(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월24일
(11) 등록번호 10-2036676
(24) 등록일자 2019년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/0014 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7030089(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년03월15일
심사청구일자 2018년11월16일
(85) 번역문제출일자 2018년10월18일
(65) 공개번호 10-2018-0116479
(43) 공개일자 2018년10월24일
(62) 원출원 특허 10-2017-7016462
원출원일자(국제) 2010년03월15일
심사청구일자 2017년07월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/027363
(87) 국제공개번호 WO 2010/120420
국제공개일자 2010년10월21일
(30) 우선권주장
61/169,384 2009년04월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2008151049 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
노오쓰웨스턴 유니버시티
미국 일리노이 60208 에반스톤클라크 스트리트 633
(72) 발명자
머킨 채드 에이.
미국 60091 일리노이주 윌멧 블랙호크 로드 2737
팔러 에이미 에스.
미국 60091 일리노이주 윌멧 브로드웨이 애비뉴 123
길조한 데이비드 에이.
미국 60626 일리노이주 시카고 #씨1 노스 보스워스 7659
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 정혜진

(54) 발명의 명칭 **올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자의 전달**

(57) 요 약

본 발명은 조성물, 및 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자를 전달하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1

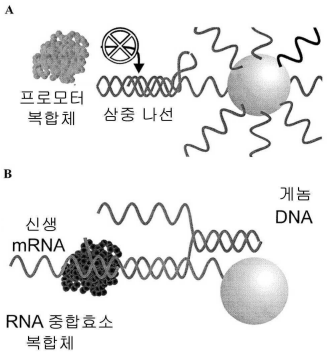


Figure 1

(52) CPC특허분류
A61K 47/6923 (2017.08)
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
C12N 15/111 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/15 (2013.01)
C12N 2320/32 (2013.01)

(30) 우선권주장
61/187,759 2009년06월17일 미국(US)
12/684,836 2010년01월08일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) 2 pmol/cm^2 이상의 표면 밀도로 RNA가 표면에 관능화된 구형의 나노입자; 및

(ii) 연고, 크림, 로션, 겔, 포말, 완충액 및 물로 이루어진 군에서 선택되는 운반체를 포함하며,

상기 나노입자는 5 나노미터(nm) 내지 50 nm 의 평균 직경을 가지고,

상기 나노입자가 금 나노입자이고,

상기 RNA가 5 내지 50개의 뉴클레오티드 길이이고,

상기 나노입자와 RNA 사이의 거리가 10 내지 30 뉴클레오티드 길이이고,

상기 RNA가 나노입자와 공유적으로 결합되고, 표적 폴리뉴클레오티드에 혼성화하여 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 억제하고,

조성물을 투여하지 않은 경우의 표적 폴리뉴클레오티드의 발현과 비교하여 표적 폴리뉴클레오티드의 발현이 10% 이상 억제되며,

상기 나노입자가 피부에 국소 적용되어 피부를 투과하여 전신에 전달되는 것을 특징으로 하는,

RNA를 피부로 전달하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나노입자의 전달이 경피 전달인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 나노입자의 전달이 국소 전달인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 피부가 인간 피부인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 RNA인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 TNF-α, Ras, IκBα, 헷지혹(hedgehog), B-Raf, Akt 및 시클린 D로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유전자의 RNA인 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 K5 (keratin 5), K14 (keratin 14), K1 (keratin 1), K10 (keratin 10), H-Ras (Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene) 및 m-Tor (Mechanistic Target Of Rapamycin)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유전자의 RNA인 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 매트릭스 메탈로프로테이나제-1 및 프로게린으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유전자의 RNA인 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 인터루킨-23 유전자의 RNA인 조성물.

청구항 10

제5항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 E6/E7 (human papillomavirus E6/E7) 유전자의 RNA인 조성물.

청구항 11

제5항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 FGFR3, K10 (keratin 10) 및 B-Raf로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유전자의 RNA인 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 조성물을 투여하지 않은 경우의 표적 폴리뉴클레오티드의 발현과 비교하여, 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 이상 억제하는 것인 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 는 siRNA 인 조성물.

청구항 14

(i) TNF-α, 수르비빈, B-raf, 또는 Akt3 에 대한 RNA 가 표면에 관능화된 구형의 나노입자로서, 상기 나노입자의 표면 상의 RNA 밀도가 2 pmol/cm^2 이상이고; 및

(ii) 연고, 크림, 로션, 겔, 포말, 완충액 및 물로 이루어진 군에서 선택되는 운반체를 포함하며,

상기 나노입자는 5 나노미터(nm) 내지 50 nm 의 평균 직경을 가지고,

상기 나노입자가 금 나노입자이고,

상기 RNA가 5 내지 50개의 뉴클레오티드 길이이고,

상기 나노입자와 RNA 사이의 거리가 10 내지 30 뉴클레오티드 길이이고,

상기 RNA가 나노입자와 공유적으로 결합되고, TNF-α, 수르비빈, B-raf, 또는 Akt3에 혼성화하여 이들의 발현을 억제하고,

조성물을 투여하지 않은 경우의 TNF-α, 수르비빈, B-raf, 또는 Akt3의 발현과 비교하여 TNF-α, 수르비빈, B-raf, 또는 Akt3의 발현이 10% 이상 억제되고,

상기 나노입자가 피부에 국소 적용시 피부를 투과하여 전신에 전달되는 것을 특징으로 하는,

흑색종 치료를 위한 피부 국소 투여용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 RNA 는 siRNA 인 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제12항 또는 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 는 2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$ (2'-MOE) 를 포함하는 변형된 RNA인, 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호참조**

[0002] 본원은 2009년 6월 17일자로 출원된 미국 가출원 제61/187,759호, 및 2009년 1월 8일자로 출원된 미국 가출원 제61/143,293호를 35 U.S.C.§ 119(e) 하에 우선권으로 주장하는 2010년 1월 8일자로 출원된 미국출원 제12/684,836호의 CIP, 및 2009년 4월 15일자로 출원된 미국 가출원 제61/169,384호를 35 U.S.C. § 119(e) 하에 우선권으로 주장하며, 이들 모두의 내용이 전체가 참조로써 본원에 통합되어 있다.

[0003] **정부 이익의 진술**

[0004] 본 발명은 미국 국립 보건원(NIH)에 의해 수여된 승인번호 5DP1 OD000285 및 U54 CA0119341 하에 미국 정부의 지원으로 수행되었다. 미국 정부는 본 발명에서 일부 권리를 갖는다.

[0005] **기술 분야**

[0006] 본 발명은 올리고뉴클레오티드-개질된 나노입자(ON-NP) 결합체(conjugate) 및 박테리아 단백질 생성을 억제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자를 전달하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 유전자 발현을 조절하기 위한 세포 및 조직 내로의 유전 물질의 도입은 유전자 경로 및 기능과 관련된 연구에 상당한 영향을 미쳐 왔으며, 치료적 응용을 위한 가능성을 제공하고 있다. 유전자 수준의 접근은 대부분의 약물을 이용할 수 없는 고유의 특이성을 가지고 있다. siRNA는 잠재적인 치료 수단으로서 상당한 가능성이 있으며 현재 암을 포함한 광범위한 임상 문제를 표적으로 하여 임상시험 중이다. 유전자 침묵(silencing)은 소분자 억제제보다 훨씬 더 비용면에서 효과적이며, 더 큰 잠재적 특이성으로 단백질 발현 및 기능을 하향 조절한다. 특히, siRNA 치료는 유전자 내 하나의 점 돌연변이를 표적으로 할 수 있는 반면, 현재까지 소분자 치료법은 돌연변이와 정상적인 유전자 산물을 정확히 구별할 수 없다. 호발부위(hotspot) 돌연변이의 확인, 직접적인 유전자 서열분석, 또는 유전자 증폭 분석을 통해 각각의 흑색종에서 특정 유전자 변이를 결정하는 능력을 고려할 때, 각각의 흑색종은 특정 유전적 특징을 할당받을 수 있다. siRNA가 많은 세포에 의해 흡수될 수 있음에도 불

구하고, 돌연변이된 유전자 또는 활성화된 신호전달 단백질을 갖는 세포만이 표적 유전자 치료법에 의해 영향을 받음으로써 정상 세포에 악영향을 미치지 않으면서 흑색종 내 신호전달 경로를 정상화한다.

[0008] 많은 단백질의 전달과 마찬가지로, 핵산의 분해 및 위장관으로부터의 낮은 생체이용률이 siRNA의 경구 전달에 대한 주된 장애이다. 심지어 정맥내 전달로도, 통상적인 siRNA는 혈청 인자들에 의해 급격하게 분해되어 그 표적에 도달하지 못한다. 핵산의 국소 적용(topical application)은 병변 피부에서 유전자를 억제하기 위한(예를 들어 그리고 제한없이, 피부에서의 전이를 치료하기 위한) 그리고 내부 표적으로의 경피 전달을 위한, 상당한 치료적 이점을 제공한다. 적용은 고통이 없으며 쉽게 제어되고, 피부는 매우 접근이 용이하다. 표피에서의 효과적인 물리적 장벽은 주로 표피의 최외곽 부분인 각질층(stratum corneum), 및 그보다 정도는 덜하지만, 더 깊은 표피에 주로 국한된다. 이 표피 장벽은 광범위한 수분 손실(내부에서 외부로) 및, 핵산을 포함하는 환경 물질의 도입(외부에서 내부로)을 막는다. 초음파, 레이저 및 주사와 같은 기계적 접근법이 마우스 각질층을 통한 침투를 용이하게 하고 siRNA를 피부 내로 진입시키기 위해 사용되어 왔으나, 전문적인 장비를 필요로 하고, 전달 부위가 제한적이며, 잠재적으로 피부를 손상시킨다. 이러한 시도들은 각질층을 통과할 수 있는 억제성 핵산을 전달하기 위해 손쉽게 적용되는 경피 시스템의 필요성을 강조한다.

[0009] 피부 질환의 직접적인 표적화는 유전자 억제 치료법을 위한 이상적인 모델이다. 하지만, 상업적으로 이용가능한 시험관내 유전자 억제 물질들은 기껏해야 각질형성세포(keratinocyte, KC) 및 멜라닌세포(melanocyte)와 같은 초대 배양 세포 내로 유전 물질을 전달하는데 아주 조금 성공적이었다. 더욱이, 피부 바깥층은 전통적으로 핵산 및 단백질의 피부 내로의 침투 및 진피로부터 순환 내로의 침투를 막는 해부학적 장벽으로 작용한다[Prausnitz et al., Nat Biotechnol 26: 1261-1268 (2008)]. 따라서, 충분한 양의 올리고뉴클레오티드를 전달하기 위해 이 층을 통과하는 것이 도전이 되고 있다.

[0010] 피부는 몸의 가장 거대한 기관으로서 세 가지 층을 함유한다: 표피, 진피, 및 피하 조직. 표피는 피부의 바깥층이다. 표피의 두께는 각각의 피부 종류에 따라 달라진다. 표피는 눈꺼풀에서 0.05 ㎜로 가장 얇으며 손바닥 및 발바닥에서 1.5 ㎜로 가장 두껍다. 표피는 점차적으로 보다 분화된 세포인 4개의 주요 층을 함유한다. 아래쪽에서부터 위쪽까지 상기 층들은 하기로 명명된다:

[0011] ● 기저층(stratum basale)

[0012] ● 유극층(stratum spinosum)

[0013] ● 과립층(stratum granulosum)

[0014] ● 각질층(stratum corneum)

[0015] 하부 층인 기저층은 기둥(column) 모양의 세포를 갖는다. 이 층에서 상기 세포가 분열하여 이미 형성된 세포를 상부 층으로 밀어낸다. 세포가 상부 층으로 이동함에 따라, 이들은 납작해지고, 더 성숙하게 되어 결국은 "사망"하고 떨어져 나온다. 표피의 가장 위층인 각질층은 떨어져 나온 납작해진 피부 세포로 이루어져 있으며, 기저층 세포가 각질층에 도달하여 떨어져 나오는 데까지 약 4주가 걸린다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] **본 발명의 요약**

[0017] 본원은 조성물, 및 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자를 전달하는 방법을 제공한다.

[0018] 일부 구현예에서, 본원은 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자 (ON-NP) 및 경피 운반체를 포함하는 경피 조성물을 제공한다.

[0019] 본원은 또한, 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자 및 경피 운반체를 포함하는 조성물을 치료가 필요한 환자의 피부에 투여하는 단계를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자를 피부로 전달하는 방법을 제공한다.

[0020] 하나의 양태에서, 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자의 전달은 피부를 통한다. 또 하나의 양태에서, 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자의 전달은 국소성이다. 또 하나의 양태에서, 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자의 전달은 국소 적용 후 표피 및 진피로이다.

[0021] 일부 구현예에서, 경피 운반체는 연고를 포함한다. 일부 양태에서, 연고는 아쿠아퍼(Aquaphor)이다.

[0022] 또 다른 구현예에서, 유전자 발현의 조절 방법이 제공되고, 이 방법은 조건 하에서, 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 피부에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자는 표적물에 혼성화하고 유전자 발현을 조절한다.

[0023] 일부 양태에서, 표적은 폴리뉴클레오티드이다. 관련 양태에서, 폴리뉴클레오티드는 RNA이다. 일부 양태에서, 표적은 폴리펩타이드이다.

[0024] 본원의 추가 구현예에서, 상기 조성물의 투여는 피부 장애를 개선한다.

[0025] 다양한 구현예에서, 피부 장애는 암, 유전 장애, 노화, 염증, 감염, 및 미용적 외관 손상으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0026] 일부 양태에서, 암은 편평 세포암, 기저세포암, 유방암, 및 흑색종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0027] 또 추가의 구현예에서, 표적은 Ras, IκBα, 헷지혹(hedgehog), B-Raf, Akt 및 시클린 D로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유전자에 의해 발현되는 유전자 산물이다.

[0028] 일부 양태에서, 유전 장애는 단순 표피 수포증, 수포성 어린선, 선천성 손발톱 비대증, 코스텔로 증후군(Costello syndrome) 및 결절성 경화증으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 추가 양태에서, 표적은 돌연변이를 포함하는 유전자 산물이고, 상기 유전자 산물은 K5, K14, K1, K10, H-Ras 및 m-Tor로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유전자에 의해 발현된다.

[0029] 일부 구현예에서, 노화 장애는 UV-손상 및 조로증으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 표적은 매트릭스 메탈로프로테이나제-1 및 프로게린으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 유전자에 의해 발현된 유전자 산물이다.

[0030] 일부 구현예에서, 염증은 건선으로부터 기인한다. 일부 양태에서, 표적은 인터루킨-23이다.

[0031] 하나의 구현예에서, 바이러스 감염은 사마귀가 생긴다. 일부 양태에서, 표적은 E6/E7이다.

[0032] 추가 구현예에서, 미용적 외관 손상은 지루성 각화증, 표피 모반 및 색소성 모반으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 다양한 양태에서, 표적은 돌연변이를 포함하는 유전자 산물이고, 상기 유전자 산물은 FGFR3, K10 및 B-Raf로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유전자에 의해 발현된다.

과제의 해결 수단

[0033] **발명의 상세한 설명**

[0034] 전신 전달을 위해 국소로 또는 경피로 투여될 수 있는 나노입자 전달 시스템이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 이 시스템은 나노입자의 표면상에 꽉 채워진 siRNA 이중체(siRNA-NP)를 이용한다. 이들 결합체는 생물학적 조건 하에서 올리고뉴클레오티드 쉘(shell)의 유지를 포함하나 이에 제한되지 않는, 많은 독특한 성질을 나타내며, 그 결과 동시 형질감염 및 유전자 조절이 가능한 단일 제제를 생성한다. 올리고뉴클레오티드-NP(ON-NP)는 유독성의 형질감염 시약을 첨가하지 않고도 세포막을 손쉽게 통과할 수 있다. 중요하게도, 이들 구조가 단지 핵산 전달을 위한 운반체(vehicle)로서 작용하는 것은 아니지만, 세포 내 구조로서 결합된 상태로 유지된다. 형광 분광학 연구들은 티올화된 올리고뉴클레오티드가 세포 내재화(cellular internalization) 후 NP에 결합된 상태로 유지된다는 것을 밝히고 있으며, 이는 나노물질의 복합 특성을 이용할 수 있게 한다. ON-NP에 의해 나타나는 또 다른 특성은 생리학적 환경에서의 뛰어난 안정성이다. 다른 나노물질 및 유전자 형질감염 시약과는 달리, 올리고뉴클레오티드-NP는 생물학적으로 적합한 조건 하에서 쉽게 조작될 수 있다. 이는 높은 염 농도 및 낮은 염 농도, 극도의 pH, 온도 변동을 포함한다. ON-NP의 부가적인 특성은 뉴클레아제(nuclease) 분해에 대한 저항성이다. 엔도- 및 엑소-뉴클레아제가 생체액 중에 존재하며 외래 유전 물질을 파괴하는 기능을 하기 때문에, 핵산의 효소 활성을 증가시키는 방법이 매우 중요하다. 핵산의 효소 안정성을 증가시키는 종래 전략들은 화학적 변형에 의존하는 반면, 올리고뉴클레오티드-NP의 향상된 저항성은 나노입자 표면의 밀집된 관능화에 기초한다는 점에 있어서 독특하다. 이 환경은 나노입자 표면 부근 내에 더 높은 국소 유전체(dielectric)를 생성함으로써, 고친화성 표적 인식, 및 효소 분해에 대한 저항성을 제공한다. ON-NP에 의해 나타나는 추가 성질은 보조 시약을 사용하지 않고 "형질감염시키기 어려운" 원발성 세포를 포함하는, 여러 유형의 세포에 들어가는 능력이다. ON-NP의 또 다른 성질은 뚜렷한 독성이 없다는 것이다. 이들 나노결합체는 올리고뉴클레

오티드 및 NP의 조합에서 비롯된 성질과 함께, 독특한 크기, 전하, 및 표면 기능성을 갖는다. 이러한 독특한 물질들의 예비 독성 탐색은 동물 모델에서 고용량에서 급성 독성이 없음을 보여준다.

[0035] 본원에 ON-NP의 국소 적용이 내부 표적으로의 경피 전달을 위하여 병변 피부, 림프절, 또는 순환 내로 선택적인 유전자 억제를 전달하는 신규 수단임이 개시되어 있다. 하나의 구현예에서, ON-NP를 직접 병변 피부로 전달함으로써, 잠재적인 부작용을 최소화하면서 최대 종양 부하(maximal tumor load) 위치에서 올리고뉴클레오티드-NP 농도가 최대가 된다.

[0036] 하나의 양태에서, 본 내용은 항생제 조성물 및 그 사용 방법을 제공한다. 하나의 양태에서, 상기 항생제 조성물은 올리고뉴클레오티드를 포함하도록 개질된 나노입자를 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오티드는 원핵생물 유전자의 표적 비코딩 서열에 충분히 상보적이어서 혼성화를 가능케 하는 조건 하에서 상기 표적 서열에 혼성화될 것이다. 이 혼성화를 통해, 상기 항생제 조성물은 표적 원핵세포의 성장을 억제한다. 표적 세포에서, 특정 양태에 있어서, 혼성화는 상기 표적 서열에 의해 암호화되는 기능성 단백질의 발현을 억제한다. 다양한 양태에서, 상기 표적 서열에 의해 암호화되는 원핵생물 단백질의 전사, 번역 또는 이들 모두가 억제된다. 본 내용은 상기 세포를 상기 항생제 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 내 표적 원핵생물 유전자 산물의 생성을 억제하기 위해 본원에 개시된 항생제 조성물을 이용하는 방법을 추가로 제공하며, 여기에서 상기 조성물의 나노입자와 결합된 올리고뉴클레오티드는 혼성화를 가능하게 하는 조건 하에서 박테리아 유전자의 표적 비코딩 서열에 충분히 상보적이며, 여기에서 혼성화는 상기 표적 유전자에 의해 암호화되는 기능성 원핵생물 유전자를 억제한다. 표적 원핵생물 서열의 전사 또는 번역, 또는 전사 및 번역 모두의 억제가 표적 원핵생물 서열에 의해 암호화되는 기능성 단백질의 생성을 억제할 것임이 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 인식될 것이다.

[0037] 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자 및 표적 원핵생물 서열의 혼성화는 본원에 정의된 바와 같이 "복합체"를 형성한다. 본원에 사용된 바와 같이, "복합체"는 이중 가닥(또는 이중체) 복합체 또는 삼중 가닥(또는 삼중체) 복합체 중 하나이다. 삼중체 복합체 및 이중체 복합체가 표적 박테리아 원핵생물 핵산의 번역 또는 전사를 억제하는 것으로 본원에 고려된다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같이, "비코딩 서열"은 본 기술분야에서 허용되는 의미를 갖는다. 일반적으로, 비코딩 서열은 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 번역을 위한 코돈을 함유하지 않는 폴리뉴클레오티드 서열을 말한다. 일부 양태에서, 비코딩 서열은 염색체이다. 일부 양태에서, 비코딩 서열은 염색체외이다. 하나의 양태에서, 비코딩 서열은 유전자의 코딩 서열의 전부 또는 일부에 상보적이다. 비코딩 서열은 발현 프로모터, 인핸서(enhancer), 및 사일런서(silencer)와 같은 조절 요소를 포함한다. 비코딩 서열의 예는 5' 비코딩 서열 및 3' 비코딩 서열이다. "5' 비코딩 서열"은 코딩 서열의 5'(상류)에 위치한 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 상기 5' 비코딩 서열은 개시 코돈의 완전히 가공된 mRNA 상류에 존재할 수 있으며 일차적인 전사체의 mRNA로의 가공, mRNA 안정성 또는 번역 효율에 영향을 미칠 수 있다. "3' 비코딩 서열"은 코딩 서열의 3'(하류)에 위치한 뉴클레오티드 서열을 지칭하며, 이는 폴리아데닐레이션 신호 서열 및 mRNA 가공 또는 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있는 신호를 암호화하는 다른 서열을 포함한다. 상기 폴리아데닐레이션 신호는 일반적으로 mRNA 전구체의 3' 말단에 폴리아데닐산 서열을 추가하는데 영향을 미치는 능력을 특징으로 한다.

[0039] 하나의 구현예에서, 비코딩 서열은 프로모터를 포함한다. "프로모터"는 구조 유전자의 전사를 지시하는 폴리뉴클레오티드 서열이다. 통상적으로, 프로모터는 구조 유전자의 전사 개시 부위에 가까운, 유전자의 5' 비코딩 서열 내에 위치한다. 전사 개시 기능을 하는 프로모터 내 서열 요소들은 종종 공통(consensus) 뉴클레오티드 서열을 특징으로 한다. 이러한 프로모터 요소들은 RNA 중합효소 결합 부위, TATA 서열, CAAT 서열, 분화-특이적 요소[DSE; McGehee *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 7: 551 (1993)], 사이클릭 AMP 반응 요소(CRE), 혈청 반응 요소[SRE; Treisman, *Seminars in Cancer Biol.* 1: 47 (1990)], 글루코코르티코이드 (glucocorticoid) 반응 요소(GRE), 및 CRE/ATF[O'Reilly *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:19938 (1992)], AP2[Ye *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:25728 (1994)], SP1, cAMP 반응 요소 결합 단백질[CREB; Loeken, Gene Expr. 3:253 (1993)] 및 팔량체(octamer) 인자[일반적으로, Watson *et al.*, eds., Molecular Biology of the Gene, 4th ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), 및 Lemaigre and Rousseau, *Biochem. J.* 303:1 (1994) 참조]를 포함한다. 프로모터가 유도성 프로모터인 경우, 전사 속도가 유도 물질에 의해 증가한다. 대조적으로, 상기 전사 속도는 프로모터가 항시성(constitutive) 프로모터인 경우 유도 물질에 의해 조절되지 않는다. 억제성(repressible) 프로모터 역시 알려져 있다. "코어(core) 프로모터"는 TATA 박스 및 전사 개시를 포함하는, 프로모터 기능에 필수적인 뉴클레오티드 서열을 함유한다. 본 정의에 의해, 코어 프로모터는 검출가능한 활성을 갖거나, 활성을 향상시키거나 조직 특이적 활성을 제공할 수 있는 특정 서열의 부재시 검출되

지 않는 활성을 가질 수 있다.

[0040] 또 다른 구현예에서, 비코딩 서열은 조절 요소를 포함한다. "조절 요소"는 코어 프로모터의 활성을 조절하는 폴리뉴클레오티드 서열이다. 예를 들어, 조절 요소는 특정 원핵생물에서 배타적으로 또는 우선적으로 전사를 가능하게 하는 세포 인자와 결합하는 폴리뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다.

[0041] 또 다른 구현예에서, 비코딩 서열은 인핸서(enhancer)를 포함한다. "인핸서"는 전사 개시 부위와 관련하여 인핸서의 거리 또는 방향에 관계없이 전사 효율을 증가시킬 수 있는 조절 요소의 유형이다.

[0042] 본 명세서 및 첨부된 청구항에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥이 달리 명확히 나타내지 않는 한, 복수 대상을 포함하는 것임을 유의해야 한다.

[0043] 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며 본 기술분야에 허용된 의미를 갖는 것임을 유의해야 한다.

[0044] 용어 "부착된", "결합된", "개질된" 및 "관능화된"은 또한 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 올리고뉴클레오티드와 나노입자와의 결합을 지칭하는 것임을 더욱 유의해야 한다.

[0045] "혼성화"는 왓슨-크릭(Watson-Crick) DNA 상보성(complementarity), 후그스틴(Hoogstein) 결합, 또는 본 기술분야에 공지된 다른 서열-특이적 결합 법칙에 따른 수소 결합에 의한 둘 또는 세 가닥의 핵산 간의 상호작용을 의미한다. 혼성화는 본 기술분야에 공지된 다른 엄격성 조건 하에서 수행될 수 있다.

