제6,573,099호, 및 미국 특허원 공개번호 제2002/0160393호 및 제2003/0027783호, 및 Tuschl and Borkhardt, *Molecular Interventions*, 2:158 (2002)]에 기재되어 있다. 소형이거나 짧은 헤어핀 RNA 분자(shRNA)는 예를 들어, 전사에 의해 세포내에서 상기 DNA 분자에 의해 제조된다. shRNA는 전형적으로 천연의 miRNA에서 발견되는 헤어핀과 유사한 짧은 루프의 뉴클레오타이드에 의해 연결된 2개의 상보적 RNA 서열을 포함한다. 전형적으로, shRNA 분자는 길이가 약 20 내지 30개 염기 뉴클레오타이드 또는 약 19 내지 22개, 또는 약 20 내지 25개 또는 약 24 내지 29개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 길이가 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오타이드이고, 헤어핀을 형성하는 뉴클레오타이드의 짧은 루프는 길이가 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개 뉴클레오타이드이다.

[0025]

siRNA는 직접 투여될 수 있거나 siRNA 발현 벡터는 상이한 디자인 기준을 갖는 RNAi를 유도하기 위해 사용될 수 있다. 벡터는 짧은 스페이서 서열에 의해 분리되어 있고 전사를 종결시키는 작용을 하는 일련의 T의 말단으로 종료된 2개의 삽입된 역위 반복체를 가질 수 있다.

[0026]

상기 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 본원에서 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용된다. 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 아미노산의 인공 화학적 모사체인 아미노산 중합체, 및 천연 아미노산 중합체 및 비-천연 아미노산 중합체에 적용된다.

[0027]

상기 용어 "아미노산"은 천연 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모사체 뿐만 아니라 천연 및 합성 아미노산을 지칭한다. 천연 아미노산은 이후 변형된 아미노산들, 예를 들어, 하이드록시프롤린, γ -카복시글루타메이트, 및 O-포스포세린 뿐만 아니라 유전자 코드에 의해 암호화된 것들이다. 아미노산 유사체는 천연 아미노산과 동일한 기본 화학적 구조, 즉, 수소, 카복실 그룹, 아미노 그룹 및 R 그룹에 결합된 a-탄소를 갖는 화합물, 예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설록사이드, 메티오닌 메틸 설포늄을 지칭한다. 상기 유사체는 변형된 R 그룹(예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩타이드 골격을 갖지만 천연 아미노산과 동일한 기본 화학적 구조를 보유한다. 아미노산 모사체는 아미노산의 일반 화학적 구조와는 상이하지만 천연 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 구조를 갖는 화학적 화합물을 지칭한다.

[0028]

아미노산은 본원에서 기관[IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission]에 의해 추천되는 이들의 통상적으로 공지된 3문자 심볼 또는 1문자 심볼에 의해 지칭될 수 있다. 마찬가지로 뉴클레오타이드는 이들의 통상적으로 수용되는 1문자 코드에 의해 지칭될 수 있다.

[0029]

"보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 둘다에 적용된다. 특정 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체는 동일하거나 필수적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 지칭하거나 상기 핵산이 아미노산 서열을 암호화하지 않는 경우, 필수적으로 동일한 서열을 지칭한다. 유전자 코드의 축퇴성 때문에, 대다수의 기능적으로 동일한 핵산은 임의의 소정의 단백질을 암호화한다. 예를 들어, 상기 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU 모두는 아미노산 알라닌을 암호화한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 특정된 모든 위치에서, 상기 코돈은 암호화된 폴리펩타이드를 변형시키는 것 없이 기재된 상응하는 임의의 코돈으로 변화될 수 있다. 상기 핵산 변형은 보존적으로 변형된 변형의 한 종류인 "사일런트 변형"이다. 본원에서 폴리펩타이드를 암호화하는 모든 핵산 서열은 또한 모든 가능한 핵산의 사일런트 변형을 기재한다. 당업자는 핵산에서 각각의 코돈(통상적으로 메티오닌에 대해 유일한 코돈인 AUG 및 통상적으로 트립토판에 대해 유일한 코돈인 TGG를 제외하고는)이 기능적으로 동일한 문자를 생성하도록 변형될 수 있음을 인지할 것이다. 따라서, 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 각각의 사일런트 변형은 발현 생성물과 관련하여 그러나 실제 프로브 서열과는 관련되지 않는 각각의 기재된 서열에서 절대적이다.

[0030]

아미노산 서열에 관하여, 당업자는 암호화된 서열에서 단일 아미노산 또는 적은 %의 아미노산을 변화시키거나,

첨가하거나 결실시키는 핵산, 웨타이드, 폴리웨타이드 또는 단백질 서열에 대한 개별 치환, 결실 또는 첨가가, 상기 변화가 아미노산을 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환시키는 "보존적으로 변형된 변이체임"을 인지할 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당업계에 널리 공지되어 있다. 상기 보존적으로 변형된 변이체는 또한 다형성 변이체, 중간 동족체 및 대립유전자이고 이들을 배제하지 않는다.

[0031] 하기의 8개 그룹은 각각 서로에 대해 보존적 치환인 아미노산을 함유한다: 1) 알라닌 (A), 글라이신 (G); 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E); 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q); 4) 아르기닌 (R), 라이신 (K); 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W); 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M) (문헌참조: 예를 들어, Creighton, Proteins (1984)).

[0032] 용어 "엄중 하이브리드화 조건"은 프로브가 전형적으로 핵산의 복합 혼합물에서 이의 표적 서브서열에 하이브리드화하지만 다른 서열에는 하이브리드화하지 않는 조건을 지칭한다. 엄중 조건은 서열 의존적이고 상이한 상황에서 상이할 것이다. 보다 긴 서열은 보다 높은 온도에서 특이적으로 하이브리드화한다. 핵산의 하이브리드화에 대한 광범위한 가이드는 문헌[Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)]에 기재되어 있다. 일반적으로, 엄중 조건은 한정된 이온 강도 pH에서 특정 서열에 대한 열적 융점(T_m)의 약 5 내지 10°C 미만으로 선택된다. 상기 T_m 은 (정의된 이온 강도, pH 및 핵 농도 하에서) 표적에 상보적인 프로브의 50%가 평형 상태에서 표적 서열에 하이브리드화하는(표적 서열이 T_m 에서 과량으로 존재함에 따라, 프로브의 50%는 평형 상태에서 점령된다) 온도이다. 엄중 조건은 또한 포름아미드와 같은 불안정화 제제의 첨가로 성취될 수 있다. 선택적 또는 특이적 하이브리드화를 위해, 양성 시그널은 백그라운드의 적어도 2배이고, 바람직하게는 백그라운드 하이브리드화의 10배이다. 예시적인 엄중 하이브리드화 조건은 다음과 같을 수 있다: 50% 포름아미드, 5x SSC, 및 1% SDS, 42°C에서 항온처리, 또는 5x SSC, 1% SDS, 65°C에서 항온처리, 65°C에서 0.2x SSC, 및 0.1% SDS에서 세척.

[0033] 엄중 조건하에서 서로 하이브리드화하지 않는 핵산은 이들이 암호화하는 폴리웨타이드가 실질적으로 동일한 경우 여전히 실질적으로 동일하다. 이것은 예를 들어, 핵산 복제물이 유전자 코드에 의해 허용되는 최대 코돈 축퇴성을 사용하여 생성되는 경우 존재한다. 상기 경우에, 상기 핵산은 전형적으로 적당한 엄중 하이브리드화 조건하에서 하이브리드화한다. 예시적인 "적당한 엄중 하이브리드화 조건"은 37°C에서 40% 포름아미드, 1 M NaCl, 1% SDS 완충액 중에서의 하이브리드화 및 45°C에서 1 X SSC에서의 세척을 포함한다. 양성 하이브리드화는 백그라운드의 적어도 2배이다. 당업자는 또 다른 하이브리드화 및 세척 조건이 유사한 엄중 조건을 제공하기 위해 사용될 수 있음을 인지할 것이다. 하이브리드화 파라미터를 결정하기 위한 추가의 가이드라인은 다수의 문헌에 제공되어 있고, 예를 들어, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, et al., John Wiley & Sons]을 참조한다.

[0034] PCR을 위해, 약 36°C의 온도는 낮은 엄중 증폭을 위해 전형적이지만 어닐링 온도는 프라이머의 길이에 따라 약 32°C 내지 48°C에서 다양할 수 있다. 높은 엄중 PCR 증폭을 위해, 약 62°C의 온도가 전형적이지만 높은 엄중 어닐링 온도는 프라이머의 길이 및 특이성에 따라 약 50°C에서 약 65°C의 범위일 수 있다. 높고 낮은 엄중 증폭 둘다를 위한 전형적인 사이클 조건은 30초에서 2분동안 90°C 내지 95°C의 변성 단계, 30초에서 2분까지 지속하는 어닐링 단계 및 1 분 내지 2분동안 약 72°C의 연장 단계를 포함한다. 낮고 높은 엄중 증폭 반응을 위한 프로토콜 및 가이드라인은 예를 들어, 문헌[참조: Innis et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.)]에 제공되어 있다.

[0035] "대조군" 샘플 또는 값은 표준, 일반적으로 시험 샘플과 비교하기 위해 공지된 표준으로서 작용하는 샘플을 지칭한다. 예를 들어, 시험 샘플은 예를 들어, 시험 제제의 존재하에 시험 조건으로부터 채취되고 예를 들어, 시험 제제의 부재(네가티브 대조군) 또는 공지된 제제의 존재(양성 대조군)하에 공지된 조건으로부터의 샘플과 비교될 수 있다. 대조군은 또한 다수의 시험 또는 결과들로부터 취합된 평균값을 나타낼 수 있다. 당업자는 대조군이 임의의 다수의 파라미터의 평가를 위해 디자인될 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들어, 대조군은 앤리학적 데이터(예를 들어, 반감기) 또는 치료학적 측정(예를 들어, 부작용의 비교)을 기준으로 치료학적 이득을 비교하기 위해 고안될 수 있다. 당업자는 어느 대조군이 소정의 상황에서 가치가 있을 수 있고 대조군 값과의 비교를 기준으로 데이터를 분석할 수 있는지를 이해할 것이다. 대조군은 또한 데이터의 유의성을 결정하기 위해 가치 있을 수 있다. 예를 들어, 소정의 파라미터에 대한 값이 대조군에서 광범위하게 변수인 경우, 시험 샘플에서 변수는 유의적인 것으로 간주되지 않을 것이다.

[0036] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "암"은 포유동물에서 발견되는 모든 유형의 암, 신생물 또는 악성 종양을 지칭하

고, 이는 백혈병, 암종 및 육종을 포함한다. 예시적인 암은 뇌암, 유방암, 경부암, 결장암, 두경부암, 간암, 신장암, 폐암, 비-소 세포 폐암, 흑색종, 중피종, 난소암, 육종, 위암, 자궁암 및 수모세포종을 포함한다. 추가의 예는 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 신경아세포종, 난소암, 횡문근육종, 원발성 혈소판 증가증, 원발성 고분자글로불린혈증, 원발성 뇌 종양, 암, 악성 췌장 인슐린종, 악성 카르시노이드, 뇌 방광암, 전암성 피부 병소, 고환암, 림프종, 갑상선암, 신경아세포종, 식도암, 비뇨 생식관암, 악성 고칼슘혈증, 자궁내막암, 부신피질암, 내분비 및 외분비 췌장의 신생물 및 전립선암을 포함한다.

[0037]

상기 용어 "백혈병"은 광범위하게 혈액 형성 기관의 진행성 악성 질환을 지칭하고 일반적으로 혈액 및 골수에서 백혈구 및 이의 전구체의 기형 증식 및 발육을 특징으로 한다. 백혈병은 일반적으로 (1) 질환-급성 또는 만성의 지속성 및 특성; (2) 관여하는 세포의 유형; 골수(골수성), 림프구(림프구성), 또는 단핵구; 및 (3) 혈액 백혈병 또는 비백혈병(준백혈병)에서 다수의 비정상 세포에서의 증가 또는 비증가를 기초로 하여 임상적으로 분류된다. 상기 P388 백혈병 모델은 광범위하게 생체내 항-백혈병 활성을 예측하는 것으로서 받아들여진다. P388 검정에서 양성인 시험은 일반적으로 치료될 백혈병 유형과는 상관 없이 일부 생체내 항-백혈병 활성 수준을 나타내는 것으로 사료된다. 따라서, 본원은 백혈병을 치료하는 방법, 및 바람직하게는 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 과립구성 백혈병, 만성 과립구성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 성인 T-세포 백혈병, 비백혈병성 백혈병, 류코사이테믹 백혈병(leukocytemic leukemia), 호염기성 백혈병, 아세포 백혈병, 소 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 피부 백혈병, 배아 백혈병, 호산성 백혈병, 그로스 백혈병, 모발 세포 백혈병, 조혈세포 백혈병, 혈구모세포 백혈병, 조직구 백혈병, 줄기 세포 백혈병, 급성 단핵구 백혈병, 백혈구감소성 백혈병, 림프성 백혈병, 림프아구 백혈병, 림프구성 백혈병, 림프형성 백혈병, 림프구성 백혈병, 림프육종 세포 백혈병, 비만 세포 백혈병, 거핵구성 백혈병, 소골수아구 백혈병, 단핵구성 백혈병, 골수아구성 백혈병, 골수성 백혈병, 골수 과립구성 백혈병, 골수단핵구성 백혈병, 나에렐리 백혈병, 혈장 세포 백혈병, 다발성 골수종, 형질세포성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 리에더 세포 백혈병(Rieder cell leukemia), 철링 백혈병, 줄기 세포 백혈병, 아백 혈성 백혈병, 및 미분화된 세포 백혈병을 포함한다.

[0038]

상기 용어 "육종"은 일반적으로 배아 연결 조직과 같이 물질로 구성되고 일반적으로 미소 섬유 또는 동질성 물질내 매립된 세밀하게 팩킹된 세포로 구성되는 종양을 지칭한다. 항신생물 티올-결합 미토콘드리아 산화제와 항암제의 병용물로 치료될 수 있는 육종은 연골육종, 섬유육종, 림프육종, 흑색육종, 점액육종, 골육종, 아베메티 육종(Abemethy's sarcoma), 지방 육종, 지질육종, 포상 연조직 육종, 에나멜 아세포 육종, 포도송이 모양의 육종, 녹색종 육종, 융모막 암종, 배 육종, 빌름스 종양 육종(Wilms' tumor sarcoma), 자궁내막 육종, 간질성 육종, 어윙 육종(Ewing's sarcoma), 파시알 육종(fascial sarcoma), 섬유모세포 육종, 거대 세포 육종, 과립구 육종, 호지킨 육종, 특발성 다발성 유색 출혈 육종, B 세포의 면역아세포 육종, 림프종, T 세포의 면역아세포 육종, 얀센 육종, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 쿠퍼 세포 육종(Kupffer cell sarcoma), 혈관육종, 백혈육종, 악성 간엽종 육종, 골막주위육종, 망상적혈구 육종, 라우스 육종(Rous sarcoma), 장액낭종 육종, 윤활액 육종 및 텔란기액탈티 육종(telangiectaltic sarcoma)을 포함한다.

