



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월17일

(11) 등록번호 10-2755601

(24) 등록일자 2025년01월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7125* (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01) *A61K 47/69* (2017.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7125 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7013428
- (22) 출원일자(국제) 2016년10월14일
 심사청구일자 2021년10월14일
- (85) 번역문제출일자 2018년05월11일
- (65) 공개번호 10-2018-0091816
- (43) 공개일자 2018년08월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/057148
- (87) 국제공개번호 WO 2017/066643
 국제공개일자 2017년04월20일
- (30) 우선권주장
 62/241,503 2015년10월14일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 US06015886 A*
 W02001060998 A1
 W01997007784 A1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
 바이오-팩스 홀딩스 인크.
 미국 텍사스주 77401 벨러리 슈트 210 벨러리 블러버드 4710
- (72) 발명자
 닐센 피터
 미국 텍사스 77450 케이티 프린스 크리크 드라이브 20651
- (74) 대리인
 장훈

전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 리포좀 제제를 위한 p-에톡시 헥산

(57) 요약

적어도 하나의 p-에톡시 백본 연결을 포함하나 80% 이하의 p-에톡시 백본 연결을 포함하는 치료용 올리고뉴클레오타이드가 본원에 제공된다. 리포좀 내에 포획된 중성 인지질 및 p-에톡시 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리포좀을 포함하는 치료용 올리고뉴클레오타이드를 위한 개선된 전달 시스템이 본원에 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/544 (2017.08)

A61K 47/548 (2017.08)

A61K 47/6911 (2017.08)

C12N 15/111 (2013.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/113 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/31 (2013.01)

C12N 2310/32 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

올리고뉴클레오타이드의 집단, 인지질 및 계면활성제를 포함하는 조성물로서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 포스페이트 백본 연결을 통해 함께 연결된 뉴클레오시드 분자로 구성되고, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 백본 연결 중 60% 내지 75%는 p-에톡시 백본 연결이며, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 백본 연결 중 25% 내지 40%는 포스포디에스테르 백본 연결인 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 포스페이트 백본 연결 중 60% 내지 70%가 p-에톡시 백본 연결이고, 포스페이트 백본 연결 중 30% 내지 40%가 포스포디에스테르 백본 연결인 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드가 7 내지 30개 뉴클레오타이드 범위의 크기를 갖는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드의 집단이 단일 종의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드의 집단이 적어도 2종의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드의 집단이 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 짧은 간섭 RNA, microRNA, 또는 piwiRNA를 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드가 적어도 하나의 종양원성 단백질, 감염원 단백질, 또는 자기 항원의 발현을 억제하거나, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드가 적어도 하나의 종양원성 올리고뉴클레오타이드, 감염원 올리고뉴클레오타이드, 또는 자기 항원 올리고뉴클레오타이드와 혼성화하는 것인 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 및 인지질이 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체를 형성하는 것인 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 인지질이 생리학적 pH에서 비전하이거나 중성 전하를 갖는 것인 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 인지질이 중성 인지질인 것인 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 중성 인지질이 포스파티딜콜린인 것인 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 중성 인지질이 디올레오일포스파티딜 콜린인 것인 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 인지질 및 올리고뉴클레오타이드가 5:1 내지 100:1의 몰비로 존재하는 것인 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 계면활성제가 폴리소르베이트 20인 것인 조성물.

청구항 15

제8항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체가 리포솜의 집단으로서 추가로 한정되는 것인 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 리포솜의 적어도 90%가 5 마이크론 미만의 직경인 것인 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드의 집단이 상기 리포솜의 집단에 혼입되는 것인 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 동결건조된 것인 조성물.

청구항 19

제8항 내지 제17항 중의 어느 한 항에 따른 조성물 및 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는, 암, 자가면역 질환, 또는 감염병을 가진 환자를 치료하는데 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 20

세포를 제1항 내지 제17항 중의 어느 한 항의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 상기 올리고뉴클레오타이드의 치료적 유효량을 세포에게 전달하기 위한 시험관내 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 암이 방광, 혈액, 췌장, 골, 골수, 뇌, 유방, 결장, 식도, 위, 두경부, 신장, 간, 폐, 전립선, 피부, 고환, 혀, 난소, 또는 자궁 암인 것인 약제학적 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 자가면역 질환이 홍반성 루푸스, 쇼그렌병, 크론병, 당뇨병, 다발성 경화증, 또는 류마티스성 관절염인 것인 약제학적 조성물.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 감염병이 박테리아 감염, 진균 감염, 바이러스 감염, 또는 기생충 감염인 것인 약제학적 조성물.

청구항 24

제19항에 있어서, 상기 조성물이 피하내로, 정맥내로, 또는 복강내로 투여하기 위해 제형화되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 2015년 10월 14일에 출원된 미국 가출원 제62/241,503호의 우선권을 주장하며, 이의 전체 내용은 본원에 참고로 포함되어 있다.

[0002] **1. 발명의 분야**

[0003] 본 발명은 일반적으로 의학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 p-에톡시 올리고뉴클레오타이드의 리포솜 제제 및 의학에서 상기 제제를 제조 및 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] **2. 관련 기술의 설명**

[0005] 표적 mRNA의 특정 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (올리고)는 내인성 유전자의 발현을 억제하는데 사용되어 왔다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 표적 mRNA에 결합할 때, DNA-RNA 혼성화물이 형성된다. 이 혼성화물 형성은 mRNA의 번역, 및 이에 따라 코딩된 단백질의 발현을 억제한다. 단백질이 세포의 생존에 필수적인 경우, 그의 발현의 억제는 세포 사멸을 야기할 수 있다. 따라서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 항암 및 항바이러스 요법에서 유용한 도구일 수 있다.

[0006] 유전자 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하는데 있어서 주요 장애는 세포 불안정성, 낮은 세포 흡수, 및 불량한 세포간 전달이다. 천연 포스포디에스테르는 뉴클레아제 가수분해에 내성이 아니므로; 임의의 억제 효과가 관찰되기 전에 고농도의 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 필요하다. p-에톡시와 같은 변형된 포스포디에스테르 유사체가 이 뉴클레아제 가수분해 문제를 극복하기 위해 제조되었지만, 이들은 상기 문제에 대해 만족스러운 해결책을 제공하지 못하였다.

[0007] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수는 낮다. 이 문제를 해결하기 위해, 칼슘-포스페이트 침전, DEAE-셀룰로오스 매개, 또는 전기천공과 같은 물리적 기술이 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수를 증가시키는데 사용되어

왔다. 이러한 기술은 재현하기 어려우며 *생체내에서* 적용할 수 없다. 리포펙틴과 같은 양이온성 지질이 또한 올리고뉴클레오타이드를 전달하는데 사용되어 왔다. 양이온성 지질 및 음전하 올리고뉴클레오타이드 사이에서 정전기적 상호작용이 형성되어 복합체를 야기하며, 상기 복합체는 이후에 표적 세포에 의해 흡수된다. 이러한 양이온성 지질은 올리고뉴클레오타이드를 뉴클레아제 소화로부터 보호하지 못하므로, 세포 막에 유해하며, 뉴클레아제-내성 포스포포티오에이트를 전달할 때에만 유용하지만, 뉴클레아제-절단가능한 포스포디에스테르를 전달할 때에는 유용하지 않다.

[0008] 제조된 또 다른 변형된 포스포디에스테르 (PD) 유사체는 p-에톡시 (pE) 올리고이다. pE 올리고의 변형은 포스페이트 백본에서 이루어지므로, 상기 변형은 이들 올리고가 표적 mRNA에 결합하는 것을 방해하지 않을 것이다. pE 올리고는 포스페이트 백본의 비-가교 산소 원자에 에틸기를 부가하여 이들 올리고를 비전하 화합물로 만듦으로써 제조된다. 뉴클레아제에 대한 이들의 내성에도 불구하고, pE 올리고의 세포 흡수 및 세포내 전달은 불량한데, 내재화시, 이들 올리고가 엔도솜/리소솜 액포 내부에 격리되어 이들이 표적 mRNA에 접근하는 것을 방해하기 때문이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 질환의 치료에서 사용하기 위한 개선된 안티센스 조성물이 필요하며, 또한 이러한 개선된 조성물을 제조하기 위한 방법이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0010] **발명의 요약**

[0011] 일 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 집단을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 측면에서, 상기 집단의 올리고뉴클레오타이드는 포스페이트 백본 연결을 통해 함께 연결된 뉴클레오타이드 분자로 구성되고, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 백본 연결 중 적어도 하나는 p-에톡시 백본 연결이며, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 백본 연결의 80% 이하는 p-에톡시 백본 연결이다. 일부 측면에서, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 백본 연결 중 적어도 하나는 포스포디에스테르 백본 연결이다. 일부 측면에서, 포스페이트 백본 연결의 10% 내지 80%는 p-에톡시 백본 연결이거나; 포스페이트 백본 연결의 20% 내지 80%는 p-에톡시 백본 연결이거나; 포스페이트 백본 연결의 30% 내지 80%는 p-에톡시 백본 연결이거나; 포스페이트 백본 연결의 40% 내지 80%는 p-에톡시 백본 연결이거나; 포스페이트 백본 연결의 50% 내지 80%는 p-에톡시 백본 연결이거나; 또는 포스페이트 백본 연결의 60% 내지 70%는 p-에톡시 백본 연결이거나, 또는 그로부터 도출될 수 있는 임의의 범위는 p-에톡시 백본 연결이다. 일부 측면에서, 포스페이트 백본 연결의 20% 내지 90%는 포스포디에스테르 백본 연결이거나; 포스페이트 백본 연결의 20% 내지 80%는 포스포디에스테르 백본 연결이거나; 포스페이트 백본 연결의 20% 내지 70%는 포스포디에스테르 백본 연결이거나; 포스페이트 백본 연결의 20% 내지 60%는 포스포디에스테르 백본 연결이거나; 포스페이트 백본 연결의 20% 내지 50%는 포스포디에스테르 백본 연결이거나; 또는 포스페이트 백본 연결의 30% 내지 40%는 포스포디에스테르 백본 연결이거나, 또는 그로부터 도출될 수 있는 임의의 범위는 포스포디에스테르 백본 연결이다. 다양한 측면에서, 포스페이트 백본 연결의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%, 또는 그 안의 임의의 값은 p-에톡시 백본 연결이다. 다양한 측면에서, 포스페이트 백본 연결의 최대 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%, 또는 그 안의 임의의 값은 포스포디에스테르 백본 연결이다. 일부 측면에서, 조성물은 동결건조된다.

[0012] 일부 측면에서, 집단의 올리고뉴클레오타이드는 7 내지 30개 뉴클레오타이드 범위의 크기를 갖는다. 특정 측면에서, 집단의 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 25개 뉴클레오타이드 범위의 크기를 갖는다. 다양한 측면에서, 집단의 올리고뉴클레오타이드는 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오타이드의 크기를 갖는다. 크기 범위는 집단 내의 올리고뉴클레오타이드의 평균 크기일 수 있다.

[0013] 일부 측면에서, 집단의 올리고뉴클레오타이드는 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오타이드의 평균 크기를 가지며, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스페이트 백본 연결 중 각각 5, 6, 7, 8, 8, 9, 10, 11, 11, 12, 13, 14, 15, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20, 21, 22, 23, 또는 24개 이하는 p-에톡시 백본 연결이다. 일부 측면에서, 집단의 올리고뉴클레오타이드

는 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오타이드의 평균 크기를 가지며, 각각의 올리고뉴클레오타이드 내의 포스포이트 백본 연결의 각각 적어도 2, 2, 2, 2, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 4, 4, 4, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 6, 6, 6, 6, 또는 6개는 포스포디에스테르 백본 연결이다.

[0014] 일부 측면에서, 올리고뉴클레오타이드의 집단은 단일 종의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 측면에서, 올리고뉴클레오타이드의 집단은 적어도 2종의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 단일 종의 올리고뉴클레오타이드는 동일한 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있지만 상기 분자 내의 상이한 위치에 p-에톡시 연결을 갖거나 결여될 수 있다. 일부 측면에서, 올리고뉴클레오타이드의 집단은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 짧은 간섭 RNA (siRNA), microRNA (miRNA), 또는 piwiRNA (piRNA)를 포함한다.

[0015] 특정 측면에서, 집단의 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 종양원성 단백질, 감염원 단백질, 또는 자기 항원의 발현을 억제한다. 일부 측면에서, 집단의 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 종양원성 올리고뉴클레오타이드, 감염원 올리고뉴클레오타이드, 또는 자기 항원 올리고뉴클레오타이드와 혼성화한다.

[0016] 다양한 측면에서, 조성물은 인지질을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 인지질은 생리학적 pH에서 비전하이거나 중성 전하를 갖는다. 일부 측면에서, 인지질은 중성 인지질이다. 특정 측면에서, 중성 인지질은 포스포티딜콜린이다. 특정 측면에서, 중성 인지질은 디올레오일포스포티딜 콜린이다. 일부 측면에서, 인지질은 본질적으로 콜레스테롤이 없다.

[0017] 일부 측면에서, 인지질 및 올리고뉴클레오타이드는 약 5: 1 내지 약 100: 1의 몰비, 또는 그 안에서 도출가능한 임의의 비율로 존재한다. 다양한 측면에서, 인지질 및 올리고뉴클레오타이드는 약 5: 1, 10: 1, 15: 1, 20: 1, 25: 1, 30: 1, 35: 1, 40: 1, 45: 1, 50: 1, 55: 1, 60: 1, 65: 1, 70: 1, 75: 1, 80: 1, 85: 1, 90: 1 95: 1, 또는 100: 1의 몰비로 존재한다. 일부 측면에서, 올리고뉴클레오타이드 및 인지질은, 예를 들면, 리포솜 복합체와 같은 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체를 형성한다. 일부 측면에서, 리포솜의 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%는 5 마이크론 미만의 직경이다. 다양한 측면에서, 조성물은 예를 들면, 폴리소르베이트 20과 같은 적어도 하나의 계면활성제를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 총 리포솜 p-에톡시 안티센스 의약품의 적어도 약 5%는 계면활성제로 구성되며, 리포솜의 적어도 약 90%는 5 마이크론 미만의 직경이다. 일부 측면에서, 총 리포솜 p-에톡시 안티센스 의약품의 적어도 약 15%는 계면활성제로 구성되며, 리포솜의 적어도 약 90%는 3 마이크론 미만의 직경이다. 일부 측면에서, 올리고뉴클레오타이드의 집단은 리포솜 집단에 혼입된다.

[0018] 일 측면에서, 집단의 올리고뉴클레오타이드 각각은 약 21개 뉴클레오타이드 길이를 포함하고, 약 30% 포스포디에스테르 백본 연결을 갖는다. 일 측면에서, 올리고뉴클레오타이드의 집단은 적어도 약 5% 계면활성제를 포함하는 리포솜 조성물 내로 추가로 혼입될 수 있고, 상기 리포솜의 적어도 약 90%는 약 5 마이크론 미만의 직경을 갖는다.

[0019] 일 구현예에서, 본 구현예의 올리고뉴클레오타이드 및 인지질 및 약제학적으로 허용가능한 캐리어의 조성물을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일부 측면에서, 조성물은 화학치료제를 추가로 포함한다.

[0020] 일 구현예에서, 세포를 본 구현예의 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 올리고뉴클레오타이드의 치료적 유효량을 세포에 전달하기 위해 제공된다. 일부 측면에서, 방법은 과다형성, 암, 자가면역 질환, 또는 감염병을 치료하는 방법이다.

[0021] 일 구현예에서, 본 구현예의 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 암, 자가면역 질환, 또는 감염병을 갖는 대상체를 치료하기 위해 제공된다. 일부 측면에서, 대상체는 인간이다. 일부 측면에서, 암은 방광, 혈액, 췌장, 골, 골수, 뇌, 유방, 결장, 식도, 위, 두경부, 신장, 간, 폐, 전립선, 피부, 고환, 허, 난소, 또는 자궁암이다. 일부 측면에서, 자가면역 질환은 홍반성 루푸스, 쇼그렌병, 크론병, 당뇨병, 다발성 경화증, 또는 류마티스성 관절염이다. 일부 측면에서, 감염병은 박테리아 감염, 진균 감염, 바이러스 감염, 또는 기생충 감염이다. 일부 측면에서, 조성물은 피하내로, 정맥내로, 또는 복강내로 투여된다. 일부 측면에서, 방법은 적어도 제2 항암 요법을 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 제2 항암 요법은 수술 요법, 화학요법, 방사선 요법, 냉동요법, 호르몬 요법, 면역요법, 또는 사이토카인 요법이다.

