

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-513544

(P2021-513544A)

(43) 公表日 令和3年5月27日(2021.5.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/16 (2006.01)	A 6 1 K 9/16	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/04 (2006.01)	A 6 1 K 47/04	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/06	
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-543153 (P2020-543153)
 (86) (22) 出願日 平成31年2月12日 (2019. 2. 12)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年9月14日 (2020. 9. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2019/001708
 (87) 国際公開番号 W02019/156540
 (87) 国際公開日 令和1年8月15日 (2019. 8. 15)
 (31) 優先権主張番号 10-2018-0017075
 (32) 優先日 平成30年2月12日 (2018. 2. 12)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2019-0014955
 (32) 優先日 平成31年2月8日 (2019. 2. 8)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(71) 出願人 520200609
 ジーアンドビー バイオサイエンス カンパニー, リミテッド
 大韓民国, 07528 ソウル, ガンソグ, ヤンチョン-ロ, 401, ビー-809
 (71) 出願人 520200610
 レヨン ファーマシューティカル カンパニー, リミテッド
 大韓民国, 06176 ソウル, カンナム-グ, ヨンドン-デロ, 416, 8エフ
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK

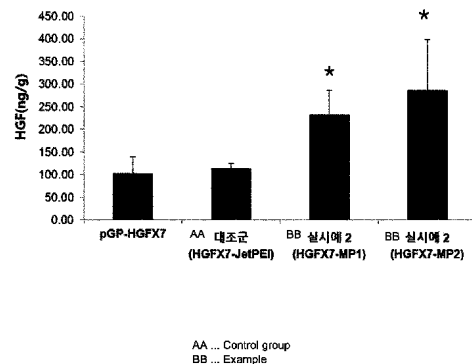
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コア-シェル構造のマイクロ粒子を有効成分として含む成長因子遺伝子発現増加用組成物

(57) 【要約】

【課題】本発明は、コア-シェル構造のマイクロ粒子を有効成分として含む成長因子遺伝子発現増加用組成物に関する。

【解決手段】本発明の成長因子遺伝子発現増加用組成物は、遺伝子と共に生体に投与される場合、共に投与される遺伝子の発現量を少なくとも30%以上増加させ得る。特に、前記組成物は、本発明に適したヒト肝細胞成長因子(Hepatocyte Growth Factor; HGF) 遺伝子、ヒト肝細胞成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子、又はヒト1型インスリン類似成長因子(Insulin like Growth Factor-1; IGF-1) 遺伝子、ヒト1型インスリン類似成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子と共に投与される場合は、前記遺伝子の発現量を少なくとも30%以上増加させ得る。前記組成物は、遺伝子治療剤と共に投与する場合、少量の遺伝子によっても治療効果を得ることができるので有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コア - シェル構造のマイクロ粒子を有効成分として含む成長因子遺伝子発現増加用組成物であって、

前記コアは、生体適合性基体として、ハロゲン化炭化水素、ハロゲン化硫黄又はこれらの混合物で、前記シェルは、脂質又はその誘導体を含んで構成され、

前記成長因子遺伝子は、ヒト肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor; HGF) 遺伝子、ヒト肝細胞成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる 1 種以上の遺伝子；又はヒト 1 型インスリン類似成長因子 (Insulin like Growth Factor - 1; IGF1) 遺伝子、ヒト 1 型インスリン類似成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる 1 種以上の遺伝子；であることを特徴とする成長因子遺伝子発現増加用組成物。

10

【請求項 2】

前記生体適合性基体は、ヘキサフルオロ化硫黄、オクタフルオロプロパン、プロモクロロジフルオロメタン、クロロジフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、プロモトリフルオロメタン、クロロトリフルオロメタン、クロロペンタフルオロエタン、ジクロロテトラフルオロエタン及びその混合物から選ばれることを特徴とする、請求項 1 に記載の成長因子遺伝子発現増加用組成物。

【請求項 3】

前記ハロゲン化炭化水素はペルフルオロ化炭化水素であることを特徴とする、請求項 1 に記載の成長因子遺伝子発現増加用組成物。

20

【請求項 4】

前記ペルフルオロ化炭化水素は、ペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘプタン、ペルフルオロプロペン、ペルフルオロブテン、ペルフルオロブタジエン、ペルフルオロブタ - 2 - イン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロメチルシクロブタン、ペルフルオロジメチルシクロブタン、ペルフルオロトリメチルシクロブタン、ペルフルオロシクロペンタン、ペルフルオロメチルシクロペンタン、ペルフルオロジメチルシクロペンタン、ペルフルオロメチルシクロヘキサン、ペルフルオロメチルシクロヘキサン、ペルフルオロメチルシクロヘキサン又はその混合物であることを特徴とする、請求項 3 に記載の成長因子遺伝子発現増加用組成物。

30

【請求項 5】

前記脂質は、単純脂質、リン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、コレステロール及び陽イオン脂質からなる群から選ばれた 1 種以上であることを特徴とする、請求項 1 に記載の成長因子遺伝子発現増加用組成物。

【請求項 6】

前記リン脂質は、ホスファチジルコリン誘導体、ホスファチジルエタノールアミン誘導体、ホスファチジルセリン誘導体、ジアセチル化リン脂質、L - ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレイン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ポリエチレングリコール化リン脂質、卵黄レシチン、大豆レシチン及び水素添加リン脂質からなる群から選ばれることを特徴とする、請求項 5 に記載の成長因子遺伝子発現増加用組成物。

40

【請求項 7】

前記グリセロ糖脂質は、スルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド及びグリコシルジグリセリドからなる群から選ばれることを特徴とする、請求項 5 に記載の成長因子遺伝子発現増加用組成物。

【請求項 8】

前記スフィンゴ糖脂質は、ガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド又はガ

50

ングリオシドであることを特徴とする、請求項 5 に記載の成長因子遺伝子発現増加用組成物。

【請求項 9】

前記陽イオン脂質は、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニオプロパン (DOTAP)、N - (2, 3 - ジオレイルオキシプロパン - 1 - イル) - N, N, N - トリメチル塩化アンモニウム (DOTMA)、2, 3 - ジオレイルオキシ - N - [2 - (スペルミンカルボキシアミド)エチル] - N, N - ジメチル - 1 - プロパンアミニウムトリフルオロ酢酸 (DOSPA)、1, 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - ジメチルヒドロキシエチル臭化アンモニウム (DMRIE)、1, 2 - ジオレオイルオキシプロピル - 3 - ジエチルヒドロキシエチル臭化アンモニウム (DORIE) 及び 3 - [N - (N'N' - ジメチルアミノエチル)カルバモイル]コレステロール (DC-Chol) からなる群から選ばれることを特徴とする、請求項 5 に記載の成長因子遺伝子発現増加用組成物。

10

【請求項 10】

前記組成物は、成長因子遺伝子の発現量を 30% 以上増加させることを特徴とする、請求項 1 に記載の成長因子遺伝子発現増加用組成物。

【請求項 11】

請求項 1 の組成物；及びヒト肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor; HGF) 遺伝子、ヒト肝細胞成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる 1 種以上の遺伝子；を含む虚血性疾患、神経疾患、腎臓疾患又は肝疾患の予防又は治療用薬学組成物。

20

【請求項 12】

前記ヒト肝細胞成長因子遺伝子は序列番号 2 の塩基序列からなることを特徴とする、請求項 11 に記載の虚血性疾患、神経疾患、腎臓疾患又は肝疾患の予防又は治療用薬学組成物。

【請求項 13】

前記ヒト肝細胞成長因子の変異体遺伝子は、序列番号 3 ~ 序列番号 6 の塩基序列から選ばれるいずれか一つからなることを特徴とする、請求項 11 に記載の虚血性疾患、神経疾患、腎臓疾患又は肝疾患の予防又は治療用薬学組成物。

【請求項 14】

請求項 1 の組成物；及びヒト 1 型インスリン類似成長因子 (Insulin like Growth Factor - 1; IGF1) 遺伝子、ヒト 1 型インスリン類似成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる 1 種以上の遺伝子；を含む、IGF1 受容体の結合によって媒介される症状又は疾患の予防又は治療用薬学組成物。

30

【請求項 15】

前記ヒト 1 型インスリン類似成長因子遺伝子は、序列番号 7 の塩基序列からなることを特徴とする、請求項 14 に記載の IGF1 受容体の結合によって媒介される症状又は疾患の予防又は治療用薬学組成物。

【請求項 16】

前記症状又は疾患は、低身長、肥満、体重減少、悪液質、食慾不振、神経退行性障害、線維症 - 関連症状、軟骨障害、骨疾患、炎症障害、腸障害、インスリン耐性、糖尿病、糖尿病性ケトアシドーシス、ラブソン・メンデンホール症候群 (Rabson - Mendenhall syndrome)、網膜症、末端肥大症 (acromegaly)、線維筋性異形成症 (fibromuscular hyperplasia) 及び心臓障害からなる群から選ばれた 1 種であることを特徴とする、請求項 14 に記載の薬学組成物。

40

【請求項 17】

前記低身長に対する治療が要求される個体は、インスリン類似成長因子 - 1 欠乏症 (IGFD) を有しているヒト小児個体であって、前記組成物は、ヒト小児個体で IGF D の治療に有効であることを特徴とする、請求項 16 に記載の薬学組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、コア-シェル構造のマイクロ粒子を有効成分として含む成長因子遺伝子発現増加用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト肝細胞成長因子(Hepatocyte Growth Factor; HGF)は、中胚葉起源の各細胞から分泌されて多くの細胞に作用し、対象細胞及び環境によって多様な機能を行う(Stella, M. C. and Comoglio, P. M., The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 31:1357-1362(1999))。それらの機能を要約すると、第一、上皮細胞の細胞分裂を促進し、細胞の運動性を促進しながら基質(matrix)の浸透能力を増進するが、これらの各機能は、結果的に、上皮細胞が細尿管構造(tubular structure)を形成することを誘導する。第二、試験管内(in vitro)及び生体内(in vivo)のいずれにおいても内皮細胞による血管新生を促進する。第三、抗-細胞自滅(anti-apoptosis)活性を有しており、肝及び腎臓の再生と関連している。第四、発生過程中には、腎臓、卵巣、精巣の機能形成に関与する。第五、破骨細胞(osteoclast)及び造骨細胞(osteoblast)の機能を調節し、骨の生成過程を調節する。第六、赤血球造血前駆細胞(Erythropoietic progenitor cell)の成長及び分化を促進する。第七、神経の軸索発生(axon sprouting)に関与する。これらの多様な機能に基づいて、肝細胞成長因子は、多様な疾患、例えば、虚血性疾患、神経疾患、腎臓疾患及び肝疾患に対する治療剤として開発され得る。

10

20

【0003】

また、ヒト1型インスリン類似成長因子(Insulin like Growth Factor-1; IGF1)は、インスリン類似活性及びミトゲン性生物学的成長活性を有している70個のアミノ酸からなるポリペプチドホルモンである。このようなホルモンは、筋骨格系、肝、腎臓、腸、神経系組織、心臓及び肺などの多様な組織で細胞成長を強化させる。

【0004】

当該技術分野の当業者によく知られているように、IGF1の公知の潜在的な用途は、多様且つ多い方である。例えば、神経退行性症状を治療するための潜在的な治療剤としてのIGF1の用途に対して多くの研究が報告されている。例えば、Kanje et al., Brain Res., 486:396-398(1989); Hantai et al., J. Neurol. Sci., 129:122-126(1995); Contreras et al., Pharmac. Exp. Therap., 274:1443-1499(1995); Di Giulio et al., Society for Neuroscience, 22:1960(1996); Di Giulio et al., Society for Neuroscience, 23:894(1997); Hsu et al., Biochem. Mol. Med., 60(2):142-148(1997); Gorio et al., Neuroscience, 82:1029-1037(1998)を参照する。IGF1療法は、ALS、脳卒中、癲癇、パーキンソン疾患、アルツハイマー疾患、急性外傷性傷害及び外傷、老化、疾患又は傷害と関連するその他の障害などの数多くの神経症状に対して処方されている。例えば、米国登録特許第5,093,137号、第5,652,214号及び第5,703,045号;国際公開特許第1990-001483号及び第1993-002695号を参照する。

30

40

【0005】

他の多様な症状に対するIGF1療法の使用に対しては、多数の公開文献に言及されている。例えば、Schalch et al., 「Short-term metabolic effects of recombinant human insulin

50

- like growth factor I (rhIGF-1) in type I
 I diabetes mellitus」. Modern Concepts of
 Insulin-Like Growth Factors, Spencer, ed.,
 New York: Elsevier Science Publ. Co. pp. 705
 - 714 (1991); Clemmons and Underwood, J. Clin
 . Endocrinol. Metab., 79 (1): 4 - 6 (1994); 及び Lan
 gford et al., Eur. J. Clin. Invest., 23 (9): 50
 3 - 516 (1993) (例えば、インスリン - 耐性状態及び糖尿病が言及される); O
 'shea et al., Am. J. Physiol., 264: F917 - F922
 (1993) (例えば、腎臓機能の減少が言及される) を参照する。また、米国登録特許
 第7, 258, 864号(例えば、低身長が言及される); 米国登録特許第5, 110,
 604号及び第5, 427, 778号(例えば、傷の治癒が言及される); 米国登録特許
 第5, 126, 324号(例えば、心臓障害及び成長遅延が言及される); 米国登録特許
 第5, 368, 858号(例えば、軟骨欠陥又は傷害が言及される); 米国登録特許第5
 , 543, 441号及び第5, 550, 188号(例えば、組織増大が言及される); 米
 国登録特許第5, 686, 425号(例えば、瘢痕組織、局所筋肉機能不全及び尿失禁が
 言及される); 及び米国登録特許第5, 656, 598号(例えば、骨の成長が言及され
 る) を参照する。また、国際公開特許第1991-012018号(例えば、腸の障害が
 言及される); 国際公開特許第1992-009301号及び国際公開特許第1992-
 014480号(例えば、傷の治癒が言及される); 国際公開特許第1993-0088
 28号(例えば、虚血症、低酸素症又は神経退行と関連した神経損傷が言及される); 国
 際公開特許第1994-016722号(例えば、インスリン耐性が言及される); 国際
 公開特許第1996-002565号(例えば、骨形成の促進及び骨リモデリングの調節
 のためのIGF/IGFBP複合体が言及される); 米国公開特許第2003-0100
 505号(例えば、骨粗鬆症が言及される); 及び米国公開特許第2005-00432
 40号(例えば、肥満が言及される) を参照する。

