



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0137725  
(43) 공개일자 2013년12월17일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C07H 21/04 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)<br/>A61K 31/7088 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2013-7032199(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2006년09월25일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2008-7010286<br/>원출원일자(국제) 2006년09월25일<br/>심사청구일자 2011년09월19일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2013년12월04일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2006/037313</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/041071<br/>국제공개일자 2007년04월12일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>11/241,799 2005년09월29일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>아스텍스 파마수티컬스, 인크.<br/>미국, 캘리포니아주 94568, 더블린, 더블린 불러바드 4140, 스위트 200</p> <p>(72) 발명자<br/>피아시봉사 파시트<br/>미국 캘리포니아주 94513 브렌트우드 세인트 레기스 애브뉴 2712<br/>레드카르 산지브<br/>미국 캘리포니아주 94545 헤이워드 브레이커 레인 2740</p> <p>(74) 대리인<br/>김진희, 김성기</p> |
|--|---|

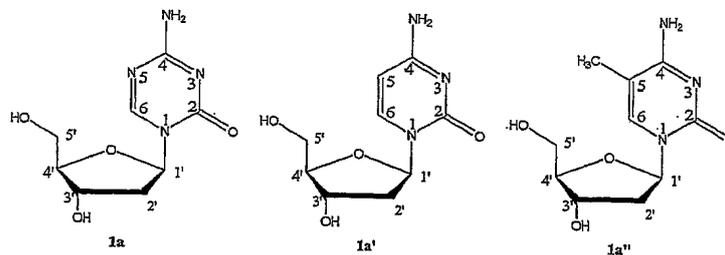
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 5-아자-시토신이 내부에 삽입된 올리고뉴클레오티드 유사체

(57) 요약

본 발명은 올리고뉴클레오티드 서열에 5-아자-시토신을, 예를 들어, 5-아자-2'-데옥시시티딘(데시타빈) 또는 5-아자-시티딘 형태로 혼입한 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 인간 게놈내, 특히, 비정상적인 과메틸화되기 쉬운 유전자의 프로모터 부위내 CpG 섬을 표적으로 하는 데시타딘-데옥시구아노신 섬(DpG 및 GpD)이 농후한 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 상기 유사체는 C-5 위치에서 메틸화의 시토신의 효과적인 저해와 같은 DNA 메틸화의 조절에 사용될 수 있다. 본 발명은 이러한 올리고뉴클레오티드 유사체를 합성하는 방법 및 핵산 메틸화를 조절하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 올리고뉴클레오티드 합성용 포스포르아미다이트 빌딩 블럭, 그러한 화합물 또는 조성물의 합성 방법, 제형화 방법, 및 암 및 혈액 질환 등의 질병을 치료하기 위해 투여하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

일반식 5'-DpG-3' 또는 5'-GpD-3'의, 단리된 또는 합성 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 그의 염으로서, 상기 일반식에서 D는 데시타빈이고; p는 포스포링커이고; G는 데옥시구아노신인 단리된 또는 합성 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 그의 염.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체가 5'-DpG-3'인 올리고뉴클레오티드 유사체.

### 청구항 3

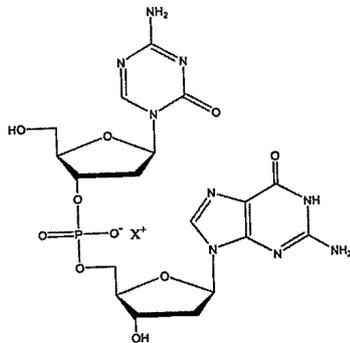
제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체가 5'-GpD-3'인 올리고뉴클레오티드 유사체.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 염의 형태인 올리고뉴클레오티드 유사체.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 하기 화학식:



(상기 화학식에서,  $X^+$ 는 반대이온임)의 화합물인 올리고뉴클레오티드 유사체.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 반대이온이 나트륨인 올리고뉴클레오티드 유사체.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 염은 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 카르복시산, 술폰산, 술폰산 또는 포스포산, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 숙신산, 말레산, 히드록시말레산, 메틸말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 락트산, 옥살산, 글루콘산, 글루카르산, 글루쿠론산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 살리실산, 4-아미노살리실산, 2-페녹시벤조산, 2-아세톡시벤조산, 엠본산, 니코틴산, 이소니코틴산, 아미노산, 글루탐산, 아스파르트산, 페닐아세트산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 2-히드록시에탄술폰산, 에탄-1,2-디술폰산, 벤젠술폰산, 4-메틸벤젠술폰산, 나프탈렌-2-술폰산, 나프탈렌-1,5-디술폰산, 2- 또는 3-포스포글리세레이트, 글루코스-6-포스페이트, N-시클로헥실술폰산, 및 아스코르브산으로 구성되는 군에서 선택되는 산으로 형성되는 것인 올리고뉴클레오티드 유사체.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 염은 염산염, 메실산염, EDTA염, 아황산염, L-아스파르트산염, 말레산염, 인산염, L-글루탐산염, (+)-L-타르타르산염, 시트르산염, L-락트산염, 숙신산염, 아세트산염, 핵산산염, 부티르산염, 또는 프로피온산염인 올리고뉴클레오티드 유사체.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 염은 나트륨염, 칼슘염, 리튬염, 칼륨염, 암모늄염, 또는 트리알킬암모늄염인 올리고뉴클레오티드 유사체.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체의 5'-말단 또는 3'-말단의 히드록시기는 비-히드록시 보호기로 치환되는 것인 올리고뉴클레오티드 유사체.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 비-히드록시 보호기는 디메톡시트리톡실(DMTTr-O), 0-메틸(OMe), 에틸렌 글리콜, 테트라에틸렌 글리콜, 헥사에틸렌 글리콜, 및 헥사에틸렌 글리콜 포스페이트로 구성되는 군에서 선택되는 것인 올리고뉴클레오티드 유사체.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 그의 염, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 에탄올, 글리세린, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 그들의 조합을 포함하는 용액인 약제학적 조성물.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 프로필렌 글리콜과 글리세린의 조합을 포함하는 것인 약제학적 조성물.

**청구항 15**

제12항에 있어서, 1% 미만의 물을 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 16**

제12항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체 중의 프로필렌 글리콜의 농도가 10~80%인 약제학적 조성물.

**청구항 17**

제12항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체 중의 프로필렌 글리콜의 농도가 50~70%인 약제학적 조성물.

**청구항 18**

제12항에 있어서, 주사로 투여하기 위한 것인 약제학적 조성물.

**청구항 19**

제12항에 있어서, 피하 주사로 투여하기 위한 것인 약제학적 조성물.

**청구항 20**

제12항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체 1 mL당 0.1~200 mg의 올리고뉴클레오티드 유사체를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 21**

제12항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체 1 mL당 0.1~100 mg의 올리고뉴클레오티드 유사체를 포함하는

약제학적 조성물.

**청구항 22**

(i) 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 단리된 또는 합성 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 그의 염, 및  
 (ii) 항종양제, 알킬화제, 레티노이드 상과(superfamily)의 일원인 제제, 항생제, 호르몬제, 식물 유래 제제, 생물학적 제제, 인터루킨, 인터페론, 사이토카인, 면역조절제, 단일클론 항체 및 히스톤 데아세틸라제의 억제제, 또는 백금 화합물인 치료 성분을 포함하는 약제학적 조합물.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 치료 성분이 히드록삼산, 환상 펩티드, 벤즈아미드, 단쇄 지방산, 트리코스타틴 A, 수버로일아닐라이드 히드록삼산, 옥삼플라틴, 수버릭 비스히드록삼산, m-카르복시-신남산 비스히드록삼산, 피록사미드, 트라프신 A, 아피시딘, FR901228, MS-27-275, 부티르산, 아르기닌 부티레이트 및 페닐부티레이트로부터 선택되는 히스톤 데아세틸라제의 억제제를 포함하는 것인 약제학적 조합물.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 상기 치료 성분이 MS-27-275인 약제학적 조합물.

**청구항 25**

제22항에 있어서, 상기 치료 성분이 시스플라틴 및 카르보플라틴으로부터 선택되는 백금 화합물을 포함하는 것인 약제학적 조합물.

**청구항 26**

비정상적 DNA 메틸화와 관련된 질환을 치료하기 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 그의 염을 포함하는 의약으로서, 상기 비정상적 DNA 메틸화와 관련된 질환이 혈액 질환, 양성 종양 및 암으로 구성되는 군에서 선택되는 것인 의약.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 비정상적 DNA 메틸화와 관련된 질환이 혈액 질환이고, 상기 혈액 질환이 급성 골수성 백혈병, 급성 전골수구성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군 및 겸상적혈구성 빈혈로 구성되는 군에서 선택되는 것인 의약.

**청구항 28**

제26항에 있어서, 상기 비정상적 DNA 메틸화와 관련된 질환이 암이고, 상기 암이 유방암, 피부암, 골암, 전립선암, 간암, 폐암, 비-소세포 폐암, 뇌암, 후두암, 담낭암, 췌장암, 직장암, 부갑상선암, 갑상선암, 부신암, 신경조직암, 두경부암, 결장암, 위암, 기관지암 및 신장암, 기저세포 암종, 궤양형 및 유두형 편평세포 암종, 전이성 피부 암종, 골 육종, 유잉 육종, 세망세포 육종, 골수종, 거대세포 종양, 소세포 폐 종양, 담석, 섬 세포 종양, 원발성 뇌종양, 급성 및 만성 림프구 및 과립구 종양, 모상세포 종양, 선종, 과다형성증, 수질 암종, 크롬친화세포종, 점막 신경종, 장 신경절신경종, 과다형성 각막 신경 종양, 마르파노이드 체질 종양, 윌름 종양, 정상피종, 난소 종양, 평활근 종양, 자궁경부 이형성 및 상피내 암종, 신경아세포종, 망막아세포종, 연조직 육종, 악성 카르시노이드, 국소 피부 병변, 균상 식육종, 횡문근육종, 카포시 육종, 골원성 육종, 악성 고칼슘혈증, 신장세포 종양, 진성 다혈구증, 선암종, 다형성 교아종, 백혈병, 림프종, 악성 흑색종, 및 유포피암으로 구성되는 군에서 선택되는 것인 의약.

**청구항 29**

비정상적 헤모글로빈 합성과 관련된 질환을 치료하기 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 그의 염을 포함하는 의약.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 상기 비정상적 헤모글로빈 합성과 관련된 질환이 겸상적혈구성 빈혈 및  $\beta$ -탈라세미아로부터 선택되는 것인 의약.

**청구항 31**

(i) 고체 형태의, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 단리된 또는 합성 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 그의 염을 포함하는 제1 용기, 및

(ii) 프로필렌 글리콜과 글리세린의 조합을 함유하는 희석제를 포함하는 제2 용기로서, 상기 희석제 중의 프로필렌 글리콜의 농도가 1~90%인 제2 용기

를 포함하는 키트.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 주사로 투여하는 것에 관한 설명서를 더 포함하는 키트.

**청구항 33**

제31항에 있어서, 피하 주사로 투여하는 것에 관한 설명서를 더 포함하는 키트.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 치료제, 진단제는 물론, 연구 시약으로서 유용한 올리고뉴클레오티드 유사체의 설계, 합성 및 적용에 관한 것이다. 본 발명은 시토신 유사체인 5-아자-시토신을, 예를 들면, 5-아자-2'-데옥시시티딘 또는 5-아자-시티딘의 형태로, 올리고뉴클레오티드 서열에 삽입한 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공한다. 이러한 유사체는 DNA 메틸화의 조정, 특히 인간 게놈의 CpG 섬(islet)을 보다 특이적으로 표적으로 함으로써 시토신의 C-5 위치에서의 메틸화를 효과적으로 저해하는 데 사용될 수 있다. 본 발명은 이들 올리고뉴클레오티드 유사체를 합성하는 방법 및 C-5 시토신 메틸화를 조정하는 방법을 제공한다. 특히, 데시타빈(decitabine)(5-아자-2'-데옥시시티딘; D), DpG-리치(데시타빈-포스포디에스테르 결합-구아노신) 섬 및 유도체를 포함하는 포스포르아미다이트 빌딩 블럭(phosphoramidite building blocks) 및 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 또한, 본 발명은 이들 화합물 또는 조성물을 치료제로서 제조, 제형화 및 그것을 필요로 하는 숙주에 투여하는 방법을 제공한다.

**배경기술**

[0002] 데시타빈은 최근 만성 골수성 백혈병(CML), 골수형성이상 증후군(MDS), 비-소세포 폐(NSCL)암, 겸상적혈구성 빈혈(sickle-cell anemia), 및 급성 골수성 백혈병(AML) 치료용 신약으로서 개발되고 있다. 데시타빈은 2가지 이성질체로 구분할 수 있다. 도 1에 나타내는  $\beta$ -아노머는 활성형이다. 데시타빈은 다중 약리 특성을 갖는다. 분자수준에서는, 세포주기의 S기 동안 DNA에 삽입된다. 세포수준에서, 데시타빈은 세포분화를 유도하고 혈액학적 독성(hematological toxicity)을 나타낸다. 생체내(in vivo)에서 짧은 반감기를 가짐에도 불구하고, 데시타빈은 일정한 조직분포를 갖는다.

[0003] 데시타빈의 기능 중 하나는 DNA 메틸화를 특이적으로 강력하게 저해하는 능력이다. DNA 메틸화는 많은 계(system)에 공통인 후생적 작용이다. 이러한 수식(modification)은 시토신의 C-5 위치(1a")에서의 공유결합 수식을 포함한다. 메틸화 패턴은, DNA 복제 후, 헤미메틸화 DNA를 인식하는 DNA 메틸트랜스퍼라제 패밀리에 의해, CpG 디뉴클레오티드에서 안정적으로 유지된다. 세포 내에서, 데시타빈은 먼저 데옥시시티딘 키나제에 의해 그 활성형인 인산화 5-아자-데옥시시티딘으로 전환하는데, 이 인산화 5-아자-데옥시시티딘은 일차적으로 세포 주기의 S기 동안 합성된다. 데옥시시티딘 키나제의 촉매 부위에 대한 데시타빈의 친화성은 자연 기질인 데옥시시티딘과 유사하다(Momparler et al. 1985 Mol. Pharmacol. 30:287-299). 데시타빈은 데옥시시티딘 키나제에 의해 그의 삼인산염 형태로 전환된 후, 자연 기질인 dCTP와 유사한 비율로, 복제되는 DNA에 삽입된다(Bouchard and Momparler 1983 Mol. Pharmacol. 24:109-114).

[0004] 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)의 CpG-리치 서열은 일반적으로 정상 세포에서는 메틸화로부터 보호된다. 암성 세포에서는, 종양억제유전자의 프로모터 부위 CpG 섬에서의 비정상적인 과다메틸화가 종양형성 표현형(tumorigenic phenotype)의 진행과 관련된 가장 일반적인 결과 중 하나이다. 분화된 세포의 각 클래스는 그 자

신만의 독특한 메틸화 패턴을 갖는다. DNA 가닥으로의 데시타빈의 삽입은 저메틸화 효과를 나타낸다. 염색체 복제 후, 이 메틸화 패턴을 보존하기 위해서, 모(parental) 가닥상의 5-메틸시토신은 상보적인 DNA 딸 가닥상에서의 메틸화를 유도하는 작용을 한다. 시토신의 C-5 위치의 탄소를 질소로 치환하는 것은 이러한 DNA 메틸화의 정상적인 과정을 방해한다. 메틸화의 특이적 부위에서 시토신을 데시타빈으로 치환함으로써, DNA 메틸트랜스퍼라제의 비가역적 불활성화가 일어난다. 데시타빈은 DNA 메틸트랜스퍼라제 효소가 메틸기를 딸 세포의 헤미메틸화 DNA 가닥으로 전달하려고 시도할 때까지 충실히 시토신 잔기로서 거동한다. 이 단계에서 DNA 메틸트랜스퍼라제 효소는 DNA 중의 데시타빈에 의해 공유적으로 트랩되어, 추가의 시토신 잔기를 더이상 침묵(메틸화)시킬 수 없다(Juttermann et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11797-11801). 이러한 데시타빈 특유의 작용 메커니즘에 의해 이전 라운드의 세포분열로부터 침묵된(일단 메틸화된) 유전자가 재발현된다. 활성 트랩은 데시타빈 처리 후 48시간까지 헤미메틸화 DNA 내에 존재한다. DNA 합성 및 세포분열 후, 헤미메틸화 DNA 유래의 자손 가닥은 이들 부위에서 완전히 비메틸화된 DNA 가닥으로 된다(Jones P. 2001 Nature 409:141, 143-4). 메틸화에 요구되는 효소인 DNA 메틸트랜스퍼라제를 특이적으로 저해함에 의해, 종양억제유전자의 비정상적인 메틸화를 막을 수 있다(reverse).

[0005] 데시타빈의 CML, MDS, 및 AML에서의 입증된 항백혈병 효과에도 불구하고, 지연되고 연장된 골수억제에 의해 그 적용 가능성은 제한된다. 데시타빈을 낮은 투여량으로 장기간에 걸쳐 투여한 경우, 저메틸화 효과를 통해 암을 억제하는 능력을 손상하지 않고 골수억제가 조절가능한 수준으로 최소화되었다. 높은 투여량에서는, 관련 독성은 엄청나다. 그러나, 최대내약용량(MTD)의 데시타빈으로 혈액 및 고형 종양을 치료하는 것은 효과가 없었다. 골수억제의 원인은 분명하지 않다. 데시타빈은 정상 조혈에 관여하는 골수세포를 포함한 S기 세포의 DNA에 랜덤하고 광범위하게 삽입되기 때문에, 데시타빈의 불안정성에 의한 심각한 DNA 손상이 괴사(necrosis)를 유발하는 것은 타당하다. 데시타빈의 삽입이 CpG-리치 서열에만 제한되는 것은 아니기 때문에, 그 DNA는 데시타빈의 불안정성에 기인하여 파손될 수 있어, CpG 섬의 바깥쪽 다수 부위에서 수복(repair)을 필요로 한다.

[0006] 데시타빈과 아자시티딘은 수성 매체에서 불안정하여 가수분해된다. 산성 매체에서는, 데시타빈은 실온에서 5-아자시토신과 2-테옥시리보스로 가수분해된다. 실온의 중성 매체에서는, 트리아진 환의 6-위치에서 개환이 일어나 일시적인 중간 포르밀 유도체를 형성하고, 이것은 아미디노-우레아 유도체와 포름산으로 더 분해된다(Piskala, A.; Synackova, M.; Tomankova, H.; Fiedler, P.; Zizkowsky, V. Nucleic Acids Res. 1978, 4, s109-s 113). 이 6-위치에서의 가수분해는 산성 및 염기성 매체에서 더 빠른 속도로 일어난다.

[0007] 데시타빈과 관련된 화학적 불안정성 및 독성의 관점에서, DNA의 완전성(integrity)에 현저한 영향을 미치지 않고, 삽입이 CpG 섬에 가능한한 국재화되거나 저메틸화가 달성되는, 보다 안정적인 데시타빈 유도체뿐만 아니라 뛰어난 저메틸화제를 개발할 필요가 있다.

**발명의 내용**

[0008] 본 발명은 올리고뉴클레오티드 서열에 5-아자-시토신을, 예를 들어, 5-아자-2'-테옥시시티딘(데시타빈) 또는 5-아자-시티딘 형태로 삽입한 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공한다.

[0009] 본 발명의 한 측면에서는, 염기 길이가 12개 이하인 단리된 또는 합성 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공하며, 그 올리고뉴클레오티드 유사체 서열은 1개 이상의 5-아자-시토신 잔기를 포함한다.

[0010] 일 실시형태에서, 올리고뉴클레오티드 유사체는 하기 일반식:

[0011] -Z-L-G-, 또는 -G-L-Z-

[0012] (식 중, Z는 5-아자-시토신이고; G는 구아닌이고; L은 Z와 G를 공유적으로 연결하는 화학적 링커(chemical linker)임)이다. 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 경우에 따라 그 올리고뉴클레오티드 유사체의 서열 중에 30%, 35%, 또는 40%보다 많은 구아닌 잔기를 갖는다.

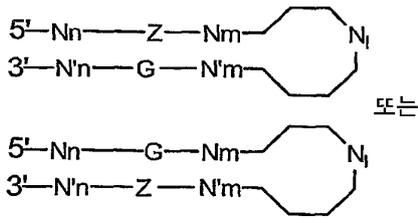
[0013] 구체적인 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 5'-DpG-3', 5'-GpD-3', 5'-DpGpD-3', 5'-GpGpD-3', 5'-GpDpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpDpG-3', 5'-DpGpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpGpA-3', 5'-DpGpDpG-3', 5'-DpGpGpD-3', 5'-GpDpGpD-3', 5'-GpDpDpG-3', 5'-DpGpDpGpA-3'로 구성되는 군에서 선택되며, 상기 D는 데시타빈이고; p는 포스포링커이고; A는 2'-테옥시아데노신이고; G는 2'-테옥시구아노신이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 측면에서는 하기 일반식:

[0015] -Z-L-G-, 또는 -G-L-Z-

- [0016] (식 중, Z는 5-아자-시토신이고; G는 구아닌이고; L은 Z와 G를 공유적으로 연결하는 화학적 링커임)
- [0017] 을 갖는 디뉴클레오티드 유사체를 2 카피(copy) 이상 포함하는, 단리된 또는 합성 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공한다.
- [0018] 경우에 따라, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 디뉴클레오티드 유사체 -Z-L-G-, 또는 -G-L-Z-를 10, 8, 6, 또는 4 카피 미만으로 포함한다.
- [0019] 구체적인 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 5'-DpG-3', 5'-GpD-3', 5'-DpGpD-3', 5'-GpGpD-3', 5'-GpDpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpDpG-3', 5'-DpGpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpGpA-3', 5'-DpGpDpG-3', 5'-DpGpGpD-3', 5'-GpDpGpD-3', 5'-GpDpDpG-3', 5'-DpGpDpGpA-3'로 구성되는 군에서 선택되는 단편(segment)을 포함하며, 상기 D는 데시타빈이고; p는 포스포링커이고; A는 2'-데옥시아데노신이고; G는 2'-데옥시구아노신이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 측면에서는, 염기 길이가 적어도 6개이고, 올리고뉴클레오티드 유사체의 서열 중에 하나 이상의 5-아자-시토신 잔기를 포함하고, 유전자 단편, 바람직하게는 유전자의 프로모터 등의 유전자의 5'-비번역 부위와 적어도 75%의 서열 상동성을 갖는 단리된 또는 합성 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공한다.
- [0021] 일 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체가 하기 일반식:
- [0022] -Z-L-G-, 또는 -G-L-Z-
- [0023] (상기 식 중에서, Z는 5-아자-시토신이고; G는 구아닌이고; L은 Z와 G를 공유적으로 연결하는 화학적 링커임.) 을 갖는다. 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 경우에 따라 30%, 35%, 또는 40%보다 많은 구아닌 잔기를 그 서열 중에 갖는다.
- [0024] 구체적인 실시형태에서는, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 5'-DpG-3', 5'-GpD-3', 5'-DpGpD-3', 5'-GpGpD-3', 5'-GpDpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpDpG-3', 5'-DpGpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpGpA-3', 5'-DpGpDpG-3', 5'-DpGpGpD-3', 5'-GpDpGpD-3', 5'-GpDpDpG-3', 5'-DpGpDpGpA-3'로 구성되는 군에서 선택되는 단편을 포함하며, 상기 D는 데시타빈이고; p는 포스포링커이고; A는 2'-데옥시아데노신이고; G는 2'-데옥시구아노신이다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 측면에서는, DNA 메틸트랜스퍼라제상의 알로스테릭 부위(allosteric site)에 결합하여 DNA 메틸트랜스퍼라제를 저해하는 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공한다.
- [0026] 일 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는
- [0027] 5'-CTGGATCCTTGCCCCGCCCTTGAATTC-3'(서열번호 25);
- [0028] 5'-GGGAATTCAAATGACGTCAAAGGATCCAG-3'(서열번호 26);
- [0029] 5'-CCTACCCACCTGGATCCTTGCCCCGCCCTTGAATTC-3'(서열번호 27);
- [0030] 5'-ATCCTTGCCCCGCCCTTGAAT-3'(서열번호 28); 또는
- [0031] 5'-TTGCCCCGCCCTT-3'(서열번호 29)의 서열을 갖고, 서열번호 25-29의 시토신 잔기 중의 적어도 하나는 5-아자-시토신으로 치환된다.
- [0032] 예를 들면, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는, 서열번호 25의 14개의 시토신 잔기 중의 하나인 뉴클레오티드 위치 15가 5-아자-시토신으로 치환된, 5'-CTGGATCCTTGCCCCGCCCTTGAATTC-3'(서열번호 30) 일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 측면에서는, 뉴클레오티드 길이가 적어도 6개이고, 염기 잔기로서 적어도 하나의 5-아자-시토신을 갖고, 20~25°C 등의 주위 온도(ambient temperature)의, 물, 식염수, 또는 20mM HEPES(pH 7), 12% 글리세롤, 1mM EDTA, 4mM 디티오프레이트, 0.1% 노니데트(Nonidet) P-40, 및 3mM MgCl<sub>2</sub>를 함유한 완충액 등의 수용액 중에서, 헤어핀 구조를 취하는 올리고뉴클레오티드 유사체가 제공된다.

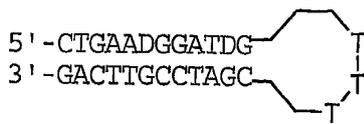
[0034] 일 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 다음의 일반 2차 구조를 갖는다:



[0035]

[0036] 상기 구조 중에서, N은 임의의 뉴클레오티드이고; N'는 N에 상보적인 뉴클레오티드이고; Z는 염기 잔기로서의 5-아자-시토신이고; G는 염기 잔기로서의 구아닌이고; l, n, 또는 m은 정수이고; 뉴클레오티드 Nn, Nm, N'n, 및 N'm은 헤어핀의 스템(stem) 부위에 위치하고; N<sub>l</sub>은 헤어핀의 루프 부위에 위치한다. 바람직하게는, l, n, 또는 m은 2, 3, 4, 또는 5보다 큰 정수이다. 경우에 따라서, l은 2, 3, 4, 5, 또는 6이다. 또한 경우에 따라서, Nn, Nm, 또는 N<sub>l</sub>이 시토신 잔기를 한 개 이상 갖는 경우, 그 시토신 잔기는 5-아자-시토신으로 치환된다.

[0037] 구체적인 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체(서열번호 31)는 다음의 헤어핀 구조를 갖는다:



[0038]

[0039] 상기 구조 중에서, D는 데시타빈이고, A는 아데노신 또는 2'-데옥시아데노신이고, T는 티미딘 또는 2'-데옥시티미딘이고, 뉴클레오티드 위치 21의 C는 경우에 따라 5-메틸-2'-데옥시시티딘으로 치환된다.

[0040] 상기 실시형태 중의 어느 하나에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드 유사체가 이중 가닥인 경우, 그 제1 가닥은 상기 올리고뉴클레오티드 유사체이고, 제2 가닥은 시토신 잔기가 5-아자-시토신으로 치환되지 않고 제1 가닥과 상보적인 서열을 가진 올리고뉴클레오티드 유사체일 수 있다. 예를 들면, 제1 가닥은 5'-TTDGDGAA-3'(서열번호 32)(여기서 D는 데시타빈)인 반면; 제2 가닥은 5'-TTCGCGAA-3'(서열번호 33)일 수 있다.

[0041] 경우에 따라서, 상기 올리고뉴클레오티드의 제2 가닥은 하나 이상의 시토신 잔기를 포함하며, 그 시토신 잔기 중 적어도 한 개는 5-메틸-시토신으로 치환된다.

[0042] 또한, 경우에 따라서, 제1 가닥은 5'-Z-L-G-3'의 단편을 갖고, 제2 가닥은 제1 가닥의 5'-Z-L-G-3' 단편과 대응되는 3'-G-L-C'-5'의 단편을 포함하며, 상기 Z는 5-아자-시토신이고; G는 구아닌이고; L은 Z와 G, 또는 G와 C'를 공유적으로 연결하는 화학적 링커이고; C'는 5-메틸-시토신이다.

[0043] 또한, 경우에 따라서, 제1 가닥은 5'-G-L-Z-3'의 단편을 갖고, 제2 가닥은 제1 가닥의 5'-G-L-Z-3' 단편과 대응되는 3'-C'-L-G-5'의 단편을 포함하며, 상기 Z는 5-아자-시토신이고; G는 구아닌이고; L은 Z와 G, 또는 G와 C'를 공유적으로 연결하는 화학적 링커이고; C'는 5-메틸-시토신이다.

[0044] 본 발명은 상기 올리고뉴클레오티드 유사체를 합성하는 방법 및 핵산 메틸화를 조정하는 방법도 제공한다. 또한, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체를 합성, 이들 화합물 및 조성물을 암 및 혈액 질환 등의 질병 치료를 위해 제형화 및 투여하기 위한 포스포아미다이트 빌딩 블록을 제공한다.

[0045] **참고 인용**

[0046] 이 명세서에 기재된 모든 간행물 및 특허출원서는 각개의 간행물 및 특허출원서가 구체적이고 개별적으로 표시되어 참고로 편입된 것과 동등한 정도로 본 명세서 중에 참고로 편입된다.

**도면의 간단한 설명**

[0047] 본 발명의 신규한 특징은 하기에 첨부한 청구범위에 구체적으로 나타난다. 본 발명의 원리가 이용된 실시형태를 설명하는 하기 상세한 설명과 첨부하는 도면을 참고하여, 본 발명의 특징 및 이점을 더 잘 이해할 수 있을 것이다.

도 1은 데시타빈, D(1a), 시토신, C(1a'), 및 5-메틸시토신, mC(1a'')의 구조를 도시한다.

- 도 2a는 데시타빈 포스포르아미다이트 빌딩 블록의 예를 도시한다.
- 도 2b는 데시타빈 포스포르아미다이트 빌딩 블록 1d( $R_1$ =페녹시아세틸)를 도시한다.
- 도 3a는 3'- 및 5'-0-캡 및 제어된 다공성 유리가 3'-결합된 데시타빈 유도체를 도시한다.
- 도 3b는 제어된 다공성 유리 지지체에 3'-결합된, 보호된 데시타빈을 도시한다.
- 도 4는 3'-0-캡 데시타빈 유도체의 예를 도시한다.
- 도 5는 올리고뉴클레오티드 합성의 표준 사이클을 나타낸다.
- 도 6a는 GpD 디뉴클레오티드 및 테트라뉴클레오티드의 합성 방식을 도시하며, 여기서  $X^+$ 는 반대이온(counter ion)이다.
- 도 6b는 GpD 디뉴클레오티드(2a) 및 DpGpGpD 테트라뉴클레오티드(3b)의 합성 사이클 모델을 도시한다.
- 도 7은 DpGpGpD 테트라뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 8은 GpD 디뉴클레오티드 및 테트라뉴클레오티드의 합성 방식을 도시한다.
- 도 9는 GpDpG 트리뉴클레오티드 및 GpDpDpG 테트라뉴클레오티드를 나타낸다.
- 도 10은 폴리(에틸렌글리콜)상에 3'-결합된 보호된 데시타빈을 도시한다.
- 도 11은 3'- 및 5'-0-캡 GpD 디뉴클레오티드의 합성 방식을 나타낸다.
- 도 12는 3'- 및 5'-0-캡 DpG 디뉴클레오티드의 합성 방식을 나타낸다.
- 도 13은 뉴클레아제 내성 포스포로티오에이트 결합을 가진 GpD 및 DpG 디뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 14는 뉴클레아제 내성 포스포로티오에이트 결합을 가진 GpDpGpD 및 DpGpGpD 테트라뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 15는 뉴클레아제 내성 포스포로티오에이트 결합을 가진 DpGpDpG 및 GpDpDpG 테트라뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 16은 시티딘 디아미나제 내성 4-아미노기를 가진 GpD 및 DpG 디뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 17은 시티딘 디아미나제 내성 4-아미노기 및 뉴클레아제 내성 포스포로티오에이트 결합을 가진 GpD 및 DpG 디뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 18은 시티딘 디아미나제 내성 4-아미노기를 가진 GpDpGpD 및 DpGpGpD 테트라뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 19는 시티딘 디아미나제 내성 4-아미노기 및 뉴클레아제 내성 포스포로티오에이트 결합을 가진 GpDpGpD 및 DpGpGpD 테트라뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 20은 시티딘 디아미나제 내성 4-아미노기를 가진 캡-0-GpD-0-캡 및 캡-0-DpG-0-캡 디뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 21은 시티딘 디아미나제 내성 4-아미노기 및 뉴클레아제 내성 포스포로티오에이트 결합을 가진 캡-0-GpD-0-캡 및 캡-0-DpG-0-캡 디뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 22는 시티딘 디아미나제 내성 4-아미노기를 가진 DpGpDpG 및 GpDpDpG 테트라뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 23은 시티딘 디아미나제 내성 4-아미노기 및 뉴클레아제 내성 포스포로티오에이트 결합을 가진 DpGpDpG 및 GpDpDpG 테트라뉴클레오티드를 도시한다.
- 도 24a는 자연 포스포디에스테르 골격 또는 수식된 골격을 가진 -DpG- 섬을 도시한다.
- 도 24b는 -DpG- 섬 펩티드 골격을 도시한다.
- 도 25는 DNA 메틸화에 대한 세포기반 GFP 평가법을 모식적으로 나타낸다. 패널 A)는 대조 세포이고; 패널 B)는 본원발명의 올리고뉴클레오티드로 처리되어 GFP를 발현하는 세포이다.
- 도 26은 P15, BRAC1 또는 P16의 프로모터 부위를 특이적으로 표적으로 하는, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 유사체의 예를 열거한 것이며, 여기서 D는 데시타빈 또는 데시타빈 유도체일 수 있으며, 자연 포스포에이트 결합에 대해서는 px=p, 포스포로티오에이트 결합에 대해서는 px=ps, 보라노포스포에이트에 대해서는 px=bp, 메틸포스포네

이트 결합이다.

