



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0052985
(43) 공개일자 2012년05월24일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
 A61K 9/127 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-7003847</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2010년07월23일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2012년02월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2010/043098</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2011/011713
 국제공개일자 2011년01월27일</p> <p>(30) 우선권주장
 61/271,715 2009년07월24일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 테라피오 코포레이션
 미국 78731 텍사스주 오스틴 세컨드 플로어 노쓰
 모팩 익스프레스웨이 7000</p> <p>(72) 발명자
 커닝햄 씨 케세이
 미국 75791 텍사스주 화이트하우스 스위트 2 사
 우스 110 스테이트 하이웨이 15632</p> <p>(74) 대리인
 김진희, 강승욱</p> |
|--|--|

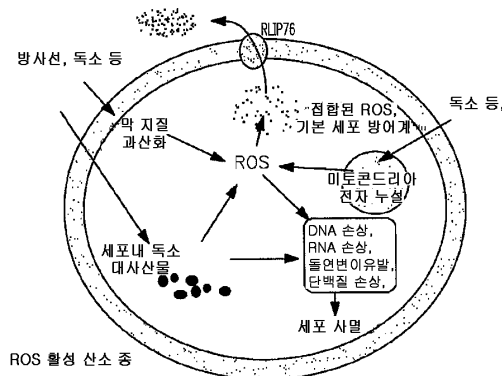
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **방사선조사 후 보호를 위한 조성물 및 그의 사용 방법**

(57) 요약

본 개시 내용은 투여가 방사선에 노출된 포유동물을 보호 및 치료하는 데 유효한 것인, 방사선 노출 후 24시간 초과된 시간이 경과한 후에 RLIP76 또는 그의 활성 단편을 투여하는 방법에 관한 것이다. 추가로, RLIP76 및 다른 방사선 보호제, 예를 들어, 항산화제를 포함하는 조성물을 개시한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

방사선 노출의 영향을 치료하는 것을 필요로 하는 피험체에서 방사선 노출의 영향을 치료하는 방법으로서, 방사선 노출 후 24시간이 넘은 후에 RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편의 유효량을 유기체에게 투여하는 것을 포함하는 치료 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 피험체가 포유동물 피험체인 치료 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 방사선이 이온화 방사선인 치료 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 이온화 방사선이 X-방사선, γ -방사선, 에너지 전자 방사선, 자외선, 열 방사선, 우주 방사선, 전자기 방사선, 핵 방사선, 또는 그의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 치료 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편이 방사선 노출 후 36시간이 넘은 후에 피험체에게 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편이 방사선 노출 후 48시간, 60시간, 72시간, 84시간, 또는 96시간이 넘은 후에 피험체에게 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편이 리포솜 또는 프로테오리포솜과 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편이 1 이상의 용량으로 피험체에게 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 9

제4항에 있어서, 에너지 전자 방사선이 β -입자 방사선인 치료 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 방사선이 양성자 또는 중이온 방사선인 치료 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 제2 방사선 보호제를 피험체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는 것인 치료 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 제2 방사선 보호제가 자유 라디칼 제거제(scavenger), 항산화제, 또는 슈퍼옥시드 디스뮤타제 유사체인 치료 방법.

청구항 13

방사선 노출의 영향을 치료하는 것을 필요로 하는 피험체에서 방사선 노출의 영향을 치료하는 방법으로서,

(a) 방사선 노출 후 24시간 내에 RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편의 유효량의 적어도 제1 용량을 피험체에게 투여하는 단계, 및 (b) 방사선 노출 후 24시간이 넘은 후에 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분의 유효량의 적어도 제2 용량을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.

청구항 14

제1항 또는 제13항에 있어서, 피험체가 인간인 치료 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 방사선이 이온화 방사선인 치료 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 이온화 방사선이 X-방사선, γ -방사선, 에너지 전자 방사선, 자외선, 열 방사선, 우주 방사선, 전자기 방사선, 핵 방사선, 또는 그의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 치료 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 제1 용량이 이온화 방사선에 대한 대략 노출 시점에 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 18

제13항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분이 리포솜 또는 프로테오리포솜과 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 19

제13항에 있어서, 방사선 노출 후 24시간 내에, 방사선 노출 후 24시간이 넘은 후에, 또는 둘 모두에 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분의 유효량의 1 이상의 추가 용량을 피험체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는 것인 치료 방법.

청구항 20

제13항에 있어서, 제1 용량 및 제2 용량이 대략 동일 양의 RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편을 포함하는 것인 치료 방법.

청구항 21

제13항에 있어서, 제1 용량 및 제2 용량이 상이한 양의 RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편을 포함하는 것인 치료 방법.

청구항 22

RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편, 및 제2 방사선 보호제를 포함하는 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 제2 방사선 보호제가 자유 라디칼 제거제, 항산화제, 또는 슈퍼옥시드 디스뮤타제 유사체인 조성물.

청구항 24

제22항에 있어서, 조성물이 리포솜 또는 프로테오리포솜과 투여되는 것인 조성물.

청구항 25

제23항에 있어서, 항산화제가 부틸화 히드록시톨루엔(BTH)인 조성물.

청구항 26

제1항 또는 제13항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편이 방사선 조사 후 24시간 후에 1회~10회

투여되는 것인 치료 방법.

청구항 27

제1항 또는 제13항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편이 방사선 조사 후 24시간 후에 3회 이상 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 28

제1항 또는 제13항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편이 방사선 조사 후 24시간 내에 1회 및 방사선 조사 후 24시간 후에 1회 또는 그 이상 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 29

제1항 또는 제13항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편이 방사선 조사 후 25시간~3개월에 1회 또는 그 이상 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 30

제1항 또는 제13항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편이 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 이상의 용량으로 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 31

제1항 또는 제13항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편이 약 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (체중)~약 100 mg/kg (체중)의 용량으로 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 32

제1항 또는 제13항에 있어서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편이 정맥내, 근육내, 피하, 복강내, 및 경구 투여로 이루어진 군에서 선택되는 투여 경로를 통해 투여되는 것인 치료 방법.

청구항 33

제1항 또는 제13항에 있어서, 방사선 노출이 2 Gy 이상인 치료 방법.

청구항 34

제1항 또는 제13항에 있어서, 방사선 노출이 약 2 Gy~약 100 Gy인 치료 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 개시 내용은 일반적으로는 방사선에의 노출에 관한 것이며, 더욱 구체적으로는 RLIP76 단백질 부분을 포함하는 조성물, 및 포유동물의 방사선 조사 후 보호에서 상기 조성물의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 방사선 손상은 여러 기전으로부터 발생하게 되는데, 이는 각각 노출량에 따라 다르게 상대적으로 기여한다. 초고선량의 방사선은 직접 DNA를 손상시켜 DNA의 이중 나선형 가닥을 완전하게 파손시킴으로써(이중 가닥 파손, DSB: double-strand breaks) 세포 사멸을 유발한다. 그러나, 노출 수준이 감소함에 따라 다른 효과도 중요시된다. 이중 심지어 핵이 직접적인 공격으로부터 벗어나 있는 세포에서도조차 고도로 반응성이 큰 자유라디칼, 특히 산소 원소와 관련되는 것(활성 산소 종; ROS: reactive oxygen species)을 생산하는 방사선의 이온화 에너지에 기인하는 과산화 과정이 있다. 활성 산소 종은 단백질, 지질 및 핵산을 비롯한, 그의 경로 중에 존재하는 거의 모든 것에 결합하여 이를 변형시킬 수 있는 성향에 기인하여 독성을 띤다. 시간이 경과함에 따라, 상당 수준의 ROS를 가진 세포는 직접적인 DNA 효과를 얻은 세포와 동일하게 손상될 수 있다. ROS 손상은 또한 DNA 이상을 일으킬 수 있으며, 이는 결국에는 게놈 불안정성으로 인해 치명적일 수 있다. 따라서, 세포가 받는 손상량은 방사선 조사를 받은 방사선 선량에 따라 달라질 것이며, 이는 ROS 효과에 기인한 직접적인 DNA 손상, ROS 손상, 및 간접적인 DNA 손상의 혼합을 반영할 것이다. 이어서, 유기체에 가해진 전반적인

손상 시간과 정도는 크기는 방사선 조사를 받은 방사선 선량에 따라 다르며, 이로써 생존과 노출 사이에는 점진적인 비선형 관계가 형성된다.

[0003] 방사능 중독을 위한 후보 치료법은 대개 ROS 효과에 대한 정상적인 세포 방법을 증진시키고자 하는 제제가 되었다. 예로는 자유 라디칼 제거제(예를 들어, 에다라본(3 메틸-1-페닐-2-피라졸린-5-온), 비타민 E 등), 슈퍼옥시드 디스뮤타제 유사체(예를 들어, 템폴(4-히드록시-2,2,6,6-테트라메틸피페리디닐옥시)), 및 ROS의 세포 내 농도를 감소시키고자 하는 다른 제제를 포함한다. 이러한 후보 치료법은 방사선 노출 이전 또는 그 직후에 투여되도록 디자인된 것이다.

[0004] 상기 제제로부터 얻게 되는 임의의 이점에 대한 평가는 보통 노출 후 1개월이 경과하였을 때의 생존이 개선될 수 있도록 하는 방법을 찾는 데 있는데, 이는 상기 시점까지의 임의의 독성이 상술된 간접 과정의 결과이기 때문이다. 통상의 벤치마크 측정치는, 마우스를 후보 제제로 치료하였을 때, 노출 후 30일이 경과하였을 때의 치사량이 50%에 도달하도록 하는 방사선 선량 대 어떤 처리도 하지 수행하지 않았을 때(또는 대조군 처리를 수행하였을 때), 상기 LD50/30에 도달하도록 하는 방사선 선량의 비로서 정의되는 선량 감소 요소(DRF: dose-reduction factor)이다. 이러한 측정치는 선형을 이루지 않으며, 이에 DRF가 조금 증가하여도 방사선 저항성은 다소 더 크게 변할 수 있다는 것을 암시한다. 국방부(Department of Defense)에 의한 추가 평가에 충분하다는 장래성을 보이는 것으로 간주되는 후보 제제를 위해 보통은 1.2 이상의 DRF가 요구된다. 이러한 요건은 상당한 장애 요인이 될 수 있다. 에다라본 및 템폴, 둘 모두 시험관내 시스템에서 상당한 효과를 발휘하지만, 전체 동물 연구에서는 간신히 1.3의 DRF만을 기록하였다. 세포는 이미 자유 라디칼에 대한 방어책, 예를 들어, ROS가 다른 구성 요소들과의 조합을 이루기 이전에 ROS에 결합할 수 있는 각종의 단백질을 가지고 있기 때문에 상기와 같은 한계가 발생할 수 있는 것이다. 그러나, 복합체로 형성된 단백질 그 자체가 세포에 독성을 띠는 점에서 상기와 같은 결합이 완전하게 보호하지는 못한다. 그러므로, 추가의 희생 제거제가 유익하기는 하나, 일단 라디칼이 더 이상 "자유형"이 아니게 되면 어떤 후속 효과도 방해하지 못하는 바, 세포 방어 캐스케이드에서 "올숙" 단계를 나타내지는 못한다.

[0005] 추가로, 현재 이용가능한 방사선 보호제는 방사선 노출 이전 또는 방사선 노출 직후에, 예를 들어, 방사선 노출 후 4시간 이내에 투여되어야 한다 (문헌 ([Landauer et al., "Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury." J APPL TOXICOL 23(6):379-85 (2003); [Vijay-Kumar et al., "Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation." J IMMUNOL 180(12):8280-5 (2008)])). 그러나, 불행하게도 방사선 노출 후 4시간 이내에 치료하는 것은 불가능할 수 있다. 그러므로, 당 업계에서는 효과적인 방사선 보호제, 특히, 방사선 노출 후 24시간 초과 시간의 시간이 경과한 후에 투여되었을 때에도 효과가 있는 방사선 조사 후 보호제가 크게 요구되고 있다.

발명의 내용

[0006] 본 발명의 요약

[0007] 본 개시 내용은 일반적으로 피험체 또는 유기체, 예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 인간에서 방사선에의 노출로 인해 발생하는 효과를, 유기체가 방사선에 노출된 후에도 잘, 예를 들어, 유기체가 방사선에 노출된 후 24시간 초과 시간의 시간이 경과한 후에도 치료하거나 처치하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 방사선에의 노출 후, 즉, 방사선 조사 후, 치료학적 유효량의 RLIP76 단백질 또는 RLIP76 단백질의 유효 부분을 유기체에게 투여하는 단계를 포함한다. 놀랍게도, 본원에 개시된 바와 같이, 유기체는 계속하여 방사선 노출 후 24시간 초과 시간의 시간이 경과한 후에도 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분의 투여로부터 이익을 얻게 된다. 본원에서 사용되는 바, "RLIP76 단백질의 유효 부분" 또는 "그의 유효 부분" 또는 "활성 단편"은 세포 또는 유기체에서 방사선에의 노출로 인해 발생하는 효과 치료를 촉진시키는 임의의 RLIP76 단백질 단편(들), 단백질 부분(들), 또는 그의 조합이다. RLIP76 단백질은 재조합 RLIP76 단백질 또는 그의 단편 또는 부분일 수 있다. 본원에 개시된 방법은 방사선 노출 이전 또는 그에 앞서 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분을 유기체에게 투여하는 것을 포함하지 않는다.

[0008] 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분은 방사선 노출 후 24시간 초과 시간의 시간이 경과한 후에 1회 이상 유기체에게 투여된다. RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분은 방사선 노출 후 약 25시간, 26시간, 27시간, 28시간, 29시간, 30시간, 31시간, 32시간, 33시간, 34시간, 35시간, 36시간, 42시간, 48시간, 60시간, 72시간, 84시간, 96시간, 4.5일, 5일, 5.5일, 6일, 6.5일, 7일, 7.5일, 8일, 8.5일, 9일, 9.5일, 10일, 10.5일, 11일, 11.5일, 12일, 12.5일, 13일, 13.5일, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주 초과 시간의 시간이 경과한 후에 1회 이상 투여될 수 있다.

