



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0102294
(43) 공개일자 2014년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 51/10 (2006.01) A61K 51/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7019228
(22) 출원일자(국제) 2012년12월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년07월10일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2012/002950
(87) 국제공개번호 WO 2013/088250
국제공개일자 2013년06월20일
(30) 우선권주장
61/569,907 2011년12월13일 미국(US)

(71) 출원인
엔진아이씨 몰레큘러 딜리버리 피티와이 리미티드
오스트레일리아, 뉴 사우스 웨일즈 2066, 시드니,
레인 코브 웨스트, 25 시리우스 로드, 빌딩 2
(72) 발명자
브람바트, 히만슈
오스트레일리아, 뉴 사우스 웨일즈 2066, 시드니,
레인 코브 웨스트, 25 시리우스 로드, 빌딩 2, 엔
진아이씨 몰레큘러 딜리버리 피티와이 리미티드
내
맥더미드, 제니퍼
오스트레일리아, 뉴 사우스 웨일즈 2066, 시드니,
레인 코브 웨스트, 25 시리우스 로드, 빌딩 2, 엔
진아이씨 몰레큘러 딜리버리 피티와이 리미티드
내
(74) 대리인
손민

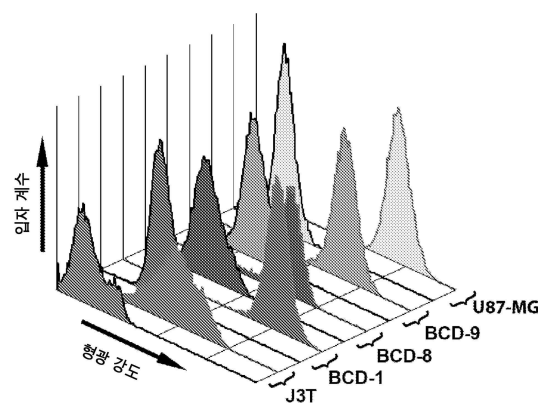
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 뇌 종양에 대한 치료제의 전달을 위한 박테리아 유래된, 무손상 미니세포

(57) 요약

무손상, 박테리아 유래된 미니세포의 전신적 투여는, 혈액 뇌 장벽을 횡단하는 내피 엔도사이토시스/트랜스사이토시스, 또는, 통상적인 접근법에 따라, 나노입자를 미세환경 내로 진입시키는 다른 기전을 필요로 하지 않으면서, 치료적으로 유의미한 농도로 뇌 종양의 미세환경에서 미니세포의 빠른 축적을 초래한다. 따라서, 원발성 및 전이성 둘 모두인 매우 다양한 뇌 종양이, 각각의 미니세포가 방사성핵종, 기능적 핵산 또는 이를 인코딩하는 플라스미드, 또는 화학요법제와 같이, 그 종양에 대한 활성제를 위한 담체인, 이러한 복수개의 미니세포로 구성되는 조성물의 치료적 유효량을 전신적으로 투여함으로써 치료될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

복수개의 무손상, 박테리아 유래된 미니세포로 구성된 조성물의 치료적 유효량을 전신적으로 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 뇌 종양을 치료하기 위한 방법으로서, 상기 복수개의 각각의 미니세포가 항-신생물제(anti-neoplastic agent)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항-신생물제가 방사성핵종인 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 방사성 핵종이 이트륨-90, 테크네튬-99m, 아이오딘-123, 아이오딘-131, 루비듐-82, 탈륨-201, 갈륨-67, 플루오린-18, 제논-133, 및 인듐-111로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 방사성핵종이 상기 미니세포의 표면 상의 단백질 또는 탄수화물에 부착되는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 방사성핵종이 미니세포의 표면과 관련된 이중특이적 항체에 부착되는 것인 방법.

청구항 6

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 약 30 Gy 내지 약 100 Gy 방사능을 함유하는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항-신생물제가 화학요법 약물인 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 화학요법 약물이 약 400 달톤 초과 분자량을 갖는 것인 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 화학요법 약물이 표적된 암에 대해 상기 화학요법 약물의 ED₅₀ 보다 낮은 LD₅₀를 갖는 것인 방법.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 최대 약 1 mg의 상기 화학요법 약물을 함유하는 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항-신생물제가 기능적 핵산 또는 기능적 핵산을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드인 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 기능적 핵산이 종양 세포 증식, 혈관신생 또는 화학요법에 대한 내성을 촉진하고/하거나 아포토시스 또는 세포 주기 정지를 억제하는 유전자를 억제하는 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 기능적 핵산이 siRNA, miRNA, shRNA, lincRNA, 안티센스 RNA, 또는 리보자임으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 항-신생물제가 아포토시스를 촉진하는 유전자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드인 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수개의 각각의 미니세포가 비-포식 포유동물 세포 표면 수용체에 특이성을 갖는 리간드를 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 수용체가 종양 세포 항원인 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 리간드가 상기 종양 세포 항원을 특이적으로 인식하는 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수개가 적어도 약 10^8 개 미니세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 복수개가 적어도 약 10^{10} 개 미니세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 약 10 EU 미만의 유리 엔도톡신을 함유하는 것인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 10^8 개 미니세포 당 최대 1개 모체 박테리아 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뇌 종양이 아교모세포종, 별아교세포종, 희소돌기아교세포종, 상의세포종, 두개인두종, 뇌하수체 종양, 뇌의 원발성 림프종, 송과선 종양, 뇌의 원발성 생식세포 종양, 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 뇌 종양이 전이성 뇌 종양인 것인 방법.

청구항 24

뇌 종양의 치료를 위한 의약품의 제조를 위한 조성물의 용도로서, 조성물이 복수개의 무손상, 박테리아 유래된 미니세포를 포함하고, 상기 복수개의 각각의 미니세포가 항-신생물제를 포함하는 것인, 용도.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 조성물이 상기 항-신생물제로서 최대 약 1 mg의 화학요법 약물을 함유하는 것인 용도.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 항-신생물제가 기능적 핵산 또는 기능적 핵산을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드인 것인 용

도.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 기능적 핵산이 종양 세포 증식, 혈관신생 또는 화학요법에 대한 내성을 촉진하고/하거나 아폽토시스 또는 세포 주기 정지를 억제하는 유전자를 억제하는 것인 용도.

청구항 28

제24항에 있어서, 상기 항-신생물제가 아폽토시스를 촉진하는 유전자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드인 것인 용도.

청구항 29

제24항에 있어서, 상기 항-신생물제가 방사성핵종인 것인 용도.

청구항 30

제24항에 있어서, 상기 복수개가 적어도 약 10^{10} 개 미니세포를 포함하는 것인 용도.

청구항 31

제24항에 있어서, 상기 조성물이 약 10 EU 미만의 유리 엔도톡신을 함유하는 것인 용도.

청구항 32

제24항에 있어서, 상기 복수개의 각각의 미니세포가 비-포식 포유동물 세포 표면 수용체에 특이성을 갖는 리간드를 포함하는 것인 용도.

청구항 33

제24항에 있어서, 상기 뇌 종양이 아교모세포종, 별아교세포종, 희소돌기아교세포종, 상의세포종, 두개인두종, 뇌하수체 종양, 뇌의 원발성 림프종, 송과선 종양, 뇌의 원발성 생식세포 종양, 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 뇌 종양이 전이성 뇌 종양인 것인 용도.

청구항 35

제24항에 있어서, 상기 항-신생물제가 약 400 달톤 초과 분자량을 갖는 화학요법 약물인 것인 용도.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 화학요법 약물이 표적된 암에 대해 상기 화학요법 약물의 ED_{50} 보다 더 낮은 LD_{50} 을 갖는 것인 용도.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 포함된, 2011년 12월 13일자로 출원된 미국 가특허 출원 제 61/569,907호의 이익을 청구한다.

배경기술

- [0003] 원발성 뇌 종양은 여러가지 다른 세포 혈통으로부터 유래된, 다양한 그룹의 신생물(neoplasm)로 구성된다. 세계 보건 기구의 분류에 따르면(Louis *et al.*, 2007), 중추 신경계의 종양은 성상세포, 희소돌기아교세포, 또는 혼합된 형태(희소돌기성상세포)로서 분류된다. 이들 종양은 아형에 의해 추가적으로 분류되고, 조직학을 기준으로 I부터 IV까지 등급 IV가 가장 공격적인 것이다. 원발성 악성 뇌 종양의 가장 공격적인 형태인 다형성 교모세포종(GBM)은 모든 원발성 뇌 종양의 대략 45% 내지 50%를 차지하고(Wrensch *et al.*, 2002; Behin *et al.*, 2003), 35세 이하 성인에서 암 사망의 두번째로 큰 원인으로 나타난다(Allard *et al.*, 2009).
- [0004] 세포 감퇴수술, 방사선요법 및 화학요법을 포함하는 수많은 치료 노력에도 불구하고, 신경아교종 환자에 대한 예후는 여전히 매우 열등하다(Stewart, 2002; Stupp *et al.*, 2005). 대다수는 결국 재발 및 진행성 질환이 발생하며, 이후 생존 기간의 중앙값은 대략 6개월이다(Wong *et al.*, 1999; Lamborn *et al.*, 2008). GBM 환자에 대한 생존기간의 중앙값은 약 12-14개월이다(Stupp *et al.*, 2005).
- [0005] 추가로, 유방암, 폐암 및 피부암 (흑색종)과 같은 원발성 종양으로부터의 뇌 전이는 중대하고, 증가하고 있는 공중 보건 문제이다. 미국에서 추정된 250,000명의 환자가 2009년에 뇌 전이로 진단되었는데(Fox *et al.*, 2011), 이는 원발성 뇌 종양의 발병률 보다 10배 더 높은 것이다(Jemal *et al.*, 2009). 뇌 전이를 갖는 환자에 대한 예후는 매우 불량하고, 대부분의 환자가 진단 후 4개월간만 생존한다. 현재의 치료 요법(regimen)은 미미한 생존 이점을 제공한다(Eichler and Loeffler, 2007).
- [0006] 신경아교종의 완전한 수술적 절제는, 이의 확산적 침습 특성 및 생체 뇌 구조에의 근접성으로 인해, 거의 불가능하다. 전신성 요법은 또한 소위 혈액 뇌 장벽(BBB) 때문에 제한된다. 일반적으로 문헌 [Cecchelli *et al.* (2007)]을 참고하라.
- [0007] 이 장벽은 뇌의 모세혈관 내피 내에 존재하고, 100년이 넘는 동안 연구의 주제였다. 실제로, 뇌 종양에 대한 대부분의 약물 후보가 임상에 도달하지 못했다는 사실(Pardridge, 2007)에는, BBB를 횡단해 치료 효과를 갖는 수준에 도달할 수 없는 이들 약물 후보의 불능이 크게 기여한다(Groothuis, 2000).
- [0008] 수십년에 걸친 광범위한 노력에도 불구하고, 뇌 암의 치료에 있어서 치료율은 매우 나쁜 상태이다. 따라서 뇌 암의 치료는 종양학에서 가장 큰 도전 중 하나이다. 더불어, 우세한 의견일치는 BBB가 뇌 종양 내로 약물 전달에 있어서의 주요 제한 인자라는 점이다.
- [0009] 따라서, BBB를 횡단하기에 충분히 작고 GBM 환자에 대한 생존 결과를 개선시키는 신규 약물을 발견하고 개발하는데 전세계적으로 상당한 노력이 행해지고 있다. 추가로, BBB를 지나 뇌 종양 미세환경 내로 약물을 수송하기 위한 기술이 개발중에 있다.
- [0010] BBB 제한을 피하려는 시도에 있어서, 연구된 접근법들 중에는 하기가 있다:
- [0011] · 고삼투성 BBB 붕괴(Kroll and Neuwelt, 1998).
- [0012] · 화학적 장벽 변형(Black *et al.*, 1997).
- [0013] · BBB를 횡단하는 수송체를 갖는 화합물에 치료제를 연결하기 위한 시도(Bickel *et al.*, 2001; Zhang and Pardridge, 2007).
- [0014] · 뇌 종양 내로 및 주위로의 약물의 직접 투여(Hassenbusch *et al.*, 2002; Hau *et al.*, 2002; Reardon *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2002). 이 접근은 종양 절제 베드(resection bed) 주위의 약물-로딩된 와퍼의 배치, 종양 절제 공동(cavity) 내로 또는 주위로의 제제의 주입, 또는 종양 덩어리 내로 약물의 직접적 주입을 수반한다.
- [0015] · 대류-강화된 전달 또는 "CED"(Bobo *et al.*, 1994; Morrison *et al.*, 1994; Hadjipanayis *et al.*, 2008; Hadjipanayis *et al.*, 2010). CED에서는, 정수압 차이를 시린지 펌프에 의해 부과하여 중추 신경계(CNS) 영역으로 주입액을 직접적으로 분배한다. CED는 혈압 구배에 의해 뇌에서 유액 대류를 제공하는 최소 침습성 수술 절차이며, 이는 BBB를 우회한다. 치료제가 최소 독성으로 뇌 내로 전달될 수 있고, 따라서 전신성 전달에 의해 통상적으로 접근되는 정상 조직 및 장기로 전달될 수 있다.

발명의 내용

- [0016] 당해 분야에서 통상적인 접근법에 영향을 미치는 단점을 고려하여, 복수개의 무손상, 박테리아 유래된 미니세포

로 구성된 조성물의 치료적 유효량을 전신적으로 투여하기 위한 방법이 제공되고, 여기서 복수개의 각각의 미니세포는 항-신생물제를 포함한다. 마찬가지로, 본 발명은 뇌 종양의 치료를 위한 의약품의 제조에 있어 이러한 조성물의 용도를 포함한다. 복수개에는 적어도 약 10^{10} 개 미니세포가 포함되고, 이로 제한되지 않지만, 적어도 10^8 개 미니세포가 포함될 수 있다. 또한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물은 10^8 개 미니세포 당, 예컨대 10^{10} 개 미니세포 당 약 10 EU 미만의 유리 엔도톡신 및/또는 최대 1 모체 박테리아 세포를 포함할 수 있다.

[0017] 미니세포에 포함된 항-신생물제는 방사성핵종, 예를 들면, 이트륨-90, 테크네튬-99m, 아이오딘-123, 아이오딘-131, 루비듐-82, 탈륨-201, 갈륨-67, 플루오린-18, 제논-133, 또는 인듐-111과 같은 것일 수 있고, 이는 미니세포의 표면 상에서 단백질 또는 탄수화물에 부착될 수 있거나, 미니세포의 표면 상에 부착된 종양 표적 리간드 표면 상에 부착될 수 있다. 이런 맥락에서, 조성물은 예를 들면, 약 30 Gy 내지 약 100 Gy 방사능을 함유할 수 있다. 항-신생물제는 또한 화학 요법 약물일 수 있는데, 예를 들면, 조성물은 최대 약 1 mg의 화학요법 약물을 함유한다. 더불어, 항-신생물제는 기능적 핵산 또는 기능적 핵산을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 따라서, 기능적 핵산은 종양 세포 증식, 혈관신생 또는 화학요법에 대한 내성을 촉진하고/하거나 아포토시스 또는 세포 주기 정지를 억제하는 유전자를 억제할 수 있다. 기능적 핵산의 부류의 예시는 siRNA, miRNA, shRNA, lincRNA, 안티센스 RNA, 및 리보자임으로 구성되는 군으로부터 선택되는 리보핵산 분자이다.

[0018] 전술한 것 중 임의에 따른 특정 구현예에 따르면, 상기 언급된 복수개의 각각의 미니세포는 비-포식성 포유동물 세포 표면 수용체, 예컨대 종양 세포 항원에 특이성을 갖는 리간드를 포함할 수 있다. 따라서, 리간드는 예를 들면, 이러한 종양 세포 항원을 특이적으로 인식하는 항체를 포함할 수 있다.

[0019] 이 발명의 방법론은, 이로 제한되지 않지만, 아교모세포종, 별아교세포종, 희소돌기아교세포종, 상의세포종, 두개인두종, 뇌하수체 종양, 뇌의 원발성 림프종, 송과선 종양, 뇌의 원발성 생식세포 종양, 및 이들의 조합으로 구성되는 군에 의해 예시되는, 일련의 뇌 종양을 치료하는데 사용될 수 있다. 치료되는 종양은 원발성 뇌 종양 또는 전이성 뇌 종양이다.

[0020] 다른 대상, 특성 및 이점은 하기 상세한 설명으로부터 자명하다. 특정 구현예의 요지 및 범주 내에서 다양한 변화 및 변형이 본 설명으로부터 자명할 것이기 때문에, 상세한 설명 및 특정 실시예는 단지 예시를 위해 제시된다.

도면의 간단한 설명

[0021] **도 1.** 항-EGFR Mab, 이어서 R-피코에리트린 접합된 염소 항-마우스 IgG로 처리된 인간(U87-MG) 및 개 뇌 종양 세포에 대한 EGF 수용체 정량화. 세포를 FACS를 사용해 분석하고 형광성 R-피코에리트린 마이크로비드 표준과 비교하였다. 대조군 세포는 일차 항체를 제외하고, 동일한 방식으로 처리하였다. EGFR 정량화 결과는 BCD-1, U87-MG, BCD-9, BCD-8 및 J3T 세포에 대한 세포 당 EGFR 농도(감소하는 순서로)가 각각 2,866,854, 1,465,755, 930,440, 774,352 및 287,622임을 보였다. 각각의 세포주에 대한 결과는 대조군(어두운 경계를 갖는 곡선) 및 항-EGFR Mab-처리된(어두운 경계가 없는 곡선) 것으로서 나타났다.

도 2. 결과는 개 및 인간(U87-MG) 뇌 암 세포의 독소루비신 민감성을 측정하기 위한 세포 증식(MTS) 분석을 나타낸다. 오류 막대, \pm SEM.

도 3. FACS 분석으로부터의 대표적인 히스토그램은 개 및 인간 뇌 종양 세포에 대한 ^{EGFR} 미니세포_{Dox}의 결합 효율을 보여준다. 각각의 사례에서 > 95%의 세포는 ^{EGFR} 미니세포_{Dox}의 유의미한 결합을 나타냈다. 비-특이적으로 표적된 ^{gp120} 미니세포_{Dox}로 처리된 세포는 세포에 대한 어떠한 결합도 나타내지 않았다. 항-gp120 항체는 임의의 종양 세포에서 발견되지 않는, HIV 바이러스 캡시드 단백질 gp120에 대해 지향된다.

도 4. 인간 및 뇌 종양 세포를 ^{EGFR} 미니세포_{Dox} 및 대조군 ^{gp120} 미니세포_{Dox}로 3시간 동안 처리하였다. 종양 세포에 결합된 미니세포는 각각의 미니세포를 표적하기 위해 사용된 이중특이적 항체의 항-LPS 성분(IgG2a)에 결합하는, 염소 항-마우스 IgG2a-AF488(녹색 형광, 열은 반점으로 나타냄)로 처리 후 시각화했다. 우측 이미지 또는 각각의 수직 패널은 dox 자가형광(붉은색 형광, 어두운 반점으로 나타냄)을 시각화한 것으로, dox는 대부분의 형질감염된 세포의 핵 내에 존재함을 나타낸다. 이미지는 Leica 형광 현미경을 사용해 캡처했다. 기준 막

대, 20 μ m.

도 5. ^{EGFR}미니세포_{Dox}로 처리 후 후기 뇌 종양을 갖는 개 7 마리에서의 종양 안정화/회귀. 각각의 개에 대한 처리 전 MRI 스캔(사전 용량)은 좌측 수직 컬럼에 나타낸다. 중간 및 우측 수직 컬럼은 ^{EGFR}미니세포_{Dox}로 처리 후 MRI 스캔을 보여주며, 후-용량 수치는 각각의 MRI에 대해 나타낸다. 묘사된 MRI 단면은 시상(BCD-1 및 -6), 측방향(BCD-2 내지 -5) 및 관상(BCD-7)을 포함한다. 종양 용적(cm인 치수)은 각각의 MRI 하부에 나타내고, 화살표는 각각의 종양의 위치를 나타낸다.

도 6. 혈청 생화학 매개변수는 뇌 암을 갖는 개 7마리(BCD-1 내지 BCD7)에 대해 처리 후 측정하였다. 각각의 그래프에서 수평선은 개에서 정상 참조 범위를 나타낸다. 오차 막대, \pm SEM.

도 7. 혈청 혈액학 매개변수는 뇌 암을 갖는 개 7마리(BCD-1 내지 BCD7)의 처리 후 측정하였다. 각각의 그래프에서 수평선은 개에서 정상 참조 범위를 나타낸다. 오차 막대, \pm SEM.

도 8. ^{EGFR}미니세포_{Dox}로 처리 후 7마리의 뇌 암을 갖는 개에서 혈청 TNF α , IL-6, 및 IL-10 반응이 도시된다.

도 9. ^{EGFR}미니세포_{Dox}로 처리 후 7마리 뇌 암을 갖는 개(생존)에서 항-LPS 항체 반응이 묘사된다.

도 10. 투여된 ^{EGFR}미니세포_{Dox}의 용량 개수(우측 y-축 및 각 막대와 관련된 다이아몬드로서 나타냄)와 함께, 뇌 암을 갖는 7마리의 개에 대한 생존(일로)(좌측 y-축에 막대로 표현됨)이 도시된다. 줄무늬 막대는 진행 중 및 차도(remission)를 보이는 개를 나타낸다. 더 어두운 실선 막대는 가능하게는 dox-저항성의 발현으로 인해 종양이 재발할 때까지 안정한 질환을 보였던 개를 나타내며, 이들 개는 안락사시켰다. 더 밝은 점선 막대는 차도가 있지만 연관없는 감염으로 인해 사망한 개의 경우이다.

도 11. (a) 동시-등록된 T1 후-대조(post-contrast) MRI 및 SPECT 스캔 및 융합된 이미지 디스플레이를 각각 3 가지 직교 평면(관상, 시상, 및 횡축)으로 (i), (ii) 및 (iii)에 나타내었다. 흡수 영역 및 국소화된 부위를 화살표로서 나타냈다. 흡수는 머리 양 측면 상의 양방향으로 보이는, 뇌외 초점에서 보다 더 낮았으나, 이는 뇌 내에서 관찰된 유일한 흡수였다.

(b) 다른 동물에 대한 결과를 나타낸다. 횡축 영상은 MRI (i) 및 SPECT (iii)에 대해서만 표시되었다. 강한 흡수는 MRI 상에 증명된 비정상적 증거이다. 이미지 (ii)는 T1 후-대조 MRI, SPECT, 및 융합된 이미지의 동시-등록된 디스플레이이다. 화살표는 MRI 스캔 상의 비정상적 부분에 상응하는, 방사성 표지된 미니세포의 강한 국소화 영역을 나타낸다.

(c) 주사 후 30분 및 3 시간째에 전신, 2D 평면 이미지를 나타낸다. 갑상선 및 일부 목 흡수와 더불어, 초기 흡수가 후기 스캔에서 가시적인 장 내로의 일부 배출과 함께, 간에서 관찰된다.

도 12. Balb/c nu/nu 마우스(그룹 당 $n = 8$)에서 인간 췌장암(MIA PaCa) 이종이식편을 유리 겐시타빈(Gemzar®) 또는 EGFR-표적된, Gemzar-패키징된 미니세포(^{EGFR}미니세포_{Gemzar})를 이용해 i.v 투여하였다. 모든 미니세포 치료는 용량 당 10⁹ 개 미니세포를 투여받았다. 치료 일수는 x-축 아래에 나타낸다(세모). 오차 막대: \pm SEM. 차트는 투여 후 지시된 일수에서 종양 용적을 보여준다.

도 13. Balb/c nu/nu 마우스(그룹 당 $n = 8$)에서 인간 유방암(MDA-MB-468) 이종이식편을 유리 카르보플라틴 또는 비표적된 또는 EGFR-표적된(^{EGFR}미니세포_{카르보플라틴}) 것인, 카르보플라틴으로 패키징된 미니세포를 이용해 i.v 투여하였다. 모든 미니세포 치료는 용량 당 10⁹ 개 미니세포를 투여받았다. 치료 일수는 x-축 아래에 나타낸다(화살표). 오차 막대: \pm SEM. 차트는 투여 후 지시된 일수에서 종양 용적을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

본 발명은 뇌 종양의 치료를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 이와 관련하여, 본 발명자들은 하나 이상의 항-신생물제와 함께 패키징된 무손상, 박테리아 유래 미니세포가, 전신 투여 시, 치료적으로 유의미한 농도로 뇌

종양의 미세 환경에 빠르게 축적됨을 발견하였다. 직경이 대략 400 nm인 미니세포는, 혈액 뇌 장벽(BBB)을 횡단할 수 있는 입자에 대한 상한선으로서 통상적으로 이해되는 12 nm 보다 훨씬 크기 때문에, 이러한 발견은 놀라웠다. 문헌 [Sarin *et al.* (2008) and Laquintana *et al.* (2009)]을 참고하라.

[0024] 따라서, 본 발명자들은 각각의 미니세포가 종양에 대한 활성제를 위한 비히클인, 복수개의 이러한 미니세포로 구성된 조성물의 치료적 유효량을 전신적으로 투여함으로써 원발성 및 전이성 둘 모두인, 매우 다양한 뇌 종양이 치료될 수 있음을 밝혀냈다.

