



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년04월16일

(11) 등록번호 10-2657218

(24) 등록일자 2024년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7125 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61K 47/69 (2017.01) A61K 9/127 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7125 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7033981

(22) 출원일자(국제) 2018년04월19일

심사청구일자 2021년04월16일

(85) 번역문제출일자 2019년11월18일

(65) 공개번호 10-2019-0137894

(43) 공개일자 2019년12월11일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/028263

(87) 국제공개번호 WO 2018/195250

국제공개일자 2018년10월25일

(30) 우선권주장

62/487,420 2017년04월19일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20170056430 A1*

US06015886 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

바이오-패스 홀딩스 인크.

미국 텍사스주 77401 벨러리 슈트 210 벨러리 블러바드 4710

(72) 발명자

아쉬자와 아나 타리

미국 텍사스주 77401 벨레르 스위트 210 벨레르 블러바드 4710 바이오-패스 홀딩스 인크.

(74) 대리인

장훈

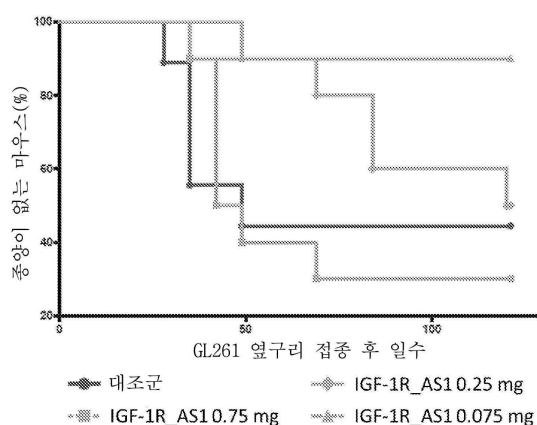
전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 IGF-1R 억제용 P-에폭시 핵산

(57) 요약

올리고뉴클레오타이드를 위한 개선된 전달 시스템이 본원에 제공되며, 상기 전달 시스템은 중성 인지질 및 IGF-1R-암호화 폴리뉴클레오타이드를 표적화하는 P-에폭시 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리포솜을 포함한다. 상기 전달 시스템을 사용하여 환자를 치료하는 방법이 또한 제공된다.

대표도

(52) CPC특허분류

A61K 47/544 (2017.08)

A61K 47/6911 (2017.08)

A61K 9/127 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07H 21/04 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

올리고뉴클레오타이드들의 집단, 인지질들 및 계면활성제를 포함하는 조성물로서, 상기 올리고뉴클레오타이드들 및 인지질들은 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체를 형성하고, 상기 올리고뉴클레오타이드들은 *IGF-1R* 폴리뉴클레오타이드 유전자 산물과 혼성화하며, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들은 포스페이트 골격 결합을 통해 함께 연결된 뉴클레오시드 분자들로 구성되며, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합들의 60% 내지 75%는 P-에톡시 골격 결합들이고, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합들의 25% 내지 40%는 포스포디에스테르 골격 결합들이고, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들은 서열 번호 1 및 2 중 어느 하나로 이루어진 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들은 서열 번호 1로 이루어진 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 포스포디에스테르 골격 결합들이 각각의 올리고뉴클레오타이드 전체에 분포된, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 포스포디에스테르 골격 결합들이 각각의 올리고뉴클레오타이드의 일부 내에 군집되지 않은, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드들의 상기 집단은, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들 내에 존재하는 P-에톡시 골격 결합들 및 포스포디에스테르 골격 결합들의 개수에 관하여 불균일한, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들은 18 내지 30개 뉴클레오타이드 범위의 크기를 갖는, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드들의 집단은 단일 종의 올리고뉴클레오타이드들을 포함하는, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드들의 집단은 적어도 2종의 올리고뉴클레오타이드들을 포함하는, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드들의 집단은, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들 중의 포스포디에스테르 골격 결합들의 분포에 관하여 불균일한, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들은 디옥시리보스 뉴클레오시드 분자들로 구성된, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트 20인, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 인지질들은 생리적 pH에서 비전하성(uncharged)이거나 중성 전하를 갖는, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 인지질들은 중성 인지질들인, 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 중성 인지질들은 포스파티딜콜린들인, 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 중성 인지질들은 디올레오일포스파티딜콜린인, 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 인지질들 및 올리고뉴클레오타이드들은 5:1 내지 100:1의 몰비로 존재하는, 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체는 리포솜들의 집단으로 추가로 정의되는, 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 리포솜들의 적어도 90%는 직경이 5 미크론 미만인, 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 리포솜들의 적어도 90%는 직경이 4 미크론 미만인, 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 조성물은 동결 건조된 것인, 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본원은 2017년 4월 19일자로 출원된 미국 가출원 제62/487,420호에 대한 우선권을 주장하며, 이 출원의 전체 내용은 원용에 의해 본원에 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 의학 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 *IGF-1R* 폴리뉴클레오타이드 유전자 산물과 혼성화하는 P-에폭시 올리고뉴클레오타이드의 리포솜 제제, 및 이러한 제제를 제조하고 이를 의학에서, 보다 특히, *IGF-1R* 유전자의 과발현 또는 그의 활성의 증가를 수반하는 암의 치료에서 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 인슐린-유사 성장인자 1 수용체 (IGF-1R)는 타이로신 키나아제 활성을 갖는 당단백질 수용체이다. 이는 각각의 절반 (디설파이드 결합에 의해 연결됨)이 세포의 α -소단위 및 막횡단 β -소단위로 구성된 이종사량체 수용체이다. IGF-1R은 매우 높은 친화도로 IGF I 및 IGF II와 결합한다. IGF-1R은 분열촉진, 분화 및 항-세포자멸사 효과를 매개한다. 세포질 타이로신 키나아제 단백질은 상기 수용체의 세포의 도메인과 리간드의 결합에 의해 활성화된다. 키나아제의 활성화는 궁극적으로 IRS-1, IRS-2, Shc 및 Grb 10을 비롯한 상이한 세포내 기질의 자극에 관여한다.

[0006] 발달에서의 IGF 시스템의 역할은 집중적인 연구의 주제가 되어 왔다. 이러한 관심은 그의 분열촉진 및 항-세포자멸사 특성뿐만 아니라, IGF-1R이 형질전환된 표현형의 확립 및 유지에 필요한 것으로 보인다는 사실의 발견 후에 뒤따른 것이다. 사실상, IGF-1R의 과발현 또는 구성적 활성화가 매우 다양한 세포들에서 우태아 혈청이 결여된 배지에서 지지체와 독립적인 세포의 성장 원인이 되며 또한 누드 마우스 (nude mice)에서 종양 형성의 원인이 된다는 것이 충분히 확립되어 왔다. IGF-1R은 매우 다양한 종양 및 종양 라인에서 발현되고, IGF는 그들의 IGF-1R과의 부착을 통해 종양 성장을 증폭시킨다. 흥미롭게도, IGF-1R에 대항하는 마우스 단일클론 항체는 배양에서의 많은 세포주의 증식 및 생체내 종양 세포의 성장을 억제한다 (Arteaga 등, 1989; Li 등, 1993; Zia 등, 1996; Scotlandi 등, 1998). 또는, IGF-1R의 음성 우성체는 종양 증식을 억제할 수 있다 (Jiang 등, 1999). 따

로서, IGF-1R은 발암 및 종양 진행에서 중요한 역할을 한다. 따라서, IGF-1R 발현을 효과적으로 억제하기 위한 조성물 및 방법이 필요한 실정이다.

발명의 내용

- [0007] IGF-1R 단백질 발현을 방지하는 중성 리포솜과 조합되어 IGF-1R-암호화 폴리뉴클레오타이드를 표적화하는 비독성, 뉴클레아제 내성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 IGF-1R 발현을 억제하여 이용 가능한 IGF-1R 단백질의 풀(pool)을 제거하기 위한 조성물이 본원에 제공된다.
- [0008] 일 구현예에서, *IGF-1R* 폴리뉴클레오타이드 유전자 산물과 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드의 집단을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 포스페이트 골격 결합을 통해 함께 연결된 뉴클레오타이드 분자로 구성되며, 여기서 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합 중 적어도 하나는 P-에톡시 골격 결합이고, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합의 80% 이하가 P-에톡시 골격 결합이다. 일부 측면에서, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합 중 적어도 하나는 포스포디에스테르 골격 결합이다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 1 내지 2 중 어느 하나에 따른 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 1에 따른 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 1에 따른 서열을 포함하고, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드의 적어도 5번째 뉴클레오타이드와 6번째 뉴클레오타이드 사이, 11번째 뉴클레오타이드와 12번째 뉴클레오타이드 사이, 및 16번째 뉴클레오타이드와 17번째 뉴클레오타이드 사이에서의 포스페이트 골격 결합은 포스포디에스테르 골격 결합이다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 2에 따른 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 2에 따른 서열을 포함하고, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드의 적어도 5번째 뉴클레오타이드와 6번째 뉴클레오타이드 사이, 11번째 뉴클레오타이드와 12번째 뉴클레오타이드 사이, 및 17번째 뉴클레오타이드와 18번째 뉴클레오타이드 사이에서의 포스페이트 골격 결합은 포스포디에스테르 골격 결합이다. 다양한 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 IGF-1R 단백질의 발현을 억제한다. 일부 측면에서, 상기 조성물은 동결 건조된다.
- [0009] 일부 측면에서, 상기 포스페이트 골격 결합의 10% 내지 80%는 P-에톡시 골격 결합이거나; 상기 포스페이트 골격 결합의 20% 내지 80%는 P-에톡시 골격 결합이거나; 상기 포스페이트 골격 결합의 30% 내지 80%는 P-에톡시 골격 결합이거나; 상기 포스페이트 골격 결합의 40% 내지 80%는 P-에톡시 골격 결합이거나; 상기 포스페이트 골격 결합의 50% 내지 80%는 P-에톡시 골격 결합이거나; 또는 상기 포스페이트 골격 결합의 60% 내지 70%는 P-에톡시 골격 결합이거나, 또는 그 안에서 유도될 수 있는 임의의 범위이다. 일부 측면에서, 상기 포스페이트 골격 결합의 20% 내지 90%는 포스포디에스테르 골격 결합이거나; 상기 포스페이트 골격 결합의 20% 내지 80%는 포스포디에스테르 골격 결합이거나; 상기 포스페이트 골격 결합의 20% 내지 70%는 포스포디에스테르 골격 결합이거나; 상기 포스페이트 골격 결합의 20% 내지 60%는 포스포디에스테르 골격 결합이거나; 상기 포스페이트 골격 결합의 20% 내지 50%는 포스포디에스테르 골격 결합이거나; 또는 상기 포스페이트 골격 결합의 30% 내지 40%는 포스포디에스테르 골격 결합이거나, 또는 그 안에서 유도될 수 있는 임의의 범위이다. 다양한 측면에서, 상기 포스페이트 골격 결합의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%, 또는 그 안의 임의의 값은 P-에톡시 골격 결합이다. 다양한 측면에서, 상기 포스페이트 골격 결합의 최대 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%, 또는 그 안의 임의의 값은 포스포디에스테르 골격 결합이다. 특정 측면에서, 상기 포스포디에스테르 골격 결합은 상기 올리고뉴클레오타이드 전체에 분포된다. 이와 같이, 상기 올리고뉴클레오타이드는 키메라 분자가 아니다. 일부 측면에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 골격 결합을 포함하지 않는다.
- [0010] 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 7 내지 30개 뉴클레오타이드 범위의 크기를 갖는다. 특정 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 25개 뉴클레오타이드 범위의 크기를 갖는다. 다양한 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오타이드의 크기를 갖는다. 상기 크기 범위는 상기 집단 내의 올리고뉴클레오타이드의 평균 크기일 수 있다.
- [0011] 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 평균 크기가 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오타이드이며, 여기서 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합 중 각각 5, 6, 7, 8, 8, 9, 10, 11, 11, 12, 13, 14, 15, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20, 21, 22, 23, 또는 24개 이하는 P-에톡시 골격 결합이다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴

클레오타이드는 평균 크기가 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오타이드이며, 여기서 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합 중 각각 적어도 2, 2, 2, 2, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 4, 4, 4, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 6, 6, 6, 6, 또는 6개 이하는 포스포디에스테르 골격 결합이다. 예를 들어, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 평균 크기가 18개 뉴클레오타이드일 수 있으며, 여기서 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합 중 14개 이하가 P-에톡시 골격 결합이거나; 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 평균 크기가 20개 뉴클레오타이드일 수 있으며, 여기서 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합 중 16개 이하가 P-에톡시 골격 결합이거나; 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 평균 크기가 25개 뉴클레오타이드일 수 있으며, 여기서 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합 중 20개 이하가 P-에톡시 골격 결합이거나; 또는 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 평균 크기가 30개 뉴클레오타이드일 수 있으며, 여기서 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합 중 24개 이하가 P-에톡시 골격 결합이다.

[0012] 일부 측면에서, 올리고뉴클레오타이드의 상기 집단은 단일 종의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 측면에서, 올리고뉴클레오타이드의 상기 집단은 적어도 2종의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 단일 종의 올리고뉴클레오타이드는 동일한 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있지만 분자 내의 상이한 위치에서 P-에톡시 결합을 갖거나 갖지 않을 수 있다. 이와 같이, 상기 집단은, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들 간에, 뉴클레오타이드 서열에 관하여 균일하고 포스포디에스테르 골격 결합의 분포에 관하여 불균일할 수 있다. 또한, 상기 집단은, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들 간에, P-에톡시 골격 결합 및 포스포디에스테르 골격 결합의 개수에 관하여 불균일할 수 있다. 비제한적인 예로서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드의 제1 부분은 70% P-에톡시 결합 및 30% 포스포디에스테르 결합을 가질 수 있는 반면, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드의 제2 부분은 60% P-에톡시 결합 및 40% 포스포디에스테르 결합을 가질 수 있다. 일부 측면에서, 올리고뉴클레오타이드의 상기 집단은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 소간섭 RNA (siRNA), 마이크로RNA (miRNA) 또는 piwiRNA (piRNA)를 포함한다.

[0013] 다양한 측면에서, 상기 조성물은 인지질을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 상기 인지질 및 올리고뉴클레오타이드는 약 5:1 내지 약 100:1의 몰비로 존재한다. 일부 측면에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 및 인지질은 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체, 예를 들어, 리포솜 복합체를 형성한다. 일부 측면에서, 상기 리포솜의 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%는 직경이 5 미크론 미만이다. 일부 측면에서, 상기 리포솜의 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%는 직경이 4 미크론 미만이다. 일부 측면에서, 올리고뉴클레오타이드의 상기 집단은 리포솜의 집단 내에 혼입된다.

[0014] 일부 측면에서, 상기 인지질은 생리적 pH에서 비전하성이거나 중성 전하를 갖는다. 일부 측면에서, 상기 인지질은 중성 인지질이다. 특정 측면에서, 상기 중성 인지질은 포스파티딜콜린이다. 특정 측면에서, 상기 중성 인지질은 디올레오일포스파티딜콜린이다. 일부 측면에서, 상기 인지질은 본질적으로 콜레스테롤을 포함하지 않는다.

[0015] 일 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 조성물 및 본 구현예들의 인지질 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 일부 측면에서, 상기 조성물은 화학치료제를 추가로 포함한다.

[0016] 일 구현예에서, 세포를 본 구현예들의 올리고뉴클레오타이드 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 세포 내의 IGF-1R 단백질의 발현 수준을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 측면에서, IGF-1R 및 IGF-1R의 하류 유전자, 예를 들어, 핵소키나아제의 발현이 상기 세포에서 하향조절된다. 일부 측면에서, 상기 세포는 포유동물 세포이다. 일부 측면에서, 상기 세포는 암 세포이다. 일부 측면에서, 상기 세포는 면역계의 세포, 예를 들어, 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구, 백혈구, 자연 살해 (NK) 세포, 림프구, T 세포, B 세포, 수지상 세포, 비만 세포 또는 대식세포이다. 특정 측면에서, 상기 대식세포는 M2 대식세포이며, 이는 M1 대식세포보다 높은 수준의 IGF-1R을 생성하고 그의 세포 표면 상에서 CD11b, CD14, CD15, CD23, CD64, CD68, CD163, CD204, CD206 중 하나 이상을 발현한다. 특정 측면에서, 상기 단핵구는 M2 단핵구이며, 이는 그의 세포 표면상에서 CD11b, CD14, CD15, CD23, CD64, CD68, CD163, CD204, CD206 중 하나 이상을 발현한다.

[0017] 일 구현예에서, 세포를 본 구현예들의 약학적 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 치료적 유효량의 올리고뉴클레오타이드를 세포에 전달하는 방법이 제공된다. 일부 측면에서, 상기 방법은 과다형성, 암, 자가면역 질환, 또는 감염병을 치료하는 방법이다. 일부 측면에서, 상기 방법은 알츠하이머병, 염증성 장 질환, 제2형 당뇨병에서의 인슐린 저항성 및 건선을 치료, 예방 또는 지연시키는 방법이다. 일 구현예에서, 치료적 유효량의 본 구현예들의 약학적 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 예방 접종에 의해 유도된 면역 반응을 향상시키는 방

법이 제공된다.

[0018] 일 구현예에서, 치료적 유효량의 본 구현예들의 약학적 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 암, 자가면역 질환 또는 감염병을 갖는 대상을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 측면에서, 상기 대상은 인간이다. 일부 측면에서, 상기 암은 방광암, 혈액암, 림프종, 췌장암, 골암, 골수암, 뇌종양, 유방암, 결장암, 식도암, 위암, 두경부암, 신장암, 간암, 폐암, 전립선암, 피부암, 고환암, 설암, 난소암 또는 자궁암이다. 본 발명의 방법으로 치료가능한 종양은 흑색종, 전립선암, 난소암, 유방암, 유방암, 두경부 편평 세포암, 유두상 신장세포암종, 담낭암, 직장암, 췌장암, 폐암, 대장 암, 신경교종, 성상세포종, 전형적 호지킨 림프종 및 평활근 종양뿐만 아니라 교모세포종의 세포, 골수 줄기 세포, 조혈 세포, 골모세포, 상피 세포, 섬유아세포 및 세포자멸사를 겪고 종양 세포에 대한 내성 또는 그의 퇴행을 유도하는 기타 종양 세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 측면에서, 상기 자가면역 질환은 Th2 우성 자가면역 질환이다. 일부 측면에서, 상기 자가면역 질환은 홍반성 낭창, 알레르기 피부염, 경피증, 아토피 습진, 부비동염, 염증성 장 질환, 천식, 알레르기, 궤양성 대장염, 화학물질 과민증, 척추관절병증, 쇼그렌병, 크론병, 당뇨병, 다발성 경화증 또는 류마티스성 관절염이다. 일부 측면에서, 상기 감염병은 박테리아 감염, 진균 감염, 바이러스 감염 또는 기생충 감염이다. 일부 측면에서, 상기 조성물은 피하로, 정맥내로 또는 복강내로 투여된다. 일부 측면에서, 상기 방법은 상기 대상에게 적어도 제2 항암 요법을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 상기 제2 항암 요법은 수술 요법, 화학요법, 방사선 요법, 냉동요법, 호르몬 요법, 면역요법, 또는 사이토카인 요법이다. 일부 측면에서, 상기 면역요법은 면역관문 억제요법이다. 일부 측면에서, 상기 조성물의 투여는 환자에서 IGF-1R 단백질의 발현을 감소시킨다. 일 구현예에서, 예방 접종에 의해 유도된 면역 반응을 향상시키는 방법이 제공된다.

[0019] 일 구현예에서, 세포 내의 IGF-1R 단백질의 발현 수준을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 상기 세포를 올리고뉴클레오타이드의 집단, 인지질, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 포함하는 본 구현예들의 약학적 조성물의 치료적 유효량과 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 올리고뉴클레오타이드는 IGF-1R 폴리뉴클레오타이드 유전자 산물과 혼성화하며, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 포스페이트 골격 결합을 통해 함께 연결된 뉴클레오시드 분자로 구성되며, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합 중 적어도 하나는 P-에톡시 골격 결합이고, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합의 80% 이하가 P-에톡시 골격 결합이며, 상기 올리고뉴클레오타이드 및 인지질은 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체를 형성한다.

[0020] 일 구현예에서, 치료적 유효량의 올리고뉴클레오타이드를 세포에 전달하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 상기 세포를 올리고뉴클레오타이드의 집단, 인지질, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 포함하는 본 구현예들의 약학적 조성물의 치료적 유효량과 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 올리고뉴클레오타이드는 IGF-1R 폴리뉴클레오타이드 유전자 산물과 혼성화하며, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 포스페이트 골격 결합을 통해 함께 연결된 뉴클레오시드 분자로 구성되며, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합 중 적어도 하나는 P-에톡시 골격 결합이고, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 골격 결합의 80% 이하가 P-에톡시 골격 결합이며, 상기 올리고뉴클레오타이드 및 인지질은 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체를 형성한다.

[0021] 올리고뉴클레오타이드는, 표적 단백질을 암호화하거나 표적 단백질의 발현을 조절하는 핵산 분자와 특이적으로 혼성화하는 안티센스 핵산 분자를 포함한다. "특이적 혼성화"는 상기 안티센스 핵산 분자가 표적화된 핵산 분자와 혼성화하고 그의 발현을 조절함을 의미한다. 바람직하게는, "특이적 혼성화"는 다른 유전자 또는 전사체가 영향을 받지 않음을 또한 의미한다. 올리고뉴클레오타이드는 단일가닥 핵산 일 수 있고 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 또는 그 이상의 핵염기를 포함할 수 있다. 특정 측면에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 15 내지 30개, 19 내지 25개, 20 내지 23개, 또는 21개의 인접 핵염기를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 암성 또는 전암성 또는 과다형성 포유동물 세포 (예를 들어, 인간 세포)의 성장을 촉진하는 유전자의 번역을 억제한다. 올리고뉴클레오타이드는 세포에서 세포자멸사를 유도하고/하거나 종양 유전자 또는 다른 표적 유전자의 번역을 억제할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 성분은 단일 종의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 성분은 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 유전자를 표적화하는 2, 3, 4 또는 그 이상의 종의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 조성물은 화학 치료제 또는 다른 항암제를 추가로 포함할 수 있으며, 이는 본 발명의 지질 성분 또는 리포솜 내에 혼입되거나 또는 혼입되지 않을 수 있다. 추가 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 성분은 상기 리포솜 또는 지질 성분 내에 혼입된다.

[0022] "포획하다," "캡슐화하다," 및 "혼입시키다"는 지질 또는 리포솜이 관심있는 제제와 또는 제제 주위에서의 결합

에 의해 용액 내로 자유롭게 확산되는 것에 대한 방해물을 형성하는 것을 지칭하며, 예를 들어, 리포솜은 지질 층 내부에, 또는 지질 층 내부 또는 지질층 간의 수성 구획 내에 제제를 캡슐화할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 내에 포함된다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 인간 대상 또는 환자에게 투여하기 위해 제제화될 수 있다.

[0023] 특정 구현예에서, 상기 지질 성분은 중성 인지질 또는 순 중성 전하 (net neutral charge)를 포함하기 때문에, 본질적으로 중성 전하를 갖는다. 특정 측면에서, 중성 인지질은 포스파티딜콜린, 예를 들어, DOPC, 달걀 포스파티딜콜린 ("EPC"), 디라우로일포스파티딜콜린 ("DLPC"), 디미리스토일포스파티딜콜린 ("DMPC"), 디팔미토일포스파티딜콜린 ("DPPC"), 디스테아로일포스파티딜콜린 ("DSPC"), 디리놀레오일포스파티딜콜린, 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린 ("DAPC"), 1,2-디에이코세노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 ("DEPC"), 1-미리스토일-2-팔미토일 포스파티딜콜린 ("MPPC"), 1-팔미토일-2-미리스토일 포스파티딜콜린 ("PMPC"), 1-팔미토일-2-스테아로일 포스파티딜콜린 ("PSPC"), 1-스테아로일-2-팔미토일 포스파티딜콜린 ("SPPC"), 1-팔미토일-2-올레오일 포스파티딜콜린 ("POPC"), 1-올레오일-2-팔미토일 포스파티딜콜린("OPPC"), 또는 리소포스파티딜콜린일 수 있다. 다른 측면에서, 상기 중성 인지질은 포스파티딜에탄올아민, 예를 들어, 디올레오일포스파티딜에탄올아민 ("DOPE"), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민 ("DSPE"), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민 ("DMPE"), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민 ("DPPE"), 팔미토일올레오일 포스파티딜에탄올아민 ("POPE"), 또는 리소포스파티딜에탄올아민일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 인지질 성분은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이상의 종류 또는 유형의 중성 인지질을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 인지질 성분은 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 종류 또는 유형의 중성 인지질을 포함할 수 있다.