- [0009] 다른 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분은 1차로 방사선 노출 후 24시간 이내에 1회 이상, 및 2차로 방사선 노출 후 24시간 초과된 시간이 경과한 후에 1회 이상에 걸쳐 투여되는, 방사선 노출 후 2회 이상에 걸쳐 유기체에게 투여된다. 제1 용량의 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분은 방사선 노출 후 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 또는 24시간에 유기체에게 투여될 수 있다. 상기 용량은 방사선 노출 후 24시간 이내에 1회 이상 투여될 수 있다. 제2 용량의 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분이 방사선 노출 후 약 30시간, 36시간, 42시간, 48시간, 60시간, 3일, 3.5일, 4일, 4.5일, 5일, 5.5일, 6일, 6.5일, 7일, 7.5일, 8일, 8.5일, 9일, 9.5일, 10일, 10.5일, 11일, 11.5일, 12일, 12.5일, 13일, 13.5일, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주 초과된 시간이 경과한 후에 유기체에게 투여될 수 있다. 상기 용량은 방사선 노출 후 24시간 이내에 1회 이상 투여될 수 있다. 24시간 이내 및 방사선 노출 후 24시간 초과된 시간이 경과한 후에 투여되는 용량은 대략 동일한 양의 RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편일 수 있거나, 상이한 양일 수 있다. 추가로, 이들 각 시간 프레임 중 각 시간 이내에 2회 이상에 걸쳐 용량을 투여할 경우, 각 용량은 대략 동일한 양의 RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편일 수 있거나, 상이한 양일 수 있다.
- [0010] 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 24시간이 경과한 후에 1회 내지 10회에 걸쳐 투여될 수 있다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 24시간이 경과한 후에 1회 내지 5회에 걸쳐 투여될 수 있다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 24시간이 경과한 후에 3회 내지 10회에 걸쳐 투여될 수 있다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 24시간이 경과한 후에 2회 내지 8회에 걸쳐 투여될 수 있다.
- [0011] 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 24시간이 경과한 후에 3회 이상에 걸쳐 투여된다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 24시간이 경과한 후에 5회 이상에 걸쳐 투여될 수 있다.
- [0012] 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 24시간 이내에 1회 이상, 및/또는 방사선 조사 후 24시간이 경과한 후에 1회 이상 투여된다. 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 24시간 이내에 1회, 및 방사선 조사 후 24시간이 경과한 후에 1회 이상 투여된다. 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 24시간 이내에 1회 이상 투여되고, 방사선 조사 후 24시간이 경과한 후에는 추가로 투여되지 않는다. 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 25시간 내지 3개월 사이에 1회 이상 투여될 수 있다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 25시간 내지 1개월 사이에 1회 이상 투여될 수 있다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 2개월 내지 3개월 사이에 1회 이상 투여될 수 있다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 48시간 내지 2개월 사이에 1회 이상 투여될 수 있다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 방사선 조사 후 1주 내지 1개월 사이에 1회 이상 투여될 수 있다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 앞서 투여된 RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편의 약물역학적 성질을 연장하고자 하는 목적을 위해 방사선 조사 후 24시간이 경과한 후에 투여된다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 앞서 투여된 RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편의 제약 효과를 연장하고자 하는 목적을 위해 방사선 조사 후 24시간이 경과한 후에 투여된다.
- [0013] 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 리포솜 내에 포함되고, 이는 또한 프로테오리포솜 또는 프로테오리포솜 조성물로서 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, RLIP 프로테오리포솜은 제약상 허용되는 담체 중에서 전달된다.
- [0014] 본 개시 내용의 특정 실시양태는 방사선 노출 후 24시간 초과된 시간이 경과한 후에 유효량의 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분을 유기체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방사선에의 노출로 인해 발생하는 효과를 치료하는 것을 필요로 하는 유기체에서 방사선에의 노출로 인해 발생하는 효과를 치료하는 방법에 관한 것이다. 다른 실시양태는 (a) 방사선 노출 후 24시간 이내에 적어도 제1 용량으로 유효량의 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분을 유기체에게 투여하는 단계, 및 (b) 방사선 노출 후 24시간 초과된 시간이 경과한 후에 적어도 제2 용량으로 유효량의 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분을 유기체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방사선에의 노출로 인해 발생하는 효과를 치료하는 것을 필요로 하는 유기체에서 방사선에의 노출로 인해 발생하는 효과를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 유기체는 포유동물, 예를 들어, 인간이다. 유기체

게 노출되는 방사선은 X-방사선, γ -방사선, 에너지 전자 방사선, 자외선, 열 방사선, 우주 방사선, 전자기 방사선, 핵 방사선, 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는 이온화 방사선일 수 있다. 추가의 다른 실시양태에서, 에너지 전자 방사선은 β -입자 방사선이고, 상기 방사선은 양성자 또는 중이온 방사선이다.

[0015] 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분은 방사선 노출 후 24시간 초과 시간이 경과한 후에 투여된다. 다른 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분은 방사선 노출 후 24시간 이내에, 예를 들어, 대략 방사선에의 노출 시점에, 및 방사선 노출 후 24시간 초과 시간이 경과한 후에 투여된다. 본원에서 기술된 바와 같은 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분은 관련 기간 중 어느 한 시점에 또는 그 둘 모두의 시점에, 즉, 방사선 노출 후 24시간 이내에 및/또는 방사선 노출 후 24시간 초과 시간이 경과한 후에 포유동물에게 하나 이상의 용량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 실시양태 중 임의의 것은, RLIP76 단백질이 방사선 노출 후 24시간 초과 시간이 경과한 후에, 또는 방사선 노출 후 24시간 이내에 및 방사선 노출 후 24시간 초과 시간이 경과한 후인 것의 다양한 조합으로 포유동물에게 다회에 걸쳐 투여되는 것일 수 있다. 관련된 상기 실시양태 중 각각에서, 용량은 거의 동일한 양의 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분을 포함할 수 있거나, 상이한 양의 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분을 포함할 수 있다.

[0016] 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분은 방사선 노출 후 24시간 초과 시간이 경과한 후에, 36시간 초과 시간이 경과한 후에, 48시간 초과 시간이 경과한 후에, 60시간 초과 시간이 경과한 후에, 72시간 초과 시간이 경과한 후에, 84시간 초과 시간이 경과한 후에, 및/또는 96시간 초과 시간이 경과한 후에 유기체에게 투여된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 용량은 각각 방사선 노출 후 +24시간, +48시간, +72시간, 및 +96시간째에 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 용량은 방사선 노출 후 48시간 및 96시간째에, 노출 후 24시간 및 72시간째에, 방사선 노출 후 0시간, 48시간 및 96시간째에, 방사선 노출 후 14시간 및 48시간째에, 방사선 노출 후 16시간 및 64시간째에, 또는 방사선 노출 후 1시간, 24시간 및 48시간째에 노출될 수 있다.

[0017] RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분은 본원에 개시된 바와 같이 그를 필요로 하는 포유동물에게 약 0.5 mg/kg(체중) 내지 약 14.0 mg/kg(체중) 사이의 용량으로, 예를 들어, 약 1.0 mg/kg(체중), 약 1.5 mg/kg(체중), 약 2.0 mg/kg(체중), 약 2.5 mg/kg(체중), 약 3.0 mg/kg(체중), 약 3.5 mg/kg(체중), 약 4.0 mg/kg(체중), 약 4.5 mg/kg(체중), 약 5.0 mg/kg(체중), 약 5.5 mg/kg(체중), 약 6.0 mg/kg(체중), 약 6.5 mg/kg(체중), 약 7.0 mg/kg(체중), 약 7.5 mg/kg(체중), 약 8.0 mg/kg(체중), 약 8.5 mg/kg(체중), 약 9.0 mg/kg(체중), 약 9.5 mg/kg(체중), 약 10.0 mg/kg(체중), 약 10.5 mg/kg(체중), 약 11.0 mg/kg(체중), 약 11.5 mg/kg(체중), 약 12.0 mg/kg(체중), 약 12.5 mg/kg(체중), 약 13.0 mg/kg(체중), 또는 약 13.5 mg/kg(체중)으로 투여될 수 있다.

[0018] 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 0.01 μ g/kg(체중) 이상의 용량으로 투여될 수 있다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 0.1 μ g/kg(체중) 이상의 용량으로 투여된다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 1 μ g/kg(체중) 이상의 용량으로 투여된다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 5 μ g/kg(체중) 이상의 용량으로 투여된다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 0.1 mg/kg(체중) 이상의 용량으로 투여된다.

[0019] 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 약 0.01 μ g/kg(체중) 내지 약 100 mg/kg(체중) 사이의 용량으로 투여된다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질은 약 0.1 μ g/kg(체중) 내지 약 50 mg/kg(체중) 사이의 용량으로 투여된다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질은 약 1 μ g/kg(체중) 내지 약 40 mg/kg(체중) 사이의 용량으로 투여된다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질은 약 5 μ g/kg(체중) 내지 약 25 mg/kg(체중) 사이의 용량으로 투여된다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질은 약 0.1 mg/kg(체중) 내지 약 10 mg/kg(체중) 사이의 용량으로 투여된다.

[0020] 특정 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 활성 단편은 정맥내, 근육내, 피하, 복강내, 및 경구 투여로 이루어진 군으로부터 선택된 투여 경로를 통해 투여된다. 추가의 실시양태에서, RLIP76 단백질은 정맥내(iv), 피하(sc), 및 경구 투여(po)로 이루어진 군으로부터 선택된 투여 경로를 통해 투여된다.

[0021] 특정 실시양태에서, 방사선 노출 또는 방사선에의 노출은 2 Gy 또는 200 cGy 이상이다. 추가의 실시양태에서, 방사선 노출 또는 방사선에의 노출은 5 Gy 또는 500 cGy 이상이다. 추가의 실시양태에서, 방사선 노출 또는 방사선에의 노출은 7.5 Gy 또는 750 cGy 이상이다. 추가의 실시양태에서, 방사선 노출 또는 방사선에의 노출은 10 Gy 또는 1,000 cGy 이상이다. 추가의 실시양태에서, 방사선 노출 또는 방사선에의 노출은 20 Gy 또는 2000 cGy 이상이다. 추가의 실시양태에서, 방사선 노출 또는 방사선에의 노출은 약 200 cGy 내지 약 5000 cGy

사이이다. 추가의 실시양태에서, 방사선 노출 또는 방사선에의 노출은 약 2 Gy 내지 약 100 Gy 사이이다. 추가의 실시양태에서, 방사선 노출 또는 방사선에의 노출은 약 3 Gy 내지 약 50 Gy 사이이다.

[0022] 특정 실시양태에서, 방사선 노출 또는 방사선에의 노출은 0.2 Gy 이상의 장시간 방사선 노출이다. 특정 실시양태에서, 방사선 노출 또는 방사선에의 노출은 0.5 Gy 이상의 장시간 방사선 노출이다. 특정 실시양태에서, 방사선 노출 또는 방사선에의 노출은 약 0.5 Gy 내지 약 2.0 Gy 사이의 장시간 방사선 노출이다. 추가의 실시양태에서, 장시간 방사선 노출은 2시간 이상 이루어진다. 추가의 실시양태에서, 장시간 방사선 노출은 12시간 이상 이루어진다. 추가의 실시양태에서, 장시간 방사선 노출은 약 2시간 내지 48시간 사이로 이루어진다.

[0023] 특정 실시양태에서, 투여된 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분의 제약 효과는 방사선 손상의 바이오마커를 사용함으로써 모니터링된다. 추가의 실시양태에서, 방사선 손상의 바이오마커로는 DNA 이상을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 방사선 손상의 바이오마커로는 주변 망상적혈구 중의 미세위성체를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 방사선 손상의 바이오마커로는 DNA 이상 또는 주변 망상적혈구 중의 미세위성체를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 방사선 손상의 바이오마커로는 DNA 이상 및 주변 망상적혈구 중의 미세위성체를 포함한다. 다른 실시양태에서, 투여된 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분의 제약 효과는 테스트된 피험체의 사망률을 사용함으로써 모니터링된다.

[0024] 상기 실시양태 중 임의의 것에서, 제2 방사선 보호제는 RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분과 동시에, 또는 그와 조합되어 유기체에게 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제2 방사선 보호제는 자유 라디칼 제거제, 항산화제, 또는 슈퍼옥시드 디스무타제 유사체일 수 있다. 본원에 개시되어 있는 바와 같이, RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분은 제약 조성물 또는 프로테오리포좀 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 제약 조성물 또는 프로테오리포좀 조성물은 추가로 렉틴, 당지질, 인지질, 또는 그의 조합을 포함한다. 다른 실시양태에서, RLIP76 단백질 또는 그의 유효 부분은 재조합 단백질 또는 그의 일부이다. 본 개시 내용의 제약 조성물 또는 프로테오리포좀 조성물은 피하로, 정맥내로, 국소적으로, 경구적으로, 비경구적으로, 또는 그의 조합으로 투여될 수 있다.

[0025] 본 개시 내용 전체에 걸쳐서, 문맥상 달리 명시되지 않는 한, 명백하게 언급되지 않은 다른 요소 또한 포함될 수 있도록 하기 위해 "포함한다(comprise)"라는 단어, 또는 파생어, 예를 들어, "포함한다(comprises)," 또는 "포함하는"은 "포함하나, 이에 한정되지 않는다"라는 의미를 가지는 것으로 이해된다. 추가로, 문맥상 달리 명시되지 않는 한, "하나"라는 용어를 사용하는 것은 단수개의 객체 또는 요소를 의미하는 것일 수 있거나, 복수개의 상기 객체 또는 요소, 또는 객체 또는 요소들 중 하나 이상을 의미할 수 있다. 추가로, 본원에서 "또는"이라는 용어를 사용하는 것은 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, "및/또는"을 의미한다. 또한, 예를 들어, "요소" 또는 "구성 요소"라는 용어는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 1 단위를 포함하는 요소 및 구성 요소, 및 1 초과개의 단위를 포함하는 요소 또는 구성 요소, 둘 모두를 포함한다.

[0026] 하기 일반 설명 및 하기 상세한 설명, 둘 모두는 단지 예시적이고 설명하기 위한 것이며, 청구하는 본 발명을 제한하는 것은 아님을 이해하여야 한다. 본원에서 사용되는 각 섹션의 제목은 단지 조직화 목적을 위한 것이며, 기술하는 주제를 제한하는 것으로 해석되서는 안된다. 특허, 특허 출원, 기사, 서적, 및 논문을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 본 출원에서 인용되는 모든 문서 또는 문서들의 일부분은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참고로 명백히 포함된다. 포함된 문헌 및 유사 자료 중 하나 이상이 본 출원에서의 상기 용어에 대한 정의와 모순되는 방식으로 용어를 정의할 경우, 본 출원을 통해 조정된다.

도면의 간단한 설명

[0027] 하기 도면이 본 명세서의 일부를 형성하며, 본 발명의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에서 제시하는 구체적인 실시양태의 상세한 설명과 함께 본 도면들 하나 이상을 참고함으로써 더욱 잘 이해될 수 있을 것이다.

도 1은 상이한 독성 손상에 의한 세포 사멸을 기전을 나타낸다.

도 2는 RLIP76의 생리학상 중요성을 나타내는 일레이다.

도 3A 및 도 3B는 다양한 선량으로 X선 방사선 조사 처리된 마우스의 기준 생존 곡선을 나타낸다. 도 3A는 대조군 처리된 마우스에서 상이한 방사선 선량에서의 생존율을 나타낸다. 도 3B는 사멸까지의 평균 소요 시간 대 방사선 선량을 나타낸다.

도 4는 RLIP76이 방사선 감수성에 미치는 효과를 나타낸다. 3개의 군이 제시되어 있다: 리포솜으로 처리되지 않는 것(동그라미 표시); RLIP76을 포함하지 않는 리포솜으로 처리된 것(사각형 표시); 및 RLIP76을 포함하는 리포솜으로 처리된 것(삼각형 표시).

