(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월09일
(11) 등록번호 10-2830459
(24) 등록일자 2025년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7034023
(22) 출원일자(국제) 2018년05월18일
심사청구일자 2021년05월12일
(85) 번역문제출일자 2019년11월18일
(65) 공개번호 10-2020-0008122
(43) 공개일자 2020년01월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/033376
(87) 국제공개번호 WO 2018/213697
국제공개일자 2018년11월22일
(30) 우선권주장
62/508,530 2017년05월19일 미국(US)
62/638,579 2018년03월05일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2010091396 A2*
국내공개특허공보 10-2016-0147884 (2016.12.23.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
밴드 쎄라퓨틱스, 엘엘씨
미국 매사추세츠 02421 렉싱턴 하트웰 애비뉴 101
(72) 발명자
주 수하오
미국 매사추세츠 01773 링컨 오텀 레인 71
길버트 제임스 씨.
미국 코네티컷 06751 베들레헴 패디 할로우 로드 110
(74) 대리인
장훈

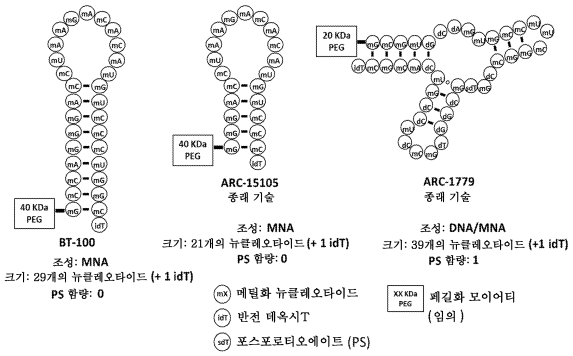
전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **폰 빌레브란트 인자와 관련된 합병증 및 장애의 치료를 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 VWF의 비정상적인 결합 또는 기능으로부터 발생하는 합병증 또는 장애의 치료 및/또는 개선을 위한 압타머 및 항체를 포함하는 VWF 보호제를 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/0019 (2013.01)
A61P 9/10 (2018.01)
C07H 21/02 (2013.01)
C07H 21/04 (2013.01)
C12N 2310/16 (2013.01)
C12N 2310/317 (2013.01)
C12N 2310/321 (2013.01)
C12N 2310/351 (2013.01)
C12N 2310/3521 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열 번호 2인 합성 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

서열 번호 3인 합성 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

서열 번호 5인 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 합성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는,

(i) 폰 빌레브란트 인자 (Von Willebrand Factor: VWF)와 관련된, 허혈성 뇌졸중을 포함하는 혈전 질환, 장애 또는 합병증;

(ii) 후천성 폰 빌레브란트 증후군 (acquired Von Willebrand Syndrome: aVWS), 혈관이형성증, 폐쇄성 혈전증 및 VAD-관련 펌프 혈전증을 포함하는, VAD-관련 합병증 또는 장애;

(iii) 겸상 적혈구병을 포함하는, 적혈구에 대한 VWF의 비정상 결합을 포함하는 합병증 또는 장애;

(iv) 혈관이형성증과 관련되는 위장 (gastrointestinal: GI) 출혈과 관련된 합병증 또는 장애;

(v) 헤이드 증후군 (Heyde's syndrome)과 관련된 위장 (GI) 출혈; 및/또는

(vi) 중증 및/또는 뇌 말라리아와 관련된 중추 신경계 (central nervous system: CNS) 혈전증

을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항의 합성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, (i) 적어도 하나의 폐쇄성 혈전으로 폐색된 1개 이상의 혈관(들)을 갖는 대상체로서, 상기 혈관(들)이 적어도 50% 폐색된, 상기 대상체에서 혈관 개통을 복원하거나, (ii) 적어도 50% 폐색된 적어도 1개의 혈관을 갖는 대상체에서 하나 이상의 폐쇄성 혈전을 분해하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 폐쇄성 혈전의 외층이 분해되는, 약제학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 폐쇄성 혈전이 10,000 s^{-1} 이상인 전단 속도의 조건하에 형성되는, 약제학적 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 폐쇄성 혈전이 섬유소 용해 (fibrinolysis) 및/또는 항혈전제에 대해 저항성인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 대상체가 급성 관상 동맥 증후군, 급성 폐쇄성 혈전증 및 허혈성 뇌졸중으로부터 선택된 병태를 갖는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항의 합성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 혈전 장애 또는 합병증을 갖는 대상체에서 혈소판 응집을 예방하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드가 정맥내 주사 또는 피하 주사를 통해 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 피하 주사의 생체이용률이 정맥내 주사에 비해 적어도 85%이거나 정맥내 주사에 비해 적어도 95%인, 약제학적 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드가 상기 대상체의 체중 kg 당 0.01 mg 내지 0.5 mg의 용량으로 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드가 70시간 내지 100시간의 혈장 반감기를 갖는, 약제학적 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 혈전 장애 또는 합병증이 심근 경색 또는 허혈성 뇌졸중인, 약제학적 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은, 2017년 5월 19일자로 출원된 폰 빌레브란트 인자와 관련된 합병증 및 장애의 치료를 위한 조성물 및 방법이라는 명칭의 미국 가특허 출원 62/508,530 및 폰 빌레브란트 인자와 관련된 합병증 및 장애의 치료를 위한 조성물 및 방법이라는 명칭의 2018년 3월 5일자로 출원된 미국 가특허 출원 62/638,579에 대한 우선권을 주장하며, 이들 출원의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 전자 양식의 서열 목록과 함께 제출되고 있다. 서열 목록은 40,942 바이트 크기인, 2018년 5월 18일자로 생성된 20591002PCT_SL.txt라는 제목의 파일로서 제공된다. 서열 목록의 전자 양식의 정보는 그 전문이 본 출원에 참조로 포함된다.

[0005] 본 발명은 폰 빌레브란트 인자와 관련된 합병증 및 장애의 치료에 유용한 치료 양식 분야에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0006] 폰 빌레브란트 인자 (Von Willebrand Factor: VWF)는 지혈을 유지하는데 있어서, 즉, 혈관 구조의 무결성이 파괴된 부위에서 출혈을 정지하는데 있어서 제1 단계에 필수적이다. VWF는 혈관 내피의 기저를 이루는 콜라겐 구조 매트릭스와 순환 혈소판 사이의 분자 브릿지를 만들어 혈소판이 혈관 손상 부위에 부착하고 혈전 형성을 개시하여 출혈을 정지할 수 있도록 한다. VWF의 이러한 필수 기능은 개별 VWF 분자의 고분자량 다량체에 의해 수행되며, 이들 다량체는 혈역학적 전단력에 노출될 때 (로프의 풀림 (uncoiling)과 유사한 방식으로) 혈소판에 결합하도록 활성화된다. VWF의 활성화는 2단계 형태 전이를 통해 발생하는 것으로 나타났다: 흐름-유도 신장, 이어서 혈소판 GpIbα에 대한 높은 친화성을 갖는 상태로의 장력-의존적 국소 전이 (문헌 [Fu H, et al., *Flow-induced elongation of von Willebrand factor precedes tension-dependent activation.* Nat Commun. 2017 Aug 23;8(1):324]). 동시에, VWF 다량체를 활성화시키는 풀림은 또한 이를 단백질 가수분해에 의한 파괴에 노출시켜, 과도한 혈전 형성을 방지하는 피드백 루프를 제공한다. 보다 최근에, VWF는 새로운 혈관 형성의 조절을 비롯하여 혈관 구조에서 다수의 과정에 관여하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Randi AM, et al., *Von Willebrand Factor, Angiodysplasia and Angiogenesis.* Mediterr J Hematol Infect Dis. 2013;5(1): e2013060; eCollection 2013]).

[0007] 심실 보조 장치 (ventricular assist device: "VAD")로서 공지된 의료 장치의 디자인에서의 최근의 진보는 VAD 성능을 개선시켰으며, 이러한 장치는 중증 심부전 환자에게 혈역학적 지지체를 제공할 수 있다. 이러한 진보 중 하나는 HeartWare의 HVAD® 또는 Thoratec의 HEARTMATE®와 같은 장치에서 예시된 연속적인 (박동식과는 대조적임) 흐름 시스템의 도입이었다. 그러나, 기계적으로 지지되는 혈류의 주요 문제점 중 하나는, 혈액이 고압 및 급격한 속도 구배와 같은 비생리학적 흐름 조건에 국소적으로 노출된다는 사실이다. 따라서, VAD 환자에서, VWF (및 기타 혈액 성분)는 VAD 자체에 의해 생성된 높은 전단력을 지속적으로 겪는다. 연속 흐름 펌프 디자인에 의해 생성된 혈역학적 전단력은후천성 폰 빌레브란트 증후군 (Acquired Von Willebrand Syndrome: aVWS)으로서 공지된 응고 시스템의 기능에서 결함 및 결과적으로 주요 출혈, 특히, 위장관 (GI)으로부터의 주요 출혈의 상당한 발생 빈도를 유발할 수 있다. 비정상적인 혈관 형성은 또한 이러한 환자들에서 관찰되고 출혈에 기여한다 (문헌 [Suarez J, et al., *Mechanisms of bleeding and approach to patients with axial-flow left ventricular assist devices.* Circ. Heart Fail. 2011 4:779-84] 및 동 문헌에서의 참고문헌).

[0008] VWF 다량체가 이의 혈소판 결합 부위 ("A1 도메인"으로 생화학적으로 지정된 부위)를 풀어 노출시키기 시작함에 따라, 이러한 기계적 전단력의 효과는 순환 혈소판의 테더링에 의해 추가로 증폭된다. 즉, 흐르는 혈액 중의 혈소판이 부분적으로 풀린 VWF 다량체 상에 노출된 A1 도메인에 결합됨에 따라, 결합된 혈소판은 견인을 적용하여 다량체 가닥을 완전히 신장시킨다. 일단 완전히 확장되면, VWF 다량체는 단백질 가수분해에 가장 취약하다. 이러한 병리생리학적 패러다임에 의해, VAD 환자는 완전히 기능적인 고분자량 VWF 다량체의 양의 감소를 나타낼 것으로 예측되는데, 이는 실제로 사실이다. 보충적 VWF가 곧 동일한 방식으로 단백질 가수분해적으로 분해될 것이기 때문에, 외인성 VWF의 투여 또는 VWF의 내인성 저장물의 분비 자극은 문제점에 대한 지속적인 교정을 제공할 것으로 예상되지 않을 것이다.

[0009] 높은 전단력의 결과로서, 심실 보조 장치, 특히, 좌심실 보조 장치 (left ventricular assist device: LVAD)의

또 다른 문제점은 HeartMate II™ LVAD를 수용받은 환자 중에서 VAD 기구에서 혈전증 비율의 증가를 관찰한 Starling 등에 의해 최근에 보고되었다. 문헌 [Starling RC, et al., *Unexpected Abrupt Increase in Left Ventricular Assist Device Thrombosis*, 2014, N. Engl. J Med., 370:33-40]. 다른 사람들은 LVAD와 유사한 결과를 보고하였다. 문헌 [Capoccia M, et al., *Recurrent Early Thrombus Formation in Heartmate II Left Ventricular Assist Device*, 2013, J. Inv. Med., 1:DOI:10, 1177/2324709613490676], [Meyer AL, et al., *Thrombus Formation in a Heartmate II Left Ventricular Assist Device*, 2008, J. Thorac Cardiovasc Surg, 135:203-204]. VAD에서의 높은 전단 속도는 VWF를 활성화시켜 aVWS로 이어지는 전신 VWF 고갈 및 VAD 유입구에서의 국소 혈전 형성을 일으킨다.

[0010] 상기에서 논의된 바와 같이, 혈관 손상 부위에서의 혈소판 응집은 출혈의 정지 및 제어 뿐만 아니라, 후속적인 혈관 복원의 중심에 있으며; 그러나, 혈관 손상 또는 죽상경화판 파열의 부위에서의 과장된 혈소판 응집 반응은 혈관 폐쇄성 혈전들의 발생을 초래할 수 있다. 연구에 의하면, VWF-혈소판 상호 작용은 매우 높은 전단 속도하에 폐쇄성 혈전 형성을 매개하는 것으로 나타났다. 문헌 [Le Behot A, et al., *GpIbα-VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice.* Blood, 2013: Feb 19, 2014; DOI 10.1182/blood-2013-12-543074]. 따라서, VAD에서 상승된 수준의 전단 응력은 aVWS (VWF 다량체 형성 및 단백질 가수분해에 의한 후속적인 파괴의 결과로서)와 혈전 형성 (VWF-혈소판 응집 반응의 결과로서) 둘 다와 관련되어 있다.

[0011] 관상 동맥 및 대뇌 동맥에서의 혈전 발생은 전세계적으로 사망률 및 이환율의 가장 흔한 원인이며, 각각 심근 경색 및 허혈성 뇌졸중과 같은 질환을 촉발시킨다. 현재의 혈전 용해 치료제는 혈전의 하나의 성분인 피브린만을 표적으로 하며, 이로 인해, 동맥 및 혈소판-풍부 혈전을 용해시키는데 부분적으로만 효과적이다. 또한, 혈소판-피브린 상호 작용을 중단시키는 치료제 (즉, 혈소판 GpIIb/IIIa 억제제)는 초기 혈전 형성을 예방하고 새로운 혈소판 응집체를 용해시키는데 효과적이지만, 이러한 중단은 매우 높은 전단 속도를 갖는 예비 폐색된 (pre-occluded) 동맥에서 혈전 형성을 유의미하게 예방하지 못하거나, 예비 폐색된 동맥 (적어도 50% 폐색된 혈관)의 개통에 유의미한 영향을 미치지 못한다. 그러나, 보다 최근의 연구에 의하면, VWF (A1 도메인)와 혈소판 (GpIb) 상의 이의 동족 리간드 사이의 상호 작용의 차단은 매우 높은 전단 속도하에 폐쇄성 혈전 형성 속도를 늦추고 이미 형성된 폐쇄성 혈전을 용해시켜 폐색된 동맥의 개통을 효과적으로 증가시키는 것으로 나타났다.

[0012] VWF 상호 작용과 관련된 또 다른 장애는 겸상 적혈구 병이다.

[0013] 겸상 적혈구 병은 2개의 카피로서 또는 결핍성 또는 결함성 β-글로빈을 지정하는 대립 유전자에 의한 돌연변이체 β-글로빈 대립 유전자 (Glu6Val)의 유전으로부터 발생하며, 강성, 부착성, 용해성 적혈구를 생성한다. 이러한 특성들은 다수의 장기에 영향을 미치는 만성 용혈성 빈혈 및 일시적 혈관 폐색을 비롯하여 겸상 적혈구 병의 임상 소견을 설명한다. 용혈 속도가 가장 높은 환자는 폐 동맥 고혈압, 지속 발기증 및 다리 궤양으로 구성된 증후군에 대한 위험이 있다. VWF를 비롯한 몇몇의 접착제 분자는 겸상 혈관 폐색에 연루되어 있다. 급성 활성화 내피 세포는 적혈구, 특히, 겸상 적혈구에 자발적으로 결합할 수 있는 다량의 매우 큰 고부착성 VWF 분자를 방출할 수 있다.

[0014] VAD-관련 후천성 폰 빌레브란트 증후군 (aVWS)의 현상을 기술하는 광범위한 의학 문헌이 있지만, 어떠한 알려진 치료도 현재 이용가능하지 않다 (문헌 [Suarez J, et al., *Mechanisms of Bleeding and Approach to Patients with Axial-Flow Left Ventricular Assist Devices*. Circulation: Heart Failure 2011; 4(6):779-784] 참조). 현재의 치료는 추가의 응고 인자 또는 농축 VWF의 투여를 포함하며, 이들 각각은 상당한 위험을 갖고 있다.

[0015] 마찬가지로, VAD 치료, 특히, LVAD 치료를 받은 환자들 중에 VAD 기구에서 혈전증의 관찰을 기술하는 최근 문헌이 있다. 이러한 혈전증은 본 출원에서 "VAD-관련 펌프 혈전증"으로 지칭된다. 예를 들어, LVAD에서 혈전 형성을 나타내는 문헌 [Starling RC, et al., *Unexpected Abrupt Increase in Left Ventricular Assist Device Thrombosis,* 2014, N. Engl. J Med., 370:33-40]의 도 2를 참조한다. 그러나, 현재까지 항응고제 치료 이외의 어떠한 치료법도 혈전증의 발생 빈도를 예방하기 위해 제안되거나 채택되지 않았다.

[0016] 결과적으로, VWF 상호 작용을 표적화하는 약물 또는 생체 치료제에 대한 필요성이 여전히 존재한다. 구체적으로, VWF 다량체가 VAD 환자에서 파괴되는 과정 중에 존재하고 VAD 환자에서 및 또한 예비 폐색된 혈관 (VAD 및 비-VAD 대상체 모두에서 존재할 수 있음)에서 발견된 것들과 같은 매우 높은 전단 속도하에 형성된 혈전의 길항제인 약리학적 길항제에 대한 필요성이 여전히 존재한다. VAD 기기에서 혈전 형성의 길항제에 대한 필요성이 여전히 존재한다. 이러한 다양한 병태들의 각각에서, 이러한 작용제는 VWF의 A1 도메인과 혈소판, 적혈구 및/또는 GpIb 상의 이의 동족 리간드 사이의 결합 상호 작용을 길항하여 VWF 다량체를 강화시키고/시키거나 이의

파괴를 느리게 할 수 있다. VAD 환자에서의 aVWS에 대한 치료법으로서 이러한 화합물 또는 조성물의 사용은 출혈 문제를 교정하기 위해 항응고제 (출혈을 증가시킴)의 투여를 동반하기 때문에 상당히 직관적이지 않다. 그러나, VAD 환자에서의 고분자량 VWF 다량체의 보존이 궁극적으로 VWF 단백질 가수분해로 이어지는 다운스트림 캐스케이드를 예방할 것이다는 점에서 치료학적 근거는 타당하다. 이러한 작용제는 또한 VWF의 A1 도메인과 혈소판 및/또는 GpIb 상의 이의 동족 리간드 사이의 결합 상호 작용을 길항하여 폐쇄성 혈전의 형성을 중단시키고/거나 느리게 할 수 있다.

[0017] 혈관 내강의 폐쇄 (폐색) 동안 (즉, VAD 환자 및/또는 예비 폐색된 혈관을 갖는 대상체에서 발견되는 것들과 같은 매우 높은 전단 속도하에) 혈소판 응집 또는 가교를 길항하는 작용제 및 혈관에서 이미 형성된 폐쇄성 혈전을 분해 또는 중단시킬 수 있는 작용제에 대한 필요성이 여전히 존재한다. 이러한 작용제는 VWF와 혈소판 사이의 상호 작용을 길항하여 기존 혈전의 분해에 의해 폐쇄성 혈전증 후에 혈관 개통을 복원할 수 있다. 이러한 작용제는 심근 경색 및 허혈성 뇌졸중과 같은 심혈관 및 관상 동맥 질환의 치료에 유용하다. 이러한 작용제는 또한 VAD 치료 동안 폐쇄성 혈전의 발생을 방지하는데 유용할 수 있다.

[0018] VWF 다량체와 적혈구의 다른 상호 작용에 기인하는 합병증 및 장애, 특히, 겸상 적혈구 병에서 적혈구에 대한 VWF의 비정상 결합의 경우에서 치료학적 개입에 대한 필요성도 또한 여전히 존재한다. 이러한 작용제는 겸상 적혈구 병에서 적혈구에 대한 VWF의 결합을 조절할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 언급된 바와 같이, aVWS 및 폐쇄성 혈전증과 같은 혈관 보조 장치 (VAD) 관련 합병증 및 장애, 및 VWF 다량체와 적혈구의 상호 작용, 예를 들어, 겸상 적혈구 병에서 VWF 다량체와 적혈구 사이에서 발생하는 상호 작용에 기인하는 장애의 치료를 위한 치료제에 대한 필요성이 여전히 존재한다. 혈관 내강의 폐색 동안 또는 VAD 기기에 의한 치료 중의 혈전 형성 동안 혈소판 응집을 길항하는 치료제, 및 혈관에서 이미 형성된 폐쇄성 혈전 또는 뇌졸중과 같은 심혈관 및/또는 관상 동맥 질환의 치료 중 VAD 펌프에서 이미 형성된 혈전을 분해 또는 중단시킬 수 있는 작용제에 대한 필요성이 추가로 여전히 존재한다.

과제의 해결 수단

[0020] **발명의 개요**

[0021] 본 개시 내용은, 다른 것들 중에서도, 독립적으로 또는 VAD 치료와 조합하여 겸상 적혈구 병과 같은 상황에서 발생할 수 있으며 VAD 환자에서 폐쇄성 혈전 형성 동안 또는, 예를 들어, 허혈성 뇌졸중과 같은 임의의 다수의 병태에서 발생할 수 있는 것과 같은 혈관 내강의 폐쇄 동안 혈소판 응집의 상황에서 발생할 수 있는 VWF-혈소판 상호 작용 및 VWF-적혈구 상호 작용의 길항제를 제공한다. 이러한 길항제는 VWF 보호제의 역할을 할 수 있다. 이러한 길항제는 또한 지혈의 조절 및 조정에서의 치료제, aVWS 및 폐쇄성 혈전증과 같은 혈관 보조 장치 (VAD) 관련 합병증 및 장애의 치료를 위한 치료제, 및 겸상 적혈구 병에서와 같은 VWF 다량체와 적혈구의 상호 작용에 기인하는 장애의 치료를 위한 치료제의 역할을 할 수 있다. 또한, 이러한 작용제는 심근 경색 및 뇌졸중과 같은 심혈관 및 뇌혈관 장애의 치료에서 치료제의 역할을 할 수 있다.

[0022] 적어도 6개의 염기쌍을 갖는 이중 가닥 영역을 나타내는, 서열 번호 1의 적어도 21개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 VWF 보호제가 또한 제공된다. 적어도 6개의 염기쌍의 이중 가닥 영역을 갖는 VWF 보호제는, 5개 이하의 염기쌍의 보다 짧은 이중 가닥 영역을 갖는 보호제와 비교하여, 보다 높은 온도에서 보다 큰 열 안정성 및, 이로 인해, VWF에 대한 보다 큰 친화성 및 증가된 기능성을 가질 수 있다. 보다 짧은 이중 가닥 영역은 보다 높은 온도에서 스템-루프 구조 (stem-loop structure)의 풀림 및 관련된 친화성 및 기능성 손실을 초래할 수 있다.

[0023] 일부 실시형태에서, 본 발명의 합성 폴리뉴클레오타이드는 25~30개 길이의 뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 이중 가닥 영역은 약 6개 내지 약 9개의 염기쌍일 수 있다. 더욱이, 상기 이중 가닥 영역은 말단에서 또는 그 부근에서 6개 이상의 3' 및 5' 뉴클레오타이드에 의해 형성된다.

[0024] 본 발명의 합성 폴리뉴클레오타이드는 화학적으로 변형될 수 있다. 각각의 뉴클레오타이드는 적어도 1개의 화학적 변형을 포함할 수 있다. 이러한 화학적 변형은 상기 합성 폴리뉴클레오타이드의 당, 핵염기 또는 뉴클레오타이드간 링커일 수 있다. 상기 당에 대한 변형은 2' O-메틸 변형로 이루어질 수 있다.

[0025] 말단 캡 구조는 또한 3' 및/또는 5' 말단에 도입될 수 있다. 이러한 구조는 적어도 1개의 반전 데옥시티미딘 또는 아미노기 (NH_2)를 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 하나의 양태에서, 상기 3' 말단 캡은 반전 데옥시티미딘을 포함하며, 상기 5' 말단 캡은 아미노기 (NH_2)를 포함한다. 하나의 양태에서, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 2이다.

[0026] 핵산 압타머를 포함하는 VWF 보호제는 임의의 다수의 컨쥬게이트에 의해 변형될 수 있다. 이러한 컨쥬게이트 중 1개는 PEG (폴리에틸렌 글리콜) 모이어티이다. 이러한 모이어티는 임의의 크기 또는 분지 형태일 수 있다. 하나의 양태에서, 상기 PEG 모이어티는 상기 핵산 압타머의 5' 말단에 컨쥬게이트될 수 있다. 또 다른 양태에서, 상기 PEG 모이어티는 상기 핵산 압타머의 3' 말단에 컨쥬게이트될 수 있다. 하나의 양태에서, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 3이다.

[0027] 상기에서 기재된 VWF 보호제 중 어느 하나와 전체적으로 또는 부분적으로 하이브리드화할 수 있거나 이에 결합하는 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드가 본 출원에서 추가로 제공된다. 하나의 양태에서, 상기 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 4의 적어도 12개의 연속 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 상기 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 4의 적어도 15개의 연속 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 상기 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 4의 적어도 18~22개의 연속 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0028] 상기 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드는 화학적으로 변형될 수 있다. 화학적 변형은 상기 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드의 적어도 1개의 뉴클레오타이드에 대해 이루어질 수 있다. 일부 양태에서, 각각의 뉴클레오타이드는 적어도 1개의 화학적 변형을 포함한다. 상기 화학적 변형은 뉴클레오타이드 당에 대한 2'-O-메틸 변형일 수 있다. 상기 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드는 3' 말단 캡을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 양태에서, 상기 3' 말단 캡은 반전 데옥시티미딘일 수 있다.

[0029] 일부 실시형태에서, 상기 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 5를 포함한다.

[0030] 혈역학적 흐름을 겪는, 전혈 또는 혈장과 같은 샘플에서 또는 의료 또는 수술 장치 내에서 VWF 다량체의 해리를 예방하는 방법이 본 출원에서 추가로 제공된다. 다량체의 해리는 부분적으로 기능성 VWF 종을 남길 수 있지만, 일부 경우에서는 해리는 기능 감소를 초래할 수 있다. 이와 같이, VWF 보호제는 이러한 기능 손실 또는 감소를 경감시키는 기능을 할 수 있다.

[0031] 일부 실시형태에서, VWF와 관련된 질환, 장애 또는 합병증의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 출원에서 기재된 합성 폴리뉴클레오타이드 또는 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드의 용도가 제공된다. 하나의 양태에서, 상기 장애는 혈전 장애이다. 하나의 양태에서, 상기 혈전 장애는 허혈성 뇌졸중이다.

[0032] 다른 실시형태에서, VAD-관련 합병증 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 출원에서 기재된 합성 폴리뉴클레오타이드 또는 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드의 용도가 제공된다. 하나의 양태에서, 상기 합병증 또는 장애는 후천성 폰 빌레브란트 증후군 (aVWS), 혈관이형성증, 폐쇄성 혈전증 또는 VAD-관련 펌프 혈전증일 수 있다.

[0033] 다른 실시형태에서, 적혈구에 대한 VWF의 비정상 결합을 포함하는 합병증 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 출원에서 기재된 합성 폴리뉴클레오타이드 또는 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드 중 어느 하나의 용도가 제공된다. 하나의 양태에서, 상기 합병증 또는 장애는 겸상 적혈구 병이다.

[0034] 다른 실시형태에서, 혈관이형성증과 관련되는 위장 (GI) 출혈과 관련된 합병증 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 출원에서 기재된 합성 폴리뉴클레오타이드 또는 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드 중 어느 하나의 용도가 제공된다.

[0035] 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 폐쇄성 혈전으로 폐색된 적어도 1개의 혈관(들)을 갖는 대상체에서 혈관 개통을 복원하기 위한 약제의 제조에서 본 출원에서 기재된 합성 폴리뉴클레오타이드 또는 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드 중 어느 하나의 용도로서, 상기 혈관(들)이 적어도 50% 폐색되고, 상기 방법이 상기 대상체를 VWF 보호제와 접촉시켜 혈관 개통이 복원되도록 하는 것을 포함하는, 용도가 제공된다.

[0036] 다른 실시형태에서, 적어도 50% 폐색된 적어도 1개의 혈관을 갖는 대상체에서 하나 이상의 폐쇄성 혈전을 분해하기 위한 약제의 제조에서 본 출원에서 기재된 합성 폴리뉴클레오타이드 또는 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드 중 어느 하나의 용도가 제공된다. 이러한 방법은 하나 이상의 폐쇄성 혈전이 분해되도록 대상체를 VWF 보호제

와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0037] 폐쇄성 혈전증과 관련되는 상기 방법 중 어느 하나의 특정 실시형태에서, 상기 작용제는 상기 폐쇄성 혈전의 외층을 분해한다. 폐쇄성 혈전증과 관련되는 상기 방법 중 어느 하나의 특정 실시형태에서, 상기 폐쇄성 혈전은 10,000 s^{-1} 이상인 전단 속도의 조건하에 형성된다. 폐쇄성 혈전증과 관련되는 상기 방법 중 어느 하나의 특정 실시형태에서, 상기 폐쇄성 혈전은 섬유소 용해제 및/또는 항혈전제에 대해 저항성이다. 폐쇄성 혈전의 형성에 기인하는 질환 또는 장애는 급성 관상 동맥 증후군, 급성 폐쇄성 혈전증 및 허혈성 뇌졸중을 포함할 수 있다.

[0038] 혈전 장애 또는 합병증을 갖는 대상체에서 혈소판 응집을 예방하기 위한 약제의 제조에서 본 출원에서 기재된 합성 폴리뉴클레오타이드 또는 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드 중 어느 하나의 용도가 추가로 제공된다. 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 정맥내 주사 또는 피하 주사를 통해 투여될 수 있다. 하나의 양태에서, 피하 주사의 생체 이용률은 정맥내 주사에 비해 적어도 85%이다. 또 다른 양태에서, 피하 주사의 생체 이용률은 정맥내 주사에 비해 적어도 85%이다. 일부 실시형태에서, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 상기 대상체의 체중 kg 당 약 0.01 mg 내지 약 0.5 mg의 용량으로 투여될 수 있다. 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 약 70시간 내지 약 100시간의 혈장 반감기를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 항응고제로서 기능하지 않을 수 있다. 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 응고 시간을 연장시키고/시키거나 트롬빈 생성을 변경시킬 수 없다. 하나의 양태에서, 상기 혈전 장애 또는 합병증은 심근 경색이다. 다른 양태에서, 상기 혈전 장애 또는 합병증은 허혈성 뇌졸중이다.

[0039] 일부 실시형태에서, 상기 장애 또는 합병증으로 진단된 환자를 본 발명의 VWF 보호제 중 어느 하나와 접촉시키는 것을 포함하는, 혈전 장애 및 이의 합병증을 치료하는 방법이 제공된다. 하나의 양태에서, 상기 혈전 장애는 허혈성 뇌졸중이다.

[0040] 일부 실시형태에서, 상기 합병증 또는 장애로 진단된 환자를 본 발명의 VWF 보호제 중 어느 하나와 접촉시키는 것을 포함하는, 예를 들어, aVWS 및 폐쇄성 혈전증과 같은 VAD-관련 합병증 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 상기 혈전증은 VAD 기기에서 발생한다. 다른 실시형태에서, 폐쇄성 혈전증은 VAD 환자 또는 비-VAD 대상체에서 심혈관 또는 뇌혈관의 내강에서 발생한다. 일부 경우에서, 본 발명의 VWF 보호제의 효과를 역전시키거나 적정하는 것이 또한 필요할 수 있다. 이러한 경우, 본 발명은 특정 역전제를 제공한다.

[0041] 다른 실시형태에서, VWF 보호제를 사용하여 VWF와 적혈구의 비정상 상호 작용에 기인하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 상기 적혈구는 겸상 적혈구이다. 이러한 질환 또는 장애의 치료는 VAD 치료와 조합하거나 VAD 치료와 무관할 수 있다.

[0042] 다른 실시형태에서, VAD 치료와 조합하거나 VAD 치료와 무관하게 VWF 보호제에 의해 혈관이형성증과 관련된 위장관 출혈을 포함하는 합병증 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다.

[0043] 다른 실시형태에서, VWF 보호제에 의해 VAD 치료와 관련된 혈전증을 포함하는 합병증 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 폐쇄성 혈전 형성은 1개 이상의 환자 혈관에서 발생할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 혈전 형성은 VAD 기기 자체에서 발생할 수 있다. 또한, VAD 환자를 VWF 보호제와 접촉시키는 것을 포함하는, VAD 환자에서 하나 이상의 혈전을 분해하는 방법이 제공된다. 혈전증의 비율이 미치료된 VAD 환자에서의 혈전증의 비율에 비해 감소되도록 VAD 환자를 VWF 보호제와 접촉시키는 것을 포함하는, VAD 환자에서 혈전증의 비율을 감소시키는 방법이 추가로 제공된다.

[0044] 다른 실시형태에서, VWF 보호제에 의해, 폐색된 혈관에서 발견되는 전단 속도와 같은 매우 높은 전단 속도 (> 10,000 s-1)와 관련된 폐쇄성 혈전 형성을 포함하는 합병증 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 상기 폐쇄성 혈전 형성은 1개 이상의 대상체 혈관에서 발생할 수 있다.

[0045] 또한, 상기 대상체를 VWF 보호제와 접촉시키는 것을 포함하는, 1개 이상의 폐색된 혈관을 갖는 대상체에서 혈관 개통을 복원하는 방법이 제공된다. 1개 이상의 폐색된 혈관을 갖는 대상체를 VWF 보호제와 접촉시키는 것을 포함하는, 1개 이상의 폐색된 혈관에서 폐쇄성 혈전을 분해하는 방법이 또한 제공된다. 혈관 폐색의 비율이 미치료된 대상체에서의 혈관 폐색의 비율에 비해 감소되도록 대상체를 VWF 보호제와 접촉시키는 것을 포함하는, 대상체에서 혈관 폐색의 비율을 감소시키는 방법이 추가로 제공된다.

[0046] 폐쇄성 혈전증과 관련되는 상기 방법 중 어느 하나의 특정 실시형태에서, 상기 1개 이상의 혈관은 적어도 50% 폐색된다. 폐쇄성 혈전증과 관련되는 상기 방법 중 어느 하나의 특정 실시형태에서, 상기 작용제는 상기 폐쇄

성 혈전의 외층을 분해한다. 폐쇄성 혈전증과 관련되는 상기 방법 중 어느 하나의 특정 실시형태에서, 상기 폐쇄성 혈전은 10,000 s^{-1} 이상인 전단 속도의 조건하에 형성된다. 폐쇄성 혈전증과 관련되는 상기 방법 중 어느 하나의 특정 실시형태에서, 상기 폐쇄성 혈전은 섬유소 용해제 및/또는 항혈전제에 대해 저항성이다.

[0047] 혈관에서 폐쇄성 혈전의 형성에 기인하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 추가로 제공된다. 특정 실시형태에서, 상기 질환 또는 장애는, 예를 들어, 심근 경색 및 불안정 협심증을 비롯한 급성 폐쇄성 혈전증 또는 급성 관상 동맥 증후군이다. 다른 실시형태에서, 상기 질환 또는 장애는 허혈성 뇌졸중이다.

[0048] 추가의 실시형태에서, 중증 및/또는 뇌 말라리아와 관련된 중추 신경계 (central nervous system: CNS)의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 출원에서 기재된 합성 폴리뉴클레오타이드 또는 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드 중 어느 하나의 용도가 제공된다.

[0049] 헤이드 증후군 (Heyde's syndrome)과 관련된 위장 (GI) 출혈의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 출원에서 기재된 합성 폴리뉴클레오타이드 또는 상보성 합성 폴리뉴클레오타이드 중 어느 하나의 용도가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0050] 전술된 목적, 특징 및 이점과 기타 목적, 특징 및 이점은, 첨부된 도면에서 도시된 바와 같이, 본 발명의 특정 실시형태의 하기 설명으로부터 명백해질 것이다. 도면들은 반드시 축척에 맞는 것은 아니며, 그 대신에 본 발명의 다양한 실시형태의 원리를 설명할 때에 강조된다.

도 1은 3개의 압타머 작제물을 도시하는 다이어그램이다. 본 발명의 BT-100 (서열 번호 2)은 종래 기술의 화합물 ARC15105 (서열 번호 6) 및 ARC1779 (서열 번호 7)와 비교하기 위해 도시되어 있다.

도 2는 BT-100 역전제를 도시하는 다이어그램이다. 도 2는 외관 순으로 서열 번호 3 및 12를 각각 개시한 것이다.

도 3은 폰 빌레브란트 인자 다량체의 겔 및 높은 전단 조건에 의해 유도된 단백질 가수분해적 분해로부터 사람 혈장 중 다량체의 보호에 대한 BT-100의 영향을 도시한 것이다.

도 4는 혈전 형성의 순차적 단계를 묘사하는 개략도이다. 도 4의 (a)는 주로 GpIIb/IIIa 상호 작용을 포함하는 혈소판-혈소판 가교에 의한 생리학적 전단 응력하에 < 50%의 폐색에서 혈전 형성의 초기 단계를 도시한 것이다. 도 4의 (b)는 주로 GpIbα-VWF 상호 작용을 포함하는 혈소판-혈소판 가교에 의한 매우 높은 전단 응력하에 > 50%의 폐색에서 혈전 형성의 다음 단계를 도시한 것이다. 도 4의 (c)는, 초기 단계에서 GpIIb/IIIa 억제제에 대해 저항성이고 GpIbα-VWF 상호 작용의 억제제에 대해 민감한 완전 폐쇄성 혈전증 (100% 폐색)의 다음 단계를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 전문가의 합의는 상기 현상의 기계적 원인이 VWF에 작용하는 축류 펌프에 의해 생성된 혈역학적 전단력이다는 것이지만, VAD에 의해 생성된 유체 전단력은 단독으로 VWF의 광범위한 단백질 가수분해를 일으키기에 충분하지 않다 (문헌 [Siediecki CA, et al., *Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor*. Blood 1996; 88(8):2939-2950], [Schneider SW, et al. *Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers*. Proceedings of the National Academy of Sciences 2007; 104(19):7899-7903], [Selgrade BP and Truskey GA. *Computational fluid dynamics analysis to determine shear stresses and rates in a centrifugal left ventricular assist device*. Artif Organs 2012; 36(4):E89-E96], [Zheng Y, et al., *Flow-driven assembly of VWF fibres and webs in in vitro microvessels*. Nat Commun. 2015 Jul 30; 6:7858], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다).

