



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C12N 15/55 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0132802  
(43) 공개일자 2006년12월22일

(21) 출원번호 10-2006-7004864

(22) 출원일자 2006년03월09일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년03월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/029718  
국제출원일자 2004년09월09일

(87) 국제공개번호 WO 2005/023994  
국제공개일자 2005년03월17일

(30) 우선권주장 60/501,509 2003년09월09일 미국(US)

(71) 출원인 제론 코포레이션  
미국 캘리포니아주 멘로 파크 콘스티튜션 드라이브 230

(72) 발명자 그리야즈노브 세르게이  
미합중국 캘리포니아 94402 산 마테오 웨스트 벨레뷰 애비뉴 138  
폰그라츠 크리스티나  
미합중국 캘리포니아 94611 오클랜드 페어레이恩 드라이브 6253

(74) 대리인 김정욱  
박종혁  
정삼영

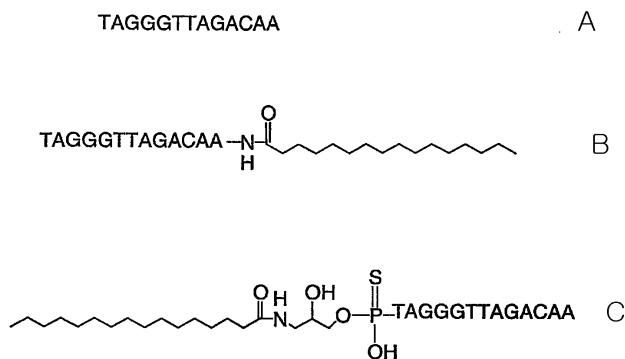
전체 청구항 수 : 총 25 항

## (54) 텔로머라제 억제를 위한 변형 올리고뉴클레오티드

## (57) 요약

지질 부분에 공유 결합으로 연결된 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 호합물이 개시되어 있다. 올리고뉴클레오티드 부분은 사람 텔로머라제의 RNA 성분에 상보적인 서열을 포함한다. 화합물은 고 효능으로 세포 내 텔로머라제 활성을 억제하며 탁월한 세포 흡수 특성을 가진다.

대표도



### 특허청구의 범위

#### 청구항 1.

하기 구조식을 포함하는 화합물:

$O-(x-L)_n$ ,

[상기식에서:

O는 사람 텔로머라제 RNA 서열(SEQ ID NO:1)에 상보적인 적어도 5 염기를 포함하는 뉴클레오티드이고;

x는 선택적 링커이며;

L은 지질 부분이고;

n은 1-5의 정수이며, 만일  $n > 1$ 이라면, 각각의  $(x-L)$  성분은 독립적으로 선택됨].

#### 청구항 2.

제 1 항에 있어서, O는 사람 텔로머라제 RNA 서열(SEQ ID NO:1)에 상보적인 적어도 10 염기를 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 3.

제 2 항에 있어서, L은 치환 또는 비치환 지방산 및 스테롤로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 4.

제 3 항에 있어서, L은 플루오르로 치환된 지방산인 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 5.

제 2 항에 있어서, L은 치환 또는 비치환 탄화수소인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 6.

제 5 항에 있어서, L은 플루오르로 치환된 탄화수소인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 7.

제 1 항에 있어서, n=1이고 (x-L) 성분은 올리고뉴클레오티드 O의 5' 말단에 공유 결합되는 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 8.

제 1 항에 있어서, n=1이고 (x-L) 성분은 올리고뉴클레오티드 O의 3' 말단에 공유 결합되는 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 9.

제 1 항에 있어서, n=2이고, 하나의 독립적으로 선택된 (x-L) 성분은 5' 말단에 공유 결합되고 하나의 독립적으로 선택된 (x-L) 성분은 3' 말단에 공유결합되는 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 10.

제 1 항에 있어서, n=1이고 (x-L) 성분은 올리고뉴클레오티드 O 상의 뉴클레오염기에 공유 결합되는 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 11.

제 1 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 O의 내부 뉴클레오시드 결합은 N3'→P5' 포스포라미데이트 결합인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 12.

제 1 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 O의 내부 뉴클레오시드 결합은 N3'→P5' 티오포스포라미데이트 결합인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 13.

제 1 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 O는 사람 텔로머라제 RNA 서열(SEQ ID NO:1)에 상보적인 적어도 10 염기를 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 14.

제 1 항에 있어서,

올리고뉴클레오티드 O의 내부 뉴클레오시드 결합은 N3'→P5' 티오포스포라미데이트 결합이고;

O의 서열은 사람 텔로머라제 RNA 서열(SEQ ID NO:1)에 상보적인 적어도 12 염기를 포함하며;

$n=1\circ$ 이고;

(x-L)은 O의 5' 또는 3' 말단에 공유 결합으로 연결되며;

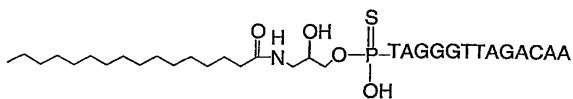
L은 지방산인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 15.

제 14 항에 있어서, x는 글리세롤 또는 아미노글리세롤 링커인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 16.

제 15 항에 있어서, 화합물의 구조식은



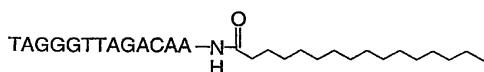
인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 17.

제 14 항에 있어서, L은 아미드 결합을 통하여 올리고뉴클레오티드 L의 3' 말단에 직접 연결되는 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 18.

제 17 항에 있어서, 화합물의 구조식은



인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 19.

텔로머라제 효소의 활성을 억제하는 방법으로서, 텔로머라제 효소를 제 1 항에 따른 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

### 청구항 20.

세포 내 텔로머라제 효소의 활성을 억제하는 방법으로서, 세포를 제 1 항에 따른 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

**청구항 21.**

제 20 항에 있어서, 세포는 암세포인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 22.**

암세포의 증식을 억제하는 방법으로서, 세포를 제 1 항에 따른 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

**청구항 23.**

약학적으로 허용가능한 부형제 내에 제형된 제 1 항에 따른 화합물을 포함하는 약학적 조성물.

**청구항 24.**

의학에서 제 1 항에 따른 화합물의 사용.

**청구항 25.**

암을 치료하기 위한 제 1 항에 따른 화합물의 사용.

**명세서****기술분야**

본 발명은 텔로머라제의 억제를 위해 유용한 화합물에 관련한다. 더 구체적으로, 본 발명은 텔로머라제의 RNA 성분에 대하여 표적하고 증가된 세포 흡수 특성을 갖는 변형 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

**배경기술****치료적 용도를 위한 올리고뉴클레오티드의 발전**

핵산의 의학적 용도에 대단히 흥미가 있다. 예를 들어, 안티센스, 리보자임, 압타머 및 RNA 간섭(RNAi) 기술이 잠재적 치료 용도를 위해 모두 발전되어 왔다. 생체 내 송달을 위한 핵산, 특히 올리고뉴클레오티드의 설계는 결합 강도, 표적 특이성, 혈청 안정성, 뉴클레아제 및 세포 흡수에 대한 내성을 포함하는 각종 인자들에 대한 고려를 필요로 한다. 다수의 접근법이 예를 들어 변형 백본화학, 송달 비히클의 조성 및 각종 다른 부분에 대한 결합과 같은 생체 내 사용에 적합한 특징들을 갖는 올리고뉴클레오티드를 생산하기 위해 제안되었다. 전신 송달에 적합한 특징을 갖는 치료적 올리고뉴클레오티드가 특히 이로울 것이다.

변형된 화학적 백본을 갖는 올리고뉴클레오티드가 [Micklefield, Backbone modification of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications, Curr. Med. Chem., 8 (10): 1157-79, 2001 and Lyer et al., Modified oligonucleotides--synthesis, properties and applications, Curr. Opin. Mol. Ther., 1 (3): 344-358, 1999]에서 개관된다.

변형된 백본 화학의 예는 다음을 포함한다:

·펩티드 핵산(PNAs)(Nielsen, Methods Mol.Biol., 208: 3-26, 2002 참조),

- 고정 핵산(LNAs)(Petersen & Wengel, Trends Biotechnol., 21 (2):74-81, 2003 참조),
- 포스포로티오에이트(Eckstein, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 10 (2): 117-21, 2000 참조),
- 메틸포스포네이트(Thiviyathan et al., Biochemistry, 41 (3): 827-38, 2002 참조),
- 포스포라미데이트(Gryaznov, Biochem. Biophys. Acta, 1489(1) : 131-40, 1999 ; Pruzan et al., Nucleic Acids Res. , 30 (2): 559-68, 2002 참조), 및
- 티오포스포라미데이트(Gryaznov et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 20 (4-7): 401-10, 2001 ; Herbert et al., Oncogene, 21 (4): 638-42, 2002 참조).

각각의 이들 유형의 올리고뉴클레오티드가 이점 및 불리점을 보고하였다. 예를 들어, 펩티드 핵산(PNAs)은 양호한 뉴클레아제 저항성 및 결합 강도를 나타내지만, 테스트 배양액에서 감소된 세포 흡수를 가지며; 포스포로티오에이트는 양호한 뉴클레아제 저상성 및 용해도를 나타내지만, 전형적으로 P-키랄 혼합물로서 합성되며 몇가지 서열-비-특이적 생물학적 효과를 나타내고; 메틸포스포네이트는 양호한 뉴클레아제 저항성 및 세포 흡수를 나타내지만, 전형적으로 P-키랄 혼합물로서 합성되며 감소된 2중 안정성을 가진다. N3'→N5' 포스포라미데이트 뉴클레오시드간 결합은 호의적인 결합 특성, 뉴클레아제 저항성, 및 용해도를 나타내는 것으로 보고된다(Gryaznov and Letsinger, Nucleic Acids Research, 20: 3403-3409, 1992 ; Chen et al., Nucleic Acids Research, 23: 2661-2668, 1995 ; Gryaznov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. , 92: 5798-5802, 1995 ; Skorski et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94: 3966-3971, 1997). 그러나, 그들은 또한 천연 포스포디에스터 대응물과 비교하여 증가된 산 안정성을 보인다(Gryaznov et al., Nucleic Acids Research, 24: 1508-1514, 1996). 올리고뉴클레오티드의 산 안정성은 경구 치료제와 같이 올리고뉴클레오티드 제제를 사용하기 위한 요구에 있어서 중요한 특질이다. N3'→P5' 티오포스포라미데이트 올리고뉴클리오텐드 중 백분율에 대한 황 원자의 첨가는 증가된 산 안정성을 제공한다.

많은 다른 치료적 화합물과 같이, 다중 음이온의 천연 올리고뉴클레오티드는 세포 흡수의 효능을 제한하는 지질 막을 횡단하는 화합물의 능력을 감소시킨다. 각종 용액이 리포좀의 조성물을 포함하는 치료제의 세포 흡수(개관을 위해, Pedroso de Lima et al., Curr Med Chem, 10 (14): 1221-1231, 2003 and Miller, Curr Med Chem., 10 (14): 1195-211, 2003 참조) 및 친유성 부분을 증가시키기 위해 제안되었다. 후자의 접근법의 예는: 미국 특허 제 5,411,947 호(약물에 지질을 공유결합시킴으로써 경구 이용가능한 형태로 약물을 전환하는 방법); 미국 특허 제 6,448,392 호(항바이러스 뉴클레오시드의 지질 유도체: 리포좀 통합 및 사용의 방법); 미국 특허 제 5,420,330 호(리포-포스포라미디트); 미국 특허 제 5,763,208 호(수동 세포막 침투가능한 올리고뉴클레오티드 및 그들의 유사체); Gryaznov & Lloyd, Nucleic Acids Research, 21: 5909-5915, 1993 (콜레스테롤-결합된 올리고뉴클레오티드); 미국 특허 제 5,416,203 호(스테로이드 변형 올리고뉴클레오티드); WO 90/10448 호(지질 및 올리고뉴클레오티드의 공유 결합); Gerster et al., Analytical Biochemistry, 262: 177-184 (1998)(고형-상 추출물에 대한 양잉노 나노입자를 사용하여 생물학적 체액 내 변형 안티센스 올리고뉴클레오티드의 정량적 분석); Bennett et al., Mol. Pharmacol., 41: 1023-1033 (1992)(양이온 지질은 포포로티오에이트 안티센스 올리고뉴클레오티드의 세포 습수 및 활성을 증가시킴); Manoharan et al., Antisense and Nucleic Acid Drug Dev., 12: 103-128 (2002)(개선된 흡수, 생체분포, 표적된 송달 및 활성의 기작을 갖는 장래의 안티센스 약물로서 올리고뉴클레오티드 결합); 및 Fiedler et al., Langenbeck's Arch. Surg., 383: 269-275 (1998)(변형된 안티센스 올리고데옥시뉴클레오티드에 의한 췌장암 세포의 성장 억제).

### 치료적 표적으로서 텔로머라제

텔로머라제는 염색체 말단에 대한 텔로머 반복 서열의 첨가를 촉매하는 리보뉴클레오단백질이다. [Blackburn, 1992, Ann. Rev. Biochem., 61: 113-129] 참조. 텔로미어, 텔로머라제, 세포 노후 및 암 사이의 관련을 설명하는 광범위한 주요 문헌이 있다(개관을 위해, Oncogene, volume 21, January 2002, which is an entire issue of the journal focused on telomerase 참조). 따라서, 텔로머라제는 암 치료제에 대한 탁월한 표적으로서 동정되었다(Lichsteiner et al., Annals New York Acad. Sci., 886: 1-11, 1999 참조).

사람 텔로머라제의 단백질 및 RNA 성분 모두를 코딩하는 유전자를 클로닝하고 서열화하였으며(각각, 미국 특허 제 6,261,836 및 5,583,016) 텔로머라제 억제제를 위한 연구에 많은 노력을 들여왔다. 현재까지 동정된 텔로머라제 억제

제는 소분자 화합물 및 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 각종 문헌들은 텔로머라제 단백질 성분을 코딩하는 mRNA(이것의 사람 형태는 사람 텔로머라제 역전사효소 또는 hTERT임) 또는 텔로머라제 완전효소의 RNA 성분(이것의 사람 형태는 사람 텔로머라제 RNA 또는 hTR로서 알려짐)에 대하여 표적된 텔로머라제를 억제하기 위한 올리고뉴클레오티드의 사용을 설명한다. hTERT mRNA에 표적된 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 mRNA에 결합하여 mRNA의 파괴를 야기하고, 그로써 hTERT 단백질의 생성을 막는 전통적인 안티센스 약물로서 작용하는 것으로 여겨진다(예를 들어, 미국 특허 제 6,444,650호 참조). hTR에 표적된 특정 올리고뉴클레오티드는 텔로머라제 완전효소에 존재하는 hTR 분자에 결합하도록 설계되어, 그로써 효소 기능을 파괴한다(예를 들어, 미국 특허 제 6,548,298호 참조). 텔로머라제 활성을 감소 또는 제거하도록 설계된 각종 올리고뉴클레오티드를 묘사하는 문헌들의 예는 다음을 포함한다:

미국 특허 제 6,444,650호(텔로머라제 역전사효소를 검출 및 억제하기 위한 안티센스 조성물);

미국 특허 제 6,331, 399호(Antisense inhibition of tert expression);

미국 특허 제 6,548, 298호(Mammalian telomerase) ;

Van Janta-Lipinski et al., Nucleosides Nucleotides, 18 (6-7): 1719-20,1999 (Protein and RNA of humantelomerase as targets for modified Oligonucleotides);

Gryaznov et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 20: 401-410,2001 (Telomerase inhibitors-Oligonucleotide phosphoramidates as potential therapeutic agents);

Herbert et al., Oncogene, 21 (4): 638-42,2002(Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as efficienttelomerase inhibitors);

Pruzan et al., Nucleic Acids Research, 30 (2): 559-568,2002 (Allosteric inhibitors of telomerase : Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates);

PCT 공개번호 WO 01/18015(Oligonucleotide N3'-P5' thiophosphoramidates: their synthesis and use); 및

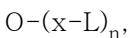
Asai et al., Cancer Research, 63: 3931-3939,2003 (A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent).

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 개요

본 발명의 조성물 및 방법은 올리고뉴클레오티드 및 적어도 하나의 공유결합으로 연결된 지질 기를 포함하는 텔로머라제 억제 화합물에 관련한다. 본 발명의 화합물은 변형되지 않은 올리고뉴클레오티드와 비교하여 탁월한 세포 흡수 특성을 가진다. 이것은 변형되지 않은 형태와 비교하여 소량의 결합된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 등가의 생물학적 효과를 얻을 수도 있음을 의미한다. 사람 치료적 세팅에 적용되는 경우, 이것은 감소된 독성 위험, 및 비용 소비로 변형될 수도 있다. 본 발명의 화합물은 암세포를 포함하여 세포 내 텔로머라제를 억제하며, 결과의 효고는 세포의 증식을 억제하는 것이다. 따라서, 본 발명의 화합물의 초기 적용은 암치료제로서이며, 본 발명은 이러한 방식으로 이용될 수도 있는 화합물의 약학적 제형을 제공한다.

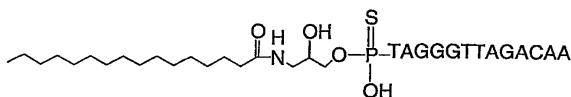
본 발명의 화합물은 하기 화학식에 의해 대표될 수도 있다:



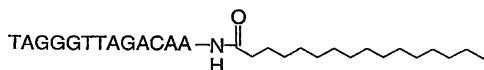
상기식에서 O는 올리고뉴클레오티드를 나타내며, x는 선택적인 링커 기 L이고, L은 지질 부분을 나타내며 n은 1-5의 정수이다. 전형적으로, n=1 또는 2이지만, 여기서 n>1이고, 각각의 지질 부분 L은 독립적으로 선택된다. 지질 부분은 전형적으로 3' 및 5' 말단의 하나(또는 만일 n=2일 경우, 각각)에서 올리고뉴클레오티드에 공유결합으로 부착되지만, 또한 하나 이상의 염기를 포함하여 다른 자리에 부착될 수도 있다.

