



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0124820  
(43) 공개일자 2010년11월29일

- (51) Int. Cl.  
*C12N 15/11* (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2010-7023194  
(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년03월13일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2010년10월15일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/053002  
(87) 국제공개번호 WO 2009/115465  
국제공개일자 2009년09월24일
- (30) 우선권주장  
08425175.0 2008년03월19일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
61/051,088 2008년05월07일 미국(US)
- (71) 출원인  
**젠티엄 에스피에이**  
이테리 코모 가르디아 빌라 22079 피아자 엑스엑스 세템브레 2
- (72) 발명자  
**스테인 애론 시**  
미국 뉴욕-10956 뉴욕주 뉴 시티 돌핀 가 11  
**이아코벨리 마시모**  
이탈리아 아이-20152 밀라노 260/3 비아 포르체 아르마테
- (74) 대리인  
**이현수, 김종선, 김태현, 정홍식**

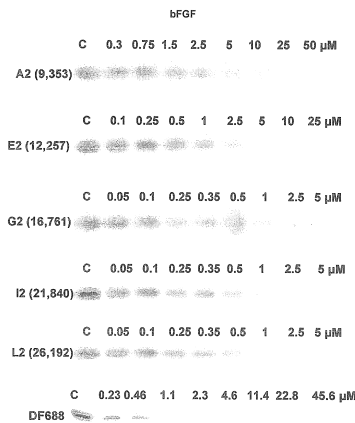
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 치료적 용도

(57) 요약

다양한 길이로 정의되는 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 조성물은 디파이브로타이드와 유사한 효과를 보이도록 창안되었다. 상기 조성물은 필수적으로 40mer 에서 65 mer의 범위인 Nmer를 함유하는 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 혼합물로 구성된다. 상기 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 각 위치에 각각 A, G, C 및 T를 포함하는 헤테로폴리머인 것이지만, 올리고뉴클레오타이드의 각 위치에 동일한 염기가 존재할 수 있는 호모폴리머일 수도 있다. 이러한 혼합물은 암 및 다른 질병을 치료하는데 효과적이다.

대표도 - 도1a



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

약 40 염기 내지 약 65 염기의 길이를 갖는 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 혼합물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 40 염기 내지 약 60 염기의 길이를 갖는 것인, 혼합물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 45 염기 내지 약 60 염기의 길이를 갖는 것인, 혼합물.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 45 염기 내지 약 55 염기의 길이를 갖는 것인, 혼합물.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 50 염기 내지 약 55 염기의 길이를 갖는 것인, 혼합물.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥인 것인, 혼합물.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 시퀀스는 DNA 및/또는 RNA 시퀀스인 것인, 혼합물.

### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 시퀀스는 임의의 시퀀스인 것인, 혼합물.

### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 퓨린 염기들(purine bases)는 구아닌, 아데닌, 잔틴(xanthine), 하이포잔틴(hypoxanthine)에서 선택된 것들이고, 상기 피리미딘 염기들(pyrimidine bases)는 시토신, 티민, 메틸시토신 및 우라실에서 선택된 것들인, 혼합물.

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 당은 리보스 및 데옥시리보스에서 선택된 것인, 혼합물.

#### 청구항 11

치료제로서의 사용을 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 혼합물.

#### 청구항 12

정맥 폐쇄성(veno-occlusive) 질병의 치료 및/또는 예방에서의 사용을 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 혼합물.

#### 청구항 13

혈전성 혈소판 감소성 자반증(thrombotic thrombocytopenic purpura)의 치료 및/또는 예방에서의 사용을 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 혼합물.

#### 청구항 14

종양 치료의 용도에서의 사용을 위한 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 혼합물.

#### 청구항 15

혈관 신생 의존성 종양(treatment of angiogenesis dependent tumors)의 치료에서의 사용을 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 혼합물.

#### 청구항 16

조혈 전구체(hematopoietic progenitors)를 가동할 수 있는 하나 이상의 조혈 인자를 복합하여 투여하거나 근소한 시간차를 두어 투여하는 경우, 포유류의 말초 혈관에서 줄기 세포 및 전구 세포의 양을 증가시키기 위한 용도를 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 혼합물.

#### 청구항 17

항혈액응고제(blood anticoagulant)로서의 용도를 위한, 1 내지 10항 중 어느 한 항에 따른 혼합물.

#### 청구항 18

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 혼합물을 함유하는 의약 제제(pharmaceutical formulation).

**청구항 19**

제18항에 있어서,  
상기 의약 제제는 수성 용액인 것을 특징으로 하는 것인, 의약 제제.

**청구항 20**

제18항에 있어서,  
상기 의약 제제는 정맥으로 투여되는 것을 특징으로 하는 것인, 의약 제제.

**청구항 21**

제18항에 있어서,  
상기 의약 제제는 포유류에게 투여되는 특징으로 하는 것인, 의약 제제.

**청구항 22**

제21항에 있어서,  
상기 포유류는 사람인 것을 특징으로 하는 것인, 의약 제제.

**청구항 23**

제19항에 있어서,  
상기 수성 용액은 약 5 내지 60 마이크로몰/리터의 올리고뉴클레오타이드의 농도를 갖는 것을 특징으로 하는 것인, 의약 제제.

**청구항 24**

제23항에 있어서,  
상기 수성 용액은 약 10 내지 50 마이크로몰/리터의 올리고뉴클레오타이드의 농도를 갖는 것을 특징으로 하는 것인, 의약 제제.

**청구항 25**

약 40 염기 내지 약 65 염기의 길이를 갖는 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 혼합물을 투여하는 것을 포함하는 질병 또는 질환(condition)을 치료하는 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 40 염기 내지 약 60염기의 길이를 갖는 것인, 방법.

**청구항 27**

제25항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 45 염기 내지 약 60 염기의 길이를 갖는 것인, 방법.

**청구항 28**

제25항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 45 염기 내지 약 55 염기의 길이를 갖는 것인, 방법.

**청구항 29**

제25항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 50 염기 내지 약 55 염기의 길이를 갖는 것인, 방법.

**청구항 30**

제25항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥인 것인, 방법.

**청구항 31**

제25항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 시퀀스는 DNA 및/또는 RNA 시퀀스인 것인, 방법.

**청구항 32**

제25항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 시퀀스는 임의 시퀀스인 것인, 방법.

**청구항 33**

제25항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 퓨린 염기(purine bases)는 구아닌, 아데닌, 잔틴(xanthine), 하이포잔틴(hypoxantine)에서 선택된 것이고, 상기 피리미딘 염기(pyrimidine bases)는 시토신, 티민, 메틸시토신 및 우라실에서 선택된 것인, 방법.

**청구항 34**

제25항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 당은 리보스 및 데옥시리보스에서 선택된 것인, 방법.

**청구항 35**

제25항에 있어서,

상기 질병 또는 질환은 정맥 폐쇄성 질병인 것인, 방법.

**청구항 36**

제25항에 있어서,

상기 질병 또는 질환은 혈전성 혈소판 감소성 자반증(thrombotic thrombocytopenic purpura)인 것인, 방법.

**청구항 37**

제25항에 있어서,

상기 질병 또는 질환은 종양인 것인, 방법.

**청구항 38**

제25항에 있어서,

상기 질병 또는 질환은 혈관신생 의존성 종양인 것인, 방법.

**청구항 39**

제25항에 있어서,

상기 질병 또는 질환은 혈액 응고제의 사용에 의해 호전되는 것인, 방법.

**청구항 40**

약 40 염기 내지 약 65 염기의 길이를 갖는 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 혼합물을, 조혈 전구체(hematopoietic progenitors)를 가동할 수 있는 하나 이상의 조혈 인자를 복합하여 투여하거나 근소한 시간차를 두어 투여하는 것을 포함하는, 포유류의 말초 혈관에서 줄기 세포 및 전구 세포의 양을 증가시키기 위한 방법.

**청구항 41**

제40항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 40 염기 내지 약 60 염기의 길이를 갖는 것인, 방법.

**청구항 42**

제40항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 45 염기 내지 약 60 염기의 길이를 갖는 것인, 방법.

#### 청구항 43

제40항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 45 염기 내지 약 55 염기의 길이를 갖는 것인, 방법.

#### 청구항 44

제40항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 50 염기 내지 약 55 염기의 길이를 갖는 것인, 방법.

#### 청구항 45

제40항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥인 것인, 방법.

#### 청구항 46

제40항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 시퀀스는 DNA 및/또는 RNA 시퀀스인 것인, 방법.

#### 청구항 47

제40항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 시퀀스는 임의 시퀀스인 것인, 방법.

#### 청구항 48

제40항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 퓨린 염기(purine bases)는 구아닌, 아데닌, 잔틴(xanthine), 하이포잔틴(hypoxanthine)에서 선택된 것이고, 상기 피리미딘 염기(pyrimidine bases)는 시토신, 티민, 메틸시토신 및 우라실에서 선택된 것인, 방법.

#### 청구항 49

제40항에 있어서,

상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 당은 리보오스 및 데옥시리보스에서 선택된 것인, 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 40mers 내지 65mers의 Nmers로 불리는 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드(synthetic phosphodiester oligonucleotides)의 혼합물, 특히 암을 포함한 질병(disease)을 치료하기 위한 이러한 올리고뉴클레오타이드의 용도에 대한 것이다. 상기 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 각 위치에 각각 A,G,C 및 T로 구성된 헤테로폴리머일 뿐만 아니라 호모폴리머일 수 있다. 즉, 상기 올리고뉴클레오타이드의 각 위치에 동일한 염기가 존재할 수 있다.

### 배경 기술

[0002] 디파이브로타이드(difibrotide)는 동물 및/또는 식물 조직, 특히 돼지 또는 소의 장에서 추출하여 얻은 단일 가닥의 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotides; 15-80mer, 평균 45mer)의 복합 혼합물(complex mixture)이다 (US 3,770,720 및 US 3,899,481). 디파이브로타이드는 평균 분자량이  $16.5 \pm 2.5$  kDa이며, 일반적으로 알칼리 금속의 염의 형태, 통상적으로 소듐염의 형태로 사용된다. 원래 이것은 항혈전성 활성(antithrombotic activity) 용도로 사용되었는데(US 3,829,567) 급성 신부전증(acute renal insufficiency)의 치료(US 4,694,134)나 급성 심근허혈(acute myocardial ischemia)의 치료(US 4,693,995)와 같은 다른 적용분야에서도 사용되었다. 디파이브로타이드에 대한 다른 문헌들은 아래와 같이 인용되었다.

[0003] US 5,081,109는 말기(III기 및 IV기)의 말초 동맥병증(peripheral arteriopathies)을 치료하기 위한 디파이브로타이드의 사용에 대해 개시하였다.