[0022] 올리고뉴클레오타이드는 표적 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 특이적으로 혼성화하거나 또는 표적 단백질의 발현을 조절하는 안티센스 핵산 분자를 포함한다. "특이적 혼성화"는 안티센스 핵산 분자가 표적화된 핵산 분자에

혼성화하고 그의 발현을 조절하는 것을 의미한다. 바람직하게는, "특이적 혼성화"는 또한 다른 유전자 또는 전사체가 영향을 받지 않는다는 것을 의미한다. 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥의 핵산일 수 있고 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 이상의 핵염기를 포함할 수 있다. 특정 측면에서, 올리고뉴클레오타이드는 15 내지 30, 19 내지 25, 20 내지 23, 또는 21개의 인접한 핵염기를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 암성 또는 전암성 또는 과다형성 포유동물 세포 (예컨대, 인간 세포)의 성장을 촉진하는 유전자의 번역을 억제한다. 올리고뉴클레오타이드는 세포에서 세포자멸사를 유도할 수 있고/있거나 종양 유전자 또는 다른 표적 유전자의 번역을 억제할 수 있다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 성분은 단일 종의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 성분은 1, 2, 3, 4개 이상의 유전자를 표적화하는 2, 3, 4종 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 조성물은 본 발명의 지질 성분 또는 리포솜에 혼입되거나 혼입되지 않을 수 있는, 화학치료제 또는 다른 항암제를 추가로 포함할 수 있다. 추가 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 성분은 리포솜 또는 지질 성분 내에 혼입된다.

[0023] "포획하다," "캡슐화하다," 및 "혼입되다"는 관심있는 제제와 또는 제제 주위에서의 결합에 의해 용액 내로 자유롭게 확산되는 것을 방해하는 지질 또는 리포솜을 지칭하며, 예컨대, 리포솜은 지질 층 내부에 또는 지질 층 내부 또는 사이의 수성 구획 내에 제제를 캡슐화할 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 약제학적으로 허용가능한 캐리어 내에 포함된다. 약제학적으로 허용가능한 캐리어는 인간 대상체 또는 환자에게 투여하기 위해 제제화될 수 있다.

[0024] 특정 구현예에서, 지질 성분은 중성 인지질 또는 순 중성 전하를 포함하기 때문에 본질적으로 중성 전하를 갖는다. 특정 측면에서, 중성 인지질은 포스파티딜콜린, 예컨대 DOPC, 달걀 포스파티딜콜린 ("EPC"), 디라우릴로일포스파티딜콜린 ("DLPC"), 디미리스토일포스파티딜콜린 ("DMPC"), 디팔미토일포스파티딜콜린 ("DPPC"), 디스테아로일포스파티딜콜린 ("DSPC"), 1-미리스토일-2-팔미토일 포스파티딜콜린 ("MPPC"), 1-팔미토일-2-미리스토일포스파티딜콜린 ("PMPC"), 1-팔미토일-2-스테아로일 포스파티딜콜린 ("PSPC"), 1-스테아로일-2-팔미토일 포스파티딜콜린 ("SPPC"), 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC"), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 ("DAPC"), 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린 ("DBPC"), 1,2-디에이코세노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 ("DEPC"), 팔미토일오일 포스파티딜콜린 ("POPC"), 리소포스파티딜콜린, 또는 디리놀레오일포스파티딜콜린일 수 있다. 다른 측면에서, 중성 인지질은 포스파티딜에탄올아민, 예컨대 디올레오일포스파티딜에탄올아민 ("DOPE"), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민 ("DSPE"), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민 ("DMPE"), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민 ("DPPE"), 팔미토일오일 포스파티딜에탄올아민 ("POPE"), 또는 리소포스파티딜에탄올아민일 수 있다. 특정 구현예에서, 인지질 성분은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 이상의 종류 또는 유형의 중성 인지질을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 인지질 성분은 2, 3, 4, 5, 6 이상의 종류 또는 유형의 중성 인지질을 포함할 수 있다.

[0025] 특정 구현예에서, 지질 성분은 양전하 지질 및 음전하 지질을 포함하기 때문에 본질적으로 중성 전하를 가질 수 있다. 지질 성분은 중성전하 지질(들) 또는 인지질(들)을 추가로 포함할 수 있다. 양전하 지질은 양전하 인지질일 수 있다. 음전하 지질은 음전하 인지질일 수 있다. 음전하 인지질은 포스파티딜세린, 예컨대 디미리스토일포스파티딜세린 ("DMPS"), 디팔미토일 포스파티딜세린 ("DPPS"), 또는 뇌 포스파티딜세린 ("BPS")일 수 있다. 음전하 인지질은 포스파티딜글리세롤, 예컨대 디라우릴로일포스파티딜글리세롤 ("DLPG"), 디미리스토일포스파티딜글리세롤 ("DMPG"), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 ("DPPG"), 디스테아로일포스파티딜글리세롤 ("DSPG"), 또는 디올레오일포스파티딜글리세롤 ("DOPG")일 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 콜레스테롤 또는 폴리에틸렌글리콜 (PEG)을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 조성물은 본질적으로 콜레스테롤이 없다. 특정 구현예에서, 인지질은 자연발생 인지질이다. 다른 구현예에서, 인지질은 합성 인지질이다.

[0026] 리포솜은 지질 물질이 실질적으로 비전하인 한, 하나 이상의 인지질로 제조될 수 있다. 조성물이 음이온성 및 양이온성 인지질 및 콜레스테롤이 실질적으로 없는 것이 중요하다. 적합한 인지질은 포스파티딜 콜린 및 본 기술분야의 숙련자에게 널리 알려진 다른 것을 포함한다.

[0027] 본 발명의 또 다른 측면은 세포를 본 발명의 중성 지질 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드를 세포에 전달하기 위한 방법을 포함한다. 방법은 본 발명의 조성물을 유효량으로 제공할 것이다. 유효량은 대상체에서 세포, 병태, 또는 질환 상태를 약화시키거나, 늦추거나, 감소시키거나 제거하는 치료용 성분의 양이다. 세포는 대상체 또는 환자, 예컨대 인간 내에 포함될 수 있다. 방법은 암 또는 다른 과다형성 병태를 치료하는 방법을 추가로 포함할 수 있다. 암은 방광, 혈액, 골, 골수, 뇌, 유방, 결장, 식도, 위장, 잇몸, 머리, 신장, 간, 폐, 비인두, 목, 전립선, 피부, 위, 고환, 혀, 또는 자궁에서 기인될 수 있다. 특정 구현예에서, 방

법은 비암성 질환 또는 과다형성 병태를 치료하는 방법을 추가로 포함한다. 세포는 전암성 또는 암성 세포일 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물 및 방법은 세포의 성장을 억제하고, 세포에서 세포자멸사를 유도하고/하거나 종양 유전자의 번역을 억제한다. 올리고뉴클레오타이드는 암성 세포에서 과발현되는 유전자의 번역을 억제할 수 있다.

[0028] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 추가적인 요법을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가적인 요법은 화학치료제 (예컨대, 파클리탁셀 또는 도세탁셀), 수술, 방사선 요법, 및/또는 유전자 요법을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 특정 측면에서, 화학요법은 도세탁셀, 파클리탁셀, 시스플라틴 (CDDP), 카르보플라틴, 프로카르바진, 메클로르에타민, 사이클로포스파미드, 캄포테신, 이포스파미드, 멜팔란, 클로람부실, 부설판, 니트로소우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드 (VP16), 타목시펜, 탈록시펜, 에스트로겐 수용체 결합제, 탁솔, 잼시타빈, 나벨빈, 파르네실-단백질 전달효소 억제제, 트랜스플라티늄, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토트렉세이트, 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학요법은 탁산, 예컨대 도세탁셀 또는 파클리탁셀이다. 화학요법은 본 발명의 중성 지질 조성물에 비해 이전, 동안, 이후, 또는 이의 조합으로 전달될 수 있다. 화학요법은 중성 지질 조성물의 0, 1, 5, 10, 12, 20, 24, 30, 48, 또는 72시간 이상 내에 전달될 수 있다. 중성 지질 조성물, 제2 항암 요법, 또는 중성 지질 조성물 및 항암 요법 모두는 중앙내로, 정맥내로, 복강내로, 피하내로, 경구로 또는 다양한 이의 조합에 의해 투여될 수 있다.

[0029] 본 명세서에 논의된 임의의 구현예는 본 발명의 임의의 방법 또는 조성물에 대해 구현될 수 있음이 고려되며, 그 반대로 그러하다. 또한, 본 발명의 조성물은 본 발명의 방법을 달성하는데 사용될 수 있다.

[0030] 본원에 사용된 바와 같이, 명시된 성분의 측면에서 "본질적으로 없는"은 명시된 성분 중 어느 것도 의도적으로 조성물로 제형화되지 않았고/않았거나 단지 오염물질로서 또는 미량으로 존재한다는 것을 의미하기 위해 본원에 사용된다. 따라서, 조성물의 임의의 의도하지 않은 오염으로부터 비롯되는 명시된 성분의 총량은 0.05% 미만, 바람직하게는 0.01% 미만이다. 명시된 성분의 양이 표준 분석 방법으로 검출될 수 없는 조성물이 가장 바람직하다.

[0031] 본원 명세서에 사용된 바와 같이, 단수형은 하나 이상을 의미할 수 있다. 본원 청구범위(들)에서 사용된 바와 같이, 단어 "포함하는"과 함께 사용될 때, 단어 단수형은 하나 또는 둘 이상을 의미할 수 있다.

[0032] 청구범위에서 용어 "또는"의 사용은, 개시내용이 대안 단독 및 "및/또는"을 지칭하는 정의를 뒷받침함에도 불구하고, 명시적으로 대안만을 언급하거나 대안이 상호배타적이지 않는 한, "및/또는"을 의미하는데 사용된다. 본원에 사용된 바와 같이 "또 다른"은 적어도 두 번째 이상을 의미할 수 있다.

[0033] 본원 전반에서, 용어 "약"은 값이 장치에 대한 고유한 오차 변동, 값을 결정하기 위해 사용된 방법, 또는 연구 대상체 사이에 존재하는 변동을 포함한다는 것을 나타내기 위해 사용된다.

[0034] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내는 상세한 설명 및 특정 예는 단지 예시로서 제공된다는 것이 이해되어야 하는데, 본 발명의 사상 및 범위 내의 다양한 변화 및 변형이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이기 때문이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 예시적인 구현예의 설명

[0036] 본 발명은 지질 조성물, 특정 측면에서 약 0의 순전하를 갖는 지질 조성물, 즉, 중성 지질 조성물을 통해 올리고뉴클레오타이드 (예컨대, 유전자 발현의 억제제)를 세포에 전달하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 지질 조성물은 비-전하 리포솜이다. 이러한 방법은 암을 치료하는데 효과적으로 사용될 수 있다.

[0037] I. 지질 및 리포솜

[0038] "리포솜"은 지질 이중층을 갖는 지질 함유 소포뿐만 아니라 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포획하거나 혼입할 수 있는 다른 지질 캐리어 입자를 의미하기 위해 본원에 사용된다. 이와 같이, 리포솜은 폐쇄된 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일라멜라, 다중라멜라, 및 다중소포성 지질 비히클을 포괄하는 일반 용어이다. 또한, 리포솜은 정의되지 않은 라멜라 구조를 가질 수 있다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소포성 구조를 갖는 것으로 특징지어질 수 있다. 다중라멜라 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다수의 지질 층을 갖는다. 이들은 인지질이 과량의 수용액에 현탁될 때 자연적으로 형성된다. 지질 성분은

폐쇄된 구조가 형성되기 전에 자가 재배열을 겪고 지질 이중층 사이에 물과 용해된 용질을 포획한다 (Ghosh and Bachhawat, 1991). 그러나, 본 발명은 또한 일반적인 소포성 구조보다 용액에서 상이한 구조를 갖는 조성물을 포괄한다. 예를 들면, 지질은 미셀 구조를 취하거나 단지 지질 분자의 비균일한 응집체로서 존재할 수 있다.

[0039] 리포솜은 다양한 약물을 병든 조직 내로 전달하기 위한 캐리어인 나노입자의 형태이다. 최적의 리포솜 크기는 표적 조직에 좌우된다. 중앙 조직에서, 혈관구조는 불연속적이며, 기공 크기는 100 내지 780 nm로 다양하다 (Siwak 등, 2002). 그에 비해, 정상 혈관 내피 내의 기공 크기는 대부분의 조직에서 <2 nm이고, 모세관후 세정 맥에서 6 nm이다. 음전하 리포솜은 중성 또는 양전하 리포솜보다 순환으로부터 더 빠르게 제거될 것으로 생각되지만; 최근 연구는 음전하 지질의 유형이 세망내피계 (RES)에 의한 리포솜 흡수율에 영향을 미친다는 것을 나타내었다. 예를 들면, 입체적으로 차폐되지 않은 음전하 지질 (포스파티딜세린, 포스파티드산, 및 포스파티딜글리세롤)을 함유하는 리포솜은 중성 리포솜보다 더 빠르게 제거된다. 흥미롭게도, 양이온성 리포솜 (1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 [DOTAP]) 및 양이온성-리포솜-DNA 복합체는 음이온성, 중성, 또는 입체적으로 안정화된 중성 리포솜보다 세포내이입을 통해 혈관신생 혈관의 내피 세포에 더 잘 결합하고 내재화된다 (Thurston 등, 1998; Krasnici 등, 2003). 양이온성 리포솜은 중앙 세포와의 표면 상호작용이 정전기적으로 유도된 결합 부위 장벽 효과를 생성하여 전달 시스템과 중앙 타원체와의 추가의 결합을 억제하기 때문에 중앙 세포를 위한 이상적인 전달 비히클이 아닐 수 있다 (Kostarelos 등, 2004). 그러나, 중성 리포솜은 더 양호한 중앙내 침투를 갖는 것으로 보인다. 특정 리포솜 제제에 대한 독성이 또한 우려되어 왔다. 양이온성 리포솜은 반응성 산소 중간체의 방출을 촉진하여 용량 의존적 독성 및 폐 염증을 유발하며, 이 효과는 DOTAP와 같은 1가 양이온성 리포솜보다 다가 양이온성 리포솜에서 더 두드러진다 (Dokka 등, 2000). 중성 및 음성 리포솜은 폐 독성을 나타내지 않는 것을 보인다 (Guitierrez-Puente 등, 1999). 양이온성 리포솜은 핵산을 효율적으로 흡수하면서 생체내 유전자 하향조절에 대한 제한된 성공을 이뤘는데, 아마도 이들의 안정적인 세포내 성질 및 그 결과 핵산 내용물의 방출 실패 때문이다. 중성 전하를 갖는 지질 또는 중성화된 전하를 갖는 지질 조성물, 예컨대, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)은 중성 특성 및 생체내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 전달 성공으로 인해 본원에서 사용된다.

[0040] 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 올리고뉴클레오타이드를 지질 및/또는 리포솜과 결합시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 올리고뉴클레오타이드는 리포솜의 수성 내부에 혼입되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오타이드 모두와 결합된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜에 포획되거나, 리포솜과 복합체화되거나, 지질을 함유하는 용액에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질 중의 현탁액으로 함유되거나, 미셀과 함께 함유되거나 복합체화되거나, 또는 지질과 결합될 수 있다. 본원에 제공된 리포솜 또는 리포솜/올리고뉴클레오타이드-결합된 조성물은 용액에서 임의의 특정 구조에 제한되지 않는다. 예를 들면, 이들은 이중층 구조로, 미셀로서, 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한 단순히 용액에서 산재되어, 아마도 크기 또는 모양이 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다.

[0041] A. 지질

[0042] 지질은 자연발생 또는 합성일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들면, 지질은 세포질에 자연적으로 존재하는 지방 소적뿐만 아니라 장쇄 지방족 탄화수소 및 이들의 유도체, 예컨대 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜, 및 알데히드를 함유하는 당업자에게 널리 알려진 화합물의 부류를 포함한다. 예는 지질 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)이다.

[0043] 본 발명의 지질 조성물은 인지질을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 단일 종류 또는 유형의 인지질이 지질 조성물, 예컨대 리포솜의 생성에 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 하나를 초과하는 종류 또는 유형의 인지질이 사용될 수 있다.

