



등록특허 10-2775924



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월07일

(11) 등록번호 10-2775924

(24) 등록일자 2025년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

A61K 47/54 (2017.01) A61K 47/69 (2017.01)

A61K 9/127 (2025.01) A61P 35/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7125 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7033985

(22) 출원일자(국제) 2018년04월19일

심사청구일자 2021년04월16일

(85) 번역문제출일자 2019년11월18일

(65) 공개번호 10-2019-0141196

(43) 공개일자 2019년12월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/028267

(87) 국제공개번호 WO 2018/195253

국제공개일자 2018년10월25일

(30) 우선권주장

62/487,302 2017년04월19일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2001060998 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

바이오-페쓰 홀딩스 인크.

미국 텍사스주 77401 벨러리 슈트 210 벨러리 블러버드 4710

(72) 발명자

아쉬자와 아나 타리

미국 텍사스주 77401 벨레르 스위트 210 벨레르 불러바드 4710 바이오-페쓰 홀딩스 인크.

닐슨 피터

미국 텍사스주 77401 벨레르 스위트 210 불러바드 4710 바이오-페쓰 홀딩스 인크.

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 28 항

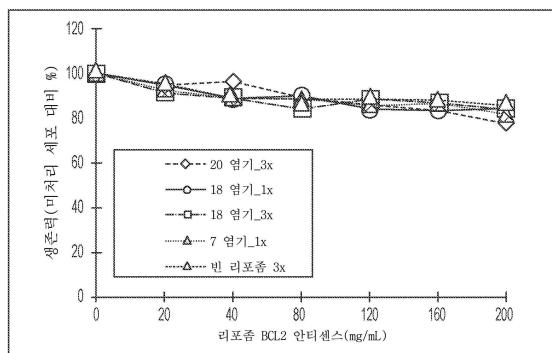
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 BCL2 억제용 P-에톡시 핵산

(57) 요약

올리고뉴클레오타이드를 위한 개선된 전달 시스템이 본원에 제공되며, 상기 전달 시스템은 중성 인지질 및 BCL2-암호화 폴리뉴클레오타이드를 표적화하는 P-에톡시 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리포좀을 포함한다. 상기 전달 시스템을 사용하여 환자를 치료하는 방법이 또한 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/544 (2017.08)

A61K 47/6911 (2017.08)

A61K 9/127 (2025.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07H 21/02 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

올리고뉴클레오타이드들의 집단, 인지질들 및 계면활성제를 포함하는 조성물로서, 상기 올리고뉴클레오타이드들은 *BCL2* 폴리뉴클레오타이드 유전자 산물과 혼성화하고 *Bc12* 단백질의 발현 수준을 억제하며, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들은 포스페이트 골격 결합들을 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%가 포스포디에스테르 골격 결합들이고, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들은 서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나에 따른 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들은 서열 번호 1에 따른 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들의 적어도 5번째 뉴클레오타이드와 6번째 뉴클레오타이드 사이, 7번째 뉴클레오타이드와 8번째 뉴클레오타이드 사이, 9번째 뉴클레오타이드와 10번째 뉴클레오타이드 사이, 11번째 뉴클레오타이드와 12번째 뉴클레오타이드 사이, 및 14번째 뉴클레오타이드와 15번째 뉴클레오타이드 사이에서의 포스페이트 골격 결합들은 포스포디에스테르 골격 결합들인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들은 서열 번호 2에 따른 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들의 적어도 5번째 뉴클레오타이드와 6번째 뉴클레오타이드 사이, 7번째 뉴클레오타이드와 8번째 뉴클레오타이드 사이, 및 9번째 뉴클레오타이드와 10번째 뉴클레오타이드 사이에서의 포스페이트 골격 결합들은 포스포디에스테르 골격 결합들인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드들은 서열 번호 3에 따른 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 7

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

청구항 8

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

청구항 9

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

청구항 10

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

청구항 11

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

청구항 12

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

청구항 13

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

청구항 14

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

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트 20인, 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드들 및 인지질들은 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체를 형성하는, 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 인지질들은 생리적 pH에서 비전하성(uncharged)이거나 중성 전하를 갖는, 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 인지질들은 중성 인지질들인, 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 중성 인지질들은 포스파티딜콜린들인, 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 중성 인지질들은 디올레오일포스파티딜콜린(dioleoylphosphatidyl choline)인, 조성물.

청구항 21

제16항에 있어서, 상기 인지질들 및 올리고뉴클레오타이드들은 5:1 내지 100:1의 몰비로 존재하는, 조성물.

청구항 22

제16항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체는 리포좀들의 집단으로 추가로 정의되는, 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 리포좀들의 적어도 90%는 직경이 5 미크론 미만인, 조성물.

청구항 24

제16항에 있어서, 상기 조성물은 동결 건조된 것인, 조성물.

청구항 25

세포 내의 Bcl2 단백질의 발현 수준을 감소시키는 시험관내 방법으로서, 상기 세포를 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 세포 내의 Bcl2 단백질의 발현 수준을 감소시키는 시험관내 방법.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 조성물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 암을 갖는 대상체를 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 암은 비소세포 폐암, 췌장 선암종, 유방암, 전립선암, 흑색종, 대장암, 백혈병, 림프종, 교모세포종, 골육종, 구강암, 난소암, 자궁암, 골암, 뇌암, 신장암, 위암, 식도암, 직장암, 방광암, 고환암 또는 간암인, 약학적 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 림프종은 배중심 B 세포 유사 미만성 거대 B 세포 림프종, 활성화된 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프종, 외투세포 림프종 또는 베켓 림프종이거나, 상기 백혈병은 골수성 백혈병인, 약학적 조성물.

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본원은 2017년 4월 19일자로 출원된 미국 가출원 제62/487,302호에 대한 우선권을 주장하며, 이 출원의 전체 내용은 원용에 의해 본원에 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 의약 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 *BCL2* 폴리뉴클레오타이드 유전자 산물과 혼성화하는 P-에톡시 올리고뉴클레오타이드의 리포좀 제제, 및 이러한 제제를 제조하고 이를 의술에서, 보다 특히, *BCL2* 유전자의 고발현 또는 그의 활성의 증가를 수반하는 암의 치료에서 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] *Bcl-2*는 세포자멸사 또는 세포예정사의 조절에 관여하는 단백질이다. *Bcl-2*의 과발현은 화학치료제를 사용한 치

료와 같은 세포질 손상에 대응하여 세포자멸사의 유도를 방지한다. Bcl-2는 염색체 재배열로 인한 소포성 B 세포 비호지킨 림프종의 90% 초파에서 과발현되며, 이러한 악성 종양의 발병에서 중요한 요소이다. Bcl-2는 또한 다양한 고형 종양에서 과발현된다 (암의 40%에서 과발현되는 것으로 추정됨). 예를 들어, Bcl-2 과발현은 호르몬 의존성으로부터 호르몬 비의존성으로의 전립선암의 진행과 관련이 있으며 호르몬 비의존성 전립선암에서 전형적으로 관찰되는 상대적으로 약물 저항성인 표현형에 기여할 수 있다.

발명의 내용

[0006]

본원은 Bcl2에 의해 제어되는 광범위한 암 세포에서 성장 억제 및/또는 세포자멸사를 유도하는 조성물 및 방법을 제공한다. Bcl2 발현은, Bcl2 단백질 발현을 방지하는 중성 리포좀과 조합되어 Bcl2-암호화 폴리뉴클레오타이드를 표적화하여, 이용 가능한 Bcl2 단백질의 풀 (pool)을 제거하는 비독성, 뉴클레아제 내성 올리고뉴클레오타이드에 의해 표적화된다.

[0007]

일 구현예에서, *BCL2* 폴리뉴클레오타이드 유전자 산물과 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드의 집단을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 포스페이트 골격 결합을 통해 함께 연결된 뉴클레오시드 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 3 중 어느 하나에 따른 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 1에 따른 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 1에 따른 서열을 포함하고, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드의 적어도 5번째 뉴클레오타이드와 6번째 뉴클레오타이드 사이, 7번째 뉴클레오타이드와 8번째 뉴클레오타이드 사이, 9번째 뉴클레오타이드와 10번째 뉴클레오타이드 사이, 11번째 뉴클레오타이드와 12번째 뉴클레오타이드 사이, 및 14번째 뉴클레오타이드와 15번째 뉴클레오타이드 사이에서의 포스페이트 골격 결합은 포스포디에스테르 골격 결합이다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 2에 따른 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 2에 따른 서열을 포함하고, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드의 적어도 5번째 뉴클레오타이드와 6번째 뉴클레오타이드 사이, 7번째 뉴클레오타이드와 8번째 뉴클레오타이드 사이, 및 9번째 뉴클레오타이드와 10번째 뉴클레오타이드 사이에서의 포스페이트 골격 결합은 포스포디에스테르 골격 결합이다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 3에 따른 서열을 포함한다. 다양한 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 Bcl2의 발현을 억제한다. 일부 측면에서, 상기 조성물은 동결 건조된다.

[0008]

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. 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.

[0009]

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.

[0010] 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, 21, 22, 23, 또는 24개 이하는 P-에톡시 골격 결합이다. 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 적어도 2, 2, 2, 3, 3, 3, 4, 4, 4, 4, 5, 5, 5, 5, 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.

[0011] 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 문자 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.

[0012] 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, 리포좀 복합체를 형성한다. 일부 측면에서, 상기 리포좀의 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 리포좀의 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 리포좀의 집단 내에 혼입된다.

[0013] 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.

[0014] 일 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 조성물 및 본 구현예들의 인지질 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 일부 측면에서, 상기 조성물은 화학치료제를 추가로 포함한다.

[0015] 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.

[0016] 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. 일부 측면에서, 상기 림프종은 배중심 B 세포 유사 미만성 거대 B 세포 림프종, 활성화된 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프

종, 외투세포 림프종 또는 베켓 림프종이다. 일부 측면에서, 상기 백혈병은 골수성 백혈병이다. 일부 측면에서, 상기 자가면역 질환은 홍반성 낭창, 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 Bc12 단백질의 발현을 감소시킨다.

[0017] 올리고뉴클레오파이드는, 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. 올리고뉴클레오파이드는 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 올리고뉴클레오파이드는 15 내지 30개, 19 내지 25개, 20 내지 23개, 또는 21개의 인접 핵염기를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오파이드는 암성 또는 전암성 또는 과다 형성 포유동물 세포 (예를 들어, 인간 세포)의 성장을 촉진하는 유전자의 번역을 억제한다. 올리고뉴클레오파이드는 세포에서 세포자멸사를 유도하고/하거나 종양 유전자 또는 다른 표적 유전자의 번역을 억제할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오파이드 성분은 단일 종의 올리고뉴클레오파이드를 포함한다. 또 다른 구현 예에서, 상기 올리고뉴클레오파이드 성분은 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 유전자를 표적화하는 2, 3, 4 또는 그 이상의 종의 올리고뉴클레오파이드를 포함한다. 상기 조성물은 화학 치료제 또는 다른 항암제를 추가로 포함할 수 있으며, 이는 본 발명의 지질 성분 또는 리포좀 내에 혼입되거나 또는 혼입되지 않을 수 있다. 추가 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오파이드 성분은 상기 리포좀 또는 지질 성분 내에 혼입된다.

[0018] "포획하다," "캡슐화하다," 및 "혼입시키다"는 지질 또는 리포좀이 관심있는 제제와 또는 제제 주위에서의 결합에 의해 용액 내로 자유롭게 확산되는 것에 대한 방해물을 형성하는 것을 지칭하며, 예를 들어, 리포좀은 지질 층 내부에, 또는 지질 층 내부 또는 지질층 간의 수성 구획 내에 제제를 캡슐화할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 내에 포함된다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 인간 대상 또는 환자에게 투여하기 위해 제제화될 수 있다.

[0019] 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"), 디스테아로일포파디딜에탄올아민 ("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.

[0020] 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 구현 예에서, 상기 조성물은 콜레스테롤 또는 폴리에틸렌글리콜 (PEG)을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 조

성물은 본질적으로 콜레스테롤을 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 인지질은 자연발생 인지질이다. 다른 구현 예에서, 인지질은 합성 인지질이다.

[0021] 리포좀은, 지질 물질이 실질적으로 비전하성인 한, 하나 이상의 인지질로 제조될 수 있다. 상기 조성물이 음이 온성 및 양이온성 인지질 및 콜레스테롤을 실질적으로 포함하지 않는 것이 중요하다. 적합한 인지질은 포스파티딜콜린 및 당업자에게 널리 공지된 다른 것들을 포함한다.

[0022] 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, 텁프절, 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.

[0023] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 부가적인 요법을 상기 대상에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 상기 부가적인 요법은 화학치료제 (예를 들어, 파클리타센 또는 도세탁센), 수술, 방사선 요법, 및/또는 유전자 요법을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 특정 측면에서, 상기 화학요법은 도세탁센, 파클리타센, 시스플라틴 (CDDP), 카르보플라틴, 프로카르바진, 메클로르에타민, 사이클로포스파미드, 캄토데신, 이포스파미드, 멜վ란, 클로람부실, 부설판, 니트로소우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드 (VP16), 타목시펜, 랄록시펜, 에스트로겐 수용체 결합제, 탁솔, 쟈시타빈, 나벨빈, 파르네실-단백질 전달효소 억제제, 트랜스플라티늄, 5-플루오로우라실, 빙크리스틴, 빙블라스틴, 메토트렉세이트, 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 화학요법은 탁산, 예를 들어, 도세탁살 또는 파클리타센이다. 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.

[0024] 본 명세서에 논의된 임의의 구현예는 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.

[0025] 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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] 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.

[0029] 본 발명의 다른 목적, 특정 및 이점은 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내는 상세한 설명 및 특정 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

[0030]

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 - 리포좀 *BCL2* 안티센스는 정상적인 말초 혈액 단핵세포의 생존력을 억제하지 않는다. 리포좀 *BCL2* 안티센스의 정상적인 말초 혈액 단핵세포의 생존력 억제능을 서열 번호 1에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스를 4일 동안 상기 세포와 함께 배양함으로써 시험하였다.

도 2a 내지 2j - 리포좀 *BCL2* 안티센스는 배중심 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프종 세포의 생존력을 억제한다. 리포좀 *BCL2* 안티센스의 배중심 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프종 세포의 성장 억제능을 10개의 인간 배중심 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프종 세포주, 즉, DOHH-2 (도 2a), SU-DHL-4 (도 2b), SU-DHL-6 (도 2c), SU-DHL-10 (도 2d), OCI-LY-18 (도 2e), OCI-LY-19 (도 2f), WSU-DLCL2 (도 2g), RL (도 2h), OCI-LY-1 (도 2i), 및 OCI-LY-7 (도 2j)에서 시험하였다.

도 3a 내지 3c - 리포좀 *BCL2* 안티센스는 활성화된 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프종 세포의 생존력을 억제한다. 리포좀 *BCL2* 안티센스의 활성화된 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프종 세포의 성장 억제능을 3개의 인간 활성화된 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프종 세포주, 즉, SU-DHL-2 (도 3a), U-2932 (도 3b), 및 RI-1 (도 3c)에서 시험하였다.

도 4a 내지 4b - 리포좀 *BCL2* 안티센스는 림프종 세포의 생존력을 억제한다. 리포좀 *BCL2* 안티센스의 림프종 세포의 성장 억제능을 2개의 인간 림프종 세포주, 즉, GRANTA-519 (외투세포 림프종; 도 4a) 및 Ramos (버켓 림프종; 도 4b)에서 시험하였다.