도 5는 RLIP76이, 보다 고선량의 X선 방사선 조사 이후의 생존에 미치는 효과를 나타낸다. 야생형(+/+) RIP1 마우스 4마리 및 동형접합성(-/-) 마우스 4마리를 각각 750 cGy X-방사선 조사에 노출시키고, 노출 후 12시간이 경과하였을 때 i.p. 주사에 의해 투여되는 대조군 리포솜(삼각형 표시, 동형접합성 RIP1 마우스; 다이아몬드 모양 표시, 야생형 RIP 마우스), 또는 i.p. 주사에 의해 투여되는 400 μ g의 RLIP76 리포솜(사각형 표시, 동형접합성 RIP1 마우스; 동그라미 표시, 야생형 RIP1 마우스)으로 처리하였다.

도 6은 500 cGy 노출 후의 생존에 대한 RLIP76의 용량에 따른 반응을 나타낸다: 다이아몬드 모양 표시, 대조군 (비처리) 마우스; 사각형 표시, 노출 후 14시간 및 48시간이 경과하였을 때, 25 μ g의 RLIP76 리포솜으로 처리된 마우스; 삼각형 표시, 노출 후 14시간 및 48시간이 경과하였을 때, 50 μ g의 RLIP76 리포솜으로 처리된 마우스; X 표시, 노출 후 14시간 및 48시간이 경과하였을 때, 100 μ g의 RLIP76 리포솜으로 처리된 마우스; 별표 표시, 노출 후 24시간 및 72시간이 경과하였을 때, 100 μ g의 RLIP76 리포솜으로 처리된 마우스; 동그라미 표시, 노출 후 48시간 및 96시간이 경과하였을 때, 100 μ g의 RLIP76 리포솜으로 처리된 마우스.

도 7은 비처리 마우스 및 RLIP76으로 처리된 마우스에서 50% 생존 대 방사선 선량을 측정하는 선량 감소 요소 그래프를 나타낸다.

도 8은 RLIP76의 투여 시간이 500 cGy 노출 후의 생존에 미치는 효과를 나타낸다: 다이아몬드 모양 표시, 대조군 (비처리) 마우스; 사각형 표시, 노출 후 14시간 및 48시간이 경과하였을 때, 25 μ g의 RLIP76 리포솜으로 처리된 마우스; 삼각형 표시, 노출 후 0시간, 48시간, 및 96시간이 경과하였을 때, 25 μ g의 RLIP76 리포솜으로 처리된 마우스.

도 9는 보다 고선량에서의 RLIP76의 효과를 나타낸다: 다이아몬드 모양 표시, 750 cGy 대조군 (비처리); 사각형 표시, 750 cGy에서의 노출 후 0시간, 48시간, 및 96시간이 경과하였을 때, 100 μ g의 RLIP76 리포솜으로 처리된 처리군; 삼각형 표시, 1,000 cGy 대조군 (비처리); X 표시, 1,000 cGy에서의 노출 후 16시간 및 64시간이 경과하였을 때, 100 μ g의 RLIP76 리포솜으로 처리된 처리군.

도 10은 감마 방사선 조사 후 마우스의 전체 생존율을 나타낸다. 14주령된 CD2F1 수컷 마우스를 각각 16마리의 마우스로 이루어진 개별 코호트로 나누고, 코발트60 원을 통해 0.6 Gy/분으로 전달되는 9.25 Gy 전신 감마 방사선에 노출시켰다. 제시되어 있는 바와 같이 i.p. 주사를 통해 다중 용량의 각종 리포솜, RLIP76 단백질 및 항산화제(BHT) 제제로 마우스를 처리하였다. RLIP76 단백질, 리포솜, 및 항산화제 BHT의 복합체를 TO-80Cx로 명명하였다(80이란 리포솜의 평균 크기가 80 nm인 것을 언급하는데, 이는 중간 크기의 소포체로 분류된다); TO-80LA는 BHT는 포함하지만, RLIP76 단백질은 포함하지 않는 완충액 중에서 구성된 리포솜을 지칭한다. 시간은 방사선 노출 전후의 시간과 관련하여 나타난 것이며, 용량 50 μ g은 각 용량으로 전달되는 TO-80Cx의 총 부피에 함유되어 있는 RLIP76 단백질의 양이다. 상기 양은 각 마우스 체중 1 kg당 RLIP76 단백질 용량 1.67 mg인 것을 나타낸다. x축은 방사선 노출 후 경과일수에 대한 측정값이고, y축은 그 당일 날 각 코호트 중의 살아있는 마우스의 비율(%)이다.

도 11은 감마 방사선 조사 후 30일째에도 여전히 살아있는, 각 코호트로부터의 마우스의 비율(%)을 도시한 다른 도면이다.

도 12는 기술된 것과 같은 조건하에서 처리된 CD2F1 마우스로 이루어진 추가 코호트의 전체 생존율을 나타내는데, 여기서, 처리는 노출 후 명시된 만큼의 시간이 경과하였을 때 전달되는 각종의 전달 비히클 및 대조군이다. 기호 설명에 있어, 5 AED는 5-안드로스텐디올을 지칭한다.

도 13은 4 Gy/분의 속도로 광자 빔을 위해 전달되는 5 Gy 전신 노출인, 보다 저선량의 감마 방사선 조사에의 노출 후 C57/B16 마우스의 전체 생존율을 나타낸다. 본 실험에서는 노출 후 14시간 및 48시간이 경과하였을 때, 경구 영양을 통해 전달됨으로써 투여되는 2가지 용량의 TO-80Cx로 마우스를 처리하였다. 제시된 용량 수준은 전달되는 TO-80Cx의 부피 중에 함유되어 있는 RLIP76 단백질의 양이고, 이는 전신 체중당 단백질의 양으로서 표시된다. x축은 방사선 노출 후 경과일수에 대한 측정값이고, y축은 그 당일 날 각 코호트 중의 살아있는 마우스의 비율(%)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 개시 내용은 적어도 부분적으로는, RLIP76 단백질 및 그의 유효 부분(예를 들어, 활성 단편)(이들은 또한 본원에서 RLIP76으로 지칭된다)이 방사선 노출 후 상당한 시간이 경과한 후에 투여된 경우에도 방사선에의 노출로 인해 발생하는 독성 효과로부터 유기체를 보호하는 데 놀라운 효과가 있다는 본 발명자들의 발견에서부터 발단된 것이다. 따라서, 다른 방사선 보호용 후보 물질과 달리, RLIP76은 방사선 노출 후 24시간 초과 시간이 경과한 후에도 방사선에의 노출로 인해 발생하는 독성 효과로부터 유기체를 계속적으로 보호한다. 방사선에의 노출로 인해 발생하는 효과를 치료하기 위해 RLIP76을 사용하는 것이 미국 시리얼 번호 제 11/741,447호(미국 공개 번호 제20080279919호, 이는 본원에서 참고로 포함된다)에서 개시된 바 있지만, 상당한 방사선 노출을 일으키는 이벤트 후에는 다수의 인간을 치료하기가 어렵다는 병참상의 어려움을 고려해 볼 때, 방사선 노출 후 상당한 시간이 경과한 후에도 계속하여 유기체를 치료학적으로 보호하거나, 그에게 이익을 제공할 수 있는 RLIP76의 능력은 놀라운 뿐만 아니라, 중요한 이점이 된다. RLIP76의 또 다른 중요한 이점은, 예비 동물 연구를 통해 입증된 바와 같이, 예를 들어, RLIP76 프로테오리포좀 조성물을 사용하여 경구적으로 투여될 수 있다는 점이다. 그럼에도 불구하고, 설하, 협측, 복강내, 흡입, 정맥내, 근육내, 점막 관통, 또는 경피 전달을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 당업계에 공지된 다른 투여 경로에 의해서도 전달될 수 있다는 것을 이해할 수 있다. RLIP76을 전달하는 것 이외에도, 본원에 개시된 RLIP76 프로테오리포좀이 유기체에게 다른 방사선 보호제를 전달하는 데 효과적인 것으로서 주시된다.

[0029] **RLIP76**

[0030] RLIP76(이는 또한 RALBP1 또는 RIP1로도 공지되어 있다)은 초파리에서부터 인간에 이르기까지 도처에서 발견되는 단백질로서, 세포 생리학상 많은 역할을 한다. 막에 결합하였을 때, 상기 단백질은 양친매성 소형 분자, 예를 들어, 통상의 항암 약물인 빈카 알칼로이드 및 안트라실린을 비롯한, 다양한 화합물에 대한 다중특이성 유출 펌프로서의 역할을 한다. 그러나, RLIP76 수송은 또한 활성 산소 종(ROS)으로부터 형성된 내인성 글루타티온 친전자체 접합체(GS-E)의 세포로부터의 이동을 포함한다. ROS는 다양한 손상, 예를 들어, 방사선 및 과잉의 유기 화합물질에 의해 생산되며, 여러 수준에서 세포에 독성을 띠게 된다. 그의 명칭이 암시하는 바와 같이, ROS는 고도로 반응성이 크며, 단백질, 지질 및 핵산을 비롯한, 그의 경로 중에 존재하는 거의 모든 것에 결합하여, 접촉시 이들 각각을 변형시킨다. ROS에 의해 지질에 가해지는 손상(지질 과산화)은 특히, 생성된 과산화 생성물 그 자체가 독성을 띠기 때문에 치명적이다. 이는 프로아포프토시스 반응성 알케날, 예를 들어, 4-히드록시노네알(4-HNE)을 포함하는데, 이는 수명이 길고, 세포내 축적될 수 있으며, 결국에는 추가의 손상을 일으켜 사멸에 이르게 한다. RLIP76은 그 자체로서 배양된 세포에서 스트레스 반응의 중요한 구성 요소이며, 열, 산화제 화합물질, 화학요법제, UV 방사선 조사 및 X-방사선 조사를 비롯한 스트레스 인자로부터 보호한다.

[0031] 정상 세포는 이들 ROS 관련 독소에 결합하도록 (접합하도록) 디자인된 방어 기전을 가지는데, 그의 주요원은 글루타티온이다. 글루타티온은 친전자성 화합물에 결합하여 반응 전자를 격리시킨다. 그러나, 생성된 접합체(GS-E)는 만약 축적될 수 있는 경우에는 세포에 유해하거나 치명적이며, 따라서, 세포에 의해 제거되어야 한다. 어떤 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 이러한 독성 중간체로부터 유도된 GS-E의 활성 유출이, RLIP76이 산화제 및 방사성 스트레스 인자에의 내성을 부여하는 주된 기전인 것으로 보여진다(도 1).

[0032] RLIP76의 보호 효과를 통해 잠재적으로 독성인 화학 치환체 및 그의 부산물에 대한 그의 보호에 관한 배후를 조사할 수 있다. 예를 들어, 방사선 조사시 생성되는 활성 산소 종에 의해 유발된 지질 퍼옥시다제(LPO: lipid peroxidase)의 친전자성 생성물이 부분적으로는 방사선 조사에 의한 세포 사멸의 원인이 될 수 있다. 본원에서 상세하게 설명되는 바와 같이, 이들 친전자체의 GSH 접합체의 RLIP76 매개 수송이 방사선으로부터의 보호를 제공할 수 있다. 그러한 보호는 장파 또는 단파 전자가 관여하는, 이온화 방사선, 전자기 방사선, 열 방사선, 및 레이저 방사선을 비롯한, 위해성 방사선으로부터 포유동물을 보호하기 위해 대규모로 쉽게 전달될 수 있다.

[0033] 그러므로, RLIP76이 내부에서 생성된 화합물질, 대사 생성물, 그의 부산물, 및 외부에서 투여된 약물 또는 방사선, 및 그의 부산물의 수송을 매개한다. RLIP76은 또한 GS-E를 포함하는 대부분의 화합물질 및 부산물(예를 들어, 4-HNE 접합체)의 수송을 매개한다. 예를 들어, RLIP76이 풍부하게 존재하는 세포는 (유기 또는 무기) 화합물질의 독성 형태의 독성, 또는 손상으로부터의(예를 들어, 스트레스, 산화, 알킬화, 방사선으로부터의) 독성에 대해 내성을 띤다. ATP에 의존하여 생체이물(예를 들어, GS-E 및 외인성 및 내인성 친전자체)을 유출하는 RLIP76의 작용은 도 2에 도시되어 있다. 여기서, 생체이물, 방사선, 그의 대사산물, 미토콘드리아 전자 수송 및 금속 이온이 막 지질 과산화 및 4-히드록시노네알(독성을 띠는 지질 과산화의 최종 생성물)을 유발할 수 있는 ROS를 생성하며, 이것이 DNA 손상을 유발함으로써 돌연변이유발, 발암, 및 아포프토시스를 일으킬 뿐

만 아니라, 스트레스 매개성 신호전달 경로를 변조시킬 수 있다. RLIP76은 진핵 세포로부터의 매우 다양한 대사, 스트레스, 및 제약 부산물, 예를 들어, 양친매성 약물, 생체이물 및 내생적 물질, 둘 모두의 GSH 접합체(GS-E), GS-HNE 및 류코트리엔의 ATP에 의존한 유출을 매개한다. GS-E 수송은 GST 및 글루타티온 리덕타제(GR: glutathione reductase)의 관능성을 유지시키는 데 있어 중요하데, 그 이유는 상기 효소들이 GS-E에 의해 억제되기 때문이다. RLIP76은 세포 GST와의 동조 기전에 의해 4-HNE의 세포내 농도를 조절한다.

[0034] **RLIP76의 구조**

[0035] RLIP76의 1차 구조를 통해 몇가지 흥미로운 특성들이 밝혀졌다. 단백질은 4개의 영역으로 구분될 수 있는데, 그중 중심에 위치하는 2개의 도메인은 Rac1/CDC42 GAP 활성 및 Ral 결합 도메인을 보유한다. 측면에 위치하는 2개의 도메인의 작용에 대해서는 아직 알려진 바 없다. 인간 RLIP76의 대표적인 뉴클레오티드 서열(진뱅크 수탁 번호 NM_006788) 및 마우스 RLIP76의 대표적인 뉴클레오티드 서열(NM_009067), 및 인간 RLIP76의 아미노산 서열(진뱅크 수탁 번호 NP_006779) 및 마우스 RLIP76의 아미노산 서열(진뱅크 수탁 번호 NP_033093)이 기술되어 있다. 인간 RLIP76 아미노산 서열은 N 당화 부위(아미노산 341-344), cAMP 부위(아미노산 113-116), cGMP 의존성 단백질 키나제 인산화 부위(아미노산 650-653), 티로신 키나제 인산화 부위(아미노산 308-315), N 미리스토일화 부위(아미노산 21-26, 40-45, 및 191-196), 류신 지퍼 패턴 부위(아미노산 547-578) 및 수개의 단백질 키나제 C 인산화, 카제인 키나제 II 인산화, 트립신 및 키모트립신 절단 부위를 포함한다. RLIP76의 1차 구조 중에 상기와 같은 모티프의 존재, 및 그의 용이한 단백질분해성 분해는 RLIP76이 수개의 세포내 및 세포외 프로세스(예를 들어, 단백질 프로세싱, 세포내 신호전달, 단백질 분해, 인식, 태깅 등)에 관여한다는 것, 및 RLIP76의 단백질분해성 프로세싱이 다중 작용에 필요하다는 것을 나타낸다. RLIP76의 펩티드 단편은 개별적으로, 또는 다른 단편과 함께 상기의 다양한 작용을 촉매화시킬 수 있다. 예를 들어, 개별적으로는 ATP의 존성 수송을 매개할 수 없는 단편인, RLIP76의 N 말단 및 C 말단 단편은 프로테오리포솜 중에서 함께 재구성되었을 때 전기적으로 하전된 약물(예를 들어, DOX, 콜히친)의 수송을 촉매화시킬 수 있다.

