



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월10일

(11) 등록번호 10-2348240

(24) 등록일자 2022년01월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6886 (2018.01) A61K 31/7088 (2006.01)  
G01N 33/533 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12Q 1/6886 (2022.01)  
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7031441(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년11월27일  
심사청구일자 2020년11월04일
- (85) 번역문제출일자 2020년10월30일
- (65) 공개번호 10-2020-0128446
- (43) 공개일자 2020년11월12일
- (62) 원출원 특허 10-2015-7017235  
원출원일자(국제) 2013년11월27일  
심사청구일자 2018년11월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/072302
- (87) 국제공개번호 WO 2014/085632  
국제공개일자 2014년06월05일
- (30) 우선권주장  
61/732,263 2012년11월30일 미국(US)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
Cancer Res, 65(17): 7866-7873 (2005.09.01.)\*  
PLOS ONE, 5(2): e9132 (2010.05.09.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
제론 코포레이션  
미국, 캘리포니아 94404, 포스터 시티, 스위트  
250, 힐스테일 블러버드, 919 이.
- (72) 발명자  
바셋 에카테리나  
미국 캘리포니아 95033 로스 가토스 나일스 로드  
15945  
버링턴 바트  
미국 캘리포니아 94619 오클랜드 킹우드 로드 1  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 7 항

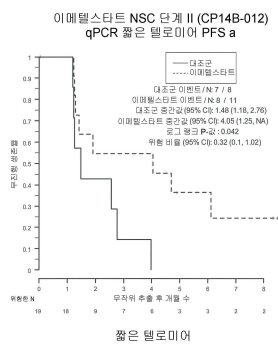
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 텔로머라제 억제자로 세포 증식성 질환 치료용 진단 마커

## (57) 요약

텔로머라제 억제자 화합물로의 치료로부터 이익을 얻는, 세포 증식성 질환으로 진단된 개체를 확인하는 방법이 본원에서 제공된다. 또한 텔로머라제 억제자 화합물로 이 개체들을 치료하는 방법이 본원에서 제공된다. 방법은 상기 개체의 암 세포에서 텔로미어의 평균 상대적 길이에 기초한 상기 치료로부터 이익을 얻는 개체를 확인하는 단계를 포함한다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

**G01N 33/533** (2013.01)

*C12Q 2600/106* (2013.01)

*C12Q 2600/156* (2013.01)

(72) 발명자

**왕 휘**

미국 캘리포니아 94087 서니베일 벨빌 웨이 1684

**앵 케빈**

미국 캘리포니아 94043 마운틴 뷰 시에라 비스타  
애비뉴 #2 509

(30) 우선권주장

13/802,035 2013년03월13일 미국(US)

61/780,851 2013년03월13일 미국(US)

61/798,478 2013년03월15일 미국(US)

61/809,228 2013년04월05일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

암으로 진단되거나 암에 걸린 것으로 의심되는 개체를 치료하기 위한, 텔로머라제 억제자를 포함하는 약학적 조성물로서,

상기 암은 비소세포 폐암(NSCLC)이고;

상기 텔로머라제 억제자는 이메텔스타트이고;

상기 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 평균 상대적 텔로미어 길이는 하나 이상의 알려진 기준으로부터 결정된 상대적 텔로미어 길이의 50번째 백분위수 이하에 있고;

여기서, (i) 상기 하나 이상의 알려진 기준은 복수의 개체의 복수의 자연 발생한 종양으로부터 확립된 텔로미어 길이 범위이고, 상기 복수의 자연 발생한 종양의 암 세포는 암으로 진단된 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포와 같은 타입이며; 또는 (ii) 상기 하나 이상의 알려진 기준은 특성화된 세포주인;

약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1 항에 있어서, 상기 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로미어 길이는 상기 상대적 텔로미어 길이 범위의 40번째 백분위수, 35번째 백분위수, 30번째 백분위수, 25번째 백분위수, 20번째 백분위수, 15번째 백분위수, 10번째 백분위수, 또는 5번째 백분위수 이하에 있는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 약학적으로 허용되는 첨가제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 상기 평균 상대적 텔로미어 길이는 qPCR, telo-FISH, 또는 서던 블롯에 의해 결정되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 상기 특성화된 세포주는 A549 세포인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 6

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 상기 특성화된 세포주는 제1 항의 생물학적 샘플의 타입을 대표하는 세포주로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 7

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 상기 특성화된 세포주는 비소세포 폐암 세포주인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2012년 11월 30일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/732,263호, 2013년 3월 13일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/780,851호, 2013년 3월 13일 출원된 미국 특허 출원 번호 제13/802,035호, 2013년 3월 15일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/798,478호 및 2013년 4월 5일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/809,228호에 대한 우선권을 주장하며 이 개시물들은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 텔로머라제 억제자 화합물로의 치료로부터 이익을 얻는, 암에 걸리거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 확인하는 방법, 뿐만 아니라 이 개체들을 치료하는 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0005] 암은 전세계적으로 주된 사망의 원인이다. 화학 요법 분야의 상당한 발전에도 불구하고, 가장 널리 퍼져있는 형태의 암 중 다수는 화학 요법의 개입에 여전히 저항하고 있다.

[0006] 텔로미어(telomere)는 진핵생물 유기체의 선형 염색체의 끝에 존재하는 반복 핵산 서열이다. 텔로미어 서열은,

텔로미어-결합 단백질과 함께, 염색체에 안정성을 부여한다. 텔로미어는 일반적으로 유기체에 특정한 텔로머라제 효소에 의해 명시된 반복 서열 유닛과 함께 짧은 탠덤(tandem) 반복 영역으로 구성된다. 다양한 유기체에 대한 텔로미어 반복 서열이 알려져 있다. 인간 텔로미어 반복 서열 유닛은 (TTAGGG)<sub>n</sub>이다. 이중 가닥 반복 서열 이외에, 일부 텔로미어의 3' 끝은 단일-가닥 영역을 함유하는데, 인간에서 이것은 G 풍부 가닥 상에 위치한다.

[0007] 텔로머라제는 텔로머 DNA를 합성하는 리보단백질이다. 텔로머라제의 부재 시, 텔로미어는 점점 짧아지는데 DNA 폴리머라제가 선형 듀플렉스(duplex) DNA의 끝을 복제할 수 없기 때문이다. 텔로미어의 점진적 단축은 궁극적으로 세포 주기 정지(cell cycle arrest) 또는 세포사(cell death)로 이어진다. 인간에서, 세포의 텔로미어 길이의 의존적 사멸은 출생 전 정상 체세포의 텔로머라제 억제, 출생 시 및 일생 동안의 초기 텔로미어 길이, 및 간세포 또는 줄기 세포에서 엄격하게 조절된 텔로머라제의 발현 때문에 발생한다. 인간은 "전장(full length)" 텔로미어를 가지고 태어난다. 텔로머라제가 체세포 조직에서 하향-조절됨에 따라, 이것은 세포 연령 및 역연령(chronological age)에 따른 텔로머 DNA의 손실로 이어진다. 따라서 텔로미어는 유사분열 시계의 역할을 하며, 정상 인간 세포 상에서의 분열에 대하여 제한된 능력을 부여한다. 짧은 텔로미어는 줄기 세포의 증식하는 능력을 손상시킨다. 예를 들어, 상피 줄기 세포에서 짧은 텔로미어는 피부 및 머리카락 성장을 손상시킨다.

[0008] 암 세포는 일반적으로 반복된 라운드의 세포 분열을 겪고 안정하지만, 정상 세포보다 더 짧은 텔로미어를 갖는다. 텔로머라제 활성화는 대부분의 암 세포가 무기한으로 복제하는데 필수적이며, 그것은 종양 성장 및 전이를 가능하게 한다 (Kim et al., Science 266: 2011-2015; Shay JW and Wright WE., Carcinogenesis 26: 867-74 (2005)). 따라서, 텔로머라제의 억제는 다양한 고체 종양 타입 및 혈액학적 악성 종양에 대한 유망한 치료 전략으로 간주된다 (Harley CB, Nature Rev. Cancer, 8: 167-179 (2008)).

[0009] 불행하게도, 많은 암 환자들은 세포 독성 약제 또는 텔로머라제 억제자와 같은 표적화된 치료법으로부터 이익을 얻지 못하지만, 여전히 그것들의 독성 효과에 노출되어 있다. 이러한 이유로, 이 치료법들의 치료에 바람직하게 반응하는 암 환자를 확인하는 새로운 방법이 시급히 필요하다.

[0010] 본 명세서를 통해, 다양한 특허, 특허 출원 및 다른 타입의 간행물 (예를 들어, 학술지 논문)이 참조된다. 본원에서 인용된 모든 특허, 특허 출원, 및 간행물의 개시물은 모든 목적을 위해 전문이 본원에 참고로 포함된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본원에서 제공된 본 발명은, 그 중에서도, 텔로머라제 억제자 요법으로의 치료로부터 이익을 얻는 개체를 확인하는 방법 및 같은 것을 치료하는 방법을 개시한다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 따라서, 한 양태에서, 텔로머라제 억제자로의 치료로부터 이익을 얻는, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 선택하는 방법이 본원에서 제공되는데, 방법은 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로머 핵산의 상대적 길이를 분석함으로써 상대적 텔로미어 길이를 결정하는 단계; 및 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 평균 상대적 텔로미어 길이가 하나 이상의 알려져 있는 기준으로부터 결정된 상대적인 텔로미어 길이 범위의 50번째 백분위수 또는 미만에 있는 것으로 결정될 때 텔로머라제 억제자로의 치료로부터 이익을 얻는 개체를 선택하는 단계를 포함한다. 본원에서 개시된 구체예 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본원에서 개시된 구체예 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 텔로머라제의 RNA 구성요소에 상보성이다. 본원에서 개시된 구체예 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 길이가 10-20개의 염기쌍이다. 본원에서 개시된 구체예 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열 TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3)를 포함한다. 본원에서 개시된 구체예 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 N3' → P5' 티오포스포르아미데이트 뉴클레오타이드 간 결합을 포함한다. 본원에서 개시된 구체예 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 N3' → P5' 티오포스포르아미데이트 뉴클레오타이드 간 결합을 포함한다. 본원에서 개시된 구체예 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 끝에 결합된 지질 모이어티(moiety)를 포함한다. 본원에서 개시된 구체예 중 어느 것의 일부 구체예에서, 지질 모이어티는 결합자를 통해 올리고뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 끝에 결합된다. 본원에서 개시된 구체예 중 어느 것의 일부 구체예에서, 결합자는 글리세롤 또는 아미노글리세롤 결합자이다. 본원에서 개시된 구체예 중 어느 것의 일부 구체예에서, 지질 모이어티는 팔미토일 (C16) 모이어티이다. 본원에서 개시된 구체예 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자

는 이메텔스타트(Imetelstat)이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 암은 소세포 폐암(small cell lung cancer), 유방암(breast cancer), 전립선암(prostate cancer), 또는 혈액암(hematological cancer)이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자의 투여는 감소된 암 세포 증식 및/또는 종양 성장을 초래한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자의 투여는 개체에서 증가된 무진행 생존율(progression free survival)을 초래한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 약학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 투여된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 경구, 정맥 내, 피하, 근육 내, 국소, 복강 내, 비강 내, 흡입, 종양 내, 또는 안 내 투여용으로 제형화된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자의 치료적 유효량의 투여는 하나 이상의 암 세포를 텔로머라제 억제자와 접촉시키는 것을 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자의 치료적 유효량의 투여는 감소된 세포 증식, 증가된 세포 사멸(apoptosis), 또는 세포 노화(senescence) 중 하나 이상을 초래한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 방법은 하나 이상의 추가적인 암 치료제의 치료적 유효량을 개체에 투여하는 단계를 더 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 평균 텔로미어 길이는 qPCR, telo-FISH, 또는 서던 블롯(Southern Blot)으로 결정된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 개체는 인간이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 알려진 기준은 특성화된 세포주이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 세포주는 M14Me1-세포, A549 세포, SK-Mel-5 세포, 및 Ovar-5 세포로 구성된 군으로부터 선택된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 특성화된 세포주는 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 생물학적 샘플의 타입을 대표하는 세포주로부터 선택된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 특성화된 세포주는 비소세포 폐암 세포주, 간세포 세포주, 또는 난소 세포주이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 상기 알려져 있는 기준 중 하나 이상은 복수의 개체의 복수의 자연 발생한 종양으로부터 확립된 텔로미어 길이 범위이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 복수의 자연 발생한 종양의 상기 암세포는 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포와 같은 타입이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포의 텔로미어 길이는 텔로미어 길이 범위의 40번째 백분위수, 35번째 백분위수, 30번째 백분위수, 25번째 백분위수, 20번째 백분위수, 15번째 백분위수, 10번째 백분위수, 5번째 백분위수에 있거나, 또는 미만인 것으로 결정된다.

[0013] 또 다른 양태에서, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 치료하는 방법이 본원에서 제공되는데, 방법은 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로머 핵산의 상대적인 길이를 분석함으로써 상대적인 텔로미어 길이를 결정하는 단계; 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 평균 상대적 텔로미어 길이가 하나 이상의 알려진 기준으로부터 결정된 상대적 텔로미어 길이의 50번째 백분위수 또는 미만에 있는 것으로 결정될 때 텔로머라제 억제자로의 치료로부터 이익을 얻는 개체를 선택하는 단계; 및 텔로머라제 억제자의 치료적 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 텔로머라제의 RNA 구성요소에 상보성이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 길이가 10-20개의 염기쌍이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열 TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3)를 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 N3' → P5' 티오포스포르아미데이트 뉴클레오시드 간 결합을 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 N3' → P5' 티오포스포르아미데이트 뉴클레오시드 간 결합을 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 끝에 결합된 지질 모이어티를 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 지질 모이어티는 결합자를 통해 올리고뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 끝에 결합된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 지질 모이어티는 팔미토일 (C16) 모이어티이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 이메텔스타트이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 암은 소세포 폐암, 유방암, 전립선암, 또는 혈액암이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자의 투여는 감소된 암 세포 증식 및/또는 종양 성장을 초래한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자의 투여개체에서 증가된 무진행 생존율을 초래한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 약학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 투여된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 경구, 정맥 내, 피하, 근육 내, 국소, 복강 내, 비강 내, 흡입, 종양 내, 또는 안 내 투여용으로 제형화된다. 본원에서 개시된



구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 텔로머라제 억제자의 치료적 유효량의 투여는 하나 이상의 암 세포를 텔로머라제 억제자와 접촉시키는 것을 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 텔로머라제 억제자의 치료적 유효량의 투여 감소된 세포 증식, 증가된 세포 사멸, 또는 세포 노화 중 하나 이상을 초래한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 방법은 하나 이상의 추가의 암 치료제의 치료적 유효량을 개체에 투여하는 단계를 더 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 평균 텔로미어 길이는 qPCR, telo-FISH, 또는 서던 블롯으로 결정된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 개체는 인간이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 상기 하나 이상의 알려진 기준은 특성화된 세포주이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 세포주는 M14Me1-세포, A549 세포, SK-Mel-5 세포, 및 Ovar-5 세포로 구성된 군으로부터 선택된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 특성화된 세포주는 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 생물학적 샘플의 타입을 대표하는 세포주로부터 선택된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 특성화된 세포주는 비소세포 폐암 세포주, 간세포 세포주, 또는 난소 세포주이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 상기 알려져 있는 기준 중 하나 이상은 복수의 개체의 복수의 자연 발생한 종양으로부터 확립된 텔로미어 길이 범위이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 상기 복수의 자연 발생한 종양의 암세포는 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포와 같은 타입이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로미어 길이는 텔로미어 길이 범위의 40번째 백분위수, 35번째 백분위수, 30번째 백분위수, 25번째 백분위수, 20번째 백분위수, 15번째 백분위수, 10번째 백분위수, 5번째 백분위수에 있거나, 또는 미만인 것으로 결정된다.

[0014]

다른 양태에서, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 치료하는 방법이 본원에서 제공되는데, 방법은 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 평균 상대적 텔로미어 길이가 하나 이상의 알려진 기준으로부터 결정된 상대적 텔로미어 길이의 50번째 백분위수 또는 미만에 있는 것으로 결정될 때 텔로머라제 억제자의 치료적 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 텔로머라제 억제자는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 올리고뉴클레오타이드는 텔로머라제의 RNA 구성요소에 상보성이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 올리고뉴클레오타이드는 길이가 10-20개의 염기쌍이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열 TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3)를 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 N3' → P5' 티오포스포라미데이트 뉴클레오시드 간 결합을 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 올리고뉴클레오타이드는 N3' → P5' 티오포스포라미데이트 뉴클레오시드 간 결합을 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 끝에 결합된 지질 모이어티를 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 지질 모이어티는 결합자를 통해 올리고뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 끝에 결합된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 결합자는 글리세롤 또는 아미노글리세롤 결합자이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 지질 모이어티는 팔미토일 (C16) 모이어티이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 텔로머라제 억제자는 이메텔스타트이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 암은 소세포 폐암, 유방암, 전립선암, 또는 혈액암이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 텔로머라제 억제자의 투여는 감소된 암 세포 증식 및/또는 종양 성장을 초래한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 텔로머라제 억제자의 투여는 개체에서 증가된 무진행 생존율을 초래한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 텔로머라제 억제자는 약학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 투여된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 텔로머라제 억제자는 경구, 정맥 내, 피하, 근육 내, 국소, 복강 내, 비강 내, 흡입, 종양 내, 또는 안 내 투여용으로 제형화된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 텔로머라제 억제자의 치료적 유효량의 투여는 하나 이상의 암 세포를 텔로머라제 억제자와 접촉시키는 것을 포함한다. 억제자. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 텔로머라제 억제자의 치료적 유효량의 투여는 감소된 세포 증식, 증가된 세포 사멸, 또는 세포 노화 중 하나 이상을 초래한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 방법은 방법은 하나 이상의 추가의 암 치료제의 치료적 유효량을 개체에 투여하는 단계를 더 포함한다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 평균 텔로미어 길이는 qPCR, telo-FISH, 또는 서던 블롯으로 결정된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 개체는 인간이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 상기 하나 이상의 알려진 기준은 특성화된 세포주이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 세포주는 M14Me1-세포, A549 세포, SK-Mel-5 세포, 및 Ovar-5 세포로 구성된 군으로부터 선택된다. 본원

에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 특성화된 세포주는 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 생물학적 샘플의 타입을 대표하는 세포주로부터 선택된다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서 특성화된 세포주는 비소세포 폐암 세포주, 간세포 세포주, 또는 난소 세포주이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 상기 알려져 있는 기준 중 하나 이상은 복수의 개체의 복수의 자연 발생한 종양으로부터 확립된 텔로미어 길이 범위이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 상기 복수의 자연 발생한 종양의 암세포는 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포와 같은 타입이다. 본원에서 개시된 구체에 중 어느 것의 일부 구체에서, 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로미어 길이는 텔로미어 길이 범위의 40번째 백분위수, 35번째 백분위수, 30번째 백분위수, 25번째 백분위수, 20번째 백분위수, 15번째 백분위수, 10번째 백분위수, 5번째 백분위수에 있거나, 또는 미만인 것으로 결정된다.

## 도면의 간단한 설명

[0015]

도 1a는 실시예 2에서 나타난 바와 같이 정량적 PCR (qPCR)를 사용하여 결정된 평균 텔로미어 길이에 기초한 이메텔스타트 비소세포 (NSC) 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 짧은 텔로미어 부분군 (33 백분위수)의 무진행 생존율 (PFS) 분석을 도시한다.

도 1b는 실시예 2에서 나타난 바와 같이 정량적 PCR (qPCR)를 사용하여 결정된 평균 텔로미어 길이에 기초한 이메텔스타트 비소세포 (NSC) 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 중간-긴 텔로미어 부분군 (상대적 텔로미어 길이의 67%보다 더 김)의 무진행 생존율 (PFS) 분석을 도시한다.

도 2는 가장 짧은 25번째 백분위수의 상대적 텔로미어 길이를 가진 이메텔스타트 비소세포 (NSC) 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 이메텔스타트-처리된 부분에서 15명의 환자의 데이터의 무진행 생존율 (PFS) 분석을 도시한다. 이 환자들 개개의 텔로미어 길이의 분석은 텔로미어 형광 제자리 부합법 (Telomere Fluorescent In Situ Hybridization; Telo-FISH)을 사용하여 실행되었다.

도 3a는 서던 블롯팅에 의해 결정된 바와 같이, 인간 포르말린-고정되고 파라핀-임베딩된 (formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) 종양 세포주 M14Mel, OVCAR-8, A549, SK-Mel-5, MDA-MB-231, MDA-MB435, OVCAR-5, A498 및 CAKI-1에서 말단 제한 단편(TRF)의 길이를 도시한다.

도 3b는 정량적 PCR (qPCR)에 의해 결정된 바와 같이 인간 포르말린-고정되고 파라핀-임베딩된 (FFPE) 종양 세포주 M14Mel, OVCAR-8, A549, SK-Mel-5, MDA-MB-231, MDA-MB435, OVCAR-5, A498 및 Caki-1의 평균 T/S 비율을 도시한다.

도 4a는 서던 블롯팅에 의해 결정된 바와 같이, 인간 포르말린-고정되고 파라핀-임베딩된 (FFPE) 종양 세포주 M14Mel, OVCAR-8, A549, SK-Mel-5, MDA-MB-231, MDA-MB435, OVCAR-5, A498 및 CAKI-1에서 말단 제한 단편 (TRF) 길이를 도시한다.

도 4b는 인간 세포주 M14Mel, A549, SK-Mel-5, 및 OVCAR-5 (OV5)에 대한 Telo-FISH 결과를 도시한다.

도 5는 환자 텔로미어 길이 백분위수에 대하여 플롯팅된(plotted) 이메텔스타트 비소세포 (NSC) 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 환자에 대한 무진행 생존율 (PFS) 위험 비율 (hazard ratio; HR)을 도시하며, 상대적 텔로미어 길이는 정량적 PCR (qPCR)에 의해 결정되었다.

도 6은 환자 텔로미어 길이 백분위수에 대하여 플롯팅된 이메텔스타트 비소세포 (NSC) 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 환자에 대한 무진행 생존율 (PFS) 위험 비율 (HR)을 도시하며, 상대적 텔로미어 길이는 텔로미어 형광 제자리 부합법 (Telo-FISH)에 의해 결정되었다.

도 7은 전향적(prospective) 텔로미어 형광 제자리 부합법 (Telo-FISH) 검정을 사용하여 결정된 상대적 텔로미어 길이에 기초한 이메텔스타트 비소세포 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 114명 환자 모두에 대한 무진행 생존율 (PFS) 분석을 도시한다.

도 8a는 전향적 Telo-FISH 검정을 사용하여 결정된 상대적 텔로미어 길이에 기초한 이메텔스타트 비소세포 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 짧은 텔로미어 부분군 (N=20)의 무진행 생존율 (PFS) 분석을 도시한다.

도 8b는 전향적 Telo-FISH 검정을 사용하여 결정된 상대적 텔로미어 길이에 기초한 이메텔스타트 비소세포 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 중간-긴 텔로미어 부분군 (N=39)의 무진행 생존율 (PFS) 분석을 도시한다.

도 9는 전향적 Telo-FISH 검정을 사용하여 결정된 상대적 텔로미어 길이에 기초한 이메텔스타트 비소세포 폐암



II 단계 (CP14B-012) 연구의 모든 환자 (N=114)에 대한 전체 생존율 (OS) 분석을 도시한다.

도 10a는 전향적 Telo-FISH 검정을 사용하여 결정된 상대적 텔로미어 길이에 기초한 이메텔스타트 비소세포 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 짧은 텔로미어 부분군 (N=20)에 대한 전체 생존율 (OS) 분석을 도시한다.

도 10b는 전향적 Telo-FISH 검정을 사용하여 결정된 상대적 텔로미어 길이에 기초한 이메텔스타트 비소세포 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 중간-긴 텔로미어 부분군 (N=39)에 대한 전체 생존율 (OS) 분석을 도시한다.

도 11a는 실시예 4에서 나타난 바와 같이 정량적 PCR (qPCR)을 사용하여 결정된 평균 텔로미어 길이에 기초한 이메텔스타트 비소세포 (NSC) 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 짧은 텔로미어 부분군 (33 백분위수)의 무진행 생존율 (PFS) 분석을 도시한다.