[0052] 예를 들어, VWF의 A1 도메인에 대한 혈소판 테더링은 전단 조건하에 풀림을 증가시키고 VWF 단백질 가수분해를 향상시키며, A1 도메인에 결합하는 약물 또는 생물 치료제는 VWF-혈소판 상호 작용을 길항한다는 것으로 잘 공지되어 있다 (문헌 [Shim K, et al., *Platelet-VWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress*. Blood 2008; 111(2):651-657], [Nishio K, et al., *Binding of platelet glycoprotein Ibα to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004; 101(29):10578-10583], [Huang RH, et al., *A structural explanation for the antithrombotic activity of ARC1172, a DNA aptamer that binds von Willebrand factor domain A1*. Structure 2009; 17(11):1476-1484], [Siller-Matula

JM, et al., *ARC15105 Is a Potent Antagonist of Von Willebrand Factor Mediated Platelet Activation and Adhesion*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2012; 32(4):902-909] 및 [Diener JL, et al., *Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779*. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2009; 7(7):1155-1162], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다). 또한, VWF-혈소판 상호 작용은 VAD 치료에서 관찰된 전단 속도와 같은 매우 높은 전단 속도하에 폐쇄성 혈전 형성을 매개하는 것으로 공지되었다. VWF (A1 도메인)와 혈소판 (GpIb) 상의 이의 리간드 사이의 상호 작용의 차단은 매우 높은 전단 속도하에 형성되는 폐쇄성 혈전의 속도를 늦추고 이미 형성된 폐쇄성 혈전을 용해시킨다. 문헌 [Le Behot A, et al., *GpIbα-VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice,* Blood, 2013: Feb 19, 2014; DOI 10.1182/blood-2013-12-543074], [Starling RC, et al., *Unexpected Abrupt Increase in Left Ventricular Assist Device Thrombosis,* 2014, N. Engl. J Med., 370:33-40], [Capoccia M, et al., *Recurrent Early Thrombus Formation in Heartmate II Left Ventricular Assist Device*, 2013, J. Inv. Med., 1:DOI:10, 1177/2324709613490676], [Meyer AL, et al., *Thrombus Formation in a Heartmate II Left Ventricular Assist Device*, 2008, J. Thorac Cardiovasc Surg, 135:203-204], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다.

[0053] 이러한 배경에서, 본 발명자들은 VWF 길항제의 투여가 VAD-관련 합병증 및/또는 장애 또는 부작용, 예를 들어, aVWS 및 폐쇄성 혈전증을 예방 및/또는 개선해야 한다는 가설을 세웠다.

[0054] 폰 빌레브란트 인자 길항제의 치료학적 유용성은 VWF-혈소판 결합의 과도한 활성화의 질환에서 입증되었다. 이러한 예 중 하나는 고분자량 VWF 다량체의 단백질 가수분해의 실패가 이의 축적을 초래하고 결국 파종성 혈관내 혈전증을 유발할 수 있는 혈전성 혈소판 감소성 자반 (Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: TTP)으로서 공지된 혈전 장애이다. TTP 환자에 대한 VWF 길항제의 투여는 이러한 질환의 특징인 혈소판 감소증을 교정하는 것으로 입증되었으며, 이러한 수단에 의한 임상 결과의 개선을 입증하기 위한 임상 실험이 진행 중에 있다.

[0055] VWF 길항제의 치료학적 유용성의 다른 예는 2b형 폰 빌레브란트 병 (Von Willebrand Disease Type 2b: 2b형 VWD)으로서 공지된 희귀성 유전 질환의 치료에 있다. 이러한 질환의 환자는 VWF의 A1 도메인에서의 돌연변이를 갖는데, 이것은 이를 항시성으로 활성화시켜 혈역학적 전단력에 의해 VWF의 활성화에 대한 정상적인 요구조건을 제거한다. 이러한 비조절된 VWF의 활성화 및 혈소판의 결합의 결과로서, 이들 환자는 혈소판 감소증 및 고분자량 VWF 다량체의 감소된 수준을 발생시키며, 자발성 점막피부 출혈 (특히, 코피 또는 월경과다)을 겪기 쉽다.

[0056] 2b형 VWD 환자에 대한 VWF 길항제의 투여는 혈소판 감소증을 교정하고 고분자량 VWF 다량체 덩어리를 정상화하는 것으로 입증되었다 (문헌 [Jilma-Stohlawetz P, et al., A dose ranging phase I/II trial of the von Willebrand factor inhibiting aptamer ARC1779 in patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. Thromb Haemost 2011; 106(3)], [Jilma-Stohlawetz P, et al., Inhibition of von Willebrand factor by ARC1779 in patients with acute thrombotic thrombocytopenic purpura. Thromb Haemost 2011; 105(3):545-552], 미국 공개특허 2009/0203766, 국제공개공보 WO 2010/091396 및 [Jilma-Stohlawetz P, et al., The anti-von Willebrand factor aptamer ARC1779 increases von Willebrand factor levels and platelet counts in patients with type 2B von Willebrand disease. Thromb Haemost 2012; 108(2)] 참조, 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다).

[0057] 그러나, 지금까지 전술한 모든 사항을 고려할 때, VAD 이식 후 환자에서 발생하는 후천성 폰 빌레브란트 증후군 (aVWS)의 만족스러운 치료는 아직도 없다. 이론적으로, VWF를 함유하는 공여체 혈장 농축물로부터 또는 재조합 공급원 (아직 시판되지 않음)으로부터의 외인성 VWF의 투여는 고분자량 VWF 다량체 수준을 일시적으로 복원할 수 있다고 추측할 수 있다. 그러나, 외인성 VWF의 투여는, 기계적으로 유도되는 상승된 전단력으로 시작하여 VWF의 부적절한 활성화를 유발하고, 결국 VWF에 대한 과도한 혈소판 결합을 유발하여, 결국 기능성 VWF 다량체의 결핍을 초래하는 단백질 가수분해에 대한 VWF의 노출을 유발하는 인과관계 사슬로부터 발생하는 근본적인 문제를 교정하지 못할 것이다. 환자가 혈역학적 지지체에 의존하는 전단력의 공급원 (즉, VAD)을 제거하는 것 외에, 이러한 인과관계 사슬을 방해하려는 차선책은, 전단력-활성화되고 부분적으로 풀린 VWF 다량체에 대한 혈소판의 결합을 차단하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 몇가지 방법 중 어느 하나에 의해, 본 출원에서 제안된 바와 같이 다량체 자체를 보존하는 것이다.

[0058] 통상의 기술자는 상기에서 언급된 ARC1779 또는 ARC15105와 같은 혈전성 혈소판 감소성 자반 또는 2b형 빌레브란트 병 (2b형 VWD)에서 유용한 것으로 밝혀진 화합물이 효과적일 수 있다는 것을 또한 제안할 수 있다. 놀랍

게도, 본 발명자는 이것이 그 경우에 해당하지 않는다는 것을 밝혀냈다.

[0059] 기준선에서의 겸상 적혈구 병은 용혈 속도와 밀접한 상관 관계가 있는 고농도의 고부착성 VWF와 관련되어 있는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Chen J, et al. *The rate of hemolysis in sickle cell disease correlates with the quantity of von Willebrand factor in the plasma.* Blood 2011, 117, 3680-3683], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다). 따라서, VWF는 VAD 치료와 조합하거나 VAD 치료와 무관하게 겸상 적혈구 병에서 용혈을 개선하기 위한 치료 표적을 나타낸다.

[0060] 지혈 유지 (즉, 출혈 정지)에서 이의 역할과 함께, VWF는 혈관 염증 및 평활근 세포 증식을 비롯한 혈관계의 여러 과정에 연루되어 있다. VWF는 또한 혈관형성의 음성 조절인자인 것으로 공지되어 있다. 본 출원에서 사용되는 "혈관형성"은 새로운 혈관의 형성으로 정의된다. VWF는 VEGFR2 신호 전달의 제어를 통해 혈관형성을 제약함으로써 "브레이크"로서 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Starke RD, et al., *Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis*. Blood, 2011, 117:1071-80], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다).

[0061] VAD 환자에서의 GI 관 출혈은 혈관이형성증에 기인하는 것으로 공지되어 있다 (문헌 [Islam S, et al, *Left ventricular assist devices and gastrointestinal bleeding: a narrative review of case reports and case series*. Clin Cardiol. 2013, 36:190-200] 및 [Suarez J, Patel CB, Felker GM, Becker R, Hernandez AF, Rogers JG. *Mechanisms of bleeding and approach to patients with axial-flow left ventricular assist devices*. Circ. Heart Fail. 2011 4:779-84] 및 이들 문헌의 참고 문헌, 상기 문헌들의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다). 본 출원에서 사용되는 "혈관이형성증"은 혈관형성 조절이상과 관련되는 GI 관의 혈관 기형으로 정의된다.

[0062] 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 혈역학적 전단력에 대한 노출에 기인하는 VWF 다량체의 단백질 가수분해를 통한 VWF의 전신 고갈은, GI 관의 혈관 내피에서 VWF의 감소를 초래하고, VAD 환자에서 혈관이형성증을 초래할 수 있다. 따라서, 지혈을 유지하고/하거나 혈관형성을 억제하는데 있어서 이의 역할을 통해, 기능성 VWF는 GI 관에서 건강한 혈관 내피를 유지하는데 중요할 수 있다.

[0063] 본 발명은 혈관 내피에서 VWF의 고갈을 예방하는 VWF 작용제 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 이들 조성물은 VAD 환자에서 GI 관에서의 혈관 기형의 형성 및 위장관 출혈을 예방한다. 본 출원에서 기재된 직접 대면 연구에서, 본 발명자들은 VWF 다량체의 보호가 당해 분야의 것과는 완전히 다른 압타머에 의해 제공된다는 것을 입증한다.

[0064] 혈소판 당단백질 IIb/IIIa (GpIIb/IIIa)와 혈장 단백질 사이의 상호 작용은 동맥 혈전에서 혈소판 가교를 매개하는 것으로 공지되어 있다. 그러나, 과거의 연구에 의하면, GpIIb/IIIa 억제제는 예비 폐색된 동맥의 개통에 유의미한 영향을 미치지 못하여 심근 경색 또는 허혈성 뇌졸중 후에 혈소판 응집체를 분산시키지 못하는 것으로 나타났다 (문헌 [Mehilli J, et al., *Abciximab in patients with acute ST-segment- elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention after clopidogrel loading: a randomized double-blind trial*. Circulation. 2009;119(14):1933-1940], [Kleinschnitz C, et al., *Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding*. Circulation. 2007;115(17):2323-2330], [Adams HP Jr, et al; AbESTT-II Investigators, *Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II).* Stroke. 2008;39(1):87-99], [Kellert L, et al., *Endovascular stroke therapy: tirofiban is associated with risk of fatal intracerebral hemorrhage and poor outcome*. Stroke. 2013; 44(5): 1453-1455], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다).

[0065] 다른 한편으로, 연구에 의하면, GpIbα와 VWF 사이의 상호 작용의 차단은 기니피그에서 광혈전증-유도된 뇌졸중 후에 재관류로 이어지는 것으로 입증되었다 (이에 반해, GpIIb/IIIa 억제제는 효과적이지 않음). 문헌 [Momi S, et al., *Reperfusion of cerebral artery thrombosis by the GPIb-VWF blockade with the Nanobody ALX-0081 reduces brain infarct size in guinea pigs.* Blood. 2013;121(25):5088-5097], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다. 마찬가지로, 추가의 연구는 일시적인 기계적 뇌졸중 모델에서 재관류 후 혈전-염증성 반응의 억제를 통해 GpIb-VWF 표적화의 유익한 효과를 나타냈다. 문헌 [Kleinschnitz C, et al., *Deficiency of von Willebrand factor protects mice from ischemic stroke*. Blood. 2009;113(15):3600-3603], [Pham M, et al., *Sustained reperfusion after blockade of glycoprotein-receptor-Ib in focal cerebral ischemia:*

an MRI study at 17.6 Tesla. PLoS One. 2011;6(4):e18386], [Stoll G, et al., *The role of glycoprotein Ibalpha and von Willebrand factor interaction in stroke development*. Hamostaseologie. 2010;30(3):136-138], [Kleinschnitz C, et al., *Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding*. Circulation. 2007;115 (17):2323-2330], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다.

[0066] 최근에, 상이한 발달 단계에서의 중간 대뇌 동맥 혈류의 전산 유체 역학 (computational fluid dynamic: CFD) 모의실험 및 생체내 혈전성 뇌졸중 모델에 의하면, 혈관 내강의 폐쇄 동안의 혈소판 가교는 GpIbα-VWF 상호 작용에 의존적이며, GpIbα-VWF 상호 작용의 중단은 매우 높은 전단 속도 (10,000 s^{-1} 이상)하에 형성된 혈소판 응집체를 포함하는 폐쇄성 혈전의 외층을 특이적으로 분해함으로써 혈관 개통을 복원하는 것으로 입증되었다. 문헌 [Le Behot A, et al., *GpIbα-VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice.* Blood, 2013: Feb 19, 2014; DOI 10.1182/blood-2013-12-543074], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다.

[0067] 폐쇄성 혈전 형성은 3가지 상이한 발달 단계에서 발생하며, 여기서, 각 단계는 상이한 국소 전단 속도를 겪고 상이한 메커니즘에 의해 조절되어 다음과 같이 3가지 상이한 영역의 폐쇄성 혈전을 초래한다: (1) 완전한 혈전 과정 전체에 걸쳐 1,500 s^{-1} 미만의 전단 속도에 노출되는 혈전의 기초 (피브린); (2) 약 1,500 s^{-1} 내지 약 10,000 s^{-1} 사이의 전단 속도에서 제1 발달 단계 동안 형성된 (0% 내지 < 50%의 폐쇄성 혈전 형성) 혈전의 일부에 상응하는 혈전의 코어 (도 4의 (a) 참조); 및 (3) 매우 높은 전단 속도 (10,000 s^{-1} 이상)에서 혈전 형성의 최종 단계 동안 형성되며 (> 50% 내지 100%의 폐쇄성 혈전 형성) (도 4의 (b) 참조), 혈관 내강 폐쇄를 담당하는 (도 4의 (c) 참조), 혈전의 외층. 혈전의 코어는 주로 GpIIb/IIIa-의존적 상호 작용에 의해 가교된 혈소판으로 구성되는 반면, 혈전의 외층의 형성은 Gp1bα-VWF 상호 작용에 의존적이다. 문헌 [Le Behot A, et al., Blood, 2013: Feb 19, 2014; DOI 10.1182/blood-2013-12-543074].

[0068] GpIbα-VWF 상호 작용에 기인하는 전단-의존적 혈전 형성은 협착성 관상 동맥 또는 파열성 죽상경화판 병변에서 발생한다 (문헌 [Sadler JE. *Biochemistry and genetics of von Willebrand factor*. Annu Rev Biochem. 1998;67:395-424], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다). VWF 수치는 또한 불량한 예후와 관련되는 부정적인 심장 이벤트를 경험한 환자에서 고조된다 (문헌 [Collet JP, et al., Acute release of plasminogen activator inhibitor-1 in ST-segment elevation myocardial infarction predicts mortality. Circulation. 2003;108:391-394], [Fuchs I, et al., *Platelet function in patients with acute coronary syndrome (ACS) predicts recurrent ACS*. J Thromb Haemost. 2006;4:2547-2552], [Thompson SG, et al., *Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group*. N Engl J Med. 1995;332:635-641], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다). 심근 경색의 통상적인 치료법은 혈소판 활성화 및 응집을 감소시키지만, 주로 VWF 이외의 수용체 및 표적을 다루고 있다. GpIb 또는 콜라겐 결합을 길항하여 초기 부착 단계를 표적화하는 것은 항혈소판 약물의 개발에서 매우 강력할 수 있는데, 특히, 이는 이러한 상호 작용에 대한 중복성이 거의 없기 때문이다. 또한, 높은 전단 조건에서 GpIb-VWF 상호 작용의 특정 요구조건으로 인해, 정맥계를 방해하지 않고도 동맥 측면을 표적화할 수 있으므로, 현재 사용되는 항혈소판 약물의 가장 중요한 부작용인 출혈 위험 문제를 감소시킬 가능성이 있다. 또한, 혈소판 부착을 방해하는 약물은 혈소판 활성화 및 분비를 감소시키는 추가 이점을 가지며, 이것은 심지어 재협착증의 예방에 유리한 것으로 판명될 수 있다 (문헌 [De Meyer SF, et al., *Antiplatelet drugs*. British Journal of Haematology, 142, 515-528], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다).

[0069] 본 개시 내용은 예비 폐색된 혈관 또는 VAD 치료에서 발견되는 전단 속도와 같은 매우 높은 전단 속도하에 형성된 폐쇄성 혈전을 분해하는 VWF 작용제, 조성물 및 방법을 제공한다. 특히, 상기 VWF 작용제는 10,000 s^{-1} 이상의 전단 속도하에 형성된 혈소판 응집체를 함유하는 폐쇄성 혈전, 즉, 폐쇄성 혈전의 외층에서 발견된 것들을 용해시킨다. 이들 작용제 및 조성물은, 예를 들어, 심근 경색 및 불안정 협심증을 비롯한 급성 폐쇄성 혈전증 또는 급성 관상 동맥 증후군을 갖는 환자에서 혈관 개통을 복원한다. 다른 실시형태에서, 상기 작용제 및 조성물은 허혈성 뇌졸중을 겪은 환자에서 혈관 개통을 복원한다. 다른 실시형태에서, 상기 작용제 및 조성물은 VAD 환자에서 혈관 개통을 복원한다. 다른 실시형태에서, 상기 작용제 및 조성물은 VAD 기기에서 하나 이상의 혈전을 분해한다.

[0070] 본 개시 내용은 예비 폐색된 혈관 또는 VAD 치료에서 발견되는 전단 속도와 같은 매우 높은 전단 속도하에 형성된 폐쇄성 혈전의 발달을 느리게 하는 VWF 작용제, 조성물 및 방법을 또한 제공한다. 특히, 상기 VWF 작용제는 10,000 s^{-1} 이상의 전단 속도하에 형성된 혈소판 응집체를 함유하는 폐쇄성 혈전, 즉, 폐쇄성 혈전의 외층에서 발견된 것들의 발달을 느리게 한다. 다른 실시형태에서, 상기 작용제 및 조성물은 VAD 기기에서 혈전의 발달을 느리게 한다.

[0071] 본 개시 내용은 하나 이상의 폐쇄성 혈전으로 적어도 50% 폐색된 하나 이상의 혈관(들)을 갖는 대상체에서 혈관 폐색의 비율을 감소시키기 위한 VWF 작용제, 조성물 및 방법을 또한 제공하며, 상기 방법은 혈관 폐색의 비율이 적어도 50% 폐색된 미치료된 혈관에서의 혈관 폐색의 비율에 비해 감소되도록 상기 대상체를 VWF 보호제와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0072] 추가의 실시형태에서, 본 개시 내용의 VWF 작용제, 조성물 및 방법은 중증 및/또는 뇌 말라리아, 및 헤이드 증후군 (이들에 제한되지 않음)과 같은 VWF와 관련된 희귀 질환 또는 징후를 치료 또는 예방하는데 유용할 수 있다.

[0073] 중증 말라리아는 플라소모디움 팔시파룸 (*Plasmodium falciparum*) 감염의 생명 위협성 병태이며, 여기서, 상기 감염은 신체의 주요 장기의 심각한 부전으로 복잡하다. 때때로, 중증 말라리아는 혼수 상태와 관련되며, 뇌 말라리아로서 공지되어 있다. VWF, VWF 프로펩타이드 (각각 만성 및 급성 내피 세포 활성화의 마커) 및 활성화된 VWF의 상승된 수준이 뇌 말라리아 환자의 혈장에서 확인되었다 (문헌 [Hollestelle MJ, et al., *von Willebrand factor propeptide in malaria: evidence of acute endothelial cell activation*. Br J Haematol. 2006;133(5):562-9], [de Mast Q, et al., *Thrombocytopenia and release of activated von Willebrand Factor during early Plasmodium falciparum malaria*. J Infect Dis. 2007;196(4):622-8], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다). 이것은 중증 말라리아가 또한 VWF 절단 프로테아제 ADAMTS13의 결핍 및 과다반응성 초대형 VWF 다량체의 축적과 관련된다는 것을 밝히는 추가의 연구에 의해 뒷받침된다 (문헌 [de Mast Q, et al. *ADAMTS13 deficiency with elevated levels of ultra-large and active von Willebrand factor in P. falciparum and P. vivax malaria*. Am J Trop Med Hyg. 2009;80(3):492-8], [Larkin D, et al. *Severe Plasmodium falciparum malaria is associated with circulating ultra-large von Willebrand multimers and ADAMTS13 inhibition*. PLoS Pathog. 2009;5(3):e1000349], [Lowenberg EC, et al. *Severe malaria is associated with a deficiency of von Willebrand factor cleaving protease, ADAMTS13*. Thromb Haemost. 2010;103(1):181-7], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다). 최근 연구에 의해, VWF는, 가능하게는 혈소판을 격리하고, 말라리아-감염된 적혈구를 동원하고, 내피 세포 투과성을 증가시키고, 결국 중추 신경계 (CNS) 혈전증을 유발함으로써, 말라리아 병인을 조절하는데 있어서 적극적인 역할을 하는 것으로 추가로 입증되었다 (문헌 [O'Regan N, et al. *A novel role for von Willebrand factor in the pathogenesis of experimental cerebral malaria*. Blood. 2016;127(9):1192-201], [Montgomery, R.R., *The heads and the tails of malaria and VWF*. Blood, 2016. 127(9): p. 1081-2], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다). 이러한 결과들에 비추어, 본 발명자들은 본 발명의 VWF 작용제를 사용하여 혈소판과 VWF의 상호 작용의 중단이 뇌 말라리아에서 혈전 형성을 예방하거나 혈소판-풍부 혈전을 분해할 수 있다고 예상한다.

[0074] 헤이드 증후군은 대동맥 협착증의 존재하에 혈관이형성증으로 인한 위장관 출혈 증후군이다. 고분자량 VWF 다량체의 손실은 GI 출혈과 대동맥 협착증 사이의 연결로서 확인되었으며 (문헌 [Warkentin TE, et al. *Aortic stenosis and bleeding gastrointestinal angiodysplasia: is acquired von Willebrand's disease the link?* Lancet. 1992;340(8810):35-7]), 중증 대동맥 협착증 환자 중 67~92%에서 발생하는 것으로 보고되었다 (문헌 [Vincentelli A, et al. *Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis.* N Engl J Med. 2003 Jul 24;349(4):343-9], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다). 더욱이, VWF 활성은 협착증의 중증도 및 출혈 속도와 유의미한 상관 관계가 있다 (문헌 [Blackshear JL, et al. *Indexes of von Willebrand factor as biomarkers of aortic stenosis severity (from the Biomarkers of Aortic Stenosis Severity [BASS] study).* Am J Cardiol. 2013;111(3):374-81], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다). 판막 폐색에 기인하는 높은 전단 응력은 VWF 다량체의 구조를 변화시켜 프로테아제 ADAMTS13에 의한 이의 단백질 가수분해를 증가시키는 것으로 생각된다 (문헌 [Vaz A, et al. *Heyde syndrome--the link between aortic stenosis and gastrointestinal bleeding.* Rev Port Cardiol. 2010 Feb;29(2):309-14], [Loscalzo J. *From clinical observation to mechanism--Heyde's syndrome.* N Engl J Med. 2012;367(20):1954-6], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다). 이것은 대동맥 판막 교체가 VWF 비정상을 복원하고 GI 출혈의 위험을 감소시킨다는 사실에 의해 뒷받침된다. VWF 다량체의 증가된 분해 및 제거율과 관련된 혈소판 미세 응집체의 형성과

함께 혈소판과 VWF 사이의 증가된 상호 작용이 존재한다. 본 개시 내용에 따르면, 본 출원에서 기재된 VWF 작용제는 VWF 다량체의 손실을 보호하고/하거나 혈소판과 VWF의 상호 작용을 길항하여 헤이드 증후군 환자에서 GI 출혈을 예방할 수 있다.

[0075] **I. 본 발명의 조성물**

[0076] VAD 치료와 조합하거나 VAD 치료와 무관하게, 심실 보조 장치 (VAD, 좌측 VAD 또는 LVAD 포함)의 이용과 관련된 병태 또는 이의 부작용, 예를 들어, LVAD 관련 혈관이형성증, 후천성 폰 빌레브란트 증후군 (aVWS), 2형 VWD 및 기타 심혈관 및 뇌혈관 장애, 예를 들어, 급성 관상 동맥 증후군, 급성 폐쇄성 혈전증, 뇌졸중, 동맥류성 및 허혈성 이벤트 뿐만 아니라, 겸상 적혈구 병, 중증 및/또는 뇌 말라리아 및 헤이드 증후군을 예방 및/또는 개선하는 화합물의 디자인, 제제, 용도 및 제조를 위한 화합물, 조성물 (약제학적 조성물 포함) 및 방법이 본 출원에서 제공된다.

[0077] 일부 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 혈관이형성증과 관련된 GI 출혈을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 GI 출혈을 갖는 VDA 환자를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0078] 이와 같이, 본 발명의 화합물 및/또는 조성물은, VWF 다량체의 손실, 감소 또는 파괴를 보존, 보호 또는 예방하고/하거나 VWF 다량체와 적혈구, 예를 들어, 겸상 적혈구의 상호 작용을 길항하는 방식으로, VWF 단량체 또는 다량체와 상호 작용하거나 이들에 결합한다. 상기 화합물 및/또는 조성물은 또한 VWF 단량체 및/또는 다량체와 혈소판의 상호 작용을 길항하여 예비 폐색된 혈관에서 폐쇄성 혈전이 분해되도록 할 수 있다. 본 출원에서 사용되는 이러한 보호 화합물 또는 조성물은 "VWF 다량체 보호제" 또는 "VWF 보호제"로서 지칭된다.

[0079] 일부 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는, VWF 다량체의 손실, 감소 또는 파괴를 보존, 보호 또는 예방하여 혈관 내피 세포에서 혈관형성에 대한 VWF 매개된 제약을 복원하고 VAD 환자에서 혈관신생을 예방하는 방식으로, VWF 단량체 또는 다량체와 상호 작용하거나 이들에 결합할 수 있다.

[0080] 다른 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는, 예를 들어, 심근 경색 및 불안정 협심증을 비롯한 급성 폐쇄성 혈전증 또는 급성 관상 동맥 증후군, 또는 허혈성 뇌졸중을 갖는 대상체와 같은 하나 이상의 예비 폐색된 혈관을 갖는 대상체에서 혈관 개통을 복원하는데 사용될 수 있다. 이러한 조건하에, 상기 화합물 및/또는 조성물은, 예비 폐색된 혈관 (적어도 50% 폐색된 혈관)에서의 폐쇄성 혈전이 분해되도록 VWF와 혈소판의 상호 작용을 길항하는 방식으로, VWF와 상호 작용하거나 이에 결합한다. 특정 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 상기 폐쇄성 혈전의 외층을 분해한다. 특정 실시형태에서, 분해되는 상기 폐쇄성 혈전은 10,000 s^{-1} 이상의 전단 속도의 조건하에 형성된다 (즉, 폐쇄성 혈전은 10,000 s^{-1} 이상의 매우 높은 전단 속도하에 형성된 혈소판 응집체를 함유한다). 일부 실시형태에서, 상기 폐쇄성 혈전은 섬유소 용해제 및/또는 항혈전제에 대해 저항성이다. 다른 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 VAD 치료를 받는 대상체에서 혈관 개통을 복원하는데 사용될 수 있다.

[0081] 추가의 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는, 혈관 폐색의 비율이 미치료된 혈관에서의 혈관 폐색의 비율에 비해 감소되도록 대상체를 VWF 보호제와 접촉시키는 것을 포함하는, 대상체에서 혈관 폐색의 비율을 감소시키는데 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 VAD 치료를 받는 대상체에서 혈관 폐색의 비율을 감소시키는데 사용될 수 있다.

[0082] 본 출원에서 사용되는 "폐쇄성 혈전" 또는 "폐쇄성 혈전들"이라는 용어는, 매우 높은 전단 속도 (10,000 s^{-1} 이상)하에 형성된 혈소판 응집체를 함유하는 혈전 또는 혈전들을 의미한다. 이러한 폐쇄성 혈전 또는 혈전들은 혈관 내강의 폐쇄 동안, 즉, 내강이 적어도 50% 폐색될 때, 형성된다. 본 출원에서 사용되는 "예비 폐색된 혈관(들)" 또는 "폐색된 혈관(들)"이라는 용어는, 적어도 50% 폐색된 혈관(들)을 지칭하며, 완전히 폐색된 혈관(들)을 포함할 수 있다. "완전히 폐색된 혈관(들)"이라는 용어는 100% 폐색된 혈관, 즉, 환언하면, 폐쇄된 내강을 갖는 혈관을 지칭한다.

[0083] 본 출원에서 사용되는 "혈전 장애"라는 용어는 비정상 혈전 형성을 특징으로 하는 임의의 질환 또는 장애를 지칭한다. 하나의 실시형태에서, 상기 장애를 특징으로 하는 비정상 혈전 형성은 하나 이상의 폐쇄성 혈전의 형성이다. 혈전 장애의 비제한적 예로는 폰 빌레브란트 병, 허혈성 뇌졸중, 급성 관상 동맥 증후군, 심근 경색, 일시적 허혈성 발작, 혈전성 혈소판 감소성 자반 및 혈전성 미세혈관병증이 포함된다. 혈전 장애는 VAD 치료와 조합하거나 VAD 치료와 무관하게 발생할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 혈전 장애는 허혈성 뇌졸중이다.

[0084] 추가의 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 중증 및/또는 뇌 말라리아, 및 헤이드 증후군 (이들에 제한되지 않

음)과 같은 VWF 비정상과 관련된 희귀 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0085] 하나의 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는, CNS 혈전 형성이 예방되거나 감소되도록, 중증 및/또는 뇌 말라리아를 갖는 대상체에서 혈소판과 VWF의 상호 작용을 길항하는데 사용될 수 있다.

[0086] 또 다른 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 헤이드 증후군과 관련된 GI 출혈을 치료하는데 사용될 수 있다. 상기 VWF 보호제는 VWF 다량체의 손실을 예방 또는 감소시키고/시키거나 혈소판과 VWF의 상호 작용을 길항하여 헤이드 증후군 대상체에서 GI 출혈을 예방할 수 있다.

[0087] VWF 보호제: 압타머

[0088] 일부 실시형태에서, 본 발명의 VWF 보호제는 압타머를 포함한다.

[0089] 본 출원에서 사용되는 "압타머"는 특정 표적 분자에 결합하여 당해 표적의 활성, 구조 또는 기능을 조절하는 생체 분자이다. 본 발명의 압타머는 핵산 또는 아미노산 기반일 수 있다. 핵산 압타머는 대표적인 Watson-Crick 염기 짝짓기 이외의 상호 작용을 통해 분자에 특이적인 결합 친화성을 갖는다. 파지 디스플레이 또는 단클론 항체 (mAb)에 의해 생성된 펩타이드와 같은 핵산 압타머는 선택된 표적에 특이적으로 결합할 수 있으며, 결합을 통해, 기능하는 이의 능력을 차단한다. 일부 경우에서, 압타머는 또한 펩타이드 압타머일 수 있다. 본 출원에서 사용되는 "압타머"는 구체적으로 핵산 압타머 또는 펩타이드 압타머를 지칭한다.

[0090] 종종 "화학적 항체"로도 불리는 압타머는 항체와 유사한 특징을 갖는다. 전형적인 핵산 압타머는 대략 10~15 kDa의 크기 (20~45개의 뉴클레오타이드)를 가지며, 적어도 나노몰 이하의 친화성을 갖는 이의 표적에 결합하고, 밀접하게 관련된 표적을 구별한다.

[0091] 압타머는 1가 또는 다가일 수 있다. 압타머는 단량체, 이량체, 삼량체, 사량체 또는 다른 고급 다량체일 수 있다. 개별 압타머 단량체들은 연결되어 다량체 압타머 융합 분자를 형성할 수 있다. 비제한적인 예로서, 연결 올리고 뉴클레오타이드 (즉, 링커)는 이량체 압타머를 형성하기 위해 랜덤 압타머의 5'-아암과 3'-아암 영역 모두에 상보적인 서열을 포함하도록 디자인될 수 있다. 삼량체 또는 사량체 압타머의 경우, 작은 삼량체 또는 사량체 (즉, 홀리데이 접합 유사) DNA 나노구조는 랜덤 압타머의 3'-아암 영역에 상보적인 서열을 포함하도록 조작될 것이고, 이로 인해, 하이브리드화를 통해 다량체 압타머 융합을 생성한다. 또한, 3 내지 5 또는 5 내지 10 dT의 풍부 뉴클레오타이드는 압타머-결합 모티프들 사이의 단일 가닥 영역으로서 링커 폴리뉴클레오타이드 내로 조작될 수 있으며, 이는 복수의 압타머의 유연성 및 자유를 제공하여 세포 리간드 또는 수용체와의 다가 상호 작용을 조정하고 상승시킨다. 대안적으로, 다량체 압타머는 또한 비오티닐화된 압타머를 스트렙타비딘과 혼합함으로써 형성될 수 있다.

[0092] 본 출원에서 사용되는 "다량체 압타머" 또는 "다가 압타머"라는 용어는 복수의 단량체 단위를 포함하는 압타머를 지칭하며, 여기서, 각각의 단량체 단위는 자체적으로 압타머일 수 있다. 다가 압타머는 다가 결합 특징을 갖는다. 다량체 압타머는 동종 다량체 또는 이종 다량체일 수 있다. "동종 다량체"라는 용어는, 동일한 종류의 복수의 결합 단위를 포함하는, 즉, 각각의 단위가 동일한 표적 분자의 동일한 결합 부위에 결합하는 다량체 압타머를 지칭한다. "이종 다량체"라는 용어는, 상이한 종류의 복수의 결합 단위를 포함하는, 즉, 각각의 결합 단위가 동일한 표적 분자의 상이한 결합 부위에 결합하거나, 각각의 결합 단위가 상이한 표적 분자 상의 결합 부위에 결합하는 다량체 압타머를 지칭한다. 따라서, 이종 다량체는 상이한 결합 부위에서 하나의 표적 분자에 결합하는 다량체 압타머, 또는 상이한 표적 분자에 결합하는 다량체 압타머를 지칭할 수 있다. 상이한 표적 분자에 결합하는 이종 다량체는 또한 다중 특이적 다량체로서 지칭될 수 있다.

[0093] 핵산 압타머는 일련의 연결된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0094] "핵산"이라는 용어는 가장 넓은 의미에서 뉴클레오타이드의 중합체를 포함하는 임의의 화합물 및/또는 물질을 포함한다. 이들 중합체는 종종 폴리뉴클레오타이드로서 지칭된다. 본 발명의 예시적인 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오타이드는 리보핵산 (RNA), 데옥시리보핵산 (DNA), 트레오스 핵산 (TNA), 글리콜 핵산 (GNA), 펩타이드 핵산 (PNA), 잠금 핵산 (LNA; β-D-리보 배열을 갖는 LNA, α-L-리보 배열을 갖는 α-LNA (LNA의 부분입체 이성질체), 2'-아미노 작용기를 갖는 2'-아미노-LNA, 및 2'-아미노 작용기를 갖는 2'-아미노-α-LNA 포함) 또는 이들의 하이브리드.

[0095] 통상의 기술자는 "RNA 분자" 또는 "리보핵산 분자"라는 용어가 자연에서 발현되거나 발견된 RNA 분자 뿐만 아니라 본 출원에서 기재되거나 당해 분야에 공지된 바와 같은 하나 이상의 리보뉴클레오타이드/리보뉴클레오사이드 유사체 또는 유도체를 포함하는 RNA의 유사체 및 유도체를 포괄한다는 것을 인식할 것이다. 엄밀히 말하면, "

리보뉴클레오사이드"는 뉴클레오사이드 염기 및 리보오스 당을 포함하며, "리보뉴클레오타이드"는 1, 2 또는 3개의 포스페이트 모이어티를 갖는 리보뉴클레오사이드이다. 그러나, "리보뉴클레오사이드" 및 "리보뉴클레오타이드"라는 용어는 본 출원에서 사용되는 바와 같이 동등한 것으로 간주될 수 있다. RNA는 핵염기 구조, 리보푸라노실 고리 또는 리보오스-포스페이트 백본에서 변형될 수 있다.

[0096] 핵산 압타머는 리보핵산, 데옥시리보핵산, 또는 리보핵산과 데옥시리보핵산의 혼합물일 수 있다. 압타머는 단일 가닥의 리보핵산, 데옥시리보핵산, 또는 리보핵산과 데옥시리보핵산의 혼합물일 수 있다.

[0097] 하나의 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 압타머 또는 이의 염일 수 있다.

[0098] 하나의 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 합성 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 압타머 또는 이의 염일 수 있다. 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 1의 적어도 21개의 연속 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 추가로, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 적어도 6개의 염기쌍을 갖는 이중 가닥 영역을 나타낼 수 있다. 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 5개 이하의 염기쌍의 보다 짧은 이중 가닥 영역은 보다 높은 온도에서 스템-루프 구조의 풀림 및 상기 보호제의 관련된 친화성 및 기능성 손실을 초래할 수 있다.

[0099] 하나의 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 합성 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 압타머 또는 이의 염일 수 있으며, 여기서, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 1의 적어도 21개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 적어도 6개의 염기쌍을 갖는 이중 가닥 영역을 포함한다. 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 적어도 6개의 염기쌍의 이중 가닥 영역을 갖는 VWF 보호제는 보다 높은 온도에서 보다 큰 열 안정성을 가질 수 있다. 보다 높은 온도에서의 이러한 열 안정성 증가는, 5개 이하의 염기쌍의 보다 짧은 이중 가닥 영역을 갖는 보호제와 비교하여, VWF에 대한 보다 높은 친화성 및 증가된 기능성을 제공할 수 있다.

[0100] 하나의 실시형태에서, 6개 이상의 염기쌍의 이중 가닥 영역은 상기 합성 폴리뉴클레오타이드의 말단에 또는 그 부근에 (예를 들어, 1~10개의 뉴클레오타이드 이내에) 있다.