[0044] 인지질은 글리세로인지질 및 특정 스펅고지질을 포함한다. 인지질은, 비제한적으로, 디올레오일포스파티딜콜린 ("DOPC"), 달걀 포스파티딜콜린 ("EPC"), 디라우릴로일포스파티딜콜린 ("DLPC"), 디미리스토일포스파티딜콜린 ("DMPC"), 디팔미토일포스파티딜콜린 ("DPPC"), 디스테아로일포스파티딜콜린 ("DSPC"), 1-미리스토일-2-팔미토일 포스파티딜콜린 ("MPPC"), 1-팔미토일-2-미리스토일 포스파티딜콜린 ("PMPC"), 1-팔미토일-2-스테아로일 포스파티딜콜린 ("PSPC"), 1-스테아로일-2-팔미토일 포스파티딜콜린 ("SPPC"), 디라우릴로일포스파티딜글리세롤 ("DLPG"), 디미리스토일포스파티딜글리세롤 ("DMPG"), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 ("DPPG"), 디스테아로일포스파티딜글리세롤 ("DSPG"), 디스테아로일 스펅고미엘린 ("DSSP"), 디스테아로일포파티딜에탄올아민 ("DSPE"), 디올레오일포스파티딜글리세롤 ("DOPG"), 디미리스토일 포스파티드산 ("DMPA"), 디팔미토일 포스파티드산 ("DPPA"), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민 ("DMPE"), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민 ("DPPE"), 디미리스

토일 포스파티딜세린 ("DMPS"), 디팔미토일 포스파티딜세린 ("DPPS"), 뇌 포스파티딜세린 ("BPS"), 뇌 스펅고미엘린 ("BSP"), 디팔미토일 스펅고미엘린 ("DPSP"), 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC"), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 ("DAPC"), 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린 ("DBPC"), 1,2-디에이코세노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 ("DEPC"), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 ("DOPE"), 팔미토일오에오일 포스파티딜콜린 ("POPC"), 팔미토일오에오일 포스파티딜에틸리놀아민 ("POPE"), 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민, 및 디리놀레오일포스파티딜콜린을 포함한다.

[0045] 인지질은, 예를 들면, 포스파티딜콜린, 포스파티딜글리세롤, 및 포스파티딜에탄올아민을 포함하며; 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티딜콜린은 생리학적 조건 하에 (즉, 약 pH 7에서) 비전하성이기 때문에, 이들 화합물은 중성 리포솜을 생성하는데 특히 유용할 수 있다. 특정 구현예에서, 인지질 DOPC는 비-전하 리포솜 또는 지질 조성물을 생산하는데 사용된다. 특정 구현예에서, 인지질이 아닌 지질 (예컨대, 콜레스테롤)이 또한 사용될 수 있다.

[0046] 인지질은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 그러나, 천연 공급원으로부터의 인지질, 예컨대 달걀 또는 대두 포스파티딜콜린, 뇌 포스파티드산, 뇌 또는 식물 포스파티딜이노시톨, 심장 카디오리핀, 및 식물 또는 박테리아 포스파티딜에탄올아민은 특정 구현예에서 주요 포스파티드 (즉, 총 포스파티드 조성물의 50% 이상을 구성함)로서 사용되지 않는데, 이것은 생성된 리포솜의 불안정성 및 누출을 초래할 수 있기 때문이다.

[0047] B. 중성 리포솜

[0048] 본원에 사용된 바와 같이, "중성 리포솜 또는 지질 조성물" 또는 "비-전하 리포솜 또는 지질 조성물"은 본질적으로-중성 순전하 (실질적으로 비-전하)를 생성하는 하나 이상의 지질을 갖는 리포솜 또는 지질 조성물로서 정의된다. 특정 구현예에서, 중성 리포솜 또는 지질 조성물은 그 자체로 중성인 지질 및/또는 인지질을 주로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 양친매성 지질은 중성 리포솜 또는 지질 조성물 내로 혼입될 수 있거나 이를 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 중성 리포솜은 양전하 및 음전하 지질을 조합함으로써 생성될 수 있고, 이로써 이들 전하가 실질적으로 서로를 상쇄하여, 본질적으로-중성 순전하를 생성할 수 있다. "본질적으로 중성" 또는 "본질적으로 비-전하"는 주어진 집단 (예컨대, 리포솜의 집단) 내의 만약에 있다면 많지 않은 지질이 또 다른 성분의 반대 전하에 의해 상쇄되지 않는 전하를 포함한다 (예컨대, 10% 미만, 보다 바람직하게는 5% 미만, 및 가장 바람직하게는 1% 미만의 성분은 상쇄되지 않는 전하를 포함함)는 것을 의미한다. 본 발명의 특정 구현예에서, 조성물의 지질 성분이 본질적으로 중성이지만 리포솜의 형태가 아닌 조성물이 제조될 수 있다.

[0049] 리포솜의 크기는 합성 방법에 따라 다양하다. 수용액에 현탁된 리포솜은 일반적으로 구형 소포 모양이며, 지질 이중층 분자의 하나 이상의 동심 층을 가질 수 있다. 각각의 층은 식 XY로 표시되는 분자의 평행 배열로 구성되며, 상기 식에서 X는 친수성 모이어티이고, Y는 소수성 모이어티이다. 수성 현탁액에서, 동심 층은 친수성 모이어티가 수성 상과 접촉된 상태를 유지하는 경향이 있고 소수성 영역이 자기 결합하는 경향이 있도록 배열된다. 예를 들면, 수성 상이 리포솜 내부 및 외부 모두에 존재할 때, 지질 분자는 배치 XY-YX의 라멜라로 알려진 이중 층을 형성할 수 있다. 하나를 초과하는 지질 분자의 친수성 및 소수성 부분이 서로 결합될 때 지질의 응집체가 형성될 수 있다. 이러한 응집체의 크기 및 모양은 많은 상이한 변수, 예컨대 용매의 특성 및 용액 중에 다른 화합물의 존재에 따라 달라질 것이다.

[0050] 본 발명의 범위 내의 리포솜은 하기에 따라 제조될 수 있다: 공지된 실험실 기술, 예를 들면, Bangham 등 (1965)의 방법 (그 내용은 본원에 참고로 포함됨); Gregoriadis (1979)의 방법 (그 내용은 본원에 참고로 포함됨); Deamer 및 Uster (1983)의 방법 (그 내용은 참고로 포함됨); 및 Szoka 및 Papahadjopoulos (1978)에 의해 기재된 역상 증발 방법. 전술한 방법은 수성 물질을 포획하는 이들 각각의 능력 및 이들 각각의 수성 공간-대-지질 비율이 상이하다.

[0051] 특정 구현예에서, 중성 리포솜은 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 전달하는데 사용될 수 있다. 중성 리포솜은 단일 유전자의 번역의 억제에 대한 단일 종의 올리고뉴클레오타이드를 함유할 수 있거나, 또는 중성 리포솜은 다수의 유전자의 번역의 억제에 대한 다수의 종의 올리고뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 또한, 중성 리포솜은 또한 올리고뉴클레오타이드 외에도 화학치료제를 함유할 수 있고; 따라서, 특정 구현예에서, 화학치료제 및 올리고뉴클레오타이드가 동일한 또는 별개의 조성물로 세포 (예컨대, 인간 대상체 내의 암성 세포)에 전달될 수 있다.

[0052] 건조된 지질 또는 동결건조된 리포솜은 탈수되고 하기로 적절한 농도로 재구성될 수 있다: 적합한 용매 (예컨대, DPBS 또는 Hepes 완충제). 이후, 상기 혼합물은 볼텍스 혼합기에서 격렬하게 진탕될 수 있다. 리포솜

은 적절한 총 인지질 농도 (예컨대, 약 10-200 mM)로 재현탁될 수 있다. 캡슐화되지 않은 올리고뉴클레오타이드는 29,000 g에서의 원심분리에 의해 제거될 수 있고, 리포솜 펠렛은 세척된다. 대안적으로, 캡슐화되지 않은 올리고뉴클레오타이드는 과량의 용매에 대해 투석화함으로써 제거될 수 있다. 캡슐화된 올리고뉴클레오타이드의 양은 표준 방법에 따라 결정될 수 있다.

II. 유전자 발현의 억제

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

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

III. 핵산

본 발명은 중성 리포솜을 통해 올리고뉴클레오타이드를 전달하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 올리고뉴클레오타이드는 핵산으로 구성되기 때문에, 핵산에 관한 방법 (예컨대, 핵산의 생산, 핵산의 변형, 등)이 올리고뉴클레오타이드에 대해서도 사용될 수 있다.

용어 "핵산"은 본 기술분야에서 널리 알려져 있다. 본원에 사용된 바와 같이 "핵산"은 일반적으로 핵염기를 포함하는, DNA, RNA, 또는 이의 유도체 또는 유사체의 분자 (즉, 가닥)를 지칭한다. 이러한 정의는 단일 가닥의 핵산 또는 이중 가닥의 핵산을 지칭한다. 이중 가닥의 핵산은 완전히 상보적인 결합에 의해 형성될 수 있으나; 일부 구현예에서, 이중 가닥의 핵산은 부분적인 또는 실질적인 상보적인 결합에 의해 형성될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 단일 가닥의 핵산은 접두사 "ss"로 표시될 수 있고 이중 가닥의 핵산은 접두사 "ds"로 표시될 수 있다.

A. 핵염기

본원에 사용된 바와 같이 "핵염기"는 헤테로사이클릭 염기, 예를 들면, 적어도 하나의 자연발생 핵산 (즉, DNA 및 RNA)에서 발견되는 자연발생 핵염기 (즉, A, T, G, C 또는 U), 및 상기 핵염기의 자연발생 또는 비-자연발생 유도체(들) 및 유사체를 지칭한다. 핵염기는 일반적으로 하기와 하나 이상의 수소 결합을 형성할 수 있다 (즉, "어닐링" 또는 "혼성화"): 자연발생 핵염기 쌍형성 (예컨대, A 및 T, G 및 C, 및 A 및 U 사이의 수소 결합)을 대체할 수 있는 방식으로 적어도 하나의 자연발생 핵염기. 핵염기는 본원에 기재되거나 당업자에게 알려진 임의의 화학적 또는 천연 합성 방법을 사용하여, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드에 포함될 수 있다.

"퓨린" 및/또는 "피리미딘" 핵염기(들)는 자연발생 퓨린 및/또는 피리미딘 핵염기 및 또한 이의 유도체(들) 및 유사체(들)를 포괄하며, 이는 비제한적으로 알킬, 카르복시알킬, 아미노, 하이드록실, 할로젠 (즉, 플루오로, 클로로, 브로모, 또는 아이오도), 티올, 또는 알킬티올 모이어티 중 하나 이상에 의해 치환된 퓨린 또는 피리미딘을 포함한다. 바람직한 알킬 (예컨대, 알킬, 카복시알킬, 등) 모이어티는 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 내지 약 6개의 탄소 원자를 포함한다. 퓨린 또는 피리미딘의 다른 비제한적인 예는 데아자퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 5-플루오로우라실, 잔틴, 하이포잔틴, 8-브로모구아닌, 8-클로로구아닌, 브로모틸린, 8-아미노구아닌, 8-하이드록시구아닌, 8-메틸구아닌, 8-티오구아닌, 아자구아닌, 2-아미노퓨린, 5-에틸시토신, 5-메틸시토신, 5-브로모우라실, 5-에틸우라실, 5-아이오도우라실, 5-클로로우라실, 5-프로필우라실, 티오우라실, 2-메틸아데닌, 메틸티오아데닌, N,N-디에틸아데닌, 아자아데닌, 8-브로모아데닌, 8-하이드록시아데닌, 6-하이드록시아미노퓨린, 6-티오피린, 4-(6-아미노핵실/시토신) 등을 포함한다. 퓨린 및 피리미딘 유도체 또는 유사체는, 비제한적으로 하기 (약어/변형된 염기설명)를 포함한다: ac4c/4-아세틸시티딘, Mam5s2u/5-메톡시아미노메틸-2-티오우리딘, Chm5u/5-(카르복시하이드록실메틸) 우리딘, Man q/베타, D-만노실퀴오신, Cm/2' -O-메틸시티딘,

Mcm5s2u/5-메톡시카보닐메틸-2-티오우리딘, Cmm5s2u/5-카르복시메틸아미노-메틸-2-티오우리딘, Mcm5u/5-메톡시카보닐메틸우리딘, Cmm5u/5-카르복시메틸아미노메틸우리딘, Mo5u/5-메톡시우리딘, D/디하이드로우리딘, Ms2i6a, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데노신, Fm/2' -O-메틸슈도우리딘, Ms2t6a/N-((9-베타-D-리보푸라노실-2-메틸티오픈-6-일)카르바모일)트레오닌, Gal q/베타,D-갈락토실퀴오신, Mt6a/N-((9-베타-D-리보푸라노실퓨린-6-일)N-메틸-카르바모일)트레오닌, Gm/2' -O-메틸구아노신, Mv/우리딘-5-옥시아세트산 메틸에스테르, I/이노신, o5u/우리딘-5-옥시아세트산 (v), I6a/N6-이소펜테닐아데노신, Osyw/와이부토신, m1a/1-메틸아데노신, P/슈도우리딘, m1f/1-메틸슈도우리딘, Q/퀴오신, m1g/1-메틸구아노신, s2c/2-티오시티딘, m1I/1-메틸이노신, s2t/5-메틸-2-티오우리딘, m22g/2,2-디메틸구아노신, s2u/2-티오우리딘, m2a/2-메틸아데노신, s4u/4-티오우리딘, m2g/2-메틸구아노신, T/5-메틸우리딘, m3c/3-메틸시티딘, t6a/N-((9-베타-D-리보푸라노실퓨린-6-일)카르바모일)트레오닌, m5c/5-메틸시티딘, Tm/2' -O-메틸-5-메틸우리딘, m6a/N6-메틸아데노신, Um/2' -O-메틸우리딘, m7g/7-메틸구아노신, Yw/와이부토신, Mam5u/5-메틸아미노메틸우리딘, 또는 X/3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘, (acp3)u.

[0062] B. 뉴클레오시드

[0063] 본원에 사용된 바와 같이, "뉴클레오시드"는 핵염기 링커 모이어티에 공유 결합된 핵염기를 포함하는 개별적인 화학적 단위를 지칭한다. "핵염기 링커 모이어티"의 비제한적인 예는 5-탄소 원자를 포함하는 당 (즉, "5-탄소 당")이며, 이는 비제한적으로 데옥시리보스, 리보스, 아라비노스, 또는 5-탄소 당의 유도체 또는 유사체를 포함한다. 5-탄소 당의 유도체 또는 유사체의 비제한적인 예는 2' '-플루오로-2' '-데옥시리보스 또는 당 고리에서 탄소가 산소 원자로 치환된 카르보사이클릭 당을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "모이어티"는 일반적으로 더 큰 화학적 또는 분자적 구조의 더 작은 화학적 또는 분자적 성분을 지칭한다.

[0064] 핵염기와 핵염기 링커 모이어티와의 상이한 유형의 공유 결합(들)이 당염계에 공지되어 있다. 비제한적인 예로써, 퓨린 (즉, A 또는 G) 또는 7-테아자퓨린 핵염기를 포함하는 뉴클레오시드는 전형적으로 퓨린 또는 7-테아자퓨린의 9 위치와 5-탄소 당의 1' '-위치와의 공유 결합을 포함한다. 또 다른 비제한적인 예에서, 피리미딘 핵염기 (즉, C, T, 또는 U)를 포함하는 뉴클레오시드는 전형적으로 피리미딘의 1 위치와 5-탄소 당의 1' '-위치와의 공유 결합을 포함한다 (Kornberg 및 Baker, 1992).

[0065] C. 뉴클레오타이드

[0066] 본원에 사용된 바와 같이, "뉴클레오타이드"는 "백본 연결"을 추가로 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다. 백본 연결은 일반적으로 뉴클레오타이드를 뉴클레오타이드를 포함하는 또 다른 분자에 공유 결합시키거나, 또는 또 다른 뉴클레오타이드에 공유 결합시켜 핵산을 형성한다. 자연발생 뉴클레오타이드 내의 "백본 연결"은 전형적으로 5-탄소 당에 공유 결합된 포스페이트 모이어티 (예컨대, 포스포디에스테르 백본 연결)를 포함한다. 백본 모이어티의 부착은 전형적으로 5-탄소 당의 3' - 또는 5' '-위치에서 일어난다. 그러나, 특히 뉴클레오타이드가 자연발생 5-탄소 당 또는 포스페이트 모이어티의 유도체 또는 유사체를 포함할 때, 다른 유형의 부착이 당염계에 알려져 있다.

[0067] D. 핵산 유사체

[0068] 핵산은 자연발생 핵산 내에 존재할 수 있는 핵염기, 핵염기 링커 모이어티, 및/또는 백본 연결을 포함하거나 전적으로 이들로 구성될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이 "유도체"는 자연발생 분자의 화학적으로 변형되거나 변경된 형태를 지칭하는 반면, 용어 "모방체" 또는 "유사체"는 자연발생 분자 또는 모이어티와 구조적으로 유사하거나 유사하지 않을 수 있지만, 유사한 기능을 보유하는 분자를 지칭한다. 핵염기, 뉴클레오시드, 및 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체는 당염계에 널리 알려져 있다.

