(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
A61K 48/00

(11) 공개번호 10-2004-0004629
(43) 공개일자 2004년01월13일

(21) 출원번호 10-2003-7014985
(22) 출원일자 2003년11월17일
번역문 제출일자 2003년11월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/015842
(86) 국제출원출원일자 2002년05월17일
(87) 국제공개번호 WO 2002/92617
(87) 국제공개일자 2002년11월21일

(30) 우선권주장 60/291,727 2001년05월17일 미국(US)

(71) 출원인 에이브이아이 바이오파마 인코포레이티드
미국 오리건주 97258 포틀랜드 사우스웨스트 콜롬비아 원 스위트 1105

(72) 발명자 이버슨패트릭엘.
미국오리건97330코발리스노스웨스트페어옥스플레이스5902

(74) 대리인 정진상
박종혁

심사청구 : 없음

(54) c-myc 안티센스 올리고머를 사용한 암치료를 위한조합 접근법

요약

c-myc에 대한 올리고머 및 표준 화학치료제를 포함하는 조합 치료 섭생에 의한 암치료의 개선된 치료 방법이 제공된다.

색인어

암, c-myc, 안티센스, 화학요법, 방사선요법, 모르폴리노

명세서

기술분야

본 발명은 전통적인 암화학치료제의 투여와 함께 c-myc에 대한 올리고머 안티센스를 투여함에 의한, 암의 생체내 면역요법을 위한 방법에 관한 것이다.

배경기술

Agrawal, S. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(4):1401-5, 1990.
Akhtar, S., *et al.*, Nucleic Acids Res. 19(20):5551-9, 1991.
Amati B *et al.*, Front Biosci 3:D250-68, 1998.
Anderson, C.M., *et al.*, J Neurochem. 73(2):867-73, 1999.
Bennett *et al.*, Circulation 92(7):1981-93, 1995.
Ben-Yosef *et al.*, Oncogene,17(2):165-71. 1998.
Bertram JS and Przemyslaw Cancer Letters 11:63-73, 1980.
Bieche I *et al.*, Cancer Res 59(12):2759-65, 1999.
Blumenreich *et al.*, Cancer. 55(5):1118-22, 1985.
Bonham, M.A. *et al., Nucleic Acids Res.* 23(7):1197-1203, 1995.
Boudvillain, M. *et al., Biochemistry* 36(10):2925-31, 1997.
Byhardt RW, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 31(2):431-3, 1995.
Dang CV *et al.*, Exp. Cell Res. 253, 63-77, 1999.
D'Cruz CM *et al.*, Nature Med 7(2):235-39, 2001.
Denhardt, DT The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control, G.S.
Stein *et al.*, Eds. pp. 225-304. 1999 Wiley-Liss, Inc.
Cohen *et al.*, *Antisense Res. & Dev.* 2:191, 1991.
Coulis CM *et al.*, Mol Pharmacol 57(3):485-94, 2000.
Forastiere *et al.*, J Clin Oncol. 19(4):1088-95, 2001.
Gandara DR *et al.*, Semin Oncol 18(1 Suppl 3):49-55, 1991.
Gandarillas A and Watt FM, Genes Dev 11(21):2869-2882, 1997.
Gauwerky CE and Croce CM, *Semin Cancer Biol.* 4(6):333-40, 1993.
Gee, J.E. *et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.* 8:103-111, 1998.
Ghosh, C *et al.*, Meth. Enzym. 313:135-143. 1999.

Giles GV *et al.*, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 9:213-220, 1999.
Giles, R.V. *et al., Anticancer Drug Des.* 8(1):33-51, 1993.
Huang, Y et al, Mol Med, 6:647-658, 1995.
Hudziak, R.M *et al.*, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 6:267-272, 1996.
Hudziak, R.M *et al.*, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 10:163-176, 2000.
Jones DP and Chesney RW., Curr Opin Pediatr. 7(2):208-13, 1995.
Kipshidze, N *et al.*, XXI Congress of the European Society of Cardiology, pp 463-467. Bologna (Italy): Monduzzi Editore S.p.A, 1999.
Lappalainen, *et al.*, Biochim Biophys Acta. 1196(2):201-8, 1994.
Leonetti, C *et al.*, J Natl Cancer Inst., 88(7):419-29, 1996.
Li *et al.*, J Surg Res., 59(4):485-92 1995).
Loke, S.L., *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 86(10):3474-8, 1989.
Lou X *et al.*, J Biomater Appl 15(4):307-20, 2001.
Mayo JG, *Cancer Chemother. Rept.* 3:325-330, 1972.
McGuffie E *et al.*, Cancer Res. 60(14):3790-9, 2000.
Monteith DK *et al.*, Toxicol Pathol 27(3):307-17, 1999.
Nagase *et al.*, Cancer Treatment Reports 71:825-829, 1997.
Nicolaou KC *et al.*, Nature 367(6464):630-4, 1994.
Onoda JM *et al.*, Cancer Lett 40(1):39-47, 1988.
Pendergast GC, Ed., Oncogene Reviews, Myc and Myb. 18(19):1, 1999.
Peters GJ *et al.*, Pharmacol Ther 87(2-3):227-53, 2000.
Popescu RA *et al.*, Eur J Cancer, 34(8):1268-73. 1998.
Ricker JL *et al.*, Kidney International. 2001 (Submitted).
Skorski, T *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A., 94(8):3966-71, 1997.
Skorski, T *et al.*, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 7:187-195, 1997.
Smith, JB and Wickstrom, EJ, Natl. Cancer Inst., 15:1146-1154, 1998.
Smith JB and Wickstrom E, Methods Enzymol., 314:537-80, 2000.
Spitzer, F. and Eckstein F., *Nucleic Acid Res.* 16: 11691-11704, 1988.
Summerton, J and Weller D, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 7:187-195, 1997
Summerton, J. and Weller, D. Nucleos. Nucleot.16:889-898, 1997.
Theon *et al.* JAVMA 202:261-267, 1993.

Toulme, J.J. *et al.*, *Biochimie* 78(7):663-73, 1996.
Williams AS, Br J Rheumatol. 35(8):719-24, 1996.
Wu WJ and Wu TL, J Microencapsul. 16(5):639-46, 1999.
Nakamura N *et al.*, J Biochem (Tokyo) 129(5):755-9, 2001.
Yakubov, L.A., *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 86(17):6454-8, 1989.
Yuen AR and Sikic BI, *Frontiers in Bioscience* d588-593, 2000.

암의 발생은 원-발암유전자 c-myc를 포함하는 세포 원-발암유전자의 발현 수 준의 변화에 연결된 복잡한 다단계 과정이다(Denhardt, DT, 1999; Pendergast GC, 1999). c-myc는 세포 성장, 분화, 및 아폽토시스를 조절하며, 그것의 이상 발현은 폐암, 결직장암, 유방암, 방광암, 백혈병, 폐암 등을 포함하는 많은 사람 암에 관련된다(Dang 등, 1999). 다수 암들에서의 염기성-나선-루프-나선 핵 c-myc의 조절되지 않은 발현이나 이상 발현을 내포하는 보고서들이 많은 접근법을 사용하여 c-myc 저해 효과를 평가하는 전-임상 및 임상 연구를 이끌고 있다.

안티센스 올리고뉴클레오티드 및 항체가 관심의 표적 단백질의 합성을 특이적으로 방해할 수 있다는 것이 증명되었다. 그것들의 소수성으로 인해 안티센스 올리고뉴클레오티드는 인지질 멤브레인과 잘 상호작용하며(Akhtar 등, 1991), 세포 원형질 멤브레인과 상호작용 후, 올리고뉴클레오티드는 살아있는 세포로 능동 수송된다고 제안되었다(Loke 등, 1989; Yakubov 등, 1989; Anderson 등, 1999).

포스포로티오에이트 백본을 가지며, p53, bcl-2, c-raf, H-ras, 단백질 키나제 C-알파 및 단백질 키나제 A를 포함하는 7개의 암 관련 유전자에 대해 디렉트되는 안티센스 화합물을 시험하기 위한 연구가 착수되었다. 포스포로티오에이트 백본 탓이라고 생각되는 일과성 저혈소판증, 피로 및 발열을 포함하는 부작용이 관찰되었다. 게다가, 표적 유전자 발현의 저해는 '고작 별로 크지 않게' 측정되었고, 최종 임상 활성은 관찰되지 않았다(Yuen 등, 2000).

c-myc 번역 시작 부위에 표적화된 포스포로티오에이트(PSO) 및 N3'-P5' 포스포라미데이트 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용한 더 이상의 연구는 다양한 종류의 종양 세포들의 성장을 저해하는 것으로 보고되었다(Leonetti 등, 1996; Smith 등, 1998; 및 Skorski 등, 1997). 이들 연구는 c-myc 저해제가 암 및 재협착과 같은 증식성 질환을 치료하는데 있어서 임상적으로 유용할 수 있음을 암시한다.

포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)는 포스포디에스테르 결합이하전되지 않은 포스포라미데이트 결합으로 대체되고, 디옥시리보스당이 모르폴린 고리로 대체된 신규한 안티센스 구조 종류를 대표한다(Summerton 등, 1997). PMO는 여러 가지의 뉴클레아제 및 프로테아제에 내성이며, 유사유전자형 포스포디에스테르 DNA보다 RNA와 더 높은 친화성으로 결합하고(Summerton 등, 1997), 번역 개시의 입체적 저해제로서 작용하는(Ghosh 등, 1999) 것으로 증명되었다.

c-myc 안티센스 올리고머는 정상 프레-mRNA 스플라이싱을 저해하며, 이상 스플라이스된 mRNA를 생성하는 것으로 알려져 있다(Hudziak 등, 2000). c-myc에 대한 PMO 안티센스는 암세포에서 c-myc 번역의 서열 특이적 저해제로서 c-myc 단백질 발현의 감소 및 G0/G1에서 세포 사이클의 정지를 일으키는 것으로 증명되었고, 암 치료법에서의 사용이 제안되었다(Hudziak 등, 2000).

암치료 전략들에서의 진보에도 불구하고, 효능의 부족 및/또는 현재 사용되는 화학치료제의 독성으로 인한 상당한 부작용이 문제점으로 남아 있다. 약물 독성은 생명을 위협하는 상황을 가져올 만큼 충분히 심각할 수 있으며, 이것은 부작용을 상쇄할 수 있는 약물의 투여를 필요로 하고, 화학치료제의 감소 및/또는 중단을 가져올 수 있으며, 이것은 환자의 치료 및/또는 삶의 질에 부정적인 영향을 미칠 수 있다.

진행중인 임상 시험의 당면 과제로서 유전자요법 전략이 시도되었다. 그러 나, 그러한 전략이 임상적 타당성을 갖기 위해서는 전통적인 화학요법과의 일관성, 송달 시스템의 특이성의 부족, 및 이들 송달 시스템으로 인한 독성 부작용이 극복되어야 한다.

따라서, 현재의 치료적 접근법에서의 결함들을 다루는 개선된 암치료 섭생에 대한 필요성이 여전히 남아 있다. 본 발명은 이런 필요성을 다룬다.

발명의 개요

따라서, 본 발명의 한 양태는 화학요법에 의한 치료에 민감한 암의 치료를 위한 개선된 방법을 제공하는 것이며, 여기서 개선은 암환자에게 c-myc에 대한 올리고머 안티센스 및 화학치료제를 투여하는 것을 포함하는 치료 섭생에 관한 것이고, 여기서 c-myc에 대한 올리고머 안티센스 및 화학치료제는 연속적으로 최소 1일 간격으로 투여된다.

본 발명의 다른 양태는 화학요법에 민감한 암의 치료를 위한 제약 조성물의 제조에서 c-myc에 대한 올리고머 안티센스 및 화학치료제의 사용을 제공하는 것이며, 여기서 c-myc에 대한 올리고머 안티센스 및 화학치료제는 연속적으로 최소 1일 간격으로 투여된다.

본 발명의 관련 양태는 화학요법에 의해 현재 치료중인 환자에서 암의 치료를 위한, c-myc에 대한 올리고머 안티센스를 포함하는 올리고머 조성물의 제공이며, 여기서 조성물은 화학치료제의 투여 전 또는 후에 투여된다.

본 발명의 또 다른 양태는 화학요법에 의한 치료에 민감한 암의 치료를 위한 키트를 제공하는 것이다. 그러한 키트는 c-myc에 대한 올리고머 안티센스를 포함 하는 제 1 조성물 및 화학치료제를 포함하는 제 2 조성물을 포함하며, 여기서 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 연속적으로 최소 1일 간격으로 투여된다.

바람직하게, 안티센스 올리고머는 약 12 내지 25 염기의 길이를 가지며, 다음을 특징으로 한다:

(a) 실질적으로 하전되지 않은 백본;

(b) 50℃ 이상의 Tm에서 높은 친화성으로 표적 RNA의 상보성 서열과 혼성화하는 능력;

(c) 뉴클레아제 내성; 및

(d) 세포로 능동 또는 촉진 수송하는 능력.

바람직하게, 안티센스 올리고머는 c-myc에 대한 mRNA 번역 시작 코돈을 포함하는 서열 또는 c-myc mRNA의 스플라이스 어셉터 영역에 표적화된다. 본 발명을 실행하는데 사용되는 바람직한 c-myc 안티센스 올리고머 서열의 예는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 및 SEQ ID NO:11로서 나타낸 서열을 함유하는 올

리고머들을 포함한다.

다음의 상세한 설명을 첨부된 도면 및 실시예와 함께 숙지할 때 본 발명의 이들 및 다른 목적 및 특징이 더욱 충분히 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 중합체를 형성하는데 적합한 5-원자(A), 6-원자(B) 및 7-원자(C-D) 연결기를 갖는 몇가지 바람직한 모르폴리노-종류 서브유닛을 나타낸다.

도 2A-D는 전형적인 모르폴리노 올리고뉴클레오티드의 반복 서브유닛 세그먼 트를 나타내며, A 내지 D로 지정된 것은 각각 도 1의 서브유닛 A-D를 사용하여 구성된 것이다.

도 3A-3G는 올리고뉴클레오티드 유사체에서 하전되지 않은 결합 종류의 예들을 나타낸다.

도 4A-C는 식염수 또는 AVI-4126의 1회 정맥내 주사로 치료된 LL 종양을 지닌 마우스로부터의 종양 조직의 대표적인 역 HPLC 크로마토그램을 묘사한다. 이 도면들은 기준 대조표준 크로마토그램(도 4A), 식염수(도 4B) 또는 300 μg AVI-4126(도 4C)로 치료된 마우스로부터의 종양 용해물(lysate)의 대표적인 크로마토그램을 제공한다.

도 5A 및 B는 식염수(레인 1 및 2); 100μg c-myc 스크램블 대조표준 올리고머 안티센스 올리고머(SEQ ID NO:2; 레인 3 및 4); 또는 100μg AVI-4126 안티센스 올리고머(SEQ ID NO:1; 레인 5 및 6)의 1회 주사를 제공받은 크게 확립된 LL 종양을 지닌 마우스로부터의 용해물에 있는 c-myc 및 β-액틴 단백질의 대표적인 면역블롯 분석의 결과를 묘사하며, 여기서 레인 7은 c-myc에 대한 양성 대조표준이다.