[0036] 일부 실시양태에서, 본 발명의 RLIP76 단백질은 진뱅크 수탁 번호 NP_006779에 기술되어 있는 655개의 아미노산으로 구성된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 RLIP76 단백질은 US 2005/0123594, US 2006/0182749, US 2008/0279919, US 2010/0124566, 또는 WO 2009/100446A1(상기 출원의 내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)에 개시된 것과 같은 서열을 포함한다.

[0037] ABC 수송체와는 달리, RLIP76 서열 중 어떤 트랜스막 알파 나선도 입증된 바 없다. 그러나, RLIP76과 막의 결합은 특이적인 항체를 사용한 면역조직화학적 연구에 의해 입증되었다(문헌 [Awasthi, et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, **43**:Abst. 4717, 2002](본 문헌은 본원에 참고로 포함된다)). 세포 용해물로부터 RLIP76을 추출해 내기 위해서는 계면활성제가 필요하며, 이는 수송에 중요한 특성인 막 결합을 제안한다. 이러한 결과를 통해 ATP 결합 및 막 결합 방식을 정의하는 구조적 요소면에서 볼 때 상기 수송체는 현재 인정되고 있는 것보다 더 다양하다는 것이 밝혀졌다. 추가로, 중성 또는 양이온성 기질과는 달리 음이온인 경우, 수송체 간의 차이는 크지 않은데, 이는 RLIP76이 2가지 모두의 수송을 촉매화시키고, MRP 1과는 대조적으로, GSH를 공수송하지 않고 상기와 같이 촉매화시킬 수 있기 때문이다.

[0038] 배양된 세포 또는 E. 콜라이(E. coli)에서 발현된 RLIP76은 정제시 쉽게 단백질분해된다. 가장 두드러진 펩티드인, 각각 RLIP76의 N 및 C 말단으로부터 형성된 N RLIP761-367 및 C RLIP76410-655는 SDS 겔에서 49 kDa 및 38 kDa 밴드로서 출현한다. 이 2가지 펩티드 모두 RLIP76에 의해 수송되는 음이온 또는 양이온 리간드의 존재 하에서 자극받을 수 있는 구성적 ATP아제 활성을 보인다. 바나테이트의 존재하에서 증가하는 광산화성 표지에 의해 나타난 바, 2가지 펩티드 모두 ATP에 결합하는데, 이는 ATP 결합 부위에 반응 중간체가 포획되어 있음을 시사하는 것이다. 2개의 단편 중 어느 것도 프로테오리포솜 중에서 단독으로 재구성되었을 때에는 수송을 촉매화시키지 못한다. 그러나, 함께 재구성되었을 때에는, RLIP76에 대한 것과 유사한 동력학적 파라미터로 하전된 화학물질(예를 들어, DNP-SG, DOX)의 ATP에 의존한 수송이 관찰된다. N RLIP761-367 및 C RLIP76410-655에서 ATP 결합 부위는 각각 아미노산 69-74 및 아미노산 418-425인 것으로 확인되었다. 각각 N 및 C 말단 펩티드에서 K74 및 K425의 돌연변이는 ATP아제 활성, ATP 결합능, 및 수송 작용을 폐기시킨다. 상기 ATP 결합 부위의 서열이 P 루프(워커(Walker) 모티프)에 대한 공통 서열과 일치하는 것은 아니다.

[0039] 상기 기술된 인간 RLIP76 핵산 서열 이외에도, 인간 RLIP76 유전자내 다수의 단일 염기 다형성(SNP: single nucleotide polymorphism)이 당업계에 기술되어 있으며, 그중 3개(코딩 서열 중 660번째 뉴클레오티드에서의 A→G 돌연변이, 코딩 서열 중 838번째 뉴클레오티드에서의 G→A 돌연변이, 및 코딩 서열 중 2,065번째 뉴클레오티드에서의 C→T 돌연변이)가 RLIP76 코딩 서열에 포함된다. 이러한 뉴클레오티드 변화로 인해 각각 149번 아미노산 위치에서의 리신→글루타메이트, 208번 아미노산 위치에서의 아르기닌→글루타민, 및 617번 아미노

산 위치에서의 알라닌→발린인 아미노산 서열 변화가 일어난다. 인간 RLIP76 유전자의 인트론에서 발생하는 SNP와 함께 상기와 같은 SNP, 및 인간 RLIP76 유전자의 5' 및 3' 비번역 영역에 존재하는 SNP도 국립 생물 기술 정보 센터(National Center for Biotechnology Information) 웹 사이트 상의 단일 염기 다형성(Single Nucleotide Polymorphism (SNP: Single Nucleotide Polymorphism)) 데이터베이스에 기술되어 있다.

[0040] 본 개시 내용의 특정 측면에서, "RLIP76 단백질"이란 진뱅크 수탁 번호 NP_006779에 제시되어 있는 것과 같은 전장의 인간 RLIP76 아미노산 서열, 단독으로 또는 함께 RLIP76 수송 활성을 보유하는 인간 RLIP76 아미노산 서열의 하나 이상의 단편, 또는 RLIP76 수송 활성을 보유하는 인간 RLIP76 아미노산 서열의 돌연변이를 지칭할 수 있다. 특정 실시양태에서, RLIP76은 진뱅크 수탁 번호 NP_006779에 제시되어 있는 것과 같은 인간 RLIP76 아미노산 서열과 약 99%의 동일성 또는 상동성을 가진 아미노산 서열, 진뱅크 수탁 번호 NP_006779에 제시되어 있는 것과 같은 인간 RLIP76 아미노산 서열과 약 98%의 동일성 또는 상동성, 약 95%의 동일성 또는 상동성, 약 90%의 동일성 또는 상동성, 약 85%의 동일성 또는 상동성, 또는 약 80%의 동일성 또는 상동성을 가진 아미노산 서열을 지칭할 수 있다. 서열 동일성 또는 상동성이 백분율은 상기 서열에의 특성의 부가, 결실, 치환, 침묵 또는 보존적 돌연변이를 반영할 수 있다.

[0041] 리포솜

[0042] 리포솜은 하나 이상의 동심 이중층으로 정렬된 양친매성 지질로 구성된 소포체이다. 지질이 수성 매질 중에 존재할 경우, 지질 헤드기와 물의 친수성 상호작용을 통해 구형 셀 형태의 생물학적 막과 유사한 다층 및 단층 시스템 및 소포체가 형성된다. 리포솜은 소형(0.025-0.05 μm)에서부터 대형(0.05-10 μm) 다층 소포체일 수 있다. 리포솜을 제조하는 데 사용되는 지질로는 인지질, 스펡고지질, 당스펙고지질, 포화 글리세리드, 스테로이드(예를 들어, 콜레스테롤) 및 합성 인지질을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 리포솜은 전형적으로는 POE와 같은 유화제를 사용하여 수성 용매 중에서 함께 지질을 용융시킴으로써 제조된다. 이어서, 상기 제제가 첨가되고, 혼합 또는 초음파 처리를 통해 리포솜이 생성된다. 일반적으로는 상기 제제는 소포체 구조체 중에 포함되어 있다. 이러한 기본 리포솜은 종종 "통상의 리포솜"이라고 지칭된다. (1) 표면이 불활성의 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜로 코팅된 것이 입체적으로 안정한 리포솜; (2) 그에 표적 리간드, 예를 들어, 항체 또는 그의 단편, 렉틴, 올리고당 또는 펩티드가 부착되어 있는 표적화되는 리포솜(예를 들어, 콜레라 독소 B(CTB: cholera toxin B)는 위장관 상피에 리포솜을 표적화하는 데 사용된다); 및 (3) 특정 상호작용에 대한 반응으로서 그의 상 및 구조를 변화시키는 반응성 또는 "다형" 리포솜(이러한 군으로는 특히 다른 자극 중에서도 이온(pH, 양이온), 열 및 광에 감수성인 리포솜을 포함한다)을 비롯한, 수개의 다른 유형의 리포솜 제제가 존재한다.

[0043] 특정 실시양태에서, 조성물은 프로테오리포솜을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "프로테오리포솜"이란 일반적으로는 구형 미셀 유사 또는 소포체 구조체를 형성하는 단백질 및 렉틴 또는 당지질 또는 인지질 조합물이다. 상기 구조체는 자발적으로 또는 화학적 또는 기계적 조작에 의해, 또는 그의 조합에 의해 형성될 수 있다. 프로테오리포솜은 용액 중에서 (a) 테일이 안쪽으로 향하고 있는 구형 미셀, 또는 (b) 친수성 헤드기 사이에 소수성 테일이 끼여 있는 이중층인 이분자 쉬트를 비롯한, 수개의 형상들 중 하나 이상의 형상이 되는 이중층이 될 수 있도록 유도하는 지질(또는 렉틴)의 양친매성 성질을 이용한다. 일반적으로, 프로테오리포솜은 파괴되거나 파괴되었을 때에는 그 스스로 할 수 있다. 프로테오리포솜은 단 1가지의 렉틴 또는 지질만을 함유할 수 있거나, 또는 그들 각각의 다양한 조합을 함유할 수 있다. 인지질의 예로는 포스파티딜콜린, 스펡고마이엘린, 포스파티딜세린, 이노시톨 인지질, 및 포스파티딜에탄올아민을 포함한다. 사용시, 프로테오리포솜은 하전될 수 있거나, 전기적으로 중성일 수 있고, 일반적으로는 생리학적 pH에서 사용된다. 이는 또한 계면활성제(예를 들어, 계면활성제/지질/단백질, 계면활성제/렉틴/단백질)와 함께 혼합된 구조체일 수 있다. 정의된 지질-단백질 또는 렉틴-단백질 비로 구성되고, 정의된 크기를 가진 프로테오리포솜을 제조하는 방법은 분자 생물학 및 단백질/지질 생화학 분야의 숙련자에게 주지되어 있다. 본 개시 내용의 프로테오리포솜은 미국 특허 출원 시리얼 번호 제10/713,578호(공개 번호 US 2005/0123594 A1, 상기 출원의 개시 내용은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)에 개시 및 기술되어 있는 방법을 비롯한, 당업계에 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0044] 추가의 방사선 보호제

[0045] 본 개시 내용의 특정 측면에서, RLIP76, 예를 들어, RLIP76 프로테오리포솜을 포함하는 조성물은 자유 라디칼 제거제, 항산화제, 및 슈퍼옥시드 디스뮤타제 유사체를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 하나 이상의 추가의 방사선 보호제와 함께 조합하여 사용될 수 있다. 보호되지 않은 RLIP76은 단백질분해되기 쉽기 때문에 나형(bare) 단백질을 투여하는 것은 난관에 부딪힐 수 있다. 단백질의 안정성을 촉진시키기 위해, RLIP76은 지질

캡슐화된 프로테오리포좀의 형태로 투여될 수 있다. 추가로, 단백질의 안정성을 촉진시키기 위해, RLIP76 단백질은 하나 이상의 방사선 보호제, 예를 들어, 항산화제, 자유 라디칼 제거제, 또는 슈퍼옥시드 디스뮤타제 유사체와 함께 투여될 수 있다.

[0046] RLIP76과 함께 조합하여 사용될 수 있는 추가의 자유 라디칼 제거제 또는 항산화제로는 부틸화된 히드록시톨루엔(BTH), N 아세틸시스테인, 티오황산나트륨, 글루타티온 에틸 에스테르, 글루타티온, D 메티오닌, 시스테아민, 시스타민, 아미노프로필메틸이소티오우레아, 에티올(Ethyol), 비타민 E, 에다라본 (3-메틸-1-페닐-2-피라졸린-5-온), 멜라토닌, 폴리니트록실-알부민, 이데베논, 산화질소, 카르베딜롤(Carvedilol), 알파 리포산, 알로푸리놀, 2 O 옥타데실아스코르브산, N-2-머캅토프로피오닐 글리신, 슈퍼옥시드 디스뮤타제(SOD), 재조합 인간 CuZn-SOD, 글루타티온 퍼옥시다제, 카탈라제, 산화질소 신타제, 아스코르브산(비타민 C), 셀레늄, 아세틸시스테인, 셀레기닌(Deprenyl®), 피크노제놀, 코엔자임 Q10, 베타 카로틴, PC 01, SC-55858, 철포르피린(III), 미트라마이신, 크로모마이신, 다우노마이신, 올리보마이신 및 WP-631, 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0047] RLIP76과 조합하여 사용될 수 있는 추가의 방사선 보호제로는 플러렌(Fullerene) DF-1, 부틸화된 히드록시아니솔(BHA), 부틸화된 히드록시톨루엔(BHT), 탄소 나노튜브, 자가 및 동종이계 골수 유래 줄기 세포, CD34 양성 세포, 단백질 및/또는 Rad51 또는 Rad52 및 관련 유전자의 cDNA 및/또는 mRNA, TGF 베타 II형 수용체 유전자 및/또는 생성물, 및 p53 유전자 및/또는 생성물, 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0048] 제약 조성물 및 투여 경로

[0049] 본원에서는 RLIP76을 포함하는 치료학상 조성물이 환자 또는 피험체에게 전신, 국소, 또는 국부 투여되는 제약 제제로서 제공된다. 본원에서 사용되는 바, "환자" 또는 "피험체"라는 용어는 인간 또는 동물 피험체(특정 조성물의 임상 효능에 대한 모델로서 특히 유용한 동물)를 지칭한다. 적합한 제약 제제를 선택하는 것은 선택된 투여 방법에 따라 달라질 수 있고, 의학 화학자에 주지된 프로토콜에 따라 선택될 수 있다.