[0025] **(A) 정의**

[0026] 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자에게 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0027] 편의를 위해, 본 명세서, 실시예, 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 특정 용어 및 구절의 의미를 하기에 제공한다. 다른 용어 및 구절은 명세서 전반에 걸쳐 정의된다.

[0028] 단수 형태 "하나(a, an)" 및 "상기(the)"는 문맥이 명백히 다르게 지시하지 않는 한 복수 참조를 포함한다.

[0029] 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된 "암", "신생물", "종양", "악성종양" 및 "암종"은 세포 증식 제어의 유한 미한 손실을 특징으로 하는 비정상 성장 표현형을 나타내는 세포 또는 조직을 나타낸다. 본 발명의 방법 및 조성물은 특히 악성, 전-전이성, 전이성 및 비-전이성 세포에 적용된다.

[0030] "약물"은 동물, 특히 포유동물 및 인간에서 국소 또는 전신적 효과를 생성하는 임의의 생리학적 또는 약학적 활성 성분을 지칭한다.

[0031] 본 설명에서 상호교환적으로 사용된 용어 "개인", "개체", "숙주" 및 "환자는 진단, 치료, 또는 요법이 요구되는 임의의 포유동물 개체를 나타낸다. 개인, 개체, 숙주 또는 환자는 인간 또는 비-인간 동물일 수 있다. 따라서 적합한 개체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 비-인간 영장류, 가축, 말, 개, 고양이, 기니아 피그, 토끼, 및 마우스를 포함할 수 있다.

[0032] 용어 "치료", "치료하는", "치료하다" 등은 뇌 종양 환자에서 원하는 약학적 및/또는 생리학적 효과를 수득하는 것을 지칭한다. 효과는 뇌 종양 또는 이의 증상을 완전하게 또는 부분적으로 예방하는 측면에서 예방적일 수 있고/있거나 뇌 종양 및/또는 뇌 종양에 기인하는 부작용에 대한 일부 또는 완전한 안정화 또는 치유의 측면에서 치료적일 수 있다. 치료는 포유동물, 특히 인간에서 뇌 종양의 임의의 치료를 포함한다. 원하는 효과는, 특히 종양 반응이며, 종양 덩어리의 감소 또는 종양 덩어리 증가의 억제로서 측정될 수 있다. 종양 반응 뿐만 아니라, 전체 생존율의 증가, 무-진행 생존율, 또는 종양 재발까지의 시간 또는 부작용의 감소가 원하는 치료 효과로서 임상적으로 사용될 수 있다.

[0033] **(B) 치료**

[0034] 본 발명은 직경이 약 400 nm인 박테리아 유래된 무손상 미니세포가 정맥내 (i.v.) 투여 시 치료적으로 유의미한 농도로 뇌 종양 미세환경 내에 빠르게 축적된다는 본 발명자들의 발견과 일치하는 실험적 증거를 반영하며, 이에 의해 입증된다. 본 발명자들은 또한 이러한 뇌 종양 침투가 BBB 내피 엔도사이토시스(endocytosis)/트랜스사이토시스(transcytosis) 또는 나노입자가 뇌 종양 미세환경 내로 진입하는 것으로 제안되었던 임의의 다른 기전에 의존하지 않는 것을 발견하였다. 그러므로, 통상의 지식의 유리한 관점으로 볼 때 이들 발견은 상당히 예상 밖이었다.

[0035] 1. BBB를 횡단하기 위한 크기 제한에 관한 통상적 지식

[0036] 나노입자는 BBB를 통과한 약물을 취하기 위한 잠재적인 캐리어로서 고려되어 왔다(Juillierat-Jeanerret, 2008). 이와 관련한 예시로는, BBB를 포함하는 내피 세포의 내강에서 수용체매개 나노입자의 결합, 이어서 내피 세포를 횡단하여 뇌 종양 미세환경 내로의 엔도사이토시스 및 트랜스사이토시스에 의해 극복하는 것을 목표로 하는 나노입자형 약물 전달 전략이다. 다른 접근법은 BBB의 내피 세포들 사이에 미세한 틈을 통해 입자의 통로를 형성하기 위해, 하기 논의된, "증강된 침투 및 보유 효과"를 이용하는 것을 포함한다.

[0037] 2. 나노입자의 트랜스사이토시스

[0038] 폴리소르베이트 80(Tween®80)으로 코팅된 폴리(부틸 시아노아크릴레이트(PBCA) 나노입자는 유리 형태로 BBB를 횡단하지 않았던 다수의 약물의 뇌 전달을 가능하게 하는 것으로 밝혀졌다(Kreuter *et al.*, 1995, 1997, 2001, 2002, 2003, and 2008; Steiniger *et al.*, 2004).

[0039] 폴리소르베이트 80이 이들 나노입자의 표면 상의 특정 혈장 단백질[(특히, 아포지단백질 E 및 B(Petri *et al.*, 2007; Re *et al.*, 2011))]의 흡착을 선택적으로 촉진하기 때문에, 이는 BBB와 관련된 내피 혈액 모세혈관에서 과-발현되는 것으로 알려져 있는 각각의 저-밀도 지방단백질 수용체(LDLr; Xin *et al.*, 2011)와 이들 나노입자의 결합을 가능하게 한다(Dehouck *et al.*, 1994).

[0040] LDLr에 결합 후, 나노입자는 혈관 내피 세포에 의해 내재화되고(Zensi *et al.*, 2009), 이들 세포를 횡단하여 통과된(transcytosed) 후 뇌 중앙 미세환경 내로 수송된다.

[0041] 뇌 중앙을 치료하기 위한 나노입자를 개발하기 위한 전세계적 노력은 BBB-관련된 내피 세포를 통과하고 뇌 중앙 미세환경 내로 진입함으로써 BBB를 횡단하는 혁신적인 방법을 발견하는데 초점을 맞추고 있다. 이는 이들 입자가 트랜스사이토시스성 세포내 이동 동안 손상없이 유지되어야 하고, 리소좀에 의해 분해되지 않아야 한다는 사실 때문에 중대한 과제이다. 후자는 일반적으로 세포내이입된(entocytosed) 물질을 분해하는 고도로 산성인 세포내 구획이다.

[0042] 이 접근법의 추가적인 심각한 결점은 LDLr이 BBB에 특이적이지 않다는 사실이다. 이는 단지 BBB와 관련된 내피 세포에서 과-발현된다. 이들 수용체가 순환계 전반에 걸쳐 내피 세포에 편재하여 위치하기 때문에, 이에 따라 이들 나노입자는 다수의 정상 조직 및 정상 중추 신경계 내로 진입할 잠재력을 갖는다. 지금까지, BBB 관련된 혈관에만 특이적인 수용체가 밝혀지지 않았고, 따라서 정상 조직에 대해 심각한 독성에 대한 잠재성 우려가 여전히 남아 있다.

[0043] 3. 뇌 중앙내로의 수동 진입

[0044] 최근의 증거는 악성 뇌교종 미세혈관계의 BBB에서 내에 기공 크기의 생리적 상한선이 약 12 nm에 불과함을 밝혀냈다(Sarin *et al.*, 2008). 또한, 분자는 BBB에서 발견된 기공을 횡단할 수 있도록 <400 달톤 만큼 작을 필요가 있음이 밝혀졌다(Bickel, 2005; Pardridge, 2007).

[0045] 크기 제약은 당해 분야의 연구자 및 임상학자 사이에 폭넓게 수용된다. 예를 들면, 최근 문헌의 검토는 나노입자가 12 nm 보다 작고, 악성 뇌교종 미세혈관계의 BBB를 횡단하기 위해 긴 혈액 반감기를 가질 필요가 있음을 결론내렸다(Laquintana *et al.*, 2009).

[0046] 이와 관련하여 리포좀, 고분자 나노입자, 고체 액체 나노입자, 고분자 마이셀, 및 덴드리머를 포함하는 다양한 나노입자가 연구되어 왔다. 정맥내 투여 후, 이들 입자는, 뇌 중앙 혈관의 파괴된 BBB 때문에, 뇌 중앙 내로 삼출시킬(extravasate) 뿐만 아니라, 더 적은 정도로 정상 뇌 조직 내로도 삼출시킬 수 있다(Moghimi *et al.*, 2005).

[0047] 파괴된 BBB를 갖는 뇌 중앙에서 나노입자의 이러한 수동 표적화는, 일반적으로 고형 중앙으로의 약물 전달에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨지는, 상기에 언급된 증강된 침투성 및 보유(EPR) 효과와 연관된다. 예를 들면, 문헌 [Laquintana *et al.* (2009)]은 전형적으로 50 내지 150 nm 범위인 리포좀이 미세혈관계 내에 잔존함으로써 캡슐화된 작은 화학요법 약물이 리포좀 막을 횡단하고 악성 뇌교종의 BBB를 갖는 기공을 횡단하여 분산된다는 현재의 관점을 반영한다. 따라서, 더 큰 입자(50 내지 150 nm)는 장벽 내 파괴에 의해 BBB를 통해 삼출될 수 있는 것으로 생각되지 않는다.

[0048] 그러므로, EPR 효과에 의해 수동적으로 BBB를 횡단하고 뇌 중앙 미세환경에서 약학적으로 유의미한 양에 도달하기 위해서는, 나노 입자가 < 12 nm 크기여야 하고 약물과 같은 거대분자는 < 400 달톤의 분자량을 가져야 한다는 것이 통상적인 이해이다. 이러한 이해는 "뇌 약물 개발에 있어서 유일한 가장 중요한 인자는 효과적인 뇌 약물 표적화 기술의 이용가능성"을 강조하는 문헌 [Pardridge (2010)]의 검토 논문에서 강조된다.

[0049] 이는 중추 신경계(CNS)에 대한 후보 약물의 대다수가 혈액-뇌 장벽(BBB)을 횡단하지 않기 때문이다. 거대 분자 약물인 생물약제는 BBB를 횡단하지 않는다. 그러므로, 뇌 표적화 기술의 부재하에서, 재조합 단백질, 모노클론 항체, 펩티드, siRNA(short-interfering RNA), 및 유전자 치료제는 이들 약물이 BBB를 횡단하지 않기 때문에,

뇌에 대해 개발될 수 없다. 소 분자에 대해서는, 이들 제제가 BBB를 횡단할 수 있는 것으로 일반적으로 추측된다. 그러나, 모든 소 분자의 > 98%는 BBB를 횡단하지 않는다(Pardridge *et al.*, 2005). <400 달톤(Da)의 분자량(MW)을 갖는 지용성의 소 분자만이 지질 매개에 의해 BBB를 횡단한다. 그러나, 대부분의 소 분자 약물은 MW >400 Da를 갖거나 높은 수용성을 가지며, 이는 BBB를 통한 자유 확산을 방지한다. 그러므로, CNS 약물 개발자가 소 분자에 초점을 맞추고 있다 하더라도, 대부분의 약물에 대한 CNS 소 분자 약물 개발 프로그램의 성공적인 완성을 위해서는 BBB 약물 표적화 기술이 여전히 요구될 가능성이 있다.

4. 뇌 종양 진입에 대한 추가적인 장벽

BBB 외에도, 뇌 흡수는 뇌 모세혈관 내피 세포 내의 천공(fenestrae) 및 포액세포의 상대적인 결핍에 의해, 뿐만 아니라 주변의 세포와 매트릭스, 혈관주위세포, 및 별아교세포 즉 돌기의 존재에 의해 더 제한된다(Hawkins and Davis, 2005). 또한, BBB는 통상적으로 뇌 밖으로 약물을 이동시키는 수많은 약물 수송 단백질 때문에 약물 및 거대분자에 대해 난공불락인 것으로 여겨진다.

예를 들면, 비교적 쉽게 BBB를 횡단하는 것으로 예상되었던 우호적인 물리화학적 특성을 갖는 치료제들조차도, 이들의 뇌 침투를 ATP-의존적인 수송체가 엄격하게 제한할 수 있음이 밝혀졌다. 대부분의 이들 수송체는 ATP-결합 카세트(ABC) 및 용질 캐리어 패밀리의 2개 슈퍼패밀리에 속한다. P-당단백질(P-gp, ABCB1), 유방-암-내성 단백질(BCRP, ABCG2), 및 다중약물 내성 관련 단백질(MRP, ABCC)이 ABC 패밀리의 중요한 구성원이다. 문헌 [Schinkel (1999), Borst *et al.* (2000), Sun *et al.* (2003), Schinkel and Jonker (2003), Kusuhara and Sugiyama (2005), Loscher and Potschka (2005), and Nicolazzo and Katneni (2009)]를 참고하라.

따라서, 본 발명자들은 미니세포가 뇌 종양 내로 진입하기 위한 나노입자에 대해 합의된 크기 상한선(<12 nm)보다 상당히 더 크다(~400 nm)는 사실에도 불구하고, 무손상, 박테리아 유래된 미니세포가 뇌 종양에서 축적됨을 정말 놀랍게도 밝혀냈다. 또한 미니세포가 파괴된 BBB를 통해 뇌에 수동적으로 진입한다는 것은 예상치 못한 것이었다. 이와 관련하여 본 발명자들은 뇌 종양과 관련된 혈관이 BBB-유형만이 아니라는 놀라운 관찰을 하였다. 초기에서조차도, 성장하는 종양은 특히 그의 중심에 많은 혈관을 가지는 것이 확인되었다. 이러한 혈관은 온전성(integrity)의 손실을 나타낸다; 즉 BBB-유형 혈관과 달리, 혈관은 큰 천공을 가지며 "누수(leaky)"되어 있다. 따라서, 통상적인 이해와 반대로, 미니세포만큼 큰, 즉 상가-논의된 BBB의 합의된 기공 크기 제한보다 훨씬 큰 입자는, 그럼에도 불구하고 누수된 혈관 벽의 천공보다는 더 작다; 그러므로, 이들은 이러한 천공을 통해 뇌 종양 미세환경 내로 수동적으로 삼출될 수 있다.

더불어, 본 발명자들은 상기 결과에 따라, 뇌 종양 미세환경에서 치료적으로 유의미한 미니세포 농도가 얼마나 신속하게 달성되는지에 있어서 상대적으로 큰 크기의 무손상, 박테리아 유래된 미니세포가 실제로 양성이고, 심지어 핵심 인자임을 발견하였다. 다시 말하면, 입자가 더 작을수록, 입자는 혈관에서 혈액 유동에 의해 제한될 가능성이 더 높다는 것이다. 대조적으로, 미니세포는 상대적으로 더 큰 덩어리의 입자이므로, 따라서 이들은 혈액 유동에 의해 발생한 힘에 의해 영향을 덜 받는다. 결론적으로, 미니세포는 혈액 모세혈관의 내피 벽에 대해 반복된 충격을 초래하는 혈액 모세혈관을 통한 경로를 따라갈 가능성이 더 높다. 이러한 순전히 물리적인 현상은, 더 큰 입자로서의 미니세포가, 발명자들이 발견한 바와 같이, 종양 내의 파괴된 BBB의 특징(hallmark)인 누수된 혈관구조 내의 천공을 통해 밀려보내지는 가능성을 증가시킨다.

인간 뇌에는 대략 400 마일의 총 길이로 존재하는 1000억 개가 넘는 모세혈관이 있지만, 이들 모세혈관의 내피-내(intra-endothelial) 용적은 약 1 $\mu\text{l/g}$ 뇌에 불과하다(Pardridge, 2011). 뇌에서 혈관의 이러한 높은 밀도는 또한 본 발견에 따른, 뇌 종양에서 미니세포의 신속한, 고-농도 축적에 기여하는 것으로 생각된다.

따라서 BBB와 관련된 모세혈관 내강의 직경이 1 μm 만큼 작을 수 있음을 인식함으로써, 본 발명자들은 무손상, 박테리아 유래된 미니세포(~ 400 nm) 만큼 큰 입자가 BBB-관련된 혈액 모세혈관의 직경의 대략 절반일 수 있으므로, 따라서 갭 크기가 400 nm를 초과하는 경우에, 파괴된 BBB로부터 신속하게 삼출될 것임을 이해하였다. 반면, 포유동물 신체의 정상 혈관구조 내의 천공은 크기가 약 100 μm 를 초과하지 않기 때문에, 본 발견에 따라, 전신적으로 도입된 무손상, 박테리아 유래된 미니세포는, 이들이 망상내피계에서 전문적인 포식세포에 의해 제거될 때까지 또는 이들이 누수된 혈관구조로부터 뇌 종양 미세환경 내로 수동적으로 삼출될 때까지 일반적 혈관 시스템에서 유지된다.

따라서, 2가지 유형의 나노입자, 예컨대 직경이 12 nm 미만인 나노입자 및 무손상, 박테리아 유래된 미니세포가 동일한 개수로 i.v. 투여될 때, 혈관구조가 12 nm 보다 큰 기공을 갖는 경우에는 이들이 정상 조직 내의 혈액

순환 밖으로 삼출될 것이기 때문에, 더 작은 입자의 순환 농도가 신속하게 감소할 것임을 예상할수 있다. 예를 들면, 간 및 위장관 조직은 약 100 nm의 정상 혈관구조 천공을 갖고(Wisse *et al.*, 2008), 말초 피부는 ~40 nm 범위인 천공을 갖는 것으로 알려져 있다. 대조적으로, 미니세포는 정상 혈관구조에서 빠져나오기에는 너무 클 것이고, 그로 인해, 이들은 정상 혈액 순환에서 높은 농도로 유지될 것으로 예상되며, 그로인해 상기 기술된 바와 같이, 뇌 종양 미세환경 내로 더 많은 수가 삼출될 것이다.

[0058] 그러므로, 일 구현예에서 따르면, 본 발명은 항-신생물제를 보유하는 복수개의 무손상, 박테리아 유래된 미니세포로 구성된 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 수반하는 뇌 종양에 대한 치료를 제공한다. 미니세포-함유 조성물의 투여는 바람직하게는 전신적, 예컨대 정맥내 또는 동맥내 투여이다.

[0059] **(C) 항-신생물제**

[0060] 언급된 바와 같이, 본 발명의 미니세포 조성물은 항-신생물제를 뇌 종양으로 전달하는데 있어서 유용하다. 이런 맥락에서, 구절 "항-신생물제"는 신생물성 세포의 성장, 발달, 성숙, 또는 확산을 예방 또는 억제하는, 화학적 이거나 생물학적인, 약물을 나타낸다.

[0061] 본 발명의 맥락에서, 소정의 뇌 종양 환자를 치료하기 위한 항-신생물제의 선택은 통상적인 의료 행위에 부합하는 여러가지 인자에 의존한다. 이들 인자에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 환자의 연령, 카르노프스키 값 (Karnofsky Score), 및 무엇이든지 환자가 이전에 받은 요법이 포함된다. 일반적으로, 문헌 [Principles and Practice of Neuro-Oncology, M. Mehta (Demos Medical Publishing 2011), and Principles Of Neuro-Oncology, D. Schiff and P. O'Neill, eds. (McGraw-Hill 2005)]을 참고하라.

[0062] 더욱 일반적으로, 소정의 뇌 암에 대해 적용가능한 케어의 표준은, 우선 먼저, 사용할 활성제의 선택을 알려야 하는 임상적 고려를 권장한다. 이 관점은 예를 들면, 하기 표 1에서 재현된, 로스앤젤레스의 캘리포니아 대학교가 공개한 뇌 종양을 치료하는데 적합한 항-신생물제의 목록으로부터 활성제의 선택을 안내할 것이다.

[0063] **표 1. 뇌 종양을 치료하기 위한 공지의 항-신생물제**

5FC	Accutane Hoffmann-La Roche	AEE788 Novartis
AMG-102	항 네오플라스톤	AQ4N (바녹사트론)
AVANDIA (로시글리타존 말리레이트)	아바스틴 (베바시주맵) Genetech	BCNU
BICNU 카르무스틴	카르보플라틴	CCI-779
CCNU	CCNU 로무스틴	셀레코시브(전신성)
클로로퀸	실렌타이드 (EMD 121974)	시스플라틴
CPT -11 (CAMPTOSAR, 이리노테칸)	사이토산	다사티닙 (BMS-354825, 스프라이셀)
수지상 세포 요법	에토포시드 (에토포신, 에토포포스, 베페시드)	GDC-0449
글리벡 (이마티닙 메실레이트)	GLIADEL Wafer	하이드록시클로로퀸
하이드록시우레아	IL-13	IMC-3G3
면역 요법	이레사 (ZD-1839)	라파티닙 (GW572016)
암에 대한 메토크렉세이트 (전신성)	노보큐어	OSI-774
PCV	프로카바진	RAD001 Novartis (mTOR 억제제)
라파마이신 (파라뮤, 시톨리무스)	RMP-7	RTA 744
심바스틴	시톨리무스	소라페닙
SU-101	SU5416 Sugen	설파살라진 (아줄피딘)
수텐트 (Pfizer)	타목시펜	TARCEVA (erlotinib HCl)
탁솔	TEMODAR Schering-Plough	TGF- β 항-체
탈로미드 (탈리도미드)	토포테칸 (전신성)	VEGF Trap
VEGF-Trap	빈크리스틴	보리노스타트 (SAHA)
XL 765	XL184	XL765
자네스트라(티피파르닙)	ZOCOR (심바스틴)	

[0064]

- [0065] 본 발명에 따르면, 약물은 또한 무손상, 박테리아 유래된 미니세포 내로 패키징된 후, 뇌 암 치료를 위해 투여되는, 하기 설명된 부류 중의 하나로부터 선택될 수 있다.
- [0066] · **다기능성 알킬화제**, 사이클로포스파미드(사이톡산), 메클로레타민, 멜팔란(알케란), 클로람부실(류케란), 티오페타(티오펙스), 부설판(마이레판)으로서 예시됨.
- [0067] · **알킬화제**, 프로카르바진(마틀란), 다카르바진(DTIC), 알트레타민(헥살렌), 클로람부실, 시스플라틴(플라티놀), 카르보플라틴, 이포사파미드, 옥살리플라틴으로서 예시됨.
- [0068] · **항대사물질**, 메토틱세이트(MTX), 6-티오펙린(머캅토픙린[6-MP], 티오구아닌[6-TG]), 머캅토픙린(퓨리네톨), 티오구아닌, 플루다라빈 포스페이트, 클라디리빈:(Leustatin), 펜토스타틴, 플루로우라실(5-FU), 시타라빈(아라-C), 아자시티딘으로서 예시됨.
- [0069] · **식물 알칼로이드, 테르페노이드 및 토포아이스오머라제 억제제**, 빈블라스틴(벨반), 빈크리스틴(온코빈), 빈데신, 비노렐빈, 포도필로톡신(에톱시드{VP-16} 및 테니포시드{VM-26}), 캄토테신(토포테칸 및 이리노테칸), 파클리탁셀(탁솔) 및 도세탁셀(탁소테레)와 같은 타산으로서 예시됨.
- [0070] · **항생제**, 독소루비신(아드리아마이신, 루벡스, 독실), 다우노루시빈, 이다루비신, 닥티노마이신(코스메젠), 플리카마이신(미트라마이신), 미토마이신: (뮤타마이신), 블레오마이신(블레녹산)으로서 예시됨.
- [0071] · **호르몬제**, 에스트로겐 및 안드로겐 억제제(타목시펜 및 플루타미드), 고나도트로핀-분비 호르몬 작용제(류프롤리드 및 고세렐린(졸라텍스)), 아로마타제 억제제(아미노글루테티미드 및 아나스트로졸(아리미텍스))로서 예시됨.
- [0072] · **그외 항암 약물**, 암사크린, 아스파라기나제(EI-spar), 하이드록시우레아, 미토산트론(노반트론), 미토탄(라이소드렌), 레티노산 유도체, 골수 성장 인자(사르그라마스틴 및 필그라스틴), 아미포스틴으로서 예시됨.
- [0073] · **폴레이트 대사를 교란하는 제제**, 예컨대, 페메트렉세드.
- [0074] · **DNA 저메틸화제(hypomethylating agents)**, 예컨대, 아자시티딘, 데시타빈.
- [0075] · **폴리(아데노신 디포스페이트 [ADP]-리보스) 폴리머라제 (PARP) 경로 억제제**, 예컨대 이니파리브, 올라파리브, 벨리파리브.
- [0076] · **PI3K/Akt/mTOR 경로 억제제**, 예컨대, 에베롤리무스.
- [0077] · **히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제**, 예컨대, 보리노스타트, 엔티노스타트(SNDX-275), 모세티노스타트(MGCD0103), 파노비노스타트(LBH589), 로미텡신, 발프론산.
- [0078] · **사이클린-의존성 키나제(CDK) 억제제**, 예컨대, 플라보피리돌, 올로모우신, 로스코비틴, 켄파울론, AG-024322(Pfizer), 파스카플리신, 류비딘, 프루발라놀 A, NU2058, BML-259, SU 9516, PD-0332991, P276-00
- [0079] · **열 충격 단백질(HSP90) 억제제**, 예컨대, 겔다나마이신, 타네스피마이신, 알베스피마이신, 라디시콜, 테구엘린, BIIB021.
- [0080] · **MDM2(Murine double minute 2) 억제제**, 예컨대, 시스-이미다졸린, 벤조디아제피네디온, 스피로-옥신돌, 이소퀴놀리논, 티오펙, 5-데아자플라빈, 트립타민.
- [0081] · **역형성 리프종 키나제(Anaplastic lymphoma kinase; ALK) 억제제**, 예컨대, 아미노피리딘, 디아미노피리미딘, 피리도이소퀴놀린, 피롤로피라졸, 인돌로카르바졸, 피롤로피리미딘, 디아닐리노피리미딘.
- [0082] · **폴리[ADP리보스] 폴리머라제(PARP) 억제제**, 벤즈아미드, 프탈라지논(Phthalazinone), 트리사이클릭 인돌, 벤즈이미다졸, 인다졸, 피롤로카르바졸, 프탈라지논, 이소인돌리논으로서 예시됨.
- [0083] 본 발명에서 사용가능한 활성제는 상기 열거된 그러한 약물 부류 또는 특정 제제에 제한되지 않는다. 상이한 발견 플랫폼이 암 세포의 고유한 분자적 특징을 지향하는 신규한 제제를 양산하기 위해 계속되고 있다; 실제로, 수천개의 이러한 화학적 및 생물학적 약물이 발견되었으며, 단지 그의 일부만이 본 명세서에 열거되어 있다. 또한, 다양한 여러가지의 친수성 또는 소수성 활성제의 패키징을 수용하기 위한 무손상, 박테리아 유래된 미니세포의 놀라운 능력은, 미니세포 내에 패키징되는 경우, 본질적으로 임의의 이러한 약물이, 본 발명에서의 본 발견에 따라, 뇌 암을 치료하기 위한 잠재력을 갖는다는 것을 의미한다.
- [0084] 이론적으로, 뇌 종양을 치료하기 위한 소정의 항-신생물제의 잠재적인 적합성은 부분적으로 그 제제가 뇌 내로

효과적으로 전달될 수 있는지 여부의 기능이다. 본 발건의 이점을 이용하면, 약물-부하된 미니세포가 BBB를 횡단하고 약물 페이로드(payload)를 뇌 종양 특이적으로 전달함으로써, 다르게는 뇌 종양을 치료하는데 효과적인 것으로 증명되지 않았을 많은 약물이 이제는 이러한 치료를 위한 가능성 있는 후보가 될 것이다. 따라서, 본 발명에서 "항-신생물제" 기준은 뇌 암 요법에 대해 효능이 알려진 약물로 제한되지 않을 뿐 아니라, 오히려 신생물성 세포에 대해 하나 이상의 전술한 활성을 갖는 것으로 측정되는 제제를 포함한다.

