(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[6]
A61K 9/127

(45) 공고일자 2005년11월22일
(11) 등록번호 10-0530534
(24) 등록일자 2005년11월16일

(21) 출원번호 10-1999-7008274
(22) 출원일자 1999년09월11일
번역문 제출일자 1999년09월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US1998/004891
국제출원일자 1998년03월12일
(65) 공개번호 10-2000-0076182
(43) 공개일자 2000년12월26일
(87) 국제공개번호 WO 1998/40052
국제공개일자 1998년09월17일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 가나, 감비아, 기니 비사우, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탐, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 08/820,337 1997년03월12일 미국(US)

(73) 특허권자
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미국 캘리포니아주 94607-5200 오크랜드 플로어 12 프랭클린 스트리트 1111

(72) 발명자
맥도날드도날드엠.
미국캘리포니아94118샌프란시스코파커애비뉴67

맥린존
미국캘리포니아94065레드우드시티레이크쇼어드라이브782

더스톤오.가빈
미국캘리포니아94122샌프란시스코10애버뉴1839

바룩피터

미국캘리포니아94122샌프란시스코9애버뉴1271

(74) 대리인 장용식
박종혁

심사관 : 문선흡

(54) 혈관형성 내피세포를 표적지향화하는 양이온성 지질 조성물

요약

혈관형성 내피세포는 지질/DNA 복합체 또는 이들의 성장을 저해하거나 촉진함으로써 표적 세포에 영향을 주는 물질을 포함하는 양이온성 리포솜으로 선택적으로 표적지향화된다. 검출가능한 표지를 함유하는 양이온성 리포솜을 투여함에 의하여 혈관형성 부위를 정확히 알아낼 수 있다. 복합체는 혈관형성 내피 세포의 환경에서 선택적으로 그리고 배타적으로 활성화되는 프로모터로 이루어지는 뉴클레오티드 구성체를 포함할 수 있다.

색인어

혈관형성 내피세포, 지질 복합체, 양이온성 리포솜, 표적지향화

명세서

기술분야

본 발명은 다양한 종류의 질환 및 질병의 치료와 진단에 적용될 수 있다. 본 발명이 이것에 제한되지는 않지만, 이것은 암, 상처 치유, 및 다양한 만성 염증질환의 치료에 사용될 수 있다. 일반적으로, 현재로서는 이들 각각은 암 조직의 외과적 제거, 상처의 봉합 및 염증을 일으킨 관절의 외과적 제거와 같은 물리적 수단에 의해서 직접 치료된다. 나아가, 이들 각각은 화학적 수단에 의하여 치료될 수 있다. 화학요법은 암에 적용되고, 성장 호르몬은 상처 치유에 적용되고, 항 염증약물은 만성 염증 상태에 적용된다. 이것들, 및 관련된 치료는 일반적으로 암, 상처, 또는 염증이 있는 조직을 직접 치료하는 것에 관한 것이다. 종래의 치료 양식과 본 발명의 차이점에 대한 이해를 돕기 위하여, 본 분야에서 현재 사용되는 치료기술의 간결하고 일반적인 설명을 제공한다.

배경기술

암 치료

"암"이라는 용어는 치료, 예후 및 치료 가능성이 다른 다양한 질환을 포함한다. 진단 및 치료법은 종양이 시작된 부위, 퍼진 정도, 종양이 차지하는 부위, 환자의 생리학적 상태 및 예후에 달려있다. 일단 진단되면, 종양은 질환의 정도를 정하고 암 환자 집단을 치료의 가능성이 적은 순서에 따라 군으로 나누기 위하여 외과적 기술, 신체 검사, 조직 병리학, 조영술 및 실험 평가를 사용하는 것을 포함하는 과정인 "단계 나누기"가 이루어진다. 이런 시스템을 사용해서 환자에 대한 치료 계획을 세우고 예후를 결정한다(Stockdale, F., 1996, "Principles of Cancer Patient Management." In: Scientific American Medicine, vol. 3, Dale, D.C., and Federman, D.D.(eds.). Scientific American Press, New York). 암의 형태나 단계로 수술, 방사선 요법 및 화학요법의 3가지 일반적 형태의 치료 중에서 어떤 것을 사용할 지 결정할 수 있다. 적극적이고 결합된 양식의 치료 계획도 또한 선택될 수 있다. 이를 위하여, 초기 종양을 제거하기 위해 수술을 사용할 수 있고, 남은 세포는 방사선 요법이나 또는 화학 요법으로 처리될 수 있다(Rosenberg, S.A., 1985, "Combined-modality therapy of cancer: what is it and when does it work?" New Engl. J. Med. 312:1512-14).

수술은 암의 진단과 치료에서 중심역할을 한다. 일반적으로, 수술법은 생검을 하는데 필요하며, 수술은 대부분의 암 환자에게 결정적인 치료일 수 있다. 수술은 또한 종양 부피를 감소시키고, 전이부를 잘라내고, 응급상황을 해결하고, 증세를 완

화시키고 회복시키기 위하여 사용한다. 암 치료에 대한 초기 외과적 기술은 직접 눈으로 보면서 암을 잘라내는 수술분야의 개발과 관련되었으나, 현재의 기술은 내시경 수단에 의해 절개를 행하는 것을 허용한다. 암 치료에서 1 차적 관심사는 수술위험에 대한 고려이다(Stockdale, F., 상기문헌).

방사선 요법은 암의 초기 및 회복기 치료 모두에서 중요한 역할을 담당한다. 원격 방사선 요법(메가볼트 방사선 요법) 및 단거리 요법(간질성 및 동내(洞內) 방사선 요법)이 보통 사용된다. 원격 방사선 요법에서는 X-레이 형태의 전자기 방사선이 통상적인 악성 종양을 치료하기 위해 가장 보편적으로 사용되지만, X-레이와 유사하지만 라듐, 코발트 및 다른 원소의 방사성 동위원소에 의해 방출되는 전자기 방사선의 형태인 감마선도 또한 사용된다. 방사선 요법은 광자라고 불리는, 세포내에서 이온화되서 악성 및 정상 조직 모두에 손상을 주는 불연속 에너지 파킷(packet)형태의 에너지를 조직에 전달한다. 이온의 표적은 대부분 통상적으로 DNA이다; 방사선 요법은 악성 조직과 비-악성 조직사이에 방사선 손상이 균일하지 않다는 사실-- 빠르게 분열하는 세포가 정적인 세포보다 DNA에 더 민감하다는 사실을 이용한다(Pass, H.I., 1993, "Photodynamic therapy in oncology: mechanism and clinical use," J. Natl. Cancer Instit. 85:443-56). 방사선 요법은 뛰어난 이점은 물론 중대한 독성과도 관계가 있다. 방사선은 방사선이 유일하게 실행가능한 국소 치료법이고, 종양 영역이 광범위한 경우에 방사선이 유일하게 실현가능한 국소 양식인 특정 해부학상 영역(예컨대, 종격)에서 바람직하다. 방사선은 또한 환자가 수술을 기피하거나, 환자의 의학적 상태 때문에 수술을 시행할 수 없을 경우에 또한 사용될 수 있다. 방사선 치료는 초기 및 말기 방사선 효과를 초래할 수 있는 조직 손상을 포함한다. 초기 효과(방사선 요법의 급성 독성)는 피부의 홍반, 표피탈락, 인후염, 메스꺼움, 탈모 및 골수생성 저해를 포함하고, 말기 효과는 조직 괴사 및 섬유증을 포함하며, 통상 방사선 요법의 독성 한계를 결정한다(Stockdale, F., 상기문헌).

현재 사용되는 거의 모든 화학요법제는 DNA의 합성, DNA 및 RNA 합성을 위한 전구체의 제공, 또는 유사분열을 방해하고, 이렇게 해서 증식중인 세포를 표적지향화 한다(Stockdale, F., "Cancer growth and chemotherapy", 상기문헌). 동물 종양연구 및 사람 임상실험은 약물병용이 단일약제보다 높은 목적 반응률 및 긴 생존률을 초래한다는 것을 나타냈다(Frei, E. III, 1972, "Combination drug therapy: presidential address," Cancer Res. 32:2593-2607). 병용약물 요법은 알킬화제, 항대사제 및 항생제를 포함하는 다수 약물의 다양한 작용 및 세포독성 기전을 이용한다(Devita, V.T.등의, 1975 "Combination versus single agent chemotherapy: a review of the basis for selection of drug treatment of cancer," Cancer 35:98-110). 환자의 생리적 상태, 종양의 성장 특성, 종양 세포 집단의 이질성 및 다수약물에 대한 종양의 내성현상은 화학요법의 효능에 영향을 미친다. 일반적으로, 화학요법은 표적지향성이 아니며(이 기술이 개발되고 있기는 하다. 예컨대 Pastan, I.등의 1986, "Immunotoxins," Cell 47:641-648), 골수 저해, 위장염, 메스꺼움, 탈모, 간 또는 폐 손상, 또는 불임 등과 같은 부작용이 발생할 수 있다.

상처 치유

상처 치유는 재생 과정의 균형을 맞추기 위하여 다양한 생화학적 케스케이드(cascade) 반응의 미세하게 조절된 제어를 요구하는 다양한 종류의 세포형을 포함하는 조직복구 및 개조의 복잡하고 긴 과정이다. 상처 치유는 일반적으로 3상으로 나누어진다.: 염증, 증식 및 성숙(Waldorf, H., and Fewkes, J., 1995, "Wound healing," Adv. Dermatol. 10:77-96). 상기 과정은 여러 형태의 세포가 상처 부위로 이주하는 단계, 내피세포 및 섬유아세포의 성장을 자극하는 단계 및 새로운 혈관의 형성 및 세포외 간질이 발생하는 단계를 포함한다. 이 과정의 정확한 작용은 다양한 시토킨의 생물학적 활성에 의존한다(Bennett, N.T., and Schultz, G.S., 1993, "Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptor," Am. J. Surg. 165:728-37). 영양, 면역계, 산소, 혈류량, 감염, 면역 저해 및 적혈구의 감소는 모두 상처 치유에서 영향력이 있는 인자들이다(Witney, J.D., 1989, "Physiological Effects of tissue oxygenation on wound healing," Heart Lung 18:466-474).

상처 치유의 속도뿐 아니라 질도 통상적으로는 원 상처의 형태와 정도에 의존한다. 일반적으로 3가지 형태의 방법을 사용하여 상처를 치료하는데, 이들 각각은 손상된 조직을 치유하는 것에 관한 것이다. 상처의 밀봉은 봉합에 의하여 가장 보편적으로 이루어지나, 테잎, 봉합기 또는 전기소작기도 또한 사용될 수 있다(Wheeless, C.R., 1996, Wheeless' Textbook of Orthaedics)(Garrett, W.E.등의 1984, J. Hand. Surg. 9(5):683-92). 피부 테잎 및 다양한 봉합은 각각 상처의 초기 봉합에 있어서 특정한 장점과 단점을 나타낸다. 피부 테잎은 염증반응을 덜 일으키나 상피하의 상처 공간을 밀봉할 수 없고, 한편 다양한 봉합에 의해 유발된 염증 반응이나 이로 인한 흉터는 봉합 바늘, 봉합 재료의 지름 및 이것이 단일사인지 또는 짜여진 봉합인지에 의존한다(Simpson, W.R., 1977, "Physiological principles of therapy in head and neck cutaneous wounds," Laryngoscope 87:792-816).

상처에 있어서, 접종된 미생물의 크기, 생물체의 독성 및 숙주의 항미생물 방어기전이 감염이 발생할 것인지를 결정한다. 따라서, 항생제는 상처의 치료에서 또한 치료적 가치가 있을 수 있다(Edlich, R.F.등의, 1986, "Antimicrobial treatment of minor soft tissue lacerations: a critical review, " Emergency Medical Clinics of North America 4(3):561-80). 적

당한 항생제와 투여경로를 선택하기 위하여, 그리고 부작용을 피하기 위하여 각 항생제의 약리학적 작용을 이해하여야 한다(Simpson, W.R., 상기문헌). 최근 결과는 항생제 요법이 세포의 증식과 분화를 보다 빨리 진행시키고 따라서 상처 복구를 증진시킨다는 것을 제안한다(Barrow, R.E.등의 1994, "Efficacy of cefazolin in promoting ovine tracheal epithelial repair," Respiration 61:231-5; Maeder, K.등의 1993, "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus(MRSA) colonization in patients with spinal cord injury," Paraplegia 31:639-44). 단백질 분해 효소도 또한 오염된 상처의 항생제 치료에 보조약으로써 사용돼왔다(Rodeheaver, G.T.등의 1978, "Mechanisms by which proteolytic enzymes prolong the golden period of antibiotic action," Am. J. Surg. 136(3):379-82).

bFGF, EGF, PDGF 및 TGF-베타를 포함하는 다양한 시토킨의 국소투여는, 단독으로 또는 병용하여, 상처치유를 상당하게 촉진시킬 수 있다(Moulin, V., 1995,"Growth factors in skin wound healing," Eur. J. Cell. Biol. 68:1-7). 성장 인자는 세포를 상처로 유인하고, 그들의 증식을 자극하고, 세포외 간질 축적에 지대한 영향을 미친다. 재조합 기술에 의하여 이들 시토킨을 대량 생산하는 능력이 개발되었기 때문에, 많은 연구는 성장 인자들이 정상 및 손상된 치유모델에서 조직 회복의 모든 양상을 증진시킨다는 것을 증명했다(예컨대, Schultz, G.S등의 1987,"Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor-alpha and vaccinia growth factor," Science 235:350-2; Deuel, T.F.등의 1991, "Growth factor and wound healing: platelet derived growth factor as a model cytokine," Annu. Rev. Med. 42:567-84).

전임상 시험은 성장 인자 치료가 때때로 통계학적으로 유의성있는 조직 회복의 개선을 초래했다고 나타냈으나, 이 결과가 임상적으로 유의성이 있는지 명확하지 않으며, 새로운 임상시험은 손상된 치유의 특정 형태에 대한 성장인자를 표적지향화 하는 것에 초점을 맞추어야 한다고 제안되었다(Greenhalgh, D.G., 1996,"The role of growth factors in wound healing," J. Trauma 41:159-67).

만성 염증

자연, 체액성 및 세포 면역 기전은 모두 만성 염증 질환의 발병학에 연관된다(Seymour, G.J.등의 1979, " The immunopathogenesis of progressive chronic inflammatory periodontal disease, 1979," J. Oral Pathol. 8:249-65). 자가면역질환은 림프구 기능 이상의 결과이다. T세포 기능의 이상은 세포-매개성 면역으로 인한 질환의 원인이 되고, 항체 생성에 있어서 헬퍼 T세포의 활성은 자가항체형성을 유발할 수 있다. 자가 면역 질환에서 헬퍼 T세포의 중심역할은 특정 HLA 분자와 많은 질환의 연관에 의하여 지지된다. 관용의 유지에 있어서 하나 이상 단계의 기능이상은 자가면역을 초래한다(Robinson, D.R., 1996," Immunologic Tolerance and Autoimmunity" in: Scientific American Medicine, Vol. 2, Section VI, Scientific American Press, New York p.1-11).

몇몇 형태의 치료가 자가면역질환의 치료에 사용되고, 이들은 모두 발병한 조직에서 면역 반응을 약하게 하는 것에 관한 것이다. 예를들면, 자가면역질환인 류마티스 관절염에 대한 치료는 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs) 또는 글루코코르티코이드와 같은 항 염증제, 금 염과 같은 약제를 포함하는 일시적 완화제(remission), 및/또는 시클로포스파미드와 같은 면역저해 약물을 이용할 수 있다. 또한 정형외과적 수술을 사용하여 염증의 진행 중 손상된 관절을 교체할 수도 있다(Gilliland, B.C., 및 Mannik, M., 1983,"Rheumatoid Arthritis" In: Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw Hill, New York, P. 1977-1984). 최근의 연구는 류마티스 관절염의 치료에서 TNF 알파의 사용과 같은 새로운 치료의 가능성을 제시하고 이것 역시 발병한 조직에 관한 것이다.(Brennan, F.M.등의 1995, "Cytokine expression in chronic inflammatory disease," Br. Med. Bull. 51:368-384).

알러지는 환경 항원에 대한 면역 반응이 조직 염증과 기관 이상을 유발하는 상태를 가리킨다. 자가 면역 질환과 같이, 데이타는 알러지 질환에서 면역계의 몇몇 성분들의 상호작용을 제안한다. 알러지 질환의 발현의 다양성은 다른 종류의 면역학적 인자 기전에 기인하고, 이것은 조직 손상의 특정한 패턴을 일으킨다(Beer, D.J.등의 , 1996. "Allergy" In: Scientific American Medicine, Vol. 2, Section Ⅶ, Scientific American Press, New York, P. 1-29). 각 알러지 질환의 임상적 특징은 발병한 기관이나 조직에서 면역학적으로 매개된 염증 반응을 반영한다(예컨대, 천식은 폐에서의 염증 반응을 반영한다.)

몇몇 치료 전략을 사용하여 면역-매개 알러지 질환을 치료하고, 이것은 모두 염증이 있는 조직에서의 면역반응을 감소하는 것에 관한 것이다. 예를들면, 천식의 치료에 있어서, 치료 요법은 환경조절, 약물요법 및 알러겐 면역 요법을 포함할 수 있다(Beer, D.J. 등의 1996, "Allergy," In: Scientific American Medicine, Vol. 2, Section VII, Scientific American Press, New York, P. 1-29). 천식의 치료에 있어서, 원인 물질의 제거가 염증을 예방하는데 가장 성공적인 수단이다. 그러나, 이것이 가능하지 않은 경우가 종종 있고, 따라서 여러 계열의 약물들이 사용돼 왔다. 이것은 메틸산틴(기관지 확장용), 아드레날린 흥분약(β-아드레날린 수용체의 흥분, 기관지 확장제), 글루코코르티코이드(폐에서의 염증의 완화), 크로

몬(cromones;비만 세포의 하향조절, 폐에서 염증의 완화) 및 항 콜린 작동약(기관지 확장제)를 포함한다(McFadden, E.R., Jr., and Austen, K.F., "Lung disease caused by immunologic and environmental injury," In: Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw Hill, New York, p. 1512-1519). 알러젠으로 추정되는 물질로 탈감작 또는 면역시키는 것도 또한 천식에서 염증을 감소하기 위해서 제안돼 왔다(McFadden and Austen, op. cit; Jacquemin, M.G., and Saint-Remy, J.M., 1995, "Specific down-regulation of anti-allergen IgE and IgG antibodies in humans associated with injections of allergen-specific antibody complexes," Ther, Immunol. 2:41-52).

현재의 치료-면역학

상기된 치료법은 성공도가 일정하지 않았다. 많은 경우에 성공률이 완전하지 않았기 때문에 더 나은 치료를 개발하고자 연구가 계속됐다. 전망이 있는 연구분야는 면역계에 영향을 미치는 것과 관련된다. 유전 공학 및/또는 화학적 자극의 사용에 의하여, 예컨대 항체가 암을 파괴하는 것과 같이 신체 자신의 면역계가 질환을 치료하기 위해서 면역 반응을 변형시키고/또는 자극하는 것이 가능하다. 이런 형태의 치료는 생물학적 과정을 이용해서 질환과 싸우게 한다는 점에서 상기한 치료법과 구별된다. 그러나, 이 치료는 생성된 항체가 암세포를 직접 공격한다는 의미에서 여전히 직접 치료이다.

본 발명은 본 발명이 암, 손상된 또는 염증이 있는 세포에 직접 작용하는 것을 포함하지 않는다는 점에서 보통 치료와 기본적 차이를 갖는 치료에 이용될 수 있다.

최소한 이론적이라도, 혈관형성을 저해하여 혈관형성과 연관된 암 또는 염증을 치료하는 것이 가능하다는 것은 인식되어 있다. 이것에 관련된 현재 의견의 전형적 예는 1995년 9월 28일 발행된 PCT 공개공보 WO 95/25543에서 논의된다. 이 공개된 출원은 혈관형성 내피세포의 표면에 있다고 믿어지는 항원과 결합하는 항체를 투여함으로 혈관형성을 저해하는 것을 개시한다. 구체적으로, 그 출원은 일반적으로 세포 부착으로 일컬어지는 세포-세포 및 세포-세포외 간질 상호작용을 매개하는 것으로 믿어지는 막 수용체인 $\alpha_v\beta_3$ 과 결합하는 항체를 투여하는 것을 개시한다. 이 수용체를 봉쇄함으로써 혈관생성을 저해하여 이에 의하여 암과 염증을 치료하고자 한다.

