



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0097938
(43) 공개일자 2011년08월31일

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7015840

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년12월11일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년07월08일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2008/004097

(87) 국제공개번호 WO 2010/067041

국제공개일자 2010년06월17일

(71) 출원인

싸이오서스 테라퓨틱스 엘티디.

영국 이씨4에이 3터더블유 런던 뉴 스트리트 스퀘어 5

(72) 발명자

세이무어, 레오나르드, 윌리엄

영국 오엑스2 6에이취에이 옥스포드 우드스탁 로드 래드클리프 인퍼머리 유니버시티 오브 옥스포드 디파트먼트 오브 클리니컬 파마콜로지

울브리히, 카렐

체코 16206 프라하 6 헤이로브스키 스퀘어 2 인스티튜트 오브 마크로몰레큘라 케미스트리

(74) 대리인

양영준, 양영환

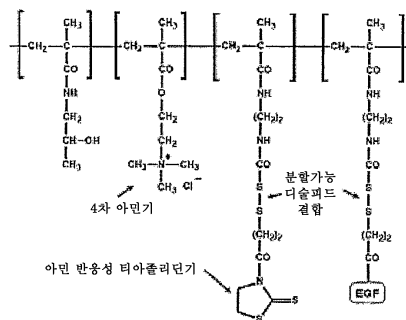
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 하전된 4차 아미노기를 포함하는 중합체를 사용한 핵산 벡터의 개질

(57) 요약

본 발명은 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기를 포함하는 중합체에 공유결합 연결되는, 중합체로 개질된 핵산 벡터를 제공한다.

대표도 - 도3a



특허청구의 범위

청구항 1

1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기를 포함하는 중합체에 공유결합 연결되는, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 치료적 유전 물질을 포함하는, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 핵산 벡터에 대한 중합체의 연결 및 핵산 벡터의 개질이, 저해되지 않는다면 보통은 상호작용할 다른 분자와 숙주의 생물학적 시스템 내에서 핵산 벡터가 상호작용하는 능력을 저해하거나, 또는 저해되지 않는다면 보통은 결합할 부위 또는 수용체에 핵산 벡터가 결합하는 능력을 저해하는, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스, 세균 또는 박테리오파지, 진균, 포자, 진핵 세포 핵 또는 유전 정보를 포함하는 다른 미생물 단편 또는 구성요소로 이루어진 군으로부터 선택되는 미생물인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 치료적 유전 물질을 포함하는 바이러스성 벡터인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 벡터가 숙주 내의 특정 부위 또는 수용체와 보통은 상호작용하는 바이러스이며, 여기서 양으로 하전된 4차 아미노기를 갖는 중합체는 바이러스의 보통의 수용체-결합 활성을 마스킹하고/하거나 숙주 내의 새로운 또는 상이한 부위 또는 수용체로의 바이러스의 재표적화를 가능하게 하는 것인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 아데노바이러스 (adenovirus), 헤르페스 바이러스 (herpes virus), 파르보바이러스 (parvovirus), 포क्स바이러스 (poxvirus), 토가바이러스 (Togavirus), 로타바이러스 (Rotavirus) 또는 피코르나바이러스 (picornavirus)를 기반으로 하는 바이러스인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 및 양으로 하전된 중합체 및/또는 지질 사이의 자가 조립 (self assembly)으로 형성되는, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 9

제8항에 있어서, 핵산이 siRNA 또는 안티센스 RNA 또는 안티센스 DNA인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 10

제8항에 있어서, 핵산이 mRNA 또는 DNA인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체가 다가 중합체인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체가 핵산 벡터에 적어도 2개의 연결, 통상적으로 적어도 3개의 연결에 의해 연결되는, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 중합체 골격이 N-2-히드록시프로필메타크릴아미드 (HPMA), N-(2-히드록시에틸)-1-글루타민 (HEG), 에틸렌글리콜-올리고펩티드와 같은 단량체 단위를 기반으로 하는 것이거나, 또는 폴리시알릭산 또는 폴리만난 중합체인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 및/또는 중합체와 핵산 벡터 사이의 연결이 가수분해성 또는 효소분해성인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 벡터를 개질시키는데 사용되는 중합체가 히드로겔을 형성하도록 가교결합되는, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 양으로 하전된 4차 아미노기가 중합체 골격에 직접 또는 스페이서 기를 통해 연결되는, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 17

제16항에 있어서, 각각의 양으로 하전된 4차 아미노기가 중합체 골격에 1개 이상의 분해성 또는 생분해성 연결을 통해, 통상적으로는 환원가능 또는 가수분해가능 결합을 포함하는 링커에 의해 연결되는, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 1개 이상의 분해성 또는 생분해성 연결이 디설피드 결합, 히드라지드 결합, 아세탈 잔기 또는 효소적으로 분할가능한 결합을 포함하는, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 활성제가 중합체에 커플링되거나 중합체 내에 포함되는, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 20

제19항에 있어서, 생물학적 활성제가 하나 이상의 성장 인자 또는 시토카인, 당, 호르몬, 지질, 인지질, 지방, 아포리포단백질, 세포 부착 프로모터, 효소, 독신, 펩티드, 당단백질, 혈청 단백질, 비타민, 미네랄 및/또는 수용체를 인식하는 항체인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 21

제19항에 있어서, 생물학적 활성제가 항체 또는 항체 단편인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 벡터의 개질이 핵산 벡터를 생물학적 숙주 내의 상이한 수용체로 재표적화하는 효과를 갖는, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 23

1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기 및 1개 이상의 반응성 기를 포함하는 중합체와 핵산 벡터를 반응시켜 핵산 벡터가 1개 이상의 공유결합 연결에 의해 중합체에 연결됨으로써 중합체로 개질된 핵산 벡터를 수득하는 단계를 포함하는, 핵산 벡터의 생물학적 및/또는 물리화학적 특성을 개질시키는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 핵산 벡터가 제2항 내지 제10항 중 어느 한 항의 특징을 부가적으로 포함하고/하거나 중합체가 제11항 내지 제19항 중 어느 한 항의 특징을 부가적으로 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 중합체가 1개 이상의 상기 반응성 기로 치환된 골격을 갖는 생물학적 불활성 중합체인 방법.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 반응성 기가 중합체 골격에 직접 또는 스페이서 기를 통해 연결되는 것인 방법.

청구항 27

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기가 중합체 골격에 제17항 또는 제18항에 정의된 1개 이상의 분해성 또는 생분해성 연결을 통해 연결되며, 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기와 중합체 골격 사이의 상기 분해성 또는 생분해성 연결을 분할하는 부가적인 단계를 포함하는 방법.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항의 방법으로 수득가능한, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 29

제1항 내지 제22항 및 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체가 마스킹하지 않으면 중합체로 개질된 핵산 벡터의 활성을 중화시킬 수 있는 항체에 의한 인식의 대상이 될 핵산 벡터의 영역을 마스킹하며, 상기 영역이 통상적으로 핵산 벡터의 표면의 음으로 하전되거나 산성인 영역인, 중합체로 개질된 핵산 벡터.

청구항 30

제1항 내지 제22항, 제28항 및 제29항 중 어느 한 항에 정의된 중합체로 개질된 핵산 벡터를 적합한 회석제 또는 담체와 함께 포함하는 조성물.

청구항 31

유전자 치료를 필요로 하는 환자에게 제1항 내지 제22항, 제28항 및 제29항 중 어느 한 항에 정의된, 치료적 유전 물질을 포함하는 중합체로 개질된 핵산 벡터 또는 제30항에 정의된 조성물의 치료적 활성이고 비독성인 양을 투여하는 것을 포함하는 유전자 치료 방법.

청구항 32

제1항 내지 제22항, 제28항 및 제29항 중 어느 한 항에 정의된, 치료적 유전 물질을 포함하는 중합체로 개질된 핵산 벡터의 백신 접종 또는 유전자 치료에 사용하기 위한 의약 제조에서의 용도.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은, 바람직하게는 바이러스, 바이러스의 단편 및 자가-조립 (self-assembling) 합성 벡터를 비롯한 치료적 형질전환유전자 또는 활성을 전달하기 위한, 입자 벡터의 생물학적 및/또는 물리화학적 특성을 개질시키는 개선된 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 본 발명에 따라 핵산 벡터의 생물학적 및/또는 물리화학적 특성을 개질 또는 변화를 야기하기 위해 개질된 핵산 벡터, 그의 제조 방법 및 의약을 비롯한 다양한 분야에서의 다양한 생명공학 전략에서의 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 바이러스를 비롯한 미생물은 생명공학의 넓은 분야에 걸쳐 다양한 적용이 가능하다. 이는 의약, 농업, 산업적 생산 과정 (특히, 오일 및 양조 산업을 포함함) 및 생물적환경정화와 관련이 있다. 이러한 생물학적 체제에 있어서 다수의 유용한 적용 및 기능이 확인되고 개발되어왔다. 그러나, 종종 그의 활성의 개발 또는 증강은 그의 정확한 특성에 의해 제한되어, 이론적으로는 가능하나 실제로는 그의 범주를 벗어나는 과업을 실현하는 능력을 한정한다. 꽤 자주 발생하는 이러한 상황에서, 바이러스 또는 미생물의 특성을 개량하여 그의 요구되는 목적을 위해 보다 적절한 특성을 부여하는 것이 종종 바람직할 것이다.
- [0003] 따라서, 생물학적 살충제, 예를 들어 바콜로바이러스는 부적절한 표적 특이성 및 환경에서의 부정적 생존 특성에 의해 그의 유용성이 한정될 수 있고; 황 대사 세균은 분산 및 분배의 부적당한 패턴에 의해 석유화학적 산업에서의 그의 유용한 적용이 제한될 수 있고; 인간 및 수의학적 유전자 치료의 맥락에서, 치료적 유전자의 전달을 매개하기 위한 바이러스는 표적 조직에서의 형질전환유전자 발현의 비효율성에 의해 그의 유용성이 제한될 수 있다.
- [0004] 체세포 유전자 치료의 분야는, 유전 질환 (예, 낭성섬유증, 근육퇴행위축, 효소결핍증) 및 연령- 또는 손상-관련 생리학적 열화로부터 조래되는 질환 (암, 심장 질환, 성인 당뇨병) 모두를 비롯한 여러 다양한 유형의 질환을 위한 치료법을 개선시키는데 유망하기 때문에 최근 많은 관심을 받고 있다. 그러나 이러한 분야는, 100회 이상의 임상 실험이 개시된 것을 비롯하여 빠르고 광범위하게 발전해왔지만, 환자에게 주어지는 명확한 치료적 혜택의 예는 매우 적다. 최근, 한 안티센스 기술이 인간 용도로 허가되었으나, 원래의 기대를 만족하는 유전자 치료 전략은 아직 없고, 가까운 미래에 루틴한 임상적 적용이 승인될 가능성이 있는 것도 없다.
- [0005] 관련된 기술 분야는, 용해성 바이러스 (치료적 유전자를 운반하도록 조작되거나 조작되지 않을 수 있음)가 선택적으로 암 세포 안에서 복제되고 종양 내에서의 바이러스의 증폭을 야기하여 종양 세포가 용해되고 인접 종양 세포로 감염이 확산되어 용해적 복제 사이클이 반복되는 "바이로테라피 (virotherapy)"로 공지되어 있다.
- [0006] 치료적 효력이 부족한 이유는 부분적으로 환자 모집단을 반영하며 (이러한 실험적 치료에 등록하는 대부분의 환자는 이미 질병이 매우 심각한 상태여서 효과적인 치료도 적은 질적 혜택을 나타낼 수 있음), 주로는 달성되는 치료적 유전자의 발현의 부적당한 수준, 지속기간 및 분포를 반영하는 것이다. 요지는, 정교한 치료 전략의 성공적인 적용은 유전자 전달 및 발현을 위한 부적당한 백터에 의해 제한된다.
- [0007] 지금까지 유전자 치료 적용에서 사용하기 위한 다음의 두 가지 주요 유형의 백터가 연구되어 왔다: 비-바이러스성 (주로 양이온성 리포솜을 기반으로 함) 및 바이러스성 (주로 레트로바이러스, 아데노바이러스, 최근의 아데노-관련 바이러스 (aav) 및 렌티바이러스).
- [0008] 바이로테라피를 위해 개발된 용해성 바이러스에는 아데노바이러스 (모든 혈청형), 헤르페스 (herpes) 바이러스, 토가 (toga) 바이러스 (특히 알파 바이러스, 에컨대 신드비스 (Sindbis) 및 쉰리키 삼림 (Semliki Forest) 바이러스), 카디오 바이러스 (특히 세네카 밸리 (Seneca Valley) 바이러스), 백신니아 (vaccinia) 바이러스, 베시쿨로 구내염 (Vesiculo Stomatitis) 바이러스, 뉴캐슬 (Newcastle) 질환 바이러스, 홍역 바이러스 및 레오바이러스 (reovirus)가 포함된다.
- [0009] 바이러스가 유전자 전달을 위한 백터로서 당연한 선택인데, 이는 자연에서 그의 본질적으로 유일한 기능이기 때문이다. 결과적으로 바이러스는 지금까지 임상적 연구에 사용된 대부분의 백터를 형성하면서 유전자 치료 및 유전자 백신에서 상당히 유용했다. 아데노바이러스의 성공적인 적용을 제한하는 그의 주요 특징은 그의 면역원성이다. 이는 매우 효율적인 유전자 전달 백터로서 수 백만년간 진화되어온 상습적 병원체이지만, 그의 숙주도 유사하게 매우 효과적인 보호 기작을 발달시켜왔다. 암 환자로부터의 혈청 및 복수 (ascite fluid)는 심지어 높은 희석율에서도 시험관내 (in vitro)에서 바이러스성 감염을 완전히 예방할 수 있는 항체를 함유한다.
- [0010] 아데노바이러스를 포함하는 통상적인 인간 프로토콜은 유의적 염증 반응뿐만 아니라 표적 세포의 비효율적 감염도 야기한다.
- [0011] 비-바이러스성 시스템이 훨씬 나은 안정성 기록을 가지며 대량으로 생산하기에도 더 용이하지만, 이는 낮은 특이성 트랜스펙션 활성을 지닌다. 표적 조직에서의 유전자 발현의 효율 또한 비-바이러스성 시스템과 관련된 주요 문제이다.
- [0012] 현재 이용가능한 질환 치료용 백터의 성공적인 적용의 또 다른 주요 제약은, 직접 적용 또는 동맥내 투여에 의한 질환 부위로의 직접적인 투여가 요구된다는 점이다. 정맥내 주사를 따라 특정 세포를 표적으로 할 수 있는

백터는 없다. 양이온성 지질 시스템은 처음으로 맞닥뜨리는 모세혈관상 (capillary bed), 폐혈관상 (pulmonary bed)을 폐색시키는 한편, 아데노바이러스/레트로바이러스는 간에서 빠르게 취하여져서 (동물 실험에서), 국소적 독성을 매개한다. 특정 질환 (예, 기관지 상피 낭성섬유증)의 치료를 위해 국소적 투여를 실현할 수 있지만, 다른 질환은 보다 널리 분포되어 있어 (특히, 임상적 암 및 아테롬성동맥경화), 성공적인 유전자 치료의 가능성을 갖기 위해 정맥내 표적된 유전자 전달이 중요하다.