[0039]

상기 용어 "흑색종"은 피부 및 다른 기관의 멜라닌 세포 시스템으로부터 발생된 종양을 의미하는 것으로 한다. 항신생물 티올-결합 미토콘드리아 산화제와 항산화제의 병용물로 치료될 수 있는 흑색종은 예를 들어, 말단흑색 흑색종(acral-lentiginous melanoma), 무흑색소성 흑색종(amelanotic melanoma), 양성소아흑색종, 클라우드만 육종(Cloudman's melanoma), S91 흑색종, 하딩-파세이 흑색종(Harding-Passey melanoma), 소아성 흑색종, 악성 흑색점 흑색종, 악성 흑색종(malignant melanoma), 결절성 흑색종, 조갑하 흑색종 및 표재 확장성 흑색종(superficial spreading melanoma)을 포함한다.

[0040]

상기 용어 "암종"은 주변 조직을 침투하는 경향이 있어 전이를 유발하는 상피 세포로 구성된 악성의 새로운 성장을 지칭한다. 항신생물 티올 결합 미토콘드리아 산화제와 항암제의 병용물로 치료될 수 있는 예시적인 암종은 예를 들어, 소핵 암종, 소핵과 암종(acinous carcinoma), 선양낭포 암종, 아데노이드 낭종 암종, 선암종, 부신 피질의 암종, 폐포 암종, 폐포 세포 암종, 기저 세포 암종, 기저세포성 암종(carcinoma basocellulare), 기저양 암종, 기저편평 세포 암종, 기관지폐포 암종, 세기관지 암종, 기관지원성암종, 대뇌양 암종, 담관세포 암종, 융모막 암종, 콜로이드 암종, 코메도 암종(comedo carcinoma), 코퍼스 암종(corpus carcinoma), 소공질 암종, 잔류갑상선암종(carcinoma en cuirasse), 피각 암종, 원주 암종, 실린더형 세포 암종, 관 암종, 드럼 암종, 배아 암종, 대뇌양 암종(encephaloid carcinoma), 상피양 암종(epiermoid carcinoma), 상피 아데노이드 암종(carcinoma epithelial adenoides), 외장성 암종(exophytic carcinoma), 궤양 생성 암종(carcinoma ex ulcere), 섬유층 암종, 젤라티니포르니 암종(gelatiniform carcinoma), 젤라틴성 암종(gelatinous carcinoma), 거대 세포 암종, 거대세포성 암종(carcinoma gigantocellulare), 선천적 암종, 과립막 세포 암종,

모발-메트릭스 암종, 헤마토이드 암종(hematoid carcinoma), 간세포 암종(hepatocellular carcinoma), 허틀 세포 암종(Hurthle cell carcinoma), 하이알린 암종(hyaline carcinoma), 하이페머프로이드 암종(hypemephroid carcinoma), 유아성 배아 암종, 원위치 암종, 표피내 암종, 상피내 암종, 크롬페처 암종(Krompecher's carcinoma), 쿨키트즈키 세포 암종(Kulchitzky-cell carcinoma), 거대-세포 암종(large-cell carcinoma), 수정체 암종, 수정체성 암종, 지방종성 암종, 림프상피성 암종, 수질 암종, 수질성 암종, 흑색증성 암종, 몰레(molle) 암종, 점액 암종, 뮤시파룸 암종(carcinoma muciparum), 점액세포 암종(carcinoma mucocellulare), 점액상피양 암종(mucoepidermoid carcinoma), 추벽 암종(carcinoma mucosum), 점액성 암종, 믹소마토드 암종(carcinoma myxomatodes), 비인두 암종, 귀리 세포 암종, 골화성 암종, 유골 암종, 젖꼭지모양의 암종, 문맥주위 암종, 조직침투전 암종, 프리클 세포 암종(prickle cell carcinoma), 풀모양의 암종, 콩팥의 신장 세포 암종, 저장 세포 암종, 육종성 암종, 상악동막 암종, 딱딱한 섬유질의 암종, 음낭암종, 시그네트-환 세포 암종(signet-ring cell carcinoma), 심플렉스 암종(carcinoma simplex), 소세포 암종, 솔라노이드 암종, 회전 타원체 세포 암종, 스판들 세포 암종, 해면체 암종, 비늘모양의 암종, 비늘모양 세포 암종, 스트링 암종, 텔란기엑타티쿰 암종(carcinoma telangiectaticum), 텔란기엑토데스 암종(carcinoma telangiectodes), 전이 세포 암종, 투버섬 암종(carcinoma tuberosum), 결절성 암종, 사마귀모양의 암종, 및 빌로섬 암종(carcinoma villosum)을 포함한다.

[0041] ShIDO-ST는 감소된 독성과 함께 인돌아민-피롤 2,3-디옥시게나제 (IDO)를 특이적으로 사일런싱하기 위해 소형 헤어핀(sh)RNA를 발현하는 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) (ST) 세포이다. 구체적으로, shIDO-ST는 YS1646 (ATCC 승인 번호 202165, 또한 본원에서 VNP20009로서 지칭됨)로서 공지된, 서열번호 8을 포함하는 IDO로 표적화된 소형 헤어핀 RNA를 발현하는 약독화된 살모넬라 티피무이움으로 구성된다. 상기 세포 기반 치료 요법은 예를 들어, 이의 전문이 본원에 참조로서 인용되는 WO2012/149364에 기재되었다. 하기 실시예에 기재된 바와 같이, 조직에 풍부한 하이알루로난을 고갈시키고 혈관 침투성을 증가시키는 폐길화된 재조합 사람 하이알루로니다제 PH20(PEGPH20TM, Halozyme Inc., San Diego, CA)과 shIDO-ST의 병용은 자생 및 오르토픽 모델에서 확립된 췌장 종양을 효과적으로 억제하고 일부 경우 이를 완전히 제거시킨다. 추가로, PEGPH20TM과 병용되는 대조군 소형 헤어핀 RNA를 함유하는 ST는 또한 종양이 보다 작은 크기인 경우 종양 성장을 억제할 수 있는 것으로 관찰되었다. 재조합 사람 하이알루로니다제 PH20 및 PH20의 폐길화된 형태는 공지되어 있고, 예를 들어, 이들의 전문이 본원에 참조로서 인용되는 문헌[예를 들어, Bookbinder et al., Journal of Controlled Release, 114:230-241 (2006) and Thompson et al., Mol. Cancer Ther. 9:3052-3064 (2010)]에 기재되어 있다.

[0042] 따라서, 세균 세포 및 종양 침투 제제를 포함하는 조성물이 제공된다. 임의로, 상기 조성물은 항암제를 추가로 포함한다. 상기 항암제는 소형 분자, 핵산, 폴리펩타이드 및 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 종양 침투 제제의 예는 하이알루로니다제 폴리펩타이드, 피르페니돈, 사리데깁(Saridegib) (IPI-926), 나노입자, 알부민 나노입자, 텍스트란, 리포좀, 및 세포 침투 웨بت이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 양태에서, 상기 종양 침투 제제는 하이알루로니다제 폴리펩타이드이다. 임의로, 상기 세균 세포 및 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 유효량, 예를 들어, 상승작용적 유효량으로 존재한다. 임의로, 상기 세균 세포는 살모넬라 세균 세포이다. 따라서, 살모넬라 세균 세포 및 하이알루로니다제 폴리펩타이드를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0043] 하이알루로니다제는 일반적으로 3개의 상이한 부류, 포유동물형 하이알루로니다제, 세균성 하이알루로니다제, 및 거미리, 다른 기생충 및 갑각류 동물로부터 기원하는 하이알루로니다제로 분류되는 중성 및 산 활성 효소 그룹이다. 포유동물 유형의 하이알루로니다제는 엔도- β -N-아세틸헥소스아미니다제이고, 이는 가수분해성 및 트랜스글리코시다제 활성 둘다를 갖고 2개의 그룹인 중성 활성 및 산 활성 효소로 추가로 분류될 수 있다. 사람 게놈에는 6개의 하이알루로니다제형 유전자인 HYAL1, HYAL2, HYAL3 HYAL4 HYALP1 및 PH20/SPAM1이 있고, 이는 하이알루로난 및 콘드로이틴 설플레이트(CS), 구체적으로 C4-S 및 C6-S를 분해시킬 수 있다. 하이알루로난은 많은 세포의 세포외 매트릭스에서 발견되고 종양형성을 포함하는 세포 이동성과 관련된 생물학적 현상에서 중요한 역할을 수행한다. 제공된 방법 및 조성물에 사용하기 위해 적합한 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 포유동물 하이알루로니다제, 예를 들어, PH-20 하이알루로니다제를 포함한다. 임의로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2 또는 이의 단편을 포함한다. 전반적으로 사용된 바와 같은 용어 "하이알루로니다제 폴리펩타이드"는 도메인, 단편 및 이의 변이체를 포함한다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 단편이 촉매적 활성을 유지하는 한, 예를 들어, 폴리펩타이드가 하이알루론 및/또는 콘드로이틴 설플레이트 분해시키는 능력을 보유하고 있는 한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 단편을 포함할 수 있다. 추가로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 하이알루로니다제가 촉매 활성을 유지하고 있는 한 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 1 또는 서열번호 2, 또는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 단편을 포함할 수

있다. 임의로, 아미노산 치환은 상기 보다 상세하게 기재된 바와 같은 보존성 아미노산 치환이다. 예를 들어, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 서열번호 1의 단편, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 35번 내지 464번 또는 서열번호 1에 제시된 아미노산의 전체 서열을 포함할 수 있다. 하이알루로니다제의 예시적 아미노산 서열은 예를 들어, 기관[GenBank 승인 번호 NM_003117 및 NM_153189.2]에서 발견될 수 있고 하이알루로니다제의 예시적인 폴리펩타이드 서열은 예를 들어, 기관[GenBank 승인 번호 NP_003108 및 NP_694859]에서 발견될 수 있다. 제공된 조성물, 키트 및 방법에 사용하기에 적합한 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 미국 특허 제7,767,429호; 제7,829,081호; 제7,846,431호; 제7,871,607호; 제8,105,586호; 제8,202,517호; 제8,257,699호; 제8,431,380호; 및 제8,450,470호에 기재되어 있고, 이들 각각은 이들의 전문이 본원에 참조로서 인용된다. 임의로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 화학적으로 변형된 하이알루로니다제 폴리펩타이드이고, 즉, 상기 폴리펩타이드는 하나 이상의 글리코실화되고/되거나 폐길화된 잔기를 포함하도록 변형시켰다. 임의로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 폐길화되어 있다. 임의로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 PEGPH20TM (Halozyme, Inc., San Diego, CA)이고, 이는 하기의 실시예에 사용된다. PEGPH20TM (Halozyme, Inc., San Diego, CA)은 폐길화에 의해 변형된 재조합 사람 하이알루로니다제 PH-20 (서열번호 1)이다. 따라서, PEGPH20TM (Halozyme, Inc., San Diego, CA)는 폐길화된 재조합 사람 하이알루로니다제 PH-20이다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같은 용어 웨타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 웨타이드 결합에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산을 의미하기 위해 광범위하게 사용된다. 단백질, 웨타이드 및 폴리펩타이드는 또한 본원에서 아미노산 서열을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 용어 폴리펩타이드는 본원에서 상기 분자를 포함하는 특정 크기 또는 수의 아미노산들을 시사하기 위해 사용되지 않고 본 발명의 웨타이드는 여러개의 아미노산 잔기들 또는 그 이상까지 함유할 수 있는 것으로 인지되어야 한다. 상기 웨타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질 서열, 변이체 및 이의 단편을 암호화할 수 있는 핵산이 또한 기재된 것으로 이해된다. 이것은 폴리펩타이드 서열의 기재된 변이체 및 유도체를 암호화하는 축퇴성 핵산을 포함하는 모든 핵산 뿐만 아니라 특정 폴리펩타이드 서열과 관련된 모든 축퇴성 서열, 즉, 하나의 특정 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 서열을 갖는 모든 핵산을 포함한다. 따라서, 각각의 특정 핵산 서열이 본원에서 기재될 수 없지만 각각 및 모든 서열은 실제 기재되고 본원에서 상기된 폴리펩타이드 서열을 통해 기재되어 있는 것으로 이해된다.

[0045] 단편을 포함하는 모든 웨타이드, 폴리펩타이드 및 단백질에 관하여, 폴리펩타이드인 제공된 제제의 아미노산 서열에서 추가의 변형이 존재할 수 있고 이는 웨타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 특성 또는 기능을 변화시키지 않는 것으로 이해된다. 따라서, 하이알루로니다제 폴리펩타이드의 변형은 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드가 촉매적으로 활성을 유지하고, 예를 들어, 상기 폴리펩타이드가 하이알루론 및/또는 콘드로이틴 셀페이트를 분해시키는 능력을 보유하고 있는 한 만들어질 수 있다. 상기 변형은 예를 들어, 보존성 아미노산 치환을 포함한다. 따라서, 폴리펩타이드 또는 핵산을 포함하는 상기 제공된 제제는 목적하는 기능이 유지되는 한 추가로 변형되고 다양해질 수 있다. 임의의 공지된 변형 및 유도체 또는 본원에 기재된 핵산 서열 및 단백질 중에서 일어날 수 있는 것들을 한정하기 위한 한가지 방법이 특정 공지된 서열과의 동일성 측면에서 변형 및 유도체를 한정함을 통한 것으로 이해된다. 본원에 제공된 폴리펩타이드와 적어도 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % 이상의 동일성을 갖는 폴리펩타이드가 제공된다. 당업자는 상기 보다 상세하게 논의된 바와 같은 2개의 폴리펩타이드의 동일성을 결정하는 방법을 용이하게 이해한다.

[0046] 제공된 조성물, 키트 및 방법에 유용한 세균 세포는 살모넬라 세균 세포, *비피도박테리아*(*Bifidobacteria*) 세균 세포, *리스테리아모노사이토게네스*(*Listeria monocytogenes*) 세균 세포, *클로스트리디움 히스토리티쿠스*(*Clostridium histolyticus*) 세균 세포, *클로스트리디움 노비이*(*Clostridium novyi*) 세균 세포, *비브리오 콜레라*(*Vibrio cholera*) 세균 세포, *쉬겔라*(*Shigella*) 세균 세포, *스트렙토코코스*(*Streptococcus*) 세균 세포, *마이코박테리움 보비스*(*Mycobacterium bovis*) 세균 세포, *예르시니아 엔테로콜리티카*(*Yersinia enterocolitica*) 세균 세포, *마실러스 안트라시스*(*Bacillus anthracis*) 세균 세포, *락토바실러스*(*Lactobacillus*) 세균 세포, *스타필로코코스*(*Staphylococcus*) 세균 세포, *이. 콜라이*(*E. coli*) 세균 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 임의로, 상기 *스트렙토코코스*(*Streptococcus*) 세균 세포는 *스트렙토코코스 피로게네스*(*Streptococcus pyrogenes*) 세균 세포 또는 *스트렙토코코스 고르도니*(*Streptococcus gordoni*) 세균 세포이다. 적합한 세균 세포는 이의 본문이 본원에 참조로서 인용되는 문헌[참조: 국제 공개 번호 WO 2012/149364]에 기재된 세균 세포를 포함한다. 임의로, 살모넬라 세균 세포는 약독화된 살모넬라 균주, 예를 들어, 임의의 혈청형 또는 살모넬라 엔테리카이고, 이는 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella*

enteritidis) 또는 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 임의로, 상기 살모넬라 세균 세포는 살모넬라 티피무리움의 약독화된 균주이다. 약독화된 살모넬라 티피무리움 균주는 YS1646, RE88, LH430, SL7207, X8429, X8431 또는 X8468를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 임의로, 약독화된 살모넬라 티피무리움 균주는 YS1646 살모넬라 티피무리움 균주 (ATCC 승인번호 202165, 또한 본원에서 VNP20009로서 지칭됨)이고 이는 하기 실시예에 사용되고 shIDO-ST를 생성하기 위해 사용된 균주이다.