【0006】

本発明の発明者等は、少量の遺伝子によっても治療効果を得ることができる遺伝子治療
 剤を開発するために研究した結果、コアがハロゲン化炭化水素及び/又はハロゲン化硫黄
 で、外郭シェルが脂質成分で構成されたコア-シェル構造のマイクロ粒子が前記HGF又
 はIGF1などの遺伝子と共に生体内に投与される場合、成長因子遺伝子の発現量を著し
 く増加させることを具体的に確認し、本発明を完成するに至った。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】大韓民国登録特許第10-0562824号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明が解決しようとする第一の課題は、コア-シェル構造のマイクロ粒子を有効成分
 として含む成長因子遺伝子発現増加用組成物を提供することにある。

本発明が解決しようとする第二の課題は、前記組成物を含む虚血性疾患、神経疾患、腎臓
 疾患又は肝疾患の予防又は治療用薬学組成物を提供することにある。

本発明が解決しようとする第三の課題は、前記組成物を含む、IGF1受容体の結合によ
 って媒介される症状又は疾患の予防又は治療用薬学組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

前記のような目的を達成するために、本発明は、コア-シェル構造のマイクロ粒子を有
 効成分として含む成長因子遺伝子発現増加用組成物であって、前記コアは、生体適合性基
 体としてハロゲン化炭化水素、ハロゲン化硫黄又はこれらの混合物で、前記シェルは、脂

質又はその誘導体を含んで構成され、前記成長因子遺伝子は、ヒト肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor; HGF) 遺伝子、ヒト肝細胞成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子；又はヒト1型インスリン類似成長因子 (Insulin like Growth Factor-1; IGF1) 遺伝子、ヒト1型インスリン類似成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子；であることを特徴とする成長因子遺伝子発現増加用組成物を提供する。

【0010】

本発明の一実施例において、前記生体適合性基体は、ヘキサフルオロ化硫黄、オクタフルオロプロパン、プロモクロロジフルオロメタン、クロロジフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、プロモトリフルオロメタン、クロロトリフルオロメタン、クロロペンタフルオロエタン、ジクロロテトラフルオロエタン及びその混合物から選ばれ得る。

10

【0011】

本発明の一実施例において、前記ハロゲン化炭化水素は、ペルフルオロ化炭化水素であり得る。

【0012】

本発明の一実施例において、前記ペルフルオロ化炭化水素は、ペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘプタン、ペルフルオロプロペン、ペルフルオロブテン、ペルフルオロブタジエン、ペルフルオロブタ-2-イン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロメチルシクロブタン、ペルフルオロジメチルシクロブタン、ペルフルオロトリメチルシクロブタン、ペルフルオロシクロペンタン、ペルフルオロメチルシクロペンタン、ペルフルオロジメチルシクロペンタン、ペルフルオロメチルシクロヘキサン、ペルフルオロメチルシクロヘキサン又はその混合物であり得る。

20

【0013】

本発明の一実施例において、前記脂質は、単純脂質、リン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、コレステロール及び陽イオン脂質からなる群から選ばれた1種以上であり得る。

【0014】

本発明の一実施例において、前記リン脂質は、ホスファチジルコリン誘導体、ホスファチジルエタノールアミン誘導体、ホスファチジルセリン誘導体、ジアセチル化リン脂質、L- - ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレイン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ポリエチレングリコール化リン脂質、卵黄レシチン、大豆レシチン及び水素添加リン脂質からなる群から選ばれたものであり得る。

30

【0015】

本発明の一実施例において、前記グリセロ糖脂質は、スルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド及びグリコシルジグリセリドからなる群から選ばれたものであり得る。

40

本発明の一実施例において、前記スフィンゴ糖脂質は、ガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド又はガングリオシドであり得る。

【0016】

本発明の一実施例において、前記陽イオン脂質は、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニオプロパン (DOTAP)、N - (2, 3 - ジオレイルオキシプロパン - 1 - イル) - N, N, N - トリメチル塩化アンモニウム (DOTMA)、2, 3 - ジオレイルオキシ - N - [2 - (スペルミンカルボキシアミド)エチル] - N, N - ジメチル - 1 - プロパンアミニウムトリフルオロ酢酸 (DOSPA)、1, 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - ジメチルヒドロキシエチル臭化アンモニウム (DMRIE)、1, 2 - ジオレオイルオキシプロピル - 3 - ジエチルヒドロキシエチル臭化アンモニウム (DORIE

50

)及び3 - [N - (N'N' - ジメチルアミノエチル)カルバモイル]コレステロール(DC - Chol)からなる群から選ばれたものであり得る。

【0017】

本発明の一実施例において、前記ヒト肝細胞成長因子の変異体遺伝子は、序列番号3～序列番号6の塩基序列から選ばれるいずれか一つからなるものであり得る。

本発明の一実施例において、前記組成物は、成長因子遺伝子の発現量を30%以上増加させ得る。

【0018】

また、本発明は、前記組成物；及びヒト肝細胞成長因子(Hepatocyte Growth Factor; HGF)遺伝子、ヒト肝細胞成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子；を含む虚血性疾患、神経疾患、腎臓疾患又は肝疾患の予防又は治療用薬学組成物を提供する。

10

【0019】

前記虚血性疾患、神経疾患、腎臓疾患又は肝疾患の予防又は治療用薬学組成物において、前記ヒト肝細胞成長因子遺伝子は、序列番号2の塩基序列からなるものであって、前記ヒト肝細胞成長因子の変異体遺伝子は、序列番号3～序列番号6の塩基序列から選ばれるいずれか一つからなるものであり得る。

また、本発明は、前記組成物；及びヒト1型インスリン類似成長因子(Insulin like Growth Factor - 1; IGF1)遺伝子、ヒト1型インスリン類似成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子；を含む、IGF1受容体の結合によって媒介される症状又は疾患の予防又は治療用薬学組成物を提供する。

20

【0020】

前記IGF1受容体の結合によって媒介される症状又は疾患の予防又は治療用薬学組成物において、前記ヒト1型インスリン類似成長因子遺伝子は、序列番号7の塩基序列からなるものであり得る。

【0021】

本発明の一実施例において、前記症状又は疾患は、低身長、肥満、体重減少、悪液質、食慾不振、神経退行性障害、線維症 - 関連症状、軟骨障害、骨疾患、炎症障害、腸障害、インスリン耐性、糖尿病、糖尿病性ケトアシドーシス、ラブソン・メンデンホール症候群(Rabson - Mendenhall syndrome)、網膜症、末端肥大症(acromegaly)、線維筋性異形成症(fibromuscular hyperplasia)及び心臓障害からなる群から選ばれた1種であり得る。

30

【0022】

本発明の一実施例において、前記低身長に対する治療が要求される個体は、インスリン類似成長因子 - 1欠乏症(IGFD)を有しているヒト小児個体であって、前記組成物は、ヒト小児個体でIGFDの治療に有効なものであり得る。

【発明の効果】

【0023】

本発明の成長因子遺伝子発現増加用組成物は、遺伝子(例えば、遺伝子を暗号化するポリヌクレオチド又はこれを含むベクター)と共に生体に投与される場合、成長因子遺伝子の発現量を少なくとも30%以上増加させ得る。

40

【0024】

特に、前記組成物は、本発明に適したヒト肝細胞成長因子(Hepatocyte Growth Factor; HGF)遺伝子、ヒト肝細胞成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子；又はヒト1型インスリン類似成長因子(Insulin like Growth Factor - 1; IGF1)遺伝子、ヒト1型インスリン類似成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子；と共に投与される場合は、前記成長因子遺伝子の発現量を少なくとも30%以上増加させ得る。

50

【0025】

前記組成物は、遺伝子治療剤と共に投与する場合、少量の遺伝子によっても治療効果を得ることができるので有用である。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】本発明の一実施例に係るpGpベクターの開裂地図を示した図である。

【図2】マウスにおいて、pGp-HGF（遺伝子のみ）、対照群の薬学組成物（HGF-JetPEI）及び実施例1に係る薬学組成物（HGF-MP1、HGF-MP2及びHGF-MP3）の投与によるHGFタンパク質の発現量を比較して示すグラフである。

【図3】マウスにおいて、pGp-HGF \times 7（遺伝子のみ）、対照群の薬学組成物（HGF \times 7-JetPEI）及び実施例2に係る薬学組成物（HGF \times 7-MP1及びHGF \times 7-MP2）の投与によるHGFタンパク質の発現量を比較して示すグラフである。

【図4】マウスにおいて、pGp-IGF1（遺伝子のみ）、対照群の薬学組成物（IGF1-JetPEI）及び実施例3に係る薬学組成物（IGF1-MP1、IGF1-MP2及びIGF1-MP3）の投与によるIGF1タンパク質の発現量を比較して示すグラフである。

【図5】マウスにおいて、pGp-VEGF（遺伝子のみ）、対照群の薬学組成物（VEGF-JetPEI）及び比較例1に係る薬学組成物（VEGF-MP1及びVEGF-MP2）の投与によるVEGFタンパク質の発現量を比較して示すグラフである。

【図6】マウスにおいて、pGp-FGF1（遺伝子のみ）及び比較例2に係る薬学組成物（FGF1-MP1及びFGF1-MP2）の投与によるFGF1タンパク質の発現量を比較して示すグラフである。

【図7】マウスにおいて、pGp-FGF4（遺伝子のみ）及び比較例3に係る薬学組成物（FGF4-MP1及びFGF4-MP2）の投与によるFGF4タンパク質の発現量を比較して示すグラフである。

【図8】マウスにおいて、pGp-PDGF-B（遺伝子のみ）及び比較例4に係る薬学組成物（PDGF-B-MP1及びPDGF-B-MP2）の投与によるPDGF-Bタンパク質の発現量を比較して示すグラフである。

【図9】糖尿病で誘発された末梢神経障害（peripheral neuropathy）ラットモデルに本発明の実施例2（HGF \times 7-MP2）の組成物を投与し、2週経過後にPWT値が著しく上昇することを示すグラフである。

【図10】慢性絞扼損傷（chronic constriction injury）手術によって誘発された神経障害（neuropathy）ラットモデルにおいて、実施例1（HGF1-MP2）の組成物を投与し、2週経過後にPWT値が著しく上昇することを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0027】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0028】

本発明の一側面によると、本発明は、コア-シェル構造のマイクロ粒子を有効成分として含む成長因子遺伝子発現増加用組成物であって、前記コアは、生体適合性基体として、ハロゲン化炭化水素、ハロゲン化硫黄又はこれらの混合物で、前記シェルは、脂質又はその誘導体を含んで構成され、前記成長因子遺伝子は、ヒト肝細胞成長因子（Hepatocyte Growth Factor；HGF）遺伝子、ヒト肝細胞成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子；又はヒト1型インスリン類似成長因子（Insulin like Growth Factor-1；IGF1）遺伝子、ヒト1型インスリン類似成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子；であることを特徴とする成長因子遺伝子発現増加用組成物を提供する。

【0029】

< コア >

本発明の明細書において、前記「コア」は、生体適合性基体として、ハロゲン化炭化水素、ハロゲン化硫黄又はこれらの混合物からなり得る。

【 0 0 3 0 】

前記生体適合性基体は、ヘキサフルオロ化硫黄、オクタフルオロプロパン、プロモクロロジフルオロメタン、クロロジフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、プロモトリフルオロメタン、クロロトリフルオロメタン、クロロペンタフルオロエタン、ジクロロテトラフルオロエタン、又はその混合物であり得る。

【 0 0 3 1 】

前記ハロゲン化炭化水素は、ペルフルオロ化炭化水素であることが好ましい。

10

【 0 0 3 2 】

前記ペルフルオロ化炭化水素としては、ペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘプタン、ペルフルオロプロペン、ペルフルオロブテン、ペルフルオロブタジエン、ペルフルオロブタ - 2 - イン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロメチルシクロブタン、ペルフルオロジメチルシクロブタン、ペルフルオロトリメチルシクロブタン、ペルフルオロシクロペンタン、ペルフルオロメチルシクロペンタン、ペルフルオロジメチルシクロペンタン、ペルフルオロメチルシクロヘキサン、ペルフルオロメチルシクロヘキサン、ペルフルオロメチルシクロヘキサン又はその混合物を挙げることができる。

20

【 0 0 3 3 】

本発明の生体適合性基体は、ヘキサフルオロ化硫黄又はペルフルオロブタンであることが好ましい。

【 0 0 3 4 】

< シェル >

本発明の明細書において、前記「シェル」は、脂質又はその誘導体を含む成分で構成され得る。

【 0 0 3 5 】

前記脂質は、単純脂質、リン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、コレステロール及び陽イオン脂質からなる群から選ばれた 1 種以上であり得るが、特にリン脂質であることが好ましい。

30

【 0 0 3 6 】

前記リン脂質としては、ホスファチジルコリン誘導体、ホスファチジルエタノールアミン誘導体、ホスファチジルセリン誘導体、ジアセチル化リン脂質、L - ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレイン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ポリエチレングリコール化リン脂質、卵黄レシチン、大豆レシチン、水素添加リン脂質などを挙げることができる。

【 0 0 3 7 】

前記グリセロ糖脂質としては、スルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリドなどを挙げることができる。

40

【 0 0 3 8 】

前記スフィンゴ糖脂質としては、ガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシドなどを挙げることができる。

【 0 0 3 9 】

また、前記陽イオン脂質としては、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニオプロパン (DOTAP)、N - (2, 3 - ジオレイルオキシプロパン - 1 - イル) - N, N, N - トリメチル塩化アンモニウム (DOTMA)、2, 3 - ジオレイルオキシ - N - [2 - (スベルミンカルボキシアミド) エチル] - N, N - ジメチル - 1 - プロパンアミ

50

ニウムトリフルオロ酢酸 (DOSPA)、1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチル臭化アンモニウム (DMRIE)、1,2-ジオレオイルオキシプロピル-3-ジエチルヒドロキシエチル臭化アンモニウム (DORIE)、3-[N-(N'-ジメチルアミノエチル)カルバモイル]コレステロール (DC-Chol)などを挙げるができる。