[0024] 특정 구현예에서, 지질 성분은 양전하 지질 및 음전하 지질을 포함하기 때문에, 본질적으로 중성 전하를 가질 수 있다. 상기 지질 성분은 중성전하 지질(들) 또는 인지질(들)을 추가로 포함할 수 있다. 상기 양전하 지질은 양전하 인지질일 수 있다. 상기 음전하 지질은 음전하 인지질일 수 있다. 상기 음전하 인지질은 포스파티딜세린, 예를 들어, 디미리스토일포스파티딜세린 ("DMPS"), 디팔미토일 포스파티딜세린 ("DPPS"), 또는 뇌 포스파티딜세린 ("BPS")일 수 있다. 상기 음전하 인지질은 포스파티딜글리세롤, 예를 들어, 디라우로일포스파티딜글리세롤 ("DLPG"), 디미리스토일포스파티딜글리세롤 ("DMPG"), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 ("DPPG"), 디스테아로일포스파티딜글리세롤 ("DSPG"), 또는 디올레오일포스파티딜글리세롤 ("DOPG")일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 조성물은 콜레스테롤 또는 폴리에틸렌글리콜 (PEG)을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 조성물은 본질적으로 콜레스테롤을 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 인지질은 자연발생 인지질이다. 다른 구현예에서, 인지질은 합성 인지질이다.

[0025] 리포솜은, 지질 물질이 실질적으로 비전하성인 한, 하나 이상의 인지질로 제조될 수 있다. 상기 조성물이 음이온성 및 양이온성 인지질 및 콜레스테롤을 실질적으로 포함하지 않는 것이 중요하다. 적합한 인지질은 포스파티딜콜린 및 당업자에게 널리 공지된 다른 것들을 포함한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 측면은 세포를 본 발명의 중성 지질 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 올리고뉴클레오타이드를 세포에 전달하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 본 발명의 조성물을 유효량으로 제공한다. 유효량은 대상에서 세포, 병태, 또는 질병 상태를 약화시키거나, 늦추거나, 감소시키거나 제거하는 치료용 성분의 양이다. 상기 세포는 대상 또는 환자, 예를 들어, 인간 내에 포함될 수 있다. 상기 방법은 암 또는 다른 과다형성 병태를 치료하는 방법을 추가로 포함할 수 있다. 상기 암은 방광, 혈액, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 결장, 식도, 위장, 잇몸, 머리, 신장, 간, 림프절, 폐, 비인두, 목, 전립선, 피부, 위, 고환, 혀, 난소, 또는 자궁에서 기인될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 비암성 질환 또는 과다형성 병태를 치료하는 방법을 추가로 포함한다. 상기 세포는 전암성 또는 암성 세포일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 및 방법은 상기 세포의 성장을 억제하고, 상기 세포에서 세포자멸사를 유도하고/하거나 종양 유전자의 번역을 억제한다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 암성 세포에서 과발현되는 유전자의 번역을 억제할 수 있다.

[0027] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 부가적인 요법을 상기 대상에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 상기 부가적인 요법은 화학치료제 (예를 들어, 파클리탁셀 또는 도세탁셀), 수술, 방사선 요법, 및/또는 유전자 요법을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 특정 측면에서, 상기 화학요법은 도세탁셀, 파클리탁셀, 시스플라틴 (CDDP), 카르보플라틴, 프로카르바진, 메클로르에타민, 사이클로포스파미드, 캄토테신, 이포스파미드, 멜팔란, 클로람부실, 부설판, 니트로소우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드 (VP16), 타목시펜, 탈록시펜, 에스트로젠 수용체 결합제, 탁솔, 젬시타빈, 나벨빈, 파르네실-단백질 전달효소 억제제, 트랜스플라티늄, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토타렉세이트, 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 화학요법은 탁산, 예를 들어, 도세탁셀 또는 파클리탁셀이

다. 상기 화학요법은 본 발명의 중성 지질 조성물에 비해 이전에, 그 동안에, 그 이후에, 또는 이의 조합으로 전달될 수 있다. 화학요법은 상기 중성 지질 조성물 이후 0, 1, 5, 10, 12, 20, 24, 30, 48, 또는 72시간 또는 그 이상 내에 전달될 수 있다. 상기 중성 지질 조성물, 상기 제2 항암 요법, 또는 상기 중성 지질 조성물 및 상기 항암 요법 모두는 종양내로, 정맥내로, 복강내로, 피하로, 경구로 또는 다양한 이의 조합에 의해 투여될 수 있다.

[0028] 본 명세서에 논의된 임의의 구현에는 본 발명의 임의의 방법 또는 조성물에 대해 구현될 수 있음이 고려되며, 그 반대도 마찬가지이다. 또한, 본 발명의 조성물은 본 발명의 방법을 달성하는 데 사용될 수 있다.

[0029] 본원에서, 명시된 성분과 관련하여, "본질적으로 포함하지 않는"은 명시된 성분 중 어느 것도 의도적으로 조성물로 제제화되지 않았고/않았거나 단지 오염물질로서 또는 미량으로 존재한다는 것을 의미하기 위해 본원에 사용된다. 따라서, 조성물의 임의의 의도하지 않은 오염으로부터 비롯되는 명시된 성분의 총량은 0.05%보다 훨씬 미만, 바람직하게는 0.01% 미만이다. 명시된 성분의 양이 표준 분석 방법으로 검출될 수 없는 조성물이 가장 바람직하다.

[0030] 본 명세서에서, 단수형은 하나 이상을 의미할 수 있다. 본 청구항(들)에서, 단어 "포함하는 (comprising)"과 함께 사용되는 경우, 단수형은 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다.

[0031] 청구항들에서 용어 "또는"의 사용은, 개시내용이 단지 대안 및 "및/또는"을 지칭하는 정의를 뒷받침한다 하더라도, 명시적으로 대안만을 지칭하도록 표시되거나 대안이 상호배타적이지 않는 한, "및/또는"을 의미하기 위해 사용된다. 본원에서, "또 다른"은 적어도 두 번째 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0032] 본원 전반에서, 용어 "약"은 값이 장치에 대한 고유한 오차 변동, 값을 측정하기 위해 사용된 방법, 또는 연구 대상 사이에 존재하는 변동을 포함한다는 것을 나타내기 위해 사용된다.

[0033] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내는 상세한 설명 및 특징 예는 단지 예시로서 제공된다는 것이 이해되어야 하는데, 본 발명의 사상 및 범위 내의 다양한 변화 및 변형이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이기 때문이다.

도면의 간단한 설명

[0034] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하며 본 발명의 특정 측면을 추가로 설명하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제시된 특정 구현예들의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1 - 리포솜 *IGF-1R* 안티센스는 마우스에서 GL261 세포 종양의 형성을 지연시킨다. 리포솜 *IGF-1R* 안티센스의, 마우스에 이식된 GL261 세포 종양의 성장 방지능을 서열 번호 1에 상응하는 리포솜 *IGF-1R* 안티센스를 마우스에 GL261 세포 이식 후 14일 후에 투여함으로써 시험하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] *IGF-1R* 단백질의 발현을 억제하기 위해, 본 발명은, 정맥내 주입을 통해 전신적 전달을 가능하게 하는, 지질 조성물, 특정 측면에서 약 0의 순전하를 갖는 지질 조성물, 즉, 중성 지질 조성물을 통해 항-*IGF-1R* 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 유전자 발현 억제제)를 세포에 전달하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 이들 방법은 암을 치료하거나, 자가면역 질환을 치료하거나, 또는 예방 접종에 의해 유도된 면역 반응을 향상시키는 데 효과적으로 사용될 수 있다.

[0036] I. 지질 및 리포솜

[0037] "리포솜"은 지질 이중층을 갖는 지질-함유 소포뿐만 아니라 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포획하거나 혼입할 수 있는 다른 지질 담체 입자를 의미하기 위해 본원에 사용된다. 이와 같이, 리포솜은 폐쇄된 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일라멜라, 다중라멜라, 및 다중소포성 지질 비히클을 포괄하는 일반 용어이다. 또한, 리포솜은 한정되지 않은 라멜라 구조를 가질 수 있다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소포성 구조를 갖는 것으로 특징지어질 수 있다. 다중라멜라 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다수의 지질 층을 갖는다. 이들은 인지질이 과량의 수용액에 현탁될 때 자연적으로 형성된다. 지질 성분은 폐쇄된 구조가 형성되기 전에 자가 재배열을 겪고 지질 이중층 사이에 물 및 용해된 용질을 포획한다 (Ghosh and Bachhawat, 1991). 그러나, 본 발명은 또한 용액 내에서 일반적인 소포성 구조와 상이한 구조를 갖는 조성물을 포괄한다. 예를 들어, 지질은 미셀 구조를 취하거나 단지 지질 분자의 비균일한 응집체로서 존재할 수 있

다.

[0038] 리포솜은 다양한 약물을 병든 조직 내로 전달하기 위한 담체인 나노입자의 형태이다. 최적의 리포솜 크기는 표적 조직에 의해 결정된다. 종양 조직에서, 혈관구조는 불연속적이며, 기공 크기는 100 내지 780 nm로 다양하다 (Siwak 등, 2002). 그에 비해, 정상 혈관 내피 내의 기공 크기는 대부분의 조직에서 <2 nm이고, 후모세관정맥에서 6 nm이다. 음전하 리포솜은 중성 또는 양전하 리포솜보다 순환으로부터 더 빠르게 제거될 것으로 생각되지만; 최근 연구는 음전하 지질의 유형이 세망내피계 (RES)에 의한 리포솜 흡수율에 영향을 미친다는 것을 나타내었다. 예를 들어, 입체적으로 차폐되지 않은 음전하 지질 (포스파티딜세린, 포스파티드산, 및 포스파티딜글리세롤)을 함유하는 리포솜은 중성 리포솜보다 더 빠르게 제거된다. 흥미롭게도, 양이온성 리포솜 (1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 [DOTAP]) 및 양이온성-리포솜-DNA 복합체는 음이온성, 중성, 또는 입체적으로 안정화된 중성 리포솜보다 세포내이입을 통해 혈관신생 혈관의 내피 세포에 더 잘 결합하고 내재화된다고 (Thurston 등, 1998; Krasnici 등, 2003). 양이온성 리포솜은, 종양 세포와의 표면 상호작용이 정전기적으로 유도된 결합 부위 장벽 효과를 생성하여 전달 시스템과 종양 타원체와의 추가의 결합을 억제하기 때문에, 종양 세포를 위한 이상적인 전달 비히클이 아닐 수 있다 (Kostarellos 등, 2004). 그러나, 중성 리포솜은 더 양호한 종양내 침투를 갖는 것으로 보인다. 특정 리포솜 제제에 대한 독성이 또한 우려되어 왔다. 양이온성 리포솜은 반응성 산소 중간체의 방출을 촉진하여 투여량 의존적 독성 및 폐 염증을 유발하며, 이 효과는 DOTAP와 같은 1가 양이온성 리포솜보다 다가 양이온성 리포솜에서 더 두드러진다 (Dokka 등, 2000). 중성 및 음전하 리포솜은 폐 독성을 나타내지 않는 것으로 보인다 (Gutierrez-Puente 등, 1999). 양이온성 리포솜은 핵산을 효율적으로 흡수하면서 생체내 유전자 하향조절에 대한 제한된 성공을 이뤘는데, 아마도 이들의 안정적인 세포내 성질 및 그 결과 핵산 내용물의 방출 실패 때문이다. 중성 전하를 갖는 지질 또는 중성화된 전하를 갖는 지질 조성물, 예를 들어, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)은 중성 특성 및 생체내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 전달 성공으로 인해 본원에서 사용된다.

[0039] 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 올리고뉴클레오타이드를 지질 및/또는 리포솜과 결합시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 리포솜의 수성 내부에 혼입되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되거나, 리포솜 및 상기 올리고뉴클레오타이드 모두와 결합된 연결 분자를 통해 상기 리포솜에 부착되거나, 리포솜 내에 포획되거나, 리포솜과 복합체화되거나, 지질을 함유하는 용액에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질 내의 현탁액으로 함유되거나, 미셀과 함께 함유되거나 복합체화되거나, 또는 지질과 결합될 수 있다. 본원에 제공된 리포솜 또는 리포솜/올리고뉴클레오타이드-결합된 조성물은 용액 내에서 임의의 특정 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 이중층 구조로, 미셀로서, 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한 단순히 용액 내에 산재되어, 아마도 크기 또는 모양이 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다.

[0040] A. 지질

[0041] 지질은 자연발생 또는 합성일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질에 자연적으로 존재하는 지방 소적뿐만 아니라 장쇄 지방족 탄화수소 및 이들의 유도체, 예를 들어, 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올, 및 알데히드를 함유하는 당염자에게 널리 공지된 화합물의 부류를 포함한다. 예는 지질 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)이다.

[0042] 본 발명의 지질 조성물은 인지질을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 단일 종류 또는 유형의 인지질이 지질 조성물, 예를 들어, 리포솜의 생성에 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 하나를 초과하는 종류 또는 유형의 인지질이 사용될 수 있다.

[0043] 인지질은 글리세로인지질 및 특정 스펅고지질을 포함한다. 인지질은 디올레오일포스파티딜콜린 ("DOPC"), 달걀 포스파티딜콜린 ("EPC"), 디라우릴로일포스파티딜콜린 ("DLPC"), 디미리스토일포스파티딜콜린 ("DMPC"), 디팔미토일포스파티딜콜린 ("DPPC"), 디스테아로일포스파티딜콜린 ("DSPC"), 디리놀레오일포스파티딜콜린, 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린 ("DAPC"), 1,2-디에이코세노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 ("DEPC"), 1-미리스토일-2-팔미토일 포스파티딜콜린 ("MPPC"), 1-팔미토일-2-미리스토일 포스파티딜콜린 ("PMPC"), 1-팔미토일-2-스테아로일 포스파티딜콜린 ("PSPC"), 1-스테아로일-2-팔미토일 포스파티딜콜린 ("SPPC"), 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린 ("POPC"), 1-올레오일-2-팔미토일 포스파티딜콜린 ("OPPC"), 디라우릴로일포스파티딜글리세롤 ("DLPG"), 디미리스토일포스파티딜글리세롤 ("DMPG"), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 ("DPPG"), 디스테아로일포스파티딜글리세롤 ("DSPG"), 디올레오일포스파티딜글리세롤 ("DOPG"), 디미리스토일 포스파티드산 ("DMPA"), 디팔미토일 포스파티드산 ("DPPA"), 디스테아로일 포스파티드산 ("DSPA"), 디올레오일 포스파티드산 ("DOPA"), 디

미리스토일 포스파티딜에탄올아민 ("DMPE"), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민 ("DPPE"), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민 ("DSPE"), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 ("DOPE"), 팔미토일올레오일 포스파티딜에탄올아민 ("POPE"), 디미리스토일 포스파티딜세린 ("DMPS"), 디팔미토일 포스파티딜세린 ("DPPS"), 뇌 포스파티딜세린 ("BPS"), 디스테아로일 스펡고미엘린 ("DSSP"), 뇌 스펡고미엘린 ("BSP"), 디팔미토일 스펡고미엘린 ("DPSP"), 리소포스파티딜콜린, 및 리소포스파티딜에탄올아민을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 인지질은, 예를 들어, 포스파티딜콜린, 포스파티딜글리세롤, 및 포스파티딜에탄올아민을 포함하며; 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티딜콜린은 생리적 조건 하에 (즉, 약 pH 7에서) 비전하성이기 때문에, 이들 화합물은 중성 리포솜을 생성하는데 특히 유용할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 인지질 DOPC는 비전하 리포솜 또는 지질 조성물을 생산하는데 사용된다. 특정 구현예에서, 인지질이 아닌 지질 (예를 들어, 콜레스테롤)이 또한 사용될 수 있다.

[0045] 인지질은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 그러나, 천연 공급원으로부터의 인지질, 예를 들어, 달걀 또는 대두 포스파티딜콜린, 뇌 포스파티드산, 뇌 또는 식물 포스파티딜이노시톨, 심장 카디오리핀, 및 식물 또는 박테리아 포스파티딜에탄올아민은 특정 구현예에서 주요 포스파티드 (즉, 총 포스파티드 조성물의 50% 이상을 구성함)로서 사용되지 않는데, 이것은 생성된 리포솜의 불안정성 및 누출을 초래할 수 있기 때문이다.

[0046] B. 중성 리포솜

[0047] 본원에서, "중성 리포솜 또는 지질 조성물" 또는 "비전하 리포솜 또는 지질 조성물"은 본질적으로-중성인 순전하 (실질적으로 비전하성)를 생성하는 하나 이상의 지질을 갖는 리포솜 또는 지질 조성물로서 정의된다. 특정 구현예에서, 중성 리포솜 또는 지질 조성물은 그 자체로 중성인 지질 및/또는 인지질을 주로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 양친매성 지질은 중성 리포솜 또는 지질 조성물 내로 혼입될 수 있거나 이를 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 중성 리포솜은, 양전하 및 음전하 지질을 조합하여 이들 전하가 실질적으로 서로를 상쇄하여 본질적으로-중성인 순전하를 생성함으로써 생성될 수 있다. "본질적으로 중성인" 또는 "본질적으로 비전하성인"은 특정 집단 (예를 들어, 리포솜의 집단) 내의 많지 않은 지질 (존재하는 경우)이 또 다른 성분의 반대 전하에 의해 상쇄되지 않는 전하를 포함한다 (예를 들어, 10% 미만, 보다 바람직하게는 5% 미만, 가장 바람직하게는 1% 미만의 성분은 상쇄되지 않는 전하를 포함함)는 것을 의미한다. 본 발명의 특정 구현예에서, 조성물의 지질 성분이 본질적으로 중성이지만 리포솜의 형태가 아닌 조성물이 제조될 수 있다.

[0048] 상기 리포솜의 크기는 합성 방법에 따라 다양하다. 수용액에 현탁된 리포솜은 일반적으로 구형 소포 모양이며, 지질 이중층 분자의 하나 이상의 동심 층 (concentric layer)을 가질 수 있다. 각각의 층은 화학식 XY로 표시되는 분자의 평행 배열로 구성되며, 여기서 X는 친수성 모이어티이고, Y는 소수성 모이어티이다. 수성 현탁액에서, 상기 동심 층은 상기 친수성 모이어티가 수성 상과 접촉된 상태를 유지하는 경향이 있고 상기 소수성 영역이 자기 결합하는 경향이 있도록 배열된다. 예를 들어, 수성 상이 상기 리포솜 내부에 존재하는 경우, 지질 분자는 배치 XY-YX의, 라멜라로 알려진, 이중층을 형성할 수 있다. 하나 초과와 지질 분자의 친수성 및 소수성 부분이 서로 결합되는 경우 지질의 응집체가 형성될 수 있다. 이러한 응집체의 크기 및 모양은 많은 상이한 변수, 예를 들어, 용매의 특성 및 용액 내의 다른 화합물의 존재에 의해 결정된다.

[0049] 본 발명의 범위 내의 리포솜은 공지된 실험실 기술, 예를 들어, Bangham 등 (1965)의 방법 (그 내용은 원용에 의해 본원에 포함됨); Gregoriadis (1979)의 방법 (그 내용은 원용에 의해 본원에 포함됨); Deamer 및 Uster (1983)의 방법 (그 내용은 원용에 의해 본원에 포함됨); 및 Szoka 및 Papahadjopoulos (1978)에 의해 기술된 역상 증발 방법에 따라 제조될 수 있다. 전술한 방법은 수성 물질을 포획하는 이들 각각의 능력 및 이들 각각의 수성 공간-대-지질 비율에 있어 상이하다.

[0050] 특정 구현예에서, 중성 리포솜은 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 전달하는데 사용될 수 있다. 상기 중성 리포솜은 단일 유전자의 번역의 억제에 관한 단일 종의 올리고뉴클레오타이드를 함유할 수 있거나, 또는 상기 중성 리포솜은 다수의 유전자의 번역의 억제에 관한 다수의 종의 올리고뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 또한, 상기 중성 리포솜은 상기 올리고뉴클레오타이드 이외에 화학치료제를 함유할 수 있고; 따라서, 특정 구현예에서, 화학치료제 및 올리고뉴클레오타이드가 동일한 또는 별개의 조성물로 세포 (예를 들어, 인간 대상 내의 암성 세포)에 전달될 수 있다.

[0051] 건조된 지질 또는 동결 건조된 리포솜은 탈수되고 적합한 용매 (예를 들어, DPBS 또는 Hepes 완충제)를 사용하여 적절한 농도로 재구성될 수 있다. 이후, 상기 혼합물은 볼텍스 혼합기에서 격렬하게 진탕될 수 있다. 상기 리포솜은 적절한 총 인지질 농도 (예를 들어, 약 10-200 mM)로 재현탁될 수 있다. 캡슐화되지 않은 올리고뉴클

레오타이드는 29,000 g에서의 원심분리에 의해 제거될 수 있고, 리포좀 펠렛은 세척된다. 대안적으로, 캡슐화되지 않은 올리고뉴클레오타이드는 과량의 용매에 대해 투석함으로써 제거될 수 있다. 캡슐화된 올리고뉴클레오타이드의 양은 표준 방법에 따라 결정될 수 있다.

II. 유전자 발현의 억제

억제성 올리고뉴클레오타이드는 세포에서 유전자의 전사 또는 번역을 억제할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 5 내지 50개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 길이일 수 있고, 특정 구현예에서 7 내지 30개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 핵산 및/또는 핵산 유사체를 포함할 수 있다. 전형적으로, 억제성 올리고뉴클레오타이드는 세포 내에서 단일 유전자의 번역을 억제하나; 특정 구현예에서, 억제성 올리고뉴클레오타이드는 세포 내에서 하나 초과 유전자의 번역을 억제할 수 있다.

올리고뉴클레오타이드 내에서, 상기 올리고뉴클레오타이드의 성분은 동일한 유형이거나 전체적으로 균일할 필요는 없다 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 및 핵산 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있음). 본 발명의 특정 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 단지 단일 핵산 또는 핵산 유사체만을 포함할 수 있다. 상기 억제성 올리고뉴클레오타이드는 상보적인 핵산과 혼성화하여 이중가닥 구조를 형성하는, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30개 또는 그 이상의 인접 핵염기 (이들 사이의 모든 범위 포함)를 포함할 수 있다.

III. 핵산

본 발명은 중성 리포좀을 통해 올리고뉴클레오타이드를 전달하는 방법 및 조성물을 제공한다. 올리고뉴클레오타이드는 핵산으로 구성되기 때문에, 핵산에 관한 방법 (예를 들어, 핵산의 생산, 핵산의 변형 등)이 올리고뉴클레오타이드에 대해서도 사용될 수 있다.

용어 "핵산"은 본 기술분야에서 널리 공지되어 있다. 본원에서, "핵산"은 일반적으로, 핵염기를 포함하는, DNA, RNA, 또는 이의 유도체 또는 유사체의 분자 (즉, 가닥)를 지칭한다. 이러한 정의는 단일가닥 핵산 또는 이중가닥 핵산을 지칭한다. 이중가닥 핵산은 완전히 상보적인 결합에 의해 형성될 수 있으나; 일부 구현예에서, 이중가닥 핵산은 부분적인 또는 실질적으로 상보적인 결합에 의해 형성될 수 있다. 본원에서, 단일가닥 핵산은 접두사 "ss"로 표시될 수 있고 이중가닥 핵산은 접두사 "ds"로 표시될 수 있다.