[0047] 임의로, 본원에 제공된 세균 세포는 질환 또는 장애의 치료를 위해 적합한 하나 이상의 분자를 포함한다. 임의로, 상기 질환 또는 장애는 암이다. 따라서, 상기 세균 세포는 항체 또는 이의 기능성 단편, 소분자, 암타마, 핵산 및 RNA 간섭 분자 (예를 들어, 소형 간섭 RNA (siRNA), 마이크로RNA (miRNA) 및 소형 헤어핀 RNA (shRNA))를 포함하지만 이에 제한되지 않는 표적 유전자 발현 또는 표적 단백질 활성을 차단하거나, 억제하거나 저해할 수 있는 하나 이상의 제제를 포함할 수 있다. 임의로, 상기 세균 세포는 기능성 핵산, 예를 들어, 안티센스 핵산을 포함한다.

[0048] 기능성 핵산은 특이적 기능을 갖는, 예를 들어, 표적 분자에 결합하거나 특이적 반응을 촉매하는 기능을 갖는 핵산 분자이다. 기능성 핵산 분자는 DNA, RNA, 폴리펩타이드 또는 탄수화물 쇄와 같은 임의의 거대분자와 상호 작용할 수 있다. 따라서, 기능성 핵산은 직접적으로 표적 분자와 상호작용할 수 있다. 흔히 기능성 핵산은 표적 핵산과 기능성 핵산 분자간의 서열 상동성을 기준으로 다른 핵산과 상호작용하도록 디자인된다.

[0049] 안티센스 핵산 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 정본 또는 비-정본 염기쌍 형성을 통해 표적 핵산 분자와 상호작용하도록 디자인된다. 안티센스 분자와 표적 분자의 상호작용은 예를 들어, RNaseH 매개된 RNA-DNA 하이브리드 분해를 통해 표적 분자의 파괴를 촉진하도록 디자인되어 있다. 대안적으로, 상기 안티센스 분자는 전사 또는 복제와 같이, 표적 분자상에 통상적으로 일어나는 프로세싱 기능을 방해하도록 디자인되어 있다. 안티센스 분자는 표적 분자의 서열을 토대로 디자인될 수 있다. 표적 분자의 가장 접근가능한 영역을 모색함에 의한 안티센스 효능의 최적화를 위한 다수의 방법이 존재한다. 예를 들어, 문헌[Vermeulen et al., RNA 13: 723-730 (2007) 및 WO2007/095387 및 WO 2008/036825; Yue, et al., Curr. Genomics, 10(7):478-92 (2009) and Lennox Gene Ther. 18(12):1111-20 (2011)]을 참조하고, 이들은 전문이 본원에 참조로 인용된다. 임의로, 상기 안티센스 핵산은 짧은 헤어핀 RNA이고 이는 고정된 헤어핀 턴을 만드는 RNA의 서열이다. 임의로, 상기 안티센스 핵산은 siRNA 또는 miRNA이다. 안티센스 핵산은 표준 핵산 합성 기술을 사용하여 디자인되고 제조될 수 있거나 상업적 제조원[예를 들어, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 또는 Regulus Therapeutics (San Diego, CA)]으로부터 수득될 수 있다.

[0050] 임의로, 상기 안티센스 핵산의 골격은 시험관내 및 생체내 안정성을 개선하고 안티센스 분자의 생체내 전달을 개선하기 위해 다양한 화학적 변형에 의해 변형시킨다. 안티센스 분자의 변형은 2'-0-메틸 변형, 3' 말단에 말단 포스포로티오에이트 및 콜레스테롤 그룹을 갖는 2'-0-메틸 변형된 리보스 당, 2'-0-메톡시에틸 (2'-MOE) 변형, 2'-플루오로 변형, 및 2',4' 메틸렌 변형 ("잠겨진 핵산" 또는 LNA로서 지칭됨)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 따라서, 억제 핵산은 예를 들어 변형된 올리고뉴클레오타이드 (2'-0-메틸화된 또는 2'-0-메톡시에틸), 잠겨진 핵산 (LNA; 문헌참조: 예를 들어, Valčík et al., Nucleic Acids Res. 32(22):e175 (2004)), 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드(문헌참조: 예를 들어, Kloosterman et al., PLoS Biol 5(8):e203 (2007)), 펩타이드 핵산 (PNA), PNA-펩타이드 접합체, 및 LNA/2'-0-메틸화된 올리고뉴클레오타이드 혼합체(문헌참조: 예를 들어, Fabiani and Gait, RNA 14:336-46 (2008))를 포함한다.

[0051] 임의로, 상기 안티센스 핵산은 대사 효소, 면역억제 표적 또는 암 표적을 표적화한다. 임의로, 상기 안티센스 핵산은 면역억제 표적을 표적화하고 상기 면역억제 표적은 STAT3, IDO1, IDO2, 아르기나제 1, iNOS, CTLA-4, TGF-β, IL-10, pGE2 또는 VEGF이다. 임의로, 상기 면역억제 표적은 IDO1이다.

[0052] 면역억제 표적 유전자 또는 단백질의 저해, 억제 또는 차단은 궁극적으로 직접 또는 간접적 기작을 통해 종양 미세환경내에서 종양 유래된 면역억제를 붕괴시킨다. 따라서, 상기 제제는 STAT3, IDO1, IDO2, 아르기나제 1 (Arg1), iNOS, CTLA-4, IL-10, VEGF, pEGF2, 또는 TGF-β를 표적화하는 안티센스 핵산일 수 있다. 이들의 아미노산 및 핵산 서열을 포함하는 이들 표적은 공지되어 있고, 공지되고 본원에 기재된 바와 같이, 이들 표적의 핵산 서열은 공지된 방법을 사용하여 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 짧은 헤어핀RNA를 포함하는 억제 핵산 분자를 생성시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 세균 세포는 서열번호 3 내지 31의 하나 이상의 하기 안티센스 핵산을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 안티센스 핵산은 STAT3을 표적화할 수 있고 shSTAT3#58: AGTTCCCTGGCACCTTGGATTGAGAGTCAA (서열번호 3), shSTAT3#59: ACTGGATAACTCATTAGCAGAATCTCAA (서열번호 4), shSTAT3#60: CATCAATCCTGTGGTATAACATGCTGACC (서열번호 5), 또는 shSTAT3#61: ACCTGAAGACCAAGTTCATCTGTGTGACA

(서열번호 6)을 포함하는 짧은 헤어핀 RNA일 수 있다. 상기 안티센스 핵산은 ID01을 표적화할 수 있고 shID01-8: CCTCGCAATAGTAGACT (서열번호 7), shID01-9: CGCTCTCTATTGGTGGAA (서열번호 8), shID01-10: GCAAAGAACCTCCTGCAGA (서열번호 9), shID01-11: GCCCATGACATACGAGAAC (서열번호 10), 또는 shID01-12: CCAGTCGGTAGTTGTCA (서열번호 11)을 포함하는 짧은 헤어핀 RNA일 수 있다. 상기 안티센스 핵산은 Arg1을 표적화할 수 있고 shArg1-5: GCAGTCCTTCTGGTATG (서열번호 12), shArg1-6: GCCTTGTTGATGTCCT (서열번호 13), shArg1-7: CCAGGGACTGACTACCTTA (서열번호 14), shArg1-8: GCCAAAGACATCGTGTACA (서열번호 15), 또는 shArg1-9: TCTCTACATCACAGAAGA (서열번호 16)을 포함하는 짧은 헤어핀 RNA일 수 있다. 상기 안티센스 핵산은 iNOS를 표적화할 수 있고 shiNOS-43: GTATTGACTATTGTGGACTA (서열번호 17), shiNOS-44: CCAGTATTATGGCTCCTTAA (서열번호 18), shiNOS-45: GCCACAGCAATATAGGCTCAT (서열번호 19), shiNOS-46: CCTATCTCCTACTACTA (서열번호 20), 또는 shiNOS-47: GCTGTAACAAAGGAAATAGAA (서열번호 21)을 포함하는 짧은 헤어핀 RNA일 수 있다. 상기 안티센스 핵산은 ID02를 표적화할 수 있고 CGCAGTTATGAGCTTCTTAA (서열번호 22), CCGCAGTTATGAGCTTCTTA (서열번호 23), CCTGGGATAAAGGCTTGT (서열번호 24), GAAAGCTATCACATATCTGAA (서열번호 25), CTTTGGAAAGCTATCACATAT (서열번호 26), CCATTGTCCTTGAAAGCTAT (서열번호 27), CTTCTCCAGATTCTGAAA (서열번호 28), GCTTCAGCTCATGTGGACAA (서열번호 29), CAAGGAATCTTGCCTTCCAT (서열번호 30), GCAGTGCCATTGTCTTGGAA (서열번호 31)을 포함하는 짧은 헤어핀 RNA일 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 안티센스 분자는 용이하게 디자인될 수 있고 공지된 방법을 사용하는 공지된 표적의 핵산 서열을 사용하여 수득될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 분자는 디자인될 수 있고 표준 핵산 합성을 사용하여 제조되거나 상업적 제조원[예를 들어, Regulus Therapeutics (San Diego, CA)]으로부터 수득될 수 있다.

[0053]

표적 유전자 발현 또는 표적 단백질 활성을 차단하거나, 억제하거나 저해할 수 있는 제제, 예를 들어, 안티센스 핵산은 세균 세포에서 발현 벡터 또는 카세트로부터 발현될 수 있다. 적합한 발현 벡터, 예를 들어, 플라스미드 및 이들의 사용 방법은 공지되어 있다.

[0054]

본원에 제공된 제제를 포함하는 조성물은 본원에 제공된다. 제공된 조성물은 단일 제제, 예를 들어, 세균 세포 또는 하나 이상의 제제, 예를 들어, 세균 세포 및 종양 침투 제제를 포함할 수 있다. 상기 제공된 조성물은 임의로 시험관내 또는 생체내 제형 및 투여를 위해 적합하다. 임의로, 상기 조성물은 하나 이상의 제공된 제제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 적합한 담체 및 이들의 제형은 문헌[참조: Remington: *The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition*, David B. Troy, ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005)]에 기재되어 있다. 약제학적으로 허용되는 담체란 생물학적으로 또는 다른 목적하지 않는 것이 아닌 물질을 의미하고, 즉, 상기 물질은 목적하지 않은 생물학적 효과를 유발하지 않거나 이것이 함유된 약제학적 조성물의 다른 성분과 해로운 방식으로 상호작용하는 것 없이 대상체에게 투여된다. 대상체에 투여되는 경우, 상기 담체는 임의로 활성 성분의 분해를 최소화하고 대상체내 부작용을 최소화하기 위해 선택된다.

[0055]

용어 "약제학적으로 허용되는 염" 또는 "약제학적으로 허용되는 담체"는 본원에 기재된 제제상에서 발견되는 특정 치환체에 의존하여 비교적 비독성 산 또는 염기를 사용하여 제조되는 활성 제제의 염을 포함하는 것으로 의미된다. 본원의 제제가 비교적 산성 기능기를 함유하는 경우, 염기 부가 염은 상기 제제의 중성 형태를, 순수하거나 적합한 불활성 용매 중에서 충분한 양의 목적하는 염기와 접촉시킴에 의해 수득될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염기 부가 염의 예는 나트륨, 칼륨, 칼슘, 암모늄, 유기 아미노, 또는 마그네슘 염, 또는 유사 염을 포함한다. 본 발명의 제제가 비교적 염기성 기능기를 함유하는 경우, 산 부가 염은 중성 형태의 상기 제제를, 순수하거나 적합한 불활성 용매 중에서 충분한 양의 목적하는 산과 접촉시킴에 의해 수득될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 산 부가 염의 예는 염산, 브롬화수소산, 질산, 탄산, 탄산일수소산, 인산, 인산일수소산, 인산이 수소산, 황산, 황산일수소산, 요오드화수소산, 또는 인산 등과 같은 무기산으로부터 유래된 것들 뿐만 아니라 아세트산, 프로피온산, 이소부티르산, 말레산, 말론산, 벤조산, 숙신산, 수베르산, 푸마르산, 락트산, 만델산, 프탈산, 벤젠설폰산, p-톨릴설폰산, 시트르산, 타르타르산, 메탄설폰산 등과 같은 비교적 비독성의 유기산으로부터 유래된 염들을 포함한다. 또한 아르기네이트 등과 같은 아미노산의 염 및 글루쿠론산 또는 갈라구노르산 등과 같은 유기산의 염이 포함된다(문헌참조: 예를 들어, Berge et al., *Journal of Pharmaceutical Science* 66:1-19 (1977)). 당업자에게 공지된 다른 약제학적으로 허용되는 담체는 본원의 조성물을 위해 적합하다.

[0056]

상기 제제는 공지된 방법, 예를 들어, 정맥내 투여, 예를 들어, 볼러스 또는 일정 기간 동안 연속 주입에 의해, 근육내 경로, 복강내 경로, 뇌척수내 경로, 피하 경로, 관절내 경로, 활액내 경로, 척추강내 경로, 장내 경로, 피내 경로, 경구 경로, 국소 경로, 종양내 경로, 비경구 경로 또는 흡입 경로에 따라 투여된다. 따라서, 상기 조성물은 국부 또는 전신 치료가 요구되는지 및 치료될 영역에 따라 다수의 방법으로 투여된다.

[0057]

투여용 조성물은 통상적으로 약제학적으로 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체 중에 용해된 본원에 기재된

바와 같은 제제를 포함한다. 다양한 수성 담체, 예를 들어, 완충 식염 수 등이 사용될 수 있다. 이들 용액은 멸균성이고 일반적으로 목적하지 않는 문제점이 없다. 이들 조성물은 통상의 널리 공지된 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 상기 조성물은 pH 조정 및 완충제, 독성 조정제 등과 같이 대략적인 생리학적 조건에 요구되는 바와 같은 약제학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들어, 나트륨 아세테이트, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 나트륨 락테이트 등을 함유할 수 있다. 이들 제형 중에 활성제의 농도는 광범위하게 다양할 수 있고 선택된 특정 투여 방식 및 대상체의 필요성에 따라 주로 유체 용적, 점도, 체중 등을 기준으로 선택된다.

[0058] 유리 염기 또는 약제학적으로 허용되는 염으로서 활성제의 용액은 하이드록시프로필셀룰로스와 같은 계면활성제와 적합하게 혼합된 물 중에서 제조될 수 있다. 분산제는 또한 글리세릴, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이의 혼합물 중에서 및 오일 중에서 제조될 수 있다. 통상적인 보관 및 사용 조건하에서, 이들 제제는 미생물의 성장을 예방하기 위한 보존제를 함유할 수 있다.