도 5a 내지 5c - 리포좀 *BCL2* 안티센스는 골수성 백혈병 세포의 생존력을 억제한다. 리포좀 *BCL2* 안티센스의 골수성 백혈병 세포의 성장 억제능을 3개의 인간 골수성 백혈병 세포주, 즉, K562 (도 5a), MV-4-11 (도 5b), 및 Kasumi-1 (도 5c)에서 시험하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031]

*Bcl-2*는 암, 예를 들어, 침습 NHL에 대한 잠재적 치료 표적이다. *Bcl-2* 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-*BCL2* 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 유전자 발현 억제제)를 세포에 전달하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 이들 방법은 암을 치료하는데 효과적으로 사용될 수 있다.

[0032]

I. 지질 및 리포좀

[0033]

"리포좀"은 지질 이중층을 갖는 지질-함유 소포뿐만 아니라 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포획하거나 혼입 할 수 있는 다른 지질 담체 입자를 의미하기 위해 본원에 사용된다. 이와 같이, 리포좀은 폐쇄된 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일라멜라, 다중라멜라, 및 다중소포성 지질 비히클을 포괄하는 일반 용어이다. 또한, 리포좀은 한정되지 않은 라멜라 구조를 가질 수 있다. 리포좀은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소포성 구조를 갖는 것으로 특징지어질 수 있다. 다중라멜라 리포좀은 수성 매질에 의해 분리된 다수의 지질 층을 갖는다. 이들은 인지질이 과량의 수용액에 혼탁될 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 있다.

[0034]

리포좀은 다양한 약물을 병든 조직 내로 전달하기 위한 담체인 나노입자의 형태이다. 최적의 리포좀 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 리포좀은 중성 또는 양전하 리포좀보다 순환으로부터 더 빠르게 제거될 것으로 생각되지만; 최근 연구는 음전하 지질의 유형이 세망내피계 (RES)에 의한 리포좀 흡수율에 영향을 미친다는 것을 나타내었다. 예를 들어, 입체적으로 차폐되지 않은 음전하 지질 (포스파티딜세린, 포스파티드산, 및 포스파티딜글리세롤)을 함유하는 리포좀은 중성 리포좀보다 더 빠르게 제거된다. 흥미롭게도, 양이온성 리포좀 (1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 [DOTAP]) 및 양이온성-리포좀-DNA 복합체는 음이온성, 중성, 또는 입체적으로 안정화된 중성 리포좀보다 세포내이입을 통해 혈관신생 혈관의 내피 세포에 더 잘 결합하고 내재화된다 (Thurston 등, 1998; Krasnici 등, 2003). 양이온성 리포좀은, 종양 세포와의 표면 상호작용이 정전기적으로 유

도된 결합 부위 장벽 효과를 생성하여 전달 시스템과 종양 타원체와의 추가의 결합을 억제하기 때문에, 종양 세포를 위한 이상적인 전달 비히클이 아닐 수 있다 (Kostarelos 등, 2004). 그러나, 중성 리포좀은 더 양호한 종양내 침투를 갖는 것으로 보인다. 특정 리포좀 제제에 대한 독성이 또한 우려되어 왔다. 양이온성 리포좀은 반응성 산소 중간체의 방출을 촉진하여 투여량 의존적 독성 및 폐 염증을 유발하며, 이 효과는 DOTAP와 같은 1가 양이온성 리포좀보다 다가 양이온성 리포좀에서 더 두드러진다 (Dokka 등, 2000). 중성 및 음전하 리포좀은 폐 독성을 나타내지 않는 것으로 보인다 (Gutierrez-Puente 등, 1999). 양이온성 리포좀은 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.

[0035] 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 올리고뉴클레오타이드를 지질 및/또는 리포좀과 결합시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 리포좀의 수성 내부에 혼입되거나, 리포좀의 지질이 중층 내에 산재되거나, 리포좀 및 상기 올리고뉴클레오타이드 모두와 결합된 연결 분자를 통해 상기 리포좀에 부착되거나, 리포좀 내에 포획되거나, 리포좀과 복합체화되거나, 지질을 함유하는 용액에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질 내의 혼탁액으로 함유되거나, 미셀과 함께 함유되거나 복합체화되거나, 또는 지질과 결합될 수 있다. 본원에 제공된 리포좀 또는 리포좀/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.

A. 지질

[0036] [0037] 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 알데하이드를 함유하는 당업자에게 널리 공지된 화합물의 부류를 포함한다. 예는 지질 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)이다.

[0038] 본 발명의 지질 조성물은 인지질을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 단일 종류 또는 유형의 인지질이 지질 조성물, 예를 들어, 리포좀의 생성에 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 하나를 초과하는 종류 또는 유형의 인지질이 사용될 수 있다.

[0039] 인지질은 글리세로인지질 및 특정 스팽고지질을 포함한다. 인지질은 디올레오일포스파티딜리콜린 ("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"), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린 ("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"), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민 ("DMPE"), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민 ("DPPE"), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민 ("DSPE"), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 ("DOPE"), 팔미토일올레오일 포스파티딜에탄올아민 ("POPE"), 디미리스토일 포스파티딜세린 ("DMPS"), 디팔미토일 포스파티딜세린 ("DPPS"), 뇌 포스파티딜세린 ("BPS"), 디스테아로일 스팽고미엘린 ("DSSP"), 뇌 스팽고미엘린 ("BSP"), 디팔미토일 스팽고미엘린 ("DPSP"), 리소포스파티딜콜린, 및 리소포스파티딜에탄올아민을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 인지질은, 예를 들어, 포스파티딜콜린, 포스파티딜글리세롤, 및 포스파티딜에탄올아민을 포함하며; 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티딜콜린은 생리적 조건 하에 (즉, 약 pH 7에서) 비전하성이기 때문에, 이들 화합물은 중성 리포좀을 생성하는데 특히 유용할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 인지질 DOPC는 비전하 리포좀 또는 지질 조성물을 생산하는데 사용된다. 특정 구현예에서, 인지질이 아닌 지질 (예를 들어, 콜레스테롤)이 또한 사용될 수 있다.

[0041] 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 리포좀의 불안정성 및 누출을 초래할 수 있기 때문이다.

B. 중성 리포좀

본원에서, "중성 리포좀 또는 지질 조성물" 또는 "비전하 리포좀 또는 지질 조성물"은 본질적으로-중성인 순전하 (실질적으로 비전하성)를 생성하는 하나 이상의 지질을 갖는 리포좀 또는 지질 조성물로서 정의된다. 특정 구현예에서, 중성 리포좀 또는 지질 조성물은 그 자체로 중성인 지질 및/또는 인지질을 주로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 양친매성 지질은 중성 리포좀 또는 지질 조성물 내로 흔입될 수 있거나 이를 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 중성 리포좀은, 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, 리포좀의 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 리포좀의 형태가 아닌 조성물이 제조될 수 있다.

상기 리포좀의 크기는 합성 방법에 따라 다양하다. 수용액에 혼탁된 리포좀은 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 혼탁액에서, 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 리포좀 내부에 존재하는 경우, 지질 분자는 배치 XY-YX의, 라벨라로 알려진, 이중층을 형성할 수 있다. 하나 초과의 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.

본 발명의 범위 내의 리포좀은 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.

특정 구현예에서, 중성 리포좀은 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 전달하는데 사용될 수 있다. 상기 중성 리포좀은 단일 유전자의 번역의 억제에 관한 단일 종의 올리고뉴클레오타이드를 함유할 수 있거나, 또는 상기 중성 리포좀은 다수의 유전자의 번역의 억제에 관한 다수의 종의 올리고뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 또한, 상기 중성 리포좀은 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.

건조된 지질 또는 동결 건조된 리포좀은 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 리포좀은 적절한 총 인지질 농도 (예를 들어, 약 10-200 mM)로 재현탁될 수 있다. 캡슐화되지 않은 올리고뉴클레오타이드는 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 초과의 유전자의 번역을 억제할 수 있다.

[0050] 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.

[0051] III. 핵산

[0052] 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.

[0053] 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.

[0054] A. 핵염기

[0055] 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.

[0056] "퓨린" 및/또는 "피리미딘" 핵염기(들)는 자연발생 퓨린 및/또는 피리미딘 핵염기 및 또한 이의 유도체(들) 및 유사체(들)를 포함하며, 이는, 알킬, 카르복시알킬, 아미노, 하이드록실, 할로겐 (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 테아자퓨린, 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-아미노핵실/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' -0-메틸시티딘, Mcm5s2u/5-메톡시카보닐메틸-2-티오우리딘, Cmm5s2u/5-카르복시메틸아미노-메틸-2-티오리딘, McM5u/5-메톡시카보닐메틸우리딘, Cmm5u/5-카르복시메틸아미노메틸우리딘, Mo5u/5-메톡시우리딘, D/디하이드로우리딘, Ms2i6a, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데노신, Fm/2' -0-메틸슈도우리딘, Ms2t6a/N-((9-베타-D-리보퓨라노실-2-메틸티오퓨린-6-일)카르바모일)트레오닌, Gal q/베타, D-갈락토실퀴오신, Mt6a/N-((9-베타-D-리보퓨라노실퓨린-6-일)N-메틸-카르바모일)트레오닌, Gm/2' -0-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-리보퓨라노실퓨린-6-일)카르바모일)트레오닌, m5c/5-메틸시티딘, Tm/2' -0-메틸-5-메틸우리딘, m6a/N6-메틸아데노신, Um/2' -0-메틸우리딘, m7g/7-메틸구아노신, Yw/와이부토신, Mam5u/5-메틸아미노메틸우리딘, 또는 X/3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘, (acp3)u.

[0057] B. 뉴클레오시드

[0058] 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 일반적으로, 더 큰 화학적 또는 분자적 구조의 더 작은 화학적 또는 분자적 성분을 지칭한다.

[0059] 핵염기와 핵염기 링커 모이어티와의 상이한 유형의 공유 결합(들)이 당업계에 공지되어 있다. 비제한적인 예로서, 퓨린 (즉, A 또는 G) 또는 7-데아자퓨린 핵염기를 포함하는 뉴클레오시드는 전형적으로 퓨린 또는 7-데아자퓨린의 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).

[0060] C. 뉴클레오타이드

[0061] 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.

[0062] D. 핵산 유사체

[0063] 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.

[0064] 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 퓨린 유도체를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,681,947호; 특히 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' -디옥시퓨라노실 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' -0 위치에

부착된 소수성 담체 제제를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,858,988호; DNA 또는 RNA에의 향상된 혼성화; 뉴클레아제에 대한 향상된 안정성을 갖는 5' 말단의 안트라퀴논에 접합된 올리고뉴클레오타이드를 기술하고 있는, 미국 특허 제5,214,136호; DNA가 향상된 뉴클레아제 내성, 결합 친화성, 및 RNase H를 활성화시키는 능력을 위해 2'-데옥시-에리트로-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, 폴리설판아미드, 또는 폴리설폰아미드 골격 결합)을 포함하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드를 일반적으로 포함하는 웹타이드 핵산 (PNA 또는 웹타이드 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 제92/20702호; 및 소수성, 뉴클레아제 내성 P-에톡시 골격 결합을 기술하고 있는, 미국 특허 제5,855,911호.

[0065] 핵산 유사체의 다른 변형 및 용도는 당업계에 공지되어 있으며, 핵산 유사체의 이러한 기술 및 유형이 본 발명에 사용될 수 있음이 예상된다.

E. 핵산의 제조

[0067] 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, 이를 각각은 원용에 의해 본원에 포함된다.

F. 핵산의 경제

[0069] 핵산은 폴리아크릴아미드 젤, 염화세슘 원심분리 구배, 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 수단에 의해 정제될 수 있다 (예를 들어, 원용에 의해 본원에 포함된 Sambrook 등 (2001) 참고).

[0070] 특정 구현예에서, 본 발명은 단리된 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.

G. 혼성화

[0072] 본원에서, "혼성화," "혼성화하다" 또는 "혼성화가능한"은 이중가닥 또는 삼중가닥 분자 또는 부분적인 이중가닥 또는 삼중가닥 성질을 갖는 분자의 형성을 의미하는 것으로 이해된다. 본원에서, 용어 "어닐링"은 "혼성화하다"와 동의어이다.

[0073] 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.

[0074] 엄격한 조건은 약 50°C 내지 약 70°C의 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.

[0075] 또한 혼성화를 위한 이러한 범위, 조성 및 조건은 단지 비제한적인 예로서 언급되고, 특정 혼성화 반응에 대한

목적하는 염격성은 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, 염격한 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 염격성" 또는 "낮은 염격성 조건"으로 불리며, 낮은 염격성의 비제한적인 예는 약 20°C 내지 약 50°C의 온도 범위에서 약 0.15 M 내지 약 0.9 M NaCl에서 수행된 혼성화를 포함한다. 물론, 낮은 또는 높은 염격성 조건을 특정 응용 분야에 맞게 추가로 변형하는 것은 당업자의 기술에 속한다.

[0076] IV. 리포좀 P-에톡시 안티센스 의약품을 제조하는 방법

표적 mRNA의 특정 영역에 상보적인 안티센스 오리고뉴클레오타이드 (올리고)는 내인성 유전자의 발현을 억제하는데 사용되어 왔다. 상기 안티센스 오리고뉴클레오타이드가 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 오리고뉴클레오타이드는 항암 및 항바이러스 요법에서 유용한 도구일 수 있다.

[0078] 유전자 발현을 억제하는 안티센스 오리고뉴클레오타이드를 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 오리고뉴클레오타이드가 필요하다. P-에톡시와 같은 변형된 포스포디에스테르 유사체가 이러한 뉴클레아제 가수분해 문제를 극복하기 위해 제조되었지만, 이들은 상기 문제에 대해 만족스러운 해결책을 제공하지 못하였다.

[0079] 안티센스 오리고뉴클레오타이드의 세포 흡수는 낮다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 칼슘-포스페이트 침전, DEAE-덱스트란 매개, 또는 전기천공과 같은 물리적 기술이 오리고뉴클레오타이드의 세포 흡수를 증가시키는데 사용되어 왔다. 이러한 기술은 재현하기 어려우며 생체 내에서 적용할 수 없다. 리포펙틴과 같은 양이온성 지질이 또한 오리고뉴클레오타이드를 전달하는데 사용되어 왔다. 양이온성 지질 및 음전하 오리고뉴클레오타이드 사이에서 정전기적 상호작용이 형성되어 복합체를 야기하며, 상기 복합체는 이후에 표적 세포에 의해 흡수된다. 이러한 양이온성 지질은 오리고뉴클레오타이드를 뉴클레아제 소화로부터 보호하지 못하고 세포 막에 유해하므로, 뉴클레아제-내성 포스포로티오에이트를 전달할 때에만 유용하고, 뉴클레아제-절단가능한 포스포디에스테르를 전달할 때에는 유용하지 않다.

[0080] 제조된 또 다른 변형된 포스포디에스테르 유사체는 P-에톡시 안티센스 골격은, 이는 다른 안티센스 유사체에 대해 보고된 독성의 일부인, 출혈 및 보체 활성화에 대한 악영향을 미치지 않는다. P-에톡시 오리고뉴클레오타이드의 변형은 포스페이트 골격에서 이루어지므로, 상기 변형은 이들 오리고뉴클레오타이드가 표적 mRNA에 결합하는 것을 방해하지 않는다. P-에톡시 오리고뉴클레오타이드는 포스페이트 골격의 비가교 산소 원자에 에틸기를 부가하여 이들 오리고뉴클레오타이드를 비전하 화합물로 만들었으며 제조된다. 뉴클레아제에 대한 이들의 내성에도 불구하고, P-에톡시 오리고뉴클레오타이드의 세포 흡수 및 세포내 전달은 불량한데, 이는, 내재화시, 이들 오리고뉴클레오타이드가 엔도좀/리소좀 액포 내부에 격리되어 이들이 표적 mRNA에 접근하는 것을 방해하기 때문이다.

[0081] A. P-에톡시 안티센스 의약품

[0082] 리포좀 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: 오리고뉴클레오타이드 (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 리포좀이 형성된다.