발명의 상세한 설명

(발명의 개요)

약제를 혈관형성 내피세포에 선택적으로 송달하는 방법이 개시된다. 본 방법은 바람직하게는 순환계, 보다 바람직하게는 동맥내로 양이온성 지질과 혈관형성을 촉진하거나 저해하는 화합물 및/또는 검출가능한 표지(lable)를 포함하는 양이온성 리포솜(또는 폴리뉴클레오타이드/지질 복합체)을 주사하는 것을 포함한다. 투여 후, 양이온성 리포솜은 혈관형성 내피세포와 선택적으로 결합하는데, 즉 혈관형성을 수행하지 않는 정적인 대응 내피세포보다 혈관형성 내피세포에 5배 이상의 비(바람직하게는 10배 이상)로 결합한다는 것이다. 리포솜(또는 폴리뉴클레오타이드/지질 복합체)이 혈관형성 내피세포와 결합할 때, 그들은 내피세포에 의하여 유입되고 바람직한 효과를 나타낸다. 이 물질은 내피세포를 파괴하고, 혈관형성을 더 촉진하고, 응집을 촉진하고 및/또는 적절한 수단으로 검출될 수 있도록 내피세포에 꼬리표지를 할 수 있다. 혈관형성 내피세포에 영향을 주는 물질은 발현됐을 때 혈관형성을 촉진하거나 저해하는 단백질을 코드화하는 DNA와 같은 핵산 서열일 수 있다. 핵산 서열은 바람직하게는 프로모터에 작동가능하게 연결된 벡터내에 포함되고, 이 프로모터는 바람직하게는 혈관형성 내피세포 내에서만 활성이 있거나 또는 이 세포내에 화합물을 투여해서 활성화 될 수 있고, 이에 의하여 프로모터를 활성화시킴으로써 유전자를 발현 또는 발현되지 않게 하는 것이 가능하다. 본 발명의 더욱 상세한 설명과 칼라 사진이 발명자인 Thurston등의 논문인 "Cationic Liposomes Target Angiogenic Endotheial Cells in Tumors and Inflammation in Mice," J. Clin. Invest., April 1, 1998에 제공된다.

양이온성 지질 및 혈관형성 저해제로 이루어지는 저해제/지질 복합체가 개시되고, 복합체는 혈중에서 대응 정상 내피세포와 비교하여 혈관형성 내피세포에 대해 보다 큰 친화도를 갖는 것으로 특징 지워진다. 표지는 복합체중의 어디라도 존재할 수 있고, 양이온성 지질, 저해제, 양자 모두 또는 다른 곳에 부착될 수도 있다.

본 발명은 또한 양이온성 지질과 뉴클레오티드 서열로 이루어진 뉴클레오티드/양이온성 지질 복합체를 포함한다. 서열은 혈관형성에 영향을 주는 단백질을 코드화한다. 복합체는 혈중에서 대응 정상 내피세포와 비교하여 맥관형성 내피세포에 더 큰 친화도를 갖는 것을 특징으로 한다. 서열은 바람직하게는 혈관형성 내피세포내에서 선택적으로 활성화되는 프로모터에 작동가능하게 연결된 DNA 서열이다. 적당한 프로모터는 FLT-1 유전자 프로모터 및 FLK-1 유전자 프로모터는 물론 von Willibrand Factor 유전자 프로모터를 포함한다. 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 정상 내피세포와 비교해서 혈관형성 내피세포 내에서 유전 물질의 발현을 선택적으로 방해하는 안티센스 서열일 수 있다.

본 발명은 또한 혈관형성의 부위를 진단하는 방법을 제공한다. 본 방법은 양이온성 지질과 검출가능한 표지로 이루어지는 복합체를 투여하는 것을 포함하고, 복합체는 혈중에서 대응 정상 내피세포와 비교해서 혈관형성 내피세포에 대해 더 큰 친화도를 갖는다. 투여된 복합체는 혈관형성 내피세포와 선택적으로 결합하게 된다. 그 다음에, 검출가능한 표지가 검출되고 이에 의하여 표지의 축적된 부위에 기초하여 혈관형성 부위를 결정한다. 표지는 형광 표지, 조직화학적 표지, 면역조직화학적 표지, 방사선 표지 또는 기타 적당한 표지일 수 있다. 본 방법은 표지의 축적부위에서 조직을 단리하고 다음에 단리된 조직을 분석하는 것을 포함할 수 있다.

혈관형성 부위를 진단하는 방법은 악성종양 또는 악성조직을 정확히 동정하고 제거하는 방법을 포함한다. 이 방법은 양이온성 지질과 시각으로 검출가능한 표지로 이루어지는 복합체를 투여하는 것을 포함한다. 표지는 특정한 파장의 빛을 표지에 조사한 후 직접 육안으로 검출가능한 빛을 방출할 수 있다. 검출가능한 표지를 갖는 복합체는 혈관형성 내피세포에 결합한다. 그후, 임의의 포유동물인, 그러나 일반적으로 사람인 환자를 수술한다. 환자가 외과적으로 절개된 경우, 표지가 형광을 발하게 하는 광선에 종양을 노출시킨다. 형광을 발하는 모든 조직을 제거한다. 따라서, 본 방법은 혈관형성세포를 함유하는 모든 조직의 위치를 정확히 알아내고 제거할 수 있는 것을 가능하게 한다.

본 발명은 양이온성 지질과 혈관형성에 영항을 주는 물질을 포함하는 혈관형성 내피세포에 선택적으로 영향을 주는 조성물을 포함하고, 조성물은 혈중에서 대응 정상 내피세포와 비교해서 혈관형성 내피세포에 보다 큰 친화도를 갖고, 조성물은 조성물이 혈관형성 내피세포로 들어가는 방식으로 잠시동안 혈관형성 내피혈관의 혈관형성 내피세포와 선택적으로 결합한다. 본 조성물은 바람직하게는 주사에 의해서 포유동물의 순환계로 투여하도록 제조된다. 조성물은 바람직하게는 혈중에서 대응 정상 내피세포와 비교했을 때 맥관형성 내피세포에 대하여 보다 5배 이상 또는 바람직하게는 10배 이상 큰 친화도를 갖는다. 조성물은 바람직하게는 5몰%이상의 양이온성 지질로 이루어지고, 혈관형성에 영향을 주는 물질은 바람직하게는 혈관형성의 저해제이지만, 조성물이 상처치유로 사용될 때 혈관형성 촉진제 일 수 있다.

본 발명의 목적은 맥관 내피세포에 선택적으로 영향을 주는 방법을 제공하고, 이에 의해서 혈관형성을 저해하거나 촉진하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 혈관형성을 수행하지 않는 내피세포와는 결합하지 않고 혈관형성 내피세포와 선택적으로 결합하도록 설계된, 검출가능한 표지를 함유하는 양이온성 리포솜을 투여함에 의하여 혈관형성 부위를 진단하는 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적은 양이온성 지질로 이루어지는 양이온성 리포솜과 혈관형성을 저해하거나 촉진하도록 구체적으로 의도되고 설계된 화합물을 제공하는 것이며, 화합물은 수용성이거나 또는 물에 쉽게 분산될 수 있고, 또는 지질과 양립하고, 지질층에 통합될 수 있다.

본 발명의 다른 목적은 혈관에서 혈류를 방해하거나 완전히 막는 국소의 혈관내 혈괴를 초래하는 방식으로 혈관형성 내피세포에 선택적으로 영향을 주는 방법을 제공하는 것이다.

다른 목적은 검출가능한 표지로 세포를 표지하고 이에 의하여 주위 세포로부터 혈관형성 내피세포를 분리하여 이어서 배양 및/또는 분석함으로써 혈관형성 내피세포를 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 종양의 혈관형성 내피세포에 혈관형성 내피세포를 파괴하고 이어서 종양 세포를 파괴하는 독성화합물들을 송달해서 불필요한 종양을 파괴하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 양이온성 지질/DNA복합체를 혈관형성 내피세포에 송달함으로써 혈관형성 내피세포에 선택적으로 영향을 주는 방법을 제공하는 것이며, DNA는 바람직하게는 혈관형성 내피세포와만 결합하는 환경에서 선택적으로 활성화되는, 즉 정적인 내피세포에서는 활성화되지 않는 프로모터에 부착되어 있다.

본 발명의 특징은 본 발명의 양이온성 리포솜이 혈관형성에 관련되지 않는 대응 내피세포와 결합하는 것보다 상당히 높은 선호도로 (5배 이상 또는 바람직하게는 10배 이상) 혈관형성 내피세포와 선택적으로 결합하는 것이다.

본 발명의 이점은 본 발명의 양이온성 리포솜은 혈괴와 같은 것에 의하여 혈관을 파괴하거나 불활성하게 하고 주위조직에 영양공급을 차단하고, 이에 의하여 조직을 파괴하는(예를 들면, 고형암의 파괴) 방식으로 영향을 받는(예컨대, 사멸시키는) 내피세포에 적은 양의 독성 화합물을 정확히 송달하기 위하여 사용할 수 있다.

본 발명의 또 다른 이점은 본 발명의 양이온성 리포솜은 진행중인 혈관형성과 관련된 악성 또는 양성 종양과 관계된 혈관생성을 저해하기 위하여 사용할 수 있다는 것이다.

본 발명의 또 다른 이점은 양이온성 리포솜은 혈관형성을 촉진하는 화합물의 부위 지향적 송달을 제공하고 이에 의하여 상처 치유를 증진시키기 위하여 사용할 수 있다는 것이다.

본 발명의 중요한 특징은 다양한 종류의 질병 및/또는 질환을 질환에 관계된 조직을 직접 치료하지 않고 치료하는, 예를 들면 혈관형성을 저해함으로써 종양에 피를 공급하는 것을 차단하고 어떤 방식으로든 종양세포를 직접 치료하지 않고 사멸시키는 것이다.

본 발명의 이들 및 기타 목적, 이점 및 장점은 첨부된 도면과 관련해서 본 명세서에 제공된 개시를 이해함에 의하여 당업자에게 분명하게 될 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1 내지 10은 칼라판 및 흑백판으로 본 명세서에 제시되었다. 이것은 본 발명은 칼라 사진을 통하여 가장 잘 이해되나 현행 PCT 출원 절차에서 이것이 허용되지 않기 때문에 행한 것이다. 도 1 내지 10에 대한 칼라사진은 본 명세서에 참고로서 포함된 1997년 3월 12일 출원된, 미국 특허출원 번호 08/820,337에 포함되어 있다. 더욱이, 대응 정상 내피세포와 비교해서 혈관형성 내피세포에 대한 본 발명의 표지된 복합체의 보다 큰 친화도를 명백하게 나타내는 칼라사진이 Thurston 등의 "Cationic Liposomes Target Angiogenic Endothelial Cells in Tumors and Inflammation in Mice" J. Clin. Invest., April 1, 1998(참고로 포함됨)에 제시된다.

도 1은 정상 마우스 난소(scale bar:60㎛)의 난포의 혈관생성 혈관에서 적색 형광 CM-DiI-표지 DDAB:콜레스테롤-DNA 복합체의 유입을 나타내는 형광 현미경 사진이다.

도 2는 RIP1-Tag5 마우스에서 췌장종양의 단면에서의 혈관생성 혈관에서 적색 형광 CM-DiI-표지 DDAB:콜레스테롤-DNA 복합체의 유입을 나타내는 형광 현미경 사진이고, 혈관은 형광 렉틴으로 녹색으로 염색되었다(scale bar:40㎛).

도 3은 정상 마우스 췌장도의 혈관에서 Texas Red-표지 DOTAP:콜레스테롤-DNA 복합체(황-오렌지색)의 유입이 없거나 거의 없는 것을 나타내는 형광 현미경 사진의 저 배율 확대도이다(scale bar:150㎛).

도 4는 RIP1-Tag2 마우스에서 췌장 종양의 혈관에 Texas Red-표지 DOTAP:콜레스테롤-DNA 복합체(황-오렌지색)의 유입을 나타내는 형광 현미경 사진의 저 배율 확대도이다.(scale bar;150㎛)

도 5는 정상 췌장도에서 Texas Red 표지된 DOTAP:콜레스테롤 리포솜(적-오렌지)의 유입이 없거나 거의 없음을 나타내고, 혈관은 형광 렉틴으로 (녹색) 염색되었다.(scale bar:50㎛)

도 6은 RIP1-Tag2 마우스에서 췌장 종양내에 Texas Red-표지 DOTAP:콜레스테롤 리포솜(적-오렌지) 유입의 이중 초점의 현미경 사진이다. 혈관은 정맥내로 리포솜을 주사후 형광 Lycopersicon esculentum 렉틴(녹색)을 관류시켜서 염색했다.(scale bar: 50㎛)

도 7은 RIP1-Tag2 마우스에서 췌장 종양내의 Texas Red-표지 DOTAP:콜레스테롤 리포솜(적-오렌지)의 유입의 이중 초점의 현미경 사진을 나타낸다. 리포솜을 정맥내로 주사후 형광 Lycopersicon esculentum 렉틴(녹색)을 관류시켜서 혈관을 염색했다(scale bar:50㎛).

도 8은 RIP1-Tag2 마우스에서 췌장 종양내의 Texas Red-표지 DOTAP:콜레스테롤 리포솜(적-오렌지)의 유입의 이중 초점의 현미경 사진을 나타낸다. 리포솜을 정맥내로 주사후 형광 Lycopersicon esculentum 렉틴을 관류시켜서 혈관을 염색했다. 혈관성장의 가능부위는 집중적인 유입을 갖는다(scale bar:50㎛)

도 9는 형광 렉틴을 사용하여 녹색으로 염색된, 무균 마우스 혈관의 기관의 정상 혈관에서 Texas Red-표지 DOTAP:콜레스테롤 리포솜(적-오렌지)의 유입이 거의 없는 것을 보여주는 이중 초점의 현미경 사진이다.(scale bar:50㎛)

도 10은 Mycoplasma pulmonis 감염된 마우스의 기관에 혈관형성 혈관에서 Texas Red-표지 DOTAP:콜레스테롤 리포솜(적-오렌지색) 유입의 이중초점 현미경 사진이다.(scale bar:50㎛)

도 11은 정맥내 주사 4시간 후에 리포솜 형광의 세기를 측정해서 평가된 무균(정상) 마우스 및 Mycoplasma pulonis-감염 마우스 기관의 혈관에서 Texas Rsd-DOTAP:콜레스테롤 리포솜의 유입의 양을 나타내는 그래프이다. Zeiss LSM 410 이중초점 현미경으로 측정을 행했다. 마우스에 M.pulmonis 생물체를 비강을 통해서 접종하여 감염시키고, 이후 4주간 관측했다. 별표시는 통계적으로 유의성 있는 차이를 나타낸다.($P<0.05$, mean±SE, 군당 마우스 n=4);

도 12는 M. pulmonis-감염 마우스의 기관에서 내피세포와 결합된 DOTAP:콜레스테롤 리포솜을 나타내는 투과 전자현미경 사진이다.(scale bar:50㎛)

도 13은 M. pulmonis-감염 마우스의 기관에서 내피세포에 의하여 유입된 DOTAP:콜레스테롤 리포솜을 나타내는 투과 전기현미경 사진이다(scale bar: 80㎛)

(바람직한 구체예의 상세한 설명)

혈관형성 내피세포에 선택적으로 영향을 미치고/표지하는 본 발명 및 본 발명에 사용되는 리포솜을 기술하기 전에, 이 발명은 변화가 당연히 가능한 특정한 리포솜, 방법, 또는 활성물질에 제한되지 않는다고 이해되어야 한다. 또한 본 명세서에 사용된 용어는 단지 특정한 구체예를 설명하기 위한 것이며, 제한하려는 의도가 아니라는 것을 이해하여야 하며, 이는 본 발명이 첨부한 특허청구범위에 의해서만 한정되게 될 것이기 때문이다.

본 명세서 및 특허청구범위에서 사용되는, 단수 형태의 표현은 문맥상 명확히 다르게 지시하지 않는 한 복수 형태도 포함한다. 따라서, 예를들면, "리포솜(a liosome)"이라 함은 혼합물 및 다수의 이런 리포솜을 포함하고, "약제(a agent)"라 함은 다수의 약제와 이들의 혼합물을 포함하고, "방법(the method)"이라 함은 하나 이상의 방법 또는 여기에 기술된 형태를 포함한다.

본 명세서에 논의된 간행물은 오로지 본 출원의 출원일전에 개시된 내용으로서 제시된다. 본 명세서에서 선행 발명에 의하여 이런 간행물에 선행하지 않는다는 허가로 해석되는 것은 없다.

다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서의 모든 기술적, 과학적 용어들은 본 발명이 속한 분야의 당업자에게 보통으로 이해되는 의미를 갖는다. 본 명세서에 기술된 것들과 유사하거나 동일한 방법 및 물질들도 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질들이 본 명세서에 기재되어 있다. 본 명세서에 인용된 모든 문헌은, 인용한 본 발명의 구체적 면을 개시하고 기재하는 목적으로 참고로서 본 명세서에 포함된다.

정의

"치료", "치료하는 것". "치료하다"등의 용어는 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 일반적으로 의미하기 위해서 본 명세서에 사용된다. 효과는 질병 또는 이것의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다는 점에서 예방적일수 있고, 및/또는 질병 및/또는 질병에 영향을 주는 부작용을 부분적으로 또는 완전하게 안정화시키거나 또는 낫게 한다는 면에서 치료적이라고 할 수 있다. 본 명세서에 사용된 "치료"는 포유동물, 특히 인간의 질병의 모든 치료를 의미하고,

(a) 아직 질병을 갖는다고 진단되지 않았으나, 질병 또는 증상에 걸리기 쉬운 환자에게서 질병이나 증상의 발생을 예방하는 것,

(b)질병의 증상의 억제, 즉 그 발전의 정지; 또는

(c)질병 증상의 완화, 즉 질병이나 증상의 퇴각의 유발

을 포함한다.

"혈관형성"은 신생혈관의 발생을 포함하는 조직 혈관신생의 과정을 일컫는다. 혈관생성은 다음: (1)신생 혈관의 형성을 시작하는, 기존재하는 혈관으로부터 내피세포가 이주하는 신생혈관생성; (2)새롭게 전구체 세포로부터 혈관이 생성되는 혈관형성 또는(3) 기존재 하는 혈관의 지름이 넓어져서 큰 혈관을 생성하는 혈관 확장의 3가지 기전 중 하나를 통해서 일어난다(Blood, C.H. and Zetter, B.R., 1990, Biochem. Biophys. Acta. 1032:89-118).

혈관형성은 신생아 성장의 정상 과정 및 황체 성장 사이클중의 여성 생식계에서 중요한 과정이다.(Moses, M.A.등의 1990, Science 248:1408-10 참조). 정상상태에서는, 신생 혈관형성 또는 존재하거나 신생 혈관의 개조를 포함하는 모든 과정은 자가-제한 과정이고, 특정 세포 형태의 확장은 제어되고 협조된다.

혈관형성은 또한 상처치유 및 조직 염증, 관절염, 천식, 종양 성장, 당뇨성 망막증 및 다른 상태를 포함하는 다수의 임상 질병의 병인론과 관련된다. 혈관형성과 관계된 임상증상은 혈관형성 질병이라고 불린다(Folkman, J. and Klagsbrun, M., 1987, Science 235:442-7).

많은 실험은 조직이 정상 및 병리학적 상태 중 혈액 공급이 나쁜 상태하에서 혈관생성을 촉진하는 혈관형성 인자를 생성할 수 있다는 것을 제안한다. 이 인자와 화합물들은 세포의 특이성과 이들이 신생활관의 성장을 유도하는 기전에 따라 다르다. 이 인자는 다양한 기전을 통하여 작용한다. 예를들면, 이들은 내피세포의 이주 및 증식을 유발할 수 있고, 또는 콜라겐아제의 생성을 자극할 수 있다.(Klagsbrun, M, and D'Amore, P.A., 1991, "Regulators of angiogenesis," Ann. Rev. Physiol. 53:217-39). 혈관형성 활동의 직접적인 측정을 허용하는 다수의 생물학적 정량이 있다(Wilting, J.등의 1991, "A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. Studies on the effects of carriers, PBS, angiogenin, and bFGF," Anat. Embrol. (Berl)183:259-71 참조).

혈관형성 저해제가 질병의 치료에서 유용할 수 있다는 것이 제안돼 왔다. 예를들면, 혈관형성을 방해하면 종양의 성장을 제한할 수 있다. (1)혈관형성 인자의 방출을 저해하는 것, (2) 모노클로날 항체과 같은 수단을 사용하여 혈관형성 인자를 중화시키는 것,(3)혈관형성을 저해한다고 알려진 분자인, 항-혈관형성 세포를 사용하여 내피세포 반응을 저해하는 것(Folkman, J.등의 1992, Seminars in Cancer Biology 3:89-96)을 포함하는 혈관형성을 저해하는 몇몇의 수단이 제안되어 왔다. 콜라겐아제 저해제, 기저막 턴오버(turnover) 저해제, 지혈 호르몬, 진균-유도 저해제, 혈소판 인자4, 크롬보스폰딘, 페니실라민과 같은 관절염 약물 및 특히 알파 인터페론과 같은 몇몇의 내피세포 저해제가 기술되었다(Folkman, J.등의 1992, Seminars in Cancer Biology 3:89-96; 예를들면 Stepien, H.등의 1996 "Inhibitory effects of fumagallin and its analogue TNP-470 on the function, morphology, and angiogenesis of an oestrogen-induced prolactinoma in Fischer 344 rats," J. Endocrinol. 150:99-106; Maione, T.E등의 1990"Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides," Science 247:77-9).