지질 기 L은 전형적으로 예로써 미리스트산(C14, 또한 테트라데카노산으로 알려짐), 팔미트산(C16, 또한 헥사데카노산으로 알려짐) 및 스테아르산(C18, 또한 옥타데카노산으로 알려짐)과 같은 14-20 탄소를 갖는 포화된 직선 사슬인 탄화수소 및 지방산의 유도체를 포함하는 지방족 탄화수소 또는 지방산, 및 아민 및 아미드 유도체와 같은 유도체와 함께, 그들의 대응 지방족 탄화수소 형태, 테트라데칸, 헥사데칸 및 옥타데칸이다. 사용될 수도 있는 다른 적합한 지질기의 예는 콜레스테롤과 같은 스테롤, 및 치환된 지방산 및 탄화수소, 특히 이들 기들의 폴리-플루오르화 형태이다. 올리고뉴클레오티드 성분 O는 리보- 또는 데옥시리보핵산 또는 그것의 변형된 형태일 수 있으며, 뉴클레오염기를 연결하는 결합은 다음을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 어떤 호환가능한 화학으로 이루어질 수도 있다: 포스포디에스테르; 포스포트리에스테르; 메틸포스포네이트; P3'→N5' 포스포라미데이트; N3'→P5' 포스포라미데이트; N3'→P5' 티오포스포라미데이트; 및 포스포로티오에이트 결합. N3'→P5' 포스포라미데이트 및 N3'→P5' 티오포스포라미데이트 화학이 바람직하다. 올리고뉴클레오티드 성분 O의 서열은 상보적, 바람직하게는 텔로머라제 RNA 성분의 서열의 선택된 "표적" 부위에 정확히 상보적인 적어도 하나의 서열 부위를 포함한다. 특정 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 성분 O의 서열은 사람 텔로머라제 RNA 성분, hTR(이 서열은 SEQ ID NO:1에서 제공됨)의 하기 부위 중 하나 중의 서열에 상보적인 서열 부위를 함유한다: 46-56, 137-196, 290-319, 및 350-380. hTR의 부위에 정확히 상보적인 O 성분 중의 서열의 길이는 바람직하게는 적어도 5 염기, 더 바람직하게는 적어도 8 염기, 및 더욱 더 바람직하게는 적어도 10 염기이다. O 성분에 추가될 수도 있는 추가적 서열 부위는 hTR에 정확히 상보적이지는 않지만, 추가적 이로운 기능을 제공할 수도 있다.

본 발명의 예시적 화합물은 하기 구조에서 묘사된 바를 포함하며, 여기서 O 성분은 N3'→P5' 티오포스포라미데이트 내부-뉴클레오시드 결합을 가지며 hTR(SEQ ID NO:1)의 염기 42-54에 정확히 상보적이다. 첫번째 전형적인 구조식에서, L, 지질 부분은 올리고뉴클레오티드 O의 5' 티오포스페이트에 아미노글리세롤 링커를 통해 결합된 팔미노일 아미노(팔미트산으로부터 유도됨)이다:



두번째 전형적인 구조식에서, L은 팔미토일 아미드에 올리고뉴클레오티드의 3' 아미노 기를 통하여 결합된다:



이들 전형적인 화합물을 포함하는 본 발명의 화합물은 대응 비변형 올리고뉴클레오티드와 비교하여 탁월한 세포 흡수 특성을 갖고, 따라서 세포 텔로머라제 활성의 더욱 효과적인 억제제인 것으로 보여진다. 이들 특성의 결과로서, 본 발명의 화합물은 암 세포 증식의 매우 효과적인 억제제이다.

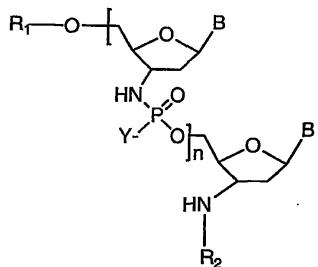
본 발명의 화합물은 텔로머라제 효소 활성을 억제하기 위한 방법에서 사용될 수도 있다. 이러한 방법은 텔로머라제 효소가 본 발명의 화합물과 접촉하는 단계를 포함한다. 본 발명의 화합물은 또한 텔로머라제를 발현시키는 세포의 텔로머라제를 억제하는데 사용되어, 이로써 이러한 세포의 증식을 억제할 수도 있다. 이러한 방법은 본 발명의 화합물과 함께 텔로머라제 활성을 갖는 세포 또는 세포들에 접촉하는 단계를 포함한다. 시험관 내 세포, 또는 생체 내 세포일 수도 있는 이러한 방식으로 처리된 세포는 일반적으로 텔로미어 단축을 겪고 증식을 멈출 것이다. 암세포는 장기간 증식 동안 텔로머라제 활성을 필요로하기 때문에, 본 발명의 화합물은 특히 암세포의 성장을 억제하는데 유용하며, 암을 치료하기 위한 치료적 용도에서 사용될 수도 있다.

따라서, 본 발명의 양태는 의약에서 사용을 위해, 그리고 특히 암을 치료하는데 사용하기 위하여 본원에서 설명된 바와 같은 화합물을 포함한다.

또한, 약학적으로 허용가능한 부형제와 함께 제형된 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드 결합을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

## 실시예

하기 실시예는 본 발명의 화합물의 합성 및 활성을 설명하며, 여기서 올리고뉴클레오티드 성분 O는 바람직한 티오포호포라미데이트 또는 포스포라미데이트 화학을 사용하여 합성된다. 특정 실시예에서, 지질 부분은 링커와 함께 또는 링커 없이 3' 또는 5' 말단 중 하나에, 또는 둘 모두에 결합된다. 이들 화합물의 일반적 구조식은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



상기식에서 R1 및 R2는 독립적으로 H 또는 지질 부분(L)이고, Y는 O(포스포라미데이트 올리고뉴클레오티드) 또는 S(티오포스포라미데이트 올리고뉴클레오티드)이며, n은 정수, 전형적으로 4 내지 49이며, B는 염기(각각 뉴클레오시드 하위단 위에 대하여 독립적으로 선택됨)를 나타낸다. 선택적 링커는 이 구조식에서 묘사되지 않는다.

### 실시예 1 화합물의 합성

#### A. 일반적 방법

올리고뉴클레오티드 N3'→P5' 포스포라미데이트(NP) 티오포스포라미데이트(NPS)를 각각 [McCurdy et al., (1997) *Tetrahedron Letters*, 38: 207-210 및 Pongracz & Gryaznov, (1999) *Tetrahedron Letters* 49: 7661-7664]에 의해 설명되는 과정에 따라서 ABI 394 합성기 상에서 아미디트 전이 반응을 사용하여 1 $\mu$ mole 스케일 상에서 합성하였다. 완전히 보호된 모노머 빌딩 블록은 3'-아미노트리틸-뉴클레오시드-5'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필아미노)뉴클레오시드포스포라미디트, 구체적으로 Transgenomic, Inc. (Omaha, Nebraska)로부터 구입된 3'-데옥시-티미딘, 2',3'-디데옥시-N<sup>2</sup>-이소부티릴-구아노신, 2',3'-디데옥시-N<sup>6</sup>-벤조일-아데노신, 및 2',3'-디데옥시-N<sup>4</sup>-벤조일-시티딘이었다. 3'-아미노트리틸-5'-숙시닐-뉴클레오시드를 긴 사슬 제어된 기공 유리(LCAA-CPG)를 함유하는 아미노 기와 함께 커플링시키고 고체 지지체로서 사용하였다. 합성은 5'에서 3' 방향으로 수행하였다. NP 백본을 갖는 뉴클레오티드를 요오드/H<sub>2</sub>O 산화 과정과 함께 표준 1 $\mu$ M(ABI Perkin Elmer) 과정을 사용하여 합성하는 반면, NPS 백본을 갖는 올리고뉴클레오티드를 황프로토콜을 사용하여 제조하였으며, 여기서 아세토니트릴 중 이황화 폐닐아세틸(PADS): 2,6-루티딘 1:1 혼합물의 0.1 M 용액을 황화 제제로서 사용하였다. 두가지 유형의 백본의 제조 동안 커플링 시간은 25 초 였다. THF:이소부티르 무수물:2,6-루티딘의 18:1:1 혼합물을 모자화 제제로서 사용하였다. 올리고뉴클레오티드에 지질 부분을 결합하는데 세가지 방법을 사용하였다: 방법 (i) 합성기 상에서 포스포라미디트 시약을 하용하여 커플링하여 3' 말단에 지질 부분을 도입하는 것; 방법 (ii) 지질 기를 5' 결합의 생산을 위한 연장 합성의 개시 전에 결합시키는 변형된 고체 지지체의 사용(상기 개략도 C에서 예시됨); 방법 (iii) 고체 지지체 상에 정지해 있는 동안 유리 3'-아미노 기의 반응 이후 탈보호. 이를 방법의 추가적 상세는 하기에 제공된다. 올리고뉴클레오티드를 6-8 시간 동안 55°C에서, 3' 말단 또는 뉴클레오염기에 대하여 부착된 지질 기에 대하여 농축 암모니아로, 또는 5' 말단에 부착된 지질 기에 대하여 에탄올:농축 암모니아의 1:1 혼합물로 탈보호시켰다. 미정제 생성물을 Pharmacia NAP-25 겔 여과 컬럼 상에서 탈염시키거나 1M 염화나트륨으로부터 에탄올로 침전시킨 후 진공에서 동결건조시켰다.

후속하여, 올리고뉴클레오티드 생성물을 Beckman Ultrasphere C18(5 $\mu$ ) 250 x 10 mm 컬럼을 사용하여 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물을 2 ml/분의 유속으로 50 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 중 아세토니크릴의 선형 기울기를 이용하여 용리시키고 순수한 냉각 에탄올과 함께 1 M 염화나트륨으로부터 침전을 갖는 나트륨 염으로 전환시켰다. 화합물의 순도를 상기 용매 시스템을 사용하여 분석 RP HPLC 및 PAGE에 의해 평가하였다. <sup>1</sup>H 및 <sup>31</sup>P NMR 스펙트럼을 VARIAN Unity Plus 400 MHz 기구 상에서 기록하였고 전기분무 이온화 질량 스펙트럼(ESI MS)을 WATERS Micromass ZMD 질량 분광계를 사용하여 얻었다.

#### B. 올리고뉴클레오티드에 대한 지질 기의 결합

상기 나타내는 바와 같이, 각종 방법이 올리고뉴클레오티드에 지질 기를 결합하는데 사용될 수도 있다. 구체적인 발명의 상세는 하기와 같다:

방법 (i) 이 방법에서 결합된 지질 기를 함유하는 포스포라미디트 시약을 올리고뉴클레오티드 합성 과정 동안 3' 뉴클레오시드로서 첨가시켜서, 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 지질 기가 결합되도록 한다. 이 합성 및 2개의 지방산-함유 포스포라미디트의 후속적 커플링이 이 접근법을 예증한다.

(i/a) 3-팔미토일아미노-프로판-1-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필포스포라미디트)의 합성 및 커플링.

아세토니트릴-염화 메틸렌 1:4 중에 용해된 1.0 g (13.3 mmole) 3-아미노-프로파놀에, 10 ml의 디이소프로필에틸아민 및 4.06 ml(13.3 mmole) 염화 팔미토일을 첨가하였다. 반응을 밤새 교반한 후, 염화 메틸렌을 더 참가한 후 혼합물을 포화 중탄산나트륨, 염수, 및 물로 순차적으로 세척시켰다. 유기 상을 황산나트륨 상에서 건조시키고 건조물질로 증발시켰다. 얻어진 500 mg(1.6 mmole) 백색 고체를 건조 아세토니트릴과 함께 공동 증발시켜서 공비화시키고 50 ml 염화 메틸렌에 용해시켰다. 1.1 ml 디이소프로필에틸아민(4 당량)의 첨가 후, 390 µl(1.7 mmole) 2-시아노에틸 디이소프로필클로로포스포라미디트를 적가하였다. 반응 혼합물을 1 시간 동안 교반하여 투명한 용액을 얻었다. 반응 혼합물을 포화 중탄산나트륨 및 염수로 순차적으로 세척시키고, 황산 나트륨 상에서 건조시키고 건조물질로 증발시켰다. 생성물을 에틸아세테이트:염화 메틸렌:트리에틸아민 45:45:10 v/v 용매 시스템을 사용하여 실리카 젤 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 0.7 g (90%) 왁스-유사 고체를 데시케이터에서  $P_2O_5$  상에서 건조시킨 후 DNA 합성기를 사용하였다.  $^{31}P$  NMR ( $CDCl_3$ )

148.45 ppm, ES MS ( $MH^+$ ) 514. DNA 합성기 상에서 커플링하는 동안, 0.1 M 용액을 무수 아세토니트릴-염화 메틸렌 9:1 혼합물에서 제조하였다. 이 합성은 도 1D에서 묘사된 결합된 올리고뉴클레오티드의 생산을 위해 사용된 시약을 얻었다.

(i/b) 3-팔미토일아미노-1-하드록시-프로판-2-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필포스포라미디트)의 합성 및 커플링.

1 g(10.97 mmole) 3-아미노-프로판디올을 10 ml 피리딘에 혼탁시키고, 2 ml의 DMF 중 3.017 g(10.97 mmole) 염화 팔미토일을 격렬히 교반하면서 적가하였다. 15분의 교반 후, 젤을 여과 및 공기-건조시켰다. 고체를 백색 분말로서 뜨거운 에탄올 및 뜨거운 2-프로파놀로부터 재결정시켰다. 백색 고체를 피리딘으로 공동-증발시킨 후, 30 ml 건조 피리딘에 용해시켰다. 2.89g(8.55 mmole) DMT-염화물을 첨가하고 반응 혼합물을 30분 동안 교반하고, 후속하여 반응물을 TLC 시켰다. 메탄올로 켄칭시킨 후, 피리딘을 증발시키고 반응물을 염화 메틸렌-포화 중탄산나트륨으로부터 작업했다. 결과의 오일을 용리제로서 4:1 헥산/에틸 아세테이트를 사용하여 실리카 젤 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 얻어진 2.4 g (3.64 mmole) 황색 오일을 피리딘과 함께 공비화시키고, 100 ml 염화 메틸렌 및 4 당량 디이소프로필에틸아민(2.5 ml)에 용해시켰다. 교반된 용액에 920µl(4 mmole) 2-시아노에틸 디이소프로필클로로포스포라미디트를 적가하였다. 반응물을 TLC시키고 2 시간 후 완성되었음을 발견하고 상기와 같이 작업하였다. 생성물을 에틸아세테이트:염화 메틸렌:트리에틸아민 45:45:10 용매 시스템을 사용하여 실리카 젤 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 얻어진 고체를 데시케이터에서 건조시킨 후 DNA 합성기 상에서 사용하였다(아세토니트릴 중 0.1 M 용액).  $^{31}P$  NMR ( $CDCl_3$ ) 149.9, 150.2 ppm, ES MS ( $MNa^+$ ) 854.57. 이 합성은 도 1 AA에서 묘사되는 결합된 올리고뉴클레오티드의 생산을 위해 사용된 시약을 얻었다.

방법 (ii) 이 방법에서, 지질 부분에 결합된 변형된 고체 지지체는 올리고뉴클레오티드의 5' 내지 3' 합성을 위한 출발 지점으로서 사용되며, 결과로서 5' 결합을 얻는다. 두개의 변형된 고체 지지체의 합성 및 사용이 이 접근법을 예증한다.

(ii/a) 3-팔미토일아미노-1-디메톡시트리틸옥시-2-숙시닐옥시-프로판의 합성

1g(10.97 mmole)의 3-아미노-1,2-프로파네디올을 10 ml의 피리딘에 혼탁시켰다. 2 ml의 DMF 중 3.017 g(10.97 mmole) 염화 팔미토일을 격렬히 교반하면서 적가하였다. 15분의 교반 후, 젤을 여과 및 공기-건조시켰다. 고체를 백색 분말로서 뜨거운 에탄올 및 뜨거운 2-프로파놀로부터 재결정시켰다. 백색 고체를 피리딘으로 공동-증발시킨 후, 30 ml 건조 피리딘에 용해시켰다. 3.2 g(9.46 mmole) DMT-염화물을 첨가하고 반응 혼합물을 30분 동안 교반하고, 후속하여 반응물을 TLC 시켰다. 메탄올로 켄칭시킨 후, 피리딘을 증발시키고 반응물을 염화 메틸렌-포화 중탄산나트륨으로부터 작업하였다. 결과의 오일을 용리제로서 4:1 헥산/에틸 아세테이트를 사용하여 실리카 젤 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 얻어진 2.5 g(3.95 mmole) 황색 오일을 30 ml 염화 메틸렌에 용해시키고, 후속하여 475 mg 숙신 무수물 및 483 mg 디메틸아미노피리딘을 첨가하고 반응 혼합물을 1 시간 동안 교반하였다. 반응을 TLC에 의해 모니터링하고 필요한 경우 추가의 숙신 무수물을 첨가하였다. 염화 메틸렌 용액을 차가운 시트르산 나트륨 완충제( $pH=4$ )로 세척시키고 유기상을 황산 나트륨 상에서 건조시킨 후 건조물질로 증발시켰다. 얻어진 종국의 생성물은 2.0 g(24.9%)였다.