[0046] 용어 "올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자" 및 "나노결합체"는 본원에 상호교환적으로 사용된다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같이, 녹는점, 또는 "T_m"은 혼성화된 두 개의 특정 핵산들이 50%로 해리될 때의 온도이다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "진피"는 피부 또는 이와 관련된 것을 의미하며, 이는 본원에서 "피부(cutaneous)"와 상호교환적으로 사용된다. 본원에 사용된 바와 같이, "경피"는 피하 조직, 및 종종 전신 혈관 또는 림프 순환 내로 향하여 피부를 통과하는 것을 의미한다. 용어 "국소"는, 본원에 사용된 바와 같이, 피부에 적용되는 것을 의미한다. 따라서, 조성물이 국소로 적용되는 경우, 이는 피부에 적용된다. 하지만, 용어 "국소"는 반드시 상기 조성물이 유지되는 곳을 지칭하기보다는 오히려 상기 조성물이 적용되는 방법을 지칭하는 것임이 본 기술분야의 통상의 기술을 가진 자에 의해 이해될 것이다.

[0049] 본 내용의 조성물 및 방법은, 다양한 구현예에서, 예를 들어 그리고 제한됨이 없이, 특정 관심 표적에 따라 다른 깊이의 피부를 표적으로 하는 것으로 고려된다. 다양한 구현예에서, 본 내용의 조성물은 표피를 표적으로 한다. 일부 구현예에서, 본 내용의 조성물은 진피를 표적으로 한다. 추가의 구현예에서, 본 내용의 조성물은 경피로 이동하여 피하 조직, 전신 혈관계 또는 림프 순환에 도달한다.

[0050] 본 내용의 조성물 및 방법의 침투 깊이에 영향을 미치는 인자들은 나노입자의 크기 및 상기 나노입자의 표면상의 관능화된 올리고뉴클레오티드의 밀도를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 양태는 하기에 좀 더 상세하게 설명되어 있다. 따라서, 일부 양태에서, 본 내용은 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자 자체가 본 개시의 조성물이 이동할 수 있는 깊이를 용이하게 한다는 것을 고려한다. 일부 양태에서, 상기 조성물 내의 운반체가 본 내용의 조성물이 이동할 수 있는 깊이를 용이하게 한다. 또 다른 양태에서, 운반체 및 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자의 조합이 본 내용의 조성물이 이동할 수 있는 깊이를 용이하게 한다.

[0051] 흑색종은 상이한 패턴의 종양유발 돌연변이 및 게놈 증폭을 갖는, 종양의 이종 그룹을 나타낸다. 색소성 모반(nevus)과 같은 전구체 병변으로부터 흑색종으로의 진행은 신호전달 경로의 활성화를 야기하는 유전적 변화를 갖는 단계적 경로를 따르는 것으로 여겨진다. RAS/RAF/MEK/ERK 경로의 활성화가 가장 흔하다(흑색종의 대략 60%가 활성화 BRAF 돌연변이 및 25% NRAS 돌연변이를 가짐). 양태에 노출된 부위가 가장 흔히 BRAF 돌연변이를 나타내는 반면, 덜 흔한 점막 또는 선단(acral) 부위가 드물게 BRAF 돌연변이를 나타낸다.

[0052] 상기 BRAF 돌연변이의 95% 이상[Dhomen et al., Hematol Oncol Clin North Am 23, 529-545, ix (2009)]은 글루탐산이 발린으로 치환되어(V600E) BRAF 활성화를 500배 증가시키는 점 돌연변이(T1799A)이다. 이 돌연변이는 과활성(hyperactive) 멜라닌세포 ERK 신호전달 및 마우스 모델에서 이식된 종양의 성장 인자-의존성 증식을 야기한다[Wellbrock et al., Cancer Res. 64(7): 2338-42 (2004)].

[0053] 하지만, BRAF/ERK 경로의 활성화만으로는 흑색종 변형을 설명하지 못한다. 실제로, 전이성 흑색종은 둘 이상의 유전자 변이를 갖는 경향이 있으며[Goel et al., Oncogene 28: 2289-2298 (2009)](하기 표 A 참조), 가장 흔하

게는, BRAF/ERK 활성화 외에도, 포스포이노시티드(phosphoinositide) 3-키나아제(PI3K)/단백질 키나아제 B(AKT) 경로의 활성화(산발성 흑색종의 ~70%)를 야기한다[Cheung et al., Cancer Res 68: 3429-3439 (2008)]. 흑색종의 BRAF V600E 돌연변이-매개 발전에서의 항시적인 PI3K/AKT 활성화의 중요한 역할이 시험관내 및 마우스 연구 모두에서 입증되었다. BRAF 돌연변이는 PTEN 손실/불활성화(세포주의 ~30% 및 흑색종 전이의 적어도 58%)(Birck et al., 2000) 또는 활성화 AKT3 돌연변이(흑색종의 43-50%) [Davies et al., Br J Cancer 99: 1265-1268 (2008); Lin et al., Cancer Res 68: 664-673 (2008); Stahl et al., Cancer Res 64: 7002-7010 (2004); Tsao et al., J Invest Dermatol 122: 337-341 (2004)]와 결합되어 빈번하게 발견된다.

[0054] [표 A]

선택된 멜라닌형성 세포 및 흑색종 세포주 유전자형

세포주	유전자 변화	전이
정상 인간 멜라닌세포	없음	없음
$BRAF^{V_E}PTEN^{lox}$ (마우스)	**Braf V600E** (4-HT에 의해 유도가능), **PTEN 손실**	폐, 림프절
SK-MEL28	동종접합성 **BRAF V600E**, CDK4 R24C, **PTEN T167A**, p53 L145R, 야생형 c-KIT, NRAS, CDKN2a	폐, 간
1205Lu	반접합성 **BRAF V600E**, CDK4 K22Q, **PTEN MU/Hem del**, CDKN2a mut, 야생형 c-KIT, NRAS, p53	폐
A375P	**BRAF V600E**, 야생형 CDK4, PTEN, p53, c-KIT, NRAS, CDKN2a	없음
C8161	**AKT 활성**, 하지만 BRAF 돌연변이 없음; 미공지된 다른 돌연변이	폐, 간

[0055]

[0056] **항생제 조성물**

[0057] 일부 구현예에서, 본원은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자 및 운반체를 포함하는 항생제 조성물을 제공하고, 여기서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 혼성화를 허용하는 조건 하에서 표적 서열에 혼성화될 원핵세포 유전자의 표적 비코딩(non-coding) 서열 표적에 충분히 보완적이다. 다양한 구현예에서, 항생제 조성물은 원핵세포 감염의 치료가 필요한 포물동물에 치료적 유효량으로 투여하기 위해 제형된다. 일부 양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0058] 다양한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자의 원핵세포 유전자에의 혼성화는 원핵세포의 성장을 억제한다 (또는 방지한다)는 것으로 생각된다. 따라서, 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자의 원핵세포 유전자에의 혼성화는, 원핵생물이 박테리아인 양태에서 정균(bacteriostatic) 또는 살균(bactericidal) 효과가 있는 것으로 생각된다. 혼성화가 생체내에서 일어나는 양태에서, 원핵세포의 성장은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자와의 접촉 부재에서 원핵세포의 성장과 비교하여 약 5%까지 억제된다. 다양한 양태에서, 원핵세포의 성장은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자와의 접촉 부재에서 원핵세포의 성장과 비교하여 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 또는 그 초과까지 억제된다.

[0059] 혼성화가 실험실내에서 일어나는 양태에서, 원핵세포의 성장은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자와의 접촉 부재에서 원핵세포의 성장과 비교하여 약 5%까지 억제된다. 다양한 양태에서, 원핵세포의 성장은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자와의 접촉 부재에서 원핵세포의 성장과 비교하여 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 또는 그 초과까지 억제된다.

[0060] 억제가 생체내 또는 실험실내이든지, 당업자는 일상적인 기술을 사용하여 원핵세포 성장의 억제 수준을 결정할 수 있다. 예를 들어, 원핵세포의 수의 직접적인 정량화는 시료의 세트 (*예를 들어,* 생체내 억제의 경우는 체액 또는 실험실내 억제의 경우는 액체 배양 시료)를 얻어서 수행되고, 여기서, 상기 시료는 기간에 걸쳐 수집되고, 고형물 성장 허용 배지 상에서 시료를 배양하고, 성장할 수 있는 원핵세포의 얻은 수를 카운팅한다. 최종 시점

에서의 원핵세포의 수 대 초기에서의 원핵세포의 수는 원핵세포 성장의 억제율 %를 산출한다.

[0061] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자의 원핵세포 유전자에의 혼성화는 원핵세포 유전자에 의해 인코딩된 기능성 원핵세포 단백질의 발현을 억제한다. "기능성 원핵세포 단백질"란, 본원에서 사용된 바와 같이, 원핵세포 유전자에 의해 인코딩된 전체 길이 야생형 단백질을 의미한다. 하나의 양태에서, 기능성 원핵세포 단백질의 발현은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자와 접촉되지 않은 세포와 비교하여 약 5%까지 억제된다. 다양한 양태에서, 기능성 원핵세포 단백질의 발현은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자와 접촉되지 않은 세포와 비교하여 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 또는 그 초과까지 억제된다. 바꾸어 말하면, 제공된 방법은 표적 유전자 산물의 발현의 임의 정도의 억제로 귀결되는 것을 포함한다.

[0062] 관련 양태에서, 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자의 원핵세포 유전자에의 혼성화는 원핵세포 성장에 필수적인 기능성 단백질의 발현을 억제한다. 하나의 양태에서, 원핵세포 성장에 필수적인 기능성 원핵세포 단백질의 발현은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자와 접촉되지 않은 세포와 비교하여 약 5%까지 억제된다. 다양한 양태에서, 원핵세포 성장에 필수적인 기능성 원핵세포 단백질의 발현은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자와 접촉되지 않은 세포와 비교하여 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 또는 그 초과까지 억제된다.

[0063] 성장에 필수적인 원핵세포 단백질은, 비제한적으로, 그람음성 유전자 산물, 그람양성 유전자 산물, 세포주기 유전자 산물, DNA 복제와 연관된 유전자 산물, 세포분열 유전자 산물, 단백질 합성과 연관된 유전자 산물, 박테리아 기라아제(gyrase), 및 아실 담체 유전자 산물을 포함한다. 이들 부류는 이하에서 상세히 논의된다.

[0064] 본원은 또한, 항생제 조성물을 생각하고, 여기서, 원핵세포 유전자의 표적 비코딩(non-coding) 서열로의 혼성화은 변경된 활성을 갖는 원핵세포 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 발현으로 귀결된다. 하나의 양태에서, 원핵세포 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 활성은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자과 접촉되지 않은 원핵세포내의 단백질의 활성과 비교하여 약 5% 감소된다. 다양한 양태에서, 원핵세포 단백질의 활성은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자과 접촉되지 않은 원핵세포내의 단백질의 활성과 비교하여 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 약 99% 또는 약 100%까지 억제된다. 또 하나의 양태에서, 원핵세포 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 활성은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자과 접촉되지 않은 원핵세포내의 단백질의 활성과 비교하여 약 5% 증가된다. 다양한 양태에서, 원핵세포 단백질의 발현은 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자과 접촉되지 않은 원핵세포내의 단백질의 활성과 비교하여 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 또는 그 초과까지 증가된다.

[0065] 원핵세포내의 단백질의 활성은 나노입자에 부착된 올리고뉴클레오티드의 서열, 표적화된 원핵세포 유전자 (및 유전자에 의해 인코딩된 단백질), 및 나노입자의 크기를 비제한적으로 포함하는 몇 개의 파라미터의 함수로서 증가 또는 감소된다.

[0066] 다양한 구현예에서, 본원의 항생제 조성물은 원핵세포 유전자의 전사를 억제하는 것으로 생각된다. 일부 구현예에서, 본원의 항생제 조성물은 원핵세포 유전자의 번역을 억제하는 것으로 생각된다.

[0067] 일부 구현예에서, 항생제 조성물은 항생제에 대한 저항성을 부여하는 원핵세포 유전자의 표적 비코딩(non-coding) 서열에 혼성화된다. 이들 유전자는 당업자에 공지되어 있고, 예를 들어 하기에서 논의된다: Liu 등, Nucleic Acids Research 37: D443-D447, 2009 (이는 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다). 일부 양태에서, 항생제에 대한 저항을 부여하는 원핵세포 유전자의 표적 비코딩(non-coding) 서열에의 항생제 조성물의 혼성화는 항생제에 대한 원핵생물의 감소성을 증가시키기 된다. 하나의 양태에서, 항생제에 대한 원핵생물의 감수성 항생제 조성물와 접촉하지 않는 원핵생물의 감수성과 비교하여 약 5%까지 증가된다. 다양한 양태에서, 항생제에 대한 원핵생물의 감수성 항생제 조성물과 접촉하지 않는 원핵생물의 감수성과 비교하여 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 또는 그 초과까지 증가된다. 항생제에 대한 상대적인 감수성은 본원에 기재된 바와 같이 일상적인 기술

을 사용하여 당업자에 의해 측정될 수 있다.

[0068] **항생제와의 병용 요법**

[0069] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드-개질된 나노입자 결합체를 포함하는 항생제 조성물은, 각각 치료적 유효량으로, 항생제와 병용 투여하기 위해 제형화된다.

[0070] 용어 "항생제"는, 본원에 사용된 바와 같이, 주로 감염성 질환의 치료에 사용되는, 박테리아 및 기타 미생물의 성장을 억제하거나 이들을 사멸시키는 능력을 갖는 화학 물질의 그룹을 의미한다. 예를 들어, 미국 특허번호 제7,638,557호(본원에 전체가 참조로써 통합되어 있음)를 참조한다. 항생제의 예로는 페니실린(Penicillin) G; 메티실린(Methicillin); 나프실린(Nafcillin); 옥사실린(Oxacillin); 클록사실린(Cloxacillin); 디클록사실린(Dicloxacillin); 암피실린(Ampicillin); 아목실린(Amoxicillin); 티카르실린(Ticarcillin); 카르베니실린(Carbenicillin); 메즐로실린(Mezlocillin); 아즐로실린(Azlocillin); 피페라실린(Piperacillin); 이미페넴(Imipenem); 아즈트레오남(Aztreonam); 세팔로틴(Cephalothin); 세파클로어(Cefaclor); 세폭시틴(Cefoxitin); 세푸록심(Cefuroxime); 세포니시드(Cefonicid); 세프메타졸(Cefmetazole); 세포테탄(Cefotetan); 세프로질(Cefprozil); 로라카르베프(Loracarbef); 세페타메트(Cefetamet); 세포페라존(Cefoperazone); 세포탁심(Cefotaxime); 세프티족심(Ceftizoxime); 세프트리아존(Ceftriaxone); 세프타지딤(Ceftazidime); 세페핌(Cefepime); 세픽심(Cefixime); 세포독심(Cefpodoxime); 세프설로딘(Cefsulodin); 플레록사신(Fleroxacin); 날리딕산(Nalidixic acid); 노르플록사신(Norfloxacin); 시플로플록사신(Ciprofloxacin); 오플록사신(Ofloxacin); 에녹사신(Enoxacin); 로메플록사신(Lomefloxacin); 시녹사신(Cinoxacin); 독시사이클린(Doxycycline); 미노사이클린(Minocycline); 테트라사이클린(Tetracycline); 아미카신(Amikacin); 젠타마이신(Gentamicin); 카나마이신(Kanamycin); 네틸미신(Netilmicin); 토브라마이신(Tobramycin); 스트렙토마이신(Streptomycin); 아지트로마이신(Azithromycin); 클라리트로마이신(Clarithromycin); 에리트로마이신(Erythromycin); 에리트로마이신 에스톨레이트(Erythromycin estolate); 에리트로마이신 에틸 석시네이트(Erythromycin ethyl succinate); 에리트로마이신 글루코헵타노에이트(Erythromycin glucoheptonate); 에리트로마이신 락토비오네이트(Erythromycin lactobionate); 에리트로마이신 스테아레이트(Erythromycin stearate); 반코마이신(Vancomycin); 테이코플라닌(Teicoplanin); 클로람페니콜(Chloramphenicol); 클린다마이신(Clindamycin); 트리메토프림(Trimethoprim); 설파메톡사졸(Sulfamethoxazole); 니트로푸란토인(Nitrofurantoin); 리팜핀(Rifampin); 무피로신(Mupirocin); 메트로니다졸(Metronidazole); 세팔렉신(Cephalexin); 록시트로마이신(Roxithromycin); 코-아목시클라부아네이트(Co-amoxiclavuanate); 피레라실린(Piperacillin)과 타조박탐(Tazobactam)의 병용; 및 이들의 다양한 염, 산, 염기, 및 기타 유도체들을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 항균성 항생제로는 페니실린, 세팔로스포린(cephalosporin), 카르바세펨(carbacephem), 세파마이신(cephamycin), 카르바페넴(carbapenem), 모노박탐(monobactam), 아미노글리코시드(aminoglycoside), 글리코펩타이드(glycopeptides), 퀴놀론(quinolone), 테트라사이클린(tetracycline), 매크로리드(macrolide), 및 플루오로퀴놀론(fluoroquinolone)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0071] **투여 및 약제학적 조성물**

[0072] 용어 "치료적 유효량"은, 본원에 사용된 바와 같이, 확인된 질환 또는 상태를 치료, 개선, 또는 예방하는데 충분한, 또는 식별가능한 치료, 예방, 또는 억제 효과를 나타내기에 충분한, 조성물의 양을 지칭한다. 상기 효과는, 예를 들어, 임상 상태의 개선, 증상의 감소에 의해, 또는 본원에 기술된 분석법에 의해 식별될 수 있다. 대상에 대한 정확한 유효량은 대상의 체중, 크기, 및 건강; 상태의 유형 및 정도; 치료를 위해 선택된 항생제 조성 또는 조성들의 조합에 따라 달라질 것이다. 주어진 상황에 대한 치료적 유효량은 임상의의 기량 및 판단에 속하는 통상적인 실험에 의해 결정될 수 있다.

[0073] 본원에 기술된 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제, 담체, 또는 희석제와 함께 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다. 상기 화합물 또는 조성물은 원핵생물 감염 또는 상태의 치료할 수 있게 하는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, ON-NP 및 운반체를 포함하는 본 내용의 조성물은 국소 적용에 유용하다. 부가적인 투여 경로는 경구 투여이다. 또한, 상기 화합물 또는 조성물은 정맥내, 복강내, 폐내, 피하 또는 근육내, 척추강내, 경피, 직장, 경구, 비강 또는 흡입에 의해서와 같이 비경구를 포함하여, 임의의 표준 투여 경로를 이용하여 환자에게 전달될 수 있다. 위장관 내 체액과 접촉하고 있는 활성 물질의 제어 방출을 달성하기 위하여, 그리고 혈장 내에 실질적인 일정 수준 및 유효 수준의 활성물질을 제공하기 위하여, 본원에 기술된 제제로부터 서방형 제형이 또한 제조될 수 있다. 이 목적을 위해 생물학적 분해가능한 중합체, 수용성 중합체 또는 이들과 임의의 적당한 계면활성제의 혼합물 내에 상기 결정형이 포매될 수 있다. 포매(embedding)는

본 문맥에서 중합체의 매트릭스 내에 미세입자의 혼입을 의미한다. 제어 방출 제형은 또한 공지된 분산 또는 유화 코팅 기법을 거쳐 분산화된 미세입자 또는 유화된 미세액적(micro-droplet)의 캡슐화를 통해 수득된다.

[0074] 투여는 단일 용량 투여의 형태를 가질 수 있거나, 상기 구현예의 화합물은 분할된 용량 또는 연속-방출 제형이나 투여 방법(예를 들어, 펌프) 중 하나로, 일정 기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 하지만, 상기 구현예의 화합물이 대상에 투여되는 경우, 투여될 화합물의 양과 선택되는 투여 경로는 상기 질환 상태의 효과적인 치료를 가능케하도록 선택되어야 한다.

[0075] 하나의 구현예에서, 상기 약제학적 조성물은 특정 투여 방식 및 투여 형태에 따라, 담체, 용매, 안정화제, 보조제, 희석제 등과 같은 약제학적으로 허용가능한 부형제와 함께 제형화될 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 일반적으로 생리학적으로 적합한 pH를 달성하도록 제형화되어야 하며, 이는 제형 및 투여 경로에 따라, 약 pH 3 내지 약 pH 11, 바람직하게는 약 pH 3 내지 약 pH 7의 범위일 수 있다. 대안적인 구현예에서, pH가 약 pH 5.0 내지 약 pH 8의 범위로 조절되는 것이 바람직할 수 있다. 더욱 상세하게는, 상기 약제학적 조성물은, 다양한 양태에서, 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 함께, 치료적 또는 예방적 유효량의 본원에 기술된 적어도 하나의 조성물을 포함한다. 본원에 기술된 바와 같이, 상기 약제학적 조성물은 본원에 기술된 화합물의 조합을 임의로 포함할 수 있다.

[0076] 용어 "약제학적으로 허용가능한 부형제"는 본원에 기술된 화합물과 같은 약제학적 제제의 투여를 위한 부형제를 지칭한다. 상기 용어는 과도한 독성 없이 투여될 수 있는 임의의 약제학적 부형제를 지칭한다.

[0077] 약제학적으로 허용가능한 부형제는 투여될 특정 조성물 뿐만 아니라 상기 조성물을 투여하는데 사용되는 특정 방법에 의해 일부 결정된다. 따라서, 약제학적 조성물의 광범위한 적합한 제형이 존재한다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences 참조).

[0078] 적합한 부형제는 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체, 및 불활성 바이러스 입자와 같은 거대하고, 느리게 대사되는 거대분자를 포함하는 담체 분자일 수 있다. 다른 예시적인 부형제는 항산화제(예를 들어, 아스코브산), 킬레이트화제(예를 들어, EDTA), 탄수화물(예를 들어, 덱스트린, 하이드록시알킬 셀룰로오스, 및/또는 하이드록시알킬메틸 셀룰로오스), 스테아린산, 액체(예를 들어, 오일, 물, 식염수, 글리세롤 및/또는 에탄올) 습윤 또는 유화제, pH 완충 물질 등을 포함한다. 리포좀 역시 약제학적으로 허용가능한 부형제의 정의에 포함된다.

[0079] 또한, 상기 약제학적 조성물은 멸균 주사가능한 수성 유화액 또는 유성 현탁액과 같은, 멸균 주사 조제물의 형태일 수 있다. 이 유화액 또는 현탁액은 적합한 분산 또는 습윤제 및 현탁제를 이용하여 당해 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 제형화될 수 있다. 상기 멸균 주사가능한 조제물은 또한 1,2-프로판-디올 중의 용액과 같이, 무독성의 비경구적으로 허용가능한 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사가능한 용액 또는 현탁액일 수 있다.

[0080] 상기 멸균 주사가능한 조제물은 또한 동결건조된 분말로 제조될 수 있다. 사용될 수 있는 허용가능한 용매 중에는 물, 링거액, 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 고정유가 용매 또는 현탁 매질로 사용될 수 있다. 이 목적을 위해 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 포함하여 임의의 블랜드(bland) 고정유가 사용될 수 있다. 또한, 지방산(예를 들어, 올레산)이 주사액의 제조에 비슷하게 사용될 수 있다.

[0081] **원핵생물 단백질의 억제**

[0082] 일부 양태에서, 본 내용은 특정 핵산을 표적화하는 방법을 제공한다. 임의의 유형의 원핵생물 핵산이 표적화될 수 있으며, 상기 방법은, 예를 들어, 기능성 원핵생물 유전자 산물의 생성을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 표적화될 수 있는 핵산의 예로는 유전자 및 원핵생물 RNA 또는 DNA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0083] 원핵생물 표적 핵산의 경우, 다양한 양태에서, 상기 핵산은 게놈 DNA로부터 전사된 RNA이다.

[0084] 억제 정도는, 예를 들어, 표적 원핵생물이 발견되고 원핵생물 단백질의 억제가 바람직한 개체의 체액 시료로부터, 또는 표적 원핵생물이 발견되고 원핵생물 단백질의 억제가 바람직한 개체에서 당해 기술분야에 널리 알려진 영상 기술에 의해, 생체내에서 결정된다. 대안적으로, 억제 정도는 초기 시점에 세포 배양물 또는 생물 내에 존재하던 원핵생물의 양과 비교하여 세포 배양물 또는 생물 내에 남아있는 원핵생물의 양을 정량함으로써 생체내에서 결정된다.

[0085] 삼중체 복합체가 형성되는 구현예에서, 상기 원핵 게놈에 돌연변이가 도입되는 것이 고려된다. 이들 구현예에

서, 올리고뉴클레오티드-개질된 나노입자 결합체는 돌연변이를 포함하며, 삼중체 복합체의 형성이 나노입자에 부착된 올리고뉴클레오티드와 상기 원핵 게놈의 가닥 사이에 재조합 사건을 일으킨다.

[0086] **올리고뉴클레오티드 혼성화 및 설계**

[0087] 본 내용의 올리고뉴클레오티드는, 표적 폴리뉴클레오티드 서열과 혼성화되는 경우, 적어도 약 45℃, 일반적으로 약 50℃ 내지 60℃의 T_m을 가지나, 상기 T_m은, 예를 들어, 65℃와 같이 더 높을 수 있다. 표적이 원핵생물의 폴리뉴클레오티드 인 양태에서, 원핵생물의 표적 폴리뉴클레오티드 서열, 및 원핵생물의 mRNA 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 선택이 하기 본원에 고려된다.