[0083] B. P-에톡시 안티센스 약물 물질

[0084] 완제품의 특정 물리적 특성 (예를 들어, 용해도 및 소수성이며, 이는 이후에 식염수 중의 의약품 용해도, 리포좀 내로의 오리고의 혼입, 및 리포좀 입자 크기에 영향을 미침)은 P-에톡시 안티센스 약물 물질의 생산 동안 정된 P-에톡시 및 포스포디에스테르 아미다이트 원료 혼합물을 사용하여 정의될 수 있다. P-에톡시 골격 그룹의 손실은 오리고뉴클레오타이드 제조 동안 무작위로 발생하여 이들 결합에서 포스포디에스테르 결합을 야기하는 반면, 그 손실은 오리고뉴클레오타이드 내에서 P-에톡시 : 포스포디에스테르 골격 결합의 바람직한 비율을 생성

하지 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 리포좀 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.

[0085] 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 리포좀 입자 크기 변동성

실험	조작된 안티센스 골격	제조후 골격 예틸 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 리포좀 입자의 90%가 5000 nm 이하인 것이다.

a. 이 롯트는 낮은 용해도; 구체적으로, 재구성된 용액 중의 안티센스 입자로 인해 폐기되었다.

b. 이 롯트는 20 mL 바이알 중에 2 mg 안티센스와 함께 더 낮은 DMSO 및 tBA 부피를 가지고 있었으며, 이는 리포좀 확대에 부가적인 성분을 부가하였다.

c. 이 롯트는 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.

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.

a. 이 룻트는 낮은 용해도; 구체적으로, 재구성된 용액 중의 안티센스 입자로 인해 폐기되었다.

b. 이 룻트는 20 mL 바이알 중에 2 mg 안티센스와 함께 더 낮은 DMSO 및 tBA 부피를 가지고 있었으며, 이는 리포좀 확대에 부가적인 성분을 부가하였다.

c. 이 룻트는 입자 크기 출시 사양을 통과하지 못하였기 때문에 출시되지 않았다.

[0087]

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

[0088] 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.

[0089] 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 리포좀 입자 크기 변동성

실험	계면활성제의 양	입자 크기 특징: 누적 분포 함수		
		50% 핵	90% 핵 **	300 nm 핵
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 리포좀 입자의 90%가 5000 nm 이하인 것이다.

[0091]

D. 투여용 리포좀 P-에톡시 안티센스 의약품의 제조

[0093] 동결 건조된 제제를 일반 식염수 (0.9%/10 mM NaCl)를 사용하여 10-5000 μ M의 최종 올리고 농도로 수화시켰다. 리포좀-P-에톡시 올리고를 손으로 교반하여 혼합하였다.

E. 리포좀 P-에톡시 안티센스 의약품을 시험하는 방법

[0095] 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 재구성을 매우 도움이 된다.

[0096] 환자 IV를 위한 준비가 된 재구성된 약물의 육안 검사: 일반 식염수를 제조된 리포좀 P-에톡시 안티센스 의약품을 함유한 바이알에 첨가하고 혼들어 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 리포좀 입자 크기를 나타내기 때문이다.

[0097] 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 넉아웃되고 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.

[0098] 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 가능성성이 높다.

[0099] 리포좀 입자 크기: 완성된 의약품의 바이알을 재구성하고 리포좀 입자 크기에 대해 시험한다. 결과는 종종 중심점, 꼬리 및 평균 핵을 갖는 대략 정규 분포 또는 대부분의 입자의 대략 정규 분포 및 2차 입자 형성 효과로부터 비롯되는 더 작은 리포좀 입자의 더 작은 2차 피크이다. 리포좀 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 리포좀의 90%가 5 mikron 이하의 크기인 것을 나타내는 것을 포함한다. 또한, 더 작은 리포좀이 바람직한데, 이는, 이들이 세포 내로 더 잘 흡수될 수 있고, 두번째로는, 더 작은 리포좀이 혈관 기공을 침투함으로써 리포좀을 종양 내부로 침투시켜 리포좀 P-에톡시 안티센스 의약품의 치료 효과를 증가시킬 수 있기 때문이다.

[0100] V. 치료 방법

[0101] 본 발명의 특정 측면은 암, 자가면역 질환, 또는 감염병과 같은 질병을 치료하기 위한 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체 (예를 들어, 비전하 리포좀 내로 혼입된 올리고뉴클레오타이드)를 제공한다. 특히, 상기 올리고뉴클레오타이드는 인간 뉴클레오타이드 서열과 염기 쌍을 이루는 서열을 가질 수 있으므로, 인간 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 단백질의 발현을 억제할 수 있다.

[0102] "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 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체의 약학적 유효량의 투여를 포함할 수 있다.

[0103] "대상" 및 "환자"는 인간 또는 비인간, 예를 들어, 영장류, 포유동물, 및 척추동물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 상기 대상은 인간이다.

[0104] 본원 전반에서, 용어 "치료적 이익" 또는 "치료적으로 유효한"은 병태의 의학적 치료와 관련하여 대상의 웰빙을 촉진하거나 향상시키는 어느 것을 지칭한다. 이는 질병의 정후 또는 증상의 빈도 또는 중증도의 감소를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 암 치료는, 예를 들어, 종양 크기의 감소, 종양 침윤성의 감소, 암 성장률의 감소, 또는 전이의 예방을 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.

[0105] 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.

[0106] 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 과제트병; 선방 세포 암종; 선편평 암종; 편평 상피화생을 동반한 선암종; 악성 흉선종; 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; 릴러의 혼합 종양; 신모세포종; 간모세포종; 암육종; 악성 간엽세포종; 악성 브레너 종양; 악성 엽상 종양; 활막 육종; 악성 중피종; 난소고환종; 배아성 암종; 악성 기형종; 악성 난소갑상선종; 읉모암 종; 악성 중신종; 혈관육종; 악성 혈관내피종; 카포시 육종; 악성 혈관주위세포종; 림프관육종; 골육종; 피질주위 골육종; 연골모세포종; 중간엽 연골육종; 뼈의 거대 세포 종양; 유잉 육종; 악성 치성 종양; 법랑아세포 치성육종; 악성 법랑아세포종; 법랑아세포성 섬유육종; 악성 송파체종; 척색종; 악성 신경교종; 뇌실막종; 성상세포종; 원형질성 성상세포종; 원섬유성 성상세포종; 성상모세포종; 교모세포종; 펩지교종; 펩지모세포종; 원시 신경외배엽성 육종; 소뇌 육종; 신경절신경모세포종; 신경모포종; 망막세포종; 후각 신경원성 종양; 악성 수막종; 신경섬유육종; 악성 신경초종; 악성 과립 세포 종양; 악성 림프종; 호지킨병; 호지킨병; 부육아종; 소림프구성 악성 림프종; 거대 세포 미만성 악성 림프종; 여포성 악성 림프종; 균상 식육종; 다른 특이성 비호지킨 림프종; 악성 조직구증; 다발성 골수종; 비만 세포 육종; 면역증식성 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.

[0107]

본 치료 방법이 유용한 자가면역 질환은 척추관절병증, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 반응성 관절염, 장병증성 관절염, 당뇨병, 셀리악병, 자가면역 갑상선 질환, 자가면역 간 질환, 아디슨병, 이식거부, 이식편대숙주 질환, 숙주대이식편 질환, 케양성 대장염, 크론병, 과민성 장 질환, 염증성 장 질환, 류마티스성 관절염, 소아기 류마티스성 관절염, 가족성 지중해열, 근위축성 축삭 경화증, 쇼그렌 증후군, 조기 관절염, 바이러스성 관절염, 다발성 경화증, 또는 건선을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 질병의 진단 및 치료는 문헌에 잘 설명되어 있다.

[0108]

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, 대상포진, 수두 대상포진, 콜라키바이러스 A16, 사이토메갈로바이러스, 에볼라 바이러스, 엔데로바이러스, 앰스타인-바 바이러스, 한타 바이러스, 핸드라 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. 투베르클로시스, M. 아비움, M. 인트라셀루라레, M. 칸사이, M. 고르도내), 스타필로코커스 아우레우스, 나이세리아 고노로에, 나이세리아 메닌자이티데스, 스트렙토코커스 피오제네스 (그룹 A 스트렙토코커스), 스트렙토코커스 아갈락티애 (그룹 B 스트렙토코커스), 스트렙토코커스 (비리단스 그룹), 스트렙토코커스 패칼리스, 스트렙토코커스 보비스, 스트렙토코커스 (협기성 종), 스트렙토코커스 뉴모니애, 병원성 캄필로박터 종, 엔테로코커스 종, 해모필러스 인플루엔자, 바실러스 안트라시스, 코리네박테리움 디프테리아, 코리네박테리움 종, 에리시펠로티릭스 류시오파티애, 클로스트리듐 퍼프린거스, 클로스트리듐 테타니, 엔데로박터 애로제네스, 클렙시엘라 뉴모니애, 파스투렐라 물토시다, 박테리오이데스 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, 아스퍼길러스 푸미가투스, 아스퍼길러스 테레우스, 크립토코커스 네오포르만스, 히스토플라스마 кап슐라툼, 콕시디오이데스 임미티스, 블라스토마이세스 데마티티디스, 및 클라미디아 이라코마티스 감염을 포함한다.

[0109]

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.

[0110]

일 구현예에서, 생체내 접촉은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체를 포함하는, 치료적 유효량의 생리학적으로 허용가능한 조성물을 정맥내, 복강내, 피하, 또는 종양내 주사에 의해 환자에게 투여함으로써 탄성된다. 상기 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체는 주사에 의해 또는 시간이 경과함에 따라 점진적인 주입에 의해

비경구로 투여될 수 있다.

[0111] 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.

[0112] 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.

[0113] 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.

[0114] 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.

[0115] 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.

VI. 약학적 제제

[0117] 상기 리포좀을 포함하는 약학적 조성물은 일반적으로, 멸균된 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제, 예를 들어, 물 또는 식염수 용액을 포함한다.

[0118] 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 비전하 지질 성분 (예를 들어, 리포좀 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.

[0119] 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.

[0120] 본원에서, "약학적으로 허용가능한 담체"는 당업자에게 공지된 바와 같은, 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 계면활성제, 항산화제, 보존제 (예를 들어, 항박테리아 제제, 항진균 제제), 등장성 제제, 흡수 지연제, 염, 보존제, 약물, 약물 안정화제, 겔, 결합제, 부형제, 붕해제, 윤활제, 감미제, 향료, 염료, 이러한 유사 물질 및

이의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 비인간 동물에게 투여하기 위해 제제화되며 인간에게 투여하는데에 허용되지 않는 (예를 들어, 정부 규제로 인해) 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.

[0121] 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.

[0122] 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /체중, 약 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /체중, 약 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /체중, 약 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /체중, 약 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /체중, 약 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /체중, 약 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /체중, 약 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /체중 내지 약 1000 mg/kg/체중, 약 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /체중 내지 약 500 mg/kg/체중 등의 범위가 투여될 수 있다.

[0123] 본 구현예들의 올리고뉴클레오파이드는 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.

[0124] 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.

[0125] 본 발명의 치료용 조성물은 유리하게는 액체 용액 또는 혼탁액으로서 주사가능한 조성물의 형태로 투여되며; 주사하기 전 액체 중의 용액, 또는 액체 중의 혼탁액에 적합한 고체 형태가 또한 제조될 수 있다. 이러한 제제는 또한 유화될 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.

[0126] 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일 및 주사가능한 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸올레이트를 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, 퀸레이트화제 및 불활성 가스를 포함한다. 상기 약학적 조성물의 다양한 성분의 pH 및 정확한 농도는 널리 공지된 파라미터에 따라 조정된다.

[0127] 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 ml 이다.

[0128] 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.

[0129] 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.

VII. 조합 치료

[0130] 특정 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 제2 또는 부가적인 요법과 조합하여, 유전자 발현 억제제를 발현 할 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 약리학적 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.

[0132] 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.

[0133] 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, 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.

[0134] 다양한 조합이 사용될 수 있다. 하기 예의 경우, 억제성 올리고뉴클레오타이드 요법은 "A"이고 항암 요법은 "B"이다:

[0135] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B

[0136] B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A

[0137] B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A

[0138] A/A/B/A

[0139] 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 개

입이 상기 기술된 요법과 조합하여 적용될 수 있음이 고려된다.

[0140] 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.

A. 화학요법

[0142] 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.

[0143] 화학치료제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오텐파 및 사이클로포스파미드; 알킬 셀포네이트, 예를 들어, 부설판, 임프로설판, 및 피포설판; 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 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체인 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어, 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 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 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 발색단백질 엔다이인 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캐티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어, 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니벡스, 지노스타틴, 및 조루비신; 항-대사산물, 예를 들어, 폐토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어, 테놉테린, 프테롭테린, 및 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 애노시타빈, 및 플록스우리딘; 안드로겐, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로페오네이트, 에피티오스타놀, 에피티오스탄, 및 테스토락톤; 항-아드레날, 예를 들어, 미토탄 및 트릴로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라تون; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 테포파민; 테메콜신; 디아지퀸; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포털론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어, 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK다당류 복합체; 라족산; 리족신; 시조피란; 스퍼로게르마늄; 테누아존산; 트리아지퀸; 2,2',2'''-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀 젬시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 백금 배위 쟈물, 예를 들어, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빙크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미놉테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (예를 들어, CPT-11); 토포이소마라아제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어, 레티노산; 카페시타빈; 카르보플라틴, 프로카르바진, 폴리코마이신, 젬시타빈, 나벨빈, 파르네실-단백질 전달효소 억제제, 트랜스플라티늄, 및 상기 중 임의의 것의 약학적으로 허용가능한 염, 산, 또는 유도체를 포함한다.

[0144] **B. 방사선요법**

[0145] 광범위하게 사용되며 DNA 손상을 일으키는 다른 인자는 일반적으로 γ선, X선, 및/또는 종양 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 렌트겐의 일일 선량부터 2000 내지 6000 렌트겐의 단일 선량까지의 범위이다. 방사성 동위원소의 선량 범위는 광범위하게 다양하며, 동위원소의 반감기, 방출된 방사선의 강도 및 유형, 및 신생물 세포의 흡수에 의해 결정된다.

[0146] 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.

[0147] **C. 면역요법**

[0148] 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, 종양 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 종양 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 활성 및 ErbB2의 억제 또는 감소의 조합은 ErbB2를 과발현하는 암의 치료에서 치료적 이익을 제공할 것이다.

[0149] 또 다른 면역요법이 또한 상기 논의된 유전자 침묵 요법과 조합된 조합 요법의 일부로서 사용될 수 있다. 면역 요법의 일 측면에서, 종양 세포는 표적화할 수 있는, 즉, 대부분의 다른 세포에 존재하지 않는, 일부 마커를 가져야 한다. 많은 종양 마커가 존재하며, 이들 중 임의의 것이 본 발명의 맥락에서 표적화에 적합할 수 있다. 일반적인 종양 마커는 암배아 항원, 전립선 특이적 항원, 소변 종양 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 종양 억제제와 조합된 유전자 전달을 사용하여 면역 자극 분자를 조합하는 것은 항-종양 효과를 향상시키는 것으로 나타났다. 더욱이, 이러한 화합물 중 임의의 것에 대한 항체는 본원에 논의된 항암제를 표적화하는데 사용될 수 있다.

[0150] 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-강글리오이드 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.

[0151] 활성 면역요법에서, 항원성 웨타이드, 폴리웨타이드 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).

[0152] 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).

[0153] 일부 구현예에서, 상기 면역요법은 면역관문 억제제일 수 있다. 면역관문은 신호 (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 측 및/또는 CTLA-4를 표적화한다.

[0154] 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 제WO2015016718호; 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, 람브롤리주맙은 대안적이고 동등한 명칭인 MK-3475 및 펜브롤리주맙으로도 알려져 있다.