도 27은 P15 프로모터 부위의 서열 및 그 단편의 예를 열거한 것이며, 그것에 근거하여 DpG 및 GpD-리치 올리고뉴클레오티드 유사체가 형성될 수 있다.

도 28은 P16 프로모터 부위의 서열 및 그 단편의 예를 열거한 것이며, 그것에 근거하여 DpG 및 GpD-리치 올리고뉴클레오티드 유사체가 형성될 수 있다.

도 29는 BRCA1 프로모터 부위의 서열 및 그 단편의 예를 열거한 것이며, 그것에 근거하여 DpG 및 GpD-리치 올리고뉴클레오티드 유사체가 형성될 수 있다.

도 30은 GpD(2a) 트리에틸암모늄염의 질량 스펙트럼이다.

도 31은 DpG(2b) 트리에틸암모늄염의 질량 스펙트럼이다.

도 32는 DpGpGpD(3b) 트리에틸암모늄염의 질량 스펙트럼이다.

도 33은 GpDpG(3c') 트리에틸암모늄염의 질량 스펙트럼이다.

도 34는 DpGpDpG(3c) 트리에틸암모늄염의 질량 스펙트럼이다.

도 35는 포스포로티오에이트 결합 DpG(2f) 트리에틸암모늄염의 질량 스펙트럼이다.

도 36은 DpG(2b) 나트륨염의 질량 스펙트럼이다.

도 37은 HEG-DpG(2d) 트리에틸암모늄염의 질량 스펙트럼이다.

도 38은 데시타빈 포스포르아미다이트 빌딩 블록의 질량 스펙트럼이다(1d; R<sub>1</sub>=페녹시아세틸).

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0048] 본 발명은 올리고뉴클레오티드 서열에 시토신 유사체인 5-아자-시토신을, 예를 들어, 5-아자-2'-데옥시시티딘 (데시타빈으로도 알려져 있음) 또는 5-아자-시티딘(5-azaC) 형태로 삽입한 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공한다. 올리고뉴클레오티드에 하나 이상의 5-아자-시토신 잔기를 삽입하는 것은 메틸화 특이 부위에서 시토신을 데시타빈으로 치환함에 의해 DNA 메틸트랜스퍼라제의 비가역적 불활성화를 일으키기 때문에, DNA 저메틸화 효과를 가질 것으로 여겨진다. 바람직하게는, 인간게놈의 CpG 섬을 보다 특이적으로 표적으로 하기 위해, 데시타빈이 상기 올리고뉴클레오티드내로 구아닌 잔기에 5'-인접하여 삽입되어 DpG 섬을 형성한다.

[0049] 본 발명은 데시타빈 및 5-아자-시티딘 등의 종래의 저메틸화제와 관련된 잠재 독성을 극복하는 것을 목적으로 한다. 전체 게놈에 랜덤하고 광범위하게 삽입된, 프리 뉴클레오시드 형태에 비해서, 본 발명의 화합물은 프라이머로서 작용하며 복제하는 동안 주로 DNA의 CpG-리치 섬으로 삽입된다. 바람직하게는, 본 발명의 화합물은 프라이머로서 작용하며, 종양억제유전자 등의 치료학적으로 또는 진단학적으로 중요한 유전자의 프로모터의 CpG-리치 섬에 특이적으로 삽입된다. 본 발명의 화합물은 일시적으로 모 가닥과 헤미메틸화 가닥을 형성하여 삽입되지 않고 DNA 메틸트랜스퍼라제의 활성 트랩으로서 기능할 수 있다. 또한 본 발명의 화합물은 그 게놈에 삽입되지 않고 DNA 메틸트랜스퍼라제를 점유 및 트랩할 수도 있다. DNA 수식은 종양억제유전자의 프로모터 부위의 CpG-리치 섬에 국재화되기 때문에, 본 발명의 화합물이 삽입되는 경우, 그 활성 트랩은 최적으로 배치되고 더 큰 게놈의 전반적인 안정성은 손상되지 않게 된다.

[0050] 본 발명의 화합물은 DNA 메틸화를 조정함으로써, 특히 암 및 혈액 질환 분야에서, 치료제, 진단제는 물론, 연구 시약으로서 사용할 수 있다. 종양억제유전자 등의 다수 유전자의 비정상적인 전사 침묵은 암 및 기타 질병의 발병기전과 직접적으로 관련된다. 암 관련 유전자의 메틸화로 인해, 이들 유전자의 발현이 억제 또는 완전히 침묵된다. 한편, 형질전환된 세포의 성장 정지, 분화, 및/또는 세포자멸을 유도하는 데에 이들 유전자의 발현이 요구된다. 형질전환된 세포에서의 이들 유전자의 활동저하는 이들 세포의 제어되지 않는 증식을 유발하고, 결국에는 암이 발병하게 된다. 따라서, 본 발명의 화합물을 사용하여 직접적으로 또한 게놈에 삽입 또는 이들 유전자의 CpG-리치 섬에 삽입시키지 않고 DNA 메틸트랜스퍼라제를 활발히 트랩함으로써, 그 프로모터의 메틸화를 저해하여 상기 유전자의 전사를 재활성화시킬 수 있으며, 그로 인해 암세포 증식을 억제하게 된다.

[0051] 본 발명의 화합물의 일부 실시형태는 유전자의 5'-비번역 부위 또는 프로모터 서열과 혼성화할 수 있어, 이러한 사실을 활용하여 샌드위치법 및 기타 평가법을 쉽게 구축할 수 있기 때문에, 본 발명의 화합물은 연구 및 진단 용으로도 유용할 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드 유사체와 프로모터 서열의 혼성화는 당업계에 알려진

수단으로 검출할 수 있다. 상기 수단으로는 상기 올리고뉴클레오티드 유사체에의 효소의 접합 또는 비공유적인 결합, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체의 방사성표지 또는 기타 다른 적합한 검출 수단을 들 수 있다. 치료 중의 유전자의 프로모터의 활성을 조정하기 위해 상기 검출 수단을 이용하는 키트도 제조할 수 있다.

[0052] 본 발명은 또한 이들 올리고뉴클레오티드 유사체를 합성하는 방법 및 C-5 시토신 메틸화를 조정하는 방법을 제공한다. 특히, 데시타빈(5-아자-2'-데옥시시타딘;D), DpG-리치(데시타빈-포스포디에스테르 결합-구아노신) 삼 및 유도체를 포함하는 포스포르아미다이트 빌딩 블럭 및 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 또한, 이들 화합물 또는 조성물을 치료제로서 제조, 제형화, 및 이들을 필요로 하는 숙주에 투여하는 방법을 제공한다. 본 발명의 화합물, 합성 방법, 약제학적 조성물의 제형화, 용기 및 키트의 제조, 및 질병 또는 질환 치료용 화합물 또는 조성물의 용도를 하기에 상세히 설명한다.

[0053] **1. 본 발명의 올리고뉴클레오티드 유사체**

[0054] 일반적으로 본 발명의 올리고뉴클레오티드 유사체는 올리고뉴클레오티드 서열 중에 삽입된 5-아자-시토신 잔기(이하, "Z"라고 약칭함)를 하나 이상 갖는다.

[0055] 본 발명의 일 측면에서, 염기길이가 12개 이하인 단리된 또는 합성 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공하며, 그 올리고뉴클레오티드 유사체 서열에는 1개 이상의 5-아자-시토신 잔기가 포함된다.

[0056] 일 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 하기 일반식:

[0057] -Z-L-G-, 또는 -G-L-Z-

[0058] (식 중, Z는 5-아자-시토신이고; G는 구아닌이고; L은 Z와 G를 공유적으로 연결하는 화학적 링커임)을 갖는다. 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 경우에 따라 그 서열 중에 30%, 35%, 또는 40%보다 많은 구아닌 잔기를 갖는다.

[0059] 구체적인 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 5'-DpG-3', 5'-GpD-3', 5'-DpGpD-3', 5'-GpGpD-3', 5'-GpDpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpDpG-3', 5'-DpGpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpGpA-3', 5'-DpGpDpG-3', 5'-DpGpGpD-3', 5'-GpDpGpD-3', 5'-GpDpDpG-3', 5'-DpGpDpGpA-3'로 구성되는 군에서 선택되며, 상기 D는 데시타빈이고; p는 포스포링커이고; A는 2'-데옥시아데노신이고; G는 2'-데옥시구아노신이다.

[0060] 본 발명의 또 다른 측면에서는, 하기 일반식:

[0061] -Z-L-G-, 또는 -G-L-Z-

[0062] (식 중, Z는 5-아자-시토신이고; G는 구아닌이고; L은 Z와 G를 공유적으로 연결하는 화학적 링커임)

[0063] 을 갖는 디뉴클레오티드 유사체를 2 카피(copy) 이상 포함하는, 단리된 또는 합성 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공한다.

[0064] 경우에 따라, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 디뉴클레오티드 유사체 -Z-L-G-, 또는 -G-L-Z-를 10, 8, 6, 또는 4 카피 미만으로 포함한다.

[0065] 구체적인 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 5'-DpG-3', 5'-GpD-3', 5'-DpGpD-3', 5'-GpGpD-3', 5'-GpDpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpDpG-3', 5'-DpGpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpGpA-3', 5'-DpGpDpG-3', 5'-DpGpGpD-3', 5'-GpDpGpD-3', 5'-GpDpDpG-3', 5'-DpGpDpGpA-3'로 구성되는 군에서 선택되는 단편을 포함하며, 상기 D는 데시타빈이고; p는 포스포링커이고; A는 2'-데옥시아데노신이고; G는 2'-데옥시구아노신이다.

[0066] 본 발명의 또 다른 측면에서, 염기 길이가 적어도 6개이고, 올리고뉴클레오티드 유사체의 서열 중에 하나 이상의 5-아자-시토신 잔기를 포함하고, 유전자 단편, 바람직하게는 유전자 프로모터 등의 유전자의 5'-비번역 부위와 적어도 75%의 서열 상동성을 갖는, 단리된 또는 합성 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공한다.

[0067] 일 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 하기 일반식:

[0068] -Z-L-G-, 또는 -G-L-Z-

[0069] (상기 식 중에서, Z는 5-아자-시토신이고; G는 구아닌이고; L은 Z와 G를 공유적으로 연결하는 화학적 링커임.)을 갖는다. 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 경우에 따라 30%, 35%, 또는 40%보다 많은 구아닌 잔기를 그 올리고뉴클레오티드 유사체의 서열 중에 갖는다.

[0070] 구체적인 실시형태에서는, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 5'-DpG-3', 5'-GpD-3', 5'-DpGpD-3', 5'-GpGpD-

3', 5'-GpDpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpDpG-3', 5'-DpGpG-3', 5'-GpDpD-3', 5'-DpGpA-3', 5'-DpGpDpG-3', 5'-DpGpGpD-3', 5'-GpDpGpD-3', 5'-GpDpDpG-3', 5'-DpGpDpGpA-3'로 구성되는 군에서 선택되는 단편을 포함하며, 상기 D는 데시타빈이고; p는 포스포팅커이고; A는 2'-데옥시아데노신이고; G는 2'-데옥시구아노신이다.

[0071] 상기 유전자는 바람직하게는 포유동물 유전자이며, 더 바람직하게는 인간 유전자이고, 가장 바람직하게는 인간 종양억제유전자이다. 상기 인간 유전자의 예로는, 본 명세서에 온전히 참고로서 편입되는 문헌[Santini et al.(2001) Ann. of Intern. Med. 134:573-586]에 기재된 바와 같은, VHL(본 히폰 란도(Von Hippo Landau) 유전자, 신장세포 암종 관련); P16/INK4a(림프종 관련); E-카드헤린(유방암, 갑상선암, 위암의 전이 관련); hMLH1(직장암, 위암, 및 자궁내막암에서의 DNA 수복 관련); BRCA1(유방암 및 난소암에서의 DNA 수복 관련); LKB1(직장암 및 유방암 관련); P15/INK4B(AML 및 ALL 등의 백혈병 관련); ER(에스트로젠 수용체, 유방암, 직장암 및 백혈병 관련); O6-MGMT(뇌암, 직장암, 폐암 및 림프종에서의 DNA 수복 관련); GST-pi(유방암, 전립선암 및 신장암 관련); TIMP-3(조직 메탈로프로테아제, 직장암, 신장암 및 뇌암 전이 관련); DAPK1(DAP 키나제, B-세포 림프종 세포의 세포자멸 관련); P73(림프종 세포의 세포자멸 관련); AR(안드로젠 수용체, 전립선암 관련); RAR-베타(레티노산 수용체-베타, 전립선암 관련); 엔도텔린-B 수용체(전립선암 관련); Rb(망막아세포종의 세포주기 조절 관련); P14ARF(세포주기 조절 관련); RASSF1(신호전달 관련); APC(신호전달 관련); 카스파제-8(세포자멸 관련); TERT(노화관련); TERC(노화 관련); TMS-1(세포자멸 관련); SOCS-1(간암종의 성장인자 반응 관련); PITX2(간암종 및 유방암 관련); MINT1; MINT2; GPR37; SDC4; MYOD1; MDR1; THBS1; PTC1; 및 pMDR1를 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 이들 유전자의 뉴클레오티드 서열은 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)의 웹사이트로부터 구할 수 있다.

[0072] 예로서, 상기 종양억제유전자 p15, p16, 및 BRCA1의 프로모터 서열은 각각 도 27, 28, 및 27에 나타낸다. p15, p16, 및 BRCA1 단편과 적어도 75%의 서열 상동성을 가진 올리고뉴클레오티드 유사체의 예는 각각 도 27, 28, 및 29에 나타낸다.

[0073] 테스트 폴리뉴클레오티드와 그 표적 폴리뉴클레오티드의 서열 상동성의 정도가 높을수록, 시험 폴리뉴클레오티드가 표적 폴리뉴클레오티드와 혼성화되어 남아있을 수 있는 조건의 엄격성이 높다는 것은 핵산 분야의 당업자에게 인지되어 있다. 따라서, 특정 유전자를 표적으로 하도록 설계된 본 발명의 올리고뉴클레오티드 유사체는 매우 저 엄격성 조건에서부터 고 엄격성의 조건 까지에서 표적 유전자와 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 유사체이다.

[0074] 길이가 적어도 100 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드 유사체에 대하여, 매우 저 엄격성 조건에서부터 매우 고 엄격성 조건은, 표준 서던 블로팅 처리 후에, 42°C, 5×SSPE, 0.3% SDS, 200µg/ml 전단 및 변성된 연어 정자 DNA, 및 매우 저 엄격성 및 저 엄격성에 대해서는 25%의 포름알데히드, 중간 엄격성 및 중간-고 엄격성에 대해서는 35% 포름알데히드, 또는 고 엄격성 및 매우 고 엄격성에 대해서는 50% 포름아미드 중의 어느 하나에서의 예비혼성화(prehybridization) 및 혼성화로서 규정한다. 상기 담체 물질은 최종적으로 2×SSC, 0.2% SDS를 사용하여 바람직하게는 적어도 45°C(매우 저 엄격성), 보다 바람직하게는 적어도 50°C(저 엄격성), 보다 바람직하게는 적어도 55°C(중엄격성), 보다 바람직하게는 적어도 60°C(중-고 엄격성), 보다 더 바람직하게는 적어도 65°C(고 엄격성), 가장 바람직하게는 적어도 70°C(매우 고 엄격성)에서 각 15분 동안 3회 세정하였다.

[0075] 뉴클레오티드의 길이가 약 50~100개인 짧은 올리고뉴클레오티드 유사체에 대하여, 엄격성 조건은, 표준 서던 블로팅 처리 후에, 0.9M NaCl, 0.09M Tris-HCl pH 7.6, 6mM EDTA, 0.5% NP-40, 1×Denhardt 용액, 1mM 피로인산 나트륨, 1mM 1염기인산나트륨, 0.1mM ATP, 및 밀리리터당 0.2mg의 효모 RNA 중에서, 볼튼 및 메카시에 의한 계산법(1962, Proceedings of the National Academy of Science USA 48:1390)을 이용하여 계산한 Tm의 5°C~10°C 아래에서, 예비혼성화, 혼성화, 및 혼성화 후 세정하는 것으로 규정한다. 상기 담체 물질은 6×SSC 플러스 0.1% SDS에서 15분 동안 한번 세정하고 상기 계산된 Tm의 5°C~10°C 아래에서 6×SSC를 사용하여 각각 15분 동안 2번 세정한다.

[0076] 고 엄격성 조건의 또 다른 비한정적 예로는, 예를 들어, 42°C의, 약 5×SSC, 0.5% SDS, 100µg/ml 변성된 연어 정자 DNA 및 50% 포름아미드를 포함하는 혼성화 용액을 들 수 있다. 블롯(blot)은, 예를 들어, 5% 미만의 염기쌍 미스매치(mismatch)를 허용하는, 즉, 95% 이상의 서열 동일성을 가진 서열을 선별하는 고 엄격성 조건(예, 0.1% SSC 및 0.1% SDS로 65°C에서 30분간 세정)에서 세정될 수 있다.

[0077] 고 엄격성 조건의 또 다른 비한정적 예는 65°C, 30mM NaCl 및 0.5% SDS를 함유하는 수성 완충액 중에서의 최종 세정을 포함한다. 고 엄격성 조건의 또 다른 예는 50°C, 7% SDS, 0.5M NaPO<sub>4</sub>, pH 7, 1mM EDTA 중에서의 하룻밤 혼성화한 후, 42°C, 1% SDS 용액으로 1회 이상 세정하는 것이다. 고 엄격성 세정은 5% 미만의 미스매치를 허용

할 수 있는 반면, 감소된 또는 저 엄격성 조건은 20%의 뉴클레오티드 미스매치까지 허용할 수 있다. 저 엄격성에서의 혼성화는 상기한 바와 같으나, 저포름아미드 조건, 저온 및/또는 저염 농도는 물론, 더 긴 배양시간을 이용함으로써 성취할 수 있다.

[0078] 바람직한 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 저 엄격성 조건 하에서 표적 유전자와 혼성화할 수 있다. 더 바람직한 실시형태에서는, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 중간 엄격성 조건 하에서 표적 유전자와 혼성화할 수 있다. 가장 바람직한 실시형태에서는 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 고 엄격성 조건 하에서 표적 유전자와 혼성화할 수 있다.

[0079] 본 발명의 또 다른 측면에서, DNA 메틸트랜스퍼라제상의 알로스테릭 부위에 결합하여 DNA 메틸트랜스퍼라제를 저해하는 올리고뉴클레오티드 유사체를 제공한다. DNA 메틸트랜스퍼라제의 저해는 DNA의 메틸화를 방해함으로써 비정상적인 DNA 메틸화와 관련된 암 및 혈액 질환 등의 질환을 치료한다.

[0080] 일 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는

[0081] 5'-CTGGATCCTTGCCCCGCCCTTGAATTCCC-3'(서열번호 25);

[0082] 5'-GGGAATTCAAATGACGTCAAAGGATCCAG-3'(서열번호 26);

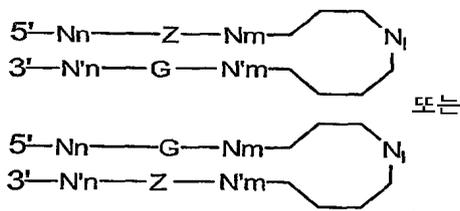
[0083] 5'-CCTACCCACCTGGATCCTTGCCCCGCCCTTGAATCCCAACCTCCAC-3'(서열번호 27);

[0084] 5'-ATCCTTGCCCCGCCCTTGAAT-3'(서열번호 28); 또는

[0085] 5'-TTGCCCCGCCCTT-3'(서열번호 29)의 서열을 갖고, 서열번호 25-28의 시토신 잔기 중의 적어도 하나는 5-아자-시토신으로 치환된다. 예를 들면, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는, 서열번호 25의 14개의 시토신 잔기 중의 하나인 뉴클레오티드 위치 15가 5-아자-시토신으로 치환된, 5'-CTGGATCCTTGCCDGGCCCTTGAATTCCC-3'(서열번호 30)일 수 있다. 시토신 잔기 중 적어도 하나를 치환함에 의해 본 발명에 따라 수식될 수 있는, DNA 메틸트랜스퍼라제에 결합하는 올리고뉴클레오티드의 기타 예는 본 명세서에 온전히 참고로서 편입한 WO 99/12027에서 확인할 수 있다. DNA 메틸트랜스퍼라제에 결합 및 그 활성을 저해함에 있어서의 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 활성을 시험하는 방법도 WO 99/12027에서 확인할 수 있다.

[0086] 본 발명의 또 다른 측면에서, 뉴클레오티드의 길이가 적어도 6개이고, 20~25℃ 등의 주위 온도의, 물, 식염수, 또는 20mM HEPES(pH 7), 12% 글리세롤, 1mM EDTA, 4mM 디티오테이트, 0.1% 노니데트 P-40, 및 3mM MgCl<sub>2</sub>를 함유한 완충액 등의 수용액 중에서, 헤어핀 구조를 취하는 올리고뉴클레오티드 유사체가 제공된다. 헤어핀 구조를 취함으로써, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드보다 DNA 메틸트랜스퍼라제에 대한 이중 가닥 DNA 기질을 더 잘 모방함으로써, DNA 메틸트랜스퍼라제의 활성을 더 효과적으로 저해하는 것으로 여겨진다.

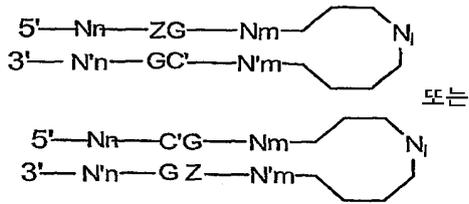
[0087] 일 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 다음의 일반적인 2차 구조를 갖는다:



[0088]

[0089] 상기 구조 중에서, N은 임의의 뉴클레오티드이고; N'는 N에 상보적인 뉴클레오티드이고; Z는 염기 잔기로서의 5-아자-시토신이고; G는 염기 잔기로서의 구아닌이고; l, n, 또는 m은 정수이고; 뉴클레오티드 Nn, Nm, N'n, 및 N'm은 헤어핀의 스템(stem) 부위에 위치하고; N<sub>l</sub>은 헤어핀의 루프 부위에 위치한다. 바람직하게는, l, n, 또는 m은 2, 3, 4, 또는 5보다 큰 정수이다. 경우에 따라서, l은 2, 3, 4, 5, 또는 6이다. 또한 경우에 따라서, Nn, Nm, 또는 N<sub>l</sub>이 시토신 잔기를 한 개 이상 갖는 경우, 그 시토신 잔기는 5-아자-시토신으로 치환된다.

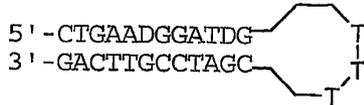
[0090] 구체적 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 유사체는 다음의 일반적인 2차 구조를 갖는다:



[0091]

[0092] 상기 구조 중에서, C'는 5-메틸-시티딘이다.

[0093] 구체적 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 유사체(서열번호 31)는 다음의 헤어핀 구조를 갖는다:



[0094]

[0095] 상기 구조 중에서, D는 데시타빈이고, A는 아데노신 또는 2'-데옥시아데노신이고, T는 티미딘 또는 2'-데옥시티미딘이고, 뉴클레오타이드 위치 21의 C는 경우에 따라 5-메틸-2'-데옥시시티딘으로 치환된다.

[0096] 상기 실시형태 중의 일 태양에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 유사체는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드 유사체가 이중 가닥인 경우, 제1 가닥은 상기 올리고뉴클레오타이드 유사체이고, 제2 가닥은 시토신 잔기가 5-아자-시토신으로 치환되지 않고 제1 가닥과 상보적인 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드 유사체일 수 있다. 예를 들면, 제1 가닥은 5'-TTDGDGAA-3'(서열번호 32)(여기서 D는 데시타빈)인 반면; 제2 가닥은 5'-TTCGCGAA-3'(서열번호 33)일 수 있다. 경우에 따라, 제1 가닥 또는 제2 가닥 중의 어느 하나의 시토신 잔기 중의 적어도 하나는 5-메틸-시토신으로 치환될 수 있다.

[0097] 상기 실시형태 중의 어느 하나에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 유사체에서의 Z와 G 사이 또는 염기 잔기 중의 어느 두 개 사이의 링커는 바람직하게는 당 포스포디에스테르 결합이다. 바람직하게는, 상기 링커는, DNA 및 RNA 각각의 자연 당 포스포디에스테르 골격에서와 마찬가지로, 2'-데옥시리보스 또는 리보스를 통한 포스포디에스테르 결합이다. 경우에 따라서, 생체내 뉴클레아제 분해에 대한 내성을 증강시키기 위해서, 자연 포스포디에스테르 링커 -O-P(=O)(O<sup>-</sup>)-O-CH<sub>2</sub>-는 포스포로티오에이트 링커 -O-P(=O)(S<sup>-</sup>)-O-CH<sub>2</sub>-, 보라노포스페이트 또는 메틸포스포네이트 링커로 변형될 수 있으며; 상기 리보스의 2'-히드록시기는 2'-메톡시기, 2'-메톡시에틸기, 또는 2'-플루오로기로 변형될 수 있다. 이렇게 자연적인 것과 다른 골격을 가진 올리고뉴클레오타이드 유사체의 예는 도 24a에 나타내고 있으며, 여기서 데시타빈은 리보스 포스페이트 골격을 통해 구아노신에 결합되어 있다. 또한 경우에 따라서, 상기 자연 당 포스포디에스테르 골격은 펩티드 결합에 의해 연결된 N-(2-아미노에틸)-글리신 단위를 반복하여 구성된 골격을 갖는 단백질 뉴클레오타이드(PNA) 골격으로 대체할 수 있다. 이러한 PNA 골격을 가진 올리고뉴클레오타이드 유사체의 예는 도 24b에 나타내고 있으며, 여기서 5-아자-시토신은 PNA 골격을 통해 구아닌에 결합되어 있다. 자연적인 것보다 뉴클레아제 분해에 대한 더 많은 내성을 갖도록 설계된 올리고뉴클레오타이드용 링커의 다른 종류는 본 명세서에 참고로서 편입한 미국특허 제6,900,540호 및 제6,900,301호에 기재되어 있다.

[0098] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 유사체는 조직, 세포 및 체액 등의 생물근원으로부터 단리될 수 있으며, 바람직하게는 높은 순도로, 보다 바람직하게는 적어도 80%의 순도로, 가장 바람직하게는 적어도 95%의 순도로 정제될 수 있다. 또한, 상기 올리고뉴클레오타이드 유사체는 5-아자-시티딘을 포함하는 인위적으로 생성한 올리고뉴클레오타이드로서, 예를 들어, 화학적으로 또는 효소학적으로 시험관내에서 합성한 합성 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[0099] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 유사체는 약제학적으로 허용가능한 임의의 염, 에스테르, 또는 상기 에스테르의 염, 또는 인간을 포함한 동물에 투여 시에, 생물학적으로 활성이 있는 대사산물 또는 그 잔기를 (직접 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 임의의 다른 화합물을 포함한다. 따라서, 예를 들면, 상기 개시물은 본 발명의 화합물의 전구약물(prodrug) 및 약제학적으로 허용가능한 염, 상기 전구약물의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 기타 생물학적 등가물에도 해당된다.

[0100] 상기 "전구약물" 라는 용어는 불활성 형태로 제조되어 생체 또는 세포내에서 내인성 효소 또는 기타 화합물질의

작용 및/또는 조건에 따라 활성형(즉, 약물)으로 전환되는 치료제를 의미한다. 특히, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 유사체의 전구약물 판(version)은 히드록시기를 함유하는 유기 화합물을 사용하여 상기 당 환의 히드록시기 중 어느 하나와의 에스테르 결합을 하나 이상 형성함으로써 제조하거나, 또는 WO 93/24510(Gosselin et al., 1993년 12월 9일 공개) 또는 WO 94/26764 또는 미국특허 제5,770,713호(Imbach et al.)에 개시된 방법에 따라 SATE[(S-아세틸-2-티오에틸)포스페이트] 유도체로서 제조할 수 있다.

[0101] 상기 "약제학적으로 허용가능한 염"이라는 용어는 본 발명의 화합물의 생리학적으로 또한 약제학적으로 허용가능한 염을 말하며: 즉, 모 화합물(parent compound)의 원하는 생물학적 활성을 보유하고 있고 바람직하지 않은 독성 효과를 나타내지 않는 염을 의미한다.

[0102] 약제학적으로 허용가능한 염기 부가 염은 알칼리 및 알칼리토금속 또는 유기 아민 등의 금속 또는 아민으로 형성된다. 양이온으로서 사용되는 금속의 예는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등이다. 적합한 아민의 예는 N,N'-디벤질에틸렌디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 디시클로헥실아민, 에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 및 프로카인이다.(예를 들면, Berge et al., "약제학적 염", J. of Pharma Sci., 1977, 66, 1-19 참조). 상기 산성 화합물의 염기 부가 염은 상기 유리산 형태와 충분한 양의 원하는 염기를 접촉시켜 종래 방식으로 염을 생성함으로써 제조된다. 상기 유리산 형태는 상기 염 형태를 산과 접촉시킨 다음 종래 방식으로 상기 유리산을 단리함으로써 재생시킬 수 있다. 상기 유리산 형태는 극성용매에서의 용해성 등의 특정한 물성 면에서 그들의 각 염과 다르지만, 상기 염은 그들의 각 유리산과 본 발명의 목적에 대하여 등가이다.

[0103] 본 명세서에서 사용되는 "약제학적 부가 염"은 본 발명의 조성물 중 하나의 구성성분의 산성 형태의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 이들은 상기 아민의 유기산 또는 무기산 염을 포함한다. 바람직한 산성염은 염산염, 아세트산염, 살리실산염, 질산염 및 인산염이다. 기타 적합한 약제학적으로 허용가능한 염은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산 또는 인산 등의 무기산; 유기 카르복시산, 술폰산, 술폰산 또는 포스포산 또는 N-치환된 설파산, 예를 들어 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 숙신산, 말레산, 히드록시말레산, 메틸말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 락트산, 옥살산, 글루콘산, 글루카르산, 글루쿠론산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 살리실산, 4-아미노살리실산, 2-페녹시벤조산, 2-아세톡시벤조산, 엠본산, 니코틴산 또는 이소니코틴산; 천연 단백질 합성에 관여하는 20개의 α-아미노산 등의 아미노산, 예를 들어, 글루탐산 또는 아스파르트산; 그리고 또한 페닐아세트산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 2-히드록시에탄술폰산, 에탄-1,2-디술폰산, 벤젠술폰산, 4-메틸벤젠술폰산, 나프탈렌-2-술폰산, 나프탈렌-1,5-디술폰산, 2- 또는 3-포스포글리세레이트, 글루코스-6-포스페이트, N-시클로헥실설파산(시클라메이트의 형성); 또는 아스코르브산 등의 기타 산성 유기 화합물 등으로 형성된, 다양한 무기산 및 유기산의 염기성염(basic salt)을 들 수 있다. 또한, 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염은 약제학적으로 허용가능한 양이온으로 제조할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용가능한 양이온은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 알칼리, 알칼리토류, 암모늄 및 4급 암모늄 양이온을 들 수 있다. 탄산염 또는 탄산수소염도 가능하다.

[0104] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 유사체에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염의 바람직한 예로는 (a)나트륨, 칼륨, 암모늄, 마그네슘, 칼슘, 폴리아민(스퍼민 및 스퍼미딘 등) 등의 양이온으로 형성된 염; (b)염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산 등의 무기산으로 형성된 산 부가염; (c)아세트산, 옥살산, 타르타르산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 글루콘산, 시트르산, 말산, 아스코르브산, 벤조산, 타닌산, 팔미트산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌술폰산, 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 나프탈렌디술폰산, 폴리갈락투론산 등의 유기산으로 형성된 염; 및 (d)염소, 브롬, 및 요오드 등의 원소 음이온으로 형성된 염을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0105] 또한, 본 발명은 단리된 화합물을 포함한다. 단리된 화합물은 혼합물 중에 존재하는 화합물의 적어도 10%, 바람직하게는 20%, 보다 바람직하게는 50%, 가장 바람직하게는 80%를 나타내고, COBRA(combined Bisulfite Restriction Analysis)법(Xiong, Z.; Laird, P. W. Nucleic Acids Res. 1997, 25, 2532-2534) 및 방사성표지된 메틸 도입법(radiolabeled methyl incorporation assay)(Francis, K. T.; Thompson, R. W.; Krumdieck, C. L. Am. J. Clin. Nutr. 1977, 30, 2028-2032) 등의 생물학적 검정법으로 시험할 때 DNA 메틸화의 검출가능한(예, 통계학적으로 유의한) 저해 활성을 나타내는 화합물을 말한다.

[0106] **2. 본 발명의 약제학적 제형**

[0107] 본 발명에 의하면, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 화합물은 각종 질병 및 질환을 치료하기 위한 약제학적으로 허용가능한 조성물로 제형화될 수 있다.