(ii/b) 3-스테아로일아미노-1-디메톡시트리틸옥시-2-숙시닐옥시-프로판의 합성

1 g(10.97 mmole) 3-아미노-프로판디올을 10 ml 피리딘에 혼탁시켰다. 10 ml의 DMF 중 3.32 g(10.97 mmole) 염화 스테아로일을 격렬히 교반하면서 적가하였다. 15분의 교반 후, 겔을 여과 및 공기-건조시켰다. 고체를 백색 분말로서 뜨거운 에탄올 및 뜨거운 2-프로파놀로부터 재결정시켰다. 백색 고체를 피리딘으로 공동-증발시킨 후, 30 ml 건조 피리딘에 용해시켰다. 2.89g(8.55 mmole) DMT-염화물을 첨가하고 반응 혼합물을 30분 동안 교반하고, 후속하여 반응물을 TLC 시켰다. 메탄올로 켄칭시킨 후, 피리딘을 증발시키고 반응물을 염화 메틸렌-포화 중탄산나트륨으로부터 작업하였다. 결과의 오일을 용리제로서 4:1 헥산/에틸 아세테이트를 사용하여 실리카 겔 걸럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 얻어진 2.4 g(3.64 mmole) 황색 오일을 30 ml 염화 메틸렌에 용해시키고, 후속하여 437 mg 숙신 무수물 및 444 mg 디메틸아미노피리딘을 첨가하고 반응 혼합물을 1 시간 동안 교반하였다. 반응을 TLC에 의해 모니터링시키고 필요한 경우 추가의 숙신 무수물을 첨가하였다. 염화 메틸렌 용액을 차가운 시트르산 나트륨 완충제(pH=4)로 세척하고 유기상을 황산 나트륨 상에서 건조시킨 후 건조물질로 증발시켰다. 얻어진 중국의 생성물을 1.2 g(14.44%)였다.

이어서, (ii/a) 및 (ii/b)에서 합성된 생성물을 긴 사슬 아미노 제어된 기공 유리(LCAA-CPG)에 결합시켜서 하기와 같이, 변형된 고체 지지체를 생산하였다:

100 ml 펩티드 합성 용기에서, 20 g의 LCAA-CPG(Transgenomic, Inc., ~200 mmole/g -NH<sub>2</sub>로딩)을 건조 디메틸포름 아미드로 세척하였다. 분리 플라스크에서 상기 (ii/a) 또는 (ii/b)에서 설명된 5.55 mmole의 생성물을 40 ml 클로로포름, 3 ml 디이소프로필에틸아민에 용해시키고, 2.13 g(8.3 mmole) 2-클로로-1-메틸피리디니움 요오드를 첨가하였다. 용액이 CPG를 통하여 거의 반쯤 잠길 때까지 이 혼탁액을 펩티드 합성 용기(콕마개 주둥이를 구비) 중 건조 CPG 상으로 쏟았다. 후속하여 콕마개 및 상단 마개를 닫고 용액이 CPG를 완전히 덮을 때까지 용기를 진탕시켰다. (만일 필요한 추가의 클로로포름이 첨가된다면, 부피는 최소한으로 유지시켜야 한다). 후속하여 용기를 진탕기 위에 놓고 반응이 실온에서 밤새 속행되도록 허용하였다. CPG를 여과시킨 후, 염화 메틸렌, 메탄올 및 아세토니트릴로 세척하였다. 미반응 아미노기를 진탕기 상에서 실온에서 1 시간 동안 THF-2,6-루티딘-이소부티르 무수물 18:1:1 및 Cap B(N-메틸이미다졸/THF)의 1:1 용액을 사용하여 모자화시켰다. 추가적 여과 후, 비드를 메탄올, 염화 메틸렌 및 아세토니트릴로 세척하였다. 로딩은 메탄올과 염소산을 사용하여 탈블록화 된 샘플의 498 nm의 디메톡시트리틸 양이온 흡광도를 측정하는 표준 방법에 의해 결정하였으며 50-60 μmole/g으로 밝혀졌다.

일단 변형된 고체 지지체가 생산되면, 그들을 상기 설명되는 바와 같이 올리고뉴클레오티드 합성법에서 사용하였다. 이 방법에서 생산된 올리고뉴클레오티드 결합의 예를 도 1F, 1G 및 1H에서 나타낸다.

방법 (iii) 이 방법에서, 올리고뉴클레오티드의 합성이 완성되면 그것이 완전히 보호된 채 유지되고 고체 지지체에 묶여 있는 동안, 3' 말단은 하기와 같이, 지질 기의 산 무수물(iii/a), 무수물(iii/b), 산(iii/c) 또는 알데히드(iii/d) 형태와 반응한다.

(iii/a) 유리 3'-아미노 기(4μmole)을 함유하는 고체 지지체 속박된 완전히 보호된 올리고뉴클레오티드를 진공에서 건조시키고 3 ml 무수 클로로포름에 혼탁트시켰다. 140μl(0.8 mmole) 디이소프로필에틸아민 및 0.4 mmole의 적절한 산 염화물(예를 들어, 122μl 염화 팔미토일)의 첨가 후, 혼합물을 2분 동안 진탕시키고 빠르게 여과시킨 후, 클로로포름, 메탄올 및 아세토니트릴로 세척하였다. 건조 비드를 1-2 ml 농축된 수산화 암모늄에 혼탁시키고 55°C에서 5시간 동안 가열시켰다. 냉각된 수산화 암모늄 용액을 후속하여 여과 및 증발시켰다. 지질 결합 생성물을 HPLC에 의해 단리시켰다. 상기 설명된 조건을 사용하여, 생성물을 40분 정도 용리시켰다. 증발 후, 생성물을 1 M 염화나트륨 및 에탄올로부터 침전시켜서 나트륨 염을 얻었다.

(iii/b) 건조 고체 지지체 속박된 완전히 보호된 올리고뉴클레오티드(1 μmole)에 2 ml 클로로포름에 용해된 0.1 mmole의 적절한 무수물 및 170μl 디이소프로필에틸아민을 첨가하고 혼합물을 함유하는 바이알을 밤새 진탕기 위에 두었다. 여과 후, 비드를 클로로포름, 메탄올 및 아세토니트릴로 세척하고 결합된 올리고뉴클레오티드를 상기와 같이 탈블록 및 정제시켰다.

(iii/c) 1μmole 고체 지지체 속박된 완전히 보호된 올리고뉴클레오티드를 2 ml 클로로포름 중 0.1 mmole의 적절한 산, 25 mg 2-클로로-1-메틸피리디늄 요오드화물(0.1 mmole) 및 170μl 디이소프로필에틸아민의 용액과 진탕기 상에서 밤새 반응시켰다. 세척, 탈블록 및 정제를 상기 설명되는 바와 같이 수행하였다.

(iii/d) 2 ml 테트라히드로푸란 중 0.3 mmole의 원하는 알데하이드, 31.5 mg 시아노보로하이드라이드 나트륨 및 100 $\mu$ l 0.5 M 아세트산 나트륨의 용액을 1  $\mu$ mole 고체 지지체 속박된 완전히 보호된 올리고뉴클레오티드에 첨가하고 30분 동안 진탕기 상에 두었다. 세척, 탈블록 및 정제를 상기 설명되는 바와 같이 수행하였다.

방법(iv) 이 방법에서, 지질 기를 올리고뉴클레오티드의 말단이 아닌, 사슬의 뉴클레오염기, 예를 들어, 구아노신에 결합시켰다. 그들 화합물이 상기 설명되는 바와 같이, 전통적인 올리고뉴클레오티드 사슬 확장 프로토콜을 이용하지만, 도 2E에서 묘사되는 바와 같이 공유결합된 지질 기로 변형된 염기의 통합과 함께 합성된다. 지질 기가 뉴클레오염기에 결합된 화합물의 예는 도 1Q 및 R에서 나타낸다.

## 실시예 2 생화학 및 세포-기재 분석에서 화합물의 활성

본원에서 설명되는 바와 같이 결합된 올리고뉴클레오티드를 상기 및 [Asai et al.(2003)]에서 설명되는 바와 같이, 생화학 Flashplate 분석 및 세포-기재 분석에서 텔로머라제를 억제하는 그들의 능력에 대하여 테스트하였다. 결과를 하기 표에 나타낸다. 이 표에서, 하기 약어가 사용된다:

### 올리고뉴클레오티드 서열:

1 = TAGGGTTAGACAA, hTR의 염기 42-54에 상보성, SEQ ID NO :1

2 = CAGTTAGGGTTAG, hTR의 38-50에 상보성, SEQ ID NO :1

### 화학:

NP는 올리고뉴클레오티드가 포스폴미데이트 내부 뉴클레오시드 결합을 가짐을 나타낸다

NPS는 올리고뉴클레오티드가 티오포스포라미데이트 내부 뉴클레오시드 결합을 가짐을 나타낸다.

### 결합:

5'는 지질 부분이 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 결합됨을 나타낸다

3'는 지질 부분이 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 결합됨을 나타낸다

### 사람 암 세포 유형(ATCC로부터 모두 이용가능):

HT-3 및 A431: 자궁경부 암

U-251: 다형성아교모세포종

DU145 및 LNCaP : 전립선암

Caki: 신장 투명 세포 암종

NCIH522 : 폐 쌈암종

Ovcar-5: 난소암종

Hep3B: 간세포 암종

올리고뉴클레오티드 서열	화학	결합된 지질 기(도 1 참조)	생화학 분석에서 IC50(nM)	세포 분석(세포 유형)에서 IC50 ( $\mu$ M)
-----------------	----	------------------	-------------------	-----------------------------------

1	NPS	없음	0.15	1.6(HT-3) 0.79(A431) 6.3(U-251) 1.4(DU145) 2.99(Caki) 6.5(Hep3B)
1	NPS	3'-미리스토일아미드(1A)	0.8(+/-0.2)	0.35(Caki) 0.21(HT-3)
1	NPS	3'-필미토일아미드(1B)	2.9(+/-2.2)	0.21(A431) 0.37(HT-3) 0.19(LNCaP) 0.2(NCI-H522) 0.65, 0.49(U-251) 2.84(Hep3B) 1.97(0vcar5)
1	NPS	3'-스테아로일아미드(1C)	11.9(+/-10.5)	0.13, 0.28(HT-3) 0.2(NCI-H522)
1	NPS	3'-필미토일아미도-프로필-티오포스페이트(1D)	0.48(+/-0.3)	0.27(HT-3)
1	NPS	3'-디옥틸아미드(1B)	1.19(+/-0.7)	N/D
1	NPS	3'-일실-bis-스테아로일아미드(1E)	2.45(+/-0.7)	2.98(HT-3)
1	NPS	3'-올레이닐아미드(1M)	5.2(+/-0.8)	1.16(HT-3)
1	NPS	3'-리놀레일아미드(10)	3.9	1.25(HT-3)
1	NPS	3'-bis-데실(1K)	36.5(+/-8.9)	N/D
1	NPS	3'-bis-도데실(1J)	>100	N/D
1	NPS	3'-필미토일아미도-아미도글리세롤-티오포스페이트(1AA)	0.4(+/-0.14)	0.5(HT-3)
1	NPS	3'-트리틸(1P)	0.9(+/-0.01)	>10(HT-3)

올리고뉴클레오태드 서열	화학	결합된 지질 기(도 1 참조)	생화학 분석에서 IC50(nM)	세포 본식(세포 유형)에서 IC50 (uM)
	NPS	5'-필미토일아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트(1F)	5.01(+/-3.37)	0.36, 0.22(HT-3) 0.15(DU145) 0.16(U-251) 3.02(Hep3B) 0.92(0vcar5)
1	NPS	5'-OH-필미틸-티오포스페이트(1X)	3.6	
1	NPS	5'-스테아로일아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트(1H)	5.2(+/-4.1)	N/D
1	NPS	5'-콜레스테릴아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트(1CC)	2.6(+/-0.14)	0.25(HT-3)
1	NPS	5'-필미토일아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트(1G)	4.65(+/-0.35)	0.55(HT-3)
1	NPS	5'-C11-테플론-티오포스페이트(1U)	4.15(+/-1.91)	0.14(HT-3)
1	NPS	5'-C13-테플론-티오포스페이트(1V)		0.23(HT-3)
1	NPS	5'-바틸-티오포스페이트(1Y)		0.59(HT-3)
1	NPS	5',3'-bis-필미토일아미도-글리세롤 티오포스페이트(도 면상 나타내지 않음)	0.3(+/-0.14)	0.34(HT-3)
1	NPS	3'-필미토일아미도-아미노글리세롤-테오포스페이트(1AA)	0.4(+/-0.14)	0.52
1	NP	없음	0.8	30

1	NP	3'-팔미토일아미드(1B)	2.85(+/-1.06)	N/D
1	NP	3'-도데실(1I)	3.2(+/-0.57)	N/D
1	NP	3'-bis 도데실(1J)	>100	N/D
1	NP	3'-bis 데실(1K)	>100	N/D

올리고뉴클레오티드 서열	화학	결합된 지질 기(도 1 참조)	생화학 분석에서 IC50(nM)	세포 분석(세포 유형)에서 IC50 (uM)
1	NP	3'-콜레스테릴아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트(1S)	>10	3.6(HT-3)
1	NP	5'-팔미토일아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트(1F)	6.25(+/-2.33)	6.5(HT-3)
1	NP	5'-스테아로일아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트(1H)	2.4(+/-1.13)	3.02(HT-3)
1	NP	5'-콜레스테릴아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트(1CC)	>10	0.8(HT-3)
1	NP	3'-일실-bis-스테아로일아미드(1E)	50	

### 실시예 3 비교상의 효능 및 생체이용가능성 연구

비-결합된 올리고뉴클레오티드에 따라서, 본 발명의 2개의 화합물을 각각의 상세한 연구에 대하여 선택하였다. 도 9에서 묘사된 선택된 화합물은 하기와 같았다:

화합물 A(비-결합): 서열 TAGGGTTAGACAA(이 서열은 hTR의 염기 42-54, SEQ ID NO:1과 상보적임)의 티오포스포라미데이트 올리고뉴클레오티드(도 9A).

화합물 B: 3' 팔미토일아미드에 결합된 화합물 A의 올리고뉴클레오티드.

화합물 C: 5'-팔미토일아미도-글리세롤-티오포스페이트에 결합된 화합물 A의 올리고뉴클레오티드 (도 9C).

이들 화합물에 대한 연구가 이 실시예 및 하기 실시예에서 보고된다.

하기 표는 상기 설명되는 바와 같이, 매칭된 RNA(표준 방법을 사용하여 결정됨)와 관련되는 경우 이들 3개의 화합물 각각의 녹는점, 생화학 분석을 사용하여 결정된 텔로머라제 억제에 대한 IC<sub>50</sub> 값, 및 세포-기재 분석(HT-3 세포를 포함)을 사용하여 결정된 텔로머라제 억제에 대한 IC<sub>50</sub>을 나타낸다.

#### 화합물 이중 온도(℃) IC<sub>50</sub>(nm) 생화학 분석 IC<sub>50</sub>(um) 세포-기재 분석

A 70 0.15 1.6

B 66.5 1.7 0.16

C 65.5 0.9 0.11

표에서 나타내는 바와 같이, 비-결합된 올리고뉴클레오티드 A는 70℃의 녹는점으로, 그것의 표적에 대하여 결합하는 매우 높은 친화성, 및 생화학 분석에서 0.15 nM의 텔로머라제 억제에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 나타냈다. 화합물 A가 다수의 상이한 종양 셀라인에서 텔로머라제 억제에 대한 낮은 마이크로몰농도 IC50로, 손상되지 않은 세포에 양호한 흡수를 갖더라도, 이것은 생화학적 효능에 관련하여 손상되지 않은 세포의 효능의 약 10,000-배 손실을 반영하였다. 올리고뉴클레오티드(각각, 화합물 C 및 B)의 5' 또는 3' 말단에 대한 지질 기의 첨가는 온도를 적당히 감소시켰으며, 이것은 65.5-66.5℃로 매우 높게 유지시켰고, 비-결합된 화합물 A에 비교하여 생화학적 효능을 6 내지 11 배 감소시켰다. 그러나, 매우 중대하게, 손상되지 않은 세포 내 지질-결합된 화합물 B 및 C의 효능은 이들 화합물의 생화학적 효능과 비교하여 단지 ~100-배 감소하였다. 더 큰 세포 흡수의 결과로서, 화합물 B 및 C는 비-결합된 올리고뉴클레오티드(화합물 A)와 비교하여 HT-3 세포에서 적어도 10-배 이상의 효능을 보였다.

유사한 결과가 사람 암 세포의 다른 유형과 함께 관찰되었다. 도 3 및 4는 손상되지 않은 U251(사람 아교모세포종) 세포 및 DU145(사람 전립선암) 세포 각각에서 화합물 A, B 및 C와 함께 얻어진 데이터를 보여준다. 화합물 C(5' 지질화 형태)의 IC<sub>50</sub>은 U251 세포 중 화합물 A의 것 보다 약 10-배 이하, 및 DU145 세포 중 약 38배 이하로서, 화합물 C를 이용한 치료의 증가된 효험을 확고히 하였다.

#### 실시예 4 동물 모델 내 사람 종양의 텔로머라제 활성의 억제

동물 내 종양 성장에 있어서 텔로머라제를 억제하는 비-결합된 올리고뉴클레오티드 화합물 A 및 지질-결합된 올리고뉴클레오티드 화합물 C의 능력을 하기 실험에서 비교하였다. 가슴샘 없는(nu/nu) 마우스를 두개의 플라스크 내에서 DU-145 종양 세포로 접종시켰다. 종양(두개의 종양/마우스)이 크기가 50-100 mm<sup>3</sup>에 이르는 때, 마우스는 PBS, FITC-표지된 화합물 A, 또는 FITC-표지된 화합물 C(40 mg/kg으로 투여된 두개의 화합물)의 단일 꼬리 정맥 주사를 받았다. 마우스를 IV 주사 24 시간 후 희생시키고; 하나의 종양을 형광 조영을 위해 수확하고 다른 종양을 TRAP 분석에 의해 텔로머라제 활성에 대하여 분석하였다.