[0059] 경구 제제는 예를 들어, 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등과 같은 부형제를 포함할 수 있다. 이들 조성물은 용제, 혼탁제, 정제, 환제, 캡슐제, 지연 방출 제형 또는 산제 형태를 취한다. 일부 양태에서, 경구 약제학적 조성물은 불활성 희석제 또는 동화성 식용 담체를 포함하거나 이들은 경질 또는 연질 헬겔라틴 캡슐에 내포될 수 있거나 이들은 정제로 타정되거나 이들은 직접 식이 음식물에 혼입될 수 있다. 경구 치료학적 투여를 위해, 상기 활성제는 부형제와 함께 혼입될 수 있고 섭취가능한 정제, 협측 정제, 트로키제, 캡슐, 엘릭시르, 혼탁제, 시럽, 웨이퍼제 등의 형태로 사용될 수 있다. 상기 조성물 및 제제는 적어도 0.1%의 활성제를 함유해야 한다. 조성물 및 제제의 %는 물론 다양할 수 있고 간편하게 유니트 중량의 약 2 내지 약 75%, 또는 바람직하게 25 내지 60%일 수 있다. 상기 조성물 중 활성제의 양은 적합한 용량이 수득될 수 있도록 하는 것이다.

[0060] 수용액 중 비경구 투여를 위해, 예를 들어, 상기 용액은 적합하게 완충되어야만 하고 액체 희석제는 처음에 충분한 식염수 또는 글루코스와 등장성이 되게 한다. 수용액, 특히, 멸균 수성 매질은 특히 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여를 위해 적합하다. 예를 들어, 하나의 용량은 1ml의 등장성 NaCl 용액 중에 용해시킬 수 있고 경막외강 유체 1000ml에 부가되거나 제안된 주입 부위에 주사된다.

[0061] 멸균성 주사용 용액은 적당한 용매 중에 요구되는 양으로 활성제 또는 작제물을 혼입함에 의해 이어서 여과 멸균함에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산제는 다양한 멸균 활성 성분을 염기성 분산 매질을 함유하는 멸균 비히클에 혼입시킴에 의해 제조된다. 활성 성분 및 임의의 추가의 목적하는 성분의 산체를 생성시키는 진공 건조 및 동결 건조 기술을 사용하여 멸균 주사가능한 용액의 재구성을 위해 멸균 산체를 제조할 수 있다. 직접 주사를 위한 보다 농축되거나 고도로 농축된 용액의 제제가 또한 고려된다. DMSO는 극히 신속한 침투를 위해 용매로서 사용될 수 있고 고농도의 활성 제제를 작은 영역으로 전달한다.

[0062] 제제의 제형은 단위 용량 또는 다중 용량 밀봉된 컨테이너, 예를 들어, 앰풀을 및 바이엘에 제공될 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 단위 용량 형태로 존재할 수 있다. 상기 형태에서, 상기 제제는 적당한 양의 활성 성분을 함유하는 단위 용량을 세분된다. 따라서, 상기 조성물은 투여 방법에 따라 다양한 단위 용량 형태로 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여를 위해 적합한 단위 용량 형태는 산제, 정제, 환제, 캡슐 및 로젠지를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0063] 본원에 기재된 조성물 및 제제는 예방학적 및 치료학적 치료 둘다를 위해 유용하다. 예방학적 사용을 위해, 본원에 기재된 치료학적 유효량의 제제들은 조기 발병 전 또는 동안에(예를 들어, 암의 초기 징후 및 증상) 대상체에게 투여된다. 치료학적 치료는 질환의 진단 또는 발병 후 본원에 기재된 치료학적 유효량의 제제를 대상체에게 투여함을 포함한다.

[0064] 유효량, 예를 들어, 조합된 유효량의 세균 세포 및 종양 침투 제제를 대상체에게 투여함을 포함하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 본원에 제공되고, 여기서, 투여는 대상체에서 암을 치료한다. 임의로, 유효량 또는 조합된 유효량은 상승작용 양 또는 조합된 상승작용적 유효량이다. 또한, 유효량의 세균 세포 및 종양 침투 제제를 대상체에게 투여함을 포함하는, 대상체에서 면역계를 자극하는 방법이 제공되고, 여기서, 세균 세포 및 종양 침투 제제의 투여는 대상체의 면역계를 자극한다. 임의로, 면역 반응은 항암 면역 반응이다. 임의로, 상기 제공된 방법은 항암제를 대상체에게 투여함을 추가로 포함한다. 임의로, 상기 항암제는 세균 세포 및 종양 침투 제제의 투여에 후속적으로 투여된다.

[0065] 종양 세포를 세균 세포, 종양 침투 제제 및 항암제와 접촉시킴을 포함하는 항암제의 종양 세포로의 전달을 증진시키는 방법이 추가로 제공되고, 여기서, 세균 세포 및 세포 침투 제제의 투여는 항암제의 전달을 증진시킨다.

[0066]

항암제는 소분자, 핵산, 폴리펩타이드, 및 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 항암제는 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[*Physician's Drug Handbook, 12th Edition*, Lippincott, Williams & Wilkins, (2007) 또는 *Physician's Cancer Chemotherapy Drug Manual 2013*, by Chu and DeVita, Jones & Bartlett Learning, LLC, (2013)]을 참조한다. 임의로, 항암제는 화학치료학적 제제이다. 화학치료학적 제제는 종양의 성장을 억제할 수 있는 제제이다. 상기 제제는 5-플루오로우라실; 켐시타빈; 마이토마이신 C; 메토트렉세이트; 하이드록시우레아; 사이클로포스파미드; 다카바진; 미톡산트론; 안트라사이클린 (에피루비신 및 독소루비신); 수용체에 대한 항체, 예를 들어 헤르셉틴; 에토포사이드; 프레그나졸; 호르몬 치료요법, 예를 들어, 타목시펜 및 항-에스트로겐; 인터페론; 아로마타제 억제제; 프로게스테론 제제; 및 LHRH 유사체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0067]

임의로, 제공된 방법에서, 상기 종양 침투 제제는 세균 세포 전에 투여된다. 상기 방법이 항암제의 투여를 포함하는 경우, 상기 항암제는 세균 세포 및/또는 종양 침투 제제의 투여 후 투여될 수 있다. 따라서, 병용되는 제제 또는 조성물은 일시에(예를 들어, 혼합물로서), 별도이지만 동시에(예를 들어, 별도의 정맥선을 통해) 또는 후속적으로(예를 들어, 하나의 제제가 먼저 투여되고 이어서 제2 제제가 투여된다) 투여될 수 있다. 따라서, 상기 용어 병용은 2개 이상의 제제 또는 조성물의 일시, 동시 또는 후속적 투여를 지칭하기 위해 사용된다.

[0068]

제공된 방법에서, 상기 세균 세포 및 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 임의로 유효량, 예를 들어, 상승작용적 유효량으로 존재한다. 임의로, 상기 세균 세포는 살모넬라(*Salmonella*) 세균 세포이다. 임의로, 상기 종양 침투 제제는 하이알루로니다제 폴리펩타이드이다. 임의로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2 또는 이의 단편을 포함한다. 제공된 조성물에 사용하기 위해 적합한 하이알루로니다제 폴리펩타이드, 키트 및 방법은 문헌[참조: 미국 특허 제7,767,429호; 제7,829,081호; 제7,846,431호; 제7,871,607호; 제8,105,586호; 제8,202,517호; 제8,257,699호; 제8,431,380호; 및 제8,450,470호]에 기재되어 있고, 이들 문헌 각각은 이의 전문이 본원에 참조로서 인용된다. 임의로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 변형된 하이알루로니다제 폴리펩타이드이다. 임의로, 상기 알루로니다제 폴리펩타이드는 폐길화되어 있다. 임의로, 상기 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 PEGPH20TM (Halozyme, Inc., San Diego, CA)이다.

[0069]

임의로, 상기 종양 침투 제제는 피르페니돈(pirfenidone) (문헌참조: Kozono et al., *Cancer Res.* 73(7):2345-56 (2013)), IPI-929 (문헌참조: Olive et al., *Science* 324(5933):1457-61 (2009)), 나노입자, 알부민 나노입자, 텍스트란, 리포좀, 및 세포 침투 펩타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0070]

제공된 방법에 유용한 세균 세포는 살모넬라(*Salmonella*) 세균 세포, *비피도박테리아*(*Bifidobacteria*) 세균 세포, 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*) 세균 세포, 클로스트리디움 히스토리티쿠스(*Clostridium histolyticus*) 세균 세포, 클로스트리디움 노비(*Clostridium novyi*) 세균 세포, 비브리오 콜레라(*Vibrio cholera*) 세균 세포, 쇠겔라(*Shigella*) 세균 세포, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 세균 세포, 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*) 세균 세포, 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 세균 세포, 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*) 세균 세포, 락토바실러스 세균 세포(*Lactobacillus*) 세균 세포, 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 세균 세포, 이. 콜라이(*E. coli*) 세균 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 임의로, 상기 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 세균 세포는 스트렙토코커스 피로게네스(*Streptococcus pyogenes*) 세균 세포 또는 스트렙토코커스 고르도니(*Streptococcus gordoni*) 세균 세포이다. 적합한 세균 세포는 이의 전문이 본원에 참조로 인용되는 문헌[국제 공개 번호 WO 2012/149364]에 기재된 세균 세포를 포함한다. 임의로, 살모넬라 세균 세포는 약독화된 살모넬라 균주이다. 임의로, 살모넬라 세균 세포는 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*)의 약독화된 균주이다. 약독화된 살모넬라 티피무리움 균주는 YS1646, RE88, LH430, SL7207, X8429, X8431 또는 X8468을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 임의로, 약독화된 살모넬라 티피무리움 균주는 YS1646 살모넬라 티피무리움 균주 (ATCC 승인 번호 202165, 또한 본원에서 VNP20009로서 지칭됨)이다. 임의로, 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*) 세포는 제공된 조성물, 키트 및 방법에 사용될 수 있다.

[0071]

임의로, 본원에 제공된 세균 세포는 질환 또는 장애의 치료를 위해 적합한 하나 이상의 분자를 포함한다. 따라서, 세균 세포는 표적 유전자 발현 또는 표적 단백질 활성을 차단하거나, 억제하거나 저해할 수 있는 하나 이상의 제제를 포함할 수 있고, 이는 항체 또는 이의 기능성 단편, 소분자, 압타머, 핵산 및 RNA 간섭 분자(예를 들어, 소형 간섭 RNA (siRNA), 마이크로RNA (miRNA) 및 소형 헤어핀 RNA(shRNA)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 임의로, 상기 세균 세포는 기능성 핵산, 예를 들어, 안티센스 핵산을 포함한다. 임의로, 상기 안티센스

핵산은 대사 효소, 면역억제 표적물 또는 암 표적물을 표적화한다. 임의로, 상기 안티센스 핵산은 면역억제 표적물을 표적화하고 상기 면역억제 표적물은 STAT3, IDO1, IDO2, 아르기나제 1, iNOS, CTLA-4, TGF- β , IL-10, pGE2 또는 VEGF이다. 임의로, 상기 면역억제 표적은 IDO1이다. 임의로, 상기 안티센스 핵산은 서열번호 3 내지 31로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0072] 본원에서 "유효 용량" 또는 "유효량"은 이것이 투여되었을 때 효과를 나타내는 용량을 의미한다. 본원에서 "병용 유효 용량 또는 병용 유효량"은 이것이 투여되는 경우 효과를 나타내는, 일시에(예를 들어, 혼합물로서), 별도이지만 동시에(예를 들어, 별도의 정맥선을 통해) 또는 후속적으로(예를 들어, 하나의 제제가 먼저 투여되고 이어서 제2 제제가 투여된다) 투여되는 2개 이상의 제제의 용량을 의미한다. 예를 들어, 치료학적 유효량 또는 병용 유효량은 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 감소시키거나 완화시키기에 충분한 제제의 양 또는 제제의 병용 양을 포함한다. 예를 들어, 소정의 파라미터에 대해, 유효량은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 또는 적어도 100%의 증가 또는 감소를 보여준다. 효능은 또한 "배수" 증가 또는 감소로서 표현될 수 있다. 예를 들어, 치료학적 유효량은 대조군에 비해 적어도 1.2-배, 1.5-배, 2-배, 5-배 이상의 효과를 가질 수 있다. 정확한 용량 및 제형은 치료 목적에 의존하고 공지된 기술을 사용하여 당업자에 의해 달성될 수 있다(문현참조: 예를 들어, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Gennaro, Editor (2003), and Pickar, Dosage Calculations (1999)).

[0073] 상기 용어 "상승작용", "상승작용 효과", "상승작용 치료학적 효과", "상승작용적 유효량" 등은 2개 이상의 제제가 다른 제제 또는 제제들의 부재하에 각각의 제제의 투여시 합산 효과로 투여되는 경우 본원에 기재된 제제의 동시 투여와 관련된 부가적(예를 들어, 초-부가적) 반응(예를 들어, 생물학적 반응)을 지칭한다. 예를 들어, 2개의 제제가 상승작용적 치료학적 효과를 제공하는 경우, 2개의 제제의 동시 투여시 관찰되는 치료학적 효과는 개개의 제제가 다른 제제의 부재하에 투여되는 경우 합산하여 관찰된 치료학적 효과 보다 크다. 마찬가지로, 제1 제제의 제1 양 및 제2 제제의 제2 양은 함께 2개의 제제의 동시 투여시 관찰된 치료학적 효과가 개개의 제제가 다른 제제의 부재하에 투여되는 경우의 합하여 관찰된 치료학적 효과 보다 큰 경우 상승작용적 유효량을 제공한다.

[0074] 본원에 사용된 바와 같이, 용어, 치료, 치료하다 또는 치료하는은 프로테아제의 발현을 특징으로 하는 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상 또는 프로테아제의 발현을 특징으로 하는 질환 또는 병태의 증상의 효과를 감소시키는 방법을 지칭한다. 따라서, 상기된 방법에서, 치료는 질환 또는 병태의 확립된 질환, 병태 또는 증상의 중증도에서 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 감소를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 질환을 치료하기 위한 방법은 대조군에 비하여 대상체에서 질환의 하나 이상의 증상을 10% 감소시키는 경우 치료인 것으로 간주된다. 따라서, 상기 감소는 본래의 수준 또는 대조군 수준과 비교하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%, 또는 10% 내지 100%에서 임의의 % 감소일 수 있다. 치료가 반드시 질환, 병태 또는 질환 또는 병태의 증상의 치유 또는 완전한 제거를 지칭하는 것이 아닌 것으로 이해된다. 추가로, 본원에 사용된 바와 같이, 저하시기거나, 감소시키거나 억제한다는 지칭은 대조군 수준과 비교하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 변화를 포함하고 상기 용어는 완전한 제거를 포함하지만 반드시 포함하는 것은 아니다.

[0075] "대상체", "개체" 또는 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고 이는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 사람을 지칭한다. 포유동물은 쥐, 시미안, 사람, 가축, 스포츠 동물 및 애완동물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 시험관내 수득되거나 시험관내 배양된 생물학적 실체의 조직, 세포 및 이들의 자손이 또한 포함된다.