- [0108] 본 발명의 약제학적으로 허용가능한 조성물은 하나 이상의 본 발명의 화합물과 함께, 하나 이상의 비독성의 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 보조제 및/또는 부형제(본 명세서에서는 총괄적으로 "담체" 물질이라고 함), 및 필요에 따라 기타 활성성분을 포함한다.
- [0109] 본 발명의 화합물은 후술하는 바와 같이, 임의의 경로로, 바람직하게는 그 경로에 적합한 약제학적 조성물의 형태로 투여되며, 치료할 상태에 따라 달라진다. 상기 화합물 및 조성물은, 예를 들어, 경구, 비경구, 복막내, 정맥내, 동맥내, 경피, 설하, 근육내, 직장, 경협측, 비강내, 리포솜, 흡입을 통해, 질내, 안내, 국소전달을 통해(예, 카테터 또는 스텐트에 의해), 피하, 지방내, 관절내, 경막내로 투여될 수 있다.
- [0110] 상기 약제학적 제형은, 경우에 따라, 상기 조성물의 안정성을 증강시키고, 용액 중에서 그 생성물을 유지하고, 또는 본 발명의 제형의 투여와 관련된 부작용(예, 잠재성 케양, 혈관 자극 또는 분출)을 방지하기에 충분한 양으로 첨가된 부형제를 더 포함할 수 있다. 부형제의 예로는 만니톨, 소르비톨, 락토스, 데스트록스, 시클로텍스트린( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -시클로텍스트린 등), 및 변형된, 비결정질 시클로텍스트린(히드록시프로필-, 히드록시에틸-, 글루코실-, 말토실-, 말토트리오실-, 카르복시아미도메틸-, 카르복시메틸-, 설포부틸에테르-, 및 디에틸아미노-치환  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -시클로텍스트린 등)를 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 얀센 파마슈티컬스(Janssen Pharmaceuticals)로부터 입수가 가능한 엔캡신(Encapsin)(상표명) 등의 시클로텍스트린 또는 등가물이 이 목적으로 사용될 수 있다.
- [0111] 경구투여용으로, 상기 약제학적 조성물은, 예를 들어, 정제, 캡슐, 현탁액 또는 액체 형태일 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 바람직하게는 치료학적 유효량의 활성성분을 함유하는 투여 단위 형태로 만들어진다. 이러한 투여 단위의 예는 정제 및 캡슐이다. 상기 정제 및 캡슐은, 치료 목적으로, 활성성분 외에, 결합제(예를 들어, 아카시아 검, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 소르비톨, 또는 트라가칸트) 등의 종래 담체; 충전제, 예를 들어, 인산칼슘, 글리신, 락토스, 옥수수-전분, 소르비톨, 또는 과당; 윤활제, 예를 들어, 스테아르산마그네슘, 폴리에틸렌 글리콜, 실리카, 또는 탈크; 붕괴제(disintegrant), 예를 들어, 감자 전분, 향미료 또는 착색제, 또는 허용가능한 습식제(wetting agent)를 함유할 수 있다. 경구용 액상 제형은 일반적으로 수성 또는 유성 용액, 현탁액, 에멀션, 시럽 또는 엘릭시르의 형태이며, 현탁액, 유화제, 비수성제, 보존료, 착색제 및 향미료 등의 종래의 첨가제를 함유할 수 있다. 액상 제형용 첨가제의 예로는 아카시아, 아몬드 오일, 에틸알콜, 분류(分溜) 코코넛 오일, 젤라틴, 글루코스 시럽, 글리세린, 수소화된 식용 지방, 레시틴, 메틸셀룰로스, 메틸 또는 프로필 파라-히드록시벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 소르비톨, 또는 소르브산을 들 수 있다.
- [0112] 또한, 국소용으로, 본 발명의 조성물은 피부, 또는 코 및 목의 점막에 적용하기에 적합한 형태로 제조될 수 있으며, 크림, 연고, 액상 스프레이 또는 흡입제, 마름모꼴 정제, 목 페인트(throat paint)의 형태를 취할 수 있다. 이러한 국소용 제형은 활성성분의 표면 침투를 촉진하기 위해서 디메틸설폭사이드(DMSO) 등의 화합물을 더 포함할 수 있다.
- [0113] 눈 또는 귀에 적용용으로, 본 발명의 화합물은 연고, 크림, 로션, 페인트 또는 파우더와 같은 소수성 또는 친수성 베이스로 제형화된 액체 또는 반액체 형태로 제공될 수 있다.
- [0114] 직장 투여용으로, 본 발명의 화합물은 코코아 버터, 왁스 또는 기타 글리세리드 등의 종래의 담체와 혼합된 좌약 형태로 투여될 수 있다.
- [0115] 경우에 따라서, 본 발명의 화합물은 전달 시간이 적합한 약제학적으로 허용가능한 담체 중에서 재구성하기 위한 파우더 형태로 할 수 있다.
- [0116] 상기 약제학적 조성물은 주사를 통해 투여될 수 있다. 비경구 투여용 제형은 수성 또는 비수성의 등장 멸균 주사 용액 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 이들 용액 또는 현탁액은 경구 투여용 제형에 사용되는 것으로 언급된 하나 이상의 담체를 포함한 멸균 파우더 또는 그레놀로 제조할 수 있다. 상기 화합물은 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에탄올, 콘 오일, 벤질알콜, 염화나트륨, 및/또는 각종 완충액에 용해될 수 있다.
- [0117] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 유사체는 에멀션으로서 제조 및 제형화된다. 에멀션은 일반적으로 하나의 액체가 또 다른 액체에 통상 직경이 0.1 $\mu$ m를 초과하는 작은방울 형태로 분산되어 있는 이종 시스템(heterogenous system)이다(Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., N.Y., volume 1, p.245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., N.Y., volume 2, p.335; Higuchi at al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985,

p.301). 에멀션은 서로 잘 혼합되고 분산된 두개의 비혼화성 액상으로 구성되는 2상 시스템이다. 일반적으로, 에멀션은 유중수형(w/o: water in oil) 또는 수중유형(o/w: oil in water) 중의 어느 한 종일 수 있다. 수상이 미세하게 조개져서 미세한 방울로서 별키한 유상내에 분산되어 있는 경우, 그 결과 조성물을 유중수형(w/o) 에멀션이라 부른다. 경우에 따라서, 유상이 미세하게 조개져서 미세한 방울로서 별키한 수상에 분산되어 있는 경우, 그 결과 조성물을 수중유형(o/w)이라고 부른다. 에멀션은 상기 분산 상(dispersed phase) 및 활성성분 외에도, 수상, 유상 또는 개별상 그자체 중 어느 하나 내에 용액으로서 존재할 수 있는 부가 성분을 함유할 수 있다. 또한, 유화제, 안정화제, 염료, 및 항산화제 등의 약제학적 부형제가 필요에 따라 에멀션에 존재할 수 있다. 약제학적 에멀션은, 예를 들어, 유중수중유형(o/w/o) 및 수중유중수형(w/o/w) 에멀션의 경우 등과 같이, 2상 이상으로 구성되는 다중 에멀션일 수 있다. 이러한 복합적 제형은 단순한 2성분 에멀션이 하지 못하는 특정한 이점을 종종 제공할 수 있다. o/w 에멀션의 개개의 오일방울이 작은 물방울을 둘러싸고 있는 다중 에멀션은 w/o/w 에멀션을 구성한다. 마찬가지로, 연속된 유상내에서 안정화된 물방울에 둘러싸인 오일방울의 계는 o/w/o 에멀션을 제공한다.

[0118] 에멀션은 열역학적 안정성이 거의 없는 것을 특징으로 한다. 종종, 상기 에멀션의 분산된 또는 불연속적인 상은 외측 또는 연속 상내로 잘 분산되며, 유화제 또는 제형의 점도를 수단으로 하여 이 형태로 유지된다. 상기 에멀션 상 중의 어느 하나는, 에멀션 스타일 연고 베이스 또는 크림의 경우와 같이, 반고체 또는 고체일 수 있다. 기타 에멀션 안정화 수단은 에멀션의 각 상으로 도입될 수 있는 유화제의 사용을 의미한다. 유화제는 크게 4개의 카테고리로 분류할 수 있다: 합성 계면활성제, 천연 유화제, 흡수 베이스(absorption base), 및 미세 분산 고체(Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199)

[0119] 합성 계면활성제는 표면활성제로서 알려져 있으며, 에멀션 제형에서 폭넓은 적용가능성이 확인되었으며 문헌(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. volume 1, p.285; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199)에서 검토되었다. 계면활성제는 일반적으로 양친매성이며, 소수성 부분과 친수성 부분을 포함한다. 계면활성제의 소수성 특성에 대한 친수성 비율은 친수/소수 밸런스(HLB)라 불리며, 제형 제조 시에 계면활성제를 분류 및 선별하는데 가치있는 도구이다. 계면활성제는 친수기의 특성에 의거하여 다른 클래스로 분류할 수 있다: 비이온성, 음이온성, 양이온성 및 양쪽성(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. volume 1, p.285).

[0120] 에멀션 제형에 사용되는 천연 유화제로는 라놀린, 밀랍, 포스파티드, 레시틴 및 아카시아를 들 수 있다. 무수 라놀린 및 친수성 바셀린(petrolatum) 등의 흡수 베이스는 그들이 물을 흡수하여 w/o 에멀션을 형성하지만 그들의 반고체 경도(consistency)를 유지할 수 있도록 친수성을 보유한다. 또한, 미세 분산 고체는 특히 계면활성제와 함께 점성이 있는 제형에서 양호한 유화제로서 사용되고 있다. 이들로는 중금속 수산화물 등의 극성 무기 고체, 벤토나이트, 에타폴자이트, 핵토라이트, 카올린, 몬모릴로나이트, 콜로이드성 규산알루미늄 및 콜로이드성 규산마그네슘알루미늄, 색소, 및 카본 또는 글리세릴 트리스테아레이트 등의 비극성 고체를 들 수 있다.

[0121] 또한, 여러가지 비유화(non-emulsifying) 물질은 에멀션 제형에 포함되어 에멀션 특성에 기여한다. 이들로는 지방, 오일, 왁스, 지방산, 지방알콜, 지방에스테르, 보습제(humectant), 친수성 콜로이드, 방부제 및 산화방지제를 들 수 있다(Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., N.Y., volume 1, p.335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199).

[0122] 친수성 콜로이드 및 히드로콜로이드로는 천연검 및 다당류(예, 아카시아, 한천, 알긴산, 카라기난, 구아검, 카라야검, 및 트라가간트) 등의 합성 폴리머, 셀룰로스 유도체(예, 카복시메틸셀룰로스 및 카복시프로필셀룰로스), 및 합성 폴리머(예, 카보머, 셀룰로스 에테르, 및 카복시비닐 폴리머)를 들 수 있다. 이들은 물에 분산 또는 팽창하여, 상기 분산상 방울 부근에 강한 계면 필름을 형성함으로써 또한 외상의 점도를 증가시킴으로써 에멀션을 안정화시키는 콜로이드 용액을 형성한다.

[0123] 에멀션은 종종 미생물의 성장을 쉽게 도울 수 있는 탄화수소, 단백질, 스테롤 및 인지질 등의 다수의 성분을 함유하므로, 이들 제형은 종종 방부제를 포함한다. 에멀션 제형에 포함되는 통용되는 방부제로는 메틸파라벤, 프로필파라벤, 4급 암모늄염, 염화벤잘코늄, p-히드록시벤조산 에스테르, 및 붕산을 들 수 있다. 또한, 상기 에멀션 제형의 변질을 막기 위해서는 통상적으로 산화방지제가 첨가된다. 사용되는 산화방지제는 토크페롤, 알킬

갈레이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔 등의 자유 라디칼 스캐빈저, 또는 아스코르브산 및 중아황산나트륨 등의 환원제, 및 시트르산, 타르타르산, 및 레시틴 등의 산화방지 상승제일 수 있다.

[0124] 피부, 경구, 비경구 경로를 통한 에멀션 제형의 적용 및 그들의 제조 방법은 문헌(Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199)에서 검토되었다. 경구 전달용 에멀션 제형은 제형화의 용이성, 흡수로 인한 효능 및 생체이용률 관점을 이유로 매우 광범위하게 사용되고 있다(Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., N.Y., volume 1, p.245; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199). 미네랄오일 베이스 설사제, 유용(oil-soluble)성 비타민 및 고지방 영양제는 통상적으로 o/w 에멀션으로서 경구투여 되고 있는 물질 중 하나이다.

[0125] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오티드 유사체는 마이크로에멀션으로서 제형화된다. 마이크로에멀션은 수계, 오일계 및 단일 광학적으로 등방성이고 열역학적으로 안정한 액체 용액인 양친매성 물질계로서 정의될 수 있다(Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., N.Y. volume 1, p.245). 일반적으로 마이크로에멀션은 먼저 수성 계면활성제 용액에 오일을 분산시킨 다음 충분한 양의 네번째 성분, 일반적으로는 중쇄 알코올을 첨가하여 투명한 계를 형성함으로써 제조되는 계이다. 따라서, 마이크로에멀션은 표면활성 분자의 계면 필름에 의해 안정화되어 있는 두개의 비혼화성 액체의 열역학적으로 안정하고 등방성이 분명한 분산액으로서 기재되었다(Leung and Shah, in: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). 마이크로에멀션은 통상적으로 오일, 물, 계면활성제, 공계면활성제(cosurfactant) 및 전해질을 포함한 3~5가지 성분의 조합으로 제조된다. 상기 마이크로에멀션이 유중수형(w/o) 또는 수중유형(o/w) 중의 어느 것인지는 사용되는 오일과 계면활성제의 특성, 및 그 계면활성제 분자의 극성 머리와 탄화수소 꼬리의 구조 및 기하학적 패키징에 따라 다르다(Schott, in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p.271).

[0126] 상 다이어그램(phase diagram)을 이용한 현상학적 접근법이 광범위하게 연구되어 왔으며 당업자로 하여금 마이크로에멀션 제형화 방법을 포괄적으로 이해할 수 있게 하였다(Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., N.Y. volume 1, p.245; Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., N.Y. volume 1, p.335). 종래의 에멀션에 비해서, 마이크로에멀션은 자발적으로 형성되는 열역학적으로 안정한 방울의 제형 중에 수불용성 약물을 용해시키는 이점을 제공한다.

[0127] 마이크로에멀션 제조에 사용되는 계면활성제로는 이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 브리지(Brij) 96, 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르, 폴리글리세롤 지방산 에스테르, 테트라글리세롤 모노라우레이트(ML310), 테트라글리세롤 모노올레이트(MO310), 헥사글리세롤 모노올레이트(PO310), 헥사글리세롤 펜타올레이트(PO500), 데카글리세롤 모노카프레이트(MCA750), 데카글리세롤 모노올레이트(MO750), 데카글리세롤 세스퀴올레이트(SO750), 데카글리세롤 데카올레이트(DA0750)의 단독 또는 공계면활성제와 조합한 것을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 상기 공계면활성제, 통상적으로 에탄올, 1-프로판올, 및 1-부탄올 등의 단쇄알코올은 계면활성제 필름으로 침투하여 그 결과 계면활성제 분자 사이에 생긴 빈 공간 때문에 교란된 막을 형성함으로써 계면 유효성을 증가시키게 된다. 하지만, 마이크로에멀션은 공계면활성제 없이 제조할 수 있으며 알코올-프리 자기유화 마이크로에멀션 계가 당업계에 알려져 있다. 상기 수상(aqueous phase)은 일반적으로 물, 약물의 수성용액, 글리세롤, PEG300, PEG400, 폴리글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 에틸렌 글리콜의 유도체일 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 상기 유상(oil phase)으로는 카프텍스(Captex) 300, 카프텍스 355, 카프물(Capmul) MCM, 지방산 에스테르, 중쇄(C<sub>8</sub>~C<sub>12</sub>) 모노, 디, 및 트리-글리세라이드, 폴리옥시에틸화된 글리세롤 지방산 에스테르, 지방알콜, 폴리글리콜화 글리세라이드, 포화 폴리글리콜화 C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> 글리세라이드, 식물성 오일 및 실리콘 오일을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0128] 마이크로에멀션은 약물 용해 및 약물의 증강된 흡수의 측면에서 특히 중요하다. 지질계(lipid-based) 마이크로에멀션(o/w와 w/o 둘다)은 펩티드를 포함한, 약물의 경구 생체이용률을 증강시키는 것으로 제안되어 있다(Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). 마이크로에멀션은 개선된 약물 용해성, 효소 가수분해로부터의 약물 보호, 계면활성제에 의해서 유도된 막 유효성 및 투과성의 변경에 기인한 약물 흡수의 증강이 가능한 점, 제조 용이성, 고

체 투여 형태를 통한 경구 투여 용이성, 개선된 임상 효능, 및 감소된 독성의 이점을 제공한다Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). 종종 마이크로에멀션은 그 성분들이 주위 온도에서 함께 놓여져 있는 경우 자발적으로 형성된다. 이것은 열불안정성 약물, 펩티드 또는 올리고뉴클레오티드를 제형화하는 경우에 특히 유익하다. 또한, 마이크로에멀션은 화장품과 약제 적용 둘 다에 있어서 활성 성분의 경피 전달에 효과적이다. 본 발명의 마이크로에멀션 조성물 및 제형은 위장관으로부터의 올리고뉴클레오티드와 핵산의 증가된 전신적 흡수를 촉진하는 것은 물론, 위장관, 질, 구강, 및 기타 투여 부분에서의 올리고뉴클레오티드와 핵산의 국소적인 세포 섭취(cell uptake)를 개선할 것으로 예상된다.

- [0129] 또한, 본 발명의 마이크로에멀션은 그 제형의 특성을 개선하고 본 발명의 올리고뉴클레오티드와 핵산의 흡수를 증강시키기 위해서, 소르비탄 모노스테아레이트(Gri11 3), 라브라졸, 및 흡수 증강제 등의 부가 성분 및 첨가제를 함유할 수 있다. 본 발명의 마이크로에멀션에 사용되는 흡수 증강제는 5개의 넓은 카테고리-계면활성제, 지방산, 담즙산염, 킬레이트제, 및 비킬레이트화 비계면활성제(non-chelating non-surfactant) 중의 하나에 속하는 것으로 분류될 수 있다(Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). 이들 클래스 각각은 상기에서 논의한 바 있다.
- [0130] 마이크로에멀션 외에도, 약물의 제형용으로 연구 및 사용되고 있는 유기적인 계면활성제 구조가 많이 있다. 이들은 단층, 미셀(micell), 이중층(bilayer) 및 소포(vesicle)을 들 수 있다. 리포솜 등의 소포는 약물 전달 관점에서 그들이 제공하는 작용 특이성과 작용 지속성으로 인해 상당히 주목받고 있다. 본 발명에서 사용되는 바와 같이, "리포솜"이라는 용어는 구형 이중층 또는 이중층으로 배열된 양친매성 지질로 구성되는 소포를 의미한다.
- [0131] 리포솜은 지질친화성 물질과 수성 내부로 형성된 막을 갖는 단층(unilamella) 또는 다층(multilamella) 소포이다. 상기 수성 부분은 전달될 조성을 포함한다. 양이온성 리포솜은 세포벽에 융합할 수 있는 이점을 가진다. 비이온성 리포솜은 세포벽과 효과적으로 융합할 수 없을지라도, 생체내에서 대식세포에 의해 흡수된다.
- [0132] 손상없는 포유동물 피부를 가로질러 들어가기 위해서, 지질 소포는 적합한 경피 경사도의 영향 하에서, 각각의 직경이 50nm 미만인 일련의 세공을 통과해야만 한다. 따라서, 고도로 변형할 수 있고 상기 세공을 통과할 수 있는 리포솜을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0133] 리포솜의 다른 이점으로는 천연 인지질로부터 얻어진 리포솜이 생체적합성과 생분해성을 갖는 것; 리포솜이 넓은 범주의 수용성 및 지질용해성 약물을 포함할 수 있는 것; 리포솜이 대사 및 분해로부터 그들의 내부 구획에 봉입된 약물(encapsulated drug)을 보호할 수 있는 것을 들 수 있다(Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., N.Y. volume 1, p.245). 리포솜 제형의 제조에 있어서 중요한 고려사항은 지질 표면 전하, 소포 크기 및 리포솜의 수성 체적이다.
- [0134] 리포솜은 활성성분의 작용 부위로의 이동 및 전달용으로 유용하다. 상기 리포솜 막은 생체막과 구조적으로 유사하기 때문에, 리포솜을 조직에 적용했을 때, 그 리포솜은 세포막과 합병하기 시작한다. 상기 리포솜과 세포의 합병이 진행됨에 따라, 상기 리포솜 내용물은 상기 활성성분이 작용할 수 있는 세포내로 옮겨진다.
- [0135] 리포솜 제형은 많은 약물에 대한 전달 방식으로서 광범위한 연구의 초점이 되고 있다. 국소 투여에 있어서, 리포솜이 기타 제형을 넘어서는 여러 이점을 나타낸다는 증거가 증대하고 있다. 이러한 이점으로는 투여된 약물의 높은 전신적인 흡수와 관련된 부작용 감소, 투여된 약물의 원하는 표적에서의 축적 증가, 및 폭넓게 다양한 약물(소수성과 친수성 둘다)을 피부 속으로 투여하는 능력을 들 수 있다.
- [0136] 리포솜은 두개의 광범위한 클래스로 구분된다. 양이온성 리포솜은 음으로 하전된 DNA 분자와 상호작용하여 안정한 복합체를 형성하는 양으로 하전된 리포솜이다. 상기 양으로 하전된 DNA/리포솜 복합체는 음으로 하전된 세포 표면에 결합하여 엔도솜내에 내재화된다. 엔도솜 내의 산성 pH로 인해, 상기 리포솜이 파괴되어, 그들의 내용물을 세포질내로 방출한다(Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 980-985).
- [0137] pH-감수성인 또는 음으로 하전된 리포솜은 DNA와의 복합체를 형성하기보다는 오히려 DNA를 트랩한다. 상기 DNA와 지질 둘다 유사하게 하전되기 때문에, 복합체 형성보다는 오히려 반발작용이 일어난다. 그럼에도 불구하고, 일부 DNA는 이들 리포솜의 수성 내부에 트랩된다. pH-감수성 리포솜은 티미딘 키나제 유전자를 코딩하는 DNA를 배양 중의 세포 단층(monolayer)으로 전달하는 데 사용되고 있다. 상기 외인성 유전자의 발현이 그 표적 세포에서 검출되었다(Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).
- [0138] 리포솜 조성물의 주요한 종류 중의 하나로는 천연 유래의 포스파티딜콜린 외에 인지질을 들 수 있다. 중성 리

리포솜 조성물은, 예를 들어, 디미리스토일 포스파티딜콜린(DMPC) 또는 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC)으로 형성할 수 있다. 음이온성 리포솜 조성물은 일반적으로 디미리스토일 포스파티딜글리세롤로 형성되지만, 음이온성 융합 리포솜은 주로 디올레오일 포스포티딜에탄올아민(DOPE)로 형성된다. 리포솜 조성물의 또 다른 종류는, 예를 들어, 대두 PC 및 에그 PC 등의 포스파티딜콜린(PC)로 형성된다. 또 다른 종류는 인지질 및/또는 포스파티딜콜린 및/또는 콜레스테롤의 혼합물로 형성된다.

[0139] 또한, 비이온성 리포솜 계, 특히 비이온성 계면활성제와 콜레스테롤을 포함하는 계는 피부로의 약물 전달에 있어서의 그들의 유용성을 결정하기 위해 조사되고 있다. 노바솜(Novasome).TM.I(글리세릴 디라우레이트/콜레스테롤/폴리에틸렌-10-스테아릴 에테르)와 노바솜.TM.II(글리세릴 디스테아레이트/콜레스테롤/폴리에틸렌-10-스테아릴 에테르)를 포함하는 비이온성 리포솜 제형은 시클로스포린-A를 마우스 스킨의 진피에 전달하기 위해 사용되었다. 그 결과는 상기 비이온성 리포솜 계가 시클로스포린-A를 피부의 다른 층으로 배치하는 것을 촉진하는 효과가 있음을 나타내었다(Hu et al., S.T.P. Pharma. Sci. 1994, 4, 6, 466).

[0140] 또한, 리포솜은 "입체적으로 안정화된(sterically stabilized)" 리포솜을 포함하며, 본 명세서에 사용되는 바와 같이 이 용어는 하나 이상의 특수화된 지질을 포함하는 리포솜을 말하며, 상기 지질이 리포솜에 편입되었을 때, 상기 특수화된 지질이 부족한 리포솜에 비해서, 증강된 순환 수명을 나타낸다. 입체적으로 안정화된 리포솜의 예로는 리포솜의 소포형성 지질 부분의 일부가 (A)모노시알로강글리오사이드 G<sub>M1</sub> 등의 하나 이상의 당지질을 포함하는 것이나, 또는 (B)폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티(moiety) 등의 하나 이상의 친수성 폴리머로 유도체화되어 있는 것이 있다. 어떠한 특정한 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 당업계에서는, 적어도 강글리오사이드, 스펅고미엘린, 또는 PET-유도 지질을 포함하는 구조적으로 안정화된 리포솜에 대해서는, 이 구조적으로 안정화된 리포솜의 순환 반감기의 증강이 세망내피계(RES: reticuloendothelial system) 세포로의 흡수(uptake)의 감소로부터 유래하는 것으로 여겨지고 있다(Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

[0141] 하나 이상의 당지질을 포함하는 다양한 리포솜이 당업계에 알려져 있다. Papahadjopoulos 등(Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64)은 리포솜의 혈액 반감기를 개선시키는, 모노시알로강글리오사이드 G<sub>M1</sub>, 갈락토세레브로사이드 설페이트 및 포스파티딜노시톨의 능력을 보고하였다. 이러한 발견은 Gabizon 등에 의해 상세히 설명되었다(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). Allen 등은 미국특허 제4,837,028호 및 WO 88/04924에 (1)스펅고미엘린 및 (2)강글리오사이드 G<sub>M1</sub> 또는 갈락토세레브로사이드 설페이트 에스테르를 포함하는 리포솜을 개시한다. 미국특허 제5,543,152호(Webb 등)에는 스펅고미엘린을 포함하는 리포솜이 개시되어 있다. WO 97/13499(Lim 등)에는 1,2-sn-디미리스토일포스파티딜콜린을 포함하는 리포솜이 개시되어 있다.

[0142] 하나 이상의 친수성 폴리머로 유도체화된 지질을 포함하는 다수의 리포솜, 및 그들의 제조 방법이 당업계에 알려져 있다. Sunamoto 등(Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778)은 PEG 부분(moiety)을 포함하는, 비이온성 세제인 2C<sub>12</sub> 15G를 언급하였다. Illum 등(FEBS Lett., 1984, 167, 79)은 중합성 글리콜로 폴리스티렌 입자를 친수적으로 코팅함에 의해 혈액 반감기가 유의하게 증가되는 것에 주목하였다. Sears에 의해, 폴리아킬렌 글리콜(예, PEG)의 카르복시기의 부착에 의해 수식된 합성 인지질이 언급되어 있다(미국특허 제4,426,330호 및 제4,534,899호). Klibanov 등(FEBS Lett., 1990, 268, 235)은 PEG 또는 PEG 스테아레이트로 유도체화된 포스파티딜에탄올아민(PE)을 포함하는 리포솜의 혈액 순환 반감기가 유의하게 증가됨을 증명하는 실험을 언급하였다. Blume 등(Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91)은 상기한 관찰을 다른 PEG-유도체화 인지질, 예를 들어, 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(DSPE)과 PEG의 조합으로 형성된 DSPE-PEG에까지 확장하였다. 그들의 외표면 상에 공유적으로 결합된 PEG 모이어티를 가진 리포솜은 유럽특허 EP 0 445 131 B1 및 WO 90/04384(Fisher)에 기재되어 있다. PEG로 유도체화된 PE를 1~20몰%로 함유하는 리포솜 조성물, 및 그들의 사용 방법이 Woodle 등(미국특허 제5,013,556호 및 제5,356,633호)과 Martin 등(미국특허 제5,213,804호 및 유럽특허 EP 0 496 813 B1)에 의해 언급되었다. 다수의 다른 지질-폴리머 접합체를 포함하는 리포솜은 WO 91/05545 및 미국특허 제5,225,212호(둘다 Marten 등) 및 WO 94/20073(Zalipsky 등)에 기재되어 있다. PEG-수식 세라마이드 지질을 포함하는 리포솜은 WO 96/10391(Choi 등)에 기재되어 있다. 미국특허 제5,540,935호(Miyazaki 등) 및 제5,556,948호(Tagawa 등)에는 그들의 표면의 작용 부분에 의해 더 유도체화될 수 있는 PEG-함유 리포솜이 기재되어 있다.

[0143] 핵산을 포함하는 제한된 수의 리포솜이 당업계에 알려져 있다. WO 96/40062(Thierry 등)는 고분자량 핵산을 리포솜내에 캡슐화하는 방법을 개시하고 있다. 미국특허 제5,264,221호(Tagawa 등)에는 단백질이 결합된 리포솜이 개시되어 있으며 이 리포솜의 내용물은 안티센스 RNA를 포함할 수 있음을 주장하고 있다. 미국특허 제

5,665,710호(Rahman 등)은 리포솜내에 올리고뉴클레오티드를 캡슐화하는 특정한 방법을 기재하고 있다. WO 97/04787(Love 등)은 raf 유전자를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 리포솜을 개시하고 있다.

- [0144] 트랜스퍼솜(transfersome)은 리포솜의 또 다른 종류이며, 약물 전달 운반체용으로 매력적인 후보자인 고도로 변형가능한 지질 응집체이다. 트랜스퍼솜은 그 방울보다 작은 세공을 통해서 쉽게 침투할 수 있도록 고도로 변형가능한 지질 방울로 묘사될 수 있다. 트랜스퍼솜은 그들이 사용되는 환경에 적응할 수 있으며, 예를 들면, 그들은 자기최적화(피부의 세공의 모양에 적응할 수 있는), 자기수복(self-repair)할 수 있으며, 단편화하지 않고 그들의 표적에 빈번히 도달하며, 종종 자체 로딩(self-loading)한다. 트랜스퍼솜을 제조하기 위해서는 표면에 지 활성제, 통상적으로 계면활성제를 표준 리포솜 조성물에 첨가할 수 있다. 트랜스퍼솜은 세럼 알부민을 피부에 전달하는데 사용되고 있다. 상기 세럼 알부민의 트랜스퍼솜 매개 전달은 세럼 알부민을 함유하는 용액의 피하 주사만큼 효과적인 것으로 밝혀져 있다.
- [0145] 계면활성제는 에멀션(마이크로에멀션 포함) 및 리포솜 등의 제형에 광범위하게 적용되게 된다. 다수의 다른 종류의 계면활성제(천연과 합성 둘다)의 특성을 분류하여 등급을 매기는 가장 일반적인 방법은 친수성/친유성 밸런스(HLB)를 사용하는 것이다. 상기 친수성 기(또한, "머리(head)"로서 알려져 있음)의 특성은 제형에 사용되는 상이한 계면활성제를 분류하기 위한 가장 유용한 수단을 제공한다(Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p.285).
- [0146] 상기 계면활성제 분자가 이온화되어 있지 않은 경우, 그것은 비이온성 계면활성제로 분류된다. 비이온성 계면활성제는 약제 및 화장품에 널리 적용되며 넓은 범위의 pH 값에 대하여 사용할 수 있다. 일반적으로 그들의 HLB 값은 그들의 구조 따라 다르지만 약 2~18이다. 비이온성 계면활성제로는 에틸렌 글리콜 에스테르, 프로필렌 글리콜 에스테르, 글리세릴 에스테르, 폴리글리세릴 에스테르, 소르비탄 에스테르, 슈크로스 에스테르, 및 에톡시화 에스테르 등의 비이온성 에스테르를 들 수 있다. 지방알콜 에톡실레이트, 프로폭시화 알콜, 및 에톡시화/프로폭시화 블록 중합체 등의 비이온성 알칸올아미드 및 에테르가 이 클래스에 포함된다. 상기 폴리옥시 에틸렌 계면활성제는 비이온성 계면활성제 클래스의 가장 인기있는 일원이다.
- [0147] 상기 계면활성제 분자가 물에 용해 또는 분산될 때 음 전하를 띠는 경우, 상기 계면활성제는 음이온성으로 분류된다. 음이온성 계면활성제로는 비누 등의 카복시산염, 아실 락틸레이트, 아미노산의 아실 아미드, 알킬 설페이트 및 에톡시화 알킬 설페이트 등의 황산의 에스테르, 알킬 벤젠 설포네이트, 아실 이소티오네이트, 아실 타우레이트 및 설포석시네이트 등의 술폰산염, 및 인산염을 들 수 있다. 상기 음이온성 계면활성제 중의 가장 중요한 일원은 상기 알킬 설페이트와 비누이다.
- [0148] 상기 계면활성제 분자가 물에 용해 또는 분산될 때 양 전하를 띠는 경우, 상기 계면활성제는 양이온성으로 분류된다. 양이온성 계면활성제로는 4급 암모늄염 및 에톡시화 아민을 들 수 있다. 상기 4급 암모늄염은 이 클래스에서 가장 많이 사용되는 일원이다.
- [0149] 상기 계면활성제 분자가 양 전하든 음 전하든 가질 수 있는 경우, 상기 계면활성제는 양쪽성으로 분류된다. 양쪽성 계면활성제로는 아크릴산 유도체, 치환된 알킬아미드, N-알킬베타인 및 인지질을 들 수 있다.
- [0150] 약품, 제형 및 에멀션에 계면활성제를 사용하는 것이 검토되어 있다(Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y. 1998, p.285).
- [0151] 구체적인 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 글리세린, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 그들의 조합을 포함한 비수성 용매로 용매화시킨 화합물을 포함하는 약제학적으로 허용가능한 조성물로 제형화될 수 있다. 이러한 약제학적 조성물 중에서는 상기 화합물이 안정할 것이며, 그 결과 상기 약제학적 제형이 사용 전에 장기간 동안 저장될 수 있을 것으로 여겨진다.
- [0152] 최근의 데시타빈을 이용한 임상 치료에서는, 약물 분해를 최소화하기 위해, 데시타빈을, 동결건조한 분말로써 공급하고, 용매(WFI 등) 중에 물을 적어도 40% 체적으로 함유하는 차가운 수용액으로 재구성하고, 투여하기 전에 차가운 주입액으로 희석시킨다. 이러한 제형 및 치료 처방은 몇몇 결점이 있다. 첫째, 차가운 용액 중에서 데시타빈을 냉각시키는 것이 필수적이며, 이는 조작하기 어렵고 더 높은 온도에서의 저장에 견딜 수 있는 제형보다 경제적으로 더 바람직하지 않다. 두번째, 수용액 중에서의 데시타빈의 빠른 분해에 기인하여, 상기 재구성한 데시타빈 용액은 그 용액이 7시간 미만 동안 냉장고에 저장된 경우에 최고 3시간 동안만 환자에게 주입될 수 있다. 더욱이, 차가운 유액의 주입은 환자에게 큰 불편과 고통을 초래하여, 상기 처방에 대한 환자의 반감을 불러일으킨다.