[0101] 일부 실시형태에서, 핵산 압타머는 하나 이상의 화학적 변형을 포함한다. 변형은, 예를 들어, 세포에 존재하는 리보뉴클레아제 (RNase)에 의한 분해에 대한 이의 저항성을 증가시켜 세포에서 이의 반감기를 증가시킴으로써 압타머의 안정성을 증가시키는데 사용될 수 있다. 변형은 또한 세포 내로 도입된 압타머가 선천성 면역 반응을 유발하는 가능성 또는 정도를 감소시키는데 사용될 수 있다. 당해 분야에서 기재된 바와 같이, 소간섭 RNA (siRNA)를 비롯한 RNA 간섭 (RNAi)의 맥락에서 잘 특성화된 이러한 반응은, RNA의 반감기 감소 및/또는 사이토카인 또는 면역 반응과 관련된 다른 인자의 제거와 관련되는 경향이 있다.

[0102] 잠재적 변형로는, 예를 들어, (a) 말단 변형, 예를 들어, 5' 말단 변형 (인산화, 탈인산화, 컨쥬게이트화, 반전 결합 등), 3' 말단 변형 (컨쥬게이트화, DNA 뉴클레오타이드, 반전 결합 등), (b) 당 변형 (예를 들어, 2' 위치 또는 4' 위치에서) 또는 당의 교체, (c) 염기 변형, 예를 들어, 변형된 염기, 안정화 염기, 탈안정화 염기, 또는 파트너의 확장된 레퍼토리와 염기쌍을 이루는 염기, 또는 컨쥬게이트된 염기에 의한 교체, 및 (d) 포스포디에스테르 결합의 변형 또는 교체를 비롯한, 뉴클레오사이드간 결합 변형이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 본 출원에서 기재된 방법에 유용한 변형된 압타머 조성물의 구체적인 예로는, 변형되거나 비-천연 뉴클레오사이드간 결합을 포함하는 핵산 분자가 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 변형된 뉴클레오사이드간 결합을 갖는 변형된 압타머는, 특히, 뉴클레오사이드간 결합에 인 원자를 갖지 않는 것들을 포함한다. 다른 실시형태에서, 변형된 압타머는 이의 뉴클레오사이드간 결합(들)에 인 원자를 갖는다.

[0103] 일부 실시형태에서, 화학적 변형은 당 위치에서의 핵산의 화학적 치환, 포스페이트 위치에서의 화학적 치환, 및 염기 위치에서의 화학적 치환으로부터 선택될 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 화학적 변형은 변형된 뉴클레오타이드의 도입; 3' 캡핑; 5' 캡핑; 고분자량의 비면역원성 화합물과의 컨쥬게이트화; 및 포스포로티오에이트의 포스페이트 백본 내로의 도입으로부터 선택된다.

[0104] 하나의 실시형태에서, 핵산 압타머의 각 뉴클레오타이드는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함할 수 있다. 이러한 화학적 변형은 상기 합성 폴리뉴클레오타이드의 당, 핵염기 또는 뉴클레오타이드간 링커일 수 있다. 상기 당에 대한 변형은 2' O-메틸 변형로 이루어질 수 있다.

[0105] 본 개시 내용에 의해 제공되는 핵산 압타머에 따르면, 말단 캡 구조는 또한 3' 및/또는 5' 말단에 도입될 수 있다. 이러한 구조는 적어도 1개의 반전 데옥시티미딘 또는 아미노기 (NH_2)를 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0106] 하나의 실시형태에서, 상기 3' 캡은 반전 데옥시티미딘 캡이다.

[0107] 또 다른 실시형태에서, 상기 3' 캡은 아미노기 (NH_2)이다.

[0108] 하나의 실시형태에서, 상기 5' 캡은 반전 데옥시티미딘 캡이다.

[0109] 또 다른 실시형태에서, 상기 5' 캡은 아미노기 (NH_2)이다.

[0110] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 VWF 보호제는 임의의 다수의 컨쥬게이트에 의해 변형될 수 있다. 비제한적인 예로서, 상기 컨쥬게이트는 고분자량의 비면역원성 화합물일 수 있다.

[0111] 하나의 실시형태에서, 상기 고분자량의 비면역원성 화합물은 폴리알킬렌 글리콜이고, 보다 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다.

[0112] 일부 실시형태에서, PEG 모이어티는 상기 핵산 압타머의 5' 말단에 컨쥬게이트될 수 있다.

[0113] 일부 실시형태에서, PEG 모이어티는 상기 핵산 압타머의 3' 말단에 컨쥬게이트될 수 있다.

[0114] 비제한적인 예로서, 핵산 압타머는, 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오사이드, 5' 포스포로티오에이트기를 포함하는 뉴클레오사이드, 콜레스테릴 유도체 또는 도데칸산 비스데실아미드기에 결합된 말단 뉴클레오사이드, 잠금 뉴클레오사이드 (예를 들어, β-D-리보 배열, α-L-리보 배열 (LNA의 부분입체 이성질체)를 갖는 α-LNA, 2'-아미노 작용기를 갖는 2'-아미노-LNA, 및 2'-아미노 작용기를 갖는 2'-아미노-α-LNA), 무염기성 뉴클레오사이드, 반전 데옥시뉴클레오사이드 또는 반전 리보뉴클레오사이드, 2'-데옥시-2'-플루오로 변형된 뉴클레오사이드, 2'-아미노-변형된 뉴클레오사이드, 2'-알킬-변형된 뉴클레오사이드, 2'-O-알킬-변형된 뉴클레오사이드, 2'-O-알킬-O-알킬-변형된 뉴클레오사이드, 2'-플루오로-변형된 뉴클레오사이드, 2'-플루오로-변형된 뉴클레오사이드, 모르폴리노 뉴클레오사이드, 포스포르아미데이트 또는 비-천연 염기 함유 뉴클레오사이드, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 적어도 하나의 변형된 리보뉴클레오사이드를 또한 포함할 수 있다. 대안적으로, 핵산 압타머는 분자의 전체 길이까지 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 그 이상의 변형된 리보뉴클레오사이드를 포함할 수 있다. 상기 변형은 핵산 분자에서 이러한 복수의 변형된 데옥시- 또는 리보뉴클레오사이드의 각각에 대해 동일할 필요는 없다.

[0115] 본 출원에서 기재된 핵산 압타머는 또한 2' 위치에서 다음 중 하나를 포함할 수 있다: H (데옥시리보오스); OH (리보오스); F; O-, S- 또는 N-알킬; O-, S- 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알키닐; 또는 O-알킬-O-알킬 (여기서, 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 비치환된 C1 내지 C10 알킬 또는 C2 내지 C10 알케닐 및 알키닐일 수 있다. 예시적인 변형로는 $O[(CH_2)_nO]_mCH3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ 및 $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3)]_2$이 포함되며, 여기서, n 및 m은 1 내지 약 10이다. 일부 실시형태에서, 핵산 압타머는 2' 위치에서 다음 중 하나를 포함한다: C1 내지 C10 저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알크아릴, 아르알킬, O-알크아릴 또는 O-아르알킬, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알크아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, 리포터기, 삽입제, 압타머의 약동학적 특성을 개선하기 위한 기, 또는 핵산 압타머의 약력학적 특성을 개선하기 위한 기, 및 유사한 특성을 갖는 다른 치환기. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 2' 메톡시에톡시 (2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$; 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로도 또한 공지됨) (문헌 [Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504]), 즉, 알콕시-알콕시기를 포함한다. 또 다른 예시적인 변형은 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 즉, $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 기 (2'-DMAOE로도 또한 공지됨), 및 2'-디메틸아미노에톡시에톡시 (2'-O-디메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE로도 또한 당해 분야에서 공지됨), 즉, 2'-O-CH_2-O-CH_2-$N(CH_2)_2$이다.

[0116] 유사한 변형은 압타머 상의 다른 위치, 특히, 3' 말단 뉴클레오타이드 상의 당의 3' 위치 및 5' 말단 뉴클레오타이드 상의 5' 위치에서도 또한 이루어질 수 있다. 압타머는 또한 펜토푸라노실기 대신 사이클로부틸과 같은 당 모방체를 가질 수 있다. 이러한 변형된 당 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허로는 미국 특허 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 및 5,700,920이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니며, 이들 중 일부는 일반적으로 본 출원과 함께 소유되며, 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다.

[0117] 핵산 기반인 VWF 보호제는 핵염기 (당해 분야에서는 간단히 "염기"로서 종종 지칭됨) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 본 출원에서 사용되는 "비변형된" 또는 "천연" 핵염기는 퓨린 염기인 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘 염기인 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 변형된 핵염기는 5-메틸사이토신 (5-me-C), 5-하이드록시메틸 사이토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오사이토신, 5-할로우라실 및 사이토신, 5-프로피닐 우라실 및 사이토신, 6-아조 우라실, 사이토신 및 티민, 5-우라실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히, 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 사이토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-다아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌과 같은 기타 합성 및 천연 핵염기를 포함한다. 추가의 핵염기는 미국 특허 3,687,808에 개시된 것들, 문헌 [Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008]에 개시된 것들; 문헌 [The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990]에 개시된 것들, 문헌 [Englisch *et al.*, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613]에 개시된 것들; 및 문헌 [Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993]에 개시된 것들을 포함하며, 이들 문헌들의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다.

[0118] 다수의 뉴클레오타이드 및 뉴클레오사이드 변형은, 이들이 도입되는 올리고뉴클레오타이드를 원래 올리고 뉴클레오타이드 보다 뉴클레아제 분해에 대해 보다 저항성을 갖도록 하는 것으로 밝혀졌으며, 이들 변형된 올리고들은 비변형된 올리고뉴클레오타이드 보다 더 오랜 시간 동안 온전히 유지된다. 변형된 올리고뉴클레오타이드의 특정 예로는 변형된 백본, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 당간 결합 또는 단쇄 헤테로 원자 또는 헤테로사이클릭 당간 결합을 포함하는 것들이 포함된다. 일부 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 백본을 갖는 올리고뉴클레오타이드 및 헤테로 원자 백본, 특히, CH_2-NH-O-CH_2, CH_2-N(CH_3)-O-CH_2 (메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 백본으로서도 또한 공지됨), CH_2-O-N (CH_3)-CH_2, CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2 및 O-N(CH_3)-CH_2-CH_2 백본 (여기서, 상기 원래 포스포디에스테르 백본은 O-P-O-CH_2-로서 표시된다), 아미드 백본 (문헌 [De Mesmaeker et al., Ace. Chem. Res., 28:366-374 (1995)] 참조; 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다); 모르폴리노 백본 구조 (Summerton and Weller, 미국 특허 5,034,506 참조); 펩타이드 핵산 (PNA) 백본 (여기서, 상기 올리고뉴클레오타이드의 포스포디에스테르 백본은 폴리아미드 백본으로 대체되며, 상기 뉴클레오타이드는 상기 폴리아미드 백본의 아자 질소 원자에 직접 또는 간접적으로 결합된다; 문헌 [Nielsen et al., Science 1991, 254, 1497] 참조; 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다)을 갖는 것들이다. 인 함유 결합은 포스포로티오에이트, 카이럴 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 3' 알킬렌 포스포네이트 및 카이럴 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 기타 알킬 포스포네이트, 포스피네이트, 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬 포스포르아미데이트를 포함하는 포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상적인 3'-5' 결합을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 반전 극성을 갖는 것들을 포함하지만 이들에 한정되는 것은 아니며, 여기서, 뉴클레오사이드 단위의 인접 쌍은 3'-5'에서 5'-3'로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결된되고; 미국 특허 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 및 5,625,050를 참조하며, 이들 특허의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다).

[0119] 모르폴리노 기반 올리고머성 화합물은 문헌 [Braasch and David Corey, Biochemistry, 41(14): 4503-4510 (2002)], [Genesis, Volume 30, Issue 3, (2001)], [Heasman, Dev. Biol., 243: 209-214 (2002)], [Nasevicius et al., Nat. Genet., 26:216-220 (2000)], [Lacerra et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 9591-9596 (2000)] 및 1991년 7월 23일자로 발행된 미국 특허 5,034,506에 기재되어 있으며, 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다.

[0120] 사이클로헥세닐 핵산 올리고뉴클레오타이드 모방체는 문헌 [Wang et al., J. Am. Chem. Soc., 122: 8595-8602 (2000)]에 기재되어 있으며, 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다. 상기에서 인 원자를 포함하지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드 백본은 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오타이드간 결합, 혼합된 헤테로 원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오타이드간 결합, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로 원자 또는 헤테로사이클릭

뉴클레오타이드간 결합에 의해 형성된 백본을 갖는다. 이들은 모르폴리노 결합 (뉴클레오사이드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨); 실록산 백본; 설파이드, 설폭사이드 및 설폰 백본; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 알켄 함유 백본; 설파메이트 백본; 메틸렌이미노 및 메틸렌하이드라지노 백본; 설포네이트 및 설폰아미드 백본; 아미드 백본; 및 혼합된 N, O, S 및 CH_2 성분 일부를 갖는 기타를 갖는 것들을 포함하며; 미국 특허 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 및 5,677,439를 참조하며, 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다.

[0121] 일부 실시형태에서, P(O)O 기가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), P(O)NR_2 ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH_2 ("포름아세탈") 또는 3'-아민 (−NH−CH_2−CH_2−) (여기서, R 또는 R'은 각각 독립적으로 H 또는 치환되거나 비치환된 알킬이다)에 의해 대체되는 핵산 압타머가 제공된다. 연결기는 −O−, −N− 또는 −S− 결합을 통해 인접 뉴클레오타이드에 부착될 수 있다. 핵산 압타머 중의 모든 결합들이 동일할 필요는 없다.

[0122] 본 발명의 핵산 압타머에 유용할 수 있는 추가의 변형은, 예를 들어, 국제공개공보 PCT/US2012/058519에 교시된 것들을 포함하며, 이 특허의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다.

[0123] 압타머에 적합한 뉴클레오타이드 길이는 약 15 내지 약 100개의 뉴클레오타이드 (nt), 다양한 다른 바람직한 실시형태에서는 15~30 nt, 20~25 nt, 30~100 nt, 30~60 nt, 25~70 nt, 25~60 nt, 40~60 nt, 25~40 nt, 30~40 nt, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40 nt 중의 어느 하나, 또는 40~70 nt 길이의 범위이다. 그러나, 서열은 본 출원에서 기재된 거리에서 압타머와 2개의 표적의 상호 작용을 수용할 수 있도록 충분한 유연성을 가지고 디자인될 수 있다.

[0124] 일부 실시형태에서, 상기 핵산 압타머는 이중 가닥 특성을 갖는 하나 이상의 영역을 포함한다. 이러한 이중 가닥 영역은 제2 또는 추가의 압타머 분자와의 내부 자가-상보성 또는 상보성으로부터 발생할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 이중 가닥 영역은 4~12, 4~10, 4~8개 길이의 염기쌍일 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 이중 가닥 영역은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 염기쌍일 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 이중 가닥 영역은 스템 영역일 수 있다. 이중 가닥 특성을 갖는 이러한 확장된 스템 영역은 핵산 압타머를 안정화시키는 역할을 할 수 있다. 적어도 6개의 염기쌍의 확장된 스템 영역은, 5개 이하의 염기쌍의 보다 짧은 스템 영역과 비교하여, 보다 높은 온도에서 보다 큰 열 안정성 및, 이로 인해, VWF에 대한 보다 큰 친화성 및 증가된 전체 기능성에 기여할 수 있다. 보다 짧은 스템 영역은 보다 높은 온도에서 스템-루프 구조의 풀림 및 관련된 친화성 및 전체 기능성 손실을 초래할 수 있다.

[0125] 본 출원에서 사용되는 "이중 가닥 특성"이라는 용어는, 임의의 길이의 2개의 핵산 분자에 걸쳐서, 이의 서열이 50% 초과 길이의 염기쌍 (표준 또는 비표준)을 형성하는 것을 의미한다. 본 출원에서 기재된 압타머의 이차 구조는 자유 에너지 계산에 기초하여 핵산 폴딩을 예측하는 당해 분야에 공지된 전산 모델, 예를 들어, Mfold에 의해 확인될 수 있다.

[0126] 당해 분야의 통상의 기술자는 올리고뉴클레오타이드의 조성물이 보체 활성화에 영향을 줄 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 포스포로티오에이트 치환의 수는 보체 활성화의 상대적인 정도와 직접 관련된다. 따라서, 바람직한 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 약제학적 조성물 및 제형 및 방법에 사용되는 압타머는, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하 또는 1개 이하의 포스포로티오에이트 백본 변형을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 상기 핵산 압타머는 어떠한 포스포로티오에이트 변형도 포함하지 않는다.

[0127] 본 발명의 압타머는 열 안정성을 증가시키기 위해 변형될 수 있다. 핵산 압타머의 열 안정성은 압타머의 구조, 하이브리드화 및 기능을 제어하는 중요한 인자이다. 비제한적인 예로서, 압타머 열 안정성을 향상시키는데 사용될 수 있는 변형은 2'-O-메틸 뉴클레오사이드, 2' 플루오로 뉴클레오사이드, 잠금 핵산 (LNA), 2,6-디아미노퓨린 (2-아미노-dA), 5-메틸 dC 및 수퍼 T (5-하이드록시부티늘-2'-데옥시우리딘)를 포함한다. DNA 또는 RNA 가닥 내에서의 2'-O-메틸 뉴클레오사이드의 존재는 이중 가닥의 열 안정성을 향상시키며, 그 효과는 RNA:DNA 이중 가닥에서 보다 RNA:RNA 이중 가닥에서 보다 두드러진다. 2'-플루오로에 의한 2'-데옥시리보오스의 변형은 삽입물 당 1.3℃로 DNA-DNA 이중 나선의 열 안정성을 향상시킨다. LNA 염기는 C3'-엔도 위치에 염기를 고정시켜 RNA A형 나선 이중 가닥 기하구조를 선호하는 리보오스 백본에 대한 변형을 갖는다. LNA 변형은 T_m을 유의

미하게 증가시키며, 또한 매우 뉴클레아제 저항성이다.

[0128] 핵산 압타머의 열 안정성은, DNA 또는 RNA 분자의 절반이 이중 가닥 형태인 반면, 나머지 절반이 단일 가닥 형태로 나타나는 용융 온도 (T_m)를 특징으로 한다. T_m은 UV 흡광도 측정, 원편광 이색성 분광법 및 열 측정과 같은 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. T_m은 압타머 농도, pH, 1가 양이온 (Na^+, K^+) 농도 또는 2가 양이온 (Mg^{2+}) 농도와 같은 다수의 인자에 의해 영향을 받을 수 있다. 본 발명에 따르면, 압타머는 37 ℃ 초과의 T_m을 가지며, 생체내에서 온전한 스템-루프 구조를 유지한다.

[0129] 압타머는 뉴클레아제 및 다른 효소 활성으로부터 압타머를 보호하도록 추가로 변형될 수 있다. 압타머 서열은 당해 분야에서 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, 포스포로티오에이트는 백본 내에 도입될 수 있으며, 5'-변형된 피리미딘은 DNA 압타머에 대한 ssDNA의 5' 말단에 포함될 수 있다. RNA 압타머의 경우, 예를 들어, 2'-데옥시-NTP 또는 2'-플루오로-NTP에 의한 리보오스 백본의 2'-OH 기의 치환과 같은 변형된 뉴클레오타이드가 T7 RNA 폴리머라아제 돌연변이체를 사용하여 RNA 분자 내에 도입될 수 있다. 2'-O-메틸 뉴클레오사이드 및 LNA는 또한 뉴클레아제에 대한 저항성에 기여할 수 있다. 이러한 변형된 압타머의 뉴클레아제에 대한 저항성은 마우스 혈청 유래의 뉴클레오타이드로부터의 뉴클레아제 또는 정제된 뉴클레아제와 함께 인큐베이션함으로써 시험될 수 있으며, 압타머의 완전성은 겔 전기 영동에 의해 분석될 수 있다.

[0130] 일부 실시형태에서, 이러한 변형된 핵산 압타머는 변형된 뉴클레오타이드 전체 또는 변형된 뉴클레오타이드의 서브세트에 의해 합성될 수 있다. 변형은 동일하거나 상이할 수 있다. 모든 뉴클레오타이드는 변형될 수 있으며, 모두 동일한 변형을 포함할 수 있다. 모든 뉴클레오타이드는 변형될 수 있지만, 상이한 변형을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 동일한 염기를 함유하는 모든 뉴클레오타이드는 하나의 유형의 변형을 가질 수 있는 반면, 다른 염기를 함유하는 뉴클레오타이드는 상이한 유형의 변형을 가질 수 있다. 예를 들어, 모든 퓨린 뉴클레오타이드는 하나의 유형의 변형을 가질 수 있는 반면 (또는 비변형됨), 모든 피리미딘 뉴클레오타이드는 또 다른 상이한 유형의 변형을 가질 수 있다 (또는 비변형됨). 이러한 방식으로, 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 라이브러리는 본 출원에서 개시된 바와 같은 변형의 임의의 조합을 사용하여 생성된다.

[0131] 일부 실시형태에서, 상기 VWF 압타머는 5'GCCAGGGACCUAAGACACAUGUCCCUGGC-3' (서열 번호 1)의 서열을 포함하는 압타머 또는 이의 염이다.

[0132] 일부 실시형태에서, 상기 VWF 압타머는 다음 구조를 포함하는 압타머 또는 이의 염이다: NH_2-mGmCmCmAmGmGmGmAmCmCmUmAmAmGmAmCmAmCmAmUmGmUmCmCmCmUmGmGmC-idT (서열 번호 2) (BT-100) (여기서, "NH"는 5'-헥실아민 링커 포스포르아미다이트이고, "idT"는 반전 데옥시티미딘이고, "mN"은 2'-O-메틸 함유 잔기이다).

[0133] 일부 실시형태에서, 상기 VWF 압타머는 다음 구조를 포함하는 압타머 또는 이의 염이다: PEG40K-NH-mGmCmCmAmGmGmGmAmCmCmUmAmAmGmAmCmAmCmAmUmGmUmCmCmCmUmGmGmC-idT (서열 번호 3) (BT-200) (여기서, "NH"는 5'-헥실아민 링커 포스포르아미다이트이고, "idT"는 반전 데옥시티미딘이고, "mN"은 2'-O-메틸 함유 잔기이고, "PEG"는 폴리에틸렌 글리콜이고, PEG40K는 대략 40 KDa의 분자량을 갖는 페길화 모이어티이다). PEG 모이어티의 존재는 임의적이지만, 존재하는 경우에는 다양한 크기일 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0134] 일부 실시형태에서, 역전제가 제공된다.

[0135] 본 발명에 따르면, "역전제"는 VWF 보호제의 효과를 변경, 경감 또는 역전시키는 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 역전제는 핵산 기반이다. 일부 실시형태에서, 역전제가 경쟁적 결합 분자이다. 일부 실시형태에서, 역전제는 VWF 보호제에 결합한다. 일부 실시형태에서, 역전제는 VWF 보호제의 일부와 하이브리드화된다. 압타머와 같은 핵산 기반 VWF 보호제의 경우, 역전제는 보호 압타머의 모두, 일부, 영역과 하이브리드화될 수 있다. 역전제는 본 출원에서 기재된 임의의 또는 모든 변형을 포함할 수 있다. 한 실시예가 도 2에 도시되어 있다.

[0136] 일부 실시형태에서, 상기 역전제는 5'-ACAUGUGUCUUAGGUCCCUGGC-3'의 서열 (서열 번호 4)의 적어도 15개의 연속 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 역전제는 서열 번호 4의 적어도 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21개의 연속 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0137] 일부 실시형태에서, 상기 역전제는 서열 번호 1에 상보적이거나 결합하는 적어도 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21개의 연속 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0138] 일부 실시형태에서, 상기 서열 번호 1에 상보적이거나 결합하는 적어도 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20

또는 21개의 연속 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 적어도 1개의 화학적 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 각각의 뉴클레오타이드는 적어도 1개의 화학적 변형을 포함한다. 비제한적인 예로서, 상기 화학적 변형은 뉴클레오타이드 당에 대한 2'-O-메틸 변형일 수 있다. 추가로, 상기 서열 번호 1에 상보적이거나 결합하는 적어도 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21개의 연속 뉴클레오타이드는 3' 말단 캡을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 3' 말단 캡은 반전 데옥시티미딘일 수 있다.

[0139] 일부 실시형태에서, 상기 역전제는 5'mAmCmAmUmGmUmGmUmCmUmUmAmGmGmUmCmCmCmUmGmGmC-idT 3' (서열 번호 5) (여기서, "idT"는 반전 데옥시티미딘이고, "mN"은 2'-O-메틸 함유 잔기이다)의 서열을 갖는 BT-201이다.

[0140] 일부 실시형태에서, 상기 VWF 압타머는 PEG40K-NH-mGmGmGmAmCmCmUmAmAmGmAmCmAmCmAmUmGmUmCmCmC-idT (ARC15105) (서열 번호 6) 또는 PEG20K-NH-mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGsdTmGdCdGdGdTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmCidT (ARC1779) (서열 번호 7) (여기서, "NH"는 5'-헥실아민 링커 포스포르아미다이트이고, "idT"는 반전 데옥시티미딘이고, "mN"은 2'-O-메틸 함유 잔기이고, "dN"은 데옥시뉴클레오타이드 잔기이고, "sdT"는 포스포로티오에이트 데옥시티미딘 잔기이고, "PEG"는 폴리에틸렌 글리콜이고, PEG20K는 대략 20 KDa의 분자량을 갖는 페길화 모이어티이다)의 서열을 포함할 수 있다.

[0141] 일부 실시형태에서, 상기 VWF 압타머는, VAD 장애를 치료하는 방법에서 사용될 때, PEG40K-NH-mGmGmGmAmCmCmUmAmAmGmAmCmAmCmAmUmGmUmCmCmC-idT (ARC15105) (서열 번호 6) 또는 PEG20K-NH-mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGsdTmGdCdGdGdTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmCidT (ARC1779) (서열 번호 7) (여기서, "NH"는 5'-헥실아민 링커 포스포르아미다이트이고, "idT"는 반전 데옥시티미딘이고, "mN"은 2'-O-메틸 함유 잔기이고, "dN"은 데옥시뉴클레오타이드 잔기이고, "sdT"는 포스포로티오에이트 데옥시티미딘 잔기이고, "PEG"는 폴리에틸렌 글리콜이고, PEG20K는 대략 20 KDa의 분자량을 갖는 페길화 모이어티이다)의 서열을 포함할 수 있다.

[0142] 일부 실시형태에서, BT-200은 BT-100의 하나 이상의 특징 및/또는 특성을 보존한다. 다른 실시형태에서, BT-200은 BT-100과 비교하여 하나 이상의 개선되거나 변경된 특징 및/또는 특성을 갖는다. 하나의 양태에서, BT-200은 BT-100보다 더 긴 혈장 반감기를 갖는다. 또 다른 양태에서, BT-200은 BT-100보다 더 긴 작용 지속 기간을 갖는다.

[0143] 일부 실시형태에서, BT-200은 ARC15105 또는 ARC1779의 하나 이상의 특징 및/또는 특성을 보존한다. 다른 실시형태에서, BT-200은 ARC15105 또는 ARC1779와 비교하여 하나 이상의 개선되거나 변경된 특징 및/또는 특성을 갖는다. 하나의 양태에서, BT-200은 ARC15105 또는 ARC1779보다 더 긴 혈장 반감기를 갖는다. 또 다른 양태에서, BT-200은 ARC15105 또는 ARC1779보다 더 긴 작용 지속 기간을 갖는다. 또 다른 양태에서, BT-200은 보다 높은 피하 생체 이용률을 갖는다. 또 다른 양태에서, BT-200은 VWF 보호제로서 ARC15105 또는 ARC1779와 비교하여 보다 큰 효능을 갖는다.

[0144] VWF 보호제의 변형

[0145] 본 발명은 변이체 및 유도체를 포함하는 핵산 기반인 여러 유형의 VWF 보호제를 고려한다. 이들은 치환, 삽입, 결실 및 공유 변이체 및 유도체를 포함한다. 이와 같이, 치환, 삽입 및/또는 부가, 결실 및 공유 변형을 포함하는 VWF 보호제는 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0146] "유도체"라는 용어는 "변이체"라는 용어와 동의어로 사용되며, 기준 분자 또는 출발 분자에 대해 임의의 방식으로 변형 또는 변경된 분자를 지칭한다.

[0147] "폴리뉴클레오타이드 변이체"라는 용어는, 이의 핵산 서열이 기준 서열과 상이한 분자를 지칭한다. 상기 핵산 서열 변이체는 기준 서열과 비교하여 핵산 서열 내의 특정 위치에서 치환, 결실 및/또는 삽입을 보유할 수 있다. 일반적으로, 변이체는 기준 서열과 적어도 약 50% 동일성 (상동성)을 보유할 것이며, 바람직하게는 이들은 기준 서열과 적어도 약 80%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90% 동일성 (상동성)일 것이다.

[0148] 일부 실시형태에서, "변이 모방체"가 제공된다. 본 출원에서 사용되는 "변이 모방체"라는 용어는 기준 서열을 모방할 1개 이상의 핵산을 포함하는 것이다. 본 발명의 VWF 보호제의 핵산 서열은 자연 발생 핵산을 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기 VWF 보호제는 자연 및 비자연 발생 핵산 둘 다를 포함할 수 있다.

[0149] 일반적으로, 변이체는 기준 서열과 적어도 약 70% 동일성을 보유할 것이며, 바람직하게는 이들은 기준 서열과

적어도 약 80%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90% 상동성일 것이다.

[0150] 핵산 서열에 적용되는 "상동성"은, 서열을 정렬하고 필요에 따라 갭을 도입하여 최대 퍼센트 상동성을 달성한 후, 제2 서열의 서열 내의 잔기와 동일한 후보 서열내 잔기의 백분율로 정의된다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 상동성은 퍼센트 동일성의 계산에 의존하지만, 계산에 도입된 갭과 패널티로 인해 값이 상이할 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0151] "유사체"라는 용어는 각각 1개 이상의 핵산 변경, 예를 들어, 모 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 특성을 여전히 유지하는 잔기의 치환, 부가 또는 결실에 의해 상이한 폴리뉴클레오타이드 변이체를 포함하는 것을 의미한다.

[0152] "치환 변이체"는 출발 서열 내의 적어도 1개의 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드)가 제거되고 동일한 위치에서 다른 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드)가 그 자리에 삽입된 것들이다. 상기 치환은 분자내 1개의 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드)만이 치환된 단일일 수 있거나, 2개 이상의 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드)가 동일한 분자 내에서 치환된 경우 복수일 수 있다.

[0153] "삽입 변이체"는 출발 서열의 특정 위치에서 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드)에 바로 인접하여 삽입된 1개 이상의 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드)를 갖는 변이체이다. 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드)에 "바로 인접한"은 폴리뉴클레오타이드의 본 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드의 5' 또는 3'에 직접적인 것을 의미한다.

[0154] "결실 변이체"는 출발 서열에서 1개 이상의 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드)가 제거된 것들이다. 일반적으로, 결실 변이체는 분자의 특정 영역에서 결실된 1개 이상의 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드)를 가질 것이다.

[0155] 공유 변형은 통상적으로 분자의 표적화된 클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드) 잔기를 선택된 원자 또는 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써 도입된다. 이러한 변형은 당해 분야의 통상의 기술 내이며, 과도한 실험없이 수행된다.

[0156] 공유 유도체는 구체적으로는 본 발명의 핵산이 비단백질성 중합체에 공유적으로 결합된 융합 분자를 포함한다. 비단백질성 중합체는 대개는 친수성 합성 중합체, 즉, 자연에서 달리 발견되지 않는 중합체이다. 그러나, 자연에서 존재하고 재조합 또는 시험관내 방법에 의해 생산되는 중합체는 자연으로부터 단리된 중합체와 마찬가지로 유용하다. 친수성 폴리비닐 중합체, 예를 들어, 폴리비닐 알코올 및 폴리비닐피롤리돈은 본 발명의 범위 내에 속한다. 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜과 같은 폴리비닐알킬렌 에테르가 특히 유용하다. 상기 VWF 보호제는, 전문이 본 출원에 참조로 삽입되는 미국 특허 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 제시된 방식으로, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌과 같은 다양한 비단백질성 중합체에 연결될 수 있다.

[0157] "특징"은 분자의 별개의 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드) 서열 기반 구성성분으로서 정의된다. 본 발명의 VWF 보호제의 특징은 표면 발현, 국소 입체 형상, 폴드, 루프, 하프 루프, 도메인, 하프 도메인, 부위, 말단 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0158] 본 출원에서 사용되는 "표면 발현"이라는 용어는 가장 바깥 표면에 나타나는 폴리뉴클레오타이드의 구성성분을 지칭한다.

[0159] 본 출원에서 사용되는 "국소 입체 형상"이라는 용어는 폴리뉴클레오타이드의 한정 가능한 공간내에 위치한 구조적 발현을 의미한다.

[0160] 본 출원에서 사용되는 "폴드"라는 용어는 에너지 최소화시 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드) 서열의 생성된 형태를 의미한다. 폴드는 폴딩 과정의 2차 또는 3차 수준에서 발생할 수 있다.

[0161] 본 출원에서 사용되는 "회전 (turn)"이라는 용어는 폴리뉴클레오타이드의 백본의 방향을 변경하고 1, 2, 3개 또는 그 이상의 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드) 잔기를 포함할 수 있는 벤드 (bend)를 의미한다.

[0162] 본 출원에서 사용되는 "루프"라는 용어는 서열의 백본의 방향을 역전시키고 4개 이상의 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드) 잔기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 구조적 특징을 지칭한다.

[0163] 본 출원에서 사용되는 "도메인"이라는 용어는 분자 상호 작용을 위한 부위의 역할을 하는 하나 이상의 식별 가능한 구조적 또는 기능적 특징 또는 특성 (예를 들어, 결합 능력)을 갖는 폴리뉴클레오타이드의 모티프를 지칭

한다.

[0164] 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드) 기반 실시 양태에 관하여 본 출원에서 사용되는 "부위"라는 용어는 "핵산 잔기"와 동의어로 사용된다. 부위는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 기반 분자내에서 변형, 조작, 변경, 유도체화 또는 변화될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 내의 위치를 나타낸다.

[0165] 본 출원에서 사용되는 "말단들 또는 말단"이라는 용어는 폴리뉴클레오타이드의 끝을 지칭한다. 이러한 끝은 폴리뉴클레오타이드의 최초 또는 최종 부위에만 한정되는 것은 아니라 말단 영역에서 추가의 뉴클레오사이드 (또는 뉴클레오타이드)를 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 기반 분자는 5' 말단 및 3' 말단 둘 다를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0166] 특징들 중 임의의 특징이 본 발명의 분자의 구성성분으로서 확인 또는 정의되면, 이들 특징들의 임의의 몇몇 조작 및/또는 변형은 이동, 스와핑, 반전, 결실, 무작위화 또는 복제에 의해 수행될 수 있다. 더욱이, 특징들의 조작은 본 발명의 분자에 대한 변형과 동일한 결과를 초래할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 도메인의 결실을 수반하는 조작은 전체 길이 미만의 분자를 암호화하는 핵산의 변형과 마찬가지로 분자 길이의 변경을 초래할 것이다.

[0167] 변형 및 조작은 부위 특이적 돌연변이유발과 같은 당해 분야에 공지된 방법에 의해 달성될 수 있다. 이어서, 생성된 변형 분자는 본 출원에서 기재된 것들과 같은 시험관내 또는 생체내 검정 또는 당해 분야에 공지된 임의의 기타 적합한 스크리닝 검정을 사용하여 활성에 대해 시험될 수 있다.

[0168] 동위원소 변형

[0169] 본 발명의 VWF 보호제는 동위 원소인 1개 이상의 원자를 포함할 수 있다. 본 출원에서 사용되는 "동위 원소"라는 용어는 1개 이상의 추가의 중성자를 갖는 화학 원소를 지칭한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 중수소화될 수 있다. 본 출원에서 사용되는 "중수소화된"이라는 용어는 중수소 동위 원소로 대체된 1개 이상의 수소 원자를 갖는 물질을 지칭한다. 중수소 동위 원소는 수소의 동위 원소이다. 수소의 핵은 1개의 양성자를 포함하는 반면, 중수소 핵은 양성자와 중성자를 둘 다를 포함한다. 상기 VWF 보호제는 안정성과 같은 화합물의 물리적 특성을 변경하기 위해 또는 화합물이 진단 및 실험 용도로 사용될 수 있도록 중수소화될 수 있다.

[0170] 컨쥬게이트 및 조합

[0171] 본 발명의 VWF 보호제는 1개 이상의 상동성 또는 이종성 분자와 복합체화, 컨쥬게이트 또는 조합될 수 있는 것으로 본 발명에 의해 고려된다. 본 출원에서 사용되는 "상동성 분자"는 출발 분자에 비해 구조 또는 기능 중 적어도 하나가 유사한 분자를 의미하는 반면, "이종성 분자"는 출발 분자에 비해 구조 또는 기능 중 적어도 하나가 상이한 분자를 의미한다. 따라서, 구조적 동족체는 실질적으로 구조적으로 유사한 분자이다. 이들은 동일할 수 있다. 기능적 동족체는 실질적으로 기능적으로 유사한 분자이다. 이들은 동일할 수 있다.

[0172] 본 발명의 VWF 보호제는 컨쥬게이트를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 컨쥬게이트는 단백질 (예를 들어, 사람 혈청 알부민 (human serum albumin: HSA), 저밀도 지질단백질 (low-density lipoprotein: LDL), 고밀도 지질단백질 (high-density lipoprotein: HDL) 또는 글로불린); 탄수화물 (예를 들어, 덱스트란, 풀루란, 키틴, 키토산, 이눌린, 사이클로덱스트린 또는 히알루론산); 또는 지질과 같은 자연 발생 물질 또는 리간드를 포함할 수 있다. 리간드는 또한 합성 중합체, 예를 들어, 합성 폴리아미노산, 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 압타머)와 같은 재조합 또는 합성 분자일 수 있다. 폴리아미노산의 예로는 폴리리신 (PLL), 폴리 L-아스파르트산, 폴리 L-글루탐산, 스티렌-말레산 무수물 공중합체, 폴리(L-락타이드-코-글리콜라이드) 공중합체, 디비닐 에테르-말레산 무수물 공중합체, N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드 공중합체 (HMPA), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리비닐 알콜 (PVA), 폴리우레탄, 폴리(2-에틸아크릴산), N-이소프로필아크릴아미드 중합체 또는 폴리포스파진이 포함된다. 폴리아민의 예로는 폴리에틸렌이민, 폴리리신 (PLL), 스페르미딘, 스페르민, 폴리아민, 슈도펩타이드-폴리아민, 펩티도미메틱 폴리아민, 덴드리머 폴리아민, 아르기닌, 아미딘, 프로타민, 양이온성 지질, 양이온성 포르피린, 폴리아민의 4차 염 또는 알파 나선 펩타이드가 포함된다.