[0050] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 또한 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "제약상 허용되는 담체"는 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 향균제 및 향진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 제약 활성제와 함께 상기와 같은 제약상 허용되는 담체를 사용하는 것을 당업계에 주지되어 있다. 임의의 종래 배지 또는 제제가 활성제와 불화합성이 아닌 한, 본원에 개시된 조성물에서의 그의 사용은 주지된다. 보존적 활성 성분 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

[0051] 본원에서 사용되는 바, "제약상 허용되는 염"이란 모체 화합물이 그의 산 또는 염기 염의 제조에 의해 변형된, RLIP76 또는 본원에 개시된 다른 화합물의 유도체를 지칭한다. 제약상 허용되는 염의 예로는 염기성 잔기, 예를 들어, 아민의 무기 또는 유기산 염; 산성 잔기, 예를 들어, 카르복실산의 알칼리 또는 유기 염 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, "산 부가 염"이라는 용어는 산 첨가에 의해 제조된 모체 화합물의 상응하는 염 유도체를 지칭한다. 제약상 허용되는 염으로는 예를 들어, 무기 또는 유기산으로부터 형성된 모체 화합물의 통상의 염 또는 4급 암모늄 염을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 상기와 같은 통상의 염으로는 무기산, 예를 들어, 염산, 브롬산, 황산, 술판산, 인산, 질산 등로부터 유도된 염; 및 유기산, 예를 들어, 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 파모산, 말레산, 히드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 술팜산, 2-아세트옥시벤조산, 푸마르산, 톨루엔술폰산, 메탄술폰산, 데탄디술폰산, 옥살산, 이세티온산 등으로부터 제조된 염을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 산성 또는 염기성 화합물은 쯔비터이온으로서 존재할 수 있다. 유기산, 유기 염기, 및 쯔비터이온을 비롯한, 모든 형태의 활성제가 본 개시 내용의 범주내 포함되는 것으로 주지된다.

[0052] 단백질은 중성 또는 염 형태의 조성물로 제제화될 수 있다. 제약상 허용되는 염은 (단백질의 유리 아미노기로 형성된) 산 부가 염, 및 무기산, 예를 들어, 염산 또는 인산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산과 같은 유기산으로 형성된 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 유리 카르복실기로 형성된 염 또한 무기 염, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화3가철, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유도될 수 있다.

[0053] RLIP76 조성물은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 금속 이온과 함께 복합체를 형성할 수 있거나, 또는 중합체 화합물, 예를 들어, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 히드로젠, 텍스트란 등 내로 혼입될 수 있거나, 또는 리포좀, 마이크로에멀전, 미셀, 단층 또는 다층 소포체, 적혈구허깨비 또는 스페로블라스트 내로 혼입될 수 있다. 상기 조성물은 물리적인 상태, 가용성, 안정성, 생체내 방출 속도, 및/또는 생체내 제거 속도에 영향을 줄 것이

며, 따라서, 의도하는 적용에 따라 선택된다.

[0054] 추가로, RLIP76, 또는 그의 하나 이상의 활성 단편은 리포솜, 프로테오리포솜, 소포체, 나노입자, 노이소솜 (noisosome), 캐리어 단백질, 금 입자, 키틴, 중합체, 유기 "케이지," 바이러스, 및 세균을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 임의의 다수의 상이한 절단 비히클과 함께 예를 들어, 공유 결합, 비공유 결합, 이온 결합, 또는 소수성 결합에 의해 결합될 수 있다. 추가로, 하나 이상의 특이적인 기관, 조직, 또는 세포 유형에 의해 일어나는 상기 RLIP76 조성물 중 임의의 것에 대한 바람직한 흡수는 RLIP76, 또는 상기 열거된 전달 비히클 중 임의의 것과 함께 하나 이상의 특이적인 표적 부분을 포함함으로써 수행될 수 있다. 상기 표적 부분으로는 항체 또는 그의 단편, 펩티드, 지질, 화학물질, 하전된 입자, 수용체, 단백질, 바이러스 프로모터, 전사 인자, DNA 프로모터, 및 특정의 2차 또는 3차 구조를 가지는 핵산을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0055] 개시된 화합물은 예를 들어, 불활성 희석제와 함께, 또는 자화성의 식용가능한 담체와 함께 경구적으로 투여될 수 있거나, 또는 경질 또는 연질 셀 젤라틴 캡슐에 밀폐될 수 있거나, 또는 식이 식품과 함께 직접 혼입될 수 있다. 치료학상 경구적으로 투여될 경우, 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입될 수 있고, 정제, 트로키, 캡슐제, 엘릭시르, 현탁제, 시럽제, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 상기 조성물 및 제제는 활성제를 0.1% 이상 함유하여야 한다. 물론, 조성물 및 제제의 비율은 달라질 수 있으며, 이는 편리하게는 단위 중량당 약 2 내지 약 60% 사이일 수 있다. 상기 치료학상 유용한 조성물 중 활성제의 양은 적합한 제제가 수득될 수 있도록 하는 양이다.

[0056] 정제, 트로키, 환제, 캡슐제 등은 또한 하기를 포함할 수 있는데: 결합제, 예를 들어, 트라가칸트 검, 아카시아, 옥수수 전분, 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들어, 제2인산칼슘; 붕해제, 예를 들어, 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산 등; 윤활제, 예를 들어, 스테아르산 마그네슘; 및 감미제, 예를 들어, 수크로스, 락토스 또는 사카린이 첨가될 수 있거나, 또는 향미제, 예를 들어, 페퍼민트, 윈터그린 오일, 또는 체리 향료가 첨가될 수 있다. 조성물이 캡슐제인 경우, 이는 상기 유형의 물질 이외에도 액체 담체를 함유할 수 있다. 각종의 다른 물질이 코팅제로서 존재할 수 있거나, 또는 다르게는 조성물의 물리적인 형태를 변형시키기 위해 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제, 또는 캡슐제는 셀락, 당, 또는 2가지 모두로 코팅될 수 있다. 시럽제, 또는 엘릭시르는 감미제로서 수크로스, 방부제로서 메틸 및 프로필파라벤, 염료 및 향료, 예를 들어, 체리 또는 오렌지 향료를 함유할 수 있다. 물론, 임의의 조성물을 제조하는 데 사용되는 임의의 물질은 제약상 순수한 것이어야 하며, 실질적으로 사용량은 비독성이어야 한다. 추가로, 활성제는 지효성 제제 및 제형으로 혼입될 수 있다.

[0057] 활성제는 또한 비경구적으로 또는 복강내로 투여될 수 있다. 유리 염기 또는 약리학상 허용되는 염으로서의 활성제 용액은 적합하게, 계면활성제, 예를 들어, 히드록시프로필셀룰로스와 혼합된 물 중에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 그의 혼합물 중, 및 오일 중에서 제조될 수 있다. 보통의 저장 및 사용 조건하에서, 상기 제제는 미생물의 성장을 막기 위해 방부제를 함유한다.

[0058] 수용액의 형태로 비경구적으로 투여하는 경우, 예를 들어, 용액은 필요에 따라 적절히 완충처리되어야 하고, 액체 희석제는 먼저 충분한 염수 또는 글루코스를 사용하여 등장성이 되도록 만들어야 한다. 이러한 특성의 수용액은 특히 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수용성 매질은 본 개시 내용에 비추어 당업자에게 공지될 것이다. 예를 들어, 1 용량은 1 mL의 등장성 NaCl 용액 중에 용해될 수 있고, 이는 1,000 mL의 피하주입액에 첨가되거나, 제안된 주입 부위에 주사될 수 있다(예를 들어, 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580] 참조). 치료받는 피험체의 상태에 따라 용량을 일부 변형시키는 것이 필요할 수 있다. 어느 경우든 투여 담당자는 개체 피험체에게 적절한 용량을 결정할 수 있을 것이다.

[0059] 주사용으로서 적합한 제약 형태로는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에 상기 형태는 멸균성이어야 하고, 적절하게 유효성이어야 한다. 제조 및 저장 조건하에서 안정하여야 하며, 미생물, 예를 들어, 세균 및 진균의 오염 작용으로부터 보호되어야 한다. 캐리어는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 적합한 그의 혼합물, 및 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들어, 코팅제, 예를 들어, 렉시틴의 사용에 의해, 분산액인 경우, 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 적절한 유도성을 유지시킬 수 있다. 각종 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 미생물 작용을 방지할 수 있다. 다수의 경우에서, 등장화제, 예를 들어, 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노

스테아레이트 및 젤라틴으로 구성된 조성물에서 사용함으로써 주사용 조성물의 흡수를 장기화시킬 수 있다.

[0060] 멸균 주사액은 필요량의 활성제를 필요에 따라 상기 열거된 다른 성분들 중 수개의 것과 적절한 용매 중에 혼합시킨 후, 여과 멸균시킴으로써 제조된다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 각종의 멸균된 활성제를 혼합시킴으로써 제조된다. 멸균 주사액의 제조를 위한 멸균 분말인 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분과 임의의 추가적인 원하는 성분을 그의 이전 멸균 여과된 용액으로부터 수득하는 것인 진공 건조 및 냉동 건조 기법이다.

[0061] 특정 실시양태에서, 개시된 조성물은 피부 패취, 또는 경피 전달 시스템의 사용에 의해 투여될 수 있도록 제제화될 수 있다. 경피 투여는 당업계에 공지된 다수의 시스템들 중 임의의 것에 의해 수행될 수 있다. 본원에 기술된 조성물 사용에 적합화될 수 있는 시스템의 예로는 미국 특허 번호 제4,816,252호; 미국 특허 번호 제5,122,382호; 미국 특허 번호 제5,198,223호; 미국 특허 번호 제5,023,084호; 미국 특허 번호 제4,906,169호; 미국 특허 번호 제5,145,682호; 미국 특허 번호 제4,624,665호; 미국 특허 번호 제4,687,481호; 미국 특허 번호 제4,834,978호; 및 미국 특허 번호 제4,810,499호(각각의 상기 출원은 본원에 참고로 포함된다)에 기술된 경구 투여 시스템을 포함한다.

[0062] 상기 방법은 전형적으로 부착 매트릭스 또는 약물 저장소 시스템을 포함하고, 이는 피부 침투 강화제, 예를 들어, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜 200 디라우레이트, 이소프로필 미리스테이트, 글리세롤 트리올레에이트, 리놀렌산 포화 에탄올, 글리세롤 모노올레에이트, 글리세롤 모노라우레이트, n-데실 알콜, 카프르산, 및 특정 포화 및 불포화 지방산, 및 그의 에스테르, 알콜, 모노글리세리드, 아세테이트, 디에탄올아미드 및 N,N-디메틸아미드를 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 제4,906,169호 참조).

[0063] 유효량

[0064] 특정 측면에서, 본 개시 내용은 예를 들어, 방사선 노출로부터 발생하는 질환 또는 질병을 치료하거나 처치하는 방법으로서, 이는 상기와 같은 치료 또는 처치를 필요로 하는 환자 또는 피험체에게 치료학적 유효량의 RLIP76 또는 RLIP76과 또 다른 활성제, 예를 들어, 또 다른 방사선 보호제의 치료학적 조합물을 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법을 포함한다. 특정 실시양태에서, RLIP76을 포함하는 상기 화합물 또는 투여 단위를 활성제로서 지칭한다. 질환 또는 질병의 치료 또는 처치용 약제의 제조에서의 개시된 조성물의 용도 또한 주시된다. 본 개시 내용은 또한 질환 또는 질병의 치료 또는 처치용 약제의 제조에서 사용하기 위한 생물학적 또는 치료학적 유효량의 하나 이상의 카고 분자를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0065] 본원에서 사용되는 바, 달리 명시하지 않는 한, "치료하다," "치료하는," 및 "치료"라는 용어는 환자가 질환 또는 질병을 앓는 동안 발생하는, 질환 또는 질병, 또는 관련된 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상 또는 효과의 중증도를 감소시키는 작용에 주시한다. 본원에서 사용되는 바, 달리 명시하지 않는 한, "처치하다," "처치하는," 및 "처치"라는 용어는 이미 질환 또는 질병을 앓고 있는 환자에서 질환 또는 질병의 재발을 예방하거나, 지연시키거나, 그의 중증도를 감소시키는 것을 포함한다. 상기 용어는 질환 또는 질병의 억제, 발생, 및/또는 지속 기간을 바꾸거나, 환자가 질환 또는 질병에 반응하는 방식을 변화시키는 것을 포함한다.

[0066] 본원에서 사용되는 바, 달리 언급되지 않는 한, 화합물의 "치료학적 유효량"은 질환 또는 질병의 치료 또는 처치에서 임의의 치료학적 이익을 제공하거나, 질환 또는 질병과 관련된 하나 이상의 증상을 최소화시키는 데 충분한 양이다. 화합물의 치료학적 유효량은 질환 또는 질병, 또는 관련된 질환 또는 질병의 치료 또는 처치에서 임의의 치료학적 이익을 제공하는, 단독의 또는 하나 이상의 다른 요법 및/또는 치료제와 병용되는 화합물의 양을 의미한다. "치료학적 유효량"이라는 용어는 질환 또는 질병을 치료하거나, 질환 또는 질병을 개선 또는 감소시키거나, 질환 또는 질병의 증상 또는 발병 원인을 감소 또는 회피하거나, 전반적인 요법을 개선시키거나, 또는 또 다른 치료제의 치료학적 효능을 증진시키는 양을 포함한다.

[0067] 기술된 화합물 및 조성물의 독성 및 치료학적 효능은 세포 배양물 또는 실험용 동물에서의 표준 제약 방법에 의해, 예를 들어, LD50(군집 중 50%를 치사하는 용량), 및 ED50(군집 중 50%에서 치료학적 유효한 용량)을 측정하는 방법에 의해 측정될 수 있다. 독성 효과와 치료학적 효과 사이의 용량비가 치료 지수이며, 이는 LD50/ED50 비로서 표시된다. 치료 지수가 큰 화합물이 바람직하다. 독성 부작용을 보이는 화합물이 특정 실시양태에서 사용될 수는 있지만, 보통은 비감염 세포에의 잠재적인 손상을 감소시킴으로써 부작용을 감소시키기 위해서는 상기 화합물을 우선적으로 환부 조직 부위로 표적화시키는 전달 시스템을 디자인하는 주의가 요망된다.

[0068] 세포 배양물 분석 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 인간에서의 사용을 위한 투여량 범위를 공식화하는 데

사용될 수 있다. 본 개시 내용의 특정 측면에서, 상기 화합물의 투여량은 독성이 거의 없거나 전혀 없는, ED50을 포함하는 순환 농도 범위에 포함되어 있다. 투여량은 사용되는 제형 및 사용되는 투여 경로에 따라 상기 범위 내에서 달라질 수 있다. 개시된 방법에서 사용되는 임의의 화합물의 경우, 치료학상 유효량은 초기에는 세포 배양 분석으로부터 예측될 수 있다. 세포 배양물에서 측정된 바와 같은 IC50(증상의 최대 억제의 중간을 달성하는 테스트 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하는 용량이 동물 모델에서 공식화될 수 있다. 상기 정보를 사용하여 인간에서 유용한 용량을 보다 정확하게 결정할 수 있다. 혈장 수준은 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0069] 치료학상 치료가 주시되는 경우, 적절한 투여량은 또한 테스트 피험체의 체중 1 kg당 생체활성제의 최대 내성 용량(MTD: maximal tolerable dose)을 측정하는 동물 연구를 사용하여 결정될 수 있다. 일반적으로, 테스트되는 1종 이상의 동물은 포유동물이다. 당업자는 주기적으로 인간을 비롯한 다른 종에 대해 독성이 없고, 효능을 발휘할 수 있는 용량을 외삽하여 추정한다. 효능에 대한 인간에서의 연구에 착수하기 이전에, I상 임상 연구가 안전한 용량을 확립하는 데 도움이 된다. 추가로, 생체활성제는 예를 들어, 생체활성제의 안정성을 증진시키거나, 또는 다르게는 그의 약리학상 특성을 증진시키는(예를 들어, 생체내 반감기를 증가시키거나, 독성을 감소시키는 것 등을 하는), 잘 확립되어 있는 각종의 화합물 또는 구조체와 함께 복합체를 형성할 수 있다.