[0085] 항-신생물제 비슷한 부류의 예시로는 방사성핵종, 화학요법 약물, 및 이로 제한되지 않지만, 조절성 RNA를 포함하는 기능적 핵산이다.

1. 방사성핵종

[0087] "방사성핵종"은 불안정한 핵을 갖는 원자, 즉 핵 내에 새롭게 생성된 방사선 입자 또는 원자성 전자에 부여되도록 이용가능한 광량의 에너지를 특징으로 하는 원자이다. 그러므로, 방사성핵종은 방사성 붕괴를 겪게 되고, 감마선(들) 및/또는 아원자성 입자를 방출한다. 수많은 방사성핵종이 당해 분야에 알려져 있고, 그들 중 다수가, 예를 들면 이트륨-90, 테크네튬-99m, 아이오딘-123, 아이오딘-131, 루비듐-82, 탈륨-201, 갈륨-67, 플루오린-18, 제논-133, 및 인듐-111이 의료 용도에 적합한 것으로 알려져 있는데, 다.

[0088] 방사성핵종은 핵 의학에 있어서, 특히 종양 세포를 손상시키기 위한 베타선 방사체로서 광범위한 용도가 규명되었다. 그러므로, 방사성핵종은 본 발명에서 항-신생물제로서 적합하게 이용된다.

[0089] 방사성핵종은 임의의 알려진 기술에 의해 무손상, 박테리아 유래된 미니세포와 결합될(associated) 수 있다. 따라서, 단백질 또는 다른 미니세포-표면 모이어티(하기 참조)는 문헌 [Rice *et al.* (2011)]에 상술된, 피어스 요오드화 시약(Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, IL) 제품)의 사용과 같은, 상업적으로 이용가능한 표지 수단을 사용하여, 방사성핵종으로 표지될 수 있다. 대안적으로, 방사성핵종은 미니세포 내부의 단백질 내로 통합될 수 있다.

[0090] 후자의 경우에는, 미니세포-생산성 박테리아 균주가 외래 단백질을 인코딩하는 플라스미드 DNA로 형질전환된다. 비대칭 세포 분열 동안에 미니세포가 형성되는 경우, 여러 카피의 플라스미드 DNA가 미니세포 세포질 내로 분리된다. 결과물인 재조합 미니세포를, 플라스미드 DNA로부터 미니세포 내에서 발현된 외래 단백질이 방사성핵종-보유성 아미노산을 통합하도록 하는 조건 하에서, 방사성표지된 아미노산의 존재 하에, 인큐베이션시킨다. 문헌 [Clark-Curtiss and Curtiss (1983)]의 프로토콜에 따르면, 예를 들면, 재조합 미니세포를 ³⁵S-메티오닌을 함유하는 최소 성장 배지에서 인큐베이션시킴으로써, 새롭게 발현된 플라스미드-인코딩된 단백질은 ³⁵S-메티오닌을 통합하게 된다. 원하는 바와 같이, 재조합 미니세포를 다른 방사성표지와 함께 패키징하기 위해 유사한 접근법이 사용될 수 있다.

[0091] 미니세포 표면 상의 올리고당이 또한, 예를 들면 문헌 [Fukuda (1994)]에 의해 잘 확립된 프로토콜을 사용하여 방사성표지될 수 있다. 미니세포에 고유한 이러한 올리고당의 예로는 그람-음성 박테리아로부터 유래된 미니세포의 표면 상에서 발견된 지다당류(LPS)의 O-다당류 성분이 있다(하기 참조).

[0092] 이와 관련한 바람직한 방법론은 미니세포가 특정 종양을 표적하도록 사용되는 이중특이적 항체를 방사성표지하는 것이다. 항목 G, 하기 및 그 내용 전체가 본 명세서에 참조로 포함되어 있는 미국 특허 공개 US 2007/0237744를 참고하라. 다시 말하면, 미니세포 상에 "코팅된" 이중특이적 항체는 방사성표지를 위해 상당한 추가적인 표면 단백질을 노출한다. 따라서, 항체-코팅된 미니세포와 결합된 방사성 표지의 더 높은 특이적 활성을 달성하는 것이 가능하다. 대조적으로, 비-코팅된 미니세포의 방사성표지는, 즉 방사성핵종이 고유한 모이어티만을 표지하는 경우, 더 약한 표지(더 낮은 특이적 활성)가 초래될 수 있다. 일 구현예에서, 그람-음성 박테리아로부터 유래된 미니세포의 외막-결합 단백질이, 하기 추가적으로 논의되는 바와 같이, 미니세포 표면을 감싸는 긴 사슬의 O-다당류를 포함하는 LPS에 의해 가려지기 때문에, 이러한 더 약한 표지가 발생하는 것으로 생각된다.

[0093] 뇌 종양 치료를 위해, 본 발명의 조성물은, 종양을 함께 제거하지 않는다면, 적어도 종양 덩어리를 감소시키는 데 충분한 종양내(in-tumor) 방사선조사 수준을 완전히 제공하는 단일 용량 또는 다중 용량으로 전달될 것이다. 치료의 진행은 사례별로 이러한 선에서 모니터링될 수 있다. 그러나 일반적인 용어로, 조성물 내에 패키징된 방사능의 양은, 본 발명이 또한 더 많은 양의 방사능, 즉 약 50 내지 100 Gy를 고려한다고 하더라도, 전형적으로 약 30 내지 50 Gy의 수준일 것이며, 이는 약 30 Gy 내지 약 100 Gy 사이의 전체 범위를 부여한다.

- [0094] 일부 예에서, 조성물 내에 패키징된 방사능의 양은, 뇌 종양에 대한 미니세포-태생 방사선택종의 매우 효과적이고 특이적인 전달을 고려하면, 상기 언급된 것 보다 심지어 더 낮을 수 있다. 따라서, 일 측면에서 조성물은 약 20 내지 40 Gy, 또는 약 10 내지 30 Gy, 또는 약 1 내지 약 20 Gy, 또는 10 Gy 미만을 포함한다.
- [0095] 2. 화학요법 약물
- [0096] 본 발명에서 사용된 항-신생물제는 또한 화학요법 약물일 수 있다. 본 명세서에서, "화학치료 약물", "화학치료제" 및 "화학요법"은 신생물성 세포를 사멸시키거나 파괴하는 능력을 갖는 약물을 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 화학치료제는 하기 추가로 상술되는 바와 같이, 소 분자 약물 또는 생물학적 약물일 수 있다.
- [0097] "소 분자 약물" 하위범주는 (i) 생물학적 공정에 대한 영향 및 (ii) 거대분자와 비교해, 상대적으로 적은 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 유기 화합물을 포함한다. 소 분자 약물은 전형적으로 약 800 달톤 이하이며, 여기서 "약"은 적격의 분자량 값이 측정 정확성에서의 변화량 및 수 달톤 또는 수십 달톤 정도의 실험적 오차 대해 적용되는 것을 나타낸다. 따라서, 소 분자 약물은 약 900 달톤 이하, 약 800 달톤 이하, 약 700 달톤 이하, 약 600 달톤 이하, 약 500 달톤 이하, 또는 약 400 달톤 이하의 분자량을 가질 수 있다. 더욱 구체적으로, 소 분자 화학요법 약물은 약 400 달톤 이상, 약 450 달톤 이상, 약 500 달톤 이상, 약 550 달톤 이상, 약 600 달톤 이상, 약 650 달톤 이상, 약 700 달톤 이상, 또는 약 750 달톤 이상의 분자량을 가질 수 있다. 다른 구현예에서, 미니세포 내로 패키징된 소 분자 화학요법 약물은 약 400 내지 약 900 달톤, 약 450 내지 약 900 달톤, 약 450 내지 약 850 달톤, 약 450 내지 약 800 달톤, 약 500 내지 약 800 달톤, 또는 약 550 내지 약 750 달톤 사이의 분자량을 갖는다.
- [0098] 본 명세서의 목적을 위해, "생물학적 약물"은, 대조적으로, 하기 논의되는 "기능적 핵산"을 제외하고, 생물학적 공정에 의해 생성될 수 있는 임의의 생물학적으로 활성인 거대분자, 및 상기 정의된 바와 같이 크기에 의해 소 분자 약물로서 자격을 얻은 폴리펩티드를 나타내는 것으로 정의된다. 따라서, "생물학적 약물" 하위범주는 소 분자 약물 및 기능적 핵산 하위범주를 제외하고 이와 중복되지 않는다. 생물학적 약물의 예시로는 천연 또는 재조합적으로 또는 합성적으로 만들어진, 예컨대 의료 화학 및 약물 설계 도구를 사용하여 만들어진 것인지에 상관없는, 치료 단백질 및 항체이다.
- [0099] 이전까지는 400 달톤 보다 큰 분자는 BBB에서 발견되는 기공을 횡단할 수 없으므로(Bickel, 2005; Pardridge, 2007); 이들 분자는 뇌 종양 치료에 적합하지 않을 것으로 널리 이해되었다. 그러나 미니세포 내로 패키징되면, 이러한 화학요법 약물은 BBB를 우회하여, 표적하는 뇌 종양 세포에 도달한다.
- [0100] 또한, 소 분자 약물이거나 생물학적 약물이거나 여부에 상관없이, 화학치료 목적으로 설계된 특정 분자는 그럼에도 불구하고 허용가능하지 않은 독성 또는 다른 안전성 우려로 인해 전임상 또는 임상 시험 기간 동안 실패한다. 본 발명자들은 미니세포 내로 화학요법 약물의 패키징, 이어서 뇌 종양 환자와 같은 종양 환자에 대한 전신적 전달이 종양 세포에의 약물 전달을 유도함을 밝혀냈다. 또한, 종양 세포가 파괴되고, 약물-함유 세포질이 근처의 정상 조직으로 방출된 후 조차도, 그 결과는 정상 조직에 비독성이다. 이는 약물이 이미 DNA와 같은 종양 세포 구조에 결합되어 있고, 정상 세포를 더 이상 공격할 수 없기 때문이다. 따라서, 본 발명은 종양 환자에게 고도로 독성인 화학요법 약물을 전달하는데 특히 유용하다.
- [0101] 본 명세서에서 구절 "고도로 독성인 화학요법 약물" 또는 "맹독성(supertoxic) 화학요법 약물"은 표적된 암에 대해 이의 유효 용량과 비교할 때 상대적으로 낮은 치사 용량을 갖는 화학요법 약물을 지칭한다. 따라서, 일 측면에서 고도로 독성인 화학요법 약물은 (1) 약물이 설계된 암 유형 (2) 그 약물에 대해 전-임상 또는 임상 시험이 진행된 제1 암 유형, 또는 (3) 시험된 모든 암 중에서 약물이 가장 높은 효능을 보이는 암 유형과 같이 표적된 암에 대한 그의 중간 유효 용량(ED₅₀) 보다 더 낮은 중간 치사 용량(LD₅₀)을 갖는다. 예를 들면, 고도로 독성인 화학요법 약물은 표적된 암에 대한 약물의 ED₅₀의 약 500%, 400%, 300%, 250%, 200%, 150%, 120%, 또는 100% 보다 더 낮은 LD₅₀를 가질 수 있다. 다른 측면에서, 고도로 독성인 화학요법 약물은 표적된 암에 대한 이의 최소 유효 용량보다 더 낮은, 예컨대 최소 유효 용량의 약 500%, 400%, 300%, 250%, 200%, 150%, 120%, 100%, 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50%보다 더 낮은 최대 아-치사 용량(즉, 심각하거나 비가역적 독성을 야기하지 않는 최고 용량)을 갖는다.
- [0102] 따라서, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 개체에서 뇌 종양은, 그들 각각이 고도로 독성인 화학요법 약물을 포함하는 복수개의 무손상, 박테리아 유래된 미니세포로 구성된 조성물의 치료적 유효량을 전신적으로 투여하는 단

계를 포함하는 방법에 의해 치료된다. 하기 논의된, 메이탄시노이드 및 듀오카르마이신은 이렇게 이용되는 맹독성 화학요법 약물의 부류를 대표한다.

[0103] 문맥 내에서 적합한 암 화학요법 약물에는 질소 머스터드, 니트로소우레아, 에틸렌이민, 알칸 설포네이트, 테트라진, 백금 화합물, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 항대사물질, 플레이트 유사체, 안트라사이클린, 타산, 빈카알칼로이드, 토포아이스오머라제 억제제 및 호르몬제 등이 포함된다.

[0104] 소 분자 약물 하위범주를 예시하는 화학요법 약물은 액티노마이신-D, 알케란, 아라-C, 아나스트로졸, BiCNU, 비칼루타마이드, 블레오마이신, 부셀판, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카르보플라티넘, 카르무스틴, CCNU, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, CPT-11, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 사이토신 아라비노시드, 사이톡산, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 텍스라족산, 도세탁셀, 독소루비신, DTIC, 에피루비신, 에틸렌이민, 에토포시드, 플록스우리딘, 플루다라빈, 플루오로우라실, 플루타미드, 포테무스틴, 켄시타빈, 헥사메틸아민, 하이드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 로무스틴, 메클로레타민, 멜팔란, 머캅토피린, 메토타렉세이트, 미토마이신, 미토탄, 미토산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 팔미드로네이트, 펜토스타틴, 플리카마이신, 프로카르바진, 스테로이드, 스트렙토조신, STI-571, 스트렙토조신, 타목시펜, 테모졸로마이드, 테니포시드, 테트라진, 티오구아닌, 티오테파, 토무텍스, 토포테칸, 트레오셀판, 트리메트렉세이트, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, VP-16, 및 젤로다이다.

[0105] 메이탄시노이드(분자량: ~738 달톤)는 강한 세포독성을 갖는 메이탄신의 화학적 유도체의 그룹이다. 독성에 대한 우려로 인해 인간 환자에 사용하는데 안전하지 않은 것으로 고려될 지라도, 메이탄시노이드는 본 발명에 따라, 미니세포를 통해 뇌 종양 환자에 전달하기에 적합하다.

[0106] 듀오카르마이신(분자량: ~588 달톤)은 스트렙토마이신 박테리아로부터 일차로 단리된, 일련의 관련 천연 생성물이다. 듀오카르마이신은 또한 강한 세포독성을 가지며 인간 사용에 안전하지 않은 것으로 고려된다. 메이탄시노이드와 같이, 듀오카르마이신은 본 발명에서 사용하기에 적합한 화학요법 약물이다.

[0107] 생물학적 화학요법 약물의 하위범주에는, 제한 없이, 아스파라기나제, AIN-457, 바피뉴주맙(Bapineuzumab), 벨리무맙(Belimumab), 브렌투시맙(Brentuximab), 브리아키누맙(Briakinumab), 카나키누맙(Canakinumab), 세톡시맙(Cetuximab), 달로투주맙(Dalotuzumab), 데노수맙(Denosumab), 에프라투주맙(Epratuzumab), 에스타페나톡스(Estafenatox), 파르레투주맙(Farletuzumab), 피기투무맙(Figitumumab), 갈릭시맙(Galiximab), 겐투주맙(Gemtuzumab), 기렌투시맙(Girentuximab)(WX-G250), 허르셉틴(Herceptin), 이브리투모맙(Ibritumomab), 이노투주맙(Inotuzumab), 이필리무맙(Ipilimumab), 메폴리주맙(Mepolizumab), 무로모납-CD3(Muromonab-CD3), 나프트모맙(Naptumomab), 네시투무맙(Necitumumab), 니모투주맙(Nimotuzumab), 오크렐리주맙(Ocrelizumab), 오파투무맙(Ofatumumab), 오텔릭시주맙(Otelixizumab), 오조가미신(Ozogamicin), 파기박시맙(Pagibaximab), 파니투무맙(Panitumumab), 페르투주맙(Pertuzumab), 라무시루맙(Ramucirumab), 레슬리주맙(Reslizumab), 리툽시맙(Rituximab), REGN88, 솔라네주맙(Solanezumab), 타네주맙(Tanezumab), 테플리주맙(Teplizumab), 티옥세탄(Tiuxetan), 토시투모맙(Tositumomab), 트라스투주맙(Trastuzumab), 트레멜리무맙(Tremelimumab), 베돌리주맙(Vedolizumab), 잘루투무맙(Zalutumumab), 및 자놀리무맙(Zanolimumab)이 포함된다.

[0108] 조성물은 최대 약 1 mg의 화학치료 약물을 포함할 수 있다. 대안적으로, 화학치료 약물의 양은 최대 약 750 μ g, 500 μ g, 250 μ g, 100 μ g, 50 μ g, 10 μ g, 5 μ g, 1 μ g, 0.5 μ g, 또는 0.1 μ g일 수 있다. 다른 측면에서, 조성물은 미니세포 내로 패키징되지 않은 채로 사용되는 경우 약물의 치료학적 유효량의 약 1/1,000 미만의 양, 또는 대안적으로 약 1/2,000, 1/5,000, 1/10,000, 1/20,000, 1/50,000, 1/100,000, 1/200,000 또는 1/500,000 미만을 갖는 화학치료 약물을 포함한다. 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 조성물은 적어도 약 1 nmol의 화학치료 약물을 포함할 수 있다. 대안적으로, 본 발명은 또한 화학치료 약물의 양이 각각 적어도 약 2 nmol, 약 3 nmol, 약 4 nmol, 약 5 nmol, 약 10 nmol, 약 20 nmol, 약 50 nmol, 약 100 nmol, 및 약 800 nmol인 구현예를 포함한다.

[0109] 3. 기능적 핵산

[0110] "기능적 핵산"은 숙주 세포 내로 도입 시, 단백질의 발현을 특이적으로 방해하는 핵산 분자를 지칭한다. 본 발명에 따른 뇌 종양의 치료와 관련하여, 무손상, 박테리아 유래 미니세포를 통해 종양 세포 내로 전달된 기능적 핵산 페이로드가 종양 세포 증식, 혈관신생 또는 화학요법에 대한 내성을 촉진하고/하거나 아폽토시스 또는 세포-주기 정지를 억제하는 유전자(즉, "종양-촉진성 유전자")를 억제하는 것이 바람직하다.

- [0111] 본 발명에서 사용된 기능적 핵산 분자가 단백질에 대한 전사체와 상호작용함으로써 단백질의 발현을 감소시키는 능력을 갖는 것이 일반적인 경우이다. 본 발명의 경우 미니세포 페이로드의 이러한 범주에는 조절성 RNA, 예컨대 siRNA, shRNA, 짧은 RNAs(전형적으로 길이가 400 염기 미만), 마이크로-RNA(miRNA), 리보자임 및 테코이 RNA, 안티센스 핵산, 및 LincRNA 등이 포함된다. 이와 관련하여, "리보자임"은 뉴클레오타이드 염기 서열-특이적 방식으로 다른 RNA 분자를 반복적으로 절단할 수 있는 효소적 활성을 갖는 RNA 분자를 지칭한다. "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는, 분자가 전사체에 혼성화하고 그의 번역을 차단할 수 있도록, 특정 유전자 전사체의 일부 분에 상보적인 핵산 분자를 나타낸다. 안티센스 올리고 뉴클레오타이드는 RNA 또는 DNA를 포함할 수 있다. "LincRNA" 또는 "긴 유전자간 비-코딩 RNA"는 200 뉴클레오타이드보다 긴 비-단백질 코딩 전사체를 포함한다. LincRNA는 예를 들면, 문헌 [Khalil *et al.*, *Proc Nat'l Acad. USA* 106: 11667-72 (2009)]에 의해 논의된 바와 같이, 유전자의 전사, 스플라이싱, 및/또는 번역을 조절할 수 있다.
- [0112] 조절성 RNA의 유형 각각은 상기 기술된 바와 같은 종양-촉진성 유전자를 억제하는 기능적 핵산 분자의 공급원일 수 있으므로, 본 발명에 따른 사용에 적합하다. 따라서, 본 발명의 하나의 바람직한 구현예에서, 무손상 미니세포는 후-전사적, 유전자-사일런싱 RNA 간섭(RNAi) 기전을 매개하는 siRNA 분자를 보유하며, 이는 종양 촉진성 유전자를 표적하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들면, 문헌 [MacDiarmid *et al.*, *Nature Biotech.* 27: 645-51 (2009) (antibody-presenting minicells deliver, with chemotherapy drug, siRNAs that counter developing resistance to drug), and Oh and Park, *Advanced Drug Delivery Rev.* 61: 850-62 (2009) (delivery of therapeutic siRNAs to treat breast, ovarian, cervical, liver, lung and prostate cancer, respectively)]을 참고하라.
- [0113] 언급한 바와 같이, "siRNA"는 일반적으로 단백질 발현을 특이적으로 방해하는 이들의 능력에 대해 명명된 약 10 내지 약 30 뉴클레오타이드 길이의 이중-가닥 RNA 분자를 지칭한다. 바람직하게는, siRNA 분자는 12-28 뉴클레오타이드 길이, 더욱 바람직하게는 15-25 뉴클레오타이드 길이, 더욱 더 바람직하게는 19-23 뉴클레오타이드 길이 및 가장 바람직하게는 21-23 뉴클레오타이드 길이이다. 그러므로, siRNA 분자는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 28 또는 29 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.
- [0114] 한 가닥의 길이가 siRNA 분자의 길이를 지정한다. 예를 들면, 21 리보뉴클레오타이드 길이(21-머)로서 기술된 siRNA는 19개 인접 염기 쌍에 어닐링하는 2개의 RNA 반대 가닥을 포함할 수 있다. 각각의 가닥 상의 2개의 잔여 리보뉴클레오타이드는 "오버행(overhang)"을 형성할 것이다. siRNA가 2개의 다른 길이의 가닥을 포함하는 경우, 더 긴 가닥이 siRNA의 길이를 지정한다. 예를 들면, 21 뉴클레오타이드 길이인 하나의 가닥과 20 뉴클레오타이드 길이인 두번째 가닥을 포함하는 dsRNA는 21-머를 구성한다.
- [0115] 특이적으로 siRNA의 설계를 보조하기 위한 도구 및 조절성 RNA는 일반적으로 쉽게 이용가능하다. 예를 들면, 컴퓨터-기반 siRNA 설계 도구가 인터넷 사이트 [www.dharmacon.com] 상에서 이용가능하다.
- [0116] 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 무손상 미니세포는 후-전사적, 유전자-사일런싱 RNA 간섭(RNAi) 기전을 매개할 수 있는, siRNA와 같은, miRNA를 보유한다. 또한 siRNA와 마찬가지로, miRNA에 의해 매개된 유전자-사일런싱 효과는 종양-촉진성 유전자를 표적하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들면, 문헌 [Kota *et al.*, *Cell* 137: 1005-17 (2009) (delivery of a miRNA via transfection resulted in inhibition of cancer cell proliferation, tumor-specific apoptosis and dramatic protection from disease progression without toxicity in murine liver cancer model), and Takeshita, *et al.*, *Molec. Ther.* 18: 181-87 (2010) (delivery of synthetic miRNA via transient transfection inhibited growth of metastatic prostate tumor cells on bone tissues)]을 참고하라.
- [0117] 둘 모두 RNA 간섭을 매개한다고 하더라도, miRNA 및 siRNA는 중요한 차이점을 갖는다. 이와 관련하여, "miRNA"는 일반적으로 (siRNA의 경우에서와 같이 이중-가닥 대신에) 17- 내지 27-뉴클레오타이드 단일 가닥 RNA 분자의 부류를 지칭한다. 그러므로, miRNA 분자는 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 뉴클레오타이드길이일 수 있다. 바람직하게는 miRNA 분자는 21-25 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0118] miRNA와 siRNA 사이의 다른 차이점은 전자가 일반적으로 mRNA 표적에 완전히 상보적이지 않다는 점이다. 반면 siRNA는 mRNA 표적에 완전히 상보적이어야만 한다. 결론적으로, siRNA는 단일의 특이적 표적의 사일런싱을 초래하는 반면, miRNA는 불규칙하다.
- [0119] 또한, 둘 모두가 RISC(RNA-유도된 사일런싱 복합체)로 조립된다고 하더라도, siRNA 및 miRNA는 RISC 조립 전에 그들 각각의 초기 공정에서 상이하다. 이들 차이점은 문헌 [Chu *et al.*, *PLoS Biology* 4: 1122-36 (2006), and

Gregory *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 342: 33-47 (2006)]에 상세히 기술되어 있다.