[0013] 유전자 전달 백터, 예컨대 DNA-기재 다가전해질 복합체 또는 중합체로 개질된 바이러스가 이러한 문제를 극복하기 위하여 개발되었다.

[0014] 바이러스의 임상적 사용을 촉진하기 위한 제WO 98/44143호에 기재된 한 접근법은 말단 아민-반응성 기를 갖는 단일-관능성 중합체, 예컨대 폴리 (에틸렌-글리콜) (PEG)로 바이러스의 표면을 개질시키는 것이다. 이는 혈청 항체에 의한 감염의 중화 감소를 야기할 수 있다. 이러한 접근법은 표적 세포에 대한 보통의 수용체-결합 및 감염 (유형 5 아데노바이러스의 경우 CAR 수용체를 포함)을 유지하지만, (비-표적된 세포의 원치 않는 감염을 제거하기 위해) 보통의 감염력의 제거를 매개하지 않거나, 유용하고 치료적으로-관련이 있는 항성을 수득하기 위해 선택된 수용체로의 바이러스의 재표적화를 촉진하지 않는다는 문제가 존재한다.

[0015] 제WO 00/74722호에는 바이러스와 같은 생물학적 요소의 생물학적 및/또는 물리화학적 특성을, 다중 반응성 기를 갖는 다가 중합체의 코팅을 제공함으로써, 개질시키는 방법이 기재되어 있다. 이러한 접근법은 일부 생물학적 요소가 숙주 생물학적 시스템 내의 특정 부위로 표적화 또는 재표적화될 수 있게 하고, 유전자 치료 또는 항암 치료를 위한 바이러스성 백터와 관련하여 유용할 수 있다.

[0016] 그러나, 이러한 기존의 방법론으로는 핵산 백터를 완전히 코팅할 수 없으며, 항체에 의해 가장 인식되기 쉬운 백터의 부분을 선택적으로 코팅할 수 없다.

[0017] 놀랍게도, 이제 양으로 하전된 4차 아미노기를 포함하는 반응성 중합체를 사용하였을 때 훨씬 더 빠르고 효율적으로 핵산 백터를 코팅할 수 있음을 발견하였다. 또한, 놀랍게도, 본 발명에 따라 코팅했을 때, 마스킹하지 않으면 항체에 의한 인식의 대상이 될 핵산 백터의 특정 영역을 마스킹할 수 있다는 것을 발견하였다. 이러한 영역은 통상적으로 음으로 하전되거나 핵산 백터의 표면 상의 산성 영역이다.

발명의 내용

[0018] 발명의 개요

[0019] 본 발명은 따라서, 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기를 포함하는 중합체에 공유결합 연결되는, 중합체로 개질된 핵산 백터를 제공한다.

[0020] 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기 및 1개 이상의 반응성 기를 포함하는 중합체와 상기 핵산 백터를 반응시켜 핵산 백터가 1개 이상의 공유결합 연결에 의해 중합체에 연결됨으로써 중합체로 개질된 핵산 백터를 수득하는 단계를 포함하는, 핵산 백터의 생물학적 및/또는 물리화학적 특성을 개질시키는 방법이 또한 제공된다.

[0021] 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 중합체로 개질된 핵산 백터가 또한 제공된다.

[0022] 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 백터를 적합한 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 조성물이 또한 제공된다.

[0023] 유전자 치료를 필요로 하는 환자에게 치료적 유전 물질을 포함하는 중합체로 개질된 핵산 백터 또는 본 발명의 조성물의 치료적 활성이고 비독성인 양을 투여하는 것을 포함하는 유전자 치료 방법 (유전자 백신 접종 포함)이 또한 제공된다.

[0024] 치료적 유전 물질을 포함하는 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 백터의 백신 접종 또는 유전자 치료에 사용하기 위한 의약 제조에서의 용도가 또한 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 발명의 상세한 설명

[0026] 본원에서 사용되는 용어 "핵산 백터"는 핵산을 포함하는 비히클을 지칭한다. 통상적으로, 핵산 백터는 치료적 유전 물질을 포함한다.

[0027] 용어 "치료적 유전 물질"은 본원에서, 예를 들어 치료적으로 유용한 단백질 또는 RNA의 발현을 통해, 치료적 효과를 수득하기 위해 투여되는 광범위한 임의의 유전 물질 또는 핵산을 나타내는 것으로 사용되는 것이 이해될

것이다.

- [0028] 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 벡터에서, 미반응 반응성 기는 주로 존재하지 않을 것임이 인식될 것이다. 그러나, 중합체로 개질된 핵산 벡터 중에 일부 미반응 반응성 기가 남아, 예를 들어 생물학적으로 활성인 제제가 도입될 수 있도록 하는 상황이 있을 것이다. 따라서, 이러한 상황에서, 중합체로 개질된 핵산 벡터는 1개 이상의 반응성 기를 추가로 포함한다.
- [0029] 일반적으로, 중합체의 핵산 벡터에의 연결 및 핵산 벡터의 개질은 핵산 벡터가 숙주의 생물학적 시스템 내에서 다른 분자 (저해가 없다면 보통은 상호작용할 다른 분자)와 상호작용하는 능력의 저해를 야기하거나, 또는 핵산 벡터가 부위 또는 수용체 (저해가 없다면 보통은 결합할 부위 또는 수용체)에 결합하는 능력의 저해를 야기한다. 특정 바람직한 핵산 벡터의 상호작용은 당연히 남아 있을 것이다. 중합체의 핵산 벡터에의 연결은 통상적으로, 보통은 핵산 벡터를 중화시킬 혈청 항체와 같은 분자와 상호작용하는 핵산 벡터의 능력의 저해를 야기한다.
- [0030] 통상적으로, 핵산 벡터는 바이러스, 세균, 박테리오파지, 진균, 포자, 진핵 세포 핵 또는 유전 정보를 포함하는 다른 미생물 단편 또는 구성요소로 이루어진 군으로부터 선택되는 미생물이다.
- [0031] 바이러스 및 바이러스성 입자가 바람직하다. 더 바람직하게는 핵산 벡터는 치료적 유전 물질을 포함하는 바이러스성 벡터 또는 내인성 치료적 활성을 갖는 바이러스이다. 원칙적으로 임의의 공지된 바이러스가 핵산 벡터로서 본 발명에서 사용될 수 있다. 바이러스는 바람직하게는 재조합 유전자 조작 바이러스이다. 재조합 바이러스는 임의로 형질전환 유전자를 포함한다. 용어 "형질전환 유전자"는 본원에서 바이러스에는 원래 없는 핵산을 나타내는 것으로 사용된다. 예를 들어, 형질전환 유전자는 생물학적 기능성 단백질 또는 펩티드, 안티센스 분자 또는 마커 분자를 인코딩할 수 있다. 바이러스는 RNA 또는 DNA 바이러스이고, 임의로 하기의 과 및 군 중 하나로부터 선택된다: 아데노바이러스과 (Adenoviridae); 알파모바이러스 (Alfamoviruses); 브로모바이러스과 (Bromoviridae); 알파크립토바이러스 (Alphacryptoviruses); 파르티티바이러스과 (Partitiviridae); 바쿨로바이러스과 (Baculoviridae); 바드나바이러스 (Badnaviruses); 베타크립토바이러스 (Betacryptoviruses); 파르티티바이러스과 (Partitiviridae); 비게미니바이러스 (Bigeminiviruses); 게미니바이러스과 (Geminiviridae); 비르나바이러스과 (Birnaviridae); 브로모바이러스 (Bromoviruses); 브로모바이러스과 (Bromoviridae); 비모바이러스 (Bymoviruses); 포티바이러스과 (Potyviridae); 분야바이러스과 (Bunyaviridae); 칼리시바이러스과 (Caliciviridae); 카필로바이러스 (Capillovirus) 군; 카를라바이러스 (Carlavirus) 군; 카르모바이러스 (Carmovirus) 바이러스 군; 카울리모바이러스 (Caulimovirus) 군; 클로스테로바이러스 (Closterovirus) 군; 코멜리나 황색 반상 바이러스 (Commelina yellow mottle virus) 군; 코모바이러스 (Comovirus) 바이러스 군; 코로나바이러스과 (Coronaviridae); PM2 과지 군; 코르시코바이러스과 (Corcicoviridae); 크립틱 바이러스 (Cryptic virus) 군; 크립토바이러스 (Cryptovirus) 군; 쿠쿠모바이러스 (Cucumovirus) 바이러스 CD6 과지 군; 시스토바이러스과 (Cystoviridae); 시토르하브도바이러스 (Cytorhabdoviruses); 라브도바이러스과 (Rhabdoviridae); 카네이션 윤문 바이러스 (Carnation ringspot) 군; 디안토바이러스 (Dianthovirus) 바이러스 군; 잠두 위조 바이러스 (Broad bean wilt) 군; 에나모바이러스 (Enamoviruse); 파마바이러스 (Fabavirus) 바이러스 군; 피지바이러스 (Fijiviruses); 레오바이러스과 (Reoviridae); 펠로바이러스과 (Filoviridae); 플라비바이러스과 (Flaviviridae); 푸로바이러스 (Furovirus) 군; 게미니바이러스 (Geminivirus) 군; 기아르디아바 바이러스 (Giardiavirus) 군; 헤파드나바이러스과 (Hepadnaviridae); 헤르페스바이러스과 (Herpesviridae); 호르데이바이러스 (Hordeivirus) 바이러스 군; 히브리게미니바이러스 (Hybrigeminiviruses) 군; 게미니바이러스과 (Geminiviridae); 이다에오바이러스 (Idaeoviruses); 일라르바이러스 (Ilarvirus) 바이러스 군; 이노바이러스과 (Inoviridae); 이포모바이러스 (Ipomoviruses); 포티바이러스과 (Potyviridae); 이리오도바이러스과 (Iriodoviridae); 레비바이러스과 (Leviviridae); 리포트릭스바이러스과 (Lipothrixviridae); 루테오바이러스 (Luteovirus) 군; 마클로모바이러스 (Machlomoviruses); 마클루라바이러스 (Macluraviruses); 마라피바이러스 (Marafivirus) 바이러스 군; 옥수수 다색 오갈병 바이러스 (Maize chlorotic dwarf virus) 군; 마이크로바이러스과 (Microviridae); 모노게미니바이러스 (Monogeminiviruses); 게미니바이러스과 (Geminiviridae); 미요바이러스과 (Myoviridae); 나나바이러스 (Nanaviruses); 네크로바이러스 (Necrovirus) 군; 네포바이러스 (Nepovirus) 바이러스 군; 노다바이러스과 (Nodaviridae); 뉴클레오르하브도바이러스 (Nucleorhabdoviruses); 라브도바이러스과 (Rhabdoviridae); 오르토믹소바이러스과 (Orthomyxoviridae); 오리자바이러스 (Oryzaviruses); 레오바이러스과 (Reoviridae); 아우르미아바이러스 (Ourmiaviruses); 파포바바이러스과 (Papovaviridae); 파라믹소바이러스과 (Paramyxoviridae); 파스닙황화반점 (Parsnip yellow fleck) 바이러스 군; 파르티티바이러스과 (Partitiviridae); 아데노 관련 바이러스를 비롯한 파르보바이러스과 (Parvoviridae);

완두돌출모자이크 바이러스 (Pea enation mosaic virus) 군; 피코드나바이러스과 (Phycodnaviridae); 피토레오 바이러스 (Phytoreoviruses): 레오바이러스과 (Reoviridae); 피코르나바이러스과 (Picornaviridae); 플라스마 르바이러스과 (Plasmaviridae); 포도바이러스과 (Podoviridae); 폴리드나바이러스과 (Polydnaviridae); 포텍 스바이러스 (Potexvirus) 군; 포티바이러스 (Potyvirus); 폭스바이러스과 (Poxviridae); 레오바이러스과 (Reoviridae); 레트로바이러스과 (Retroviridae); 라브도바이러스과 (Rhabdoviridae); 리지디오바이러스 (Rhizidiovirus) 군; 리모바이러스 (Rymoviruses): 포티바이러스과 (Potyviridae); 위성 (Satellite) RNA; 사 텔리바이러스 (Satelliviruses); 세퀴바이러스 (Sequiviruses): 세퀴바이러스과 (Sequiviridae); 소베모바이러 스 (Sobemoviruses); 시포바이러스과 (Siphoviridae); 소베모바이러스 (Sobemovirus) 군; SSVI-유형 파지; 텍 티바이러스과 (Tectirividae); 테누이바이러스 (Tenuivirus); 테트라바이러스과 (Tetraviridae); 토마모바이 러스 (Tobamovirus) 군; 토브라바이러스 (Tobravirus) 군; 토가바이러스과 (Togaviridae); 톰부스바이러스 (Tombusvirus) 군; 토스포바이러스 (Tospoviruses); 분야바이러스과 (Bunyaviridae); 토로바이러스 (Torovirus) 군; 토티바이러스과 (Totiviridae); 티모바이러스 (Tymoviruses); 티모바이러스 (Tymovirus) 군; 식물 바이러스 위성 (Plant virus satellites); 움브라바이러스 (Umbraviruses); 할당되지 않은 포티바이러스; 포티바이러스과 (Potyviridae); 할당되지 않은 라브도바이러스 (rhabdoviruses); 라브도바이러스과 (Rhabdoviridae); 바리코사바이러스 (Varicosaviruses); 와이카바이러스 (Waikaviruses); 세퀴바이러스과 (Sequiviridae); 군이 할당되지 않은 바이러스.