[0155] 일부 구현예에서, 상기 PD-1 결합 길항체는 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 길항체는 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 길항체는 PDL2가 이의 결합 파트너에 결합하는 것을 억제하는 분자이다. 특정 측면에서, PDL2 결합 파트너는 PD-1이다. 상기 길항체는 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 측 길항체는 당업계에 공지되어있으며, 예를 들어, 미국 특허 공보 제20140294898호, 제2014022021호, 및 제20110008369호에 기술된 바와 같으며, 이들 모두는 원용에 의해 본원에 포함된다.

[0156] 일부 구현예에서, 상기 PD-1 결합 길항체는 항-PD-1 항체 (예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체)이다. 일부 구현예에서, 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 펜브롤리주맙 및 CT-011로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 PD-1 결합 길항체는 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 길항체는 AMP-224이다. 니볼루맙 (MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558, 및 OPDIVO[®]로도 알려짐)은 WO2006/121168에 기술된 항-PD-1 항체이다. 펜브롤리주맙 (MK-3475, Merck 3475, 램브롤리주맙, KEYTRUDA[®], 및 SCH-900475로도 알려짐)은 WO2009/114335에 기술된 항-PD-1 항체이다. CT-011 (hBAT 또는 hBAT-1로도 알려짐)은 WO2009/101611에 기술된 항-PD-1 항체이다. AMP-224 (B7-DCIg로도 알려짐)은 WO2010/027827 및 WO2011/066342에 기술된 PDL2-Fc 융합 가용성 수용체이다.

[0157] 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 구성 원이다. 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.

[0158] 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 올리고펩타이드이다.

[0159] 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, 트레멜리무맙 (이전에는 티실리무맙으로 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.

[0160] 예시적인 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙 (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 이필리무맙의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 따라서, 일 구현예에서, 상기 항체는 이필리무맙의 VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 이필리무맙의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 구현 예에서, 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, 이필리무맙과의 적어도 약 90%, 95% 또는 99%의 가변 영역 동일성)을 갖는다.

[0161] CTLA-4를 조절하기 위한 다른 분자는 CTLA-4 리간드 및 수용체, 예를 들어, 미국 특허 제5844905호, 제5885796 호 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.

[0162] 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 생성 될 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(moity)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).

[0163] 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.

D. 수술

[0165] 암 환자의 약 60%는 예방, 진단 또는 병기결정, 치유, 및 완화 수술을 포함하는 일부 유형의 수술을 받는다. 치유 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.

[0166] 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 혼미경으로 제어되는 수술 (모즈 수술 (Mohs' surgery))을 포함한다. 본 발명이 표재암, 전암, 또는 부수적인 양의 정상 조직의 제거와 함께 사용될 수 있음이 추가로 고려된다.

[0167] 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.

E. 다른 제제

[0169] 다른 제제가 치료의 치료 효능을 개선하기 위해 본 구현예들의 특정 측면과 조합되어 사용될 수 있음이 고려된다. 이러한 부가적인 제제는 세포 표면 수용체 및 간극 연접의 상향조절에 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 연접의 수를 증가시키는 것에 의한 세포간 신호전달의 증가는 주변의 과증식성세포 집단에 대한 항-과증식성 효과를 증가시킬 것이다. 다른 구현예에서, 세포분열 억제 또는 분화 제제

는 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.

[0170] VIII. 키트 및 진단

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, BCL2 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.

[0172] 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.

[0173] 상기 키트는 상기 방법의 절차 단계를 개괄하는 지시 시트를 추가로 포함할 수 있고, 본원에 기술되거나 당업자에게 공지된 것과 동일한 절차를 실질적으로 수행한다.

[0174] IX. 실시예

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.

[0176] 실시예 1 - *BCL2*-표적화 P-에톡시 올리고뉴클레오타이드

[0177] Bc12의 발현을 억제하기 위한 리포좀 *BCL2* 안티센스 의약품에 사용하기 위해, *BCL2*을 표적화하는 올리고뉴클레오타이드를 설계하였다. *BCL2* 변이체 알파의 연속 cDNA 서열은 서열 번호 4에 제시되어 있고 *BCL2* 변이체 알파의 단백질 서열은 서열 번호 5에 제시되어 있다. *BCL2* 변이체 베타의 연속 cDNA 서열은 서열 번호 6에 제시되어 있고 *BCL2* 변이체 베타의 단백질 서열은 서열 번호 7에 제시되어 있다. 각 올리고뉴클레오타이드의 서열을 표 4에 제시하였다.

표 4

표 4. *BCL2* 안티센스 서열

안티센스 명칭	서열	서열 번호
20 염기 ^a	5'- CAG CGT <u>GCG</u> CCA T <u>CC</u> TTC CC -3'	1
18 염기 ^a	5'- GCG T <u>GC</u> <u>GCC</u> ATC CTT CCC -3'	2
7 염기	5'- TCC TTC C -3'	3

^a 밑줄은 공지된 포스포디에스테르 골격 결합의 위치를 나타낸다

[0178] [0179] 상기 리포좀 *BCL2* 안티센스 의약품은 본원에 기재된 방법에 따라 제조되었다. 상기 20 염기 올리고뉴클레오타이드에 대한 질량 분석법 시험은 상기 올리고뉴클레오타이드 약물 물질의 80% 이상이 5 내지 7개의 포스포디에스테르 골격 결합을 가지며 상기 올리고뉴클레오타이드 약물 물질의 98% 이상이 5 내지 8개의 포스포디에스테르

골격 결합을 가짐을 나타내었다. 상기 20 염기 올리고뉴클레오타이드에 대한 입자 시험은 상기 리포좀의 90%가 2462 nm 이하의 입자 직경을 가졌고, 상기 리포좀의 50%가 607 nm 이하가 입자 직경을 가졌고, 상기 리포좀의 약 28%가 300 nm 이하의 입자 직경을 가졌음을 나타내었다.

[0180] 실시예 2 - 리포좀 *BCL2* 안티센스에 의한 정상 세포 및 암 세포 생존력의 억제

[0181] 리포좀 *BCL2* 안티센스의 정상적인 말초 혈액 단핵세포 (PBMC)의 생존력 억제능을 시험하였다. 서열 번호 1에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 3x 세제, 서열 번호 2에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 1x 세제, 서열 번호 2에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 3x 세제, 및 서열 번호 3에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 1x 세제를 4일 동안 상기 세포와 함께 배양하였다. 도 1의 데이터에서 나타난 바와 같이, 리포좀 *BCL2* 안티센스와의 배양은 정상적인 PBMC의 세포 생존력을 감소시키지 않았다.

[0182] 리포좀 *BCL2* 안티센스의 배종심 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프종의 생존력 억제능을 10개의 세포주, 즉, DOHH-2, SU-DHL-4, SU-DHL-6, SU-DHL-10, OCI-LY-18, OCI-LY-19, WSU-DLCL2, RL, OCI-LY-1, 및 OCI-LY-7에서 시험하였다. 서열 번호 1에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 3x 세제, 서열 번호 2에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 1x 세제, 서열 번호 2에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 3x 세제, 및 서열 번호 3에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 1x 세제를 4일 동안 각 세포주와 함께 배양하였다. 설포로다민 B 세포독성 분석을 사용하여 세포독성을 평가하였다. 도 2a 내지 2j의 데이터에서 나타난 바와 같이, 리포좀 *BCL2* 안티센스와의 배양은 10개의 배종심 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프종 세포주 중 6개에서 50% 억제를 유도하였다.

[0183] 리포좀 *BCL2* 안티센스의 활성화된 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프종의 생존력 억제능을 3개의 세포주, 즉, SU-DHL-2, U-2932, 및 RI-1에서 시험하였다. 서열 번호 1에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 3x 세제, 서열 번호 2에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 1x 세제, 서열 번호 2에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 3x 세제, 및 서열 번호 3에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 1x 세제를 4일 동안 각 세포주와 함께 배양하였다. 설포로다민 B 세포독성 분석을 사용하여 세포독성을 평가하였다. 도 3a 내지 3c의 데이터에서 나타난 바와 같이, 리포좀 *BCL2* 안티센스와의 배양은 3개의 활성화된 B 세포 유사 아형 미만성 거대 B 세포 림프종 세포주 모두에서 50% 억제를 유도하였다.

[0184] 리포좀 *BCL2* 안티센스의 림프종 세포의 생존력 억제능을 2개의 세포주, 즉, GRANTA-519 (외투세포 림프종) 및 Ramos (버켓 림프종)에서 시험하였다. 서열 번호 1에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 3x 세제, 서열 번호 2에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 1x 세제, 서열 번호 2에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 3x 세제, 및 서열 번호 3에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 1x 세제를 4일 동안 각 세포주와 함께 배양하였다. 설포로다민 B 세포독성 분석을 사용하여 세포독성을 평가하였다. 도 4a 내지 4b의 데이터에서 나타난 바와 같이, 리포좀 *BCL2* 안티센스와의 배양은 두 세포주 모두에서 50% 억제를 유도하였다.

[0185] 리포좀 *BCL2* 안티센스의 골수성 백혈병 세포의 생존력 억제능을 3개의 세포주, 즉, K562, MV-4-11 및 Kasumi-1에서 시험하였다. 서열 번호 1에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 3x 세제, 서열 번호 2에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 1x 세제, 서열 번호 2에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 3x 세제, 및 서열 번호 3에 상응하는 리포좀 *BCL2* 안티센스 및 1x 세제를 4일 동안 각 세포주와 함께 배양하였다. 설포로다민 B 세포독성 분석을 사용하여 세포독성을 평가하였다. 도 5a 내지 5c의 데이터에서 나타난 바와 같이, 리포좀 *BCL2* 안티센스와의 배양은 3개의 골수성 백혈병 세포주 모두에서 50% 억제를 유도하였다.

[0186] * * *

[0187] 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 가능할 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.

[0188] 참고문헌

[0189] 하기 참고문헌은, 본원에 제시된 것을 보완하는 예시적인 절차 또는 다른 세부사항을 제공하는 한, 원용에 의해

본원에 명확하게 포함된다.

- [0190] 미국 특허 제4,659,774호
- [0191] 미국 특허 제4,816,571호
- [0192] 미국 특허 제4,870,287호
- [0193] 미국 특허 제4,959,463호
- [0194] 미국 특허 제5,141,813호
- [0195] 미국 특허 제5,214,136호
- [0196] 미국 특허 제5,223,618호
- [0197] 미국 특허 제5,264,566호
- [0198] 미국 특허 제5,378,825호
- [0199] 미국 특허 제5,428,148호
- [0200] 미국 특허 제5,446,137호
- [0201] 미국 특허 제5,466,786호
- [0202] 미국 특허 제5,470,967호
- [0203] 미국 특허 제5,539,082호
- [0204] 미국 특허 제5,554,744호
- [0205] 미국 특허 제5,574,146호
- [0206] 미국 특허 제5,602,240호
- [0207] 미국 특허 제5,602,244호
- [0208] 미국 특허 제5,610,289호
- [0209] 미국 특허 제5,614,617호
- [0210] 미국 특허 제5,623,070호
- [0211] 미국 특허 제5,652,099호
- [0212] 미국 특허 제5,670,663호
- [0213] 미국 특허 제5,672,697호
- [0214] 미국 특허 제5,681,947호
- [0215] 미국 특허 제5,700,922호
- [0216] 미국 특허 제5,705,629호
- [0217] 미국 특허 제5,708,154호
- [0218] 미국 특허 제5,714,331호
- [0219] 미국 특허 제5,714,606호
- [0220] 미국 특허 제5,719,262호
- [0221] 미국 특허 제5,736,336호
- [0222] 미국 특허 제5,739,169호
- [0223] 미국 특허 제5,760,395호
- [0224] 미국 특허 제5,763,167호

- [0225] 미국 특허 제5,766,855호
- [0226] 미국 특허 제5,773,571호
- [0227] 미국 특허 제5,777,092호
- [0228] 미국 특허 제5,786,461호
- [0229] 미국 특허 제5,792,847호
- [0230] 미국 특허 제5,801,005호
- [0231] 미국 특허 제5,824,311호
- [0232] 미국 특허 제5,830,880호
- [0233] 미국 특허 제5,846,945호
- [0234] 미국 특허 제5,855,911호
- [0235] 미국 특허 제5,858,988호
- [0236] 미국 특허 제5,859,221호
- [0237] 미국 특허 제5,872,232호
- [0238] 미국 특허 제5,886,165호
- [0239] 미국 특허 제5,891,625호
- [0240] 미국 특허 제5,908,845호
- [0241] 미국 특허 제9,744,187호
- [0242] Amin 등, Oncogene, 22:5399-5407, 2013.
- [0243] Austin-Ward and Villaseca, Revista Medica de Chile, 126(7):838-845, 1998.
- [0244] Bailey and Sullivan, Biochimica. Biophys. Acta., 239-252, 2000.
- [0245] Bangham 등, J. Mol. Biol, 13(1):253-259, 1965.
- [0246] Bukowski 등, Clinical Cancer Res., 4(10):2337-2347, 1998.
- [0247] Christodoulides 등, Microbiology, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
- [0248] Davidson 등, J. Immunother., 21(5):389-398, 1998.
- [0249] Deamer and Uster, In: Liposome Preparation: Methods and Mechanisms, Ostro (Ed.), Liposomes, 1983.
- [0250] Dokka 등, Pharm Res, 17: 521-25, 2000.
- [0251] duBois 등, J Clin Oncol, 17: 46-51, 1999.
- [0252] Dubey 등, J. Drug Target, 12:257-264, 2004.
- [0253] Duxbury 등, Biochem. Biophys. Res. Commun., 311:786-792, 2003.
- [0254] Duxbury 등, Oncogene, 23:1448-1456, 2004.
- [0255] Egholm 등, Nature, 365(6446):566-568, 1993.
- [0256] Elbashir 등, Nature, 411 (6836):494-498, 2001.
- [0257] 유럽 출원 01219
- [0258] 유럽 출원 266,032
- [0259] Fagard 등, JAKSTAT, 2:e22882, 2013.
- [0260] Farhood 등, Biochim. Biophys. Act, 289-295, 1995.