[0069] 5-탄소 당 및/또는 백본 연결 유도체 또는 유사체를 포함하는 뉴클레오시드, 뉴클레오타이드, 또는 핵산의 비제한적인 예는 하기에서의 것을 포함한다: 미국 특허 제5,681,947호: dsDNA와 삼중 나선을 형성하고/하거나 dsDNA의 발현을 방지하는 퓨린 유도체를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 기술함; 미국 특허 제5,652,099호 및 제5,763,167호: DNA 또는 RNA, 특히 형광 핵산 프로브로서 사용하기 위한, DNA 또는 RNA에서 발견된 뉴클레오시드의 형광 유사체를 포함하는 핵산을 기술함; 미국 특허 제5,614,617호: 향상된 뉴클레아제 안정성을 갖는 피리미딘 고리 상에 치환을 갖는 올리고뉴클레오타이드 유사체를 기술함; 미국 특허 제5,670,663호, 제5,872,232호 및 제5,859,221호: 핵산 검출에서 사용된 변형된 5-탄소 당 (즉, 변형된 2' '-데옥시푸라노실 모이어티)을 갖는 올리고뉴클레오타이드 유사체를 기술함; 미국 특허 제5,446,137호: 혼성화 분석에서 사용될 수 있는 수소 이외의 치환체로 4' 위치에서 치환된 적어도 하나의 5-탄소 당 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 기술함; 미국 특허 제5,886,165호: 3' -5' ' 백본 연결을 갖는 데옥시리보뉴클레오타이드 및 2' -5' ' 백본 연결을 갖는

리보뉴클레오타이드를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 기술함; 미국 특허 제5,714,606호: 백본 연결의 3' '-위치 산소가 핵산의 뉴클레아제 내성을 향상시키기 위해 탄소로 치환된 변형된 백본 연결을 기술함; 미국 특허 제 5,672,697호: 뉴클레아제 내성을 향상시키는 하나 이상의 5' 메틸렌 포스포네이트 백본 연결을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 기술함; 미국 특허 제5,466,786호 및 제5,792,847호: 향상된 뉴클레아제 안정성 및 약물 또는 검출 모이어티를 전달하는 능력을 제공하기 위해 올리고뉴클레오타이드의 2' 탄소에 약물 또는 라벨을 포함할 수 있는 치환체 모이어티의 연결을 기술함; 미국 특허 제5,223,618호: 세포 흡수, 뉴클레아제에 대한 내성, 및 표적 RNA에의 혼성화를 향상시키기 위해 인접한 5-탄소 당 모이어티의 4' 위치 및 3' 위치를 부착시키는 2 또는 3 탄소 백본 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드 유사체를 기술함; 미국 특허 제5,470,967호: 핵산 혼성화 프로브로서 유용한 적어도 하나의 설파메이트 또는 설파미드 백본 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 기술함; 미국 특허 제5,378,825호, 제5,777,092호, 제5,623,070호, 제5,610,289호 및 제5,602,240호: 개선된 뉴클레아제 내성, 세포 흡수, 및 RNA 발현의 조절에 사용된 포스포디에스테르 백본 연결을 대체하는 3개 또는 4개 원자 백본 연결 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 기술함; 미국 특허 제5,858,988호: 막 투과성 및 안정성을 향상시키기 위해 올리고뉴클레오타이드의 2' -O 위치에 부착된 소수성 캐리어 제제를 기술함; 미국 특허 제5,214,136호: DNA 또는 RNA에의 향상된 혼성화; 뉴클레아제에 대한 향상된 안정성을 갖는 5' 말단의 안트라퀴논에 접합된 올리고뉴클레오타이드를 기술함; 미국 특허 제5,700,922호: DNA가 향상된 뉴클레아제 내성, 결합 친화성, 및 RNase H를 활성화시키는 능력을 위해 2' '-데옥시-에리트로-펜토파라노실 뉴클레오타이드를 포함하는 PNA-DNA-PNA 키메라를 기술함; 미국 특허 제5,708,154호: DNA-RNA 혼성화물을 형성하는 DNA에 연결된 RNA를 기술함; 미국 특허 제5,908,845호: 하나 이상의 핵염기가 폴리테르 백본 내의 키랄 탄소 원자에 연결된 폴리에테르 핵산을 기술함; 미국 특허 제5,786,461호, 제5,891,625호, 제5,786,461호, 제5,773,571호, 제5,766,855호, 제5,736,336호, 제5,719,262호, 제5,714,331호, 제5,539,082호, 및 WO 제92/20702호: 5-탄소 당이 아닌 핵염기 모이어티, 핵염기 링커 모이어티 (예컨대, 아자 질소 원자, 아미도 및/또는 우레이도 테더 (tether)), 및/또는 포스포이트 백본 연결이 아닌 백본 연결 (예컨대, 아미노에틸글리신, 폴리아미드, 폴리에틸, 폴리티오아미드, 폴리설파아미드, 또는 폴리설파아미드 백본 연결)을 포함하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드를 일반적으로 포함하는 펩타이드 핵산 (PNA 또는 펩타이드 기반 핵산 유사체; 또는 PENAM)을 기술함; 및 미국 특허 제5,855,911호: 소수성, 뉴클레아제 내성 p-에톡시 백본 연결을 기술함.

[0070] 핵산 유사체의 다른 변형 및 용도는 당업계에 알려져 있으며, 핵산 유사체의 이러한 기술 및 유형이 본 발명에 사용될 수 있음이 예상된다.

[0071] E. 핵산의 제조

[0072] 핵산은 화학적 합성, 효소적 생산 또는 생물학적 생산과 같은 당업계에 알려진 임의의 기술에 의해 제조될 수 있다. 합성 핵산 (예컨대, 합성 올리고뉴클레오타이드)의 비제한적인 예는 본원에 참고로 포함된 EP 제266,032호에 기재된 바와 같은 포스포트리에스테르, 포스파이트, 또는 포스포르아미다이트 화학 및 고체상 기술을 사용한 시험관내 화학적 합성에 의해, 또는 하기에 기재된 바와 같은 데옥시뉴클레오시드 H-포스포네이트 중간체에 의해 제조된 핵산을 포함한다: 각각 본원에 참고로 포함된 Froehler 등 (1986) 및 미국 특허 제5,705,629호. 본 발명의 방법에서, 하나 이상의 종의 올리고뉴클레오타이드가 사용될 수 있다. 다양한 올리고뉴클레오타이드 합성 기전이 하기에 개시되었고: 예를 들면, 미국 특허 제4,659,774호, 제4,816,571호, 제5,141,813호, 제5,264,566호, 제4,959,463호, 제5,428,148호, 제5,554,744호, 제5,574,146호, 제5,602,244호, 이들 각각은 본원에 참고로 포함되어 있다.

[0073] F. 핵산의 정제

[0074] 핵산은 폴리아크릴아미드 겔, 염화세슘 원심분리 구배, 또는 by 당업자에게 알려진 임의의 다른 수단에 의해 정제될 수 있다 (예를 들면, 본원에 참고로 포함된 Sambrook 등 (2001) 참고).

[0075] 특정 구현예에서, 본 발명은 단리된 핵산인 핵산에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된 핵산"은 하나 이상의 세포의 총 게놈 및 전사된 핵산의 대부분이 없도록 단리된, 또는 이들이 없는 핵산 분자 (예컨대, RNA 또는 DNA 분자)를 지칭한다. 특정 구현예에서, "단리된 핵산"은 세포 성분 또는 시험관내 반응 성분, 예를 들면, 거대분자, 예컨대 지질 또는 단백질, 작은 생물학적 분자 등의 대부분이 없도록 단리된, 또는 이들이 없는 핵산을 지칭한다.

[0076] G. 혼성화

[0077] 본원에 사용된 바와 같이, "혼성화," "혼성화하다" 또는 "혼성화가능한"은 이중 또는 삼중 가닥의 분자 또는 부

분적인 이중 또는 삼중 가닥 성질을 갖는 분자의 형성을 의미하는 것으로 이해된다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "어닐링"은 "혼성화하다"와 동의어이다.

[0078] 본원에 사용된 바와 같이 "엄격한 조건(들)" 또는 "높은 엄격성"은 상보적인 서열(들)을 함유하는 하나 이상의 핵산 가닥(들) 사이에 또는 내부에서 혼성화를 허용하지만 무작위 서열의 혼성화를 배제하는 조건이다. 엄격한 조건은 핵산 및 표적 가닥 사이의 미스매치 (존재하는 경우)를 거의 허용하지 않는다. 이러한 조건은 당업자에게 널리 알려져 있으며, 높은 선택성이 요구되는 적용에 바람직하다.

[0079] 엄격한 조건은 약 50° C 내지 약 70° C의 온도에서 약 0.02 M 내지 약 0.15 M NaCl에 의해 제공되는 것과 같은, 낮은 염 및/또는 높은 온도 조건을 포함할 수 있다. 원하는 엄격성의 온도 및 이온 강도는 특정 핵산(들)의 길이, 표적 서열(들)의 길이 및 핵염기 함량, 핵산(들)의 전하 조성, 및 혼성화 혼합물 내의 포름아미드, 테트라 메틸암모늄 클로라이드, 또는 다른 용매(들)의 존재 또는 농도에 의해 일부 결정되는 것으로 이해된다.

[0080] 또한 혼성화를 위한 이러한 범위, 조성 및 조건은 단지 비제한적인 예로써 언급되고, 특정 혼성화 반응에 대한 원하는 엄격성은 종종 하나 이상의 양성 또는 음성 대조군과 비교하여 경험적으로 결정되는 것으로 이해된다. 구상된 적용에 따라, 표적 서열에 대한 핵산의 다양한 선택성 정도를 달성하기 위해 다양한 조건의 혼성화를 이용하는 것이 바람직하다. 비제한적인 예에서, 엄격한 조건 하에 핵산에 혼성화하지 않는 관련된 표적 핵산의 확인 또는 단리는 저온 및/또는 높은 이온 강도에서의 혼성화에 의해 달성될 수 있다. 이러한 조건은 "낮은 엄격성" 또는 "낮은 엄격성 조건"으로 불리며, 낮은 엄격성의 비제한적인 예는 약 20° C 내지 약 50° C의 온도 범위에서 약 0.15 M 내지 약 0.9 M NaCl에서 수행된 혼성화를 포함한다. 물론, 낮은 또는 높은 엄격성 조건을 특정 용도에 맞게 추가로 변형하는 것은 당업자의 기술에 속한다.

[0081] IV. 리포솜 p-에톡시 안티센스 의약품 제조하는 방법

[0082] 리포솜 p-에톡시 안티센스 의약품은 2개의 cGMP 제품으로 구성되며, 이들 모두는 FDA 승인된 출시 기준으로 FDA가 요구하는 분석 증명서를 가지고 있다. 원료, 용매, 및 최종 의약품이 본원에 기재되어 있다. 제조시, 의약품은 하기 물질을 포함하는 호박색 또는 백색의 동결건조된 결정 또는 분말이다: 올리고뉴클레오타이드 (예컨대, p-에톡시 안티센스 약물 물질), 중성 지질 (예컨대, DOPC), 및 계면활성제 (예컨대, 폴리소르베이트 20). 환자에게 투여하기 위한 제제에서, 일반 식염수가 바이알에 첨가되며, 이때 내부에 혼입된 p-에톡시 안티센스와 함께 리포솜이 형성된다.

[0083] 완제품의 특정 물리적 특성 (예컨대, 용해도 및 소수성, 이는 이후에 식염수 중의 의약품 용해도, 리포솜 내로의 올리고의 혼입, 및 리포솜 입자 크기에 영향을 미침)은 p-에톡시 안티센스 약물 물질의 생산 동안 미리 결정된 p-에톡시 및 포스포디에스테르 아마이드이트 원료 혼합물을 사용하여 정의될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 백본에서 p-에톡시 분자의 수를 증가시키는 것은 분자를 더 소수성 (이는 더 큰 리포솜 입자를 생성함), 덜 극성, 및 덜 가용성으로 만든다. 올리고뉴클레오타이드는 더 많은 수의 p-에톡시 백본 연결로 인해 덜 가용성이 되므로, 재구성된 용액은 소수성이 너무 높아져 입자가 형성될 때까지 더 백색이 된다.

[0084] 리포솜 입자 크기에 대한 계면활성제 (폴리소르베이트 20)의 효과를 계면활성제의 양을 적정하여 결정하였다. 폴리소르베이트 20이 없는 경우, 입자의 2.8%만이 300 nm 이하의 직경을 가지고 있었다. 1x 폴리소르베이트 20 (총 리포솜 p-에톡시 안티센스 의약품의 약 5%)이 존재하는 경우, 입자의 12.5%가 300 nm 이하의 직경을 가지고 있었다. 3x-10x 폴리소르베이트 20을 첨가한 경우, 입자의 약 20%가 300 nm 이하의 직경을 가지고 있었다. 따라서, 1x에서 3x로 계면활성제의 증가는 입자 크기를 감소시킨다.

[0085] V. 리포솜 P-에톡시 안티센스 의약품 시험하는 방법

[0086] **제조된 의약품의 육안 검사:** 제조 후, 의 pharm을 함유하는 샘플 바이알을 선택하고 육안으로 검사한다. 액체의 부재는 필수적이며, 바이알의 바닥에 있는 호박색 결정이 허용가능하고, 백색의 응집된 분말 또는 외관의 수용이 증가하면, 최상의 결과이다. 백색 외관은 높은 표면적 대 질량비를 갖는 더 우수한 건조 공정을 나타내며, 이는 사용을 위한 재구성에 매우 도움이 된다.

[0087] **환자 IV를 위한 준비가 된 재구성된 약물의 육안 검사:** 일반 식염수를 제조된 리포솜 P-에톡시 안티센스 의 pharm을 함유하는 바이알에 첨가하고 흔들어 약물 결정 또는 분말이 완전히 용해된 용액으로 재구성한다. 3가지 주요 관찰이 이루어진다: 1) 결정 또는 분말이 완전히 용해된 것, 2) 비용해 물질의 백색 덩어리가 없는 것, 및 3) 외관이 유백색 또는 탈지유 외관인 것. 재구성된 액체의 외관이 더 푸를수록 더 좋은데, 이것은 청색 스펙트럼에서 빛을 반사하는 더 작은 리포솜 입자 크기를 표시하기 때문이다.