- [0120] 다수의 데이터베이스가 miRNA 저장소로서 제공된다. 예를 들면, miRBase (www.mirbase.org) 및 tarbase (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/DianaToolsNew/index.php?r=tarbase/index>)를 참고하라. 통상적인 사용에 있어서, miRNA는 전형적으로 순차적인 숫자와 조합된, 접두사 "-mir"로 명명된다. 예를 들면, 마우스 mir-352 이후에 발견된 새로운 miRNA는 마우스 mir-353으로 명명될 것이다.
- [0121] miRNA를 포함하는 조절성 RNA의 설계를 보조하기 위한 도구는 용이하게 이용 가능하다. 이와 관련하여, 컴퓨터-기반 miRNA 설계 도구가 인터넷 사이트[wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl]상에서 이용가능하다.
- [0122] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명에서 이용된 기능적 핵산은 종양 세포 증식, 혈관신생 또는 화학요법에 대한 내성을 촉진하는 유전자를 억제할 수 있다. 억제된 유전자는 또한 그 자체가 아포토시스 또는 세포 주기 정지를 억제할 수 있다. 기능적 핵산에 의해 표적될 수 있는 유전자의 예는 하기에 제공된다.
- [0123] 본 발명의 기능적 핵산은 바람직하게는 약물 내성을 촉진하고, 아포토시스를 억제하거나 신생물성 표현형을 촉진하는 유전자 또는 단백질을 표적한다. 이러한 맥락에서 기능적 핵산 전략의 성공적인 적용이 당해 분야에서 달성되었으나, 미니세포 벡터에 대한 이점이 없었다. 예를 들면, 문헌 [Sioud (2004), Caplen (2003), Nieth *et al.* (2003), Caplen and Mousses (2003), Duxbury *et al.* (2004), Yague *et al.* (2004), and Duan *et al.* (2004)]을 참고하라.
- [0124] 약물 내성에 기여하는 단백질은 기능적 핵산의 바람직한 표적을 구성한다. 단백질은 후천적 약물 내성 또는 내재적 약물 내성에 기여할 수 있다. 종양 세포와 같은 병에 걸린 세포가 초기에는 약물에 반응하지만 후속적인 치료 주기 동안 불응성이 되는 경우, 내성 표현형이 획득된다. 후천적 약물 내성에 관여하는 유용한 표적에는 ATP 결합 카세트 수송체, 예를 들면 P-당단백질(P-gp, P-170, P-glycoprotein, MDR1, ABCB1, MDR-관련 단백질, 다중약물 내성 단백질 1), MDR-2 및 MDR-3이 포함된다. MRP2(다중-약물 내성 관련 단백질), BCR-ABL(변종점 클러스터 영역 - 아벨슨 원발암 유전자(Abelson protooncogene)), STI-571 내성-관련 단백질, 폐 내성-관련 단백질, 사이클로옥시게나제-2, 핵 인자 카파, XRCC1(X-선 교차-상보성 그룹 1), ERCC1(적체 수복 교차-상보성 유전자), GSTP1(글루타티온 S-트랜스퍼라제), 돌연변이 β -튜블린, 및 IL-6와 같은 성장 인자가 후천성 약물 내성에 관여하는 추가적인 표적이다.
- [0125] 약물 내성에 기여하는 특히 유용한 표적은 P-당단백질, MDR-2, MDR-3, BCRP, APT11a, 및 LRP와 같은 ATP 결합 카세트 수송체를 포함한다.
- [0126] 유용한 표적에는 또한 아포토시스 내성을 촉진하는 단백질이 포함된다. 이들에는 Bcl-2(B 세포 백혈병/림프종), Bcl-X_L, A1/Bfl 1, 국소 부착 키나제, 디하이드로디올 데하이드로게나제, 및 p53 돌연변이 단백질이 포함된다.
- [0127] 유용한 표적에는 추가적으로 발암 및 돌연변이 종양 억제자 단백질이 포함된다. 이들의 예시는 β -카테닌, PKC- α (단백질 키나제 C), C-RAF, K-Ras(V12), DP97 사멸 박스 RNA 헬리카제, DNMT1(DNA 메틸트랜스퍼라제 1), FLIP(Flice-유사 억제성 단백질), C-Sfc, 53BP1, 폴리콤 그룹 단백질 EZH2(zeste 유사체의 인핸서), ErbB1, HPV-16 E5 및 E7(인간 파필로마바이러스 초기 5 및 초기 7), 포르틸린 & MCI1P (골수 세포 백혈병 1 단백질), DIP13 α (DDC 상호작용성 단백질 13 α), MBD2(메틸 CpG 결합 도메인), p21, KLF4(Kruppel-유사 인자 4), tpt/TCTP(번역 제어된 종양 단백질), SPK1 및 SPK2(스핑고신 키나제), P300, PLK1(Polo-유사 키나제-1), Trp53, Ras, ErbB1, VEGF(혈관 내피 성장 인자), BAG-1(BCL2-관련 아싸노진(athanogene) 1), MRP2, BCR-ABL, STI-571 내성-관련 단백질, 폐 내성-관련 단백질, 사이클로옥시게나제-2, 핵 인자 카파, XRCC1, ERCC1, GSTP1, 돌연변이성 β -튜블린, 및 성장인자이다.
- [0128] 세포질 폴리아데닐화 요소 결합 단백질(CEPB)로 예시되는 총체적 조절성 요소가 또한 표적으로 유용하다. 예를 들면, CEPB4는 아교모세포종 및 뇌종양에서 과발현되며, 여기에서 단백질은 종양 성장과 관련된 수백개의 유전자를 활성화시키고, 이는 건강한 세포에서는 검출되지 않는다(Ortiz-Zapater *et al.*, 2011). 그러므로, 본 발명에 따르면, 아교모세포종의 치료는 뇌 종양 세포에 의해 CEPB4 발현을 파괴하는 siRNA 또는 다른 기능적 핵산 분자와 같은 CEPB4의 과발현에 대응하는 제제를 포함하는 무손상, 박테리아 유래된 미니세포를 함유하는 조성물의 투여를 통해 효과적일 수 있다.
- [0129] (D) 뇌 종양

- [0130] 상술된 바와 같이, 혈관 온전성의 손실이 뇌 종양의 모든 유형 및 단계의 특성이라는 사실은 본 발명에 따른 방법론이 임의의 뇌 종양을 치료하는데 사용하기 위해 적용될 수 있음을 의미한다. 이와 관련하여, "뇌 종양"은 두개내 또는 중추 척추관 내의 고형 신생물을 내포한다.
- [0131] 120개가 넘는 유형의 뇌 종양이 있다. 대부분의 의료 기관은 뇌 종양을 규명하기 위해 세계 보건 기구(WHO) 분류 시스템을 사용한다. WHO는 세포 기원 및 세포가 어떻게 행동하는지에 의해 뇌종양을, 최소 침습성(양성)인 것부터 최대 침습성(악성)으로 구분한다. 일부 종양 유형은, 성장 속도를 의미하는 등급 I(최소 악성)에서부터 등급 IV(최대 악성)까지 범위한 등급이 할당된다. 종양 유형에 따라 등급 시스템은 다양하다. 개별 종양의 분류 및 등급은 이의 가능한 행태를 예측하는 것을 도와준다. 가장 흔히 진단된 유형에는 청신경종, 별아교세포종(등급 I - 털모양(pilocytic) 별아교세포종, 등급 II - 저-등급 별아교세포종, 등급 III - 역형성(anaplastic) 별아교세포종, 및 등급 IV - 아교모세포종(GBM)을 포함함), 척삭종(chordoma), CNS 림프종, 두개인두종, 다른 신경아교종(뇌간 신경아교종, 상의세포종, 혼합 신경아교종, 시신경 신경아교종 및 뇌실막하세포종(subependymoma)), 수모세포종(medulloblastoma), 뇌수막종, 전이성 뇌 종양, 희소돌기신경아교종, 뇌하수체 종양, 원시성 신경외배엽성 종양(PNET), 다른 뇌-관련 상태, 및 슈반세포종(schwannoma)이 포함된다.
- [0132] 어린이들 중에는, 다음의 뇌 조양 유형이 더 흔하다: 뇌간 신경아교종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 청소년 털모양 별아교세포종(JPA), 수모세포종, 시신경 신경아교종, 송과체종(pineal tumor), 원시성 신경외배엽성 종양(PNET), 및 간상 종양(rhabdoid tumor).
- [0133] 본 기술은 혈관신생이 촉발되는 한, 전술한 유형 및 등급을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 임의의 뇌 종양을 치료하기 위해 적용될 수 있다. 실제로, 이 기준점(benchmark)은 적어도 종양이 MRI에 의해 검출가능한 경우, 즉 종양이 새로운 혈관신생이 요구되는 바와 같은 크기로 성장하는 경우에 속한다. 따라서, 본 발명의 방법론은 다음 단계에서 임의의 단계 중의 원발성 뇌 종양 또는 전이성 이차 뇌 종양을 치료하는데 적합하다:
- [0134] 등급 I: 조직이 양성이다. 세포가 거의 정상 뇌 세포같이 보이며, 세포 성장이 느리다.
- [0135] 등급 II: 조직이 악성이다. 세포가 등급 I 종양의 세포 보다 덜 정상 세포처럼 보인다.
- [0136] 등급 III: 악성 조직이 정상 세포와 아주 다르게 보이는 세포를 가진다. 비정상 세포가 활발하게 성장하고 있다. 이들 비정상적으로 보이는 세포는 역형성(anaplastic)으로 불린다.
- [0137] 등급 IV: 악성 조직이 가장 비정상적으로 보이고 아주 빠르게 자라는 경향의 세포를 갖는다.
- [0138] 상이한 종양 유형이 그의 세포 표면 상에서 특정한 수용체를 과발현하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, 뇌로 전이하는 유방암은 HER2 수용체를 과발현하는 전이성 유방암 세포의 더 큰 비율을 갖는 경향이 있다(Palmieri *et al.*, 2007). 동일한 저자는 EGF 수용체 발현이 또한 뇌 전이에서 더욱 높은 것을 밝혀냈다. 다른 실시예에서, $\alpha 3\beta 1$ 인테그린 수용체는 뇌로 전이된 폐 암 세포에서 과발현되는 것으로 밝혀졌다(Yoshimasu *et al.*, 2004).
- [0139] 알려진 바와 같이, 본 발명에 따른 특정한 원발성 암으로부터 초래된 뇌 전이의 치료는 원발성 암에 적합한 특이성을 갖는, 제제-패키징된 미니세포에 대한, 표적화 리간드를 사용하도록 적절히 변경될 수 있다. 따라서, 원발성 유방암으로부터 초래된 뇌 전이를 위한 치료는, HER2 특이성을 나타내는 리간드를 미니세포에 부착된 상태로 이용할 수 있다. 유사하게, 원발성 폐 암에 의해 야기된 뇌 전이를 치료하기 위해, 리간드는 항- $\alpha 3\beta 1$ 항체와 같은 $\alpha 3\beta 1$ 특이성 등을 나타내는 것일 수 있다.
- [0140] 통상적인 기술에 따르면, 로슈/제넨테크 제품인 트라스투주맙에서와 같이, 항-HER 2와 같은 모노클론 항체의 전신적 투여는 원발성 유방암으로부터 초래된 뇌 전이를 치료하지 못하는 것으로 이해된다. 이러한 이해는 항체 활성제가 뇌 전이성 종양에서 치료적으로 유의미한 농도를 달성하기에 충분히 효과적으로 혈액 뇌 장벽을 횡단하지 않는다는 사실로부터 근거한다. 예를 들면, 문헌 [Stemmler *et al.* (2007) (trastuzumab levels in cerebrospinal fluid increased only under conditions of an impaired blood-brain barrier, such as meningeal carcinomatosis or radiotherapy)]을 참고하라. 그러므로, 전술한 방식으로 리간드에 의해 표적된, 전이성 뇌 암을 치료하기 위해 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 유효성은 더욱 더 놀랍고 유의미하다.
- [0141] (E) 미니세포
- [0142] "미니세포"는 염색체가 결여, ("무-염색체")되고, 이분열 동안 세포 분열과 DNA 분리의 조화에서의 교란에 의해

발생된 박테리아 세포의 유도체를 지칭한다. 미니세포는 특정 상황에서 자발적으로 생성되고 방출되지만, 특이적 유전적 재배열 또는 에피솜 유전자 발현에 기인한 것이 아닌, 소위 "막 수포"와 같은, 다른 작은 소포(약 0.2 μm 이하의 크기)와 구분된다. 마찬가지로, 무손상 미니세포는 특이적 유전적 재배열 또는 에피솜 유전자 발현으로 인해 생성되지 않는, 박테리아 유령과 구분된다. 본 발명에서 이용된 박테리아 유래된 미니세포는 완전하게 무손상이므로, 따라서 파괴되거나 분해된, 심지어 제거된 외막 또는 설정 막(defining membrane)을 특징으로 하는 박테리아 세포 유도체의 다른 무염색체 형태와 구별된다. 미국 특허 제7,183,105호의 111 문단, 54번째 줄 이하를 참조하라. 본 발명의 미니세포를 규정하는 무손상 막은 중앙 세포 내에서 흡수-후에 페이로드가 방출될 때까지 미니세포 내에서 치료적 페이로드의 보유를 가능하게 한다.

[0143] 본 발명에서 이용된 미니세포는 대장균 및 *S. 티피뮤리움*(*S. typhimurium*)과 같은 박테리아 세포로부터 제조될 수 있다. 원핵성 염색체 복제는 정상적 이분열과 관련되고, 이는 중간-세포 격막 형성을 수반한다. 예를 들면, 대장균에서, *minCD*와 같은 *min* 유전자의 돌연변이는 세포 분열 동안 세포극(cell pole)에서 격막 형성의 억제를 제거하여, 정상 딸 세포 및 염색체가 없는(chromosome-less) 미니세포의 생산을 초래할 수 있다. 문헌 [de Boer *et al.*, 1992; Raskin & de Boer, 1999; Hu & Lutkenhaus, 1999; Harry, 2001]을 참고하라.

[0144] *min* 오프론 돌연변이 외에도, 염색체가 없는 미니세포는 또한, 예를 들면 *B. 서브틸리스*(*B. subtilis*) *divIB1*에서 격막 형성에 영향을 미치는 다양한 다른 유전적 재배열 또는 돌연변이 후에, 생성된다. 문헌 [Reeve and Cornett (1975)]을 참고하라. 미니세포는 또한 세포분열/염색체 분리에 관여하는 단백질의 유전자 발현 수준의 동요(perturbation) 후에 형성될 수 있다. 예를 들면, *minE*의 과발현은 미니세포의 극성 분열 및 생산을 유도한다. 유사하게, 염색체가 없는 미니세포는 염색체 분리에서의 결함, 예를 들면 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*)에서 *smc* 돌연변이(Britton *et al.*, 1998), *B. 서브틸리스*에서 *spoJ* 결실(Ireton *et al.*, 1994), 대장균에서 *mukB* 돌연변이(Hiraga *et al.*, 1989), 및 대장균에서 *parC* 돌연변이(Stewart and D'Ari, 1992)로부터 야기될 수 있다. 또한, CafA는 복제 후 세포 분열 속도를 향상시키고/시키거나 염색체 분할을 억제하여(Okada *et al.*, 1994), 일련의(chained) 세포 및 염색체가 없는 미니세포의 형성을 초래할 수 있다.

[0145] 따라서, 미니세포는 그람-양성 또는 그람-음성 기원인, 임의의 박테리아 세포로부터 본 발명을 위해 제조될 수 있다. 더욱이, 본 발명에서 이용된 미니세포는 상술된 바와 같이 무손상 세포 벽을 보유해야 하며(즉, "무손상 미니세포"임), 특이적 유전적 재배열 또는 에피솜 유전자 발현에 기여하지 않는, 막 수포와 같은 다른 소포와 구별되고 이와 분리되어야 한다.

[0146] 소정의 구현예에서, 미니세포에 대한 모체(공급원) 박테리아는 그람 양성일 수 있거나, 또는 언급된 바와 같이, 이들은 그람 음성일 수 있다. 그러므로, 일 측면에서, 모체 박테리아는 테라-/글리도박테리아(BV1), 프로테오박테리아(BV2), 스피로헤타(Spirochaete)를 포함하는 BV4, 스펅고박테리아, 및 플란кто박테리아로부터 선택된 하나 이상이다. 다른 측면에 따르면, 박테리아는 바실리와 같은 피르미큐트(Firmicute)(BV3), 클로스트리디아(Clostridia) 또는 테네리큐트(Tenericute)/몰리큐트(Mollicute), 또는 방선균 또는 비피도박테리아균과 같은 액티노박테리아(BV5)로부터 선택된 하나 이상이다.

[0147] 또 다른 측면에서, 박테리아는 예오박테리아(Chloroflexi, Deinococcus-Thermus), 시아노박테리아, 써모데설포박테리아(Thermodesulfobacteria), 써모필리스(아퀴피케(Aquificae), 써모토아게(Thermotogae), 알파, 베타, 감마(엔테로박테리아세아(Enterobacteriaceae)), 델타 또는 엡실론 프로테오박테리아, 스피로헤타, 피브로박테레스(Fibrobacteres), 클로로비/박테로이데테스(Chlorobi/Bacteroidetes), 클라미디아에/베루코마이크로비아(Chlorobi/Bacteroidetes), 플란кто마이세테스(Planctomycetes), 아시도박테리아(Acidobacteria), 크리시오게네테스(Chrysiogenetes), 데페리박테레스(Deferribacter), 푸소박테리아(Fusobacteria), 겐마티모나데테스(Gemmatimonadetes), 니트로스피라에(Nitrospirae), 시너지스테테스(Synergistetes), 디타오글로미(Dictyoglomi), 렌티스파에라에 바실라레스(Lentisphaerae Bacillales), 바실라세아에(Bacillaceae), 리스테리아세아에(Listeriaceae), 스탕필로코카세아에(Staphylococcaceae), 락토바실라레스(Lactobacillales), 엔테로코카세아에(Enterococcaceae), 락토바실라세아에(Lactobacillaceae), 류코노스토카세아에(Leuconostocaceae), 스트렙토코카세아에(Streptococcaceae), 클로스트리디알레스(Clostridiales), 할라나에로비알레스(Halanaerobiales), 써모아나에로박테랄레스(Thermoanaerobacterales), 마이코플라스마탈레스(Mycoplasmatales), 엔토모플라스마탈레스(Entomoplasmatales), 사나에로플라스마탈레스(Anaeroplasmatales), 아콜레플라스마탈레스(Acholeplasmatales), 할로플라스마탈레스(Haloplasmatales), 액티노마이세타세아에(Actinomycetaceae), 코리네박테리네아에(Corynebacterineae), 마이코박테리아세아에(Mycobacteriaceae), 노카르디아세아에(Nocardiaceae), 코리네박테리아세아에(Corynebacteriaceae), 프랑키네아에(Frankineae), 프랑키아세아에(Frankiaceae), 마이크로코키네아에(Micrococcineae), 프레비박테리아세아에(Brevibacteriaceae),

및 비피도박테리아세아에(Bifidobacteriaceae)로부터 선택된 하나 이상이다.

- [0148] 약학적 사용을 위해, 본 발명의 조성물은 면역원성 성분 및 다른 독성 오염물로부터 가능한 한 완전히 단리된 미니세포를 포함해야 한다. 유리 엔도톡신 및 모체 박테리아 세포를 제거하기 위해 박테리아 유래된 미니세포를 정제하기 위한 방법론은, 그 전체가 본 명세서에 참조로서 포함되는 WO 2004/113507에 기술되어 있다. 요약하면, 정제 공정은 (a) 일반적으로 크기가 $0.2\ \mu\text{m}$ 보다 작은 막 수포와 같은 더 작은 소포, (b) 세포 막으로부터 방출된 유리 엔도톡신, 및 (c) 생 또는 사(live or dead)에 관계없이 모체 박테리아, 및 유리 엔도톡신의 공급원이기도 한 이의 잔해의 제거를 달성한다. 이러한 제거는, 특히, 더 작은 소포 및 세포 잔해를 제거하기 위한 $0.2\ \mu\text{m}$ 필터, 필라멘트를 형성하기 위한 모체 세포의 유도 후 모체 세포를 제거하기 위한 $0.45\ \mu\text{m}$ 필터, 생 박테리아 세포를 사멸시키기 위한 항생제, 및 유리 엔도톡신에 대한 항체를 이용해 수행될 수 있다.
- [0149] 이러한 정제 공정에는 이들 박테리아 공급원의 차이에도 불구하고, 모든 무손상 미니세포가 대략 크기가 400 nm, 즉 막 수포 및 다른 더 작은 소포보다 크기가 크지만 모체 박테리아보다 작다는 본 발명자들에 의한 발견이 내재한다. 미니세포의 사이즈 결정은 전자 현미경법과 같이 고체-상태 기술을 이용하거나, 액체-기반 기술, 예컨대 동적 광 산란에 의해 성취될 수 있다. 각각의 이러한 기술에 의해 산출된 크기값은 오차 범위를 가질 수 있고, 그 값은 기술들 사이에 다소 차이가 있을 수 있다. 따라서, 건조 상태의 미니세포의 크기는 전자 현미경법을 통해 대략 $400\ \text{nm} \pm 50\ \text{nm}$ 로 측정될 수 있다. 반면, 동적 광 산란은 동일한 미니세포의 크기가 대략 $500\ \text{nm} \pm 50\ \text{nm}$ 인 것으로 측정할 수 있다. 또한, 약물-패키징된, 리간드-표적된 미니세포는, 다시 동적 광 산란을 이용하여, 대략 $600\ \text{nm} \pm 50\ \text{nm}$ 인 것으로 측정될 수 있다.
- [0150] 크기 값의 이러한 산란은 실제로, 예컨대 상기 기술된 바와 같은 면역원성 성분 및 다른 독성 오염물로부터 미니세포를 단리하는 목적을 위해 용이하게 조정된다. 다시 말하면, 무손상, 박테리아 유래된 미니세포는 미니세포에 단단한, 구형 구조를 부여하는, 단단한 막에 의해 둘러싸인 세포질을 특징으로 한다. 이 구조는 미니세포 직경이 단단한 막의 외부 경계 사이에서 미니세포를 횡단하여 측정되는, 투과 전자 현미경사진에서 명백하다. 이 측정은 $400\ \text{nm} \pm 50\ \text{nm}$ 의 상기-언급된 크기 값을 제공한다.
- [0151] 그람-음성 박테리아로부터 유래된 미니세포의 다른 구조적 요소는, 지질 A 앵커(anchor)를 통해 외막에 포매되어 있는 지다당류(LPS)의 O-다당류 성분이다. 성분은 사슬 당 4개 내지 5개 당의 최대 70개 내지 100개 반복 유닛을 갖는, 탄수화물-잔기 유닛의 반복 사슬이다. 이들 사슬이 생체내와 같은 액체 환경에서는 단단하지 않기 때문에, 이들은 산호해 환경에서 해초의 일반적인 외형을 부여하는 흔들리는, 유연한 구조를 채택할 수 있다; 즉, 사슬은 미니세포 막에 부착된 상태를 유지하면서 액체와 함께 이동한다.
- [0152] O-다당류 성분에 의해 영향받은, 동적 광 산란은 상기 언급한 바와 같이 약 500 nm 내지 약 600 nm의 미니세포 크기에 대한 값을 제공할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 그람-음성 및 그람-양성 박테리아로부터의 미니세포는 비슷하게 $0.45\ \mu\text{m}$ 필터를 용이하게 통과할 수 있는데, 이는 $400\ \text{nm} \pm 50\ \text{nm}$ 의 유효 미니세포 크기를 입증한다. 크기에 있어서 상기-언급된 산란은 본 발명에 포함되고, 특히 구절 "대략 크기가 400 nm"에서 수식어 "대략"에 의해 표현된다.
- [0153] 독성 오염물과 관련하여, 본 발명의 조성물은 약 350 EU 미만의 유리 엔도톡신을 포함할 수 있다. 이와 관련한 예시로는 각각 약 250 EU, 약 200 EU, 약 150 EU, 약 100 EU, 약 90 EU, 약 80 EU, 약 70 EU, 약 60 EU, 약 50 EU, 약 40 EU, 약 30 EU, 약 20 EU, 약 15 EU, 약 10 EU, 약 9 EU, 약 8 EU, 약 7 EU, 약 6 EU, 약 5 EU, 약 4 EU, 약 3 EU, 약 2 EU, 약 1 EU, 약 0.9 EU, 약 0.8 EU, 약 0.7 EU, 약 0.6 EU, 약 0.5 EU, 약 0.4 EU, 약 0.3 EU, 약 0.2 EU, 약 0.1 EU, 약 0.05 EU, 및 약 0.01 EU의 유리 엔도톡신 수준이다.
- [0154] 본 발명의 조성물은 또한 적어도 약 10^8 개 미니세포, 예컨대 적어도 약 5×10^8 개 미니세포를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 10^9 개 또는 10^{10} 개에 달하는 미니세포, 예컨대 5×10^9 개, 1×10^{10} 개 또는 5×10^{10} 개 미니세포를 포함할 수 있다. 또한, 임의의 이러한 개수의 미니세포 중에서, 본 발명의 조성물은 약 10개 오염성 모체 박테리아 세포 미만, 예컨대 약 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 모체 박테리아 세포를 포함할 수 있다.
- [0155] (F) 미니세포 내로 항-신생물제의 패키징
- [0156] 핵산에 의해 인코딩될 수 있는 단백질 및 기능적 핵산과 같은 항-신생물제는 항-신생물제를 인코딩하는 플라스미드와 같은 벡터를 모체 박테리아 세포 내로 형질전환시킴으로써 미니세포 내로 도입될 수 있다. 미니세포가 모체 박테리아 세포로부터 형성되는 경우, 미니세포는 플라스미드 및/또는 발현 산물, 항-신생물제의 특정한 카

피를 유지한다. 미니세포 내로 발현 산물을 패키징하는 더 상세한 설명은, 그 내용 전체가 참조로서 본 발명에 포함되어 있는 WO 03/033519에 제공되어 있다.