[0173] 본 발명의 VWF 보호제는 다른 폴리뉴클레오타이드, 염료, 중격제 (예를 들어, 아크리딘), 가교제 (예를 들어, 소랄렌, 미토마이신 C), 포르피린 (TPPC4, 텍사피린, 사피린), 리포터 분자, 폴리사이클릭 방향족 탄화수소 (예를 들어, 페나진, 디하이드로페나진), 인공 엔도뉴클레아제 (예를 들어, EDTA), 알킬화제, 포스페이트, 아미노, 머캅토, PEG (예를 들어, PEG-40K), MPEG, $[MPEG]_2$, 폴리아미노, 알킬, 치환된 알킬, 방사성 라벨링된 마커, 효소, 합텐 (예를 들어, 비오틴), 운반/흡수 촉진제 (예를 들어, 아스피린, 비타민 E, 폴산), 합성 리보뉴클레아

제, 단백질, 예를 들어, 당단백질 또는 펩타이드, 예를 들어, 코-리간드에 대한 특이적인 친화성을 갖는 분자, 또는 항체, 예를 들어, 암 세포, 내피 세포 또는 골 세포와 같은 특정 세포 유형에 결합하는 항체, 호르몬 및 호르몬 수용체, 비펩타이드성 종, 예를 들어, 지질, 렉틴, 탄수화물, 비타민, 보조인자 또는 약물에 컨쥬게이트되도록 디자인될 수 있다.

[0174] 컨쥬게이트는 표적화 기, 예를 들어, 세포 또는 조직 표적화제 또는 표적화 기, 예를 들어, 렉틴, 당단백질, 지질 또는 단백질, 예를 들어, 신장 세포와 같은 특정 세포 유형에 결합하는 항체를 또한 포함할 수 있다. 표적화 기는 티로트로핀, 멜라노트로핀, 렉틴, 당단백질, 계면 활성제 단백질 A, 뮤신 탄수화물, 다가 락토오스, 다가 갈락토오스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민, 다가 만노오스, 다가 푸코오스, 글리코실화된 폴리아미노산, 다가 갈락토오스, 트랜스페린, 비스포스포네이트, 폴리글루타메이트, 폴리아스파르테이트, 지질, 콜레스테롤, 스테로이드, 담즙산, 폴레이트, 비타민 B12, 비오틴, RGD 펩타이드, RGD 펩타이드 모방체 또는 압타머일 수 있다.

[0175] 표적화 기는 단백질, 예를 들어, 당단백질 또는 펩타이드, 예를 들어, 공-리간드에 대한 특이적인 친화성을 갖는 분자, 또는 항체, 예를 들어, 암 세포, 내피 세포 또는 골 세포와 같은 특정 세포 유형에 결합하는 항체일 수 있다. 표적화 기는 또한 호르몬 및 호르몬 수용체를 포함할 수 있다. 이들은 또한 지질, 렉틴, 탄수화물, 비타민, 보조인자, 다가 락토오스, 다가 갈락토오스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민, 다가 만노오스, 다가 푸코오스 또는 압타머와 같은 비펩타이드성 종을 포함할 수 있다.

[0176] 상기 표적화 기는 특정 수용체를 표적화할 수 있는 임의의 리간드일 수 있다. 예로는 폴레이트, GalNAc, 갈락토오스, 만노오스, 만노오스-6P, 압타머, 인테그린 수용체 리간드, 케모카인 수용체 리간드, 트랜스페린, 비오틴, 세로토닌 수용체 리간드, PSMA, 엔도텔린, GCPII, 소마토스타틴, LDL 및 HDL 리간드가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 특정 실시형태에서, 상기 표적화 기는 압타머이다. 상기 압타머는 비변형되거나 본 출원에서 개시된 변형들의 임의의 조합을 가질 수 있다.

[0177] 다른 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 세포 침투 폴리펩타이드에 공유적으로 컨쥬게이트된다. 상기 세포 침투 펩타이드는 또한 신호 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 컨쥬게이트는 증가된 안정성, 증가된 세포 형질감염 및/또는 변경된 생체 분포 (예를 들어, 특정 조직 또는 세포 유형에 표적화됨)를 갖도록 디자인될 수 있다.

[0178] 본 발명의 VWF 보호제는 임의의 다수의 컨쥬게이트에 컨쥬게이트되도록 디자인될 수 있다. 비제한적인 예로서, 상기 컨쥬게이트는 고분자량의 비면역원성 화합물일 수 있다.

[0179] 컨쥬게이트화 모이어티는 제거율을 위해 VWF를 라벨링 또는 표시할 수 있도록 상기 VWF 보호제에 첨가될 수 있다. 이러한 태그/표시 분자로는 유비퀴틴, 형광 분자, 사람 인플루엔자 헤마글루티닌 (HA), c-myc (EQKLISEEDL (서열 번호 10)의 서열을 갖는 사람 원암 유전자 myc의 10개의 아미노산 분절), 히스티딘 (His), 플래그 (DYKDDDDK (서열 번호 11)의 서열의 짧은 펩타이드), 글루타티온 S-트랜스퍼라아제 (glutathione S-transferase: GST), V5 (시미안 바이러스 5 에피토프의 파라믹소바이러스), 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, 서양고추냉이 퍼옥시다아제 (horse radish peroxidase: HRP) 및 디곡시게닌이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0180] 일부 실시형태에서, VWF 보호제는 질환 또는 병태의 치료에서 다른 VWF 보호제 또는 다른 분자와 조합될 수 있다.

[0181] 상기 VWF 보호제는 1종 이상의 다른 치료제, 예방제, 진단제 또는 이미지화제와 함께 사용될 수 있다. "~와 조합하여"란, 작용제의 전달 방법이 본 개시 내용의 범위 내에 있지만, 작용제가 동시에 투여되고/되거나 함께 전달되도록 제형화되어야 하는 것을 의미하도록 의도되지는 않는다. 조성물은 1종 이상의 다른 목적하는 치료법 또는 의료 절차와 동시에, 이전 또는 이후에 투여될 수 있다. 일반적으로, 각 작용제는 당해 작용제에 대해 결정된 용량 및/또는 시간 일정으로 투여될 것이다. 일부 실시형태에서, 본 개시 내용은 체내에서 생체 이용률을 개선하고, 대사를 감소 및/또는 변형시키고, 분비를 억제하고/시키거나 분포를 변형시킬 수 있는 작용제와 조합하여 약제학적, 예방학적, 진단학적 또는 이미지화 조성물의 전달을 포함한다.

[0182] 일부 실시형태에서, 상기 조합은 세포 독소, 방사성 이온, 화학 요법제 또는 기타 치료제와 같은 치료제를 포함할 수 있다. 세포 독소 또는 세포 독성제는 세포에 유해할 수 있는 임의의 작용제를 포함한다. 예로는 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테니포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시안트라시네디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프

라놀롤, 퓨로마이신, 메이탄시노이드, 예를 들어, 메이탄시놀 (전문이 본 출원에서 참조로서 포함되는 미국 특허 5,208,020 참조), 라켈마이신 (CC-1065, 미국 특허 5,475,092, 5,585,499 및 5,846,545 참조, 이들 특허의 전문은 본 출원에 참조로서 포함됨) 및 이들의 유사체 또는 동족체가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 방사성 이온으로는 요오드 (예를 들어, 요오드 125 또는 요오드 131), 스트론튬 89, 인, 팔라듐, 세슘, 이리듐, 포스페이트, 코발트, 이트륨 90, 사마륨 153 및 프라세오디뮴이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 기타 치료제로는 항대사물질 (예를 들어, 메토트렉세이트, 6-머캅토퓨린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 5-플루오로우라실 데카바진), 알킬화제 (예를 들어, 메클로르에타민, 티오테파 클로람부실, 라켈마이신 (CC-1065)), 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU), 로무스틴 (CCNU), 사이클로포스파마이드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스-디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린 (예를 들어, 다우노루비신 (예전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들어, 닥티노마이신 (예전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신 (AMC)) 및 항-유사 분열제 (예를 들어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 탁솔 및 메이탄시노이드)가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0183] 일부 실시형태에서, 상기 조합은 다양한 유기 소분자, 무기 화합물, 나노입자, 효소 또는 효소 기질, 형광 물질, 발광 물질 (예를 들어, 루미놀), 생물 발광 물질 (예를 들어, 루시퍼라아제, 루시페린 및 에쿠오린), 화학 발광 물질, 방사성 물질 (예를 들어, ^{18}F, ^{67}Ga, ^{81m}Kr, ^{82}Rb, ^{111}In, ^{123}I, ^{133}Xe, ^{201}Tl, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, ^{3}H 또는 ^{99m}Tc (예를 들어, 퍼테크네테이트 (테크네테이트 (VII), TcO_4^-))) 및 조영제 (예를 들어, 금 (예를 들어, 금 나노입자), 가돌리늄 (예를 들어, 킬레이트화된 Gd), 산화철 (예를 들어, 초상자성 산화철 (SPIO), 단결정성 산화철 나노입자 (MION) 및 초소형 초상자성 산화철 (USPIO)), 망간 킬레이트 (예를 들어, Mn-DPDP), 황산 바륨, 요오드화 조영제 (이오헥솔), 미세 기포 또는 퍼플루오로카본)와 같은 검출 가능한 제제를 포함할 수 있다. 이러한 광학적으로 검출 가능한 라벨로는, 예를 들어, 4-아세트아미도-4'-이소티오시아네이토스틸벤-2,2'-디설폰산; 아크리딘 및 유도체 (예를 들어, 아크리딘 및 아크리딘 이소티오시아네이트); 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-설폰산 (EDANS); 4-아미노-N-[3-비닐설포닐)페닐]나프탈이미드-3,5-디설포네이트; N-(4-아닐리노-1-나프틸)말레이미드; 안트라닐아미드; BODIPY; 브릴리언트 옐로우; 쿠마린 및 유도체 (예를 들어, 쿠마린, 7-아미노-4-메틸쿠마린 (AMC, 쿠마린 120) 및 7-아미노-4-트리플루오로메틸쿠마린 (쿠마린 151)); 시아닌 염료; 시아노신; 4',6-디아미니디노-2-페닐인돌 (DAPI); 5',5''-디브로모피로갈롤-설포나프탈레인 (브로모피로갈롤 레드); 7-디에틸아미노-3-(4'-이소티오시아네이토페닐)-4-메틸쿠마린; 디에틸렌트리아민 펜타아세테이트; 4,4'-디이소티오시아네이토디하이드로-스틸벤-2,2'-디설폰산; 4,4'-디이소티오시아네이토스틸벤-2,2'-디설폰산; 5-[디메틸아미노]-나프탈렌-1-설포닐 클로라이드 (DNS, 단실클로라이드); 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4'-이소티오시아네이트 (DABITC); 에오신 및 유도체 (예를 들어, 에오신 및 에오신 이소티오시아네이트); 에리트로신 및 유도체 (예를 들어, 에리트로신 B 및 에리트로신 이소티오시아네이트); 에티듐; 플루오레세인 및 유도체 (예를 들어, 5-카복시플루오레세인 (FAM), 5-(4,6-디클로로트리아진-2-일)아미노플루오레세인 (DTAF), 2',7'-디메톡시-4',5'-디클로로-6-카복시플루오레세인, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, X-로다민-5-(및-6)-이소티오시아네이트 (QFITC 또는 XRITC) 및 플루오레사민); 2-[2-[3-[[1,3-디하이드로-1,1-디메틸-3-(3-설포프로필)-2H-벤즈[e]인돌-2-일리덴]에틸리덴]-2-[4-(에톡시카보닐)-1-피페라지닐]-1-사이클로펜텐-1-일]에테닐]-1,1-디메틸-3-(3-설포르프로필)-1H-벤즈[e]인돌리움 하이드록사이드, 분자 내염, N,N-디에틸에탄아민과의 화합물 (1:1) (IR144); 5-클로로-2-[2-[3-[(5-클로로-3-에틸-2(3H)-벤조티아졸-일리덴)에틸리덴]-2-(디페닐아미노)-1-사이클로펜텐-1-일]에테닐]-3-에틸 벤조티아졸리움 퍼클로레이트 (IR140); 말라카이트 그린 이소티오시아네이트; 4-메틸움벨리페론 오르토크레졸프탈레인; 니트로타이로신; 파라로자닐린; 페놀 레드; B-피코에리트린; o-프탈디알데하이드; 피렌 및 유도체 (예를 들어, 피렌, 피렌 부티레이트 및 석신이미딜 1-피렌); 부티레이트 퀀텀닷; 리액티브 레드 4 (CIBACRON™ 브릴리언트 레드 3B-A); 로다민 및 유도체 (예를 들어, 6-카복시-X-로다민 (ROX), 6-카복시로다민 (R6G), 리사민 로다민 B 설포닐 클로라이드 로다민 (Rhod), 로다민 B, 로다민 123, 로다민 X 이소티오시아네이트, 설포로다민 B, 설포로다민 101, 설포로다민 101의 설포닐 클로라이드 유도체 (텍사스 레드), N,N,N′,N′-테트라메틸-6-카복시로다민 (TAMRA) 테트라메틸 로다민 및 테트라메틸 로다민 이소티오시아네이트 (TRITC)); 리보플라빈; 로졸산; 터븀 킬레이트 유도체; 시아닌-3 (Cy3); 시아닌-5 (Cy5); 시아닌-5.5 (Cy5.5), 시아닌-7 (Cy7); IRD 700; IRD 800; 알렉사 647; 라 졸타 블루; 프탈로 시아닌; 및 나프탈로 시아닌이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0184] 일부 실시형태에서, 상기 검출 가능한 제제는 활성화시 검출가능하게 되는 검출 불가능한 전구체 (예를 들어, 형광발생 테트라진-플루오로포어 작제물 (예를 들어, 테트라진-BODIPY FL, 테트라진-오레곤 그린 488, 또는 테트라진-BODIPY TMR-X) 또는 효소 활성화 가능한 형광발생제 (예를 들어, PROSENSE (VisEn Medical))일 수

있다. 효소 라벨링된 조성물이 사용될 수 있는 시험관내 검정에서, 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA), 면역 침강 검정, 면역 형광, 효소 면역 검정 (EIA), 방사선 면역 검정 (RIA) 및 웨스턴 블롯 분석이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0185] **II. 본 발명의 표적: VWF 단량체 또는 다량체**

[0186] 본 발명은 폰 빌레브란트 인자 (VWF) 단량체 또는 다량체에 결합하는 압타머 (그 자체로 단량체 또는 다량체)를 제공한다. 이들 압타머는 본 출원에서 "VWF 압타머"로서 지칭된다. 상기에서 언급된 바와 같이, VWF 압타머는 핵산 기반 또는 아미노산 기반일 수 있다.

[0187] 일부 실시형태에서, 상기 VWF 보호제의 표적은 VWF 단백질 또는 단백질 다량체이다. 일부 실시형태에서, VWF 보호제는, 그 자체가 VWF 단백질과 회합하는 단백질 또는 다른 생체 분자와 결합하거나 회합하도록 디자인될 수 있다.

[0188] 호모 사피엔스 폰 빌레브란트 인자 mRNA는 본 출원에서 서열 번호 8 (NM_000552; 8833 nt)로서, 단백질은 서열 번호 9 (NP_000543; 2813개의 아미노산)로서 제공된다.

[0189] 사람 VWF mRNA 서열은 여기에 되시된다: >gi|89191867|ref|NM_000552.3| 호모 사피엔스 폰 빌레브란트 인자 (VWF), mRNA:

AGCTCACAGCTATTGTGGTGGGAAAGGGAGGGTGGTTGGTGGATGTCACAGCTTGGGCTTTATCTCCCCCAGCAGTGGGGACTCCACAGCCCCTGGGCTACA
TAACAGCAAGACAGTCCGGAGCTGTAGCAGACCTGATTGAGCCTTTGCAGCAGCTGAGAGCATGGCCTAGGGTGGGCGGCACCATTGTCCAGCAGCTGAGTT
TCCCAGGGACCTTGGAGATAGCCGCAGCCCTCATTTGCAGGGGAAGATGATTCCTGCCAGATTTGCCGGGGTGCTGCTTGCTCTGGCCCTCATTTTGCCAGG
GACCCTTTGTGCAGAAGGAACTCGCGGCAGGTCATCCACGGCCCGATGCAGCCTTTTCGGAAGTGACTTCGTCAACACCTTTGATGGGAGCATGTACAGCTT
TGCGGGATACTGCAGTTACCTCCTGGCAGGGGGCTGCCAGAAACGCTCCTTCTCGATTATTGGGGACTTCCAGAATGGCAAGAGAGTGAGCCTCTCCGTGTA
TCTTGGGGAATTTTTTGACATCCATTTGTTTGTCAATGGTACCGTGACACAGGGGGACCAAAGAGTCTCCATGCCCTATGCCTCCAAAGGGCTGTATCTAGA
AACTGAGGCTGGGTACTACAAGCTGTCCGGTGAGGCCTATGGCTTTGTGGCCAGGATCGATGGCAGCGGCAACTTTCAAGTCCTGCTGTCAGACAGATACTT
CAACAAGACCTGCGGGCTGTGTGGCAACTTTAACATCTTTGCTGAAGATGACTTTATGACCCAAGAAGGGACCTTGACCTCGGACCCTTATGACTTTGCCAA
CTCATGGGCTCTGAGCAGTGGAGAACAGTGGTGTGAACGGGCATCTCCTCCCAGCAGCTCATGCAACATCTCCTCTGGGGAAATGCAGAAGGGCCTGTGGGA
GCAGTGCCAGCTTCTGAAGAGCACCTCGGTGTTTGCCCGCTGCCACCCTCTGGTGGACCCCGAGCCTTTTGTGGCCCTGTGTGAGAAGACTTTGTGTGAGTG
TGCTGGGGGGCTGGAGTGCGCCTGCCCTGCCCTCCTGGAGTACGCCCGGACCTGTGCCCAGGAGGGAATGGTGCTGTACGGCTGGACCGACCACAGCGCGTG
CAGCCCAGTGTGCCCTGCTGGTATGGAGTATAGGCAGTGTGTGTCCCCTTGCGCCAGGACCTGCCAGAGCCTGCACATCAATGAAATGTGTCAGGAGCGATG
CGTGGATGGCTGCAGCTGCCCTGAGGGACAGCTCCTGGATGAAGGCCTCTGCGTGGAGAGCACCGAGTGTCCCTGCGTGCATTCCGGAAAGCGCTACCCTCC
CGGCACCTCCCTCTCTCGAGACTGCAACACCTGCATTTGCCGAAACAGCCAGTGGATCTGCAGCAATGAAGAATGTCCAGGGGAGTGCCTTGTCACAGGTCA
ATCACACTTCAAGAGCTTTGACAACAGATACTTCACCTTCAGTGGGATCTGCCAGTACCTGCTGGCCCGGGATTGCCAGGACCACTCCTTCTCCATTGTCAT
TGAGACTGTCCAGTGTGCTGATGACCGCGACGCTGTGTGCACCCGCTCCGTCACCGTCCGGCTGCCTGGCCTGCACAACAGCCTTGTGAAACTGAAGCATGG
GGCAGGAGTTGCCATGGATGGCCAGGACGTCCAGCTCCCCCTCCTGAAAGGTGACCTCCGCATCCAGCATACAGTGACGGCCTCCGTGCGCCTCAGCTACGG
GGAGGACCTGCAGATGGACTGGGATGGCCGCGGGAGGCTGCTGGTGAAGCTGTCCCCCGTCTATGCCGGGAAGACCTGCGGCCTGTGTGGGAATTACAATGG
CAACCAGGGCGACGACTTCCTTACCCCCTCTGGGCTGGCGGAGCCCCGGGTGGAGGACTTCGGGAACGCCTGGAAGCTGCACGGGGACTGCCAGGACCTGCA
GAAGCAGCACAGCGATCCCTGCGCCCTCAACCCGCGCATGACCAGGTTCTCCGAGGAGGCGTGCGCGGTCCTGACGTCCCCCACATTCGAGGCCTGCCATCG
TGCCGTCAGCCCGCTGCCCTACCTGCGGAACTGCCGCTACGACGTGTGCTCCTGCTCGGACGGCCGCGAGTGCCTGTGCGGCGCCCTGGCCAGCTATGCCGC
GGCCTGCGCGGGGAGAGGCGTGCGCGTCGCGTGGCGCGAGCCAGGCCGCTGTGAGCTGAACTGCCCGAAAGGCCAGGTGTACCTGCAGTGCGGGACCCCCTG
CAACCTGACCTGCCGCTCTCTCTCTTACCCGGATGAGGAATGCAATGAGGCCTGCCTGGAGGGCTGCTTCTGCCCCCCAGGGCTCTACATGGATGAGAGGGG
GGACTGCGTGCCCAAGGCCCAGTGCCCCTGTTACTATGACGGTGAGATCTTCCAGCCAGAAGACATCTTCTCAGACCATCACACCATGTGCTACTGTGAGGA
TGGCTTCATGCACTGTACCATGAGTGGAGTCCCCGGAAGCTTGCTGCCTGACGCTGTCCTCAGCAGTCCCCTGTCTCATCGCAGCAAAAGGAGCCTATCCTG
TCGGCCCCCCATGGTCAAGCTGGTGTGTCCCGCTGACAACCTGCGGGCTGAAGGGCTCGAGTGTACCAAAACGTGCCAGAACTATGACCTGGAGTGCATGAG
CATGGGCTGTGTCTCTGGCTGCCTCTGCCCCCCGGGCATGGTCCGGCATGAGAACAGATGTGTGGCCCTGGAAAGGTGTCCCTGCTTCCATCAGGGCAAGGA
GTATGCCCCTGGAGAAACAGTGAAGATTGGCTGCAACACTTGTGTCTGTCGGGACCGGAAGTGGAACTGCACAGACCATGTGTGTGATGCCACGTGCTCCAC
GATCGGCATGGCCCACTACCTCACCTTCGACGGGCTCAAATACCTGTTCCCCGGGGAGTGCCAGTACGTTCTGGTGCAGGATTACTGCGGCAGTAACCCTGG
GACCTTTCGGATCCTAGTGGGGAATAAGGGATGCAGCCACCCCTCAGTGAAATGCAAGAAACGGGTCACCATCCTGGTGGAGGGAGGAGAGATTGAGCTGTT
TGACGGGGAGGTGAATGTGAAGAGGCCCATGAAGGATGAGACTCACTTTGAGGTGGTGGAGTCTGGCCGGTACATCATTCTGCTGCTGGGCAAAGCCCTCTC
CGTGGTCTGGGACCGCCACCTGAGCATCTCCGTGGTCCTGAAGCAGACATACCAGGAGAAAGTGTGTGGCCTGTGTGGGAATTTTGATGGCATCCAGAACAA
TGACCTCACCAGCAGCAACCTCCAAGTGGAGGAAGACCCTGTGGACTTTGGGAACTCCTGGAAAGTGAGCTCGCAGTGTGCTGACACCAGAAAAGTGCCTCT
GGACTCATCCCCTGCCACCTGCCATAACAACATCATGAAGCAGACGATGGTGGATTCCTCCTGTAGAATCCTTACCAGTGACGTCTTCCAGGACTGCAACAA
GCTGGTGGACCCCGAGCCATATCTGGATGTCTGCATTTACGACACCTGCTCCTGTGAGTCCATTGGGGACTGCGCCTGCTTCTGCGACACCATTGCTGCCTA

TGCCCACGTGTGTGCCCAGCATGGCAAGGTGGTGACCTGGAGGACGGCCACATTGTGCCCCCAGAGCTGCGAGGAGAGGAATCTCCGGGAGAACGGGTATGA
GTGTGAGTGGCGCTATAACAGCTGTGCACCTGCCTGTCAAGTCACGTGTCAGCACCCTGAGCCACTGGCCTGCCCTGTGCAGTGTGTGGAGGGCTGCCATGC
CCACTGCCCTCCAGGGAAAATCCTGGATGAGCTTTTGCAGACCTGCGTTGACCCTGAAGACTGTCCAGTGTGTGAGGTGGCTGGCCGGCGTTTTGCCTCAGG
AAAGAAAGTCACCTTGAATCCCAGTGACCCTGAGCACTGCCAGATTTGCCACTGTGATGTTGTCAACCTCACCTGTGAAGCCTGCCAGGAGCCGGGAGGCCT
GGTGGTGCCTCCCACAGATGCCCCGGTGAGCCCCACCACTCTGTATGTGGAGGACATCTCGGAACCGCCGTTGCACGATTTCTACTGCAGCAGGCTACTGGA
CCTGGTCTTCCTGCTGGATGGCTCCTCCAGGCTGTCCGAGGCTGAGTTTGAAGTGCTGAAGGCCTTTGTGGTGGACATGATGGAGCGGCTGCGCATCTCCCA
GAAGTGGGTCCGCGTGGCCGTGGTGGAGTACCACGACGGCTCCCACGCCTACATCGGGCTCAAGGACCGGAAGCGACCGTCAGAGCTGCGGCGCATTGCCAG
CCAGGTGAAGTATGCGGGCAGCCAGGTGGCCTCCACCAGCGAGGTCTTGAAATACACACTGTTCCAAATCTTCAGCAAGATCGACCGCCCTGAAGCCTCCCG
CATCACCCTGCTCCTGATGGCCAGCCAGGAGCCCCAACGGATGTCCCGGAACTTTGTCCGCTACGTCCAGGGCCTGAAGAAGAAGAAGGTCATTGTGATCCC
GGTGGGCATTGGGCCCCATGCCAACCTCAAGCAGATCCGCCTCATCGAGAAGCAGGCCCCTGAGAACAAGGCCTTCGTGCTGAGCAGTGTGGATGAGCTGGA
GCAGCAAAGGGACGAGATCGTTAGCTACCTCTGTGACCTTGCCCCTGAAGCCCCTCCTCCTACTCTGCCCCCCGACATGGCACAAGTCACTGTGGGCCCGGG
GCTCTTGGGGGTTTCGACCCTGGGGCCCAAGAGGAACTCCATGGTTCTGGATGTGGCGTTCGTCCTGGAAGGATCGGACAAAATTGGTGAAGCCGACTTCAA
CAGGAGCAAGGAGTTCATGGAGGAGGTGATTCAGCGGATGGATGTGGGCCAGGACAGCATCCACGTCACGGTGCTGCAGTACTCCTACATGGTGACTGTGGA
GTACCCCTTCAGCGAGGCACAGTCCAAAGGGGACATCCTGCAGCGGGTGCGAGAGATCCGCTACCAGGGCGGCAACAGGACCAACACTGGGCTGGCCCTGCG
GTACCTCTCTGACCACAGCTTCTTGGTCAGCCAGGGTGACCGGGAGCAGGCGCCCAACCTGGTCTACATGGTCACCGGAAATCCTGCCTCTGATGAGATCAA
GAGGCTGCCTGGAGACATCCAGGTGGTGCCCATTGGAGTGGGCCCTAATGCCAACGTGCAGGAGCTGGAGAGGATTGGCTGGCCCAATGCCCCTATCCTCAT
CCAGGACTTTGAGACGCTCCCCCGAGAGGCTCCTGACCTGGTGCTGCAGAGGTGCTGCTCCGGAGAGGGGCTGCAGATCCCCACCCTCTCCCCTGCACCTGA
CTGCAGCCAGCCCCTGGACGTGATCCTTCTCCTGGATGGCTCCTCCAGTTTCCCAGCTTCTTATTTTGATGAAATGAAGAGTTTCGCCAAGGCTTTCATTTC
AAAAGCCAATATAGGGCCTCGTCTCACTCAGGTGTCAGTGCTGCAGTATGGAAGCATCACCACCATTGACGTGCCATGGAACGTGGTCCCGGAGAAAGCCCA
TTTGCTGAGCCTTGTGGACGTCATGCAGCGGGAGGGAGGCCCCAGCCAAATCGGGGATGCCTTGGGCTTTGCTGTGCGATACTTGACTTCAGAAATGCATGG
TGCCAGGCCGGGAGCCTCAAAGGCGGTGGTCATCCTGGTCACGGACGTCTCTGTGGATTCAGTGGATGCAGCAGCTGATGCCGCCAGGTCCAACAGAGTGAC
AGTGTTCCCTATTGGAATTGGAGATCGCTACGATGCAGCCCAGCTACGGATCTTGGCAGGCCCAGCAGGCGACTCCAACGTGGTGAAGCTCCAGCGAATCGA
AGACCTCCCTACCATGGTCACCTTGGGCAATTCCTTCCTCCACAAACTGTGCTCTGGATTTGTTAGGATTTGCATGGATGAGGATGGGAATGAGAAGAGGCC
CGGGGACGTCTGGACCTTGCCAGACCAGTGCCACACCGTGACTTGCCAGCCAGATGGCCAGACCTTGCTGAAGAGTCATCGGGTCAACTGTGACCGGGGGCT
GAGGCCTTCGTGCCCTAACAGCCAGTCCCCTGTTAAAGTGGAAGAGACCTGTGGCTGCCGCTGGACCTGCCCCTGCGTGTGCACAGGCAGCTCCACTCGGCA
CATCGTGACCTTTGATGGGCAGAATTTCAAGCTGACTGGCAGCTGTTCTTATGTCCTATTTCAAAACAAGGAGCAGGACCTGGAGGTGATTCTCCATAATGG
TGCCTGCAGCCCTGGAGCAAGGCAGGGCTGCATGAAATCCATCGAGGTGAAGCACAGTGCCCTCTCCGTCGAGCTGCACAGTGACATGGAGGTGACGGTGAA
TGGGAGACTGGTCTCTGTTCCTTACGTGGGTGGGAACATGGAAGTCAACGTTTATGGTGCCATCATGCATGAGGTCAGATTCAATCACCTTGGTCACATCTT
CACATTCACTCCACAAAACAATGAGTTCCAACTGCAGCTCAGCCCCAAGACTTTTGCTTCAAAGACGTATGGTCTGTGTGGGATCTGTGATGAGAACGGAGC
CAATGACTTCATGCTGAGGGATGGCACAGTCACCACAGACTGGAAAACACTTGTTCAGGAATGGACTGTGCAGCGGCCAGGGCAGACGTGCCAGCCCATCCT
GGAGGAGCAGTGTCTTGTCCCCGACAGCTCCCACTGCCAGGTCCTCCTCTTACCACTGTTTGCTGAATGCCACAAGGTCCTGGCTCCAGCCACATTCTATGC
CATCTGCCAGCAGGACAGTTGCCACCAGGAGCAAGTGTGTGAGGTGATCGCCTCTTATGCCCACCTCTGTCGGACCAACGGGGTCTGCGTTGACTGGAGGAC
ACCTGATTTCTGTGCTATGTCATGCCCACCATCTCTGGTCTACAACCACTGTGAGCATGGCTGTCCCCGGCACTGTGATGGCAACGTGAGCTCCTGTGGGGA
CCATCCCTCCGAAGGCTGTTTCTGCCCTCCAGATAAAGTCATGTTGGAAGGCAGCTGTGTCCCTGAAGAGGCCTGCACTCAGTGCATTGGTGAGGATGGAGT
CCAGCACCAGTTCCTGGAAGCCTGGGTCCCGGACCACCAGCCCTGTCAGATCTGCACATGCCTCAGCGGGCGGAAGGTCAACTGCACAACGCAGCCCTGCCC
CACGGCCAAAGCTCCCACGTGTGGCCTGTGTGAAGTAGCCCGCCTCCGCCAGAATGCAGACCAGTGCTGCCCCGAGTATGAGTGTGTGTGTGACCCAGTGAG
CTGTGACCTGCCCCCAGTGCCTCACTGTGAACGTGGCCTCCAGCCCACACTGACCAACCCTGGCGAGTGCAGACCCAACTTCACCTGCGCCTGCAGGAAGGA
GGAGTGCAAAAGAGTGTCCCCACCCTCCTGCCCCCCGCACCGTTTGCCCACCCTTCGGAAGACCCAGTGCTGTGATGAGTATGAGTGTGCCTGCAACTGTGT
CAACTCCACAGTGAGCTGTCCCCTTGGGTACTTGGCCTCAACTGCCACCAATGACTGTGGCTGTACCACAACCACCTGCCTTCCCGACAAGGTGTGTGTCCA
CCGAAGCACCATCTACCCTGTGGGCCAGTTCTGGGAGGAGGGCTGCGATGTGTGCACCTGCACCGACATGGAGGATGCCGTGATGGGCCTCCGCGTGGCCCA
GTGCTCCCAGAAGCCCTGTGAGGACAGCTGTCGGTCGGGCTTCACTTACGTTCTGCATGAAGGCGAGTGCTGTGGAAGGTGCCTGCCATCTGCCTGTGAGGT
GGTGACTGGCTCACCGCGGGGGGACTCCCAGTCTTCCTGGAAGAGTGTCGGCTCCCAGTGGGCCTCCCCGGAGAACCCCTGCCTCATCAATGAGTGTGTCCG
AGTGAAGGAGGAGGTCTTTATACAACAAAGGAACGTCTCCTGCCCCCAGCTGGAGGTCCCTGTCTGCCCCTCGGGCTTTCAGCTGAGCTGTAAGACCTCAGC
GTGCTGCCCAAGCTGTCGCTGTGAGCGCATGGAGGCCTGCATGCTCAATGGCACTGTCATTGGGCCCGGGAAGACTGTGATGATCGATGTGTGCACGACCTG
CCGCTGCATGGTGCAGGTGGGGGTCATCTCTGGATTCAAGCTGGAGTGCAGGAAGACCACCTGCAACCCCTGCCCCCTGGGTTACAAGGAAGAAAATAACAC
AGGTGAATGTTGTGGGAGATGTTTGCCTACGGCTTGCACCATTCAGCTAAGAGGAGGACAGATCATGACACTGAAGCGTGATGAGACGCTCCAGGATGGCTG
TGATACTCACTTCTGCAAGGTCAATGAGAGAGGAGAGTACTTCTGGGAGAAGAGGGTCACAGGCTGCCCACCCTTTGATGAACACAAGTGTCTGGCTGAGGG
AGGTAAAATTATGAAAATTCCAGGCACCTGCTGTGACACATGTGAGGAGCCTGAGTGCAACGACATCACTGCCAGGCTGCAGTATGTCAAGGTGGGAAGCTG
TAAGTCTGAAGTAGAGGTGGATATCCACTACTGCCAGGGCAAATGTGCCAGCAAAGCCATGTACTCCATTGACATCAACGATGTGCAGGACCAGTGCTCCTG
CTGCTCTCCGACACGGACGGAGCCCATGCAGGTGGCCCTGCACTGCACCAATGGCTCTGTTGTGTACCATGAGGTTCTCAATGCCATGGAGTGCAAATGCTC
CCCCAGGAAGTGCAGCAAGTGAGGCTGCTGCAGCTGCATGGGTGCCTGCTGCTGCCTGCCTTGGCCTGATGGCCAGGCCAGAGTGCTGCCAGTCCTCTGCAT

GTTCTGCTCTTGTGCCCTTCTGAGCCCACAATAAAGGCTGAGCTCTTATCTTGCAAAAGGC (서열 번호 8). 본 mRNA에서, 우리딘은 티미틴으로 표시되는 것에 유의한다.

[0190] 단백질 서열은 여기에 도시된다: >gi|89191868|ref|NP_000543.2| 폰 빌레브란트 인자 프레프로단백질 [호모 사피엔스].

[0191] MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIGDFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNGTV
TQGDQRVSMPYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSDRYFNKTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERAS
PPSSSCNISSGEMQKGLWEQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSACSPVCPAGMEYRQCVS
PCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLDEGLCVESTECPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTCICRNSQWICSNEECPGECLVTGQSHFKSFDNRYFTFSG
ICQYLLARDCQDHSFSIVIETVQCADDRDAVCTRSVTVRLPGLHNSLVKLKHGAGVAMDGQDVQLPLLKGDLRIQHTVTASVRLSYGEDLQMDWDGRGRLLV
KLSPVYAGKTCGLCGNYNGNQGDDFLTPSGLAEPRVEDFGNAWKLHGDCQDLQKQHSDPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVSPLPYLRNCRYDV
CSCSDGRECLCGALASYAAACAGRGVRVAWREPGRCELNCPKGQVYLQCGTPCNLTCRSLSYPDEECNEACLEGCFCPPGLYMDERGDCVPKAQCPCYYDGE
IFQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSLLPDAVLSSPLSHRSKRSLSCRPPMVKLVCPADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVR
HENRCVALERCPCFHQGKEYAPGETVKIGCNTCVCRDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPS
VKCKKRVTILVEGGEIELFDGEVNVKRPMKDETHFEVVESGRYIILLLGKALSVVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVD
FGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHGKVVTWRT
ATLCPQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQI
CHCDVVNLTCEACQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVDMMERLRISQKWVRVAVVEYHDGSH
AYIGLKDRKRPSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRITLLLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVGIGPHANLKQIRLI
EKQAPENKAFVLSSVDELEQQRDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPDMAQVTVGPGLLGVSTLGPKRNSMVLDVAFVLEGSDKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMDV
GQDSIHVTVLQYSYMVTVEYPFSEAQSKGDILQRVREIRYQGGNRTNTGLALRYLSDHSFLVSQGDREQAPNLVYMVTGNPASDEIKRLPGDIQVVPIGVGP
NANVQELERIGWPNAPILIQDFETLPREAPDLVLQRCCSGEGLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLLDGSSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQ
YGSITTIDVPWNVVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEMHGARPGASKAVVILVTDVSVDSVDAAADAARSNRVTVFPIGIGDRYDAAQL
RILAGPAGDSNVVKLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCSGFVRICMDEDGNEKRPGDVWTLPDQCHTVTCQPDGQTLLKSHRVNCDRGLRPSCPNSQSPVKVEE
TCGCRWTCPCVCTGSSTRHIVTFDGQNFKLTGSCSYVLFQNKEQDLEVILHNGACSPGARQGCMKSIEVKHSALSVELHSDMEVTVNGRLVSVPYVGGNMEV
NVYGAIMHEVRFNHLGHIFTFTPQNNEFQLQLSPKTFASKTYGLCGICDENGANDFMLRDGTVTTDWKTLVQEWTVQRPGQTCQPILEEQCLVPDSSHCQVL
LLPLFAECHKVLAPATFYAICQQDSCHQEQVCEVIASYAHLCRTNGVCVDWRTPDFCAMSCPPSLVYNHCEHGCPRHCDGNVSSCGDHPSEGCFCPPDKVML
EGSCVPEEACTQCIGEDGVQHQFLEAWVPDHQPCQICTCLSGRKVNCTTQPCPTAKAPTCGLCEVARLRQNADQCCPEYECVCDPVSCDLPPVPHCERGLQP
TLTNPGECRPNFTCACRKEECKRVSPPSCPPHRLPTLRKTQCCDEYECACNCVNSTVSCPLGYLASTATNDCGCTTTTCLPDKVCVHRSTIYPVGQFWEEGC
DVCTCTDMEDAVMGLRVAQCSQKPCEDSCRSGFTYVLHEGECCGRCLPSACEVVTGSPRGDSQSSWKSVGSQWASPENPCLINECVRVKEEVFIQQRNVSCP
QLEVPVCPSGFQLSCKTSACCPSCRCERMEACMLNGTVIGPGKTVMIDVCTTCRCMVQVGVISGFKLECRKTTCNPCPLGYKEENNTGECCGRCLPTACTIQ
LRGGQIMTLKRDETLQDGCDTHFCKVNERGEYFWEKRVTGCPPFDEHKCLAEGGKIMKIPGTCCDTCEEPECNDITARLQYVKVGSCKSEVEVDIHYCQGKC
ASKAMYSIDINDVQDQCSCCSPTRTEPMQVALHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSPRKCSK. (서열 번호 9).