[0070] 본 개시 내용의 특정 실시양태에서, 조성물 또는 투여 단위의 유효량은 약 14 mg/kg 내지 약 0.01 mg/kg, 약 14 mg/kg 내지 약 0.025 mg/kg, 약 14 mg/kg 내지 약 0.05 mg/kg, 약 14 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg, 약 14 mg/kg 내지 약 0.25 mg/kg, 약 14 mg/kg 내지 약 0.5 mg/kg, 약 14 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 14 mg/kg 내지 약 2.5 mg/kg, 약 14 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 0.01 mg/kg, 약 2.5 mg/kg 내지 약 0.01 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 0.01 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 0.01 mg/kg, 약 0.25 mg/kg 내지 약 0.01 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 0.01 mg/kg, 약 0.05 mg/kg 내지 약 0.01 mg/kg, 약 0.025 mg/kg 내지 약 0.01 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 0.025 mg/kg, 약 2.5 mg/kg 내지 약 0.05 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 0.25 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg 등의 범위일 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 조성물 또는 투여 단위의 유효량은 약 0.01 mg/kg, 약 0.025 mg/kg, 약 0.05 mg/kg, 약 0.075 mg/kg, 약 0.1 mg/kg, 약 0.25 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 0.75 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 7.5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 11 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 13 mg/kg, 약 14 mg/kg 등이다.

[0071] **키트**

[0072] 전형적인 키트는 RLIP76, 또는 그의 제약상 허용되는 염, 프로드럭, 용매화물, 수화물, 또는 입체이성체를 포함하는 조성물로 이루어진 하나 이상의 투여 단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 또 다른 제제, 예를 들어, 방사선 보호제의 단일 투여 단위 형태가 개시된 화합물과 조합하여 사용될 수 있다. 본 개시 내용의 키트는 활성 성분을 투여하는 데 사용되는 장치를 추가로 포함할 수 있다. 그러한 장치의 예로는 시린지, 드립 백, 패치, 및 흡입기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0073] 개시된 키트는 추가로 하나 이상의 개시된 조성물을 투여하는 데 사용될 수 있는 제약상 허용되는 비히클을 포함할 수 있다. 예를 들어, 개시된 조성물이 비경구 투여를 위해 재구성되는 고체 형태로 제공되는 경우, 키트는 비경구 투여에 적합한 미립자가 없는 멸균액을 형성할 수 있도록, 개시된 조성물이 그 안에 용해되어 있을 수 있는 적합한 비히클의 밀봉 용기를 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 비히클의 예로는 주사용수 USP; 수성 비히클(예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 염화나트륨 주사액, 링커 주사액, 텍스트로스 주사액, 및 텍스트로스 및 염화나트륨 주사액, 및 락트산 링커 주사액); 수 혼화성 비히클(예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 에틸 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 폴리프로필렌 글리콜); 및 비수성 비히클(예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 옥수수 오일, 면실유, 땅콩유, 참깨유, 에틸 올레이트, 이소프로필 미리스테이트, 및 벤질 벤조에이트)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 그러나, 구체적인 실시양태에서, 개시된 제제는 어떤 알콜, 다른 공용매, 오일 또는 단백질도 함유하지 않는다.

[0074] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시양태를 입증하기 위해 포함된 것이다. 하기 실시예에서 개시하는 기법은 본 발명을 실시함에 있어 그 기능을 잘 발휘한다고 본 발명자들을 통해 발견된 기법을 나타내는 바, 이에 그러한 기법은 본 발명의 실시를 위한 바람직한 모두를 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것을 당업자는 이해하여야 한다. 그러나, 본 개시 내용에 비추어 본 발명자들은 본 발명의 정신 및 범주로부터 벗어남 없이 개시된 구체적인 실시양태를 다수 수정할 수 있고, 여전히 비슷하거나 유사한 결과를 얻을 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 본 발명은, 본 발명의 개별적 측면의 단일 일례로서 의도된 본원에 기술된 구체적인 실시양태에 의해 그 범주가 제한되는 것은 아니며, 기능적으로 등가인 방법 및 구성 요소도 본 발명의 범주 내에 포함

된다. 사실상, 본원에 제시되어 있고 기술되어 있는 것 이외에도, 본 발명의 다양한 변형이 상기 기술 내용으로부터 당업자에게는 자명할 것이다. 그러한 변형을 첨부되는 특허청구범위의 범주 내에 포함시키고자 한다.

[0075] 실시예

[0076] 실시예 1

[0077] RLIP76에 의한 방사선 보호

[0078] 모든 동물 모델에서, 방사선 노출과 생존과의 관계는 실험 파라미터에 따라 달라질 것이며, 이에 비처리군(대조군)과 함께 각각의 특정 모델에 대해 측정하여야 한다. X-방사선 조사가 마우스의 생존에 미치는 효과를 보여주는 연구를 수행하였다. 다양한 선량의 X-방사선 조사로 처리된 C57/B16 계통의 마우스에 대한 기준 생존 곡선을 획득하였다. 도 3A는 대조군 처리된 마우스에서 상이한 방사선 선량에서의 생존율을 나타내고, 도 3B는 사멸까지의 평균 소요 시간 대 방사선 선량을 도시한 것이다. 명백하게, X-방사선 조사의 선량이 증가함에 따라 생존 시간은 단축되었다.

[0079] 놀랍게도, RLIP76을 야생형 마우스에 투여한 결과, 그의 생존율은 개선되었다. 4마리의 야생형 마우스를 1,000 cGy에 노출시키고, 노출 후 +3일째에 i.p. 주사에 의해 투여된 대조군 리포솜(도 4, 다이아몬드 모양 표시), 또는 i.p. 주사에 의해 투여된 400 μ g RLIP76 리포솜(도 4, 사각형 표시)으로 처리하였다. 제시된 바와 같이, RLIP76 리포솜의 투여를 통해 야생형 마우스의 생존율은 증가하였다.

[0080] 실시예 2

[0081] 넉아웃 마우스를 사용한 RLIP76 및 방사선 감수성

[0082] 마우스에서 RLIP76 수준을 정상 수준보다 더 많이 보충하면 방사선 독성 효과에 대한 상기 마우스의 내성이 증가할 수 있다는 관찰 결과는 RLIP76이 상기 보호 과정에서 "율속" 단계로서 작용한다는 것을 암시한다. 따라서, RLIP76의 함량을 증가시키면 정상적인 생리학상 기능을 사용하여 용량 및 시간에 따라 반응하는 방식으로 보호는 증가할 수 있다. 다양한 조건하에서 방사선 조사를 받은 마우스의 생존에 대해 RLIP76 투여가 미치는 효과를 조사하는 연구에서 상기를 확인하였다.

[0083] 미국 시리얼 번호 제11/741,447호에 개시되어 있는 바와 같이, 유전자를 선택적으로 억제시킬 수 있는 Cre-Lox 기술(텍사스주 더 우드랜드 소재의 Lexicon Genetics, Incorporated)을 사용하여 2개의 RIP1(RLIP76의 마우스 버전) 유전자 카피 모두(야생형; +/+), 1개의 RIP1 유전자 카피(이형접합성; +/-)를 보유하거나, 또는 어떤 RIP1 유전자 카피도 보유하지 않는(동형접합성; -/-) C57B 마우스를 만들었다. RLIP76-리포솜을 i.p. 주사한 후, 동형접합성 RIP1 넉아웃 마우스로부터 유래된 조직에 대한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 야생형(+/+), 이형접합성(+/-), 및 동형접합성(-/-) RIP1 마우스(1군당 마우스 6마리)에 500 cGy, 750 cGy, 및 1,000 cGy의 전신 X-방사선 조사를 수행한 후, 생존에 대해 모니터링함으로써 RIP1 발현 감소가 방사선 감수성에 미치는 효과를 조사하였다. 하기 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 이형접합성(+/-) RIP1 마우스와 비교하였을 때, 야생형(+/) RIP1 마우스에서는 테스트된 모든 방사선 선량에서 생존 시간이 증가하였고, 동형접합성(-/-) RIP1 마우스와 비교하였을 때, 이형접합성(+/-) RIP1 마우스에서는 테스트된 모든 방사선 선량에서 생존 시간이 증가하였다. 따라서, RIP1 발현 감소시 방사선 감수성은 증가하는 것으로 관찰되었다.

표 1

방사선 선량 (cGy)	생존(시간)		
	야생형 (+/+)	이형접합성 (+/-)	동형접합성 (-/-)
500	648 ± 53	360 ± 28	264 ± 28
750	336 ± 30	168 ± 21	144 ± 12
1000	138 ± 14	19 ± 4	8 ± 3

[0084]

[0085] RIP1 손실이 상기 후천적 방사선 감수성에서 주요 결정 인자일 경우, 이러한 결손을 대체하면 방사선 내성이 역전되어야 한다. 따라서, 넉아웃 동물의 조직에 재조합 인간 RLIP76을 제공하는 리포솜 전달 시스템을 사용하였다. E. 콜라이에서 재조합 인간 RLIP76을 발현시키고, 발현된 단백질을 아미노산 조성 분석에 의해 >96%의 고순도 정제하고, 인공 리포솜에서 상기 RLIP76의 수송 작용을 재구성하는 방법은 당업계에 기술되어 있는

것(문헌 [Awasthi, et al, *Biochemistry* **39**:9327-9334, 2000](이는 본원에서 참고로 포함된다))과 동일하였다. 리포솜을 충분한 양으로 제조하고, 복강내(i.p.) 주사를 통해 동형접합성 RIP1 마우스에게 투여하였다.

[0086] 상기 효과는 보다 고선량의 방사선 노출에서 관찰되었다(도 5). 야생형 RIP1 마우스 4마리를 750 cGy에 노출시키고, 노출 후 12시간이 경과하였을 때 i.p. 주사에 의해 투여되는 대조군 리포솜(도 5, 다이아몬드 모양 표시), 또는 i.p. 주사에 의해 투여되는 400 μ g의 RLIP76 리포솜(도 5, 사각형 표시)으로 처리하고, RIP -/- 마우스마우스 4마리를 750 cGy에 노출시키고, 노출 후 12시간이 경과하였을 때 i.p. 주사에 의해 투여되는 대조군 리포솜(도 5, 삼각형 표시), 또는 i.p. 주사에 의해 투여되는 400 μ g의 RLIP76 리포솜(도 5, 동그라미 표시)으로 처리하였다. 명백하게, RLIP76 리포솜 투여가 RIP1 / 마우스의 생존을 증가시키기는 하였지만, 이는 또한 야생형 RIP1 마우스의 생존을 급격히 증가시켰다. 놀랍게도, 심지어 RIP1 +/+ 마우스와의 비교에서도 RLIP76으로 보충된 RIP1 -/- 마우스의 생존은 현저히 증가하였다. 이러한 관찰 결과는 RLIP76의 방사선 보호 효과를 확실히 입증한다.

[0087] 실시예 3

[0088] 용량 반응 연구

[0089] RLIP76이 방사선 노출 후 24시간 초과 시간의 경과한 후에 전달된 경우에도 유효한지 여부를 조사하기 위해, 용량, 노출 수준, 및 노출 후 경과 시간을 달리하여 제공된 RLIP76의 보호적 이점을 조사하는 일련의 연구를 수행하였다. 모든 마우스는 C57BL6/알비노 계통으로서, 이는 방사선 효과 모델로서 가장 일반적으로 사용되는 것이다. 텍사스 암 센터(Texas Cancer Center: 텍사스주 알링턴 소재)에서 배리안 클리닉 선형 가속기(Varian Clinac Linear accelerator)(2100C)를 사용하여 전신 X-방사선 조사에 의해 노출을 전달하였다. 400 cGy/분의 속도로 6-MeV 광자 빔을 사용하였다. 마우스를 1.5 cm 수퍼플랩 볼루스 상단의 그의 우리 한쪽으로 격리시켜 놓고, 처리 대역을 그의 중심으로 집중시켰다. 가속기 갠트리를 180도 회전시켜 전체 선량을 전방 및 후방의 2개의 분획으로 나누었다. 달리 언급하지 않는 한, 모든 실험은 1군당 6마리의 마우스에서 수행하였다. 특히, RLIP76 프로테오리포솜의 경구 투여를 통해 단백질이 효율적으로 전달되었다; 따라서, 모든 실험은 상기와 같은 경구 투여를 통해 이루어졌다.

[0090] 방사선 노출 범위에서의 용량 및 시간 의존성에 대해 조사하였다. 먼저, 6개의 야생형 마우스 군을 500 cGy의 방사선에 노출시킨 후, RLIP76 프로테오리포솜으로 처리하지 않거나(대조군), 또는 방사선 노출 후 다양한 시점에 투여되는 다양한 용량의 RLIP76 프로테오리포솜으로 처리하였다. 도 6은 RLIP76을 투여받지 못한 대조군 마우스(다이아몬드 모양 표시)와의 비교로 이루어진, 방사선 노출 후 14시간 및 48시간이 경과하였을 때 투여된 25 μ g의 RLIP76 프로테오리포솜(사각형 표시), 방사선 노출 후 14시간 및 48시간이 경과하였을 때 투여된 50 μ g의 RLIP76 프로테오리포솜(삼각형 표시), 방사선 노출 후 14시간 및 48시간이 경과하였을 때 투여된 100 μ g의 RLIP76 프로테오리포솜(X 표시), 방사선 노출 후 24시간 및 72시간이 경과하였을 때 투여된 100 μ g의 RLIP76 프로테오리포솜(* 표시), 또는 방사선 노출 후 48시간 및 96시간이 경과하였을 때 투여된 100 μ g의 RLIP76 프로테오리포솜(동그라미 표시) 투여의 용량에 따른 반응을 나타낸 것이다. 유의적으로는, RLIP76 단백질이 정상적으로 보완된 마우스에서도 조차 추가의 RLIP76 단백질이 제공되면 방사선에 대한 내성은 현저하게 증가하게 된다. 사실상, 보통 30일째까지 완전 치사시키는 방사선 선량에 노출된 야생형 마우스의 경우, 경구 투여에 의해 100 μ g의 RLIP76 단백질을 2회에 걸쳐 투약받았을 때에는 생존율이 200% 증가한 것으로 나타났다(도 6). 놀랍게도, 비처리 마우스 및 RLIP76 프로테오리포솜으로 처리된 마우스의 50% 생존 대 방사선 선량을 측정하는 선량 감소 요소 그래프(도 7)를 통해 초기 투약이 이루어지기 전 방사선 노출 후 전체 24시간을 기다린 경우에도 여전히 1.7-1.8이라는 주목할 만한 선량 감소 요소("DRF")를 얻은 것으로 나타났다. 방사선 노출 후 24시간 초과 시간의 경과한 후에도 RLIP76을 투여할 수 있고, 여전히 치료학적 이익을 얻을 수 있는 능력은 중요한 것이다.