[0157] WO 03/033519에 제시된 데이터는, 예를 들면 포유동물 유전자 발현 플라스미드를 보유하는 재조합 미니세포가 포식세포 및 비-포식 세포로 전달될 수 있음을 증명하였다. 상기 출원은 또한 에피솜적-복제성 플라스미드 DNA 상에서 수행된 이중 핵산을 갖는 미니세포-생산성 모체 박테리아 균주의 유전적 형질전환을 기술하였다. 모체 박테리아 및 미니세포의 분리 시에, 에피솜 DNA의 일부는 미니세포 내로 분리되었다. 생성된 재조합 미니세포는 포유동물 포식세포에 의해 쉽게 포식되었고 세포내 포식리소좀 내에서 분해되기 시작했다. 더욱이, 일부 재조합 DNA는 포식리소좀 막을 탈출하여, 재조합 유전자가 발현되었던, 포유동물 세포 핵으로 수송되었다.

[0158] 핵산은 또한 직접적으로 미니세포 내로 패키징될 수 있다. 따라서, 핵산은 완충액 중에 핵산과 함께 복수개의 무손상 미니세포를 동시-인큐베이션시킴으로써 무손상 미니세포 내로 직접적으로 패키징될 수 있다. 완충액 조성물은 무손상 미니세포 내에서 핵산의 로딩을 최적화하기 위해, 당해 분야에 잘 알려진 조건으로, 다양할 수 있다. 완충액은 또한 뉴클레오타이드 서열 및 미니세포에 로딩되는 핵산의 길이에 의존하여 다양할 수 있다. 일단 패키징되면, 핵산은 미니세포 내에 잔존하여 분해로부터 보호된다. 멸균 염수 중에 인큐베이션된 siRNA-패키징된 미니세포를 이용한 연장된 인큐베이션 연구는, 예를 들면 siRNA의 비누출을 나타내었다.

[0159] 다른 구현예에서, 상이한 mRNA 표적에 지시된 다중 핵산이 동일한 미니세포 내에 패키징될 수 있다. 이러한 접근법은 약물 내성 및 아폽토시스 내성을 방지하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 암 환자는 통상적으로 화학 치료 약물에 대한 내성을 나타낸다. 이러한 내성은 여러가지 중에서도 다중-약물 내성(MDR) 펌프 및 항-아폽토시스 유전자와 같은 유전자의 과-발현에 의해 매개될 수 있다. 이러한 내성을 방지하기 위해, 미니세포는 MDR-관련된 유전자에 치료적으로 유의미한 농도의 기능적 핵산으로 패키징되고, 화학요법 전에 환자에게 투여될 수 있다. 또한, 상이한 mRNA 표적에 지시된 다중 기능적 핵산을 동일한 미니세포 내로 패키징하면, 대부분의 분자 표적이 돌연변이되어 다중 대립유전자를 갖기 때문에, 치료 성공을 높일 수 있다. 미니세포 내로 핵산을 직접적으로 패키징하는 것에 대한 상세한 설명은 그 내용 전체가 본 명세서에 참조로서 포함된 WO 2009/027830에 제공되어 있다.

[0160] 친수성 또는 소수성에 여부에 관계없이, 소 분자 약물은 미니세포를 함유하는 세포의 매질과 미니세포 세포질 사이에 약물의 농도 구배를 생성함으로써 미니세포에 패키징될 수 있다. 세포의 매질이 미니세포 세포질 보다 더 높은 약물 농도를 함유하는 경우, 약물은 자연적으로 이 농도 구배로 미니세포 세포질 내로 하강하게 된다. 그러나 농도 구배가 역전되는 경우, 약물은 미니세포 밖으로 이동하지 않는다.

[0161] 보통 수용성이 아닌 약물로 미니세포를 로딩하기 위해서는, 약물을 먼저 적절한 용매에 용해시킬 수 있다. 예를 들면, 파클리탁셀을 에탄올과 크레모포르 EL(폴리에톡실화된 캐스터 오일)의 1:1 혼합물에 용해시키고, 이어서 PBS 중에 희석시켜, 수성 매질에 부분적으로 희석되고 약물이 용액 내에 남아있는 것을 보장하도록 유기 용매의 최소 양을 보유하는 파클리탁셀의 용액을 수득할 수 있다. 미니세포는 약물 로딩을 위해 이 최종 매질 내에 인큐베이션될 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 소수성 약물이라도 미니세포의 세포질 또는 막 내로 확산되어 고도의, 치료적으로 유의미한 세포질 약물 로드를 달성할 수 있음을 발견하였다. 미니세포 막이 세포질 내로의 소수성 분자의 확산을 방지하는 것으로 예상되는 소수성 인지질 이중층으로 구성되기 때문에, 이는 예상 밖이다.

[0162] 하기 실시예 10은 상이한 크기 및 화학적 특성을 보이는 다양한 대표적인 소 분자 약물의 미니세포 내로의 로딩을 증명한다: 독소루비신, 파클리탁셀, 플루오로-파클리탁셀, 시스플라틴, 빈블라스틴, 몬사트룰, 티미딜레이트 신타제(TS) 억제제 OSI-7904, 이리노테칸, 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 및 카르보플라틴. 더욱이, 전반적으로, 생성된 소 분자 약물-패키징된 미니세포는 시험관내 및 생체내에서 유의미한 항-종양 효능을 보인다. 그러므로, 본 명세서에 제시된 이러한 데이터는 미니세포 로딩 방법의 효능 및 다능성(versatility)을 명백히 증명한다.

[0163] (G) 특이적 포유동물 세포를 지시하는 미니세포

[0164] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 상기 기술된 바와 같은 조성물의 미니세포는 리간드를 통해 표적 포유동물 종양 세포에 지시된다. 일부 구현예에서, 리간드는 "이중특이적"이다. 다시 말하면, 소정의 미니세포가 표적 세포에 결합하도록 야기함으로써, 후자가 전자를 포식하도록, 리간드는 미니세포 및 포유동물 (종양)세포 성분 둘 모두에 대해 특이성을 나타낸다. 종양 세포에 대해 미니세포를 표적하기 위한 이중특이적 리간드의 사용은, 각각의 내용이 그 전체로 참조로서 본 명세서에 포함된 WO 05/056749 및 WO 05/079854에 추가적으로 기술되어 있다. 일단 이러한 리간드가 미니세포에 부착하면, 리간드의 비점유 특이성("nonspecificity")은 리간드가 표적

(종양) 포유동물 세포와 상호작용할 때까지 유지된다.

- [0165] 리간드는 미니세포 또는 이의 모체 내로부터 발현된 후 미니세포 표면 상에 표시될 수 있다. 대안적으로, 리간드는 예컨대, 리간드-수용체 상호작용에 의해서, 미니세포의 세포막에 부착("그 위에 코팅")될 수 있다. 다른 예에서, 리간드는 미니세포에 대해 특이성이 요구되지 않으며, 단지 포유동물 세포의 특징적인 성분에 대해 특이성을 나타낸다. 다시 말하면, 이러한 성분은, 종양 세포가 자신의 세포 표면 상에 상기 성분을 제시하는 한, 종양 세포 그 자체에 대해, 또는 심지어 치료 중인 특정 종류의 종양 세포에 대해 특이적일 필요는 없다. 정맥 내 투여 시, 미니세포는 본 발명자들이 발견한 바와 같이(또한 하기 실시예 참고) 종양 미세환경 내에 빠르게 축적한다. 상기-기술된 누수된 종양 혈관구조의 기능에 의해 발생하는 이러한 축적은 종양의 세포에 대한 미니세포-패키징된 치료적 페이로드의 표적된 전달을 일으킨다. 또한, 이는 리간드가 치료될 종양의 성분을 표적하는데, 본 발명과 일맥상통하게, 유용하고, 때때로 바람직하다.
- [0166] 어느 경우이나, 본 발명의 투여된 조성물 내에 포함된 미니세포는, 상기 기술된 바와 같은 뇌 종양 미세환경 내에 축적 시, 표적된 종양 세포와 접촉 및 결합하여, 세포 내로 이들의 흡수를 유도한 후, 치료적 페이로드에 의해 영향받는다. 이 페이로드는 상기 기술된 바와 같은, 세포독성 약물, 예컨대 독소루비신 또는 임의의 다른 항-신생물성 약물일 수 있다. 페이로드는 또한 siRNA 또는 miRNA, 예컨대 항-Bcl2와 같은 항-아포토시스 RNAi 계열일 수 있다.
- [0167] 본 발명자들은 이러한 표적된 전달 접근법이 보통 미니세포의 특이적 접착 및 엔도사이토시스에 대해 무반응성인 세포를 포함하는 일련의 포유동물 종양 세포에 넓게 적용가능한 것을 밝혀냈다. 예를 들면, 항-HER2 수용체 또는 항-EGF 수용체에 지시된 항체로 구성된 리간드는 일련의 표적된, 비-포식 세포 상에서 각각의 수용체에 미니세포를 효과적으로 결합한다. 이들 세포에는 폐, 난소, 뇌, 유방, 전립선 및 피부 암 세포가 포함된다.
- [0168] 그렇게, 달성된 결합은 각각의 유형의 비-포식 세포에 의한 미니세포의 빠른 엔도사이토시스에 선행한다. 더욱 일반적으로, 본 발명에 적합한 표적 세포는 리간드의 결합시, 엔도사이토시스를 촉진하는 세포 표면 수용체의 발현을 특징으로 한다. 숙주 세포는 보통 부착에 대해 내성이 있다. 그러므로, 리간드에 의해 부착되는 경우, 숙주 세포는 이의 엔도사이토시스 기전을 활성화시켜 리간드를 제거한다.
- [0169] 용어 "엔도사이토시스"는 (1) 파고사이토시스 및 (2) 그 자체로 (2a) 수용체 결합을 요구하지 않는 마크로피노사이토시스, 뿐만 아니라 (2b) 클라트린-매개된 엔도사이토시스, (2c) 포낭-매개된 엔도사이토시스 및 (2d) 클라트린- /포낭-의존성 엔도사이토시스를 포함하는 범주이며, 이들 모두가 후기 엔도솜/리소솜 경로를 이용하는 경향이 있는, 피노사이토시스를 포함한다. 본 발명자들이 발견한 미니세포 상의 리간드와 포유동물 세포 표면 수용체 사이의 상호작용은 후기-엔도솜/리소솜 구획으로 수용체 매개된 엔도사이토시스(rME)를 수반하는 특정 엔도사이토시스 경로를 활성화시킨다. 이러한 엔도사이토시스 경로에 의해, 본 발명자들은 추가적으로 미니세포가 이의 페이로드를 표적된 포유동물 세포의 세포질 내로 방출할 수 있었음을 발견하였다. 페이로드가 핵산을 인코딩하는 경우에, 핵산은 후기-엔도솜/리소솜 구획에서 완전히 분해되지 않을 뿐만 아니라, 표적 포유동물 세포에서 또한 발현된다.
- [0170] 본 발명에 따른, 상기-기술된 표적된 전달 접근에서 유용한 리간드는 표적 세포 상의 표면 성분 및 미니세포 상의 표면 성분에 결합하는 임의의 제제를 포함한다. 바람직하게는, 표적 세포 상의 표면 성분은 수용체이다. 리간드는 폴리펩티드 및/또는 탄수화물 성분을 포함할 수 있다. 항체는 바람직하게는 리간드이다.
- [0171] 예를 들면, 표적 포유동물 뇌 종양 세포 상에 종양 항원과 같은 표면 성분에 대한 특이성을 보유하는 항체가 치료될 뇌 종양에서 표적 세포에 미니세포를 표적하기 위해 효과적으로 사용될 수 있다. 세포 표면 수용체의 예로는 상피세포 성장 인자 수용체(EGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR), 혈소판-유래 성장 인자 수용체(PDGFR) 및 인슐린-유사 성장 인자 수용체(IGFR)가 포함되며, 이들 모두는 뇌 종양을 포함하는 일련의 고형 종양에서 고도로 발현되며 일부 뇌하수체 샘종에서 과 발현되는 염산 수용체이다. 이중특이적 리간드는 또한 돌연변이 또는 변형 수용체, 예를 들면 50% 내지 80%의 인간 GBM에서 발현되지만(Debinski et al., 2000; Jarboe et al., 2007; Okada et al., 2008; Wykosky et al., 2008) 정상 조직에서 발현되는 이의 생리적 대응물 IL4R/IL13R과는 상이한(Hershey 2003), IL-13R $\alpha 2$ 수용체에 표적될 수 있다. IL13R $\alpha 2$ 는 사실상 정상 뇌 세포에서 부재한다(Debinski and Gibo 2000). 추가적으로, 뇌로 전이하는 종양은 특정한 수용체를 과 발현할 수 있고, 이들 수용체는 또한 적합한 표적일 수 있다. 예를 들면, 한 연구는 유방암의 뇌 전이가 티로신 키나제 수용체의 HER 패밀리의 모든 멤버를 발현하였음을 보여주었다(Da Silva et al., 2010). HER2는 뇌 전이의 20%에서 증폭되고 과발현되었고, EGFR은 뇌 전이의 21%에서 과발현되었고, HER3는 뇌 전이의 60%에서 과발현되었고, HER4는 뇌 전이의 22%에서 과발현되었다. 흥미롭게도, HER3 발현은 뇌에서 존재하는 유방 암 세포에서 증가하였다.

- [0172] 바람직한 리간드는 항체 및/또는 항체 유도체를 포함한다. 이의 당해 사용에서, 용어 "항체"는 면역원성 반응의 시험관내 또는 생체내 생성에 의해 수득된 면역글로불린 분자를 포함한다. 따라서, "항체" 범주에는 모노클론 항체 및 인간화된 항체, 뿐만 아니라 단일-사슬 항체 단편(scFv)와 같은 항체 유도체, 이중특이적 항체 등이 포함된다. 그 전체가 참조로서 본 명세서에 포함된 검토 문헌 [Caravella and Lugovskoy (2010)]에 의해 증명된 바와 같이, 다수의 상이한 이중특이적 단백질 및 항체-기반 리간드가 알려져있다. 본 발명에서 유용한 항체 및 항체 유도체는 또한 재조합 DNA 기술에 의해 수득될 수 있다.
- [0173] (H) 제형 및 투여 경로 및 일정
- [0174] 본 발명의 조성물의 제형은, 보존제가 첨가되든 첨가되지 않든, 예를 들면, 앰플 또는 바이알 내에, 단위 용량 형태로, 또는 복수-용량 용기 내에 존재할 수 있다. 제형은 용액, 현탁액, 또는 오일성 또는 수성 비히클 중의 에멀전일 수 있고, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 포함할 수 있다. 적합한 용액은 수용자의 혈액과 등장성이고 염수, 링거액, 및 텍스트로스 용액으로서 예시된다. 대안적으로, 제형은 적합한 비히클, 예를 들면 멸균, 발열원-무함유(pyrogen-free) 물 또는 생리 식염수를 이용한 재구성을 위해, 동결건조된 분말 형태일 수 있다. 제형은 또한 데포(depot) 제제의 형태일 수 있다. 이러한 지속성 제형은 이식(예를 들면, 피하 또는 근육내) 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0175] 일부 측면에서, 치료적 유효량의 항-신생물제를 포함하는 미니세포-함유 조성물이 제공된다. 항-신생물제의 "치료적 유효"량은 본 발명에 따라, 개체에 투여되는 경우 약물학적 반응을 일으키는 당해 제제, 예를 들면 siRNA 또는 화학치료 약물의 용량이다.
- [0176] 그러므로, 본 발명의 문맥에서, 치료적 유효량은, 하기 추가로 기술된 바와 같이, 치료적 페이로드를 보유하는 미니세포가 투여되는 경우, 동물 모델 또는 인간 개체에서, 뇌 종양 또는 뇌 종양의 증상의 예방 또는 개선을 참고하여 측정될 수 있다. 특정한 개체에 대해, 소정의 사례에서 "치료적 유효량"으로 증명된 양은, 이러한 양이 숙련된 의사에 의해 "치료적 유효량"으로서 고려된다고 하더라도, 뇌 종양에 대해 유사하게 치료된 모든 개체에게 효과적이지 않을 수 있다. 이와 관련하여, 적절한 용량은 또한, 예를 들면 뇌 종양의 유형, 단계, 및 중증도에 의해 달라질 것이다. 임의의 경우에서, 본 발명에 따른 시험관내 시험(실시에 3 및 4) 및 생체내 시험(실시에 5, 7 및 8) 뿐만 아니라 생체내에서 약물의 분배를 정량화하기 위한 방법론(실시에 9)의 본 발명의 예시는, 명세서 전체 내용에 비추어 고려될 때, 약물 후보의 전임상 및 임상 시험에 박식한 자가 통상적인 실험을 통해 특정 적응증에 대한 활성제의 치료적 유효량을 결정하는 것을 가능하게 한다. 유사하게, "치료적으로 유효한"이 약학 조성물 내의 미니세포의 개수를 지칭하여 사용되는 경우, 그 개수는 미니세포 내로 패키징된 항-신생물제가 무엇인지와 뇌 종양을 치료하는데 있어서 그 제제의 효능을 근거로 확인될 수 있다. 이와 관련하여, 치료적 효과는 종양 덩어리와 같은 임상적 또는 병리학적 매개변수로 측정될 수 있다. 따라서, 종양 덩어리의 감소 또는 감소된 증가는 치료 효과를 측정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0177] 본 발명의 제형은 국소 또는 전신적으로 원하는 치료 효과(들)를 달성하기 위해 포유동물 신체의 다양한 부위에 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 특정한 측면에서, 투여의 경로는 정맥내 주사이다.
- [0178] 일반적으로, 본 발명의 제형은 임의의 잠재적 독성을 최소화하면서, 최적의 생리적 효과를 수득하기 위해, 통상적인 시험에 의해 설정된 적절한 용량으로 사용될 수 있다. 용량 요법은 환자의 나이, 체중, 성별, 의학적 상태를 포함하는 다양한 인자; 뇌 종양의 중증도 또는 단계, 투여의 경로, 및 환자의 신장 및 간 기능에 따라 선택될 수 있다.
- [0179] 최소의 부작용으로 최대 효능을 양산하는 범위 내의 미니세포 및 치료제의 농도를 달성하는데 있어서 최적의 정확성은 전형적으로 표적 부위 및 표적 세포에 대한 제제 이용가능성의 동역학을 기반으로 하는 요법을 요구할 것이다. 미니세포 또는 제제의 분배, 평형, 및 제거는 치료 요법에 대한 최적의 농도를 결정하는 경우 고려될 수 있다. 미니세포 및 치료제 각각의 용량은 원하는 효과를 달성하기 위해 조정될 수 있다.
- [0180] 나아가, 제형의 용량 투여는 약동학/약력학 모델 시스템을 사용하여 최적화될 수 있다. 따라서, 하나 이상의 용량 요법이 선택될 수 있고, 약동학/약력학 모델을 사용하여 하나 이상의 용량 요법의 약동학/약력학 프로파일을 결정할 수 있다. 이러한 특정 프로파일을 기반으로 하여, 그후 투여를 위한 용량 요법의 하나가 원하는 약동학/약력학 반응을 달성하도록 선택될 수 있다. 예를 들면, WO 00/67776을 참고하라
- [0181] 본 발명의 제형은 수 주의 과정에 걸쳐, 뇌 종양 환자에게 적어도 1주일에 1회 투여될 수 있다. 따라서, 제형은

수 주에서 수 개월의 기간에 걸쳐 적어도 1주일에 1회 투여될 수 있다.

- [0182] 더욱 구체적으로, 본 발명의 제형은 약 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 또는 31일 동안 적어도 1일 1회 투여될 수 있다. 대안적으로, 제형은 매일 약 1회 또는 매 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 또는 31일 이상 마다 약 1회 투여될 수 있다.
- [0183] 본 발명의 다른 구현예에서, 제형은 매주 약 1회, 또는 매 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20주 이상 마다 약 1회 투여될 수 있다. 대안적으로, 제형은 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20주 이상 동안 적어도 1주일에 1회 투여될 수 있다.
- [0184] 대안적으로, 제형은 매달 약 1회 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월 이상 마다 약 1회 투여될 수 있다.
- [0185] 제형은 단일 일일 용량으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 총 일일 용량은 2, 3, 또는 4회의 분할 용량으로 매일 투여될 수 있다.
- [0186] 하기 실시예는 제한이 아닌, 예시만을 위한 것이며 본 발명의 더욱 완전한 이해를 제공한다.
- [0187] 실시예 1. 독소루비신-패키징된, 개 EGFR-표적된 미니세포의 제조
- [0188] 살모넬라 엔테리카 혈청형 티피뮤리움(*Salmonella enterica serovar Typhimurium*), S.티피뮤리움(*S. typhimurium*)의 minCDE-염색체 결실 돌연변이체로부터 유래된 미니세포를 정제하고, 독소루비신(dox)으로 패키징하고, 문헌 [MacDiarmid *et al.* (2007)]에서 이전 기술된 바와 같은 항-미니세포 표면 O-다당류 및 항-개 EGFR 특이성을 포함하는 이중 모노클론 항체(MAb)의 부착을 통해 표적하였다(^{EGFR}미니세포_{dox}로 명명됨).
- [0189] ^{EGFR}미니세포_{dox}를 후기 뇌 암을 갖는 개 7 마리(BCD-1 내지 BCD-7로 명명된 개)에 i.v. 투여하는 경우 이의 적합성에 대해 우선적으로 특성화하였다. 추가의 개 2마리, BCD-8 및 BCD-9가 Veterinary Specialist Centre에 있었지만, 이들의 뇌 종양이 극 말기였기 때문에 연구에 참여시키지 않고, 안락사시켰다. 뇌 생검 시료를 시험관 내 연구를 위한 각각의 뇌 종양 세포를 제공했다.
- [0190] 실시예 2. 개 뇌 종양 세포에 결합을 위한 항-인간 EGFR 모노클론 항체의 특성화
- [0191] EGFR의 상향조절 및 과발현은 인간(Smith *et al.*, 2001) 및 개(Higgins *et al.*, 2010) 둘 모두의 GBM의 사례의 ~60%에서 잘 알려져 있다. 특이적 개 EGFR MAb의 입수가 불가능한 것을 고려하여, 상업적으로 입수가 가능한 항-인간 EGFR MAb를 개 및 인간 뇌 종양 세포주에서 시험하여 개 뇌 종양 세포 상에서 EGFR에 대한 MAb의 교차-반응성을 측정하였다.
- [0192] 실현가능한 경우, 뇌 종양 생검 시료를 사례 연구 개로부터 수득하였다. BCD-1, -8 및 -9로부터의 조직 시료를 10% 소 태아 혈청(FCS) 및 Penstrep을 함유하는 둘베코 변형 이글 배지(DMEM) 중에서 1 mg/ml 콜라게나제로 10분 동안 처리하였다. 소화되지 않은 조직을 멸균된 거즈 면봉의 이중층을 통해 여과하여 제거하였다. 콜라게나제 소화를 5 ml 배지로 세포를 희석함으로써 중단시키고, 5분 동안 1,200 g로 원심분리하였다. 세포를 추가의 5 ml 배지로 세척하고, 이어서 원심분리와 재현탁을 반복했다. 그 후 세포를 조직 배양 플라스크에 도말하였다.
- [0193] 개 GBM 세포주인 J3T(Rainov *et al.*, 2000)는 Translation Genomics Research Institute(Phoenix, AZ, USA)의 Michael Berens 박사로부터 얻었다. 모든 개 뇌 종양 세포 배양물은 10%(vol/vol) FCS, 100 U/ml 페니실린, 100 U/ml 스트렙토마이신, 2 mM l-글루타민, 및 2 mM 비필수 아미노산으로 보충된 DMEM에서 유지하였다.
- [0194] 인간 GBM-별아교세포종 상피 세포주(U87-MG)는 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 입수하였고, 5% 소 태아 혈청(FBS) 함유 OPTI-MEM 배지(Invitrogen, USA)에서 키웠다.
- [0195] 세포는 2 mM EDTA/PBS를 이용해 플라스크로부터 분리시킴으로써 수집하였고, 1×10^6 세포/튜브로 분배하였다. 세포를 차단 용액(2% BSA 및 0.1% 아지드화 나트륨 함유 PBS)으로 2회 세척하고, 10분 동안 얼음 상에서 차단

용액 중에 인큐베이션시킨 후, 45분 동안 얼음 상에서 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 항-인간 EGFR 모노클론 항체(IgG2a; Calbiochem)와 인큐베이션시켰다. 차단 용액으로 2회 세척한 후, 세포를 얼음 상에서 가볍게 교반하면서 45분 동안 R-피코에리트린 접합된 염소 항-마우스 IgG(Molecular Probes/Invitrogen)로 인큐베이션시켰다. 차단 용액으로 2회 세척한 후, 세포를 PBS 중에 재현탁시키고, 유동 세포분석법을 위해 사용하였다. 대조군으로서, 일차 항체 대신에 PBS를 사용하여 자가형광을 측정하였다.

