

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 31/70

(11) 공개번호 특2000-0052697
(43) 공개일자 2000년08월25일

(21) 출원번호	10-1999-7003488		
(22) 출원일자	1999년04월21일		
번역문제출일자	1999년04월21일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/18944	(87) 국제공개번호	WO 1998/18480
(86) 국제출원출원일자	1997년10월17일	(87) 국제공개일자	1998년05월07일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 짐바브웨 가나 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 핀란드 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽골 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 가나 인도네시아 유고슬라비아		
(30) 우선권주장	8/739,109 1996년10월25일 미국(US) 8/870,930 1997년06월06일 미국(US) 8/897,351 1997년07월21일 미국(US)		
(71) 출원인	넥스스타 파머수티컬스, 인크. 래리 더블유. 스미스, 코크란 아담		
(72) 발명자	미국 콜로라도 80301 보울더 월더니스 플레이스 2860 스위트 200 잔지크네보자 미국콜로라도80301, 보울더, 카터트라일6973 골드래리 미국콜로라도80302, 보울더, 5스트리트1033 슈미트폴지. 미국콜로라도80544, 니와트, 피.오.박스1125 바지스칸드라 미국콜로라도80233, 썬톤, 이스트117에버뉴5295 월리스미첼 미국콜로라도80027, 로위스빌레, 웨스트펠코얼트786		
(74) 대리인	신영우, 최승민		

심사청구 : 없음

(54) 혈관내피 성장인자 핵산 리간드 복합체

요약

본 발명은, SELEX 방법론에 의하여 VEGF 핵산 리간드를 식별하고, VEGF 핵산 리간드를 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 회합시킴으로써, VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체를 제조하는 방법을 개시한다. 본 발명은 또한, 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 함께 하나 이상의 VEGF 핵산 리간드를 포함하는 복합체를 개시한다. 본 발명은 또한 VEGF 핵산 리간드 또는 복합체를 포함하는 지질구조체 및 그 제조방법을 내포한다.

명세서

기술분야

여기에 기재된 것은 혈관내피 성장인자(VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor)에 대하여 친화력이 높은 2' 플루오로(2'-F) 피리미딘 RNA 리간드에 관한 것이다. 이와 같은 핵산 리간드를 식별하는데 있어서, 여기서 이용된 방법을 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)라 한다. 또한 본 발명은, SELEX 방법론에 의한 VEGF 핵산 리간드의 식별에 의하여, VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의, 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 치료제 또는 진단제 복합체의 제조 및 VEGF 핵산리간드를 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 공유 결합식으로 연결시키는 방법을 포함한다. 본 발명은 또한, 하나 이상의 VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체를 내포한다. 본 발명은 또한, 복합체를 형성하기 위하여 VEGF 핵산 리간드를 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 공유 결합식으로 연결시킴으로써, VEGF 핵산 리간드의 약물속도론적 특성을 개선시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, VEGF 핵산 리간드를 포함하는 지질 구조체 또는 VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체를 이용하여 VEGF 핵산 리간드의 약물속도론적 특성을 개선시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 치료제 또는 진단제와 VEGF 핵산 리간드 및 친유성 화합물 또는 비면역원성의 고분자 화합물을 포함하는 복합체의 회합에 의하여, VEGF를 발현시키는 생물학적 표적에 치료제 또는 진단제를 표적화하는 방법에 관한 것인데, 여기서 상기 복합체는 지질 구조체와 더 회합되며, VEGF 핵산 리간드는 지질 구조체의 외부와 더 회합된다.

배경기술

A. SELEX

수년간에 있어서의 도그마는 핵산이 원래부터 정보적 역할을 갖고 있다는 것이었다. SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)라고 알려진 방법을 통하여, 핵산이 단백질과 다음없이 3차원 구조적 다양성을 갖는다는 것이 분명해졌다. SELEX는 표적 분자에 대하여 높은 특이적 결합력을 지니는 핵산 분자의 시험관내 진화를 위한 방법으로서, 지금은 포기되었으며, 발명의 명칭이, '지수적 부유화에 의한 리간드의 총체적 진화'(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)이고, 1990년 6월 11일 출원된, 미국특허출원 제 07/536,428호, 현재 미국특허 제5,475,096호로서, 발명의 명칭이 '핵산 리간드'(Nucleic Acid Ligands)이, 1991.6.10 출원된 미국특허출원 제07/714,131호, 현재 미국특허 제5,270,163호로서, 발명의 명칭이 '핵산 리간드의 식별방법'(Method for identifying Nucleic Acid Ligands)이며, 1992.8.17. 출원된 미국특허출원 제07/931,473호(WO 91/19813호도 참조)에 기재되어 있는데, 이들 각각을 여기서 구체적으로 참고로 인용한다. 총체적으로 SELEX 특허출원이라고 칭하는 이들 각각은, 임의의 요망 표적 분자에 대한 핵산 리간드를 제조하기 위하여 근본적으로 신규의 방법을 기재하고 있다. SELEX 공정은, 각 리간드가 독특한 서열을 지니고 있으며, 핵산 리간드라고 불리우는, 요망 표적 화합물 또 분자에 특이적으로 결합하는 특성을 지닌 생성물류를 제공한다. 각각의 SELEX-식별 핵산 리간드는 소정의 표적 화합물 또는 분자의 특정 리간드이다. SELEX는, 핵산이 다양한 2차원 및 3차원 구조를 형성하는 충분한 능력 및 모노머성이건 폴리머성이건 간에, 사실상 임의의 화합물과 리간드로서 작용(특이적 결합쌍을 형성) 할 수 있는, 그들 모노머에서 가능한 충분한 화학적 다양성을 지니고 있다는, 독특한 식견을 근거로 하고 있다. 임의의 크기 또는 조성의 분자도 표적으로서 역할을 할 수 있다.

SELEX 방법은, 결합 친화성 및 선별성의 임의의 요망 기준을 사실상 달성하기 위하여, 동일한 일반적인 선별 방법을 이용하는, 대상 올리고뉴클레오타이드 혼합물로부터의 선별 및 결합의 단계적 반복, 분리 및 증폭을 내포한다. 바람직하게는 랜덤화 서열의 세그먼트를 포함하는 핵산의 혼합물로부터 출발하여, SELEX 방법은, 결합에 유리한 조건하에서 혼합물을 표적과 접촉, 표적분자에 특이적으로 결합된 핵산들로부터 미결합 핵산의 분리, 핵산-표적 복합체의 해리, 핵산의 리간드-부유화 혼합물을 산출하기 위하여 핵산-표적 복합체로부터 해리된 핵산의 증폭, 다음에는 표적분자에 대하여 매우 특이적인 높은 친화력의 핵산 리간드를 산출하는데 필요한 만큼의 회전을 통하여, 결합, 분리, 해리 및 증폭단계를 반복하는 단계를 내포한다.

본 발명자들은, 화합물로서의 핵산이 폭넓은 배열의 형상, 크기 및 배위공간을 형성할 수 있으며, 생물학적 시스템의 핵산에 의하여 전개되는 것 보다 훨씬 넓은 레퍼토리의 결합 및 기타 기능이 가능하다는 것을 SELEX 방법이, 과시하고 있다는 것을 인식하였다.

본 발명자들은 SELEX 또는 SELEX-유사 공정이, 핵산 리간드가 임의의 소정 표적에 대하여 식별되는 것과 유사한 방법으로 임의의 선택된 반응을 촉진시킬 수 있는 핵산을 식별하는데 사용될 수 있다는 것을 인식하였다. 이론적으로, 약 $10^{13} \sim 10^{18}$ 핵산의 대상 혼합물내에서, 본 발명자들은 하나 이상의 핵산이 각각의 폭넓은 다양성의 물리적 및 화학적 상호작용을 촉진하는데 적합한 형태로 존재한다는 것을 주장하였다.

기본적 SELEX 방법은 변형되어 다수의 특정 목적을 달성한다. 예를들면, 발명의 명칭이 '구조를 기초로 한 핵산의 선별방법'(Methods for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure)이며, 1992.10.14. 출원된 미국특허출원 제07/960,093호는, 굴곡 DNA와 같이, 특정 구조 특성을 지닌 핵산 분자를 선별하기 위하여 겔 전기영동법과 함께 SELEX를 사용하는 방법을 기재하고 있다. 발명의 명칭이 '핵산 리간드의 광선별'(Phytoselection of Nucleic Acid Ligands)이며, 1993.9.17. 출원된 미국특허출원 제 08/123,935호는 표적분자를 결합 및/또는 광가교결합 및/또는 광불활성화 할 수 있는 광반응성 그룹을 함유하는 핵산 리간드를 선별하기 위한 SELEX를 기초로 한 방법을 기재하고 있다. 현재 미국특허 제 5,580,737호로서, 발명의 명칭이 '테오필린과 카페인을 구별하는 고 친화력 핵산리간드'(High Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine)이며, 1993.10.7. 출원된 미국특허출원 제08/134,028호는, 밀접히 관련된 분자들을 구분할 수 있는 고도로 특이적인 핵산 리간드를 식별하는 방법을 기재하고 있는데, 상기 방법은 카운터-SELEX라고 하는 비-펩티드성일 수 있다. 현재 미

국특허 제5,567,588호로서, 발명의 명칭이 '지수 부유화에 의한 리간드의 총체적 진화; 용액 SELEX'(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Solution SELEX)이며, 1993.10.25. 출원된 미국특허 출원 제08/143,564호는, 표적 분자에 대하여 고 저 친화력을 지닌 올리고뉴클레오티드를 높은 효율로 분리할 수 있는 SELEX-기초 방법을 기재하고 있다.

SELEX 방법은, 개선된 생체내 안정성 또는 개선된 운반 특성과 같은 리간드상에 개선된 특성을 부여하는 변형된 뉴클레오티드를 함유하는 고친화성 핵산 리간드의 식별을 포함한다. 이와 같은 변형의 예에는 리보오스 및/또는 인산염 및/또는 염기 위치에 대한 화학적 치환이 포함된다. 변형된 뉴클레오티드를 함유하는 SELEX-식별 핵산 리간드가, 현재 미국특허 제5,660,98호로서, 발명의 명칭이 '변형된 뉴클레오티드를 함유하는 고친화성 핵산 리간드'(High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides)이며, 1993.9.8. 출원된 미국특허출원 제08/117,991호에 기재되어 있는데, 상기 특허는 피리미딘의 5'- 및 2'-위치에서 화학적으로 변형된 뉴클레오티드 유도체를 함유하는 올리고뉴클레오티드를 설명하고 있다. 상기 미국특허출원 제08/134,028호는, 2'-아미노(2'-NH₂), 2'-플루오로(2'-F), 및/또는 2'-O-메틸(2'-OMe)로 변형된 하나 이상의 뉴클레오티드를 함유하는 고도로 특이적인 핵산 리간드를 기재하고 있다. 발명의 명칭이 '분자의 친핵성 치환 반응에 의한 공지 및 신규의 2' 변형 뉴클레오시드의 신규 제조방법'(Novel Method of Preparation of Known and Novel 2' Modified Nucleosides by Intramolecular Nucleophilic Displacement)으로서, 1994.6.22 출원된 미국특허출원 제08/264,029호는 다양한 2'-변형 피리미딘을 함유하는 올리고뉴클레오티드를 기재하고 있다.

SELEX 방법은, 현재 미국특허 제5,637,459호로서, 발명의 명칭이 '지수부유화에 의한 리간드의 총체적 진화: 키메라 SELEX'(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chimeric SELEX)이며, 1994.8.2 출원된 미국특허출원 제08/284,063호 및 발명의 명칭이 '지수 부유화에 의한 리간드의 총체적 진화: 혼합된 SELEX'(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Blended SELEX)로서, 1994.4.28 출원된 미국 특허출원 제08/234,997호 각각에 기재된 바와 같이, 선별된 올리고뉴클레오티드 다른 선택된 올리고뉴클레오티드 및 비-올리고뉴클레오티드 기능 단위와 결합시키는 방법을 포함한다. 이들 특허출원은 다른 분자의 요망 특성과, 올리고뉴클레오티드의 형상 및 기타 특성이 넓은 배열의 결합, 및 효율적인 증폭 및 복제 특성을 가능케 한다.

SELEX 방법은 또한, 발명의 명칭이 '핵산 복합체'(Nucleic Acid Complexes)로서, 1995.5.4 출원된 미국특허출원 제08/434,465호에 기재된 바와 같이, 선별된 핵산 리간드를 진단 또는 치료용 복합체의 친유성 화합물 또는 비-면역원성의 고분자 화합물과 결합시키는 방법을 포함한다. 진단 또는 치료용 복합체의, 디아실 글리세롤 또는 디알킬 글리세롤과 같은, 친유성 화합물과 회합되어 있는 VEGF 핵산 리간드가, 발명의 명칭이 '혈관내피 성장인자(VEGF) 핵산 리간드 복합체'(Vascular Endothelial Growth Factor Nucleic Acid Ligand Complexes)로서, 1996.10.25. 출원된 미국특허출원 제08/739,109호에 기재되어 있다. 진단 또는 치료용 복합체의, 폴리메틸렌 글리콜과 같은 고분자량의, 비면역원성 화합물, 또는 글리세롤리피드, 포스포리피드 또는 글리세롤 아마이드 리피드와 같은 친유성 화합물과 회합되어 있는 VEGF 핵산 리간드가, 발명의 명칭이 '혈관내피 성장인자(VEGF) 핵산 리간드 복합체'(Vascular Endothelial Growth Factor Nucleic Acid Ligand Complexes)로서, 1997.7.21. 출원된 미국특허출원 제08/897,351호에 기재되어 있다. 기본적 SELEX 공정의 변형된 방법을 기재하고 있는 상기 특허출원들의 각각의, 완전한 상태로 여기서 참고로 구체적으로 인용된다.

B. 지질 구조체

지질 2중막층 소포는, 밀폐, 유체 충전된 미시적인 구인데, 이것은 원래 극성(친수성) 및 비극성(친유성) 부분을 지닌 개별 분자들로부터 형성된다. 친수성 부분은 포스페이트, 글리세릴포스페이트, 카르복시, 술페이트, 아미노, 히드록시, 콜린 또는 기타 극성그룹을 포함할 수 있다. 친유성 그룹의 예로는, 알킬, 알케닐 또는 기타 지질 그룹과 같은 포화 또는 불포화 탄화수소가 있다. 소포의 안정성을 개선하거나 또는 기타 요망특성을 부여하기 위하여, 스테롤 (예를들면, 콜레스테롤) 및 기타 약품학적으로 수용 가능한 보조제(알파-토코페롤과 같은 산화 방지제를 포함)도 포함될 수 있다.

리포솜은 이들 2중막층 소포의 부분집합으로서, 지방산 사슬로 구성되어 있는 2개의 소수성 꼬리를 함유하는 인지질 분자를 원칙적으로 포함한다. 물에 노출시키면, 이들 분자들은 자연스럽게 정렬하여, 막의 중심부와 회합된 각 층의 분자의 친유성 단부와 2중막층의 각각의 내외 표면을 형성하는 맞은 편 극성 단부를 지니는, 구상 2중막층을 형성한다. 따라서, 막의 각 측은 친수성을 제공하는 반면에 막의 내부는 친유성 매질을 포함한다. 이들 막은, 내부 수성 공간 주위에, 양파의 층과 닮은 형태로, 물의 박층으로 분리된 일련의 동심 구상막내에 배열될 수 있다. 이들 다층판 소포(MLV, Multilamellar Vesicles)는, 전단력의 작용에 의하여, 작은 또는 단층판 소포(UV, Unilamellar Vesicle)로 전환될 수 있다.

리포솜의 치료적 이용은 자유 형태에서 통상적으로 독성인 약물의 운반을 내포한다. 리포솜 형태에서, 독성 약물이 폐색되고, 약물에 민감한 조직으로부터 떨어져 선택된 영역을 표적으로 할 수 있다. 리포솜은 또한 약물을 장시간에 걸쳐 방출하는데 치료적으로 사용되어 약물 투여의 빈도를 감소시킬 수 있다. 또한 리포솜은 소수성 또는 양성친화성 약물의 수성 분산액을 형성하는 방법을 제공할 수 있는데, 상기 약물은 통상적으로 정맥내 운송용으로는 부적절하다.

많은 약물 및 영상제 치료적 또는 진단적 잠재능력을 갖기 위하여는, 그들이 체내의 적당한 위치에 운반될 필요가 있는데, 리포솜은 용이하게 주입되는 것이 가능하여 특정 세포 형태, 또는 신체부위에 대한 자연된 방출 및 약물 운송의 기초를 형성한다. 캡슐화된 약물을 선택된 숙주조직으로 향하게 하고 민감한 조직으로부터는 멀리하게 하는데 리포솜을 이용하는 몇가지 기술이 채용될 수 있다. 이들 기술은 리포솜의 크기, 그들 총 표면 전하 및 그들 복용 루트를 조정하는 방법을 내포한다. MLV는, 우선 그들이 비교적 크기 때문에, 망내피계 시스템(원칙적으로 간 및 지라)에 의하여 통상적으로 신속하게 취해진다. 한편 UV는 MLV에 비하여, 증가된 순환시간, 감소된 소거율 및 보다 큰 생체내 분포를 나타내는 것으로 판명되었다.

리포좀의 수동적 운송은, 예를들면 정맥내, 피하, 근육내 및 국소적인 다양한 복용 루트를 이용하는 방법과 관련된다. 각각의 루트는 리포좀의 국부화에 있어서 차이가 있다. 리포좀을 선택된 표적 영역에 활성적으로 표적화하는데 사용되는 2가지 방법은, 항체나 특정 수용체 리간드를 리포좀의 표면에 부착시키는 방법을 포함한다. 항체는 그들의 대응 항원에 대하여 높은 특이성을 지니며, 리포좀의 표면에 부착되는 것으로 알려져 왔으나, 그 결과는 많은 예에서 별로 성공하지 못하였다. 그러나 몇가지 노력은 항체를 이용하지 않고 리포좀을 종양에 표적화하는데 성공하였다. 예를들면, 미국특허 제5,019,369호, 미국특허 제5,441,745호 또는 미국특허 제5,435,989호를 참조할 것.

연구자들에 의하여 적극적으로 추구된 하나의 개발분야는, 재제를 특정 세포 형태에 뿐만 아니라 세포의 세포질 및 다시 또 핵까지 운반하는 것이다. 이것은 DNA, RNA, 리보자임 및 단백질과 같은 생물학적 재제의 운반에 있어서 특히 중요하다. 이 분야에 있어서의 유망한 치료적 연구는, 질병의 치료를 위하여 안티센스 DNA 및 RNA 올리고뉴클레오티드를 사용하는 방법을 포함한다. 그러나, 안티센스 기술의 효율적인 응용에 있어서 부딪치는 하나의 주요 문제는, 그들 포스포디에스테르 형태의 올리고뉴클레오티드가 체액내에서, 표적 세포가 도달하기 전에, 엔도뉴클리아제 및 엑소뉴클리아제와 같은 세포내 및 세포외 효소에 의하여 신속히 분해된다는 점이다. 정맥내 투여도 신장에 의하여 혈류로부터 신속히 제거되는 결과를 초래하며, 흡수는 효과적인 세포내 약물 농도를 생성하는데 불충분하다. 리포좀 캡슐화는, 리포좀의 식세포 작용의 결과로서, 분해 효소로부터 올리고뉴클레오티드를 보호하며, 순환반감기를 증가시키고 및 흡수 효율을 증가시킨다. 이 방법으로, 올리고뉴클레오티드는 그 요망 표적에 도달 및 생체내 세포로 운반될 수 있다.

연구자들이 안티센스 올리고뉴클레오티드를 친유성 화합물 또는 비-면역원성의 고분자 화합물에 부착하였다는 몇 개의 예가 보고되어 있다. 그러나, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 오직 세포내 제재로서만 유효하다. 외피세포 성장인자 (EGF) 수용체에 표적화된 안티센스 올리고데옥시리보 뉴클레오티드는, 폴리에틸렌 글리콜 스페이서를 경유하여 폴레이트(folate)에 연결된 리포좀으로 캡슐화되고 (폴레이트-PEG-리포좀), 폴레이트 수용체-매개 엔도시토시스를 경우하여, 배양된 KB 세포로 운반된다(왕(Wang) 등 (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3318-3322). 또한, 알킬렌 디올이 올리고뉴클레오티드에 부착되었다(바이스(Weiss) 등, 미국특허 제5,245,022호). 또한, 안티센스 올리고뉴클레오티드에 공유 결합식으로 부착된 친유성 화합물이 문헌에 개시되어 있다(EP 462 145 B1).

지질 배합중에 포함시키거나 또는 예비 형성된 리포좀에 적재함으로써, 생물학적 제재를 리포좀에 적재시키는 것이 완수되었다. 리포좀의 외부 표면에 대한 올리고펩티드 및 올리고당의 수동적 부착방법이 기재되어 있다(잘립스키(Zalipsky) 등, (1977) Bioconj. Chem. 8: 111: 118).

C. VEGF

현존 내피로부터의 신규 혈관의 성장(맥관 형성)은 양성 및 음성 조절인자의 대항 효과에 의하여 건강한 성체에서 엄격히 조절된다. 증식성 강막증, 류머티스성 관절염, 건선 및 암을 포함하는 특정 병리학적 조건하에서는, 양성 조절인자가 우세하며, 맥관형성은 질병의 진전에 기여한다(폴크만(Folkman)(1995) Nature Medicine 1: 27-31에서 검토). 암에 있어서, 맥관형성이 종양성장 및 전이의 속도 제한 단계를 나타낸다는 관념(폴크만(1971) New Engl. J. Med. 285: 1182~1186)은 현재 상당한 실험적 증거에 의하여 지지되고 있다(아즈나보오리안(Aznavorian) 등 (1993) Cancer 71: 1368~1383; 피들러(Fidler) 및 엘리스(Ellis) (1994) Cell 79: 185~188; 폴크만(1990) J. Natl. Cancer Inst. 82: 4~6에서 검토).

종양 조직내의 혈관의 양은, 유방암(와이드너(Weidner) 등 (1992) J. Natl. Cancer Inst. 84: 1875~1887) 전립선암(와이드너 등(1993) Am. J. Pathol. 143: 401~409), 뇌종양 (리(Li) 등 (1994) Lancet 344: 82~86), 및 흑색종(포스(Foss) 등 (1996) Cancer Res. 56: 2900~2903)에 있어서 강력한 음성적 예상 지시자이다.

지금까지 다수의 맥관형성 성장인자가 기재되어 왔는데, 그중 혈관내피 성장인자(VEGF)가 생리학적 및 병리학적 맥관형성의 양성 조절인자로서 중심적 역할을 하는 것으로 나타났다(브라운(Brow) 등 (1996) 맥관형성의 조절(Control of Angiogenesis) (골드베르그 및 로젠(Goldberg and Rosen)편) Birkhauser, Basel 출판; 토마스(Thomas) (1966) J. Biol. Chem. 271: 603~606에서 검토). VEGF는 기재-분해효소를 증식, 이동 및 생산하기 위하여 내피세포를 선별적으로 자극하는, 분비된 디설피드-연결 호모다имер인데 (콘(Conn) 등 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1323~1327); 페라라(Ferrara) 및 헨젤(Henzel) (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161: 851~858); 고스포다로비체트(Gospodarowicz) 등 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:11~7315); 펄퍼(Pepper) 등 (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181: 902~906; 우네모리(Unemori) 등 (1992) J. Cell. Physiol. 153: 557~562), 상기 과정은 모두 신규 혈관의 형성에 필요한 공정이다. 단지 알려져 있는 내피세포 특이적 미토겐이라는 것 외에, VEGF는 거대 분자에 대한 혈관 투과성에 있어서 일시적 증가현상을 유도할 수 있는 능력면에서 맥관형성 성장인자 중 유일하다(그 원래 및 선택적인 이름 때문에, 혈관 투과 인자(VPF, Vascular Permeability Factor) (드보락(Dvorak) 등 (1979) J. Immunol. 122: 166~174; 쟁거(Senger) 등 (1983) Science 219: 983~985; 쟁거(Senger) 등 (1986) Cancer Res. 46: 5629~5632). 증가된 혈관투과성 및 결과적인 혈관외 공간의 플라스마 단백질의 퇴적은, 내피세포의 이동을 위한 일시적인 기재를 제공함으로써 신규 혈관의 형성을 지원한다(드보락 등 (1995) Am. J. Pathol. 146: 1029~1039). 과투과성은, 종양과 관련된 것을 포함하여, 참으로 신규 혈관의 특징이 된다(드보락 등 (1995) Am. J. Pathol. 146: 1029~1039). 또한, 조직 저산소증에 의하여 유도된 보상 맥관형성은 현재 VEGF에 의하여 매개되는 것으로 알려져 있다(레비(Levy) 등 (1996) J. Biol. Chem. 271: 2746~2753); 스베이키(Shweiki) 등 (1992) Nature 359: 843~845).

VEGF는, VEGF 유전자의 대체 스플라이싱의 결과, 4가지 형태(VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189, VEGF-206)로 발생한다(후크(Houck) 등 (1991) Mol. Endocrin. 5: (806~1814); 티셔(Tischer) 등 (1991) J. Biol. Chem. 266: 11947~11954). 2개의 작은 형태는 확산성인 반면에 큰쪽의 2개 형태는 헤파린에 대한 높은 친화력 때문에 세포막에 주로 국부화된 상태를 유지한다. VEGF-165도 헤파린에 결합되며, 가장 풍부한 형태다. 헤파린과 결합하지 않는 유일한 형태인 VEGF-121은 수용체에 대한 낮은 친화성(기타이-고렌(Gitay-

Goren) 등 (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 5519~5523) 및 낮은 분열촉진성 능력 (키트(Keyt) 등 (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 7788~7795)을 나타낸다. VEGF의 생물학적 효과는 2개의 티로신 키나제 수용체(Fit-1 및 Fik-1/KDR)에 의하여 매개되는데, 상기 수용체의 발현은 내피 기원의 세포에 고도로 제한된다(드 브리스(de Vries) 등 (1992) *Science* 255: 989~991; 밀리우어(Mulauer) 등 (1993) *Cell* 72: 835~846; 터만(Terman) 등 (1991) *Oncogene* 6: 519~524). 양방 기능 수용체의 발현에 고도의 친화성 결합이 필요한 반면에, 내피 세포의 주화성 및 분열촉진성 신호방식은 주로 KDR 수용체를 통하여 발생하는 것으로 보인다(팍(Park) 등 (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 25646~25654; 시타람(Seetharam) 등 (1995) *Oncogene* 10: 135~147; 발렌베르거(Waltenberger) 등 (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 26988~26995). 혈관의 개발을 위한 VEGF 및 VEGF 수용체의 중요성이, VEGF 유전자에 대한 단일 대립 유전자(카아멜릿(Carmeliet) 등 *Nature* 380: 435~439; 페라라 등 (1996) *Nature* 380: 439~442) 또는 Fit-1 (퐁(Fong) 등 (1995) 376: 66~70) 또는 Fik-1 유전자(살라비(Shalaby) 등 (1995) *Nature* 376: 62~66)의 양방 대립 유전자가 결여된 마우스에서 최근 과시되었다. 각각의 경우, 배치사를 초래하는 혈관 형성에 있어서의 독특한 비정상성이 관측되었다.

VEGF는 사실상 모든 종양세포에 의하여 다양한 양으로 생성 및 분비된다(브라운 등 (1997) 맥관형성의 조절(Regulation of Angiogenesis) (골드베르그 및 로센 편) 버크하우저, 바셀 233~269 페이지). VEGF 및 그 수용체가 종양성장기에 기여한다는 직접적인 증거가, 무모 마우스에서의 인체종양 이종이식편의 성장이 VEGF에 대한 항체의 중화(김(Kim) 등 (1993) *Nature* 362: 841~844), 지배적-음성 VEGF 수용체 Fik-1의 발현(밀라우어 등 (1996) *Cancer Res.* 56: 1615~1620; 밀라우어 등 (1994) *Nature* 367: 576~579), Fik-1 티로신 키나제 활성의 저분자량 억제제(스트라운(Strawn) 등 (1966) *Cancer Res.* 56: 3540~3545), 또는 VEGF mRNA에 대한 안티센스 서열의 발현(살레(Saleh) 등 (1996) *Cancer Res.* 56: 393~401)에 의하여 억제될 수 있다는 발표로부터 얻어졌다. 중요하게도, 종양 전이의 발생도, VEGF 길항물질에 의하여 극적으로 감소된다는 것이 판명되었다(콜라피(Claffy) 등 (1996) *Cancer Res.* 56: 172~181).

항암제로서의 용도외에, VEGF 억제제는, 건선, 안구장애, 콜라겐 혈관병 및 류머티스 관절염을 포함하는, 과잉의 맥관형성을 특징으로 하는 다양한 증식성 질병에 유용할 수 있다. 대부분의 종양 형태가 VEGF를 생성하는 것으로 알려져 있기는 하나, 최근까지 기능성 VEGF 수용체를 발현하는 것은 아무것도 나타나지 않았다. 카포시의 육종(KS, Kaposi's Sarcoma) 세포는 풍부한 양의 VEGF를 생성할 뿐만 아니라 기능성 VEGF 수용체를 발현하기 때문에, VEGF를 오우토크라인 (autocrine) 성장용으로 이용하는 것으로 나타났다. 카포시 육종은 통상적으로 종래의 항대사약물로 처리된다. 그러나, KS 환자에 화학요법을 사용하는데 있어서의 중요 단점은, 면역 시스템이 이미 손상된 환자에 심각한 영향력을 미치는 면역억제의 도입이 수반된다는 것이다. KS 병변이 나타나기 시작하나 환자는 이와 달리 매우 건강한 것으로 느끼는 질병의 초기 단계에서, 대체 치료방법의 필요성이 특히 크다. 이와 같은 점에서, 다우노루비신과 같은 화학요법 약물을 리포솜으로 캡슐화하는 것이 항종양 효능을 유지하면서도 화학요법의 부작용을 최소화할 수 있는 유력한 방법이라는 것이 최근 증명되었다. 여기에 기재된 핵산 리간드 VEGF 길항물질과 같은, 내피 세포 기원의 활성화된 세포를 선별적으로 표적으로 하는, 독성이 낮은 약물은 KS의 치료에 있어서 매우 유리하게 된다.

VEGF 핵산 리간드에 대한 잠재적인 임상적 용도의 기타 분야는, 과잉의 맥관형성을 특징으로 하는 안구장애이다. 이와같은 질병의 예로는 황반장애 및 당뇨병 망막병증이 있다. 황반 장애에 있어서, 황반 아래의 점진적 맥락막 맥관 형성(최고의 시력을 담당하는 망막 부위)은 시각을 방해한다. 황반 장애 및 당뇨병 망막병증에 있어서 혈관 성장을 개시하는 초기 자극은 현재 알려져 있지 않으나, VEGF가 주요 맥관형성 유도인자로 보인다(로페즈(Lopez, P.F) 등 (1996) *Invest. Ophthalmol. Visual Science* 37, 855~868; 클리펜(Kliffen, M) 등 (1997) *Br. J. Ophthalmol.* 81, 154~162; 반타(Kvanta, A) 등 (1996) *Invest. Ophthalmol. Visual Science* 37, 1929~1934; 파퀘스(Paques) 등 (1997) *당뇨병 및 신진대사(Diabetes & Metabolism)* 23: 125~130). 따라서 VEGF의 억제제는 황반장애에 있어서의 맥관 형성을 약화시키는데 유용할 수 있다.

발명의 요약

여기에 기재된 것은 혈관 내피 성장인자(VEGF)에 대한 친화성이 높은 2'-플루오로(2'-F)-변성 피리미딘 RNA 리간드이다. 이와 같은 핵산 리간드를 식별하기 위하여 여기서 이용된 방법을, 지수적 부유화에 의한 리간드의 총체적 진화, 즉 SELEX라 한다. 여기에 기재된 리간드는 30 또는 40개의 인접한 위치에 랜덤화된 약 10^{14} RNA 분자의 초기 풀로부터 선택된다. 여기에 포함된 것은 표 2~6에 나타나는 전개된 리간드이다. 본 발명에 또한 포함되는 것은 핵산이 VEGF의 리간드인, 핵산의 대상 혼합물로부터 핵산 리간드를 식별하는 것을 포함하는 방법에 의한 VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체의 제조방법인데, 상기 방법은, (a) 핵산의 대상 혼합물을 VEGF와 접촉, (b) VEGF에 대한 친화력을 기준으로 상기 대상 혼합물의 멤버 사이를 분리 및 (c) VEGF에 대한 결합 친화력이 비교적 높은 핵산 서열에 대하여 부유화된 핵산의 혼합물을 산출하기 위하여 선별된 분자를 증폭, 및 상기 식별된 VEGF 핵산 리간드와 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 공유 결합식으로 연결시키는 것이다. 본 발명은 또한 VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체를 포함한다.

본 발명은 또한 VEGF 핵산 리간드 또는 복합체를 포함하는 지질 구조체를 포함한다. 본 발명은 또한, 복합체가 VEGF 핵산 리간드 및 친유성 화합물을 포함하고 있는 복합체를 포함하는 지질 구조체의 제조방법에 관한 것이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 VEGF 핵산 리간드를 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 공유 결합식으로 연결하여 복합체를 형성하고, 상기 복합체를 환자에 복용시킴으로써, VEGF 핵산 리간드의 약물 속도론적 특성을 개선하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 복합체를 다시 지질 구조체와 회합시킴으로써 VEGF 핵산 리간드의 약물속도론적 특성을 개선하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 하나의 목적은, 하나 이상의 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 함께 하나 이상의 VEGF 핵산 리간드를 포함하는 복합체 및 상기 복합체의 제조 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 다

른 하나의 목적은 복합체를 포함하는 지질 구조체를 제공하는 것이다. 본 발명의 또다른 하나의 목적은 개선된 약물속도론적 특성을 지닌, 하나 이상의 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 함께 하나 이상의 VEGF 핵산 리간드를 제공하는 것이다.

VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물을 포함하는 복합체에 관한 본 발명의 구체예에서, 비면역원성의 고분자 화합물은 바람직하게는 폴리알킬렌 글리콜, 좀더 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. 보다 바람직하게는, PEG는 약 10~80K의 분자량을 갖는다. 가장 바람직하게는, PEG의 분자량은 약 20~45K이다. VEGF 핵산 리간드 및 친유성 화합물을 포함하는 복합체에 관한 본 발명의 구체예에서, 친유성 화합물이 글리세로리피드인 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 지질 구조체는 바람직하게는 지질 2중막층 소포이며 가장 바람직하게는 리포솜이다. 바람직한 구체예에서, VEGF 핵산 리간드는 SELEX 방법에 의하여 식별된다.

VEGF 핵산 리간드 또는 리간드들과 공유 결합식으로 연결된 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체에 관한 본 발명의 구체예에서, VEGF 핵산 리간드 또는 리간드들은 표적화 능력내에서 역할을 할 수 있다.

또한, VEGF 핵산 리간드는, 복합체의 일부가 됨이 없이, 공유 또는 비공유 결합 상호작용을 통하여 지질 구조체와 회합될 수 있다.

또한, 지질구조체가 지질 2중막층 소포와 같이 내부 구획을 한정하는 막을 지니는 형태로서, VEGF 핵산 리간드, 또는 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물/VEGF 핵산 리간드 복합체를 포함하는 지질 구조체에 관한 본 발명의 구체예에서, 지질 구조체와 공동으로 복합체 또는 VEGF 핵산 리간드는 구획내에서 캡슐화되거나 또는 지질 구조체의 막과 회합될 수 있다. VEGF 핵산 리간드가 막과 관련되어 있는 구체예에 있어서, VEGF 핵산 리간드는, VEGF 핵산 리간드가 소포의 속으로 또는 밖으로 돌출하도록, 막의 내면부 또는 외면부와 회합될 수 있다. 특정 구체예에서, VEGF 핵산 리간드 복합체는 미리 형성된 지질 구조체의 외측상에 수동적으로 적재될 수 있다. 핵산 리간드가 지질 구조체의 밖으로 돌출되어 있는 구체예에서, VEGF 핵산 리간드는 표적화 능력내에서 역할을 할 수 있다.

지질 구조체의 VEGF 핵산 리간드가 표적화 범위내에서 역할하는 구체예에서, 지질 구조체는 부가적인 치료제 또는 진단제와 회합될 수 있다. 하나의 구체예에서, 치료 또는 진단제는 지질 구조체의 외부와 회합된다. 다른 구체예에서는, 치료 또는 진단제는 지질 구조체내에 캡슐화되거나 또는 지질 구조체의 내부와 회합된다. 또다른 구체예에서, 치료 또는 진단제는 복합체와 회합된다. 하나의 구체예에서, 치료제는 약물이다. 하나의 대체 구체예에서, 치료 또는 진단제는 하나 이상의 추가적인 핵산 리간드이다.

본 발명의 다른 하나의 목적은 VEGF 핵산 리간드, 또는 VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체 또는 본 발명의 상기 복합체를 포함하는 지질 구조체의 복용에 의한, 맥관형성의 억제방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또다른 하나의 목적은, VEGF 핵산 리간드, 또는 VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체 또는 본 발명의 상기 복합체를 포함하는 지질 구조체의 복용에 의한, 종양성장의 억제 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또다른 하나의 목적은, VEGF 핵산 리간드, 또는 VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체 또는 본 발명의 상기 복합체를 포함하는 지질 구조체의 복용에 의한, 카포시 육종의 억제방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또다른 하나의 목적은, VEGF 핵산 리간드, 또는 VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체 또는 본 발명의 상기 복합체를 포함하는 지질 구조체의 복용에 의한, 황반장애의 억제방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또다른 하나의 목적은, VEGF 핵산 리간드, 또는 VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체 또는 본 발명의 상기 복합체를 포함하는 지질 구조체의 복용에 의한, 당뇨병 망막병증의 억제방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 하나의 목적은, 치료 또는 진단제를, VEGF 핵산 리간드 및 친유성 화합물 또는 비면역원성의 고분자 화합물을 포함하는 복합체와 회합시킴으로써, VEGF를 발현시키는 생물학적 표적에 상기 체재를 표적화하는 방법을 제공하는 것인데, 여기서 상기 복합체는 다시 지질구조체와 회합되며, VEGF 핵산 리간드는 다시 지질구조체의 외부와 회합된다.