- [0032] 일반적으로, 핵산 백터는 숙주 내의 특정 부위 또는 수용체와 보통은 상호작용하는 바이러스이며, 여기서 양으 로 하전된 4차 아미노기를 갖는 1가 또는 다가 반응성 중합체는 바이러스의 수용체-결합 활성을 마스킹하고/하 거나 숙주 내의 새로운 또는 상이한 부위 또는 수용체로의 재표적화를 가능하게 한다.
- [0033] 핵산 백터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노관련 바이러스, 바쿨로바이러스, 헤르페스바이러스, 파포 바바이러스 또는 폭스바이러스일 수 있다. 일부 적용에 있어서, 핵산 백터는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러 스, 백시니아 바이러스 또는 알파 바이러스를 기반으로 한 재조합 바이러스일 수 있다.
- [0034] 바람직하게는 핵산 백터는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 파르보바이러스, 폭스바이러스, 토가바이러스, 로타바이러스 또는 피코르나바이러스를 기반으로 한 바이러스이다.
- [0035] 아데노바이러스가 특히 바람직하다. 아데노바이러스에는 비-인간 아데노바이러스, 예컨대 조류 아데노바이러스 CELO가 포함된다.
- [0036] 핵산 백터가 외 껍질을 갖는 바이러스인 일부 경우, 중합체와 반응시키기 전에 예비 단계는 껍질을 벗겨내는 단 계를 포함할 수 있다.
- [0037] 핵산 백터로 사용하기에 적합한 핵산 백터의 구성요소는, 예를 들어 바이러스성 코어 또는 프로바이러스로부터 (예를 들어, 폭스 바이러스로부터) 제공될 수 있다. 바이러스성 코어의 예는 문헌 [Russell, W. C., M., K., Skehel, J. J. (1972). "The preparation and properties of adenovirus cores" Journal of General Virology 11,35-46]에 개시된 방법 및 그의 개질된 방법에 의해 제조가능한 아데노바이러스 코어이다.
- [0038] 통상적으로, 핵산 백터는 바이러스 또는 바이러스성 코어이다.
- [0039] 본 발명을 수행하는데 사용되는 세균성 핵산 백터에는, 예를 들어 실험적 유전자 치료에 사용되는 세균 (예, 살 모넬라), 생물학적 살충제로 사용되는 세균 또는 바쿨로바이러스 (예, 핵 다각체병 바이러스 NPD, 봉입체 비형 성 바이러스 NV, 과립병 바이러스 또는 바실러스 투린지엔시스 (Bacillus thuringiensis)), 오일 슬러지/유출을 분해하는데 유용한 세균 균주 또는 그의 유전적으로 개질된 형태 (예, 장내 세균과 (Enterobacteriaceae), 아니 트라툼 (anitratum), 슈도모나스 (pseudomonas), 미구균 (micrococcus), 코마모나스 (comamonas), 잔토모나스 (zanthomonas), 아크로모박터 (achromobacter) 또는 비드리오-아에로모나스 (vidrio-aeromonas)), 오일 중 황 을 H2S로 환원시키는 원인이 되는 세균성 균주 (예, 페트로토가 스노빌리스 (petrotoga snobilis), 페트로토가 미오테르마 (petrotoga miotherma), 데술포토마쿨룸 니그리프 칸스 (desulfotomaculum nigrif cans), 데술포비 브리오 (desulphovibrio)) 또는 오일로부터 황을 산화시킬 수 있는 세균성 균주 (예, 로도코커스 (rhodococcus) 중 균주 ECRD-1)가 포함될 수 있다.
- [0040] 핵산 백터로 사용하기에 적합한 세균의 추가적 예는 리켓시엘라 포필리아에 (Rickettsiella popiliae), 바실러 스 포필리아에 (Bacillus popiliae), B. 투린지엔시스 (그의 아종 이스라엘렌시스 (israelensis), 쿠르스타키 (kurstaki) 및 B. 스파에리쿠스 (B. sphaericus) 포함), B. 렌티모르부스 (B. lentimorbus), B. 스파에리쿠스, 클로스트리듐 말라코소메 (Clostridium malacosome), 슈도모나스 아에루기노사 (Pseudomonas aeruginosa) 및

제노르하브두스 네마토틸루스 (*Xenorhabdus nematophilus*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이다.

- [0041] 핵산 벡터로 사용하기에 적합한 파지는, 예를 들어 하기 과 중 하나로부터의 파지이다: 시아노파지 (Cyanophage), 람다형 파지, 이노바이러스, 레비바이러스과, 스틸로바이러스과 (Styloviridae), 마이크로바이러스과, 플렉트로바이러스 (Plectrovirus), 플라스마바이러스과 (Plasmaviridae), 코르티코바이러스과 (Corticoviridae), 위성 박테리오파지, 미요바이러스과, 포도바이러스과, T-작수 파지. 특정 파지의 예는 MV-L3, PI, P2, P22, d) 29, SPOI, T4, T7, MV-L2, PM2, F1, MV-L51, ou174,06, MS2, M13, Qp, 텍티바이러스과 (tektiviridae) (예, PRD1)이다.
- [0042] 핵산 벡터로 사용하기에 적합한 진균은, 예를 들어 하기 과 중 하나로부터의 진균이다: 바시디오미세테스 (Basidiomycetes) (담자홀씨를 만드는 것, 가스테로미세테스 (Gasteromycetes), 히메노미세테스 (hymenomycetes), 우레디니오미세테스 (urediniomycetes), 우스틸라지노미세테스와 같은 것이 포함됨), 보베리아 (Beauveria); 베타르지움 (Vetarrhizium), 엔토모프토라 (Entomophthora) 또는 코엘로미세스 (Coelomomyces). 핵산 벡터로 사용하기에 적합한 포자는 담자포자, 악티노미세레스 (actinomyceres), 아르트로박터 (arthrobacter), 마이크로박테리움 (microbacterium), 클로스트리듐 (clostridium), 로도코커스 (Rhodococcus), 테르모모노스포라 또는 아스페르길루스 푸미가투스 (Aspergillus fumigatus)이다.
- [0043] 핵산 벡터로 사용하기에 적합한 세균의 추가적 예는 리켓시엘라 포필리아에, 바실러스 포필리아에, B. 투린지엔시스 (그의 아종 이스라엘렌시스, 쿠르스타키 및 B. 스파에리쿠스 포함), B. 렌티모르부스, B. 스파에리쿠스, 클로스트리듐 말라코소메, 슈도모나스 아에루기노사 및 제노르하브두스 네마토틸루스로 이루어진 군으로부터 선택되는 세균이다.
- [0044] 한 실시양태에서, 핵산 벡터는 핵산과 양으로 하전된 중합체 및/또는 지질 사이의 자가 조립으로 형성된다. 용어 핵산에는 합성 분자, 예컨대 siRNA, 안티센스 RNA 및 안티센스 DNA가 포함된다. 일반적으로, 핵산은 mRNA 또는 DNA이다. 본 실시양태에서, 이렇게 형성된 다가전해질 벡터는 일반적으로 표면 순 음전하를 지닌다. 따라서, 핵산과 양으로 하전된 지질 또는 중합체의 전하 비율 (+/-)은 통상적으로 1.0 미만이다. 0.8-0.9의 전하 비율이 바람직하다.
- [0045] 통상적으로, 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 벡터 중에 존재하는 중합체는 다가 중합체이다.
- [0046] 통상적으로, 중합체는 핵산 벡터에 2개 이상의 연결에 의해 연결되며, 사용되는 중합체는 다가 중합체인데, 즉, 다중 반응성 기를 포함한다. 중합체와 핵산 벡터 사이의 연결의 개수는 바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 4개 이상이다. 연결의 개수는, 예를 들어 12 또는 14개일 수 있다. 연결의 개수가 많을수록 중합체로 개질된 핵산 벡터가 안정하다는 장점이 있다.
- [0047] 중합체 골격은 바람직하게는 단량체 단위, 예컨대 N-2-히드록시프로필메타크릴아미드 (HPMA), N-(2-히드록시에틸)-1-글루타민 (HEG), 에틸렌글리콜-올리고펩티드를 기반으로하거나, 폴리시알릭산 또는 폴리만난 중합체이다. HPMA가 바람직하다. 골격이 에틸렌글리콜-올리고펩티드를 기반으로 하는 경우, 올리고펩티드는 바람직하게는 1 내지 4개의 펩티드기를 포함한다.
- [0048] 통상적으로 본 발명에 사용되는 중합체는, 예를 들어 문헌 [Scales, C. W.; Vasilieva, Y. A.; Convertine, A. J.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. Biomacromolecules 2005, 6, 1846-1850]; 문헌 [Yanjarappa, M. J.; Gujraty, K. V.; Joshi, A.; Saraph, A.; Kane, R. S. Biomacromolecules 2006, 7, 1665-1670]; 문헌 [Convertine, A. J.; Ayres, N.; Scales, C. W.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. Biomacromolecules 2004, 5, 1177-1180] (상기 문헌의 전체내용은 본원에 참고문헌으로 도입됨)에 기재된 바와 같이 ATRP (원자 이동 라디칼 중합) 또는 RAFT (가역적 부가-절단 연쇄 이동)와 같은 리빙 라디칼 중합법을 사용하여 제조한다.
- [0049] 관련 교시내용은 본원에 참고문헌으로 도입된 문헌 ['Macromolecular design via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT)/xanthates (MADIX) polymerization.' Perrier, Sebastien; Takolpuckdee, Pittaya. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. (2005), 43(22), 5347-5393]에서도 찾아볼 수 있다.
- [0050] 통상적으로, 중합체 및/또는 중합체와 핵산 벡터 사이의 연결은 가수분해성 또는 효소분해성이다.
- [0051] 가수분해성에 의해 제공되는 불안정성은 핵산 벡터가 보호되는 시간의 통제를 가능하게 하므로 바람직할 수 있다. 따라서, 중합체에 조직-특이적 표적화 기, 즉, 본원에 정의된 바와 같은 생물학적 활성제를 제공하면, 개질된 핵산 벡터가 봉쇄되어 핵산 벡터가 조직과 상호작용하기 전에 표적 조직내의 적절한 위치에 도달하는데 걸

리는 시간 동안 중합체가 핵산 벡터를 보호하도록 중합체 (또는 중합체와 핵산 벡터 사이의 연결)를 설계할 수 있다. 대안적으로, 핵산 벡터의 해제의 최적의 동력학을 수득하는 속도로 분해되도록 중합체를 설계할 수 있다.

- [0052] 효소분해성에 의해 제공되는 불안정성은 중합체 (또는 중합체와 핵산 벡터 사이의 연결)가 선택된 효소에 의해 선택적으로 분해되는 것을 가능하게 하므로 바람직할 수 있다. 이러한 효소는 표적 부위에 존재함으로써, 개질된 핵산 벡터에 표적 부위에서의 유발된 분해 가능성을 부여하여 표적 조직과의 상호작용을 위해 핵산 벡터를 해제시킬 수 있다. 효소는 또한, 표적 세포의 선택된 세포 구획 내에서 개질된 핵산 벡터의 분해를 야기하여 핵산 벡터의 활성을 증강시킬 수 있는 세포내 효소일 수 있다. 대안적으로, 효소-분할 부위는 적절한 생물학적 활성 (예, 금속성단백질분해효소 (metalloproteinase)를 발현하는 침입성 또는 전이성 종양 세포의 도착)에 반응하여 개질된 핵산 벡터의 분해를 촉진하도록 설계할 수 있다. 추가적 변형에서, 개질된 핵산 벡터를 활성화시킬 수 있는 효소를 적절한 시간 또는 부위에 투여하여 개질된 핵산 벡터의 목적하는 분해 및 핵산 벡터와 조직의 후속 상호작용을 매개할 수 있다.
- [0053] 적어도 일부 실시양태에서 핵산 벡터를 개질시키는데 사용되는 중합체는 바람직하게는 히드로겔을 형성하도록 가교결합된다. 히드로겔은 바람직하게는 가수분해적으로 불안정하거나 효소, 예를 들어 매트릭스 금속성단백질 분해효소 2 또는 9에 의해 분해가능하다. 이는 핵산 벡터를 히드로겔 내에 고정시켜 핵산 벡터의 해제를 통제할 수 있게 하기 위함이다. 따라서, 본 발명의 한 바람직한 특징에 따라, 본 발명의 방법은 가교결합 및 히드로겔 형성을 촉진할 수 있는 조건 (예를 들어, 어떠한 것도 과량으로 존재하지 않는 고농도의 시약)하에서 또는 가교결합을 촉진할 수 있는 디아민과 같은 제제의 존재하에서 수행한다. 개질된 핵산 벡터를 포함하는 히드로겔의 형성은 일반적으로 문헌 [Subr, V., Duncan, R. and Kopeck, J. (1990) "Release of macromolecules and daunomycin from hydrophilic gels containing enzymatically degradable bonds", J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 1 (4) 61-278]에 기재된 화학적 접근법을 사용하여 수행할 것이다.
- [0054] 본 발명에 사용되는 중합체는 통상적으로, 중합체 골격 또는 측쇄, 바람직하게는 측쇄에 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기를 포함한다.
- [0055] 일반적으로, 각각의 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기는 중합체 골격에 직접 또는 스페이서 기를 통해 연결된다. 통상적으로, 스페이서 기는 본원에 정의된 바와 같다. 한 실시양태에서, 상기 스페이서 기는 본원에 정의된 바와 같은 기 L이다.
- [0056] 중합체 내의 양으로 하전된 4차 아미노기의 개수는 중합체의 총 중량을 기준으로 바람직하게는 예컨대 0.25 내지 10 mol%, 더 바람직하게는 0.5 내지 7.5 mol%, 가장 바람직하게는 1.5 내지 5 mol%의 양으로 하전된 4차 아미노기를 제공하도록 하는 것이다.
- [0057] 일반적으로, 양으로 하전된 4차 아미노기는 중합체 내에 무작위적으로 위치한다.
- [0058] 중합체가 1가 중합체인 경우, 즉 오직 1개의 반응성 기를 갖는 경우, 양으로 하전된 4차 아미노기는 바람직하게는 반응성 기 가까이에 위치한다.
- [0059] 통상적으로, 중합체 골격에 연결된 양으로 하전된 4차 아미노기는 본원에 정의된 바와 같은 화학식 Ia, Ib, Ic, Id 및 Ie의 양으로 하전된 4차 아미노기로부터 선택된다. 화학식 Ia의 양으로 하전된 4차 아미노기가 바람직하다.
- [0060] 일반적으로, 각각의 양으로 하전된 4차 아미노기는 중합체에 1개 이상의 분해성 또는 생분해성 연결, 바람직하게는 1개의 분해성 또는 생분해성 연결을 통해 연결된다. 이러한 연결은 양으로 하전된 4차 아미노기와 중합체 골격 사이의 직접 결합 또는, 대안적으로는, 상기 스페이서 기 내의 결합일 수 있다. 통상적으로, 상기 연결은 환원가능, 가수분해가능 또는 다른 분할가능한 결합을 지칭한다. 이러한 결합의 예에는, 디설피드 결합, 히드라이드 결합, 아세탈 잔기 또는 효소적으로 분할가능한 결합이 포함된다.
- [0061] 디설피드 결합 -S-S-은 통상적으로 온화한 환원 조건, 예컨대 금속 술파이트를 사용하거나, 적절하게 선택된 효소, 예를 들어 티오레독신을 사용하여 분할된다. 통상적으로, 분할 조건은 벡터의 실행력이 영향을 받지 않도록 선택된다.
- [0062] 히드라이드 결합 -N-N-은 통상적으로 온화한 산화 또는 환원 조건을 사용하여 분할된다. 역시, 분할 조건은 통상적으로 벡터의 실행력이 영향을 받지 않도록 선택된다.