【0040】

<マイクロ粒子>

本発明のマイクロ粒子は、コアである基体を取り囲むシェルによって安定化され、基体の周囲液体への拡散を遅延させ、その結果、マイクロ粒子間の融合を防止する。

前記マイクロ粒子は、生体内に投入される場合、標的細胞又は組織付近に到着するまでは形状を維持しているが、標的細胞又は組織付近で破壊されながら気体を噴射ようになる。このとき、噴射される気体は標的細胞の細胞膜に変化を起こし、気体の噴射力は、成長因子遺伝子が標的細胞の細胞質環境中に進入できるように促進する役割をすることができる。

【0041】

前記マイクロ粒子は、平均直径が1 μ m~10 μ m、好ましくは2 μ m~8 μ m、さらに好ましくは2 μ m~4 μ mである。

【0042】

<遺伝子発現増加用組成物>

最近、基体をコアとするコア-シェルマイクロ粒子と関連して多様な研究がなされてきた。既存の各研究では、マイクロ粒子と共に超音波を照射しないと遺伝子発現増加効果が表れなかった。

【0043】

具体的に、Sang-Chol Lee et al., Korean Circulation J 2006; 36: 32-38; 「低周波超音波を用いた微細気泡の破壊を通じた筋肉組織への遺伝子伝達増強に対する研究」には、超音波の照射なしでルシフェラーゼ (luciferase) 遺伝子-マイクロ粒子混合物のみを注入する場合は遺伝子発現増加効果が表れないという内容が開示されている。

ZP Shen et al., Gene Therapy (2008) 15, 1147-1155; 「Ultrasound with microbubbles enhances gene expression of plasmid DNA in the liver via intraportal delivery」には、超音波の照射なしでルシフェラーゼ遺伝子-マイクロ粒子混合物のみを注入する場合は遺伝子発現増加効果が表れないという内容が開示されている。

【0044】

また、Xingsheng Li et al., J Ultrasound Med 2008; 27: 453-460; 「Experimental Research on Therapeutic Angiogenesis Induced by Hepatocyte Growth Factor Directed by Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction in Rats」には、超音波の照射なしでHGF遺伝子-リボソームマイクロ粒子混合物を注入する場合は遺伝子発現増加効果が表れないという内容が開示されている。

【0045】

しかし、本発明者等は、マイクロ粒子の用途に対して研究した結果、本発明に係るマイクロ粒子をHGF又はIGF遺伝子と共に注入する場合は、特異的に超音波の照射なしでも遺伝子の発現量を著しく増加させることを確認し、本発明を完成するに至った。一方、下記の実験例で具体的に示したように、前記HGF及びIGF1以外の成長因子系列の他の遺伝子では、前記マイクロ粒子による遺伝子発現量の増加効果が表れなかった。

【0046】

本発明に係る成長因子遺伝子発現増加用組成物は、遺伝子と共に生体に投与される場合

10

20

30

40

50

、成長因子遺伝子の発現量を少なくとも30%以上増加させ得る。

【0047】

特に、本発明に係る成長因子遺伝子発現増加用組成物は、本発明に適したヒト肝細胞成長因子(Hepatocyte Growth Factor; HGF)遺伝子、ヒト肝細胞成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子、又はヒト1型インスリン類似成長因子(Insulin like Growth Factor-1; IGF1)遺伝子、ヒト1型インスリン類似成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子と共に投与される場合は、前記遺伝子の発現量を少なくとも30%以上、好ましくは40%以上、さらに好ましくは50%以上、最も好ましくは100%以上増加させ得る。

10

【0048】

下記の実施例において、本発明の遺伝子発現増加用組成物は、HGF、HGF X 7又はIGF1遺伝子と共にマウスに投与する場合、前記HGF、HGF X 7又はIGF1遺伝子の発現量を著しく増加させることを確認した。さらに具体的には、HGFは45%以上、HGF X 7は120%以上、IGF1は35%以上発現量を増加させることを確認した。一方、VEGF、FGF1、FGF4又はPDGF-Bの場合は、本発明の遺伝子発現増加用組成物と共にマウスに投与したとしても遺伝子発現増加率が有意に増加しないことを確認した。具体的には、VEGFは最大16%、FGF4は最大14%、PDGF-Bは最大4%程度にのみ発現量が増加し、FGF1の場合は、むしろ発現量が40%以上減少した。

20

【0049】

すなわち、本発明の遺伝子発現増加用組成物は、成長因子遺伝子のうちヒト肝細胞成長因子(HGF)、その異型体及びその変異体から選ばれる1種以上の遺伝子；又はヒト1型インスリン類似成長因子(IGF1)、その異型体及びその変異体から選ばれる1種以上の遺伝子；と共に投与される場合にのみ特異的に遺伝子の発現量を増加させる効果を有すると判断される。

【0050】

前記組成物は、安定化剤、緩衝剤、浸透圧の調節のための塩、賦形剤、防腐剤などの薬学的補助剤又はその他の治療的に有用な物質をさらに含有することができ、通常の方法によって多様な経口又は非経口の形態に剤形化できるが、非経口の形態であることが好ましい。代表的な非経口投与用剤形は、注射用剤形として等張性水溶液又は懸濁液であることが好ましい。又は、前記組成物を粉末化した後、投与直前に溶剤と共に懸濁して使用することもできる。

30

【0051】

本発明の遺伝子発現増加用組成物において、前記マイクロ粒子の含量は、特に制限されないが、 $0.5 \mu\text{l}/\text{ml} \sim 2,000 \mu\text{l}/\text{ml}$ 、好ましくは $1 \mu\text{l}/\text{ml} \sim 1,000 \mu\text{l}/\text{ml}$ であってもよく、 $5 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 2,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $10 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ であってもよい。

【0052】

前記マイクロ粒子の含量が前記範囲を逸脱する場合は、期待する効果を得ることができない。

40

【0053】

そして、前記組成物は、遺伝子と混合された混合液の形態で投与されることが効果の面で好ましい。

【0054】

<遺伝子>

本発明に係る遺伝子発現増加用組成物は、下記の各遺伝子と共に投与される場合、前記遺伝子の発現効率及びこれによる効能をさらに増大させ得る。

【0055】

〔ヒト肝細胞成長因子(HGF)遺伝子〕

50

ヒト肝細胞成長因子遺伝子は、序列番号2の塩基序列からなるものであり得る。ヒト肝細胞成長因子遺伝子は、遺伝子治療剤の形態に開発されてもよく、タンパク質治療剤の形態に開発されてもよい。

【0056】

〔ヒト肝細胞成長因子の異型体〕

本明細書において、「ヒト肝細胞成長因子の異型体(isoform)」は、全ての対立遺伝子変異体(variants)を含む、動物で自然に生成される(naturally occurring)HGFアミノ酸序列と少なくとも80%同じアミノ酸序列を有するHGFポリペプチドを意味する。例えば、HGF異型体は、HGFの正常型(normal form)又は野生型(wild type)、そして、HGFの多様な変異体(例えば、スプライシング変異体及び欠損変異体)を全て包括する意味を有する。

10

【0057】

〔ヒト肝細胞成長因子の変異体〕

本明細書において、「ヒト肝細胞成長因子の変異体」は、HGFの二つの異型体(HGF及びdHGF)を全て発現できるハイブリッドHGF遺伝子であり得る(大韓民国登録特許第10-0562824号参照)。具体的に、前記「ハイブリッドHGF遺伝子」は、HGF cDNAのエクソン4とエクソン5との間にヒトHGF遺伝子のイントロン4又はその断片序列が挿入された、遺伝子発現効率が高く、HGF及びdHGF(deleted variant of HGF)の二つの異型体を同時に発現するハイブリッドHGF遺伝子(序列番号3~序列番号5)を意味する。

20

本発明の遺伝子治療剤の戦略によると、HGFの2種類以上の異型体を暗号化する一つ以上のヌクレオチド序列を用いることが治療効果の面で好ましい。2種類以上のHGF異型体-暗号化ヌクレオチド序列には、一つのポリヌクレオチドが提供されてもよく、別途のポリヌクレオチドが提供されてもよい。

【0058】

また、本明細書において、「ヒト肝細胞成長因子の変異体」は、HGF X 6(序列番号3)(大韓民国登録特許第10-0562824号参照)であり得る。

【0059】

また、本明細書において、「ヒト肝細胞成長因子の変異体」は、HGF X 7(序列番号4)(大韓民国登録特許第10-0562824号参照)であり得る。

30

【0060】

また、本明細書において、「ヒト肝細胞成長因子の変異体」は、HGF X 8(序列番号5)(大韓民国登録特許第10-0562824号参照)であり得る。

【0061】

また、本明細書において、「ヒト肝細胞成長因子の変異体」は、欠損された変異型HGF(deleted variant of HGF; dHGF)(序列番号6)(大韓民国登録特許第10-0562824号参照)であり得る。本明細書で使用される「dHGF」という用語は、動物、好ましくは哺乳動物でHGF遺伝子の選択的スプライシングによって生成されるHGFタンパク質の欠損された変異体、より好ましくは全長HGF序列(728個のアミノ酸)から鎖の1番目のクリングルドメインで5個のアミノ酸(F、L、P、S及びS)が欠損された723個のアミノ酸からなるヒトHGFを称する。

40

【0062】

〔ヒト1型インスリン類似成長因子(IGF1)遺伝子〕

ヒトインスリン類似成長因子遺伝子、特に、ヒト1型インスリン類似成長因子(IGF1)遺伝子は、序列番号7の塩基序列からなるものであり得る。ヒトインスリン類似成長因子遺伝子は、タンパク質形態の治療剤に開発されてもよく、遺伝子治療剤の形態に開発されてもよい。

【0063】

IGF1は、主に、ヒト成長ホルモン(hGH)による刺激の結果として肝によって分泌される。人体のほぼ全ての細胞、特に、筋肉、軟骨、骨、肝、腎臓、神経、皮膚及び肺

50

内の細胞は IGF1 によって影響を受ける。前記 IGF1 は、インスリン - 類似効果のみならず、細胞成長調節効果を有する。

【0064】

〔ヒト1型インスリン類似成長因子の異型体〕

本明細書で使用される「IGF1異型体(isoform)」という用語は、全ての対立遺伝子変異体(variants)を含む、動物で自然に生成される(naturally occurring) IGF1アミノ酸序列と少なくとも80%同じアミノ酸序列を有するIGF1ポリペプチドを意味する。例えば、IGF1異型体は、IGF1の正常型(normal form)又は野生型(wild type)、そして、IGF1の多様な変異体(例えば、スプライシング変異体、欠損変異体、置換変異体)を全て包括する意味を有する。

10

【0065】

IGF1異型体の具体的な例としては、IGF1 Ea、IGF1 Eb、IGF1 Ecなどがある。

【0066】

〔ヒト1型インスリン類似成長因子の変異体〕

本明細書において、「IGF1変異体」は、欠損された変異型IGF1(deleted variant of IGF1; dIGF1)又は特定位置のアミノ酸が置換された変異型IGF1であり得る。本明細書で使用される「dIGF1」という用語は、動物、好ましくは哺乳動物でIGF1遺伝子の選択的スプライシングによって生成されるIGF1タンパク質の欠損された変異体を称する。また、置換された変異型IGF1の具体的な例として、「IGF1変異体」は、位置42のアミノ酸グリシンがセリンによって置換されたポリペプチドであり得る。又は、具体的な他の例として、「IGF1変異体」は、IGF1タンパク質のアミノ酸G1、P2、E3、R36、R37、K68、S69及び/又はA70に突然変異があるポリペプチドであり得る。

20

【0067】

〔プラスミド〕

本発明に係る遺伝子発現増加用組成物は、前記遺伝子を暗号化する単一鎖ポリヌクレオチドを含む各プラスミドと共に投与される場合、遺伝子の発現効率及びこれによる効能をさらに増大させ得る。

30

【0068】

本明細書において、「プラスミド」という用語は、一般に、外来遺伝子が宿主細胞で発現できるようにベクターに作動的に連結されて形成された環状のDNA分子を言う。しかし、プラスミドは、目的とする遺伝子を含むように遺伝子組換えによって特定の制限酵素によって分解され、新しい遺伝子を導入するベクターとして使用され得る。よって、本願では、プラスミドとベクターは相互交換的に使用され、遺伝工学分野で通常の知識を有する者であれば、それらの名称を区分しないとしても、その意味を十分に理解するだろう。

【0069】

本明細書において、「ベクター」という用語は、外来遺伝子を宿主細胞内に安定的に運搬できる運搬体としてのDNA分子を言う。有用なベクターになるためには複製されるべきであり、宿主細胞内に流入し得る方案を備えるべきで、自分の存在を検出できる手段を備えるべきである。

40

【0070】

<発現>

〔発現ベクター〕

本発明に係る遺伝子発現増加用組成物は、前記遺伝子を暗号化する単一鎖ポリヌクレオチドを含む各発現ベクターと共に投与される場合、遺伝子の発現効率及びこれによる効能をさらに増大させ得る。

【0071】

本明細書において、「発現(expression)」という用語は、細胞での前記遺

50

伝子の生成を意味する。

【0072】

本明細書において、「発現ベクター」という用語は、適当な宿主で前記遺伝子を発現できるベクターであって、遺伝子挿入物が発現されるように作動可能に連結された必須的な調節要素を含む遺伝子コンストラクトを言う。

【0073】

本明細書において、「作動可能に連結された (operably linked)」という用語は、一般的な機能を行うように核酸発現調節序列と前記遺伝子を暗号化するポリヌクレオチドとが機能的に連結 (functional linkage) されていることを意味する。例えば、プロモーターと前記遺伝子を暗号化するポリヌクレオチドとが作動可能に連結され、前記ポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼし得る。組換えベクターとの作動的連結は、当該技術分野でよく知られている遺伝子組換え技術を用いて行うことができ、部位 - 特異的 DNA 切断及び連結は、当該技術分野で一般的に知られている酵素などを用いて行う。

