



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

A61K 38/05 (2006.01)
A61K 31/554 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0073863
(43) 공개일자 2007년07월10일

(21) 출원번호 10-2007-7010099

(22) 출원일자 2007년05월03일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년05월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/035803

(87) 국제공개번호 WO 2006/044205

국제출원일자 2005년10월04일

국제공개일자 2006년04월27일

(30) 우선권주장 60/615,970 2004년10월04일 미국(US)
60/684,484 2005년05월24일 미국(US)
60/718,907 2005년09월19일 미국(US)

(71) 출원인 트리니티 바이오시스템스, 인크.
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 빌딩 15 멘로 비즈니스 파크 스위트 1316 아담스 드라이브 1455

(72) 발명자 미시즈니, 랜달, 제이.
미국 94022 캘리포니아주 로스 알토스 힐즈 부에나 비스타드라이브 11620

(74) 대리인 김영
양영준

전체 청구항 수 : 총 68 항

(54) 거대분자의 무침 전달을 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

대상체의 혈류에 거대분자를 무침 전달하기 위한 방법 및 조성물이 본원에서 제공된다. 한 양상에서, 본 발명은 수용체 결합 도메인, 트랜스사이토시스 도메인, 대상체에게 전달될 거대분자 및 절단가능 링커를 포함하는 전달 구축물을 제공한다. 일반적으로, 절단가능 링커는 신체 내의 다른 곳, 예를 들어, 분극화 상피 세포의 최상단부 면에서보다, 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 또는 이러한 막 근처에, 또는 혈장 내에 더 높은 농도로 존재하는 효소에 의해 절단가능하다. 또다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 전달 구축물을 코딩하는 핵산, 본 발명의 전달 구축물을 포함하는 키트, 본 발명의 전달 구축물을 발현하는 세포, 및 본 발명의 전달 구축물을 사용하는 방법을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1.

- a) 수용체 결합 도메인,
- b) 트랜스사이토시스(transcytosis) 도메인,
- c) 대상체에게 전달될 거대분자, 및
- d) 절단가능 링커

를 포함하며, 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리되고, 상기 절단가능 링커는 i) 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에서의 활성이 분극화 상피 세포의 최상단부(apical) 막에서보다 더 큰 효소, 또는 ii) 대상체의 혈장에서의 활성이 대상체의 분극화 상피 세포의 최상단부 막에서보다 더 큰 효소에 의해 절단 가능한 것인 전달 구축물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 제2 절단가능 링커를 추가로 포함하는 전달 구축물.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 절단가능 링커가 Ala-Ala-Pro-Phe (서열 4), Gly-Gly-Phe (서열 5), Ala-Ala-Pro-Val (서열 6), Gly-Gly-Leu (서열 7), Ala-Ala-Leu (서열 8), Phe-Val-Arg (서열 9), Val-Gly-Arg (서열 10)으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 전달 구축물.

청구항 4.

제1항에 있어서, 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 상기 효소가 카텝신 GI, 키모트립신 I, 엘라스타제 I, 서브틸리신 AI, 서브틸리신 AII, 트롬빈 I, 및 유로키나제 I로 구성되는 군으로부터 선택되는 전달 구축물.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 수용체 결합 도메인이 슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소 A, 콜레라 독소, 보툴리눔 독소, 디프테리아 독소, 시가(shiga) 독소 또는 시가-유사 독소, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 단일쇄 항체, TGF α , EGF, IGF-I, IGF-II, IGF-III, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, MIP-1a, MIP-1b, MCAF, 및 IL-8로부터의 수용체 결합 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택되는 전달 구축물.

청구항 6.

제1항에 있어서, 상기 수용체 결합 도메인이 α 2-마크로글로불린 수용체, 표피 성장 인자 수용체, 트랜스페린 수용체, 케모카인 수용체, CD25, CD11B, CD11C, CD80, CD86, TNF α 수용체, TOLL 수용체, M-CSF 수용체, GM-CSF 수용체, 스캐빈저(scavenger) 수용체, 및 VEGF 수용체로 구성되는 군으로부터 선택된 세포 표면 수용체에 결합하는 전달 구축물.

청구항 7.

제5항에 있어서, 슈도모나스 외독소 A의 상기 수용체 결합 도메인이 슈도모나스 외독소 A의 도메인 Ia인 전달 구축물.

청구항 8.

제7항에 있어서, 슈도모나스 외독소 A의 상기 수용체 결합 도메인의 아미노산 서열이 서열 1인 전달 구축물.

청구항 9.

제1항에 있어서, 상기 트랜스사이토시스 도메인이 슈도모나스 외독소 A, 보툴리눔 독소, 디프테리아 독소, 백일해 독소, 콜레라 독소, 이열성(heat-labile) 대장균(*E.coli*) 장독소, 시가 독소, 및 시가-유사 독소로부터의 트랜스사이토시스 도메인으로 구성되는 균으로부터 선택되는 전달 구축물.

청구항 10.

제9항에 있어서, 상기 트랜스사이토시스 도메인이 슈도모나스 외독소 A 트랜스사이토시스 도메인인 전달 구축물.

청구항 11.

제10항에 있어서, 상기 슈도모나스 외독소 A 트랜스사이토시스 도메인의 아미노산 서열이 서열 2인 전달 구축물.

청구항 12.

제1항에 있어서, 상기 거대분자가 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 및 지질로 구성되는 균으로부터 선택되는 전달 구축물.

청구항 13.

제12항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 폴리펩티드 호르몬, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 및 응고 인자로 구성되는 균으로부터 선택되는 전달 구축물.

청구항 14.

제13항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 IGF-I, IGF-II, IGF-III, EGF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, EPO, 성장 호르몬, 인자 VII, 바소프레신, 칼시토닌, 부갑상선 호르몬, 황체형성 호르몬-방출 인자, 조직 플라스미노겐 활성화자, 프로인슐린, 인슐린, 글루코코르티코이드, 아밀린, 부신피질자극호르몬, 엔케팔린, 및 글루카곤-유사 펩티드 1로 구성되는 균으로부터 선택되는 전달 구축물.

청구항 15.

제14항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 인간 성장 호르몬인 전달 구축물.

청구항 16.

제12항에 있어서, 상기 단백질이 인간 인슐린인 전달 구축물.

청구항 17.

제12항에 있어서, 상기 단백질이 인간 IFN- α 인 전달 구축물.

청구항 18.

제12항에 있어서, 상기 단백질이 인간 IFN- α 2b인 전달 구축물.

청구항 19.

제12항에 있어서, 상기 단백질이 인간 프로인슐린인 전달 구축물.

청구항 20.

제12항에 있어서, 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 지질 또는 유기 소분자의 군으로부터 선택된 제2 거대분자 및 제2 절단가능 링커를 추가로 포함하며, 상기 제2 절단가능 링커에서의 절단에 의해 상기 제2 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리되는 전달 구축물.

청구항 21.

제17항에 있어서, 상기 거대분자가 제1 폴리펩티드이고, 상기 제2 거대분자가 제2 폴리펩티드인 전달 구축물.

청구항 22.

제21항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 및 상기 제2 폴리펩티드가 회합되어 다량체를 형성하는 전달 구축물.

청구항 23.

제22항에 있어서, 상기 다량체가 2량체, 4량체 또는 8량체인 전달 구축물.

청구항 24.

제23항에 있어서, 상기 2량체가 항체인 전달 구축물.

청구항 25.

a) 수용체 결합 도메인,

b) 트랜스사이토시스 도메인,

c) 대상체에게 전달될 거대분자, 및

d) 절단가능 링커

를 포함하는 전달 구축물을 코딩하며, 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 상기 구축물의 나머지 부분으로부터 분리되고, 상기 절단가능 링커는 i) 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에서의 활성이 분극화 상피 세포의 최상단부 막에서보다 더 큰 효소, 또는 ii) 대상체의 혈장에서의 활성이 대상체의 분극화 상피 세포의 최상단부 막에서보다 더 큰 효소에 의해 절단가능한 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 26.

엄격한 혼성화 조건 하에서 제25항의 폴리뉴클레오티드에 혼성화되는 폴리뉴클레오티드.

청구항 27.

제25항에 있어서, 상기 전달 구축물이 제2 절단가능 링커를 추가로 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 28.

제25항에 있어서, 상기 절단가능 링커가 Ala-Ala-Pro-Phe (서열 4), Gly-Gly-Phe (서열 5), Ala-Ala-Pro-Val (서열 6), Gly-Gly-Leu (서열 7), Ala-Ala-Leu (서열 8), Phe-Val-Arg (서열 9), Val-Gly-Arg (서열 10)으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 29.

제25항에 있어서, 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 상기 효소가 카텝신 GI, 키모트립신 I, 엘라스타제 I, 서브틸리신 AI, 서브틸리신 AII, 트롬빈 I, 및 유로키나제 I로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드.

청구항 30.

제25항에 있어서, 상기 수용체 결합 도메인이 슈도모나스 외독소 A, 콜레라 독소, 보툴리눔 독소, 디프테리아 독소, 시가 독소 또는 시가-유사 독소, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 단일쇄 항체, TGF α , EGF, IGF-I, IGF-II, IGF-III, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, MIP-1a, MIP-1b, MCAF, 및 IL-8로부터의 수용체 결합 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드.

청구항 31.

제25항에 있어서, 상기 수용체 결합 도메인이 α 2-마크로글로불린 수용체, EGFR, IGFR, 트랜스페린 수용체, 케모카인 수용체, CD25, CD11B, CD11C, CD80, CD86, TNF α 수용체, TOLL 수용체, M-CSF 수용체, GM-CSF 수용체, 스캐빈저 수용체, 및 VEGF 수용체로 구성되는 군으로부터 선택된 세포 표면 수용체에 결합하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 32.

제30항에 있어서, 슈도모나스 외독소 A의 상기 수용체 결합 도메인이 슈도모나스 외독소 A의 도메인 Ia인 폴리뉴클레오티드.

청구항 33.

제31항에 있어서, 슈도모나스 외독소 A의 상기 수용체 결합 도메인의 아미노산 서열이 서열 1인 폴리뉴클레오티드.

청구항 34.

제25항에 있어서, 상기 트랜스사이토시스 도메인이 슈도모나스 외독소 A, 보툴리눔 독소, 디프테리아 독소, 백일해 독소, 콜레라 독소, 이열성 대장균 장독소, 시가 독소, 및 시가-유사 독소로부터의 트랜스사이토시스 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드.

청구항 35.

제34항에 있어서, 상기 트랜스사이토시스 도메인이 슈도모나스 외독소 A 트랜스사이토시스 도메인인 폴리뉴클레오티드.

청구항 36.

제35항에 있어서, 상기 슈도모나스 외독소 A 트랜스사이토시스 도메인의 아미노산 서열이 서열 2인 폴리뉴클레오티드.

청구항 37.

제25항에 있어서, 상기 거대분자가 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드.

청구항 38.

제37항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 폴리펩티드 호르몬, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 및 응고 인자로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드.

청구항 39.

제38항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 IGF-I, IGF-II, IGF-III, EGF, IFN- α , IFN- α 2b, IFN- β , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, EPO, 성장 호르몬, 인자 VII, 바소프레신, 칼시토닌, 부갑상선 호르몬, 황체형성 호르몬-방출 인자, 조직 플라스미노겐 활성화자, 프로인슐린, 인슐린, 글루코코르티코이드, 아밀린, 부신피질자극호르몬, 엔케팔린, 및 글루카곤-유사 펩티드 1로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드.

청구항 40.

제39항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 인간 성장 호르몬인 폴리뉴클레오티드.

청구항 41.

제39항에 있어서, 상기 단백질이 인간 인슐린인 폴리뉴클레오티드.

청구항 42.

- a) 수용체 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열,
- b) 트랜스사이토시스 도메인을 코딩하는 핵산 서열,
- c) 절단가능 링커를 코딩하는 핵산 서열, 및
- d) 폴리링커 삽입 부위를 포함하는 핵산 서열

을 포함하며, 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리되고, 상기 절단가능 링커는 i) 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에서의 활성이 분극화 상피 세포의 최상단부 막에서보다 더 큰 효소, 또는 ii) 대상체의 혈장에서의 활성이 대상체의 분극화 상피 세포의 최상단부 막에서보다 더 큰 효소에 의해 절단가능한 것인, 전달 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 43.

제25항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 44.

제43항의 발현 벡터를 포함하는 세포.

청구항 45.

- a) 수용체 결합 도메인,
- b) 트랜스사이토시스 도메인,
- c) 대상체에게 전달될 거대분자, 및
- d) 절단가능 링커

를 포함하는 전달 구축물을 포함하며, 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 상기 구축물의 나머지 부분으로부터 분리되고, 상기 절단가능 링커는 i) 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에서의 활성이 분극화 상피 세포의 최상단부 막에서보다 더 큰 효소, 또는 ii) 대상체의 혈장에서의 활성이 대상체의 분극화 상피 세포의 최상단부 막에서보다 더 큰 효소에 의해 절단가능한 것인 조성물.

청구항 46.

제45항에 있어서, 제약상 허용가능한 희석제, 부형제, 비히클 또는 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 47.

제45항에 있어서, 비강(nasal) 또는 경구 투여용으로 제형화된 조성물.

청구항 48.

대상체의 분극화 상피 세포의 최상단부 표면을 수용체 결합 도메인, 트랜스사이토시스 도메인, 절단가능 링커 및 거대분자를 포함하는 전달 구축물과 접촉시키는 것을 포함하며, 이때 상기 트랜스사이토시스 도메인은 거대분자를 상기 상피 세포의 기저-측면 막을 통해 트랜스사이토시스시키고, 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 상기 구축물의 나머지 부분으로부터 분리되고, 상기 절단가능 링커는 i) 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에서의 활성이 분극화 상피 세포의 최상단부 막에서보다 더 큰 효소, 또는 ii) 대상체의 혈장에서의 활성이 대상체의 분극화 상피 세포의 최상단부 막에서보다 더 큰 효소에 의해 절단가능하고, 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 상기 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리됨으로써 거대분자가 대상체에게 전달되는 것인, 거대분자를 대상체에게 전달하는 방법.

청구항 49.

제48항에 있어서, 상기 수용체 결합 도메인이 슈도모나스 외독소 A, 콜레라 독소, 디프테리아 독소, 시가 독소 또는 시가-유사 독소, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 단일쇄 항체, TGF α , EGF, IGF-I, IGF-II, IGF-III, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, MIP-1a, MIP-1b, MCAF, 및 IL-8로부터의 수용체 결합 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 50.

제48항에 있어서, 상기 수용체 결합 도메인이 α 2-마크로글로불린 수용체, EGFR, IGFR, 트랜스페린 수용체, 케모카인 수용체, CD25, CD11B, CD11C, CD80, CD86, TNF α 수용체, TOLL 수용체, M-CSF 수용체, GM-CSF 수용체, 스캐빈저 수용체, 및 VEGF 수용체로 구성되는 군으로부터 선택된 세포 표면 수용체에 결합하는 것인 방법.

청구항 51.

제48항에 있어서, 상기 트랜스사이토시스 도메인이 슈도모나스 외독소 A, 보툴리눔 독소, 디프테리아 독소, 백일해 독소, 콜레라 독소, 이열성 대장균 장독소, 시가 독소, 및 시가-유사 독소로부터의 트랜스사이토시스 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 52.

제48항에 있어서, 상기 거대분자가 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 핵산 및 지질로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 53.

제48항에 있어서, 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 상기 효소가 카텡신 GI, 키모트립신 I, 엘라스타제 I, 서브틸리신 AI, 서브틸리신 AII, 트롬빈 I, 및 유로키나제 I로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 54.

제48항에 있어서, 상기 절단가능 링커가 Ala-Ala-Pro-Phe (서열 4), Gly-Gly-Phe (서열 5), Ala-Ala-Pro-Val (서열 6), Gly-Gly-Leu (서열 7), Ala-Ala-Leu (서열 8), Phe-Val-Arg (서열 9), Val-Gly-Arg (서열 10)으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 55.

제48항에 있어서, 상피 세포가 비강 상피 세포, 구강 상피 세포, 장 상피 세포, 직장 상피 세포, 질 상피 세포 및 폐 상피 세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 56.

제48항에 있어서, 상기 포유동물이 인간인 방법.

청구항 57.

제48항에 있어서, 상기 전달 구축물을 상피 세포의 최상단부 막과 접촉시키는 것인 방법.

청구항 58.

제1항의 전달 구축물을 대상체의 분극화 상피 세포의 최상단부 표면과 접촉시켜서 거대분자가 대상체의 혈류에 전달되도록 하는 것을 포함하며, 이때 대상체의 혈청 내에서 유도되는 거대분자-특이적 항체의 역가가, 거대분자를 전달 구축물의 나머지 부분 없이 대상체에게 피하 투여하여 유도되는 경우보다 더 낮은 것인, 대상체의 혈류에 거대분자를 전달하는 방법.

청구항 59.

제58항에 있어서, 거대분자가 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 핵산 및 지질로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 60.

제58항에 있어서, 거대분자가 폴리펩티드 호르몬, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 및 응고 인자로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 61.

제58항에 있어서, 거대분자가 IGF-I, IGF-II, IGF-III, EGF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, EPO, 성장 호르몬, 인자 VII, 바소프레신, 칼시토닌, 부갑상선 호르몬, 황체형성 호르몬-방출 인자, 조직 플라스미노겐 활성화자, 프로인슐린, 인슐린, 글루코코르티코이드, 아밀린, 부신피질자극호르몬, 엔케팔린, 및 글루카곤-유사 펩티드 1로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 62.

제58항에 있어서, 거대분자가 인간 성장 호르몬인 방법.

청구항 63.

제58항에 있어서, 거대분자가 인간 인슐린인 방법.

청구항 64.

제58항에 있어서, 대상체가 마우스, 개, 염소 또는 인간인 방법.

청구항 65.

제58항에 있어서, 전달 구축물에 의해 전달된 거대분자로 인해 대상체의 혈청 내에서 유도된 거대분자-특이적 항체의 역가가, 거대분자를 전달 구축물의 나머지 부분 없이 대상체에게 피하 투여하여 유도되는 항체 역가의 약 75% 미만인 방법.

청구항 66.

제58항에 있어서, 전달 구축물에 의해 전달된 거대분자로 인해 대상체의 혈청 내에서 유도된 거대분자-특이적 항체의 역가가, 거대분자를 전달 구축물의 나머지 부분 없이 대상체에게 피하 투여하여 유도되는 항체 역가의 약 50% 미만인 방법.

청구항 67.

제58항에 있어서, 전달 구축물에 의해 전달된 거대분자로 인해 대상체의 혈청 내에서 유도된 거대분자-특이적 항체의 역가가, 거대분자를 전달 구축물의 나머지 부분 없이 대상체에게 피하 투여하여 유도되는 항체 역가의 약 25% 미만인 방법.

청구항 68.

제58항에 있어서, 전달 구축물에 의해 전달된 거대분자로 인해 대상체의 혈청 내에서 유도된 거대분자-특이적 항체의 역가가, 거대분자를 전달 구축물의 나머지 부분 없이 대상체에게 피하 투여하여 유도되는 항체 역가의 약 10% 미만인 방법.

명세서

기술분야

1. 기술분야

본 발명은, 부분적으로, 대상체에게 거대 분자를 무침(needleless) 전달하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 한 양상에서, 이러한 방법 및 조성물에는 전달될 거대분자를 포함하는 전달 구축물을 대상체에게 투여하는 것이 수반되고, 이때 거대분자는 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에서 절단가능한 링커(linker)로 구축물의 나머지 부분에 연결된다.

배경기술

2. 배경기술

생화학 및 분자 생물학의 발전으로 성장 호르몬, 에리트로포이에틴, 인슐린, IGF 등이 예를 들어 포함되는 많은 치료용 거대분자가 확인 및 특징화되었다. 이러한 분자의 투여로 광범위한 병을 앓고 있는 대상체에서 삶의 질이 철저히 개선될 수 있다.

그러나, 이러한 치료용 거대분자의 투여에는 여전히 문제가 있다. 현재, 치료용 거대분자는 주사에 의해 전형적으로 투여된다. 이같은 주사는 대상체의 피부 및 조직의 관통을 필요로 하고, 통증이 연관된다. 또한, 피부의 관통은 감염에 대한 보호의 한 효과적인 비특이적 메커니즘을 위반하고, 따라서, 잠재적으로 심각한 감염에 이를 수 있다.

거대분자를 대상체에게 무침 전달하기 위한 시도들이 기존에 이루어졌다. 예를 들어, 국제 특허 공개공보 WO 01/30,392 참조. 이러한 노력들에서는, 분극화 상피 세포를 통해 대상체에게 거대분자를 전달하기 위해 전달 비히클(vehicle)이 사용된다. 그러나, 이러한 유도체에는 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에서 효소에 의해 절단가능한 절단가능 링커가 없다. 절단되지 않으면, 전달될 거대분자 및/또는 전달 비히클에 대한 면역 응답의 유도 가능성이 증가된다. 또한, 전달 비히클과 거대분자 간의 입체 장애가 거대분자의 활성을 감소시켜, 치료 효능을 감소시킬 수 있다.

따라서, 대상체의 피부를 위반하지 않으면서 대상체에게 거대분자를 투여하는데 사용될 수 있는 새로운 방법 및 조성물에 대한, 충족되지 않은 요구가 존재한다. 이러한 및 또다른 요구가 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 충족된다.

3. 발명의 개요

본 발명의 전달 구축물은 절단가능 링커로 구축물의 나머지 부분에 연결된, 대상체에게 전달하기 위한 거대분자를 포함한다. 링커는 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 효소 또는 환경 신호에 의해 절단가능하다.

따라서, 특정 양상에서, 본 발명은 수용체 결합 도메인, 트랜스사이토시스(transcytosis) 도메인, 대상체에게 전달될 거대분자 및 절단가능 링커를 포함하는 전달 구축물을 제공한다. 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리될 수 있다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 효소에 의해 절단가능할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 절단가능 링커는 상기 대상체의 혈장 내에 존재하는 효소에 의해 절단가능할 수 있다.

또다른 양상에서, 본 발명은 수용체 결합 도메인, 트랜스사이토시스 도메인, 대상체에게 전달될 거대분자 및 절단가능 링커를 포함하는 전달 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리될 수 있다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 효소에 의해 절단가능할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 절단가능 링커는 상기 대상체의 혈장 내에 존재하는 효소에 의해 절단가능할 수 있다.

또다른 실시양태에서, 전달 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 수용체 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열, 트랜스사이토시스 도메인을 코딩하는 핵산 서열, 절단가능 링커를 코딩하는 핵산 서열, 및 폴리링커(polylinker) 삽입 부위를 포함하는 핵산 서열을 포함한다. 폴리링커 삽입 부위는, 절단가능 링커의 절단으로 폴리링커 삽입 부위 내로 삽입된 핵산에 의해 코딩되는 거대분자가 코딩된 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리되도록, 절단가능 링커를 코딩하는 핵산 서열에 대해 배향될 수 있다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 효소에 의해 절단가능할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 절단가능 링커는 상기 대상체의 혈장 내에 존재하는 효소에 의해 절단가능할 수 있다.

또다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

또다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

또다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 전달 구축물을 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 이러한 조성물은 제약 조성물이다.

또다른 양상에서, 본 발명은 거대분자를 대상체에게 전달하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체의 분극화 상피 세포의 최상단부(apical) 표면을 본 발명의 전달 구축물과 접촉시키는 것을 포함한다. 전달 구축물은 수용체 결합 도메인, 트랜스사이토시스 도메인, 절단가능 링커, 및 전달될 거대분자를 포함할 수 있다. 트랜스사이토시스 도메인은 거대분자를 상피 세포의 기저-측면 막을 통해 트랜스사이토시스시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 효소에 의해 절단될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 절단가능 링커는 대상체의 혈장 내에 존재하는 효소에 의해 절단가능할 수 있다. 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리될 수 있고, 구축물의 나머지 부분 없이 거대분자가 대상체에게 전달될 수 있다.

발명의 상세한 설명

5. 발명의 상세한 설명

5.1. 정의

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 본원에서 사용될 때, 하기의 용어들은 달리 특정되지 않는 한 이들에 속하는 의미를 갖는다.

"리간드"는 표적 분자에 특이적으로 결합하는 화합물이다. 예시적인 리간드에는 항체, 사이토카인, 기질, 신호전달 분자 등이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

"수용체"는 리간드에 특이적으로 결합하는 화합물이다.

리간드 또는 수용체 (예를 들어, 항체)는 비균질 화합물들의 샘플 내에 분자가 존재하는 것을 가리키는 결합 반응에서 리간드 또는 수용체가 기능할 때 또다른 분자에 "특이적으로 결합"하거나 이와 "특이적으로 면역반응성"이다. 따라서, 명시된 분석 (예를 들어, 면역분석) 조건 하에서, 리간드 또는 수용체는 특정 화합물에 우선적으로 결합하고, 샘플 내에 존재하는 다른 화합물에는 유의한 양으로 결합하지 않는다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 상보적인 서열을 포함하는 또다른 폴리뉴클레오티드에 혼성화 조건 하에 특이적으로 결합하고, 항체는 항체를 유도하는데 사용된 에피토프가 있는 항원에 면역 분석 조건 하에 특이적으로 결합한다.

"면역분석"은 샘플을 분석물에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계 및 항체와 분석물 간의 결합을 검출하는 단계를 수반하는 샘플 내의 분석물을 검출하는 방법을 지칭한다. 다양한 면역분석 포맷을 사용하여, 특정 단백질과 특이적으로 면역반응성인 항체를 선별할 수 있다. 예를 들어, 고체-상 ELISA 면역분석은 단백질과 특이적으로 면역반응성인 모노클로날 항체를 선별하는데 관례적으로 사용된다. 특이적인 면역반응성을 결정하는데 사용될 수 있는 면역분석 포맷 및 조건의 기술에 대해서, [Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York] 참조. 한 예에서, 약 10 μM 의 친화력 (K_m)으로 특정 항원에 결합하는 항체는 항원에 특이적으로 결합한다.

"링커"는 공유결합에 의해, 또는 이온성, 반 데르 발스(van der Waals) 또는 수소 결합을 통해 2개의 다른 분자를 연결시키는 분자, 예를 들어, 5' 말단에서 한 상보적인 서열에 혼성화되고 3' 말단에서 또다른 상보적인 서열에 혼성화되어 2개의 비-상보적인 서열을 연결시키는 핵산을 지칭한다. "절단가능 링커"는 절단가능 링커에 의해 연결된 2개의 성분이 분리되도록 분해되거나 또는 다른 방식으로 단절될 수 있는 링커를 지칭한다. 절단가능 링커는 효소, 전형적으로는 펩티드분해효소, 단백질분해효소, 핵산분해효소, 지질분해효소 등에 의해 일반적으로 절단된다. 절단가능 링커는 분극화 상피 막을 가로지르는 전달 구축물의 트랜스사이토시스 후 환경에서의 변화가 있을 때 환경적인 신호, 예를 들어, 온도, pH, 염 농도 등에서의 변화에 의해서 또한 절단될 수 있다.

"제약 조성물"은 동물에서의 제약 용도에 적절한 조성물을 지칭한다. 제약 조성물은 약리학적으로 효과적인 양의 활성제 및 제약상 허용가능한 담체를 포함한다. "약리학적으로 효과적인 양"은 계획된 약리학적 결과를 일으키기에 효과적인 작용제의 양을 지칭한다. "제약상 허용가능한 담체"는 임의의 표준 제약 담체, 비히클, 버퍼, 및 부형제, 예컨대 포스페이트 완충 염수 용액, 텍스트로스의 5% 수용액, 및 에멀션, 예컨대 수중유 또는 유중수 에멀션, 및 다양한 유형의 습윤화제 및/또는 보조제를 지칭한다. 적절한 제약 담체 및 제제는 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Ed. 2005, Mack Publishing Co., Easton]에 기술되어 있다. "제약상 허용가능한 염"은 금속 염 (나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등) 및 암모니아 또는 유기 아민의 염이 예를 들어 포함되는, 제약 용도용 화합물로 제형화될 수 있는 염이다.

바람직한 제약 담체는 활성제의 계획된 투여 방식에 좌우된다. 전형적인 투여 방식에는 장내 투여 (예를 들어, 경구, 비강내, 직장 또는 질) 또는 비경구 투여 (예를 들어, 피하, 근육내, 정맥내 또는 복막내 주사); 또는 국소 투여 (예를 들어, 경피 또는 경점막 투여)가 포함된다.

"유기 소분자(small organic molecule)"는 제약에서 일반적으로 사용되는 유기 분자에 필적하는 크기의 유기 분자를 지칭한다. 이 용어에는 유기 생체중합체 (예를 들어, 단백질, 핵산 등)가 제외된다. 바람직한 유기 소분자는 크기가 약 5000 Da 이하, 약 2000 Da 이하, 또는 약 1000 Da 이하의 범위이다.

진단, 처치 또는 투여의 "대상체"는 포유동물 또는 영장류가 포함되는 인간 또는 비-인간 동물이고, 바람직하게는 인간이다.

"처치"는 예방용 처치 또는 치료용 처치를 지칭한다. "예방용" 처치는 질환의 징후를 나타내지 않거나 초기 징후만을 나타내는 대상체에게 병리학의 발병 위험을 감소시키기 위한 목적으로 투여되는 처치이다. "치료용" 처치는 병리학의 징후를 나타내는 대상체에게 이러한 징후를 축소 또는 제거하기 위한 목적으로 투여되는 처치이다.

"슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소 A" 또는 "PE"는 3개의 두드러진 구형 도메인 (Ia, II, 및 III) 및 도메인 II 및 III를 연결하는 1개의 작은 서브도메인 (Ib)으로 구성된 67 kD 단백질로서 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 의해 분비된다. [A.S. Allured et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:1320-1324] 참조. 어떠한 특정한 이론 또는 작용 메커니즘에 제한되지 않고, 도메인 Ia가 CD-91 및 $\alpha 2$ -마크로글로불린 수용체 (" $\alpha 2$ -MR")로 또한 공지된 저밀도 지단백질 수용체-관련 단백질 ("LRP")에 특이적으로 결합하기 때문에, PE의 도메인 Ia는 세포 결합을 매개하는 것으로 여겨진다. [M.Z. Kounnas et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:12420-23] 참조. 도메인 Ia는 아미산 1-252에 걸쳐진다. PE의 도메인 II는 도메인 Ia가 $\alpha 2$ -MR에 결합한 후 세포 내부로의 트랜스사이토시스를 매개하는 것으로 여겨진다. 도메인 II는 아미노산 253-364에 걸쳐진다. 이러한 도메인의 특정 부분은 합성 후 녹농균으로부터의 PE의 분비에 필요할 수 있다. 예를 들어, [Vouloux et al., 2000, J Bacteriol. 182:4051-8] 참조. 도메인 Ib는 기능이 공지되어 있지 않고, 아미노산 365-399에 걸쳐진다. 도메인 III는 PE의 세포독성을 매개하고, 형질내 세망 잔류 서열을 포함한다. PE 세포독성은 단백질 합성을 불활성화시키는 신장 인자 2의 ADP 리보실화로부터 초래되는 것으로 여겨진다. 도메인 III는 PE의 아미노산 400-613에 걸쳐진다. 도메인 III로부터의 아미노산 E553의 결실 (" $\Delta E553$ ")은 EF2 ADP 리보실화 활성을 제거하고, PE가 비독성 있게 한다. $\Delta E553$ 돌연변이가 있는 PE는 본원에서 " $PE\Delta E553$ "으로 지칭된다. PE의 유전자 변형된 형태는, 예를 들어, 미국 특허 5,602,095; 5,512,658 및 5,458,878에 기술되어 있다. 본원에서 사용된 슈도모나스 외독소에는 이러한 정의 내의 PE의 유전자 변형, 대립유전자 및 화학적 불활성화 형태가 또한 포함된다. 예를 들어, [Vasil et al., 1986, Infect. Immunol 52:538-48] 참조. 또한, PE의 다양한 도메인에 대해 도 3에 제시된 기준 PE 서열이 참조된다. 그러나, 변형된 PE, 예를 들어, 유전자 변형 또는 화학적으로 변형된 PE로부터의 1개 이상의 도메인, 또는 이같은 도메인의 일부 또한 도메인이 기능적 활성을 유지하는 한 본 발명의 키메라 면역원에서 사용될 수 있다. 당업자는, 예를 들어, 도 3에 예시된 PE 서열에 대한 상동성, 및 하기 기술되는 분석법을 예를 들어 이용하는 기능적 활성에 대한 테스트를 기초로, 이같은 변형된 PE의 이같은 도메인을 쉽게 확인할 수 있다.

"폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위로 구성된 중합체를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드에는 천연 발생 핵산, 예컨대 데옥시리보핵산 ("DNA") 및 리보핵산 ("RNA"), 뿐만 아니라 핵산 유사체가 포함된다. 핵산 유사체에는 비-천연 발생 염기, 천연 발생 포스포디에스테르 결합 이외의 다른 뉴클레오티드와의 결합에 관여하는 뉴클레오티드를 포함하는 것들 또는 포스포디에스테르 결합 이외의 결합을 통해 부착된 염기를 포함하는 것들이 포함된다. 따라서, 뉴클레오티드 유사체에는 포스포리오테이트, 포스포리오티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트, 보라노포스페이트, 메틸포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오티드, 펩티드-핵산 (PNA) 등이 예를 들어 비제한적으로 포함된다. 이같은 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 자동화된 DNA 합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 용어 "핵산"은 대형 폴리뉴클레오티드를 전형적으로 지칭한다. 용어 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로 뉴클레오티드 약 50개 이하의 짧은 폴리뉴클레오티드를 전형적으로 지칭한다. 뉴클레오티드 서열이 DNA 서열 (즉, A, T, G, C)로 표시될 때, 이는 "U"가 "T"를 대체하는 RNA 서열 (즉, A, U, G, C)을 또한 포함한다는 것이 이해될 것이다.

폴리뉴클레오티드 서열을 기술하기 위해 통상적인 표시법이 본원에서 사용된다: 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 왼쪽 말단이 5'-말단이다; 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 왼쪽 방향이 5'-방향으로 지칭된다.

신생 RNA 전사물에 뉴클레오티드가 5'에서 3'으로 부가되는 방향이 전사 방향으로 지칭된다. mRNA와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥은 "코딩 서열"로 지칭된다; 이러한 DNA로부터 전사된 mRNA와 동일한 서열을 갖고 RNA 전사물의 5'-말단에 대해 5'에 위치한 DNA 가닥 상의 서열은 "상류 서열"로 지칭된다; RNA와 동일한 서열을 갖고 코딩 RNA 전사물의 3' 말단에 대해 3'인 DNA 가닥 상의 서열은 "하류 서열"로 지칭된다.

"상보적"은 2개의 폴리뉴클레오티드의 상호작용 표면의 위상적인 적합성 또는 서로 매칭(matching)되는 것을 지칭한다. 따라서, 2개의 분자가 상보적인 것으로 기술될 수 있고, 또한 접촉 표면 특징이 서로에 대해 상보적이다. 제1 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 제2 폴리뉴클레오티드의 폴리뉴클레오티드 결합 파트너의 뉴클레오티드 서열과 실질적으로 동일하다면, 또는 제1 폴리뉴클레오티드가 엄격한 혼성화 조건 하에 제2 폴리뉴클레오티드에 혼성화할 수 있으면, 제1 폴리뉴클레오티드는 제2 폴리뉴클레오티드에 대해 상보적이다. 따라서, 서열이 5'-TATAC-3'인 폴리뉴클레오티드는 서열이 5'-GTATA-3'인 폴리뉴클레오티드에 대해 상보적이다.