- [0088] 질량 분석법: 질량 분석법 (mass spec)은 샘플 내의 다양한 질량의 프로파일을 표시하는데 사용된다. p-에톡시 안티센스 물질이 생산될 때, 질량 분석이 샘플 상에서 진행된다. 결과는 "x" 축 상에서 오른쪽으로 증가하는 질량을 갖는 그리드 상에 존재하는 물질의 피크, 및 위로 증가하는 "y" 축 상의 상대적 질량 존재비를 나타낸다. 샘플의 프로파일을 분석하여 p-에톡시 샘플 내의 p-에톡시 백본의 상대적 양을 결정하며, 피크의 프로파일은 (가장 먼 곳에서 시작하여 우측으로) p-에톡시 연결로 구성된 모든 백본을 갖는 전체 길이 물질을 나타내며, 좌측으로 이동하는 다음 피크는 p-에톡시 결실을 갖는 하나의 백본을 갖는 전체 길이를 나타내고 (따라서, 에틸은 நீ아웃되고 결과는 정상 포스포디에스테르 백본 연결임), 계속된다는 것을 인식한다. 우측으로 이동된 질량 분석 패턴은 더 많은 p-에톡시 백본을 가지며, 따라서 더 소수성이고 덜 가용성인 특성을 갖는 p-에톡시 샘플을 나타내고; 마찬가지로 좌측으로 이동된 질량 분석 패턴은 반대 효과를 갖는 p-에톡시 샘플을 나타낸다. 샘플의 질량 분석 차트의 검사는 또한 제조 과정 중의 여과가 여과된 의약품에 존재하는 올리고뉴클레오타이드 조성에 임의의 부작용을 미치는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0089] UV 시험: 자외선 시험은 샘플에 존재하는 올리고뉴클레오타이드의 질량을 결정하는데 사용된다. 올리고뉴클레오타이드는 260 나노미터 범위의 빛을 흡수한다. 그 결과, 완성된 재구성된 의약품의 UV 시험은 의약품의 바이알 내의 올리고뉴클레오타이드 약물 물질의 양을 결정하는 방법으로서 사용되게 되었다. 제조 개발 및 혁신 면에서, UV 시험은 용액 중에 더 적은 올리고뉴클레오타이드와 이에 따라 더 낮은 UV 판독을 야기하는, 제조시 여과 동안 경험하는 문제 또는 p-에톡시 안티센스 약물 물질의 불량한 용해도가 있는지 결정하는데 사용되었다. 상기 방법은 검증될 것이며 최종 제품 출시 시험의 일부가 될 가능성이 높다.
- [0090] 리포솜 입자 크기: 완성된 의약품의 바이알을 재구성하고 리포솜 입자 크기에 대해 시험한다. 결과는 종종 중심 점, 꼬리 및 평균 값을 갖는 대략 정규 분포 또는 대부분의 입자의 대략 정규 분포 및 2차 입자 형성 효과로부터 비롯되는 더 작은 리포솜 입자의 더 작은 이차 피크이다. 리포솜 입자는 너무 크지 않는 것이 중요한데, 이들은 환자에서 부작용을 야기할 수 있기 때문이다 (예를 들면, 폐 내의 더 작은 혈관에서 혈류 문제를 일으킴). 그 결과, 의약품 출시 기준은 입자 크기 시험이 리포솜의 90%가 약 5 마이크로 이하의 크기 또는 약 3 마이크로 이하의 크기인 것을 나타내는 것을 포함한다. 또한, 더 작은 리포솜이 바람직한데, 이것이 세포 내로 더 잘 흡수될 수 있고, 다음으로, 더 작은 리포솜이 혈관 기공을 침투함으로써 리포솜을 종양 내부로 침투시켜 리포솜 p-에톡시 안티센스 의약품의 치료 효과를 증가시킬 수 있기 때문이다.
- [0091] **VI. 치료 방법**
- [0092] 본 발명의 특정 측면은 암, 자가면역 질환, 또는 감염병과 같은 질환을 치료하기 위한 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체 (예컨대, 비-전하 리포솜 내로 혼입된 올리고뉴클레오타이드)를 제공한다. 특히, 올리고뉴클레오타이드는 인간 뉴클레오타이드 서열과 염기 쌍을 이루는 서열을 가질 수 있으므로, 인간 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 단백질의 발현을 억제할 수 있다.
- [0093] "치료" 및 "치료하는"은 질환 또는 건강 관련 병태의 치료적 이익을 얻기 위한 목적으로 대상체에게 치료제를 투여 또는 적용하거나 절차 또는 양식을 수행하는 것을 지칭한다. 예를 들면, 치료는 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체의 약제학적 유효량의 투여를 포함할 수 있다.
- [0094] "대상체" 및 "환자"는 인간 또는 비-인간, 예컨대 영장류, 포유동물, 및 척추동물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 대상체는 인간이다.
- [0095] 본원 전반에 사용된 바와 같은 용어 "치료적 이익" 또는 "치료적으로 효과적인"은 이 병태의 의학적 치료와 관련하여 대상의 웰빙을 촉진하거나 향상시키는 어느 것을 지칭한다. 이것은, 비제한적으로, 질환의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도의 감소를 포함한다. 예를 들면, 암 치료는, 예를 들면, 종양 크기의 감소, 종양 침윤성의 감소, 암 성장률의 감소, 또는 전이의 예방을 포함할 수 있다. 암 치료는 또한 암을 가진 대상체의 생존을 연장시키는 것을 지칭할 수 있다. 자가면역 질환의 치료는, 예를 들면, 원하지 않는 면역 반응이 있는 자기 항원의 발현을 감소시키는 것, 원하지 않는 면역 반응이 있는 자기 항원의 내성을 유도하는 것, 또는 자기 항원에 대한 면역 반응을 억제하는 것을 포함할 수 있다. 감염병의 치료는, 예를 들면, 감염원을 제거하는 것, 감염원의 수준을 감소시키는 것, 또는 감염원의 수준을 특정 수준으로 유지시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0096] 본 발명의 치료 방법이 유용한 종양은 고형 종양, 혈액학적 종양, 전이성 암, 또는 비-전이성 암에서 발견되는 것과 같은 임의의 악성 세포 유형을 포함한다. 예시적인 고형 종양은 췌장, 결장, 맹장, 식도, 위장관, 잇몸, 간, 피부, 위, 고환, 혀, 자궁, 위, 뇌, 머리, 목, 난소, 신장, 후두, 육종, 골, 폐, 방광, 흑색종, 전립선, 및 유방으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기관의 종양을 포함할 수 있다. 예시적인 혈액학적 종양은 골수의

종양, T 또는 B 세포 악성 종양, 백혈병, 림프종, 모세포종, 골수종 등을 포함한다. 본원에 제공된 방법을 사용하여 치료될 수 있는 암의 추가의 예는, 비제한적으로, 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 백혈병, 편평 세포암, 폐암 (소-세포 폐암, 비-소 세포 폐암, 폐의 선암종, 및 폐의 편평 암종 포함), 복막의 암, 간세포암, 위암 (위장암 및 위장 간질암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁암, 난소암, 간암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액샘 암종, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 다양한 유형의 두경부 암, 흑색종, 표재 확산성 흑색종, 악성 흑자 흑색종, 선단 흑자성 흑색종, 결절성 흑색종, 뿐만 아니라 B-세포 림프종 (저등급/소포성 비호지킨 림프종 (NHL); 소 림프구성 (SL) NHL; 중간 등급/소포성 NHL; 중간 등급 미만성 NHL; 고등급 면역모세포성 NHL; 고등급 림프모구성 NHL; 고등급 소 비-절단 세포 NHL; 큰 종양(bulky disease) NHL; 맨틀 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 포함), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 모세포 백혈병, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병 (AML) 및 만성 골수성 백혈병을 포함한다.

[0097]

암은 구체적으로 하기 조직학적 유형일 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다, : 신생물, 악성; 암종; 암종, 미분화; 거대 및 방추 세포 암종; 소 세포 암종; 유두 암종; 편평 세포 암종; 림프상피 암종; 기저 세포 암종; 모기질 암종; 이행 세포 암종; 유두 이행 세포 암종; 선암종; 가스트린종, 악성; 담관암종; 간세포 암종; 조합된 간세포 암종 및 담관암종; 육주상의 선암종; 선양 양성 암종; 선종성 용종에서의 선암종; 선암종, 가족성 대상 용종증; 고형 암종; 유암종, 악성; 세기관지 폐포 선암종; 유두 선암종; 협색소성 암종; 호산성 암종; 호산세포성 선암종; 호염기성 암종; 투명 세포 선암종; 과립 세포 암종; 여포성 선암종; 유두 및 여포성 선암종; 비피낭 경화성 암종; 부신 피질 암종; 자궁내막양 암종; 피부 부속기 암종; 아포크린 선암종; 피지선 선암종; 이구선 선암종; 점액표피양 암종; 낭선암종; 유두 낭선암종; 유두 장액 낭선암종; 점액성 낭선암종; 점액 선암종; 인환 세포 암종; 침윤성 유관 암종; 수질성 암종; 소엽성 암종; 염증성 암종; 파제트병, 유방; 선방 세포 암종; 선편평 암종; 편평 상피화생을 동반한 선암종; 흉선종, 악성; 난소 기질 종양, 악성; 협막세포종, 악성; 과립막 세포 종양, 악성; 남성모세포종, 악성; 세르톨리 세포 암종; 라이디히 세포 종양, 악성; 지질 세포 종양, 악성; 부신경절종, 악성; 유방외 부신경절종, 악성; 갈색세포종; 사구맥관육종; 악성 흑색종; 무색소성 흑색종; 표재 확산성 흑색종; 거대 색소모반 중 악성 흑색종; 상피 세포 흑색종; 청색 모반, 악성; 육종; 섬유육종; 섬유조직구종, 악성; 점액육종; 지방육종; 평활근육종; 횡문근육종; 배아 횡문근육육종; 포상 횡문근육육종; 기질 육종; 혼합 종양, 악성; 췌장의 혼합 종양; 신모세포종; 간모세포종; 암육종; 간엽세포종, 악성; 브레너 종양, 악성; 엽상 종양, 악성; 활막 육종; 중피종, 악성; 난소고환종; 배아성 암종; 기형종, 악성; 난소갑상선종, 악성; 용모암종; 중신종, 악성; 혈관육종; 혈관내피종, 악성; 카포시 육종; 혈관주위세포종, 악성; 림프관육종; 골육종; 피질주위 골육종; 연골육종; 연골모세포종, 악성; 중간엽 연골육종; 뼈의 거대 세포 종양; 유잉 육종; 치성 종양, 악성; 법랑아세포 치성육종; 법랑아세포종, 악성; 법랑아세포성 섬유육종; 송과체종, 악성; 척색종; 신경교종, 악성; 뇌실막종; 성상세포종; 원형질성 성상세포종; 원섬유성 성상세포종; 성상모세포종; 교모세포종; 뿔지교종; 뿔지모세포종; 원시 신경외배엽성 육종; 신경절신경모세포종; 신경모세포종; 망막세포종; 후각 신경원성 종양; 수막종, 악성; 신경섬유육종; 신경초종, 악성; 과립 세포 종양, 악성; 악성 림프종; 호지킨병; 호지킨병; 부속아종; 악성 림프종, 소 림프구성; 악성 림프종, 거대 세포, 확산성; 악성 림프종, 여포성; 균상 식육종; 다른 특이성 비호지킨 림프종; 악성 조직구종; 다발성 골수종; 비만 세포 육종; 면역증식성 소장 질환; 백혈병; 림프구성 백혈병; 혈장 세포 백혈병; 적백혈병; 림프육종 세포 백혈병; 골수성 백혈병; 호염기성 백혈병; 호산성 백혈병; 단핵구성 백혈병; 비만 세포 백혈병; 거대핵모세포성 백혈병; 골수성 육종; 및 모세포 백혈병.

[0098]

본 발명의 치료 방법이 유용한 자가면역 질환은, 비제한적으로, 척추관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 반응성 관절염, 장병증성 관절염, 당뇨병, 쉐리악병, 자가면역 갑상선 질환, 자가면역 간 질환, 아디슨병, 이식 거부, 이식편대 숙주 질환, 숙주대 이식편 질환, 췌양성 대장염, 크론병, 과민성 장 질환, 염증성 장 질환, 류마티스성 관절염, 소아기 류마티스성 관절염, 가족성 지중해열, 근위축성 측삭 경화증, 쇼그렌 증후군, 조기 관절염, 바이러스성 관절염, 다발성 경화증, 또는 건선을 포함한다. 이러한 질환의 진단 및 치료는 문헌에 잘 설명되어 있다.

[0099]

본 발명의 치료 방법이 유용한 감염병은, 비제한적으로, 박테리아 감염, 바이러스 감염, 진균 감염, 및 기생충 감염을 포함한다. 예시적인 바이러스 감염은 B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 1, 인간 면역결핍 바이러스 2, 인간 유두종 바이러스, 단순 포진 바이러스 1, 단순 포진 바이러스 2, 대상 포진, 수두 대상포진, 콕사키바이러스 A16, 사이토메갈로바이러스, 에볼라 바이러스, 엔테로바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 한타 바이러스, 헨드라 바이러스, 바이러스 수막염, 호흡기 세포융합 바이러스, 로타바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 아데노바이러스, 및 인플루엔자 바이러스 감염을 포함한다. 예시적인 박테리아 감염은 클라미디아 트라코마티스, 리스테리아 모노사이토제네스, 헬리코박터 파일로리, 에스케리키아 콜리, 보렐리아

부르그도르페리, 레지오넬라 뉴모필리아, 마이코박테리아 종 (예컨대, *M. 투베르쿨로시스*, *M. 아비움*, *M. 인트라셀룰라레*, *M. 칸사이*, *M. 고르도네*), 스타필로코커스 아우레우스, 나이세리아 고도로에, 나이세리아 메닌자이티데스, 스트렙토코커스 피오제네스 (그룹 A 스트렙토코커스), 스트렙토코커스 아갈락티에 (그룹 B 스트렙토코커스), 스트렙토코커스 (비리단스 그룹), 스트렙토코커스 패칼리스, 스트렙토코커스 보비스, 스트렙토코커스 (혐기성 종), 스트렙토코커스 뉴모니에, 병원성 캄필로박터 sp., 엔테로코커스 sp., 헤모필러스 인플루엔제, 바실러스 안트라시스, 코리네박테리움 디프테리애, 코리네박테리움 종, 에리시켈로티릭스 류시오파티애, 클로스트리듐 퍼프린거스, 클로스트리듐 테타니, 엔테로박터 애로제네스, 클렙시엘라 뉴모니에, 파스투렐라 물토시다, 박테로이데스 종, 푸소박테리움 누클레아툼, 스트렙토바실러스 모닐리포르미스, 트레포네마 팔리듐, 트레포네마 퍼테누, 렙토스피라, 리켓시아, 악티노마이세스 이스라엘리, 쉬겔라 종 (예컨대, *S. 플렉스네리*, *S. 손나이*, *S. 디센테리애*), 및 살모넬라 종 감염을 포함한다. 예시적인 진균 감염은 칸디다 알비칸스, 칸디다 글라브라타, 아스페질러스 푸미가투스, 아스페질러스 테레우스, 크립토코커스 네오포르만스, 히스토플라스마 캡슐라툼, 콕시디오이데스 임피티스, 블라스토마이세스 테마티티디스, 및 클라미디아 이라코마티스 감염을 포함한다.

[0100] 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체는 다양한 양상으로 항종양, 항바이러스, 항박테리아, 항진균, 항기생충, 또는 항-자가면역 제제로서 본원에서 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명은 질환을 억제하거나 역전시키는 데 충분한 기간 동안 병에 걸린 세포의 집단을 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체의 치료적 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체의 사용 방법을 고려한다.

[0101] 일 구현예에서, 생체내 접촉은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체를 포함하는 생리학적으로 허용가능한 조성물의 치료적 유효량을 정맥내, 복강내, 피하내, 또는 종양내 주사에 의해 환자에게 투여함으로써 달성된다. 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체는 주사에 의해 또는 시간이 경과함에 따라 점진적인 주입에 의해 비경구로 투여될 수 있다.

[0102] 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체를 포함하는 치료용 조성물은 통상적으로, 예를 들면, 단위 용량의 주사에 의해서와 같이, 정맥내로 또는 피하내로 투여된다. 치료용 조성물에 관하여 사용될 때 용어 "단위 용량"은 대상체를 위한 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 필요한 희석제, 즉, 캐리어, 또는 비히클과 결합되어 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 활성 물질의 미리 결정된 양을 함유한다.

[0103] 조성물은 투여 제제와 양립가능한 방식으로, 그리고 치료적 유효량으로 투여된다. 투여될 양은 치료될 대상체, 활성 성분을 이용하는 대상체의 시스템의 능력, 및 원하는 치료 효과의 정도에 좌우된다. 투여될 필요가 있는 활성 성분의 정확한 양은 의사의 판단에 좌우되며 각 개인마다 다르다. 그러나, 전신 적용을 위한 적합한 투여량 범위가 본원에 개시되어 있으며, 이는 투여 경로에 좌우된다. 초기 및 부스터 투여를 위한 적합한 요법이 또한 고려되며, 이는 초기 투여 후 후속 주사 또는 다른 투여에 의한 1시간 이상의 시간 간격의 반복된 용량에 의해 전형화된다. 예시적인 다중 투여가 본원에 기재되어 있으며, 이는 폴리펩타이드의 높은 혈청 및 조직 수준을 계속 유지하는데 특히 바람직하다. 대안적으로, 혈중 농도를 생체내 요법을 위해 명시된 범위로 유지시키는데 충분한 연속적인 정맥내 주입이 고려된다.

[0104] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 질환을 치료하기 위해, 예컨대 종양 세포 성장을 억제하기 위해 또는 국소로 진전된 암 또는 전이성 암을 가진 암 환자에서 암 세포를 사멸하기 위해, 전신으로 또는 국소로 투여될 수 있음이 고려된다. 이것은 정맥내로, 척추강내로, 피하내로, 및/또는 복강내로 투여될 수 있다. 이것은 단독으로 또는 항-증식 약물과 조합하여 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 이것은 수술 또는 다른 절차 이전에 환자에서 암 부하를 감소시키기 위해 투여된다. 대안적으로, 이것은 임의의 나머지 암 (예컨대, 수술이 제거하지 못한 암)이 생존하지 않도록 수술 후에 투여될 수 있다.

[0105] 올리고뉴클레오타이드의 치료적 유효량은 원하는 효과를 달성하기 위해, 즉, 표적 단백질의 발현을 억제하기 위해 계산된 미리 결정된 양이다. 따라서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 투여를 위한 투여량 범위는 원하는 효과를 생성하기에 충분히 큰 투여량 범위이다. 투여량은 부정적인 부작용, 예컨대 과다점성 증후군, 폐 부종, 울혈성 심부전, 신경학상 효과 등을 일으킬 정도로 크지 않아야 한다. 일반적으로, 투여량은 환자의 연령, 환자의 병태, 환자의 성별, 및 환자에서 질환의 정도에 따라 달라질 것이며, 이는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 투여량은 임의의 합병증이 있는 경우 개별 의사에 의해 조정될 수 있다.