[0004] US 5,116,617는 디파이브로타이드를 함유하는 조성물을 국소적으로 적용하여 사람의 모세혈관을 강화시키는 방법을 개시하였다.

[0005] US 5,977,083는 정상, 질병 및 회복 표지(marker)에 있어서 관찰된 변동(가령 증가, 감소, 출현, 소멸)에 대응하여 디파이브로타이드의 복용량을 변화시킴으로써 치료될 수 있는 다양한 질병 상태를 개시하였다.

[0006] US 6,046,172는 동물 기원의 4000 내지 10000 달톤(Dalton)으로 구성된 분자량을 갖는 올리고데옥시뉴클레오타이드를 개시하였는데, 이것은 폴리데옥시리보스뉴클레오타이드를 분절화(fractionation)하거나 고분자량의 데옥시리보핵산을 화학적 또는 효소적으로 해중합(depolymerization)함으로써 얻어질 수 있다.

[0007] US 6,699,985 및 US 5,624,912은 HIV 감염을 포함하는 다양한 질병 질환을 치료하는 디파이브로타이드 사용방법을 개시하였다.

[0008] US 7,338,777는 디파이브로타이드의 생물학적인 활성을 결정하는 방법을 개시하였다.

[0009] EP1276497은 디파이브로타이드를 조혈 전구체(hematopoietic progenitors)를 가동할 수 있는 하나 이상의 조혈 인자(hematopoietic factor)(G-CSF와 같은)와 복합하여 투여하거나 근소한 시간차를 두고 투여하여 포유류의 말초 혈관에서의 줄기세포 및 전구세포의 양을 증가시키는 방법을 개시하였다. WO2005023273 는 디파이브로타이드의 항종양 작용(anti tumor action)을 개시하였다.

[0010] WO2006094916은 혈관신생 의존성 종양(angiogenesis-dependent tumor)를 치료하기 위한 디파이브로타이드의 용도를 개시하였다.

[0011] 또한, 리뷰 기사인 [Defibrotide, a Polydisperse Mixture of Single Stranded Phosphodiester Oligonucleotides with Lifesaving Activity in Severe Hepatic Venocclusive Disease: Clinical Outcomes and Potential Mechanisms of Action(Kornblum 등, Oligonucleotides, 16:105-114 (2006))]은 디파이브로타이드 및 폐쇄성 정맥 질병(veno-occlusive disease, VOD)를 치료하는데 관한 이의 용도를 개시하였다.

[0012] 1998년에는 Dana-Farber Cancer Institute (보스톤, 매사추세츠)의 Paul Richardson 박사가 골수 이식 후 중증 간성 VOD를 치료하는데 디파이브로타이드를 사용하기 시작하였다. 상기 약물은 정맥으로 투여되며 독성이 거의 없고, 현재까지95%의 치사율을 갖는 질병에서 환자의 약 40%-50%가 완치되었다. 비록 그 작용의 메카니즘은 알려지지 않았지만, 미국과 유럽의 여러 기관에서 후속적인 시험이 진행되어 디파이브로타이드의 효능을 확인하였다.

[0013] US 4,985,552 및 US 5,223,609는 물리화학적 특성이 잘 나타나고 일정한 상품을 얻을 수 있으며 부작용이 없는 피브로타이드의 생산 공정에 대해 개시하였다.

[0014] EP 1325162는 디파이브로타이드의 생물학적인 활성을 결정하는 방법에 대해 개시하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0015] 수십년 동안, 뉴클레아제 분해(nuclease digestion) 때문에 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약물로 사용할 수 없다는 것이 정설이었으나 이것은 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드 독성이 낮기 때문에 환자들에게 다량이 투여될 수 있다는 것을 무시한 것이다. 디파이브로타이드를 사용한 임상실험은 이러한 타입의 분자들이 치료적인 효능을 갖고 있음을 명백하게 나타내었다. 그러나, 디파이브로타이드가 천연물처럼 동일하게 재생산이 가능한지가 문제이다. 따라서, 이 기술분야에서는 디파이브로타이드와 동일한 효과를 갖고 동일하게 재생산될 수 있는 조성물을 개발할 필요가 있다.

**과제의 해결 수단**

[0016] 본 발명은 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 혼합물을 투여하는 것을 포함하는 질병 또는 질환을 치료하는 방법에 대한 것으로서, 상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드는 약 40 염기 내지 약 65 염기, 바람직하게는 약 40 염기 내지 약 60 염기, 더욱 바람직하게는 약 45 염기 내지 약 60 염기, 약 45 염기 내지 약 55 염기 또는 약 50 염기 내지 약 55 염기의 길이를 갖는 것이다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기에서 정의된 것의 평균 길이를 갖는 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드 및 의약적 캐리어(및 선택적으로는 의약적으로 허용되는 부형제 및/또는 보조제(adjuvants))를 필수적으로 포함하지만 상기 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 활성에 실질적으로 영향을 미치는 성분들은 포함되지 않은 의약 조성물을 포함한다.

[0018] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥인 것일 수 있다; 상기 올리고뉴클레오타이드의 시퀀스는 DNA 및/또는 RNA 시퀀스일 수 있다; 상기 올리고뉴클레오타이드의 시퀀스는 임의의 시퀀스일 수 있다. 본 발명의 상기 방법에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드의 퓨린 염기는 구아닌(guanine), 아데닌(adenine), 잔틴(xanthine) 및 하이포잔틴(hypoxanthine)에서 선택될 수 있으며, 피리미딘(pyrimidine) 염기는 시토신(cytosine), 티민(thymine), 메틸시토신(methylcytosine) 및 우라실(uracil)에서 선택될 수 있다; 상기 올리고뉴클레오타이드의 당은 리보오스(ribose) 및 데옥시리보오스(deoxyribose)에서 선택될 수 있다. 본 발명의 방법에 있어서, 상기 질병 또는 질환은 정맥 폐쇄성 질병(veno-occlusive disease), 혈전성 혈소판 감소성 자반증(thrombotic thrombocytopenic purpura), 종양, 혈관신생 의존성 종양(angiogenesis-dependent tumors) 또는 항혈액응고제를 사용하여 호전되는 질병 또는 질환이다; 상기 방법은 조혈 전구체(hematopoietic progenitors)를 가동할 수 있는 하나 이상의 조혈 인자를 상기 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드와 복합하여 투여하거나 근소한 시간차를 두어 투여하여 포유류의 말초 혈관에서 줄기 세포 및 전구 세포의 양을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 이러한 측면 및 다른 측면들은 다음의 상세한 설명 및 첨부된 도면에 의해서 더욱 명확해질 것이다. 상기 및 하기의, 여기에 인용된 모든 문헌, 등록 특허 및 출원 특허는 전체로서 참조에 의해 통합되었다.

**도면의 간단한 설명**

[0020] 첨부된 도면은 단지 본 발명의 바람직한 실시형태를 도시한 것으로, 본 발명을 한정하기 위해서 사용되는 것이 아니다.

도 1a는 C1RNH<sup>32</sup>P-OdT<sub>18</sub>의 bFGF의 결합에 대한 디파이브로타이드와 디파이브로타이드 분자량 분절에 의한 경쟁을 보여주는 밴드 강도를 나타낸다.

도 1b는 디파이브로타이드 또는 디파이브로타이드 분자량 분절 농도의 로그에 대한 정규화된 밴드 강도의 플롯(plot)이다.

도 2는 CIRNH<sup>32</sup>P-OdT<sub>18</sub>의 bFGF에 대한 결합에 있어서 디파이브로타이드와 디파이브로타이드 분자량 분절 및 Nmer 경쟁자에 대한 K<sub>c</sub> 수치의 비교를 나타낸 표 및 차트이다.

도 3a는 알킬화 올리고뉴클레오타이드인 CIRNH<sup>32</sup>P-OdT<sub>18</sub>에 의한 PDFG BB의 변형을 나타내는 밴드강도이다.

도 3b는 반응성 올리고데옥시뉴클레오타이드 농도와 상대적인 밴드의 강도의 플롯이다.

도 3c는 도 3b의 데이터의 이중 역수 플롯(double reciprocal plot)이다.

도 4는 bFGF에 대한 CIRNH<sup>32</sup>P-OdT<sub>18</sub> 결합의 디파이브로타이드, 디파이브로타이드 분자량 분절 및 Nmer 경쟁자에 대한 K<sub>c</sub> 수치를 비교하여 나타낸 표 및 차트이다.

도 5는 VEGF에 대한 CIRNH<sup>32</sup>P-OdT<sub>18</sub> 결합의 Nmer 및 Tmer의 경쟁자에 대한 K<sub>c</sub> 값을 비교하여 나타낸 표 및 차트이다.

도 6은 라미닌에 대한 CIRNH<sup>32</sup>P-OdT<sub>18</sub> 결합의 Nmer 및 Tmer에 대한 K<sub>c</sub> 수치를 비교하여 나타낸 표 및 차트이다.

도 7은 HB-EGF에 대한 CIRNH<sup>32</sup>P-OdT<sub>18</sub> 결합의 Nmer 및 Tmer의 K<sub>c</sub> 수치를 비교하여 나타낸 표 및 차트이다.

도 8a는 디파이브로타이드에 의한 bFGF 매개 HMEC-1 증식의 억제를 나타낸 차트이다.

도 8b는 bFGF의 부존재시 세포 성장에 대한 디파이브로타이드의 억제 효과를 나타낸 차트이다.

도 9a는 Nmers에 의한 bFGF 매개 HMEC-1 증식의 억제를 나타낸 차트이다.

도 9b는 bFGF의 부존재시 세포 성장에 대한 Nmer의 억제 효과를 나타내는 차트이다.

도 10은 부분 트롬보플라스틴 시간(PTT)에 대한 디파이브로타이드 및 Nmer의 효과를 나타내는 차트이다.

도 11a는 24시간 동안 디파이브로타이드의 농도를 증가시켜 HMEC-1 세포를 노출시켜 얻은 조건 배지에 대한 복용량-의존성 방출 TFPI를 나타내는 차트이다.

도 11b는 5 μM의 디파이브로타이드에 의해 유도되는 조건 배지에 대한 TFPI 방출의 시간 간격(time course)을 나타내는 차트이다.

도 11c는 30분 동안 디파이브로타이드의 농도를 증가시켜 HMEC-1 세포를 노출시켜 얻은 조건 배지에 대한 복용량-의존성 방출 TFPI를 나타내는 차트이다.

도 12a는 디파이브로타이드 분자량 분절의 농도를 증가시켜 HNEC-I 세포를 노출시켜 얻은 조건 배지에 대한 TFPI의 복용량-의존성 방출을 나타내는 차트이다.

도 12b는 5 μM 디파이브로타이드에 의해 유도된 조건 배지에 대한 TFPI 방출의 시간 간격을 나타내는 차트이다.