[0192] 상기 VWF 단백질의 전부 또는 임의의 단편 (5개의 아미노산에서 전체 길이까지)이 본 출원에서 기재된 바와 같은 VWF 보호제를 제조하는데 사용될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 서열 번호 9의 돌연변이된 버전 또는 변이체는 또한 VWF 보호제를 디자인하는데 사용될 수 있다.

[0193] 본 발명에 따르면, 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 상기 VWF 보호제는 혈소판 또는 적혈구에 결합하는 VWF의 능력을 부분적으로 또는 완전히 차단함으로써 VWF 단량체 또는 다량체 분해를 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있다. 상기 VWF 압타머는, 단량체 또는 적어도 2개의 단량체의 다량체의 보호의 수준이 상기 VWF 보호제의 부재하의 온전한 단량체 또는 다량체의 수준과 비교하여 적어도 95%, 예를 들어, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%일 때, VWF 분해를 완전히 억제하는 것으로 간주된다.

[0194] 상기 VWF 압타머는, 단량체 또는 적어도 2개의 단량체의 다량체의 보호의 수준이 상기 VWF 보호제의 부재하의 온전한 단량체 또는 다량체의 수준과 비교하여 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% 또는 90%일 때, VWF 분해를 부분적으로 억제하는 것으로 간주된다.

[0195] 대상체의 적어도 하나의 용기가 폐쇄성 혈전에 의해 부분적으로 (적어도 50%) 폐색되거나 완전히 폐색된 다른 실시형태에서, 상기 VWF 보호제는 혈소판에 결합하는 VWF의 능력을 부분적으로 또는 완전히 차단함으로써 폐쇄성 혈전을 완전히 또는 부분적으로 분해할 수 있다 . 상기 VWF 압타머는, 폐쇄성 혈전이 상기 VWF 보호제의 부재하의 폐쇄성 혈전의 수준과 비교하여 적어도 95%, 예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 분해될 때, 폐쇄성 혈전을 완전히 분해하는 것으로 간주된다.

[0196] 상기 VWF 압타머는, 폐쇄성 혈전이 상기 VWF 보호제의 부재하의 폐쇄성 혈전의 수준과 비교하여 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 분해될 때, 폐쇄성 혈전을 부분적으로 분해하는 것으로 간주된다.

[0197] 핵산 압타머인 VWF 보호제는 사람 폰 빌레브란트 인자 도메인 A1 또는 이의 변이체에 대해 100 uM 미만, 1 uM 미만, 500 nM 미만, 100 nM 미만, 바람직하게는 50 nM 이하, 바람직하게는 10 nM 이하, 바람직하게는 5 nM 이하, 바람직하게는 1 nM 이하, 보다 바람직하게는 500 pM 이하의 해리 상수를 포함할 수 있다.

[0198] **III. VWF 보호제: 치료제**

[0199] 압타머는 분자 표적에 대한 높은 특이성 및 친화성, 생물학적 효능 및 우수한 약동학적 특성을 비롯하여 치료제로서 사용하기 위한 다수의 바람직한 특징을 갖는다. 또한, 예를 들어, 다음과 같은 다른 생물제제에 비해 구체적인 경쟁 우위를 제공한다:

[0200] *속도 및 제어* 압타머는 온전히 시험관내 과정에 의해 제조될 수 있다. 시험관내 선택은 압타머의 특이성 및 친화성을 엄격하게 제어할 수 있도록 하며 독성 및 비면역원성 표적 둘 다에 대한 납의 생성을 허용한다. 압타머는 또한 고체상 합성과 같은 화학 합성이든지 T7 RNA 폴리머라아제와 같은 폴리머라아제 효소를 사용하는 효소 합성이든지에 의해 합성적으로 제조될 수 있다.

[0201] *독성 및 면역원성* 부류로서의 압타머는 독성 또는 면역원성을 거의 또는 전혀 나타내지 않았다. 이러한 면역원성은 이러한 면역 반응을 약화시키거나 개선시키는 화학적 변형을 도입함으로써 추가로 제어될 수 있다. 이러한 변형은 국제출원 PCT/US2012/058519에 교시되어 있으며, 이의 전문은 본 출원에 참조로서 포함된다.

[0202] *투여* 현재 승인된 모든 항체 치료제가 정맥내 주입 (통상적으로는 2~4시간에 걸쳐서)으로 투여되는 반면, 압타머는 피하 주사에 의해 또는 다른 경로에 의해 투여될 수 있다. 피하 투여를 통한 압타머 생체 이용률은 원숭이 연구에서 > 80%인 것으로 나타났다. 일부 실시형태에서, 대상체에 대한 VWF 보호제의 피하 투여는 정맥내 투여에 비해 적어도 약 50%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 약 98%, 또는 약 99%의 생체 이용률을 산출할 수 있다.

[0203] *확장성 및 비용* 압타머는 화학적으로 또는 효소적으로 합성되며, 결과적으로 생산 수요를 충족시키기 위해 필요에 따라 용이하게 확장될 수 있다.

[0204] *안정성* 압타머는 열, 변성제 등에 대한 노출 후에 활동을 회복할 수 있으며, 장기간 (> 1년) 동안 보관될 수 있다.

[0205] *조합 요법* 본 발명의 하나의 실시형태는 응고, 출혈 또는 VAD-관련 장애에 대한 1종 이상의 다른 치료제와 조합하여 사용되는 본 발명의 VWF 보호제 제형을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, VWF 보호제 제형은, 예를 들어, 아스피린, 혈전 용해제 (즉, 조직 플라스미노겐 활성화제, 알테플라제), 니트로글리세린, 베타 차단제, 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 억제제, 안지오텐신 수용체 차단제 (ARB), Ca^{2+} 채널 차단제, 콜레스테롤 강하 약물 (즉, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA), 알테플라제) 및 응괴 방지 약물 (즉, 클로피도그렐 및 프라수그렐)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는, 급성 관상 동맥 증후군 또는 급성 폐쇄성 혈전증에 대한 1종 이상의 다른 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, VWF 보호제 제형은, 예를 들어, 피브린을 표적화하는 혈전 용해 치료제 및 혈소판-피브린 상호 작용을 중단시키려는 치료제, 즉, 혈소판 GpIIb/IIIa 억제제 (예를 들어, 압식시맙, 엡티피바타이드, 티로피반)와 같은 혈소판 응집체를 분해하는데 사용되는 1종 이상의 다른 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, VWF 보호제 제형은, 예를 들어, 항응고제, 혈전 용해제 (tPA, 알테플라제), 항혈소판 요법제 (예를 들어, 아스피린, 다비가트란, 클로피도그렐, 디피리다몰) 및 와파린과 같은 허혈성 뇌졸중을 치료하는데 사용되는 1종 이상의 다른 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 VWF 보호제 제형은, 예를 들어, 1종 이상의 압타머를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 압타머를 함유하는 본 발명의 VWF 보호제 제형은 또 다른 유용한 제형 또는 약물과 조합하여 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 압타머 제형은 수술 절차와 같은 비약물 요법 또는 치료와 조합하여 사용된다. 일반적으로, 현재 이용 가능한 투여 형태의 공지된 치료제 및 이러한 조합에 사용하기 한 비약물 요법의 사용이 적합할 것이다.

[0206] "조합 요법"(또는 "공동 요법")은 본 발명의 VWF 보호제 제형과 적어도 제2 제제 또는 이들 치료제 또는 치료의 공동-작용으로부터 유리한 효과를 제공하도록 의도된 특정 치료 요법의 일부로서의 치료의 투여를 포함한다. 상기 조합의 유리한 효과는 치료제 또는 치료의 조합으로부터 발생하는 약동학적 또는 약력학적 공동 작용을 포

함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 이들 치료제 또는 치료의 조합 투여는 전형적으로 정해진 기간 (통상적으로 선택된 조합에 따라 분, 시간, 일 또는 주)에 걸쳐 수행된다.

[0207] 조합 요법은, 일반적으로는 아니지만, 본 발명의 조합을 우발적으로 및 임의로 초래하는 별도의 단일 요법 요법의 일부로서의 치료 또는 이들 치료제 중 2가지의 투여를 포함하도록 의도될 수 있다. 조합 요법은 이들 치료제 또는 치료의 순차적인 방식의 투여 (즉, 여기서, 각 치료제 또는 치료는 상이한 시간에 투여됨) 뿐만 아니라, 이들 치료제 또는 치료, 또는 적어도 2가지의 치료제 또는 치료의 실질적인 동시 투여를 포함하도록 의도된다. 실질적인 동시 투여는, 예를 들어, 각 치료제의 고정된 비율을 갖는 단일 주사 또는 각 치료제에 대한 복수의 단일 주사를 대상체에게 투여함으로써 달성될 수 있다.

[0208] 각 치료제 또는 치료의 순차적인 또는 실질적인 동시 투여는 국소 경로, 경구 경로, 정맥내 경로, 피하, 근육내 경로 및 점막 조직을 통한 직접 흡수를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 임의의 적절한 경로에 의해 영향을 받을 수 있다. 상기 치료제 또는 치료는 동일한 경로 또는 상이한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들어, 선택된 조합의 제1 치료제 또는 치료는 주사로 투여될 수 있는 반면, 조합의 다른 치료제 또는 치료는 피하로 투여될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어, 모든 치료제 또는 치료는 피하로 투여될 수 있거나, 모든 치료제 또는 치료는 주사로 투여 될 수 있다. 상기 치료제 또는 치료가 투여되는 순서는 달리 언급되지 않는다면 중요하지 않다.

[0209] 조합 요법은 또한 다른 생물학적 활성 성분과 추가로 조합하여 상기에서 기재된 바와 같은 치료제 또는 치료의 투여를 포함할 수 있다. 상기 조합 요법이 비약물 치료를 포함하는 경우, 상기 비약물 치료는 치료제와 비약물 치료의 조합의 공동 작용으로부터의 유리한 효과가 달성되는 한 임의의 적절한 시간에 수행될 수 있다. 예를 들어, 적절한 경우, 유리한 효과는 비약물 치료가 치료제의 투여로부터 일시적으로, 아마도 수일 또는 심지어 수주까지 제거될 때 여전히 달성된다.

[0210] *약동학적 또는 약력학적 특성* 압타머는 반감기 및/또는 작용 지속 기간과 같은 약동학적 또는 약력학적 특성을 개선시키도록 변형될 수 있다. 본 출원에서 사용되는 "반감기" 또는 "혈장 반감기"라는 용어는, 압타머의 투여량의 절반이 혈류로부터 제거되는 시간의 양을 지칭한다. "작용 지속 기간"은, 압타머가 효과적인 시간의 길이를 지칭한다. 압타머의 작용 지속 기간은 혈장 반감기, 투여 용량, 약제학적 제제, 및 약물 제거에 대한 질환의 영향과 같은 몇몇 파라미터에 좌우될 수 있다 (문헌 [Carruthers SG. *Duration of drug action*. 1980Am Fam Physician. 1980 Feb;21(2):119-26], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로서 포함된다). 스템 영역의 변경 또는 중합체 (예를 들어, PEG)에 대한 압타머의 부착과 같은 압타머의 변형은 반감기 및/또는 작용 지속 기간을 변경시킬 수 있다.

[0211] 일부 실시형태에서, 본 발명의 압타머는 대상체에게 투여된 후 약 20시간 내지 약 40시간, 약 30시간 내지 약 50시간, 약 40시간 내지 약 60시간, 약 50시간 내지 약 70시간, 약 55시간 내지 약 75시간, 약 60시간 내지 약 80시간, 약 70시간 내지 약 85시간, 약 75시간 내지 약 90시간, 약 85시간 내지 약 100시간, 또는 적어도 100시간의 혈장 반감기를 가질 수 있다.

[0212] 일부 실시형태에서, 본 발명의 압타머는 적어도 8시간, 적어도 16시간, 적어도 24시간, 적어도 36시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간, 약 72시간 내지 약 96시간, 약 90시간 내지 120시간, 약 110시간 내지 약 135시간, 약 120시간 내지 150시간, 약 135시간 내지 168시간, 약 150시간 내지 180시간, 약 180시간 내지 약 210시간, 약 210시간 내지 약 240시간, 약 240시간 내지 300시간, 약 300시간 내지 360시간, 또는 적어도 360시간의 작용 지속 기간을 가질 수 있다.

[0213] *항응고 및 응고* 일부 실시형태에서, 본 발명의 압타머는 항응고제로서 기능하고/하거나 응고 기능을 변경시키지 않는다. 본 출원에서 사용되는 "항응고제"라는 용어는 혈액의 응고를 예방하거나 감소시켜 응고 시간을 연장시키는 화학 물질을 지칭한다. 혈액의 응고는 본 출원에서 기재된 기술 및 방법 및 당해 분야에 공지된 기술, 예를 들어, 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간 (activated partial thromboplastin time: aPTT) 검정, 프로트롬빈 시간 (prothrombin time: PT) 시험, 트롬빈 시간 시험, 피브리노겐 시험, 항-인자 Xa 검정, 회전 혈전 탄성측정법 및 트롬빈 생성 검정 (예를 들어, 보정된 자동화 혈전도)을 통해 검정될 수 있다.

[0214] 일부 실시형태에서, 본 발명의 압타머는 응고 시간을 연장시키지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 압타머는 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간을 연장시키지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 압타머는 프로트롬빈 시간을 연장시키지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 압타머는 트롬빈 시간을 연장시키지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 압타머는 피브리노겐 농도를 변경시키지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 발명의

압타머는 트롬빈 생성을 변경시키지 않는다.

[0215] **IV. 제형, 용량 및 투여**

[0216] 약제학적 조성물 및 제형

[0217] 본 발명의 약제학적 조성물은 활성 성분으로서 적어도 1종의 VWF 보호제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 내용으로 적합하며, 유효량의 본 발명의 약리학적 활성 화합물을 단독으로 또는 1종 이상의 약제학적으로 허용되는 담체와 조합하여 포함한다. 상기 화합물은 임의의 독성이 있는 경우 매우 낮다는 점에서 특히 유용하다.

[0218] 본 발명의 약제학적 조성물, 특히, 핵산 기반 조성물에 적합할 수 있는 제형은 국제공개공보 WO 2013/090648 (국제출원 PCT/US2012/069610)에 교시되어 있으며, 이 특허의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다.

[0219] 상기 제형은 임의의 양의 본 발명의 압타머 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. 본 출원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 염"이란 용어는, 사용 조건하에 무독성이고 안정한 제형과 상용 가능한 반대 이온으로 제조된 활성 화합물의 염 형태를 지칭한다. 압타머의 약제학적으로 허용되는 염의 예로는 나트륨 염, 하이드로클로라이드, 설페이트, 포스페이트, 아세테이트, 푸마레이트, 말레에이트 및 타르트레이트가 포함된다. 상기 제형은 폴리펩타이드의 전체 길이 또는 이의 변이체 또는 단편에 결합하는 임의의 압타머 또는 압타머의 조합을 포함할 수 있다. 상기 폴리펩타이드는 임의의 종으로부터 유래될 수 있지만, 바람직하게는 사람으로부터 유래된다.

[0220] 상기 제형은 또한 약제학적으로 허용되는 용매를 포함한다. 본 출원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 용매"라는 용어는, 제형의 다른 성분과 상용가능하고 이의 수용자에게 유해하지 않은 것을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 용매는 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 약제학적으로 허용되는 용매의 예는, 예를 들어, 문헌 [Goodman and Gillmans, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 최신판]에서 발견될 수 있으며, 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로서 포함된다. 바람직하게는, 상기 약제학적으로 허용되는 용매는 0.9% 식염수 (생리 식염수 또는 멸균 등장 식염수 용액으로도 또한 공지됨) 또는 포스페이트 완충 식염수로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 상기 약제학적으로 허용되는 용매는 0.9% 식염수이다.

[0221] 상기 제형은 임의의 양의 약제학적으로 허용되는 용매를 포함할 수 있다.

[0222] 상기 제형의 다양한 실시형태는 임의로 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 완충액, pH 조절제, 등장화제, 공용매 또는 약제학적으로 허용되는 담체.

[0223] 일부 실시형태에서, 상기 제형은 완충액을 추가로 포함할 수 있다. 완충제는 용액에 첨가될 때 용액의 산도 또는 알칼리도를 눈에 띄게 변화시키지 않으면서 산과 염기 둘 다를 중화시킬 수 있는 임의의 물질이다. 완충제의 예로는 아세테이트, 글루타메이트, 시트레이트, 타르트레이트, 벤조에이트, 락테이트, 히스티딘 또는 다른 아미노산, 글루코네이트, 포스페이트, 말레이트, 석시네이트, 포르메이트, 프로피오네이트 및 카보네이트의 약제학적으로 허용되는 염 및 산이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0224] 일부 실시형태에서, 상기 제형은 pH 조정제를 추가로 포함할 수 있다. pH 조정제는 상기 제형의 pH를 조정하는데 사용된다. 적합한 pH 조절제는 전형적으로 적어도 산 또는 이의 염 및/또는 염기 또는 이의 염을 포함한다. 목적하는 pH를 달성하기 위해서는 필요에 따라 산 및 염기를 첨가할 수 있다. 예를 들어, 상기 pH가 목적하는 pH보다 큰 경우, 산을 사용하여 상기 pH를 목적하는 pH로 낮출 수 있다. 산의 예로는 염산, 인산, 시트르산, 아스코르브산, 아세트산, 황산, 탄산 및 질산이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 또 다른 예로서, 상기 pH가 목적하는 pH보다 작은 경우, 염기를 사용하여 상기 pH를 목적하는 pH로 조정할 수 있다. 염기의 예로는 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 칼슘, 탄산 나트륨, 시트르산 나트륨, 아세트산 나트륨 및 수산화 마그네슘이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0225] 일부 실시형태에서, 상기 제형은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다. 등장화제는 혈액 또는 혈장과 같은 체액의 삼투압에 더 가깝게 하기 위해 상기 제형의 삼투압을 조정하는데 사용된다. 등장화제의 예로는 무수 또는 수화 형태의 염화 나트륨, 덱스트로오스, 수크로오스, 자일리톨, 프럭토오스, 글리세롤, 소르비톨, 만니톨, 염화 칼륨, 만노오스, 염화 칼슘, 염화 마그네슘 및 기타 무기 염이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0226] 일부 실시형태에서, 상기 제형은 공용매를 추가로 포함할 수 있다. 공용매는 물보다 적은 중량으로 수성 제형에 첨가되고 압타머의 가용화를 보조하는 용매이다. 공용매의 예로는 글리콜, 에탄올 및 다가 알코올이 포함되

지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0227] 일부 실시형태에서, 상기 제형은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 출원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"라는 용어는, 제형의 다른 성분과 상용가능하고 이의 수용자에게 유해하지 않은 것을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 담체는 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예는, 예를 들어, 문헌 [Goodman and Gillmans, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 최신판]에서 발견될 수 있다.

[0228] 본 출원에서 기재된 제형은 안정하다. 본 출원에서 사용되는 "안정한"이라는 용어는 환자에게 투여하기에 적합한 상태 또는 조건으로 유지되는 것을 의미한다.

[0229] 상기 제형은 바람직하게는 실질적으로 순수하다. 본 출원에서 사용되는 "실질적으로 순수한"은, 활성 성분 (압타머)이 존재하는 우세한 종이고 (즉, 몰 기준으로, 조성물에서 어떠한 다른 개별 종보다 풍부함), 바람직하게는 실질적으로 정제된 분획이 활성 성분이 존재하는 모든 거대 분자 종의 적어도 약 50% (몰 기준)를 포함하는 조성물이다는 것을 의미한다. 일반적으로, 실질적으로 순수한 조성물은 조성물 중에 존재하는 모든 거대 분자 종의 80% 초과, 보다 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 99% 이상을 포함할 것이다. 가장 바람직하게는, 활성 성분은 본질적으로 균질하게 정제되며 (오염물 종은 통상적인 검출 방법에 의해 조성물 중에서 검출될 수 없음), 여기서, 상기 조성물은 본질적으로 단일 거대 분자 종으로 이루어진다.

[0230] 용량

[0231] 본 발명에 따른 조성물은 전형적으로 투여의 용이성 및 투약량의 균일성을 위해 투약 단위 형태로 제형화된다. 그러나, 본 발명의 조성물의 1일 총 사용량은 주치의에 의해 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 결정될 수 있다. 임의의 특정 환자에 대한 구체적인 치료학적 유효, 예방학적 유효 또는 적절한 영상 용량 수준은, 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 사용되는 특정 화합물의 활성; 사용되는 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 전반적인 건강, 성별 및 식이; 투여 시간, 투여 경로 및 사용되는 특정 화합물의 배출 속도; 치료 기간; 사용되는 특정 화합물과 조합하여 또는 동시에 사용되는 약물; 의학 분야에 널리 공지된 유사 요인들을 비롯하여 다양한 요인들에 따라 달라질 것이다.

[0232] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 조성물은 목적하는 치료, 진단, 예방 또는 영상 효과를 수득하기 위해 하루에 1회 이상 하루에 대상체 체중의 약 0.0001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.05 mg/kg, 약 0.005 mg/kg 내지 약 0.05 mg/kg, 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.005 mg/kg, 약 0.05 mg/kg 내지 약 0.5 mg/kg, 약 0.01 mg/ml 내지 약 0.5 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 25 mg/kg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여될 수 있다. 목적하는 투약량은 하루에 3회, 하루에 2회, 하루에 1회, 격일로, 3일마다, 매주, 2주마다, 3주마다 또는 4주마다 전달될 수 있다. 특정 실시형태에서, 목적하는 투약량은 다중 투여 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 그 이상의 투여)를 사용하여 전달될 수 있다.

[0233] 일부 실시형태에서, 압타머의 총 용량은, 90%의 최대 반응을 일으키는 약물의 농도인 적어도 EC_{90}과 동일한 정상 상태의 혈액 농도를 달성한 후에 유지하도록 투여된다. 대안적으로, 압타머의 총 용량은, 80%의 최대 반응을 일으키는 약물의 농도인 적어도 EC_{80}과 동일한 정상 상태의 혈액 농도를 달성한 후에 유지하도록 투여된다.

[0234] 총 용량은 단일 용량, 다중 용량, 반복 용량, 연속 용량 또는 이들의 조합으로 투여될 수 있다.

[0235] 하나의 예에서, 상기 제형은 부하 용량, 유지 용량 및 테이퍼 용량 (tapered dose)으로 투여된다.

[0236] 화합물을 사용하는 투약 요법은 환자의 유형, 인종, 연령, 체중, 성별 및 의학적 병태; 치료되는 병태의 중증도; 투여 경로; 환자의 신장 및 간 기능; 및 사용되는 특정 화합물 또는 이의 염을 비롯하여 다양한 요인들에 따라 선택된다. 통상의 숙련된 의사 또는 수의사라면 해당 병태의 진행을 예방, 대응 또는 정지시키는데 필요한 약물의 유효량을 용이하게 결정하여 처방할 수 있다.

[0237] 명시된 효과에 사용될 때, 본 발명의 경구 투약량은 경구로 약 0.05 내지 1000 mg/일의 범위일 것 이다. 상기 조성물은 바람직하게는 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0 및 1000.0 mg의 활성 성분을 함유하는 할선 정제의 형태로 제공된다. 본 발명의 화합물의 효과적인 혈장 수준은 하루에 체중 kg 당 0.002 mg 내지 50 mg의 범위이다.

[0238] 본 발명의 화합물은 하루에 단일 일일 용량으로 투여될 수 있거나, 총 1일 투약량은 하루에 2, 3 또는 4회의 분할 분할 용량으로 투여될 수 있다.

[0239] 본 출원에서 기재된 제형 및 투약량은 VAD-매개성 질환 및 VWF 다량체와 적혈구의 상호 작용, 예를 들어, 겸상 적혈구 병에서 VWF 다량체와 적혈구 사이에서 발생하는 상호 작용으로 인한 장애의 치료 뿐만 아니라, 혈관 내강의 폐쇄 동안 및/또는 매우 높은 전단 속도 (10,000 s^{-1} 이상)하에 발생하는 폐쇄성 혈전의 형성 동안 VWF 단량체 또는 다량체와 혈소판의 상호 작용으로 인한 질병 및 장애 (예를 들어, 급성 관상 동맥 증후군, 급성 폐쇄성 혈전증 및 허혈성 뇌졸중과 같은 장애)의 치료에서 임상 효능을 극대화하면서 해독제에 대한 필요 없이도 불리한 부작용을 동시에 감소시키거나 최소화하도록 디자인된다.

[0240] 투여

[0241] 본 출원에 기재된 약제학적 조성물은, 예를 들면, 국소, 비강내, 기관내 또는 주사 가능한 (예를 들면, 정맥내, 안구내, 유리체내, 근육내, 심장내, 복강내, 피하) 본원에 기재된 복용형으로 제형화될 수 있다.

[0242] 본 출원에서 제공된 압타머 제형은 허혈성 뇌졸중과 같은 혈전 장애, 심실 보조 장치와 관련된 질환 또는 장애, 및 VWF 다량체와 적혈구의 상호 작용, 예를 들어, 겸상 적혈구 병에서 VWF 다량체와 적혈구 사이에서 발생하는 상호 작용으로 인한 장애를 예방, 개선 또는 치료하기에 효과적인 양으로 대상체, 바람직하게는 사람 대상체에게 투여된다.

[0243] 정제 또는 캡슐 (예를 들어, 젤라틴 캡슐) 형태의 경구 투여의 경우, 활성 약물 구성성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구용 무독성의 약제학적으로 허용되는 불활성 담체와 조합될 수 있다. 더욱이, 목적하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 착색제를 혼합물에 혼입시킬 수 있다. 적합한 결합제로는 전분, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스 및/또는 폴리비닐피롤리돈, 천연 당류, 예를 들어, 글루코오스 또는 베타-락토오스, 옥수수 감미료, 천연 및 합성 검, 예를 들어, 아카시아, 트라가칸트 또는 알긴산 나트륨, 폴리에틸렌 글리콜, 왁스 등이 포함된다. 이들 투약 형태에 사용되는 윤활제로는 올레산 나트륨, 스테아르산 나트륨, 스테아르산 마그네슘, 벤조산 나트륨, 아세트산 나트륨, 염화 나트륨, 실리카, 탈크, 스테아르산, 이의 마그네슘 또는 칼슘 염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜 등이 포함된다. 붕해제로는 전분, 메틸 셀룰로오스, 한천, 벤토나이트, 크산탄 검, 전분, 한천, 알긴산 또는 이의 나트륨 염 또는 발포성 혼합물 등이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 희석제로는, 예를 들어, 락토오스, 덱스트로오스, 수 크로오스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로오스 및/또는 글리신이 포함된다.

[0244] 본 발명의 화합물은 또한 정시 방출 및 지효성 정제 또는 캡슐, 환제, 분말, 과립,, 엘릭시르, 팅크제, 현탁액, 시럽 및 유화액과 같은 경구 투약 형태로 투여될 수 있다.

[0245] 주사용 조성물은 바람직하게는 등장성 수용액 또는 현탁액이며, 좌약은 유리하게는 지방 유화액 또는 현탁액으로부터 제조된다. 상기 조성물은 멸균될 수 있고/있거나, 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용해 촉진제, 삼투압 조절용 염 및/또는 완충제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 또한, 이들은 치료학적으로 유용한 다른 물질을 함유할 수도 있다. 상기 조성물은 각각 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제조되며, 약 0.1 내지 75%, 바람직하게는 약 1 내지 50%의 활성 성분을 함유한다.

[0246] 액체, 특히, 주사용 조성물은, 예를 들어, 용해, 분산 등에 의해 제조될 수 있다. 활성 화합물은, 예를 들어, 물, 식염수, 수성 덱스트로오스, 글리세롤, 에탄올 등과 같은 약제학적으로 순수한 용매 중에 용해되거나 이와 혼합되어 주사용 용액 또는 현탁액을 형성한다. 또한, 주사 전에 액체 중에 용해시키기에 적합한 고체 형태가 제형화될 수 있다. 주사용 조성물은 바람직하게는 등장성 수용액 또는 현탁액이다. 상기 조성물은 멸균될 수 있고/있거나, 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용해 촉진제, 삼투압 조절용 염 및/또는 완충제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 또한, 이들은 치료학적으로 유용한 다른 물질을 함유할 수도 있다.

[0247] 또한, 본 발명의 화합물은 정맥내 (볼루스와 주입 둘 다), 복강내, 피하 또는 근육내 형태로 투여할 수 있으며, 사용되는 모든 제형은 제약 분야의 통상의 기술자들에게 잘 공지되어 있다. 주사제는 액체 용액 또는 현탁액으로서 통상적인 형태로 제조될 수 있다. 특히, 본 발명의 물질은 하기에서 기재된 방법에 의해 안강으로 전달될 수 있다. 또한, 본 발명의 물질은 하기에서 기재된 바와 같이 당해 분야에 공지된 방식으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0248] 비경구 주사 투여는 일반적으로 피하, 근육내 또는 정맥내 주사 및 주입에 사용된다. 또한, 비경구 투여를 위한 하나의 접근법은, 본 출원에 참조로 포함되는 미국 특허 3,710,795에 따라, 일정 수준의 투약량이 유지되도

록 보장하는 서방성 또는 지효성 시스템의 이식을 사용한다.

[0249] 또한, 본 발명에 바람직한 화합물은 적합한 비강내 비히클의 국소적 사용을 통해 비강내 형태로 투여되거나, 당해 분야의 통상의 기술자들에게 잘 공지된 경피 피부 패치를 사용하여 경피 경로를 통해 투여될 수 있다. 경피 전달 시스템의 형태로 투여되는 경우, 투약량 투여는 물론 투약 용법 전체에 걸쳐 간헐적이기 보다는 지속적일 것이다. 바람직한 기타 국소 제제로는 크림, 연고, 로션, 에어로졸 스프레이 및 겔이 포함되며, 여기서, 활성 성분의 농도는 0.1% 내지 15% w/w 또는 w/v의 범위일 것이다.

[0250] 고체 조성물의 경우, 약제학적 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 스테아르산 마그네슘, 나트륨 사카린, 탈크, 셀룰로오스, 글루코오스, 수크로오스, 탄산 마그네슘 등을 포함하는 부형제가 사용될 수 있다. 상기에서 정의된 활성 화합물은 또한 담체로서, 예를 들어, 폴리알킬렌 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜을 사용하여 좌약으로 제형화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 좌약은 유리하게는 지방 유화액 또는 현탁액으로부터 제조된다.

[0251] 또한, 본 발명의 화합물은 또한 소형 단일막 소포체, 대형 단일막 소포체 및 다중막 소포체와 같은 리포솜 전달 시스템의 형태로 투여될 수 있다. 리포솜은 콜레스테롤, 스테아릴아민 또는 포스파티딜콜린을 비롯한 다양한 인지질로부터 형성될 수 있다.

[0252] 또한, 본 발명의 화합물은 또한 표적화 가능한 약물 담체로서 가용성 중합체와 커플링될 수 있다. 이러한 중합체는 폴리비닐피롤리돈, 피란 공중합체, 폴리하이드록시프로필-메타크릴아미드-페놀, 폴리하이드록시에틸아스판아미드페놀, 또는 팔미토일 잔기로 치환된 폴리에틸렌옥사이드폴리리신을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 약물의 방출 제어를 달성하는데 유용한 생분해성 중합체 부류, 예를 들어, 폴리락트산, 폴리엡실론 카프로락톤, 폴리하이드록시 부티르산, 폴리오르토에스테르, 폴리아세탈, 폴리디하이드로피란, 폴리시아노아크릴레이트, 및 하이드로겔의 가교성 또는 양친매성 블록 공중합체와 커플링될 수 있다.

[0253] 목적하는 경우, 투여되는 약제학적 조성물은 또한 소량의 무독성 보조 물질, 예를 들어, 습윤제 또는 유화제, pH 완충제 및 다른 물질, 예를 들어, 아세트산 나트륨, 트리에탄올아민 올레에이트 등을 함유할 수 있다.

[0254] 상기 제형은 다른 약물 또는 요법과 조합하여 투여될 수 있다.

[0255] 생체 이용률

[0256] 본 출원에서 사용되는 "생체 이용률"은 대상체에게 투여되는 주어진 양의 VWF 보호제의 전신 유효성을 지칭한다. 생체 이용률은 대상체에 대한 화합물의 투여 후 변경되지 않은 형태의 화합물의 곡선하 면적 (area under the curve: AUC) 또는 최대 혈청 또는 혈장 농도 ($C_{최대}$)를 측정함으로써 평가될 수 있다. AUC는 가로 좌표 (X축)에 따른 시간에 대한 세로 좌표 (Y축)에 따른 화합물의 혈청 또는 혈장 농도를 플롯팅하는 곡선하 면적의 측정이다. 일반적으로, 특정 화합물에 대한 AUC는 당해 분야의 통상의 기술자들에게 공지된 방법을 사용하여 계산될 수 있고, 문헌 [G. S. Banker, *Modern Pharmaceutics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v. 72*, Marcel Dekker, New York, Inc., 1996]에 기재되어 있으며, 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다. 상기 $C_{최대}$ 값은 대상체에 대한 화합물의 투여 후 대상체의 혈청 또는 혈장에서 달성되는 화합물의 최대 농도이다. 특정 화합물의 $C_{최대}$ 값은 당해 분야의 통상의 기술자들에게 공지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0257] 일부 실시형태에서, 본 발명의 VWF 보호제는 생체 이용률을 증가시키기 위해 본 출원에서 기재된 바와 같은 전달/제형화 제제 또는 비히클과 함께 조성물로 제형된다. 본 출원에서 사용되는 "생체 이용률을 증가시키는" 또는 "약동학을 개선시키는"이라는 문구는, 대상체에서 AUC, $C_{최대}$ 또는 $C_{최소}$로서 측정된 VWF 보호제의 전신 유효성이 공동 투여가 발생하지 않을 때 보다 본 출원에서 기재된 바와 같은 전달제와 공동 투여될 때 더 크다는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 상기 VWF 보호제의 생체 이용률은 적어도 약 2%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 약 100%까지 증가할 수 있다.

[0258] **V. 키트, 장치 및 포장**

[0259] 키트 및 장치

[0260] 본 발명의 VWF 보호제 화합물 및 조성물은 다른 성분 또는 시약과 조합되거나 상업적 판매 또는 유통을 위한 키트 또는 다른 소매 제품의 구성성분으로서 제조될 수 있다.

[0261] 상기 키트는 키트의 투여 및/또는 사용에 관한 설명서와 함께 화합물 또는 조성물을 포함할 것이다. 상기 키트는 또한 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 주사기, 정맥내 주사용 백 또는 병, 상이한 투약 형태의 동일 약물, 또는 또 다른 약물. 예를 들어, 상기 키트는 본 발명의 정맥내 주사용 제형과 피하 주사용 제형 둘 다를 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기 키트는 동결 건조된 항트롬빈 압타머 및 정맥내 주사용 용액 백을 포함할 수 있다. 키트 형태는, 별도의 구성성분이 상이한 투약 형태 (즉, 비경구 및 경구)로 투여되어야 하거나 상이한 투약 간격으로 투여될 때, 특히 유리하다.

[0262] 바람직하게는, 상기 키트는 5 ± 3℃에서 보관된다. 상기 키트는 또한 실온에서 보관되거나, -20℃에서 냉동될 수 있다.

[0263] VWF 보호제인 본 발명의 조성물은 1종 이상의 치료 장치와 함께 사용될 수 있다. 이러한 장치는 혈관 보조 장치 (VAD), 스텐트, 또는, 예를 들어, 조직 또는 장기로의 혈류와 관련된 혈역학적 흐름의 조절 또는 관리에 유용한 임의의 장치를 포함한다. 상기 VWF 보호제는 고체 표면상의 코팅물로서 사용되거나, 약제학적 조성물이 혈역학적 흐름의 조절 또는 관리에서 사용되는 장치의 사용 이전, 동안 또는 이후에 고체 또는 액체 형태로 첨가되는 보조 요법으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, VWF 압타머는 이식, 혈관 성형술 및 스텐트 삽입과 같은 수술 과정 동안, 또는 이식된 내부 VAD 또는 LVAD 장치를 갖는 환자와 같은 장기 치료 동안 혈액 또는 혈장 흐름에 첨가되도록 제형화될 수 있다.

[0264] 포장

[0265] 본 발명의 VWF 보호제의 제형 및/또는 조성물은 임의의 약제학적으로 허용되는 용기 마개를 사용하는 다양한 약제학적으로 허용되는 용기에서 사용하기 위해 포장될 수 있는데, 이는 상기 제형이 PVC 함유 및 PVC 무함유 용기 및 용기 마개와 상용 가능하기 때문이다. 약제학적으로 허용되는 용기의 예로는 앰풀, 미리 충전된 주사기, 정맥내 주사용 백, 정맥내 주사용 병 및 혼합 백이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 제형은 항트롬빈 압타머와 약제학적으로 허용되는 용매 둘 다를 함유하는 수성 제형일 수 있다.