- [0063] 아세탈 잔기는 숙련자에게 널리 공지되어 있고 수성산을 사용하여 용이하게 분할된다.
- [0064] 효소적으로 분할가능한 결합은 통상적으로 반응성 기와 중합체 골격 사이의 연결과 관련하여 본원에 논의된 바와 같다.
- [0065] 일부 실시양태에서, 핵산 벡터 및 양으로 하전된 4차 아미노기는 둘 다 중합체에 분해성 결합을 통해 연결된다. 본 실시양태에서, 핵산 벡터와 중합체 사이의 결합, 및 양으로 하전된 4차 아미노기와 중합체 사이의 결합은 동일한 조건 하에서 분할될 수 있다. 그러나, 핵산 벡터와 중합체 사이의 결합, 및 양으로 하전된 4차 아미노기와 중합체 사이의 결합이 동일한 조건 하에서 분할되지 않는 것이 바람직하다. 따라서, 양으로 하전된 4차 아미노기와 중합체 사이의 결합은 분할되면서 핵산 벡터와 중합체 골격 사이의 결합은 그대로 남기는 것이 가능하다. 이러한 방식으로, 양으로 하전된 4차 아미노기를 중합체로 개질된 핵산 벡터로부터 제거하여 중합체를 핵산 벡터에 부착된 채로 남겨둘 수 있다.
- [0066] 본 발명에 따라 개질된 보통은 감염성인 핵산 벡터, 예컨대 바이러스가 그의 원래의 감염력을 잃어버리는 것이 확인되었다. 그러나, 감염력은, 특정 바람직한 실시양태에서 생물학적 활성제를 중합체에 커플링시킴으로써, 복원시키거나 되돌려놓을 수 있다. 생물학적 활성제는 중합체가 핵산 벡터와 결합하기 전에 또는 결합한 후에 중합체에 임의로 커플링시킨다. 바람직하게는 표적화제, 즉 생물학적 활성제가 복수개의 반응성 기를 갖는 경우, 커플링 반응을 방해하지 않기 위하여 중합체로 핵산 벡터를 코팅한 후 중합체에 생물학적 활성제를 커플링시키며, 다른 경우에는 중합체로 핵산 벡터를 코팅하기 전에 커플링시키는 것이 만족스러울 수 있다. 통상적으로, 생물학적 활성제는 중합체에 커플링되거나 포함된다.
- [0067] 생물학적 활성제는, 반응성 중합체를 핵산 벡터에 커플링시키는데 사용된 것과 동일한 유형의 반응성 기를 사용하여 도입할 수 있거나, 다른 화학 반응을 사용하여 커플링시킬 수 있다. 다른 반응을 사용하는 경우, 이중 다관능성 반응성 중합체 (예를 들어, 혼합된 ONp 에스테르 및 티올기를 함유함)를 사용할 것이다.
- [0068] 이러한 생물학적 활성제는 바람직하게는 표적화, 조직 침투, 약물동태학 또는 면역 자극 또는 억제제를 개선시키기 위해 본 발명에 따라 도입된다. 생물학적 활성제는, 예를 들어 성장 인자 또는 시토카인, 당, 호르몬, 지질, 인지질, 지방, 아포리포단백질, 세포 부착 프로모터, 효소, 독신, 펩티드, 당단백질, 혈청 단백질, 비타민, 미네랄, 보조제 분자, 핵산, 면역조절 인자 또는 수용체, 예를 들어 성장 인자 수용체를 인식하는 항체 또는 조직-특이적 항원 또는 종양-관련 항원을 인식하는 항체일 수 있다. 제제는 내피 조직을 표적화하는데 사용할 수 있는 시알릴 루이스 X일 수 있다.
- [0069] 예를 들어, 다양한 수용체, 상이한 세포, 세포의 환경 및 다른 단백질을 포함할 수 있는 상이한 표적 부위로 개질된 핵산 벡터를 재표적화하기 위하여 항체가 생물학적 활성제로 바람직하게 사용된다. 단클론 항체, 다클론 항체, 디아바디 (diabody), 키메라 항체, 인간화 항체, 이중특이적 항체, 카말리드 (camalid) 항체, Fab 단편, Fc 단편 및 Fv 분자를 비롯한 광범위한 여러 형태의 항체를 사용할 수 있다.
- [0070] 종양 표적화에 사용하기에 적합한 생물학적 활성제는, 예를 들어 암 관련 항원, 예컨대 암배 항원 또는 α -태아 단백질, 테나신, HER-2 원-발암유전자, 전립선 특이적 항원 또는 MUC-1을 인식하는 항체, 또는 종양-관련 내피 세포와 연관된 항원, 예컨대 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)에 대한 수용체, Tie1, Tie2, P-셀렉틴, E-셀렉틴 또는 전립선-특이적 세포막 항원 (PSMA)을 인식하는 항체이다.
- [0071] 적용의 유연성을 허용하는 일반적 링커로 작용하기 위해 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 다목적 단백질은 단백질 G (이는 항체와 결합하여 대부분의 종으로부터의 임의의 IgG 계열 항체로 표면 개질을 가능하게 할 것임), 단백질 A (단백질 G와 유사한 특성을 가짐), 아비딘 (매우 높은 친화성으로 비오틴과 결합하여 임의의 비오틴으로 라벨링된 요소를 표면 상에 도입 가능하게 할 것임), 스트렙타비딘 (아비딘과 유사한 특성을 가짐), 엑스트라비딘 (아비딘과 유사한 특성을 가짐), 분가라톡신-결합 펩티드 (분가라톡신 융합 단백질과 결합함), 밀배아 아글루티닌 (당과 결합함), 헥사히스티딘 (니켈 킬레이트 컬럼 상에서의 온화한 정제를 가능하게 함), GST (친화성 크로마토그래피에 의한 온화한 정제를 가능하게 함)이다.
- [0072] 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 성장 인자 또는 시토카인은, 예를 들어 뇌유래 신경영양 인자, 모양체 신경영양 인자, b-내피 성장 인자, 표피 성장 인자 (EGF), 섬유모세포 성장 인자 산성 (aFGF), 섬유모세포 성장 인자 염기성 (bFGF), 과립구 집락-자극 인자, 과립구 마크로파지 집락-자극 인자, 성장 호르몬을 방출하는 호르몬, 간세포 성장 인자, 인슐린 유사 성장 인자-I, 인슐린 유사 성장 인자-II, 인터류킨-1a, 인터류킨-1b, 인터류킨 2, 인터류킨 3, 인터류킨 4, 인터류킨 5, 인터류킨 6, 인터류킨 7, 인터류킨 8, 인터류킨 9, 인터류킨 10, 인터류킨 11, 인터류킨 12, 인터류킨 13, 각질세포 성장 인자, 랩틴, 간 세포 성장 인자, 마크로파지 집락

자극 인자, 마크로파지 염증 단백질 1a, 마크로파지 염증 단백질 1b, 단핵구 화학주성 단백질 1, 2-메톡시에스트라디올, b-신경 성장 인자, 2.5s 신경 성장 인자, 7s 신경 성장 인자, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 성 호르몬 결합 글로불린, 줄기 세포 인자, 전환 성장 인자-β1, 전환 성장 인자-β3, 종양 괴사 인자 α, 종양 괴사 인자 β, 혈관 내피 성장 인자 및 혈관 내피 성장 인자 C이다.

[0073] 도입을 위한 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 당은 단당류, 이당류 또는 분지형 다당류를 비롯한 다당류이고, 예를 들어 D-갈락토오스, D-만노스, D-글루코오스, L- 글루코오스, L-푸코오스 및 락토오스이다. 당은 통상적으로 아미노 유도체화로 도입된다.

[0074] 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 호르몬은, 예를 들어 아드레노메둘린, 부신피질자극 호르몬, 융모성 성선 자극 호르몬, 코르티코스테론, 에스트라디올, 에스트리올, 난포 자극 호르몬, 가스트린 1, 글루카곤, 고나도트로핀, 성장 호르몬, 히드로코르티손, 인슐린, 렙틴, 멜라닌세포 자극 호르몬, 멜라토닌, 옥시토신, 부갑상선 호르몬, 프로락틴, 프로게스테론, 세크레틴, 트롬보포에틴, 티로트로핀, 갑상선 자극 호르몬 및 바소프레신이다.

[0075] 중합체로 개질된 핵산 벡터를 표적화하기 위한 또는 입체적 보호를 제공하기 위한 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 지질 또는 인지질은, 예를 들어 콜레스테롤, 글리세롤, 당지질, 장쇄 지방산, 특히 불포화 지방산, 예를 들어 올레산, 혈소판 활성 인자, 스펅고미엘린, 포스파티딜 콜린 또는 포스파티딜 세린이다.

[0076] 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 세포 부착 프로모터는, 예를 들어 섬유결합소, 라미닌, 트롬보스폰딘, 비트로넥틴, 다양이온, 인테그린에 의해 또는 올리고펩티드 서열 결합 인테그린 또는 테트라스판 단백질에 의해 제공될 수 있다.

[0077] 입체적 보호도 제공할 수 있는 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 아포리포단백질은, 예를 들어 고밀도 리포단백질 또는 저밀도 리포단백질 또는 그의 구성요소이다.

[0078] 예를 들어, 특정 환경을 통해 개질된 핵산 벡터의 이동성을 촉진시키기 위한 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 효소는, 세포외 매트릭스를 분해할 수 있는 효소 (예를 들어 젤라틴분해효소, 예를 들어 매트릭스 금속성 단백질분해효소 유형 1 내지 11 또는 히알루론산분해효소), 핵산을 분해할 수 있는 효소 (예를 들어, DNA 분해효소 I, DNA 분해효소 II, 핵산분해효소, RNA 분해효소 A), 단백질을 분해할 수 있는 효소 (예를 들어 카복시펩티다아제, 플라스민, 카텝신, 엔도단백질분해효소, 펩신, 단백질분해효소 K, 트롬빈, 트립신, 조직 유형 플라스미노겐 활성제 또는 우로키나아제 유형 플라스미노겐 활성제), 검출을 용이하게 하는 효소 (예를 들어, 루시페라제, 퍼옥시다아제, b-갈락토시다아제), 또는 다른 유용한 효소, 예컨대 아밀라아제, 엔도글리코시다아제, 엔도-b-갈락토시다아제, 갈락토시다아제, 핵산분해효소, HIV 역전사효소, b-히드록시부티레이트 탈수소효소, 인슐린 수용체 키나아제, 리소좀, 뉴라미니다아제, 산화질소 합성효소, 단백질 디설피드 이성화효소이다.

[0079] 수용체에 결합하기 위한 또는 세포막과 상호작용하기 위한 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 독신은, 예를 들어 콜레라 독신 B 아단위, 크로독신 B 아단위, 덴드로독신, 리신 B 사슬이다.

[0080] 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 펩티드는, 예를 들어 트랜스페린, 녹색/청색/황색 형광 단백질, 아드레노메둘린, 아밀로이드 펩티드, 안지오텐신 I, 안지오텐신 II, Arg-Gly-Asp, 아트리오펩틴, 엔도텔린, 피브리노펩티드 A, 피브리노펩티드 B, 갈라닌, 가스트린, 글루타티온, 라미닌, 신경펩티드, Asn-Gly-Arg, 인테그린 결합 모티프를 함유하는 펩티드, 파지 라이브러리를 사용하여 식별된 표적화 펩티드, 핵 위치 서열을 함유하는 펩티드 및 미토콘드리아 유도 서열을 함유하는 펩티드에 의해 제공될 수 있다.

[0081] 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 혈청 단백질은, 예를 들어 알부민, 보체 단백질, 트랜스페린, 피브리노겐 또는 플라스미노겐이다.

[0082] 생물학적 활성제로 사용하기에 적합한 비타민 또는 미네랄은, 예를 들어 비타민 B 12, 비타민 B 16 또는 엽산이다.

[0083] 통상적으로, 핵산 벡터의 개질은 생물학적 숙주 내의 상이한 수용체로 핵산 벡터를 재표적화하는 효과를 갖는다.

[0084] 따라서, 고도로 특이적인 세포의 집합, 예를 들어 종양 세포를 표적화하도록 본 발명에 따라 중합체로 개질된 핵산 벡터를 합성할 수 있음을 보일 것이다. 그러나, 동시에, 본 발명에 따라 중합체로 개질된 핵산 벡터는 일반적으로 중화 항체에 의해 불활성화되지 않는다는 것을 확인하였다. 이는 개질된 핵산 벡터가 중합체에 의해

보호되기 때문인 것으로 생각된다. 핵산 벡터를 중합체로 감싸는 것은, 연장된 저장 기간 및 낮은 pH에 대한 보다 나은 저항성을 비롯한 다른 잠재적 장점을 갖는 것으로 확인되었다. 또한, 현존하는 개질되지 않은 핵산 벡터에서 실현가능한 것보다 더 공격적인 기술을 사용하여 이러한 개질된 핵산 벡터를 정제하는 것이 가능할 수 있다.