도 13은 FGFR2- 전이 C11 세포의 bFGF+헤파린 자극 증식에서 디파이브로타이드 및 Nmer가 헤파린을 치환할 수 있는 능력을 나타내는 차트를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 정의

[0022] 다음의 정의는 본 발명을 더욱 명확하게 이해할 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0023] 뉴클레오타이드는 헤테로고리 염기, 당, 및 하나 이상의 인산기인 세 부분으로 구성된 화합물이다. 대부분의 일반적인 뉴클레오타이드에 있어서, 상기 염기는 퓨린 또는 피리미딘의 유도체이며, 상기 당은 5탄당(펜토오스)의 데옥시리보오스 또는 리보오스인 것이다. 뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA와 같은 핵산의 단위체이다.

[0024] 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 짧은 시퀀스로, 20 또는 그 미만의 염기를 갖는다. 자동 합성기(Automated synthesizers)를 이용하여 160 내지 200 염기의 올리고뉴클레오타이드를 합성할 수 있다. 합성된 염

기의 길이는 일반적으로 'mer'라는 단위를 사용한다(그리스어의 'meros'에서 유래했으며, 부분(part)을 의미한다). 가령, 25 염기의 분절을 25-mer라고 한다.

- [0025] 포스포디에스테르 결합은 인산기의 인(P) 원자와 다른 두 분자가 에스테르 결합에 의해 강한 공유결합을 형성하는 것이다. 포스포디에스테르 결합은 DNA 및 RNA 가닥의 백본(backbone)을 형성한다. DNA 및 RNA는 뉴클레오타이드라고 하는 단순한 단위의 긴 폴리머로, 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 당 및 인산기로 이루어진 백본을 갖는다. 각 당에는 염기라고 하는 네 가지 분자 중 하나가 부착된다. DNA 및 RNA에 있어서, 상기 포스포디에스테르 결합은 리보오스 당의 3' 탄소원자와 5' 탄소 원자 사이의 연결이다.
- [0026] DNA는 종종 이중가닥이며, 일반적으로는 두 종류의 퓨린 염기인 구아닌 및 아데닌과 두 종류의 피리미딘 염기인 시토신 및 티민을 함유한다. 어떤 경우에는, 퓨린 및 피리미딘 염기는 이들의 돌연변이 형태에 의해서 치환될 수 있다. 구아닌 및 아데닌은 각각 잔틴 및 하이포잔틴으로 치환되며, 시토신은 메틸시토신으로 치환될 수 있다. RNA는 DNA와 매우 유사하지만, 다음과 같이 구조적으로 몇 가지 중요한 차이점이 있다. 일반적으로 RNA는 단일 가닥이나 DNA는 이중가닥이다. 또한, RNA 뉴클레오타이드는 리보오스 당을 함유하지만 DNA는 데옥시리보오스를 포함한다. 또한, RNA는 DNA에 존재하는 티민 대신 우라실을 함유한다.
- [0027] 임의의 뉴클레오타이드 시퀀스는 두 개의 다른 퓨린 염기와 두 개의 다른 피리미딘 염기의 동일한 혼합물을 필수적으로 함유하는 뉴클레오타이드 시퀀스로, 여기에서 상기 시퀀스의 각 위치에서 각 퓨린 또는 피리미딘 염기는 25%±5로 존재하며, 바람직하게는 25%±2, 가장 바람직하게는 25%±1로 존재할 수 있다.
- [0028] 상기 용어 '분리된(isolated)'는 인용되는 재료가, 자연적으로 발견되며 특정한 시료에 존재한다는 것을 규명할 수 있기 위해 충분한 정도로 존재하는 환경(environment)에서 제거되는 것을 의미한다. 이러한 특성화는 시퀀싱, 혼성화(hybridization), 면역 검정(immunoassay), 기능 검정(functional assay), 발현(expression), 크기 측정(size determination)과 같은 표준 기술에 의해서 이루어질 수 있다. 따라서, 어떤 물질이 자연에서 발견되거나 생산되는 세포의 구성물인 세포 구성물에서 자유롭다면 상기 생물학적 물질을 분리할 수 있다.
- [0029] 분리된 세포 소기관(organelle), 세포, 또는 조직은 해부학적인 자리(세포, 조직, 또는 기관)으로부터 제거된 것으로 생물체원(source organism)에서 발견되는 것이다. 분리된 물질은 정제되거나 정제되지 않을 수 있다. 상기 용어인 '정제된'은 여기에서는 다른 오염물질의 존재를 제거하거나 상당히 저감시킨 조건 하에서 분리된 물질(가령 핵산 분자 또는 단백질)을 의미한다. 오염물질은 얻어진 정제물로부터의 천연물을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 정제된 물질은 바람직하게는 약 90 중량% 미만, 약 75 중량% 미만, 약 50 중량% 미만, 약 25 중량% 미만, 약 10 중량% 미만, 약 5 중량% 미만 또는 약 2 중량% 미만으로 원래 관련이 있던 다른 요소를 함유할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 실시예에 있어서, 특별하게 반대되는 표시가 없다면 이 기술 분야에 속하는 범위 내에서 종래의 분자 생물학적, 세포 생물학적 및 단백질 화학 방법을 사용할 수 있으며, 이들은 대부분 설명(illustration)의 목적으로 아래에 기재되어 있다. 이러한 기술은 다음의 문헌에 상세하게 설명되어 있다. 다음의 문헌을 참조하라. Sambrook, 등, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2판, 1989); "DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II" (D. Glover 편저); "Oligonucleotide Synthesis" (N. Gait 편저, 1984); "Nucleic Acid Hybridization" (B. Hames & S. Higgins 편저, 1985); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984); Ausubel 등, "Current protocols in Molecular Biology" (New York, John Wiley & Sons, 1987); 및 Bonifacino 등, "Current Protocols in Cell Biology" (New York, John Wiley & Sons, 1999).
- [0031] 용어 '약(about)'는 본 기술분야의 당업자에 의해 결정되는 특정한 값에 대해 허용 가능한 오류의 범위 이내를 의미하며, 이것은 부분적으로는 상기 값이 특정되거나 결정되는 방법, 즉 측정 시스템의 한계(limitation)에 좌우된다. 가령 '약(about)'는 기술 분야에서 실행당 허용되는 표준 편차 이내를 의미한다. 또는, '약(about)'은 주어진 값의 ±20% 까지의 범위, 바람직하게는 ±10%까지의 범위, 더욱 바람직하게는 ±5%, 가장 바람직한 경우에는 ±1%의 범위를 의미할 수 있다. 또는, 특히 생물학적인 시스템 또는 공정의 측면에 있어서, 상기 용어는 값의 차수의 범위 내, 바람직하게는 값의 2배 범위 내를 의미할 수 있다. 출원서 및 청구항에서 특정한 값을 기재할 경우, 달리 기재가 없다면, 상기 용어 '약(about)'은 암시되어 있고, 이러한 문맥에 있어서 특정 값에 대해 허용되는 오차 범위내임을 의미한다.
- [0032] 본 발명의 문맥상, 이것이 여기에 언급된 질병 질환에 대한 것인 한, 상기 용어 '치료하다(treat)', '치료(treatment)' 및 이와 유사한 것은 이러한 질환에 관련된 적어도 하나의 증상을 예방하거나 경감하거나 완화하

는 것, 또는 이러한 질환의 진전을 늦추거나 역으로 진행하도록 하는 것을 의미한다. 가령, 본 발명의 목적 내에서, 상기 용어 '치료하다(treat)'는 또한 발병(onset)을 막거나 지연시키는 것(즉, 질병의 임상적인 징후가 나타나기 전의 기간), 및/또는 발병의 위험성이나 질병 악화를 저감시키는 것을 나타낸다. 상기 용어 '보호하다(protect)'는 예방, 지연 또는 치료, 또는 이 모든 것, 적절하게는 환자에 있어서 질병의 진전, 계속, 또는 악화를 의미한다.

[0033] 본 발명의 조성물과 관련하여 사용되는 '의약적으로 허용 가능한(pharmaceutically acceptable)'은 생리학적으로 인용할 수 있고 포유류와 같은 동물(가령 사람)에 투여되었을 때, 부정적인 반응을 나타내지 않는 그러한 조성물의 분자체(molecular entity) 및 다른 성분들을 의미한다. 바람직하게는 여기에서 사용한 것과 같이, 상기 용어 '의약적으로 허용가능한'은 연방정부 또는 주정부의 규제 기관에 의해서 승인되었거나 미국 약전 또는 다른 일반적으로 공인된 약전에 포유류용 특히 사람용으로 수록되어 있음을 의미한다.

[0034] 여기에서 사용되는 것과 같이, 상기 표현 '합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 혼합물(mixture of synthetic phosphodiester oligonucleotides)'은 동일한 및/또는 다른 시퀀스를 갖는 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 혼합물을 의미한다. 제1 실시형태에 따르면, 상기 혼합물은 동일한 시퀀스를 갖는 올리고뉴클레오타이드와 다른 시퀀스를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 모두 포함할 수 있다. 다른 시퀀스를 갖는 그와 같은 올리고뉴클레오타이드는 같거나 또는 다른 길이를 가질 수 있다. 제2 실시형태에 따르면, 상기 혼합물은 길이는 갖지만 다른 시퀀스를 갖는 올리고뉴클레오타이드로 구성될 수 있다.

[0035] 상기 용어 중 "투여함(administering)" 또는 "투여(administration)"은 화합물을 직접 또는 간접적으로 목적하는 작용 부위로 전달하는 모든 방법을 아우르는 것으로 사용된다.

[0036] 상기 용어 중 '동물'은 포유류, 특히 사람을 포함하는 모든 동물을 의미한다.

[0037] 발명의 상세한 설명

[0038] 디파이브로타이드와 같은 올리고뉴클레오타이드는 헤파린(heparin)에 부착되는 단백질에 부착될 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 상기 용어 '헤파린'은 저친화성(low-affinity) 헤파린을 의미한다. 디파이브로타이드의 합성 상동체(analogs)는 천연 산물(natural product)에 비해 높거나 필적할만한 활성을 갖도록 만들어질 수 있으며, 이러한 상동체는 헤파린-결합 성장 인자(heparin-binding growth factor)에 부착할 수 있는 능력이 있어서 항암 활성을 갖는다.