10

【0074】

本発明の発現ベクターは、プラスミド、ベクター又はウイルスベクターを用いて製作されるが、これに限定されることはない。適切な発現ベクターは、プロモーター、オペレーター、開始コドン、終結コドン、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーなどの発現調節エレメントなどを含むことができ、目的に応じて多様に製造可能であり、ベクターのプロモーターは構成的又は誘導性であり得る。現在、プラスミドがベクターの最も通常的に使用される形態であるので、本発明の明細書において、「プラスミド (plasmid)」及び「ベクター (vector)」は時々相互交換的に使用される。本発明の目的上、プラスミドベクターを用いることが好ましい。このような目的に使用可能な典型的なプラスミドベクターは、(a) 宿主細胞当たり数個から数百個のプラスミドベクターを含むように複製を効率的に行わせる複製開始点、及び (b) 外来 DNA 切片が挿入され得る制限酵素切断部位を含む構造を有している。適切な制限酵素切断部位が存在しないとしても、通常の方法による合成オリゴヌクレオチドアダプター (oligonucleotide adaptor) 又はリンカー (linker) を使用すると、ベクターと外来 DNA とを容易にライゲーション (ligation) することができる。

20

【0075】

本発明に係る遺伝子の過剰発現のために使用されるベクターは、当業界で公知となった発現ベクターであり得る。本発明の骨格ベクターとしては、特に制限されることはないが、pCDNA3.1、pGP、pEF、pVAX、pUDK、pCK、pQE40、pT7、pET/Rb、pET28a、pET-22b(+) 及び pGEX からなる群から選ばれる多様なベクターを使用することができ、pGP、pCK、pUDK 及び pVAX からなる群から選ばれる一つのベクターを用いることが効果の面で好ましい。

30

【0076】

好ましい具体例において、本発明の発現ベクターは、図1の開裂地図を有する pGP ベクターを含む発現ベクターであり得る。

【0077】

<薬学組成物>

また、本発明は、前記遺伝子発現増加用組成物；及び前記ヒト肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor; HGF) 遺伝子、ヒト肝細胞成長因子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子；を含むことを特徴とする虚血性疾患、神経疾患、腎臓疾患又は肝疾患の予防又は治療用薬学組成物を提供する。前記虚血性疾患、神経疾患、腎臓疾患又は肝疾患の予防又は治療用薬学組成物は、少量のヒト肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor; HGF) 遺伝子、ヒト肝細胞成長因子の異型体遺伝子又はその変異体遺伝子によっても体内で前記遺伝子の発現が増加することによって優れた治療効果を示すので、虚血性疾患、神経疾患、腎臓疾患又は肝疾患の予防又は治療に有用に利用可能である。

40

50

【0078】

前記ヒト肝細胞成長因子遺伝子は、序列番号2の塩基序列からなるものであって、前記ヒト肝細胞成長因子遺伝子の変異体は、序列番号3～序列番号6の塩基序列から選ばれるいずれか一つからなるものであり得る。

【0079】

前記「虚血性疾患」は、虚血性脳血管疾患、虚血性心臓疾患、虚血性心筋梗塞、糖尿病性血管心臓疾患、虚血性心不全、虚血性血管疾患、閉塞性動脈硬化症、心筋肥大症、虚血性網膜症、虚血性下肢疾患、虚血性大腸炎、虚血性急性腎不全症、虚血性肺疾患、虚血性脳卒中、虚血性怪死、脳外傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、新生児低酸素症、緑内障及び糖尿病性神経病変からなる群から選ばれるものであり得る。

10

【0080】

前記「神経疾患」は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病（Huntington's chorea）、脊髄小脳変性症、脊髄損傷、脳梗塞、脳虚血及び多発性硬化症からなる群から選ばれる中枢神経疾患であり得る。

【0081】

前記「腎臓疾患」は、急性腎不全又は慢性腎不全であり得る。

【0082】

前記「肝疾患」は、肝虚血、脂肪肝、肝炎、肝癌、肝線維化又は肝硬変症であり得る。

20

【0083】

また、本発明は、前記遺伝子発現増加用組成物；及びヒト1型インスリン類似成長因子（Insulin like Growth Factor-1；IGF1）遺伝子、ヒト1型インスリン類似成長因子遺伝子の異型体遺伝子及びその変異体遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子；を含む、IGF1受容体の結合によって媒介される症状又は疾患の予防又は治療用薬学組成物を提供する。前記IGF1受容体の結合によって媒介される症状又は疾患の予防又は治療用薬学組成物は、少量のヒト1型インスリン類似成長因子遺伝子によっても体内で前記遺伝子の発現が増加することによって優れた治療効果を示すので、前記IGF1受容体の結合によって媒介される症状又は疾患の予防又は治療に有用に利用可能である。

30

【0084】

前記ヒト1型インスリン類似成長因子遺伝子は、序列番号7の塩基序列からなるものであり得る。

【0085】

本発明の薬学組成物において、前記遺伝子発現増加用組成物：前記成長因子遺伝子は、1：0.5～1：30の体積比（w/v）で含まれ得る。

【0086】

一方、前記症状又は疾患は、低身長、肥満、体重減少、悪液質、食慾不振、神経退行性障害、線維症-関連症状、軟骨障害、骨疾患、炎症障害、腸障害、インスリン耐性、糖尿病、糖尿病性ケトアシドーシス、ラブソン・メンデンホール症候群（Rabson-Mendenhall syndrome）、網膜症、末端肥大症（acromegaly）、線維筋性異形成症（fibromuscular hyperplasia）及び心臓障害からなる群から選ばれた1種であり得る。

40

【0087】

特に、前記低身長に対する治療が要求される個体は、インスリン類似成長因子-1欠乏症（IGFD）を有しているヒト小児個体であって、本発明の薬学組成物は、ヒト小児個体でIGFDの治療に非常に有効である。

【0088】

本発明の薬学組成物は、遺伝子の治療のためのものであり得る。

【0089】

50

〔 剤形 〕

本発明に記述された薬学組成物は、治療用薬剤学的製剤に剤形化され得る。

【 0 0 9 0 】

このような薬剤学的担体及び賦形剤のみならず、適当な薬剤学的剤形は当業界に公知となっている（例えば、「Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins」, Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) 又は「Handbook of Pharmaceutical Excipients」, 3rd edition, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)）。特に、本発明の薬学組成物は、凍結乾燥形態又は安定した液体の形態に剤形化され得る。本発明の組成物は、当業界に公知となった多様な手順を通じて凍結乾燥され得る。凍結乾燥された剤形は、注射用滅菌水又は滅菌生理食塩水などの一つ以上の薬剤学的に許容される希釈剤を添加して使用する前に再構成する。

10

【 0 0 9 1 】

組成物の剤形は、任意の薬剤学的に適当な投与手段によって個体に伝達される。多様な伝達システムが公知となっており、組成物を任意の便利な経路で投与するのに使用され得る。主に、本発明の組成物は全身投与される。全身投与用の場合、本発明の組成物は、通常の方法によって非経口（例：静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、脳内、肺内、鼻腔内又は経皮）伝達又は腸（例：経口、膣又は直腸）伝達用に剤形化される。最も優先的な投与経路は静脈内及び筋肉内投与である。これらの剤形は、注入又は一時注射によって連続して投与され得る。一部の剤形は徐放型システムを含む。

20

【 0 0 9 2 】

本発明の組成物は、許容できない副作用を起こす容量に至らず、治療する病態又は兆候の病度又は拡散を予防又は縮小させながら所望の効果を生産するに十分な容量を意味する治療学的有効量で患者に投与する。正確な容量は、兆候、剤形、投与方式などの多様な要因によって変わり得るので、それぞれの兆候ごとに臨床前に及び臨床試験を通じて決定されるべきである。

【 0 0 9 3 】

本発明の薬学組成物は、単独で投与することもでき、他の治療剤と併用して投与することもできる。このような製剤は、同一の薬剤の一部として含まれ得る。

30

【 0 0 9 4 】

〔 治療方法 〕

また、本発明は、虚血性疾患、神経疾患、腎臓疾患又は肝疾患を病んでいる個体、又は IGF 1 受容体の結合によって媒介される症状又は疾患を病んでいる個体を治療する方法に関する。前記治療方法は、本発明の薬学組成物を有効量で個体に投与する段階を含み得る。

【 0 0 9 5 】

本発明の一具現例によると、本発明の HGF 又は IGF 1 などの遺伝子は、10 ng ~ 100 mg の投与量で投与され得る。前記 HGF 又は IGF 1、又はこれを暗号化するポリヌクレオチドの投与が 1 回を超えて繰り返されるとき、投与量は毎回同一又は異なり得る。

40

【 0 0 9 6 】

以下、好ましい実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。しかし、これらの実施例は、本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の範囲がこれによって制限されないことは当業界の通常の知識を有する者にとって自明であろう。

【 実施例 〕

【 0 0 9 7 】

< 材料の準備 >

〔 遺伝子 〕

（ヒト肝細胞成長因子（Hepatocyte Growth Factor ; HGF

50

))

序列番号2で表示されるヒト肝細胞成長因子(HGF)の遺伝子(NCBI塩基序列NM_000601.6参考)をGenscript社(USA)に依頼して製作した。

【0098】

(ヒト肝細胞成長因子の変異体(HGF X6))

序列番号3で表示されるヒト肝細胞成長因子の変異体遺伝子、HGF X6(大韓民国登録特許第10-0562824号参考)をGenscript社(USA)に依頼して製作した。

【0099】

(ヒト肝細胞成長因子の変異体(HGF X7))

10

序列番号4で表示されるヒト肝細胞成長因子の変異体遺伝子、HGF X7(大韓民国登録特許第10-0562824号参考)をGenscript社(USA)に依頼して製作した。

【0100】

(ヒト肝細胞成長因子の変異体(HGF X8))

序列番号5で表示されるヒト肝細胞成長因子の変異体遺伝子、HGF X8(大韓民国登録特許第10-0562824号参考)をGenscript社(USA)に依頼して製作した。

【0101】

(ヒト肝細胞成長因子の変異体(dHGF))

20

序列番号6で表示されるヒト肝細胞成長因子の変異体遺伝子、dHGF(大韓民国登録特許第10-0562824号参考)をGenscript社(USA)に依頼して製作した。

【0102】

(ヒト1型インスリン類似成長因子(Insulin like Growth Factor-1; IGF1))

序列番号7で表示されるヒト1型インスリン類似成長因子遺伝子、IGF1(NCBI塩基序列NM_001111283.2参考)をバイオニクス社(大韓民国)に依頼して製作した。

【0103】

30

(ヒト血管内皮細胞成長因子(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF))

序列番号8で表示されるヒト血管内皮成長因子遺伝子、VEGF(GenBank塩基序列AB021221.1参考; VEGF₁₆₅)をバイオニクス社(大韓民国)に依頼して製作した。

【0104】

(ヒト1型線維芽細胞成長因子(Fibroblast Growth Factor-1; FGF1))

序列番号9で表示されるヒト1型線維芽細胞成長因子遺伝子、FGF1(GenBank塩基序列X65778.1参考)をバイオニクス社(大韓民国)に依頼して製作した。

40

【0105】

(ヒト4型線維芽細胞成長因子(Fibroblast Growth Factor-4; FGF4))

序列番号10で表示されるヒト4型線維芽細胞成長因子遺伝子、FGF4(GenBank塩基序列M17446.1参考)をバイオニクス社(大韓民国)に依頼して製作した。

【0106】

(ヒトB型血小板由来成長因子(Platelet-derived Growth Factor; PDGF-B))

序列番号11で表示されるヒトB型血小板由来成長因子遺伝子、PDGF-B(Gen

50

Bank 塩基序列 X02811.1 参考) をバイオニクス社 (大韓民国) に依頼して製作した。

【0107】

〔プラスミド (pGP)〕

Lee Y, et al., Improved expression of vascular endothelial growth factor by naked DNA in mouse skeletal muscles: implication for gene therapy of ischemic diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 272 (1): 230 - 235) の論文を参考にして pCK プラスミドを合成した後、下記の表 1 のプライマー 1 及びプライマー 2 を用いて上述した方法と同一の方法で PCR を行うことによって切片を収得し、EcoRI 酵素で 37 で 1 時間にわたって反応した後、Expin Gel SV (GeneAll, Korea) キットを用いて DNA を精製した。その後、T4 リガーゼ (ligase) を用いて 30 分間ライゲーションを行った後、E. coli に一晚 (overnight) 培養した。翌日にコロニー (colony) を培養した後、ミニ-プレップ (mini-prep) によって DNA を分離し、序列番号 1 で表示される pGP プラスミドを製作した。図 1 は、本発明の一実施例に係る pGP ベクターの開裂地図を示した図である。

10

【0108】

【表 1】

20

(表 1)

プライマー番号	プライマー名	塩基序列
1	pGP (F)	GACGAATTCACGCGTCTCGAGGCGGC CGCTCTAGAGGGCCCGTTTAAA
2	pGP (R)	GACGAATTCGTCGACGGATCCGCTAG CAAGCTTCGTGTCAAGGACGGT

【0109】

< 製造例 >

〔遺伝子を含むプラスミド DNA の製造〕

前記のように準備した各遺伝子のそれぞれと pGP プラスミドをそれぞれ NheI と NotI 酵素で 1 時間にわたって切断し、アガロースゲルに電気泳動することによって切片を分離した。分離された切片を T4 リガーゼを用いて 30 分間ライゲーションし、E. coli に一晚培養した。翌日にコロニーを培養した後、ミニ-プレップによって DNA を分離し、これを NheI 及び NotI で確認した。クローニングが完了した DNA は、制限酵素で確認された E. coli 上清液 (supernatant) を 4 L のフラスコ 2 個にカナマイシン (kanamycin) と共に入れて一晚培養した後、Endofree Giga prep. キット (Qiagen, USA) を用いてプラスミド DNA に生産し、これを動物実験に使用した。前記製造されたそれぞれのプラスミド DNA を下記の表 2 にまとめて示した。

30

【0110】

40

【表 2】

(表 2)

遺伝子	序列番号	プラスミドDNA
ヒト肝細胞成長因子 (HGF)	序列番号 2	pGP-HGF
ヒト肝細胞成長因子の変異体 (HGFX6)	序列番号 3	pGP-HGFX6
ヒト肝細胞成長因子の変異体 (HGFX7)	序列番号 4	pGP-HGFX7
ヒト肝細胞成長因子の変異体 (HGFX8)	序列番号 5	pGP-HGFX8
ヒト肝細胞成長因子の変異体 (dHGF)	序列番号 6	pGP-dHGF
ヒト1型インスリン類似成長因子 (IGF1)	序列番号 7	pGP-IGF1
ヒト血管内皮細胞成長因子 (VEGF)	序列番号 8	pGP-VEGF
ヒト1型線維芽細胞成長因子 (FGF1)	序列番号 9	pGP-FGF1
ヒト4型線維芽細胞成長因子 (FGF4)	序列番号 10	pGP-FGF4
ヒトB型血小板由来成長因子 (PDGF-B)	序列番号 11	pGP-PDGF-B