[0106] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 환자에게 비경구로, 예를 들면 정맥내, 동맥내, 근육내, 림프관내, 복강내, 피하내, 흉막내, 또는 척추강내 주사에 의해 투여되거나, 또는 생체외에서 사용될 수 있다. 바람직한 투여량은 5-25 mg/kg이다. 투여는 바람직하게는 암이 사라지거나 퇴행될 때까지 예정된 스케줄로 반복되며, 다른 형태의 요법과 함께 투여될 수 있다.

[0107] VII. 약제학적 제제

[0108] 리포솜을 포함하는 약제학적 조성물은 일반적으로 멸균된 약제학적으로 허용가능한 캐리어 또는 희석제, 예컨대 물 또는 식염수 용액을 포함할 것이다.

[0109] 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 비-전하 지질 성분 (예컨대, 리포솜 형태)의 임상 적용이 수행되는 경우, 일반적으로 지질 복합체를 의도된 적용에 적절한 약제학적 조성물로 제조하는 것이 유익할 것이다. 이것은 전형적으로 발열원, 뿐만 아니라 인간 또는 동물에게 해로울 수 있는 임의의 다른 불순물이 본질적으로 없는 약제학적 조성물을 제조하는 것을 수반할 것이다. 복합체를 안정화시키고 표적 세포에 의한 흡수를 허용하기 위해 적절한 완충제를 사용할 수 있다.

[0110] 문구 "약제학적 또는 약리학적으로 허용가능한"은 동물, 예컨대 인간에게 적절하게 투여될 때 불리한, 알레르기성 또는 다른 뜻밖의 반응을 일으키지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. 올리고뉴클레오타이드 또는 부가적인 활성 성분을 포함하는 적어도 하나의 비-전하 지질 성분을 함유하는 약제학적 조성물의 제조는 본원에 참고로 포함된 하기 문헌에 의해 예시된 바와 같이 본 개시내용에 비추어 당업자에게 공지되어 있을 것이다: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st, 2005. 더욱이, 동물 (예컨대, 인간) 투여의 경우, 생물학적 표준의 FDA에 의해 요구되는 바와 같은 안정성, 무균성, 발열원성, 일반 안정성 및 순도 표준을 만족해야 함이 이해될 것이다.

[0111] 본원에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 캐리어"는 당업자에게 공지된 바와 같은, 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 계면활성제, 항산화제, 보존제 (예컨대, 항박테리아 제제, 항진균 제제), 등장성 제제, 흡수 지연제, 염, 보존제, 약물, 약물 안정화제, 겔, 결합제, 부형제, 붕해제, 윤활제, 감미제, 향료, 염료, 이러한 유사 물질 및 이의 조합을 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 캐리어는 바람직하게는 인간에게 투여하기 위해 제제화되지만, 특정 구현예에서 그것은 비-인간 동물에게 투여하기 위해 제제화되지만 인간에게 투여하는데 허용되지 않을 (예컨대, 정부 규제에 의해) 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 임의의 통상적인 캐리어가 활성 성분과 양립불가능한 경우를 제외하고, 치료적 또는 약제학적 조성물에서의 그의 용도가 고려된다.

[0112] 환자 또는 대상체에게 투여된 본 발명의 조성물의 실제 투여량은 신체적 및 생리학적 인자, 예컨대 체중, 병태의 중증도, 치료되는 질환의 유형, 이전 또는 동시 치료 개입, 환자의 특발성 질환 및 투여 경로에 의해 결정될 수 있다. 투여를 담당하는 의사는, 어떤 경우에도, 조성물 내의 활성 성분(들)의 농도 및 개별 대상체를 위한 적절한 용량(들)을 결정할 것이다.

[0113] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은, 예를 들면, 적어도 약 0.1%의 활성 화합물을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 활성 화합물은 단위 중량의 약 2% 내지 약 75%, 또는 예를 들어 약 25% 내지 약 60%, 및 그로부터 도출될 수 있는 임의의 범위를 포함할 수 있다. 다른 비제한적인 예에서, 용량은 또한 투여당 약 1 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 5 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 10 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 50 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 100 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 200 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 350 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 500 $\mu\text{g/kg}$ /체중, 약 1 mg/kg/체중, 약 5 mg/kg/체중, 약 10 mg/kg/체중, 약 50 mg/kg/체중, 약 100 mg/kg/체중, 약 200 mg/kg/체중, 약 350 mg/kg/체중, 약 500 mg/kg/체중, 내지 약 1000 mg/kg/체중 이상, 및 그로부터 도출될 수 있는 임의의 범위를 포함할 수 있다. 본원에 열거된 수로부터 도출가능한 범위의 비제한적인 예에서, 약 5 $\mu\text{g/kg}$ /체중 내지 약 100 mg/kg/체중, 약 5 $\mu\text{g/kg}$ /체중 내지 약 500 mg/kg/체중 등의 범위가 투여될 수 있다.

[0114] 본 구현예의 올리고뉴클레오타이드는 용량당 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μg 이상의 핵산으로 투여될 수 있다. 각각의 용량은 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 이상 μl 또는 ml의 부피일 수 있다.

[0115] 치료용 조성물의 용액은 계면활성제, 예컨대 하이드록시프로필셀룰로오스와 적합하게 혼합된 물에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 이의 혼합물 및 오일에서 제조될 수 있다. 일반적인 저장 및 사용 조건 하에, 이러한 제제는 미생물의 성장을 방지하는 보존제를 함유한다.

[0116] 본 발명의 치료용 조성물은 유리하게는 액체 용액 또는 현탁액으로 주사가능한 조성물의 형태로 투여되며; 주사하기 전 액체 중의 용액, 또는 액체 중의 현탁액에 적합한 고체 형태가 또한 제조될 수 있다. 이러한 제제는 또한 유회될 수 있다. 이러한 목적을 위한 전형적인 조성물은 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함한다. 예를 들어, 조성물은 인산 완충 식염수의 mL당 10 mg, 25 mg, 50 mg 또는 최대 약 100 mg의 인간 혈청 알부민을 함유할 수 있다. 다른 약제학적으로 허용가능한 캐리어는 수용액, 비독성 부형제, 예컨대 염, 보존제, 완충제 등을

포함한다.

[0117] 비-수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성오일 및 주사가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸올레이트를 포함한다. 수성 캐리어는 물, 알콜성/수성 용액, 식염수 용액, 비경구 비히클, 예컨대 염화나트륨, 링거 텍스트로스 등을 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양 보충제를 포함한다. 보존제는 항미생물제제, 항산화제, 킬레이트화제 및 불활성 가스를 포함한다. 약제학적 조성물의 다양한 성분의 pH 및 정확한 농도는 잘 알려진 파라미터에 따라 조정된다.

[0118] 본 발명의 치료용 조성물은 고전적인 약제학적 제제를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여는 표적 조직이 상기 경로를 통해 이용가능한 경우 임의의 일반적인 경로를 통해 이루어질 것이다. 이것은 경구, 비강, 구강, 직장, 질 또는 국소를 포함한다. 국소 투여는 특히 피부 암, 화학요법 유도 탈모증 또는 다른 피부 과증식성 장애를 치료하는 피부암의 치료에 유리할 수 있다. 대안적으로, 투여는 정위 (orthotopic), 피내, 피하내, 근육내, 복강내 또는 정맥내 주사에 의할 수 있다. 이러한 조성물은 일반적으로 생리학적으로 허용가능한 캐리어, 완충제 또는 다른 부형제를 포함하는 약제학적으로 허용가능한 조성물로서 투여될 것이다. 폐의 병태의 치료를 위해, 에어로졸 전달이 사용될 수 있다. 에어로졸의 부피는 약 0.01 ml 내지 0.5 ml이다.

[0119] 치료용 조성물의 유효량은 의도된 목표에 기초하여 결정된다. 용어 "단위 용량" 또는 "투여량"은 대상체에서 사용하는 데 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 그의 투여, 즉, 적절한 경로 및 치료 요법과 관련하여 상기 논의된 원하는 반응을 생성하도록 계산된 치료용 조성물의 미리 결정된 양을 함유한다. 치료 횟수 및 단위 용량에 따라 투여되는 양은 원하는 예방 또는 효과에 좌우된다.

[0120] 치료용 조성물의 정확한 양은 또한 의사의 판단에 좌우되며, 각각의 개체마다 다르다. 용량에 영향을 미치는 인자는 환자의 신체적 및 임상적 상태, 투여 경로, 의도된 치료 목표 (예컨대, 증상의 경감 대 치유) 및 특정 치료 물질의 효능, 안정성 및 독성을 포함한다.

[0121] VIII. 조합 치료

[0122] 특정 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 제2 또는 부가적인 요법과 조합하여, 유전자 발현의 억제제를 발현할 수 있는 억제성 올리고뉴클레오타이드, 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 조합 요법을 포함하는 방법 및 조성물은 치료 또는 예방 효과를 향상시키고/시킴거나 또 다른 항암 또는 항-과증식성 요법의 치료 효과를 증가시킨다. 치료 및 예방 방법 및 조성물은 원하는 효과, 예컨대 암 세포의 사멸 및/또는 세포 과증식의 억제를 달성하는데 효과적인 조합된 양으로 제공될 수 있다. 이 과정은 세포를 유전자 발현의 억제제 및 제2 요법 모두와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 조직, 종양, 또는 세포는 하나 이상의 제제 (즉, 유전자 발현의 억제제 또는 항암제)를 포함하는 하나 이상의 조성물 또는 약리학적 제제(들)과 접촉될 수 있거나, 또는 조직, 종양, 및/또는 세포를 둘 이상의 별개의 조성물 또는 제제와 접촉함으로써 접촉될 수 있으며, 하나의 조성물은 1) 억제성 올리고뉴클레오타이드; 2) 항암제, 또는 3) 억제성 올리고뉴클레오타이드 및 항암제 모두를 제공한다. 또한, 이러한 조합 요법이 화학요법, 방사선요법, 수술 요법, 또는 면역요법과 함께 사용될 수 있음이 고려된다.

[0123] 억제성 올리고뉴클레오타이드는 항암 치료에 대해 이전, 동안, 이후, 또는 다양한 조합으로 투여될 수 있다. 투여는 동시부터 몇 분 내지 며칠 내지 몇 주의 범위의 간격일 수 있다. 억제성 올리고뉴클레오타이드가 항암제와 별도로 환자에게 제공되는 구현예에서, 두 화합물이 환자에게 유리하게 조합된 효과를 여전히 발휘할 수 있도록 일반적으로 각각의 전달 시간 사이에 상당한 시간이 만료되지 않도록 보장할 것이다. 이러한 경우, 억제성 올리고뉴클레오타이드 요법 및 항암 요법을 서로 약 12 내지 24 또는 72시간 내에, 더욱 바람직하게는 서로 약 6-12시간 내에 환자에게 제공할 수 있음이 고려된다. 일부 경우, 각각의 투여 사이에 며칠 (2, 3, 4, 5, 6 또는 7일) 내지 몇 주 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주)가 경과하는 경우, 치료 기간을 유의하게 연장하는 것이 바람직할 수 있다.

[0124] 특정 구현예에서, 치료 과정은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90일 이상 지속될 것이다. 하나의 제제가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76,

77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 및/또는 90일, 이의 임의의 조합에 제공될 수 있고, 또 다른 제제가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 및/또는 90일, 또는 이의 임의의 조합에 제공되는 것이 고려된다. 1일 (24시간) 이내에, 환자는 제제(들)의 하나 또는 복수 투여를 제공받을 수 있다. 더욱이, 치료 과정 후, 항암 치료가 투여되지 않는 시간이 있음이 고려된다. 이러한 시간은, 환자의 상태, 예컨대 이들의 예후, 체력, 건강 등에 따라, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일, 및/또는 1, 2, 3, 4, 5주, 및/또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개월 이상 지속될 수 있다.

[0125] 다양한 조합이 사용될 수 있다. 하기 예의 경우, 억제성 올리고뉴클레오타이드 요법은 "A"이고 항암 요법은 "B"이다:

[0126] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B

[0127] B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A

[0128] B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A

[0129] A/A/B/A

[0130] 본 발명의 임의의 화합물 또는 요법의 투여는 제제의 독성을 고려하여(만일 있는 경우), 이러한 화합물의 투여를 위한 일반 프로토콜을 따를 것이다. 따라서, 일부 구현예에서, 조합 요법에 기인하는 독성을 모니터링하는 단계가 있다. 치료 주기는 필요에 따라 반복될 것임이 예상된다. 또한 다양한 표준 요법, 뿐만 아니라 수술 개입이 기재된 요법과 조합하여 적용될 수 있음이 고려된다.

[0131] 특정 측면에서, 표준 요법은 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 수술 요법 또는 유전자 요법을 포함할 것이고, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 발현의 억제제 요법, 항암 요법, 또는 유전자 발현의 억제제 요법 및 항암 요법 모두와 조합하여 사용될 수 있음이 고려된다.

[0132] A. 화학요법

[0133] 다양한 화학치료제가 본 구현예에 따라 사용될 수 있다. 용어 "화학요법"은 암을 치료하기 위한 약물의 사용을 지칭한다. "화학치료제"는 암 치료에서 투여되는 화합물 또는 조성물을 내포하기 위해 사용된다. 이러한 제제 또는 약물은 세포 내에서 이들의 활성 방식, 예를 들면, 이들의 세포 주기에 영향을 미치는지와 이들이 무슨 단계에서 세포 주기에 영향을 미치는지에 의해 분류된다. 대안적으로, 제제는 DNA를 직접 가교결합시키는 그의 능력, DNA로 삽입되는 그의 능력, 또는 핵산 합성에 영향을 미쳐 염색체 및 유사분열 이상을 유도하는 그의 능력에 기초하여 규명될 수 있다.

[0134] 화학치료제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예컨대 부설판, 임프로셀판, 및 피로셀판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보퀸, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예컨대 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드, 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 캄포테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코디티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤펌진, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 및 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님누스틴; 항생제, 예컨대 에데다인 항생제 (예컨대, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가II); 다이네미신, 예컨대 다이네미신 A; 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 발색단백질 에네다인 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대, 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘,

우베니맥스, 지노스타틴, 및 조루비신; 항-대사산물, 예컨대 메토타렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데놈테린, 프테롬테린, 및 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 및 플록스우리딘; 안드로젠, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 및 테스토라톤; 항-아드레날, 예컨대 미톡산 및 트릴로스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지퀸; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모르피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페바메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK다당류 복합체; 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지퀸; 2,2',2-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 탁소이드, 예컨대, 파클리탁셀 및 도세탁셀 젬시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 백금 배위 착물, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴, 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렌빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노테린; 젤로다; 이만드로네이트; 이리노테칸 (예컨대, CPT-11); 토포이소머라아제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 카페시타빈; 카르보플라틴, 프로카르바진, 플리코마이신, 젬시타빈, 나벨빈, 파르네실-단백질 전달효소 억제제, 트랜스플라티늄, 및 상기 중 어느 것의 약제학적으로 허용가능한 염, 산, 또는 유도체를 포함한다.

[0135] B. 방사선요법

[0136] DNA 손상을 일으키고 광범위하게 사용된 다른 인자는 일반적으로 γ 선, X선, 및/또는 종양 세포에 방사성 동위원소의 유도된 전달로서 알려진 것을 포함한다. 하기와 같은 DNA 손상 인자의 다른 형태가 또한 고려된다: 마이크로파, 양성자 빔 조사 (미국 특허 제5,760,395호 및 제4,870,287호) 및 UV-조사. 이러한 인자 모두는 DNA, DNA의 전구체, DNA의 복제 및 복구, 및 염색체의 조립 및 유지의 광범위한 손상에 영향을 미칠 가능성이 매우 높다. X선의 투여량 범위는 연장된 시간 (3 내지 4주) 동안 50 내지 200 윈트겐의 일일 용량부터 2000 내지 6000 윈트겐의 단일 용량까지의 범위이다. 방사성 동위원소에 대한 투여량 범위는 광범위하게 다양하며, 동위원소의 반감기, 방출된 방사선의 강도 및 유형, 및 신생물 세포의 흡수에 좌우된다.

[0137] 세포에 적용될 때 용어 "접촉된" 및 "노출된"은 치료용 구조물 및 화학치료제 또는 방사성 치료제가 표적 세포에 전달되거나 표적 세포와 직접 병치되어 위치하는 과정을 기술하기 위해 본원에 사용된다. 세포 사멸을 달성하기 위해, 예를 들면, 두 가지 제제는 세포를 사멸시키거나 세포가 분열하는 것을 방지하는데 효과적인 조합된 양으로 세포에 전달된다.

