(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월07일
(11) 등록번호 10-1294131
(24) 등록일자 2013년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7028308
(22) 출원일자(국제) 2006년02월13일
심사청구일자 2010년12월20일
(85) 번역문제출일자 2007년12월04일
(65) 공개번호 10-2008-0011426
(43) 공개일자 2008년02월04일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2006/000216
(87) 국제공개번호 WO 2006/122464
국제공개일자 2006년11월23일
(30) 우선권주장
200510069576.4 2005년05월17일 중국(CN)
(56) 선행기술조사문헌
WO2001097843 A2
WO2001022972 A2

(73) 특허권자
창춘 후아푸 바이오테크놀로지 씨오., 엘티디.
중국 질린 130000 창춘 신민 스트리트 4-28/1102-54
(72) 발명자
왕 리-잉
중국 베이징 100101, 차오양 디스트릭, 노오스 스타 이스트 로드넘버 8, 휘 유안 서비스 아파트멘트 엔-1401
바오 무-셍
중국 베이징 100101, 차오양 디스트릭, 노오스 스타 이스트 로드넘버 8, 휘 유안 서비스 아파트멘트 엔-1401
유 용-리
중국 베이징 100101, 차오양 디스트릭, 노오스 스타 이스트 로드넘버 8, 휘 유안 서비스 아파트멘트 엔-1401
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 17 항 심사관 : 최준호

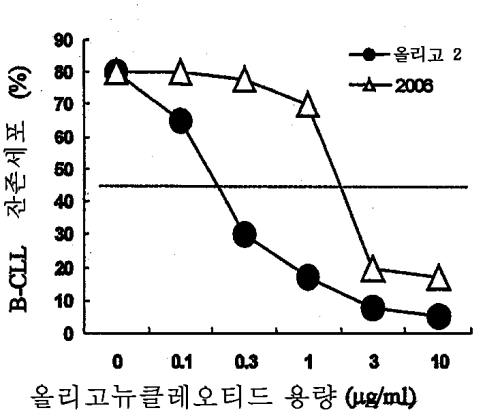
(54) 발명의 명칭 **하나의 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체, 이들을 함유한 조성물 및 B세포 종양의 치료 방법**

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1의 서열을 가진 하나의 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체(functional homologues) 또는 상기 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체를 함유한 조성물 및 상기 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체 또는 상기 올리고뉴클레오티드를 함유한 조성물을 사용하여 B세포 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

상기 올리고뉴클레오티드는 B세포 종양세포의 에이포토시스(apoptosis)를 유발하며, B세포 종양세포 상에서 CD40의 조절을 향상하고 B세포 종양세포에서 IL-10의 생성을 촉진한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 서열을 가진 올리고뉴클레오티드를 함유한, B세포 종양의 치료를 위한 의약조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 치료가 B세포 종양세포의 에이포토시스(apoptosis)를 유발하는 것을 포함하는, 의약조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 치료가 B세포 종양세포 상에서 CD40을 업레규레이팅(up-regulating)하는 것을 포함하는, 의약조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 치료가 B세포 종양세포에 IL-10의 생성을 자극하는 것을 포함하는, 의약조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 B세포 종양이 B세포 백혈병, B세포 림프종 또는 골수종인, 의약조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 B세포 백혈병이 B세포 만성 림프성 백혈병 또는 B세포 급성 림프성 백혈병인, 의약조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서,

B세포 림프종이 소림프 구성 림프종인, 의약조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 의약조성물이 경장 투여(administering enterally), 비경구 투여, 또는 국소투여 또는 흡인투여를 하는, 의약조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

(1) 서열번호 1의 서열을 가진 올리고뉴클레오티드와,

(2) 항 B세포 종양제를 함유하는

B세포 종양 치료용 의약조성물.

청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 항 B세포 종양제가 화학요법제, 면역요법제 또는 방사선요법에서 사용되는 작용물질(agents)인, 의약조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 화학요법제가 플루다라빈 모노포스페이트(fludarabine monophosphate), 펜토스타틴(pentostatin), 빈크리스틴(vincristine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide) 및 프레드니손(prednisone)으로 이루어진 군에서 선택하는, 의약조성물.

청구항 19

제 17항에 있어서,

상기 화학요법제가, 시클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손으로 구성된 CVP 화학요법제; 그리고 시클로포스파미드, 독소루비신(doxorubicin), 빈크리스틴 및 프레드니손으로 구성된 CHOP 화학요법제로부터 선택되는, 의약조성물.

청구항 20

제 17항에 있어서,

상기 면역요법제가 항 CD20 항체인, 의약조성물.

청구항 21

제 17항에 있어서,

상기 방사선요법은 체외조사(external radiation) 또는 방사성 표지 항체 치료(radiolabeled antibody treatment)인, 의약조성물.

청구항 22

제 16항에 있어서,

상기 B세포 종양이 B세포 백혈병, B세포 림프종 또는 골수종(myeloma)인, 의약조성물.

청구항 23

제 22항에 있어서,

상기 B세포 백혈병이 B세포 만성 림프성 백혈병 또는 B세포 급성 림프성 백혈병인, 의약조성물.

청구항 24

제 22항에 있어서,

상기 B세포 림프종이 소 림프구성 림프종인, 의약조성물.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 서열번호 1로 나타낸 서열(Sequences)을 가진 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체(functional homologue), 이들을 함유한 조성물 및 상기 올리고뉴클레오티드를 사용하여 B세포(B cell) 종양세포의 에이포토시스(apoptosis)를 유발하여, B세포 종양세포 상에서 CD40을 업레규레이팅하고(up-regulating)하며, 또 B세포 종양세포를 자극하여 IL-10을 생성함으로써 B세포 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

[0002] 상기 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체는 단독으로 또는 화학요법제, 면역요법제 및 방사선(radiation)과 병용함으로써 B세포 종양을 치료할 수 있다.

배 경 기 술

[0003] 세계보건기구 시스템(WHO system)(참고문헌 : American Journal of Surgical Pathology, 1997, 21(1): 114-121)에 의해 림프성 악성질환(lymphoid malignancies)은 다음 3가지의 주요분류, 즉 B세포 종양(B-cell neoplasm), T세포(T-cell)/내튜럴킬러세포[natural killer (NK)-cell] 종양 및 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphomas)으로 구분하였다.

[0004] 상기 B세포 종양은 다음 2가지 그룹(group)으로 더 분류한다:

[0005] 전구 B세포 종양(precursor B-cell neoplasm) 및 말초 B세포 종양(peripheral B-cell neoplasm). 전구 B세포 종양에는 전구체 B-급성림프 아구성 백혈병(B세포 급성 림프 아구성 백혈병)(precureor B-acute lymphoblastic leukemia)(B-cell acute lymphoblastic leukema: B-ALL)/림프아구성 림프종(lymphoblastic lymphoma:LBL)을 포함한다.

[0006] 말초 B세포 종양에는 B세포 만성 림프성 백혈병(B-cell chronic lymphocytic leukemia)(B-CLL), 소 림프구성 림프종(small lymphocytic lymphoma), B세포 전림프성 백혈병(B-cell prolymphocytic leukemia), 림프 형질 세포성 림프종/면역 세포종(immunocytoma), 외투세포 림프종(mantle cell lymphoma), 여포성 림프종(follocular lymphoma), 피부 여포성 림프종(cutaneous follicular lymphoma), MALT 형(type) 절외성 외연변층 B세포 림프종(extranodal marginal zone B-cell lymphoma), 절성 연변층 B세포 림프종(nodal marginal zone B-cell lymphoma)(+/- 단구상 B세포), 비성 연변층 림프종(splenic marginal zone lymphoma)(+/- 융모상 림프구(villous lymphoma)), 유모상 세포 백혈병(hairy cell leukemia), 형질세포종(plasmacytoma)/형질세포 골수종(plasma cell myeloma), 비만성 대 세포형 B세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 종격(흉선) 대 세포형 B세포 림프종(mediastinal(thymic) large B cell lymphoma), 혈관내 대 세포형 B세포 림프종(intravascular large B-cell lymphoma), 원발성 삼출액 림프종(primary effusion lymphoma) 및 버킷트 림프종(Burkitt's lymphoma)을 포함한다.

[0007] B세포 만성 림프성 백혈병(B-CLL)과 B세포 급성 림프 아구성/림프성 백혈병(B-ALL)은 2가지 타입의 B세포 백혈병이다.

[0008] 상기 B-CLL 세포는 CD19, CD5 및 CD23을 발현한다(참고문헌 : Nicholas Chiorazzi, M.D., 등, N Engl J. Med.

2005;352:804-15).

[0009] 상기 B-ALL 세포는 CD19 + CD10 + 표지(markers)를 발현한다.

[0010] 소 세포성 림프종(Small lymphocytic lymphoma)은 B세포 종양이다. 소 림프구성 림프종에서 B세포의 모노클론 모집단은 CD19, CD5 및 CD23(참고문헌 : Catherine Thieblemont, 등, Blood. 2004;103:2727-2737)을 발현한다.

[0011] 진단한 B세포 종양에 따라, 현행 치료선택에는 화학요법, 방사선요법 및 면역요법이 있다.