용어 "서열 동일성(%)"은 용어 "동일성(%)"과 본원에서 구별없이 사용되고, 서열 정렬 프로그램을 사용하여 정렬되었을 때, 2개 이상의 펩티드 서열 간의 아미노산 서열 동일성의 수준, 또는 2개 이상의 뉴클레오티드 서열 간의 뉴클레오티드 서

열 동일성의 수준을 지칭한다. 예를 들어, 본원에서 사용된 80% 동일성은 정의된 알고리즘에 의해 결정된 80% 서열 동일성과 동일한 것을 의미하고, 주어진 서열이 또다른 길이의 또다른 서열과 적어도 80% 동일하다는 것을 의미한다. 서열 동일성의 예시적인 수준에는 주어진 서열에 대한 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98% 또는 그 이상의 서열 동일성이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

용어 "서열 상동성(%)"은 용어 "상동성(%)"과 본원에서 구별없이 사용되고, 서열 정렬 프로그램을 사용하여 정렬되었을 때, 2개 이상의 펩티드 서열 간의 아미노산 서열 상동성의 수준, 또는 2개 이상의 뉴클레오티드 서열 간의 뉴클레오티드 서열 상동성의 수준을 지칭한다. 예를 들어, 본원에서 사용된 80% 상동성은 정의된 알고리즘에 의해 결정된 80% 서열 상동성과 동일한 것을 의미하고, 따라서 주어진 서열의 상동체는 주어진 서열의 길이에 걸쳐 80%를 초과하는 서열 상동성을 갖는다. 서열 상동성의 예시적인 수준에는 주어진 서열에 대한 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98% 또는 그 이상의 서열 상동성이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

2개의 서열 간의 동일성을 결정하는데 사용될 수 있는 예시적인 컴퓨터 프로그램으로는 NCBI 웹사이트에서 인터넷으로 공개적으로 입수가 가능한 한 별의 BLAST 프로그램, 예를 들어, BLASTN, BLASTX, 및 TBLASTX, BLASTP 및 TBLASTN이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. [Altschul et al., 1990, J Mol Biol. 215:403-10] (공개된 디폴트 (default) 설정, 즉, 파라미터 $w=4$, $t=17$ 를 특히 참조) 및 [Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402] 를 또한 참조. 주어진 아미노산 서열을 진뱅크 단백질 서열(GenBank Protein Sequences) 및 기타 공공 데이터베이스 내의 아미노산 서열과 관련하여 평가하는 경우, 서열 검색은 BLASTP 프로그램을 사용하여 전형적으로 수행한다. BLASTX 프로그램은 진뱅크 단백질 서열 및 기타 공공 데이터베이스 내의 아미노산 서열에 대해 모든 리딩 프레임에서 번역된 핵산 서열을 검색하는데 바람직하다. BLASTP 및 BLASTX 모두 11.0의 오픈 갭 페널티(open gap penalty) 및 1.0의 확장 갭 페널티(extended gap penalty)의 디폴트 파라미터를 사용하여 실행되고, BLOSUM-62 매트릭스가 사용된다. 동일 문헌 참조.

2개 이상의 서열 간의 "동일성(%)"을 결정하기 위한 선별된 서열의 바람직한 정렬은, 예를 들어, 10.0의 오픈 갭 페널티, 0.1의 확장 갭 페널티, 및 BLOSUM 30 유사성 매트릭스가 포함되는 디폴트 파라미터로 조작되는 MacVector 버전 6.5의 CLUSTAL-W 프로그램을 사용하여 수행된다.

"극성 아미노산"은 생리학적 pH에서 전하를 띠지 않고, 2개의 원자에 의해 공유된 한쌍의 전자가 원자들 중 하나에 더욱 가깝게 유지된 결합을 1개 이상 갖는 측쇄를 갖는 친수성 아미노산을 지칭한다. 유전적으로 코딩되는 극성 아미노산에는 Asn (N), Gln (Q), Ser (S) 및 Thr (T)이 포함된다.

"비극성 아미노산"은 생리학적 pH에서 전하를 띠지 않고, 2개의 원자에 의해 공유된 한쌍의 전자가 각각의 2개 원자에 의해 동등하게 일반적으로 유지된 결합을 갖는 측쇄를 갖는 소수성 아미노산을 지칭한다 (즉, 측쇄가 극성이지 않음). 유전적으로 코딩되는 비극성 아미노산에는 Ala (A), Gly (G), Ile (I), Leu (L), Met (M) 및 Val (V)이 포함된다.

"친수성 아미노산"은 [Eisenberg et al., 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142]의 표준화된 합의 소수성 척도에 따라 0 미만의 소수성을 나타내는 아미노산을 지칭한다. 유전적으로 코딩되는 친수성 아미노산에는 Arg (R), Asn (N), Asp (D), Glu (E), Gln (Q), His (H), Lys (K), Ser (S) 및 Thr (T)이 포함된다.

"소수성 아미노산"은 [Eisenberg et al., 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142]의 표준화된 합의 소수성 척도에 따라 0을 초과하는 소수성을 나타내는 아미노산을 지칭한다. 유전적으로 코딩되는 소수성 아미노산에는 Ala (A), Gly (G), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Pro (P), Trp (W), Tyr (Y) 및 Val (V)이 포함된다.

"산성 아미노산"은 측쇄의 pK 값이 7 미만인 친수성 아미노산을 지칭한다. 전형적으로 산성 아미노산은 수소 이온의 손실로 인해 생리학적 pH에서 음성 전하를 띠는 측쇄를 갖는다. 유전적으로 코딩되는 산성 아미노산에는 Asp (D) 및 Glu (E)이 포함된다.

"염기성 아미노산"은 측쇄의 pK 값이 7을 초과하는 친수성 아미노산을 지칭한다. 전형적으로 염기성 아미노산은 수소 이온의 회합으로 인해 생리학적 pH에서 양성 전하를 띠는 측쇄를 갖는다. 유전적으로 코딩되는 염기성 아미노산에는 Arg (R), His (H) 및 Lys (K)이 포함된다.

"코딩"은 한정된 뉴클레오티드 서열 (즉, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 한정된 아미노산 서열 및 이로부터 생성된 생물학적 성질을 갖는 생물학적 프로세스 내의 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로 작용하는, 폴리뉴클레오티드, 예컨대 유전자, cDNA, 또는 mRNA 내의 특정 서열의 뉴클레오티드의 고유의 성질을 지칭한다. 따라서, 유전자에 의해 생

산된 mRNA의 전사 및 번역으로 세포 또는 기타 생물학적 시스템에서 단백질이 생산되는 경우, 이 유전자는 단백질을 코딩한다. 유전자 또는 cDNA의, 뉴클레오티드 서열이 mRNA 서열과 동일하고 일반적으로 서열 목록에서 제공되는 코딩 가닥, 및 전사에 대한 주형으로 사용되는 비-코딩 가닥 모두 이러한 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 기타 생성물을 코딩하는 것으로 지칭될 수 있다. 달리 특정되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열"에는 서로의 축퇴성 버전이고, 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열이 포함된다. 단백질 및 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 인트론(intron)을 포함할 수 있다.

"중폭"은, 예를 들어, 역전사, 중합효소 연쇄 반응, 결찰효소 연쇄 반응 등에 의해, 폴리뉴클레오티드 서열이 복사되고 따라서 더 큰 갯수의 폴리뉴클레오티드 분자로 확장되는 임의의 수단을 지칭한다.

"프라이머"는 지정된 폴리뉴클레오티드 주형에 특이적으로 결합하여 상보적인 폴리뉴클레오티드의 합성을 위한 시작점을 제공할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 이같은 합성은 폴리뉴클레오티드 프라이머가 합성이 유도되는 조건 하에 놓일 때, 즉, 뉴클레오티드, 상보적인 폴리뉴클레오티드 주형, 및 중합용 작용제 예컨대 DNA 중합효소의 존재 하에 발생한다. 프라이머는 전형적으로 단일 가닥이지만, 이중 가닥일 수 있다. 프라이머는 전형적으로 테옥시리보핵산이지만, 광범위한 합성 및 천연 발생 프라이머가 많은 용도에 유용하다. 프라이머는 합성 시작 부위로 작용하기 위해 이에 혼성화되도록 지정된 주형에 상보적이지만, 주형의 정확한 서열을 반영할 필요는 없다. 이같은 경우에, 주형에 대한 프라이머의 특이적 혼성화는 혼성화 조건의 엄격도에 좌우된다. 프라이머는, 예를 들어, 색소원성, 방사성 또는 형광 모이어티(moiety)로 표지되어, 검출가능한 모이어티로 사용될 있다.

폴리뉴클레오티드와 관련하여 사용된 "프로브"는 또다른 폴리뉴클레오티드의 지정된 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 프로브는 상보적인 표적 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 혼성화하지만, 주형의 정확한 상보적인 서열을 반영할 필요는 없다. 이같은 경우에, 표적에 대한 프로브의 특이적인 혼성화는 혼성화 조건의 엄격도에 좌우된다. 프로브는, 예를 들어, 색소원성, 방사성 또는 형광 모이어티로 표지되어, 검출가능한 모이어티로 사용될 있다. 프로브가 상보적인 폴리뉴클레오티드의 합성을 위한 시작점을 제공하는 경우, 프로브는 또한 프라이머일 수 있다.

"특이적으로 혼성화" 또는 "특이적 혼성화" 또는 "선택적으로 혼성화"는 특정 뉴클레오티드 서열이 복합적인 혼합물 (예를 들어, 전체 세포성) DNA 또는 RNA 내에 존재할 때 엄격한 조건 하에 특정 뉴클레오티드 서열에 대해 우선적인 핵산 분자의 결합, 듀플렉스화 또는 혼성화를 지칭한다.

용어 "엄격한 조건"은 프로브가 이의 표적 서열에 우선적으로 혼성화하고, 다른 서열에는 더 낮은 정도로 혼성화하거나 전혀 혼성화하지 않는 조건을 지칭한다. 핵산 혼성화 실험 예컨대 써던(Southern) 및 노던(northern) 혼성화의 문맥에서 "엄격한 혼성화" 및 "엄격한 혼성화 세정 조건"은 서열 의존적이고, 여러 환경 파라미터에 따라 상이하다. 핵산의 혼성화에 대한 광범위한 안내는 [Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, part I, chapter 2, "Overview of principles of hybridization and strategy of the nucleic acid probe assays", Elsevier, NY]; [Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd ed., NY]; 및 [Ausubel et al., eds., Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY]에서 발견할 수 있다.

일반적으로, 고도로 엄격한 혼성화 및 세정 조건은 규정된 이온 강도 및 pH에서 특정 서열에 대한 열 융점 (T_m)보다 약 5°C 낮도록 선택된다. T_m 은 표적 서열의 50%가 완전하게 매칭되는 프로브에 혼성화되는 온도 (규정된 이온 강도 및 pH 하에)이다. 매우 엄격한 조건은 특정 프로브에 대한 T_m 과 동일하도록 선택된다.

써던 또는 노던 블롯에서 필터 상의 약 100개를 초과하는 상보적인 잔기를 갖는 상보적인 핵산의 혼성화를 위한 엄격한 혼성화 조건의 한 예는 42°C 의 1 mg의 헤파린이 있는 50% 포르말린이고, 혼성화는 하룻밤 동안 수행된다. 고도로 엄격한 세정 조건의 예는 약 15분 동안의 72°C 의 0.15M NaCl이다. 엄격한 세정 조건의 한 예는 15분 동안의 65°C 의 $0.2\times$ SSC 세정이다. SSC 버퍼의 기술에 대해서는 [Sambrook et al.] 참조. 고도로 엄격한 세정에 앞서 낮은 엄격도의 세정으로 배경 프로브 신호를 제거할 수 있다. 예를 들어, 약 100개를 초과하는 뉴클레오티드의 듀플렉스에 대한 예시적인 중간 정도로 엄격한 세정은 15분 동안의 45°C 에서의 $1\times$ SSC이다. 예를 들어, 약 100개를 초과하는 뉴클레오티드의 듀플렉스에 대한 예시적인 낮은 엄격도의 세정은 15분 동안의 40°C 에서의 $4-6\times$ SSC이다. 일반적으로, 특정 혼성화 분석에서 관련되지 않은 프로브에 대해 관찰된 것의 2배 (또는 그 이상)인 신호 대 노이즈 비율은 특이적 혼성화의 검출을 가리킨다.

"폴리펩티드"는 펩티드 결합을 통해 연결된 아미노산 잔기, 관련된 천연 발생 구조 변이체 및 이의 비-천연 발생 합성 유사체로 구성된 중합체, 관련된 천연 발생 구조 변이체, 및 이의 비-천연 발생 합성 유사체를 지칭한다. 합성 폴리펩티드는, 예를 들어, 자동화된 폴리펩티드 합성기를 사용하여 합성할 수 있다. 폴리펩티드 서열을 묘사하기 위해 통상적인 표시법이 본원에서 사용된다; 폴리펩티드 서열의 시작부분은 아미노-말단이고, 폴리펩티드 서열의 끝부분은 카르복실-말단이다.

용어 "단백질"은 대형 폴리펩티드를 전형적으로 지칭하고, 예를 들어, 아미노산이 약 50개를 초과하는 폴리펩티드이다. 용어 "단백질"은 1개를 초과하는 폴리펩티드를 포함하는 이량체, 삼량체, 또는 다량체를 또한 지칭할 수 있다.

"보존적 치환"은 폴리펩티드 내의 아미노산의 기능적으로 유사한 아미노산으로의 치환을 지칭한다. 하기의 6가지 군은 서로에 대해 보존성 치환인 아미노산을 각각 함유한다:

알라닌 (A), 세린 (S), 및 트레오닌 (T)

아스파르트산 (D) 및 글루탐산 (E)

아스파라긴 (N) 및 글루타민 (Q)

아르기닌 (R) 및 라이신 (K)

이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 및 발린 (V)

페닐알라닌 (F), 타이로신 (Y), 및 트립토판 (W).

본원에서 사용된 용어 "약"은, 달리 지시되지 않는 한, 이러한 용어에 의해 수식된 값의 $\pm 10\%$ 인 값을 지칭한다. 예를 들어, 용어 "약 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ "은 4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 5.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 범위를 의미한다. 또다른 예로서, "약 1시간"은 48분 내지 72분의 범위를 의미한다.

5.2. 전달 구축물

일반적으로, 본 발명의 전달 구축물은 PE의 도메인 Ia 및 II에 상응하는 구조 도메인을 갖는 폴리펩티드이다. 이러한 구조 도메인은 PE의 도메인들의 기능에 상응하는, 세포 인식 및 트랜스사이토시스에 포함되지만 이에 한정되지 않는 특정 기능을 수행한다.

PE 기능 도메인에 상응하는 분자의 부분에 더하여, 본 발명의 전달 구축물은 대상체의 생물학적 구획으로의 전달을 위한 거대분자를 추가로 포함할 수 있다. 거대분자는 세포-결합 또는 트랜스사이토시스 활성을 붕괴시키지 않는 전달 구축물의 임의의 부분 내로 도입될 수 있다. 거대분자는 절단가능 링커로 전달 구축물의 나머지 부분과 연결된다.

따라서, 본 발명의 전달 구축물은 하기의 구조 요소를 일반적으로 포함하고, 각각의 요소는 특정 기능을 전달 구축물에 부여한다: (1) 세포 표면 수용체에 대한 리간드로 기능하고, 구축물이 세포에 결합하는 것을 매개하는 "수용체 결합 도메인"; (2) 점막의 최상단부 표면에 접경된 루멘으로부터 점막의 기저-측면쪽 면으로의 트랜스사이토시스를 매개하는 "트랜스사이토시스 도메인"; (3) 거대분자; 및 (4) 거대분자를 전달 구축물의 나머지 부분에 연결시키는 절단가능 링커.

본 발명의 전달 구축물은 대상체에게 거대분자를 국소 또는 전신 전달하기 위한 통상적인 기술에 비해 여러 장점을 제공한다. 이같은 장점 중 가장 우선적인 것은 대상체의 피부를 뚫는 침을 사용하지 않으면서 거대분자를 전달하는 능력이다. 많은 대상체는 거대분자의 반복된 정기적인 투약을 필요로 한다. 예를 들어, 당뇨병환자는 인슐린을 하루에 수회 주사하여 혈당 농도를 제어하여야 한다. 거대분자의 전달이 주사 없이 달성될 수 있다면, 주사와 관련된 통증 또는 잠재적인 합병증을 피함으로써, 이같은 대상체의 삶의 질이 크게 개선될 것이다.

또한, 전달 구축물의 많은 실시양태가 재조합 시스템에서 구축 및 발현될 수 있다. 재조합 기술은 임의의 적절한 거대분자의 도입용으로 디자인된 삽입 부위를 갖는 전달 구축물이 제조되도록 한다. 이같은 삽입 부위는 필요한 경우 당업자가 새로운 거대분자의 전달을 위한 전달 구축물을 빠르고 쉽게 생산하도록 한다.

또한, 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 효소에 의해 절단되는 링커로 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분에 연결되는 것은 상피 막을 가로지르는 트랜스사이토시스 직후 거대분자가 전달 구축물로부터 유리되고, 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 방출되도록 한다. 이같은 유리는 거대 분자에 대한 면역 응답이 유도되는 가능성을 감소시킨다. 또한 이는 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분 없이 이의 표적과 상호작용하도록 한다.

본 발명의 전달 구축물의 기타 장점들은 당업자에게 명백할 것이다.

특정 실시양태에서, 본 발명은 수용체 결합 도메인, 트랜스사이토시스 도메인, 대상체에게 전달될 거대분자, 및 절단가능 링커를 포함하는 전달 구축물을 제공한다. 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 구축물의 나머지 부분으로부터 분리된다. 절단가능 링커는 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 또는 대상체의 혈장 내에 존재하는 효소에 의해 절단가능하다. 특정 실시양태에서, 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 있는 효소는 분극화 상피 세포의 최상단부 면에서보다 분극화 상피 세포의 기저-측면쪽 면에서 더 높은 활성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 대상체의 혈장 내의 효소는 극정화된 상피 세포의 최상단부 면에서보다 혈장에서 더 높은 활성을 나타낸다.

특정 실시양태에서, 전달 구축물은 제2 절단가능 링커를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 절단가능 링커는 Ala-Ala-Pro-Phe (서열 4), Gly-Gly-Phe (서열 5), Ala-Ala-Pro-Val (서열 6), Gly-Gly-Leu (서열 7), Ala-Ala-Leu (서열 8), Phe-Val-Arg (서열 9), Val-Gly-Arg (서열 10)으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 절단가능 링커는 Ala-Ala-Pro-Phe (서열 4), Gly-Gly-Phe (서열 5), Ala-Ala-Pro-Val (서열 6), Gly-Gly-Leu (서열 7), Ala-Ala-Leu (서열 8), Phe-Val-Arg (서열 9), Val-Gly-Arg (서열 10)으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 분극화 상피 세포의 최상단부 면에서보다 분극화 상피 세포의 기저-측면쪽 면에서 더 높은 활성을 나타내는 효소에 의해 절단가능하다. 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 절단가능 링커는 Ala-Ala-Pro-Phe (서열 4), Gly-Gly-Phe (서열 5), Ala-Ala-Pro-Val (서열 6), Gly-Gly-Leu (서열 7), Ala-Ala-Leu (서열 8), Phe-Val-Arg (서열 9), Val-Gly-Arg (서열 10)으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 분극화 상피 세포의 최상단부 면에서보다 혈장 내에서 더 높은 활성을 나타내는 효소에 의해 절단가능하다.

특정 실시양태에서, 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 효소는 카텡신(Cathepsin) GI, 키모트립신(Chymotrypsin) I, 엘라스타제(Elastase) I, 서브틸리신(Subtilisin) AI, 서브틸리신 AII, 트롬빈(Thrombin) I, 및 유로키나제(Urokinase) I로 구성되는 군으로부터 선택된다.

특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 슈도모나스 외독소 A, 콜레라 독소, 보툴리눔 독소, 디프테리아 독소, 시가(shiga) 독소 또는 시가-유사 독소; 모노클로날 항체; 폴리클로날 항체; 단일쇄 항체; TGF α ; EGF; IGF-I; IGF-II; IGF-III; IL-1; IL-2; IL-3; IL-6; MIP-1a; MIP-1b; MCAF; 및 IL-8로부터의 수용체 결합 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 α 2-마크로글로불린 수용체, 표피 성장 인자 수용체, 트랜스페린 수용체, 케모카인 수용체, CD25, CD11B, CD11C, CD80, CD86, TNF α 수용체, TOLL 수용체, M-CSF 수용체, GM-CSF 수용체, 스캐빈저(scavenger) 수용체, 및 VEGF 수용체로 구성되는 군으로부터 선택된 세포 표면 수용체에 결합한다. 추가적인 실시양태에서, 슈도모나스 외독소 A의 수용체 결합 도메인은 슈도모나스 외독소 A의 도메인 Ia이다. 또다른 추가적인 실시양태에서, 슈도모나스 외독소 A의 수용체 결합 도메인의 아미노산 서열은 서열 1이다.

특정 실시양태에서, 트랜스사이토시스 도메인은 슈도모나스 외독소 A, 보툴리눔 독소, 디프테리아 독소, 백일해 독소, 콜레라 독소, 이열성(heat-labile) 대장균(*E.coli*) 장독소, 시가 독소, 및 시가-유사 독소로부터의 트랜스사이토시스 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 추가적인 실시양태에서, 트랜스사이토시스 도메인은 슈도모나스 외독소 A 트랜스사이토시스 도메인이다. 또다른 추가적인 실시양태에서, 슈도모나스 외독소 A 트랜스사이토시스 도메인의 아미노산 서열은 서열 2이다.

특정 실시양태에서, 거대분자는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 및 지질로 구성되는 군으로부터 선택된다. 추가적인 실시양태에서, 폴리펩티드는 폴리펩티드 호르몬, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 및 응고 인자로 구성되는 군으로부터 선택된다. 또다른 추가적인 실시양태에서, 폴리펩티드는 IGF-I, IGF-II, IGF-III, EGF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, EPO, 성장 호르몬, 인자 VII, 바소프레신, 칼시토닌, 부갑상선 호르몬, 황체형성 호르몬-방출 인자, 조직 플라스미노겐 활성화자, 부신피질자극호르몬, 엔케팔린, 및 글루카곤-유사 펩티드 1로 구성되는 군으로부터 선택된다. 또다른 추가적인 실시양태에서, 폴리펩티드는 인간 성장 호르몬이다. 또다른 실시양태에서, 단백질은 인간 인슐린이다.

특정 실시양태에서, 전달 구축물은 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 지질, 및 유기 소분자로 구성되는 군으로부터 선택된 제2 거대분자, 및 제2 절단가능 링커를 추가로 포함하고, 이때 상기 제2 절단가능 링커에서의 절단에 의해 상기 제2 거대분자가 상기 구축물의 나머지 부분으로부터 분리된다. 특정 실시양태에서, 제1 거대분자는 제1 폴리펩티드이고, 상기 제2 거대분자는 제2 폴리펩티드이다. 특정 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드가 회합되어 다량체를 형성한다. 특정 실시양태에서, 다량체는 2량체, 4량체, 또는 8량체이다. 추가적인 실시양태에서, 2량체는 항체이다.

5.2.1. 수용체 결합 도메인

본 발명의 전달 구축물은 수용체 결합 도메인을 일반적으로 포함한다. 수용체 결합 도메인은 상피 세포의 최상단부 막에 존재하는 세포 표면 수용체에 결합하는 것으로 비제한적으로 당업자에게 공지된 임의의 수용체 결합 도메인일 수 있다. 바람직하게는, 수용체 결합 도메인은 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합한다. 수용체 결합 도메인은 전달 구축물이 세포내 이입되도록 하기에 충분한 친화력으로 세포 표면 수용체에 결합하여야 한다.

특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 지질, 탄수화물, 또는 유기 소분자, 또는 이의 배합물을 포함한다. 상피 세포의 최상단부 막에 존재하는 세포 표면 수용체에 결합하는 각각의 이러한 분자의 예는 당업자에게 주지되어 있다. 적절한 펩티드 또는 폴리펩티드에는 박테리아 독소 수용체 결합 도메인, 예컨대 PE, 콜레라 독소, 보툴리눔 독소, 디프테리아 독소, 시가 독소, 시가-유사 독소 등; 모노클로날, 폴리클로날, 및 단일쇄 항체, 또는 이의 유도체가 포함되는 항체, 성장 인자, 예컨대 EGF, IGF-I, IGF-II, IGF-III 등; 사이토카인, 예컨대 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 등; 케모카인, 예컨대 MIP-1a, MIP-1b, MCAF, IL-8 등; 및 기타 리간드, 예컨대 CD4, 면역글로불린 상과로부터의 세포 부착 분자, 인테그린, IgA 수용체에 특이적인 리간드로부터의 수용체 결합 도메인 등이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어, [Pastan et al., 1992, Annu. Rev. Biochem. 61:331-54]; 및 미국 특허 5,668,255, 5,696,237, 5,863,745, 5,965,406, 6,022,950, 6,051,405, 6,251,392, 6,440,419, 및 6,488,926 참조. 당업자는 수용체 결합 도메인이 결합하는 수용체의 발현 패턴을 기초로 적절한 수용체 결합 도메인을 선택할 수 있다.

수용체 결합 도메인에 적절한 지질에는 자신이 세포 표면 수용체에 결합하는 지질, 예컨대 스펅고신-1-포스페이트, 리소포스파티드산, 스펅고실포스포릴콜린, 레티노산 등; 지단백질 예컨대 아포지단백질 E, 아포지단백질 A 등, 및 당지질 예컨대 지질다당류 등; 당스핑고지질 예컨대 글로보트리아오실세라마이드 및 갈라비오실세라마이드 등이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 수용체 결합 도메인에 적절한 탄수화물에는 단순당 예컨대 글루코스, 프룩토스, 갈락토스 등을 포함하는 단량류, 이당류 및 다당류; 및 당단백질 예컨대 점액소, 셀렉틴 등이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 수용체 결합 도메인에 적절한 유기 소분자에는 비타민, 예컨대 비타민 A, B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, B₁₂, C, D, E, 및 K, 아미노산, 및 상피 세포의 최상단부 표면에 존재하는 수용체에 의해 인식되고/되거나 포착되는 기타 소분자가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 미국 특허 5,807,832는 이같은 유기 소분자 수용체 결합 도메인, 비타민 B₁₂의 예를 제공한다.

특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 상피 세포 상에서 발견되는 수용체에 결합할 수 있다. 추가적인 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 상피 세포의 최상단부 막 상에서 발견되는 수용체에 결합할 수 있다. 수용체 결합 도메인은 비제한적으로 당업자에 의해 상피 세포의 최상단부 막 상에 존재하는 것으로 공지된 임의의 수용체에 결합할 수 있다. 예를 들어, 수용체 결합 도메인은 α2-MR, EGFR, 또는 IGFR에 결합할 수 있다. α2-MR에 결합할 수 있는 수용체 결합 도메인의 한 예는 PE의 도메인 Ia이다. 따라서, 특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 PE의 도메인 Ia이다. 또다른 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 α2-MR에 결합할 수 있는 PE의 도메인 Ia의 일부분이다. EGFR에 결합할 수 있는 예시적인 수용체 결합 도메인에는 EGF 및 TGFα가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. IGFR에 결합할 수 있는 예시적인 수용체 결합 도메인에는 IGF-I, IGF-II, 또는 IGF-III가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 따라서, 특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 EGF, IGF-I, IGF-II, 또는 IGF-III이다. 또다른 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 EGF 또는 IGF 수용체에 결합할 수 있는 EGF, IGF-I, IGF-II, 또는 IGF-III의 일부분이다.

특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 분극화 상피 세포의 최상단부 막 상에서 고도로 발현되지만 예를 들어 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포 상에서는 발현되지 않거나 낮은 수준으로 발현되는 수용체에 결합한다. 이러한 종류의 발현 패턴을 갖는 예시적인 수용체 결합 도메인에는 TGFα, EGF, IGF-I, IGF-II, 및 IGF-III이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

특정 실시양태에서, 본 발명의 전달 구축물은 수용체 결합 도메인으로서 기능할 수 있는 도메인을 1개를 초과하여 포함한다. 예를 들어, 전달 구축물은 PE 도메인 Ia에 더하여 또다른 수용체 결합 도메인을 포함할 수 있다.

수용체 결합 도메인은 비제한적으로 이같은 분자를 부착시키는데 유용한 것으로 당업자에게 공지된 임의의 방법 또는 수단에 의해 전달 구축물의 나머지 부분에 부착될 수 있다. 특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 전달 구축물의 나머지 부분과 함께 융합 단백질로서 발현된다. 이같은 실시양태는 수용체 결합 도메인 및 구축물의 나머지 부분이 펩티드 또는 폴리펩티드로부터 형성되는 경우에 특히 유용하다.

또다른 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 전달 구축물의 나머지 부분에 링커로 연결된다. 또다른 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 전달 구축물의 나머지 부분에 링커 없이 연결된다. 이러한 실시양태들 모두 수용체 결합 도메인이 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 지질, 탄수화물, 핵산, 또는 유기 소분자를 포함하는 경우에 유용하다.

특정 실시양태에서, 링커는 수용체 결합 도메인과 전달 구축물의 나머지 부분 사이에 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 공유 결합은 펩티드 결합일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 링커는 충분한 친화력의 1개 이상의 비-공유 상호작용으로 수용체 결합 도메인을 전달 구축물의 나머지 부분에 연결시킬 수 있다. 당업자는 서로 충분한 친화력으로 상호작용하여 본 발명의 전달 구축물에서 유용한 링커들을 용이하게 인식할 것이다. 예를 들어, 비오틴이 수용체 결합 도메인에 부착될 수 있고, 스트렙타비딘이 분자의 나머지 부분에 부착될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 수용체 결합 도메인을 분자의 나머지 부분에 직접적으로 연결시킬 수 있다. 또다른 실시양태에서는, 링커 자체가 수용체 결합 도메인을 분자의 나머지 부분에 연결시키기 위해 회합되는 2개 이상의 분자를 포함한다. 예시적인 링커에는 직쇄 또는 분지쇄 탄소 링커, 헤테로고리형 탄소 링커, 치환된 탄소 링커, 불포화 탄소 링커, 방향족 탄소 링커, 펩티드 링커 등이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

수용체 결합 도메인을 전달 구축물의 나머지 부분에 연결시키기 위해 링커가 사용되는 실시양태에서, 링커는 비제한적으로 당업자에게 공지된 임의의 수단 또는 방법에 의해 수용체 결합 도메인 및/또는 전달 구축물의 나머지 부분에 부착될 수 있다. 예를 들어, 링커는 에테르, 에스테르, 티오에테르, 티오에스테르, 아마이드, 이미드, 디설피드, 펩티드, 또는 기타 적절한 모이어티로 수용체 결합 도메인 및/또는 전달 구축물의 나머지 부분에 부착될 수 있다. 당업자는 선택된 수용체 결합 도메인 및 링커의 물리적 및 화학적 성질을 기초로 적절한 링커 및 링커의 부착 방법을 선택할 수 있다. 링커는 수용체 결합 도메인 또는 분자의 나머지 부분 상의 임의의 적절한 관능기에 부착될 수 있다. 예를 들어, 링커는 링커 상의 적절한 관능기와와의 반응에 이용가능한 술폰히드릴 (-S), 카르복실산 (COOH) 또는 유리 아민 (-NH₂) 기에 부착될 수 있다. 이러한 기들은 링커의 부재 하에 분자의 나머지 부분에 직접적으로 수용체 결합 도메인을 연결시키는데 또한 사용될 수 있다.

또한, 수용체 결합 도메인 및/또는 전달 구축물의 나머지 부분이 링커가 이러한 모이어티에 부착되는 것을 용이하게 하기 위해 유도체화될 수 있다. 예를 들어, 이같은 유도체화는 적절한 유도체 예컨대 Pierce Chemical Company (Rockford, Illinois)로부터 입수가 가능한 것들을 부착시킴으로써 달성될 수 있다. 별법으로, 유도체화는 수용체 결합 도메인 및/또는 분자의 나머지 부분의 화학 처리를 수반할 수 있다. 예를 들어, 탄수화물 또는 당단백질 수용체 결합 도메인의 당 모이어티의 글리콜 절단에 의해 유리 알데히드기가 생성된다. 이러한 유리 알데히드기가 분자의 이러한 부분을 연결시키기 위해 분자의 나머지 부분 상의 유리 아민 또는 히드라진 기와 반응될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 4,671,958 참조. 또한, 당업자는 단백질 상에 유리 술폰히드릴 기를 생성시켜, 디설피드, 티오에테르, 티오에스테르 등의 결합을 만들기 위한 반응성 모이어티를 제공할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 4,659,839 참조.

링커를 수용체 결합 도메인 및/또는 전달 구축물의 나머지 부분에 부착시키기 위한 임의의 이러한 방법은 링커의 부재 하에 수용체 결합 도메인을 전달 구축물의 나머지 부분과 연결시키는데 또한 사용될 수 있다. 이같은 실시양태에서, 특정 수용체 결합 도메인에 적절한 방법을 사용하여 수용체 결합 도메인을 구축물의 나머지 부분과 커플링시킨다. 따라서, 비제한적으로 당업자에게 공지된, 단백질, 펩티드, 폴리펩티드, 핵산, 탄수화물, 지질, 또는 유기 소분자를 전달 구축물의 나머지 부분에 연결시키는데 적절한 임의의 방법을 사용하여 수용체 결합 도메인을 구축물의 나머지 부분에 연결시킬 수 있다. 상기 기술된 바와 같은 링커를 수용체 결합 도메인 또는 전달 구축물의 나머지 부분에 부착시키는 방법에 더하여, 수용체 결합 도메인을, 예를 들어, 미국 특허 6,673,905; 6,585,973; 6,596,475; 5,856,090; 5,663,312; 5,391,723; 6,171,614; 5,366,958; 및 5,614,503에 기술된 바와 같이 구축물의 나머지 부분에 연결시킬 수 있다.

특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 모노클로날 항체일 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, 키메라 면역원이 키메라 면역원이 결합하도록 의도되는 세포 상의 수용체에 특이적인 면역글로불린으로부터의 면역글로불린 중쇄를 포함하는 융합 단백질로서 발현된다. 그 후, 면역글로불린의 경쇄가 키메라 면역원과 동시-발현됨으로써, 경쇄-중쇄 이량체를 형성할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항체는 키메라 면역원의 나머지 부분과 별도로 발현 및 조립되어, 이에 화학적으로 연결될 수 있다.

5.2.2. 트랜스사이토시스 도메인

본 발명의 전달 구축물은 트랜스사이토시스 도메인을 또한 포함한다. 트랜스사이토시스 도메인은 상피 세포의 최상단부 막 상에 존재하는 세포 표면 수용체에 결합된 키메라 단백질의 트랜스사이토시스를 초래하는 것으로 당업계에 공지된 임의의 트랜스사이토시스 도메인일 수 있다. 특정 실시양태에서, 트랜스사이토시스 도메인은 PE, 디프테리아 독소, 백일해 독소, 콜레라 독소, 이열성 대장균 장독소, 시가 독소 또는 시가-유사 독소로부터의 트랜스사이토시스 도메인이다. 예를 들어, 미국 특허 5,965,406, 및 6,022,950 참조. 바람직한 실시양태에서, 트랜스사이토시스 도메인은 PE의 도메인 II이다.