[0138] C. 면역요법

[0139] 암 치료의 문맥에서, 면역치료제는, 일반적으로, 암 세포를 표적화하고 파괴하는 면역 효과기 세포 및 분자의 사용에 의존한다. 트라스투주맙 (허셉틴)이 그러한 예이다. 면역 효과기는, 예를 들면, 종양 세포의 표면 상의 일부 마커에 특이적인 항체일 수 있다. 항체 단독은 요법의 효과기로서 작용할 수 있거나 또는 그것은 세포 사멸에 실제로 영향을 미치는 다른 세포를 동원할 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소 (화학치료제, 방사성핵종, 리신 A 사슬, 콜레라 독소, 백일해 독소, 등)에 접합될 수 있고 단지 표적화제로서 작용할 수 있다. 대안적으로, 효과기는 종양 세포 표적과 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자를 갖는 림프구일 수 있다. 다양한 효과기 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다. 치료 양상의 조합, 즉, 직접적인 세포독성 활성화 및 ErbB2의 억제 또는 감소는 ErbB2를 과발현하는 암의 치료에서 치료적 이익을 제공할 것이다.

[0140] 또 다른 면역요법이 또한 본원에 논의된 유전자 침묵 요법과 조합된 요법의 일부로서 사용될 수 있다. 면역요법의 일 측면에서, 종양 세포는 표적화할 수 있는, 즉, 대부분의 다른 세포에 존재하지 않는 일부 마커를 가져야 한다. 많은 종양 마커가 존재하며, 이들 중 어느 것은 본 발명의 문맥에서 표적화에 적합할 수 있다. 일반적인 종양 마커는 암배아 항원, 전립선 특이적 항원, 소변 종양 관련 항원, 태아 항원, 티로시나아제 (p97), gp68, TAG-72, HMGF, 시알릴 루이스 항원, MucA, MucB, PLAP, 에스트로젠 수용체, 라미닌 수용체, erb B 및 p155를 포함한다. 면역요법의 대안적인 측면은 항암 효과와 면역 자극 효과를 조합하는 것이다. 하기를 포함하는 면역 자극 분자가 또한 존재한다: 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, 감마-IFN, 케모카인, 예컨대 MIP-1, MCP-1, IL-8 및 성장 인자, 예컨대 FLT3 리간드. 단백질로서 또는 종양 억제자와 조합된 유전자 전달을 사용

하여 면역 자극 분자를 조합하는 것은 항-종양 효과를 향상시키는 것으로 나타났다. 더욱이, 이러한 화합물 중 어느 것에 대한 항체는 본원에 논의된 항암제를 표적화하는데 사용될 수 있다.

[0141] 현재 조사 중이거나 사용중인 면역요법의 예는 하기와 같다: 면역 보조제, 예컨대, 마이코박테리움 보비스, 플라스모디움 팔시파룸, 디니트로클로로벤젠 및 방향족 화합물 (미국 특허 제5,801,005호 및 제5,739,169호; Huian Hashimoto, 1998; Christodoulides 등, 1998), 사이토카인 요법, 예컨대, 인터페론 α , β 및 γ ; IL-1, GM-CSF 및 TNF (Bukowski 등, 1998; Davidson 등, 1998; Hellstrand 등, 1998) 유전자 요법, 예컨대, TNF, IL-1, IL-2, p53 (Qin 등, 1998; Austin-Wardand Villaseca, 1998; 미국 특허 제5,830,880호 및 제5,846,945호) 및 단일클론 항체, 예컨대, 항-강글리오시드 GM2, 항-HER-2, 항-p185 (Pietras 등, 1998; Hanibuchi 등, 1998; 미국 특허 제5,824,311호). 하나 이상의 항암 요법이 본원에 논의된 유전자 침묵 요법과 함께 사용될 수 있음이 고려된다.

[0142] 활성 면역요법에서, 항원성 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질, 또는 자가 또는 동종의 종양 세포 조성물 또는 "백신"은 일반적으로 구별되는 박테리아 보조제와 함께 투여된다 (Ravindranath and Morton, 1991; Morton 등, 1992; Mitchell 등, 1990; Mitchell 등, 1993).

[0143] 양자 면역요법에서, 환자의 순환성 림프구, 또는 종양 침윤된 림프구는 시험관내에서 분리되고, IL-2와 같은 림포카인에 의해 활성화되거나 종양 괴사를 위한 유전자가 형질도입되고, 재투여된다 (Rosenberg 등, 1988; 1989).

[0144] D. 수술

[0145] 암 환자의 약 60%는 예방, 진단 또는 병기결정, 치유, 및 완화 수술을 포함하는 일부 유형의 수술을 받을 것이다. 치유적 수술은 본 발명의 치료, 화학요법, 방사선요법, 호르몬 요법, 유전자 요법, 면역요법 및/또는 대안적인 요법과 같은 다른 요법과 함께 사용될 수 있는 암 치료이다.

[0146] 치유적 수술은 암성 조직의 전부 또는 일부를 물리적으로 제거, 절개 및/또는 파괴하는 절제술을 포함한다. 종양 절제술은 종양의 적어도 일부를 물리적으로 제거하는 것을 지칭한다. 종양 절제술 외에도, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 냉동수술, 전기수술, 및 현미경으로 제어되는 수술 (모즈 수술)을 포함한다. 본 발명이 표재암, 전암, 또는 부수적인 양의 정상 조직의 제거와 함께 사용될 수 있음이 추가로 고려된다.

[0147] 암성 세포, 조직, 또는 종양의 일부 또는 전부의 절개시, 신체에 공동(cavity)이 형성될 수 있다. 치료는 관류, 직접적인 주사 또는 부가적인 항암 요법을 이용한 부위의 국소 적용에 의해 달성될 수 있다. 이러한 치료는, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일마다, 또는 1, 2, 3, 4, 및 5주마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월마다 반복될 수 있다. 이러한 치료는 또한 다양한 투여량일 수 있다.

[0148] E. 다른 제제

[0149] 다른 제제가 치료의 치료 효능을 개선하기 위해 본 구현예의 특정 측면과 조합되어 사용될 수 있음이 고려된다. 이러한 부가적인 제제는 세포 표면 수용체 및 GAP 연결의 상향조절에 영향을 미치는 제제, 세포분열 억제 및 분화 제제, 세포 부착의 억제제, 세포자멸 유도제에 대한 과증식성 세포의 민감성을 증가시키는 제제, 또는 다른 생물학적 제제를 포함한다. GAP 연결의 수를 증가시키는 것에 의한 세포간 신호전달의 증가는 주변의 과증식성 세포 집단에 대한 항-과증식성 효과를 증가시킬 것이다. 다른 구현예에서, 세포분열 억제 또는 분화 제제는 치료의 항-과증식성 효능을 증가시키기 위해 본 구현예의 특정 측면과 조합하여 사용될 수 있다. 세포 부착의 억제제 제가 본 구현예의 효능을 개선하기 위해 고려된다. 세포 부착 억제제의 예는 국소 부착 키나아제 (FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 세포자멸사에 대한 과증식성 세포의 민감성을 증가시키는 다른 제제, 예컨대 항체 c225가 치료 효능을 개선하기 위해 본 구현예의 특정 측면과 조합하여 사용될 수 있음이 추가로 고려된다.

[0150] IX. 키트 및 진단

[0151] 본 발명의 다양한 측면에서, 치료제 및/또는 다른 치료 및 전달 제제를 함유하는 키트가 상상된다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 요법을 제조하고/하거나 투여하기 위한 키트를 고려한다. 키트는 본 발명의 활성제 또는 효과적인 제제(들)를 투여하는데 사용할 수 있는 시약을 포함할 수 있다. 키트의 시약은 유전자 발현의 적어도 하나의 억제제, 하나 이상의 지질 성분, 조합 요법의 하나 이상의 항암 성분, 뿐만 아니라 본 발명의 성분을 제조, 제제화, 및/또는 투여하기 위한 시약 또는 본 발명의 방법의 하나 이상의 단계를 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있다.

[0152] 일부 구현예에서, 키트는 또한 키트의 성분, 예컨대 에펜도르프 튜브, 분석 플레이트, 주사기, 병, 또는 튜브와

반응하지 않을 용기인 적합한 용기 수단을 포함할 수 있다. 용기는 플라스틱 또는 유리와 같은 멸균가능한 물질로부터 제조될 수 있다.

[0153] 키트는 방법의 절차 단계를 개괄하는 지시 시트를 추가로 포함할 수 있고, 본원에 기재되거나 당업자에게 알려진 바와 같은 동일한 절차를 실질적으로 수행할 것이다.

[0154] X. 실시예

[0155] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 후속하는 실시예에 개시된 기술은 본 발명의 실시에서 잘 기능하기 위해 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내므로, 그 실시를 위한 바람직한 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있음이 당업자에게 인식되어야 한다. 그러나, 당업자는 본 개시내용에 비추어 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 개시된 특정 구현예에서 많은 변화가 일어날 수 있고 유사한 결과를 얻을 수 있음을 이해해야 한다.

[0156] 실시예 1 - 리포솜 p-에톡시 안티센스 의약품의 제조 방법

[0157] 리포솜 p-에톡시 안티센스 의약품은 2개의 cGMP 제품으로 구성되며, 이들 모두는 FDA 승인된 출시 기준으로 FDA가 요구하는 분석 증명서를 가지고 있다. 원료, 용매, 및 최종 의약품이 본원에 기재되어 있다. 제조시, 의약품은 하기 물질을 포함하는 호박색 또는 백색의 동결건조된 결정 또는 분말이다: 올리고뉴클레오타이드 (예컨대, p-에톡시 안티센스 약물 물질), 중성 지질 (예컨대, DOPC), 및 계면활성제 (예컨대, 폴리소르베이트 20). 환자에게 투여하기 위한 제제에서, 일반 식염수가 바이알에 첨가되며, 이때 내부에 혼입된 p-에톡시 안티센스와 함께 리포솜이 형성된다.

[0158] *p-에톡시 안티센스 약물 물질*. 완제품의 특정 물리적 특성 (예컨대, 용해도 및 소수성, 이는 이후에 식염수 중의 의약품 용해도, 리포솜 내로의 올리고의 혼입, 및 리포솜 입자 크기에 영향을 미침)은 p-에톡시 안티센스 약물 물질의 생산 동안 미리 결정된 p-에톡시 및 포스포디에스테르 아미다이트 원료 혼합물을 사용하여 정의될 수 있다. p-에톡시 백본 그룹의 손실은 올리고뉴클레오타이드 제조 동안 무작위로 발생하여 이들 연결에서 포스포디에스테르 결합을 야기하지만, 그 손실은 올리고뉴클레오타이드 내에서 p-에톡시 : 포스포디에스테르 백본 연결의 바람직한 비율을 생성하지 않을 수 있다. 이 경우, p-에톡시 및 포스포디에스테르 아미다이트 원료의 혼합물은 p-에톡시 백본 결실의 예상된 값을 보충하여, 원하는 비율을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 생성한다. 올리고뉴클레오타이드의 백본에서 p-에톡시 분자의 수를 증가시키는 것은 분자를 더 소수성 (더 큰 리포솜 입자를 생성함; 표 1), 덜 극성, 및 덜 가용성으로 만든다 (표 2). 전하-중성, 소수성 p-에톡시 약물 물질을 시험하는 방법은 올리고뉴클레오타이드 길이의 분포를 결정하는 질량 분석법 및 용해도에 대한 실용적인 목적으로 식염수에서 재구성된 의약품의 육안 검사인 약물 물질의 용해도를 결정하는 분석을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 더 많은 수의 p-에톡시 백본 연결로 인해 덜 가용성으로 되므로, 재구성된 용액은 소수성이 너무 높아짐에 따라 미립자가 형성될 때까지 더 백색이 된다.

[0159] 표 1. 안티센스 백본 조성물을 사용한 리포좀 입자 크기 변동성

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

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

- 이 롯트를 낮은 용해도; 구체적으로, 재구성된 용액 중의 안티센스 입자 때문에 버렸다.
- 이것은 20 mL 바이알 중에 2 mg 안티센스를 갖는 더 낮은 DMSO 및 tBA 부피를 가지고 있었으며, 리포좀 확대에 부가적인 성분을 부가하였다.
- 이 롯트는 출시되지 않았는데, 입자 크기 출시 사양에 실패하였기 때문이다.

[0160]

[0161] 표 2. 안티센스 백본 조성물을 이용한 리포솜 입자 용해도

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

** 의약품 샘플이 입자를 가지면, 롯트가 거부될 것이다

a. 이 롯트를 낮은 용해도; 구체적으로, 재구성된 용액 중의 안티센스 입자 때문에 버렸다.

b. 이것은 20 mL 바이알 중에 2 mg 안티센스를 갖는 더 낮은 DMSO 및 tBA 부피를 가지고 있었으며, 리포솜 확대에 부가적인 성분을 추가하였다.

c. 이 롯트는 출시되지 않았는데, 입자 크기 출시 사양에 실패하였기 때문이다.

[0162]

[0163]

리포솜 p-에톡시 안티센스 의약품의 제제, 여과, 및 동결건조. 1 그램 (1 g)의 pE 올리고를 1 mL DMSO당 10 mg 올리고뉴클레오타이드의 비율로 DMSO에 용해시킨다. 다음으로, DOPC를 1719 mL의 터트-부틸 알코올당 1 g DOPC의 비율로 첨가한다. 올리고 및 DOPC를 2.67 g DOPC당 1 g 올리고뉴클레오타이드의 비율로 조합 및 혼합한다. 이후, 폴리소르베이트 20의 20 mL의 0.835% (v/v) 용액을 혼합물에 첨가하여 0.039 mg/mL의 최종 농도를 얻는다. 용액을 동결건조를 위한 유리 바이알에 분배하기 전에 멸균 필터를 통과시킨다.

[0164]

리포솜 입자 크기에 대한 계면활성제의 효과를 계면활성제의 양을 적정하여 결정하였다 (표 3). 폴리소르베이트 20이 없는 경우, 입자의 2.8%만이 300 nm 이하의 직경을 가지고 있었다. 1x 폴리소르베이트 20 (총 리포솜 p-에톡시 안티센스 의약품의 약 5%)이 존재하는 경우, 입자의 12.5%가 300 nm 이하의 직경을 가지고 있었다. 3x-10x 폴리소르베이트 20을 첨가한 경우, 입자의 약 20%가 300 nm 이하의 직경을 가지고 있었다. 따라서, 1x에서 3x로 계면활성제의 증가는 입자 크기를 감소시킨다.