본 발명의 이들 및 기타 목적과 특성, 범위 및 이용방법은 하기 명세서의 내용 및 첨부된 특허청구의 범위로부터 당분야의 숙련자는 용이하게 명백하게 될 것이다.

도면의 간단한 설명

제1A~1Q도는 다음의 분자 설명이다. NX213(제 1A도), NX278(제 1B도), scNX278(제 1C도), scNX213(제 1D도), NX31838-PL(제 1E도), NX31838 리피드 아마이드 1(제 1F도), NX31838 리피드 아마이드 2(제 1G도), NX31838-40K PEG (제 1H도), NX31838-20K PEG (제 1I도), 링커가 없는, NX31838 40K PEG 다이머(NX31838d0)(제 1J도), 1개의 C5 링커를 지닌, NX31838 40K 다이머(NX318381d)(제 1K도), 2개의 C5 링커를 지닌, NX31838 40K PEG 다이머(NX31838d2)(제 1L도), C-5 아미노링커(제 1M도), 글리세롤 비스포스페이트 링커(제 1N도), 18 원자 스페이서 링커(제 1O도), 아미노테트라에틸렌 글리콜 링커(제 1P도), 3'3dT(제 1Q도) 및 NX31917(제 1R도). 리간드의 5' 포스페이트 그룹이 도면에 묘사된다. mPEG는 메틸 폴리에틸렌 글리콜을 나타낸다. 뉴클레오티드 앞의 소문자는 다음을 가르킨다; m=2'-O-메틸, a=2'-아미노, r=리보, 및 f=2'-플루오로. 뉴클레오티드 앞의 문자가 없는 것은 데옥시리보뉴클레오티드를 의미한다(2'H). 3'3'-dT는 3'단부에서 3'3' 전화된 포스포디에스테르 연결을 가르킨다. 뉴클레오티드 뒤의 S는 포스포로티오에이트 인터뉴클레오시드 연결로 구성되는 백본 변형을 나타낸다.

제2도는 VEGF에 대한 다양한 핵산 리간드의 결합성을 나타낸다. 불변형 핵산리간드(NX213, 개방 서클), 그 디알킬글리세로 변형 유사체(NX278, 개방 다이아몬드) 및 리포솜 NX278(NX278-L, 개방 4각형)의 결합 친화성과 함께 서열 혼란제어(sc, sequence scrambled control)(scNX213, 폐쇄 서클: scNX278, 폐쇄 다이아몬드; 및 scNX278-L, 폐쇄 4각형)가 경쟁 전기영동 이동변이 분석법(competition electrophoretic

mobility shift assay)에 의하여 측정되었다. NX213은

5'-TsTsTsTsmAaCaCaCaUrGrAaUmGrGaUmAmGrAaCmGaCaCmGaCaCmGmGmGaUmGTsTsTs TsT-3'이며, scNX213은 다음과 같다.

5'-TsTsTsTsmGaUaCmGmGaUmAaCrGmGrAmGaUmGrGrAaCnCmGaUaCmAaCmG TsTsTsTsT-3'

VEGF(0.33nM) 및 경합제 올리고뉴클레오티드(5pM-0.33 μM)의 존재하에, 37°C에서 20분간 ³²P 5-단부-표지 NX-213(1.5nM)이 결합 완충액(0.01% 인체 혈청 알부민을 지닌, 인산염 완충작용 식염수)에서 배양되었다. ³²P NX-213/VEGF 복합체가, 전기영동 8% 폴리아크릴아미드겔(가동 완충액으로서 19:1 아크릴아미드:비스-아크릴아미드, 트리스-붕산염, 89mM, 1mM EDTA)에 의하여 ³²P NX-213으로부터 용해되었다. 포스포리메이지(phosphor imager) 분석법에 의하여, 다양한 경합제 농도에서 ³²P NX-213/VEGF 복합체에 해당하는 밴드의 강도가 정량되었다. 경합제의 부재하에 형성된 복합체의 양에 대하여 정상화된 데이터가, 최소 제곱법에 의하여, 경쟁 결합 등식에 적용되었다.

제3도는 혈관 투과성에 있어서의 VEGF-유도 증가에 대하여, 다양한 핵산 리간드의 효과를 나타내고 있다. 핵산 리간드가 있거나 없는 VEGF(20nM)가, 미리 에반스 청색 염료의 주사를 맞은 기니아 돼지에 피내 주사되었다. 염료 누출량은, 주사부위의 피부에 의하여 흡수되는 빛의 상대적 양을 측정함으로써 정량되었다.

제4도는 NX278-L이 KS 세포성장을 억제함을 나타내고 있다. 다양한 농도의 NX213, NX278 및 scNX278-L 존재하의 KSY-1 세포의 성장. KSY-1 세포는 0일째에 1X10⁴ 세포/웰의 밀도로 24웰 플레이트에 파종되었다. 동일하게 처리된 신선배지가 1 및 3일째에 대체되었다. 세포수는 입자 카운터 카운터를 사용하여, 배양 5 또는 6일째에 세포의 트립신 처리에 의하여 측정되었다. 실험은 여러번에 걸쳐 3중으로 시행되었다. 도시된 결과는 평균치이며 대표적 실험의 SE이다.

제5A도 및 5B도는 NX278이 무흉선 마우스에서 KS 세포의 성장을 억제한다는 것을 나타낸다. 무흉선 마우스가 1일째에 앞다리 뒤에 KS 종양으로 이식되었다. 마우스는 2일째에 시작하여 5일간 매일 복강내 주사에 의하여, NX278-L(50 μg/일/마우스, 제5A도 및 150 μg/일/마우스, 제5B도)로 처리되었다. 대조 마우스는 핵산 리간드 처리 그룹과 같은 양의 지질을 사용하여 공 리포솜으로 처리되었다. 종양 크기는 2주간에 걸쳐 측정되었다. 종양은 14일째에 제거하여 측정하였다.

제6도는 대형환제 주사에 따르는 시간의 함수로서, NX31838 20K PEG(□), 40K PEG(■), 및 NX31838(마이너스 PEG)(▽)의 플라스마 농도에 대한 데이터를 요약한다.

제7도는 대형환제 주사에 따르는 시간의 함수로서, NX31838 PL의 플라스마 농도에 대한 데이터를 요약한다.

제8A도~8D도는 지시된 바와 같이 VEGF 단백질(0.8pmol) ± 핵산리간드/모노클로날 항체의 피내 주사에 의하여 도출된 혈관 투과성의 변화를 나타낸다. 에반스 청색 염료의 국부 혈관외 유출은 수집된 피부의 투시법에 의하여 주사 30분 후에 측정되었다. A, B, C 및 D도는 주사 30분전 NX31838-20K PEG, NX31838-40K PEG, NX31838-PL 또는 NX31838-40K PEG와 단백질의 공혼합 효과를 나타낸다. 값은 평균 ± SEM. VEGF 단독과 비교하여 *P < 0.05. 제1도의 분자 설명 참조.

제9A도~9C도는 VEGF-유도 각막 맥관형성의 핵산 리간드 감쇠의 평가를 나타낸다. 0 또는 3pmol의 VEGF 단백질이 생체고분자(하이드론)에 첨합되고 각막 스트로마에 이식되었다. 동물은 5일동안 지시된 바와 같이, PBS나 핵산 리간드로 매일 두번씩 정맥내로 처리되었다. A, B 및 C도는 신생혈관 형성에 대한 NX31838-20K PEG, NX31838-40K PEG, NX31838-PL 핵산 리간드로의 총체적 처리 효과를 나타낸다. 값은 평균 ± SEM. 3pmol VEGF+PBS 그룹과 비교하여 *P < 0.05. 제1도의 분자 설명 참조.

제10도는 복용 후 시간에 대한 함수로서 NX31838-40K PEG의 플라스마(○, △) 또는 초자체(●, ▲, ■) 농도에 관한 데이터를 요약한다.

제11도는 하루에 두번 운반(BID)된 40mg/kg 또는 10mg/kg의 VEGF NX31838 40K PEG 핵산 리간드(NX31838 NAL)로 처리된 무모 마우스에서 피하(s.c) 성장하는 인체 A673 종양의 종양 성장 곡선을 나타낸다. 뒤섞인 VEGF 핵산 리간드 서열, NX31917 NAL(제 1R도의 분자 설명 참조)로 구성된 음성 대조물이 하루에 두번 40mg/kg으로 투여되고, 항-VEGF 모노클로날 항체 mAb26503.11(R&D 시스템)로 구성된 양성 대조물이 1주일일에 두번 100 μg/마우스로 투여되었다. 40mg/kg 투여 그룹과 10mg/kg 투여 그룹 사이에 전혀 현저한 차이가 나타나지 않기 때문에, 14일째 후에는 더 이상의 40mg/kg 그룹의 투여는 없었다. 8 마우스 그룹은 0일째에 1 x 10⁷ A673 종양세포로 피하이식되고, 복강내 주사에 의한 시험 화합물로의 처리가, 실험이 지속되는 동안 1일째에 개시되었다. mm³로서 표시되는 종양 용적은 공식: 종양 용적=L x W²/2을 이용하여 측정되었다.

제12도는 VEGF NX31838 핵산 리간드(NAL)의 상이한 투여 스케줄(1일 2회 투여(BID)와 1일 1회 투여(QD)의 비교), 40K PEG 벡터(NX31838.07 벡터와 신규 NX31838.04 벡터의 비교), 및 상이한 약물 배합(리포솜 VEGF NX31838.PL NAL과 VEGF NX31838 NAL 40K PEG의 비교)의 종양 성장 곡선을 나타낸다. 8마우스 그룹은 0일째에 1x10⁷ A673 종양세포로 피하이식되고, 복강내 주사에 의한 시험 화합물로의 처리가, 실험이 지속되는 동안 1일째에 개시되었다. 몇개의 그룹에는 종양이 성장하지 않은 동물이 있었으며, 따라서 최종 분석을 위하여 일부 그룹은 단지 7마리(NX31838.04 10mg/kg BID, 및 NX31838.04 3mg/kg BID), 또는 6마리(NX31838.04 10mg/kg QD, 및 NX31838.07 10mg/kg BID) 동물을 포함한다. mm³로서 표시되는 종양 용적은 공식: 종양 용적=L x W²/2을 이용하여 측정되었다.

제13도는 1일 1회 운반된 VEGF NX31838 40K PEG 핵산 리간드(NX31838 NAL)에 의하여 무모마우스에서 피하

(s.c) 성장하는 A673 종양의 투여-의존성 억제를 나타낸다. 이 적정은 무효 투여량에 도달하는데는 실패 하였으며; 최저(0.03mg/kg) 투여에서도 종양억제 효과가 관측되었다. 8 마우스 그룹은 0일째에 1×10^7 A673 종양세포로 피하이식되고, 복강내 주사에 의한 시험 화합물의 처리가, 실험이 지속되는 동안 1일 째에 개시되고, 그룹 NX31838 NAL 3mg/kg에는 종양성장이 실패한 2마리 동물이 있었고, 따라서 단지 6마 리만 포함되었다. mm^3 로서 표시되는 종양 용적은 공식: 종양 용적= $n \times W^2/2$ 을 이용하여 측정되었다.

제 14도는 1일 1회 운반된 VEGF NX31838 40K PEG 핵산 리간드(NAL)에 의하여 무모마우스에서 피하(s.c) 성 장하는, 구축된 A673 종양의 억제를 표시하는 종양성장 곡선을 나타낸다. 항-VEGF 모노클로날 항체 mAb 26503.11(R&D 시스템)으로 구성된 양성 대조물이 1주일에 2회 $100 \mu\text{g}$ /마우스로 투여되었다. 마우스는 1×10^7 A673 세포로 이식되고, 종양은 $200 \pm 100 \text{mm}^3$ 의 용적으로 성장되도록 하였으며, 이때 동물은 종양에 따라 분류되고, 영구적인 식별을 위하여 문신하고, 복강내 주사에 의한 시험화합물의 처리가 개시되어 실험 지속 기간동안 계속되었다. 각 점은 8마우스의 평균을 나타낸다. mm^3 로서 표시되는 종양 용적은 공식: 종양 용적= $n \times W^2/2$ 을 이용하여 측정되었다.

제 15도는 대량 주사 후의, NX213, NX278, NX278-리포좀의 플라스마 농도에 대한 데이터를 요약한다.

제 16도는 무모마우스에 피하 이식된 KSY-1 종양의 성장곡선을 나타낸다. 마우스는 실험시작 기간동안 1일 2회의, NX31917 40K PEG 또는 NX31838 40K PEG(30mg/Kg) 또는 PBS의 복강내 주사로 처리되었다. 처리는 무모마우스의 뒷쪽 옆구리에 2×10^7 KSY-1 세포를 피하 이식한 1일 후에 개시되었다. 각 그룹에 4 마우스가 사용되었다. 오차는 SEM이다.

발명의 상세한 설명

정의:

'공유결합'이란 전자의 공유에 의한 화학 결합이다.

'비공유 상호작용'이란 이온 상호작용 및 수소 결합을 포함하는, 공유결합 이외의 상호작용에 의하여 분 자 구성 요소가 함께 고정하게 되는 작용을 의미한다.

'친유성 화합물'이란 지질 및/또는, 실질적으로 친유성 성분을 포함하는 구조체를 포함하여, 유전상수가 낮은 기타 물질 또는 상과 결합하는 경향이 있는 화합물이다. 친유성 화합물은 지질은 물론 지질(및/또는 유전상수가 낮은 기타 물질 또는 상)과 결합하는 경향이 있는 비지질 함유 화합물을 포함한다. 콜레스테 롤, 인지질 및 디알킬글리세롤과 같은 글리세롤리피드 및 디아실글리세롤 및 글리세롤 아미드 리피드는 친유성 화합물의 또다른 예이다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, VEGF 핵산 리간드에 공유 결합식으로 연결된 친유성 화합물은 하기 구조를 지닌 글리세롤리피드이다.



여기서 R^1 , R^2 및 R^3 는 독립적으로, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-O}(\text{PO}_3)\text{-CH}_2\text{-}$; 및 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-CONH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-O-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_2\text{-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n(\text{CO})\text{OCH}_2\text{-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n(\text{CO})\text{O-}$ 및 X-로 구성되어 있는 군으로부터 독립적으로 선택되 는데, 여기서 하나 이상은 X-이어야 하며, X는 (PO_4) , O 및 $\text{CH}_2\text{OC=O}$ 로 구성되어 있는 군으로부터 독립적으 로, 선택되며, $n=0\sim 30$, 바람직하게는 $10\sim 200$ 이다. ROI $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-O}(\text{PO}_3)\text{-CH}_2\text{-}$ 일 경우, 친유성 화합물은 포스포리피드이다. ROI $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-CONH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ 일 경우, 친유성 화합물은 글리세롤 아미드 리피드이다. ROI $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-O-}$ 또는 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_2\text{-}$ 이면, 친유성 화합물은 디알킬 글리세롤 리피드이다. ROI $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n(\text{CO})\text{OCH}_2\text{-}$ 또는 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n(\text{CO})\text{O-}$ 이면, 친유성 화합물은 디아실글리세롤 리피드이다. 바람직한 구체 예에서 R^3 는 X-이다.

여기서 사용된 '복합체'는 VEGF 핵산 리간드가 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물에 공유 결합 연결에 의하여 형성된 분자 구성 요소를 말한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 복합체는 A-B-Y로 표 시되는데, 여기서 A는 여기에 기재된 바와 같은 친유성 화합물 또는 비면역원성의 고분자 화합물; B는 임 의의 물질, 및 하나 이상의 링커 Z일 수 있으며; Y는 VEGF 핵산 리간드이다.

본 발명의 목적을 위한 '지질 구조체', 지질이 수성 현탁액에 채택되는 것으로 알려진 다양한 다른 구조 의 배열체를 포함하는, 지질, 포스포리피드, 또는 그들 유도체를 함유하는 구조체이다. 이들 구조체는 이 들만에 국한되는 것은 아니나, 지질 2중막층 소포, 리포좀, 에멀션, 지질 리본 또는 시트를 포함하며, 약 리학적으로 수용 가능한 것으로 알려진 다양한 약물 및 성분과 복합체를 이룰 수 있다. 바람직한 구체예 에서, 지질 구조체는 리포좀이다. 바람직한 리포좀은 단층상이며 200nm 미만의 상대적 크기를 갖는다. 지 질 구조체내의 통상적인 첨가 성분은 콜레스테롤 및 알파-토코페롤이다. 지질 구조체는 단독으로, 또는 당분야의 숙련자가 특정 용도에 요망되는 특성을 제공하는 것으로 이해하는 임의의 조합형태로 사용될 수 있다. 또한, 지질구조체 및 리포좀 형성의 기술적 관점은 당분야에 잘 알려져 있으며, 현장에서 시행되고 있는 통상적인 방법이 본 발명에 이용될 수 있다.

여기서 사용된 '핵산 리간드'는 표적에 대하여 요망스러운 작용을 하는 비자연 발생 핵산이다. 본 발명의 표적은 VEGF이므로, VEGF 핵산 리간드라는 용어가 있다. 요망스러운 작용에는, 이것만에 국한되는 것은 아니나, 표적의 결합, 촉매작용적으로 표적을 변화, 표적 또는 표적의 기능적 활성을 변형/변경시키는 방법으로 표적과 반응, 자기불활화 억제제에서와 같이 표적에 공유결합식으로 부착, 표적과 다른 분자 사이의 반응을 촉진하는 것을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 작용은 VEGF에 대하여 특이적인 결합 친화성인데, 여기서 핵산리간드는 VEGF에 의하여 결합되는 것으로 알려진 생리학적 기능을 갖는 핵산이 아니다.

본 발명의 바람직한 구체예에서, 복합체의 VEGF 핵산 리간드 및 본 발명의 지질구조체는 SELEX 방법론에 의하여 식별된다. VEGF 핵산 리간드는, a) 대상 혼합물을 VEGF와 접촉, 여기서, 대상 혼합물에 비하여 상대적으로 VEGF에 친화성이 증가되어 있는 핵산이 대상 혼합물의 잔류물로부터 분리될 수 있다; b) 대상 혼합물의 잔류물로부터 친화력이 증가된 핵산을 분리; 및 c) 핵산의 리간드 부유화 혼합물을 산출하기 위하여 친화력이 증가된 핵산을 증식하는 단계를 포함하는 방법에 의하여, 핵산(이 핵산은 VEGF의 리간드이다)의 대상 혼합물로부터 식별된다(발명의 명칭이 '혈관내피 성장인자(VEGF)에 대한 높은 친화력의 올리고뉴클레오티드'(High Affinity Oligonucleotides to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF))이며, 1994.4.25 출원된 미국특허출원 제08/233,012호, 발명의 명칭이 '혈관내피 성장인자에 대한 높은 친화력의 올리고뉴클레오티드 리간드'(High Affinity Oligonucleotide Ligands to Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF))이며, 1995.5.19 출원된 미국특허출원 제08/447,169호를 참조할 것, 이들을 여기서 참고로 인용한다).

'대상 혼합물'은 서열을 달리하는 핵산의 혼합물인데, 이로부터 요망 리간드를 선별한다. 대상 혼합물의 공급원은 자연 발생 핵산 또는 그 단편, 화학적으로 합성된 핵산, 효소적으로 합성된 핵산 또는 상기 기술들의 조합에 의하여 제조된 핵산일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 각 핵산은 증폭 공정을 촉진하기 위하여 랜덤화 영역을 포위하고 있는 고정된 서열을 갖는다.

'핵산'은 단일사슬이나 2중 사슬의 DNA, RNA 및 그들의 임의의 화학적 변형체를 의미한다. 변형방법은, 이것만에 국한되는 것은 아니나, 핵산 리간드 염기 또는 핵산 리간드 전체에 부가적인 전하, 분극성, 수소결합, 정전기적 상호작용 및 유연성을 첨가시키는 기타 화학 그룹을 제공하는 것을 포함한다. 이와같은 변형은, 이것만에 국한되는 것은 아니나, 2'-위치 당 변형, 5-위치 피리미딘 변형, 8-위치 퓨린 변형, 외향고리 아민에서의 변형, 4-티오유리딘의 치환, 5-브로모 또는 5-이오도-유라실의 치환, 뉴클레오시드간의 포스포로티오에이트 연결과 같은 백본 변형, 메틸화, 이소염기인 이소사이티딘 및 이소구아니딘 등과 같은 비정상 염기쌍 조합을 포함한다. 변형은 또한 캡핑과 같은 3' 및 5' 변형을 포함할 수 있다.

'비면역원성의 고분자 화합물'은 면역원성 반응을 나타내지 않는, 약 1,000Da~1,000,000Da, 좀더 바람직하게는 1000Da~500,000Da 및 가장 바람직하게는 1000Da~200,000Da의 화합물이다. 본 발명의 목적에 있어서, 면역원성 반응이란 항체 단백질을 제조하기 위한 유기체를 발생시키는 것이다. 비면역원성의 고분자 화합물의 예로는 폴리알킬렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, VEGF 핵산 리간드에 공유 결합식으로 연결된 비면역원성의 고분자 화합물은 폴리알킬렌 글리콜이며, 구조식이 $R(O(CH_2)_x)_nO-$ 인데, 여기서 R은 독립적으로 H 및 CH_3 로 구성되어 있는 군으로부터 선택되며, $x=2$

~ 5 , 및 $n \approx$ 폴리알킬렌 글리콜의 $MMW/16+14x$ 이다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 분자량은 약 10~80kDa이다. 가장 바람직한 구체예에서, 폴리알킬렌 글리콜의 분자량은 약 20~45kDa이다. 가장 바람직한 구체예에서, $x=2$ 및 $n=9 \times 10^2$ 이다. 동일 VEGF 핵산 리간드에 부착된 하나 이상의 폴리알킬렌 글리콜이 있을 수 있는데, 분자량의 합계는 바람직하게는 10~80kDa, 보다 바람직하게는 20~45kDa이다. 특정 구체예에서, 비면역원성의 고분자 화합물은 핵산 리간드도 될 수 있다.

'지질 2중막층 소포'는 극성(친수성) 및 비극성(친유성) 부분을 갖는 개별 분자들로 원칙적으로 형성된, 폐쇄된 유체-충전 미세구이다. 친수성 부분은 포스페이트, 글리세릴포스페이트, 카르복시, 술페이트, 아미노, 히드록시, 콜린 및 기타 극성 그룹을 포함한다. 비극성 그룹의 예에는 알킬, 알케닐 또는 기타 지질그룹과 같은 포화 또는 불포화 탄화수소가 있다. 스테롤(예를들면 콜레스테롤) 및 기타 약리학적으로 수용 가능한 성분(산화방지제형 알파-토코페롤을 포함)도 소포의 안정성을 개선하거나 기타 요망 특성을 부여하기 위하여 내포될 수 있다.

'리포솜'은 지질 2중막층 소포의 소단위인데, 대체로, 긴 지방산 사슬로 구성되어 있는 2개의 소수성 꼬리를 함유하는 포스포리피드 분자를 포함한다. 물에 노출되면, 이들 분자는 자발적으로 정렬되어, 막의 중앙에 회합된 각 층에 있는 분자의 친유성 단부 및 2중막층 막의 각각의 내부 및 외부 표면을 형성하는 반대편 극성 단부를 지닌 2중막층 막을 형성한다. 따라서, 막의 각 측은 친수성 표면을 나타내는 반면에 막의 내부는 친유성 매질을 포함한다. 형성되었을 때 이들 막은 일반적으로, 내부 수성 공간 주위로, 양파층과 유사하게, 층간의 수성상에 의하여 분리된 동심의 근접한 막의 시스템으로 배열된다. 이들 다중 판상 소포(MLV)는 전단력의 작용에 의하여 단층 판상 소포(UV)로 전환될 수 있다.

'양이온 리포솜'은 생리학적 pH에서 전체적으로 양전하를 지니는 지질 성분을 함유하는 리포솜이다.

'SELEX' 방법론은, 예를들면 단백질에 결합시키는 것과 같이, 요망스러운 방식으로 표적과 상호작용하는 핵산리간드의 선별과 이들 선별된 핵산의 증폭의 조합과 관련된다. 선별/증폭 단계의 반복적인 순환은, 수많은 핵산을 함유하는 풀로부터 표적과 가장 강력하게 상호작용하는 하나 또는 소수의 핵산의 선별을 가능케 한다. 선별/증폭 공정의 순환은 목적이 달성될 때까지 계속된다. SELEX 방법론은 SELEX 특허출원에 기재되어 있다.

'표적'은 리간드가 요망하는 임의의 관심 화합물 또는 분자를 의미한다. 표적은 단백질(VEGF, 트롬빈 및 셀렉틴과 같은), 펩티드, 탄수화물, 다당류, 글리코단백질, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 바이러스, 기재, 대사물질, 전이상태 아날로그, 공동인자, 억제제 약물, 염료, 영양제, 성장인자 등 제한이 없다. 본 발명의 주 표적은 VEGF이다.

'개선된 약물속도론적 특성'이란 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 공유 결합식으로 연

결된 또는 지질 구조체와 관련된 VEGF 핵산 리간드가, 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물 또는 지질 구조체와 관련되지 않은 동일 VEGF 핵산 리간드에 비하여 상대적인 긴 생체내 순환 반감기를 나타내는 것을 의미한다.

'링커'는 공유결합 또는 비공유결합 상호작용을 통하여 둘 이상의 분자 구성성분을 연결시키며, 하나 이상의 분자 구성 성분의 기능적 특성을 보존하는 상태로 분자 구성 성분의 공간적 분리를 가능케 하는 분자 구성 성분이다. 링커는 스페이서로서도 알려져 있다. 링커의 예에는, 이것만에 국한되는 것은 아니나, 제 1M도~1P도에 도시된 구조체를 내포한다.

여기서 사용된 '치료법'은 치료 및/또는 예방을 내포한다. 사용되면 치료대상은 인간 및 기타 동물들이다.

본 발명은 2'F-변형 뉴클레오티드를 포함하는, VEGF에 대한 RNA 리간드를 포함한다. 본 발명은 또한 표 2~6 (SEQ ID NO:)에 표시된, VEGF에 대한 특정 RNA 리간드를 내포한다. 좀더 구체적으로 본 발명은 표 2~6에 표시된 특정 핵산 리간드와 실질적으로 일치하며, VEGF와의 결합 능력이 상기 특정 핵산 리간드와 실질적으로 같은 핵산 서열을 내포한다. 실질적으로 일치한다는 것은, 서열의 상동성 정도가 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 및 보다 바람직하게는 90%, 95% 또는 99% 이상을 의미한다. 여기에 기재된 상동성의 백분율은, 10 뉴클레오티드내의 1쌍이 그 배열을 지원하기 위하여 도입될 수 있을 때와 비교되는 서열내의 동일 뉴클레오티드 잔기와 정렬하는 2개의 서열 중 작은 쪽에서 발견된 뉴클레오티드의 백분율로서 계산된다. 사실상 VEGF를 결합하는 동일 능력이란, 친화력이 여기에 기재된 리간드의 친화력 정도의 순서로 1 또는 2번째 내에 있다는 의미이다. 소정의 서열-여기에 구체적으로 기재된 것과 사실상 일치하는-이 VEGF에 대하여 동일한 능력을 갖는지의 여부를 측정하는 것은, 당분야의 통상적인 숙련자에게 잘 알려져 있다.

표 2~6(SEQ ID NOS:)에 표시된 VEGF의 핵산 리간드의 서열 상동성을 검토한 결과, 상동성이 거의 또는 전혀 없는 서열이 VEGF에 대하여 사실상 동일한 결합능력을 가질 수 있다는 것을 보인다. 이들 이유 때문에, 본 발명은 또한 표 2~6에 표시된 핵산 리간드와 동일한 추정된 구조 또는 구조적 기초 및 VEGF에 대한 결합능력을 갖는 핵산 리간드를 포함한다. 실질적으로 동일한 구조 또는 구조적 기초는 주커폴드 (Zuckerfold) 프로그램(주커(1989) Science 244: 48~52 참조)을 이용하는 서열 정렬에 의하여 가정될 수 있다. 당분야에 알려진 바와 같이, 2차 구조 및 구조적 기초를 예측하기 위하여 기타 컴퓨터 프로그램이 이용될 수 있다. 용액내에서 또는 결합 구조로서, 핵산 리간드의 실질적으로 동일한 구조 또는 구조적 기초는 당분야에 알려진 바와 같이 NMR 또는 기타 기술을 이용하여 가정될 수 있다.

본 발명에 또한 포함되는 것은 핵산이 VEGF의 리간드인, 핵산의 대상 혼합물로부터 핵산 리간드를 식별하는 것을 포함하는 방법에 의한 VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체의 제조방법인데, 상기 방법은, (a) 핵산의 대상 혼합물을 VEGF와 접촉, (b) VEGF에 대한 친화력을 기준으로 상기 대상 혼합물의 멤버 사이를 분리 및 (c) VEGF에 대한 결합 친화력이 비교적 높은 핵산 서열에 대하여 부유화된 핵산의 혼합물을 산출하기 위하여 선별된 분자를 증폭, 및 상기 식별된 VEGF 핵산 리간드와 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 공유결합식으로 연결시키는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물에 공유 결합식으로 연결된 하나 이상의 VEGF 핵산 리간드를 포함하는 복합체를 제공하는 것이다. 이와같은 복합체는, 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 회합되어 있지 않은 VEGF 핵산 리간드 보다도, 하나 이상이 다음과 같은 장점이 있다: 1) 개선된 약물속도론적 특성, 및 2) 세포내 운송에 있어서의 개선된 능력, 또는 3) 개선된 표적화 능력. 지질구조체와 다시 회합된 복합체도 동일한 장점을 갖는다.

복합체, 또는 VEGF 핵산 리간드 또는 복합체를 포함하는 지질구조체는 이들 장점중 하나, 둘 또는 세개의 이점을 얻을 수 있다. 예를들면, 본 발명의 지질 구조체는, a) 리포솜, b) 리포솜내의 내부에 캡슐화된 약물, 및 c) 복합체의 VEGF 핵산 리간드 성분이 지질 구조체와 회합되어 그 외부로 돌출되는, VEGF 핵산 리간드 및 친유성 화합물을 포함하는 복합체를 포함할 수 있다. 이와 같은 경우, 복합체를 포함하는 지질 구조체는 1)개선된 약물 속도론적 특성을 가지며, 2) 캡슐화 약물의 개선된 세포내 운반능력을 갖고, 3) 외부로 회합된 VEGF 핵산 리간드에 의하여 VEGF를 발현시키는 생체내의 미리 선별된 위치에 특이적으로 표적화된다.

다른 구체예에서, 본 발명은 VEGF 핵산 리간드를 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 공유 결합식으로 연결하여 복합체를 형성하고, 상기 복합체를 환자에 복용시킴으로써 VEGF 핵산 리간드의 약물 속도론적 특성을 개선하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 복합체를 다시 지질 구조체와 회합시킴으로써 VEGF 핵산 리간드의 약물속도론적 특성을 개선하는 방법에 관한 것이다.

다른 구체예에서, 본 발명의 복합체는 글리세로리피드와 같은 친유성 화합물, 또는 폴리알킬렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비면역원성의 고분자 화합물에 공유결합식으로 부착된 VEGF 핵산 리간드를 포함한다. 이들 경우에 있어서, 복합체의 약물속도론적 특성은 VEGF 핵산 리간드 단독에 비하여 상대적으로 강화된다. 다른 구체예에서, VEGF 핵산 리간드가 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물에 공유 결합식으로 부착 및 다시 지질 구조체와 회합되거나 또는 VEGF 핵산 리간드가 지질 구조체내에 캡슐화될 때 VEGF 핵산 리간드의 약물 속도론적 특성은 VEGF 핵산 리간드 단독에 비하여 강화된다.

복합적인 VEGF 핵산 리간드가 존재하는 구체예에 있어서는, VEGF와의 복합적인 결합 상호작용 때문에, 결합 활성이 증가한다. 또한 복합체가 복합적인 VEGF 핵산 리간드를 포함하는 구체예에서는, 복합체의 약물 속도론적 특성이 VEGF 핵산 리간드 단독만에 비하여 개선된다. 지질구조체가, 복합적인 핵산 리간드 또는 복합체를 포함하는 구체예에서는, VEGF 핵산 리간드의 약물속도론적 특성이, 오직 하나의 핵산 리간드 또는 복합체가 존재하는 지질 구조체에 비하여 개선될 수 있다.

본 발명의 특정 구체예에서, 본 발명의 복합체는 하나(2량체) 또는 그 이상(다량체)의 다른 핵산 리간드

에 부착된 VEGF 핵산 리간드를 포함한다. 핵산 리간드는 VEGF 또는 다른 표적으로 향할 수 있다. 복합적인 VEGF 핵산 리간드가 존재하는 구체에에서, VEGF와의 복합적인 결합 상호작용 때문에 결합 활성이 증가된다. 또한, 복합체가 하나 이상의 VEGF 핵산 리간드에 부착된 VEGF 핵산 리간드를 포함하는 본 발명의 구체에에서, 복합체의 약물 속도론적 특성은 하나의 VEGF 핵산 리간드만에 비하여 개선된다.

비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물은, VEGF 핵산 리간드의 염기상의 외향고리 아미노 그룹, 피리미딘 뉴클레오타이드의 5'-위치, 퓨린 뉴클레오타이드의 8-위치, 포스페이트의 히드록실 그룹, 또는 5' 또는 3' 말단의 히드록실 그룹 또는 기타 그룹에와 같이, VEGF 핵산 리간드상의 다양한 위치에 공유결합식으로 결합될 수 있다. 친유성 화합물이 글리세로리피드, 또는 비면역원성의 고분자 화합물이 폴리알킬렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜인 구체에에서는, 바람직하게는, 그 포스페이트 그룹의 5' 또는 3' 히드록실에 결합된다. 가장 바람직한 구체에에서, 친유성 화합물 또는 비면역원성의 고분자 화합물은 핵산 리간드의 포스페이트 그룹의 5' 히드록실에 결합된다. VEGF 핵산 리간드에 대한 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물의 부착은 직접적으로 또는 링커 또는 스페이스를 이용하여 이루어질 수 있다. 지질 구조체가 복합체를 포함하거나, 또는 VEGF 핵산 리간드가 리포솜에 캡슐화된 구체에에서는, VEGF 핵산 리간드 또는 복합체와 지질 구조체간의 비공유 결합 상호작용이 바람직하다.

핵산을 치료용으로 사용하는데 있어서 직면하는 하나의 문제는, 포스포리에스테르 형태의 올리고뉴클레오타이드는, 요양 효과가 나타나기 전에, 엔도뉴클리아제 및 엑소뉴클리아제와 같은 세포내 및 세포외 효소에 의하여 체액내에 신속히 분해될 수 있다는 점이다. VEGF의 생체내 안정성을 증가시키거나, VEGF 핵산 리간드의 운송을 강화 또는 매개하기 위하여, VEGF 핵산 리간드에 대한 특정 화학적 변형이 이루어질 수 있다. 본 발명에서 기묘한 VEGF 핵산 리간드의 변형 방법은, 이것만에 국한되는 것은 아니나, 핵산 리간드 염기 또는 핵산 리간드 전체에 부가적인 전하, 분극성, 수소결합, 정전기적 상호작용 및 유연성을 첨가시키는 기타 화학 그룹을 제공하는 것을 포함한다. 이와같은 변형은, 이것만에 국한되는 것은 아니나, 2'-위치 당 변형, 5-위치 피리미딘 변형, 8-위치 퓨린 변형, 외향고리 아민에서의 변형, 4-티오유리딘의 치환, 5-브로모 또는 5-이오도-유라실의 치환, 뉴클레오시드간의 포스포로티오에이트 연결과 같은 백본 변형, 메틸화, 이소염기인 이소사이티딘 및 이소구아니딘 등과 같은 비정상 염기쌍 조합을 포함한다. 변형은 또한 캡핑과 같은 3' 및 5' 변형을 포함할 수 있다.

핵산 리간드가 SELEX 방법에 의하여 운반되는 경우, 변형방법은 프레- 또는 포스트-SELEX 변형일 수 있다. 프레-SELEX 변형방법은 VEGF에 대하여 특이적이며 생체내 안정성이 개선된 VEGF 핵산 리간드를 산출한다. 2'-OH 핵산 리간드에 대한 포스트-SELEX 변형은 핵산 리간드의 결합 능력에 부작용을 일으키지 않아 생체내 안정성을 개선시킬 수 있다. 본 발명의 VEGF 핵산 리간드의 바람직한 변형은 3' 단부에서의 3'3'역 포스포디에스테르 연결 및/또는 5' 및 3' 포스포로티오에이트 캡핑이다. 가장 바람직한 구체에에서, VEGF 핵산 리간드의 바람직한 변형은 3' 단부의 3'3'역 포스포디에스테르 연결이다. 일부 또는 모든 뉴클레오타이드의 부가적인 2' 플루오로(2'-F), 2' 아미노(2'-NH₂) 및 2'0 메틸(2'-OMe) 변형이 바람직하다.

본 발명의 다른 하나의 관점에서, VEGF 핵산 리간드와 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물의 공유 결합 연결은, 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 관련되지 않은 VEGF 핵산 리간드에 비하여 개선된 약물 속도론적 특성(즉, 서행 소모율)을 나타낸다.

본 발명의 다른 관점에서, VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체는 지질 구조체와 다시 회합될 수 있다. 이 회합은 VEGF 핵산 리간드 또는 지질 구조체와 회합되지 않은 복합체에 비하여 개선된 약물 속도론적 특성을 초래한다. VEGF 핵산 리간드 또는 복합체는 공유 결합 또는 비공유 결합 상호작용을 통하여 지질 구조체와 회합될 수 있다. 바람직한 구체에에서, 회합은 비공유결합 상호작용을 통한이다. 바람직한 구체에에서, 지질 구조체는 지질 2중막층 소포이다. 가장 바람직한 구체에에서, 지질 구조체는 리포솜이다.