[0039] 암 세포에 매우 중요한 세가지 헤파린-결합 단백질에는 기초 섬유아세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor; bFGF), 혈관 내피세포 성장 인자(vascular endothelial growth factor; VEGF) 및 라미닌(laminin)이 포함된다. 상기 본 발명의 조성물은 나노몰 친화도(nanomolar affinity)로 이러한 단백질에 부착할 수 있는데, 이러한 결합은 시퀀스 특이적인 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 조성물은 약 40 mer 내지 약 65 mer의 길이를 갖는 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 혼합물이 디파이브로타이드의 특성을 재현하며, 따라서 그러한 활성 원소에 대해서 합성 대체물을 사용할 수 있다는 놀라운 발견을 기반으로 하고 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 약 40-60 mers의 길이, 바람직하게는 약 45-60 mers의 길이를 갖는 것이다. 본 발명의 더 나은 실시형태에 따르면, 이것은 약 45-55 mers, 바람직하게는 약 50-55 mers의 길이를 가질 수 있다. 본 발명의 상기 올리고뉴클레오타이드의 퓨린 염기는 바람직하게는 구아닌, 아데닌, 잔틴(xanthine) 및 하이포잔틴(hypoxanthine)에서 선택되며, 상기 피리미딘 염기는 시토신, 티민, 메틸시토신 및 우라실에서 선택된다. 일 실시형태에 따르면, 상기 시퀀스는 상기 올리고뉴클레오타이드의 각 위치에 각 유전적 염기(A, G, C 및 T)의 혼합물로 구성된다. 바람직하게는 임의적인 시퀀스일 수 있다. 다른 실시형태에 따르면 상기 뉴클레오타이드의 각 위치에서 상기 시퀀스는 동일한 염기(티민과 같은, 즉, Tx)로 구성될 수 있다(일련의 Tm 또는 Tmers). 다른 실시형태에 따르면 본 발명의 뉴클레오타이드의 당은 리보오스 및 데옥시리보오스에서 선택된다.

[0041] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명의 상기 올리고뉴클레오타이드는 DNA 및/또는 RNA 시퀀스로 구성된다.

[0042] 바람직한 실시형태에 따르면 본 발명의 상기 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥인 것이다.

[0043] 실험을 통해 분명해지겠지만, 본 발명은 놀랍게도 저분자량을 갖는 디파이브로타이드의 분질(fraction), 특히 40kDa 미만의 분자량을 갖는 것들은 헤파린-결합 성장 인자에 부착할 수 있는 능력이 낮다. 따라서, 상기와 같은 결과로 용이하게 그리고 동일하게 재생산될 수 있고 디파이브로타이드와의 효과를 모방할 수 있는 정제가 잘 된 올

리고뉴클레오타이드의 혼합물을 선별하게 되었다.

[0044] 따라서, 본 상기 혼합물은, VOD, 혈전성 혈소판 감소성 자반증(thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP), 종양, 혈관신생 의존성 종양(다발성 골수종(multiple myeloma) 유방암(breast carcinoma) 등)와 같은, 디파이브로타이드를 투여해서 치료하는 그러한 질병을 갖는 포류유 환자, 바람직하게는 사람을 치료하는데 사용할 수 있다. 그러한 혼합물은 혈액 항응고제로서 사용할 수 있으며, 또는 조혈 전구체(hematopoietic progenitor)를 가동시킬 수 있는 적어도 하나의 조혈 인자와 복합하여, 또는 근소한 시간차를 두고 투여함으로써 포류유의 말초 혈관 중 줄기 세포 및 전구 세포의 양을 증가시키는데 사용할 수 있다.

[0045] 본 발명의 상기 올리고뉴클레오타이드 혼합물은 디파이브로타이드와 동일한 방법으로 투여할 수 있다. 바람직하게는, 수성 용액을 주사로, 바람직하게는 정맥 주사를 통해 투여될 수 있다. 그러한 수성 용액은 5 내지 60 마이크로몰/리터, 바람직하게는 10 내지 50 마이크로몰/리터의 농도를 갖는 것이다.

[0046] 실시예

[0047] 본 발명은 다음의 실시예를 참조로 하여 더욱 잘 이해 될 수 있다. 하기 실시예는 본 발명의 일 실시형태인 것으로 본 발명을 제한하는 것이 아니다.

[0048] 재료 및 방법

[0049] 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 생성

[0050] 일련의 Nmers을 만들기 위해서, DNA 시퀀싱 기계(가령 ABI 또는 Millipore와 같은 시판의 기계)를 사용하였다. 각 염기(아데닌, 시토신, 구아닌, 및 티민)의 동일한 분량(몰농도 기준)을 시퀀싱 반응에 사용하였다. 상기 기계를 25 염기 내지 200 염기의 크기의 단일 가닥 DNA의 임의 길이를 만들도록 설정하였으며, 각 염기는 상기 네 개의 유전적 염기로부터 임의적으로 선택되었다.

[0051] 세포 배양

[0052] SV40-변형 HMEC-1 세포를 CDC(Atlanta, GA)에서 얻었다. 10%의 열불활성 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS), 10ng/ml EFG, 1 $\mu$ g/ml의 하이드로코르티손, 100 U/ml 페니실린 G 소듐 및 100 $\mu$ g/ml 스트렙토마이신 황으로 보충된 MCDB 131 배지에서 상기 세포를 배양시켰다. 마이코플라즈마-프리 사람 흑색종(mycoplasma-free human melanoma) 세포주 518A2를 오스트리아의 비엔나 대학의 Volker Wacheck 박사로 부터 공급받아 사용하였다. 10% 열불활성 FBS 및 100 U/ml 페니실린 G 소듐 및 100 $\mu$ g/ml의 스트렙토마이신 황이 들어진 DMEM에서 세포를 배양하였다. 저혈청 조건에서 사람 간성상세포(hepatic stellate) LX2 세포주를 SV40 T 항체 자연적 불멸화로 생성했으며, 뉴욕 Mount Sinai 의학 대학의 Scott L.Frieddman 박사로부터 공급되었다. LX2 세포를 1% 열불활성 FBS 및 100U/ml 페니실린 G 소듐 및 100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신 황이 포함된 DMEM으로 배양하였다. 상기 세포 배양은 습도 5% 및 37 $^{\circ}$ C 조건의 CO<sub>2</sub>배양기에서 수행되었다.

[0053] 디파이브로타이드, 디파이브로타이드 분자량 분절 및 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 생성

[0054] 단일 가닥의 포스포디에스테르 폴리데옥시리보뉴클레오타이드로 구성된 고도 복합 복잡분산 재료(highly complex polydisperse material)(분자량이 16.5 $\pm$ 2.25 kDa이다)인 디파이브로타이드를 돼지의 장 세포에서 추출된 DNA의 제어된 해중합반응(depolymerization)을 통해 제조되었으며, 젠티엄(GENTIUM)에서 제공되었다(Como, 이탈리아). 돼지 장 세포에서 추출된 다음 분절된(각 분자량 9,353; 12,258; 16,761; 21,840; 및 26,190인 A2, E2, G2, I2, L2) 디파이브로타이드인 디파이브로타이드 분자량 분절도 젠티엄에서 제공하였다. Nmer(일련의 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드, 길이로 정의됨) 및 Tmer(일련의 티민 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드, 길이로 정의됨)을 합성하고, 상기한 절차에 의해 정제하고 Trilink 바이오테크놀로지에 의해서 공급되었다(샌디에고, CA).

- [0055] 재조합 단백질 및 세포 배양 재료
- [0056] 재조합 사람 bFGF 및 VEGF 165, 혈소판 유래 성장 인자-BB(platelet-derived growth factor BB, PDGF BB) 및 헤파린-결합 상피 성장 인자 유사 성장 인자(heparin binding epidermal growth factor like growth factor, HB-EGF)를 R&D 시스템에서 구입하였다(Minneapolis MN). 라미닌(laminin)은 Sigma-Aldrich(새인트루이스 MO)에서 구입하였다. DMEM, MCDB 131, M199 배지 및 FBS는 인비트로젠에서 구입하였다(Carlsbad, CA). 피브로넥틴(fibronectin) 코팅 플레이트 및 매트리지젤(matrigel)은 BD 바이오사이언스(Bedford, MA)에서 구입하였다. 이뮤바인드 토탈(IMUBIND Total) TFPI ELISA 키트는 아메리칸 디아그노스틱스(스탠포드 CT)에서 구입하였다.
- [0057] 상기 알킬화 올리고데옥시뉴클레오타이드 프로브 CIRNH<sup>32</sup> p-OdT<sub>18</sub>의 합성
- [0058] OdT<sub>18</sub>의 OD U 10개를 5'-폴리뉴클레오타이드 키나아제(polynucleotide kinase)의 반응에 의해 [<sup>32</sup>P]포스페이트로 5'를 표지하였다. 0.1 M 리튬 퍼콜레이트 중 세파덱스(Sephadex) G05 크로마토그래피에 의해 과량의 ATP가 반응 산물로부터 분리되었다. 다음으로 상기 올리고뉴클레오타이드를 2% LiClO<sub>4</sub>/아세톤을 첨가하여 침전시키고 물에 200 OD U/ $\mu$ l의 농도로 용해시켰다. 그런 다음 상기 올리고뉴클레오타이드를 8% 아세틸트리메틸암모늄 브로마이드 수성 용액을 첨가하여 침전시키고 건조시켰다. 20 $\mu$ l의 디메틸포름아미드 중 p-(벤질아미노)-N-클로로에틸-N-메틸아민(CIRNH<sub>2</sub>) 6.5mg을 넣고 다음으로 디피리딜 디설파이드(dipyridyl disulfide) 8mg 및 트리페닐포스파인(triphenylphosphine) 9.5mg을 상기 건조된 올리고뉴클레오타이드에 첨가하였다. 2시간 후, 상기 올리고뉴클레오타이드에 2% LiClO<sub>4</sub>/아세톤을 첨가하여 침전시키고, 1M NaCl 25 $\mu$ l에 용해시킨 후 건조시켰다. 상기 최종 산물을 물에 재용해 시킨 후 -80°C에 보관하였다.
- [0059] CIRNH<sup>32</sup> P-OdT<sub>18</sub>에 의한 헤파린 결합 단백질의 변형(modification)
- [0060] CIRNH<sup>32</sup> P-OdT<sub>18</sub>에 의한 헤파린 결합 단백질의 변형(modification)은 Yakubov 등의 방법에 따랐다(Oligonucleotides interact with recombinant CD4 at multiple sites. J. Biol. Chem. 1993 268:19918-18823). 처음에, bFGF(50 nM 농도), PDGF BB (500 nM), VEGF (150 nM), 라미닌(laminin)(50 nM) 또는 HB-EGF (400 nM)을 CIRNH<sup>32</sup> P-OdT<sub>18</sub>이 10-20  $\mu$ M가 함유된 pH 7.4, 0.1M Tris-HCl에 배양시켰다. 농도를 증가시켜 가며, 디파이브로타이드, 디파이브로타이드 분자량 분절, Tmers 또는 Nmers를 상기 단백질에 대한 프로브 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 결합의 경쟁물로서 사용하였다. 37°C에서 1시간 경과 후, 10%의 글리세롤, 4%의 2-메르캅토에탄올(mercaptoethanol), 4% SDS 및 0.2% 브로모페놀블루(bromophenol blue)를 함유하는 완충액(buffer) 1 부피를 첨가하고, SDS-PAGE를 수행하였다. 상기 젤을 건조시키고, 밴드가 나타날때까지 코닥(Kodak) X 선 필름에 노출시켰다. 상기 필름을 현상하고 밴드의 밀도를 레이저 덴시토메트리(laser densitometry)로 정량화하였다.
- [0061] 증식 검정(Proliferation assay)
- [0062] 융합성 HMEC-1 세포(confluent HMEC-1 cell)를 2.5% FBS를 함유하는 M199 배지에서 24시간 동안 한 자리에서 처리한 후 피브로넥틴이 코팅된 96-웰 플레이트(2.5% FBS가 첨가된 M199 배지)에 계대하였다(웰당 2 $\times$ 10<sup>4</sup> 세포). 다음으로 상기 배지를 20ng/ml bFGF만 함유되어 있는 배지, bFGF가 없고 디파이브로타이드 또는 Nmer가 함유된 배지 및 bFGF 및 디파이브로타이드 또는 Nmer가 함께 포함된 새 배지로 갈아주었다. 37°C에서 3일동안 처리 후, 상기 세포 성장을 설프로다민 B 염색으로 평가하였다. 모든 실험은 4회 중복하여 수행되었다.
- [0063] 조직인자경로저해제(Tissue Factor Pathway Inhibitor; TFPI) 방출의 결정
- [0064] HMEC-1 세포를 2.5% FBS가 함유된 M199 배지가 들어있는 24-웰 플레이트에 웰당 10 $\times$ 10<sup>4</sup> 세포의 밀도로 계대하