- [0153] 데시타빈의 트리아진 환 및/또는 리보스 환을 수식하고 그 화합물을 비수성 용매로 제형화함으로써, 상기 약제학적 제형은 최근의 데시타빈을 이용한 임상치료와 관련하여 상기에 열거한 문제점을 극복할 수 있다. 본 발명의 화합물의 이들 제형은 용매 중에 물을 적어도 40% 체적으로 함유하는 수용액으로 제형화한 데시타빈보다 화학적으로 더 안정한 것으로 여겨진다.
- [0154] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 제형은 용매 중에 40% 미만의 물을 함유하고, 경우에 따라 20% 미만, 또는 경우에 따라 10% 미만, 또는 경우에 따라 1% 미만의 물을 용매 중에 함유한다. 일 변형예에서는, 상기 약제학적 제형은 실질적으로 무수물 형태로 저장된다. 경우에 따라, 상기 약제학적 조성물에, 물을 흡수시키기 위해 건조제를 첨가할 수 있다.
- [0155] 상기의 증강된 안정성으로 인하여, 본 발명의 제형은 주위 온도에서 저장하고 수송할 수 있으므로, 약물 취급 비용이 유의하게 감소된다. 게다가, 본 발명의 제형은 환자에게 투여하기 전에 장시간 동안 편리하게 저장할 수 있다. 또한, 본 발명의 제형은 정규 주입액(차게하지 않은 것)으로 희석하여 실온으로 환자에게 투여함으로써, 차가운 유액의 주입과 관련된 환자의 불편감 유발을 피할 수 있다.
- [0156] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 글리세린에 상이한 농도로 용해된다. 예를 들면, 상기 제형은 경우에 따라 글리세린 1ml 당 0.1~200mg; 1~100mg; 1~50mg; 2~50mg; 2~100mg; 5~100mg; 10~100mg; 또는 20~100mg의 본 발명의 화합물을 포함할 수 있다. 글리세린당 본 발명의 화합물의 농도의 구체예로는 2, 5, 10, 20, 22, 25, 30, 40 및 50mg/ml를 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0157] 상기 제형을 제조하기 위해서 상이한 등급의 글리세린(동의어: 1,2,3-프로판트리올; 글리세롤; 글리콜 알콜; 무수 글리세롤)을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 상기 제형을 제조하기 위해, 화학 순도가 90%보다 높은 글리세린이 사용된다.
- [0158] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 상이한 농도의 프로필렌 글리콜에 용해된다. 예를 들면, 상기 제형은, 경우에 따라, 프로필렌 글리콜 1ml당 0.1~200mg; 0.1~100mg; 0.1~50mg; 2~50mg; 2~100mg; 5~100mg; 10~100mg; 또는 20~100mg의 본 발명의 화합물을 포함한다. 프로필렌 글리콜 당 데시타빈의 농도의 구체예로는 2, 5, 10, 20, 22, 25, 30, 40 및 50mg/ml를 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0159] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 글리세린과 프로필렌 글리콜을 상이한 농도로 조합한 용매에 용해된다. 상기 용매 중의 프로필렌 글리콜의 농도는 0.1~99.9%, 경우에 따라 1~90%, 10~80%, 또는 50~70%이다.
- [0160] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 글리세린과 PEG300, PEG400 및 PEG1000 등의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 상이한 농도로 조합한 용매에 용해된다. 상기 용매 중의 폴리에틸렌 글리콜의 농도는 0.1~99.9%, 경우에 따라 1~90%, 10~80%, 또는 50~70%이다.
- [0161] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 글리세린을 상이한 농도로 조합한 용매에 용해된다. 상기 용매 중의 프로필렌 글리콜의 농도는 0.1~99.9%, 경우에 따라 1~90%, 10~60%, 또는 20~40%이고; 폴리에틸렌 글리콜의 농도는 0.1~99.9%, 경우에 따라 1~90%, 10~80%, 또는 50~70%이다.
- [0162] 프로필렌 글리콜을 첨가함에 의해, 상기 제형의 화학적 안정성을 개선하고, 상기 제형의 점도를 감소시키고, 상기 용매 중에서의 본 발명의 화합물의 용해를 촉진할 수 있는 것으로 여겨지고 있으며 또한 실험적으로 입증되었다.
- [0163] 상기 약제학적 제형에는 그 제형의 최종 pH가 약 4~8이 되는 비율로 산성화제를 더 첨가할 수 있다. 상기 산성화제는 유기산이다. 유기산의 예로는, 아스코르브산, 시트르산, 타르타르산, 락트산, 옥살산, 포름산, 벤젠술폰산, 벤조산, 말레산, 글루탐산, 숙신산, 아스파르트산, 디아트리조산, 및 아세트산을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 또한 상기 산성화제는 염산, 황산, 인산, 및 질산 등의 무기산일 수 있다.
- [0164] 상대적으로 중성의 pH(예, pH 4~8)를 유지하기 위해 상기 제형에 산성화제를 첨가함으로써, 용매에 본 발명의 화합물의 신속한 용해를 촉진하고 상기 제형의 장기 안정성을 증강시키는 것으로 여겨진다. 알칼리성 용액에서는, 데시타빈이 빠르게 가역적으로 분해되어, N-(포르밀아미디노)-N'-β-D-2-데옥시리보푸라노실우레아로 되고, 이것은 비가역적으로 분해되어 1-β-D-2'-데옥시리보푸라노실-3-구아닐우레아를 형성한다. 상기 가수분해의 첫 번째 단계는 N-아미디늄-N'-(2-데옥시-β-D-에리트르펜토프라노실)우레아 포르메이트(AUF)의 형성을 수반한다. 상승된 온도에서의 상기 분해의 두 번째 단계는 구아닌의 형성을 수반한다. 산성 용액에서는, N-(포르밀아미디노)-N'-β-D-2-데옥시리보푸라노실우레아와 일부 불명확한 화합물이 형성된다. 강산성 용액(pH < 2.2)에서는

5-아자시토신이 생성된다. 따라서, 상대적으로 중성의 pH 를 유지하는 것이 데시타빈의 유사체 및 유도체를 포함하는 제형에 유리할 수 있다.

- [0165] 일 변형 예에서, 상기 산성화제는 용매 중의 농도가 0.01~0.2 mg/ml, 경우에 따라 0.04~0.1 mg/ml 또는 0.03~0.07 mg/ml인 아스코르브산이다.
- [0166] 상기 약제학적 조성물의 pH는 pH 4~8, 바람직하게는 pH 5~7, 보다 바람직하게는 pH 5.5~6.8로 조정할 수 있다.
- [0167] 상기 약제학적 조성물은 바람직하게는 25℃에서 7, 14, 21, 28일 또는 그 이상 동안 저장 시에 적어도 80%, 90%, 95% 이상 안정하다. 상기 약제학적 조성물은 바람직하게는 40℃에서 7, 14, 21, 28일 또는 그 이상 동안 저장 시에 적어도 80%, 90%, 95% 이상 안정하다.
- [0168] 일 실시형태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 글리세린을 취하여 본 발명의 화합물을 글리세린에 용해시킴으로써 제조된다. 이것은 예를 들면, 본 발명의 화합물을 글리세린에 첨가하거나 또는 글리세린을 데시타빈에 첨가함으로써 행해질 수 있다. 그들의 혼합에 의해, 상기 약제학적 조성물이 형성된다.
- [0169] 경우에 따라, 상기 방법은 본 발명의 화합물이 글리세린에 의해 용매화되는 속도를 증가시키는 부가적인 단계를 더 포함한다. 수행될 수 있는 부가적인 단계의 예로는 교반(agitation), 가열, 용매화 기간 연장, 및 마이크로화된 발명 화합물의 적용 및 이들의 조합을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0170] 일 변형 예에서는 교반이 적용된다. 교반의 예로는 기계적 교반, 초음파 처리, 종래의 혼합, 종래의 휘저음 및 그들의 조합을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 상기 제형의 기계적 교반은 실버손 머신스 인코포레이션(Silverson Machines Inc., 미국 MA East Longmeadow 소재)제의 실버손 호모지나이저에 의해 제조사의 프로토콜에 따라서 행해질 수 있다.
- [0171] 또 다른 변형 예에서는 가열을 적용할 수 있다. 경우에 따라, 상기 제형을 수조(water bath)에서 가열할 수 있다. 바람직하게는, 상기 가열된 제형의 온도는 70℃ 미만, 보다 바람직하게는 25℃~40℃일 수 있다. 일례로서, 상기 제형은 37℃까지 가열시킬 수 있다.
- [0172] 또 다른 변형 예에서는, 본 발명의 화합물은 연장된 시간에 걸쳐 글리세린 중에 용매화된다.
- [0173] 또 다른 변형 예에서는, 본 발명의 화합물의 마이크로화된 형태를 용매화 동역학을 증가시키기 위해서 사용할 수 있다. 경우에 따라, 마이크로화는 분쇄법에 의해 수행될 수 있다. 일례로서, 마이크로화는 인코플루드 에너지 알제트 인코포레이션(IncFluid Energy Aljet Inc., 미국 PA IDTelford Boise 소재)제의 에어 제트 밀(Air Jet Mill)을 사용하여 분쇄법을 행하는 마스터사이저(Mastersizer)에 의해 수행될 수 있다.
- [0174] 경우에 따라서, 상기 방법은 통상적으로 사용되는 방법에 의해 상기 약제학적 조성물의 pH를 조정하는 단계를 더 포함한다. 일 변형 예에서, pH는 아스코르브산 등의 산이나 염화나트륨 등의 염기를 첨가하여 조정한다. 다른 변형 예에서는 (에틸렌디아민트릴로)테트라아세트산 디나트륨염(EDTA) 용액 등의 완충액을 첨가하여 조정 및 안정화시킨다. 데시타빈은 pH-감수성인 것으로 알려져 있기 때문에, 상기 약제학적 조성물의 pH를 대략 pH 7로 조정함으로써 치료 성분의 안정성을 증가시킬 수 있다.
- [0175] 경우에 따라서, 상기 방법은 상기 약제학적 제형으로부터 불용성의 발명 화합물을 분리하는 단계를 더 포함한다. 분리하는 임의의 적합한 기술에 의해 수행할 수 있다. 예를 들어, 적합한 분리 방법으로는 약제학적 조성물의 여과, 침전, 및 원심분리 중 하나 이상을 들 수 있다. 본 발명의 화합물의 불용성 입자에 의해 일어날 수 있는 응고(clogging)는 상기 약제학적 조성물의 투여에 장애물이 되어 환자에게 잠재적인 위험요인이 될 수 있다. 상기 약제학적 제형으로부터 불용성의 발명 화합물을 분리함으로써 투여를 촉진하고 치료학적 생성물의 안전성을 증가시킬 수 있다.
- [0176] 경우에 따라서, 상기 방법은 상기 약제학적 제형을 멸균하는 단계를 더 포함한다. 멸균은 임의의 적합한 기술에 의해 수행할 수 있다. 예를 들어, 적합한 멸균 방법으로는 상기 약제학적 제형의 멸균 여과, 화학물질 처리, 방사선 처리, 가열, 및 화학 살균제 첨가 중의 하나 이상을 들 수 있다.
- [0177] 상기한 바와 같이, 데시타빈은 물에 불안정하므로, 본 발명의 화합물을 제형화하기 위해 사용되는 글리세린의 수분 함량을 감소시키는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 상기 용해 및/또는 살균 단계 전에, 글리세린을 건조시킬 수 있다. 상기한 글리세린 또는 본 발명의 화합물의 글리세린 용액의 건조는 상기 글리세린에 약제학적으로 허용가능한 건조제를 첨가함에 의해 수행할 수 있다. 상기 글리세린 또는 본 발명의 제형은, 예를 들어, 건

조제를 포함하는 층을 통과시켜 여과함에 의해 건조시킬 수 있다.

[0178] 경우에 따라서, 상기 방법은 건조제, 완충제, 산화방지제, 안정화제, 항균제, 및 약제학적 불활성제로부터 선택되는 군의 하나 이상의 일원을 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 일 변형 예에서는, 아스코르브산, 아스코르브산염 및 그들의 혼합물 등의 산화방지제가 첨가될 수 있다. 또 다른 변형 예에서는, 글리세롤과 같은 안정화제가 첨가될 수 있다.

[0179] **3. 발명 화합물 또는 제형을 포함하는 용기 또는 키트**

[0180] 이 발명에 기재된 약제학적 제형은 다양한 크기와 용량의 주사기, 바이알, 또는 앰플 등의 멸균된 용기(vesse l)에 담을 수 있다. 상기 멸균된 용기는 경우에 따라 1~50ml, 1~25ml 또는 1~20ml 또는 1~10ml의 제형을 담을 수 있다. 멸균된 용기는 약제학적 제형의 멸균성을 유지하고, 수송 및 보관을 용이하게 하고, 사전 멸균 단계를 거치지 않고 약제학적 제형의 투여를 가능하게 한다.

[0181] 또한, 본 발명은 본 발명의 화합물을 그것을 필요로 하는 숙주에 투여하기 위한 키트를 제공한다. 일 실시형태에서, 상기 키트는 고체, 바람직하게는 분말 형태의 본 발명의 화합물과, 글리세린, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 이들의 조합물을 포함한 비수성 희석제를 포함한다. 상기 고체 데시타빈과 상기 희석제를 혼합함으로써 본 발명에 따른 약제학적 제형을 형성한다. 예를 들면, 상기 키트는 고형의 본 발명의 화합물을 포함하는 제1 용기; 및 글리세린을 포함한 희석제를 포함하는 용기 컨테이너를 포함할 수 있으며; 상기 희석제를 고체의 발명 화합물에 첨가함으로써 본 발명의 화합물을 투여하기 위한 약제학적 제형을 형성한다. 상기 고체 발명 화합물과 희석제를 혼합함으로써, 경우에 따라 상기 희석제 1 ml당 0.1~200mg, 경우에 따라 용매 1ml당 0.1~100mg, 2~50mg, 5~30mg, 10~25mg의 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적 제형을 형성할 수 있다.

[0182] 상기 실시형태에 의하면, 상기 희석제는 프로필렌 글리콜과 글리세린의 조합물이며, 이때 용매 중의 프로필렌 글리콜의 농도는 0.1~99.9%, 경우에 따라 1~90%, 10~60%, 또는 20~40%이다.

[0183] 또한 상기 실시형태에 의하면, 상기 희석제는 폴리에틸렌 글리콜과 글리세린의 조합물이며, 이때 용매 중의 폴리에틸렌 글리콜의 농도는 0.1~99.9%, 경우에 따라 1~90%, 10~60%, 또는 20~40%이다.

[0184] 또한 상기 실시형태에 의하면, 상기 희석제는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 글리세린의 조합물이며, 이때 용매 중의 프로필렌 글리콜의 농도는 0.1~99.9%, 경우에 따라 1~90%, 10~60%, 또는 20~40%이고; 용매 중의 폴리에틸렌 글리콜의 농도는 0.1~99.9%, 경우에 따라 1~90%, 10~60%, 또는 20~40%이다.

[0185] 또한 상기 희석제는 경우에 따라서 40%, 20%, 10%, 5%, 2% 이하의 물을 포함한다. 일 변형 예에서는 상기 희석제는 무수물이며 경우에 따라서 건조제를 더 포함할 수 있다. 상기 희석제는 경우에 따라서 하나 이상의 건조제, 글리콜, 산화방지제 및/또는 항균제를 포함할 수 있다.

[0186] 상기 키트는 경우에 따라 사용설명서를 더 포함한다. 상기 사용설명서에는 상기 고체인 본 발명의 화합물과 상기 희석제를 혼합하여 약제학적 제형을 형성하는 방법을 기재할 수 있다. 상기 사용설명서에는 얻어진 약제학적 제형을 환자에게 투여하는 방법을 기재할 수 있다. 상기 사용설명서에는 경우에 따라 본 발명에 따른 투여 방법을 기재할 수 있다.

[0187] 상기 희석제 및 본 발명의 화합물은 개별 용기에 담을 수 있다. 상기 용기는 다른 크기로 할 수 있다. 예를 들어, 상기 용기는 1~50ml, 1~25ml, 1~20ml, 1~10ml의 희석제를 담을 수 있다.

[0188] 상기 용기 또는 키트에 제공된 약제학적 제형은 직접 투여에 적합한 형태이거나 또는 환자에게 투여하는 것에 대해서는 희석을 필요로 하는 농축된 형태일 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 기재된 약제학적 제형은 주입을 통한 직접 투여에 적합한 형태일 수 있다.

[0189] 본 명세서에 기재된 방법 및 키트는 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적 제형의 안정성 및 치료 효과를 더 증강 또는 보완할 수 있는 융통성(flexibility)을 제공한다.

[0190] **4. 발명 화합물/조성물을 투여하는 방법**

[0191] 본 발명의 화합물/조성물은 임의의 경로로, 바람직하게는, 후술하는 바와 같이, 상기 경로에 적합한 약제학적 조성물의 형태로 치료할 조건에 따라 달리 투여할 수 있다. 상기 화합물 또는 제형은 예를 들어 경구, 비경구, 국소, 복막내, 정맥내, 동맥내, 경피, 설하, 근육내, 직장, 경협측, 비강내, 리포솜, 흡입을 통해, 질내, 안내, 국소전달을 통해(예, 카테터 또는 스텐트에 의해), 피하, 지방내, 관절내, 경막내로 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물 및/또는 조성물은 느린 방출 투여형태로 투여 또는 공-투여(co-administration)될 수 있다.

- [0192] 본 발명의 화합물 및/또는 조성물은 임의의 종래 투여 형태로 투여 또는 공-투여될 수 있다. 본 발명에서 말하는 공-투여는 개선된 임상 결과를 달성하기 위해서 협력치료(coordinated treatment)하는 동안 하나 이상의 치료제를 투여함을 의미하는 것으로 규정한다. 또한, 상기한 공-투여는 동일한 기간에 걸쳐서, 즉, 중복되는 기간 동안 일어날 수 있다.
- [0193] 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 환자 등의 숙주에 0.1~1000mg/m<sup>2</sup>, 경우에 따라서 1~200mg/m<sup>2</sup>, 경우에 따라서, 1~50mg/m<sup>2</sup>, 경우에 따라서 1~40mg/m<sup>2</sup>, 경우에 따라서 1~30mg/m<sup>2</sup>, 경우에 따라서 1~20mg/m<sup>2</sup>, 또는 경우에 따라서 5~30mg/m<sup>2</sup>의 투여량으로 투여될 수 있다.
- [0194] 예를 들면, 본 발명의 화합물/조성물은 주사용 멸균 분말로서, 인산이수소칼륨 등의 완충염 및 수산화나트륨 등의 pH 조정제와 함께 공급될 수 있다. 이 제형은 바람직하게는 28℃에서 저장되어, 적어도 2년 동안 약물 안정성이 유지되어야 한다. 이 분말 제형은 주사용 멸균수 10ml를 사용하여 재구성된다. 이 용액은 0.9% 염화나트륨 주사액, 5% 텍스트로스 주사액 및 유산 링거 주사액 등의 당업계에 알려진 주입액으로 더 희석할 수 있다. 상기 재구성 및 희석 용액은 최고 효과의 전달을 위해 4~6시간 내에 사용하는 것이 바람직하다.
- [0195] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 화합물/조성물은 피하 주사, 일시(bolus) 정맥내 주사, 연속 정맥내 주입 및 1시간에 걸친 정맥내 주입 등의 주사에 의해 환자에게 투여된다. 경우에 따라서, 본 발명의 화합물/조성물은 치료 주기당 3~5일 동안 1일당 1~24 시간 정맥내 주사를 통해서, 1일당 0.1~1000mg/m<sup>2</sup>, 경우에 따라서 1일당 1~100mg/m<sup>2</sup>, 경우에 따라서 1일당 2~50mg/m<sup>2</sup>, 경우에 따라서 10~30mg/m<sup>2</sup>, 또는 경우에 따라서 5~20mg/m<sup>2</sup>의 투여량으로 투여된다.
- [0196] 데시타빈 또는 아자시티딘에 대해서, 종래 암의 화학요법에 사용되는 것보다 훨씬 더 낮은 50mg/m<sup>2</sup> 이하의 투여량이 고려된다. 이렇게 낮은 투여량의 데시타빈 또는 아자시티딘 유사체/유도체를 사용함으로써, 비정상적인 메틸화에 의해 암세포에서 침묵된 유전자의 전사 활성을 활성화할 수 있게 되어 하류(downstream)의 신호전달을 유발하고, 세포성장 정지, 분화 및 세포자멸을 유도하여, 결국에는 이들 암세포가 사멸된다. 이러한 낮은 투여량이지만, 정상 세포에서 전신적인 세포독성 효과가 보다 적고, 따라서 치료되는 환자에 부작용이 더 적을 것이다.
- [0197] 상기 약제학적 조성물은 임의의 종래 형태로, 주사액, 치료 화합물, 영양 유액, 항균 유액, 완충제 및 안정화제로 구성되는 군에서 선택되는 하나 이상의 일원과 함께 공-투여될 수 있다.
- [0198] 상기한 바와 같이, 본 발명의 화합물은 본 발명의 화합물을 글리세린 등의 비수성 용매에 용매화시킴으로써 액체 형태로 제형화할 수 있다. 상기 약제학적 액체 제형은 직접 투여가능하다(더이상 희석할 필요 없이)는 이점을 더 제공하므로 투여할 때까지 안정한 형태로 저장할 수 있다. 또한, 글리세린은 물과 쉽게 섞이기 때문에, 상기 제형은 투여 직전에 쉽게 또한 즉시 더 희석시킬 수 있다. 예를 들면, 상기 약제학적 제형은 환자에게 투여하기 180, 60, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1 분 이하 전에 물로 희석시킬 수 있다.
- [0199] 환자에게 상기 약제학적 제형을 정맥내 투여할 수 있다. 바람직한 투여 경로는 정맥내 주사에 의한 것이다. 경우에 따라서, 본 발명의 상기 약제학적 조성물은 직접, 사전 재구성 없이 주입될 수 있다.
- [0200] 일 실시형태에서, 상기 약제학적 제형은 팔이 3개이고 각 팔이 튜브에 접속된 Y부 연결기 등의 연결기를 통해서 주입된다. 일례로서, 다양한 크기의 박스터(Baxter:상표명) Y-연결기를 사용할 수 있다. 상기 약제학적 제형을 포함하는 용기는 상기 연결기의 한 팔에 더 부착된 튜브에 부착된다. 0.9% 염화나트륨, 또는 5% 텍스트로스, 또는 5% 글루코스, 또는 유산첨가 링거액 등의 주입액은 Y부 연결기의 다른 팔에 부착된 튜브를 통해서 주입된다. 상기 주입액 및 약제학적 제형은 Y부 연결기 내부에서 혼합된다. 그 결과 얻어진 혼합물은 Y부 연결기의 세번째 팔에 접속된 튜브를 통해서 환자에게 주입된다. 종래 기술을 능가하는 이 투여 접근법의 이점은 본 발명의 화합물을 환자 신체에 들어가기 전에 혼합하여, 본 발명의 화합물이 물과 접촉함으로써 인해 분해가 일어날 수 있는 시간을 감소시키는 것이다. 예를 들면, 본 발명의 화합물은 환자의 몸에 들어가기 10, 5, 2, 또는 1분 미만 전에 혼합된다.
- [0201] 상기 제형의 안정성 증강의 결과로서, 환자에게 상기 약제학적 조성물을 1, 2, 3, 4, 5 시간 또는 그 이상 시간 동안 주입할 수 있다. 장시간의 주입으로 인해 탄력적인 스케줄로 치료 제형을 투여할 수 있게 된다.
- [0202] 택일적으로 또는 추가로, 상기 주입 속도 및 체적은 환자의 필요에 따라서 조절할 수 있다. 약제학적 제형의 주입 조절은 기존의 프로토콜에 따라서 수행할 수 있다.
- [0203] 상기 약제학적 제형은 종래의 형태로, 주입액, 치료 화합물, 영양 유액, 항균 유액, 완충제 및 안정화제로 구성

되는 군에서 선택되는 하나 이상의 일원과 함께 공-주입(co-infusion)될 수 있다. 경우에 따라서, 항종양제, 알킬화제, 레티노이드 상과(superfamily)의 일원인 약제, 항생제, 호르몬제, 식물 유래 제제, 생물학적 제제, 인터루킨, 인터페론, 사이토카인, 면역조절제, 및 단일클론 항체를 포함한 치료 성분(이들에 한정되는 것은 아님)을 본 발명의 제형과 공-주입할 수 있다.

[0204] 본 발명에서 말하는 공-주입은 개선된 임상 결과를 달성하기 위해서 협력치료하는 동안 하나 이상의 치료제를 주입함을 의미하는 것으로 규정한다. 상기한 공-주입은 동시에, 중복하여 또는 연속적일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 약제학적 제형과 주입액의 공-주입은 Y형 연결기를 통해서 수행될 수 있다.

[0205] 정맥내 투여된 상기 약제학적 제형의 약물동태학 및 대사는 정맥내 투여된 본 발명의 화합물의 약물동태학 및 대사와 닮았다.

[0206] 인간에서, 데시타빈은, 생물학적 분석법에 의해 측정했을 때, 반감기가 7분이고 최종 반감기가 약 10~35분의 분포상(distribution phase)을 나타낸다. 분포 용적은 약 4.6L/kg이다. 짧은 혈장 반감기는 간 시티딘 디아미나제에 의한 탈아민화에 의한 데시타빈의 빠른 불활성화에 기인한다. 인간에서의 제거율(clearance)은 약 126 ml/분/kg로 높다. 총 5명의 환자의 혈장 곡선 아래 평균 면적은 408 $\mu$ g/시간/l였으며 피크 혈장 농도는 2.01 $\mu$ M 이었다. 환자에서의 데시타빈 농도는 3시간 주입으로 100mg/m<sup>2</sup> 투여했을 때 약 0.4 $\mu$ g/ml(2 $\mu$ M)였다. 더 긴 주입 시간 동안(40시간까지), 혈장 농도는 약 0.1~0.4 $\mu$ g/ml였다. 1 mg/kg/시간의 주입 속도로, 40~60 시간 주입하면, 0.43~0.76 $\mu$ g/ml의 혈장 농도가 얻어졌다. 1 mg/kg/시간의 주입 속도에서의 항정상상태(steady-state) 혈장 농도는 0.2~0.5 $\mu$ g/ml인 것으로 평가된다. 상기 주입을 중단한 후의 반감기는 12~20분이다. 데시타빈의 항정상상태 혈장 농도는 100 mg/m<sup>2</sup>의 6시간 주입 동안 0.31~0.39 $\mu$ g/ml인 것으로 평가되었다. 600 mg/m<sup>2</sup> 주입 동안의 농도 범위는 0.41~16 $\mu$ g/ml였다. 남자에서의 데시타빈의 뇌척수액으로의 침투는 36시간 정맥내 투여 말미에 14~21%의 혈장 농도에 도달하였다. 미변화 데시타빈의 뇨 배출량은 총 투여량의 0.01% 미만에서 0.9%까지의 범위로 낮으며, 배출량과 투여량 또는 혈장 약물 수준 간에는 관계가 없다. 높은 제거율 값과 투여량의 1% 미만의 총 뇨배출량은 데시타빈이 대사 과정에 의해 신속하게 대량으로 제거됨을 시사한다.

[0207] 데시타빈에 비해 그 증강된 안정성에 기인하여, 본 발명의 화합물/조성물은 보관시 더 긴 저장수명을 갖게 되고 데시타빈의 임상적 사용과 관련된 문제를 극복할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 화합물은, 동결건조된 분말로서, 경우에 따라 부형제(예, 시클로덱스트린), 산(예, 아스코르브산), 알칼리(수산화나트륨), 또는 완충염(1염 기성 인산이수소칼륨)과 함께 공급될 수 있다. 상기 동결건조된 분말은 주사(예, 정맥내 주사, 복강내 주사, 근육내 주사 또는 피하 주사)용 멸균수로 재구성될 수 있다. 경우에 따라서, 상기 분말은 글리세린, 프로필렌 글리콜, 에탄올 및 PEG 등의 물과 혼합할 수 있는 용매를 포함하는 수성 또는 비수성 용매로 재구성할 수 있다. 그 결과 얻어진 용액은 환자에게 직접 투여하거나, 또는 0.9% 염화나트륨; 5% 텍스트로스; 및 유산첨가 링거 주사액 등의 주입액으로 더 희석하여 투여할 수 있다.

[0208] 본 발명의 화합물/조성물은 주위 조건 하에 또는 냉장(2~8 $^{\circ}$ C: 36~46 $^{\circ}$ F) 등의 제어된 환경에서 저장할 수 있다. 데시타빈에 비해 그들의 우수한 안정성에 기인하여, 본 발명의 화합물/조성물은 실온에서 저장할 수 있고, 주사액으로 재구성할 수 있고, 약물 용액의 사전 냉각 없이 환자에게 투여할 수 있다.

[0209] 또한, 그 증강된 화학적 안정성에 기인하여, 본 발명의 화합물/조성물은 데시타빈에 비해 더 긴 혈장 반감기를 가질 것이다. 따라서, 본 발명의 화합물/조성물은 데시타빈에 비해 저 투여량 및/또는 저 빈도로 환자에게 투여할 수 있게 된다.

[0210] **5. 본 발명의 약제학적 조성물과의 병용 요법**

[0211] 본 발명의 화합물 또는 약제학적 제형은 유전자 전사를 더 조정(예, 과메틸화와 히스톤 아세틸화에 의해 침묵된 유전자의 전사를 회복)하기 위해서 히스톤 데아세틸라제(HDAC: histon deacetylase)의 저해제와 함께 시너지 효과를 내는 방식으로 사용될 수 있다.

[0212] HDAC 는 유전자의 전사 침묵에 중요한 역할을 한다. 히스톤상에서의 아세틸화 양은 두 종류의 효소인 히스톤 아세틸 트랜스퍼라제(HAT)와 히스톤 데아세틸라제(HDAC)의 상반되는 활성에 의해 조절된다. 이들 효소에 대한 기질은 히스톤 H3, H4, H2A, 및 H2B의 아미노 말단 꼬리에 위치한 리신 잔기의 e-아미노기를 포함한다. 이들 아미노산 잔기는 HAT에 의해 아세틸화되고 HDAC에 의해 탈아세틸화된다. HDAC에 의해 히스톤 리신으로부터 아세틸기를 제거하면, 양 전하가 리신 잔기로 되돌려지므로, 뉴클레오솜의 구조를 압축하여 그 안에 포함된 유전자를 침묵시킨다. 그래서, 히스톤 데아세틸라제에 의해 침묵된 이들 유전자를 활성화시키기 위해서는, HDAC의 활성을 저해해야 한다. HDAC를 저해하면, 히스톤이 아세틸화되고, 탈아세틸화된 히스톤 코어 주변에 기밀하게

둘러싸인 DNA가 이완된다(relax). DNA 구조의 열림은 특정 유전자의 발현을 유도한다.