형광성의 수준은 두개의 치료 그룹 모두에서 유사하였다. 그러나, 도 5에서 나타내는 바와 같이, 화합물 C는 화합물 A에서 보다 텔로머라제 활성의 더 큰 억제를 야기하였다. 0.75 ug의 종양 용해물에 대응하는 레인의 수직 화살표는 이들 샘플이 내부 표준의 유사한 수준을 함유한다는 것을 나타낸다(수평 화살표로 나타냄). 혈액은 헤모글로빈 및 갈색의 원쪽에서 레인의 내부 표준의 손실로서 나타내는 바와 같이, 다른 비-특이적 태그 폴리머라제 억제제(텔로머라제 생성물의 PCR 증폭에서 사용됨)를 함유한다. 그러나, 이들 비-특이적 억제제는 일련의 희석제(반응 혼합물 중 종양 용해물이 양을 감소시킴)에 의해 희석될 수 있다. 종양 용해물의 최저 농도에서(오른쪽의 3번째 레인), 내부 표준이 모두 3개의 치료 조건에서 유사한 곳에서, 화합물 C가 화합물 A의 유사한 투여량을 행한 것 보다 더 큰 정도로 텔로머라제 활성을 억제하였음이 명백하다.

#### 실시예 5 동물 모델 내 골수종 단백질 수준의 감소

골수종에 걸린 환자의 혈장은 암 세포에 의해 생산되는 항체의 특징적은 높은 수준("골수종 스파이크" 또는 M-단백질로서 검출됨)을 함유한다. M-단백질 수준의 감소는 질병의 완화와 상호관련있다. 이 실험에서, 골수종 세포로 주사된 동물 내 M-단백질의 수준의 수준을 감소시키는 비-결합된 올리고뉴클레오티드 화합물 A 및 지질-결합된 올리고뉴클레오티드 화합물 C의 능력을 비교하였다. 방사성 조사된 NOD/SCID 마우스를 106 CAG 골수종 세포로 주사한 후 PBS, PBS 중 화합물 A, 또는 PBS 중 화합물 C의 복막 내(IP) 주사로 처리하였다. 처음 2주 동안 화합물 A를 25 mg/kg/일(175 mg/kg 주 x 5 주)로 투여하고; 화합물 C를 25 mg/kg/일로 투여하였으며, 3주 동안 보관한 후, 마지막 2주 동안 1주 당 3일로 25 mg/kg/일로 투여하였다(5주 이상에서 100 mg/kg/주의 평균 투여량). 치료의 마지막에(접종 후 35일), 마우스를 희생시키고, 혈장을 골수종 단백질의 결정을 위해 각 그룹(4-5 마우스/그룹) 내에 풀시켰다. 도 6에서 나타내는 바와 같이, 화합물 C의 40% 이하 투여량에도 불구하고(화합물 A에 대한 500 mg 대 875 mg의 누적 투여량), 화합물 C 그룹은 골수종 단백질의 낮은 수준을 보였다(마우스 당 표준화 된 수치).

#### 실시예 6 동물 모델 내 사람 종양 성장의 억제

동물 내 사람 종양의 성장을 억제하는 비-결합된 화합물 A 및 지질-결합된 올리고뉴클레오티드 화합물 C의 능력을 하기 실험에서 비교하였다. 방사능 조사된 NOD/SCID 마우스를 CAG 골수종 세포로 피하 접종시키고, 종양 성장의 14일 후 PBS, 화합물 A(25 mg/kg/일 M-F, 또는 125 mg/kg/주) 또는 화합물 C(25 mg/kg MWF, 또는 75 mg/kg/주)의 복막 내 주사로 처리하였다. 도 7에서 나타내는 바와 같이, 40% 이하 투여량에도 불구하고, 화합물 C는 화합물 A 보다 더 큰 항-종양 효능을 보였다. (이 연구에서, 화합물 A를 이 모델에서 항-종양 효능과 이전에 관련된 것 보다 더 30% 이하 투여량으로 투여하였다, 175 mg/kg/주).

이 연구의 일부로서, 옆구리 CAG 골수종 종양을 희생-후에 절개하고 텔로머라제 활성(TRAP 분석에 포함) 및 서던 블롯에 의해 TRF 길이를 분석하였다. 도 8에서 나타내는 바와 같이, 40% 이하의 투여량으로 투여됨에도 불구하고, 화합물 C는 텔로머라제 활성의 억제(83% 감소) 및 종양 세포의 텔로머라제 단축(2.85 Kb 평균 TRF)의 유도를 더 크게 실질적으로 보였다. 화합물 A의 더 높은 투여량은 낮은 텔로머라제 억제(41%)를 제공하였으며, 연구의 시감 경로 이상에서 현저한 텔로머라제 단축을 야기하지 않았다.

\* \* \* \* \*

이 개시에서 제공된 당면 과제는 본 발명의 취지, 또는 첨부된 청구항의 범위에서 벗어나지 않으면서, 루틴한 최적화의 문제로서 변형될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 화합물의 올리고뉴클레오티드에 각종 지질 L 기의 부착의 예를 보여준다.

도 2는 본 발명의 화합물에 대한 전형적인 합성 과정의 개요를 보여준다. 도 2A, 2B 및 2C는 지질 부분이 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 결합되는 화합물의 생산을 위해 사용될 수도 있는 합성 과정을 나타낸다. 도 2C에서 나타낸 반응도는 지질 알데히드와 함께 출발하는 환원 아민화이며; 이것은 지질 기 및 올리고뉴클레오티드 간의 아민 결합을 생산하고(하기 반응도 B 참조), 반대로 도 2A에서 나타낸 반응도에서, 출발 물질은 카르복시산, 지방산의 산 무수물 또는 산 염화물이며, 아미드 결합의 형성을 가져온다(하기 반응도 A를 참조). 도 2B는 3'-티오포스포라미데이트 결합을 생산사기에 적합한 반응도를 나타낸다. 이 예에서, 아미노 글리세롤 링커 서열(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NHC(O))-이 나타나지만, 이 합성은 이러한 링커 없이, 또는 대안적인 링커 서열과 함께 사용될 수도 있음이 이해될 것이다. 도 2D는 화합물의 생산을 위해 사용될 수도 있는 합성 과정을 나타내는데, 여기서 지질 부분은 인산 기(또는 티오인산, 이때 X=S)를 통한 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 결합된다. 이 반응도에서, 올리고뉴클레오티드의 3' 말단은 티오포스포라미데이트(X=S) 및 포스포라미데이트(X=O)의 바람직한 올리고뉴클레오티드 결합과 일치하는, 아미노 기로서 나타낸다. 도 2E는 지질 기로 변형된 전형적인 보호 염기를 나타내는데(이 경우에, 테트라데실에 대한 결합에 의해 변형된 구아노신), 이것은 하나 이상의 기질기가 하나 이상이 뉴클레오염기에 공유결합으로 부착된 올리고뉴클레오티드를 제조하기 위한 표준 올리고뉴클레오티드 합성 과정에서 사용될 수 있다. 도 2에서, 하기 약어를 적용한다:

i = CI-C(O)-R"/(i-Pr)2NEt, 또는 HO-C(O)-R"/C.A, 또는 [C(O)-R"]20/(i-Pr)2NEt

ii = DMTO-CH<sub>2</sub>CHO(CEO-P[N(i-Pr)<sub>2</sub>])-CH<sub>2</sub>-NHC(O)-R"/Tetr

iii = 올리고뉴크렐오티드 사슬 연장

iv = R"-HC = O+ [H]

R = 5'-CPG-지지된 P,N-보호된 올리고뉴클레오티드

R'= 보호된 NP- 또는 NPS-올리고뉴클레오티드

R"= 지질 부분, L(링커에 결합될 수도 있음, 원한다면, 결합된 아미노 글리세롤 링커의 예를 위해 R'"를 참조)

R""= -O-CH<sub>2</sub>(CHOH)CH<sub>2</sub>-NHC(O)-R"

X = O, S; Y = H, 또는 C (O)-R", Z = O 또는 NH

도 3 및 4는 각각 U251 및 DU145 세포의 텔로머라제 활성을 억제하기 위한 본 발명의 화합물의 능력을 나타내는 그래프이다(전체 설명을 위해 실시예 3을 참조). 이들 및 하기 도면에서, A, B 및 C는 실시예 3에서 설명한 바와 같은 화합물이며 도 9에서 나타낸다.

도 5는 본 발명의 화합물을 포함한 또는 이를 포함하지 않는 처리 후 사람 종양 이종 이식 모델을 갖는 마우스로부터 해부된 사람 종양 세포 상에서 수행된 TRAP 분석의 결과를 보여주는 젤의 이미지이다(전체 설명을 위해 실시예 4 참조).

도 6은 본 발명의 화합물을 포함한 또는 이를 포함하지 않는 처리 후 사람 골수종을 지니는 마우스, 이종이식 내 골수종 단백질의 혈장 수준을 나타내는 그래프이다(전체 설명을 위해 실시예 5 참조).

도 7 및 8은 본 발명의 화합물의 투여를 포함하거나 포함하지 않고서, 사람 골수종 이종이식을 지니는 마우스 내 종양 부피, 텔로머라제 활성 및 텔로미어 길이에 대한 영향을 묘사하는 그래프이다(전체 설명을 위해 실시예 6을 참조).

도 9는 실시예 3-7에서 이용된 화합물 A, B 및 C의 구조식을 묘사하며, 올리고뉴클레오티드 성분은 티오포스포라미데이트 결합을 갖는다.

### 서열 목록

수반하는 서열 목록의 SEQ ID NO:1은 사람 텔로머라제 RNA 성분(hTR)의 서열을 제공한다(또한 Feng et al., Science 269 (5228): 1236-1241, 1995, 및 GenBank, 승인 번호 제 U86046호 참조). 서열이 SEQ ID NO:1에 함유된 부위와 상보적인 각종 올리고뉴클레오티드는 그들이 상보적인 SEQ ID:1 내 서열의 위치와 관련하여 이 개시를 통하여 언급된다.

### 상세한 설명

#### A. 정의

"알킬 기"는 메틸, 에틸, 프로필 등과 같은 1 내지 20 탄소 원자를 갖는 알킬 또는 치환 알킬 기를 나타낸다. 저급 알킬은 전형적으로 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>5</sub>를 나타낸다. 중간물 알킬은 전형적으로 C<sub>6</sub> 내지 C<sub>10</sub>을 나타낸다. "아실 기"는 구조 RCO를 갖는 기를 나타내며, R은 알킬이다. 저급 알킬은 아실이며, R은 저급 알킬이다.

"알킬아민"기는 부착된 질소를 갖는 알킬 기, 예를 들어, 1-메틸1-부틸아민(CH<sub>3</sub>CHNH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)을 나타낸다.

"아릴 기"는 5-20 탄소 원자를 갖는 방향족 고리 기를 나타내는데, 예를 들어, 폐닐, 나프틸, 안트릴, 또는 톨릴, 에틸페닐, 비페닐릴 등과 같은 알킬- 또는 아릴-치환기와 같은 치환된 아릴 기와 같은 것이다.

"올리고뉴클레오티드"는 약 2 내지 약 200 인접 소브유닛을 갖는 리보스 및/또는 데옥시리보스 뉴클레오시드 서브유닛을 나타낸다. 뉴클레오시드 서브유닛은 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, P3'→N5' 포스포라미데이트, N3'→P5' 포스포라미데이트, 및 포스포로티오에이트 결합을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 각종 내부 서브유닛 결합에 의해 결합될 수 있다. 또한, "올리고뉴클레오티드"는 설탕(예를 들어, 2' 하위 치환), 염기(하기 "뉴클레오시드"의 정의 참조), 및 3' 및 5' 말단에 대하여 당업계 숙련자에게 공지된 변형을 포함한다. 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 부분이 내부서브유닛 결합을 포함하는 경우, 각각의 결합은 동일한 화학을 사용하여 형성될 수도 있거나 또는 결합 화학의 혼합물이 사용될 수도 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "폴리뉴클레오티드"는 "올리고뉴클레오티드"와 동일한 의미를 가지며 "올리고뉴클레오티드"와 상호교환적으로 사용된다.

올리고뉴크레오티드는 "ATGUCCTG"와 같은 문자의 서열에 의해 나타낼 때마다, 뉴클레오티드가 왼쪽에서 오른쪽으로 5'→3' 순서이다. 이 방식의 올리고뉴클레오티드의 염기 서열의 표현은 올리고뉴클레오티드 내 내부뉴클레오시드 서브유닛의 어떤 특정한 형태의 사용을 포함하지 않는다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "뉴클레오시드"는 예를 들어, [Komberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992)]에서 설명되는 바와 같이 2'-데옥시 및 2'-히드록실 형태를 포함하는 천연 뉴클레오시드, 및 유사체를 포함한다. 뉴클레오시드에 관한 "유사체"는 예를 들어, 일반적으로 [Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, New York, 1980)]에 의해 설명되는 변형된 뉴클레오염기 부분(하기 "뉴클레오염기"의 정의 참조) 및/또는 변형된 설탕 부분을 갖는 합성 뉴클레오시드를 포함한다. 이러한 유사체는 [Uhlmann and Peyman (Chemical Reviews, 90: 543-584, 1990)]에 의해 개시되는 바와 같이 결합 특성, 예를 들어, 안정성, 특이성 등을 증가시키도록 설계된 합성 뉴클레오시드를 포함한다.

용어 "지질"은 본원에서 유기 용매에서 가용성이지만, 가능한 경우 물속에서는 거의 녹지 않는 물질을 포함하도록 광범위하게 사용된다. 용어 지질은 탄화수소, 오일, 지방(지방산, 글리세리드와 같은 것), 스테롤, 스테로이드 및 이들 화합물의 유도체 형태를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 바람직한 지질은 지방산 및 그들의 유도체, 탄화수소 및 그들의 유도체, 및 콜레스테롤과 같은 스테롤이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 지질은 또한 지질 및 친수성 부분을 함유하는 양친매성 화합물을 포함한다.

지방산은 일반적으로 직선 사슬 내에 짹수의 탄소 원자를 함유하고(통상적으로 12-24 탄소) 포화 또는 불포화될 수도 있으며, 각종 치환기를 함유할 수 있거나, 함유하도록 변형될 수 있다. 간단히 말해, 용어 "지방산"은 또한 도 2A에서 나타낸 합성 반응도에 의해 생산된 지방 아미드와 같은 지방산 유도체를 포함한다(예를 들어, 도 1A-1E에서 나타낸 화합물).

본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "탄화수소"는 공유결합된 수소 및 탄소만으로 구성되는 화합물을 포함한다. 상기 용어는 직선 사슬 및 분지형 탄화수소를 포함하는 개방형 사슬(지방족) 탄화수소, 및 포화 및 모노- 및 폴리-불포화 탄화수소를 포함한다. 상기 용어는 또한 하나 이상의 방향족 고리를 함유하는 탄화수소를 포함한다.

용어 "치환된"은 하나의 원자의 다른 것으로의 교환에 의해 변형된 화합물을 나타낸다. 특히, 상기 용어는 할로겐화 탄화수소 및 지방산, 특히 하나 이상의 수소 원자가 플루오르로 치환된 것에 관하여 사용된다.

본원에서 사용되는 바와 같이 "뉴클레오염기"는 (i) 전형적인 DNA 및 RNA 뉴클레오염기(우라실, 티민, 아데닌, 구아닌, 및 시토신), (ii) 변형된 뉴클레오염기 또는 뉴클레오염기 유사체(예를 들어, 5-메틸-시토신, 5-브로모우라실 또는 2-이노신) 및 (iii) 뉴클레오염기 유사체를 포함한다. 뉴클레오염기 유사체는 분자 구조가 전형적인 DNA 또는 RNA 염기의 것을 모방하는 화학물질이다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "파리딘"은 옥시, 메틸, 프로피닐, 메톡시, 히드록실, 아미노, 티오, 할로, 및 치환기를 함유하는 것과 같이, 시토신, 티민, 및 우라실을 포함하는 천연 뉴클레오시드, 및 그것의 유사체에서 존재하는 파리미딘을 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이 상기 용어는 N<sub>4</sub>-벤조일시토신과 같이, 보호 기 부착된 파리미딘을 더 포함한다. 추가의 파리미딘 보호기가 [Beaucage and Iyer (테트라hedron 48: 223-2311, 1992)]에 의해 개시된다.

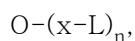
본원에서 사용되는 바와 같이, "퓨린"은 옥시, 메틸, 프로피닐, 메톡시, 히드록실, 아미노, 티오, 할로, 및 치환기를 함유하는 것과 같이, 아데닌, 구아닌, 및 히포산틴을 포함하는 천연 뉴클레오시드, 및 그것의 유사체에서 존재하는 퓨린을 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이 상기 용어는 N<sub>2</sub>-벤조일구아닌, N<sub>2</sub>-이소부티릴구아닌, N<sub>6</sub>-벤조일아데닌 등과 같이, 보호기 부착된 퓨린을 더 포함한다. 또한 퓨린 보호기는 [Beaucage and Iyer](상기 인용됨)에 의해 개시된다.