였다. 상기 세포를 디파이브로타이드 또는 디파이브로타이드 분자량 분절물 또는 Nmer를 각각 다른 시간차를 두고 처리하였다. 다음으로, 상기 조건의 세포 배지를 수집하여 10분 동안 10,000g으로 원심분리하여 세포 파편(debris)를 제거한 후, 상기 배지 내의 상기 조직인자경로저해제(Tissue Factor Pathway Inhibitor; TFPI)의 농도를 ELISA를 이용해 제조자가 설명한대로 측정하였다.

[0065] 결과

[0066] 디파이브로타이드 분자량 분절 및 Nmer는 유사하게 헤파린 결합 단백질과 상호작용을 한다

[0067] 디파이브로타이드, 디파이브로타이드 분자량 분절 및 Nmer는 종양의 성장, 생육력(viability), 혈관신생(angiogenesis) 및 전이(migration)에 중요한 역할을 하는 헤파린 결합 단백질과 상호작용을 한다. 디파이브로타이드, 디파이브로타이드 분자량 분절 및 Nmer이 헤파린 결합 단백질에 결합하는 능력을 경쟁 검증(competition assay)으로 평가하였다. 첫번째로, 알킬화, <sup>32</sup>P 표지된 포스포디에스테르 18mer의 티미딘 호모 폴리머(CIRNH<sup>32</sup>P-OdT<sub>18</sub>)를 합성하였다. 이 분자를 bFGF, PDGF BB, BB, VEGF, 라미닌 또는 HB-EGF와 혼합하고, 10-20 μM의 표지된 프로브가 함유된 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4에서 디파이브로타이드, 디파이브로타이드 분자량 분절 또는 Nmer의 농도를 증가하면서 배양하였다. 다음으로 상기 혼합물을 젤 전기영동으로 분리하고 방사능 사진을 촬영하였다. 디파이브로타이드, 디파이브로타이드 분자량 분절 및 Nmer는 방사능으로 표지된 알킬화 올리고뉴클레오타이드에 의한 단백질, CIRNH<sup>32</sup>P-OdT<sub>18</sub>의 결합의 경쟁자이다.

[0068] 각각의 단백질에 대한 CIRNH<sup>32</sup>P-OdT<sub>18</sub>의 K<sub>d</sub> 수치는 이전에 미리 결정되어있다: bFGF에 대한 평균적인 K<sub>d</sub> 수치는 0.5 μM(Guvakova 등, "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix", J. Biol. Chem., 1995, (270) 2620-2627)이고, 라미닌에 대한 평균 K<sub>d</sub>는 14 μM(Khaled 등, "Multiple mechanisms may contribute to the cellular antiadhesive effects of phosphorothioate oligodeoxynucleotides", Nucl. Acids Res., 1996, (24) 737-745)이다.

[0069] VEGF 165에 대한 K<sub>d</sub>를 결정하기 위해서, CIRNH<sup>32</sup>P-OdT<sub>18</sub>에 의한 VEGF의 변형의 농도 의존성을 실험하였다(도 3a). 이 결과를 도 3b에 나타내었는데, 여기에서, 상기 올리고뉴클레오타이드의 변형의 농도는 젤 밴드 강도의 기능에 따라서 표시되었다.

[0070] VEGF와 변형 올리고뉴클레오타이드간의 회합(association)은 대략적인 포화 결합(saturation binding)을 나타내며 미하엘리스-멘텐(Michaelis-Menton) 타입의 단일 부위 결합 등식에 의해서 설명되어 질 수 있다.

[0071] 도 3c는 도 3b의 상기 데이터의 이중 역수 재도시(double-reciprocal replot)를 도시한 것이다. 이러한 데이터는 선형이며(R<sup>2</sup>=0.98), 상기 선은 33.9 μM의 명백한 K<sub>d</sub> 수치에 상응하는 횡좌표를 가로지른다. 유사한 실험이 PDGF BB 및 HB-EGF에 대해서 수행되었다. K<sub>d</sub>는 각각 4.5 및 8.7 μM 이었다. .

[0072] K<sub>c</sub>는 Cheng 및 Prusoff의해 기술된 바와 같이 하기 식 1로 부터 계산되었다.

[0073] [식 1]

[0074] 
$$K_c = IC_{50} / (1 + [CIRNH^{32}P-OdT_{18}] / K_d)$$

[0075] 도 1a에서와 같이, bFGF에 대한 상기 결합 경쟁력이 나타난다. 식 1에서와 같이, 경쟁자 농도에 대한 젤 밴드의 정규 강도(normalized intensity)의 플롯은 선형이다(도 1b).

[0076] 상기 IC<sub>50</sub>은 검사(inspection)에 의해서 결정된다. 대상 단백질에 대한 다른 경쟁자의 결합의 유사한 경쟁도 결정하였다.

[0077] 동일한 방법으로 결정된 K<sub>c</sub> 수치를 다음의 표 2, 4, 5, 6, 및 7에 요약하였다.

- [0078] 조직 배양에 있어서, 길이 의존성 방식인 Nmers, 및 디파이브로타이드는 헤파린-결합 성장 인자가 SV40-변형 HMEC-1 세포의 성장을 최대한 자극할 수 있는 능력을 저해한다.
- [0079] 사이토카인 자극에 의한 세포 성장은 설향로다민 B(sulforhodamine B;SRB)를 사용하여 결정하였다. 이 실험은 bFGF 자극에 의해 성장한 SV40-변형 HMEC-1 세포를 통해 수행되었다. 상기 세포는 bFGF 세포 표면 수용체를 증가시키기 위해서 2.5% FBS를 함유한 M199 배지에 bFGF를 처리하기 전 24시간 동안 혈청 0% 조건에 두었으며, 그 후 디파이브로타이드 또는 Nmer의 농도를 유지하거나 증가시키는 조건에서 그 후 20ng/mL bFGF를 함유한 배지에서 3일 동안 배양하였다. 도 8 및 9에서 나타난 바와 같이, 길이 의존성 방식(길이가 약 45 뉴클레오타이드이고 더 큰 효과를 갖는)의 Nmers 및 디파이브로타이드는 최대 bFGF 유도 세포 세포증식에서 소량의 감소를 보였다 (및 Nmers인 경우는 길이 의존성).
- [0080] 미자극 그룹인 bFGF 대조에 비해 bFGF 처리 후 HMEC-1 세포의 증식 비율이 60% 내지 70% 증가했다. bFGF 전 디파이브로타이드를 첨가하기 1 시간 전 상기 디파이브로타이드의 억제 효과는 동시에 첨가했을 때 관찰될 것보다 크게 다르지 않았다(데이터 미도시).
- [0081] 디파이브로타이드 및 Nmer 독성의 평가
- [0082] 디파이브로타이드 및 Nmer의 주요 독성인 응고장애(coagulopathy) 및 출혈(bleeding)은 상기 올리고뉴클레오타이드가 응고 다단(coagulation cascade)의 헤파린 결합 요소(member)에 결합하고 이들의 기능을 억제하기 때문이다. 이러한 항응고 효과는 부분 트롬보플라스틴 시간(partial thromboplastin time; PTT)에 의해 평가된다. 건강한 지원자로부터 채취한 혈장을 다양한 농도의 디파이브로타이드 또는 Nmer과 혼합하고 표준 PTT 검정을 수행하였다. 도 10에서와 같이, 디파이브로타이드 및 Nmers는 상기 PTT가 심각하게 증가하지는 않았다. N50 또는 N60 (~100 μM)인 디파이브로타이드의 농도가 높은 경우에는 PTT가 증가되는 것(대조에 비해 1.5에서 1.7배)이 관찰되었다(도 10). 더 긴 Nmer, N80의 경우, 이러한 효과는 심지어 25 μM 농도에서 나타났다.
- [0083] 디파이브로타이드, 디파이브로타이드 분자량 분절 및 Nmer는 조직인자경로저해제(Tissue Factor Pathway Inhibitor; TFPI) 합성을 증가시키고 HMEC-1 세포에서 방출한다
- [0084] 어떻게 디파이브로타이드가 응고장애를 줄이는 단백질인 TFPI의 HMEC-1 세포에서의 급성 및 장기적인 방출에 영향을 미치는지 조사하기 위해서, 농도 및 시간 경과 모두에 대한 실험을 수행하였다. HMEC-1 세포로부터 얻은 조건 배지(Conditioned medium)를 선택된 시간 간격에 따라서 수집하고, 제조자 매뉴얼에 따라 ELISA 검정을 이용해서 TFPI 수치를 결정하였다. 도 11a에서 나타난 바와 같이, 12.5 μM의 디파이브로타이드는 TFPI가 배지에서 시간에 따라 증가하였으며, 실질적인 양은 방출 후 20 내지 30 분 이후에 나타났다(대조 세포에 비해 5 내지 6배 증가하였다). 급성 단계 동안(30분), 디파이브로타이드의 농도가 증가하면서 HMEC-1의 자극은 TFPI 방출의 농도 의존적 증가를 야기하였는데, 이것은 디파이브로타이드의 농도가 12.5 μM이 되면서 정체되었다(도 11c). 상기 세포를 24시간 동안 12.5 μM 디파이브로타이드 분자량 분획 또는 Nmer로 배양한 결과 비자극 세포에 비해 상기 배지에서 TFPI가 7 내지 8배 증가하였다.
- [0085] C11 세포에서의 유사분열생식(mitogenesis)의 결정
- [0086] C11 클론(clone)은 섬유아세포 성장 인자 수용체 1(fibroblast growth factor receptor 1; FGFR-1)이 과발현되도록 조작된 BAF3 마우스 림프 세포로 bFGF와 높은(pM) 친화도로 결합한다. 이세포는 D. Ornitz로부터 받았다(워싱턴 대학, 세인트 루이스). 이 세포는 bFGF가 증식하는데 필수적이다. 또한, bFGF의 활성화에 헤파린이 필요하다고 알려져 있다. DF 및 Nmers가 세포 외부 매트릭스에 있는 낮은 친화도 결합 부위로부터 bFGF를 제거할 수 있다는 것이 이미 알려져 있다(Guvakova, et al., "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix", J. Biol. Chem., 1995, (270) 2620-2627).
- [0087] 본 발명은 이제 DF 및 Nmer가 높은 친화도 결합 부위에 대한 bFGF의 결합을 방해할 수 있는지 알아보고자 한다. 따라서, C11 세포를 IL-3이 결여된 RPMI 배지로 두 번 세척하였다.  $2.2 \times 10^4$  세포를 48웰 플레이트의 각 웰에 분