- [0085] 임의로 중합체는, 예를 들어 생물학적 환경에서 핵산 벡터의 검출을 가능하게 하기 위해 방사성 동위원소에 커플링시킬 수 있다.
- [0086] 한 실시양태에서, 핵산 벡터의 개질은 비-수성 환경내에서의 핵산 벡터의 용해도 및 분산성 및 안정성 특성을 개질시키는 효과를 갖는다. 본 실시양태에서, 핵산 벡터는 일반적으로 오일 분해 활성을 갖는 미생물이다. 바람직하게는 핵산 벡터는 바콜로바이러스 입자이다. 본 실시양태에서, 중합체에는 통상적으로 올레일 또는 다른 소수성기가 도입된다.
- [0087] 코팅된 바이러스 입자는 고도로 정제되고 오염성 단백질 또는 펩티드가 부재해야 한다. 코팅 반응은 보통 7.4 내지 8.4의 pH 범위에서 수행되며, 7.8 내지 8.0이 바람직하다. 중합체와 반응할 수 있는 것은 제외하고 목적하는 pH를 달성하기 위해 임의의 적합한 완충제를 사용할 수 있다 (예컨대, 트리스 기반 완충제). 반응은 생리학적 염 (150 mM NaCl) 농도 및 바이러스 제조물을 안정화시키는데 사용할 수 있는 Mg^{2+} 또는 Ca^{2+} 와 같은 다른 안정화제의 존재하에서 일어날 수 있다. 반응 과정 중에 아지드화나트륨 또는 다른 보존제를 사용하는 것은 권장되지 않는다. 실온에서 중합체 코팅 반응은 1시간 후에 포화에 도달하지만, 보다 낮은 온도에서는 더 긴 시간이 필요할 수도 있다.
- [0088] 재표적화 또는 부가적 관능성을 위해서, 이전에 기술된 (예를 들어, 본원에 참고문헌으로 도입되는 문헌 [Fisher KD, Stallwood Y, Green NK, Ulbrich K, Mautner V, Seymour LW] 참고) 바와 같은 코팅 반응 동안 부가적인 생물학적 제제, 예컨대 항체, 리간드 또는 펩티드를 첨가하는 것이 가능하다. 중합체로 코팅된 아데노바이러스는 효율적인 재표적화를 가능하게 하고 중화 항체를 피한다. 본원에 참고문헌으로 도입되어 있는 문헌 [Gene Ther. Mar 2001;8(5):341-348]을 참고한다. 대안적으로 코팅은 표적화 요소에 미리-컨쥬게이팅 되어 있는 중합체를 사용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Stevenson M, Hale AB, Hale SJ, Green NK, Black G, Fisher KD, Ulbrich K, Fabra A, Seymour LW] 참고). 중합체로 개질된 아데노바이러스 상의 라미닌-유래 펩티드 (SIKVAV)의 도입은 알파6-인테그린을 통한 종양-특이적 표적화를 가능하게 한다. 문헌 [Cancer Gene Ther. Apr 2007;14(4):335-345]을 참고한다.
- [0089] 본원에서 용어 "반응성 기"는, 특히 다른 분자의 상보적 반응성기와, 통상적으로 핵산 벡터의 표면 상의기와 커플링 또는 연결 반응과 관련하여 유의적 화학 반응성을 보이는 기를 나타내는 것으로 사용됨이 이해될 것이다.
- [0090] 통상적으로, 반응성 기는 핵산 벡터의 표면 상에 존재하는기와, 예를 들어 아민기, 티올, 히드록시기, 알데히드, 케톤, 티로신 잔기, 카르복실산 또는 당기 (sugar group)와 공유 결합을 형성할 수 있는기이다. 핵산 벡터의 표면 상에 존재하는 상기 기는 유전 공학에 의해, 예를 들어 섬유 분자 중에 유리 티올을 갖는 시스테인 잔기를 함유하도록 아데노바이러스를 조작하여 도입할 수 있다. 그러나, 일반적으로, 핵산 벡터의 표면 상에 존재하는 상기 기는 자연적으로 존재하는기이다.
- [0091] 한 실시양태에서, 반응성 기는 핵산 벡터의 표면 상의 아민기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 본 실시양태에서 반응성기의 적합한 유형의 예에는, 산 클로라이드, 아실-티아졸리딘-2-티온, 말레이미드, N-히드록시-숙신이미드 에스테르 (NHS 에스테르) 술폰-N-히드록시-숙신이미드 에스테르 (술폰-NHS 에스테르), 4-니트로페놀 에스테르, 에폭시드, 2-이미노-2-메톡시에틸-1-티오글리코시드, 시아누릭 클로라이드, 이미다졸릴 포르메이트, 숙신이미딜 숙시네이트, 숙신이미딜 글루타레이트, 아실 아지드, 아실 니트릴, 디클로로트리아진, 2,4,5-트리클로로페놀, 아즐락톤 및 클로로포르메이트가 포함된다. 이러한 기는 아민과 용이하게 반응한다. 아실-티아졸리딘-2-티온 및 술폰-NHS 에스테르가 바람직하다. 아실-티아졸리딘-2-티온은 그의 높은 반응성 및 수용액 중에서의 상대적 안정성으로 인해 바람직하다.
- [0092] 또 다른 실시양태에서, 반응성 기는 핵산 벡터의 표면 상의 티올기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 본 실시양태에서 반응성기의 적합한 유형의 예에는, 알킬 할라이드, 할로아세트아미드 및 말레이미드가 포함된다.
- [0093] 또 다른 실시양태에서, 반응성 기는 핵산 벡터의 표면 상의 히드록실기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 본 실시양태에서 반응성기의 적합한 유형의 예에는, 클로로포르메이트 및 산 할라이드가 포함된다. 대안적으로, 핵산 벡터의 표면 상의 히드록실기는 산화제, 예를 들어 과옥소산염으로 산화시킨 후 히드라진, 히드록실아민 또

는 아민을 포함하는 반응성 기와 반응시킬 수 있다.

- [0094] 또 다른 실시양태에서, 반응성 기는 핵산 벡터의 표면 상의 티로신 잔기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 본 실시양태에서 반응성 기의 적합한 유형의 예에는, 술폰일 클로라이드 및 요오도아세트아미드가 포함된다.
- [0095] 또 다른 실시양태에서, 반응성 기는 핵산 벡터의 표면 상의 알데히드 또는 케톤기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 본 실시양태에서 반응성 기의 적합한 유형의 예에는, 히드라지드, 세미카르바미드, 1차 지방족 아민, 방향족 아민 및 카르보히드라지드가 포함된다.
- [0096] 또 다른 실시양태에서, 반응성 기는 핵산 벡터의 표면 상의 카르복실산과 공유 결합을 형성할 수 있다. 이는, 예를 들어 수용성 카르보디이미드, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 히드록로라이드를 사용하여 카르복실산을 활성화시킨 후, 반응성 기로서 아민과 반응시켜 수행할 수 있다.
- [0097] 또 다른 실시양태에서, 반응성 기는 핵산 벡터의 표면 상의 당과 반응시켜 공유 결합을 형성할 수 있다. 이는, 예를 들어 갈락토오스 산화효소를 사용하여 당을 효소-매개된 산화시켜 알데히드를 형성한 후, 반응성 기로서 알데히드 반응성 화합물, 예컨대 히드라지드와 반응시켜 수행할 수 있다.
- [0098] 중합체 상의 반응성 기의 개수는 중합체의 총 중량을 기준으로 바람직하게는 0.5 내지 10 mol%, 더 바람직하게는 1 내지 6 mol%, 가장 바람직하게는 2 내지 5 mol%의 반응성 기를 제공하도록 하는 것이다. 일반적으로, 중합체는 생물학적 불활성 중합체이다. 중합체 골격은 일반적으로 상기 반응성 기로 치환된다. 일반적으로, 중합체는 1개 이상의 반응성 기로 치환되는 골격을 갖는 생물학적 불활성 중합체이다. 이러한 반응성 기는 중합체 골격에 직접 또는 스페이서 기를 통해 연결될 수 있다. 스페이서 기의 예에는 올리고펩티드 연결이 포함된다. 이러한 올리고펩티드 연결은 바람직하게는 1 내지 4개, 특히 2 또는 4개의 펩티드기를 포함한다. 적합한 연결의 예에는 -Gly-Gly-, -Glu-Lys-Glu- 및 -Gly-Phe-Leu-Gly-이 포함된다. 에틸렌글리콜-올리고펩티드 중합체의 경우, 올리고펩티드기가 반응성 기로, 임의로 상기 정의된 바와 같은 스페이서 기를 통해 치환된다. 일부 실시양태에서, 상기 스페이서는 상기 정의된 바와 같은 기 L이다.
- [0099] 본 발명에 사용되는 중합체는 바람직하게는 1개 이상의 상기 반응성 기를 포함하는 합성 친수성 중합체이다.
- [0100] 더 바람직하게는 본 발명에 사용되는 중합체는 바람직하게는 복수개의 상기 반응성 기를 포함하는 합성 친수성 다가 중합체이다.
- [0101] 본 발명에 사용하기에 적합한 중합체의 예는 제WO 98/19710호에 개시된 것이며, 폴리HPMA-GlyPheLeuGly-ONp, 폴리HPMA GlyPheLeuGly-NHS, 폴리HPMA-Gly-Gly-ONp, 폴리HPMA-Gly-Gly-NHS, 폴리 (pEG-올리고펩티드 (-ONp)), 폴리 (pEG-GluLysGlu (ONp)), pHEG-ONp. pHEG-NHS를 포함한다. 이러한 화합물의 제법은 제WO 98/19710호에 개시되어 있다. 제WO 98/19710호의 전체 내용은 본원에 참고문헌으로 도입된다.
- [0102] 본 발명의 방법의 한 실시양태에서, 각각의 양으로 하전된 4차 아미노기는 중합체 골격에 1개 이상의 분해성 또는 생분해성 연결을 통해, 통상적으로 환원가능 또는 가수분해가능 결합을 포함하는 링커에 의해 연결되고, 상기 방법은 4차 양으로 하전된 아미노기와 중합체 골격 사이의 상기 분해성 또는 생분해성 연결을 분할하는 부가적인 단계를 포함한다.
- [0103] 일반적으로, 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 벡터에서, 마스킹하지 않으면 중합체로 개질된 핵산 벡터의 활성을 중화시킬 수 있는 항체에 의한 인식의 대상이 될 핵산 벡터의 영역을 중합체가 마스킹한다. 통상적으로, 상기 영역은 핵산 벡터의 표면 상의 음으로 하전되거나 산성인 영역이다.
- [0104] 핵산 벡터가 아데노바이러스인 경우, 상기 음으로 하전된 영역은 통상적으로 아데노바이러스 핵산 단백질의 음으로 하전된 영역, 예를 들어 모티프 147-162 (EDEEEDEDEEEEE)이다. 이러한 영역은 통상적으로 중합체 상의 반응성 기에 대해 비반응성이고 일반적으로 약간 음으로 하전된 중합체, 예를 들어 HPMA를 기반으로 하는 중합체를 밀어낸다. 따라서, 중합체 중에 양으로 하전된 4차 아미노기를 도입하면 이러한 영역과 중합체가 정전기적으로 연합되어 이러한 영역과 중합체 사이의 임의의 가능한 반발력이 최소화된다. 따라서, 이는 벡터와 양으로 하전된 4차 아미노기를 포함하는 중합체 사이의 반응 속도를 증가시킨다.
- [0105] 본 발명에 따른 조성물은 통상적으로 시험관내에서 또는 식물 또는 동물에 사용하기에 적합하다. 조성물을 동물, 특히, 포유류 동물에 사용할 경우, 운반체는 바람직하게는 제약상 허용되는 첨가제, 희석제 또는 부형제이다. 바람직한 조성물에는 미생물 및 발열물질로부터의 오염이 부재한다.
- [0106] 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 벡터는 다양한 투약 형태로 투여할 수 있다. 따라서, 이는 경구, 예를 들어

수성 또는 유성 현탁액으로 투여할 수 있다. 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 벡터는 또한, 피하, 정맥내, 근육내, 흉골내, 복막내, 피부내, 경피적 또는 주입 기술에 의해 비경구적으로 투여할 수 있다. 복막내 및 피부내 투여가 바람직하다. 중합체로 개질된 핵산 벡터는 흡입기 또는 분무기를 통해 에어로졸 형태로 흡입 투여할 수 있다.

[0107] 경구 투여를 위한 제형은, 예를 들어 중합체로 개질된 핵산 벡터와 함께 가용화제, 예를 들어 시클로텍스트린 또는 개질된 시클로텍스트린; 희석제, 예를 들어 락토오스, 텍스트로오스, 사카로오스, 셀룰로오스, 옥수수 전분 또는 감자 전분; 윤활제, 예를 들어 실리카, 탈크, 스테아르산, 마그네슘 또는 칼슘 스테아레이트 및/또는 폴리에틸렌 글리콜; 결합제, 예를 들어 전분, 아라비아검, 젤라틴, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 또는 폴리비닐 피롤리돈; 응집억제제 (disaggregating agent), 예를 들어 전분, 알긴산, 알기네이트 또는 전분 글리콜산나트륨; 비등 혼합물; 염료; 감미료; 습윤제, 예컨대 레시틴, 폴리소르베이트, 라우릴술포이트; 및 일반적으로, 제약상 제형에 사용되는 비독성 및 약리학상 불활성 물질을 함유할 수 있다.

[0108] 경구 투여를 위한 액체 분산액은 용액, 시럽, 유탁액 및 현탁액일 수 있다. 용액은 가용화제, 예를 들어 시클로텍스트린 또는 개질된 시클로텍스트린을 함유할 수 있다. 시럽은 운반체로서, 예를 들어 사카로오스 또는 사카로오스와 글리세린 및/또는 만니톨 및/또는 소르비톨을 함유할 수 있다.