[0012] 정상 B림프구 및 수상 세포(dentritic cells)의 세포표면 상에서 발현된 CD40은 종양 괴사 인자 수용체(tumor necrosis factor receptor)(TNFR) 계통군(family) 중 하나의 멤버이다. T림프구 상에서 발현된 CD40L(CD154)은 종양 괴사 인자 계통군 중 하나의 멤버이다(참고문헌 : Castle BE 등, J. Immunol. 1993; 151: 1777-1788).

[0013] CD40L과 CD40의 상호작용은 B림프구, 수상 세포 및 단구(monocytes)의 증식, 분화(differentiation) 및 항원제시(antigen presentation)를 촉진한다(참고문헌 : Ranheim EA, 등, J. Exp. Med. 1993; 177:925-935; Yellin M.J. 등, J. Immunol. 1994; 153:666-674; Banchereau J. 등, Annu. Rev. Immunol. 1994; 12: 881-922; M.von Bergwelt-Baildon MS. 등, Blood 2002; 99: 3319-3325).

[0014] 또, CD40은 B세포 종양세포(B cell neoplastic cells) 상에서 발현한다.

[0015] 상기 CD40의 발현을 높혀(enhancing) B세포 종양세포의 에이포토시스(apoptosis)를 촉진하는 것을 실증하였다(참고문헌:Peter Chu 등, PNAS, March 19, 2002, vol. 99, no: 6 3854-3859; Frank Dicker 등, BLOOD, 15 April 2005; Volume 105, Number 8: 3193-3198).

[0016] 생체외(실험관내) 및 생체내 양쪽 실험에서, CD40의 자극 및 업레규레이션(up-regulation)에 의해 B세포 종양세포의 성장저해를 유발하였음을 나타내었다(참고문헌:Funakoshi 등, Blood 83: 2787-2794, 1994; Murphy 등, Blood 86: 1946-1953, 1995; Eliopoulos, A. G., 등, 1996, Oncogene 13:2243; Hirano, A, 등, 1999, Blood 93:2999; Tong, A. W., M 등, 2001, Clin. Cancer Res. 7:691).

[0017] B세포 종양세포 상에서 CD40의 발현의 촉진은 B세포 종양세포의 항원성을 증강하여, 결과적으로 그 종양세포에 특이적인 세포상해성 T림프구(cytotoxic T lymphocyte : CTL)의 생성을 촉진하는 것으로 보고 되었다.

[0018] 상기 CTL(세포상해성 T림프구)은 B세포 종양세포를 효율적으로 킬링(killing)할 수 있다(참고문헌:Dilloo D 등, Blood. 1997;90:1927-1933; Kato K, 등, J. Clin Invest. 1998;101:1133-1141; Wierda WG, 등, Blood, 2000;96:2917-2924; Takahashi S, 등, Hum Gene Ther. 2001;12:659-670; Takahashi S, 등, Cancer Gene Ther. 2001;8:378-387).

[0019] CD40L의 존재하에서, CD40을 발현하는 B세포 만성 림프성 백혈병 세포(B cell chronic lymphocytic leukemia cells)는 CD4 세포상해성 T림프구에 의해 킬링(killing)할 수 있다(참고문헌: Frank Dicker 등, Blood, 15 April 2005 Vol. 105, Num. 8: 3193-3198).

[0020] 버켓트 림프종(Burkett'slymphoma)의 세포 상에서 D40L과 CD40의 상호작용에 의해 그 세포에서의 종양 항원의 특이적 CTL에 대한 제시를 촉진할 수 있다(참고문헌:Khanna R. 등, 1997. J. Immunol. 159:5782).

[0021] 생체내 실험과 임상실험에서도 CD40의 활성화에 의해 B세포 만성 림프성 백혈병(B-CLL) 세포의 면역원성(immungenicity)을 증강시킬 수 있어, 결과적으로 이들 세포에 특이적인 CTL의 생성을 유발할 수 있다는 것을 나타내었다(참고문헌:Kato, K. 등, 1998.J. Clin. Invest. 101:1133; Wierda, W. G. 등, 2000. Blood 96:2917).

[0022] 동시에, 이들의 데이터에서는 B세포 종양세포(B cell neoplastic cells) 상에서 CD40의 발현을 촉진하여 B세포 종양에 대한 항종양 면역성(anti-tumor immunity)을 자극할 수 있다는 것을 나타내었다.

[0023] 항종양 면역성은 다음 특성을 포함하나, 이들에 한정되어 있는 것은 아니다:

[0024] 1. B세포 종양세포의 에이포토시스의 촉진;

[0025] 2. B세포 종양세포의 성장의 저해;

[0026] 3. B세포 종양세포의 면역원성의 증강과, 이것에 의한 상기 세포에 특이적인 CTL의 생성 촉진.

[0027] 인터류킨(interleukin)-10(IL-10)은 특정의 T세포의 세포(T cell cells), 단구, 마크로파아지와, B세포, T세포 또는 NK세포에서 발생한 신생 세포 일부에 의해 생성된 호모다이머 사이토카인(homodimer cytokine)이다(참고문

헌:Kitabayashi 등, 1995; Masood 등, 1995; Sjoberg 등, 1996; Beatty 등, 1997; Boulland 등, 1998; Jones 등, 1999).

[0028] IL-10 활성은 이것에 특이적인 세포 표면 수용체에 의해 매개 된다.

[0029] 그 수용체는 항원 제시 세포(antigen-presenting cells), 림프구(lymphocytes) 및 B세포 만성 림프성 백혈병(B-CLL) 세포 상에서 발현한다.

[0030] 외인성 IL-10의 첨가에 의해 환자로부터 새로 분리한 B-CLL 세포의 증식이 저해하였다는 것을 확인하였다(참고문헌:Jesper Juriander, Chun-Fai Lai, Jimmy Tan 등, B세포 만성 림프성 백혈병 세포 상에서 인터류킨-10 수용체 발현의 성상, Blood, Vol. 89, No 11(June 1), 1997: pp 4146-4152).

[0031] IL-10은 또 B-CLL 세포의 증식을 저해하여 B-CLL 세포의 에이포토시스(apoptosis)를 촉진하는 것으로 보고하였다[Anne-Catherine Fluckiger, Isabelle Durand 및 Jacques Banchereau; 인터류킨 10은 B-만성 림프성 백혈병 세포의 세포사멸(Apoptotic cell death)을 유발한다; J. Exp. Med. Volume 179 January 1994 91-99].

[0032] IL-10의 면역자극성 항암 특성(immunostimulating anticancer properties)은 종양 미세환경(tumor microenvironment) 내에서 IL-10의 과잉발현(over-expression)이 암면역 거절(cancer immune rejection)을 촉진할 수 있는 것으로 추정하는 논문집에서 토의 되었다(참고문헌: Simone Mocellin, Francesco M. Marincola 및 Howard A. Young; Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint, Journal of Leukocyte Biology, 2005; 78-1043-1051).

[0033] 본 발명에서, 발명자들은 올리고뉴클레오티드 및 본 발명의 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)를 사용하여 B세포 종양의 치료를 위한 방법을 제공한다.

[0034] 올리고뉴클레오티드는 B세포 종양 세포의 에이포토시스를 유발하여 B세포 종양세포 상에서 CD40 발현을 촉진하며, 또 B세포 종양세포에서 IL-10의 생성을 자극하여, 모두 B세포 종양의 치료에 기여한다.

[0035] (발명의 개시)

[0036] 첫째 예에서, 본 발명은 서열 5'-TCGTCGACGTCGTTCGTTCTC-3'(올리고-2로 지정하거나 서열번호 1로 지정)를 가진 올리고뉴클레오티드(Oligonucleotides) 및 그 기능상동체(functional homologue)를 제공한다.

[0037] 상기 올리고뉴클레이티드 또는 그 기능상동체는 부분 또는 완전 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 또는 포스포로디티오에이트 수식(phosphorodithioate modification)인 포스페이트 골격 수식을 가질 수 있다.

[0038] 그 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체는 화학수식(chemical modifications)을 가질 수 있거나, 또는 미량염기(rare bases)와의 치환을 가질 수 있다.

[0039] 그 올리고뉴클레이티드 또는 그 기능상동체는 임의의 다른 올리고뉴클레오티드 또는 어느 다른 DNA 프라그멘트의 기능부분(functional part)이거나, 또는 플라스미드(plasmid), 세균 백터(bacterial vector), 바이러스 백터(viral vector) 또는 DNA 백신에 각각 클로닝(cloning)할 수 있다.

[0040] 서열번호 1의 서열을 가진 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 염기(바람직하게는 1~10개의 염기)를 각각의 말단에 부가하거나 또는 염기들을 그 올리고뉴클레오티드 내에서 변화시켜 수식할 수 있다.

[0041] 당업자는 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 이 기술분야에서 주지된 기술내용과 본 발명에서의 교시내용을 기초로 하여 서열번호 1의 서열을 가진 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체, 서열(서열번호 1)을 가진 올리고뉴클레오티드의 1개 이상의 코피(copy)로 이루어진 단 가닥 또는 두 가닥의 DNA 프라그멘트를 사용하는 것을 결정할 수 있다.