도 6A-C는 식염수(레인 2-5) 및 AVI-4126(레인 6-9) 치료된 마우스로부터의 대표적인 종양 용해물의 웨스턴블롯 이미지를 제공한다. 레인 1은 c-myc 양성 대조표준이며, 여기서 패널 A는 N-말단 c-myc 항체, 패널 B는 C-말단 c-myc 항체, 패널 C는 β-액틴 항체로 프로브되었고, 패널 C는 로딩 대조표준으로 사용한다.

도 7A 및 B는 식염수(레인 1-2), 시스플라틴(레인 3-4) 및 시스플라틴 + AVI-4126(레인 5-6) 치료 그룹으로부터의 대표적인 종양 용해물의 웨스턴블롯 이미 지를 제공한다. 도 7A는 블롯이 N-말단 c-myc 항체로 프로브되었을 때의 결과를 예시하며, 도 7B는 블롯이 로딩 대조표준으로서 β-액틴 항체로 프로브되었을 때의 결과를 예시한다.

도 8A-D는 표 1에 설명된 조합 화학요법 치료에서 AVI-4126의 효과를 예시하며, 여기서 AVI-4126은 시스플라틴(도 8A), 탁솔(도 8B), 에토포시드(도 8C) 및 5-FU(도 8D)를 사용한 치료 섭생과 교대로 투여된다.

발명의 상세한 설명

1. 정의

본원에서 사용된 하기 용어들은 다른 지시가 없다면 다음의 의미를 가진다.

본원에서 사용된 용어 '화합물', '제제', '올리고머' 및 '올리고뉴클레오티드'는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관하여 상호 교환하여 사용될 수 있다. 유사하게, 용어 '화합물' 및 '제제'는 본 발명을 실행하는데 사용되는 화학치료 화합물에 관하여 상호 교환하여 사용될 수 있다.

본원에서 사용된 용어 '안티센스 올리고뉴클레오티드' 및 '안티센스 올리고머'는 상호 교환하여 사용되며, 안티센스 올리고머가 왓슨-클릭 염기쌍에 의해 RNA 중의 표적 서열과 혼성화하여 표적 서열 내에 RNA:올리고머 헤테로듀플렉스를 형성하도록 허용하는 뉴클레오티드 염기들의 서열 및 서브유닛-대-서브유닛 백본으로 간주한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성을 가지거나 또는 거의 상보성일 수 있다. 그러한 안티센스 올리고머는 표적 서열을 함유하는 mRNA의 번역을 차단 또는 저해하거나, 또는 유전자 전사를 저해할 수 있으며, 이중-가닥 또는 단일-가닥 서열과 결합할 수 있고, 그것이 혼성화하는 서열'에 대해 디렉트'된다고 말할 수 있다.

본 발명에 사용되는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 전형적인 구조는 도 1A-E에 나타낸 β-모르폴리노 서브유닛 종류를 포함한다. 중합체는 1개 이상의 결합 종류를 함유할 수 있다는 것이 인정될 것이다.

도 1의 서브유닛 A는 도 2의 A에서 나타낸 5-원자 반복-유닛 백본을 형성하는 1-원자 인-함유 결합을 함유하며, 여기서 모르폴리노 고리는 1-원자 포스폰아미드 결합에 의해 연결된다.

도 1의 서브유닛 B는 도 2에서 B로 나타낸 6-원자 반복-유닛 백본을 위해 디자인된다. 도 1의 구조 B에서 5' 모르폴리노 탄소와 인기를 연결하는 원자 Y는 는 황, 질소, 탄소, 또는 바림직하게는 산소일 수 있다. 인으로부터의 펜던트 부분인 X는 다음 중 어느 것일 수 있다: 불소; 알킬 또는 치환 알킬; 알콕시 또는 치환 알콕시; 티오알콕시 또는 치환 티오알콕시; 또는 고리 구조를 포함하는 비치환, 일치환, 또는 이치환 질소.

도 1의 구조 C-E는 도 2에서 C 내지 E로 나타낸 7-원자 유닛-길이 백본을 위해 디자인된다. 도 1의 구조 C에서 X 부분은 도 1의 구조 B에서와 같고, Y 부분은 메틸렌, 황, 또는 바람직하게는 산소일 수 있다. 도 1의 구조 D에서 X 및 Y 부분은 도 1의 구조 B에서와 같다. 도 1의 구조 E에서 X는 도 1의 구조 B에서와 같고 Y는 O, S, 또는 NR이다. 도 1 A-E에 묘사된 모든 서브유닛에서, Z는 O 또는 S이고, Pi 또는 Pj는 아데닌, 시토신, 구아닌 또는 우라실이다.

본원에 사용된 '모르폴리노 올리고머'는 전형적인 폴리뉴클레오티드와 수소결합 할 수 있는 염기를 지지하는 백본을 갖는 중합체 분자로 간주하며, 여기서 중합체는 펜토스당 백본 부분, 더 구체적으로는 전형적인 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드인 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 리보스 백본을 결여하지만, 대신 고리 질소를 함유하며 이 고리 질소를 통해 커플링한다. 바람직한 '모르폴리노' 올리고뉴클레오티드는 도 2B에 나타낸 형태의 모르폴리노 서브유닛 구조들로 구성되며, 여기서 (i) 구조들은 한 서브유닛의 모르폴리노 질소와 인접 서브유닛의 5' 외향고리 탄소를 잇는 1 내지 3개 원자 길이의 인-함유 결합에 의해 함께 연결되고, (ii) 폴리뉴클레오티드의 염기와 염기 특이적 수소결합에 의해 결합하는데 효과적인 푸린 또는 피리미딘 염기쌍 부분이다.

본 발명의 이 바람직한 양태가 도 2B에 예시되며, 이것은 포스포로디아미데이트 결합에 의해 이어진 2개의 그러한 서브유닛을 나타낸다. 모르폴리노 올리고뉴클레오티드(이는 안티센스 올리고머를 포함함)는, 예를 들어 본원에 참고자료로서 수록된 미국특허 No. 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,185,444, 5,521,063 및 5,506,337에 상세히 설명된다.

본원에 사용된 '뉴클레아제-내성' 올리고머계 분자(올리고머)는 포스포디에스테르 결합의 뉴클레아제 절단에 민감하지 않은 백본을 갖는 것이다. 전형적인 뉴클레아제 내성 안티센스 올리고머는 하전된 백본을 갖는 포스포로티오에이트 및 포스페이트-아민 DNA(pnDNA)와 같은 올리고뉴클레오티드 유사체, 및 하전되지 않은 백본을 갖는 메틸-포스포네이트, 모르폴리노, 및 펩티드 핵산(PNA) 올리고뉴클레오 티드들이다.

본원에 사용된 대로, 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고머는 만일 이 올리고머가 실질적으로 37℃ 이상, 바람직하게는 적어도 50℃, 전형적으로 60℃-80℃ 이상의 Tm을 갖는 생리학적 조건하에서 표적에 혼성화한다면, 표적 폴리뉴클레오티드와 '특이적으로 혼성화한다'. 그러한 혼성화는 바람직하게는 규정된 이온강도 및 pH에서 특이적 서열에 대한 열용융점(T[m])보다 약 10℃, 바람직하게 약 5℃ 더 낮도록 선택된 긴축 혼성화 조건에 해당한다. 주어진 이온강도 및 pH에서 T[m]은 표적 서열 중 50%가 상보성 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 온도이다.

폴리뉴클레오티드는 혼성화가 2개의 단일-가닥 폴리뉴클레오티드들 사이에서 역평행 배열로 일어날 때 서로 '상보성'이라고 설명된다. 이중-가닥 폴리뉴클레오티드는 만일 혼성화가 제 1 폴리뉴클레오티드 및 제 2 폴리뉴클레오티드 가닥들 중 하나 사이에서 일어날 수 있다면, 다른 하나의 폴리뉴클레오티드와 '상보성'일 수 있다. 상보성(한 폴리뉴클레오티드가 다른 하나와 상보하는 정도)은 일반적으로 허용된 염기쌍 규칙에 따라서, 서로 수소결합을 형성할 것으로 예상되는 마주한 가닥들에 있는 염기 비율에 관하여 정량가능하다.

올리고머에 관하여 본원에 사용된 용어 '유사체'는 기준 올리고머의 것들과 유사한 구조적 및 화학적 특성을 모두 지니는 물질을 의미한다.

본원에 사용된 대로, 만일 폴리뉴클레오티드의 서열이 생리학적 조건하에서 제 2 폴리뉴클레오티드의 서열과 특이적으로 결합하거나 또는 특이적으로 혼성화하는 제 1 서열이라면, 제 1 서열은 제 2 서열에 관하여 '안티센스 서열'이다.

본원에 사용된 '표적 RNA를 수반하는 염기-특이적 세포내 결합 사건'은 올리고머와 세포 내부의 표적 RNA 서열의 서열 특이적 결합으로 간주한다. 예를 들어, 단일-가닥 폴리뉴클레오티드는 서열 중의 상보하는 단일-가닥 폴리뉴클레오티드와 특이적으로 결합할 수 있다.

본원에 사용된 '뉴클레아제-내성 헤테로듀플렉스'는 안티센스 올리고머와 그것의 상보성 표적의 결합에 의해 형성된 헤테로듀플렉스로 간주하며, 이것은 편재하는 세포내 및 세포외 뉴클레아제에 의한 생체내 분해에 내성이다.

본원에 사용된 'c-myc'는 암 또는 종양의 발생 및 성장을 향해 세포를 디렉트하는 암유전자 또는 유전자로 간주한다. 'c-myc'는 다양한 종류들의 암에서 유전자 증폭에 관련되며, 이것은 하기 더 상세히 설명된다.

본원에 사용된 용어 'c-myc 안티센스 올리고머'는 상보성 또는 거의 상보성인 c-myc 핵산 서열에 대해 높은 친화성을 갖는 뉴클레아제-내성 안티센스 올리고머(즉, 이것은 '특이적으로 혼성화한다')로 간주한다.

본원에 사용된 올리고뉴클레오티드에 관한 용어 '발현 조정'은 RNA의 발현 또는 번역을 방해함으로써 주어진 단백질의 발현을 증진 또는 감소시키는 안티센스 올리고뉴클레오티드(올리고머)의 능력으로 간주한다. 증진된 단백질 발현의 경우, 안티센스 올리고머는 억제인자 유전자, 예를 들어 종양 억제인자 유전자의 발현을 차단할 수 있다. 감소된 단백질 발현의 경우, 안티센스 올리고머는 주어진 유전자의 발현을 직접 차단할 수 있거나, 또는 그 유전자로부터 전사된 RNA의 고장을 가속시킬 수 있다.

본원에 사용된 용어 '종양' 및 '암'은 성장 제어의 상실을 나타내거나 또는 유별나게 큰 세포 클론을 형성하는 세포로 간주한다. 종양 또는 암세포는 일반적으로 접촉 저해를 상실하며, 침습적일 수 있고 및/또는 전이하는 능력을 가질 수 있다.

안티센스 올리고머에 관하여 본원에서 사용된 '유효량'은 단일 용량 또는 일련의 용량의 일부로서, 선택된 표적 핵산 서열의 발현을 저해하는데 효과적인 포유류 피험자에게 투여되는 안티센스 올리고머의 양으로 간주한다.

본원에서 사용된 개체 또는 세포의 '치료'는 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변형하려는 시도에서 사용되는 어떤 종류의 중재이다. 치료는 제한은 없으나, 예를 들어 제약 조성물의 투여를 포함하며, 예방적으로, 또는 병원성 사건의 개시에 이어서, 또는 병인성 제제와 접촉하여 수행될 수 있다.

II. 본 발명의 실행에 사용되는 안티센스 올리고뉴클레오티드

A. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 종류

15-20 염기의 안티센스 올리고뉴클레오티드가 통상 포유류 게놈에서 한 상보성 서열을 가지기에 충분히 길다. 여기에 더하여, 적어도 17 뉴클레오티드 길이를 갖는 안티센스 화합물은 상보성 표적 mRNA 서열과 잘 혼성화하는 것으로 알려져 있다(Cohen 등, 1991).

안티센스 올리고뉴클레오티드에 의한 발현의 저해를 설명하기 위해서 2가지의 일반적인 메카니즘이 제안되었다(예를 들어, Agrawal 등, 1990; Bonham 등, 1995; 및 Boudvillain 등, 1997 참조).

첫째로, 올리고뉴클레오티드와 mRNA 사이에 형성된 헤테로듀플렉스가 mRNA의 절단을 가져오는 RNase H의 기질이다. 이런 부류에 속하는 또는 속한다고 제안된 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르 및 포스포디에스테르이다(즉, 변형되지 않은 '천연' 올리고뉴클레오티드). 그러한 화합물은 일반적으로 높은 활성을 나타내며, 현재 포스포로티오에이트가 안티센스 분야에서 가장 널리 사용되는 올리고뉴클레오티드이다. 그러나, 이들 화합물은 세포 단백질과의 비-특이적 결합(Gee 등, 1998) 뿐만 아니라 비-표적 RNA 헤테로듀플렉스의 부적절한 RNase 절단(Giles 등, 1993)으로 인해 원치 않는 부작용을 야기하는 경향이 있다.

'입체적 차단체' 또는 달리 'RNase H 불활성' 또는 'RNase H 내성'으로 명명된 두번째 부류의 올리고뉴클레오티드 유사체는 RNase H에 대한 기질로서 작용하는 것은 관찰되지 않았으며, 표적 RNA 형성, 핵세포질 수송 또는 번역을 입체적으로 차단함으로써 작용하는 것으로 여겨진다. 이 부류는 메틸포스포네이트(Toulme 등, 1996), 모르폴리노 올리고뉴클레오티드, 펩티드 핵산(PNA), 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형 올리고뉴클레오티드(Bonham, 1995), 및 N 3'→P5' 포스포라미데이트(Gee, 1998)를 포함한다.

천연 발생 올리고뉴클레오티드는 뉴클레아제에 의한 분해에 민감한 포스포디에스테르 백본이지만, 백본의 어떤 변형은 그러한 분해에 대한 자생 올리고뉴클레오티드의 내성을 증가시킨다(예를 들어, Spitzer 등, 1988 참조).

B. 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오티드

선택된 핵산 표적 서열의 영역에 상보하는 염기 서열에 더하여, 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 상보성 표적 서열과의 매우 특이적인 결합 및 세포 및 세포-프리 시스템에서 표적 핵산의 발현을 차단하는데 효능을 나타낸다.

본 발명의 방법에 사용되는 안티센스 올리고머는 바람직하게, (1) 실질적으로 하전되지 않은 백본(예를 들어, Uhlmann 등, 1990), (2) 실질적으로 37℃ 이상, 바람직하게는 적어도 50℃, 전형적으로 60℃-80℃ 이상의 Tm에서 높은 친화성으로 표적 RNA의 상보성 서열과 혼성화하는 능력, (3) 적어도 8 염기, 일반적으로 약 8-40 염기, 바람직하게 12-25 염기 길이의 서브유닛, (4) 뉴클레아제 내성(Hudziak 등, 1996) 및 (5) (i) 포스포로티오에이트 안티센스 올리고머와의 경쟁적 결합 및/또는 (ii) 세포로 검출가능한 리포터를 수송하는 능력에 의해 증명된 능동 또는 촉진 수송하는 능력을 포함하는 하나 이상의 특성을 가진다.