"내피세포"라는 용어는 순환계의 안쪽 표면에 배치된 단일한 비늘모양 세포의 한층인, 내피를 구성하는 세포를 의미한다. 이 세포는 정상상태에서는 일년에 단 한번 세포분열을 행하는 매우 느리게 증식하지만, 세포분열을 위한 공간을 보유한다. 내피세포의 증식은 S상에서 [^{3}H]티미딘을 세포에 표지해서 나타낼 수 있다. 정상 혈관에서 표지되는 내피세포의 비율은 특히 동맥의 분지점에서 높고, 여기에서 와류와 교반(wear)이 턴오버를 자극하는 것으로 보인다(Goss, R.J., 1978, The Physiology of Growth, Academic Press, New York, pp. 120-137). 정상 내피세포는 정적이고, 즉 분열하지 않고, 이점이 아래에 기술된 혈관형성 내피세포와 구별된다.

내피세포는 또한 혈관형성에서 중요한 과정인 이주하는 능력을 갖는다. 내피세포는 상처치유 중일 때와 같이 그들에 대한 요구가 있을 때 또는 종양형성에서와 같이 그들에 대한 요구가 감지될 때 생체내에서 신생 모세혈관을 형성한다. 신생혈관의 형성은 혈관형성이라고 불리우고, 내피세포에 대한 유사분열촉진 또는 화학 유도제일 수 있는 분자(혈관형성 인자)를 포함한다. 혈관형성 중에, 내피세포는 존재하는 모세혈관에서 이주하여 신생 혈관의 형성을 시작할 수 있고, 즉, 혈관세포는 그 혈관의 확장을 허용하는 방식으로 이주한다(Speidel, C.C., Am J. Anat. 52:1-79). 시험관내 연구는 내피세포의 증식 및 이주를 보고하며; 배양중의 내피세포는 증식 및 자발적으로 모세혈관을 발생시킬 수 있다(Folkman, J. and Haudenschild, C., 1980, Nature 288:551-56).

"혈관형성 내피세포" 및 "혈관형성을 행하는 내피세포"등과 같은 용어는 본 명세서에서 혈관형성(상기 정의됨)을 행하는 내피세포(상기 정의됨)를 의미하기 위하여 사용된다. 따라서, 혈관형성 내피세포는 약 일년에 한번 세포분열을 행하는 정상상태를 초과하는 속도로 증식하는 내피세포이다. 내피세포의 정상 증식으로부터 분화의 속도는 정상 증식의 2배, 5배, 또는 10배 이상이 될 수 있고, 환자의 나이 및 상태, 관계된 종양의 형태, 상처의 유형등과 같은 인자에 따라 크게 다를 수

있다. 정상내피세포와 혈관형성 내피세포 사이에서 증식의 정도의 차이가 측정가능하고 생물학적으로 유의성 있다고 가정하면, 2가지 형태의 세포는 본 발명 마다 구별될 수 있고, 즉, 양이온성 리포솜과 결합하는 선호도의 면에서 대응하는, 정상의, 정적인 내피세포와 구별된다.

"대응 내피세포" "정상 또는 정적인 내피세포" 등의 용어는 몇몇 내피세포는 혈관형성을 수행하고 몇몇 내피세포는 정적일 때 같은 조직형태(정상 상태에서)를 포함하는 정상의, 정적인 내피세포를 나타내기 위하여 사용된다. 본 발명과 관련하여, 혈관형성 내피세포는 우선적으로는 지향성이 있고, 대응하는 정적인 내피세포보다 5배, 바람직하게는 10배이상의 선호도로 지향성이 있다.

"지질"이라는 용어는 지방, 지질, 물에는 불용성이고 알콜-에테르에 용해성인 원형질의 구성성분을 포함하는 일반적 용어로서 보편적인 의미로 사용된다. 지질은 지방, 지방유, 필수 오일(oil), 왁스, 스테로이드, 스테롤, 인지질, 당지질, 황지질, 아미노리피드, 크로모리피드(리포크롬) 및 지방산으로 구성된다. 이 용어는 천연적으로 발생한 및 합성해서 생산된 지질을 모두 포함한다. 본 발명과 관련하여 바람직한 지질은 포스패티딜콜린 및 포스패티딜에탄올아민 및 스핑고 마이엘린 등을 포함하는 인지질이다. 지방산인 경우에, 이들은 탄소수 12-24의 길이이며, 6개 이하의 불포화(이중결합) 탄소를 갖고 아실 또는 에테르 결합에 의하여 백본에 결합된다. 백본에 결합된 지방산이 하나 이상일 경우에, 지방산은 서로 다를 수 있고(비대칭), 또는 예를들면 라이조레시틴 같이 1개의 지방산 사슬이 존재할 수도 있다. 특히 달걀 노른자, 소의 심장, 뇌, 간, 또는 콩에서 정제된 레시틴(포스패티딜콜린)과 같은 비-양이온성 지질이 천연 공급원으로부터 유래된 경우에 혼합된 처방도 또한 가능하다. 스테로이드 및 스테롤, 특히 콜레스테롤 및 스테롤은 3b 위치에서 치환됐다.

"양이온성 지질"이란 용어는 양이온인 본 발명의 모든 지질(상기 정의됨)을 포함하기 위하여 본 명세서에 사용된다. 지질이 측정시에 이용한 기계에 의하여 측정되어 양 전하(생리학적 pH에서)를 가질 때, 지질은 양이온성이라고 결정될 것이다. 지방산이 양이온성 지질에 존재하는 경우, 이들은 탄소수 12-24의 길이이고, 6개 이하의 불포화 탄소(이중결합)를 갖고, 아실 또는 에테르 결합에 의해 백본에 연결될 수 있다; 백본에 단 하나의 지방산 사슬이 연결될 수 도 있다. 백본백본상의 지방산이 결합된 경우에, 지방산은 또한 다를 수 있다(비 대칭). 혼합된 처방도 또한 가능하다.

"리포솜"이라는 용어는 지질 이중층에 의해서 둘러쌓인 모든 구획을 포함한다. 리포솜은 또한 지질 소포라고 언급될 수도 있다. 리포솜을 형성하기 위해서, 지질 분자는 긴 비극성(소수성) 부분 및 극성(친수성) 부분을 포함한다. 분자의 소수성 및 친수성 부분은 바람직하게는 기다란 분자 구조의 맨 끝에 위치한다. 이런 지질을 물에 분산시켰을 때, 이들은 자발적으로 라멜라로 불리는 2층의 막을 형성한다. 라멜라는 두 개의 단일 층으로 구성되며 이들의 비극성(소수성)부분은 서로 안쪽을 향하고 있고, 극성(친수성)부분은 수상 매질쪽을 향하고 있다. 지질에 의하여 형성된 막은 세포의 내용물을 둘러쌓는 세포막과 유사한 방식으로 수상부를 둘러싼다. 따라서, 리포솜의 이중층은 세포막에 단백질이 없는 세포막과 유사성을 갖는다. 본 발명과 관련되어 사용될 때, 리포솜이라는 용어는 수상층과 지질이중층이 교대로 있는 2내지 수백개의 층으로 이루어지고, 일반적으로 1 내지 10 마이크로미터 범위의 지름을 갖는 다층 라멜라 리포솜을 포함하고, 또한 다층라멜라 리포솜을 초음파분해하여 생성될 수 있고, 일반적으로 20 내지 100 nm의 지름을 갖는, 단일 지질층으로 이루어지는 단일 라멜라 소포을 포함한다.

바람직한 리포솜은 단일 지질 이중층을 갖고, 25-200 nm 범위의 지름을 갖는 소형 단일 라멜라 소포(SUVs)가 될 것이다.

바람직한 폴리뉴클레오타이드(DNA, RNA 및 합성 폴리뉴클레오타이드 유사체) 리포솜은 복합체는 바람직한 리포솜으로부터 제조될 것이다. 복합체는 양이온성 지질 1-50 nmol당 1㎍의 폴리뉴클레오티드가 존재하도록 제조될 것이다. DNA 유전자 카세트에서 원하는 최종 목적물이 발현될 때, 양이온에 대한 폴리뉴클레오티드의 최적비는 DNA의 표준양이상기한 범위내에서 양이온성 리포솜의 다른 양과 혼합된 일련의 처방을 제조함에 의하여 실험실적으로 결정된다. 이 처방은 다음에 생체로 투여되고, 가장 최고의 발현을 나타내는 처방이 결정될 수 있다.

양이온성 리포솜은 0mV보다 큰 제타 포텐셜을 갖도록 기능적으로 정의될 수 있다.

본 명세서에 사용되는 "양이온성 리포솜"이라는 용어는 양이온성인 위에서 정의된 모든 리포솜을 포함하도록 의도된다. 리포솜은 생리학적 pH에 존재할 때 양이온성이 되도록 정해진다. 리포솜 자체가 양이온성으로 결정된 것, 즉, 생리학적 pH 내에서 측정가능한 양전하를 갖는 리포솜은 생체 환경에서 다른 물질에 부착되게 된다는 점에 주목하여야 한다. 이 다른 물질은 음전하를 띨 수 있고, 이에 의하여 양전하를 갖지 않는 구조의 형성을 초래할 수 있다. 생체내 환경에서 본 발명의 리포솜의 전하 및/또는 구조는 정확하게 결정되지 않았다. 그러나, 본 발명에 따라서, 본 발명의 양이온성 리포솜은 자

신이 양이온성인 적어도 몇몇 지질을 사용하여 생산될 수 있을 것이다. 리포솜은 전부가 양이온성 지질로 구성될 필요는 없으나, 리포솜이 형성되고 생리학적 pH에서 생체 환경에 놓였을 때, 양 전하를 갖도록 충분한 양의 양이온성 지질로 이루어져야만 한다.

"뉴클레오티드 서열/양이온성 지질 복합체"라는 용어는 적어도 상기된 양이온성 지질과 결합한 RNA 또는 DNA 서열일 수 있는 및 중성 지질을 포함할 수 있는 뉴클레오티드 서열의 조합을 의미한다. DNA 서열 및 양이온성 지질이 결합했을 때, 이들은 전통적인 리포솜이 아닌 복합체를 자발적으로 형성할 것이다. 본 발명은 구체적으로 특정 뉴클레오티드 서열/양이온성 지질 복합체의 형성을 겨냥한 것이며, 여기서 뉴클레오티드 서열은 구체적으로 혈관형성 내피세포에 영향을 주게 설계된다. 예를들면, 뉴클레오티드 서열은 혈관형성 내피세포를 죽이는 단백질을 코드화할 수 있다. 서열은 바람직하게는 혈관형성 내피세포의 환경에서만 선택적으로 활성화되는 , 즉 대응하는 정적인 세포에서는 활성화되지 않는 프로모터에 작동가능하게 결합된다. 더욱이, 복합체는 혈관생성 내피세포내의 유전물질의 발현을 막는 안티센스 서열을 포함할수 있고, 이에 의하여 혈관생성 내피세포의 작동을 방해하거나 및/또는 죽일 수 있다. DNA는 플라스미드 또는 선형일 수 있다. 유전자 생산물이 요구될 때(자가 RNA 전사, 또는 단백질로의 번역), DNA 프로모터 서열 및 유전자 생성물을 코드화하는 DNA 서열로 이루어지는 발현 카세트가 필요하다. 다른 포스포디에스테르 결합과 함께 뉴클레오티드는 특히 안티센스 용도로 사용된다.

"-과 결합하다"라는 용어는 리포솜 및/또는 그 내용물이 내피세포로 들어갈 수 있도록 충분히 긴 시간동안 혈관형성 내피세포에 충분히 근접해서 유지되는, 본 발명의 양이온성 리포솜의 작용을 의미한다. 본 발명의 리포솜은 다양한 환경에서 혈관형성 내피세포와 결합할 수 있으나, 가장 바람직하게는 생체 조건일 때 혈관형성 내피세포와 결합한다. 따라서, 리포솜은 혈관형성 내피세포와 결합하기 전에 혈류에 존재하는 다른 분자 또는 물질과의 부착, 결찰 또는 결합에 의하여 변형될 수 있다. 사람 혈청알부민 및 사람 트랜스 페린과 같은 관계없는 두 분자 사이에서 발생하는 비 특이성 상호작용과 같은 다양한 힘이 리포솜과 혈관형성 내피세포의 결합에 영향을 준다. 이 상호분자간의 힘은 (1)정전기; (2)수소 결합; (3)소수성; 및 (4) 반 데어 발스의 4가지 일반적인 영역으로 분류될 수 있다. 정전기력은 양이온성 리포솜상의 반대로 하전된 기와 혈관형성 내피세포상에 또는 안의 기사이에 반대로 하전된 이온기사이의 인력에서 기인한다. 인력(F)은 전하사이의 거리(d)의 제곱에 반비례한다. 수소결합력은 친수성 기사이에 가역적인 수소 가교의 형성에 의하여 제공된다. 본 발명의 리포솜은 -COOH와 같은 친수성 기를 포함할수 있고, -OH, -NH2와 같은 유사한 기가 내피세포의 표면에 존재할 수 있다. 이 힘은 이 기를 갖는 2개의 분자들의 근접한 위치에 크게 의존한다. 소수력(hydrophobic forces)은 물속의 기름방울이 하나의 큰 방울을 형성하는 방식으로 작용한다. 따라서, 본 발명의 리포솜에 존재하는 것과 같은 비극성 소수성기는 수성 환경에서 회합하는 경향이 있고, 내피세포의 표면상에 존재하는 소수성기와 결합하는 경향이 있다. 마지막으로, 반 데르 발스 힘은 외각 전자운사이의 상호작용에 의존하는 분자간에 발생한다.

"선택적으로 결합한다" 및 "선택적으로 표적지향화한다"등의 용어는 양이온성 리포솜이 혈관형성에 관계하지 않는 대응하는 정상 내피세포보다 혈관형성 내피세포와 더 높은 정도로 결합하게 하는 본 발명의 양이온성 리포솜의 성질을 기술하기 위하여 본 명세서에 사용된다. 본 명세서에 따르면, 선택적 또는 우선적인 결합은 혈관형성을 수행하지 않는 대응하는 정상 내피세포와 비교해서 혈관형성을 수행하는 내피세포와 5배 이상으로 결합하는 것을 의미한다. 가장 바람직하게는, 우선적 또는 선택적 결합은 혈관형성 내피세포와 대응하는 정상 내피세포사이에 10배이상의 선택성이 있는 것을 나타낸다.

"암"이란 용어는 비정상적으로 세포가 증식하는 질병을 나타낸다. 이 이상은 종양 조직덩어리가 생체 기관의 기능을 손상시킬때 임상적으로 명백하다. 정상 조직 성장을 기술하는 개념은 악성 조직에 적용되는데, 왜냐하면 정상 및 악성 조직은 단일 세포 및 조직의 레벨에서 유사한 성장 특성을 공유할 수 있기 때문이다. 암은 이상 세포 성장 조절과 같은 이상 조직 성장 조절의 질병이다. 배가시간이라 함은 조직 또는 종양이 크기나 세포수가 2배로 되는데 요구되는 시간을 의미한다. 임상적으로 명백한 종양의 배가 시간은 통상 종양을 구성하는 세포의 세포사이클보다 상당히 길다. 그러나, 종양과 달리, 성인의 정상 간, 심장 또는 폐는 세포가 생산되는 속도와 세포가 죽는 속도가 같기 때문에 배가 시간을 갖지 않는다(Stockdale, F., 1996 "Cancer growth and chemotherapy," in: Scientific American Medicine, vol. 3, Scientific American Press, New York, pp. 12-18). 종양의 성장 특성은 새로운 세포생성이 세포가 죽는 것보다 빠르고; 신생물 발생은 자가복제를 수행하는 간세포의 비율이 증가하고 성숙기로 진행하는 비율은 상응하게 감소한다는 것이다(McCulloch, E.A.등의 1982. "The contribution of blast cell properties to outcome variation in acute myeloblastic leukemia(AML), Blood 59:601-608). 각 종양 집단 마다, 배가시간이 있고, 특정한 성장 곡선이 정해질 수 있다(Stockdale, F., 상기문헌). 종양의 성장 패턴은 종양의 발생중에 성장 속도가 초기에는 매우 빠르고, 그후 크기가 커지면서 점진적으로 감소하는 것을 나타내는 곰페르지안(gomperizian) 곡선(Steel, GG, 1977, Growth kinetics of tumors, Oxford University Press, Inc., New York, p.40)에 의해 서술될 수 있다.

본 발명의 일반적 양상

첨부한 도면은 본 발명의 양이온성 리포솜이 혈관형성 내피세포를 표적지향화하는 고도로 선택적인 방식의 깨끗한 시각적 묘사를 제공한다. 본 발명의 기본 구체예는 약제학적으로 허용가능한 담체와 물질 또는 DNA/양이온성 복합체를 함유하는 양이온성 리포솜을 포함하는 제제를 투여(바람직하게는 혈관내 주사, 가장 바람직하게는 동맥내 주사)해서 혈관형성 내피세포에 선택적으로 영향을 주는 방법을 포함한다. 이 물질은 혈관형성을 저해하는 화합물, 혈관형성을 촉진하고 및/또는 검출가능한 표지를 포함하는 화합물일 수 있다. 주사된 제제내의 양이온성 리포솜은 혈관형성 혈관의 벽을 구성하는 혈관형성 내피세포로 (엔도사이토시스에 의해) 들어가게 된다. 양이온성 리포솜은 리포솜 자체 및/또는 그 내용물이 혈관형성 내피세포로 들어가도록 하는 방식으로 및 충분한 시간동안 혈관형성 내피세포와 결합한다. 이후에, 세포내로 들어간 화합물은 혈관형성을 저해하거나 촉진할수 있고, 또는 단지 혈관형성 부위를 검출할 수 있게 표지만을 제공할 수 있다. 혈관형성 내피세포로 표적지향화의 선택성은 첨부한 도면을 참조하여 가장 잘 이해할 수 있다.

도 1은 난소위에 위치한 큰 원형의 난포(노란색)를 갖는 마우스 난소의 일부를 나타낸다. 혈관형성이 정상 마우스 난소내에서 발생하기 때문에, 검출가능한 표지를 함유하는 양이온성 리포솜이 난포(적-오렌지)의 성장하는 혈관의 혈관형성 내피세포와 결합한다. 그러나, 도 1에서는 표지가 혈관형성 내피세포와만 결합하는지 또는 난소 및 난포의 모든 조직과 결합하는지를 명백히 결정하기가 가능하지 않다.

도 2는 검출가능한 표지를 함유하는 본 발명의 양이온성 리포솜(적-오렌지)을 혈관내로 주사한 마우스로 부터의 췌장종양의 일부를 나타내는 형광 현미경사진이다. 혈관형성이 종양내에서 쉽게 일어난다. 따라서 이 사진은 본 발명의 양이온성 리포솜(적-오렌지)이 혈관형성 내피세포(녹색)와 특이적으로 결합한다는 암시를 제공한다. 그러나, 이 결과는 본 발명의 특이성을 극적으로 설명하지는 못한다.

도 3과 도 4의 비교는 혈관형성의 부위를 찾아내는 본 발명의 능력을 도시한다. 도 3은 마우스의 정상췌장 조직내에 혈관을 나타내는 사진이다. 정상 내피세포에는 대응하는 혈관형성 내피세포보다 표지가 훨씬 적다. 이것은 도 3과 마우스의 췌장 종양의 사진인 도 4를 비교해서 명백하게 증명된다. 도 4는 종양영역에서 양이온성 리포솜에 함유된 표지(노란-오렌지)의 높은 축적도를 나타낸다. 도 3과 도 4 사이의 극적인 차이점은 종양부위를 명백하고 정확하게 표시하는 본 발명의 이용을 나타낸다. 그러나, 도 4에서 너무 많은 양의 표지가 혈관형성 혈관에 결합했기 때문에, 혈관형성 내피세포를 우선적으로 표적지향화하는 양이온성 리포솜의 특이성을 완전히 이해하는 것이 가능하지 않다.

도 5는 정상 마우스 췌장도에서의 혈관(녹색)사진이다. 적-오렌지 색으로 채색된 적은 양은 췌장 조직의 혈관을 구성하는 정상 내피세포와 양이온성 리포솜과의 한정된 결합을 나타낸다.

검출가능한 표지를 포함하는 양이온성 리포솜의 특이성은 도 5와 도6을 비교함에 의하여 더욱 명백하게 나타난다. 도 6은 마우스의 췌장내의 종양의 혈관형성 혈관의 내피세포에서 표지의 높은 축적을 나타낸다.