본원에서 사용되는 바와 같이, 화학적 명칭의 구성요소로서 용어 "보호된"은 화합물의 특정 부분에 대하여 업계-인지된 보호기를 나타내는데, 예를 들어, 뉴클레오시드에 관하여 "5'-보호된-히드록실"은 트리페닐메틸(즉, 트리틸), p-아니실디페닐메틸(즉, 모노메톡시트리틸 또는 MMT), 디-p-아니실페닐메틸(즉, 디메톡시트리틸 또는 DMT) 등을 포함한다. 업계-인지된 보호기는 하기 참고문헌에서 설명된 것들을 포함한다: Gait, editor, Oligonucleotides Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984); Amarnath and Broom, Chemical Reviews, 77: 183-217, 1977; Pon et al., Biotechniques, 6: 768-775, 1988; Ohtsuka et al., Nucleic Acids Research, 10: 6553-6570, 1982; Eckstein, editor, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991); Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Second Edition, (John Wiley & Sons, New York, 1991); Narang, editor, Synthesis and Applications of DNA and RNA (Academic Press, New York, 1987); Beaucage and Iyer (상기 인용됨) 등.

용어 "할로겐" 또는 "할로"는 그것의 전통적인 의미에서 클로로, 브로모, 플루오로 또는 이오도 치환기를 나타내는데 사용된다. 본원에서 설명되고 청구된 화합물에서, 할로겐 치환기는 일반적으로 플루오로, 브로모, 또는 클로로, 바람직하게는 플루오로 또는 클로로이다.

## B. 발명 화합물의 설계

본 발명의 화합물은 하기 화학식으로 나타낼 수도 있으며:



상기식에서 O는 올리고뉴클레오티드를 나타내고, x는 선택적인 링커 기이며, L은 지질 부분을 나타내고 n은 1-5의 정수이다.

따라서 본 화합물의 설계는 두개의 실재물, O 및 L의 선택을 필요로 하며, 이들 실재물 사이의 구조적 결합(들)의 결정은 선택적 링커 기 x에 연루될 수도 있다.

### O의 선택

올리고뉴클레오티드 성분 O는 화합물의 "작동자" 성분으로서 간주될 수도 있는데, 그것은 텔로머라제의 RNA 성분에 대한 결합에 의해 텔로머라제 효소의 억제를 초래하는 이 성분이다. 따라서, O의 서열은 SEQ ID NO:1에서 나타낸 텔로머라제

RNA의 서열에 상보적인 부위를 포함하여 선택된다. 텔로머라제 RNA 성분에 상보적인 부위는 이론적으로 텔로머라제 RNA의 어떤 부분에 표적될 수도 있으나, 텔로머라제 RNA의 특정 부위는 억제성 올리고뉴클레오티드에 대한 바람직한 표적이다. 한 바람직한 표적 부위는 SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 30-67에 이르는 부위이며, 이것은 SEQ ID NO1의 뉴클레오티드 46-56에 이르는 서열 5'-CUAACCCUAAC-3'의 11 뉴클레오티드 부위인 "주형 부위"를 포함한다. 주형 부위는 텔로머라제가 염색체 말단에 첨가하고 텔로머라제 효소의 활성에 필수적인 텔로머 반복의 서열을 열거하는 작용을 한다 (Chen et al., Cell 100: 503-514, 2000 ; Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98 (14): 7982-7987, 2001 참조). 따라서, 모든 또는 일부의 주형 부위에 대하여 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 부분을 함유하는 본 발명의 화합물이 특히 바람직하다. 다른 바람직한 표적 부위는 hTR의 뉴클레오티드 137-179에 이르는 부위이다(Pruzan et al., Nuci. Acids Research, 30: 559- 568, 2002 참조). 이 부위에서, 141-153에 이르는 서열이 바람직한 표적이다. PCT 공개공보 WO 98/28442호가 텔로머라제를 억제하기 위한 길이가 적어도 7 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드의 사용을 설명하며, 여기서 올리고뉴클레오티드는 hTR의 뉴클레오티드 137-196, 290-319, 및 350-380을 포함하는 주형 부위의 hTR 서열 외부의 접근 가능한 부분에 상보적이도록 설계되어 있다.

hTR 서열에 표적되어 있는 O의 부위는 바람직하게는 대응 hTR 서열에 정확히 상보적이다. 부적절한 짹이 특정 예에서 허용되는 동안, 그들은 결과의 올리고뉴클레오티드 결합의 특이성 및 활성을 감소시키는 것으로 기대된다. 따라서, 특정 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 O의 염기 서열은 텔로머라제 RNA에 정확히 상보적인 적어도 5 뉴클레오티드의 서열을 포함하도록 선택되며, 상보성 서열의 길이 증가가 텔로머라제 RNA에 정확히 상보적인 적어도 8, 적어도 10, 적어도 12, 적어도 13 또는 적어도 15 뉴클레오티드와 같이 사용되는 경우, 증가된 텔로머라제 억제가 획득될 수도 있다. 다른 구체예에서, 올리고뉴클레오티드의 서열은 텔로머라제 RNA 서열에 정확히 상보적인 적어도 5 내지 20, 적어도 8 내지 20, 적어도 10 내지 20 또는 적어도 10 내지 15 뉴클레오티드의 서열을 포함한다. 올리고뉴클레오티드 O의 총 길이가 텔로머라제 RNA에 상보적으로 선택되는 경우 최적의 텔로머라제 억제 활성이 얻어질 수도 있다. 그러나, 올리고뉴클레오티드 성분의 총 길이가 표적 서열에 정확히 상보적인 것이 필수적이지는 않으며, 올리고뉴클레오티드 서열이 표적 서열에 상보적이지 않은 부위를 포함할 수도 있다. 이러한 부위는 예를 들어, 정제를 촉진하는 서열과 같이, 화합물 상 기타 특성을 수여하도록 첨가될 수도 있다. 올리고뉴클레오티드 성분 O가 표적 서열에 상보적이지 않은 부위를 포함한다면, 이러한 부위는 전형적으로 하나 또는 둘의 5' 또는 3' 말단에 위치된다. 예를 들어, 정확히 상보적인 부위가 주형 부위에 표적되는 경우, 효과적인 텔로머라제 억제가 텔로머라제-유사(G-rich) 서열이 5' 말단에 결합되는 정확히 상보성인 짧은(5-8 뉴클레오티드) 부위와 함께 이루어질 수도 있다.

사람 텔로머라제 RNA에 상보적이고 올리고뉴클레오티드 성분 O의 일부로서 포함될 수도 있으며, 또는 전체 올리고뉴클레오티드 성분 O로서 사용될 수도 있는 전형적인 서열은 다음을 포함한다:

올리고뉴클레오티드 서열	hTR 상보적 서열 (SEQ ID NO:1의 부위)
GCTCTAGAATGAACGGTGGAAAGGCGGCAGG	137-166
GTGGAAGGCCGGCAGG	137-151
GGAAGGCCGGCAGG	137-149
GTGGAAGGCCGGCA	139-151
GTGGAAGGCCGG	141-151
CGGTGGAAGGCCGG	141-153
ACGGTGGAAGGCCGG	142-154
AACGGTGGAAGGCCGG	143-155
ATGAAACGGTGGAAAGGCCGG	144-158
ACATTTTTGTTGCTCTAG	160-179
TAGGGTTAGACAA	42-54
GTTAGGGTTAG	46-56
GTTAGGGTTAGAC	44-56
GTTAGGGTTAGACAA	42-56
GGGTTAGAC	44-52
CAGTTAGGG	50-58
CCCTTCTCAGTT	54-65
CGCCCTTCAG	56-67

O 성분의 합성에서 사용되는 내부-뉴클레오시드 결합의 유형의 선택은 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, P3'→N5' 포스포라미데이트, N3'→P5' 포스포라미데이트, N3'→P5' 티오포스포라미데이트, 및 포스포로티오에이트 결합을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 어떤 이용가능한 올리고뉴클레오티드 화학으로부터 만들어질 수도 있다.

바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 성분 O 및 그것의 약학적으로 허용가능한 염은 적어도 하나의 N3'→P5' 포스포라미데이트 또는 N3'→P5' 티오포스포라미데이트 결합을 가지며, 이 결합은 하기 구조에 의해 나타낼 수도 있다:

3'-[-NH-P(=O)(-XR)-O-]-5', 식중 X는 O 또는 S이고 R은 수소, 알킬, 및 아릴로 구성되는 군으로부터 선택된다.

필수적이지는 않지만, 전형적으로, 올리고뉴클레오티드 성분이 상이한 결합의 혼합을 사용하여 합성될 수도 있을지라도, 올리고뉴클레오티드 O 내 모든 내부 뉴클레오시드 결합이 동일한 유형일 것이다. 지질 부분이 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 결합되는 곳에서, 결합의 합성이 올리고뉴클레오티드 상 3' 아미도 기에 의해 대단히 촉진된다. 따라서, 바람직한 화학물질 중 하나가 선택되지 않을지라도, 3' 아미노기의 첨가가 이롭다.

### L의 선택

본 발명의 화합물은 지질 성분에 결합되어 있지 않은 대응 올리고뉴클레오티드 보다 세포 내 텔로머라제 억제를 생성하는데 보다 효과적이다. 지질 성분 L은 화합물의 세포 흡수를 증가시키는데, 특히 세포 막을 통한 통과를 촉진하는데 있어서 작용하는 것으로 여겨진다. 이것이 발생하는 메카니즘이 완전히 설명되지는 않지만, 하나의 가능성은 지질 성분이 후속적 내부화와 함께, 단일 분자, 또는 응집(교질 입자) 형태로서 세포막에 대한 화합물의 결합을 촉진할 수도 있다는 것이다. 그러나, 정확한 메카니즘에 대한 이해가 본 발명이 이용되기 위해 꼭 필요하지는 않다.

지질 성분은 변형되지 않은 올리고뉴클레오티드와 비교하여 증가된 세포 흡수를 제공하는 어떤 지질 또는 지질 유도체일 수도 있다. 바람직한 지질은 탄화수소, 지방(예를 들어, 글리세리드, 지방산 및 지방 아미드와 같은 지방산 유도체) 및 스테롤이다. 지질 성분이 탄화수소인 곳에서, L 성분은 치환 또는 비치환된 고리 탄화수소 또는 지방족 직선형 사슬 또는 분지형 탄화수소일 수도 있으며, 이것은 포화 또는 불포화되어 있을 수도 있다. 바람직한 예는 완전히 포화 또는 다중불포화되어 있는 직선 사슬 비분지형 탄화수소이다. 탄화수소 사슬의 길이는 C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>으로 다양할 수도 있으나, 최적의 텔로머라제 억제는 C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>인 탄소 사슬과 함께 얻어질 수도 있다. 바람직한 포화 탄화수소(알칸)의 예가 하기 열거되어 있다:

### 분류 명칭 탄소 사슬

테트라데칸 C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>

펜타데칸 C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>

헥사데칸 C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>

헵타데칸 C<sub>17</sub>H<sub>36</sub>

옥타데칸 C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>

노나데칸 C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>

에이코산 C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>

이중 결합 이상을 갖는 화합물이 사용될 수 있지만, 탄화수소의 단일- 및 다중-불포화 형태(알켄 및 폴리엔으로서, 예를 들어, 알카디엔 및 알카트리엔과 같은 것)는 바람직한 1 내지 3 개의 이중 결합을 갖는 화합물과 함께 선택될 수도 있다. 알킨(하나 아시아의 3중 결합을 함유) 및 알케닌(3중 결합(들) 및 이중 결합(들))이 또한 이용될 수도 있다. 사용될 수도 있는 일반적인 단일- 및 다중-불포화 탄화수소의 예는 도 1M, 1L 및 1O에서 나타낸 것을 포함한다.

탄화수소의 치환된 형태는 생체 내 및 시험관 내에서 바람직하게는 비활성인 치환 기와 함께, 본 발명의 화합물에서 사용될 수도 있다. 특히 바람직한 치환기는 플루오르이다. 다중플루오르화 탄화수소의 전형적인 일반적 구조는 다음을 포함한다:

$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n-(\text{CH}_2)_m-$  식 중  $m$ 은 적어도 1, 바람직하게는 적어도 2, 및  $n=1-30$ 이고, 예를 들어, 플루오로트리데칸:  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_9(\text{CH}_2)_3$ ; 및

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)_c-$  식 중  $a, b$  및  $c$ 는 독립적으로 1-30이다.

도 1W는 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 결합된 폴리플루오르화 탄화수소의 예를 보여준다.

다른 적합한 지질 성분은 단순한 지방산 및 지방산 유도체, 글리세리드 및 스테롤과 같은 그 이상의 착체 지질, 예를 들어, 콜레스테롤을 포함한다. 지방산 및 그들의 유도체는 완전히 포화 또는 모노- 또는 다중-불포화될 수도 있다. 탄소 원자의 길이는  $C_2-C_{30}$ 으로 변화할 수도 있으나, 최적의 텔로머라제 억제는  $C_8-C_{22}$ 인 탄소 사슬과 함께 얻어질 수 있다. 포화 지방산의 바람직한 예가 하기 열거되어 있다:

#### 분류 명칭 실용 명칭 탄소 사슬

테트라데카노산 미리스트산 14:0

헥사데카노산 팔미트산 16:0

옥타데카노산 스테아르산 18:0

에이코사노산 아라키드산 20:0

이중 결합 이상을 갖는 화합물이 또한 사용될 수도 있지만, 1 내지 3개의 바람직한 이중 결합을 갖는 화합물과 함께, 지방산의 단일- 및 다중-불포화 형태가 또한 사용될 수도 있다. 사용될 수도 있는 공통적인 단일- 및 다중-불포화 지방산의 예는 다음을 포함한다:

#### 분류 명칭 실용 명칭 탄소 사슬

*Cis*-9-헥사데카노산 팔미톨레산 16:1(n-7)

*Cis*-6-옥타데카노산 페트로셀린산 18:1(n-12)

*Cis*-9-옥타데카노산 올레산 18:1(n-9)

9,12-옥타데카디에노산 리노레산 18:2(n-6)

6,9,12-옥타데카트리에노산 감마-리놀렌산 18:3(n-6)

9,12,15-옥타데카트리에노산 알파-리놀렌산 18:3(n-3)

5,8,11,14-에이코사데트라에노산 아라키돈산 20:4(n-6)

탄소 사슬에서 하나 이상의 3중 결합을 갖는 지방산, 및 분자형 지방산이 또한 본 발명의 화합물에서 사용될 수도 있다. 지방산의 치환된 형태가 본 발명의 화합물에 사용될 수도 있다. 탄화수소 기와 함께, 생체 내 및 시험관 내에서 비활성인 치환기가 특히 바람직하게는 플루오르와 함께 바람직하다. 본 발명의 사용을 위해 적합한 지방산의 다중 플루오르화 유도체의 전형적인 일반적 구조는:

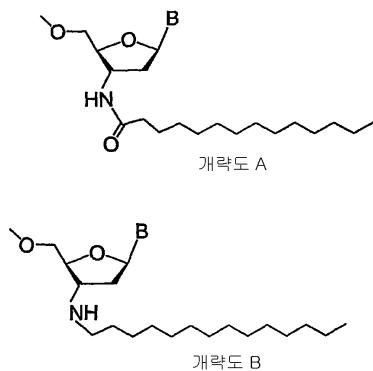
$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n-(\text{CH}_2)_m\text{CO}^-$  식 중  $m$ 은 적어도 1, 바람직하게는 적어도 2, 및  $n=1-30$ 이고,

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)\text{CCO}^-$  식 중  $a, b$  및  $c$ 는 독립적으로 1-30이다.

지방산의 다중플루오르화 유도체를 갖는 본 발명의 화합물의 예를 도 1U 및 1V에서 나타낸다.

전형적으로, 1 내지 5 L 성분( $n=1-5$ )이 선택적으로 링커를 통하여, O 성분에 공유결합으로 연결되어 있다. 보다 일반적으로 1 또는 2개의 L 성분이 이용된다( $n=1$  또는 2). 하나 이상의 L 성분이 O 성분에 연결되는 곳에서, 각각의 L 성분은 독립적으로 선택된다.

L 부분으로서 특이화된 탄화수소를 갖는 것으로 설명된 본 발명의 화합물 및 특이화 된 지방산을 갖는 것으로 설명된 화합물(특이화 된 탄화수소로서 동일한 수의 탄소 원자를 가짐)이 올리고뉴클레오티드에 대하여 L 부분에 결합하는 결합의 특성과 밀접히 관련되어 있으며 단지 구조상에서만 다르고, 이것은 차례로 화합물을 생산하는데 사용되는 합성 과정의 결과임이 이해될 것이다. 예를 들어, 하기에서 더 상세히 설명되는 바와 같이, 화합물이 올리고뉴클레오티드의 3'-아미노 말단으로 결합되는 L 부분을 갖고 합성되며(포스포라미데이트 또는 티오포스포라미데이트 내부 뉴클레오시드 결합을 가짐), 출발 물질로서 지방산(지방 알데하يد)의 알데하يد 형태의 사용은 지질 사슬 및 뉴클레오티드 간의 아미노 결합의 형성을 야기하며, 이 지질기는 탄화수소로서 나타난다. 반대로, 동일한 지방산의 카르복시산, 산 무수물 또는 산 염화물 형태의 사용은 아미드 결합을 야기하며, 이러한 지질기는 지방산 유도체, 특히 이 경우 지방 아미드로서 나타난다(상기 정의 단락에서 나타내는 바와 같이, 단순함을 위해, 결합된 L 기를 설명하는 경우 "지방산"은 본원에서 지방 아미드를 포함하여, 지방산 유도체를 포함하도록 널리 사용됨). 이것은 C14 지질 성분에 결합된 포스포라미데이트 올리고뉴클레오티드의 3'-아미도 말단을 묘사하는 하기 개략도(및 도 2A 및 2C)에서 도해된다. 개략도 A에서, L은 테트라데카노산(미리스트산)이며, L 및 O 기 사이의 연결은 아미드이다. 개략도 B에서, L은 테트라데칸이며, L 및 O 기 사이의 연결은 아민이다.