[0109] 현탁액 및 유탁액은 운반체로서, 예를 들어 천연 검, 한천, 알긴산나트륨, 펙틴, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 또는 폴리비닐 알콜을 함유할 수 있다. 근육내 주사용 현탁액 또는 용액은 활성 화합물과 함께 제약상 허용되는 운반체, 예를 들어 멸균수, 올리브 오일, 에틸 올리에이트, 글리콜, 예를 들어 프로필렌 글리콜; 가용화제, 예를 들어 시클로텍스트린 또는 개질된 시클로텍스트린, 그리고 필요시, 적합한 양의 리도카인 히드로클로라이드를 함유할 수 있다.

[0110] 정맥내 또는 주입용 용액은 운반체로서, 예를 들어 멸균수 및 가용화제, 예를 들어 시클로텍스트린 또는 개질된 시클로텍스트린을 함유할 수 있으며, 또는 바람직하게는 이들은 멸균, 수성, 등장 식염 용액 형태일 수 있다.

[0111] 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 벡터의 치료적 유효량을 환자에게 투여한다. 바이로테라피를 위한 중합체로 개질된 종양용해성 바이러스의 경우, 통상적 투약량은 개개의 바이러스에 따라 107-1013개의 바이러스 입자를 포함할 것이다. 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 벡터는 통상적으로 환자에게 비독성 양으로 투여된다.

[0112] 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 벡터는 생체내에서 (in vivo), 예를 들어 유전자 치료 또는 유전자-백신 접종 치료 수행시에 환자에게 치료적 유전 물질을 전달하는데 유용하며, 여기서 중합체로 개질된 핵산 벡터는 치료적 유전 물질을 포함하는 본 발명에 따른 중합체로 개질된 핵산 벡터이다.

[0113] 유전자 치료는 비제한적으로 암 (직접 주사에 적합한 국소 접근가능 종양 결절 및 또한 전신적 치료가 요구되는 전이성 암 포함), 파킨슨 질환, X-SCID, 겸상 적혈구 질환, 레쉬-니한 (Lesch-Nyhan) 증후군, 페닐케톤뇨증 (PKU), 헌팅턴 무도병, 뒤센 (Duchenne) 근육퇴행위축, 혈우병, 낭성섬유증, 리소좀 저장 질환, 심혈관 질환 및 당뇨병 치료를 비롯한 인간 질환 전체 분야에 걸쳐 적용된다.

[0114] 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 벡터는 또한 바이러스성 백신의 전달에 사용할 수 있다. HIV, 결핵, 말라리아, 독감, 암 및 다른 질환에 대한 백신 접종이 예상된다. 백신은 프라임 부스트 계획으로 (즉, 다중 투여에 의해) 또는 보조제와 조합으로 주어질 수 있다.

[0115] 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 벡터는 생체내에서, 예를 들어 바이로테라피를 비롯한 미생물성 치료 수행시에 환자에게 치료적 체제를 전달하는데 유용하며, 여기서 중합체로 개질된 핵산 벡터는 본 발명에 따른 중합체로 개질된 핵산 벡터이다.

[0116] 특정 실시양태에서, 본 발명의 중합체로 개질된 핵산 벡터는 다른 의약, 예를 들어 암 치료에 효과적인 다른 의약과 병용할 수 있다.

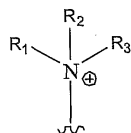
[0117] 본 발명은 또한 (a) 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기 및 (b) 1개 이상의 반응성 기를 포함하는 1가 또는 다가 중합체를 제공한다.

[0118] 이러한 중합체는 본 발명의 방법에 사용하기 바람직한 중합체일 수 있다.

[0119] 중합체는 일반적으로 골격 및 측쇄를 포함한다. 측쇄는 중합체 골격에 부착된다.

[0120] 한 실시양태에서, 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기는 하기 화학식 Ia의 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기이다.

[0121] [화학식 Ia]



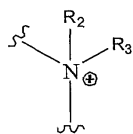
[0122]

[0123] (식 중, R1, R2 및 R3은 각각 독립적으로 직쇄 또는 분지쇄 C1-C6 알킬기, 직쇄 또는 분지쇄 C2-C6 알케닐기, 직쇄 또는 분지쇄 C2-C6 알키닐기, 6- 내지 10-원 아릴기, 5- 내지 10-원 헤테로아릴기, C3-C8 시클로알킬기 및 3- 내지 8-원 헤테로시클릴기 (여기서 C1-C6 알킬기, C2-C6 알케닐기, C2-C6 알키닐기, 6- 내지 10-원 아릴기, 5- 내지 10-원 헤테로아릴기, C3-C8 시클로알킬기 및 3- 내지 8-원 헤테로시클릴기는 할로겐 원자, -CN기, -NH2기, 히드록시기, -COOH기, -NO2기로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 치환기로 치환되거나 비치환됨), 직쇄 또는 분지쇄 비치환된 C1-C4 알킬기, 직쇄 또는 분지쇄 C1-C4 알콕시기, 직쇄 또는 분지쇄 C1-C4 알킬티오기, 직쇄 또는 분지쇄 C1-C4 알킬아미노기, 6- 내지 10-원 아릴옥시기 및 페닐기 (여기서 페닐기는 통상적으로 할로겐 원자, -CN기, -NH2기, 히드록시기 및 -NO2기로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 치환기로 치환되거나 비치환됨)로부터 선택됨).

[0124] 화학식 Ia의 양으로 하전된 4차 아미노기는 일반적으로 중합체 골격에 부착된 측쇄에 존재한다. 화학식 Ia의 양으로 하전된 4차 아미노기는 보여지는 바와 같이 통상적으로 중합체 골격에 단일 결합으로 부착된다.

[0125] 또 다른 실시양태에서, 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기는 하기 화학식 Ib의 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기이다.

[0126] [화학식 Ib]



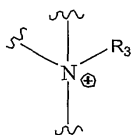
[0127]

[0128] (식 중, R2 및 R3은 상기 정의된 바와 같음).

[0129] 화학식 Ib의 양으로 하전된 4차 아미노기는 일반적으로 중합체 골격 또는 중합체 골격에 부착된 측쇄에 존재한다. 측쇄에 존재할 경우, 화학식 Ib의 양으로 하전된 4차 아미노기는 보여지는 바와 같이 중합체 골격에 통상적으로 1 또는 2개의 단일 결합으로, 바람직하게는 1개의 단일 결합으로 부착된다.

[0130] 또 다른 실시양태에서, 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기는 하기 화학식 Ic의 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기이다.

[0131] [화학식 Ic]



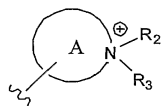
[0132]

[0133] (식 중, R3은 상기 정의된 바와 같음).

[0134] 화학식 Ic의 양으로 하전된 4차 아미노기는 일반적으로 중합체 골격 또는 중합체 골격에 부착된 측쇄에 존재한다. 측쇄에 존재할 경우, 화학식 Ic의 양으로 하전된 4차 아미노기는 보여지는 바와 같이 중합체 골격에 통상적으로 1, 2 또는 3개의 단일 결합으로, 바람직하게는 1개의 단일 결합으로 부착된다.

[0135] 또 다른 실시양태에서, 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기는 하기 화학식 Id의 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기이다.

[0136] [화학식 Id]



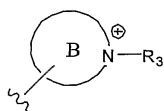
[0137]

[0138] (식 중, A는 R2 및 R3이 결합되는 질소 원자를 포함하는 3- 내지 8-원 헤테로시클릴 고리이고, R2 및 R3은 상기 정의된 바와 같음).

[0139] 화학식 Id 중 고리 A는 R2 및 R3이 결합되는 질소 원자에 부가적으로 O, S 및 N으로부터 선택되는 1 또는 2개의 헤테로원자를 임의로 포함할 수 있다. 화학식 Id의 양으로 하전된 4차 아미노기는 일반적으로 중합체 골격에 부착된 측쇄에 존재한다. 화학식 Id의 양으로 하전된 4차 아미노기는 보여지는 바와 같이 중합체 골격에 통상적으로 1개의 단일 결합으로 부착된다.

[0140] 또 다른 실시양태에서, 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기는 하기 화학식 Ie의 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기이다.

[0141] [화학식 Ie]



[0142]

[0143] (식 중, B는 R3이 결합되는 질소 원자를 포함하는 6- 내지 10-원 헤테로아릴 고리이고, R3은 상기 정의된 바와 같음).

[0144] 화학식 Ie에서 고리 B는 R3이 결합되는 질소 원자에 부가적으로 O, S 및 N으로부터 선택되는 1 또는 2개의 헤테로원자를 임의로 포함할 수 있다. 화학식 Ie의 양으로 하전된 4차 아미노기는 일반적으로 중합체 골격에 부착된 측쇄에 존재한다. 화학식 Ia의 양으로 하전된 4차 아미노기는 보여지는 바와 같이 중합체 골격에 통상적으로 1개의 단일 결합으로 부착된다.

[0145] 본원에서 사용되는 용어 C1-C6 알킬에는 포화 직쇄 및 분지쇄 알킬기가 둘 다 포함된다. C1-C6 알킬기의 예에는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, tert-부틸, 펜틸 및 헥실기가 포함된다. 바람직하게는 C1-C6 알킬기는 C1-4 알킬기, 더 바람직하게는 C1-3 알킬기, 보다 더 바람직하게는 메틸 또는 에틸기, 가장 바람직하게는 메틸기이다.

[0146] 본원에서 사용되는 용어 C2-C6 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄일 수 있는 1개 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 기를 지칭한다. 바람직하게는 C2-C6 알케닐기는 C2-C4 알케닐기이다. 더 바람직하게는 C2-C6 알케닐기는 비닐, 알릴 또는 크로틸기, 가장 바람직하게는 알릴기이다.

[0147] 본원에서 사용되는 용어 C2-C6 알키닐은 직쇄 또는 분지쇄일 수 있는 1개 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 기를 지칭한다.

[0148] 본원에서 사용되는 용어 6- 내지 10-원 아릴은 모노시클릭 또는 폴리시클릭 방향족 고리 시스템, 예컨대 페닐 또는 나프틸을 지칭한다. 페닐이 바람직하다.

[0149] 본원에서 사용되는 용어 5- 내지 10-원 헤테로아릴은 적어도 1개의 헤테로방향족 고리를 포함하고, O, S 및 N으로부터 선택되는 적어도 1개의 헤테로원자를 포함하는 방향족 고리계를 지칭한다. 헤테로아릴기는 적어도 1개의 고리가 헤테로원자를 포함하는, 단일 고리 또는 2개 이상의 융합된 고리일 수 있다. 예에는, 피리딜, 피라지닐, 피리미디닐, 피리다지닐, 푸릴, 옥사디아졸릴, 옥사졸릴, 이미다졸릴, 티아졸릴, 티아디아졸릴, 티에닐, 피롤릴, 피리디닐, 벤조디아졸릴, 인돌릴, 인다졸릴, 푸리닐, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 프탈라지닐, 나프티리디닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 퀴놀리지닐, 신놀리닐, 트리아졸릴, 인돌리지닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 이소인돌릴, 이미다졸리디닐, 프테리디닐 및 피라졸릴 라디칼이 포함된다. 피리딜, 티에닐, 푸라닐, 피리다지닐, 피리미디닐 및 퀴놀릴 라디칼이 바람직하다. 바람직하게는 헤테로아릴기는 5 또는 6-원 단일 고리, 예를 들어 피리딜, 피라지닐, 피리미디닐, 피리다지닐, 푸릴, 옥사디아졸릴, 옥사졸릴, 이미다졸릴, 티아졸릴, 티아디아졸릴, 티에닐, 피롤릴 및 피리디닐이다.

[0150] 본원에서 사용되는 용어 C3-C8 시클로알킬기는 포화 또는 불포화기를 지칭한다. 바람직하게는 C3-C8 시클로알

킬기는 포화된 것이다. C3-C8 시클로알킬기의 예에는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸 및 시클로옥틸이 포함된다. 바람직하게는 C3-C8 시클로알킬기는 시클로헥실기이다.

[0151] 본원에서 사용되는 용어 C3-C8 헤테로시클릭기는 1개 이상의, 예를 들어 1, 2 또는 3개의 탄소 원자, 바람직하게는 1 또는 2개의 탄소 원자가 N, O 및 S로부터 선택되는 헤테로원자로 교체된 포화 또는 불포화, 비-방향족, 카르보시클릭 고리, 예컨대 5, 6 또는 7-원 고리를 지칭한다. 포화 헤테로시클릭기가 바람직하다. 헤테로시클릭기는 적어도 1개의 고리가 헤테로원자를 포함하는 단일 고리 또는 2개 이상의 융합된 고리일 수 있다.

[0152] 헤테로시클릭기의 예에는 피페리딜, 피롤리딜, 피롤리닐, 피페라지닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 피롤릴, 피라졸리닐, 피라졸리디닐, 퀴누클리디닐, 트리아졸릴, 피라졸릴, 테트라졸릴, 크로마닐, 이소크로마닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸릴, 옥시라닐, 아자리디닐, 4,5-디히드로-옥사졸릴 및 3-아자-테트라히드로푸라닐이 포함된다.

[0153] 본원에서 사용되는 용어 할로겐 원자는 염소, 불소, 브롬 또는 요오드 원자, 통상적으로는 불소, 염소 또는 브롬 원자, 가장 바람직하게는 염소 또는 불소를 지칭한다. 용어 할로는 접두어로 사용될 경우에도 동일한 의미이다.

[0154] 본원에서 사용되는 C1-C4 알콕시기는 산소 원자에 부착되는 상기 C1-C4 알킬기, 예를 들어 C1-C2 알킬기이다. 비치환된 C1-C4 알콕시기가 바람직하다. 바람직하게는 C1-C4 알콕시기는 메톡시기이다.

[0155] 본원에서 사용되는 C1-C4 알킬티오기는 황 원자에 부착되는 상기 C1-C4 알킬기, 예를 들어 C1-C2 알킬기이다. 비치환된 C1-C4 알킬티오기가 바람직하다.

[0156] 본원에서 사용되는 C1-C4 알킬아미노기는 질소 원자에 부착되는 상기 C1-C4 알킬기, 예를 들어 C1-C2 알킬기이다. 비치환된 C1-C4 알킬아미노기가 바람직하다.

[0157] 본원에서 사용되는 용어 6- 내지 10-원 아릴옥시기는 산소 원자에 부착되는 상기 6- 내지 10-원 아릴기이다. 비치환된 페녹시기가 바람직하다.