도 11b는 실시예 4에서 나타난 바와 같이 정량적 PCR (qPCR)을 사용하여 결정된 평균 텔로미어 길이에 기초한 이메텔스타트 비소세포 (NSC) 폐암 II 단계 (CP14B-012) 연구의 중간-긴 텔로미어 부분군 (상대적 텔로미어 길이의 67%보다 더 김)의 무진행 생존율 (PFS) 분석을 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

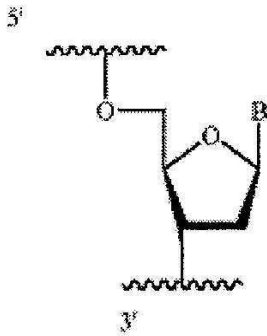
[0016] 본 발명은, 그 중에서도, 텔로머라제 억제자 화합물로의 치료로부터 이익을 얻는, 세포 증식성 질환에 걸린 것으로 의심되거나 이것으로 진단된 개체를 확인하는 방법, 뿐만 아니라 이 개체들을 치료하는 방법을 제공한다. 암 세포에서 텔로미어 길이는 종양마다 다를 수도 있다. 발명자들은 더 긴 텔로미어 길이를 가진 암 세포와 비교하여 더 짧은 텔로미어 길이를 갖는 암 세포가 텔로머라제 억제자 화합물 (예를 들어, 이메텔스타트)의 처리에 더 반응성이라는 것을 관찰하였다. 따라서, 텔로머라제 억제자로의 치료로부터 이익을 얻는, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 선택하는 방법이 본원에서 제공된다. 또한 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 평균 상대적 텔로미어 길이가 하나 이상의 알려진 기준으로부터 결정된 상대적 텔로미어 길이의 50번째 백분위수 또는 미만에 있는 것으로 결정될 때, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 텔로머라제 억제자로 치료하는 방법이 본원에서 제공된다.

### [0017] I. 일반적인 기술

[0018] 본 발명의 실행은, 달리 지시되지 않으면, 당업자에게 잘 알려져 있는, 핵산 화학, 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학, 생화학, 및 면역학의 통상적인 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) 및 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook and Russel, 2001), (본원에서 "Sambrook"으로 공동으로 언급됨); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, 2001년의 부록 포함); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)과 같은 문헌에서 충분히 설명된다. 핵산은 잘 알려져 있는 화학적 합성 기술에 의해 시험관 내(in vitro)에서 합성될 수 있으며, 예를 들어, Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 411-418; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105: 661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 5 25: 3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19: 373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33: 7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68: 90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68: 109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22: 1859; Komberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992); Scheit, 뉴클레오티드 유사체 (John Wiley, New York, 1980); Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews, 90: 543-584, 1990에서 설명된다.

### [0019] II. 정의

[0020] 용어 "뉴클레오타이드"는 하기 나타난 일반적인 구조를 갖는 모이어티를 나타내는데, B는 핵염기를 나타내고 2' 탄소는 하기 설명된 바와 같이 치환될 수 있다. 올리고머 또는 폴리머로 통합될 때, 3' 탄소는 산소 또는 질소 원자에 더 결합된다.



[0021]

[0022]

이 구조는 2'-데옥시 및 2'-히드록실 (즉, 데옥시리보스 및 리보스) 형태, 및 유사체를 포함한다. 드물게, 5'-NH 기는 5'-산소로 치환된다. "유사체"는, 뉴클레오시드에 관하여, 변형된 핵염기 모이어티 (하기 "핵염기"의 정의 참조) 및/또는 2'-플루오로 당과 같은 변형된 당 모이어티, 및 추가의 유사체를 갖는 합성 뉴클레오시드를 포함한다. 이러한 유사체는 전형적으로 결합 성질, 예를 들어, 안정성, 특이성, 등에 영향을 미치도록 설계된다. 용어 뉴클레오시드는, 예를 들어, Komberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992)에서 설명된 바와 같은 2'-데옥시 및 2'-히드록실 형태, 및 유사체를 포함하는, 천연 뉴클레오시드를 포함한다. "유사체"는, 뉴클레오시드에 관하여, 변형된 핵염기 모이어티 (하기 "핵염기"의 정의 참조) 및/또는, 예를 들어, 일반적으로 Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, New York, 1980)에 의해 설명된 변형된 당 모이어티를 가진 합성 뉴클레오시드를 포함한다. 이러한 유사체는 결합 성질, 예를 들어, 안정성, 특이성, 등을 향상시키도록 설계된 합성 뉴클레오시드를 포함하며, Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90: 543-584, 1990에 의해 설명된 바와 같다. 이러한 뉴클레오시드를 함유하고, 전형적으로 합성 뉴클레아제-저항성 뉴클레오시드 간 결합을 함유하는 올리고뉴클레오티드는 그 자체로 "유사체"로 불릴 수도 있다.

[0023]

"폴리뉴클레오티드" 또는 "올리고뉴클레오티드"는 약 2 내지 약 200개의 인접한 서브유닛을 가진 리보스 및/또는 데옥시리보스 뉴클레오시드 서브유닛 폴리머 또는 올리고머를 나타낸다. 뉴클레오시드 서브유닛은 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, P3' → N5' 포스포르아미데이트, N3' → P5' 포스포르아미데이트, N3 → P5' 티오포스포르아미데이트, 및 포스포르오티오에이트 결합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 다양한 서브유닛 간 결합에 의해 결합될 수 있다. 용어는 또한 당업자에게 알려져 있는, 당 (예를 들어, 2' 치환), 염기 (상기 "뉴클레오시드"의 정의 참조), 및 3' 및 5' 말단으로의 변형을 가진 이러한 폴리머 또는 올리고머를 포함한다. 올리고뉴클레오티드 모이어티가 복수의 서브유닛 간 결합을 포함하는 구체예에서, 각 결합은 같은 화학 반응을 사용하여 형성될 수도 있거나, 또는 결합 화학 반응의 혼합물이 사용될 수도 있다. 올리고뉴클레오티드가 "ATGUCCTG"와 같이 문자의 순서로 표시될 때, 뉴클레오티드는 왼쪽에서 오른쪽으로 5' → 3' 순서인 것으로 생각될 것이다. 이 방식으로 올리고뉴클레오티드의 염기 서열의 표시는 올리고뉴클레오티드에서 어떤 특정한 타입의 뉴클레오시드 간 서브유닛의 사용을 나타내는 것은 아니다.

[0024]

"핵염기"는 (i) 원래의 DNA 및 RNA 핵염기 (유라실, 티민, 아데닌, 구아닌, 및 시토신), (ii) 변형된 핵염기 또는 핵염기 유사체 (예를 들어, 5-메틸시토신, 5-브로모유라실, 또는 이노신) 및 (iii) 핵염기 유사체를 포함한다. 핵염기 유사체는 분자 구조가 전형적인 DNA 또는 RNA 염기의 것을 모방하는 화합물이다.

[0025]

용어 "지질"은 본원에서 유기 용매에 녹지만, 물에는, 녹더라도, 조금 녹는 기질을 포함하는 것으로 널리 사용된다. 용어 지질은 탄화수소, 오일, 지방 (예를 들어, 지방산 및 글리세리드), 스테롤, 스테로이드 및 이 화합물들의 파생형을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 지질은 지방산 및 그것들의 유도체, 탄화수소 및 그것들의 유도체, 및 스테롤, 예를 들어, 콜레스테롤이다. 지방산은 보통 직쇄에서 다수의 탄소 원자 (일반적으로 12-24개의 탄소)를 함유하며 포화되거나 포화되지 않을 수도 있고, 다양한 치환기를 함유하거나, 또는 함유하도록 변형될 수 있다. 편의상, 용어 "지방산"은 또한 지방 또는 에스테르와 같은 지방산 유도체를 포함한다. 일부 구체예에서, 용어 "지질"은 또한 지질 및 친수성 모이어티 둘 다를 함유하는 양친매성 화합물을 포함한다.

[0026]

본원에서 사용된 바와 같이 "텔로머 핵산"은 포유동물의 텔로미어 서열을 암호화하는 이중 또는 단일 가닥 핵산상의 핵산 서열을 의미한다. 인간에서는, 텔로머 반복 서열은 한 가닥에서 TTAGGG이고 다른 가닥에서는 CCCTAA이다.

[0027]

"텔로머라제 억제자"는 포유동물 세포에서 텔로머라제 역전사 효소의 활성을 감소시키거나 억제할 수 있는 화합

물이다. 이러한 억제자는 본원에서 설명된 바와 같은 소분자 화합물, 또는 본원에서 설명된 바와 같은 올리고뉴클레오티드를 포함하는 hTR 주형 억제자일 수도 있다. 한 양태에서, 텔로머라제 억제자는 이메텔스타트이다.

[0028] "hTR 주형 억제자"는 인간 텔로머라제의 RNA 구성요소의 주형 영역 (본원에서 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 30-67을 스패닝(spanning)하는 영역)을 차단하고, 이로 인해 효소의 활성을 억제하는 화합물이다. 억제자는 전형적으로 이 영역을 잡종화할 수 있는 올리고뉴클레오티드이다. 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 본원에서 이 영역의 더 특이적인 부분을 잡종화하는데 효과적이고, 서열 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID NO: 2)을 가지며, SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 46-56을 스패닝한다.

[0029] 화합물은 화합물의 존재 시 세포의 증식이 화합물의 부재 시 관찰된 것들보다 적으면 "세포의 증식을 억제한다"고 한다. 즉, 세포의 증식은 화합물의 존재 시 느려지거나 멈춘다. 암-세포 증식의 억제는, 예를 들어, 세포 수 또는 세포의 확장 속도의 감소, 종양 질량 또는 종양 성장 속도의 감소, 또는 치료되는 대상체의 생존율 증가에 의해 입증될 수도 있다.

[0030] "뉴클레아제-저항성 결합"을 가진 올리고뉴클레오티드는 백본이, 비-잡종화 또는 잡종화 형태에서, 일반적인 세포 외 및 세포 내 뉴클레아제에 의해 뉴클레아제 분할에 실질적으로 저항성인 서브유닛 결합을 갖는 것을 나타낸다; 즉, 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드가 노출되는 신체의 정상 뉴클레아제 조건 하에서 뉴클레아제 분할을 거의 또는 전혀 나타내지 않는다. 하기 설명된 N3' → P5' 포스포르아미데이트 (NP) 또는 N3' → P5' 티오포스포르아미데이트 (NPS) 결합은 뉴클레아제 저항성이다.

[0031] "개체"는 어떤 일반적인 실험실 모델 유기체와 같은 포유동물일 수 있다. 포유동물은 인간 및 비-인간 영장류, 가축, 스포츠 동물, 애완동물, 마우스, 래트, 및 다른 설치류를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 개체는 인간이다.

[0032] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 이것들의 문법적 변형)는 임상 병리의 과정 중에 치료되는 개체 또는 세포의 자연스러운 과정을 변화시키도록 설계된 임상적 개입을 나타낸다. 치료의 바람직한 효과는 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 차도 또는 개선된 예후를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본원에서 사용된 바와 같이, "예방(prevention)"은 개체에서 질환의 발생 또는 재발 또는 질환과 관련된 증상에 관한 예방법(prophylaxis)을 제공하는 것을 포함한다. 개체는 질환에 취약하거나, 이것에 예민하거나, 또는 이것에 걸릴 위험이 있을 수도 있지만, 질환으로 진단되지는 않았다.

[0034] "유효량" 또는 "치료적 유효량"은, 일회 용량 또는 일련의 용량의 일부로서, 포유동물 대상체에 투여된, 치료적 화합물의, 예를 들어, 텔로머라제 억제자의 양을 나타내는데, 이것은 원하는 치료적 효과를 생산하는데 효과적이다.

[0035] "생물학적 샘플"은 개체로부터 얻은 조직, 혈액, 림프액, 또는 척수액의 샘플이다. 생물학적 샘플은 개체로부터 암종의 제거 중에 얻은 샘플일 수도 있다. 생물학적 샘플은 신선한 조직 또는 포르말린 고정되고 파라핀 임베딩된 조직 또는 냉동된 조직을 포함할 수 있다.

[0036] 본원에서 사용된 바와 같이, 단수형 "하나(a)", "하나(an)", 및 "그(the)"는 달리 지시되지 않으면 복수의 지시 대상을 포함한다.

[0037] 본원에서 설명된 본 발명의 양태 및 구체예는 양태 및 구체예를 "포함하며", "이것들로 구성되고", "본질적으로 이것들로 구성되는" 것을 포함하는 것으로 생각된다.

[0038] 본 명세서 전체에 걸쳐 제공된 모든 최대 수치적 제한은 더 낮은 수치적 제한이 본원에서 명시적으로 작성된 것처럼, 모든 더 낮은 수치적 제한을 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서 전체에 걸쳐 제공된 모든 최대 수치적 제한은 더 높은 수치적 제한이 본원에서 명시적으로 작성된 것처럼, 모든 더 높은 수치적 제한을 포함할 것이다. 본 명세서 전체에 걸쳐 제공된 모든 수치적 범위는 더 좁은 수치적 범위가 모두 본원에서 명시적으로 작성된 것처럼, 더 넓은 수치적 범위에 있는 모든 더 좁은 수치적 범위를 포함할 것이다.

### [0039] III. 텔로머라제 억제자 화합물

[0040] 텔로머라제는 텔로머 반복 서열 (인간에서 서열 5'-TTAGGG-3'을 가짐)의 염색체 끝으로의 추가를 촉진하는 리보핵산단백질이다. 예를 들어, Blackburn, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61: 113-129를 참고하면 된다. 효소는 대부분의 암 세포에서 발현되지만 성숙한 체세포에서는 발현되지 않는다. 텔로머 DNA의 손실은 세포 노화를 촉발하

는데 있어서 역할을 할 수도 있다; Harley, 1991, Mutation Research 256: 271-282를 참고하면 된다. 다양한 암 세포는 텔로머라제-양성인 것으로 나타났으며, 피부, 연결 조직, 지방 조직, 유방, 폐, 위, 췌장, 난소, 자궁경부, 자궁, 신장, 방광, 결장, 전립선, 중추 신경계 (CNS), 망막의 암 및 혈액 종양 (예를 들어, 골수종 (myeloma), 백혈병 (leukemia) 및 림프종 (lymphoma))의 세포를 포함한다. 텔로머라제의 표적화는 악성 세포와 정상 세포를 구별하는 치료를 높은 정도로 제공하는데 있어서 효과적인 수도 있는데, 분열하는 세포를 무차별적으로 표적화하는 화학 치료 요법을 동반할 수 있는 해로운 부작용 중 다수를 방지한다.

[0041] 현재까지 확인된 텔로머라제의 억제자는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레아제 저항성 결합을 가진 올리고뉴클레오티드), 뿐만 아니라 소분자 화합물을 포함한다. 텔로머라제 억제자 화합물에 관한 추가의 정보는 미국 특허 번호 제7,998,938호에서 발견될 수 있으며, 이것의 개시물은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0042] A. 소분자 화합물

[0043] 텔로머라제의 소분자 억제자는, 예를 들어, BRAC019 ((9-(4-(N,N-디메틸아미노)페닐아미노)-3,6-비스(3-피롤로디노 프로피온아미도)아크리딘 (Mol. Pharmacol. 61(5): 1154-62, 2002 참조); DODC (디에틸옥사디카르보시아닌), 및 텔로메스타틴을 포함한다. 이 화합물들은 G-퀴드(G-quad) 안정화제로서 역할을 할 수도 있는데, 이것은 텔로머라제의 RNA 구성요소에서 비활성 G-퀴드 배치의 형성을 촉진한다. 텔로머라제의 다른 소분자 억제자는 BIBR1532 (2-[(E)-3-나프텐-2-일 부트-2-에노일아미노]벤조산) (Ward & Autexier, Mol. Pharmacol. 68: 779-786, 2005; 또한 J. Biol. Chem. 277(18): 15566-72, 2002를 참고하면 된다); AZT 및 다른 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어, ddG 및 ara-G (예를 들어, 미국 특허 번호 제5,695,932호 및 제6,368,789호를 참고하면 된다), 및 특정 티오피리딘, 벤조[b]티오펜, 및 피리도[b]티오펜 유도체를 포함하며, 미국 특허 번호 제5,767,278호, 제5,770,613호, 제5,863,936호, 제5,656,638호 및 제5,760,062호에서 Gaeta et al.에 의해 설명되고, 이것의 개시물은 본원에서 참고로 포함된다. 또 다른 예는 3-클로로벤조[b]티오펜-2-카르복시-2'-[(2,5-디클로로페닐아미노)티아]히드라진이며, 미국 특허 번호 제5,760,062호에서 설명되고 이것은 본원에서 참고로 포함된다.

[0044] B. 올리고뉴클레오티드-기반 텔로머라제 억제자: 서열 및 조성

[0045] 인간 텔로머라제의 단백질 및 RNA 구성 요소 둘 다를 암호화하는 유전자가 클로닝되고 시퀀싱되었다(sequenced) (각각 미국 특허 번호 제6,261,836호 및 제5,583,016호를 참고하면 되고, 이것들 둘 다는 본원에 참고로 포함됨). 올리고뉴클레오티드는 텔로머라제 단백질 구성요소 (이것의 인간형은 인간 텔로머라제 역전사 효소, 또는 hTERT로 알려져 있다) 또는 텔로머라제 홀로효소(holoenzyme)의 RNA 구성요소 (이것의 인간형은 인간 텔로머라제 RNA, 또는 hTR로 알려져 있다)를 암호화하는 mRNA에 대하여 표적화될 수 있다.

[0046] 인간 텔로머라제 (hTR)의 RNA 구성요소의 뉴클레오티드 서열은 하기 서열 목록에서, 5' → 3' 방향으로, 나타난다 (SEQ ID NO: 1). 서열은 리보뉴클레오티드에 대한 표준 약어를 사용하여 나타나는데; 당업자들은 상기 서열이 또한 cDNA의 서열을 나타낸다는 것을 인식할 것이며, 여기에서 리보뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드로 대체되고, 유리딘 (U)은 티미딘 (T)으로 대체된다. RNA 구성 요소의 주형 서열은 뉴클레오티드 46-56 (5'-CUAACCUAAC-3') (SEQ ID NO: 2)에 의해 한정된 영역 내에 위치하는데, 이것은 약 1과 3분의 2의 텔로머 반복 유닛으로 구성된 텔로머 서열에 상보성이다. 주형 영역은 텔로머라제가 염색체의 끝에 추가하고 텔로머라제 효소의 활성화에 필수적인 텔로머 반복 영역의 서열을 명시하는 기능을 한다 (예를 들어 Chen et al., Cell 100: 503-514, 2000; Kim et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (14): 7982-7987, 2001을 참고하면 된다). mRNA의 파괴를 억제하거나 유발하기 위한 안티센스, 리보자임 또는 짧은 간섭 RNA (siRNA) 약제의 설계가 잘 알려져 있으며 (예를 들어, Lebedeva, I, et al. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Vol. 41: 403-419, April 2001; Macejak, D, et al. Journal of Virology, Vol. 73 (9): 7745-7751, September 1999, 및 Zeng, Y. et al, PNAS Vol. 100 (17) p. 9779-9784, Aug. 19, 2003을 참고하면 된다) 이러한 약제는 hTERT mRNA를 표적화하고 이로 인해 암 세포와 같은 표적 세포에서 hTERT 단백질의 생산을 억제하도록 설계될 수도 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 제6,444,650호 및 제6,331,399호를 참고하면 된다).

[0047] hTR을 표적화하는 올리고뉴클레오티드 (즉, 효소의 RNA 구성요소)는 hTR과 hTERT 단백질의 상호작용을 차단하거나 또는 그렇지 않으면 이것에 개입함으로써 텔로머라제 효소 활성화의 억제로 작용하는데, 이 상호작용은 텔로머라제 기능에 필수적이다 (예를 들어, Villeponteau et al, 미국 특허 번호 제6,548,298호를 참고하면 된다).

[0048] hTR의 바람직한 표적 영역은 주형 영역이며,

[0049] SEQ ID NO: 1 (GGGUUGCGGAGGGUGGCCUGGGAGGGUGGUGGCCAUUU



- [0050] UUUGUCUAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGCUCCCC
- [0051] GCGCGCUGUUUUUCUCGUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUG
- [0052] CCGCCUUCACCGUUAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGC
- [0053] CCGUUCGCCUCCCGGGGACCGCGGGGUGCGCCUGCCCAGCCCCGAAC
- [0054] CCCGCCUGGAGCCGCGGUCGGCCCGGGGCUUCUCCGGAGGCACCCACUGC
- [0055] CACCGCGAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGUCUCUGGGGCGAGGG
- [0056] CGAGGUUACCGUUUCAGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCC
- [0057] GCGGCGCGAUUCCUGAGCUGUGGGACGUGACCCAGGACUCGGCUCACA
- [0058] CAUGCAGUUCGCUUCCUGUUGGUGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCC
- [0059] GUCACCCUCGCCGCGAGUGGGGCGUUGUGAACCCCAAAACCUGACUGAC
- [0060] UGGGCCAGUGUGCU)의 뉴클레오티드 30-67을 스패닝한다. 이 영역을 표적화하는 올리고뉴클레오티드는 본원에서 "hTR 주형 억제자"로 나타난다 (예를 들어 Herbert et al., Oncogene 21 (4): 638-42 (2002)를 참고하면 된다). 바람직하게, 이러한 올리고뉴클레오티드는 서열 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID NO: 2)을 가진 11-뉴클레오티드 영역의 일부에 상보성 또는 거의-상보성인 서열을 포함하며, SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 46-56을 스패닝한다.
- [0061] 또 다른 바람직한 표적 영역은 hTR의 뉴클레오티드 137-179를 스패닝하는 영역이다 (Pruzan et al., Nucl. Acids Research, 30: 559-568, 2002를 참고하면 된다). 이 영역 내에서, 141-153을 스패닝하는 영역이 바람직한 표적이다. PCT 공개 번호 제WO 98/28442호는 텔로머라제를 억제하기 위해 길이가 적어도 7개의 뉴클레오티드의 올리고뉴클레오티드의 사용을 설명하는데, 올리고뉴클레오티드는 주형 영역 외부의 hTR 서열의 접근 가능한 부분에 상보성하도록 설계되며, hTR의 뉴클레오티드 137-196, 290-319, 및 350-380을 포함한다.
- [0062] hTR 서열에 표적화된 치료적 올리고뉴클레오티드의 영역은 바람직하게는 해당 hTR 서열에 정확히 상보성이다. 어떤 경우에는 불일치가 허용될 수 있지만, 그것들은 결과의 올리고뉴클레오티드 컨주게이트(conjugate)의 특이성 및 활성을 감소시키는 것으로 예상된다. 특정 구체예에서, 올리고뉴클레오티드의 염기 서열은 따라서 hTR 표적에 정확히 상보성인 적어도 5개의 뉴클레오티드의 서열을 포함하도록 선택되고, 증가하는 길이의 상보성 서열, 예를 들어, hTR 표적에 정확히 상보성인 적어도 8개, 적어도 10개, 적어도 12개, 적어도 13개 또는 적어도 15개의 뉴클레오티드가 이용되면, 향상된 텔로머라제 억제가 얻어질 수도 있다. 다른 구체예에서, 올리고뉴클레오티드의 서열은 hTR 표적 서열에 정확히 상보성인 적어도 5 내지 20, 적어도 8 내지 20, 적어도 10 내지 20 또는 적어도 10 내지 15 뉴클레오티드의 서열을 포함한다.
- [0063] 최적의 텔로머라제 억제 활성은 올리고뉴클레오티드의 전장이 hTR 표적 서열에 상보성인 것으로 선택될 때 얻어질 수도 있다. 하지만, 올리고뉴클레오티드의 전장이 표적 서열에 정확히 상보성일 필요는 없으며, 올리고뉴클레오티드 서열은 표적 서열에 상보성이 아닌 영역을 포함할 수도 있다. 이러한 영역은, 예를 들어, 정제를 용이하게 하는 서열과 같이, 화합물에 다른 성질을 부여하기 위해 추가될 수도 있다. 대안으로, 올리고뉴클레오티드는 hTR 표적 서열에 상보성인 서열의 다중 반복 영역을 포함할 수도 있다.
- [0064] 올리고뉴클레오티드가 표적 서열에 상보성이 아닌 영역을 포함하기 위한 것이면, 이러한 영역은 전형적으로 5' 또는 3' 말단 중 하나 또는 둘 다에 위치한다. 인간 텔로머라제 RNA (hTR)를 표적화하는 예시의 서열은 다음을 포함한다:
- [0065] 올리고뉴클레오티드에서 뉴클레오티드 간 결합은 이용 가능한 올리고뉴클레오티드 화학 반응 중 어떤 것, 예를 들어 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, P3' → N5' 포스포르아미데이트, N3' → P5' 포스포르아미데이트, N3' → P5' 티오포스포르아미데이트, 및 포스포르티오에이트도 포함할 수 있다. 반드시 아니지만, 전형적으로, 올리고뉴클레오티드 내 모든 뉴클레오티드 간 결합은 같은 타입이지만, 올리고뉴클레오티드 구성요소는 다른 결합의 혼합물을 사용하여 합성될 수도 있다.
- [0066] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 N3' → P5' 포스포르아미데이트 (NP) 또는 N3' → P5' 티오포스포르아미데이트 (NPS) 결합을 갖는데, 이 결합은 구조 3'-(-NH--P(=O)(--XR)--O)-5'로 나타날 수도 있으며, X는 O 또는 S 이고 XR이 OH 또는 SH일 때 R은 수소, 알킬, 및 아릴; 및 이것들의 약학적으로 허용 가능한

염으로 구성된 군으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 모든 NP, 또는 일부 구체예에서는, 모든 NPS 결합을 포함한다.