10

【0111】

< 実施例 >

〔実施例 1：遺伝子発現増加用組成物及び HGF を含む薬学組成物の製造 (HGF - MP1、HGF - MP2 及び HGF - MP3)〕

(遺伝子発現増加用組成物)

平均直径が約 2.5 μm で、コアはヘキサフルオロ化硫黄、シェルは脂質を含んで構成されており、標準コード 621400210 で表示されるコア - シェル構造のマイクロ粒子をブラッコイメーシングコリアから購入した (MP1)。また、平均直径が約 2.4 μm ~ 3.6 μm で、コアはペルフルオロブタン、シェルは脂質及び界面活性剤を含んで構成されており、標準コード 646300210 で表示されるコア - シェル構造のマイクロ粒子を GEヘルスケア AS 大韓民国支店から購入した (MP2)。また、平均直径が約 1.1 μm ~ 3.3 μm で、コアはペルフルオロプロパン、シェルは脂質及び界面活性剤を含んで構成されており、標準コード 662900020 で表示されるコア - シェル構造のマイクロ粒子を B o o K y u n g S . M から購入した (MP3)。

20

【0112】

前記マイクロ粒子 MP1 は、製造社のマニュアルによって 225 μg に 2 ml の生理食塩水を混合することによって懸濁液 (遺伝子発現増加用組成物) に製造し、MP2 は、製造社のマニュアルによって 16 μl を 2 ml の注射用水と混合することによって懸濁液 (遺伝子発現増加用組成物) に製造した。また、生理食塩水と混合されたマイクロ粒子溶液 MP3 (150 $\mu\text{l} / \text{ml}$) は、製造社のマニュアルによって 45 秒間強く振って懸濁液 (遺伝子発現増加用組成物) に製造した。

30

【0113】

(遺伝子発現増加用組成物及び HGF を含む薬学組成物の製造)

前記それぞれの遺伝子発現増加用組成物 (MP1、MP2 及び MP3) 15 μl と前記製造された pGP-HGF 70 $\mu\text{g} / 35 \mu\text{l}$ とを混合することによってそれぞれの薬学組成物 HGF - MP1、HGF - MP2 及び HGF - MP3 を製造した。

【0114】

〔実施例 2：遺伝子発現増加用組成物及び HGFX7 を含む薬学組成物の製造 (HGFX7 - MP1 及び HGFX7 - MP2)〕

(遺伝子発現増加用組成物)

前記実施例 1 と同一の方法で遺伝子発現増加用組成物を製造した。

【0115】

(遺伝子発現増加用組成物及び HGFX7 を含む薬学組成物の製造)

前記それぞれの遺伝子発現増加用組成物 (MP1 及び MP2) 15 μl と前記製造された pGP-HGFX7 70 $\mu\text{g} / 35 \mu\text{l}$ とを混合することによってそれぞれの薬学組成物 HGFX7 - MP1 及び HGFX7 - MP2 を製造した。

40

【0116】

50

〔実施例 3：遺伝子発現増加用組成物及び IGF 1 を含む薬学組成物の製造 (IGF 1 - MP 1、IGF 1 - MP 2 及び IGF 1 - MP 3)〕

(遺伝子発現増加用組成物)

前記実施例 1 と同一の方法で遺伝子発現増加用組成物を製造した。

【0117】

(遺伝子発現増加用組成物及び IGF 1 を含む薬学組成物の製造)

前記それぞれの遺伝子発現増加用組成物 (MP 1、MP 2 及び MP 3) 15 μ l と前記製造された pGP - IGF 1 70 μ g / 35 μ l とを混合することによってそれぞれの薬学組成物 IGF 1 - MP 1、IGF 1 - MP 2 及び IGF 1 - MP 3 を製造した。

【0118】

10

〔比較例 1：遺伝子発現増加用組成物及び VEGF を含む薬学組成物の製造 (VEGF - MP 1 及び VEGF - MP 2)〕

(遺伝子発現増加用組成物)

前記実施例 1 と同一の方法で遺伝子発現増加用組成物を製造した。

【0119】

(遺伝子発現増加用組成物及び VEGF を含む薬学組成物の製造)

前記それぞれの遺伝子発現増加用組成物 (MP 1 及び MP 2) 15 μ l と前記製造された pGP - VEGF 70 μ g / 35 μ l とを混合することによってそれぞれの薬学組成物 VEGF - MP 1 及び VEGF - MP 2 を製造した。

【0120】

20

〔比較例 2：遺伝子発現増加用組成物及び FGF 1 を含む薬学組成物の製造 (FGF 1 - MP 1 及び FGF 1 - MP 2)〕

(遺伝子発現増加用組成物)

前記実施例 1 と同一の方法で遺伝子発現増加用組成物を製造した。

【0121】

(遺伝子発現増加用組成物及び FGF 1 を含む薬学組成物の製造)

前記それぞれの遺伝子発現増加用組成物 (MP 1 及び MP 2) 15 μ l と前記製造された pGP - FGF 1 70 μ g / 35 μ l とを混合することによってそれぞれの薬学組成物 FGF 1 - MP 1 及び FGF 1 - MP 2 を製造した。

【0122】

30

〔比較例 3：遺伝子発現増加用組成物及び FGF 4 を含む薬学組成物の製造 (FGF 4 - MP 1 及び FGF 4 - MP 2)〕

(遺伝子発現増加用組成物)

前記実施例 1 と同一の方法で遺伝子発現増加用組成物を製造した。

【0123】

(遺伝子発現増加用組成物及び FGF 4 を含む薬学組成物の製造)

前記それぞれの遺伝子発現増加用組成物 (MP 1 及び MP 2) 15 μ l と前記製造された pGP - FGF 4 70 μ g / 35 μ l とを混合することによってそれぞれの薬学組成物 FGF 4 - MP 1 及び FGF 4 - MP 2 を製造した。

【0124】

40

〔比較例 4：遺伝子発現増加用組成物及び PDGF - B を含む薬学組成物の製造 (PDGF - B - MP 1 及び PDGF - B - MP 2)〕

(遺伝子発現増加用組成物)

前記実施例 1 と同一の方法で遺伝子発現増加用組成物を製造した。

【0125】

(遺伝子発現増加用組成物及び PDGF - B を含む薬学組成物の製造)

前記それぞれの遺伝子発現増加用組成物 (MP 1 及び MP 2) 15 μ l と前記製造された pGP - PDGF - B 70 μ g / 35 μ l とを混合することによってそれぞれの薬学組成物 PDGF - B - MP 1 及び PDGF - B - MP 2 を製造した。

【0126】

50

〔対照群〕

（遺伝子発現増加用組成物）

in vivo JetPEI (Polypplus, USA) の製造社のマニュアルによって JetPEI 128 μ l を 2ml の 5% グルコースと混合することによって懸濁液（遺伝子発現増加用組成物に対応）を製造した。

【0127】

（遺伝子発現増加用組成物及びそれぞれの遺伝子を含む薬学組成物の製造）

前記遺伝子発現増加用組成物 15 μ l と各 DNA 70 μ g / 35 μ l とを混合することによってそれぞれの薬学組成物 HGF - JetPEI、HGF α 7 - JetPEI、IGF1 - JetPEI、及び VEGF - JetPEI を製造した。

10

【0128】

< 実験例 >

〔実験例 1：マウスでのタンパク質の発現量〕

前記対照群、実施例及び比較例に係る薬学組成物のそれぞれを Balb/c マウス (Samtako Bio) の下肢の腓腹筋に 75 μ g / 50 μ l / leg ずつ注射した。

【0129】

投与後、7日目にマウスを屠殺し、注射した部位の筋肉を切り取った。そして、前記切り取ったそれぞれの筋肉を液体窒素及びタンパク質抽出キット (cellbiolabs, USA) を用いて粉碎した後、総タンパク質を分離した。分離された総タンパク質量は、DCタンパク質分析キット (Bio-Rad laboratories, USA) を用いて測定した。

20

【0130】

HGFタンパク質の測定のためには、同一の量のタンパク質を用いて ELISA キット (R&D systems, USA) を通じて各遺伝子の発現量を測定し、その結果を図 2 及び図 3 に示した。

【0131】

IGF1タンパク質の測定のためには、同一の量のタンパク質を用いて IGF1 ELISA キット (R&D systems, USA) を通じて各遺伝子の発現量を測定し、その結果を図 4 に示した。

【0132】

図 2 ~ 図 4 を通じて、本発明に係る薬学組成物（実施例 1 ~ 実施例 3）を投与した場合、各対照群の組成物に比べて統計的に有意に高い HGF 又は IGF1 遺伝子の発現量を示すことが分かる。

30

【0133】

VEGFタンパク質の測定のためには、同一の量のタンパク質を用いて VEGF ELISA キット (R&D systems, USA) を通じて各遺伝子の発現量を測定し、その結果を図 5 に示した。

【0134】

FGF1タンパク質の測定のためには、同一の量のタンパク質を用いて FGF1 ELISA キット (Abcam, USA) を通じて各遺伝子の発現量を測定し、その結果を図 6 に示した。

40

【0135】

FGF4タンパク質の測定のためには、同一の量のタンパク質を用いて FGF4 ELISA キット (Abcam, USA) を通じて各遺伝子の発現量を測定し、その結果を図 7 に示した。

【0136】

PDGF-Bタンパク質の測定のためには、同一の量のタンパク質を用いて PDGF-B ELISA キット (R&D systems, USA) を通じて各遺伝子の発現量を測定し、その結果を図 8 に示した。

【0137】

50

図5～図8を通じて、比較例1～比較例4の組成物を投与した場合は、各対照群の組成物に比べて有意に発現量が増加しないことが分かる。

以上の各結果を通じて、本発明に係る実施例1～実施例3の組成物において、HGF又はIGF1遺伝子の発現量を有意的に増加できることを確認した。

【0138】

〔実験例2：糖尿病で誘発された末梢神経障害ラットモデルにおける本発明の薬学組成物の効能評価〕

糖尿病性神経病変 (diabetic peripheral neuropathy、DPN)の原因は、糖尿病の誘発によって血糖が上昇し、これを通じた微細血管の損傷によって末梢神経損傷が誘発され、臨床的に痛み、異常などの症状が発病される虚血性疾患及び神経疾患の複合疾患である。本研究で使用したストレプトゾトシンで誘発された糖尿病性神経病変 (streptozotocin induced diabetic peripheral neuropathy) が代表的な動物モデルである。

【0139】

Samtako Bioで購入した6週齢雄のスプラーグドローリー (Sprague-Dawley) ラットの静脈にSTZ (streptozotocin) 70 mg/kgを注入し、1型糖尿病を誘発した。STZの注入後、1週目に非絶食血糖が300 mg/dL以上になる個体を選別し、各個体別に痛み誘発程度を測定するためのマニュアルフォンフレイ (manual Von Frey) テストを通じてPWT (paw withdrawal threshold) を測定し、痛みが誘発された個体 (PWT値が4.0以下) を選別した後、各群当たり5匹ずつ2群に分離した。

【0140】

その後、対照群には、pGP-HGF X7 DNA 400 µgを両側の腓腹筋にそれぞれ200 µg / 200 µlずつ投与し、実施例2のHGF X7-MP2を両側の腓腹筋に対照群と同量 (400 µg) で投与した。

【0141】

投与後、2週目に痛み尺度であるPWTを測定した結果、実施例2のHGF X7-MP2を投与した群では、対照群と比較して統計的に有意にPWT値が上昇したことを確認した (図9参照)。

【0142】

〔実験例3：慢性絞扼損傷手術によって誘発された神経障害ラットモデルにおける本発明の薬学組成物の効能評価〕

神経性疼痛 (neuropathic pain) は、神経系異常に起因した慢性神経疾患として知られており、臨床的に痛みの感受性が増加し、異常、痛みなどを示すようになる。このような慢性神経性疼痛は、本研究で使用した座骨神経の結紮によって発生する慢性絞扼損傷が代表的な動物モデルである。

【0143】

オリエンタバイオで購入した5週齢雄のスプラーグドローリーラットを呼吸麻酔 (isoflurane、二酸化窒素、酸素混合) し、左側大腿部の中間部を切開することによって座骨神経を露出させた。露出した座骨神経を4-0 catgutの縫合糸3本を用いて1.0 mm～1.5 mmの間隔で緩やかに結紮して縫合した。手術1週目にマニュアルフォンフレイテストを通じてPWT (paw withdrawal threshold) を測定し、痛みが誘発された個体 (PWT値が4.0以下) を選別し、各群当たり5匹ずつ2群に分離した。

【0144】

その後、対照群には、pGP-HGF DNA 1 mgを左側大腿筋に250 µg / 250 µlずつ4ヶ所に投与し、実施例1のHGF-MP2を対照群と同一の部位に同一に250 µg / 250 µlずつ4ヶ所 (合計1 mg) に投与した。

【0145】

投与後、2週目に痛み尺度であるPWTを測定した結果、実施例1のHGF-MP2を

10

20

30

40

50

投与した群では、対照群と比較して統計的に有意にPWT値が上昇し、痛みを感じる力の大きさが有意に増加することが確認された(図10参照)。

【0146】

以上の結果を通じて、本発明の組成物が遺伝子の発現量を著しく増加させることによって、様々な疾患モデルで遺伝子の機能を向上させることを証明した。

【0147】

具体的に、前記実験例2では、本発明の遺伝子発現増加用組成物をHGF X7と共に糖尿病性神経病変が誘発されたラットモデルに投与した後、2週目になる日にPWT値を測定した結果、対照群に比べて80%ほどPWT値が上昇したことを確認した。

【0148】

また、前記実験例3では、本発明の遺伝子発現増加用組成物をHGFと共に神経性疼痛が誘発されたラットモデルに投与した後、2週目になる日にPWT値を測定した結果、対照群に比べて40%以上PWT値が上昇したことを確認した

【0149】

前記のように、PWT値が上昇することは、痛みを感じる力の大きさが有意に増加すること、すなわち、痛みが緩和されることを意味する。このように、糖尿病性神経病変又は神経性疼痛が誘発された動物モデルで痛みが緩和される効果が表れることは、本発明の遺伝子発現増加用組成物によって体内でHGF又はHGF X7の発現が増加したためであると見なされる。