[0158] 통상적으로, 중합체는 화학식 Ia, Ib, Ic, Id 및 Ie의 군으로부터 선택되는 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기를 포함한다. 화학식 Ia의 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기를 포함하는 중합체가 바람직하다.

[0159] 실제로, 중합체는 통상적으로 적합한 반대이온과의 염 형태이다. 따라서, 질소 원자 상의 양 전하는 통상적으로 음이온 A-과 연합된다. A-는 주로 미네랄 산, 예컨대 할라이드, 예를 들어 클로라이드, 브로마이드 또는 요오다이드, 술페이트, 니트레이트, 포스페이트, 헥사플루오로포스페이트 및 테트라플루오로보레이트의 음이온, 또는 유기산, 예컨대 아세테이트, 말리에이트, 푸마레이트, 시트레이트, 옥살레이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 말레이트, 만델레이트, 트리플루오로아세테이트, 메탄술포네이트 및 p-톨루엔술포네이트의 음이온이다. A-는 바람직하게는 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 술페이트, 니트레이트, 헥사플루오로포스페이트, 테트라플루오로보레이트, 아세테이트, 말리에이트, 옥살레이트, 숙시네이트 또는 트리플루오로아세테이트로부터 선택되는 음이온이다. 더 바람직하게는 A-는 클로라이드, 브로마이드, 헥사플루오로포스페이트, 테트라플루오로보레이트, 트리플루오로아세테이트 또는 메탄술포네이트이다. 보다 더 바람직하게는 A-는 클로라이드이다.

[0160] 양으로 하전된 4차 아미노기는, 측쇄에 존재할 경우, 중합체 골격에 직접 연결될 수 있거나, 링커 L를 통해 연결될 수 있다. L은 주로 올리고 및 폴리(알킬렌 글리콜) 및 알킬렌 술퍼드, 예를 들어 1 내지 20 아미노산의 짧은 펩티드 서열, 알킬기, 예를 들어 C1-C6 알킬기 및 짧은 폴리에스테르 또는 폴리카르보네이트 사슬, 예를 들어 10 내지 30개의 탄소 원자를 갖는 폴리에스테르 또는 폴리카르보네이트 사슬로부터 선택된다. L은 바람직하게는 친수성이다. L은 1개 이상의, 통상적으로 1개의 분할가능한 기를 임의로 포함할 수 있다. 분할가능한 기는 일반적으로 환원가능 기, 예를 들어 -S-S- 또는 산 분할가능한 기, 예를 들어 아세탈기이다.

[0161] 1개 이상의 반응성 기는 통상적으로 골격에 부착된 측쇄에 존재한다.

[0162] 화학식 Ia의 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기를 포함하는 중합체가 바람직하다.

[0163] 일반적으로, R1, R2 및 R3은 각각 독립적으로 직쇄 또는 분지쇄 C1-C4 알킬기, 페닐기, 5- 내지 6-원 헤테로아릴기, C3-C6 시클로알킬기 및 C5-C6 헤테로시클릭기 (여기서, C1-C4 알킬기, 페닐기, 5- 내지 6-원 헤테로아릴기, C3-C6 시클로알킬기 및 C5-C6 헤테로시클릭기는 할로겐 원자, 히드록시기, -CN기, -NH2기 및 -NO2기로부터 선택되는 1 또는 2개의 치환기로 치환 또는 비치환됨)로부터 선택된다.

[0164] 바람직하게는 R1, R2 및 R3은 각각 독립적으로 직쇄 또는 분지쇄 C1-C4 알킬기 및 페닐기 (여기서, C1-C4 알킬

기 및 페닐기는 할로젠 원자 및 히드록시기로부터 선택되는 1개의 치환기로 치환 또는 비치환됨)로부터 선택된다.

[0165] 더 바람직하게는 R1, R2 및 R3은 각각 독립적으로 직쇄 또는 분지쇄 C1-C2 알킬기 (여기서 C1-C2 알킬기는 할로젠 원자 및 히드록시기로부터 선택되는 1개의 치환기로 치환 또는 비치환됨)로부터 선택된다.

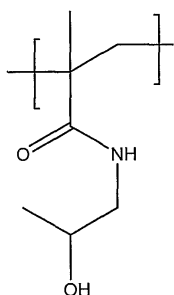
[0166] 보다 더 바람직하게는 R1, R2 및 R3은 동일하며 각각 비치환된 메틸기를 나타낸다.

[0167] 통상적으로, 중합체 골격은 (메트)아크릴레이트, (메트)아크릴아미드, 스티릴 단량체, 비닐 단량체, 비닐 에테르 단량체, 비닐 에스테르 단량체, 시알릭산 단량체, 만노스 단량체, N-(2-히드록시에틸)-1-글루타민 (HEG) 단량체 및 에틸렌글리콜-올리고펩티드 단량체로부터 선택되는 단량체 단위 (M)를 기반으로 한다. 바람직하게는 중합체 골격은 N-2-히드록시프로필메타크릴아미드 (HPMA), N-(2-히드록시에틸)-1-글루타민 (HEG) 및 에틸렌글리콜-올리고펩티드로부터 선택되는 단량체 단위를 기반으로 하는 것이거나, 또는 폴리시알릭산 또는 폴리만난 중합체이다.

[0168] HPMA를 기반으로 하는 중합체 골격이 더 바람직하다.

[0169] 따라서, 중합체는 통상적으로 하기 화학식 II의 하나 이상의 단위를 포함한다.

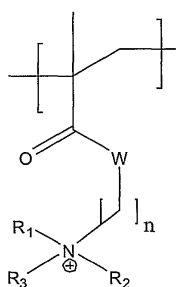
[0170] [화학식 II]



[0171]

[0172] 중합체 골격이 HPMA 단량체 단위를 기반으로 하고 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기가 화학식 Ia의 것일 경우, 중합체는 통상적으로 하기 화학식 IIIa 및/또는 IIIb의 하나 이상의 단위를 포함한다.

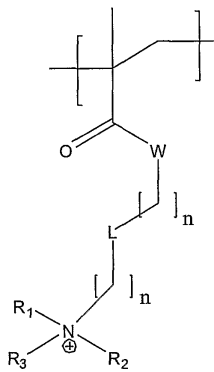
[0173] [화학식 IIIa]



[0174]

[0175] (식 중, W는 S, NH 또는 O이고, n은 1 내지 4의 정수이고, R1, R2 및 R3은 상기 정의된 바와 같음).

[0176] [화학식 IIIb]



[0177]

[0178] (식 중, L은 상기 정의된 바와 같은 분해성 또는 생분해성 연결이고, W, n, R1, R2 및 R3은 상기 정의된 바와 같음).

[0179] W는 바람직하게는 NH 또는 O, 더 바람직하게는 O이다.

[0180] n은 바람직하게는 1 내지 2의 정수이고, 더 바람직하게는 2이다.

[0181] 상기 화학식 IIIa 및 IIIb에서 R1, R2 및 R3은 바람직하게는 동일하고 각각 비치환된 메틸기를 나타낸다. 화학식 IIIa 및 IIIb 중 질소 원자 상의 양 전하는 일반적으로 상기 정의된 바와 같이 적합한 반대이온과 연합된다.

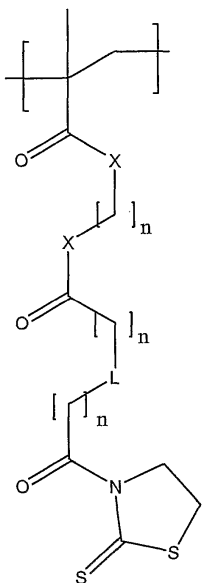
[0182] 상기 화학식 IIIb에서, L은 통상적으로 -N-N- 또는 -S-S-, 바람직하게는 -S-S-이다.

[0183] 화학식 IIIa의 단위가 바람직하다.

[0184] 일반적으로, 반응성 기는 핵산 벡터의 표면 상에 존재하는 기, 예를 들어 아미노기와 반응할 기이다. 아미노기와 반응할 적합한 반응성 기에는 p-니트로페놀 (ONp) 에스테르, N-히드록시숙신이미드 (NHS) 에스테르 및 티아졸리딘-2-티온기가 포함된다. 티아졸리딘-2-티온기가 바람직하다.

[0185] 중합체 골격이 HPMA를 기반으로 하고 반응성 기가 티아졸리딘-2-티온기를 포함하는 경우, 중합체는 통상적으로 하기 화학식 IVa 및/또는 IVb의 하나 이상의 단위를 포함한다.

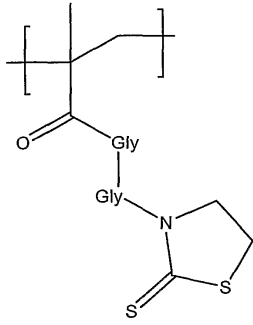
[0186] [화학식 IVa]



[0187]

[0188] (식 중, X는 O, S 또는 NH이고, L 및 n은 상기 정의된 바와 같음).

[0189] [화학식 IVb]



[0190]

[0191] (식 중, Gly는 아미노산 글리신임).

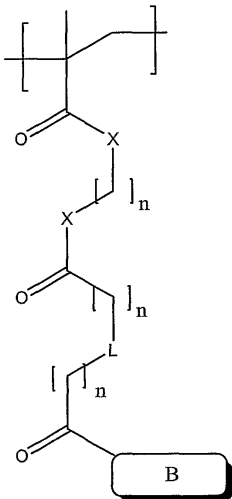
[0192] X는 바람직하게는 NH이다.

[0193] 화학식 IVa의 단위가 바람직하다.


[0194] 한 실시양태에서, 중합체는 상기 정의된 바와 같은 1개 이상의 생물학적 활성제를 추가로 포함한다. 상기 1개 이상의 생물학적 활성제는 일반적으로 골격에 부착된 측쇄에 존재한다.

[0195] 중합체 골격이 HPMA를 기반으로 하고 중합체가 1개 이상의 생물학적 활성제를 추가로 포함하는 경우, 중합체는 통상적으로 하기 화학식 V의 하나 이상의 단위를 포함한다.

[0196] [화학식 V]



[0197]

[0198] (식 중,  는 본원에 정의된 바와 같은 생물학적 활성제이고, X, L 및 n은 상기 정의된 바와 같음).

[0199] 상기 화학식 V에서,  는 바람직하게는 표피 성장 인자 (EGF)이다.

[0200] 바람직하게는 중합체는 0 초과 내지 10 mol%의 화학식 IIIa 및/또는 IIIb, 바람직하게는 IIIa의 단위, 0 초과 내지 14 mol%의 화학식 IVa 및/또는 IVb, 바람직하게는 IVa의 단위, 0 내지 20 mol%의 화학식 V의 단위를 포함하고, 나머지 mol%는 일반적으로 화학식 II의 단위로 이루어진다.

[0201] 더 바람직하게는 화학식 IIIa 및/또는 IIIb의 단위의 양은 바람직하게는 0.25 내지 10 mol%, 더 바람직하게는 0.5 내지 7.5 mol%, 보다 더 바람직하게는 1.5 내지 5 mol%이다.

[0202] 더 바람직하게는 화학식 IVa 또는 IVb의 단위의 양은 바람직하게는 0.5 내지 10 mol%, 더 바람직하게는 1 내지 6 mol%, 보다 더 바람직하게는 2 내지 5 mol%이다.

[0203] 보다 더 바람직하게는 상기 화학식 IIIa 또는 IIIb에서 n은 2이고, R1, R2 및 R3은 동일하고 각각 비치환된 메틸기를 나타내고, X-는 클로라이드이며, 상기 화학식 IVa 또는 IVb에서, X는 NH이고, n은 2이고, L은

-S-S-이며, 상기 화학식 V에서, X는 NH이고, n은 2이고, L은 -S-S-이고, B는 EGF이다.

[0204] 본 발명의 추가적으로 바람직한 실시양태에서, 중합체는 골격 및 측쇄를 포함하고, 중합체 골격은 HPMA를 기반으로 하며, 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기는 화학식 Ia의 것이고 골격에 부착된 측쇄에 존재하며, R1, R2 및 R3은 동일하고 각각 비치환된 메틸기를 나타낸다.

[0205] 본 발명의 중합체는, 예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로 도입되는 문헌 [Konak, et al., Langmuir, 2008, 24, 7092-7098]에 기재된 바와 같은 공지된 방법과 유사하게 제조할 수 있다.

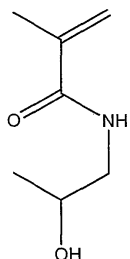
[0206] 따라서, 본 발명의 중합체는 통상적으로 1개 이상의 단량체 단위, 예를 들어 1개 이상의 N-2-히드록시프로필메타크릴아미드 (HPMA), N-(2-히드록시에틸)-1-글루타민 (HEG), 에틸렌글리콜-올리고펩티드, 시알릭산 또는 만노스 단량체 단위, 바람직하게는 HPMA 단량체 단위를 양으로 하전된 4차 아미노기를 포함하는 1개 이상의 관능화된 단량체 단위와 함께, 반응성 기를 포함하는 1개 이상의 관능화된 단량체 단위와 함께, 임의로, 생물학적 활성제를 포함하는 1개 이상의 관능화된 단량체 단위와 함께 공중합하여 제조한다.

[0207] 통상적으로, 본 발명의 중합체는 본원에 정의된 바와 같이 1개 이상의 단량체 단위 M을 반응성 기로 관능화된 1개 이상의 단량체 단위 M과, 1개 이상의 단량체 단위 M-L-N+R1R2R3 (식 중, M, L, R1, R2 및 R3은 본원에 정의된 바와 같음)과 공중합하여 제조한다.

[0208] 대안적으로, 중합체는 본원에 정의된 바와 같이 1개 이상의 단량체 단위를 중합하여, 그리고 이렇게 수득된 중합체를 1개 이상의 양으로 하전된 4차 아미노기 및 1개 이상의 반응성 기 및, 임의로, 1개 이상의 생물학적 활성제로 관능화시켜 제조할 수 있다.

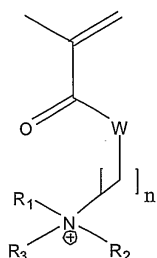
[0209] 따라서, 중합체 골격이 HPMA를 기반으로 하는 경우, 본 발명의 중합체는 하기 화학식 II'의 하나 이상의 단위, 하기 화학식 III'a 및/또는 III'b, 바람직하게는 III'a의 하나 이상의 단위, 하기 화학식 IV'a 및/또는 IV'b, 바람직하게는 III'a의 하나 이상의 단위 및, 임의로, 하기 화학식 V'의 하나 이상의 단위를 중합하여 제조할 수 있다.