트랜스사이토시스 도메인은 PE의 잔기 253-364에 걸쳐진 천연 PE의 도메인 II의 전체 아미노산 서열을, 포함할 수는 있지만, 포함할 필요는 없다. 예를 들어, 트랜스사이토시스 도메인은 PE의 도메인 II의 잔기 280-344에 걸쳐진 PE의 일부분을 포함할 수 있다. 위치 339 및 343의 아미노산이 트랜스사이토시스에 필요한 것으로 보인다. [Siegall et al., 1991, Biochemistry 30:7154-59] 참조. 또한, 트랜스사이토시스 활성이 실질적으로 제거되지 않는 한, 보존성 또는 비-보존성 치환이 트랜스사이토시스 도메인의 아미노산 서열에 이루어질 수 있다. 트랜스사이토시스 도메인이 트랜스사이토시스 활성을 갖는지 여부를 결정하기 위해 당업자가 관례적으로 사용할 수 있는 대표적인 분석법이 하기에 기술된다.

임의의 특정한 작용 이론 또는 메카니즘에 제한되지 않고, 트랜스사이토시스 도메인은 구축물이 분극화 상피 세포의 최상단부 표면 상에 존재하는 수용체에 결합한 후 분극화 상피 세포를 통한 전달 구축물의 통행을 허용하는 것으로 여겨진다. 분극화 상피 세포를 통한 이같은 통행이 본원에서 "트랜스사이토시스"로 지칭된다. 이러한 통행으로 전달 구축물이 분극화 상피 세포의 기저-측면 막으로부터 방출된다.

5.2.3. 전달용 거대분자

본 발명의 전달 구축물은 거대분자를 또한 포함한다. 거대분자는 비제한적으로 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 전달 구축물의 나머지 부분에 부착될 수 있다. 특정 실시양태에서, 거대분자는 전달 구축물의 나머지 부분과 함께 융합 단백질로서 발현된다. 이같은 실시양태에서, 수용체 결합 도메인, 트랜스사이토시스 도메인, 및 거대분자가 이들의 활성을 유지하는 한, 거대분자는 전달 구축물의 임의의 부분 내로 삽입되거나 또는 이에 부착될 수 있다. 거대분자는 하기 기술되는 바와 같이, 절단가능 링커, 또는 절단가능 링커들의 조합물로 구축물의 나머지 부분과 연결된다.

천연 PE에서, Ib 루프 (도메인 Ib)는 아미노산 365 내지 399에 걸쳐지고, 위치 372 및 379의 2개의 시스테인 간의 디설피드 결합을 구조적으로 특징으로 한다. PE의 이러한 부분은 세포 결합, 트랜스사이토시스, ER 잔류 또는 ADP 리보실화 활성이 포함되는 PE의 임의의 공지된 활성에 필수적이지 않다. 따라서, 거대분자를 함유하도록 도메인 Ib가 전체적으로 결실되거나, 또는 변형될 수 있다.

따라서, 특정 실시양태에서, 거대분자가 도메인 Ib 내로 삽입될 수 있다. 바람직한 경우, 위치 372 및 379에서의 시스테인이 가교되지 않은 도메인 Ib 내로 거대분자가 삽입될 수 있다. 이는 시스테인 간의 디설피드 결합을 환원시킴으로써, 시스테인을 Ib 도메인으로부터 완전히 제거함으로써, 시스테인을 예를 들어 세린과 같은 다른 잔기로 돌연변이시킴으로써, 또는 기타 유사한 기술에 의해 달성될 수 있다. 별법으로, 거대분자는 위치 372 및 379에서의 시스테인 간의 Ib 루프 내로 삽입될 수 있다. 이같은 실시양태에서, 바람직한 경우, 시스테인 간의 디설피드 결합을 사용하여 거대분자를 구속할 수 있다. 모든 경우에, 거대분자가 PE의 도메인 Ib 내로, 또는 전달 구축물의 임의의 다른 부분 내로 삽입되는 실시양태에서, 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 구축물의 나머지 부분으로부터 유리되도록 거대분자에 절단가능 링커가 플랭킹(flanking)되어야 한다.

또다른 실시양태에서, 거대분자는 전달 구축물의 폴리펩티드 부분의 N-말단 또는 C-말단 끝과 연결될 수 있다. 이같은 실시양태에서, 연결 방법은 전달 구축물의 다른 기능, 예컨대 수용체 결합 또는 트랜스사이토시스를 간섭하지 않도록 디자인되어야 한다. 또다른 실시양태에서, 거대분자는 전달 구축물의 아미노산의 측쇄와 연결될 수 있다. 거대분자는 하기 기술되는 바와 같이 전달 구축물의 나머지 부분과 절단가능 링커로 연결된다. 이같은 실시양태에서, 절단가능 링커(들)에서의 절단에 의해 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리되도록, 전달될 거대분자는 1개 이상의 절단가능 링커로 전달 구축물의 나머지 부분에 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, 당해 거대분자가 절단가능 링커의 절단 후에 거대분자에 여전히 부착되어 있는 짧은 (아미노산 1-20개, 바람직하게는 아미노산 1-10개, 더욱 바람직하게는 아미노산 1-5개) 리더(leader) 펩티드를 당해 거대분자에 더하여 또한 포함할 수 있다는 것을 주지하여야 한다. 바람직하게는, 이러한 리더 펩티드는 거대분자의 활성 또는 면역원성에 영향을 미치지 않는다.

거대분자가 전달 구축물의 또다른 부분과 함께 융합 단백질로서 발현되는 실시양태에서, 거대분자는 비제한적으로 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 전달 구축물 내로 삽입될 수 있다. 예를 들어, 천연 아미노산 서열이 결실되면서 또는 결실되지 않으면서, 거대분자에 상응하는 아미노산이 전달 구축물 내로 직접적으로 삽입될 수 있다. 특정 실시양태에서, PE

의 Ib 도메인의 모두 또는 일부분이 결실되어, 거대분자로 대체될 수 있다. 특정 실시양태에서는, 거대분자가 구속되지 않고 유지되도록 Ib 루프의 시스테인 잔기가 결실된다. 또다른 실시양태에서는, Ib 루프의 시스테인 잔기가 디설피드 결합에 연결되어, 거대분자가 구속된다.

거대분자는 대상체 내로 도입하려고 하는 임의의 거대분자일 수 있다. 따라서, 거대분자는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질, 당단백질, 합성 유기 및 무기 화합물, 또는 이의 임의의 배합물일 수 있다. 또한 거대분자는 공기 및 바륨 및 자기 화합물이 포함되는 방사선 비투과성 화합물과 같은 검출가능한 화합물일 수 있다. 특정 실시양태에서, 거대분자는 수용성 또는 수불용성일 수 있다. 특정 실시양태에서, 거대분자는 대상체의 혈류에 도입되었을 때 바람직한 생물학적 활성을 수행할 수 있는 거대분자일 수 있다. 예를 들어, 거대분자는 수용체 결합 활성, 효소 활성, 전령 활성 (즉, 호르몬, 사이토카인, 신경전달물질, 또는 기타 신호전달 분자로 작용), 발광성 또는 기타 검출가능한 활성, 또는 조절 활성, 또는 이의 임의의 조합된 활성을 갖는다. 예를 들어, 진단 실시양태에서, 거대분자는 인듐 및 테크네튬, 자기 입자, 방사선 비투과성 재료 예컨대 공기 또는 바륨 및 형광성 화합물이 포함되는 제약상 허용가능한 감마-방출 모이어티에 접합될 수 있거나, 자체적으로 이러한 모이어티일 수 있다.

또다른 실시양태에서, 전달되는 거대분자는 대상체의 혈액 이외의 대상체의 생물학적 구획에서 이의 효과를 발휘할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 거대분자는 림프계에서 이의 효과를 발휘할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 거대분자는, 예를 들어, 대상체의 간, 심장, 폐, 췌장, 신장, 뇌, 골수 등과 같은 장기 또는 조직에서 이의 효과를 발휘할 수 있다. 이 같은 실시양태에서, 거대분자는 혈액, 림프, 또는 기타 생물학적 체액에 검출가능한 농도로 존재하거나 존재하지 않을 수 있지만, 이의 작용 부위에서 충분한 농도로 축적되어 생물학적 효과를 발휘할 수 있다.

또한, 거대분자는 1개를 초과하는 폴리펩티드 서브유닛을 포함하는 단백질일 수 있다. 예를 들어, 단백질은 2량체, 3량체, 또는 더 고급의 다량체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 단백질의 2개 이상의 서브유닛은 공유 결합, 예를 들어, 디설피드 결합에 의해 연결될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 단백질의 서브유닛들은 비-공유 상호작용에 의해 서로 유지될 수 있다. 당업자는 관례적으로 이같은 단백질을 확인할 수 있고, 서브유닛들이 정확하게 회합되었는지 여부를, 예를 들어, 면역분석법을 사용하여 확인할 수 있다. 본 발명의 전달 구축물로 전달될 수 있는 1개를 초과하는 폴리펩티드 사슬을 포함하는 예시적인 단백질로는 항체, 인슐린, IGF I 등이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

따라서, 특정 실시양태에서, 거대분자는 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질이다. 특정 실시양태에서, 거대분자는 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 약 15개, 약 17개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 40개, 약 50개, 또는 약 60개, 약 70개, 약 80개, 약 90개, 약 100개, 약 200개, 약 400개, 약 600개, 약 800개, 또는 약 1000개의 아미노산을 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 거대분자는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 또는 그 이상의 폴리펩티드를 포함하는 단백질이다. 특정 실시양태에서, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질은 주사에 의해 대상체에게 통상적으로 투여되는 분자이다. 예시적인 펩티드 또는 폴리펩티드에는 IGF-I, IGF-II, IGF-III, EGF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, EPO, 성장 호르몬, 응고 인자 예컨대 인자 VII, 바소프레신, 칼시토닌 부갑상선 호르몬, 황체형성 호르몬-방출 인자, 조직 플라스미노겐 활성화자, 부신피질자극호르몬, 엔케팔린, 글루카곤-유사 펩티드 1, 아스파라기나제 등이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, 거대분자는 인슐린이다. 특정한 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 성장 호르몬이다. 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 인간 성장 호르몬이다. 동등하게 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 IFN- α , 더욱 바람직하게는 IFN α -2b이다. 동등하게 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 인슐린 또는 프로인슐린이다. 또다른 실시양태에서, 폴리펩티드는 녹색 형광 단백질이다. 모든 이러한 거대분자의 서열은 당업자에게 주지되어 있고, 하기 논의된 바와 같이, 표준 기술을 사용하여 이러한 거대분자를 전달 구축물에 부착하는 것은 당업자의 기술 내에 포함된다.

특정 실시양태에서, 거대분자는 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 효소에 의해 절단가능하지 않도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 실시예에 기술된 분석법을 사용하여, 전달될 거대분자를 이같은 절단 효소가 절단할 수 있는지 여부를 관례적으로 테스트할 수 있다. 이러한 경우, 절단 효소에 의해 인식되는 위반(offending) 아미노산 서열을 제거하도록 거대분자를 관례적으로 변경시킬 수 있다. 그 후, 변경된 거대분자를 당업계에 관례적인 방법을 사용하여 테스트하여 거대분자가 활성을 유지한다는 것을 확실히 할 수 있다.

본 발명에 따라 전달될 수 있는 거대분자의 또다른 예로는 항신생물 화합물, 예컨대 니트로소우레아, 예를 들어, 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 세무스틴(semustine), 스트렙조토신(strepzotocin); 메틸히드라진, 예를 들어, 프로카르바진(procarbazine), 다카르바진(dacarbazine); 스테로이드 호르몬, 예를 들어, 글루코코르티코이드, 에스트로겐, 프로게스틴, 안드로젠, 테트라히드로테스옥시카리코스테론; 면역활성 화합물 예컨대 면역억제제, 예를 들어, 피리메타민(pyrimethamine), 트리메토프테린(trimethoprim), 페니실라민(penicillamine), 시클로스포린(cyclosporine), 아자티오프린(azathioprine); 및 면역자극제, 예를 들어, 레바미솔(levamisole), 디에틸 디티오카르바메이트, 엔케팔린, 엔도르핀;

항균 화합물 예컨대 항생제, 예를 들어, β -락탐, 페니실린, 세팔로스포린(cephalosporin), 카르바페넴(carbapenim) 및 모노락탐(monobactam), β -락타마제 억제제, 아미노글리코시드, 마크로라이드, 테트라사이클린, 스펙티노마이신; 항말라리아제, 항아메바제; 항원충제; 항진균제, 예를 들어, 암포테리신 β , 항바이러스제, 예를 들어, 아실클로비르(acyclovir), 이독수리딘(idoxuridine), 리바비린(ribavirin), 트리플루리딘(trifluridine), 비다르빈(vidarbine), 간시클로비르(gancyclovir); 구충제; 구충약; 방사성의약품; 위장약; 혈액작용 화합물; 면역글로불린; 혈액 응고 단백질, 예를 들어, 할혈우병 인자, 인자 IX 복합체; 항응고제, 예를 들어, 디쿠마롤(dicumarol), 헤파린 Na; 섬유용해소 억제제, 예를 들어, 트라넥사민산; 심혈관약; 말초 항협심증약; 중추 작용성 항고혈압성 약물, 예를 들어, 메틸도파, 메틸도파 HCl; 항고혈압성 직접 혈관확장제, 예를 들어, 디아족시드, 히드랄라진 HCl; 레닌-안지오텐신 시스템에 영향을 미치는 약물; 말초 혈관확장제, 예를 들어, 펜톨라민(phentolamine); 항협심증 약물; 강심 배당체; 심장수축혈관확장제, 예를 들어, 암리논(amrinone), 밀리논(milrinone), 에녹시몬(enoximone), 페녹시몬(fenoximone), 이마조단(imazodan), 술마졸(sulmazole); 항부정맥제; 갈슘 통로 차단제; 혈액 지질에 영향을 미치는 약물, 예를 들어, 라니티딘(ranitidine), 보센탄(bosentan), 레줄린(rezulin); 호흡 약물; 교감신경유사작용 약물, 예를 들어, 알부테롤(albuterol), 비톨테롤 메실레이트(bitolterol mesylate), 도부타민(dobutamine) HCl, 도파민(dopamine) HCl, 에페드린(ephedrine) So, 에피네프린(epinephrine), 펜플루라민(fenfluramine) HCl, 이소프로테레놀(isoproterenol) HCl, 메톡사민(methoxamine) HCl, 노르에피네프린 비타르트레이트(norepinephrine bitartrate), 페닐에프린(phenylephrine) HCl, 리토드린(ritodrine) HCl; 콜린유사성 약물, 예를 들어, 아세틸콜린 Cl; 항콜린에스테라제, 예를 들어, 에드로포늄 Cl; 콜린에스테라제 재활성화제; 아드레날린 차단 약물, 예를 들어, 아세부톨롤(acebutolol) HCl, 아테놀롤(atenolol), 에스몰롤(esmolol) HCl, 라베탈롤(labetalol) HCl, 메토프롤롤(metoprolol), 나돌롤(nadolol), 펜톨아민 메실레이트, 프로판올롤(propranolol) HCl; 항무스카린성 약물, 예를 들어, 안이소트로핀(anisotropine) 메틸브로마이드, 아트로핀(atropine) SO₄, 클리니디움(clinidium) Br, 글리코피롤레이트, 이프라트로피움(ipratropium) Br, 스코폴라민(scopolamine) HBr; 신경근육 차단 약물; 탈분극 약물, 예를 들어, 아트라쿠리움 베실레이트(atracurium besylate), 헥사플루오레니움(hexafluorenum) Br, 메토쿠린(metocurine) 요오다이드, 숙시닐콜린 Cl, 투보쿠라린(tubocurarine) Cl, 베쿠로니움(vecuronium) Br; 중추 작용성 근육 이완제, 예를 들어, 바클로펜(baclofen); 신경전달물질 및 신경전달물질 작용제, 예를 들어, 아세틸콜린, 아데노신, 아데노신 트리포스페이트; 아미노산 신경전달물질, 예를 들어, 흥분성 아미노산, GABA, 글리신; 생체 아민 신경전달물질, 예를 들어, 도파민, 에피네프린, 히스타민, 노르에피네프린, 옥토파민, 세로노닌, 타이라민; 신경펩티드, 산화질소, K⁺ 채널 독소; 항과키슨 약물, 예를 들어, 아말티딘(amaltidine) HCl, 벤즈트로핀 메실레이트, 카르비도파(carbidopa); 이노 약물, 예를 들어, 디클로르페나미드, 메타졸라미드, 벤드로플루메타지드, 폴리타지드; 항편두통 약물, 예를 들어, 카르보프로스트 트로메타민 메실레이트(carboprost tromethamine mesylate), 메티세르자이드 말레에이트(methysergide maleate)가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

본 발명에 따라 전달될 수 있는 거대분자의 또다른 예로는 호르몬 예컨대 뇌하수체 호르몬, 예를 들어, 용모성 생식샘자극 호르몬, 코신티로핀, 메노트로핀, 성장호르몬, 코르티코트로핀, 프로티렐린, 갑상선자극호르몬, 바소프레신, 리프레신; 부신 호르몬, 예를 들어, 베클로메타손 디프로피오네이트, 베타메타손, 텍사메타손, 트리암시놀론; 췌장 호르몬, 예를 들어, 글루카곤, 인슐린; 부갑상선 호르몬, 예를 들어, 디히드로키스테롤; 갑상선 호르몬, 예를 들어, 칼시토닌 에티드로네이트 디소듐, 레보티록신 Na, 리오티로닌 Na, 리오티릭스, 티로글로불린, 테리파라티드 아세테이트; 항갑상선 약물; 에스트로겐성 호르몬; 프로세스틴 및 길항제; 호르몬성 피임제; 고환 호르몬; 위장 호르몬, 예를 들어, 콜레시스토키닌, 엔테로글리칸, 갈라닌, 위 억제성 폴리펩티드, 표피 성장 인자-유로개스트론, 위 억제성 폴리펩티드, 개스트린-방출 펩티드, 개스트린, 펜타개스트린, 테트라개스트린, 모틸린, 펩티드 YY, 시크레틴, 혈관작용성 장(腸) 펩티드, 신칼리드가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

본 발명에 따라 전달될 수 있는 거대분자의 또다른 예로는 효소 예컨대 히알루로니다제, 스트렙토키나제, 조직 플라스미노겐 활성화자, 유로키나제, PGE-아데노신 탈아민효소; 정맥 마취제 예컨대 드로페리돌, 에토미데이트, 페타닐 시트레이트/드로페리돌, 헥소바르비탈, 케타민 HCl, 메토헥시탈 Na, 티아밀랄 Na, 티오펜탈 Na; 항간질제, 예를 들어, 카르바마제핀, 클로나제팜, 디발프로엑스 Na, 에토숙시마이드, 메페닐토인, 파라메타돈, 페니토인, 프리미돈이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

본 발명에 따라 전달될 수 있는 거대분자의 또다른 예로는 펩티드 및 단백질 예컨대 안키린(ankyrin), 어레스틴(arrestin), 박테리아 막 단백질, 클라트린(clathrin), 코넥신(connexin), 디스트로핀(dystrophin), 엔도텔린(endothelin) 수용체, 스펙트린(spectrin), 셀렉틴(selectin), 사이토카인; 케모카인; 성장 인자, 인슐린, 에리트로포이에틴 (EPO), 종양 괴사 인자 (TNF), 신경펩티드, 신경펩티드 Y, 뉴로텐신(neurotensin), 전환 성장 인자 α , 전환 성장 인자 β , 인터페론 (IFN); 호르몬, 성장 억제제, 예를 들어, 제니스테인(genistein), 스테로이드 등; 당단백질, 예를 들어, ABC 전달체, 혈소판 당단백질,

GPIIb-IX 복합체, GPIIb-IIIa 복합체, 비트로넥틴(vitronectin), 트롬보모듈린(thrombomodulin), CD4, CD55, CD58, CD59, CD44, 림프구 기능-관련 항원, 세포간 부착 분자, 혈관세포 부착 분자, Thy-1, 안티포터(antiporter), CA-15-3 항원, 피브로넥틴, 라미닌(laminin), 미엘린-관련 당단백질, GAP, GAP-43이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

본 발명에 따라 전달될 수 있는 거대분자의 또다른 예로는 사이토카인 및 사이토카인 수용체 예컨대 인터류킨-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-1 수용체, IL-2 수용체, IL-3 수용체, IL-4 수용체, IL-5 수용체, IL-6 수용체, IL-7 수용체, IL-8 수용체, IL-9 수용체, IL-10 수용체, IL-11 수용체, IL-12 수용체, IL-13 수용체, IL-14 수용체, IL-15 수용체, IL-16 수용체, IL-17 수용체, IL-18 수용체, 림포카인 억제 인자, 대식세포 콜로니 자극 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 줄기 세포 인자, 종양 성장 인자 β , 종양 괴사 인자, 림프독소, Fas, 과립구 콜로니 자극 인자, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자, 인터페론 α , 인터페론 β , 및 인터페론 γ 가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

본 발명에 따라 전달될 수 있는 거대분자의 또다른 예로는 성장 인자 및 단백질 호르몬 예컨대 에리트로포이에틴, 안지오팀닌, 간세포 성장 인자, 섬유모세포 성장 인자, 각질형성세포 성장 인자, 신경 성장 인자, 종양 성장 인자 α , 트롬보포이에틴, 갑상선 자극 인자, 갑상선 방출 호르몬, 뉴로트로핀, 표피 성장 인자, VEGF, 섬모성 신경영양 인자, LDL, 소마토메딘, 인슐린 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I 및 II; 케모카인 예컨대 ENA-78, ELC, GRO- α , GRO- β , GRO- γ , HRG, LIF, IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1 α , MIP-1 β , MIG, MDC, NT-3, NT-4, SCF, LIF, 렘틴, RANTES, 렘포타틴, 예오타신-1, 예오타신-2, TARC, TECK, WAP-1, WAP-2, GCP-1, GCP-2; α -케모카인 수용체, 예를 들어, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7; 및 β -케모카인 수용체, 예를 들어, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

본 발명에 따라 전달될 수 있는 거대분자의 또다른 예로는 화학요법제, 예컨대 백혈병, 림프종, 암종, 육종, 골수종 등이 포함되는 다양한 유형의 인간 암에 대해 효과적인 화학요법 또는 항-종양 작용제, 예를 들어, 독소루비신, 미토마이신, 시스플라틴, 다우노루비신, 블레오마이신, 악티노마이신 D, 및 네오키르지노스타틴이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

본 발명에 따라 전달될 수 있는 거대분자의 또다른 예로는 항체 예컨대 분화 항원 CD-1 내지 CD-166의 항-클러스터 (anti-cluster) 및 이러한 분자에 대한 리간드 또는 카운터(counter) 수용체; 항-사이토카인 항체, 예를 들어, 항-IL-1 내지 항-IL-18 및 이러한 분자에 대한 수용체; 항-면역 수용체 항체; T 세포 수용체, 주요 조직적합성 복합체 I 및 II, B 세포 수용체, 셀렉틴 킬러(killer) 억제 수용체, 킬러 활성화 수용체, OX-40, MadCAM-1, Gly-CAM1, 인테그린, 카드헤린, 시알로이드헤린, Fas, CTLA-4, Fc γ -수용체, Fc α -수용체, Fc ϵ -수용체, Fc μ -수용체에 대한 항체, 및 이들의 리간드; 항-메탈로프로테이나제 항체, 예를 들어, 콜라게나제, MMP-1 내지 MMP-8, TIMP-1, TIMP-2에 대해 특이적인 항체; 항-세포 용해/전염증(proinflammatory) 분자, 예를 들어, 퍼포린(perforin), 보체 성분, 프로스타노이드, 산화질소, 트롬복산; 및 항-부착 분자, 예를 들어, 암배아 항원, 라민(lamin), 피브로넥틴이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

본 발명에 따라 전달될 수 있는 거대분자의 또다른 예로는 항바이러스제 예컨대 역전사효소 억제제 및 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어, ddI, ddC, 3TC, ddA, AZT; 단백질분해효소 억제제, 예를 들어, 인비라제(Invirase), ABT-538; 및 RNA 프로세싱 억제제, 예를 들어, 리바비린(ribavirin)이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

또한, 본 발명의 전달 구축물로 전달될 수 있는 거대분자의 구체적인 예로는 카포텐(Capoten), 모노프릴(Monopril), 프라바콜(Pravachol), 아바프로(Avapro), 플라빅스(Plavix), 세프질(Cefzil), 두리세프(Duricef)/울트라세프(Ultracef), 아작탐(Azactam), 비텍스(Videx), 제리트(Zerit), 맥시핼(Maxipime), 베페시드(VePesid), 파라플리틴(Paraplatin), 플라티놀(Platinol), 탁솔(Taxol), UFT, 부스파르(Buspar), 세르존(Serzone), 스타돌(Stadol) NS, 에스트레이스(Estrace), 글루코파지(Glucophage) (Bristol-Myers Squibb); 세클로르(Ceclor), 로라비드(Lorabid), 다이낙(Dynabac), 프로작(Prozac), 다르본(Darvon), 페르맥스(Permax), 자이프렉사(Zyprexa), 후마로그(Humalog), 악시드(Axid), 겐자르(Gemzar), 에비스타(Evista) (Eli Lilly); 바소텍(Vasotec)/바세레틱(Vaseretic), 메바코르(Mevacor), 조코르(Zocor), 프리니빌(Prinivil)/프리니지드(Prinizide), 플렌딜(Plendil), 코자아르(Cozaar)/하이자아르(Hyzaar), 펩시드(Pepcid), 프릴로섹(Prilosec), 프리맥신(Primaxin), 노록신(Noroxin), 리콤비박스(Recombivax) HB, 바리박스(Varivax), 티몹틱(Timoptic)/XE, 트루슈트(Trusopt), 프로스카(Proscar), 포스맥스(Fosamax), 시네메트(Sinemet), 크릭시반(Crixivan), 프로페시아(Propecia), 비옥스(Vioxx), 신굴레어(Singulair), 맥살트(Maxalt), 이베르멕틴(Ivermectin) (Merck & Co.); 디플루칸(Diflucan), 우나신(Unasyn), 술페라존(Sulperazon), 지트로맥스(Zithromax), 트로반(Trovan), 프로카르디아(Procardia) XL, 카르두라(Cardura), 노르바스크(Norvasc), 도페틸리드(Dofetilide), 펠덴(Feldene), 졸로프트(Zolof), 젤독스(Zeldox), 글루코트롤(Glucotrol) XL, 자이르텍(Zyrtec), 엘레트리판(Eletriptan), 비아그라(Viagra), 드롤록시펜(Droloxifene), 아리셉트(Aricept), 리피토르(Lipitor) (Pfizer); 반틴(Vantin), 레스크립터(Rescriptor), 비스티드(Vistide), 게노트로핀(Genotropin), 마이크로네이스(Micronase)/Glyn./Glyb., 프라그민(Fragmin), 토탈 메드롤(Total

Medrol), 자넥스(Xanax)/알프라졸람(alprazolam), 서미온(Sermion), 할시온(Halcion)/트리아졸람(triazolam), 프리독스(Freedox), 도스티넥스(Dostinex), 에드로낙스(Edronax), 미라펙스(Mirapex), 파르모루비신(Pharmorubicin), 아드리아마이신(Adriamycin), 캄프토사르(Camptosar), 레미사르(Remisar), 데포-프로베라(Depo-Provera), 카베르젝터(Caverject), 데트루시톨(Detrusitol), 에스트링(Estring), 헤알론(Healon), 잘라탄(Xalatan), 로게인(Rogaine)(Pharmacia & Upjohn); 로피드(Lopid), 아크루펠(Accrupil), 딜란틴(Dilantin), 코르넥스(Cognex), 뉴론틴(Neurontin), 로에스트린(Loestrin), 딜젠펜(Dilzem), 펌패치(Fempatch), 에스트로스텝(Estrostep), 레줄린(Rezulin), 리피토르(Lipitor), 옴니세프(Omnicef), FemHRT, 수라민(Suramin), 및 클리나플록사신(Clinafloxacin) (Warner Lambert)이 포함된다.

본 발명의 전달 구축물로 전달될 수 있는 거대분자의 추가적인 예는 거명에 의해 전체적으로 본원에 포함된 [Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. McGraw-Hill 1996]에서 확인할 수 있다.

특정 실시양태에서, 거대분자는 투여될 때는 불활성이거나 덜 활성인 형태이고, 그 후 대상체에서 활성화될 수 있다. 예를 들어, 거대분자는 차폐된 활성 부위를 갖는 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다. 차폐 모이어티를 제거함으로써 펩티드 또는 폴리펩티드가 활성화될 수 있다. 이같은 제거는 펩티드 또는 폴리펩티드 차폐제의 경우 펩티드분해효소 또는 단백질분해효소에 의해 달성될 수 있다. 별법으로, 차폐제는 대상체에게 존재하는 효소에 의해 제거되는 화학 모이어티일 수 있다. 거대분자가 한정된 환경에서 활성인 것이 바람직한 경우에 이러한 전략을 사용할 수 있다. 예를 들어, 거대분자가 대상체의 간에서만 활성인 것이 유용할 수 있다. 이같은 경우에, 간에는 존재하지만 다른 장기 또는 조직에는 존재하지 않는 효소에 의해 제거될 수 있는 차폐 모이어티를 갖도록 거대분자를 선택할 수 있다. 이같은 차폐된 거대분자를 제조 및 사용하기 위한 예시적인 방법 및 조성물은 미국 특허 6,080,575, 6,265,540, 및 6,670,147에서 확인할 수 있다.

이같은 실시양태의 또다른 예에서, 거대분자는 대상체 내에 존재하는 생물학적 활성, 예를 들어 프로세싱에 의해 활성화되는 전구-거대분자일 수 있다. 예를 들어, 예시적인 거대분자인 프로인슐린이 본 발명의 전달 구축물로 전달될 수 있다. 전구-거대분자의 전달 후, 이는 적절한 프로세싱 효소에 의해 대상체 내에서 활성화될 수 있다. 췌장 베타-세포의 분비 과립 내에 가장 높은 농도로 존재하는 효소 (엔도프로테아제(endoprotease) PC2 및 PC3)에 의해 프로인슐린이 프로세싱되는 것으로 여겨지지만, 이같은 효소가 전구-거대분자가 이의 완전하게 활성인 형태로 활성화되도록 하기에 충분한 농도로 다른 구획 내에 존재하는 것으로 또한 여겨진다. 또한, 프로인슐린이 예를 들어 포함되는 많은 전구-거대분자가 완전하게 활성인 분자의 활성과 유사한 활성을 또한 나타낸다는 것을 주지하여야 한다. 예를 들어, [Desbuquois et al., 2003, Endocrinology 12:5308-5321] 참조. 따라서, 모든 전구-거대분자가 완전하게 활성인 형태로 전환되지 않는 경우에도, 전구-분자가 많은 경우에 대상체 내에서 바람직한 생물학적 활성을 여전히 발휘할 수 있다.

5.2.4. 절단가능 링커

본 발명의 전달 구축물에서, 대상체에게 전달될 거대분자는 1개 이상의 절단가능 링커로 전달 구축물의 나머지 부분과 연결된다. 구축물 내에 존재하는 절단가능 링커의 갯수는, 적어도 부분적으로, 전달 구축물의 나머지 부분과 관련된 거대분자의 위치, 및 거대분자의 성질에 따라 좌우된다. 거대분자가 전달 구축물 내로 삽입되는 경우, 양쪽 링커의 절단에 의해 거대분자가 분리되도록 거대분자에 절단가능 링커들이 플랭킹될 수 있다. 플랭킹된 절단가능 링커들은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 단일 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리될 수 있을 때, 전달 구축물은 단일 절단가능 링커를 포함할 수 있다. 또한, 거대분자가, 예를 들어, 이량체 또는 기타 다량체인 경우, 거대분자의 각각의 서브유닛이 절단가능 링커에서의 절단에 의해 전달 구축물의 나머지 부분 및/또는 거대분자의 다른 서브유닛으로부터 분리될 수 있다.

절단가능 링커는 상피 세포의 기저-측면 막에 또는 이러한 막 근처에 존재하는 절단 효소에 의해 일반적으로 절단가능하다. 이같은 효소에 의해 절단될 절단가능 링커를 선택함으로써, 점막을 가로지르는 트랜스사이토시스 및 상피 세포에서 막의 기저-측면쪽 면 상의 세포 매트릭스 내로의 방출 후 거대분자가 구축물의 나머지 부분으로부터 유리될 수 있다. 또한, 전달 구축물 및 거대분자가 세포의 기저-측면 막으로부터 방출되도록 하는 분극화 상피 세포 내의 통행 경로에 전달 구축물이 들어가기 전에 절단 효소가 전달 구축물을 절단하지 않는 한, 절단가능 링커가 기저-측면 막으로부터의 전달 구축물의 방출 전에 절단되도록, 상피 세포 내부에 존재하는 절단 효소가 사용될 수 있다.

특정 실시양태에서, 절단 효소는 펩티드분해효소이다. 또다른 실시양태에서, 절단 효소는 RNA분해효소이다. 또다른 실시양태에서, 절단 효소는 탄수화물을 절단할 수 있다. 바람직한 펩티드분해효소에는 카텝신 GI, 키모트립신 I, 엘라스타제 I, 서브틸리신 AI, 서브틸리신 AII, 트롬빈 I, 및 유로키나제 I이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 표 1에 이러한 효소들이 특정 펩티드분해효소에 의해 인식 및 절단되는 아미노산 서열과 함께 제시된다.

[표 1]

기저-측면 정막 근처에 존재하는 펩티드분해효소	
펩티드분해효소	인식 및 절단되는 아미노산 서열
카텝신 GI	Ala-Ala-Pro-Phe (서열 4)
키모트립신 I	Gly-Gly-Phe (서열 5)
엘라스타제 I	Ala-Ala-Pro-Val (서열 6)
서브틸리신 AI	Gly-Gly-Leu (서열 7)
서브틸리신 AII	Ala-Ala-Leu (서열 8)
트롬빈 I	Phe-Val-Arg (서열 9)
유로키나제 I	Val-Gly-Arg (서열 10)

특정 실시양태에서, 전달 구조물은 1개 이상의 절단가능 링커를 포함할 수 있고, 이때 어느 한쪽의 절단가능 링커에서의 절단에 의해 전달될 거대분자가 전달 구조물로부터 분리될 수 있다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는, 전달용 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질 거대분자의 경우에, 전달될 거대분자 내에 존재하는 서열을 포함하는 절단가능 링커가 사용되는 것을 피하기 위해, 서열을 기초로 선택될 수 있다. 예를 들어, 거대분자가 AAL을 포함하는 경우, 절단가능 링커는 이러한 서열을 인식하지 않는 효소에 의해 절단되도록 선택될 수 있다.