[0266] 대안적으로, 상기 제형은, 2개의 구획이 환자에 대한 투여 전에 함께 혼합될 수 있도록, 혼합 백의 하나의 구획에 동결 건조된 압타머를 함유하고 혼합 백의 다른 구획에 약제학적으로 허용되는 용매를 함유할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 용기는 당해 분야에 잘 공지되어 있으며, 시판되고 있다. 바람직하게는, 상기 제형은 부틸 고무 마개가 있는 1형 유리 바이알에 보관된다. 액체 형태의 제형은 냉장 환경에서 보관되어야 한다. 바람직하게는, 상기 액체 제형은 2~8℃에서 보관된다. 대안적으로, 상기 동결 건조된 제형은 실온에서 보관되거나, 냉장 또는 냉동될 수 있다.

[0267] 바람직하게는, 상기 제형은 무균성이다. 본 출원에서 사용되는 "멸균" 제형은 멸균 상태로 되고 이후 미생물 오염에 노출되지 않은 제형, 즉, 멸균 조성물을 담는 용기가 손상되지 않은 제형을 의미한다. 멸균 조성물은 일반적으로 미국 식품 의약국의 현행 현행 우수 제조 관리기준 (current Good Manufacturing Practice: "cGMP") 규정에 따라 제약 제조업자에 의해 제조된다.

[0268] 약제학적으로 허용되는 용기에 약제학적 제형을 충전하는 절차 및 이의 후속 공정은 당해 분야에 공지되어 있다. 이러한 절차는 종종 건강 관리에 필요한 멸균 약제학적 의약품을 생산하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM), "Guidance for Industry for the Submission Documentation for Sterilization Process Validation in Applications for Human and Veterinary Drug Products" (November 1994)]을 참조한다. 멸균 약제학적 의약품을 제조하기 위한 적합한 절차의 예로는 종말 습열 살균, 에틸렌 옥사이드, 방사선 (즉, 감마 및 전자 빔) 및 무균 처리 기술이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 이러한 멸균 절차 중 임의의 하나는 본 출원에서 기재된 멸균 약제학적 제형을 제조하는데 사용될 수 있다.

[0269] 일부 실시형태에서, 멸균 약제학적 제형은 무균 처리 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 무균성은 멸균 물질 및 통제된 작업 환경을 사용하여 유지된다. 모든 용기 및 장치는 충전 전에 바람직하게는 가열 살균에 의해 멸균된다. 이어서, 상기 용기는 필터를 통해 조성물을 통과시키고 유닛을 충전시키는 것과 같은 무균 조건하에 충전된다. 따라서, 상기 제형은 용기 내에 멸균 충전되어 종말 살균의 열 스트레스를 피할 수 있다.

[0270] 일부 실시형태에서, 상기 제형은 습열을 사용하여 종말 살균된다. 종말 살균은 약제학적 제형을 함유하는 최종 밀봉 용기 내에서 모든 생존 미생물을 파괴하는데 사용될 수 있다. 오토클레이브는 전형적으로 최종 포장에서 의약품의 종말 가열 살균을 달성하는데 사용된다. 최종 제품의 종말 살균을 달성하기 위한 제약 산업에서의 전형적인 오토클레이브 주기는 121℃에서 적어도 10분 동안이다.

[0271] **등가물 및 범위**

[0272] 통상의 기술자는 본원에 기재된 본 발명에 따른 특정 실시형태에 대한 다수의 등가물을 통상적인 실험을 사용하여 인식하거나 확인할 수 있다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명에 한정되는 것으로 의도되지 않고 첨부된 특허청구범위에서 설명된 바와 같다.

[0273] 특허청구범위에서, 단수 및 "상기"와 같은 표현은 달리 반대로 명시되거나 달리 문맥으로부터 명백하지 않다면 하나 이상을 의미한다. 그룹의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는" 을 포함하는 특허청구범위 또는 상세한 설명은 그룹 구성원의 1개, 1개 이상 또는 모두가 존재하거나 사용되거나 달리 주어진 물건 또는 방법과 관련되지 않거나 달리 이와 반대로 명시되지 않거나 달리 문맥으로부터 명백하지 않다면, 만족스로운 것으로 간주된다. 본 발명은 그룹의 정확히 하나의 구성원이 존재하거나 사용되거나 달리 주어진 물건 또는 방법과 관련되지 않는 실시형태를 포함한다. 본 발명은 그룹의 정확히 하나 이상 또는 모든 구성원이 존재하거나 사용되거나 달리 주어진 물건 또는 방법과 관련되지 않는 실시형태를 포함한다.

[0274] "포함하는"이라는 용어는 개방적인 것으로 의도되며, 추가의 요소 또는 단계의 포함을 허용하지만 이를 필요로 하지 않는다는 것에 또한 유의한다. 따라서, "포함하는"이라는 용어가 본 출원에서 사용될 때, "~로 이루어진"이라는 용어도 또한 포함되고 개시된다.

[0275] 범위가 주어지는 경우, 종점은 포함된다. 더욱이, 달리 명시되지 않거나 달리 문맥 및 통상의 기술자의 이해로부터 명백하지 않다면, 범위로서 표현된 수치는 본 발명의 다양한 실시형태에서 명시된 범위 내의 임의의 특정 수치 또는 하위 범위를 달리 문맥에 의해 명백히 지시되지 않는다면 범위의 하한 유닛의 10배까지 상정한다.

[0276] "약"이라는 용어가 사용되는 경우, 인용된 값의 +/- 10%를 반영하는 것으로 이해된다.

[0277] 또한, 종래 기술 내에 속하는 본 발명의 임의의 특정 실시형태는 임의의 하나 이상의 특허청구범위로부터 명시적으로 배제될 수 있는 것으로 이해된다. 이러한 실시형태는 통상의 기술자에게 알려져 있는 것으로 간주되기 때문에, 배제가 본원에서 명시적으로 설명되지 않을 지라도, 이들은 배제될 수 있다. 본 발명의 조성물의 임의의 특정 실시형태 (예를 들어, 임의의 핵산; 임의의 제조 방법; 임의의 사용 방법 등) 는, 종개 기술의 존재에 관련되든지 관련되지 않든지간에, 임의의 하나 이상의 청구항로부터 배제될 수 있다.

[0278] 모든 인용된 출처, 예를 들면, 참조문헌, 공보, 데이터베이스, 데이터베이스 항목, 및 본원에 인용된 종래 기술은 비록 인용에서 명백히 진술되지 않더라도 본 출원에 인용된다. 인용된 출처와 본 출원이 진술이 상충하는 경우, 본 출원의 진술이 통제할 것이다.

[0279] 섹션 및 표 제목은 제한적인 것으로 의도되지 않는다.

[0280] **실시예**

[0281] **실시예 1. 핵산 압타머의 제조**

[0282] 표준 포스포르아미다이트 고상 화학을 사용하여 핵산 압타머를 AKTA Oligopilot (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)상에서 합성하였다. 포스포르아미다이트를 Hongene Biotechnology Limited (Shanghai, P.R. China)로부터 구입하였다. BT-100 (서열 번호 2)을 6개의 탄소-링커를 통해 5'-말단에 부착된 유리 아민기로 합성하였다.

[0283] BT-200 (서열 번호 3)을 제조하기 위해, 10 m/mL의 농도에서 100 mM 중탄산 나트륨 완충액 (pH 8.0) 중에 용해시키기 전에, BT-100을 먼저 음이온-교환 및 한외 여과를 통해 정제하였다. 이어서, 정제된 BT-100을 NHS 활성화된 분지된 40K-PEG (카탈로그 번호 Y-NHS-40K, JenKem Technology USA Inc., Plano, TX)와 1:2의 BT-100 대 NHS 활성화된 분지된 40K-PEG의 몰비로 혼합하였다. 반응을 실온에서 밤새 진행하였다. 이어서, 생성물을 음이온 교환 및 한외 여과를 통해 정제하여 비공액된 40K-PEG 및 BT-100을 제거하고, BT-200을 수득하였다.

[0284] ARC15105 (PEG화) (서열 번호 6)는 문헌 [Siller-Matula JM, Merhi Y, Tanguay JF et al. *ARC15105 Is a Potent Antagonist of Von Willebrand Factor Mediated Platelet Activation and Adhesion*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2012; 32(4):902-909]에서 이전에 기재된 바와 같이 제조되었으며, 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다.

[0285] 합성된 BT-100 또는 BT-200은 수성계 완충 용액 중에 용해될 때 자연스럽게 스템-루프 구조 (도 1에 도시된 바와 같음)를 형성하는 것으로 예측되었다. 이것은 Mfold와 같은 몇몇 2차 구조 예측 모델에 의해 확인되었다.

[0286] **실시예 2. 혈관 보조 장치 (VAD) 회로 분석: VWF 다량체**

[0287] 사람 자원 공혈자들의 혈액을 2개의 분취량으로 나누어서, 대상체간 비교를 가능하게 하는 2개의 체외 회로를 병렬로 실행할 수 있다. 대상체간 비교 이외.

[0288] 좌심실 보조 장치 (HEARTWARE®), 및 혈액 주입구 및 배출구가 있는 실리콘 튜브를 사용하여 시험관내 체외 회로를 확립하였다. 펌프 속도를 분 당 1800 내지 3500회 (rpm)에서 다르게 하였으며, 순환 혈액 부피를 사람에 대한 정상적인 생리적 환경에 상응하도록 분 당 대략 5리터로 조정하였다. 항응고된 혈액을 체외 회로에서 1~4시간 동안 순환시켰다.

[0289] 병렬 LVAD 회로를 2시간 동안 실행시키고, 각각의 회로로부터 최소한 2개의 샘플을 사용하였다 (기준선, 이어서 2시간). 회로를 37℃에서 실행시켰다. 데이터는 도 3 에 도시되어 있다.

[0290] 폰 빌레브란트 인자 다량체를 이전에 기재된 바와 같이 분석하였다 (문헌 [Jilma-Stohlawetz P, et al., *The anti-von Willebrand factor aptamer ARC1779 increases von Willebrand factor levels and platelet counts in patients with type 2B von Willebrand disease.* Thromb Haemost. 2012 Aug;108(2):284-90], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다).

[0291] 나트륨 도데실 설페이트-아가로오스 불연속 겔 (1.2%) 전기 영동, 이어서 웨스턴-블롯팅 및 발광 이미지 분석기 (LAS-3000, Raytest GmbH, Berlin, Germany)에 의한 결과적 정량화에 의해 VWF 다량체의 정량화를 수행하였다 (문헌 [Reiter RA, et al., *Changes in ADAMTS13 (von-Willebrand-factor-cleaving protease) activity after induced release of von Willebrand factor during acute systemic inflammation.* Thromb Haemost. 2005 Mar;93(3):554-8], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다).

[0292] AIDA Image Analyzer 소프트웨어 버전 4.11을 사용하여 최종 분석을 수행하였다.

[0293] 도면에서, 레인 1 및 10은 정상 혈장이다 (George King Bio-Medical Inc.).

[0294] 겔의 밀도 분석에 의하면, 육량체에 의한 감소는 24.9 유닛에서 5.3 또는 3.3 유닛으로, 즉, 전체 87%의 감소에 상응하는 것으로 나타났다.

[0295] BT-100 (비페길화)과 ARC15105 (페길화 분자) 사이의 직접 비교에서, 겔 밀도는 기준선과 비교하여 ARC15105 (페길화)하에 23에서 5로 (78%; 레인 9와 8을 비교함), BT-100에 의해 12.6에서 11.5로 (8%; 레인 7과 6을 비교함) 감소하였는데, 이는 BT-100이 고분자량 다량체 구조의 92%를 보존할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0296] 두 번째 자원자에서, 젤에 대한 밀도는 기준선과 비교하여 ARC15105 (페길화)에 의해 10.0에서 3.6로 (64%; 레인 5와 4를 비교함), BT-100에 의해 13.8에서 10.8로 (22%; 레인 3과 2를 비교함) 감소하였다. 이들 데이터로부터, BT-100이 HMW (고분자량) VWF 종류의 손실을 둔화시킬 수 있다는 것은 명백하다.

[0297] 요약

[0298] 생체외 체외 회로는 좌심실 보조 장치 (LVAD) 및 VWF 결핍 증후군이 있는 환자에서 BT-100의 잠재적 치료 역할에 대한 개념 증명을 확립하였다. 체외 회로에서 혈액의 순환은 VWF:RCo의 급격한 감소를 유도하며, VWF의 고분자량 다량체를 감소시켰는데, 이는 LVAD가 사람에게 이식될 때 발생하는 병리생리학적 이벤트와 유사하다.

[0299] 최대 14~15량체가 겔에서 보였으며, 이는 높은 전단 응력에 의해 최대한 6~7량체에서 8량체까지 감소하였다. 고분자량 다량체에서의 이러한 손실은 BT-100에 의해 유의미하게 둔화되었지만, ARC15105의 등몰 농도는 다량체에서 최대 손실을 감소시키지 않았다.

[0300] **실시예 3. 폰 빌레브란트 리스토세틴 보조인자 [vWF:RCo] 검정**

[0301] 폰 빌레브란트 리스토세틴 보조인자 [vWF:RCo] 검정은 항생제 리스토세틴의 존재하에 혈소판을 응집시키는 환자의 혈장의 능력을 측정한다. 리스토세틴 유도된 응집의 속도는 혈장 폰 빌레브란트 인자의 농도 및 기능성 활성도와 관련되어 있다.

[0302] VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo; 1차 종점)의 혈장 활성을 탁도 측정법에 의해 37ºC에서 분석하였다.

[0303] 활성화 시약 리스토세틴의 첨가 약 37분 전에 37ºC에서 혈장을 BT-100 또는 ARC15105 (페길화)와 함께 예비 인큐베이션하였다. 검정을 수행하였다 (BC 폰 빌레브란트 시약; Dade Behring/Siemens, Marburg, Germany) (문헌 [Reiter RA, et al., *Desmopressin antagonizes the in vitro platelet dysfunction induced by*

GPIIb/IIIa inhibitors and aspirin. Blood 2003; 102: 4594-4599], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다).

[0304] 두 번째 실험에서, 차세대 임피던스 응집계 (Multiplate Analyzer; Dynabyte) 상에서 다중 전극 응집 측정법 (multiple electrode aggregometry: MEA)을 사용하여 전혈 응집을 측정하였다 (문헌 [Derhaschnig U, Jilma B. *Assessment of platelets and the endothelium in patients presenting with acute coronary syndromes--is there a future?* Thromb Haemost 2009; 102: 1144-1148], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다).

[0305] 상기 시스템은 테스트 큐벳의 2개의 독립적인 전극 세트 표면 상에서 혈소판의 유착 및 응집으로 인한 전기 임피던스 변화를 검출한다. 응집 곡선하 면적 (AUC)은 환자의 불리한 결과 및 심지어 출혈을 예측할 수 있는 측정 시간 (AU×분) 경과에 따른 응집 반응을 표현한다 (문헌 [Sibbing D, et al., *Antiplatelet effects of clopidogrel and bleeding in patients undergoing coronary stent placement*. J Thromb Haemost 2010; 8: 250-256] 및 [Siller-Matula JM et al., *Cross validation of the Multiple Electrode Aggregometry. A prospective trial in healthy volunteers*. Thromb Haemost 2009; 102: 397-403], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다).

[0306] 혈소판 활성화에서 상이한 수용체/신호 전달 경로 (아라키돈산 [AA], 트롬빈 수용체, ADP 수용체, 콜라겐 수용체, 당단백질 Ib-IX)의 역할의 검출을 가능하게 하는 다수의 특정 멀티플레이트 시험 시약 (ASPItest, COLtest, TRAPtest, ADPtest, RISTOtest)이 이용 가능하다.

[0307] 제조업자에 의해 권장되는 바와 같이 전혈을 히루딘 (200 U/ml, Dynabyte)으로 항응고시키고, 실온 (22℃)에서 30분 동안 보관하였다. 이후, 0.9% NaCl 및 히루딘-항응고된 혈액의 1:2 혼합물을 시험 큐벳에서 37℃에서 3분 동안 교반하였다. 활성화 시약 리스토세틴의 첨가 약 10분 전에 37ºC에서 전혈을 BT-100 또는 ARC15105 (페길화)와 함께 예비 인큐베이션하였다. 이후, 리스토세틴 (0.77 mg/ml)을 첨가하여 샘플을 분리하여 농도-효과 곡선을 확립하였다. 전기 임피던스의 증가를 6분 동안 지속적으로 기록하였다. 2개의 독립적인 측정의 평균값은 응집 트레이스의 AUC로서 표현된다. 상기 MEA 기기는 AUC를 표현하는 다음 2가지 방식을 가능하게 한다: 임의의 응집 유닛 (AU×분)으로서 또는 유닛 (U)으로서. 10 AU×분은 1 U에 상응한다. 제조업자의 현재 권고사항 및 다수의 최근 연구에 따라 AUC를 U 유닛으로 측정하였으며, 기준선 값과 비교하여 상대적 증가 또는 감소로서 혈소판 응집을 표현하였다. 데이터는 표 1 및 2에 제공되어 있다.

[0308] 상기 데이터는 압타머 (BT-100 및 ARC15105 (페 길화))가 폰 빌레브란트 인자 리스토세틴 보조 인자 활성을 억제하였다는 것을 나타낸다. 등몰 농도에서, BT-100은 동맥 차단 전후 시나리오 둘 다에서 VWF:RCo를 억제하는 더 큰 효능을 나타냈다.

표 1

멀티플레이트 분석

[0309]

처리		A	B	C	D
멀티플레이트	**RISTO** 기준선	**RISTO** BT-100 25 nM	**RISTO** BT-100 100 nM	**RISTO** ARC15105 25 nM	**RISTO** ARC15105 100 nM
동맥 차단 전의 샘플 #1 AUC (곡선하 면적)	87	5	2	56	56
동맥 차단 후의 샘플 #1 AUC (곡선하 면적)	105	20	4	56	50

표 2

용량 비교

	대상체 1		대상체 2		대상체 3	
	BT-100	ARC15105	BT-100	ARC15105	BT-100	ARC15105
기준선	87	87	88	88	107	107
25 nM	ND	ND	ND	ND	14	115
50 nM	5	56	4	83	8	101
100 nM	2	50	5	69	4	94
200 nM	ND	ND	2	61	ND	ND

* 데이터는 응집 곡선하 면적을 나타낸다.

[0310]

[0311] 전혈에서 리스토세틴 유도된 혈소판 응집에서, 25~50 nM의 BT-100 농도가 90% 억제를 생성하는 반면, 최대 16배 더 높은 농도의 ARC15105 (페길화)가 90% 억제에 도달하는데 필요하였다 ($p < 0.05$). 놀랍게도, 이러한 데이터는 BT-100이 ARC15105 보다 더 나은 결과를 낸다는 것을 입증한다.

[0312] BT-100과 ARC15105의 비교는 BT-100이 최대 25배 더 강력하고 전체 평균이 10배이다는 것을 나타낸다 (처리 컬럼 A와 C 및 B와 D를 비교함).

[0313] **실시예 4. 혈소판 기능 분석기 (PFA-100)**

[0314] PFA-100 (Dade Behring, Marburg, Germany)을 사용하여 높은 전단 속도 (5,000~6,000s^{-1})하에 혈소판 기능을 측정하였다. 3.8% 시트르산 나트륨 (혈액:시트르산 나트륨 비율 = 9:1)을 함유하는 혈액 수집 튜브에 4.5 mL의 혈액 샘플을 수집하였다. PFA-100은, 폐쇄 시간 (closure time: CT)으로 정의되는, 혈소판 플러그에 의한 구멍 폐색에 필요한 시간을 측정한다. 기기는 모세관 및 막에 절단된 미세한 구멍 (147 μm)을 통해 시료 저장소로부터 일정한 진공하에 혈액 샘플을 흡인하는데, 이는 높은 전단 유도된 혈소판 플러그 형성을 유발한다 (문헌 [Jilma et al. 2001]). 막은 폰 빌레브란트 인자 수준에 매우 민감한 콜라겐/아데노신 디포스페이트 (Ccollagen/adenosine diphosphate: CADP)로 코팅되어 있다. 이것은, 예를 들어, 데스모프레신 또는 내독소에 의해 VWF 방출 뿐만 아니라 VWF의 결함, 항-VWF 압타머에 의한 차단에 적용된다 (문헌 [Jilma B. *Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction.* J Lab Clin Med 2001; 138: 152-163], [Jilma-Stohlawetz et al. 2012], [Reiter et al. 2003], [Homoncik M, Blann AD, Hollenstein U, Pernerstorfer T, Eichler HG, Jilma B. *Systemic inflammation increases shear stress-induced platelet plug formation measured by the PFA-100.* Br J Haematol. 2000 Dec;111(4):1250-2] 및 [Homoncik M, Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W. *Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100.* Thromb Haemost. 2000 Feb;83(2):316-21], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다).

[0315] 좋은 상관 관계가 VWF 수준과 PFA-100 측정값 사이에 존재하기 때문에, 시험은 심장 환자의 향후 혈전색전성 이벤트에 대해 예측한다 (문헌 [Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, et al. *Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction.* Circulation 2004; 110: 1392-1397], [Fuchs I, Frossard M, Spiel A, et al. *Platelet function in patients with acute coronary syndrome (ACS) predicts recurrent ACS.* J Thromb Haemost 2006; 4: 2547-2552], 이들 문헌의 전문은 둘 다 본 출원에 참조로 포함된다).

[0316] 본 실험에서, ARC15105 (페길화) 또는 BT-100의 농도 (1~400 nM 범위)를 증가시키면서 혈액 샘플을 37℃에서 10분 동안 예비 배양하였다. 두 항-VWF 압타머는 PFA-100 중에서 콜라겐 아데노신 디포스페이트 폐쇄 시간을 농도-의존적으로 증가시켰지만, 반수 최대 억제 농도 (IC_{50}) 값은 BT-100과 비교하여 ARC15105 (페길화)에 있어 3~8배 더 높았다 ($p < 0.05$). 유사하게, IC_{100} 값은 BT-100과 비교하여 ARC15105 (페길화)에서 2~16배 더 높았다 ($p < 0.05$). 데이터는 표 3~6에 나타나 있다.

[0317] 이들 실험은 등몰 농도의 ARC15105 (페길화)에 비해 BT-100의 우수한 효능을 명백히 확립하였다.

표 3

PFA 결과

[0318]

PFA 100	0 nM	5 nM	10 nM	25 nM	50 nM	100 nM
BT-100	139	135	205	301	301	301
ARC15105	139	94	99	104	128	162

표 4

PFA 결과

[0319]

실험 A			
용량	BT-100	ARC15105	원래
0 nM			128
2 nM	184	ND	
5 nM	156	ND	
10 nM	123	129	
15 nM	277	ND	
20 nM	301	152	
25 nM	301	ND	
50 nM	ND	204	

표 5

PFA 결과

[0320]

실험 B			
용량	BT-100	ARC15105	원래
0 nM			112
1 nM	91	88	
2.5 nM	97	103	
5 nM	ND	ND	
10 nM	117	96	
15 nM	226	118	
20 nM	301	100	
25 nM	276	112	
50 nM	301	301	
100 nM	208	236	

표 6

PFA 결과

[0321]

실험 C			
용량	BT-100	ARC15105	원래
0 nM			90
1 nM	95	82	
5 nM	111	ND	
10 nM	169	83	
15 nM	183	91	
20 nM	284	96	
25 nM	301	109	
50 nM	301	161	
75 nM	ND	223	
100 nM	ND	301	

[0322] 상기 표에서, 폐쇄 시간 (초)이 각 처리에 대해 제공되어 있다. 300초의 최대 폐색 시간으로 구멍의 폐쇄 시간을 측정하여 응집을 정량화한다. "원래"는, "정상" 기준 수준의 검정 결과를 확립하는, 처리되지 않은 정상 공여자 샘플을 지칭하며; "ND"는 시험되지 않은 것을 의미한다.

[0323] **실시예 5. GpIb 및 폰 빌레브란트 인자 결합의 중단**

[0324] 완전 자동화된 INNOVANCE® GpIb 및 VWF 결합 검정 (VWF:Ac; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany)은 재조합 GpIb에 대한 VWF의 결합에 기초하여 환자 혈장 샘플에서 폰 빌레브란트 인자의 활성을 측정한다. 실시예 3에서 기재된 vWF:RCO 검정과 달리, 조합 GpIb가 2개의 기능 획득 돌연변이를 가지기 때문에, VWF:Ac 검정은 리스토세틴의 사용을 필요로 하지 않는다. 탁도 측정에 의한 소멸의 증가는 증가된 VWF 결합 및 응집과 관련되어 있다. 문헌 [Lawrie AS, et al., *A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity.* Haemophilia 2013 Mar;19(2):338-342], [de Maistre E, et al., *Performance of two new automated assays for measuring von Willebrand activity: HemosIL AcuStar and Innovance.* Throm Haemost. 2014(4)]을 참조하며, 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다.

[0325] 사람 자원자로부터 혈액 샘플을 수집하였다. BT-100 또는 ARC15105의 농도를 증가시키면서 샘플을 37°C에서 30분 동안 예비 배양하였다.

[0326] 제조업자 설명서에 따라 Sysmex CS2000i-분석기 (Sysmex UK Ltd) 상에서 INNOVANCE® VWF Activity 키트를 사용하여 VWF:Ac를 측정하였다.

[0327] 두 압타머는 고농도에서 VWF 및 GpIb의 결합 활성을 감소시킬 수 있었지만, BT-100은 표 7에서 나타난 바와 같이 ARC15105와 비교하여 강화된 효능을 나타냈다.

표 7

결합 활성 퍼센트 (%)

[0328]

용량	BT-100	ARC15105
8 nM	100	100
10 nM	100	100
30 nM	92	100
80 nM	81	98
100 nM	63	95
300 nM	40	90
800 nM	20	85

[0329] **실시예 6. 폰 빌레브란트 인자에 대한 혈소판, 백혈구 및 적혈구의 상호 작용의 차단**

[0330] 본 실시예에서, VWF 압타머를 활성화된 내피 세포로부터 분비되는 폰 빌레브란트 인자 (VWF) 가닥에 대한 혈소판, 백혈구 및 적혈구의 상호 작용을 차단하는 능력에 대해 조사한다. 실험은, 활성화된 내피 세포로부터 매우 길고 두꺼운 VWF 가닥 및 케이블의 형성을 입증 최근에 기술된 시험관내 미세혈관 시스템의 사람 성분을 이용한다 (문헌 [*In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109, 9342-9347], *ctor in the plasma.* Blood 2011, 117, 3680-3683], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다). 이러한 VWF 가닥은 적용되는 전단 응력에 따라 혈소판 및 기타 혈액 세포에 결합할 수 있다. 상기 실험은 혈전성 혈소판 감소성 자반 및 겸상 적혈구 병과 같은 혈전성 미세혈관병증에서 미세혈관 폐색의 모델을 제공하며, 이들 과정을 방해하는 항-VWF 압타머의 능력을 시험한다.

[0331] **실시예 7. 혈관이형성증에 기인하는 GI 출혈의 예방**

[0332] 본 실험에서, 혈관이형성증을 유발하고 GI 관에서 출혈을 초래하는 혈관 형성의 증가를 예방 또는 억제하는 능력에 대해 VWF 압타머를 시험관내 및 생체내 모델에서 조사한다.

[0333] VWF 압타머를 사람 제정맥 내피 세포 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell: HUVEC)와 접촉시켜 혈관 형성을 억제하는 이의 능력을 평가한다. 평가는 혈관망 형성, 세포 이동, 세포 증식 및 유착으로 이루어진다. 이러한 평가 방법은, 예를 들어, 문헌 [Starke RD, et al., *Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis.* Blood, 2011, 117:1071-80]에 교시되어 있으며, 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다.

[0334] 전체 혈관 형성 과정에 대한 VWF 압타머의 효과를 평가하기 위해, 망 형성을 방해하는 VWF 압타머의 능력을 입증하는 Matrigel 검정에서 VWF 압타머와 접촉된 HUVEC에 시험관내 튜브 형성을 실시한다. 혈관 형성의 한 양태는 세포 이동이다. 시간차 현미경 (time lapse microscopy)과 결합된 스크래치 상처 검정을 사용하여 이동을 억제하는 압타머의 능력을 평가한다. 본 검정에서, 압타머와 접촉된 HUVEC 세포를 감소된 이동 속도 및 방향에 대해 평가한다. 혈관 신생의 또 다른 양태는 증식이다. 하나 이상의 VWF 압타머와 접촉된 HUVEC의 증식 감소는, 미처리 대조군과 비교하여, 세포수의 감소로서 측정된다. 혈관 형성의 또 다른 양태는 유착 검정에서 측정되는 내피 세포의 유착이다. 시판중인 키트 (Invitrogen)를 사용하여, 세포 이동에 대한 VWF 압타머의 억제 효과는 웰에서 결합된 세포의 형광 감소에 의해 측정될 수 있다.

[0335] 건강한 개체 및 폰 빌레브란트 병 (VWD) 환자 유래의, 혈액 성장성 내피 세포 (blood outgrowth endothelial cell: BOEC)라고 호칭되는 순환 선조 세포로부터 유래된 EC는, 문헌 [Starke RD, et al., *Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis.* Blood, 2011, 117:1071-80] 및 [Ingram DA, et al., *Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood.* Blood 2004 104:2752-60]에서 기재된 방법에 따라 단리되며, 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다. BOEC를 사용하여, 건강한 대조군 유래의 BOEC와 비교하여, VWD 환자 유래의 BOEC에서 관찰되는, 매트릭스 검정, 이동, 증식 및 유착 검정에 의해 측정될 때, VWD 환자 유래의 BOEC에서 관찰되는 증가된 혈관 형성의 감소 또는 구제에 영향을 미치는 VWF 압타머의 능력을 평가한다.

[0336] 혈관 형성의 마우스 모델 (문헌 [Couffinhal et al., *Mouse models to study angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis in the context of cardiovascular diseases.* Frontiers in Bioscience; 2009; 14:3310-25]에서 검토되며, 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함됨)로는 뒷다리 허혈, 심장 허혈 및 피부 모델과 같은 허혈 모델, 및 매트리젤 플러그 검정, 디스크 검정, 눈 망막 및 각막 검정, 상처 치유 및 난소 모델과 같은 비-허혈 모델이 포함된다. 이들 모델을 사용하여 생체내 혈관 형성에 대한 VWF 압타머 전달의 효과를 평가한다. 매트리젤 플러그 모델에서, 마우스에게 매트리젤 단독 또는 VWF 압타머를 함유하는 매트리젤을 주사하고, 상기 모델을 문헌 [Couffinhal et al, 2009] 및 [Starke et al, 2011] (이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 사용하여 매트리젤 플러그에서 혈관 형성에 대한 압타머의 효과를 평가할 수 있다.

[0337] **실시예 8. 뇌내 폐쇄성 혈전 (섬유소-풍부 응괴 형성)의 예방**

[0338] 실험을 2월령의 성인 수컷 스위스 마우스에 대해 수행한다. 다음 그룹을 포함하는 N = 5~8마리의 동물/그룹: 대조군-트롬빈 (식염수) 및 압타머-트롬빈. 무제한 음식 및 물과 함께 12시간 명/12시간 암 주기로 온도 제어 룸에 마우스를 수용한다. 동물을 5% 이소플루란으로 깊게 마취시킨 후, NO_2/O_2의 70%/30% 혼합물에서 2.5% 이소플루란으로 유지하였다. 카테터를 꼬리 정맥내에 삽입하여 식염수 또는 압타머의 정맥내 투여한다 (200 μL). 마이크로피펫을 1 μL의 정제된 쥐 알파-트롬빈 (약 1000 NIH 유닛/mg; Sigma-Aldrich)으로 충전한다. 마우스를 정위 장치에 넣고, 우측 눈과 우측 귀 사이의 피부를 절개하고, 측두근을 수축시킨다. 소형 개두술을 수행하고, 경막을 절제하고, 중간 대뇌 동맥 (middle cerebral artery: MCA)을 노출시킨다. 1 μL의 정제된 쥐 알파-트롬빈 (0.75 UI)을 MCA의 내강에 주입하여 원위치에서 응괴 형성을 유도한다. 알파 트롬빈의 주사 10분 후에 피펫을 제거하여 응괴를 안정화시킨다. 혈전 용해를 유도하기 위해, 알파-트롬빈의 주사 20분 후에 압타머를 꼬리 정맥 내에 정맥내 주사한다. 대조군은 동일한 조건하에 동일한 부피의 식염수를 투여받는다.

[0339] MCA 영역의 두개골에 고정된 광섬유 프로브 (Oxford Optronix)를 사용하여 레이저 도플러 유량계에 의해 뇌혈류 (cerebral blood flow: CBF)를 측정한다. 알파-트롬빈 (100% 기준선) 주사 전에 및 실험 기간 전체에 걸쳐 CBF를 측정한다. 압타머 또는 식염수의 투여 후 1분, 5분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분 및 60분에서 압타머의 존재 또는 부재하에 MCA에서 CBF를 측정한다. 완전 폐색이 식염수 대조군에 비해 압타머의 존재하에 나중에 발생한다는 것을 내타내는 것은, 압타머가 MCA에서 폐색의 속도를 느리게 한다는 것을 입증한다. 완전 폐색이 60분 내에 발생하지 않는다는 것을 나타내는 것은, 압타머가 폐쇄성 혈전 형성을 예방한다는 것을 나타낸다.

[0340] 또한, 혈류를 측정하기 위해 2D-TOF 서열을 사용하여 자기 공명 혈관 조영술을 수행한다 (문헌 [Gaubert et al., J. Thromb Haemost., 2013], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다). 또한, 완전 폐색 후 6시간 및 24시간에서 MCA 영역에서의 허혈성 뇌 손상을 자기 공명 영상 (magnetic resonance imaging: MRI)에 의해 평가할 수 있다. 표면 코일을 사용하는 Pharmascan 7 T/12 cm 시스템 상에서 MRI를 수행하여 병변 크기를 결정하며, ImageJ 소프트웨어를 사용하여 T2 가중 이미지 상에서 정량화한다. 식염수-처리된 마우스의 병변 크기와 비교하여 압타머로 처리된 마우스에서의 병변 크기의 감소는, 압타머가 폐쇄성 혈전 형성을 예방 또는 감소시킨

다는 것을 나타낸다.

[0341] **실시예 9. 뇌내 폐쇄성 혈전 (혈소판-풍부 응괴 형성)의 예방**

[0342] 실험을 2월령의 성인 수컷 스위스 마우스 (N = 5~8마리의 동물/그룹)에 대해 수행한다. 마우스를 5% 이소플루란 (Baxter, Paris, France)으로 마취시키고, 정위 장치에 넣고, N_2O/O_2의 70%/30% 혼합물에서 2% 이소플루란으로 마취하에 최대 2시간 동안 유지하였다. 우측 눈과 귀 사이의 피부 절개를 통해 교근을 절제하고, 두정골 상에 소형 개두술 (직경, 1 mm)을 수행하여 우측 중간 대뇌 동맥 (MCA)을 노출시킨다. 새로 제조된 $FeCl_3$ (5% 내지 20%, Sigma Aldrich, Lisle d'Abeau, France)에 침지된 WHATMAN™ 여과지 스트립 1조각을 4분 동안 MCA 상의 온전한 경막 상에 놓음으로써 혈전 유도를 달성한다. 마우스에서의 이전 연구에 따르면, 5% $FeCl_3$은 혈전증을 유발하지 않는 반면, 10% $FeCl_3$은 부분 혈전증 (10,000 s^{-1} 미만의 전단 속도에서 형성된 혈전 "코어"를 형성함)을 유발하고, 20% $FeCl_3$은 안정적이고 완전한 폐쇄성 혈전을 유발하는 것으로 나타났다 (10,000 s^{-1} 이상의 전단 속도에서 형성됨). 프로브 처리된 조직에서 혈액 이동을 측정하는 레이저 도플러 유량계 (Oxford Optronix)에 의해 MCA 영역에서 뇌혈류 (CBF)를 측정한다. MCA 폐색 전과 폐색, 허혈 및 혈전 용해의 기간 전체에 걸쳐 CBF를 지속적으로 측정한다. 폐색 시간은 $FeCl_3$ 적용과 기준선의 20% 미만의 CBF 감소 사이의 시간으로 정의된다.

[0343] 마우스에게 20% $FeCl_3$을 투여하여 혈전증을 유도하였다. 대략 4~5 분 후에 (뇌혈류가 기저값의 50% 미만으로 떨어질 때, 즉, 부분 폐색 후에), 압타머 또는 식염수 (대조군)를 마우스에게 투여한다. MCA에서의 CBF (도플러 유량계에 의해 측정됨)를 사용하여 압타머의 존재 또는 부재하에 시간 경과에 따른 폐색 정도를 측정한다 (즉, 압타머 또는 식염수의 투여 후 1분, 5분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분 및 60분에서 폐색을 측정한다). 완전 폐색이 식염수 대조군에 비해 압타머의 존재하에 나중에 발생한다는 것을 내타내는 것은, 압타머가 MCA에서 폐색의 속도를 느리게 한다는 것을 입증한다. 완전 폐색이 60분 내에 발생하지 않는다는 것을 나타내는 것은, 압타머가 혈소판 부착 단계 후에 폐쇄성 혈전 형성을 예방한다는 것을 나타낸다.