[0076] 상기 제공된 조성물 중 하나 이상을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 따라서, 세균 세포 및 종양 침투 제제를 포함하는 키트가 제공된다. 임의로, 상기 세균 세포 및 종양 침투 제제는 유효량, 예를 들어, 상승작용적 유효량으로 존재한다. 임의로, 상기 키트는 살모넬라 세균 세포를 포함하는 제1 조성물 및 하이알루로니다제 폴리펩타이드를 포함하는 제2 조성물을 포함한다. 임의로, 상기 살모넬라 세균 세포 및 하이알루로니다제 폴리펩타이드는 유효량, 예를 들어, 상승작용적 유효량으로 존재한다. 임의로, 상기 조성물은 바이엘 또는 패킷와 같은 컨테이너에 존재한다. 임의로, 상기 키트는 하나 이상의 추가의 제제를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 상기 키트는 추가의 치료학적 제제, 예를 들어, 항암제를 추가로 포함한다. 추가의 치료학적 제제는 세균 세포 및/또는 종양 침투 제제를 포함하는 조성물에 포함되거나 별도의 조성물로서 제형화될 수 있다. 임의로, 상기 키트는 예를 들어, 시린지, 바늘, 튜빙, 카테터, 패치 등과 같은 조성물을 투여하는 수단을 포함한다. 상기 키트는 또한 상기 제형 및/또는 멸균을 요하는 물질 및/또는 사용전 희석을 포함할 수 있다. 임의로, 제공된 키트는 사용 지

침서를 포함한다.

[0077] 이를 위해 사용될 수 있거나 이와 연계하여 사용될 수 있거나 이에 대한 제제 중에 사용될 수 있는 물질, 조성물 및 성분들 및 기재된 방법의 생성물 및 조성물이 기재되어 있다. 이들 및 다른 물질은 본원에 기재되어 있고 이들 물질의 조합, 서브세트, 상호작용, 그룹 등이 기재되어 있고 각각의 다양한 개별 및 총체적 조합 및 이들 제제의 치환에 대한 특정 지침이 명백히 기재되지 않을 수 있고 각각은 구체적으로 고려되고 본원에 기재된 것으로 이해된다. 예를 들어, 방법이 기재된 경우 및 논의된 경우 및 상기 방법을 포함하는 다수의 분자에게 부가될 수 있는 다수의 변형이 논의되는 경우각각 및 모든 조합 및 방법의 치환, 및 가능한 변형은 달리 반대로 지적되지 않는 경우 구체적으로 고려된다. 마찬가지로, 이들의 임의의 서브세트 또는 조합이 고려되고 기재된다. 이러한 개념은 상기된 조성물을 사용하는 방법에서의 단계를 포함하지만 이에 제한되지 않는 상기 기재된 모든 측면에 적용된다. 따라서, 수행될 수 있는 다양한 추가의 단계가 존재하는 경우, 이들 추가의 단계들 각각은 임의의 특정 방법 단계 또는 기재된 방법의 방법 단계의 조합으로 수행될 수 있고 상기 각각의 조합 또는 조합의 서브세트는 구체적으로 고려되고 기재된 것으로 고려되어야 한다.

[0078] 본원에 인용된 공보 및 이들이 인용된 자료는 이들의 전문이 본원에 구체적으로 인용된다.

[0079] 다수의 양태가 기재되어 있다. 그럼에도 불구하고 다양한 변형이 만들어 질 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 다른 양태는 특허청구범위내에 있다.

실시예

0081] 실시예 1. 암 치료를 위한 shIDO-ST와 PEGPH20™의 병용

[0082] shIDO-ST와 PEGPH20™의 효과를 결정하기 위해, 9마리의 C57BL/6 마우스에 정위적으로(췌장에) 5×10^5 KPC-luc 세포를 주사하였다. 3개의 소그룹($n=3$)을 생성시켰다: 단독의 shIDO-ST, 단독의 PEGPH20™, 및 shIDO-ST와 PEGPH20™. 상기 단독의 shIDO-ST 그룹에 8일째 및 12일째에 정맥내(i.v.) 주사를 통해 5×10^6 cfu/마우스의 용량으로 shIDO-ST를 주사하였다. 단독의 PEGPH20™ 그룹에 정맥내 주사를 통해 7일째에 4.5 mg/kg (약 90 ug/마우스)의 용량으로 PEGPH20™을 투여하였다. 상기 병용 (PEGPH20™와 shIDO-ST) 그룹에 7일째 4.5mg/kg으로 PEGPH20™을 투여하고 이어서 5×10^6 cfu/마우스로 8일째에 shIDO-ST로 치료하였다. 마우스는 종양 세포 이식 후 지정된 시간에 생존기간 이미지화 시스템(IVIS)를 사용하여 이미지화하였다. 지정된 날짜에 마우스에 D-루시페린을 주사하고 주사 후 5 내지 10분에 이미지화하였다. 노출 시간은 모든 시점 동안 2초였다. shIDO-ST 그룹 및 병용 그룹 둘다에서, 마우스는 shIDO-ST의 독성으로 인해 병든 징후를 나타냈고, 이것은 너무 높은 용량으로 인한 것일 가능성이 있다. 병용 그룹에서, 및 보다 드문 정도로 단독의 shIDO-ST 그룹에서 종양 감소가 관찰되었다. PEGPH20™ 그룹에서 마우스는 모든 경우에 거동 문제점 및 3마리의 마우스에서 2마리에서 병든 문제점을 유발하는 상당히 큰 종양으로 인해 안락사시켰다.

[0083] shIDO-ST와 PEGPH20™를 사용한 적정의 병용 치료를 수행하여 초기 실험에서 관찰된 독성을 감소시켰다(도 2). 상이한 용량의 shIDO-ST와 PEGPH20™의 병용을 나타내는 3개의 그룹을 생성하여 거의 독성이 없는 종양 성장을 계속 억제하는 최적의 용량을 결정하였다. 그룹들은 절반 용량의 shIDO-ST와 함께 완전한 용량의 PEGPH20™ (~90ug) (2.5×10^6 cfu/마우스, 즉, 2백5십만 (2.5M)), 완전한 용량의 shIDO-ST와 함께 절반 용량의 PEGPH20™, 또는 둘다 절반 용량으로 이루어졌다. 완전한 용량의 PEGPH20™ 및 임의의 유전자 표적에 특이적이지 않은 완전한 용량의 스크램블(shScr-ST) 대조군으로 이루어진 대조군 그룹을 부가하였다. 전과 같이, 7일째에 마우스에 PEGPH20™를 투여하고 8일째에 shIDO-ST 또는 shScr-ST를 투여하였다. 상기 실험에서, 지정된 용량을 사용한 치료로 인해 어떠한 마우스도 병에 걸리지 않았다. 절반 용량의 shIDO-ST와 함께 완전한 용량의 PEGPH20™을 투여받은 마우스는 초기에 종양을 억제하였으나 종양은 신속히 재발되어 대형 종양으로 인해 상기 그룹을 안락사시켰다. 절반 용량의 PEGPH20™과 완전한 용량의 shIDO-ST를 투여받은 그룹은 종양이 상당히 억제되었고 3마리 마우스 중 2마리는 종양 주사 후 80일이 지나 KPC-luc가 완전히 치유되었다. 3마리의 마우스 중 1마리는 여전히 종양이 명백히 나타났고 동일한 용량의 제2 치료는 56 내지 57일째에 수행되었다. 종양 시그널의 일부 퇴행이 발생하였지만 종양은 계속 성장하였고 이는 양자 시그널의 계속적인 증가에 의해 입증되었다(도 3). 둘다 절반

용량의 PEGPH20™ 및 shIDO-ST를 투여받은 마우스에서 KPC-luc 종양은 어떠한 유의적인 종양 성장 억제를 나타내지 않았다 (도 1에서 단독의 PEGPH20™ 그룹과 비교하여). shScr-ST과 PEGPH20™의 병용은 일시적이지만 측정 가능한 종양 성장 억제를 나타냈지만 종양은 3마리의 마우스중 2마리에서 신속하게 재발하였고 어떠한 마우스도 KPC-luc가 치유되지 않았고 모든 마우스는 여전히 45일째에 종양을 가졌다. 도 2에서 이미지화된 마우스로부터 방출된 양자는 Living Image® 소프트웨어를 사용하여 정량하였다. 45ug PEGPH20™ (PEG)와 5M shIDO-ST로 처리된 마우스로부터의 종양은 모든 다른 그룹 보다 상당히 우수하게 억제된다 (도 3).

[0084] PEGPH20™와 shScr-ST 치료 병용에 대한 7일째 KPC-luc 종양의 민감성으로 인해 (도 2), 이식된 KPC-luc 종양의 치료는 14째로 지연되었다. 이것은 종양의 보다 큰 설정을 가능하게 하여 PEGPH20™과 병용되는 shIDO-ST 대 shScr-ST의 효능을 보다 양호하게 비교할 수 있다. 상기 실험은 6개의 치료 그룹으로 이루어졌다: 3개 그룹은 PEGPH20™과 shScr-ST, shIDO-ST, 또는 겔시타빈 (GEM, 100mg/kg으로) 치료받았다. 다른 3개의 그룹은 또한 shScr-ST, shIDO-ST, 또는 GEM으로 치료받았지만 PEGPH20™으로는 치료받지 않았다. 용량 (도 2에 기재된 적정 연구로부터 이전에 결정됨)은 45 ug의 PEGPH20™에 이어서 5×10^6 cfu/마우스의 shIDO-ST 또는 shScr-ST로 이루어졌다. 이전에 지정된 바와 같이, 마우스는 14일째에 치료를 개시하였다 (PEGPH20™ 또는 비히를 대조군과 함께). 이어서 마우스에 15일째 단일 용량의 치료제를 투여하였다. 종양 성장은 IVIS에 의해 세로로 가시화하였다. 상기 이미지는 도 4에 나타냈다. PEGPH20™과 shIDO-ST 병용 그룹을 제외한 모든 그룹은 마우스에 거동 문제점 또는 병을 유발하는 상당히 큰 종양으로 인해 30일째에 안락사시켰다. 다시, 종양 성장에서 상당한 감소는 21일 및 30일째에 PEGPH20™과 shIDO-ST 병용 그룹에서 3마리의 마우스 중 2마리에서 관찰되었다. 상당하지는 않더라도, 제3 마우스는 또한 생존을 연장시키는 종양 억제를 나타냈다. 37일째에 마우스에 종양이 다시 나타났다. 따라서, 제2 치료제를 상기 마우스에 투여하여 이것이 추가의 종양 퇴행을 유도할 수 있는지를 결정하였다. 본원 발명자는 44일을 통해 약간의 종양 감소를 관찰했다. 도 4에서 이미지화된 마우스로부터 방출된 양자는 Living Image® 소프트웨어를 사용하여 정량하였다. PEGPH20™ (PEG) + shIDO-ST 처리된 마우스로부터의 종양은 모든 다른 그룹 보다 상당히 우수하게 억제되었다. 도 5를 참조한다. 추가로, 도 4에서 마우스는 각각의 이미지화 시점에서 무게를 재었다. 어떠한 그룹에 대해서는 마우스의 체중에 유의적인 변화가 없었다. 도 6을 참조한다.

실시예 2. 암 치료를 위한 shArg-ST와 PEGPH20™의 병용.

[0086] PEGPH20™과 병용되는 shArg-ST의 효과를 결정하기 위해, 5마리의 마우스에 정위적으로 5×10^5 KPC-luc 종양 세포를 이식하였다. 2마리의 마우스는 PEGPH20™ 및 임의의 공지된 유전자(Scr=스크램블)를 표적화하지 않는 shRNA 플라스미드를 갖는 살모넬라 (ST) 치료요법 (shScr-ST)를 사용한 치료로 이루어진 대조군 그룹을 위해 사용하였다. 3마리의 마우스는 PEGPH20™과 shArg-ST를 투여받은 실험 그룹에 대해 사용하였다. 모든 그룹은 7일째에 PEGPH20 (정맥내로 90 ug/마우스)를 투여받고 8일 및 11 일째 ST 치료요법 (정맥내 5×10^6 cfu/마우스)을 받았다. PEGPH20™과 병용되는 shArg-ST 치료 뿐만 아니라 shScr-ST 대조군 치료는 종양 성장을 약화시켰다. 그러나, 일부 독성이 관찰되었다. 상기 결과는 도 7에 나타낸다.

[0087] shIDO-ST와 PEGPH20™의 병용 치료를 위해 사용되는 용량은 초기 실험에서 관찰된 독성을 감소시키기 위해 변화시켰다 (도 7). 정의적 KPC-luc 종양을 갖는 2개의 그룹 ($n=4$)을 생성시키고 shScr-ST 또는 shArg-ST와 함께 PEGPH20™ 치료를 받았다. PEGPH20™은 양 그룹에 대해 후기 시점, 9일째(이전 실험에서 7일째인 것과는 반대로)에 45 ug/마우스 (이전에 사용된 것 보다 절반 용량)로 투여하고 이어서 10일 및 13일째에 shScr-ST 또는 shArg-ST를 사용하여 치료하였다(완전한 용량, 5×10^6 cfu). 대조군 그룹에서 마우스의 50%는 여전히 종양으로부터 치유받았고 실험 그룹은 거의 양호하였다. shArg-ST 치료 받은 마우스는 여전히 약간의 독성 징후를 보여주었다. 상기 결과는 도 8에 나타낸다.

실시예 3. shIDO-ST/PEGPH20™ 병용 치료요법의 효능.

[0089] shIDO-ST/PEGPH20TM 병용 치료요법의 효능을 추가로 평가하기 위해, 마우스 그룹에 루시페라제를 발현하는 50만 KPC (KrasLSL.G12D/+; p53R172H/+; PdxCretg+) 세포(KPC-luc 세포)를 이식하였다. 이식한지 14일 후, 모든 마우스는 표 1에 명시된 스케줄에 따라 지정된 치료요법을 사용하여 치료하였다.

【표 1】

투여된 PEGPH20TM 및 치료제의 용량 및 스케줄.

	용량	스케줄	경로
PEGPH20 TM	45 µg/마우스	(1X)d0*	정맥내
shIDO-ST	5X10 ⁶ cfu/마우스	(3X)d1-d3	정맥내
shScr-ST	5X10 ⁶ cfu/마우스	(3X)d1-d3	정맥내
겐시타비	100 mg/kg	(5X)d1-d5	복강내
아브락산	120 mg/kg	(3X)d1, d4, d7	정맥내

[0090] *d=일. 치료 0일은 종양 이식 후 14일에 상응한다. shScr-ST는 어떠한 특이성을 갖지 않는 스크램블 shRNA 서열을 갖는 살모넬라 대조군이다.

[0091] 각각의 지정된 시점에서, 그룹에 Xenogen 100 기계를 사용한 생존기간 이미지화에 의한 이미지화 5분 전에 D-루시페린을 주사하였다. 도 9에 보여진 바와 같이, 이미지화 결과를, PEGPH20TM/shIDO-ST로 치료받은 마우스 100%가 상당한 종양 퇴행을 갖는 것으로 관찰되었고 마우스의 거의 75%는 종양이 현저하게 제거되었음을 보여주었고 건강한 종양 부재 마우스와 비교하여 무한 생존 (> 1Y)을 보여주었다. 어떠한 다른 치료 병용물도 거의 효과적이지 않았다.