- [0213] 히스톤의 탈아세틸화 외에, HDAC는 p53(종양억제유전자), GATA-1, TFIIE, 및TFIIF 등의 전사 인자를 탈아세틸화 함으로써 유전자 발현을 조절할 수 있다(Gu and Roeder(1997) Cell 90: 595-606(p53); 및 Boys et al.(1998) Nature 396:594-598(GATA-1)). HDAC는, 예를 들어, HDAC를 채용하는 RB 종양억제 단백질에 의해 중재되는 전사 억제에 의한, 세포주기 조절에도 관여한다(Brehm et al.(1998) Nature 391:597-601). 따라서, HDAC의 저해는 p53과 RB 등의 종양억제유전자의 발현을 활성화시키게 되고, 그 결과 이들 유전자에 의해 유도되는 세포성장 정지, 분화 및 세포사멸을 조장한다.
- [0214] 상기한 바와 같이, 종양억제유전자 등의 다수의 유전자의 비정상적인 전사 침묵은 암 및 기타 질병의 발명과 직접 관련된다. DNA의 시토신 잔기의 메틸화와 히스톤으로부터의 아세틸기 제거는 유전자 침묵의 두가지 주요한 메커니즘이다. 암관련 유전자의 메틸화 및/또는 히스톤 탈아세틸화에 기인하여, 이들 유전자의 발현은 억제되거나 완전히 침묵된다. 한편, 형질전환된 세포의 성장 정지, 분화, 및/또는 세포사멸을 유도하기 위해서는 이들 유전자의 발현이 요구된다. 형질전환된 세포에서의 이들 유전자의 활동저하에 의해 이들 세포의 무절제한 증식이 유도되고, 결국에는 암이 생긴다.
- [0215] 본 발명의 화합물/조성물과 HDAC 저해제를 병용하면, 형질전환된 세포의 성장정지, 분화 및 세포사멸을 유도하기 위해 요구되는 유전자가 효과적으로 재활성화될 수 있다. 본 발명의 화합물/조성물은 유전자의 특히 조절부위의 DNA 메틸화를 저해함으로써, 그 유전자의 전사를 활성화시킨다. 한편, HDAC 저해제는 유전자의 뉴클레오솜 코어내의 히스톤의 디아세틸라제를 저해함으로써, 히스톤의 아세틸화를 순 증가시키고, 차례로, 그 유전자의 전사를 활성화시킨다. 이들 두 상보적인 메커니즘을 활용함으로써, 상기 병용 요법은 유전자의 전사를 더 효과적으로 또한 이상적으로, 시너지 효과를 나타내는 방식으로 회복시키게 된다. 시너지 효과를 나타내는 병용 요법은 단독으로 사용되는 것보다 각각 더 작은 양의 저해제를 필요로 하므로, 상기 저해제를 고 투여량으로 전신적으로 투여하는 것과 관련된 잠재적인 부작용을 줄이고 치료 지수를 개선시킨다.
- [0216] 다수의 항암제는 이들 종양억제유전자에 의해 코딩되는 단백질을 포함하는 신호전달 연쇄반응을 유발함으로써 그들의 항암 효과를 발휘한다. 암세포에서의 이들 유전자의 발현이 불충분하면, 이들 항암제의 항암 효과가 심각하게 감소되거나 또는 완전히 사라진다. DNA 메틸화 및 히스톤 디아세틸라제에 의해 후생적으로 침묵된 이들 유전자의 재활성화 또는 재발현을 통해서, 신체의 내인성 방어 메커니즘이 동원되어, 투여된 항암제에 의해 보내어진 신호에 응답하여 암세포에 대한 종양억제 기능을 회복시킴으로써 질병과 싸운다. 이러한 내인성 종양억제 기능의 자극에 의해, 저 투여량의 항암제가 필요하게 되고, 항암제의 치료 지수가 더 높아진다(즉, 많은 효능 및 낮은 독성).
- [0217] HDCA의 저해제로는 다음의 구조적 클래스: 1)히드록삼산, 2)환상 펩티드, 3)벤즈아미드, 및 4)단쇄 지방산을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0218] 히드록삼산 및 히드록삼산 유도체의 예로는 트리코스타틴 A(TSA), 수버로일아닐라이드(suberoylanilide) 히드록삼산(SAHA), 옥삼플라틴, 수버릭 비스히드록삼산(SBHA), m-카르복시-신남산 비스히드록삼산(CBHA), 및 피록사미드를 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. TSA는 항진균용 항생제로서 단리되었고(Tsui et al.(1976) J. Antibiot(Tokyo) 29:1-6), 포유동물 HDAC의 강력한 저해제로 확인되었다(Yoshida et al.(1990) J. Biol. Chem. 265:17174-17179). 변형된 HDAC를 가진 TSA 내성 세포주가 발견됨으로써, 이 효소가 TSA에 대한 중요한 표적임이 입증되었다. 기타 히드록삼산계 HDAC 저해제인 SAHA, SBHA, 및 CBHA는 시험관내 및 생체내에서 마이크로몰 이하의 농도로 HDAC를 저해할 수 있는 합성 화합물이다(Glick et al.(1999) Cancer Res. 59:4392-4399). 이들 히드록삼산계 HDAC 저해제는 모두 필수적인 구조 특징을 공유한다: 말단 소수성 부분(예, 벤젠환)에 부착된 또 다른 극성 부위에, 소수성 메틸렌 스페이스(spacer)(예, 6개의 카본 길이)를 통해서 결합된 극성 히드록삼 말단. 또한, 상기한 필수적인 특징을 갖도록 개발된 화합물은 HDAC 저해제로서 사용될 수 있는 상기 히드록삼산의 범위내에 들어간다. HDAC 저해제로서 사용되는 환상 펩티드는 주로 환상 테트라펩티드이다. 환상 펩티드의 예로는 트라포신(Trapoxin) A, 아피시딘(Apicidine) 및 FR901228을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 트라포신 A는 2-아미노-8-옥소-9,10-에폭시-데카노일(AOE) 부분을 포함하는 환상 테트라펩티드이다(Kijima et al.(1993) J. Biol. Chem. 268:22429-22435). 아피시딘은 나노몰 농도로 강력하고 넓은 스펙트럼의 항원생동물 활성을 나타내고 HDAC를 저해하는 균류 대사산물(fungal metabolite)이다(Darkin-Rattray et al.(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93; 13143-13147). FR901228은 크로모박테리움 바이올라세움(*Chromobacterium violaceum*)으로부터 단리된 펩시펩티드이며, 마이크로몰 농도로 HDAC 활성을 저해하는 것으로 확인되어 있다.

- [0219] 벤즈아미드의 예로는 MS-27-275를 들 수 있으며, 이들에 한정되는 것은 아니다(Saito et al.(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:4592-4597). 단쇄 지방산의 예로는 부티레이트(예, 부티르산, 아르기닌 부티레이트 및 페닐부티레이트(PB))를 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다(Newmark et al.(1994) Cancer Lett. 78:1-5; 및 Carducci et al. (1997) Anticancer Res. 17:3972-3973). 또한, 마이크로몰 농도로 HDAC를 저해하는 것으로 확인된 데푸데신(depudecin)(Kwon et al.(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:3356-3361)도 본 발명의 히스톤 데아세틸라제 저해제의 범위에 들어간다.
- [0220] 본 발명의 화합물 또는 약제학적 제형은 항종양제, 알킬화제, 레티노이드 상과의 일원인 약제, 항생제, 호르몬제, 식물 유래 제제, 생물학적 제제, 인터루킨, 인터페론, 사이토카인, 면역조절제, 및 단일클론 항체를 포함한다 기타 치료 성분(이들에 한정되는 것은 아님)과 함께 사용할 수 있다.
- [0221] 일 실시형태에서는, 알킬화제가 본 발명의 화합물/제형에 병용되거나 및/또는 첨가된다. 알킬화제의 예로는 비스클로로에틸아민(질소 머스타드, 예를 들어, 클로르암부실, 시클로포스파미드, 이포스파미드, 메클로르에타민, 멜팔란, 우라실 머스타드), 아지리딘(예, 티오테파(thiotepa)), 알킬 알콘 설포네이트(예, 부술판), 니트로소우레아(예, 카르무스틴, 로무스틴, 스트렙토조신), 비고전적(nonclassic) 알킬화제(알트레타, 다카바진, 및 프로카바진), 백금 화합물(카르보플라стин 및 시스플라틴)을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0222] 또 다른 실시형태에서는, 시스플라틴, 카르보플라틴 또는 시클로포스파미드가 본 발명의 화합물/제형에 병용되거나 및/또는 첨가된다.
- [0223] 또 다른 실시형태에서는, 레티노이드 상과의 일원이 본 발명의 화합물/제형에 병용되거나 및/또는 첨가된다. 레티노이드는 비타민 A(올(all)-트랜스-레티놀)에 유래 또는 관련되어 있는 구조 및 기능적으로 관련된 분자의 패밀리이다. 레티노이드의 예로는 올-트랜스-레티놀, 올-트랜스-레티노산(트레티노인), 13-시스 레티노산(이소트레티노인) 및 9-시스-레티노산을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0224] 또 다른 실시형태에서는, 호르몬제가 본 발명의 화합물/제형에 병용되거나 및 또는 첨가된다. 상기 호르몬제의 예로는 합성 에스트로겐(예, 디에틸stil베스트롤), 항에스트로겐(예, 타목시펜, 토레미펜, 플루옥시메스테롤 및 랄옥시펜), 항안드로겐(바이칼루타미드, 닐루타미드, 플루타미드), 아로마타제 저해제(예, 아미노글루테이미드, 아나스트로졸 및 테트라졸), 케토코나졸, 고세렐린 아세테이트, 류프롤라이드, 메게스트롤 아세테이트 및 미페프리스톤을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0225] 또 다른 실시형태에서는, 식물 유래 제제가 본 발명의 화합물/제형에 병용되거나 및 또는 첨가된다. 식물 유래 제제의 예로는 빈카 알칼로이드(예, 빈크리스틴, 빈블라стин, 빈데신, 빈줄리딘 및 비노렐빈), 캄프토테신(20(S)-캄프토테신, 9-니트로-20(S)-캄프토테신, 및 9-아미노-20(S)-캄프토테신), 포도필로톡신(예, 테토포사이드(VP-16) 및 테니포사이드(VM-26)), 및 탁센(예, 파클리탁셀, 및 도세탁셀)을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0226] 또 다른 실시형태에서는, 사이토카인 등의 면역 조정 단백질, 종양 항원에 대한 단일클론 항체, 종양억제유전자, 및 암 백신 등의 생물학적 제제가 본 발명의 화합물/제형에 병용되거나 및 또는 첨가된다.
- [0227] 본 발명의 화합물/제형에 병용되거나 및 또는 첨가될 수 있는 인터루킨의 예로는 인터루킨 2(IL-2), 인터루킨 4(IL-4), 및 인터루킨 12(IL-12)을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 데시타빈-글리세린 제형과 병용될 수 있는 인터페론의 예로는 인터페론  $\alpha$ , 인터페론  $\beta$  (섭유아세포 인터페론) 및 인터페론  $\gamma$  (섭유아세포 인터페론)을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 상기한 사이토카인의 예로는 에리트로포이에틴(에포이틴), 과립구-CSF(필그라스티م), 및 과립구, 대식세포-CSF(사르그라마스팀)을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 사이토카인 이외의 면역조절제로는 칼메트-구에린 간균(Bacillus Calmette-Guerin), 레바미솔, 및 옥트레오타이드를 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0228] 본 발명의 제형에 병용되거나 및 또는 첨가될 수 있는, 종양 항원에 대한 단일클론 항체의 예로는 HERCEPTIN(상표명)(트라스투루마브), RITUXAN(상표명)(리툽시마브), MYLOTARG(상표명)(안티-CD33), 및 CAMPATH(상표명)(안티-CD2)를 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0229] **6. 본 발명의 화합물 또는 약제학적 조성물에 대한 적응증(indication)**
- [0230] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 데시타빈에 의한 치료에 감수성을 나타내는 광범위한 질병을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0231] 본 발명의 약제학적 조성물을 사용하여 치료할 수 있는 바람직한 적응증으로는 바람직하지 못한 또는 비조절성

세포 증식을 포함하는 것들을 들 수 있다. 상기 적응증으로는 양성 종양, 원발 종양 및 종양 전이 등의 각종 암, 재협착(예, 심장동맥, 목동맥, 및 뇌동맥 병변) 혈액 질환, 내피세포의 비정상적 자극(아테롬성 동맥경화증), 외과수술에 의한 신체 조직 손상, 비정상적 상처 치유, 비정상적 혈관형성, 조직 섬유증을 생성하는 질병, 반복적인 운동 장애, 고도로 혈관분포되지 않은 조직의 질환, 및 장기이식과 관련된 증식성 반응을 들 수 있다.

[0232] 일반적으로, 양성 종양의 세포는 그들의 분화된 특성을 보유하며 완전히 제어되지 않는 방식으로 분할되지는 않는다. 양성 종양은 통상적으로 국제화되며 비전이성이다. 본 발명을 이용하여 치료할 수 있는 양성 종양의 구체적인 종류로는 혈관종, 간세포 선암종, 해면 혈관종, 초점성 결정성 과다형성, 청신경종, 신경 섬유종, 담관 선종, 담관 낭성종, 섬유종, 지방종, 평활근종, 증피종, 기형종, 점액종, 결절제상 과다형성, 트라코마, 및 화농 육아종을 들 수 있다.

[0233] 악성 종양에서 세포는 미분화되고, 신체의 성장 조절 신호에 반응하지 않으며, 억제되지 않는 방식으로 증식한다. 상기 악성 종양은 침입성이며 먼 부위까지 퍼질 수 있다(전이). 악성 종양은 일반적으로 2개의 카테고리로 나뉜다: 원발 종양 및 이차 종양. 원발 종양은 그들이 형성된 조직으로부터 직접 생긴다. 이차 종양, 또는 전이는 신체의 다른 장소에서 생긴 종양이지만 멀리 떨어진 장기까지 확산한 종양이다. 전이의 통상적인 경로는 인접 구조로 직접 성장되어, 혈관계 또는 림프계를 통해서 퍼져서, 조직 면 및 신체 공간(복수, 뇌척수액 등)을 따라간다.

[0234] 본 발명을 이용하여 치료할 수 있는 암 또는 악성 종양(원발 또는 이차)의 구체적인 종류로는 유방암, 피부암, 골암, 전립선암, 간암, 폐암, 뇌암, 후두암, 담낭암, 췌장암, 직장암, 부갑상선암, 갑상선암, 부신암, 신경조직암, 두경부암, 결장암, 위암, 기관지암, 신장암, 기저세포 암종, 궤양형 및 유두형 편평세포 암종, 전이성 피부암종, 골 육종, 유잉(Ewing) 육종, 세망세포 육종, 골수종, 거대세포 종양, 비소세포 폐 종양, 담석, 섬 세포 종양, 원발성 뇌종양, 급성 및 만성 림프구 및 과립구 종양, 모상세포 종양, 선종, 과다형성증, 수질 암종, 크롬친화세포종, 점막 신경종, 장 신경절신경종, 과다형성 각막 신경 종양, 마르파노이드 체질 종양, 윌름(Wilms) 종양, 정상피종, 난소 종양, 평활근 종양, 자궁경부 이형성 및 상피내 암종, 신경아세포종, 망막아세포종, 연조직 육종, 악성 카르시노이드, 국소 피부 병변, 균상 식육종, 횡문근육종, 카포시(Kaposi) 육종, 골원성 및 기타 육종, 악성 고칼슘혈증, 신장세포 종양, 진성 다혈구증, 선암종, 다형성 신경교아종, 백혈병, 림프종, 악성 흑색종, 유포피암, 및 기타 암종 및 육종을 들 수 있다.

[0235] 혈액 질환은 혈액 세포에서의 형성이상 변화(dysplastic change) 및 각종 백혈병 등의 혈액암을 유발할 수 있는 혈액 세포의 비정상적인 성장을 포함한다. 혈액 질환의 예로는 급성 골수성 백혈병, 급성 선골수성 백혈병, 급성 림프모세포성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군, 및 겸상적혈구성 빈혈을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0236] 급성 골수성 백혈병(AML)은 어른에 발병하는 가장 일반적인 급성 백혈병 종류이다. 몇몇 유전병과 면역결핍 상태는 AML에 걸릴 위험의 증가와 관련된다. 이들로는 블루움(Bloom) 증후군, 판코니(Fanconi) 빈혈, 리-프라우메니(Li-Fraumeni) 동증, 혈관확장성 운동실조증, X-연관성 무감마글로불린증 등의, DNA 안정성에 결함이 있어, 무작위 염색체 파손이 유도되는 질환을 들 수 있다.

[0237] 급성 전골수구성 백혈병(APML)은 AML 중의 독특한 소군(subgroup)을 나타낸다. 이 아류(subtype)는 15:17 염색체 전위를 포함하는 전골수성 모세포를 특징으로 한다. 이 전위는 레티노산 수용체와 서열 PML로 구성되는 융합 전사체의 생성을 유도한다.

[0238] 급성 림프아구성 백혈병(ALL)은 각종 아류에 의해 나타나는 독특한 임상적 특징을 가진 이질성 질병이다. 세포 유전학적 이상의 재발이 ALL에서 확인되었다. 가장 일반적인 세포유전학적 이상은 9:22 전위이다. 그 결과 얻어지는 필라델피아 염색체는 환자의 나쁜 예후를 나타낸다.

[0239] 만성 골수성 백혈병(CML)은 다능성 간세포의 클론성 골수증식 질환이다. CML은 염색체 9과 22의 전위를 포함한 특이적 염색체 이상을 특징으로 하며, 필라델피아 염색체를 생성한다. 진리방사선은 CML의 발병과 관련된다.

[0240] 상기 골수성 증후군(MDS)은, 골수, 적혈구, 및 거대핵세포 시리즈에서의 형성이상 변화를 포함한, 하나 이상의 조혈 계통에서의 형성이상 변화의 존재로 인해서 함께 분류되는 이질 클론성 조혈 간세포 질환이다. 이들 변화는 3가지 계통 중의 하나 이상에서의 혈구감소증을 유발한다. MDS에 걸린 환자들은 일반적으로 빈혈, 호중성 백혈구 감소증(감염), 또는 저혈소판증(출혈)과 관련된 합병증이 발생한다. 일반적으로, MDS에 걸린 환자들의 약 10~70%가 급성 백혈병이 발명한다.

- [0241] 수술하는 동안의 신체 조직 손상으로 인한 비정상적인 세포 증식의 치료는 관절 수술, 장 수술을 포함한 다양한 수술 과정, 및 켈로이드 흉터형성 동안 할 수 있다. 섬유 조직을 생성하는 질병으로는 폐기종을 들 수 있다. 본 발명을 이용하여 치료할 수 있는 반복적인 운동 장애로는 수근관 증후군을 들 수 있다. 본 발명을 이용하여 치료할 수 있는 세포 증식 질환의 예로는 골 종양이 있다.
- [0242] 본 발명을 이용하여 치료할 수 있는 장기 이식과 관련된 증식 반응으로는 잠재적인 장기 거부 또는 관련 합병증의 원인이 되는 증식 반응을 들 수 있다. 구체적으로는, 이들 증식 반응은 심장, 폐, 간, 신장, 및 기타 신체 장기 또는 장기 시스템을 이식하는 동안 일어날 수 있다.
- [0243] 본 발명을 이용하여 치료할 수 있는 비정상적인 혈관형성으로는 류마티스 관절염, 허혈재관류 관련 뇌부종 및 뇌손상, 피질 허혈, 난소 과다형성 및 혈관과다(다낭 난소 증후군), 자궁내막증, 당뇨병망막병증, 및 미숙 망막병증(수정체후부 섬유증식증), 근육 퇴행, 각막이식편 거부, 신생혈관 녹내장 및 오스터 웨버(Oster Webber) 증후군 등의 기타 눈 혈관형성 질병을 동반한 비정상적인 혈관형성을 들 수 있다.
- [0244] 비정상적인 혈관형성과 관련된 질병은 혈관 성장을 요구 또는 유도한다. 예를 들면, 각막 혈관형성은 3가지 기(phase)를 포함한다: 전-혈관 잠복기, 활성 신생혈관증식, 및 혈관 성숙 및 퇴행. 백혈구, 혈소판, 사이토카인, 및 에이코사노이드 등의 염증 반응 요소 또는 미확인된 혈장 구성성분을 포함한, 각종 혈관형성 인자의 정체 및 메커니즘은 여전히 밝혀져야 한다.
- [0245] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 약제학적 제형은 원하지 않는 또는 비정상적인 혈관형성과 관련된 질병을 치료하는데 사용될 수 있다. 상기 방법은 원하지 않는 또는 비정상적인 혈관형성에 걸린 환자에게 본 발명의 약제학적 제형을 단독으로, 또는 고수준의 DNA 메틸화에 의해 생체내에서 항혈관형성제로서의 활성이 방해받는 항혈관형성제와 병용하여 투여하는 단계를 포함한다. 혈관형성 및/또는 혈관형성성 질병을 저해하는 데 필요한 이들 약제의 구체적인 투여량은 질병상태, 투여 경로, 및 담당 의사에 의해서 결정될 수 있는 관련 인자들에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 허용 1일 유효 투여량은 혈관형성 및/또는 혈관형성성 질병을 효과적으로 저해하기에 충분한 양이다.
- [0246] 이 실시형태에 의하면, 본 발명의 약제학적 제형은 망막/맥락막 혈관형성 및 각막 혈관형성 등의 원하지 않는 혈관형성과 관련된 다양한 질병을 치료하는 데 사용될 수 있다. 망막/맥락막 혈관형성의 예로는 베스트 병, 근시, 시신경유도소와, 스타가르트(Stargarts) 병, 파제트(Pagets) 병, 정맥 폐색, 동맥 폐색, 겸상적혈구성 빈혈, 사르코이드, 매독, 탄력섬유 과황색증, 경동맥 폐쇄성 병, 만성 포도막염/유리체염, 마이코박테리아 감염증, 라임 병, 전신 홍반 루푸스, 미숙 망막병증, 일스 병, 당뇨병 망막병증, 황반 변성, 베체트병, 망막염 또는 맥락막염을 일으키는 감염증, 추정 눈 히스토플라스마증, 주변 포도막염, 만성 망막박리, 과다점성 증후군, 특소포자충증, 트라우마 및 레이저후 합병증, 피부홍조와 관련된 질병(전방각 혈관형성), 및 모든 형태의 증식 유리체 망막병증을 포함한 섬유혈관 또는 섬유조직의 비정상적인 증식에 의해서 유발되는 질병을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 각막 혈관형성의 예로는 유행성 각막결막염, 비타민 A 결핍증, 콘택트 렌즈 과도착용 증후군, 아토피 각막염, 상윤부 각막염, 익상편 건성각막염, 쇼그렌 증후군, 주사성 여드름, 소수포증, 당뇨병 망막병증, 미숙 망막병증, 각막이식 거부, 무렌(Mooren) 각막 궤양, 테리엔(Terrien) 가장자리 각막변성, 가장자리 각질용해증, 다발동맥염, 베게너(Wegener) 사르코이드증, 공막염, 유천포창, 방사상 각막절개, 신생혈관 녹내장, 수정체후부 섬유증식증, 매독, 마이코박테리아 감염증, 지질 변성, 화학화상, 세균성 궤양, 진균성 궤양, 단순 포진 감염증, 대상 포진 감염증, 원충 감염증 및 카포시 육종을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0247] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 약제학적 제형은 비정상적인 혈관형성과 관련된 만성 염증성 질병을 치료하는 데 사용될 수 있다. 상기 방법은 비정상적인 혈관형성과 관련된 만성 염증성 질병에 걸린 환자에게 본 발명의 약제학적 제형을 단독으로, 또는 고수준의 DNA 메틸화에 의해 생체내에서 항혈관형성제로서의 활성이 방해받는 항혈관형성제와 병용하여 투여하는 단계를 포함한다. 상기 만성 염증은 염증세포의 유입을 유지하기 위한 모세혈관 발아의 지속적인 형성에 의존한다. 상기 염증세포의 유입 및 존재에 의해 육아종이 생성되고, 그 결과 만성염증 상태가 유지된다. 본 발명의 약제학적 제형을 사용한 혈관형성 저해는 육아종 형성을 방해함으로써, 질병을 경감시킬 수 있다. 만성염증 질병의 예로는, 크론병(Chrohn's disease) 및 궤양성 대장염 등의 염증성 장질환, 건선, 사르코이드증, 및 류마티스 관절염을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0248] 크론병 및 궤양성 대장염 등의 염증성 장 질환은 위장관의 다양한 부위에서의 만성염증 및 혈관형성을 특징으로 한다. 예를 들면, 크론병은 먼쪽 회장 및 직장에 가장 일반적으로 침범하지만 입으로부터 항문 및 항문주변에 이르는 위장관의 어느 부분에서라도 발병할 수 있는, 만성적인 전층 염증성 질병으로서 발병된다. 크론병에 걸

린 환자는 일반적으로 복통, 발열, 식욕부진, 체중 감소 및 복부 종창과 함께 만성적으로 설사를 한다. 또한, 궤양성 대장염은 장 점막에서 발병하는 만성적, 비특이적, 염증성 및 궤양성 질병이며, 출혈성 설사의 존재를 특징으로 한다. 이들 염증성 장 질환은 일반적으로 만성 육아종 염증에 의해 위장관 도처에서 발병하며, 염증 세포 실린더에 의해 둘러싸인 새로운 모세혈관 발아를 수반한다. 본 발명의 약제학적 제형에 의한 혈관형성의 저해에 의해, 발아의 형성 및 육아종의 형성을 저해할 것이다. 상기 염증성 장 질환은 또한 피부 병변 등의 가외의 장 소견을 나타낸다. 이러한 병변은 염증 및 혈관형성을 특징으로 하고 기타 위장관의 많은 부위에서 생길 수 있다. 본 발명의 약제학적 제형에 의한 혈관형성의 저해에 의해, 염증세포의 유입을 감소시키고 상기 병변 형성을 방지할 것이다.

[0249] 또 하나의 만성 염증성 질병인 사르코이드증은 다발계통 육아종 질환으로 간주된다. 이 질병의 육아종은 신체의 어느 곳에서나 형성될 수 있으며, 따라서, 그 증상은 육아종 부위 및 질병의 활성 여부에 따라 다르다. 상기 육아종은 염증세포의 일정한 공급을 제공하는 신생 모세혈관 발아에 의해 생성된다. 본 발명의 약제학적 제형을 사용함으로써, 상기 육아종 형성과 같은 혈관형성을 저해시킬 수 있다. 건선, 또한 만성 및 재발 염증성 질병은 다양한 크기의 구진 및 플라크를 갖는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 약제학적 제형을 사용하여 치료함으로써, 특징적인 병변을 유지하는데 필요한 새로운 혈관의 형성이 방해될 것이며 환자의 증상이 완화될 것이다.

[0250] 또한, 류마티스 관절염(RA)은 주변관절의 비특이적인 염증을 특징으로 하는 만성 염증성 질병이다. 상기 관절의 윤활막의 혈관이 혈관형성되는 것으로 여겨진다. 새로운 혈관 네트워크를 형성하는 것 외에, 상기 내피 세포는 관누스 성장 및 연골 파괴를 유도하는 인자 및 반응성 산소종을 방출한다. 혈관형성에 관여하는 인자들이 류마티스 관절염의 만성적 염증 상태에 능동적으로 기여하고 그 상태의 유지를 도울 수 있다. 본 발명의 약제학적 제형을 단독으로 사용하거나 또는 다른 항-RA 제와 병용하여 치료함으로써, 만성염증 유지에 필요한 새로운 혈관의 형성을 방지하여 RA 환자의 증상을 완화시키게 된다.

[0251] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 약제학적 제형은 비정상적인 헤모글로빈 합성과 관련된 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 상기 방법은 본 발명의 약제학적 제형을 비정상적인 헤모글로빈 합성과 관련된 질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 데시타빈 함유 제형은 DNA로의 삼입 메커니즘이 DNA 저메틸화와 관련되기 때문에 태아 헤모글로빈 합성을 자극한다. 비정상적인 헤모글로빈 합성과 관련된 질환의 예로는 겸상적혈구성 빈혈 및 β-탈라세미아를 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0252] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 약제학적 제형은 세포내 유전자 발현을 제어하기 위해 사용될 수 있다. 상기 방법은 본 발명의 약제학적 제형을 비정상적인 유전자 발현 수준과 관련된 질병에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. DNA 메틸화는 유전자 발현의 제어와 관련된다. 구체적으로, 프로모터 내 또는 부근에서의 메틸화는 전사를 저해하는 반면 탈메틸화는 발현을 회복시킨다. 상기한 메커니즘의 가능한 적용 예로는 치료학적으로 조정된 성장 저해, 세포자멸 유도, 및 세포 분화를 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0253] 본 발명의 약제학적 제형에 의해 촉진되는 유전자 활성화에 의해, 치료 목적용 세포의 분화를 유도할 수 있다. 세포 분화는 저메틸화 메커니즘을 통해 유도된다. 형태학적 및 기능적 분화의 예로는 근육 세포, 근관, 적혈구 및 림프구 계통 세포의 형성으로의 분화를 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0254] 본 발명의 대표적인 실시형태를 설명 및 묘사하였으나, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명에 다수의 변화, 변형, 또는 변경이 행해질 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 상기한 모든 변화, 변형, 또는 변경은 본 발명의 범위내로 간주될 것이다.

[0255] [실시예]

[0256] 1. 포스포르아미다이트 빌딩 블록 및 3'-캡 유도체의 합성

[0257] 본 발명은 또한 하기 신규한 포스포르아미다이트 빌딩 블록을 합성하는 효과적인 화학적 방법을 제공한다(도 2a).

[0258] 1a의 4-아민 작용기는, 메틸, 에틸, 9-플루오레닐메틸, 9-(2-설포)플루오레닐메틸, 9-(2,7-디브로모)플루오레닐메틸, 17-테트라벤조[*a, c, g, i*]플루오레닐메틸, 2-클로로-3-인데닐메틸, 벤즈[*f*]인텐-3-일메틸, 2,7-디-*tert*-[9-(10,10-디옥소-10,10,10,10-테트라히드로티오크산틸)메틸, 1,1-디옥소벤조[*b*]티오펜-2-일메틸, 2,2,2-트리클로로에틸, 2-트리메틸실릴에틸, 2-페닐에틸, 1-(1-아다만틸)-1-메틸에틸, 2-클로로에틸, 1,1-디메틸-2-할로에틸, 1,1-디메틸-2,2-디브로메틸, 1,1-디메틸-2,2,2-트리클로로에틸, 1-메틸-1-(4-비페닐일)에틸, 1-(3,5-디-*tert*-부틸페닐)-1-메틸에틸, 2-(2'- 및 4'-피리딜)에틸, 2,2-비스(4'-니트로페닐)에틸, *N*-(2-피발로일아미노)-

1,1-디메틸에틸, 2-[(2-니트로페닐)디티오]-1-페닐에틸, 2-(*N,N*-디시클로헥실카복사미도)에틸, *t*-부틸, 1-아다만틸, 2-아다만틸, 비닐, 알릴, 1-이소프로필알릴, 신나밀, 4-니트로신나밀, 3-(3'-피리딜)프로프-2-에닐, 8-퀴놀릴, *N*-히드록시피페리디닐, 알킬디티오, 벤질, *p*-메톡시벤질, *p*-니트로벤질, *p*-브로모벤질, *p*-클로로벤질, 2,4-디클로로벤질, 4-메틸설피닐벤질, 9-안티릴메틸, 디페닐메틸, 2-메틸티오에틸, 2-메틸설포닐에틸, 2-(*p*-톨루엔설포닐)에틸, [2-(1,3-디티아닐)]메틸, 4-메틸티페닐, 2,4-디메틸티페닐, 2-포스포니오에틸, 1-메틸-1-(트리페닐포스포니오)에틸, 1,1-디메틸-2-시아노에틸, 2-단실에틸, 4-페닐아세톡시벤질, 4-아지도벤질, 4-아지도메톡시벤질, *m*-클로로-*p*-아실옥시벤질, *p*-(디히드록시보릴)벤질, 5-벤즈이소크사졸릴메틸, 2-(트리플루오로에틸)-6-크로모닐메틸, *m*-니트로페닐, 3,5-디메톡시벤질, 1-메틸-1-(3,5-디메톡시페닐)에틸,  $\alpha$ -메틸니트로피페로닐, *o*-니트로페닐, 3,4-디메톡시-6-니트로벤질, 페닐(*o*-니트로페닐)에틸, 2-(2-니트로페닐)에틸, 6-니트로베라트릴, 4-메톡시페나실, 3',5'-디메톡시벤조인, *t*-아밀, *S*-벤질티오, 부티닐, *p*-시아노벤질, 시클로헥실, 시클로펜틸, 시클로프로필메틸, *p*-데실옥시벤질, 디이소프로필메틸, 2,2-디메톡시카르보닐비닐, *o*-(*N,N*-디메틸카복사미도)벤질, 1,1-디메틸-3-(*N,N*-디메틸카복사미도)프로필, 1,1-디메틸프로피닐, 2-퓨라닐메틸, 2-아이오도에틸, 이소보르닐, 이소부틸, 이소니코티닐, *p*-(*p*'-메톡시페닐아조)벤질, 1-메틸시클로부틸, 1-메틸시클로헥실, 1-메틸-1-시클로프로필메틸, 1-메틸-1-(*p*-페닐아조페닐)에틸, 1-메틸-1-페닐에틸, 1-메틸-1-(4'-피리딜)에틸, 페닐, *p*-(페닐아조)벤질, 2,4,6-트리-*t*-부틸페닐, 4-(트리메틸암모늄)벤질, 2,4,6-트리메틸벤질 기를 갖는 카바메이트;

[0259] 페노티아지닐-(10)-카르보닐, *N'*-*p*-톨루엔설포닐아미노카르보닐, *N'*-페닐아미노티오카르보닐 기를 갖는 우레아;

[0260] 포름아미드, 아세트아미드, 페녹시아세트아미드, 트리클로로아세트아미드, 트리플루오로아세트아미드, 페닐아세트아미드, 3-페닐프로파미드, 펜트-4-엔아미드, *o*-니트로페닐아세트아미드, *o*-니트로페녹시아세트아미드, 3-(*o*-니트로페닐)프로판아미드, 2-메틸-2-(*o*-니트로페녹시)프로판아미드, 3-메틸-3-니트로부탄아미드, *o*-니트로신나미드, 3-(4-*t*-부틸-2,6-디니트로페닐)-2,2-디메틸프로판아미드, *o*-(벤조일옥시메틸)벤즈아미드, 2-[(*t*-부틸디페닐설흐시)메틸]메틸]벤즈아미드, 3-(3',6'-디옥소-2',4',5'-트리메틸시클로헥사-1',4'-디엔)-3,3-디메틸프로피온아미드, *o*-히드록시-*trans*-신나미드, 아세토아세트아미드, *p*-톨루엔설포나미드, 및 벤즈설포나미드 등의 아미드 등의 다양한 보호기(R<sub>1</sub>)로의 변환을 통해 보호될 수 있다.

[0261] 데시타빈의 4-*O*-메톡시(1b) 및 4-*S*-메틸티오(1c) 유사체는, 공지의 데시타빈 합성 방법에, 1-(2-데옥시-3,5-디-*O-p*-클로로벤조일 또는 벤조일-D-리보푸라노실)-4-메톡시 또는 메틸티오-1,3,5-트리아진-2(*H*)-온의  $\alpha$  및  $\beta$  아노머를 분리하고 메탄올 중의 암모니아(methanolic ammonia)에 의한 처리 없이 3,5-보호기를 제거하는 변경을 가하여 얻을 수 있다(Pliml and Sorm(1964) Collect. Czech. Chem. Commun. 29: 2576-2577; Piskala and Sorm(1978) Nucleic Acid Chemistry(Towsend and Tipson, Wiley, 1978), pp. 443-449).

[0262] 5'-OH의 보호는, 4-아미노 보호된 데시타빈과 4-메톡시 및 4-메틸티오 유사체(1b, 1c)를 디메톡시트리틸 클로라이드(1.1당량)를 첨가하기 전에 무수 피리딘(5 ml/mmol)에 용해시킴으로써 달성할 수 있다.