[0088] 하나의 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 생리학적 조건하에서 실질적으로 37℃보다 큰, 예컨대, 적어도 45℃ 및, 일부 양태에서, 대략 60℃-80℃의 T_m을 갖는 표적 올리고뉴클레오티드 서열과 혼성화되도록 설계된다. 상기 올리고뉴클레오티드는 상기 핵산에 높은 결합 친화도를 갖도록 설계되며, 하나의 양태에서 상기 표적 올리고뉴클레오티드 서열에 100% 상보적이거나, 이는 불일치(mismatch)를 포함할 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드가 표적 올리고뉴클레오티드 서열에 대해 95%를 초과하여 상보적이거나, 표적 올리고뉴클레오티드 서열에 대해 90%를 초과하여 상보적이거나, 표적 올리고뉴클레오티드 서열에 대해 80%를 초과하여 상보적이거나, 표적 올리고뉴클레오티드 서열에 대해 75%를 초과하여 상보적이거나, 표적 올리고뉴클레오티드 서열에 대해 70%를 초과하여 상보적이거나, 표적 올리고뉴클레오티드 서열에 대해 65%를 초과하여 상보적이거나, 표적 올리고뉴클레오티드 서열에 대해 60%를 초과하여 상보적이거나. 표적 올리고뉴클레오티드 서열에 대해 55%를 초과하여 상보적이거나, 표적 올리고뉴클레오티드 서열에 대해 50%를 초과하여 상보적인 방법이 제공된다.

[0089] 본 기술분야의 숙련자라면 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자 결합체에 대한 적절한 표적을 용이하게 결정하고, 본 기술분야에 알려진 기술을 이용하여 올리고뉴클레오티드를 설계 및 합성할 수 있다고 이해될 것이다. 표적은, 예컨대, 관심 표적 핵산의 서열(예컨대, GenBank로부터)을 얻고, 이를, 예를 들어, 맥벡터(MacVector) 6.0 프로그램, 클러스탈W(ClustalW) 알고리즘, 블로섬(BLOSUM) 30 매트릭스, 및 핵산 정렬에 대해 갭 끊김 벌점(open gap penalty) 10 및 갭 확장 벌점(extended gap penalty) 5.0을 포함하는 기본 매개변수(default parameter)를 이용하여, 다른 핵산 서열과 정렬함으로써 확인될 수 있다.

[0090] 임의의 필수적인 원핵생물 유전자가 본 내용의 방법을 이용한 표적 유전자로서 고려된다. 전술한 바와 같이, 임의의 원핵생물 종(species)에 대한 필수적인 원핵생물 유전자는 *E. coli*에 대하여 게르데스(Gerdes)에 의해 설명된 것을 포함하는 여러 가지 방법을 이용하여 결정될 수 있다[Gerdes *et al.*, *J Bacteriol.* 185(19): 5673-84, 2003]. 많은 필수적인 유전자들이 박테리아계에 통해 보존됨으로써 표적 선발에 부가적인 지침을 제공한다. 표적 유전자 서열은 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에 의해 유지된 것과 같이 용이하게 이용가능한 생물정보 자원을 이용하여 확인될 수 있다. 다수의 미생물 종에 대한 완전한 참조 게놈 서열이 얻어질 수 있으며, 필수 박테리아 유전자에 대한 서열이 확인될 수 있다. 박테리아 균주는 또한 하나의 양태에서 미국 미생물 보존센터(American Type Culture Collection, ATCC)에서 수득된다. 임의의 주어진 종에 대한 적절한 배양 배지 및 조건을 이용한, 단순한 세포 배양 방법이 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자 결합체의 항균 활성을 결정하기 위해 확립될 수 있다.

[0091] 그리고 나서, 인간 감염을 치료하는데 사용하기에 앞서, 최적 활성을 나타내는 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자 결합체가 동물 모델 또는 가축에서 시험된다.

[0092] **치료 표적**

[0093] **세포-분열 및 세포-주기 표적 단백질에 대한 표적 서열**

[0094] 본 내용의 올리고뉴클레오티드는 필수적인 원핵생물 유전자를 암호화하는 원핵생물의 핵산 서열에 혼성화되도록 설계된다. 예시적인 유전자로는 세포 분열에 요구되는 것, 세포 주기 단백질, 또는 지질 생합성 또는 핵산 복제에 요구되는 유전자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 임의의 필수적인 박테리아 유전자는 유전자의 필수성이 결정되면 표적이 된다. 생물에서 어떤 유전자가 필수적인지 결정하는 한 가지 접근법은 기술된 바와 같은 유전자 풋프린팅(footprinting) 기술을 사용하는 것이다[Gerdes *et al.*, *J Bacteriol.* 185(19): 5673-84, 2003, 전체가 참조로써 본원에 통합됨]. 상기 보고에서, 620개의 *E. coli* 유전자가 필수적인 것으로 확인되었고, 3,126개의 유전자가 왕성한 호기성 성장을 위한 배양 조건 하에서의 성장에 불필요한 것으로 확인되었다. 진화 전후관계 분석(evolutionary context analysis)은 박테리아계에 전체에 상당한 수의 필수적인 *E. coli* 유전자가 보존되어 있으며, 특히 DNA 복제, 세포 분열 및 단백질 합성과 같은 핵심적인 세포 과정을 위해 하위 집

합의 유전자가 보존되어 있음을 입증하였다.

[0095] 다양한 양태에서, 본 내용은 하기를 포함하는 필수적인 박테리아 단백질을 암호화하는 표적 서열에 안정적으로 그리고 특이적으로 결합하는데 효과적인 핵산 서열인 올리고뉴클레오티드를 제공한다: (1) 식중독과 관련된 *E. coli* 균주, 예를 들어, O157:H7(본원에 전체가 참조로써 통합된, 미국 특허출원 제20080194463호의 표 1 참조)와 같은, 제시된 박테리아의 종의 특정 균주에 특이적인 서열; (2) 둘 이상의 박테리아 종에 공통된 서열; (3) 박테리아의 두 개의 관련된 속(즉, 비슷한 계통발생적 기원을 갖는 박테리아 속)에 공통된 서열; (4) 그람음성 박테리아 간에 일반적으로 보존된 서열; (5) 그람양성 박테리아 간에 일반적으로 보존된 서열; 또는 (6) 일반적으로 필수적인 박테리아 단백질-암호화 핵산 서열에 대한 공통 서열.

[0096] 일반적으로, 본 내용의 방법을 이용하여 유전자 발현을 조절하기 위한 표적은, 세포 분열 및 세포벽 합성(분열 세포벽 또는 dcw) 유전자 클러스터 중 하나의 유전자로부터 전사된 mRNA 서열과 같이, 활발한 원핵생물 성장 또는 복제 중에 발현되는 원핵생물 핵산을 포함하며, 이는 zipA, sulA, secA, dicA, dicB, dicC, dicF, ftsA, ftsI, ftsN, ftsK, ftsL, ftsQ, ftsW, ftsZ, murC, murD, murE, murF, murg, minC, minD, minE, mraY, mraW, mraZ, seqA 및 ddlB를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 각각 박테리아의 세포 분열 및 *E. coli*의 세포 주기의 일반적 검토를 위하여, 본원에 참고로써 명확히 통합되어 있는 문헌[Bramhill, *Annu Rev 세포 Dev Biol.* 13: 395-424, 1997], 및 [Donachie, *Annu Rev Microbiol.* 47: 199-230, 1993]을 참조한다. 부가적인 표적으로는 지질 생합성(예컨대, acpP) 및 복제(예컨대, gyrA)에 관여하는 유전자를 포함한다.

[0097] *E. coli*에서의 세포 분열은 세포 외피의 3개의 층 모두(세포막, 견고한 펩티도글리칸 층 및 외막)의 연계된 함입(invagination)을 포함한다. 격막(septum)의 수축은 세포를 두 개의 구획으로 절단시켜 복제된 DNA를 분리시킨다. 적어도 9개의 필수적인 유전자 산물이 이 과정에 참여한다: ftsZ, ftsA, ftsQ, ftsL, ftsI, ftsN, ftsK, ftsW 및 zipA[Hale *et al.*, *J Bacteriol.* 181(1): 167-76, 1999]. 고려되는 단백질 표적은 하기 논의되는 세 가지와 특히, 하기에 기술되는 GyrA 및 AcpP 표적이다.

[0098] *E. coli*에서 가장 이른 필수적인 세포 분열 유전자 중 하나인 FtsZ는 박테리아 세포의 분열 부위에서 막-관련 고리를 형성하는 수용성의 튜불린-유사 GTPase이다. 상기 고리는 세포 수축을 유도하는 것으로 여겨지며, 세포벽 함입에 영향을 미치는 것으로 보인다. FtsZ는 *E. coli* 내 세포 분열을 매개하는 격막 고리 구조의 필수 성분인, zipA라 불리는 *E. coli* 내의 신규 필수 내막 단백질에 직접 결합한다[Lutkenhaus *et al.*, *Annu Rev Biochem.* 66: 93-116, 1997].

[0099] GyrA는 박테리아 자이레이즈(gyrase) 효소의 소단위 A, 및 이의 유전자를 지칭한다. 박테리아 자이레이즈는 세포내 DNA의 초나선꼬임(supercoiling) 수준을 조절하며 DNA 복제에 필요한 박테리아 DNA 토포이소머라아제 중 하나이다.

[0100] AcpP는 지질 생합성에서 필수적인 보조 인자(cofactor)인 아실기 운반 단백질을 암호화한다. 상기 지방산 생합성 경로는 열 안정성 보조인자 아실기 운반 단백질이 상기 경로에서 중간체들에 결합하는 것을 필요로 한다.

[0101] 이들 세 가지 단백질 각각에 대하여, 미국 특허출원 제20080194463호의 표 1은 많은 중요한 병원성 박테리아 각각에 대한 표적 서열을 함유하는 예시적인 박테리아 서열을 제공한다. 상기 유전자 서열은 각 박테리아 균주에 대한 GenBank 참조 전체 게놈 서열로부터 유래된다.

[0102] **원핵생물 16S 리보솜 RNA에 대한 표적 서열**

[0103] 하나의 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 생리학적 조건하에서 실질적으로 37℃를 초과하는, 예를 들어, 적어도 45℃ 및 바람직하게는 60℃-80℃의 T_m을 갖는, 박테리아 16S rRNA 핵산 서열을 암호화하는 서열에 혼성화하도록 설계된다.

[0104] 보다 상세하게는, 상기 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 하기 특징을 갖는 표적 16S rRNA 핵산 서열에 안정적으로 그리고 특이적으로 결합하는데 효과적인 서열을 갖는다: (1) 16s rRNA의 이중가닥 서열에서 발견되는 서열, 예컨대, 16S rRNA 서열의 펩티딜 트랜스퍼라아제 중심, 알파-사르신 루프(alpha-sarcin loop) 및 mRNA 결합 서열; (2) 박테리아 16s rRNA의 단일 가닥 서열에서 발견되는 서열; (3) 주어진 박테리아 종의 특정 균주, 즉 식중독과 연관된 *E. coli*의 균주에 특이적인 서열; (4) 특정 박테리아 종에 특이적인 서열; (5) 둘 이상의 박테리아 종에 공통된 서열; (6) 박테리아의 두 개의 연관된 속(즉, 비슷한 계통발생적 기원을 갖는 박테리아 속)에 공통된 서열; (7) 그람음성 박테리아 16S rRNA 서열 간에 일반적으로 보존된 서열; (6) 그람양성 박테리아 16S rRNA 서열 간에 일반적으로 보존된 서열; 또는 (7) 일반적으로 박테리아 16S rRNA 서열에 대한 공통 서

열.

[0105] 예시적인 박테리아 및 16S rRNA 서열에 대하여 관련된 GenBank 등록번호가 본원에 전체가 참조로써 통합되어 있는 미국 특허번호 제6,677,153호의 표 1에 제시되어 있다.

[0106] 에세리키아 콜리(*Escherichia col, E. coli*)는 위장관의 정상세균총의 일부인 그람음성 박테리아이다. 수백 가지의 *E. coli* 균주가 존재하며, 이들 중 대부분은 무해하며 건강한 인간 및 동물의 위장관에 서식한다. 현재, 인간에서 위장염(gastroenteritis)을 일으키는 4가지 알려진 부류의 병원성(enterovirulent) *E. coli*("EEC 그룹")가 존재한다. 이들 중에는, 장관병원성(enteropathogenic)(EPEC) 균주 및 독성 기전이 일반적인 *E. coli* 내독소(enterotoxin) 분비와 관련된 균주가 있다. 그러한 *E. coli* 균주는 위장관 및 요로의 감염과 관련된 질환, 패혈증(septicemia), 폐렴, 및 수막염(meningitis)을 포함하는 다양한 질환을 일으킬 수 있다. 항생제가 일부 균주에는 효과적이지 않으며 항상 감염 재발을 예방하지는 않는다.

[0107] 예를 들어, *E. coli* 균주 0157:H7은 매해 미국에서 10,000 내지 20,000건의 감염을 일으키는 것으로 추정된다(Federal Centers for Disease Control and Prevention). 출혈성 대장염(Hemorrhagic colitis)은 *E. coli* 0157:H7에 의해 야기되는 급성 질환의 명칭이다. 미취학 아동 및 노인들은 심각한 합병증에 걸릴 위험성이 크다. *E. coli* 균주 0157:H7은 최근에 태평양 북서부에 있는 패스트푸드점에서 덜 익은 햄버거를 먹은 4명의 어린이를 사망시킨 원인으로 보고되었다 [예컨대, Jackson *et al.*, Epidemiol. Infect. 120(1):17-20, 1998 참조].

[0108] 병원성 *E. coli* 균주에 대한 예시적인 서열은 GenBank 등록번호 X97542, AF074613, Y11275 및 AJ007716을 포함한다.

[0109] 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*)은 국소화된 위장관 감염인 위장염(gastroenteritis)(설사, 복부 경련, 및 열)에서부터 심각한 전신성 질환인 장티푸스(enteric fever)(typhoid fever 포함)까지의 임상학적 범위의 다양한 질환을 일으키는 그람음성 박테리아이다. 살모넬라 감염은 또한 상당한 가축의 손실을 야기한다.

[0110] 그람음성 바실러스를 대표하여, 살모넬라속 균(*Salmonella spp.*)의 세포벽은, 세포 용해시 방출되어 생물의 독성의 원인인 내독소로 작용할 수 있는 복합체 지질다당류(LPS)를 함유한다.

[0111] 살모넬라가 완전히 익히지 않은 고기 및 동물 제품에서 생존한다는 사실 때문에, 오염된 식품이 비-장티푸스성 살모넬라 감염에 대한 주된 전염 방식이다. 가장 흔한 동물 공급원은 닭, 칠면조, 돼지, 및 소이며, 그 외에도 수많은 기타 가축 및 야생 동물이다. 장티푸스 및 살모넬라속 균에 의해 야기되는 기타 장티푸스의 역학(epidemiology)은 인간 배설물로 오염된 물과 관련이 있다.

[0112] 백신이 장티푸스에 이용될 수 있고 일부 효과적이긴 하지만, 어떠한 백신도 비-장티푸스성 살모넬라 감염에는 이용될 수 없다. 비-장티푸스성 살모넬라증(salmonellosis)은 위생적인 도축 행위 및 식품의 조리 및 냉장을 통해 관리된다. 전신성 질환을 위해 항생제가 권고되며, 암피실린이 일부 성공적으로 사용되어 왔다. 하지만, 과량의 항생제로 치료 중인 환자, 위 수술 후 면역억제 약물로 치료 중인 환자, 및 용혈성 빈혈(hemolytic anemia), 백혈병, 림프종, 또는 AIDS를 갖는 환자에게 있어서, 살모넬라 감염은 의학적 문제로 남아있다.

[0113] 슈도모나스속 균(*Pseudomonas spp.*)은 대부분의 항생제에 내성이기 때문에 임상학적으로 중요한 운동성의 그람음성 간균이며, 병원에서 획득되는(병원에서 감염되는) 감염의 주된 원인이다. 감염은 면역력이 약화된 개체, 화상 피해자, 인공호흡기를 달고 있는 개체, 유치 도관(indwelling catheter)을 갖는 개체, 정맥내 진통제 사용자(IV narcotic user) 및 만성 폐질환(예컨대, 낭포성 섬유증(cystic fibrosis))을 갖는 개체에서 가장 흔하다. 건강한 개체에서 감염은 드물긴 하지만, 이는 많은 부위에서 발생하여 요로 감염, 패혈증, 폐렴, 인두염(pharyngitis), 및 수많은 기타 문제를 야기하며, 치료는 종종 더 큰 상당한 사망률로 실패한다.

[0114] 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)는 단극 운동성(unipolar motility)을 갖는 그람음성의 호기성 간균이다. 기회감염성 인간 병원균인 *P. aeruginosa*는 또한 식물의 기회감염성 병원균이다. 다른 슈도모나드(Pseudomonad)와 마찬가지로, *P. aeruginosa*는 여러 가지 색소를 분비한다. *P. aeruginosa*의 최종적인 임상 확인은 피오시아닌 및 플루오레세인의 생성 뿐만 아니라 42℃에서 성장하는 생물의 능력의 확인을 포함할 수 있다. *P. aeruginosa* 는 또한 디젤 및 제트 연료에서 성장할 수 있으며, 이 때문에 미생물 부식을 일으키는, 탄화수소 이용 미생물(또는 "HUM bug")으로 알려져 있다.

[0115] 비브리오 콜레라(*Vibrio cholera*)는 인간을 감염시키며 열악한 위생 상태에 의해 확산되는 질환인 콜레라를 일으키며, 오염된 물 공급을 야기한다. *Vibrio cholerae*는 인간 소장에 서식할 수 있으며, 그 곳에서 점막을 통

한 이온 수송을 방해하는 독소를 생성하여 설사 및 수분 손실을 야기한다. *Vibrio cholerae*로 감염된 개체는 전해질을 함유하는 용액으로 정맥내 또는 경구 중 하나로 수분보충을 요한다. 상기 질병은 일반적으로 자기 한정적이지만, 탈수 및 필수 전해질의 손실로 인해 사망이 발생할 수 있다. 테트라사이클린과 같은 항생제가 상기 질병의 진행을 단축시키는 것으로 입증되어 왔으며, 경구 백신이 현재 개발 중이다.

[0116] 네이세리아 고노로애(*Neisseria gonorrhoea*)는 그람음성 구균으로서, 흔한 성병인 임질(gonorrhea)의 원인 인자이다. *Neisseria gonorrhoea*는 그 표면 항원이 달라질 수 있으며, 이는 재감염에 대한 면역발달을 막는다. 주로 십대 및 젊은 성인 사이에서, 매해 추정상 750,000건의 보고되지 않은 추가 건과 함께, 미국에서 매해 거의 750,000건의 임질이 보고되고 있다. 암피실린, 아목실린, 또는 일부 유형의 페니실린이 임질의 치료에 사용이 권장되고 있다. 하지만, 페니실린 내성 임질의 발생률이 증가하고 있으며, 주사에 의해 제공되는 새로운 항생제, 예컨대, 세프트리악손(ceftriaxone) 또는 스펙티노마이신(spectinomycin)이 대부분의 임균 감염을 치료하는데 현재 사용되고 있다.

[0117] 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)는 일반적으로 인간의 코에 서식하며 종종 피부 상에서 발견되는 그람양성 간균이다. 스타필로코커스는 혈류 감염, 폐렴, 및 병원내 감염을 일으킬 수 있다. *Staph. aureus*는 심각한 식중독을 일으킬 수 있으며, 많은 균주들이 식품에서 성장하여 외독소를 생성한다. 통상적인 항생제, 예컨대, 반코마이신(vancomycin)에 내성인 스타필로코커스가 미국 및 해외에서 공동체와 병원 환경 내의 주된 공공 건강 위해요소(health challenge)로서 부각되었다. 최근에는, 반코마이신 내성 *Staph. aureus* 분리균이 일본에서도 확인되었다.

[0118] 마이코박테리움 투버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)는 때때로 불구가 되게 하고 치명적인 질환인 결핵(tuberculosis)의 원인 인자인 그람 양성 박테리아이다. 결핵은 전 세계적으로 증가하고 있으며 단일 감염 질환으로 인한 사망의 주된 원인이다(현재 매해 3백만명의 사망률을 보임). 결핵은 뇌, 신장 및 뼈를 포함하는 인체의 몇 가지 장기에 영향을 미칠 수 있지만, 가장 흔하게는 폐에 영향을 미친다.

[0119] 미국에서, 매해 대략 26,000건의 활동성 질환의 새로운 사례와 더불어, 양성 피부 시험에서 나타난 바와 같이, 대략 천만명의 사람들이 마이코박테리움 투버큘로시스에 감염되고 있다. 결핵(TB) 사례의 증가는 HIV/AIDS, 노숙(homelessness), 약물 남용(drug abuse) 및 활동성 감염을 갖는 사람들의 이주(immigration)와 연관되어 있다. 약물 민감성 TB를 위한 현 치료 프로그램은 6 내지 9개월의 기간 동안 둘 또는 네 가지의 약물(예컨대, 이소니아지드(isoniazid), 리팜핀(rifampin), 피라진아미드(pyrazinamide), 에탐부톨(ethambutol) 또는 스트렙토마이신)을 복용하는 것을 포함하는데, 모든 TB 균이 단일 약물에 의해 사멸될 수 없기 때문이다. 또한, 마이코박테리움 투버큘로시스의 약물 내성 및 다약제 내성 균주의 관찰이 증가하고 있다.

[0120] 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylor, H. pylori)*는 위벽을 감염시키는 나선 또는 S-모양의 형태를 갖는, 미호기성의 그람음성의 성장이 느린 편모 생물이다. *H. pylori*는 만성 표재성 위염(chronic superficial gastritis), 위궤양 질환, 및 위선암(gastric adenocarcinoma)을 야기하는 만성 위축성 위염(chronic atrophic gastritis)과 연관된 인간 위 병원균이다. *H. pylori*는 인간에서 가장 흔한 만성 박테리아 감염 중 하나이며 활동성 위염을 가진 환자의 90% 이상에서 발견된다. 현 치료법은 비스무스(bismuth), 메트로니다졸(metronidazole), 및 테트라사이클린 또는 아목실린 중 하나를 이용한 세 가지 약물 치료요법을 포함하며, 이는 대부분의 경우에 *H. pylori* 를 제거한다. 세 가지 약물 요법의 문제점으로는 환자 순응도(compliance), 부작용 및 메트로니다졸 내성을 포함한다. 유망한 대안적인 두 가지 약물 요법은 아목실린과 메트로니다졸 또는 오메프라졸과 아목실린이다.

[0121] 스타필로코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)는 그람양성 구균이며 박테리아 폐렴 뿐만 아니라 중이염(otitis media) 및 수막염(meningitis)의 가장 흔한 원인 중 하나이다. 미국에서 매해, 폐렴구균 질환은 대략 50,000건의 균혈증(bacteremia); 3,000건의 수막염; 100,000-135,000 입원; 및 7백만 건의 중이염을 차지한다. 폐렴구균 감염은 미국에서 매해 추정상 40,000명의 사망을 야기한다. 2세 미만의 아동, 65세가 넘는 성인 및, 예컨대, 울혈성 심부전, 당뇨, 기종(emphysema), 간 질환, 겸상 적혈구, HIV를 포함하는, 기저 의학적 상태를 갖는 임의의 연령의 사람 및 특별한 환경, 예를 들어, 양로원, 장기 보호시설에 사는 사람들이 감염 위험성이 높다.

[0122] 약물 내성 *S. pneumoniae* 균주가 미국에서 흔하게 되었고, 많은 페니실린 내성 폐렴구균 역시 에리트로마이신 또는 트리메토프림-설파메톡사졸(trimethoprim-sulfamethoxazole)과 같은 기타 항미생물 약물에 내성이다.

[0123] 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*)은 매독(syphilis)을 일으키는 스피로헤타(spirochete)이다. *T.*

*pallidum*은 매독, 매종(yaws) 및 비성병성(non-venereal) 풍토병성 매독 또는 열대 백반성 피부병(pinta)을 일으키는 유일한 병원균이다. 트레포네마 팔리둠은 시험관내에서 성장할 수 없고 포유동물 세포의 부재하에서 복제한다. 초기 감염은 감염 부위에 궤양을 일으키지만, 상기 박테리아는 체내 전체로 이동하여 시간이 흐르면서 많은 장기를 손상시킨다. 마지막 단계에서, 전염되는 것은 아니지만, 치료되지 않은 매독은 심각한 심장 이상, 정신적 장애, 실명, 기타 신경학적 문제, 및 사망을 일으킬 수 있다.

[0124] 매독은 일반적으로 주사에 의해 투여되는 페니실린으로 치료된다. 다른 항생제들이 페니실린에 알레르기가 있는 환자, 또는 통상적인 용량의 페니실린에 반응하지 않는 환자를 위해 이용될 수 있다. 매독의 모든 단계에서, 적절한 치료가 상기 질환을 치료할 것이지만, 매독 말기에서는 신체 장기에 이미 이뤄진 손상은 뒤바뀔수 없다.

[0125] 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)는 미국에서 가장 흔한 박테리아성 성병 질환이며, 매해 4백만건의 새로운 사례가 발생하는 것으로 추정된다. 가장 높은 감염율은 15 내지 19세이다. 클라미디아는 비임균성 요도염(non-gonococcal urethritis, NGU), 자궁경관염(cervicitis), 박테리아 질염(vaginitis), 및 골반내염증 질환(PID)의 주된 원인이다. 클라미디아 감염은 증상이 매우 가볍거나 증상이 전혀 없을 수 있지만, 치료되지 않는 경우 특히 여성의 생식기에 심각한 손상을 일으킬 수 있다. 클라미디아 감염을 치료하기 위해 아지트로마이신(azithromycin), 에리트로마이신, 오플록사신(oflloxacin), 아목실린 또는 독시사이클린(doxycycline)과 같은 항생제가 통상적으로 처방된다.