[0165]

표 3. 계면활성제를 이용한 리포솜 입자 크기 변동성

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

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

[0166]

- [0167] 투여를 위한 리포좀 p-에톡시 안티센스 의약품의 제조. 동결건조된 제제를 일반 식염수 (0.9%/10 mM NaCl)를 사용하여 10-5000 μ M의 최종 올리고 농도로 수화시켰다. 리포좀-p-에톡시 올리고를 손으로 교반하여 혼합하였다.
- [0168] 실시예 2 - 리포좀 p-에톡시 안티센스 의약품을 시험하는 방법
- [0169] 제조된 의약품의 육안 검사: 제조 후, 의약품을 함유하는 샘플 바이알을 선택하고 육안으로 검사한다. 액체의 부재는 필수적이며, 바이알의 바닥에 있는 호박색 결정이 허용가능하고, 백색의 응집된 분말 또는 외관의 수용이 증가하면, 최상의 결과이다. 백색 외관은 높은 표면적 대 질량비를 갖는 더 우수한 건조 공정을 나타내며, 이는 사용을 위한 재구성에 매우 도움이 된다.
- [0170] 환자 IV를 위한 준비가 된 재구성된 약물의 육안 검사: 일반 식염수를 제조된 리포좀 P-에톡시 안티센스 의약품을 함유하는 바이알에 첨가하고 흔들어 약물 결정 또는 분말이 완전히 용해된 용액으로 재구성한다. 3가지 주요 관찰이 이루어진다: 1) 결정 또는 분말이 완전히 용해된 것, 2) 비용해 물질의 백색 덩어리가 없는 것, 및 3) 외관이 유백색 또는 탈지유 외관인 것. 재구성된 액체의 외관이 더 푸를수록 더 좋은데, 이것은 청색 스펙트럼에서 빛을 반사하는 더 작은 리포좀 입자 크기를 표시하기 때문이다.
- [0171] 질량 분석법: 질량 분석법 (mass spec)은 샘플 내의 다양한 질량의 프로파일을 표시하는데 사용된다. p-에톡시 안티센스 물질이 생산될 때, 질량 분석이 샘플 상에서 진행된다. 결과는 "x" 축 상에서 오른쪽으로 증가하는 질량을 갖는 그리드 상에 존재하는 물질의 피크, 및 위로 증가하는 "y" 축 상의 상대적 질량 존재비를 나타낸다. 샘플의 프로파일을 분석하여 p-에톡시 샘플 내의 p-에톡시 백본의 상대적 양을 결정하며, 피크의 프로파일은 (가장 먼 곳에서 시작하여 우측으로) p-에톡시 연결로 구성된 모든 백본을 갖는 전체 길이 물질을 나타내며, 좌측으로 이동하는 다음 피크는 p-에톡시 결실을 갖는 하나의 백본을 갖는 전체 길이를 나타내고 (따라서, 에틸은 நீ아웃되고 결과는 정상 포스포디에스테르 백본 연결임), 계속된다는 것을 인식한다. 우측으로 이동된 질량 분석 패턴은 더 많은 p-에톡시 백본을 가지며, 따라서 더 소수성이고 덜 가용성인 특성을 갖는 p-에톡시 샘플을 나타내고; 마찬가지로 좌측으로 이동된 질량 분석 패턴은 반대 효과를 갖는 p-에톡시 샘플을 나타낸다. 샘플의 질량 분석 차트의 검사는 또한 제조 과정 중의 여과가 여과된 의약품에 존재하는 올리고뉴클레오타이드 조성에 임의의 부작용을 미치는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0172] UV 시험: 자외선 시험은 샘플에 존재하는 올리고뉴클레오타이드의 질량을 결정하는데 사용된다. 올리고뉴클레오타이드는 260 나노미터 범위의 빛을 흡수한다. 그 결과, 완성된 재구성된 의약품의 UV 시험은 의약품의 바이알 내의 올리고뉴클레오타이드 약물 물질의 양을 결정하는 방법으로서 사용되게 되었다. 제조 개발 및 혁신 면에서, UV 시험은 용액 중에 더 적은 올리고뉴클레오타이드와 이에 따라 더 낮은 UV 관독을 야기하는, 제조시 여과 동안 경험하는 문제 또는 p-에톡시 안티센스 약물 물질의 불량한 용해도가 있는지 결정하는데 사용되었다. 상기 방법은 검증될 것이며 최종 제품 출시 시험의 일부가 될 가능성이 높다.
- [0173] 리포좀 입자 크기: 완성된 의약품의 바이알을 재구성하고 리포좀 입자 크기에 대해 시험한다. 결과는 종종 중심 점, 꼬리 및 평균 값을 갖는 대략 정규 분포 또는 대부분의 입자의 대략 정규 분포 및 2차 입자 형성 효과로부터 비롯되는 더 작은 리포좀 입자의 더 작은 이차 피크이다. 리포좀 입자는 너무 크지 않는 것이 중요한데, 이들은 환자에서 부작용을 야기할 수 있기 때문이다 (예를 들면, 폐 내의 더 작은 혈관에서 혈류 문제를 일으킴). 그 결과, 의약품 출시 기준은 입자 크기 시험이 리포좀의 90%가 약 5 마이크로 이하의 크기 또는 약 3 마이크로 이하의 크기인 것을 나타내는 것을 포함한다. 또한, 더 작은 리포좀이 바람직한데, 이것이 세포 내로 더 잘 흡수될 수 있고, 다음으로, 더 작은 리포좀이 혈관 기공을 침투함으로써 리포좀을 종양 내부로 침투시켜 리포좀 P-에톡시 안티센스 의약품의 치료 효과를 증가시킬 수 있기 때문이다.
- [0174] * * *
- [0175] 본원에 개시되고 청구된 모든 방법은 본 개시내용에 비추어 과도한 실험 없이 이뤄지고 수행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 바람직한 구현예의 측면에서 설명되었지만, 방법의 개념, 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 변형이 방법 및 단계 또는 본원에 기재된 방법의 단계의 순서에 적용될 수 있음이 당업자에게 자명할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적으로 및 생리학적으로 관련된 특정 제제가 동일하거나 유사한 결과가 달성되는 동안 본원에 기재된 제제를 대체할 수 있음이 자명할 것이다. 당업자에게 자명한 그러한 모든 유사한 대체물 및 변형은 첨부된 청구범위에 의해 정의된 바와 같은 본 발명의 사상, 범위 및 개념에 속하는 것으로 간주된다.
- [0176] 참고문헌
- [0177] 다음의 참고문헌은 본원에 제시된 것을 보완하는 예시적인 절차 또는 다른 세부사항을 제공하는 한 본원에 명시

적으로 참고로 포함된다.

[0178]	미국 특허 제4,659,774호
[0179]	미국 특허 제4,816,571호
[0180]	미국 특허 제4,870,287호
[0181]	미국 특허 제4,959,463호
[0182]	미국 특허 제5,141,813호
[0183]	미국 특허 제5,214,136호
[0184]	미국 특허 제5,223,618호
[0185]	미국 특허 제5,264,566호
[0186]	미국 특허 제5,378,825호
[0187]	미국 특허 제5,428,148호
[0188]	미국 특허 제5,446,137호
[0189]	미국 특허 제5,466,786호
[0190]	미국 특허 제5,470,967호
[0191]	미국 특허 제5,539,082호
[0192]	미국 특허 제5,554,744호
[0193]	미국 특허 제5,574,146호
[0194]	미국 특허 제5,602,240호
[0195]	미국 특허 제5,602,244호
[0196]	미국 특허 제5,610,289호
[0197]	미국 특허 제5,614,617호
[0198]	미국 특허 제5,623,070호
[0199]	미국 특허 제5,652,099호
[0200]	미국 특허 제5,670,663호
[0201]	미국 특허 제5,672,697호
[0202]	미국 특허 제5,681,947호
[0203]	미국 특허 제5,700,922호
[0204]	미국 특허 제5,705,629호
[0205]	미국 특허 제5,708,154호
[0206]	미국 특허 제5,714,331호
[0207]	미국 특허 제5,714,606호
[0208]	미국 특허 제5,719,262호
[0209]	미국 특허 제5,736,336호
[0210]	미국 특허 제5,739,169호
[0211]	미국 특허 제5,760,395호
[0212]	미국 특허 제5,763,167호

- [0213] 미국 특허 제5,766,855호
- [0214] 미국 특허 제5,773,571호
- [0215] 미국 특허 제5,777,092호
- [0216] 미국 특허 제5,786,461호
- [0217] 미국 특허 제5,792,847호
- [0218] 미국 특허 제5,801,005호
- [0219] 미국 특허 제5,824,311호
- [0220] 미국 특허 제5,830,880호
- [0221] 미국 특허 제5,846,945호
- [0222] 미국 특허 제5,855,911호
- [0223] 미국 특허 제5,858,988호
- [0224] 미국 특허 제5,859,221호
- [0225] 미국 특허 제5,872,232호
- [0226] 미국 특허 제5,886,165호
- [0227] 미국 특허 제5,891,625호
- [0228] 미국 특허 제5,908,845호
- [0229] Austin-Wardand Villaseca, Revista Medica de Chile, 126(7): 838-845, 1998.
- [0230] Bailey and Sullivan, Biochimica. Biophys. Acts., 239-252, 2000.
- [0231] Bangham 등, J. Mol. Biol, 13(1): 253-259, 1965.
- [0232] Bukowski 등, Clinical Cancer Res., 4(10): 2337-2347, 1998.
- [0233] Christodoulides 등, Microbiology, 144(Pt 11): 3027-3037, 1998.
- [0234] Davidson 등, J. Immunother., 21(5): 389-398, 1998.
- [0235] Deamer and Uster, In: Liposome Preparation: Methods and Mechanisms, Ostro (Ed.), Liposomes, 1983.
- [0236] Dokka 등, Pharm Res, 17: 521-25, 2000.
- [0237] duBois 등, J Clin Oncol, 17: 46-51, 1999.
- [0238] Dubeyet 등, J. Drug Target, 12: 257-264, 2004.
- [0239] Duxbury 등, Biochem. Biophys. Res. Commun., 311: 786-792, 2003.
- [0240] Duxbury 등, Oncogene, 23: 1448-1456, 2004.
- [0241] Egholm 등, Nature, 365(6446): 566-568, 1993.
- [0242] Elbashir 등, Nature, 411 (6836): 494-498, 2001.
- [0243] 유럽 출원 01219
- [0244] 유럽 출원 266,032
- [0245] Farhood 등, Biochim. Biophys. Act, 289-295, 1995.
- [0246] Fire 등, Nature, 391(6669): 806-811, 1998.
- [0247] Flenniken 등, Dev.Biol., 179: 382-401, 1996.
- [0248] Froehler 등, NucleicAcids Res., 14(13): 5399-5407, 1986.

- [0249] Gabizon, *Cancer Invest.*, 19: 424-436, 2001.
- [0250] Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu 등 (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- [0251] Gregoriadis, In: *Drug Carriers in Biology and Medicine*, Gregoriadis (Ed.), 287-341, 1979.
- [0252] Gutierrez-Puente 등, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291: 865-869, 1999.
- [0253] Halder 등, *Clinical Cancer Research*, 11: 8829-36, 2005.
- [0254] Han 등, *Ann SurgOncol*, 4: 264-268, 1997.
- [0255] Hanibuchi 등, *Int. J. Cancer*, 78(4): 480-485, 1998.
- [0256] Hannon and Rossi, *Nature*, 431: 371-378, 2004.
- [0257] Hassani 등, *J. Gene Med.*, 7(2): 198-207, 2005.
- [0258] Hecker 등, *Cancer Research*, 62: 2699-2707, 2002.
- [0259] Hellstrand 등, *Acta Oncologica*, 37(4): 347-353, 1998.
- [0260] Hortobagyi 등, *J. Clin. Oncol.*, 19: 3422-3433, 2001.
- [0261] Hsia 등, *J Cell Biol*, 160: 753-67, 2003.
- [0262] Huiand Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11): 5329-5336, 1998.
- [0263] Jackson 등, *Nat. Biotechnol.*, 21: 635-637, 2003.
- [0264] Jemal 등, *CA Cancer J. Clin.*, 55(1): 10-30, 2005.
- [0265] Judson 등, *Cancer*, 86: 1551-56, 1999.
- [0266] Kaneda 등, *Science*, 243: 375-378, 1989.
- [0267] Kato 등, *J. Biol. Chem.*, 266: 3361-3364, 1991.
- [0268] Kim 등, *Nat. Biotechnol.*, 22: 321-325, 2004.
- [0269] Kinch 등, *Clin. Exp. Metastasis*, 20: 59-68, 2003.
- [0270] Klein 등, *Gastroenterology*, 125: 9-18, 2003.
- [0271] Kohno 등, *Int J Cancer*, 97: 336-43, 2002.
- [0272] Kornberg and Baker, *DNA Replication*, 2nd Ed., Freeman, San Francisco, 1992.
- [0273] Kornberg 등, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 4463-69, 2004.
- [0274] Kornberg, *Head Neck*, 20: 634-639, 1998.
- [0275] Kostarelos 등, *Int J Cancer*, 112: 713-21, 2004.
- [0276] Krasnici 등, *Int. J. Cancer*, 105(4): 561-567, 2003.
- [0277] Landen, *Cancer Res*, 65: 6910-18, 2005.
- [0278] Langley 등, *Cancer Research*, 63: 2971-76, 2003.
- [0279] Lewis 등, *Cell*, 115: 787-798, 2003.
- [0280] Lewis 등, *Nat. Genet.*, 32: 107-108, 2002.
- [0281] Lori 등, *Am. J. Pharmacogenomics*, 2: 245-252, 2002.
- [0282] Matsuda 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 16-22, 2004.
- [0283] McCaffrey 등, *Nature*, 418: 38-39, 2002.

- [0284] McGuire 등, New England Journal of Medicine, 334: 1-6, 1996.
- [0285] McLean 등, Expert Opin Pharmacother, 4: 227-34, 2003.
- [0286] Miller 등, Biochemistry, 37(37): 12875-83, 1998.
- [0287] Mitchell 등, Ann.NY Acad.Sci. , 690: 153-166, 1993.
- [0288] Mitchell 등, J. Clin. Oncol., 8(5): 856-869, 1990.
- [0289] Mitra 등, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6: 56-68, 2005.
- [0290] Mitra 등, Proc Am Assoc Cancer Res, 2005.
- [0291] Morton 등, Arch.Surg., 127: 392-399, 1992.
- [0292] Nemoto 등, Pathobiology, 65: 195-203, 1997.
- [0293] Nicolau 등, Methods Enzymol., 149: 157-176, 1987.
- [0294] Noblitt 등, Cancer Gene Ther., 11: 757-766, 2004.
- [0295] Ogawa 등, Oncogene, 19: 6043-6052, 2000.
- [0296] Owens 등, Cancer Res, 55: 2752-2755, 1995.
- [0297] Park 등, Cancer Lett., 118: 153-160, 1997.
- [0298] PCT 출원 WO 제92/20702호
- [0299] PCT 출원 WO 제02/100435호 A1
- [0300] PCT 출원 WO 제03/015757호 A1
- [0301] PCT 출원 WO 제04/002453호 A1
- [0302] PCT 출원 WO 제04029213호 A2
- [0303] Pietras 등, Oncogene, 17(17): 2235-2249, 1998.
- [0304] Qin 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(24): 14411-14416, 1998.
- [0305] Ravindranath and Morton, Intern. Rev. Immunol., 7: 303-329, 1991.
- [0306] Reich 등, Mol. Vis., 9: 210-216, 2003.
- [0307] Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed.Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- [0308] Rosenberg 등, Ann. Surg. 210(4): 474-548, 1989.
- [0309] Rosenberg 등, N. Engl.J. Med., 319: 1676, 1988.
- [0310] Ryther 등, Gene Ther., 12(1): 5-11, 2004.
- [0311] Sambrook 등, In: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001.
- [0312] Schaller and Parsons, Trends in Cell Biology, 3: 258-62, 1993.
- [0313] Schaller 등, Mol Biol Cell, 10: 3489-3505, 1999.
- [0314] Schaller, Biochim Biophys Acta, 1540: 1-21, 2001.
- [0315] Schaller, J Endocrinol, 150: 1-7, 1996.
- [0316] Schaller, Trends Cell Biol, 3: 258-262, 1993.
- [0317] Scheit, In: Synthesis and Biological Function,Wiley-Interscience, NY, 171-172, 1980.
- [0318] Schlaepfer and Hunter,Trends in Cell Biology, 8: 151-57, 1998.

- [0319] Schlaepfer 등, Prog Biophys Mol Biol, 71: 435-78, 1999.
- [0320] Sein 등, Oncogene, 19: 5539-42, 2000.
- [0321] Sheta 등, J Natl Cancer inst, 92: 1065-73, 2000.
- [0322] Shibata 등, Cancer Res, 58: 900-903, 1998.
- [0323] Sieg 등, Nat Cell Biol, 2: 249-56, 2000.
- [0324] Sioud and Sorensen, Biochem. Biophys. Res. Comm., 312: 1220-1225, 2003.
- [0325] Siwak 등, Clin Cancer Res, 8: 955-56, 2002.
- [0326] Sledz 등, Nat. Cell Biol., 5: 834-839, 2003.
- [0327] Song 등, Nature Med. 9: 347-351, 2003.
- [0328] Sonoda 등, Journal of Biological Chemistry, 275: 16309-15, 2000.
- [0329] Sood 등, Am J Pathol, 165: 1087-1095, 2004.
- [0330] Sood 등, Cancer Biology & Therapy, 1: 511-17, 2002.
- [0331] Sorensen 등, J. Mol. Biol., 327: 761-66, 2003.
- [0332] Soutschek 등, Nature, 432: 173-178, 2004.
- [0333] Spagnou 등, Biochemistry, 43: 13348-13356, 2004.
- [0334] Sulman 등, Genomics, 40: 371-374, 1997.
- [0335] Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 4194-4198, 1978.
- [0336] Thaker 등, 36th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists, Miami, Fla., 2005.
- [0337] Thaker 등, Clin. Cancer Res., 10: 5145-5150, 2004.
- [0338] Thurston 등, J. Clin. Invest., 101(7): 1401-1413, 1998.
- [0339] Uchida 등, Mol. Ther., 10: 162-171, 2004.
- [0340] Voskoglou-Nomikos 등, Clin. Cancer Res., 9: 4227-4239, 2003.
- [0341] Walker-Daniels 등, Prostate, 41: 275-80, 1999.
- [0342] Wianny 등, Nat. Cell Biol., 2: 70-75, 2000.
- [0343] Wong 등, Gene, 10: 87-94, 1980.
- [0344] Xia 등, Nat. Biotechnol, 20: 1006-10, 2002.
- [0345] Yang 등, Oncogene, 22: 5694-701, 2003.
- [0346] Zelinski 등, Cancer Res., 61: 2301, 2001.
- [0347] Zhang 등, J. Biol. Chem., 279: 10677-684, 2004.