A. 핵염기

본원에서, "핵염기"는 헤테로사이클릭 염기, 예를 들어, 적어도 하나의 자연발생 핵산 (즉, DNA 및 RNA)에서 발견되는 자연발생 핵염기 (즉, A, T, G, C 또는 U), 및 이러한 핵염기의 자연발생 또는 비-자연발생 유도체(들) 및 유사체를 지칭한다. 핵염기는 일반적으로, 자연발생 핵염기 쌍형성 (예를 들어, A 및 T, G 및 C, 및 A 및 U 사이의 수소 결합)을 대체할 수 있는 방식으로 적어도 하나의 자연발생 핵염기와 하나 이상의 수소 결합을 형성 (즉, "어닐링" 또는 "혼성화")할 수 있다. 핵염기는, 본원에 기술되거나 당업자에게 공지된 임의의 화학적 또는 천연 합성 방법을 사용하여, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오타이드에 포함될 수 있다.

"퓨린" 및/또는 "피리미딘" 핵염기(들)는 자연발생 퓨린 및/또는 피리미딘 핵염기 및 또한 이의 유도체(들) 및 유사체(들)를 포괄하며, 이는, 알킬, 카르복시알킬, 아미노, 하이드록실, 할로젠 (즉, 플루오로, 클로로, 브로모, 또는 요오도), 티올, 또는 알킬티올 모이어티 중 하나 이상에 의해 치환된 퓨린 또는 피리미딘을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직한 알킬 (예를 들어, 알킬, 카르복시알킬 등) 모이어티는 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 내지 약 6개의 탄소 원자를 포함한다. 퓨린 또는 피리미딘의 다른 비제한적인 예는 데아자퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 5-플루오로우라실, 잔틴, 하이포잔틴, 8-브로모구아닌, 8-클로로구아닌, 브로모틸린, 8-아미노구아닌, 8-하이드록시구아닌, 8-메틸구아닌, 8-티오구아닌, 아자구아닌, 2-아미노퓨린, 5-에틸시토신, 5-메틸시토신, 5-브로모우라실, 5-에틸우라실, 5-요오도우라실, 5-클로로우라실, 5-프로필우라실, 티오우라실, 2-메틸아데닌, 메틸티오아데닌, N,N-디메틸아데닌, 아자아데닌, 8-브로모아데닌, 8-하이드록시아데닌, 6-하이드록시아미노퓨린, 6-티오피린, 4-(6-아미노헥실/시토신) 등을 포함한다. 퓨린 및 피리미딘 유도체 또는 유사체는, 하기 (약어/변형된 염기설명)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다: ac4c/4-아세틸시티딘, Mam5s2u/5-메톡시아미노메틸-2-티오우리딘, Chm5u/5-(카르복시하이드록실메틸) 우리딘, Man q/베타, D-만노실퀴오신, Cm/2' -O-메틸 시티딘, Mcm5s2u/5-메톡시카보닐메틸-2-티오우리딘, Cmm5s2u/5-카르복시메틸아미노-메틸-2-티오우리딘, Mcm5u/5-메톡시카보닐메틸우리딘, Cmm5u/5-카르복시메틸아미노메틸우리딘, Mo5u/5-메톡시우리딘, D/디하이드로우리딘,

Ms2i6a, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데노신, Fm/2' -O-메틸슈도우리딘, Ms2t6a/N-((9-베타-D-리보푸라노실-2-메틸티오피린-6-일)카르바모일)트레오닌, Gal q/베타, D-갈락토실퀴오신, Mt6a/N-((9-베타-D-리보푸라노실푸린-6-일)N-메틸-카르바모일)트레오닌, Gm/2' -O-메틸구아노신, Mv/우리딘-5-옥시아세트산 메틸에스테르, I/이노신, o5u/우리딘-5-옥시아세트산 (v), I6a/N6-이소펜테닐아데노신, Osyw/와이부토신, m1a/1-메틸아데노신, P/슈도우리딘, m1f/1-메틸슈도우리딘, Q/퀴오신, m1g/1-메틸구아노신, s2c/2-티오시티딘, m1I/1-메틸이노신, s2t/5-메틸-2-티오우리딘, m22g/2,2-디메틸구아노신, s2u/2-티오우리딘, m2a/2-메틸아데노신, s4u/4-티오우리딘, m2g/2-메틸구아노신, T/5-메틸우리딘, m3c/3-메틸시티딘, t6a/N-((9-베타-D-리보푸라노실푸린-6-일)카르바모일)트레오닌, m5c/5-메틸시티딘, Tm/2' -O-메틸-5-메틸우리딘, m6a/N6-메틸아데노신, Um/2' -O-메틸우리딘, m7g/7-메틸구아노신, Yw/와이부토신, Mam5u/5-메틸아미노메틸우리딘, 또는 X/3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘, (acp3)u.

[0061] **B. 뉴클레오시드**

[0062] 본원에서, "뉴클레오시드"는 핵염기 링커 (linker) 모이어티에 공유 결합된 핵염기를 포함하는 개별적인 화학적 단위를 지칭한다. "핵염기 링커 모이어티"의 비제한적인 예는 5-탄소 원자를 포함하는 당 (즉, "5-탄소당")이며, 이는 디옥시리보스, 리보스, 아라비노스, 또는 5-탄소 당의 유도체 또는 유사체를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 5-탄소 당의 유도체 또는 유사체의 비제한적인 예는 2' -플루오로-2' -디옥시리보스 또는 당 고리에서 산소 원자가 탄소로 치환된 카르보사이클릭 당을 포함한다. 본원에서, "모이어티"는 일반적인 것으로, 더 큰 화학적 또는 분자적 구조의 더 작은 화학적 또는 분자적 성분을 지칭한다.

[0063] 핵염기와 핵염기 링커 모이어티와의 상이한 유형의 공유 결합(들)이 당업계에 공지되어 있다. 비제한적인 예로서, 푸린 (즉, A 또는 G) 또는 7-테아자푸린 핵염기를 포함하는 뉴클레오시드는 전형적으로 푸린 또는 7-테아자푸린의 9-위치와 5-탄소 당의 1' -위치와의 공유 결합을 포함한다. 또 다른 비제한적인 예에서, 피리미딘 핵염기 (즉, C, T, 또는 U)를 포함하는 뉴클레오시드는 전형적으로 피리미딘의 1-위치와 5-탄소 당의 1' -위치와의 공유 결합을 포함한다 (Kornberg and Baker, 1992).

[0064] **C. 뉴클레오타이드**

[0065] 본원에서, "뉴클레오타이드"는 "골격 결합"을 추가로 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다. 골격 결합은 일반적으로, 뉴클레오타이드를 뉴클레오타이드를 포함하는 또 다른 분자에 공유 결합시키거나, 또는 또다른 뉴클레오타이드에 공유 결합시켜 핵산을 형성한다. 자연발생 뉴클레오타이드 내의 "골격 결합"은 전형적으로 5-탄소 당에 공유 결합된 포스페이트 모이어티 (예를 들어, 포스포디에스테르 골격 결합)를 포함한다. 골격 모이어티의 부착은 전형적으로 5-탄소 당의 3' - 또는 5' -위치에서 일어난다. 그러나, 특히 뉴클레오타이드가 자연발생 5-탄소 당 또는 포스페이트 모이어티의 유도체 또는 유사체를 포함하는 경우, 다른 유형의 부착이 당업계에 공지되어 있다.

[0066] **D. 핵산 유사체**

[0067] 핵산은 자연발생 핵산 내에 존재할 수 있는 핵염기, 핵염기 링커 모이어티, 및/또는 골격 결합을 포함하거나, 또는 전적으로 이들로 구성될 수 있다. 본원에서, "유도체"는 자연발생 분자의 화학적으로 변형되거나 변경된 형태를 지칭하는 반면, 용어 "모방체" 또는 "유사체"는 자연발생 분자 또는 모이어티와 구조적으로 유사하거나 유사하지 않을 수 있지만, 유사한 기능을 보유한 분자를 지칭한다. 핵염기, 뉴클레오시드, 및 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체는 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0068] 5-탄소 당 및/또는 골격 결합 유도체 또는 유사체를 포함하는 뉴클레오시드, 뉴클레오타이드, 또는 핵산의 비제한적인 예는 하기에서의 것들을 포함한다: dsDNA와 삼중 나선을 형성하고/하거나 dsDNA의 발현을 방지하는 푸린 유도체를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,681,947호; 특허 형광 핵산 프로브로서 사용하기 위한, DNA 또는 RNA에서 발견된 뉴클레오시드의 형광 유사체를 포함하는 핵산을 기술하고 있는, 미국 특허 제5,652,099호 및 제5,763,167호; 향상된 뉴클레아제 안정성을 갖는 피리미딘 고리 상에 치환을 갖는 올리고뉴클레오타이드 유사체를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,614,617호; 핵산 검출에서 사용된 변형된 5-탄소 당 (즉, 변형된 2' -디옥시푸라노실 모이어티)을 갖는 올리고뉴클레오타이드 유사체를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,670,663호, 제5,872,232호 및 제5,859,221호; 혼성화 분석에서 사용될 수 있는 수소 이외의 치환기로 4' -위치에서 치환된 적어도 하나의 5-탄소 당 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,446,137호; 3' -5' 골격 결합을 갖는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 2' -5' 골격 결합을 갖는 리보뉴클레오타이드를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,886,165호; 골격 결합의 3' -

위치 산소가 핵산의 뉴클레아제 내성을 향상시키기 위해 탄소로 치환된 변형된 골격 결합을 기술하고 있는, 미국 특허 제5,714,606호; 뉴클레아제 내성을 향상시키는 하나 이상의 5' 메틸렌 포스포네이트 골격 결합을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,672,697호; 향상된 뉴클레아제 안정성 및 약물 또는 검출 모이어티를 전달하는 능력을 제공하기 위해 올리고뉴클레오타이드의 2' 탄소에 약물 또는 라벨을 포함할 수 있는 치환기 모이어티의 결합을 기술하고 있는, 미국 특허 제5,466,786호 및 제5,792,847호; 세포 흡수, 뉴클레아제에 대한 내성, 및 표적 RNA에의 혼성화를 향상시키기 위해 인접한 5-탄소 당 모이어티의 4' 위치 및 3' 위치를 부착시키는 2 또는 3 탄소 골격 결합을 갖는 올리고뉴클레오타이드 유사체를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,223,618호; 핵산 혼성화 프로브로서 유용한 적어도 하나의 설파메이트 또는 설파미드 골격 결합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,470,967호; 개선된 뉴클레아제 내성, 세포 흡수, 및 RNA 발현의 조절에 사용되는 포스포디에스테르 골격 결합을 대체하는 3개 또는 4개 원자 골격 결합 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,378,825호, 제5,777,092호, 제5,623,070호, 제5,610,289호 및 제5,602,240호; 막 투과성 및 안정성을 향상시키기 위해 올리고뉴클레오타이드의 2' -O 위치에 부착된 소수성 담체 체제를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,858,988호; DNA 또는 RNA에의 향상된 혼성화; 뉴클레아제에 대한 향상된 안정성을 갖는 5' 말단의 안타라퀴논에 접합된 올리고뉴클레오타이드를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,214,136호; DNA가 향상된 뉴클레아제 내성, 결합 친화성, 및 RNase H를 활성화시키는 능력을 위해 2' -데옥시-에리트르-펜토파라노실 뉴클레오타이드를 포함하는 PNA-DNA-PNA 키메라를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,700,922호; DNA-RNA 혼성화물을 형성하는 DNA에 연결된 RNA를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,708,154호; 하나 이상의 핵염기가 폴리에테르 골격 내의 키랄 탄소 원자에 연결된 폴리에테르 핵산을 기술하고 있는, 미국 특허 제5,908,845호; 핵염기 모이어티, 5-탄소 당이 아닌 핵염기 링커 모이어티 (예를 들어, 아자 질소 원자, 아미도 및/또는 우레이도 테더 (tether)), 및/또는 포스페이트 골격 결합이 아닌 골격 결합 (예를 들어, 아미노 에틸글리신, 폴리아미드, 폴리에틸, 폴리티오아미드, 폴리설파아미드, 또는 폴리설파아미드 골격 결합)을 포함하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드를 일반적으로 포함하는 펩타이드 핵산 (PNA 또는 펩타이드 기반 핵산 유사체; 또는 PENAM)을 기술하고 있는, 미국 특허 제5,786,461호, 제5,891,625호, 제5,786,461호, 제5,773,571호, 제5,766,855호, 제5,736,336호, 제5,719,262호, 제5,714,331호, 제5,539,082호, 및 WO 제 92/20702호; 및 소수성, 뉴클레아제 내성 P-에톡시 골격 결합을 기술하고 있는, 미국 특허 제5,855,911호.

[0069] 핵산 유사체의 다른 변형 및 용도는 당업계에 공지되어 있으며, 핵산 유사체의 이러한 기술 및 유형이 본 발명에 사용될 수 있음이 예상된다.

[0070] E. 핵산의 제조

[0071] 핵산은 화학적 합성, 효소적 생산 또는 생물학적 생산과 같은 당업계에 공지된 임의의 기술에 의해 제조될 수 있다. 합성 핵산 (예를 들어, 합성 올리고뉴클레오타이드)의 비제한적인 예는 EP 제266,032호 (원용에 의해 본원에 포함됨)에 기술된 바와 같은 포스포트리에스테르, 포스파이트, 또는 포스포르아미다이트 화학 및 고체상 기술을 사용한 시험관내 화학적 합성에 의해, 또는 Froehler 등 (1986) 및 미국 특허 제5,705,629호 (각각 원용에 의해 본원에 포함됨)에 의해 기술된 바와 같은 디옥시뉴클레오시드 H-포스포네이트 중간체에 의해 제조된 핵산을 포함한다. 본 발명의 방법에서, 하나 이상의 종의 올리고뉴클레오타이드가 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 다양한 합성 기전이 예를 들어, 미국 특허 제4,659,774호, 제4,816,571호, 제5,141,813호, 제5,264,566호, 제4,959,463호, 제5,428,148호, 제5,554,744호, 제5,574,146호, 제5,602,244호에 개시되었으며, 이들 각각은 원용에 의해 본원에 포함된다.

[0072] F. 핵산의 정제

[0073] 핵산은 폴리아크릴아미드 겔, 염화세슘 원심분리 구배, 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 수단에 의해 정제될 수 있다 (예를 들어, 원용에 의해 본원에 포함됨 Sambrook 등 (2001) 참고).

[0074] 특정 구현예에서, 본 발명은 단리된 핵산인 핵산에 관한 것이다. 본원에서, 용어 "단리된 핵산"은 하나 이상의 세포의 총 게놈 및 전사된 핵산의 대부분을 포함하지 않도록 단리된, 또는 이들을 포함하지 않는 핵산 분자 (예를 들어, RNA 또는 DNA 분자)를 지칭한다. 특정 구현예에서, "단리된 핵산"은 세포 성분 또는 시험관내 반응 성분, 예를 들어, 거대분자, 예를 들어, 지질 또는 단백질, 작은 생물학적 분자 등의 대부분을 포함하지 않도록 단리된, 또는 이들을 포함하지 않는 핵산을 지칭한다.

[0075] G. 혼성화

[0076] 본원에서, "혼성화," "혼성화하다" 또는 "혼성화가능한"은 이중가닥 또는 삼중가닥 분자 또는 부분적인 이중가

닥 또는 삼중가닥 성질을 갖는 분자의 형성을 의미하는 것으로 이해된다. 본원에서, 용어 "어닐링"은 "혼성화하다"와 동의어이다.

[0077] 본원에서, "엄격한 조건(들)" 또는 "높은 엄격성"은 상보적인 서열(들)을 함유하는 하나 이상의 핵산 가닥(들) 사이에 또는 내부에서 혼성화를 허용하지만 무작위 서열의 혼성화를 배제하는 조건이다. 엄격한 조건은 핵산 및 표적 가닥 사이의 미스매치 (존재하는 경우)를 거의 허용하지 않는다. 이러한 조건은 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 높은 선택성이 요구되는 응용 분야에 바람직하다.

[0078] 엄격한 조건은 약 50℃ 내지 약 70℃의 온도에서 약 0.02 M 내지 약 0.15 M NaCl에 의해 제공되는 것과 같은, 낮은 염 및/또는 높은 온도 조건을 포함할 수 있다. 목적하는 엄격성의 온도 및 이온 강도는 특정 핵산(들)의 길이, 표적 서열(들)의 길이 및 핵염기 함량, 핵산(들)의 전하 조성, 및 혼성화 혼합물 내의 포름아미드, 테트라메틸암모늄 클로라이드, 또는 다른 용매(들)의 존재 또는 농도에 의해 일부 결정되는 것으로 이해된다.

[0079] 또한 혼성화를 위한 이러한 범위, 조성 및 조건은 단지 비제한적인 예로서 언급되고, 특정 혼성화 반응에 대한 목적하는 엄격성은 종종 하나 이상의 양성 또는 음성 대조군과 비교하여 경험적으로 결정되는 것으로 이해된다. 구상된 응용 분야에 따라, 표적 서열에 대한 핵산의 다양한 선택성 정도를 달성하기 위해 다양한 혼성화 조건을 이용하는 것이 바람직하다. 비제한적인 예에서, 엄격한 조건 하에 핵산과 혼성화하지 않는 관련된 표적 핵산의 확인 또는 단리는 저온 및/또는 높은 이온 강도에서의 혼성화에 의해 달성될 수 있다. 이러한 조건은 "낮은 엄격성" 또는 "낮은 엄격성 조건"으로 불리며, 낮은 엄격성의 비제한적인 예는 약 20℃ 내지 약 50℃의 온도 범위에서 약 0.15 M 내지 약 0.9 M NaCl에서 수행된 혼성화를 포함한다. 물론, 낮은 또는 높은 엄격성 조건을 특정 응용 분야에 맞게 추가로 변형하는 것은 당업자의 기술에 속한다.

[0080] IV. 리포솜 P-에톡시 안티센스 의약품 제조하는 방법

[0081] 표적 mRNA의 특정 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (올리고)는 내인성 유전자의 발현을 억제하는데 사용되어 왔다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 표적 mRNA와 결합하는 경우, DNA-RNA 혼성화물이 형성된다. 이러한 혼성화물 형성은 mRNA의 번역을 억제하며, 따라서, 암호화된 단백질의 발현을 억제한다. 단백질이 세포의 생존에 필수적인 경우, 그의 발현의 억제는 세포 사멸을 야기할 수 있다. 따라서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 항암 및 항바이러스 요법에서 유용한 도구일 수 있다.

[0082] 유전자 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하는데 있어서 주요 장애는 세포 불안정성, 낮은 세포 흡수, 및 불량한 세포간 전달이다. 천연 포스포디에스테르는 뉴클레아제 가수분해에 내성이 아니므로; 임의의 억제 효과가 관찰되기 전까지 고농도의 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 필요하다. P-에톡시와 같은 변형된 포스포디에스테르 유사체가 이러한 뉴클레아제 가수분해 문제를 극복하기 위해 제조되었지만, 이들은 상기 문제에 대해 만족스러운 해결책을 제공하지 못하였다.

[0083] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수는 낮다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 칼슘-포스페이트 침전, DEAE-텍스트란 매개, 또는 전기천공과 같은 물리적 기술이 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수를 증가시키는데 사용되어 왔다. 이러한 기술은 재현하기 어려우며 생체 내에서 적용할 수 없다. 리포펙틴과 같은 양이온성 지질이 또한 올리고뉴클레오타이드를 전달하는데 사용되어 왔다. 양이온성 지질 및 음전하 올리고뉴클레오타이드 사이에서 정전기적 상호작용이 형성되어 복합체를 야기하며, 상기 복합체는 이후에 표적 세포에 의해 흡수된다. 이러한 양이온성 지질은 올리고뉴클레오타이드를 뉴클레아제 소화로부터 보호하지 못하고 세포 막에 유해하므로, 뉴클레아제-내성 포스포로티오에이트를 전달할 때에만 유용하고, 뉴클레아제-절단가능한 포스포디에스테르를 전달할 때에는 유용하지 않다.

[0084] 제조된 또 다른 변형된 포스포디에스테르 유사체는 P-에톡시이다. P-에톡시 안티센스 골격은, 이는 다른 안티센스 유사체에 대해 보고된 독성의 일부인, 출혈 및 보체 활성화에 대한 악영향을 미치지 않는다. P-에톡시 올리고뉴클레오타이드의 변형은 포스페이트 골격에서 이루어지므로, 상기 변형은 이들 올리고뉴클레오타이드가 표적 mRNA에 결합하는 것을 방해하지 않는다. P-에톡시 올리고뉴클레오타이드는 포스페이트 골격의 비가교 산소 원자에 에틸기를 부가하여 이들 올리고뉴클레오타이드를 비전하 화합물로 만듦으로써 제조된다. 뉴클레아제에 대한 이들의 내성에도 불구하고, P-에톡시 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수 및 세포내 전달은 불량한데, 이는, 내재화시, 이들 올리고뉴클레오타이드가 엔도솜/리소솜 액포 내부에 격리되어 이들이 표적 mRNA에 접근하는 것을 방해하기 때문이다.

[0085] A. P-에톡시 안티센스 의약품

[0086] 리포솜 P-에톡시 안티센스 의약품은 2개의 cGMP 제품으로 구성되며, 이들 모두는 FDA 승인된 출시 기준을 갖는

FDA가 요구하는 분석 증명서를 가지고 있다. 원료, 용매, 및 최종 의약품이 본원에 기술되어 있다. 제조시, 상기 의약품은 하기 물질을 포함하는 호박색 또는 백색의 동결 건조된 결정 또는 분말이다: 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, P-에톡시 안티센스 약물 물질), 중성 지질 (예를 들어, DOPC), 및 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트 20). 환자에게 투여하기 위한 준비로, 일반 식염수를 바이알에 첨가하며, 이때 내부에 혼입된 P-에톡시 안티센스와 함께 리포솜이 형성된다.

[0087] **B. P-에톡시 안티센스 약물 물질**

[0088] 완제품의 특정 물리적 특성 (예를 들어, 용해도 및 소수성이며, 이는 이후에 식염수 중의 의약품 용해도, 리포솜 내로의 올리고의 혼입, 및 리포솜 입자 크기에 영향을 미침)은 P-에톡시 안티센스 약물 물질의 생산 동안 지정된 P-에톡시 및 포스포디에스테르 아미다이트 원료 혼합물을 사용하여 정의될 수 있다. P-에톡시 골격 그룹의 손실은 올리고뉴클레오타이드 제조 동안 무작위로 발생하여 이들 결합에서 포스포디에스테르 결합을 야기하는 반면, 그 손실은 올리고뉴클레오타이드 내에서 P-에톡시 : 포스포디에스테르 골격 결합의 바람직한 비율을 생성하지 않을 수 있다. 이 경우, P-에톡시 및 포스포디에스테르 아미다이트 원료의 혼합물은 P-에톡시 골격 결실의 예상된 값을 보충하여, 목적하는 비율을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 생성한다. 올리고뉴클레오타이드의 골격에서 P-에톡시 분자의 수를 증가시키는 것은 분자를 더 소수성 (이는 더 큰 리포솜 입자를 생성함; 표 1), 덜 극성, 및 덜 가용성으로 만든다 (표 2). 중성 전하, 소수성 P-에톡시 약물 물질을 시험하는 방법은 올리고뉴클레오타이드 길이의 분포를 측정하는 질량 분석법, 및 사실상 용해도에 대한 것인, 식염수에서 재구성된 의약품의 육안 검사인, 약물 물질의 용해도를 측정하는 분석을 포함한다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 더 많은 수의 P-에톡시 골격 결합로 인해 덜 가용성이 되므로, 재구성된 용액은 소수성이 너무 높아짐에 따라 미립자가 형성될 때까지 더 백색이 된다.