모르폴리노 올리고뉴클레오티드, 특히 포스포라미데이트- 또는 포스포로디아미데이트-연결 모르폴리노 올리고뉴클레오티드는 상보성 또는 거의 상보성인 핵산에 대해 높은 결합 친화성을 가지는 것으로 알려져 있다. 또한, 모르폴리노 올리고머는 비-특이적 안티센스 활성을 거의 나타내지 않으며, 우수한 수용해도를 제공하고, 뉴클레아제에 면역성이고, 저렴한 생산 비용을 가지도록 설계된다(Summerton 등, 1997).

모르폴리노 올리고머의 합성, 구조, 및 결합 특징은 본원에 참고자료로 특별히 수록된 미국특허 No. 5,698,685; 5,217,866; 5,142,047; 5,034,506; 5,166,315; 5,521,063; 및 5,506,337에 상세히 설명된다.

본 발명의 바람직한 안티센스 올리고머는 상기 인용된 특허들에 나타낸 형태의 모르폴리노 서브유닛들로 이루어지며, 여기서 (i) 모르폴리노기는 한 서브유닛의 모르폴리노 질소와 인접 서브유닛의 5' 외향고리 탄소를 잇는 1 내지 3개 원자 길이의 하전되지 않은 결합에 의해 함께 연결되고, (ii) 모르폴리노기에 부착된 염기는 폴리뉴클레오티드의 염기와 염기-특이적 수소결합에 의해 결합하는데 효과적인 푸린 또는 피리미딘 염기쌍 부분이다. 푸린 또는 피리미딘 염기쌍 부분은 전형적으로 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실 또는 티민이다. 그러한 올리고머의 제조는 본원에 참고자료로 수록된 미국특허 No. 5,185,444(Summerton 등, 1993)에 상세히 설명된다. 참고자료에 나타난 대로, 몇가지 종류의 비이온계 결합이 모르폴리노 백본을 구성하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 전형적인 백본 구조는 도 1A-E에 나타낸 β-모르폴리노 서브유닛 종류를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 결합 종류를 함유할 수 있다는 것이 인정될 것이다.

도 1의 서브유닛 A는 도 2의 A에서 나타낸 5-원자 반복-유닛 백본을 형성하는 1-원자 인-함유 결합을 함유하며, 여기서 모르폴리노 고리는 1-원자 포스포아미드 결합에 의해 연결된다.

도 1의 서브유닛 B는 도 2의 B에서 나타낸 6-원자 반복-유닛 백본을 위해 디자인된다. 구조 B에서 5' 모르폴리노 탄소와 인기를 연결하는 Y 원자는 황, 질소, 탄소, 또는 바람직하게는 산소일 수 있다. 인으로부터의 펜던트 부분인 X는 다음 중 어느 것일 수 있다: 불소; 알킬 또는 치환 알킬; 알콕시 또는 치환 알콕시; 티 오알콕시 또는 치환 티오알콕시; 또는 고리 구조를 포함하는 비치환, 일치환, 또는 이치환 질소. 바람직한 구체예에서, 인으로부터의 펜던트 부분인 X는 디메틸 아미노기[$N(CH_3)_2$]이다.

도 1의 구조 C-E는 도 2에서 C 내지 E로 나타낸 7-원자 유닛-길이 백본을 위해 디자인된다. 도 1의 구조 C에서 X 부분은 도 1의 구조 B에서와 같고, Y 부분은 메틸렌, 황, 또는 바람직하게는 산소일 수 있다. 도 1의 구조 D에서 X 및 Y 부분은 도 1의 구조 B에서와 같다. 도 1의 구조 E에서 X는 도 1의 구조 B에서와 같고 Y는 O, S, 또는 NR이다. 도 1A-E에 묘사된 모든 서브유닛에서, Z는 O 또는 S이고, Pi 또는 Pj는 아데닌, 시토신, 구아닌 또는 우라실이다.

바람직한 '모르폴리노' 올리고뉴클레오티드는 도 2B에 나타낸 형태의 모르폴리노 서브유닛 구조들로 구성되며, 여기서 (i) 구조들은 한 서브유닛의 모르폴리노 질소와 인접 서브유닛의 5' 외향고리 탄소를 잇는 1 내지 3개 원자 길이의 인-함유 결합에 의해 함께 연결되고, (ii) Pi 및 Pj는 폴리뉴클레오티드의 염기와 염기-특이적 수소결합에 의해 결합하는데 효과적인 푸린 또는 피리미딘 염기쌍 부분이다.

C. 바람직한 안티센스 표적

본 발명의 실행에서, 일반적으로는 관심의 유전자의 관련 영역으로부터 전사된 mRNA가 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의해 표적화 되지만, 단일-가닥 RNA, 이중-가닥 RNA, 단일-가닥 DNA 또는 이중-가닥 DNA도 표적화 될 수 있다. 예를 들어, 이중-가닥 DNA는 듀플렉스 DNA에 있는 메이저-그루브 부위와 서열-특이적 결합 하도록 지정된 비-이온 프로브를 사용하여 표적화될 수 있다. 전형적인 프로브는 본원에 참고자료로 수록된 미국특허 No. 5,166,315(Summerton 및 Weller, 1992)에 설명된다. 그러한 프로브는 일반적으로 본원에서 표적 핵산의 발현을 차단하는 능력에 관해 안티센스 올리고머로 언급된다.

본 발명의 방법에서, 안티센스 올리고머는 실질적으로 37℃ 이상, 예를 들어 적어도 50℃, 바람직하게는 60℃-80℃의 Tm을 갖는 생리학적 조건하에서 c-myc 핵산 서열의 영역에 혼성화하도록 디자인된다. 이 올리고머는 핵산에 대해 높은 결합 친화성을 갖도록 설계되며, c-myc 표적 서열에 100% 상보성일 수 있거나, 또는 올리고머와 c-myc 사이에 형성된 헤테로듀플렉스가 세포에서 체액으로 운반되는 동안 세포 뉴클레아제 및 다른 방식의 분해 작용을 견딜 만큼 충분히 안정한 한, 예를 들어 대립형질 변이체를 수용할 수 있는 미스매치를 포함할 수 있다. 미스매치는 만일 존재한다면 중앙에 있는 것보다는 혼성 듀플렉스의 단부 영역 쪽에서 보다 덜 불안정하다. 듀플렉스 안정성의 잘 이해된 원리에 따르면, 허용되는 미스매치의 수는 올리고머의 길이, 듀플렉스에 있는 G:C의 퍼센트 및 듀플렉스에서 미스매치(들)의 위치에 의존할 것이다.

그러한 안티센스 올리고머는 c-myc 표적 서열에 반드시 100% 상보성일 필요는 없지만, 그것은 표적 서열에 안정하게 특이적으로 결합하여 c-myc의 발현이 조정되도록 하는데 효과적이다. 양호한 특이성과 조합하여 안정한 효과적

인 결합을 허용하는 올리고머의 적합한 길이는 약 8-40 뉴클레오티드 염기 유닛, 바람직하게는 약 12-25 뉴클레오티드이다. 또한, 표적과의 염기쌍 특이성이 유지된다는 가정 하에, 표적 염기들과 쌍을 이룬 축퇴 염기를 허용하는 올리고머 염기가 고려된다.

한 바람직한 접근법에서, 본 발명의 안티센스 방법을 사용하여 유전자 발현을 조정하는 표적은 c-myc에 대한 mRNA 번역 시작 코돈을 포함하는 서열을 포함한다. 다른 바람직한 접근법에서, c-myc mRNA의 스플라이스 어셉터 영역이 표적화 된다. 이니시에이터 또는 프로모터 부위, 인트론 또는 엑손 정션 부위, 3'-미번역 영역 및 5'-미번역 영역 중 하나 이상을 포함하는 c-myc mRNA의 다른 영역들도 표적화 될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 더 이상으로, 스플라이스된 RNA 및 스플라이스되지 않은 RNA는 본 발명의 방법에 사용되는 안티센스 올리고머의 디자인을 위한 주형으로서 사용할 수 있다는 것이 이해될 것이다(예를 들어, 본원에 참고자료로 수록된 Hudziak 등, 2000 참조).

허드작(Hudziak) 등(2000)은 형질전환된 사람 및 래트 섬유아세포(각각 NRK 및 WI-38)에 대해 항증식 효과를 갖는다고 알려진 c-myc mRNA에 대한 다수의 올리고머 안티센스를 설명한다. 전형적인 안티센스 올리고머가 하기 표 1에 제공된다.

[표 1]

전형적인 안티센스 올리고머

올리고머 #	서 열[1]	길이 (염기)	종
92	GMT MMM TMT GTM TMT MGM TGG (SEQ ID NO: 5)	21	R,H
93	MMG MMM GMT MGM TMM MTM TG (SEQ ID NO: 6)	20	R,H
25	GGC AUC GUC GUG ACU GUC GGG UUU UCC ACC (SEQ ID NO: 7)	30	R
21	GGG GCA UCG UCG UGA CUG UCU GUU GGA GGG (SEQ ID NO: 8)	30	R
108	CGU CGU GAC UGU CUG UUG GAG (SEQ ID NO: 9)	22	R
111	CGT CGT GAC TGT CTG TTG GAG G (SEQ ID NO: 10)	22	R
37	GGC AUC GUC GCG GGA GGC UGC UGG AGC G (SEQ ID NO: 11)	28	H
26	CCG CGA CAU AGG ACG GAG AGC AGA GCC C (SEQ ID NO: 12)	28	R
126	ACG TTG AGG GGC ATC GTC GC (SEQ ID NO: 1)	20	R,H
174	TTG AGG GGC ATC (SEQ ID NO: 13)	12	R,H

1 모든 서열은 5'에서 3' 방향으로 나타낸다; M은 5-메틸 시토신으로 간주한다; T는 티미딘으로 간주하고, R은 서열이 c-myc 서열에 상보성인 것을 의미하며, H는 서열이 사람 서열에 상보성인 것을 의미한다.

본 발명의 전형적인 구체예에서, 안티센스 올리고머는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, 또는 SEQ ID NO:11로서 나타낸 서열을 함유하는 PMO이다.

III. c-myc

c-myc는 세포 성장, 분화, 및 아폽토시스를 조절하는 원-발암유전자이며,그것의 이상 발현이 사람 암에서 흔히 관찰된다. c-myc의 이상, 구성적 또는 과발현이 폐암, 결직장암, 유방암, 방광암, 백혈병, 폐암 등을 포함하는 많은 사람 암에 관련된다(예를 들어, Bieche 등, 1999 참조).

(1) 프로모터 삽입, (2) 인핸서 삽입, (3) 염색체 전위, (4) 유전자 증폭 및 (5) 점돌연변이를 포함하는 여러 가지 메카니즘에 의해 원-발암유전자가 암유전자로 활성화된다. 본원에 사용된 원-발암유전자에 관련된 '활성화'는, 유전자의

전사가, 예를 들어 무발현에서 낮은 수준의 발현으로 증가된다는 것을 의미한다. (1) 내지 (4)의 메카니즘은 암유전자의 발현 수준의 증가를 가져오며, 반면 (5)는 변형된 유전자 생성물의 발현을 가져온다. 증거는 종양 억제인자 유전자의 불활성화와 함께 어떤 형태의 암유전자 발현이 암의 발생에 필요하다는 것을 암시한다.

myc 원-발암유전자는 다른 유전자들의 발현을 직접적으로 조절하는 전사 인자로서 설명되며, 이것들의 예는 ECA39, p53, 오르티닌 디카르복실라제(ODC), 알파-프로티모신 및 Cdc25A를 포함한다(Ben-Yosef 등, 1998).

닭에서, 어떤 조류 백혈병 바이러스로 닭 B-세포를 감염시킨 후, 프로바이러스는 가까운 myc 유전자에 통합되게 되고, 이것은 프로모터 또는 인핸서로 작용하는 바이러스의 긴 말단 반복부(LTR)에 의해 활성화되어 myc의 발현 및 B-세포 종양의 형성을 가져온다. 유사하게, 버킷 림프종에서는 인핸서 서열이 전위되어 myc의 발현을 가져온다(예를 들어, Gauwerky 등, 1993 참조).

c-myc는 정상 조혈줄기세포에서 발현되고, 사람 상피줄기세포의 분화를 촉진 한다고 알려져 있다(Gandarillas 등, 1997). 휴지 세포가 세포 사이클에 재진입할 때 c-myc 발현이 상향조절되며, c-myc의 이소성 발현은 성장-저해 신호, 분화 자극 또는 미토겐 금단에 대한 반응에서 세포 사이클 정지를 방지한다는 것이 관찰되었다(예를 들어, Amati B 등, 1998). 더 이상으로, 아폽토시스 저해인자인 bcl-2의 발현은 결직장 암세포에서의 c-myc 발현과 역으로 관련된다(예를 들어, Popescu RA 등, 1998 참조).

경쟁적 역전사-중합효소 연쇄반응을 사용하여, c-myc 과발현 백혈병 및 결장암 셀라인의 c-myc 안티센스 포스포로티오에이트 올리고머 치료 후, 결장암 셀라인 및 백혈병 셀라인에서 세포 증식의 저해가 각각 c-myc mRNA의 20내지 100배 감소의 검출과 함께 관찰되었다(Li 등, 1995. 또, McGuffie 등, 2000; Skorski 등, 1997 및 Huang 등, 1995 참조). 게다가, c-myc mRNA 단백질 결합 부위 표적에 대한 올리고디옥시뉴클레오티드 안티센스는 서열-특이적 방식으로 75%까지 RNA 결합을 저해하는 것이 증명되었다. 그러한 c-myc 안티센스 올리고뉴클레오티드로 치료된 K562 세포는 c-myc mRNA 및 단백질 수준의 농도-의존적 감소를 나타냈다. 반대로, 번역 개시 코돈을 표적으로 하는 c-myc 안티센스 올리고뉴클레오티드는 c-myc 단백질은 감소시키나, mRNA 수준은 증가시키는 것으로 나타났다(Coulis 등, 2000).

더 이상으로, 원숭이에서 포스포로티오에이트 및 올리고디옥시뉴클레오티드의 신장 효과에 대한 연구는 비특이적이면서 명백한 독성을 나타냈다. 이 화합물은 신장에 축적되며, 고용량에서는 근위 관형변성을 유발한다고 나타났다(Monteith 등, 1999). 이것은 화학치료제와의 공-침전 및 신장에서의 축적 및 침전을 가져오 는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드의 하전된 성질 때문일 수 있다. 반면, 하전된 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드와는 달리, 본 발명의 PMO는 실질적으로 하전되지 않으며, 따라서 시스플라틴과 같은 화학치료제와의 상호작용 또는 공-침전을 위한 부위를 갖지 않는다.

놀랍게도, 미국출원 일련번호 09/679,475(PCT 공개번호 WO 01/25405, 공동소유)에 설명된 대로, c-myc에 대한 안티센스 올리고머를 사용하여 부화된 조혈줄기세포 집단을 치료했을 때, 조혈줄기세포 집단의 발생이 조정되었다.

본 발명은 c-myc에 대한 올리고머 안티센스가 몇몇 광범하게 사용되는 화학치료제와 조합하여 사용될 때, 증진된 항암 효능을 가져온다는 놀라운 발견을 반영한다. 실시예 1에 나타낸 결과로부터 볼 수 있는 대로, C57BL 마우스의 루이스 폐세포 유래 종양을 사용한 모델을 사용하여, c-myc(AVI-4126, SEQ ID NO:1)에 대한 올리고머 안티센스로 치료된 종양에서 c-myc 발현의 저해는 시스플라틴 치료에 상대적인 안티센스 올리고머의 투여 타이밍에 의존하는 것으로 밝혀졌다. 더 이상으로, c-myc 안티센스 올리고머는 시스플라틴, 에토포시드 및 탁솔의 항종양 활성은 상당히 증진시키지만, 5-FU에 대해서는 그렇지 않은 것으로 나타났다(도 8A-D 참조).