[0344] 또한, 자기 공명 혈관 조영술을 실시예 8에서 기재된 바와 같이 수행한다. 또한, 실시예 8에서 기재된 바와 같이 완전 폐색 후 6시간 및 24시간에서 MCA에서의 허혈성 뇌 손상을 자기 공명 영상 (MRI)을 사용하여 평가한다. 식염수-처리된 마우스의 병변 크기와 비교하여 압타머로 처리된 마우스에서의 병변 크기의 감소는, 압타머가 혈소판 부착 단계 후에 폐쇄성 혈전 형성을 예방 또는 감소시킨다는 것을 나타낸다. 유용한 양성 대조군의 예 (실시예 8~12 중 임의의 실시예에서 사용될 수 있음)로는, VWF의 A1 도메인에 결합하여 혈소판 GpIb에 대한 VWF의 결합을 방지하는 폴리카복실화 화합물인 아우린트리카복실산 (aurintricarboxylic acid: "ATA", 20 mg/kg; Sigma-Aldrich), 및 VWF의 A1 도메인에 결합하여 혈소판 GpIb에 대한 결합을 방지하는 단클론 항체 또는 항체 단편, 즉, 단클론 항체 Xia.B2의 Fab 단편 (2.5 mg/kg, Emfret Analytics, Wurzburg, Germany)이 포함된다. 유용한 음성 대조군의 예로는 GR144053 트리하이드로클로라이드 ("GR", 10 mg/kg; R&D Systems, Lille, France), 비펩타이드성 GpIIb/IIIa 억제제, 및 GpIIb/IIIa에 대한 단클론 항체 또는 항체 단편, 즉, 단클론 항체 Leo.H4의 Fab 단편 (2.5 mg/kg, Emfret Analytics, Wurzburg, Germany)이 포함된다. ATA 및 GR 용액을 투여 전에 0.22 μm 필터를 통과시킨 후, 신속한 볼루스 (200 μL)로서 주입한다. 대조군 IgG (래트)를 Jackson Immunoresearch로부터 구입할 수 있다. 제조업자 설명서에 따라 Pierce Fab 제조 키트 (Fisher Scientific, Illkirch, France)를 사용하여 Fab 단편을 제조한다.

[0345] **실시예 10. 뇌내 폐쇄성 혈전의 분해**

[0346] GpIbα-VWF 상호 작용의 억제는 혈전의 VWF-풍부 부분에서 혈소판을 가교시키는 VWF를 해제하여 혈관 개통을 복원해야 한다. 실시예 9에서 기재된 MCA 혈전증의 마우스 모델을 사용하여 압타머의 존재하에 폐쇄성 혈전의 분해를 나타낸다. 실시예 9에 기재된 바와 같이 20% $FeCl_3$을 사용하여 완전 폐쇄성 혈전이 있는 마우스를 생성한다. 레이저 도플러 유량계로 측정할 때 MCA에서 뇌혈류 (CBF)에 의해 측정된 완전 폐색 (기준선의 20% 미만의 CBF 감소는 완전 폐색으로 간주됨) 후 10분에서 식염수 (대조군) 또는 압타머를 마우스에게 정맥내 투여한다. VWF 및 CD41 (혈소판 마커)에 대해 형광-라벨링된 항체 및 MCA의 DAPI 핵 염색을 사용하여, 압타머의 투여 후 10분 (예를 들어, 완전 폐색 후 20분)에서 안락사된 마우스 유래의 혈전의 면역 조직학적 분석을 수행한다. 대조군 마우스와 비교하여 압타머-처리된 마우스의 MCA에서 더 적은 VWF 및 CD41의 관찰 (형광 염색에 의해 측정됨)은, 압타머의 존재하에 혈전의 분해를 나타낸다. 또한, 다른 시험 마우스에서, 식염수-처리된 마우스에 비

해 압타머-처리된 마우스에서의 혈전의 크기를 측정하기 위해 MCA를 재개방하고 검사할 수 있다. 유용한 양성 대조군의 예로는 ATA 및 Xia.B2가 포함된다. 유용한 음성 대조군의 예로는 GR144053 트리하이드로클로라이드 및 GpIIb/IIIa에 대한 단클론 항체 또는 항체 단편이 포함된다.

[0347] **실시예 11: 혈관 개통의 본원**

[0348] 실시예 9에서 기재된 MCA 혈전증의 마우스 모델을 사용하여 압타머의 존재하에 혈관 개통의 복원을 나타낸다. 실시예 9에 기재된 바와 같이 20% $FeCl_3$을 사용하여 완전 폐쇄성 혈전이 있는 마우스를 생성한다. 완전 폐색 후 20분에서 식염수 (대조군) 또는 압타머를 마우스에게 정맥내 또는 피하로 투여한다. 도플러 유량계를 사용하여 MCA에서 뇌혈류 (CBF)를 측정하며, 식염수-처리된 마우스와 비교하여 압타머-처리된 마우스에서의 CBF 증가의 관찰은 혈관 개통의 복원을 입증한다. 또한, 2D-TOF 서열을 사용하여 자기 공명 혈관 조영술을 수행하여 혈류를 측정하고, 폐색 후 6시간 및 24시간에서 MCA 영역에서의 허혈성 뇌 손상을 자기 공명 영상 (MRI)에 의해 평가한다. MRI를 실시예 9에서 기재된 바와 같이 수행한다. 식염수-처리된 마우스의 병변 크기와 비교하여 압타머로 처리된 마우스에서의 병변 크기의 감소는, 혈관 개통의 복원을 나타낸다. 이전에 기재된 바와 같이, 혈전증의 $FeCl_3$ 모델 및 도플러 유량계 MRI를 통한 모니터링 및 면역 조직학적 분석을 사용하여 경동맥과 같은 대형 동맥에서의 개통의 복원을 결정하기 위해 유사한 방법을 사용할 수 있다.

[0349] **실시예 12. 비-사람 영장류에서 광화학적으로 유도된 혈전성 중간 대뇌 동맥 폐색**

[0350] 실험을 7~13세의 성인 수컷 비-사람 영장류 (non-human primate: NHP, 즉, 시노몰구스 (cynomolgus), 다람쥐 또는 붉은털 원숭이)에 대해 수행한다. 다음 그룹을 포함하는 N = 2~3마리의 동물/그룹: 대조군 (식염수) 및 압타머 (BT-100). 무제한 음식 및 물과 함께 12시간 명/12시간 암 주기로 온도 제어 룸에 NHP를 수용한다. 동물을 10 mg/kg의 케타민 하이드로클로라이드의 근육내 주사로 가볍게 마취시키고, 삽관하고, 30% O_2에서 0.5% 내지 1.5% 이소플루란으로 마취를 유지시킨다. 체온을 지속적으로 모니터링하며, 가열 패드에 의해 37~39ºC로 유지한다. 카테터를 대퇴 정맥내에 삽입하여 로즈 벤갈, 식염수 또는 BT-100 압타머를 정맥내 투여한다. 문헌 [Maeda M, Moriguchi A, Mihara K, Aoki T, Takamatsu H et al. *FK419, a nonpeptide platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, ameliorates brain infarction associated with thrombotic focal cerebral ischemia in monkeys: comparison with tissue plasminogen activator.* J Cereb Blood Flow Metab. 2005 Jan;25:108-118]에서 기재된 바와 같이 우측 MCA에 대한 안와경유 접근법을 수행하며, 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다. 경막을 온전히 유지하면서, 우측 MCA를 시각화할 수 있는 안와 개두술을 수행한다. 이어서, 6분의 정맥내 로즈 벤갈 투여 (20 mg/kg)와 함께 상기 영역을 10분 동안 녹색광 (파장 540 nm)으로 조사한다. 광 조사의 종료시에 처리 (식염수 또는 압타머)를 적용한다.

[0351] MCA 상에 놓인 광섬유 프로브 (Oxford Optronix)를 사용하여 레이저 도플러 유량계에 의해 뇌혈류 (CBF)를 측정한다. CBF를 광 조사 전과 압타머 투여 후 최대 3시간 동안 측정한다. BT-100 압타머 또는 식염수의 투여 후 1분, 5분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 60분, 120분 및 180분에서 BT-100 압타머의 존재 또는 부재하에 MCA에서 CBF를 측정한다. 완전 폐색이 식염수 대조군에 비해 BT-100 압타머의 존재하에 나중에 발생한다는 것을 내타내는 것은, 상기 압타머가 MCA에서 폐색의 속도를 느리게 한다는 것을 입증한다. 완전 폐색이 60분 내에 발생하지 않는다는 것을 나타내는 것은, 압타머가 폐쇄성 혈전 형성을 예방한다는 것을 나타낸다. 식염수 대조군에 비해 BT-100 압타머의 존재가 재관류까지의 기간을 단축시키고/시키거나 재관류 후 재폐색을 방지한다는 것을 나타내는 것은, 폐쇄성 혈전을 분해하는 BT-100의 능력을 나타낸다.

[0352] 비-사람 영장류를 광혈전증 후 24 시간에서 신경학적 결함에 대해 검사한다. 식염수에 비해 BT-100 압타머로 처리된 NHP에서 개선된 신경학적 성능은 폐쇄성 혈전의 보다 신속하고 보다 효율적인 분해를 시사한다.

[0353] **실시예 13. 작용의 지속 시간을 연장시키기 위한 압타머 디자인**

[0354] 압타머는 상기 압타머의 하나 이상의 목적하는 특징 또는 특성을 개선하도록 최적화된다. 이러한 특징 또는 특성으로는 결합 친화성, 약동학적 또는 약력학적 특성, 열 안정성, 효능 또는 당해 분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 다른 특징 또는 특성의 개선이 포함된다.

[0355] 하나의 예에서, 압타머는 스템을 변경함으로써 최적화된다. 스템 길이를 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 스템 길이를 연장하고 보다 길게 한다. 스템의 이중 가닥 영역을 변경시켜 보다 짧게 또는 보다 길게 하거나, 대칭 또는 비대칭을 변경할 수 있다. 압타머의 스템에 분지 (branch)를 부가할 수 있다.

[0356] 하나의 예에서, 하나 이상의 컨쥬게이트 및/또는 말단 캡 구조를 부가 또는 변경함으로써 압타머를 최적화한다. 컨쥬게이트는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티 또는 당해 분야에 공지된 임의의 다른 컨쥬게이트 또는 말단 캡일 수 있다. 목적하는 특징 또는 특성을 개선시키기 위해 하나 이상의 컨쥬게이트를 압타머에 부가한다. 또한, 컨쥬게이트(들)는 압타머의 5' 또는 3' 말단에 존재할 수 있다.

[0357] 하나의 예에서, 스템의 이중 가닥 영역을 6개의 염기쌍을 초과하여 증가시킴으로써 압타머를 최적화하여 열 안정성을 증가시킨다.

[0358] 본 출원에서 기재된 것들을 포함하여 목적하는 특징 및/또는 특성을 평가하기 위해 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 최적화된 압타머를 시험할 수 있다. 최적화된 압타머는 적어도 하나의 특징 및/또는 특성에서 동등하지만 최적화되지 않은 압타머의 성능을 초과해야 한다.

[0359] **실시예 14. BT-200을 생성하기 위한 ARC15105의 최적화**

[0360] BT-200을 생성하기 위해 ARC15105를 최적화한다. 최적화는 열 안정성, 및 반감기 및/또는 작용 지속 기간과 같은 약동학적 또는 약력학적 특성을 개선시키는 것이다. ARC15105의 이중 가닥 스템 영역을 5개의 염기쌍 이중 가닥에서 9개의 염기쌍 이중 가닥으로 연장시킨다. 스템 영역의 연장은 BT-200의 열 안정성을 증가시키고, 압타머의 완전성을 안정화시킴으로써, 뉴클레아제 절단에 덜 민감하게 하고 압타머의 생체내 반감기 및/또는 작용 지속 기간을 연장시킨다. 40 kD의 PEG는 BT-200에 대해 유지된다. 당해 분야에 공지되고/되거나 본 출원에 기재된 임의의 방법에 의해 BT-200의 특징 및/또는 특성을 시험한다. 직접적인 비교에서, 최적화된 압타머 BT-200은 원래 압타머 ARC15105 보다 더 나은 결과를 낼 것이다.

[0361] **실시예 15. BT-200을 생성하기 위한 BT-100의 최적화**

[0362] BT-200을 생성하기 위해 BT-100을 최적화한다. 40 kD의 PEG를 BT-100의 5' 말단에 컨주게이트한다. 페길화는 압타머의 분자 질량을 증가시키고 뉴클레아제로부터 이들을 차폐함으로써 반감기 및/또는 작용 지속 기간과 같은 약동학적 및 약력학적 특성을 개선시킨다. 당해 분야에 공지되고/되거나 본 출원에 기재된 임의의 방법에 의해 BT-200의 특징 및/또는 특성을 시험한다.

[0363] **실시예 16. VWF 활성화 검정 (REAADS)의 시험관내 차단**

[0364] BT-200을 VWF 활성의 생체내 억제에 대해 평가하였다. REAADS® 폰 빌레브란트 인자 활성 시험 키트 (DDiapharma, Catalog #: K10826, West Chester, Ohio)를 사용하여 혈장 샘플에서 기능적 VWF를 측정하였다. 검정을 조정하여 BT-200에 의한 VWF 활성의 억제를 평가하였다. 시험 키트는 정제된 쥐 항-VWF 단클론 항체를 사용하여 VWF의 A1 도메인을 검출하는 효소 결합 면역흡착 분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)이다.

[0365] 전혈을 3마리의 시노몰구스 원숭이 (Xishan Zhongke Laboratory Animal Co., Suzhou, China)로부터 3.2% 시트르산 나트륨 (혈액:시트르산 나트륨 비율 = 9:1)을 함유하는 혈액 수집 튜브에 채취하였다. 3000 rpm에서 원심분리하여 혈장을 분리하였다. BT-200 원액을 인산 완충된 식염수 (phosphate-buffered saline: PBS) 중에서 1 mg/ml로 제조하였다. BT-200을 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 및 30000 ng/ml의 최종 농도로 혈장 샘플에 스파이킹하였다. 실온에서 제조업자의 설명서에 따라 REAADS 검정을 수행하였다. 혈장에서 인자 VIII 및 폰 빌레브란트 인자에 대한 3차 국제 표준 (91/666)에 대해 표준화된 캘리브레이터에 비하여 VWF 활성을 정상의 퍼센트 (%)로 보고하였다. VWF 활성을 BT-200 농도에 대해 플롯팅하여 IC_{50} 값을 결정하였다.

[0366] 시험관내 REAADS 검정의 결과는 표 8에 제시되어 있다. 상기 데이터는 원숭이 혈장에서 BT-200에 의한 VWF A1 도메인 활성의 용량-의존적 억제를 나타낸다. 각 동물에 대해 결정된 IC_{50} 값은 각각 1618 ng/ml (R^2 = 0.998), 1633 ng/ml (R^2 = 0.999) 및 1606 ng/ml (R^2 = 0.997)이었다. 상기 연구는 BT-200이 VWF의 A1 도메인을 차단함으로써 VWF 활성을 억제한다는 것을 확인한다.

표 8

VWF 활성

BT-200 농도 (ng/ml)	정상의 퍼센트 (%)		
	동물 A	동물 B	동물 C
30000	0.6	0.6	0.6
10000	4.7	5.6	4.5
3000	28.6	31.2	22.3
1000	72.4	72.4	74.3
300	98.7	98.4	94.9
100	105.8	104.5	104.5
30	101.9	109.0	97.5
10	110.0	111.2	103.5
0	111.2	109.8	105.9

[0367]

[0368] **실시예 17. VWF 활성화 검정 (REAADS)의 생체내 차단**

[0369] 원숭이에서 VWF 활성의 BT-200 억제를 평가하기 위해 생체내 실험을 수행하였다. 3마리의 성인 시노몰구스 원숭이에게 정맥내 주사 (intravenous injection: I.V.)에 의해 3 mg/kg의 BT-200을, 피하 주사 (subcutaneous injectio: S.C.)에 의해 1 mg/kg 및 3 mg/kg의 BT-200을 각각 투여하였다. REAADS 시험 키트를 사용하여 주사 후 1시간, 4시간, 8시간, 24시간, 48시간, 96시간, 168시간, 240시간 및 336시간에서 VWF 활성을 검정하였다. REAADS 검정을 실시예 16에 기재된 바와 같이 수행하여 VWF A1 도메인 활성을 결정하였다.

[0370] REAADS 검정의 결과는 표 9에 제시되어 있다. VWF 활성에 대한 BT-200의 억제는 정맥내 또는 피하 투여된 3 mg/kg의 용량으로 336시간 초과 지속되었다. BT-200은 S.C. 주사에 의해 1 mg/kg의 용량으로 168시간 초과 동안 VWF 활성을 차단하였다. 이들 데이터는 생체내에서 BT-200과 VWF의 A1 도메인 사이에서 높은 친화도를 나타냈다.

표 9

VWF 활성

샘플 시간	정상의 퍼센트 (%)		
	동물 A 3 mg/kg I.V.	동물 B 1 mg/kg S.C.	동물 C 3 mg/kg S.C.
0	111.2	109.8	105.9
1 h	0.2	62.6	94.0
4 h	0.1	13.3	16.4
8 h	0.1	4.4	4.0
24 h	0.2	3.0	0.5
48 h	0.4	5.7	0.4
96 h	1.9	6.1	0.4
168 h	9.1	60.6	4.3
240 h	33.0	122.7	21.6
336 h	79.9	122.3	62.3

[0371]

[0372] **실시예 18. 시험관내 혈소판 기능 분석기 (PFA-200) 검정**

[0373] 실시예 4에 기재된 바와 같이 PFA 분석을 사용하여 시험관내에서 VWF 활성을 억제하는 능력에 대해 BT-200을 평가하였다. 사람 공여자 혈장 샘플과 시노몰구스 원숭이 혈장 샘플 둘 다를 사용하였다. 3.2% 시트르산 나트륨 (혈액:시트르산 나트륨 비율 = 9:1)을 함유하는 혈액 수집 튜브에 4.5 mL의 전혈을 수집하여 혈장 샘플을 제조하였다. BT-200 원액을 PBS 중에서 1 mg/ml로 제조하였다. BT-200을 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.06, 0.1, 0.2, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 및 30.0 ug/mL의 최종 농도로 사람 샘플에 스파이킹하였다. 원숭이 샘플에서, BT-200의 농도를 0.01, 0.1, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 3.0 및 10.0 ug/mL로 조정하였다. 37°C에서 15분 동안 인큐베이션 처리한 후, 혈소판 플러그 형성을 혈소판 기능 분석기 PFA-200 (Siemens, Marburg, Germany)으로 콜라겐/아데노신 디포스페이트-유도된 폐쇄 시간 (collagen/adenosine diphosphate-induced closure time: CADP-CT)에

의해 측정하였다. 정상 식염수를 음성 대조군으로 사용하였다. PFA-200으로 측정한 최대 CT는 5분이며, 이 시간을 초과하는 경우, 기기는 > 300초의 결과를 제공한다. 데이터를 BT-200 농도에 대해 플롯팅하고, GraphPad Prism 5 (San Diego, CA)에서 피팅 (fitting)하여 유효 용량 (ED_{50}) 중간값을 수득하였다.

[0374] 사람 샘플의 경우, 중국 쑤저우 대학교에 등록한 14명의 건강한 자원자로부터 데이터를 수집하였다. BT-200과의 인큐베이션 처리 후 샘플의 폐쇄 시간을 분석하였다. 분산 분석 (analysis of variance: ANOVA) 결과에 의하면, 0.2 ug/ml 초과의 BT-200의 농도는 CADP-CT를 유의하게 연장시킨 것으로 나타났다 ($P < 0.01$). BT-200은 CADP-CT의 농도-의존적 연장을 초래하였다. 0.086~0.408 ug/ml의 95% 신뢰 구간 ($R^2 = 0.940$)으로 0.187 ug/ml이 되도록 ED_{50}을 계산하였다. 데이터는 표 10에 나타나 있다.

표 10

사람 자원자의 폐쇄 시간

[0375]

BT-200 (ug/ml)	폐쇄 시간 (초)													
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14
30.0	300	300	300	300	300	300	300	-	-	-	-	-	-	-
10.0	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
3.0	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
1.0	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
0.3	275	300	300	267	300	300	300	243	191	300	258	300	300	300
0.2	-	-	-	-	-	164	258	145	108	260	128	137	201	237
0.1	110	127	237	111	190	109	174	99	86	165	91	134	182	158
0.06	-	-	-	-	-	-	-	91	77	145	83	115	157	113
0.01	74	109	122	102	127	82	104	85	73	121	77	112	133	103
0.003	85	85	130	83	106	83	121	77	85	117	68	84	103	93
0.001	77	101	98	101	113	69	92	73	79	113	80	95	100	95
블랭크	77	81	113	87	126	79	117	70	63	112	69	84	111	103

[0376] 원숭이 샘플의 경우, 16마리의 시노몰구스 원숭이 (Xishan Zhongke Laboratory Animal Co.; Suzhou, China)로부터 데이터를 수집하였다. BT-200과의 인큐베이션 처리 후 샘플의 폐쇄 시간을 분석하였다. ANOVA 결과에 의하면, 0.6 ug/ml 초과의 BT-200의 농도는 CADP-CT를 유의하게 연장시킨 것으로 나타났다 ($P < 0.01$). BT-200은 CADP-CT의 농도-의존적 연장을 초래하였다. 0.135~-3.599 ug/ml의 95% 신뢰 구간 ($R^2 = 0.852$)으로 0.697 ug/ml이 되도록 ED_{50}을 계산하였다. 데이터는 표 11에 나타나 있다.

표 11

시노몰구스 원숭이의 폐쇄 시간

BT-200 (ug/ml)	폐쇄 시간 (초)							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
10.00	300	300	300	300	300	300	300	300
3.00	-	-	300	300	300	300	300	300
1.00	215	300	300	300	300	300	300	300
0.80	-	-	179	105	300	300	300	176
0.60	65	152	109	96	130	300	101	130
0.40	56	86	73	57	90	88	68	104
0.10	-	55	56	53	63	54	59	75
0.01	52	59	51	46	50	54	49	63
블랭크	55	55	54	53	57	50	50	75
	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16
10.00	300	300	300	300	300	300	300	300
3.00	300	300	-	-	-	-	-	-
1.00	300	212	300	300	300	300	300	300
0.80	300	141	300	300	80	158	300	300
0.60	170	82	-	300	75	72	153	106
0.40	91	78	133	137	60	53	79	72
0.10	61	58	-	-	-	-	-	-
0.01	76	63	58	73	53	40	49	50
블랭크	66	56	58	73	53	40	49	50

[0377]

[0378] 두 세트의 샘플에서, BT-200은 VWF 활성의 농도-의존적 억제를 초래하였다. 사람 또는 시노몰구스 원숭이 CADP-CT를 연장시키기 위한 평균 ED_{50}은 각각 0.158 ± 0.105 ug/ml (n = 14) 및 0.576 ± 0.390 ug/ml (n = 16)이었다. 사람 VWF에 대한 BT-200 결합의 친화성은 원숭이 VWF 보다 3.72배 더 높았다.

[0379] **실시예 19. 생체내 PFA-200 검정**

[0380] BT-200을 VWF 활성의 생체내 억제에 대해 시노몰구스 원숭이에서 평가하였다. 16마리의 성인 원숭이를 선택하여 성별 및 체중에 따라 4개의 처리 그룹에 분배하였다. 원숭이는 2.6 내지 3.9 kg 사이로 칭량되었으며, 3세 내지 5세이었다. 각 그룹은 4마리의 동물, 즉, 2마리의 수컷 및 2마리의 암컷을 포함하였으며, 각 그룹의 평균 체중은 약 3.2 kg이었다. BT-200 투여 용액을 0.9% 식염수 중에서 10 mg/ml의 최종 농도로 제조하였다. 그룹 1~4에게 정맥내 주사 (I.V.)에 의해 3 mg/kg의 BT-200을, 피하 주사 (S.C.)에 의해 3.0 mg/kg, 1.0 mg/kg 및 5.0 mg/kg의 BT-200을 각각 투여하였다. 주사 30분 전 (-30분), 주사 후 1시간, 4시간, 12시간, 24시간, 48시간, 96시간, 168시간 및 240시간에서 혈액 샘플을 수집하였다. 혈장 샘플을 이전에 기재된 바와 같이 제조하였다. 샘플 수집 즉시 PFA-200으로 CADP-CT 측정을 수행하였다.

[0381] BT-200 주사 전 또는 후 시노몰구스 원숭이의 폐쇄 시간을 각각 평균 ± 표준 편차 (standard deviation: SD)로서 표현하였다 (표 12 참조). ANOVA 결과에 의하면, BT-200은 주사 1시간 후 4개의 모든 그룹에서 CADP-CT를 유의하게 연장시킨 것으로 나타났다 ($P < 0.01$). 생체내에서 VWF에 대한 BT-200의 억제는 적어도 240시간으로 유지되었다. ANOVA 결과에 의하면, 주사 1시간 후, 4개의 그룹의 CADP-CT는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 더욱이, 상기 데이터는 BT-200이 긴 반감기를 가지며 BT-200의 피하 주사 생체 이용률이 정맥내 주사와 유사하다는 것을 시사한다.

표 12

다양한 시점에서의 폐쇄 시간 (초)

샘플 시간	3 mg/kg I.V.	3 mg/kg S.C.	1 mg/kg S.C.	5 mg/kg S.C.
-30 분	73.5±3.0	79.5± 2.4	73.8± 2.4	86.0± 5.8
1 h	300± 0.0	255.0± 52.6	271.3± 57.5	300.0± 0.0
4 h	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0
8 h	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0
24 h	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0
48 h	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0
96 h	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0
168 h	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0
240 h	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0	300.0± 0.0

[0382]

[0383] 실시예 20. 응고 기능

[0384] 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간 (aPTT), 프로트롬빈 시간 (PT), 트롬빈 시간 (TT) 및 피브리노겐 (FIB)을 비롯한 응고 파라미터를, 실시예 19에서와 동일한 16마리 원숭이로부터 주사 전 30분 (투여 전 (pre-dose)), 주사 후 15분, 1시간, 4시간, 8시간, 24시간, 48시간, 96시간, 168시간 및 240시간에서 자동 응고계 (Stago, France)로 분석하였다.

[0385] BT-200은 정맥내 주사 1시간 후 aPTT를 유의하게 연장시켰으며, 48시간으로 유지되었다. BT-200의 피하 주사는 정맥내 주사보다 늦게 aPTT를 연장시켰다. ANOVA 결과에 의하면, 1 mg/kg BT-200 피하 주사 24시간 후, aPTT는 유의하게 연장되고 (P = 0.03) 48시간에서 기준선으로 기울어졌으며, 3 mg/kg BT-200 피하 주사 8시간 후, aPTT는 유의하게 연장되고 (P < 0.05) 주사 후 96시간으로 유지되된 것으로 나타났다. 5 mg/kg BT-200이 주사될 때, aPTT는 주사 후 8시간에서 연장되고 240시간으로 유지되었다. PT, TT 및 FIB 값은 BT-200 주사 후에 변하지 않았다. 상기 결과는 BT-200이 aPTT를 제외하고 이들 응고 인자에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다. 그러나, aPTT 연장은 실시예 21에 설명된 바와 같은 허상이다.

[0386] 다양한 시점에서의 각 그룹의 응고 파라미터는 표 13~16에 제시되어 있다. 표에서, aPTT, PT, TT 및 FIB 값은 평균 ± SD (n = 4)로 제시되고; *는 매우 큰 유의차를 나타내며 (P < 0.01); #은 유의차를 나타낸다 (0.01<P < 0.05).

표 13

활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간 (aPTT) (초)

샘플 시간	3 mg/kg I.V.	3 mg/kg S.C.	1 mg/kg S.C.	5 mg/kg S.C.
-30 분	31.2± 3.0	31.6± 2.4	29.4± 2.4	30.3± 5.8
1 h	60.3± 2.9*	34.7± 4.6	28.1± 4.7	29.7± 4.7
4 h	61.4± 6.8*	39.7± 8.2	29.1± 5.1	39.5± 10.4
8 h	59.7± 3.5*	47.1± 10.8*	34.3± 3.5	53.3± 9.4*
24 h	60.7± 7.4*	58.8± 9.4*	36.0± 2.8#	48.6± 6.0*
48 h	54.7± 3.9*	54.4± 7.2*	34.0± 5.2	48.6± 6.0*
96 h	37.5± 4.8	42. 8± 4.9#	30.7± 4.6	44.6± 4.4*
168 h	32.6± 6.9	38.1± 7.6	27.1± 4.3	45.3± 4.8*
240 h	26.7± 4.4	29.9± 6.2	27.6± 4.7	40.7± 8.9#

[0387]

표 14

프로트롬빈 시간 (PT) (초)

[0388]

샘플 시간	3 mg/kg I.V.	3 mg/kg S.C.	1 mg/kg S.C.	5 mg/kg S.C.
-30 분	16.6± 5.7	12.8± 0.7	13.3± 0.5	12.9± 1.1
1 h	13.3± 0.7	15.1± 2.5	12.7± 0.9	12.2± 0.5
4 h	14.2± 1.8	13.2± 1.0	12.7± 0.9	12.1± 0.6
8 h	14.3± 1.3	15.9± 4.2	12.4± 0.2	11.9± 0.5
24 h	13.9± 1.2	12.8± 1.6	11.4± 0.5	11.3± 0.4
48 h	13.1± 0.7	12.7± 1.7	11.1± 0.2	11.1± 0.5
96 h	11.5± 0.4	11.1± 0.3	11.3± 0.2	11.3± 0.7
168 h	12.7± 0.7	11.5± 0.7	11.6± 0.2	11.6± 0.9
240 h	12.9± 0.8	11.7± 0.1	11.7± 0.2	12.2± 1.0

표 15

트롬빈 시간 (TT) (초)

[0389]

샘플 시간	3 mg/kg I.V.	3 mg/kg S.C.	1 mg/kg S.C.	5 mg/kg S.C.
-30 분	19.4± 2.8	20.6± 1.7	18.3± 0.4	19.1± 3.1
1 h	18.9± 1.2	23.3± 2.5	18.4± 0.6	20.7± 2.9
4 h	22.5± 4.1	20.9± 1.8	19.5± 3.1	21.5± 2.7
8 h	19.8± 1.0	25.2± 3.	19.2± 2.6	23.0± 2.9
24 h	19.7± 1.8	21.1± 3.0	20.4± 1.0	22.9± 4.1
48 h	20.1± 3.2	21.5± 4.3	20.5± 0.5	20.9± 0.7
96 h	22.1± 1.6	21.7± 1.5	20.5± 0.8	20.7± 0.6
168 h	22.1± 2.8	21.4± 1.4	20.4± 1.0	20.5± 0.5
240 h	21.4± 1.1	21.7± 0.8	20.9± 0.6	21.0± 0.5

표 16

피브리노겐 농도 (g/L)

[0390]

샘플 시간	3 mg/kg I.V.	3 mg/kg S.C.	1 mg/kg S.C.	5 mg/kg S.C.
-30 분	2.80± 1.75	3.57± 0.78	2.76± 0.82	2.48± 0.69
1 h	2.88± 1.94	2.60± 0.38	2.38± 0.41	2.91± 0.43
4 h	2.73± 0.82	3.38± 0.84	2.41± 0.59	2.62± 0.39
8 h	2.38± 1.11	2.62± 0.64	3.42± 0.90	3.08± 0.58
24 h	2.64± 1.33	3.22± 0.22	3.28± 0.77	3.01± 0.73
48 h	2.85± 1.45	2.84± 0.42	2.97± 0.57	2.85± 0.44
96 h	3.40± 1.17	3.35± 0.30	3.07± 0.45	2.87± 0.53
168 h	3.28± 1.70	3.40± 1.10	3.00± 1.13	2.89± 0.63
240 h	3.14± 1.53	3.32± 0.78	2.62± 0.97	2.82± 0.27

[0391] **실시예 21. 추가의 응고 검정**

[0392] A. aPTT 검정

[0393] BT-200은, 이전에 항응고제로서 나타나지 않았기 때문에, 응고 시간을 연장할 것으로 예상되지 않았다. 실시예 20에서 관찰된 연장된 aPTT를 추가로 조사하였다. 응고 활성화제로서 실리카 또는 엘라그산과 함께 aPTT 시약 Actin-FS (Siemens, Marburg, Germany) 및 aPTT-루푸스 항응고제 (LA) (Stago, France)를 사용하여 aPTT을 반복하였다. Actin-FS는 인자 VIII, IX 및 XI의 약한 감소에 가장 민감한 시약이다. 상기 결과에 의해, 거짓 aPTT 효과는 시약 특이적인 것으로 밝혀졌다 (표 17 참조). 활성화제로서 실리카와 aPTT 시약은 BT-200의 존재하에 증가된 aPTT 값을 나타냈지만, 엘라그산과 aPTT Actin-FS는 모든 BT-200 농도에서 동일한 aPTT 값을 나타

냈다.

표 17

aPTT 검정

[0394]

BT-200 농도 (ug/ml)	0	3	10	30	100	활성화제	제조업자
aPTT (초)	40.1	48.6	65.1	77.3	83.2	실리카	Stago
aPTT Actin-FS (초)	40.9	41.1	40.9	40.2	40.3	엘라그산	Stago
aPTT-LA (초)	40.9	44.8	65.7	82.5	98.7	실리카	Stago

[0395] 응고 인자에 대한 BT-200의 효과를 또한 활성화제로서 엘라그산으로 평가하였다. 결과는 표 18에 제시되어 있다. 예상된 바와 같이, BT-200은 인자 VIII 또는 인자 XI 활성을 감소시키지 않는다.

표 18

인자 활성

[0396]

BT200 농도 (ug/ml)	0	3	10	30	100	활성화제	제조업자
항-Xa (헤파린) (IU/ml)	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1		
인자 VIII 활성 (%)	59	58	58	60	60	엘라그산	Siemens
인자 XI 활성 (%)	80	79	81	79	80	엘라그산	Siemens

[0397] B. 회전 혈전 탄성 측정법 (ROTEM)

[0398] PT 및 aPTT와 같은 응고 검정이 널리 수행되지만, 이들은 내재적인 한계가 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 이들 검정은 응고 캐스케이드를 별개로 평가하므로 비-생리학적이다. 결과적으로, 이들은 일반적으로 임상적 표현형과의 불량한 상관 관계를 나타내며, 즉, PT 또는 aPTT는 연장될 수 있지만 이것은 반드시 출혈 표현형을 예측하는 것은 아니다. 더욱이, 이들 검정은 일반적으로 전혈전 상태에 둔감하다. 또한, PT 및 aPTT 검정은 시험의 종말점으로서 피브린 응괴의 형성을 사용하며, 이것은 총 트롬빈의 5% 미만 만이 생성될 때 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0399] 회전 혈전 탄성 측정법 (ROTEM)은 샘플의 재계산 후 활성화제가 있거나 없는 전혈 또는 혈장의 응고를 측정하는 방법이다. ROTEM의 주요 결과는, 응괴가 형성되거나 용해됨에 따라, 시간 경과에 따른 탄성을 나타내는 반응 곡선이다. 측정 파라미터로는 응고 시간 (clotting time: CT), 응괴 형성 시간 (clot formation time: CFT), 최대 응괴 견고성 (maximum clot firmness: MCF), CT 5분 후 진폭 (A5), 30분 후 용해 지수 (LI 30) 및 최대 용해 (maximum lysis: ML; MCF 60분 후 진폭의 감소 퍼센트)가 포함된다. CT는 시작 시약을 혈액에 첨가한 때부터 응괴가 형성되기 시작할 때까지의 대기 시간이다. CFT는 CT에서부터 20 mm 포인트의 응괴 견고성이 도달될 때까지의 시간이다. MCF는 트레이스의 최대 수직 진폭이다. 응고 시간은 전형적으로 항응고제에 의해 연장된다.

[0400] ROTEM® 델타 지혈 분석기 (Tem Innovations GmbH, Germany) 상에서 ROTEM 검정을 사용하여 응고 시간에 대한 BT-200의 효과를 평가하였다. 외인성 지혈 시스템에 대한 스크리닝 시험인 EXTEM 시험을 수행하였다. 결과는 표 19에 제시되어 있다. 응고 시간은 모든 농도의 BT-200에서 거의 동일하였으며, 이는 BT-200이 응고에 영향을 미치지 않으며 이전 관찰과 일치한다는 것을 시사한다. 비교를 위해, 직접적인 인자 II 억제제인 다비가트란의 약리학적 농도는 응고 시간을 10배 연장시키고, 직접적인 인자 X 억제제인 리바록사반의 약리학적 농도는 4배 연장시킨다 (문헌 [Schoergenhofer C, et al., *The use of frozen plasma samples in thromboelastometry*. Clin Exp Med, DOI 10.1007/s10238-017-0454-5], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다).

표 19

ROTEM 검정

BT-200 농도 (ug/ml)	CT (초)	CFT (초)	MCF (분)
30	73	540	22
10	76	325	24
2	80	493	23
0	77	360	23

[0401]

[0402] C. 트롬빈 생성 검정

[0403] 트롬빈 생성은 트롬빈을 생성하는 혈장의 전체 능력을 반영한다. 보정된 자동화 혈전도 (calibrated automated thrombogram: CAT) 검정은 트롬빈의 생성을 측정하는데 사용되는 일상적인 시험이다. 이러한 검정은 형광성 기질의 분할을 모니터링하고 이를 병행 비-응집 샘플에서의 일정한 공지의 트롬빈 활성과 비교함으로써 응고 혈장 중 트롬빈의 농도를 시간의 함수로서 표시한다. 혈전도의 파라미터로는 지연 시간, 피크 높이, 내인성 트롬빈 전위 (endogenous thrombin potential: ETP) (곡선하 면적으로 계산됨), 최대 상승 경사 및 피크까지의 시간이 포함된다 (문헌 [Hemker HC, et al., *Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system*. Thromb Haemost. 2006 Nov;96(5):553-61], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다). 리바록사반과 같은 응고 억제제는 ETP 및/또는 피크를 감소시키며, 피크까지의 시간을 연장시킨다.

[0404] 낮거나 높은 혈소판-부족 혈장 (platelet-poor plasma: PPP) 시약(Thrombinoscope BV, Netherlands)을 사용하여 CAT 검정을 통해 트롬빈 생성에 대한 BT-200의 효과를 평가하였다. PPP 시약은 혈소판-부족 혈장에 첨가되어 트롬빈 생성을 개시하는 촉발자로서 사용된다. Fluoroskan ASCENT™ 마이크로플레이트 형광계 (Thermo Scientific, Waltham, MA) 상에서 판독을 측정하였다. 결과는 표 20 및 21에 제시되어 있다. 이들 결과에 의해, BT-200은 트롬빈 생성을 변경하지 않는 것으로 확인되었다.