[0126] 바토넬라 헨셀래(*Bartonella henselae*) 고양이 찰상열(Cat Scratch Fever, CSF) 또는 고양이 찰상 질환(CSD)은 고양이에 대한 노출을 통해 획득되는 인간의 질환으로서, 처음에는 로카리마애 헨셀래(*Rochalimaea henselae*)로 명명되어 현재는 바토넬라 헨셀래(*Bartonella henselae*)로 알려진, 그람음성 간균에 의해 야기된다. 증상으로는 열 및 부은 림프절을 포함하며, CSF는 일반적으로 사람들에게 상대적으로 양성인 자기 제한적인 질환이나, 바토넬라 헨셀래의 감염은 균혈증을 갖는 급성 열성 질환(acute febrile illness), 간균성 혈관종증(bacillary angiomatosis), 간자색반병(peliosis hepatis), 간균성 비장염(bacillary splenitis), 및 AIDS 뇌병증(encephalopathy)과 같은 기타 만성 질환 징후를 포함하는, 면역이 저하된 사람들에게 뚜렷한 임상 증상을 생성할 수 있다. 상기 질환은 독시사이클린, 에리트로마이신, 리팜핀, 페니실린, 젠타마이신, 세프트리악손, 시프로플록사신, 및 아지트로마이신과 같은 항생제로 치료된다.

[0127] 해모필러스 인플루엔자(H*aemophilus influenza, H. influenza*)는 그람음성 박테리아의 패밀리이며, 6가지 유형이 알려져 있으며, 대부분의 *H. influenza* 관련 질환은 유형 B, 또는 "HIB"에 의해 야기된다. HIB에 대한 백신이 개발될 때까지, HIB는 중이염, 부비강 감염, 기관지염의 흔한 원인, 수막염의 가장 흔한 원인, 및 폐렴, 화농성관절염(septic arthritis)(관절 감염), 봉와직염(cellulitis)(연조직의 감염), 및 심막염(pericarditis)(심장을 둘러싸는 막의 감염) 사례에서의 흔한 원인이었다. *H. influenza* 유형 B 박테리움은 인간에 널리 퍼져 있으며, 일반적으로 병을 일으키지 않고 목과 코에서 서식한다. 백신접종을 하지 않은 5세 이하의 아동은 HIB 질환의 위험에 있다. *H. influenza* 감염에 의해 야기되는 수막염 및 기타 중증 감염은 뇌손상과 사망을 야기할 수 있다.

[0128] 쉬겔라 디센테리애(*Shigella dysenteriae,* Shigella dys.)는 이질(dysentary)을 일으키는 그람음성 간균이다. 결장에서, 상기 박테리아는 점막 세포로 들어가 점막 세포 내에서 분열하여, 광범위한 염증 반응을 일으킨다. 쉬겔라 감염은 심각한 설사를 일으켜 탈수를 야기할 수 있으며, 저연령, 고령 또는 만성적으로 아픈 사람들에게 위험할 수 있다. Shigella dys.는 강력한 독소(쉬가(shiga) 독소)를 생성하며, 이는 세포독성, 장독성, 신경독성이며 단백질 합성의 억제제로 작용한다. 암피실린 및 TMP-SMX와 같은 항생제에 대한 내성이 생겨났지만, 시프로플록사신(ciprofloxacin), 노르플록사신(norfloxacin) 및 에녹사신(enoxacin)과 같은 더 새롭고 더 값비싼 항생제를 이용한 치료가 여전히 효과적이다.

[0129] 리스테리아(*Listeria*)는 인간 및 동물 분변에서 발견되는 그람양성, 운동성 박테리아의 종이다. 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogene*)는 선회병(listeriosis), 수막뇌염(meningoencephalitis) 및 수막염과 같은 질환을 일으킨다. 이 생물은 특히 임신한 여성, 갓난 아기, 노인 및 면역이 저하된 개체에서 식품매개 병원균으로 인한 사망의 주된 원인 중 하나이다. 이는 썩어가는 식물질, 하수, 물, 및 토양과 같은 환경에서 발견되며, 극도로 높은 온도 및 염 농도에서 생존할 수 있어 특히 재가열되지 않는 식품에서 매우 위험한 식품 매개 병원균이다. 상기 박테리움은 장 내 감염 부위로부터 중추신경계 및 태아-태반 구성단위(fetal-placental unit)까지 퍼질 수 있다. 감염으로 인해 수막염, 위장염, 및 패혈증이 발생할 수 있다. 소와 양에서, 리스테리아 감염은 뇌염과 자연유산을 일으킨다.

[0130] 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*)는 장내 그람음성 공생 생물로서 *E. coli*와 먼 친척 관계에 있다. 이는 일반적으로 인간 요도에서 서식하지만, 도관이 삽입된 개체에서의 요로 감염의 주된 원인인 기회감염성 병원균이다. *P. mirabilis*는 두 가지 우수한 특성을 갖는다: 1) 배양 플레이트 상에서 군집하는 현상으로 나타나는, 매우 빠른 운동성을 가짐; 및 2) 요소를 분해하고 비뇨생식관(genitourinary tract)에서 생존하는 능력을 부여하는 우레아제(urease)를 생산함.

[0131] 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*)는 전 세계적으로 수백만명을 사망시킨 전염병(선페스트(bubonic) 및 폐) 파괴 질환의 원인 물질이다. 상기 생물은 감염된 벼룩이 물어 쥐에서 인간으로 전염되거나 광범위한 감염 중에 공기를 통해 인간에서 인간으로 전염될 수 있다. 예르시니아 페스티스는 매우 병원성이 강한 생물로서 질환을 일으키는데 매우 적은 수를 필요로 하며, 치료되지 않는 경우 종종 치명적이다. 상기 생물은 장침윤성이며, 숙주 세포 전신으로 퍼지기에 앞서 대식세포 내에서 생존 및 번식할 수 있다.

[0132] 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*)는 또한 탄저균(anthrax)으로도 알려져 있다. 인간이 오염된 동물과 접촉되는 경우 감염된다. 탄저균은 인간 대 인간 접촉에 의해 전염되지 않는다. 상기 질환의 세 가지 형태는 피부, 폐 및 장을 포함하는 감염 부위를 반영한다. 폐 및 장 감염은 치료되지 않는 경우 보통 치명적이다. 포자가 대식세포에 의해 흡수되어 포식용해소체(phagolysozome; 막 구획) 내로 내재화되며, 그곳에서 발아가 개시된다. 박테리아는 상기 감염된 대식세포가 용해되자마자 혈액 내로 방출되며, 그곳에서 박테리아가 급격하게 증가하여 순환계 및 림프계 전체로 퍼지는데, 이 과정이 패혈 쇼크, 호흡 곤란 및 장기 손상을 야기한다. 이 병원균의 포자가 테러 무기로 사용되어 왔다.

[0133] 버크홀데리아 말레이(*Burkholderia mallei*)는 일차적으로 말, 노새, 및 당나귀에서 발생하는 감염성 질환인 마비저(glanders)를 일으키는 그람음성 호기성 박테리움이다. 이는 드물게 인감 감염과 연관되며 가축에서 더 흔하게 발견된다. 이 생물은 *B. pseudomallei*와 유사하며 비운동성에 의해 구별된다. 상기 병원균은 숙주 적응성(host-adapted)이며 숙주 외부 환경에서는 발견되지 않는다. 마비저는 항생제로 치료되지 않는 경우 보통 치명적이며, 감염은 공기를 통해서, 또는 보다 흔하게는 감염된 동물과의 접촉시 발생할 수 있다. 급성 발병 폐렴, 균혈증(혈액을 통한 생물의 확산), 농포(pustule), 및 사망이 감염 동안에 발생하는 흔한 결과이다. *Salmonella typhimurium*로부터 나온 것과 유사한 타입 III 분비 시스템이 필요하긴 하지만, 독성 기전은 잘 알려져 있지 않다. 생물학적 테러 물질로서 잠재성을 가지는 것으로 여겨지는 이 잠재적으로 위험한 생물에 대하여 백신은 존재하지 않는다. 이 생물의 게놈은 관련된 *Bukholderia pseudomallei*(하기)에 비해 다수의 삽입 서열, 및 세포 표면 단백질의 항원 변이에 작용할 수 있는 다수의 단순한 서열 반복을 갖는다.

[0134] 버크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*)는 인간과 동물에서 유비저(meliodosis)를 일으키는 그람음성 박테리움이다. 유비저는 아시아, 태국, 및 호주의 일부 지역에서 발견되는 질환이다. *B. pseudomallei*는 통상적으로 토양 생물이며, 논 및 습한 열대 토양에서 회수되었지만, 기회감염성 병원균으로서 당뇨병으로부터 고통받는 개체와 같은 민감한 개체에서 질환을 일으킬 수 있다. 상기 생물은 세포내에 존재할 수 있으며, 폐렴 및 균혈증(혈류를 통한 박테리움의 확산)을 일으킨다. 잠복기간은 매우 길고, 감염이 질환보다 수십년 앞서 일어나며, 흔히 관찰되는 현상과 함께, 치료에 수개월의 항생제 사용이 소요될 수 있다. 세포내 확산은 세포의 한쪽 끝에서 액틴 중합(actin polymerization)의 유도를 통해 일어날 수 있으며, 이는 세포질을 통한 이동 및 세포에서 세포로의 이동을 가능케 한다. 이 생물은 *B. mallei* 게놈에서 관찰되는 것과 유사한, 항원 변이를 촉진할 수 있는 수많은 작은 서열 반복을 가지고 있다.

[0135] 버크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*)는 버크홀데리아 멀티보란스(*Burkholderia multivorans*), 버크홀데리아 베트나미엔시스(*Burkholderia vietnamiensis*), 버크홀데리아 스타빌리스(*Burkholderia stabilis*), 버크홀데리아 세노세파시아(*Burkholderia cenocepacia*) 및 버크홀데리아 암비파리아(*Burkholderia ambifaria*)를 포함하는 적어도 7가지의 상이한 아종(sub-species)으로 구성된 그람음성 박테리움이다. B. cepacia는 기저 폐 질환(예를 들어, 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 또는 면역 문제(예를 들어, 만성 육아종 질환(chronic granulomatous disease))를 갖는 사람에게 흔히 폐렴을 일으키는 중요한 인간 병원균이다. B. cepacia는 일반적으로 물과 토양에서 발견되며 습한 환경에서 오랫동안 생존할 수 있다. 사람에서 사람으로의 확산이 입증되어 왔으며, 그 결과 낭포성 섬유증을 갖는 환자를 위해 많은 병원, 진료소, 및 캠프들은 *B. cepacia*의 엄격한 격리 조치를 강구해왔다. 확산을 제한하기 위해 상기 박테리아를 갖는 개체들은 분리된 영역에서 종종 치료된다. 이는 *B. cepacia*의 감염이 급격한 폐 기능의 급격한 저하를 야기하여 사망을 초래하기 때문이다. *B. cepacia*의 진단은 객담 배양(sputum culture)으로부터 상기 박테리아를 분리하는 것을 포함한다. *B. cepacia*가 아미노글리코사이드(예컨대, 토브라마이신(tobramycin)) 및 폴리믹신(polymixin) B를 포함하는 많은 통상적인 항생제에 선천적으로 내성이기 때문에 치료가 어렵다. 치료는 통상적으로 다수의 항생제를 포함하며, 세프트라

지딤, 독시사이클린, 피페라실린, 클로람페니콜, 및 코-트리목사졸을 포함할 수 있다.

[0136] 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*)는 에드워드 프란시스에 의해 20세기 초 캘리포니아의 툴레어 카운티에 있는 다람쥐에 영향을 미쳤던 전염병 유사 질환의 원인물질로서 최초로 알려졌다. 이 생물은 현재 그와 이름이 같은 질환을 갖는다. 이 질환은 야토병(tularemia)이라 불리며 기록된 역사 전체에 잘 알려져 왔다. 이 생물은 감염된 고기를 통해 또는 에어로졸을 통해 감염된 진드기 또는 사슴파리로부터 인간으로 전염될 수 있으므로 강력한 생물테러 물질이다. 이는 수중 생물이며, 레지오넬라균(Legionella)에서 관찰되는 것과 유사하게, 원생동물 내에 서식하는 것으로 발견될 수 있다. 이는 매우 높은 감염율을 가지며 포식 세포 및 비포식 세포에 침윤하여 급격하게 번식할 수 있다. 대식세포 내에서 상기 생물은 식포(phagosome)를 벗어나 세포질에 서식할 수 있다.

[0137] **수의학적 적용**

[0138] 가축의 위장관에서의 건강한 미생물상(microflora)은 건강 및 부합하는 관련 식품의 생산에 있어 매우 중요하다. 인간과 마찬가지로, 건강한 동물의 위장관은 수많은 유형의 박테리아(즉, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Salmonella spp.*)를 함유하며, 이들은 서로 생태적 균형을 맞추어 서식한다. 이 균형은 식이 변화, 스트레스에 의해, 또는 항생제 또는 기타 치료법에 대해 반응으로 방해를 받아, 동물에서 일반적으로 살모넬라, 캄필로박터, 엔테로코사이(*Enterococci*), 툴라레미아(*Tularemia*) 및 *E. coli*와 같은 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 질환을 야기한다. 이들 동물에서의 박테리아 감염은 종종 치료적 개입을 필요로 하며, 이는 빈번히 생산성 감소와 연관된 치료 비용을 갖는다.

[0139] 그 결과, 위장관 내 미생물상의 균형을 유지하기 위해 가축은 일상적으로 항생체로 치료된다. 이 접근법의 단점은 항생제 내성 박테리아가 생성되는 것과 상기 항생제 및 내성 박테리아가 인간 섭취용 식품으로 이어지는 것이다.

[0140] **피부 장애를 개선하기 위한 표적**

[0141] 본 내용의 일부 구현예에서, 본원에 개시된 ON-NP를 포함하는 조성물을 투여되고 표적 유전자의 발현을 조절하는 것이 고려된다. 다양한 구현예에서, 상기 조성물은 피부 장애를 개선하기 위해 투여된다.

[0142] 일부 양태에서, 개선될 피부 장애는 과증식 장애, 종양 장애, 유전적 장애, 노화, 염증, 감염, 및 화장품 미용 손상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 추가의 양태에서, 상기 피부 장애는 암을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또 다른 추가 양태에서, 상기 암은 편평세포암종, 기저세포암종, 흑색종 및 유방암을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 관련 양태에서, 본 내용의 조성물에 의해 표적화되는 유전자 생성물은 Ras, IkBa, hedgehog, B-Raf, Akt 및 사이클린 D를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0143] 일부 구현예에서, 본 내용의 조성물은 단순성 수포성 표피박리증(epidermolysis bullosa simplex), 수포성 어린선(bullous ichthyosis), 선천성 경조증(pachyonychia congenita), 코스텔로 증후군(Costello syndrome) 및 결절성경화증(tuberous sclerosis)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 유전적 장애를 개선하기 위해 투여된다. 일부 양태에서, 상기 투여 조성물에 의해 표적화되는 유전자 산물은 돌연변이를 포함하는 유전자 산물이며, 상기 유전자 산물은 K5, K14, K1, K10, H-Ras, N-Ras, K-Ras, NF-kB, Akt, B-raf, ERK, Mek1, Mek2, 및 m-Tor를 포함하나 이에 제한되지 않는 유전자에 의해 발현된다.

[0144] 일부 구현예에서, 본 내용의 조성물은 UV-손상 및 조로증(progeria)을 포함하나 이에 제한되지 않는 노화 장애를 개선하기 위해 투여된다. 일부 양태에서, 투여 조성물에 의해 표적화되는 유전자 산물은 매트릭스 메탈로프로테나아제-1 및 프로게린(progerin)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0145] 추가의 구현예에서, 본 내용의 조성물은 아토피성 피부염 및 건선을 포함하는 염증 장애를 개선하기 위해 투여된다. 일부 양태에서, 투여 조성물에 의해 표적화되는 유전자 산물은 인터루킨-23을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다양한 양태에서, 투여 조성물에 의해 표적화되는 유전자 산물은 IL1-α, IL1-β, IL6, TNF-α, 백혈병 억제 인자(LIF), IFN-ɣ, 온코스타틴 M(OSM), 섬모 향신경성 인자(ciliary neurotrophic factor, CNTF), TGF-β, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, IL-8을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0146] 또 다른 추가의 구현예에서, 본 내용의 조성물은 감염을 개선하기 위해 투여된다. 일부 양태에서, 상기 감염은 바이러스 감염이다. 일부 양태에서, 상기 감염은 본원에 개시된 박테리아 감염이다. 상기 감염이 바이러스 감염인 양태에서, 바이러스 감염이 사마귀를 생성하는 것으로 고려된다. 이들 양태에서, 투여 조성물에 의해 표적화되는 유전자 산물은 E6/E7을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0147] 일부 구현예에서, 본 내용의 조성물은 지루성 각화증(seborrheic keratoses), 표피 모반(epidermal nevus) 및 색소성 모반(pigmented nevus)을 포함하나 이에 제한되지 않는 화장품 미용손상을 개선하기 위해 투여된다. 일부 양태에서, 투여 조성물에 의해 표적화되는 유전자 산물은 돌연변이를 포함하는 유전자 산물이며, 상기 유전자 산물은 FGFR3, K10 및 B-Raf를 포함하나 이에 제한되지 않는 유전자에 의해 발현된다.

[0148] **운반체**

[0149] 일부 구현예에서, 본 내용의 ON-NP 조성물 및 방법은 운반체(vehicle)를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "운반체"는 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자가 결합되는 기본 화합물이다.

[0150] 본 내용의 조성물 및 방법에 유용한 운반체는 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 알려져 있으며, 연고, 크림, 로션, 겔, 포말, 완충액 또는 물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 운반체는 살리실산, 알파-하이드록시산, 또는 각질층을 통한 침투를 향상시키는 요소(urea)를 포함하는 하나 이상의 부가적인 물질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0151] 다양한 양태에서, 본 내용의 조성물 및 방법에 사용하기 위해 고려되는 운반체는, 아쿠아포어® 치료 연고(Aquaphor® healing ointment), A+D, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글리세롤, 광물유, 바셀린 인텐시브 케어 크림(Vaseline Intensive Care cream)(광물유 및 글리세린 포함), 바셀린(petroleum jelly), DML(바셀린(petrolatum), 글리세린 및 PEG 20 포함), DML(바셀린, 글리세린 및 PEG 100 포함), 유세린 보습 크림(Eucerin moisturizing cream), 세타필(Cetaphil)(바셀린, 글리세롤 및 PEG 30 포함), 세타필, 세라베(CeraVe)(바셀린 및 글리세린 포함), 세라베(CeraVe)(글리세린, EDTA 및 콜레스테롤 포함), 저겐스(Jergens)(바셀린, 글리세린 및 광물유 포함), 및 니베아(Nivea)(바셀린, 글리세린 및 광물유 포함)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 통상의 기술을 가진 자라면 부가적인 운반체가 본 개시의 조성물 및 방법에 유용하다는 것을 상기 리스트로부터 이해할 것이다.

[0152] 연고는, 본원에 사용된 바와 같이, 수중유(water in oil) 제형이다. 크림은, 본원에 사용된 바와 같이, 유중수 제형이다. 일반적으로, 로션은 크림이나 연고보다 많은 수분을 가지며, 겔은 알코올을 포함하고, 포말은 기체 방울을 액체 내에 포획함으로써 형성되는 물질이다. 이들 용어는 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 이해된다.

[0153] **나노입자**

[0154] 나노입자에 부착된 폴리뉴클레오티드를 갖는 것을 관능화된 나노입자를 제공한다. 나노입자의 크기, 형상 및 화학 조성은 수득한 폴리뉴클레오티드 관능화된 나노입자의 물성에 기여한다. 이들 물성은 예를 들어, 광학 물성, 광전자 물성, 전자화학 물성, 전자 물성, 다양한 용액 중 안정성, 자기 물성, 및 공극 및 채널 크기 변화를 포함한다. 상이한 크기, 형상 및/또는 화학 조성을 갖는 나노입자의 혼합, 및 균일한 크기, 형상 및 화학 조성을 갖는 나노입자의 사용, 및 따라서 물성의 혼합이 고려된다. 적당한 입자의 예는 응집 입자, 등방성 (예컨대, 구형 입자), 이방성 입자 (예컨대, 비구형 로드(rod), 사면체, 및/또는 프리즘) 및 코아-쉘 입자, 예컨대 U.S. 특허 번호 7,238,472 및 국제공개 번호 WO 2003/08539에 기재된 것들을 비제한적으로 포함하고, 이들의 내용은 그 전체가 참고로 통합된다.

[0155] 하나의 구현예에서, 나노입자은 금속성이고, 다양한 양태에서, 나노입자는 콜로이드성 금속이다. 따라서, 다양한 구현예에서, 본 발명의 나노입자는 금속 (예를 들어 및 비제한적으로, 은, 금, 백금, 알루미늄, 팔라듐, 구리, 코발트, 인듐, 니켈, 또는 나노입자 형성에 따르는 임의의 다른 금속 포함), 반도체 (예를 들어 및 비제한적으로, CdSe, CdS, 및 ZnS로 코팅된 CdS 또는 CdSe 포함) 및 자기 (예를 들어, 강자성) 콜로이드 물질을 포함한다.

[0156] 또한, U.S. 특허 공보 번호 2003/0147966에 기재된 바와 같이, 본 발명의 나노입자는 상업적으로 이용가능한뿐만 아니라 합성된 것, *예를 들어,* (*예를 들어,* 콜로이드 반응에 의해) 또는 다양한 물리 및 화학 기상 증착 공정, 예컨대 스퍼터 증착에 의해, 용액 중 점진하는 핵형성으로부터 생산되는 것을 포함한. 참고, *예를 들어,* HaVashi, Vac. Sci. Technol. A5(4) :1375-84 (1987); Hayashi, Physics Today, 44-60 (1987); MRS Bulletin, January 1990, 16-47. U.S. 특허 공보 번호. 2003/0147966에서 추가로 기재된 바와 같이, 고려된 나노입자는 본 기술분야에서 공지된 방법을 사용하여, $HAuCl_4$ 및 시트레이트 환원제를 사용하여 대안적으로 생산된다, *예를 들어,* Marinakos 등, Adv. Mater. 11:34-37 (1999); Marinakos 등, Chem. Mater. 10: 1214-19 (1998); Enustun & Turkevich, J. Am. Chem. Soc. 85: 3317 (1963).

[0157] 일부 구현예에서, 나노입자의 크기는 피부를 투과하는 능력과 관련된다. 일반적으로, 나노입자의 직경의 크기가 작을수록, 피부에의 또는 피부를 통해 투과는 더 깊다. 하나의 양태에서, 나노입자의 직경은, ON-NP가 피부를 가로지르도록 하며, 혈액에 들어가서 ON-NP의 전신 전달을 달성한다. 또 하나의 양태에서, 나노입자의 직경는, ON-NP가 피부를 가로지르는 것을 방지하고, ON-NP는 피부의 표면에서 계속 유지된다. 다양한 양태에서, 나노입자의 크기는 조정되어 투여된 ON-NP의 원하는 투과 깊이를 달성할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0158] 나노입자는, 그 크기가 약 1 nm 내지 약 250 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 240 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 230 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 220 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 210 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 200 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 190 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 180 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 170 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 160 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 150 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 140 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 130 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 120 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 110 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 100 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 90 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 80 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 70 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 60 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 50 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 40 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 30 nm의 평균 직경, 또는 약 1 nm 내지 약 20 nm의 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 10 nm의 평균 직경일 수 있다. 다른 양태에서, 나노입자의 크기는 약 5 nm 내지 약 150 nm (평균 직경), 약 5 내지 약 50 nm, 약 10 내지 약 30 nm, 약 10 내지 150 nm, 약 10 내지 약 100 nm, 또는 약 10 내지 약 50 nm이다. 나노입자의 크기는 약 5 nm 내지 약 150 nm (평균 직경), 약 30 내지 약 100 nm, 약 40 내지 약 80 nm이다. 본 방법에 사용된 나노입자의 크기는 그의 특정 사용 또는 적용에 의한 필요에 따라 변한다. 크기의 변화는 유익하게는, 나노입자의 어떤 물리적 특성, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 관능화될 수 있는 광학 물성 또는 표면적의 양을 최적화하기 위해 사용된다.