[0042] 둘째 예에서, 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체또는 상기 올리고뉴클레오티드 또는 기능상동체 함유 조성물을 피험자에 사용하여 B세포 종양(B cell neoplasm)을 치료하는 방법을 제공한다.

[0043] 상기 피험자는 인간 또는 동물이다. B세포 종양에는 B세포 백혈병, B세포 림프종(lymphoma) 및 골수종(myeloma)을 포함하나, 이들에 한정되어 있는 것은 아니다.

[0044] 셋째 예에서, 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체또는 상기 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체 함유 조성물을 사용하여 B세포 종양세포의 에이포토시스(apoptosis)를 유도하여 B세포 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

[0045] 넷째 예에서, 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체를 또는 상기 올리고뉴클레오티드 또는 기능상동체를 함유한 조성물을 사용하여 B세포 종양세포 상에서 CD40을 업레귤레이팅(up-regulating)함으로써, B세포 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

[0046] 다섯째 예에서, 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체 또는 상기 올리고뉴클레오티드 또는 기능상동체를 함유하는 조성물을 사용하여 B세포 종양세포에서 IL-10의 생성을 자극함으로써 B세포 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

[0047] 또 다른 예에서, 본 발명은 본 발명의 치료 유효량의 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체를 단독으로 함유하거나, 또는 의약적으로 허용할 수 있는 1종 이상의 캐리어(carrier) 중에 함유하거나, 또는 그 캐리어와 함께 함유한 조성물을 제공한다.

[0048] 그 조성물은 경장 투여, 비경구 투여 및 국소 투여, 또는 흡입 투여를 할 수 있다.

[0049] 하나의 다른 예에서, 본 발명은 B세포 종양을 치료하는 방법에 있어서, 치료 유효량의 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 그 기능상동체 또는 이들을 함유하는 조성물 및 화학요법제, 면역요법제 및 방사선 요법에서 사용되는 작용물질을 포함하는 항 B세포 종양제 중 최소 1종을 함유하는 조성물을 투여하는 스텝을 함유한, B세포 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

발명의 상세한 설명

[0050] 정의

[0051] 본 발명에서 다음 용어는 아래의 의미를 가진다:

[0052] "올리고뉴클레오티드"(oligonucleotide)는 복수의 뉴클레오티드(즉, 하나의 포스페이트기와 하나의 교환할 수 있는 유기 염기에 연결된 하나의 당(suger)(예로서, 데옥시리보스)으로 이루어진 분자)를 의미한다.

[0053] 4종의 유기 염기에는 시토신(C), 티민(T), 아데닌(A) 및 구아닌(G)이 있다.

[0054] 상기 올리고뉴클레오티드는 시중에서 입수할 수 있는 자동 올리고뉴클레오티드 신세사이저(synthesizer)에 의해 합성하거나, 또는 공지기술을 사용하여 현행 핵산서열에서 제조할 수 있다.

[0055] 올리고뉴클레오티드의 "골격수식"("backbone modification")은 하나의 올리고뉴클레오티드가 하나의 포스포로티오에이트 수식 포스페이트 골격(즉, 그 포스페이트의 산소 중 최소 하나가 황에 의해 치환 됨) 또는 다른 수식 골격을 가진 것을 의미한다.

[0056] 올리고뉴클레오티드의 "화학수식"(chemical modification)은 뉴클레오티드의 활성기를 사용하거나 또는 뉴클레오티드 유사체 생성에 의한 수식을 의미한다.

[0057] 상기 수식은 올리고뉴클레오티드의 합성 중 또는 합성 후에 발생할 수 있다.

[0058] 그 합성 중에, 수식 염기(modified bases)(티미딘 유사체를 포함하나 이들에 한정되는 것은 아니다.)가 내부에 또는 5' 말단측에 결합할 수 있다.

[0059] 합성 후에, 그 수식은 활성기[아미노 수식인자(amino modifier)를 통해, 3' 또는 5' 히드록시기를 통하여, 또는 포스페이트기를 통해]를 사용하여 실시할 수 있다.

[0060] "B세포 종양"(B cell neoplasm)은 B세포구계 세포의 비정상(이상) 증식에서 발생한 질병(diseases)을 의미한다.

[0061] 그 B세포 종양은 B세포 백혈병, B세포 림프종 및 골수종(myeloma)(형질 세포종/형질 세포 골수종)으로 분류할 수 있다.

[0062] B세포 백혈병에는 B세포 만성 림프성 백혈병(B-CLL), 전구 B세포 급성 림프아구성 백혈병(precursor B-acute lymphoblastic leukemia)(B세포 급성 림프성 백혈병, B-ALL), B세포 전 림프성 백혈병(B-cell prolymphocytic leukemia) 및 유모상 세포 백혈병(hairy cell leukemia)을 포함한다.

[0063] B세포 림프종에는 소 림프구성 림프종(small lymphocytic lymphoma), 림프 형질 세포성 림프종(lymphoplasmacytic lymphoma)/면역 세포종(immunocytoma), 외투 세포 림프종(Mantle cell lymphoma), 여포성 림프종(Follicular lymphoma), 피부여포성 림프종(cutaneous follicular lymphoma), MALT 형 절외성 외변층 B세포 림프종(extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT type), 절성 외변층 B세포 림프종(nodal marginal

zone B-cell lymphoma)(+/- 단구상 B세포:monocytoid B-cells), 비장성 외변층 림프종(splenic marginal zone lymphoma)(+/- 융모상 림프구:villous lymphocytes), 비만성 대 세포형 B세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 종격(흉선) 대 세포형 B세포 림프종, 혈관내 대 세포형 B세포 림프종(intravascular large B-cell lymphoma), 원발성 삼출액 림프종(primary effusion lymphoma) 및 버킷트 림프종(Burkitt's lymphoma)을 포함한다.

[0064] "피험자"(subject)는 인간, 원숭이, 개, 고양이, 말(horse), 소(cow), 돼지, 염소, 양, 마우스(mouse) 및 랫(rat)을 포함하나 이들에 한정되지 않은 포유동물(mammal)을 말한다.

[0065] 본 발명의 올리고뉴클레이티드는 B세포 종양을 가진 피험자에 투여할 수 있다.

[0066] "항 B세포 종양제"(anti-B cell neoplasm agent)는 피험자의 B세포 종양을 치료하는데 사용되는 작용물질(agent)을 의미한다.

[0067] 그 작용물질(agent)에는 본 발명의 올리고뉴클레이티드, 화학요법제, 면역요법제 및 방사선 요법으로 사용되는 작용물질을 포함한다.

[0068] 본 발명의 올리고뉴클레이티드를 1종 이상의 다른 항 B세포 종양제의 투여 전, 투여와 함께, 또는 투여 후에 투여하여 B세포 종양의 치료에서 상승 효과를 얻을 수 있다.

[0069] "화학요법제"(chemotherapeutics)는 본 발명의 올리고뉴클레오티드와 병용하여 B세포 종양을 치료하는 화학요법제를 말한다.

[0070] 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 B세포 종양의 치료에서 1종 이상의 화학요법제와 병용할 수 있다.

[0071] 상기 화학요법제에는 시클로포스파미드 또는 클로람부실(chlorambucil), 빈카 알카로이드(vinca alkaloids)(예로서, 빈크리스틴 및 빈블라스틴), 프로카르바진, 메토트렉세이트(methotrexate), 프레드니손(prednisone), 안트라시클린, L-아스파라기나아제, 푸린유사제(purine analogs)(예로서, 플루다라빈 모노포스페이트(fludarabine monophosphate), 2-클로로데옥시아데노신 및 펜토스타틴), 시토신, 아라비노시드(arabinoside), 시스플라틴, 에토포시드 및 이포스파미드(ifosfamide) 등 알킬화제(alkylating agents)를 포함하나, 이들에 한정되어 있는 것은 아니다.

[0072] 화학요법제에서는 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 또 1종 이상의 화학요법제와 병용할 수 있다.