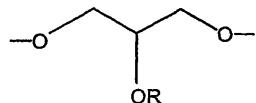
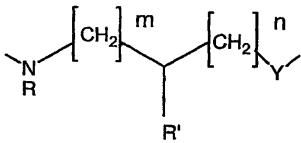
### O 및 L 성분의 결합

O 및 L 성분 간의 결합은 직접 결합일 수도 있으며, 또는 선택적인 링커 부분, x를 통할 수도 있다. 링커기는 화합물의 화학적 합성을 촉진하도록 작용할 수도 있다(하기 합성 단락에서 논의됨). 링커기가 O 및 L 성분의 결합을 매개하는데 사용되든 아니든 간에, L 성분(들)이 편리하게 결합될 수도 있는 올리고뉴클레오티드 성분 O 상에 다수의 자리가 존재한다. 적당한 결합 지점은 5' 및 3' 말단, 하나 이상의 설탕 고리, 내부 뉴클레오시드 백분 및 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오염기를 포함한다. 전형적으로, L 부분은 올리고뉴클레오티드의 3' 또는 5' 말단에 부착된다.

L 성분이 3' 말단에 부착되는 경우, 부착은 3' 치환기에 직접적으로 될 수도 있으며, 바람직한 경우에 포스포라미데이트 및 티오포스포라미데이트 올리고뉴크렐오티드는 3'-아미노 기이며(예는 도 1A-C에서 나타냄), 다른 경우에, 편리한 포스포디에스테르 올리고뉴클레오티드와 같은 것은 3-히드록시 기이다. 택일적으로, L 부분은 3'-연결된 포스페이트 기를 통하여 연결될 수도 있다(예는 도 1Z에서 나타냄), 여기서 헥사데칸 탄화수소는 O-알킬 링커를 통하여 티오포스포라미데이트 올리고뉴클레오티드의 3' 포스페이트에 연결된다. L 부분이 5' 말단에 연결된다면, 그것은 전형적으로 5'-연결된 포스페이트 기를 통하여 부착된다(아미노 글리세롤 링커의 사용을 나타내는 도 1F 및 bis-아미노 글리세롤 링커의 사용을 나타내는 도 1G를 참조). O 부분 상의 염기에 대한 부착은 어떤 적당한 원자, 예를 들어, 구아노신의 N<sup>2</sup> 아미노 기를 통할 수도

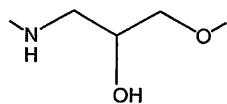
있다(도 1Q-R 참조). 다수의 지질 부분이 O 성분에 부착되는 이러한  $n > 1$ 의 경우에, 각각 선택된 L 성분이 어떤 적당한 자리(들)에 부착될 수도 있다. 예를 들어, 하나의 L기가 각각의 말단에 부착될 수도 있으며, 각종 L기는 염기에 부착될 수도 있으며, 또는 둘 이상의 L기가 하나의 말단에 부착될 수도 있다(도 1E, 1J, 1K 참조).

임의의 링커 성분 x는 화합물의 O 및 L 성분을 결합시키는데 사용될 수도 있다. 링커가 사용되는 경우, 그것은 상기 도 2에서의 설명문에서 기술되는 바와 같이 합성 과정으로 통합된다. 적당한 링커 기의 예는 각각 일반적 구조식에 의해 묘사될 수 있는 아미노 글리세롤 및 O-알킬 글리세롤-형 링커를 포함한다.

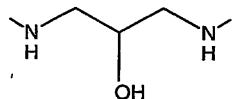


상기식에서  $\text{R}'=\text{H}, \text{OH}, \text{NH}_2$  또는  $\text{SH}$ ;  $\text{Y}=\text{O}, \text{S}$  또는  $\text{NR}$ ;  $\text{R}=\text{H}$  또는 알킬; 및  $n$  및  $m$ 은 독립적으로 1 내지 18의 정수이다.

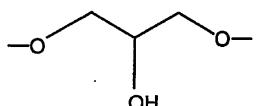
적당한 링커의 특이적 예는 아미노글리세롤 링커이고, 식중  $\text{R}'=\text{OH}$ ,  $\text{Y}=\text{NH}$ , 및  $m$  및  $n$ 은 각각 1이고:



bis-아미노글리세롤 링커, 식중  $\text{R}'=\text{OH}$ ,  $\text{Y}=\text{NH}$ , 및  $m$  및  $n$ 은 각각 1이며:



O-알킬 글리세롤 링커, 식중  $\text{R}=\text{H}$ 이다:



### C. 발명 화합물의 예

발명 화합물의 예가 도 1에서 나타난다. 간단히 말해, 올리고뉴클레오티드 O의 오직 하나의 염기가 묘사되는 일반적 염기, B 및 잔여의 올리고뉴클레오티드에 대한 부착 지점을 나타내는 R과 함께 나타내어 진다. 3' 말단에 연결된 화합물이 바람직한 티오포스포라미레이트 및 포스포라미레이트 올리고뉴클레오티드 화학물질과 일관되게, 3'-질소와 함께 도해된다. 도 1A-1L은 5' 또는 3' 말단에 부착된 포화 지질 기를 갖는 화합물을 도해한다. 도 1M-1P는 단일- 또는 다중-불포화 지질 기를 갖는 화합물을 도해한다. 도 1Q-1R은 염기(이 경우, 구아노신)를 통해 올리고뉴클레오티드에 결합된 지질 기를 갖는 화합물을 도해한다. 도 1S 및 1CC는 각각 3'- 및 5'- 결합된 콜레스테롤 지질 부분을 도해한다. 도 1U 및 1V는 5'-결합된 다중플루오르 치환된 지방산 유도체를 도해하고, 도 1W는 5' 결합된 다중 플루오르화 탄화수소를 도해한다. 도 1X-Z는 산소를 함유하는 5' 지질 부분을 도해한다. 도해된 각각의 지질 기에 대하여 본원에서 사용된 명명법은 다음과 같다:

도 1 A : 3'-미리스토일아미드

도 1 B: 3'-팔미토일아미드

도 1 C : 3'-스테아로일아미드

도 1 D: 3'-팔미토일아미도-프로필-티오포스페이트

도 1 E: 3'-일실-bis-스테아로일아미드

도 1 F :5'-팔미토일아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트

도 1 G : 5'-팔미토일아미도-bis-아미노글리세롤-티오포스페이트

도 1 H : 5'-스테아로일아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트

도 1 I : 3'-도데실

도 1 J : 3'-bis-도데실

도 1 K: 3'bis-데실

도 1 L :3'-에이코사노일아미드

도 1 M: 3'-올레이닐아미드

도 1 N : 3'-리놀레닐아미드

도 1 O : 3'-리놀레일아미드

도 1 P : 3'-트리틸

도 1 Q : N<sup>2</sup>-테트라데실구아노신

도 1 R: N<sup>2</sup>-옥타데실-구아노신

도 1 S : 3'-콜레스테릴아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트

도 1 T : 5'-(12-OH)-스테아로일-티오포스페이트

도 1 U : 5'-C11-테플론-티오포스페이트

도 1 V : 5'-C13-테플론-티오포스페이트

도 1 W : 5'-OH-C10-테플론-티오포스페이트

도 1 X : 5'-OH-팔미틸-티오포스페이트

도 1 Y : 5'-바틸-티오포스페이트

도 1 Z :3'-바틸-티오포스페이트

도 1 AA : 3'-팔미토일아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트

도 1 BB : 3'-티옥틸아미드

도 1 CC : 5'-콜레스테릴아미도-아미노글리세롤-티오포스페이트

도 1 DD : 5'-(2-OH)-헥사데카놀-토포스페이트

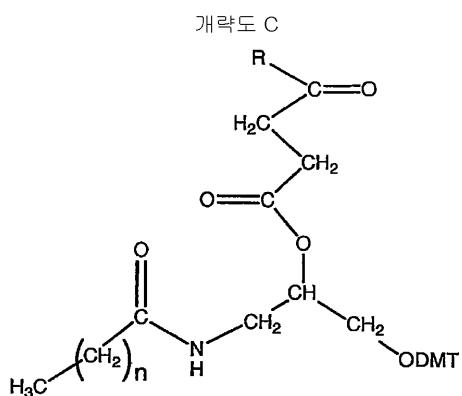
## D. 본 발명의 화합물의 합성

본 발명 화합물의 올리고뉴클레오티드 성분은 선택된 유형의 화학에 대한 표준 프로토콜을 사용하여 합성될 수도 있다. 바람직한 N3'→P5' 포스포라미데이트 및 N3'→P5' 티오포스포라미데이트 화학을 갖는 올리고뉴크레오티드의 합성 방법이 각각 [McCurdy et al., (1997) Tetrahedron Letters, 38: 207-210 and Pongracz & Gryaznov, (1999) Tetrahedron Letters, 49: 7661-7664]에서 설명되어 있다.

각정 합성의 접근법이 [Mishra et al., (1995) Biochimica et Biophysica Acta, 1264: 229-237, Shea et al., (1990) Nucleic Acids Res. 18 : 3777-3783, and Rump et al., (1998) Bioconjug. Chem. 9: 341-349]에서 설명된 접근법을 포함하여, 선택된 결합의 특성에 따라서, 올리고뉴클레오티드에 지질 부분 L을 결합하는데 사용될 수 있다. 지질 부분이 올리고뉴클레오티드의 5' 또는 3' 말단에 결합되는 보통 발명의 화합물의 합성은 카르복시산, 산 염화물, 무수물 및 활성 에스테르와 반응할 수 있는 적절한 말단에서 적당한 작용기, 가장 전형적으로는 아미노 기의 사용을 통하여 이루어질 수 있다. 또한 티올 기가 작용 기로서 적당하다(Kupihar et al., (2001) Bioorganic and Medicinal Chemistry 9: 1241-1247 참조). 상이한 사슬 길이의 아미노- 및 티올- 변형제가 올리고뉴클레오티드 합성을 위해 상업적으로 이용 가능하다. N3'→P5' 포스포라미데이트 및 N3'→P5' 티오포스포라미데이트 결합을 갖는 올리고뉴클레오티드는 (대부분의 종래의 올리고뉴클레오티드 화학에서 발견된 3'-히드록시 보다는) 3'-아민 기를 함유하며, 따라서 이들 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드의 3'-말단에 지질 기를 결합하기 위한 유일한 기회를 제공한다.

각종 접근법이 바람직한 N3'→P5' 포스포라미데이트 및 N3'→P5' 티오포스포라미데이트 화학과 함께 올리고뉴클레오티드의 말단에 지질 기를 부착시키는데 사용될 수 있다. 본 발명의 결합 화합물을 생산하기 위한 합성 도식의 예가 도 2에서 나타난다. 3' 말단에 대한 부착을 위해, 결합된 화합물은 유리 3'-아미노 기의 완전히 보호된 고체 지지체 결합된 올리고뉴클레오티드를 대응 산 무수물과 반응시킨 후, 암모니아를 이용한 탈보호 및 정제에 의해 합성시킬 수 있다. 택일적으로, 카르보디이미드, HBTU 또는 2-클로로-1-요오드 메틸피리미디니움과 같은 커플링 제제를 사용하여 유리 3'-아미노 기의 지지체 결합된 올리고뉴클레오티드에 대한 지질의 카르복시산의 커플링이 지질 기를 결합하는데 사용될 수 있다. 이들 두 가지 방법이 지질 및 올리고뉴클레오티드 간의 아미드 결합을 형성할 것이다. 또한 지질은 사슬 연장 중에 올리고뉴클레오티드에 대하여 커플링 된 지질의 포스포라미디트 유도체를 사용하여 올리고뉴클레오티드 사슬에 부착될 수도 있다. 이 접근법은 지질 및 올리고뉴클레오티드를 연결하는 포스포라미데이트 또는 티오포스포라미데이트를 생산한다(예로써, 프로필-필미토일 및 2-히드록시-프로필-필미토일 화합물). 또 다른 접근법은 유리 3'-아미노 기의 완전히 보호된 지지체 결합된 올리고뉴클레오티드의 적당한 지질 알데히드와의 반응 후, 아민 결합을 생산하는 수소화붕소시안 나트륨을 이용한 화워을 포함한다.

5' 말단에 대한 부착을 위해, 올리고뉴클레오티드를 변형된, 지질-함유 고체 지지체, 후속하여 [Pongracz & Gryaznov (1999)]에서 설명되는 바와 같이 5'-내지 3' 방향으로 올리고뉴클레오티드의 합성을 사용하여 합성시킬 수 있다. 변형된 지지체의 예가 하기 개략도 C에서 제공된다. 예로서, n=14인 경우, 지방산은 팔미트산이며: 3-아미노-1,2-프로파네디올의 염화 팔미토일파의 반응, 후속하여 디메톡시트리틸화 및 숙신화는 고체 지지체에 대한 커플리에 사용되는 중간물을 제공하였다. R은 긴 사슬 알킬 아민 제어된 기공 유리이다.



## E. 텔로머라제 억제 분석

본 발명의 결합체는 텔로머라제 효소 활성 및/또는 텔로머라제 활성을 갖는 세포의 증식을 억제 또는 감소시키는데 사용될 수도 있다. 이들 문맥에서, 효소 활성 또는 세포 증식에 대한 억제 또는 감소는 효소 또는 세포가 결합체로 처리되지 않은 대조군 실험과 비교하여 측정된 활성의 낮은 수준을 의미한다. 특정 구체예에서, 측정된 활성의 억제 또는 감소는 적어도 10% 감소 또는 억제이다. 당업계 숙련자는 적어도 20%, 50%, 75%, 90% 또는 100%의 측정된 활성의 감소 또는 억제가 특정 용도를 위해 바람직할 수도 있음을 이해할 것이다. 텔로머라제를 억제하기 위한 본 화합물의 능력은 세포-유리 분석 내(생화학적 분석으로서 언급됨) 및 세포 내에서 측정될 수 있다.

텔로머라제 활성을 특정하는 방법, 및 화합물의 텔로머라제 억제 활성을 결정하기 위한 이러한 방법의 사용이 주지되어 있다. 예를 들어, TRAP 분석법은 세포 추출 시스템에서 텔로머라제 활성을 측정하기 위한 표준 분석 방법이며 텔로머라제 억제성 화합물에 대한 연구세어 널리 사용되었다(Kim et al., Science 266: 2011, 1997 ; Weinrich et al., Nature Genetics 17: 498, 1997). TRAP 분석은 텔로머라제 기질 또는 프라이머에 대한 뉴클레오티드 첨가에 의해 형성된 연장 생성물(폴리뉴클레오티드)로 통합된 방사성 뉴클레오티드의 양을 측정한다. 통합된 방사성은 방사성 생산물이 분리되어 있는 젤 상에 노출된 검출 스크린(예를 들어, Phosphorimager 스크린) 상 띠의 강도로서 측정될 수 있다. 또한, TRAP 분석은 미국 특히 제 5,629,154, 5,837,453 및 5,863,726호에서 상세히 설명되어 있으며, 텔로머라제 억제 화합물의 활성을 테스트함에 있어서 그것의 사용은 WO 01/18015호를 포함하는 각종 문헌에서 설명되어 있다. 또한, 다음 키트는 텔로머라제 활성을 측정하기 위한 연구 목적을 위해 상업적으로 이용가능하다: TRAPeze® XK 텔로머라제 검출 키트(Cat. S7707; Intergen Co., Purchase NY); 및 TeloTAGGG 텔로머라제 PCR ELISA 플러스(Cat. 2,013, 89; Roche Diagnostics, Indianapolis IN).

생화학적 분석에서 텔로머라제를 억제하는 화합물의 능력을 측정하기 위해 바람직한 프로토콜은 직접(PCR 기초되지 않음) 세포-유리 텔로머라제 분석이며, "Flashplate 분석"으로 나타내며, [Asai et al., Cancer Research, 63: 3931-3939 (2003)]에 설명되어 있다.

세포 내 텔로머라제를 억제하는 본 발명의 화합물의 능력은 한정된 시간의 기간 동안 텔로머라제-발현 세포와 함께 화합물을 배양시킨 후, 시토졸 추출물 중 텔로머라제 활성을 측정함으로써 측정될 수도 있다. 세포-기재 분석을 위해 바람직한 프로토콜은 [Asao et al.(2003)]에서 설명된 세포-기재 텔로머라제 분석이다. 이러한 분석에 적당한 텔로머라제-발현 종양 셀라인은 HME50-5E 사람 흉부 상피 세포(Dr. Jerry Shay, University of Texas Southwestern Medical Center에 의해 제공됨), 난소암 셀라인 OVCAR-5 (MIIB, Milan) 및 SK-OV-3 (어메리칸 타입 컬쳐 콜렉숀, ATCC), 사람 신장 암 종 Caki-1 세포(Japanese Collection of Research Bioresources, JCRB), 사람 폐 암종 1549 세포(ATCC), 사람 편평세포 암종 A431 세포 (JCRB), 및 사람 전립선암 DU145 세포(ATCC)를 포함한다.

## F. 세포 증식 분석

본 발명의 화합물의 중요한 치료적 적용은 텔로머라제-발현 세포, 특히 종양 세포의 성장의 억제이다. 세포 내 텔로머라제 활성을 억제하는 본 발명의 화합물은, 다른 알려진 텔로머라제-억제 화합물과 같이, 세포 성장 및 죽음의 중지를 유도하는, 텔로머라제-양성 셀라인의 위기를 유도한다. 그러나, 중요하게, 섬유아세포 기원의 BJ 세포와 같이, 텔로머라제를 발현하지 않는 정상 사람 세포에서, 어떠한 위기 또는 기타의 독성이 본 발명의 화합물을 이용한 치료에 의해 유도되지 않는다. 종양세포의 성장을 특이적으로 억제하는 화합물의 능력이 시험관 내, 또는 이종 이식 동물 모델 생체 내 종양 셀라인을 사용하여 분석될 수 있다.