혈관형성 내피세포를 표적지향화하는 양이온성 리포솜의 정확한 능력은 도 7 및 도 8에 극적으로 나타난다. 도 7은 형광표지가 혈관에만 결합한, 즉 표지가 주위 조직으로 누출되거나 이주하지 않은 것을 명백하게 나타낸다. 특이성은 표지가 이 세포에 특이적이고 주위조직으로 누출되거나 이주하지 않은 것을 나타내는 혈관형성 내피세포 내에서 검출된 표지된 양이온성 리포솜에 명백하게 초점을 맞춘 도 8에서 가장 극적으로 나타난다.

도 9 및 10은 상기한 것과 효과는 동일하지만 다른 모델의 혈관형성을 사용한 것을 도시한다. 도 1 내지 8은 모두 정상 또는 암조직에 관한 것이다. 도 9 및 10은 각각, 마우스 기관의 정상 및 염증 조직을 나타낸다. 보다 구체적으로, 도 9는 기관의 정상 혈관, 즉 무균 마우스의 기관을 나타낸다. 도 10은 감염으로 유발된 혈관형성이 발생한 기관의 혈관을 나타낸다. 도 10에서 검출가능한 표지가 높게 축적되는 것은 본 발명의 양이온성 리포솜이 혈관형성 내피세포와 선택적으로 결합하는--구체적으로 감염에 의하여 혈관형성이 시작된 기관의 내피세포와 결합하는 것을 명백하게 나타낸다.

도 11은 혈관형성 내피세포와 혈관형성을 행하지 않는 대응하는 정상 내피세포간에 양이온성 리포솜의 특이성의 차이를 나타내는 그래프이다. 도 11에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 양이온성 리포솜(본 실험에서)은 혈관형성을 수행하지 않는 대응하는 내피세포와 비교해서 혈관형성 내피세포에 대해서 약 10배 이상의 친화도를 나타낸다.

마지막으로, 도 12 및 도 13은 본 발명의 양이온성 리포솜이 혈관형성 내피세포로 들어가는 방법을 나타낸다. 도 12에서, 양이온성 리포솜은 혈관형성 내피세포의 표면과 접촉한다. 도 13에서는, 양이온성 리포솜은 엔도사이토시스에 의해 혈관혈성 내피세포로 들어가서, 세포내에 존재한다.

본 발명의 양이온성 리포솜의 특이성을 글로써 기재하고 도면을 통하여 나타냈으므로, 당업자들은 본 발명을 실시하기 위하여 다양한 종류의 물질을 함유하는 다양한 종류의 양이온성 리포솜을 생산할 수 있을 것이다. 그러나, 완전한 실시를 위해서, 양이온성 리포솜 및 그 생산 방법을 이하에 기재하고, 이어서 혈관형성을 저해하거나 촉진하는 물질을 기재한다.

리포솜

리포솜은 양이온성 지질(상기 정의됨)을 포함하는 지질(상기 정의됨)을 수용액에 넣고, 용액을 몇 초내지 시간동안 교반함으로써 쉽게 형성할 수 있다. 이 간단한 방법으로 약 1 내지 10 마이크로 미터범위의 지름을 갖는 큰, 다층 라멜라 리포솜 또는 소포를 생산한다. 이 리포솜은 내부에 지질이 존재하는 수상층과 교대로 있는 2개 내지 수백개의 동심원의 지질 이중층으로 구성된다. 혈관형성을 저해하고, 혈관형성을 촉진하거나 또는 검출가능한 표지를 제공하는 화합물같은 물질은 수상에 포함될 수 있다. 물질은 바람직하게는 수용성이거나, 적어도 물에 쉽게 분산될 수 있다.

수상층의 두께 및 따라서 리포솜내에 저장된 수상의 전체양은 하전된 지질간의 정전기적 반발력 및 이중층간에 반 데르 발스 인력에 전체적으로 의존한다. 따라서, 수상 공간(및 따라서 저장된 수상 물질의 부피)는 막에 있는 하전된 지질의 부분이 증가할수록 및 수상에 있는 전해질(하전된 이온)의 농도가 감소할수록 증가한다. 형성된 작은 리포솜 또는 소포는 단일 라멜라이고 약 20 내지 100 nm 범위의 크기를 갖고, 다층 라멜라 소포를 초음파 분해해서 생산할 수 있다. 약 0.1 내지 1㎛범위의 지름 크기를 갖는 큰 단일 라멜라 리포솜은 지질을 유기 용매 또는 계면활성제에 용해하고 용해한 시약을 증발이나 투석에 의해 제거하면 얻을 수 있다. 특정한 지질 또는 긴축적 탈수-수화 조건을 요구하는 방법에 의한 더 작은 단일 라멜라 리포솜의 용해는 세포와 크기가 같거나, 또는 더 큰 단일 라멜라 혈관을 생산할 수 있다.

본 발명의 양이온성 리포솜을 형성하기 위해서, 적어도 몇몇의 양이온성 지질을 사용하여 리포솜을 생산하는 것이 필요하다. 그러나, 본 발명의 양이온성 리포솜은 전체가 양이온성 지질로 이루어질 필요는 없다. 예를 들면, 약 45%의 중성 지질과 약 55%의 양이온성 지질을 사용하면 본 발명과 관계된 유용한 양이온성 지질을 생산할 수 있고, 혈관형성 내피세포를 우선적으로 표적지향화할 수 있다.

혈관형성에 영향을 주는 물질 및/또는 표지와 양이온성 리포솜의 혼합은 리포솜 제제를 포함하고, 여기서 리포솜은 표준 기술, 예를들면 1-2-(9(Z)-옥타데세노일옥시)에틸-2-(8(Z)-헵타데세닐)3-(2-히드록시에틸)이미다졸리니움 클로라이드 9DOTAP), 콜레스테롤 및 Texas Red DHPE를 혼합하고, 증발해서 건조하고, 액체 필름을 이어서 5% 덱스트로스에서 다시 수화시켜서 다층 라멜라 소포를 생산한다. 이 소포는 폴리카보네이트 막 필터를 통하여 압출되어 단일 소포를 생산한다. 리포솜과 혼합된 물질은, 예를들면 플라스미드 DNA,는 5% 덱스트로스 용액 또는 다른 생리학적으로 허용되는 부형제에서 특정비로 함께 혼합된다. 유용한 양이온성 지질은 DDAB, 디메틸디옥타데실 암모늄 브로마이드 [Avanti Polar Lipids 및 Sigma Chemical Company에서 구입가능], 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판(디올레오일(DOTAP), 디미리스토일, 디팔미토일, 디세아르오일을 포함하며 한정되지는 않음) [이것들은 Avanti Polar Lipids에서 구입가능], 1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판 (디올레오일, 디미리스토일, 디팔미토일, 디세아르오일을 포함하며 한정되지는 않음) [이것들은 Avanti Polar Lipids에서 구입가능] DOTMA, N-[1-[2,3-비스(올레오일옥시)]프로필]-N,N,N-트리메틸 암모늄 클로라이드, DOGS, 디옥타데실아미도글리실스페르민[Promega Corporation에서 구입가능] DC-콜레스테롤, 3b-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤 DOSPA, 2,3-디올레오일옥시-N-(2(스페르민카르복스아미도)-에틸)-N,N-디메틸-1-프로판아미니움 트리플루오로아세테이트, 1,2-디아실-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(디올레오일(DOEPC), 디라우로일, 디미리스토일, 디팔미토일, 디스테아로일, 팔미토일-올레오일을 포함하나 한정되지는 않음)[이것들은 모두 Avanti Polar Lipids에서 구입가능], b-알라닐 콜레스테롤, CTAB, 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드 디C14-아미딘, N-t-부틸-N'-테트라데실-3-테트라데실아미노프로피온아미딘, 14Dea2, O,O'-디테트라데카놀일-N-(트리메틸암모니오아세틸)디에타놀아민 클로라이드,(N,N,N',N'-테트라메틸-N,N'-비스(2-히드록실에틸)-2,3-디올레오일옥시-1,4-부탄디암모늄 요오드[Promega Corporation에서 구입가능] 1-[2-(9(Z)-옥타데세노일옥시)에틸]-2-(8(Z)-헵타데세닐-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리니움 클로라이드(DOTIM), 1-[2-(헥사데카노일옥시)에틸]-2-펜타데실-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리니움 클로라이드(DPTIM), 1-[2-테트라데카노일옥시)에틸]-2-트리데실-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리움 클로라이드(DMTIM)과 같은 1-[2-아실옥시)에틸]2-알킬(알케닐)-3-)2_히드록시에틸)이미다졸리니움 클로라이드 유도체, 이들 3개의 지질은 Solodin등의 Biochem 43, 135737-13544, 1995에 개시되어 있다. 이것은 위시콘신의 Tim Heath's lab에서 구입한 것이고; Megabios는 몇몇의 지질발명에 대한 특허를 취득했다.

1,2-디올레오일-3-디메틸-히드록시에틸 암모늄 브로마이드(DORI);

1,2-디올레일옥시프로필-3-디메틸-히드록시에틸 암모늄 브로마이드(DORIE)

1,2-디올레일옥시프로필-3-디메틸-히드록시프로필 암모늄 브로마이드(DORIE-HP);

1,2-디올레일옥시프로필-3-디메틸-히드록시부틸 암모늄 브로마이드(DORIE-HB);

1,2-디올레일옥시프로필-3-디메틸-히드록시펜틸 암모늄 브로마이드(DORIE-HPe);

1,2-디미리스틸옥시프로필-3-디메틸-히드록시에틸암모늄 브로마이드(DMRIE);

1,2-디팔미틸옥시프로필-3-디메틸-히드록시에틸암모늄 브로마이드(DPRIE);

1,2-디스테릴옥시프로필-3-디메틸-히드록시에틸 암모늄 브로마이드(DSRIE) 와 같은 4급 아민상에 히드록시알킬 잔기를 포함하는 2,3-디알킬옥시프로필 4차 암모늄 화합물 유도체 - 이들 지질은 Vical, Felgner등에 의하여 개발되었다(J, Biol, Chem, 269, 2550-2561, 1994).

양이온성 리포솜은 양이온성 지질 자체에서 제조되거나, 또는 다른 지질, 특히 다음과 같은 중성 지질과 혼합하여 제조된다.

콜레스테롤

1,2-디아실-sn-글리세로-3-포스포에탄놀아민,(디올레오일(DOPE)을 포함하나 한정되지는 않음; 다양한 종류의 유도체가 Avanti Polar Lipids에서 구입가능하다.);

1,2-디아실-sn-글리세로-3-포스포콜린(다양한 종류의 유도체가 Avanti Polar Lipids에서 구입가능하다.);

N.B. 상기한 디아실 유도체에 대하여 비대칭성의 지방산, 합성 및 천연 모두 그리고 혼합 제제를 포함할 수도 있다.

상기한 형태의 리포솜 및 당업자가 제조할 수 있는 다른 형태의 리포솜은 본 발명에서 혈관형성을 촉진하거나 또는 저해하고 및/또는 검출가능한 표지를 포함하는 물질을 함유하는 리포솜으로 사용될 수 있다. 본 발명의 리포솜의 한 실시예는 혈관형성을 저해하는 지질 용해성 또는 수용성 물질을 포함하는 양이온성 리포솜이다. 그러나, 지질 용해성 화합물은 지질 이중층일수 있다. 이하에 혈관형성 저해제의 설명을 제공한다. 그러나, 당업자에게 다른 변형이 일어날 수 있고, 및/또는 본 발명후에 개발될 것이며, 본 발명과 관련하여 혈관형성의 저해제는 쉽게 사용될 수도 있음을 알아야 한다.

혈관형성 저해제

헤파린은 혈관형성의 증강제이고, 헤파린 길항약은 혈관형성 반응을 막을수 있다. 헤파린과 결합하는 단백질인 프로타민은 항-혈관형성 성질을 나타내지만(Taylor, S and Folkman, J., 1982, "Protamine is an inhibitor of angiogenesis," Nature, 297, 307), 사람에게 노출되었을 때 과민반응을 유발시킨다고 알려져 있기 때문에 임상적으로 유용하지 않다. 다른 항-혈관형성제는 헤파린과 결합하는 단백질인 메이저 베이식 단백질(Major Basic Protein)이고, 이것도 또한 독성이 많고, 따라서 인체용으로 사용할 수 없다. 그러나, 본 발명이 달성한 고도의 선택적인 표적지향화덕분에, 혈관형성을 저해하지만 너무 독성이 많아 사람 치료용으로는 적합하지 않다고 교시된 이런 화합물들도 매우 소량으로 사용될 수 있기 때문에 유용하게 될 수 있다.

혈소판 인자4(PF4)은 헤파린-결합 활성 및 항-혈관형성 성질을 모두 나타내고, 다른 헤파린 길항제와는 달리 독성이 없어서 임상적으로 유용할 수 있다. 미국 특허 5,112,946에 개시된 바와 같이 PF4의 화학적 변형은 PF4의 항-혈관형성 성질을 증진시킨다. 이 변형은 프루오레세인-이소티오시아네이트로 자유 아미노기를 통하여 변형된 PF4 유사체의 생산, 특이적으로 변형된 단백질의 구조 조성을 갖는 PF4 돌연변이, 및 항 혈관형성 성질을 보유하는 PF4 단편의 생산을 포함한다. 특히, PF4의 카르복실 말단에 대응하는 13개의 아미노 산의 합성 펩타이드가 강력한 지혈작용을 나타낸다.

다양한 스테로이드가 혈관형성을 저해하는 것으로 나타났다. 이 항-혈관형성 활성은 헤파린 또는 관련 분자의 첨가에 의하여 증진된다(Folkman,J., Weisz, P.B.등의 1989, "Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes," Science 243, 1490-3). 테트라히드로코르티손과 같은 소위 "지혈 스테로이드"는 생체내에서 혈관형성을 막는 능력을 갖는다. 구체적으로, 6α-플루오로-17,21-디히드록시-16β-메틸-프레그나-4,9-(11)-디엔-3,20-디온은 강력한 지혈 스테로이드로 사용돼왔다.

콜라겐 대사를 조절하는 약물이 혈관형성을 저해한다고 밝혀졌다. 구체적으로 아미노산인 프롤린의 유사체가 콜라겐 합성을 저해하고 생체내에서 혈관형성을 저해한다. 구체적으로, L-아제티딘-2-카르복실릭 산(LACA), cis-히드록시프롤린(CHP), D,L-3,4-디히드로프롤린(DHP), 및 티오프롤린(TP) 각각은 활성이 작은 순서대로 항-혈관형성 활성을 나타낸다(Ingber, D., and Folkman, J., 1988, "Inhibtion of angiogenesis through modulation of collagen metabolism," 1988, Lab, Invest. 59, 44-51). 각각의 이 유사체는 또한 지혈 스테로이드 및 헤파린의 항-지혈 효과를 증진시킨다.

혈소판의 알파 과립에서 발견되는 당단백질인 사람 트롬보스폰딘은 미국 특허 5,192,744에 개시된 바와 같이 삼량체나 단량체 또는 단편의 형태로 혈관형성을 저해한다. 이들은 글리코실화된 형태에서 작용하고, 글리코실화되지 않은 형태에서도 작용한다고 예상된다. 혈관형성-저해 성질은 아미노 말단과 결합한 헤파린 결합 도메인 및 모노메릭 단백질의 카르복실 말단에서 발견되는 혈소판 결합 도메인이 소실된 후에 나타난다.

라미닌 활성을 나타내는 펩타이드는 혈관형성을 막고 조직에서 과도한 혈관의 형성을 방지한다. 이런 할성을 갖는 구체적인 펩타이드는: 1)티로신-이소로이신-글라이신-세린-아르기닌; 2)프롤린-아스파르틴-세린-글라이신-아르기닌; 및 3) 시스틴-아스파테이트-프롤린-글라이신-티로신-이소로이신-글라이신-세린-아르기닌 이다. 이 펩타이드는 복소환 형태에서도 그들의 항-혈관형성 활성을 유지할 것이라고 예상된다.

혈관형성-저해 물질의 다른 실시예는 망막 색소 내피세포(Arch. Ophthamol., 103,1870(1985))에서 유래된 단백질인 콜라겐아제 활성을 나타내는 연골 조직의 추출물, 배양된 연골세포에서 유도된 항암 인자(Takigawa, M. and Suzuki, F., 1988, "Establishment of clonal cell lines producing cartilage-derived anti-tumor factor(CATF), Pretein, Nucleic acid and Enzyme, 33, 1803-7), 인도메타신 같은 항염증약물(Peterson, H.I., 1986, "Tumor angiogenesis inhibition by prostagladin synthetase inhibitors," Anticancer Res., 6, 251-3), 리보뉴클레아제 저해제(Shapiro, R., and Vallee, B.L., 1987, "Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin," PNAS 84, 2238-41), 황산 폴리사카라이드 및 펩티드 글리칸의 복합체(예를들면 JPA-S63(1988)-119500), 관절염용 금제제, 헤르비마이신 A(herbimycin A)(JPA-S63(1988)-295509) 및 푸마길린 또는 푸마길롤 유도체를 포함한다. 다수의 푸마길롤 유도체는 미국 특허 5,202,352에 개시된 바와 같이 혈관형성-저해 성질을 갖는다. 상기한 문헌은 혈관형성의 저해를 개시하고 기술하기 위하여 참고로 본 명세서에 포함된다.

혈관형성 인자

다수의 생물학적 화합물이 혈관형성을 자극한다. 안지오게닌은 병아리 CAM 및 래빗 각막에서 강력한 혈관형성 인자로 나타났다. 말초혈관 단핵구에서 단리된 인자인 안지오트로핀은 정상 상처 치유에서 역할을 담당하는 것으로 제안된 다른 혈관형성 화합물이다(Biochemistry 27, 6282(1988)). 피브린과 같은 상처치유에 관련된 다른 인자도 역시 혈관형성을 유발한다.

혈관형성을 조절하는 다른 집단은 성장인자와 같은 폴리펩타이드 혈관형성 인자이고, 이것은 산성 및 염기성 섬유아세포 성장 인자(FGFs), 변형된 성장 인자 알파(TGF-α) 및 혈소판-유래의 성장 인자(PDGF)를 포함한다. 각각의 이들 분자는 생체내에서 혈관형성을 유발한다고 보여졌다. 혈관형성 활성을 나타내는 다른 유사한 분자들은 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 종양괴사인자 알파(TNF-α), 전환된 성장 인자베타(TGF-β), 및 헤파린 결합 성장인자(HBGFs)이다.

폴리펩타이드 혈관형성 인자에 부가하여 다른 혈관형성 인자도 기술되었다. 지질에서 유래된 혈관형성 인자인 프로스타글란딘 E1 및 E2는 혈관형성 성질을 갖는 주지된 염증 세포 유인제이다(J. Natl. Cancer Inst. 69, 475-482(1982)). 니코틴아미드는 병아리 각막 및 병아리 CAM 분석에서 테스트됐을 때, 혈관형성 반응을 유발한다(Science 236, 843-845(1987)).

검출가능한 표지

본 발명의 양이온성 리포솜은 어떤 종류의 검출가능한 표지를 송달하기 위하여 사용될 수 있다. 표지는 리포솜을 만드는데 사용된 지질에 용해성이거나, 또는 적어도 수성 염수 또는 수성 덱스트로스 용액과 같은 물이나 수성 용액에 분산가능하다. 표지는 방사성 표지, 형광 표지, 조직화학적으로 또는 면역조직화학적으로 검출가능한 물질, 또는 검출가능한 염료일 수 있다. 표지는 적당한 양으로 존재할 수 있으며, 리포솜에 또는 혈관형성을 저해하거나 촉진하는 물질과 함께 복합체에 포함될 수 있다.

투여량

환자(혈관형성을 수행하는 내피세포를 갖는 순환계를 갖는 동물일 수도 있다)에게 투여되는 혈관형성 저해제 또는 촉진제의 양은 다양한 범위의 인자에 따라 변할 것이다. 예를들면, 조그만 동물보다 사람에게는 실질적으로 대용량을 제공하는 것이 필요할 것이다. 혈관형성 저해제 또는 프로모터의 양은 투여되는 물질의 효능뿐 아니라 환자의 크기, 나이, 성, 체중 및 상태에 의존할 것이다. 투여량의 면에서는 상당한 가변성이 있는 것을 나타내므로, 당업자들의 본 개시를 사용해서, 처음에 아주 적은 양을 투여하고 원하는 효과를 얻을 때 까지 투여량을 증가시킴으로써 적당한 양을 쉽게 결정할 수 있을 것이다. 상기한 인자에 기초하여 투여량이 크게 변하기는 하지만, 일반적으로 본 발명은 주위 조직, 예를들면 종양세포 자신을 표적지향화하는 송달 시스템과 비교해서, 실질적으로 적은 양의 물질을 투여하는 것을 가능하게 한다.