[0067] 한 구체예에서, hTR 주형 억제자 올리고뉴클레오타이드에 대한 서열은 상기 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오타이드 42-54에 상보적인 서열이다. 이 서열 (TAGGGTTAGACAA; SEQ ID NO: 3) 및 N3' → P5' 티오포스포라미데이트 (NPS) 결합을 가진 올리고뉴클레오타이드는 본원에서 GRN163으로 지칭된다. 예를 들어, Asai et al., Cancer Research 63: 3931-3939 (2003) 및 Gryaznov et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 22(5-8): 577-81 (2003)을 참고하면 된다.

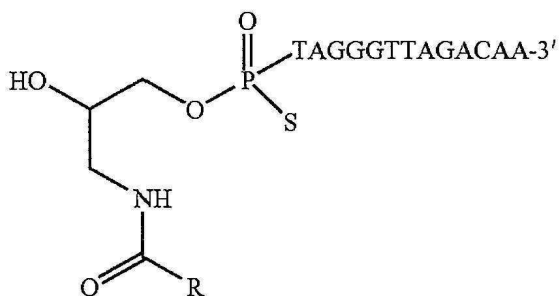
[0068] 단독으로 투여된 올리고뉴클레오타이드 GRN163은 세포 배양 시 시험 관 내 억제 활성을 나타냈으며, 표피 암종(epidermoid carcinoma), 유방 상피, 신장 암종(renal carcinoma), 신장 선암(renal adenocarcinoma), 췌장, 뇌, 결장, 전립선, 백혈병, 림프종, 골수종, 상피, 자궁경부, 난소 및 간 암 세포를 포함한다.

[0069] 올리고뉴클레오타이드 GRN163이 또한 테스트되었고 다양한 동물 종양 모델에서 치료적으로 유효한 것으로 나타났으며, 난소 및 폐, 소세포 및 비소세포 둘 다를 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 제7,998,938호를 참고하면 되고, 이것의 개시물은 참고로 포함됨).

[0070] C. 지질-올리고뉴클레오타이드 컨쥬게이트

[0071] 일부 양태에서, 본원에서 개시된 올리고뉴클레오티드-기반 텔로머라제 억제자는 적어도 하나의 공유 결합된 지질기를 포함한다 (미국 공개 번호 제2005/0113325호를 참고하면 되고, 이것은 본원에 참고로 포함됨). 이 변형은 우수한 세포 섭취 성질을 제공하는데, 이로 인해 변형되지 않은 형태와 비교하여 더 적은 양의 컨쥬게이션된 (conjugated) 올리고뉴클레오티드를 사용하여 동등한 생물학적 효과가 얻어질 수도 있다. 인간 치료적 환경에 적용될 때, 이것은 감소된 독성 위험, 및 비용 절감으로 전환될 수도 있다.

[0072] 지질기 L은 전형적으로 지방족 탄화수소 또는 지방산인데, 탄화수소 및 지방산의 유도체를 포함하며, 예는 미리스트(테트라데칸)산, 팔미트(헥사데칸)산, 및 스테아르(옥타데칸)산, 및 그것들의 해당하는 지방족 탄화수소 형태, 테트라데칸, 헥사데칸 및 옥타데칸과 같이, 14-20개의 탄소를 가진 포화된 직쇄 화합물이다. 이용될 수도 있는 다른 적합한 지질기의 예는 스테롤, 예를 들어, 콜레스테롤, 및 치환된 지방산 및 탄화수소, 특히 이기들의 다수의 불소를 함유한 형태이다. 지질기 L의 범위는 유도체, 예를 들어, 아민, 아마이드, 에스테르 및 카바메이트 유도체를 포함한다. 유도체의 타입은 종종 하기 예시된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드에 대한 결합 방식에 의해 결정된다.



[0073]

[0074] 한 예시적 구조에서, 지질 모이어티는 아미노글리세롤 결합자를 통해 NPS-결합된 올리고뉴클레오타이드의 5' 티오 포스페이트 기에 컨쥬게이션된, 팔미토일 아미드 (팔미트산으로부터 유래됨)이다. GRN163에 대해 나타나고 이 방식으로 컨쥬게이션된 서열을 가진 NPS 올리고뉴클레오타이드 (하기 나타난 바와 같음)는 본원에서 GRN163L (이 메텔스타트)로 지정된다. 제2 예시적 구조에서, 팔미토일 아미드로서 지질은 NPS 올리고뉴클레오타이드의 말단 3' 아미노 기를 통해 컨쥬게이션된다.

[0075] D. 약학적 조성물

[0076] 본 발명의 일부 양태에서, 의약품으로 이용될 때, 본원에서 개시된 텔로머라제 억제자 화합물은 약학적 조성물로 제형화되도록 약학적으로 허용 가능한 첨가제 또는 담체와 함께 제형화될 수 있다.

[0077] 의약품으로 이용될 때, 텔로머라제 억제자 화합물은 약학적 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 이 화합물들은 경구, 직장, 경피, 피하, 정맥 내, 근육 내, 및 비강 내를 포함하는 다양한 경로로 투여될 수 있다. 이 화합물들은 주사용 및 경구용 조성물 둘 다로서 유효하다. 이러한 조성물은 제약 업계에서 잘 알려져 있는 방식으로 제



조되고 적어도 하나의 활성 화합물을 포함한다. 경구용 조성물로 이용될 때, 본원에서 개시된 텔로머라제 억제자 화합물은 약학적으로 허용 가능한 보호제에 의해 위에서 산 분해로부터 보호된다.

[0078] 본 발명은 또한, 활성 성분으로서, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제 또는 담체와 관련된 텔로머라제 억제자 화합물을 함유하는 약학적 조성물을 포함한다. 본 발명의 조성물을 만드는데 있어서, 활성 성분은 보통 첨가제 또는 담체와 혼합되거나, 첨가제 또는 담체에 의해 희석되거나 또는 캡슐, 봉지, 종이 또는 다른 용기의 형태로 있을 수 있는 이러한 첨가제 또는 담체 내에 둘러싸여 있다. 첨가제 또는 담체가 희석제의 역할을 할 때, 그것은 고체, 반고체, 또는 액체 재료일 수 있는데, 이것은 활성 성분에 대한 비히클(vehicle), 담체 또는 배지로서 역할을 한다. 따라서, 조성물은 타블렛, 알약, 분말, 로젠지(lozenge), 봉지, 카시에(cachet), 엘릭서(elixir), 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸 (고체로서 또는 액체 배지 중의), 예를 들어, 활성 화합물의 최대 10 중량%를 함유하는 연고, 연질 및 경질 젤라틴 캡슐, 좌약, 멸균 주사액, 및 멸균 포장된 분말의 형태일 수 있다.

[0079] 제형을 제조하는데 있어서, 다른 성분과 조합하기 전에 적절한 입자 크기를 제공하기 위해 활성 동결건조 화합물을 분쇄하는 것이 필요할 수도 있다. 활성 화합물이 실질적으로 불용성이면, 그것은 보통 200 미만 메시(mesh)의 입자 크기로 분쇄된다. 활성 화합물이 실질적으로 수용성이면, 입자 크기는 보통 제형에서 실질적으로 균일한 분포, 예를 들어 약 40 메시를 제공하도록 분쇄함으로써 조정된다.

[0080] 적합한 첨가제 또는 담체의 일부 예는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 검 아카시아(gum acacia), 칼슘 포스페이트, 알기네이트, 트라가칸트(tragacanth), 젤라틴, 칼슘 실리케이트, 미세결정 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 증류수, 시럽, 및 메틸 셀룰로스를 포함한다. 제형은 추가적으로 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 미네랄 오일과 같은 윤활제; 습윤제; 에멀전화제 및 현탁화제; 메틸- 및 프로필히드록시-벤조에이트와 같은 보존제; 감미제; 및 방향제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 업계에 알려져 있는 과정을 이용함으로써 환자에게 투여 후 활성 성분의 빠른, 지속적인 또는 지연된 방출을 제공하기 위해 제형화될 수 있다.

[0081] 조성물은 단위 투약 형태로 제형화될 수 있으며, 각 투약량은 활성 성분의 약 5 mg 내지 약 100 mg 이상, 예를 들어, 약 1 mg 내지 약 5 mg, 1 mg 내지 약 10 mg, 약 1 mg 내지 약 20 mg, 약 1 mg 내지 약 30 mg, 약 1 mg 내지 약 40 mg, 약 1 mg 내지 약 50 mg, 약 1 mg 내지 약 60 mg, 약 1 mg 내지 약 70 mg, 약 1 mg 내지 약 80 mg, 또는 약 1 mg 내지 약 90 mg, 및 이 값들 사이의 어떤 범위도 함유한다. 용어 "단위 투약 형태"는 개체에 일원적 투약량(unitary dosage)으로 적합한 물리적으로 별개의 유닛을 나타내며, 각 유닛은 적합한 약학적 첨가제 또는 담체와 함께 원하는 치료적 효과를 생산하기 위해 계산된 활성 재료의 미리 결정된 양을 함유한다.

[0082] 텔로머라제 억제자 화합물은 넓은 투약 범위에서 유효하고 일반적으로 치료적 유효량으로 투여된다. 하지만, 실제로 투여된 텔로머라제 억제자 화합물의 양이 치료되는 질병, 선택된 투여 경로, 투여된 실제 화합물, 나이, 체중, 및 개개의 환자의 반응, 환자의 증상의 심각도, 등을 포함하는 적절한 상황을 고려하여 의사에 의해 결정되는 것으로 생각될 것이다.

[0083] 타블렛과 같은 고체 조성물을 제조하기 위해, 주요 활성 성분 텔로머라제 억제자 화합물은 약학적 첨가제 또는 담체와 혼합되어 본 발명의 화합물의 균질 혼합물을 함유하는 고체 사전 제형화 조성물을 형성한다. 이 사전 제형화 조성물을 균질한 것으로 나타낼 때, 활성 성분이 조성물이 타블렛, 알약 및 캡슐과 같이 동등하게 유효한 단위 투약 형태로 쉽게 세분화될 수 있도록 조성물을 통해 고르게 분포된다는 것을 의미한다.

[0084] 본 발명의 타블렛 또는 알약은 장기적 작용의 이점을 허용하는 투약량을 제공하고 위에서 산 가수분해로부터 텔로머라제 억제자 화합물을 보호하기 위해 코팅되거나 그렇지 않으면 혼합될 수 있다. 예를 들어, 타블렛 또는 알약은 내부 투약 및 외부 투약 구성요소를 포함할 수 있으며, 후자는 전자 상에서 외피의 형태로 되어있다. 두 구성요소들은 위에서의 분해에 저항하고 내부 구성요소가 십이지장으로 온전하게 통과하거나 방출이 지연되게 하는 역할을 하는 장 내 층으로 구별될 수 있다. 다양한 재료가 사용될 수 있으며, 이러한 재료는 많은 폴리머 산 및 폴리머 산과 셀락(shellac), 세틸 알콜, 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 재료의 혼합물을 포함한다.

[0085] 본 발명의 새로운 조성물이 경구 또는 주사에 의한 투여를 위해 통합될 수 있는 액체 형태는 옥수수 오일, 면실유, 참기름, 코코넛 오일, 또는 땅콩 오일과 같은 식용 오일, 뿐만 아니라 엘릭서 및 유사한 약학적 비히클과 함께 수용액, 적절하게 맛을 첨가한 시럽, 수성 또는 유성 현탁액, 및 맛을 첨가한 에멀전을 포함한다.

[0086] 흡입용 용액 또는 흡입제는 약학적으로 허용 가능한 수성 또는 유기 용매 중의 용액 및 현탁액, 또는 이것들의 혼합물, 및 분말을 포함한다. 액체 또는 고체 조성물은 상기 설명된 바와 같이 적합한 약학적으로 허용 가능한

첨가제를 함유할 수 있다. 조성물은 국부적 또는 전신 효과를 위해 경구 또는 비강 호흡 경로로 투여될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 용매 중의 조성물은 비활성 가스의 사용에 의해 분무될 수 있다. 분무된 용액은 분무 장치로부터 직접 흡입될 수 있거나 분무 장치는 안면 마스크 텐트(face mask tent), 또는 간헐적 양압 호흡기(intermittent positive pressure breathing machine)에 부착될 수 있다. 용액, 현탁액, 또는 분말 조성물은 또한 적절한 방식으로 제형을 전달하는 장치로부터 경구로 또는 비강으로 투여될 수 있다.

#### [0087] IV. 본 발명의 방법

[0088] 일부 양태에서, 텔로머라제 억제자 처리로부터 이익을 얻는, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 선택하는 방법이 본원에서 제공된다. 이 방법들은 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로미어의 평균 상대적 길이의 결정에 기초한다. 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포의 평균 텔로미어 길이는 하나 이상의 알려진 기준으로부터 결정된 상대적 텔로미어 길이의 50번째 미만의 백분위수에 있는 것으로 결정되고, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체는 텔로머라제 억제자 (예를 들어, 본원에서 제공된 텔로머라제 억제자 중 어떤 것)의 처리로부터 이익을 얻을 것이다. 다른 양태에서, 본원에서 개시된 텔로머라제 억제자 화합물은 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 평균 상대적 텔로미어 길이가 하나 이상의 알려진 기준으로부터 결정된 상대적 텔로미어 길이의 50번째 미만의 백분위수에 있는 것으로 결정될 때, 세포 증식성 질환 (예를 들어, 암)의 치료 및/또는 예방에 사용될 수 있다.

#### [0089] A. 세포 증식성 질환

[0090] "증식성 질환"은 세포가 정상 조직 성장보다 더 신속하게 증식하는 어떤 세포 장애이다. 따라서 "증식성 세포"는 정상 세포보다 더 신속하게 증식하는 세포이다. 증식성 질환은 신생물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. "신생물"은 비정상 조직 성장이며, 일반적으로 세포 증식에 의해 정상 조직 성장보다 더 신속하게 성장하는 별개의 덩어리를 형성한다. 신생물은 구조적 조직의 부분적 또는 전체적 결핍 및 정상 조직과의 기능적 조정을 나타낸다. 이것은 크게 세 개의 주요 타입으로 분류될 수 있다. 상피성 구조로부터 발생한 악성 신생물은 암종으로 불리며, 근육, 연골, 지방 또는 뼈와 같은 연결 조직으로부터 기원한 악성 신생물은 육종으로 불리고 면역계의 구성요소를 포함하는 조혈성 구조 (혈액 세포의 형성에 관계된 구조)에 영향을 미치는 악성 종양은 백혈병 및 림프종으로 불린다. 종양은 질환 암의 신생물 성장이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "종양"으로도 불리는 신생물은 조혈성 신생물, 뿐만 아니라 고체 신생물을 포함하는 것으로 의도된 것이다. 다른 증식성 질환은 신경섬유종증(neurofibromatosis)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0091] 본원에서 제공된 텔로머라제 억제자 화합물 (예를 들어, 조성물 내)은 텔로미어 길이의 조절 장애와 관련된 질환 상태를 조절하는데 유용하다. 일부 구체예에서, 세포 증식성 질환은 텔로머라제의 증가된 발현 또는 활성 또는 세포 성장, 또는 둘 다와 관련된다. 일부 구체예에서, 세포 증식은 암이다.

[0092] 본원에서 설명된 방법은 또한 고체 종양 (예를 들어, 진행성 고체 종양)을 치료하는데 유용하다. 일부 구체예에서, 예를 들어, 비소세포 폐암 (NSCLC, 예를 들어, 진행성 NSCLC), 소세포 폐암 (SCLC, 예를 들어, 진행성 SCLC), 및 폐에서 진행성 고체 악성 종양을 포함하는 폐암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 난소암, 두경부암(head and neck cancer), 위 악성 종양, 예를 들어, 위암, 위장암, 예를 들어, 상부 위장암, 담낭암, 방광암, 교모세포종, 육종, 예를 들어, 골육종(osteosarcoma), 유잉 육종(Ewing sarcoma) 및 뇌수막종(meningiosarcoma), 흑색종(melanoma) (전이성 흑색종 및 악성 흑색종), 대장암(colorectal cancer), 및 췌장암 중 어떤 것을 치료하는 방법이 제공된다.

[0093] 일부 구체예에서, 방법은 다음 중 하나 이상을 치료하는데 유용하다: 피부 T 세포 림프종 (CTCL), 백혈병, 여포성 림프종, 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 및 급성 골수성 백혈병.

[0094] 일부 구체예에서, 질환은 다음 중 어느 하나의 암이다: 기저 세포 암종, 수모세포종(medulloblastoma), 교모세포종, 다발성 골수종(multiple myeloma), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 골수성 백혈병, 췌장암, 폐암 (소세포 폐암 및 비소세포 폐암), 식도암, 위암, 담관암, 전립선암, 간암, 간세포암, 위장암, 위암, 담낭암, 난소암 및 방광암. 일부 구체예에서, 암은 췌장 관세포 선암(rectal ductal adenocarcinoma), 결장 선암(colon adenocarcinoma), 및 난소 낭선암(ovary cystadenocarcinoma)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 암은 췌장 관세포 선암이다. 일부 구체예에서, 암은 불량하게 관류되고 및/또는 불량하게 혈관이 발달하는 종양이다.

[0095] 일부 구체예에서, 암은 췌장암이며, 예를 들어, 췌장 선암, 췌장 선편평세포 암종(pancreatic adenosquamous carcinoma), 췌장 편평세포 암종(pancreatic squamous cell carcinoma), 및 췌장 거대세포 암종(pancreatic

giant cell carcinoma)을 포함한다. 일부 구체예에서, 췌장암은 외분비성 췌장암이다. 일부 구체예에서, 췌장암은 내분비성 췌장암 (예를 들어, 도세포 암종(islet cell carcinoma))이다. 일부 구체예에서, 췌장암은 진행성 전이성 췌장암이다.

[0096]

본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 암의 다른 예는 부신피질 암종(adenocortical carcinoma), 특발성 골수 섬유증(agnogenic myeloid metaplasia), AIDS-관련 암 (예를 들어, AIDS-관련 림프종), 항문암, 충수암 (appendix cancer), 성상세포종(astrocytoma) (예를 들어, 소뇌 및 대뇌), 기저 세포 암종, 담도암(bile duct cancer) (예를 들어, 간 외), 방광암, 골암(bone cancer), (골육종 및 악성 섬유성 조직구종(malignant fibrous histiocytoma)), 뇌종양 (예를 들어, 신경교종(glioma), 뇌간 신경교종(brain stem glioma), 소뇌 또는 대뇌 성상세포종 (예를 들어, 모양세포성 성상세포종(pilocytic astrocytoma), 미만성 성상세포종(diffuse astrocytoma), 퇴행성 (악성) 성상세포종), 악성 신경교종, 상의세포종(ependymoma), 뿔지교종(oligodenglioma), 수막종(meningioma), 뇌수막종, 두개인두종(craniopharyngioma), 혈관아세포종(haemangioblastoma), 수모세포종, 말초 신경 외배엽성 종양(supratentorial primitive neuroectodermal tumor), 시로 및 시상하부 신경교종(visual pathway and hypothalamic glioma), 및 교모세포종), 유방암, 기관지 선종(bronchial adenoma)/유암(carcinoid), 유암종(carcinoid tumor) (예를 들어, 위장관 유암종(gastrointestinal carcinoid tumor)), 원발부위 미상암(carcinoma of unknown primary), 중추 신경계 림프종, 자궁경부암, 결장암, 대장암, 만성 골수증식성 질환(chronic myeloproliferative disorder), 자궁내막암(endometrial cancer) (예를 들어, 자궁암(uterine cancer)), 상의세포종, 식도암, 유잉 육종(Ewing's family of tumor), 안암(eye cancer) (예를 들어, 안 내 흑색종 및 망막아세포종(retinoblastoma)), 담낭암, 위 (위) 암, 위장관 유암종, 위장관 기질 종양 (gastrointestinal stromal tumor; GIST), 생식세포종(germ cell tumor), (예를 들어, 두개 외, 고환 외, 난소), 임신성 용모상피성 종양(gestational trophoblastic tumor), 두경부암, 간세포 (간) 암 (예를 들어, 간암종 및 간세포 선종(heptoma)), 식도암, 도세포 암종 (내분비성 췌장암), 후두암(laryngeal cancer), 후두암, 백혈병, 구순암 및 구강암(lip and oral cavity cancer), 구강암(oral cancer), 간암, 폐암 (예를 들어, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐선암, 및 폐 편평세포 암종), 림프성 신생물 (예를 들어, 림프종), 수모세포종, 난소암, 중피종(mesothelioma), 전이성 편평세포 경부암(squamous neck cancer), 구강암(mouth cancer), 다발성 내분비샘 종증(multiple endocrine neoplasia syndrome), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome), 골수 형성 이상(myelodysplastic)/골수 증식성(myeloproliferative) 질환, 비강암 및 부비동암(nasal cavity and paranasal sinus cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 신경아세포종(neuroblastoma), 신경 내분비 암(neuroendocrine cancer), 구인두암(oropharyngeal cancer), 난소암 (예를 들어, 난소 상피암(ovarian epithelial cancer), 난소 생식세포종, 난소 저악성도 종양(ovarian low malignant potential tumor)), 췌장암, 부갑상선암(parathyroid cancer), 음경암(penile cancer), 복막암(cancer of the peritoneal), 인두암(pharyngeal cancer), 크롬 친화성 세포종(pheochromocytoma), 송과체아세포종(pineoblastoma) 및 말초 신경 외배엽성 종양, 뇌하수체 종양(pituitary tumor), 흉막폐아세포종(pleuropulmonary blastoma), 림프종, 원발성 중추 신경계 림프종 (소교종(microglioma)), 폐 림프관근종(pulmonary lymphangiomyomatosis), 직장암, 신장암, 신우요관암(renal pelvis and ureter cancer) (이행세포암(transitional cell cancer)), 횡문 근육종(rhabdomyosarcoma), 침샘암, 피부암 (예를 들어, 비-흑색종 (예를 들어, 평편 상피 세포 암종), 흑색종, 및 메르켈 세포 암종(Merkel cell carcinoma)), 소장암, 평편세포 암, 고환암, 인후암, 흉선종(thymoma) 및 흉선 암종(thymic carcinoma), 갑상선암, 결절성 경화증(tuberous sclerosis), 요도암, 질암, 외음부암, 윌름 종양(Wilms' tumor), 및 이식 후 림프 증식성 질환 ((post-transplant lymphoproliferative disorder; PTLD), 모반증(phakomatoses) 관련된 비정상적인 혈관 증식, 부종(edema) (예를 들어, 뇌종양과 관련된), 및 메이그스 증후군(Meigs' syndrome)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0097]