IV. 전통적인 암치료 섭생

현체의 암치료 섭생은 많은 결함들로 고통받는데, 그 중 가장 중요한 것은 효능의 부족과 빈번한 독성 부작용이다. 암치료제의 임상적 사용에서 주된 제한들 중 하나는 치료 내성의 발생이다. 약물 내성의 문제는 고상종양 및 백혈병을 치료 하는데 사용되는 시스플라틴-종류 화합물을 포함한 다수의 화학치료제에서 관찰된다. 그러한 내성은 전형적으로 화학요법 후 종양의 재발에 의해 증명된다. 결과적으로, 대부분의 치료 섭생은 내성을 회피하는 방법으로서 2개 이상의 상이한 약물을 포함한다. 게다가, 전형적으로 고용량 화학요법이 효과적인 치료를 위해 필요하다. 그러한 고용량은 독성 부작용에 관련된다.

본 발명의 실행에 사용되는 화학치료제는 암치료에서 확정 사용되는 다수의 제제 중 어느 것을 포함한다. 본 발명에 사용되는 전형적인 화학치료제는 항대사물질, 산화성 스트레스를 일으키는 화합물 및 토포이소머라제 저해제이다. 어느 한 특정 이론에 결부시키지 않고, 화학치료제는 덜 분화된 세포에 대해 더 독성이며, 그로써 화학치료제에 내성인 더 고도로 분화된 암세포 집단이 화학요법 치료 후 남게 된다고 여겨진다. 그러한 세포는 더 분화될 수 있으며, 따라서 c-myc 안티센스 올리고머에 의한 저해 또는 세포사에 더욱 민감할 수 있다.

제한되지는 않지만, 전형적인 항암제는 (1) 폴릭산 유사체 및 메토트렉세이트(MTX)와 같은 항대사물질; 5-플루오로우라실(5-FU), 플루오로디옥시우리딘, 시토신 아라비노시드 및 시타라빈과 같은 피리미딘 유사체; 6-메르캅토푸린(6-MP) 및 6-티오구아닌(6-TG)와 같은 푸린 유사체; (2) 질소 머스타드, 메클로르에타민, 시클로포스파미드(CytoxanR) 멜팔란 및 클로람부실과 같은 알킬화제; (3) 빈카 알칼로이드, 빈크리스틴(OncovinR), 빈블라스틴(VelbanR), 비노렐빈(NavelbineR), 에피포도필로톡신, 에토포시드(VePesidR, VP-16) 및 탁솔(PaclitaxelR)을 포함하는 천연 생성물(제한은 없음); (4) 안트라시클린, 독소루비신 염산염(adriamycinR), 다 우노루비신, 이드라루비신, 미토크산트론, 블레오마이신(blenoxaneR), 닥티노마이신(actinomycin D), 미토마이신 C, 플리카마이신 및 (미트라마이신)을 포함하는 항종양 항체를 특징으로 하는 화합물(제한은 없음); 및 (5) 시스플라틴, 카르보플라틴, 아스파라기나제, 히드록시유레아, 미토탄(o,p'-DDD; Lysodren), 타목시펜 및 프레드니손을 포함하는 여러 제제(제한은 없음)를 포함한다.

시스플라틴(시스-플래티늄, Platinol; 시스-디아민디클로로플래티늄; cDDP라고도 함)은 고환암, 난소종양, 및 여러 가지 다른 암들의 치료에 빈번히 사용되는 광범한 부류의 대표적인 수용성 플래티늄 배위 화합물이다(예를 들어, Blumenreich 등, 1985; Forastiere 등, 2001 참조).

임상적으로 cDDP를 사용하는 방법은 본 분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들어, cDDP는 느린 정맥내 주입에 의해 1달에 1번 6시간에 걸쳐 단 하루에 투여된다. 국부 병소에 대해서, cDDP는 국부 주사에 의해 투여될 수 있다. 또한, 복강내 주입이 사용될 수도 있다. 만일 다수-약물 섭생의 일부이거나, 또는 환자가 더 높은 용량에 대해 부작용을 가진다면 cDDP는 치료 당 10mg/m ^{2} 정도의 용량으로 투여된다. 일반적으로, 임상 용량은 치료 당 약 30 내지 약 120 또는 150mg/m ^{2} 이다.

전형적으로, 플래티늄-함유 화학치료제는 비경구적으로, 예를 들어 상기 논의된 바와 같이 느린 정맥내 주입에 의해, 또는 국부 주사에 의해 투여된다. 시스플라틴의 병소내(종양내) 및 정맥내 투여의 효과는 Nagase 등, 1997 및 Theon 등, 1993에 설명된다.

시스플라틴은 광범하게 사용되지만, 시스플라틴(cDDP 또는 Platinol)의 투여 후 보고된 부작용이 공통적이며, 얇아지거나 또는 부스러지는 머리카락, 식욕 및/또는 체중 감소, 설사, 메스꺼움 및 구토, 및 손가락끝 및 발가락의 마비 또는 저림를 포함한다. 일반적으로, 시스플라틴의 효과는 비-특이적이며, 시스플라틴의 투여는 빠르게 성장하는 모든 조직에 손상을 가져온다. 예를 들어, Gandara 등, 1991; peters 등, 2000; Jones 등, 1995; 및 Byhardt RW, 1995 참조).

더 이상으로, 시스플라틴은 좁은 범위의 종양에 대해 효과적이며, 내성 발생이 보고되었다(Onoda 등, 1988).

탁솔(Paclitaxel)은 원래 다양한 종의 주목(Taxaceae)의 껍질로부터 적은 수율로 분리된 복잡한 디테르페노이드이다. 또한, 탁솔은 이제 화학 합성에 의해 제조될 수도 있다(예를 들어, Nicolaou 등, 1994 참조). 탁솔은 암화학요법에서 가장 효능 있는 약물 중 하나를 구성하며, 난소암 및 유방암의 치료에 대해 FDA에 의해 승인되었고, 폐, 피부 및 두부/경부의 암의 치료에서 잠재적인 유용성을 나타낸다.

탁솔 및 관련 약물의 임상적 유용성은 비용, 제한된 생체이용율(낮은 수용해도로 인한) 및 다중내성 세포의 발생에 의해 제한된다. 크레모포(폴리에톡실화 캐스톨유) 및 알콜과 같은 용해제가 용해도를 개선한다고 증명되었으며, 마이크로캡슐 형태가 설명되었다(예를 들어, WO 93/18751 참조).

일반적으로, 탁솔(Paclitaxel)에 대해 보고된 부작용은 백혈구 및 적혈구 수의 감소, 감염, 메스꺼움 및 구토, 식욕 감소, 맛의 변화, 탈모, 관절 및 근육통, 사지 마비 및 설사를 포함한다.

에토포시드(Etoposide(VP-16, VePesid Oral)는 현재 고환암, 폐암, 림프종, 신경모세포종, 비-호지킨 림프종, 카포시 육종, 윌름즈 종양, 다양한 종류의 백혈병, 및 다른 것들을 포함하는 여러 가지 암을 위한 치료법에 사용된다.

에토포시드는 일반적으로 경구적으로 또는 정맥내로 투여된다. Etoposide Oral(VP-16, VePesid Oral) 투여에 관련된 부작용은 메스꺼움 및 구토, 식욕 감소, 설사, 위통, 피로 및 탈모를 포함한다. 에토포시드 및 관련 화합물의 주된 용량-제한적 부작용은, 특히 추가의 화학치료제 또는 방사선 치료중인 환자들에서 주로 심한 호중성백혈구감소증이다.

5-FU(플루오로우라실, 상품명: 5-FU, Adrucil)는 결장암, 직장암, 유방암, 위암, 췌장암, 난소암, 경부암, 방광암 질사마귀 및 광선각막염(전암성 피부 병소)를 포함하는 여러 가지 암을 위한 화학요법에 사용된다. 5-FU는 전형적으로 정맥내(IV) 주사, 정맥내 주입(점적주입), 경구적으로, 또는 피부에 직접 도포하는 크림으로서 투여된다. 5-FU는 탈모, 두통, 허약, 통증, 일광에 대한 피부 민감성, 피부 물집 및 여드름, 식욕 및/또는 체중 감소 및 손 또는 발의 저림을 포함하는 광범하게 기록된 부작용에 관련된다.

현재 화학치료 치료 섭생은 광범한 부작용을 제공하며 장기간 효능이 부족하므로, 그러한 부작용을 감소 또는 제거하고 및/또는 증진된 치료 효능을 나타내는 새로운 또는 개선된 치료 섭생은 의학 분야에서 상당한 가치를 가질 것이다.

V. 본 발명의 방법을 사용한 암의 치료

본 발명은 전통적인 암치료, 즉 화학요법 및/또는 방사선요법과 함께 c-myc를 암호화하는 핵산 서열에 대해 디렉트된 안티센스 올리고뉴클레오티드로 암을 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명은 높은 Tm을 특징으로 하며, 세포로 능동 또는 촉진 수송을 할 수 있고, 상보성 또는 거의 상보성인 c-myc 핵산 서열과 높은 친화성으로 결합할 수 있는, 안정한 실질적으로 하전되지 않은 안티센스 올리고뉴클레오티드가 암 환자에게 투여되고, 세포에 의한 c-myc의 발현을 저해하며, 전통적인 화학치료제와 조합하여 투여되었을 때 종양 성장의 조정을 가져온다는 발견에 기초한다.

A. 암의 치료

본원에 설명된 방법을 사용하여, 전통적인 암치료와 함께 피험자에게 c-myc 안티센스 올리고머를 생체내 투여하는 것은, (1) c-myc 안티센스 올리고머 투여의 지속기간, 용량 및 빈도, (2) 화학요법에 사용된 지속기간, 용량, 빈도 및 화합물, (3) 화학치료제의 투여에 상대적인 c-myc 안티센스 올리고머 투여의 지속기간 및 타이밍, 및 (4) 피험자의 일반적 상태를 포함하는 다수의 요인들에 따라서, 환자를 위한 개선된 치료 성과를 가져올 수 있다.

일반적으로, 암환자에 관한 개선된 치료 성과는 암세포 또는 고상종양의 성장을 늦추거나 또는 감쇠시키는 것, 또는 암세포의 총수 또는 총종양부담의 감소로 간주한다.

본 방법의 바람직한 적용에서 피험자는 사람 피험자이다. 또한, 피험자는 암환자, 구체적으로 백혈병, 림프종, 신경모세포종, 유방암, 결장암, 폐암 환자, 또는 화학요법 또는 방사선요법으로 치료되고 있거나 또는 치료된 어떤 종류의 암으로 진단된 환자일 수 있다. 또한, 이 방법은 급성 또는 만성 골수성 백혈병, 담관암종, 흑색종, 다발골수종, 골육종, 위육종, 신경아교종, 방광, 경부, 결직장, 난소, 췌장, 전립선, 및 위임의 치료에 이용가능하다.

줄기세포 이식과 조합된 또는 그 단독의 화학요법 및/또는 방사선요법은 급성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 신경모세포종, 림프종, 유방암, 결장암, 폐암, 난소암, 흉선종, 생식세포종양, 다발골수종, 흑색종, 고환암, 폐암, 및 뇌암을 포함하는 다수의 악성종양을 위한 표준 치료 섭생이다.

많은 암치료 섭생은 환자의 면역억제를 가져와서, 환자에게 빈혈, 저혈소판증(낮은 혈소판 수), 및/또는 호중성백혈구감소증(낮은 호중구수)를 남긴다. 그러한 암치료 후 환자는 흔히 감염에 대항할 수 없게 된다. 면역억제에 대한 지원 관리는 환자가 감염 병인에 노출되지 않도록 환자를 보호 격리하는 것; 항생물질, 예를 들어 항바이러스제 및 항균제의 투여; 및/또는 빈혈, 저혈소판증 및/또는 호중성백혈구감소증을 치료하기 위한 주기적인 혈액 수혈을 포함할 수 있다.

사람 암환자의 치료에 사용되는 조혈줄기세포의 수를 증가시키는데 효과적인 방식으로, HSC를 포함하는 세포 집단을 c-myc 안티센스 올리고머에 노출시킴으로써 조혈줄기세포(HSC)의 수를 증가시키는 방법이 본원에 참고자료로 수록된 미국출원 일련번호 09/879,475(PCT 공개번호 WO 01/25405, 공동소유)에 설명되었다. 이 참고자료(WO 01/25405)에는 배양 조건에 따라 c-myc 치료를 사용하여 HSC의 수를 증가시키고 HSC로부터 유래한 특정 계통에 속한 선조세포의 수를 증가시키는 것이 설 명된다.

메카니즘이 본 발명의 일부는 아니지만, 암유전자 경로들 사이의 상승작용은 이미 증명되었으며, 조절되지 않은 c-myc 발현이 바람직한 2차 암유전자 경로들을 선택한다는 것이 암시되었다(D'Cruz 등, 2001). 본원에 나타낸 결과는, c-myc의 감소된 수준이 안티센스 치료된 종양에서 달성되었지만, 그럼에도 c-myc 안티센스 올리고머 치료가 성장 속도를 변경시킬 수는 없었다는 것을 나타낸다. 이것은 c-myc 발현이 형질전환 과정에 영향을 미치지만 그것이 형질전환된 표현형을 유지하는데 연루된 유일한 인자는 아닌 모델과 일치된다. 전통적인 화학치료제와의 조합 섭생에서 c-myc에 대한 올리고머 안티센스의 투여 후 관찰된 놀라운 예상치 못한 결과는 c-myc가 형질전환된 표현형을 유지하는데 있어 중요할 수 있다는 것을 또한 암시한다. 본원에 나타낸 결과(실시예 1)는 시스플라틴에 본질적으로 내성인 LLC1 종양이 c-myc에 대한 올리고머 안티센스(AVI-4126, SEQ ID NO:1)를 포함했던 치료 섭생에서 시스플라틴에 대해 증가된 민감성을 나타낸다는 것을 나타낸다. c-myc 안티센스 올리고머 치료가 화학요법에 이어졌을 때, 종양은 시스플라틴 및 탁솔 치료에 대해, 그리고 더 적은 규모의 에토포시드에 대해 상당히 더 민감했다.

또한, 전통적인 화학요법과 c-myc에 대한 올리고머 안티센스 투여를 조합한 본원에 설명된 방법 및 관련된 치료 섭생은 다낭신장 질환의 치료 및 심혈관 질환의 치료에서 유용할 수 있다. 특히 관심 있는 것은 시스플라틴 또는 탁솔 투여와 c-myc에 대한 올리고머 안티센스 투여를 조합한 치료 섭생이다. 그러한 치료 섭생에서, 화학치료제는 안티센

스 올리고머 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 투여될 수 있다.

B. 치료 섭생

본 발명은 c-myc에 대한 올리고머 안티센스 및 하나 이상의 화학치료제가 환자에게 투여되는 암 치료법을 위한 방법을 제공한다. 본원에 설명된 본 발명의 바람직한 양태에서, c-myc 안티센스 올리고머는 하나 이상의 화학치료제의 투여 전 또는 후에 환자에게 투여되지만, 동시에 투여되지는 않는다.