[0263] 예를 들면, 데시타빈(1.2g)을 무수 피리딘으로 2회 공증류(co-distillation)하고 20ml 무수 DMF에 용해시켰다. 헥사메틸디실라잔(2.8ml)을 첨가하였다. 그 용액을 교반하여 하룻밤 방치하였다. 그 용액을 진공에서 증발시키고 남은 잔사를 톨루엔에 용해시켜 2회 증발시켰다. 3',5'-디트리메틸실릴 5-아자-2'-데옥시시티딘(R<sub>f</sub>=0.67, 4:1 디클로로메탄/메탄올)을 무수 피리딘(~10ml)으로 2회 공증류하고 무수 피리딘(20ml)에 용해시켰다. 페녹시아세트산 무수물(1.5g)을 첨가하고 얻어진 용액을 1시간 교반하였다. 페녹시아세트산 무수물(0.18g)을 더 첨가하고 1시간 더 교반하였다. 반응 혼합물을 진공에서 증발 건조시키고 톨루엔으로 공증류(3×)하였다. 그 잔사를 디클로로메탄(~50ml)에 용해시켜 1M 수성 NaHCO<sub>3</sub> 용액(~50ml)으로 추출하고, 디클로로메탄(~20ml)으로 재추출하였다. 유기상을 합한 것을 황산나트륨으로 건조시키고 진공에서 환원시켜 조정제(crude) 3',5'-디 트리메틸실릴-N-페녹시아세틸 5-아자-2'-데옥시시티딘(3g; R<sub>f</sub>=0.82, 9:1 디클로로메탄/메탄올)을 수득하였다. 상기 조정제 물질을 무수 DMF(20ml)에 용해시켜 50ml 플라스틱 팔콘 튜브에 옮기고, TAS-F(2.4g)을 첨가하였다(가스가 방출됨). 반응은 22°C에서 4시간 진행되었다(압력의 축적을 줄이기 위해, 바이알(vial)을 완전히 닫지 않았다.) DMF를 진공에서 증발시키고 남은 잔사에 대하여 칼럼 크로마토그래피를 행하였다(30g 실리카겔, 2.5cm 칼럼, 99:1~9:1 디클로로메탄/메탄올). 백색 고형의 N-페녹시아세틸 5-아자-2'-데옥시시티딘(0.81g; R<sub>f</sub>=0.26, 9:1 디클로로메탄/메탄올)을 수득하였다. 디메톡시트리틸 클로라이드(0.9g)를 첨가하고 22°C에서 2시간 교반하기 전에, 이 화합물(0.6g)을 무수 피리딘으로 2회 공증류하고 무수 피리딘(20ml)에 용해하였다. 용매를 진공에서 제거하고 톨루엔으로 공증류하였다(×3). 그 잔사를 디클로로메탄(50ml)에 용해시키고 1M 수성 NaHCO<sub>3</sub> 용액(~50ml)으로 추출하고, 디클로로메탄(~20ml)으로 재추출하였다. 유기상을 합한 것을 황산나트륨으로 건조시

키고 진공에서 환원시켰다. 잔사에 대하여 실리카겔 크로마토그래피를 행하여(디클로로메탄 100%~95:5 디클로로메탄/메탄올), 5'-디메톡시트리틸-N-페녹시아세틸 5-아자-2'-데옥시시티딘(0.35g, 0.53mmole, 32%;  $R_f=0.49$ , 9:1 디클로로메탄/메탄올)을 수득하였다. 이 중간체(0.3g)를, 0.3M 벤질티오테트라졸/무수 아세트니트릴 용액(0.9ml) 및 시아노에틸테트라이소프로필 포스포로디아미다이트(0.17ml)를 첨가하기 전에, 무수아세트니트릴(2ml)에 용해시켰다. 그 혼합물을 22°C에서 1.5시간 교반하였다. 박막 크로마토그래피(TLC)(2:1 에틸 아세테이트/헥산 + 2% TEA)의 결과  $R_f=0.27$ 과 0.36의 부분입체이성질성 혼합물임이 나타났다. 용매를 진공에서 제거하고 남은 잔사에 대하여 칼럼 크로마토그래피를 행하였다(20g 실리카겔, 2.5cm 칼럼, 9:1 헥산/에틸 아세테이트 + 2% TEA(300ml), 1:1 헥산/에틸 아세테이트 + 1% TEA(200ml), 1:2 헥산/에틸 아세테이트 + 0% TEA(250ml)).  $R_f=$ 페녹시아세틸(0.297g, 0.34mmol, 76%)인 데시타빈 포스포르아미다이트 빌딩(1d)을 1:2 헥산/에틸 아세테이트로 용출하였다. 1d( $C_{46}H_{53}N_6O_9P$ 의 계산된 정확한 질량은 864.36)의 EMI-MS는  $m/z$  864.1 및 966.4  $[M+NEt_3+H]^+$ 를 나타내고;  $^{31}P$  NMR( $CDCl_3$ , 500MHz)은 149.17 및 149.0 ppm을 나타내고.;  $^1H$  NMR( $CDCl_3$ , 500MHz)은 8.63 및 8.59(1H, 이중항, H-6), 7.4-6.6(18H, 다중항, 방향족 DMTr/Pac), 6.05(1H, 삼중항, H-1'), 4.79(2H, 일중항, Pac의  $CH_2$ ), 4.59(1H, 일중항, H-4'), 4.25 내지 4.20(1H, 이중항, H-3'), 3.8-3.7(1H, 다중항, P-O- $CH_2$ ), 3.70(3H, 일중항, DMTr의  $CH_3O$ ), 3.68(3H, 일중항, DMTr의  $CH_3O$ ), 3.6-3.48(3H, 다중항, 이소프로필의 2개의 CH 및 1개의 P-O- $CH_2$ ), 3.36-3.27(2H, 다중항, H-5'), 2.80(1H, 일중항, H-2'), 2.53(1H, 일중항, H-2'), 2.40(2H, 다중항,  $CH_2CN$ ), 1.1(12H, 이소프로필의  $CH_3$ )의 케미칼 시프트(ppm)를 나타내었다.

[0264] 또한, 공지된 방법을 약간 변경함으로써 3'- 및 5'-O-캡 유도체(도 3a, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k, 1l)에 도달할 수 있는데(Bagnall, Bell and Pearson (1978) J. of Fluorine Chem. 11: 93-107), 여기서 캡은 알킬기, 에스테르, 지방산 에스테르, 에틸렌 및 프로필렌 글리콜 등의 글리콜 유도체; 및 제어된 다공성 유리 지지체에 3'-연결된 보호된 데시타빈일 수 있다(도 3b, 1m, 1n, 1o)(Alul, Singman, Zhan and Letsinger (1991) 19: 1527-1532).

[0265] 기타 데시타빈 유도체는, 도 4에 나타낸 바와 같이, 그 3'-OH가, 에스테르(아세틸, 벤조일, 및 할로벤조일; 및 지방산을 들 수 있으며 이들에 한정되는 것은 아님) 및 에테르(*p*-니트로페닐에틸, 메톡시메틸, 메틸티오테틸, (페닐디메틸실릴)메톡시메틸, 벤질옥시메틸, *p*-메톡시벤질옥시메틸, *p*-니트로벤질옥시메틸, *o*-니트로벤질옥시메틸, (4-메톡시페녹시)메틸, *t*-부톡시메틸, 4-펜테닐옥시메틸, 실록시메틸, 2-메톡시에톡시메틸, 2,2,2-트리클로로에톡시메틸, 비스(2-클로로에톡시)메틸, 2-(트리메틸실릴)에톡시메틸, 멘톡시메틸, 테트라히드로피라닐, 테트라히드로푸라닐, 및 1-(2-플루오로페닐)-4-메톡시피페리딘-4-일을 들 수 있으며 이들에 한정되는 것은 아님), 에틸렌 및 프로필렌 글리콜 등의 글리콜 유도체에 의해 보호된다.

[0266] **2. 고체 지지체 상에서의 DpG 및 GpD 디뉴클레오티드 및 테트라뉴클레오티드의 합성**

[0267] DpG 및 GpD 디뉴클레오티드 및 테트라뉴클레오티드는 표준 방법(도 5)에 결합 시간을 증가시키는(>2분) 약간의 변경을 가하여 합성할 수 있다(Beaucage and Caruthers (1981) Tet. Lett. 22: 1859-1862; McBride and Caruthers (1983) Tet. Lett. 24: 245-248). GpD 디뉴클레오티드(2a)의 합성 및 DpGpGpD 테트라뉴클레오티드(3a)의 합성은, 도 6a에 나타낸 바와 같이, 1m, 1n 또는 1o를, 유사하게 보호된 5'-O-DMTr 2'-데옥시구아노신-3'-O-시아노에틸-N,N-디이소프로필포스포르아미다이트 및 5'-O-DMTr 2'-데옥시-5-아자-시티딘-3'-O-시아노에틸-N,N-디이소프로필포스포르아미다이트(1d, 1e 또는 1f)와 결합함으로써 개시할 수 있다. 이어서 고체 지지체(제어된 다공성 유리(CPG) 등)로부터 떼어내고 카르바메이트 보호기를 DBU/피리딘(또는 아세트니트릴) 등의 염기로 제거하고, 4-O-메톡시 및 4-O-메틸티오 보호기를 메탄올 중의 암모니아로 제거하여, 목적하는 올리고뉴클레오티드를 최종의 DMTr기가 있거나 없는 채로 수득한다. DpGpGpD(3b)를 유사하게 얻을 수 있다(도 7).

[0268] 예를 들면(도 6a 및 6b), 앰머샴(Amersham) AKTA 올리고필로트(Oligpilot) 10 시스템에, 보호된 데시타빈이 연결된, CPG 고체 지지체(1m)(여기서  $R_1=$ 페녹시아세틸)를 로딩하고, 60%의 0.3M 벤질티오테트라졸 활성제(아세트니트릴 중)의 존재하에, 2~2.5 당량의 *tert*-부틸 페녹시아세틸 2'-데옥시구아노신 포스포르아미다이트와 2.5분간 결합시킨다. 보호된 GpD 디뉴클레오티드를 함유하는 CPG 고체 지지체를 50mM  $K_2CO_3$ /메탄올 20ml로 1시간 20분 동안 처리한다. 결합된 생성물을 2M *tert*-부틸히드로퍼옥사이드/무수 아세트니트릴(*tert*-부틸히드로퍼옥사이드를 80% *tert*-부틸퍼옥사이드에 용해시켜 제조함)로 산화시킨다. 디메톡시 트리틸 보호기를 3% 디클로로아세트산/톨루엔으로 제거한다. CPG 고체 지지체를 무수 메탄올로 세정하고; 그 여과물을 2ml의 1M 아세트산/메탄올을 첨가하여 중화시키고, 그 용액을 회전증발에 의해 농축시키고; 잔사를 200mM 트리에틸암모늄 아세테이트

(pH 6.9)에 넣고, 아세트니트릴(50% 수성 아세트니트릴 500 $\mu$ l)로 세정하고, 주사기 필터를 통해 여과한다. 이어서 GpD 디뉴클레오티드를 제미니(Gemini) C18 분취 칼럼(Phenomenex), 250 $\times$ 21.2mm, 10 $\mu$ m와 가아드 칼럼(Phenomenex), 50 $\times$ 21.2mm, 10 $\mu$ m를 장착한 AKTA Explorer 100 HPLC로, 50mM 트리에틸암모늄 아세테이트(pH 7)/MilliQ 워터(이동상 A)와 80% 아세트니트릴/MilliQ 워터(이동상 B)를 이용하여 칼럼 부피 중 2% 내지 20/25%의 이동상 B 조건으로 정제한다. X<sup>+</sup>=트리에틸암모늄인 GpD 디뉴클레오티드(2a)(중성 화합물 C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>P의 계산된 정확한 질량은 557.14)의 ESI-MS(-ve)는 m/z 556.1 [M-H]<sup>-</sup> 및 1113.1 [2M-H]<sup>-</sup>을 나타내었다(도 30의 질량 스펙트럼 참조).

[0269] 60%의 0.3M 벤질티오테트라졸 활성화제(아세트니트릴 중) 존재하에, 각각 2.5분 및 10분간, 2~2.5 당량의 tert-부틸 페녹시아세틸 2'-데옥시구아노신 또는 페녹시아세틸 5-아자-2'-데옥시시티딘 포스포르아미다이트로 사이클을 3회 반복할 때, X<sup>+</sup>=트리에틸암모늄인 DpGpGpD 테트라뉴클레오티드(3b)(중성 화합물 C<sub>36</sub>H<sub>47</sub>N<sub>18</sub>O<sub>22</sub>P<sub>3</sub>의 계산된 정확한 질량은 1176.23)가 수득되며(도 6b 및 7), m/z 587.2 [M-2H]<sup>-</sup> 및 1175.2 [M-H]<sup>-</sup>를 나타낸다(도 32).

[0270] 또한, DpG 디뉴클레오티드(2b) 및 GpDpGpD(3c)는 1s(R<sub>1</sub>=카르바메이트 보호기)를 포스포르아미다이트 빌딩 블록(1d, 1e 또는 1f)과 결합함으로써 합성할 수 있다(도 8). GpDpDpG 및 GpDpG(3c')도 마찬가지로 수득할 수 있다(도 9).

[0271] 예를 들면, 보호된 2'-데옥시구아노신이 연결된, CPG 고체 지지체 (1s)(R<sub>1</sub>=tert-부틸 페녹시아세틸)를, 60%의 0.3M 벤질티오테트라졸 활성화제(아세트니트릴 중) 존재하에 10분간, 2~2.5 당량의 페녹시아세틸 데시타빈 포스포르아미다이트(도 2a, 1d, R<sub>1</sub>=페녹시아세틸; 도 38의 질량 스펙트럼 참조)와 결합시킨다. 보호된 DpG 디뉴클레오티드를 함유하는, CPG 고체 지지체를, 20ml의 50mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 메탄올로 1시간 20분 처리한다. 결합된 생성물을, GpD 디뉴클레오티드에 대하여 상술한 바와 마찬가지로, 산화하고, 보호기를 제거하고, 세정하고, 여과하고, 정제한다. X<sup>+</sup>=트리에틸암모늄인 DpG 디뉴클레오티드(2b)(중성 화합물 C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>P의 계산된 정확한 질량은 557.14)의 ESI-MS(-ve)는 m/z 556.1 [M-H]<sup>-</sup> 및 1113.1 [2M-H]<sup>-</sup>이다(도 31의 질량 스펙트럼 참조). 상기 트리에틸암모늄염을, 4ml의 물, 0.2ml의 2M NaClO<sub>4</sub> 용액에 재용해시켜, X<sup>+</sup>=나트륨인 DpG 디뉴클레오티드(2b)를 수득한다. 36ml 아세톤을 첨가하면 상기 디뉴클레오티드가 침전한다. 상기 용액을 수시간 동안 -20 $^{\circ}$ C로 유지하고 4000rpm에서 20분간 원심분리한다. 상정액을 버리고 고체를 30ml 아세톤으로 세정한 후 4000rpm에서 20분간 더 원심분리한다. 그 침전물을 물에 용해시켜 동결 건조한 것은 m/z 556.0 [M-H]<sup>-</sup>를 나타내었다(도 36의 질량 스펙트럼 참조).

[0272] 60%의 0.3M 벤질티오테트라졸 활성화제(아세트니트릴 중) 존재하에, 각각 2.5분 및 10분간, 2~2.5 당량의 tert-부틸 페녹시아세틸 2'-데옥시구아노신 또는 페녹시아세틸 5-아자-2'-데옥시시티딘 포스포르아미다이트로 사이클을 3회 반복할 때, X<sup>+</sup>=트리에틸암모늄인 GpDpG 트리뉴클레오티드(3c')(중성 화합물 C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>N<sub>14</sub>O<sub>16</sub>P<sub>2</sub>의 계산된 정확한 질량은 886.2)가 수득되며, m/z 885.16 [M-H]<sup>-</sup>를 나타내었다(도 33의 질량 스펙트럼 참조).

[0273] 사이클을 3회 반복할 때, X<sup>+</sup>=트리에틸암모늄인 DpGpDpG 테트라뉴클레오티드(3c)(중성 화합물 C<sub>36</sub>H<sub>47</sub>N<sub>18</sub>O<sub>22</sub>P<sub>3</sub>의 계산된 정확한 질량은 1176.23)가 수득되며, 이것은 m/z 587.4 [M-2H]<sup>-</sup> 및 1175.4 [M-H]<sup>-</sup>를 나타내었다(도 34의 질량 스펙트럼 참조)

[0274] 상기 결합 단계 동안 새로 형성된 포스포이트 트리에스테르를 5% 페닐아세틸 디실과이드(PADS)(디클로로에탄/sym 콜리딘 4/1(v/v) 중) 용액 4.3ml(3.6 칼럼 부피), 유속 50cm/h(접촉 시간 3 칼럼 부피)에 의해, 대응하는 포스포로티오에이트 트리에스테르로 전환시키면, 포스포로티오에이트 유도체(2b)를 수득할 수 있다. 황화는 3분내에 완결되며, 이때 아세트니트릴로 세정함으로써 여분의 반응물을 반응 용기로부터 제거한다. 이어서 2a에 대하여 기재한 바와 같이, 탈보호 및 정제함으로써, X<sup>+</sup>=트리에틸암모늄인 포스포로티오에이트 DpG(Sp 및 Rp, 도 13, 2e)(중성 화합물 C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>PS의 계산된 정확한 질량은 573.12)가 얻어지며, 이것은 m/z 571.9 [M-H]<sup>-</sup>를 나타내었다(도 35의 질량 스펙트럼 참조).

[0275] DMT 핵사에틸렌글리콜 포스포르아미다이트(60% 활성제, 결합 시간 7분)로 1회 사이클을 반복한 후, 2a에 대하여 기재한 바와 같이 표준 산화 및 정제를 하면, X<sup>+</sup>=트리에틸암모늄이고 캡=핵사에틸렌글리콜 포스페이트인 HEG-DpG 디뉴클레오티드(2d)(중성 화합물 C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>N<sub>9</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>의 계산된 정확한 질량은 901.71)가 수득되며(도 12), 이것은 m/z 900.4 [M-H]<sup>-</sup>를 나타내었다(도 37의 질량 스펙트럼 참조).

[0276] **3. DpG 및 GpD 디-, 트리- 및 테트라뉴클레오티드에 의한 DNA 메틸화의 저해**

[0277] DpG 및 GpD 디-, 트리-, 및 테트라뉴클레오티드의 탈메틸화 활성을 세포 기반 GFP(green fluorescent protein) 평가법에 의해 시험하였다. 도 25에 모식적으로 나타난 이 평가법은, CMV 프로모터에 의해 조절되는 GFP 유전자를 가지며, 그 프로모터 내의 CpG 자리의 메틸화에 민감하다. 메틸화 저해제에의 노출에 기인하는 메틸화의 감소는, GFP를 발현되게 하며, 이는 용이하게 평가할 수 있다. 특히, 후생적으로 침묵된 GFP 도입유전자를 함유하는 CMV-EE210 세포주를 사용하여, 흐름세포측정법(flow cytometry)에 의해 GFP 발현의 재활성화를 평가하였다. NIH 3T3 세포에, 포유동물 세포 내에서의 발현에 적용되는 인간화된 GFP 유전자를 구동하는 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터를 함유하는 pBS(+)(Stratagene, Inc.)로 이루어진 pTR-UF/UF1/UF2 플라스미드(Zolotuhin et al., 1996)를 도입하여 CMV-EE210를 제작하였다. 도입 후, 처음에는 MoFlo 혈구계산기(Cytomation, Inc.)를 사용하여 GFP를 고수준으로 발현하는 세포를 FACS 분석 및 분류에 의해 선택하였다. 포유동물의 DNMT1의 강력한 저해제인 데시타빈을 양성 대조구(positive control)로 사용하였다. CMV-EE210의 재활성화를 스크리닝하기 위해, 데시타빈(1 μM) 또는 시험 화합물(30~50 μM 농도)을 완전 배지(10% 소 태아 혈청(Hyclone)이 보충된, 페놀 레드 무함유의 DMEM(Gibco, Life Technologies))에 첨가하였다. 시험 화합물을 함유하는 96 웰 플레이트에 30% 충실도(confluence)(~5000 세포/웰)로 세포를 접종하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 3일간 배양하였다. 450-490 여기 필터(13 필터 큐브, Leica, Deerfield IL)를 사용하여 형광현미경 하에서 플레이트를 검사하였다. 생존세포의 10%가 GFP를 발현하면 g1 양성, 생존세포의 30%가 GFP를 발현하면 g2 양성, 생존세포의 75% 이상이 GFP를 발현하면 g3으로 평가하였다. GFP 50은 GFP 발현 수준이 g3에서 g1/2로 될 때의 투여량인 저해제의 농도이다(IC<sub>50</sub>과 유사). 표 1은 DNA 메틸화 저해제로서 데시타빈, DpG, GpD, GpDpG, DpGpGpD 및 DpGpDpG에 대한 시험결과를 나타낸다. 표 1에 나타난 바와 같이, 시험한 5개의 올리고뉴클레오티드 유사체 모두에 있어서 저농도에서 DNA 메틸화를 효과적으로 저해하였고, 그 결과 GFP 유전자의 전사가 재활성화되었다.

**표 1**

탈메틸화 활성의 예비 스크리닝

화합물	GFP 발현 수준	IC <sub>50</sub> (nM)
데시타빈	g3	500
DpG	g3	400
GpD	g3	700
GpDpG	g3	1800
DpGpGpD	g3	1100
DpGpDpG	g3	1400

[0279] **4. DpG 및 GpD 디뉴클레오티드 및 테트라뉴클레오티드의 용액 중에서의 합성**

[0280] 이들 올리고뉴클레오티드를 대량으로 합성하기 위해서는, 가용성 중합체 지지체를 사용함이 바람직하다(Bayer and Mutter, (1972) Nature 237: 512-513; Bonora (1995) Appl. Biochem. Biotechnol. 54: 3-17). 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 PEG 중합체 지지체에 의해, 합성 과정이 균일 상으로 행하여지게 되며, 간단한 침전 및 여과 과정을 통한, 용이한 중간 정제 과정이 보장된다(Poly(ethylene glycol) Chemistry. Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris (Ed.), Plenum Press, New York (USA), 1992, pp. 1-14 [책 인용]). 예를 들면, 1t, 1u, 또는 1v 등의 3'-연결된 유도체를(도 10), 상기한 고상 과정에 채용되는 표준 포스포르아미다이트계 화학에 용이하게 적용하여, DpG 및 GpD 디- 및 테트라뉴클레오티드(2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 3d)를 얻을 수 있다.

[0281] 또는, 신규한 DpG 디뉴클레오티드(2a)는 유도체(1p, 1q, 또는 1r)를 유사하게 보호된 5'-O-DMTr 2'-테옥시구아노신-3'-O-시아노에틸-N,N-디이소프로필포스포르아미다이트와, 또한 GpD는 유사하게 3'-보호된 2'-테옥시구아노

신을 5'-O-DMTr 2'-데옥시-5-아자-시티딘-3'-O-시아노에틸-N,N-디이소프로필포스포르아미다이트(1d, 1e 또는 1f)와, 아세토니트릴 및/또는 디클로로메탄 중에서 결합시킨 후, 요오드/물로 산화하고, 염기 보호기를 탈보호하고, DMTr기를 제거함으로써(올리고뉴클레오티드 합성의 표준 사이클에서와 마찬가지로), 용액 중에서 제조할 수 있다.

[0282] 또한, 말단 3'-OH 및 5'-OH가 메틸기로 캡핑된 신규한 DpG(2c) 디뉴클레오티드는, 3'-O-메틸 유도체(1g, 1h 또는 1i)를, 2'-데옥시구아노신-3'-O-시아노에틸-N,N-디이소프로필포스포르아미다이트의 5'-O-메틸 유도체(1w)와 결합시킨 후(도 11), 요오드/물로 산화하고, 염기 보호기를 탈보호하고, DMTr기를 제거함으로써(올리고뉴클레오티드 합성의 표준 사이클에서와 마찬가지로) 제조할 수 있다. 디뉴클레오티드 GpD(2d) 또한 유사하게 3'-O-메틸 2'-데옥시구아노신 유도체(1x)를 2'-5-아자시티딘-3'-O-시아노에틸-N,N-디이소프로필포스포르아미다이트의 5'-O-메틸 유도체(1j, 1k 또는 1l)와 결합시킴으로써 제조할 수 있다(도 12).

[0283] **5. 시티딘 디아미나제 및 뉴클레아제에 내성인 DpG 및 GpD 올리고뉴클레오티드의 합성**

[0284] 일반적으로, 체액 중의 올리고뉴클레오티드는 뉴클레아제에 의해 분해되기 쉽다(Stein and Cheng (1993) Science 261: 1004-1012; Cohen (1994) Adv. Pharmacol. 25: 319-339). 뉴클레아제 분해에 대한 안정성을 증가시키기 위해, 뉴클레오티드 간의 비가교 산소가 황으로 치환된, 2e, 2f, 3e, 3f, 3g, 및 3h (도 13, 14 및 15) 등의 포스포리티오에이트 디뉴클레오티드 및 테트라뉴클레오티드 유도체를 만든다. 산화 단계 동안의 요오드를 비스(0,0-디이소프로폭시 포스포노티오일) 디설파이드 (S-테트라)로 대체한 이외에는 표준 포스포르아미다이트 프로토콜을 사용한다(Zon and Stec (1991) In Eckstein, F. (ed.), 'Phosphorothioate Analogues' in Oligonucleotide and Their Analogs: A Practical Approach. IRL Press, pp. 87-108; Zon, G. (1990) In Hancock, W. S. (ed.), High Performance Liquid Chromatography in Biotechnology. Wiley, New York, Ch. 14, pp. 310-397 [book citations]; Stec, Uznanski, Wilk, Hirschbein, Fearon, and Bergot (1993) Tet. Lett. 34: 5317-5320; Iyer, Phillips, Egan, Regan, and Beaucage (1990) J. Org. Chem. 55: 4693-4699).

[0285] 이들 올리고뉴클레오티드를 약제로 이용함에 있어서의 또 다른 강력한 장애는 시티딘 디아미나제(CDA)가 도처에 존재하는 것인데, 데시타빈의 탈아미노화는 활성의 전부 상실로 귀결되기 때문이다(Momparler, Cote and Eliopoulos (1997) Leukemia 11 (Suppl. 1): 1-6; Chabot, Bouchard and Momparler (1983) Biochem. Pharmacol. 32: 1327-1328; Laliberte, Marquez and Momparler (1992) Cancer Chemother. Pharmacol. 30: 7-11). 이 문제를 해결하기 위해, 4-NH<sub>2</sub>가 4-NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>(R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>는 알킬, 알킬 아민, 및 알킬 알콜일 수 있음)로 치환된 데시타빈 유도체를 함유하는 올리고뉴클레오티드를 또한 제조하여, 유도체(2g, 2h, 2i, 2j, 2k, 2l, 2m, 2n, 3i, 3j, 3k, 3l, 3m, 3n, 3o, 및 3p) 등을 제조하였다(도 16, 17, 18, 19, 20 및 21). 4-메톡시 및 4-메틸티오기의 제거 동안에 메탄올 중의 암모니아를 알킬 아민, 알킬 디아민, 및 히드록실아민으로 대체한 것 외에는 표준 포스포르아미다이트 프로토콜을 이용하였다. 2차 및 3차 아민, 디아민, 히드록실아민은 암모니아보다 불량한 이탈기를 만들기 때문에, 이들 유도체는 탈아미노화하기가 더 어렵다.

[0286] **6. P15 (CDKN2B), BRCA1, and P16 (CDKN2a) 등의 암 관련 유전자의 프로모터 부위의 CpG 섬에 근거한 DpG 및 GpD-리치 올리고뉴클레오티드의 합성**

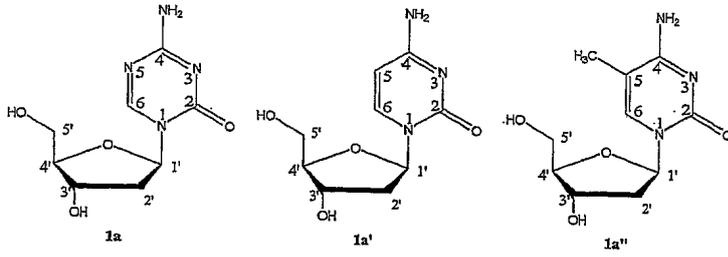
[0287] 염기 길이가 5~100개인 DpG 및 GpD 섬-리치 올리고뉴클레오티드 유사체를 제조할 수 있다(D는 데시타빈 또는 데시타빈 유사체일 수 있다). 상술한 DpG 및 GpD 디뉴클레오티드 및 테트라뉴클레오티드와는 달리, 이들 상대적으로 긴 DpG 및 GpD-리치 올리고뉴클레오티드 유사체는 프로모터 부위의 CpG 섬 내에서 제한적으로 작용할 뿐만 아니라 P15(CDKN2B), P16(CDKN2A) 및 BRCA1 등의 암 관련 유전자의 프로모터 부위 서열 내의 단편에 특이적이다. 예를 들면, P15, P16, 및 BRCA1 프로모터 부위 서열(도 27, 28 및 29, 각각)에 근거한 8량체, 10량체, 및 12량체 DpG 및 GpD-리치 올리고뉴클레오티드 유사체(도 26)를 포스포르아미다이트 빌딩 블록(1d, 1e 또는 1f)을 사용하여 표준 고상 올리고뉴클레오티드 합성법으로 제조할 수 있다. 수식되어 내부에 5-아자-시토신이 삽입될 수 있는 올리고뉴클레오티드의 예를 도 27, 28 및 29에 더 기재하였다. 이들 올리고뉴클레오티드 유사체는 프라이머처럼 작용하여, 복제하는 DNA에 오직 P15, P16, 또는 BRCA1의 프로모터 부위 서열의 특정 단편에만 삽입되어, 프로모터 부위의 메틸화를 효과적이고 선택적으로 저해할 수 있다.

[0288] 본 발명의 바람직한 실시형태를 본 명세서에 나타내고 기재하였으나, 그러한 실시형태가 단지 예시로서 제공되는 것임은 당업자에게 명백하다. 당업자는 본 발명 내에서 다수의 차이, 변경, 및 치환을 할 수 있을 것이다. 본 발명을 실시함에 있어서 본 명세서에 기재된 발명의 실시형태의 다양한 대안을 채용할 수 있음은 당연하다. 다음의 청구범위는 발명의 범위를 규정하기 위한 것으로서, 이로써 이들 청구항의 범위 내의 방법 및 구조 그리

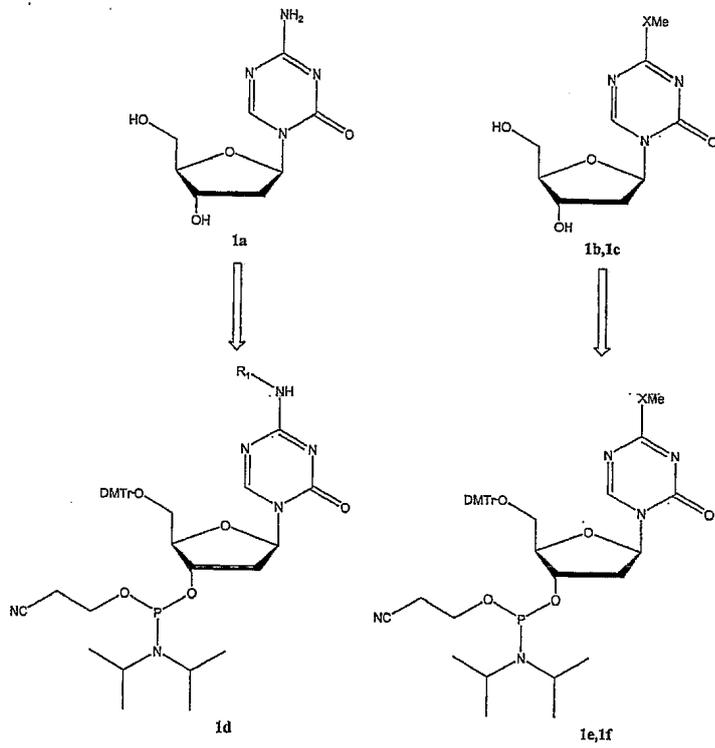
고 그 균등물이 보호된다.