[0159] **올리고뉴클레오티드**

[0160] 용어 "뉴클레오티드" 또는 이의 복수는, 본원에서 사용된 바와 같이, 본원에서 논의되고, 다르게는 본 기술분야에서 공지된 바와 같이 개질휜 형태로 상호교환가능하다. 어떤 예에서, 기술은 용어 "뉴클레오베이스"를 사용하고, 이는 천연 발생 뉴클레오티드, 및 비천연 발생 뉴클레오티드를 포함하며, 이는 개질된 뉴클레오티드를 포함한다. 따라서, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오베이스는 천연 발생 뉴클레오베이스 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C), 티민 (T) 및 우라실 (U)을 의미한다. 비천연 발생 뉴클레오베이스는, 예를 들어 및 비제한적으로, 크산틴, 디아미노퓨린, 8-옥소-N6-메틸아데닌, 7-데아자크산틴, 7-데아자구아닌, N4,N4-에타노시토신, N',N'-에타노-2,6-디아미노퓨린, 5-메틸시토신 (mC), 5-(C_3-C_6)-알키닐-시토신, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 슈도이소시토신, 2-하이드록시-5-메틸-4-트리아졸로피리딘, 이소시토신, 이소구아닌, 이노신 및 하기에 기재된 "비천연 발생" 뉴클레오베이스를 포함한다: Benner 등, U.S. 특허 번호 5,432,272 및 Susan M. Freier 및 Karl-Heinz Altmann, 1997, Nucleic Acids Research, vol. 25: pp 4429-4443. 용어 "뉴클레오베이스"는 또한, 공지된 퓨린 및 피리미딘 헤테로사이클뿐만 아니라 그의 헤테로시클릭 유사체 및 호변체를 포함한다. 또한, 천연 및 비천연 발생 뉴클레오베이스는 하기에 기재된 것을 포함한다: U.S. 특허 번호 3,687,808 (Merigan, *et al.*), in Chapter 15 by Sanghvi, in Antisense Research and Application, Ed. S. T. Crooke 및 B. Lebleu, CRC Press, 1993, in Englisch 등, 1991, Angewandte Chemie, International Edition, 30: 613-722 (참조, 특히 페이지 622 및 623, 및 in the Concise Encyclopedia of 폴리머 Science 및 Engineering, J. I. Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, 1990, pages 858-859, Cook, Anti-Cancer Drug Design 1991, 6, 585-607, 이들 각각은 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다). 다양한 양태에서, 폴리뉴클레오티드는 또한, 하나 이상의 "뉴클레오시드 염기" 또는 "염기 단위"를 포함하고, 이 염기는, 가장 고전적 의미로 뉴클레오시드 염기는 아니지만 뉴클레오시드 염기로서 쓰이는 어떤 "만능(universal) 염기"를 포함하는, 뉴클레오베이스와 같이 쓰일 수 있는 헤테로시클릭 화합물과 같은 화합물을 포함하는 비천연 발생 뉴클레오티드의 카테고리이다. 만능 염기는 3-니트로피롤, 임의 치환된 인돌 (*예를 들어,* 5-니트로인돌), 및 임의 치환된 하이포크산틴을 포함한다. 다른 바람직한 만능 염기는, 피롤, 디아졸 또는 트리아졸 유도체를 포함하고, 이 유도체는 본 기술분야에 공지된 만능 염기를 포함한다.

[0161] 개질된 뉴클레오티드는 EP 1 072 679 및 WO 97/12896에 기재되어 있고, 이의 내용은 참고로 본 명세서에 통합된다. 개질된 뉴클레오베이스는 비제한적으로 하기를 포함한다: 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 6-메틸 및 아데닌 및 구아닌의 다른 알킬 유도체, 2-프로필 및 아데닌 및 구아닌의 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 우라실 및 시토신 및 피리미딘 염기의 다른 알키닐 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라

실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티오l, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌. 또한, 개질된 염기는 트리시클릭 피리미딘, 예컨대 페녹사진 시티딘 (1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤족사진-2(3H)-온), 페노티아진 시티딘 (1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조티아진-2(3H)-온), G-클램프, 예컨대 치환된 페녹사진 시티딘 (예를 들어, 9-(2-아미노에톡시)-H-피리미도[5,4-b][1,4]벤족사진-2(3H)-온), 카바졸 시티딘 (2H-피리미도[4,5-b]인돌-2-온), 피리도인돌 시티딘 (H-피리도[3',2':4,5]피롤로[2,3-d]피리미딘-2-온)을 포함한다. 개질된 염기는 또한, 퓨린 또는 피리미딘 염기가 다른 헤테로사이클, 예를 들어 7-데아자-아데닌, 7-데아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈으로 대체되는 것들을 포함할 수 있다. 추가 뉴클레오베이스는 하기에 기재된 것들을 포함한다: U.S. 특허 번호 3,687,808, The Concise Encyclopedia Of 폴리머 Science 및 Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, Englisch 등, 1991, Angewandte Chemie, International Edition, 30: 613, 및 Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research 및 Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. 및 Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. 임의의 이들 염기는 결합 친화성을 증가시키는데 유용하고 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린을 포함하고, 이는 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은 0.6-1.2℃까지 핵산 이중 안정성을 증가시키는 것으로 보여주었고, 어떤 양태에서 2'-O-메톡시에틸 당 변형물과 조합된. 참고, U.S. 특허 번호 3,687,808, U.S. 특허 번호 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; 5,750,692 및 5,681,941, 이의 내용은 참고로 본 명세서에 통합된다.

[0162] 예정된 서열의 폴리뉴클레오티드의 제조 방법은 공지되어 있다. 참고, *예를 들어,* Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed. 1989) 및 F. Eckstein (ed.) Oligonucleotides and Analogues, 1st Ed. (Oxford University Press, New York, 1991). 고상 합성 방법은 폴리리보뉴클레오티드 및 폴리데옥시리보뉴클레오티드 모두에 대해 바람직하다 (DNA를 합성하는 공지된 방법은 또한, RNA를 합성하는데 유용하다). 폴리리보뉴클레오티드는 또한 효소적으로 제조될 수 있다. 비천연 발생 뉴클레오베이스는 폴리뉴클레오티드에도 혼입될 수 있다. 참고, *예를 들어,* U.S. 특허 번호 7,223,833; Katz, J. Am. Chem. Soc., 74:2238 (1951); Yamane, 등, J. Am. Chem. Soc., 83:2599 (1961); Kosturko, 등, Biochemistry, 13:3949 (1974); Thomas, J. Am. Chem. Soc., 76:6032 (1954); Zhang, 등, J. Am. Chem. Soc., 127:74-75 (2005); 및 Zimmermann, 등, J. Am. Chem. Soc., 124:13684-13685 (2002).

[0163] 본원에서 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오티드, 또는 그의 개질된 형태, 및 도메인으로 관능화된 제공 나노입자는 약 5개의 뉴클레오티드 내지 약 100개의 뉴클레오티드의 길이의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 더 상세하게는, 나노입자는 약 5 내지 약 90개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 80개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 70개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 60개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 50개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 45개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 40개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 35개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 30개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 25개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 20개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 15개의 뉴클레오티드의 길이, 약 5 내지 약 10개의 뉴클레오티드의 길이를 갖는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드가 원하는 결과를 달성할 수 있을 정도로 개시된 크기의 길이의 모든 폴리뉴클레오티드로 관능화된다. 따라서, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 그 초과 뉴클레오티드의 길이를 갖는 폴리뉴클레오티드가 고려된다.

[0164] 일부 양태에서, 나노입자가 부착된 올리고뉴클레오티드를 갖는 나노입자가 제공되고, 여기서, 세포에 의해 취해진 효능에 영향을 주는 도메인을 추가로 포함하는 올리고뉴클레오티드는 나노입자와 연관된다. 따라서, 도메인은 효능을 증가 또는 감소시킨다. 본원에 사용된 바와 같이, "효능"란 세포 내에/세포에 의해 나노입자의 흡수의 수 또는 비율을 의미한다. 세포에 들어가고 나가는 나노입자의 공정은 동적인 것이기 때문에, 효능은 더 많은 나노입자를 취하거나 또는 세포 장기간 동안 세포에 들어가는 나노입자를 유지함으로써 증가될 수 있다. 유사하게, 효능은 더 적은 나노입자를 취하거나 세포 단기간 동안 세포에 들어가는 나노입자를 유지함으로써 감소

될 수 있다.

[0165] 일부 양태에서, 도메인은 올리고뉴클레오티드와 인접/동일선상이고, 나노입자에 대해서 인접하여 위치한다. 일부 양태에서, 도메인은 올리고뉴클레오티드와 인접/동일선상이고 나노입자에 대해서 떨어져서 위치한다. 용어 "인접" 및 "떨어져서"란 올리고뉴클레오티드의 중점에 대한 위치아다. 일부 양태에서, 도메인는 올리고뉴클레오티드 내에 내부 구역에서 위치한다. 추가 양태에서, 도메인은 나노입자에 부착된 제2 올리고뉴클레오티드 상에 위치한다. 따라서, 일부 구현예에서, 도메인은 올리고뉴클레오티드로부터의 별도의 존재로서 나노입자에 부착될 것으로 생각된다.

[0166] 또한, 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 본원에 기재된 임의 위치에 위치한 하나 초과의 도메인을 포함는 것으로 생각된다.

[0167] 도메인은, 일부 구현예에서, 세포에 의한 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자의 흡수 효능을 증가시킨다. 일부 양태에서, 도메인은 티미딘 잔기 (polyT) 또는 우리딘 잔기 (polyU)의 서열을 포함한다. 추가 양태에서, polyT 또는 polyU 서열은 2개의 티미딘 또는 우리딘을 포함한다. 다양한 양태에서, polyT 또는 polyU 서열은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 약 55, 약 60, 약 65, 약 70, 약 75, 약 80, 약 85, 약 90, 약 95, 약 100, 약 125, 약 150, 약 175, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 약 500 또는 그 초과 개의 티미딘 또는 우리딘 잔기을 포함한다.

[0168] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 및 도메인으로 관능화된 나노입자는 동일한 올리고뉴클레오티드로 관능화되지만 도메인은 없는 나노입자보다 더 큰 효능으로 세포에 의해 취해지는 것이 고려된다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 및 도메인으로 관능화된 나노입자는 동일한 올리고뉴클레오티드로 관능화되지만 도메인은 없는 나노입자보다 1% 더 효율적으로 세포에 의해 취해진다. 다양한 양태에서, 올리고뉴클레오티드 및 도메인으로 관능화된 나노입자는 동일한 올리고뉴클레오티드로 관능화되지만 도메인은 없는 나노입자보다 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%,32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 20배, 약 30배, 약 40배, 약 50배, 약 100배 또는 그 초과, 더 효능적으로 세포에 의해 취해진다.

[0169] 일부 구현예에서, 도메인은 세포에 의한 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자의 흡수 효능을 감소시킨다. 일부 양태에서, 도메인은 2개의 포스페이트로 구성된 포스페이트 폴리머 (C3 잔기)를 포함한다. 다양한 양태에서, C3 잔기는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 약 55, 약 60, 약 65, 약 70, 약 75, 약 80, 약 85, 약 90, 약 95, 약 100, 약 125, 약 150, 약 175, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 약 500 또는 그 초과개의 포스페이트를 포함한다.

[0170] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 및 도메인으로 관능화된 나노입자는 동일한 올리고뉴클레오티드로 관능화되지만 도메인은 없는 나노입자보다 더 낮은 효능을갖는 세포에 의해 취해진다는 것이 고려된다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 및 도메인으로 관능화된 나노입자는 동일한 올리고뉴클레오티드로 관능화되지만 도메인은 없는 나노입자보다 1%까지 덜 효능적으로 세포에 의해 취해진다. 다양한 양태에서, 올리고뉴클레오티드 및 도메인으로 관능화된 나노입자는 동일한 올리고뉴클레오티드로 관능화되지만 도메인은 없는 나노입자보다 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%,32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 20배, 약 30배, 약 40배, 약 50배, 약 100배 또는 그 초과 덜 효능적으로 세포에 의해 취해진다.

[0171] 나노입자에의 부착에 대해 고려된 대한 부착에 폴리뉴클레오티드는 표적 폴리뉴클레오티드로부터 발현된 유전자 산물의 발현을 조절하는 것을 포함한다. 본원에 의해 고려된 폴리뉴클레오티드는, 이하에 정의된 바와 같이

DNA, RNA 및 이의 개질된 형태를 포함한다. 따라서, 다양한 형태에서 그리고 비제한적으로, 표적 폴리뉴클레오티드에 혼성화되고 표적 폴리뉴클레오티드의 전사 또는 번역에서의 감소를 개시하는 폴리뉴클레오티드, 이중가닥 폴리뉴클레오티드에 혼성화되고 전사를 억제하는 삼중 나선형 형성 폴리뉴클레오티드, 및 표적 폴리뉴클레오티드에 혼성화되고 번역을 억제하는 리보자임이 고려된다.

[0172] 다양한 양태에서, 특히 폴리뉴클레오티드가 표적화되면, 단일 관능화된 올리고뉴클레오티드-나노입자 조성물은 동일한 전사물의 다중 복사물에 결합하는 능력을 갖는다. 하나의 양태에서, 동일한 폴리뉴클레오티드로 관능화된 나노입자가 제공되고, 즉 각각의 폴리뉴클레오티드는 동일한 길이 및 동일한 서열을 갖는다. 다른 양태에서, 나노입자는 2개 이상의 동일하지 않는 2개 이상의 폴리뉴클레오티드로 관능화되고, 즉 폴리뉴클레오티드의 적어도 하나는 상이한 길이 및/또는 상이한 서열을 갖는 적어도 하나의 다른 부착된 폴리뉴클레오티드로부터 상이하다. 상이한 폴리뉴클레오티드가 나노입자에 부착되는 양태에서, 이들 상이한 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드에, 하지만 상이한 위치에서 결합하지고, 또는 상이한 유전자 산물을 인코딩하는 상이한 표적 폴리뉴클레오티드에 결합한다.

[0173] **개질된 올리고뉴클레오티드**

[0174] 상기에서 논의한 바와 같이, 개질된 올리고뉴클레오티드는 나노입자를 관능화하기 위해 고려된다. 다양한 양태에서, 나노입자 상에서 관능화된 올리고뉴클레오티드는 완전히 개질되거나 부분적으로 개질된다. 따라서, 다양한 양태에서, 폴리뉴클레오티드 중 뉴클레오티드 단위의 하나 이상의, 또는 모든, 당 및/또는 하나 이상의 또는 모든 뉴클레오티드간 연결은 "비천연 발생" 그룹으로 대체된다.

[0175] 하나의 양태에서, 이 구현예는 펩타이드 핵산 (PNA)을 고려한다. PNA 화합물에서, 폴리뉴클레오티드의 당-골격은 아미드 함유 골격으로 대체된다. 참고, 예를 들어 US 특허 번호 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262, 및 Nielsen 등, Science, 1991, 254, 1497-1500, 이의 내용은 참고로 본 명세서에 통합된다.

[0176] 뉴클레오티드와, 개시된 폴리뉴클레오티드에 대해 고려된 비천연 뉴클레오티드 사이의 다른 연결은 하기에 기재된 것들을 포함한다: U.S. 특허 번호 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; 및 5,700,920; U.S. 특허 공보 번호. 20040219565; 국제특허공보 번호 WO 98/39352 및 WO 99/14226; Mesmaeker et. al., Current Opinion in Structural Biology 5:343-355 (1995) 및 Susan M. Freier 및 Karl-Heinz Altmann, Nucleic Acids Research, 25:4429-4443 (1997), 이의 내용은 참고로 본 명세서에 통합된다.

[0177] 올리고뉴클레오티드의 구체적인 예는 개질된 골격 또는 비천연 뉴클레오시드간 연결을 함유하는 것을 포함한다. 개질된 골격을 갖는 올리고뉴클레오티드는 골격 내에 인 원자를 보유하는 것 및 골격 내에 인 원자를 갖지 않는 것을 포함한다. 뉴클레오시드간 골격 내에 인 원자를 갖지 않는 개질된 올리고뉴클레오티드는 "올리고뉴클레오티드"의 의미 내에 있는 것으로 생각된다.

[0178] 인 원자를 함유하는 개질된 올리고뉴클레오티드 골격은 예를 들어 하기를 포함한다: 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트 (이는 3'-알킬렌 포스포네이트, 5'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함함), 포스피네이트, 포스포르아미데이트 (이는 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트를 포함함), 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 셀레노포스페이트 및 보라노포스페이트 (이는 정상 3'-5' 연결, 이들의 2'-5' 연결된 유사체를 가짐), 및 하나 이상의 뉴클레오티드간 연결은 3'에서 3'으로, 5'에서 5'로 또는 2'에서 2'로의 연결인 반전된 극성을 갖는 것들. 또한, 3'-대부분의 뉴클레오티드간 연결, 즉, 어베이직(abasic)일 수 있는 단일 반전된 뉴클레오시드 잔기 (뉴클레오티드는 그 위치에서 히드록실 그룹을 빠뜨리거나 가짐)에서 단일 3'에서 3'으로의 연결을 포함하는 반전된 극성을 갖는 폴리뉴클레오티드가 고려된다. 염, 혼합된 염 및 유리산 형태가 또한 고려된다.

[0179] 상기 인 함유 연결의 제조를 교시하고 있는 대표적인 미국 특허는 하기를 포함한다: U.S. 특허 번호 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 및 5,625,050, 이들 내용은 참고로 본 명세서에 통합된다.

[0180] 인 원자를 포함하지 않는 개질된 폴리뉴클레오티드 골격은 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드간 연결, 혼

합된 헤테로원자 및 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드간 연결, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로시클릭 뉴클레오시드간 연결에 의해 형성된 골격을 갖는다. 이들은 하기를 갖는 것들을 포함한다: 모폴리노 연결; 실록산 골격; 설파이드, 설폭사이드 및 설폰 골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 리보아세틸 골격; 알켄 함유 골격; 설파메이트 골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 골격; 설포네이트 및 설폰아미드 골격; 아미드 골격; 및 혼합된 N, O, S 및 CH_2 성분 파트를 갖는 다른 것들. 또 다른 구현예에서, 폴리뉴클레오티드에는 포스포로티오에이트 골격이 제공되고, 올리고뉴클레오시드에는 헤테로원자 골격이 제공되며, including 하기에 기재된 $-CH_2-NH-O-CH_2-$, $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$, $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$, $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 및 $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$을 포함한다 US 특허 번호 5,489,677, 및 5,602,240. 참고, 예를 들어, U.S. 특허 번호 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 및 5,677,439, 이들 내용은 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다.

[0181] 다양한 형태에서, 올리고 중 2개의 연속하는 모노머들 사이의 연결은 $-CH_2-$, $-O-$, $-S-$, $-NRH-$, $>C=O$, $>C=NRH$, $>C=S$, $-Si(R")_2-$, $-SO-$, $-S(O)_2-$, $-P(O)_2-$, $-PO(BH_3)-$, $-P(O,S)-$, $-P(S)_2-$, $-PO(R")-$, $-PO(OCH_3)-$, 및 $-PO(NHRH)-$로부터 선택된 2 내지 4, 바람직하게는 3개의 그룹/원자로 이루어지고, 여기서 RH는 수소 및 C1-4-알킬로부터 선택되고, R"는 C1-6-알킬 및 페닐로부터 선택된다. 그와 같은 연결의 설명적인 예는 $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CO-CH_2-$, $-CH_2-CHOH-CH_2-$, $-O-CH_2-O-$, $-O-CH2-CH2-$, $-O-CH2-CH=$(연속하는 모노머에 대한 연결로서 사용될 때, R5를 포함함), $-CH_2-CH_2-O-$, $-NRH-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-NRH-$, $-CH_2-NRH-CH_2-$, $-O-CH_2-CH_2-NRH-$, $-NRH-CO-O-$, $-NRH-CO-NRH-$, $-NRH-CS-NRH-$, $-NRH-C(=NRH)-NRH-$, $-NRH-CO-CH_2-NRH-O-CO-O-$, $-O-CO-CH_2-O-$, $-O-CH_2-CO-O-$, $-CH_2-CO-NRH-$, $-O-CO-NRH-$, $-NRH-CO-CH_2-$, $-O-CH_2-CO-NRH-$, $-O-CH_2-CH_2-NRH-$, $-CH=N-O-$, $-CH_2-NRH-O-$, $-CH_2-O-N=$(연속하는 모노머에 대한 연결로서 사용될 때, R5를 포함함), $-CH_2-O-NRH-$, $-CO-NRH-CH_2-$, $-CH_2-NRH-O-$, $-CH_2-NRH-CO-$, $-O-NRH-CH_2-$, $-O-NRH$, $-O-CH_2-S-$, $-S-CH_2-O-$, $-CH_2-CH_2-S-$, $-O-CH_2-CH_2-S-$, $-S-CH_2-CH=$(연속하는 모노머에 대한 연결로서 사용될 때, R5를 포함함), $-S-CH_2-CH_2-$, $-S-CH_2-CH_2-O-$, $-S-CH_2-CH_2-S-$, $-CH_2-S-CH_2-$, $-CH_2-SO-CH_2-$, $-CH_2-SO_2-CH_2-$, $-O-SO-O-$, $-O-S(O)_2-O-$, $-O-S(O)_2-CH_2-$, $-O-S(O)_2-NRH-$, $-NRH-S(O)_2-CH_2-$; $-O-S(O)_2-CH_2-$, $-O-P(O)_2-O-$, $-O-P(O,S)-O-$, $-O-P(S)_2-O-$, $-S-P(O)_2-O-$, $-S-P(O,S)-O-$, $-S-P(S)_2-O-$, $-O-P(O)_2-S-$, $-O-P(O,S)-S-$, $-O-P(S)_2-S-$, $-S-P(O)_2-S-$, $-S-P(O,S)-S-$, $-S-P(S)_2-S-$, $-O-PO(R")-O-$, $-O-PO(OCH_3)-O-$, $-O-PO(O\ CH_2CH_3)-O-$, $-O-PO(O\ CH_2CH_{2S}-R)-O-$, $-O-PO(BH_3)-O-$, $-O-PO(NHRN)-O-$, $-O-P(O)_2-NRH\ H-$, $-NRH-P(O)_2-O-$, $-O-P(O,NRH)-O-$, $-CH_2-P(O)_2-O-$, $-O-P(O)_2-CH_2-$, 및 $-O-Si(R")_2-O-$이고; 이들 중에서, $-CH_2-CO-NRH-$, $-CH_2-NRH-O-$, $-S-CH_2-O-$, $-O-P(O)_{2-O-O}-P(-O,S)-O-$, $-O-P(S)_2-O-$, $-NRH\ P(O)_2-O-$, $-O-P(O,NRH)-O-$, $-O-PO(R")-O-$, $-O-PO(CH_3)-O-$, 및 $-O-PO(NHRN)-O-$ (여기서, RH는 수소 및 C1-4-알킬로부터 선택되고, R"는 C1-6-알킬 및 페닐로부터 선택됨)이 고려된다. 추가 설명적인 예는 하기에서 주어진다: Mesmaeker et. al., 1995, Current Opinion in Structural Biology, 5: 343-355 및 Susan M. Freier 및 Karl-Heinz Altmann, 1997, Nucleic Acids Research, vol 25: pp 4429-4443.

[0182] 폴리뉴클레오티드의 또 다른 개질된 형태는 U.S. 특허출원 번호 20040219565에서 상세히 기재되어 있고, 이의 내용은 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다.

[0183] 개질된 폴리뉴클레오티드는 또한, 하나 이상의 치환된 당 잔기를 함유할 수 있다. 어떤 양태에서, 폴리뉴클레오티드는 2' 위치에서 하기 중 하나를 포함한다: OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알키닐; 또는 O-알킬-O-알킬, 여기서, 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{10} 알킬 또는 C_2 내지 C_{10} 알케닐 및 알키닐일 수 있다. 다른 구현예는 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, 및 $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$을 포함하고, 여기서, n 및 m은 1 내지 약 10이다. 다른 폴리

뉴클레오티드는 2' 위치에서 하기 중 하나를 포함한다: C1 내지 C10 저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알케닐, 알키닐, 알카릴, 아르알킬, O-알카릴 또는 O-아르알킬, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, 헤테로시클로알킬, 헤테로시클로알카릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단 그룹, 리포터(reporter) 그룹, 인터칼레이터(intercalator), 폴리뉴클레오티드의 약동학적 물성을 개선하기 위한 그룹, 또는 폴리뉴클레오티드의 약력학적 물성을 개선하기 위한 그룹, 및 유사한 물성을 갖는 다른 치환기. 하나의 양태에서, 변형은 2'-메톡시에톡시 (2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$ (2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE)로도 공지됨) (Martin 등, 1995, Helv. Chim. Acta, 78: 486-504), 즉 알콕시알콕시 그룹을 포함한다. 다른 변형은 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 즉 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 그룹 (2'-DMAOE로도 공지됨), 및 2'-디메틸아미노에톡시에톡시 (2'-O-디메틸-아미노-에톡시-에틸 또는 2'-DMAEOE로도 본 기술분야에 공지됨), 즉 2'-O-CH_2-O-CH_2-$N(CH_3)_2$을 포함한다.

[0184] 또 다른 변형은 2'-메톡시 (2'-O-CH_3), 2'-아미노프로폭시 (2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$), 2'-알릴 (2'-CH_2-H=CH_2), 2'-O-알릴 (2'-O-CH_2-CH=CH_2) 및 2'-플루오로 (2'-F)를 포함한다. 2'-변형은 아라비노 (상부) 위치 또는 리보 (하부) 위치에서 일 수 있다. 하나의 양태에서, 2'-아라비노 변형은 2'-F이다. 유사한 변형은 폴리뉴클레오티드상의 다른 위치 상의 다른 위치, 예를 들어, 3' 말단 뉴클레오티드 상의 당의 3' 위치에서 또는 2'-5' 연결된 폴리뉴클레오티드에서 및 5' 말단 뉴클레오티드의 5' 위치에서 행해질 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한, 펜토푸라노실 당 대신에 당 모방체, 예컨대 시클로부틸 잔기를 가질 수 있다. 참고, 예를 들어, U.S. 특허 번호 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; 및 5,700,920, 이들 내용은 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다.

[0185] 하나의 양태에서, 당의 변형은 잠금 핵산 (LNA)을 포함하고, 여기서, 2'-히드록실 그룹은 당 고리의 3' 또는 4' 탄소원자에 연결되고, 이로써, 바이시클릭 당 잔기를 형성한다. 연결은, 어떤 양태에서, 2' 산소원자 및 4' 탄소원자를 브릿징(bridging)하는 메틸렌 (-CH_2-)n 그룹이고, 여기서, n은 1 또는 2이다. LNA 및 이의 제조는 WO 98/39352 및 WO 99/14226에 기재되어 있고, 이의 내용은 참고로 본 명세서에 통합된다.

[0186] **폴리펩타이드**

[0187] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩타이드"란 펩타이드, 단백질, 아미노산의 폴리머, 호르몬, 바이러스, 및 항체를 의미하고, 이들은 천연 유도, 합성 생성, 또는 재조합 생성된다.