본 발명에서 사용되는 리포솜은 당분야에 알려지거나, 계속하여 개발된 임의의 다양한 기술에 의하여 제조될 수 있다. 전형적으로, 그들은, 예를들면 디스테아릴 포스파티딜콜린과 같은 포스포리피드로부터 제조되며, 콜레스테롤과 같은 중성 지질과 같은 기타 물질 및 또한 양하전된(예를들면, 스테릴아민 또는 콜레스테롤의 아미노만노오스 또는 아미노만니톨 유도체) 또는 음하전된(예를들면, 디아세틸 포스페이트, 포스파티딜 글리세롤) 화합물과 같은 표면 변형제도 내포할 수 있다. 다중 판상 리포솜이 종래의 기술, 즉 적절한 용기의 내벽에 선택된 지질을 퇴적시키고 적절한 용매로 상기 지질을 용해시킨 후, 용매를 증발 또는 분무 건조하여 용기의 내벽에 박막을 잔류시키는 방법으로 형성될 수 있다. 다음에 수성상을 저으면서 용기에 첨가하면 MLV를 형성하는 결과를 초래한다. UV는 다음에 MV의 균질화, 음파처리 또는 압축(필터를 통하여)에 의하여 형성될 수 있다. 또한, UV는 세척제 제거 기술에 의하여 형성될 수 있다.

본 발명의 특정 구체에에서, 지질 구조체는 지질 구조체의 표면과 회합된 표적화 VEGF 핵산 리간드(들) 및 캡슐화된 치료제 또는 진단제를 포함한다. 바람직하게는 지질구조체는 리포솜이다. 예비 형성된 리포솜은 변형되어 VEGF 핵산 리간드와 회합할 수 있다. 예를들면, 양이온 리포솜은 정전기적 상호작용을 통하여 VEGF 핵산 리간드와 회합한다. 글리세로리피드와 같은 친유성 화합에 공유 결합식으로 연결된 VEGF 핵산 리간드는 예비 형성된 리포솜에 첨가됨으로써 글리세로리피드, 포스포리피드, 또는 글리세롤 아미드 리피드는 리포솜 막과 회합하게 된다. 대체 방법으로 VEGF 핵산 리간드는 리포솜의 배합기간 중 리포솜과 회합될 수 있다.

리포솜이 다양한 치료제 및 진단제를 캡슐화 또는 첨가시키는데 편리하다는 것은 당분야에 잘 알려져 있다. 임의의 다양한 화합물이 리포솜의 내부 수성 구획내에 둘러싸여질 수 있다. 예시적인 치료제는 항생제, 항바이러스 뉴클레오시드, 항진균성 뉴클레오시드, 대사 조절제, 면역 조절제, 화학요법 약물, 독소해독제, DNA, RNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 등을 내포한다. 또한, 지질 2중막층 소포는 진단용 방사성 핵종(예를들면, 인듐 111, 이오딘 131, 이트륨 90, 인32, 또는 가도리늄) 및 형광물질 또는 시험관내 및 생체내 응용에 있어서 검출 가능한 기타 물질과 함께 적재될 수 있다. 치료제 또는 진단제가 수성 내부의 리포솜 벽에 의하여 캡슐화될 수 있다는 점을 이해하여야 한다. 대체적인 방법으로, 운반된 제제는 소포벽 형성재내에 분산 또는 용해될 수 있다.

리포솜 형성중, 수가용성 캐리어는 그들을 수화 용액에 내포시킴으로써 캡슐화 될 수 있으며, 친유성 분

자는 지질 배합물에 내포시킴으로써 지질 2중막층에 첨합된다. 특정 분자(예를들면, 양이온 또는 음이온 친유성 약물)의 경우, 미국특허 제4,946,683호에 기재된 바와 같은 방법들에 의하여 약물의 예비성형 리포솜으로의 적재가 완수되는데, 상기 문헌을 여기서 참고로 인용한다. 약물 캡슐화에 뒤이어, 리포솜은 가공 처리되어 겔 크로마토그래피 또는 한외여과와 같은 공정을 통하여 미캡슐화 약물을 제거한다. 다음에 리포솜은 통상적으로 살균 여과되어 현탁액에 존재할 수도 있는 임의의 미생물을 제거한다. 미생물은 무료 공정에 의하여도 제거될 수 있다.

대형 친수성 분자를 리포솜으로 캡슐화하기를 원한다면, 역상 증발(REV, reverse-phase evaporation) 또는 용제 주입법과 같은 방법에 의하여 대형 단층상 소포가 형성될 수 있다. 리포솜을 형성하기 위한 기타 표준방법이 당분야에 공지되어 있는데, 예를들면, 리포솜의 상업적 제조방법에는, 미국특허 제4,753,788호에 기재된 균질화 방법 및 미국특허 제4,935,171호에 기재된 박막 증발방법이 포함되는데, 이들을 여기서 참고로 인용한다.

치료제 또는 진단제가 지질 2중막층 소포의 표면과 회합될 수도 있다는 것을 이해하여야 한다. 예를들면, 약물은 포스포라피드 또는 글리세리드 (프로드럭 (prodrug))에 부착될 수 있다. 프로드럭의 포스포리피드 또는 글리세리드부는 지질 배합물에 내포되거나 또는 예비성형 리포솜내에 적재됨으로써 리포솜의 지질 2중막층에 첨합될 수 있다(미국 특허 제5,194,654호 및 5,223,263호 참조, 이들을 여기서 참고로 인용한다).

특정 리포솜 제조방법은 2중막층 막을 형성하기 위하여 사용된 지질의 계획된 사용과 형태에 의존한다는 것은, 당분야의 숙련자에게는 용이하게 자명할 것이다.

리(Lee) 및 로우(Low)(1994, JBC, 269: 3198~3204) 및 데프리스(DeFrees) 등 (1996, JACS, 118: 6101~6104)은 리간드-PEG-지질과 지질 성분의 공배합이, PEG-리간드의 내외향 오리엔테이션 모두를 지닌 리포솜을 제공한다는 것을 처음으로 나타내었다. 올리고펩티드 및 올리고당 리간드를 오직 리포솜의 외부 표면에 고정하기 위한 방법으로서 수동적 고정방법이 잘립스키(Zalipsky) 등 (1997, Bioconj. Chem. 8: 111~118)에 의하여 설명되었다. 그들 연구의 주요 개념은 리간드-PEG-지질 접합체가 제조된 후 지질 꼬리가 존재하는 지질 2중막층으로 자발적으로 첨합('고정')됨으로써 예비성형 리포솜으로 배합될 수 있다는 것이다. 지질 그룹은, 수성 용액으로부터 그 소수성 지질 앵커의 제거 및 계속하여 소수성 지질 2중막층에서 그 위치를 설정함으로써 보다 낮은 자유 에너지 상태에 도달하기 위하여 이와같은 삽입을 받아들인다. 이와같은 시스템에 대한 주 장점은 올리고-지질이 오직 지질 2중막층의 외부에 고정된다는 것이다. 따라서, 내향 배향에 의한 그들 생물학적 표적과의 상호작용에 대한 불필요성에 의하여 소모되는 올리고리피드가 없다.

VEGF 핵산 리간드의 세포로의 운송효율은, 리포솜과 세포막의 융합을 강화하는 것으로 알려진 지질 배합 방법 및 조건을 이용함으로써 최적화될 수 있다. 예를들면, 포스파티딜글리세롤 및 포스파티딜세린과 같은 특정 음성 하전 지질은, 특히 다른 퓨소겐(fusogen)(예를들면, 다가 양이온형 Ca^{2+} , 자유 지방산, 비루스 융합단백질, 단백질 PEG, 라이조렉시틴, 세척제 및 표면활성제)의 존재하에 융합을 촉진한다. 포스파티딜에탄올아민도 리포솜 배합에 포함되어 막융합을 증가시키고, 부수적으로, 세포 운송을 강화시킬 수 있다. 또한, 유리지방산 및 예를들면 카르복실화 구성 성분을 함유하는 그들 유도체가, 높은 pH에서는 음성으로 하전되고 낮은 pH에서는 중성 또는 양성자화되는 pH-민감 리포솜을 제조하는데 사용될 수 있다. 이와같은 pH-민감 리포솜은 보다 큰 융합경향을 갖는 것으로 알려진다.

바람직한 구체예에서, 본 발명의 VEGF 핵산 리간드는 SELEX 방법론으로부터 유도된다. SELEX는, 지금은 포기되었으며, 발명의 명칭이, '지수적 부유화에 의한 리간드의 총체적 진화'(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)이고, 1990년 6월 11일 출원된, 미국특허출원 제 07/536,428호, 현재 미국특허 제5,475,096호로서, 발명의 명칭이 '핵산 리간드'(Nucleic Acid Ligands)이며, 1991.6.10 출원된 내국특허출원 제07/714,131호, 현재 미국특허 제5,270,163호(WO 91/19813호도 참조)로서, 발명의 명칭이 '핵산 리간드의 식별방법'(Method for identifying Nucleic Acid Ligands)이며, 1992.8.17 출원된 미국특허출원 제07/931,473호에 기재되어 있다. 여기서 참고로 구체적으로 인용하는 이들 각 출원을 총체적으로 SELEX 특허출원이라 한다.

SELEX 공정은, 핵산 분자이며, 각각이 독특한 서열을 지니고 있고, 각각이 요망 표적 화합물 또는 분자에 특이적으로 결합하는 특성을 지닌, 생성물류를 제공한다. 표적분자는 바람직하게는 단백질이나, 탄수화물, 펩티도글리칸 및 다양한 소분자를 내포할 수도 있다. SELEX 방법론은 생물학적 구조의 필수적 부분인 분자와의 특이적 상호작용을 통하여, 세포 표면 또는 비루스와 같은 생물학적 구조체를 표적화하는데 이용될 수도 있다.

가장 기본적인 형태에 있어서, SELEX 공정은 다음과 같은 일련의 단계로 정의될 수 있다:

- 1) 서열을 달리하는 핵산의 대상 혼합물이 제공된다. 대상 혼합물은 고정 서열의 영역(즉, 대상 혼합물의 각 멤버는 동일 장소에서 동일 서열을 함유한다) 및 랜덤화 서열의 영역을 일반적으로 내포한다. 고정 서열은, (a) 아래에 기재된 증식 단계를 지원하기 위하여, (b) 표적에 결합하는 것으로 알려진 서열을 의태하기 위하여, 또는 (c) 대상 혼합물내의 소정의 구조적 배열의 핵산 농도를 높이기 위하여 선별된다. 랜덤화 서열은 전체적으로 랜덤화(즉, 임의의 장소에서 염기를 발견할 확률이 4분의 1) 되거나 또는 부분적으로 랜덤화(예를들면, 임의의 장소에서 염기를 발견할 확률이 0~100 퍼센트 사이의 임의의 값에서 선택될 수 있다) 될 수 있다.
- 2) 표적 및 대상 혼합물 멤버간의 결합에 유리한 조건하에서, 대상 혼합물이 선별된 표적과 접촉된다. 이들 환경하에서, 표적 및 대상 혼합물의 핵산 리간드간의 상호작용은, 표적 및 표적에 대하여 최강의 친화력을 지니는 핵산간에 핵산-표적 쌍을 형성하는 것으로 생각된다.
- 3) 표적에 대한 친화력이 가장 높은 핵산들은 표적에 대한 친화력이 보다 낮은 핵산으로부터 분리된다. 최고 친화력의 핵산에 대응하는, 오직 극소수의 서열(및 아마도 핵산의 오직 한 분자)이 대상 혼합물내에 존재하기 때문에, 혼합물내에 현저한 양의 핵산(약 5~10%)이 분리중 유지되도록 분리 기준을 설정하는

것이 일반적으로 요망된다.

4) 표적에 대한 친화성이 상대적으로 높도록 분리 기간중 선별된 핵산은 다음에 증폭되어, 표적에 대한 친화력이 상대적으로 높은 핵산내에 부유화된 신규의 대상 혼합물을 창조한다.

5) 상기 분리 및 증폭단계의 반복에 의하여, 새로이 형성된 대상 혼합물은 더욱 더 소수의 특이 서열을 함유하며, 표적에 대한 핵산의 평균 친화력은 일반적으로 증가하게 된다. 극단적으로, SELEX 공정은 원래의 대상 혼합물로부터, 표적 분자에 대한 친화력이 가장 높은 핵산을 나타내는 하나 또는 소수의 특이 핵산을 함유하는 대상 혼합물을 산출하게 된다.

다수의 특이한 목적을 달성하기 위하여, 기본적 SELEX 방법은 변형되어 왔다. 예를들면, 발명의 명칭이 '구조를 기초로 한 핵산의 선별방법'(Methods for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure)이며, 1992.10.14 출원된 미국특허출원 제07/960,093호는, 굴곡 DNA와 같이, 특정 구조 특성을 지닌 핵산 분자를 선별하기 위하여 겔 전기영동법과 함께 SELEX를 사용하는 방법을 기재하고 있다. 발명의 명칭이 '핵산 리간드의 광선별'(Phytoselection of Nucleic Acid Ligands)이며, 1993.9.17 출원된 미국특허출원 제08/123,935호는 표적분자를 결합 및/또는 광가교결합 및/또는 광불활성화할 수 있는 광반응성 그룹을 함유하는 핵산 리간드를 선별하기 위한 SELEX를 기초로 한 방법을 기재하고 있다. 현재 미국특허 제 5,580,737호로서, 발명의 명칭이 '테오필린과 카페인을 구별하는 고 친화성 핵산리간드'(High Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine)이며, 1993.10.7 출원된 미국특허출원 제08/134,028호는, 밀접히 관련된 분자들을 구분할 수 있는 고도로 특이적인 핵산 리간드를 식별하는 방법을 기재하고 있는데, 상기 방법은 카운터-SELEX라고 하는 비-펩티드성일 수 있다. 현재 미국특허 제5,567,588호로서, 발명의 명칭이 '지수 부유화에 의한 리간드의 총체적 진화; 용액 SELEX'(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Solution SELEX)이며, 1993.10.25 출원된 미국특허 출원 제08/143,564호는, 표적 분자에 대하여 고 저 친화성을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 높은 효율로 분리할 수 있는 SELEX-기초 방법을 기재하고 있다. 현재 미국특허 제5,496,93호이며, 발명의 명칭이 'HIV-RT 및 HIV-1 Rev에 대한 핵산 리간드'(Nucleic Acid Ligands to HIV-RT and HIV-1 Rev)이며, 1992.10.21 출원된 미국특허출원 제07/914,624호는 SELEX가 수행된 후에 개선된 핵산 리간드를 얻는 방법을 기재하고 있다. 발명의 명칭이 '지수적 부유화에 의한 리간드의 총체적 진화: 케미-SELEX'(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX)이며, 1995.3.8 출원된 미국특허 출원 제 08/400,440호는 리간드를 그 표적에 공유결합식으로 연결하는 방법을 개시하고 있다.

SELEX 방법은, 개선된 생체내 안정성 또는 개선된 운반 특성과 같이, 리간드상에 개선된 특성을 부여하는, 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 고친화성 핵산 리간드의 식별을 포함한다. 이와같은 변형의 예에는 리보오스 및/또는 인산염 및/또는 염기 위치에 대한 화학적 치환이 포함된다. 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 SELEX-식별 핵산 리간드가, 현재 미국특허 제5,660,98호로서, 발명의 명칭이 '변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 고친화성 핵산 리간드'(High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides)이며, 1993.9.8 출원된 미국특허출원 제08/117,991호에 기재되어 있는데, 상기 특허는 피리미딘의 5- 및 2'-위치에서 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드 유도체를 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 설명하고 있다. 상기 미국특허출원 제08/134,028호는, 2'-아미노(2'-NH₂), 2'-플루오로(2'-F), 및/또는 2'-O-메틸(2'-OMe)로 변형된 하나 이상의 뉴클레오타이드를 함유하는 고도로 특이적인 핵산 리간드를 기재하고 있다. 발명의 명칭이 '분자의 친핵성 치환 반응에 의한 공지 및 신규의 2' 변형 뉴클레오시드의 신규 제조방법'(Novel Method of Preparation of Known and Novel 2' Modified Nucleosides by Intramolecular Nucleophilic Displacement)으로서, 1994.6.22 출원된 미국특허출원 제08/264,029호는 다양한 2'-변형 피리미딘을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 기재하고 있다.

SELEX 방법은, 현재 미국특허 제5,637,459호로서, 발명의 명칭이 '지수부유화에 의한 리간드의 총체적 진화: 키메릭 SELEX'(Systematic Evaluation of Ligands by Exponential Enrichment Chimeric SELEX)이며, 1994.8.2 출원된 미국특허출원 제08/284,063호 및 발명의 명칭이 '지수 부유화에 의한 리간드의 총체적 진화: 혼합된 SELEX'(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Blended SELEX)로서, 1994.4.28 출원된 미국특허출원 제08/234,997호 각각에 기재된 바와 같이, 선별된 올리고뉴클레오타이드를 다른 선별된 올리고뉴클레오타이드 및 비-올리고뉴클레오타이드 기능 단위와 결합시키는 방법을 포함한다. 이들 특허출원은 다른 분자의 요망 특성과, 올리고뉴클레오타이드의 형상 및 기타 특성이 넓은 배열의 결합, 및 효율적인 증폭 및 복제특성을 가능케 한다.

SELEX 방법은 또한, 발명의 명칭이 '핵산 복합체'(Nucleic Acid Complexes)로서, 1995.5.4 출원된 미국특허출원 제08/434,465호에 기재된 바와 같이, 선별된 핵산 리간드를 진단 또는 치료용 복합체의 친유성 화합물 또는 비-면역원성의 고분자 화합물과 결합시키는 방법을 포함한다. SELEX 방법은 또한, 발명의 명칭이 '혈관내피 성장인자(VEGF) 핵산 리간드 복합체'(Vascular Endothelial Growth Factor Nucleic Acid Ligand Complexes)로서, 1996.10.25 출원된 미국특허출원 제08/739,109호에 기재되어 있는 바와 같이, 선별된 VEGF 핵산 리간드를 디알킬 글리세롤과 같은 친유성 화합물과 결합시키는 방법을 포함한다. 진단 또는 치료용 복합체의, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 고분자량의, 비면역원성 화합물, 또는 글리세로리피드, 포스포리피드 또는 글리세롤 아미드 리피드와 같은 친유성 화합물과 회합되어 있는 VEGF 핵산 리간드가, 발명의 명칭이 '혈관내피 성장인자(VEGF) 핵산 리간드 복합체'(Vascular Endothelial Growth Factor Nucleic Acid Ligand Complexes)로서, 1997.7.21 출원된 미국특허출원 제08/897,351호에 기재되어 있다. 기본적 SELEX 공정의 변형된 방법을 기재하고 있는 상기 특허 출원들의 각각의, 완전한 상태로 여기서 참고로 구체적으로 인용된다.

SELEX는 높은 친화력 및 현저한 특이성을 지닌 표적과 결합할 수 있는 핵산리간드를 식별하는데, 이것은 핵산 연구 분야에 있어서 전례가 없는 목적 달성을 의미한다. 물론, 이들 특성은 당분야의 숙련자가 치료제 또는 진단제 리간드에서 모색하고 있는 요망 특성이다.

약품으로서의 용도에 요망되는 핵산 리간드를 제조하기 위하여는 핵산 리간드가 (1) 표적에 대하여 소정의 효과를 달성할 수 있는 방식으로 표적에 결합하고 (2) 가능한 한 작은 크기로 소정의 효과를 얻으며 (3) 가능한 한 안정하며 (4) 선택된 표적에 대하여 특이적인 것이 바람직하다. 대부분의 경우에 있어서,

핵산 리간드가 표적에 대하여 최고로 가능한 친화력을 갖는 것이 바람직하다. 또한 핵산 리간드는 촉진성을 가질 수 있다.

현재 미국특허 제5,496,93호로서, 1992.10.21에 출원된 미국특허출원 제07/944,624호('624)에는 SELEX가 수행된 후에 개선된 핵산 리간드를 얻는 방법이 기재되어 있다. 발명의 명칭이 'HIV-RT 및 HIV-1 Rev에 대한 핵산 리간드'인 '624 출원을 여기서 참고로 구체적으로 인용한다.

SELEX 공정은, 랜덤 2'-아미노피리미딘 RNA 라이브러리로부터 VEGF에 대하여 친화성 높은 RNA 리간드 및 랜덤 ssDNA 라이브러리로부터 ssDNA 리간드 그룹을 식별하는데 이용된다(발명의 명칭이, '혈관내피 성장인자(VEGF)에 대하여 친화력이 높은 올리고뉴클레오타이드 리간드'(High Affinity Oligonucleotide Ligands to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF))이며, 1994.4.25.에 출원된 미국특허출원 제08/233,012호의 일부 계속출원인, 발명의 명칭이 '혈관내피 성장인자(VEGF)에 대하여 친화력이 높은 올리고뉴클레오타이드 리간드'(High Affinity Oligonucleotide Ligands to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF))이며, 1995.5.19에 출원된 미국특허출원 제08/447,169호, 이들 모두를 여기서 참고로 인용한다; 그린(Green) 등 (1995) 화학 및 생물(Chemistry and Biology) 2: 683~695도 참조할 것).

VEGF 핵산 리간드(들)이 표적화 능력을 발휘할 수 있는 구체예에서, VEGF 핵산 리간드는 VEGF 핵산 리간드가 그 표적과 결합할 수 있도록 유지되어야 하는 3차원 구조를 채택한다. 지질구조체가 복합체를 포함하고, 복합체의 VEGF 핵산 리간드가 지질구조체의 표면으로부터 돌출되는 구체예에서, VEGF 핵산 리간드는 그 표적화 능력이 손상되지 않도록 지질구조체의 표면에 대하여 적절히 배열되어야 한다. 이것은 VEGF 핵산 리간드의 결합부분으로부터 떨어진 위치에 VEGF 핵산 리간드를 부착시킴으로써 달성될 수 있다. 3차원 구조 및 적절한 배열은 상술한 링커 또는 스페이서를 사용함으로써도 보호될 수 있다.

다양한 치료제 또는 진단제가 복합체에 의한 표적으로의 운반을 위하여 복합체에 부착될 수 있다. 또한 임의의 다양한 치료제 또는 진단제가, 지질구조체에 의한 표적을 향한 운반에 대하여 상술한 바와 같이, 구조체에 부착, 캡슐화 또는 첨할 수 있다.

복합체가 친유성 화합물 및 리포솜과 회합된 VEGF 핵산 리간드를 포함하는 구체예에서는, 예를들면, VEGF 핵산 리간드는 항종양 약물(예를들면 다우노루비신) 또는 영상제 (예를들면, 라디오라벨)의 운반을 위하여 종양세포 발현 VEGF(예를들면, 카포시 육종의)를 표적으로 할 수 있다. 종양을 포위하고 있는 세포 및 조직도 VEGF를 발현할 수 있으며, 이들 세포를 표적으로 하는 항 종양 약물의 운반도 효과적이다.

대체 방법의 구체예에서, 표적 세포에 운반되는 치료제 또는 진단제는 다른 핵산 리간드일 수 있다.

운반되는 제제가, 리포솜의 외부 표면과 회합되도록 복합체에 첨할 수 있다는 것도 본 발명에 의하여 기도되었다(예를들면, 프로드럭, 수용체 길항물질, 또는 치료 또는 영상용 방사성 물질). VEGF 핵산 리간드와 같이, 제제는 공유 또는 비공유 결합 상호작용을 통하여 회합될 수 있다. 리포솜은 제제를 세포외로 표적을 향하여 운반하는데, 여기서 리포솜은 링커로서의 역할을 한다.

다른 구체예에서, 비면역원성의 고분자 화합물(예, PEG)이 리포솜에 부착되어 복합체에 대한 개선된 약물 속도론적 특성을 제공할 수 있다. VEGF 핵산 리간드는 리포솜 막에 또는 비면역원성의 고분자 화합물에 부착된 다음에 이것이 막에 부착될 수도 있다. 이와같은 방법에서 복합체는 혈청 단백질로부터 보호되어, 연장된 기간동안 순환이 가능하게 되며, 반면에 VEGF 핵산 리간드는 여전히 충분히 노출되어 그 표적과 접촉 및 결합하게 된다.

본 발명의 다른 하나의 구체예에서, 하나 이상의 VEGF 핵산 리간드가 동일 리포솜이 표면에 부착된다. 이것은 상호간에 밀접한 동일 VEGF 분자를 가져올 가능성을 제공하며, VEGF 분자간의 특이적 상호작용을 생성하는데 이용될 수 있다.

본 발명의 대체 방법적인 구체예에서, VEGF 핵산 리간드 및 다른 표적에 대한 핵산 리간드가 동일 리포솜의 표면에 부착될 수 있다. 이것은 상이한 표적에 밀접한 VEGF를 가져올 가능성을 제공하며 VEGF 및 다른 표적간의 특이적 상호작용을 생성하는데 이용될 수 있다. 밀접한 표적을 가져오는 방법으로서 리포솜을 이용하는 외에, 제제가 리포솜내에 캡슐화되어 상호작용의 강도를 증가시킬 수 있다.

복합체를 포함하는 지질구조체는 VEGF에 대한 다수의 결합 상호작용의 가능성이 있다. 물론 이것은, 복합체당 VEGF 핵산 리간드의 수, 및 지질구조체당 복합체의 수, 및 VEGF 핵산 리간드의 운동성 및 그들 각 막내의 수용체에 좌우된다. 각 부위에 대한 결합상수의 곱으로 효율적인 결합상수가 증가할 수 있기 때문에, 다수의 결합 상호작용을 갖는 실질적인 장점이 있는 것이다. 환원하면, 지질구조체에 부착된 많은 VEGF 핵산 리간드를 가짐으로써, 따라서 다원자기를 창출함으로써, 그 표적에 대한 다량체 복합체의 효율적 친화력(즉, 결합활성)이 각 부위에 대한 결합상수의 곱과 같이 양호하게 될 수 있다.

본 발명의 특정 구체예에서, 본 발명의 복합체는 글리세롤 리피드와 같은 친유성 화합물에 부착된 VEGF 핵산 리간드를 포함한다. 이 경우, 복합체의 약물 속도론적 특성은 VEGF 핵산 리간드 단독만에 비하여 개선된다. 상술한 바와 같이, 글리세롤 리피드, 포스포리피드 또는 글리세롤 아미드 리피드는 VEGF 핵산 리간드상의 수많은 위치에서 VEGF 핵산 리간드에 공유 결합식으로 결합될 수 있다. 글리세롤 리피드가 사용되는 구체예에서는, VEGF 핵산 리간드가 포스포디에스테르 연결을 통하여 리피드에 결합되는 것이 바람직하다.

본 발명이 다른 구체예에서, 지질구조체는 VEGF 핵산 리간드 또는 복합체를 포함한다. 이 구체예에서, 글리세롤 리피드의 다른 친유성 화합물과 회합하려는 경향 때문에, 글리세롤 리피드는 VEGF 핵산 리간드가 리포솜으로 첨할되는 것을 지원할 수 있다. VEGF 핵산 리간드와 함께 글리세롤 리피드는, 배합물내의 내포 또는 예비성형 리포솜으로의 적재에 의하여, 리포솜이 지질 2중막층으로 첨할될 수 있다. 글리세롤 리피드는, VEGF 핵산 리간드가 리포솜 속으로 또는 밖으로 돌출하는 방식으로, 리포솜의 막과 회합할 수 있다. VEGF 핵산 리간드가 복합체의 외부로 돌출하는 구체예에서, VEGF 핵산 리간드는 표적화 능력내에서 역할을 할 수 있다. 지질구조체의 약물 속도론적 특성을 더욱 개선하기 위하여 별도의 화합물이 지질 구조체에 회합될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 예를들면, PEG가 지질구조체 막의 외부에 부착될 수도

있다.

다른 구체예에서, 본 발명의 복합체는 폴리알킬렌 글리콜 또는 PEG와 같은 비면역원성의 고분자 화합물에 공유결합식으로 연결된 VEGF 핵산 리간드를 포함한다. 이 구체예에서, 복합체의 약물속도론적 특성은 VEGF 핵산 리간드 단독만에 비하여 개선된다. 폴리알킬렌 글리콜 또는 PEG는 VEGF 핵산 리간드상의 다양한 위치에 공유결합식으로 결합될 수 있다. 폴리알킬렌 또는 PEG가 사용되는 구체예에 있어서, VEGF 핵산 리간드가 포스포디에스테르 연결에 의하여 5' 히드록실 그룹을 통하여 결합되는 것이 바람직하다.

특정 구체예에서, 복수의 핵산리간드가 폴리알킬렌 또는 PEG와 같은 단일 비면역원성의 고분자 화합물 또는 글리세롤 리피드와 같은 친유성 화합물과 회합될 수 있다. 핵산리간드들은 모두 VEGF 또는 VEGF 및 다른 표적으로 될 수 있다. 다수의 VEGF 핵산 리간드가 존재하는 구체예에서는, VEGF와의 다중 결합 상호작용 때문에 결합활성이 증가된다. 또다른 구체예에서, 복수의 폴리알킬렌 글리콜, PEG, 글리세롤 리피드 분자가 서로 부착될 수 있다. 이들 구체예에서, 하나 이상의 VEGF 핵산 리간드 또는 VEGF 및 기타 표적에 대한 핵산 리간드가 각각의 폴리알킬렌 글리콜, PEG 또는 글리세롤 리피드와 회합될 수 있다. 이것도 또한 그 표적에 대한 각 핵산 리간드의 결합 활성을 증가시키게 된다. 다수의 VEGF 핵산 리간드가 폴리알킬렌 글리콜, PEG 또는 글리세롤 리피드에 부착되는 구체예에서, VEGF 간의 특이한 상호작용을 생성하기 위하여, 상호 밀접하여 있는 VEGF 분자를 가져올 가능성이 있다. VEGF 및 다른 표적에 특이적인 다수의 핵산 리간드가 폴리알킬렌 글리콜, PEG 또는 글리세롤 리피드에 부착되면, VEGF 및 다른 표적 사이에 특이적 상호작용을 생성하기 위하여 서로 밀접하여 있는 VEGF 및 다른 표적을 초래할 가능성이 있다. 또한, VEGF에 대한 핵산 리간드 또는 VEGF 및 폴리알킬렌 글리콜, PEG, 또는 글리세롤 리피드와 회합된 상이한 표적에 대한 핵산 리간드가 존재하는 구체예에서, 약물도 폴리알킬렌 글리콜, PEG 또는 글리세롤 리피드와 회합될 수 있다. 따라서 복합체는 약물의 표적을 향한 운반이 가능해지며, 폴리알킬렌 글리콜, PEG, 또는 글리세롤 리피드는 링커로서 역할한다.

VEGF 핵산 리간드는 VEGF와 선택적으로 결합한다. 따라서, VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체 또는 VEGF 핵산 리간드 또는 복합체를 포함하는 지질 구조체는 의약품 또는 진단제로서 유용하다. 따라서 본 발명은, VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체, 또는 VEGF 핵산 리간드 또는 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체를 포함하는 지질 구조체를 복용함으로써 맥관 형성을 억제하는 방법을 내포한다. VEGF 핵산 리간드 함유 복합체 및 지질 구조체는, 부적절한 VEGF 생성, 특히 맥관형성과 관련된 임의의 질병을 치료, 억제, 방지 또는 진단하는데 사용될 수 있다. 맥관 형성은, 월경주기 및 상처치료를 기간을 제외하고는, 건강한 성체에서는 드물게 발생한다. 맥관형성은, 이것만에 국한되는 것은 아니나, 당뇨병성 강막증, 황반 장애, 건선 및 류마티스 관절염을 포함하는 다양한 질병 상태이다. 본 발명은, 이것만에 국한되는 것은 아니나, 당뇨병성 강막증, 황반 장애, 건선 및 류마티스 관절염 치료, 억제, 예방, 또는 진단하는 방법도 포함한다. 또한, VEGF는 사실상 모든 종양세포에 의하여 다양한 양으로 생성 및 분비된다. 따라서 본 발명은, 이것만에 국한되는 것은 아니나, VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체, 복합체를 포함하는 지질구조체, 또는 복합체의 일부가 아닌 지질구조체와 회합된 VEGF 핵산 리간드를 복용함으로써, 암을 치료, 억제, 예방, 또는 진단하는 방법을 포함한다. 암의 한 형태인, 카포시 육종(KS)에 있어서, 세포들은 풍부한 양의 VEGF를 생성할 뿐만 아니라, 기능성 VEGF 수용체를 발현하기 때문에, VEGF를 오토크라인(autocrine) 성장용으로 사용한다. 따라서 본 발명은 VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체, 복합체를 포함하는 지질구조체, 또는 복합체의 일부가 아닌 지질구조체와 회합된 VEGF 핵산 리간드를 복용함으로써, 카포시 육종을 억제하는 방법을 포함한다.

본 발명의 하나의 구체예에서, 지질 구조체는 VEGF 핵산 리간드 및 친유성 화합물을 포함하는 복합체를 포함하는데, 별도의 진단제 또는 치료제가 지질구조체 내에 캡슐화, 즉 지질구조체의 내벽에 회합된다. 바람직한 구체예에서, 지질구조체는 지질 2중막층 소포, 및 보다 바람직하게는 리포솜이다. 리포솜의 치료적 용도는, 자유 형태로는 통상적으로 독성인 약물을 운반하는 것을 포함한다. 리포솜 형태에서, 독성 약물은 폐쇄되며, 약물에 민감한 조직으로부터 떨어져 나와 선택된 영역으로 향한다. 리포솜은 약물을 장시간에 걸쳐 방출시키는데 있어서 치료적으로 사용될 수도 있어서, 약물 투여의 빈도를 감소시킨다. 또한 리포솜은 통상적으로 정맥내 운반용으로는 부적절한 소수성 또는 양친매성 약물의 수성 분산액을 형성하는 방법을 제공할 수 있다.

많은 약물 및 영상제가 치료적 또는 진단적 가능성을 갖기 위하여는, 그들이 체내의 적당한 위치로 운반될 필요가 있는데, 리포솜은 이와같이 용이하게 주입될 수 있어서 체내의 특정 세포 형태 즉 부위에 대한 지연방출 및 약물 운반의 기초를 형성한다. 캡슐화 약물이 민감한 조직으로부터 멀리, 선택된 숙주 조직을 목표로 하는데 있어서 리포솜을 사용하기 위하여 몇가지 기술이 채택될 수 있다. 이들 기술은, 리포솜의 크기를 조작, 그들의 총 전하, 및 그들의 복용 경로를 조작하는 방법을 포함한다. MLV는, 우선 그들이 상대적으로 크기 때문에, 세망내피계(주로 간 및 이자)에 의하여 통상적으로 신속히 흡취된다. 한편, UV는, MLV에 비하여 증가된 순환기간, 감소된 소모율 및 보다 큰 생체내 분포를 나타내는 것으로 판명되었다.

리포솜의 수동적 운반은, 예를들면 정맥내, 피하, 근육내 및 경구적인, 다양한 경로를 통한 투여와 관련된다. 각 경로는 리포솜의 국부화에 있어서 차이를 나타낸다. 선택된 표적 영역에 리포솜을 능동적으로 향하게 하는데 이용되는 2가지 통상적인 방법은, 리포솜의 표면에 항체나 특정 수용체 리간드를 부착시키는 방법과 관련된다. 본 발명의 하나의 구체예에서, VEGF 핵산 리간드는 리포솜의 외부 표면에 회합되어 표적화 능력을 발휘한다. 항체 또는 특정 수용체 리간드와 같은 별도의 표적화 대상 성분은, 당분야의 숙련자에게 알려진 바와 같이, 리포솜 표면에 포함될 수 있다. 또한 일부 연구결과는 항체의 이용없이 리포솜을 종양에 표적화하는데 있어서 성공적이었다. 예를들면 미국특허 제5,019,369호, 미국특허 제5,435,989호 및 미국특허 제4,441,775호를 참조할 것. 이들 대체 수단인 표적화 방법은 당분야의 숙련자에게 알려질 것이다.

VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체, VEGF 핵산 리간드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체를 포함하는 지질구조체, 및

복합체의 일부가 아닌 상태로 지질구조체와 회합된 VEGF 핵산 리간드의 동맥내 주사, 흡입 분무기, 구강적 활성 배합물, 또는 좌약과 같은 기타 효율적인 투여 형태도 생각할 수 있으나, 치료제 또는 진단제 조성물은 주사에 의하여 비경구적으로 투여될 수 있다. 하나의 바람직한 캐리어는 생리학적 식염수 용액인데, 그러나 기타 약리학적으로 수용 가능한 캐리어도 사용될 수 있다는 점을 고려하여야 한다. 하나의 구체에서, 캐리어 및 VEGF 핵산 리간드 복합체가 생리학적으로 양립 가능하며, 서방형인 배합물을 구성하는 것이 계획되었다. 이와같은 캐리어에서의 1차 용매는 자연상태에서 수성 또는 비수성이 될 수 있다. 또한, 캐리어는 배합물의 pH, 삼투물 농도, 점도, 정화도, 색깔, 무균성, 안정성, 용해속도 또는 냄새를 변형 또는 유지하기 위한 기타 약리학적으로 수용 가능한 성분을 함유할 수 있다. 마찬가지로, 캐리어는 VEGF 핵산 리간드의 안정성, 용해속도, 방출 또는 흡수를 변형 또는 유지하기 위한 기타 약리학적으로 수용 가능한 성분도 함유할 수 있다. 이와같은 성분은, 단일 복용 또는 다수복용 형태의 비경구적 투여를 위한 복용량을 배합하기 위하여 통상적으로 및 관습적으로 채택되는 것들이다.