한 바람직한 구체예에서, 시스플라틴이 c-myc 안티센스 올리고머의 투여 전 또는 후에 환자에게 투여되며, 동시에 투여되지는 않는다.

한 전형적인 구체예에서, 시스플라틴(cDDP, Platinol), 탁솔(Paclitaxel) 또는 에토포시드(VP-16, VePesid Oral)가 1 내지 5일간 매일, 바람직하게는 3일 연속하여 투여되고, 이어서 1일 이상은 어떤 항암 치료체도 투여되지 않은 후에, c-myc에 대한 올리고머 안티센스가 2 내지 7일간 매일, 바람직하게는 5일 연속하여 투여되며, 화학요법과 안티센스 올리고머 투여 사이클은 적어도 2회 반복된다.

다른 전형적인 구체예에서, 시스플라틴(cDDP, Platinol), 탁솔(Paclitaxel) 또는 에토포시드(VP-16, VePesid Oral)가 1 내지 5일간 매일, 바람직하게는 3일 연속하여 투여되고, 이어서 c-myc에 대한 올리고머 안티센스가 2 내지 7일간 매일, 바람직하게는 5일 연속하여 투여되며, 화학요법과 안티센스 올리고머 투여 사이클은 적어도 2회 반복된다.

다른 바람직한 구체예에서, c-myc에 대한 올리고머 안티센스 및 화학치료제는 연속하여 적어도 1일 간격으로 투여된다. 바람직하게, c-myc에 대한 올리고머 안티센스가 적어도 2일간 매일 투여되고, 이어서 1일 이상 동안 화학치료제가 투여되며, c-myc에 대한 안티센스 올리고머와 화학치료제를 교대로 투여하는 사이클은 적어도 2회 반복된다. 2개 화합물 투여 사이의 시간 간격은 바람직하게 마지막 투여되는 화합물의 반감기의 적어도 3배이며, 이로써 마지막-투여된 화합물이 나머지 화합물의 투여 전에 환자로부터 대부분 청소되는 것을 확실하게 한다.

전형적으로, 화학치료 화합물은 2-6시간의 반감기로 청소되며, 그래서 약 6-24시간이 청소를 위해 허용되어야 한다. c-myc에 대한 올리고머 안티센스는 전형적으로 18-24시간의 반감기로 청소되며, 그래서 2-3일의 기간이 청소를 위해 허용되어야 한다.

당업자에 의해 잘 이해된 바 대로, 최적의 치료 섭생은 변할 것이며, 화학요법과 안티센스 올리고머 투여의 추가적 사이클이 처방되어야 하는지를 결정하기 위해서, 화학요법과 안티센스 올리고머 투여의 1회 이상의 사이클 전과 후에 치료중인 질환의 상태 및 환자의 일반적 건강을 평가하는 것이 본 발명의 치료 방법의 범위 내이다. 그러한 평가는 전형적으로 전통적인 암화학요법을 평가하는데 전형적으로 사용되는 시험의 사용에 의해 수행되며, 하기 '치료 모니터링' 제하의 섹션에서 더 설명된다.

본 발명의 실행에 사용되는 바람직한 치료 섭생은 c-myc 안티센스 올리고머의 투여 전에 하나 이상의 화학치료제의 투여를 포함한다. 메카니즘은 본 발명의 일부는 아니지만, 화학요법 후, 화학요법에 내성인 암세포 집단이 남게 되고, 그러한 세포는 더 분화되며, 따라서 화학요법 후 투여된 c-myc 안티센스 올리고머에 의 한 조정에 더욱 민감할 수 있다.

상기 상세히 설명한 대로, 이들 방법에 사용되는 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 안정성, 높은 Tm, 및 (i) 포스포로티오에이트 안티센스 올리고머와의 경쟁적 결합, 및/또는 (ii) 세포로 검출가능한 리셉터를 수송하는 능력에 의해 증명된, 능동 또는 촉진 수송하는 능력을 특징으로 하는 실질적으로 하전되지 않은 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)이다.

이 구체예의 한 바람직한 양태에서, 올리고머는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, 및 SEQ ID NO:11로 나타낸 서열로 구성된 군으로부터 선택된 PMO이다.

C. 화학치료제의 송달

본 발명의 중요한 양태는 제약학적으로 허용되는 담체 중에서 하나 이상의 화학치료제의 효과적인 송달이다.

본 발명의 한 양태에 따라서, 화학치료제(들) 및 대응하는 송달 경로 및 타이밍의 선택은 (i) 치료중인 특정한 종류의 암의 치료에서의 확실한 사용; (ii) c-myc에 대한 올리고머 안티센스와 조합하여 투여되었을 때 개선된 치료를 가져올 수 있는 선택된 화학치료제의 능력; 및 (iii) 암세포에 제제의 충분한 국부적 노출을 달성하는데 효과적인 투여 방식에 의한 화학치료제의 국부적 송달 중 하나 이상의 이점을 취한다.

본 발명의 실행에서, 화학치료제는 암화학요법에서 확실히 시용되는 경로 및 치료 섭생을 사용하여 투여된다. 상기 제시된 대로, 최적의 경로는 화학치료제에 따라 변할 것이다. 그러나, 바람직한 경로는 전형적으로 느린 정맥내 주입(IV 점적주입), 경구 투여 및 국부 주사를 포함한다. 제제는 주사용액, 약물 방출 캡슐, 이식편 또는 리포솜 또는 마이크로캡슐과 같은 담체와 조합된 것과 같은 여러 가지 제형으로 쉽게 투여된다.

다수의 화학치료제에 대해 권고된 투약량 및 제형이 확립되었으며, Medical Economics Company, Inc., Oradell, N.J.에서 출판된 Physicians Desk Reference와 같은 종래의 공급원으로부터 얻을 수 있다. 필요하다면 이들 파라미터는, 예를 들어 임상 시험에서 잘 확립된 과정 및 분석에 의해 각 시스템에 대해 결정될 수 있다.

예를 들어, 경구 투여되었을 때, 활성 화합물은 불활성 희석제와, 또는 식용 담체 내에 조합될 수 있거나, 또는 하드 또는 소프트 껍질 젤라틴 캡슐에 넣은 형태, 정제로 압축된 형태, 음식에 직접 결합된 형태, 부형제와 결합된 형태, 섭취 가능한 정제, 구강 정제, 알약, 캡슐, 엘리시르, 현탁액, 시럽, 와퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 활성 화합물의 적합한 양은 특정한 화학치료제에 대해 특이적이며 일반적으로 본 분야에 공지되어 있다. 그러한 치료적으로 유용한 조성물에서 활성 화합물의 양은 적합한 투약량이 얻어질 수 있는 그러한 양일 것이다.

비경구 투여는 식염수 또는 글루코스를 사용하여 등장용액 형태로 제조된 적합한 완충 수용액 및 액체 희석제를 사용하여 달성될 수 있다. 그러한 수용액은 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 적합하다('Remington's Pharmaceutical Sciences', 15판 p 1035-1038 및 1570-1580 참조). 멸균 주사용액은 다양한 다른 성분들이 포함된 필요량의 적합한 용매 내에 화학치료제를 결합시킨 후, 여과 멸균함으로써 제조된다. 멸균 주사용액에 사용되는 멸균 가루는 활성 화학치료제와 이미 멸균 용액으로부터 제조된 추가의 바람직한 성분이 더해진 가루를 가져오는 진공건조 또는 동결건조 기술 또는 다른 수단에 의해 제조된다.

본 발명이 하나 이상의 화학치료제 투여 및 암의 화학요법을 위한 c-myc에 대한 올리고머 안티센스 투여를 포함하는 치료 섭생을 고려한다는 것이 이해될 것이다. 그러한 치료 섭생은 방사선요법, 추가적 화학요법 및/또는 면역요법과 같은 추가 암치료 전에, 동시에, 또는 이어서 투여될 수 있다.

본 발명은 c-myc 안티센스 올리고머 투여를 포함하지 않는 치료 섭생에 비하여 c-myc 안티센스 올리고머 투여를 또 포함하는 치료 섭생에서 투여되었을 때, 하나 이상의 화학치료제의 용량이 감소될 수 있다는 이점을 제공한다. 그러한 조합 치료는 어리거나 나이든 환자, 또는 환자의 암이 c-myc 안티센스 올리고머 투여를 포함하지 않는 치료 섭생에 말을 듣지 않는 환자에서 유리하다.

D. 환자로 안티센스 올리고머의 송달

표적 c-myc 핵산 서열로 안티센스 올리고머의 효과적인 송달은 본 발명 방법의 중요한 양태이다. 본 발명의 한 양태에 따라서, 하기 논의된 투여 방법은 다음의 중요 특징들 중 하나 이상을 이용한다: (i) 높은 비율의 세포 흡수를 갖는 안티센스 화합물의 사용, (ii) c-myc mRNA 프로세싱 및 mRNA 번역을 방해하는 안티센스 화합물의 능력, 및 (iii) 암세포에 화합물의 높은 국부 농도를 달성하는데 효과적인 투여 방식에 의한 안티센스 올리고머의 송달.

본 발명에 따라서, c-myc로 올리고머 안티센스의 효과적인 송달은 제한은 없지만, 경구 및 비경구 경로, 예를 들어 정맥내, 피하, 복강내, 및 근육내를 포함하는 다양한 전신적 경로 뿐만 아니라 흡입 및 경피 송달을 포함할 수 있다.

또한, 피험자의 혈류로 c-myc 안티센스 올리고머를 송달하는데 효과적인 어떤 방업이 고려된다는 것이 인정된다.

안티센스 올리고머의 경피 송달은, 예를 들어 국소 투여에 적합하게 된 제약학적으로 허용되는 담체의 사용에 의해 달성될 수 있다. 모르폴리노 올리고머 송달의 한 예는 본원에 참고자료로 수록된 PCT 특허출원 WO 97/40854에 설명된다.

c-myc 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 화학치료제의 투여량은 조합된 두 종류의 제제가 치료적으로 효과적인 그러한 양이다. 투약량은 환자의 나이, 건강, 성별, 크기 및 체중, 투여 경로, 약물의 독성, 및 올리고뉴클레오티드 및 화학치료제에 대한 암의 상대적 민감성과 같은 요인들에 따라서 변할 것이다.

전형적으로, 안티센스 올리고머의 하나 이상의 용량이, 일반적으로 약 1 내지 2주의 기간 동안 규칙적인 간격으로 투여된다. 경구 투여에 대한 바람직한 용량은 약 1mg 올리고머/환자 대 약 25mg 올리고머/환자이다(성인 체중 70kg을 기준으로 하여). 어떤 경우, 25mg 올리고머/환자 이상의 용량이 필요할 수 있다. 정맥내 투여에 대해서, 바람직한 용량은 약 0.5mg 올리고머/환자 내지 약 10mg 올리고머/환자이다(성인 체중 70kg을 기준으로 하여). 안티센스 화합물은 일반적으로적어도 200-400nM 안티센스 올리고머의 최고 혈중농도를 가져오는데 충분한 양으로 투여된다. 필요에 따라 더 많거나 또는 더 적은 양의 올리고뉴클레오티드가 투여 될 수 있으며, 지속 용량은 저하될 수 있다.

일반적으로, 본 방법은 c-myc 핵산 표적 서열의 발현을 저해하는데 효과적인 안티센스 제제의 양을 적합한 제약학적 담체 중에서 피험자에게 투여하는 것을 포함한다.

안티센스 올리고뉴클레오티드 조성물은 생리학적으로 허용되는 어떤 편리한 부형제 중에서 투여될 수 있다. 그러한 올리고뉴클레오티드 조성물은 당업자에 의해 사용되는 여러 가지 표준적인 생리학적으로 허용되는 담체 중 어느 것을 포함할 수 있다. 그러한 제약학적 담체들의 예들은, 제한은 없지만 식염수, 인산염 완충 식염수(PBS), 물, 수성 에탄올, 기름/물 에멀젼과 같은 에멀젼, 트리글리세리드 에멀젼, 습윤제, 정제 및 캡슐을 포함한다. 적합한 생리학적으로 허용되는 담체의 선택이 선택된 투여 방식에 따라 변할 것이라는 게 이해될 것이다.

어떤 경우 리포좀을 사용하여 세포로 안티센스 올리고뉴클레오티드의 흡수를 촉진시킬 수 있다(예를 들어, Williams AS, 1996; Lappalainen 등, 1994; Nakamura 등, 2001; 및 Lou 등, 2001 참조).

또한, 하이드로겔이 안티센스 올리고머 투여를 위한 부형제로서 사용될 수 있으며, 예를 들어 WO 93/01286에 설명된다. 또는 달리, 올리고뉴클레오티드는 마이크로스피어 또는 미립자 중에서 투여될 수 있다(예를 들어, Wu 등, 1999 참조).

또한, 지속 방출 조성물이 이 출원의 범위 내에서 고려된다. 이것들은 필름 또는 마이크로캡슐과 같은 형상화된 물품 형태 내에 반투과성 중합체 물질을 포함할 수 있다.

본 발명의 방법에 사용되는 c-myc 안티센스 올리고뉴클레오티드의 효과적인 생체내 용량이 투여 빈도 및 경로 뿐만 아니라 치료중인 피험자의 상태에 따라서 변할 것이라는 게 이해될 것이다. 따라서, 최적의 치료 성과를 달성하기 위해서는 그러한 생체내 치료법은 일반적으로 치료될 상태에 적합한 시험에 의한 모니터링 및 용량 및 치료 섭생에서의 대응하는 조정을 필요로 할 것이다.

한 바람직한 구체예에서, 올리고머는 제약학적으로 허용되는 담체 중에 함유된 경구 송달되는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)이다. 이 구체예의 더 이상의 양태로서, 모르폴리노 c-myc 안티센스 올리고뉴클레오티드는 짧은 시간 기간 동안 규칙적인 간격으로, 예를 들어 2주 이하 동안 매일 투여된다. 그러나, 어떤 경우 안티센스 올리고머는 장기간의 시간에 걸쳐 간헐적으로 투여된다.

어떤 경우, 치료 섭생은 방사선요법, 면역요법 및/또는 추가적 화학요법과 같은 더 이상의 중재를 포함할 것이다. 그러한 치료는 화학치료제 및 c-myc 안티센스 올리고머의 투여 전에, 투여 동안에, 또는 투여에 이어서 일어날 수 있다.

VI. 안티센스 올리고머의 효과 평가

A. 안티센스 올리고머 치료의 효과 분석

잘 공지된 방법에 따라서, 후보 안티센스 올리고머가 3H-로이신 및 3H-티미딘의 결합에 의해 각각 측정되는 단백질 및 DNA 합성에 대한 효과와 같은, 급성 및 만성 세포 독성에 대해 평가된다. 여기에 더하여, 다양한 대조표준 올리고뉴클레오티드, 예를 들어 센스, 논센스 또는 스크램블 안티센스 서열, 또는 미스매치 염기를 함유하는 서열과 같은 대조표준 올리고뉴클레오티드가 후보 안티센스 올리고 머의 결합 특이성을 확인하기 위해서 평가된다. 그러한 시험의 성과는 유전자 발현에 대한 안티센스 저해의 특이적 효과와 무차별한 억제를 식별하는데 중요하다(예를 들어, Bennett 등, 1995 참조). 따라서, 서열은 안티센스 올리고머와 비-표적 서열의 비-특이적 결합을 제한할 필요에 따라 변형될 수 있다.