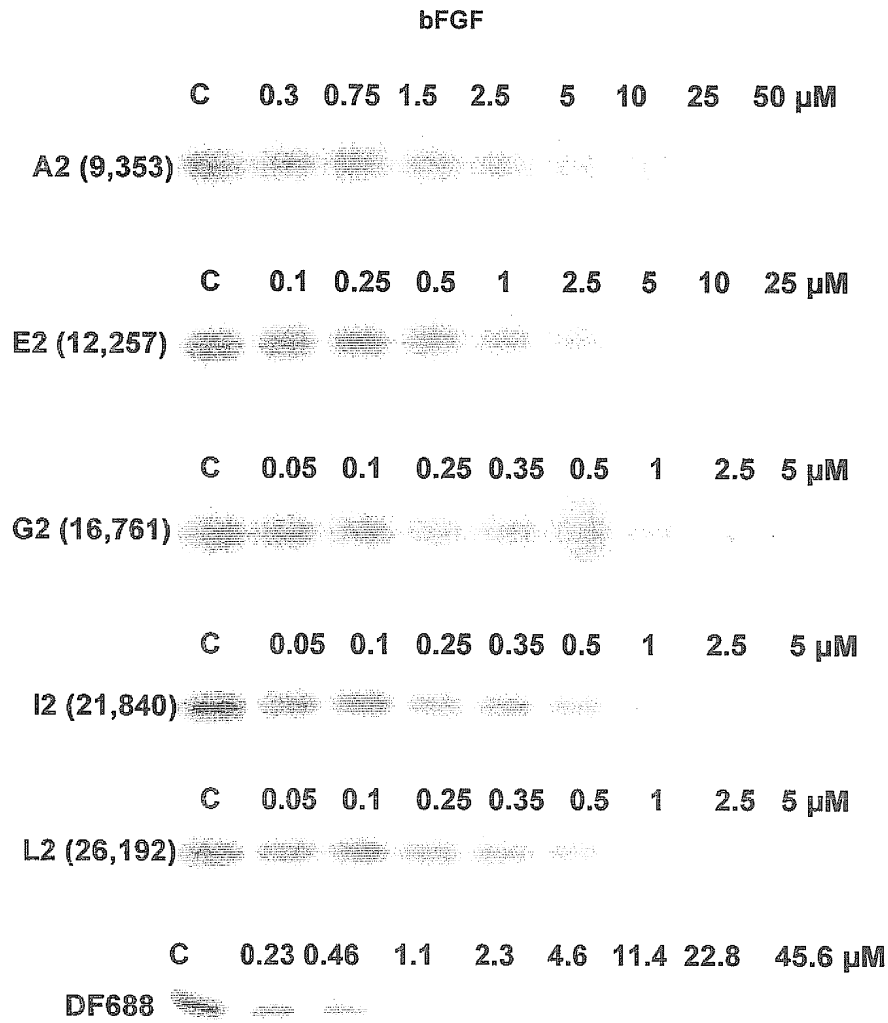
주하였다. bFGF(최종 1nM) 및 DF 또는 Nmers(최종 10 μM) 또는 헤파린(1 μg/mL)을 첨가하여 총 부피가 200 μL가 되도록 하였다. 그런 다음 각 세포(각 실험당 n=3)을 2 내지 3일 동안 배양하고, 설향로다민 블루(sulforhodamine blue; SRB)로 염색하였다. 세포의 수는 대조(bFGF, 헤파린 또는 올리고뉴클레오타이드가 없는 상태에서의 증식)를 위해 표준화하였다. 도 13에서 나타난 바와 같이, bFGF 또는 헤파린은 3일 후 그 자체로는 세포의 증식에 영향을 거의 미치지 않았다. 상기 bFGF의 활성화는 헤파린 및 DF 모두에 의해서 효과가 증가되었으며, DF는 헤파린을 대신할 수 있다는 것을 보여주었다. 그러나 DF는 bFGF의 고친화도 결합 부위에의 결합에는 영향을 미치지 않았다. 상기 길이 의존적인 Nmer는 DF 또는 헤파린을 대신할 수 있지만, 약 80 mer의 길이가 될 때까지는 이들의 활성화는 DF처럼 그렇게 높지 않았다.

[0088] 결론

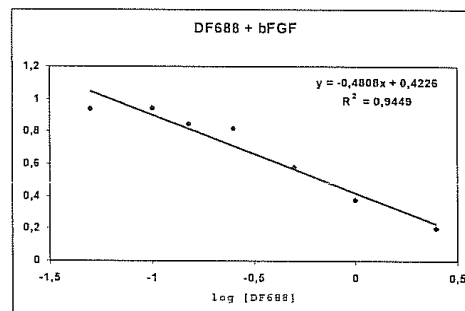
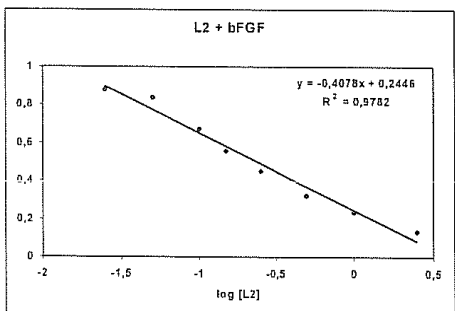
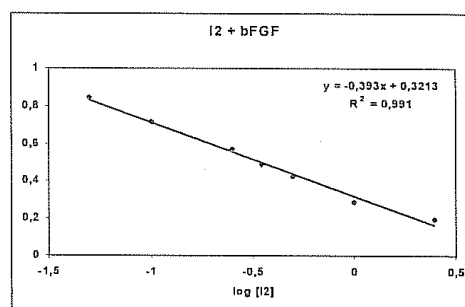
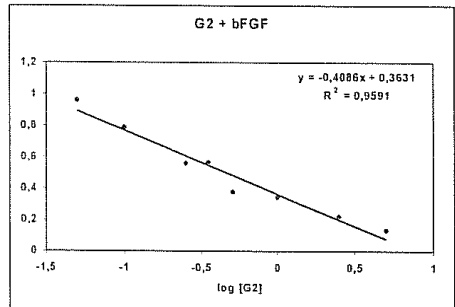
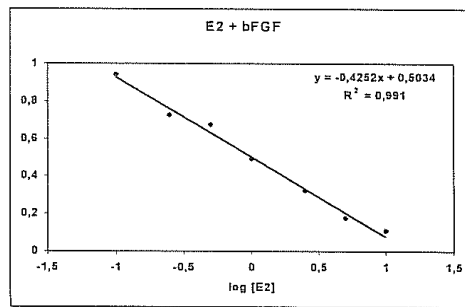
[0089] 본 발명의 상기 합성 포스포다이에스테르 올리고뉴클레오타이드(Nmers)는 디파이브로타이드의 특질을 거의 재현할 수 있다. Nmers 및 디파이브로타이드는 헤파린 결합 단백질(bFGF, PDGF BB, VEGF 165, 라미닌(laminin), 및 HB-EGF 포함)에 결합할 수 있으며, HMEC-1 세포로부터 TFPI를 방출하는 능력에 있어서 비교되고 평가되었다. 상기 Nmers는 보통의 생리식염수 또는 5% 텍스트로오스 수용액으로 인퓨전(infusion)하여 암이나 VOD(또는 디파이브로타이드를 투여하여 치료될 수 있는 다른 질병)을 앓는 환자에게 14일 동안 매일 1회 또는 나누어서 체중 1kg 당 10mg 내지 60mg의 복용량으로 투여될 수 있다. 상기 복용량은 치료의 특정한 코스에 대한 환자 개개인의 반응에 따라서 조절될 수 있다. bFGF 및 PDFG에 대한 K<sub>d</sub> 수치 및 다양한 길이의 Nmers(도 2, 4, 5, 6, 7)은 길이가 적어도 40mers인 Nmer 길이가 최대 Nmers 활성을 위해 충분하다는 것을 보여준다. 이러한 K<sub>d</sub> 수치는 또한 더 긴 Nmers가 전체적인 헤파린 결합 단백질 친화도에 첨가하지 않는다는 것을 보여준다. 결과적으로, 이들의 높은 체중/복용량의 비율 및 이들의 합성에 대한 어려움 때문에, 대략적으로 65 mer를 초과하는 mer는 디파이브로타이드의 대체물로서 소용이 없다고 보인다. 따라서, 약 40 mers 에서 약 65 mers의 길이를 갖는 상기 합성 포스포다이에스테르 올리고뉴클레오타이드는 디파이브로타이드의 대체물로서 사용할 수 있으며, 특히, 이들은 '발명의 배경' 장에서 개시한 모든 치료적인 목적에 사용될 수 있는데, 전체적으로 참조에 의해서 여기 통합되었다. 본 발명의 하나의 잇점은 상기 관련된 의약적 체제의 투여는, 상기 생물학적인 활성화의 기능보다는 상기 합성 포스포다이에스테르 올리고뉴클레오타이드의 농도의 기능에 의해서 결정될 수 있다. 본 발명의 다른 장점은 본 발명은 단지 활성화 시퀀스를 투여하기 위해 제공된다는 사실이다. 따라서, 만일 예를 들어 추출한 올리고뉴클레오타이드 혼합물과 비교한다면, 투여당 올리고뉴클레오타이드가 덜 투여된다는 것으로, 효능, 안전성 및 부작용의 측면에서 명백하게 우수한 것이다. 본 발명을 기술하면서, 본 발명의 범위 및 목적 내에서 벗어나지 않고 상기 개시된 실시예들에 대해 변형과 변화가 가능할 것이다.