[0188] 일부 구현예에서, 본원의 조성물은 표적 폴리펩타이드의 활성을 조절한다. 따라서, 다양한 양태에서, 나노입자는 압타머(aptamer)로 관능화된다. 본원에 사용된 바와 같이, "압타머"는 특히 표적 분자에 결합하는 올리고뉴클레오티드 또는 펩타이드 분자이다. 따라서, 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자는 표적 폴리펩타이드에 결합하고, 그의 활성을 조절한다.

[0189] 하나의 양태에서, 표적 폴리펩타이드의 활성은 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자와 접촉하지 않는 세포와 비교하여 약 5%까지 억제된다. 다양한 양태에서, 표적 폴리펩타이드의 발현은 올리고뉴클레오티드 관능화된 나노입자와 접촉하지 않는 세포와 비교하여 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 99% 또는 그 초과까지 억제된다. 바꾸어 말하면, 제공된 방법은 표적 폴리펩타이드의 활성의 억제의 임의 정도로 귀결되는 것들을 포함한다.

[0190] **표면 밀도**

[0191] NP의 표면 상의 올리고뉴클레오티드의 밀도는 주어진 적용에 대해 조절될 수 있다. 예를 들어, Seferos 등 [*Nano Lett.*, 9(1): 308-311, 2009]에 의한 작업은, NP 표면 상의 DNA의 밀도는 뉴클레아제에 의해 분해된 속도에 영향을 주었다는 것을 실증한다. 이 밀도 변형은, 예를 들어 및 비제한적으로, 약물 및 ON-NP가 세포에 들어가는 NP 기반 약물 전달계에서 사용되고, 상기 ON은 제어된 속도로 분해된다.

[0192] 제공된 바와 같은 나노입자는, 나노입자들 사이 및 단일 나노입자 상의 폴리뉴클레오티드 가닥들 사이의 협력 행동으로, 다양한 양태에서, 충분히 귀결되는 나노입자의 표면 상의 폴리뉴클레오티드의 패키징 밀도를 갖는다. 또 하나의 양태에서, 나노입자들 사이의 협력 행동은 뉴클레아제 분해에 대한 폴리뉴클레오티드의 저항을 증가시킨다. 또다른 양태에서, 세포에 의한 나노입자의 흡수는 나노입자와 연관된 폴리뉴클레오티드의 밀도에 의해

영향을 받는다. 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합되는 PCT/US2008/65366에서 기재된 바와 같이, 나노입자의 표면 상의 폴리뉴클레오티드의 더 높은 밀도는 세포에 의한 나노입자의 증가된 흡수와 연관된다.

[0193] 일부 구현예에서, NP의 표면 상의 올리고뉴클레오티드의 표면 밀도는 피부를 투과하는 능력과 관련되어 있다. 일반적으로, ON-NP의 표면 상의 표면 밀도가 더 높을수록, 피부에 또는 피부를 통한 투과는 더 깊다. 일부 양태에서, 표면 밀도는, ON-NP가 피부를 관통하고 혈액에 들어가서 ON-NP의 전신 전달을 달성하는 것을 허용한다. 또 하나의 양태에서, 표면 밀도는, ON-NP가 피부를 관통하는 것을 방지하고, ON-NP는 피부의 표면에서 유지된다. 다양한 양태에서, 나노입자의 표면 상의 올리고뉴클레오티드의 표면 밀도는 조절되어 투여된 ON-NP의 원하는 투과 깊이를 달성할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0194] 나노입자 및 폴리뉴클레오티드의 원하는 조합에 대해 나노입자가 안정하고, 조건이 필요하도록 하는데 알맞은 표면 밀도는 경험적으로 결정될 수 있다. 일반적으로, 적어도 2 pmol/cm^2의 표면 밀도는 안정한 나노입자-올리고뉴클레오티드 조성물을 제공하는데 알맞을 것이다. 일부 양태에서, 표면 밀도는 적어도 15 pmol/cm^2이다. 폴리뉴클레오티드가 하기의 표면 밀도에서 나노입자에 결합되는 방법이 또한 제공된다: 적어도 2 pmol/cm^2, 적어도 3 pmol/cm^2, 적어도 4 pmol/cm^2, 적어도 5 pmol/cm^2, 적어도 6 pmol/cm^2, 적어도 7 pmol/cm^2, 적어도 8 pmol/cm^2, 적어도 9 pmol/cm^2, 적어도 10 pmol/cm^2, 적어도 약 15 pmol/cm^2, 적어도 약 20 pmol/cm^2, 적어도 약 25 pmol/cm^2, 적어도 약 30 pmol/cm^2, 적어도 약 35 pmol/cm^2, 적어도 약 40 pmol/cm^2, 적어도 약 45 pmol/cm^2, 적어도 약 50 pmol/cm^2, 적어도 약 55 pmol/cm^2, 적어도 약 60 pmol/cm^2, 적어도 약 65 pmol/cm^2, 적어도 약 70 pmol/cm^2, 적어도 약 75 pmol/cm^2, 적어도 약 80 pmol/cm^2, 적어도 약 85 pmol/cm^2, 적어도 약 90 pmol/cm^2, 적어도 약 95 pmol/cm^2, 적어도 약 100 pmol/cm^2, 적어도 약 125 pmol/cm^2, 적어도 약 150 pmol/cm^2, 적어도 약 175 pmol/cm^2, 적어도 약 200 pmol/cm^2, 적어도 약 250 pmol/cm^2, 적어도 약 300 pmol/cm^2, 적어도 약 350 pmol/cm^2, 적어도 약 400 pmol/cm^2, 적어도 약 450 pmol/cm^2, 적어도 약 500 pmol/cm^2, 적어도 약 550 pmol/cm^2, 적어도 약 600 pmol/cm^2, 적어도 약 650 pmol/cm^2, 적어도 약 700 pmol/cm^2, 적어도 약 750 pmol/cm^2, 적어도 약 800 pmol/cm^2, 적어도 약 850 pmol/cm^2, 적어도 약 900 pmol/cm^2, 적어도 약 950 pmol/cm^2, 적어도 약 1000 pmol/cm^2 또는 그 초과.

[0195] **나노입자로의 올리고뉴클레오티드 부착**

[0196] 본 방법에 사용하기 위해 고려되는 올리고뉴클레오티드는 임의의 방식을 통해 나노입자에 결합된 것을 포함한다. 올리고뉴클레오티드가 나노입자에 부착되는 방식에 관계없이, 5' 연결, 3' 연결, 일부 유형의 내부 연결, 또는 이들 부착의 임의의 조합을 통해 다양한 양태으로 부착이 이뤄진다.

[0197] 부착 방법은 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 알려져 있으며, 전체가 참조로써 본원에 통합되어 있는 미국 공개 번호 제2009/0209629호에 기술되어 있다. RNA를 나노입자에 부착하는 방법은 전체가 참조로써 본원에 통합되어 있는 PCT/US2009/65822에 일반적으로 기술되어 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 내용은 나노입자에 부착된 폴리뉴클레오티드가 RNA임을 고려한다.

[0198] 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드가 부착된 나노입자가 제공되며, 여기에서 도메인을 추가로 포함하는 올리고뉴클레오티드가 상기 나노입자와 결합된다. 일부 양태에서, 상기 도메인은 폴리티미딘(polythymidine) 서열이다. 다른 양태에서, 상기 도메인은 포스페이트 중합체(C3 잔기)이다.

[0199] 일부 구현예에서, 나노입자에 부착된 상기 올리고뉴클레오티드는 DNA이다. DNA가 상기 나노입자에 부착되는 경우, 상기 DNA는 폴리뉴클레오티드의 표적 서열에 충분히 상보적인 서열로 구성되어 나노입자에 부착된 올리고뉴클레오티드와 표적 폴리뉴클레오티드의 혼성화가 일어나며, 이로써 나노입자에 상기 표적 폴리뉴클레오티드를 결합시킨다. 다양한 양태에서, 이중 가닥 분자가 표적 폴리뉴클레오티드의 단일 가닥 서열에 혼성화하는 단일 가닥을 포함하는 한, 상기 DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥이다. 일부 양태에서, 상기 나노입자에 관능화된 올리고뉴클레오티드의 혼성화는 이중 가닥의 표적 폴리뉴클레오티드와 삼중체 구조를 형성할 수 있다. 또 다른 양태에서, 나노입자 상에서 관능화된 이중 가닥의 올리고뉴클레오티드와 단일 가닥의 표적 폴리뉴클레오티드의 혼성화에 의해 삼중체 구조가 형성될 수 있다.

[0200] **스페이서(spacer)**

[0201] 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드와 도메인이 스페이서(spacer)를 통해 나노입자에 부착된 것을 포함하는 관능화 나노입자가 고려된다. "스페이서(spacer)"는, 본원에 사용된 바와 같이, 그 자체로는 유전자 발현을 조절하는데 참여하지 않지만 나노입자와 기능성 올리고뉴클레오티드 간의 거리를 증가시키거나, 다수의 복제본인 나노입자에 부착시 각각의 올리고뉴클레오티드 간의 거리를 증가시키는 작용을 한다. 따라서, 올리고뉴클레오티드가 동일한 서열을 갖거나 상이한 서열을 갖든지 간에, 스페이서는 개별 올리고뉴클레오티드 사이에 일렬로 위치하는 것으로 고려된다. 도메인이 나노입자에 직접 부착되는 본 발명의 양태에서, 상기 도메인은 스페이서를 통해 나노입자에 대해 임의로 관능화된다. 일렬의 도메인이 나노입자에 대해 관능화되는 양태에서, 스페이서는 일렬 구조인 도메인 단위의 일부 또는 전체 사이에 임의로 존재한다. 하나의 양태에서, 존재하는 경우, 상기 스페이서는 유기 부분이다. 또 다른 양태에서, 상기 스페이서는 수용성 중합체, 핵산, 폴리펩타이드, 올리고당, 탄수화물, 지질, 에틸글리콜, 또는 이의 조합을 포함하는 중합체이나, 이에 제한되지 않는다.

[0202] 일부 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 스페이서를 가지며 이를 통해 나노입자에 공유결합된다. 이들 폴리뉴클레오티드는 전술한 바와 동일한 폴리뉴클레오티드이다. 스페이서가 나노입자에 결합한 결과, 상기 폴리뉴클레오티드가 나노입자의 표면으로부터 간격을 두게 되며 그 표적과의 혼성화를 위해 더 접근할 수 있다. 상기 스페이서가 폴리뉴클레오티드인 경우, 다양한 구현예에서, 스페이서의 길이는 적어도 약 10 뉴클레오티드, 10-30 뉴클레오티드, 또는 30 뉴클레오티드 초과일 수 있다. 상기 스페이서는 나노입자 또는 표적 폴리뉴클레오티드에 결합하게 되는 폴리뉴클레오티드의 능력을 방해하지 않는 임의의 서열을 가질 수 있다. 상기 스페이서는 서로 또는 올리고뉴클레오티드의 서열과 상보적인 서열을 가져서는 안되지만, 표적 폴리뉴클레오티드에 전부 또는 일부 상보적일 수 있다. 일부 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드 스페이서의 염기는 모두 아데닌, 모두 티민, 모두 시티딘, 모두 구아닌, 모두 우라실, 또는 모두 일부 다른 개질된 염기이다.

도면의 간단한 설명

[0203] 도 1은 프로모터 복합체 결합(A) 및 전체 mRNA 전사체 형성물(B) 형성을 차단하는 올리고뉴클레오티드 금 나노입자(Au-NP) 결합체의 도식을 나타낸다.

도 2는 결합체 처리 후 *E. coli*의 전자 현미경 이미지를 나타낸다.

도 3은 나노입자를 이용한 박테리아 루시퍼라아제 발현의 억제 결과를 요약한 것이다. 넌센스(nonsense)는 *E. coli* 게놈 또는 형질감염된 플라스미드 상에 상보적인(complementary) 영역이 없는 서열을 나타낸다. 안티센스(antisense)는 루시퍼라아제를 표적으로 하는 서열을 나타낸다. 상대적인 루시퍼라아제 활성은 레닐라(renilla) 발현으로 정규화된, 막대 내에 퍼센트로 나타나 있다.

도 4는 이중체(duplex) 침윤 도식을 나타낸다. A) 나노입자에 의한 이중체의 침윤(이중체의 말단에 있는 플루오레세인(fluorescein) 및 인접한 다부실(dabcyl))으로 인한 형광 신호 방출의 도식. B) 짧은 이중체(20 염기쌍) 및 긴 이중체(40 염기쌍)에서, 이중체 침윤에 따른 형광 증가를 보여주는 결과(회색 박스는 넌센스 서열을 나타내고, 검정 박스는 안티센스 서열을 나타냄).

도 5는 적용 후 24시간 내에 표피, 진피, 및 피하 조직 내로의 대략 25 nM siRNA-금 나노입자의 침투를 나타낸다. A) 마우스 피부에서의 siRNA-Au NP의 공초점 이미지. 좌측 패널 = Cy3. 밝은 색상은 각질층(최외곽 피부층)인데, 이는 치밀한 입자 축적 및 자가형광(autofluorescence)으로 인해 밝은 형광을 띨 수 있으며, 머리카락(모낭내 종단면에서 관찰됨) 역시 강한 형광을 띠며, 중간 = 핵의 DAPI 염색이고, 오른쪽 = 오버랩 이미지이다. 상기 이미지는 표피 세포의 ~100%에서 형광성 siRNA-Au NP의 흡수를 나타낸다. B) 지방세포(adipocyte)(화살표) 및 기저 간엽 조직의 섬유아세포(+) 역시 거의 보편적으로 형광 입자를 흡수한다. 막대 = 20 μm.

도 6은 siRNA-Au NP 처리 4주 후, C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J 마우스에서의 GFP 넉다운(knockdown)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0204] **실시예**

[0205] **실시예 1**

[0206] **나노입자의 제조**

[0207] 시트레이트-안정화된 금 나노입자(1-250 nm)를 공개된 과정[G. Frens, Nature Physical Science. 1973, 241, 20]을 이용하여 제조한다. 13 및 5 nm 크기가 본 실시예에 사용된 반면, 다른 실시예는 1 nm 내지 500 nm 크기의 나노입자를 포함한다. 요약하면, 환류수 중의 시트레이트로 처리하여 수소 테트라클로로아우레이트(hydrogen tetrachloroaurate)를 환원시킨다. 입자 크기 및 분산도는 투과 전자 현미경 및 자외선/가시광선 분광광도법을 이용하여 확인할 수 있다. 티올화된 올리고뉴클레오티드를 표준 고체상 포스포라미디트법(phosphoramidite methodology)[Pon, R. T. Solid-phase supports for oligonucleotide synthesis. Methods in Molecular Biology (Totowa, NJ, United States) (1993), 20 (Protocols for Oligonucleotides and Analogs), 465-496]을 이용하여 합성한다. 그 다음, 상기 티올-개질된 올리고뉴클레오티드를 13±1 및 5 nm 금 콜로이드에 10 nM 콜로이드 1 mL 당 3 nmol의 올리고뉴클레오티드 농도로 첨가하고 하룻밤 동안 교반한다. 12 시간 후, 상기 혼합물에 소디움 도데실설페이트(SDS) 용액(10%)을 첨가하여 0.1 % SDS 농도를 얻고, 상기 혼합물에 인산 완충액(0.1 M; pH = 7.4)을 첨가하여 0.01 인산염 농도를 얻고, 상기 혼합물에 염화나트륨 용액(2.0 M)을 첨가하여 0.1 M 염화나트륨 농도를 얻는다. 그리고 나서, 상기혼합물에 염화나트륨 용액(2.0 M)의 6개의 분취물을 4시간에 걸쳐 첨가하여 0.3 M의 최종 염화나트륨 농도를 얻고 하룻밤 동안 교반하여 관능화 과정을 완료한다. 상기 용액을 원심분리(13,000 rpm, 20 min)하고 멸균 인산완충식염수에 3회 재현탁하여 정제된 결합체를 생성한다.

[0208] **실시예 2**

[0209] **올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자 결합 방법**

[0210] 본 실시예에서 올리고뉴클레오티드 설계는 두 가지 가능한 작용 기전을 포함한다. 첫째, 암피실린 내성(AmpR) 유전자 β-락타마아제(β-lactamase)에 대한 프로모터 부위의 센스 가닥에 우선적으로 혼성화될 공개된 플라스미드 서열을 이용하여 서열을 설계하였다. 이는 박테리아 게놈 내 AmpR의 프로모터 서열에 대한 상기 결합체의 우선적인 혼성화(입자의 보다 유리한 결합 상수 및/또는 세포내 농도에 의해 부여됨)를 이용함으로써 상기 박테리아를 암피실린에 민감하게 할 것이다. 이는 상기 프로모터 복합체가 그 표적 부위에 결합하는 것을 막고 mRNA 전사체(Amp 내성 유전자)의 전사를 막음으로써, 상기 박테리아를 암피실린에 민감하게 할 것이다. 사용된 서열은 5'-AT TGT CTC ATG AGC GGA TAC ATA TTT GAA AAA AAA AAA A-SH-3' (서열번호: 1) 및 5'-AT TGT CTC ATG AGC GGA TAC AAA AAA AAA A-SH-3' (서열번호: 2)이었다.

[0211] 두번째 전략은 AmpR 유전자의 내부 영역에 혼성화되도록 설계된 서열을 이용할 것이다. 그렇게 함으로써, 이는 전체 mRNA 전사체의 완료를 막을 것이다. 이것의 하류 효과(downstream effect)는 기능성 mRNA 전사체(Amp 내성 유전자)의 완전한 전사를 막아 박테리아를 암피실린에 민감하게 하는 것이다. 이 전략을 위해, 표적 이중체 DNA에 혼성화하도록 센스 가닥을 선택하였다. 이를 위한 서열은 5'-ACT TTT AAA GTT CTG CTA TAA AAA AAA AA-SH-3' (서열번호: 3)이었다. 두 가지 전략을 위한 도식이 도 1에 나타나 있다. 대안적으로, mRNA에 결합하고 단백질 생성을 억제함으로써 박테리아를 항생제에 민감하게 하는, 전통적인 안티센스 전략을 사용할 수 있다.

[0212] JM109 *E. coli* 컴피턴트 세포를 공개된 과정(Promega 및 Invitrogen)에 따라 암피실린 함유 플라스미드(psiCHECK 2, Promega 또는 pScreen-iT, Invitrogen 중 하나)를 이용하여 형질전환시키고 항생제 함유(Amp) 플레이트 상에서 성장시켰다. 단일 콜로니를 선택하여 암피실린을 갖는 액체 배양에서 12시간 동안 성장시켰다. 이 배양물을 사용하여 추후 실험에 사용하기 위한 동결된(10% 글리세롤) 스탁(stock)을 형성하였다.

[0213] *E. coli* 스탁을 녹인 후, 소량을 하기에 설명된 바와 같이 암피실린을 갖거나 갖지 않는 액체 배양액에서 성장시키고, 상응하는 LB 플레이트 상에 도말하였다. 하나의 예에서, 5 μL의 동결된 박테리아 배양액을 30nM 입자를 갖는 1 mL의 LB 배양액에서 5.5시간 동안 성장시켰다. 이 1mL로부터, 100 μL를 도말하고 하룻밤 동안 성장시켰다. 투과 전자 현미경을 이용하여 박테리아 진입을 확인하였다(도 2).

[0214] 나노입자로 몇 시간 처리한 후, 소량의 박테리아를 암피실린 양성 또는 암피실린 음성 플레이트 상에 도말한다. 상기 박테리아를 이들 플레이트 상에서 추가로 12시간 동안 성장시키고, 각 조건 하에 성장한 콜로니의 수를 평가한다. 결과가 하기 표 1에 요약되어 있다. 이 전략을 이용하여 박테리아 성장이 66% 억제되었다. 조건들의 통상적인 최적화가 100%의 성공적인 박테리아 민감화를 낼 것으로 예상된다.

[0215] [표 1]

성장 조건	시험			예상 성장
	1	2	3	
대장균 (-) Amp (-) 나노입자 (-)	NA	NA	NA	(-)
대장균 (-) Amp (+) 나노입자 (-)	(-)	(-)	(-)	(-)
대장균 (+) Amp (-) 넌센스(Nonsense) NP (+)	NA	NA	NA	(+)
대장균 (+) Amp (+) 넌센스(Nonsense) NP (+)	NA	NA	NA	(+)
대장균 (+) Amp (-) 프로모터 NP (+)	(+)	(+)	(-)	(+)
대장균 (+) Amp (+) 프로모터 NP (+)	(-)	(-)	(-)	(-)
대장균 (+) Amp (-) 내부 NP (+)	(+)	(+)	(-)	(+)
대장균 (+) Amp (+) 내부 NP (+)	(-)	(-)	(-)	(-)

프로토콜: 3.5 시간 동안 성장한 30nM 입자를 갖는 1mL 배양액 중 5μL 박테리아 배양액.

[0216] 100 μL 의 플레이팅 및 밤새 성장.

성장 조건	시험			예상 성장
	1	2	3	
대장균 (-) Amp (-) 나노입자 (-)	(-)	(-)	(-)	(-)
대장균 (-) Amp (+) 나노입자 (-)	(-)	(-)	(-)	(-)
대장균 (+) Amp (-) 넌센스(Nonsense) NP (+)	(+)	(+)	(+)	(+)
대장균 (+) Amp (+) 넌센스(Nonsense) NP (+)	(+)	(+)	(+)	(+)
대장균 (+) Amp (-) 프로모터 NP (+)	(+)	(+)	(+)	(+)
대장균 (+) Amp (+) 프로모터 NP (+)	(-)	(-)	(+)	(-)
대장균 (+) Amp (-) 내부 NP (+)	(+)	(+)	(+)	(+)
대장균 (+) Amp (+) 내부 NP (+)	(+)	(+)	(+)	(-)

프로토콜: 5.5 시간 동안 성장한 30nM 입자를 갖는 1mL 배양액 중 5μL 박테리아 배양액.

[0217] 100 μL 의 플레이팅 및 밤새 성장.

[0218] **실시예 3**

[0219] **올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자 결합체가 전사 넉다운(knockdown)을 달성한다**

[0220] 부가적인 전략을 사용하여 플라스미드 유래 루시퍼라아제 유전자에서 전사 넉다운을 조사하였다. 레닐라 발현을 암호화하는 플라스미드 상의 독립된 영역과 루시퍼라아제 넉다운을 구별함으로써, 이 모델은 부위-특이적 유전자 넉다운을 입증하는데 사용되었다. 이 효과를 분석하기 위하여, 이중-루시퍼라아제 리포터 분석 시스템(Promega)을 사용하였다. 이 모델에 사용된 전략은 상기 루시퍼라아제 유전자의 전체 mRNA 전사체의 형성을 차단하는 것이었다. 이는 레닐라와 관련된 루시퍼라아제 신호의 감소를 야기한다. 이를 위해 사용된 서열은 5'-CCC GAG CAA CGC AAA CGC AAA AAA AAA AA-SH-3' (서열번호: 4)이었다. 대안적으로, 프로모터 복합체가 그 표적 부위에 결합하는 것을 차단하기 위해 상기에 사용된 것과 유사한 전략을 사용할 수 있다. 본 실시예에서, 5nm 입자를 사용하였다. 12시간 후 상기 결과로 초래된 넉아웃은 300 nM 농도의 입자(p 값 = 0.0004)를 이용하여 59%였다. 이들 결과는 전사 수준에서 유전자 조절을 달성하는 또 다른 방법을 보여준다. 상기 데이터의 개요가 도 3에 나타나 있다.

[0221] **실시예 4**

[0222] **전사를 차단하는 올리고뉴클레오티드 개질된 나노입자 결합체**

[0223] 이중 가닥 게놈 DNA와 혼성화함으로써 전사와 이후의 단백질 생성을 차단하는 이들 결합체의 능력의 입증으로서, 시험관내 전사 분석을 수행하였다. 루시퍼라아제 유전자를 암호화하는 이중 가닥의 플라스미드 DNA를 함유한 시험관내 전사 반응(Promega)에 올리고뉴클레오티드 관능화 금 나노입자를 첨가하였다. 상기 올리고뉴클레오티드 서열은 루시퍼라아제 유전자의 센스 가닥을 표적화하였고, 따라서 단지 번역이 아닌 전사만을 차단할 수 있었다. 대조군으로서, 비상보적인 서열로 관능화된 나노입자 결합체를 또한 동일한 방식으로 사용하였다. 상기 전사 반응을 진행시키고 상업용 키트(Promega)를 이용하여 루시퍼라아제 활성을 측정하였다. 루시퍼라아제 유전자를 표적화하는 나노입자 결합체를 함유하는 시료에서, 비상보적인 서열을 갖는 나노입자 결합체를 함유한 대조 반응과 비교하여 루시퍼라아제 활성의 유의한 감소(> 75%)가 관찰되었다.

[0224] 또한, 넉다운의 기저 원리를 설명하기 위해, 완충액에서 실험을 수행하여 미리 형성된 이중체의 올리고뉴클레오티드 금 나노입자 결합체 침윤을 조사하였다. 도식 및 얻어진 결과가 도 4(A 및 B)에 나타나 있다. 상기 입자는 미리 형성된 이중체에 결합할 수 있다(삼중체 형성). 대안적으로, 상기 입자는 표적 서열에 대하여 더 높은 결합 상수를 통해 미리 형성된 이중체를 대체할 수 있다. 이후, 상기 입자를 13,000 RPM에서 원심분리하고, PBS에서 3회 세척하고, KCN을 이용하여 산화시킨다. 결합된 가닥의 형광성을 측정한다. 이론에 구속되지 않고, 이는 플루오레세인(fluorescein)-캡핑된 올리고뉴클레오티드(안티센스 가닥)의 방출 및 형광 신호의 증가를 야기하는 것으로 가설이 세워진다. 나노입자 첨가에 앞서, 켄칭제(quencher) (답실(dabcyl), 센스 가닥) 및 형광단(fluorophore)(플루오레세인, 안티센스 가닥)을 갖는 이중체가 형성된다. 일정 농도 범위 이상에서, 이 전략에 대한 서열 특이성을 관찰할 수 있다.