[0091] 3개의 야생형 마우스 군을 500 cGy의 방사선에 노출시킨 후, 1개의 군은 RLIP76 프로테오리포솜으로 처리하지 않고(대조군; 다이아몬드 모양 표시), 1개의 군은 방사선 노출 후 14시간 및 48시간이 경과하였을 때 투여된 25 μ g의 RLIP76 프로테오리포솜으로 처리하고(사각형 표시), 및 1개의 군은 방사선 노출 후 0시간, 48시간, 및 96시간이 경과하였을 때 투여된 25 μ g의 RLIP76 프로테오리포솜으로 처리하였다(삼각형 표시). 그 결과는 도 8에 제시되어 있는데, 이를 통해 RLIP76 프로테오리포솜을 조기에 보다 자주 투여하였을 때, RLIP76 프로테오리포솜의 방사선 보호 효과가 개선된다는 것이 명백하게 입증되었다.

[0092] RLIP76 프로테오리포솜의 방사선 보호 효과는 또한 보다 고선량의 방사선에서도 입증되었다. 2개의 야생형 마

우스 군을 750 cGy의 방사선에 노출시킨 후, 1개의 군은 RLIP76 프로테오리포솜으로 처리하지 않고(대조군; 다이아몬드 모양 표시), 1개의 군은 방사선 노출 후 0시간, 48시간, 및 96시간이 경과하였을 때 투여된 100 μ g의 RLIP76 프로테오리포솜으로 처리하였다(사각형 표시). 추가로, 2개의 야생형 마우스 군을 1,000 cGy의 방사선에 노출시킨 후, 1개의 군은 RLIP76 프로테오리포솜으로 처리하지 않고(대조군; 삼각형 표시), 1개의 군은 방사선 노출 후 16시간, 및 64시간이 경과하였을 때 투여된 100 μ g의 RLIP76 프로테오리포솜으로 처리하였다(X 표시). 그 결과는 도 9에 제시되어 있는데, 이를 통해 RLIP76 프로테오리포솜이 750 cGy에서 탁월한 방사선 보호 효과를 발휘하며, 심지어 1,000 cGy에서도조차 일부 보호 효과를 발휘한다는 것이 밝혀졌다. 요약컨대, RLIP76은 그의 뚜렷한 생존상의 이점, 경구적으로 전달될 수 있는 능력, 및 노출 후 유의적인 지연을 고려해 볼 때 현 방사선 보호 후보 물질보다는 상당한 장점을 제공한다.

[0093] 실시예 4

[0094] RLIP76 리포솜과 항산화제에 의한 방사선 보호

[0095] 보호되지 않은 RLIP76 단백질은 단백질분해되기 쉽기 때문에 나형 단백질을 투여하는 것은 난관에 부딪힐 수 있다. 본 연구에서는 RLIP76을 지질 캡슐화된 프로테오리포솜의 형태로 투여하였다. 투여를 기다리는 동안 산화적 분해를 감소시키거나 방해하기 위해서, 완충액 중의 RLIP76이 리포솜 내로 재구성되는 것일 경우, 완충액은 항산화제, 예를 들어, 부틸화된 히드록시톨루엔(BHT)을 함유하였다. 하나 이상의 다른 항산화제 또한 RLIP76을 포함하는 지질 캡슐화된 프로테오리포솜에 첨가될 수 있다. 그중에서도 특히, BHT는 그 스스로 방사선 보호 효과를 가지는 것으로서 과학 문헌상에 기록되어 있다. 리포솜은 또한 방사선 해결책으로서의 후보 약물을 전달하는 데 사용되었지만, 리포솜 그 스스로 보호 효과를 제공할 수 있는 능력을 문헌을 통해서 알 수 없다.

[0096] RLIP76의 지질에 기반한 전달이 제약 제제 중 단백질의 안정성을 개선시킬 수 있다는 가정하에, RLIP76 단백질, 리포솜, 및 항산화제(예를 들어, BHT)로 이루어진 복합체를 생성하고, 이를 TO-80Cx로 명명하였다(80이란 리포솜의 평균 크기가 80 nm인 것을 언급하는데, 이는 중간 크기의 소포체로 분류된다). 추가로 명명되는 명칭으로는 항산화제(BHT)를 포함하는 완충액 중에서 구성된 리포솜을 지칭하는 TO-80LA, 및 항산화제 또는 RLIP76 단백질을 포함하지 않는 완충액 중에서 구성된 리포솜을 지칭하는 TO-80L을 포함한다. 이어서, RLIP76 프로테오리포솜과 항산화제, 예를 들어, BHT로 이루어진 상기 복합체가 단독의 또는 조합된 리포솜 및 BHT의 효과를 초과하는, 방사선 독성에 대한 보호 및/또는 치료학적 효과를 제공할 수 있는지 여부를 판단하기 위해 상기 복합체를 테스트하였다.

[0097] 평균 체중이 30.0 g인 14주령된 CD2F1 수컷 마우스를 0.60 Gy/분의 선량 속도로 코발트60 원으로부터 9.25 Gy 감마 방사선에 노출시킨 후, 상기 마우스의 전체 생존율에 대해 측정하였다. 마우스를 1개의 코호트당 16마리의 마우스로 이루어진 코호트로 나누고, 다회 투약 요법을 사용하여 TO-80Cx 50 μ g (RLIP76 단백질 중량)/마우스, 또는 동일 부피/농도의 개별 약물 구성 요소를 복강내 투여함으로써 다회에 걸쳐 투약하고, 대조군과 비교하였다. 마우스의 생존에 대해 30일 동안 연구하였다.

[0098] 도 10에 제시되어 있는 바와 같이, 노출 전 24시간째에 전체 TO-80Cx 복합체를 투여하였을 때 최대 이익을 얻을 수 있었다. 다른 실험에서는 투여가 몇시간 지연된 경우에서도 보다 큰 효과가 있는 것으로 나타났지만, 본 실험에서는 투여가 대략 노출 시점까지 지연된 경우에도 생존에 있어 상기보다는 좀더 작은 이익을 얻은 것으로 관찰되었다. 본 데이터 또한 도 11에 제시되어 있다. 본 실험에서, BHT를 함유하는 완충액은 단독으로 작은 효과를 나타내었고(완충액 + BHT), 리포솜과 BHT의 조합물은 보다 큰 효과를 발휘하였다(TO-80LA). 본 실험에서, TO-80LA는노출이 이루어지는 시간의 주변 시점에 투여된 TO-80Cx와 유사한 효과를 발휘하였다. 그러나, 도 13에 제시되어 있는 바와 같이, 이전 실험 세트에서 TO-80LA는 전체 방사선 노출 선량이 더 낮은 경우에 전체 TO-80Cx보다도 현저히 열등하였다. 흥미롭게도, 도 12에 제시되어 있는 바와 같이, RLIP76을 포함하지 않는 상이한 전달 비히클의 비교를 통해서 TO-80LA가 단독으로 BHT를 함유하는 완충액과 비교하였을 때 일부 보호 효과를 발휘하는 것으로 나타났으며, 이는 리포솜 그 자체도 약간의 방사선 보호 효과를 가질 수 있다는 것을 제안한다.

[0099] 따라서, TO-80Cx를 구성하는 각각의 활성 구성 요소는 방사선 보호제로서의 일부 효과를 가진다. 그러나, 전체 복합체를 사용할 경우에 최대 효과가 발휘되는 것으로 관찰되었다. 정량적인 의미에서 리포솜 또는 리포솜과 BHT의 구체적인 기여도는 가변적인 것으로 남아있으며, 이는 방사선 노출 수준에 따라 달라질 수 있다.

[0100] 실시예 5

[0101] **우주 방사선 해결책으로서의 RLIP76**

[0102] 우주 탐험의 본질이 일시적인 우주 비행으로부터 장기간의 프로젝트(예를 들어, 국제 우주 정거장(International Space Station))로 바뀔에 따라, 이러한 탐험의 위험 또한 순수하게 기계적인 문제에서부터 우주 그 자체의 고유한 위험에 대한 관심으로 바뀌었다. 이중 주된 관심사는 장기간 동안의 방사선 노출이다. 보통은 지구 표면에서 차단되거나 약화되는, 전자기 방사선(X선 및 감마선) 및 우주선(양성자 및 중이온)을 비롯한 방사선으로 우주는 가득 차 있다. 입자 방사선은 또한 물질과 상호작용할 경우, 2차 방사선, 예를 들어, 중성자선 및 감마선을 생성한다. 이러한 사실은 우주선 및 그의 내용물을 차폐시키는 문제와 관련이 있다; 차폐가 심각할 뿐만 아니라, 더욱 위험한 방사선을 생성시킬 수 있다.

[0103] 전형적인 지구상의 인간은 한해 5×10^{-3} Gy 미만을 경험하게 된다. 우주 공간에서, 태양 플레어는 3 Gy까지의 노출 수준을 생산할 수 있지만, 대부분의 경우, 그보다는 훨씬 작다. 그러나, x선, 감마선 및 에너지 전자(β -입자 포함) 이외의 이온화 방사선은 상기 방사선들보다도 더 큰 단위 에너지당 생물학적 손상을 일으키며, 이에 측정치는 생물학적 효과비(RBE: Relative Biological Effectiveness)로 명명되는 보정 계수에 의해 보정된다. RBE 개념은 우주 방사선 건강상에 있어 중요한데, 이는 특히 사람이 지구 대기권 밖에 있는 전체 기간 동안 계속되는 노출로 인해 손상이 축적되기 때문이다. 이러한 방사선으로 인해 우주 여행자에게 나타나는 위험으로는 만성 양성자 및 우주선 노출에 기인한 암, 고선량의 태양 양성자 폭풍에 기인한 면역 기능 상실, 및 가능하게는, 신경 세포 중 우주선 중핵의 단일 트랙에 의해 유발되는 신경계 효과를 포함한다. 이러한 효과로는 인지 장애 및 (이미 1명의 아폴로(Apollo) 우주 비행사에서 기술된) 망막 섬광을 포함한다.

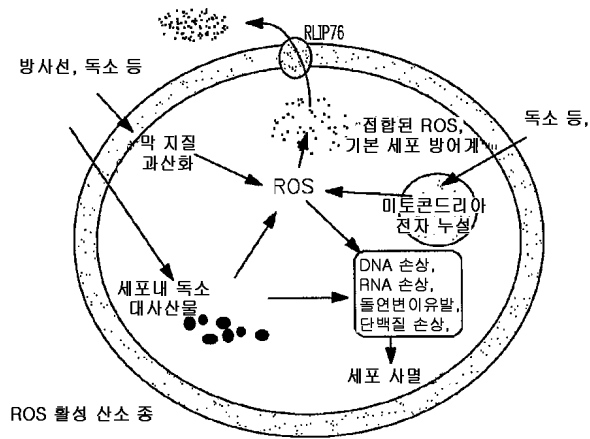
[0104] RLIP76의 효능에 대한 증거는 상기 기술된 바와 같이, 실험 데이터를 통해 입증되었다. 유전적으로 RLIP76 단백질이 결핍된 마우스는 매우 다양한 방사선 노출 수준에 대해 고감도의 감수성을 띠며, 이러한 감수성은 정맥내 또는 경구 투여에 의해 보충되는 RLIP76 단백질에 의해 역전될 수 있다. 유의적으로는, RLIP76 단백질이 정상적으로 보완된 마우스에서도 조차 추가의 RLIP76 단백질이 제공되면 방사선에 대한 내성은 현저하게 증가하게 된다. 사실상, 보통 30일째까지 완전 치사시키는 방사선 선량에 노출된 야생형 마우스의 경우, 경구 투여에 의해 100 μ g의 RLIP76을 2회에 걸쳐 투약받았을 때에는 생존율이 200% 증가한 것으로 나타났다. 예상대로, 보다 초기에 RLIP76을 투여할수록, 그 효과가 더 커지며, 초기 투약이 이루어지기 전 방사선 노출 후 전체 24시간 이상의 기간 동안 기다린 경우에도 여전히 상당한 구조(rescue)가 이루어졌다.

[0105] 그렇지만, 아마도 가장 유의적인 것은 프로테오리포좀 중에 캡슐화된 RLIP76이 경구적으로 투여된 경우에도 혈뇌장벽을 통과한다는 점이다. 따라서, RLIP76의 보호 효과는 중이온의 충격을 받은 래트에서 관찰되는 많은 신경계 손상 부위로서 위치하는 해마와 같은 중추 신경계 조직으로 확장될 것이다. 따라서, 작용 기전의조합, 투여의 용이함 및 해부적 전달을 통해 RLIP76은 우주 방사선 해결책으로서 관심가는 후보 물질이 된다.

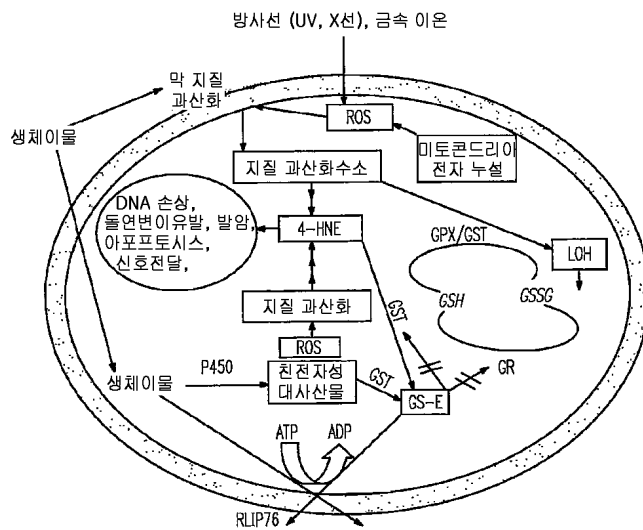
[0106] 본원에 개시되어 있고, 청구되는 모든 조성물 및/또는 방법은 본 개시 내용에 비추어 과도한 실험없이도 제조되고 수행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 바람직한 실시양태에 의해 기술되었지만, 본 발명의 개념, 정신 및 범주로부터 벗어남 없이 본원에 기술된 조성물 및/또는, 상기 방법의 단계 또는 단계 순서에 변형이 적용될 수 있다는 것이 당업자에게는 자명할 것이다. 더욱 구체적으로, 화학적 및 생리학적으로 관련이 있는 특성의 제제를 통해 동일하거나, 유사한 결과를 달성할 수 있는 한, 상기와 같은 제제는 본원에 기술된 제제를 치환하여 대체될 수 있다는 것은 자명할 것이다. 당업자에게 자명한 상기와 같은 모든 유사한 치환 및 변형은 첨부되는 특허청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 정신, 범주 및 개념에 포함되는 것으로 간주된다.