뉴클레오티드 서열/양이온성 지질 복합체

DNA 및 RNA 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열이 지질과 결합하는 경우에, 2가지 형태의 복합체가 형성된다. 뉴클레오티드 서열 및 지질의 특정량을 선택함에 의해, 그리고 특정 지질을 선택함에 의해, 생체내에서 회합하지 않는 복합체를 형성할 수 있다. 이런 복합체의 형성에 대한 일반적 정보는 뉴클레오티드 서열/지질 복합체의 형성을 구체적으로 개시하고 기술하기 위해 참고로 본 명세서에 포함된, 1993년 6월 24일 공개된 PCT 공개공보 WO 93/12240에 기술되어 있다. 본 발명과 관련하여, 뉴클레오티드 서열은 구체적으로 혈관형성 내피세포에 영향을 주고, 다른 세포에는 영향이 없도록, 구체적으로 다른 대응하는 내피세포, 즉 정적인 내피세포에는 영향이 없도록 설계된다. 본 발명과 관련되어 사용되는 DNA 서열은 프로모터에 작동가능하게 결합되고, 이 프로모터는 구체적으로 뉴클레오티드 서열의 발현이 혈관형성 내피세포의 환경에서만 얻어지도록 설계된다. 우선, 프로모터는 서열이 혈관형성 내피세포에 송달된 후에 활성화될 수 있는 활성화 가능한 프로모터일 수 있다. 더욱 바람직하게는, 프로모터는 혈관형성 내피세포의 특정 환경에서 활성화되도록 설계될 수 있다. 정적인 내피세포의 환경에서는 일어나지 않고 혈관형성 내피세포의 환경에서 자연적으로 발생하는 많은 현상이 있다. 두 형태의 세포의 차이를 이용해서, 혈관형성 내피세포가 존재할 경우에만 활성화되도록 프로모터를 구체적으로 설계할 수 있다.

DNA 카세트로부터의 전사는 특정한 유전자 프로모터를 사용해서 하나의 또는 좁은 범위의 세포형으로 제한할 수 있다. 내피세포는 유전자 또는 그들의 프로모터가 설명하는 몇몇 단백질을 선택적으로 발현할 수 있다. 혈관내피 성장인자(VEGF) 수용체 flt-1 및 flk-1 유전자 프로모터, 폰 빌리브란트 인자(von Willibrand Factor;VWF) 유전자 프로모터 및 타이 패밀리(tie family) 유전자 프로모터는 수용체 유전자 구성체와 결합했을 때 내피세포에서 선택적 발현을 유발하는 것으로 나타났다. 이하의 문헌은 혈관형성 내피세포에서 활성화되는 프로모터를 개시하고 기술하기 위하여 인용된다.

Hatva, E.등의 1996 "Vascular growth factors and receptors in capillary hemangioblastomas and hemangiopericytomas," Am. J. Path. 148: 763-75;

Strawn, L.M.등의 1996, "Flk-1 as a target for tumor growth inhibition," Cancer Res. 56:3540-5;

Millauer, B.등의 1996, "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo," Cancer Res. 56: 1615-20;

Sato, T.N.등의 1996,"District roles of the receptor tyrosine kinase Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation," Nature 376: 70-4;

Ozaki, K.등의 1996,"Use of von Willebrand factor promotor to transduce suicidal gene to human endothlial cells, HUVEC," Human Gene Therapy: 13 1483-90;

Ronicke, V.등의 1996, "Characterization of the endothelium-specific murine vascular endothelial growth factor receptor-2(Flk-1) promotor," Circulation Res. 79:277-85;

Shima, D.T.등의 1996, "The mouse gene for vascular endothelial growth factor, Genomic structure, definition of the transcriptional unit. and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences," J. Biol. Chem. 271: 3877-8;

Morishita, K.등의 1995, "A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor(flt-1) that confers endothelial-specific gene expression," J. Biol. Chem. 270: 27948-53;

Patterson, D.등의 1995, "Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor," J. Biol. Chem. 270: 23111-8;

Korhonen, J.등의 1995, "Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo, " Blood 86: 1828-35.

N.B. Ozaki의 문헌은 다른 유용한 접근을 기술하는데, 즉 내피세포에서 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(TK)를 발현하고, 이어서 간시클로바(ganciclovir)의 프로드럭(prodrug)으로 치료하는 것이다.

대안으로, 뉴클레오티드 서열은 혈관형성 내피세포내에서 발현되는 서열과 결합하고, 이에 의하여 세포의 생존에 필요한 혈관형성 내피세포의 서열의 자연적 발현을 막는 안티센스 서열일 수 있다.

응괴 형성

리포솜 또는 뉴클레오티드 서열/지질 복합체를 사용하여 수행될 수 있는 본 발명의 다른 양상은 혈괴의 형성을 포함한다. 구체적으로, 본 발명의 리포솜 또는 복합체는 혈관형성 혈관에 혈괴의 형성을 초래하는 혈관형성 내피세포에 영향을 주도록 설계된다. 혈괴는 혈관에 산소와 영양분의 유입을 방해해서, 혈관 및 주위 조직의 죽음을 초래한다.

원하지 않은 종양을 소실시키기 위하여 종양 맥관계내에 응괴를 형성하는 기본적 개념은 종양 맥관을 표적지향화하는 항체를 사용함으로써 수행되어 왔다. 본 발명은 응괴형성 연쇄반응을 촉진하는 약제를 포함하는 양이온성 지질을 사용하여 개선된 결과를 달성할 수 있다. 예를들면 본 발명의 양이온성 리포솜은 응괴반응(혈액 응고 연쇄)의 주된 개시 수용체인 사람 조직 인자(TF)를 포함하게 구성될 수 있다.

종양 세포는 혈액 공급에 의존한다. 종양 맥관계의 국소적 방해는 종양세포가 죽는 사태를 발생시킨다. 종양 맥관의 내피는 혈액과 직접 접촉한다. 그러나, 종양 세포 자신은 혈류의 바깥에 있고, 대부분 순환계로 주사된 많은 물질로 접근하기가 쉽지 않다. 스스로 형질전환을 하지 않는, 즉 치료 요법에 대한 내성을 갖도록 돌연변이를 획득하지 못하는 혈관형성 내피세포를 표적지향화한다는 점에서 본 발명의 다른 양상과 함께 이 양상이 특히 성공적이다. 종양세포는 많은 돌연변이를 수반하고, 이런 돌연변이는 종종 세포가 요법에 대하여 내성을 갖게 한다. 항체-지향 표적지향화를 사용하는 종양의 크기를 감소시키는 것과 관련된 결과가 다음과 같은 사람에 의하여 교시되었다: Burrows, F,J. and P.E. Thorpe; Eradication of large tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature, Proc Natl Acad Sci USA 90:8996-9000, 1993. Huang, X., G. Molema, S. King, L. Watkins, T.S. Edgington, and P.E. Thorpe, Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature, Science 275: 547-550, 1997.

본 발명과 관련하여 응괴형성을 수행하기 위하여, DNA/양이온성 지질 복합체를 형성하는 것이 바람직하다. 복합체는 응괴반응(혈액 응고) 연쇄에 대한 주된 개시 수용체인 단백질인, 사람 조직 인자와 같은 단백질을 코드화하는 DNA를 포함할 것이다. TF를 코드화하는 유전자는 바람직하게는 혈관형성 내피세포의 환경에서 활성화되고, 정적인 내피세포의 환경에서는 활성화되지 않는 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 따라서, 복합체의 양이온성 지질은 복합체가 혈관형성 내피세포와 결합하게 할 것이다. 이후에, 복합체는 혈관형성 내피세포로 유입될 것이고, 복합체의 DNA가 발현될 것이다. 발현된 단백질은 혈액 응고 연쇄반응 개시할 것이다. 혈액 응괴가 혈관내에 형성되면, 주위 종양세포에 더 많은 산소와 영양분이 단절될 것이다. 이후에, 종양세포는 죽을 것이다. 체간 사람 조직 인자(tTF)와 같은 사람 조직 인자상의 가변성은 또한 응괴를 개시하는데 사용될 수 있다. tTF를 코드화하는 유전 물질 및 다른 인자도 공지되었다(상기 인용한 Huang등의 문헌과 거기서 인용한 공보 참조).

혈관형성의 실험적 모델

본 발명은 혈관형성에 대한 설치류 모델을 사용하여 용이하게 실시될 수 있다. 천식이나 기관지 염증과 같은 만성 염증 질병은 기도 점막에 조직 및 혈관의 개조를 유발한다. 만성 기도 염증의 병인을 연구하기 위하여, 래트와 마우스의 기도에서 만성염증 및 조직 변이가 발생한 모델을 사용했다. 혈관형성이 Mycoplasma pulmonis 감염의 결과로 기도 점막에서 발생했다. 이 모델에서, Mycoplasma pulmonis 생물체는 기관 및 기관지 내피에 잠복기가 긴 염증을 유발한다. M. pulmonis로 감염된 래트의 기도 점막은 몇가지 명백한 질환을 갖는다; 1) 내피 및 고유판이 두꺼워짐; 2)내피의 세포 성분의 변화 3) 혈관생성; 4)혈청 누출로 인한 염증 매개 물질 P에 대한 혈관형성 혈관의 감도의 증가; 5)세정맥은 물론 모세혈관으로부터 물질P 유도의 누출; 및 6) 모세혈관 내피세포상에 물질 P에 대한 수용체(NK1 수용체) 수의 증가. 이 모델에서, 혈관생성은 만성 염증에 의해서 촉진되고, 혈관은 염증 매개체가 될 수 있다.

렉틴의 관류를 사용하여 내강 내피세포 표면을 염색하는 연구는 M. pulmonis 감염후에 래트에서 혈관형성의 정도를 밝혀냈다. 수많은 모세혈관과 같은 혈관이 감염된 래트의 기관 점막에 있었고, 이 혈관은 염증 매개체인 물질 P의 정맥내 주사후에 누출된다.

마우스에서, M. pulmonis는 접종후 6-9일에 피크를 이루고 이어서 기도에 잠복기인 감염이 되는 급성 폐 염증을 유발한다. M. pulmonis에 의한 감염에 대한 마우스의 반응은 종류에 따라 크게 의존한다: 예를들면, C3H 계통은 C57BL계통 보다 높은 생존률 및 사이토킨인 종양 괴사 인자α의 큰 감소를 보인다. 내피의 과다형성과 같은 점막 변이의 양상은 M. pulmonis에 의해 감염된 마우스의 기도를 통하여 설명되어 왔다. M. pulmonis의 비강 접종으로 감염된 C57BL/6 마우스에서는, 다수의 기관 혈관이 새로운 모세혈관의 성장을 통하여 분명히 극적으로 증가한다. 이 계통에서는, 기관점막 맥관계는 더 이상 평면이 아니고, 작은 혈관이 점막면과 수직으로 성장한다. 수많은 명백한 맥관의 싹(sprout)들이 증가된 맥관질 영역에서 발견된다. 따라서, M. pulmonis에 의한 C57BL/6마우스의 감염은 내피증식, 맥관 변이 및 혈관생성을 수반하는 만성 기도 염증을 발생시킨다. 반대로, M. pulminis의 비강 접종에 의해 감염된 C3H/HeNCr 마우스에서는, 기관 점막에서 다수의 맥관 내피세포가 증가하지만, 혈관의 수는 그렇지 않다. 증가한 맥관질은 혈관의 길이나 개수의 증가로 인한 것이 아니라, 혈관 지름의 증가로 인한 것이고, 이 혈관의 증가는 내피세포의 개수가 두배로 증가함에 의한 것이다. 감염된 기관에서 개개의 내피세포의 크기는 현저하게 증가하지 않았다. M. pulmonis에 대한 순환하는 항체의 수준은 두 계통의 마우스에서 비슷했다. 따라서, M. pulmonis에 의한 C3H/HeNCr 마우스의 감염은 맥관변이 및 내피 증식을 수반하는 만성 기도감염을 발생시켰지만, 혈관의 개수가 현저하게 증가하지는 않았고, 반면, C57BL/6마우스에서는 내피세포의 증식 및 새로운 혈관을 발생시켰다.

두 번째 모델에서는, SV40 바이러스 종양 유전자(oncogene)의 트랜스게닉(transgenic)발현으로부터 초래된 종양에서 혈관형성이 발생했다. "RIP-Tag" 트랜스게닉 마우스 모델에서, 대형 T 항원인 SV-40 바이러스로부터의 종양유전자가 래트 인슐린 프로모터의 영역에 의하여 구동된다. 쥐 유전자로 삽입했을 때, 이 구성물은 췌장에 흩어져 있는 약 400개의 섬에 위치하는 췌도 β세포에서 구체적으로 Tag 발현을 유도한다. 이 마우스에서 췌장의 모든 섬들이 Tag를 발현하지만, 그러나 섬은 통상 약 6주 까지만 발육한다. 이점에서, 섬의 약 50%가 과형성이 된다. 그러나, 이 과형성된 섬중에서, 적은 부분(<5%)이 약 10주 내에 종양으로 발육한다. 종양 생성의 병목단계는 섬이 혈관형성을 유발하는 능력을 획득할 때, 극복될 것으로 보인다: 따라서 종양생성의 이 단계를 "혈관생성 스위치"라고 명명된다. 유사한 혈관생성 스위치는 몇몇 사람 종양뿐 아니라 다른 쥐 종양 생성의 모델에서도 존재하는 것으로 또한 보인다. 따라서, RIP-Tag 모델은 종양에서 혈관형성의 진행을 조사하기 위한 잘 특성화된 골격을 제공한다.

실시예

다음의 실시예는 양이온성 리포솜의 제조 방법 및 이런 리포솜을 사용하는 방법론을 수행하는 방법의 완전한 개시 및 설명을 당업자에게 제공하기 위하여 제시된 것이고, 발명으로 간주되는 것의 범위를 제한하려는 의도가 아니다. 사용된 숫자(예를들면 양, 온도 등)에 관해서는 정확도를 보증하려는 노력을 행했으나, 실험상의 착오 및 일탈치도 있음이 고려되어야 한다. 다르게 지시되지 않으면, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고; 온도는 섭씨; 압력은 대기압이거나 대기압에 가까운 기압이다. 하기의 각각의 실시예는 방법과 결과를 요약해서 다수의 수행된 실험을 나타냈다는 것을 알아야 한다. 당업자들은 실험 모두가 긍정적 결과를 제공하지 않은 것을 알게 될 것이다. 그러나, 다음은 얻은 결과를 정확히 전달하는 것이라고 믿어진다.

실시예1

정상 마우스에서 양이온성 지질의 분포

리포솜 및/또는 플라스미드 DNA를 표지하고, 표지된 복합체의 세포 분포를 정맥주사 후 여러 시간에 걸쳐 결정했다. 실험을 모두 6마리의 무균 마우스(20-25g 체중)상에서 수행했다.

양이온성 소형 단일층 소포 리포솜을 양이온성 지질인 DDAB나 DOTAB, 및 중성 지질인 DOPE나 콜레스테롤로부터 제조하고, Texas Red 또는 적색 형광 카보시아닌 염료인 Dil 또는 CM-Dil로 표지했고, 몇몇 경우에서는 루시페라제 또는 β-갈락토시다제와 같은 리포터(reporter) 유전자를 함유하는 플라스미드 DNA와 복합체를 형성했다. 내피세포를 형광식물 렉틴인 플루오레신-Lycopersicon esculentum을 사용해서 표지했다. 단핵구/거대세포를 형광 비드(bead)를 사용해서 표지했다(Duke, 500nm). 세포핵을 DAPI, YO-PRO 또는 호이스트33342 염료로 표지했다.

300㎕ 이하중 16-60㎍의 DNA를 함유하는 형광 리포솜 또는 리포솜-DNA 복합체를 꼬리 정맥을 통하여 마취하지 않은 마우스에 주사했다. 몇몇 실험에서는, 복합체 투여후 500nm의 형광 비드를 주사했다. 5분 내지 24시간 후에, 페노바비탈 나트륨으로 동물을 마취시키고, 다음에 좌심실을 통하여 고정액(인산 완충 염수중 1% 파라포름알데히드)을 관류시키고, 이어서 형광 렉틴으로 맥관계의 내피 표면을 표지했다. 관류후에, 조직을 제거해서 전체로서 제조하거나 또는 비브라톰 또는 조직 초퍼(chopper)로 잘라서 절편으로 했다. 또한, 몇몇 검체를 전자 현미경으로 관찰했다. 조직을 형광 현미경 또는 이중 초점 현미경에 의하여 검사했다. 또한 몇몇 검체를 투과전자 현미경에 의해서 검사했다.

결과: 주사 5분 내지 24시간 후에 검사한 마우스에서, CM-DiI 또는 DiI-표지 리포솜 또는 리포솜-DNA 복합체가 폐에서 가장 풍부했다. 더욱이, 그들은 폐포 모세혈관의 내피세포에 가장 많았다. 폐포 모세혈관에서 형광은 양쪽 폐엽에 균일하게 분포된다. 또한 몇몇의 CM-DiI 또는 DiI 형광은 혈관내 단핵구/거대세포에 있었다.

폐 다음으로는, 간 및 비장이 가장 많은 양의 표지된 리포솜 또는 복합체를 갖는다. 이 기관에서는, CM-DiI 또는 DiI 형광이 형광비드와 함께 같이 위치한다. 간에서는, CM-DiI 또는 DiI 형광 및 비드가 쿠퍼세포에 있었다. 비장에서는, 그들은 거대세포내에 있었다.

난소도 또한 CM-DiI 또는 DiI로 과다하게 표지된 리포솜 또는 복합체를 가졌다. 구체적으로, 마우스 난소의 대난포 및 황체의 혈관형성 혈관에서 내피세포가 정맥주사후에 CM0DiI 또는 DiI-표지 DDAB:콜레스테롤(리포솜 또는)-DNA 복합체를 유입하는 것이 관측되었다. 이 관측을 사진으로 증명했다(도 1). 다른 난소 혈관은 비교적 표지된 복합체를 거의 함유하지 않는다. 이 결과를 사용해서 혈관형성 내피세포가 우선적으로 리포솜 및 리포솜-DNA 복합체를 유입한다는 것, 즉 실험에 사용된 양이온성 리포솜이 혈관형성을 수행하지 않는 대응 내피세포와 비교해서 혈관형성을 수행하는 내피세포와 더 결합하기 쉽다고 추론했다.

표지된 리포솜 또는 복합체는 또한 림프절의 고도의 내피 세정맥(HEV) 및 소장의 파이어반의 내피세포에 매우 풍부하고, 반면, 그들은 이 림프 기관의 모세혈관의 내피세포에는 희박하다. 표지된 리포솜 또는 복합체는 또한 하수체 전엽, 심근, 횡경막, 부신 피질 및 지방 조직의 모세혈관 내피세포에 다수가 존재한다.

표지된 리포솜 또는 복합체는 방광, 자궁 및 팔로피오난관의 세정맥에 부착된 단핵구/거대세포에 풍부하다. 몇몇의 세정맥은 다량의 표지된 단핵구/거대세포를 함유했다. 또한, 이 기관내의 세동맥, 모세혈관 및 세정맥의 내피세포의 일부가 조금 표지됐다.

표지된 리포솜 또는 복합체는 하수체 후엽, 신장 골수, 소장(회장) 융모, 췌장 및 부신 수질의 모세혈관 내피세포와 비교적 거의 결합하지 않는다. 뇌, 갑상선, 신 피질, 췌도, 기관 또는 기관지에서는 표지된 리포솜 또는 복합체를 거의 발견할 수 없었고, 때때로 단핵구/거대세포가 발견됐다.

결론: 이 연구에 사용된 CM-DiI 또는 DiI-표지 DDAB:콜레스테롤 리포솜 또는 리포솜-DNA 복합체의 형성은 내피세포, 거대세포 및 단핵구의 3가지 주요 세포형태를 표적지향화한다. 리포솜 또는 복합체의 유입은 기관 및 혈관 특이적이다. 폐의 모세혈관 내피세포 및 간과 비장의 거대세포에 가장 많이 유입됐다. 난소, 하수체 전엽, 심장, 횡경막, 부신 피질 및 지방 조직의 모세혈관 내피세포도 또한 표적지향화됐다. 난소에서 리포솜 또는 복합체를 유입하는 혈관이 혈관형성 부위였다. 또한, 소장 파이어판 및 림프절의 HEV가 표적지향화됐다. 다른 기관의 내피세포 또는 거대세포의 표적지향화는 빈도는 적고 변화가 많았다. 뇌, 갑상선, 신 피질, 기관 및 기관지의 혈관은 표적지향화되지 않았다.

또한, 실험은 대부분의 기관에서 리포솜 또는 복합체가 맥간계 밖으로 유출되지 않는다는 것을 증명했다. 그들이 불연속적인 내피로 구성된 혈관을 갖는 비장의 혈관외 세포는 발견되었지만, 다른 기관에서는 맥관에서 흘러나오지 않았다.