[0092] 통계학적 분석을 위해, 도 9에 나타낸 마우스 그룹의 IVIS 이미지화로부터 방출된 양자를 정량하였다. 도 10에 나타낸 바와 같이, 루시페라제 시그널의 정량은 PEGPH20TM + shIDO-ST로 치료받은 마우스만이 PEGPH20TM를 사용한 표준 화학치료요법의 모든 시험된 병용물과 비교하여 종양에 대해 통계학적으로 유의적인 억제 (p<0.01, ANOVA)를 나타냄을 보여준다.

[0093] 도 9에 나타낸 마우스 그룹은 지정된 각각의 시점에서 무게를 재었다. 도 11에 나타낸 바와 같이, PEGPH20TM/shIDO-ST 병용 치료요법을 사용한 PDAC 종양의 제거는 어떠한 상당한 독성(체중 손실)과 관련되지 않았다. 전체적으로 어떠한 치료 그룹도 임의의 관련된 체중 손실을 갖지 않았다.

[0094] PEGPH20TM로 치료받거나 치료받지 않은 마우스로부터 14일째 정위적 종양을 하이알루로난의 보다 큰 강도 염색을 위해 10% 산 포르말린 및 70% 에탄올을 사용하는 변형된 방법(표준 10% 포르말린 고정화)을 사용하여 고정화시켰다(문헌참조: Lin et al., J Histochem Cytochem 1997). 도 12에 나타낸 바와 같이, 상기 염색은 이식 후 14일째 KPC-luc 종양은 상당한 양의 하이알루로난을 발현함을 밝힌다. PEGPH20TM을 사용한 치료 후 48시간에, KPC-luc 종양 조직 분절에서 하이알루로난이 상당히 고갈됨이 관찰되었다(도 12).

[0095] PEGPH20으로 치료받거나 치료받지 않은 마우스의 14일 종양으로부터의 분절은 항-CD31 항체로 염색시켜 종양 매쓰내 혈관의 절단 분절을 위치화하였다. CD31 1차에 특이적인 FITC-접합된 2차 및 DAPI 염색은 형광 현미경으로 가시화하였다. 도 13에 나타낸 바와 같이, 상기 이미지는 비처리된 종양에서 대다수 폐쇄된 혈관을 나타내고 PEGPH20TM으로 치료받은 마우스의 종양에서는 보다 많은 개방된 혈관을 나타낸다.

[0096] 지정된 치료 그룹에서 종양 및 호중구는 살모넬라를 사용한 치료 개시 후 72시간에 걸쳐 이미지화하였다. 시점은 살모넬라를 사용한 치료 후 수시간을 나타낸다 (즉, PEGPH20TM은 -24시간 시점에 투여하였다). 도 14에 나타낸 바와 같이, 호중구의 종양으로의 현저한 특이적 이동이 관찰되었고 중첩 영역을 유발하고 PEGPH20TM/shIDO-ST를 치료받은 마우스에서 일어난다. PEGPH20TM/shIDO-ST로 치료받은 마우스는 PMN 유입(72시간 시점을 주지한다)과 일치하는 급격한 종양 퇴행을 보여주었다.

[0098] PEGPH20TM/shScr-ST 및 PEGPH20TM/shIDO-ST 마우스에 대해 도 14에 나타낸 종양은 살모넬라 치료 후 96시간에 절개하여 종양 매쓰내 특이적 PMN의 존재를 확인하였다. 종양 절개 1시간 전에 마우스에 근적외선 이미지화 제제(PMN에 특이적인)를 주사하였다. 도 15에 나타낸 바와 같이, PEGPH20TM/shIDO-ST 치료받은 마우스로부터 절개된 종양(우측)은 PEGPH20/shScr-ST 대조군 치료된 마우스와 비교하여 (좌측) 상당히 보다 많은 PMN 침윤을 갖는 것으로 관찰되었다.

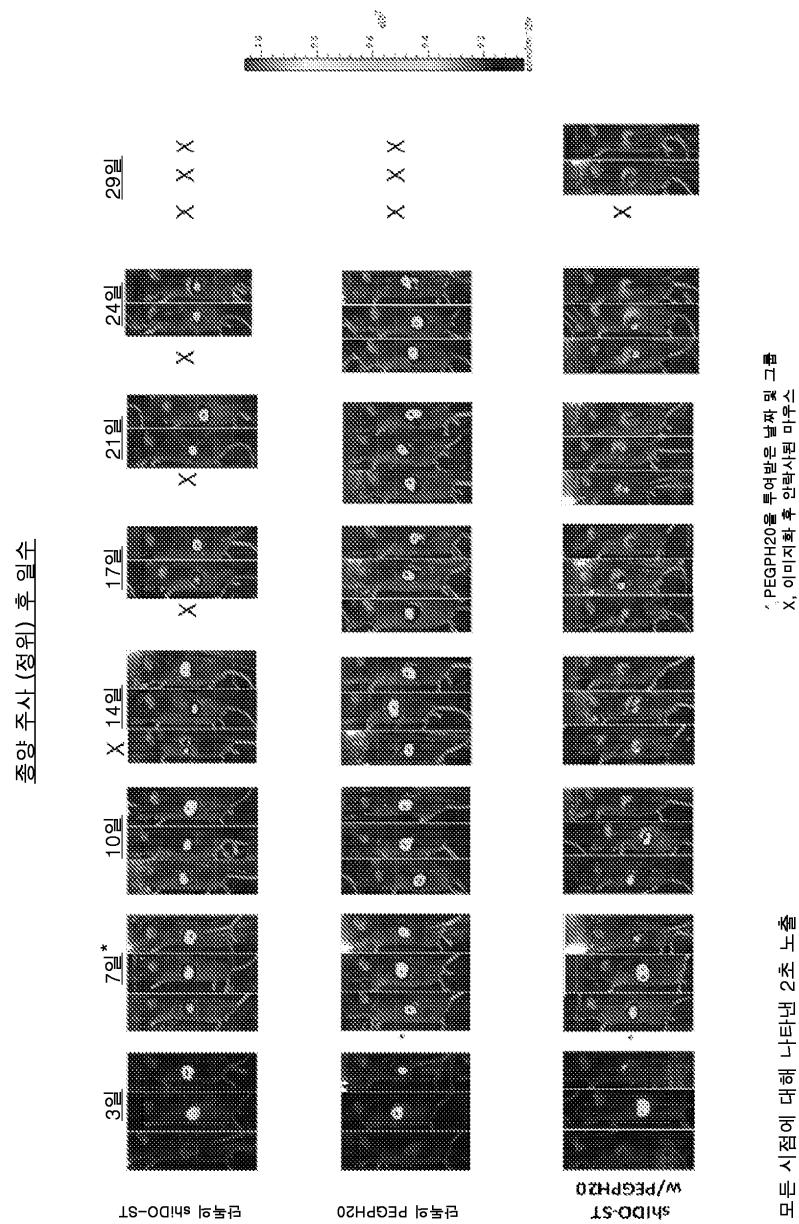
[0099] 도 15에 나타낸 대조군 종양 및 종양은 살모넬라, PMN 및 온전한 핵(DAPI)의 면역형광 염색을 위해 절개하였다. PEGPH20TM/shIDO-ST로 치료받은 마우스만이 살모넬라 및 PMN의 급격한 유입을 갖는 것으로 관찰되었다(도 16). PMN은 정량 PCR에 의해 IDO mRNA의 유의적인 높다운을 갖는 것으로 관찰되었다. 종양 세포의 상당한 피사(DAPI 염색의 부재)는 PEGPH20TM/shIDO-ST로 치료받은 종양의 코어에서 가시화한다(도 16).

[0100] PEGPH20TM/shIDO-ST 병용 치료 효과를 추가로 조사하기 위해, 동시 췌장암을 유발하는, 췌장에서 특이적으로 Cre(KPC-Brca1)의 존재에 조건적으로 발현되는 Kras, p53 및 Brca1 돌연변이가 혼입된 유전학적으로 가공된 마우스 모델(GEMM)을 치료하였다. 좌측 상에 비장 및 췌장은 12주령의 정상의 C57BL/6 마우스로부터 추출한 반면, 우측에 대한 비장 및 췌장은 7주령에서 PEGPH20TM/shIDO-ST로 치료받은 KPC-Brca1 마우스로부터 취하였다. 상기 치료 스케줄은 도 18에 명시한다. 상기 치료된 KPC-Brca1 마우스는 5주 후(12주령에서) 안락사시켰다. 도 17에 나타낸 바와 같이, KPC-Brca1 마우스는 정상 크기의 췌장과 비교하는 경우 유의적으로 보다 작은 췌장을 갖는 것으로 관찰되었다.

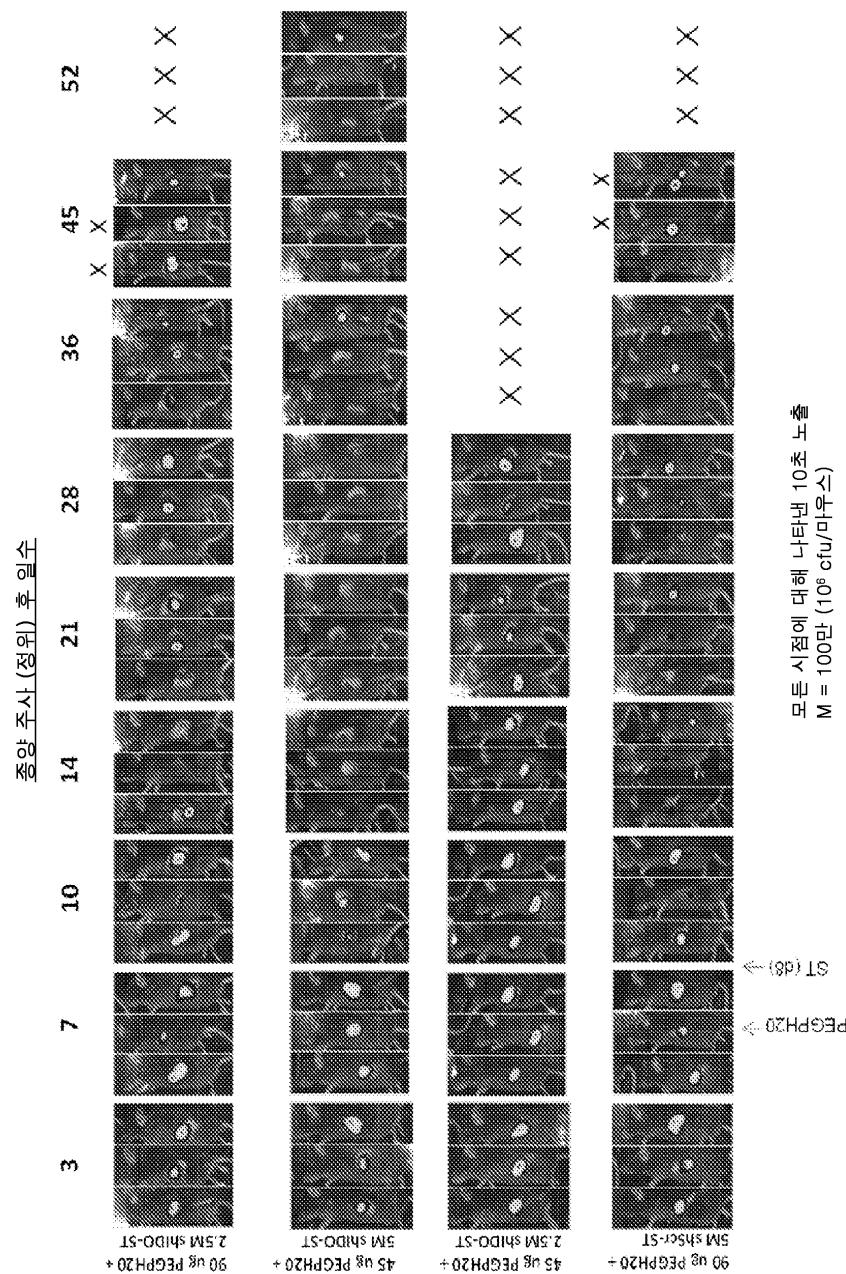
[0101] 이어서 추가의 실험은 적당히 억제 치료된 마우스(즉, PEGPH20TM/shScr-ST)와 함께 KPC-Brca1 마우스에서 수행하였다. 수컷 및 암컷 KPC-Brca1 마우스는 도 18에 명시된 치료 스케줄을 사용하여 PEGPH20TM 및 shScr-ST 또는 shIDO-ST로 치료하였다. 다시, PEGPH20TM/shScr-ST로 치료받은 마우스와 비교하여 PEGPH20TM/shIDO-ST를 치료받은 마우스에서 종양 크기의 상당한 억제/감소를 나타내고, 이것은 왕성한 자생/동시 모델에서의 효능을 지적한다(도 19).

도면

도면1

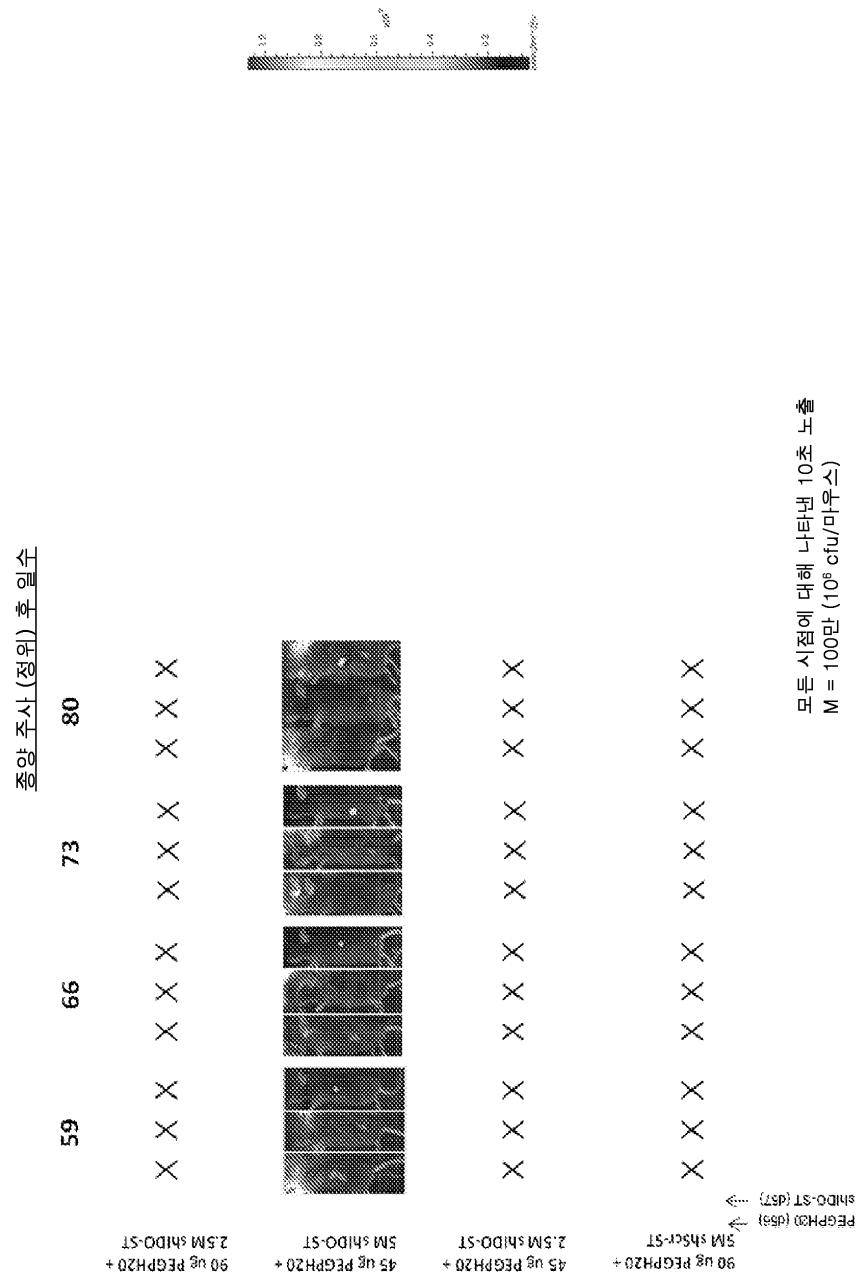


도면2a

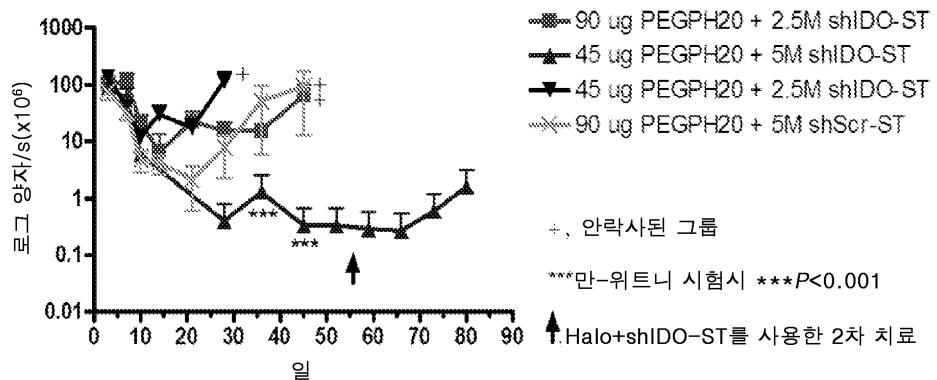


모든 시점에 대해 나타낸 10초 노출
M = 100만 (10^6 cfu/미리스)