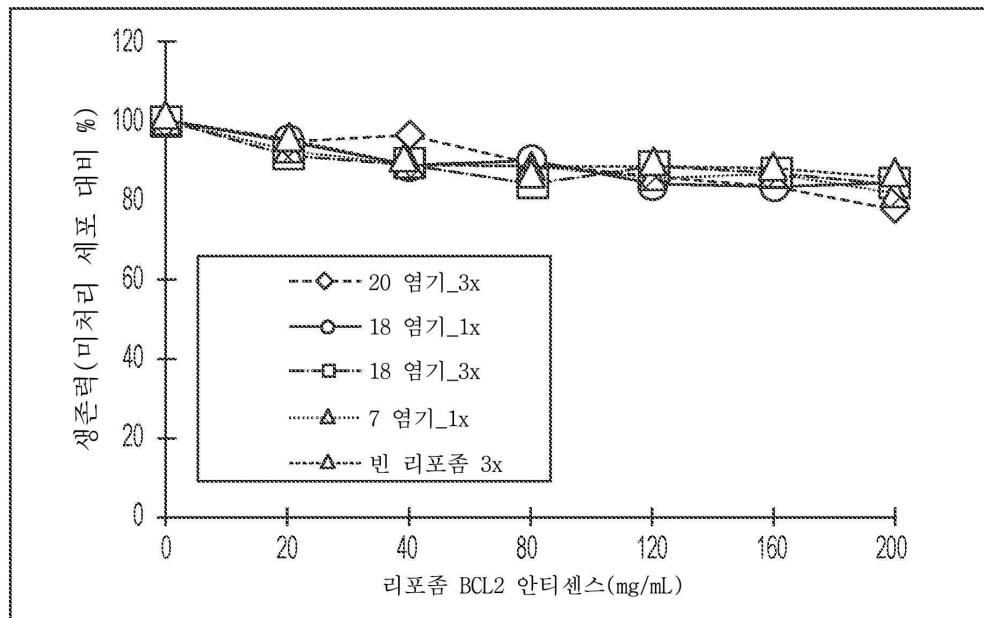
- [0261] Fire 등, *Nature*, 391(6669):806-811, 1998.
- [0262] Flenniken 등, *Dev. Biol.*, 179:382-401, 1996.
- [0263] Froehler 등, *Nucleic Acids Res.*, 14(13):5399-5407, 1986.
- [0264] Gabizon, *Cancer Invest.*, 19:424-436, 2001.
- [0265] Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu 등 (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- [0266] Gregoriadis, In: *Drug Carriers in Biology and Medicine*, Gregoriadis (Ed.), 287-341, 1979.
- [0267] Gutierrez-Puente 등, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291:865-869, 1999.
- [0268] Halder 등, *Clinical Cancer Research*, 11: 8829-36, 2005.
- [0269] Han 등, *Ann Surg Oncol*, 4:264-268, 1997.
- [0270] Hanibuchi 등, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- [0271] Hannon and Rossi, *Nature*, 431:371-378, 2004.
- [0272] Hardee 등, *G3 (Bethesda)* 3:2173-2185, 2013.
- [0273] Hassani 등, *J. Gene Med.*, 7(2):198-207, 2005.
- [0274] Hecker 등, *Cancer Research*, 62:2699-2707, 2002.
- [0275] Hellstrand 등, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- [0276] Hortobagyi 등, *J. Clin. Oncol.*, 19:3422-3433, 2001.
- [0277] Hsia 등, *J Cell Biol*, 160:753-67, 2003.
- [0278] Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- [0279] Jackson 등, *Nat. Biotechnol.*, 21:635-637, 2003.
- [0280] Jemal 등, *CA Cancer J. Clin.*, 55(1):10-30, 2005.
- [0281] Judson 등, *Cancer*, 86: 1551-56, 1999.
- [0282] Kaneda 등, *Science*, 243:375-378, 1989.
- [0283] Kato 등, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- [0284] Kim 등, *Nat. Biotechnol.*, 22:321-325, 2004.
- [0285] Kinch 등, *Clin. Exp. Metastasis*, 20:59-68, 2003.
- [0286] Klein 등, *Gastroenterology*, 125:9-18, 2003.
- [0287] Kohno 등, *Int J Cancer*, 97:336-43, 2002.
- [0288] Kornberg and Baker, *DNA Replication*, 2nd Ed., Freeman, San Francisco, 1992.
- [0289] Kornberg 등, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45:4463-69, 2004.
- [0290] Kornberg, *Head Neck*, 20: 634-639, 1998.
- [0291] Kostarelos 등, *Int J Cancer*, 112: 713-21, 2004.
- [0292] Krasnici 등, *Int. J. Cancer*, 105(4):561-567, 2003.
- [0293] Landen, *Cancer Res*, 65: 6910-18, 2005.
- [0294] Langley 등, *Cancer Research*, 63: 2971-76, 2003.
- [0295] Lewis 등, *Cell*, 115:787-798, 2003.

- [0296] Lewis 등, *Nat. Genet.*, 32:107-108, 2002.
- [0297] Lori 등, *Am. J. Pharmacogenomics*, 2:245-252, 2002.
- [0298] Matsuda 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:16-22, 2004.
- [0299] McCaffrey 등, *Nature*, 418:38-39, 2002.
- [0300] McGuire 등, *New England Journal of Medicine*, 334:1-6, 1996.
- [0301] McLean 등, *Expert Opin Pharmacother*, 4: 227-34, 2003.
- [0302] Miklossy 등, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12:611-629, 2013.
- [0303] Miller 등, *Biochemistry*, 37(37):12875-83, 1998.
- [0304] Mitchell 등, *Ann. NY Acad. Sci.*, 690:153-166, 1993.
- [0305] Mitchell 등, *J. Clin. Oncol.*, 8(5):856-869, 1990.
- [0306] Mitra 등, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 56-68, 2005.
- [0307] Mitra 등, *Proc Am Assoc Cancer Res*, 2005.
- [0308] Morton 등, *Arch. Surg.*, 127:392-399, 1992.
- [0309] Nemoto 등, *Pathobiology*, 65:195-203, 1997.
- [0310] Nicolau 등, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- [0311] Noblitt 등, *Cancer Gene Ther.*, 11:757-766, 2004.
- [0312] Ogawa 등, *Oncogene*, 19:6043-6052, 2000.
- [0313] Owens 등, *Cancer Res*, 55:2752-2755, 1995.
- [0314] Park 등, *Cancer Lett.*, 118:153-160, 1997.
- [0315] PCT 출원 WO 92/20702
- [0316] PCT 출원 WO02/100435A1
- [0317] PCT 출원 WO03/015757A1
- [0318] PCT 출원 WO04/002453A1
- [0319] PCT 출원 WO04029213A2
- [0320] Pietras 등, *Oncogene*, 17(17):2235-2249, 1998.
- [0321] Qin 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- [0322] Ravindranath and Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303-329, 1991.
- [0323] Reich 등, *Mol. Vis.*, 9:210-216, 2003.
- [0324] Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- [0325] Rosenberg 등, *Ann. Surg.* 210(4):474-548, 1989.
- [0326] Rosenberg 등, *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.
- [0327] Ryther 등, *Gene Ther.*, 12(1):5-11, 2004.
- [0328] Sambrook 등, In: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.
- [0329] Schaller and Parsons, *Trends in Cell Biology*, 3:258-62, 1993.
- [0330] Schaller 등, *Mol Biol Cell*, 10:3489-3505, 1999.

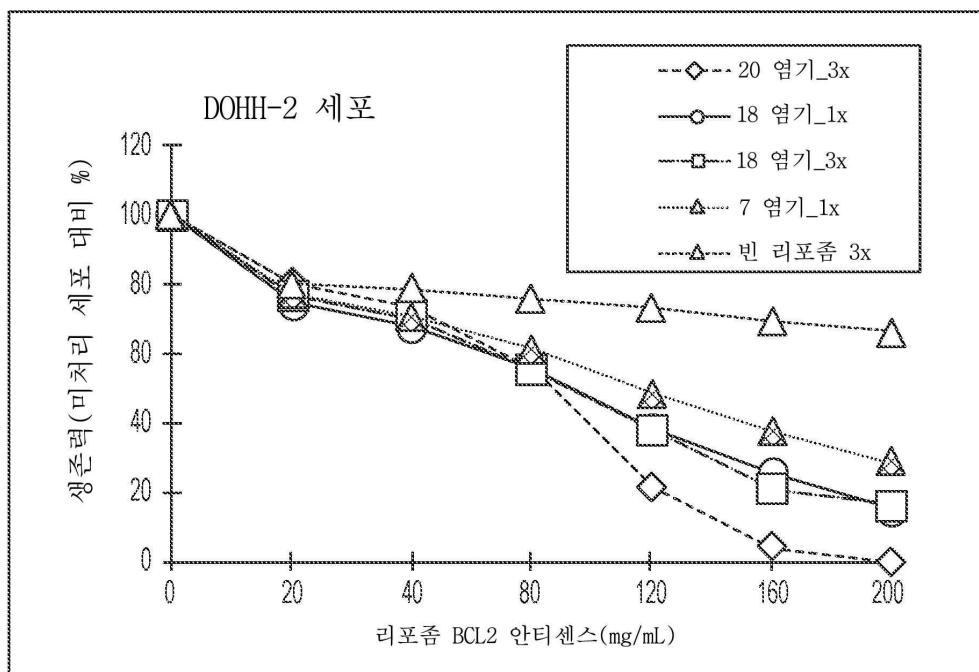
- [0331] Schaller, *Biochim Biophys Acta*, 1540:1-21, 2001.
- [0332] Schaller, *J Endocrinol*, 150:1-7, 1996.
- [0333] Schaller, *Trends Cell Biol*, 3:258-262, 1993.
- [0334] Scheit, In: *Synthesis and Biological Function*, Wiley-Interscience, NY, 171-172, 1980.
- [0335] Schlaepfer and Hunter, *Trends in Cell Biology*, 8: 151-57, 1998.
- [0336] Schlaepfer 등, *Prog Biophys Mol Biol*, 71: 435-78, 1999.
- [0337] Scuto 등, *Cancer Res.*, 71:3182-3188, 2011.
- [0338] Sein 등, *Oncogene*, 19: 5539-42, 2000.
- [0339] Sheta 등, *J Natl Cancer Inst*, 92: 1065-73, 2000.
- [0340] Shibata 등, *Cancer Res*, 58: 900-903, 1998.
- [0341] Sieg 등, *Nat Cell Biol*, 2:249-56, 2000.
- [0342] Sioud and Sorensen, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 312:1220-1225, 2003.
- [0343] Siwak 등, *Clin Cancer Res*, 8: 955-56, 2002.
- [0344] Sledz 등, *Nat. Cell Biol.*, 5:834-839, 2003.
- [0345] Song 등, *Nature Med.* 9:347-351, 2003.
- [0346] Sonoda 등, *Journal of Biological Chemistry*, 275:16309-15, 2000.
- [0347] Sood 등, *Am J Pathol*, 165:1087-1095, 2004.
- [0348] Sood 등, *Cancer Biology & Therapy*, 1: 511-17, 2002.
- [0349] Sorensen 등, *J. Mol. Biol.*, 327:761-66, 2003.
- [0350] Soutschek 등, *Nature*, 432:173-178, 2004.
- [0351] Spagnou 등, *Biochemistry*, 43:13348-13356, 2004.
- [0352] Sulman 등, *Genomics*, 40:371-374, 1997.
- [0353] Szoka and Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4194-4198, 1978.
- [0354] Thaker 등, 36th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists, Miami, Fla., 2005.
- [0355] Thaker 등, *Clin. Cancer Res.*, 10:5145-5150, 2004.
- [0356] Thurston 등, *J. Clin. Invest.*, 101(7):1401-1413, 1998.
- [0357] Uchida 등, *Mol. Ther.*, 10:162-171, 2004.
- [0358] Voskoglou-Nomikos 등, *Clin. Cancer Res.*, 9:4227-4239, 2003.
- [0359] Walker-Daniels 등, *Prostate*, 41:275-80, 1999.
- [0360] Wianny 등, *Nat. Cell Biol.*, 2:70-75, 2000.
- [0361] Wong 등, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- [0362] Wu 등, *J. Hematol. Oncol.*, 4:31, 2011.
- [0363] Xia 등, *Nat. Biotechnol*, 20:1006-10, 2002.
- [0364] Yang 등, *Oncogene*, 22:5694-701, 2003.
- [0365] Zelinski 등, *Cancer Res.*, 61:2301, 2001.
- [0366] Zhang 등, *J. Biol. Chem.*, 279:10677-684, 2004.