표적 RNA와의 헤테로듀플렉스를 형성하는데서 주어진 안티센스 올리고머 분자의 유효성은 본 분야에 공지된 스크리닝 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 올리고머는 c-myc를 발현하는 세포 배양물과 인큐베이션되고, 표적 RNA에 대한 효과가 (1) 당업자에게 공지된 과정을 사용한 표적 서열 및 비-표적 서열과의 헤테로듀플렉스 형성, (2) RT-PCR 또는 노던블롯과 같은 표준 기술에 의해 측정되는 c-myc mRNA의 양, 또는 (3) ELISA 또는 웨스턴블롯과 같은 표준 기술에 의해 측정되는 c-myc 단백질의 양의 존재 또는 부재를 모니터링함으로써 평가된다.

B. 동물 모델

항암 치료법을 평가하기 위해 당업자에 의해 통상 사용되는 동물 모델을 사용하여 본 발명 방법의 효능을 증명했다. 예들은 Smith 등, 2000에 설명된다. 모델은 고도 종양형성성 폐암종 셀라인인 루이스 폐세포(LLC1)를 공통유전자 C57-blk 마우스에 이식하는 것에 기초한다. 200,000개의 세포가 C57-BL 마우스의 좌측 옆구리 위에 피하이식되었을 때, LLC1은 4일까지 식별가능한 종양을 생성한다. 치료 효능은 25일 연구의 마지막까지 매일 종양 길이와 너비 및 종양 중량의 캘리퍼스 측정에 기초하여 평가되었다. 무손상 AVI-4126이 300μg/마우스/일로 복강내 투여 후 종양 조

직에서 발견되었으며, c-myc 발현을 감쇠시켰지만 종양 성장을 유의하게 감소시키는데는 실패했다. 또한, AVI-4126은 화학요법과 조합하여 복강내(300μg/마우스/일) 투여된다. 2-4일 및 13-15일째에 시스플라틴(83μg/마우스/일)과 2-8일 및 13-19일째에 AVI-4126의 공동-투여는 시스플라틴 단독 투여에 대하여 종양 성장 저해에 대한 추가적 효과를 갖지 않았다(실시예 1). 시스플라틴이 2-4일 및 13-15일째에 투여된 후, 이어서 6-12일 및 17-23일째에 AVI-4126이 투여된 조합 섭생은 시스플라틴 단독 투여보다 종양 성장을 더욱 유의하게 저해했으며, 이것은 항-종양 효과가 시스플라틴 및 AVI-4126 치료를 별도로 하는 투약 스케쥴을 필요로 한다는 것을 나타낸다(도 8A). 항-종양 활성의 이런 증가는 탁솔 및 더 적은 규모의 에토포시드와의 조합에서도 증명되었다.

실시예 1에 더 이상 설명된 결과는 AVI-4126을 사용한 치료가 LLC1 종양에서 c-myc의 발현을 저해하며, 조합 화학요법에서 효능 있는 항암제로서 잠재성을 가진다.

VII. 치료 모니터링

본원에 설명된 방법을 수반하는 주어진 치료 섭생의 효능은, 예를 들어 치료중인 암의 종류에 적합한 진단 기술을 사용하여 모니터될 수 있다.

정확한 평가 성질은 치료될 상태에 따라서 변할 것이며, 치료 섭생은 그러한 진단 시험의 결과에 기초하여, 처방된 대로 조정될 수 있다(용량, 빈도, 경로 등).

본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용한 효과적인 생체내 치료 섭생은 투여 빈도 및 경로 뿐만 아니라 치료중인 피험자의 상태(즉, 예방적 투여 대 국부적 또는 전신적 감염에 대한 투여)에 따라서 변할 것이라는 게 이해될 것이다. 따라서, 최적의 치료 성과를 달성하기 위해서, 그러한 생체내 치료법은 일반적으로 치료중인 특정한 종류의 상태, 예를 들어 암에 적합한 시험에 의한 모니터링 및 용량 또는 치료 섭생에서의 대응하는 조정을 필요로 할 것이다.

암의 진단 및 모니터링은 일반적으로 (1) 조직생검, (2) 초음파, (3) x-선, (4) 자기공명영상, (5) 핵산검출법, (6) 혈청검출법, 즉 종래의 면역분석법 및 (7) 다른 생화학적 방법들 중 하나 이상을 포함한다. 그러한 방법은 정성적 또는 정량적일 수 있다.

본원에 설명된 방법을 수반하는 주어진 치료 섭생의 효능은, 상기 더 설명된 대로, 예를 들어 치료중인 질환 상태의 일반적인 징후에 의해 모니터될 수 있다.

핵산 프로브는 치료중인 특정한 암에 관련된 c-myc 또는 다른 핵산 서열을 기초로 하여 디자인될 수 있다. 또한, 핵산 증폭 시험(예를 들어, PCR)이 그러한 검출 방법에서 사용될 수 있다.

진단 시험의 정확한 성질 뿐만 아니라 질환 상태의 징후인 다른 생리학적 요인들이 치료될 특정한 상태와 치료가 예방적인지 또는 치료적인지의 여부에 따라서 변할 것이라는 게 이해될 것이다.

피험자가 특정한 종류의 암으로 진단된 경우, 암의 상태가 또한 치료중의 특정한 종류의 암을 모니터하는데 있어 당업자에 의해 전형적으로 사용되는 진단 기술을 사용하여 모니터된다.

안티센스 올리고머 치료 섭생은 치료중인 피험자의 면역분석, 다른 생화학적 시험 및 생리학적 시험의 결과에 기초하여, 처방된 대로 조정될 수 있다(용량, 빈 도, 경로 등).

VIII. 본 발명의 적용/이용

본원에 설명된 대로, 화학요법 및/또는 방사선요법과 같은 전통적인 암치료와 조합된 c-myc 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용한 암치료는 암의 성장 및/또는 전파를 지연 또는 제거하는데 유용하다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 (1) 암세포의 성장을 저지 또는 정지시키고; (2) 화학치료제의 투여 용량을 줄이고 및/또는 투여 기간을 단축시키는 것을 허용하여 그 결과 독성 부작용을 감소시키고; (3) 화학치료제의 투여 용량을 줄이고 및/또는 투여 기간을 단축시키는 것을 허용하여 화학치료제에 대한 내성의 발생 가능성을 감소시키고; (4) 실질적으로 하전되지 않고 화학치료제와 공-침전하지 않는 안티센스 올리고머 종류(예를 들어, PMO)를 제공하고; (5) c-myc 안티센스 올리고머 투여를 결여한 치료 섭생에서 투여되었을 때의 효능에 필요한 화학치료제의 용량을 견딜 수 없는 환자 집단을 위한 대안의 유효한 치료 섭생을 제공할 수 있다.

본 명세서에 인용된 모든 특허 및 문헌의 참고자료는 그 전체가 본원에 참고자료로 수록된다.

다음의 실시예들은 본 발명을 예시하며 본 발명을 어떤 식으로도 제한하지 않는다.

실시예

재료 및 방법

모르폴리노 올리고머 합성

c-myc 번역 시작 부위에 상보하는 서열을 갖는 모르폴리노 포스포로디아미데이트 올리고머(PMO)(AVI-14126; SEQ ID NO:1), 마우스 p21 서열(SEQ ID NO:3), 마우스 RAD51 서열(SEQ ID NO:4) 및 스크램블 대조표준(SEQ ID NO:2)를 합성하고 AVI BioPharma, Inc.(Corvallis, OR)에 의해 정제했다. 역상 HPLC 및 MALDI TOF 질량분광기에 의해 측정된 순도는 90% 이상이었다. 동결건조된 PMO를 주사용으로 멸균 식염수에 용해시켰다.

종양 세포

본원에 설명된 연구에서 사용된 루이스 폐셀라인(LLC1)은 1951년에 Dr. M. R. 루이스에 의해 확립된 루이스 폐암종으로부터 유래되었고, 암화학치료제 평가에 이용된다(Mayo, 1972; Bertram 등 1980). 루이스 폐암종세포(ATCC, Manassas, VA)를 37°C의 5% CO_2 /95% 공기 가습 인큐베이터에서 10% 태아소혈청, 페니실린(100-유닛/ml), 스트렙토마이신(100μg/ml) 및 암포테리신(0.25μg/ml)로 보충된 DMEF-12 배지 중에 유지했다. 세포를 이식시에 로그 성장상의 대략 70% 컨플루언트 배양물로서 수집했고, 100μℓ 주사 당 200,000 세포의 농도로 배지 중의 세포 현탁액으로서 주사했다.

공통유전자 마우스

22 내지 24g으로 칭량된 C57BL/6J 마우스(Simonsen, Gilroy, CA)를 오리곤주립대학(OSU)(Corvallis, OR)의 Laboratory Animal Resources Facility에서 멸균 플라스틱 우리에서 가두었다. 마우스에게 설치류 식사(Harlan Teklad, Madison, WI) 및 수돗물을 임의로 제공하고 12시간 빛/암흑 사이클에 노출했다. 모든 동물 프로토콜은 1975년 헬싱키 선언의 윤리 가이드라인에 따랐고, OSU의 '동물 관리 및 사용 위원회'에 의해 승인되었다.

c-myc 단백질의 면역블롯 분석

모든 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)로부터 얻었다. 300개 미생물의 LLC1 단백질 용해물을 12% v/v 나트륨 도데실술페이트(SDS)/아크릴아미드 분리젤을 갖는 5% SDS/아크릴아미드 점착젤 상에서 분석했다. 젤을 표준 웨스턴 블롯팅 과정에 따라 블롯팅, 프로브, 및 시각화했다. 멤브레인을 차단 완충액(Genotech)으로 1:2000 희석된 토끼 항-마우스 c-myc 폴리클로날 항체 N-262(sc-764) 또는 C-19(sc-788)로, 이어서 염소-항 토끼 HRP-콘쥬게이트 항체(sc-2054)로 프로브했다. c-myc와 액틴 단백질의 상대량을 ECLplus(Amersham, Piscataway, NJ)로 시가화했고, 1D 영상분석 소프트웨어(Kodak, Rochester, NY)를 사용하여 Kodak 440 이미지 스테이션 상에서 분석했다. 다음에, 멤브레인을 25°C 스트립핑 완충액 중에서 20분간 소킹했고, 단백질 로딩 대조표준으로서 사용된 염소 항-마우스 β-액틴 폴리클로날 항체(sc-1616)의 1:2000 희석물로 재프로프한 후, 당나귀 항-염소 HRP-콘쥬게이트 항체(sc-2056)로 프로프했다.

LLC1 종양 조직에서 AVI-4126의 HPLC 검출

종양 조직 용해물(종양을 지닌 마우스에 AVI-4126 100μg을 1회 주사한 후 4시간 후 제조된)에서 AVI-4126의 존재를 AVI BioPharma(Corvallis, OR)에서 개발된 5'-플루오레세닐 DNA:AVI-4126(FDNA:AVI-4126) 듀플렉스 검출 방법에 의해 측정했 다. 간단히 말해서, FDNA 프로브(5'-GAGGGGCATCGTCGC-3'(SEQ ID NO:14))에 상보하는 15량체 내부 PMO 표준의 내부 표준 500ng(0.025M 트리스 완충액 pH=8 중 2.29mg PMO/ml 10μℓ)를 각 종양 조직 용해물에 가했다. 용해물을 250μℓ 메탄올과 조합하고 완전히 혼합했다. 샘플을 15,000xg에서 10분간 원심분리했고, 상청액을 제거하고 10분간 70°C로 가열했다. 샘플을 10분간 원심분리했고, 상청액을 1시간 동안 저열 Savant SC110 스피드 진동에서 건조 하강시켰다. 다음에, 건조된 샘플을 투명한 셀 바이엘에서 100μℓ 트리스 완충액과 조합하고 동결건조시켰다. 각 동결건조된 샘플을 AVI-4126에 상보하는 서열을 갖는 1.0 OD/ml 5'-플루오레세닐 DNA 프로브(FDNA, 5'-플루오레세닐-GCGACGATGCCCCTCAACGT-3'(SEQ ID NO:15))의 100μℓ 알리쿼트로 다시 가수분해했다.

다음에, 전체 100μℓ 샘플을 형광 검출 역상 HPLC를 사용하여 FDNA:AVI-4126 듀플렉스의 존재에 대해 분석했다. 샘플을 형광 검출기 및 AI-200 오토샘플러(100μℓ 주사기 루프 용적)을 구비한 Varian HPLC 펌프(모델 9010 불활성)을 사용하여 Dionex DNAPac PA-100 칼럼(4X250)에 주사했다. 이동상(A: 0.025M 트리스, pH=8 및 B: 0.025M 트리스/1M NaCl pH=8)은 사용하기 전에 0.2 마이크론 필터를 통해 여과된 HPLC 등급 용매를 사용하여 제조했다. 펌프 구배 프로그램은 1.5ml/분의 유속에서 90% A + 10% B(0분) 및 55%A + 45%B(20분)이었고, 형광 검출은 494nm(들뜸) 및 518nm 방출 파장에서 행했다.

플래티늄/시스플라틴의 ICP-MS 검출 및 정량

조직 용해물(LLC1 종양 조직 40mg)의 200㎕ 알리쿼트를 왕수 1.33ml에 용해 하고 10배까지 희석했다. 다음에, 샘플을 Anatek Labs(Moscow, ID)에 의한 Long 등(16)의 방법에 따라서 Pt의 존재에 대해 ICP-MS 기술에 의해 분석했다.

통계적 분석

모든 데이타는 컴퓨터 프로그램 InStat2(GraphPad, San Diego)에 의해 측정된 평균 ± SEM으로서 기록했다. p 값은 ANOVA 및 Tukey 다중 비교 시험을 사용하여 InStat2에 의해 계산했다. Prism v2.0(GraphPad)를 사용하여 그래프, 선형회귀 및 기울기를 생성했다.

실시예 1

AVI-4126 및 화학요법을 사용한 종양 연구

5일의 새 환경 순응 기간 후, C57BL/6J 마우스(Simonsen, Gilroy, CA)를 상기 설명된 대로 관리했고, 이소플루란으로 마취하고, 털을 깍고, 대략 200,000의 생육성 LLC1 세포로 우측 후위 옆구리에 피하 주사했다(연구 1일째). 주사 부위를 매일 모니터하여 고상의 균질한 종양 성장이 LLC1 세포 주사 후 4일간 일관되게 얻어지는 것을 확실히 했다. 화학요법 주사제는 복강내 주사 전에 매일 신선하게 제조했다(표 1). 모든 PMO 및 시스플라틴(Sigma, St. Louis, MO)를 0.1ml의 주사 부피에 적합하게 된 멸균 아피로제닉 식염수(Sigma)에 용해시켰다. 탁솔 스톡 용액(크레모포 EL 및 에탄올 중의 6mg/ml, Bristol Myers Squibb, Syracuse, NY)를 주사 전에 1x PBS 중에 1mg/ml로 희석했다. 에토포시드(Sigma) 스톡 용액을 11mg/ml로 70% 에탄올 중에 용해한 후, 5mg/ml의 최종 농도로 식염수으로 희석하여 제조했다. 5-FU(Calbiochem)을 12.5mg/ml의 농도로 식염수에 용해시켰다.

c-myc 번역 출발 부위에 상보하는 서열을 갖는 모르폴리노 포스포로디아미데이트 올리고머(PMO)(AVI-4126; SEQ ID NO:1), 마우스 p21 서열(SEQ ID NO:3), 마우스 RAD51 서열(SEQ ID NO:4) 및 스크램블 대조표준(SEQ ID NO:2)를 합성하고 상기 설명된 대로 정제했다.