일부 구체예에서, 암은 고체 종양 (예를 들어, 진행성 고체 종양)이다. 고체 종양은 섬유육종(fibrosarcoma), 점액육종(myxosarcoma), 지방육종(liposarcoma), 연골육종(chondrosarcoma), 골원성 육종(osteogenic sarcoma), 골육종, 청삭종(chordoma), 혈관육종(angiosarcoma), 혈관 내피(endotheliosarcoma) 육종, 림프관 육종(lymphangiosarcoma), 림프관 내피 육종(lymphangioendotheliosarcoma), 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 연조직 육종(soft tissue sarcoma), 자궁 육종 활막종(uterine sacronomasynovioma), 중피종, 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근 육종(leiomyosarcoma), 횡문 근육종, 뇌수막종, 결장 육종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 평편 상피 세포 암종, 기저 세포 육종, 선암, 한선 암종(sweat gland carcinoma), 피지선 암종(sebaceous gland carcinoma), 유두상 암종, 유두상 선암, 낭선암, 수질 암종(medullary carcinoma), 기관지원성 암종(bronchogenic carcinoma), 신장 세포 암종 (예를 들어, 선암, 투명 세포 신장 세포 암종(clear cell

renal cell carcinoma), 유두상 신장 세포 암종(papillary renal cell carcinoma), 혐색소형 신장 세포 암종(chromophobe renal cell carcinoma), 집합관 신장 세포 암종(collecting duct renal cell carcinoma), 과립형 신장 세포 암종(granular renal cell carcinoma), 혼합 과립형 신장 세포 암종(mixed granular renal cell carcinoma), 신장 혈관근 지방종(renal angiomyolipomas), 또는 방추형 신장 세포 암종(spindle renal cell carcinoma)), 간세포 선종(hepatoma), 담도 암종(bile duct carcinoma), 융모막 암종(choriocarcinoma), 정낭 피종(seminoma), 배아 암종(embryonal carcinoma), 윌름스 종양(Wilm's tumor), 자궁경부암, 고환 종양, 폐 육종, 소세포 폐 육종, 방광 육종, 상피육종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과 체종양(pinealoma), 혈관아세포종(hemangioblastoma), 청신경종(acoustic neuroma), 뿔피교종(oligodendroglioma), 수막종(menangioma), 흑색종, 신경아세포종, 및 망막아세포종과 같은, 육종 및 암종을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0098] 일부 구체예에서, 림프성 신생물 (예를 들어, 림프종)은 B-세포 신생물이다. B-세포 신생물의 예는 전구체 B-세포 신생물 (예를 들어, 전구체 B-림프아구성 백혈병/림프종) 및 말초 B-세포 신생물 (예를 들어, B-세포 만성 림프구성 백혈병/전림프구성 백혈병/작은 림프구성 림프종 (작은 림프구성 (SL) NHL), 림프형질세포모양 림프종 (lymphoplasmacytoid lymphoma)/면역세포종(immunocytoma), 외투세포 림프종(mantel cell lymphoma), 여포 중심 림프종(follicle center lymphoma), 여포성 림프종 (예를 들어, 세포학적 등급: I (소세포), II (소세포 및 대세포 혼합), III (대세포) 및/또는 하위 타입: 미만성 및 대부분 소세포 타입), 하등급/여포성 비-호지킨 림프종 (NHL), 중등급/여포성 NHL, 변연부(marginal zone) B-세포 림프종 (예를 들어, 림프절 외 (예를 들어, MALT-타입 +/- 단핵구 모양 B 세포) 및/또는 림프절 (예를 들어, +/- 단핵구 모양 B 세포)), 비장 변연부 림프종 (예를 들어, +/- 융모상 림프구), 모양 세포성 백혈병(Hairy cell leukemia), 형질세포종(plasmacytoma)/형질세포 골수종 (예를 들어, 골수종 및 다발성 골수종), 미만성 큰 B-세포 림프종 (예를 들어, 일차 종격 (mediastinal) (가슴샘) B-세포 림프종), 중등급 미만성 NHL, 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), B-세포 림프종, 버킷-유사, 고등급 면역아세포 NHL, 고등급 림프아구성 NHL, 고등급 작은 비-분할 세포 NHL, 거대 종양 NHL, AIDS-관련 림프종, 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia))을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0099] 일부 구체예에서, 림프성 신생물 (예를 들어, 림프종)은 T-세포 및/또는 추정상 NK-세포 신생물이다. T-세포 및/또는 추정상 NK-세포 신생물의 예는 전구체 T-세포 신생물 (전구체 T-림프아구성 림프종/백혈병) 및 말초 T-세포 및 NK-세포 신생물 (예를 들어, T-세포 만성 림프구성 백혈병/전림프구성 백혈병, 및 큰 과립형 림프구 백혈병 (LGL) (예를 들어, T-세포 타입 및/또는 NK-세포 타입), 피부 T-세포 림프종 (예를 들어, 균상식육종 (mycosis fungoides)/세자리 증후군(Sezary syndrome)), 일차 T-세포 림프종 상세불명 (예를 들어, 세포학적 범주 (예를 들어, 중간 크기 세포, 중세포 및 대세포 혼합), 대세포, 림프상피모양 세포, 하위 타입 간비장  $\gamma$  &  $\delta$  T-세포 림프종, 및 피부 지방층 T-세포 림프종), 혈관면역아세포 T-세포 림프종 (AILD), 혈관중심성 림프종 (angiocentric lymphoma), 장 T-세포 림프종 (예를 들어, 관련된 +/- 장질환(enteropathy)), 성인 T-세포 림프종/백혈병 (ATL), 퇴행성 대세포 림프종 (ALCL) (예를 들어, CD30+, T- 및 null(Null)-세포 타입), 퇴행성 대세포 림프종, 및 호지킨 림프종)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0100] 일부 구체예에서, 림프성 신생물 (예를 들어, 림프종)은 호지킨 병(Hodgkin's disease)이다. 예를 들어, 호지킨 병은 림프구 우세형, 결절 경화형, 혼합 세포형, 림프구 소실형, 및/또는 림프구 과다형일 수 있다.

[0101] 일부 구체예에서, 암은 백혈병이다. 일부 구체예에서, 백혈병은 만성 백혈병이다. 만성 백혈병의 예는 만성 골수성 I (과립구성) 백혈병, 만성 골수성, 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 백혈병은 급성 백혈병이다. 급성 백혈병의 예는 급성 림프아구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 및 급성 골수성 백혈병 (예를 들어, 골수아구성, 전골수성, 골수단핵구성, 단핵구성, 및 적백혈병(erythroleukemia))을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0102] 일부 구체예에서, 암은 액체 종양 또는 형질세포종이다. 형질세포종은 골수종을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 골수종은 골수외성 형질세포종(extramedullary plasmacytoma), 고립성 골수종(solitary myeloma), 및 다발성 골수종을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 형질세포종은 다발성 골수종이다.

[0103] 일부 구체예에서, 암은 다발성 골수종이다. 다발성 골수종의 예는 IgG 다발성 골수종, IgA 다발성 골수종, IgD 다발성 골수종, IgE 다발성 골수종, 및 비분비성 다발성 골수종(nonsecretory multiple myeloma)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 다발성 골수종은 IgG 다발성 골수종이다. 일부 구체예에서, 다발성 골수종은 IgA 다발성 골수종이다. 일부 구체예에서, 다발성 골수종은 무증상(smoldering) 또는 무통



성(indolent) 다발성 골수종이다. 일부 구체예에서, 다발성 골수종은 진행성 다발성 골수종이다. 일부 구체예에서, 다발성 골수종은 제한은 아니지만, 보르테조미(bortezomib), 텍사메타손(dexamethasone; Dex-), 독소루비신(doxorubicin; Dox-), 및 멜팔란(melphalan; LR)과 같은 약물에 저항성일 수도 있다.

[0104] B. 텔로머라제 억제자로의 치료로부터 이익을 얻는 개체를 선택하는 방법

[0105] 텔로머라제 억제자로의 치료로부터 이익을 얻는, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 선택하는 방법이 본원에서 제공된다. 텔로미어 길이는 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로미어 뉴클레오타이드의 길이를 분석함으로써 결정된다. "이익"은 본 발명의 텔로머라제 억제자 화합물로 치료된 이러한 개체를 치료되지 않은 것들과 비교하여 평가하기 위해 사용된 적어도 하나의 임상적 또는 생물학적 점수 (예를 들어, 무진행 생존율, 하지만 이에 제한되지 않음), 값, 또는 측정값의 심각도 또는 발생률의 양의 또는 유의한 차이가 있는 것을 의미한다.

[0106] 1. 생물학적 샘플을 얻는 단계

[0107] 세포 증식성 질환 (예를 들어, 암)으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체의 생물학적 샘플은 다양한 방법으로 얻을 수 있다. 예를 들어, 생물학적 샘플은 고체 종양으로부터 얻을 수 있는데, 이것은 피하로 접근 가능한 종양 또는 생검(biopsy) 또는 제거 수술에 접근 가능한 암성 고체 종양의 어떤 다른 타입도 될 수 있다. 생물학적 샘플은 업계에 알려져 있는 어떤 방법으로도 얻을 수 있는데 바늘 또는 종 생검(core biopsy) 또는 미세 바늘 흡인술(fine needle aspiration)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 게다가, 생물학적 샘플은 텔로미어 길이가 결정되기 전에 고정되거나, 파라핀 임베딩되거나, 신선하거나, 또는 냉동될 수도 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 샘플은 포르말린 고정되고 그때 파라핀에서 임베딩된다. 일부 구체예에서, 개체는 혈액-매개 암 (즉, 제한은 아니지만, 백혈병, 림프종, 등과 같은 혈액암)에 걸리거나 이것에 걸린 것으로 의심된다. 이 경우에, 생물학적 샘플은 개체의 혈액으로부터 얻을 수도 있다.

[0108] 2. 생물학적 샘플에서 텔로미어 길이를 측정하는 단계

[0109] 본원에서 개시된 방법에 따라 생물학적 샘플에서 세포의 텔로미어 길이를 결정하기 위해 많은 방법이 이용 가능하다.

[0110] 한 양태에서, 텔로미어 길이는 말단 제한 단편 (TRF)의 평균 길이를 측정함으로써 결정될 수 있다. TRF는 게놈 DNA의 텔로미어 서열 내에서 핵산을 분할하지 않는 제한 효소로의 완벽한 분해로 인한 단편의 길이-일반적으로 평균 길이-로 한정된다. 전형적으로, DNA는 게놈 DNA 내에서 분할하지만 텔로미어 서열 내에서 분할하지 않는 제한 효소로 분해된다. 전형적으로, 제한 효소는 4 염기 인식 서열 (예를 들어, AluI, HinfI, RsaI, 및 Sau3A I)을 가지며 단독으로 또는 조합으로 사용된다. 결과의 말단 제한 단편은 텔로미어 반복 영역 및 서브텔로미어 DNA 둘 다를 함유한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 서브텔로미어 DNA는 텔로미어 서열의 탠덤 반복 영역에 인접한 DNA 서열이고 가변 텔로미어-유사 서열이 배치된 텔로미어 반복 서열을 함유한다. 분해된 DNA는 전기영동에 의해 분리되고 막과 같은 지지물에 블롯팅된다(blotted). 텔로미어 서열을 함유하는 단편은 프로브, 즉, 표지된 반복 서열을 막에 잡종화함으로써 검출된다. 텔로미어 함유 단편의 시각화 시, 말단 제한 단편의 평균 길이가 계산된다 (Harley, C. B. et al., Nature. 345(6274): 458-60 (1990), 본원에 참고로 포함됨). 서던 블롯팅에 의한 TRF 측정은 세포 또는 조직에서 텔로미어 길이의 분포, 및 따라서 모든 세포의 평균 텔로미어 길이를 제공한다.

[0111] 본원에서 설명된 다양한 방법에 대하여, 높은, 중간, 및 낮은 엄중 조건을 포함하는 다양한 잡종화 조건이 사용될 수도 있다 (예를 들어, Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (updates to 2002)를 참고하면 되고, 본원에 참고로 포함됨). 엄중 조건은 서열-의존적이고 프로브 또는 프라이머의 길이, 불일치의 수, G/C 함량, 및 이온 강도를 포함하는 상이한 상황에서 상이할 것이다. 핵산 잡종화에 대한 안내가 Tijssen, P. "Overview of Principles of Hybridization and the Strategy of Nucleic Acid Assays", in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Vol 24, Elsevier Publishers, Amsterdam (1993)에서 제공된다. 일반적으로, 엄중 조건은 평형시 프로브 또는 프라이머의 50%가 표적 핵산에 잡종화되는 한정된 용액 조건 하에서 한정된 온도에서 특정 잡종물(hybrid)에 대한 녹는점 (즉, T<sub>m</sub>)보다 약 5-10°C 더 낮은 것으로 선택된다. 엄중의 정도가 일반적으로 잡종화 온도 및 T<sub>m</sub>의 차이에 의해 결정되기 때문에, T<sub>m</sub>과의 온도 차이가 유지되는 한 잡종화의 용액 조건의 변화에도 불구하고 엄중의 특정한 정도는 유지될 수 있다. 잡종화 조건은 또한 핵산 백본의 타입, 예를 들어 리보핵산 또는 펩티드 핵산 백본에 따라 다를 수도 있다.

- [0112] 또 다른 양태에서, 텔로미어 길이는 유동 세포 분석법으로 측정될 수 있다 (Hultdin, M. et al., Nucleic Acids Res. 26: 3651-3656 (1998); Rufer, N. et al., Nat. Biotechnol. 16: 743-747 (1998); 본원에서 참고로 포함됨). 유동 세포 분석법은 FISH 기술의 변형이다. 시작 재료가 조직이면, 세포 현탁액은 일반적으로 기계적 분리 및/또는 프로테아제의 처리에 의해 만들어진다. 일반적으로, 세포는 고정액으로 고정하고 형광 표지로 표지된 텔로미어 서열 특이적 프로브, 바람직하게 PNA 프로브로 잡종화된다. 잡종화 후, 세포는 세척되고 그때 FACS로 분석된다. 형광 신호는 배경 형광 신호를 적절하게 뺀 후 Go/G1의 세포에 대하여 측정된다. 이 기술은 다수의 샘플에 대한 텔로미어 길이의 신속한 측정에 적합하다. TRF와 유사하게, 텔로미어 길이는 세포 내에서 텔로미어의 평균 길이이다.
- [0113] 다른 양태에서, 생물학적 샘플 내 세포의 텔로미어 평균 길이는 정량적 PCR (qPCR) 또는 텔로미어 형광 제자리 부합법 (telo-FISH)을 통해 결정된다.
- [0114] a. 포르말린 고정되고 파라핀 임베딩된 (FFPE) 샘플
- [0115] 일부 양태에서, 텔로미어 길이는 포르말린 고정되고, 파라핀 임베딩된 (FFPE) 생물학적 샘플로부터 추출된 DNA의 qPCR을 사용하여 결정된다.
- [0116] qPCR에서, DNA 결합 염료는 모든 이중-가닥 DNA에 결합하여 염료의 형광 발광을 유발한다. PCR 반응 동안 DNA 생산의 증가는 형광 강도의 증가로 이어지고 PCR 반응의 각 주기에 측정된다. 이것은 DNA 농도를 정량화되게 한다. 반응의 지수기(exponential phase) 동안 존재하는 DNA의 상대적 농도는 반-로그 스케일(semi-logarithmic scale)에서 PCR 주기 수에 대한 형광 발광의 수준을 플롯팅함으로써 결정된다. 배경보다 높은 형광 발광의 검출에 대한 역치가 결정된다. 샘플의 형광 발광이 역치를 초과하는 주기는 역치 주기 (Ct)로 불린다. DNA의 양이 이론적으로는 지수기 동안 매 주기 두 배가 되기 때문에, DNA의 상대적 양이 계산될 수 있다. 베이스라인(베이스라인)은 PCR의 처음 주기이며, 형광 발광 신호의 변화가 거의 없다.
- [0117] 역치는 서열 검출 시스템 소프트웨어에 의해 자동으로 결정되거나 수동으로 설정되고 실시간 검정에서 Ct 결정에 사용되는  $\Delta Rn$ 의 수준이다. 수준은 베이스라인보다 높고 증폭 곡선의 지수 성장 영역 내에 있도록 충분히 낮게 설정된다. 역치는 증폭 플롯과의 교차점이 Ct를 한정하는 선이다. Ct는 형광 발광이 역치를 통과하는 단편적인 주기 수이다. 샘플의 역치 주기는 텔로미어 폴리머라제 연쇄 반응의 역치 주기에서 참조 샘플의 역치 주기를 뺀으로써 결정된다 ( $\Delta Ct_{\text{샘플}} = Ct_{\text{텔로미어}} - Ct_{\text{참조}}$ ). 폴리머라제 연쇄 반응은 또한 단일 카피 수 유전자에 대한 역치 주기를 결정하기 위한 참조로서 단일 카피 수 유전자에 관한 프라이머로 수행된다. 텔로미어 폴리머라제 연쇄 반응에 대한 단일 카피 유전자의 평균 주기 수 차이는 텔로미어 길이를 결정할 것이다 ( $\Delta Ct = Ct_{\text{텔로미어}} - Ct_{\text{단일 카피 유전자}}$ ).
- [0118] 텔로미어 핵산은 가벼운 추출 방법을 사용하여 포르말린 고정되고, 파라핀 임베딩된 생물학적 샘플로부터 추출될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 세포를 분쇄하기 위해 세제, 초음파 처리(sonication), 전기천공법, 변성제, 등을 사용하여 처리될 수도 있다. 표적 핵산은 필요하면 정제될 수도 있다. 핵산을 분리하기 위해 컬럼을 사용하지 않는 가벼운 추출 방법이 유익한데 이 방법들이 최종 핵산 조제물에서 핵산의 더 작은 단편을 보유하기 때문이라는 것이 발견되었다 (작은 DNA 단편은 FFPE 샘플에서 발견되고 컬럼 추출 중에 손실될 수 있다). 일부 구체예에서, 추출 방법은 적어도 50 bp, 적어도 60 bp, 적어도 70 bp, 적어도 80 bp인 다수의 텔로미어 표적 핵산 단편을 보유한다. 한 구체예에서, 추출 방법은 60 bp 미만, 70 bp 미만, 80 bp 미만, 90 bp 미만, 100 bp 미만, 110 bp 미만인 핵산 단편을 보유한다. 한 구체예에서, 가벼운 DNA 추출 방법은 DNA 단편을 분리하기 위해 컬럼을 사용하지 않는다. 한 구체예에서, 핵산 추출 방법은 BioChain FFPE Tissue DNA Extraction Kit이다.
- [0119] 한 구체예에서, FFPE 샘플은 DNA의 추출 전 파라핀이 제거될 수 있다. 또 다른 구체예에서, DNA는 FFPE 샘플의 사전 파라핀 제거 없이 FFPE 샘플로부터 추출될 수 있다. 이 구체예에서, 파라핀은 FFPE 샘플로부터 제거되지 않는다. 한 구체예에서, 추출된 핵산은 적어도 1분, 5분, 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 70분, 80분 동안 적어도 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C로 가열된다.
- [0120] DNA 추출 후, DNA는 형광 염료 (예를 들어, SYBR Green I, Invitrogen, Carlsbad, CA)로 표지된다. 일부 구체예에서, DNA는 약 0.04X, 0.06X, 0.08X, 0.1X, 0.15X, 0.2X, 0.25X, 0.3X, 0.35X, 0.4X, 0.45X, 0.5X, 0.55X, 0.60X, 0.65X, 0.70X, 0.75X, 0.8X, 0.9X, 1.0X, 또는 1.1X, 및 이 숫자들 사이의 어떤 값도 포함하는, SYBR Green I 염료 중 어떤 것으로도 표지된다. DNA 표지 후, 폴리머라제 연쇄 반응은 포르말린 고정되고 파라핀 생물학적 샘플로부터 추출된 표적 단일 카피 핵산 (실질적 상보성인 제1 가닥 및 제2 가닥 포함), 제1 단일 카피 유전자 프라이머 (제1 단일 카피 유전자 프라이머는 (i) 표적 단일 카피 유전자 핵산의 제1 가닥에 잡종화하고 (ii) DNA 폴리머라제에 의해 신장되어 신장된 단일 카피 유전자 프라이머를 형성할 수 있다), 및 제2 단일 카피



유전자 프라이머 (제2 단일 카피 유전자 프라이머는 (i) 신장된 제1 단일 카피 유전자 프라이머에 잡종화하고 (ii) DNA 폴리머라제에 의해 신장될 수 있다)를 사용하여 수행되며, 폴리머라제 연쇄 반응이 변성 및 신장의 주기로 진행되게 하고 역치 PCR 신호가 전달되는 복제 주기를 확인한다.

[0121] 텔로미어 서열은 세 단계에서 증폭된 폴리머라제 연쇄 반응이다. 단계 1은 DNA 폴리머라제를 활성화하기 충분한 조건 하에서 실행된다. 단계 2는 증폭의 다음 주기에 대한 주형의 역할을 하는 PCR 생성물을 발생시키기 충분한 조건 하에서 실행된다. 한 구체예에서, 단계 2의 주기의 수는 2 내지 8 주기, 또는 3 내지 6 주기 또는 3 내지 5 주기이다. 한 구체예에서, 분리 온도는 10초 내지 20초의 기간 동안 90℃ 내지 98℃, 또는 92℃ 내지 97℃ 또는 94℃ 내지 96℃의 범위에 있다. 한 구체예에서, 결합 온도는 5초 내지 20초의 기간 동안 45℃ 내지 60℃, 49℃ 내지 58℃, 50℃ 내지 55℃의 범위에 있다. 단계 3은 주형을 증폭시키기 충분한 조건 하에서 실행된다. 한 구체예에서, 단계 3의 주기의 수는 20 내지 40 주기, 또는 25 내지 35 주기이다. 한 구체예에서, 분리 온도는 10초 내지 20초의 기간 동안 90℃ 내지 98℃, 또는 92℃ 내지 97℃ 또는 94℃ 내지 96℃의 범위에 있다. 한 구체예에서, 결합 온도는 5초 내지 20초의 기간 동안 45℃ 내지 70℃, 49℃ 내지 68℃, 50℃ 내지 60℃의 범위에 있다.

[0122] 한 구체예에서, 단일 카피 유전자 증폭 qPCR은 상이한 플레이트 상에서 및 두 번째 플레이트 상에서 실행되는 텔로미어 증폭 qPCR과 비교하여 상이한 조건 하에서 실행된다. 또 다른 구체예에서, 단일 카피 유전자 증폭 qPCR은 첫 번째 웰에서 실행되고 텔로미어 증폭 qPCR은 같은 플레이트 상의 두 번째 웰에서 및 같은 조건 하에서 실행된다. qPCR 텔로미어 분석은 같은 환자 종양의 1, 2 또는 그 이상의 조직 샘플에서 실행될 수도 있다.

[0123] 한 구체예에서, PCR 반응에서 단일 카피 유전자 앰플리콘(amplicon)의 크기는 텔로미어 PCR 반응에 대한 앰플리콘의 크기와 유사하다. 한 구체예에서, 제1 및 제2 프라이머의 신장에 의해 발생한 단일 유전자 앰플리콘은 약 50 내지 100개의 뉴클레오티드, 60 내지 90개의 뉴클레오티드, 70 내지 80개의 뉴클레오티드이다.

[0124] 텔로미어 길이는 텔로머 정량적 폴리머라제 연쇄 반응의 역치 주기에서 단일 유전자 카피 정량적 PCR의 역치 주기를 뺀으로써 결정된다 ( $\Delta Ct_{\text{샘플}} = Ct_{\text{텔로미어}} - Ct_{\text{단일 카피 유전자}}$ ). 텔로머 폴리머라제 연쇄 반응에 대한 단일 카피 유전자의 평균 주기 수 차이는 텔로미어 길이를 결정할 것이다 ( $\Delta Ct = Ct_{\text{텔로미어}} - Ct_{\text{단일 카피 유전자}}$ ). 텔로미어 길이는 개체에 대하여 결정되고 개체의 집단에서 관찰된 텔로미어 길이 또는 참조 개체와 관련된다. 한 구체예에서, 개체의 집단은 테스트되는 개체의 나이와 일치하는 나이이다. 인간에 대하여, 나이-일치 집단은 개체의 나이의 약 10년 내, 또는 5년 내 또는 1년 내이다. 또 다른 구체예에서, 개체의 집단은 암 세포의 타입 (제한은 아니지만, 예를 들어, 폐암, 전립선암, 백혈병, 등)에 따라 일치된다.

[0125] 텔로미어 길이는 단일 카피 유전자 생성물에 의해 표준화된 텔로미어 생성물로서 표현된다. 즉, 샘플의 상대적 텔로미어 길이는 실험 샘플이 단일 유전자 카피 수 당 참조 DNA 샘플 및 텔로미어 반복 카피 수의 비율이 다른 인자이다. 각 실험 샘플에서 텔로미어 반복 영역의 양은 PCR 증폭의 지수기 동안 텔로미어 PCR 생성물의 특정 양을 생성하는데 필요한 PCR의 주기의 수에 관하여 실험 및 참조 샘플을 동등하게 만드는, 임의로 선택된 참조 DNA 샘플의 희석 수준으로서 측정된다. 유사하게 각 실험 샘플에서 단일 카피 유전자의 상대적 양은 PCR의 지수기 동안 단일 카피 유전자 PCR 생성물의 특정 양을 생성하는데 필요한 PCR의 주기의 수에 관하여 참조 DNA 샘플을 실험 샘플과 일치시키는데 필요한 참조 DNA 샘플의 희석 수준으로서 표현된다.