[0073] 그 병용제에는 CVP(시클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손), CHOP(CVP 및 독소루비신), C-MOPP(시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진), CAP-BOP(CHOP+프로카르바진 및 블레오마이신), m-BACOD(CHOP+메토트렉세이트, 블레오마이신 및 류코보린), ProMACE-MOPP(프레드니손, 메토트렉세이트, 독소루비신, 시클로포스파미드, 에토포시드 및 류코보린 + 표준(standard) MOPP), ProMACE-CytaBOM(프레드니손, 독소루비신, 시클로포스파미드, 에토포시드, 사이타라빈, 블레오마이신, 빈크리스틴, 메토트렉세이트 및 류코보린), MACOP-B(메토트렉세이트, 독소루비신, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴, 고정용량의 프레드니손(fixed dose prednisone), 블레오마이신 및 류코보린), IMVP-16(이포스파미드, 메토트렉세이트 및 에토포시드), MIME(메틸-개그(methyl-gag), 이포스파미드, 메토트렉세이트 및 에토포시드), DHAP(덱사메타손, 고용량의 사이타라빈 및 시스플라틴), ESHAP(에토포시드, 메틸프레디솔론, HD사이타라빈, 시스플라틴), CEPP(B)(사이클로포스파미드, 에토포시드, 프로카르바진, 프레드니손 및 블레오마이신), CAMP(로무스틴, 미톡산트론, 사이타라빈 및 레리드니손), CHOP+블레오마이신, 메토트렉세이트, 프로카르바진, 나이트로젠 머스타드(nitrogen mustard), 시토신 아라비노시드 및 에토포시드, MOPP(메클리타민(나이트로젠 머스타드), 빈크리스틴(온코빈:Oncovin), 프로카르바진 및 프레드니손), ABVD(즉, 아드리아마이신, 블레오마이신, 빈블라스틴 및 다카르바진), ChIVPP(클로람부실, 빈블라스틴, 프로카르바진 및 프레드니손), CABS(로무스틴, 독소루비신, 블레오마이신 및 스트렙토조토신), MOPP+ABVD, MOPP+ABV(독소루비신, 블레오마이신 및 빈블라스틴) 또는 BCVPP(카르무스틴, 사이클로포스파미드, 빈블라스틴, 프로카르바진 및 프레드니손) 및 CAP(사이클로포스파미드, 독소루비신 및 프레드니손)을 포함하나, 이들에 한정되어 있는 것은 아니다.

[0074] "면역요법제"(immunotherapeutics)는 본 발명의 올리고뉴클레오티드와 병용하여 B세포 종양을 치료하는 면역요법제를 의미한다.

[0075] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 B세포 종양의 치료에서 1종 이상의 면역요법제와 병용할 수 있다.

[0076] 상기 면역요법제는 항 CD20 항체(anti-CD20 antibodies)를 포함하나, 이들에 한정되어 있는 것은 아니다.

[0077] 항 CD20 항체에는 B세포 종양세포의 세포표면 상에서 CD20 단백질과 특이하게 반응하는 면역글로불린(immunoglobulins) 및 그 프라그멘트(fragments)를 포함한다.

[0078] CD20 항체는 폴리클론항체(polyclonal antibody) 및 모노클론항체, 키메라항체, 이중 특이성 항체(bi-specific antibody) 및 인체항체(humanized antibody)로 할 수 있다.

[0079] "CD20"은 B세포 단백질(B-cell membrane protein)이며(참고문헌: Tedder 등, Immunology Today 15: 450-454(1994)), 정상(normal) 세포와 종양 B세포의 양쪽 세포 상에서 발현한다(참고문헌: John C. Byrd 등, J. Clin, Oncol. 2001; 19:2165-2170; Huhn D, 등,Blood 2001, 98: 1326-1331).

[0080] "의약적으로 허용할 수 있는 캐리어"(pharmaceutically acceptable carrier)는 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 피험자에 투여하는데 적합한 1종 이상의 고체 또는 액체 필러(filler), 희석제(diluents) 또는 캡셀화 물질(encapsulating substances)을 의미한다.

[0081] 그 캐리어는 유기물, 무기물, 천연물 또는 합성 물로 할 수 있다.

[0082] 그 캐리어에는 모든 용액, 희석제, 용매, 분산매, 리포솜(liposome), 에멀젼, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장제(isotonic) 및 흡수 지연제와 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 투여에 적합한 임의의 다른 캐리어를 포함하며, 이들의 사용은 이 기술분야에서 주지되었다.

[0083] 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 "치료 유효량"은 피험자에서 B세포 종양을 치료하는데 있어, 소정의 결과를 얻는데 사용되는 용량(dose)을 말한다.

[0084] 그 용량은 그 기술분야의 기술자에 의해 주지된 표준기술에 의해 결정할 수 있으며, 또 그 피험자의 체형 또는/및 전체 건강상태 또는 질환의 중증도(severity)(질병의 정도)를 포함하나 이들에 한정되지 않은 여러 가지의 인자(factors)에 따라 변화할 수 있다.

[0085] 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 도입은 단회치료 또는 일련의 복수회 치료에 걸쳐 실시할 수 있다.

[0086] 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 피험자 투여용량은 1회 투여당 약 1㎍ ~ 100㎎의 범위를 가진다.

[0087] 그러나, B세포 종양의 치료용량은 위에서 설명한 용량보다 10 ~ 1,000배 더 높은 용량 범위에서 사용할 수 있다.

[0088] 그 투여 처방(dosage regimen)은 최적의 치료 효과를 제공할 수 있도록 당업자에 의해 조절한다.

[0089] 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 투여하는 "경로(route)는 경장(enteral)투여, 비경구투여 및 국소투여 또는 흡입(inhalation) 투여를 의미한다.

[0090] 여기서 사용되는 용어 "경장"에는 경구(oral)투여, 위내(gastric)투여, 장내(intestinal)투여 및 직장내(rectal)투여를 포함한다.

[0091] 용어 "비경구"(parenteral)에는 정맥내투여, 복강내투여, 근육내투여, 피하투여, 직장투여 및 질내(vaginal)투여를 포함한다.

[0092] 용어 "국소"(topical)는 표피, 구강 및 귀(ear), 눈(eye) 및 코(nose)의 외부에서 상기 올리고뉴클레오티드의 적용을 의미한다.

[0093] 용어, "의약 조성물"(pharmaceutical composition)은 의약적으로 허용할 수 있는 캐리어를 동반하거나 또는 동반하지 않는 치료 유효량의 올리고뉴클레오티드를 함유한 조성물을 의미한다.

[0094] 그 조성물에는 수용액 또는 식염수, 입자(particles), 에어로졸(aerosols), 펠릿(pellets), 과립(granules), 분말(powders), 타블렛(tablets), 피복타블렛, (마이클로)캡셀, 좌제, 시럽, 에멀젼(emulsions), 현탁액, 크림, 드롭(drops) 및 여러 가지의 약제송달계(drug delivery systems)의 사용에 적합한 다른 의약 조성물을 포함하나, 이들에 한정되어 있는 것은 아니다.

[0095] 그 조성물은 주사, 경구, 구강, 직장 및 질내사용(vaginal use), 흡입 및 데포제(depot)의 적용에 적합하다.

[0096] 모든 경우, 그 조성물은 제조 및 보존의 조건하에서 무균이며, 안정하고, 미생물(균)의 오염에 대하여 보호할 필요가 있다.

[0097] 주사에서는 그 조성물이 주사할 수 있는 용액 또는 분산액의 즉석 조제용으로 수용액 또는 분산액 및 분말을 포

함한다.

[0098] 이 발명에서 "분말"(powder)은 상기 올리고뉴클레오티드를 함유한 미세분산성 고체입자를 함유하는 조성물을 말한다.

[0099] 그 분말은 사용 전에 의약적으로 허용되는 다른 캐리어(예로서, 물, PBS, 식염수 및 다른 의약적으로 허용되는 완충액)와 조합할 수 있다.

[0100] 그 용액은 1종 이상의 적합한 용제와 다른 필요한 성분 중에 상기 올리고뉴클레오티드를 혼화시켜 조제할 수 있다.

[0101] 분산액은 상기 올리고뉴클레오티드를 분산 매질(dispersion medium)(예로서, 글리세롤, 액체 폴리에틸렌글리콜 및 오일)과 다른 필요한 성분을 포함하는 비히클(vehicle)(부형제)에 혼화하여 조제할 수 있다.

[0102] 경구투여에서는, 상기 조성물을 식용 캐리어(edible carriers)와 조합하여 타블렛, 환제, 당제(dragees), 캡셀, 액체, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 형성한다.

[0103] 구강투여에서는, 상기 조성물을 통상의 방법으로 하여 타블렛(tablets) 또는 로렌지(lozenges)로 할 수 있다.

[0104] 흡입(inhalation)투여에서는, 상기 조성물을 가압팩(packs)에 의한 에어로롤 스프레이, 또는 네블라이저(nebulizer) 또는 건조분말로 하며 이 기술분야의 기술자에 의해 선택할 수 있다.

[0105] 또, 상기 올리고뉴클레오티드는 직장용 또는 질용 또는 데포(depot)용의 의약적으로 허용할 수 있는 조성물로서 조합할 수 있다.

[0106] 그 조성물 중에서 상기 올리고뉴클레오티드는 단독으로 사용하거나, 화학요법제, 면역요법제 및 표적세포의 특이적 수용체 또는 분자에 의해 인식된 리간드를 포함하나 한정되지 않은 1종 이상의 다른 작용물질(agents)과 병용할 수 있다.

[0107] 또 다른 작용물질과 병용하는 상기 올리고뉴클레오티드는 각각의 조성물로 하여 다음과 같이 사용할 수 있다:

[0108] (1) 상기 올리고뉴클레오티드가 투여 전 하나의 제 2 작용물질(second agent)과 혼합하며;

[0109] (2) 상기 올리고뉴클레오티드와 하나의 제 2 작용물질을 피험자에 시간을 달리하여 투여하며;

[0110] (3) 상기 올리고뉴클레오티드와 하나의 제 2 작용물질을 피험자의 다른 부위에 투여하도록 하는 방법으로 하여 사용할 수 있다.