또한, 바람직하게는 절단가능 링커는 전달 구조물의 나머지 부분보다 절단에 대해 더 큰 경향을 나타낸다. 당업자가 인식하는 바와 같이, 많은 펩티드 및 폴리펩티드 서열이 펩티드분해효소 및 단백질분해효소에 의해 절단될 수 있다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 전달 구조물의 투여 동안 전달 구조물 내에 존재하는 다른 아미노산 서열에 비해 우선적으로 절단되도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 대상체의 혈류에 전달 구조물이 전달된 후 실질적으로 (예를 들어, 약 99%, 약 95%, 약 90%, 약 85%, 약 80%, 또는 약 75%) 손상되지 않는다. 특정 실시양태에서, 전위 도메인은 대상체의 혈류에 전달 구조물이 전달된 후 실질적으로 (예를 들어, 약 99%, 약 95%, 약 90%, 약 85%, 약 80%, 또는 약 75%) 손상되지 않는다. 특정 실시양태에서, 거대분자는 대상체의 혈류에 전달 구조물이 전달된 후 실질적으로 (예를 들어, 약 99%, 약 95%, 약 90%, 약 85%, 약 80%, 또는 약 75%) 손상되지 않는다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 대상체의 혈류에 전달 구조물이 전달된 후 실질적으로 (예를 들어, 약 99%, 약 95%, 약 90%, 약 85%, 약 80%, 또는 약 75%) 절단된다.

또다른 실시양태에서, 절단가능 링커는 대상체의 혈장에서 발견되는 절단 효소에 의해 절단된다. 대상체의 혈장 내에 존재하는 것으로 당업자에게 공지된 임의의 절단 효소를 사용하여 절단가능 링커를 절단할 수 있다. 절단가능 링커를 절단하기 위해 이같은 효소를 사용하는 것은 분극화 상피 세포의 기저-측면 막 근처에서 발견되는 절단 효소를 사용하는 것보다 덜 바람직한데, 기저-측면 막 근처에서 더욱 효율적인 절단이 발생할 것으로 여겨지기 때문이다. 그러나, 혈장 효소에 의해 매개되는 절단이 전달 구조물의 충분한 분획이 절단되도록 하여 역효과를 피하기에 충분히 효율적인 것으로 당업자가 결정하면, 이같은 혈장 절단 효소를 사용하여 전달 구조물을 절단할 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 카스파제(caspase)-1, 카스파제-3, 전구단백질 전환효소 1, 전구단백질 전환효소 2, 전구단백질 전환효소 4, 전구단백질 전환효소 4 PACE 4, 프로릴 올리고펩티드분해효소, 엔도텔린 절단 효소, 디펩티딜-펩티드분해효소 IV, 신호 펩티드분해효소, 네프릴리신(neprilysin), 레닌(renin), 및 에스테라제로 구성되는 군으로부터 선택된 효소로 절단될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 6,673,574 참조. 표 2에 이러한 효소들이 특정 펩티드분해효소에 의해 인식되는 아미노산 서열(들)과 함께 제시된다. 펩티드분해효소는 이러한 서열을 포함하는 펩티드를 별표로 표시된 아미노산의 N-말단 측면에서 절단한다.

[표 2]

혈장 펩티드분해효소	
펩티드분해효소	인식 및 절단되는 아미노산 서열
카스파제-1	Tyr-Val-Ala-Asp-Xaa* (서열 11)
카스파제-3	Asp-Xaa-Xaa-Asp-Xaa* (서열 12)

전구단백질 전환효소 1	Arg-(Xaa) _n -Arg-Xaa*; n = 0, 2, 4 또는 6 (서열 13)
전구단백질 전환효소 2	Lys-(Xaa) _n -Arg-Xaa*; n = 0, 2, 4 또는 6 (서열 14)
전구단백질 전환효소 4	Glp-Arg-Thr-Lys-Arg-Xaa* (서열 15)
전구단백질 전환효소 4 PACE 4	Arg-Val-Arg-Arg-Xaa* (서열 16) 데카노일-Arg-Val-Arg-Arg-Xaa* (서열 17)
디펩티달-펩티드분해효소 IV와 조합된 프로릴올리고펩티드분해효소 엔도텔린 절단 효소	Pro-Xaa*-Trp-Val-Pro-Xaa (서열 18)
신호 펩티드분해효소	Trp-Val*-Ala-Xaa (서열 19)
디펩티달-펩티드분해효소 IV와 조합된 네프릴리신	Xaa-Phe*-Xaa-Xaa (서열 20) Xaa-Tyr*-Xaa-Xaa (서열 21) Xaa-Trp*-Xaa-Xaa (서열 22)
디펩티달-펩티드분해효소 IV와 조합된 레닌	Arg-Arg-Tyr-Ile-Pro-Phe-His-Leu*-Leu-(Val, Ala 또는 Pro)-Tyr-(Ser, Pro 또는 Ala) (서열 23)

따라서, 특정한 더욱 바람직한 실시양태에서, 절단가능 링커는 상피 세포의 기저-측면 막에 존재하는 효소에 의해 절단가능한 것으로 당업자에게 공지된 임의의 절단가능 링커일 수 있다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 펩티드를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 절단가능 링커는 핵산, 예컨대 RNA 또는 DNA를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 절단가능 링커는 탄수화물, 예컨대 이당류 또는 삼당류를 포함한다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 Ala-Ala-Pro-Phe (서열 4), Gly-Gly-Phe (서열 5), Ala-Ala-Pro-Val (서열 6), Gly-Gly-Leu (서열 7), Ala-Ala-Leu (서열 8), Phe-Val-Arg (서열 9), Val-Gly-Arg (서열 10)으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩티드이다.

별법으로, 덜 바람직한 실시양태에서, 절단가능 링커는 전달 구축물이 투여되는 대상체의 혈장 내에 존재하는 효소에 의해 절단가능한 것으로 당업자에게 공지된 임의의 절단가능 링커일 수 있다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 펩티드를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 절단가능 링커는 핵산, 예컨대 RNA 또는 DNA를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 절단가능 링커는 탄수화물, 예컨대 이당류 또는 삼당류를 포함한다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 표 2에 제시된 아미노산 서열로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩티드이다.

특정 실시양태에서, 전달 구축물은 1개를 초과하는 절단가능 링커를 포함한다. 특정 실시양태에서, 임의의 절단가능 링커에서의 절단에 의해 전달될 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리될 것이다. 특정 실시양태에서, 전달 구축물은 분극화 상피 막의 기저-측면쪽 면에 존재하는 효소에 의해 절단가능한 절단가능 링커 및 전달 구축물이 투여되는 대상체의 혈장 내에 존재하는 효소에 의해 절단가능한 절단가능 링커를 포함한다.

또한, 하기의 표 4 및 5에는 분극화 상피 막의 기저-측면 또는 최상단부 표면에 적용되었을 때 기질을 절단하는 펩티드분해효소의 능력을 테스트한 실험 결과가 제시된다. 이러한 효소에 의해 인식되는 서열은 당업계에 주지되어 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 전달 구축물은 표 4 및 5에 열거된 효소에 의해 절단가능한 절단가능 링커를 포함한다. 바람직한 펩티드분해효소는 막의 기저측면부 면에서 더 높은 활성을 나타낸다. 특히 바람직한 펩티드분해효소는 기저측면부 면에서 훨씬 더 높은 활성을 나타낸다 (예를 들어, 최상단부에 비해 활성이 100%, 200%, 또는 그 이상 증가). 따라서, 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 막의 최상단부 면에서보다 막의 기저-측면쪽 면에서 50% 더 높은 활성을 나타내는 효소에 의해 절단가능하다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 막의 최상단부 면에서보다 막의 기저-측면쪽 면에서 100% 더 높은 활성을 나타내는 효소에 의해 절단가능하다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 막의 최상단부 면에서보다 막의 기저-측면쪽 면에서 200% 더 높은 활성을 나타내는 효소에 의해 절단가능하다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 막의 최상단부 면에서보다 막의 기저-측면쪽 면에서 500% 더 높은 활성을 나타내는 효소에 의해 절단가능하다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 막의 최상단부 면에서보다 막의 기저-측면쪽 면에서 1,000% 더 높은 활성을 나타내는 효소에 의해 절단가능하다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 막의 최상단부 면에서보다 막의 기저-측면쪽 면에서 2,000% 더 높은 활성을 나타내는 효소에 의해 절단가능하다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 막의 최상단부 면에서보다 막의 기저-측면쪽 면에서 3,000% 더 높은 활성을 나타내는 효소에 의해 절단가능하다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 막의 최

상단부 면에서보다 막의 기저-측면쪽 면에서 5,000% 더 높은 활성을 나타내는 효소에 의해 절단가능하다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 막의 최상단부 면에서보다 막의 기저-측면쪽 면에서 10,000% 더 높은 활성을 나타내는 효소에 의해 절단가능하다.

또한, 표 4 및 5의 결과는 다른 상피 계통과 비교하여 특정 상피 계통에서 특정 효소가 더 높은 농도로 존재하거나 더 큰 활성을 나타낸다는 것을 가리킨다. 따라서, 하기에 기술된 실험을 사용하여 거대 분자가 이를 통해 전달될 특정 상피 세포 계통이 원하는 절단 활성을 나타내는지 여부를 테스트할 수 있다. 특정 실시양태에서, 절단 활성이 기관(氣管) 상피 세포에는 존재하지만, 장 상피 세포에는 존재하지 않는다. 또다른 실시양태에서, 절단 활성이 장 상피 세포에는 존재하지만, 기관 상피 세포에는 존재하지 않는다. 특정 실시양태에서, 절단 활성이 장 상피 세포 및 기관 상피 세포에 존재한다.

특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 막의 최상단부 면과 비교하여 상피 막의 기저측면부 면에서 우선적으로 절단하는 임의의 효소에 의해 절단가능할 수 있다. 하기의 실시예 6.4에는 이같은 효소의 활성을 평가하는데 사용될 수 있는 분석법이 기술되어 있고, 본 문헌의 끝에 첨부된 표 7에는 모든 공지된 인간 단백질분해효소 또는 펩티드분해효소에 대한 짧은 명칭 및 할당 번호가 제공된다. 상피 막의 기저측면부 면 상에서 또는 혈장 내에서 이같은 막의 최상단부 면과 비교하여 테스트 기질을 우선적으로 절단하는 이같은 단백질분해효소 또는 펩티드분해효소에 의해 인식되는 임의의 절단 서열이 또한 본 발명의 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다. 이같은 실시양태에서, 당업자는 당업계에 공지된 표준 절차에 따라 또는 단백질분해효소 및 펩티드분해효소에 의해 인식되는 공지된 서열에 따라 이같은 펩티드분해효소 또는 단백질분해효소에 의해 인식되는 아미노산 서열을 쉽게 결정할 수 있다.

하기의 실시예들은 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 또는 이 근처에 존재하는 절단 효소를 확인하는 방법을 제공한다. 당업자는 이같은 방법을 관례적으로 사용하여, 추가적인 절단 효소 및 이같은 절단 효소에 의해 확인 및 절단되는 화학 구조(들)를 확인할 수 있다. 이같은 절단 효소가 표 7에 제시되었는지 여부와 상관없이, 이같은 절단가능 링커를 포함하는 전달 구축물 및 이같은 절단가능 링커를 포함하는 전달 구축물을 사용하여 거대분자를 전달하는 방법 또한 본 발명의 범주 내에 속한다.

또다른 실시양태에서, 절단가능 링커는 전달 구축물의 환경에서의 변화 후 절단되는 절단가능 링커일 수 있다. 예를 들어, 절단가능 링커는 pH 민감성이고 전달 구축물이 분극화 상피 세포의 기저-측면 막으로부터 방출될 때 경험하게 되는 pH 변화에 의해 절단되는 절단가능 링커일 수 있다. 예를 들어, 장 루멘은 강하게 알칼리성인 반면, 혈장은 본질적으로 중성이다. 따라서, 절단가능 링커는 알칼리성에서 중성 pH로의 이동 시 절단되는 모이어티일 수 있다. 절단가능링커가 절단되는 전달 구축물의 환경에서의 변화는 비제한적으로 당업자에게 공지된, 전달 구축물이 분극화 상피 세포의 기저-측면 막으로부터 방출될 때 경험하는 임의의 환경 변화일 수 있다.

5.3. 거대분자의 전달 방법

또다른 양상에서, 본 발명은 거대분자를 대상체에게 국소 또는 전신 전달하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 본 발명의 전달 구축물을 거대분자가 전달되는 대상체의 점막에 투여하는 것을 일반적으로 포함한다. 전달 구축물은, 하기 기술되는 바와 같이, 제약 조성물의 형태로 전형적으로 투여된다.

따라서, 특정 양상에서, 본 발명은 거대분자를 대상체에게 전달하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체의 분극화 상피 세포의 최상단부 표면을 전달 구축물과 접촉시키는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 전달 구축물은 수용체 결합 도메인, 트랜스사이토시스 도메인, 절단가능 링커, 및 전달될 거대분자를 포함한다. 트랜스사이토시스 도메인은 거대분자를 상기 상피세포의 기저-측면 막을 통해 트랜스사이토시스시킬 수 있다. 절단가능 링커는 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막 또는 대상체의 혈장 내에 존재하는 효소에 의해 절단될 수 있다. 절단가능 링커의 절단에 의해 거대분자가 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리됨으로써, 거대분자가 대상체에게 전달된다.

특정 실시양태에서, 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 또는 이 근처에 존재하는 효소는 카텝신 GI, 키모트립신 I, 엘라스타제 I, 서브틸리신 AI, 서브틸리신 AII, 트롬빈 I, 및 유로키나제 I로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 절단가능 링커는 Ala-Ala-Pro-Phe (서열 4), Gly-Gly-Phe (서열 5), Ala-Ala-Pro-Val (서열 6), Gly-Gly-Leu (서열 7), Ala-Ala-Leu (서열 8), Phe-Val-Arg (서열 9), Val-Gly-Arg (서열 10)으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 슈도모나스 외독소 A, 콜레라 독소, 디프테리아 독소, 시가 독소 또는 시가-유사 독소; 모노클로날 항체; 폴리클로날 항체; 단일쇄 항체; TGF α ; EGF; IGF-I; IGF-II; IGF-III; IL-1; IL-2; IL-3; IL-6; MIP-1a; MIP-1b; MCAF; 및 IL-8로부터의 수용체 결합 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서,

수용체 결합 도메인은 $\alpha 2$ -마크로글로불린 수용체, EGFR, IGFR, 트랜스페린 수용체, 케모카인 수용체, CD25, CD11B, CD11C, CD80, CD86, TNF α 수용체, TOLL 수용체, M-CSF 수용체, GM-CSF 수용체, 스캐빈저 수용체, 및 VEGF 수용체로 구성되는 군으로부터 선택된 세포 표면 수용체에 결합한다.

특정 실시양태에서, 트랜스사이토시스 도메인은 슈도모나스 외독소 A, 디프테리아 독소, 백일해 독소, 콜레라 독소, 이열성 대장균 장독소, 시가 독소, 및 시가-유사 독소로부터의 트랜스사이토시스 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

특정 실시양태에서, 거대분자는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 및 지질로 구성되는 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 거대분자는 성장 호르몬이다. 더욱 더 바람직하게는, 거대분자는 인간 성장 호르몬이다.

특정 실시양태에서, 본 발명은 거대분자의 약 30% 이상의 생체이용율을 일으키는, 대상체의 혈류에 거대분자를 전달하는 방법으로, 거대분자를 포함하는 전달 구축물을 대상체에게 투여함으로써, 투여된 전체 거대분자의 약 30% 이상을 생체이용가능한 형태의 거대분자로 대상체의 혈류에 전달하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 10% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 15% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 20% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 25% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 35% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 40% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 45% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 50% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 55% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 60% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 65% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 70% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 75% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 80% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 85% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 90% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 투여된 전체 거대분자의 약 95% 이상이 대상체에게 생체이용가능하다. 특정 실시양태에서, 거대분자의 생체이용률 백분율은 거대분자를 포함하는 전달 구축물의 투여 후 대상체의 혈액 내에 존재하는 거대분자의 양을 또다른 투여 경로를 통해 거대분자를 투여한 후의 대상체의 혈액 내에 존재하는 거대분자의 양과 비교함으로써 결정된다. 특정 실시양태에서, 또다른 투여 경로는 주사, 예를 들어, 피하 주사, 정맥내 주사, 동맥내 주사 등이다. 또다른 실시양태에서, 거대분자의 생체이용률 백분율은 거대분자를 포함하는 전달 구축물의 투여 후 대상체의 혈액 내에 존재하는 거대분자의 양을 전달 구축물의 일부로서 투여된 거대분자의 전체 양과 비교함으로써 결정된다.

특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 10분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 15분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 5분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 20분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 25분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 30분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 35분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 40분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 45분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 50분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 55분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 60분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 90분 후에 달성된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서의 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 투여 약 120분 후에 달성된다.

특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 0.01 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 10 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 0.01 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 1 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 0.01 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.1 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 0.01 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 10 ng 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 10 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 1 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다.

태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.1 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 10 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 1 μ g 사이이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 10 ng 내지 혈장 1 ml 당 약 0.5 μ g 사이이다.

특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 10 μ g 이상이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 5 μ g 이상이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 μ g 이상이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 500 ng 이상이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 250 ng 이상이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 100 ng 이상이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 50 ng 이상이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 10 ng 이상이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 5 ng 이상이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 1 ng 이상이다. 특정 실시양태에서, 전달된 거대분자의 최고 혈장 농도는 혈장 1 ml 당 약 0.1 ng 이상이다.

또한, 특정한 이론 또는 작용 메커니즘에 구속되지 않고, 전달 구축물의 경구 투여로 대상체의 혈장에서 관찰되는 것보다 더 높은 유효 농도의 전달된 거대분자를 대상체의 간에 전달할 수 있을 것으로 여겨진다. 이러한 문맥에서, "유효 농도"는 거대분자의 표적이 경험하는 농도를 지칭하고, 거대분자-표적 상호작용의 하류 효과를 모니터링하고/하거나 정량함으로써 결정할 수 있다. 여전히 특정 이론에 구속되지 않고, 전달 구축물의 경구 투여로 소화 점막, 예를 들어, 장 점막의 분극화 상피 세포를 통해 전달 구축물이 흡수된 후, 점막의 기저측면부 면에서 구축물이 절단되고 거대분자가 방출되는 것으로 여겨진다. 당업자가 인식할 바와 같이, 이같은 소화 점막의 기저측면 막에서의 혈액은 문맥계를 통해 이러한 위치에서 간으로 운반된다. 따라서, 거대분자가 간에서의 생물학적 활성, 예를 들어, 동족(cognate) 수용체에 대한 성장 호르몬, 인슐린, IGF-I 등의 결합에 의해 매개되는 활성을 발휘할 때, 거대분자는 대상체에서 관찰된 혈장 농도를 기초로 예상되는 것을 초과하여 효과를 발휘할 것으로 여겨진다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명은 거대분자를 포함하는 전달 구축물을 대상체에게 경구 투여하는 것을 포함하는, 대상체에게 거대분자를 투여하는 방법으로, 거대분자가 대상체의 혈장에서 관찰되는 것보다 더 높은 유효 농도로 대상체의 간에게 전달되는 방법을 제공한다.

특정 실시양태에서, 상피 세포는 비강(nasal) 상피 세포, 구강 상피 세포, 장 상피 세포, 직장 상피 세포, 질 상피 세포, 및 폐 상피 세포로 구성되는 군으로부터 선택된다.

특정 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다. 추가적인 실시양태에서, 대상체는 설치류, 토끼목 포유동물, 또는 영장류이다. 또다른 추가적인 실시양태에서, 설치류는 마우스 또는 래트이다. 또다른 실시양태에서, 토끼목 포유동물은 토끼이다. 또다른 실시양태에서, 영장류는 인간, 원숭이, 또는 유인원이다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

또다른 양상에서, 본 발명은 다른 투여 경로보다 거대분자에 대한 더 낮은 항체 역가를 유도하는, 거대분자를 대상체의 혈류에 전달하는 방법을 제공한다. 임의의 특정한 이론 또는 작용 메커니즘에 구속되지 않고, 점막, 예를 들어, 장 점막을 통한 거대분자의 진입은 거대분자가 예를 들어 주사되는 것보다 면역계가 거대분자를 더 잘 허용하도록 하는 것으로 여겨진다. 따라서, 거대분자를, 예를 들어, 피하, 정맥내, 통맥내, 복막내, 또는 다른 방식으로 주사하는 것보다는 거대분자를 본 발명의 전달 구축물로 점막을 통해 전달함으로써, 거대분자에 대한 더 낮은 항체 역가가 대상체에서 생산될 수 있다. 일반적으로, 별법적인 투여 경로에 대해 검출된 더 낮은 항체 역가가 검출되는 시간은 대략 유사하여야 한다; 예를 들어, 항체 역가가 전달 구축물로의 또는 주사에 의한 거대분자의 투여 후 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 2개월, 또는 약 6개월에 검출될 수 있다.

따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명은 거대분자가 대상체의 혈류에 투여되도록, 전달될 거대분자를 포함하는 본 발명의 전달 구축물을 대상체의 분극화 상피 세포의 최상단부 표면에 접촉시키는 것을 포함하는, 거대분자를 대상체의 혈류에 전달하는 방법으로, 대상체의 혈청에서 거대분자에 대해 특이적인 항체가 거대분자를 전달 구축물의 나머지 부분과 별도로 대상체에게 피하 투여함으로써 유도되는 것보다 더 낮은 항체 역가로 유도되는 방법을 제공한다.

특정 실시양태에서, 거대분자는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 및 지질로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 거대분자는 폴리펩티드 호르몬, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 및 옹고 인자로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 거대분자는 IGF-I, IGF-II, IGF-III, EGF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, EPO, 성장 호르몬, 인자 VII, 바소프레신, 칼시토닌, 부갑상선 호르몬, 황체형성 호르몬-방출 인자, 조직 플라즈미노겐 활성자, 부신피질자극호르몬, 엔케팔린, 및 글루카곤-유사 펩티드 1로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 거대분자는 인간 성장 호르몬이다. 특정 실시양태에서, 거대분자는 인간 인슐린이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 마우스, 래트, 개, 염소 또는 인간이다.

이같은 실시양태에서, 전달 구축물은 바람직하게는 대상체에게 경구 투여된다. 따라서, 필요하다면, 위의 산 환경에서의 분해로부터 전달 구축물을 보호하도록 전달 구축물이 제형화될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 전달 구축물의 많은 실시양태는 규정된 활성을 갖는 폴리펩티드 도메인을 포함한다. 이같은 전달 구축물이 위에서의 산 및/또는 효소성 분해로부터 보호되지 않으면, 실질적인 양의 전달될 거대분자가 전달되기 전에 구축물이 일반적으로 분해될 것이다. 따라서, 분해로부터 전달 구축물을 보호하는 조성물 제제가 이러한 전달 구축물의 투여에서 사용될 수 있다.

5.3.2. 투여량

일반적으로, 제약상 유효한 양의 본 발명의 전달 구축물이 대상체에게 투여된다. 하기 기술되는 바와 같이, 당업자는 전달 구축물의 투여량이 유효량의 거대분자를 전달하는데 충분한지를 쉽게 결정할 수 있다. 특정 실시양태에서, 약 1 μg 내지 약 1 g의 전달 구축물이 투여된다. 또다른 실시양태에서, 약 10 μg 내지 약 500 mg의 전달 구축물이 투여된다. 또다른 실시양태에서, 약 10 μg 내지 약 100 mg의 전달 구축물이 투여된다. 또다른 실시양태에서, 약 10 μg 내지 약 1000 μg 의 전달 구축물이 투여된다. 또다른 실시양태에서, 약 10 μg 내지 약 250 μg 의 전달 구축물이 투여된다. 또다른 실시양태에서, 약 10 μg 내지 약 100 μg 의 전달 구축물이 투여된다. 바람직하게는, 약 10 μg 내지 약 50 μg 의 전달 구축물이 투여된다.

투여되는 전달 구축물을 포함하는 조성물의 부피는 전달 구축물의 농도 및 조성물의 제형에 일반적으로 좌우될 것이다. 특정 실시양태에서, 전달 구축물 조성물의 단위 용량은 약 0.05 ml 내지 약 1 ml, 바람직하게는 약 0.5 ml이다. 전달 구축물 조성물은 1 내지 50회의 용량(예를 들어, 0.5 ml 내지 25 ml), 더욱 일반적으로는 1 내지 10회의 용량(예를 들어, 0.5 ml 내지 5 ml)을 함유하는 투약 형태로 제조될 수 있다.

본 발명의 전달 구축물 조성물은 1회 용량으로 또는 다회 용량으로 투여될 수 있다. 1회 용량 후 약 1 내지 약 6시간, 약 6 내지 약 12시간, 약 12 내지 약 24시간, 약 1일 내지 약 3일, 약 1일 내지 약 1주, 약 1주 내지 약 2주, 약 2주 내지 약 1개월, 약 4주 내지 약 8주, 약 1개월 내지 약 3개월, 또는 약 1개월 내지 약 6개월의 간격으로 1회 이상의 용량이 이어질 수 있다.

전달될 거대분자는 일반적으로 투여량, 투여 빈도, 및 대상체에서의 유효 농도의 평가 방법과 관련된 대량의 지식이 축적된 거대분자이다. 이같은 지식을 사용하여, 전달 효율, 대상체에서의 거대분자의 유효 농도, 및 투여 빈도를 평가할 수 있다. 따라서, 당업자의 지식을 사용하여, 예를 들어, 대상체에게 전달된 거대분자의 양이 유효량인지, 투여량이 증가 또는 감소되어야 하는지, 대상체에게 전달 구축물을 더욱 또는 덜 빈번하게 투여하여야 하는지 등의 여부를 결정할 수 있다.

5.3.3. 전달된 거대분자의 양의 결정

본 발명의 방법을 사용하여, 제약상 유효한 양의 거대분자를 대상체에게 국소 또는 전신 전달할 수 있다. 당업자는 이러한 방법으로 이같은 제약상 유효한 양의 거대분자가 전달되었는지 여부를 결정할 수 있다. 정확한 방법은 전달되는 거대분자에 좌우될 것이지만, 거대분자가 이의 효과를 발휘하는 대상체의 생물학적 구획 또는 대상체의 혈액 내의 거대분자의 농도를 결정하는 것에 일반적으로 의존할 것이다. 별법으로 또는 추가적으로, 대상체에 대한 거대분자의 효과를 모니터링할 수 있다.

예를 들어, 본 발명의 특정 실시양태에서, 전달되는 거대분자는 인슐린, 예를 들어, 인간 인슐린이다. 이같은 실시양태에서, 당업자는, 예를 들어, 대상체로부터 혈장 샘플을 취하고, 이의 인간 인슐린 농도를 결정함으로써, 제약상 유효한 양의 인간 인슐린이 대상체에게 전달되었는지를 결정할 수 있다. 인간 인슐린의 농도를 결정하는 한 예시적인 방법은 ELISA 분석을 수행하는 것에 의한 것이지만, 당업자에게 공지된 임의의 다른 적절한 분석법을 사용할 수 있다.

별법으로, 당업자는 유효량의 인간 인슐린이 대상체에게 전달되었는지를 대상체의 혈당 농도를 모니터링함으로써 결정할 수 있다. 당업계에 주지된 바와 같이, 인간 인슐린은, 여러 활성들 중에서, 간세포 상에 작용하여 글리코겐 형성을 촉진함으로써, 혈장 글루코스 농도를 저하시킨다. 따라서, 대상체의 혈장 글루코스 농도를 모니터링하여 유효량의 인슐린이 전달되었는지 여부를 결정할 수 있다.

유효량의 거대분자가 전달되었는지 여부를 결정하는데 있어서, 비제한적으로 당업자에게 공지된, 투여된 거대분자의 임의의 효과를 평가할 수 있다. 예시적인 효과로는 수용체 결합, 수용체 활성화, 수용체 결합의 하류 효과, 수용체 활성화의 하류 효과, 화합물의 배위, 효과적인 혈액 응고, 골 성장, 상처 치유, 세포 증식 등이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 평가되는 정확한 효과는 전달되는 거대분자에 좌우될 것이다.

5.4. 전달 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드

또다른 양상에서, 본 발명은 전달 구축물을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이러한 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 전달 구축물의 제조에 유용하다. 또다른 양상에서, 본 발명은 수용체 결합 도메인, 트랜스사이토시스 도메인, 및 거대분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 대한 폴리링커 삽입 부위를 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 시스템을 제공한다. 폴리링커 삽입 부위는 폴리링커 삽입이 수용체 결합 도메인 또는 트랜스사이토시스 도메인을 파괴하지 않는 한 폴리뉴클레오티드 서열 내의 임의의 장소일 수 있다. 절단가능 링커에서의 절단으로 폴리링커 삽입 부위 내로 삽입된 핵산에 의해 코딩되는 거대분자가 코딩된 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리되도록 폴리링커 삽입 부위는 절단가능 링커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 근처에 배향되어야 한다. 따라서, 폴리링커 삽입 부위가 코딩된 구축물의 끝부분에 있는 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 폴리링커 삽입 부위와 폴리뉴클레오티드의 나머지 부분 사이의 절단가능 링커를 코딩하는 1개의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 폴리링커 삽입 부위가 코딩된 구축물의 끝부분에 있지 않는 실시양태에서, 절단가능 링커를 각각 코딩하는 뉴클레오티드 서열들이 폴리링커 삽입 부위에 플랭킹될 수 있다.

특정 실시양태에서, 재조합 폴리뉴클레오티드는 PE, 또는 이의 일부 또는 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 기초로 한다. 또다른 실시양태에서, 재조합 폴리뉴클레오티드는 엄격한 혼성화 조건 하에 PE를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 혼성화되는 폴리뉴클레오티드를 기초로 한다. PE를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 서열 3으로 제시된다. 이러한 서열을 사용하여, 원하는 이러한 서열의 임의의 부분을 코딩하는 핵산을 단리하기 위한 PCR 프라이머를 제조할 수 있다. 예를 들어, PCR을 사용하여, PE의 1개 이상의 기능성 도메인을 코딩하는 핵산을 단리할 수 있다. 그 후, 이렇게 단리된 핵산을 표준 재조합 기술을 사용하여 전달 구축물의 다른 기능성 도메인을 코딩하는 핵산에 연결시킬 수 있다.

본 발명의 전달 구축물에 유용한 PE, PE 도메인, 또는 임의의 다른 기능성 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제조하는데 사용할 수 있는 다른 시험관내 방법에는 역전사, 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 절찰효소 연쇄 반응 (LCR), 전사-기재 증폭 시스템 (TAS), 자가-부양성(self-sustained) 서열 복제 시스템 (3SR) 및 QP 복제효소 증폭 (QB)이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 재조합 핵산의 구축에 유용한 것으로 당업자에게 공지된 임의의 이같은 기술을 사용할 수 있다. 예를 들어, 단백질 또는 이의 일부를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 수용체 결합 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 또는 PE의 DNA 서열을 기초로 하는 프라이머를 사용하여 cDNA의 중합 효소 연쇄 반응에 의해 단리할 수 있다.

이러한 클로닝 및 시험관내 증폭 방법을 사용하는 것에 대한 안내는, 예를 들어, 미국 특허 4,683,195; [Mullis et al., 1987, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263]; 및 [Erich, ed, 1989, PCR Technology, Stockton Press, NY]에 기술되어 있다. 엄격한, 중간 정도로 엄격한, 또는 고도로 엄격한 혼성화 조건 하에 원하는 폴리뉴클레오티드의 서열로부터 선택된 프로브로 게놈 또는 cDNA 라이브러리를 스크리닝함으로써 전달 구축물 또는 이의 일부를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 또한 단리할 수 있다.

거대분자를 코딩하는 핵산에 대한 삽입 부위를 구축물 내로 도입함으로써 본 발명의 전달 구축물을 코딩하는 핵산의 구축을 용이하게 할 수 있다. 특정 실시양태에서, 거대분자에 대한 삽입 부위를 도메인 Ib의 시스템 잔기들을 코딩하는 뉴클레오티드들 사이에 도입할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 삽입이 코딩된 기능성 도메인을 파괴하지 않는 한, 삽입 부위는 구축물을 코딩하는 핵산 내의 임의의 장소에 도입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 삽입 부위는 ER 잔류 도메인 내에 있을 수 있다.

더욱 구체적인 실시양태에서, 시스템-코딩 잔기들 사이의 Ib 도메인의 일부를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 제거되어 제한 효소에 의해 절단되는 클로닝 부위를 포함하는 뉴클레오티드 서열로 대체될 수 있다. 예를 들어, 클로닝 부위가 PstI에 의해 인식 및 절단될 수 있다. 이같은 예에서, PstI 서열들이 플랭킹된 거대분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 벡터 내로 삽입될 수 있다.

또한, 폴리뉴클레오티드는 코딩된 전달 구축물의 아미노 말단에서 분비 서열을 또한 코딩할 수 있다. 이같은 구축물은 면역원의 단리를 단순화시키기 때문에 포유류에서 전달 구축물을 생산하는데 유용하다.

또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 전달 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 유도체 버전을 또한 포함한다. 이같은 유도체는 비제한적으로 당업자에게 공지된 임의의 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 전달 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 1개, 2개, 3개, 5개, 10개 또는 그 이상의 뉴클레오티드의 치환, 삽입 또는 결실을 포함하는 부위-지정 돌연변이 유발에 의해 유도체를 제조할 수 있다. 별법으로, 무작위 돌연변이 유발에 의해 유도체를 제조할 수 있다. 핵산을 무작위

로 돌연변이시키는 한 방법은 0.1 mM MnCl₂ 및 균형이 맞지 않는 뉴클레오티드 농도의 존재 하에 PCR 반응에서 핵산을 증폭시키는 것을 포함한다. 이러한 조건은 PCR 반응에서 사용된 중합효소의 잘못된 혼입 비율을 증가시키고, 그 결과 증폭된 핵산의 무작위 돌연변이유발이 초래된다.

PE로부터 유도된 키메라 분자에서의 여러 부위-지정 돌연변이 및 결실이 이루어졌고, 특징화되었다. 예를 들어, PE의 아미노산 1-252를 코딩하는 뉴클레오티드의 결실로 "PE40"으로 지칭되는 구축물이 산출되었다. PE의 아미노산 1-279를 코딩하는 뉴클레오티드의 결실로 "PE37"로 지칭되는 구축물이 산출되었다. 미국 특허 5,602,095 참조. 이러한 구축물 모두에서, PE의 수용체 결합 도메인, 즉, 도메인 Ia가 결실되었다. 수용체 결합 도메인을 코딩하는 핵산이 이러한 구축물에 결합되어, 이러한 수용체 결합 도메인에 의해 인식되는 세포 표면 수용체를 표적으로 하는 전달 구축물이 생산될 수 있다. 물론, 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드는 PE의 도메인 Ia가 아닌 수용체 결합 도메인을 갖는 전달 구축물을 발현하는데 특히 유용하다. 재조합 폴리뉴클레오티드는 구축물의 발현을 보조하는 아미노-말단 메티오닌을 임의로 코딩할 수 있다. 특정 실시양태에서, 수용체 결합 도메인은 트랜스사이토시스 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5' 말단에 결합될 수 있다.

본 발명의 전달 구축물을 구축하기 위한 핵산의 공급원으로서 사용될 수 있는 돌연변이 형태의 PE를 코딩하는 또다른 핵산에는 PEΔ553 및 미국 특허 5,602,095; 5,512,658 및 5,458,878, 및 [Vasil et al., 1986, Infect. Immunol. 52:538-48]에 기술된 것들이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다.

따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명은 전달 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 전달 구축물은 수용체 결합 도메인, 트랜스사이토시스 도메인, 대상체에게 전달될 거대분자, 및 절단가능 링커를 포함한다. 절단가능 링커에서의 절단에 의해 거대분자가 구축물의 나머지 부분으로부터 절단될 수 있다. 절단가능 링커는 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 또는 대상체의 혈장 내에 존재하는 효소에 의해 절단될 수 있다.