도면

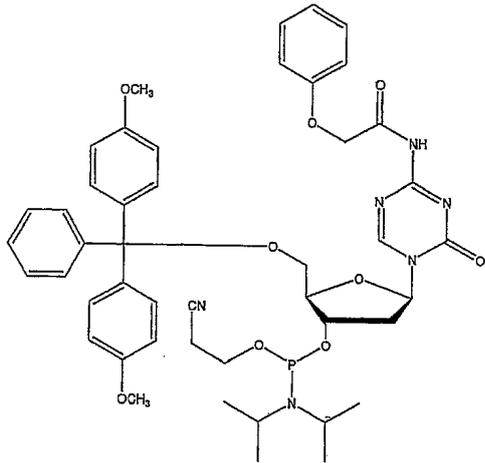
도면1



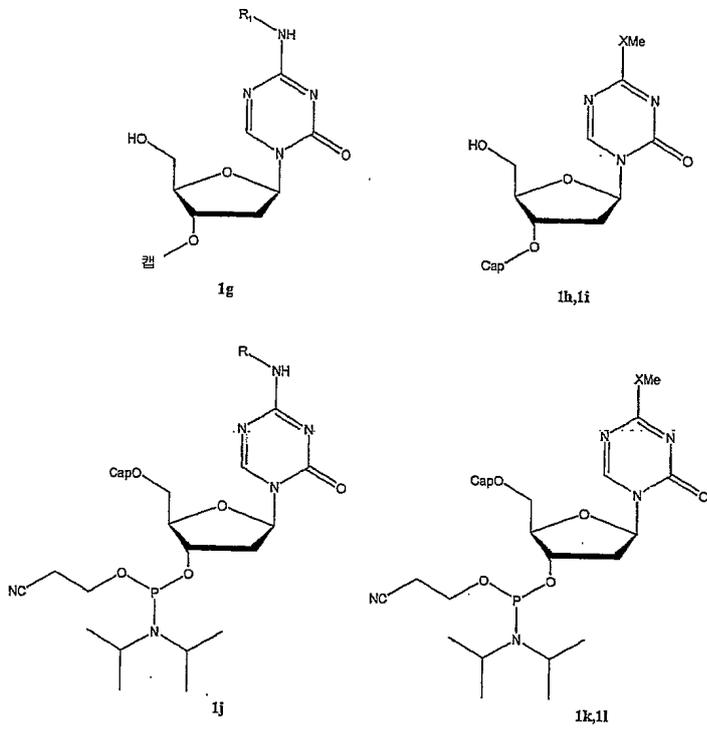
도면2a



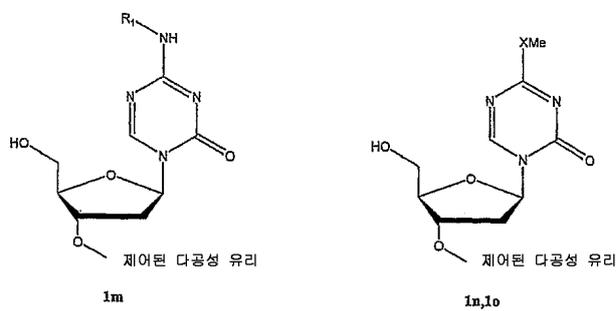
도면2b



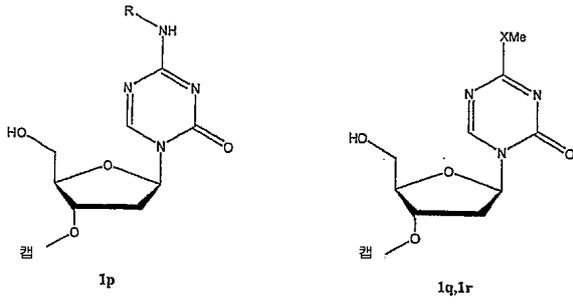
도면3a



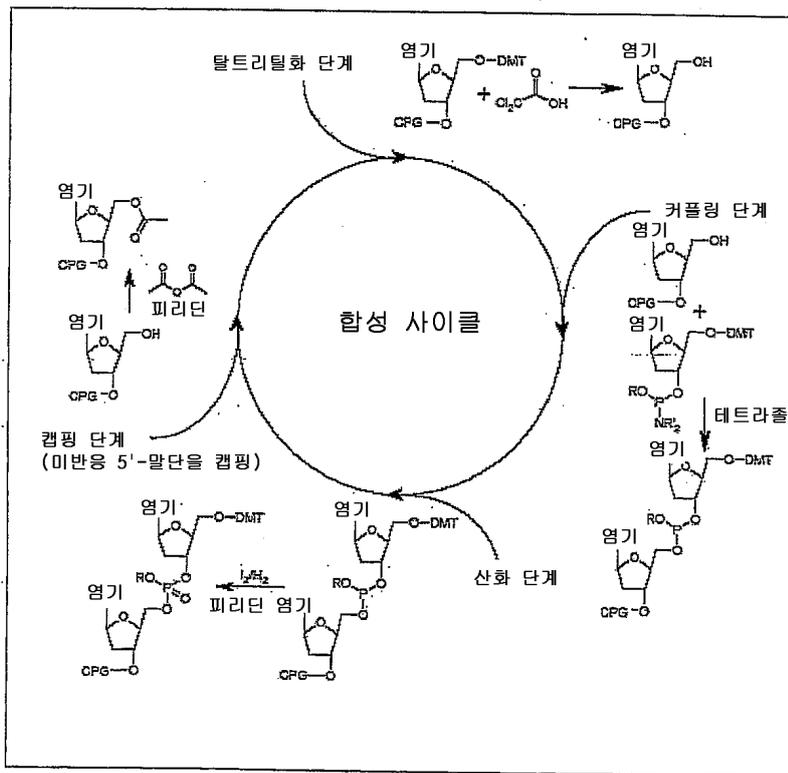
도면3b



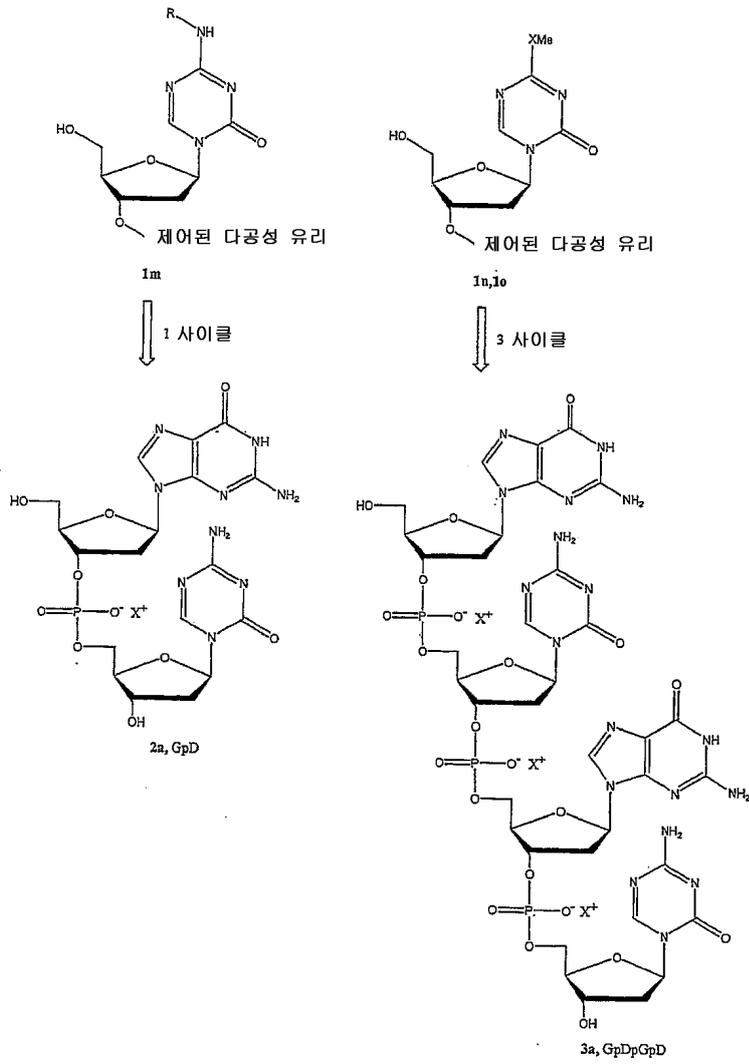
도면4



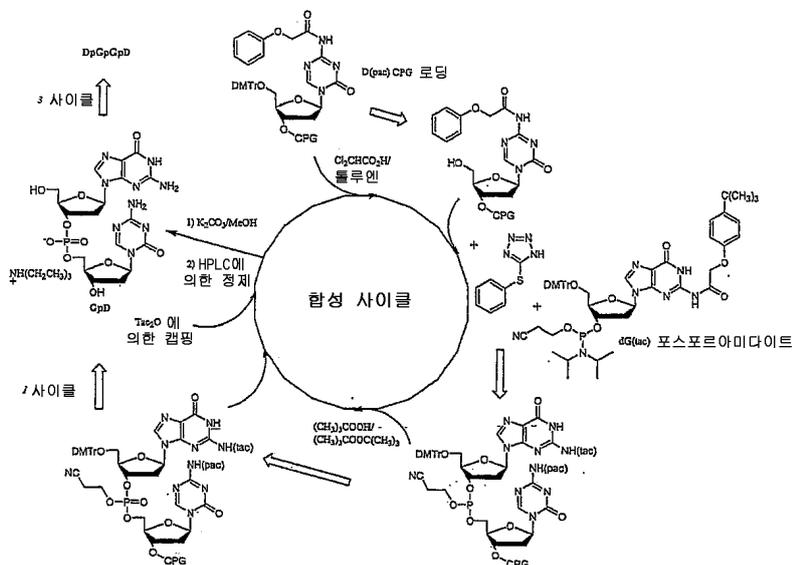
도면5



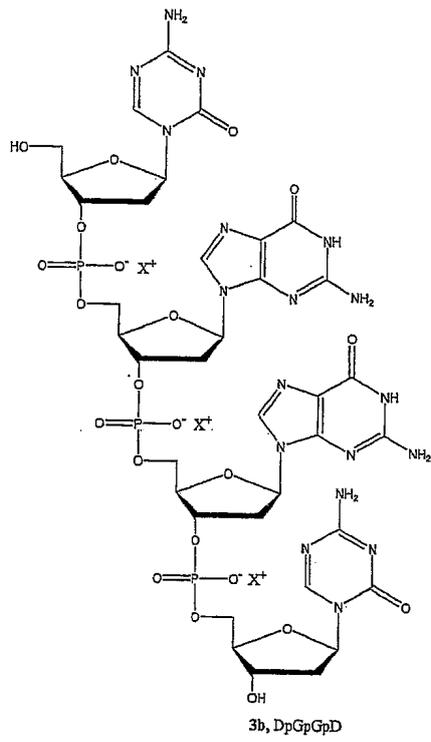
도면6a



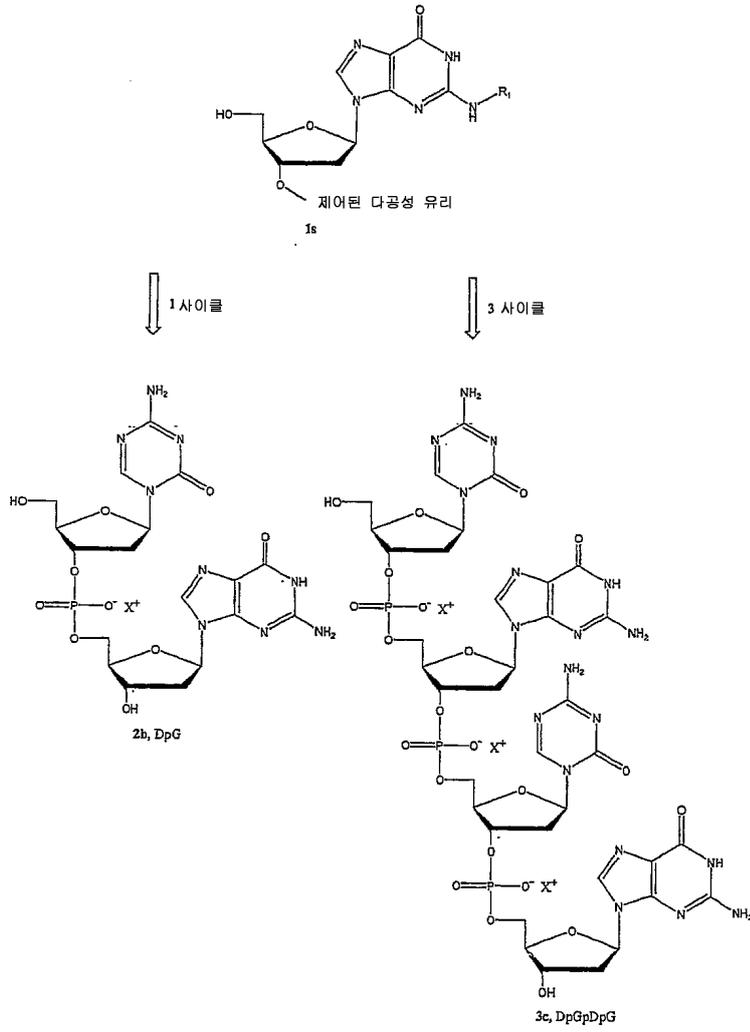
도면6b



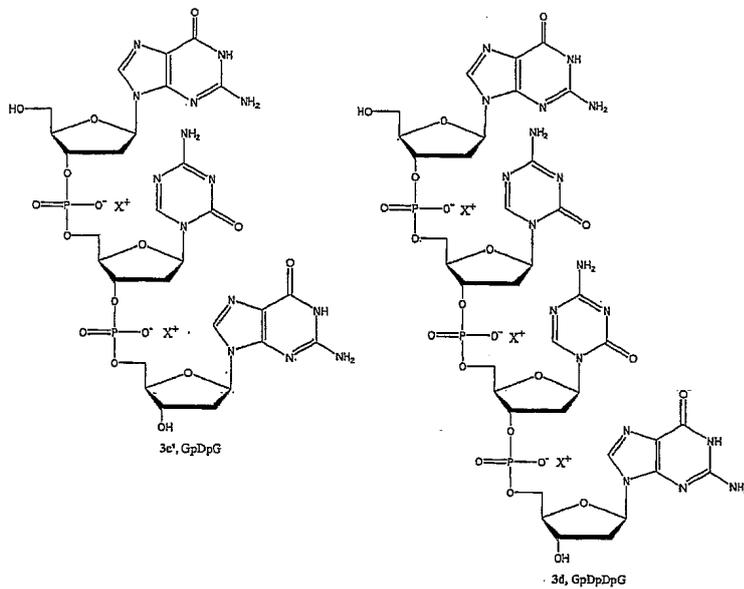
도면7



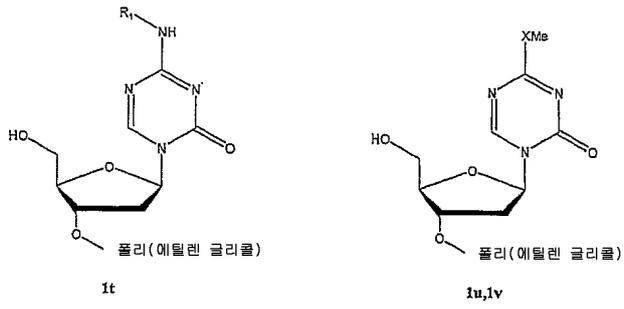
도면8



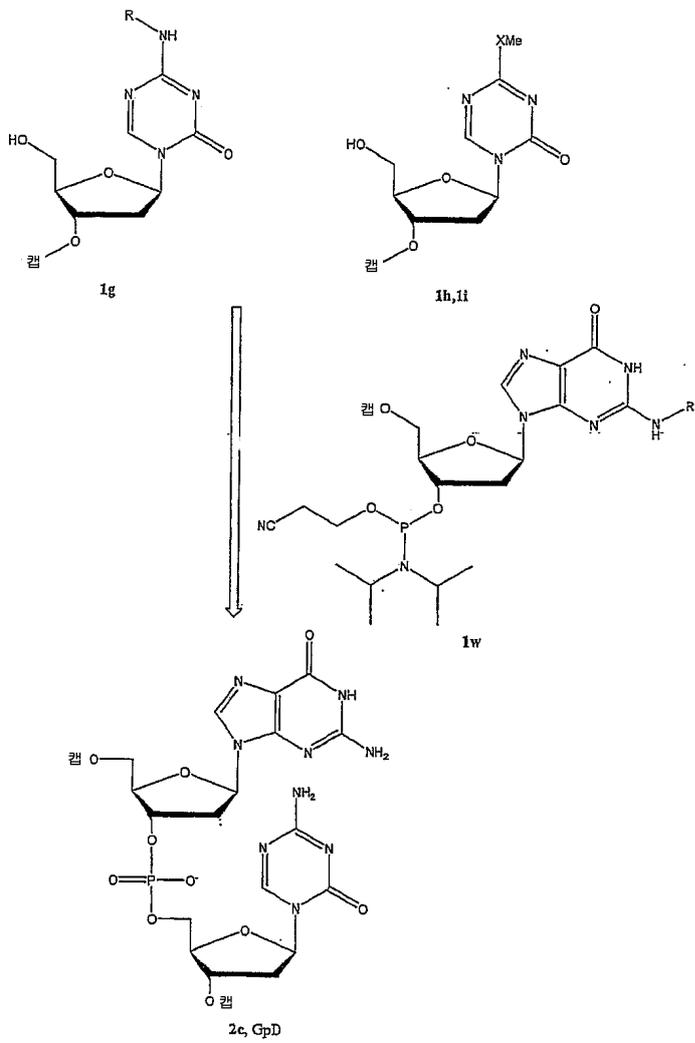
도면9



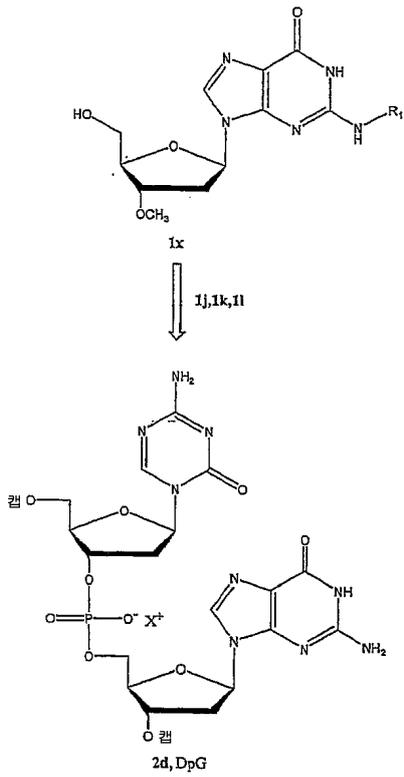
도면10



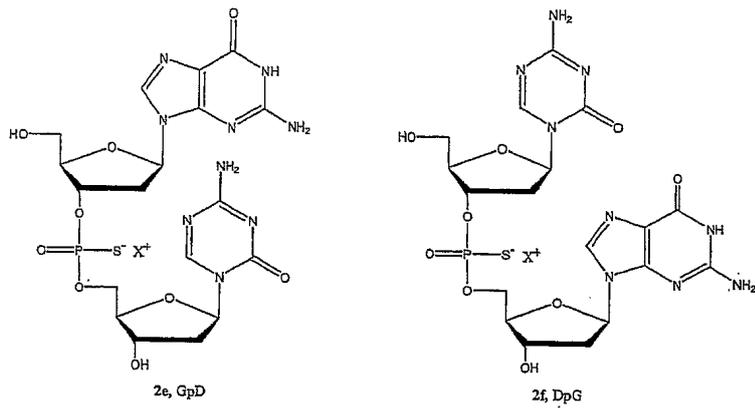
도면11



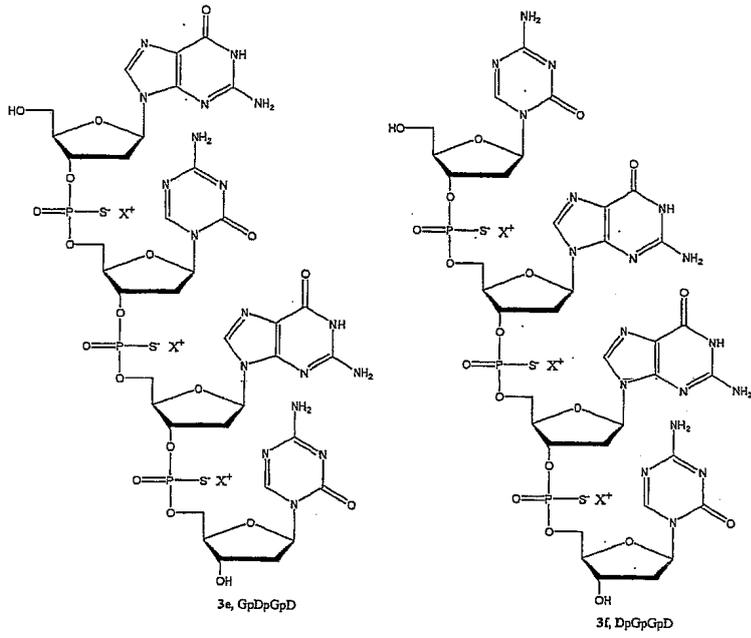
도면12



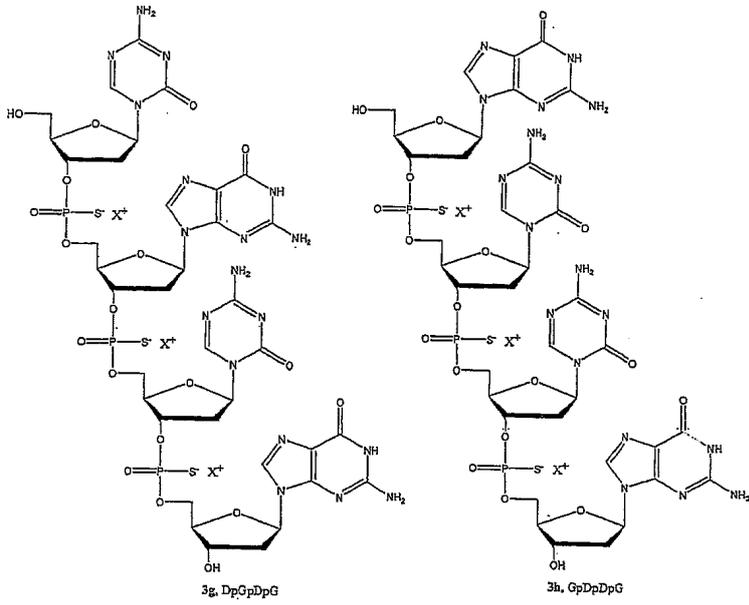
도면13



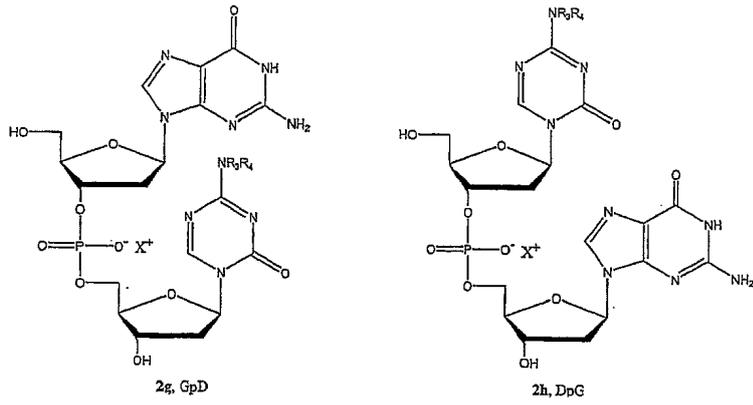
도면14



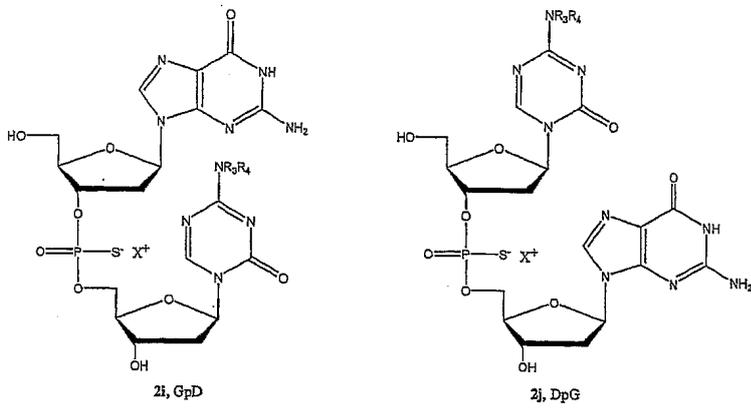
도면15



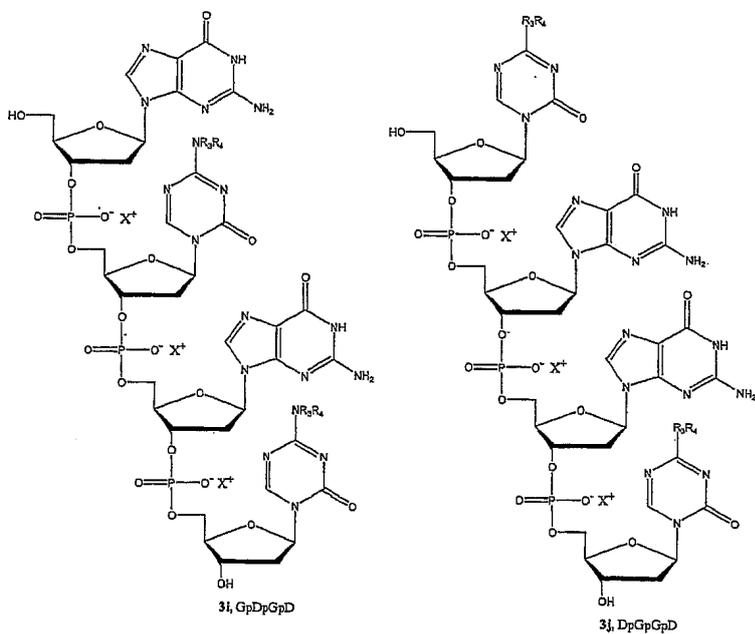
도면16



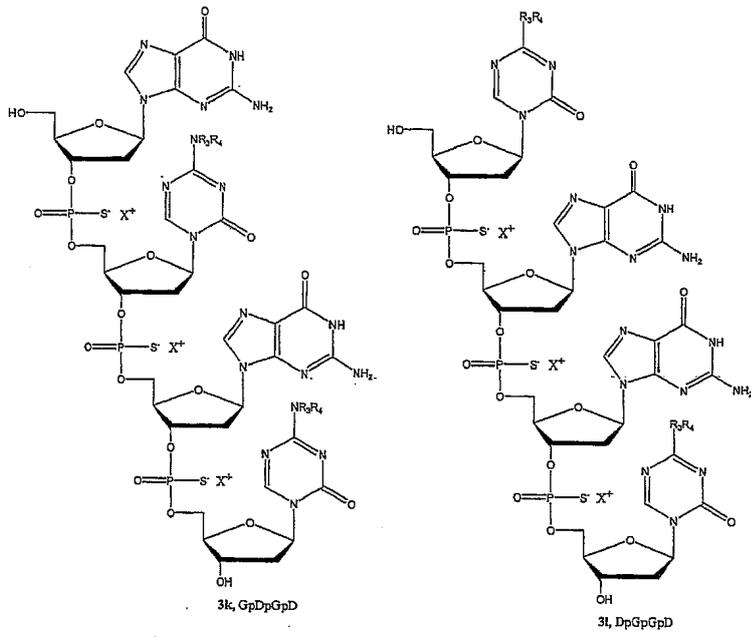
도면17



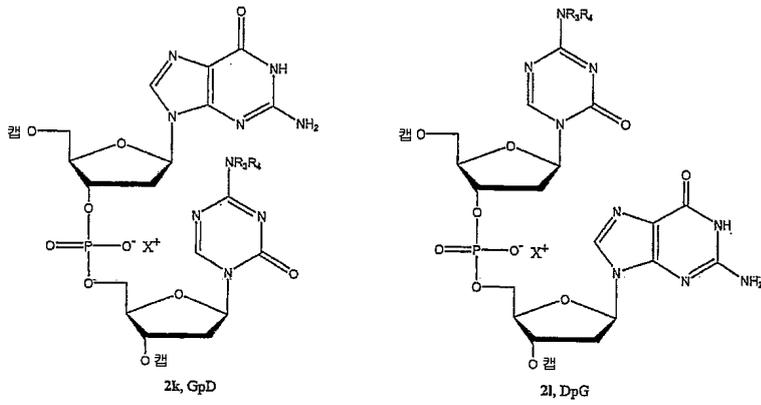
도면18



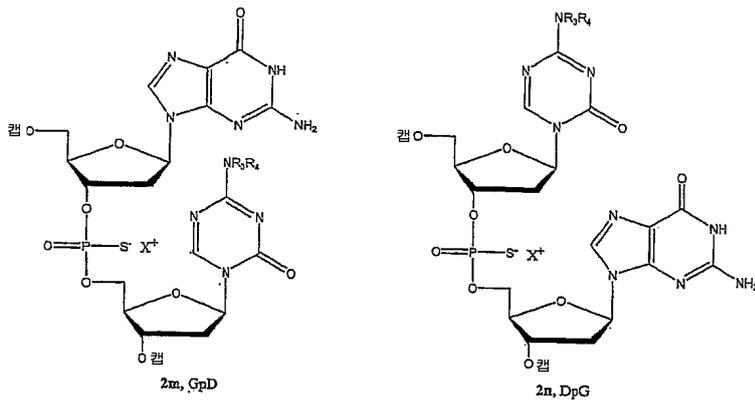
도면19



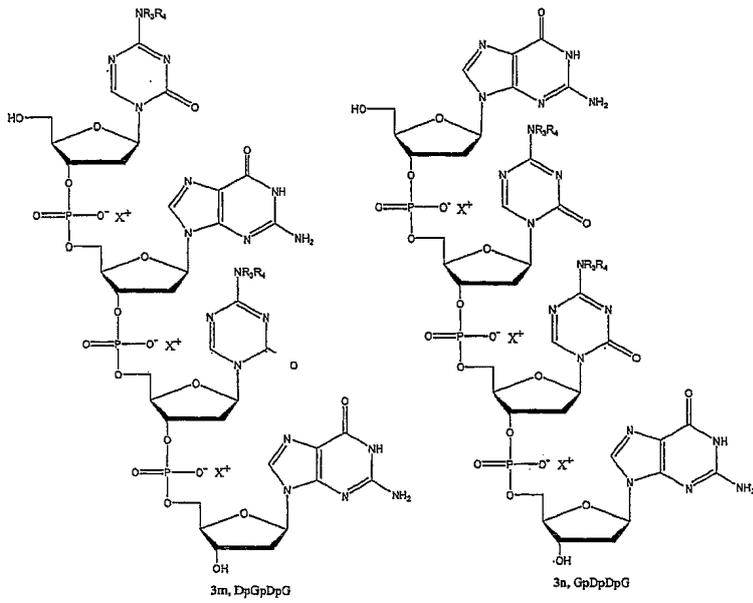
도면20



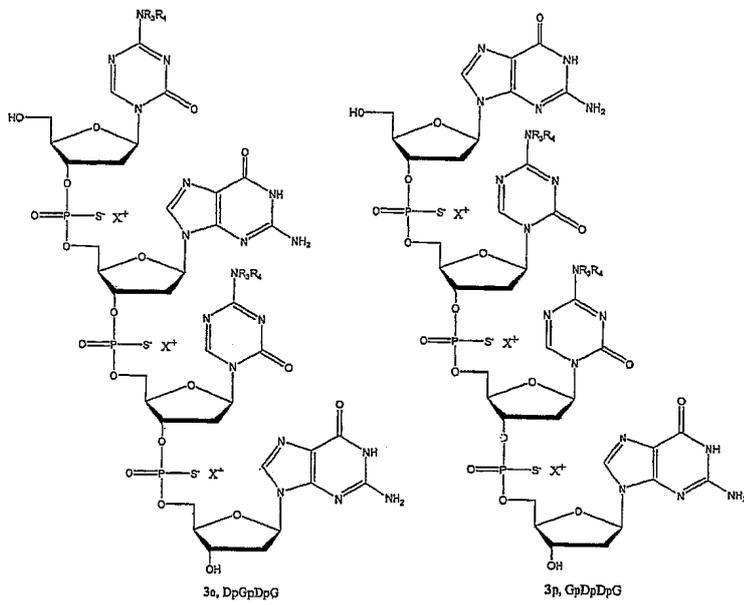
도면21



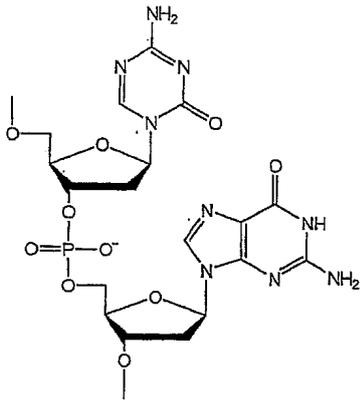
도면22



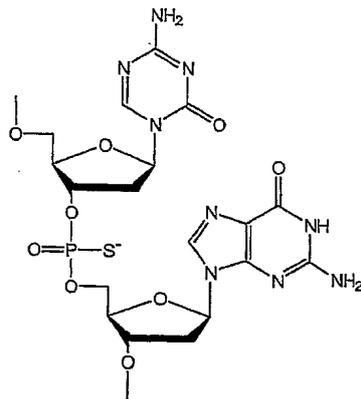
도면23



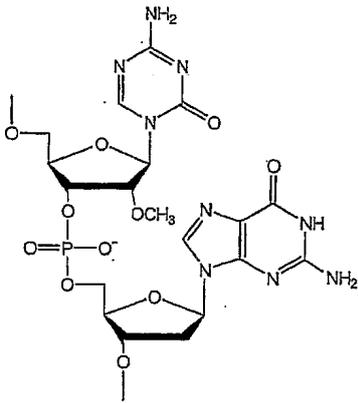
도면24a



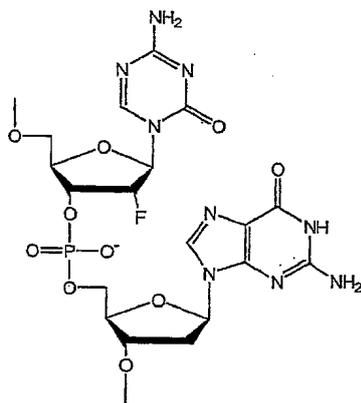
자연 포스포디에스테르 골격을 가진 -DpG- 섬



포스포로티오에이트 골격을 가진 -DpG- 섬

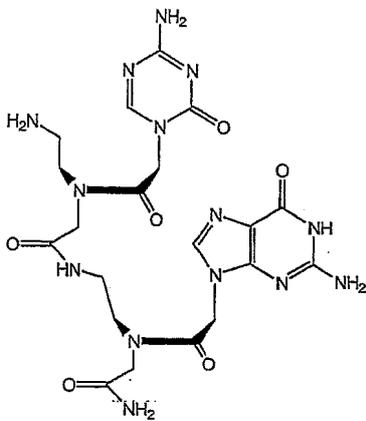


2'-메톡시 리보스 포스포디에스테르 골격을 가진 -DpG- 섬



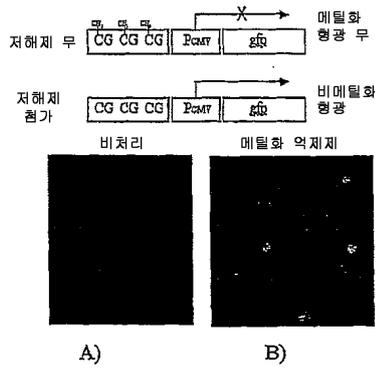
2'-플루오로 리보스 포스포디에스테르 골격을 가진 -DpG- 섬

도면24b



펩티드 골격을 가진 -DpnaC- 섬

도면25



도면26

- 서열번호 1 TpTpDpxGpDpxGpApA
- 서열번호 2 TpGpxCpCpTpDpxGpT
- 서열번호 3 ApGpGpxDpApCpApGpxDpA
- 서열번호 4 GpTpGpxDpApGpxDpA
- 서열번호 5 ApApDpxGpGpGpxDpGpGpxDpGpG
- 서열번호 6 CpApDpxGpGpxDpGpxDpGpG