【0150】

すなわち、前記各実験例を通じて、本発明の遺伝子発現増加用組成物及びヒト肝細胞成長因子(HGF)、その異型体及びその変異体から選ばれる1種以上の遺伝子を含む薬学組成物が、神経性疼痛の動物モデルと糖尿病性神経病変の動物モデルのいずれにおいても痛みを緩和させる効果を有することを確認することができた。したがって、本発明の遺伝子発現増加用組成物及びヒト肝細胞成長因子(HGF)、その異型体及びその変異体から選ばれる1種以上の遺伝子を有効成分として含む薬学組成物を用いる場合、糖尿病性神経病変又は神経性疼痛などの多様な神経疾患を予防、緩和又は治療できると判断される。

【0151】

以上では、本発明を前記言及した好ましい実施例として説明したが、発明の要旨及び範囲から逸脱しない限り、多様な修正や変形を行うことが可能である。また、添付の特許請求の範囲は、本発明の要旨に属するこのような修正や変形を含む。

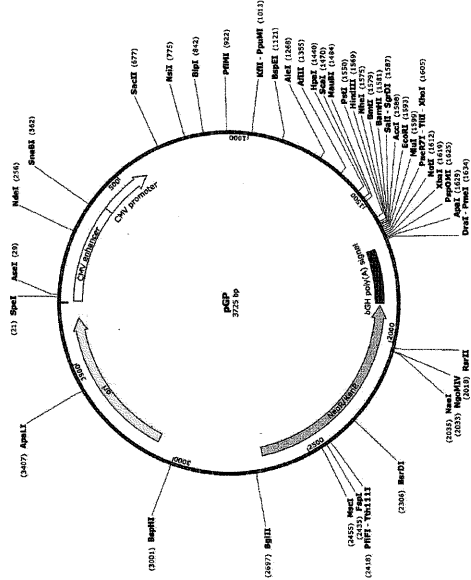
10

20

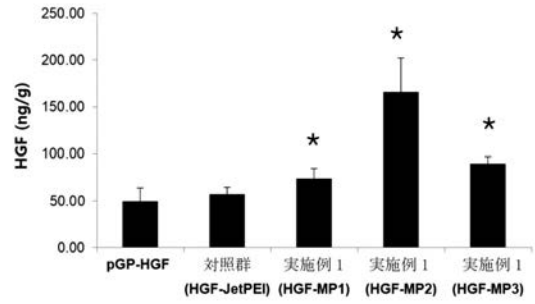
30

【 図 1 】

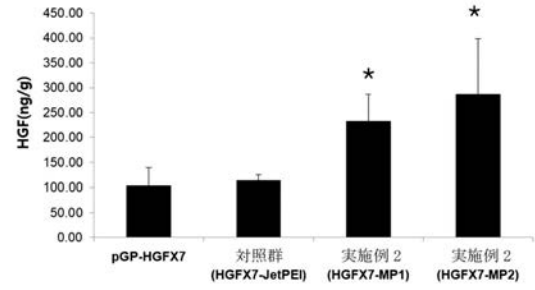
[5]



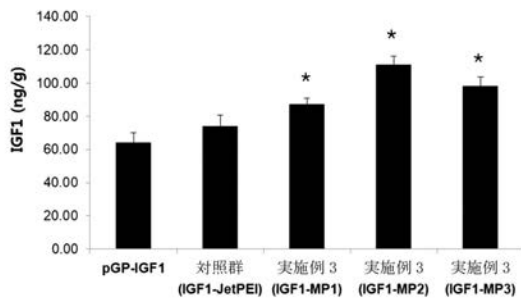
【 図 2 】



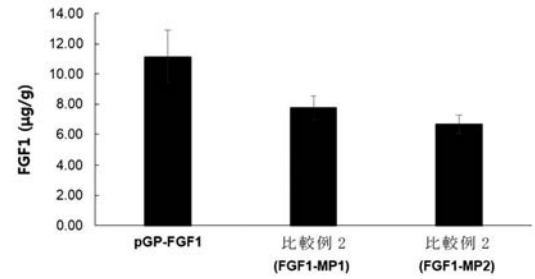
【 図 3 】



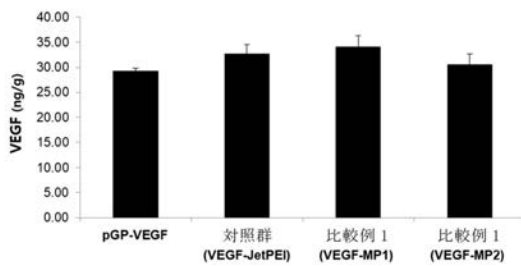
【 図 4 】



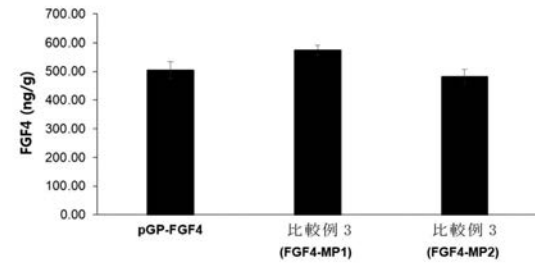
【 図 6 】



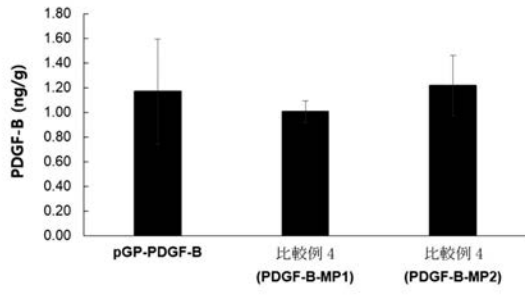
【 図 5 】



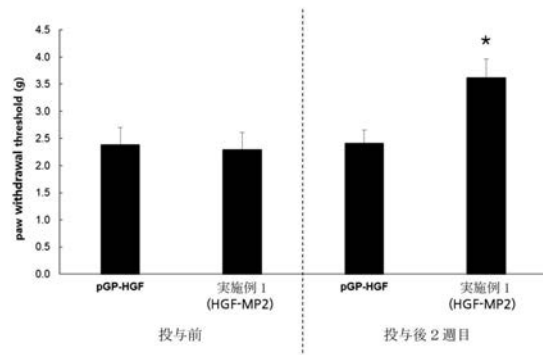
【 図 7 】



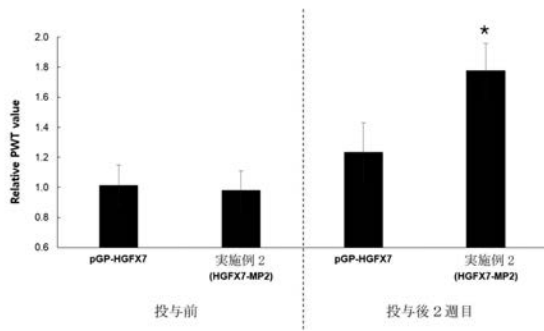
【 図 8 】



【 図 10 】




【 図 9 】



【 配列表 】

2021513544000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2019/001708
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>A61K 9/16(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 7/04(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 9/16; A61K 38/22; A61K 47/48; A61K 48/00; A61K 49/22; A61K 9/127; A61P 5/00; C12N 5/10; A61P 7/04 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: core-shell, micro particle, hallogen, gene		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-507207 A (IMARX PHARMACEUTICAL CORP.) 05 June 2001 See claims 1, 2, 4, 9, 13, 14, 28, 29, 38, 39, 43, 44, 69; example 13; and pages 31, 60, 54, 85.	1-10,14-17
A		11-13
A	KR 10-2017-0075771 A (LANTHEUS MEDICAL IMAGING, INC.) 03 July 2017 See paragraphs [0033], [0058], [0076].	1-17
A	KR 10-2014-0063697 A (GENERAL ELECTRIC COMPANY) 27 May 2014 See paragraphs [0007]-[0009], [0015], [0024].	1-17
A	KR 10-2015-0032944 A (THE OHIO STATE UNIVERSITY) 31 March 2015 See paragraphs [0031], [0034].	1-17
A	JP 2007-505140 A (TERCICA, INC.) 08 March 2007 See paragraph [0050] and claim 1.	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center;">16 MAY 2019 (16.05.2019)</p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">16 MAY 2019 (16.05.2019)</p>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongse-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/001708

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2001-507207 A	05/06/2001	AR 001496 A1	22/10/1997
		AR 002310 A1	11/03/1998
		AT 172625 T	15/11/1998
		AT 180170 T	15/06/1999
		AT 203148 T	15/08/2001
		AT 214903 T	15/04/2002
		AT 227960 T	15/12/2002
		AT 233574 T	15/03/2003
		AT 235228 T	15/04/2003
		AT 243997 T	15/07/2003
		AT 246956 T	15/08/2003
		AT 270878 T	15/07/2004
		AT 270879 T	15/07/2004
		AT 345682 T	15/12/2006
		AT 445390 T	15/10/2009
		AU 1004399 A	04/03/1999
		AU 1221297 A	06/03/1997
		AU 1992692 A	29/11/1993
		AU 2002092 A	12/01/1993
		AU 2023892 A	12/01/1993
		AU 2149692 A	12/01/1993
		AU 2157395 A	25/09/1995
		AU 2185095 A	19/06/1995
		AU 2451097 A	19/11/1997
		AU 2749097 A	19/11/1997
		AU 3146595 A	29/03/1996
		AU 5184496 A	02/10/1996
		AU 5375596 A	23/10/1996
		AU 5627198 A	07/05/1996
		AU 661701 B2	03/08/1995
		AU 667471 B2	28/03/1996
		AU 667672 B2	04/04/1996
		AU 678341 B2	29/05/1997
		AU 683900 B2	27/11/1997
		AU 684088 B2	04/12/1997
		AU 694973 B2	06/08/1998
		AU 6953794 A	03/01/1995
		AU 696056 B2	27/08/1998
		AU 703846 B2	01/04/1999
		AU 7041694 A	03/01/1995
AU 7043194 A	03/01/1995		
AU 708341 B2	05/08/1999		
AU 7094894 A	03/01/1995		
AU 713127 B2	25/11/1999		
AU 721923 B2	20/07/2000		
AU 731072 B2	22/03/2001		
AU 732440 B2	26/04/2001		
AU 736301 B2	26/07/2001		
AU 7594796 A	22/01/1997		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/001708

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		AU 8840598 A	03/12/1998
		AU 8840698 A	04/02/1999
		AU 9136998 A	18/02/1999
		BR 1100994 A	07/12/1999
		BR 9509011 A	30/09/1997
		BR 9509011 B1	13/01/2009
		BR 9604786 A	07/07/1998
		BR 9609343 A	28/12/1999
		CA 2069759 A1	23/06/1991
		CA 2069759 C	16/01/2007
		CA 2110487 A1	23/12/1992
		CA 2110490 A1	23/12/1992
		CA 2110490 C	29/07/2008
		CA 2110491 A1	23/12/1992
		CA 2110491 C	24/07/2007
		CA 2164843 A1	22/12/1994
		CA 2164844 A1	22/12/1994
		CA 2164844 C	07/01/2003
		CA 2164845 A1	22/12/1994
		CA 2164845 C	29/04/2008
		CA 2164846 A1	22/12/1994
		CA 2177713 A1	08/06/1995
		CA 2200061 A1	21/03/1996
		CA 2200061 C	10/04/2007
		CA 2214855 A1	19/09/1996
		CA 2217494 A1	10/10/1996
		CA 2217494 C	05/08/2008
		CA 2218860 A1	09/01/1997
		CA 2218860 C	05/12/2006
		CA 2252617 A1	06/11/1997
		CN 1098068 C	08/01/2003
		CN 1102045 C	26/02/2003
		CN 1119173 C	27/08/2003
		CN 1125389 A	26/06/1996
		CN 1125393 A	26/06/1996
		CN 1125394 A	26/06/1996
		CN 1125654 C	29/10/2003
		CN 1137748 A	10/12/1996
		CN 1158082 A	27/08/1997
		CN 1180310 A	29/04/1998
		CN 1186419 A	01/07/1998
		CN 1215986 A	05/05/1999
		CN 1216925 A	19/05/1999
		CN 1221214 C	05/10/2005
		DE 122007000024 11	04/10/2007
		DE 122007000024 12	16/06/2011
		DE 69033118 T2	15/06/2000
		DE 69227468 T2	25/03/1999
		DE 69231950 T2	17/01/2002
		DE 69231950 T3	10/03/2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/001708

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		DE 69232518 T2	31/10/2002
		DE 69233119 T2	13/05/2004
		DE 69431753 T2	03/07/2003
		DE 69431753 T3	09/07/2009
		DE 69432219 T2	04/12/2003
		DE 69432358 T2	19/02/2004
		DE 69533261 T2	04/08/2005
		DE 69629478 T2	17/06/2004
		DE 69632907 T2	28/07/2005
		DK 0511273 T3	08/11/1999
		DK 0616508 T3	05/11/2001
		DK 0616508 T4	31/01/2005
		DK 0660687 T3	12/07/1999
		DK 0711127 T3	17/03/2003
		DK 0711127 T4	16/03/2009
		DK 0712293 T3	30/06/2003
		DK 0788348 T3	29/11/2004
		DK 0818989 T3	15/11/2004
		DK 1588699 T3	01/03/2010
		EP 0511273 A1	04/11/1992
		EP 0511273 A4	31/03/1993
		EP 0511273 B1	19/05/1999
		EP 0616508 A1	28/09/1994
		EP 0616508 A4	26/06/1996
		EP 0616508 B1	18/07/2001
		EP 0616508 B2	29/09/2004
		EP 0639067 A1	22/02/1995
		EP 0639067 A4	19/04/1995
		EP 0639067 B1	27/03/2002
		EP 0660687 A1	05/07/1995
		EP 0660687 A4	26/06/1996
		EP 0660687 B1	28/10/1998
		EP 0660714 A1	05/07/1995
		EP 0660714 A4	26/06/1996
		EP 0660714 B1	02/07/2003
		EP 0707471 A1	24/04/1996
		EP 0707471 A4	29/07/1998
		EP 0707846 A2	24/04/1996
		EP 0707846 A3	03/07/1996
		EP 0711127 A1	15/05/1996
		EP 0711127 A4	20/05/1998
		EP 0711127 B1	20/11/2002
		EP 0711127 B2	21/01/2009
		EP 0712293 A1	22/05/1996
		EP 0712293 A4	06/05/1998
		EP 0712293 B1	05/03/2003
		EP 0740528 A1	06/11/1996
		EP 0740528 A4	01/04/1998
		EP 0740528 B1	26/03/2003
		EP 0788348 A1	13/08/1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/001708