[0126] 한 구체예에서, 각 실험 샘플에 대하여, 희석 인자의 비율은 단일 카피 유전자 당 상대적 텔로미어 (T/S) 비율이다. 따라서 알려지지 않은 DNA가 단일 카피수 당 텔로미어 반복 카피 수 비율이 참조 DNA와 동일할 때 T/S=1이다. 참조 DNA 샘플 (특정 연구에서 모든 실험 샘플이 비교됨)은 단일 개체의 것일 수도 있거나 또는 다수의 개체로부터 모아진 샘플일 수도 있거나 또는 알려져 있는 길이의 텔로미어를 갖는 하나 이상의 세포주의 것일 수도 있다. 참조 개체 또는 모아진 샘플 또는 세포주의 T/S 비율에 관하여 한 개체의 T/S 비율은 개체의 DNA의 상대적 텔로미어 길이에 해당한다. 한 구체예에서, 세포주는 M14Me1-세포, A549 세포, SK-Mel-5 세포, 및 Ovar-5 세포로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0127] 또 다른 구체예에서, 각 실험 샘플에 대하여, 희석 인자의 비율은 단일 카피 유전자 당 상대적 텔로미어의  $\log_2$  ( $\log_2 S/T$ ) 비율이다. 참조 DNA 샘플 (특정 연구에서 모든 실험 샘플이 비교됨)은 단일 개체의 것일 수 있거나 그것은 다수의 개체로부터 모아진 샘플일 수 있거나 또는 그것은 알려진 길이의 텔로미어를 갖는 하나 이상의 세포주의 것일 수 있다. 참조 개체 또는 모아진 샘플 또는 세포주의  $\log_2 S/T$  비율에 비해 한 개체의  $\log_2 S/T$  비율은 개체의 DNA의 상대적 텔로미어 길이에 해당한다. 한 구체예에서, 세포주는 M14Me1-세포, A549 세포, SK-Mel-5 세포, 및 Ovar-5 세포로 구성된 군으로부터 선택된다.

- [0128] 개체 및 집단의 측정된 텔로미어 길이의 연관성은 다양한 통계적인 방법, 예를 들어, 콕스 비례 위험 회귀 모델(Cox proportional hazard regression model), 카플란-메이어 생존 분포 추정(Kaplan-Meier survival distribution estimate), 페토 윌콕슨 테스트(Peto Wilcoxon test), 최대 가능성 분석(maximum likelihood analysis), 다중 회귀 분석(multiple regression analysis) 등을 포함하는 생존율 분석으로 검사된다.
- [0129] 본원에서 설명된 qPCR 방법은 또한 텔로머라제 억제자 (예를 들어, 본원에서 개시된 텔로머라제 억제자 중 어떤 것)의 처리에 대한 개체의 반응을 측정하는데 사용될 수도 있다. 상대적 텔로미어 길이가 치료 시간 동안 고체 중앙에서 짧아지는 속도는 텔로머라제 억제자에 대한 개체의 반응을 결정하기 위해 측정된다.
- [0130] 게다가 다양한 약제가 최적의 잡종화, 증폭 및 검출을 용이하게 하기 위해 PCR 반응에 추가될 수도 있다. 이것은 염, 버퍼, 중립 단백질, 세제 등을 포함한다. 프로테아제 억제자, 뉴클레아제 억제자, 항미생물제 등과 같은 다른 약제가 반응의 효율을 개선하기 위해 투여될 수도 있다.
- [0131] qPCR을 통한 텔로미어 길이의 평가에 관련된 추가 정보는 미국 특허 출원 공개 번호 제2006/0210980호, 제2010/0151477호, 및 제2011/0207128호, 뿐만 아니라 국제 특허 출원 번호 제WO 2010/075413호 및 제WO 2012/0135125호에서 발견될 수 있으며, 이것들 각각의 개시물은 본원에서 참고로 포함된다.
- [0132] b. 텔로미어 형광 제자리 부합법 (telo-FISH)
- [0133] 일부 양태에서, 텔로미어 길이는 telo-FISH를 사용하여 결정된다. 이 방법에서, 세포는 고정되고 형광 발광 표지, 예를 들어, Cy-3, 플루오레세인, 로다민, 등에 컨쥬게이션된 프로브로 잡종화된다. 이 방법을 위한 프로브는 텔로미어 서열에 특이적으로 잡종화하도록 설계된 올리고뉴클레오타이드이다. 일반적으로, 프로브는 길이가 8 개 이상의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 길이가 12-20개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드이다. 한 양태에서, 프로브는 자연 발생한 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. 한 양태에서, 프로브는 펩티드 핵산인데, 이것은 유사한 천연 서열보다 더 높은 Tm을 갖고, 따라서 더 엄중한 잡종화 조건의 사용을 허용한다. 잡종화 및 분석을 위한 중기 염색체를 제공하기 위해 중기에 세포 주기 정지를 유발하도록 세포에 콜세미드와 같은 약제가 처리될 수도 있다. 일부 구체예에서, 세포 DNA는 또한 형광 발광 염료 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI)로 염색될 수 있다.
- [0134] 온전한 중기 염색체의 디지털 이미지가 획득되어 텔로미어에 잡종화된 프로브의 형광 강도가 정량화된다. 이것은 세포에서 평균 텔로미어 길이 이외에, 개개의 염색체의 텔로미어 길이의 측정을 허용하며, 서브텔로머 DNA의 존재와 연관된 문제를 방지한다 (Zjilmans, J. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7423-7428 (1997); Blasco, M. A. et al., Cell 91: 25-34 (1997); 참고로 포함됨). 형광 발광 신호의 강도는 텔로미어의 길이와 연관성이 있는데, 더 밝은 형광 발광 신호는 더 긴 텔로미어를 나타낸다.
- [0135] 일부 양태에서, 소프트웨어 (예를 들어, IN Cell developer Toolbox 1.9, GE Corp.)가 생물학적 샘플로부터 얻어지고 telo-FISH를 받은 세포의 평균 텔로미어 길이를 정량화하는데 이용된다. 한 구체예에서, 소프트웨어는 (i) DAPI 염색의 위치에 기초하여 결정되는 세포핵 주위, 및 (ii) 텔로미어 주위에 하나 이상의 선을 그리는데 사용된다. 각 핵 및 텔로미어가 둘러싸이면, 소프트웨어는 세포에서 각각의 텔로미어의 강도를 계산하고 이로 인해 생물학적 샘플로부터 유래된 세포에 대한 평균 텔로미어 길이를 결정할 수 있다. 일부 구체예에서, 텔로미어 길이는 하기 방정식을 사용하여 계산된다:
- [0136]  $1.376 \times \log_2(\text{강도}) - 6.215 \times \sqrt{(\text{면적})}$  [방정식 1]
- [0137] 여기에서 "강도"는 텔로미어의 강도로서 한정되고 "면적"은 그것의 주위에 그려진 선에 의해 한정된 텔로미어의 면적으로서 한정된다.
- [0138] 또 다른 구체예에서, 각 실험 샘플에 대하여, 방정식 1을 사용하여 계산된 값은 단일 개체로부터 또는 다수의 개체의 모아진 샘플로부터 또는 알려져 있는 길이의 텔로미어를 가진 하나 이상의 세포주로부터 계산된 값에 대하여 표준화된다. 참조 개체 또는 모아진 샘플 또는 세포주로부터 방정식 1을 사용하여 계산된 값에 관하여 방정식 1을 사용하여 계산된 값은 개체의 DNA의 상대적 텔로미어 길이에 해당한다. 한 구체예에서, 세포주는 M14Me1-세포, A549 세포, SK-Me1-5 세포, 및 Ovar-5 세포로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0139] 개체 및 집단의 측정된 텔로미어 길이의 연관성은 다양한 통계적 방법, 예를 들어, 콕스 비례 위험 회귀 모델, 카플란-메이어 생존 분포 추정, 페토 윌콕슨 테스트, 최대 가능성 분석, 다중 회귀 분석 등을 포함하는 생존 분석으로 검사된다.
- [0140] 3. 텔로머라제 억제자의 처리로부터 이익을 얻는, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 선택

하는 단계

[0141] 일부 양태에서, 텔로머라제 억제자의 처리로부터 이익을 얻는, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 선택하는 방법이 본원에서 제공되는데, 방법은 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로머 핵산의 상대적인 길이를 분석함으로써 상대적인 텔로미어 길이를 결정하는 단계; 및 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 평균 상대적 텔로미어 길이가 하나 이상의 알려진 기준으로부터 결정된 상대적 텔로미어 길이의 50번째 백분위수 또는 미만인 것으로 결정될 때 텔로머라제 억제자로의 치료로부터 이익을 얻는 개체를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 이메텔스타트이다. 또 다른 구체예에서, 암은 소세포 폐암, 유방암, 전립선암, 또는 혈액암이다. 다른 구체예에서, 개체는 인간이다.

[0142] 어떤 방법도 개체의 상대적 텔로미어 길이를 결정하는데 사용될 수 있는데, 본원에서 설명된 방법 중 어떤 것도 포함한다. 한 구체예에서, 텔로머 핵산의 상대적 길이는 포르말린 고정되고, 파라핀 임베딩된 (FFPE) 생물학적 샘플로부터 추출된 DNA의 qPCR을 사용하여 결정된다. 이 방법이 사용될 때, 구절 "상대적 텔로미어 길이"는 (i) 단일 카피 유전자 당 상대적 텔로미어 (T/S) 비율 또는 (ii) 상대적 텔로미어 당 단일 카피 유전자의  $\log_2$  ( $\log_2 S/T$ ) 비율로서 한정된다. 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 알려진 기준은 특성화된 세포주이다. "특성화된 세포주"는 세포주에서 세포의 텔로머 핵산의 상대적 길이가 알려져 있으며 비교적 일정하다는 것을 의미한다. 특성화된 세포주의 비-제한 예는 M14Me1-세포, A549 세포, SK-Mel-5 세포, 및 Ovar-5 세포를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 특성화된 세포주는 개체의 생물학적 샘플을 대표하는 세포주로부터 선택된다. 이 세포주들의 비-제한 예는 비소세포 폐암 세포주, 간세포 세포주, 또는 난소 세포주를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 알려져 있는 기준 중 하나 이상은 복수의 개체의 복수의 자연 발생한 종양으로부터 확립된 텔로미어 길이 범위이다. 한 구체예에서, 복수의 자연 발생한 종양의 암 세포는 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포와 같은 타입일 수 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로미어 길이는 텔로미어 길이 범위의 45번째 백분위수, 40번째 백분위수, 35번째 백분위수, 30번째 백분위수, 25번째 백분위수, 20번째 백분위수, 15번째 백분위수, 10번째 백분위수, 5번째 백분위수, 또는 미만 중 어떤 것에 있는 것으로 결정되며, 이 숫자들 사이의 어떤 백분위수도 포함한다.

[0143] 다른 구체예에서, 텔로머 핵산의 상대적 길이는 포르말린 고정되고, 파라핀 임베딩된 (FFPE) 생물학적 샘플로부터 추출된 DNA의 qPCR을 사용하여 결정되고 구절 "상대적 텔로미어 길이"는 상대적 텔로미어 당 단일 카피 유전자의  $\log_2$  ( $\log_2 S/T$ ) 비율로서 한정된다. 일부 구체예에서,  $\log_2 S/T$  비율은 약 0, -0.1, -0.2, -0.3, -0.4, -0.5, -0.6, -0.7, -0.8, -0.9, -1.0, -1.1, -1.2, -1.3, -1.4, -1.5, -1.6, -1.7, -1.8, -1.9, -2.0, 또는 그 이상 중 어떤 것보다 더 낮다.

[0144] 또 다른 구체예에서, 텔로머 핵산의 상대적 길이는 telo-FISH를 사용하여 결정된다. 이 방법이 사용될 때, 구절 "상대적 텔로미어 길이"는 상기 설명된 방법의 방정식 1을 사용하여 결정된 값으로 한정된다. 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 알려진 기준은 특성화된 세포주이다. "특성화된 세포주"는 세포주에서 세포의 상대적 텔로머 핵산이 알려져 있으며 비교적 일정하다는 것을 의미한다. 특성화된 세포주의 비-제한 예는 M14Me1-세포, A549 세포, SK-Mel-5 세포, 및 Ovar-5 세포를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 특성화된 세포주는 개체의 생물학적 샘플을 대표하는 세포주로부터 선택된다. 이 세포주들의 비-제한 예는 비소세포 폐암 세포주, 간세포 세포주, 또는 난소 세포주를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 알려져 있는 기준 중 하나 이상은 복수의 개체의 복수의 자연 발생한 종양으로부터 확립된 텔로미어 길이 범위이다. 한 구체예에서, 복수의 자연 발생한 종양의 암 세포는 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포와 같은 타입일 수 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로미어 길이는 텔로미어 길이 범위의 45번째 백분위수, 40번째 백분위수, 35번째 백분위수, 30번째 백분위수, 25번째 백분위수, 20번째 백분위수, 15번째 백분위수, 10번째 백분위수, 5번째 백분위수, 또는 미만 중 어떤 것에 있는 것으로 결정되며, 이 숫자들 사이의 어떤 백분위수도 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 설명된 방법의 방정식 1을 사용하여 결정된 바와 같이 상대적 텔로미어 길이는 약 0, -0.1, -0.2, -0.3, -0.4, -0.5, -0.6, -0.7, -0.8, -0.9, -1.0, -1.5, -2.0, -2.5, -3.0, -3.5, -4.0, -4.5, -5.0, -5.5, -6.0, -6.5, -7.0, -7.5, -8.0, -8.5, -9.0, -9.5, -10.0 또는 그 이상 중 어떤 것보다 낮으며, 이 값들 사이의 어떤 숫자도 포함한다.

[0145] C. 텔로머라제 억제자를 사용하여 세포 증식성 질환을 치료하는 방법

[0146] 일부 양태에서, 본 발명은 상기 상세히 설명된 바와 같이 세포 증식성 질환 (예를 들어, 암)과 관련된 증상 또는 상태 (장애, 손상)를 억제하는 방법에 관한 것이다. 이와 같이, 상태의 모든 효과가 완전히 방지되거나 역전

될 필요는 없지만, 본 발명에서 현재 개시된 방법은 환자에게 상당한 치료적 이익으로 연장될 가능성이 높다. 이와 같이, 치료적 이익이 반드시 세포 증식성 질환 (예를 들어, 암)으로부터 발생하는 특정 상태에 대한 완벽한 예방 또는 치유는 아니지만, 오히려, 세포 증식성 질환으로부터 발생하는 증상의 감소 또는 예방, 이러한 증상의 발생의 감소 또는 예방 (양적으로 또는 질적으로), 이러한 증상의 심각도 또는 이것들의 생리학적 효과의 감소, 및/또는 세포 증식성 질환 증상을 겪은 후 개체의 회복의 향상을 포함하는 결과를 포함할 수 있다.

[0147] 특이적으로, 본 발명의 조성물 (예를 들어, 본원에서 개시된 텔로머라제 억제자 화합물 중 어떤 것)은, 개체에 투여될 때, 세포 증식성 질환 (예를 들어, 암)과 관련된 증상 또는 질환 중 하나 이상을 치료하거나 예방하고 및/또는 이 장애의 증상 또는 이것과 관련된 상태를 감소시키거나 완화할 수 있다. 이와 같이, 세포 증식성 질환 (예를 들어, 암)으로부터 발생하는 효과 또는 증상으로부터 개체의 보호는 장애의 효과의 발생을 및/또는 심각도의 예방 또는 감소 및 장애의 효과가 이미 발생하고 있거나 발생하기 시작한 환자의 치료를 포함한다. 유익한 효과는 당업자에 의해 및/또는 환자를 치료하는 숙련된 의사에 의해 쉽게 평가될 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 방법으로 치료된 이러한 환자를 치료되지 않은 사람들과 비교하여 평가하는데 사용된 적어도 하나의 임상적 또는 생물학적 점수, 값, 또는 측정값의 심각도 또는 발생률의 양성 또는 유익한 차이가 있다.

[0148] 방법은 보조 요법으로 실행될 수 있다. "보조 요법"은 개체가 증식성 질환, 특히 암의 병력을 가지며 일반적으로 (반드시는 아니지만) 수술 (예를 들어, 수술적 절제), 방사선 요법, 및 화학 요법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 치료법에 반응성인 임상적 요법을 나타낸다. 하지만, 증식성 질환 (예를 들어, 암)의 병력 때문에, 이 개체들은 질환에 걸릴 위험이 있는 것으로 간주된다. "보조 요법"에서 치료 및 투여는 치료의 이후의 방식을 나타낸다. 위험의 정도 (즉, 보조 요법 중의 개체가 "높은 위험" 또는 "낮은 위험"으로 간주될 때)는 여러 인자, 가장 일반적으로 처음 치료될 때 질환의 정도에 의존적이다.

[0149] 본원에서 제공된 방법은 또한 "선행 보조 요법(neoadjuvant setting)"으로 실행될 수 있다, 즉, 방법은 1차/최종 치료 전 수행될 수 있다. 일부 구체예에서, 개체는 이전에 치료되었다. 일부 구체예에서, 개체는 이전에 치료되지 않았다. 일부 구체예에서, 처리는 1선 치료이다.

[0150] 따라서, 일부 양태에서, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 치료하는 방법이 본원에서 제공되는데, 방법은 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로머 핵산의 상대적인 길이를 분석함으로써 상대적인 텔로미어 길이를 결정하는 단계; 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 평균 상대적 텔로미어 길이가 하나 이상의 알려진 기준으로부터 결정된 상대적 텔로미어 길이의 50번째 백분위수 또는 미만인 것으로 결정될 때 텔로머라제 억제자로의 치료로부터 이익을 얻는 개체를 선택하는 단계; 및 텔로머라제 억제자의 치료적 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 이메텔스타트이다. 또 다른 구체예에서, 암은 소세포 폐암, 유방암, 전립선암, 또는 혈액암이다. 다른 구체예에서, 개체는 인간이다.

[0151] 다른 양태에서, 암으로 진단되거나 이것에 걸린 것으로 의심되는 개체를 치료하는 방법이 본원에서 제공되는데, 방법은 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 평균 상대적 텔로미어 길이가 하나 이상의 알려진 기준으로부터 결정된 상대적 텔로미어 길이의 50번째 백분위수 또는 미만에 있는 것으로 결정될 때 텔로머라제 억제자의 치료적 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는 이메텔스타트이다. 또 다른 구체예에서, 암은 소세포 폐암, 유방암, 전립선암, 또는 혈액암이다. 다른 구체예에서, 개체는 인간이다.

[0152] 어떤 방법도 개체에서 상대적 텔로미어 길이를 결정하는데 사용될 수 있으며, 본원에서 설명된 방법 중 어떤 것도 포함한다. 한 구체예에서, 텔로머 핵산의 상대적 길이는 포르말린 고정되고, 파라핀 임베딩된 (FFPE) 생물학적 샘플으로부터 추출된 DNA의 qPCR을 사용하여 결정된다. 이 방법이 사용될 때, 구절 "상대적 텔로미어 길이"는 (i) 단일 카피 유전자 당 상대적 텔로미어 (T/S) 비율 또는 (ii) 상대적 텔로미어 당 단일 카피 유전자의  $\log_2$  ( $\log_2 S/T$ ) 비율로서 한정된다. 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 알려진 기준은 특성화된 세포주이다. "특성화된 세포주"는 세포주에서 세포의 텔로머 핵산의 상대적 길이가 알려져 있고 비교적 일정하다는 것을 의미한다. 특성화된 세포주의 비-제한 예는 M14Me1-세포, A549 세포, SK-Me1-5 세포, 및 Ovar-5 세포를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 특성화된 세포주는 개체의 생물학적 샘플을 대표하는 세포주로부터 선택된다. 이 세포주들의 비-제한 예는 비소세포 폐암 세포주, 간세포 세포주, 또는 난소 세포주를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 알려져 있는 기준 중 하나 이상은 복수의 개체의 복수의 자연 발생한 종양으로부터 확립된 텔로미어 길이 범위이다. 한 구체예에서, 복수의 자연 발생한 종양의 암 세포는 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포와 같은 타입일 수 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로미어 길이는 텔



로미어 길이 범위의 45번째 백분위수, 40번째 백분위수, 35번째 백분위수, 30번째 백분위수, 25번째 백분위수, 20번째 백분위수, 15번째 백분위수, 10번째 백분위수, 5번째 백분위수, 또는 미만 중 어떤 것에 있는 것으로 결정되며, 이 숫자들 사이의 어떤 백분위수도 포함한다.

[0153] 또 다른 구체예에서, 텔로머 핵산의 상대적 길이는 telo-FISH를 사용하여 결정된다. 이 방법이 사용될 때, 구절 "상대적 텔로미어 길이"는 상기 설명된 방법의 방정식 1을 사용하여 결정된 값으로 한정된다. 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 알려진 기준은 특성화된 세포주이다. 특성화된 세포주의 비-제한 예는 M14Me1-세포, A549 세포, SK-Mel-5 세포, 및 Ovar-5 세포를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 특성화된 세포주는 개체의 생물학적 샘플을 대표하는 세포주로부터 선택된다. 이 세포주들의 비-제한 예는 비소세포 폐암 세포주, 간세포 세포주, 또는 난소 세포주를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 알려져 있는 기준 중 하나 이상은 복수의 개체의 복수의 자연 발생한 종양으로부터 확립된 텔로미어 길이 범위이다. 한 구체예에서, 복수의 자연 발생한 종양의 암 세포는 개체의 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포와 같은 타입일 수 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 샘플에 존재하는 암 세포에서 텔로미어 길이는 텔로미어 길이 범위의 45번째 백분위수, 40번째 백분위수, 35번째 백분위수, 30번째 백분위수, 25번째 백분위수, 20번째 백분위수, 15번째 백분위수, 10번째 백분위수, 5번째 백분위수, 또는 미만 중 어떤 것에 있는 것으로 결정되며, 이 숫자들 사이의 어떤 백분위수도 포함한다.

[0154] D. 텔로머라제 억제자의 투여

[0155] 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자 (예를 들어, 본원에서 개시된 텔로머라제 억제자 화합물 중 어떤 것)는 주사의 형태로 투여된다. 주사는 수성 주사 가능한 첨가제 또는 담체와 함께 화합물을 포함할 수 있다. 적합한 수성 주사 가능한 첨가제 또는 담체의 비-제한 예는 당업자에게 잘 알려져 있고, 그것들, 및 제형을 제형화하는 방법은 Alfonso AR: Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton Pa., 1985와 같은 이러한 표준 참고문헌에서 발견될 수도 있다. 적합한 수성 주사 가능한 첨가제 또는 담체는 물, 수성 식염수, 수성 텍스트로스 용액, 등을 포함하며, 선택적으로 10% 만니톨 또는 다른 당, 10% 글리신, 또는 다른 아미노산과 같은 용해 인핸서(enhancer)를 함유한다. 조성물은 피하, 복강 내, 또는 정맥 내로 주사될 수 있다.

[0156] 일부 구체예에서, 정맥 내 투여가 사용되며, 그것은 몇 분 내지 한 시간 또는 그 이상의 기간, 예를 들어, 약 15분 동안 지속적인 정맥 내 주입일 수 있다. 투여된 양은 텔로머라제 억제자의 타입, 단위 투약량의 크기, 첨가제 또는 담체의 종류, 및 당업자에게 잘 알려져 있는 다른 인자에 따라 크게 다를 수 있다. 텔로머라제 억제자는, 예를 들어, 약 0.001% 내지 약 10% (w/w), 약 0.01% 내지 약 1%, 약 0.1% 내지 약 0.8%, 또는 그 안의 어떤 범위도 포함할 수 있으며, 나머지는 첨가제(들) 또는 담체(들)를 포함한다.

[0157] 경구 투여를 위해서, 텔로머라제 억제자는, 예를 들어, 결합제; 충전제; 윤활제; 붕괴제; 또는 습윤제와 같이 약학적으로 허용 가능한 첨가제 또는 담체와의 통상적인 수단에 의해 제조된 타블렛 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 경구 투여용 액체 조제물은, 예를 들어, 용액, 시럽 또는 현탁액의 형태를 취할 수 있거나, 사용 전 물 또는 다른 적합한 비히클로 구성된 건조 제품으로서 제공될 수 있다. 이러한 액체 조제물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제, 예를 들어, 현탁화제 (예를 들어, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 에멀전화제 (예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클 (예를 들어, 아몬드 오일, 유성 에스테르, 에틸 알콜 또는 분별화된 식물성 오일); 및 보존제 (예를 들어, 메틸 또는 프로필-p-히드록시벤조에이트 또는 소르브산)와의 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 조제물은 또한 버퍼 염, 방향제, 및 착색제를 적절히 함유할 수 있다.