일단 치료제 또는 진단제 조성물이 배합되면, 용액, 현탁액, 겔, 에밀존, 고체 또는 탈수 또는 냉동건조 분말로서 살균병내에 저장된다. 이와같은 배합물은 사용 가능 형태나 또는 투여 직전에 재구성이 요구되는 형태로 저장될 수 있다. 전신적 운반을 위한 VEGF 핵산 리간드를 함유하는 배합물의 투여 방법은 피하, 근육내, 정맥내, 비장내 또는 직장 좌약을 경유할 수 있다.

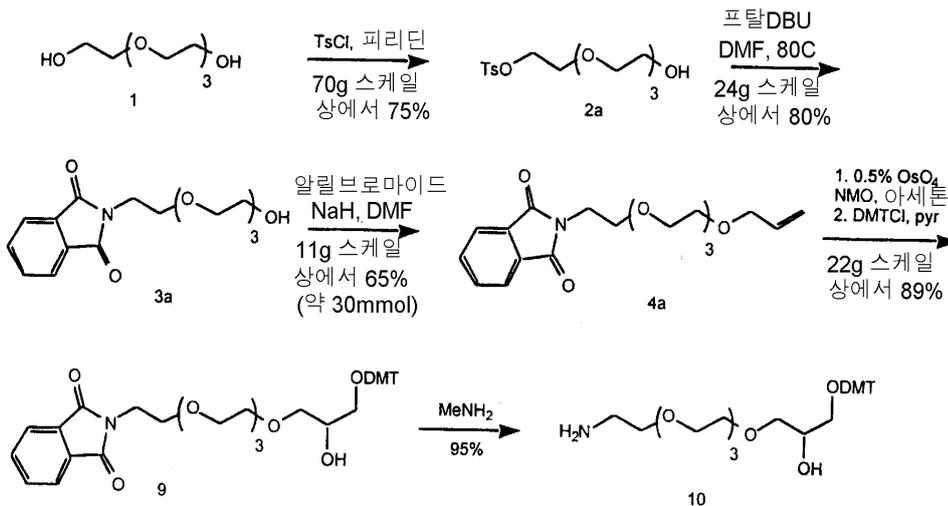
본 발명의 복합체 및 지질 구조체의 장점: i) 핵산의 플라스마 약물 속도성을 개선; ii) 표적과 상호작용의 결합 활성을 증가시킬 목적으로 다원자가 배열로 핵산 리간드들을 제공; iii) 동일 리포좀 입자내에서 상이한 특이성을 지닌, 2개 이상의 제공 핵산 리간드들을 결합; iv) 리포좀의 본질적인 중앙 표적화 특성의 장점을 취하여, 중앙으로의 제공 핵산 리간드의 운반을 강화; 및 v) 리포좀 내용물을 특정 표적에 인도하기 위하여, 항체 특성과 양립할 수 있는 제공 핵산 리간드의 높은 친화력 및 특이성을 이용하는 것을 내포한다. 제공 핵산 리간드는, 대부분의 단백질과는 달리, 열에 의한 제공 핵산 리간드의 변성, 다양한 분자 변형체 및 유기 용매의 변성이 용이하게 가역성이 되기 때문에, 여기에 기재된 제재류에 잘 적합된다.

하기 실시예는 본 발명을 설명 및 예시하기 위한 것으로, 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니다. 하기 실시예에 기재된 핵산 리간드의 구조는 제1도에 도시된다. 실시예 1은 핵산 리간드와 지질 시약과의 접합을 설명한다. 자유 리간드로서 또는 리포좀(NX278-L)의 2중막층에 첨합된 VEGF 핵산 리간드(NX278)의 디알킬 글리세롤 유도체가, 시판관 및 생체내에서 VEGF의 활성을 억제할 수 있는 능력이 실시예 2에 기재된다. 실시예 3은 VEGF에 대한 2'-F 피리미딘 변형 RNA 리간드를 생성하기 위한 실험적 공정을 설명하고 있다. 실시예 4는 VEGF에 대한 2'-F 피리미딘 변형 RNA 리간드를 기재하고 있다. 실시예 5는 글리세롤 리피드, 포스포리피드, 글리세롤 아이드 리피드 및 PEG-변형 VEGF 핵산 리간드의 합성을 설명하고 있다. 실시예 6은 포스포리피드(PL) 및 PEG 변형 VEGF 핵산 리간드의 약물속도론적 특성을 설명한다. 실시예 7은 NX31838PL-리포좀 복합체의 제조방법을 기재하고 있다. 실시예 8~10은 VEGF 핵산 리간드 복합체의 생체내 효율을 나타낸다. 실시예 11은 토끼에 있어서의 NX31838-40K PEG의 인트라비트리알(intravitreal) 약물 속도성을 나타낸다.

실시예 1. 디알킬 글리세롤 (1,2-디-O-옥타데실-sn-글리세롤)-변형 VEGF 핵산 리간드의 합성.

이 실시예에서, 핵산 리간드와 지질 시약의 접합이 설명된다. (1,2-디-O-옥타데실-sn-글리세롤)-변형 VEGF 핵산 리간드의 합성은 다음과 같이 표시된다:

도해 1



테트라에틸렌 글리콜 모노에틸레이트[2a]: 테트라에틸렌 글리콜(200ml, 1.15몰)이 500ml의 피리딘에 용해되어 0°C로 냉각되고 22.0g(0.115몰)의 p-톨루엔술포닐 클로라이드로 처리되었다. 용액이 완성되었을 때, 반응혼합물은 철야로 냉장고에 저장된 후 진공 농축되었다. 잔류물은 800ml의 EtOAc에 용해되어 3 × 600ml의 물로 추출되었다. H₂O 분획은 EtOAc로 역-추출되었으며, 결합된 EtOAc 분획은 포화된 수성 Na₂HPO₄로 추출되었다. 유기상은 MgSO₄ 상에서 건조되고 무색 오일로 농축되었다. 오일은 800ml의 실리카 겔을 사용하고, 핵산, 핵산 중의 25% EtOAc-50% EtOAc, 다음에는 EtOAc 중의 10% MeOH-20% MeOH로 용출되는 크로마토그래피에 의하여 정제되어, 23.7g(60%)의 순수 생성물 및 미량의 불소물을 함유하는 생성물을

제공하였다. 2a: ^1H NMR (300MHz, CDCl_3)d 7.77 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 7.32 (d, $J=8.1\text{ Hz}$, 2H), 4.13 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.68-3.53 (m, 14H), 2.58 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 2.42 (s, 3H); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3)d 168.2, 158.3, 144.8, 135.9, 133.8, 132.0, 129.9, 128.0, 127.7, 126.6, 123.1, 113.0, 85.9, 73.0, 70.6, 70.4, 70.0, 69.7, 67.8, 64.4, 55.1, 37.1; $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{S}(\text{M}+1)$ 에 대하여 계산된 저해상도 MS m/e: 349.1.

테트라에틸렌 글리콜 모노 프탈이미드[3a]: 400ml의 무수 DMF 중에 31.96g (0.092몰)의 2a를 교반한 용액에, 14.2g(1.05당량)의 프탈이미드 및 14.4ml(1.05당량)의 1,8-디아자비시클로[5,4,0] 언덱-7-엔이 첨가되었다. 용액을 70°C에서 18시간 가열한 후 진공농축하였다. 1600ml의 실리카 겔을 사용하고, 핵산 중의 25% EtOAc-50% EtOAc-75% EtOAc, 다음에는 EtOAc 중의 10% MeOH-20% MeOH로 용출하는 크로마토그래피에 의하여 조 황색 오일이 정제되어, 오일로서 23.8g(80%)이 제공되었다. 세워 놓자, [3a]는 왁스성의 백색 고체가 되었다. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3)d 7.84-7.78 (m, 2H), 7.70-7.66(m, 2H), 3.86 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 2H), 3.70 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 2H), 3.64-3.51 (m, 12H), 2.67 (bs, 1H); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3)d 168.2, 133.8, 132.0, 123.1, 72.4, 70.5, 70.4, 70.2, 70.0, 67.8, 61.6, 37.2.

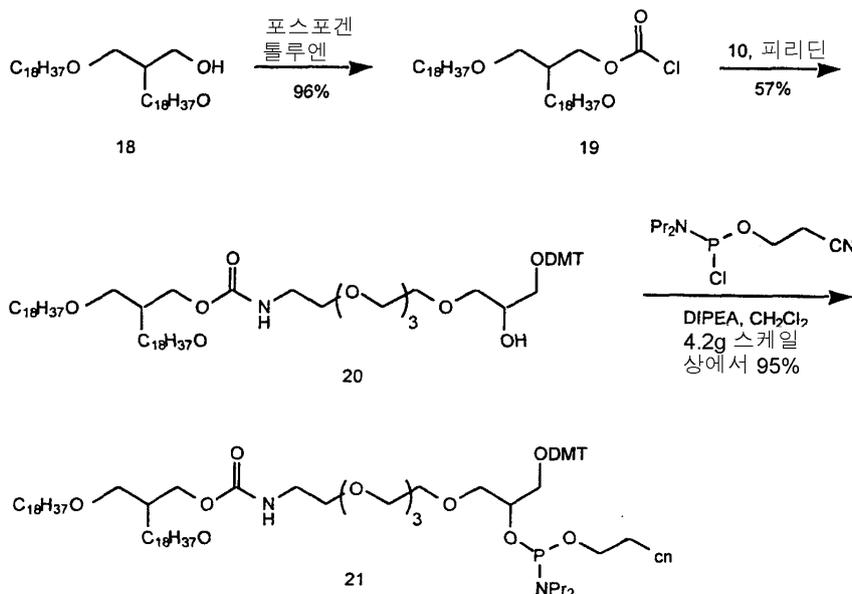
화합물 [4a]의 합성: 150ml의 THF 및 15ml의 DMF 중의 15g(0.0464몰)의 [3a] 용액이 Ar 하에서 0°C로 냉각되었다. 브롬화 알릴(6.0mL, 1.5당량)이 용액에 첨가된 후 다시 1.76g(1.5당량)의 고체 NaOH가 첨가되었다. 불투명한 황색 현탁액이 0°C에서 30분간, 다음에는 실온에서 18시간 교반되었다. MeOH(50-100ml)가 첨가되고 농축된 후 혼합물이 진공 농축되었다. 1500ml의 실리카 겔을 사용하고, 핵산 중의 25% EtOAc-50% EtOAc-75% EtOAc, 다음에는 EtOAc, 다음에는 EtOAc 중의 10% MeOH로 용출하는 크로마토그래피에 의하여 조 물질이 정제되어 11.05g(65%)의, 황색 오일인 [4a]가 생성되었다. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3)d 7.84-7.80 (m, 2H), 7.72-7.67 (m, 2H), 5.94-5.84 (m, 1H), 5.28-5.14 (m, 2H), 3.99 (d, $J=5.61\text{ Hz}$, 2H), 3.88 (t, $J=5.85\text{ Hz}$, 2H), 3.72 (t, $J=5.76\text{ Hz}$, 2H), 3.64-3.54 (m, 13H); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3)d 168.0, 134.6, 133.7, 131.9, 123.0, 116.9, 72.0, 70.4, 69.9, 69.2, 67.7, 37.0.

1-디메톡시트리틸-3-(프탈이미드테트라에틸렌글리콜일)-sm-글리세롤[9]: 도해 1에 따라, 화합물 [9]가 다음과 같이 합성되었다: 100ml의 아세톤 및 1ml이 H_2O 중에 교반된 [4a](10.13g, 0.0279몰) 용액에, 3.98g (1.22 당량)의 N-메틸모르폴린 N-옥사이드가 첨가되었다. 이 현탁액에, iPrOH 중의 2.5% 용액으로서 1.75ml(0.005 당량)의 4산화 오소늄이 첨가되었다. OsO_4 용액을 첨가한 후, 반응 혼합물이 맑은 황색으로 되었다. TLC 분석이 [4a]의 완전한 전환을 나타낸 후(약 16시간), 반응혼합물은 1.5g의 히드로아황산 나트륨 및 5.0g의 플로리실(Florisil)로 처리되어 30분간 교반되었다. 현탁액이 플로리실을 통하여 여과되고, 여과액은 오일로 농축되었다. 이 조생성물은, 1.0g의 [4a]로부터 동일 방법으로 제조된 다른 배치와 결합되었다. 2개의 100부의 피리딘이 결합된 콧트로부터 공증발되고 잔류물은 300ml의 피리딘에 용해되었다. 용액은 0°C로 냉각되고 10.89g(1.05당량)의 4,4-염화디메톡시트리틸이 첨가되었다. 플라스크에 건조 튜브가 삽입되고, 반응 혼합물은 실온에서 16시간 교반되었다. 용액은 20ml의 MeOH로 처리되어 수조의 온도를 40°C 이하로 유지하면서 진공 농축되었다. 1100ml의 실리카 겔(핵산 중의 3% 트리에틸아민을 이용하는 칼럼상에 젖은 상태로 팩킹)을 사용하고, 핵산 중의 10~100% EtOAc (모두 3% 트리에틸아민 함유)로 용출되는 크로마토그래피에 의하여, 조 오일이 정제되어 황색 오일로서 21.3g(2단계 후에 89%)의 화합물 [9]가 제공되었다. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3)d 7.80-7.77 (m, 2H), 7.66-7.64 (m, 2H), 7.39-7.22 (m, 9H), 7.20-6.76 (m, 4H), 3.97 (bs, 1H), 3.84 (t, $J=5.97\text{Hz}$, 2H), 3.74 (s, 6H), 3.68 (t, $J=5.7\text{Hz}$, 2H), 3.60-3.49 (m, 14H), 3.13-2.76 (m, 2H), 2.00 (bs, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3)d 168.2, 158.3, 144.8, 135.9, 133.8, 132.0, 129.9, 128.0, 127.7, 126.6, 123.1, 113.0, 85.9, 73.0, 70.6, 70.4, 70.0, 69.7, 67.8, 64.4, 55.1, 37.1; $\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{O}_{10}\text{N}(\text{M}+\text{NH}_4^+)$ 에 대하여 계산된 저해상도 MS m/e: 717.5.

1-디메톡시트리틸-3-(아미노테트라에틸렌글리콜일)-sn-글리세롤[10]:

도해 1에 따라, 화합물 [10]이 다음과 같이 합성되었다: 화합물 [9] (5.2g, 7.2mmol)이 수중의 50ml의 40% 메틸아민에 취해지고, 출발물질을 용해하기 위하여 100ml의 메탄올이 첨가되었다. 반응혼합물이 50°C에서 5시간 가열된 후 진공농축되고 툴루엔과 함께 공증발되었다. 200ml의 실리카 겔을 이용하고, 디클로로메탈중의 15% 메탄올 암모니아로 용출되는 크로마토그래피에 의하여 조물질이 정제되었다. 옅은 황색 오일로서 3.94g(96%)의 화합물 [10]이 수집되었다. ^1H NMR (300MHz, CDCl_3)d 7.46-7.21 (m, 9H, DMT), 6.81 (d, 4H, DMT), 4.00(m, 1H), 3.80(s, 6H), 3.70-3.49 (중복 m, 18H), 3.20 (dd, $J=9.24, 5.49\text{ Hz}$, 1H), 3.12 (dd, $J=9.21, 6.0\text{ Hz}$, 1H), 2.84-2.80 (m, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3)d 158.30, 144.82, 136.01, 129.95, 128.04, 127.66, 126.61, 112.95, 85.85, 73.46, 72.85, 70.55, 70.45, 69.99, 69.51, 64.43, 55.10, 41.40; $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_8\text{N}(\text{M}+1^+)$:570.353에 대하여 계산된 저해상도 MS m/e: 570.4.

도해 2



염화수소염 [19]: 60ml 톨루엔 중의 3g(5.03mmol)의 1,2-디-0-옥타데실-*sn*-글리세롤 [18] 교반 용액에, 20ml이 1.93M 포스겐 용액이 첨가되었다. 더 이상의 알코올 출발물질이 잔류하지 않을 때까지 (농축된 일정 부분의 $^1\text{H NMR}$ 분석에 의하여) 별도의 포스겐 용액(2×10ml; 총 15.4 당량 포스겐)이 첨가되었다. 흡인기에 의하여 과잉의 포스겐 및 HCl이 제거되고, 반응혼합물이 진공 농축되어, 백색 분말로서 3.3g(98%)의 요망 염화수소염 [19]이 제공되었다. $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) d 4.45 (dd, $J=11.22, 3.69$ Hz, 1H), 4.34 (dd, $J=11.22, 6.15$ Hz, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.56–3.40 (m, 6H), 1.53 (m, 4H), 1.24 (m, 62H), 0.87 (t, $J=6.36$ Hz, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) d 75.90, 71.91, 71.35, 70.93, 69.36, 31.99, 29.96–29.44(탄화수소 사슬로부터의 중복 시그널), 26.13, 26.04, 22.76, 14.18.

접합체 [20]: 60ml 피리딘 중의 2.25g(3.95mmol) [10]의 교반용액에, 2.6g의 디스테아릴 글리콜 염화수소염 [18]이 첨가되었다. 2시간 후 농축된 부분의 $^1\text{H NMR}$ 분석 결과 염화수소염이 잔류하지 않는 것으로 나타났으며, 혼합물은 진공농축되었다. 조 잔류물은, 0.5g (0.88mmol)이 [10] 및 0.58g의 염화수소염으로부터 유사하게 제조된 물질과 합쳐지고, 합쳐진 콧트는 100ml의 실리카 겔 칼럼(2% 트리에틸아민을 함유하는 헥산에 팩킹)을 이용하고, 200ml 헥산, 다음에는 250ml 각각의, 헥산 중의 10~20 및 30% EtOAc, 헥산 중의 500ml 40% EtOAc, 다음에는 250ml 각각의 헥산 중의 50~60, 70 및 80% EtOAc 및 마지막으로 250ml의 EtOAc로 용출되는 실리카 겔 크로마토그래피에 의하여 정제되었다. 분획을 함유하는 생성물은 농축되어 3.3g (57%)의 접합체 [20]를 제공하였다.

포스포아미디트 [21]: 25ml의 CH_2Cl_2 중의 3.8g(9.26mmol) 접합체의 교반 용액에, 1.14ml(6.52mmol)의 디이소프로필에틸아민, 다음에는 1.09ml(4.88mmol)의 2-시아노에틸 *N,N*-디이소프로필클로로-포스포아미디트가 첨가되었다. 2시간 후, 혼합물이 CH_2Cl_2 로 희석, 포화 NaHCO_3 용액으로 세척, Na_2SO_4 상에서 건조 및 농축되었다. 125ml의 실리카 겔 칼럼(2% 트리에틸아민을 함유하는 헥산에 팩킹)을 이용하고, 100ml 헥산, 다음에는 250ml 각각의, 헥산 중의 10 및 20% EtOAc, 헥산 중의 500ml 30% EtOAc, 다음에는 헥산 중의 250ml 50% EtOAc로 용출되는 실리카 겔 크로마토그래피에 의하여 조 잔류물이 정제되었다. 분획을 함유하는 생성물이 농축되어 4.2g(95%)의 포스포아미디트 [21]를 제공하였다. $^{31}\text{P NMR}$ (CDCl_3) d 151.52, 151.08.

VEGF 핵산 리간드-1,2-디-0-옥타데실-*sn*-글리세롤 접합체:

포스포아미디트 [21] (도해 2)을 이용하여, 1,2-디-0-옥타데실-*sn*-글리세롤 그룹이 VEGF 핵산 리간드 NX213 (제 1A도 참조)에 접합되었다. 얻어진 접합체는 NX278 (제 1B도 참조)로 명명되었다. NX278은 가역상 HPLC에 의하여 정제되고, 그 조성은 전기 분무 질량 분석법에 의하여 확인되었다(m/z 관측치=11703±4, m/z 특징치=11720). 포스포로티오에이트 인터뉴클레오시드 연결이 NX278 (3' 및 5' 단부)의 8개의 위치에서 이용되었는데, 예상 및 관측 질량간의 차이 0.16 질량 단위는, 아마도 황화체에 의한 불완전한 산화때문에, 평균적으로, 예상치보다 분자당 하나 적은 포스포로티오에이트 연결이 초래되는 것 같다.

실시에 2. 핵산 리간드-리포좀 복합체의 시험관내 및 생체내 효능. 리포좀 2중막층에 매입된 디알킬글리세롤(DAG)-변형 VEGF 핵산 리간드(NX 278).

NX-278(1mg) (제 1B도; SEQ ID NO: 2)을, 9% 슈크로우즈를 함유하는 25mM 포스페이트(pH7.4) 완충액 중의 분무-건조된 DSPC: 콜레스테롤의 혼합물(50mg/ml; 2:1, Mol: Mol)과 함께 배양하고, 단백질 용액이 얼어질 때까지 프로브형 음파처리를 이용하여 약 60°C에서 15분간 음파처리함으로써, NX278-리포좀 복합체가 제조되었다. 리간드 NX-278의 유사체가 뒤섞인 서열(sc NX278) (제 1C도; SEQ ID NO: 3)을 함유하는 대조 핵산 리간드-리포좀 복합체가 동일 방식으로 제조되었다. 전형적인 제조에 있어서, 평균 직경이 50nm

및 반 높이에서의 분포 폭이 20nm인 리포좀이 얻어졌다. 리포좀 입자의 크기는 입자 분석기(Leeds & Northrup Model Microtrack UPA 150, 펜실바니아주, 호르삼)에서 측정되었다. 비교할 수 있는 크기 분포의 리포좀은 동일한 지질 조성여기는 하나 지질-접합된 핵산 리간드가 없는 것으로 얻어졌다. 50nm 리포좀은 평균 40 핵산 리간드를 함유할 것으로 예상되었으며, 2중막층의 양면에 전시되었다. 계산은 다음과 같이 이루어졌다. 외경이 50nm 및 20Å의 막 두께인 구형 리포좀에 대하여, 리포좀내의 콜레스테롤에 대한 19°C 및 디스테아릴포스파티딜콜린에 대한 60Å의 표면적을 가정하여, 리포좀당 지질 분자수 3.13×10^4 이 얻어졌다. 리포좀의 조성(2: 1 mol: mol 디스테아릴포스파티딜콜린 (MW=790.2): 콜레스테롤 (MW=386.7))으로 부터, 지질의 균일한 분포를 가정하여, 리포좀에 대한 분자질량, 2.1×10^7 이 계산되었다.

리포좀의 내측 및 외측 표면 사이의 핵산 리간드의 분리를 측정하기 위하여, T₁ 리보뉴클리아제에 대한 리포좀 배합물의 NX278의 접근성이 검사되었다. 서열내의 2개의 리보구아노신(그린 등 (1995), 화학 및 생물 2: 683-615)으로, NX278은 리보뉴클리아제 T₁에 의하여 효율적으로 개열된다. 예비성형 리포좀으로의 단순한 NX278 배양은 핵산 리간드를 리보뉴클리아제 T₁으로부터 보호하지 못한다. 그러나, NX278이 음파처리에 의하여 리포좀에 침투되면(NX278-리포좀), 약 1/3이 뉴클리아제로 부터 보호된다. NX278-리포좀에 0.1% 트리톤(Triton) X-100을 첨가하면, 이것은 뉴클리아제의 활성에 영향을 주지 않고 리포좀을 붕괴시키는데, 이전에 보호된 핵산 리간드가 소화되도록 한다. 이들 결과는, 핵산 리간드가 2중막층의 양측위에 분포된다는 개념과 일치한다.

VEGF에 대한 NX213, NX278 및 NX278-리포좀의 결합 친화력

경쟁 전기 영동 이동 방법을 이용하여, VEGF에 대한 NX213, NX278 및 NX278-리포좀의 결합 친화력이 검사되었다(제 2도). VEGF에 대한 NX278의 결합 친화력은 NX213의 친화력과 비견되었다. NX278-리포좀의 외견상 결합 친화력은 NX278에 비하여 3배 낮았다. 관측된 친화력 저하의 일부는 아마도 핵산 리간드의 분획을 리포좀의 내부에 국한하기 때문일 것이다. 예시된 바와 같이, 뒤섞인 유사체의 서열은 사실상 낮은 친화력으로 VEGF에 결합한다(제 2도).

NX213, NX278 및 NX278-리포좀의 플라즈마 약물 속도론적 특성

시간의 함수로서, 스프라구 다울리(Sprague Dawley) 중의 플라즈마내의 NX213, NX278 및 NX278-리포좀의 농도가 제 15도에 도시되며, 구획 분석으로부터의 매개변수가 표 1에 요약된다. 대부분의 NX213은 t_{1/2}인 7분으로 알파상태에서 신속히 소모되며, 전반적인 소모율은 6.8ml/Kg/분이다. 포스포리피드 그룹이 핵산 리간드에 접합한 결과, β(t_{1/2})가 증가된 혈액으로부터 고도로 이상성(二相性)인 소모 및 NX213에 비하여 어느 정도 서행인 전반적 소모율(4.95ml/Kg/분)을 나타낸다. 리포좀에 NX278을 첨가시키면 플라즈마로부터 핵산 리간드의 소모율에 있어서 실질적인 별도의 감소가 나타난다(1.88ml/kg/분).

HUVEC 증식 및 맥관형성에 대한 NX278의 효과

인체 배꼽정맥 내피세포(HUVEC)의 증식에 대한 NX278-리포좀, scNX278-리포좀 및 NX213의 효과가 검사되었다. 10% 양소 혈청(FCS) 및 헤파린(45μg/ml)을 함유하는 IMDM: 항(Ham) F12 (1:1) 배지의 VEGF(10ng/ml) 존재하에, HUVEC가 성장되었다. 세포는 0일째에 웰당 20,000 세포의 밀도로 24-웰 겔라틴-피복 플레이트에 평판화되고, 1, 2 및 3일째에 0.1nM~1μM 사이의 농도에서 상기 리간드들로 처리되었다(리간드에 따라 배지를 대체하였다. NX278-리포좀은 HUVEC의 증식을 \approx 300nM의 IC₅₀으로 억제하였다(농도는 핵산 리간드 성분을 가르킨다); scNX278-리포좀 및 NX213은 현저히 효율이 낮았다(IC₅₀>1μM).

VEGF는 닭 고막(CAM) 검정에서 맥관 형성을 유도하며, 이 검정은 맥관형성을 억제하는 화합물의 연구에 이용될 수 있다. 검정은, VEGF에 적셔진 필터 디스크를 CAM상에 놓음으로써 수행되는데, 새로운 혈관의 진전이 정량될 수 있다. NX278-리포좀은 VEGF 유도 맥관형성을 효율적으로 차단(데이타는 표시되지 않음)하는 반면에, NX213, NX278 및 scNX278-리포좀은 효과가 없다. 이들 연구결과들은 NX278이 시험관내 VEGF 유도 내피세포증식 및 생체내의 새로운 혈관 형성의 특이적 억제제라는 것을 나타낸다.

VEGF 유도 모세혈관 투과성에 대한 NX278의 효과.

VEGF는 모세관 투과성을 일시적으로 강화시키는 것으로 알려진 오직 하나의 맥관형성 인자이다. 생체내에서 VEGF의 혈관 투과 활성을 억제시키는 NX278-리포좀의 능력이 검사되었다. 혈관 투과성 검정(또한 마일스(Miles) 검정(마일스 (Miles, A.A) 및 마일스(Miles, E. M) (1952) J. Physiol. (런던) 118: 228)으로도 알려짐)이 기재된 바와 같이 특별히 기니아 돼지에서 수행되었다(생거(Senger, R.S)등 (1983) Science 219: 983). 에반스 청색 염료가 미리 주입된 기니아 돼지에, VEGF(20nM)와 함께, 1μM의 농도로 NX278-리포좀, NX278 및 NX213이 피내 주사되었다. VEGF에 대한 반응에서, 혈관 투과성의 증가는, 주사부위에 푸른 반점을 초래하는 알부민-결합 에반스 청색 염료의 혈관외 유출을 일으킨다. 유기용매 추출에 의한 염료의 회수가 일반적으로 매우 불량하기 때문에, 피부를 통하여 빛의 흡수를 측정하는 정량방법이 개발되었다. 제 3도에 도시한 바와 같이, NX213, NX278, NX278-리포좀 및 VEGF에 대한 중화 모노클로날 항체 모두가 VEGF-유도 투과성을 현저히 억제하였다. 핵산 리간드 중, NX278-리포좀이 가장 유력한 길항물질인 것으로 나타났다. 이들 화합물의 서열 혼합 유사체는 억제성이 없었다. 차이는 육안으로도 극적이며 감지할 수 있었다.

NX278-L은 시험관내에서 카포시 육종 세포주를 억제한다.

VEGF의 억제제는 종양 진행 및 전이가 신규 혈관 형성에 의존되는 악성 종양을 포함하는, 다양한 질병에서 용도가 크다. 대부분의 종양 형태가 VEGF를 생성하는 것으로 알려졌으나, 이전에는 아무도 기능성 VEGF 수용체를 발현시키는 것을 보이지 못했다. 최근 카포시 육종(KS) 세포가 풍부한 양의 VEGF를 생성할 뿐만 아니라, 기능성 VEGF 수용체를 발현시키는 것으로 밝혀져, VEGF를 오우토크라인 성장용으로 사용한다. 따라서 KS 세포주는 오우토크라인 VEGF 성장 활성을 차단시키는 NX278의 능력을 검사하기 위한 유일한 기회를 제공하게 된다.

KS 세포의 증식에 대한 NX278-리포좀, scNX278-리포좀 및 NX213의 효과가 검사되었다. 2% FCS, L-글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640을 함유하는 배지에서, 0일째에 웰당 7,500~10,000 세포의 밀도로, KS 세포주 KSY-10이 24-웰 겔라틴 피복 플레이트에 평판화되었다. 1, 2 및 3일째에 핵산 리간드가 0.1nM~1 μ M의 농도로 새로운 배지에 첨가되고, 4일째에 세포수가 계산되었다. NX278-리포좀은 100nM의 IC50으로 KS세포의 증식을 억제하였으며; 1 μ M NX278-리포좀에서, 이들 세포의 성장은 완전히 억제되었다. scNS278-리포좀 및 NX213은 IC50 값>1 μ M으로 억제하였다(제 4도).

NX278-리포좀은 생체내에서 KS 세포 성장을 억제한다.

VEGF가 KS 세포에 대한 성장인자이기 때문에, 생체내 KS 종양에 대한 VEGF 길항물질의 효과는, 종양 결합 내피세포에 대한 VEGF의 파라크라인(paracrine) 성장 효과의 억제 및 종양 세포에 대한 오우토크라인 효과의 억제로, 2배인 것 같다. 생체내에서 핵산 리간드의 활성을 시험하기 위하여, 종양 투관침(3mm³)이 1일째에 무흉선 마우스에 이식되고, 2일째 부터 시작하여 연 5일동안 50, 100 또는 150 μ g/일/마우스로 처리되었다. 종양성장 속도가 2주간 측정되었다. NX278-리포좀은 투여량에 따라 종양성장을 억제하였는데, 최저 투여량 50 μ g/일/마우스 복용에서는 종양성장의 억제가 매우 작았으며(제5A도), 100 및 150 μ g/일/마우스 복용에서는 종양 성장의 억제가 현저하였다(제 5B도, 150 μ g/일/마우스복용이 도시됨). 공 리포좀(제 5A, B도), scNX278-리포좀 및 NX213, NX278은 검사된 모든 투여량에서 비효과적이었다. 또한, NX278-리포좀은 혈관으로부터의 VEGF-유도 혈액 누출을 차단하였다.

실시에 3. VEGF에 대한 2'-플루오로 피리미딘-변형 RNA 리간드의 실험적 방법

본 실시예는, VEGF에 대한 2'-플루오로-변형 핵산 리간드의 전개를 위하여 실시예 4가 뒤따르고 그에 첨합되는 일반적 공정을 제공한다.

재료.

곤충세포주 Sf21로부터 정제된 재조합 인체 VEGF165를, 캐리어 없는 동결건조 분말로서, R&D 시스템사로부터 구입하였다. 단백질은 10 μ M의 농도로 인산염-완충작용 식염수에 재부유되어, 사용할 때까지 작은 부분단위로 -20 $^{\circ}$ C에서 저장되었다. 부분 단위는, 녹인 후, 4주까지 4 $^{\circ}$ C에서 저장되었다. Sf21-발현 마우스 VEGF₁₆₄ 및 대장균-발현 인체 VEGF₁₂₁, VEGF/PIGF 이중 2량체, 및 PIGF도 캐리어-없는 동결건조 제재로서 R&D 시스템사로부터 구입하였다.

올리고뉴클레오티드는 오페론 테크놀로지스사(Operon Technologies, Inc.)로부터 구입하거나 또는 최적 프로토콜에 따라, 어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems) 모델 394 올리고뉴클레오티드 합성장치를 이용하여 합성하였다. 2'-F 및 2'-OMe-리보뉴클레오티드 포스포아미디트는 JBL 사이언티픽사(JBL Scientific, Inc. 산루이스 오비스포, 캘리포니아주)에 의하여 제조되었다. 2'-F 피리미딘 NTP도 JBL로부터 구입하였다. 2'-OH-퓨린 NTP 및 dNTP는 파아마시아 바이오테크, 피스카타웨이, 뉴저지(Pharmacia Biotech, Piscataway, WJ)로부터 구입하였다.

티.아쿠아티쿠스(T. aquaticus) 열안정성 DNA 폴리머라제(Taq polymerase)는 페르킨-엘머-세터스(Perkin-Elmer-Cetus, 포스터시, 캘리포니아주); AMV 역전사 효소(AMV RT)는 라이프 사이언스사(Life Science, Inc.); 클리나우 DNA 폴리머라제는 뉴잉글랜드 바이오라브스사(New England Biolabs, 베버리, MA)로부터 구입하였다. T7 RNA 폴리머라제는 엔지코사(Enzyco, 덴버, Co)로부터 구입하였다. 시퀀나제 DNA 폴리머라제는 유나이티드 바이오케미칼사(United Biochemical Corp. 클리브랜드, 오하이오주)에 의하여 제조되었다.

α -[³²P]-ATP 및 γ -[³²P]-ATP는 뉴잉글랜드 뉴클레어(New England Nuclear, 보스턴, 마사추세츠주)로부터 얻었다.

SELEX 프로토콜

SELEX 공정은 SELEX 특허 출원에 상세히 기재되어 있다. 화학적으로 합성된 DNA 올리고뉴클레오티드 라이브러리('30N7' 및 '40N7')는 통상의 5' 및 3' 고정 서열과 측면으로 인접한 30 또는 40 뉴클레오티드의 랜덤화 영역으로 제조되었다(5'-

TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG(30 또는 40N)

CAGACGACTCGCCCGA-3'; SEQ ID NO:). 각 주형의 5' 단부에 있는 이태리체 뉴클레오티드는 T7 RNA 폴리머라제 프로모터 서열에 해당한다. 올리고뉴클레오티드 프라이머도, 주형 제조 및 증폭, 및 역전사에서의 용도를 위하여 합성되었다: 5'-TCGGGCGAGTCTGTCTG-3'('3N7'; SEQ ID NO:) 및 5'-

TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-3'('5N7' SEQ ID NO:). 2중사슬 DNA 주형은, 프라이머 3N7를 30N7 또는 40N7 라이브러리로 어닐링하고 클리나우 DNA 폴리머라제 또는 AMV RJ를 이용하여 플라이머즈를 연장함으로써 제조하였다. AMV RJ에 사용된 배양의 보다 높은 온도(37 $^{\circ}$ C 보다는 45 $^{\circ}$ C)는 고도로 구조를 이룬 주형 올리고뉴클레오티드를 통하여 완전한 연장을 보다 잘 촉진시킬 수 있다. 라이브러리는, 1mM의 각

2'-OH ATP 및 GTP, 3mM의 각 2'-f-CTP 및 UTP 및 50 μ Ci α -³²P-ATP의 존재하에 T7 RNA 폴리머라제를 이용하여 전사되었다. RNA는, RNA를 함유하는 겔 슬라이스를 절제하고, 이를 분쇄 및 장시간 2mM EDTA에 담금으로써 정제되었다.

선별된 푸울 증폭이 뒤따르는 친화성 선택의 SELEX 공정은 상세히 기록되어 있다(SELEX 특허출원 참조). 요약하면, 1회전의 선별 및 증폭이 다음과 같이 수행되었다: VEGF는 1mM MgCl₂을 지닌 인산염-완충작용 식염수(PBSM)(30N7 및 40N7 라이브러리) 또는 트리스-완충작용 식염수, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂(TBSMC)(오직, 30N7 라이브러리)중의 5 또는 10배의 과잉 RNA와 혼합되고 혼합물은 세 용액으로 연속적으로 희석되었다. 37°C에서 15분간 배양후, VEGF와 RNA의 복합체를 수집하기 위하여, 혼합물은 0.45 μ 형 HA 필터(밀리포어)를 관통하였다. RNA는, 2:1 페놀, pH7: 7M 요소중의 배양에 의하여, 선택된 필터로부터 용출되었다. 수성상으로부터의 침전 후, RNA는 프라이머 3N7로 아닐링되고, AMV RT를 사용하여 역전사되었다. 얻어진 cDNA는 3N7 및 5N7 프라이머 및 Taq DNA 폴리머라제를 사용하여 15 회전의 폴리머라제 연쇄반응(PCR)으로 증폭되었다. PCR 산물의 전사결과, VEGF에 대한 친화력을 지닌 서열이 부유화된 신규 라이브러리를 산출하였다. 4회전에서, VEGF 부재하에서의 실질적인 배경 필터-결합 시그널이 3개의 모든 선택 RNA 푸울에 출현하였다. 필터-결합 RNA의 푸울을 제거하기 위하여, 5회전 및 6회전이, 미결합 분자로부터 VEGF-결합 RNA를 분리하기 위하여 대체 방안 도해로 수행되었는데: RNA 푸울을 성장인자로 배양한 후, 각 혼합물은 8% 폴리아크릴아미드, 비-변성 겔에 적용되고 4°C에서 45~60분간 10W로 전기영동처리 되었다. VEGF/RNA 복합체는 이 시스템에서 미결합 RNA 위에서 이동하였으며, 겔에 X-광선 필름을 노출시킴으로써 가시화되었다. 이들 회전에 있어서, 선택된 RNA가 상술한 바와같이, 분쇄 및 침지법에 의하여 정제되었다. 12회전의 선별 및 증식 후, 선택된 푸울내의 개별 분자는 스트라젠사(라졸라, 캘리포니아)의 pCR-스크립트 디렉트 클로닝 키트(pCR-Script Direct Cloning Kit)를 사용하여 클론화되었다. 플라스미드는 알카린 용해방법을 이용하여 정제되고 (PERFECTprep 플라스미드 DNA 키트, 5 프라임→3프라임, 보올더사), 클론화 영역의 서열은, 페르킨 엘머사(포스터시, 캘리포니아) 제품인 다이 터미네이터 사이클 시퀀싱 키트(Dye Terminator Cycle Sequencing Kit)를 이용하여 얻어졌다. 형광 서열 결정 사다리(Fluorescent sequencing ladder)는 국립 유대인 센터(National Jewish Center), 브라이언 코친, 덴버, 코(Brian Kotzin, Denver, Co.)의 실험실에서 판독하였다. 서열은 즉속으로 그룹을 이루어, 눈으로 정렬되었다.