초기 연구를 수행하여 종양 내의 AVI-4126 수준을 측정했고, c-myc 단백질 수준의 서열 특이적 저해를 평가했다. LLC1 이식 후 24일 후에 종양을 지닌 마우스에게 식염수, AVI-4126 또는 스크램블 대조표준(100㎍/마우스 복강내)를 주사했다. 하기 설명된 대로, 종양을 4시간 후에 절제하여 AVI-4126에 대해 평가했고, c-myc에 대한 면역블롯에 의해 분석했다.

3개 연구(A, B 및 C)에서 사용한 치료 그룹을 표 1에 요약한다. 동물은 설명한 대로 치료했다. 디지탈 캘리퍼스로 매일 측정한 종양 면적(길이x너비, cm2) 및 안락사시 측정된 종양 질량을 기준으로 하여 치료 효능을 평가했다. 모든 연구에서 마우스를 PMO 치료의 최종일에 CO2를 사용하여 질식시켜 안락사시켰다. 종양을 즉시 제거하여 칭량하였고, 조직 균질화 30분전에 용해 완충액에 용해시킨 프로테아제 저해제 칵테일 정제(CompleteTM Mini EDTA-프리, Boehringer-Mannheim)를 함유하는 1.0ml 조직-PE 용해 완충액(Genotech, St. Louis, MO) 중에서 대략 0.25g 종양 조직을 균질화시켰다. 용해물을 4℃에서 15분간 15,000xg으로 원심분리하고, 상청액 150㎕ 알리쿼트를 전기영동 샘플 완충액과 1:1로 조합하고 100℃에서 5분간 끓였다.

[표 2]

조합 화학요법 섭생

연구	치 료
A	(1) 식염수 (2) 시스플라틴 (83 μg/마우스/일 IP) 2-4, 14-16 일 . (3) AVI-4126 (300 μg/마우스/일 IP) 2-8, 14-21 일 . (4) 시스플라틴 (83 μg/마우스/일 IP) 2-4, 14-16 일 및 AVI-4126 (300 μg/마우스/일 IP) 6-12, 18-23 일 . (5) 시스플라틴 (83 μg/마우스/일 IP) 2-4, 14-16 일 및 AVI-4126 (300 μg/마우스/일 IP) 2-8, 13-19 일
B	(1) 식염수 (2) 에토포시드 (375 μg/마우스/일 IP) 2-4, 14-16 일 . (3) 에토포시드 (375 μg/마우스/일 IP) 2-4, 14-16 일 및 AVI-4126 (300 μg/마우스/일 IP) 6-12, 18-23 일 .
C	(1) 식염수 (2) 탁솔 (125 μg/마우스/일 IP) 2-4, 14-16 일 .
	(3) 탁솔 (125 μg/마우스/일 IP) 2-4, 14-16 일 및 AVI-4126 (300 μg/마우스/일 IP) 6-12, 18-23 일
D	(1) 식염수 (2) 5-FU (1250 μg/마우스/일 IP) 2-4, 14-16 일 . (3) 5-FU (1250 μg/마우스/일 IP) 2-4, 14-16 일 및 AVI-4126 (300 μg/마우스/일 IP) 6-12, 18-23 일

A. AVI-4126은 LLC1 종양 조직에서 검출가능하다

AVI-4126의 HPLC 형광 검출을 AVI-4126 또는 식염수으로 치료된 마우스로부터의 조직 용해물에서 수행했다. FDNA:AVI-4126 듀플렉스를 나타내는 형광피크를 나타내는 대표적인 HPLC 분석은 오직 AVI-4126으로 치료된 마우스에서만 쉽게 검출할 수 있었다(도 4C). AVI-4126의 분해에 대한 증거는 관찰되지 않았다. AVI-4126의 투여는 종양 조직의 플래티늄 수준에 영향을 미치지 않았다(데이타는 나타 내지 않음).

B. AVI-4126은 LLC1 종양 조직에서 c-myc 수준을 감소시킨다

종양 조직의 c-myc 수준을 측정하기 위한 면역블롯 분석을 수행하였다. 1회 AVI-4216 주사는 식염수 및 스크램블 PMO 대조표준에서 검출된 수준에 비하여 77% 및 63%까지 c-myc의 수준을 감소시켰다(도 5A). 유사하게, 표 2A의 그룹 (5)에 설명된 대로, 대조표준에 비하여 식염수, AVI-4126 단독, 시스플라틴, 또는 AVI-4126과 시스플라틴의 조합으로 치료된 마우스로부터 수집된 종양으로부터의 용해물에서 c-myc가 감소되었다(도 7 및 8A 참조).

분리되지 않은 용량의 AVI-4126 및 시스플라틴으로 치료된 동물은 면역블롯 분석을 수행하는데 충분한 종양 조직을 제공하지 않았다. 식염수 또는 AVI-4126 치료 그룹의 대표 동물로부터의 4개 종양을 도 6A 및 B에 나타내는데, 이것은 n-말단 및 c-말단 특이적 c-myc 항체로 프로브된 면역블롯 이미지를 나타낸다. β-액틴 단백질 수준(도 6C)으로 정규화된 밴드 강도 분석은 식염수 또는 AVI-4126만으로 치료된 동물로부터의 대표 종양에서 식염수 대조표준과 비교하여 c-myc 수준의 74% 및 61% 저해를 드러낸다. 밴드는 대략 66kD에서 나타나며, AVI-4126(13)에 의해 야기된 사람 세포에서의 c-myc 스플라이스 변이체에 대해 보고된 38kD의 증거는 없었다. 도 7A에 나타낸 면역블롯 분석은 시스플라틴 + AVI-4126이 투여된 마우스에서 c-myc가 감소된다는 것을 드러낸다(식염수과 비교하여 72%). 식염수과 비교하여 시스플라틴 치료 그룹에서 c-myc 수준들 사이에 통계적인 차이는 없었다.

C. AVI-4126 및 시스플라틴을 사용한 조합 화학요법의 항종양 효과는 스케쥴 의존적이다

모든 치료 그룹에 대한 매일의 종양 면적을 도 8A-C에 나타낸다. 종양 성장을 시스플라틴 단독 투여, AVI-4216과의 공동-투여, 또는 AVI-4126 치료와의 교대 섭생으로 투여한 조합 연구에서 분석했다. 종양을 지닌 마우스에게 AVI-4126과 시스플라틴을 공동-투여하는 치료를 2회 제공했을 때(표 2A, 그룹 5 참조), 연구 마지막에서의 종양 성장률 및 질량은 시스플라틴 치료만 했을 때와 차이가 없었다(데이타는 나타내지 않음). 그러한, 시스플라틴을 받은 그룹에서 종양 성장율은 AVI-4126만으로 또는 식염수으로 치료된 그룹보다 상당히 저하되었다($p<001$).

종양을 지닌 마우스에게 시스플라틴과 AVI-4126를 교대로 투여하는 섭생을 2회 투여했을 때(표 2A, 그룹 4), 시스플라틴 단독(p<001) 또는 식염수(p<001)을 2회 투여했던 마우스에 비하여 종양 성장율이 상당히 감소했다(도 8 패널 A 및 표 3). 시스플라틴 및 AVI-4126 치료를 교대로 한 섭생으로부터의 종양 검시는 매우 작고 비-침습적인 종양결절을 드러낸 반면, 시스플라틴 단독 투여 및 시스플라틴과 AVI-4126의 공동-투여로 치료한 마우스에서 종양은 고도로 침습적이었고 혈관형성성이었다.

AVI-4126과 함께 에토포시드, 탁솔 또는 5-FU를 교대로 투여했던 추가 연구는 증진된 효능이 화학요법에 의존한다는 것을 드러냈다. 시스플라틴이 가장 효과적이었으며 다음에 에토포시드 및 탁솔이 효과적이었다. 3개 제제의 효능은 모두 치료 섭생에 AVI-4126의 첨가에 의해 상당히 증진되었다(TGR에 의해 처방된 각 단일 제제 치료 섭생 또는 식염수과 비교하여 3개 치료 모두에 대해 p<001). 5-FU는 단일 제제 또는 AVI-4126과의 조합했을 때 비교적 효과적이지 않았다(표 3 및 도 8D 참조).

AVI-4126에 대한 대조표준 PMO 올리고머는 광범하게 연구되었고 이미 보고되었다(Hudziak 등, 2000).

스크램블 대조표준 PMO(SEQ ID NO:2)는 c-myc 수준에 영향을 미치지 않았다. AVI-4126과 동일한 프로토콜로 PMO 백본을 시험하기 위해서, 2개의 PMO를 이용했는데, p21AS(SEQ ID NO:3) 및 RAD51AS(SEQ ID NO:4)를 상기 설명된 대로 합성했고, AVI-4126에 효과적이었던 동일한 섭생을 이용하여 이 모델에서 시험했다. 이들 서열은 시스플라틴과 조합되었을 때 증진된 효과를 생성하지 못했다. 이들 모델에 대한 연구의 마지막에서 종양 성장율 및 질량을 표 3에 나타낸다.

요약해서, 표 3에 나타낸 결과는 c-myc 안티센스 올리고머가 시스플라틴, 에토포시드, 또는 탁솔과의 교대 섭생으로 투여된 치료 프로토콜이 종양 성장율(TGR) 및 종양 크기에서 각각 18.6%, 36.8%, 50.9%의 상당한 감소를 가져왔다는 것을 증명한다.

[표 3]

다양한 조합 치료에 대한
종양 질량 및 성장률의 요약

치료	n	종양 질량 (gm ± STE)	종양 성장율* (TGR)	식염수 TGR에 대한 %
식염수	29	1.508 ± 0.181	0.204 ± 0.014	100.0
AVI-4126	6	1.788 ± 0.651	0.212 ± 0.031	103.9
시스플라틴	26	0.550 ± 0.081	0.101 ± 0.011	49.5
시스플라틴 + AVI-4126	6	0.112 ± 0.059	0.038 ± 0.011	18.6
p21AS	6	1.260 ± 0.389	0.184 ± 0.030	90.2
시스플라틴 + p21AS	6	0.607 ± 0.194	0.108 ± 0.018	50.9
RAD51AS	6	1.193 ± 0.166	0.198 ± 0.017	97.1
시스플라틴 + RAD51AS	6	0.322 ± 0.076	0.089 ± 0.012	43.6
에토포시드	5	0.970 ± 0.244	0.153 ± 0.025	75.0
에토포시드 + AVI-4126	5	0.560 ± 0.258	0.075 ± 0.016	36.8
탁솔	6	1.827 ± 0.210	0.234 ± 0.023	114.7
탁솔 + AVI-4126	6	0.558 ± 0.279	0.104 ± 0.022	50.9
5-FU	6	2.720 ± 0.991	0.234 ± 0.044	114.7
5-FU + AVI-4126	6	1.018 ± 0.224	0.180 ± 0.018	88.2

* 종양 성장율은 종양 면적의 변화가 선형일 때 14일에서 25일까지 종양 면적 변화를 선형 회귀를 사용하여 분석하여 계산했다. 나타낸 데이타는 기울기 ± 표준편차이다.

[표 4]

본 발명을 지지하여 제공된 서열

설 명	SEQ ID NO
c-myc AUG에 대한 안티센스 ; AVI 4126: ACG TTG AGG GGC ATC GTC GC	1
c-myc 안티센스 스크램블 대조표준 AVI 4144: ACT GTG AGG GCG ATC GCT GC	2
c-myc 안티센스 대조표준 : 마우스 p21: CAT CAC CAG GAT TGG ACA TGG	3
c-myc 안티센스 대조표준 : 마우스 RAD51: CAA GCT GCA TTT GCA TAG CCA T	4
c-myc에 대한 안티센스, AVI #92: GMT MMM TMT GTM TMT MGM TGG	5
c-myc에 대한 안티센스, AVI #93: MMG MMM GMT MGM TMM MTM TG	6
c-myc에 대한 안티센스, AVI #25: GGC AUC GUC GUG ACU GUC GGG UUU UCC ACC	7
c-myc에 대한 안티센스, AVI #21: GGG GCA UCG UCG UGA CUG UCU GUU GGA GGG	8
c-myc에 대한 안티센스, AVI #108: CGU CGU GAC UGU CUG UUG GAG	9
c-myc에 대한 안티센스, AVI #111: CGT CGT GAC TGT CTG TTG GAG G	10
c-myc에 대한 안티센스, AVI #37: GGC AUC GUC GCG GGA GGC UGC UGG AGC G	11
c-myc에 대한 안티센스, AVI #26: CCG CGA CAU AGG ACG GAG AGC AGA GCC C	12
c-myc에 대한 안티센스, AVI 4174: TTG AGG GGC ATC	13

(57) 청구의 범위

청구항 1.

c-myc에 대한 올리고머 안티센스를 포함하는 제 1 조성물 및 화학치료제를 포함하는 제 2 조성물을 포함하며, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 제 1 조성물의 투여 후 최소 1일, 그리고 제 2 조성물의 투여 후 수 시간의 간격을 두고 연속적으로 투여되는, 화학요법에 의한 치료에 민감한 암의 치료용 키트.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, c-myc에 대한 올리고머 안티센스는 12 내지 25 염기 길이이며, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 및 SEQ ID NO:11로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 함유하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 안티센스 올리고머는

(a) 실질적으로 하전되지 않은 백본;

(b) 50℃ 이상의 Tm에서 높은 친화성으로 표적 RNA의 상보성 서열과 혼성화하는 능력;

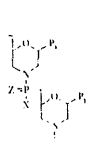
(c) 뉴클레아제 내성; 및

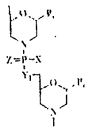
(d) 세포로 능동 또는 촉진 수송하는 능력

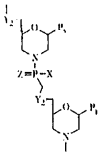
을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 4.

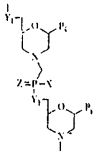
제 3 항에 있어서, 안티센스 올리고머 백본은


구조 A


구조 B


구조 C

및


구조 D

로 구성되는 군으로부터 선택된 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 5.
제 1 항에 있어서, 상기 화학치료제는 시스플라틴, 에토포시드(VP-16), 탁솔, 및 그들의 유사체 및 유도체로 구성되는 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 6.
제 1 항에 있어서, c-myc에 대한 안티센스 올리고머의 투여는 상기 화학치료제를 투여한 후 최소 1일 후에 시작하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 7.
제 6 항에 있어서, 상기 올리고머 조성물의 투여와 최소 1일 후에 이어지는 화학치료제의 투여는 여러번 반복되는 치료법 사이클을 나타내며, 각 사이클은 최소 1일에 의해 분리된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 8.
c-myc에 대한 올리고머 안티센스를 포함하며, 화학치료제의 투여 전 또는 후에 투여되는, 화학요법에 의해 현재 치료중인 환자에서 암을 치료하기 위한 올리고 머 조성물.

청구항 9.
제 8 항에 있어서, 12 내지 25 염기 길이이며, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 및 SEQ ID NO:11로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 함유하는 것을 특징으로 하는 올리고머 조성물.