특정 실시양태에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 엄격한 혼성화 조건 하에 임의의 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 혼성화한다. 추가적인 실시양태에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 엄격한 조건 하에 임의의 본 발명의 전달 구축물을 코딩하는 핵산에 혼성화한다.

특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 제2 절단가능 링커를 추가로 포함하는 전달 구축물을 코딩한다. 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 절단가능 링커는 Ala-Ala-Pro-Phe (서열 4), Gly-Gly-Phe (서열 5), Ala-Ala-Pro-Val (서열 6), Gly-Gly-Leu (서열 7), Ala-Ala-Leu (서열 8), Phe-Val-Arg (서열 9), Val-Gly-Arg (서열 10)으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 제1 및/또는 제2 절단가능 링커는 카텡신 GI, 키모트립신 I, 엘라스타제 I, 서브틸리신 AI, 서브틸리신 AII, 트롬빈 I, 및 유로키나제 I로 구성되는 군으로부터 선택된 효소에 의해 절단가능하다.

특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 수용체 결합 도메인은 슈도모나스 외독소 A, 콜레라 독소, 디프테리아 독소, 시가 독소 또는 시가-유사 독소; 모노클로날 항체; 폴리클로날 항체; 단일쇄 항체; TGFα; EGF; IGF-I; IGF-II; IGF-III; IL-1; IL-2; IL-3; IL-6; MIP-1a; MIP-1b; MCAF; 및 IL-8로부터의 수용체 결합 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 수용체 결합 도메인은 α2-마크로글로불린 수용체, EGFR, IGFR, 트랜스페린 수용체, 케모카인 수용체, CD25, CD11B, CD11C, CD80, CD86, TNFα 수용체, TOLL 수용체, M-CSF 수용체, GM-CSF 수용체, 스캐빈저 수용체, 및 VEGF 수용체로 구성되는 군으로부터 선택된 세포 표면 수용체에 결합한다. 추가적인 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 수용체 결합 도메인은 슈도모나스 외독소 A의 도메인 Ia이다. 또다른 추가적인 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 수용체 결합 도메인의 아미노산 서열은 서열 1이다.

특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 트랜스사이토시스 도메인은 슈도모나스 외독소 A, 디프테리아 독소, 백일해 독소, 콜레라 독소, 이열성 대장균 장독소, 시가 독소, 및 시가-유사 독소로부터의 트랜스사이토시스 도메인으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 추가적인 실시양태에서, 트랜스사이토시스 도메인은 슈도모나스 외독소 A 트랜스사이토시스 도메인이다. 또다른 추가적인 실시양태에서, 슈도모나스 외독소 A 트랜스사이토시스 도메인의 아미노산 서열은 서열 2이다.

특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 거대분자는 펩티드, 폴리펩티드, 및 단백질로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 폴리펩티드 호르몬, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 및 응고 인자로 구성되는 군으로부터 선택된다. 추가적인 실시양태에서, 폴리펩티드는 IGF-I, IGF-II, IGF-III, EGF, IFN-α, IFN-β, IFN-

y, G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, EPO, 성장 호르몬, 인자 VII, 바소프레신, 칼시토닌, 부갑상선 호르몬, 황체형성 호르몬-방출 인자, 조직 플라스미노겐 활성화자, 부신피질자극호르몬, 엔케팔린, 및 글루카곤-유사 펩티드 1로 구성되는 군으로부터 선택된다. 또다른 추가적인 실시양태에서, 폴리펩티드는 인간 성장 호르몬이다. 또다른 실시양태에서, 단백질은 인간 인슐린이다.

또다른 실시양태에서, 본 발명은 수용체 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열, 트랜스사이토시스 도메인을 코딩하는 핵산 서열, 절단가능 링커를 코딩하는 핵산 서열, 및 폴리링커 삽입 부위를 포함하는 핵산 서열을 포함하는, 전달 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 절단가능 링커의 절단으로 폴리링커 삽입 부위 내로 삽입된 핵산에 의해 코딩되는 거대 분자가 상기 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 분리되도록 폴리링커 삽입 부위가 절단가능 링커를 코딩하는 핵산 서열에 대해 배향될 수 있다. 절단가능 링커는 상기 대상체의 분극화 상피 세포의 기저-측면 막에 또는 상기 대상체의 혈장 내에 존재하는 효소에 의해 절단가능할 수 있다.

5.5. 발현 벡터

또다른 양상에서, 본 발명은 전달 구축물의 발현을 위한 발현 벡터를 제공한다. 일반적으로, 발현 벡터는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자이다. 발현 벡터는 적합한 프로모터, 복제 서열, 선택가능 마커 등의 혼입에 의해 원핵생물 또는 진핵생물에서의 기능에 대해 쉽게 개조되어, 그 결과 mRNA가 안정적으로 전사 및 번역될 수 있다. 발현 벡터의 구축 및 발현 벡터를 포함하는 세포에서의 유전자의 발현에 대한 기술은 당업계에 주지되어 있다. 예를 들어, [Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY], 및 [Ausubel et al., eds., Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY] 참조.

발현 벡터에서 사용하기에 유용한 프로모터에는 메탈로티오네인 프로모터, 항시성(constitutive) 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 텍사메타손-유도성 MMTV 프로모터, SV40 프로모터, MRP pol III 프로모터, 항시성 MPSV 프로모터, 테트라사이클린-유도성 CMV 프로모터 (예컨대 인간 극초기(immediate-early) CMV 프로모터), 및 항시성 CMV 프로모터가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

발현 벡터는 전달 구축물이 발현되는 세포와 호환성인 발현 및 복제 신호를 함유하여야 한다. 전달 구축물의 발현에 유용한 발현 벡터에는 바이러스 벡터 예컨대 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스, 플라스미드 벡터, 코스미드 등이 포함된다. 바이러스 및 플라스미드 벡터가 발현 벡터를 포유류 세포 내로 형질감염시키는데 바람직하다. 예를 들어, 발현 제어 서열이 CMV 프로모터를 포함하는 발현 벡터 pcDNA1 (Invitrogen, San Diego, CA)은 이같은 세포 내로의 양호한 비율의 형질감염 및 발현을 제공한다.

비제한적으로 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 발현 벡터가 전달 구축물의 발현을 위한 세포 내로 도입될 수 있다. 이같은 방법에는, 예를 들어, 용액으로부터의 세포에 의한 분자의 직접 포획; 리포솜 또는 면역리포솜을 예를 들어 사용하는 리포펙션(lipofection)을 통한 촉진된 포획; 입자-매개 형질감염 등이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어, 미국 특허 5,272,065; [Goeddel et al., eds, 1990, Methods in Enzymology, vol. 185, Academic Press, Inc., CA]; [Krieger, 1990, Gene Transfer and Expression - A Laboratory Manual, Stockton Press, NY]; [Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY]; 및 [Ausubel et al., eds., Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY] 참조.

발현 벡터는 전달 구축물의 단리를 단순화시키는 정제 모이어티를 또한 함유할 수 있다. 예를 들어, 폴리히스티딘 모이어티 (예를 들어, 히스티딘 잔기 6개)가 단백질의 아미노 말단 끝에 혼입될 수 있다. 폴리히스티딘 모이어티는 니켈-킬레이트 크로마토그래피에 의해 단일 단계에서 단백질을 편리하게 단리할 수 있도록 한다. 특정 실시양태에서, 정제 모이어티는 정제 후 전달 구축물의 나머지 부분으로부터 절단될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 모이어티는 전달 구축물의 기능성 도메인의 기능을 방해하지 않고, 따라서 절단될 필요가 없다.

5.6. 전달 구축물을 발현하기 위한 세포

또다른 양상에서, 본 발명은 전달 구축물을 발현하기 위한 발현 벡터를 포함하는 세포, 또는 이의 일부분을 제공한다. 바람직하게는 세포는 고농도의 전달 구축물을 발현하여 단백질의 정제를 용이하게 하는 능력에 대해 선택된다. 특정 실시양태에서, 세포는 원핵생물 세포, 예를 들어, 대장균이다. 실시예에 기술된 바와 같이, 대장균에서 발현될 때 전달 구축물은 적절하게 폴딩되고, 적합한 디설피드 결합을 포함한다.

또다른 실시양태에서, 세포는 진핵생물 세포이다. 유용한 진핵생물 세포에는 효모 및 포유류 세포가 포함된다. 비제한적으로 재조합 폴리펩티드의 발현에 유용한 것으로 당업자에게 공지된 임의의 포유류 세포를 사용하여, 전달 구축물을 발현시킬 수 있다. 예를 들어, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포를 사용하여 전달 구축물을 발현시킬 수 있다.

5.7. 전달 구축물을 포함하는 조성물

본 발명의 전달 구축물은 조성물로 제형화될 수 있다. 일반적으로 조성물은 전달 구축물에 대해 의도된 즉각적인 사용에 적합하게 제형화된다. 예를 들어, 전달 구축물이 즉각적으로 투여되지 않는 경우, 전달 구축물은 보관에 적절한 조성물로 제형화될 수 있다. 한 이같은 조성물은 적절한 안정화제와의 전달 구축물의 동결건조 제제이다. 별법으로, 전달 구축물 조성물은 1가지 이상의 적절한 안정화제와 함께 용액 내에서의 보관에 대해 제형화될 수 있다. 비제한적으로 당업자에게 공지된 임의의 이같은 안정화제를 사용할 수 있다. 예를 들어, 동결건조 제제에 적절한 안정화제로는 당, 염, 계면활성제, 단백질, 무질서유발제, 지질, 및 아미노산이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 조성물에서 사용될 수 있는 구체적인 안정화제로는 트레할로스, 혈청 알부민, 포스파티딜콜린, 레시틴 및 아르기닌이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 전달 구축물의 동결건조 또는 액체 제제를 안정화시키기 위한 기타 화합물, 조성물, 및 방법은, 예를 들어, 미국 특허 6,573,237, 6,525,102, 6,391,296, 6,255,284, 6,133,229, 6,007,791, 5,997,856, 및 5,917,021에서 확인할 수 있다.

또한, 본 발명의 전달 구축물 조성물은 대상체로의 투여용으로 제형화될 수 있다. 이같은 백신 조성물은 1개 이상의 본 발명의 전달 구축물 및 제약상 허용가능한 부형제, 희석제, 담체 또는 비히클을 일반적으로 포함한다. 비제한적으로 당업자에게 공지된 임의의 이같은 제약상 허용가능한 부형제, 희석제, 담체 또는 비히클을 사용할 수 있다. 적절한 부형제, 희석제, 담체 또는 비히클의 예는 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Ed. 2005, Mack Publishing Co., Easton]에서 확인할 수 있다.

특정 실시양태에서, 전달 구축물 조성물은 경구 투여용으로 제형화된다. 이같은 실시양태에서, 조성물은 위에서의 산 및/또는 효소성 분해로부터 전달 구축물을 보호하도록 제형화된다. 그 후, 십이지장의 중성 내지 알칼리성 환경을 통과하면서, 전달 구축물은 점막과 접촉하여, 분극화 상피 막을 가로질러 수송된다. 전달 구축물은 비제한적으로 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 이같은 조성물로 제형화될 수 있다.

특정 실시양태에서, 경구 제제는 전달 구축물, 및 위에서 전달 구축물을 보호할 수 있는 1가지 이상의 화합물을 포함한다. 예를 들어, 보호 화합물은 전달 구축물의 산 및/또는 효소성 가수분해를 방지할 수 있다. 특정 실시양태에서, 경구 제제는 전달 구축물, 및 구축물이 위에서 소장으로 통과하는 것을 용이하게 하는 1가지 이상의 화합물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 위에서의 분해로부터 전달 구축물을 보호할 수 있는 1가지 이상의 화합물이 또한 구축물이 위에서 소장으로 통과하는 것을 용이하게 할 수 있다. 바람직하게는, 경구 제제는 위에서의 분해로부터 전달 구축물을 보호할 수 있고 구축물이 위에서 소장으로 통과하는 것을 용이하게 할 수 있는 1가지 이상의 화합물을 포함한다. 예를 들어, [Mrsny et al., 1999, Vaccine 17:1425-1433]에 기술된 바와 같이, 탄산수소나트륨을 포함하는 것이 위내 전달된 물질이 위에서 십이지장으로 신속하게 이동하도록 촉진하는데 유용할 수 있다.

전달 구축물이 위를 통과하여 소장 내의 분극화 상피 막과 접촉할 수 있도록 조성물을 제형화하는 또다른 방법에는 [DeYoung, 1989, Int J Pancreatol. 5 Suppl:31-6]에 기술된 바와 같은 장용 코팅 기술, 및 미국 특허 6,613,332, 6,174,529, 6,086,918, 5,922,680, 및 5,807,832에 제공된 방법이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

5.7.1. 조성물을 포함하는 키트

또다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 특정 실시양태에서, 키트는 조성물이 투여되는 대상체의 점막으로의 조성물의 투여를 지시하는 설명서를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 키트는 조성물이 투여되는 대상체로의 조성물의 경구 투여를 지시하는 설명서를 추가로 포함한다.

특정 실시양태에서, 키트는 1개 이상의 용기 내에 본 발명의 조성물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 단위 투여량 형태, 예를 들어, 정제, 로젠지, 캡슐 등의 형태일 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 단일-단위 용량의 조성물을 투여하도록 구성된 장치, 예를 들어, 흡입기와 같은 조성물을 투여하기 위한 장치 내에 또는 이러한 장치와 함께 제공될 수 있다.

5.8. 전달 구축물의 제조 및 테스트

바람직하게는 본 발명의 전달 구축물은, 하기에 기술되는 바와 같이, 재조합에 의해 생산된다. 그러나, 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 화학적 합성에 의해 전달 구축물을 또한 생산할 수 있다.

5.8.1. 전달 구축물의 제작

본 발명의 전달 구축물의 발현 및 정제 방법은 하기 실시예에서 광범위하게 기술된다. 일반적으로, 이러한 방법은 전달 구축물을 코딩하는 발현 벡터를 벡터로부터 발현 구축물을 발현할 수 있는 세포에 도입하는 것에 의존한다. 그 후, 전달 구축물을 정제하여 대상체에게 투여할 수 있다.

5.8.2. 전달 구축물의 테스트

전달 구축물의 도메인, 이러한 도메인들의 기능, 및 전체적인 전달 구축물의 선택을 관례적으로 테스트하여, 구축물이 구축물의 나머지 부분 없이 대상체의 접막을 가로질러 거대분자를 전달할 수 있는지를 확실히 할 수 있다. 예를 들어, 관례적인 분석법을 사용하여 전달 구축물을 세포 인식, 트랜스사이토시스 및 절단에 대해 테스트할 수 있다. 전체적인 키메라 단백질질을 테스트할 수 있거나, 또는 다양한 도메인의 기능을 야생형 독소의 천연 도메인을 이러한 도메인으로 치환하여 테스트할 수 있다.

5.8.2.1. 수용체 결합/세포 인식

표적 수용체에 결합하는 전달 구축물의 능력을 모니터링함으로써 수용체 결합 도메인 기능을 테스트할 수 있다. 이같은 테스트는 세포-기재 분석법을 사용하여, 세포 표면 상에 존재하는 표적 수용체로, 또는 무세포 분석법에서 달성할 수 있다. 예를 들어, 표적에 대한 전달 구축물 결합을 친화 크로마토그래피로 평가할 수 있다. 구축물이 친화성 컬럼 내의 매트릭스에 부착되어, 매트릭스에 대한 수용체의 결합을 검출할 수 있거나, 또는 이의 역(逆)도 가능하다. 별법으로, 수용체 결합 도메인 또는 이의 동족 수용체에 결합하는 항체가 확인된 경우, 예를 들어, 동족 수용체에 대한 경쟁 분석법에서, 또는 면역 분석법에 의해 전달 구축물 내의 수용체 결합 도메인을 검출하는데 항체를 사용할 수 있다. 세포 상의 수용체에 대한 전달 구축물 결합을 검출하는 예시적인 세포-기재 분석법은 구축물을 표지하여 세포에 대한 이의 결합을, 예를 들어, 형광 세포 분류, 자가방사선술 등에 의해 검출하는 것을 포함한다.

5.8.2.2. 트랜스사이토시스

트랜스사이토시스 도메인의 기능은 상피 막을 통과하는 전달 구축물의 능력으로서 테스트할 수 있다. 트랜스사이토시스는 세포에 결합하는 것을 먼저 필요로 하기 때문에, 이러한 분석법은 세포 인식 도메인의 기능을 평가하는데 또한 사용될 수 있다.

전달 구축물의 트랜스사이토시스 활성은 비제한적으로 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 테스트할 수 있다. 특정 실시양태에서, 전달 구축물이 결합하는 비-분극화 세포에 들어가는 전달 구축물의 능력을 평가함으로써 트랜스사이토시스 활성을 테스트할 수 있다. 임의의 특정한 이론 또는 작용 메커니즘에 구속되지 않고, 트랜스사이토시스 도메인이 분극화 상피 세포를 통과하도록 하는 동일한 성질이 또한 트랜스사이토시스 도메인을 갖는 분자가 비-분극화된 세포에 들어가도록 하는 것으로 여겨진다. 따라서, 예를 들어, 세포 내부에서의 구축물의 물리적 존재를 검출함으로써, 세포에 들어가는 전달 구축물의 능력을 평가할 수 있다. 예를 들어, 전달 구축물을, 예를 들어, 형광 마커로 표지시키고, 전달 구축물을 세포에 노출시킬 수 있다. 그 후, 세포를 세정하여, 세포에 들어가지 않은 모든 전달 구축물을 제거하고, 남아있는 표지의 양을 검출한다. 이러한 분획 내에서의 표지의 검출은 전달 구축물이 세포에 들어갔음을 가리킨다.

또다른 실시양태에서, 분극화 상피 세포를 통과하는 전달 구축물의 능력을 평가함으로써 전달 구축물의 트랜스사이토시스 능력을 테스트할 수 있다. 예를 들어, 전달 구축물을, 예를 들어, 형광 마커로 표시시키고, 한 층의 상피 세포의 최상단부 막에 접촉시킨다. 상피 세포에 의해 형성된 막의 기저-측면쪽 면 상에서 검출된 형광은 트랜스사이토시스 도메인이 적절하게 기능하고 있음을 가리킨다.

5.8.2.3. 절단가능 링커 절단

절단가능 링커의 기능을 절단 분석법에서 일반적으로 테스트할 수 있다. 비제한적으로 당업자에게 공지된 임의의 적절한 절단 분석법을 사용하여, 절단가능 링커를 테스트할 수 있다. 세포-기재 분석법 및 무세포 분석법 모두 절단가능 링커를 절단하는 효소의 능력을 테스트하는데 사용될 수 있다.

절단가능 링커의 절단을 테스트하기 위한 예시적인 무세포 분석법은 분극화 상피 세포의 추출물을 제조하는 단계 및 절단가능 링커를 갖는 표지된 전달 구축물을 막-회합 효소에 상응하는 추출물의 분획에 노출시키는 단계를 포함한다. 이같은 분석법에서, 표지는 전달될 거대분자 또는 전달 구축물의 나머지 부분 중 어느 한쪽에 부착될 수 있다. 이러한 효소들 중에, 상기 기술된 바와 같이, 분극화 상피 세포의 기저-측면 막 근처에서 발견되는 절단 효소들이 있다. 예를 들어, 전달 구축물을 예를 들어 항체와 결합시키고 결합되지 않은 분자를 세척하여 제거함으로써 절단을 검출할 수 있다. 전달될 거대분자에 표지가 부착된 경우, 항체에 결합된 분자 상에서 표지가 거의 관찰되지 않거나 관찰되지 않아야 한다. 별법으로, 분석법에서 사용된 결합제는 거대분자에 특이적일 수 있고, 구축물의 나머지 부분이 표지될 수 있다. 모든 경우에, 절단을 평가할 수 있다.

막으로 조립된 분극화 상피 세포에 의한 절단을 테스트하는 세포-기재 분석법을 사용하여 절단을 또한 테스트할 수 있다. 예를 들어, 링커의 절단을 허용하는 조건 하에 적절한 상피 세포, 예를 들어, Coco-2 세포 단층의 최상단부 또는 기저측면부 면에 절단가능 링커를 포함하는 표지된 전달 구축물 또는 전달 구축물의 일부분을 접촉시킬 수 있다. 전달 구축물 또는 이의 일부분에 특이적으로 결합하는 시약을 사용하여 표지의 존재 또는 부재를 검출함으로써 절단을 검출할 수 있다. 예를 들어, 항체에 결합된 전달 구축물의 부분에 관하여 절단가능 링커의 원위부에 표지를 포함하는 전달 구축물에 결합하는, 전달 구축물에 특이적인 항체를 사용할 수 있다. 그 후, 항체에 결합된 분자 상의 표지의 존재를 검출함으로써 절단을 평가할 수 있다. 절단이 발생하였으면, 항체에 결합된 분자 상에서 표지가 거의 관찰되지 않거나 관찰되지 않아야 한다. 이같은 실험을 수행함으로써, 최상단부 막보다 기저측면 막에서 우선적으로 절단하는 효소를 확인할 수 있고, 또한 전달 구축물 내의 절단가능 링커를 절단하는 이같은 효소의 능력을 확인할 수 있다.

또한, 미국 특허 6,759,207에 기술된 바와 같은 형광 리포터(reporter) 분석법을 사용하여 절단을 또한 테스트할 수 있다. 간략하게, 이같은 분석법에서는, 형광 리포터가 절단 효소가 리포터를 절단하도록 하는 조건 하에 적절한 상피 세포의 단층의 기저측면부 면에 접촉된다. 리포터의 절단에 의해 형광 리포터의 구조가 변화되어, 리포터가 비-형광 구조에서 형광 구조로 변화하게 된다. 관찰된 형광의 양은 기저측면 막에 존재하는 절단 효소의 활성을 가리킨다.

또한, 분자 내부적으로 켄칭(quenching)된 분자 프로브, 예컨대 미국 특허 6,592,847에 기술된 것들을 사용하여 절단을 또한 테스트할 수 있다. 이같은 프로브는 적합한 파장의 빛으로 여기될 때 광자를 방출하는 형광 모이어티, 및 형광 모이어티에 아주 근접한 경우 이같은 광자를 흡수하는 켄처(quencher) 모이어티를 일반적으로 포함한다. 프로브의 절단에 의해 형광이 검출될 수 있도록 켄칭 모이어티가 형광 모이어티로부터 분리됨으로써, 절단이 발생하였음을 가리킨다. 따라서, 절단 효소가 프로브를 절단하도록 하는 조건 하에 적절한 상피 세포의 단층의 기저측면부 면을 프로브와 접촉시킴으로써 이같은 프로브를 사용하여 특정 절단 효소에 의한 절단을 확인 및 평가할 수 있다. 관찰된 형광의 양은 테스트되는 절단 효소의 활성을 가리킨다.

실시예

6. 실시예

하기의 실시예들은 단지 본 발명을 설명하기 위한 것이고, 어떠한 방식으로든 본 발명을 한정하는 것으로 의도되지 않는다.

6.1. 전달 구축물의 구축

래트 성장 호르몬 (rGH)을 전달하기 위한 5개의 예시적인 전달 구축물 발현 벡터를 하기의 프로토콜에 따라 구축하였다. 먼저, rGH 유전자를 PCR에 의해 증폭시켜, PCR 생성물의 두 말단에 NdeI 및 EcoRI, PstI 및 PstI, AgeI 및 EcoRI, 또는 PstI 및 EcoRI 부위의 제한효소 쌍을 혼입시켰다. 제한 효소 소화 후, 상응하는 제한 효소 쌍으로 소화된 pPE64-PstI-Δ553 내로 PCR 생성물을 클로닝하였다. 생성된 구축물을 pPE-RGH(NdeI-EcoRI), pntPE-RGH(PstI), pntPE-RGH(AgeI-EcoRI), 및 pPE-RGH(PstI-EcoRI)로 명명하였다. 따라서 이러한 구축물들은 ntPE의 도메인 I 및 II (도 3에 제시된 바와 같은 아미노산 26-372) 및 rGH (접근 번호 P01244; [Seeburg et al., 1977, Nature 270:486-494] 및 [Page et al., 1981, Nucleic Acids Res. 9:2087-2104] 참조)를 코딩하는 서열을 포함하고, 또한 6-His 모티프의 태그(tag)이 폴리펩티드의 N-말단에 부착되어 정제를 용이하게 한다. 최종 플라스미드를 제한 효소 소화 및 DNA 서열분석에 의해 확인하였다.

적합한 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 도입함으로써 절단가능 링커를 포함하는 발현 벡터를 구축하였다. 이렇게 하기 위해, 적합한 제한 부위에 상보적인 서열 및 하기의 아미노산 서열 중 하나를 코딩하는 올리고뉴클레오티드를 합성한 후, 상기 기술된 바와 같이 제조된 발현 벡터 내로 ntPE 서열과 rGH 사이에 결합시켰다. 전달 구축물 1에 대해서, 절단가능 링커 서열은 RQPRGGL이다. 전달 구축물 2에 대해서, 절단가능 링커 서열은 GGLRQPR이다. 전달 구축물 3에 대해서, 절단가능 링커 서열은 RQPREGR이다. 전달 구축물 4에 대해, 절단가능 링커 서열은 RQPRVGR이다. 전달 구축물 5에 대해, 절단가능 링커 서열은 RQPRARR이다.

융합 단백질이 항원 제시 세포에 의해 포획되는 경우에 rGH를 PE 단백질로부터 분리하기 위해, 단백질분해효소 푸린(furin) 부위를 절단가능 링커와 rGH 사이에 또한 삽입하였다. 이렇게 하기 위해, 5가지 상이한 절단가능 링커와 함께 푸린 부위를 코딩하는 서열을 함유하는 구축물을 제조하였다. 5가지 절단가능 링커에 대한 올리고뉴클레오티드 서열 및 푸린 클립 부위가 하기 표 3에 제시된다. 각각의 올리고 듀플렉스(duplexe)를 pPE-RGH(PstI-EcoRI)의 PstI 부위 내로 삽입하였다. pPE-RGH-F1, pPE-RGH-F2, pPE-RGH-F3, pPE-RGH-F4, pPE-RGH-F5로 명명된 최종 구축물들을 제한 효소 소화 및 DNA 서열분석에 의해 확인하였다.

[표 3]

푸린 절단 부위 및 단백질분해효소 절단 부위를 도입하기 위한 올리고뉴클레오티드 쌍	
pPE-RGH-1	1 F: AACTGCAGCGCCAGCCTCGAGGAGGATTACTGCAGAA (서열 24) 1 R: TTCTGCAGTAATCCTCCTCGAGGCTGGCGCTGCAGTT (서열 25)
pPE-RGH-2	2 F: AACTGCAGGGAGGCTTACGCCAGCCTCGACTGCAGAA (서열 26) 2 R: TTCTGCAGTCGAGGCTGGCGTAAGCCTCCCTGCAGTT (서열 27)
pPE-RGH-3	3 F: AACTGCAGCGCCAGCCTCGAGAGGGCCGTCTGCAGAA (서열 28) 3 R: TTCTGCAGACGGCCCTCTCGAGGCTGGCGCTGCAGTT (서열 29)
pPE-RGH-4	4 F: AACTGCAGCGCCAGCCTCGAGTCGGCCGTCTGCAGAA (서열 30) 4 R: TTCTGCAGACGGCCGACTCGAGGCTGGCGCTGCAGTT (서열 31)
pPE-RGH-5	5 F: AACTGCAGCGCCAGCCTCGAGCACGTCTGTCTGCAGAA (서열 32) 5 R: TTCTGCAGACGACGTGCTCGAGGCTGGCGCTGCAGTT (서열 33)

6.2. 전달 구축물의 발현

대장균 BL21(DE3) pLysS 수용성 세포 (Novagen, Madison, WI)를 적합한 플라즈미드의 존재 하에 표준 열-충격 방법을 사용하여 형질전환시켜, ntPE-래트 성장 호르몬 (rGH) 발현 세포를 생성시키고, 앰피실린-함유 배지에서 선별하고, 단리하여, 항생제가 있는 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 브로쓰 (Difco; Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.)에서 성장시킨 후, OD 0.6에서 1 mM 이소프로필-D-티오갈락토피라노시드 (IPTG)의 첨가에 의해 단백질 발현을 유도하였다. IPTG 유도 2시간 후, 5,000 rpm에서 10분 동안의 원심분리에 의해 세포를 수확하였다. 세포 용해 후 봉입체를 단리하고, 단백질을 100 mM 트리스-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 6 M 구아니딘 HCl, 및 65 mM 디티오프레이톨을 함유하는 버퍼에 용해시켰다. 용해된 His ntPE-rGH는 0.1 M 트리스 (pH=7.4), 500 mM L-아르기닌, 0.9 mM GSSG, 2 mM EDTA의 존재 하에 리폴딩(refolding)된다. 리폴딩된 단백질을 Q 세파로스 이온 교환 및 수퍼텍스 200 겔 여과 크로마토그래피 (Amersham BioSciences, Inc., Sweden)에 의해 정제하였다. 단백질의 순도를 SDS-PAGE 및 분석용 HPLC (Agilent, Inc. Palo Alto, CA)에 의해 평가하였다.

6.3. 전달 구축물의 특징화

하기의 절차를 사용하여 전달 구축물의 적합한 리폴딩을 평가하였다. 단백질 리폴딩 프로세스는 제조업자의 지시에 따라 비아코어(Biacore) SPR 설비 (Biacore, Sweden) 상에서 ntPE 결합 수용체, CD 91 수용체, 및 rGH 결합 단백질과 전달 구축물 1 결합 활성을 예를 들어 측정함으로써 모니터링한다. 예시적인 구축물 내의 다른 거대분자의 적합한 리폴딩을 적절한 결합제로 유사한 결합 분석법에서 테스트할 수 있다. 이같은 결합 친화력을 테스트함으로써, 당업자는 전달 구축물의 각각의 부분의 적합한 폴딩을 평가할 수 있다.

6.4. 전달 구축물 절단 분석법

본 실시예는 본원에 기술된 전달 구축물의 절단가능 링커를 절단하는데 사용될 수 있는 효소를 확인 및 증명하기 위해 수행된 실험을 기술한다. 먼저, 계대 21의 Caco-2 (ATCC 접근 번호 HTB-37) 세포를 아메리칸 타입 컬렉션 (American Type Culture Collection (Manassas, VA))으로부터 취득하였다. 인간 기관 상피 (HTE) 세포를 [Department of Physiology at University of California, Davis Medical School]의 J. Whiddecombe로부터 취득하였다. 75 cm² 플라스틱 배양 플라스크 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 상에서 10% 소 태아 혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 내에서 37°C에서 5% CO₂/95% 공기 대기에서 Caco-2 세포를 관례적으로 성장시켰다. HTE 세포는 [Yamaya et al., 1992, Am J Physiol. 262(6 Pt 1):L713-24]에 기술된 바와 같이 성장시켰다.

적절한 절단가능 링커를 확인하기 위해, HTE 또는 Caco-2 세포를 5 × 10⁴ 개의 세포/cm²의 밀도로 24-웰 콜라겐-코팅 폴리카르보네이트 트랜스웰 필터 (Corning, Acton, MA) 상으로 12-14일 동안 파종하였다. EVOM 상피 볼트옴미터 (voltohmmeter) 및 STX2 전극 (World Precision Instruments, Sarasota, FL)을 사용하여 측정했을 때, 전면(confluent) 단층으로 >500 옴 · cm²의 상피투과 저항 (transepithelial resistance (TER))이 달성되었다. 특이적인 효소 활성을 결정하기 위해, 테스트된 펩티드분해효소에 특이적인 기질 (FBS 또는 항생제가 없는 250 μl DMEM 내의 500 μM 또는 1 mM 기질)을 단층의 최상단부 (AP) 또는 기저측면부 (BL) 면에 첨가하였다. 펩티드분해효소 기질은 Calbiochem, Inc. (Division of EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA)로부터 취득하였다. 세포를 2시간 동안 37°C에서 5% CO₂/95% 공기 대기에서 인큐베이션하였다. 그 후, 최상단부 및 기저측면 배지 모두를 제조업자의 지시에 따라 이의 특이적 효소 활성에 대해 측정하였다. 절단에 의해 기질 상에 존재하는 형광 작용제로부터 케칭제가 분리되고, 이러한 분리는 형광이 검출되도록 하기 때문에, 절단을 반영하는 기질의 형광을 검출함으로써 절단을 평가하였다.

표 4는 HTE 세포를 사용한 이러한 분석법의 결과의 요약을 제시하고, 표 5는 Caco-2 세포를 사용한 이러한 분석법의 결과의 요약을 제시한다. 모든 결과에 대해, 기준선 대조군 값을 기질 값으로부터 뺀 후에 백분율을 결정하였고, 테스트를 적어도 이중으로 수행하였다. 표에 제시된 백분율은 최상단부 또는 기저측면 배지에서 분석법에서 관찰된 백분율 증가를 나타내고, 이는 막의 어느쪽이 더 높은 펩티드분해효소 활성을 나타내는지에 좌우된다. 기질이 막의 최상단부 면 상의 배지에 첨가된 경우에도, 막을 가로지르는 기질의 확산으로 인해 막의 기저측면부 면에서 펩티드분해효소 활성이 관찰될 수 있다는 것을 주지하여야 한다.