최종적으로, 대난포 및 항체 혈관에 의한 양이온성 리포솜 및 리포솜-DNA 복합체의 유입은 혈관형성 혈관의 내피세포가 우선적인 유입부위라는 것을 나타낸다.

실시예2

RIP-Tag5 마우스에서 DDAB:콜레스테롤(리포솜 또는)-DNA 복합체의 유입

실시예 1의 실험의 결과는 난포 및 황체에서 혈관형성 혈관이 양이온성 리포솜 및 리포솜-DNA 복합체를 맹렬히 유입하는 것을 나타냈다. 따라서, 종양의 혈관형성 혈관의 내피세포가 양이온성 리포솜 또는 리포솜-DNA복합체를 맹렬히 유입하는 지를 결정하기 위해서 실험을 수행했다.

Experimental Mouse Models Section, Hanahan, D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumors in trasgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. Nature 315: 115-22, 1985; Hanahan, D., and J. Folkman. Patterns and energing mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86: 353-64, 1996 에 기재된 것과 같이 종양의 트랜스게닉 RIP-tag5모델을 사용했다. 이 모델에서, RIP-Tag으로 명명되는 SV-40 바이러스로부터의 종양 유전자인 거대 T 항원 (Tag)이 래트 인슐린 프로모터(RIP)의 영역에 의하여 구동된다. 쥐의 게놈에 삽입되었을 때, 이 구성물은 구체적으로 췌도의 β세포에서 T항원의 발현을 유도한다.

이 모델의 하나의 중요한 특성은 종양 발생의 다양한 단계 및 따라서 혈관형성의 다양한 단계가 각 RIP-Tag5 마우스에서 동시에 존재한다는 것이다. 모두 300-400개의 섬이 T 항원을 발현했지만, 섬은 초기에 정상적으로 발생했다. 그러나, 6주 후에 약 절반이 과형성되고, 이것들 중에서, 일부가 10주가 될 때까지 종양으로 발전했다. 종양형성은 혈관형성의 착수와 동시에 동시에 발생하는 것으로 보인다. 이 전환은 "혈관형성 스위치"라고 명명되었다(Folkman, J., K. Watson, D. Ingber, and D. Hanahan, Induction of angioginesis during the transition from hyperplasia to neoplasia, Nature 339: 58-61, 1989; Hanahan, D., and J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, Cell 86: 353-64, 1996. 참조)

유사한 혈관형성 스위치가 사람 종양은 물론 다른 마우스의 종양신생 모델에서도 존재하는 것으로 보인다(Hanahan, D., and J. Folkman, Patterns and energing mechanisms of the angiogenem switch during tumorigenesis, Cell 86: 353-64, 1996.참조).

실시예 1과 같은 방법과 재료를 사용했다. 구체적으로, CM-DiI 또는 DiI-표지 DDAB:콜레스테롤 리포솜을 종양을 갖고 있는 RIP-Tag5 마우스에 정맥주사하고, CM-DiI 또는 DiI-표지 DDAB:콜레스테롤-DNA 복합체를 다른 RIP-Tag5 마우스에 정맥주사했다. 췌도 세포 종양의 혈관형성 혈관에 리포솜 또는 복합체의 분포를 주사 24시간 후에 검사했고, 정상 마우스의 췌도의 혈관에서의 분포와 비교했다.

결과: 2가지 새로운 관측을 하였다: (1)리포솜 또는 복합체는 내피를 가로질러 유출되지 않고 혈관형성 혈관의 내피세포에 의해 유입됐다. 및 (2)리포솜 또는 복합체의 엔도솜 유입이 췌도의 정상 혈관의 내피세포보다 혈관형성 혈관의 내피세포에서 더 컸다(도 2는 조직 검체이다).

결론:이 실험은 혈관형성 종양혈관에 의하여 DDAB:콜레스테롤 리포솜 또는 리포솜-DNA 복합체의 우선적 유입과 일치하는 결과를 나타냈다. 실험(1)을 반복하기 전에 리포솜-DNA 복합체의 형광 강도를 증가키켰고, (2)RIP-Tag 마우스의 종양에서 양성 리포솜 및 리포솜-DNA 복합체의 유입부위를 찾는 방법을 개선시켰고; 및 (3)RIP-Tag5 마우스에서 췌도 세포 종양의 혈관형성 혈관의 구조와 기능에 대한 자세한 지식을 얻었다.

실시예 3

RIP-Tag2 마우스에서 DOTAP:콜레스테롤-DNA 복합체의 유입

목적: 리포솜-DNA 복합체의 형광 강도를 DiI대신에 Texas Red-DHPE를 사용해서 증가시켰고;형광 양이온성 리포솜-DNA 복합체의 유입부위를 찾기 위한 RIP-Tag2 마우스의 췌장을 제조하는 방법을 개선시켰고; RIPI-Tag2 마우스에서 췌도 세포 종양의 혈관형성 혈관의 구조와 기능을 연구했다. 이렇게 개선하여, 실시예 2에 기술된 형태의 실험을 실행해서 양이온성 리포솜과 지질-DNA복합체가 유입되는 방법을 결정했다.

방법:Texas Red-DHPE로 표지된 양이온성 DOTAP:콜레스테롤 소형 단일층 소포 리포솜을 제조했다. 리포솜-DNA 복합체를 300㎕ 중 60㎍의 플라스미드를 사용해서 5% 글루코스 중 지질과 DNA의 총 비가 24:1(nmols/㎍)이 되게 제조했다. 복합체(300㎕)를 마취하지 않은 트랜스게닉 RIP1-Tag2 C57BL/6 마우스와 마취하지 않은 정상 C57BL/6 마우스의 꼬리 정맥에 주사했다.

복합체 주사 4시간 후에, 마우스에 넴부탈 50mg/kg을 복강주사하여 마취했다. 맥관계를 상행 대동맥에 1% 파라포름알데히드를 관류시켜 고정하고,맥관계의 내강 표면을 녹색의 형광 렉틴을 관류시켜서 염색했다(Thurston, G., P. Baluk, A.

Hirata, and D.M. McDonald, Permeability-unrelated changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding, Am J Physiol 271:H2547-2562, 1996. 참조). 조직 전체 또는 비브라톰 절단부를 벡타실드(Vectashield)에 탑재했고, 혈관을 Zeiss Axiophot 형광 현미경 또는 크립톤-아르곤 레이저 및 최적화된 광전 배증관을 구비한 Zeiss LSM 410 이중 초점 현비경을 사용해서 검사했다. 영상을 코닥 엑타크롬 필름(ASA 400) 또는 디지털 이중 초점 이미지 파일에 기록했다.

결과: 실험은 RIP1-Tag2 마우스에서 췌장 종양의 혈관형성 내피세포에 의한 Texas Red-표지 DOTAP: 콜레스테롤-DNA 복합체의 유입을 명백히 나타냈다. 종양 혈관에 의한 유입은 정상 췌도의 대응 내피세포에 의한 복합체의 유입을 훨씬 초과했다.

종양은 그들의 혈관이 적색 형광 리포솜 복합체로 과다하게 표지되었기 때문에 인접조직과 쉽게 구별되었다(도 3과 도 4를 비교하라). 종양의 맥관계의 형상은 가변성이고, 정상 섬의 전형적인 패턴에서 조밀하고, 꼬이고, 문합하는 유동형의 혈관으로 변할 수 있고, 정상 섬에서 보다 조밀하게 채워진다. 후자에서, 맥관계는 황체의 그것을 닮았다. 종양혈관의 표지의 강도는 종양의 크기와 대강 관련된다. 가장 큰 종양이 최대로 표지되었다.

소형에서 중간 크기의 몇몇 종양혈관은 뭉뚝한, 초점이 있는, 동맥류와 같은 융기부를 갖는다. 이 부위는 엔도솜이라고 추정되는 비정상적으로 많은 Texas Red 표지된 점의 존재로 인해 특히 두드러진다. 이 부위의 Texas Red 표지은 인접 혈관의 그것보다 더 많다. 이 구조는 모세혈관의 싹이 될 수도 있다고 보인다. 구조는 조밀한 복잡한 맥관계를 갖는 대형 종양에서는 발견되지 않았고, 여기서 혈관은 균일하게 심하게 표지 된다.

종양에서 Texas Red-표지 복합체가 맥관외로 유출된다는 증거는 없었다. 또한 Texas Red-표지 복합체는 종양의 맥관외 적혈구 집단에서 보이지 않았다. 종양 맥관계의 심한 표지는 초기 단계의 발생중에 있는 황체와 닮았다.

실시예 4

종양 및 만성 염증에서 혈관형성 혈관에 의한 양이온성 리포솜 및 리포솜-DNA 복합체의 유입

목적: 실시예 3에 기술된 형태의 실험을 수행해서 관찰을 혈관형성의 다른 모델로 확장했다. 이 실험은 또한 양이온성 리포솜이 혈관형성 혈관을 표적지향화하기 위해서 DNA가 존재해야만 하는지의 여부의 문제를 해결했다. 혈관형성의 4개의 동물모델을 혈관형성 혈관에 의하여 DOTAP:콜레스테롤 리포솜 또는 리포솜-DNA 복합체의 우선적인 유입이 있는지에 관하여 조사했다.

모델:RIP1-Tag2 종양 모델. 트랜스게닉 C57/BL/6 마우스를 생산했고 PCR 분석에 의하여 표현형을 출산시켰다. 마우스 모델을 상기에 기술했다.

HPV 종양 모델. 트랜스게닉 HPV(사람 파필로마 바이러스)마우스를 생산했고 PCR 분석에 의해서 표현형을 출산시켰다. 비-트랜스게닉 동산아(同産兒)를 대조군으로 사용했다. 이 모델에서, 사람 파필로마 바이러스로 부터의 종양 유전자는 케라틴 14 프로모터의 영역에 의하여 구동된다. 마우스의 게놈으로 삽입되었을 때, 이 구성물은 내피세포에서 구체적으로 HPV 발현을 유발한다. 모든 트랜스게닉 마우스에서 상부 흉곽 및 귀의 피부에서 혈관형성에 수반되는 이형성이 발생했고, 일부에서는 종양이 발생했다.

마우스의 Mycoplasma pulmonis 감염 모델. 이 염증은 기도 점막에서 혈관형성에 의해 수반되는 만성기도 염증을 초래한다. 마취(87 mg/kg 케타민 및 13mg/kg 크실라진의 복강내주사)후, 무균의, 8주된, 수컷 및 암컷 C3H/HeNCr 또는 C57BL/6 마우스(모두 Charles River에서 구입)에 비강으로 50㎕의 부피중 Mycoplasma pulmonis(5782C-UAB CT7 계통)의 단위를 형성하는 3×10^4 콜로니를 접종했다. 무균 마우스를 대조군으로 하여 멸균 육즙에 접종했다. 감염된 마우스와 대조군 마우스를 장벽 조건(barrier condition)에서 분리해서 사육했다. M. pulmonis에 대한 항체의 혈청 레벨을 실험이 끝날 때 측정했다(Microbiological Associate, Bethesda MD). 주사후 1 내지 8주간 마우스를 연구했다.

래트에서의 Mycoplasma pulminis 감염 모델. 마우스에서와 마찬가지로, 이 감염도 만성 기도 질병을 유발하고, 특징중의 하나는 기도점막에서의 혈관형성이다. 마취(40 mg/kg 케타민 및 8mg/kg 크실라진의 복강내 주사)후에, 무균의, 8주된, 암컷 Wistar 래트(Charles River에서 구입)를 200㎕ 부피중 5782C4 계통의 Mycoplasma pulmonis로 3일 연속으로

매일 비강을 통하여 접종했다. 육즙으로 접종한 무균 래트를 대조군으로 사용했다. 감염된 래트와 대조군 래트를 장벽조건에서 따로 사육했다. M. pulmonis 및 다른 병원균에 대한 항체의 레벨을 실험이 끝날 때 측정했다(microbiological Associates, Bethesda MD).

방법: Texas Red-DHPE로 표지된 양이온성 DOTAP: 콜레스테롤 리포솜을 실시예 3에 기술된 대로 제조했다. 리포솜을 5% 글루코스의 100㎕부피중 360nmol의 총지질량으로 마우스의 꼬리 정맥에 주사했다. 대퇴골 정맥을 통하여 래트를 감염시켰다. 리포솜-DNA 복합체를 200-300㎕중 60㎍ 플라스미드 DNA를 사용해서 5% 글루코스중 총 지질:DNA의 비를 24:1로해서 제조했다. 리포솜 또는 복합체(200-300㎕)를 마취하지 않은 RIP-Tag2, HPV, 또는 M. pulmonis 감염된 마우스의 꼬리 정맥으로 주사했다. 비 트랜스게닉, 무균 마우스를 대조군으로 사용했다.

주사후 20분 또는 4시간에, 마우스 또는 래트에 넴부탈 50mg/kg를 복강내 주사해서 마취시켰다. 맥관계를 상행 대동맥을 통하여 1% 파라포름알데히드를 관류시켜 고정했고, 맥관계의 내강 표면에 녹색 형광 렉틴을 관류시켜서 염색했다(Thusrton, G., P.Baluk, A. Hirata and D. M. Mcdonald) 투과성과 관련된 변화가 렉틴의 결합에 의한 감염된 세정맥의 내피세포 가장자리에서 나타났다(Am J Physiol 271:H2547-2562, 1996) 조직 전체 또는 비브라톰 절편을 벡타실드(Vectashield)에 장착하고, 혈관을 Zeiss 형광 현미경 또는 이중 초점 현미경으로 검사했다.

형광 리포솜 또는 복합체 유입의 양을 이중 초점 현미경으로 정량했다. 요약하면, 초점(z)축에 2.5㎛씩 분리된 일련의 12 초점 영상을 20×NA 0.6 렌즈(Zeiss) 및 이중초점의 바늘구멍 크기인 표준화된 장치, 및 레이저 파워를 사용해서 플루오레세인과 Texas Red channel중의 기관 주둥이 부위에 모았다. 혈관(플루오레세인-L. esculentum) 및 리포솜(Texas Red)을 각각 나타내는 영상 시리즈로부터 영상을 발생시켰다. 이중초점 소프트웨어를 사용해서, 면적중 약 200μm^2을 혈관 영상이라고 정했고, 그 후 리포솜 영상의 대응 영역의 평균형광을 측정했다. 배경 강도를 혈관에 인접한 선택된 영역에서 형광을 측정해서 결정했다. 그룹당 4개의 기관 및 기관당 25개의 혈관에서 측정을 행했다(n=4). 차이의 유의성을 Student' t-테스트로 평가했다.

투과전자 현미경용으로 제조한 조직을 상기대로 가공했다(McDonald, D. M. Endothelial gaps and permeability of venules of rat tracheas exposed to inflammatory stimuli, Am. J. Physiol. 266:L61-L83, 1994 참조). 요약하면, 1차 고정액(75mM 카코딜레이트 완충액중의 3% 글루타알데히드, pH 7.1 더하기 1% 수크로스, 4% PVP, 0.05% $CaCl_2$, 및 0.075% H_2O_2)을 실온에서 5분간 관류시키고, 이어서 2차 고정액(0.05% $CaCl_2$, 1% 수크로스, 및 4% PVP를 함유하는 카코딜레이트 완충액 75mM중 3% 글루타알데히드, pH7.1)을 5분간 관류시켰다. 조직을 실온에서 1시간 동안 원래의 위치에서 고정되도록 방치한후 제거하고 4℃에서 밤새워 방치했다. 조직을 레이저 칼로 자르거나 또는 조직 초퍼로 썰고, 오스뮴(100mM 카코딜레이트 완충액중 2% OsO_4, pH 7.4, 4℃에서 18시간)중에서 후-고정했고, H_2O로 세척하고(4℃에서 18시간), 초산 우라닐로 일괄해서 염색했다 (수성, 37℃에서 48시간). 그 후 조직을 아세톤으로 탈수하고, 여과하고, 에폭시 수지에 묻었다. 초 박막 절편을 초 마이크로톰으로 절단하고, 단일-홈 검체 격자에 장착해서, Zeiss EM-10 전자 현미경으로 검사했다.

결과: 실험은 Texas Red-표지 DOTAP:콜레스테롤-DNA 복합체 및 DiI-표지 DDAB:콜레스테롤-DNA 복합체에서의 결과와 유사하게 DNA가 없이 Texas Red 표지된 DOTAP:콜레스테롤 리포솜이 선택적으로 RIP1-Tag2 마우스에서 종양의 혈관형성 내피세포를 표적지향화 한다는 것을 나타냈다. 트랜스게닉 RIP1-Tag2 마우스에 대한 본 실험 및 후속 실험은 과형성 섬 및 종양의 혈관형성 혈관에 의한 양이온성 리포솜의 유입이 대응 정상 혈관의 그것을 많이 초과한다는 것을 확인했다(도 5, 6, 7 및 8). 과형성 섬 및 소형 종양의 몇몇 혈관에서, 리포솜이 초점영역에서만 내피세포에 의해 유입된 반면, 대형 종양에서는 유입이 더 일반적이었다(도 6). 유입의 초점 영역은 새로운 혈관이 성장할 수 있는 부위로 생각된다(도 8).

양이온성 리포솜 또는 리포솜-DNA 복합체의 이 성질은 물질을 혈관형성 내피세포에 선택적으로 송달하는 강력한 실제 용도를 갖기 때문에, 종양의 혈관형성 내피세포의 이 성질이 병리학적으로 혈관형성이 일어나는 다른부위의 내피세포에 의해서도 공유되는 지의 여부를 결정하는 것이 바람직하게 보였다. 이 물음은 혈관형성을 그 특징중의 하나로 하는, 만성 기도 염증을 유발하는 Mycoplasma pulminis 감염을 갖는 마우스의 기관에서 혈관형성 내피세포에 의한 Texas Red-표지 DOTAP:콜레스테롤 리포솜의 유입을 조사한 실험으로 해결했다(도 9와 10을 비교하라). 만성 염증의 영역에서 혈관형성 내피세포는 양이온성 리포솜의 대단히 많은 유입하는 부위로 밝혀졌다(도10). 구체적으로, M.pulmonis로 감염된 마우스의 기관의 혈관은 대단히 많은 유입량을 갖는다. 혈관형성 혈관의 이중초점 현미경 측정은 감염된 마우스가 대조군보다

20 내지 30 배 많은 유입을 갖는다는 것을 나타냈다(도 11). 100배의 유입을 갖는 혈관형성 혈관도 있었다. M. pulmonis 로 감염된 마우스에서 혈관형성 내피세포의 이중초점 및 전자 현미경 연구는 양이온성 리포솜이 우선 결합하고(도 12) 이어서 엔도솜(도13)으로 흡수된다(도 13).

마찬가지로, 양이온성 리포솜은 마우스의 난포 및 황체, HPV 마우스의 이형성 피부, 및 M. pulmonis 감염에 기인한 혈관형성을 갖는 래트의 기관에서의 혈관형성 혈관에 의해 맹렬히 유입됐다.

결론:이 실험은 양이온성 리포솜 및 리포솜-DNA복합체가 종양 또는 만성 염증의 부위의 혈관형성 내피세포를 우선적으로 표적지향화한다는 것을 확인했다.

본 발명에서 가장 실용적이고, 바람직한 구체예로 간주되는 것을 본 명세서에 나타내고 기술했다. 그러나, 이로부터 본 발명의 범위에 속하는 변형이 행해질 수 있고, 명백한 변형예가 본 개시를 검토함에 의해서 당업자들에게 일어날 수 있는 것으로 인정된다.

[참고목록]

이하의 문헌은 상기 본문을 통하여 문자와 수자로 인용된 것이다. 이들의 내용은 이에 의하여 명백하게 본 명세서에 참고로 포함된다:

A. U.S. Pat. No. 4,897,355

B. U.S. Pat. No. 4,394,448

C. U.S. Pat. No. 5,328,470

D. WO93/12240

E. WO/91/06309

F. Huang, et al, Cancer Res. 52, 5135 (1992).

G. Rosenecker et al., PNAS 93, 7236 (1996).

H. Abdi, et al., In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 31, 310 (1995).

I. Chonn et al., Curr. Opin. Biotechnol. 6, 698 (1995).

J. Green, et al., Adv. Exp. Med. Biol. 383, 83 (1995).

K. Hung, et al, Gene 159, 65 (1995).

L. Ledley, et al., Hum. Gene Ther. 6, 1129 (1995).

M. Mori, et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 35, 447 (1995).

N. Volm, et al.,et al, Curr. Opin. Oncol. 7, 429 (1995).

O. Litzinger, et al., Biochim. Biophys. Acta 1190, 99 (1994).

P. Northfelt, et al., Drugs 48, 569 (1994).

Q. Oku, et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 11, 231 (1994).

R. Gabizon, et al., Ann Biol.Clin (Paris) 51, 811 (1993).

S. Huang, et al, Am. J. Pathol. 143, 10 (1994).

T. Mori, et al., Pharm. Res. 10, 507 (1993).

U. Priebe, et al., Pharmacol. Ther. 60, 215 (1993).

V. Straubinger, et al., J. Natl. Cancer Inst. Monogr. 69 (1993).

W. Fidler, et al., World J. Surg. 16, 270 (1992).

X. Rowlinson-Busza, et al., Curr. Opin. Oncol. 4, 1142 (1992).

Y. Sugarman, et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 12, 231 (1992).

Z. Pak, et al., Biotherapy 3, 55 (1991).

AA. De Smidt, et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 7, 99 (1990).