도면27

P15 프로모터 부위 서열(서열번호 7)

```

tttttcattcagtcacttgcttcgcgaagctcacacatctgctcgtgcaagattctcagtcattttac
ttagtcattgggtctttccctatcaccattctttatgtcccccctcaagaaaaacattatcttccattcctttatocaaact
ccaaacagcttttcaatctttctgacatatttactacctaaagaaaatggctcaagaattgggtagactatctgttccctaact
ttctgataagtttcagagaaactcaaaaggtcaaaacaagagcataagagtaaaaggttagagaaatgaagaaactgaagac
taggaaatgggggttgggatgggaaagaaaaagaaatgtgtataatgtaaccgggttcccttccctgtccaggtggattt
cagctctgttgaggctctgtcagtagatattcagccctaacccagcacttccatgggtgggcaacttccactgccccttaa
aagaaagagcttttttaattctacagggatgtgggggtgaggagtcagagctaaaggtatcctaaaaaaacatgtgaa
gactctcattttgcaatacaccaagcaattgcccctctgttaagactttgtcttccctcagcactccgaaacaaaaatgatc
tgtaaaaaaaaatgttctcatttttagggaggggtccacttatgtagtctctcaccaaaagtttttaggcaacaaatccataa
cttgggttctcttccatccaaatgtagcatccgctgaaatgttttaaatattttaagtaataaatgttgattcaaaactc
acctaggaagattaggaaggggaaaaaaagcacttggcattttaaactctcagaagagaatttaatgacaggttcagcctg
tttaatgacaagccagcaccacaccccctctcttatgatgtttcatattactcgcataaaatttctttatctactcatgat
aaataaaaaataagatacctgacaaaagtgggtttaaataagtaagagtgcaaacaaaagatttactgtacaaaatgatgaa
actgggatctcagattcttaagttataatttttttctgtctatgtgtgcccaggttgccactctcaatctcgaactagttt
tttctcttttaagggttgatccataatgcaaaaatggaaagaataaaaagcacacgcaaaaacatgattctcgggatt
ttctctatatttttgggttgactaattcaaacagaaagacacatccaaagagaaaatttgctaagtttgatacaagttatga
aacttgtaagcccaagtaactgctggggatgaatttaacttgtagacaggtgcagagctctgcttccagacatctta
agaaaacggagttattttgaatgacttctctcgggtccaaagggagccaccacgctcaccagtgaaacccactggct
ggctgaaggaaacagaaatctctgctcctactggggatttaggagctgagggcaggtgggaacattccaaaaatata
gcttggcttactggacatccagcagcagtgacagccagcattctcggggctccctggcccagctctcgggcagtgcg
tccatagcactctttgggcaggcttccccccctcgtgacgctcggcccgggctcggctcccgggcagatccagcgggacag
ggggcggagcctaaaggggtggggagacgcggccctctggcccajctgaaacggaaatctcttgccggctggctccccca
ctctgcagagcagggcggggcagtgaggactccgcgacgcctccgcaacctgcccggccagagcggcttgagctcggctg
cgtccgcctaggccttttccagaaagcaatccagggcgcggccggctggttcttgagccagggaaagccgggagcta
acgaccggccgctcggccactgcagggggcccaagccgcagaaaggacggggagggtaataagctgagccaggtct
ctagggaaggagagtgccggccggagcagcgtgggaaagaaagggaagtgctcgttaagtttacggccaaacgggtggatta
tcggggccgctgcccgtctgggggtcgggaatgcccagagagaaacaaaggcagtcgccagtgggggcggcagcg
    
```

- 서열번호 8 TTCGCGAA
- 서열번호 9 TGCCTCGT
- 서열번호 10 TGCCGGCT
- 서열번호 11 CGGCCCGG
- 서열번호 12 GCTCGGCT

도면28

P16 프로모터 부위 서열(서열번호 13)

cggaagagggggagaaacagacaacggggcggcggggagcagcatggagccggcggcggggagcagcatggag  
 ccttcggctgactggctgggcacggccggcggcccggggtcgggttagaggaggtgcgggcgctgctggaggcggggcgct  
 gcccaacgcaccgaatagttacggtcgggagccgatccaggatcatgatgatgggcagcggccgagtgccggagctgctgc  
 tgcctccacggcggcggagcccaactggcggccgaccccgcaactctcaccggaccctgcaacgacgctgcccggagggcttc  
 ctggacacgctggctggctgcaocggggcggggcggcggctggacgtgcggatgcctggggcggctctgcccgtggacct  
 ggctgaggagctgggccaacggatgctgcacggtaacctgcggcggctgcggggggcaccagaggcagtaacctgccc  
 gcatagatgcccgggaaggctccctcagacatccccgattgaaagaaaccaagaggctctgagaaaacctcgggaaaacttag  
 atcatcagtcacggaggctcctacaggggcccaactgccccggcacaacccaccggcttctgtagttttcatttagaa  
 aatagagcttttaaaaatgctcctgcttttaacgtagatataagccttccccactacogtaaatgtccatttataatcat  
 tttttatatatttataaaaaatgtaaaaaagaaaaaacacogctctgccttttccactggtgttgagttt  
 tctggagtgagcactcaccgcccgaagcagatctcatgtgggcatttcttgaggccctcagcagcctcgggaagctgtoga  
 cttcatgacaagcattttgtgaactagggagctcaggggggttactggcttctcttgagtcacaotgctagcaaatggc  
 agaaccaaaagctcaataaaaaataaataattttcattcattcactc

- 서열번호 14 AACGGGCGGCGG
- 서열번호 15 CACGGCCGGG
- 서열번호 16 CGGGCGGC
- 서열번호 17 AGCAGCAT
- 서열번호 18 CCGCCGAC

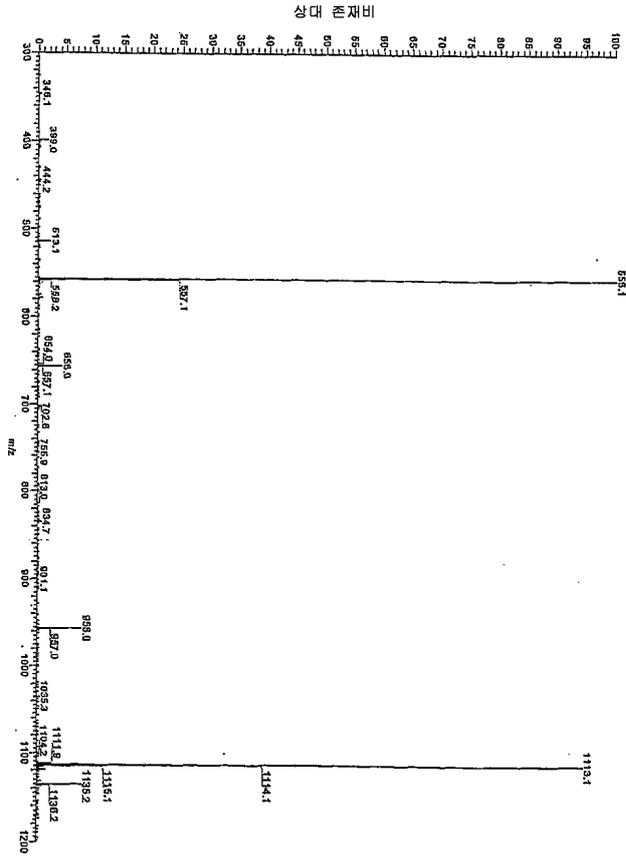
도면29

BRCA1 프로모터 부위 서열(서열번호 19)

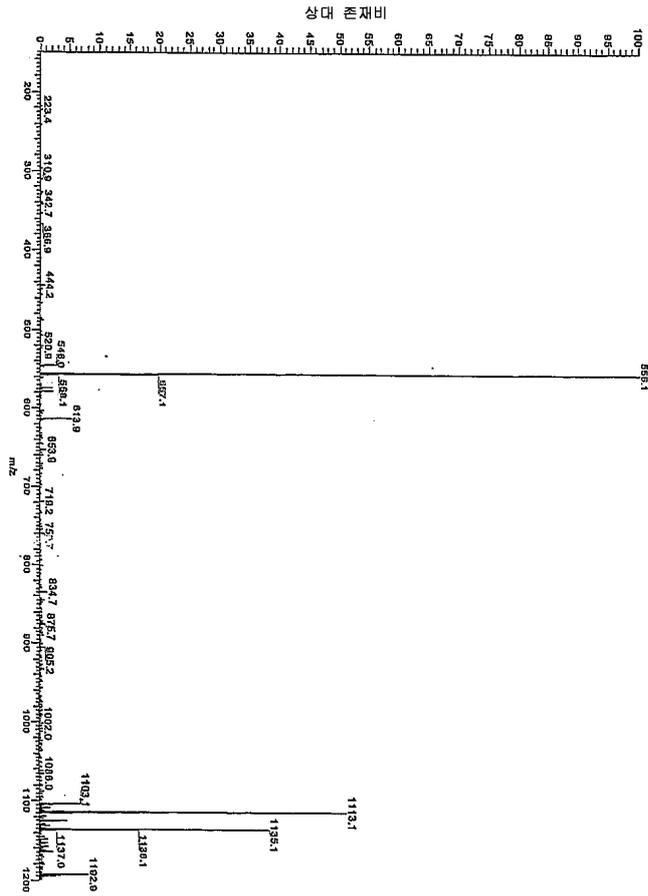
ccacctaatgtactgaattgcaattgatagttgttctagcagtgaaagagataaagaaaaaaaaagtaca  
 accaaatgcccagtcaggcacagcagaacctacaactcatggaaggtaagaaacctgcaactggagccaaagaagagtaac  
 aagccaaatgaaacagacaagtaaaagacatgacagcgatacttcccagagctgagtttaacaaatgcacctgggtcttt  
 tactaagtgttcaaataccagtgacttaagaatttgcatactctagccttccaagagaaagaaaaagaagagaaactag  
 aaacagttagtgctcaataatgctgaagaccccaagatctcatgtaagtggagaaaggggttttgcaaaactgaaagato  
 tstagagtagcagctatttcttggtacctggctactgattatggcactcaggaaagtatctgtaactgggaagttagca  
 ctctagggaaggcaaaaaacagaaacaaataatgtgtgagtcagtgctgcagcatttgaaaaaccccaaggactaattcat  
 gggtgttccaagataatagaatgacacagaaggctttaagatccattgggacatgaagtaaccacagtcgggaaac  
 aagcatagaatggaagaa

- 서열번호 20 AGGCACAGCA
- 서열번호 21 GTGCAGCA
- 서열번호 22 CAGCGATA
- 서열번호 23 TAGCAGTG
- 서열번호 24 AGGCTTTA

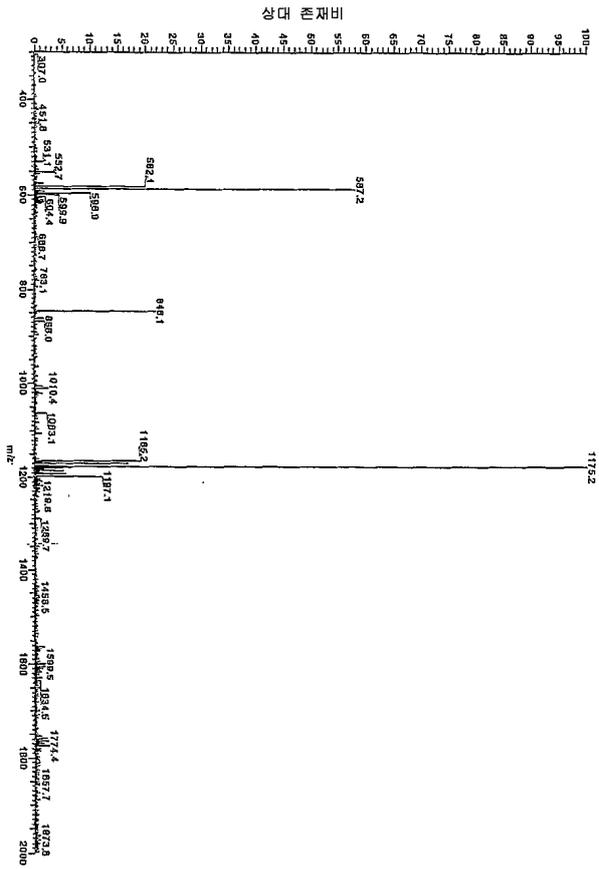
도면30



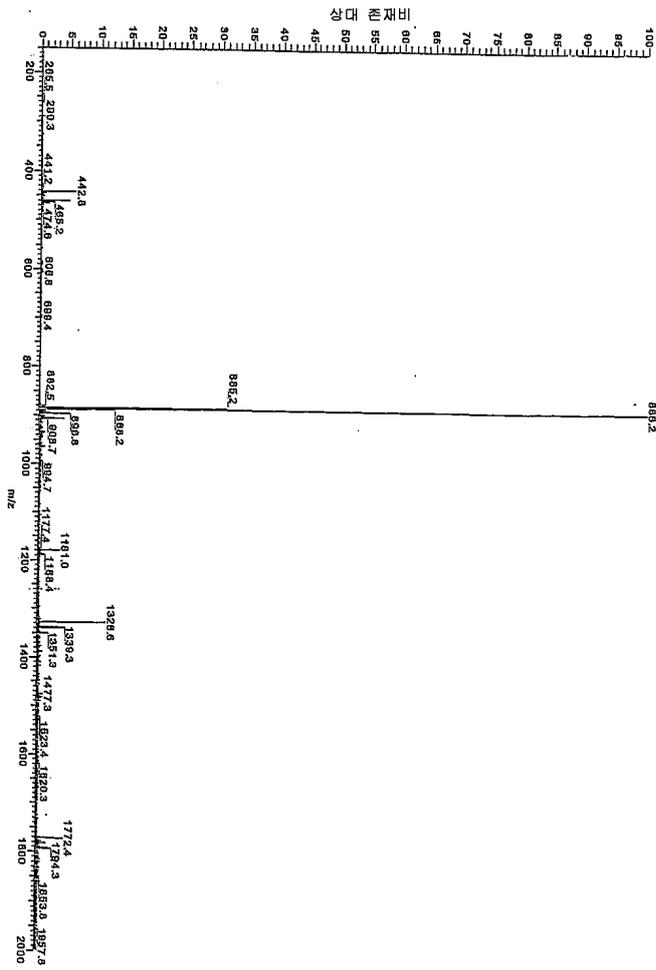
도면31



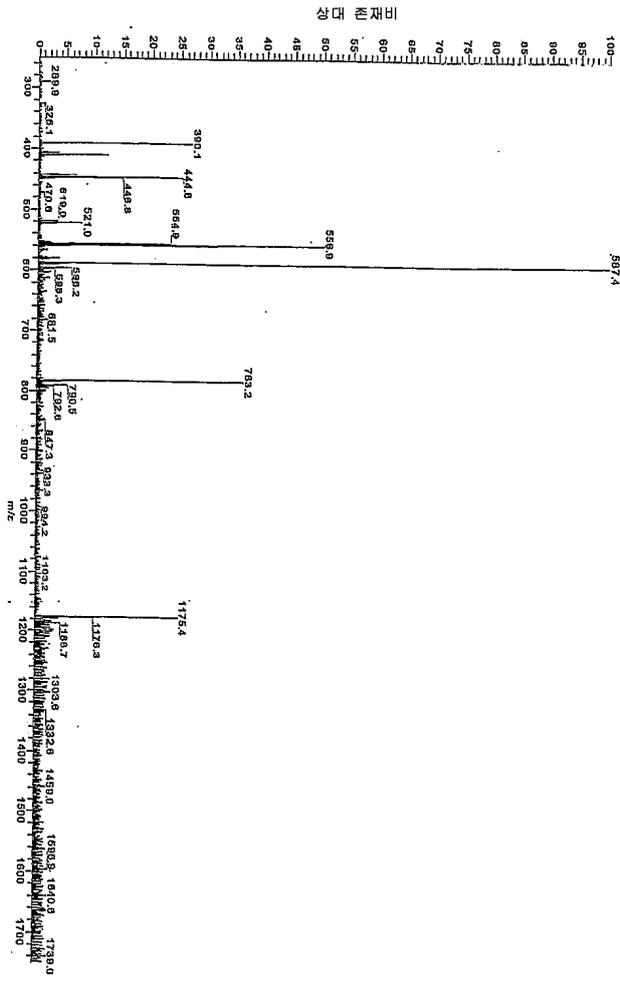
도면32



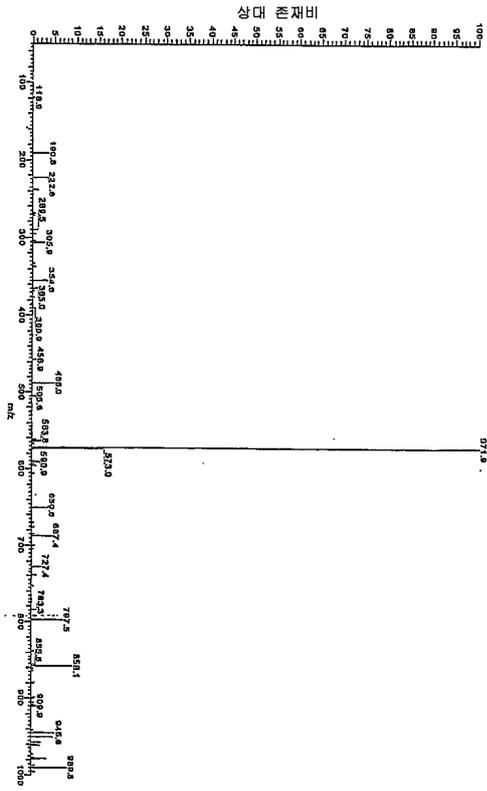
도면33



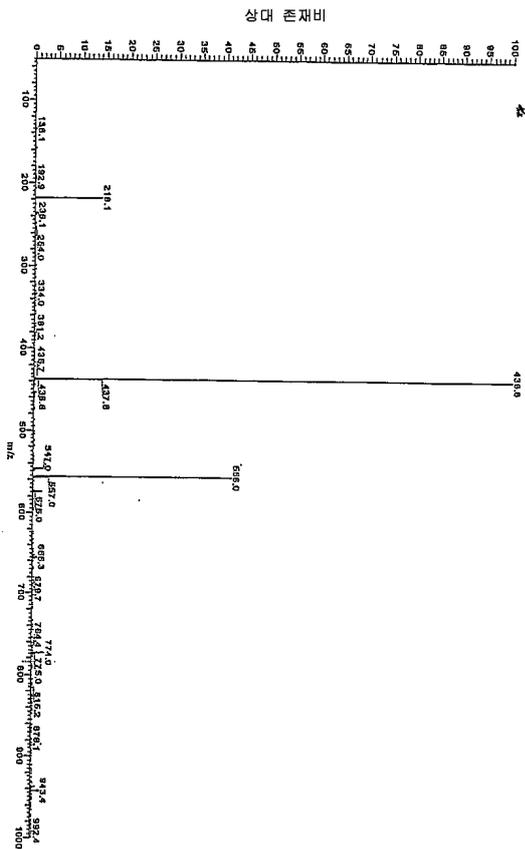
도면34



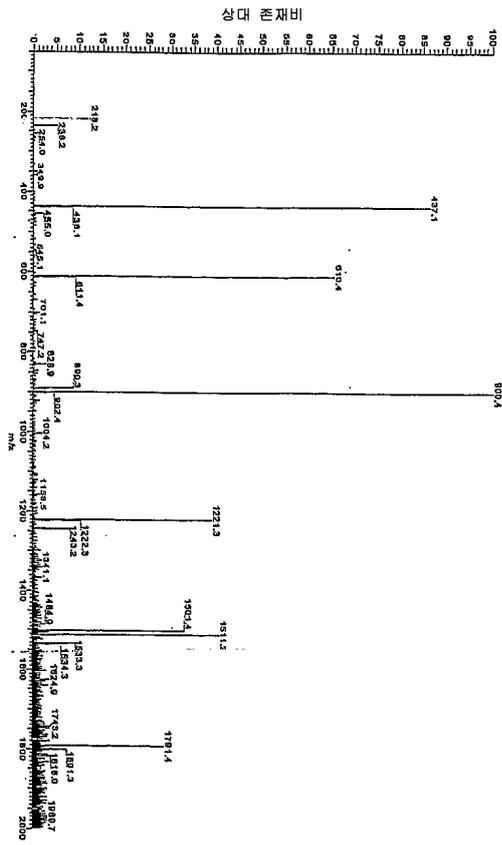
도면35



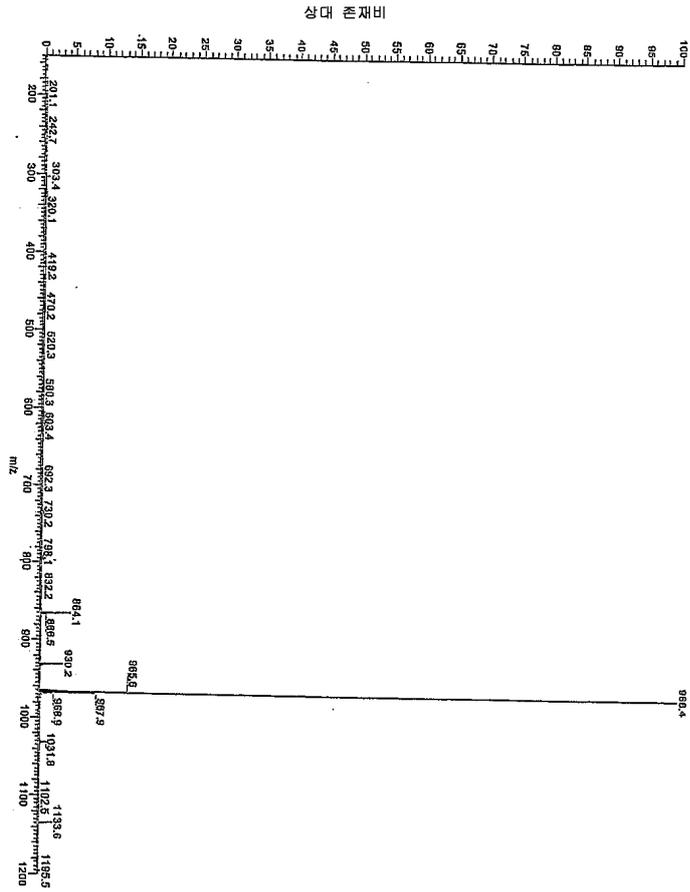
도면36



도면37



도면38



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SUPERGEN, INC.

Phiasivongsa, Pasit

Redkar, Sanjeev

<120> OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUES INCORPORATING 5-AZA-CYTOSINE

THEREIN

<130> 12636-350.601

<160> 33

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide analogue targeting a segment of P15 promoter regi

on  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (5)..(5)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <220><  
 221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <400> 1  
 ttngngaa 8  
 <210> 2  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Oligonucleotide analogue targeting a segment of P15 promoter regi

on  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <400> 2  
 tgcctngt 8  
 <210> 3  
 <211  
 > 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Oligonucleotide analogue targeting a segment of BRCA1 promoter re

gion  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (4)..(4)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <400> 3

aggnacagna 10  
 <210> 4  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Oligonucleotide analogue targeting a segment of BRCA1 promoter re

gion  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (4)..(4)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (7)..(7)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <400> 4

gtgnagna 8  
 <210> 5  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Oligonucleotide analogue targeting a segment of P16 promoter regi

on  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (7)..(7)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <400> 5

aangggnggn gg 12  
 <210> 6

<211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Oligonucleotide analogue targeting a segment of P16 promoter regi  
 on  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <

220><221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (8)..(8)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue

<400> 6  
 cangngngg 10

<210> 7  
 <211> 2144  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 7

tttttcattc agtcaacttg cttcgcgaag ctcacacatc tgcctcgtgc aagattctca 60  
 gtcattttac ttagtcattg gttctttccc taccaccatt ctttatgtcc ccctcaaaga 120  
 aaaacattat cttccatttc cttatcaact ccaaacagct ttcatttttc tgacatattt 180  
  
 actacctaag aaaatggctc aagaattggg tagactatct tgcctaact tttctgataa 240  
 gtttcagaga aactcaaagg tcaaaacaag agcataagag taaaggtaga gaaattaaga 300  
 aactgaagac taggaaatgg gggttgggat gggaaagaaa aagaattgt tataatgcta 360  
 cccggttccc ttcctgtcc aggtggattt cagctctgtt gaggetctgt cagtagatat 420  
 tcagccctaa ccagcacttc catggtgggtg gcacttccac tgcctttta aagaaagagc 480  
 tttttttaat tctacagga tttgggggat gaggagtcag agctaaggta tcctaaaaaa 540  
 aacatgtgaa gactctcatt ttgcaataca caagcaattg ccctcctgtt aagactttgt 600  
  
 cttcctcagc actccgaacc aaaatgattc tgtaaacaaa aattgttcac ttttaggaga 660

ggtccactta tgcagttcct caccaaagt tttaggcaac aaatccataa ctgctgggtc 720  
 tcttcctatc caatgtagca tccgctgaaa tgttttaaat attttaagta ataaatgttg 780  
 attcaaactc acctaggaag attaggaagg ggaaaaaaag cacttggcat ttaaactctc 840  
 agaagagaat ttaatgacag gttcagcctg tttaatgaca agcccagcac cacaccctc 900  
 tcttatgatg tttcattatt actgcataaa tttcctttat tactcatgat aaataaaaat 960  
 aagatacctg acaaagtggg tttaaatagg taagagtgca aacaaagatt tactgtacaa 1020  
  
 atatgatgaa actgggatct cagattctta aagtataatt tttttgtct tatgtgtgcc 1080  
 aggttgccac tctcaatctc gaactagttt ttttctcttt taagggttgt atccataatg 1140  
 caaaaatgga aagaattaaa aagcacacgc aaaacatgat tctcgggatt tttctctatt 1200  
 tttatggttg actaattcaa acagaaagac acatccaaga gaaaattgct aagtttgata 1260  
 caagtatga aacttgtgaa gcccaagtac tgcttgggga tgaatttaac ttgtatgaca 1320  
 ggtgcagagc tgcgctttc agacatctta agaaagacgg agttattttg aatgactttc 1380  
 tctcggtcac aaggagacca ccaactctc cacagtgaaa ccaactggct ggctgaagga 1440  
  
 acagaaatcc tctgctccgc ctactgggga ttaggagctg agggcagtgg tgaacattcc 1500  
 caaaatatta gccttggctt tactggacat ccagcgagca gtgcagccag cattcctggc 1560  
 ggctccctgg ccagctctt ggcgcatgcg tcttagcacc tttgggcagg ctccccgcc 1620  
 ctctgacgc gtcggcccgg gcctggcctc ccggcgatca cagcggacag gggcgaggagc 1680  
 ctaaggggtt ggggagacgc cggccccttg gccagctga aaacggaatt ctttgccggc 1740  
 tggctccca ctctgccaga gcgaggggg gcagtgagga ctccgcgac cgtccgcacc 1800  
 ctgcccagc agcggctttg agctcggctg cgtccgcct aggcgctttt tcccagaagc 1860  
  
 aatccaggcg cccccctgg tcttgagcg ccaggaaaag cccggagcta acgaccggcc 1920  
 gctcggccac tgcacggggc cccaagccgc agaaggacga cgggagggtt atgaagctga 1980  
 gccaggtct cctaggaagg agagagtgcg ccggagcagc gtgggaaaga agggaagagt 2040  
 gtcgttaagt ttacggccaa cggtggatta tccgggccgc tgcgctctg gggctgctg 2100  
 aatgcgcgag gagaacaagg gcatgccag tggggcgccg agcg 2144  
  
 <210> 8  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 8  
 ttcgcgaa 8

<210> 9  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 9  
 tgcctcgt 8  
 <210> 10  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 10  
 tgccggct 8  
 <210> 11  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 11  
 cggcccgg 8  
 <210> 12  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 12  
 gctcggct 8  
  
 <210> 13  
 <211> 987  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 13  
 cggagagggg gagaacagac aacgggcggc ggggagcagc atggagccgg cggcggggag 60  
 cagcatggag ccttcggctg actggctggc cacggccgcg gcccggggtc gggtagagga 120  
 ggtgcgggcg ctgctggagg cgggggcgct gcccaacgca ccgaatagtt acggtcggag 180  
 gccgatccag gtcatgatga tgggcagcgc ccgagtggcg gagctgctgc tgctccacgg 240  
 cgcggagccc aactgcgceg accccgccac tctcaccga cccgtgcacg acgctgcccc 300

ggagggcttc ctggacacgc tgggtggct gcaccgggcc ggggcgcggc tggacgtgcg 360

cgatgcctgg ggccgtctgc ccgtggacct ggctgaggag ctgggccatc gcgatgtcgc 420

acggtacctg cgcgcggctg cggggggcac cagaggcagt aaccatgccc gcatagatgc 480

cgcggaaggt ccctcagaca tccccgattg aaagaaccag agaggctctg agaaacctcg 540

ggaaaacttag atcatcagtc accgaaggtc ctacagggcc acaactgccc cggccacaac 600

ccaccccgtt ttcgtagttt tcatttagaa aatagagctt ttaaaaatgt cctgcctttt 660

aacgtagata taagccttcc cccactaccg taaatgtcca tttatatcat tttttatata 720

ttcttataaa aatgtaaaaa agaaaaacac cgcttctgcc ttttactgt gttggagttt 780

tctggagtga gcactcacgc cctaagcgca cattcatgtg ggcatcttct gcgagcctcg 840

cagcctccgg aagctgtcga ctcatgaca agcattttgt gaactagga agctcagggg 900

ggttactggc ttctctttag tcacactgct agcaaatggc agaaccaaag ctcaaataaa 960

aataaaataa ttttcattca ttcactc 987

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> homo sapien

<400> 14

aacgggcggc gg 12

<210> 15

<211> 10

<212> DNA

<213> homo sapien

<400> 15

cacggcgcgg 10

<210> 16

<211> 8

<212> DNA

<213> homo sapien

<400> 16

cgggcggc 8

<210> 17

<211> 8

<212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 17  
 agcagcat 8  
 <210> 18  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 18  
 gcgccgac 8  
 <210> 19  
  
 <211> 649  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 19  
 ccacctaatt gtactgaatt gcaaattgat agttgttcta gcagtgaaga gataaagaaa 60  
 aaaaagtaca accaaatgcc agtcaggcac agcagaaacc tacaactcat ggaaggtaaa 120  
 gaacctgcaa ctggagccaa gaagagtaac aagccaaatg aacagacaag taaaagacat 180  
 gacagcgata ctttcccaga gctgaagtta acaaatgcac ctggttcttt tactaagtgt 240  
 tcaaatacca gtgaacttaa agaatttgtc aatcctagcc ttccaagaga agaaaaagaa 300  
 gagaaactag aaacagttag tgtctaataa tgctgaagac cccaagatc tcatgttaag 360  
 tggagaaagg gttttgcaaa ctgaaagatc tntagagagt agcagtattt catttgtacc 420  
  
 tggtagctgat tatggcactc aggaaagtat ctcgttactg gaagttagca ctctagggaa 480  
 ggcaaaaaca gaaccaata aatgtgtgag tcagtgtgca gcattgaaa accccaaggg 540  
 actaatcat ggttgttcca aagataatag aatgacaca gaaggcttta agtatccatt 600  
 gggacatgaa gtttaaccaca gtcgggaaac aagcatagaa atggaagaa 649  
 <210> 20  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 20  
 aggcacagca 10  
 <210> 21

<211> 8  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 21  
  
 gtgcagca 8  
 <210> 22  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 22  
 cagcgata 8  
 <210> 23  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 23  
 tagcagtg 8  
 <210> 24  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> homo sapien  
 <400> 24  
 aggcttta 8  
 <210> 25  
  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Sequence template for oligonucleotide analogue as DNA methyltrans  
           ferase inhibitor  
 <400> 25  
 ctggatcctt gccccgcccc ttgaatcecc 30  
 <210> 26  
 <211> 30

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Sequence template for oligonucleotide analogue as DNA methyltransferase inhibitor  
 <400> 26  
 gggaattcaa atgacgtcaa aaggatccag 30  
 <210> 27

<211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Sequence template for oligonucleotide analogue as DNA methyltransferase inhibitor  
 <400> 27  
 cctaceccacc ctggatcctt gccccgcccc ttgaattccc aaccctccac 50  
 <210> 28  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Sequence template for oligonucleotide analogue as DNA methyltransferase inhibitor  
 <400> 28  
 atccttgccc cgccccttga at 22  
 <210> 29

<211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Sequence template for oligonucleotide analogue as DNA methyltransferase inhibitor  
 <400> 29  
 ttgccccgcc cctt 14  
 <210> 30  
 <211> 30  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> Oligonucleotide analogue as DNA methyltransferase  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <400> 30  
 ctggatcctt gccngcccc ttgaattccc 30

<210> 31  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Oligonucleotide analogue with hairpin conformation  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <400> 31  
 ctgaanggat ngtttcgatc cgttcag 27

<210> 32  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Oligonucleotide analogue  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <220><221> misc\_feature<222> (5)..(5)  
 <223> n = 5-aza-cytosine as base residue  
 <400> 32  
 ttngngaa 8

<210> 33

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementary strand of SEQ ID:30

<400> 33

ttcgcaa

8