[표 4-1]

HTE 세포에서 테스트된 펩티드분해효소	% AP>BL	% BL>AP	AP A405nm	BL A405nm
AP-500 uM 카텡신 B I	86%		0.37	0.20
BL-500 uM 카텡신 B I	64%		0.35	0.21
AP-500 uM 카텡신 G I	882%		0.04	0.004
BL-500 uM 카텡신 G I	6%		0.02	0.02
AP-500 uM 카텡신 G II	371%		0.02	0.01
BL-500 uM 카텡신 G II	0%	0%	0.02	0.02
AP-500 uM 카텡신 G III		11%	0.02	0.02
BL-500 uM 카텡신 G III		400%	0.01	0.03
AP-500 uM 키모트립신 I	74%		0.04	0.02
BL-500 uM 키모트립신 I		36%	0.03	0.04
AP-500 uM 엘라스타제 I	49%		0.05	0.03
BL-500 uM 엘라스타제 I		23%	0.02	0.03
AP-500 uM 엘라스타제 II	43%		0.29	0.20
BL-500 uM 엘라스타제 II	31%		0.18	0.13
AP-500 uM 엘라스타제 III	89%		0.04	0.02
BL-500 uM 엘라스타제 III	967%		0.03	0.003
AP-500 uM 엘라스타제 IV	84%		0.35	0.19
BL-500 uM 엘라스타제 IV	65%		0.23	0.14
AP-500 uM 엘라스타제 VIII	529%		0.16	0.03
BL-500 uM 엘라스타제 VIII	181%		0.09	0.03
AP-500 uM 파파인	57%		0.02	0.02
BL-500 uM 파파인	5%		0.03	0.03
AP-500 uM 서브틸리신 A I		9%	0.02	0.02
BL-500 uM 서브틸리신 A I		3000%	0.001	0.03
AP-500 uM 서브틸리신 A II	21%		0.02	0.02
BL-500 uM 서브틸리신 A II		55%	0.01	0.02
AP-500 uM 트롬빈 I	42%		0.15	0.11
BL-500 uM 트롬빈 I		15%	0.09	0.10
AP-500 uM 트롬빈 II	445%		0.40	0.07
BL-500 uM 트롬빈 II	741%		0.41	0.05

[표 4-2]

AP-500 uM 유로키나제 I	8%		0.11	0.10
BL-500 uM 유로키나제 I		4%	0.13	0.13
AP-1 mM 카텡신 B I	17%		0.18	0.15
BL-1 mM 카텡신 B I	42%		0.24	0.17
AP-1 mM 카텡신 G I	114%		0.05	0.02
BL-1 mM 카텡신 G I		47%	0.02	0.03
AP-1 mM 카텡신 G II	138%		0.05	0.02
BL-1 mM 카텡신 G II	19%		0.03	0.03
AP-1 mM 카텡신 G III	225%		0.07	0.02
BL-1 mM 카텡신 G III		54%	0.02	0.03
AP-1 mM 키모트립신 I	35%		0.06	0.04
BL-1 mM 키모트립신 I		90%	0.04	0.07
AP-1 mM 엘라스타제 I		108%	0.02	0.03
BL-1 mM 엘라스타제 I		864%	0.01	0.09
AP-1 mM 엘라스타제 II	62%		0.28	0.17
BL-1 mM 엘라스타제 II	42%		0.33	0.23
AP-1 mM 엘라스타제 III	318%		0.02	0.01
BL-1 mM 엘라스타제 III	131%		0.04	0.02
AP-1 mM 엘라스타제 IV	94%		0.41	0.21
BL-1 mM 엘라스타제 IV	61%		0.30	0.19
AP-1 mM 엘라스타제 VIII	233%		0.14	0.04
BL-1 mM 엘라스타제 VIII	41%		0.06	0.05
AP-1 mM 파파인	424%		0.02	0.004
BL-1 mM 파파인	141%		0.02	0.01
AP-1 mM 서브틸리신 A I	18%		0.03	0.03
BL-1 mM 서브틸리신 A I		290%	0.01	0.04
AP-1 mM 서브틸리신 A II	17%		0.03	0.02
BL-1 mM 서브틸리신 A II		318%	0.01	0.04
AP-1 mM 트롬빈 I	27%		0.17	0.14
BL-1 mM 트롬빈 I	28%		0.17	0.13
AP-1 mM 트롬빈 II	20%		0.12	0.10
BL-1 mM 트롬빈 II		13%	0.05	0.06
AP-1 mM 유로키나제 I		14%	0.19	0.21
BL-1 mM 유로키나제 I	4%		0.21	0.20

[표 5-1]

Caco-2 세포에서 테스트된 펩티드분해효소	% AP>BL	% BL>AP	AP A405nm	BL A405nm
AP-500 uM 카텡신 B I	150%		0.14	0.06
BL-500 uM 카텡신 B I	34%		0.17	0.12
AP-10 mM 카텡신 G I	195%		0.31	0.10
BL-10 mM 카텡신 G I		145%	0.42	1.03
AP-500 uM 카텡신 G III	35%		0.014	0.01
BL-500 uM 카텡신 G III	185%		0.03	0.01
AP-500 uM 카텡신 G I	232%		0.05	0.01
BL-500 uM 카텡신 G I		1709%	0.01	0.15
AP-500 uM 카텡신 G II	3900%		0.01	0.0003
BL-500 uM 카텡신 G II		1330%	0.003	0.04
AP-500 uM 키모트립신 I		342%	0.01	0.04
BL-500 uM 키모트립신 I		403%	0.03	0.16
AP-500 uM 엘라스타제 I	73%		0.01	0.01
BL-500 uM 엘라스타제 I	295%		0.04	0.01
AP- 500 uM 엘라스타제 II	59%		0.12	0.07
BL- 500 uM 엘라스타제 II		89%	0.01	0.02
AP-500 uM 엘라스타제 III	85%		0.01	0.07
BL-500 uM 엘라스타제 III		320%	0.003	0.01
AP- 500 uM 엘라스타제 IV	32%		0.11	0.08
BL- 500 uM 엘라스타제 IV		12%	0.02	0.02
AP-500 uM 엘라스타제 VIII		16%	0.02	0.02
BL-500 uM 엘라스타제 VIII		115%	0.01	0.02
AP-500 uM 파파인		19%	0.018	0.02
BL-500 uM 파파인	339%		0.07	0.02
AP-500 uM 서브틸리신 A I		***23%	-	0.05
BL-500 uM 서브틸리신 A I		***94%	-	0.20
AP-500 uM 서브틸리신 A II	N/A		-	-
BL-500 uM 서브틸리신 A II		***11%	-	0.02
AP-500 uM 트롬빈 I	81%		0.04	0.02
BL-500 uM 트롬빈 I		254%	0.01	0.04
AP-트롬빈 II 500 uM	42%		0.08	0.06
BL-트롬빈 II 500 uM	62%		0.09	0.06
AP-500 uM 유로키나제 I	111%		0.12	0.06
BL-500 uM 유로키나제 I		1044%	0.005	0.05
AP-1 mM 카텡신 B I	109%		0.27	0.13
BL-1 mM 카텡신 B I		58%	0.12	0.2
AP-20 mM 카텡신 G I		129%	0.10	0.23
BL-20 mM 카텡신 G I		540%	0.11	0.70
AP-1 mM 카텡신 G III	37%		0.01	0.01
BL-1 mM 카텡신 G III	103%		0.07	0.03
AP-1 mM 카텡신 G I	107%		0.08	0.04
BL-1 mM 카텡신 G I	144%		0.12	0.05
AP-1 mM 카텡신 G II		11%	0.05	0.06
BL-1 mM 카텡신 G II		7850%	0.00	0.04
AP-1 mM 키모트립신 I	107%		0.08	0.04
BL-1 mM 키모트립신 I		288%	0.02	0.07

[표 5-2]

AP-1 mM 엘라스타제 I	217%		0.03	0.001
BL-1 mM 엘라스타제 I		880%	0.003	0.02
AP-1 mM 엘라스타제 II	27%		0.17	0.14
BL-1 mM 엘라스타제 II		34%	0.02	0.03
AP-1 mM 엘라스타제 III	192%		0.02	0.01
BL-1 mM 엘라스타제 III	77%		0.02	0.01
AP-1 mM 엘라스타제 IV	42%		0.16	0.11
BL-1 mM 엘라스타제 IV		10%	0.04	0.05
AP-1 mM 엘라스타제 VIII	70%		0.05	0.03
BL-1 mM 엘라스타제 VIII	332%		0.11	0.03
AP-1 mM 파파인	61%		0.02	0.01
BL-1 mM 파파인		0%	0.005	0.005
AP-1 mM 서브틸리신 A I		***61%	-	0.13
BL-1 mM 서브틸리신 A I		***44%	-	0.09
AP-1 mM 서브틸리신 A II	N/A		-	-
BL-1 mM 서브틸리신 A II	N/A		-	-
AP-1 mM 트롬빈 I	420%		0.11	0.02
BL-1 mM 트롬빈 I		3400%	0.005	0.16
AP-트롬빈 II 1 mM	163%		0.14	0.05
BL-트롬빈 II 1 mM	29%		0.11	0.09
AP-1 mM 유로키나제 I	57%		0.17	0.11
BL-1 mM 유로키나제 I		230%	0.05	0.15

***는 기준선 대조군만을 초과하는 비율(%)을 나타낸다.

"-"는 기준선 대조군 미만의 값을 나타낸다

6.5. 예시적인 거대분자 - 녹색 형광 단백질의 전달

하기의 실시예는 마우스 상피 막을 가로질러 녹색 형광 단백질 ("GFP")을 전달하기 위한 예시적인 전달 구축물의 트랜스사이토시스를 평가하기 위해 수행된 실험을 기술한다. 이러한 예시적인 전달 구축물이 절단가능 링커를 포함하지 않는다는 것을 주지하여야 한다; 그러나, 절단가능 링커의 존재 또는 부재는 전달 구축물의 트랜스사이토시스에 영향을 미치지 않는다.

간략하게, nt-PE-GFP 구축물을 약 8주령의 마취된 암컷 balb/c 마우스의 기관에 적용하였다. 마우스를 이소플루란 흡입으로 마취시키고, 기관을 노출시켰다. 기관 상에 작은 구멍을 만들어 본 발명의 GFP 물질을 적용하였다. 본 발명의 실험에서, 100 µg의 GFP 단독 또는 ntPE-GFP를 각각 사용하였다. GFP 물질을 100 µl 부피로 노출된 기관 상에 직접 천천히 점적하였다. 15분후, 마우스를 CO₂ 질식으로 안락사시켰다. 기관을 옮기고, 생검 냉동주형(cryomold) (카탈로그#4565-Tissue Tek)을 사용하여 OCT (카탈로그#25608-930-Tissue Tek)에서 동결시켰다. 샘플을 슬라이드 상에 절편화시키고, 형광 현미경 (Nikon model Eclipse E400)에 의해 가시화시켰다.

상피 절편의 현미경사진이 도 1A-1C에 제시된다. 도 1A는 기관 상피의 최상단부 표면에 강력하게 접촉된 nt-PE-GFP 구축물을 나타낸다. 도 1B는 기관 상피를 가로지르는 nt-PE-GFP 구축물의 트랜스사이토시스를 나타낸다. 도 1C는 기관 상피의 기저측면부 면으로부터의 nt-PE-GFP 구축물의 방출을 나타낸다. 도 1D는 단독 GFP와 접촉된 마우스로부터의 기관 상피 절편인 음성 대조군의 현미경사진을 나타낸다. 조직들을 15분 동안 노출시켜 이러한 현미경사진을 수득하였다.

현미경사진들은 nt-PE-GFP가 마우스 기관 상피의 최상단부 표면 상의 수용체와 강력하게 상호작용하고, 이같은 상피 조직을 가로질러 트랜스사이토시스되고, 마우스 기관 상피의 기저측면 표면으로부터 방출된다는 것을 설명한다.

또한, 하기 실시예 6.6.1에 기술된 바와 같은 ELISA 분석법을 사용하여 전달 구축물의 투여 후 nt-PE-GFP 구축물의 혈장 농도를 결정하였다. 투여 후 매 30분마다 100 µg의 nt-PE-GFP 전달 구축물이 비강내 투여된 마취된 마우스로부터 혈청 샘플을 취하였다. 도 2에 전달 구축물의 최고 혈장 수준이 500-900 ng/ml 사이에 도달하는 것을 나타내는 이러한 실험의 결과가 제시되고, 이는 비강내 투여 후 전달 구축물이 약 22% 생체이용율을 나타낸다는 것을 가리킨다.

6.6. 면역학적 시험에 의한 조직 내의 성장 호르몬 단백질의 검출

본 실시예는 대표적인 전달용 거대분자인 성장 호르몬의 조직 내에서의 면역학적 검출을 기술한다. 전달 구축물의 투여 후, 동물을 CO₂ 질식에 의해 안락사시키고, 심장 천자에 의해 채혈하였다. 특정 조직 (림프절, 기관, 뇌, 지라, 간, 위장관)을 제거하고, PBS에서 간략하게 세정하여 임의의 잔류 혈액을 제거하고, OCT에서 동결시켰다. 절편들 (5 마이크론 두께)을 슬라이드 상에 놓았다. 슬라이드를 아세톤에서 10분 동안 고정시키고, PBS로 헹구었다. 슬라이드를 3% 과산화효소와 함께 5분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 슬라이드를 추가로 5분 동안 단백질로 블록킹하였다. 1차 성장 호르몬 항체를 슬라이드 상에서 30분 동안 1:100 희석으로 인큐베이션한 후, PBS로 세정하였다. 그 후, 비오틴-표지된 2차 항체를 약 15분 동안 인큐베이션한 후, PBS로 세정하였다. 스트렙타비딘 HRP 표지를 슬라이드 상에서 15분 동안 인큐베이션한 후, PBS로 세정하였다. HRP 크로마젠(Chromagen)을 5분 동안 적용한 후, 증류 H₂O로 여러번 헹구었다. 마지막으로, 슬라이드를 헤마토자일린으로 1분 동안 대비염색하고, 덮개 유리를 덮고, GH의 존재에 대해 시험하였다.

6.7. 시험관내 시스템에서의 예시적인 전달 구축물의 수송 및 절단

본 실시예는 인간 기관 상피 세포를 사용하는 시험관내 시스템에서의 예시적인 전달 구축물인, 래트 성장 호르몬 (rGH)을 포함하는 전달 구축물 2의 수송 및 절단을 기술한다.

6.7.1. 인간 기관 상피 세포의 성장

인간 기관 상피 (HTE) 세포를 기존에 기술된 바와 같이 기관으로부터 단리하고, 인간 태반 콜라겐으로 코팅된 반투과성 필터 시스템 (0.45 μm 세공 크기; Corning, Acton, MA) 상에서 배양하였다. [Yamaya et al., 1992, Am J Physiol, 262:L713-24] 및 [Sachs et al., 2003, In Vitro Cell Dev Biol Anim, 39:56-62] 참조. 플레이팅 후 >10일에 세포 시트를 사용하였고, 이 시점에 "젯가락" 볼륨미터 (Millicell ERS, Manassas, VA)로 측정시 상피투과 저항 (TER)은 >100 Ω · 옴 · cm²이었다.

계대 21의 Caco-2 세포를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (Manassas, VA)으로부터 수득하였다. 세포를 75 cm² 플라스틱 배양 플라스크 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 상에서 10% 소 태아 혈청 (FBS) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 내에서 37°C에서 5% CO₂/95% 공기 대기에서 관례적으로 성장시켰다. 수송 및 절단 연구를 위해,

Caco-2 세포를 5 × 10⁴ 개의 세포/cm²의 밀도로 콜라겐-코팅된 24-웰 폴리카르보네이트 트랜스웰 필터 (Corning, Acton MA) 상에 12-14일 동안 파종하였다. EVOM 및 STX2 전극 (World Precision Instruments)을 사용하여 측정 시, 전면 단층으로 >500 Ω · cm²의 상피투과 저항 (TER)이 달성되었다.

6.7.2. 수송 및 절단 분석법

수송 및 절단 활성을 결정하기 위해, 전달 구축물 1 및 2 단백질 (페놀 레드, FBS 또는 항생제가 없는 100 μl DMEM 내의 10 μg)을 상피 단층의 최상단부 면에 첨가하였다. 세포를 4시간 동안 37°C에서 5% CO₂/95% 공기 대기에서 인큐베이션하였다. 그 후, 하기 기술되는 바와 같이, 웨스턴 블롯 분석법에 의해 전달 구축물로부터 절단된 rGH의 존재를 테스트함으로써 최상단부 및 기저측면 배지 모두를 이의 수송 및 절단 활성에 대해 분석하였다. 대조군으로서, 누출을 점검하기 위해 10 μg의 텍스트란 플루오레세인을 또한 최상단부 웰에 첨가하였다.

상기 기술된 4시간 인큐베이션 후, 트리클로로아세트산 (TCA)을 첨가하여 최상단부 및 기저측면 배지 샘플을 침전시켰다. 각각의 샘플에 첨가된 TCA의 양은 샘플 부피에 대해 20%였다. 각각의 샘플을 와류시키고, 30 분 동안 얼음 상에 놓았다. 얼음 상에서의 이러한 인큐베이션 후, 샘플을 14,000RPM에서 10분 동안 원심분리하였다. 그 다음, 각각의 샘플로부터의 상청액을 흡인하고, 나머지 펠렛을 함유하는 튜브를 개방한 채로 두어 공기 건조시켰다. 4 μl의 0.2M NaOH를 각각의 펠렛에 첨가하였다. NaOH를 첨가하고 5분 후, 펠렛을 36 μl의 8M 요소에 재현탁시켰다.

그 다음, DTT를 함유하는 샘플 버퍼 (Invitrogen NP0007, NP0009) 10 μl를 각각의 샘플에 첨가하였다. 그 후, 샘플을 100°C 가열 블럭 상에 5분 동안 놓았다. 그 후, 각각의 샘플의 절반 (19 μl)을 4%-12% 트리스 비스 젤(Tris Bis Gel) (Invitrogen NP3022BOX) 상에 로딩하였다. 대조군으로, 재조합 래트 GH (RDI R0125) 및 전달 구축물 1 또는 전달 구축물 2 단백질을 또한 젤 내로 직접 로딩하였다. 전기영동을 150V에서 30분 동안 수행하였다. 젤로부터, 샘플들을 30V에서 1시간 동안 니트로셀룰로스 상으로 옮겼다.

Invitrogen's WesternBreeze로부터의 블로킹 용액, 항체 희석물 및 항체 세정 용액을 후속 단계에서 사용하였다. 니트로셀룰로스 막을 블로킹 버퍼 내에 놓고, 4°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 막을 3회 각각 3분 동안 세정하였다. 그 후, 막을 실온에서 10ml의 1:2000 토끼 항 성장 호르몬 (RDI RDIRtGHabr.)와 함께 인큐베이션하였다. 1시간 후, 막을 다시 3회 각각 3분 동안 행구었다. 막을 1시간 동안 실온에서 10 ml의 1:5000 염소 항-토끼 IgG AP (Pierce 31340)와 함께 인큐베이션하였다. 막을 3회 각각 3분 동안 행구었다. 5 μ l의 기질 (Pierce 34042)을 막에 첨가하였다. 발색이 원하는 강도에 도달한 후, 기질 제거 및 정제수의 첨가에 의해 반응을 정지시켰다. 마지막으로, 막을 정제수에서 30분 동안 세정하고, 공기 건조시켰다.

웨스턴 블롯 분석의 결과가 도 4에 제시된다. 도 4에 나타난 바와 같이, 상피 세포 층의 기저측면부 면으로부터의 배지는 전달 구축물 2의 나머지 부분으로부터 분리된 절단된 rGH와 일치하는 단백질을 함유하였다. 반면에, 상피 세포 층의 최상단부 면으로부터의 배지는 대부분 손상되지 않은 전달 구축물을 함유하였다. 따라서, 전달 구축물 2를 인간 상피 세포막의 최상단부 면에 적용한 결과, 적합한 길보기 분자량 및 항-rGH 항체로 검출가능한 rGH의 방출에서 볼 수 있듯이 막의 기저측면부 면으로의 수송 및 구축물의 정확한 절단 모두가 초래되었다. 유사한 결과가 전달 구축물 1에 대해 또한 관찰되었다 (데이터는 제시되지 않음).

6.8. 생체내 시스템에서의 예시적인 거대분자의 전달

본 실시예는 마우스 모델에서의 예시적인 전달 구축물 2의 사용을 기술하고, 생체내에서의 전달 구축물의 효과적인 수송 및 절단, 및 전달 구축물 2에 의해 전달된 거대분자인 rGH의 생체이용율을 나타낸다.

6.8.1. 래트 성장 호르몬을 포함하는 전달 구축물의 투여

동물 급식 바늘을 사용하여, 100 μ g의 전달 구축물 2 (250 μ l의 전체 부피)를 5-6주령의 암컷 BALB/c 마우스 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA)에 경구 전달하였다. 전달 구축물 2를 1 mg/ml 소 혈청 알부민 (BSA) 및 포스페이 트 완충 염수 (PBS)에 희석하였다. 양성 대조군으로서, PBS에 희석된 재조합 래트 성장 호르몬 (rGH) 30 μ g (100 μ l의 전체 부피)을 대조군 마우스에게 등쪽에서 피하 (SC) 주사하였다. 경구 위관영양 및 SC 투여 후 특정 시점에 마우스를 CO₂ 질식에 의해 안락사시키고, 채혈하였다. 전혈 및 간을 수집하고, 하기 기술되는 바와 같이 분석하였다. 전달 구축물 2와 rGH 간의 분자량 차이로 인해, 본질적으로 동일한 갯수의 rGH 분자가 양쪽 경로로 투여되었다.

6.8.2. 생체내 시스템에서의 전달 구축물로 전달된

예시적인 거대분자의 약동학

전달 구축물로 전달된 예시적인 거대분자의 약동학을 평가하기 위해, ELISA 분석법을 사용하여 투여 후 특정 시점에 rGH의 혈청 농도를 측정하였다. 이렇게 수득된 혈청 농도 데이터를 사용하여 전달 구축물 2로 투여된 rGH의 약동학을 통상적인 피하 투여로 관찰된 것과 비교하였다. 하기와 같이 ELISA 분석법을 수행하였다.

코스타(Costar) 9018 E.I.A./R.I.A. 96-웰 플레이트를 0.2M NaHCO₃-Na₂CO₃ (pH 9.4) 내의 200 ng/웰의 염소 항-rGH (Diagnostics Systems Laboratories, 카달로그# R01235)로 하룻밤 동안 코팅하였다. 각각의 96-웰 플레이트를 0.05% 트윈(Tween) 20-0.01% 티메로살을 함유하는 PBS (세정 버퍼)로 4회 세정하고; 1시간 동안 200 μ l/웰의 0.5% BSA-0.01% 티메로살을 함유하는 PBS/트윈 20 (분석 버퍼)로 블로킹하였다. 분석 버퍼 (PBST-0.5%BAS)에 희석된 재조합 래트 GH (Diagnostics Systems Laboratories, 카달로그# R01205)를 사용하여 표준 곡선을 제조하였다. 50 μ l의 재조합 래트 GH를 10 ml (1:200)의 분석 버퍼에 첨가하여 표준 곡선의 첫번째 포인트를 제조하고, 와류시키고, 200 μ l를 800 μ l의 분석 버퍼 (1:5)로 이동시켰다. 각각의 플레이트에 대해, 모든 후속 포인트에 대해 1:2 연속 희석을 수행함으로써 0.5 ml를 0.5 ml 분석 버퍼로 이동시켰다. 표준 곡선의 10가지 포인트는 하기와 같다: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 및 0.195 ng/웰. 샘플들을 1:10으로 분석 버퍼로 희석하고, 100 μ l/웰로 삼중으로 96-웰 플레이트 상에 로딩하고, 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 각각의 96-웰 플레이트를 세정 버퍼로 4회 세정하고, 분석 버퍼 (PBST-0.5% BSA) 내의 1:300의 2차 항체 (토끼 항-rGH, Cell Sciences, 카달로그# PAAC1)를 100 μ l/웰로 로딩하고, 실온에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 각각의 96-웰 플레이트를 세정 버퍼로 4회 세정하고, 분석 버퍼 (PBST-0.5% BSA) 내의 1:2000의 3차 항체 (염소 항-토끼 IgG-양고추냉이 과산화효소 (HRP), Pierce, 카달로그# 31460)를 100 μ l/

웰로 로딩하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 모든 인큐베이션 및 코팅 단계는 실온에서 6 RPM의 진탕기 상에서 수행하였다. 결합된 항체를 정량하기 위해 사용된 HRP 기질인 TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)을 450nm에서 측정하였다.

ELISA 결과는 각각의 샘플의 삼중 OD (450 nm) 값의 평균으로 보고된다. 래트 GH 농도는 초과하는 평균 값 더하기 적절한 대조군 값의 평균 표준 편차 (SEM) \times 3에 의해 결정되었다.

ELISA 분석법의 결과가 도 5-7에 제시된다. 도 5는 30 μ g의 비-글리코실화 재조합 래트 GH가 피하 (SC) 주사에 의해 투약된 BALB/c 마우스에서의 혈청 rGH 농도를 나타낸다. 개별적인 마우스 혈청을 1:10 희석으로 테스트하였고, rGH 농도의 균 평균을 보고하였다 (시점 당 n=마우스 4마리). 평균 표준 오차 (SEM)가 오차 막대에 의해 지시되었다. 도 5에 나타난 바와 같이, 약 240 ng/ml rGH의 최고 혈청 농도가 rGH를 피하 투여한 지 30분 후에 관찰되었다.

도 6은 100 μ g의 전달 구축물 2가 경구 투약된 BALB/c 마우스에서의 혈청 rGH 농도를 나타낸다. 개별적인 마우스 혈청을 1:10 희석으로 테스트하였고, rGH 농도의 균 평균을 보고하였다 (시점 당 n=마우스 4마리). 평균 표준 오차 (SEM)가 오차 막대에 의해 지시되었다. 도 6에 나타난 바와 같이, 약 280 ng/ml rGH의 최고 혈청 농도가 전달 구축물 2를 투여한 지 20분 후에 관찰되었다.

도 7은 피하 전달된 rGH 및 전달 구축물 2로 전달된 rGH의 약동학을 비교하는 그래프식 표현이다. PK 솔루션 2.0, 약동학 데이터 분석 (Summit Research Services, Montrose, CO)을 사용하여 상기 기술된 바와 같은 ELISA 데이터를 평가함으로써 rGH (SC)와 전달 구축물 2 (경구) 간의 곡선 맞춤 비교를 수행하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, rGH의 피하 투여에 비해 전달 구축물 2로 실질적으로 더 높은 최고 혈청 rGH 농도가 산출되었다. 또한, 최고 혈청 농도가 피하 rGH에 비해 전달 구축물 2로 더 빨리 달성되었다. 관찰된 전달 구축물 2로 전달된 rGH의 생체이용율은 피하 주사에 의해 투여된 rGH에 비해 약 60%였다.

6.8.3. 전달 구축물로의 전달 후 거대분자의 활성을 나타내는 분석법

본 실시예는 생체내 시스템에서 전달 구축물 2로 전달된 예시적인 거대분자인 rGH의 생물학적 효과의 분석법을 기술한다. 간략하게, 인슐린-유사 성장 인자 I-결합 단백질 3 (IGF-I-BP3), 성장 호르몬 (GH) 수용체 및 인슐린-유사 성장 인자 I (IGF-I) 발현 수준을 상기 기술된 바와 같이 전달 구축물 2 또는 피하 rGH가 투여된 마우스로부터의 간 조직에서 평가하였다. GH가 이의 수용체에 결합하는 것의 IGF-I-BP3 및 GH 수용체 수준에 대한 잘 규명된 효과로 인해 이러한 전사물들을 분석하였다. 특히, GH에 의한 결합 후 GH 수용체의 기능적 활성화는 IGF-I-BP3의 상향조절 및 GH 수용체 발현의 하향조절을 초래하는 것으로 공지되어 있다. 이들 중, IGF-I-BP3 mRNA 발현의 상향 조절이 GH 수용체 활성화의 가장 신뢰할 수 있는 지표인 것으로 여겨진다. 예를 들어, [Sondergaard et al., 2003, Am J Physiol Endocrinol Metab 285:E427-32] 참조.

따라서, 정략적 실시간 PCR을 사용하여 상기 기술된 바와 같이 제조된 마우스 간 조직 약 30 mg 내의 IGF-I-BP3, GH 수용체, IGF-I, 및 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소 (GAPDH) mRNA의 양을 검출 및 정량하였다. 추가적으로 프로세싱할 때까지 수집된 간 조직을 -70°C 에서 보관하였다. PCR의 실시간 검출은 [Applied Biosystems 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)]을 사용하여 수행하였다. 마우스 간으로부터의 전체 RNA를 [RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen)]에 따라 단리하였다. 전체 RNA를 사용하여, [Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen)]에 대한 프로토콜에 따라 올리고 dT 올리고데옥시뉴클레오티드 프라이머 (T12- 18)에 대한 cDNA를 생성시켰다. cDNA를 증폭시키는데 사용된 프라이머는 프라이머 익스프레스(Primer Express) 소프트웨어 (Applied Biosystems)를 사용하여 디자인되었고, Operon (Alameda, CA)에 의해 합성되었으며, 표 6에 제시된다

[표 6]

RT-PCR 프라이머	
IGF-I-BP3 (전방향):	CGCAGAGAAATGGAGGACACA;
IGF-I-BP3 (역방향):	GGACGCCTCTGGGACTCA;
GH 수용체 (전방향):	GTTGACGAAATAGTGCAACCTGAT;
GH 수용체 (역방향):	CACGAATCCCGGTCAAACCTAA;
IGF-I (전방향):	GCTATGGCTCCAGCATTTCG;
IGF-I (역방향):	GCTCCGGAAGCAACTCA
GAPDH (전방향):	GCAACAGGGTGGTGGACCT
GAPDH (역방향):	GGATAGGGCCTCTTGTCTCA

등량의 cDNA를 이중으로 사용하였고, [SYBR Green I Master Mix (Applied Biosystems)]으로 증폭시켰다. 열 사이클링 파라미터는 하기와 같았다: 10분 동안 95°C에서 열 활성화, 및 40 사이클의 PCR (15초 동안 95°C에서 용융 및 1분 동안 60°C에서 어닐링(anealing)/신장). 대조군 마우스 간 샘플로부터의 전체 RNA의 희석 곡선 (1:10, 1:100, 1:500, 1:1,000, 1:2,000)으로 표준 곡선을 구축하였다. "주형이 없는 대조군"이 각각의 PCR에 포함되었다. 증폭 효율을 확인하고, GAPDH에 대해 표준화하였다. 정확한 PCR 생성물 크기를 브롬화에티딴으로 염색된 1% 아가로스 겔에서의 전기영동에 의해 확인하였다. 증폭된 PCR 생성물의 순도를 열-해리 프로토콜에 의해 결정하였다.

이러한 분석의 결과가 도 8-10에 제시된다. 도 8은 피하 주사에 의해 30 µg의 재조합 rGH로 처리된 또는 경구 위관영양에 의해 100 µg의 전달 구축물 2로 처리된 암컷 BALB/c 마우스의 간에서의 IGF-I-BP3 mRNA의 발현 수준을 나타낸다. 상기 기술된 바와 같은 IGF-I-BP3에 특이적인 프라이머를 사용하여 간으로부터 추출된 전체 RNA에 정량적 RT-PCR을 실시하였다. 값들은 글리세르알데히드-3 포스페이트 탈수소효소 (GAPDH)에 대해 표준화되었고, 대조군의 비율(%)로 표현되었다. 도 8에 나타난 바와 같이, rGH를 피하 투여한 결과, 투여 60분 후에 간에서의 IGF-1-BP3 mRNA 발현 수준이 약 250% 증가하였다. 반면에, 전달 구축물 2로는 투여 30분 후 간에서의 IGF-1-BP3 mRNA 발현 수준이 거의 400% 증가되었다. 따라서, 전달 구축물 2의 경구 투여가 rGH를 테스트 마우스의 혈류에 효과적으로 전달함으로써, 전달 구축물이 활성 거대분자를 생체내 시스템에서 짐막을 가로질러 효과적으로 전달할 수 있다는 것을 나타냈다. 또한, 전달 구축물 2는 피하 투여보다 더욱 활성인 rGH를 간에 전달하였고, rGH의 투여 효과가 rGH의 피하 투여로 가능한 것보다 실질적으로 더 빠르게 관찰되었다.

도 9는 피하 주사 (30 µg)에 의해 재조합 랫트 성장 호르몬 (rGH)로 또는 경구 위관영양 (100 µg)에 의해 전달 구축물 2로 처리된 암컷 BALB/c 마우스의 간에서의 성장 호르몬 (GH) 수용체 mRNA의 발현 수준을 나타낸다. 상기 제시된 바와 같은 GH 수용체에 특이적인 프라이머를 사용하여 간으로부터 추출된 전체 RNA에 정량적 RT-PCR을 실시하였다. 값들은 글리세르알데히드-3 포스페이트 탈수소효소 (GAPDH)에 대해 표준화되었고, 대조군의 비율(%)로 표현되었다. 도 9에 나타난 바와 같이, rGH를 피하 투여한 결과, 투여 60분 후 간에서의 GH 수용체 mRNA 발현 수준이 투여 전에 관찰된 수준의 약 65%로 감소되었다. 반면에, 전달 구축물 2로는 이같은 mRNA 수준이 투여 전에 관찰된 수준의 약 15%로 감소되었다. 따라서, 이러한 결과로 전달 구축물 2의 경구 투여가 rGH를 대상체의 혈류에 전달하는데 효과적이라는 것, 및, 추가로, GH 수용체 mRNA 발현의 증강된 하향조절에 의해 제시되는 바와 같이 전달 구축물 2가 통상적인 rGH의 피하 투여보다 현저하게 더욱 활성인 rGH를 마우스 간에 전달한다는 것이 확인된다.

도 10은 피하 주사 (30 µg)에 의해 재조합 랫트 성장 호르몬 (rGH)로 또는 경구 위관영양 (100 µg)에 의해 전달 구축물 2로 처리된 암컷 BALB/c 마우스의 간에서의 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) mRNA의 발현 수준을 나타낸다. 상기 제시된 바와 같은 IGF-I에 특이적인 프라이머를 사용하여 간으로부터 추출된 전체 RNA에 정량적 RT-PCR을 실시하였다. 값들은 글리세르알데히드-3 포스페이트 탈수소효소 (GAPDH)에 대해 표준화되었고, 대조군의 비율(%)로 표현되었다. 도 10에 나타난 바와 같이, 피하 rGH 또는 전달 구축물 2의 투여로 투여 30분 후 간에서의 IGF-I mRNA 발현 수준이 투여 전에 관찰된 수준의 약 20%로 감소되었다. 따라서, 피하 rGH 및 경구 투여된 전달 구축물 2 모두로 동일한 효과가 산출되었고, 이는 전달 구축물 2가 활성 rGH를 혈류에 전달할 수 있다는 것을 가리킨다.

6.9. 전달 구축물로 투여된 거대분자의 감소된 면역원성

본 실시예는 전달 구축물 2로 경구 투여된 예시적인 거대분자인 rGH가 피하 투여된 rGH보다 덜 면역원성이라는 것을 나타낸다.

피하 투여에 비해 전달 구축물로 투여된 rGH에 대한 마우스에서의 상대적인 면역원성을 평가하기 위해, 3, 10, 또는 30 μg 의 전달 구축물 2의 경구 투여, 또는 3 또는 10 μg 의 피하 rGH로부터의 항-rGH IgG 항체의 혈청 역가를 ELISA 분석법에서 결정하였다. 이렇게 하기 위하여, 코팅 버퍼 (0.2 M $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$, pH 9.4) 내에 희석된 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 재조합 rGH 100 μl 를 코스타 EIA/RIA 플레이트에 첨가한 후, 실온에서 16-24시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 플레이트를 300 μl 의 세정 버퍼 (포스페이트-완충 염수)로 4회 세정하였다. 그 후, 플레이트를 200 μl 의 블로킹 버퍼 (포스페이트 완충 염수 내의 0.5% BSA)로 블로킹하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 플레이트를 다시 300 μl 의 세정 버퍼로 4회 세정하였다.

플레이트의 제조 후, 100 μl 의 희석된 샘플, 표준 양성 대조군, 또는 음성 대조군으로서의 분석 버퍼를 적절한 웰에 첨가하고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 마우스 혈청 샘플 및 양성 대조군 (항-rGH IgG)을 분석 버퍼 (포스페이트 완충 염수 내의 0.5% BSA)에서 1:20으로 희석하였다. 그 후, 플레이트를 300 μl 의 세정 버퍼로 4회 세정하였다. 다음으로, 분석 버퍼 내에 1:6000로 희석된 100 μl 의 2차 항체 (양고추냉이 과산화효소가 접합된 염소 항-마우스 IgG, 0.4 mg/ml , Pierce # 31430)를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 플레이트를 다시 300 μl 의 세정 버퍼로 4회 세정하였다. 다음으로, 100 μl 의 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 기질 (Sigma)을 각각의 웰에 첨가하고, 발색에 따라 2-10분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 100 μl /웰의 1M H_2SO_4 를 첨가하여 반응을 정지시키고, 흡광도를 450 nm에서 판독하였다. 모든 분석을 삼중으로 수행하였고, 결과를 평균내었다.