[0158] 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자는, 예를 들어, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 이산화탄소, 또는 이것들의 조합과 같은 적합한 추진제를 포함할 수 있는 에어로졸 스프레이(aerosol spray) 또는 분무기를 통한 흡입에 의해 투여될 수 있다. 하나의 비-제한 예에서, 가압형 에어로졸에 대한 투약 단위는 계량 밸브를 통해 전달될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는, 예를 들어, 흡입기에서 사용될 수 있고 화합물과, 예를 들어, 전분 또는 락토스와 같이 적합한 파우더 베이스(powder base)의 분말화된 혼합물을 함유하도록 제형화될 수 있다.

[0159] 일부 구체예에서, 조성물 (예를 들어, 약학적 조성물) 중의 텔로머라제 억제자의 양은 하기 범위 중 어떤 것에도 포함된다: 약 0.5 내지 약 5 mg, 약 5 내지 약 10 mg, 약 10 내지 약 15 mg, 약 15 내지 약 20 mg, 약 20 내지 약 25 mg, 약 25 내지 약 50 mg, 약 25 내지 약 50 mg, 약 50 내지 약 75 mg, 약 50 내지 약 100 mg, 약 75 내지 약 100 mg, 약 100 내지 약 125 mg, 약 125 내지 약 150 mg, 약 150 내지 약 175 mg, 약 175 내지 약 200 mg, 약 200 내지 약 225 mg, 약 225 내지 약 250 mg, 약 250 내지 약 300 mg, 약 300 내지 약 350 mg, 약

350 내지 약 400 mg, 약 400 내지 약 450 mg, 또는 약 450 내지 약 500 mg. 일부 구체예에서, 약학적 조성물의 유효량 (예를 들어, 단위 투약 형태) 중 텔로머라제 억제자의 양은 약 5 mg 내지 약 500 mg, 예를 들어, 약 30 mg 내지 약 300 mg 또는 약 50 mg 내지 약 200 mg의 범위에 있다. 일부 구체예에서, 약학적 조성물 중의 텔로머라제 억제자의 농도는 희석되거나 (약 0.1 mg/ml) 또는 농축되며 (약 100 mg/ml), 예를 들어, 약 0.1 내지 약 50 mg/ml, 약 0.1 내지 약 20 mg/ml, 약 1 내지 약 10 mg/ml, 약 2 mg/ml 내지 약 8 mg/ml, 약 4 내지 약 6 mg/ml, 약 5 mg/ml 중 어떤 것도 포함한다. 일부 구체예에서, 텔로머라제 억제자의 농도는 적어도 약 0.5 mg/ml, 1.3 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 또는 50 mg/ml 중 어떤 것이다.

[0160] 약학적 조성물 중의 텔로머라제 억제자의 예시적 유효량은  $25 \text{ mg/m}^2$ ,  $30 \text{ mg/m}^2$ ,  $50 \text{ mg/m}^2$ ,  $60 \text{ mg/m}^2$ ,  $75 \text{ mg/m}^2$ ,  $80 \text{ mg/m}^2$ ,  $90 \text{ mg/m}^2$ ,  $100 \text{ mg/m}^2$ ,  $120 \text{ mg/m}^2$ ,  $125 \text{ mg/m}^2$ ,  $150 \text{ mg/m}^2$ ,  $160 \text{ mg/m}^2$ ,  $175 \text{ mg/m}^2$ ,  $180 \text{ mg/m}^2$ ,  $200 \text{ mg/m}^2$ ,  $210 \text{ mg/m}^2$ ,  $220 \text{ mg/m}^2$ ,  $250 \text{ mg/m}^2$ ,  $260 \text{ mg/m}^2$ ,  $300 \text{ mg/m}^2$ ,  $350 \text{ mg/m}^2$ ,  $400 \text{ mg/m}^2$ ,  $500 \text{ mg/m}^2$ ,  $540 \text{ mg/m}^2$ ,  $750 \text{ mg/m}^2$ ,  $1000 \text{ mg/m}^2$ , 또는  $1080 \text{ mg/m}^2$  중 적어도 어떤 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 다양한 구체예에서, 약학적 조성물은 텔로머라제 억제자의  $350 \text{ mg/m}^2$ ,  $300 \text{ mg/m}^2$ ,  $250 \text{ mg/m}^2$ ,  $200 \text{ mg/m}^2$ ,  $150 \text{ mg/m}^2$ ,  $120 \text{ mg/m}^2$ ,  $100 \text{ mg/m}^2$ ,  $90 \text{ mg/m}^2$ ,  $50 \text{ mg/m}^2$ , 또는  $30 \text{ mg/m}^2$  중 어떤 것보다 더 적은 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 투여 당 텔로머라제 억제자의 양은  $25 \text{ mg/m}^2$ ,  $22 \text{ mg/m}^2$ ,  $20 \text{ mg/m}^2$ ,  $18 \text{ mg/m}^2$ ,  $15 \text{ mg/m}^2$ ,  $14 \text{ mg/m}^2$ ,  $13 \text{ mg/m}^2$ ,  $12 \text{ mg/m}^2$ ,  $11 \text{ mg/m}^2$ ,  $10 \text{ mg/m}^2$ ,  $9 \text{ mg/m}^2$ ,  $8 \text{ mg/m}^2$ ,  $7 \text{ mg/m}^2$ ,  $6 \text{ mg/m}^2$ ,  $5 \text{ mg/m}^2$ ,  $4 \text{ mg/m}^2$ ,  $3 \text{ mg/m}^2$ ,  $2 \text{ mg/m}^2$ , 또는  $1 \text{ mg/m}^2$  중 어떤 것보다 더 적다. 일부 구체예에서, 약학적 조성물 중의 텔로머라제 억제자의 유효량은 하기 범위 중 어떤 것에도 포함된다: 약 1 내지 약  $5 \text{ mg/m}^2$ , 약 5 내지 약  $10 \text{ mg/m}^2$ , 약 10 내지 약  $25 \text{ mg/m}^2$ , 약 25 내지 약  $50 \text{ mg/m}^2$ , 약 50 내지 약  $75 \text{ mg/m}^2$ , 약 75 내지 약  $100 \text{ mg/m}^2$ , 약 100 내지 약  $125 \text{ mg/m}^2$ , 약 125 내지 약  $150 \text{ mg/m}^2$ , 약 150 내지 약  $175 \text{ mg/m}^2$ , 약 175 내지 약  $200 \text{ mg/m}^2$ , 약 200 내지 약  $225 \text{ mg/m}^2$ , 약 225 내지 약  $250 \text{ mg/m}^2$ , 약 250 내지 약  $300 \text{ mg/m}^2$ , 약 300 내지 약  $350 \text{ mg/m}^2$ , 또는 약 350 내지 약  $400 \text{ mg/m}^2$ . 일부 구체예에서, 약학적 조성물 중 텔로머라제 억제자의 유효량은 약 5 내지 약  $300 \text{ mg/m}^2$ , 예를 들어, 약 20 내지 약  $300 \text{ mg/m}^2$ , 약 50 내지 약  $250 \text{ mg/m}^2$ , 약 100 내지 약  $150 \text{ mg/m}^2$ , 약 120  $\text{mg/m}^2$ , 약 130  $\text{mg/m}^2$ , 또는 약  $140 \text{ mg/m}^2$ , 또는 약  $260 \text{ mg/m}^2$ 이다.

[0161] 상기 양태 중 어떤 것의 일부 구체예에서, 약학적 조성물 중 텔로머라제 억제자의 유효량은 1 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3.5 mg/kg, 5 mg/kg, 6.5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 9.4mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 또는 20 mg/kg 중 적어도 어떤 것을 포함한다. 다양한 구체예에서, 약학적 조성물 중 텔로머라제 억제자의 유효량은 텔로머라제 억제자의 350 mg kg, 300 mg/kg, 250 mg/kg, 200 mg/kg, 150 mg/kg, 100 mg/kg, 50 mg/kg, 30 mg/kg, 25 mg/kg, 20 mg/kg, 10 mg/kg, 9.4mg/kg, 7.5 mg/kg, 6.5 mg/kg, 5 mg/kg, 3.5 mg/kg, 2.5 mg/kg, 또는 1 mg/kg 중 어떤 것보다 적은 것을 포함한다.

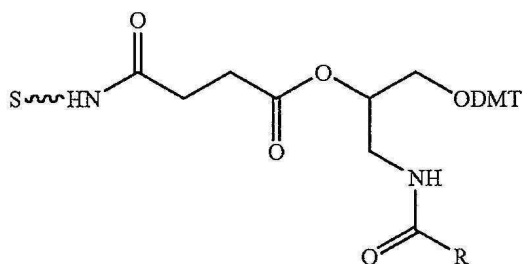
[0162] 약학적 조성물 (예를 들어, 본원에서 개시된 텔로머라제 억제자 중 어떤 것을 함유하는 약학적 조성물)에 대한 예시적 투여 빈도는 매일; 이틀마다; 일주일에 두 번; 일주일에 세 번; 휴식 없이 매주; 매주, 4주 당 3번; 3주 당 한 번; 2주 당 한 번; 매주, 3주 당 두 번을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 거의 2주 당 한 번, 3주 당 한 번, 4주 당 한 번, 6주 당 한 번, 또는 8주 당 한 번 투여된다. 일부 구체예에서, 조성물은 매주 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 또는 7x (즉, 매일), 또는 하루에 세 번, 하루에 두 번 중 적어도 어떤 것으로 투여된다. 일부 구체예에서, 각 투여 사이의 간격은 6개월, 3개월, 1개월, 20일, 15일, 12일, 10일, 9일, 8일, 7일, 6일, 5일, 4일, 3일, 2일, 또는 1일 중 어떤 것 이하이다. 일부 구체예에서, 각 투여 사이의 간격은 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 8개월, 또는 12개월 중 어떤 것 이상이다. 일부 구체예에서, 투여 일정 중에 휴식은 없다. 일부 구체예에서, 각 투여 사이의 간격은 약 1주 이하이다.

[0163] 약학적 조성물의 투여는 약 1개월에서 최대 약 7년으로 늘어난 기간 동안 연장된다. 일부 구체예에서, 조성물은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 또는 84개월 중 적어도 어떤 것의 기간 동안 투여된다.

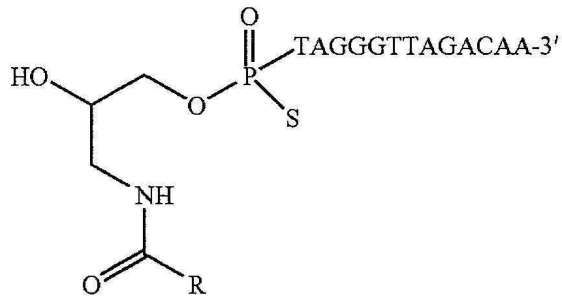
[0164] 실시예



- [0165] 실시예 1: 올리고뉴클레오타이드 N3' → P5' 포스포르아미데이트 iNP 또는 N3' → P5' 티오포스포르아미데이트 (NPS)의 제조 및 지질 컨쥬게이션
- [0166] 이 실시예는 지질 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오타이드 N3' → P5' 포스포르아미데이트 (NP) 또는 N3' → P5' 티오포스포르아미데이트 (NPS)를 합성하는 방법을 나타낸다.
- [0167] 재료 및 방법
- [0168] 시작 화합물
- [0169] 이 화합물은, 예를 들어, McCurdy et al., Tetrahedron Letters 38: 207-210 (1997) 또는 Pongracz & Gryaznov, Tetrahedron Letters 49: 7661-7664 (1999)에서 설명된 바와 같이 제조될 수도 있다. 시작 3'-아미노 뉴클레오시드 모노머는 Nelson et al., J. Org. Chem. 62: 7278-7287 (1997)에서 설명된 바와 같이 또는 Gryaznov et al., 미국 출원 공개 번호 제2006/0009636호에서 설명된 방법에 의해 제조될 수도 있다.
- [0170] 지질 부착
- [0171] 다양한 합성 접근법은 지질 모이어티 L을 올리고뉴클레오타이드에 컨쥬게이션하는데 사용될 수 있으며, 선택된 결합의 성질에 의존적이다; 예를 들어, Mishra et al., Biochim. et Biophys. Acta 1264: 229-237 (1995), Shea et al., Nucleic Acids Res. 18: 3777-3783 (1995), 또는 Rump et al., Bioconj. Chem. 9: 341-349 (1995)를 참고하면 된다. 전형적으로, 컨쥬게이션은 올리고뉴클레오타이드 말단에서 적합한 작용기의 사용을 통해 달성된다. 예를 들어, NP 및 NPS 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 존재하는 3'-아미노 기는 아마이드 결합을 형성하기 위해, 적합한 커플링(coupling) 촉매를 사용하여, 카르복시 산, 산 염화물, 무수물 및 활성 에스테르와 반응될 수 있다. 티올 기가 또한 작용기로서 적합하다 (Kupihar et al., Bioorg. Med. Chem. 9: 1241-1247 (2001)을 참고하면 된다). 다른 사슬 길이의 다양한 아미노- 및 티올-기능화된 변형자는 올리고뉴클레오타이드 합성에 상업적으로 이용 가능하다.
- [0172] 지질기를 NP 또는 NPS 올리고뉴클레오타이드의 말단에 부착하기 위한 특이적 접근법은 미국 출원 공개 번호 제2005/0113325호에서 설명된 것들을 포함하는데, 이것은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 상기 언급된 아마이드 결합 이외에, 예를 들어, 지질은 지질 및 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 포스포르아미데이트 또는 티오포스포르아미데이트 결합을 생산하기 위해 지질의 포스포라미데이트를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 사슬에 부착될 수도 있다. 완전히 보호된 지지물-결합된 올리고뉴클레오타이드의 유리 3'-아미노는 또한 적합한 지질 알데히드와 반응된 후 이어서, 나트륨 시아노보로하이드라이드로 환원될 수도 있으며, 이것은 아민 결합을 생산한다.
- [0173] 지질의 5' 말단으로의 부착을 위해, 미국 출원 공개 번호 제2005/0113325호에서 설명된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드는 변형된, 지질-함유 고체 지지물을 사용하여 합성될 수 있다. 3'-아미노-1,2-프로판디올과 지방산 아실 클로라이드 (RC(O)Cl)의 반응에 이어서, 1차 알콜의 디메톡시트리틸화 및 2차 알콜의 숙시닐화는 그때 유리 숙시닐 카르복시 기를 통해 고체 지지물에 커플링되는 중간물을 제공한다. 변형된 지지물의 예가 하기 나타나는 데, S-는 장쇄 알킬 아민 CPG 지지물을 나타내고, R은 지질을 나타낸다.



- [0174]
- [0175] 이 과정은, 예를 들어, Pongracz & Gryaznov (1999)에서 설명된 바와 같이, 5'에서 3' 방향으로 올리고뉴클레오타이드의 합성으로 이어지며, -ODMT 기의 탈보호 및 포스포리틸화와 함께 시작한다. 이것은, 고체 지지물로부터 분할 후, 예를 들어, 하기 구조를 생산하는데 효과적이다:



[0176]

[0177] 상기 구조는, -R이  $-(CH_2)_{14}CH_3$  (팔미토일)일 때, 본원에서 GRN163L (이메텔스타트)로 지정된다.

[0178] FlashPlate™ 검정

[0179] 이 검정을 본질적으로 Asai et al., Cancer Research 63: 3931-3939 (2003)에서 설명된 바와 같이 실행하였다. 간략히 말하면, 검정은 TTAGGG 텔로미어 반복 영역의 비오티닐화된 텔로머라제 기질 프라이머로의 추가를 측정함으로써 텔로머라제 활성을 검출하고 및/또는 측정한다. 비오티닐화된 생성물을 스트렙타비딘-코팅된 미세역가 플레이트에서 캡처하고, 33P로 표지된, 3.5 텔로미어 반복 영역에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 프로브를 텔로머라제 생성물을 측정하는데 사용한다. 결합되지 않은 프로브를 세척에 의해 제거하고, 캡처된 텔로머라제 생성물에 어닐링(annealing)하는 프로브의 양을 섬광 계수(scintillation counting)에 의해 결정한다.

[0180] 실시예 2: 이메텔스타트 NSC 단계 II (CP14B-012) 연구의 포르말린-고정되고, 파라핀-임베딩된 qPCR

[0181] 이 실시예는 FFPE NSC 단계 II (CP14B-012) 연구 조직 샘플의 상대적 텔로미어 길이를 결정하는 정량적 폴리머라제 연쇄 반응의 성능을 입증한다.

[0182] 재료 및 방법

[0183] 임상 시험 설계

[0184] NSC 단계 II (CP14B-012) 연구의 목적은 4 주기의 백금 기반 치료법 이후 진행하지 않은 진행 단계 비소세포 폐암에 걸린 환자에 대한 유지 요법으로서 이메텔스타트 (GRN163L)의 효능 및 안전성을 평가하는 것이었다. 참가자를 이메텔스타트 플러스 치료 기준 대 치료 기준 단독으로 2:1 비율로 무작위로 추출하였다. 유발 화학 요법과 함께 베바시주맵을 받은 참가자는 이 연구에서 베바시주맵을 계속해서 받았다.

[0185] 1차 결과 측정값은 무진행 생존율인데, 어느 쪽이 먼저 발생하든, 무작위 추출에서 문서로 기록된 질환 진행 또는 사망까지의 시간으로서 한정되며, RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)에 따르는 조사자의 평가에 의해 결정된 바와 같다. 2차 결과 측정값은 객관적인 반응, 전 원인(all-cause) 사망까지의 시간, 및 안전성 및 내성이었다 (발생률, 부작용의 성질, 및 심각도, 실험실 이상, 및 바이탈 사인(vital sign)에 의해 평가됨).

[0186] 환자를 두 부분으로 나누었다. 실험적 부분에서, 환자는 이메텔스타트 플러스 치료 기준 (베바시주맵 또는 관찰)을 받았다. 특히적으로, 9.4 mg/kg의 이메텔스타트 (GRN163L)를 각 21일 주기 중 제1 일 및 제8 일에 2시간 IV 주입을 통해 질환 진행까지 환자에게 제공하였다. 투여되면, 베바시주맵을 21일 주기 중 제1 일에 제공하였으며, 투약량 및 지속 기간은 FDA-승인된 베바시주맵 포장 삽입물에 따랐다.

[0187] 제어 부분에서, 환자는 베바시주맵 또는 관찰을 받았다. 투여되면, 베바시주맵을 21일 주기 중 제1 일에 제공하였으며, 투약량 및 지속 기간은 FDA-승인된 베바시주맵 포장 삽입물에 따랐다.

[0188] 샘플을 NSC 단계 II (CP14B-012) 연구에 등록된 116명의 환자 중 61명으로부터 얻었고, 이것들 중 57개는 무진행 생존율 (PFS) 분석에 사용된 평가 가능한 검정 결과를 초래한다.

[0189] 포르말린 고정 및 파라핀 임베딩

[0190] 포르말린 고정되고 파라핀 임베딩된 샘플을 HistoGel Kit (제품 번호 R904012: Richard Allen Scientific, ThermoFisher의 자회사, Kalamazoo, MI)를 사용하여 제조하였다. 세포를 80-90% 면적으로 배양하였다. 세포 펠릿 ( $10^6$ /펠릿)을 먼저  $50 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 녹은 HistoGel의 200-500  $\mu\text{L}$ 에서 부드럽게 혼합하였고, 그때 얼음 위에서 냉각하여 고체화하였다. 고체화 후, 샘플을 재빨리 회전시켜 잔여 액체를 제거하였다. 4% 포르말린 10 mL을 겔

화된 펠릿에 추가하였고 세포 펠릿을 실온에서 48시간 동안 고정하였다. 고정된 세포 펠릿을 그때 Hayward, CA에 있는 Histo-Tec Laboratory의 표준 조직학 기술을 사용하여 임베딩하였고, 그때 -80℃에서 냉동시켰다.

- [0191] DNA 추출
- [0192] NSCLC 단계 II 연구 샘플의 게놈 DNA를 제조사의 지시에 따라, BioChain (BioChain Institute, 제품 번호 K5019100, Hayward, CA)에 의해 만들어진 FFPE DNA Extraction Kit를 사용하여 FFPE 가공된 샘플로부터 분리하였다. 조직을 키트 버퍼 170  $\mu$ L 및 프로테아제 K 30  $\mu$ L에서 혼합하였다. 혼합물을 1시간 동안 56℃에서 배양하였고, 그때 온도를 60분 동안 90℃, 그 다음에 2분 동안 98℃로 증가시켰고, 2분 동안 얼음 위에 두었다. 혼합물을 4℃에서 10분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 얻었다. DNA 농도를 Quant-iT Pico Green dsDNA Assay Kit (Invitrogen, 제품 번호 P7589, Carlsbad, CA)에 의해 결정하였다. 상층액 중 DNA의 농도를 H<sub>2</sub>O로 0.1 ng/ $\mu$ L로 조정하였다.
- [0193] 정량적 PCR (qPCR)
- [0194] 모든 정량적 PCR 반응을 ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad CA)을 사용하여 수행하였다. 두 번의 PCR을 각 샘플에 대하여 수행하였는데, 하나는 텔로미어 (T) 증폭에 대한 주기 역치 (Ct) 값을 결정하고 다른 것은 단일 카피 유전자 (산성 리보솜 포스포단백질 P, 36B4)의 증폭에 대한 Ct 값을 결정한다.
- [0195] 텔로미어 증폭을 위한 프라이머 서열은 Telg 5'-ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTA GTG T (SEQ ID NO: 4) 및 Tele 5'-TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA (SEQ ID NO: 5)였고 (Cawthon, 2009); 36B4u에 대한 것들은 5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC (SEQ ID NO: 6) 및 36B4d: 5'-CCC ATT CTA TCA TCA TCA ACG GGT ACA A (SEQ ID NO: 7)였다 (Cawthon, 2002).
- [0196] 텔로미어 증폭에 대한 각 PCR 반응을 1 ng/10  $\mu$ L 샘플 (0.1 ng/ $\mu$ L) 및 1.25 U Hotstart DNA Taq 폴리머라제 (BioChain), 150 nM 6-ROX 형광 발광 염료, 0.04 x SYBR Green I 핵산 염색제 (Invitrogen, Carlsbad CA), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 각각 0.2 mM 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), 5 mM 디티오프레이톨, 1% 디메틸 술폭시드, 및 15 mM Tris-HCl pH 8.0 및 프라이머 쌍 Telg 및 Tele (둘 다 900 nM)를 함유하는 40  $\mu$ L PCR 혼합물을 사용하여 수행하였다. FFPE DNA를 사용할 때 더 높은 프라이머 농도가 텔로미어 DNA에 바람직한데, 높은 농도의 프라이머가 다수의 어닐링 부위를 허용하기 때문이다.
- [0197] 텔로미어 서열을 세 단계로 증폭시켰다. 단계 1: 95℃에서 10분 동안 Hotstart DNA Taq 폴리머라제 (BioChain) 활성화; 단계 2: 95℃에서 15초의 5주기, 50℃에서 10초, 증폭의 그 다음 주기를 위한 주형의 역할을 하는 PCR 생성물 생성. 단계 2에서 어닐링 온도는 49℃ 내지 58℃의 범위에 있을 수 있다. 단계3: 95℃에서 15초의 25 주기, 60℃에서 15초, 60℃에서 신호 획득. 총 실행 시간은 70분이었다.
- [0198] 단일 카피 36B4 유전자의 증폭을 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)를 사용하여 다음과 같이 실행하였다: 95℃에서 10분 동안 Master Mix (Applied Biosystems)에서 DNA 폴리머라제의 활성화에 이어, 95℃에서 15초 동안의 40주기, 58℃에서 1분, 58℃에서 신호 획득. 36B4 증폭을 1 ng/10  $\mu$ L의 샘플 (0.1 ng/ $\mu$ L), 40  $\mu$ L의 Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad CA) 및 프라이머 쌍 36B4d (300 nM) 및 36B4u (300 nM)를 사용하여 수행하였다.
- [0199] 단계 2에서 텔로미어 서열 PCR에 대한 주기의 수를 각 PCR 반응에서 1 ng의 DNA를 사용할 때 적절한  $\Delta$ Ct 값을 갖기 위해서 ( $\Delta$ Ct<sub>샘플</sub> = Ct<sub>텔로미어</sub>-Ct<sub>참조</sub>) 5 주기로 변형시켰다. 반응 당 1 ng-10 ng의 DNA는 재현 가능성 연구에서 >94% PCR 효율을 가졌다. 단일 카피 유전자 PCR에 대한 주기 수는 충분한 단일 카피 유전자 PCR 생성물을 생산하기 위해 텔로미어 PCR에 대한 것보다 더 높은 9 주기가 될 필요가 있다.
- [0200] 샘플 사이에서 단일 카피 유전자와 텔로미어의 평균 주기 수 차이 (Ct<sub>36B4</sub>-Ct<sub>텔로미어</sub>, 또는  $\Delta$ Ct)는 9.208 내지 14.500의 범위에 있었다.
- [0201] FFPE 샘플의 게놈 DNA에서 DNA 교차 결합 및 분별화는 특히 길고, 반복적인 텔로미어 서열을 증폭하는 독특한 시도를 하는 한편, 같은 샘플에서 산성 리보솜 포스포단백질 P (본 문서에서는 36B4로 지정됨)에 대한 단일 카피 유전자의 76 bp 단편의 증폭은 종종 영향을 받지 않는다. 이 문제를 해결하기 위해, 여러 PCR 조건, 즉, PCR 프라이머의 선택, PCR 반응 버퍼 조건 및 열 주기 조건을 변화시켜서 텔로미어 앰플리콘 크기를 짧게하고 PCR 증폭 효율을 개선하려는 목적을 달성하였다.