[0089] 제제는 90% 값이 5000 nm 미만의 크기인 입자 크기를 사용해야 하며, 가용성이며, 이는 뉴클레오타이드 조성물의 기능이다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드가 18-20개 뉴클레오타이드 길이인 경우, 포스페이트 골격 결합 중 적어도 5개는 포스포디에스테르 골격 결합이어야 한다. 이는, 18mer 올리고뉴클레오타이드로부터의 데이터를 제공하고 있는 하기 표 1의 실험 7 내지 10에 의해 뒷받침된다. 올리고뉴클레오타이드가 25개 뉴클레오타이드 길이인 경우, 포스페이트 골격 결합 중 적어도 6개는 포스포디에스테르 골격 결합이어야 한다.

표 1

표 1. 안티센스 골격 조성물에 따른 리포솜 입자 크기 변동성

실험	조작된 안티센스 골격	제조후 골격 에틸 결실		입자 크기 특징: 누적 분포 함수		
		주요 피크 ^d	복합 결실 ^e	90% 값 (nm) ^{**}	50% 값 (nm)	300 nm 값 (%)
1	3 아미다이트 치환	-6	-5.67	2130	911	15.30
2	3 아미다이트 치환	-6	-5.67	2420	1004	15.50
3	3 아미다이트 치환	-6	-6.12	3682	943	15.50
4	3 아미다이트 치환	-7	-6.66	3805	978	14.60
5	100% P-에톡시	-5	-5.66	3924	976	16.00
6	2 아미다이트 치환	-5	-5.32	4387	1888	11.60
7 ^a	100% P-에톡시	-4	-4.22	5057	1131	17.70
8	100% P-에톡시	-4	-4.52	5659	1359	10.00
9 ^b	100% P-에톡시	-4	-4.38	7571	1909	2.60
10 ^c	100% P-에톡시	-4	-4.38	7994	1653	14.40

** 의약품 출시 기준은 리포솜 입자의 90%가 5000 nm 이하인 것이다.

- a. 이 룯트는 낮은 용해도; 구체적으로, 재구성된 용액 중의 안티센스 입자로 인해 폐기되었다.
- b. 이 룯트는 20 mL 바이알 중에 2 mg 안티센스와 함께 더 낮은 DMSO 및 tBA 부피를 가지고 있었으며, 이는 리포솜 확대에 부가적인 성분을 추가하였다.
- c. 이 룯트는 입자 크기 출시 사양을 통과하지 못하였기 때문에 출시되지 않았다.
- d. 주요 피크는 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드 내에서의 p-에톡시 결실의 가장 보편적인 개수를 나타낸다.
- e. 복합 결실은 올리고뉴클레오타이드의 상기 집단 내에서의 p-에톡시 결실의 평균 개수를 나타낸다.

[0090]

표 2

표 2. 안티센스 골격 조성물에 따른 리포좀 입자 용해도

실험	조작된 안티센스 골격	제조후 골격 에틸 결실		약물 용해도	
		주요 피크	복합 결실	육안 관찰 **	용해도 평가
1	3 아미다이트 치환	-6	-5.67	탈지유 용액	우수
2	3 아미다이트 치환	-6	-5.67	탈지유 용액	우수
3	3 아미다이트 치환	-6	-6.12	탈지유 용액	우수
4	3 아미다이트 치환	-7	-6.66	탈지유 용액	우수
5	100% P-에톡시	-5	-5.66	탈지유 용액	우수
6	2 아미다이트 치환	-5	-5.32	탈지유 용액	우수
7	100% P-에톡시	-4	-4.52	백색 용액	통과
8 ^b	100% P-에톡시	-4	-4.38	백색 용액	통과
9 ^c	100% P-에톡시	-4	-4.38	백색 용액	통과
10 ^a	100% P-에톡시	-4	-4.22	백색 용액 입자	실패

** 의약품 샘플이 입자를 가지면, 그 룻트는 불합격된다.

- 이 룻트는 낮은 용해도; 구체적으로, 재구성된 용액 중의 안티센스 입자로 인해 폐기되었다.
- 이 룻트는 20 mL 바이알 중에 2 mg 안티센스와 함께 더 낮은 DMSO 및 tBA 부피를 가지고 있었으며, 이는 리포좀 확대에 부가적인 성분을 부가하였다.
- 이 룻트는 입자 크기 출시 사양을 통과하지 못하였기 때문에 출시되지 않았다.

[0091]

[0092]

C. 리포좀 P-에톡시 안티센스 의약품의 제제, 여과, 및 동결 건조

[0093]

1 그램 (1 g)의 pE 올리고를 1 mL DMSO당 10 mg 올리고뉴클레오타이드의 비율로 DMSO에 용해시킨다. 다음으로, DOPC를 tert-부틸 알코올에, 1719 mL의 tert-부틸 알코올 당 1 g DOPC의 비율로, 첨가한다. 올리고 및 DOPC를 2.67 g DOPC당 1 g 올리고뉴클레오타이드의 비율로 조합 및 혼합한다. 이후, 폴리소르베이트 20의 20 mL의 0.835% (v/v) 용액을 혼합물에 첨가하여 0.039 mg/mL의 최종 농도를 얻는다. 용액을 동결 건조를 위한 유리 바이알에 분배하기 전에 멸균 필터를 통과시킨다.

[0094]

리포좀 입자 크기에 대한 계면활성제의 효과를 계면활성제의 양을 적정하여 측정하였다 (표 3). 폴리소르베이트 20이 존재하지 않는 경우, 입자의 2.8%만이 300 nm 이하의 직경을 가졌다. 1x 폴리소르베이트 20이 존재하는 경우, 입자의 12.5%가 300 nm 이하의 직경을 가졌다. 3x-10x 폴리소르베이트 20을 첨가한 경우, 입자의 약 20%가 300 nm 이하의 직경을 가졌다. 따라서, 1x에서 3x로의 계면활성제의 증가는 입자 크기를 감소시킨다.

표 3

표 3. 계면활성제에 따른 리포솜 입자 크기 변동성

실험	계면활성제의 양	입자 크기 특징: 누적 분포 함수		
		50% 값	90% 값 **	300 nm 값
1	0x	5301 nm	10719 nm	2.8%
2	1x	1053 nm	4054 nm	12.5%
3	3x	785 nm	2926 nm	19.1%
4	5x	721 nm	2691 nm	21.9%
5	10x	734 nm	2937 nm	21.4%

** 의약품 출시 기준은 리포솜 입자의 90%가 5000 nm 이하인 것이다.

[0095]

[0096]

D. 투여용 리포솜 P-에톡시 안티센스 의약품의 제조

[0097]

동결 건조된 제제를 일반 식염수 (0.9%/10 mM NaCl)를 사용하여 10-5000 μ M의 최종 올리고 농도로 수화시켰다. 리포솜-P-에톡시 올리고를 손으로 교반하여 혼합하였다.

[0098]

E. 리포솜 P-에톡시 안티센스 의약품을 시험하는 방법

[0099]

제조된 의약품의 육안 검사: 제조 후, 의약품을 함유하는 샘플 바이알을 선택하고 육안으로 검사한다. 액체의 부재는 필수적이며, 바이알의 바닥에 있는 호박색 결정이 허용가능하고, 백색의 응집된 분말 또는 외관의 수용이 증가하면, 최상의 결과이다. 백색 외관은 높은 표면적 대 질량비를 갖는 우수한 건조 공정을 나타내며, 이는 사용을 위한 재구성에 매우 도움이 된다.

[0100]

환자 IV를 위한 준비가 된 재구성된 약물의 육안 검사: 일반 식염수를 제조된 리포솜 P-에톡시 안티센스 의약품을 함유한 바이알에 첨가하고 흔들어 약물 결정 또는 분말이 완전히 용해된 용액으로 재구성한다. 다음과 같은 3가지 주요 관찰을 수행한다: 1) 결정 또는 분말이 완전히 용해된 것, 2) 비용해 물질의 백색 덩어리가 없는 것, 및 3) 외관이 유백색 또는 탈지유 외관인 것. 재구성된 액체의 외관이 더 푸를수록 더 양호한데, 이것은 청색 스펙트럼에서 빛을 반사하는 작은 리포솜 입자 크기를 나타내기 때문이다.

[0101]

질량 분석법: 질량 분석법 (mass spec)은 샘플 내의 다양한 질량의 프로파일을 표시하는데 사용된다. P-에톡시 안티센스 물질이 생산될 때, 질량 분석을 샘플 상에서 진행한다. 결과는 "x" 축 상에 오른쪽으로 증가하는 질량 및 "y" 축 상에 위로 증가하는 상대적 질량 존재비를 갖는 그리드 상에 존재하는 물질의 피크를 나타낸다. 샘플의 프로파일을 분석하여 P-에톡시 샘플 내의 P-에톡시 골격의 상대적 양을 측정하며, 피크의 프로파일은 (가장 우측에서 시작하여), 모든 골격이 P-에톡시 결합으로 구성된 전장 물질을 나타내며, 좌측으로 이동한 다음 피크는 하나의 골격이 P-에톡시 결실을 갖는 (따라서, 에틸은 நீ아웃되고 결과적으로 정상 포스포디에스테르 골격 결합임) 전장 물질을 나타내고, 계속된다는 것을 인식한다. 우측으로 이동된 질량 분석 패턴은 더 많은 P-에톡시 골격을 가지며, 따라서 더 소수성이고 덜 가용성인 특성을 갖는 P-에톡시 샘플을 나타내고; 마찬가지로 좌측으로 이동된 질량 분석 패턴은 반대 효과를 갖는 P-에톡시 샘플을 나타낸다. 샘플의 질량 분석 차트의 검사는 또한 제조 과정 중의 여과가 여과된 의약품에 존재하는 올리고뉴클레오타이드 조성에 임의의 부작용을 미치는지 여부를 측정하는데 사용될 수 있다.

[0102]

UV 시험: 자외선 시험은 샘플에 존재하는 올리고뉴클레오타이드의 질량을 측정하는데 사용된다. 올리고뉴클레오타이드는 260 나노미터 범위의 빛을 흡수한다. 그 결과, 완성된 재구성된 의약품의 UV 시험은 의약품의 바이알 내의 올리고뉴클레오타이드 약물 물질의 양을 측정하는 방법으로서 사용되게 되었다. 제조 개발 및 혁신 면에서, 제조시 여과 동안 겪는 문제 또는 P-에톡시 안티센스 약물 물질의 불량한 용해도가 존재하여 용액 중의 더 적은 올리고뉴클레오타이드와 이에 따라 더 낮은 UV 측정값을 야기하는지를 측정하기 위해 UV 시험을 사용하였다. 상기 방법은 검증될 것이며 최종 제품 출시 시험의 일부가 될 가능성이 높다.

[0103]

리포솜 입자 크기: 완성된 의약품의 바이알을 재구성하고 리포솜 입자 크기에 대해 시험한다. 결과는 종종 중심점, 꼬리 및 평균 값을 갖는 대략 정규 분포 또는 대부분의 입자의 대략 정규 분포 및 2차 입자 형성 효과로부터 비롯되는 더 작은 리포솜 입자의 더 작은 2차 피크이다. 리포솜 입자는 너무 크지 않는 것이 중요한데, 이

들은 환자에서 부작용을 야기할 수 있기 때문이다 (예를 들어, 폐 내의 더 작은 혈관에서 혈류 문제를 일으킴). 그 결과, 의약품 출시 기준은 입자 크기 시험이 리포솜의 90%가 5 미크론 이하의 크기인 것을 나타내는 것을 포함한다. 또한, 더 작은 리포솜이 바람직한데, 이는, 이들이 세포 내로 더 잘 흡수될 수 있고, 두번째로는, 더 작은 리포솜이 혈관 기공을 침투함으로써 리포솜을 종양 내부로 침투시켜 리포솜 P-에톡시 안티센스 의약품의 치료 효과를 증가시킬 수 있기 때문이다.

[0104] V. 치료 방법

[0105] 본 발명의 특정 측면은 암, 자가면역 질환, 또는 감염병과 같은 질병을 치료하기 위한 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체 (예를 들어, 비전하 리포솜 내로 혼입된 올리고뉴클레오타이드)를 제공한다. 본 발명의 특정 측면은 대상에서 면역 반응, 예를 들어, 예방 접종에 의해 유도된 면역 반응을 향상시켜 치료적 면역성을 향상시키기 위한 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체 (예를 들어, 비전하 리포솜 내로 혼입된 올리고뉴클레오타이드)를 제공한다. 특히, 상기 올리고뉴클레오타이드는 인간 뉴클레오타이드 서열과 염기 쌍을 이루는 서열을 가질 수 있으므로, 인간 뉴클레오타이드 서열 (예를 들어, *IGF-1R*)에 의해 암호화된 단백질의 발현을 억제할 수 있다.

[0106] IGF-1R 및 잠재적으로 IGF-1R의 하류 유전자, 예를 들어, 핵소키나아제의 발현이 상기 올리고뉴클레오타이드에 노출된 세포에서 하향조절될 수 있다. 상기 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 상기 세포는 암 세포일 수 있다. 상기 세포는 면역계의 세포, 예를 들어 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구, 백혈구, 자연 살해 (NK) 세포, 림프구, T 세포, B 세포, 수지상 세포, 비만 세포 또는 대식세포일 수 있다. 대식세포의 기능은 식균 작용, 항원 제시 및 사이토카인 제시를 포함한다. 상기 대식세포는 M2 대식세포일 수 있으며, 이는 M1 대식세포보다 높은 수준의 IGF-1R을 생성하고 그의 세포 표면 상에서 CD11b, CD14, CD15, CD23, CD64, CD68, CD163, CD204, CD206 중 하나 이상을 발현한다. 상기 단핵구는 M2 단핵구일 수 있으며, 이는 그의 세포 표면상에서 CD11b, CD14, CD15, CD23, CD64, CD68, CD163, CD204, CD206 중 하나 이상을 발현한다. 미분화 단핵구 또는 대식세포에서의 IGF-1R의 발현의 억제는 미분화 단핵구 또는 대식세포가 M2 단핵구 또는 대식세포로 분극되는 것을 방지할 수 있다. M2 단핵구 또는 대식세포에서의 IGF-1R의 발현의 억제는 M2 단핵구 또는 대식세포가 M2 표현형 및 기능을 상실하게 하고/하거나 세포주기 억제를 겪게 하고/하거나 세포 사멸, 예를 들어 세포자멸사 또는 괴사를 겪도록 유도할 수 있다. 대식세포에서의 IGF-1R의 발현의 억제는 M1 대식세포에 비해 M2 대식세포에 선택적으로 영향을 미칠 수 있는데, 이는 M2 대식세포가 M1 대식세포보다 높은 수준의 IGF-1R을 생성하기 때문이다.

[0107] "치료" 및 "치료하는"은 질병 또는 건강 관련 병태의 치료적 이익을 얻기 위한 목적으로 대상에게 치료제를 투여 또는 적용하거나 절차 또는 양식을 수행하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 치료는 약학적 유효량의 IGF-1R 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체의 투여를 포함할 수 있다.

[0108] "대상" 및 "환자"는 인간 또는 비인간, 예를 들어, 영장류, 포유동물, 및 척추동물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 상기 대상은 인간이다.

[0109] 본원 전반에서, 용어 "치료적 이익" 또는 "치료적으로 유효한"은 병태의 의학적 치료와 관련하여 대상의 웰빙을 촉진하거나 향상시키는 어느 것을 지칭한다. 이는 질병의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도의 감소를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 암 치료는, 예를 들어, 종양의 퇴행, 종양 크기의 감소, 종양 침윤성의 감소, 암 성장률의 감소, 전이의 예방, 또는 종양의 제거를 포함할 수 있다. 암 치료는 또한 암을 가진 대상의 생존을 연장시키는 것을 지칭할 수 있다. 자가면역 질환의 치료는, 예를 들어, 원하지 않는 면역 반응이 있는 자기 항원의 발현을 감소시키는 것, 원하지 않는 면역 반응이 있는 자기 항원의 내성을 유도하는 것, 또는 자기 항원에 대한 면역 반응을 억제하는 것을 포함할 수 있다. 감염병의 치료는, 예를 들어, 감염원을 제거하는 것, 감염원의 수준을 감소시키는 것, 또는 감염원의 수준을 특정 수준으로 유지시키는 것을 포함할 수 있다.

[0110] 본 치료 방법이 유용한 종양은 고형 종양, 혈액 종양, 전이성 암, 또는 비전이성 암에서 발견되는 것과 같은 임의의 악성 세포 유형을 포함한다. 예시적인 고형 종양은 췌장, 결장, 맹장, 식도, 위장, 잇몸, 간, 피부, 위, 고환, 혀, 자궁, 위, 뇌, 머리, 목, 난소, 신장, 후두, 육종, 뼈, 폐, 방광, 흑색종, 전립선, 및 유방으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기관의 종양을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 혈액 종양은 골수의 종양, T 또는 B 세포 악성 종양, 백혈병, 림프종, 예를 들어, 미만성 거대 B 세포 림프종, 모세포종, 골수종 등을 포함한다. 본원에 제공된 방법을 사용하여 치료될 수 있는 암의 추가적인 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 백혈병, 편평 세포암, 폐암 (소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종, 및 폐의 편평 암종 포함), 복막의 암, 간세포암, 위암 (위장암 및 위장관 간질암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁암, 난소암, 간암, 방광암, 유방암, 대장암, 결장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액샘 암종, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 다양한 유형의 두경부암, 흑색종, 표재 확산성 흑색종, 악성 흑자 흑색종, 선단 흑자성 흑색종, 결절성 흑색종,

뿐만 아니라 B-세포 림프종 (저등급/소포성 비호지킨 림프종 (NHL); 소 림프구성 (SL) NHL; 중간 등급/소포성 NHL; 중간 등급 미만성 NHL; 고등급 면역모세포성 NHL; 고등급 림프모구성 NHL; 고등급 소 비-절단 세포 NHL; 거대 종양 (bulky disease) NHL; 미만성 거대 B 세포 림프종; 외투세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발렌스트롬 마크로글로불린혈증 포함), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 모세포 백혈병, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병 (AML) 및 만성 골수모구 백혈병을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0111] 상기 암은 구체적으로 다음과 같은 조직학적 유형일 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다: 악성 신생물; 암종; 미분화 암종; 거대 및 방추 세포 암종; 소세포 암종; 유두 암종; 편평 세포 암종; 림프상피 암종; 기저 세포 암종; 모기질 암종; 이행 세포 암종; 유두 이행 세포 암종; 선암종; 악성 가스트린종; 담관암종; 간세포 암종; 조합된 간세포 암종 및 담관암종; 육주상의 선암종; 선양 낭성 암종; 선종성 용종에서의 선암종; 선암종, 가족성 대상 용종증; 고형 암종; 악성 유암종; 세기관지 폐포 선암종; 유두 선암종; 협색소성 암종; 호산성 암종; 호산세포성 선암종; 호염기성 암종; 투명 세포 선암종; 과립 세포 암종; 여포성 선암종; 유두 및 여포성 선암종; 비피낭 경화성 암종; 부신 피질 암종; 자궁내막양 암종; 피부 부속기 암종; 아포크린 선암종; 피지선 선암종; 이구선 선암종; 점액표피양 암종; 낭선암종; 유두 낭선암종; 유두 장액 낭선암종; 점액성 낭선암종; 점액 선암종; 인환 세포 암종; 침윤성 유관 암종; 수질성 암종; 소엽성 암종; 염증성 암종; 유방 파제테병; 선방 세포 암종; 선편평 암종; 편평 상피화생을 동반한 선암종; 악성 흥선종; 악성 난소 기질 종양; 악성 협막세포종; 악성 과립막 세포 종양; 악성 남성모세포종; 세르톨리 세포 암종; 악성 라이디히 세포 종양; 악성 지질 세포 종양; 악성 부신경절종; 악성 유방외 부신경절종; 갈색세포종; 사구맥관육종; 악성 흑색종; 무색소성 흑색종; 표재 확산성 흑색종; 거대 색소모반 중 악성 흑색종; 상피 세포 흑색종; 악성 청색 모반; 육종; 섬유육종; 악성 섬유조직 구종; 점액육종; 지방육종; 평활근육종; 횡문근육종; 배아 횡문근육육종; 포상 횡문근육육종; 기질 육종; 악성 혼합 종양; 윌러의 혼합 종양; 신모세포종; 간모세포종; 암육종; 악성 간엽세포종; 악성 브레너 종양; 악성 엽상 종양; 활막 육종; 악성 중피종; 난소고환종; 배아성 암종; 악성 기형종; 악성 난소갑상선종; 융모암종; 악성 중신종; 혈관육종; 악성 혈관내피종; 카포시 육종; 악성 혈관주위세포종; 림프관육종; 골육종; 피질주위 골육종; 연골육종; 악성 연골모세포종; 중간엽 연골육종; 뼈의 거대 세포 종양; 유잉 육종; 악성 치성 종양; 범랑아세포 치성육종; 악성 범랑아세포종; 범랑아세포성 섬유육종; 악성 송과체종; 척색종; 악성 신경교종; 뇌실막종; 성상세포종 (I 등급, II 등급, III 등급, 또는 IV 등급); 원형질성 성상세포종; 원섬유성 성상세포종; 성상모세포종; 교모세포종; 다형성 교모세포종; 핏지교종; 핏지모세포종; 원시 신경외배엽성 육종; 소뇌 육종; 신경절신경모세포종; 신경모세포종; 망막세포종; 후각 신경원성 종양; 악성 수막종; 신경섬유육종; 악성 신경초종; 악성 과립 세포 종양; 악성 림프종; 호지킨병; 호지킨병; 부속아종; 소림프구성 악성 림프종; 거대 세포 미만성 악성 림프종; 여포성 악성 림프종; 균상 식육종; 다른 특이성 비호지킨 림프종; 악성 조직구종; 다발성 골수종; 비만 세포 육종; 면역중식성 소장 질환; 백혈병; 림프구성 백혈병; 혈장 세포 백혈병; 적백혈병; 림프육종 세포 백혈병; 골수성 백혈병; 호염기성 백혈병; 호산구성 백혈병; 단핵구성 백혈병; 비만 세포 백혈병; 거대핵모세포성 백혈병; 골수성 육종; 및 모양 세포성 백혈병.

[0112] 본 치료 방법이 유용한 자가면역 질환은, 비제한적으로, 낭창, 경피증, 아토피 습진, 부비동염, 천식, 알레르기, 화학물질 과민증, 제1형 당뇨병, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 편평태선, 척추관절염증, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 반응성 관절염, 장병증성 관절염, 당뇨병, 셀리악병, 자가면역 갑상선 질환, 자가면역 간 질환, 아디슨병, 이식거부, 이식편대숙주 질환, 숙주대이식편 질환, 궤양성 대장염, 크론병, 과민성 장 질환, 염증성 장 질환, 류마티스성 관절염, 소아기 류마티스성 관절염, 가족성 지중해열, 근위축성 측삭 경화증, 쇼그렌 증후군, 조기 관절염, 바이러스성 관절염, 다발성 경화증, 또는 건선을 포함한다. 이러한 질병의 진단 및 치료는 문헌에 잘 설명되어 있다.