ELISA의 대표적인 결과가 도 11A-D에 제시된다. 이러한 도면에서 제시된 그래프는 경구 투여된 3, 10, 및 30 μg 의 전달 구축물 2가 3 또는 10 μg 의 피하 rGH보다 더 낮은 역가의 항-rGH IgG 항체를 도출해냈다는 것을 나타낸다. 특히, 10 μg rGH의 피하 투여는 모든 8마리의 마우스에서 실질적인 항-rGH IgG 응답을 야기한 반면, 3, 10, 또는 30 μg 의 전달 구축물 2가 경구 위관영양에 의해 투여된 8마리의 마우스에서는 항-rGH IgG 응답이 최소였다. 또한, 이러한 관찰은 혈청이 1:25 (도 11A 및 11C) 또는 1:200 (도 11B 및 11D)로 희석되었는지와 상관없이 일관적이었다. 마지막으로, 도 11C 및 D의 데이터 포인트들의 촘촘한 클러스터링(clustering)에서 보이는 바와 같이, 3, 10, 또는 30 μg 의 전달 구축물 2가 투여된 각각의 마우스는 rGH에 대한 최소의 면역 응답을 경험하였다는 것을 주지하여야 한다. 따라서, 이러한 결과들은 전달 구축물 2의 경구 투여가 피하 주사로 가능한 것보다 더욱 활성인 rGH를 간에 전달할 뿐만 아니라, 또한 피하 투여와 비교하여 전달 구축물 2로 경구 투여될 때 활성 rGH가 덜 면역원성이라는 것을 나타낸다.

6.10. 인간 성장 호르몬의 전달을 위한 예시적인 전달 구축물

본 실시예는 전달 구축물 6으로 명명된, 인간 성장 호르몬을 전달하기 위한 예시적인 전달 구축물의 구축을 기술한다. 상기 실시예 6.1에 기술된 것과 유사한 기술을 사용하여 전달 구축물 6을 발현시키는데 사용되는 플라스미드를 구축하였다. 예시적인 전달 구축물을 코딩하는 이러한 플라스미드의 일부분의 뉴클레오티드 서열이 도 12로 제시되고, 전달 구축물의 아미노산 서열이 도 13으로 제시된다.

6.11. 인터페론 알파의 전달을 위한 예시적인 전달 구축물

본 실시예는 전달 구축물 7로 명명된, IFN α (이 경우 IFN α -2b)를 전달하기 위한 예시적인 전달 구축물의 구축을 기술한다. 상기 실시예 6.1에 기술된 것과 유사한 기술을 사용하여 전달 구축물 7을 발현시키는데 사용되는 플라스미드를 구축하였다. 예시적인 전달 구축물 7을 코딩하는 이러한 플라스미드의 일부분의 뉴클레오티드 서열이 도 14로 제시되고, 전달 구축물 7의 아미노산 서열이 도 15로 제시된다.

6.12. 생체내 시스템에서의 인터페론 알파의 전달

본 실시예는 IFN α -2b를 마우스 모델 시스템에서 대상체의 혈류에 전달하기 위한 전달 구축물 7의 용도를 설명한다.

동물 급식 바늘을 사용하여, 100 μg 의 전달 구축물 7 (250 μl 의 전체 부피)를 5-6주령의 암컷 BALB/c 마우스 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA)에 경구 투여하였다. 전달 구축물 7을 1 mg/ml 소 혈청 알부민 (BSA) 및 포스페이트 완충 염수 (PBS)에 희석하였다. 경구 위관영양 및 SC 투여 후 특정 시점에 마우스를 CO_2 질식에 의해 안락사시키고, 채혈하였다. 전혈을 수집하고, 하기 기술되는 바와 같이 분석하였다.

ELISA 분석법을 사용하여, IFN α -2b의 혈청 농도를 투여 직후에 마우스 한 마리에서, 그리고 마우스 세 마리에서 투여 15분 후, 30분 후 및 75분 후에 측정하였다. ELISA 분석은 제조업자의 지시에 따라 R&D Systems 혈청 ELISA 키트 41110-1호를 사용하여 수행하였다.

ELISA 결과는 각각의 샘플의 삼중 OD (450 nm) 값의 평균으로 보고된다. ELISA 분석 결과가 도 16에 제시된다. 도 16에 나타난 바와 같이, IFN α -2b가 투여 15분 후에 낮은 (약 3 ng/ml) 농도로 검출되었다. 투여 30분 후, IFN α -2b의 혈청 농도는 약 43 ng/ml였다. 투여 45분 후, IFN α -2b의 혈청 농도는 약 13 ng/ml로 떨어졌다.

6.13. 프로인슐린의 전달을 위한 예시적인 전달 구축물

본 실시예는 전달 구축물 8로 명명된, 프로인슐린을 전달하기 위한 예시적인 전달 구축물의 구축을 기술한다. 상기 실시예 6.1에 기술된 것과 유사한 기술을 사용하여 전달 구축물 8을 발현시키는데 사용되는 플라스미드를 구축하였다. 전달 구축물 8의 아미노산 서열이 도 17로 제시된다.

6.14. 인슐린의 전달을 위한 예시적인 전달 구축물

본 실시예는 전달 구축물 9로 명명된, 인슐린을 전달하기 위한 예시적인 전달 구축물의 구축을 기술한다. 특정한 변형과 함께 상기 실시예 6.1에 기술된 것과 유사한 기술을 사용하여 전달 구축물 9를 발현시키는데 사용되는 플라스미드를 구축하였다.

특히, 인슐린은 2개의 분리된 아미노산 사슬을 포함하기 때문에, 전달 구축물 9를 발현시키는데 사용된 계획이 변형된다. 이러한 실시예에서, 인슐린의 B-사슬은 실시예 6.1에 제시된 일반적인 계획에 따라 구축된, 전달 구축물의 나머지 부분과 함께 발현된다. A-사슬에 상응하는 아미노산은 합성에 의해 제조되거나 (예를 들어, 아미노산들로부터 A-사슬 펩티드를 화학적으로 합성함), 또는 재조합에 의해 합성된다 (예를 들어, 적절한 재조합 시스템, 예를 들어, 대장균, 효모 등에서 발현됨). 그 후, A-사슬과 B-사슬의 회합을 허용하는 조건 하에 2개의 폴리펩티드 사슬이 합쳐진다. 그 후, 마일드한 산화 조건의 적용에 의해 디설피드 결합이 천연 인슐린에서 발견되는 바와 같이 인슐린의 2개의 사슬 간에 이루어진다. 전달 구축물 9의 2개의 아미노산 사슬의 아미노산 서열이 도 17로 제시된다.

본 발명은 대상체에서 면역 응답을 유도하는 전달 구축물 및 방법을 특히 제공한다. 많은 구체적인 실시예들이 제공되었지만, 상기의 기술은 본 발명을 한정하기보다는 설명하기 위한 것이다. 본 명세서의 재고 시 본 발명의 많은 변형이 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 범주는 상기의 기술과 관련되어 결정되지 않아야 하고, 대신 첨부된 청구항의 전체적인 범주의 등가물과 함께 첨부된 청구항과 관련되어 결정되어야 한다.

본 출원에 인용된 모든 간행물 및 특허 문헌은 각각의 개별적인 간행물 또는 특허 문헌이 개별적으로 나타내어진 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 거명에 의해 전체적으로 포함된다. 이러한 문헌들의 인용은 임의의 특정한 참고문헌이 본 발명에 대해 "종래 기술"이라는 것을 승인하지는 않는다.

[표 7-1]

클래스에 의한 인간 펩티드 분해 효소				
아스코르틴-유형 펩티드 분해 효소	시스테인-유형 펩티드 분해 효소	메탈로펩티다제	세린-유형 펩티드 분해 효소	트레오닌-유형 펩티드 분해 효소
BAE1_HUMAN (P56817)	BLMH_HUMAN (Q13867)	AMPB_HUMAN (Q9H4A4)	ACRL_HUMAN (P58840)	PS7L_HUMAN (Q8TAA3)
BAE2_HUMAN (Q9Y5Z0)	CATB_HUMAN (P07858)	AMPE_HUMAN (Q07075)	ACRO_HUMAN (P10323)	PSA1_HUMAN (P25786)
CATD_HUMAN (P07339)	CATC_HUMAN (P53634)	AMPN_HUMAN (P15144)	APQA_HUMAN (P08519)	PSA2_HUMAN (P25787)
CATE_HUMAN (P14091)	CATF_HUMAN (Q9UBX1)	ARTI_HUMAN (Q9NZ08)	BSS4_HUMAN (Q9GZN4)	PSA3_HUMAN (P25788)
NAP1_HUMAN (Q96009)	CATH_HUMAN (P09668)	LCAP_HUMAN (Q9UIQ6)	CIR_HUMAN (P00736)	PSA4_HUMAN (P25789)
PEPA_HUMAN (P00790)	CATK_HUMAN (P43235)	LKHA_HUMAN (P09960)	CIS_HUMAN (P09871)	PSA5_HUMAN (P28066)
PEPC_HUMAN (P20142)	CATL_HUMAN (P07711)	PSA_HUMAN (P55786)	CAP7_HUMAN (P20160)	PSA6_HUMAN (P60900)
RENI_HUMAN (P00797)	CATO_HUMAN (P43234)	RNPL_HUMAN (Q9HAU8)	CATG_HUMAN (P08311)	PSA7_HUMAN (O14818)
VPRT_HUMAN (P10265)	CATS_HUMAN (P25774)	THDE_HUMAN (Q9UKU6)	CFAB_HUMAN (P00751)	PSB1_HUMAN (P20618)
	CATW_HUMAN (P56202)	ACEF_HUMAN (P22966)	CFAD_HUMAN (P00746)	PSB2_HUMAN (P49721)
기타 펩티드 분해 효소	CATZ_HUMAN (Q9UBR2)	ACE_HUMAN (P12821)	CEA1_HUMAN (P05156)	PSB3_HUMAN (P49720)
FAC2_HUMAN (Q9Y256)				

[표 7-2]

CSI2_HUMAN (Q60911)	MERP_HUMAN (P52888)	CLCR_HUMAN (Q99895)	PSB4_HUMAN (P28070)
TNAG_HUMAN (Q9UW2)	NEUL_HUMAN (Q9BYT8)	CO2_HUMAN (P06811)	PSB5_HUMAN (P28074)
CANI_HUMAN (P07384)	PMIP_HUMAN (Q99797)	CORI_HUMAN (Q9Y3Q5)	PSB6_HUMAN (P28072)
CAN2_HUMAN (P17655)	MM01_HUMAN (P03956)	CRAR_HUMAN (P48740)	PSB7_HUMAN (Q99436)
CAN3_HUMAN (P20807)	MM02_HUMAN (P08253)	CTRB_HUMAN (P17538)	PSB8_HUMAN (P28062)
CAN5_HUMAN (O15484)	MM03_HUMAN (P08254)	CTRL_HUMAN (P40313)	PSB9_HUMAN (P28065)
CAN6_HUMAN (Q9Y6Q1)	MM07_HUMAN (P09237)	DESI_HUMAN (Q9UL52)	PSBA_HUMAN (P40306)
CAN7_HUMAN (Q9Y6W3)	MM08_HUMAN (P22894)	EL1_HUMAN (Q9UN11)	
CAN9_HUMAN (O14815)	MM09_HUMAN (P14780)	EL2A_HUMAN (P08217)	
CANA_HUMAN (Q9HC96)	MM10_HUMAN (P09238)	EL2B_HUMAN (P08218)	
CANB_HUMAN (Q9UNQ6)	MM11_HUMAN (P24347)	EL3A_HUMAN (P09093)	
UBL1_HUMAN (P09936)	MM12_HUMAN (P39900)	EL3B_HUMAN (P08861)	
UBL3_HUMAN (P15374)	MM13_HUMAN (P45452)	ELNE_HUMAN (P08246)	
UBL5_HUMAN (Q9Y5K5)	MM14_HUMAN (P50281)	ENTK_HUMAN (P98073)	
GP18_HUMAN (Q92643)	MM15_HUMAN (P31511)	FA10_HUMAN (P00742)	
LGMN_HUMAN (Q99538)	MM16_HUMAN (P31512)	FA11_HUMAN (P03951)	
CELA_HUMAN (O15519)	MM17_HUMAN (Q9ULZ9)	FA12_HUMAN (P00748)	
IIBC_HUMAN (P29466)	MM19_HUMAN (Q99542)	FA7_HUMAN (P08709)	
ICE2_HUMAN (P42575)	MM20_HUMAN (O60882)	FA9_HUMAN (P00740)	

[표 7-3]

ICE3_HUMAN (P42574)	MM21_HUMAN (Q8N119)	GRAA_HUMAN (P12544)	
ICE4_HUMAN (P49662)	MM24_HUMAN (Q9Y5R2)	GRAB_HUMAN (P10144)	
ICE5_HUMAN (P51878)	MM25_HUMAN (Q9NPA2)	GRAH_HUMAN (P20718)	
ICE6_HUMAN (P55212)	MM26_HUMAN (Q9NRE1)	GRAK_HUMAN (P49863)	
ICE7_HUMAN (P55210)	MM28_HUMAN (Q9H239)	GRAM_HUMAN (P51124)	
ICE8_HUMAN (Q14790)	EMPI_HUMAN (P13497)	HATT_HUMAN (O60235)	
ICE9_HUMAN (P55211)	MEPA_HUMAN (Q16819)	HEPS_HUMAN (P05981)	
ICEA_HUMAN (Q92851)	MEPB_HUMAN (Q16820)	HGFA_HUMAN (Q04756)	
ICEE_HUMAN (P31944)	AD02_HUMAN (Q99965)	HGFL_HUMAN (P26927)	
MLTI_HUMAN (Q9UDY8)	AD07_HUMAN (Q9H2U9)	HGF_HUMAN (P14210)	
PGPI_HUMAN (Q9NXX5)	AD08_HUMAN (P78325)	HPTR_HUMAN (P00739)	
FAFX_HUMAN (Q93008)	AD09_HUMAN (Q13443)	HPY_HUMAN (P00738)	
FAPY_HUMAN (O000507)	AD10_HUMAN (O14672)	KAL_HUMAN (P03952)	
UBI0_HUMAN (Q14694)	AD11_HUMAN (O75078)	KLK1_HUMAN (P06870)	
UBI1_HUMAN (P51784)	AD12_HUMAN (O43184)	KLK2_HUMAN (P20151)	
UBI2_HUMAN (O75317)	AD15_HUMAN (Q13444)	KLK3_HUMAN (P07288)	
UBI3_HUMAN (Q92995)	AD17_HUMAN (P78336)	KLK4_HUMAN (Q9Y5K2)	
UBI4_HUMAN (P54578)	AD18_HUMAN (Q9Y3Q7)	KLK5_HUMAN (Q9Y337)	
UBI5_HUMAN (Q9Y4E8)	AD19_HUMAN (Q9H013)	KLK6_HUMAN (Q92876)	

[표 7-4]

UB16_HUMAN (Q9Y5T5)	AD20_HUMAN (Q43506)	KLK7_HUMAN (P49862)	
UB18_HUMAN (Q9UMW8)	AD21_HUMAN (Q9UKJ8)	KLK8_HUMAN (Q60259)	
UB19_HUMAN (Q94966)	AD22_HUMAN (Q9P0K1)	KLK9_HUMAN (Q9UKQ9)	
UB20_HUMAN (Q9Y2K6)	AD28_HUMAN (Q9UKQ2)	KLKA_HUMAN (Q43240)	
UB21_HUMAN (Q9UK80)	AD29_HUMAN (Q9UKF5)	KLKB_HUMAN (Q9UBX7)	
UB22_HUMAN (Q9UP79)	AD30_HUMAN (Q9UKF2)	KLKC_HUMAN (Q9UKR0)	
UB24_HUMAN (Q9UPU5)	AD33_HUMAN (Q9BZ11)	KLKD_HUMAN (Q9UKR3)	
UB25_HUMAN (Q9UHP3)	AT10_HUMAN (Q9H324)	KLKE_HUMAN (Q9P0G3)	
UB26_HUMAN (Q9BXU7)	AT12_HUMAN (P58397)	KLKF_HUMAN (Q9H2R5)	
UB28_HUMAN (Q96R02)	AT14_HUMAN (Q8WXS8)	LCLP_HUMAN (P34168)	
UB29_HUMAN (Q9HBJ7)	AT15_HUMAN (Q8TE58)	MAS2_HUMAN (Q00187)	
UB32_HUMAN (Q8NFA0)	AT16_HUMAN (Q8TE37)	MCT1_HUMAN (P23946)	
UB33_HUMAN (Q8TEY7)	AT17_HUMAN (Q8TE56)	NETR_HUMAN (P56730)	
UB35_HUMAN (Q9P2H5)	AT18_HUMAN (Q8TB60)	PLAN_HUMAN (P00747)	
UB36_HUMAN (Q9P275)	AT19_HUMAN (Q8TE39)	PR27_HUMAN (Q9BQR3)	
UB37_HUMAN (Q86T82)	AT20_HUMAN (P59510)	PRN3_HUMAN (P24158)	
UB38_HUMAN (Q8NBJ4)	ATSI_HUMAN (Q9UHH8)	PRTC_HUMAN (P04070)	
UB40_HUMAN (Q9NVE5)	ATSI2_HUMAN (Q9S450)	PRTZ_HUMAN (P22891)	
UB42_HUMAN (Q9H9I4)	ATSI3_HUMAN (O15072)	PS23_HUMAN (Q95084)	

[표 7-5]

UBP4_HUMAN (Q9H0E7)	ATS4_HUMAN (Q75173)	PSS8_HUMAN (Q16651)
UB46_HUMAN (P62068)	ATS5_HUMAN (Q9UNAA0)	ST14_HUMAN (Q9Y3Y6)
UBP1_HUMAN (Q94782)	ATS6_HUMAN (Q9UKP5)	TEST_HUMAN (Q9Y6M0)
UBP2_HUMAN (O75604)	ATS7_HUMAN (Q9UKP4)	TRBB_HUMAN (P00734)
UBP3_HUMAN (Q9Y64)	ATS8_HUMAN (Q9UFP9)	TMS2_HUMAN (O15393)
UBP4_HUMAN (Q13107)	ATS9_HUMAN (Q9P2N4)	TMS3_HUMAN (P57727)
UBP5_HUMAN (P45974)	ECEL_HUMAN (P42892)	TMS4_HUMAN (Q9NRS4)
UBP6_HUMAN (P35125)	ECE2_HUMAN (Q60344)	TMS5_HUMAN (Q9H3S3)
UBP7_HUMAN (Q93009)	ECEL_HUMAN (Q95672)	TMS6_HUMAN (Q8IU80)
UBP8_HUMAN (P40818)	KELL_HUMAN (P23276)	TPA_HUMAN (P00750)
GGH_HUMAN (Q92820)	NEP_HUMAN (P08473)	TRB1_HUMAN (Q15661)
SENI_HUMAN (Q9P0U3)	PEX_HUMAN (P78362)	TRB2_HUMAN (P20231)
SEN3_HUMAN (Q9H4L4)	CBP1_HUMAN (P15085)	TRY1_HUMAN (P07477)
SEN5_HUMAN (Q96H10)	CBP2_HUMAN (P48052)	TRY2_HUMAN (P07478)
SEN6_HUMAN (Q9GZR1)	CBP4_HUMAN (Q9U442)	TRY3_HUMAN (P35030)
SEN7_HUMAN (Q9BQF6)	CBP5_HUMAN (Q8VXQ8)	TRYA_HUMAN (P15157)
SEN8_HUMAN (Q96LD8)	CBP6_HUMAN (Q8N4T0)	TRYD_HUMAN (Q9BZ13)
SNP2_HUMAN (Q9HC62)	CBPB_HUMAN (P15086)	TRYG_HUMAN (Q9NRR2)
ESP1_HUMAN (Q14674)	CBPC_HUMAN (P15088)	TSS0_HUMAN (Q9UJ8)

[표 7-7]

GCP_HUMAN (Q9NRF4)	CPVL_HUMAN (Q9H8G5)		
AMP1_HUMAN (P53582)	PRTP_HUMAN (P10619)		
PEPD_HUMAN (P12955)	RISC_HUMAN (Q9H840)		
XPP2_HUMAN (O43895)	CLPP_HUMAN (Q16740)		
AMP2_HUMAN (P50579)	LONM_HUMAN (P36776)		
P2G4_HUMAN (Q9UQ80)	SPC3_HUMAN (Q9BY50)		
POH1_HUMAN (Q04609)	SPC4_HUMAN (P21378)		
NLID2_HUMAN (Q9Y3Q0)	DPP2_HUMAN (Q9UHL4)		
NLDL_HUMAN (Q9UQQ1)	PCP_HUMAN (P42785)		
TRR1_HUMAN (P02786)	TSSP_HUMAN (Q9NQE7)		
TRR2_HUMAN (Q9UP52)	HYEP_HUMAN (P07099)		
AR31_HUMAN (O43931)	TTP1_HUMAN (O14773)		
AF32_HUMAN (Q9Y4W6)	RHB1_HUMAN (O75783)		
SPG7_HUMAN (Q9UQ90)	RHB2_HUMAN (Q9NX52)		
YME1_HUMAN (Q96TA2)	RHB4_HUMAN (P58872)		
PAPA_HUMAN (Q13219)			
FAO1_HUMAN (O75844)			
DPP3_HUMAN (Q9NY33)			
MSP2_HUMAN (O43462)			

도면의 간단한 설명

4. 도면의 간단한 설명

도 1A-1D는 녹색 형광 단백질 (GFP)을 포함하는 예시적인 전달 구축물의 마우스 기관(氣管) 상피에 대한 부착 및 이를 가로지르는 수송을 나타내는 현미경사진을 나타내고 (패널 A-C), 단독 GFP는 상피 세포에 부착하지 않는다 (패널 D).

도 2는 100 μg의 nt-PE-GFP를 마취된 마우스에 비강내 투여한 후의 혈청 nt-PE-GFP 농도의 시간에 따른 추이를 나타낸다.

도 3은 예시적인 PE의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 4는 인간의 장 상피 세포 단층에 의한 래트 성장 호르몬 (rGH)을 포함하는 예시적인 전달 구축물의 수송 및 절단을 나타내는 웨스턴 블롯(western blot)이다. 전달 구축물을 상피 세포 단층의 최상단부 면과 접촉시켜 4시간 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후 막의 기저측면부 면으로부터 분리된 배지 (레인 1)는 천연 고티기 분자량의 rGH를 함유하였고, 막의 최상단부 면으로부터의 배지 (레인 2)는 손상되지 않은 전달 구축물을 함유하였다. 레인 3 및 4는 손상되지 않은 전달 구축물 2 및 재조합 rGH를 각각 나타낸다.

도 5는 30 μg 의 비-글리코실화 재조합 래트 GH가 피하 (SC) 주사에 의해 투약된 BALB/c 마우스에서의 혈청 rGH 농도를 나타낸다. 개별적인 마우스 혈청을 1:10 희석으로 테스트하였고, rGH 농도의 군 평균을 보고하였다 (시점 당 n=마우스 4 마리). 평균 표준 오차 (SEM)가 오차 막대에 의해 지시되었다.

도 6은 100 μg 의 전달 구축물 2가 경구 투약된 BALB/c 마우스에서의 혈청 rGH 농도를 나타낸다. 개별적인 마우스 혈청을 1:10 희석으로 테스트하였고, rGH 농도의 군 평균을 보고하였다 (시점 당 n=마우스 4마리). 평균 표준 오차 (SEM)가 오차 막대에 의해 지시되었다.

도 7은 피하 전달된 rGH 및 전달 구축물 2로 전달된 rGH의 약동학을 비교하는 그래프식 표현이다.

도 8은 피하 주사에 의해 30 μg 의 재조합 rGH로 처치된 또는 경구 위관영양(gavage)에 의해 100 μg 의 전달 구축물 2로 처치된 암컷 BALB/c 마우스의 간에서의 IGF-I-BP3 mRNA의 발현 수준을 나타낸다. 상기 기술된 바와 같은 IGF-I-BP3에 특이적인 프라이머를 사용하여 간으로부터 추출된 전체 RNA에 정량적 RT-PCR을 실시하였다. 값들은 글리세르알데히드-3 포스페이트 탈수소효소 (GAPDH)에 대해 표준화되었고, 대조군의 비율(%)로 표현되었다.

도 9는 피하 주사 (30 μg)에 의해 rGH로 또는 경구 위관영양 (100 μg)에 의해 전달 구축물 2로 처치된 암컷 BALB/c 마우스의 간에서의 성장 호르몬 (GH) 수용체 mRNA의 발현 수준을 나타낸다. 상기 제시된 바와 같은 GH 수용체에 특이적인 프라이머를 사용하여 간으로부터 추출된 전체 RNA에 정량적 RT-PCR을 실시하였다. 값들은 글리세르알데히드-3 포스페이트 탈수소효소 (GAPDH)에 대해 표준화되었고, 대조군의 비율(%)로 표현되었다.

도 10은 피하 주사 (30 μg)에 의해 rGH로 또는 경구 위관영양 (100 μg)에 의해 전달 구축물 2로 처치된 암컷 BALB/c 마우스의 간에서의 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) mRNA의 발현 수준을 나타낸다. 상기 제시된 바와 같은 IGF-I에 특이적인 프라이머를 사용하여 간으로부터 추출된 전체 RNA에 정량적 RT-PCR을 실시하였다. 값들은 글리세르알데히드-3 포스페이트 탈수소효소 (GAPDH)에 대해 표준화되었고, 대조군의 비율(%)로 표현되었다.

도 11A 및 B는 3, 10, 또는 30 μg 의 전달 구축물 2 (F2)가 경구 투여된 또는 3 또는 10 μg 의 rGH가 피하 투여된 마우스의 혈청 항-rGH IgG 항체 (도 11A에서는 1:25로 희석, 도 11B에서는 1:200로 희석)를 오차 막대가 있는 그래프로 나타내고, 도 11C 및 D는 개별적인 동물들로부터의 동일한 데이터를 나타낸다.

도 12는 인간 성장 호르몬 (hGH)을 전달하기 위한 예시적인 전달 구축물인 전달 구축물 6의 뉴클레오티드 서열 (서열 34)을 나타낸다.

도 13A 및 B는 hGH를 전달하기 위한 예시적인 전달 구축물인 전달 구축물 6의 아미노산 서열 (서열 35)을 나타낸다.

도 14는 인터페론- α (IFN- α)를 전달하기 위한 예시적인 전달 구축물인 전달 구축물 7의 뉴클레오티드 서열 (서열 36)을 나타낸다.

도 15A 및 B는 IFN- α 를 전달하기 위한 예시적인 전달 구축물인 전달 구축물 7의 아미노산 서열 (서열 37)을 나타낸다.

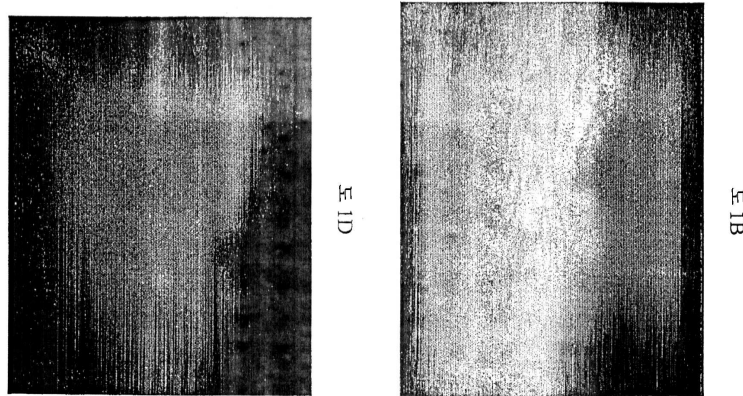
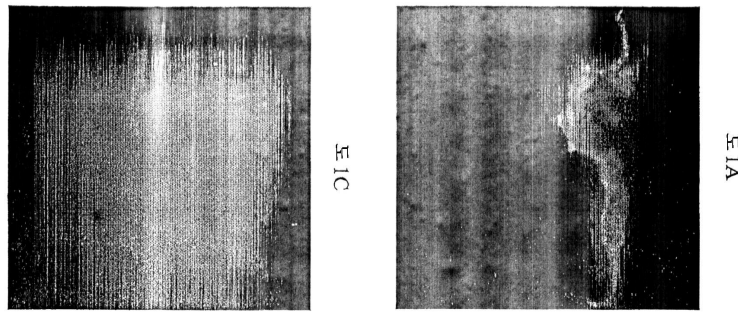
도 16은 100 μg 의 전달 구축물 8이 경구 투약된 BALB/c 마우스에서의 혈청 IFN- α 농도를 나타낸다. 개별적인 마우스 혈청을 1:10 희석으로 테스트하였고, IFN- α 농도의 군 평균을 보고하였다 (시점 당 n=마우스 3마리).

도 17A 및 B는 프로인슐린을 전달하기 위한 예시적인 전달 구축물인 전달 구축물 8의 아미노산 서열 (서열 38)을 나타낸다.

도 18A 및 B는 인슐린을 전달하기 위한 예시적인 전달 구축물인 전달 구축물 9의 2개의 아미노산 사슬의 아미노산 서열 (각각 서열 번호 39 및 40)을 나타낸다. 서열 40 (도 18B에 제시됨)의 위치 7의 시스테인과 서열 39 (도 18A에 제시됨)의 위치 381의 시스테인, 및 서열 40의 위치 20의 시스테인과 서열 39의 위치 393의 시스테인 간에 디설피드 결합이 형성된다.

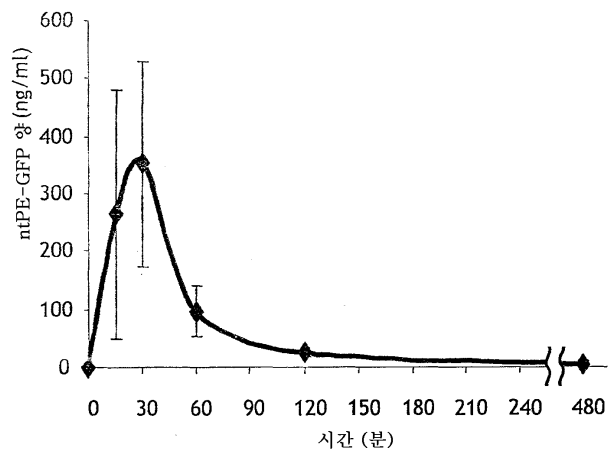
도면

도면1A



도면2

100 μ g의 비강내 적용 후
혈청 nt-PE-GFP 수준



도면3

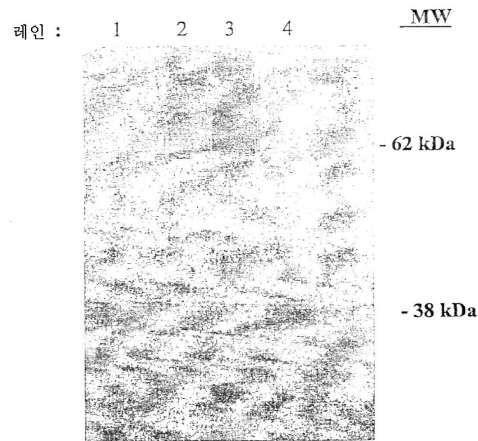
녹농균 외독소 A 아미노산 서열

도메인 I 시작 ↓
 1 mhliphwipl vaslgllagg ssasa aeef dlwnecakac vldlkdgvr^s srmsvdpai^a
 61 dtngggv^lhy smvlegg^{nda} lklaidnals itsdgtirl^l eggvep^{nkpv} rysytrg^{arg}
 121 swslnlv^{pi} ghekp^{snkv} fihelnagn^q lshmspi^{yti} emgdellak^l ardatff^{vra}
 181 hesnemq^{ptl} aishagv^{svv} maqtq^{prrek} rwsewasg^{kv} lcldp^{ldgv} yn^{yla}qgrcⁿ

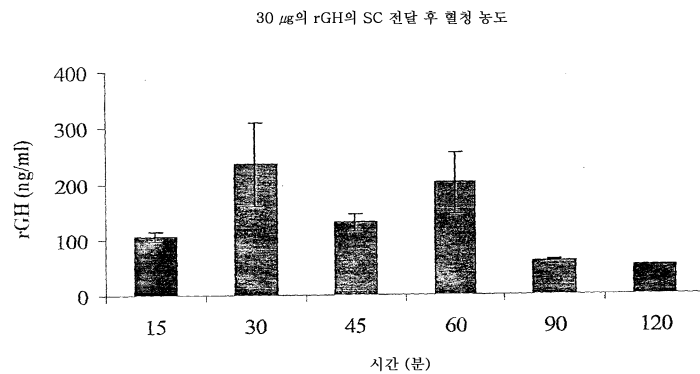
도메인 II 시작 ↓
 241 lddtweg^{kiy} rvlagn^{pakh} dldik^{ptvis} hrlhf^{peggs} laaltah^{qac} hlp^{letftrh}

↓ 푸린 클립 부위
 301 rcpr~~g~~qweqle gcgypvgrlv alylaarl^{sw} nqv^{dqvirna} laspgsg^{gd}l geaireq^{peg}
 361 arlaltl^{aaa} eserfvrggt gndeagaana dvvsl^{tcpva} agecag^{pads} gdall^{ernyp} 도메인 III 시작 ↓
 421 tgaeflg^{dgg} dvsfst^{rgtq} nwtver^{llqa} hrqle^{ergyv} fvgyh^{gtfle} aaqsiv^{fggv}
 481 rarsq^{ldai} wrgyi^{agdp} alaygy^{aqdq} epdar^{grirn} gallrvy^{vpr} sslpg^{fyrts}
 541 ltlaape^{aag} evEr^{lghpl} plrldai^{tgp} eeegrletl lgwpla^{ertv} vipsai^{ptdp}
 601 rnv^{ggldps} sipdke^{qais} alpdy^{asqpg} kppredlk

도면4

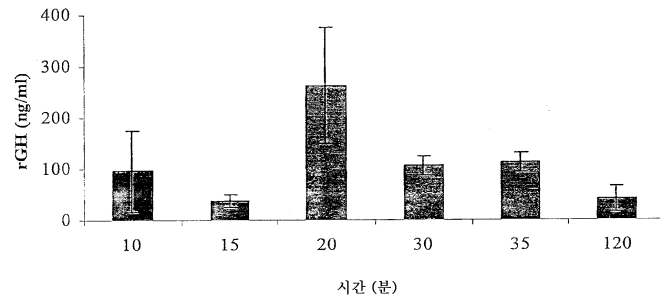


도면5

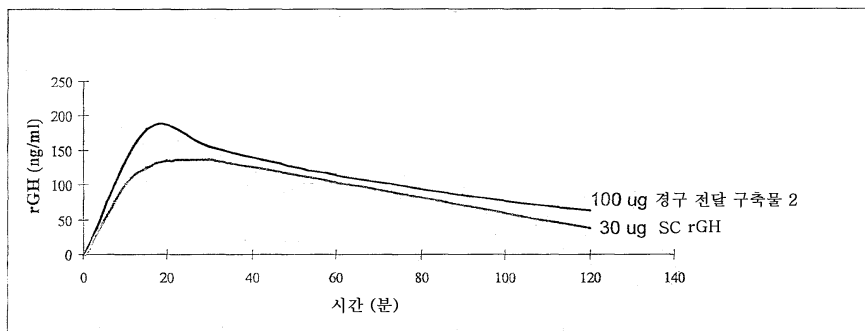


도면6

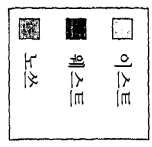
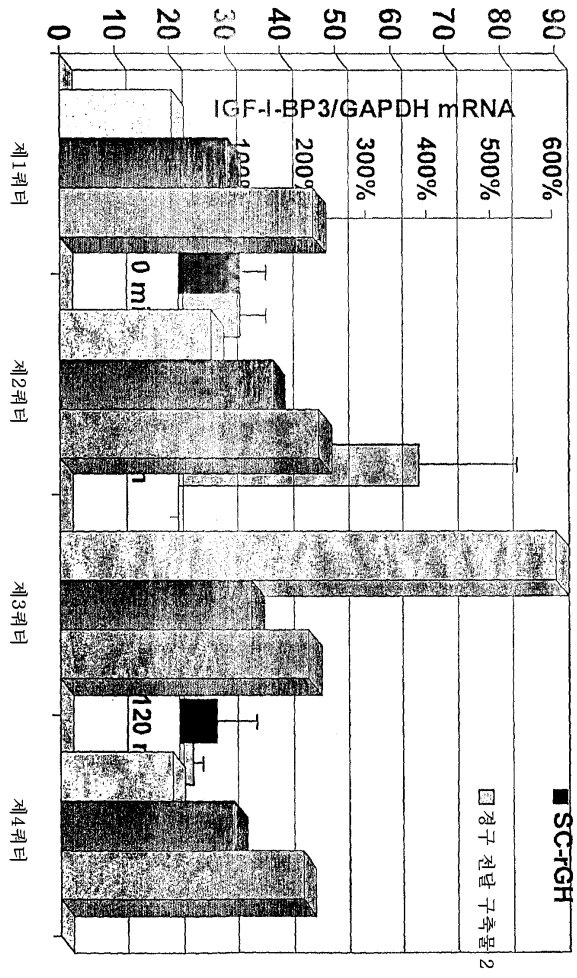
1000 μ g의 전달 구축물 2의
경구 전달 후 혈청 농도