- [0202] 결과
- [0203] 서던 블롯에 의해 결정된 인간 종양 세포주에서 평균 텔로미어 길이는 qPCR (검정 표준)에 의해 얻어진 결과와 연관성이 있다 (도 3a 및 3b).
- [0204] qPCR에 의해 얻어진 텔로미어 길이 부분군에서 무진행 생존율의 분석은 이메텔스타트가 처리된, 짧은 텔로미어를 가진 환자가 대조군과 비교하여 중간-긴 텔로미어를 가진 환자보다 훨씬 더 반응성이라는 것을 나타낸다 (도 1a 및 1b).
- [0205] 57개의 샘플 중 19개 (33%)는 짧은 텔로미어를 갖고 있었다 (도 1a). 이것에 대하여, 무진행 생존율 분석은 다음을 나타냈다: 대조군 이벤트/N은 7/8이었고, 이메텔스타트 이벤트/N은 8/11이었다 (도 1a); 대조군 중간값 (95% CI)은 1.48 (1.18, 2.76)이었고, 이메텔스타트 중간값 (95% CI)은 4.05 (1.25, NA)였다. (도 1a); 로그 랭크(log rank) P-값은 0.042였고, 위험 비율 (95% CI)은 0.32 (0.1, 1.02)였다 (도 1a).
- [0206] 57개 샘플의 샘플 중 38개 (67%)는 중간-긴 텔로미어를 갖고 있었다 (도 1b). 이것에 대하여, 무진행 생존율 분석은 다음을 나타냈다: 대조군 이벤트/N은 8/12였고, 이메텔스타트 이벤트/N은 21/26이었다 (도 1b); 대조군 중간값 (95% CI)은 2.7 (1.09, 3.59)이었고, 이메텔스타트 중간값 (95% CI)은 2.8 (1.51, 4.18)였다. (도 1b); 로그 랭크 P-값은 0.623이었고, 위험 비율 (95% CI)은 0.83 (0.36, 1.89)이었다 (도 1b).
- [0207] 처리 효과는 비-선형 방식을 증가시키며 종양 텔로미어 길이를 감소시킨다 (도 5).
- [0208] 실시예 3: NSC 단계 II (CP14B) 연구의 포르말린-고정되고 파라핀-임베딩된 샘플에서 Telo-FISH
- [0209] 샘플을 상기 설명된 NSC 단계 II (CP14B-012) 연구에 등록된 116명의 환자 중 61명으로부터 얻었다. 이 61명의 환자 샘플에서, 59개가 PFS 분석에 사용된 평가 가능한 Telo-FISH 검정 결과를 초래하였다. 각 검정은 슬라이드 상의 6개의 영역 ('필드(field)')로부터 7 내지 14545개의 병소에 대한 데이터를 생산하였다. 면적 및 형광 발광 강도를 각 병소에 대하여 기록하였다.
- [0210] 재료 및 방법
- [0211] 염색되지 않은 FFPE 조직 슬라이드 (5  $\mu$ m 두께 조직 절편)를 일상적인 조직학적 방법에 의해 제조하였다. 조직 슬라이드를 파라핀을 녹이기 위해 65°C에서 6분 동안 미리 가열하였고, 그때 슬라이드 랙(rack)에 로딩하였다. 로딩된 슬라이드 랙을 파라핀을 제거하기 위해 3분 동안 2번 (3분 x 2) 염색 탱크의 100 mL 자일렌에 담겼다.
- [0212] 슬라이드를 그때 등급화된 에탄올 연속물을 통해 3분 단위로 수화하였다: 100% EtOH, (3분 x 2), 95% EtOH (3분 x 2), 및 70% EtOH (3분 x 2). 이 에탄올 담금 후, 슬라이드를 3분 동안 탈이온수 및 또 다른 3분 동안 1% Tween-20 세제가 들어있는 탈이온수에 담겼다.
- [0213] 슬라이드를 물에 살짝 담가서 Tween-20을 세척하였고, 그때 블롯팅하였고 (blotted) 벡터 표적 언마스킹 (unmasking) 용액 (H<sub>2</sub>O로 100x 희석)을 함유하는 100 mL 1X 시트레이트 버퍼 탱크에 담갔다. 전체 탱크를 미리 가열된 (끓고 있는) 스티머(steamer)에 두었고 35분 동안 증기를 켜게 했고, 그때 스티머로부터 제거하여 실온에서 적어도 30분 동안 냉각하였다. 슬라이드를 다음에 3분 동안 탈이온수에 담겼고, 그때 70% 에탄올에 두 번, 95% 에탄올에 두 번 담겼고, 공기 건조하였다.
- [0214] 잡종화 프로브를 하기 시약 및 부피를 사용하여 제조하였다:

PNA 텔로미어 프로브에 대한 잡종화 버퍼		
시약	부피	일반
증류수	190ul	
1 M Tris HCl (pH7.5)	10ul	2M Tris. HCl로부터 1:2 희석
차단 버퍼	5 ul (1x)	(말레산 중 분유, 10% 스톡)
100% 포름아미드	700ul	

- [0215]
- [0216] 10 ug/mL PNA 텔로미어 프로브 TelC-Cy3 (PNA Bio Inc.)
- [0217] CCCTAACCTAACCTAA (SEQ ID NO: 8) 스톡(stock)을 적절한 희석 인자 (예를 들어, 5x)로 잡종화 버퍼에서 희석하였다. 희석된 PNA 프로브 30-50  $\mu$ L를 표본에 추가하였고, 그때 기포를 도입하지 않으면서 커버 슬립을 적용

하였다. 슬라이드를 텔로미어 DNA를 변성시키기 위해 84℃에서 6분 동안 슬라이드 배양기의 표면 상에 두었다.

[0218] 슬라이드를 어두운 밀폐 용기로 옮겼고 실온에서 2시간 동안 잡종화하였다. 건조를 방지하기 위해 물 또는 젖은 킴와이프(kimwipe)를 추가함으로써 용기를 축축하게 하였다.

[0219] PNA 텔로미어 프로브에 대한 세척 버퍼를 하기 시약 및 부피를 사용하여 제조하였다:

PNA 텔로미어 프로브에 대한 세척 버퍼 (100ml)		
시약	부피	일반
증류수	29ml	
1 M Tris HCl (pH7.5)	1ml	2M Tris. HCl로부터 1:2 희석
100% 포름아미드	700ml	

[0220]

[0221] 커버 슬립 제거 후, 슬라이드를 PNA 세척 버퍼로 부드럽게 교반하면서 실온에서 15분 동안 2번 세척하였다. 그 다음에 슬라이드의 액체를 따라냈고 핵을 1 ug/ml DAPI 용액으로 5분 동안 대비 염색하였다 (5 mg/mL DAPI 스톱 용액의 물에서 1:5000 희석; 예를 들어, H<sub>2</sub>O 100 mL 중에 5 mg/mL DAPI 스톱 20  $\mu$ L).

[0222] 슬라이드를 그 다음에 증류수에서 3분 동안 네 번 세척 하였고 (3분 x 4), 그때 액체를 따라냈고 공기 건조하였다. 커버 슬립을 안티-페이드(anti-fade) 봉입제 용액을 사용하여 슬라이드 위에 올리는 한편 기포를 방지한다. 봉입된 슬라이드를 현미경 하에서 테스트하기 전에 슬라이드를 빛으로부터 보호하기 위해 어두운 장소에서 하룻밤 동안 두었다. 염색된 슬라이드를 DAPI (핵) 및 Cy3 (텔로미어)의 형광 발광 신호 강도 및 형광 발광 신호 면적을 수집하기 위해 IN Cell Analyzer 2000 (GE Corp.) 하에서 스크리닝 하였다.

[0223] IN Cell developer Toolbox 1.9 (GE Corp.)를 이용하여 생물학적 샘플로부터 얻어져서 telo-FISH를 받은 세포의 평균 텔로미어 길이를 정량화하였다. 이 소프트웨어를 사용하여 DAPI 염색의 위치에 기초하여 세포 핵 주위, 및 텔로미어-특이적 형광 발광의 위치에 기초하여 세포 텔로미어 주위에 선을 그렸다. 각각의 핵 및 텔로미어가 둘러싸이면, 소프트웨어는 세포에서 각각의 텔로미어의 강도 및 면적을 계산하였고 방정식 1에 따라 생물학적 샘플로부터 유래된 세포에 대한 평균 텔로미어 길이를 결정하였다:

[0224]  $1.376 \times \log_2(\text{강도}) - 6.215 \times \sqrt{(\text{면적})}$  [방정식 1].

[0225] 초기 결과

[0226] 서던 블롯에 의해 결정된 인간 종양 세포주에서 텔로미어 길이는 Telo-FISH에 의해 얻어진 결과 (검정 표준)와 연관성이 있다 (도 4a 및 4b).

[0227] Telo-FISH IN Cell-Quartile Split에 의해 얻어진 텔로미어 길이 부분군에서 무진행 생존율의 분석은 큰 면적 및 낮은 강도 (즉, 면적 당 낮은 강도 비율)가 더 나은 이메텔스타트 효율과 관련된다는 것을 나타낸다 (도 2).

[0228] 무진행 생존율 분석은 다음을 나타냈다: 이벤트/N은 9/15였다; 대조군 중간값 (95% CI)은 1.18 (1.09, NA)이었고, 이메텔스타트 중간값 (95% CI)는 4.7 (1.41, NA)이었다 (도 2); 로그 랭크 P-값은 0.044였고, 위험 비율 (95% CI)은 0.26 (0.06, 1.1)이었다 (도 2).

[0229] 이메텔스타트 처리된 환자에서 무진행 생존율의 Telo-FISH 다변수 예측은 하기 데이터를 초래하였다:

TeloFISH Metric	위험 비율 (HR)	선형 계수 Log(HR)	P-값
Log2(강도)	3.960	1.376	0.22
평방 피트 (면적)	0.002	-6.215	0.017

[0230]





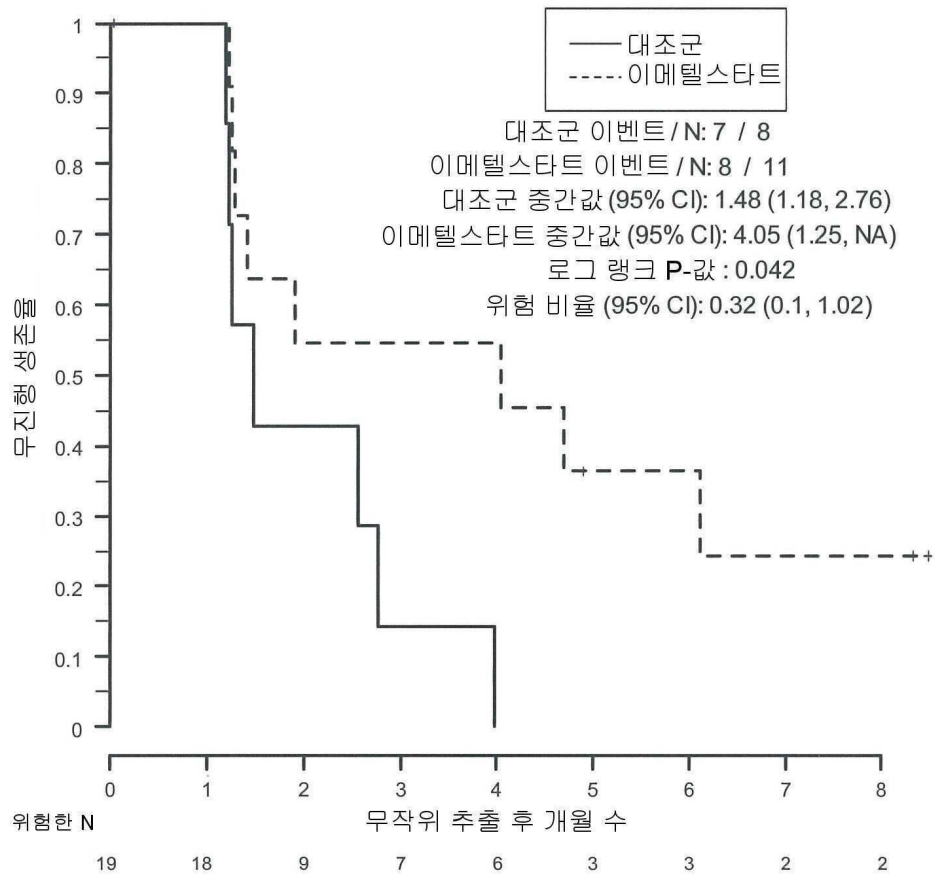


- [0247] 텔로미어 서열의 증폭을 위한 FFPE 샘플의 DNA 및 단일 카피 유전자의 증폭을 위한 FFPE 샘플의 DNA를 플레이트 상의 별개의 웰에 두었다. 텔로미어 서열의 증폭 및 단일 카피 36B4 유전자의 증폭을 위한 DNA 표준을 같은 플레이트 상의 별개의 웰에 두었고 모두 세 단계로 증폭시켰다. 단계 1: 95℃에서 10분 동안 DNA Taq 폴리머라제의 활성화; 단계 2: 95℃에서 15초의 3주기, 50℃에서 10초, 증폭의 그 다음 주기에 대한 주형의 역할을 하는 PCR 생성물 생성. 단계 3: 95℃에서 15초의 35 주기, 60℃에서 15초, 60℃에서 신호 획득. 총 실행 시간은 90분이었다.
- [0248] 단계 2에서 주기의 수는 각 PCR 반응에서 FFPE 샘플 DNA 10 ng을 사용할 때 적절한  $\Delta Ct$  값 ( $\Delta Ct_{\text{샘플}} = Ct_{\text{텔로미어}} - Ct_{\text{참조}}$ )을 갖기 위해 3주기였다. 반응 당 1 ng-10 ng의 FFPE 샘플 DNA는 재현 가능성 연구에서 >94% PCR 효율을 가졌다.
- [0249] 결과
- [0250] 후향적 qPCR에 의해 얻어진 텔로미어 길이 부분군에서 무진행 생존율의 분석은 이메텔스타트가 처리된, 짧은 텔로미어를 가진 환자가 대조군과 비교하여 중간-긴 텔로미어를 가진 환자보다 훨씬 더 반응성이라는 것을 나타냈다 (도 11a 및 11b).
- [0251] 52개의 샘플 중 18개 (35%)는 짧은 텔로미어를 갖고 있었다 (도 11a). 이것들에 대하여, 무진행 생존율 분석은 다음을 나타낸다: 이벤트/N은 13/18이었다 (도 11a); 대조군 중간값 (95% CI)은 2.57 (1.18, NA)이었고, 이메텔스타트 중간값 (95% CI)은 1.91 (1.22, NA)이었다 (도 11a); 로그 랭크 P-값은 0.325였고, 위험 비율 (95% CI)은 0.55 (0.17, 1.84)였다 (도 11a).
- [0252] 52개의 샘플 중 34개 (65%)는 중간-긴 텔로미어를 갖고 있었다 (도 11b). 이것들에 대하여, 무진행 생존율 분석은 다음을 나타낸다: 이벤트/N은: 26/34였다 (도 11b); 대조군 중간값 (95% CI)은 2.66 (0.92, NA)이었고, 이메텔스타트 중간값 (95% CI)은 3.03 (1.58, 4.47)이었다 (도 11b); 로그 랭크 P-값은 0.309였고, 위험 비율 (95% CI)은 0.65 (0.27, 1.56)였다 (도 11b).
- [0253] 실시예는, 본 발명의 순수하게 예시적인 것으로 의도되고 그러므로 어떤 방법으로도 본 발명을 제한하는 것으로 간주되어서는 안되며, 또한 상기 논의된 본 발명의 양태 및 구체예를 설명하고 상술한다. 상기 언급된 실시예 및 상술된 설명은 도시의 방법으로 제공되지만 제한의 방법으로는 제공되지 않는다. 본 명세서에서 인용된 모든 간행물, 특허 출원, 및 특허는 각각의 간행물, 특허 출원, 또는 특허가 참고로 포함되는 것으로 특이적으로 및 개별적으로 나타난 것처럼 본원에서 참고로 포함된다. 특히 본원에서 인용된 모든 간행물은 본 발명과 관련되어 사용될 수도 있는 조성물 및 방법론을 설명하고 개시할 목적을 위해 분명하게 본원에서 참고로 포함된다. 상기 언급된 발명이 명확한 이해를 위해 도시 및 예의 방법으로 어느 정도 상세히 설명되었지만, 특정 변화 및 변형이 첨부된 청구범위의 사상 또는 범위에서 벗어나지 않으면서 이루어질 수도 있다는 것이 본 발명의 교시 내용에 비추어 당업자에게 쉽게 분명해질 것이다.

도면

도면1a

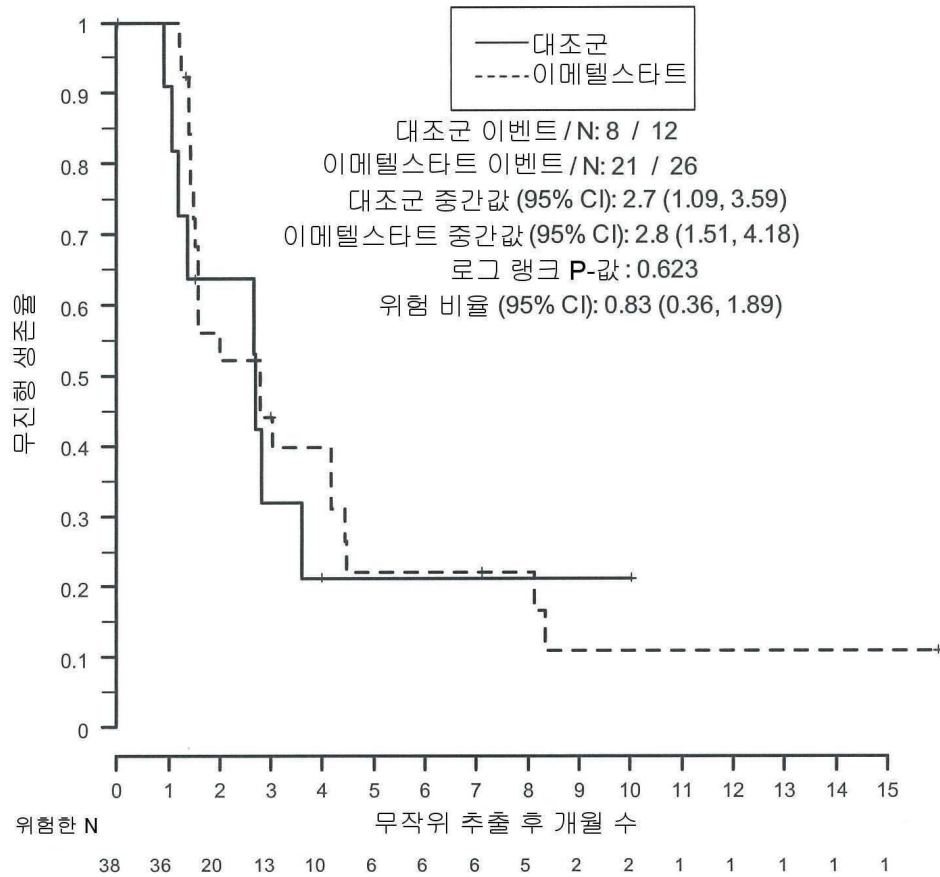
# 이메텔스타트 NSC 단계 II (CP14B-012) qPCR 짧은 텔로미어 PFS a



짧은 텔로미어  
19 (33%)

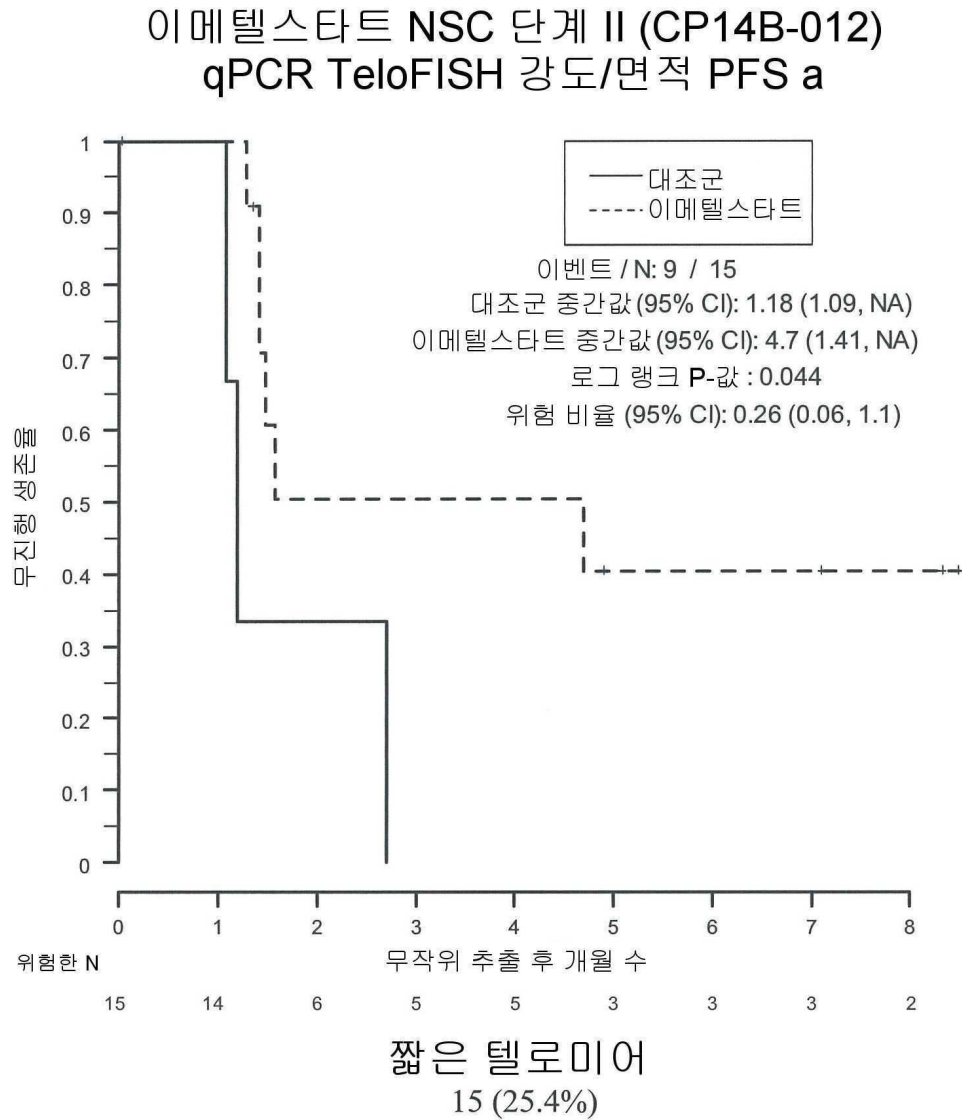
도면1b

# 이메텔스타트 NSC 단계 II (CP14B-012) qPCR 중간-긴 텔로미어 PFS a



중간-긴 텔로미어  
38 (67%)