[0196] 염색된 세포 현탁물을 CXP 세포분석기 소프트웨어(Beckman Coulter)를 사용하는 유동 세포분석기 FC 500으로 측정하였다. EGF 수용체의 개수는 형광 R-피코에리트린 마이크로비드 표준(Quantum R-PE MESF beads; Bang Laboratories Inc, Fishers, IN, USA)과 비교하여 분석적 세포유동 분석기에 의해 측정하였다. 보정 곡선을 비드 당 등가 R-피코에리트린 분자의 소정의 개수 대 이의 평균 형광 강도의 로그를 플로팅함으로써 생성하였다. 세포 형광 강도를 표준 형광 보정 곡선 상에 외삽하였다. 평균 형광 값은 음성 대조군으로부터 감산 후 세포 당 결합된 항체의 개수로 전환하였다.

[0197] 결과는 MAb가 개(J3T, BCD-1, -8 및 -9) 및 인간(U87-MG) 뇌 암 세포 둘 모두에서 EGFR에 강하게 결합함을 보여주었다(도 1).

[0198] FACS 분석을 사용하는 수용체 정량화 연구는 BCD-1, U87-MG, BCD-9, BCD-8 및 J3T 세포에 대한 세포 당 EGFR 농도가(감소하는 순서로) 각각 2,866,854, 1,465,755, 930,440, 774,352 및 287,622임을 보였다(도 1). 이는 각각의 세포 유형이 EGFR을 과발현함을 제안하였다.

[0199] 그러므로, 개 EGFR에 대한 항-인간 EGFR Mab의 결합 교차-반응성이 개 및 인간 뇌 암 세포에 대한 시험관내 결합 분석에 따라 확인되었다.

[0200] 따라서, 뇌 종양 세포의 활성 표적화를 달성하기 위해서, 항-인간 EGFR Mab를 Dox-패키징된 미니세포를 코팅하기 위해 선택하였다.

[0201] 실시예 3. 화학요법 약물 독소루비신에 대한 개 뇌 암 세포의 민감성 측정

[0202] dox-패키징된, EGFR-표적 미니세포를 후기 뇌 암을 갖는 개를 치료하는데 사용하기 전에, 개 뇌 종양 세포가 화학요법 약물 독소루비신에 민감한지 또는 내성인지 여부를 결정하는 것이 중요하였다.

[0203] 개 뇌 종양 세포인 BCD-1, -8, -9 및 J3T와 인간 뇌 종양 세포주인 U87-MG를 웰 당 5×10^3 세포로 96 웰 플레이트로 접종하였다. 세포를 5% CO₂, 37°C에서 밤새 인큐베이션시켰다.

[0204] 독소루비신을 1.7 nM 내지 8,600 nM 범위의 농도로 혈청을 함유하는 100 μl 의 상응하는 배지로 세포에 첨가하고, 72시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0205] 독소루비신의 세포독성 효과를 측정하기 위해, MTS 세포 증식 분석을 수행하였다. 각각의 웰에 20 μl 의 MTS 용액(CellTitre 96®Aqueous One MTS reagent - Promega)을 첨가하고 30분 동안 암실에서 인큐베이션시켰다. 흡광도를 490 nm의 파장에서 판독하였다. 데이터를 비선형 회귀 및 4-매개변수 곡선 피트(fit)를 사용하는 Prism GraphPad (La Jolla, CA, USA)에서 분석하였다.

[0206] 세포 증식 분석은 상기 세포주 모두가 동일하게 독소루비신에 민감하였음을 보였다(도 2).

[0207] 실시예 4. 개 뇌 종양 세포에 대한 ^{EGFR}미니세포_{Dox}의 결합 효능

[0208] 개 및 인간 종양 세포를 특이적 및 비-특이적으로-표적하는 미니세포, 각각 ^{EGFR}미니세포_{Dox} 및 ^{gp120}미니세포_{Dox}로 2 시간 동안 형질감염시키고, 비-부착성 미니세포를 세척한 후, 세포를 Alexa-Fluor 488 형광 염료(AF-488)로 태깅된 항-마우스 IgG2a MAb로 처리하였다. gp120 MAb는 인간 면역결핍 바이러스 1 외피 당단백질 gp120에 대해 지향되고 본 연구에서 시험한 임의의 뇌 종양 세포주의 표면 상에서 발견되지 않는다. 그후, 세포를 FACS를 사용하여 분석하였다. 결과는 각각의 경우에서 > 95%의 세포가 ^{EGFR}미니세포_{Dox}로 처리되었을 때 강한 형광을 띄었고, 대조군 ^{gp120}미니세포_{Dox}로 처리되었을 때 이들 세포는 어떠한 형광도 보이지 않았음을 나타냈다(도 3).

- [0209] 관찰된 결합 효능을 형광 현미경법을 사용해 추가적으로 확인하여 뇌 종양 세포에 대한 ^{EGFR} 미니세포_{Dox}의 결합 및 암 세포에서 독소루비신의 세포내 전달을 또한 직접적으로 시각화하였다.
- [0210] ^{EGFR} 미니세포_{Dox}를 사용하여 개 뇌 종양 및 인간 대조군 세포주를 형질감염시켰다. 3시간 형질감염 및 과량의 비결합 미니세포의 세척제거 후, 세포주에 여전히 부착된 미니세포를 항-IgG2a-AF488을 이용해 EGFR 표적화 MAb를 표지함으로써 드러냈다. 결과는 특이적으로 표적된 미니세포 (^{EGFR} 미니세포_{Dox})가 인간 및 개 뇌 암 세포에 대량으로 결합한 반면, 대조군 미니세포를 결합하지 않았음을 보였다(도 4). 추가적으로, ^{EGFR} 미니세포_{Dox}로 처리된 대부분의 세포는 세포 핵에서 dox 자가형광을 보였는데, 이는 상당한 수의 미니세포가 세포내이입되고, 세포내 리소좀에서 용해되었고 dox가 세포내로 방출되었음을 시사한다. 상이한 종양 세포주에 대한 이중특이적 항체-표적된, 약물-패키징된 미니세포를 통한 약물의 세포내 전달의 기전은 본 출원의 발명자에 의해 이전에 서술되었고 공개되었다(MacDiarmid *et al.*, 2007).
- [0211] 상기 결과는 dox와 미니세포를 패키징하고 EGFR에 이들을 표적하는 것에 대한 논리적 근거를 제공하였다.
- [0212] **실시예 5. ^{EGFR} 미니세포_{Dox}를 이용한 7마리의 후기 뇌 암 개의 치료 및 항-종양 효능**
- [0213] 본 연구의 개는 호주 시드니의 Veterinary Specialist Centre(VSC) 또는 Small Animal Specialist Hospital(SASH)에 환자로 있는 애완용 개였다. 연구 참여는 개 주인에 의해 표준 요법이 거절된 환자, 또는 어떠한 의미 있는 표준 요법도 존재하지 않는 진행된 질환의 경우에 제공되었다. 실험실 동물의 케어 및 사용에 대한 호주 가이드라인 National Health 및 Medical Research Council 및 EnGeneIC Animal Ethics Committee 승인에 따라 개를 치료하였다. 사인된 사전 동의서를 모든 개주인으로부터 얻었다. 모든 환자는 그 당시에 또는 임의의 원인에 의한 사망시 부검 검사를 받았다.
- [0214] 모든 뇌 종양은 실현가능한 경우 조직학 또는 세포학에 의해 진단하였다. 생전 진단(Antemortem diagnose)은 자기 공명 영상법(MRI) 상의 특징적인 외관 및 임상적 징후의 조합을 기초로 하였다. 조직학적 진단은 이들 뇌 종양의 경우에 너무 침습적인 것으로 고려되어 부검에 의해 진단을 확인하였다.
- [0215] 사용된 병기결정(staging) 방법은 종양의 조직학적 유형 및 해부학적 부위와 임상적 상태에 따라 다양하였다. 이들에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 신체 검사, 전혈구 계산, 혈청 생화학 프로파일, 소변 검사, 응고 프로파일, 흉부 방사선 사진, 복부 초음파 및 자기 공명 영상법(MRI)이 포함된다. MRI 스캔은 1.5T Phillips Achieva를 이용해 수행하였다.
- [0216] 개가 요법을 받기에 충분한 수행 상태와 혈액학적 및 혈청 생화학적 매개변수를 갖는다면, 이들은 연구에 적합하였다. 모든 개는 연구 진입시 측정가능한 질환을 가졌으나 질환의 단계 또는 질환 부담에 대한 어떠한 제한도 없었다. 환자는 발작 및 CNS 부종의 예방을 보조하기 위해 약물치료를 지속하도록 허락되었다. 동시 상태에 대해 이전에 처방된 약물치료를 또한 지속하도록 허용되었다. 대체 요법은 시험 기간 동안 허락되지 않았다.
- [0217] 용량 당 1×10^{10} 개 ^{EGFR} 미니세포_{Dox}로의 치료를 주 단위로 수행하였다. 치료는 무균적으로 위치한 말초 혈관 카테터(왼쪽 둔부)를 통해 2분 주입에 걸쳐 2 ml를 투여하였다.
- [0218] 환자를 병원에 입원시키고, 혈액 3 ml를 경정맥 천자(jugular venipuncture)를 통해 수집하였다. 이를 혈액학 분석을 위해 칼륨 EDTA 내에, 생화학 분석을 위해 혈청 응고 활성화자 튜브 내에 놓아두었다. 추가의 5 ml를 ^{EGFR} 미니세포_{Dox} 투여-전 및 미니세포 투여 후 4시간 췌에 수집하였다. 임상 치료 기간 동안 내내 개를 모니터링했고, ^{EGFR} 미니세포_{Dox} 치료 후 4시간까지 임의의 독성 부작용이 없는 경우, 개를 집으로 보냈다.
- [0219] 혈액을 멸균 튜브에 넣고, 실온(20 내지 22℃)에서 15분 동안 $1,580 \times g$ 에서 원심분리하고, 혈청을 무균적으로 수집하였다. 혈청을 사이토카인 또는 항체 반응 프로파일링이 필요할 때까지 -80℃에서 저장하였다. 환자를 치료 15분 전에 0.5 mg/kg의 클로르페니라민 말리에이트 및 0.2 mg/kg의 텍사메타손 나트륨 포스페이트로 사전-약물치료하였다.

- [0220] 뇌의 임상 관찰 및 MRI를 이용한 초기 임상 병기결정을 겪은 7마리의 후기 뇌 암 개에서 사례 연구를 수행하였다.
- [0221] BCD-1 내지 BCD-7로 명명된 개 환자는 발작, 운동실조, 부분적 사지 마비, 주변시력의 부분적 손실 및 공격적인 행동을 포함하는 후기 뇌 종양의 전형적인 임상 징후를 보였다(하기, 표 2 참고).
- [0222] 1×10^{10} EGFR 미니세포_{Dox} (2 ml)의 정맥내(i.v.) 볼루스 주사를 1주일에 1회 개에게 투여하였고, 임상 평가, 혈청 혈액학, 생화학, 면역 반응(미니세포 우세 항원, LPS에 대한 항체 역가) 및 사이토카인 반응 연구를 매주 수행하였다. 뇌의 MRI 스캔은 대략 매 8주 마다 수행하여 항-종양 반응을 측정하였다. 개에 투여된 미니세포의 용량은 후기 혈관육종을 갖는 20마리의 개에 대한 연구와 붉은털 원숭이에서의 독성학 연구로부터 미리 결정하였다(데이터 도시하지 않음).
- [0223] 결과는 뇌 종양의 비정상 임상 증상이 EGFR 미니세포_{Dox}의 대략 5 내지 15 용량 후, 정상으로 회복된 임상 병기결정 시점에서(표 2)에서 측정되었음을 보였다.
- [0224] 반응을 MRI 스캔으로 평가하였다. 반응을 고형 종양에 대한 Response Criteria In Solid Tumors(RECIST v 1.1)에 따라 분류하였다. 추가적으로, 뇌 종양 용적을 다음의 식을 사용해 결정하였다: 가로 x 세로 x 높이 x ($\pi/6$). 완전한 반응(CR)은 모든 알려진 총 질환의 소멸로서 정의하였고, 부분적 반응(PR)은 기저선으로부터 종양 크기가 $\geq 50\%$ 감소하였지만 CR은 아닌 것으로서 정의하였고, 안정한 질환은 기준 또는 CR, PR 또는 진행성 질환을 충족하지 않는 종양에 대해 지정되었고, 진행성 질환(PD)은 종양 크기가 $\geq 25\%$ 증가하거나 신규한 병변의 출현으로서 정의하였다.
- [0225] MRI 스캔은 모든 개에서, 종양 성장이 정지하였고, BCD-2의 한 사례에서 EGFR 미니세포_{Dox}의 단 5회 용량 후에 큰 종양 덩어리의 증거가 전혀 없었음을 보여주었다(도 5).
- [0226] **실시예 6. EGFR 미니세포_{Dox}의 반복된 투약에도 불구하고 뇌 암을 갖는 개에서 독성의 부재**
- [0227] 독성을 위장관의 기능장애의 징후(식욕부진, 설사, 구토, 및 장염) 및 체질적 징후(무기력/피로)에 대한 고객 설문지에 의해 평가하였다. 혈액학적 및 생화학적 독성을 각각의 치료 전에 주 단위로 측정하였다. 독성은 개 및 고양이 v1.0에서 화학요법 또는 생물학적 항-신생물 요법 이후 Veterinary Co-operative Oncology Group-common terminology criteria for adverse events(VCOG-CTCAE)에 따라서 등급을 매겼다.
- [0228] 체중은 치료 기간 내내 변화없이 유지되었다. 체온은 투약 후 처음 한시간 이내에 38.5°C에서 39°C로 증가하였고 4시간 내에 정상으로 돌아왔다.
- [0229] EGFR 미니세포_{Dox}의 투약 전 및 투약 후 4시간 내에 개로부터 혈청(5 ml)을 수집하였다. 혈청 생화학 및 혈액학 프로파일의 평가(도 6 및 7)는 IDEXX Laboratories(Sydney, Australia)에서 수행하였다. 개에 대한 참조 범위는 IDEXX laboratories에서 제공받았다.
- [0230] 혈청 생화학 매개변수는 정상 참조 범위 내에 유지되었다(도 6). 초기 임상 병기결정 시점에서, 모든 개는 간 효소 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 및 알칼라인 포스페이트(ALP)가 현저히 상승함을 보였는데, 이는 모든 개가 제어하기 어려운 1일 1회 0.5 내지 2 mg/kg 범위의 용량으로 글루코코르티코이드(프레드니솔론) 및 페노바르비톤(1 mg 1일 2회)으로 통상적으로 치료받았기 때문일 것이다. 간 초음파를 모든 개에 대해 정기적으로 수행하였고, 간 종양에 대한 어떠한 징후도 보이지 않았다. 연구 전반에 걸쳐, 간은 정상적으로 남아 있었고, 이는 EGFR 미니세포_{Dox}의 반복 투약에도 불구하고 간에서 어떠한 부작용도 나타내지 않았음을 지시한다.
- [0231] 모든 개에 대한 혈액학적 지표가 또한 연구 전반에 걸쳐 정상 범위 내에 유지되었다(도 7).
- [0232] **실시예 7. EGFR 미니세포_{Dox}의 반복 투약 후 뇌 암 개에서 사이토카인 및 항체 반응**
- [0233] 개 혈청을 제조자의 지시에 따라 각각의 ELISA의 검증 후 R&D Systems (USA) 에 의해 제공되는 ELISA 이중세트

키트를 사용하여 개 염증 사이토카인 TNF α , IL-6 및 항-염증성 사이토카인 IL-10에 대해 분석하였다. 고도 결합성 마이크로웰 플레이트(Greiner)를 TMB 기질(Sigma)을 사용해 발색시키고, Biotek uQuant 플레이트 판독기로 450 nm에서 판독하였다.

[0234] 염증성 사이토카인 TNF α 반응은 각각의 개마다 다양했고, 일정한 패턴을 보이지 않았다. 3마리의 개(BCD-2, -4 및 -6)는 반복 투약에도 불구하고 TNF α 상승이 전혀 나타나지 않았다(도 8). BCD-5 및 BCD-7 역시 각각 용량 9 및 10까지 TNF α 상승이 전혀 나타나지 않았던 반면, 후속된 3 및 7 용량 각각은 유의미한 증가를 보였지만 임상적인 위해 징후는 전혀 없었다. BCD-1은 임상 병기결정 시점에서 상승된 TNF α 를 가졌고 ^{EGFR}미니세포_{Dox}의 후속된 97 용량은 TNF α 에서 추가적인 상승을 나타내지 않았다.

[0235] 염증성 사이토카인 IL-6은 투약 후 4시간째에 경향성을 보였는데(도 8), 24시간 째에 정상으로 돌아오는 IL-6의 작은 스파이크가 있었다. 후속된 용량은 IL-6 스파이크의 증대를 초래하지 않았고, 이러한 경향성은 각각의 용량 후 동일하게 유지되었다. 연구 전반(288일에 걸쳐 39 용량)에 걸쳐 IL-6가 정상으로 유지된, BCD-4는 예외였다.

[0236] 흥미롭게도, 항-염증성 사이토카인 IL-10은 TNF α 및 IL-6에 스파이크가 있을 경우 상승하였다(도 8). 단핵구 및 대식세포가 박테리아 LPS와 같은 다양한 매개를 이용한 활성화 후에 IL-10을 분비한다는 것을 잘 확립되어 있다.

[0237] S. 티피뮤리움(S. typhimurium)으로부터 정제한 LPS(Sigma)를 코팅 완충액(10 mM Na 카르보네이트 pH 9.6) 중에서 웰(250 ng/웰)에 도말하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션시켰다. 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 PBS 중에 1% BSA를 함유하는 차단 완충액으로 차단하였다. 혈청 시료의 연속 희석물을 각각의 플레이트에 첨가하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션시켰다. 세척 후, 결합된 항체를 염소 항-개 IgG 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP) 접합체(RDI)로 검출하였다.

[0238] 항체 역가를 최대 반값 광학 밀도(450 nm) 판독을 부여하는 반비례 혈청 희석으로서 정의하였다. KC Junior Software를 사용하여 각각의 혈청 시료에 대해 2개의 매개변수 곡선을 맞추었다. 모든 시료를 2회 반복 분석하고 데이터를 평균의 표준 오차로 표현했다.

[0239] O-다당류 혈청 항체 역가는 용량 3(3주에 걸쳐)에 의한 IgG 역가의 20배 증가를 보이는 전형적인 반응을 나타내었고(도 9), 각각의 개에 대한 연구 과정 전반에 걸쳐 어떠한 추가적인 상승 없이 정체기에 도달했다. 이는, LPS의 O-다당류 성분이 T-세포 의존성 유형 1 항원인 것으로 알려져 있고 이들 항원이 미토겐성 수용체, 예를 들면 Toll-유사 수용체(TLR)를 자극함으로써 일차적으로 B 세포를 활성화하기 때문에 놀랍지 않다.

[0240] 실시예 8. 투여된 ^{EGFR}미니세포_{Dox}의 반복 투약 횟수 및 후기 뇌 암을 갖는 개의 생존

[0241] 흥미롭게도, 개 BCD1 내지 BCD7은 각각 822, 709, 471, 288, 408, 140 및 101일 동안 생존하였고, 각각 97, 43, 44, 39, 32, 20 및 13 용량의 ^{EGFR}미니세포_{Dox}를 투여받았다(도 10). BCD-2, -3 및 -5는 진행중이고 BCD-2는 종양의 재발 없이 300일에 걸친 기간 동안 용량을 투여받지 않았다. BCD-4는 288일 동안 생존했고 안정한 질환 상태를 유지하였지만, 신장 감염으로 사망했다. 사후 분석은 사망이 뇌 종양과 관련이 없었음을 나타내었다. 놀랍게도, 전신적으로 투여된 ^{EGFR}미니세포_{Dox}의 매우 많은 횟수의 투약에도 불구하고, 부작용의 어떠한 임상적 징후도 없었다.

[0242] 실시예 9. 후기 뇌 암을 갖는 2마리 개의 뇌에서 ^{EGFR}미니세포의 생체내 이미징

[0243] 특히 대 동물 중에서, 생체내 나노입자 생물분류는 입자의 아주 작은 크기, 시각화를 가능하게 하는 입자 당 충분한 형광 분자를 보유하기 위한 능력 및 임의의 특정 기관에서 생체내 달성된 농도로 인해 방해받았다. 추가적으로, 12 nm 보다 더 큰 나노입자는 BBB의 존재 때문에 뇌 종양으로 진입하지 못할 것이라는 것이 현재의 이해이다. 그러나, 모든 7마리의 개에서 관찰된 현저한 항-종양 효능은 ^{EGFR}미니세포_{Dox}가 그의 무섭도록 큰 크기인 ~ 400 nm에도 불구하고 뇌 종양 내로의 진입을 어떻게든 달성하는지 여부를 결정할 것을 촉구한다.