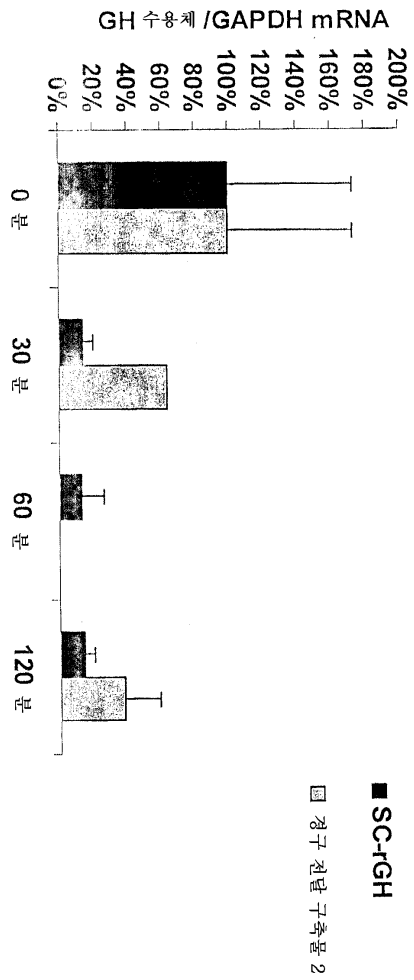
도면7



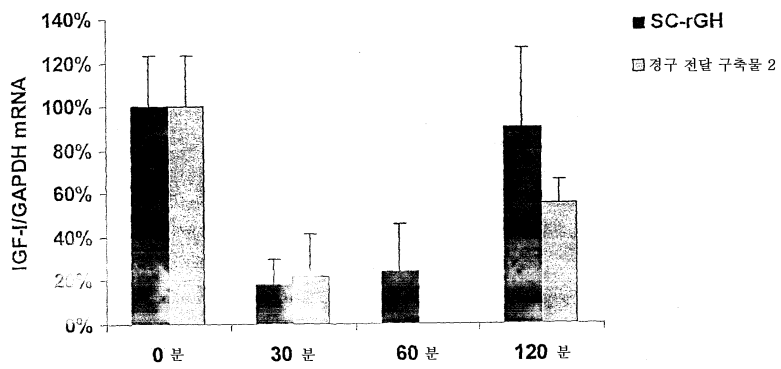
도면8



도면9

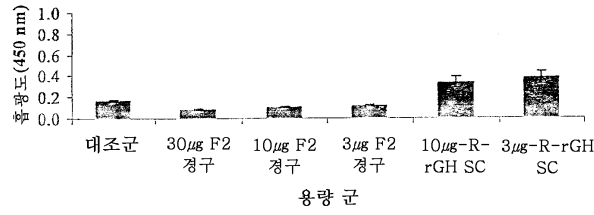


도면10



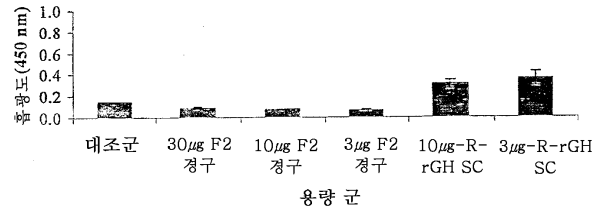
도면11A

마우스 혈청 IgG 항-rGH (1:25 희석)



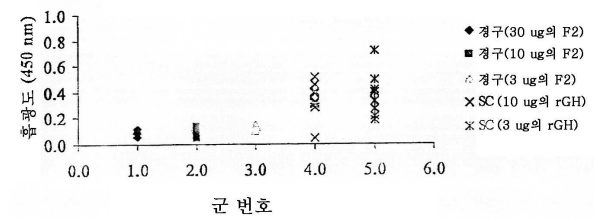
도면11B

마우스 혈청 IgG 항-rGH (1:200 희석)



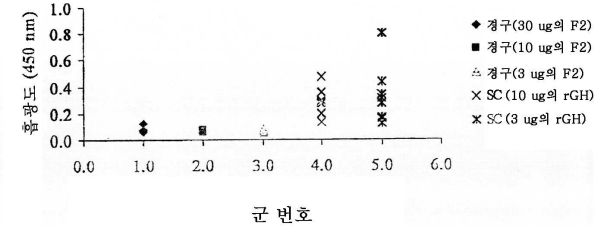
도면11C

마우스 혈청 IgG 항-rGH (1:25 희석)



도면11D

마우스 혈청 IgG 항-rGH (1:200 희석)



도면12

```

atggccgaag aagctttcga cctctggaac gaatgcgcca aagcctgogt gctcgacctc 60
aaggacggcg tgcgttccag ccgcatgagc gtcgacccgg ccatacgccga caccacacggc 120
cagggcgctgc tgcactactc catgggtcctg gagggcggca acgacgcgct caagctggcc 180
atcgacaacg cctcagcat caaccagcac gccctgacca tccgcctoga aggcggcgctc 240
gagccgaaca agccggtgcy ctacagctac acgcgccagg cgcgcggcag ttggtcgtg 300
aaactggctgg taccgatcgg ccacgagaag cctcgaaca tcaaggtggt catccaagaa 360
ctgaacgccc gcaaccagct cagccacatg tcgcccactt acaccatoga gatggcgac 420
gagttgctgg cgaagctggc gcgcatgcc accttcttcc tcagggcgca cgagagcaac 480
gagatgcagc cgaagctcgc catcagccat gccggggtca gcgtggtcct ggcccagacc 540
cagcgcgcc gggaaaagcg ctggagcga tgggccagcg gcaaggtggt gtgcctgctc 600
gacccgctgg acggggtcta caactacctc gccacgcaac gctgcaacct cgacgatacc 660
tgggaaggca agatctaacc ggtgctcgcc ggcaacccgg cgaagcatga cctggacatc 720
aaaccacggt tcatcagta tcgctcgac tttcccgag ggcgcagcct ggcccgcctg 780
accgcgcacc aggttgcca cctgcccgtg gagacttca cccgtcactc ccagccgcgc 840
ggctgggaac aactcgagca gtgcggctat ccggtgcagc ggctggctgc cctctacctg 900
gcgcgcgccg tgtcgtgaa ccaggctgac caggtgatcc gcaaccgccc gccacgcccc 960
ggcagcggcg gcgacctggc cgaagcgatc cgcgagcagc ccgagcagcc ccgttgccc 1020
ctgacctgg ccgcccgcga gagcagcgc ttctctcggc agggcaaccg caacgacgag 1080
gccggcgcg caaacctgca gggaggatta cgcagcctc gattcccagc catcccctg 1140
tcccgtctgt tcgacaacgc tatgctgct gctcacctc tgcaccagct ggctttcgac 1200
acctaccagg agttcgaaga agcatacat ccgaaaagac agaaatactc cttcctgcaa 1260
aaccgcgaga cctccctgtg cttctccgaa tcgatccgca ccccgccaaa ccgtgaagaa 1320
accacagaga aatccaacct ggagctcctg cgtatctccc tgcctgctgat ccagtcctgg 1380
ctcgagccgg ttcagttcct gcgttcctt ttctgtaact cccctggctta cgggtgctagc 1440
gactccaacg tttacgacct gctgaaagac ctggaagaag gtaaccagac cctgatgggt 1500
cgtctggaag acggttccc gcgtaccggt cagatcttca aacagaccta ctccaaattc 1560
gacaccaact cccacaacga cgaagctctg ctgaaaaact acggtctgct gtactgctc 1620
cgtaaagaca tggacaagt tgaaaccttc ctgcgtatcg ttcagtgccg ttcctgttaa 1680
ggttctcgcg gtttctaa
    
```

도면13A

Met Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys
 1 5 10 15
 Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp
 20 25 30
 Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met
 35 40 45
 Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala
 50 55 60
 Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
 85 90 95
 Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
 100 105 110
 Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
 115 120 125
 His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala
 130 135 140
 Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
 165 170 175
 Met Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
 180 185 190
 Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
 195 200 205
 Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys
 210 215 220
 Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser
 245 250 255
 Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr
 260 265 270
 Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
 275 280 285
 Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu
 290 295 300
 Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro
 305 310 315 320
 Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln
 325 330 335
 Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val
 340 345 350
 Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Leu Gln Gly
 355 360 365
 Gly Leu Arg Gln Pro Arg Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
 370 375 380

도면13B

Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
 385 390 395 400
 Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
 405 410 415
 Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
 420 425 430
 Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
 435 440 445
 Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
 450 455 460
 Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
 465 470 475 480
 Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
 485 490 495
 Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
 500 505 510
 Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
 515 520 525
 Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
 530 535 540
 Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
 545 550 555 560
 Gly Ser Cys Gly Phe
 565

도면14

```

atggccgaag aagctttcga cctctggaac gaatgcgcca aagcctgcgt gctcgaccto 60
aaggacggcg tgcgttccag cgcgatgagc gtcgaccogg ccategccga caccaacggc 120
cagggcgtgc tgcactactc catggtoctg gaggggcgca acgacggcct caagctggcc 180
atcgacaacg ccctcagcat caccagcgac ggcoctgacca tccgctoga agggggcgtc 240
gagccgaaca agccggtgcg ctacagctac acgcgccagg cgcggcgagc ttggtcgtg 300
aactggctgg tacogatcgg ccacgagaag ccctogaaca tcaagggtgtt catccacgaa 360
ctgaacgccg gcaaccagct cagccacatg tcgccgatct acaccatoga gatgggggac 420
gagttgctgg cgaagctggc gcgcgatgcc accttcttog tcaggggcga cgagagcaac 480
gagatgcagc cgacgctcgc catcagccat gccggggtoa gcgtggtcat ggcccagacc 540
cagcccgccc gggaaaagcg ctggagcga tgggccagcg gcaagggtgtt gtgcctgctc 600
gacccgctgg acggggctca caactacctc gccagcaac gctgcaacct cgacgatacc 660
tgggaaggca agatctaccg ggtgctcgcc ggcaaccogg cgaagcatga cctggacatc 720
aaaccacgg tcatcagtca tcgctgcac tttccgagg gcggcagcct ggcccgctg 780
accgcgcacc aggcttgcca cctgcccgtg gagactttca cccgtcatcg ccagccggc 840
ggctgggaac aactcgagca gtgcggctat ccggtgacg ggctggctgc cctctacctg 900
gcggcgcgcc tgtcgtggaa ccaggtcgac caggtgatcc gcaacgcctt ggccagcccc 960
ggcagcgcg cgcacctggg cgaagcgatc cgcgagcagc cggagcagge cgtctggcc 1020
ctgacctgg ccgccgccga gagcgagcgc ttctgcggc agggcaccgg caacgacgag 1080
gccggcgogg caaacctgca gggaggctta cgcagcctc gatgcgatct gctcagacc 1140
cacagcctgg gcagcaggag gacctgatg ctgctggctc agatgaggag aatcagcctg 1200
tttagctgcc tgaaggatag gcaagatctt ggtttcctc aagaggagt ttggcaaccag 1260
tttcagaagg ctgagaccat cctgtgctg cagagatga tccagagat ctttaacctg 1320
tttagacca aggatagcag cgtgcttgg gatgagacc tctgggataa gttttacacc 1380
gagctgtacc agcagctgaa cgatctggag gcttgctga tccagggcgt gggcgtgacc 1440
gagaccctc tgatgaagga ggatagcatc ctggctgtga gtagtactt tcagaggatc 1500
accctgtacc tgaaggagaa gaagtacagc cctgcccctt gggagctcgt gaggcctgag 1560
atcatgagga gctttgacct gagcaccaac ctgcaagaga gcttgaggtc taaggagtaa 1620

```

도면15A

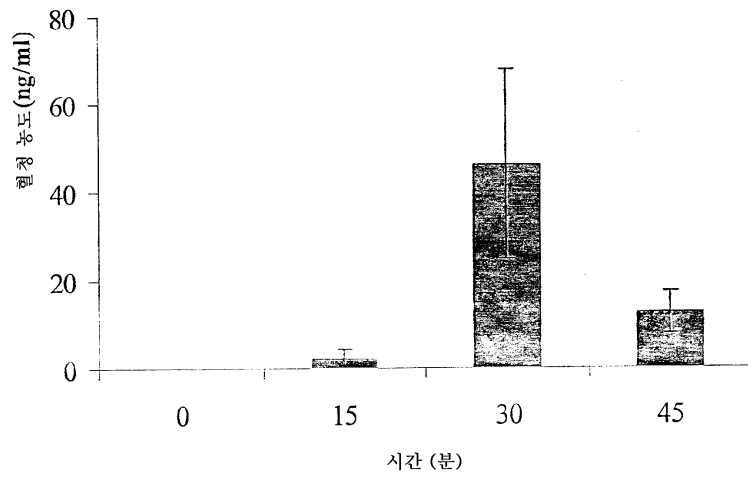
Met Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys
 1 5 10 15
 Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp
 20 25 30
 Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met
 35 40 45
 Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala
 50 55 60
 Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
 85 90 95
 Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
 100 105 110
 Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
 115 120 125
 His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala
 130 135 140
 Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
 165 170 175
 Met Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
 180 185 190
 Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
 195 200 205
 Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys
 210 215 220
 Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser
 245 250 255
 Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr
 260 265 270
 Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
 275 280 285
 Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu
 290 295 300
 Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro
 305 310 315 320
 Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln
 325 330 335
 Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val
 340 345 350
 Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Leu Gln Gly
 355 360 365
 Gly Leu Arg Gln Pro Arg Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly
 370 375 380

도면15B

Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu
 385 390 395 400
 Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu
 405 410 415
 Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu
 420 425 430
 Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala
 435 440 445
 Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln
 450 455 460
 Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr
 465 470 475 480
 Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr
 485 490 495
 Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Thr Ser Pro Cys
 500 505 510
 Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser
 515 520 525
 Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
 530 535

도면16

BALB/c 마우스에서의 100 μ g의 전달 구축물 8의 경구 전달



도면17A

Met Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys
 1 5 10 15
 Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp
 20 25 30
 Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met
 35 40 45
 Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala
 50 55 60
 Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
 85 90 95
 Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
 100 105 110
 Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
 115 120 125
 His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala
 130 135 140
 Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
 165 170 175
 Met Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
 180 185 190
 Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
 195 200 205
 Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys
 210 215 220
 Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser
 245 250 255
 Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr
 260 265 270
 Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
 275 280 285
 Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu
 290 295 300
 Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro
 305 310 315 320
 Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln
 325 330 335
 Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val
 340 345 350
 Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Leu Gln Gly
 355 360 365
 Gly Leu Arg Gln Pro Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His
 370 375 380

도면17B

Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr
 385 390 395 400
 Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val
 405 410 415
 Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu
 420 425 430
 Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
 435 440 445
 Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 450 455 460

도면18A

```

Met Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys
 1          5          10          15
Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp
 20          25          30
Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met
 35          40          45
Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala
 50          55          60
Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val
 65          70          75          80
Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
 85          90          95
Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
 100         105         110
Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
 115         120         125
His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala
 130         135         140
Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
 145         150         155         160
Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
 165         170         175
Met Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
 180         185         190
Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
 195         200         205
Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys
 210         215         220
Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
 225         230         235         240
Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser
 245         250         255
Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr
 260         265         270
Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
 275         280         285
Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu
 290         295         300
Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro
 305         310         315         320
Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln
 325         330         335
Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val
 340         345         350
Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Leu Gln Gly
 355         360         365
Gly Leu Arg Gln Pro Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His
 370         375         380
Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr
 385         390         395         400
Thr Pro Lys Thr
    
```

도면18B

```

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu
 1          5          10          15
Glu Asn Tyr Cys Asn
 20
    
```

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Mrsny, Randall J.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEEDLELESS
DELIVERY OF MACROMOLECULES

<130> 10901-014-999

<140> 11/244,349

<141> 2005-10-04

<150> 60/615,970

<151> 2004-10-04

<150> 60/684,484

<151> 2005-05-24

<150> 60/718,907

<151> 2005-09-19

<160> 40

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 266

<212> PRT

<213> *P. aeruginosa*

<220>

<223> Peptide

<400> 1

```

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

```

                180                185                190
Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg
      195                200                205
Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu
      210                215                220
Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn
      225                230                235                240
Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn
      245                250                255
Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys Pro
      260                265

```

<210> 2
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> P. aeruginosa

<220>
 <223> Polypeptide

```

<400> 2
Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala
  1                5                10                15
Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr
      20                25                30
Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr
      35                40                45
Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp
      50                55                60
Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser
      65                70                75                80
Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg
      85                90                95
Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln
      100                105                110
Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val Ser
      115                120                125
Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser
      130                135                140
Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr
      145                150

```

<210> 3
 <211> 1839
 <212> DNA
 <213> P. aeruginosa

<220>
 <223> Polynucleotide

<400> 3

```

gccgaagaag ctttcgacct ctggaacgaa tgcgcctaaag cctgctgtgt cgacctcaag 60
gacggcgtgc gttccagccg catgagcgtc gaccocggcca tcgccgacac caacggccag 120
ggcgtgtgtc actactccat ggtcctggag ggcggcaacg acgcgctcaa gctggccatc 180
gacaacgccc tcagcatcac cagcgacggc ctgacctacc gcctcgaagg cggcgtcgag 240
ccgaacaagc cgggtgcgta cagctacacg cggcaggcgc gcggcagttg gtcgctgaac 300
tggctggtac cgatcgcca cgagaagccc tcgaacatca aggtgttcat ccacgaactg 360
aacgccggca accagctcag ccacatgtcg ccgatctaca ccatcgagat gggcgacgag 420
ttgctggcga agctggcgcg cgatgccacc ttcttcgtca gggcgcacga gagcaacgag 480
atgcagccga cgctcgccat cagccatgcc ggggtcagcg tggatcatggc ccagaccag 540
ccgcgccggg aaaagcgtg gagcgaatgg gccagcggca aggtgttggt cctgctcgac 600
ccgctggacg gggctctaaa ctacctgcc cagcaacgct gcaacctcga cgatacctgg 660
gaaggcaaga tctaccgggt gctcgccggc aaccggcga agcatgacct ggacatcaaa 720
cccacggtca tcagtcatcg cctgcacttt cccgagggcg gcagcctggc cgcgctgacc 780
gcgaccagc cttgccacct gccgctggag actttcacc gtcacgcca gccgcgccc 840
tgggaacaac tggagcagtg cggctatccg gtgcagcggc tggctgccct ctacctggcg 900
gcgcggtgt cgtggaacca ggtcgaccag gtgatccgca acgccctggc cagccccggc 960
agcggcggcg acctgggcca agcgcacggc gagcagccgg agcaggccc tctggccctg 1020
accctggccg ccgccgagag cgagcgttc gtcggcagg gcaccggcaa cgacgaggcc 1080
ggcgcgccca acgccgacgt ggtgagcctg acctgcccgg tcgccgcccg tgaatgcgcg 1140
ggccccggcg acagcggcga cgccccgctg gagcgcaact atcccactgg cgcggagtgc 1200
ctcgcgacg gcggcgacgt cagcttcagc acccgcgcca cgcagaactg gacggtggag 1260
cggctgtctc aggcgcaccg ccaactggag gagcgcggct atgtgttcgt cggctaccac 1320
ggcaccttc tcgaagcggc gcaaagcacc gtcttcggcg gggctgcgcg gcgcagccag 1380
gacctcgacg cgatctggcg cggtttctat atcgccggcg atccggcgct ggcctacggc 1440
tacgcccagg accaggaacc cgacgcacgc ggccggatcc gcaacggtgc cctgctgcgg 1500
gtctatgtc cgcgctcgag cctgccgggc ttctaccgca ccagcctgac cctggcccgcg 1560
ccggaggcgg cgggcgaggt cgaacggctg atcgccacc cgctgccgct gcgcctggac 1620
gcatcaccg gccccgagga ggaaggcggg cgccctggaga ccattctcgg ctggccgctg 1680
gccgagcga ccgtggtgat tccctcgcg atccccaccg acccgcgcaa cgtcgggcggc 1740
gacctcgacc cgtccagcat ccccgacaag gaacaggcga tcagcgccct gccggactac 1800
gccagccagc ccggcaaac gccgcgagc gacctgaag 1839

```

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide

<400> 4

Ala Ala Pro Phe

1

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide

<400> 5

Gly Gly Phe

1

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide

<400> 6

Ala Ala Pro Val

1

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide

<400> 7

Gly Gly Leu

1

<210> 8

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide

<400> 8

Ala Ala Leu

1

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide

<400> 9

Phe Val Arg

1

<210> 10

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide

<400> 10

Val Gly Arg

1

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 11

Tyr Val Ala Asp Xaa

1

5

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide

<221> VARIANT

<222> 2, 3, 5

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 12

Asp Xaa Xaa Asp Xaa

1

5

<210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<221> VARIANT
<222> 2, 4
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 13
Arg Xaa Arg Xaa
1

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<221> VARIANT
<222> 2, 4
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 14
Lys Xaa Arg Xaa
1

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<221> VARIANT
<222> 6
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 15
Gly Arg Thr Lys Arg Xaa
1 5

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<221> VARIANT
<222> 5
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 16
Arg Val Arg Arg Xaa
1 5

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<221> VARIANT
<222> 6
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 17
Asp Arg Val Arg Arg Xaa
1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<221> VARIANT
<222> 2, 6
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 18
Pro Xaa Trp Val Pro Xaa
1 5

<210> 19
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 19
Trp Val Ala Xaa
1

<210> 20
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<221> VARIANT
<222> 1, 3, 4
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 20
Xaa Phe Xaa Xaa
1

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<221> VARIANT
<222> 1, 3, 4
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 21
Xaa Tyr Xaa Xaa
1

<210> 22

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide

<221> VARIANT
 <222> 1, 3, 4
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 22
 Xaa Trp Xaa Xaa
 1

<210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide

<400> 23
 Asp Arg Tyr Ile Pro Phe His Leu Leu Val Ala Pro Tyr Ser Pro Ala
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 24
 aactgcagcg ccagcctcga ggaggattac tgcagaa 37

<210> 25
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 25
 ttctgcagta atcctcctcg aggctggcgc tgcagtt 37

<210> 26

<211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide

 <400> 26
 aactgcaggg aggcttacgc cagcctcgac tgcagaa 37

 <210> 27
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide

 <400> 27
 ttctgcagtc gaggctggcg taagcctccc tgcagtt 37

 <210> 28
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide

 <400> 28
 aactgcagcg ccagcctcga gagggccgtc tgcagaa 37

 <210> 29
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide

 <400> 29
 ttctgcagac ggcctctcg aggctggcgc tgcagtt 37

 <210> 30
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide

 <400> 30

aactgcagcg ccagcctcga gtcggccgtc tgcagaa 37

<210> 31
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 31
 ttctgcagac ggccgactcg aggctggcgc tgcagtt 37

<210> 32
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 32
 aactgcagcg ccagcctcga gcacgtcgtc tgcagaa 37

<210> 33
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 33
 ttctgcagac gacgtgctcg aggctggcgc tgcagtt 37

<210> 34
 <211> 1698
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Polynucleotide

<400> 34
 atggccgaag aagctttcga cctctggaac gaatgogcca aagcctgcgt gctcgacctc 60
 aaggacggcg tgcgttccag ccgcatgagc gtcgaccggy ccatcgccga caccaacggc 120
 cagggcgtgc tgcactactc catggtcctg gagggcggca acgacgcgct caagctggcc 180
 atcgacaacg ccctcagcat caccagcgac ggctgacca tccgcctcga aggcggcgctc 240
 gagccgaaca agccggtgcy ctacagctac acgogccagg cgcgcggcag ttggtcgctg 300
 aactggctgg taccgatcgg ccacgagaag coctcgaaca tcaaggtgtt catccacgaa 360
 ctgaacgccc gcaaccagct cagccacatg tcgccgatct acaccatcga gatgggcygac 420
 gagttgctgg cgaagctggc gcgcgatgcc accttcttcg tcagggcgca cgagagcaac 480

gagatgcagc cgacgctcgc catcagccat gccgggggtca gcgtgggtcat ggcccagacc 540
 cagccgcgcc gggaaaagcg ctggagcgaa tggggccagcg gcaaggtggt gtgcctgctc 600
 gacccgctgg acgggggtcta caactacctc gccagcaac gctgcaacct cgacgatacc 660
 tgggaaggca agatctaccg ggtgctcgcg ggcaaccggc cgaagcatga cctggacatc 720
 aaaccacggy tcatcagtca tcgcctgcac tttcccaggg gcggcagcct ggccgcgctg 780
 accgcgcacc aggcttgcca cctgcccgtg gagactttca cccgtcatcg ccagccgcgc 840
 ggctgggaac aactcgagca gtgcggctat ccggtgcagc ggctgggtcgc cctctacctg 900
 gcgggcgccc tgctgtggaa ccaggctcgc caggtgatcc gcaacgccct ggccagcccc 960
 ggagcggcgc gcgacctggg cgaagcgatc cgcgagcagc cggagcaggg ccgtctggcc 1020
 ctgaccctgg ccgcccgcga gagcgcgcgc ttcgtccggc agggcaccgg caacgacgag 1080
 gccggcgcgg caaacctgca gggaggatta cgcagcctc gattcccgcac catcccgtg 1140
 tcccgtctgt tcgacaacgc tatgctcgtg gctcaccgtc tgcaccagct ggctttcgac 1200
 acctaccagg agttcgaaga agcatacatc ccgaaagaac agaaatactc cttcctgcaa 1260
 aaccgcgaga cctccctgtg cttctccgaa tcgatcccga ccccgtccaa ccgtgaagaa 1320
 acccagcaga aatccaacct ggagctcctg cgtatctccc tgctgctgat ccagtctgg 1380
 ctgcagccgg ttcagttcct gcgttccggt ttcgctaact ccctggttta cgggtgctagc 1440
 gactccaacg tttacgacct gctgaaagac ctggaagaag gtatccagac cctgatgggt 1500
 cgtctggaag acggttcccc gcgtaccggt cagatcttca aacagaccta ctccaaattc 1560
 gacaccaact cccacaacga cgacgctctg ctgaaaaact acggtctgct gtactgcttc 1620
 cgtaaagaca tggacaaaagt tgaaaccttc ctgcgtatcg ttcagtgccg ttccgttgaa 1680
 ggttcctgcg gtttctaa 1698

<210> 35

<211> 565

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide

<400> 35

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

				165					170					175			
Met	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Trp	Ser	Glu	Trp	Ala		
				180					185					190			
Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Asp	Gly	Val	Tyr	Asn		
				195					200					205			
Tyr	Leu	Ala	Gln	Gln	Arg	Cys	Asn	Leu	Asp	Asp	Thr	Trp	Glu	Gly	Lys		
				210					215					220			
Ile	Tyr	Arg	Val	Leu	Ala	Gly	Asn	Pro	Ala	Lys	His	Asp	Leu	Asp	Ile		
225							230					235			240		
Lys	Pro	Thr	Val	Ile	Ser	His	Arg	Leu	His	Phe	Pro	Glu	Gly	Gly	Ser		
				245								250			255		
Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	His	Gln	Ala	Cys	His	Leu	Pro	Leu	Glu	Thr		
				260										270			
Phe	Thr	Arg	His	Arg	Gln	Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Leu	Glu	Gln	Cys		
				275										285			
Gly	Tyr	Pro	Val	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Leu	Tyr	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu		
				290										300			
Ser	Trp	Asn	Gln	Val	Asp	Gln	Val	Ile	Arg	Asn	Ala	Leu	Ala	Ser	Pro		
305							310							315			320
Gly	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Gly	Glu	Ala	Ile	Arg	Glu	Gln	Pro	Glu	Gln		
				325										330			335
Ala	Arg	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ala	Ala	Ala	Glu	Ser	Glu	Arg	Phe	Val		
				340										345			350
Arg	Gln	Gly	Thr	Gly	Asn	Asp	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Asn	Leu	Gln	Gly		
				355										360			365
Gly	Leu	Arg	Gln	Pro	Arg	Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe		
				370										375			380
Asp	Asn	Ala	Met	Leu	Arg	Ala	His	Arg	Leu	His	Gln	Leu	Ala	Phe	Asp		
385							390							395			400
Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Glu	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Lys	Glu	Gln	Lys	Tyr		
				405										410			415
Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro	Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile		
				420										425			430
Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu		
				435										440			445
Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val		
				450										455			460
Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Ser		
				465										470			475
Asp	Ser	Asn	Val	Tyr	Asp	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly	Ile	Gln		
				485										490			495
Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Ile		
				500										505			510
Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser	Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp		
				515										520			525
Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	Lys	Asp	Met		
				530										535			540
Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Val	Gln	Cys	Arg	Ser	Val	Glu		
				545										550			555
Gly	Ser	Cys	Gly	Phe													
				565													

<210> 36
 <211> 1620
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Polynucleotide

<400> 36
 atggccgaag aagctttcga cctctggaac gaatgcgcca aagcctgcgt gctcgacctc 60
 aaggacggcg tgcgttccag ccgcatgagc gtcgaccggg ccatcgccga caccaacggc 120
 cagggcgtgc tgcactactc catggtcctg gagggcggca acgacgcgct caagctggcc 180
 atcgacaacg ccctcagcat caccagcgac ggctgacca tccgcctcga aggcggcgctc 240
 gagccgaaca agccggtgcg ctacagctac acgcgccagg cgcgaggcag ttggtcgtg 300
 aactggctgg taccgatcgg ccacgagaag ccctcgaaca tcaaggtggt catccacgaa 360
 ctgaacgccg gcaaccagct cagccacatg tcgccgatct acaccatcga gatggggcgac 420
 gagttgctgg cgaagctggc gcgcatgccc accttcttcg tcagggcgca cgagagcaac 480
 gagatgcagc cgacgctcgc catcagccat gccgggggtca gctggtcat ggcccagacc 540
 cagccgcgcc gggaaaagcg ctggagcgaa tggggcagcg gcaaggtggt gtgcctgctc 600
 gaccgcgtgg acggggtcta caactacctc gccagcaac gctgcaacct cgacgatacc 660
 tgggaaggca agatctaccg ggtgctcgcc ggcaaccggc cgaagcatga cctggacatc 720
 aaaccacgg tcatcagtca tcgctgcac tttcccagg gcggcagcct ggccgcgctg 780
 accgcgcacc aggcttgcca cctgccgctg gagactttca cccgtcatcg ccagccgcgc 840
 ggctgggaac aactcgagca gtgcggctat ccggtgcagc ggctggctgc cctctacctg 900
 gcggcgcgcc tgtcgtggaa ccaggctgac caggtgatcc gcaacgccct ggccagcccc 960
 ggacgcggcg gcgacctggg cgaagcgatc cgcgagcagc cggagcaggc ccgtctggcc 1020
 ctgacctggt ccgccgccga gagcgcgccc ttctgcccgc agggcaccgg caacgacgag 1080
 gccggcgcgg caaacctgca gggaggctta cgcagcctc gatgcgatct gcctcagacc 1140
 cacagcctgg gcagcaggag gacctgatg ctgctggctc agatgaggag aatcagcctg 1200
 tttagctgcc tgaaggatag gcacgatttt ggctttctc aagaggagt tggcaaccag 1260
 tttcagaagg ctgagaccat ccctgtgctg cacgagatga tccagcagat ctttaacctg 1320
 tttagacca aggatagcag cgctgcttgg gatgagacc tgctggataa gttttacacc 1380
 gagctgtacc agcagctgaa cgatctggag gcttgctgta tccagggcgt gggcgtgacc 1440
 gagaccctc tgatgaagga ggatagcatc ctggctgtga ggaagtactt tcagaggatc 1500
 accctgtacc tgaaggagaa gaagtacagc ccctgcgctt gggaagtcgt gagggctgag 1560
 atcatgagga gctttagcct gagcaccaac ctgcaagaga gcttgaggtc taaggagtaa 1620

<210> 37
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Polypeptide

<400> 37
 Met Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys
 1 5 10 15
 Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp
 20 25 30

Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met
 35 40 45
 Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala
 50 55 60
 Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
 85 90 95
 Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
 100 105 110
 Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
 115 120 125
 His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala
 130 135 140
 Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
 165 170 175
 Met Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
 180 185 190
 Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
 195 200 205
 Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys
 210 215 220
 Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser
 245 250 255
 Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr
 260 265 270
 Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
 275 280 285
 Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu
 290 295 300
 Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro
 305 310 315 320
 Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln
 325 330 335
 Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val
 340 345 350
 Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Leu Gln Gly
 355 360 365
 Gly Leu Arg Gln Pro Arg Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly
 370 375 380
 Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu
 385 390 395 400
 Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu
 405 410 415
 Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu
 420 425 430
 Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala
 435 440 445

Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln
 450 455 460
 Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr
 465 470 475 480
 Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr
 485 490 495
 Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys
 500 505 510
 Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser
 515 520 525
 Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
 530 535

<210> 38

<211> 460

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide

<400> 38

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

225 230 235 240
 Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser
 245 250 255
 Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr
 260 265 270
 Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
 275 280 285
 Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu
 290 295 300
 Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro
 305 310 315 320
 Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln
 325 330 335
 Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val
 340 345 350
 Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Leu Gln Gly
 355 360 365
 Gly Leu Arg Gln Pro Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His
 370 375 380
 Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr
 385 390 395 400
 Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val
 405 410 415
 Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu
 420 425 430
 Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
 435 440 445
 Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 450 455 460

<210> 39
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Polypeptide

<400> 39
 Met Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys
 1 5 10 15
 Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp
 20 25 30
 Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met
 35 40 45
 Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala
 50 55 60
 Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
 85 90 95

Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
 100 105 110
 Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
 115 120 125
 His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala
 130 135 140
 Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
 165 170 175
 Met Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
 180 185 190
 Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
 195 200 205
 Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys
 210 215 220
 Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser
 245 250 255
 Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr
 260 265 270
 Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
 275 280 285
 Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu
 290 295 300
 Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro
 305 310 315 320
 Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln
 325 330 335
 Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val
 340 345 350
 Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Leu Gln Gly
 355 360 365
 Gly Leu Arg Gln Pro Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His
 370 375 380
 Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr
 385 390 395 400
 Thr Pro Lys Thr

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide

<400> 40

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu

1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20