[0111] 또, 그 조성물은 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 서열을 가진 플라스미드, 세균벡터, 바이러스벡터 및 핵산 백신을 함유할 수 있다.

실 시 예

[0133] 다음의 실시예는 예시적인 것으로, 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0134] 이 기술분야의 기술자에 의해 합리적으로 구상한 변형 등 여러 가지의 합리적인 변형은 여기서 본 발명의 범위 내에서 벗어남이 없이 실시할 수 있다.

[0135] 실시예 1 : 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)의 합성

[0136] 하나의 서열 5'-TCGTCGACGTCGTTCGTTCTC-3'(올리고 2로 설계함, 서열번호 1)를 가진 올리고뉴클레오티드를 설계하여 합성하였다.

[0137] 올리고 2의 기능을 분석하기 위하여, 서열 5'-tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt-3'(서열번호 2)를 가진 2006 및 서열 5'-gggggacgatcgtcgggggg-3'(서열번호 3)을 가진 2216의 2종의 대조 올리고뉴클레오티드(control oliginucleitude)도 또 합성하였다.

[0138] 3종의 올리고뉴클레오티드 모두는 상곤 바이오테크 컴파니(Sangon Biotech Company)(중국, 상하이)에서 합성하였으며, 리뮬루스 아메바세포 분해산물 아세이(Limulus amebocyte lysate assay)를 이용하여 엔도톡신(endotoxin)(내독소)에 대하여 시험하여(Associates of Cape Cod, Inc), 발열물질을 함유하지 않은 시약(pyrogen-free reagents) 중에서 조작(manipulation) 하였다.

[0139] 2006(참고문헌: J. Immunol. 2000; 164: 1617)은 정상 B세포를 강하게 활성화시켜, 충분히 연구한 올리고뉴클레

오티드이다.

[0140] 2216(참고문헌: Eur. J. Immunol. 2001; 31:2154)은 형질세포 형상의 수상 세포(plamacytoid dendritic cells)에서 다량의 타입 1 인터페론(interferon)을 유도하는, 충분하게 연구한 또 따른 올리고뉴클레오티드이다.

[0141] 그 올리고뉴클레오티드의 합성방법은 이 기술분야의 기술자에 의해 주지되었으며, 기타방법 중에서 고상 합성(solid-phase synthesis)이 일반적으로 사용되었다.

[0142] 특히, 상기 고상 합성의 프로세스에서 사용하는 고체 지지체는 다공질글라스(controlled pore glass : CPG) 비이드(bead)이다.

[0143] 이 비이드(bead)는 표면에 구멍(holes)과 채널(channels)을 가지며, 이들의 내부에 보호된(protected) 뉴클레오티드가 결합되어 있다.

[0144] 올리고뉴클레오티드 합성은 3'-말단 뉴클레오티드에서 개시하여 5'-말단 뉴클레오티드가 결합될 때까지 반복되는 5개의 스텝으로 이루어진 일련의 사이클(cycles)을 통하여 진행한다.

[0145] 이들의 스텝에는 탈보호(deprotection), 활성화(activation), 커플링(coupling), 캐핑(capping) 및 안정화(stabilization)가 있다.

[0146] 스텝 1 : 탈보호(deprotection)

[0147] CPG(controlled pore glass)(다공질글라스) 비이드(bead)에 부착된 보호 뉴클레오시드에서의 보호기가 반응성의 5'-히드록시기를 이탈하는 트리클로로아세트산(TCA)에 의해 제거된다.

[0148] 스텝 2 : 활성화(activation)

[0149] 이 스텝에서, 테트라졸이 테트라졸릴 포스포르아미다이트 중간체를 형성하는 커플링 포스포르아미다이트 뉴클레오사이드를 공격한다.

[0150] 스텝 3 : 커플링(coupling)

[0151] 테트라졸릴 포스포르아미다이트 중간체가 수용체(recipient)의 히드록시기와 반응하여 5'에서 3'로 연결이 형성된다.

[0152] 그 테트라졸이 재구성되고, 그 프로세스가 계속한다.

[0153] 스텝 4 : 캐핑(capping)

[0154] 이 스텝에서, 아세트산 무수물과 N-메틸이미다졸로 이루어진 아세틸화 시약을 사용하여 올리고뉴클레오티드의 5'-말단(most end) 상에서 반응성 히드록시기를 차단(blocking)시켜 커플링이 될 수 없는 사태를 회피하도록 한다.

[0155] 스텝 5 : 안정화(stabilization)

[0156] 일단 캐핑 스텝이 완료될 때, 사이클에서의 최종 스텝은 신장하는 올리고뉴클레오티드 사슬과 직전에 부가한 염기(most recently added base) 사이에서 포스페이트 결합을 안정화시키는 산화 스텝이다.

[0157] 이 스텝은 테트라히드로푸란(THF)과 수 중에서 약산화제로서 요오드(iodine)의 존재하에 실시한다.

[0158] 이 최종 스텝 다음에, 이 사이클은 서열 내에서 각각의 뉴클레오티드에 대하여 반복한다.

[0159] 상기 합성이 완료된 후에 단일가닥(single stranded) DNA 분자를 HAP, PAGE, HPLC, C18 및 OPC 등의 방법에 의해 정제한다.

[0160] 실시예 2 : 올리고 2에 의해 유도되는 인간 B-CLL 세포의 에이포토시스(apoptosis)

[0161] 1. 인간 B-CLL 세포의 조제

[0162] 치료하지 않은 B-CLL(병리학적으로 동정된) 환자(중국, 지린대학교, 제 1병원)의 혈액샘플을, 혈액 채취 허가서를 발급받은 후에 채취하였다.

[0163] 말초혈 단핵구(peripheral blood mononuclear cells : PBMC를 피콜-팩(Ficoll-Paque)(Pharmacia)의 밀도구배

원심분리(density gradient centrifugation)에 의해 분리하였다.

[0164] 상기 PBMC에서의 CD5 + CD19 + CD23 + B-CLL 세포를 B세포 분리 킷(kit)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)을 사용하여 CD5 + CD19 + CD23 + 세포(B-CLL 세포)가 95%를 초과하도록 정제하였다.

[0165] 그 세포조제를 제조업자(Miltenyi Biotec)의 지침서(사용설명서)에 따라 실시하였다.

[0166] 2. 올리고 2에 의해 유도된 인간 B-CLL 세포의 에이포토시스

[0167] B-CLL 세포를, 48-웰플레이트(well plate)에서 10^6 세포/웰로 하고 10% 인간 AB혈청 RPMI 1640 배지(HyClone) 내에서 최종 농도 3㎍/ml로 하여 올리고 2, 2006 또는 2216과 함께 배양하였다.

[0168] 혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone)에서 올리고 2, 2006 또는 2216을 희석하였다.

[0169] 동용량의 희석물(혈청 없는 RPMI 1640 배지, HyClone)을 대조(control)(배지:Medium)로 사용하였다.

[0170] 배양 3일, 5일 및 7일 후에, 세포를 카운팅(counting)하고, 10분간 테트라메틸-로드아민 에틸에스테르(TMRE)(Molecular Probes Inc)로 염색(staining)하였다(참고문헌: Lena Thyrell 등, The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, No. 23, Issue of June 4, pp. 24152-24162, 2004).

[0171] TMRE 양성(+)(생존) 및 TMRE 음성(-)(에이포토시스:apoptotic)의 B-CLL 세포를 플로사이토메트리(flow cytometry)에 의해 측정하였다(B.D. FAC Aria).

[0172] 생존 B-CLL 세포수는 전 세포수(total cell count)에 각각의 시점(time point)에서 TMRE-양성(+) 세포의 %를 곱하여 계산하였다.

[0173] B-CLL 환자에서 채취한 10종의 혈액샘플을 사용하여 실험을 반복하여 실시하였다.

[0174] 평균으로 얻어진 결과(n=10)에서는 올리고 2가 B-CLL 세포의 에이포토시스를 유의성 있게 유도하여,

[0175] 올리고 2에 의한 유도 작용이 2006에 의한 유도 작용과 대비하여 약 2배가 더 강력함을 나타내었다(표 1 참조).

[0176] 또, B-CLL 세포의 에어포토시스에 대한 올리고 2와 2006의 용량 작용도 관찰하였다.

[0177] 그 결과에서는 농도 0.1~10㎍/ml의 범위에서 여러 가지 용량의 올리고 2가 B-CLL 세포의 에이포토시스를 확실하게 유도하였음을 나타내었다(도 1 참조).

[0178] 비교할 때, 농도 1㎍/ml의 용량에서 올리고 2의 에이포토시스 유도 작용은 2006의 에이포토시스 유도 작용과 대비하여 약 3배가 더 강력하였다.

[0179] 또, 전체적으로 이들의 결과에서는 올리고 2를 사용하여 B-CLL 세포의 에이포토시스의 유도에 의해 B-CLL을 치료할 수 있다는 것을 나타낸다.