이러한 성장 곡선 분석을 위한 바람직한 프로토콜은 [Asai et al.(2003)]에서 설명된 단기간 세포 생존력 분석이다. 치료적 적용을 위해 본 발명의 화합물을 선택함에 있어서, 화합물이 텔로머라제를 발현하지 않는 정상 세포 내 약 10 $\mu$ M 이하의 농도로 현저한 세포독성 효과를 생산하는 것이 바람직하다.

생체 내 종양 세포 성장을 억제하기 위한 본 발명의 화합물의 능력은 사람 종양의 확립된 이종 이식 모델을 사용하여 확고해질 수 있으며, 여기서 테스트 화합물을 종양 부위로 직접 또는 전신으로 투여시키고, 후속하여 종양의 성장을 물리적 측정한다. 본 발명의 화합물을 이용하여 처리된 동물은 평균적으로 초기 도성 후 일정 기간 동안 증가할 수도 있는 종양 부피를 가지는 것으로 예상되지만, 계속적 치료와 함께 부피의 감소가 시작될 것이다. 반대로, 미처리 대조군 마우스는 증가를 계속하는 종양 부피를 갖는 것으로 예상된다. 적당한 생체 내 종양 이종이식 분석의 바람직한 예가 [Asai et al.(2003)]에서 설명된다. 다른 예가 [Scorski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 3966-3971 (1997) and Damm et al., EMBO J., 20: 6958-6968 (2001)]에서 설명된다.

## G. 발명 화합물의 제형

본 발명은 특이적으로 및 잠재적으로 텔로머라제 활성을 억제할 수 있는 화합물을 제공하며, 따라서, 이것은 종양 세포와 같이, 텔로머라제-양성 세포의 증식을 억제하는데 사용될 수도 있다. 광범위한 각종 암세포는 피부, 결합 조직, 지방 조직, 흉부, 폐, 위, 이자, 난소, 자궁 경부, 자궁, 신장, 방광, 결장, 전립선, 중추 신경계(CNS), 망막 및 혈액 종양(골수종, 백혈병 및 림프종과 같은 것)을 포함하여, 텔로머라제-양성인 것으로 나타났다.

따라서, 본원에서 제공된 화합물은 광범위한 암을 치료하는데 널리 유용하다. 더 중대하게, 본 발명의 화합물은 무차별적으로 분화 세포를 죽이는 제제에 의존적인 가장 최근의 화학치료 요법과 함께 존재하는 많은 해로운 부작용을 높은 정도로 피하기 위해 암 및 정상 세포 사이를 구별하는 치료를 제공함에 있어서 효과적일 수 있다. 더욱이, 본 발명의 화합물은 동 가의 비결합된 올리고뉴클레오티드 보다 더 효능 있는데, 이것은 그들이 증가된 안전성 및 치료의 비용에 있어서 현저한 감소를 제공하는 낮은 투여량으로 투여될 수 있음을 의미한다. 따라서, 본 발명의 한 양태는 본 발명의 화합물의 치료적 유효성을 환자에 투여하는 것을 포함하는, 환자의 암을 치료하는 방법이다. 본 발명의 화합물을 포함하는 텔로머라제 억제제는 초기 암의 수술적 제거, 화학요법제 및 방사능 치료를 포함하는 기타 암 치료 접근법과 결합하여 사용될 수도 있다.

치료적 적용을 위해, 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 치료적으로 유효한 양으로 제형된다. 하나 이상의 본 화합물(예를 들어, 상이한 L 또는 O 성분을 가짐)이 어떤 주어진 제형으로 포함될 수도 있다. 약학적 담체는 고체 또는 액체일 수도 있다. 액체 담체는 용액, 에멀젼, 혼탁액 및 가압 조성물의 제조에서 사용될 수 있다. 화합물은 약학적으로 허용가능한 액체 부형제 중에 용해 또는 혼탁된다. 올리고뉴클레오티드 제조물의 비경구 투여를 위한 액체 담체의 적당한 예는 물(첨가제를 함유할 수도 있음, 예를 들어, 셀룰로스 유도체, 바람직하게는 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스 용액), 인산 완충 식염수(PBS), 알콜(단일 수소 알콜 및 다중 수소 알콜을 포함, 예를 들어, 글리콜) 및 그들의 유도체, 및 오일(예를 들어, 분별된 코코넛 오일 및 아라키스 오일)을 포함한다. 액체 담체는 다음을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 다른 적당한 약학적 첨가제를 함유할 수 있다: 용해제, 혼탁제, 유화제, 완충제, 농후화제, 색소, 점도 조절제, 보존제, 안정화제 및 삼투압 조절제.

화합물의 비경구 투여를 위해, 담체는 또한 올레산 에틸 및 미리스트산 이소프로필과 같은 오일 에스테르일 수 있다. 비경구 투여를 위한 멸균 액체 형태 조성물에서 멸균 담체가 유용하다.

멸균 액체 약학적 조성물, 용액 또는 혼탁액이 예를 들어, 복막내 주사, 피하 주사, 정맥 내, 또는 국소적으로 이용될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 또한 혈관내로 또는 혈관 스텐트(stent)를 통해 투여될 수 있다.

감압 조성물을 위한 액체 담체는 할로겐화 탄화수소 또는 다른 약학적으로 허용가능한 추진제일 수 있다. 이러한 감압화 조성물은 또한 흡입을 통한 송달을 위해 캡슐화 된 지질일 수도 있다. 비내 또는 기관지내 흡입 또는 쥐입에 의한 투여를 위해, 올리고뉴클레오티드는 수성 또는 부분적으로 수성 용액으로 제형될 수도 있으며, 후속하여 이것을 에어로졸 형태로 이용할 수도 있다.

화합물은 전형적으로 활성 화합물을 함유하는 약학적으로 허용가능한 비히클을 포함하는 제제에 의해, 용액, 크림, 또는 로션으로서 투여될 수도 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 분말 또는 미립자의 제형, 및 물 또는 비-수성 매질 중 혼탁액 또는 용액과 같은 것을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 어떤 허용가능한 투여량으로 경구 투여될 수도 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물 및/또는 제형은 담체, 윤활제, 희석제, 농후화제, 향미제, 유화제, 분산 보조 또는 결합제를 포함할 수도 있다. 경구 사용을 위한 정제의 경우에, 공통적으로 사용되는 담체는 락토스 및 콘 스타치를 포함한다. 스테아르산 마그네슘과 같은 윤활제가 또한 전형적으로 첨가된다. 캡슐 형태의 경구 투여를 위해, 유용한 희석제는 락토스 및 콘 스타치를 포함한다. 수성 혼탁액이 경구 사용을 위해 필요한 경우, 활성 성분이 유화제 및 혼탁제와 함께 조합된다. 또한, 원한다면, 특정한 감미제, 향미제 또는 색소제를 첨가할 수도 있다.

본 발명의 화합물이 세포 및 조직 침투에 대하여 탁월한 특성을 갖는 반면, 그들은 예를 들어, 리포좀 담체 내에 훨씬 큰 이득을 제공하도록 제형될 수도 있다. 세포 흡수를 촉진하기 위한 리포좀의 사용이 예를 들어, 미국 특허 제 4,897,355 및 미국 특허 제 4,394,448호에서 설명되어 있다. 수많은 문헌들이 리포좀의 제형 및 제조를 설명한다. 화합물은 또한 지방산 및 그들의 유도체를 포함하여, 상기 설명되는 지질 부분의 비결합된 형태와 같이, 추가의 침투 증강제와 함께 혼합함으로써 제형될 수 있다. 예는 올레산, 라우르산, 카프르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 디카프레이트, 트리카프레이트, 레신리에이트, 모노올레인(a.k.a. 1-모노올레오일-락-글리세롤), 디라우린, 카프릴산, 아리키돈산,

글리세릴 1-모노카프레이트, 1-도데실라자시클로헵탄-2-온, 아실카르니틴, 아실콜린, 모노- 및 디-글리세리드 및 약학적으로 허용가능한 그것의 염(즉, 올레이트, 라우레이트, 카프레이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 리놀레이트 등)을 포함한다.

하나 이상의 침투 강화제를 포함하는 착체 제형이 이용될 수도 있다. 예를 들어, 담즙 염이 착체 제형을 만들기 위한 지방산과 조합하여 사용될 수도 있다. 전형적인 조합은 일반적으로 약 0.5 내지 5%의 농도에서 사용된 나트륨 카프레이트 또는 나트륨 라우레이트와 조합하여, 일반적으로 약 0.5 내지 2%의 농도에서 사용된 케노데옥시콜산(CDCA)을 포함한다.

본 발명의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물 및/또는 제형은 또한 키클레이트제, 계면활성제 및 비-계면활성제를 포함할 수도 있다. 키클레이트제는 디소디움 에틸렌디아민테트라아세테이트(EDTA), 시트르산, 살리실산(예를 들어, 살리실산 나트륨, 5-메톡시살리실산 및 호모바닐레이트), 콜라겐의 N-아실 유도체, 라우레쓰-9 및 베타-디캐톤의 N-아미노 아실 유도체(에나민)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 계면활성제는 예를 들어, 황산 라우릴 나트륨, 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르 및 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에테르; 및 FC-43과 같은 퍼플루오르계 에멀젼을 포함한다. 비-계면활성제는 예를 들어, 불포화 환형 요소, 1-알킬- 및 1-알케닐아자시클로-알카논 유도체, 및 디클로페닐 나트륨, 인도메타신 및 페닐부타존과 같은 비-스테로이드계 항-염증성 제제를 포함한다.

따라서, 본 발명의 다른 양태에서, 약학적 조성물을 제조하는 방법에 제공되는에, 상기 방법은 본원에서 설명된 바와 같은 화합물을 제공하는 것, 및 약학적으로 허용가능한 부형제와 함께 화합물을 조합하는 것을 포함한다. 바람직하게, 화합물을 하기 정의되는 바와 같이, 약학적 순도로 제공된다. 방법은 화합물에, 부형체의 첨가 전 또는 후에, 침투 강화제를 첨가하는 것을 더 포함할 수도 있다.

약학적 조성물은 전형적으로 약학적 순도 표준을 따를 것이다. 약학적 제조물에서 활성 성분으로서 사용하기 위해, 본 발명의 화합물은 일반적으로 그들이 제조되는 혼합물에 존재하는 다른 활성 또는 잠재적으로 면역원성 성분과 따로 떨어져서 정제된다. 전형적으로, 약학적 정제를 달성하기 위해 핵산-기재 화합물이 활성 성분인 곳에서, 활성 성분은 작용 분석법, 크로마토그래피, 또는 겔 전기천공법에 의해 결정되는 바와 같이, 적어도 약 50% 동일성, 및 더 바람직하게는 60%, 70%, 80% 또는 90% 동질성으로 제공된다. 후속하여 활성 성분은 약학적 제조물의 제조를 위해 일반적으로 허용되는 과정에 따라서 약제에 혼합된다. 따라서, 본 발명에서, 약학적 순도로 화합물을 제공하는 것은 화합물이 적어도 약 50% 동질성, 및 더 바람직하게는 적어도 80% 또는 90% 동질성으로 제공되는 것을 요구한다.

또한, 약학적 조성물은 단일 투약 또는 복합-투약 단위로 분취 및 패키징될 것이다. 올리고뉴클레오티드 화합물을 이용한 치료를 위한 투여 요건은 사용되는 특정 조성물, 투여의 루트, 존재하는 증상의 심각도, 화합물의 형태 및 치료되는 특정 피험체에 의해 변화한다.

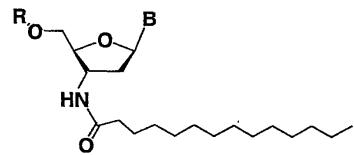
본 발명의 약학적 조성물은 제형으로 및 임상적으로 바람직한 결과를 달성하기에 효과적이 양으로 피험체에 투여될 수 있다. 암의 치료를 위해, 바람직한 결과는 종양 부피의 감소(촉진 또는 영상에 의해 결정되는 바와 같음; 예를 들어, X선 촬영, 방사성뉴클레오티드 스캔, CAT 스캔, 또는 MRI), 종양 성장률의 감소, 전이 형성률의 감소(예를 들어, 생검 표본의 조직학적 분석에 의해 결정되는 바와 같음), 생화학적 마커의 감소(ESR과 같은 일반적 마커, 및 혈청 PSA와 같은 종양-특이적 마커를 포함), 및 삶의 질의 질의 개선(임상적 평가에 의해 결정되는 바와 같음, 예를 들어, Karnofsky 스코어), 진행에 대한 감소된 시간, 무질병 생존 및 총 생존을 포함한다.

이러한 효과를 달성하기 위해 요구되는 투약 당 화합물의 양 및 투약의 수는 질병 징후, 치료되는 환자의 특성 및 투여의 방식을 포함하는 많은 인자들에 따라서 변화할 것이다. 전형적으로, 투여의 제형 및 루트는 1 μM 내지 1 nM의 화합물의 질병 부위에서의 국소 농도를 제공할 것이다.

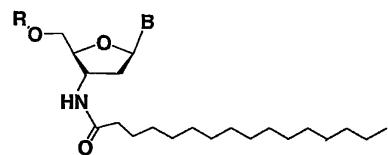
일반적으로, 화합물은 어떤 유해하거나 해로운 부작용을 야기하지 않는 유효한 결과를 제공하는 농도로 투여된다. 이러한 농도는 단일 단위 투약의 투여에 의해, 또는 하루를 통하여 적당한 간격으로 편리한 하위단위로 나뉘어진 투여량의 투여에 의해 달성될 수 있다.