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		EP 0788348 A4	01/04/1998
		EP 0788348 B1	14/07/2004
		EP 0797433 A1	01/10/1997
		EP 0797433 A4	03/12/1997
		EP 0802788 A1	29/10/1997
		EP 0802788 A4	09/09/1998
		EP 0804944 A2	05/11/1997
		EP 0804944 A3	26/08/1998
		EP 0818989 A1	21/01/1998
		EP 0818989 A4	13/09/2000
		EP 0818989 B1	14/07/2004
		EP 0840570 A2	13/05/1998
		EP 0840570 A4	30/05/2001
		EP 0840570 B1	13/08/2003
		EP 0852477 A1	15/07/1998
		EP 0852477 A4	23/09/1998
		EP 0923383 A1	23/06/1999
		EP 0923383 A4	13/06/2001
		EP 0935415 A1	18/08/1999
		EP 0935415 A4	14/08/2002
		EP 0935415 B1	22/11/2006
		EP 1104678 A2	06/06/2001
		EP 1252885 A2	30/10/2002
		EP 1252885 A3	16/04/2003
		EP 1588699 A2	26/10/2005
		EP 1588699 A3	18/01/2006
		EP 1588699 B1	14/10/2009
		EP 1593395 A2	09/11/2005
		EP 1593395 A3	16/11/2005
		ES 2124733 T3	16/02/1999
		ES 2131051 T3	16/07/1999
		ES 2159280 T3	01/10/2001
		ES 2159280 T5	16/03/2005
		ES 2187524 T3	16/06/2003
		ES 2187524 T5	04/05/2009
		ES 2193161 T3	01/11/2003
		ES 2207687 T3	01/06/2004
		ES 2225844 T3	16/03/2005
		ES 2225878 T3	16/03/2005
		ES 2335206 T3	23/03/2010
		GR 3030481 T3	29/10/1999
		GR 3036877 T3	31/01/2002
		HK 1010127 A1	04/05/2006
		HK 1013625 A1	20/04/2000
		HK 1028943 A1	14/05/2004
		HR P970328 A2	30/04/2001
		JP 05-502675 A	13/05/1993
		JP 06-508277 A	22/09/1994
		JP 06-508364 A	22/09/1994
		JP 06-508617 A	29/09/1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/001708

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 07-506032 A	06/07/1995
		JP 08-511523 A	03/12/1996
		JP 08-511526 A	03/12/1996
		JP 09-501410 A	10/02/1997
		JP 09-506098 A	17/06/1997
		JP 09-510204 A	14/10/1997
		JP 10-505900 A	09/06/1998
		JP 11-501839 A	16/02/1999
		JP 11-507873 A	13/07/1999
		JP 11-508871 A	03/08/1999
		JP 2000-510108 A	08/08/2000
		JP 2002-510278 A	02/04/2002
		JP 2007-314559 A	06/12/2007
		JP 2008-260775 A	30/10/2008
		JP 3053217 B2	19/06/2000
		JP 3299745 B2	08/07/2002
		JP 3309356 B2	29/07/2002
		JP 3456584 B2	14/10/2003
		JP 3645909 B2	11/05/2005
		JP 3910630 B2	25/04/2007
		JP 4004063 B2	07/11/2007
		JP 4274387 B2	03/06/2009
		JP 4916969 B2	18/04/2012
		LU 91325 I2	16/05/2007
		MX 9701969 A	28/02/1998
		MX 9707633 A	31/12/1997
		MX 9709717 A	31/07/1998
		NL 300267 I1	01/05/2007
		NL 300267 I2	01/10/2007
		PT 1588699 E	19/01/2010
		PT 711127 E	30/04/2003
		PT 712293 E	31/07/2003
		PT 788348 E	30/09/2004
		PT 818989 E	29/10/2004
		RU 2181998 C2	10/05/2002
		TW 1256307 B	11/06/2006
		US 5088499 A	18/02/1992
		US 5123414 A	23/06/1992
		US 5149319 A	22/09/1992
		US 5209720 A	11/05/1993
		US 5228446 A	20/07/1993
		US 5230882 A	27/07/1993
		US 5305757 A	26/04/1994
		US 5334381 A	02/08/1994
		US 5348016 A	20/09/1994
		US 5352435 A	04/10/1994
		US 5456901 A	10/10/1995
		US 5469854 A	28/11/1995
		US 5542935 A	06/08/1996
		US 5571497 A	05/11/1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/001708

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 5580575 A	03/12/1996
		US 5585112 A	17/12/1996
		US 5656211 A	12/08/1997
		US 5705187 A	06/01/1998
		US 5715624 A	10/02/1998
		US 5733572 A	31/03/1998
		US 5769080 A	23/06/1998
KR 10-2017-0075771 A	03/07/2017	AU 2014-410198 A1	08/06/2017
		CA 2965851 A1	06/05/2016
		CN 106999611 A	01/08/2017
		EP 3212240 A1	06/09/2017
		EP 3212240 A4	18/07/2018
		MX 2017005700 A	23/03/2018
		SG 11201703417 A	30/05/2017
		US 2017-0360966 A1	21/12/2017
		WO 2016-068961 A1	06/05/2016
KR 10-2014-0063697 A	27/05/2014	AU 2012-311659 A1	10/04/2014
		AU 2012-311659 B2	15/06/2017
		BR 112014006412 A2	04/04/2017
		CA 2849037 A1	28/03/2013
		CN 103957940 A	30/07/2014
		CN 103957940 B	17/11/2017
		CN 107737335 A	27/02/2018
		EP 2758081 A1	30/07/2014
		EP 2758081 B1	08/02/2017
		ES 2621821 T3	05/07/2017
		HK 1200362 A1	07/08/2015
		JP 2014-526493 A	06/10/2014
		JP 6059725 B2	11/01/2017
		MX 2014003358 A	01/08/2014
		MX 347719 B	10/05/2017
		RU 2014108245 A	27/10/2015
		RU 2613321 C2	15/03/2017
		US 10004760 B2	26/06/2018
		US 2013-0072854 A1	21/03/2013
		US 2017-0007636 A1	12/01/2017
		US 2019-0060347 A1	28/02/2019
		WO 2013-041500 A1	28/03/2013
KR 10-2015-0032944 A	31/03/2015	AU 2013-266232 A1	20/11/2014
		AU 2013-266232 B2	03/08/2017
		AU 2013-266236 A1	18/12/2014
		AU 2013-266238 A1	18/12/2014
		AU 2013-266238 B2	27/07/2017
		AU 2017-245294 A1	02/11/2017
		BR 112014027834 A2	08/08/2017
		BR 112014029247 A2	27/06/2017
		CA 2871477 A1	28/11/2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/001708

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		CA 2874490 A1	28/11/2013
		CA 2874495 A1	28/11/2013
		CN 104428005 A	18/03/2015
		CN 104582691 A	29/04/2015
		CN 105163721 A	16/12/2015
		CN 105163721 B	22/05/2018
		EP 2852380 A2	01/04/2015
		EP 2852380 A4	20/01/2016
		EP 2852381 A2	01/04/2015
		EP 2852381 A4	13/01/2016
		EP 2852415 A1	01/04/2015
		JP 2015-519346 A	09/07/2015
		JP 2015-523969 A	20/08/2015
		JP 2015-525209 A	03/09/2015
		JP 2018-002727 A	11/01/2018
		JP 6220389 B2	25/10/2017
		JP 6228191 B2	08/11/2017
		KR 10-2015-0020180 A	25/02/2015
		KR 10-2015-0032945 A	31/03/2015
		MX 2014014196 A	14/08/2015
		MX 2014014251 A	17/06/2015
		MX 353567 B	18/01/2018
		US 2013-0315937 A1	28/11/2013
		US 2015-0118288 A1	30/04/2015
		US 2016-0015824 A1	21/01/2016
		US 2018-0021447 A1	25/01/2018
		US 9750819 B2	05/09/2017
		WO 2013-177415 A1	28/11/2013
		WO 2013-177419 A2	28/11/2013
		WO 2013-177419 A3	20/02/2014
		WO 2013-177421 A2	28/11/2013
		WO 2013-177421 A3	27/02/2014
JP 2007-505140 A	08/03/2007	AT 536186 T	15/12/2011
		AU 2004-291833 B2	26/08/2010
		AU 2005-291833 A1	02/06/2005
		CA 2538342 A1	02/06/2005
		CA 2538342 C	08/01/2013
		CN 100870893 A	29/11/2006
		CN 102861321 A	09/01/2013
		DK 2274978 T3	15/06/2015
		EP 1667521 A2	14/06/2006
		EP 1667521 A4	02/07/2008
		EP 1667521 B1	07/12/2011
		EP 2274978 A1	19/01/2011
		EP 2274978 B1	20/05/2015
		ES 2373783 T3	08/02/2012
		ES 2541673 T3	23/07/2015
		HU E027218 T2	28/10/2016
		IL 174209 A	31/12/2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/001708

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 4738337 B2	03/08/2011
		MA 28091 A1	01/08/2006
		NZ 545940 A	24/12/2009
		PT 2274978 E	09/07/2015
		TN SN06082 A1	03/10/2007
		US 2005-0059598 A1	17/03/2005
		US 2008-0058259 A1	06/03/2008
		US 2009-0270323 A1	29/10/2009
		US 7258664 B2	21/08/2007
		US 7517530 B2	14/04/2009
		US 8133862 B2	13/03/2012
		WO 2005-049792 A2	02/06/2005
		WO 2005-049792 A3	23/02/2006
		ZA 200602183 B	25/07/2007

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/001708

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 9/16(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 7/04(2006.01)i
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 9/16; A61K 38/22; A61K 47/48; A61K 48/00; A61K 49/22; A61K 9/127; A61P 5/00; C12N 5/10; A61P 7/04 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 코어-셀, 마이크로 입자, 할로젠, 유전자

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JP 2001-507207 A (IMARX PHARMACEUTICAL CORP.) 2001.06.05 청구항 1, 2, 4, 9, 13, 14, 28, 29, 38, 39, 43, 44, 69; 실시예 13; 및 페이지 31, 60, 54, 85 참조.	1-10, 14-17
A		11-13
A	KR 10-2017-0075771 A (랜티우스 메디컬 이메징, 인크.) 2017.07.03 단락 [0033], [0058], [0076] 참조.	1-17
A	KR 10-2014-0063697 A (제너럴 일렉트릭 캄파니) 2014.05.27 단락 [0007]-[0009], [0015], [0024] 참조.	1-17
A	KR 10-2015-0032944 A (더 오하이오 스테이트 유니버시티) 2015.03.31 단락 [0031], [0034] 참조.	1-17
A	JP 2007-505140 A (TERCICA, INC.) 2007.03.08 단락 [0050] 및 청구항 1 참조.	1-17

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:	
“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌	“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌	“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌	“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌	
“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌	“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2019년 05월 16일 (16.05.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 05월 16일 (16.05.2019)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516
---	------------------------------------

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)



국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/001708

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2001-507207 A	2001/06/05	AR 001496 A1	1997/10/22
		AR 002310 A1	1998/03/11
		AT 172625 T	1998/11/15
		AT 180170 T	1999/06/15
		AT 203148 T	2001/08/15
		AT 214903 T	2002/04/15
		AT 227960 T	2002/12/15
		AT 233574 T	2003/03/15
		AT 235228 T	2003/04/15
		AT 243997 T	2003/07/15
		AT 246956 T	2003/08/15
		AT 270878 T	2004/07/15
		AT 270879 T	2004/07/15
		AT 345682 T	2006/12/15
		AT 445390 T	2009/10/15
		AU 1004399 A	1999/03/04
		AU 1221297 A	1997/03/06
		AU 1992692 A	1993/11/29
		AU 2002092 A	1993/01/12
		AU 2023892 A	1993/01/12
		AU 2149692 A	1993/01/12
		AU 2157395 A	1995/09/25
		AU 2185095 A	1995/06/19
		AU 2451097 A	1997/11/19
		AU 2749097 A	1997/11/19
		AU 3146595 A	1996/03/29
		AU 5184496 A	1996/10/02
		AU 5375596 A	1996/10/23
		AU 5627198 A	1998/05/07
		AU 661701 B2	1995/08/03
		AU 667471 B2	1996/03/28
		AU 667672 B2	1996/04/04
		AU 678341 B2	1997/05/29
		AU 683900 B2	1997/11/27
		AU 684088 B2	1997/12/04
		AU 694973 B2	1998/08/06
		AU 6953794 A	1995/01/03
		AU 696056 B2	1998/08/27
		AU 703846 B2	1999/04/01
		AU 7041694 A	1995/01/03
		AU 7043194 A	1995/01/03
		AU 708341 B2	1999/08/05
		AU 7094894 A	1995/01/03
		AU 713127 B2	1999/11/25
		AU 721923 B2	2000/07/20
		AU 731072 B2	2001/03/22
		AU 732440 B2	2001/04/26
		AU 736301 B2	2001/07/26
		AU 7594796 A	1997/01/22