결합 친화력의 측정

전사중 α -[³²P]-표지 NTP에 침투에 의하여, 또는 합성후에 γ -[³²P]-ATP 및 T4 폴리뉴클레오티드 키나제를 사용하여 방사능 표지된 핵산리간드가, VEGF 또는 기타 성장인자의 농도를 변화시키면서, 37°C에서 15분간 낮은 농도(20~70pM)에서 배양되었다. 배양은 보충적인 2가 양이온을 첨가하거나 하지 않고 TBS, PBS 또는 HEPES-완충작용 식염수(HBS), pH7.4에서 수행되었다. 샘플은 예비 세척된 0.45 μ 타입 HA 필터(밀리포어)를 관통한 후 결합 완충액 5~10ml로 세척되었다. 필터는 신틸런트(scintillant)에 침적되고 각 필터에 의하여 유지되는 단백질-결합 RNA의 양을 계량하기 위하여 계수되었다. 특정 단백질과 결합하는 핵산 리간드의 평형 해리 상수(K₀)가 그린 등(1996) Biochem. 35: 14413~14424에 기재된 바와 같이 데이터 포인트로부터 계산되었다.

핵산 리간드 단편의 친화력 선별

10pmol의, 고친화성 VEGF 핵산 리간드의 내부-방사능 표지 전사체가 37 뉴클리아제로 부분적으로 소화되어 방사능 표지 단편 혼합물을 생성하였다. 단편 RNA의 1/100이, 니트로셀룰로오스를 통하여 여과되기 전, 45ml 결합 완충액중의 10pM VEGF와 함께 배양되었다. 필터로부터 회수된 선별 단편은, 거의 미선별 푸울로 적재된 레인인 고분해능 변성 폴리아크릴아미드 겔상을 주행하였다. 최소 선별 밴드는 겔로부터 개별적으로 정제되고, 그들 비활성을 증가하기 위하여 폴리뉴클레오티드 키나제로 5' 단부에 다시 표지된다. 샘플의 1/2이 원래 전사체의 cDNA로 아닐링되고, 시퀀나제 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형의 단부로 연장되었다. 정제된 단편 및 그 연장 생성물의 이동을 표준 서열결정 사다리에 비교하여 본래 전사체내에서 선택된 단편의 가능한 크기 및 위치를 측정하는데 이용하였다. 친화성 선별 단편에 차례 차례로 대응하는 합성 올리고뉴클레오티드가 제조되어, 절단된 핵산 리간드가 VEGF에 대한 친화력을 유지하고 있다는 것을 증명하였다.

2'-Ome-치환

본질적으로 그린 등(1995) Chem. Biol. 2: 683~695에 기재된 바와 같이 2'-Ome 치환 실험이 수행되었다. 3개의 각 절단 리간드(t22, t2, t44)에 대하여 3 또는 4개의 라이브러리가 제조되었는데, 여기서 5 또는 6개의 2'-OH-퓨린 위치가 부분적으로 2'-Ome 치환되었다. 각 퓨린 위치는 오직 하나의 라이브러리에서 부분적으로 2'-Ome 변형되었다. 각 5'-방사능 표지 라이브러리가 VEGF와 함께 배양되고, 단백질에 의하여 결합된 치환 올리고뉴클레오티드는 니트로셀룰로오스 필터상에 수집되었다. 선별된 푸울 및 출발 미선별 라이브러리는 알카리에 의하여 부분적으로 가수분해 되고, 생성물은 고분해성 폴리아크릴아미드 겔상에 위치되었다. 미선별 라이브러리의 일정 위치에 대하여 얻어진 시그널에 의하여, 선별된 푸울내의 동일 위치에서의 가수분해로부터 얻어진 포스포이미지 시그널을 분할함으로써, 각 퓨린 위치에 대한 '밴드 강도 비율'('band intensity ratio')가 측정되었다. 특정 위치에 대한 범위 이상에 해당하는 밴드 강도 비율은 친화력 선별 푸울의 2'-OH(2'-Ome에 대항하여)에 대한 편향성을 나타내는 지표이다.

결합속도 상수

소량(통상적으로 1pmol 미만)의 5'-방사능 표지 핵산 리간드가, 2가 양이온으로 보충된 1ml 완충작용 식

영수에서 37°C로 1nM VEGF와 함께 배양되었다. '제로' 시점에서, 단백질에 결합된 RNA의 분획을 측정하기 위하여 50 μ l가 니트로셀룰로오스를 통하여 여과된 후, 과잉(상이한 실험에서 100 또는 500nM)의 미표지 핵산 리간드가 첨가되고, 그 후의 시점에서 50 μ l 일정 부분이 여과되었다. 필터가 신틸런트에서 계수되어, 각 시점에서 여전히 VEGF에 결합되어 있는 방사능 표지 RNA의 양을 측정하였다. 결합된 RNA의 분획(f)대 시간으로서 플롯트된 데이터는, 지수형 감쇠에 대한 하기 등식에 적용되었다:

$$f(t) = f_0 e^{-kt} + b,$$

여기서 f_0 는 제로 시점에서 결합된 RNA의 분획, k 는 해리속도 상수(k_d)이며 b 는 실험의 종점에서 필터에 잔류 결합된 방사능 표지 RNA이다(효율적으로, 단백질의 부재하에). 회합속도상수(k_a)는 하기 등식에 의하여, 측정된 k_d 및 K_D 값으로부터 계산된다:

$$k_a = k_d / K_D$$

실시예 4. VEGF에 대한 2'-플루오로-변형 RNA 리간드

리간드의 선별

30 또는 40 랜덤 뉴클레오타이드를 함유하는 2'-피리미딘-변형 RNA의 라이브러리로부터의 3개의 별도 SELEX 실험에서, VEGF에 대한 리간드가 유리되었다. 선별은, 1mM MgCl₂로 보충된 PBS (30N 및 40N 라이브러리)에서 또는 1mM MgCl₂ 및 1mM CaCl₂를 지닌 트리스-완충용 식염수(오직 30N 라이브러리)에서 수행되었다.

약 10¹⁴ 특이 서열이 각 실험의 제 1 선별 사이클에 포함되었다. 10 사이클 후, VEGF 및 각 RNA 풀물간의 친화력은 출발 풀물에 비하여 약 1000 배인 것으로 밝혀졌다. 2번 추가 사이클 후에도 결합 친화력에 있어서 더 이상의 진전이 관측되지 않았기 때문에, 12회전 풀물의 개별 멤버가 클론화 되고, 각 선별로 부타의 약 50 유리체에 대한 서열이 결정되었다.

3개의 별도 SELEX 실험에서, VEGF₁₆₅에 대한 올리고뉴클레오타이드 리간드가 유리되었다. 개별 클론은 유리 및 서열 결정되고, 서열은 공유된 1차 구조적 모티프를 기준으로 그룹으로 나누어졌다(표 2). 각 리간드의 이름은 표적(V=VEGF), 선택 완충액(P=PBS; T=TBS), 라이브러리내의 랜덤화 영역의 길이(30 또는 40 뉴클레오타이드) 및 클론 번호(소수점을 따라)를 가르킨다. 분석된 클론 중 서열이 나타나는 빈도가 괄호내에 표시되며; 오직 하나의 뉴클레오타이드만을 달리하는 뉴클레오타이드는 보통의 전구체의 PCR 돌연변이 유발 때문이었으며, 적절한 기호(Y=U 또는 C)에 의하여 서열내에 표시된 다양한 염기와 함께 그룹을 이루었다. 모든 리간드에 대하여 공통적인 고정 서열은 앞부분의 낮은 문자로 표시된다. 개별 클론에 있어서, 가변성 영역의 서열이 높은 위치의 문자로 표시된다. 일부 리간드에 있어서, 낮은 문자의 고정 서열이 가변성 영역 서열에 첨부됨으로써, 가능한 2차 구조에 기여하게 된다. VEGF와 결합하기 위한 고 친화력 K_D 가 각 리간드에 대하여 표시된다. 각 군에 있어서 하나의 리간드는 다음의 분석을 위하여 선택되었다(회색 칸).

분석된 총 143 클론 중, 하나 이상의 뉴클레오타이드를 달리하는 76 서열이 얻어졌다. 이들 서열중 44개가, 보존된 제1차 구조적 모티프를 기준으로한 3개의 다수 군으로 그룹을 이루었다(표 2). 5개 미만의 멤버를 지닌 소수군의 그룹을 이룰 수 있는 서열 및 유리체중 유일한 '고아' 서열이 표 6에 표시된다. 1족 및 2족으로 규정된 1차 구조 모티프를 함유하는 리간드는 3개의 모든 친화력 선별군에서 발생하였다. 양쪽의 보존 리간드는 3개의 모든 친화력 선별군에서 발생하였다. 양쪽의 보존된 1차 구조간의 유사성은, 그들이 유사한 2차 구조도 공유할 수 있으며 및/또는 그들이, 유사한 접촉 영역을 이용하여, VEGF를 차단할 수도 있음을 암시한다. 제2족의 멤버는, 큰 '루우프'에 보존된 서열 모티프를 내포하고 있는 짧은 염기쌍 스템 형성할 수 있는 가능성을 공유한다(표 2에서 밑줄 친 부분). 폐쇄 A/U 염기쌍을 제외하고는, 추정 스템 영역의 염기의 서열 동일성은 보존되지 않는다. 1차 구조보다는 2차 구조를 보존하는 염기의 이와같은 '공-변동'('co-variation')은 추정 스템의 존재를 지지하며, 이 구조가 이 족의 VEGF 리간드의 고 친화성 형태에 있어서 중요할 수 있다는 것을 암시한다. 제 1족 서열중에서는 유사한 보존 염기쌍 상호작용이 검출되지 않았다. 제 3족 리간드는 TBSCM에서 수행된 선별군에서만 발생하였다(제 3족, 표 2). 고도로 보존된 1차 구조 모티프외에, 이 족의 모든 멤버에 있어서, 보존 영역의 서열 3'는 5' 고정 영역의 뉴클레오타이드에 대하여 염기쌍 상보성을 공유하다(표 2에서 밑줄 친 부분). 대부분의 리간드에 있어서, 추정 스템의 5'측의 염기는 그들 염기쌍 파트너와 함께 공동으로 변동한다고 말할 수는 없기 때문에, 이와 같은 관측은 통상의 2차 구조의 전조는 거의 되지 않으나, 이 족으로부터 유도된 최소 고친화력 서열에 대한 본 발명자들의 최초 추측(아래에 기재)은, 이 모티프의 강력한 보존에 의하여 인도되었다. VEGF에 대한 개별 RNA의 친화력은, 그들 상호작용에 대한 K_D 의 단일 측정을 기준으로 계산되었다. 몇 개의 예외를 제외하고, 리간드는 성장인자에 대하여 매우 높은 친화력을 나타냈는데, K_D 가 5~50pM 이었다.

최소 리간드

각 서열족을 규정하는, 공유된 1차 및 2차 구조 모티프는 VEGF에 대한 고 친화력 결합에 필요한 최소 서열 구성성분을 암시한다. 각 족으로부터의 대표 리간드의 내포된 절단체(표 2에서 회색 박스로 표시)가 화학적 합성법에 의하여 제조되어, VEGF에 대한 이들의 상대적 친화력이 측정되었다(표 3). 리간드 VP30.22, VP30.2 및 VT30.44의 절단부가 화학적 합성법에 의하여 제조되어, 실시예 3에 기재된 바와 같이 VEGF에 대한 그들의 친화력이 측정되었다. 초기 절단체(t22, t2, t44)는, 5' 및/또는 3' 단부로부터 떨어져 있는 추가의 염기로 올리고뉴클레오타이드를 합성함으로써 더욱 정제되었다. 화학적 합성을 개시하기 위하여, 2'-F-사이티딘을 2'-OH-사이티딘으로 치환(밑줄 친)하거나, 또는 3'-3'-연결 디옥시티미딘 '캡'을 첨가(별표)함으로써 몇개의 리간드의 3'-대부분 뉴클레오타이드가 변형되었다. 각 올리고뉴클레오타이드의

길이(캡을 뺀) 및 VEGF와의 결합을 위한 그 고 친화력 K_D 가 제시된다.

클론 VP30.22(제 1족)로부터의 최소 서열에 대한 초기 예측은, 전장 리간드의 정제된, 친화력-선별 단편의 단부를 지도화함으로써 이루어졌다(실시예 3 참조). 이 29 뉴클레오타이드 분자('t22')는 전장의 리간드에 비하여 VEGF에 대한 친화력에 있어서 약 3배의 손실을 보였다. 이 분자의 3' 단부에서 다시 절단한 결과, 친화력에 있어서 급격한 손실을 일으켰으나, 6개 까지의 추가의 뉴클레오타이드가 별 문제 없이 5' 단부로부터 제거될 수 있다(표 3). 제 2족으로부터의 클론 VP30.2 및 제3족으로부터의 클론 VT30.44에 있어서, 추정 5 염기쌍 스템 및 보존 서열 모티프를 내포하는 절단 리간드 't2' 및 't44'가 합성되었다. 양 절단 리간드는 모두 거의 전장 분자의 결합 활성 전부를 유지하였다. 동시에 하나의 추정 염기쌍을 제거함으로써 다시 절단(리간드의 각 단부로부터 하나의 뉴클레오타이드)한 결과, 친화력에 있어서 점진적인 손실을 일으켰다. 따라서, 이들 서열에 있어서, 가능한 2차 구조를 기준으로 한 절단은 최소 고친화력 리간드를 매우 잘 예측하였으며, 또한 추정 스템이 이들 리간드의 고친화성 형태에 기여한다는 가설을 지지한다.

2'-OMe 변형

2'-OMe에 의한 RNA 올리고뉴클레오타이드의 2'-OH 위치에서의 치환은, 쥐 오줌 및 기타 생물체 유액에 존재하는 뉴클리아제에 대하여 그들 안정성을 개선시키는 것으로 관측되었다. 뉴클리아제에 대한 올리고뉴클레오타이드의 안정화는 그들의 치료제 또는 진단제로서의 성공에 절대적인 것으로 보인다. 유감스럽게도, 2'-OMe-변형 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 표준 반응 조건하에서 RNA 폴리머라제에 의한 기재로서는 일반적으로 수용되지 않는다. 그러나, 2'-OMe 퓨린은 화학적 합성에 의하여 특정 올리고뉴클레오타이드에 도입될 수 있다. 일부 고친화력 2'-OH 퓨린 RNA 리간드가, 표적 단백질에 대한 친화력을 거의 상실하지 않고, 놀랍게도 높은 백분율의 2'-OMe 퓨린 치환을 수용하는 것이 관측되었다. 2'-OMe 치환이 VEGF에 대한 고친화성 결합과 양립하게 되는 퓨린 위치를 확인하기 위하여, 리간드 t2, t22 및 t44의 몇개의 합성물이 제조되었는데, 여기서 동시에 5 또는 6개의 퓨린이 변형 뉴클레오타이드로 부분적으로 치환되었다(실시예 3에 기재). 부분적 치환된 각 라이브러리의 친화력 선별은, VEGF에 대하여 실질적인 친화력을 유지하는 분자들을 유리하는데 이용되었다. 이와같은 친화력 선별 풀에서, 치환을 허용하지 않는 위치는 2'-OH에 대하여 편향되었으며, 미선별 라이브러리의 동일 위치에 비하여 알카리에 의한 가수분해에 대하여 보다 높은 민감성을 나타내었다. 5'-방사능 표지 미선별 및 친화력 선별 풀은 알카리에 의하여 부분적으로 가수분해되었으며, 생성물은 고분해성 폴리아크릴아미드 겔상에 전시되었다. A6 및 G21 리간드 t2에서, 및 A5 및 A6가 리간드 t44에서 나타낸 것과 같이, 리간드 t22에서, G10 및 A12는 친화력 선별 풀들의 2'-OH에 대하여 실질적인 편향성을 나타내었다. 상기 분석 결과가, 2'-OMe 뉴클레오타이드로의 치환을 허용하지 않는 것으로 보이는 위치들을 확인하는 반면에, 동시에 일어나는 모든 기타 퓨린의 변형이 어떻게 결합 친화성에 영향을 미치는지를 예측할 수는 없다. 사실, G10, A12 및 G12(2'-OH에 대하여 한계 선호도를 나타냄)를 제외한 모든 2'-OMe-퓨린으로 합성된 리간드 t22는 적어도 모든 2'-OH-퓨린 서열과 동일한 친화력으로 VEGF와 결합하였다(표 4).

절단된 올리고뉴클레오타이드(t22, t2 및 t44)는, 2'-OMe-퓨린으로 치환된 1, 2 또는 3개의 퓨린 위치 이외의 모든 위치와 화학적으로 합성되었다. 잔류 2'-OH-퓨린은 각 리간드 이름에서 표시되며, 리간드 서열에서 굵게 표시된다. VEGF에 대한 각 치환 리간드의 결합을 위한 K_D 값이 표시된다. G22에 대한 추가의 치환은, VEGF에 대한 결합에 거의 영향이 없으나, G10 또는 A12에의 2'-OMe의 첨가는, 예상된 바와 같이, 결합 친화력에 불리하였다. 마찬가지로, 리간드 t2 및 t44는 2개의 퓨린을 제외한 모든 퓨린에서, VEGF에 대한 핵산 리간드의 친화력에 3~4배의 영향으로, 2'-OMe-치환을 허용하였다(표 4).

치환된 절단체에 대한 결합 친화력 및 속도 상수.

최소 길이의, 고도로 2'-치환된 VEGF 핵산 리간드를 식별하기 위한 목적으로, 결합력을 극적으로 저하시키지 않는 모든 2'-OMe 치환체가, 절단된 리간드 t22c, t2a 및 t44a로 첨가되었다(표 3 참조). 2'-OH 뉴클레오타이드는 굵은 글씨로 표시되며, 2'-OMe 뉴클레오타이드는 평범한 문자로 표시된다. 얻어진 핵산 리간드, t22-OMe 및 t44-OMe는 각각 67pM 및 49pM의 K_D 로 VEGF에 결합된 반면에, 리간드 t20Me는 약 140pM의 K_D 로 결합되었다(표 5). 이들 K_D 값은, 앞서 기재한 VEGF의 2'-NH₂-피리미딘-, 2'-OMe-퓨린-치환 올리고뉴클레오타이드 억제제, NX-213($K_D=140pM$)와 비견되었다(미국특허출원 제08/447,169호를 참조, 여기서 이를 참고로 인용한다). 각각의 절단된 2'-OMe-치환 올리고뉴클레오타이드는 VEGF와의 결합에 있어서 NX-213 및 다른 하나와 결합하는 것으로 판명되었다.

과잉의 미표지 리간드를 첨가시에, 방사능 표지 리간드 및 VEGF간의 예비성형 복합체의 손실을 따라 해리 속도 상수(k_d)가 3개의 각 2'-OMe-치환 리간드에 대하여 측정되었다. 리간드 t22-OMe는 가장 빠른 해리 속도를 나타냈는데, 반감기가 약 60초 였다. 리간드 t2-OMe 및 t44-OMe는 반감기가 각각 170초 및 90초로서 약간 늦은 해리 속도를 나타냈다. 평형 해리 상수 및 해리 상수로부터 계산($K_D=k_d/k_a$)된, 회합속도상수(k_a)

의 범위는 $3 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8 M^{-1} sec^{-1}$ 이었다(표 5). 이와같이 신속한 회합 속도는 이들 리간드 및 VEGF 사이의 근거리 확산 제한 결합 상호작용을 암시하며, 기타 표적을 향한 SELEX-유도 핵산 리간드에 대하여 관측된 회합속도 상수와 일치한다.

2가 양이온 의존성

제1족 및 2족내의 리간드가 마그네슘 양이온 존재하에 선별된 반면에 제3족 리간드는 마그네슘 및 칼슘 모두를 함유하는 완충액중에서 선별되었다. 2가 양이온은, 고 친화성 RNA 구조의 비특이적 또는 특이적 안정화를 통하여 RNA/단백질의 상호작용에 기여할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 마그네슘 및/또는 칼슘

이 VEGF에 대한 전형적인 리간드의 고친화성 결합에 요구되는지의 여부가 의문이었다. 핵산 리간드 t22-OMe 및 t2-OMe(각각 제 1족 및 2족으로부터)의 친화력은, 보조 2가 양이온 또는 킬레이트제 EDTA의 존재 여부에 관계없이 불변이었다(데이터는 기재되지 않음). 그러나, 리간드 t44-OMe로 표시되는 제 3족 리간드는 VEGF에 대한 고 친화성 결합에 있어서 칼슘의 존재에 절대적으로 의존함을 보였다. 결합 완충액중의 2가 양이온이 EGTA로 대체될 경우, 결합은 극적으로 저하되었다($K_D > 10^{-7}$). 과잉 $MgCl_2$ 를 2가-양이온-고갈 결합 완충액에 첨가하면 결합 친화력을 개선하지 못하나, $CaCl_2$ 를 EDTA보다 몰수를 2배로 하면 결합 친화력을 완전히 복구시킨다. 미변형 리간드 T44에 있어서도 동일한 결합 현상이 관측되었다(데이터는 기재되지 않음).

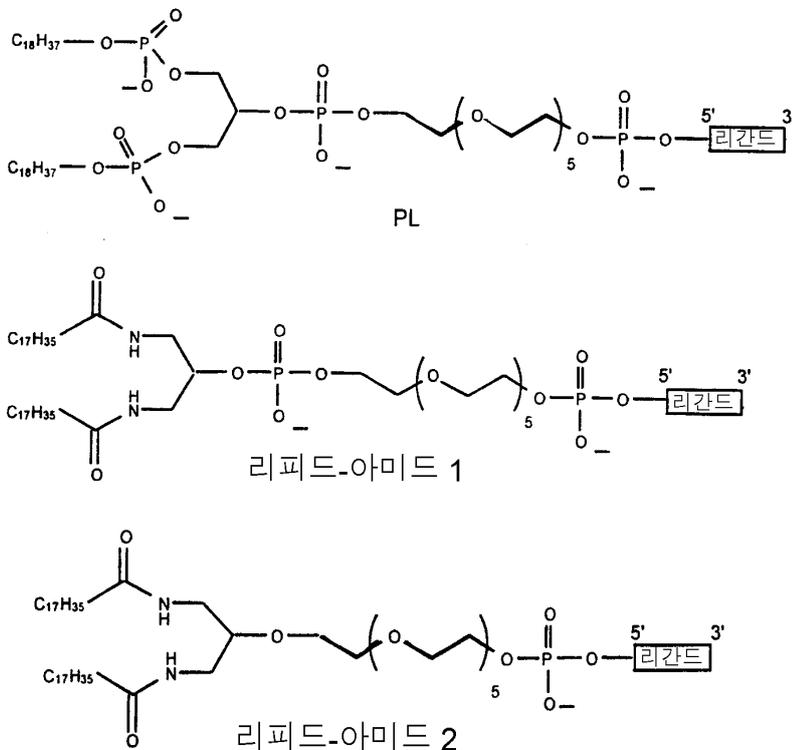
단백질 특이성

여기에 기재된 올리고뉴클레오티드는, 성장인자의 2개의 핵산성 이성체중 큰 쪽인, VEGF₁₆₅에 대한 그들의 친화력을 기준으로 선별되었다. 작은쪽 이성체인 VEGF₁₂₁은 VEGF₁₆₅에 있는 엑손중의 하나를 결여하고 있으며 후자와는 달리, 헤파린과 결합하지 않는다. 3개의 절단체중에는 포함되는 것이 아닌, 2'-OMe-치환 올리고뉴클레오티드는 임의의 측정 가능한 친화력으로 VEGF₁₂₁과 결합하였다. 또한, VEGF₁₆₅ 본래의 구조는, 올리고뉴클레오티드와 함께 배양하기 전에 단백질이 DTT로 환원될 때 결합이 관측되지 않았기 때문에, 3개의 모든 핵산 리간드의 결합에 필수적이다.

VEGF는, 인체 VEGF₁₆₅ 및 마우스 VEGF₁₆₄에 걸쳐 고도로 보존된 단백질인데, 88% 서열 동일성을 나타낸다. 절단된 2'-OMe-치환 리간드는 인체 및 쥐과의 VEGF에 동일하게 잘 결합한다. 그러나, 보존된 혈소판 유도 성장인자형 영역을 횡단하여, VEGF와 53% 서열 동일성을 공유하는 태반-유도 단백질인 PlGF의 호모다이머에 대한 어떤 리간드의 결합도 관측되지 않았다. VEGF 및 PlGF간의 헤테로다이머는, 정상 및 종양 세포주 모두의 상청액으로부터 최근 유리되었으며, 이와같은 헤테로다이머는, 2개의 고친화성 VEGF 수용체중 하나와의 결합 및 배양된 내피세포에서 반응을 유도하는데 있어서 활성을 나타내었다. VEGF/PlGF 헤테로 다이머의 생물학적 관련성은 알지 못한다. 친화력이 크게 저하하긴 하였으나 VEGF/PlGF 헤테로다이머와의 실질적인 결합이 관측되었다. 이들 데이터는 핵산 리간드가 다이머의 두 소단위 사이의 경계면에 또는 가까이 결합하며, PlGF가 고친화력 결합에 필요한 모든 접촉부위를 제공하지 않는다는 것을 나타낸다. 대체 방법으로, VEGF 소단위의 구조는, 헤테로다이머에 핵산 리간드 결합 표면이 비틀려 있는 PlGF와 함께 관여함으로써 변경될 수 있다.

실시에 5. 포스포리피드, 글리세롤 아마이드 리피드, 및 PEG-변형 VEGF 핵산 리간드의 합성

다음과 같이, 다양한 친유성 화합물/핵산 리간드 복합체의 합성을 위하여 3개의 다른 배합이 사용되었다:

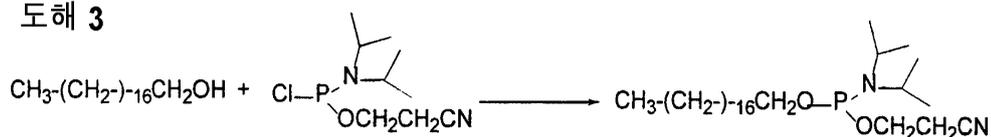


PL 배합물의 합성을 위한 C-18 포스포아미디트

C-18 포스포아미디트의 제조방법에 관한 윤곽이 도해 3에 도시된다. 표준 조건하에서, 1-옥타데칸올이 산화되었다. 반응 혼합물을 완성시킨 후, 잔류물이 핵산: 아세트산 에틸: 트리에틸아민 (90: 10: 5)인 실

리카 겔 칼럼상에서 정제되어 21.5g의 순수 생성물을 제공하였다(57% 수율).

도해 3

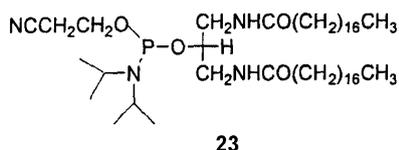


리피드 아마이드[1]의 합성

상기 PL과는 달리, 이 포스포아미디트는 아마이드 연결을 갖는다. 이 리피드의 콘주게이션으로부터 나온 올리고의 구조가 아래에 도시된다.

몇 개의 실험결과, 유기 용매내의 화합물 [22]의 고도의 불용성이 NMR 및 MS 특성화 및 DAG 아마이드트[23]에 대한 화합물[22]의 더 이상의 포스포아미디화를 불가능하게 만든다는 것을 나타내고 있으나, 리피드-스페이스 아마이드트(도해 1)의 제조에 관한 결과로부터, 본 발명자들은, 혼합물이 환류된다면, 화합물[22]은 클로로-(2-시아노에톡시)-N,N-디이소프로필아미노-포스핀으로 인산화될 수 있다고 예상하였다. DAG 아마이드트를 제조하기 위한 시도 방안이 도해 4에 도시되었다.

도해 4



N,N'-비스(스테아로일)-1,3-디아미노-2-프로판올 [22]. $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ (50ml) 중의 염화스테아로일 (6.789g, 22.41mmol)을, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ (100.0 ml) 중의 1,3-디아미노-2-히드록시프로판 (1.0g, 11.10mmol) 및 TEA (2.896g, 22.41mmol)의 용액에, 실온에서 저으면서 적하하여 첨가하였다. 첨가를 끝낸 후, 혼합물을 철야로 70°C로 가열하여, 투명한 용액이 형성되었으며, 용액은 실온으로 냉각되고, 여과되어, 고형분은 CH_2Cl_2 , CH_3OH , 5% NaHCO_3 및 에틸에테르로 세척되고, 진공중 건조되어, 백색 고체인 화합물 [22] (6.40g, 93% 수율)을 얻었다. ^1H NMR (피리딘- d_5 ; 60°C, δ , ppm): 3.82-3.78 (m, 1H), 2.37 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 4H), 1.81-1.76 (m, 4H), 1.30-1.27 (m, 60H), 0.87 (t, $J=5.7\text{ Hz}$, 6H).

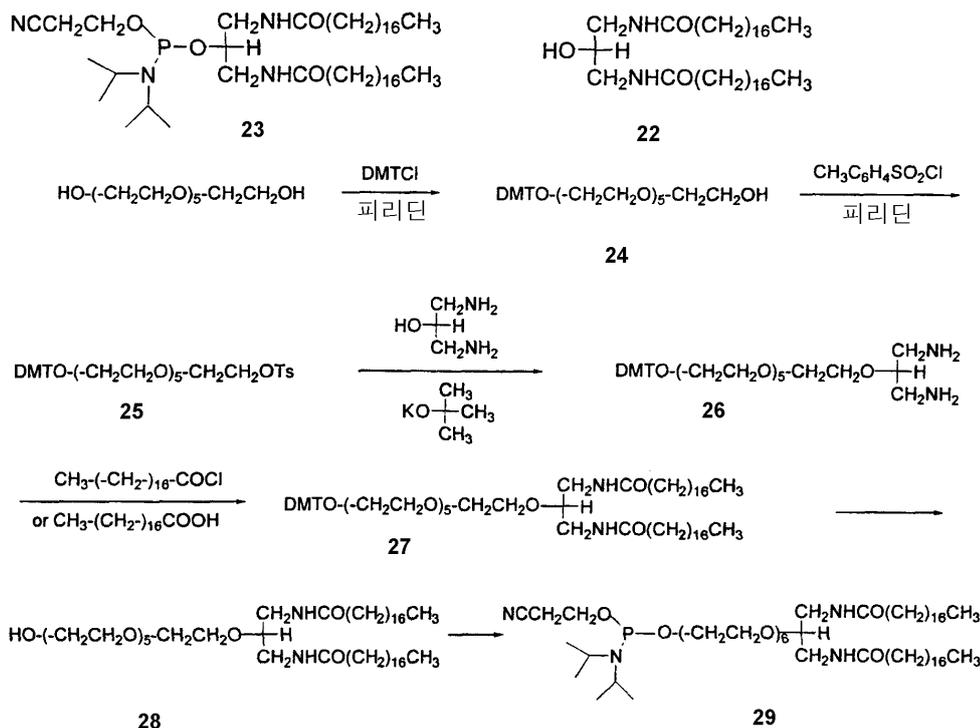
N,N'-비스(스테아로일)-O-(디이소프로필아미노-2-시아노에톡시포스피닐)-1,3-디아미노-2-프로판올 [23]. 진공중 철야로 건조된 화합물 [22] (5.80g, 9.31mmol)에 무수 CH_2Cl_2 (150.0ml)가 첨가되고, N,N-디이소프로필에틸아민 (4.2ml, 18.62mmol)이 주입되었다. 혼합물이 얼음-수조에서 냉각되고,

클로로-(2-시아노에톡시)-N,N-디이소프로필아미노-포스핀 (8.6ml, 0.47mmol)이 주입되었다. 30분간 교반 후, 혼합물은 90분간 60°C에서 가열되었다. 실온으로 냉각 후, 불용성 물질은 여과되고, 용액은 5% NaHCO_3 및 염수로 세척, Na_2SO_4 상에서 건조, 및 진공중 농축되었다. 조 생성물은 CH_3CN 으로부터의 침전에 의하여 정제되어 백색 고체인 순수한 생성물 (4.56g, 61% 수율)을 제공하였다. ^{31}P NMR (CDCl_3 , ppm): 154.04.

DAG-스페이스 아마이드트, 리피드 아마이드 [2]의 합성

리피드 아마이드트 [23]에 대한 중간체인, 디아미드 화합물 [22]의 불용성을 완화하기 위하여, 헥사(에틸렌 글리콜)이 리피드 아마이드트에 첨가되었다. 리피드-스페이스-아마이드트 [29]의 제조방법의 개략이 도해 5에 도시된다. 화합물 [25]와 1,3-디아미노-2-히드록시프로판 및 THF 중의 포타슘 t-부톡시드의 카플링 단계는 잘 진행되지 않았으며, 수율은 단지 약 20% 였다. 수율을 개선하기 위하여 화합물 [25]와 다이머드 [22]를 반응시키는 시도가 이루어졌으나, 요망하는 생성물은 검출되지 않았다.

도해 5



리피드 아미드 2

(4,4'-디메톡시트리틸옥시)-헥사에틸렌 글리콜 [24]. 헥사(에틸렌 글리콜 (18.93g, 67.05mmol)이 무수 피리딘(3×50ml)과 공증발되어, 무수 피리딘(400ml)에 용해되고, 0°C로 냉각된 후, 피리딘(50ml)중의 DMTrCl(23.85g, 70.40mmol)이, Ar 하에서 저으면서 30분간 적하하여 첨가되었다. 반응혼합물은 철야로 실온에서 유지되었다. 피리딘은 고 진공하에서 제거되고, 잔류물은 CH_2Cl_2 에 용해되어, 5% NaHCO_3 및 염수로 세척, Na_2SO_4 상에서 건조, 및 진공중 농축되었다. 조 생성물은 아세트산 에틸, 다음에는 CH_2Cl_2 및 0.5% TEA를 함유하는 메탄올(95/5) 구배의 실리카 겔 칼럼에 의하여 정제되었다. 적절한 분획이 결합, 증발, 및 진공 중 건조되어 연황색 오일인 화합물[24] (26.1g, 66.6% 수율)을 제공하였다. ^1H NMR (DMSO- d_6 ; δ , ppm): 7.40 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 7.33-7.24 (m, 7H), 6.89 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 4H), 4.61 (t, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.05 (m, 24H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 ; δ , ppm): 158.02, 145.02, 135.78, 129.67, 128.13, 127.71, 126.61, 113.14, 85.29, 72.33, 72.27, 70.06, 69.87, 69.80, 69.75, 69.70, 62.84, 60.25, 60.19, 55.01.

(4,4'-디메톡시트리틸옥시)-헥사에틸렌 글리콜 토실레이트 [25]. 무수 피리딘(50ml) 중 화합물[24]의 얼음 냉각 용액(0°C)에, 피리딘(30ml) 중의 염화 톨루엔 술포닐 용액이 첨가되었다. 실온에서의 2시간 후, 용액은 옅은 황색 오일로 증발되었다. 잔류물은 CH_2Cl_2 중에 취하여, 5% NaHCO_3 및 염수로 세척, Na_2SO_4 상에서 건조, 여과 및 진공중 증발시켰다. 생성물은 아세트산 에틸로 용출하는 실리카 겔 크로마토그라피에 의하여 정제되어 옅은 황색 오일은 생성물(4.08g, 93% 수율)을 제공하였다. ^1H NMR (DMSO- d_6 ; δ , ppm): 7.78 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 7.46 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 7.40 (d, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 7.32-7.23 (m, 7H), 6.88 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 4.09 (t, $J=4.3\text{Hz}$, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.06 (m, 22H), 2.40 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 ; δ , ppm): 158.01, 145.01, 135.78, 132.38, 130.12, 129.67, 128.12, 128.02, 127.80, 127.70, 127.62, 113.13.