[0210] [화학식 II']



[0211]

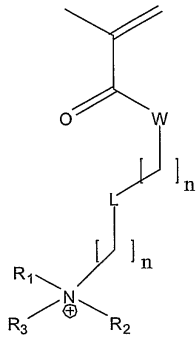
[0212] [화학식 III'a]



[0213]

[0214] (식 중, W, n, R1, R2 및 R3은 상기 정의된 바와 같음).

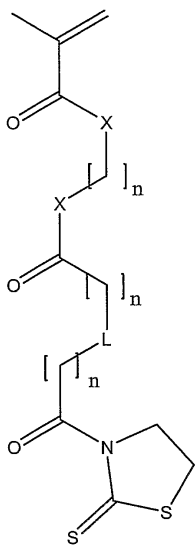
[0215] [화학식 III'b]



[0216]

[0217] (식 중, W, n, L, R1, R2 및 R3은 상기 정의된 바와 같음).

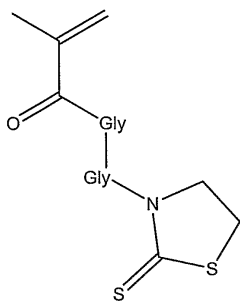
[0218] [화학식 IV'a]



[0219]

[0220] (식 중, X, n 및 L은 상기 정의된 바와 같음).

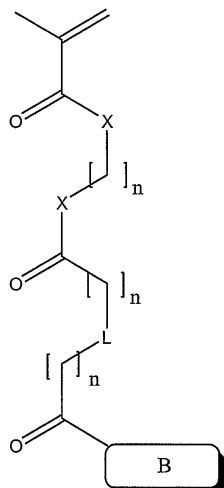
[0221] [화학식 IV'b]



[0222]

[0223] (식 중, Gly는 아미노산 글리신임).

[0224] [화학식 V']



[0225]

[0226] (식 중, X, n, L 및 B는 상기 정의된 바와 같음).

[0227] 공중합 반응에 사용되는 단량체 II', III'a, III'b, IV'a, IV'b 및 V'의 바람직한 양은 일반적으로 상기 정의된 바와 같은 단위 II, IIIa, IIIb, IVa, IVb 및 V의 바람직한 양과 동일하다.

[0228] 통상적으로 상기 공중합 반응에 개시제, 바람직하게는 AIBN이 사용된다. 반응은 일반적으로 유기 용매, 통상적으로 DMSO 중에서 수행한다. 반응은 주로 50 내지 70℃, 바람직하게는 약 60℃의 온도로 가열한다. 반응은 주로 상기 특정된 온도로 4 내지 8시간, 바람직하게는 5 내지 7시간, 더 바람직하게는 약 6시간 동안 가열한다. 이렇게 수득된 중합체는 통상적으로 아세톤-디에틸 에테르 (3:1) 혼합물 중에서 침전시키고, 여과해내고, 아세톤 및 디에틸 에테르로 세척하고 진공에서 건조시킨다. 이렇게 수득된 중합체는 메탄올을 사용하여 세파덱스 (Sephadex)-LH 20 컬럼 내에서 추가로 정제할 수 있다.

[0229] 중합 반응을 위한 단량체는 통상적으로 시판되거나, 예를 들어 문헌 [Konak, et al., Langmuir, 2008, 24, 7092-7098]에 기재된 바와 같은 공지된 방법과 유사하게 제조할 수 있다.

[0230] 실시예

[0231] 실시예 1: ELISA로 확인한 항체 상호작용으로부터의 바이러스 입자의 보호

[0232] 아데노바이러스 입자 (Ad5 야생형)를 다양한 4차 아민 (QA) 및 반응성 티아졸리딘-2-티온 (TT)기를 갖는 여러 농도의 중합체로 코팅하였다 (도 1 참고). 중합체를 개질시키기 전에, 바이러스 입자는 고도로 정제하여 TT기와 경쟁할 수 있는 오염물이 부재하도록 해야 한다. 본 실시예에서, 바이러스 입자는 벤조나아제 (Benzonase)[®]로 처리한 후 염화세슘 구매 상에서 더블 밴드로 나타났다 (적합한 프로토콜은 문헌에 보고됨). 대안적으로 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토그래피에 의한 정제도 적합할 것이다. 정제에 후속하여, 바이러스 입자를 반응 완충제 (150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.8, 2mM CaCl₂ 및 MgCl₂) 안으로 투석시켰다. 바이러스 입자를 반응 완충제 내 20℃에서 1시간 동안 코팅한 후 4℃에 밤새 두었다. 그 후, 중합체로 코팅된 바이러스 입자를 S400 컬럼 (파마시아 (Pharmacia))을 사용하여 스핀 컬럼 정제에 의해 미반응성 중합체로부터 분리하였다.

[0233] 다클론 항체가 바이러스 입자와 결합하는 능력은 포획 ELISA로 측정하였다. 본 실시예에서, ELISA 판을 Ad5에 대한 다클론 토끼 항체로 코팅하였다. 블로킹 및 세척을 한 후, 코팅된 바이러스 입자를 웰 당 1e9 입자로 1시간 동안 첨가하였다. 검출은 아비딘 호스 래디쉬 퍼록시다아제 컨쥬게이트 2차를 갖는 바이오티닐화 염소 다클론 항체를 사용하여 수행하였다. 데이터는 중합체 코팅의 농도를 증가시키면 항체로부터의 보호가 개선됨을 나타냈다. 또한, 4차 아민기를 갖는 중합체는 낮은 농도에서 보다 큰 정도의 보호를 제공하였다.

[0234] 실시예 2: 증식허용 (permissive) 세포의 바이러스 감염을 막는 중합체 능력에 대한 4차 아민의 영향

[0235] E1 대신 cmv 프로모터의 제어 하에서 루시퍼라제를 발현시키는 아데노바이러스 유형 5 입자를 0% 또는 7.8%의 4차 아민을 함유하는 중합체 (각각 EC221 및 EC160)로 (상기한 바와 같이) 코팅하였다. 세포를 감염시키는 코팅된 바이러스 입자의 능력은 시험관내에서 A549 (폐 암종) 단일층 상에서 평가하였다 (도 2). 간략히, 바이러스

입자 (세포 당 1000개의 입자)를 96-웰 플레이트 내에서 성장하는 A549 세포에 (웰 당 50,000개의 세포) 1.5시간 동안 첨가하였다. 추가 24시간 후, 세포를 용해시키고 루시페라제 발현을 인광광도법으로 평가하였다. 재표적화 되지 않은 중합체 코팅은 바이러스가 세포 표면 수용체에 접근하는 것을 방지함으로써 자연적인 바이러스 향성을 제거하였다. 4차 아민 (EC221)의 첨가는 보다 효과적으로 훨씬 더 낮은 농도에서 향성의 제거가 이루어지게 한다.

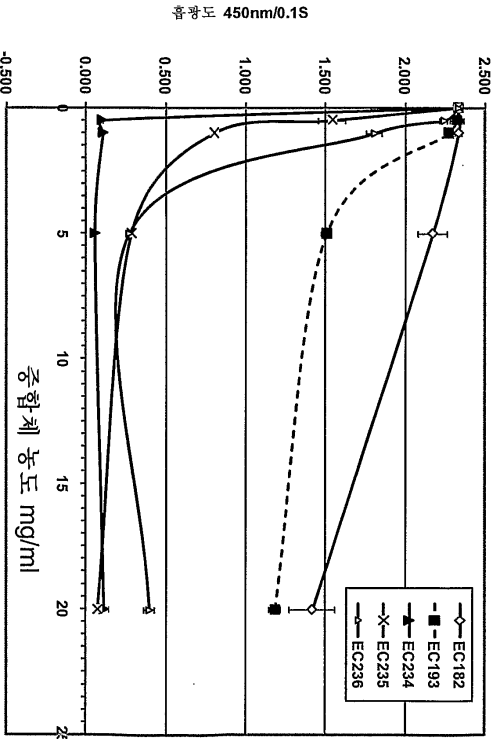
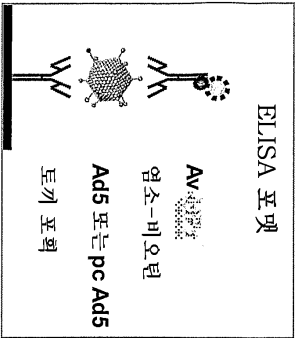
[0236] 실시예 3: 4차 아민을 갖는 중합체는 높은 역가의 중화 혈청의 존재하에서 Ad5가 혈액 세포와 상호작용하는 것 으로부터 보호하고, 감염을 가능하게 함

[0237] 이러한 연구에 사용되는 중합체는 4차 아민을 포함하고 N-말단을 통해 중합체에 컨쥬게이팅된 표피 성장 인자 (EGF)로 재표적화시켰다 (도 3a). 중화 혈장 중에서의 보통의 감염 및 EGF-매개된 감염의 비교를 도 4b에 도시 하였다. 간략히, Ad5 또는 EGF-P-Ad5를 중화 항혈청으로 희석하여 인큐베이션한 후, A431 세포의 단일층을 첨 가하고, 90분 후 배지를 제거하고 PBS 중에서 세척하고, 24시간 후 루시페라제 발현을 분석하였다. 상기의 각 각은 아데노바이러스에 대해 평균보다 극히 높은 역가의 중화 항체 (1:20,000)를 가짐을 주지한다. 도 3c는 코팅된 바이러스 입자가 PBS/1%BSA 또는 신선한 인간 전체 혈장 중에 현탁된 적혈구와의 상호작용을 피한다는 것 을 나타낸다. 인큐베이션한 후, 적혈구 및 액체 분획을 분리하고 Ad5 유전체를 정량 PCR로 분석하였다 (백색 = 액체 분획, 회색 = 세포 분획).

[0238] 인간 적혈구의 존재하에서의 보통의 감염 및 EGF-매개된 감염의 비교를 도 3d에 도시하였다. A431 세포를 PBS 또는 혈장 중에 현탁된 1/5 희석 적혈구의 존재하에서 Ad5 또는 EGF-P-Ad5로 감염시켰다. 90분 후, 배지를 제 거하고 PBS 중에서 철저히 세척하고, 24시간 후 루시페라제 발현을 분석하였다. 검정색 막대 = Ad5, 백색 막대 = EGF-P-Ad. N = 4, SEM을 나타냄, **p < 0.005.

반응성 테아졸리딘-2-티온 (TT)기 및 4차 아민 (QA)을
갖는 HPMa 기재 중합체에 의한 Ad5 바이러스 입자의
다클론 항체로부터의 보호

결과



	TT	QA	SS-TT
EC182	8.3	0	있음
EC193	10.3	0	있음
EC234	6.5	5	있음
EC235	5.5	5	있음
EC236	5.3	1.5	있음

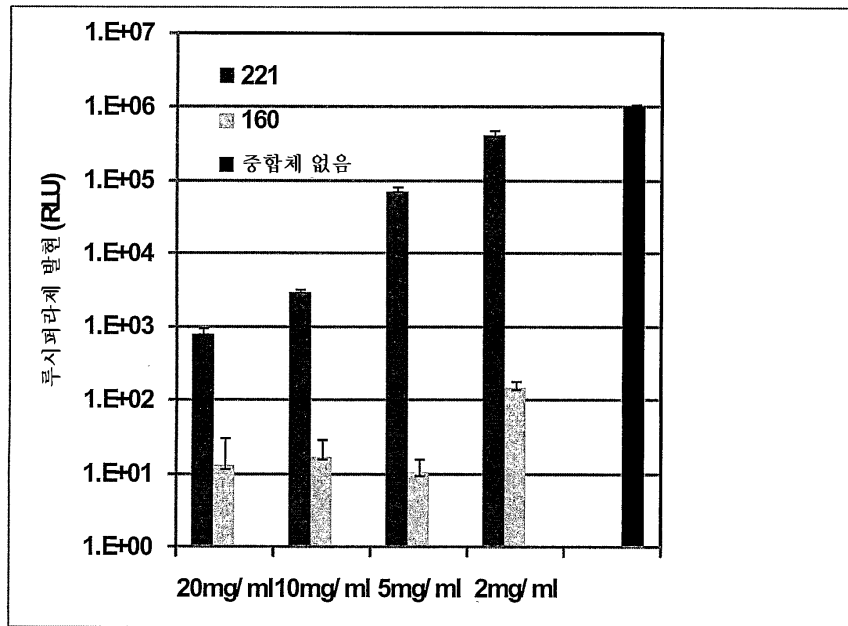
SS-TT = 중합체와
TT기 사이의 환원가능
측정

도면

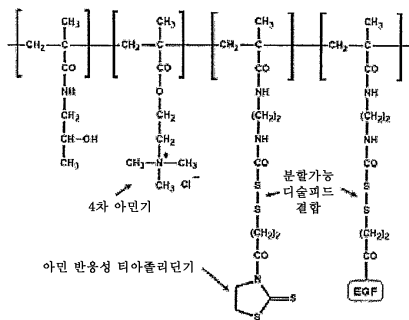
도면1

도면2

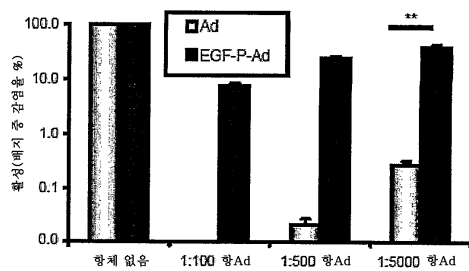
4차 아민을 갖는 중합체 (160)가 4차 아민을 갖지 않는 중합체 (221) 보다 Ad5 입자와 훨씬 더 효율적으로 반응함



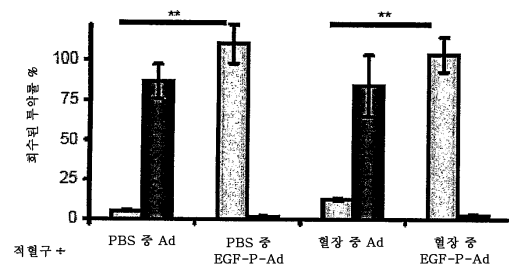
도면3a



도면3b



도면3c



도면3d