## 도면

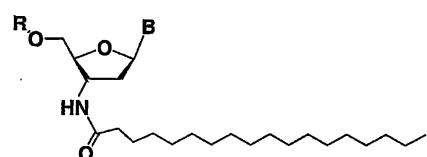
## 도면 1A



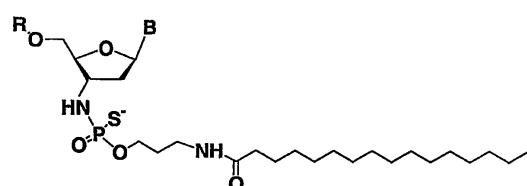
도면1B



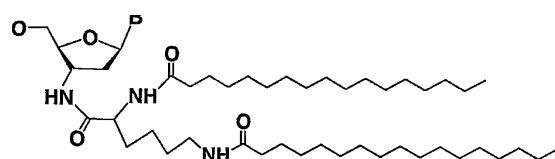
도면1C



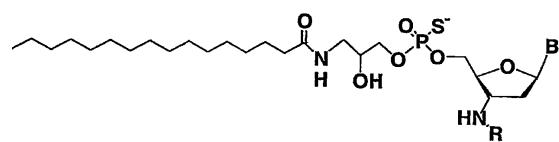
도면1D



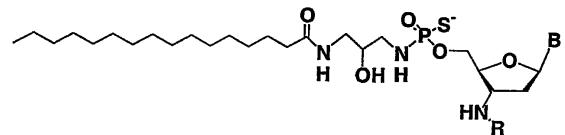
도면1E



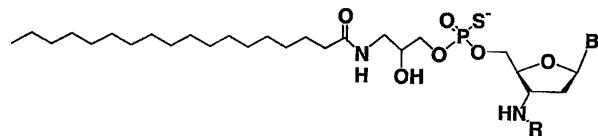
도면 1F



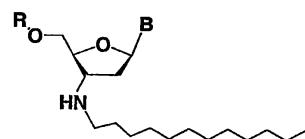
도면1G



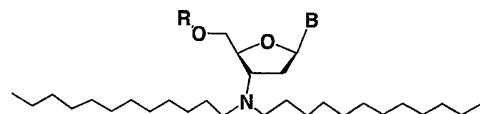
도면1H



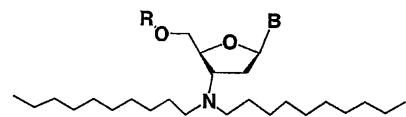
도면1I



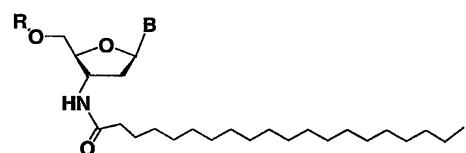
도면1J



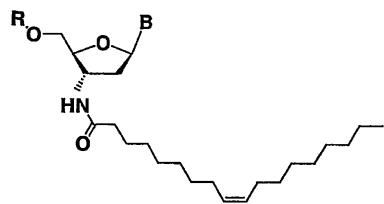
도면1K



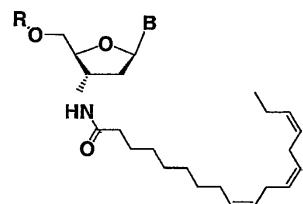
도면1L



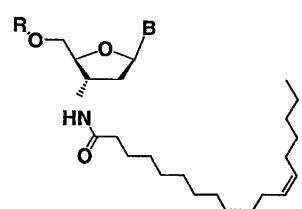
## 도면1M



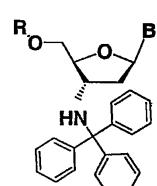
## 도면1N



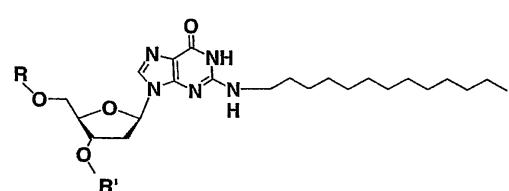
## 도면1O



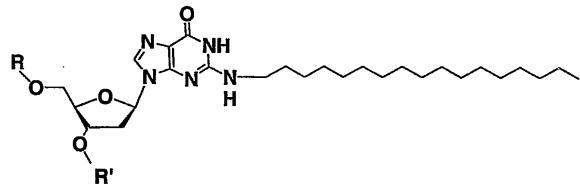
## 도면1P



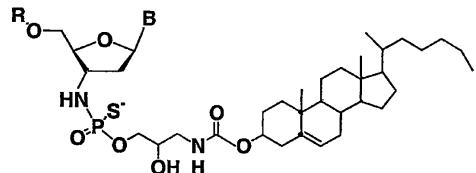
## 도면1Q



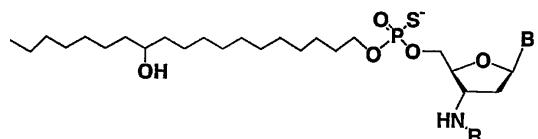
도면1R



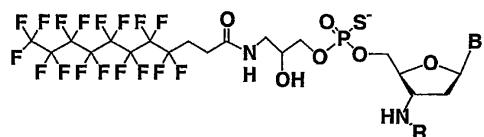
도면1S



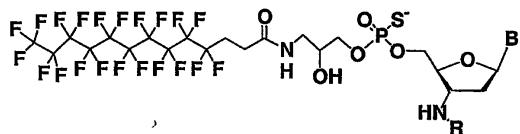
도면1T



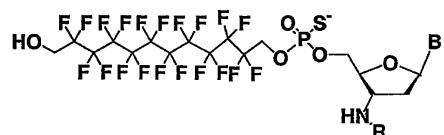
도면1U



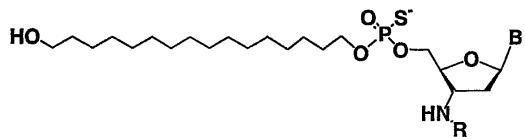
도면1V



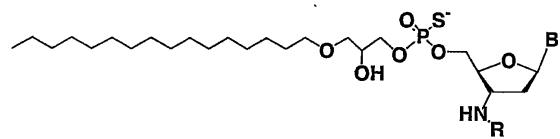
도면1W



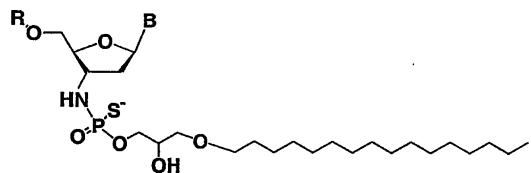
도면1X



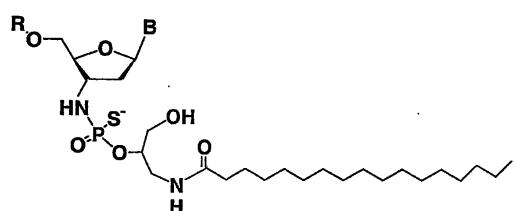
도면1Y



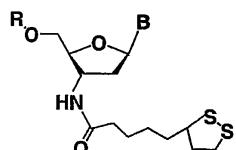
도면1Z



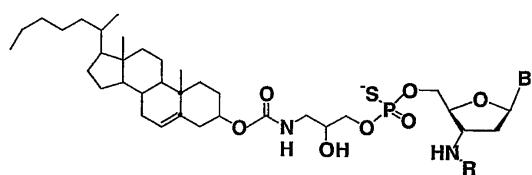
도면1AA



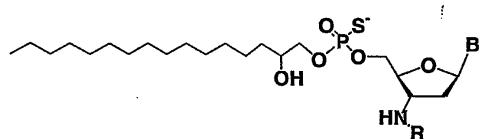
도면1BB



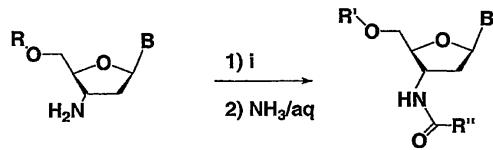
도면1CC



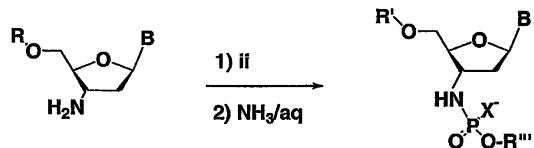
도면1DD



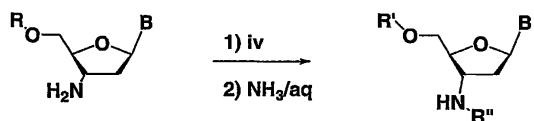
## 도면2A



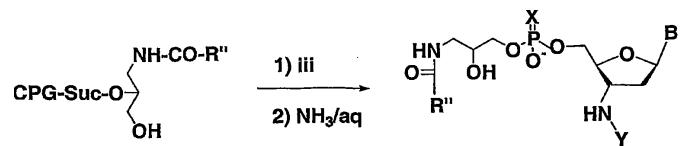
## 도면2B



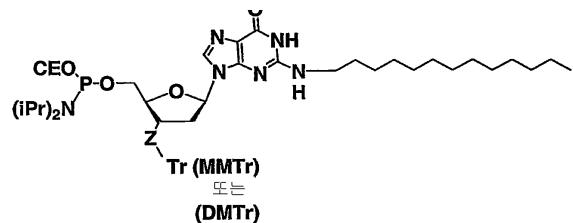
## 도면2C



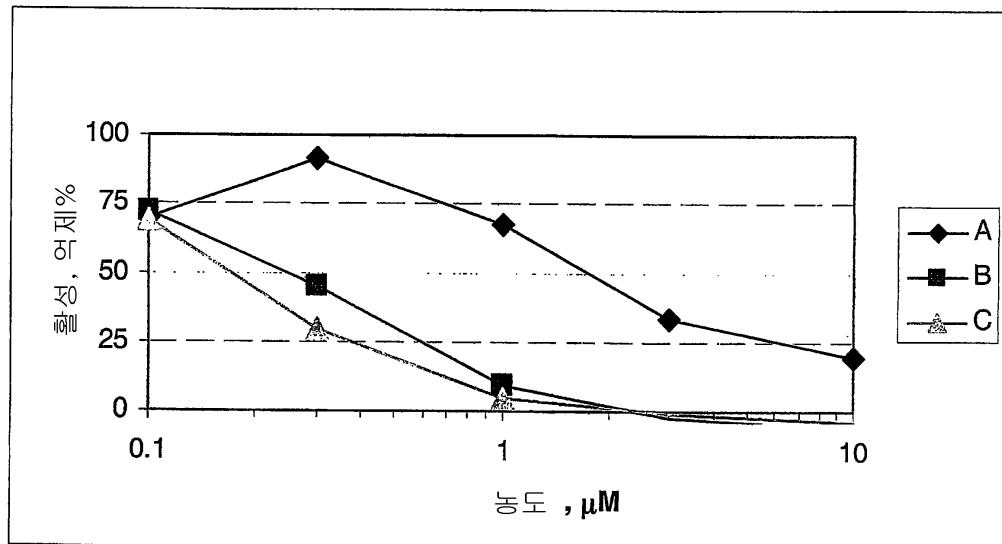
## 도면2D



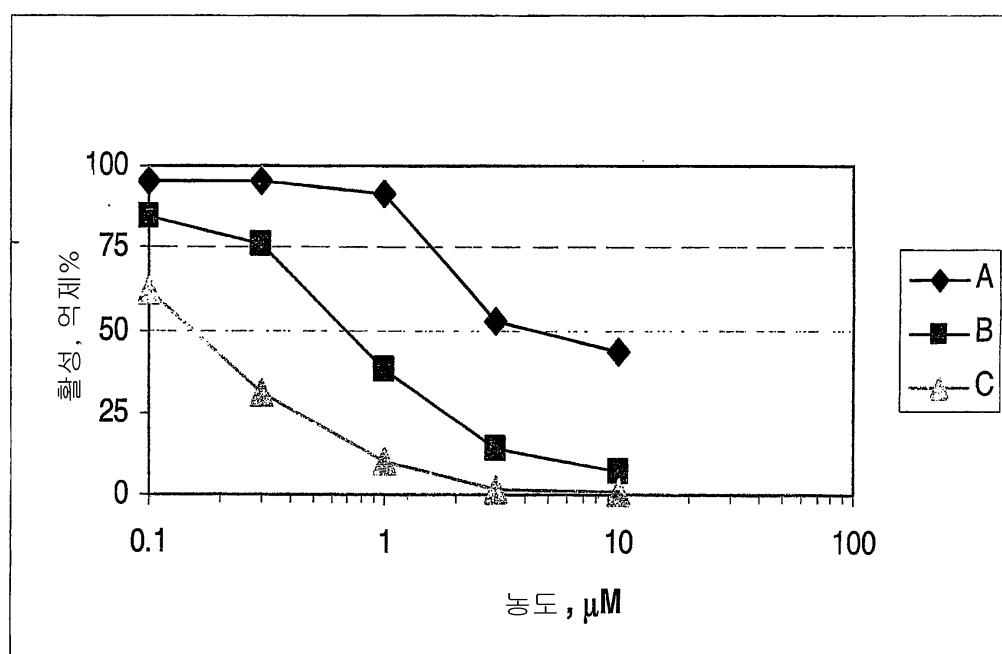
## 도면2E



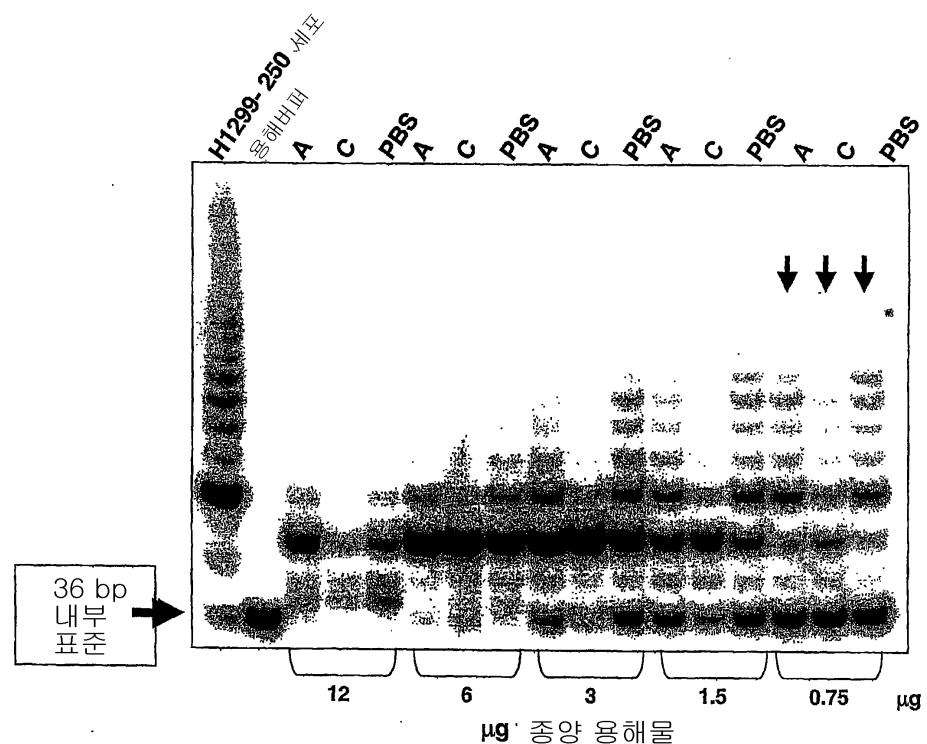
도면3



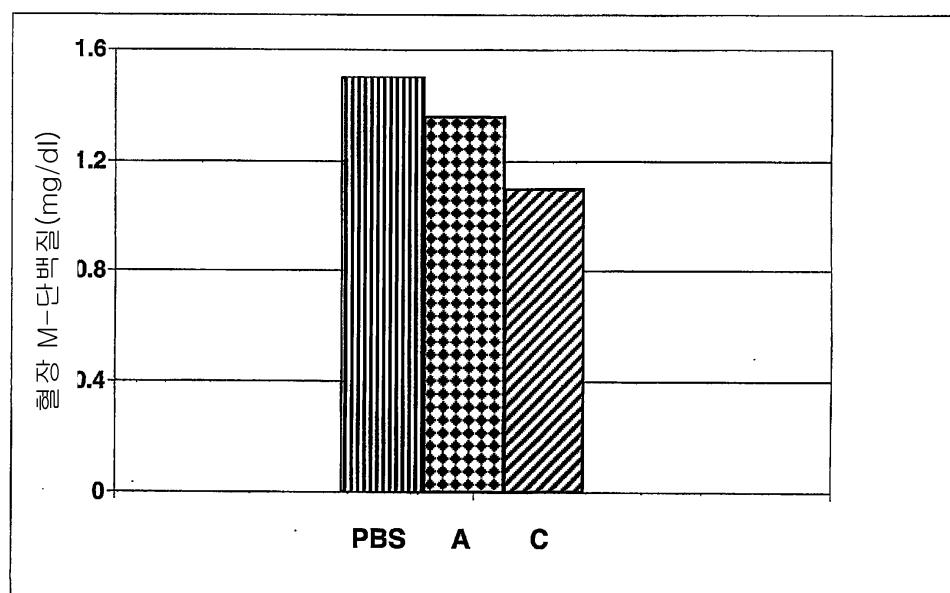
도면4



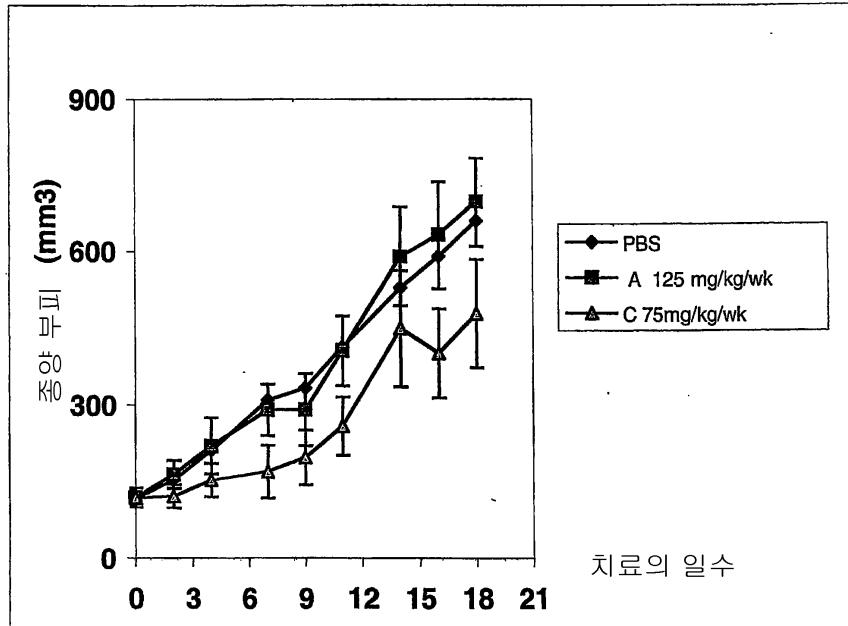
도면5



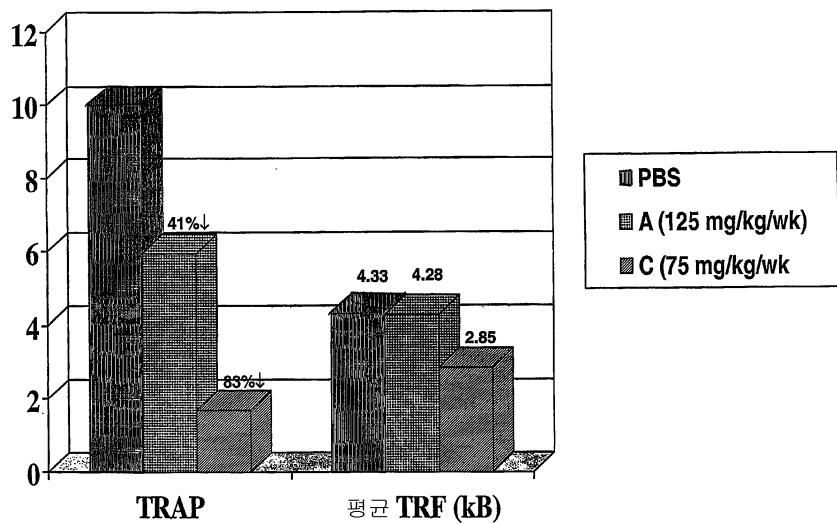
도면6



도면7



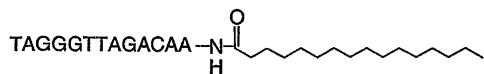
도면8



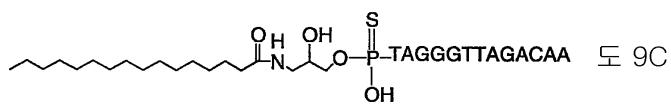
## 도면9

TAGGGTTAGACAA

도 9A



도 9B



59C

## 서열목록

&lt;110&gt; GERON CORPORATION

&lt;120&gt; MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES FOR TELOMERASE INHIBITION

&lt;150&gt; 60/501,509

&lt;151&gt; 2003-09-09

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; KopatentIn 1.71

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 451

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

ggguugcgga gggugggccu gggaggggug guggccauuu uuugucuaac ccuaacugag 60

aagggcguag gcgcgcugcu uuugcucccc gcgcgcuguu uuucucgcug acuuucagcg 120

ggcgaaaaag ccucggccug ccgcuuccca ccguucauuc uagagcaaac aaaaaauguc 180

agcugcuggc ccguucgccc cucccgaaaa ccugcgccgg gucgccugcc cagccccgaa 240

accccgccug gaggccgcgg ucggcccgaa gcuucuccgg aggccaccac ugccaccgcg 300

aagaguuggg cucugucagc cgccggucuc ucggggggcga gggcgaggua caggccuuuc 360

aggccgcagg aagaggaacg gagcgagucc ccgcgcgcgg cgcgauuccc ugagcugugg 420

gacgugcacc caggacucgg cucacacaug c 451