도면

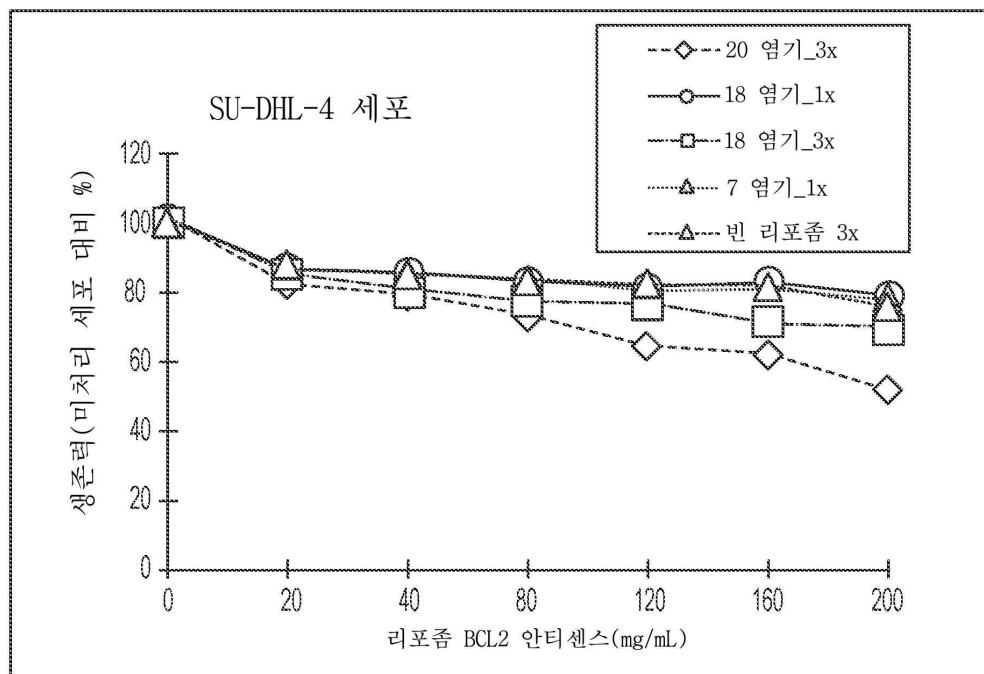
도면1



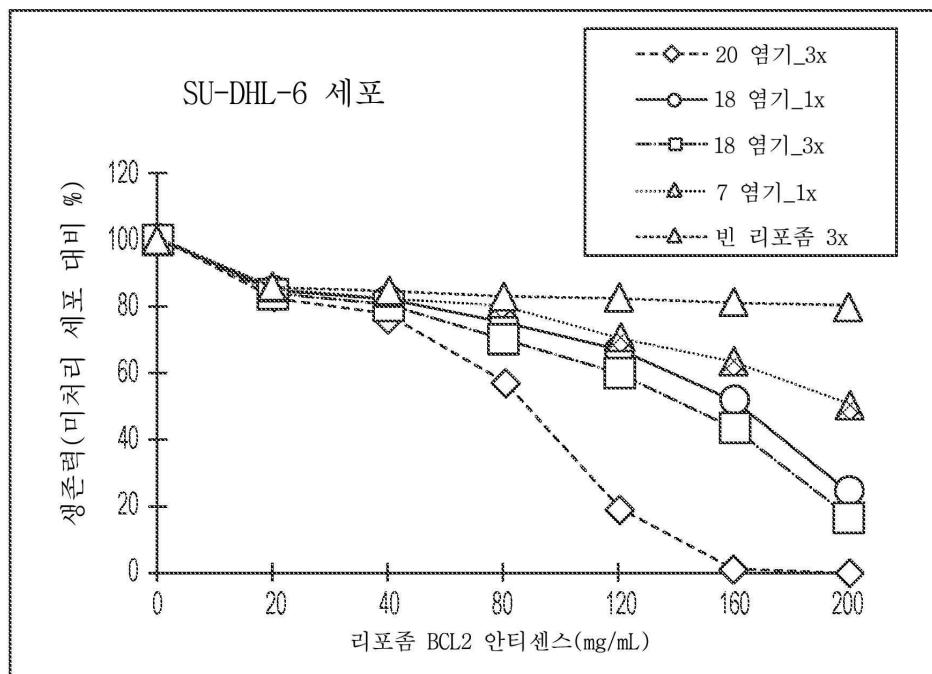
도면2a



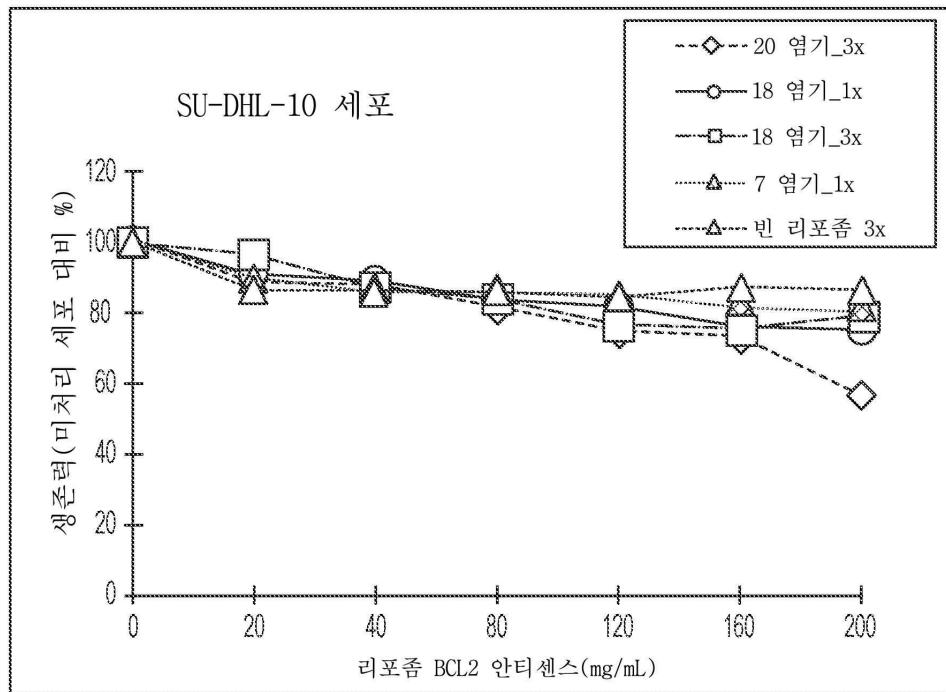
도면2b



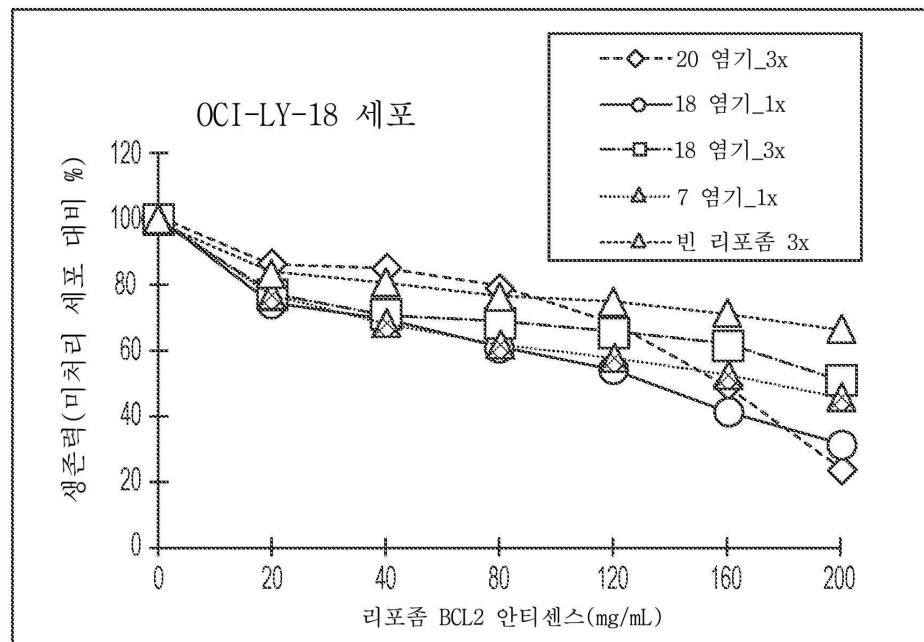
도면2c



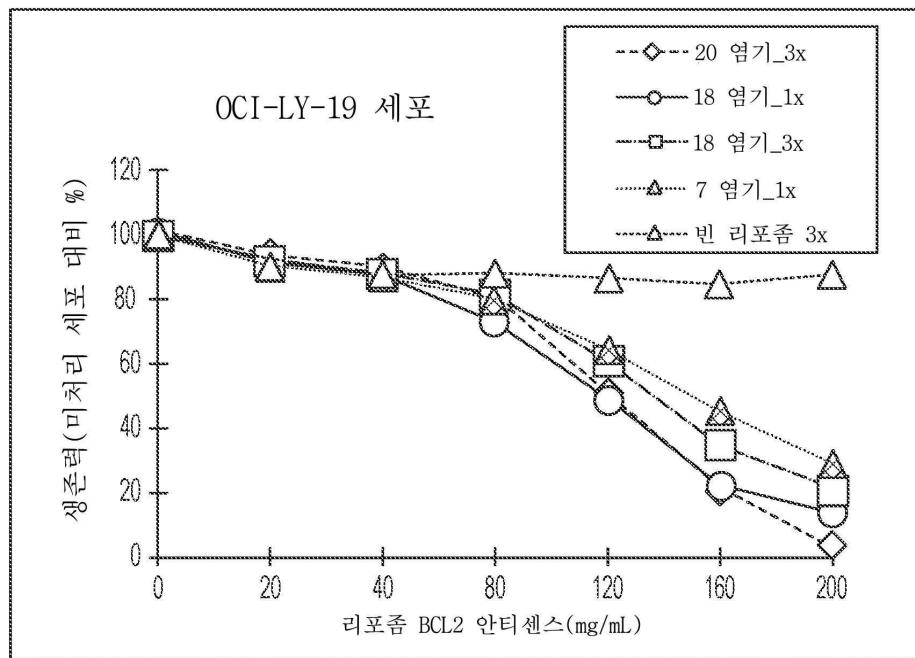
도면2d



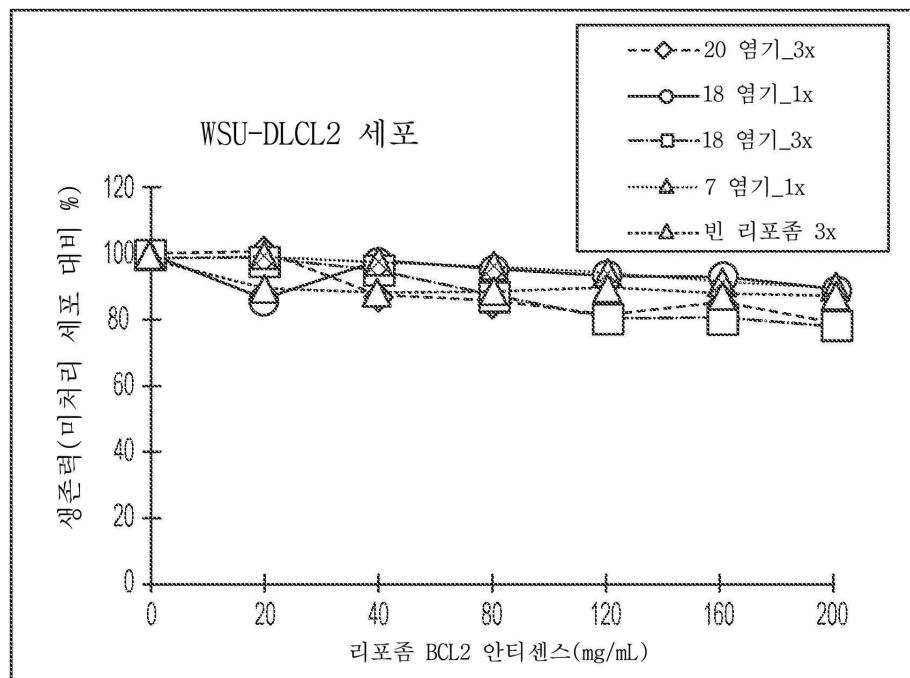
도면2e



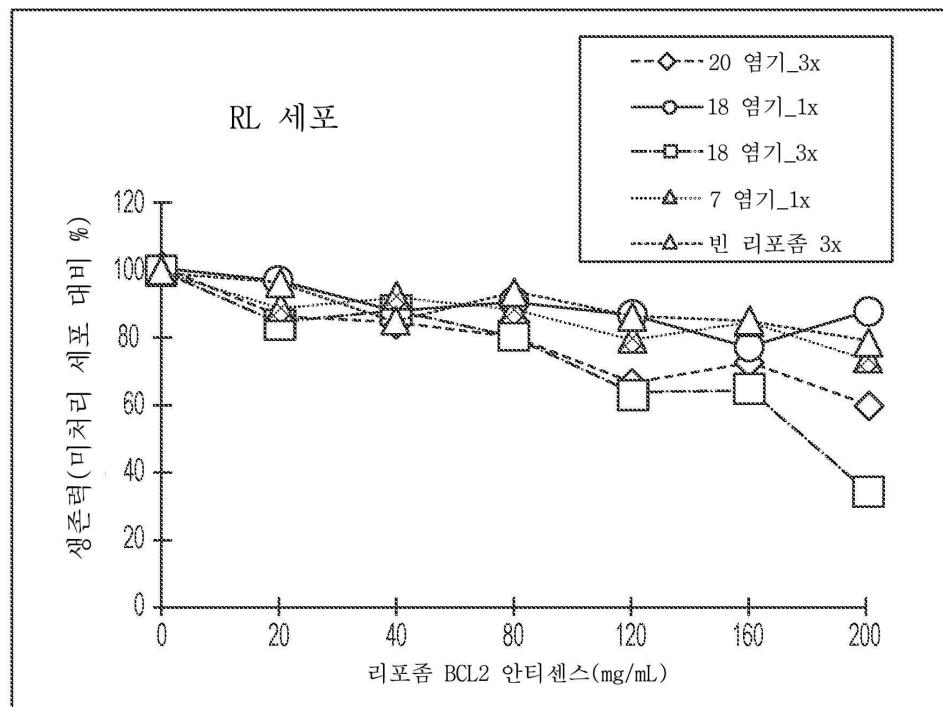
도면2f



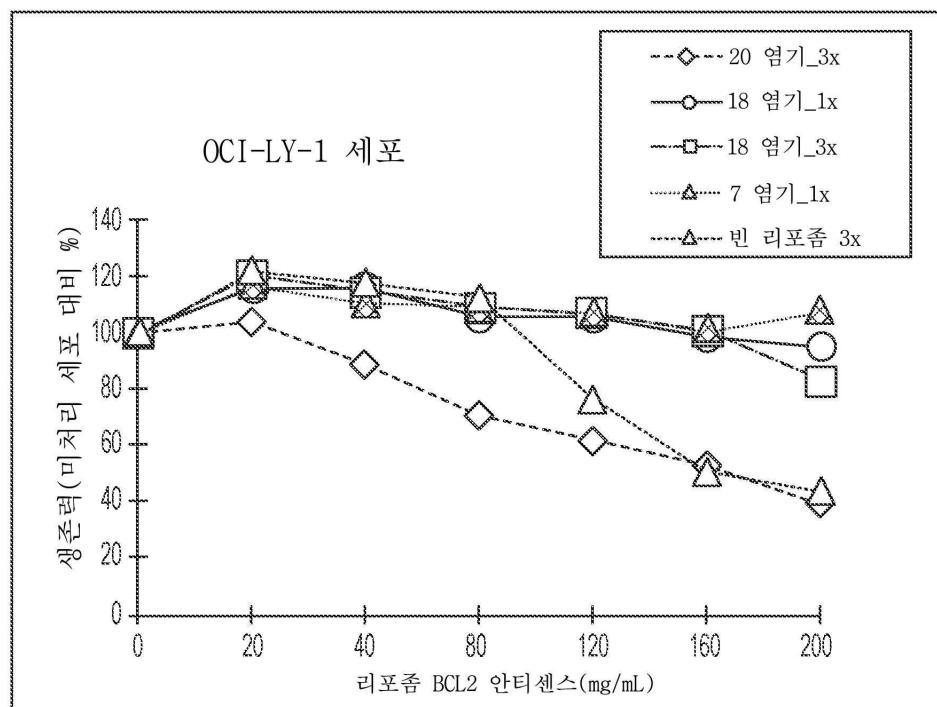
도면2g



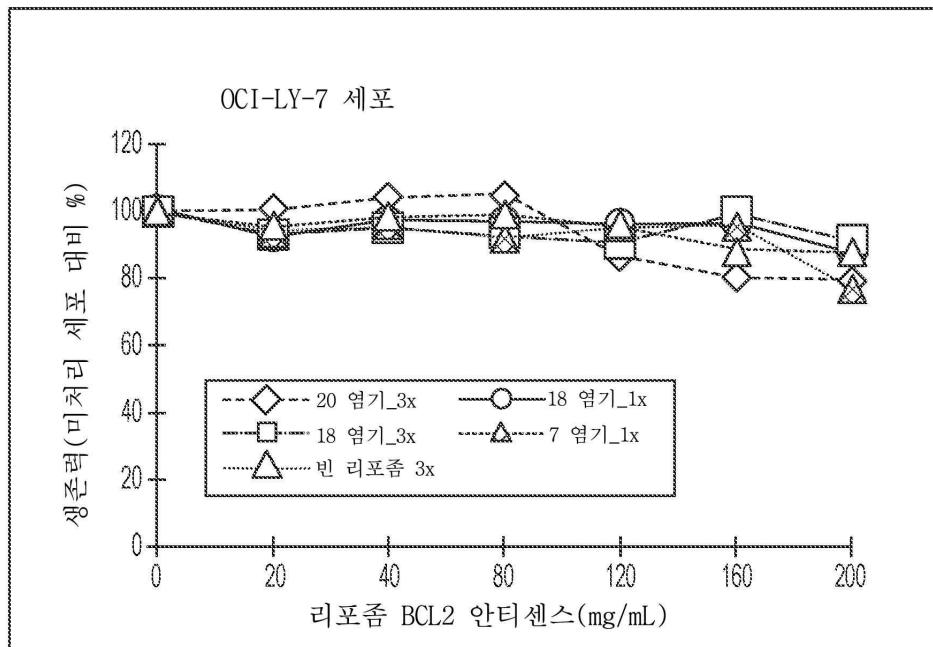
도면2h