도면

도면1a



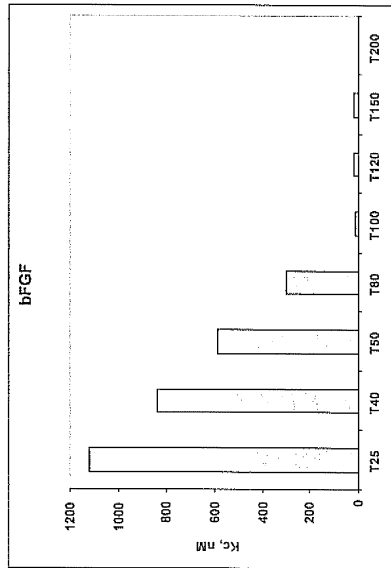
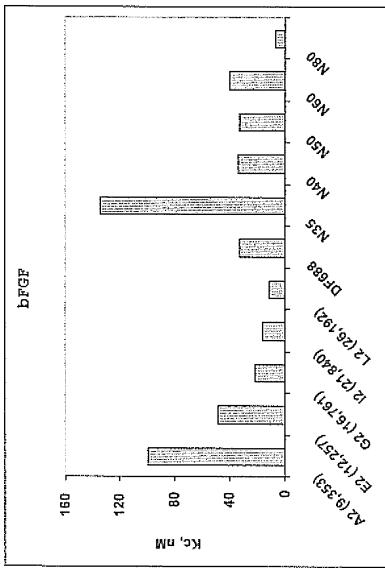
도면1b



도면2

DF	Kc, nM
A2 (9,353)	100
E2 (12,257)	48.6
G2 (16,761)	22
I2 (21,840)	16.7
L2 (26,192)	11.2
DF688	32.4
N35	134
N40	33.5
N50	33
N60	40
N80	7.1

Oligo	Kc, nM
T25	1120
T40	840
T50	590
T80	300
T100	10
T120	16
T150	21
T200	2

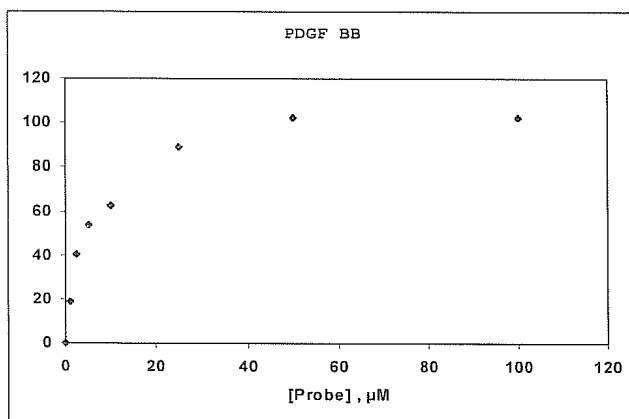


도면3a

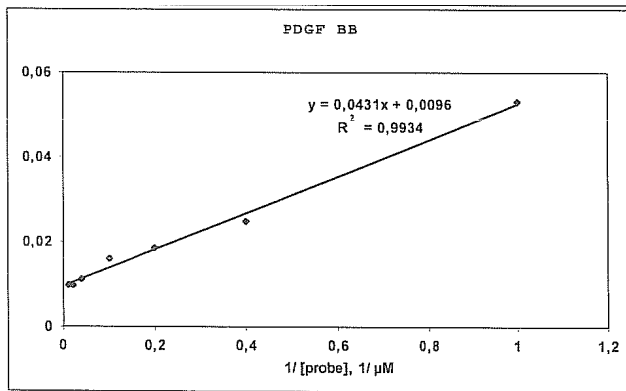
A) 0.1 0.25 0.5 1 2.5 5 10 25 50 100  $\mu$ M



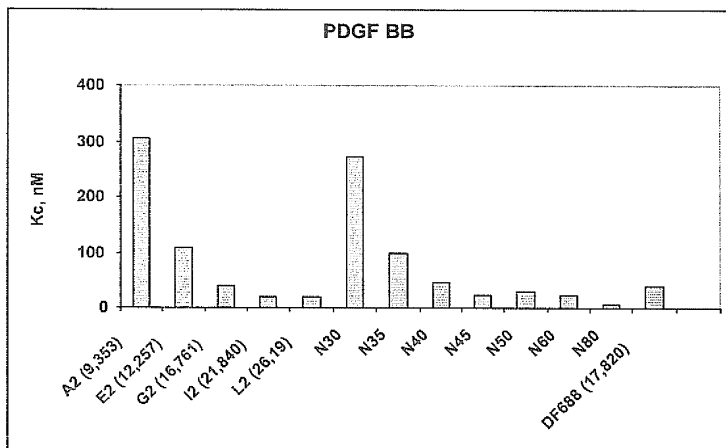
도면3b



도면3c



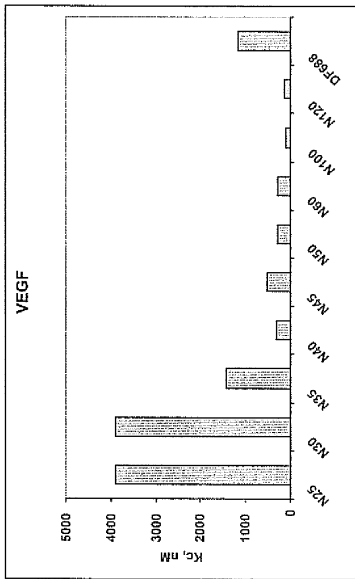
도면4



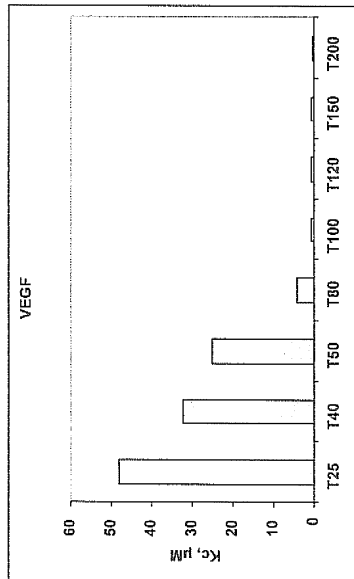
DF	Kc, nM
<b>A2 (9,353)</b>	304.3
<b>E2 (12,257)</b>	108.7
<b>G2 (16,761)</b>	38.5
<b>I2 (21,840)</b>	20.2
<b>L2 (26,192)</b>	20.5
<b>N30</b>	272
<b>N35</b>	99
<b>N40</b>	47
<b>N45</b>	22
<b>N50</b>	29
<b>N60</b>	23
<b>N80</b>	6
<b>DF688 (17,820)</b>	39.8

도면5

Oligo	Kc, nM
N25	3880
N30	3900
N35	1440
N40	327
N45	533
N50	298
N60	290
N100	110
N120	130
DF688	1170

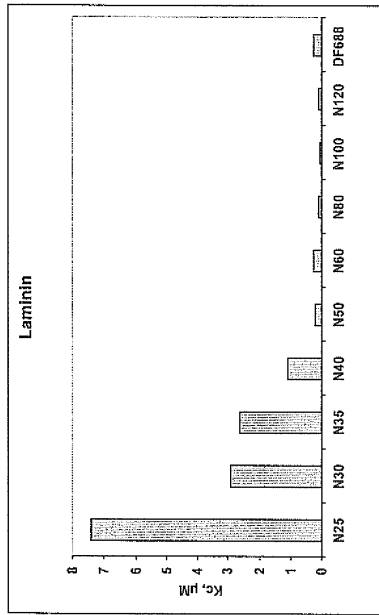


Oligo	Kc, nM
T25	48.1
T40	32.2
T50	25.2
T80	4.3
T100	0.5
T120	0.58
T150	0.49
T200	0.34

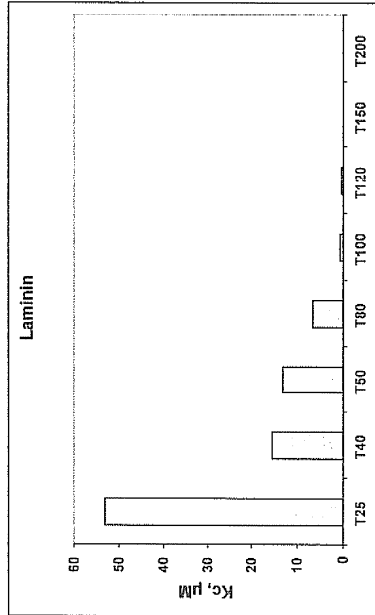


도면6

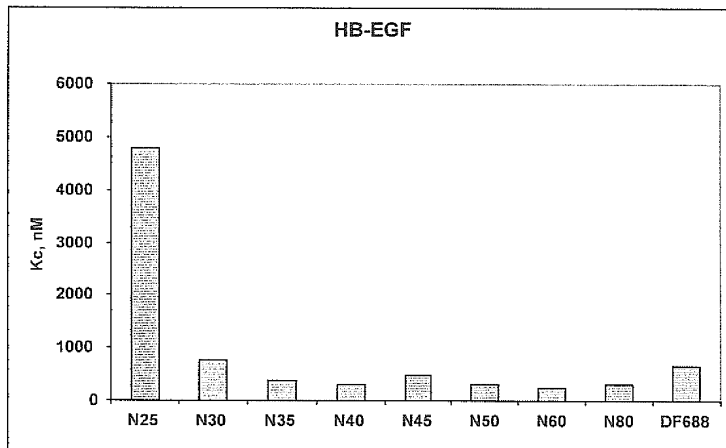
Oligo	Kc, $\mu\text{M}$
N25	7.4
N30	2.92
N35	2.6
N40	1.11
N50	0.185
N60	0.237
N80	0.097
N100	0.059
N120	0.092
DF688	0.27



Oligo	Kc, $\mu\text{M}$
T25	53
T40	15.6
T50	13.3
T80	6.7
T100	0.6
T120	0.38
T150	0.11
T200	0.1