도면2

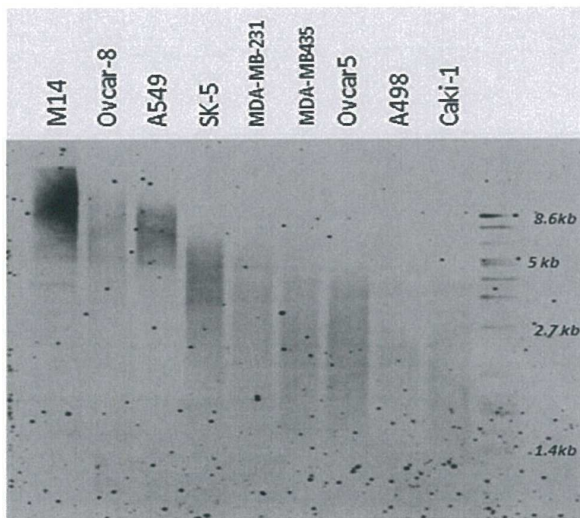




도면3a

A

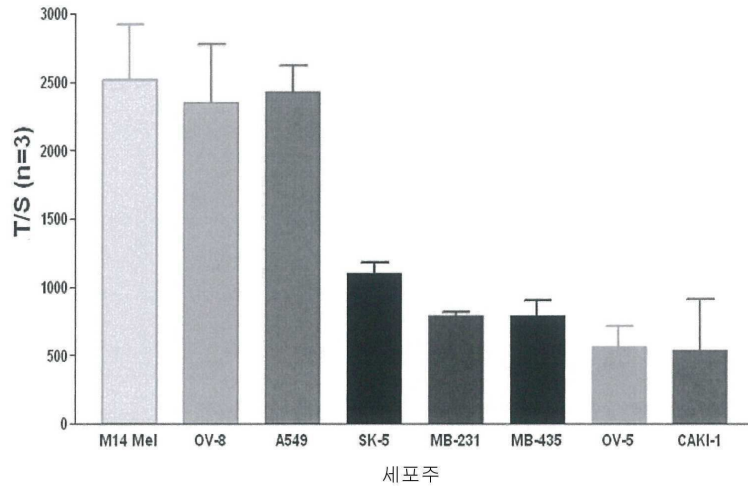
인간 종양 세포주에서 TRF 길이



도면3b

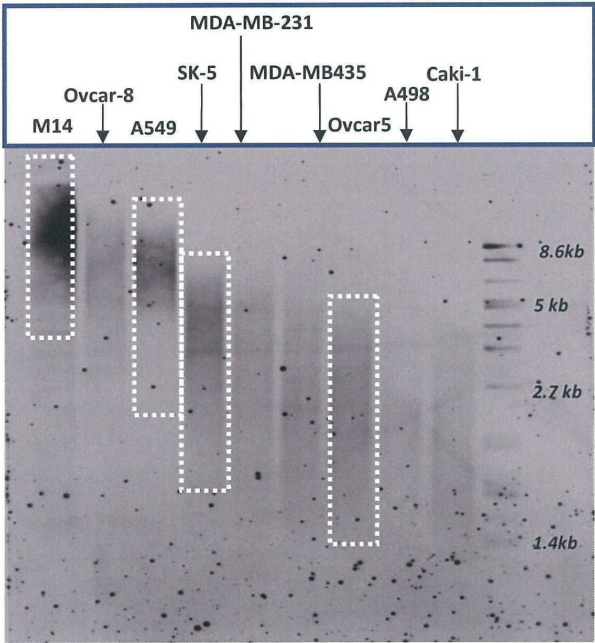
B

인간 FFPE 종양 세포주에서 평균 T/S 비율



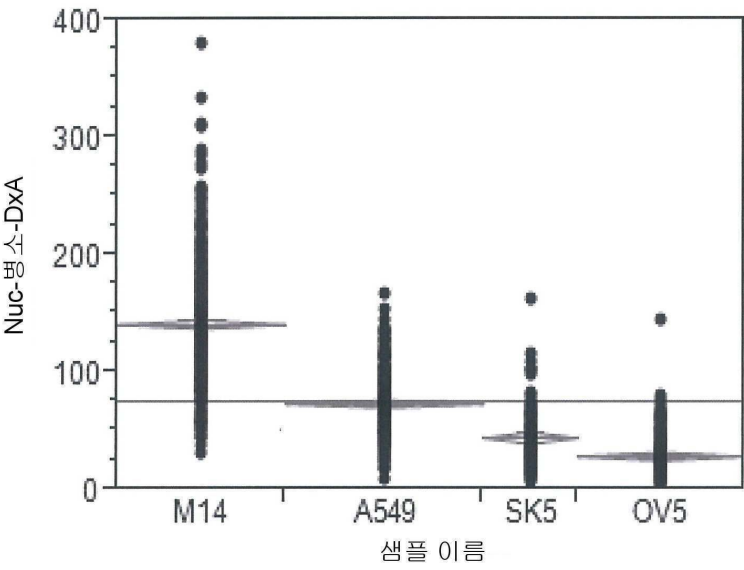
도면4a

A)



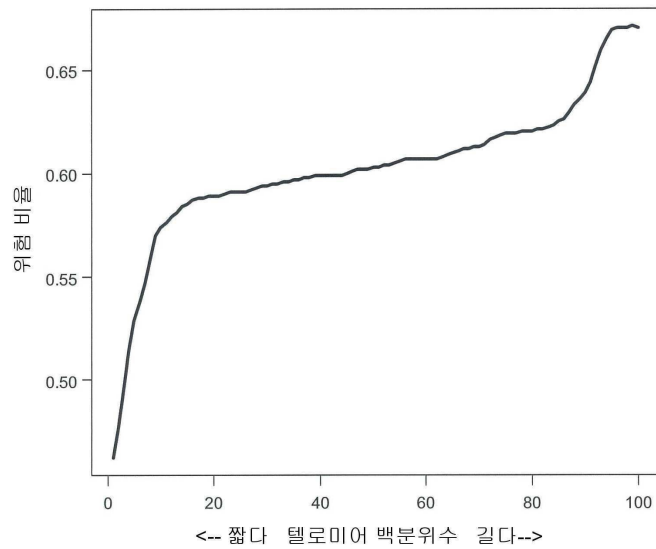
도면4b

B)



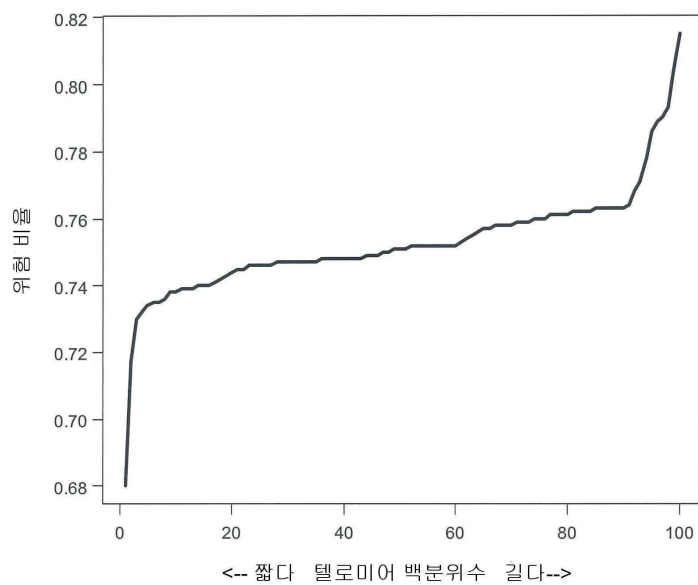
도면5

qPCR 텔로미어 길이에 의한 위험 비율

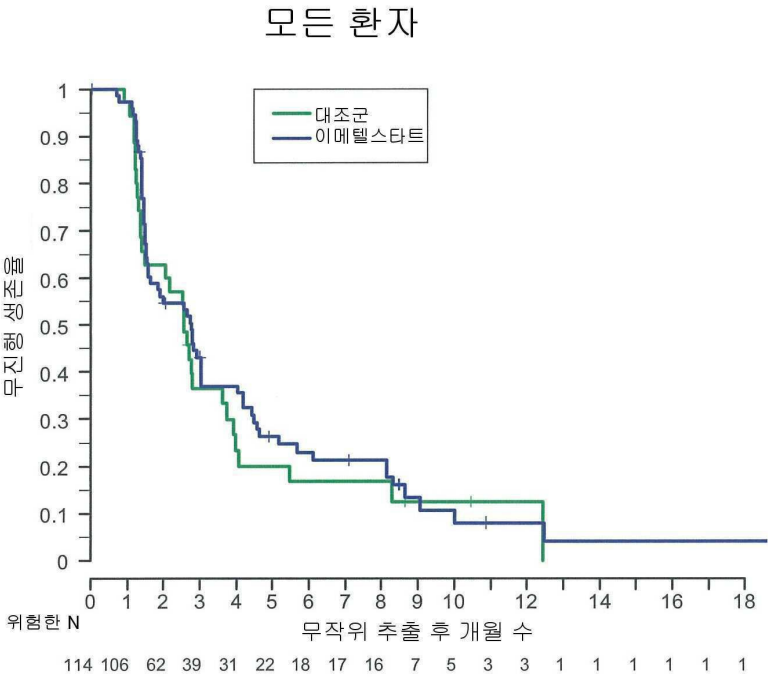


도면6

TeloFISH 텔로미어 길이에 의한 위험 비율



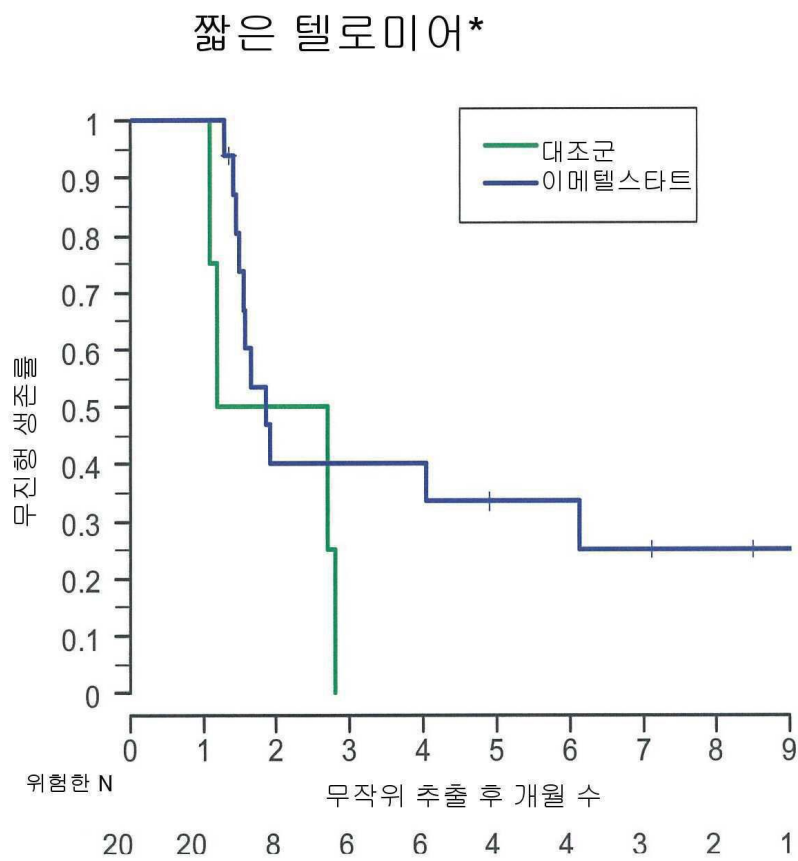
도면7



PFS 결과 (N=114, 이벤트 =92, 중간값 FU 2.6mn)	
대조군 중간값 (95% CI)	2.57 (1.41, 3.62)
이메텔스타트 중간값 (95% CI)	2.76 (1.58, 3.03)
위험 비율 (95% CI)	0.84 (0.54, 1.31)
P-값 (점수 테스트)	0.446



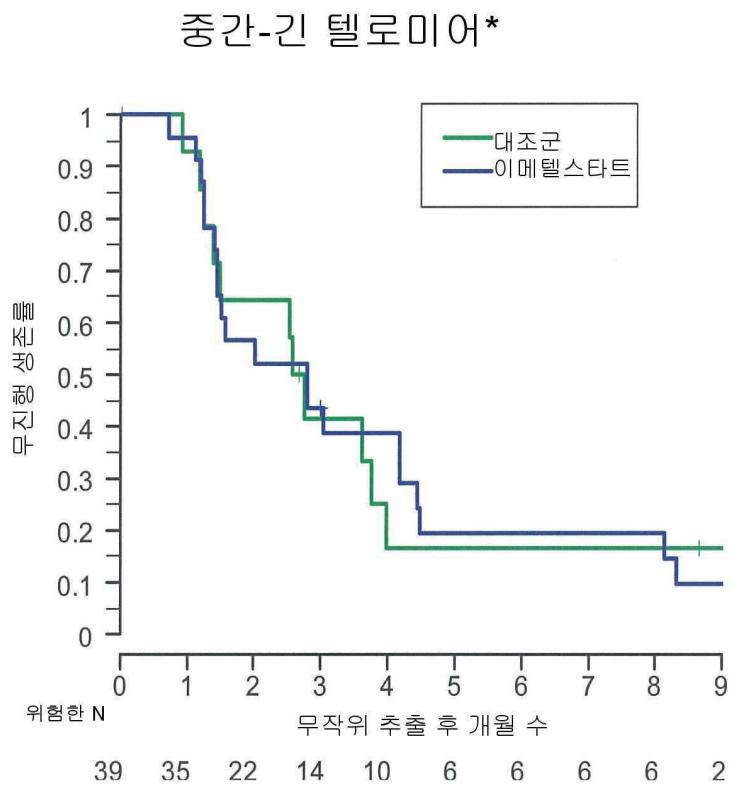
도면8a



\* 상호작용 P=0.175

	짧은 TL 결과 N=20, 이벤트=16
대조군 중간값 (95% CI)	1.94 (1.09, NA)
이메텔스타트 중간값 (95% CI)	1.84 (1.48, 6.12)
위험 비율 (95% CI)	0.45 (0.14, 1.48)
P-값 (점수 테스트)	0.177

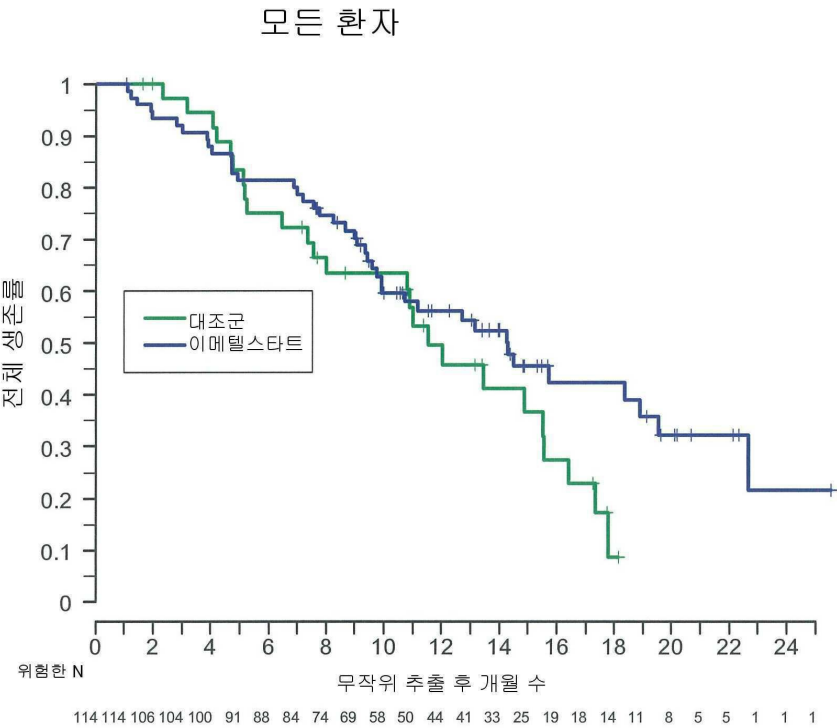
도면8b



\* 상호작용  $P=0.175$

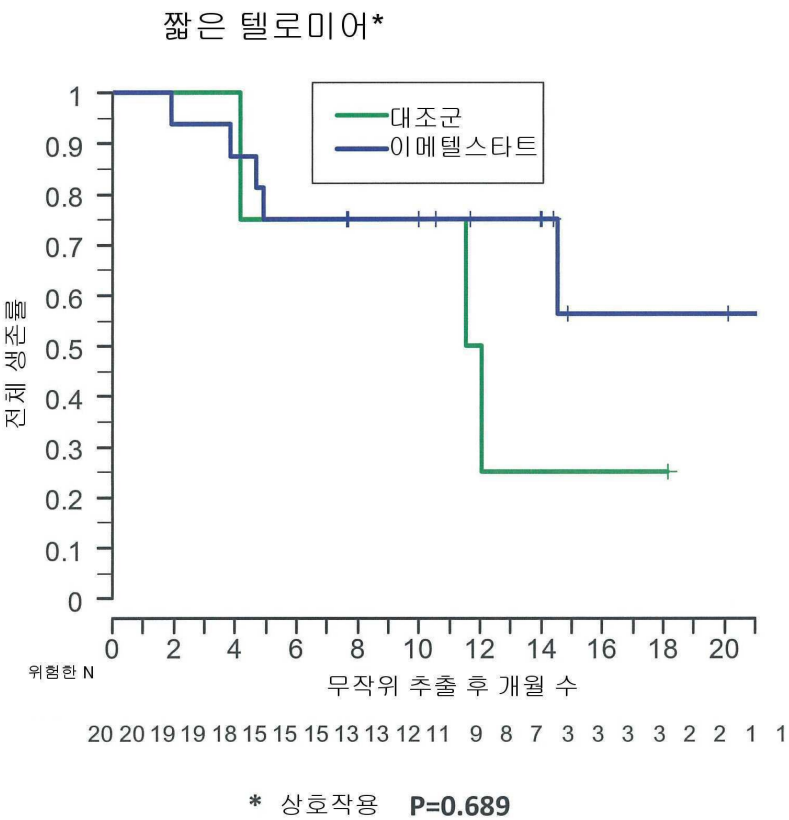
중간-긴 TL 결과	
N=39, 이벤트=32	
2.66 (1.25, 3.75)	
2.80 (1.45, 4.18)	
0.92 (0.45, 1.89)	
0.801	

도면9



전체 생존률 (N=114, 이벤트=66, 중간값 FU 10.5mn)		
	이메텔스타트	대조군
중간값 (95% CI)	14.3 (9.9, 18.9)	11.5 (7.6, 15.5)
6개월 생존률 (95% CI)	81%	75%
위험 비율 (95% CI)	0.68 (0.41, 1.12)	
P-값 (점수 테스트)	0.129	

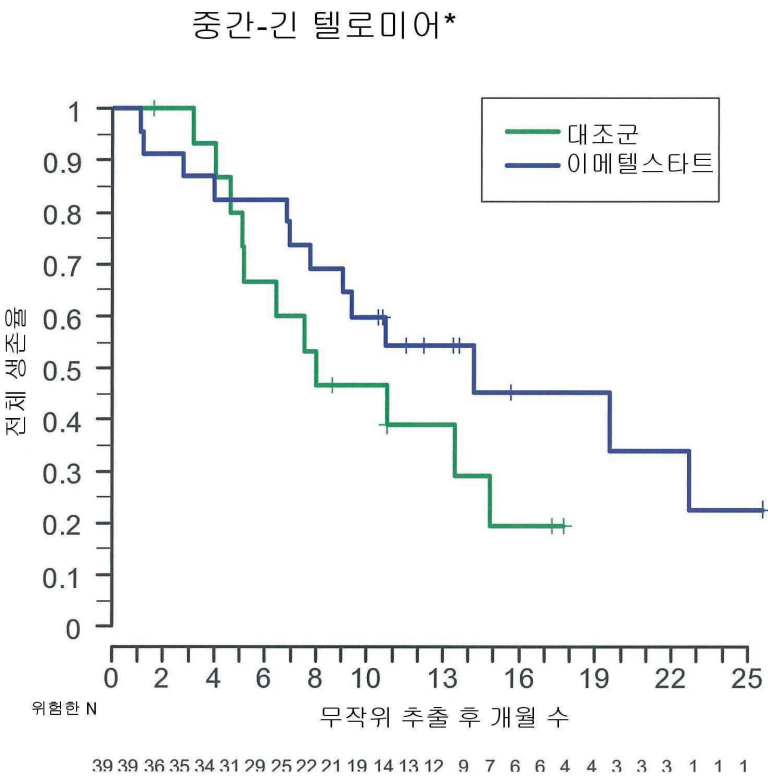
도면10a



	짧은 TL 결과 N=20, 이벤트=8
대조군 중간값 (95% CI)	11.79 (4.18, NA)
이메텔스타트 중간값 (95% CI)	NA (4.93, NA)
위험 비율 (95% CI)	0.44 (0.11, 1.87)
P-값 (점수 테스트)	0.256



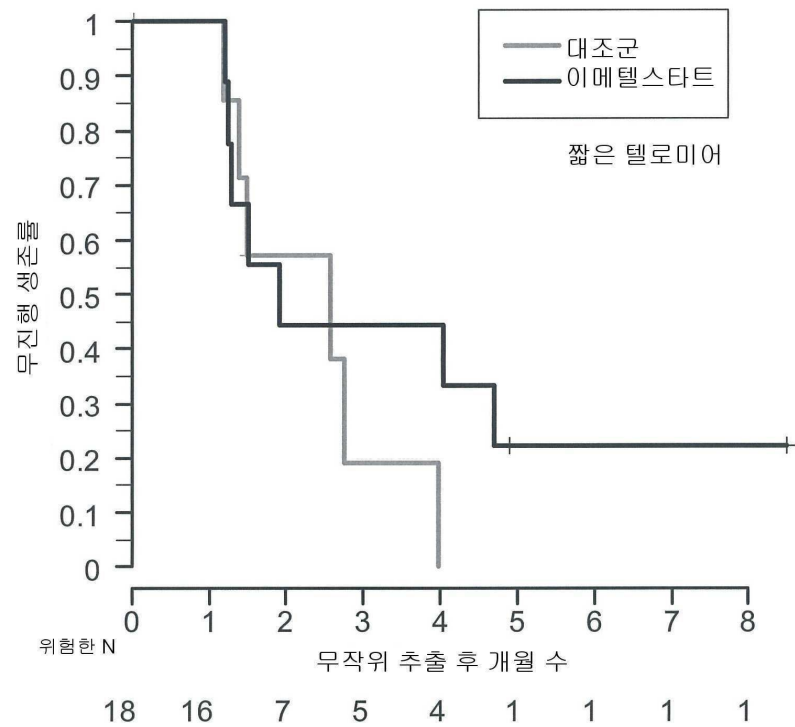
도면10b



\* 상호작용 P=0.689

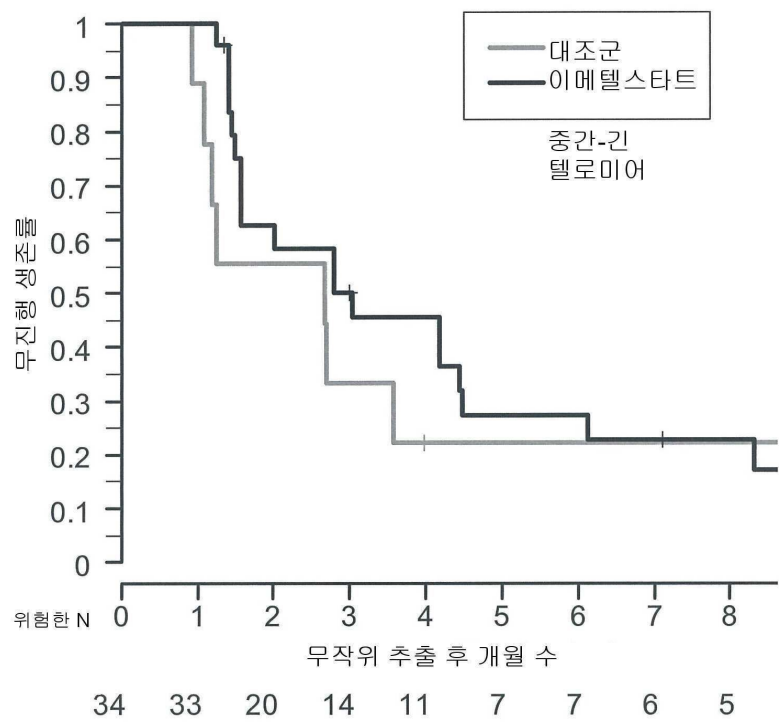
중간-긴 TL 결과 N=39, 이벤트=24
7.99 (4.67, 14.87)
14.24 (7.76, 22.66)
0.58 (0.25, 1.35)
0.200

도면11a



	짧은 텔로미어 PFS 결과 N=18 (35%), 이벤트=13
대조군 중간값 (95% CI)	2.57 (1.18, NA)
이메텔스타트 중간값 (95% CI)	1.91 (1.22, NA)
위험 비율 (95% CI)	0.55 (0.17, 1.84)
P-값 (로그 랭크 테스트)	0.325

도면11b



	중간-긴 텔로미어 PFS 결과 N=34 (65%), 이벤트 = 26
대조군 중간값 (95% CI)	2.66 (0.92, NA)
이메텔스타트 중간값 (95% CI)	3.03 (1.58, 4.47)
위험 비율 (95% CI)	0.65 (0.27, 1.56)
P-값 (로그 랭크 테스트)	0.309