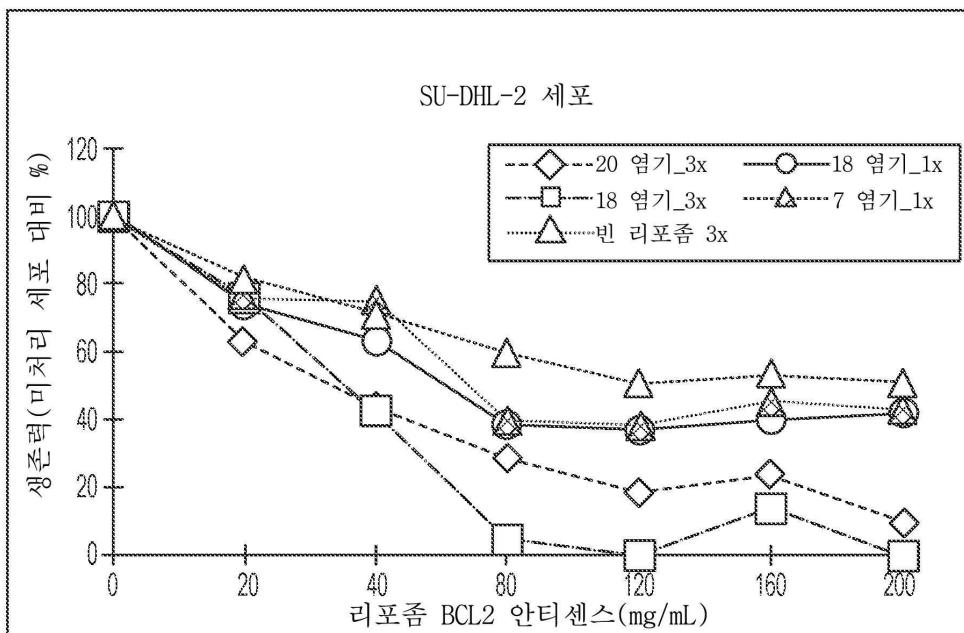
도면2i



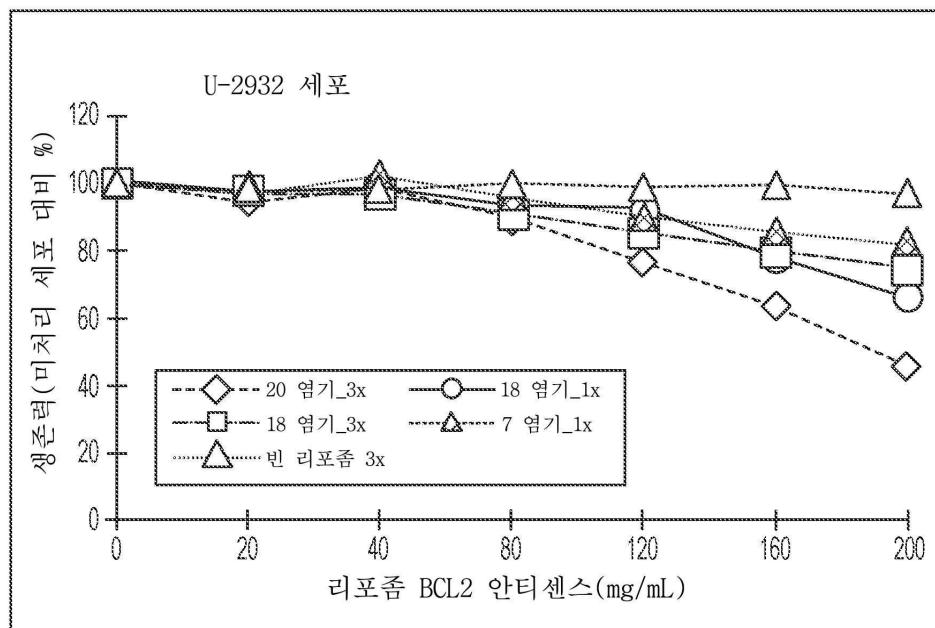
도면2j



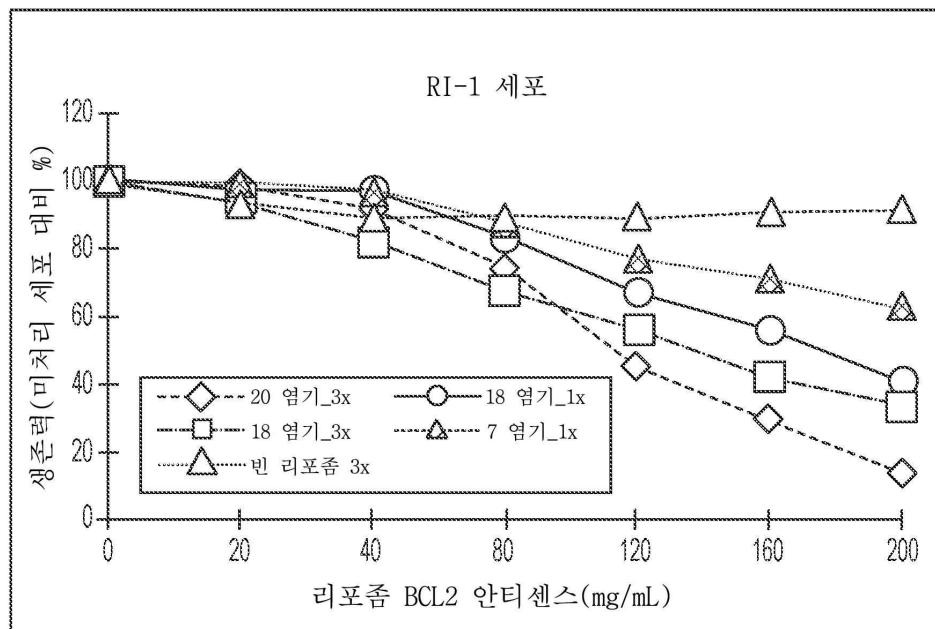
도면3a



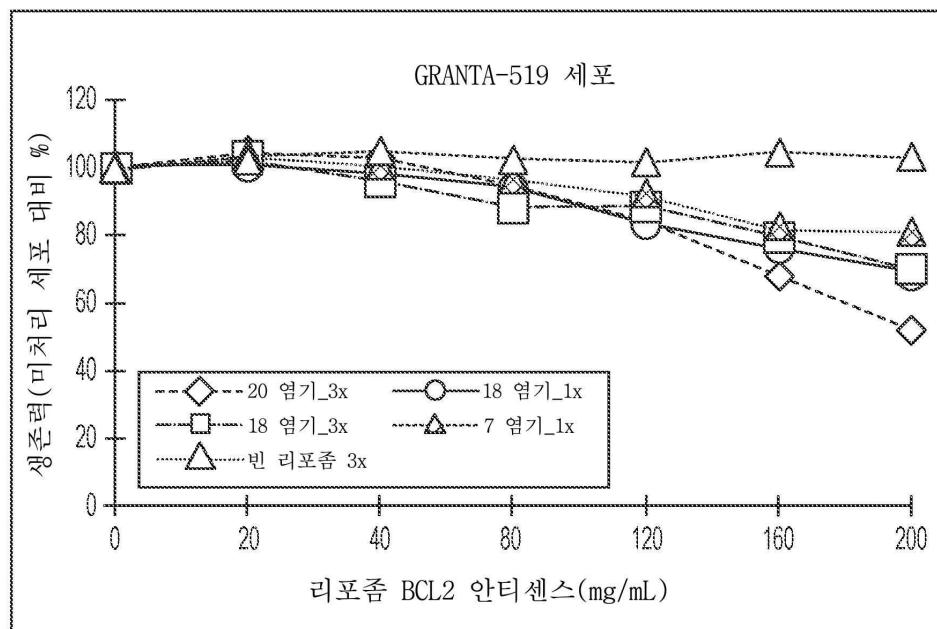
도면3b



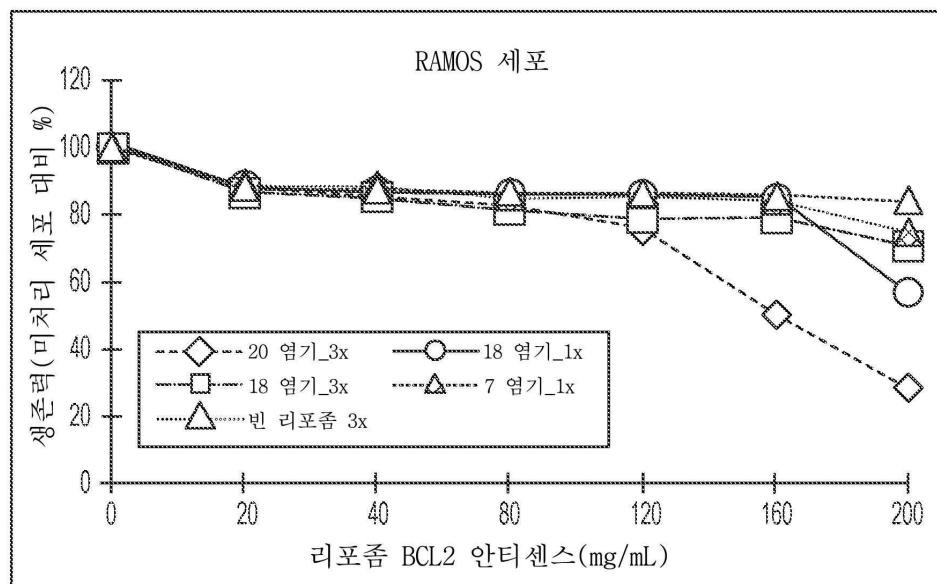
도면3c



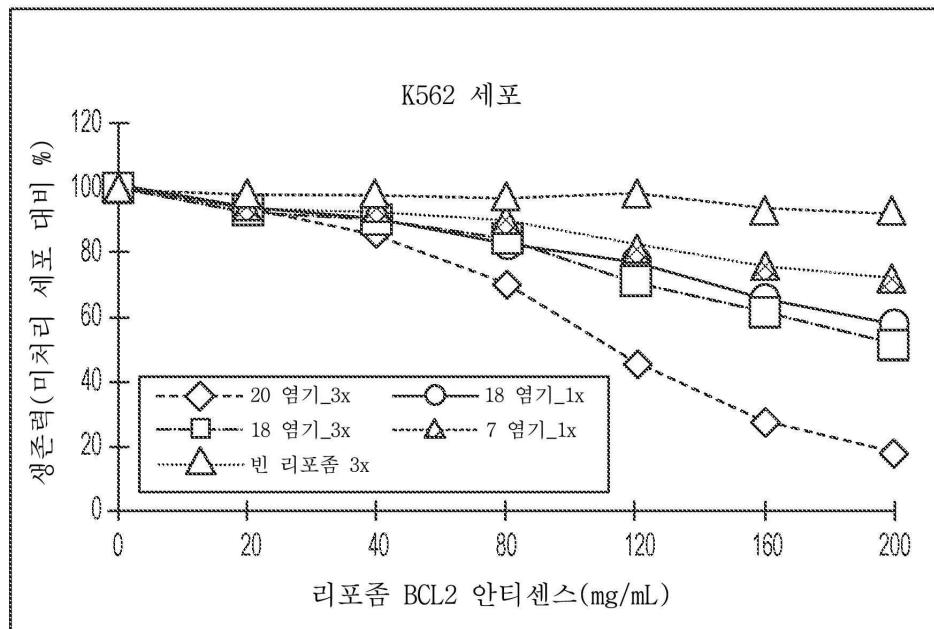
도면4a



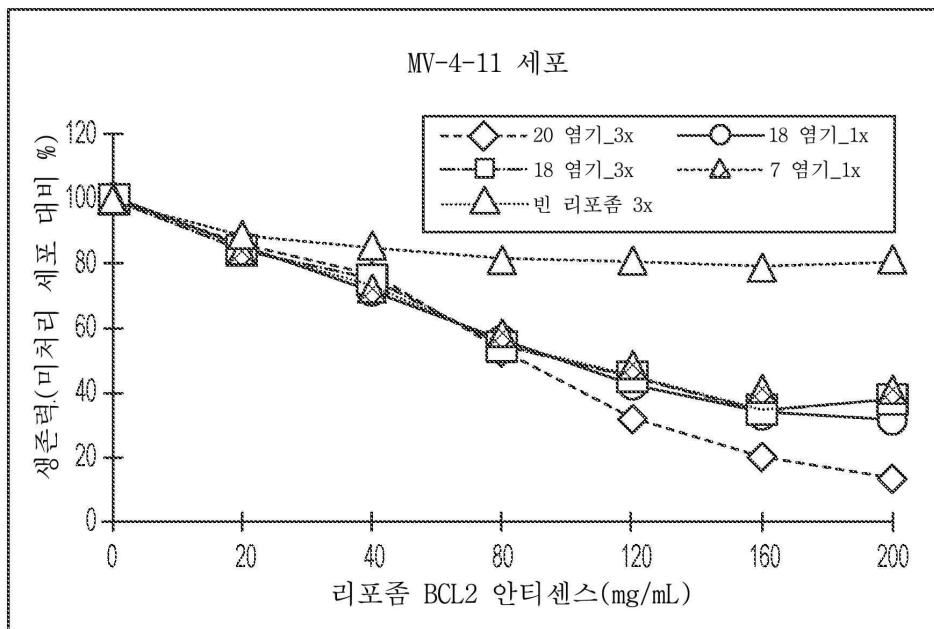
도면4b



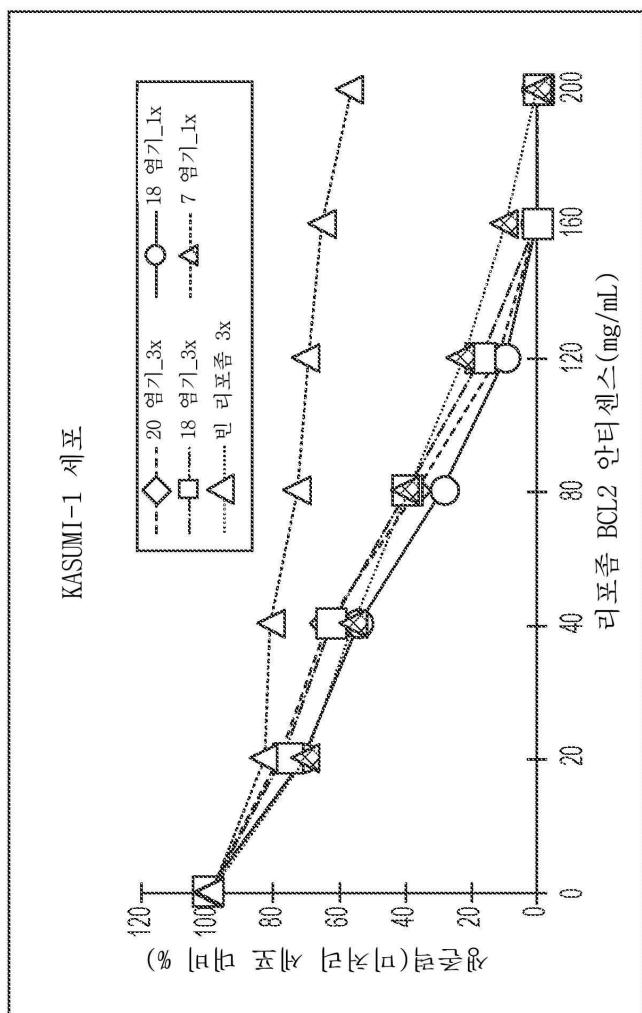
도면5a



도면5b



도면5c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BIO-PATH HOLDINGS, INC.