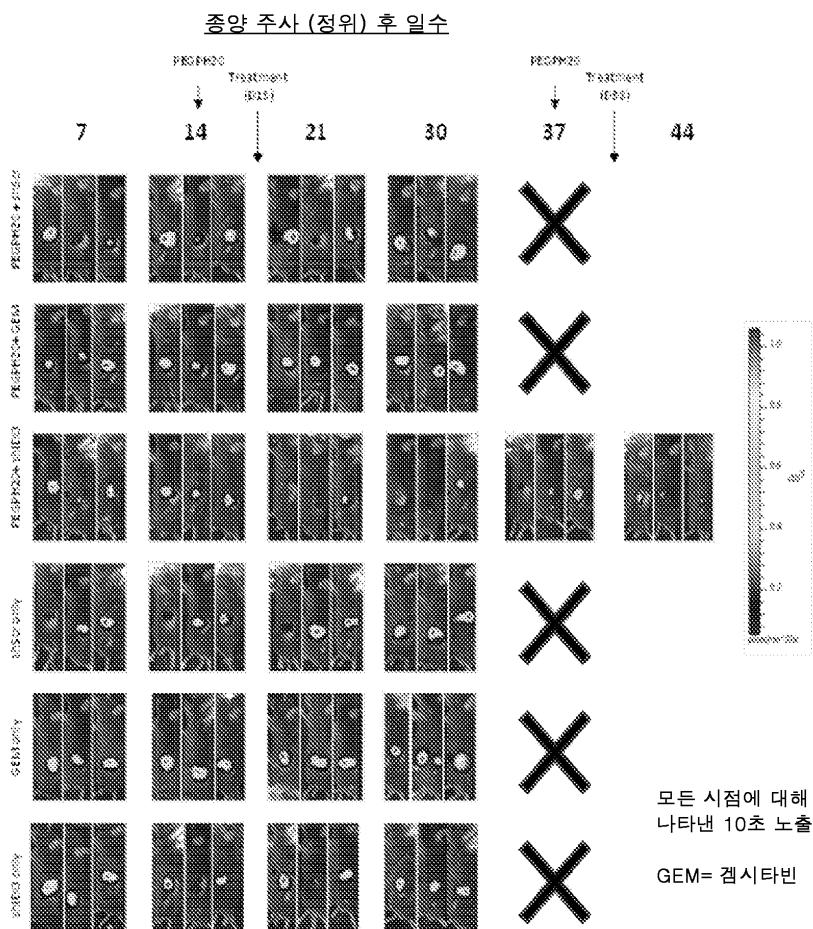
도면2b



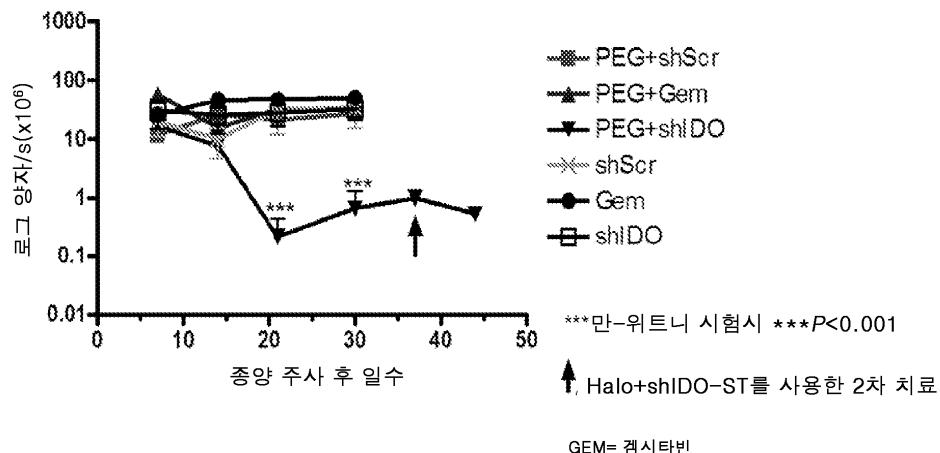
도면3



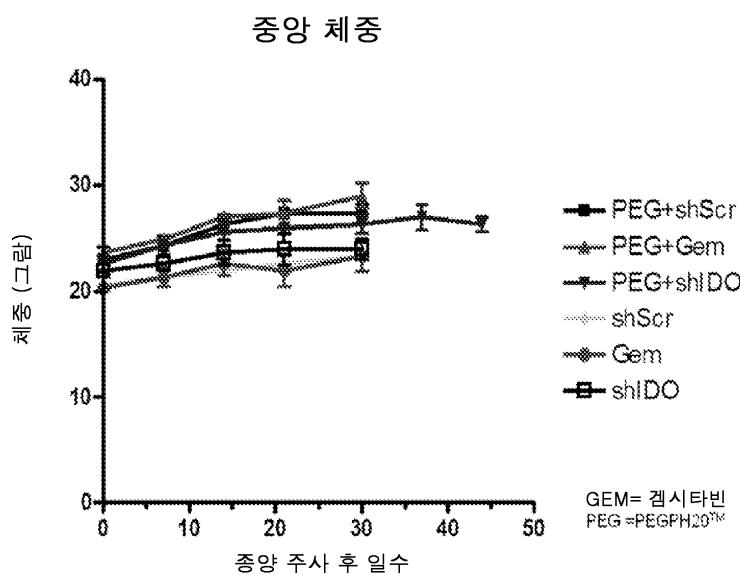
도면4



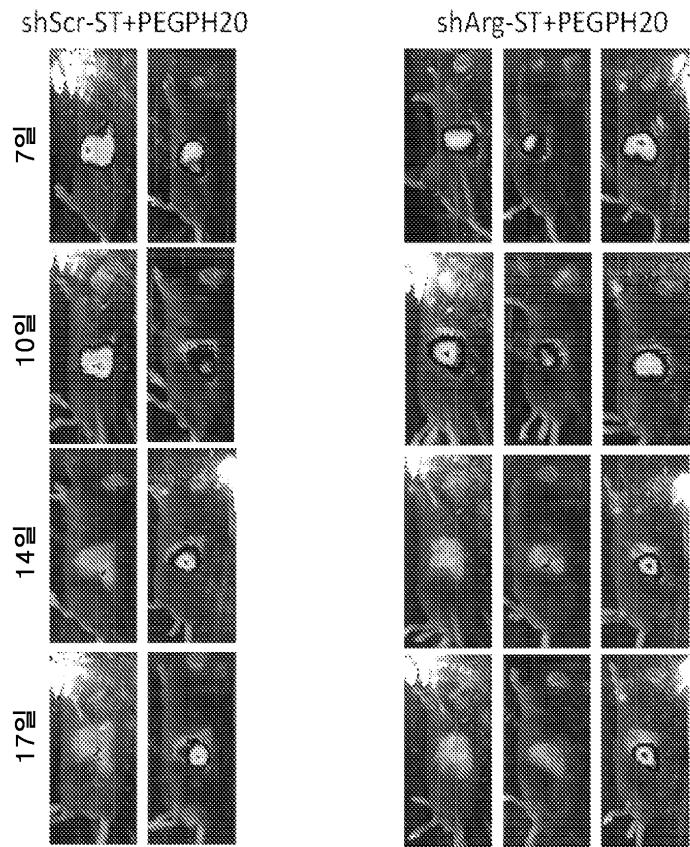
도면5



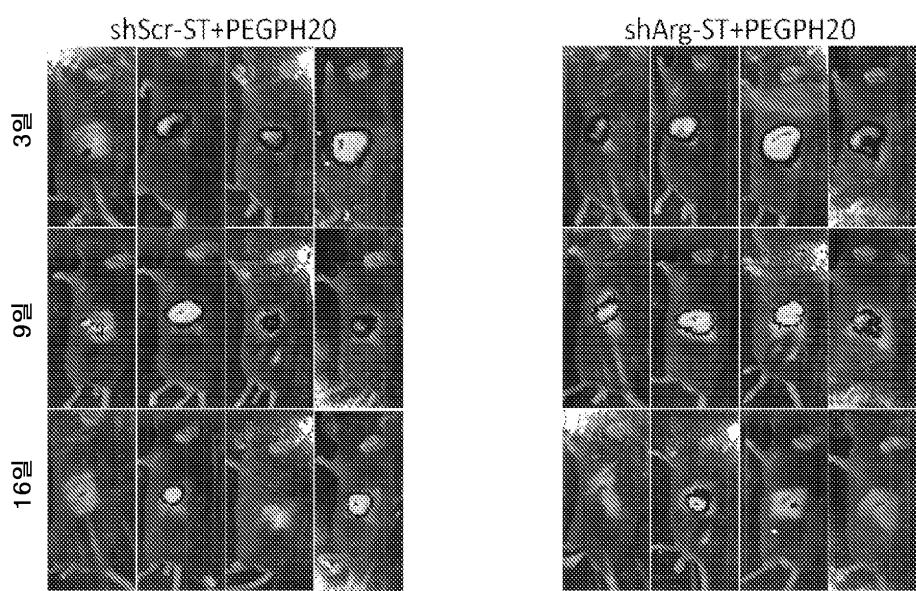
도면6



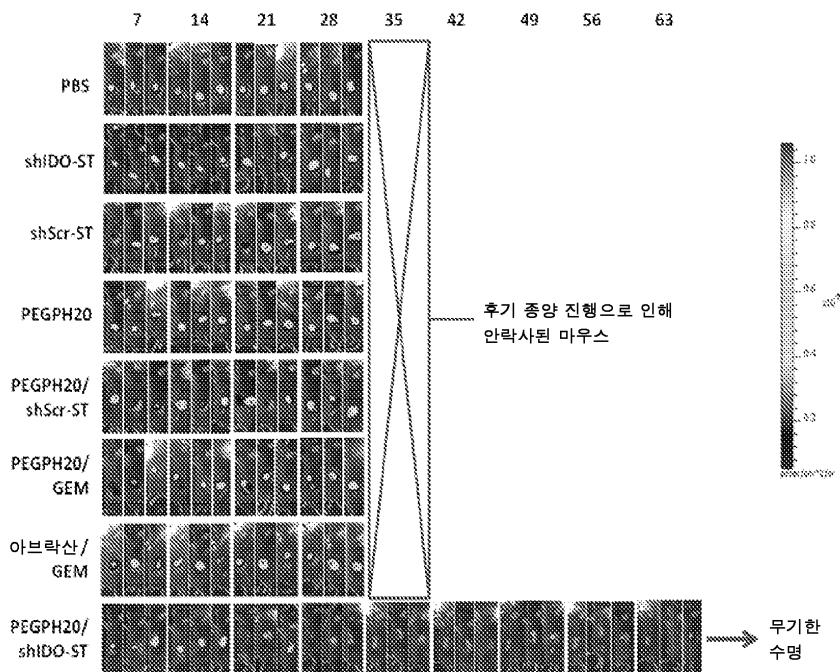
도면7



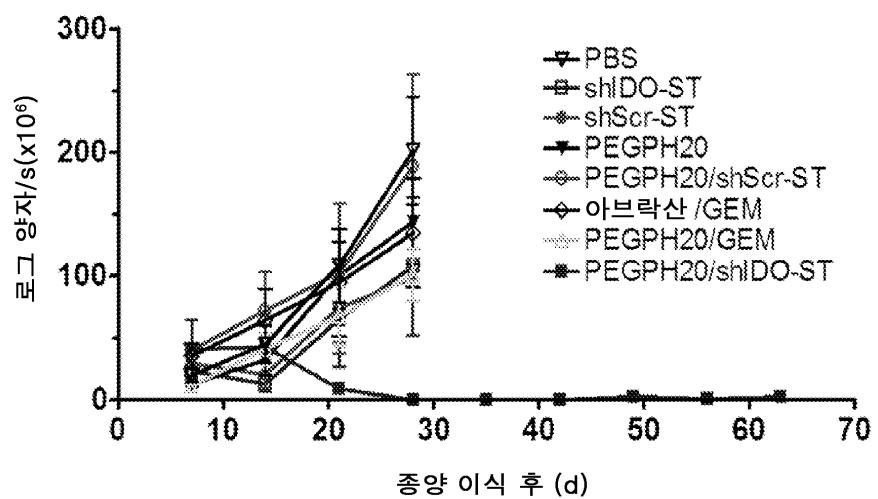
도면8



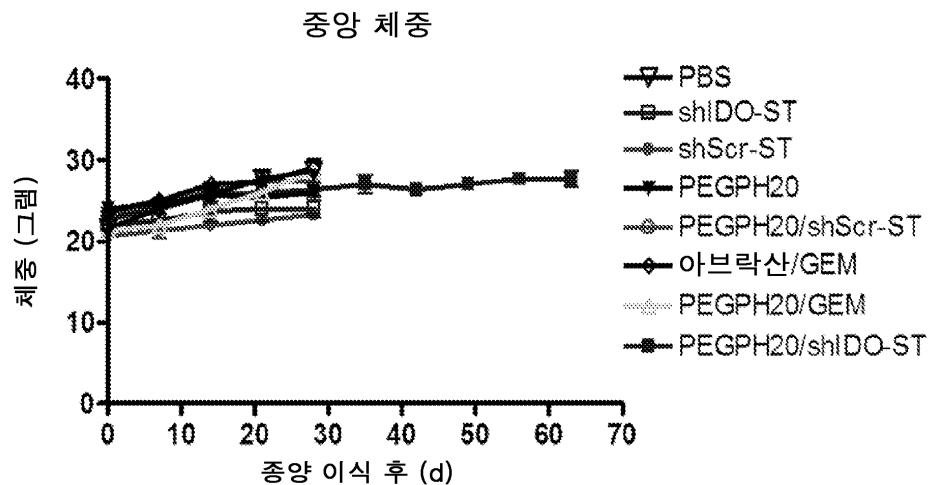
도면9



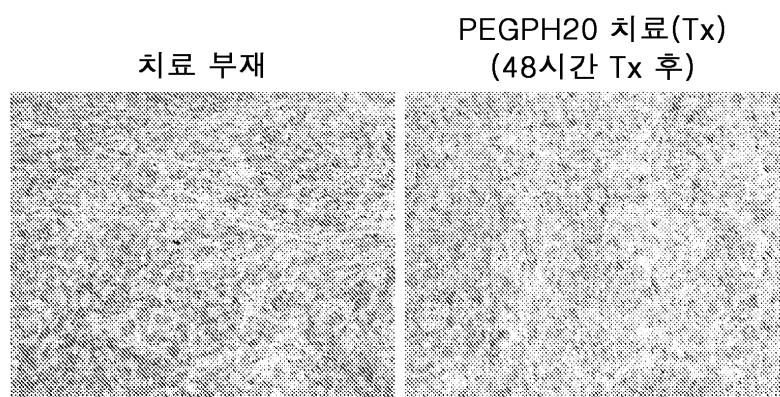
도면10



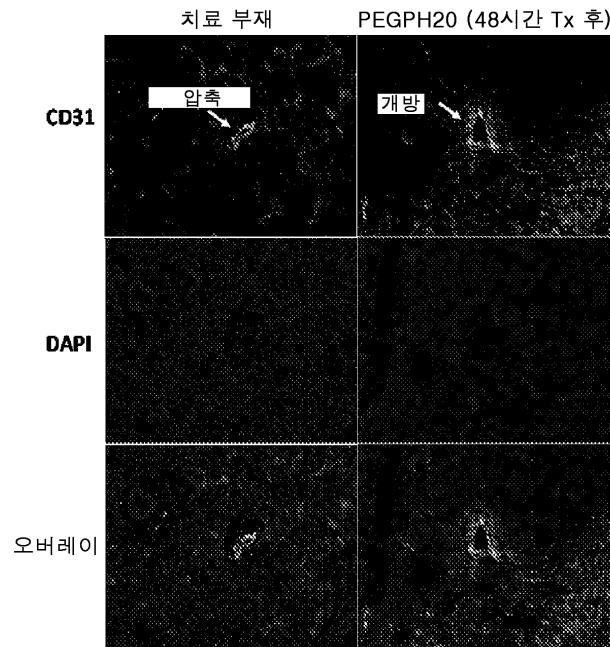
도면11



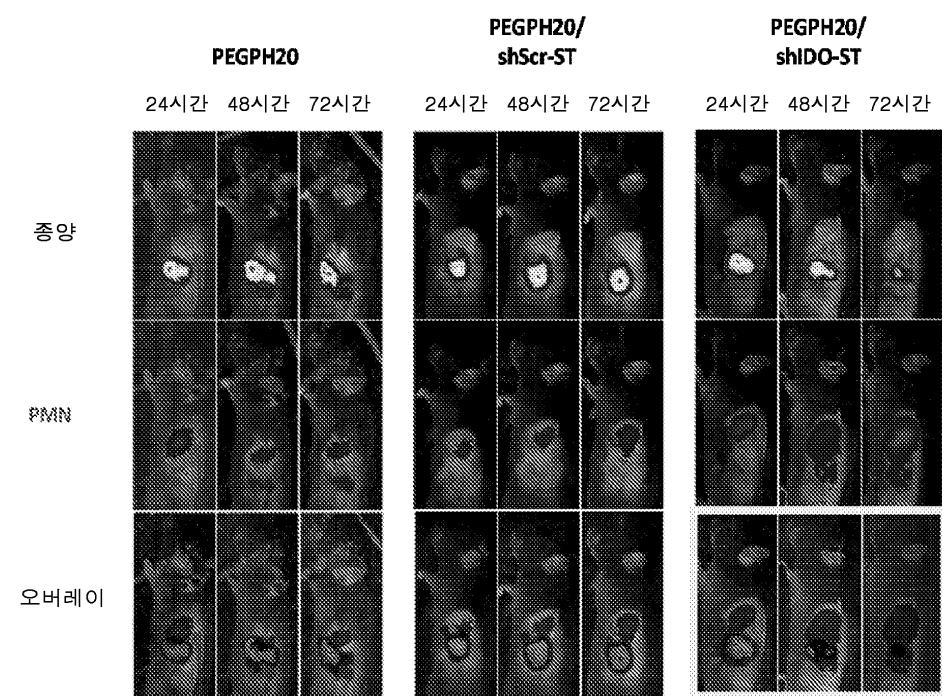
도면12



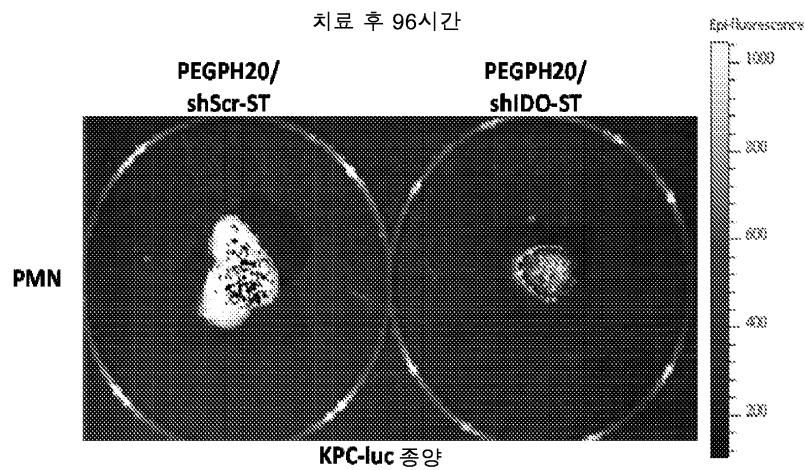
도면13



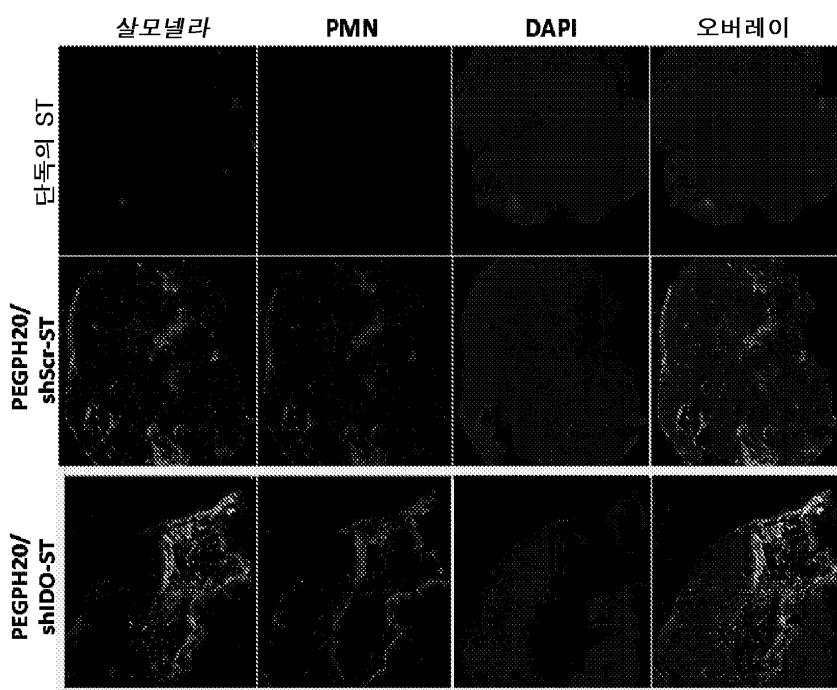
도면14



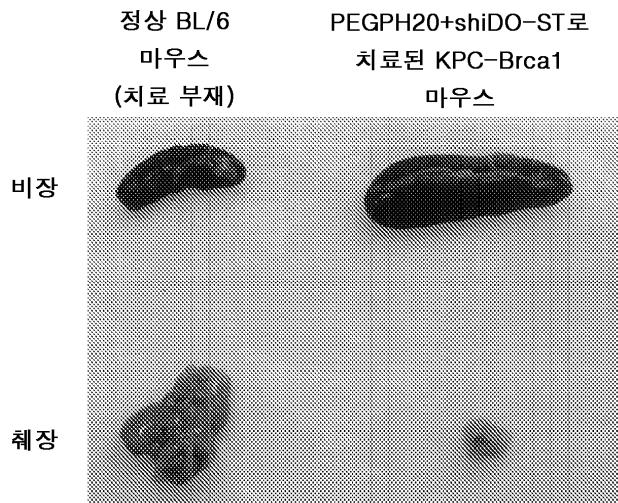
도면15



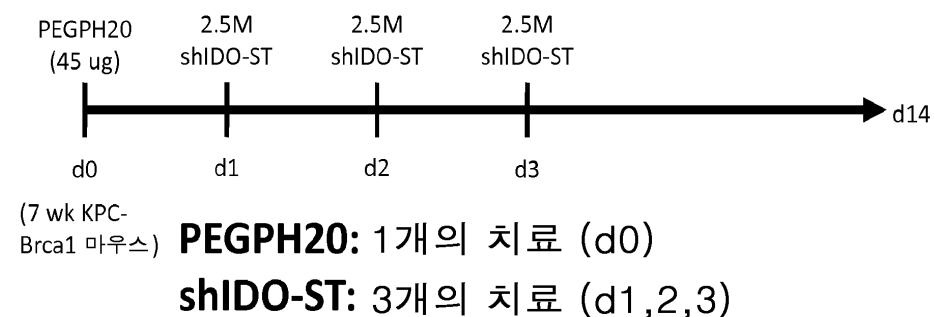
도면16



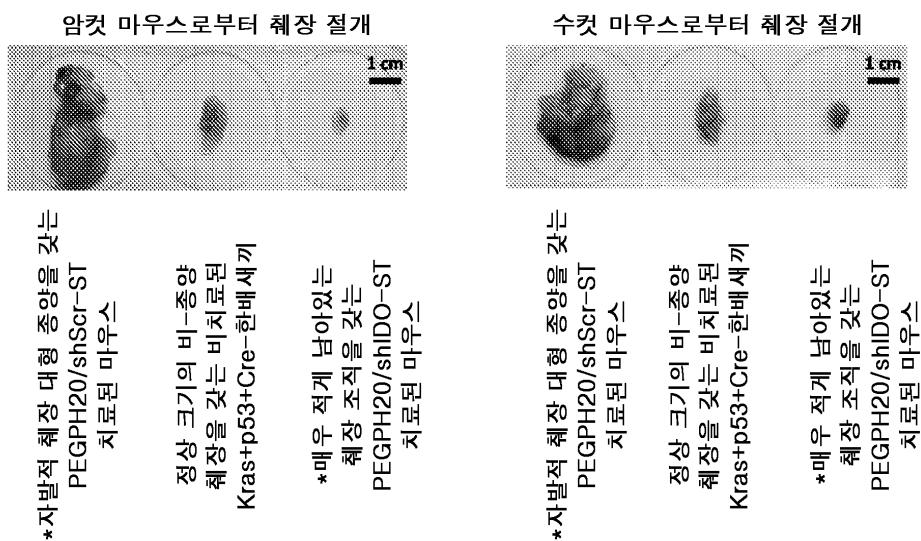
도면17



도면18



도면19



*PEGPH20은 먼저 5 내지 6주령에게 1회 정맥으로 투여하고
이어서 정맥내에 의한 것과는 별도로 하루에 ST(3X)로 투여하였다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Diamond, Don

Manuel, Edwin

<120> Anticancer Combinations

<130> 95058-003110PC-910636

<150> 61/842,749

<151> 2013-07-03

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro

35 40 45

Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe

50 55 60

Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg

65 70 75 80

Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu

85 90 95

Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly

100 105 110

Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys

115 120 125

Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val

130	135	140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro		
145	150	155
160		
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn		
165	170	175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe		
180	185	190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys		
195	200	205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Leu Phe Pro Asp Cys		
210	215	220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn		
225	230	235
240		
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser		
245	250	255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val		
260	265	270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val		
275	280	285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr		
290	295	300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu		
305	310	315
320		
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile		
325	330	335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu		
340	345	350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn		
355	360	365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln		
370	375	380

Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415

Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480

Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 485 490 495
 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
 500 505
 <210> 2
 <211> 511
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 2

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30

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

85 90 95

Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly

100 105 110

Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys

115 120 125

Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val

130 135 140

Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe

180 185 190

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

195 200 205

Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys

210 215 220

Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn

225 230 235 240

Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser

245 250 255

Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val

260 265 270

Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val

275 280 285

Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr

290 295 300

Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu

340 345 350

Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn

355 360 365

Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln

370 375 380

Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys

420 425 430

Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp

435 440 445

Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys

450 455 460

Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile

465 470 475 480

Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Trp

485 490 495

Arg Leu Glu Val Trp Asp Gln Gly Ile Ser Arg Ile Gly Phe Phe

500 505 510

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

agttcctggc accttggatt gagagtcaa 29

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence	
<220>	
><223> Synthetic Construct	
<400> 4	
actggataac ttcattagca gaatctcaa	29
<210> 5	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 5	
catcaatcct gtggtataac atgctgacc	29
<210> 6	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 6	
acctgaagac caagttcatc tgtgtgaca	29
<210> 7	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 7	
cctcgcaata gtagatact	19
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 8	
cgtctctcta ttggtgaa	19
<210> 9	

<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 9	
gcaaagaatc tcctgcaga	19
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 10	
gcccatgaca tacgagaac	19
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 11	
ccagtcgtg agttgtca	19
<210> 12	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 12	
gcagttcctt tctggatg	19
<210> 13	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 13	

gcctttgttg atgtccct	18
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 14	
ccagggactg actaccta	19
<210> 15	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 15	
gccaagaca tcgtgtaca	19
<210> 16	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 16	
tctctacatc acagaaga	18
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 17	
gtattgtact attgtggact a	21
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	

<400> 18

ccagtattat ggcccttta a

21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

gccacagcaa tataggctca t

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

cctatctcca ttctactact a

21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

gctgttaacaa agaaataga a

21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

cgccgttat agctttctta a

21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 23	
ccgcagttat gagcttctt a	21
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 24	
cctgggataa aggctttgt t	21
<210> 25	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 25	
gaaagctatc acatatctga a	21
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 26	
ctttggaaag ctatcacata t	21
<210> 27	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 27	
ccattgtctt tgaaagcta t	21
<210> 28	

<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 28	
cttcttccag attctctgaa a	21
<210> 29	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 29	
gcttcaagct catgtggaca a	21
<210> 30	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 30	
caaggaatct tgcccttcca t	21
<210> 31	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 31	
gcagtgccat tgtcttgga a	21