- [0244] ^{EGFR}미니세포를 ¹²³아이오딘으로 방사성-표지하였고, 1×10^{10} 개 미니세포를 BCD-3 및 BCD-5에 i.v. 투여하였다. 개를 진정시키고, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT)를 사용해 이미지화하였다. 두 마리 개 모두는 또한 사전 MRI 스캔을 하여 종양 크기 및 위치를 명백히 보여주었다.
- [0245] 대략 40 MBq의 방사성표지된 [¹²³I]-^{EGFR}미니세포를 동물에게 주사하고, 이후의 4시간에 걸친 다양한 시점에서 이미지화하였다. 모든 이미지화는 저 에너지, 다목적 평행 홀 조준기가 장착된 Picker 3000XP 삼중-검출기 SPECT(Single Photon Emission Computed Tomography) 감마 카메라 상에서 수행하였다. 모든 수득물은 159 keV $\pm 10\%$ 의 광피크 윈도우 세팅을 사용하였다. 동물은 이미지화 전에 약간의 빛을 주어 마취시켰다. 개 한마리(BCD-3)를 주사 후 30분 및 3시간 후에 생체분포 연구를 위해 바로누운 자세에서 비-단층촬영으로 이미지화하였다. 머리 및 몸통을 포함하는 다중 평면 이미지를 두 시점 모두에서 베드 위치 당 2분 동안 256 x 256 매트릭스로 수집하고, 획득-후 결합하여 전신 2D 스캔을 수득하였다. 모든 단층촬영(SPECT) 이미지는 투사 당 20초 동안 3° 라디칼 증가의 120 투사(총 360°)를 사용하여, 128 x 28 매트릭스로 획득하였다. 모든 데이터를 오프라인 핵 의학 워크스테이션(HERMES, Nuclear Diagnostic, Stockholm, Sweden)으로 옮기고, 반복성 재구성 알고리즘(OSEM, 8 서브세트, 4회 반복)을 사용해 재구성하였다. 이미지를 2.0의 소프트웨어 줌으로 재구성하여 1.78 x 1.78 x 2.56 mm(X x Y x Z)을 측정하는 복셀(voxel)을 수득하였다. 재구성 후의 이미지를 등급 10의 버터워스 필터(Butterworth filter) 및 1.25 사이클.픽셀-1의 컷-오프로 여과하였다. 개에 대한 이전에 얻은 MRI 스캔을 워크스테이션으로 불러오고 해부학적(MRI) 및 기능적(SPECT) 스캔을 소프트웨어에 등록하였다.
- [0246] 전신 스캔(도 11ci 및 ii)은 가장 빠른 시점(주사 후 30분)으로부터 간에서 표지된 [¹²³I]-^{EGFR}미니세포의 강한 흡수를 보여주었다. 갑상선의 초기 시각화의 부재에 더하여, 이러한 사실은 미니세포의 우수한 표지화를 나타냈다. 목에서 일부 좌우대칭 선(glandular) 흡수 및 존재하는 (추정의) 유리 [¹²³I]-요오드의 소량의 갑상선 흡수와 마찬가지로, 장 내로의 배출은 이후의 이미지에서 가시적이었다.
- [0247] 뇌의 SPECT 이미지(도 11ai-iii 및 11biii; SPECT)는 MRI 스캔(도 11ai-iii 및 11bi; MRI) 상에서 나타난 뇌 종양에 상응하는 영역에서 방사능의 집중을 나타내었다. 동시-등록된 T1 후-대조 MRI 및 SPECT 적층 이미지(도 11ai-iii 및 11bii; SPECT/MRI)는 집중된 방사능이 각각의 개의 종양의 중심에 국소화되었음을 보여주었다.
- [0248] 이들 실시예는 본 발명으로 달성된 전례없는 결과인, 후기 뇌 종양을 갖는 사례의 전부(100%)에서 항-종양 효능을 증명한다. 이는 또한 다음의 고려사항을 고려해 볼 때 매우 놀라운 결과이다.
- [0249] 1. 파클리탁셀(853.9 달톤) 및 빈블라스틴(810.9 달톤)과 같은 대략 독소루비신(579.98 달톤)과 유사한 크기인 약물은 지금까지는 뇌 종양의 전신성(i.v.) 전달 및 치료를 위해 고려되지 못했다. 상기 논의된 바와 같은, 약 400 달톤의 합의된 컷오프(cutoff)를 고려할 때, 이들은 BBB를 횡단할 것으로 전혀 예상되지 않았다.
- [0250] 2. 수십년간의 연구는 뇌 암의 치료를 위한 유일한 FDA-승인된 약물로서 테모졸로마이드를 양산하였다; 이는 테로졸로마이드가 BBB를 횡단하기 위한 인지된 400-달톤 컷오프 미만인 194.15 달톤의 분자량을 갖기 때문이다.
- [0251] 3. 뇌 종양의 치료를 위해 고려되었다고 하더라도, 통상적인 화학요법에서 독소루비신은 일반적으로 평균 환자(60 kg)에게 100 mg 내지 125 mg의 용량으로 투여된다. 이는 일부 암을 치료하는데 있어서 치료 효과를 달성하기 위해 최소인 것으로 여겨지는 i.v 용량 당 100,000 μ g 내지 125,000 μ g에 해당한다. 대조적으로, 본 발명에 따르면, 1×10^{10} 개 ^{EGFR}미니세포_{Dox} 내에 보유된 독소루비신 용량은 약 4 μ g이며, 이는 통상적인 dox 화학요법을 위해 투여된 용량에 비해 25,000-배 내지 31,250-배 낮은 것이다. 본 발명에 따르면, 통상적인 수행과의 이러한 차이는 암 치료의 현재의 이해와 통합하여 임상학자가 뇌 암의 상황은 고사하고, 임의의 상황에서 이러한 낮은 약물 용량의 가능성을 고려하는 것을 단념할 것이다.
- [0252] 4. 본 발명에 따른 미니세포 전달 비히클의 사용은 상기 논의된, 컨센서스 크기 제한을 부인하고, 결과적으로 뇌 종양에서 파괴된 BBB의 통상적인 관점에 의해 안내된다. 그러나, 본 발명에 의해 수득된 데이터는 무손상, 박테리아 유래된 미니세포가 유의미한 농도로 뇌 종양 내로 빠르게 진입하며, 예를 들면 뇌 종양 미세환경에서 방사성 표지된 미니세포의 이미지화를 가능하게 함을 나타낸다. 이러한 결과는 이전에 오로지 난해한 결과에 의해서만 특정된 임상 종양학 분야에 있어서, 본 발명과 일치하는, 효과적인 치료적 패러다임을 강조하는 전례없는 성과인, 처리된 개체 모두에서의 아주 유의미한 종양 안정성/회귀를 또한 증명한다.

[0253] 표 2.

녀 암 개 (BCD)	체중 (kg)	체표면적 (m^2)	종	나이	수컷 / 암컷	병기결정 시점에서 임상적 징후	진단
BCD-1	23.18	0.81	래브라도-리트리버 교차종	5 년	수컷	측정과대증, 좌측으로 넘어짐, 좌측에 뇌신경 결실됨. 특히, 둔부에 실조증. 측변 보행 경향, "정방측면 동시 보행(half-pass)" 방식, 그러나 넘어지지 않았음. 중증의 근육 소모	맥락종암 (Choroid plexus carcinoma)
BCD-2	33.27	1.03	골든 리트리버	7 년 6개월	암컷	발작 후 나타남. 신경학적 검사는 우측 뒷다리에 서 자기수용 결손 나타냄.	N/A
BCD-3	8.65	0.42	테리어 교잡종	12 년	수컷	우측 안구에 동공 빛 반사의 부재	N/A
BCD-4	32.90	1.03	복서	10 년	암컷	발작 동안 나타남. 눈 양쪽 동공 및 반사 부재	별아교세포종
BCD-5	6.50	0.35	잭 러셀 테리어	15 년	수컷	발작 동안 나타남. 정면 우측 및 뒷쪽 우측 사지에 대한 상부 운동 뉴런 사인	N/A
BCD-6	22.66	0.80	스태퍼드셔 불 테리어	11 년	수컷	발작동안 나타남. 양쪽 뒷다리의 자기수용 결손. 모든 다른 관찰은 정상임.	불량하게 분화된 악성 수막종
BCD-7	23.50		복서	7 년	수컷	좌측으로 회전, 공격적 행동, 식욕부진, 체중 손실	잘 분화된 성상세포종

[0254]

[0255] 실시예 10. 미니세포 내로의 다양한 소 분자 약물의 패키징

[0256] 본 실시예는 미니세포 내로의 다양한 수의 소 분자 약물의 로딩의 실현가능성 및 생성된, 소 분자 약물-패키징된 미니세포-함유 조성물의 유의미한 항-종양 효능 둘 모두를 설명한다. 관련된 소 분자 약물은 하기와 같다:

[0257] A. 독소루비신,

[0258] B. 파클리탁셀,

[0259] C. 플루오로-파클리탁셀,

[0260] D. 시스플라틴,

[0261] E. 빈블라스틴,

[0262] F. 몬사트롤,

[0263] G. 티미딜레이트 신타제(TS) 억제제 OSI-7904

[0264] H. 이리노테칸,

[0265] I. 5-플루오로우라실,

[0266] J. 젬시타빈, 및

[0267] K. 카르보플라틴.

- [0268] 독소루비신, 빈블라스틴 및 파클리탁셀의 패키징. 무손상 미니세포 내로의 독소루비신, 형광 빈블라스틴 및 플루오로-파클리탁셀 패키징의 유효성은 본 발명자들의 문헌 [MacDiarmid *et al.*, *Cancer Cell* 11: 431-45 (2007)]에서 증명되었다. 문헌 [MacDiarmid *et al.*, *Cancer Cell* (2007)]의 도 1E에서는 상이한 형광 색을 이용하여 미니세포가 각각 다량의 독소루비신(DOX), 빈블라스틴(VIN) 및 파클리탁셀(PAC)과 함께 패키징되었음을 보여준다.
- [0269] 독소루비신, 플루오로-파클리탁셀 및 시스플라틴은 일단 패키징되면 미니세포로부터 유출되지 않았다. 문헌 [MacDiarmid *et al.*, *Cancer Cell* (2007)]은 동역학을 이용하여 약물(독소루비신, 플루오로-파클리탁셀 및 시스플라틴)이 무손상 미니세포 내로 충분히 로딩되었을 뿐만 아니라, 이들 약물이 일단 패키징되면 무손상 미니세포로부터 유출되지 않았음을 증명하였다(문헌의 도 2A 참고).
- [0270] 독소루비신 및 파클리탁셀 패키징된 미니세포는 유방암 이종이식을 치료하는데 유용했다. 또한, 문헌 [MacDiarmid *et al.*, *Cancer Cell* (2007)]의 도 4A에 나타나 있는 데이터는 인간 유방암 이종이식이 독소루비신 - 또는 파클리탁셀-패키징된 미니세포로 효과적으로 치료되었음을 보여준다.
- [0271] 모나스트롤-패키징된 미니세포의 항-종양 효과. 본 발명자들에 의해 공개된 다른 문헌 [MacDiarmid *et al.*, *Cell Cycle* 17: 1-7 (2007)]은 인간 유방암 이종이식편을 포함하는 마우스에서 종양 성장을 억제하는데 있어서 모나스트롤-패키징된 미니세포의 유효성을 증명하기 위한 데이터를 제시하였다(문헌의 도 1A 참고).
- [0272] 도 1A에서 나타낸 바와 같이, 모나스트롤은 무손상 미니세포 내로 효과적으로 패키징되었고, 인간 유방암 이종이식편은 모나스트롤-패키징된 미니세포로 효과적으로 치료되었다.
- [0273] 티미딜레이트 신타제 억제제 OSI-7904로 패키징된 미니세포의 항-종양 효과. 유사하게 인간 결장암 이종이식편이 약물-로딩된 미니세포로 효과적으로 치료되었다. 문헌 [MacDiarmid *et al.*, (2007)]의 도 1B는 OSI-7904-로딩된 미니세포가 OSI-7904L의 리포솜 제형 보다 ~385배 더 적은 용량에서 이보다 더욱 효과적임을 보여준다. 따라서 미니세포 전달 벡터는 OSI-7904의 치료적 지표를 현저하게 증가시켰다.
- [0274] 이리노테칸-내성 인간 결장암 이종이식편의 효과적인 치료. 이리노테칸을 또한 무손상 미니세포 내로 패키징하였다. 또한, shRNA-MDR1-패키징된 미니세포에 있어서 이리노테칸-표적된 미니세포를 이용한 이중 순차 치료 후 이리노테칸-내성 인간 결장암 이종이식편의 효과적인 치료가 본 발명자들의 다른 문헌 [MacDiarmid *et al.*, *Nature Biotechnology* 27: 643-51 (2009)]의 도 5A 및 5B에서 증명되었다.
- [0275] 5-플루오로우라실-내성 인간 결장암 이종이식편의 효과적인 치료. 이리노테칸과 같이, 5-플루오로우라실을 또한 무손상 미니세포 내로 패키징시키고, 5-플루오로우라실-내성 인간 결장암 이종이식편의 효과적인 치료를 shRNA-MDR1-패키징된 미니세포에 있어서 5-플루오로우라실-표적된 미니세포를 이용한 이중 순차 치료 후에 달성하였다. 문헌 [MacDiarmid *et al.*, (2009)]의 보충 도면 4A 및 4B를 참고하라.
- [0276] 젬시타빈(Gemzar®)-패키징된 미니세포로 인간 췌장암 이종이식편의 효과적인 치료. 도 12는 인간 췌장암 이종이식편이 젬시타빈(Gemzar®)-패키징된 미니세포로 효과적으로 치료되었음을 증명한다.
- [0277] Balb/c *nu/nu* 마우스에서 인간 췌장암(MIA PaCa) 이종이식편을 유리 Gemzar 또는 EGFR-표적된, Gemzar-패키징된 미니세포(^{EGFR}미니세포_{Gemzar}) 중 하나와 i.v. 투여하였다. 도 12는 미니세포가 ~50 ng의 Gemzar만을 보유하고 있다고 하더라도, ^{EGFR}미니세포_{Gemzar} 치료의 항-종양 효능은, 항-종양 효능 측면에서 용량 당 400,000 ng의 용량으로 주어지는 유리 Gemzar 만큼 효과적이었음을 보여준다.
- [0278] 인간 유방암 이종이식편 치료에 있어서 카르보플라틴. 인간 유방암 이종이식편을 치료하기 위한 카르보플라틴-패키징된 미니세포의 효과를 도 13에서 증명하였다.
- [0279] Balb/c *nu/nu* 마우스에서 인간 유방암(MDA-MB-468) 이종이식편을 유리 카르보플라틴 또는 카르보플라틴으로 패키징된 비-표적된 미니세포 또는 EGFR-표적된, 카르보플라틴-패키징된 미니세포(^{EGFR}미니세포_{카르보플라틴})와 i.v. 투여하였다. 도 13에서의 결과는 카르보플라틴의 용량이 유리 카르보플라틴 용량 보다 ~1,000-배 더 낮았음에도 불구하고, ^{EGFR}미니세포_{카르보플라틴} 치료가 종양 안정화를 달성하는데 훨씬 효과적이었음을 보여준다.

[0280]

인용 문헌

- Allard, E., Passirani, C., Benoit, J.P. Convection-enhanced delivery of nanoparticles for the treatment for brain tumors. *Biomaterials* **30**, 2302-2318 (2009).
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., Delattre, J.Y. Primary brain tumours in adults. *Lancet* **361**, 323-331 (2003).
- Bickel, U. How to Measure Drug Transport across the Blood-Brain Barrier. *NeuroRx*. **2**, 15–26 (2005).
- Black, K.L., Ningaraj, N.S. Modulation of brain tumor capillaries for enhanced drug delivery selectively to brain tumor. *Cancer Control* **11**, 165-73 (2004).
- Bobo, R.H., Laske, D.W., Akbasak, A., Morrison, P.F., Dedrick, R.L., Oldfield, E.H. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 2076–2080 (1994).
- Borst, P. *et al.* A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1295-1302 (2000).
- Caravella J., Lugovskoy, A. Design of next-generation protein therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 520-528 (2010).
- Britton, R.A., Lin, D.C., Grossman, A.D. Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev.* **12**, 1254-9 (1998).
- Caplen, N.J. RNAi as a gene therapy approach. *Expert Opin. Biol. Ther.* **3**, 575-86 (2003).
- Caplen, N.J., Mousses, S. Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **1002**, 56-62 (2003).
- Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renfel, M., Dehouck, M.P., Fenart, L. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 650-661 (2007).
- Chu, C.Y., Rana, T.M. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.* **4**, e210 (2006).

[0281]

- Clark-Curtiss, J.E., Curtiss, R. III Analysis of recombinant DNA using *Escherichia coli* minicells. *Methods Enzymol.* **101**, 347-62 (1983).
- Da Silva L *et al.* HER3 and downstream pathways are involved in colonization of brain metastases from breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, R46 (1-13) (2010).
- Debinski, W., Gibo, D.M. (2000) Molecular expression analysis of restrictive receptor for interleukin 13, a brain tumor-associated cancer/testis antigen. *Mol. Med.* **6**, 440-449 (2000).
- Debinski, W., Slagle, B., Gibo, D.M., Powers, S.K., Gillespie, G.Y. Expression of a restrictive receptor for interleukin 13 is associated with glial transformation. *J. Neurooncol.* **48**, 103-111 (2000).
- de Boer, P.A., Crossley, R.E., Rothfield, L.I. Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 63-70 (1992).
- Dehouck, B., Dehouck, M.P., Fruchart, J.C., Cecchelli, R. Upregulation of the low-density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J. Cell Biol.* **126**, 465-473 (1994).
- Duan, Z., *et al.* Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 833-8 (2004).
- Duxbury, M.S., *et al.* Systemic siRNA-mediated gene silencing : A new approach to targeted therapy of cancer. *Ann. Surg.* **240**, 667-74 (2004).
- Eichler, A.F., Loeffler, J.S. Multidisciplinary management of brain metastases. *Oncologist* **12**, 884-98 (2007).
- Fox, B.D., Cheung, V.J., Patel, A.J., Suki, D., Rao, G. Epidemiology of metastatic brain tumors. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **22**, 1-6 (2011).
- Fukuda, M. Radiolabeling oligosaccharides after mild periodate oxidation. *Curr. Protocols Molec. Biol.* (Suppl. 26), 17.5.1-17.5.8 (1994).
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Shiekhattar, R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol. Biol.* **342**, 33-47 (2006).

[0282]

- Groothuis, D.R. The blood-brain and blood tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro-oncol.* **2**, 45-59 (2000).
- Hadjipanayis, C.G., Fellows-Mayle, W., Deluca, N.A. Therapeutic efficacy of a herpes simplex virus in combination with radiation or temozolomide for intracranial glioblastoma after convection enhanced delivery. *Mol. Ther.* **16**, 1783-1788 (2008).
- Hadjipanayis, C.G., Machaidze, R., Kaluzova, M., Wang, L., Schuette, A.J., Chen, H., *et al.* EGFRvIII antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Res.* **70**, 6303-6312 (2010).
- Hassenbusch, S.J., Gunes, S., Wachsmann, S., Willis, K.D. Intrathecal clonidine in the treatment of intractable pain: a phase I/II study. *Pain Med.* **3**, 85-91 (2002).
- Hau, V.S., Huber, J.D., Campos, C.R., Lipkowski, A.W., Misicka, A., Davis, T.P. Effect of guanidino modification and proline substitution on the in vitro stability and blood-brain barrier permeability of endomorphin II. *J. Pharm. Sci.* **91**, 2140-9 (2002).
- Hawkins, B.T., Davis, T.P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological Reviews* **57**, 173-185 (2005).
- Hershey, G.K. IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 677-690 (2003).
- Higgins, R.J. *et al.* Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR, PDGFR alpha and IGFBP2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping. *J. Neurooncol.* **98**, 49-55 (2010).
- Hiraga, S., Niki, H., Ogura, T., Ichinose, C., Mori, H., Ezaki, B., Jaffe, A. Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J. Bacteriol.* **171**, 1496-1505 (1989).
- Hu, Z., Lutkenhaus, J. Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Mol. Microbiol.* **34**, 82-90 (1999).

[0283]

Ireton, K., Gunther, N.W. 4th, Grossman, A.D. spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**, 5320-9 (1994).

Jarboe, J.S., Johnson, K.R., Choi, Y., Lonser, R.R., Park, J.K. Expression of interleukin-13 receptor $\alpha 2$ in glioblastoma multiforme: Implications for targeted therapies. *Cancer Res.* **67**, 7983-7986 (2007).

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* **59**, 225-49 (2009).

Juillerat-Jeanneret, L. The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? *Drug Discov. Today* **13**, 1099-1106 (2008).

Khalil, A.M. *et al.* Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **106**, 11667-72 (2009).

Kota, J. *et al.* Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* **137**, 1005-17 (2009).

Kreuter, J., Alyautdin, R.N., Kharkevich, D.A., Ivanov, A.A. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles), *Brain Res.* **674**, 171-174 (1995).

Kreuter, J., Petrov, V.E., Kharkevich, D.A., Alyautdin, R.N. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles, *J. Control. Release* **49**, 81-87 (1997).

Kreuter, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 65-81 (2001).

Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Ramge, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., Alyautdin, R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier, *J. Drug Target.* **10**, 317-325 (2002).

[0284]

- Kreuter, J., Ramege, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S.E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., von Briesen, H., Begley, D.J. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles, *Pharm. Res.* **20**, 409–416 (2003).
- Kreuter, J., Gelperina, S. Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori* **94**, 271–277 (2008).
- Kroll, R.A., Neuwelt, E.A. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery* **42**, 1083-99 (1998).
- Kusuhara, H., Sugiyama, Y. (2005) Active efflux across the blood–brain barrier: role of the solute carrier family. *NeuroRx* **2**, 73-85 (2005).
- Lamborn, K.R. *et al.* Progression-free survival: an important end point in evaluating therapy for recurrent high-grade gliomas. *Neuro Oncol.* **10**, 162-70 (2008).
- Laquintana, V., Trapani, A., Denora, N., Wang, F., Gallo, J.M., Trapani, G. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. *Expert Opin. Drug Deliv.* **6**, 1017-1032 (2009).
- Loscher, W., and Potschka, H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog. Neurobiol.* **76**, 22-76 (2005).
- Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109 (2007).
- MacDiarmid, J.A. *et al.* Bacterially derived 400 nm particles for encapsulation and cancer cell targeting of chemotherapeutics. *Cancer Cell* **11**, 431–445 (2007).
- MacDiarmid, J.A., Madrid-Weiss, J., Amaro-Mugridge, N.B., Phillips, L. & Brahmabhatt, H. Bacterially-derived nanocells for tumor-targeted delivery of chemotherapeutics and cell cycle inhibitors. *Cell Cycle* **6**, 2099–2105 (2007).
- MacDiarmid, J.A. *et al.* Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug. *Nat. Biotechnol.* **27**, 643-651 (2009).
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* **19**, 311–330 (2005).

[0285]

Morrison, P.F., Laske, D.W., Bobo, H., Oldfield, E.H., Dedrick, R.L. High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. *Am. J. Physiol.* **266**, R292–305 (1994).

Nicolazzo, J.A., Katneni, K. Drug transport across the blood–brain barrier and the impact of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Curr. Top. in Med. Chem.* **9**, 130-147 (2009).

Nieth, C., *et al.* Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett.* **545**, 144-50 (2003).

Oh, Y.K., Park, T.G. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 850-62 (2009).

Okada, Y., Wachi, M., Hirata, A., Suzuki, K., Nagai, K., Matsuhashi, M. Cytoplasmic axial filaments in Escherichia coli cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division. *J. Bacteriol.* **176**, 917-22 (1994).

Okada, H., *et al.* Expression of glioma-associated antigens in pediatric brain stem and non-brain stem gliomas. *J. Neurooncol.* **88**, 245–250 (2008).

Ortiz-Zapater *et al.* Key contribution of CPEB4-mediated translational control to cancer progression. *Nature Medicine*, doi: 10.1038/nm.2540 (published on-line December 4, 2011).

Palmieri, D., Bronder, J.L., Herring, J.M., Yoneda, T., Weil, R.J., Stark, A.M., *et al.* Her-2 overexpression increases the metastatic outgrowth of breast cancer cells in the brain. *Cancer Res.* **67**, 4190–98 (2007).

Pardridge, W.M. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol. Biotechnol.* **30**, 57-70 (2005).

Pardridge, W.M. Drug targeting to the brain. *Pharm. Res.* **9**, 1733-1744 (2007).

Pardridge, W.M. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today* **12**, 54–61 (2007).

Pardridge, W.M. Biopharmaceutical drug targeting to the brain. *J. Drug Target.* **18**, 157-167 (2010).

Pardridge, W.M. Drug transport in brain via the cerebrospinal fluid. *Fluids Barriers CNS* **8**, 1-4 (2011).

[0286]

- Petri, B., Bootz, A., Khalansky, A., Hekmatara, T., Muller, R., Uhl, R., *et al.* Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *J. Control. Release* **117**, 51-58 (2007).
- Rainov, N.G., Koch, S., Sena-Esteves, M. & Berens, M.E. Characterization of a canine glioma cell line as related to established experimental brain tumor models. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**, 607-613 (2000).
- Raskin, D.M. de Boer, P.A. MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 6419-6424 (1999).
- Reardon, D.A. *et al.* Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1389-97 (2002).
- Re, F., Cambianica, I., Zona, C., Sesana, S., Gregori, M., Rigolio, R., La Ferla, B., Nicotra, F., Forloni, G., Cagnotto, A., Salmona, M., Masserini, M., Sancini, G. Functionalization of liposomes with ApoE-derived peptides at different density affects cellular uptake and drug transport across a blood-brain barrier model. *Nanomedicine* **7**, 551-559 (2011)..
- Reeve, J.N., Cornett, J.B. Bacteriophage SPO1-induced macromolecular synthesis in minicells of *Bacillus subtilis*. *J. Virol.* **15**, 1308-16 (1975).
- Rice, S.L., Roney, C.A., Daumar, P., Lewis, J.S. The next generation of positron emission tomography radiopharmaceuticals in oncology. *Semin. Nucl. Med.* **41**, 265-282 (2011).
- Sabat, R. *et al.* Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 331-344 (2010).
- Sarin, H., Kanevsky, A.S., Wu, H., *et al.* Effective transvascular delivery of nanoparticles across the blood-brain tumor barrier into malignant glioma cells. *J. Transl. Med.* **6**, 80 (2008).
- Schinkel, A.H. P-glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv. Drug Del. Rev.* **36**, 179-194 (1999).
- Schinkel, A.H., Jonker, J.W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Del. Rev.* **55**, 3-29 (2003).
- Sioud, M. Therapeutic siRNAs. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 22-8 (2004).

[0287]

- Smith, J.S. *et al.* PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 1246–1256 (2001).
- Steiniger, S.C., Kreuter, J., Khalansky, A.S., Skidan, I.N., Bobruskin, A.I., *et al.* Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int. J. Cancer* **109**, 759–767 (2004).
- Stemmler, H.J., Schmitt, M., Willems, A., Bernhard, H., Harbeck, N., Heinemann, V. Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood–brain barrier. *Anticancer Drugs* **18**, 23–28 (2007).
- Stewart, L.A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* **359**, 1011–18 (2002).
- Stewart, P.S. and D’Ari, R. Genetic and morphological characterization of an *Escherichia coli* chromosome segregation mutant. *J. Bacteriol.* **174**, 4513–6 (1992).
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996 (2005).
- Sun, H. *et al.* (2003) Drug efflux transporters in the CNS. *Adv. Drug Del. Rev.* **55**, 83–105 (2003).
- Takeshita, F., *et al.* Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol. Ther.* **18**, 181–7 (2010).
- Weber, F.W. Local convection enhanced delivery of IL4-Pseudomonas exotoxin (NBI-3001) for treatment of patients with recurrent malignant glioma. *Acta Neurochir. Suppl.* **88**, 93–103 (2003).
- Wisse, E., Jacobs, F., Topal, B., Frederik, P., De Geest, B. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther.* **15**, 1193–1199 (2008).

[0288]

Wong, E.T. *et al.* Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2572-2578 (1999).

Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., Berger, M.S. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro. Oncol.* **4**, 278-299 (2002).