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/001708

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		AU 8840598 A	1998/12/03
		AU 8840698 A	1999/02/04
		AU 9136998 A	1999/02/18
		BR 1100994 A	1999/12/07
		BR 9509011 A	1997/09/30
		BR 9509011 B1	2009/01/13
		BR 9604786 A	1998/07/07
		BR 9609343 A	1999/12/28
		CA 2069759 A1	1991/06/23
		CA 2069759 C	2007/01/16
		CA 2110487 A1	1992/12/23
		CA 2110490 A1	1992/12/23
		CA 2110490 C	2008/07/29
		CA 2110491 A1	1992/12/23
		CA 2110491 C	2007/07/24
		CA 2164843 A1	1994/12/22
		CA 2164844 A1	1994/12/22
		CA 2164844 C	2003/01/07
		CA 2164845 A1	1994/12/22
		CA 2164845 C	2008/04/29
		CA 2164846 A1	1994/12/22
		CA 2177713 A1	1995/06/08
		CA 2200061 A1	1996/03/21
		CA 2200061 C	2007/04/10
		CA 2214855 A1	1996/09/19
		CA 2217494 A1	1996/10/10
		CA 2217494 C	2008/08/05
		CA 2218860 A1	1997/01/09
		CA 2218860 C	2006/12/05
		CA 2252617 A1	1997/11/06
		CN 1098068 C	2003/01/08
		CN 1102045 C	2003/02/26
		CN 1119173 C	2003/08/27
		CN 1125389 A	1996/06/26
		CN 1125393 A	1996/06/26
		CN 1125394 A	1996/06/26
		CN 1125654 C	2003/10/29
		CN 1137748 A	1996/12/10
		CN 1158082 A	1997/08/27
		CN 1180310 A	1998/04/29
		CN 1186419 A	1998/07/01
		CN 1215986 A	1999/05/05
		CN 1216925 A	1999/05/19
		CN 1221214 C	2005/10/05
		DE 122007000024 I1	2007/10/04
		DE 122007000024 I2	2011/06/16
		DE 69033118 T2	2000/06/15
		DE 69227468 T2	1999/03/25
		DE 69231950 T2	2002/01/17
		DE 69231950 T3	2005/03/10

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/001708

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		DE 69232518 T2	2002/10/31
		DE 69233119 T2	2004/05/13
		DE 69431753 T2	2003/07/03
		DE 69431753 T3	2009/07/09
		DE 69432219 T2	2003/12/04
		DE 69432358 T2	2004/02/19
		DE 69533261 T2	2005/08/04
		DE 69629478 T2	2004/06/17
		DE 69632907 T2	2005/07/28
		DK 0511273 T3	1999/11/08
		DK 0616508 T3	2001/11/05
		DK 0616508 T4	2005/01/31
		DK 0660687 T3	1999/07/12
		DK 0711127 T3	2003/03/17
		DK 0711127 T4	2009/03/16
		DK 0712293 T3	2003/06/30
		DK 0788348 T3	2004/11/29
		DK 0818989 T3	2004/11/15
		DK 1588699 T3	2010/03/01
		EP 0511273 A1	1992/11/04
		EP 0511273 A4	1993/03/31
		EP 0511273 B1	1999/05/19
		EP 0616508 A1	1994/09/28
		EP 0616508 A4	1996/06/26
		EP 0616508 B1	2001/07/18
		EP 0616508 B2	2004/09/29
		EP 0639067 A1	1995/02/22
		EP 0639067 A4	1995/04/19
		EP 0639067 B1	2002/03/27
		EP 0660687 A1	1995/07/05
		EP 0660687 A4	1996/06/26
		EP 0660687 B1	1998/10/28
		EP 0660714 A1	1995/07/05
		EP 0660714 A4	1996/06/26
		EP 0660714 B1	2003/07/02
		EP 0707471 A1	1996/04/24
		EP 0707471 A4	1998/07/29
		EP 0707846 A2	1996/04/24
		EP 0707846 A3	1996/07/03
		EP 0711127 A1	1996/05/15
		EP 0711127 A4	1998/05/20
		EP 0711127 B1	2002/11/20
		EP 0711127 B2	2009/01/21
		EP 0712293 A1	1996/05/22
		EP 0712293 A4	1998/05/06
		EP 0712293 B1	2003/03/05
		EP 0740528 A1	1996/11/06
		EP 0740528 A4	1998/04/01
		EP 0740528 B1	2003/03/26
		EP 0788348 A1	1997/08/13

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/001708

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 0788348 A4	1998/04/01
		EP 0788348 B1	2004/07/14
		EP 0797433 A1	1997/10/01
		EP 0797433 A4	1997/12/03
		EP 0802788 A1	1997/10/29
		EP 0802788 A4	1998/09/09
		EP 0804944 A2	1997/11/05
		EP 0804944 A3	1998/08/26
		EP 0818989 A1	1998/01/21
		EP 0818989 A4	2000/09/13
		EP 0818989 B1	2004/07/14
		EP 0840570 A2	1998/05/13
		EP 0840570 A4	2001/05/30
		EP 0840570 B1	2003/08/13
		EP 0852477 A1	1998/07/15
		EP 0852477 A4	1998/09/23
		EP 0923383 A1	1999/06/23
		EP 0923383 A4	2001/06/13
		EP 0935415 A1	1999/08/18
		EP 0935415 A4	2002/08/14
		EP 0935415 B1	2006/11/22
		EP 1104678 A2	2001/06/06
		EP 1252885 A2	2002/10/30
		EP 1252885 A3	2003/04/16
		EP 1588699 A2	2005/10/26
		EP 1588699 A3	2006/01/18
		EP 1588699 B1	2009/10/14
		EP 1593395 A2	2005/11/09
		EP 1593395 A3	2005/11/16
		ES 2124733 T3	1999/02/16
		ES 2131051 T3	1999/07/16
		ES 2159280 T3	2001/10/01
		ES 2159280 T5	2005/03/16
		ES 2187524 T3	2003/06/16
		ES 2187524 T5	2009/05/04
		ES 2193161 T3	2003/11/01
		ES 2207687 T3	2004/06/01
		ES 2225844 T3	2005/03/16
		ES 2225878 T3	2005/03/16
		ES 2335206 T3	2010/03/23
		GR 3030481 T3	1999/10/29
		GR 3036877 T3	2002/01/31
		HK 1010127 A1	2006/05/04
		HK 1013625 A1	2000/04/20
		HK 1028943 A1	2004/05/14
		HR P970328 A2	2001/04/30
		JP 05-502675 A	1993/05/13
		JP 06-508277 A	1994/09/22
		JP 06-508364 A	1994/09/22
		JP 06-508617 A	1994/09/29

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/001708

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 07-506032 A	1995/07/06
		JP 08-511523 A	1996/12/03
		JP 08-511526 A	1996/12/03
		JP 09-501410 A	1997/02/10
		JP 09-506098 A	1997/06/17
		JP 09-510204 A	1997/10/14
		JP 10-505900 A	1998/06/09
		JP 11-501839 A	1999/02/16
		JP 11-507873 A	1999/07/13
		JP 11-508871 A	1999/08/03
		JP 2000-510108 A	2000/08/08
		JP 2002-510278 A	2002/04/02
		JP 2007-314559 A	2007/12/06
		JP 2008-260775 A	2008/10/30
		JP 3053217 B2	2000/06/19
		JP 3299745 B2	2002/07/08
		JP 3309356 B2	2002/07/29
		JP 3456584 B2	2003/10/14
		JP 3645909 B2	2005/05/11
		JP 3910630 B2	2007/04/25
		JP 4004063 B2	2007/11/07
		JP 4274387 B2	2009/06/03
		JP 4916969 B2	2012/04/18
		LU 91325 I2	2007/05/16
		MX 9701969 A	1998/02/28
		MX 9707633 A	1997/12/31
		MX 9709717 A	1998/07/31
		NL 300267 I1	2007/05/01
		NL 300267 I2	2007/10/01
		PT 1588699 E	2010/01/19
		PT 711127 E	2003/04/30
		PT 712293 E	2003/07/31
		PT 788348 E	2004/09/30
		PT 818989 E	2004/10/29
		RU 2181998 C2	2002/05/10
		TW 1256307 B	2006/06/11
		US 5088499 A	1992/02/18
		US 5123414 A	1992/06/23
		US 5149319 A	1992/09/22
		US 5209720 A	1993/05/11
		US 5228446 A	1993/07/20
		US 5230882 A	1993/07/27
		US 5305757 A	1994/04/26
		US 5334381 A	1994/08/02
		US 5348016 A	1994/09/20
		US 5352435 A	1994/10/04
		US 5456901 A	1995/10/10
		US 5469854 A	1995/11/28
		US 5542935 A	1996/08/06
		US 5571497 A	1996/11/05

국제조사보고서 대응특허에 관한 정보		국제출원번호 PCT/KR2019/001708	
국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 5580575 A	1996/12/03
		US 5585112 A	1996/12/17
		US 5656211 A	1997/08/12
		US 5705187 A	1998/01/06
		US 5715824 A	1998/02/10
		US 5733572 A	1998/03/31
		US 5769080 A	1998/06/23
KR 10-2017-0075771 A	2017/07/03	AU 2014-410198 A1	2017/06/08
		CA 2965851 A1	2016/05/06
		CN 106999611 A	2017/08/01
		EP 3212240 A1	2017/09/06
		EP 3212240 A4	2018/07/18
		MX 2017005700 A	2018/03/23
		SG 11201703417 A	2017/05/30
		US 2017-0360966 A1	2017/12/21
		WO 2016-068961 A1	2016/05/06
KR 10-2014-0063697 A	2014/05/27	AU 2012-311659 A1	2014/04/10
		AU 2012-311659 B2	2017/06/15
		BR 112014006412 A2	2017/04/04
		CA 2849037 A1	2013/03/28
		CN 103957940 A	2014/07/30
		CN 103957940 B	2017/11/17
		CN 107737335 A	2018/02/27
		EP 2758081 A1	2014/07/30
		EP 2758081 B1	2017/02/08
		ES 2621821 T3	2017/07/05
		HK 1200362 A1	2015/08/07
		JP 2014-526493 A	2014/10/06
		JP 6059725 B2	2017/01/11
		MX 2014003358 A	2014/08/01
		MX 347719 B	2017/05/10
		RU 2014108245 A	2015/10/27
		RU 2613321 C2	2017/03/15
		US 10004760 B2	2018/06/26
		US 2013-0072854 A1	2013/03/21
		US 2017-0007636 A1	2017/01/12
		US 2019-0060347 A1	2019/02/28
		WO 2013-041500 A1	2013/03/28
KR 10-2015-0032944 A	2015/03/31	AU 2013-266232 A1	2014/11/20
		AU 2013-266232 B2	2017/08/03
		AU 2013-266236 A1	2014/12/18
		AU 2013-266238 A1	2014/12/18
		AU 2013-266238 B2	2017/07/27
		AU 2017-245294 A1	2017/11/02
		BR 112014027834 A2	2017/08/08
		BR 112014029247 A2	2017/06/27
		CA 2871477 A1	2013/11/28

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

국제조사보고서 대응특허에 관한 정보		국제출원번호 PCT/KR2019/001708	
국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		CA 2874490 A1	2013/11/28
		CA 2874495 A1	2013/11/28
		CN 104428005 A	2015/03/18
		CN 104582691 A	2015/04/29
		CN 105163721 A	2015/12/16
		CN 105163721 B	2018/05/22
		EP 2852380 A2	2015/04/01
		EP 2852380 A4	2016/01/20
		EP 2852381 A2	2015/04/01
		EP 2852381 A4	2016/01/13
		EP 2852415 A1	2015/04/01
		JP 2015-519346 A	2015/07/09
		JP 2015-523969 A	2015/08/20
		JP 2015-525209 A	2015/09/03
		JP 2018-002727 A	2018/01/11
		JP 6220389 B2	2017/10/25
		JP 6228191 B2	2017/11/08
		KR 10-2015-0020180 A	2015/02/25
		KR 10-2015-0032945 A	2015/03/31
		MX 2014014196 A	2015/08/14
		MX 2014014251 A	2015/06/17
		MX 353567 B	2018/01/18
		US 2013-0315937 A1	2013/11/28
		US 2015-0118288 A1	2015/04/30
		US 2016-0015824 A1	2016/01/21
		US 2018-0021447 A1	2018/01/25
		US 9750819 B2	2017/09/05
		WO 2013-177415 A1	2013/11/28
		WO 2013-177419 A2	2013/11/28
		WO 2013-177419 A3	2014/02/20
		WO 2013-177421 A2	2013/11/28
		WO 2013-177421 A3	2014/02/27
JP 2007-505140 A	2007/03/08	AT 536186 T	2011/12/15
		AU 2004-291833 B2	2010/08/26
		AU 2005-291833 A1	2005/06/02
		CA 2538342 A1	2005/06/02
		CA 2538342 C	2013/01/08
		CN 100870893 A	2006/11/29
		CN 102861321 A	2013/01/09
		DK 2274978 T3	2015/06/15
		EP 1667521 A2	2006/06/14
		EP 1667521 A4	2008/07/02
		EP 1667521 B1	2011/12/07
		EP 2274978 A1	2011/01/19
		EP 2274978 B1	2015/05/20
		ES 2373783 T3	2012/02/08
		ES 2541673 T3	2015/07/23
		HU E027218 T2	2016/10/28
		IL 174209 A	2012/12/31

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/001708

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 4738337 B2	2011/08/03
		MA 28091 A1	2006/08/01
		NZ 545940 A	2009/12/24
		PT 2274978 E	2015/07/09
		TN SN06082 A1	2007/10/03
		US 2005-0059598 A1	2005/03/17
		US 2008-0058259 A1	2008/03/06
		US 2009-0270323 A1	2009/10/29
		US 7258864 B2	2007/08/21
		US 7517530 B2	2009/04/14
		US 8133862 B2	2012/03/13
		WO 2005-049792 A2	2005/06/02
		WO 2005-049792 A3	2006/02/23
		ZA 200602183 B	2007/07/25

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	47/28	(2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	47/18	(2006.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	38/30	(2006.01)	A 6 1 K	38/30
A 6 1 K	38/22	(2006.01)	A 6 1 K	38/22
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
C 1 2 N	15/18	(2006.01)	C 1 2 N	15/18
				Z N A

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72) 発明者 ホ, ソン - ヒョン

大韓民国, 0 8 0 5 2 ソウル, ヤンチョン - グ, シンジョン - ロ 1 1 - ギル, 6 3, 3 0 5 - 1 0 4

(72) 発明者 パク, ス ジン

大韓民国, 1 4 2 5 6 キョンギ - ド クァンミョン - シ, オリ - ロ, 8 0 1, 3 0 3 - 1 9 0 2

F ターム(参考) 4C076 AA29 BB11 CC09 DD21 DD35 DD49 DD52 DD63 DD69 DD70

EE51

4C084 AA02 AA03 AA13 BA44 DB52 DB58 DB62 ZA011 ZA012 ZA331

ZA332 ZA361 ZA362 ZA661 ZA662 ZA701 ZA702 ZA751 ZA752 ZA811

ZA812 ZA961 ZA962 ZB111 ZB112 ZC211 ZC212 ZC351 ZC352