표 1

[0180] 올리고 2에 의해 유도된 B-CLL 세포의 에이포토시스(동태)

생존 B-CLL 세포(%) (n=10)			
그룹	배양시간(일)		
	3	5	7
대조(배지)	82.2±12.2	79.5±9.25	81.3±11.0
2216	67.7±18.2	57.7±16.7	50.7±13.5
2006	66.5±12.1	44.4±15.0	40.2±10.8
Oligo-2	45.5±9.5	17.6±5.6	14.2±3.1

[0181] 실시예 3 : 올리고 2에 의한 인간 B-CLL 세포 상에서 CD40의 업레규레이션(up-regulation)

[0182] 1. 인간 B-CLL 세포의 조제

[0183] 실시예 2에서 설명한 바와 같은 처리순서에 따라 B-CLL 환자에서 인간 B-CLL 세포를 분리하였다.

[0184] 2. 올리고 2에 의한 인간 B-CLL 세포 상에서의 CD40의 업레규레이션(up-regulation)

[0185] B-CLL 세포를, 48-웰플레이트(well plate)에서 10^6 세포/웰로 하고 10% 인간 AB혈청 RPMI 1640의 배지(HyClone) 내에서 최종 농도 3㎍/ml로 한 올리고 2, 2006 또는 2216과 함께 배양하였다.

[0186] 혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone)에서 올리고 2, 2006 또는 2216을 희석하였다.

[0187] 동용량의 희석물[혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone)]을 대조(배지)로 사용하였다.

[0188] 배양 7일 후에, 세포(cells)를 카운팅(counting)하여, FITC-CD40 항체로 10분간 염색하였다(Becton Dickinson)(Molecular Probes Inc)(참고문헌: Lena Thyrell 등, The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, No. 23, Issue of June 4, pp. 24152-24162, 2004).

[0189] CD40 항체로 염색한 B-CLL 세포를 플로사이토메트리(flow cytometry)(B.D. FACS Aria)에 의해 측정하였다.

[0190] 그 결과(도 2)에서는 올리고 2가 B-CLL 세포 상에서 CD40의 발현을 유의성 있게 업레규레이팅 한다는 것을 나타내었으며, 이것은 올리고 2를 사용하여 B-CLL 세포 상에서 CD40의 업레규레이션에 의해 B-CLL을 치료할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0191] CD40의 업레규레이션은 B-CLL 세포의 에이포토시스를 촉진하여, B-CLL 세포의 성장 저해(growth inhibition)를 유발하고, 또 B-CLL 세포에서의 면역원성(immunogenic)을 높힘으로써 B-CLL 세포에 특이적인 CTL의 생성을 자극한다.

[0192] B-CLL 환자로부터 채취한 최소 10종의 혈액샘플을 사용하여 동일하게 실험을 반복하여 동일한 결과를 얻었다.

[0193] 실시예 4 : 올리고 2에 의해 유도된 인간 소 림프구성 림프종 세포의 에이포토시스

[0194] 1. 인간 소 림프구성 림프종 세포의 조제

[0195] 환자 혈액 채취 허가 통지서를 취득한 다음, 소 림프구성 림프종(병리학적으로 동정된)을 가진 환자(중국, 지린대학교, 제 1병원)의 림프절(lymph node)의 생검조직(biopsy tissue)에서 소림프 구성 림프종 세포를 분리하였다.

[0196] 생검조직을 거친 표면의 슬리이드 글라스(glass slides)로 민싱(mincing)하여 6㎝의 배양 플레이트 내에서 5ml의 10% 인간 AB혈청 RPMI 1640 배지(HyClone) 중에서 이들 세포(cells)를 방출하였다.

[0197] 그 방출된 세포는 스테인리스 스틸제 메시를 통하여 여과하고 15ml의 혈청 없는 RPMI 1640 배지를 가진 50ml의 삼각 튜브 내에 회수(collection)하였다.

[0198] 그 삼각튜브를 10분간 300×g으로 원심분리한 다음, 상청액을 폐기하였다.

[0199] CD5 + CD19 +CD23 + 소 림프구성 림프종 세포를 B세포 분리키트(kit)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 사용하여 CD5 + CD19 + CD23 + 세포(소 림프구성 림프종 세포)가 95%를 초과하도록 정제하였다.

[0200] 그 세포조제를 상기 제조업자(Miltenyi Biotec)의 지침서(사용설명서)에 따라 실시하였다.

[0201] 2. 올리고 2에 의해 유도된 소 림프구성 림프종 세포의 에이포토시스

[0202] 소림프 구성 림프종 세포를, 48-웰 플레이트(well plate)에서 10^6 세포/웰로 하고, 10% 인간 AB혈청 RPMI 1640 배지(HyClone) 내에서 최종 농도를 3㎍/ml로 한 올리고 2, 2006 또는 2216과 함께 배양하였다.

[0203] 혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone)로 올리고 2, 2006 또는 2216을 희석하였다.

[0204] 대조(control)(배지)로서 동일 용량의 희석물(혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone))을 사용하였다.

[0205] 배양 3일, 5일 및 7일 후에, 이들 세포를 카운팅(counting)하여, 테트라메틸-로드아민 에틸에스테르(TMRE)(Molecular Probes Inc)(참고문헌: Lena Thyrell 등, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 279, No. 23, Issue of June 4, pp. 24152-24162, 2004)로 10분간 염색하였다.

[0206] TMRE-양성(+)(생존) 및 TMRE-음성(-)(에이포토시스)의 소 림프구성 림프종 세포를 플로사이토메트리(flow cytometry)(B.D FACS Aria)에 의해 측정하였다.

[0207] 생존 소 림프구성 림프종 세포수는 전 세포수(total cell count)에 TMRE-양성 세포의 %를 각각의 시점에서 곱하여 계산하였다.

[0208] 소 림프구성 림프종 환자로부터 얻은 5종의 혈액 샘플을 사용하여 동일하게 실험을 반복하여, 평균으로 얻어진 결과(n=5)에서는 올리고 2가 소 림프구성 림프종 세포의 에이포토시스를 유의성 있게 유도한다는 것을 나타내었으며(다음 표 2), 이것은 올리고 2를 사용하여 소 림프구성 림프종 세포의 에이포토시스를 유도함으로써 소 림프구성 림프종을 치료할 수 있다는 것을 나타낸다.

표 2

[0209] 올리고 2에 의해 유도된 소 림프구성 림프종 세포의 에이포토시스

생존 소 림프구성 림프종 세포(%) (n=5)			
그룹	배양시간(일)		
	3	5	7
대조(배지)	81.2±7.7	78.4±9.1	77.3±13.2
2216	68.5±15.0	58.7±12.3	52.1±10.2
2006	67.6±10.3	45.3±8.9	41.1±8.2
올리고 2	60.3±12.2	23.2±5.6	15.5±6.2

[0210] 실시예 5 : 올리고 2에 의해 유도된 소 림프구성 림프종 세포 상에서 CD40의 업레규레이션(up-regulation)

[0211] 1. 인간 소 림프구성 림프종 세포의 조제

[0212] 실시예 4에서 설명한 바와 같은 처리순서에 따라 환자로부터 인간 소 림프구성 림프종 세포를 분리하였다.

[0213] 2. 올리고 2에 의해 유도된 소 림프구성 림프종 세포 상에서의 CD40의 업레규레이션

[0214] 소 림프구성 림프종 세포를 48-웰 플레이트(well plate)에서 10^6 세포/웰로 하고, 10% 인간 AB혈청 RPMI 1640 배지(HyClone)에서 최종 농도를 3㎍/ml로 한 올리고 2, 2006 또는 2216과 함께 배양하였다.

[0215] 혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone)에서 올리고 2, 2006 또는 2216을 희석하였다.

[0216] 대조(control)(배지)로서 동일 용량의 희석물(혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone))을 사용하였다.

[0217] 배양 7일 후에, 이들 세포(cells)를 카운팅(counting)하여, FITC-CD40 항체로 10분간 염색하였다(Becton ickinson)(Moleculas Probes Inc)(참고문헌: Lena Thyrell 등, The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, No. 23, Issue of June 4, pp. 24152-24162, 2004).

[0218] 상기 CD40 항체로 염색한 소 림프구성 림프종 세포를 플로사이토메트리(flow cytometry)(B.D. FACS Aria)에 의해 측정하였다.

[0219] 그 결과(도 3)에서는 올리고 2가 소 림프구성 림프종 세포 상에서 CD40의 발현을 유의성 있게 업레규레이션 한다는 것을 나타내었으며, 이것은 올리고 2를 사용하여 세포(cells) 상에서 CD40의 업레규레이션에 의해 소 림프구성 림프종을 치료할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0220] CD40의 업레규레이션은 소 림프구성 림프종 세포의 에이포토시스를 촉진하여, 소 림프구성 림프종 세포의 성장 저해를 유도하며, 또 소 림푸구성 림프종 세포에서 면역원성을 높힘으로써 소림프구성 림프종 세포에 특이적인 CTL의 생성을 자극한다.

[0221] 5종의 샘플을 사용하여 동일하게 실험을 반복하여 동일한 결과를 얻었다.