[0225] **실시예 5**

[0226] **시험관내 독성이 없는 유전자 억제**

[0227] DNA-Au NP 및 siRNA-Au NP 모두는 시험관내 많은 세포에서 유전자 기능을 억제하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 수르비빈(survivin)에 대항하는 siRNA-Au NP는 T-24 및 HT-1376 방광암 세포의 세포사멸을 야기하였다. 또한, siRNA-Au NP는 단일 처리 후 배양 중에 4일 동안 HeLa 세포에서 루시퍼라아제의 발현을 점차 감소시킨 반면, 통상적인 siRNA로 처리한 후 4일까지 루시퍼라아제 발현이 기저수준으로 되돌아갔다[Giljohann et al., J Am Chem Soc 131: 2072-2073 (2009)]. 세포 독성은 유전자 침묵(silencing)에 요구되는 농도에서 관찰되지 않았고, 면역-매개 효과는 통상적인 핵산의 효과보다 현저히 낮다. 또한 올리고뉴클레오티드-Au NP를 이용한 둘 이상의 유전자의 동시 억제가 관찰되었으며, 배양된 각질형성세포(KC)에 강글리오사이드(ganglioside) 생합성의 두 가지 효소(GM2/GD2 합성효소 및 GD3 합성효소)에 대항하는 DNA-Au NP를 동시에 첨가하는 것은, 안티센스 차단 이후 적어도 1주일 동안 가시적인 막 발현의 지속과 함께, 개시 후 3일까지 각질형성세포 막에서 GM3 기질의 축적을 야기하였다.

[0228] 이들 나노결합체에 대한 세포 반응을 조사하기 위해, 13 nm 시트레이트 안정화된 금 나노입자 및 올리고뉴클레오티드-개질된 입자를 비교하였다. 시트레이트 안정화된 입자는 HeLa 세포의 유전자 발현 프로파일에 유의한 변화(127 유전자가 상향 또는 하향조절됨)를 유도하는 반면, 스크램블(scrambled) siRNA 또는 DNA 관능화 나노입자는 유전자 발현 프로파일에 유의한 변화를 나타내지 않는다.

[0229] **실시예 6**

[0230] **나노입자 결합체는 국소 적용 후 경피로 전달된다**

[0231] DNA-Au NP 또는 siRNA-Au NP를 이용한 연구는 일차 인간 각질형성세포가 2시간 내에 ~100% 효율로 DNA-Au NP 및 siRNA-Au NP를 흡수한다는 것을 보여준다. 금 입자 흡수를 측정하는 유도결합 플라즈마 질량 분석(inductively coupled plasma mass spectroscopy(ICP-MS))을 이용하여[Giljohannet al., Nano Lett 7: 3818-3821 (2007)]을 이용하여, 배양된 각질형성세포에 의한 DNA-Au NP의 흡수는 임의의 다른 세포의 흡수보다 적어도 10배 큰 것으로 확인되었고, KC 내로의 siRNA-Au NP의 흡수는 다른 세포 유형에 비해 최대 20배 높았다. 예를 들어, 낮은 칼슘 매질에서 KC와 함께 6 시간 동안 50 pM siRNA-Au를 배양한 결과 세포당 대략 6 x 10^5 NP의 흡수가 일어나며, 이는 통상적인 siRNA의 세포 흡수보다 더 높다.

[0232] 국소 전달을 위한 잠재적인 연고, 크림 및 로션의 그룹은 쉬운 혼합, 적용 부위에서의 잔류, 및 나노결합체의 안정성(나노입자의 특징적인 적색의 지속에 의해 결정된 바와 같음)을 보장하는 것으로 확인되었다. Cy5-표지된 센스 DNA-Au NP 연고(아쿠아포어® 연고 내에 DNA-Au NP)를 마우스 등의 피부에 적용시 단일 적용 후 2시간까지 각질층을 통한 표피로의 침투, 6-8시간까지 상부 진피로의 침투, 및 24 및 48까지 진피 전체에 광범위한 분포를 나타내었다. 상기 입증된 형광성의 지속은 ICP-MS에 의해 측정된 조직 내 금 나노입자의 지속과 상당히 상관관계가 있었다. 유사하게, Cy3-개질된 siRNA-Au NP 연고는 마우스 피부를 통해 신속히 흡수되었고, 이는 적용 후 24시간까지 진피를 통해 그리고 피하 조직 내로, 표피의 기저로의 우수한 침투를 보여준다(도 5A, B). 이들 연구는 상기 나노입자가 각질층을 침투하고 표피를 가로질러 그 맥관구조를 갖는 진피에 도달한다는 것을 보여주었다.

[0233] 국소 적용은 독성의 증거를 나타내지 않았다. C57BL/6 마우스의 등 피부로 1개월 동안 15 nM 스크램블된 siRNA-Au NP를 적용시 전신 또는 피부의 임상 변화가 관찰되지 않았다. 대조군(운반체 적용 또는 비처리)과 비교하여, 금 입자 축적은 흑색종 전이 부위: 피부, 림프절, 폐 및, 보다 적게, 간 및 신장에서 가장 두드러졌다. 조직 절편들은 염증, 세포사멸(apoptosis)의 증거, 피부의 증식/두께의 변화를 나타내지 않았다. 예비 독성 연구에서, 국소적용 스크램블된 siRNA-Au NP를 50 nm 내지 500 nM (각 그룹에서 n=5) 범위의 용량으로 마우스에 10일간 매일 처리하였다. 금 입자는 피부, 림프절, 간, 위장관 및 분변에서 검출되었고, 농도는 적용된 나노입자의 농도에 비례하여 이들 생물에서 증가하였다.

[0234] **실시예 7**

[0235] **국소적용된 siRNA-Au NP는 유전자 발현을 억제한다**

[0236] 국소 접근법을 이용한 표적 유전자 발현에 대한 연구에서, 흔히 형질전환 유전자(transgene)를 발현하는 마우스(C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J)에서 녹색 형광 단백질(GFP)이 표적화되었다. GFP에 대항하는 siRNA-Au NP를 아쿠아포어(Aquaphor) 운반체를 이용하여 국소로 15 nM 농도로 적용하였다. 마우스를 4주간 매 주마다 3회씩 연속 처리하였고, 상기 마우스의 등의 절반은 항-GFP siRNA-Au NP로 처리하고 나머지 절반은 스크램블된 siRNA-Au NP로 처리하였다. 처리된 피부를 분리한 후, 형광측정법(fluorimetry)을 사용하여 대조군과 항-GFP siRNA-Au NP로 처리된 군 간의 GFP 수준을 비교하였다. 처리된 마우스에서(n=5), 이 요법은 형광으로 측정된 바와 같이 GFP 발현의 43% 감소를 야기하였다($p<0.0036$)(도 6). 스크램블된(대조군) siRNA-Au NP로 절반이 처리된 마우스의 피부에서 관찰된 대략 12% 넉다운은 항-GFP siRNA-Au NP의 전신 흡수를 반영하였다.

[0237] **실시예 8**

[0238] **치료 표적으로서의 전이성 흑색종**

[0239] 상이한 유전자형의 인간 흑색종 세포주(예를 들어, SK-MEL-28, 1205Lu, A375P, C8161, 및 WM3211 세포주) 및 인간 흑색종 조직의 연구를 통해, 독특한 탈-아세틸화 형태의 강글리오사이드 GM3의 존재에 의해 전이성 세포가 비전이성 흑색종 세포 및 정상 멜라닌세포와 구별될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 데-N-아세틸 GM3는 항원상으로 구별되는 마커일 뿐만 아니라, 세포 이동 및 침윤을 유도한다[Liu J., 데-N-아세틸 GM3는 유로키나아제 플라스미노겐 활성제 수용체 신호전단 의존 매트릭스 메탈로프로테아제-2 활성화를 통해 흑색종 이동 및 침입을 촉진한다. Cancer Res (2009)]. 이식 마우스 모델을 이용한 연구는 마우스의 전이성 세포주의 폐 및 간으로의 전이의 확산을 억제하는데 있어서 데-N-아세틸GM3가 유용함을 입증하였다. 이들 연구 중, 피부 및 전이성 흑색종의 확립의 시간 경과가 두 가지 BRAF V600E/PTEN 손실 모델인 SK-MEL-28 및 1205Lu를 갖는 이식 모델에서 검토되었다. 이들 모델에서, 10^6 세포의 피하 주입은 전체 현미경 및 RT-PCR 평가에 의해 주입 후 몇 주 내에 대부분

의 마우스에서 피부 종양 및 폐와 간으로의 전이를 야기하였다. 흑색종 세포 내로 침투하여 수르비빈의 발현을 억제하는 siRNA-Au NP의 능력을 또한 연구하였다. SK-MEL 28 흑색종 세포주를 이용시, siRNA Au-NP는 정량적 역전사효소-중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)에 의해 측정된 바와 같이 수르비빈 mRNA 수준을 91%까지 감소시키는 것으로 나타났다.

[0240] **실시예 9**

[0241] **조합 시험관내 접근법을 이용한 전이성 흑색종에 관련된 공지의 유전자를 표적화하는 다기능성 siRNA-Au NP**

[0242] 흑색종 내 신호전달 경로를 유전적으로 표적화하는 다기능성 나노입자의 능력을 조사한다. 결합체를 설계하고 조합 방식으로 여러 가지 돌연변이를 표적화함을 입증하였다. 비율-계량 접근법을 이용하여, 동시에 여러 가지 유전자를 조절하기 위한 목적으로 관능화 결합체를 최적화한다.

[0243] 전이성 흑색종에서 여러 가지 신호전달 경로, 특히 BRAF/ERK 및 AKT3 신호전달이 상향조절되는 것으로 알려져 있다. 조합 접근법을 이용하여 일반적인 BRAF 돌연변이 및 활성화된 AKT3을 표적화한다. 또한, 각 실험에서 BRAF V600E 및 AKT3 siRNA-Au NP에 의한 넉다운 결과를 비상보적인 대조군 siRNA-Au NP의 결과와 비교한다. 이는 유전자 넉다운의 특이성을 결정하고 결합체 독성의 평가를 가능케 한다.

[0244] 이들 두 가지 흑색종 표적을 독립적으로 표적화하는 최적의 전략을 결정한다. 첫째, BRAF 내 T1799A(V600E) 돌연변이를 표적화하도록 siRNA 결합체를 설계한다. siRNA 설계 알고리즘을 이용하여 또는 문헌[Sharma et al., Cancer Res 65: 2412-2421 (2005)]으로부터 선발을 통해 표적당 적어도 세 가지 서열을 설계한다. BrafVE Ptenlox 마우스 세포주, 세 가지의 인간 BRAF V600E 함유 세포주(A375P; SK-MEL-28; 1205Lu) 및, 음성 대조군으로서, 정상 멜라닌세포(ScienCell Research Labs, Carlsbad, CA) 및 단지 야생형 BRAF를 나타내는 C8161 전이성 흑색종 세포주에서 유전자 넉다운을 위한 최적 농도를 결정하기 위해, BRAF 결합체를 개별적으로 평가한다(표 A 참조).

[0245] AKT3를 표적화하도록 제2 서열을 설계하고[Sharma et al., Clin Cancer Res 15: 1674-1685 (2009)], 이를 세 가지의 BRAF V600E 함유 세포주, AKT 활성화 역시 갖는 C8161 세포주 및, 대조군으로서, 정상 인간 멜라닌세포에서 시험한다. 형질전환 마우스 세포주로부터 얻은 세포를 4-HT의 존재하에(그리고, 대조군으로서, 4-HT 없이) 성장시켜 BrafVE 발현을 유도한다. 인간 및 마우스 BRAF V600E 및 AKT3의 mRNA 및 단백질 발현 수준을 결정하기 위해, siRNA-Au NP 처리 이후 특정 시점에 세포를 회수한 후 qRT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석을 사용한다[Dankort et al., Nat Genet 41: 544-552 (2009); Dankort et al., Genes Dev 21: 379-384 (2007)]. 넉다운의 특이성을 확인하기 위해, qRT-PCR 및 면역블롯팅에 의해 야생형 BRAF, CRAF, AKT1 및 AKT2에서 siRNA-Au NP 처리의 효과를 평가한다[Stahl et al., Cancer Res 64: 7002-7010 (2004)]. 상기 기술은 또한 NRAS (예를 들어, Q61L) 또는 c-KIT에서와 같이 증가된 ERK 활성화를 야기하는 덜 흔한 돌연변이의 표적화를 가능케 한다.

[0246] 금 나노입자는 분자 부착을 위한 지지체(scaffold)로 작용하기 때문에, BRAF V600E 및 AKT3를 동시에 표적화하는 조합 접근법의 사용을 조사한다. 각 돌연변이를 표적화하는 siRNA 이중체를 상이한 비율로 나노입자에 첨가할 것이다. 상기 결합체의 화학량론을 조절하는 능력을 이용하여, siRNA의 세포로의 전달이 정확히 영향을 받으며, 이는 넉다운의 조사 및 각 표적의 양이 미세조정됨에 따라 세포 반응의 조사를 가능하게 한다.

[0247] **실시예 10**

[0248] **신호전달 경로 변화 및 세포 기능의 평가**

[0249] 선발된 개별 및 다기능성 siRNA-Au NP의 신호전달 및 세포 생물학적 행동에 대한 효과를 전술한 바와 같이 비교한다[Sun et al., J Invest Dermatol 119: 107-117 (2002); Wang et al., J Invest Dermatol 126: 2687-2696 (2006); Wang et al., J Biol Chem 276: 44504-44511 (2001); Wang et al., J Biol Chem 278: 25591-25599 (2003)]. BRAF V600E/AKT3 siRNA-Au NP는 ERK 인산화, 및 AKT 발현 및 인산화 모두를 억제한다. 이는 pERK, ERK, pAKT, 및 AKT에 대항하는 항체를 이용한 면역블로팅을 통해 확인된다. 흑색종 세포 증식 및 생존 증가에서의 BRAF/ERK 및 AKT 신호전달의 핵심적인 역할을 고려할 때, 시험관내 흑색종 세포 기능의 현저한 변화가 넉다운의 결과로서 발생한다. PARP 절단을 평가하는 면역블롯팅에 의해 그리고 아넥신 V(annexin V) 흐름 연구에 의해 세포사멸의 유도를 결정한다. Bim(BRAF 활성화에 의해 유도됨), BCL-2(AKT 활성화에 의해 유도됨) 및 BAD(AKT 활성화에 의해 억제됨)의 단백질 발현을 결정함으로써 BRAF V600E 억제 및 AKT3 억제의 상대적인 역할을 분석한다. 스크램블된 서열을 갖는 대조군에서 유도된 세포사멸의 부족은 세포사멸이 siRNA-Au NP 독성이 아닌 의도된 표적화로부터 비롯된다는 것을 확인한다. 증식은 세포수 및 WST-1[(4-[3-(4-아이오도페닐)-2-(4-니트로페닐)-2*H*-5-테트라졸리오]-1,3-벤젠 디설포네이트)] 분석에 의해 평가되며, 사이클린 D1 발현은 면역

블롯팅에 의해 평가된다. 흑색종 세포는 혈관형성에 기여하는 인자(특히 IL-8 및 VEGF) 및 침윤에 기여하는 인자(특히 MMP-2)를 발현한다[Liu J et al., 데-N-아세틸 GM3는 유로키나아제 플라스미노겐 활성제 수용체 신호전단 의존 매트릭스 메탈로프로테아제-2 활성화를 통해 흑색종 이동 및 침입을 촉진한다. Cancer Res (2009)]. 종양 VEGF, Hif-1α 및 MMP-2의 발현은 세포 추출물 및 상층액을 면역블롯팅함으로써 평가되며, MMP-2 기능을 평가하기 위해 전술한 바와 같이 배양 상층액의 자이모그래피(zymography) 분석이 수행된다[Liu J et al., 데-N-아세틸 GM3는 유로키나아제 플라스미노겐 활성제 수용체 신호전단 의존 매트릭스 메탈로프로테아제-2 활성화를 통해 흑색종 이동 및 침입을 촉진한다. Cancer Res (2009); Wang et al., J Biol Chem 278: 25591-25599 (2003)]. IL-8 발현은 ELISA에 의해 세포 상층액에서 평가된다[Crawford et al., Mol Cancer Ther 7: 492-499 (2008)]. 세포 침윤 분석은 매트리겔 침윤 챔버(Matrigel Invasion Chamber)를 이용하여 수행된다[Wang et al., J Biol Chem 278: 25591-25599 (2003)].

[0250] 다기능성 siRNA-Au NP는, 대안적인 유전자 돌연변이(예컨대, WM1366 세포주에서)를 표적화하거나, BRAF V600E 및 AKT3를 표적화하는 다기능성 siRNA-Au NP에 부가적인 표적화 siRNA를 첨가하는 기회를 제공한다. 그러므로, 세포주 각각의 유전적 프로파일 뿐만 아니라 이들의 알려진 유전적 돌연변이를 이용하여 셋 이상의 유전자를 표적화하는 능력이 고려된다(표 A). 예를 들어, SK-MEL-28 및 1205Lu 세포 모두는 특이적 CDK4 점 돌연변이를 가지며, 이들 돌연변이가 BRAF 억제에 대한 반응에 영향을 미치는 것으로 보이진 않지만, 부가적인 표적화는 이들 돌연변이의 기능적 효과의 탐색을 가능하게 한다. 유사하게, SK-MEL-28 및 1205Lu는 전이성 흑색종 변형 및 진행에서의 이들의 중요성을 탐색하기 위해 표적화되는 p53(SK-MEL-28) 및 CDKN2A(1205Lu)에서 부가적인 서명(signature) 돌연변이를 갖는다. 이들 세포주는 모두 생체내 이종이식 모델용으로 광범위하게 사용되어왔다.

[0251] **실시예 11**

[0252] **siRNA 나노결합체의 경피 및 정맥내 전달을 위한 조건, 안정성 및 생체분포**

[0253] 정맥내 및 경피로 투여된 스크램블된 siRNA-Au NP의 전달, 제거(clearance), 및 독성을 면역컴피턴트 마우스에서 비교한다. 또한, 상기 결합체의 독성 및 약동학적 프로파일을 평가한다. 본원에 전술한 바와 같이 인간 피부를 통한 침투를 위해 다기능성 나노입자를 또한 최적화한다.

[0254] siRNA-Au NP는 경피 전달에 의해 전신으로 전달되며, 이들의 운명은 금 입자의 증착에 의해 추적된다. 생물 내 금 입자의 수준은 전술한 바와 같이 ICP-MS에 의해 측정된다[Giljohann et al., Nano Lett 7: 3818-3821 (2007)]. 이들 연구에서, 각각의 siRNA-Au NP 처리 그룹에서 6마리의 마우스가 연구되고, 각 매개변수에 대해 2마리의 마우스에 대조군으로서 운반체가 적용된다. 생체분포(biodistribution) 연구에서, 전달은 간, 폐, 피부 및 림프절, 흑색종 전이의 가장 흔한 부위 및 국소 ㅌ투투여를 이용한 연구에서 siRNA-Au NP에 의해 도달된 부위에 집중된다. 신장, 비장, 부신 및 위장관(잠재적 독성 부위)을 또한 관찰하며, 뇌(도달하기 힘든 인간에서의 드문 전이 부위)를 관찰한다. 이들 연구에서 500 nM siRNA-Au NP를 투여하는데, 이 농도가 경피 전달을 통해 내부 표적에 잘 전달되기 때문이다.

[0255] **경피 전달**

[0256] 표피, 진피 및 피하 세포에 의한 25 nM 형광단(fluorophore)-결합된 siRNA-Au NP의 광범위한 흡수가 적용 24시간 내에 입증되었고(도 5), 심지어 단지 15 nM 단기능성 siRNA-Au NP의 적용 후에도 금 입자의 피부, 림프절, 폐, 간 및 신장으로의 전달이 입증되었다. 연구들은 형질전환 마우스 흑색종 모델에서 처리가 시작된 연령인 7-주령의 면역컴피턴트 C57BL/6 마우스에서 수행되었다.

[0257] **단일 투여의 전달, 제거 및 독성**

[0258] 다기능성 siRNA-Au NP를 이용한 시간 경과 실험을 수행하여 하기를 결정하였다: 1) 경피 침투의 시간 경과 및 효율; 2) 내부 장기로의 전달의 효능; 3) 단일 적용 후의 제거; 및 4) 자극 또는 독성에 대한 잠재력. 마우스에 1회 처리한 다음, 처리 후 2시간 내지 7주까지의 8번의 시점에 안락사시킨다. 이들 연구에서, 초기 시점(즉 2, 4, 24, 및 72시간)에서 siRNA-Au NP의 분포를 비교하여 피부를 통한 침투, 장기로의 전달, 및 제거를 확인한다. 국소 처리된 마우스에서, 조직학적 분석을 위해 상기 처리된 피부 부위를 삼등분하여, 금 입자 농도를 정량화하는 ICP-MS를 위해, 및 -80℃에서 보관하기 위해(예를 들어, 추후 ELISA 분석을 위해) 독성 부족을 확인한다. ICP-MS를 위한 피부 절편은 60℃ 물에 잠시 동안 노출되어 혈관성 진피로부터 표피가 분리되며 이로써 표피 대 진피/피하 전달을 결정한다. 희생시에, ICP-MS에 의해 장기(상기 언급한 바와 같음) 및 먼 피부의 금 함량을 평가하며, 조직학적 평가(하기 참조)를 위해 각 장기의 일부가 취한다.

[0259] **반복 투여를 이용한 축적**

[0260] 마우스를 제안된 실험에서 단지 단일 적용보다는 반복적으로 처리한다는 점을 고려할 때, 이들 연구는 또한 금 입자 축적을 정량화하기 위해 10일, 4주 및 7주 동안 (단일 적용 이후 피부에서의 금 입자의 지속에 기초하여) 매주 2-3회 처리된 마우스를 이용하여 수행된다.

[0261] **독성 평가**

[0262] 마우스를 이틀에 한번씩 체중을 측정하고 가시적인 피부 변화 또는 행동 변화를 관찰한다. 부작용을 시험하기 위해, 장기 수준에서 조직학적 및 면역조직화학적 평가를 수행한다. 구체적으로, 모든 조직 및 피부에서 괴사(necrosis) 및 염증의 존재, 표피 성숙의 변화 및 흑피증(melanoderma; pigment dumping)의 존재를 결정한다. 피부 또는 내장 위축(atrophy)이 관찰되는 경우, Ki67의 검출에 의해 면역조직화학적으로 세포 증식을 평가한다. 의심되는 세포사멸의 존재는 면역조직화학적으로 확인한다(ApopTag In Situ Apoptosis Detection)[Lannutti et al., Cancer Res. 57(23): 5277-80 (1997)]. 처리된 피부에서 표피 세포사멸이 관찰되는 경우, 피부가 선천적인 면역 기관이며 세포사멸 유도성 사이토카인을 발현할 수 있다는 것을 고려하여, siRNA-Au NP 피부 대 대조군-처리된 피부에서 TNF-알파 발현에 대한 ELISA 분석을 수행한다.

[0263] 혈액은 모든 동물이 죽기 전 심장 천자(cardiac puncture)로 수득한다. 단일 용량 연구에서, 필요한 경우 추후 분석을 위해 혈청을 냉동한다. 10일 이상 처리된 마우스로부터 얻은 혈액은 혈구수, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라아제(간 기능) 및 크레아티닌(creatinine) 수준(신장 기능)을 분석한다(Charles River Labs).

[0264] **인간 피부에서의 경피 전달**

[0265] 인간 피부를 통과하는 siRNA-Au NP의 능력을 프란츠 확산 세포(Franz diffusion cell)를 이용한 시험관내 실험을 수행하는 복강 형성술(abdominoplasty)로부터 얻은 정상 인간 피부를 이용하여 시험한다. 이들 프란츠 세포는 과거 수십년간 인간 피부를 통한 흐름(flux)을 시험하기 위한 금 표준품이었다. 이들은 인간 생체내 조건과 일치하도록 그리고 중요하게는 피부와 유사한 삼투압 구배를 제공하도록 온도 및 습도가 조절된다. 인간 피부를 통한 금 입자의 통과는 침투 마커로서 ICP-MS에 의해 정량화되는데, 상기 siRNA 및 금 입자가 결합된 상태로 남아있기 때문이다. 재구성된(reconstituted) 피부는 진피로부터 각질층/표피를 분리한 후에 얻어진다. 재구성된 인간 피부 시료의 온전성은 해부 현미경 하에서 육안으로 확인된다. 조직이 온전하다는 것을 좀더 확인하기 위해, 조직이 온전한 경우 최초 30분 내에 회수된 시료 내에서 금이 검출될 수 없다는 가정으로, 수용체 유체 시료를 최초 30분에 회수한다. 피부를 프란츠 세포 위에 얹은 후, siRNA-Au NP(500 nM로 시작하여 100 pM까지 감소)를 대조군으로서 아쿠아포어와 함께 적용한다. 연구는 적어도 세번 반복하여 적어도 3회 수행한다. 이들 연구는 인간 표피를 통한 흐름, 시간에 따른 피부 표면 cm^2를 통과하는 약물의 양($ng/cm^2/h$)을 보여준다. 6시간 및 24시간 끝에, 피부를 갈고 ICP-MS 측정을 위해 금입자를 추출하여 조직 내에 남아있는 Au NP를 측정한다.