BB. Papahadjopoulos, et al., Prog. Clin. Biol. Res. 343, 85 (1990).

CC. Shibata, et al., Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 30, 242 (1990).

DD. Hughes, et al., Cancer Res. 49, 6214 (1989).

EE. Shibata, et al., Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 29, 696 (1989).

FF. Freeman, et al., Cancer 58, 573 (1986).

GG. Zolotareva, et al., Eksp. Onkol. 8, 28 (1986).

HH. Caride, et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 1, 121 (1985).

II. Yatvin, et al., Med. Phys. 9, 149 (1982).

JJ. Liposomes, A Practical Approach, edited by Nev, R.R.C., IRL Press, 1994.

KK. Liposomes, From Physics to Applications, Lasic, D.D., Elsevier, 1993.

LL. Thurston, et al., "Cationic Liposomes Target Angiogenic Endothelial Cells in Tumors and Inflammation in Mice," J. Clin. Invest., April 1, 1998.

실시예에 인용된 문헌:

1. Arfors, K.-E., G. Rutili, and E. SvensjÜ. Microvascular transport of macromolecules in normal and inflammatory conditions. Acta Physiol. Scand. Suppl. 463: 93-103, 1979.

2. Baluk, P., and D. M. McDonald. The b2-adrenergic receptor agonist formoterol reduces microvascular leakage by inhibiting endothelial gap formation. Am. J. Physiol. 266: L461-L468, 1994.

3. Bowden, J. J., A. Garland, P. Baluk, P. Lefevre, E. Grady, S. R. Vigna, N. W. Bunnett, and D. M. McDonald. Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8964-8968, 1994.

4. Brigham, K., B. Meyrick, B. Christman, M. Magnuson, G. King, and L. C. Berry. *In vivo* transfection of murine lungs with a functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle. Am. J. Med. Sci. 298: 278-281, 1989.

5. Christenson, L. K., and R. L. Stouffer. Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. Endocrinology 137: 367-374, 1996.

6. Conary, J. T., R. E. Parker, B. W. Christman, R. D. Faulks, G. A. King, B. O. Meyrick, and K. L. Brigham. Protection of rabbit lungs from endotoxin injury by *in vivo* hyperexpression of the prostaglandin G/H synthase gene. J. Clin. Invest. 93: 1834-1840, 1994.

7. Folkman, J., K. Watson, D. Ingber, and D. Hanahan. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature 339: 58-61, 1989.

8. Hanahan, D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. Nature 315: 115-22, 1985.

9. Hanahan, D., and J. Folkman. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86: 353-64, 1996.

10. Lundberg, J. M., and A. Saria. Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. Nature 302: 251-253, 1983.

11. Majno, G., and G. E. Palade. Studies on inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11:571-604, 1961.

12. McDonald, D. M. Neurogenic inflammation in the rat trachea. I. Changes in venules, leucocytes, and epithelial cells. J. Neurocytology 17:583-603, 1988.

13. McDonald, D. M. The ultrastructure and permeability of tracheobronchial blood vessels in health and disease. Eur. J. Respir. Dis. 3 (Suppl 12):572s-585s, 1990.

14. McDonald, D. M. Endothelial gaps and permeability of venules of rat tracheas exposed to inflammatory stimuli. Am. J. Physiol. 266: L61-L83, 1994.

15. McDonald, D. M., and A. Goldfein. The relation of lutein cell Golgi apparatus morphology to ovarian progesterone secretion during the rat estrous cycle. Anat. Rec. 151: 385, 1965.

16. McDonald, D. M., K. Seiki, M. Prizant, and A. Goldfein. Ovarian progesterone secretion in relation to the lutein cell Golgi apparatus during rat estrous cycle. Endocrinology 85: 236-243, 1969.

17. Nabel, E. G., D. Gordon, Z. Y. Yang, L. Xu, H. San, G. E. Plautz, B. Y. Wu, X. Gao, L. Huang, and G. J. Nabel. Gene transfer *in vivo* with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. Hum. Gene Ther. 3: 649-56, 1992.

18. Philip, R., D. Liggitt, M. Philip, P. Dazin, and R. J. Debs. *In vivo* gene delivery: Efficient transfection of T lymphocytes in adult mice. J. Biol. Chem. 268: 16087, 1993.

19. Thurston, G., P. Baluk, A. Hirata, and D. M. McDonald. Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding. Am J Physiol 271: H2547-2562, 1996.

20. Tsukada, K., T. Matsushima, and N. Yamanaka. Neovascularization of the corpus luteum of rats during the estrus cycle. Pathol Int 46:408-416, 1996.

21. Umeno, E., J. A. Nadel, and D. M. McDonald. Neurogenic inflammation of the rat trachea: fate of neutrophils that adhere to venules. J. Appl. Physiol. 69: 2131-2136, 1990.

22. Zhu, N., D. Liggitt, Y. Liu, and R. Debs. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. Science 261: 209-211, 1993.

23. Bowden, J. J., T. R. Schoeb, J. R. Lindsey, and D. M. McDonald. Dexamethasone and oxytetracycline reverse the potentiation of neurogenic inflammation in airways of rats with *Mycoplasma pulmonis* infection. Am J Respir Crit Care Med 150:1391-401, 1994.

24. McDonald, D. M. Infections intensify neurogenic plasma extravasation in the airway mucosa. Am Rev Respir Dis 146: S40-4, 1992.

25. McDonald, D. M. Upregulation of tachykinin receptors in an animal model of chronic airway inflammation. Pulmonary Pharmacology 8: 203-205, 1995.

26. McDonald, D. M., T. R. Schoeb, and J. R. Lindsey. *Mycoplasma pulmonis* infections cause long-lasting potentiation of neurogenic inflammation in the respiratory tract of the rat. J Clin Invest 87:787-99, 1991.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

5몰% 이상의 하나 이상의 양이온성 지질; 및

혈관형성 저해제를 포함하는 양이온성 리포좀에 있어서, 리포좀은 혈중에서 대응 정상 내피세포와 비교해서 혈관형성 내피세포에 대한 보다 큰 친화도를 갖고, 리포좀은 생리학적 pH에서 존재할 때 0 mV 보다 큰 제타 포텐셜을 가지며, 양이온성 지질은 1,2-디올레일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP), 디메틸디옥타데실 암모늄 브로미드(DDAB), 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판 (DXTAP), 디데실디메틸암모늄-프로판 (DDAC), 1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판 (DXDAP) 및 1,2-디올레일-3-디메틸암모늄-프로판 (DODAP)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 양이온성 리포좀.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 검출가능한 표지를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 리포좀.

청구항 3.

5몰% 이상의 하나 이상의 양이온성 지질; 및

및 혈관형성에 영향을 주는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드/양이온성 지질 복합체에 있어서, 복합체는 생리학적 pH에서 존재할 때 0 mV 보다 큰 제타 포텐셜을 갖고, 복합체는 혈중에서 대응 정상 내피세포와 비교해서 혈관형성 내피세포에 대한 보다 큰 친화도를 가지며, 양이온성 지질은 1,2-디올레일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP), 디메틸디옥타데실 암모늄 브로미드(DDAB), 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판 (DXTAP), 디데실디메틸암모늄-프로판 (DDAC), 1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판 (DXDAP) 및 1,2-디올레일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드/양이온성 지질 복합체.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 뉴클레오티드 서열은 혈관형성 내피세포 내에서 선택적으로 활성화되는 프로모터에 작동가능하게 연결된 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 5.

제 3항에 있어서, 뉴클레오티드 서열은 혈관형성 내피세포 내에서 유전물질의 발현을 선택적으로 방해하는 안티센스 서열인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 6.

제 2 항에 따르는 양이온성 리포좀을 포함하는, 포유동물 혈관형성 부위의 진단제.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 포유동물은 인간이고, 검출가능한 표지는 형광 표지, 조직화학적 표지, 면역조직화학적 표지, 및 방사성 표지로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 진단제.

청구항 8.

제 4 항에 있어서, 프로모터는 FLT-1 유전자 프로모터, FLK-1 유전자 프로모터 및 폰 빌리브란트 인자(von Willibrand Factor) 유전자 프로모터로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 9.

혈관형성 내피세포에 선택적으로 영향을 끼치기 위한, 제 1 항에 따르는 양이온성 리포좀에 있어서,

상기 조성물은 상기 조성물이 혈관형성 내피세포로 들어가도록 하는 방식으로 혈관혈성 혈관의 혈관형성 내피세포와 선택적으로 일정기간 결합하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10.

제 9항에 있어서, 상기 조성물은 포유동물의 순환계에 주사에 의한 투여용으로 제조되고, 또한 상기 조성물은 혈중에서 대응 정상 내피세포와 비교해서 혈관형성 내피세포에 대해서 5배 이상의 큰 친화도를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11.

세포내에서 혈관형성 내피세포에 선택적으로 영향을 주는 약제에 있어서,

5몰% 이상의 하나 이상의 양이온성 지질; 및

혈관형성 증강제와 혈관형성 저해제로 구성된 군으로부터 선택되는 혈관형성에 영향을 주는 물질을 포함하는 양이온성 리포좀으로 이루어지는 리포좀 조성물을 포함하고, 리포좀은 혈중에서 대응 정상 내피세포와 비교해서 혈관형성 내피세포에 대한 보다 큰 친화도를 갖고, 리포좀은 생리학적 pH에서 존재할 때 0 mV 보다 큰 제타 포텐셜을 가지며, 양이온성 지질은 1,2-디올레일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP), 디메틸디옥타데실 암모늄 브로미드(DDAB), 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판 (DXTAP), 디데실디메틸암모늄-프로판 (DDAC), 1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판 (DXDAP) 및 1,2-디올레일-3-디메틸암모늄-프로판 (DODAP)으로 이루어진 군으로부터 선택되며,

리포솜 조성물은 리포솜 조성물이 혈관형성 내피세포에 들어가도록 하는 방식으로 리포솜 조성물을 혈관형성 혈관의 혈관형성 내피세포에 선택적으로 일정 기간 결합하는 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 리포솜 조성물은 포유동물의 순환계 내로 투여되는 주사용인 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 13.

제 12 항에 있어서, 리포솜 조성물은 5 몰% 이상의 양이온성 지질을 포함하고 리포솜 조성물은 동맥내 주사용인 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 14.

제 13 항에 있어서, 혈관형성에 영향을 주는 물질은 혈관형성 저해제인 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 15.

제 14 항에 있어서, 혈관형성 저해제는 스테로이드인 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 16.

제 11 항에 있어서, 혈관형성에 영향을 주는 물질은 혈관형성 증강제인 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 17.

제 11 항에 있어서, 혈관형성에 영향을 주는 물질은 혈관형성에 영향을 주는 단백질을 발현하는 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 18.

제 11 항에 있어서, 혈관형성에 영향을 주는 물질은 혈관형성 내피세포 내에서 발현되는 DNA의 발현을 방해하는 안티센스 RNA 서열인 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 19.

제 17 항에 있어서, 단백질을 코드화하는 상기 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열에 작동 가능하게 부착된 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 20.

제 19 항에 있어서, 프로모터는 혈관형성 내피세포 내에서 선택적으로 활성화되고 대응하는 정적인 내피세포에서는 활성화되지 않는 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 21.

제 20 항에 있어서, 단백질은 혈전형성 연쇄반응을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 22.

혈관형성 부위가 있는 환자의 혈관형성 부위에서 혈공급을 생체내 감소시키기 위한 리포솜 DNA/양이온성 지질 복합체로서,

복합체는 대응하는 정상 내피세포와 비교해 혈관형성 내피세포에 더 큰 친화도를 갖고, 리포솜 복합체는 적어도 5몰%의 적어도 하나의 양이온성 지질을 포함하고, 혈관형성을 저해하는 단백질을 코드화하는 DNA를 포함하며, 여기서 양이온성 지질은 1,2-디올레일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP), 디메틸디옥타데실 암모늄 브로미드(DDAB), 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판 (DXTAP), 디데실디메틸암모늄-프로판 (DDAC), 1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판 (DXDAP) 및 1,2-디올레일-3-디메틸암모늄-프로판 (DODAP)으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 복합체는 생리학적 pH에서 존재할 때 0 mV 보다 큰 제타 포텐셜을 갖고, 복합체는 DNA에 의하여 발현되는 단백질의 양이 혈관형성 부위의 혈관에서 혈관형성 내피세포를 사멸시키기에 충분한 순환계 내로의 주사용인 것을 특징으로 하는 리포솜 DNA/양이온성 지질 복합체.

청구항 23.

제 2 항에 있어서, 검출가능한 표지는 방사성 표지, 형광 표지, 조직화학적으로 검출가능한 표지, 면역조직화학적으로 검출가능한 표지, 및 검출가능한 염료로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 리포좀.

청구항 24.

제 3 항에 있어서, 복합체는 혈관형성을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 25.

제 3 항에 있어서, 복합체는 혈관형성을 저해하는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 26.

제 1 항에 있어서, 리포좀은 혈중에서 대응 정상 내피세포와 비교해서 혈관형성 내피세포에 대해서 5배 이상의 큰 친화도를 갖는 것을 특징으로 하는 리포좀.

청구항 27.

제 1 항에 있어서, 리포좀은 혈중에서 대응 정상 내피세포와 비교해서 혈관형성 내피세포에 대해서 10배 이상의 큰 친화도를 갖는 것을 특징으로 하는 리포좀.

청구항 28.

제 1 항에 있어서, 혈관형성 저해제는 독성 화합물인 것을 특징으로 하는 리포좀.

청구항 29.

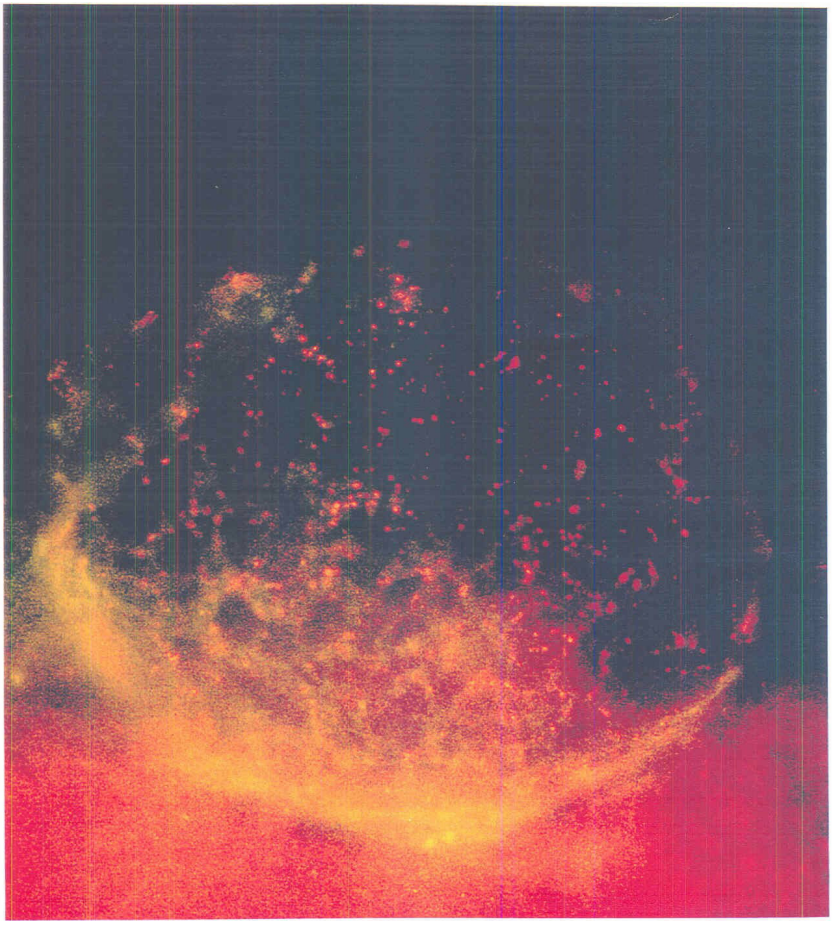
제 1 항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 백본과 탄소수 12 내지 14 길이이고 6개 까지의 불포화를 함유하고 백본에 아실 또는 에테르 결합에 의하여 결합하는 지방산 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 리포좀.

청구항 30.

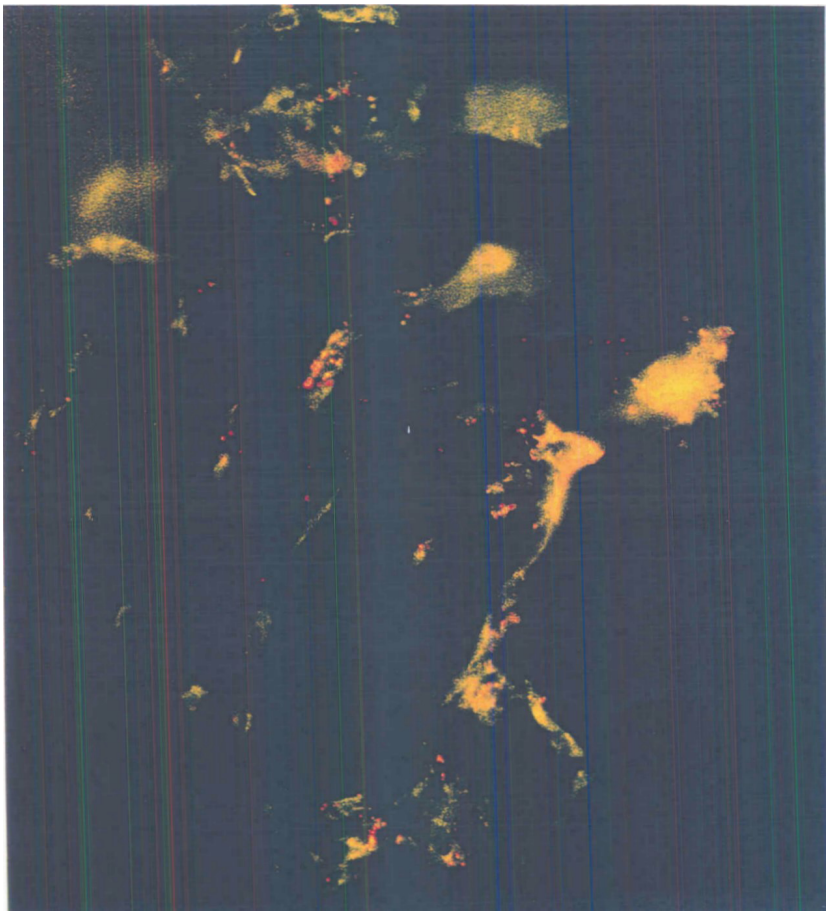
제 1 항에 있어서, 적어도 하나의 중성지방을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 리포좀.