[0113] 본 치료 방법이 유용한 감염병은 박테리아 감염, 바이러스 감염, 진균 감염, 및 기생충 감염을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 바이러스 감염은 B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 1, 인간 면역결핍 바이러스 2, 인간 유두종 바이러스, 단순 포진 바이러스 1, 단순 포진 바이러스 2, 대상 포진, 수두 대상포진, 콕삭키바이러스 A16, 사이토메갈로바이러스, 에볼라 바이러스, 엔테로바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 한타 바이러스, 헨드라 바이러스, 바이러스 수막염, 호흡기 세포융합 바이러스, 로타바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 아데노바이러스, 및 인플루엔자 바이러스 감염을 포함한다. 예시적인 박테리아 감염은 클라미디아 트라코마티스, 리스테리아 모노사이토제네스, 헬리코박터 파일로리, 에스케리키아 콜리, 보렐리아 부르그도르페리, 레지오넬라 뉴모필리아, 마이코박테리아 종 (예를 들어, M. 투베르쿨로시스, M. 아비움, M. 인트라셀룰라레, M. 칸사이, M. 고르도내), 스태필로코커스 아우레우스, 나이세리아 고도로에, 나이세리아 메닌자이티데스, 스트렙토코커스 피오제네스 (그룹 A 스트렙토코커스), 스트렙토코커스 아갈락티에 (그룹 B 스트렙토코커스), 스트렙토코커스 (비리단스 그룹), 스트렙토코커스 패칼리스, 스트렙토코커스 보비스, 스트렙토코커스

(혐기성 종), 스트렙토코커스 뉴모니에, 병원성 캄필로박터 종, 엔테로코커스 종, 헤모필러스 인플루엔제, 바실러스 안트라시스, 코리네박테리움 디프테리애, 코리네박테리움 종, 에리시펠로티릭스 류시오파티애, 클로스트리듐 퍼프린거스, 클로스트리듐 테타니, 엔테로박터 애로제네스, 클렙시엘라 뉴모니애, 파스투렐라 물토시다, 박테로이데스 종, 푸소박테리움 누클레아툼, 스트렙토바실러스 모닐리포르미스, 트레포네마 팔리듐, 트레포네마 페르테뉴, 랩토스피라, 리켓시아, 악티노마이세스 이스라엘리, 쉬겔라 종 (예를 들어, S. 플렉스네리, S. 손네이, S. 디센테리애), 및 살모넬라 종 감염을 포함한다. 예시적인 진균 감염은 칸디다 알비칸스, 칸디다 글라브라타, 아스퍼질러스 푸미가투스, 아스퍼질러스 테레우스, 크립토코커스 네오포르만스, 히스토플라스마 캡슐라툼, 콕시디오이데스 임미티스, 블라스토마이세스 데마티디디스, 및 클라미디아 이라코마티스 감염을 포함한다.

[0114] 상기 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체는 다양한 양식으로 항종양, 항바이러스, 항박테리아, 항진균, 항기생충, 또는 항-자가면역 제제로서 본원에서 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명은 질환을 억제하거나 역전시키는데 충분한 기간 동안 병에 걸린 세포의 집단을 치료적 유효량의 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체와 접촉시키는 것을 포함하는, 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체의 사용 방법을 고려한다.

[0115] 일 구현예에서, 생체내 접촉은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체를 포함하는, 치료적 유효량의 생리학적으로 허용가능한 조성물을 정맥내, 복강내, 피하, 또는 종양내 주사에 의해 환자에게 투여함으로써 달성된다. 상기 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체는 주사에 의해 또는 시간이 경과함에 따라 점진적인 주입에 의해 비경구로 투여될 수 있다.

[0116] 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체를 포함하는 치료용 조성물은 통상적으로, 정맥내로 또는 피하로, 예를 들어, 단위 투여량의 주사에 의해 투여된다. 치료용 조성물에 관하여 사용시, 용어 "단위 투여량"은 대상을 위한 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 필요한 희석제, 즉, 담체, 또는 비히클과 결합되어 목적하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 지정된 양의 활성 물질을 함유한다.

[0117] 상기 조성물은 투여 제제와 양립가능한 방식으로, 그리고 치료적 유효량으로 투여된다. 투여될 양은 치료될 대상, 활성 성분을 이용하는 대상의 시스템의 능력, 및 목적하는 치료 효과의 정도에 따라 결정된다. 투여될 필요가 있는 활성 성분의 정확한 양은 의사의 판단에 따라 결정되며 각 개인에 특유하다. 그러나, 전신 적용을 위한 적합한 투여량 범위가 본원에 개시되어 있으며, 이는 투여 경로에 따라 결정된다. 초기 및 부스터 투여를 위한 적합한 요법이 또한 고려되며, 이는 초기 투여 후 후속 주사 또는 다른 투여에 의한 1시간 이상의 간격의 반복된 투여량으로 대표된다. 예시적인 다중 투여가 본원에 기술되어 있으며, 이는 폴리펩타이드의 높은 혈청 및 조직 수준을 계속 유지하는데 특히 바람직하다. 대안적으로, 혈중 농도를 생체내 요법에 대해 명시된 범위로 유지시키는데 충분한 연속적인 정맥내 주입이 고려된다.

[0118] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 질병을 치료하기 위해, 예를 들어, 종양 세포 성장을 억제하기 위해 또는 국소 진행성 암 또는 전이성 암을 가진 암 환자에서 암 세포를 사멸하기 위해, 전신으로 또는 국소로 투여될 수 있음이 고려된다. 이는 정맥내로, 척추강내로, 피하로, 및/또는 복강내로 투여될 수 있다. 이는 단독으로 또는 항증식 약물과 조합하여 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 이는 수술 또는 다른 절차 이전에 환자에서 암 부하를 감소시키기 위해 투여된다. 대안적으로, 이는 임의의 나머지 암 (예를 들어, 수술에서 제거하지 못한 암)이 생존하지 않도록 수술 후에 투여될 수 있다.

[0119] 올리고뉴클레오타이드의 치료적 유효량은 목적하는 효과를 달성하기 위해, 즉, 표적 단백질의 발현을 억제하기 위해 계산된 지정된 양이다. 따라서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 투여를 위한 투여량 범위는 목적하는 효과를 생성할 만큼 충분히 높은 투여량 범위이다. 상기 투여량은 부정적인 부작용, 예를 들어, 과다점성 증후군, 폐 부종, 울혈성 심부전, 신경학상 효과 등을 일으킬 정도로 높지 않아야 한다. 일반적으로, 상기 투여량은 환자의 연령, 환자의 병태, 환자의 성별, 및 환자에서 질병의 정도에 따라 변화하며, 이는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 상기 투여량은 임의의 합병증이 있는 경우 개별 의사에 의해 조정될 수 있다.

[0120] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 환자에게 비경구로, 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 근육내, 림프관내, 복강내, 피하, 흉막내, 또는 척추강내 주사에 의해 투여되거나, 또는 생체외에서 사용될 수 있다. 바람직한 투여량은 5-25 mg/kg이다. 투여는 바람직하게는 암이 사라지거나 퇴행될 때까지 예정된 스케줄로 반복되며, 다른 형태의 요법과 함께 투여될 수 있다.

[0121] VI. 약학적 제제

[0122] 상기 리포솜을 포함하는 약학적 조성물은 일반적으로, 멸균된 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제, 예를

들어, 물 또는 식염수 용액을 포함한다.

- [0123] 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 비전하 지질 성분 (예를 들어, 리포솜 형태)의 임상 적용이 수행되는 경우, 일반적으로, 상기 지질 복합체를 목표 응용 분야에 적절한 약학적 조성물로 제조하는 것이 유익하다. 이는 전형적으로, 발열원 뿐만 아니라 인간 또는 동물에게 해로울 수 있는 임의의 다른 불순물을 본질적으로 포함하지 않는 약학적 조성물을 제조하는 것을 수반한다. 상기 복합체를 안정화시키고 표적 세포에 의한 흡수를 허용하기 위해 적절한 완충제를 사용할 수도 있다.
- [0124] 문구 "약학적으로 또는 약리학적으로 허용가능한"은 동물, 예를 들어, 인간에게 적절하게 투여될 때 부정적인, 알레르기성 또는 다른 뜻밖의 반응을 일으키지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. 올리고뉴클레오타이드 또는 부가적인 활성 성분을 포함하는 적어도 하나의 비전하 지질 성분을 함유하는 약학적 조성물의 제조는, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st, 2005 (원용에 의해 본원에 포함됨)]에 의해 예시된 바와 같이, 본 개시내용에 비추어 당업자에게 알려질 것이다. 더욱이, 동물 (예를 들어, 인간) 투여의 경우, 제제가 FDA 사무국의 생물학적 표준 (FDA Office of Biological Standards)에 의해 요구되는 바와 같은 무균성, 발열원성, 일반적인 안전성 및 순도를 만족해야 함이 이해될 것이다.
- [0125] 본원에서, "약학적으로 허용가능한 담체"는 당업자에게 공지된 바와 같은, 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 계면활성제, 향산화제, 보존제 (예를 들어, 항박테리아 제제, 항진균 제제), 등장성 제제, 흡수 지연제, 염, 보존제, 약물, 약물 안정화제, 겔, 결합제, 부형제, 붕해제, 유회제, 감미제, 향료, 염료, 이러한 유사 물질 및 이의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 비인간 동물에게 투여하기 위해 제제화되며 인간에게 투여하는데에 허용되지 않는 (예를 들어, 정부 규제에 의해) 약학적으로 허용가능한 담체를 사용하는 것이 바람직할 수 있으나, 바람직하게는, 약학적으로 허용가능한 담체는 인간에게 투여하기 위해 제제화된다. 임의의 통상적인 담체가 활성 성분과 양립불가능한 경우를 제외하고, 치료용 또는 약학적 조성물에서의 그의 사용이 고려된다.
- [0126] 환자 또는 대상에게 투여된 본 발명의 조성물의 실제 투여량은 신체적 및 생리학적 인자, 예를 들어, 체중, 병태의 중증도, 치료되는 질병의 유형, 이전 또는 동시 치료 개입, 환자의 특발성 질환 및 투여 경로에 의해 결정될 수 있다. 어떤 경우에도, 투여를 담당하는 의사가 조성물 내의 활성 성분(들)의 농도 및 개별 대상을 위한 적절한 투여량(들)을 결정한다.
- [0127] 특정 구현예에서, 약학적 조성물은, 예를 들어, 적어도 약 0.1%의 활성 화합물을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 활성 화합물은 단위 중량의 약 2% 내지 약 75%, 또는 예를 들어, 약 25% 내지 약 60%, 및 그 안에서 유도될 수 있는 임의의 범위를 포함할 수 있다. 다른 비제한적인 예에서, 투여량은 또한 투여 당 약 1 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 5 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 10 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 50 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 100 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 200 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 350 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 500 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 1 mg/kg/체중, 약 5 mg/kg/체중, 약 10 mg/kg/체중, 약 50 mg/kg/체중, 약 100 mg/kg/체중, 약 200 mg/kg/체중, 약 350 mg/kg/체중, 약 500 mg/kg/체중, 내지 약 1000 mg/kg/체중 또는 그 이상, 및 그 안에서 유도될 수 있는 임의의 범위를 포함할 수 있다. 본원에 열거된 수로부터 유도될 수 있는 범위의 비제한적인 예에서, 약 5 $\mu\text{g/kg}$ /체중 내지 약 1000 mg/kg/체중, 약 5 $\mu\text{g/kg}$ /체중 내지 약 500 mg/kg/체중 등의 범위가 투여될 수 있다.
- [0128] 본 구현예들의 올리고뉴클레오타이드는 투여량 당 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μg 또는 그 이상의 핵산의 투여량으로 투여될 수 있다. 각각의 투여량은 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 μl 또는 ml 또는 그 이상의 부피일 수 있다.
- [0129] 치료용 조성물의 용액은 계면활성제, 예를 들어, 하이드록시프로필셀룰로오스와 적합하게 혼합된 물 중에 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 이의 혼합물 및 오일 중에 제조될 수 있다. 일반적인 저장 및 사용 조건 하에, 이러한 제제는 미생물의 성장을 방지하는 보존제를 함유한다.
- [0130] 본 발명의 치료용 조성물은 유리하게는 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사가 가능한 조성물의 형태로 투여되며; 주사하기 전 액체 중의 용액, 또는 액체 중의 현탁액에 적합한 고체 형태가 또한 제조될 수 있다. 이러한 제제는 또한 유회될 수 있다. 이러한 목적을 위한 전형적인 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 예를 들어, 상기 조성물은 포스페이트 완충 식염수의 ml 당 10 mg, 25 mg, 50 mg 또는 최대 약 100 mg의 인간 혈청 알부민을 함유할 수 있다. 다른 약학적으로 허용가능한 담체는 수용액, 비독성 부형제, 예를 들어, 염, 보존제, 완충제 등을 포함한다.
- [0131] 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일 및 주사가 가능한 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸올레에이트를 포함한다. 수성 담체는 물, 알코올성/수성 용액, 식염수 용액, 비경구 비히클, 예를

들어, 염화나트륨, 링거 텍스트로스 등을 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양 보충제를 포함한다. 보존제는 항미생물 제제, 항산화제, 킬레이트화제 및 불활성 가스를 포함한다. 상기 약학적 조성물의 다양한 성분의 pH 및 정확한 농도는 널리 공지된 파라미터에 따라 조정된다.

[0132] 본 발명의 치료용 조성물은 전형적인 약학적 제제를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여는, 표적 조직이 해당 경로를 통해 이용가능한 한, 임의의 일반적인 경로를 통해 이루어진다. 이는 경구, 비강, 구강, 직장, 질 또는 국소를 포함한다. 국소 투여는 특히, 피부암, 화학요법 유도 탈모증 또는 다른 피부과증식성 장애를 치료하는, 피부암 치료에 유리할 수 있다. 대안적으로, 투여는 정위 (orthotopic), 피내, 피하, 근육내, 복강내 또는 정맥내 주사에 의할 수 있다. 이러한 조성물은 일반적으로, 생리학적으로 허용가능한 담체, 완충제 또는 다른 부형제를 포함하는 약학적으로 허용가능한 조성물로서 투여될 것이다. 폐의 병태의 치료를 위해, 에어로졸 전달이 사용될 수 있다. 에어로졸의 부피는 약 0.01 ml 내지 0.5 ml이다.

[0133] 상기 치료용 조성물의 유효량은 의도된 목표에 기초하여 결정된다. 용어 "단위 투여량" 또는 "투여량"은 대상에서 사용하는데 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 그의 투여, 즉, 적절한 경로 및 치료 요법과 관련하여 상기 논의된 목적하는 반응을 생성하도록 계산된 지정된 양의 상기 치료용 조성물을 함유한다. 치료 횟수 및 단위 투여량에 따라 투여되는 양은 목적하는 예방 또는 효과에 따라 결정된다.

[0134] 상기 치료용 조성물의 정확한 양은 또한 의사의 판단에 따라 결정되며 각 개인에 특유하다. 투여량에 영향을 미치는 인자는 환자의 신체적 및 임상적 상태, 투여 경로, 의도된 치료 목표 (예를 들어, 증상의 경감 대 치유) 및 특정 치료 물질의 효능, 안정성 및 독성을 포함한다.

[0135] VII. 조합 치료

[0136] 특정 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 제2 또는 부가적인 요법과 조합하여, 유전자 발현 억제제를 발현할 수 있는 억제성 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 조합 요법을 포함하는 상기 방법 및 조성물은 치료 또는 예방 효과를 향상시키고/시키거나 또 다른 항암 또는 항-과증식성 요법의 치료 효과를 증가시킨다. 치료 및 예방 방법 및 조성물은 목적하는 효과, 예를 들어, 암 세포의 사멸 및/또는 세포 과증식의 억제를 달성하는데 효과적인 조합된 양으로 제공될 수 있다. 이러한 과정은 세포를 유전자 발현 억제제 및 제2 요법 모두와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 조직, 종양, 또는 세포는 하나 이상의 상기 제제 (즉, 유전자 발현 억제제 또는 항암제)를 포함하는 하나 이상의 조성물 또는 약리학제 제제(들)과 접촉될 수 있거나, 또는 조직, 종양, 및/또는 세포를 둘 이상의 별개의 조성물 또는 제제와 접촉함으로써 접촉될 수 있으며, 여기서 하나의 조성물이 1) 억제성 올리고뉴클레오타이드; 2) 항암제, 또는 3) 억제성 올리고뉴클레오타이드 및 항암제 모두를 제공한다. 또한, 이러한 조합 요법이 화학요법, 방사선요법, 수술 요법, 또는 면역요법과 함께 사용될 수 있음이 고려된다.

[0137] 억제성 올리고뉴클레오타이드는 항암 치료에 대해 이전, 동안, 이후, 또는 다양한 조합으로 투여될 수 있다. 상기 투여는 동시부터 몇 분 내지 며칠 내지 몇 주의 범위의 간격일 수 있다. 상기 억제성 올리고뉴클레오타이드가 항암제와 별도로 환자에게 제공되는 구현예에서, 상기 두 화합물이 환자에게 유리하게 조합된 효과를 여전히 발휘할 수 있도록, 일반적으로, 각각의 전달 시간 사이에 상당한 시간이 만료되지 않도록 할 것이다. 이러한 경우, 상기 억제성 올리고뉴클레오타이드 요법 및 항암 요법을 서로 약 12 내지 24 또는 72시간 내에, 더욱 바람직하게는 서로 약 6-12시간 내에 환자에게 제공할 수 있음이 고려된다. 일부 경우, 각각의 투여 사이에 며칠 (2, 3, 4, 5, 6 또는 7일) 내지 몇 주 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주)가 경과하는 경우, 치료 기간을 유의하게 연장하는 것이 바람직할 수 있다.

[0138] 특정 구현예에서, 치료 과정은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90일 또는 그 이상 지속된다. 하나의 제제가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 및/또는 90일째에, 그의 임의의 조합에 제공될 수 있고, 또 다른 제제가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72,

73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 및/또는 90일째에, 또는 그의 임의의 조합에 제공되는 것이 고려된다. 1일 (24시간) 이내에, 환자는 상기 제제(들)의 단일 또는 복수 투여를 제공받을 수 있다. 더욱이, 치료 과정 후, 항암 치료가 투여되지 않는 기간이 있음이 고려된다. 이러한 기간은, 환자의 상태, 예를 들어, 이들의 예후, 체력, 건강 등에 따라, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일, 및/또는 1, 2, 3, 4, 5주, 및/또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개월 또는 그 이상 지속될 수 있다.

[0139] 다양한 조합이 사용될 수 있다. 하기 예의 경우, 억제성 올리고뉴클레오타이드 요법은 "A"이고 항암 요법은 "B"이다:

[0140] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B

[0141] B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A

[0142] B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A

[0143] A/A/B/A

[0144] 본 발명의 임의의 화합물 또는 요법의 투여는 상기 제제의 독성 (존재하는 경우)을 고려하여, 이러한 화합물의 투여에 대한 일반 프로토콜을 따른다. 따라서, 일부 구현예에서, 조합 요법에 기인하는 독성을 모니터링하는 단계가 존재한다. 치료 주기는 필요에 따라 반복될 것임이 예상된다. 또한 다양한 표준 요법뿐만 아니라 수술 개입이 상기 기술된 요법과 조합하여 적용될 수 있음이 고려된다.

[0145] 특정 측면에서, 표준 요법은 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 수술 요법 또는 유전자 요법을 포함하며, 이는 본원에 기술된 바와 같은 유전자 발현 억제제 요법, 항암 요법, 또는 유전자 발현 억제제 요법 및 항암 요법 모두와 조합하여 사용될 수 있음이 고려된다.

[0146] A. 화학요법

[0147] 다양한 화학치료제가 본 구현예들에 따라 사용될 수 있다. 용어 "화학요법"은 암을 치료하기 위한 약물의 사용을 지칭한다. "화학치료제"는 암 치료에서 투여되는 화합물 또는 조성물을 함축하기 위해 사용된다. 이러한 제제 또는 약물은 세포 내에서의 이들의 활성 방식, 예를 들어, 이들이 세포 주기에 영향을 미치는지 여부 및 이들이 어떤 단계에서 세포 주기에 영향을 미치는지에 의해 분류된다. 대안적으로, 제제는 DNA를 직접 가교결합시키는 그의 능력, DNA로 삽입되는 그의 능력, 또는 핵산 합성에 영향을 미쳐 염색체 및 유사분열 이상을 유도하는 그의 능력에 기초하여 특징지어질 수 있다.

[0148] 화학치료제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오테파 및 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어, 부셀판, 임프로셀판, 및 피포셀판; 아지리딘, 예를 들어, 벤조도파, 카르보퀸, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어, 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드, 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 캄포테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체인 KW-2189 및 CBI-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코디티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어, 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 및 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어, 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님누스틴; 항생제, 예를 들어, 엔다이인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가II); 다이네미신, 예를 들어, 다이네미신 A; 비스포스포네이트, 예를 들어, 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오킴지노스타틴 발색단 및 관련 발색단백질 엔다이인 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데투루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어, 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 및 조루비신; 항-대사산물, 예를 들어, 메토타렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어, 데놉테린, 프레토포테린, 및 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 예노

시타빈, 및 플록스우리딘; 안드로겐, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 및 테스토라톤; 항-아드레날, 예를 들어, 미토탄 및 트릴로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지퀸; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어, 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미복산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK다당류 복합체; 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지퀸; 2,2',2''-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈테신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀 젬시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 백금 배위 착물, 예를 들어, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미복산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (예를 들어, CPT-11); 토포이소머라아제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어, 레티노산; 카페시타빈; 카르보플라틴, 프로카르바진, 플리코마이신, 젬시타빈, 나벨빈, 파르네실-단백질 전달효소 억제제, 트랜스플라티늄, 및 상기 중 임의의 것의 약학적으로 허용가능한 염, 산, 또는 유도체를 포함한다.

[0149] **B. 방사선요법**

[0150] 광범위하게 사용되며 DNA 손상을 일으키는 다른 인자는 일반적으로 γ 선, X선, 및/또는 중양 세포로의 방사성 동위원소의 규제된 전달로서 알려진 것을 포함한다. 마이크로파, 양성자 빔 조사 (미국 특허 제5,760,395호 및 제4,870,287호) 및 UV-조사와 같은 DNA 손상 인자의 다른 형태가 또한 고려된다. 이러한 인자 모두는, DNA, DNA의 전구체, DNA의 복제 및 복구, 및 염색체의 조립 및 유지의 광범위한 손상에 영향을 미칠 가능성이 매우 높다. X선의 선량 범위는 장시간 (3 내지 4주) 동안 50 내지 200 윈트겐의 일일 선량부터 2000 내지 6000 윈트겐의 단일 선량까지의 범위이다. 방사성 동위원소의 선량 범위는 광범위하게 다양하며, 동위원소의 반감기, 방출된 방사선의 강도 및 유형, 및 신생물 세포의 흡수에 의해 결정된다.

[0151] 세포에 적용되는 경우, 용어 "접촉된" 및 "노출된"은 치료용 구조물 및 화학치료제 또는 방사성 치료제가 표적 세포에 전달되거나 표적 세포와 직접 병렬로 배치되는 과정을 기술하기 위해 본원에 사용된다. 세포 사멸을 달성하기 위해, 예를 들어, 두 가지 제제가 세포를 사멸시키거나 세포가 분열하는 것을 방지하는데 효과적인 조합된 양으로 세포에 전달된다.

[0152] **C. 면역요법**

[0153] 암 치료의 맥락에서, 면역치료제는, 일반적으로, 암 세포를 표적화하고 파괴하는 면역 효과기 세포 및 분자의 사용에 의존한다. 트라스투주맙 (허셉틴™ (Herceptin™))이 그러한 예이다. 상기 면역 효과기는, 예를 들어, 중양 세포의 표면 상의 일부 마커에 특이적인 항체일 수 있다. 상기 항체는 단독으로 요법의 효과기로서 작용할 수 있거나 또는 다른 세포를 동원하여 세포 사멸에 실제로 영향을 미칠 수 있다. 상기 항체는 또한 약물 또는 독소 (화학치료제, 방사성핵종, 리신 A 사슬, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)에 접합될 수 있고 단지 표적화제로서 작용할 수 있다. 대안적으로, 상기 효과기는 중양 세포 표적과 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자를 갖는 림프구일 수 있다. 다양한 효과기 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다. 치료 양식, 즉, 직접적인 세포독성 활성화 및 ErbB2의 억제 또는 감소의 조합은 ErbB2를 과발현하는 암의 치료에서 치료적 이익을 제공할 것이다.