표 20

PPP 시약 (낮음)에 의한 CAT

BT-200 농도 (ug/ml)	0	3	10	30	100
지연 시간 (분)	2.33	2.33	2	2	2
ETP (nM×분)	609	599	557	561	553
피크 (nM)	100	98.1	94.3	98.7	98.2
피크까지의 시간 (분)	5.0	5.0	5.0	4.8	4.7

[0405]

표 21

PPP 시약 (높음)에 의한 CAT

BT-200 농도 (ug/ml)	0	3	10	30	100
지연 시간 (분)	1	1	1	1	1
ETP (nM×분)	577	581	579	570	553
피크 (nM)	138	139	134	139	135
피크까지의 시간 (분)	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7

[0406]

[0407] **실시예 22. 혈액학 시험**

[0408] 헤모글로빈 농도, 헤마토크리트, 백혈구 (white blood cell: WBC) 및 혈소판 수치를 비롯한 혈액학 파라미터를, 실시 예 19에서와 동일한 16마리 원숭이로부터 투여 전, BT-200 주사 1주 및 2주 후에 분석하였다. 혈액학 시험을 Sysmex XP-100 3-Part Differential 혈액학 분석기 (Sysmex, Japan)로 수행하였다. 헤모글로빈 및 헤마토크리트 값은 투여 전과 비교하여 유의차 없이 약간 감소하였다. WBC 및 혈소판 수치는 BT-200 주사 후 변하

지 않았다.

[0409] 혈액학 파라미터는 표 22~25에서 평균 ± SD (n = 4)로서 제시되어 있다.

표 22

헤모글로빈 농도 (g/L)

[0410]

샘플 시간	3 mg/kg I.V.	3 mg/kg S.C.	1 mg/kg S.C.	5 mg/kg S.C.
투여 전	138.3±11.3	138.5± 8.4	133.8±16.3	132.5±12.5
투여 후 1w	108.3±23.3	95.3± 32.6	116.8± 13.5	111.0± 13.6
투여 후 2w	113.3±18.9	100.5± 26.6	126.0± 4.3	114.0±9.8

표 23

헤마토크리트 (%)

[0411]

샘플 시간	3 mg/kg I.V.	3 mg/kg S.C.	1 mg/kg S.C.	5 mg/kg S.C.
투여 전	43.7±2.5	45.5± 1.7	43.7± 3.8	43.0± 2.8
투여 후 1w	36.5±5.2	32.0± 9.5	39.2± 3.6	37.3± 3.0
투여 후 2w	37.7±4.7	34.5± 7.7	41.6± 0.6	38.1± 3.1

표 24

백혈구 수 ($\times 10^9$/L)

[0412]

샘플 시간	3 mg/kg I.V.	3 mg/kg S.C.	1 mg/kg S.C.	5 mg/kg S.C.
투여 전	15.3±1.2	13.7± 3.7	15.2± 2.3	15.2± 2.3
투여 후 1w	15.1±3.3	13.6± 5.9	15.0± 0.9	13.6± 2.4
투여 후 2w	14.5±4.4	15.2±2.6	17.2± 4.1	14.0± 3.9

표 25

혈소판 수 ($\times 10^9$/L)

[0413]

샘플 시간	3 mg/kg I.V.	3 mg/kg S.C.	1 mg/kg S.C.	5 mg/kg S.C.
투여 전	476.8±111.2	484.0± 79.6	473.8±141.1	454.5± 123.1
투여 후 1w	555.0±43.7	516.8±137.7	463.5± 50.3	512.3± 110.6
투여 후 2w	528.3±47.0	503.8±160.9	444.8± 57.9	483.0± 93.7

[0414] **실시예 23. 과장된 약리학**

[0415] 1형 폰 빌레브란트 병에서와 같은 폰 빌레브란트 인자의 부분 결핍은 전형적으로 매우 약한 임상적 표현형을 가지며 일반적으로 진단없이 진행된다. 실제로, 일반 인구의 거의 1%가 무작위 혈액 샘플의 실험실 분석 결과에만 기초하여 1형 VWD의 진단을 배정받을 것이다 (문헌 [Nichols WL, et al., *von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA).* Haemophilia. 2008 Mar;14(2):171-232], 이 문헌의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다). 다른 한편으로, 3형 폰 빌레브란트 병에서와 같은 폰 빌레브란트 인자의 심각한 결핍은 점막 출혈, 외상으로 인한 출혈, 또는 치과 또는 수술 절차 부위에서의 국소 출혈로서 나타나는 임상적 표현형과 관

련될 수 있다. 3형 폰 빌레브란트 병 하위 집단 내에서도 폰 빌레브란트 인자의 순환 수준의 연속이 존재하며, 일반적으로 이들 환자 중에서 가장 낮은 VWF 수준에서의 출혈 증상의 증가된 빈도에 대한 경향이 존재한다 (문헌 [Schneppenheim R., et al. *Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population.* Hum Genet. 1994 Dec;94(6):640-52], [Zhang Z, Lindstedt M, Blomback M, Anvret M. *Effects of the mutant von Willebrand factor gene in von Willebrand disease.* Hum Genet. 1995 Oct;96(4):388-94] 및 [Nichols WL et al., Haemophilia. 2008 Mar;14(2):171-232], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다).

[0416] 폰 빌레브란트 병의 임상 역학에 의해 기술된 유전자형-표현형 상관 관계에 의하면, 정상 숙주에 대한 폰 빌레브란트 인자의 약리학적 억제제의 투여는, 당해 억제제가 완전하고 지속적인 억제에 영향을 줄 수 없다면, 출혈 표현형의 최소 위험을 초래할 것으로 제시된다. 본 예측은, 비-사람 영장류, 정상적인 사람 자원자, 및 심지어 혈소판 감소증 환자 또는 항응고제 환자에게 투여된, 폰 빌레브란트 인자 ARC1779의 1세대 압타머 억제제의 경험으로 확인되었지만, 어떠한 출혈 증상도 관찰되지 않았다 (문헌 [Gilbert JC, et al., *First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers.* Circulation. 2007 Dec 4;116(23):2678-86], [Diener JL, et al., *Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779.* J Thromb Haemost. 2009 Jul;7(7):1155-62], [Knobl P, et al., *Anti-von Willebrand factor aptamer ARC1779 for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura.* Transfusion. 2009 Oct;49(10):2181-5], [Jilma-Stohlawetz P, et al., *A dose ranging phase I/II trial of the von Willebrand factor inhibiting aptamer ARC1779 in patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura.* Thromb Haemost. 2011 Sep;106(3):539-47], 이들 문헌의 전문은 각각 본 출원에 참조로 포함된다).

[0417] BT-200은 ARC1779 및 ARC15105와 같은 폰 빌레브란트 인자의 선행 압타머 억제제보다 더 강력하고 오래 작용하며 더 우수한 피하 생체 이용률을 갖도록 조작되었다. 이러한 목표는 시노몰구스 원숭이에서 BT-200의 PK/PD 연구 결과에 기초하여 완전히 충족된 것으로 보인다. 본 연구에서 투여된 동물의 대부분은 피부 아래의 사지 및/또는 흉부 영역에서 발생되는 점막 피부 출혈을 갖는 것으로 관찰되었다. 이들 동물에서, 3형 폰 빌레브란트 병의 전형적인 점막 피부 출혈이 처음으로 관찰되었으며, 이는 최고 용량의 ARC1779를 사용한 비-사람 영장류 독성 연구 및 최대 20 mg/kg으로 투여된 ARC15105를 사용한 원숭이 연구에서도 관찰된 적이 없었다. 이러한 출혈은 표적외 독성 (off-target toxicity)이 아닌 "과장된 약리학"을 나타내며, 폰 빌레브란트 인자 기능이 여전히 억제되고 항혈전 효과가 예상되지만 출혈이 더 이상 관찰되지 않는 수준으로 간단한 복용량 감소로 이를 피하는 것은 가능하였다.

[0418] 투여량이 시노몰구스 원숭이에서 0.3 mg/kg 또는 0.1 mg/kg으로 감소된 후속 연구에 의해 이를 확인하였다. 폰 빌레브란트 인자 기능의 완전한 억제는 여전히 PFA-200 분석을 사용하여 관찰되었으며 (표 26 참조), 어떠한 출혈도 관찰되지 않았다.

표 26

PFA-200 에 의한 폐쇄 시간 (초)

[0419]

샘플 시간	0.3 mg/kg S.C.		0.1 mg/kg S.C.	
	수컷	암컷	수컷	암컷
투여 전	86	66	70	76
1 h	112	201	106	103
8 h	300	300	300	300
24 h	300	300	253	300

[0420] **실시예 24. 약동학 연구**

[0421] BT-200의 약동학 (PK) 분석을 실시예 19에서 기재된 바와 동일한 16마리의 원숭이 유래의 혈장 샘플에서 수행하였다. 투여 전 (-30분), 투여 후 1시간, 4시간, 8시간, 24시간, 48시간, 96시간, 168시간, 240시간 및 336시간에서 혈액을 샘플링하였다. 1.5% K_2-EDTA를 함유하는 튜브에 대략 0.5 ml의 전혈을 각 시점에서 수집하였다. 샘플을 3000 rpm에서 원심 분리하여 혈장을 수득하였다. 모든 혈장 샘플을 분석할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 4*250 mm의 DNA PAC200 컬럼을 갖는 Agilent 1260 Infinity System (Agilent, Santa Clara, CA)을 사용하

는 고성능 액체 크로마토그래피6 (HPLC)에 의해 BT-200의 혈장 농도를 결정하였다. 반감기 ($T_{1/2}$), 최대 농도 도달 시간 ($T_{최대}$), 초기 농도 (C_0), 최대 농도 ($C_{최대}$), 마지막으로 측정 가능 농도까지의 AUC ($AUC_{마지막}$), 0에서부터 무한대까지의 AUC ($AUC_{무한}$) 및 생체 이용률 (F)을 비롯한 PK 파라미터를 Phoenix WinNonlin 소프트웨어 (Certara, Princeton, NJ)를 사용하여 결정하였다.

[0422] PK 파라미터의 평균값은 표 27에 제시되어 있다. 원숭이 혈장에서의 BT-200의 반감기 ($T_{1/2}$)는 76.4 내지 85.7 시간이었다. 1:3.0:5.0의 S.C. 용량의 경우, $C_{최대}$로 측정된 노출 대 용량 수준은 1:2.8:5.3이며, $AUC_{무한}$로는 1:2.9:5.5이었다. S.C. 투여에 대한 $T_{최대}$는 24 내지 42시간이었다. S.C. 투여의 생체 이용률은 115% 내지 133%이었다 (제1 샘플 수집 시간은 I.V. 투여에 대해 1시간이었다). 어떠한 성 유의차도 관찰되지 않았다. 결론적으로, BT-200은 탁월한 S.C. 생체 이용률 및 긴 반감기를 갖기 때문에 훌륭한 약물 후보이다.

표 27

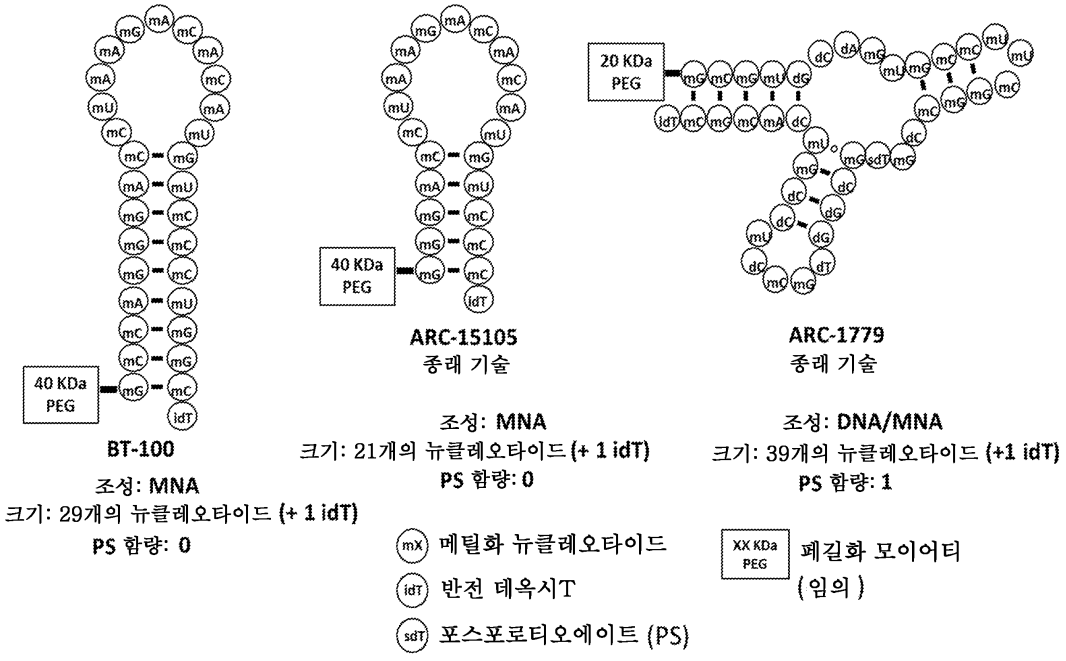
PK 파라미터

[0423]

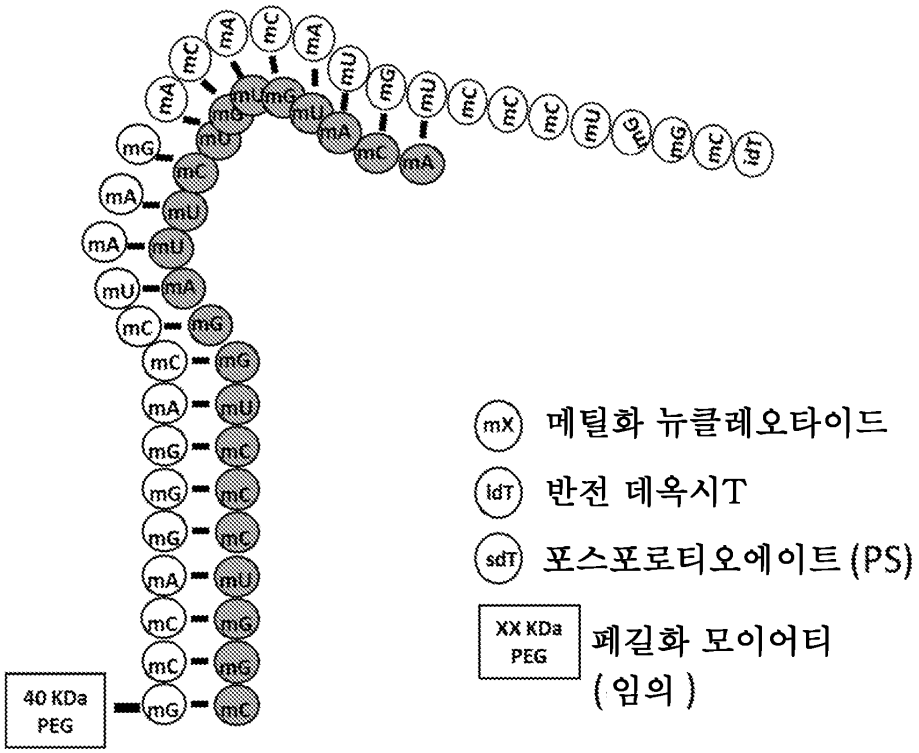
처리	$T_{1/2}$ (시간)	$T_{최대}$ (시간)	C_0/$C_{최대}$ (ug/mL)	$AUC_{마지막}$ (h*ug/mL)	$AUC_{무한}$ (h*ug/mL)	F (%)
3 mg/kg I.V.	85.7	1	74.6	4213	4473	NA
1 mg/kg S.C.	76.4	24	13.2	1602	1785	120
3 mg/kg S.C.	83.9	42	37.0	4798	5139	115
5 mg/kg S.C.	79.3	30	69.4	9294	9906	133

도면

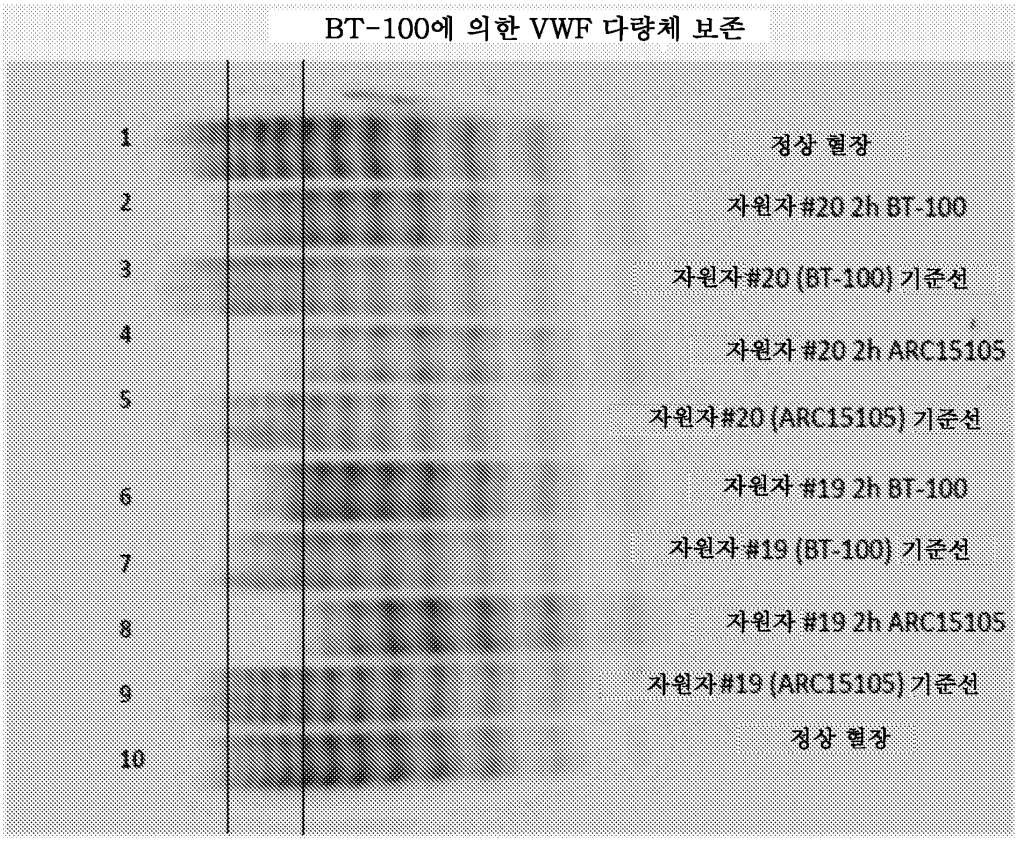
도면1



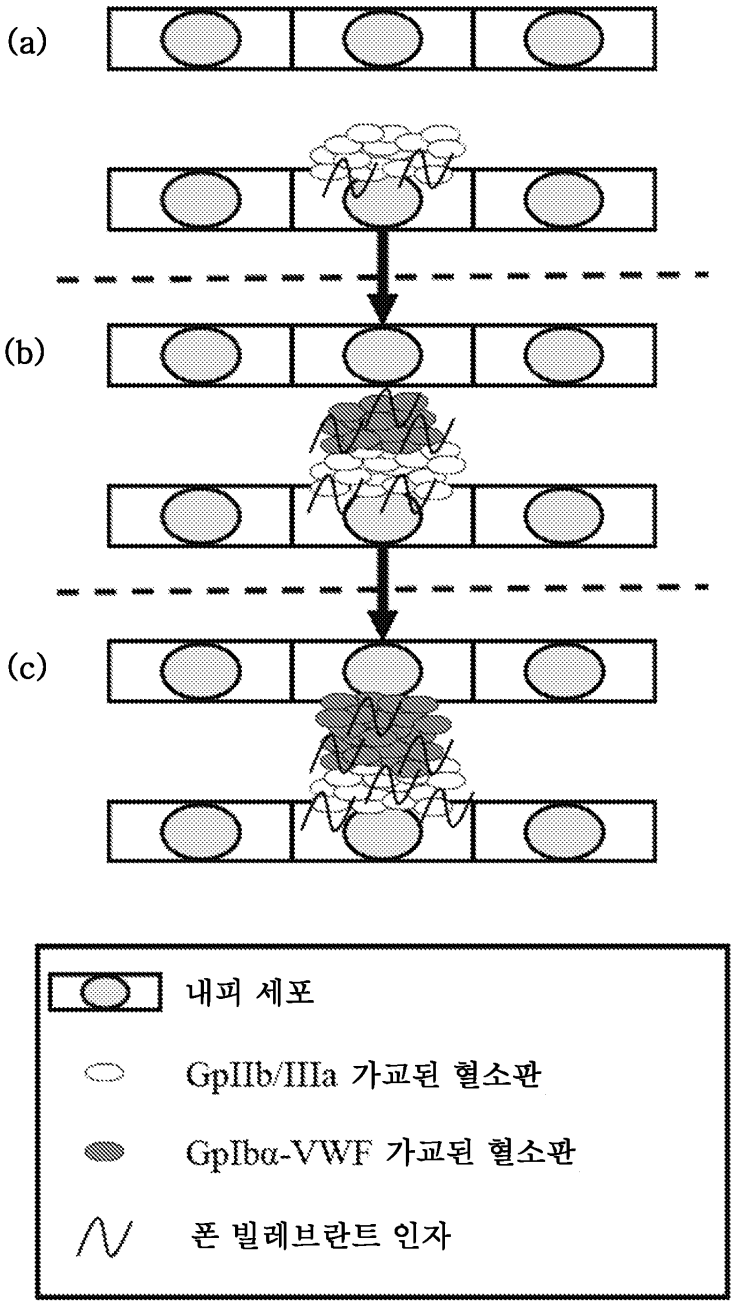
도면2


40 KDa PEG
mX 메틸화 뉴클레오타이드
idT 반전 데옥시T
sdT 포스포로티오에이트 (PS)
XX KDa PEG 페길화 모이어티 (임의)

도면3


BT-100에 의한 VWF 다량체 보존
1 정상 혈장
2 자원자#20 2h BT-100
3 자원자#20 (BT-100) 기준선
4 자원자 #20 2h ARC15105
5 자원자#20 (ARC15105) 기준선
6 자원자 #19 2h BT-100
7 자원자#19 (BT-100) 기준선
8 자원자 #19 2h ARC15105
9 자원자#19 (ARC15105) 기준선
10 정상 혈장

도면4



서 열 목 록

<110> BAND THERAPEUTICS, LLC

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF COMPLICATIONS AND DISORDERS RELATING TO VON WILLEBRAND FACTOR

<130> 2059.1002PCT

<140> PCT/US2018/XXXXXX

<141> 2018-05-18

<150> 62/508,530

<151> 2017-05-19

<150> 62/638,579

<151> 2018-03-05

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 1

gccagggacc uaagacacau gucccuggc 29

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(29)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (30)..(30)

<223> Inverted nucleotide

<400> 2

gccagggacc uaagacacau gucccuggct 30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(29)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (30)..(30)

<223> Inverted nucleotide

<400> 3

gccagggacc uaagacacau gucccuggct 30

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 4

acaugugucu uaggucccug gc 22

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(22)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> Inverted nucleotide

<400> 5

acaugugucu uaggucccug gct 23

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> Inverted nucleotide

<400> 6

gggaccuaag acacaugucc ct 22

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(18)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (27)..(28)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (30)..(30)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (33)..(34)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (36)..(39)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (40)..(40)

<223> Inverted nucleotide

<400> 7

gcgugcagug ccuucggccg tgcggtgccu ccgucacgct 40

<210> 8

<211

> 8833

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

agctcacagc tattgtggtg ggaaagggag ggtggttggt ggatgtcaca gcttgggctt 60

tatctccccc agcagtgggg actccacagc ccctgggcta cataacagca agacagtccg 120

gagctgtagc agacctgatt gagcctttgc agcagctgag agcatggcct agggtgggcg 180

gcaccattgt ccagcagctg agtttcccag ggaccttgga gatagccgca gccctcattt 240

gcaggggaag atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt 300

gccagggacc ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct 360

tttcggaagt gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg 420

cagttacctc ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca 480

gaatggcaag agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt 540

tgtcaatggt accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg 600

gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt 660

ggccaggatc gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa 720

gacctgcggg ctgtgtggca actttaacat ctttgctgaa gatgacttta tgacccaaga 780

agggaccttg acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga 840

acagtggtgt gaacgggcat ctcctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat 900

gcagaagggc ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcggtgt ttgcccgctg 960

ccaccctctg gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg 1020

tgctgggggg ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgccca 1080

ggagggaatg gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc 1140

tggtatggag tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat 1200

caatgaaatg tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg gacagctcct 1260

ggatgaaggc ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta 1320

ccctcccggc acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg 1380

gatctgcagc aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc acaggtcaat cacacttcaa 1440

gagctttgac aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga 1500

ttgccaggac cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgcga 1560

cgctgtgtgc acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa 1620

actgaagcat ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac gtccagctcc ccctcctgaa 1680

aggtgacctc cgcatccagc atacagtgac ggcctccgtg cgcctcagct acggggagga 1740

cctgcagatg gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc 1800

cgggaagacc tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac 1860

cccctctggg ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg 1920

ggactgccag gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac 1980

caggttctcc gaggaggcgt gcgcggtcct gacgtccccc acattcgagg cctgccatcg 2040

tgccgtcagc ccgctgccct acctgcggaa ctgccgctac gacgtgtgct cctgctcgga 2100
cggccgcgag tgcctgtgcg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg 2160
cgtgcgcgtc gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt 2220
gtacctgcag tgcgggaccc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccggatga 2280
ggaatgcaat gaggcctgcc tggagggctg cttctgcccc ccagggctct acatggatga 2340
gaggggggac tgcgtgccca aggcccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca 2400
gccagaagac atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg gcttcatgca 2460

ctgtaccatg agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcccct 2520
gtctcatcgc agcaaaagga gcctatcctg tcggcccccc atggtcaagc tggtgtgtcc 2580
cgctgacaac ctgcgggctg aagggctcga gtgtaccaaa acgtgccaga actatgacct 2640
ggagtgcatg agcatgggct gtgtctctgg ctgcctctgc cccccgggca tggtccggca 2700
tgagaacaga tgtgtggccc tggaaaggtg tccctgcttc catcagggca aggagtatgc 2760
ccctggagaa acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcgggacc ggaagtggaa 2820
ctgcacagac catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgatc ggcatggccc actacctcac 2880

cttcgacggg ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta 2940
ctgcggcagt aaccctggga cctttcggat cctagtgggg aataagggat gcagccaccc 3000
ctcagtgaaa tgcaagaaac gggtcaccat cctggtggag ggaggagaga ttgagctgtt 3060
tgacggggag gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga 3120
gtctggccgg tacatcattc tgctgctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca 3180
cctgagcatc tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg 3240
gaattttgat ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga 3300

ccctgtggac tttgggaact cctggaaagt gagctcgcag tgtgctgaca ccagaaaagt 3360
gcctctggac tcatcccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga 3420
ttcctcctgt agaatcctta ccagtgacgt cttccaggac tgcaacaagc tggtggaccc 3480
cgagccatat ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg 3540
cgcctgcttc tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgcccagc atggcaaggt 3600
ggtgacctgg aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga 3660
gaacgggtat gagtgtgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg 3720

tcagcaccct gagccactgg cctgccctgt gcagtgtgtg gagggctgcc atgcccactg 3780

ccctccaggg aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgaccctg aagactgtcc 3840

agtgtgtgag gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtcacct tgaatcccag 3900

tgaccctgag cactgccaga tttgccactg tgatgttgtc aacctcacct gtgaagcctg 3960

ccaggagccg ggaggcctgg tggtgcctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct 4020

gtatgtggag gacatctcgg aaccgccgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga 4080

cctggtcttc ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagtttg aagtgctgaa 4140

ggcctttgtg gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc 4200

cgtggtggag taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc 4260

gtcagagctg cggcgcattg ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac 4320

cagcgaggtc ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc 4380

ctcccgcatc accctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt 4440

tgtccgctac gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccgg tgggcattgg 4500

gccccatgcc aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggcccctg agaacaaggc 4560

cttcgtgctg agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct 4620

ctgtgacctt gcccctgaag ccctcctcc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac 4680

tgtgggcccg gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct 4740

ggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt gaagccgact tcaacaggag 4800

caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt 4860

cacggtgctg cagtactcct acatggtgac tgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc 4920

caaaggggac atcctgcagc gggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa 4980

cactgggctg gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg 5040

ggagcaggcg cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa 5100

gaggctgcct ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg ggccctaatg ccaacgtgca 5160

ggagctggag aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgct 5220

cccccgagag gctcctgacc tggtgctgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat 5280

ccccaccctc tcccctgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctcctgga 5340

tggctcctcc agtttcccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt 5400

catttcaaaa gccaatatag ggcctcgtct cactcaggtg tcagtgctgc agtatggaag 5460

catcaccacc attgacgtgc catggaacgt ggtcccggag aaagcccatt tgctgagcct 5520

tgtggacgtc atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc 5580

tgtgcgatac ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcctcaa aggcggtggt 5640

catcctggtc acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc 5700

caacagagtg acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgatgcag cccagctacg 5760

gatcttggca ggcccagcag gcgactccaa cgtggtgaag ctccagcgaa tcgaagacct 5820

ccctaccatg gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgttag 5880

gatttgcatg gatgaggatg ggaatgagaa gaggcccggg gacgtctgga ccttgccaga 5940

ccagtgccac accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcatcgggt 6000

caactgtgac cgggggctga ggccttcgtg ccctaacagc cagtcccctg ttaaagtgga 6060

agagacctgt ggctgccgct ggacctgccc ctgcgtgtgc acaggcagct ccactcggca 6120

catcgtgacc tttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt 6180

tcaaaacaag gagcaggacc tggaggtgat tctccataat ggtgcctgca gccctggagc 6240

aaggcagggc tgcatgaaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagctgca 6300

cagtgacatg gaggtgacgg tgaatgggag actggtctct gttccttacg tgggtgggaa 6360

catggaagtc aacgtttatg gtgccatcat gcatgaggtc agattcaatc accttggtca 6420

catcttcaca ttcactccac aaaacaatga gttccaactg cagctcagcc ccaagacttt 6480

tgcttcaaag acgtatggtc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat 6540

gctgagggat ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca 6600

gcggccaggg cagacgtgcc agcccatcct ggaggagcag tgtcttgtcc ccgacagctc 6660

ccactgccag gtcctcctct taccactgtt tgctgaatgc cacaaggtcc tggctccagc 6720

cacattctat gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaagtgt gtgaggtgat 6780

cgcctcttat gcccacctct gtcggaccaa cggggtctgc gttgactgga ggacacctga 6840

tttctgtgct atgtcatgcc caccatctct ggtctacaac cactgtgagc atggctgtcc 6900

ccggcactgt gatggcaacg tgagctcctg tggggaccat ccctccgaag gctgtttctg 6960

ccctccagat aaagtcatgt tggaaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagtg 7020

cattggtgag gatggagtcc agcaccagtt cctggaagcc tgggtcccgg accaccagcc 7080

ctgtcagatc tgcacatgcc tcagcgggcg gaaggtcaac tgcacaacgc agccctgccc 7140

cacggccaaa gctcccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgcc agaatgcaga 7200

ccagtgctgc cccgagtatg agtgtgtgtg tgacccagtg agctgtgacc tgcccccagt 7260

gcctcactgt gaacgtggcc tccagcccac actgaccaac cctggcgagt gcagacccaa 7320

cttcacctgc gcctgcagga aggaggagtg caaaagagtg tccccaccct cctgcccccc 7380

gcaccgtttg cccacccttc ggaagaccca gtgctgtgat gagtatgagt gtgcctgcaa 7440

ctgtgtcaac tccacagtga gctgtcccct tgggtacttg gcctcaactg ccaccaatga 7500

ctgtggctgt accacaacca cctgccttcc cgacaaggtg tgtgtccacc gaagcaccat 7560

ctaccctgtg ggccagttct gggaggaggg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga 7620

ggatgccgtg atgggcctcc gcgtggccca gtgctcccag aagccctgtg aggacagctg 7680

tcggtcgggc ttcacttacg ttctgcatga aggcgagtgc tgtggaaggt gcctgccatc 7740

tgcctgtgag gtggtgactg gctcaccgcg gggggactcc cagtcttcct ggaagagtgt 7800

cggctcccag tgggcctccc cggagaaccc ctgcctcatc aatgagtgtg tccgagtgaa 7860

ggaggaggtc tttatacaac aaaggaacgt ctcctgcccc cagctggagg tccctgtctg 7920

cccctcgggc tttcagctga gctgtaagac ctcagcgtgc tgcccaagct gtcgctgtga 7980

gcgcatggag gcctgcatgc tcaatggcac tgtcattggg cccgggaaga ctgtgatgat 8040

cgatgtgtgc acgacctgcc gctgcatggt gcaggtgggg gtcatctctg gattcaagct 8100

ggagtgcagg aagaccacct gcaacccctg ccccctgggt tacaaggaag aaaataacac 8160

aggtgaatgt tgtgggagat gtttgcctac ggcttgcacc attcagctaa gaggaggaca 8220

gatcatgaca ctgaagcgtg atgagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa 8280

ggtcaatgag agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc cacccttga 8340

tgaacacaag tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga 8400

cacatgtgag gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaaggtggg 8460

aagctgtaag tctgaagtag aggtggatat ccactactgc cagggcaaat gtgccagcaa 8520

agccatgtac tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac 8580

acggacggag cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtaccatga 8640

ggttctcaat gccatggagt gcaaatgctc ccccaggaag tgcagcaagt gaggctgctg 8700

cagctgcatg ggtgcctgct gctgcctgcc ttggcctgat ggccaggcca gagtgctgcc 8760

agtcctctgc atgttctgct cttgtgccct tctgagccca caataaaggc tgagctctta 8820

tcttgcaaaa ggc 8833

<210> 9

<211> 2813

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile

1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr

20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly

35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly

50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys

65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu

85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro

100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys

115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly

130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly

145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln

165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala

180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser

195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln

210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu

225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu

245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala

260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His

275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys

290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met

305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu

325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His

340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn

355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys

370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp

385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg

405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys

420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu

435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val

450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu

465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu

485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu

500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525
Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540
Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln

545 550 555 560
Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575
Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590
Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605
Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly

610 615 620
Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640
Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655
Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670
Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe

675 680 685
Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700
Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720
Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735
His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val

740 745 750
Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg

```
        755                 760                 765
Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
    770                 775                 780
Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785                 790                 795                 800
Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg

                805                 810                 815
His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
            820                 825                 830
Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
        835                 840                 845
Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
    850                 855                 860
Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly

865                 870                 875                 880
Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
                885                 890                 895
Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
            900                 905                 910
Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
        915                 920                 925
Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys

    930                 935                 940
Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
945                 950                 955                 960
Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
                965                 970                 975
His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
            980                 985                 990
Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp  Gly Ile Gln Asn Asn  Asp Leu Thr

        995                 1000                1005
```

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn

1010 1015 1020

Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro

1025 1030 1035

Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln

1040 1045 1050

Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe

1055 1060 1065

Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val

1070 1075 1080

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala

1085 1090 1095

Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln

1100 1105 1110

His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln

1115 1120 1125

Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu

1130 1135 1140

Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln

1145 1150 1155

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys

1160 1165 1170

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln

1175 1180 1185

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly

1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp

1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr

1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr

1235 1240 1245

Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser

1250 1255 1260

Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu

1265 1270 1275

Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe

1280 1285 1290

Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg

1295 1300 1305

Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp

1310 1315 1320

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser

1325 1330 1335

Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln

1340 1345 1350

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile

1355 1360 1365

Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu

1370 1375 1380

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val

1385 1390 1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro

1400 1405 1410

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile

1415 1420 1425

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val

1430 1435 1440

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys

1445 1450 1455

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met

1460 1465 1470

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu

1475 1480 1485

Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu

1490 1495 1500

Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys

1505 1510 1515

Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp

1520 1525 1530

Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val

1535 1540 1545

Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln

1550 1555 1560

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr

1565 1570 1575

Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser

1580 1585 1590

Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr

1595 1600 1605

Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile

1610 1615 1620

Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu

1625 1630 1635

Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp

1640 1645 1650

Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg

1655 1660 1665

Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala

1670 1675 1680

Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly

1685 1690 1695

Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe

1700 1705 1710

Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr

1715 1720 1725

Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val

1730 1735 1740

Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val

1745 1750 1755

Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala

1760 1765 1770

Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala

1775 1780 1785

Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val

1790 1795 1800

Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn

1805 1810 1815

Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala

1820 1825 1830

Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val

1835 1840 1845

Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu

1850 1855 1860

Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile

1865 1870 1875

Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp

1880 1885 1890

Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly

1895 1900 1905

Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu

1910 1915 1920

Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu

1925 1930 1935

Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser

1940 1945 1950

Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu

1955 1960 1965

Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp

1970 1975 1980

Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg

1985 1990 1995

Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser

2000 2005 2010

Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu

2015 2020 2025

Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr

2030 2035 2040

Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile

2045 2050 2055

Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser

2060 2065 2070

Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys

2075 2080 2085

Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val

2090 2095 2100

Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg

2105 2110 2115

Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val

2120 2125 2130

Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala

2135 2140 2145

Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys

2150 2155 2160

Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala

2165 2170 2175

Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp

2180 2185 2190

Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val

2195 2200 2205

Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn

2210 2215 2220

Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro

2225 2230 2235

Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala

2240 2245 2250

Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu

2255 2260 2265

Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys

2270 2275 2280

Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr

2285 2290 2295

Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg

2300 2305 2310

Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp

2315 2320 2325

Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly

2330 2335 2340

Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe

2345 2350 2355

Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro

2360 2365 2370

Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys

2375 2380 2385

Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val

2390 2395 2400

Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys

2405 2410 2415

Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His

2420 2425 2430

Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys

2435 2440 2445

Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu

2450 2455 2460

Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg

2465 2470 2475

Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg

2480 2485 2490

Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly

2495 2500 2505

Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser

2510 2515 2520

Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu

2525 2530 2535

Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu

2540 2545 2550

Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser

2555 2560 2565

Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met

2570 2575 2580

Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp

2585 2590 2595

Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser

2600 2605 2610

Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro

2615 2620 2625

Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg

2630 2635 2640

Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile

2645 2650 2655

Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr

2660 2665 2670

His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys

2675 2680 2685

Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala

2690 2695 2700

Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr

2705 2710 2715

Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr

2720 2725 2730

Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His

2735 2740 2745

Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp

2750 2755 2760

Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg

2765 2770 2775

Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val

2780 2785 2790

Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro

2795 2800 2805

Arg Lys Cys Ser Lys

2810

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 11

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 12

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(22)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 12

acaugugucu uaggucccug gc 22