Wykosky, J., Gibo, D.M., Stanton, C., Debinski, W. Interleukin-13 receptor $\alpha 2$, EphA2, and Fos-related antigen 1 as molecular denominators of high-grade astrocytomas and specific targets for combinatorial therapy. *Clin Cancer Res.* **14**, 199-208 (2008).

Xin, H., Jiang, X., Gu, J., Sha, X., Chen, L., Law, K., *et al.* Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles as dual targeting drug delivery system for brain glioma. *Biomaterials* **32**, 4293-305 (2011).

Yagüe, E., *et al.* Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Ther.* **11**, 1170-4 (2004).

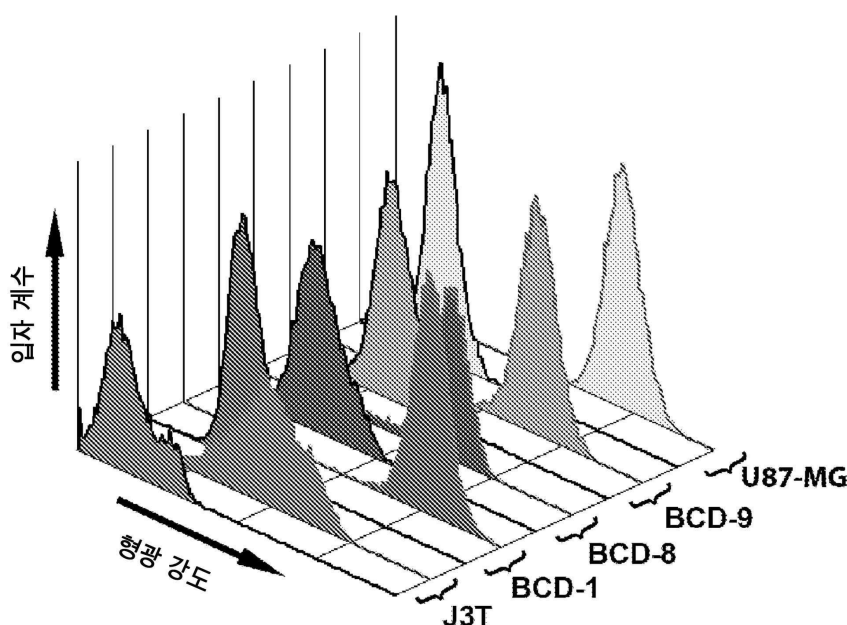
Yoshimasu, T., Sakurai, T., Oura, S., Hirai, I., Tanino, H., Kokawa, Y., *et al.* Increased expression of integrin $\alpha 3 \beta 1$ in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci.* **95**, 142-48 (2004).

Zensi, A., Begley, D., Pontikis, C., Legros, C., Mihoreanu, L., *et al.* Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *J. Control. Release* **137**, 78-86 (2009).

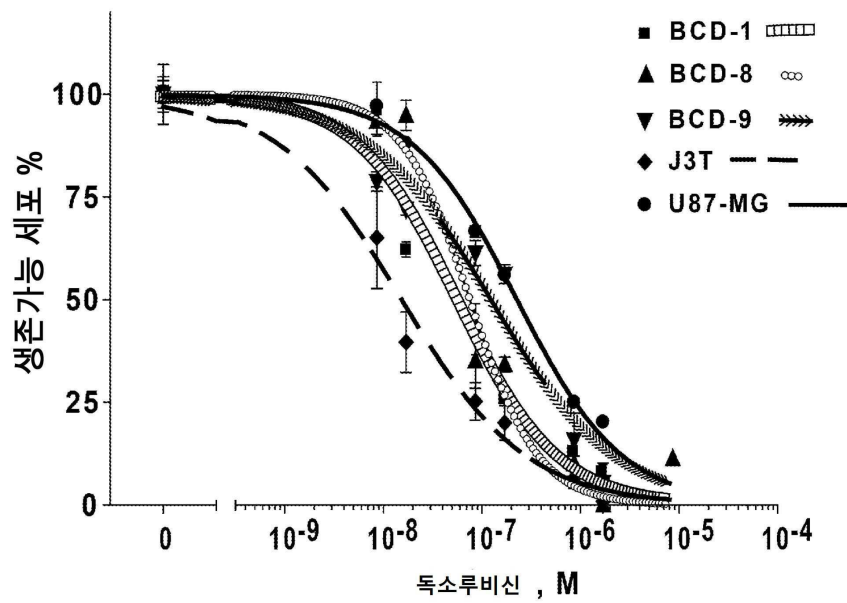
Zhang, Y., Pardridge, W.M. Conjugation of brain-derived neurotrophic factor to a blood-brain barrier drug targeting system enables neuroprotection in regional brain ischemia following intravenous injection of the neurotrophin. *Brain Res.* **889**, 49-56 (2001).

도면

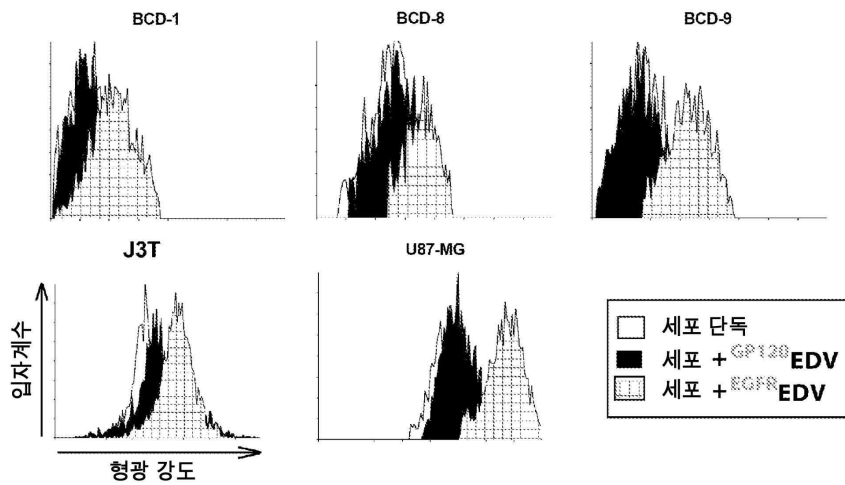
도면1



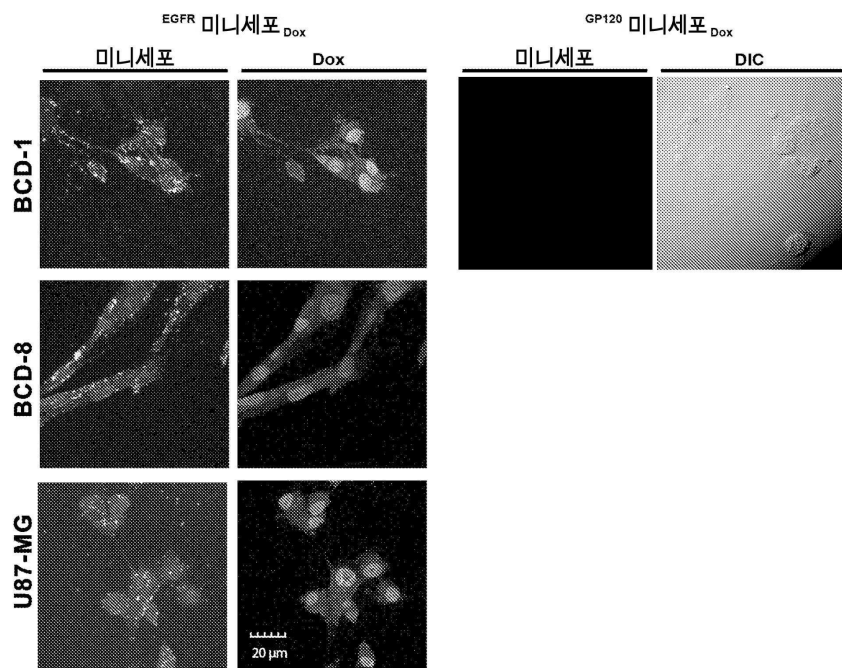
도면2



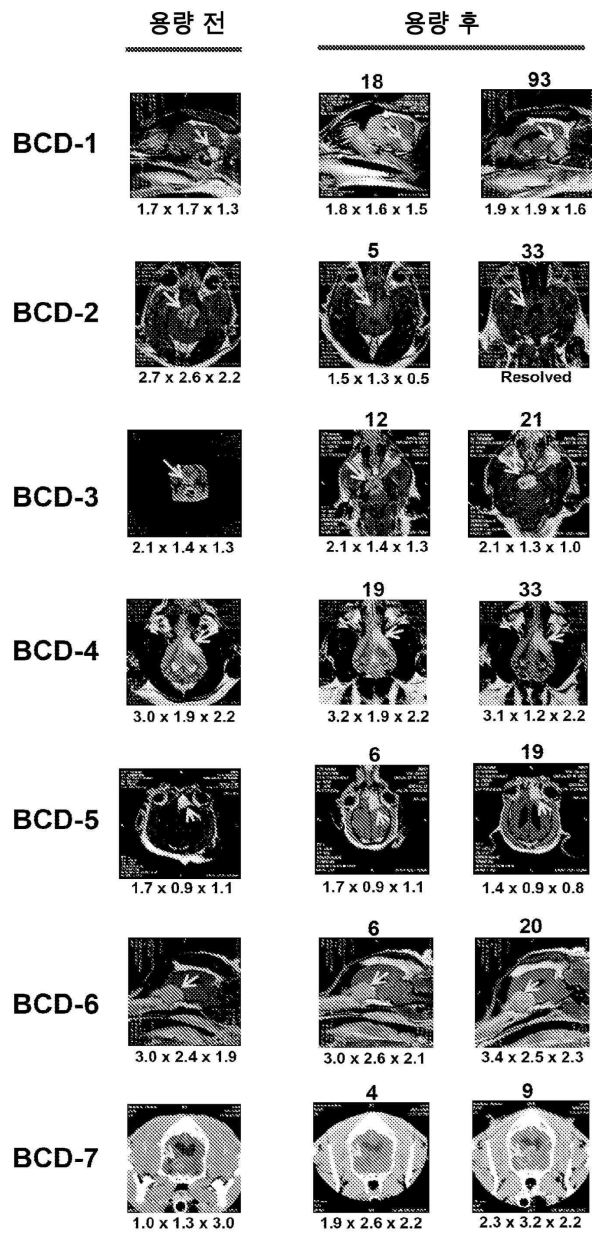
도면3



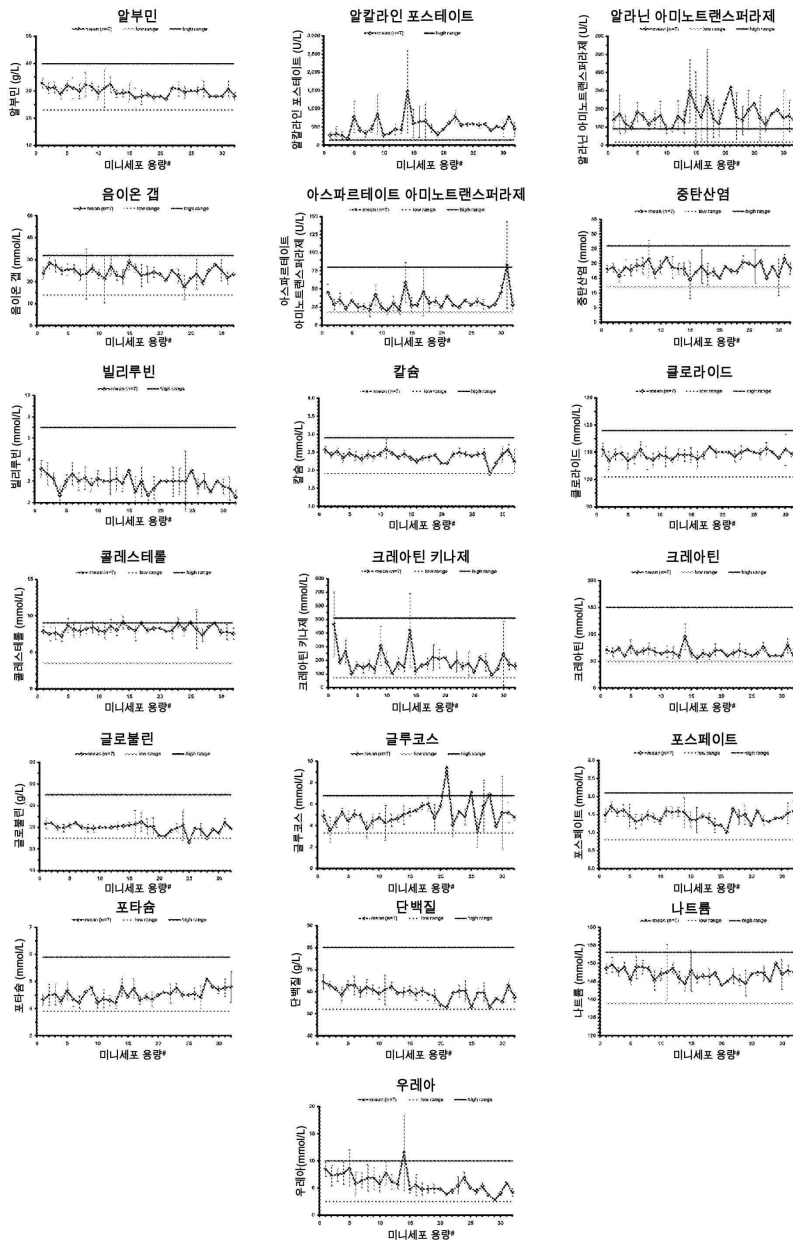
도면4



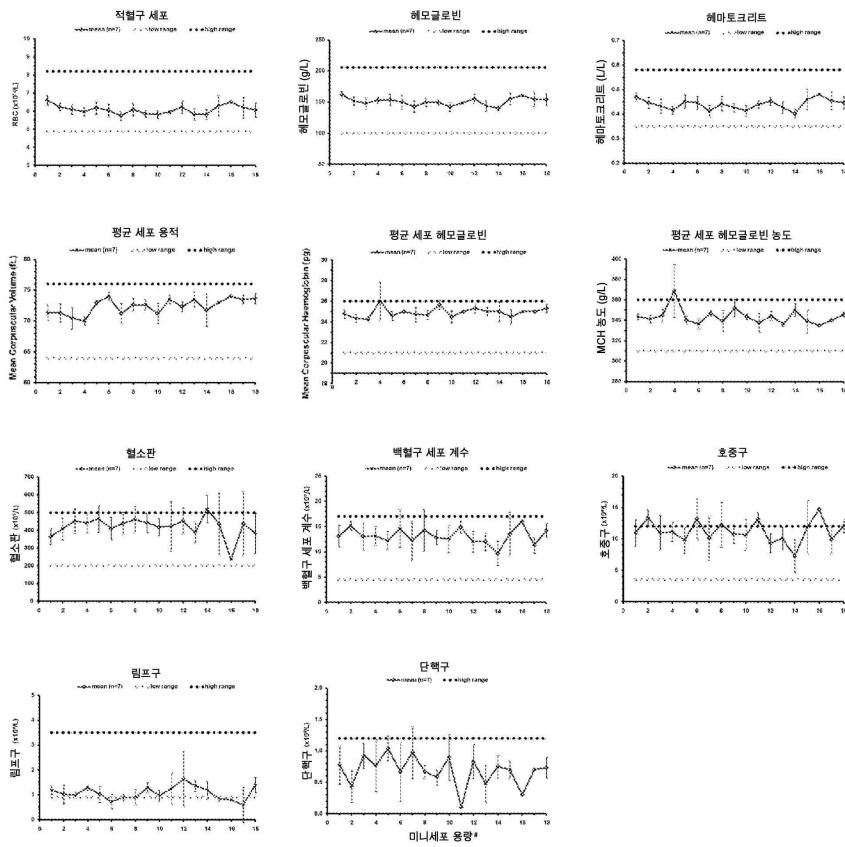
도면5



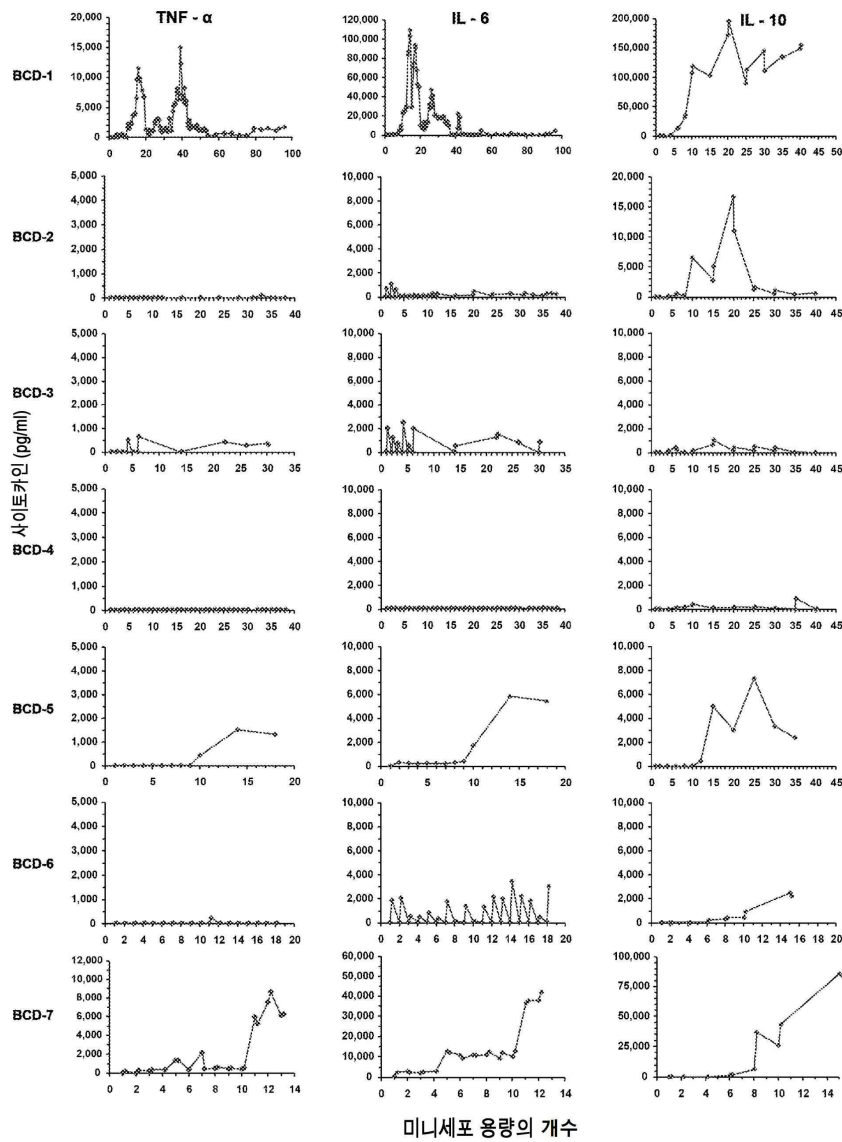
도면6



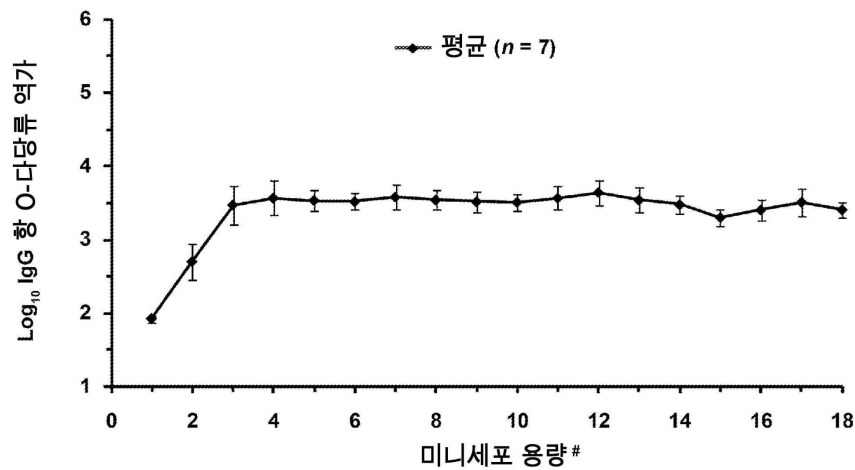
도면7



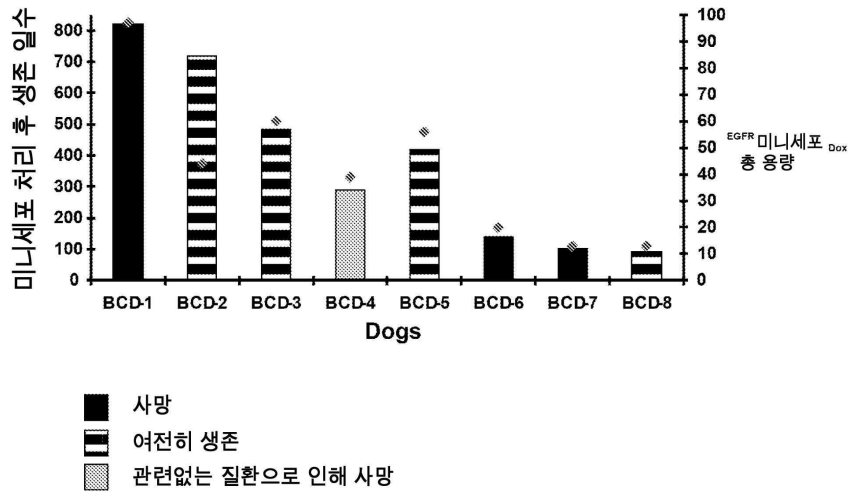
도면8



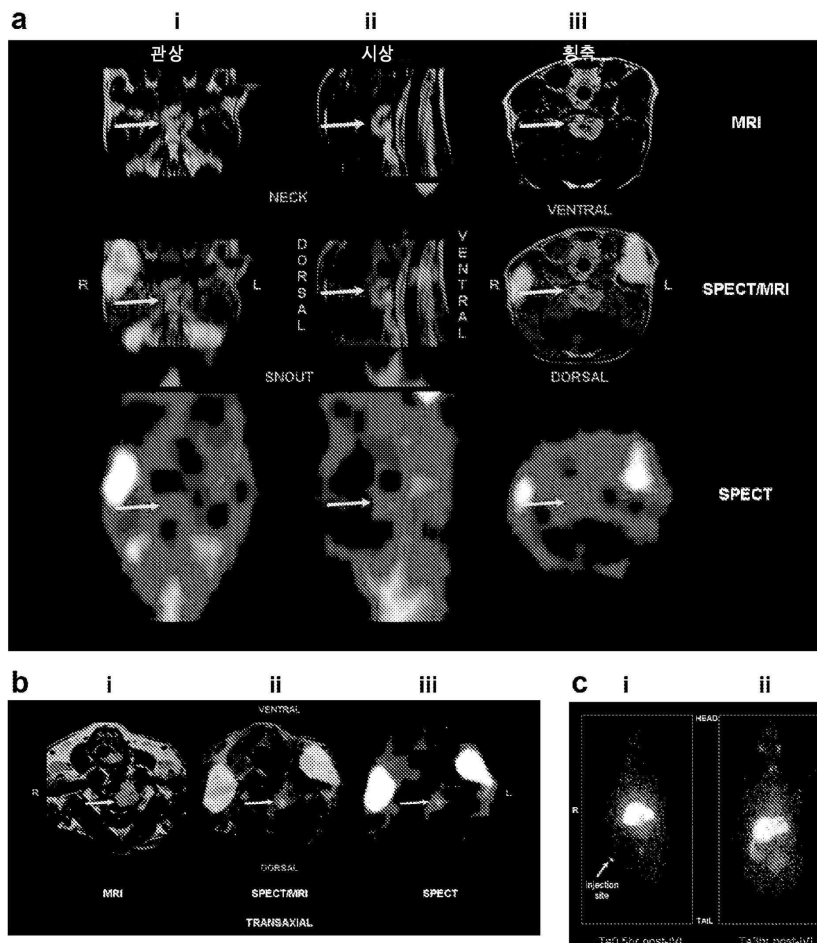
도면9



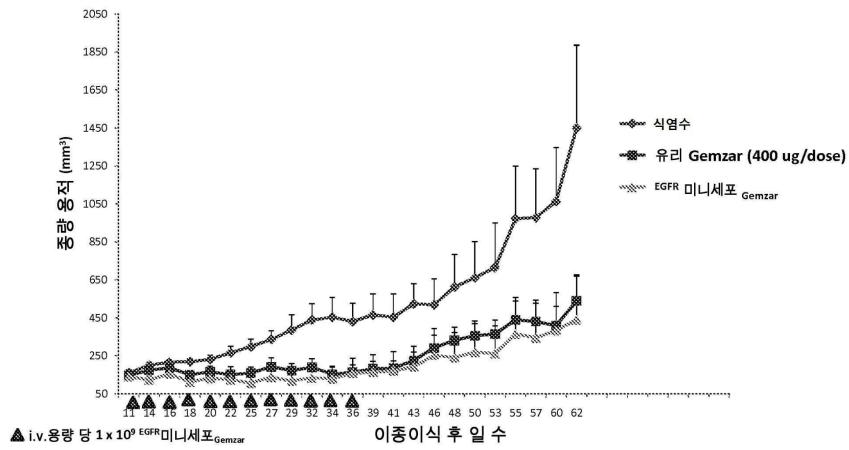
도면10



도면11



도면12



도면13