2-(4,4'-디메톡시트리틸옥시)-헥사 에틸렌 글리콜-1,3-디아미노프로판 [26]. 무수 THF 중의 1,3-디아미노-2-히드록시프로판(747mg, 8.28mmol) 및 포타슘 t-부톡시(2.78g, 24.84mmol)의 혼합물이 70°C로 2시간 가열된 후, 실온으로 냉각되었다. THF중의 화합물[25](4.08g, 5.25mmol)이 주입되고, TLC가 더 이상의 화합물[25]을 보이지 않을 때까지, 혼합물은 70°C에서 철야로 교반되었다. 용액이 실온으로 냉각된 후, THF는 진공중에서 제거되고, 25ml의 CH_2Cl_2 및 25ml의 물이 첨가되었다. CH_2Cl_2 용액은 결합되고, Na_2SO_4 상에서 건조 및 감압하에서 증발되었다. 조 생성물은 더이상 정제하지 않고 직접 반응에 사용되었다. ^1H NMR (DMSO- d_6 ; δ , ppm): 7.41 (d, $J=7.7\text{Hz}$, 2H), 7.32-7.21 (m, 7H), 6.87 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 3.73 (s, 6H), 3.52-3.40 (m, 24H), 3.17 (s, 1H), 3.07-3.02 (m, 4H),

N,N'-비스(스테아로일)-2-(4,4'-디메톡시트리틸옥시)-헥사에틸렌 글리콜-1,3-디아미노프로판[27]. $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 중의 염화 스테아릴(3.363g, 11.1mmol) 용액이, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 중의 화합물[26] 및 TEA(1.9ml, 11.1mmol)의 용액에, 실온에서 저으면서 주입되었다. 혼합물이 실온에서 2시간 유지된 후, 70°C로 철야로 가열되었다. 용액이 실온으로 냉각된 후, 용액은 5% NaHCO_3 및 염수로 세척, Na_2SO_4 상에서 건조, 및 진공 농축되었다. 조 생성물은 아세트산 에틸 및 CH_2Cl_2 (50/50) 및 다음에는 아세트산 에틸 및 메탄올 (50/50)의 구배로, 실리카 겔 크로마토그래피에 의하여 정제되었다. 제2분획이 수집되어, 증발되고, 진공 건조되어 옅은 황색 고체인 화합물[27](640mg)을 제공하였다. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$; δ , ppm): 7.40 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 7.37-7.20 (m, 7H), 6.74 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 4H), 3.71 (s, 6H), 3.63-3.51 (m, 24H), 3.17 (s, 1H), 3.16-3.13 (m, 4H), 2.12 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 4H), 1.18(m, 60H), 0.08 (t, $J=6.2\text{Hz}$, 6H).

N,N'-비스(스테아로일)-2-헥사에틸렌 글리콜-1,3-디아미노프로판[28].

화합물[27] (640mg), CH_2Cl_2 (5ml)중의 2.5% DCA 용액 및 트리헥실실란(2ml)의 혼합물이, 오렌지색이 희미한 색으로 변할 때까지, 실온에서 교반되었다. CH_2Cl_2 를 제거한 후, 잔류물이 핵산으로부터 반복적으로 침전되어 옅은 황색 고체(210mg, 63% 수율)를 제공하였다. ^1H NMR (CDCl_3 ; δ , ppm): 3.3.69-3.59 (m, 24H), 3.17(s, 1H), 3.06-3.01 (m, 4H), 2.21 (t, $J=7.9\text{Hz}$, 4H), 1.18 (m, 60H), 0.81 (t, $J=6.3\text{Hz}$, 6H).

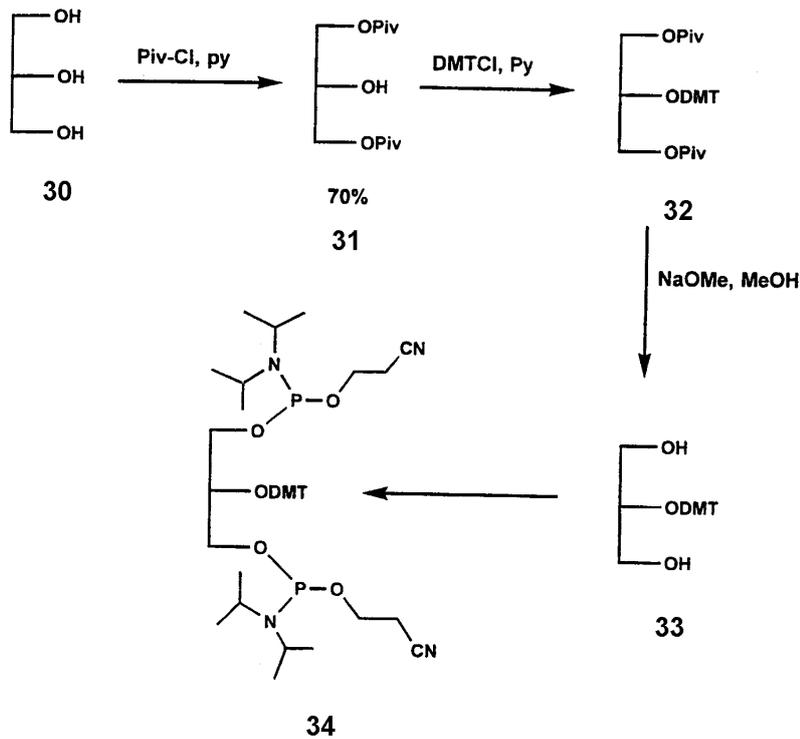
N,N'-비스(스테아로일)-2-(디이소프로필아미노-2-시아노에톡시포스포닐)-헥사에틸렌 글리콜)-1,3-디아미노프로판[29]. 진공중 철야로 건조된 화합물[28] (210mg, 0.237mmol)이 무수 CH_2Cl_2 (5.0ml) 중에 용해되고, N,N-디이소프로필에틸아민 (218 μL , 1.25mmol)이 첨가되었다. 용액은 빙수조에서 냉각되고 클로로-(2-시아노에톡시)-N,N-디이소프로필아미노-포스핀(106 μL , 0.47mmol)이 주입되었다. 30분간 교반 후, 혼합물은 CH_2Cl_2 로 희석되고, 5% NaHCO_3 및 염수로 세척, Na_2SO_4 상에서 건조, 및 진공 농축되어 화합물[29]를 제공하였다. ^{31}P NMR (CDCl_3 , ppm): 154.04.

VEGF 핵산 리간드에 대한 20K 또는 40K PEG NHS 에스테르의 접합.

일반적인 공정: VEGF 올리고뉴클레오티드가 트리에틸암모늄 염으로 교환되어 동결건조되었다. 조 올리고뉴클레오티드가 60mg/ml의 농도로 붕산나트륨 완충액 (pH9)에 용해되었다. 2당량의 PEG NHS(Shearwater Polymers, Inc)가 건조 DMF에 용해되고(붕산염: DMF의 비 1: 1), 혼합물은 PEG NHS 에스테르를 용해하기 위하여 가온되었다. 올리고뉴클레오티드 용액은 신속히 PEG 용액에 첨가되고, 혼합물은 실온에서 10분간 격렬히 교반되었다. 약 90%의 올리고뉴클레오티드가 PEG NHS 에스테르에 접합되었다. 제1도 및 11도 참조.

2량체 VEGF 핵산 리간드의 합성.

제 1J, K 및 L도에 도시된 2량체 VEGF 핵산 리간드가 다음과 같이 제조되었다:



1,3-디피발롤일-2-O-디메톡시 트리틸글리세롤[32]의 합성

맥기(McGee) 등 (1988, Synthetic Communication, 1651)에 의하여 제조된, 화합물[31]의 교반된 피리딘 용액(200ml)의 피리딘 중, 62g의 70% 순수 생성물, 200mmol)에, 염화 디메톡시 트리틸(84g, 240mmol, 1.2배 과잉)이 첨가되고, 반응물은 실온에서 16시간 교반되도록 하였다. 반응혼합물은 감압하에서 농축되고, 잔류물은 CH_2Cl_2 (11)에 취해져서 물로 세척, 건조(MgSO_4) 및 농축되었다. 조 혼합물(130g)은 다음 반응에서와 같이 사용되었다.

2-O-디메톡시 트리틸 글리세롤[33]의 합성

조 화합물[32] (130g), NaOMe (28g) 및 메탄올(900ml)의 혼합물이 50°C 에서 16시간 가열되었다. 반응이 완결된 후 (TLC), 혼합물은 농축되어 건조되고, 잔류물은 물 및 CH_2Cl_2 (1: 1)에 용해되었다. 유기층은 분리되고, 수성층은 포화 NH_4Cl , 물 및 염수로 세척 및 건조(MgSO_4) 되었다. 용매를 증발시킨 결과 점착성 화합물이 얻어졌는데, 이것은 2% TEA를 함유하는 1:1 핵산/아세트산 에틸올이 이용하는 실리카 겔 칼럼에 의하여 정제되어, 75% 유리된 수율로 화합물[33]이 제공되었다. ^1H NMR (DMSO-d_6), 3.02-3.07 (m, 2H), 3.17-3.23 (m, 2H), 3.3-3.35 (m, 1H), 3.7(s, 6H), 4.26 (t, $J=4.1\text{Hz}$, 2H, 교환할 수 있는 D2O), 6.59-6.86 (m, 4H), 7.17-7.68 (m, 9H).

비스아미디트[34]의 합성

CH_2Cl_2 (125ml)중의 알코올[33] (16.2g, 41.1868mmol) 및 디이소프로필에틸아민(58ml, 320mmol)에, 포피틸 화제(20.5ml, 90.62mmol)이 첨가되어, 용액은 서서히 실온으로 가온되고, 동일 온도에서 2시간 교반되었다. 반응혼합물을 분쇄된 얼음에 서서히 부어서, CH_2Cl_2 로 추출, 5% NaHCO_3 , 물 및 염수로 세척 및 건조되었다. 용매 증발후에 얻어진 잔류물은, 1: 1 핵산/2% TEA 함유 아세트산 에틸올을 이용하는 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의하여 정제되어 70% 수율로 화합물[34]이 제공되었다. ^1H NMR (DMSO-d_6), 1.03-1.12 (2d, 24H), 2.69-2.75 (2t, 4H), 3.1-3.33 (m, 4H), 3.33-3.55(m, 5H), 3.66-3.7 (m, 4H), 3.72 (s, 6H), 6.83-6.89 (m, 4H), 7.19-7.48 (m, 9H). 외부 표준으로서의 ^{31}P D_3PO_4 153.64 및 153.39(2S).

VEGF 2량체의 제조

8800 자동화 DNA/RNA 합성 장치상에서, VEGF 2량체의 합성이 수행되었다. NX318380이 제조되었는데, rA는 아데노신, mG 및 mA는 각각 2'-O-메틸구아노신 및 아데노신을, fC 및 fU는 각각 2'-데옥시-2'-플루오로사이티딘 및 2'-플루오로우리딘 및 [3'-3']는 3'-3'-뉴클레오타이드간 연결을 나타낸다. 합성은 5'-DMT-2'-O-메틸-N⁶-tert-부틸페녹시아세틸-아데노신, 5'-DMT-2'-O-TBDMS-N²-tert-부틸-페녹시아세틸-구아노신 및

5'-DMT-2'-0-TBDMs-N⁶-tert-부틸-페녹시아세틸-아데노신 3'-N,N-디이소프로필-(2-시아노에틸)포스포아미디트 및 2'-디옥시-2'-플루오로-5'-DMT-N⁴-아세틸사이티딘 및 2'-디옥시-2'-플루오로-5'-DMT-유리딘 3'-N,N-디이소프로필-(2-시아노에틸)-포스포아미디트를 사용하여, 밀리포어 8800 자동화 합성장치상에서 1mmol 스케일로 수행되었다. 합성 과정은 다음과 같다. 활성제는 표 12에 기재된다. 합성은, 600 Å 기공 크기, 80~120 메쉬, 및 5'-숙시닐티미딘으로 적재된 60~70 μmol/g의 CPG 지원을 이용하여 수행되었다. 카플링 사이클이 표 12에 표시된다.

실시에 6. 포스포리피드(PL) 및 PEG 변형 VEGF 핵산 리간드의 약물 속도론적 특성

표 2에 기재된 서열 중, 검토 대상으로 VT30.44가 선택되어, NX31838로 재명명되었다. 20 및 40K PEG에 접합된 VEGF 핵산 리간드 NX31838의 약물 속도론적 특성이 스프라구 다우리 쥐(Sprague Dawley rat)에서 측정되었다(분자 설명에 대한 제 1도 참조)(SEQ ID NOS:). 리포좀 배합물로서 및 자유 약물로서 PL 지질에 접합된 NX31838에 대하여 유사한 검토가 수행되었다(분자 설명에 대한 제 1도 참조)(SEQ ID NOS:). 각 검토에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 260nm에서의 UV 흡광을 기준으로 용액 농도 1.0mg/ml 및 0.37 μg 올리고/ml로 PBS에 희석되었다. 모든 검토에서, 9마리 쥐는, 대량 꼬리정맥주사에 의하여, 1.0mg 올리고뉴클레오티드/kg 동물 체중을 받았고, 2분으로부터 24시간까지 다양한 시점에서 플라즈마 샘플이 취해졌다. 하이브리드 형성 검정법을 사용하여 플라즈마 샘플 및 품질관리 샘플이 분석되었다. 하이브리드 형성 검정은, 산화철(FeO) 비드(FeO-스페이서-3'-d(GCC TTA GTC ACT T-5') (SEQ ID NO:)(여기서 스페이서=(dT)₈) 및 5'-단부에 2개의 바이오틴 분자를 함유하는 검출 올리고뉴클레오티드(바이오틴-바이오틴-5'-d(스페이서-CGG ATG TAT AAG CA-3')(여기서 스페이서=(dT)₈)(SEQ ID NO:))에 접합된 VEGF 핵산 리간드의 5'-단부에 대한 상보 서열을 함유하는 포획 올리고뉴클레오티드를 이용하였다. 포획 및 검출 프로브를, VEGF NX31838을 함유하는 플라즈마 샘플로 배양한 후, 비드로 잡종 형성된 바이오틴 올리고뉴클레오티드의 양이 발광 기체로서 CSPD-사파이어 (Sapphire)를 사용하여, 스트렙타비딘-연결 알카린 포스파타제와 함께 정량되었다.

대량주사에 따른 시간의 함수로서, 자유, PEG 20K 및 PEG 40K VEGF (NX31838) (SEQ ID NO:)의 플라즈마 농도에 대한 데이터가 제 6도에 요약되어 있다. 40K PEG 콘주게이트가 단일지수 t_{1/2}이 360분으로 제거된 반면에, 20K PEG 콘주게이트는, 95%의 핵산리간드가 알파 t_{1/2}이 49분으로, 5%가 베타 t_{1/2}이 192분으로 훨씬 신속히 제거되었는데, 이것은 제거에 있어서 크기의 명백한 중요성을 나타내는 것이다. PEG-접합 핵산 리간드에 비하여, 자유(미접합) NX31838은 t_{1/2}이 수분으로, 플라즈마로부터 매우 신속히 제거되었다. 시간의 함수로서 올리고뉴클레오티드의 플라즈마 농도는, 올리고뉴클레오티드에 적절한 기능 그룹을 도입함으로써 현저히 증가시킬 수 있다.

대량 주사에 따른 시간의 함수로서, 리포좀과 함께 및 리포좀 없이 배합된 PL 리피드 접합 VEGF 핵산 리간드(SEQ ID NO:)의 플라즈마 농도에 대한 데이터가 제7도에 요약되어 있다. 리포좀은, 핵산 리간드의 존재하에 음파처리에 의하여 실시예 7A에 기재된 바와 같이 제조되어, 내면 및 외연상에 올리고뉴클레오티드를 함유한다. 리포좀 배합물은, 각각 베타 t_{1/2}이 1161분 및 131분으로, 자유 약물보다 훨씬 서서히 제거되었다. 시간의 함수로서의 올리고뉴클레오티드의 플라즈마 농도는 리포좀 배합물에 의하여 현저히 증가될 수 있다.

실시에 7. NX31838 PL-리포좀 복합체의 제조

A. 필름화에 의한 리포좀 제조.

지질이 2몰의 DSPC대 1몰의 콜레스테롤의 비율로 결합되었다. 수종의 NX31838 PL이 1: 50(w/w)의 비율로 지질에 첨가된다. 물질은, 클로로포름: 메탄올: 물(1: 3: 1)의 용액과 함께 용매화 함으로써 결합된다. 용매는 회전 증발에 제거되어 지질과 공혼합된 NX31838 PL의 불균질 필름을 만든다. 필름은 pH7.4에서 25mM 인산 나트륨으로 완충작용하는, 9% 슈크로스 용액에서, 지질 기준으로 50mg/ml로 재수화된다. 용액은 격렬히 혼합되고, 65°C로 가열되고, 얻어진 백색 밀크형 용액은, 75ml의 일정부분에서 음파처리되어 지질을 단층상 리포좀으로 조립한다. 육안으로 용액이 밀크색이 될 때까지, 리포좀 배합이 계속된 후, 입자 분석기(Leeds & Northrup Model Microtrack UPA 150, 호르삼 펜실바니아)를 이용하는 동적인 빛 산란을 통하여 입자 크기가 측정된다.

B. 수동적 앵커링에 의한 리포좀의 제조

scNX-278 (분자 설명은 제10도 참조)이 예비성형('비어있는') 리포좀에 자발적으로 첨합하는지를 알아보기 위하여 시험되었다. DEAE 검정법을 이용하는 예비 결과(자유 핵산 리간드/글리세롤 리피드 복합체의 제거를 위한)는 다음과 같은 2가지 주요한 사항을 나타낸다: 1) 적재가 달성될 수 있다; 및 보다 중요한 것은 2) 핵산 리간드/글리세롤 리피드 복합체의 완전한 적재가 실온에서 24시간에 걸쳐 관측되었다. 적재에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 보다 상세한 연구가 계속되었다. 온도가 첨합의 속도에 극적인 효과가 있다는 것이 관측되었다. 완전한 적재가 실온에서 24시간에 걸쳐 달성될 수 있기는 하나, 완전한 첨합은 상승된 온도(67°C)에서 잠시동안에 달성될 수 있다. 이것은 핵산 리간드/친유성 화합물 복합체를 예비성형 리포좀에 첨합시키기 위한 신속하고 효율적인 방법이 된다는 것을 증명한다.

다음에는 리포좀-회합형으로부터 유리 scNX-278을 분리하기 위하여, 크기-배제 크로마토그래피가 사용되었다. '비어있는' 2:1 DSPC: 콜레스테롤 리포좀에 scNX-278을 적재시키는 것을 이용하여 예비작업이 수행되었다. 22°C에서 슈퍼맥스 S-200 칼럼을 이용하여 크로마토그램이 생성되었다. 22시간에 걸쳐, 피크 영역에서의 이동으로, scNX-278이 비어있는 리포좀 집단으로 점진적으로 첨합되는 것이 관측되었다(데이터는

기재되지 않음). 결과는 DEAE 검정으로부터 얻는 데이터와 잘 관련된다.

추가 scNX-2780I 음파처리된 올리고-리포솜에 적재될 수 있는지의 여부를 결정하기 위한 연구도 수행되었다. 올리고-리포솜 및 리피드를 공-용해하고, 이들 둘을 함께 공-음파 처리함으로써, 음파처리된-scNS-2780I 제조되었다. 얻어진 리포솜은 scNX-2780I의 완전한 침합을 나타냈다. 다음에 이 음파처리된 제조물은, 추가 scNX-2780I 성공적으로 침합될 수 있는지의 여부를 결정하기 위하여, 추가의 자유 scNX-2780I와 함께 수동적 앵커링의 별개의 2회전으로 처리되었다. 수동적 앵커링의 제1회전 동안에, 모든 자유 scNX-2780I는, 65°C에서 1시간 배양후에, 리포솜에 수동적으로 정착되었다. 추가 scNX-2780I 수동적 정착화의 제2 시도 결과는 완전한 적재를 초래하였다.

이를 실험으로부터 발견한 주요 사항은, 핵산 리간드/친유성 화합물 복합체가 고농도에서 음파처리된 올리고-리포솜에 수동적으로 정착될 수 있으나, 추가의 핵산 리간드/친유성 화합물 복합체를 흡수하는 리포솜의 능력 정도를 지나칠 수 있다는 점이다. 2회전의 수동적 적재 후 (약 3mg 리피드-올리고/50mg 리피드로), 일부 자유 리피드-올리고가 잔류하기 때문에, 리포솜은 추가의 올리고-리포솜을 흡수할 수 있는 그를 '능력'에 분명히 도달한다. 이들 데이터는 DEAE 스핀-칼럼 분석에 의하여 확인되었다(데이터는 기재되지 않음). 얻을 수 있는 결론은: 1) 음파처리된 리포솜은 핵산 리간드/친유성 화합물 복합체를 침합시킬 수 있는 추가의 능력을 소유하며; 및 2) 음파 처리를 통하여 100% 핵산 리간드 침합이 달성될 수 있다는 것이다.

NX31838 PL(분자 설명은 제1E도 참조)에 대하여 계속적인 연구가 수행되었다. NX31838은 리포솜에 침합될 때 VEGF 표적에 대하여 개선된 약물 속도론성(실시에 6 참조) 및 생체내 분포를 갖기 때문에, 매우 흥미로운 것이다. 수동적 정착을 통하여 NX31838이 리포솜으로 침합되는 것을 보다 잘 이해하기 위하여 몇가지 연구가 수행되었다.

NX31838 PL의 운동론에 관한 연구결과는, 이 분자에 대한 수동적 정착이, 문헌에 알려진 임의의 크로마토그래피 기술(모두 최소 수분의 주행시간이 필요)을 통하여 측정이 불가능하다고 생각될 정도로 빠르다는 것을 나타내었다.

NX31838 PL 분자의 배향을 결정하기 위하여(즉, 핵산 리간드 성분이 리포솜으로부터 외부로 돌출하는지, 또는 리포솜 수성 중심으로 돌출하는지), 리포솜으로부터 외부로 돌출하는 임의의 핵산 리간드 성분을 선별적으로 개질하기 위하여, 외부로 도입된 RNase가 사용되었다. 수동적으로 정착된 NX31838 PL 리포솜의 경우, 모든 핵산 리간드는 RNase I로 노출된다. 트리톤 X-100 처리에 따라, 아무런 추가의 소화도 관측되지 않았다. 이들 결과는, 수동적으로 적재된 NX31838 PL은, 핵산 리간드 성분이 리포솜으로부터 외부로 돌출하도록 배향하고 있다는 것을 가리킨다. 수동적으로 정착된 NX31838 PL 리포솜이 RNase I로 예비 소화되어, 다음에 DEAE 칼럼위를 주행하면, 약 99%의 핵산 리간드가 칼럼에 의하여 포착되는 반면에, 동일 샘플이 DEAE 상을 주행하나 RNase I로의 예비 배양이 없으면, 거의 100%의 올리고가 칼럼을 관통하는 것이 가능하여, DEAE에 결합하지 못한다. 리포솜은 DEAE로부터 올리고를 보호한다. 리포솜은 높은 친화력으로 핵산 리간드와 회합하여, DEAE 그룹에 대한 노출을 크게 감소시키기 때문에, DEAE로부터 핵산 리간드 성분을 보호하는 역할을 한다.

마지막으로, 자유 핵산 리간드/친유성 화합물 복합체를 리포솜-정착형으로부터 분리하기 위하여 새로운 방법을 개발하기 위한 일부로서, 본 발명자들은 NX31838 PL을 RNase I로 소화하였다. 개질된 올리고는, 크기 배제 크로마토그래피(S-1000 수지) 다음에 리피드 꼬리의 제거를 이용하여 용이하게 분리될 수 있는 반면에, 온전한 핵산 리간드/친유성 화합물 복합체는 동일한 조건하에서 리포솜과 함께 공동 용출되었다. 이 데이터는 핵산 리간드/친유성 화합물 복합체가 용액내에 자유 상태로 있을 때, 아마도 미셀을 형성할지 모른다는 것을 나타낸다. 이것은 리포솜과 함께 칼럼의 공 용적에서 공동 용출시키는 결과를 초래한다. 리피드 테일을 제거하면, 겔 여과 매개체로 들어가게하여 크기가 결정되고 적절히 저장되게 한다.

실시에 8. VEGF 핵산 리간드 복합체의 생체내 효능-피부 혈관 투과성 검정

피부 혈관의 투과성에 있어서 VEGF-유도 변화를 희박하게 하는 NX31838 핵산 리간드의 몇개의 상이한 배합물의 능력(마일스(Miles) 검정)이, 사소한 변형을 가하여 문헌에 기재된 바와 같이 수행되었다(생거 등 (1986) Cancer Research 46: 5629~5632). 요약하면, 성체 암 기니아돼지 (3/조사)가 이소프란으로 마취되어 등쪽 머리카락 및 측면 등 영역이 클리퍼로 제거되었다. 에반스 청색염료 (2.5mg/기니아 돼지)가 정맥내로 투여되었다. 주사용액(PBS, VEGF, NX31838 배합물, 및 항-VEGF 모노클로날 항체)은 30분전에 미리 제조되어, 기재된 바와 같은 최종 농도로, 지시한 바와 같이 공동 혼합되었다. 다음에 각 용액은, 털이 배지영역의 격자 모양에 랜덤화 양식으로 피내 주사되었다(2중 주사/기니아 돼지; 40 μ l/부위). 기니아 돼지는 마취로부터 회복되도록 두었으며, 피내 주사 완료 30분 후 CO₂ 노출에 의하여 희생되었다. 다음에 피부를 수확하여, 피하조직이 없도록 자르고 투시법으로 처리되었다. 다음에 색상 CCD 카메라(히타치 덴시 KP-50U, 일본) 및 이미지-프로 플러스 소프트웨어(버전 3.1, 메지아 사이버네틱스, 실버 스프링스, 메릴랜드주)를 이용하여, 영상을 포착하였다. 각 피부 샘플은, 광학농도 및 관련 영역에 대하여 분석된 각 주사부위로, 강도에 대하여 정상화 되었다.

제8A~C도는, 실시에 7A에 기재된 바와 같이 리포솜 제재에 있어서, NX31838-20K PEG, NX31838-40K PEG, NX31838-PL에 대한 VEGF·유도 혈관 누출의 핵산 리간드 감쇠의 결과를 나타낸다. 모든 배합물은, 100nM 정도의 낮은 농도로, 혈관 누출을 PBS 대조 수준 이하 또는 부근까지 현저히 감소시킬 수 있었다. 30nM에서 핵산 리간드의 차단 효과는 상실되었다. NX31838-PL 리포솜 배합물은 이 농도에서는 평가되지 않았으나, 100nM에서 차단 활성을 감소시킨 것으로 보였다. 이 모델 시스템에서 항-VEGF 모노클로날 항체도 평가되었는데, 마찬가지로 100nM에서 효과가 저하하였으며 30nM에서 활성을 상실하였다. 따라서 이 모델 시스템에서, 조사된 다양한 배합물의 NX31838은 VEGF 단백질의 하나의 기능적 효과를 차단하는데 있어서 항체로서 동일하게 효과적이라는 것을 암시한다.

실시에 9. VEGF 핵산 리간드 복합체의 생체내 효율-각막 포켓 모델.

VEGF 핵산 리간드(NX31838) 배합물이, 정상적으로 무혈관성인 쥐 각막에서 VEGF-유도 각막 맥관형성을 감소시킬 수 있는 그들 능력이 시험되었다. 요약하면, 단백질 또는 캐리어 용액을 95% 에탄올중의 12% 생체 고분자에 첨가함으로써, 약 30시간 전에 생체 중합체(하이드론) 펠렛±VEGF 단백질(3pmol)을 제조하였다. 케타민 HCl (50mg/kg) 및 크시라진(10mg/kg)을 복강내 주사함으로써, 성체, 스프라그-다우리 쥐(200-24kg)이 마취되었다. 다음에, 좌측 눈을 국부 마취를 위하여 테트라카인 HCl을 경피 투여한 후 묶은 포비드-요오드 용액으로 처리하고 등장 식염수 용액으로 세척하였다. 중간-각막에서 수직 부분 두께 절개부위를 만들었다. 중간-간질 포켓이, 각막윤부의 1.5mm 범위내로 뺄는 측면 안각을 향하여 꼬리 모양으로 절개되었다. 다음에 펠렛이 포켓의 꼬리 모양의 한계까지 삽입하여 밀어냈다. 잔류 공기는 온화하게 마사지하여 포켓 밖으로 밀어냈다. 다음에 눈에 한 방울의 클로람페니콜 안과용 액제를 가하였다. 동물은 굴러 넘어지고, 동일한 형태의 펠렛을 삽입하여 오른쪽 눈에 대하여도 공정이 반복되었다. 각각의 눈에 펠렛의 삽입이 완료된 후, 지시된 바와 같이 하루에 두번, PBS(핵산 리간드 배합물 그룹과 일치하는 용량) 또는 핵산 리간드(10mg/kg)가 정맥내 투여 되었다. 5일째에, 각 동물은 마취되어, 해부 현미경(KAPS, 독일)상에 설치된 35mm 카메라(미롤타 X9)를 사용하여 촬영되었다. 혈관 성장의 최대 길이(0~5), 이식된 펠렛에 인접한 혈관 성장의 밀도(1~4) 및 맥관형성이 발생하는 눈의 원둘레(0~1)를 측정함으로써 맥관형성 반응에 대하여 각 눈을 평가하였다. 다음에 맥관형성 지수는 길이×밀도×원둘레의 곱으로 측정된다.

핵산 리간드 배합물의 VEGF-유도 맥관형성 차단능력이 제9A~C도에 도시된다. 혈관 투과성 변화를 차단하는데 있어서 다른 배합물과 같이 동일하게 효과적이긴 하나, NX31838-20K PEG는 정상적으로 무혈관성인 각막에서의 맥관형성 반응을 감소시키는데 있어서는 비효율적이었다. 그러나, NX31838-40K PEG 및 리포좀 NX31838-PL은 맥관형성 수준을 65~70%로 현저히 저하시켰다. 이들 차이는 핵산 리간드의 약물 속도론적 특성을 가져오는 것으로 추측된다.

통계적 분석: 마일스 검정 및 각막 맥관형성 모델의 그룹이, 듀넛(Dunnett)의 비교와 함께 랭크(Rank) ANOVA를 이용하여 비교되었다.

실시에 10. 종양 모델에 있어서의 VEGF 핵산 리간드의 생체내 효율

인체 종양 이종이식 모델: VEGF 핵산 리간드 NX31838 40K PEG의 총살성 종양성장에 대한 영향력이, 무모 마우스의 피하 종양 모델에서 측정되었다. A673 인체 라브도미소육종 종양세포가 조직배양으로 성장되어 수확되고, 1×10^7 생존가능 세포가, 옆구리의 겨드랑이 부근의 무모 마우스에 피하로 이식되었다. 12시간 후에, 시험 화합물에 의한 처리가 개시되어 실험기간 중 계속되었다. 화합물은 하루에 두번, 10 및 40mg/kg으로 복강내 투여되었다. 음성대조는 하루에 두번, 40mg/kg으로, 뒤섞인 애프터머(aptamer) 서열, NX31917-40K PEG (분자 설명을 위한 제 1R도 참조)의 투여로 구성되고, 양성 대조는 1주일에 두번 100 μ g/마우스로 투여되는 항-VEGF 항체 Mab. 26503.11(R&D Systems, Lot#LD03)으로 구성된다. 양 핵산처리 그룹 및 항체 처리 그룹은 뒤섞인 서열의 음성 대조 그룹에 비하여 종양성장을 현저히 저하시키는 것을 보여주고 있다(제 11도). % 종양성장억제(TGI)는, 40mg/kg 및 10mg/kg BID 그룹에 있어서 75% 및 80%, 모노클로날 항체 처리 그룹에 있어서는 83%로 측정되었다(표 8). 40mg/kg 투여 그룹과 10mg/kg 투여 그룹 사이에 현저한 차이는 보이지 않았기 때문에, 14일째 후에는 40mg/kg 그룹의 투여는 더 이상 없었다. 제 11도에서 알 수 있는 바와 같이 투여 종료 며칠 후, 종양은 신속히 성장하여 음성 대조 그룹의 성장속도를 의태한 반면에, 10mg/kg 핵산 리간드 그룹 및 항체 처리 그룹은 계속 성장속도가 감소된 상태였다.

동일한 종양 모델을 이용하여 추가의 검토가 수행되었는데, 여기서 새로운 배치의 핵산 리간드, NX31838 40K PEG(NX31838.04 및 NX318.38.07로 명명)가 비교되었으며, 투여량도 10mg/kg BID, 3mg/kg BID 및 1mg/kg BID로부터 하향하여 적정되었다. 실험은 또한 10mg/kg의 1일 1회 투여 및 10mg/kg BID로 리포좀형의 VEGF 핵산 리간드, NX31838 PL도 내포하였다. 제12도 및 표 9에서 알 수 있는 바와 같이, 양 실험에서 동일한 정도의 종양성장 억제가 달성되었다. VEGF 핵산 리간드의 양 배치는, 1일 2회 투여 스케줄에서 비교할 때, 각각 구 및 신 배치에 대한 TGI 값 61% 및 70%와 대등하였다. 또한, 1일 1회 투여(SID)가 1일 2회 투여만큼 효율적이라는 것이 측정되었다. 그러나, 이 실험에서 사용된 적정 구도는 무효과 투여량에 도달하는데 실패하였다.

제3실험이 수행되었는데, VEGF 핵산 리간드의 더 이상의 하향 적정이, 종양성장에 대한 투여량 반응 관계를 나타낼 수 있었다. 이 실험에서, VEGF 핵산 리간드는 하향 적정되었으며, 무효과 투여량 0.03mg/kg에 접근하였다. 상대적인 종양성장억제가 제13도에서 나타나며 표 10에 요약된다.

3개의 각색되지 않은 종양연구외에, 각색된 종양 연구가 마련되었는데, 여기서 종양은 VEGF 핵산 리간드로 처리되기전에 $200 \pm 100\text{mm}^3$ 에 도달되도록 하였다. 10mg/kg의 NX31838 40K PEG 및 100 μ g 주 2회의 mAb 26503(R & D 시스템스)의 투여 그룹은 각각 59% 및 69% 종양성장 억제율을 달성하였다(제14도, 표 11). 이들 집합적 연구는 일단 종양이 정착되면 VEGF 핵산 리간드가 A673 종양정착을 서행시키며 종양성장을 억제시킬 수 있다는 것을 과시한다.

카포시의 육종 모델: 무모 마우스에서 카포시의 육종 세포주 KSY-101 피하 성장에 대한 NX31838-40K PEG의 효과도 검토되었다. KSY-1 세포는 그들이 VEGF 길항 물질에 의하여 배양중 억제될 수 있는 종양세포주 중에서 독특한 것이다. KSY-1 세포는 배양으로 성장, 수집되어 마우스의 뒷 옆구리에 피하주사(2×10^7 세포/마우스) 되었다. 3그룹의 마우스(그룹당 4마우스)가 실험기간 중 30mg/kg의 NX31838-40K PEG, 30mg/kg NX31917-40K PEG(제 1R도의 분자설명 참조) 또는 PBS로, 매 12시간 마다 복강내 주사처리 되었다. 처리는 종양세포 이식 후 하루만에 개시되었다. PBS-처리 및 NX31917-40K PEG-처리 그룹의 종양성장은 비견할만 하였으나, NX31838-40K PEG-처리 그룹에서는 상당한 종양성장의 억제가 관측되었다(제 16도). 실험이 종결되었을 때 (22일째), NX31838-40K PEG는 KSY-1 종양의 성장을 65% (PBS-처리 그룹에 비하여) 또는

69%(NX31917-40K PEG-처리 그룹에 비하여) 억제하였다.

실시에 11. 토끼에서의 VEGF 핵산 리간드 NX31838+40K PEG의 초자체내 약물속도론

0.5mg/눈의 투여량으로 초자체 주입에 의하여, 뉴질랜드 백색 토끼가 40m PEG에 접합된 VEGF 핵산 리간드 NX31838로 처리되었다. 실시에 5에 기재된 바와 같이 40K PEG가 VEGF 핵산 리간드에 접합되고, 얻어진 복합체가 제1도 (SEQ ID NO:)에 도시된다. 토끼는 각 눈에 NX31838-40K PEG가 초자체로 주입되었다. 대상 동물에 대한 투여시간의 간격은 15분을 초과하지 않았다. 혈액 및 초자체 샘플이, 표 7에 규정된 바와 같이 수집되었다.

2중 잡종형성화 검정법을 이용하여, 플라스마 및 초자체 샘플의 분석이 수행되었다. 이 검정법에서, 2개의 잡종형성 프로브가 사용되었는데, 96 웰 플레이트의 웰에 부착된 포착 프로브 및 바이오티닐화 검출 프로브이다. 포착 프로브는 핵산 리간드의 5' 단부와 함께 하이브리드를 형성한다. 이 검정은 전장의 핵산 리간드에 고도로 특이적이며 민감하여 양성 시그널을 산출한다. 현행 정량 한계는 5 μ l의 플라스마에 있어서 약 2fmol이다.