도면

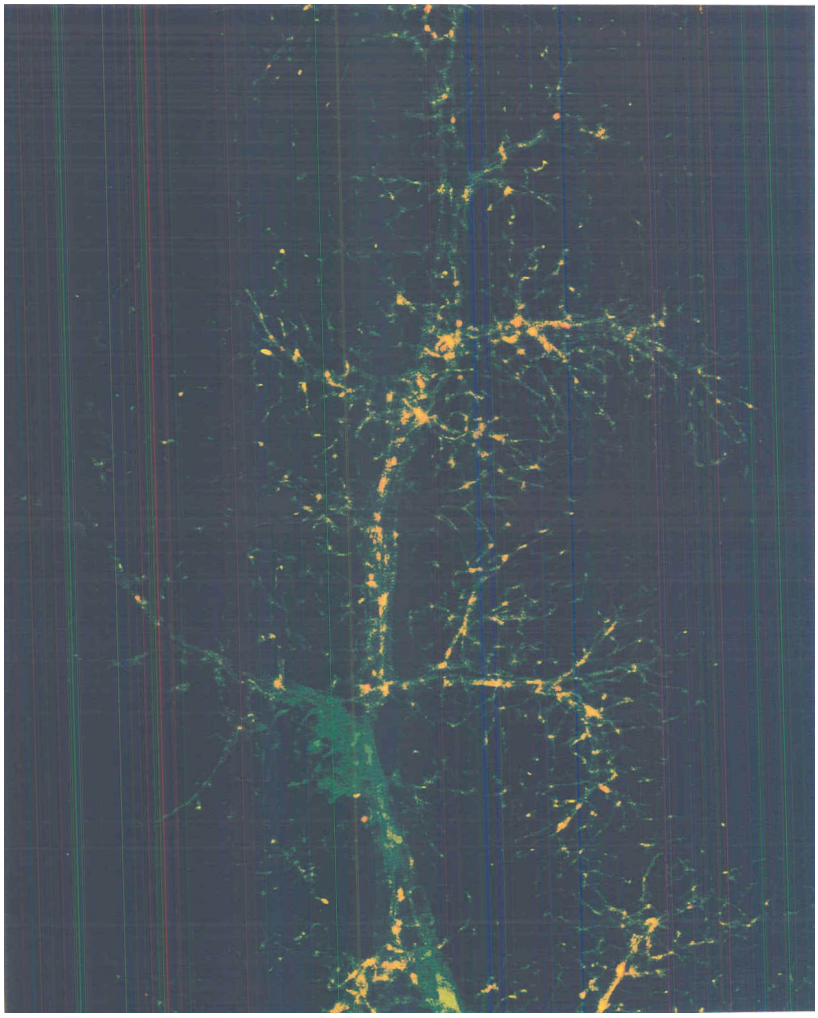
도면1



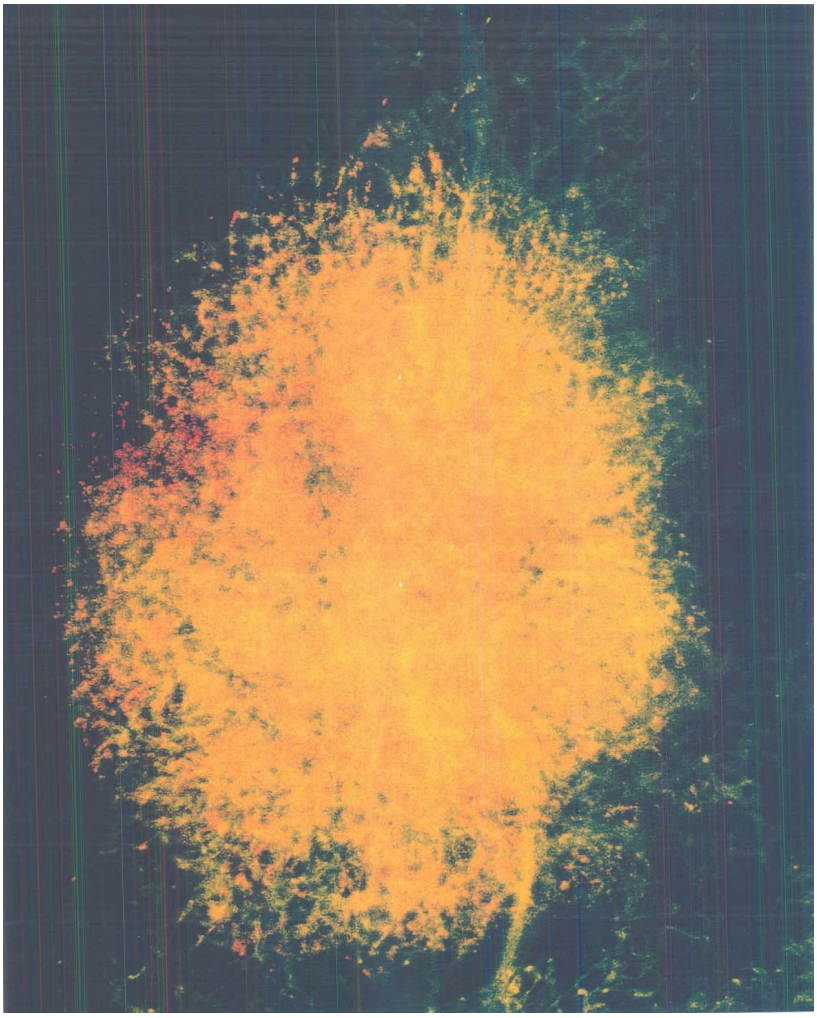
도면2



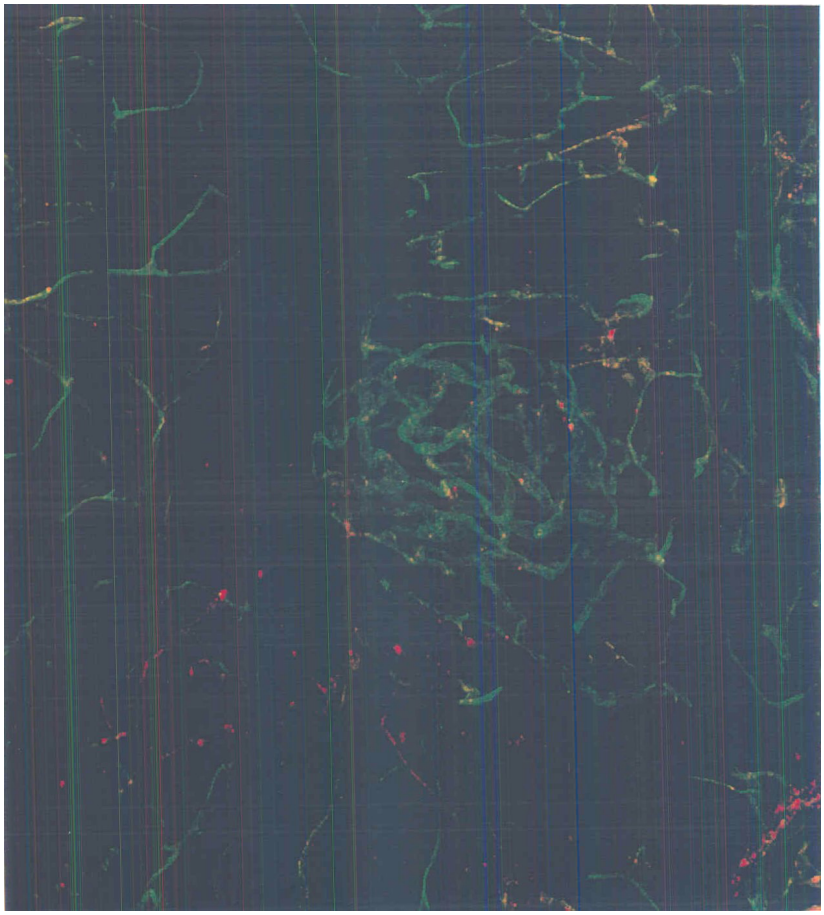
도면3



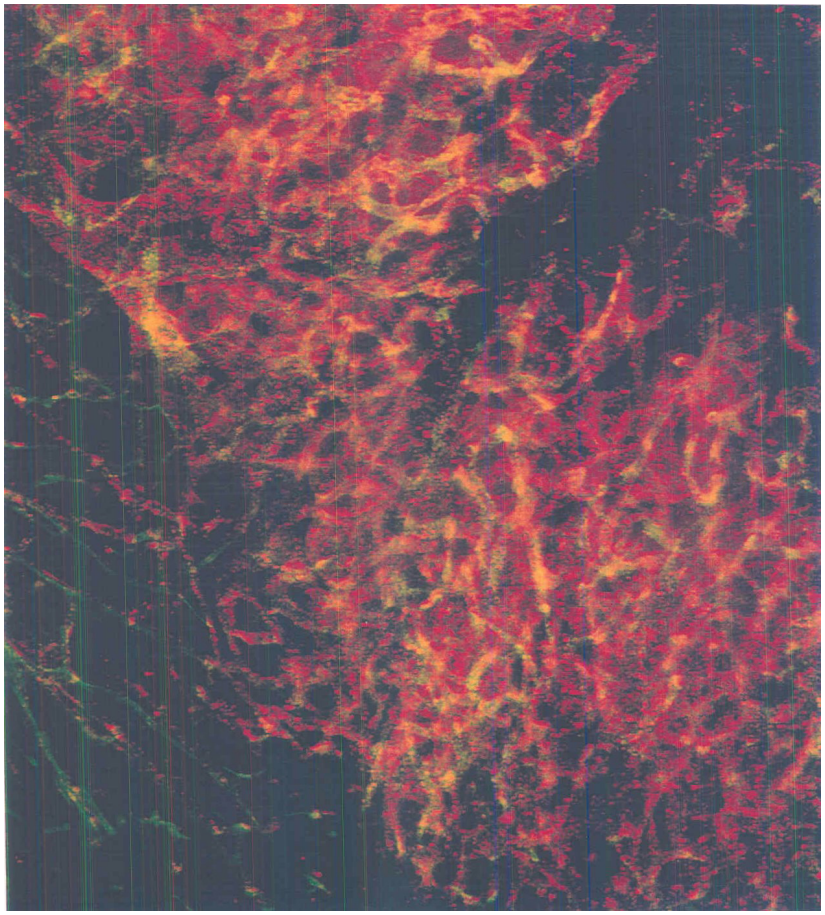
도면4



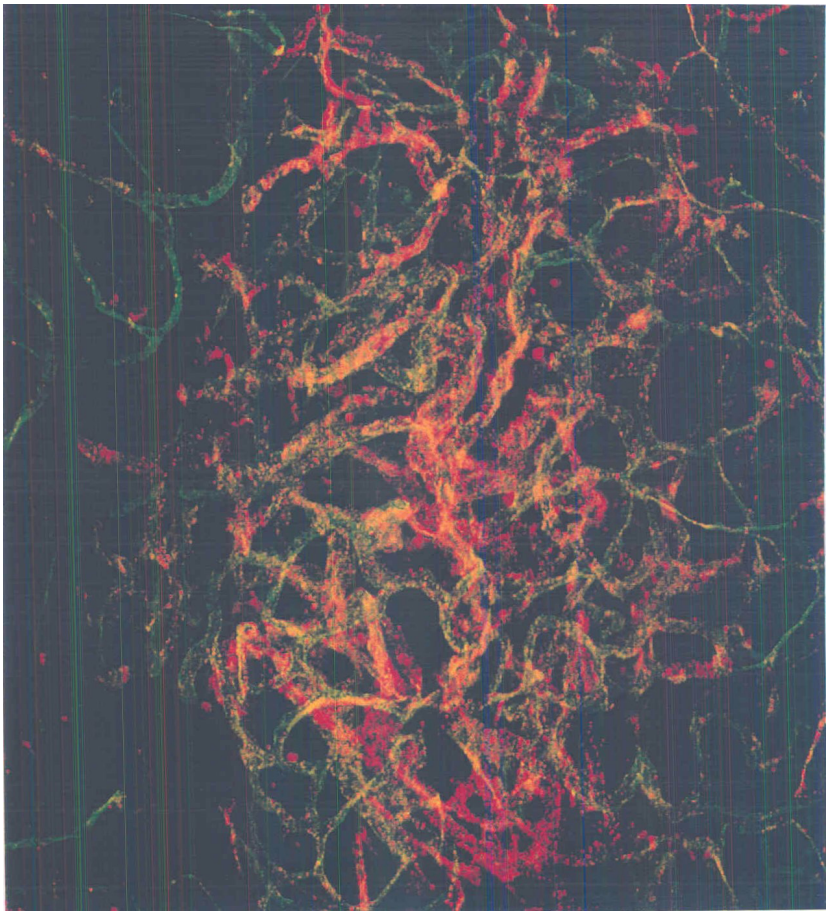
도면5



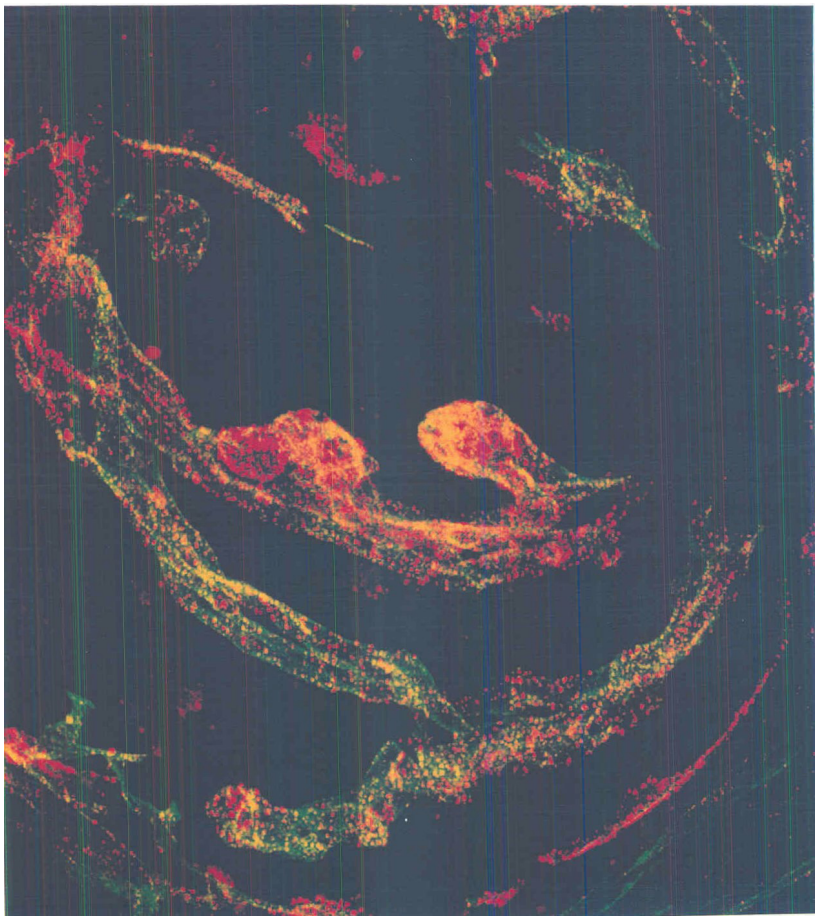
도면6



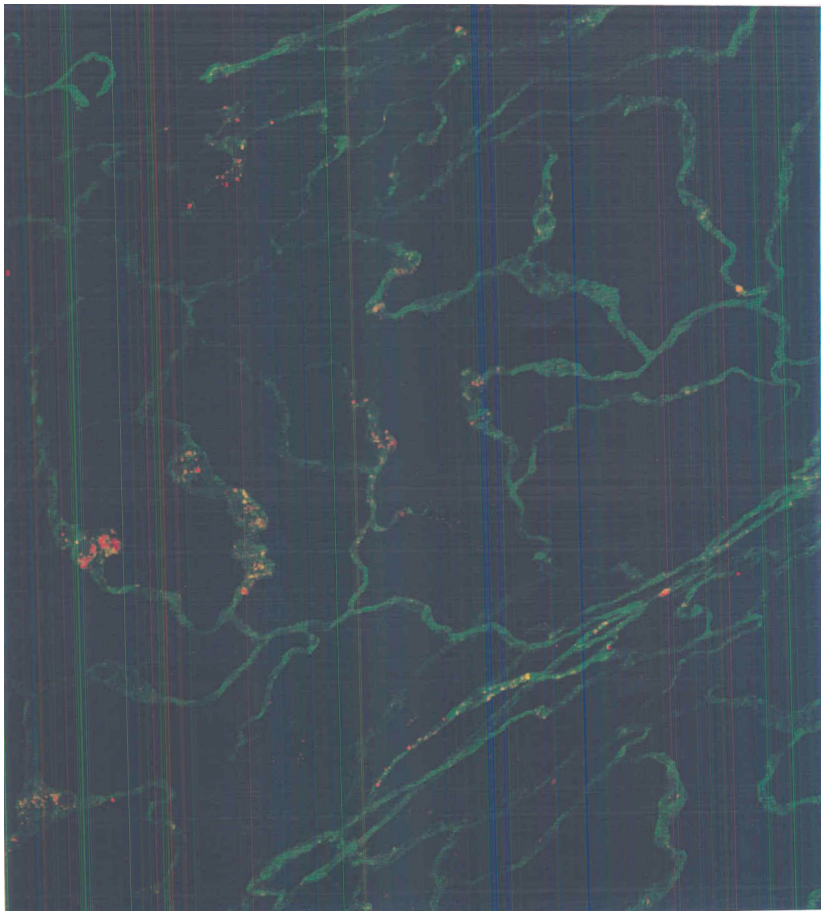
도면7



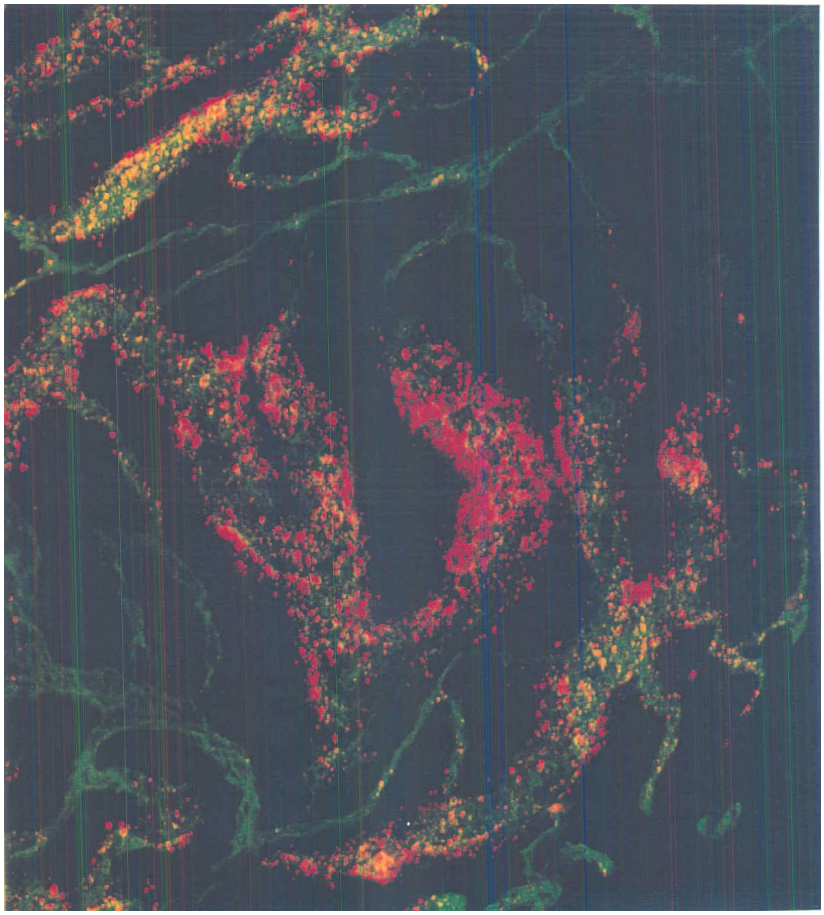
도면8



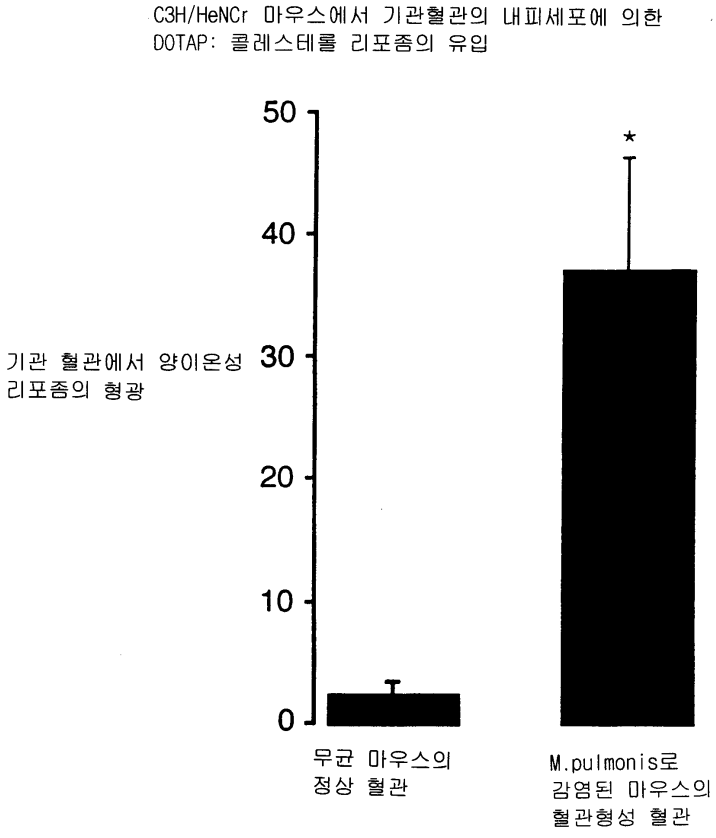
도면9



도면10



도면11


C3H/HeNCr 마우스에서 기관혈관의 내피세포에 의한
DOTAP: 콜레스테롤 리포좀의 유입
기관 혈관에서 양이온성
리포좀의 형광
50
40
30
20
10
0
★
무균 마우스의
정상 혈관
M.pulmonis로
감염된 마우스의
혈관형성 혈관

도면12



도면13