[0222] 실시예 6 : 올리고 2에 의해 유도된 인간 B세포 급성림프 아구성/림프구성 백혈병(B-ALL) 세포의 에이포토시스

[0223] 1. 인간 B-ALL 세포의 조제

[0224] 환자 혈액 채취 허가 통지서를 얻은 다음에, 치료하지 않은 B-ALL(병리학적으로 동정된) 환자(중국,

지린대학교, 제일병원)로부터 혈액샘플을 채취하였다. PBMC는 피콜-팩(Ficoll-Paque) (Pharmacia)의 밀도구배 원심분리에 의해 분리하였다.

[0225] PBMC 내에서의 CD19 + CD10 + B-ALL 세포는 B세포 분리킷트(kit)(Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Germany)를 사용하여 CD19 + CD10 + 세포(B-ALL 세포)가 95%를 초과하도록 정제하였다.

[0226] 그 세포조제는 상기 제조업자(Miltenyi Biotec)의 지침서(사용설명서)에 따라 실시하였다.

[0227] 2. 올리고 2에 의해 유도되는 B-ALL 세포의 에이포토시스

[0228] B-ALL 세포를, 48-웰 플레이트(well plate)에서 10^6 세포/웰로 하고, 10% 인간 AB혈청 RPMI 1640 배지(HyClone)에서 최종 농도 3㎍/ml로 한 올리고 2 또는 2216과 함께 배양하였다.

[0229] 올리고 2 또는 2216을 혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone)에서 희석하였다.

[0230] 대조(배지)로서 동일 용량의 희석물(혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone))을 사용하였다.

[0231] 배양 3일, 5일 및 7일 후에, 이들의 세포(cells)를 카운팅(counting) 하여, 테트라메틸-로드아민 에틸에스테르(TMRE)(Molecular Probes Inc)로 10분간 염색하였다(참고문헌: Lena Thyrell 등, The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, No. 23, Issue of June 4, pp. 24152-24162, 2004).

[0232] TMRE-양성(+)(생존) 및 TMRE-음성(-)(에이포토시스)의 B-ALL 세포를 플로사이토메트리(B.D FACS Aria)에 의해 측정하였다.

[0233] 생존 B-ALL 세포수를, 전 세포수(total cell count)와 TMRE-양성(+) 세포의 %를 각각의 시점에서 곱하여 계산하였다.

[0234] 얻은 결과에서는 올리고 2가 B-ALL 세포의 에이포토시스를 유의성 있게 유도한다는 것을 나타내었으며(도 4), 이것은 올리고 2를 사용하여 B-ALL 세포의 에이포토시스를 유도함으로써 B-ALL을 치료할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0235] B-ALL 환자로부터 채취한 10종의 혈액 샘플을 사용하여 실험을 동일하게 반복하여 동일한 결과를 얻었다.

[0236] 실시예 7 : 올리고 2에 의한 B-ALL 세포 상에서 CD40의 업레규레이션(up-regulation)

[0237] 1. 인간 B-ALL 세포의 조제

[0238] 인간 B-ALL 세포를 실시예 6에서 설명한 바와 같은 처리순서에 따라 환자의 혈액샘플에서 조제하였다.

[0239] B-ALL 세포를, 48-웰 플레이트(well plate)에서 10^6 세포/웰로 하고, 10% 인간 AB혈청 RPMI 1640 배지(HyClone)에서 최종 농도 3㎍/ml로 한 올리고 2 또는 2216과 함께 배양하였다.

[0240] 혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone)에서 올리고 2 또는 2216을 희석하였다.

[0241] 동일 용량의 희석물[혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone)]을 대조(배지)로서 사용하였다.

[0242] 배양 3일, 5일 및 7일 후에, 세포(cells)를 카운팅하여, FITC-CD40 항체(Becton Dickinson)(Molecular Probes Inc)로 10분간 염색하였다(참고문헌: Lena Thyrell 등, The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, No. 23, Issue of June 4, pp. 24152-24162, 2004).

[0243] CD40 항체로 염색한 B-ALL 세포는 플로사이토메트리(flow cytometry)(B.D. FACS Aria)에 의해 측정하였다.

[0244] 그 결과(도 5)에서는 올리고 2가 B-ALL 세포 상에서 CD40의 발현을 유의성 있게 업레규레이션 한다는 것을 나타내었으며, 이것은 올리고 2를 사용하여 세포(cells) 상에서 CD40의 업레규레이션에 의해 B-ALL을 치료할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0245] CD40의 업레규레이션은 B-ALL 세포(cells)의 에이포토시스를 촉진하여 B-ALL 세포(cells)의 성장저해를 유발하며, 또 그 B-ALL 세포에서의 면역원성을 높힘으로써 B-ALL 세포(cells)에 특이적인 CTL의 생성을 자극한다.

[0246] B-ALL 환자에서 채취한 10종의 혈액 샘플을 사용하여 동일하게 실험을 반복하여 동일한 결과를 얻었다.

[0247] 실시예 8 : 올리고 2에 의해 유도되는 B-CLL에서의 IL-10의 생성

[0248] 1. 인간 B-CLL 세포의 조제

[0249] 인간 B-CLL 세포를 실시예 2에서 설명한 바와 같은 처리순서에 따라 B-CLL 환자에서 분리하였다.

[0250] 2. 올리고 2에 의해 유도되는 B-CLL에서 IL-10의 생성

[0251] B-CLL 세포를, 48-웰 플레이트(well plate)에서 10^6 세포/웰로 하고, 혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone)에서 최종 농도 3㎍/ml로 한 올리고 2와 함께 3반복 배양하였다.

[0252] 올리고 2를 혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone)에서 희석하였다.

[0253] 동일 용량의 희석물[혈청 없는 RPMI 1640 배지(HyClone)]을 대조(배지)로서 사용하였다.

[0254] 배양 상청액은 72시간 후 또는 지정시간에 회수하여 플루오로카인(Fluorokine) MAP 면역 배열구조(immunoarray) 시스템(R&D Systems)에서 IL-10에 대하여 평가하였다.

[0255] 본 발명에 의한 데이터에서는 상기 올리고 2를 유인하여(triggering) B-CLL 세포에서 레벨이 높은 IL-10의 생성을 유발한다는 것을 나타내었다(도 6).

[0256] 6시간 후 IL-10의 생성의 현저한 증가가 검출되었으며, 24시간 후에 피크에 도달하였으며, 72시간 배양에 걸쳐 높은 레벨를 유지하였다(도 6 참조).

[0257] 또, 본 발명의 데이터에서는 외인성 rh-IL-10(Schering Corp)의 B-CLL 세포 배양물에의 첨가에 의해 IL-10의 용량 의존적으로 에이포토시스성 B-CLL 세포가 유도되어, 이것은 항 IL-10항체(R&D Systems)에 의해 특이적으로 차단된다는 것을 또 나타내었다.

[0258] 이들의 실험결과에서는 올리고 2를 사용하여 B-CLL 세포의 에이포토시스(apoptosis)를 자기 분비적으로 유발하는 IL-10의 생성을 유도함으로써 B-CLL을 치료할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0259] B-CLL 환자에서 얻은 최소 10종의 혈액 샘플을 사용하여 동일하게 실험을 반복하여 동일한 결과를 얻었다.

[0260] 실시예 9 : 인간 정상(human normal) PBMC의 증식에 대한 올리고 2의 작용

[0261] 인간 PBMC를 피콜-하이핵(Ficoll-Hypaque)의 밀도구배 원심분리(Pharmacia)에 의해 정상 헌혈자(중국, 지린성 혈액센터)의 연막(buffy coat)에서 분리하였다.

[0262] 그 PBMC의 생존율(viability)은 트리판 블루 배제(trypan blue exclusion)에 의한 측정에 의해 95 ~ 99% 이었다.

[0263] PBMC(6×10^5/웰(well)를 96-웰 U형상 저부형성 플레이트(U-bottomed plates)(Costar)내에 파종(plated)하고, 올리고 2(6㎍/ml)와 함께 또는 이것을 동반함이 없이 3중(triplicates)으로 36시간 배양하였다

[0264] 그 다음, 이어서 [^{3}H] 티미딘(New England Nuclear, Boston, MA, US)으로 16시간 펄스를 제공하였다(pulsing).

[0265] 셀(cells)을 글라스파이버필터 상에서 회수하고, 신틸레이션 카운터(scintillation counter : 섬광계수기)로 검출하였다.

[0266] 세포증식을 SI(자극지수: stimulation index)[3중 웰(triple wells)에서]로 나타내었다.

[0267] 5종의 정상 혈액샘플에서의 데이터를 나타내었다.

[0268] 2006 및 2216은 대조(controls)로 사용하였다.

[0269] 그 결과에서는 올리고 2가 PBMC의 증식을 명백하게 자극할 수 있다는 것을 나타내었으며(도 7), 이것은 올리고 2가 에이포토시스를 유도하지 않고 정상 인간 PBMC에 대하여 증식-자극성(proliferation-stimulatory)을 나타내며, 또 배양세포에 대하여 비독성인 것을 나타내었다.