[표 1]

제15도에 도시된 데이터로부터 측정된, 스프라그 다울리 쥐에 i.v. 대량 투여의 VEGF 핵산 리간드 약물속도론적 매개변수의 요약 (구획적 분석)

<u>매개변수</u>	<u>NX213</u>	<u>NX278</u>	<u>NX278-L</u>
Total AUC (μ g* 분 /ml)	147	202	531
C, t=0 분 (μ g/ml)	14.59	23.16	16.95
C, t=2 분(μ g/ml)	15.31	14.08	15.74
α t _{1/2} (분)	7	3	13
β t _{1/2} (분)	49	67	113
Clearance (ml/kg/ 분)	6.80	4.95	1.88
v _{ss} (ml/kg)	72	251	152

[표 2a]

VEGF₁₆₅에 대한 2'-F-피리미딘 리간드

리간드 (빈도)	가변성 영역의 서열			K _d (μ M)
	5'- <u>gggaggacgaugcgg</u> [가변 영역] <u>cagacgacucgcccga</u> -3'			
제1족				
VP30.7	<u>gcggg</u>	<u>gAAGAAUUGG</u>	UCAUCGUCGUUCUCCGCCUCCC	3000
VP30.12	<u>gcgggAAUACG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	AUACAU AUGCU <u>CGU</u>	7
VP30.13 (7)	<u>ugcggGAUAACA</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	UGAACAA <u>CGUGGU</u>	10
VP30.16	AUGAUCGCGUAG	<u>GAAGUAUUGG</u>	AAGGCCCU	6
VP30.19	<u>gcgggCACUUUA</u>	<u>GAAGAAUUGA</u>	AUUU <u>CCCGCUGGU</u>	9
VP30.22 (6)	<u>gcgggUAG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	AAGCGCAUUU <u>CCUCCGY</u>	20
VP30.25	<u>cggCGGGAUUUUG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	AUA <u>UUGGCCU</u>	20
VP30.26 (2)	<u>gcgggCGGYACUUUG</u>	<u>GAAGAAUUGA</u>	AUUU <u>CCCGCU</u>	10
VP30.27	<u>gcggg</u>	<u>gAAGAAUUGG</u>	AUAUA <u>UCGUUCACCCCCACCU</u>	400
VP30.40	<u>ugcggAAACG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	AUA <u>CGCAAGCAGUU</u>	6
VP30.41	<u>gcgggUAG</u>	<u>GAAGUAUUGU</u>	AAGCGCC <u>UCGUUUUCGC</u>	7
VP30.51 (2)	<u>gcgggAGUUUUG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	AUGUCCGA <u>UCGU</u>	90
VP30.54	<u>gcgggAAGAAACG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	AGACACGC <u>UCGU</u>	10
VP40.4 (5)	<u>gggagggacgaugcgg</u>	<u>GAAGAAUUGA</u>	UGU <u>UGUAUUGUCCUCCGAUUUCCUGCCGU</u>	200
VP40.43	<u>gggagggacgaugcggACA</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	GCU <u>UCGCAUUAUCCUCUGUCAGCCGC</u>	30
VP40.53	<u>ugcggUGAGAGAAACG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	AUACGAUACUCA <u>UCGCGCU</u>	8
VT30.4	<u>augcggCUUAAGUUUUG</u>	<u>GAAGAAUUGA</u>	AUA <u>CUGGGU</u>	20
VT30.7	<u>gcggUAACCAGUG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	<u>CUGCUAUCCU</u>	10
VT30.10	<u>augcggAACG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	AUACGUAGCA <u>UGCGU</u>	2
VT30.13	<u>ugcggCAGGAUUUUG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	AUAUUG <u>CCGca</u>	10
VT30.20	<u>gaugcggAAACG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	AUACCGCUAC <u>GUGUU</u>	4
VT30.52	<u>ugcggg</u>	<u>gAAGAAUUGA</u>	GCAUCCUUC <u>CCUUGUGCCU</u>	9000
VT30.53	<u>gaugcggAGCUAACG</u>	<u>GAAGAAUUGG</u>	AAACA <u>CCGCGUc</u>	10

[표 2b]

리간드 (빈도)	가변성 영역의 서열						K _d (pM)
	5' - <u>gggagggacgauqcgq</u> [가변 영역] <u>cgagcgacucgccccga</u> - 3'						
제2족							
VP30.2 (5)	<u>ggYGA</u> ACCGA	UGGAA	UUU	UUGGACGC	<u>UCGCCU</u>		10
VP30.5 (4)	<u>gAYCA</u> ACCGA	UUGAC	GUUA	UGGACGC	<u>UGGUc</u>		8
VP30.31 (5)	<u>gcggUA</u> ACCGA	UUGAA	CUUC	UUGGACGC	<u>UACCGU</u>		6
VP30.43	<u>gcUA</u> ACCGAA	UUGAA	GUUA	UUGGACGC	<u>UACCU</u>		5
VP40.9	<u>gGAGCAGA</u> ACCGA	UAGAA	GAA	UUGGACGC	<u>UCAGCUCCGGU</u>		30
VP40.14	GUACCAGAA <u>UGAGCA</u> ACCGA	AUGAA	GAA	CUGGACGC	<u>UGCUCa</u>		8
VP40.17	<u>ugcggUA</u> ACCGA	UGGAA	UCGC	UUGGACGC	<u>UCAUCGCA</u> CGUUGCU		10
VT30.9 (6)	<u>ggUCA</u> ACCGG	UUGAA	UAU	UUGGUCGC	<u>UGACCU</u>		30
제3족							
VT30.1 (2)	<u>gacgauqcgq</u> A	ACUA	GUGAAUGCUU	AUA	CGA	<u>CCGUGUUGUc</u>	10
VT30.2	<u>gcgg</u>	AUCA	GUGAAUGCUU	AUA	GA	<u>CCGCCUCCGU</u>	2
VT30.3 (7)	<u>gauqcgq</u> AGA	AUCA	GUGAAUGCUU	AUA	AAUC	<u>UCGYGUc</u>	5
VT30.11	<u>gauqcgq</u> A	AUCA	GUGAAUGCUU	AUA	GCUC	<u>CCGCGUCUc</u>	4
VT30.15	<u>gcgg</u> A	ACCA	GUGAAUGCUU	AUA	AGA	<u>CUGCUCGU</u>	3
VT30.21	<u>cgauqcgq</u>	AUCA	GUGAAUGCUU	AUA	GA	<u>CCGUUUUGCGU</u>	6
VT30.28	<u>gauqcgq</u> AGA	AUCA	GUGAAUGCUU	AUA	AACC	<u>UCGUGUc</u>	60
VT30.29	<u>augcggA</u>	AUCA	GUGAAUGCUU	AUA	GC	<u>UCCGCGUGGU</u>	10
VT30.35	<u>cgq</u>	ACCA	GUGAAUGCUU	AUA	AGCCCA	<u>UCGACCU</u>	N.D.
VT30.41	<u>gauqcgq</u>	CAGG	GUGAAUGCCA	AUG	UACUUU	<u>UCGCGUc</u>	40
VT30.42	<u>gacgauqcgqA</u>	AUCA	GUGAAUGCUU	AUA	GC	<u>UCCACGUCGUc</u>	N.D.
VT30.44	<u>gcggA</u>	AUCA	GUGAAUGCUU	AUA	CA	<u>UCCGCUCCGU</u>	10
VT30.54	<u>gcggG</u>	ACUAG	GUGAAUGCCA	AUA	UUUUUC	<u>UCCGU</u>	10

[표 3]

리간드	서열	길이 (nts)	K _D (pM)
t22	GACGAUGC CGGU AGGAAGAAUUGGAAGCGC*	29	70
t22a	GACGAUGC CGGU AGGAAGAAUUGGAAGCG	28	3000
t22b	ACGAUGC CGGU AGGAAGAAUUGGAAGCG <u>C</u>	28	80
t22c	GCGGUAGGAAGAAUUGGAAGCG <u>C</u>	23	90
t22d	CGGUAGGAAGAAUUGGAAGCG <u>C</u>	22	100
t22e	GGUAGGAAGAAUUGGAAGCGC*	21	200
t22f	GUAGGAAGAAUUGGAAGCGC*	20	>100,000
t2	GGCGAACCGAUGGAAUUUUUGGACGCUCGCC*	31	20
t2a	GCGAACCGAUGGAAUUUUUGGACGCUC <u>GC</u>	29	40
t2b	CGAACCGAUGGAAUUUUUGGACGCUCG	27	100
t2c	GAACCGAUGGAAUUUUUGGACGCUC*	25	200
t2d	AACCGAUGGAAUUUUUGGACGCU*	23	20,000
t2e	ACCGAUGGAAUUUUUGGACGC*	21	>100,000
t44	GCGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUC <u>CGC</u> *	29	10
t44a	CGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUC <u>G</u>	27	10
t44b	GGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUC <u>C</u>	25	60
t44c	GAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUC*	23	2000
t44d	AAUCAGUGAAUGCUUAUACAUC*	21	>100,000
t44e	AUCAGUGAAUGCUUAUACA*	19	>100,000

[표 4]

VEGF에 대한 친화성에 관한 2'-OMe 퓨린 치환의 효과

리간드	서열	K_D (pM)
t22OMe (OH-10,12,22)	GACGAUGC GGU AGGAAGAAUUGGAAGCGC	10
t22OMe (OH-10,12)	GACGAUGC GGU AGGAAGAAUUGGAAGCGC	20
t22OMe (OH-10,22)	GACGAUGC GGU AGGAAGAAUUGGAAGCGC	4,000
t22OMe (OH-12,22)	GACGAUGC GGU AGGAAGAAUUGGAAGCGC	90
t2OMe (OH-6,21)	GGCGA ACCG AUGGAAUUUUUGGACGCUCGCC	60
t2OMe (OH-6)	GGCGA ACCG AUGGAAUUUUUGGACGCUCGCC	500
t2OMe (OH-21)	GGCGA ACCG AUGGAAUUUUUGGACGCUCGCC	20,000
t44OMe (OH-5,6)	GCGGAAUCAGUGAAUGC UU AUACAUCCGC	40
t44OMe (OH-5)	GCGGAAUCAGUGAAUGC UU AUACAUCCGC	>100,000
t44OMe (OH-6)	GCGGAAUCAGUGAAUGC UU AUACAUCCGC	>100,000

[표 5]

리간드	서열	K_D (s.d.) (pM)	k_d (s.d.) (sec ⁻¹)	k_a (M ⁻¹ sec ⁻¹)
t22OMe	GCGGU AGGA AGAAUUGGAAGCGC	67 (36)	0.012 (0.004)	1.8 x 10 ⁸
t2OMe	GCGA ACCG AUGGAAUUUUUGGACGCUCGC	140 (50)	0.0042 (0.002)	3.0 x 10 ⁷
t44OMe	CGGAAUCAGUGAAUGC UU AUACAUCCG	51 (11)	0.0074 (0.002)	1.5 x 10 ⁸

[표 6a]

VEGF₁₆₅에 대한 추가의 2'-F-피리미딘 리간드

리간드 (빈도)	가변성 영역의 서열 5'-gggaggacggaugcgg [가변 영역] cagacgacucgccccga-3'	Kd (pM)
VP30.1	TCTTTGAGTTTTTGCCAACGGTTTTTCGCT	32,000
VP30.6	AACGGAATTCTTGGATACACACCTCGTCCT	20
VP30.11	TCAGGAACGGAATTTTTGGAGACACGCCCT	25
VP30.14	ACTGGGAGAATCCGAAAAACCTTCACGCGT	25
VP30.18	ATCCATCATTTAACCGTTTGCTCTCCCCCT	27
VP30.20 (3)	TTGATCGGACGTTTAGTCATTTCCCGATCGT	57
VP30.23	GAGCTTGAAGTTTCAGTATTGGCACAACCT	63
VP30.29	CGCCACTTTGGAAGTTATTGAATTTTCGCGT	7
VP30.35	TGAATGAGCTGACGACCCTGAATTGCTCGT	6
VP30.48	GAGCTTGAAGTTTCGGTATTGGCACAACCT	>10,000
VP30.58	CAACTATTCGTTGATGTTTCCGTGAGCCGT	6
VP30.61	GAGCTTGAAGTTTCAGTACTGGCACAACCT	43
VP30.63	AACCAATAGAGATCTTCGGCTGCCCCGCGT	16
VP30.65	AAAACGCTTTTCTTGCCCCCTCGTTGCGC	33
VP30.67	TTAACGGAATTCTTGGATACATAGCATGGT	24
VP40.1	CAAAGTTTGAGTTGATCTGATACGTTTCAGTATTGGCGT	N. D.
VP40.2 (5)	ATCTGTGAACTGGGTTTTTGCCGACGGTTACGCTTTTGCT	35
VP40.3 (5)	CAAAAGTTTGAGTTGATCTGATACGTTTCAGTATTGGCGT	2,000
VP40.5	TTGATCGAGGTTCTAAAGCCTATTTCTGACTTTCTCCCC	19
VP40.10	ATCTGTGAACTGGGTTTTTGCCGACGGTTACGCTTTTGCT	N. D.
VP40.11 (6)	AAGGAAGATGTTGATCGTTTGACGTGATGTGGATCCGCGT	980
VP40.18	TAGTAAGTTATTGAAAGCGCATCTCTATCAACTCTCGGCC	12
VP40.20	TACTTTCTTCTTTCTTTGCTTTCTTTTCTTTTACGCCT	N. D.
VP40.21	CAGTTAATTAATTTGAGTTGTGATGTGTGTCGTTATGGGT	>100,000
VP40.24	GATGCTGAGTGAGGAAGTCTGATTGTTGCAGTATTGGCGT	5,000
VP40.25	AATGGAATTTGAGTCGATCTAGAATGCGTCGTATGGGCT	740
VP40.26	ACTCAACTGGACGCTATGTTGACGGTTATCGCTTTTGGGT	13
VP40.36	CAGGTTCAGAAATGGCAGTCGCATTGATCTTTTTCACCGC	1,300
VP40.37	CAAAAGTTTGAGTTGATCTGATACGTTTCCAGTATTGGCGT	N. D.
VP40.39	CAGTTAATTAACCTGAGTTGTGATGTGTGTCGTTATGGGT	73,000
VP40.41	CAAATTCAGGTCGAGTTATGCGTAGATGTGGCTCCTGTG	11,000

[표 6b]

리간드 (빈도)	가변성 영역의 서열 5'-gggaggacgaugccg [가변 영역] cagacgacucgccccga-3'	Kd (nM)
VP40.44	ATCTGTTGAACTGGGTTTTGCCGACGGTTACGCTTTTGCT	43
VP40.47	CAGTTAATTAATTTGAGTTGTGATGTGTGTCGTTATGGGC	96
VT30.8	TTGATCGATTTTTCCTGGCGTCCTTATGGGT	34
VT30.12 (4)	TCTTTGGGTTTTTGCACACGGTTTTTCGCT	9
VT30.18	TTCAGAAATGGCTGCGATCCTTTTCCCCCT	4
VT30.22	TTGATCGACTTTTTCCTGATCTTCTCCTCCT	N. D.
VT30.24	CACTAGGTGCATGCCATGAAATCTTGCTGT	N. D.
VT30.27	GATCACGGCTTTGACGATCTTCTCCTCCT	120
VT30.23	GATCACGATACTTGACGATTTTTCCTCCTCCT	19
VT30.38	AGCGGTATTCTGTTTCGGTCGTTTTTCTCCT	5
VT30.40	ATTTGGATGCATGTCAAGCGTTTTTGCCCT	30

[표 7]

그룹 할당 및 샘플 시간

(검토 #1)

그룹 #	# 토끼	혈액 샘플 시간	종결 (초자체 샘플 시간)
1	2	예비투여, 15분 30분, 1시간	1시간
2	2	예비투여, 30분 1시간, 2시간 6시간	6시간
3	2	예비투여, 1시간, 4시간 8시간, 24시간	24시간
4	2	예비투여, 15분 6시간, 8시간 24시간, 48시간 72시간	72시간
5	2	예비투여, 2시간, 4시간 4일, 5일 7일	7일

(검토 #2)

그룹 #	# 토끼	혈액 샘플 시간	종결 (초자체 샘플 시간)
1	2	24시간, 7일	7일
2	2	24시간, 7일 13일	13일
3	2	24시간, 7일 13일, 21일 28일	28일

[표 8]

A673 무모 마우스 제노그래프 모델에서의 VEGF 핵산 리간드(NX31838)의 항-종양 효율

% 종양성장 억제율 (TGI)

처리	평균 종양 용적	일	%TGI
뒤섞인 핵산 리간드 40mg/kg BID	2823	13	0
VEGF 핵산 리간드 40mg/kg BID	710	13	74.8
VEGF 핵산 리간드 10mg/kg BID	565	13	80.0
항-VEGF mAb 주 2회	489	13	82.7

$\%TGI = 100(1 - W_t/W_c)$; W_t 는 x시간에서 처리된 그룹의 평균 종양 용적이다; W_c 는 x시간에서의 대조그룹의 평균 종양 용적이다.

42% TGI 또는 그 이상이 현저하다.

종양성장 인자	1000 mm ³ 까지의 일수	GD (t ₁ - t ₂)	1500 mm ³ 까지의 일수	GD
뒤섞인 핵산 리간드 40mg/kg BID	8.5	0	10	0
VEGF 핵산 리간드 40mg/kg BID	14.5	6**	--	-
VEGF 핵산 리간드 10mg/kg BID	17	8.5	20	10
항-VEGF mAb 주 2회	18	9.5	21	11

** 주: VEGF 핵산 리간드에 대한 투여 @40mg/kg은 14일째에 종결되었다.

[표 9]

A673 무모 마우스 제노그래프 모델에서의 VEGF 핵산 리간드(NX31838)의 항-종양 효율

% 종양성장 억제율 (TGI)

처리	평균 종양 용적 평균 (±SD)	#동물	일	%TGI
PBS 대조	2357 (± 1361)	8	16	0
VEGF NX31838.04 10 mg/kg BID	930 (± 312)	7	16	61
VEGF NX31838.04 3 mg/kg BID	1135 (± 364)	7	16	52
VEGF NX31838.04 1 mg/kg BID	1045 (± 265)	8	16	56
VEGF NX31838.04 10 mg/kg SID	713 (± 206)	6	16	70
VEGF NX31838.07 10 mg/kg BID	570 (± 273)	6	16	76
VEGF NX31838PL 10 mg/kg BID	555 (± 174)	8	16	76

$\%TGI = 100(1 - W_t/W_c)$; W_t 는 x시간에서 처리된 그룹의 평균 종양 용적이다; W_c 는 x시간에서의 대조그룹의 평균 종양 용적이다.

42% TGI 또는 그 이상이 현저하다.

[표 10]

무모 마우스 제노그래프 모델에서의
VEGF 핵산 리간드(NX31838) 40K PEG 항-종양 효율

% 종양성장 억제율 (TGI)

처리	평균 종양 용적 평균(±SD)	#동물	일	%TGI
PBS 대조	3446(±1522)	8	14	0
NX31838 10mg/kg	540(±122)	8	14	84
NX31838 3mg/kg	795(±403)	7	14	77
NX31838 0.3mg/kg	1261(±337)	8	14	63
NX31838 0.03mg/kg	1773(±785)	8	14	49

$\%TGI=100(1-W_t/W_c)$; W_t 는 x시간에서 처리된 그룹의 평균 종양 용적이다;
 W_c 는 x시간에서의 대조그룹의 평균 종양 용적이다.

42% TGI 또는 그 이상이 현저하다.

[표 11]

성장 각색된 A673 제노그래프 모델에서의
VEGF 핵산 리간드(NX31838)대 항-VEGF MAb의 항-종양 효율

% 종양성장 억제율 (TGI)

처리	평균 종양 용적 평균(±SD)	#동물	일	%TGI
PBS 대조	3082(±1198)	8	12	0
NX31838 10mg/kg	1278(±543)	8	12	59
항 -VEGF Mab 100µg 주 2회	959(±359)	8	12	69

$\%TGI=100(1-W_t/W_c)$; W_t 는 x시간에서 처리된 그룹의 평균 종양 용적이다;
 W_c 는 x시간에서의 대조그룹의 평균 종양 용적이다.

42% TGI 또는 그 이상이 현저하다.

종양성장 인자

처리	1000mm ³ 까지의 일수	TGD(t ₁ -t ₀)	2000 mm ³ 까지의 일수	TGD(t ₁ -t ₀)
PBS 대조	6.3		9.5	
NX31838 10mg/kg	10	3.7	15.5	6
항 -VEGF mAb 100µg 주 2회	12.3	6	18.3	8.8

[표 12]

NX31838의 제조를 위한 자동화 합성 사이클

단계	시약	당량*	반응시간
테트리틸화	CH ₂ Cl ₂ 중의 디클로로아세트산 (3% v/v)	250	15 분
카플링	뉴클레오시드 포스포아미디트 (CH ₃ CN 중 0.2M)	2	fC 및 fU에 대하여 20분 및 기타 모두에 대하여 30분
	1.0 M DCI	8**	
산화	2:1 피리딘: 물 중 0.05 M I ₂	5.2	2
캡핑	캡 A: 1:1:8 Ac ₂ O:2,6- 루티딘: THF 캡 B: 16% THF 중 NMI	32	1

* 당량은 CPG-결합 3'-말단 뉴클레오시드의 물을 기준

** 활성화제 당량은 뉴클레오시드 포스포아미디트의 물을 기준.

2량체의 합성을 위한 일반적 공정

글리세롤 비스 아미디트를 제외하고는, 상술한 바와 같이 동일한 방식으로 기타 모든 포스포아미디트가 결합되었다.

	시약	당량 *	반응시간
테트리틸화	CH ₂ Cl ₂ 중의 디클로로아세트산 (3% v/v)	250	15 분
카플링 (2회 결합)	뉴클레오시드 포스포아미디트 (CH ₃ CN) 중 0.4M)	카플링당 0.75 당량	2 x 20 분
	1.0 M DCI	16**	
산화	2:1 피리딘: 물 중 0.05 M I ₂ in 2:1	5.2	2
캡핑	캡 A: 1:1:8 Ac ₂ O:2,6- 루티딘: THF 캡 B: 16% THF 중 NMI	32	1

(57) 청구의 범위

청구항 1

VEGF에 대한, 정제되고 유리된 비-자연 발생 RNA 리간드, 여기서 상기 리간드는 2' 플루오로(2'F)-변형 뉴클레오티드를 포함한다.

청구항 2

제1항에 있어서, 리간드가 표 2~6 (SEQ ID NO.:)에 제시된 서열로 구성되어 있는 군으로부터 선택되는, VEGF에 대한 RNA 리간드.

청구항 3

제2항에 있어서, 리간드가 표 2~6 (SEQ ID NO.:)에 제시된 서열로 구성되어 있는 군으로부터 선택된 리간드와 동형이며, VEGF와의 결합능력이 동일한 RNA 리간드.

청구항 4

제2항에 있어서, 리간드가 표 2~6 (SEQ ID NO.:)에 제시된 서열로 구성되어 있는 군으로부터 선택된 리

간드와 동일한 구조를 가지며 VEGF와의 결합능력이 동일한 RNA 리간드.

청구항 5

하기 단계 a~c)를 포함하는 방법에 의하여 확인되는, 제1항의 VEGF에 대한 RNA 리간드.

- a) RNA의 대상 혼합물과 VEGF를 접촉, 여기서 대상 혼합물에 비하여 VEGF에 친화력이 증가된 RNA가, 대상 혼합물의 잔류물로부터 분리될 수 있다;
- b) 대상 혼합물의 잔류물로부터 친화력이 증가된 RNA를 분리; 및
- c) VEGF에 대한 친화력이 증가된 RNA가 부유화된 RNA의 혼합물을 산출하기 위하여, 친화력이 증가된 RNA를 증폭시킴으로써, VEGF의 RNA 리간드가 생성된다.

청구항 6

하기 단계 a)~c)를 포함하는 방법에 의하여 확인되는, 제2항의 VEGF에 대한 RNA 리간드.

- a) RNA의 대상 혼합물과 VEGF를 접촉, 여기서 대상 혼합물에 비하여 VEGF에 친화력이 증가된 RNA가, 대상 혼합물의 잔류물로부터 분리될 수 있다;
- b) 대상 혼합물의 잔류물로부터 친화력이 증가된 RNA를 분리; 및
- c) VEGF에 대한 친화력이 증가된 RNA가 부유화된 RNA의 혼합물을 산출하기 위하여, 친화력이 증가된 RNA를 증폭시킴으로써 VEGF의 RNA 리간드가 생성된다.

청구항 7

2'F-변형 뉴클레오티드 및 비-면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 VEGF 핵산 리간드를 포함하는 복합체.

청구항 8

제7항에 있어서, 리간드 및 비-면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물 사이에 링커를 또한 포함하는 복합체.

청구항 9

제7항에 있어서, 비-면역원성의 고분자 화합물이 폴리알킬렌 글리콜인 복합체.

청구항 10

제9항에 있어서, 폴리알킬렌 글리콜이 폴리에틸렌 글리콜인 복합체.

청구항 11

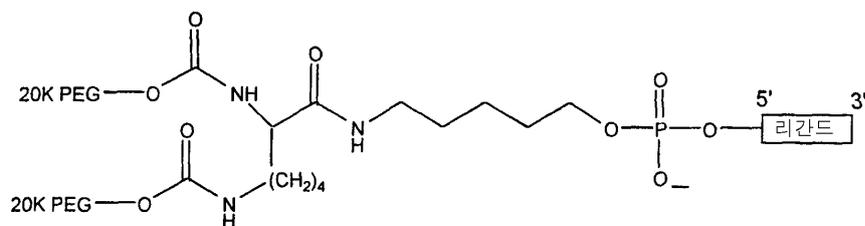
제10항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량이 10~80K인 복합체.

청구항 12

제10항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량이 20~45K인 복합체.

청구항 13

제10항에 있어서, 복합체가 하기와 같은 복합체.

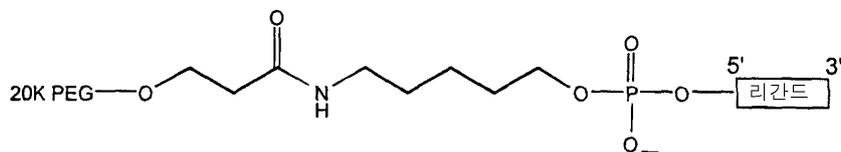


리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 14

제10항에 있어서, 복합체가 하기와 같은 복합체.

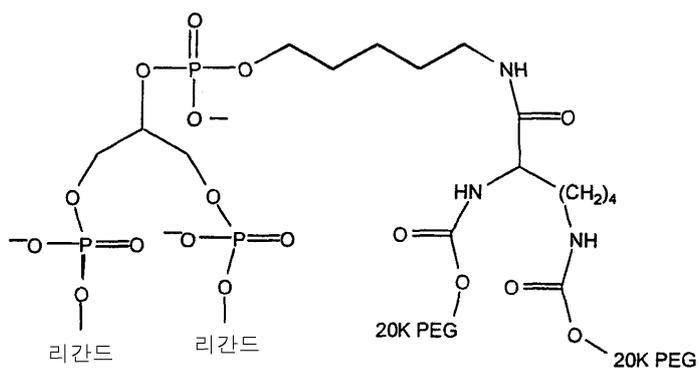


리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 15

제10항에 있어서, 복합체가 하기와 같은 복합체.

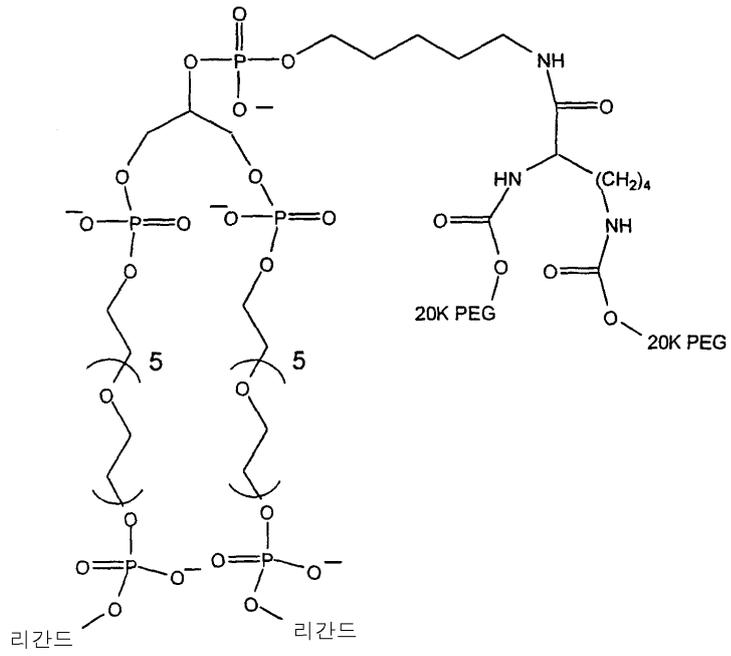


리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 16

제10항에 있어서, 복합체가 하기와 같은 복합체.

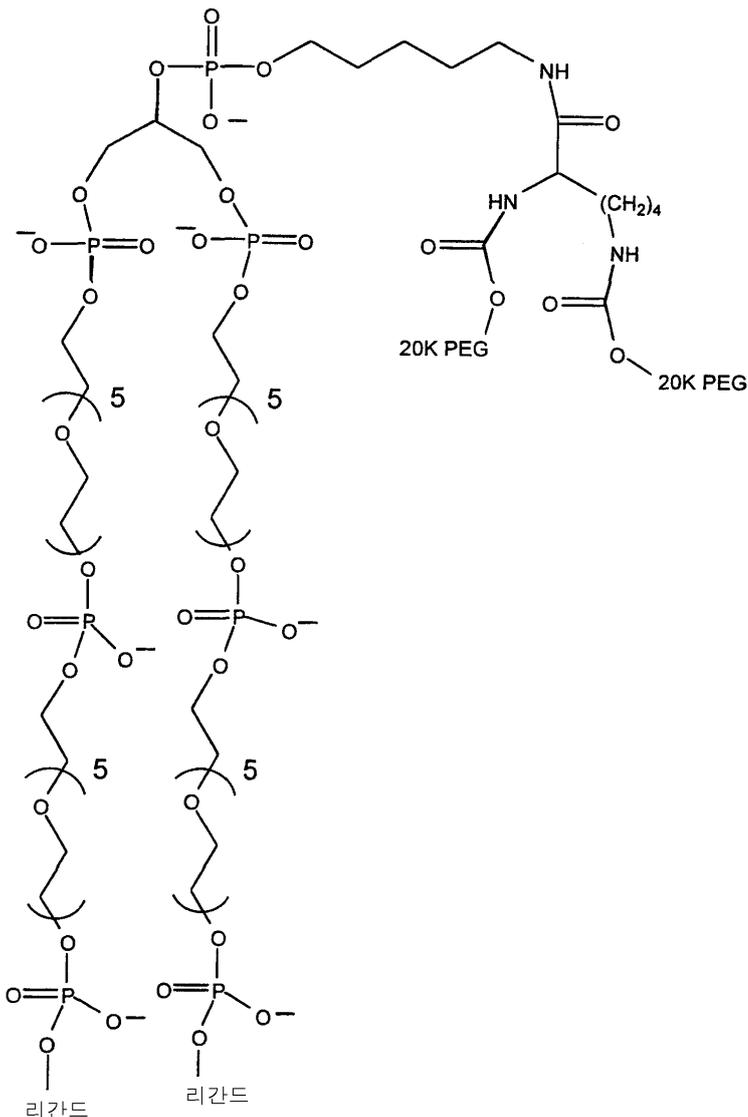


리간드 성분=

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 17

제10항에 있어서, 복합체가 하기와 같은 복합체.



리간드 성분=

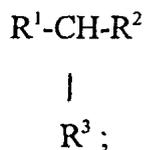
fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 18

제7항에 있어서, 친유성 화합물이 글리세롤 리피드인 복합체.

청구항 19

제18항에 있어서, 친유성 화합물이 하기 구조식을 갖는 글리세롤 리피드인 복합체.



여기서, R¹, R² 및 R³ 는 CH₃(CH₂)_n-O(PO₃)CH₂-; 및 CH₃(CH₂)_n-CONH₂-CH₂-, CH₃(CH₂)_nO-, CH₃(CH₂)_nOCH₂-, CH₃(CH₂)_n(CO)OCH₂-, CH₃(CH₂)_n(CO)O- 및 X로 구성되어 있는 군으로부터 독립적으로 선택되는데, 여기서 하나 이상은 X-이어야 하며, X는 (PO₄), O 및 CH₂OC=O으로 구성되어 있는 군으로부터 독립적으로 선택되고,

여기서 $n=0\sim 30$ 이다.

청구항 20

제 19항에 있어서, 글리세롤 리피드가 포스포리피드인데, 여기서 R이 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-O}(\text{PO}_3)\text{-CH}_2$ -인 복합체.

청구항 21

제 20항에 있어서, R^1 이 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-O}(\text{PO}_3)\text{-CH}_2$ -, R^2 가 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-O}(\text{PO}_3)\text{-CH}_2$ -, 및 R^3 가 X-인데, 여기서 $n=17$ 인 복합체.

청구항 22

제 21항에 있어서, X가 PO_4 인 복합체.

청구항 23

제 19항에 있어서, 글리세롤 리피드가 글리세롤 아마이드 리피드인데, 여기서 R이 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-CONH}_2\text{-CH}_2$ -인 복합체.

청구항 24

제 23항에 있어서, R^1 이 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-CONH}_2\text{-CH}_2$ -, R^2 가 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{-CONH}_2\text{-CH}_2$ - 및 R^3 가 X-인데, 여기서 $n=16$ 인 복합체.

청구항 25

제 24항에 있어서, X가 PO_4 인 복합체.

청구항 26

제 24항에 있어서, X가 0인 복합체.

청구항 27

제 19항에 있어서, R^1 이 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{O-}$, R^2 가 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_2$ - 및 R^3 가 $\text{CH}_2\text{O}(\text{CO})$ 인데, 여기서 $n=17$ 인 복합체.

청구항 28

제 19항에 있어서, R^1 이 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n(\text{CO})\text{O-}$, R^2 가 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n(\text{CO})\text{OCH}_2$ -, 및 R^3 는 $\text{CH}_2\text{O}(\text{CO})$ 인데, 여기서 $n=17$ 인 복합체.

청구항 29

제 7항의 복합체를 포함하는 지질 구조체.

청구항 30

제 19항의 복합체를 포함하는 지질 구조체.

청구항 31

제 20항의 복합체를 포함하는 지질 구조체.

청구항 32

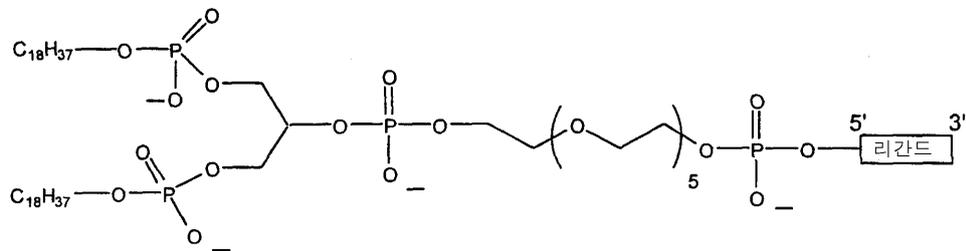
제21항의 복합체를 포함하는 지질 구조체.

청구항 33

제22항의 복합체를 포함하는 지질 구조체.

청구항 34

제33항에 있어서, 복합체가 하기와 같은 지질 구조체.



리간드 성분=
fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
 (VEGF 리간드)

청구항 35

제23항의 복합체를 포함하는 지질 구조체.

청구항 36

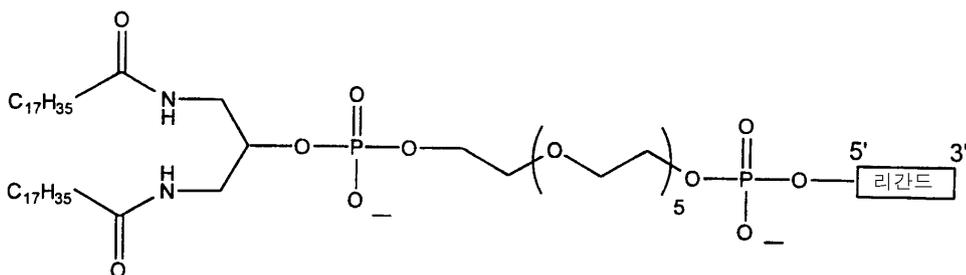
제24항의 복합체를 포함하는 지질 구조체.

청구항 37

제25항의 복합체를 포함하는 지질 구조체.

청구항 38

제37항에 있어서, 복합체가 하기와 같은 지질 구조체.



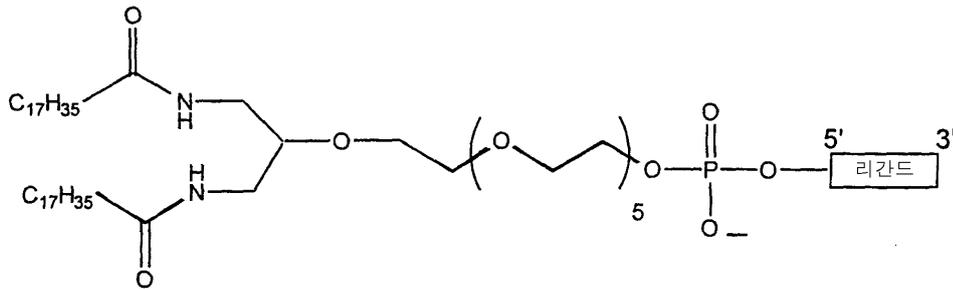
리간드 성분=
fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
 (VEGF 리간드)

청구항 39

제26항의 복합체를 포함하는 지질 구조체.

청구항 40

제39항에 있어서, 복합체가 하기와 같은 지질 구조체.



리간드 성분 =

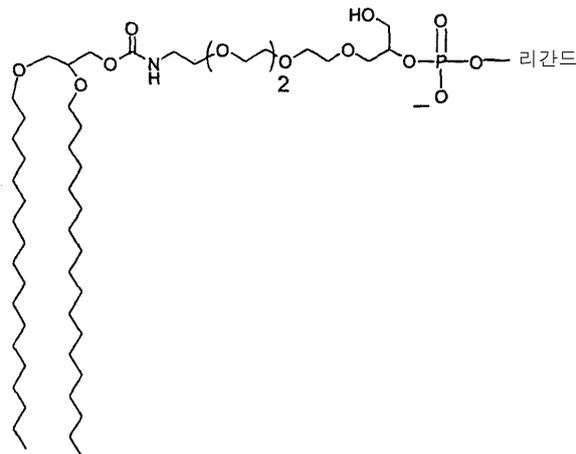
fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 41

제27항의 복합체를 포함하는 지질 구조체.

청구항 42

제41항에 있어서, 복합체가 하기와 같은 지질 구조체.



리간드 성분 =

5'-TsTsTsTs mGaUaC mGmGaU mAaCrG mGrAmG aUmGrG rAaCaC mGaUaC mAaCmG TsTsTsTsT-3'
(VEGF 리간드)

청구항 43

제7항에 있어서, VEGF 핵산 리간드가 하기 단계 a)~c)를 포함하는 방법에 의하여, 핵산의 대상 혼합물로부터 식별되는 복합체.

- 대상 혼합물과 VEGF를 접촉, 여기서 대상 혼합물에 비하여 VEGF에 친화력이 증가된 핵산이, 대상 혼합물의 잔류물로부터 분리될 수 있다;
- 대상 혼합물의 잔류물로부터 친화력이 증가된 핵산을 분리; 및
- VEGF에 대한 친화력이 증가된 핵산이 부유화된 핵산의 혼합물을 산출하기 위하여, 친화력이 증가된 핵산을 증폭시킴으로써 VEGF의 핵산 리간드가 생성된다.

청구항 44

제43항에 있어서, 방법이 단계 b) 및 c)를 반복하는 단계를 더 포함하는 복합체.