<120> P-ETHOXY NUCLEIC ACIDS FOR BCL2 INHIBITION

<130> BPH1.P0007WO

<140> Unknown

<141> 2018-04-19

<150> 62/487,302

<151> 2017-04-19

<160> 7

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 1

cagcgtgcgc catccttccc 20

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Synthetic polynucleotide

<400> 2

gcgtgcgcca tccttccc 18

<210> 3

<211> 7

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 3

tccttcc 7

<210> 4

<211> 6492

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (494)..(1213)

<400> 4

tttcgtgaa gcagaagtct gggaaatcgat ctggaaatcc tcttaatttt tactccctct 60
 ccccgcgact cctgattcat tggaaagttt caaatcagct ataactggag agtgcgtgaag 120

attgatggga tcgttgcc ttgcattttt tttggttta caaaaaggaa acttgacaga 180
 ggatcatgct gtacttaaaa aataacaacat cacagaggaa gtagactgat attaacaata 240
 cttactaata ataacgtgcc tcatgaaata aagatccgaa aggaatggaa ataaaaattt 300
 cctgcatttc atgccaaggg ggaaacacca gaatcaagt ttcggcgtga ttgaagacac 360
 cccctcgatcc aagaatgcaa agcacatcca ataaaaatagc tggattataa ctcctttct 420

ttctctgggg	gccgtgggt	gggagctggg	gcgagagggt	ccgttggccc	cggttgctt	480		
tcctctggga	agg atg	gct ggg	aga aca	ggg tac	aat aac	529		
Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg								
1	5	10						
gag ata	gtg atg	aag tac	atc cat	tat aag	ctg tcg	cag agg ggc tac	577	
Glu Ile	Val Met	Lys Tyr	Ile His	Tyr Lys	Leu Ser	Gln Arg Gly Tyr		
15	20	25						
gag tgg	gat gct	gga gat	gtg ggc	gcc gct	ccc ccc	cgg gcc gcc ccc	625	
Glu Trp	Asp Ala	Gly Asp Val	Gly Ala	Ala Pro	Pro Pro	Gly Ala Ala Pro		
30	35	40						
gca ccg	ggc atc	ttc tcc	tcc cag	ccc ggg	cac acg	ccc cat cca gcc	673	
Ala Pro	Gly Ile	Phe Ser	Ser Gln	Pro Gly	His Thr	Pro His Pro Ala		
45	50	55	60					
gca tcc	cg gac	ccg gtc	gcc agg	acc tcg	ccg ctg	cag acc ccg gct	721	
Ala Ser	Arg Asp	Pro Val	Ala Arg	Thr Ser	Pro Leu	Gln Thr Pro Ala		
65	70	75						
gcc ccc	ggc gcc	gcc gct	ggg cct	gct ctc	agc ccg	gtg cca cct gtg	769	
Ala Pro	Gly Ala	Ala Gly	Pro Ala	Leu Ser	Pro Val	Pro Pro Val		
80	85	90						
gtc cac	ctg acc	ctc cgc	cag gcc	gac gac	ttc tcc	ccg cgc tac	817	
Val His	Leu Thr	Leu Arg	Gln Ala	Gly Asp	Asp Phe	Ser Arg Arg Tyr		
95	100	105						
cgc cgc	gac ttc	gcc gag	atg tcc	agc cag	ctg cac	ctg acg ccc ttc	865	
Arg Arg Asp Phe Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe								
110	115	120						
acc gcg	cg gga	cgc ttt	gcc acg	gtg gtg	gag gag	ctc ttc	agg gac	913
Thr Ala	Arg Gly	Arg Phe	Ala Thr	Val Val	Glu Glu	Leu Phe	Arg Asp	
125	130	135	140					
ggg gtg	aac tgg	ggg agg	att gtg	gcc ttc	ttt gag	ttc ggt	ggg gtc	961

Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Gly Val

145	150	155	
atg tgt gtg gag agc gtc aac cgg gag atg tcg ccc ctg gtg gac aac			1009
Met Cys Val Glu Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn			
160	165	170	
atc gcc ctg tgg atg act gag tac ctg aac cgg cac ctg cac acc tgg			1057
Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp			
175	180	185	
atc cag gat aac gga ggc tgg gat gcc ttt gtg gaa ctg tac ggc ccc			1105
Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro			
190	195	200	
agc atg cgg cct ctg ttt gat ttc tcc tgg ctg tct ctg aag act ctg			1153
Ser Met Arg Pro Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu			
205	210	215	220
ctc agt ttg gcc ctg gtg gga gct tgc atc acc ctg ggt gcc tat ctg			1201
Leu Ser Leu Ala Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu			
225	230	235	
ggc cac aag tga agtcaacatg cctccccaa acaaatatgc aaaaggttca			1253
Gly His Lys			
ctaaaggagt agaaaataata tgcattgtca gtgatgtacc atgaaacaaa gctgcaggct			1313
gtttaagaaa aaataacaca catataaaca tcacacacac agacagacac acacacacac			1373
aacaattaac agtcttcagg caaaacgtcg aatcagctat ttactgccaa agggaaatat			1433
catttattt ttacattatt aagaaaaaaa gatttattt ttaagacag tcccatcaaa			1493
actcctgtct ttggaaatcc gaccactaat tgccaagcac cgttcgtgt ggctccacct			1553
ggatgttctg tgcctgtaaa catagattcg cttccatgt tttggccgg atcaccatct			1613
gaagagcaga cggatggaaa aaggacctga tcattggga agctggctt ctggctgctg			1673
gaggctgggg agaagggtt cattcacttg cattttttt ccctggggc ttttatattt			1733
acagagggag gttcctgtg ggggaagtc catgcctccc tggctgaag aagagactct			1793

ttgcatatga ctcacatgt gcatacctgg tgggaggaaa agagttggga acttcagatg	1853
gaccttagtac ccactgagat ttccacgcgg aaggacagcg atggaaaaaa tgcccttaaa	1913
tcatagggaaa gtatTTTT aagctaccaa ttgtgccgag aaaagcattt tagcaattta	1973
tacaatatca tccagtacct taagccctga ttgtgtatat tcataatattt tggatacga	2033
cccccaact cccaatactg gctctgtctg agtaagaac agaatcctct ggaacttgag	2093
gaagtgaaca ttccggtgac ttccgcatca ggaaggctag agttacccag agcatcaggc	2153
cggcacaagt gcctgcttt aggagaccga agtccgcaga acctgcctgt gtcccagctt	2213
ggaggcctgg tcctggaact gagccggggc cctcaactggc ctccctccagg gatgatcaac	2273
agggcagtgt ggtctccgaa tgtctggaa ctgtatggagc tcagaattcc actgtcaaga	2333
aagagcagta gaggggtgtg gctgggcctg tcaccctggg gccctccagg taggcccgtt	2393
ttcacgtgga gcatgggagc caagaccctt cttaagacat gtatcactgt agagggaagg	2453
aacagaggcc ctggggccctt cctatcagaa ggacatggtg aaggctggga acgtgaggag	2513
aggcaatggc caegggccat tttggctgta gcacatggca cgttggctgt gtggccttgg	2573
cccacctgtg agtttaaagc aaggcttaaa atgactttgg agagggtcac aaatcctaaa	2633
agaagcattt aagtgggggtg tcatggatta attgaccctt gtctatggaa ttacatgtaa	2693
aacatttatct tgcactgta gtttggttt atttggaaaac ctgacaaaaaa aaaagttcca	2753
ggtgtggaat atgggggtta tctgtacatc ctggggcatt aaaaaaaaaa tcaatggtg	2813
ggaactataa agaagtaaca aaagaagtga catcttcagc aaataaacta gggaaatttt	2873
ttttcttcca gttttagaattc agccttgaaa cattgtatggc ataactctgt ggcattattt	2933
cattatatac catttatctg tattaacttt ggaatgtact ctgttcaatg tttatgtct	2993
tgggtgatattt ttcgaaagct gctttaaaaa aatacatgca tctcagcggtt ttttgggg	3053
taattgtatt tagttatggc ctatacacta tttgtgagca aaggtgatcg ttttctgttt	3113
gagatTTTTa tctcttgatt ctcaaaagc attctgagaa ggtgagataa gccctgagtc	3173
tcagctaccc aagaaaaacc tggatgtcac tggccactga ggagctttgt ttcaaccaag	3233
tcatgtgcat ttccacgtca acagaattgt ttattgtac agttatatct gttgtccctt	3293
tgaccttggtt tcttgaaggt ttccctcgatcc ctggcaatt ccgcatttaa ttcatggat	3353
tcaggattac atgcatgttt gtttaaaccctt atgagattca ttcatggat aatccagatg	3413
gcaaatgacc agcagattca aatctatggt ggtttgaccc tttagagatg tcttacgtg	3473
gcctgtttca acacagaccc acccagagcc ctcctgcctt cttccgcgg gggctttctc	3533
atggctgtcc ttccagggtct tcctgaaatg cagtggtgt tacgctccac caagaaagca	3593
ggaaacctgt ggtatgaagc cagacccccc cggcgggcct caggaaacag aatgatcaga	3653

ccttgaatg attctaattt ttaagcaaaa tattattttt taaaagggttt acatgtcaa	3713
agtgtgaat atggaatac caatccgtg ctgcatacct gccaaatca tttaatggaa	3773
gtcagttgc agtatgtcc acgtggtaag atccccaag ctgcattaga agtaacaatg	3833
aagaacgtgg acgttttaa tataaaggct gtttgttctt tttttttgt tcaaacggaa	3893
ttcacagagt attgaaaaa tgtatatata ttaagggc acggggcata attgtggct	3953
ggctgcctt tgctgtggg tttgttacc tggtttaat aacagtaaat gtgccagcc	4013
tcttggccc agaactgtac agtattgtgg ctgcacttc tctaagagta gttgttg	4073
catttcctt attgttaaaa acatgttaga agcaatgaat gtatataaaa gcctcaacta	4133
gtcattttt tcicctcttc ttttttca ttatatactaa ttatgtca gttggcaac	4193
agagaaccat ccctatttt tattgaagag ggattcacat ctgcacatc actgtcttt	4253
atgaatgaaa aaacagtct ctgtatgtac tcctttac actggccagg gtcagagtta	4313
aatagagtat atgcacttt caaattgggg acaaggcctc taaaaaaagc cccaaaagga	4373
gaagaacatc tgagaacctc ctggccctc ccagtcctc gtcacaaa tactcccaa	4433
gagaggccag aatgacagct gacagggtct atggccatcg gtcgtctcc gaagatttg	4493
cagggcaga aaactctggc aggcttaaga tttgaataa agtcacagaa ttaaggaagc	4553
acctaattt agtcaaaca agacgccaac attctctca cagtcactt acctctgt	4613
gttcagatgt ggcctccat ttatgtca tctttttt attagtaaat gcttatcatc	4673
taaagatgta gctctggccc agtggaaaaa attagaaatg gattataaat cgagaggagt	4733
tataataatc aagattaaat gtaaataatc agggcaatcc caacacatgt ctgcattca	4793
cctccaggat ctattgagtg aacagaattt caaatagtc ctattgtaa ttgaacttat	4853
cctaaaacaa atagttata aatgtgaact taaactctaa ttaattccaa ctgtacttt	4913
aaggcagtgg ctgttttag actttcttat cacttatagt tagtaatgta cacctactt	4973
atcagagaaaa aacagggaaag gtcgaaata caagccatc taagggaaatt agggagt	5033
ttgaaattct attctgatct tattctgtgg tgtctttgc agccagaca aatgtggta	5093
cacactttt aagaatatacattt gtcaagctt tgaagggtcc aatcagatct	5153
ttattgttat tcaatttgg tcttcaggg atttttttt taaatttatta tgggacaaag	5213
gacattttttt ggaggggtgg gagggaggaa gaattttaa atgtaaaaca ttcccaagtt	5273
tggatcaggg agttggaaatg tttcagaata accagaacta agggatgaa ggacctgtat	5333
tgggtcgat gtgatgcctc tgcagaagaac cttgtgtgac aaatgagaaaa cattttgaag	5393
tttgtggatc gacctttaga ttccagagac atcagcatgg ctcaaagtgc agtccgttt	5453
ggcagtgc当地 tggataaat ttcaagctgg atatgtctaa tgggtattta aacaataaat	5513

gtgcagttt aactaacagg atatthaatg acaacccctt ggtggtagg gacatctgtt	5573		
tctaaatgtt tattatgtac aatacagaaa aaaattttat aaaattaagc aatgtgaaac	5633		
tgaatggag agtgataata caagtcctt agtcttaccc agtgaatcat tctgttccat	5693		
gtcttggac aaccatgacc ttggacaatc atgaaatatg catctcaactg gatgcaaaga	5753		
aaatcagatg gagcatgaat ggtactgtac cggttcatct ggactgcccc agaaaaataa	5813		
cttcaagcaa acatcctatc aacaacaagg ttgttctgca taccagctg agcacagaag	5873		
atggaaacac tggggagga tggaaaggct cgctcaatca agaaaattct gagactatta	5933		
ataaataaga ctgtagtgt aatactgagt aaatccatgc acctaaacct tttggaaaat	5993		
ctgccgtgg ccctccagat agtcatttc attaagttt tcctccaag gtagaatttg	6053		
caagagtgac agtggattgc atttctttg ggaaagctt ctttggtgg ttttgttat	6113		
tatacctct taagtttca accaaggttt gctttgttt tgagttactg gggttatttt	6173		
tgtttaaat aaaaataagt gtacaataag tgttttgta ttgaaagctt ttgttatcaa	6233		
gatttcata cttaacattt ccatggctt tttaagatt gatacttttta agagggtggct	6293		
gatattctgc aacactgtac acataaaaaa tacggtaagg atacttaca tggtaaggt	6353		
aaagtaagtc tccagttggc caccattagc tataatggca ctttgttgt gttgttggaa	6413		
aaagtcacat tgccattaaa cttccttgt ctgtctagtt aatattgtga agaaaaataa	6473		
agtacagtgt gagatactg	6492		
<210> 5			
<211> 239			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 5			
Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met			
1	5	10	15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala			
20	25	30	
Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile			
35	40	45	
Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp			
50	55	60	
Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala			

65 70 75 80

Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr

85 90 95

Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe

100 105 110

Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly

115 120 125

Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp

130 135 140

Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu

145 150 155 160

Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp

165 170 175

Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn

180 185 190

Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro

195 200 205

Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala

210 215 220

Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Gly His Lys

225 230 235

<210> 6

<211> 1207

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (494)..(1111)

<400> 6

tttctgtgaa gcagaagtct gggaaatcgat ctggaaatcc tcctaatttt tactccctct 60

ccccgcgact cctgattcat tggaaagttt caaatcagct ataactggag agtgctgaag 120

attgatggga tcgttgcctt atgcatttgt tttggttta caaaaaggaa acttgacaga 180

ggatcatgct gtacttaaaa aataacaacat cacagaggaa gtagactgat attaacaata 240

cttactaata ataacgtgcc tcatgaaata aagatccgaa aggaatttgg	300
cctgcacatc atgccaaggg ggaaacacca gaatcaagt ttccgcgtga ttgaagacac	360
ccccctcgcc aagaatgcaa agcacatcca ataaaatagc tggattataa ctccctttct	420
ttctctgggg gccgtgggt gggagctggg gcgagaggta cggttgccc cggttgcttt	480
tcctctggga agg atg gcg cac gct ggg aga aca ggg tac gat aac cgg	529
Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg	
1 5 10	
gag ata gtg atg aag tac atc cat tat aag ctg tcg cag agg ggc tac	577
Glu Ile Val Met Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr	
15 20 25	
gag tgg gat gcg gga gat gtg ggc gcc gcg ccc ccg ggg gcc gcc ccc	625
Glu Trp Asp Ala Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro	
30 35 40	
gca ccg ggc atc ttc tcc tcc cag ccc ggg cac acg ccc cat cca gcc	673
Ala Pro Gly Ile Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala	
45 50 55 60	
gca tcc ccg gac ccg gtc gcc agg acc tcg ccg ctg cag acc ccg gct	721
Ala Ser Arg Asp Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala	
65 70 75	
gcc ccc ggc gcc gcc gcg ggg cct gcg ctc agc ccg gtg cca cct gtg	769
Ala Pro Gly Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val	
80 85 90	
gtc cac ctg acc ctc ccg cag gcc ggc gac gac ttc tcc ccg ccg tac	817
Val His Leu Thr Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr	
95 100 105	
cgc ccg gac ttc gcc gag atg tcc agc cag ctg cac ctg acg ccc ttc	865
Arg Arg Asp Phe Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe	
110 115 120	
acc gcg cgg gga ccg ttt gcc acg gtg gtg gag gag ctc ttc agg gac	913

Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp
 125 130 135 140
 ggg gtg aac tgg ggg agg att gtg gcc ttc ttt gag ttc ggt ggg gtc 961
 Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val
 145 150 155
 atg tgt gtg gag agc gtc aac cgg gag atg tcg ccc ctg gtg gac aac 1009
 Met Cys Val Glu Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asn

 160 165 170
 atc gcc ctg tgg atg act gag tac ctg aac cgg cac ctg cac acc tgg 1057
 Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp
 175 180 185
 atc cag gat aac gga ggc tgg gta ggt gca ctt ggt gat gtg agt ctg 1105
 Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp Val Gly Ala Leu Gly Asp Val Ser Leu
 190 195 200

 ggc tga ggccacaggt ccgagatgcg ggggttggag tgccgggtggg ctcctgggc 1161
 Gly
 205
 aatggaggc tgtggagccg gcgaaataaa atcagagtgttgcata 1207
 <210> 7
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1 5 10 15
 Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala

 20 25 30
 Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
 35 40 45
 Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp
 50 55 60
 Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala

65	70	75	80
Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr			
85	90	95	
Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe			
100	105	110	
Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly			
115	120	125	
Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp			
130	135	140	
Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Gly Val Met Cys Val Glu			
145	150	155	160
Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp			
165	170	175	
Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn			
180	185	190	
Gly Gly Trp Val Gly Ala Leu Gly Asp Val Ser Leu Gly			
195	200	205	