[0270] 본 발명은 바람직한 실시예에 따라 구체적으로 설명한 바 있으나, 다음의 첨부된 청구범위에서 한정한 바와 같이 본 발명의 범위에서 벗어남이 없이 개량 및 변형이 가능하다는 것은 이 기술분야의 기술자에 의해 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0112] 도 1은 올리고-2에 의해 유도되는 B-CLL 세포의 에이포토시스(apoptosis)(용량)를 나타낸 그래프이다.

[0113] B-CLL 세포는 여러 가지 용량의 올리고 2와 함께 또는 이것을 동반함이 없이 10% 인간 AB 혈청 배지 내에서 배양하였다.

[0114] 배양 7일에, 이들 세포는 TMRE로 염색하였다. 생존 B-CLL 세포수는 TMRE-양성(+) 세포의 %에 의해 계산하였다.

[0115] 도 2는 B-CLL 세포 상에서 CD40의 업레규레이션(up-regulation)에 대한 올리고 2의 작용을 나타낸다.

[0116] B-CLL 세포는 7일간 올리고 2와 함께, 또는 올리고 2 없이 배양한 다음, 플로사이토메트리(flow cytometry)을 사용하여 CD40의 발현을 분석하기 위해 FITC-CD40 항체로 염색하였다. 그 발현 레벨(expression level)은 MFI 수(number)로 나타내었다.

[0117] 도 3은 소 림프구성 림프종 세포 상에서 CD40의 업레규레이션에 대한 올리고 2의 작용을 나타낸다.

[0118] 상기 소 림프구성 림프종 세포는 올리고 2와 함께 또는 올리고 2 없이 배양하였다. 배양 7일에, 그 세포는 플로사이토메트리를 사용하여 CD40의 발현을 분석하기 위해 FITC-CD40 항체로 염색하였다. 발현 레벨은 MFI 수로 나타내었다.

[0119] 삭제

[0120] 도 4는 올리고 2에 의해 유도된 B-ALL 세포의 에이포토시스를 나타낸다.

[0121] B-ALL 세포는 올리고 2와 함께 또는 올리고 2 없이 배양하였다. 배양 3일, 5일 및 7일에 이들의 세포를 TMRE로 염색한 다음, 플로사이토메트리로 분석하였다.

[0122] 생존 B-ALL 세포수를 TMRE-양성(+) 세포의 %에 의해 계산하였다.

[0123] 도 5는 올리고 2에 의한 B-ALL 세포 상에서 CD40의 업레규레이션을 나타낸다.

[0124] B-ALL 세포는 1㎍/ml의 올리고 2와 함께 또는 그 올리고 2 없이 배양하였다. 배양 3일, 5일 및 7일에 세포는 플로사이토메트리를 사용하여 CD40의 발현을 분석하기 위해 FITC로 표지된(labeled) 항 CD40 mAb로 염색하였다.

[0125] 그 발현 레벨은 MFI 수로 나타내었다.

[0126] 도 6은 올리고 2에 의해 유도된 B-CLL 세포로부터 인터류킨-10의 생성을 나타낸 그래프이다.

[0127] B-CLL 세포는 올리고 2와 함께 또는 올리고 2 없이 혈청 없는 배지 내에서 배양하였다.

[0128] 그 상청액은 지정시간에 회수하고, ELISA 킷트(kit)를 사용하여 IL-10에 대하여 평가하였다.

[0129] 도 7은 정상 인간 PBMC의 증식에 대한 올리고 2의 작용을 나타낸 그래프이다.

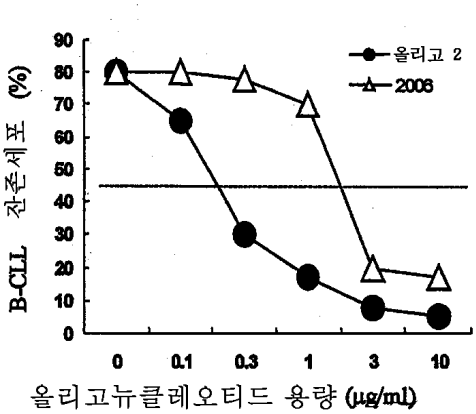
[0130] 정상 인간 PBMC는 올리고 2, 2216 또는 2006과 함께 36시간 배양한 다음, 각각의 이들 세포의 증식을 측정하기 위하여 [^{3}H] 티미딘과 혼화하였다.

[0131] 5종의 혈액 샘플을 분석하였다.

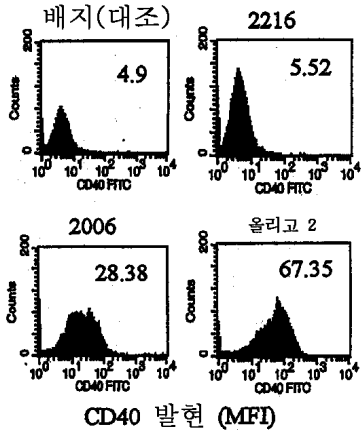
[0132] 이들 세포의 증식을 자극 지수(stimulation index) SI로 나타내었다.

도면

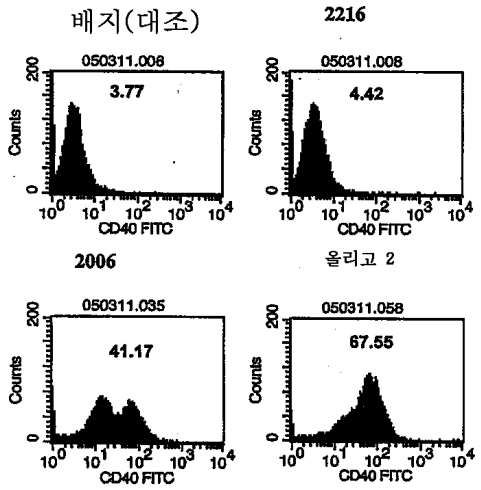
도면1


B-CLL 잔존세포 (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.1
0.3
1
3
10
올리고 2
2006
올리고뉴클레오티드 용량 (μg/ml)

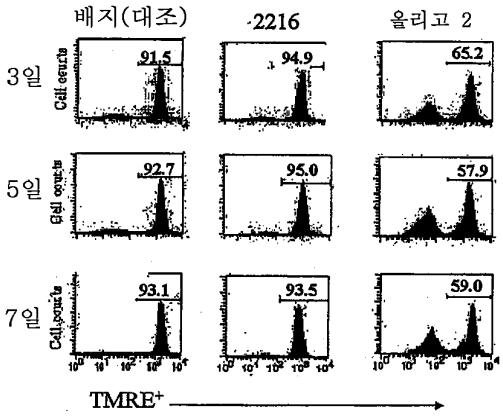
도면2


배지(대조)
4.9
2216
5.52
2006
28.38
올리고 2
67.35
Counts
CD40 FITC
CD40 발현 (MFI)

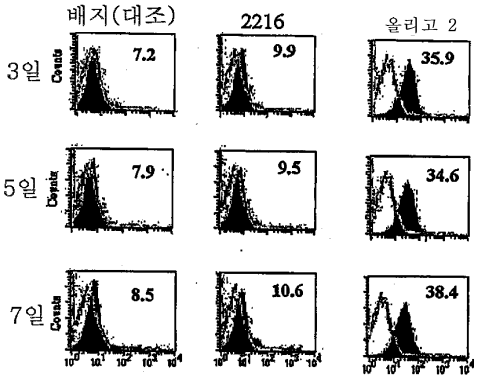
도면3



도면4

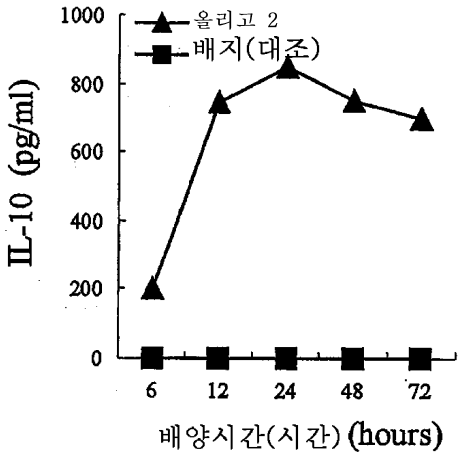


도면5

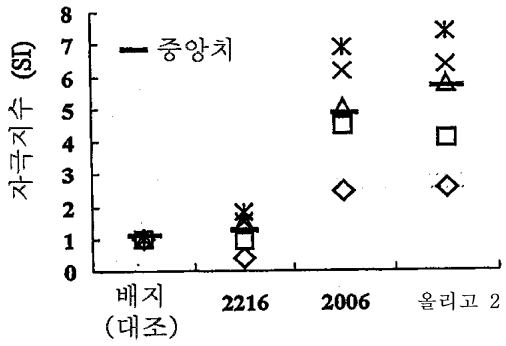


B-ALL세포상에서 CD40발현

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> Changchun Huapu Biotechnology Co., Ltd

<120> An oligonucleotide or its functional homologue, a composition comprising the same and a method for treating B cell neoplasm

<130> IP060010

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sequence

<400> 1
tcgtcgacgt cgttcgttct c 21

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sequence

<400> 2
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sequence

<400> 3
gggggacgat cgtcgggggg 20