[0266] **실시예 12**

[0267] **마우스 모델의 확립**

[0268] 흑색종은 전술한 바와 같이 3일 연속하여 좌측 및 우측 측면부로 6주령에 DMSO 중의 5 mM 4-HT를 국소 투여함으로써 유도된다[Dankort et al., Nat Genet 41: 544-552 (2009)]. 이러한 고도로 색소침착된 흑색종은 고도로 색소침착된 종양으로서 형질전환 모델에 4-HT 투여한지 7-10일에 일차적으로 분명해질 것이다[Dankort et al., Nat Genet 41: 544-552 (2009)]. 상기 마우스 모델을 생성하는 연구에서, 용매 단독의 적용이 대조군으로 사용된다. 인간 질환을 모사하기 위해, 치료요법은 적어도 피부 종양이 최초로 검출될 때까지 시작되지 않을 것이고, 흑색종이 적어도 5 mm^2의 최소 영역으로 보이거나 감지될 때까지 양 마우스 모델에서 치료요법의 개시가 보류된다.

[0269] **용량 설정 연구**

[0270] 8마리의 마우스를 50 nM과 500 nM 사이의 3가지 용량 각각에서 시험한다. 용량 설정 연구에서 대조군은 스크램블된 siRNA 및 아쿠아포어 단독을 포함한다. 마우스를 해부를 위해 치료요법 개시 7주 후에 희생시킨다. 원발성 흑색종 및 임의의 피부 전이를 촬영하고, 각 처리 시점에 캘리퍼스에 의해 부피를 측정한다. 눈에 보이거나 감지할 수 있는 피부 전이의 수에 주목한다. 폐, 간, 림프절, 신장 및 뇌의 총 전이를 계수하고(흑갈색에 의해 가능해짐), 미세전이의 증거확보를 위해 각 장기 전역의 여러 절편을 이용하여 조직학적으로 장기를 조사한다.

미세전이는 현미경으로 쉽게 눈에 보이지만, 필요한 경우 색소침착을 좀 더 강조하기 위해 폰타나-마손(Fontana-Masson) 염색을 이용한다. 어떠한 독성의 증거 없이 전이를 감소시키는데 가장 효과적인 용량을 추후 연구에 사용한다.

[0271] **전이 발전의 시간 경과 및 siRNA-Au NP의 치료요법에 의한 그 변화**

[0272] 마우스에 이전 연구에 기초한 용량 및 빈도로 siRNA-Au NP, 스크램블된 siRNA-Au NP 또는 대조군 운반체(국소 아쿠아포어)를 투여한다. 8마리의 마우스 세트 각각을 치료요법 개시 1, 3, 5, 및 7주 후에 희생시켜 전술한 바와 같이 내장 전이를 전체적으로 그리고 조직학적으로 평가한다.

[0273] **siRNA-Au NP 효과의 기전**

[0274] 원발성 종양을 통상의 조직학 및 면역조직화학 연구, 면역블롯 분석, 및 qPCR을 위해 나눈다. 이들 연구에서 대조군은 스크램블된 siRNA-Au NP 또는 운반체로 처리도니 마우스로부터 얻은 종양 및 정상/비처리 피부(예를 들어, 형질전환 마우스의 등 위쪽 피부)이다. 하기를 조사한다: i) Ki67 염색을 이용한 종양 세포 증식; ii) 항-CD31 항체를 이용한 종양 주변부 혈관분포상태(vascularity); iii) TUNEL 분석 또는 캐스파아제 3 염색을 이용한 종양 세포 세포사멸; iv) 전술한 프라이머로 qPCR을 이용하여 형질전환 모델에서 BrafVE, 야생형 Braf, 및 Akt3 발현의 직접적 억제[Dankort et al., Nat Genet 41: 544-552 (2009); Sharma et al., Clin Cancer Res 15: 1674-1685 (2009); Sharma et al., Cancer Res 66: 8200-8209 (2006); Sharma et al., Cancer Res 65: 2412-2421 (2005)]; 및 v) 총 Braf; Craf; p-Akt/총 Akt; 및 p-ERK1/2/총 ERK1/2의 단백질 발현 변화. 종양 시료로부터 추출된 단백질을 대상으로 면역블롯팅에 의해 혈관신생 및 침윤의 마커(VEGF, MMP-2 및 Hif-1)를 분석한다. siRNA-Au NP를 마지막으로 투여하고 2시간 후 희생시킬 때 기준 구후 출혈(Baseline retrobulbar bleeding) 및 심장 천자(cardiac puncture)를 수행하여 ELISA에 의하여 IL-8 수준을 평가한다[Crawford et al., Mol Cancer Ther 7: 492-499 (2008)]. 면역컴피턴프 형질전환 모델에서, Braf 및/또는 Akt3 활성의 억제가 면역 반응에 영향을 미치고 세포독성 T 세포 기능을 촉진시키는지 여부를 또한 평가한다. 이들 연구는 비처리 또는 스크램블된 siRNA-Au NP 처리된 마우스로부터 얻은 세포와 BrafVE Akt3 siRNA-Au NP-처리된 형질전환 마우스로부터 얻은 세포를 비교한다. 면역조직화학을 이용하여, 종양 절편에서 Foxp3+(조절 T 세포) 및 CTLA4+/CD152(세포독성 CD8+ T 세포)의 수를 계수한다. 항체의 시각화를 위해, AEC 크로모겐(적색)을 사용한다. 종양 침윤성 림프구를 피부 종양[Lin et al., J Immunol 182: 6095-6104 (2009)] 및 치료요법 개시 후 1, 4, 및 7주에 희생된 마우스로부터 추출한다. 세포를 CD4, CD25, Foxp3, CD8 및 CTLA4에 대항하는 플루오로크롬-결합 항체를 이용하여 염색한 후 FACS 분석을 수행한다.

[0275] **siRNA 억제의 지속**

[0276] 개별 연구에서, 원발성 종양 성장 및 전이를 조절하기 위해 마우스를 7주간 siRNA-Au NP로 처리한다. 치료요법을 상기 마우스(n=12) 중 절반에서 중지한다. 치료가 중지된 마우스 및 계속 치료중인 집단을 2, 4, 8 및 12주 후에 희생시킨다. 원발성 흑색종을 일주일에 2회 측정하고 내장 전이를 종료시점에 계수한다. 또한, 피부 및 내장 종양에서 Au-NP를 정량하여 이들의 제거가 종양 억제의 전환과 어떻게 상호관련되는지 결정한다.

[0277] **생존의 연장**

[0278] 형질전환 마우스는 25-50일 정도에 안락사를 요한다[Dankort et al., Nat Genet 41: 544-552 (2009)](예를 들어, 종양이 최대 직경 2cm에 도달할 경우 또는 마우스가 병적상태, 예를 들어 잘 먹지 못하거나, 일주일 내에 체중의 20% 또는 2주 연속 체중의 10%가 손실되거나, 비정상적인 호흡을 보이거나, 또는 고통을 표시하는 자세를 보이는 경우). siRNA-Au NP의 효과를 평가하는 전술한 연구에서, 최대 10주 시점에 마우스를 희생시킨다. 마우스에 처리를 계속하고 최대 3개월의 생존 연구를 위해 비처리 및 스크램블된 siRNA-Au NP-처리 마우스와 비교한다. 마우스 생존을 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선을 이용하여 도식화한다.

[0279] **독성 평가**

[0280] 마우스를 이틀에 한번씩 체중을 재고 행동 또는 식욕이 변화된 증거를 관찰한다. 간 및 신장 조직을 대상으로 통상의 조직병리 염색에 의해 조직 독성(예를 들어, 세포사멸 또는 염증)의 증거를 평가하고, 본 기술분야에 알려진 방법에 따라 골수, 간 및 신장 기능에 대하여 스크리닝 혈액 연구를 수행한다. 독성 증거가 의심스러운 경우, 부가적인 면역조직화학 평가(예컨대, TUNEL 및 Ki67)를 수행한다. 전체 게놈 분석(Affymetrix)을 수행하기 위해 심장 천자에 의해 얻어진 혈청에서 siRNA-유도된 탈표적 효과(off-target effect)를 평가한다. BrafVE Akt 3 siRNA-Au NP 및 이들의 대조군에 적어도 7주간 노출된 마우스로부터 얻은 시료에 대해 적어도 3회 반복하여 유전자 분석 연구를 수행하며, 만약 탈표적 효과가 감지되지 않는 경우 시료를 모아 더 짧게 노출된 마우스

에 대해 분석을 수행한다.

[0281] **통계 분석**

[0282] 유전자를 넉다운시키고 단백질 발현에 영향을 미치는 합성된 결합체의 능력을 $P<0.05$의 유의성을 갖는 양측 스튜던트 t 검정(two-tailed Student's t test)을 이용하여 평가한다. 피부 흑색종의 크기 및 폐와 간 전이의 수에서의 유의차를 비모수적 만-휘트니 U-검정(nonparametric Mann-Whitney U-test) 및 PRISM 소프트웨어를 이용하여 결정한다. 생존 연구에서의 유의성은 생존 곡선의 로그 순위 검정(logrank test)에 의해 결정한다.

[0283] 본 발명은 다양한 구현예 및 실시예를 들어 설명되었지만, 본 기술분야의 숙련자에게 변형 및 개선이 일어날 것으로 이해된다. 그러므로, 청구항에 나타난 한정만이 본 발명에 사용되어야 한다.

도면

도면1

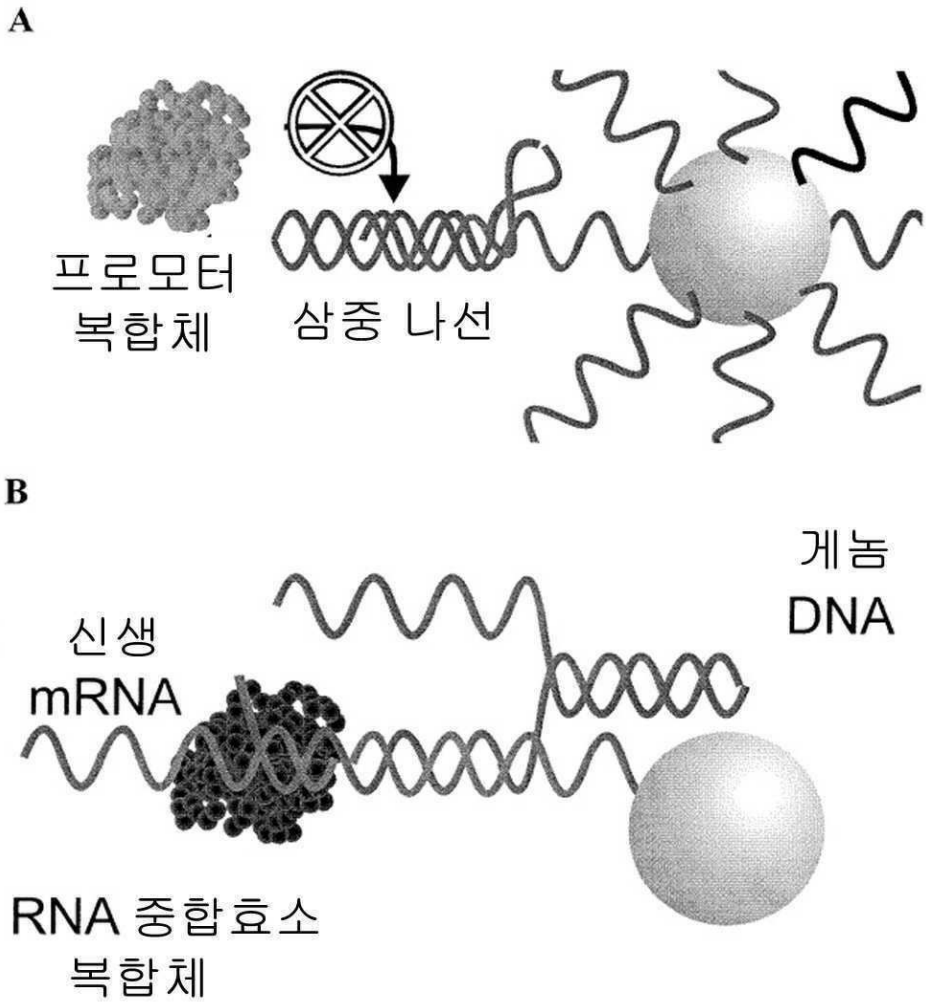
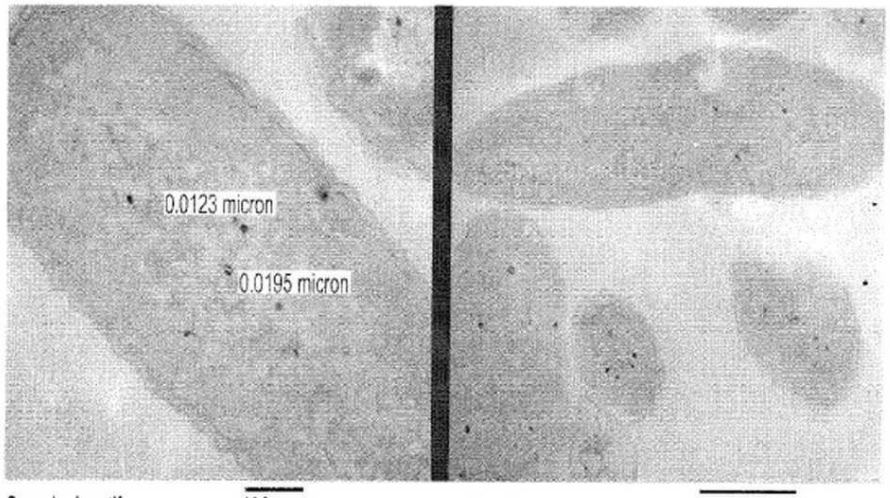


Figure 1

도면2

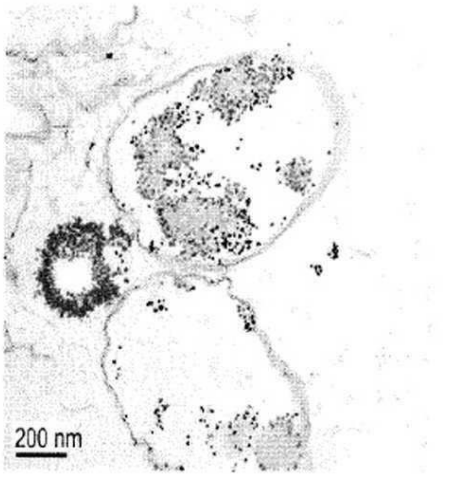


6_scale_bac.tif
박테리아 w/ GNP
Gilljohann
인쇄 배율: 200000x @ 7.0 in
14:37 12/09/08

100 nm
HV=100kV
직접 배율: 150000x
생체 영상 설비

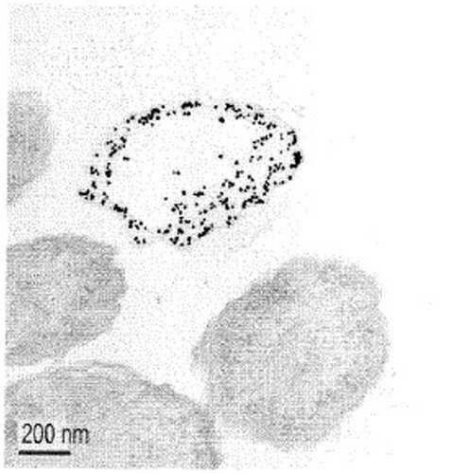
8_bac.tif
박테리아 w/ GNP
Gilljohann
인쇄 배율: 80100x @ 7.0 in
15:03 12/09/08

500 nm
HV=100kV
직접 배율: 60000x
생체 영상 설비



시료: 12 hour AuNP w/ 영색
작업자: C. Wilke
전압: 100kV
현미경 명: JEOL 1230
장치 명: Orius
총 배율: X99000

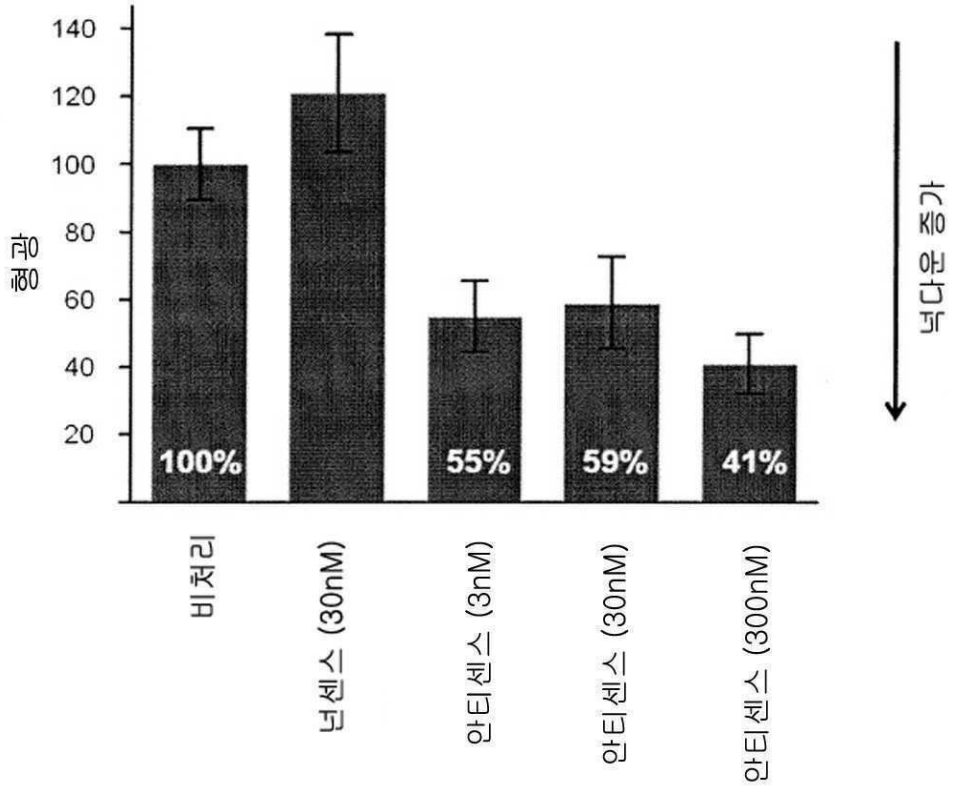
이미지 명: AuNP E Coli-0213
해상도: 2688 x 2672 pixels
획득 일자: 3/25/2009
획득 시간: 9:53:05PM
수집 번호: 213
노출 시간: 0.3 s



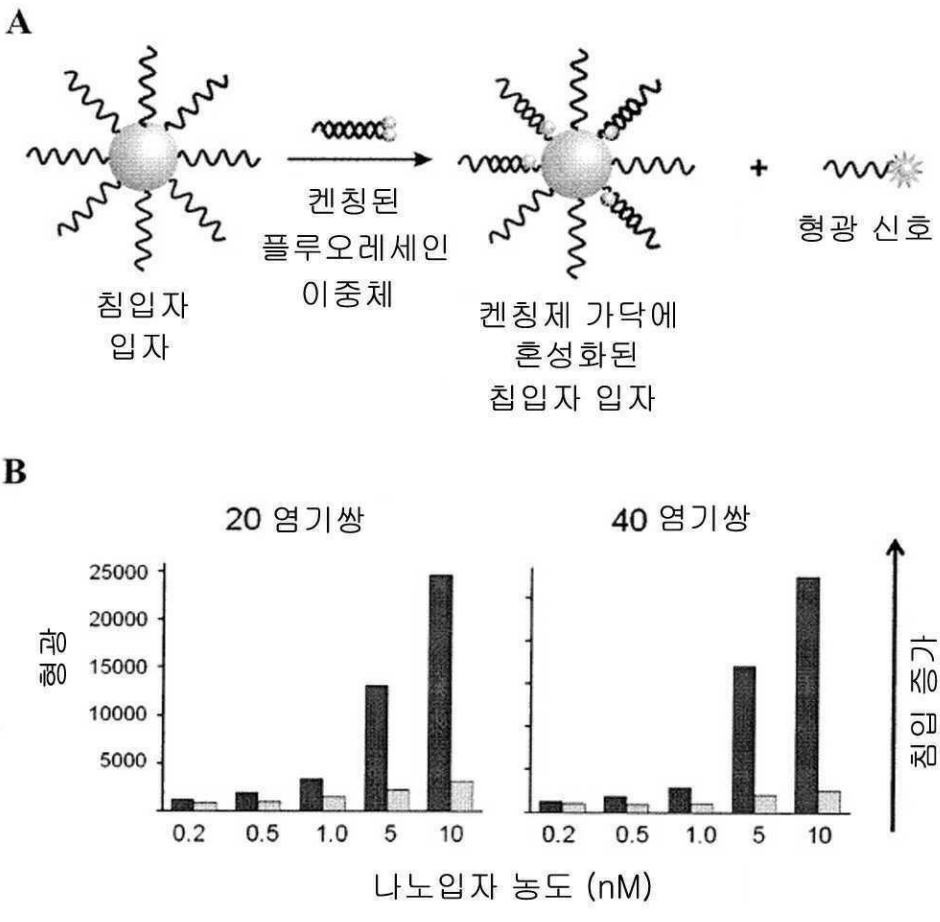
시료: 12 hour AuNP w/ 영색
작업자: C. Wilke
전압: 100kV
현미경 명: JEOL 1230
장치 명: Orius
총 배율: X99000

이미지 명: AuNP E Coli-0213
해상도: 2688 x 2672 pixels
획득 일자: 3/25/2009
획득 시간: 9:53:05PM
수집 번호: 213
노출 시간: 0.3 s

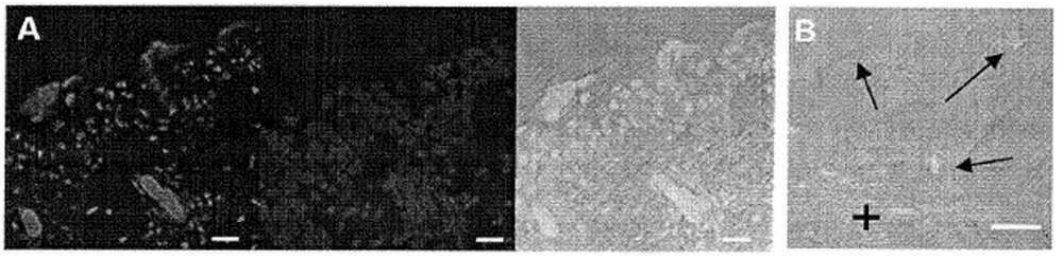
도면3


140
120
100
80
60
40
20
형광
100%
55%
59%
41%
넉다운 증가
비처리
넌센스 (30nM)
안티센스 (3nM)
안티센스 (30nM)
안티센스 (300nM)

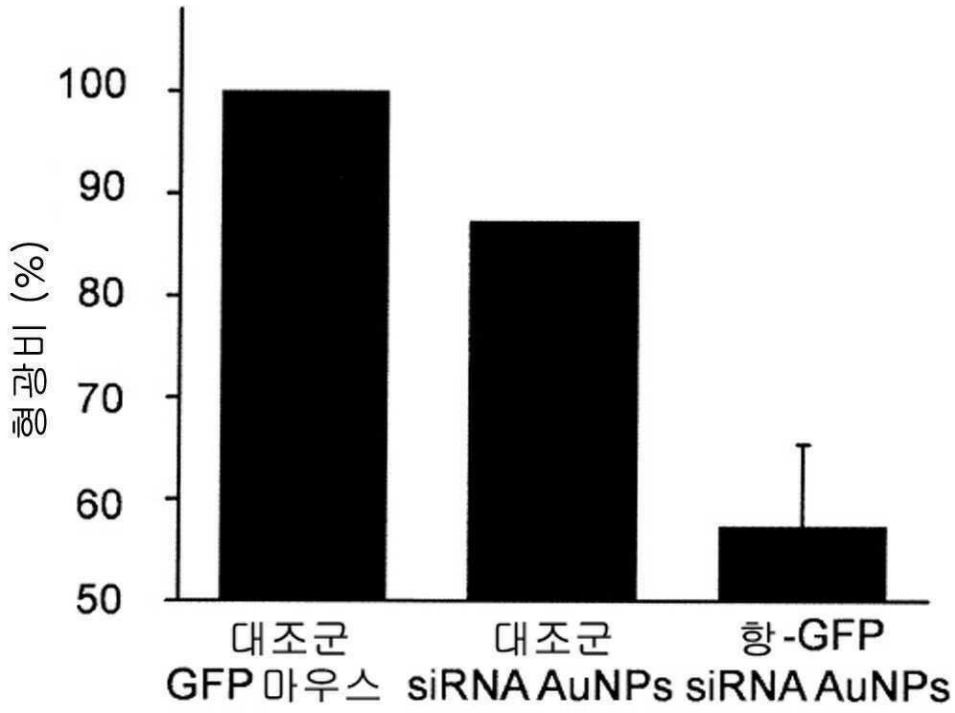
도면4


A
켄칭된
플루오레세인
이중체
+
형광 신호
침입자
입자
켄칭제 가닥에
혼성화된
침입자 입자
B
20 염기쌍
40 염기쌍
25000
20000
15000
10000
5000
형광
0.2
0.5
1.0
5
10
침입 증가
나노입자 농도 (nM)

도면5



도면6



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Mirkin, et al.

<120> DELIVERY OF OLIGONUCLEOTIDE-FUNCTIONALIZED NANOPARTICLES

<130> 30938/29095

<150> US 61/169,384

<151> 2009-04-15

<150> US 61/187,759

<151> 2009-06-17

<150> US 12/684,836

<151> 2010-01-08

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (39)..(39)

<223> Thiol

<400> 1

attgtctcat gagcggatac atatttgaaa aaaaaaaaa 39

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (30)..(30)

<223> Thiol

<400> 2

attgtctcat gagcggatac aaaaaaaaaa 30

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (29)..(29)

<223> Thiol

<400> 3

acttttaaag ttctgctata aaaaaaaaa 29

<210

> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (29)..(29)

<223> Thiol

<400> 4

cccgagcaac gcaaacgcaa aaaaaaaaa 29