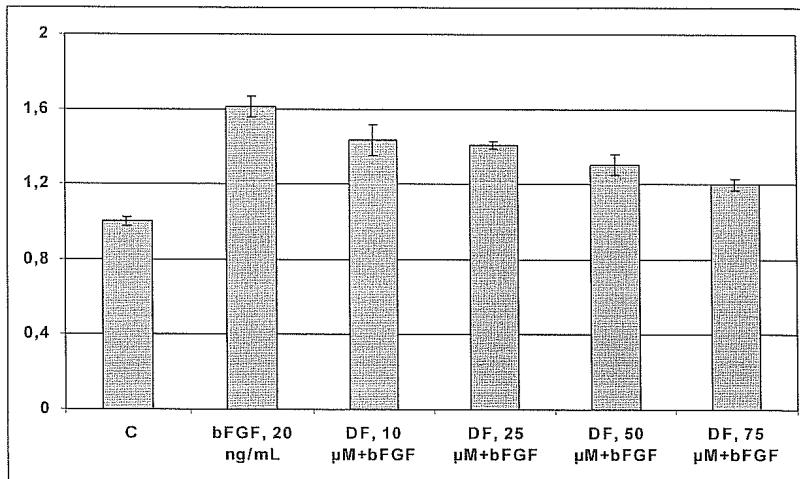


도면7

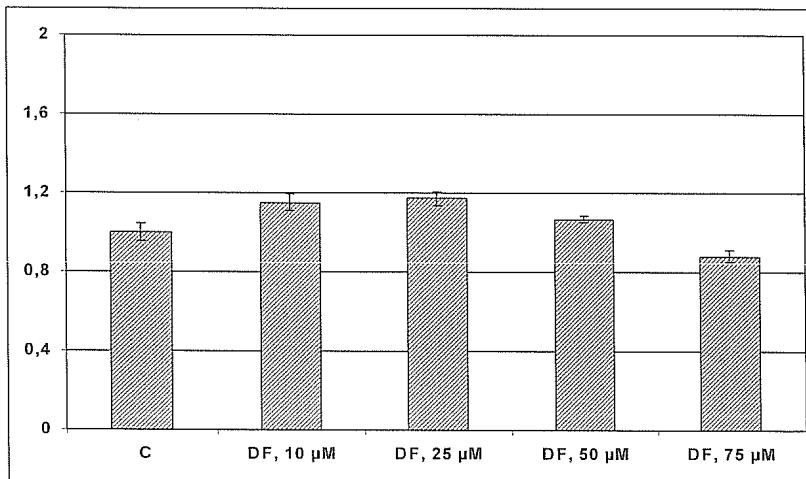


Oligo	Kc, nM
N25	4800
N30	757
N35	396
N40	318
N45	490
N50	313
N60	252
N80	321
DF688	648

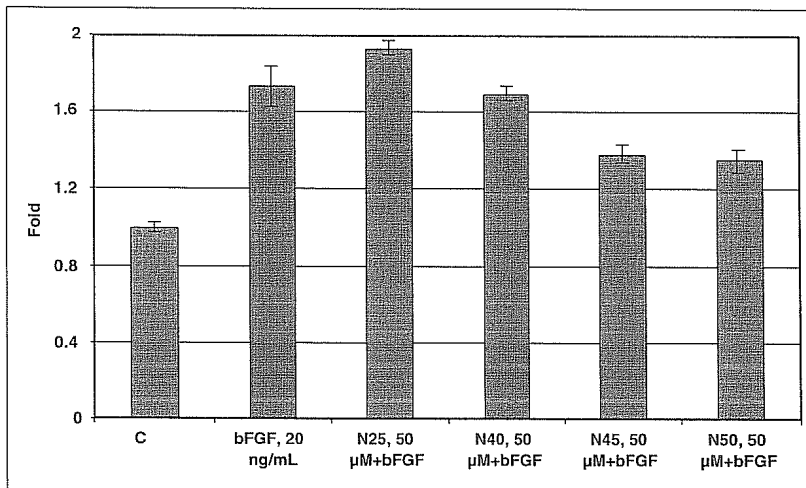
도면8a



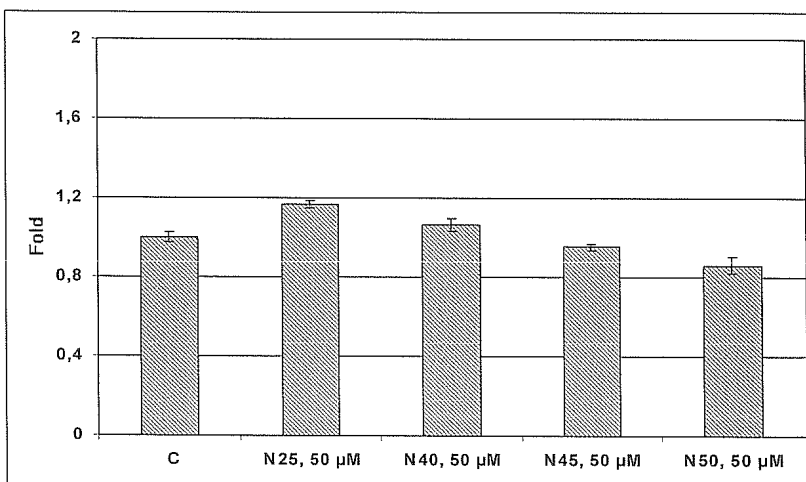
도면8b



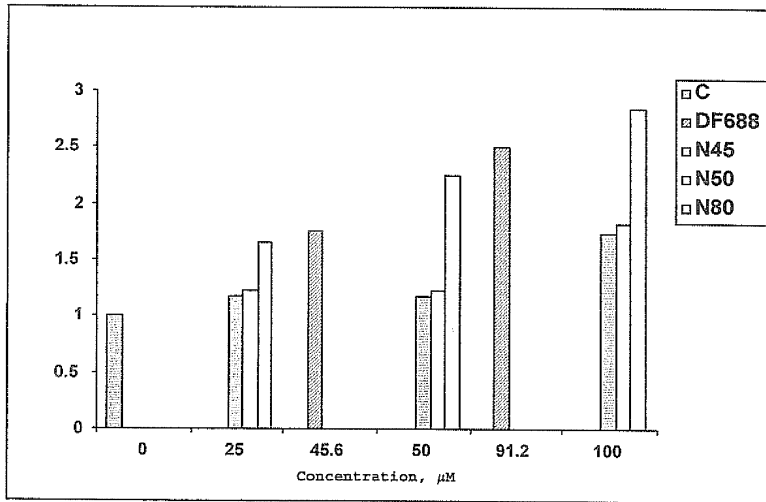
도면9a



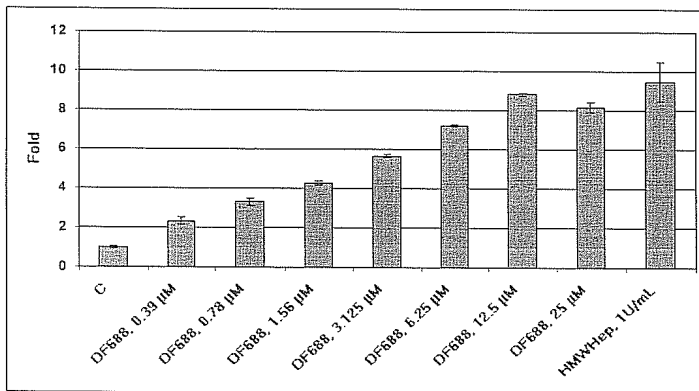
도면9b



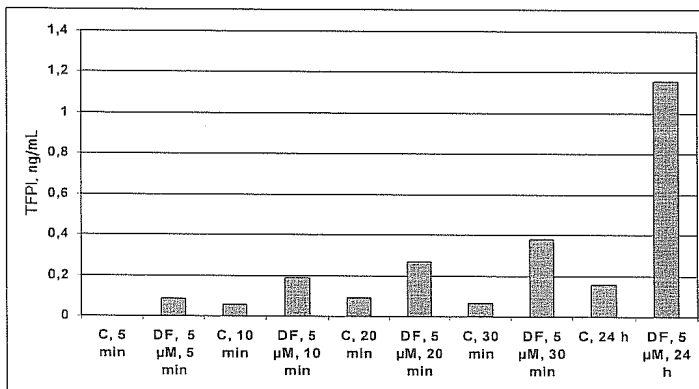
도면10



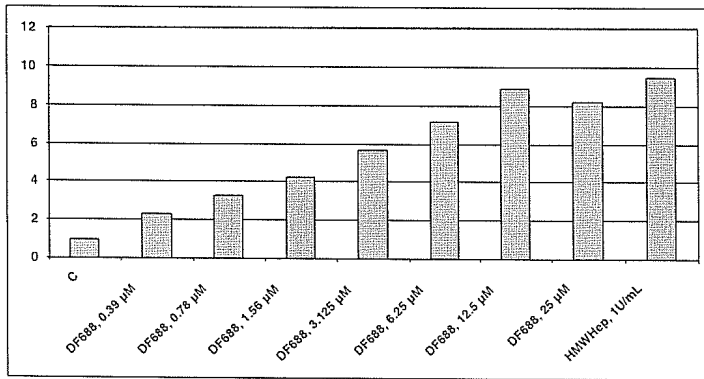
도면11a



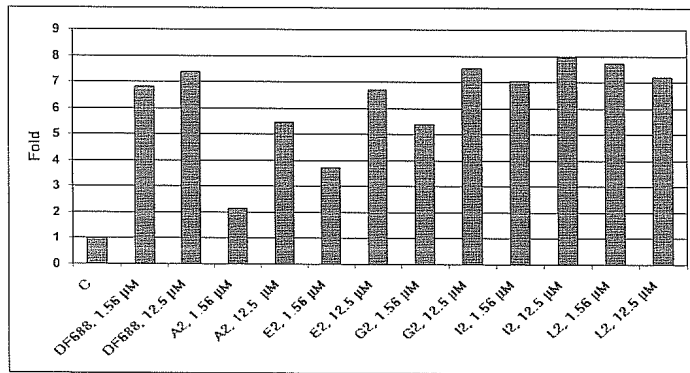
도면11b



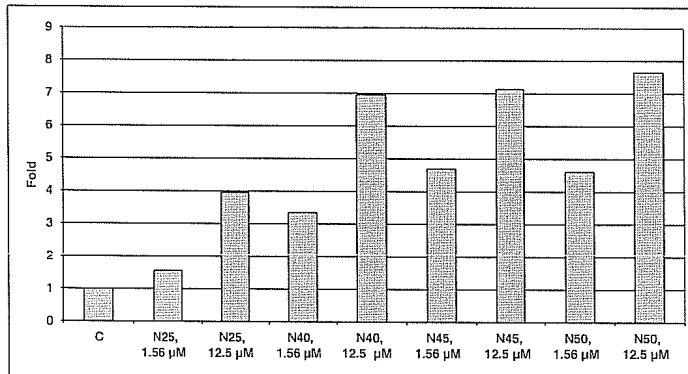
도면11c



도면12a



도면12b



도면13