[0154] 또 다른 면역요법이 또한 상기 논의된 유전자 침묵 요법과 조합된 조합 요법의 일부로서 사용될 수 있다. 면역요법의 일 측면에서, 중양 세포는 표적화할 수 있는, 즉, 대부분의 다른 세포에 존재하지 않는, 일부 마커를 가져야 한다. 많은 중양 마커가 존재하며, 이들 중 임의의 것이 본 발명의 맥락에서 표적화에 적합할 수 있다. 일반적인 중양 마커는 암배아 항원, 전립선 특이적 항원, 소변 중양 관련 항원, 태아 항원, 티로시나아제 (p97), gp68, TAG-72, HMFg, 시알릴 루이스 항원, MucA, MucB, PLAP, 에스트로겐 수용체, 라미닌 수용체, erb B 및 p155를 포함한다. 면역요법의 대안적인 측면은 항암 효과와 면역 자극 효과를 조합하는 것이다. 하기를 비롯한 면역 자극 분자가 또한 존재한다: 사이토카인, 예를 들어, IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, 감마-IFN, 케모카인, 예를 들어, MIP-1, MCP-1, IL-8 및 성장 인자, 예를 들어, FLT3 리간드. 단백질로서 또는 중양 억제제와 조합된 유전자 전달을 사용하여 면역 자극 분자를 조합하는 것은 항-중양 효과를 향상시키는 것으로 나타났다. 더욱이, 이러한 화합물 중 임의의 것에 대한 항체는 본원에 논의된 항암제를 표적화하는데 사용될 수 있다.

- [0155] 현재 연구 중이거나 사용 중인 면역요법의 예는, 면역 보조제, 예를 들어, 마이코박테리움 보비스, 플라스모디움 팔시파룸, 디니트로클로로벤젠 및 방향족 화합물 (미국 특허 제5,801,005호 및 제5,739,169호; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides 등, 1998), 사이토카인 요법, 예를 들어, 인터페론 α , β 및 γ ; IL-1, GM-CSF 및 TNF (Bukowski 등, 1998; Davidson 등, 1998; Hellstrand 등, 1998) 유전자 요법, 예를 들어, TNF, IL-1, IL-2, p53 (Qin 등, 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; 미국 특허 제5,830,880호 및 제5,846,945호) 및 단일클론 항체, 예를 들어, 항-강글리오시드 GM2, 항-HER-2, 항-p185 (Pietras 등, 1998; Hanibuchi 등, 1998; 미국 특허 제5,824,311호)이다. 하나 이상의 항암 요법이 본원에 기술된 유전자 침묵 요법과 함께 사용될 수 있음이 고려된다.
- [0156] 활성 면역요법에서, 항원성 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질, 또는 자가 또는 동종이형 종양 세포 조성물 또는 "백신"은 일반적으로, 별개의 박테리아 보조제와 함께 투여된다 (Ravindranath and Morton, 1991; Morton 등, 1992; Mitchell 등, 1990; Mitchell 등, 1993).
- [0157] 입양 면역요법에서, 환자의 순환성 림프구, 또는 종양 침윤된 림프구는 시험관내에서 단리되고, IL-2와 같은 림포카인에 의해 활성화되거나 종양 괴사를 위한 유전자가 형질도입되고, 재투여된다 (Rosenberg 등, 1988; 1989).
- [0158] 일부 구현예에서, 상기 면역요법은 면역관문 억제제일 수 있다. 면역관문 억제제 (예를 들어, 보조자극 분자)를 증가시키거나 신호를 감소시킨다. 면역관문 억제에 의해 표적화될 수 있는 억제성 면역관문은 아데노신 A2A 수용체 (A2AR), B7-H3 (CD276으로도 알려짐), B 및 T 림프구 감쇠기 (BTLA), 세포 독성 T-림프구-관련 단백질 4 (CTLA-4, CD152로도 알려져 있음), 인돌아민 2,3-디옥시게나제 (IDO), 살해세포 면역글로불린 (KIR), 림프구 활성화 유전자-3 (LAG3), 계획된 세포소멸 1 (PD-1), T-세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3 (TIM-3) 및 T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제제 (VISTA)를 포함한다. 특히, 상기 면역관문 억제제는 PD-1 축 및/또는 CTLA-4를 표적화한다.
- [0159] 상기 면역관문 억제제는 소분자, 재조합 형태의 리간드 또는 수용체와 같은 약물 일 수 있거나, 특히 인간 항체와 같은 항체일 수 있다 (예를 들어, 국제 특허 공보 제W02015016718호; Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012 (둘 모두는 원용에 의해 본원에 포함됨)). 면역관문 단백질 또는 이의 유사체의 공지된 억제제가 사용될 수 있으며, 특히 키메라화, 인간화 또는 인간 형태의 항체가 사용될 수 있다. 당업자가 알 수 있는 바와 같이, 대안적인 및/또는 동등한 명칭이 본 개시내용에서 언급된 특정 항체에 사용될 수 있다. 이러한 대안적인 및/또는 동등한 명칭은 본 개시내용의 맥락에서 상호 교환 가능하다. 예를 들어, 램브롤리주맵은 대안적이고 동등한 명칭인 MK-3475 및 펌브롤리주맵으로도 알려져 있다.
- [0160] 일부 구현예에서, 상기 PD-1 결합 길항제는 PD-1이 이의 리간드 결합 파트너에 결합하는 것을 억제하는 분자이다. 특정 측면에서, 상기 PD-1 리간드 결합 파트너는 PDL1 및/또는 PDL2이다. 또 다른 구현예에서, PDL1 결합 길항제는 PDL1이 이의 결합 파트너에 결합하는 것을 억제하는 분자이다. 특정 측면에서, PDL1 결합 파트너는 PD-1 및/또는 B7-1이다. 또 다른 구현예에서, 상기 PDL2 결합 길항제는 PDL2가 이의 결합 파트너에 결합하는 것을 억제하는 분자이다. 특정 측면에서, PDL2 결합 파트너는 PD-1이다. 상기 길항제는 항체, 이의 항원 결합 단편, 면역접합체, 융합 단백질 또는 올리고펩타이드일 수 있다. 예시적인 항체는 미국 특허 제8,735,553 호, 제8,354,509호 및 제8,008,449호에 기술되어 있으며, 이들 모두는 원용에 의해 본원에 포함된다. 본원에 제공된 방법에 사용하기 위한 다른 PD-1 축 길항제는 당업계에 공지되어있으며, 예를 들어, 미국 특허 공보 제20140294898호, 제2014022021호, 및 제20110008369호에 기술된 바와 같으며, 이들 모두는 원용에 의해 본원에 포함된다.
- [0161] 일부 구현예에서, 상기 PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체 (예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체)이다. 일부 구현예에서, 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맵, 펌브롤리주맵 및 CT-011로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 PD-1 결합 길항제는 면역접합체 (예를 들어, 불변 영역 (예를 들어, 면역글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PDL1 또는 PDL2의 세포외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 면역접합체)이다. 일부 구현예에서, 상기 PD-1 결합 길항제는 AMP-224이다. 니볼루맵 (MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558, 및 OPDIVO[®]로도 알려짐)은 W02006/121168에 기술된 항-PD-1 항체이다. 펌브롤리주맵 (MK-3475, Merck 3475, 램브롤리주맵, KEYTRUDA[®], 및 SCH-900475로도 알려짐)은 W02009/114335에 기술된 항-PD-1 항체이다. CT-011 (hBAT 또는 hBAT-1로도 알려짐)은 W02009/101611에 기술된 항-PD-1 항체이다. AMP-224 (B7-DCIg로도 알려짐)은 W02010/027827 및 W02011/066342 에 기술된 PDL2-Fc 융합 가용성 수용체이다.

- [0162] 본원에 제공된 방법에서 표적화될 수 있는 또 다른 면역관문은 CD152로도 알려진 세포 독성 T-림프구-관련 단백질 4 (CTLA-4)이다. 인간 CTLA-4의 완전한 cDNA 서열은 Genbank 수탁 번호 L15006을 갖는다. CTLA-4는 T 세포의 표면에서 발견되며 항원 제시 세포의 표면에서 CD80 또는 CD86에 결합될 때 "꺼짐"스위치로 작동한다. CTLA4는, 도움 T 세포의 표면에서 발현되고 억제 신호를 T 세포에 전달하는 면역글로불린 상과 (superfamily)의 구성원이다. CTLA4는 T-세포 보조자극 단백질인 CD28과 유사하고, 두 분자는 항원 제시 세포 상의 CD80 및 CD86 (각각 B7-1 및 B7-2로도 지칭됨)과 결합한다. CTLA4는 억제 신호를 T 세포에 전달하는 반면, CD28은 자극 신호를 전달한다. 세포내 CTLA4는 조절 T 세포에서도 발견되며 이들의 기능에 중요할 수 있다. T 세포 수용체 및 CD28을 통한 T 세포 활성화는 B7 분자에 대한 억제 수용체인 CTLA-4의 발현을 증가시킨다.
- [0163] 일부 구현예에서, 상기 면역관문 억제제는 항-CTLA-4 항체 (예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체), 그의 항원 결합 단편, 면역접합체, 융합 단백질 또는 올리고캡타이드이다.
- [0164] 본 방법에 사용하기에 적합한 항-인간 -CTLA-4 항체 (또는 이로부터 유래된 VH 및/또는 VL 도메인)는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 대안적으로, 당업계에 인정된 항-CTLA-4 항체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 다음에 개시된 항-CTLA-4 항체가 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있다: 미국 특허 제8,119,129호, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504 (CP675,206, 트레멜리무맵 (이전에는 티실리무맵으로 지칭됨)으로도 알려져 있음), 미국 특허 제6,207,156호; Hurwitz 등 (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071; Camacho 등 (2004) *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206); 및 Mokyr 등 (1998) *Cancer Res* 58:5301-5304. 전술한 각각의 공보의 교시는 원용에 의해 본원에 포함된다. CTLA-4에 결합하기 위한 이러한 당업계에 공지된 항체들 중 임의의 것과 경쟁하는 항체가 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간화된 CTLA-4 항체는 국제 특허 출원 제WO2001014424호, 제WO2000037504호 및 미국 특허 제8,017,114호에 기술되어 있으며, 이들 모두는 원용에 의해 본원에 포함된다.
- [0165] 예시적인 항-CTLA-4 항체는 이필리무맵 (10D1, MDX-010, MDX-101 및 예르보이® (Yervoy®)로도 알려져 있음) 또는 이의 항원 결합 단편 및 변이체이다 (예를 들어, WO 01/14424 참조). 다른 구현예에서, 상기 항체는 이필리무맵의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 따라서, 일 구현예에서, 상기 항체는 이필리무맵의 VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 이필리무맵의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체는 상기 언급된 항체와 동일한 CTLA-4 상의 에피토프에 결합하기 위해 경쟁하고/하거나 또는 이에 결합한다. 다른 구현예에서, 상기 항체는 상기 언급된 항체와 적어도 약 90%의 가변 영역 아미노산 서열 동일성 (예를 들어, 이필리무맵과의 적어도 약 90%, 95% 또는 99%의 가변 영역 동일성)을 갖는다.
- [0166] CTLA-4를 조절하기 위한 다른 분자는 CTLA-4 리간드 및 수용체, 예를 들어, 미국 특허 제5844905호, 제5885796호 및 국제 특허 출원 제WO1995001994 및 제WO1998042752호 (이들 모두는 원용에 의해 본원에 포함됨)에 기술된 것들, 및 면역접합체, 예를 들어, 미국 특허 제8329867호 (원용에 의해 본원에 포함됨)에 기술된 것들을 포함한다.
- [0167] 일부 구현예에서, 상기 면역요법은 입양 면역요법일 수 있으며, 이는 생체외에서 생성된 자가 항원-특이적 T 세포의 전달을 포함한다. 입양 면역요법에 사용되는 T 세포는 항원-특이적 T 세포의 확장 또는 유전 공학을 통한 T 세포의 방향 전환에 의해 생성될 수 있다 (Park, Rosenberg 등 2011). 종양 특이적 T 세포의 단리 및 전달은 흑색종 치료에 성공적인 것으로 나타났다. 트랜스제닉 T 세포 수용체 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)의 유전자 전달을 통해 T 세포의 신규 특이성이 성공적으로 생성되었다 (Jena, Dotti 등 2010). CAR은 단일 융합 분자 내의 하나 이상의 신호전달 도메인과 연결되어 있는 표적화 모이어티(moiety)로 구성된 합성 수용체이다. 일반적으로, CAR의 결합 모이어티는 유연성 링커에 의해 연결된 단일클론 항체의 경쇄 및 가변 단편들을 포함하는, 단일쇄 항체(scFv)의 항원 결합 도메인으로 구성된다. 수용체 또는 리간드 도메인에 기초한 결합 모이어티도 성공적으로 사용되고 있다. 제1세대 CAR들을 위한 신호전달 도메인은 CD3제타 또는 Fc 수용체 감마쇄의 세포질 영역으로부터 유래된다. CAR은 림프종 및 고형 종양을 비롯한 다양한 악성 종양으로부터의 종양 세포의 표면에서 발현된 항원에 대해 T 세포의 방향이 성공적으로 전환되도록 하였다 (Jena, Dotti 등 2010).
- [0168] 일 구현예에서, 본원은 암 치료를 위한 조합 요법을 제공하며, 여기서 상기 조합 요법은 입양 T-세포 요법 및 면역관문 억제제를 포함한다. 일 측면에서, 상기 입양 T-세포 요법은 자가 및/또는 동종이형 T 세포를 포함한다. 또 다른 측면에서, 상기 자가 및/또는 동종이형 T 세포는 종양 항원을 표적으로 한다.
- [0169] **D. 수술**
- [0170] 암 환자의 약 60%는 예방, 진단 또는 병기결정, 치유, 및 완화 수술을 포함하는 일부 유형의 수술을 받는다. 치

유 수술은 다른 요법과 함께 사용될 수 있는 암 치료, 예를 들어, 본 발명의 치료, 화학요법, 방사선요법, 호르몬 요법, 유전자 요법, 면역요법 및/또는 대안적인 요법이다.

[0171] 치유 수술은 암성 조직의 전부 또는 일부를 물리적으로 제거, 절개 및/또는 파괴하는 절제술을 포함한다. 종양 절제술은 종양의 적어도 일부를 물리적으로 제거하는 것을 지칭한다. 종양 절제술 외에도, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 냉동수술, 전기수술, 및 현미경으로 제어되는 수술 (모즈 수술 (Mohs' surgery))을 포함한다. 본 발명이 표재암, 전암, 또는 부수적인 양의 정상 조직의 제거와 함께 사용될 수 있음이 추가로 고려된다.

[0172] 암성 세포, 조직, 또는 종양의 일부 또는 전부의 절개시, 신체에 공동 (cavity)이 형성될 수 있다. 치료는 관류, 직접적인 주사 또는 부가적인 항암 요법을 이용한 국소 부위 적용에 의해 달성될 수 있다. 이러한 치료는, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일마다, 또는 1, 2, 3, 4, 및 5주마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월마다 반복될 수 있다. 이러한 치료는 또한 다양한 투여량일 수 있다.

[0173] E. 다른 제제

[0174] 다른 제제가 치료의 치료 효능을 개선하기 위해 본 구현예들의 특정 측면과 조합되어 사용될 수 있음이 고려된다. 이러한 부가적인 제제는 세포 표면 수용체 및 간극 연결의 상호조절에 영향을 미치는 제제, 세포분열 억제 및 분화 제제, 세포 부착 억제제, 세포자멸사 유도제에 대한 과증식성 세포의 민감성을 증가시키는 제제, 또는 다른 생물학적 제제를 포함한다. 간극 연결의 수를 증가시키는 것에 의한 세포간 신호전달의 증가는 주변의 과증식성세포 집단에 대한 항-과증식성 효과를 증가시킬 것이다. 다른 구현예에서, 세포분열 억제 또는 분화 제제는 치료의 항-과증식성 효능을 증가시키기 위해 본 구현예들의 특정 측면과 조합하여 사용될 수 있다. 세포 부착 억제제가 본 구현예들의 효능을 개선하기 위해 고려된다. 세포 부착 억제제의 예는 국소 부착 키나아제 (FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 세포자멸사에 대한 과증식성 세포의 민감성을 증가시키는 다른 제제, 예를 들어, 항체 c225가 치료 효능을 개선하기 위해 본 구현예들의 특정 측면과 조합하여 사용될 수 있음이 추가로 고려된다.

[0175] VIII. 키트 및 진단

[0176] 본 발명의 다양한 측면에서, 치료제 및/또는 다른 치료 및 전달 제제를 함유하는 키트가 구상된다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 요법을 제조하고/하거나 투여하기 위한 키트를 고려한다. 상기 키트는 본 발명의 활성제 또는 효과적인 제제(들)를 투여하는데 사용할 수 있는 시약을 포함할 수 있다. 상기 키트의 시약은 적어도 하나의 유전자 발현 억제제 (예를 들어, IGF-1R 올리고뉴클레오타이드), 하나 이상의 지질 성분, 조합 요법의 하나 이상의 항암 성분뿐만 아니라 본 발명의 성분을 제조, 제제화, 및/또는 투여하기 위한 또는 본 발명의 방법의 하나 이상의 단계를 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있다.

[0177] 일부 구현예에서, 상기 키트는 또한 상기 키트의 성분, 예를 들어, 에펜도르프 튜브, 분석 플레이트, 주사기, 병, 또는 튜브와 반응하지 않는 용기인 적합한 용기 수단을 포함할 수 있다. 상기 용기는 플라스틱 또는 유리와 같은 멸균가능한 물질로부터 제조될 수 있다.

[0178] 상기 키트는 상기 방법의 절차 단계를 개괄하는 지시 시트를 추가로 포함할 수 있고, 본원에 기술되거나 당업자에게 공지된 것과 동일한 절차를 실질적으로 수행한다.

[0179] IX. 실시예

[0180] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 후속하는 실시예에 개시된 기술은 본 발명의 실시에서 잘 기능하는 것으로 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내며, 따라서 그의 실시를 위한 바람직한 방식을 구성하는 것으로 간주될 수 있음이 당업자에게 인식되어야 한다. 그러나, 당업자는, 본 개시내용을 고려하여, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서, 개시된 특정 구현예에 많은 변화를 가하면서도 유사한 결과를 얻을 수 있음을 이해해야 한다.

[0181] 실시예 1 - IGF-1R-표적화 P-에폭시 올리고뉴클레오타이드

[0182] IGF-1R 단백질의 발현을 억제하기 위한 리포좀 IGF-1R 안티센스 의약품에 사용하기 위해, IGF-1R을 표적화하는 올리고뉴클레오타이드를 설계하였다. IGF-1R의 연속 cDNA 서열은 서열 번호 3에 제시되어 있고 IGF-1R의 단백질 서열은 서열 번호 4에 제시되어 있다. 각 올리고뉴클레오타이드의 서열을 표 4에 제시하였다.

표 4

표 4. IGF-1R 안티센스 서열

안티센스 명칭	서열	서열 번호
IGF-1R_AS1	5'- TCC TCC GGA GCC AGA CTT -3'	1
IGF-1R_AS2	5'- GGA CCC TCC TCC GGA GCC -3'	2

[0183]

[0184]

상기 리포솜 IGF-1R 안티센스 의약품은 본원에 기재된 방법에 따라 제조되었다. IGF-1R_AS1 염기 올리고뉴클레오타이드에 대한 질량 분석법 시험은 상기 올리고뉴클레오타이드 약물 물질의 80% 이상이 3 내지 7개의 포스포디에스테르 골격 결합을 가지며 상기 올리고뉴클레오타이드 약물 물질의 70% 이상이 4 내지 7개의 포스포디에스테르 골격 결합을 가짐을 나타내었다.

[0185]

실시예 2 - 마우스에서 GL261 종양 성장에 대한 리포솜 IGF-1R 안티센스의 효과

[0186]

리포솜 IGF-1R_AS1 안티센스의, 마우스에 이식된 GL261 세포 종양의 성장 방지능을 시험하였다. GL261 세포 (10^5)를 0일째에 C57BL/6 마우스의 옆구리에 이식하였다. 14일 후, 리포솜 IGF-1R_AS1 안티센스 (0.75 mg, 0.25 mg, 또는 0.075 mg)를 복강내로 투여하였다. 종양 발달을 추적하기 위해 마우스를 관찰하였다. 리포솜 IGF-1R_AS1의 안티센스의 투여는 종양 형성을 지연시켰다 (도 1).

[0187]

* * *

[0188]

본원에 개시되고 청구된 모든 방법은 본 개시내용에 비추어 과도한 실험 없이 이뤄지고 수행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법을 바람직한 구현예의 측면에서 설명하였지만, 본 발명의 개념, 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 상기 방법 및 본원에 기술된 상기 방법의 단계 또는 단계의 순서에 변형이 가해질 수 있음이 당업자에게 자명할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적으로 및 생리학적으로 관련된 특정 제제가, 동일하거나 유사한 결과가 달성되는 한, 본원에 기술된 제제를 대체할 수 있음이 자명할 것이다. 당업자에게 자명한 이러한 모든 유사한 대체물 및 변형은 첨부된 청구범위에 의해 정의된 바와 같은 본 발명의 사상, 범위 및 개념에 속하는 것으로 간주된다.

[0189]

참고문헌

[0190]

하기 참고문헌은, 본원에 제시된 것을 보완하는 예시적인 절차 또는 다른 세부사항을 제공하는 한, 원용에 의해 본원에 명확하게 포함된다.

[0191]

미국 특허 제4,659,774호

[0192]

미국 특허 제4,816,571호

[0193]

미국 특허 제4,870,287호

[0194]

미국 특허 제4,959,463호

[0195]

미국 특허 제5,141,813호

[0196]

미국 특허 제5,214,136호

[0197]

미국 특허 제5,223,618호

[0198]

미국 특허 제5,264,566호

[0199]

미국 특허 제5,378,825호

[0200]

미국 특허 제5,428,148호

[0201]

미국 특허 제5,446,137호

[0202]	미국 특허 제5,466,786호
[0203]	미국 특허 제5,470,967호
[0204]	미국 특허 제5,539,082호
[0205]	미국 특허 제5,554,744호
[0206]	미국 특허 제5,574,146호
[0207]	미국 특허 제5,602,240호
[0208]	미국 특허 제5,602,244호
[0209]	미국 특허 제5,610,289호
[0210]	미국 특허 제5,614,617호
[0211]	미국 특허 제5,623,070호
[0212]	미국 특허 제5,652,099호
[0213]	미국 특허 제5,670,663호
[0214]	미국 특허 제5,672,697호
[0215]	미국 특허 제5,681,947호
[0216]	미국 특허 제5,700,922호
[0217]	미국 특허 제5,705,629호
[0218]	미국 특허 제5,708,154호
[0219]	미국 특허 제5,714,331호
[0220]	미국 특허 제5,714,606호
[0221]	미국 특허 제5,719,262호
[0222]	미국 특허 제5,736,336호
[0223]	미국 특허 제5,739,169호
[0224]	미국 특허 제5,760,395호
[0225]	미국 특허 제5,763,167호
[0226]	미국 특허 제5,766,855호
[0227]	미국 특허 제5,773,571호
[0228]	미국 특허 제5,777,092호
[0229]	미국 특허 제5,786,461호
[0230]	미국 특허 제5,792,847호
[0231]	미국 특허 제5,801,005호
[0232]	미국 특허 제5,824,311호
[0233]	미국 특허 제5,830,880호
[0234]	미국 특허 제5,846,945호
[0235]	미국 특허 제5,855,911호
[0236]	미국 특허 제5,858,988호
[0237]	미국 특허 제5,859,221호

- [0238] 미국 특허 제5,872,232호
- [0239] 미국 특허 제5,886,165호
- [0240] 미국 특허 제5,891,625호
- [0241] 미국 특허 제5,908,845호
- [0242] 미국 특허 제6,541,036호
- [0243] 미국 특허 제9,744,187호
- [0244] Amin 등, *Oncogene*, 22:5399-5407, 2013.
- [0245] Arteaga 등, *Cancer Res.*, 49:6237-41, 1989.
- [0246] Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.
- [0247] Bailey and Sullivan, *Biochimica. Biophys. Acts.*, 239-252, 2000.
- [0248] Bangham 등, *J. Mol. Biol*, 13(1):253-259, 1965.
- [0249] Bukowski 등, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.
- [0250] Christodoulides 등, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
- [0251] Davidson 등, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.
- [0252] Deamer and Uster, In: *Liposome Preparation: Methods and Mechanisms*, Ostro (Ed.), *Liposomes*, 1983.
- [0253] Dokka 등, *Pharm Res*, 17: 521-25, 2000.
- [0254] duBois 등, *J Clin Oncol*, 17: 46-51, 1999.
- [0255] Dubey 등, *J. Drug Target*, 12:257-264, 2004.
- [0256] Duxbury 등, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311:786-792, 2003.
- [0257] Duxbury 등, *Oncogene*, 23:1448-1456, 2004.
- [0258] Egholm 등, *Nature*, 365(6446):566-568, 1993.
- [0259] Elbashir 등, *Nature*, 411 (6836):494-498, 2001.
- [0260] 유럽 출원 01219
- [0261] 유럽 출원 266,032
- [0262] Fagard 등, *JAKSTAT*, 2:e22882, 2013.
- [0263] Farhood 등, *Biochim. Biophys. Act*, 289-295, 1995.
- [0264] Fire 등, *Nature*, 391(6669):806-811, 1998.
- [0265] Flenniken 등, *Dev. Biol.*, 179:382-401, 1996.
- [0266] Froehler 등, *Nucleic Acids Res.*, 14(13):5399-5407, 1986.
- [0267] Gabizon, *Cancer Invest.*, 19:424-436, 2001.
- [0268] Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu 등 (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- [0269] Gregoriadis, In: *Drug Carriers in Biology and Medicine*, Gregoriadis (Ed.), 287-341, 1979.
- [0270] Gutierrez-Puente 등, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291:865-869, 1999.
- [0271] Halder 등, *Clinical Cancer Research*, 11: 8829-36, 2005.
- [0272] Han 등, *Ann Surg Oncol*, 4:264-268, 1997.