도면

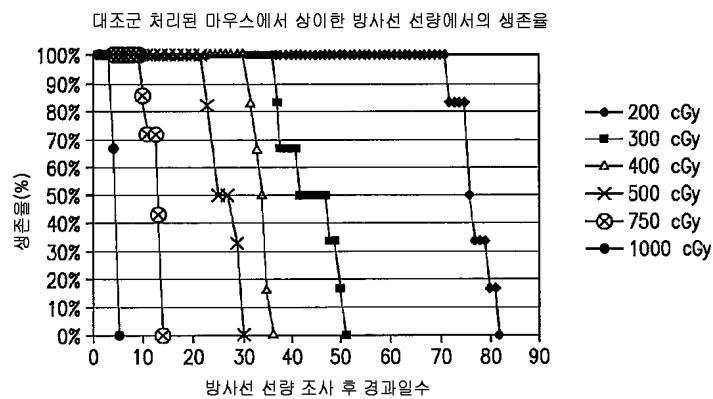
도면1



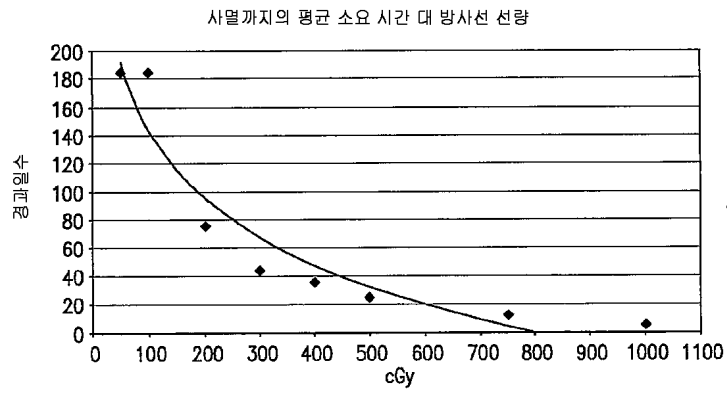
도면2



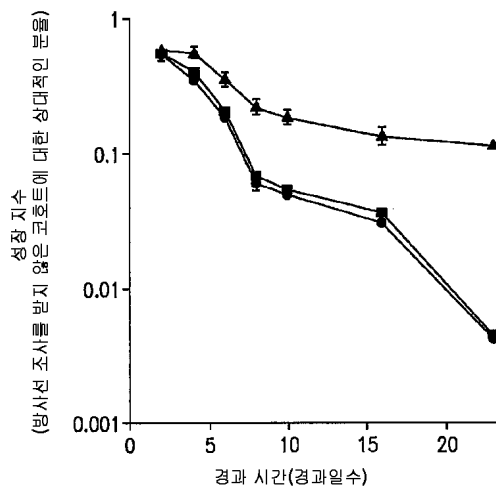
도면3a



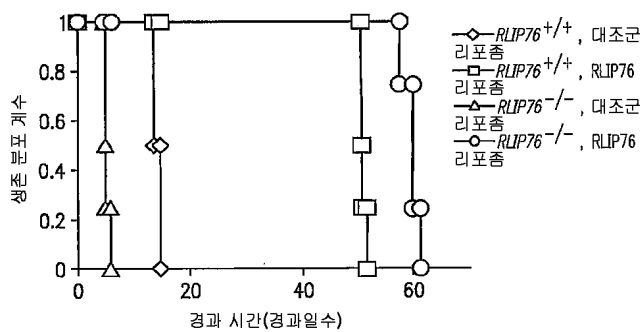
도면3b



도면4

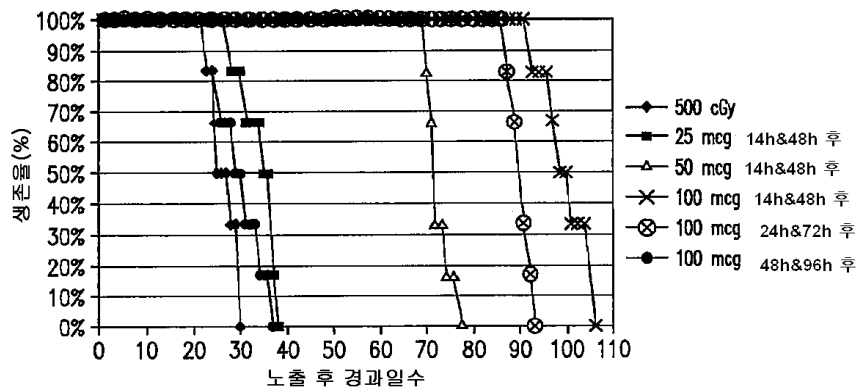


도면5



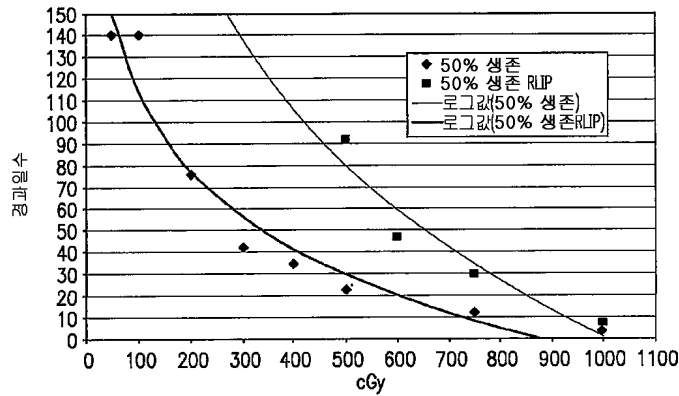
도면6

500 cGy 노출 후의 생존에 대한 RLIP76의 용량에 따른 반응
(1군당 6마리)



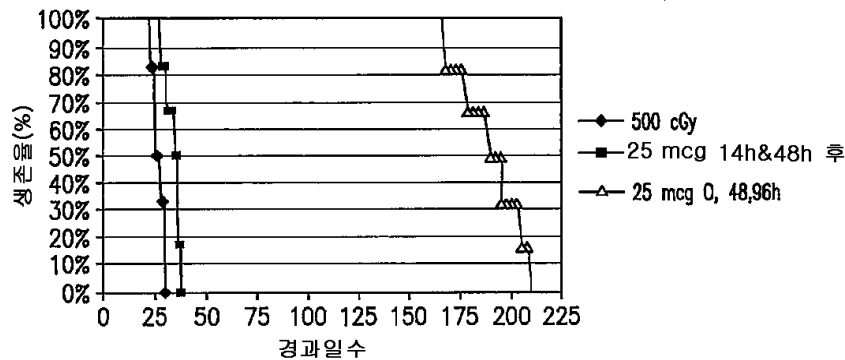
도면7

50% 생존 대 방사선 선량



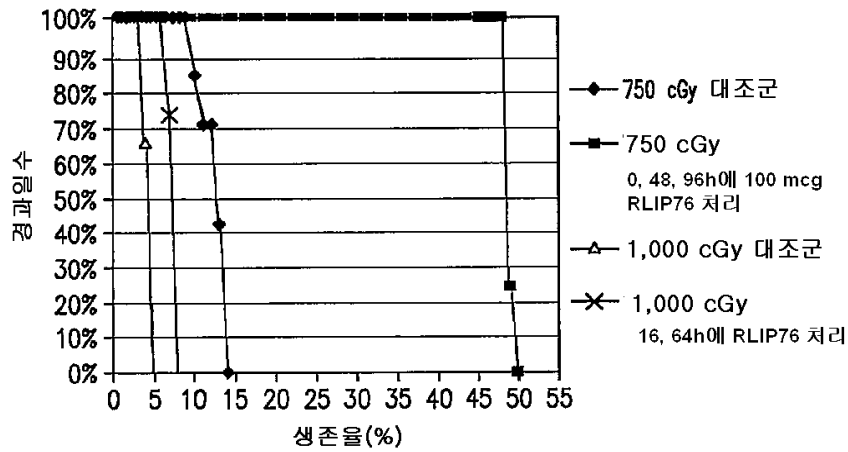
도면8

조기에 보다 자주 투여하였을 때의 생존율이 보다 높다
(500 cGy 방사선에서 처리된 모든 마우스)

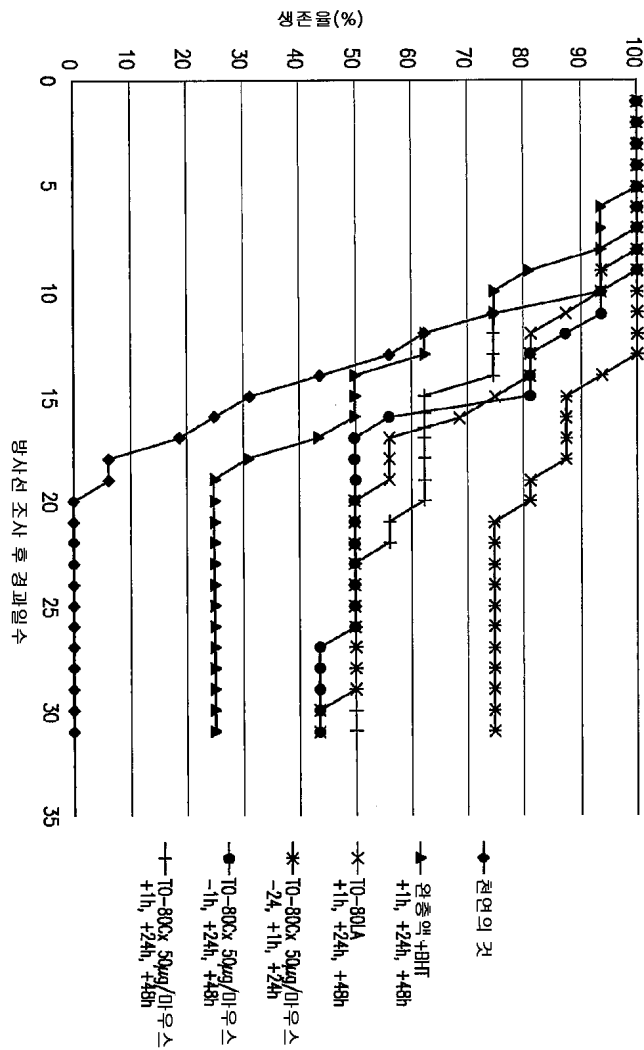


도면9

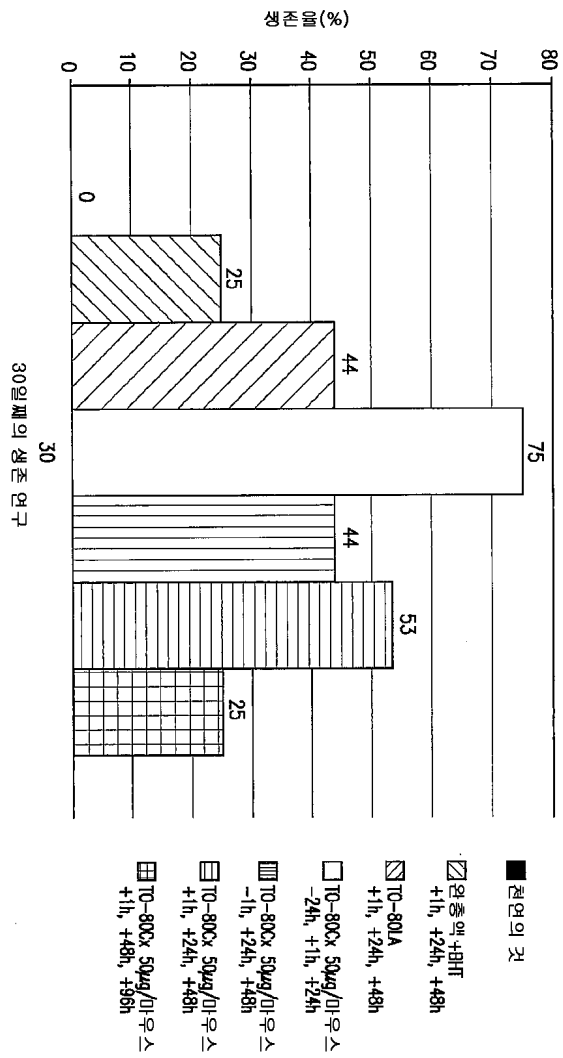
보다 고선량의 방사선에서의 RLIP76의 효과



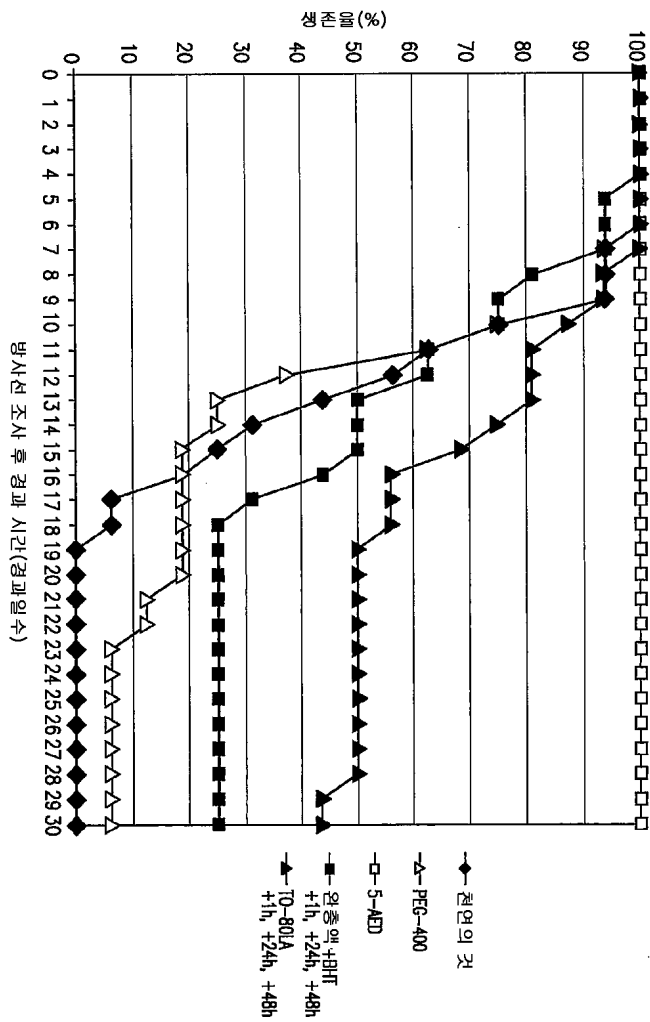
도면10



도면11



도면12



도면13