청구항 10.
제 8 항에 있어서,

(a) 실질적으로 하전되지 않은 백본;

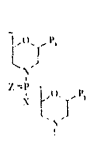
(b) 50℃ 이상의 Tm에서 높은 친화성으로 표적 RNA의 상보성 서열과 혼성화하는 능력;

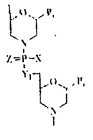
(c) 뉴클레아제 내성; 및

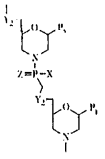
(d) 세포로 능동 또는 촉진 수송하는 능력

을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 올리고머 조성물.

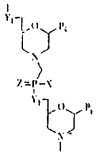
청구항 11.
제 10 항에 있어서,


구조 A


구조 B


구조 C

및


구조 D

로 구성되는 군으로부터 선택된 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 올리고머 조성물.

청구항 12.
화학요법에 의한 치료에 민감한 암의 치료용 제약 조성물의 제조를 위한 c-myc에 대한 올리고머 안티센스 및 화학치

료제의 사용으로서, 여기서 c-myc에 대한 상기 올리고머 안티센스 및 화학치료제는 화학치료제의 투여 후 수 시간, 그리고 올리고머 안티센스의 투여 후 최소 1일의 간격을 두고 연속적으로 투여되는 것을 특징으로 하는 사용.

청구항 13.
제 12 항에 있어서, c-myc에 대한 올리고머 안티센스는 12 내지 25 염기 길이이며, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 및 SEQ ID NO:11로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 함유하는 것을 특징으로 하는 사용.

청구항 14.
제 12 항에 있어서, 안티센스 올리고머는

(a) 실질적으로 하전되지 않은 백본;

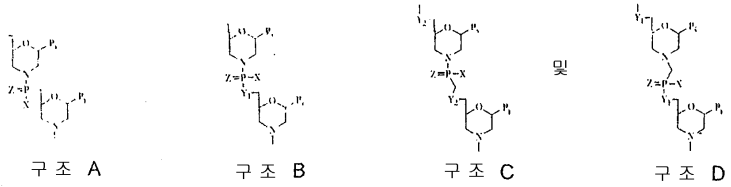
(b) 50℃ 이상의 Tm에서 높은 친화성으로 표적 RNA의 상보성 서열과 혼성화하는 능력;

(c) 뉴클레아제 내성; 및

(d) 세포로 능동 또는 촉진 수송하는 능력

을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 사용.

청구항 15.
제 14 항에 있어서, 안티센스 올리고머 백본은



로 구성되는 군으로부터 선택된 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 사용.

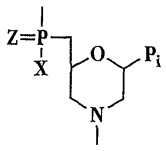
청구항 16.
제 12 항에 있어서, 상기 화학치료제는 시스플라틴, 에토포시드(VP-16), 탁솔, 및 그들의 유사체 및 유도체로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 사용.

청구항 17.
제 16 항에 있어서, c-myc에 대한 안티센스 올리고머의 투여는 화학치료제를 투여한 후 최소 1일 후에 시작하는 것을 특징으로 하는 사용.

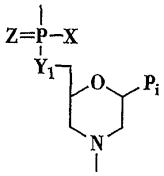
청구항 18.
제 17 항에 있어서, 상기 올리고머 조성물의 투여와 최소 1일 후에 이어지는 화학치료제의 투여는 여러번 반복되는 치료법 사이클을 나타내며, 각 사이클은 최소 1일에 의해 분리되는 것을 특징으로 하는 사용.

도면

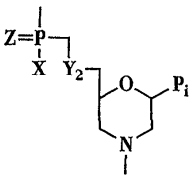
도면1



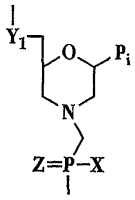
도 1A



도 1B

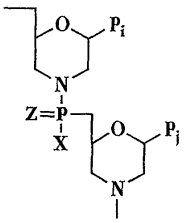


도 1C

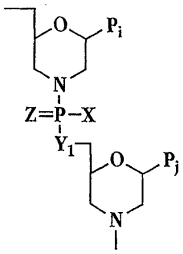


도 1D

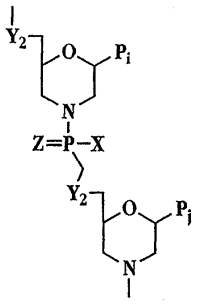
도면2



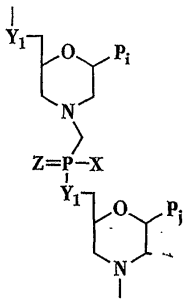
도 2A



도 2B

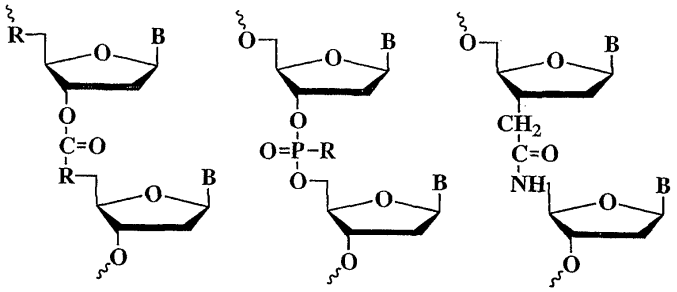


도 2C



도 2D

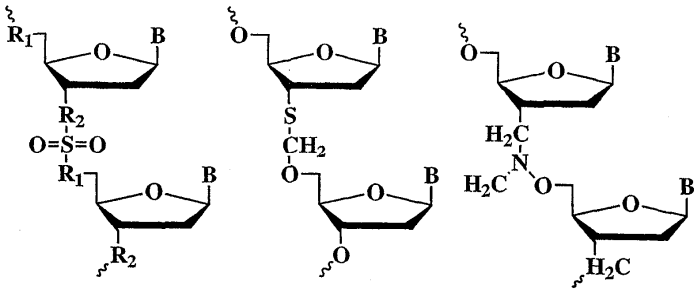
도면3



도 3A

도 3B

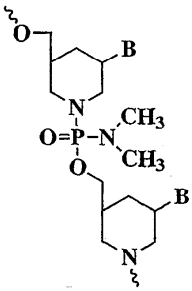
도 3C



도 3D

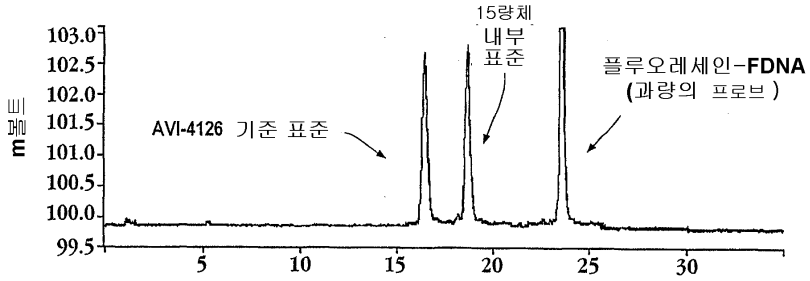
도 3E

도 3F

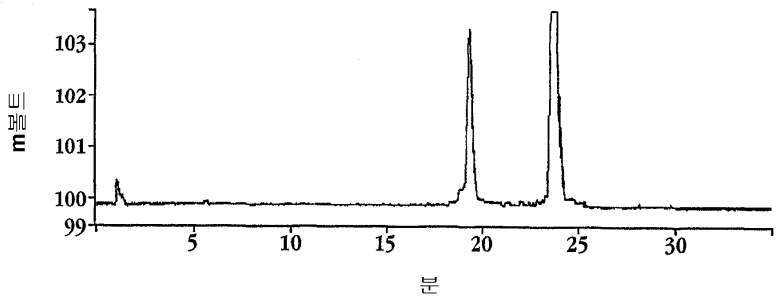


도 3G

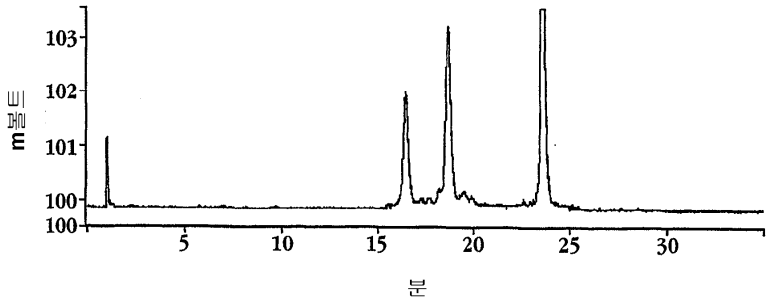
도면4a



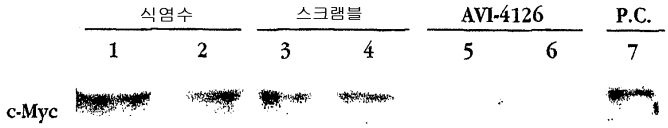
도면4b



도면4c

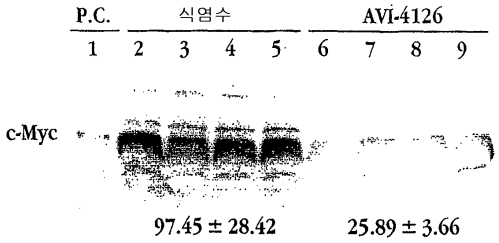


도면5a

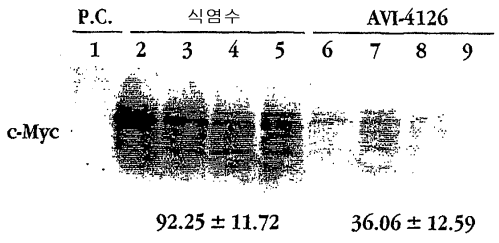


도면5b

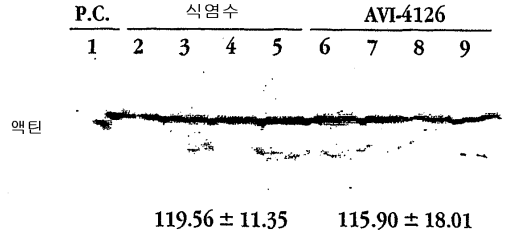
도면6a



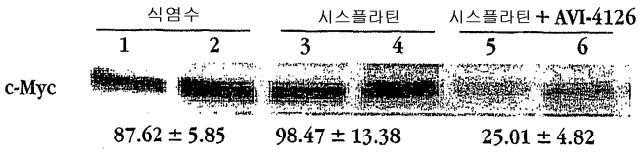
도면6b



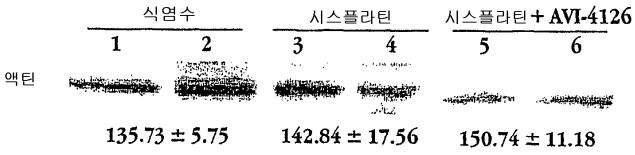
도면6c



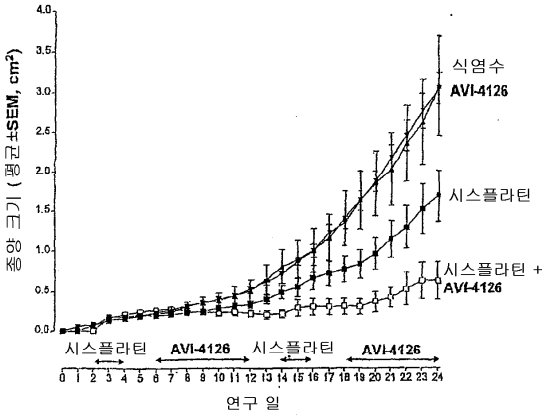
도면7a



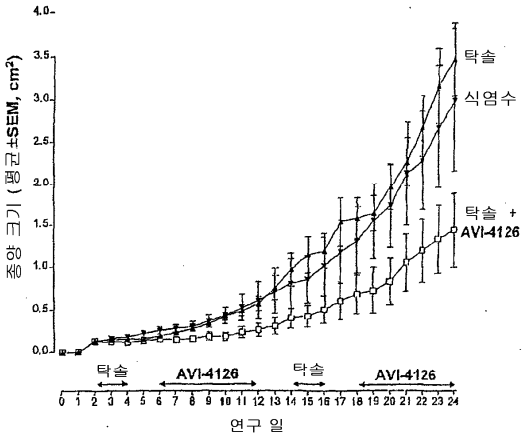
도면7b



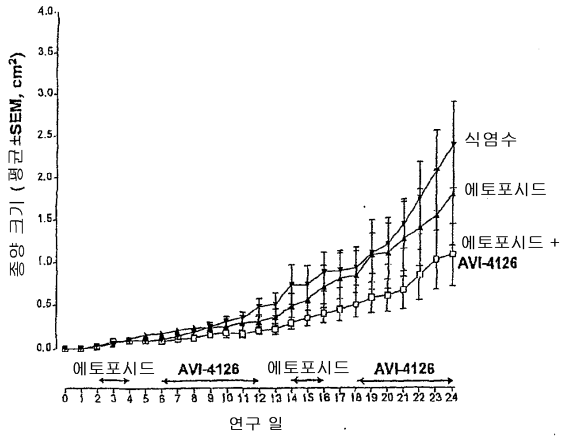
도면8a



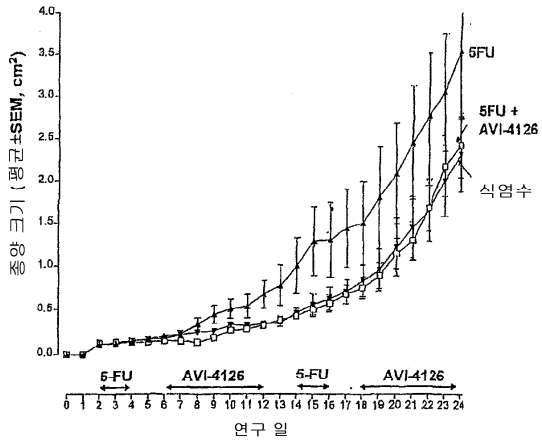
도면8b



도면8c



도면8d



<110> AVI BioPharma, Inc.

<120> Combined Approach to Treatment of Cancer Using a c-myc Antisense Oligomer

<150> US 60/291,727

<151> 2001-05-17

<160> 15

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense to c-myc

<400> 1

acgttgaggg gcatcgtcgc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> c-myc antisense scramble control

<400> 2

actgtgaggg cgatcgctgc 20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> c-myc antisense control

<400> 3

catcaccagg attggacatg g 21

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> c-myc antisense control

<400> 4

caagctgcat ttgcatagcc at 22

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense to c-myc

<400> 5

gmtmmmtmtg tmtmtmgmtg g 21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense to c-myc

<400> 6

mmgmmmgmtm gmtmmmtmtg 20

<210> 7

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense to c-myc

<400> 7

ggcaucgucg ugacugucgg guuuuccacc 30

<210> 8

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense to c-myc

<400> 8

ggggcaucgu cgugacuguc uguuggaggg 30

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense to c-myc

<400> 9

cgucgugacu gucuguugga g 21

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense to c-myc

<400> 10

cgtcgtgact gtctgttgga gg 22

<210> 11

<211> 28

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense to c-myc

<400> 11

ggcaucgucg cgggaggcug cuggagcg 28

<210> 12

<211> 28

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense to c-myc

<400> 12

ccgcgacaua ggacggagag cagagccc 28

<210> 13

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense to c-myc

<400> 13

ttgaggggca tc 12

<210> 14

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 14

gaggggcatc gtcgc 15

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)

<223> 5' nucletide modified to include fluoresceinyl

<400> 15

gcgacgatgc ccctcaacgt 20