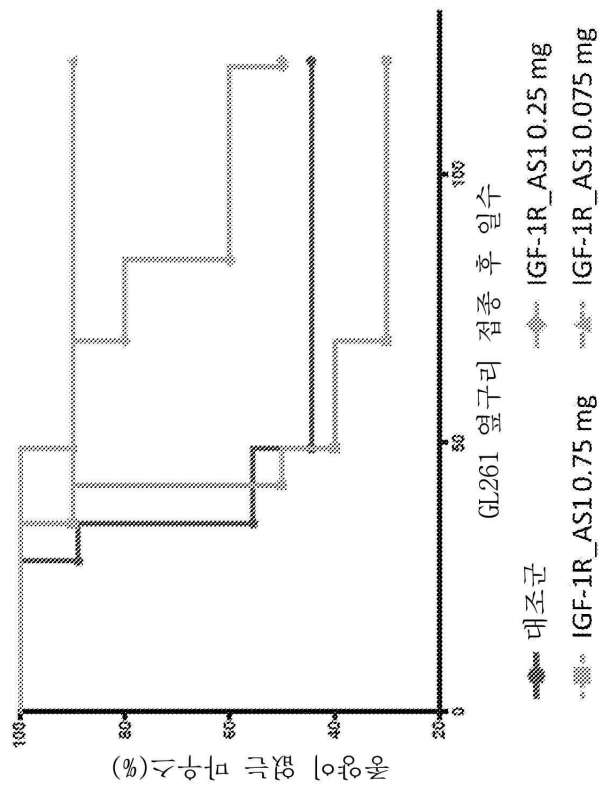
- [0273] Hanibuchi 등, Int. J. Cancer, 78(4):480-485, 1998.
- [0274] Hannon and Rossi, Nature, 431:371-378, 2004.
- [0275] Hardee 등, G3 (Bethesda) 3:2173-2185, 2013.
- [0276] Hassani 등, J. Gene Med., 7(2):198-207, 2005.
- [0277] Hecker 등, Cancer Research, 62:2699-2707, 2002.
- [0278] Hellstrand 등, Acta Oncologica, 37(4):347-353, 1998.
- [0279] Hortobagyi 등, J. Clin. Oncol., 19:3422-3433, 2001.
- [0280] Hsia 등, J Cell Biol, 160:753-67, 2003.
- [0281] Hui and Hashimoto, Infection Immun., 66(11):5329-5336, 1998.
- [0282] Jackson 등, Nat. Biotechnol., 21:635-637, 2003.
- [0283] Jemal 등, CA Cancer J. Clin., 55(1):10-30, 2005.
- [0284] Jiang 등, Oncogene, 18:6071-77, 1999.
- [0285] Judson 등, Cancer, 86: 1551-56, 1999.
- [0286] Kaneda 등, Science, 243:375-378, 1989.
- [0287] Kato 등, J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.
- [0288] Kim 등, Nat. Biotechnol., 22:321-325, 2004.
- [0289] Kinch 등, Clin. Exp. Metastasis, 20:59-68, 2003.
- [0290] Klein 등, Gastroenterology, 125:9-18, 2003.
- [0291] Kohno 등, Int J Cancer, 97:336-43, 2002.
- [0292] Kornberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed., Freeman, San Francisco, 1992.
- [0293] Kornberg 등, Invest Ophthalmol Vis Sci, 45:4463-69, 2004.
- [0294] Kornberg, Head Neck, 20: 634-639, 1998.
- [0295] Kostarelos 등, Int J Cancer, 112: 713-21, 2004.
- [0296] Krasnici 등, Int. J. Cancer, 105(4):561-567, 2003.
- [0297] Landen, Cancer Res, 65: 6910-18, 2005.
- [0298] Langley 등, Cancer Research, 63: 2971-76, 2003.
- [0299] Lewis 등, Cell, 115:787-798, 2003.
- [0300] Lewis 등, Nat. Genet., 32:107-108, 2002.
- [0301] Li 등, Biochem. Biophys. Res. Com., 196:92-98, 1993.
- [0302] Lori 등, Am. J. Pharmacogenomics, 2:245-252, 2002.
- [0303] Matsuda 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:16-22, 2004.
- [0304] McCaffrey 등, Nature, 418:38-39, 2002.
- [0305] McGuire 등, New England Journal of Medicine, 334:1-6, 1996.
- [0306] McLean 등, Expert Opin Pharmacother, 4: 227-34, 2003.
- [0307] Miklossy 등, Nat. Rev. Drug Discov., 12:611-629, 2013.
- [0308] Miller 등, Biochemistry, 37(37):12875-83, 1998.

- [0309] Mitchell 등, Ann. NY Acad. Sci., 690:153-166, 1993.
- [0310] Mitchell 등, J. Clin. Oncol., 8(5):856-869, 1990.
- [0311] Mitra 등, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6: 56-68, 2005.
- [0312] Mitra 등, Proc Am Assoc Cancer Res, 2005.
- [0313] Morton 등, Arch. Surg., 127:392-399, 1992.
- [0314] Nemoto 등, Pathobiology, 65:195-203, 1997.
- [0315] Nicolau 등, Methods Enzymol., 149:157-176, 1987.
- [0316] Noblitt 등, Cancer Gene Ther., 11:757-766, 2004.
- [0317] Ogawa 등, Oncogene, 19:6043-6052, 2000.
- [0318] Owens 등, Cancer Res, 55:2752-2755, 1995.
- [0319] Park 등, Cancer Lett., 118:153-160, 1997.
- [0320] PCT 공보 WO 92/20702
- [0321] PCT 공보 WO 02/100435
- [0322] PCT 공보 WO 03/015757
- [0323] PCT 공보 WO 04/002453
- [0324] PCT 공보 WO 04/029213
- [0325] PCT 공보 WO 2016/164916
- [0326] Pietras 등, Oncogene, 17(17):2235-2249, 1998.
- [0327] Qin 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(24):14411-14416, 1998.
- [0328] Ravindranath and Morton, Intern. Rev. Immunol., 7: 303-329, 1991.
- [0329] Reich 등, Mol. Vis., 9:210-216, 2003.
- [0330] Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- [0331] Rosenberg 등, Ann. Surg. 210(4):474-548, 1989.
- [0332] Rosenberg 등, N. Engl. J. Med., 319:1676, 1988.
- [0333] Ryther 등, Gene Ther., 12(1):5-11, 2004.
- [0334] Sambrook 등, In: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.
- [0335] Schaller and Parsons, Trends in Cell Biology, 3:258-62, 1993.
- [0336] Schaller 등, Mol Biol Cell, 10:3489-3505, 1999.
- [0337] Schaller, Biochim Biophys Acta, 1540:1-21, 2001.
- [0338] Schaller, J Endocrinol, 150:1-7, 1996.
- [0339] Schaller, Trends Cell Biol, 3:258-262, 1993.
- [0340] Scheit, In: Synthesis and Biological Function, Wiley-Interscience, NY, 171-172, 1980.
- [0341] Schlaepfer and Hunter, Trends in Cell Biology, 8: 151-57, 1998.
- [0342] Schlaepfer 등, Prog Biophys Mol Biol, 71: 435-78, 1999.
- [0343] Scotlandi 등, Cancer Res., 58:4127-31, 1998.

- [0344] Scuto 등, Cancer Res., 71:3182-3188, 2011.
- [0345] Sein 등, Oncogene, 19: 5539-42, 2000.
- [0346] Sheta 등, J Natl Cancer inst, 92: 1065-73, 2000.
- [0347] Shibata 등, Cancer Res, 58: 900-903, 1998.
- [0348] Sieg 등, Nat Cell Biol, 2:249-56, 2000.
- [0349] Sioud and Sorensen, Biochem. Biophys. Res. Comm., 312:1220-1225, 2003.
- [0350] Siwak 등, Clin Cancer Res, 8: 955-56, 2002.
- [0351] Sledz 등, Nat. Cell Biol., 5:834-839, 2003.
- [0352] Song 등, Nature Med. 9:347-351, 2003.
- [0353] Sonoda 등, Journal of Biological Chemistry, 275:16309-15, 2000.
- [0354] Sood 등, Am J Pathol, 165:1087-1095, 2004.
- [0355] Sood 등, Cancer Biology & Therapy, 1: 511-17, 2002.
- [0356] Sorensen 등, J. Mol. Biol., 327:761-66, 2003.
- [0357] Soutschek 등, Nature, 432:173-178, 2004.
- [0358] Spagnou 등, Biochemistry, 43:13348-13356, 2004.
- [0359] Sulman 등, Genomics, 40:371-374, 1997.
- [0360] Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:4194-4198, 1978.
- [0361] Thaker 등, 36th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists, Miami, Fla., 2005.
- [0362] Thaker 등, Clin. Cancer Res., 10:5145-5150, 2004.
- [0363] Thurston 등, J. Clin. Invest., 101(7):1401-1413, 1998.
- [0364] Uchida 등, Mol. Ther., 10:162-171, 2004.
- [0365] Voskoglou-Nomikos 등, Clin. Cancer Res., 9:4227-4239, 2003.
- [0366] Walker-Daniels 등, Prostate, 41:275-80, 1999.
- [0367] Wianny 등, Nat. Cell Biol., 2:70-75, 2000.
- [0368] Wong 등, Gene, 10:87-94, 1980.
- [0369] Wu 등, J. Hematol. Oncol., 4:31, 2011.
- [0370] Xia 등, Nat. Biotechnol, 20:1006-10, 2002.
- [0371] Yang 등, Oncogene, 22:5694-701, 2003.
- [0372] Zelinski 등, Cancer Res., 61:2301, 2001.
- [0373] Zhang 등, J. Biol. Chem., 279:10677-684, 2004.
- [0374] Zia 등, J. Cell. Biol., 24:269-75, 1996.

도면

도면1



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> BIO-PATH HOLDINGS, INC.

<120> P-ETHOXY NUCLEIC ACIDS FOR IGF-1R INHIBITION

<130> BPHI.P0006W0

<140> Unknown

>141> 2018-04-19

<150> 62/487,420

<151> 2017-04-19

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 1
tcctccggag ccagactt 18

<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223>
> Synthetic polynucleotide

<400> 2
ggaccctcct ccggagcc 18

<210> 3
<211> 12262
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1044)..(5147)

<400> 3
agtgtgtggc agcggcggcg gcggcgcggc gaggtgggg ctcttgttta ccagcattaa 60
ctccgctgag cggaaaaaaaa aagggaiaaaa acccgaggag gagcgagcgc accaggcgaa 120
ctcgagagag gcgggagagc gagagggacg cgcacagcga gcctgcccac ggccggcgct 180
cgcagaccct cggccccgct ccccgatcc ccccgcgccc tccacgcccc tcccgcgcgg 240

gggcagctcc acggcgcgcc tcgcctcggc tgtgaccttc agcgagccgg agcccccgcg 300
cagagcaggc ggcgggcgcc ggggggccgg cgggggcgcg gcggggcgcg 360
agagccgggc ggcgcgcgcg gagtgtgag cgcggcgcg cgggcccc gctttgtgtg 420
tgtctggat ttgggaagga gctcgccg cgcgcgcgcg cgctgaggga ggaggcgcg 480
gcgagcggag ccaggaggag gaggaggagg gggagccgct cattatttt gactccgct 540
ttctgcccc cgccggcctc gcctgtgacc cggacttcgg ggcgatcttg cgaactgct 600
cgcgcccccc cgcgggcgaa gtcggggcgt ccggccgct ccccgcgcg cagggccggg 660

cttgtttttc ctgcctagg cagatttggg ctttgcccc tttctttgca gttttcccc 720
cttctgcct ctccgggttt gaaaatggag gccgacgacg ccgacagccc gccccggcg 780
gcctcgggtt cccgactccg ccgagccctg ggccgctgct gccggcgctg aggggcccgc 840
ccgcgccgcc cgccccgtcc gcgcacccgg agggccccgg cggcgccgcc ttcggagtat 900
tgtttcttc gcccttgttt ttggaggggg agcgaagact gattttgaga cttgtttcct 960

ttcatttcct ttttttcttt tcttttcttt tttttttttt tttttttttt tgagaaaggg	1020
gaatttcac ccaataaaaa gga atg aag tct ggc tcc gga gga ggg tcc ccg	1073
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro	
1 5 10	
acc tcg ctg tgg ggg ctc ctg ttt ctc tcc gcc gcg ctc tcg ctc tgg	1121
Thr Ser Leu Trp Gly Leu Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp	
15 20 25	
ccg acg agt gga gaa atc tgc ggg cca ggc atc gac atc cgc aac gac	1169
Pro Thr Ser Gly Glu Ile Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp	
30 35 40	
tat cag cag ctg aag cgc ctg gag aac tgc acg gtg atc gag ggc tac	1217
Tyr Gln Gln Leu Lys Arg Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr	
45 50 55	
ctc cac atc ctg ctc atc tcc aag gcc gag gac tac cgc agc tac cgc	1265
Leu His Ile Leu Leu Ile Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg	
60 65 70	
ttc ccc aag ctc acg gtc att acc gag tac ttg ctg ctg ttc cga gtg	1313
Phe Pro Lys Leu Thr Val Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val	
75 80 85 90	
gct ggc ctc gag agc ctc gga gac ctc ttc ccc aac ctc acg gtc atc	1361
Ala Gly Leu Glu Ser Leu Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile	
95 100 105	
cgc ggc tgg aaa ctc ttc tac aac tac gcc ctg gtc atc ttc gag atg	1409
Arg Gly Trp Lys Leu Phe Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met	
110 115 120	
acc aat ctc aag gat att ggg ctt tac aac ctg agg aac att act cgg	1457
Thr Asn Leu Lys Asp Ile Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg	
125 130 135	
ggg gcc atc agg att gag aaa aat gct gac ctc tgt tac ctc tcc act	1505

Gly Ala Ile Arg Ile Glu Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr

140 145 150

gtg gac tgg tcc ctg atc ctg gat gcg gtg tcc aat aac tac att gtg 1553

Val Asp Trp Ser Leu Ile Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val

155 160 165 170

ggg aat aag ccc cca aag gaa tgt ggg gac ctg tgt cca ggg acc atg 1601

Gly Asn Lys Pro Pro Lys Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met

175 180 185

gag gag aag ccg atg tgt gag aag acc acc atc aac aat gag tac aac 1649

Glu Glu Lys Pro Met Cys Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn

190 195 200

tac cgc tgc tgg acc aca aac cgc tgc cag aaa atg tgc cca agc acg 1697

Tyr Arg Cys Trp Thr Thr Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr

205 210 215

tgt ggg aag cgg gcg tgc acc gag aac aat gag tgc tgc cac ccc gag 1745

Cys Gly Lys Arg Ala Cys Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu

220 225 230

tgc ctg ggc agc tgc agc gcg cct gac aac gac acg gcc tgt gta gct 1793

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

235 240 245 250

tgc cgc cac tac tac tat gcc ggt gtc tgt gtg cct gcc tgc ccg ccc 1841

Cys Arg His Tyr Tyr Tyr Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro

255 260 265

aac acc tac agg ttt gag ggc tgg cgc tgt gtg gac cgt gac ttc tgc 1889

Asn Thr Tyr Arg Phe Glu Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys

270 275 280

gcc aac atc ctc agc gcc gag agc agc gac tcc gag ggg ttt gtg atc 1937

Ala Asn Ile Leu Ser Ala Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile

285 290 295

cac gac ggc gag tgc atg cag gag tgc ccc tcg ggc ttc atc cgc aac	1985
His Asp Gly Glu Cys Met Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn	
300 305 310	
ggc agc cag agc atg tac tgc atc cct tgt gaa ggt cct tgc ccg aag	2033
Gly Ser Gln Ser Met Tyr Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys	
315 320 325 330	
gtc tgt gag gaa gaa aag aaa aca aag acc att gat tct gtt act tct	2081
Val Cys Glu Glu Glu Lys Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser	
335 340 345	
gct cag atg ctc caa gga tgc acc atc ttc aag ggc aat ttg ctc att	2129
Ala Gln Met Leu Gln Gly Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile	
350 355 360	
aac atc cga cgg ggg aat aac att gct tca gag ctg gag aac ttc atg	2177
Asn Ile Arg Arg Gly Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met	
365 370 375	
ggg ctc atc gag gtg gtg acg ggc tac gtg aag atc cgc cat tct cat	2225
Gly Leu Ile Glu Val Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His	
380 385 390	
gcc ttg gtc tcc ttg tcc ttc cta aaa aac ctt cgc ctc atc cta gga	2273
Ala Leu Val Ser Leu Ser Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly	
395 400 405 410	
gag gag cag cta gaa ggg aat tac tcc ttc tac gtc ctc gac aac cag	2321
Glu Glu Gln Leu Glu Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln	
415 420 425	
aac ttg cag caa ctg tgg gac tgg gac cac cgc aac ctg acc atc aaa	2369
Asn Leu Gln Gln Leu Trp Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys	
430 435 440	
gca ggg aaa atg tac ttt gct ttc aat ccc aaa tta tgt gtt tcc gaa	2417
Ala Gly Lys Met Tyr Phe Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu	
445 450 455	
att tac cgc atg gag gaa gtg acg ggg act aaa ggg cgc caa agc aaa	2465

Ile	Tyr	Arg	Met	Glu	Glu	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	
460				465				470								
ggg	gac	ata	aac	acc	agg	aac	aac	ggg	gag	aga	gcc	tcc	tgt	gaa	agt	2513
Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg	Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	
475				480				485				490				
gac	gtc	ctg	cat	ttc	acc	tcc	acc	acc	acg	tcg	aag	aat	cgc	atc	atc	2561
Asp	Val	Leu	His	Phe	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	
495				500				505								
ata	acc	tgg	cac	cgg	tac	cgg	ccc	cct	gac	tac	agg	gat	ctc	atc	agc	2609
Ile	Thr	Trp	His	Arg	Tyr	Arg	Pro	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	
510				515				520								
ttc	acc	gtt	tac	tac	aag	gaa	gca	ccc	ttt	aag	aat	gtc	aca	gag	tat	2657
Phe	Thr	Val	Tyr	Tyr	Lys	Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	
525				530				535								
gat	ggg	cag	gat	gcc	tgc	ggc	tcc	aac	agc	tgg	aac	atg	gtg	gac	gtg	2705
Asp	Gly	Gln	Asp	Ala	Cys	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	
540				545				550								
gac	ctc	ccg	ccc	aac	aag	gac	gtg	gag	ccc	ggc	atc	tta	cta	cat	ggg	2753
Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys	Asp	Val	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	
555				560				565				570				
ctg	aag	ccc	tgg	act	cag	tac	gcc	gtt	tac	gtc	aag	gct	gtg	acc	ctc	2801
Leu	Lys	Pro	Trp	Thr	Gln	Tyr	Ala	Val	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	
575				580				585								
acc	atg	gtg	gag	aac	gac	cat	atc	cgt	ggg	gcc	aag	agt	gag	atc	ttg	2849
Thr	Met	Val	Glu	Asn	Asp	His	Ile	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	
590				595				600								
tac	att	cgc	acc	aat	gct	tca	gtt	cct	tcc	att	ccc	ttg	gac	gtt	ctt	2897
Tyr	Ile	Arg	Thr	Asn	Ala	Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	
605				610				615								
tca	gca	tcg	aac	tcc	tct	tct	cag	tta	atc	gtg	aag	tgg	aac	cct	ccc	2945
Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser	Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro	

620	625	630	
tct ctg ccc aac ggc aac ctg agt tac tac att gtg cgc tgg cag cgg			2993
Ser Leu Pro Asn Gly Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg			
635	640	645	650
cag cct cag gac ggc tac ctt tac cgg cac aat tac tgc tcc aaa gac			3041
Gln Pro Gln Asp Gly Tyr Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp			
	655	660	665
aaa atc ccc atc agg aag tat gcc gac ggc acc atc gac att gag gag			3089
Lys Ile Pro Ile Arg Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu			
	670	675	680
gtc aca gag aac ccc aag act gag gtg tgt ggt ggg gag aaa ggg cct			3137
Val Thr Glu Asn Pro Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro			
	685	690	695
tgc tgc gcc tgc ccc aaa act gaa gcc gag aag cag gcc gag aag gag			3185
Cys Cys Ala Cys Pro Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu			
700	705	710	
gag gct gaa tac cgc aaa gtc ttt gag aat ttc ctg cac aac tcc atc			3233
Glu Ala Glu Tyr Arg Lys Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile			
715	720	725	730
ttc gtg ccc aga cct gaa agg aag cgg aga gat gtc atg caa gtg gcc			3281
Phe Val Pro Arg Pro Glu Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala			
	735	740	745
aac acc acc atg tcc agc cga agc agg aac acc acg gcc gca gac acc			3329
Asn Thr Thr Met Ser Ser Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr			
	750	755	760
tac aac atc acc gac ccg gaa gag ctg gag aca gag tac cct ttc ttt			3377
Tyr Asn Ile Thr Asp Pro Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe			
	765	770	775
gag agc aga gtg gat aac aag gag aga act gtc att tct aac ctt cgg			3425

Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Asn	Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	
780			785			790										
cct	ttc	aca	ttg	tac	cgc	atc	gat	atc	cac	agc	tgc	aac	cac	gag	gct	3473
Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr	Arg	Ile	Asp	Ile	His	Ser	Cys	Asn	His	Glu	Ala	
795			800			805			810							
gag	aag	ctg	ggc	tgc	agc	gcc	tcc	aac	ttc	gtc	ttt	gca	agg	act	atg	3521
Glu	Lys	Leu	Gly	Cys	Ser	Ala	Ser	Asn	Phe	Val	Phe	Ala	Arg	Thr	Met	
815			820			825										
ccc	gca	gaa	gga	gca	gat	gac	att	cct	ggg	cca	gtg	acc	tgg	gag	cca	3569
Pro	Ala	Glu	Gly	Ala	Asp	Asp	Ile	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	
830			835			840										
agg	cct	gaa	aac	tcc	atc	ttt	tta	aag	tgg	ccg	gaa	cct	gag	aat	ccc	3617
Arg	Pro	Glu	Asn	Ser	Ile	Phe	Leu	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	
845			850			855										
aat	gga	ttg	att	cta	atg	tat	gaa	ata	aaa	tac	gga	tca	caa	gtt	gag	3665
Asn	Gly	Leu	Ile	Leu	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	
860			865			870										
gat	cag	cga	gaa	tgt	gtg	tcc	aga	cag	gaa	tac	agg	aag	tat	gga	ggg	3713
Asp	Gln	Arg	Glu	Cys	Val	Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly	
875			880			885			890							
gcc	aag	cta	aac	cgg	cta	aac	ccg	ggg	aac	tac	aca	gcc	cgg	att	cag	3761
Ala	Lys	Leu	Asn	Arg	Leu	Asn	Pro	Gly	Asn	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile	Gln	
895			900			905										
gcc	aca	tct	ctc	tct	ggg	aat	ggg	tcg	tgg	aca	gat	cct	gtg	ttc	ttc	3809
Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Trp	Thr	Asp	Pro	Val	Phe	Phe	
910			915			920										
tat	gtc	cag	gcc	aaa	aca	gga	tat	gaa	aac	ttc	atc	cat	ctg	atc	atc	3857
Tyr	Val	Gln	Ala	Lys	Thr	Gly	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ile	His	Leu	Ile	Ile	
925			930			935										
gct	ctg	ccc	gtc	gct	gtc	ctg	ttg	atc	gtg	gga	ggg	ttg	gtg	att	atg	3905
Ala	Leu	Pro	Val	Ala	Val	Leu	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Met	

940	945	950	
ctg tac gtc ttc cat aga aag aga aat aac agc agg ctg ggg aat gga			3953
Leu Tyr Val Phe His Arg Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly			
955	960	965	970
gtg ctg tat gcc tct gtg aac ccg gag tac ttc agc gct gct gat gtg			4001
Val Leu Tyr Ala Ser Val Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val			
975	980	985	
tac gtt cct gat gag tgg gag gtg gct cgg gag aag atc acc atg agc			4049
Tyr Val Pro Asp Glu Trp Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser			
990	995	1000	
cgg gaa ctt ggg cag ggg tcg ttt ggg atg gtc tat gaa gga gtt			4094
Arg Glu Leu Gly Gln Gly Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val			
1005	1010	1015	
gcc aag ggt gtg gtg aaa gat gaa cct gaa acc aga gtg gcc att			4139
Ala Lys Gly Val Val Lys Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile			
1020	1025	1030	
aaa aca gtg aac gag gcc gca agc atg cgt gag agg att gag ttt			4184
Lys Thr Val Asn Glu Ala Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe			
1035	1040	1045	
ctc aac gaa gct tct gtg atg aag gag ttc aat tgt cac cat gtg			4229
Leu Asn Glu Ala Ser Val Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val			
1050	1055	1060	
gtg cga ttg ctg ggt gtg gtg tcc caa ggc cag cca aca ctg gtc			4274
Val Arg Leu Leu Gly Val Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val			
1065	1070	1075	
atc atg gaa ctg atg aca cgg ggc gat ctc aaa agt tat ctc cgg			4319
Ile Met Glu Leu Met Thr Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg			
1080	1085	1090	
tct ctg agg cca gaa atg gag aat aat cca gtc cta gca cct cca			4364
Ser Leu Arg Pro Glu Met Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro			
1095	1100	1105	

agc ctg agc	aag atg att cag atg	gcc gga gag att gca	gac ggc	4409
Ser Leu Ser	Lys Met Ile Gln Met	Ala Gly Glu Ile Ala	Asp Gly	
1110	1115	1120		
atg gca tac	ctc aac gcc aat aag	ttc gtc cac aga gac	ctt gct	4454
Met Ala Tyr	Leu Asn Ala Asn Lys	Phe Val His Arg Asp	Leu Ala	
1125	1130	1135		
gcc cgg aat	tgc atg gta gcc gaa	gat ttc aca gtc aaa	atc gga	4499
Ala Arg Asn	Cys Met Val Ala Glu	Asp Phe Thr Val Lys	Ile Gly	
1140	1145	1150		
gat ttt ggt	atg acg cga gat atc	tat gag aca gac tat	tac cgg	4544
Asp Phe Gly	Met Thr Arg Asp Ile	Tyr Glu Thr Asp Tyr	Tyr Arg	
1155	1160	1165		
aaa gga ggg	aaa ggg ctg ctg ccc	gtg cgc tgg atg tct	cct gag	4589
Lys Gly Gly	Lys Gly Leu Leu Pro	Val Arg Trp Met Ser	Pro Glu	
1170	1175	1180		
tcc ctc aag	gat gga gtc ttc acc	act tac tcg gac gtc	tgg tcc	4634
Ser Leu Lys	Asp Gly Val Phe Thr	Thr Tyr Ser Asp Val	Trp Ser	
1185	1190	1195		
ttc ggg gtc	gtc ctc tgg gag atc	gcc aca ctg gcc gag	cag ccc	4679
Phe Gly Val	Val Leu Trp Glu Ile	Ala Thr Leu Ala Glu	Gln Pro	
1200	1205	1210		
tac cag ggc	ttg tcc aac gag caa	gtc ctt cgc ttc gtc	atg gag	4724
Tyr Gln Gly	Leu Ser Asn Glu Gln	Val Leu Arg Phe Val	Met Glu	
1215	1220	1225		
ggc ggc ctt	ctg gac aag cca gac	aac tgt cct gac atg	ctg ttt	4769
Gly Gly Leu	Leu Asp Lys Pro Asp	Asn Cys Pro Asp Met	Leu Phe	
1230	1235	1240		
gaa ctg atg	cgc atg tgc tgg cag	tat aac ccc aag atg	agg cct	4814
Glu Leu Met	Arg Met Cys Trp Gln	Tyr Asn Pro Lys Met	Arg Pro	

1245	1250	1255	
tcc ttc ctg gag atc atc agc agc atc aaa gag gag atg gag cct			4859
Ser Phe Leu Glu Ile Ile Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro			
1260	1265	1270	
ggc ttc cgg gag gtc tcc ttc tac tac agc gag gag aac aag ctg			4904
Gly Phe Arg Glu Val Ser Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu			
1275	1280	1285	
ccc gag ccg gag gag ctg gac ctg gag cca gag aac atg gag agc			4949
Pro Glu Pro Glu Glu Leu Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser			
1290	1295	1300	
gtc ccc ctg gac ccc tcg gcc tcc tcg tcc tcc ctg cca ctg ccc			4994
Val Pro Leu Asp Pro Ser Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro			
1305	1310	1315	
gac aga cac tca gga cac aag gcc gag aac ggc ccc ggc cct ggg			5039
Asp Arg His Ser Gly His Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly			
1320	1325	1330	
gtg ctg gtc ctc cgc gcc agc ttc gac gag aga cag cct tac gcc			5084
Val Leu Val Leu Arg Ala Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala			
1335	1340	1345	
cac atg aac ggg ggc cgc aag aac gag cgg gcc ttg ccg ctg ccc			5129
His Met Asn Gly Gly Arg Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro			
1350	1355	1360	
cag tct tcg acc tgc tga tccttggatc ctgaatctgt gcaaacagta			5177
Gln Ser Ser Thr Cys			
1365			
acgtgtgcgc acgcgcagcg ggggtgggggg ggagagagag ttttaacaat ccattcacia			5237
gcctcctgta cctcagtga tcttcagaac tgcccttgc gcccgcgga gacagcttct			5297
ctgcagtaaa acacatttgg gatgttcctt ttttaatat gcaagcagct ttttattccc			5357
tgcccaaacc cttaactgac atgggccttt aagaacctta atgacaacac ttaatagcaa			5417
cagagcactt gagaaccagt ctctcactc tgtccctgtc ctccctgtt ctccctttct			5477
ctctctctc tgcttcataa cggaataa attgccacaa gtccagctgg gaagcccttt			5537

ttatcagttt gaggaagtgg ctgtccctgt ggccccatcc aaccactgta cacaccgccc	5597
tgacaccgtg ggtcattaca aaaaaacacg tggagatgga aatttttacc ttatctttc	5657
acctttctag ggacatgaaa ttacaaaagg gccatcgttc atccaaggt gttaccattt	5717
taacgtgcc taattttgcc aaaatcctga actttctccc tcatcgcccc ggcgctgatt	5777
cctcgtgtcc ggaggcatgg gtgagcatgg cagctggttg ctccatttga gagacacgt	5837
ggcgacacac tccgtccatc cgactgcccc tctgtgtctg ctcaaggcca caggcacaca	5897
ggtctcattg ctctgacta gattattatt tgggggaact ggacacaata ggtctttctc	5957
tcagtgaagg tggggagaag ctgaaccggc ttcctgccc tgcctccca gccccctgcc	6017
caacccccaa gaatctggtg gccatgggcc ccgaagcagc ctggcggaca ggcttggagt	6077
caaggggccc catgcctgt tctctcccag cccagctcc cccgcccccc cccaaggaca	6137
cagatgggaa ggggtttcca gggactcagc cccactgttg atgcaggttt gcaaggaaag	6197
aaattcaaac accacaacag cagtaagaag aaaagcagtc aatggattca agcattctaa	6257
gctttgttga cttttctct gtccctagga ctctctcatg ggtcttacag ttctatgtta	6317
gacctgaaa catttgcata cacatcgtct ttaatgtcac ttttataact tttttacggt	6377
tcagatattc atctatact ctgtacagaa aaaaaaagc tgctatttt ttgttcttg	6437
atctttgttg atttaacta tgaaaacct caggctccacc ctctccccct tctgtcact	6497
ccaagaaact tcttatgctt tgtactagag tgcgtgactt tcttctctt tccccgtaa	6557
tggatacttc tatcacataa ttgcatga actgttggat gcctttttat aaatacatcc	6617
cccatccctg ctcccacctg cccctttagt tgttttctaa cccgtaggct ctctgggcac	6677
gaggcagaaa gcaggccggg caccatcct gagagggccg cgctcctctc cccagcctgc	6737
cctcacagca ttggagcctg ttacagtga agacatgata caaactcagg tcagaaaaac	6797
aaagggtaaa tatttcacac gtctttgttc agtgtttcca ctaccgtgg ttgagaagcc	6857
tcaccctctc ttccccctgc ctttgcttag gttgtgacac acatataat atatttttt	6917
aattcttggg tacaacagca gtgttaaccg cagacactag gcatttggat tactattttt	6977
cttaatggct atttaactct tccatccac gaaaaacagc tgctgagtcc aaggagcag	7037
cagagcgtgg tccggcaggg cctgttgttg cctcgcac cccctcacc ggaccgactg	7097
acctgtcttt ggaaccagaa cateccaagg gaactcctc gcactggcgt tgagtgggac	7157
cccgggatcc aggttgccc agggcggcac cctcagggt gtgcccgtg gagtgtagg	7217
tggaggcagc acagacgcca cgggtggcca agagccccct tgcttcttgc tgggggacca	7277
gggctgtggt gctggccac ttctctcgg ccaggaatcc aggtccttgg ggcccagggg	7337
tcttgtcttg ttcatTTTT agcacttctc accagagaga tgacagaca agagtgtctt	7397

ctgggataga aatgttttagg agtaagaaca aagctgggat acggtgattg ctagttgtga	7457
ctgaagattc aacacagaaa agaaagttaa tacggctttt ttgctggtca gcagtttgtc	7517
ccactgcttt ctctagtctc tatcccatag cgtgttcctt ttaaaaaaaaa aaaaaaggta	7577
ttatatgtag gagttttctt ttaatttatt ttgtgataaa tiaccagttt caatcactgt	7637
agaaaagccc cattatgaat ttaaatttca aggaaagggt gtgtgtgtgt gtatgtgtgg	7697
ggtgtgtgtg tgtgagagtg atgggacagt tcttgatttt ttgggttttt tttccccaa	7757
acattttatct acctcactct tattttttat atgtgtatat agacaaaaga atacatctca	7817
cctttctcag cacctgacaa taggccgttg atactggtaa cctcatccac gccacaggcg	7877
ccacaccag gtgatgcagg gggaagccag gctgtattcc ggggtcaaag caacactaac	7937
tcacctctct gctcatttca gacagcttgc ctttttctga gatgtcctgt tttgtgttgc	7997
tttttttgtt ttgttttcta tcttggtttc caccaagggt ttagattttct cctcctccta	8057
gccagggtggc cctgtgagcg caacgagggc accagagcac acctggggga gccaccaggc	8117
tgtccctggc tggttgtctt tggaacaaac tgcttctgtg cagatggaat gaccaacaca	8177
tttcgtcctt aagagagcag tggttcctca ggttctgagg agaggaaggt gtccaggcag	8237
caccatctct gtgcgaatcc ccagggtaaa ggcgtggggc attgggtttg ccccccttgc	8297
tgtgtctcca tcctgcagg aggtctcgcg tgaggcagga ccgtgcggcc atggctgctg	8357
cattcattga gcacaaagggt gcagctgcag cagcagctgg agagcaagag tcaccagcc	8417
tgtgcgccag aatgcagagg ctctgacct cacagccagt ccctgataga acacacgcag	8477
gagcagagtc cctccccct ccaggctgcc ctctcaactt ctcctcacc tccttcctta	8537
ggggttagaca gagatgiacc aaaccttcg gctggaaagc ccagtggccg gcgccgaggc	8597
tcgtggcgtc acgcccccc cgccagggtc gtacctcgt ctccttggtc ctgctgctca	8657
caggacagac ggctcgtcc cctcttcag cagctgctct tacaggcact gatgatttcg	8717
ctgggaagtg tggcgggcag ctttgccaa gcgtggatgg ctctcggca attccagcct	8777
aagtgaaggc gtcaggagc ctctgctgg aacgcgacce atctctcca ggacccggg	8837
gatcttaagg tcattgagaa atactgttg atcagggttt tgttcttcca cactgiagg	8897
gacccttgg aataacggcc tctcctctcg tgcacatacc taccggtttc cacaactgga	8957
tttctacaga tcattcagct ggttataagg gttttgtta aactgtccga gttactgatg	9017
tcattttgtt ttgttttat gtaggtagct ttaagtaga aaactaac agtgtagtgc	9077
ccatcatagc aaatgttca gaaacacctc aataaaagag aaaacttggc ttgtgtgatg	9137

gtgcagtcac ttiactggac caaccacacc accttgacta taccaaggca tcatctatcc	9197
acagtcttag cctaacttca tgctgatttc tctgcctctt gatitctctc tgtgtgttcc	9257
aaataatctt aagctgagtt gtggcatttt ccatgcaacc tccttctgcc agcagctcac	9317
actgcttgaa gtcatatgaa ccactgaggc acatcatgga attgatgtga gcattaagac	9377
gttctccac acagcccttc cctgaggcag caggagctgg tgtgtactgg agacactgtt	9437
gaacttgatc aagaccaga ccacccagg tctccttctg gggatgtcat gacgtttgac	9497
atacctttgg aacgagctc ctccttgga gatggaagac cgtgttcgtg gccgacctgg	9557
cctctcctgg cctgtttctt aagatgcgga gtcacatttc aatggtacga aaagtggctt	9617
cgtaaaatag aagagcagtc actgtggaac taccaaattg cgagatgctc ggtgcacatt	9677
gggggtgcttt ggataaaaag atttatgagc caactattct ctggcaccag attctaggcc	9737
agtttgttcc actgaagctt tcccacagc agtccacctc tgcaggctgg cagccgaatg	9797
gcttgccagt ggctctgtgg caagatcaca ctgagatcga tgggtgagaa ggctaggatg	9857
cttgtctagt gttcttagct gtcagttgg ctccttccag ggtggccaga cgggtgtggc	9917
cactcccttc taaaacacag gcgccctctt ggtgacagtg acccgccgtg gtatgccttg	9977
gcccattcca gcagtcccag ttatgcattt caagtttggg gtttgttctt ttcgttaatg	10037
ttctctgtg ttgtcagctg tcttcatttc ctgggctaag cagcattggg agatgtggac	10097
cagagatcca ctcttaaga accagtggcg aaagacactt tctttcttca ctctgaagta	10157
gctgttggt caaatgagaa cttcaagaga ggatgttatt tagactgaac ctctgttgcc	10217
agagatgctg aagatacaga ccttggacag gtcagagggt ttcatttttg gccttcatct	10277
tagatgactg gttgcgtcat ttggagaagt gattgctcct tgatggtgga atgaccgggt	10337
ggtgggtaca gaaccattgt cacagggatc ctggcacaga gaagagttac gagcagcagg	10397
gtgcagggct tggaaggaat gtgggcaagg ttttgaactt gattgttctt gaagctatca	10457
gaccacatcg aggctcagca gtcacccgtg ggcatattgt ttcaacaaag aaacctaaca	10517
tcctactctg gaaactgac tcggagttaa ggcaattgt tcaagaacac aaactacatc	10577
gcactcgtca gttgtcagtt ctggggcatg actttagcgt tttgtttctg cgagaacata	10637
acgatcactc attttatgt ccacgtgtg tgtgtccgca tcttctggt caacattgtt	10697
ttaactagtc actcattagc gttttcaata gggtctttaa gtccagtaga ttacgggtag	10757
tcagttgacg aagatctggt ttacaagaac taattaaatg tttcattgca tttttgtaag	10817
aacagaataa ttttataaaa tgtttgtagt ttataattgc cgaaaataat ttaaagacac	10877
tttttttttc tctgtgtgtg caaatgtgtg tttgtgatcc attttttttt ttttttttta	10937
ggacacctgt ttactagcta gctttacaat atgccaataa aggatttctc cctgaccca	10997

tccgtgggtc accctctttt ccccccattgc tttttgcctt agtttataac aaaggaatga 11057
 tgatgattta aaaagtagtt ctgtatcttc agtatcttgg tcttccagaa ccctctggtt 11117
 gggaagggga tcatttttta ctggtcattt ccctttggag tgtagctact ttaacagatg 11177
 gaaagaacct cattggccat ggaaacagcc gaggtgttgg agcccagcag tgcattggcac 11237

cgttcggcat ctggcttgat tggctctggct gccgtcattg tcagcacagt gccatggaca 11297
 tgggaagact tgactgcaca gccaatggtt ttcattgatga ttacagcata cacagtgate 11357
 acataaacga tgacagctat ggggcacaca ggccatttgc ttacatgcct cgtatcatga 11417
 ctgattactg ctttgttaga acacagaaga gacctattt tatttaaggc agaaccgccga 11477
 agatacgtat ttccaataga gaaaagaatt ttaataaaaa actataacat acacaaaaat 11537
 tggtttttaa gtgactcca ctctctctaa ctccagtga ttgttggcca tgtctcccca 11597
 actccacaat atctctatca tgggaaacac ctggggtttt tgcgctacat aggagaaaga 11657

tctggaact atttgggttt tgttttcaac ttttcatttg gatgtttggc gttgcacaca 11717
 cacatccacc ggtggaagag acgcccgttg aaaacacctg tctgctttct aagccagtga 11777
 ggttgaggtg agaggtttgc cagagtttgt ctacctctgg gtatcccttt gtctgggata 11837
 aaaaaatca aaccagaagg cgggatggaa tggatgcacc gcaaataatg ctttttctga 11897
 gttttcttgt taaaaaaaaa tttttttaag taagaaaaaa aaagtaata acatggccaa 11957
 tttgttacct aaaatgactt tctgtgtata aattattcct aaaaaatcct gtttatataa 12017
 aaaatcagta gatgaaaaaa atttcaaat gtttttgtat attctgttgt aagaatttat 12077

tcctgttatt gcgataact ctggattctt tacataatgg aaaaaagaaa ctgtctattt 12137
 tgaatggctg aagctaaggc aacgttagtt tctcttactc tgcttttttc tagtaaagta 12197
 ctacatggtt taagttaaat aaaataattc tgtatgcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 12257
 aaaaa 12262

<210> 4

<211> 1367

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu

1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
 35 40 45
 Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
 50 55 60
 Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
 65 70 75 80
 Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
 85 90 95
 Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
 100 105 110
 Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
 115 120 125
 Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
 130 135 140
 Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
 165 170 175
 Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
 180 185 190
 Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
 195 200 205
 Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
 210 215 220
 Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
 225 230 235 240
 Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
 245 250 255
 Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
 260 265 270
 Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala

275 280 285
 Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
 290 295 300
 Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
 305 310 315 320
 Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
 325 330 335
 Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly

 340 345 350
 Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
 355 360 365
 Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
 370 375 380
 Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
 385 390 395 400
 Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly

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

 465 470 475 480
 Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
 485 490 495
 Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
 500 505 510
 Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
 515 520 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys

530

535

540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys

545

550

555

560

Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln

565

570

575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp

580

585

590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala

595

600

605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser

610

615

620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn

625

630

635

640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr

645

650

655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys

660

665

670

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

675

680

685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys

690

695

700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys

705

710

715

720

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

725

730

735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser

740

745

750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro

755

760

765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn

770 775 780
 Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg

 785 790 795 800
 Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
 805 810 815
 Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
 820 825 830
 Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
 835 840 845
 Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met

 850 855 860
 Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
 865 870 875 880
 Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
 885 890 895
 Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
 900 905 910
 Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr

 915 920 925
 Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val
 930 935 940
 Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
 945 950 955 960
 Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
 965 970 975
 Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp

 980 985 990
 Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
 995 1000 1005
 Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys
 1010 1015 1020

Asp Glu	Pro Glu Thr Arg Val	Ala Ile Lys Thr Val	Asn Glu Ala
1025	1030	1035	
Ala Ser	Met Arg Glu Arg Ile	Glu Phe Leu Asn Glu	Ala Ser Val
1040	1045	1050	
Met Lys	Glu Phe Asn Cys His	His Val Val Arg Leu	Leu Gly Val
1055	1060	1065	
Val Ser	Gln Gly Gln Pro Thr	Leu Val Ile Met Glu	Leu Met Thr
1070	1075	1080	
Arg Gly	Asp Leu Lys Ser Tyr	Leu Arg Ser Leu Arg	Pro Glu Met
1085	1090	1095	
Glu Asn	Asn Pro Val Leu Ala	Pro Pro Ser Leu Ser	Lys Met Ile
1100	1105	1110	
Gln Met	Ala Gly Glu Ile Ala	Asp Gly Met Ala Tyr	Leu Asn Ala
1115	1120	1125	
Asn Lys	Phe Val His Arg Asp	Leu Ala Ala Arg Asn	Cys Met Val
1130	1135	1140	
Ala Glu	Asp Phe Thr Val Lys	Ile Gly Asp Phe Gly	Met Thr Arg
1145	1150	1155	
Asp Ile	Tyr Glu Thr Asp Tyr	Tyr Arg Lys Gly Gly	Lys Gly Leu
1160	1165	1170	
Leu Pro	Val Arg Trp Met Ser	Pro Glu Ser Leu Lys	Asp Gly Val
1175	1180	1185	
Phe Thr	Thr Tyr Ser Asp Val	Trp Ser Phe Gly Val	Val Leu Trp
1190	1195	1200	
Glu Ile	Ala Thr Leu Ala Glu	Gln Pro Tyr Gln Gly	Leu Ser Asn
1205	1210	1215	
Glu Gln	Val Leu Arg Phe Val	Met Glu Gly Gly Leu	Leu Asp Lys
1220	1225	1230	
Pro Asp	Asn Cys Pro Asp Met	Leu Phe Glu Leu Met	Arg Met Cys
1235	1240	1245	
Trp Gln	Tyr Asn Pro Lys Met	Arg Pro Ser Phe Leu	Glu Ile Ile

1250	1255	1260
Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met	Glu Pro Gly Phe Arg	Glu Val Ser
1265	1270	1275
Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn	Lys Leu Pro Glu Pro	Glu Glu Leu

1280	1285	1290
Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met	Glu Ser Val Pro Leu	Asp Pro Ser
1295	1300	1305
Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro	Leu Pro Asp Arg His	Ser Gly His
1310	1315	1320
Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly	Pro Gly Val Leu Val	Leu Arg Ala
1325	1330	1335
Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro	Tyr Ala His Met Asn	Gly Gly Arg

1340	1345	1350
Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro	Leu Pro Gln Ser Ser	Thr Cys
1355	1360	1365