청구항 45

2F'-변형 뉴클레오티드 및 비-면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 VEGF 핵산 리간드를 포함하는, 약리학적으로 유효량의 복합체를 투여하는 방법을 포함하는, VEGF 매개병 또는 의학적 증상의 치료방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 비면역원성의 고분자 화합물이 폴리알킬렌 글리콜인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 폴리알킬렌 글리콜이 폴리에틸렌 글리콜인 방법.

청구항 48

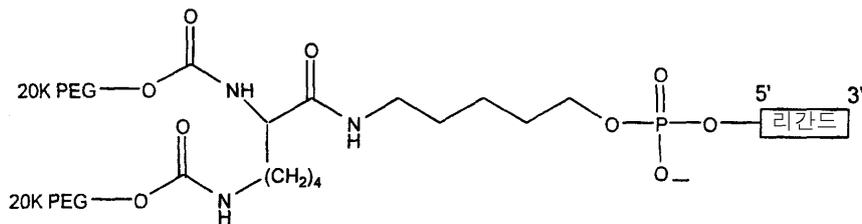
제47항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량이 10~80K인 방법.

청구항 49

제47항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량이 20~45K인 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 복합체가 하기 구조식을 갖는 방법.



리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 51

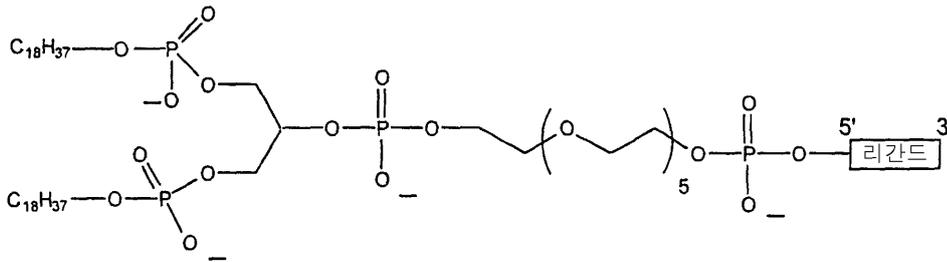
제45항에 있어서, 친유성 화합물이 글리세롤 리피드인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 복합체가 지질 구조체와 더 회합되는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 복합체가 하기 구조식을 갖는 방법.



리간드 성분=

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 54

하기 단계 a)~f)를 포함하는 방법에 의한, 2'-F-변형 뉴클레오타이드 및 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 VEGF 핵산 리간드를 포함하는 복합체의 제조방법.

- 하기 b)~e) 단계를 포함하는 방법에 의하여 핵산의 대상 혼합물로부터 VEGF 핵산 리간드를 식별;
- 대상 혼합물과 VEGF를 접촉, 여기서 대상 혼합물에 비하여 VEGF에 친화력이 증가된 핵산이, 대상 혼합물의 잔류물로부터 분리될 수 있다;
- 대상 혼합물의 잔류물로부터 친화력이 강화된 VEGF 핵산을 분리.
- 핵산의 리간드 부유화 혼합물을 산출하기 위하여, 친화력이 증가된 VEGF 핵산을 증폭; 및
- 식별된 VEGF 핵산 리간드를 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물과 회합.

청구항 55

제54항에 있어서, 복합체가 지질 구조체와 더 회합되는 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 지질 구조체가 리포솜인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 복합체가 핵산 리간드 및 친유성 화합물을 포함하는데, 여기서 상기 복합체가, 하기 단계 a) 및 b)를 포함하는 방법에 의하여, 리포솜의 2중막층과 수동적으로 회합되는 방법.

- 리포솜을 형성; 및
- 핵산 리간드 및 친유성 화합물을 포함하는 복합체를 단계 a)의 리포솜과 혼합하여, 복합체의 핵산 리간드 성분이 리포솜의 2중막층과 회합하게 되어, 지질 2중막층의 외부로부터 돌출.

청구항 58

제54항에 있어서, 비-면역원성의 고분자 화합물이 폴리알킬렌 글리콜인 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 폴리알킬렌 글리콜이 폴리에틸렌 글리콜인 방법.

청구항 60

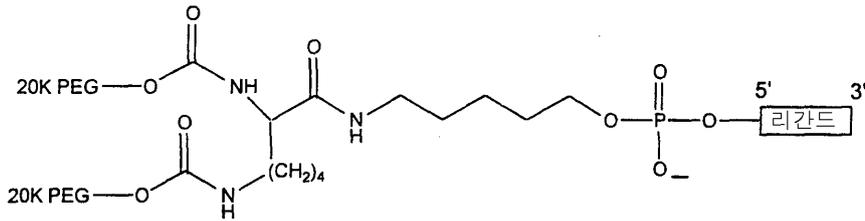
제59항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량이 10~80K인 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량이 20~45K인 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 복합체가 하기 구조를 갖는 방법.



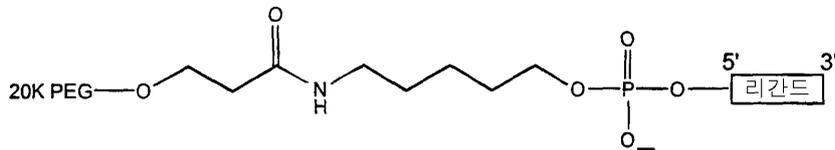
리간드 성분=

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT

(VEGF 리간드)

청구항 63

제61항에 있어서, 복합체가 하기 구조를 갖는 방법.



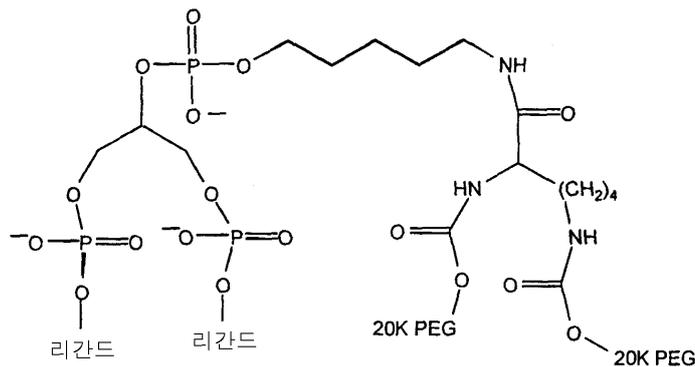
리간드 성분=

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT

(VEGF 리간드)

청구항 64

제61항에 있어서, 복합체가 하기 구조를 갖는 방법.



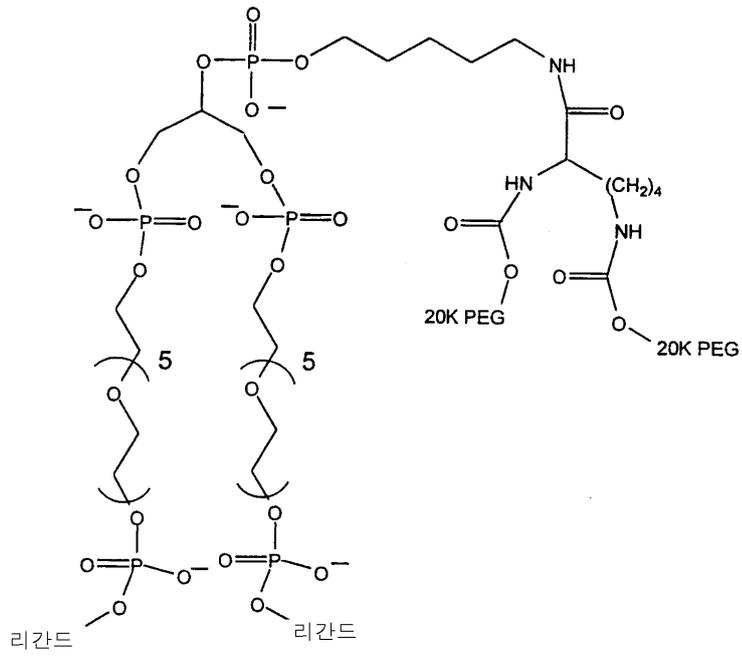
리간드 성분=

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT

(VEGF 리간드)

청구항 65

제61항에 있어서, 복합체가 하기 구조를 갖는 방법.

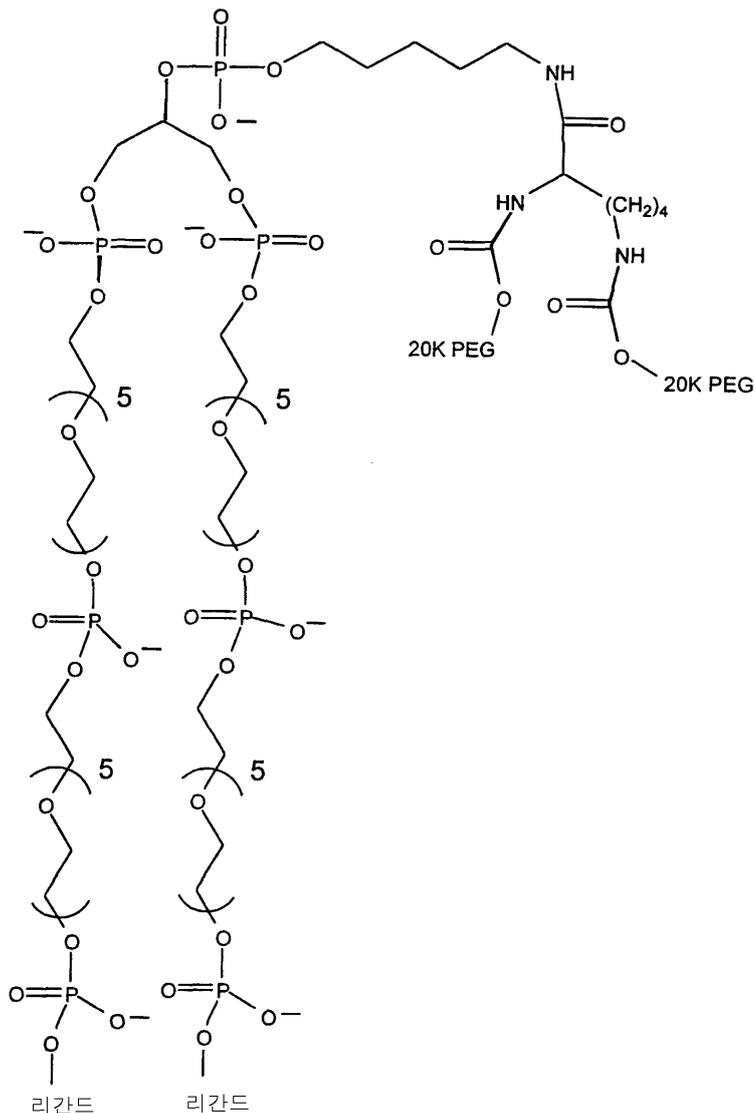


리간드 성분=

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 66

제61항에 있어서, 복합체가 하기 구조를 갖는 방법.

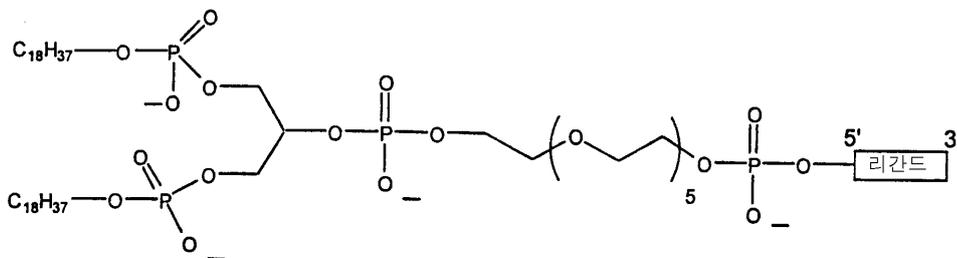


리간드 성분=

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 67

제55항에 있어서, 복합체가 하기 구조를 갖는 방법.

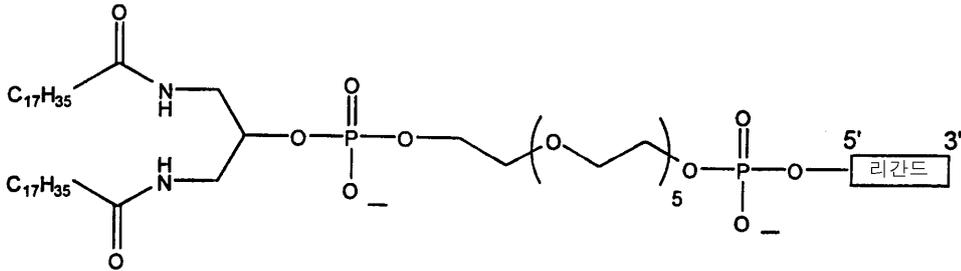


리간드 성분=

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 68

제55항에 있어서, 복합체가 하기 구조를 갖는 방법.

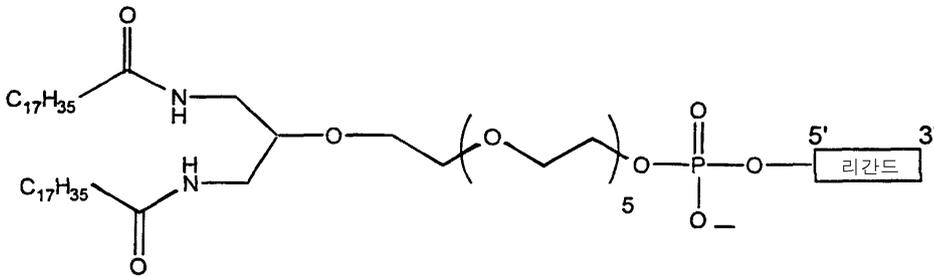


리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 69

제55항에 있어서, 복합체가 하기 구조를 갖는 방법.

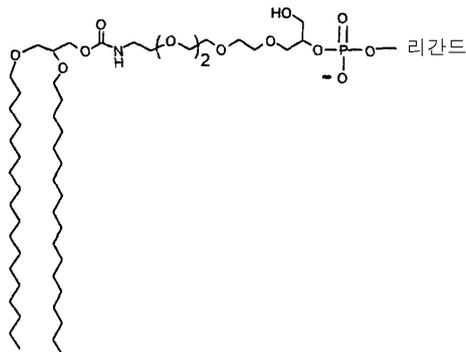


리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 70

제55항에 있어서, 복합체가 하기와 같은 방법.



리간드 성분 =

5'-TsTsTsTs mGaUaC mGmGaU mAaCrG mGrAmG aUmGrG rAaCaC mGaUaC mAaCmG TsTsTsTsT-3'
(VEGF 리간드)

청구항 71

하기 단계 a) 및 b)를 포함하는 방법에 의한, 2'-F-변형 뉴클레오타이드를 포함하는 VEGF 핵산 리간드의 약물 속도론적 특성의 개선방법:

a) VEGF 핵산 리간드와 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 공유결합으로 연결하여, VEGF 핵산 리간드 및 비-면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 복합체를 형성; 및

b) 상기 복합체를 환자에게 투여.

청구항 72

하기 단계 a) 및 b)를 포함하는 방법에 의하여, 환자에 VEGF를 발현시키는 특성의 예정된 생물학적 표적에, 치료제 또는 진단제를 표적화하는 방법:

a) 상기 치료제 또는 진단제를, 2'F-변형 뉴클레오티드 및 비-면역원성이 고분자 화합물 또는 친유성 화합물을 포함하는 VEGF 핵산 리간드를 포함하는 복합체와 공유결합식으로 연결; 및

b) 상기 복합체를 환자에게 투여.

청구항 73

하기 단계 a) 및 b)를 포함하는 방법에 의한, VEGF 매개 맥관형성의 억제방법.

a) 2'F-변형 뉴클레오티드를 포함하는 VEGF 핵산 리간드를, 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물에 공유 결합식으로 연결하여, 복합체를 형성; 및

b) 상기 복합체를 환자에게 투여.

청구항 74

하기 단계 a) 및 b)를 포함하는 방법에 의한, 종양성장의 억제방법.

a) 2'F-변형 뉴클레오티드를 포함하는 VEGF 핵산 리간드를, 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물에 공유 결합식으로 연결하여, 복합체를 형성; 및

b) 상기 복합체를 환자에게 투여.

청구항 75

제74항에 있어서, 종양 또는 상기 종양을 포위하고 있는 세포 또는 조직이 VEGF를 발현하는 방법.

청구항 76

제74항에 있어서, 종양 또는 상기 종양을 포위하고 있는 세포 또는 조직이 VEGF 수용체를 발현하는 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 종양이 카포시 육종 세포를 포함하는 방법.

청구항 78

하기 단계 a) 및 b)를 포함하는 방법에 의한, 황반 장애의 억제방법.

a) 2'F-변형 뉴클레오티드를 포함하는 VEGF 핵산 리간드를, 비면역원성의 고분자 화합물 또는 친유성 화합물에 공유 결합식으로 연결하여, 복합체를 형성; 및

b) 상기 복합체를 환자에게 투여.

청구항 79

제78항에 있어서, 비면역원성의 고분자 화합물이 폴리알킬렌 글리콜인 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 폴리알킬렌 글리콜이 폴리에틸렌 글리콜인 방법.

청구항 81

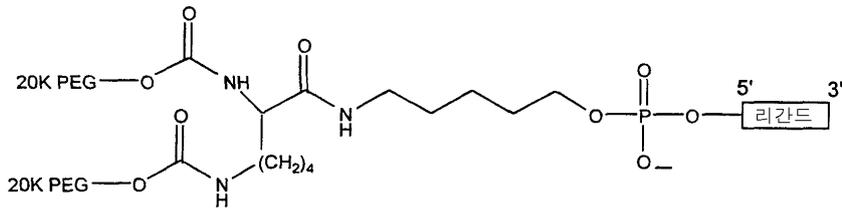
제80항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량이 10~80K인 방법.

청구항 82

제80항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량이 20~45K인 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 복합체가 하기 구조를 갖는 방법.



리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

청구항 84

하기 단계 a) 및 b)를 포함하는 방법에 의하여, 눈에 사용시에 있어서, 핵산 리간드 체류시간을 연장시키는 방법.

- 비면역원성의 고분자 화합물을 핵산 리간드에 부착시켜 복합체를 형성; 및
- 상기 복합체를 눈에 투여.

도면

도면 1a

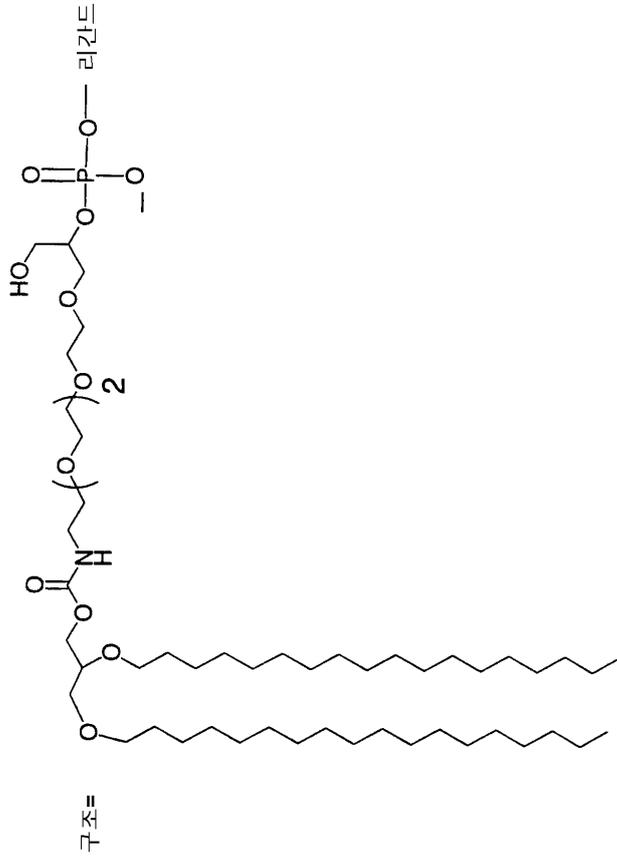
NX-213
SEQ ID NO: 1

리간드=

5'-TsTsTsmAaCaCaUrGrAaUmGrGaUmAmGrAaCmGaCaCmGmGmGmGaUmGTsTsTsT-3'

도면 1b

NX-278
SEQ ID NO: 2

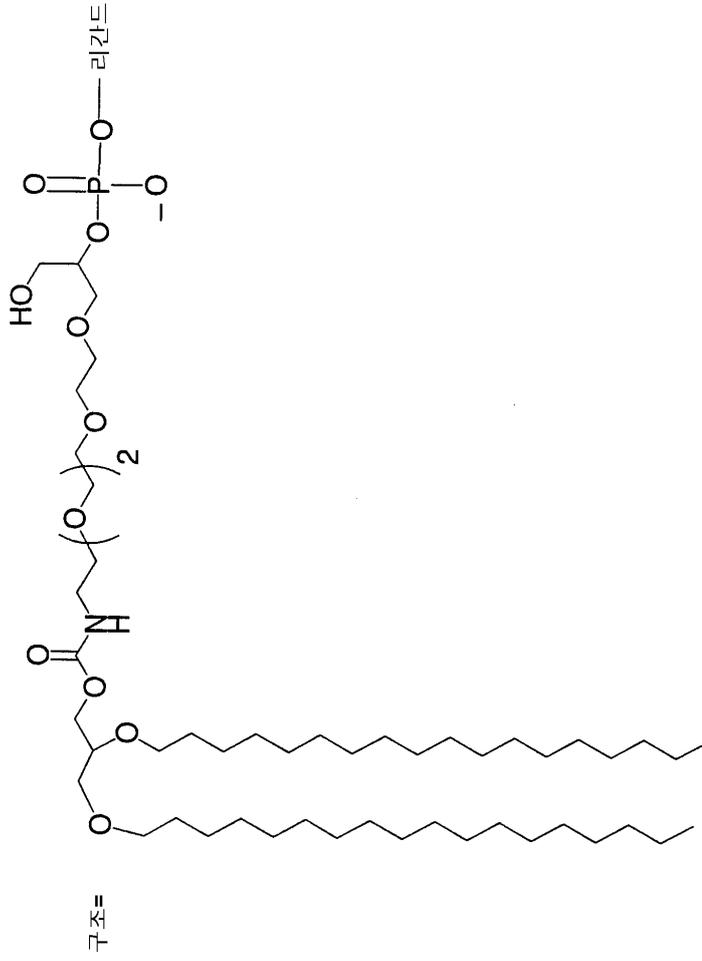


리간드 성분=

5'-TsTsTsTs mGaUaC mGmGaU mAaCrG mGrAmG aUmGrG rAaCaC mGaUaC mAaCmG TsTsTsTsT-3'
(VEGF 리간드)

도면 1c

scNX-278
SEQ ID NO: 3



리간드 성분=

5'-TsTsTsTs mGaUaC mGmGaU mAaCrG mGrAmG aUmGrG rAaCaC mGaUaC mAaCmG TsTsTsT-3'
(VEGF 리간드)

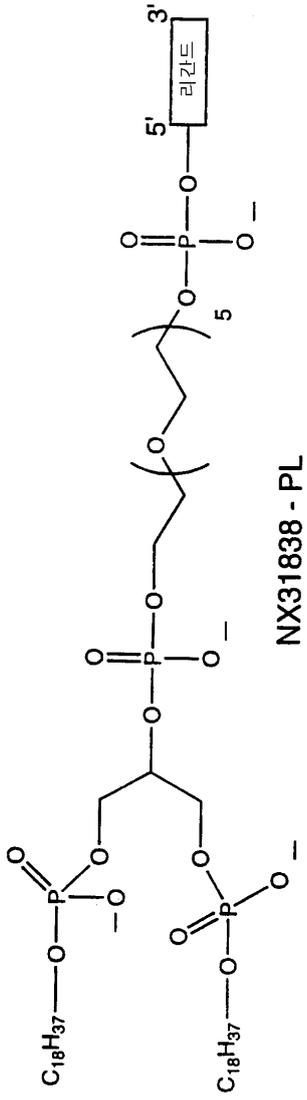
도면 1d

scNX-213
SEQ ID NO: 4

리간드 =

5'-TsTsTsmGaJaCmGmGaUmAaCrGmGrAmGaUmGrGrAaCaCmGaJaCmAaCmGTsTsTsT-3'

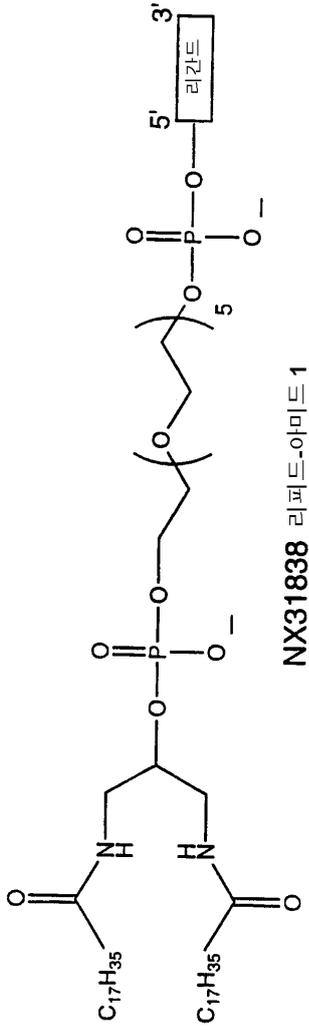
도면 1e



리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

도면 1f

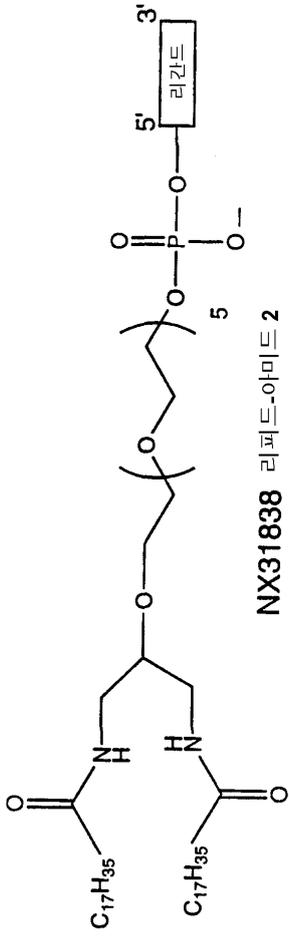


NX31838 리피드-아미드 1

리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

도면 1g

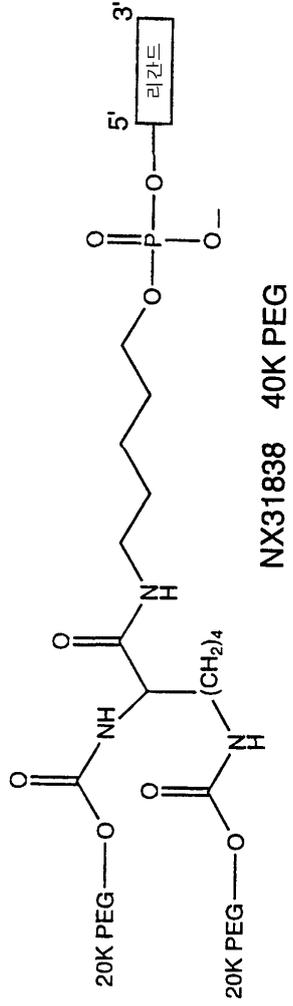


NX31838 리페드-아미드 2

리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

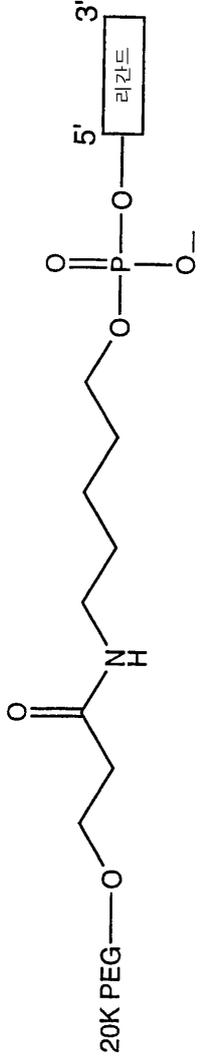
도면 1h



리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfUmAfUfCfCmG-3'3'-dT
 (VEGF 리간드)

도면 11

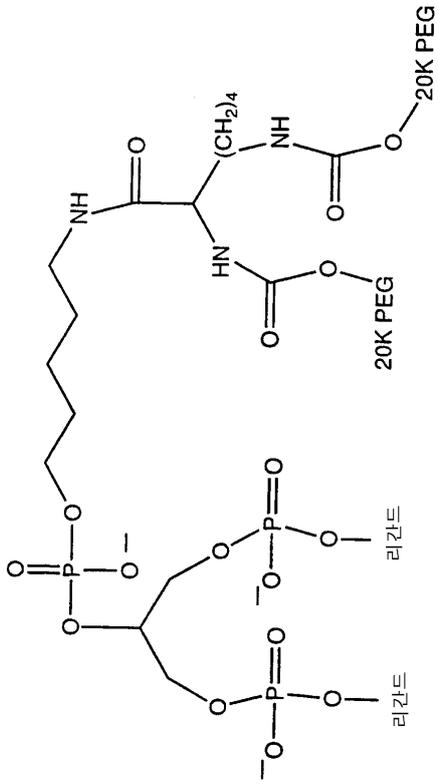


NX31838 20K PEG

리간드 성분 =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

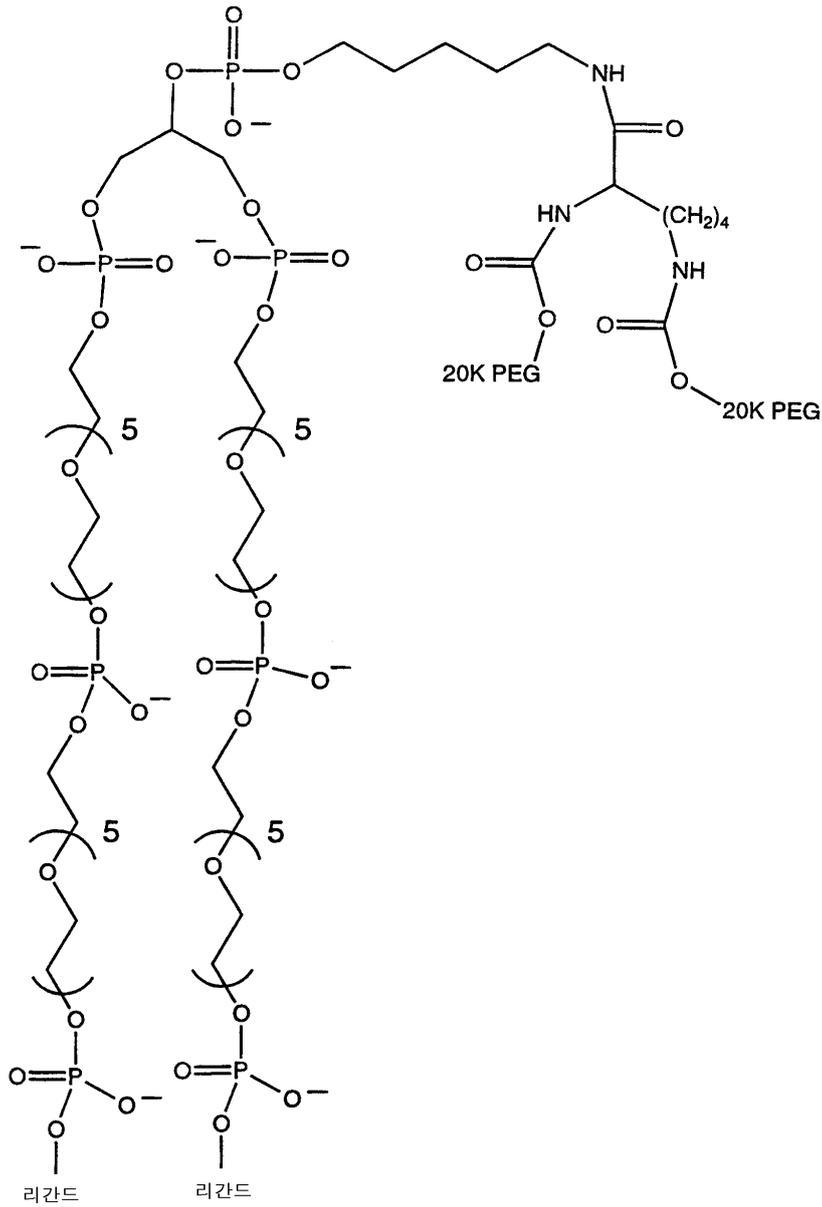
도면1j



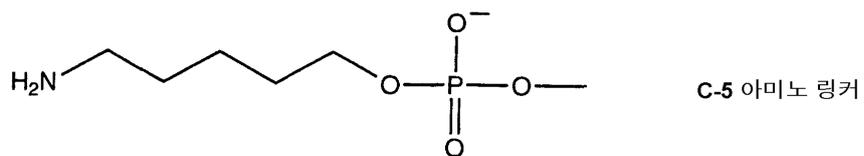
리간드 성분=

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGmGfCfUfUmAfUmAfUmAfUfCfCmG-3'3'-dT
(VEGF 리간드)

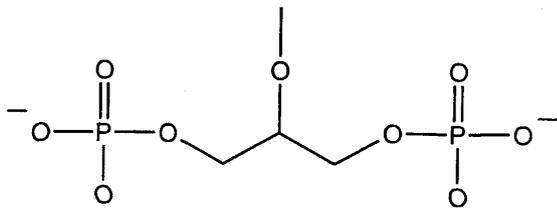
도면 11



도면 1m

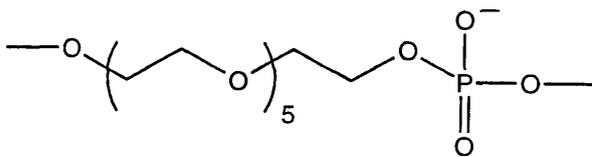


도면 1n



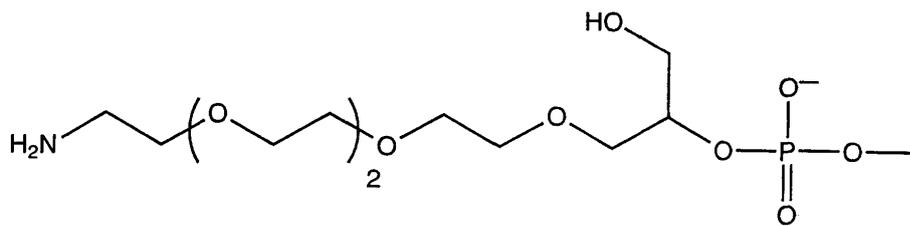
글리세롤 비스포스페이트

도면 1o

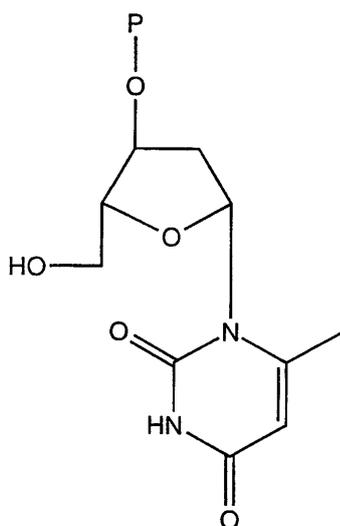


18 원자 스페이서

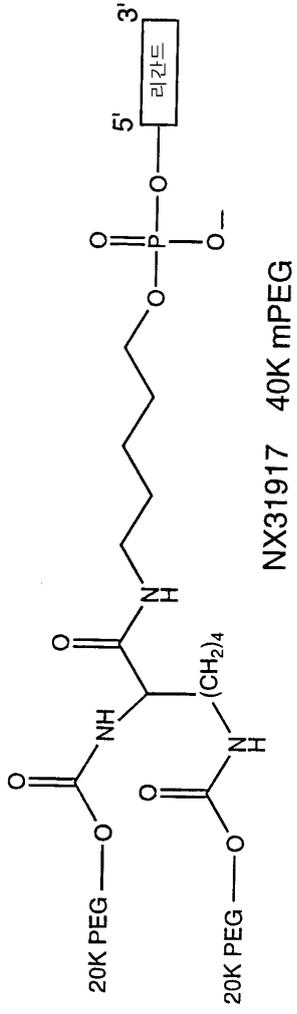
도면 1p



도면 1q



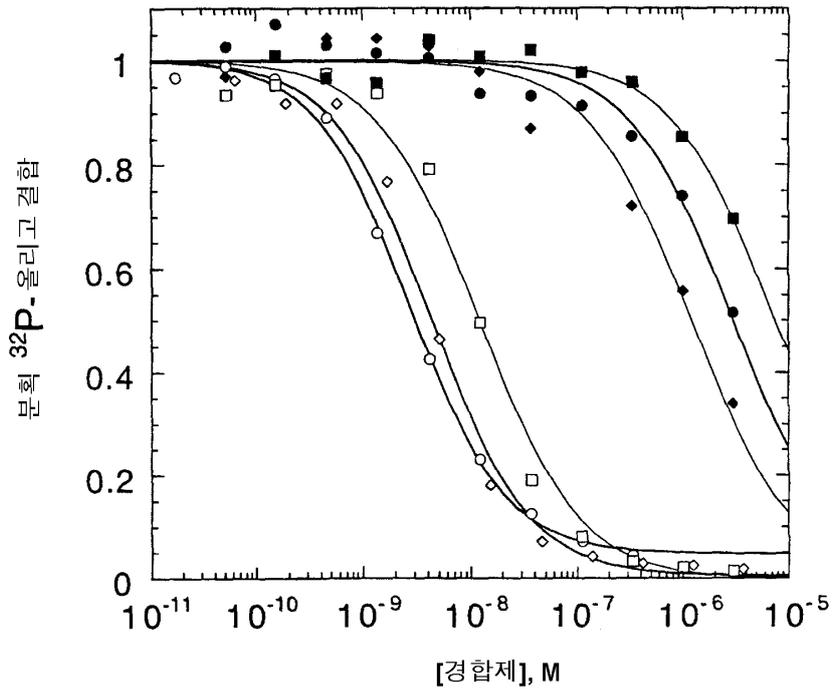
도면 1r



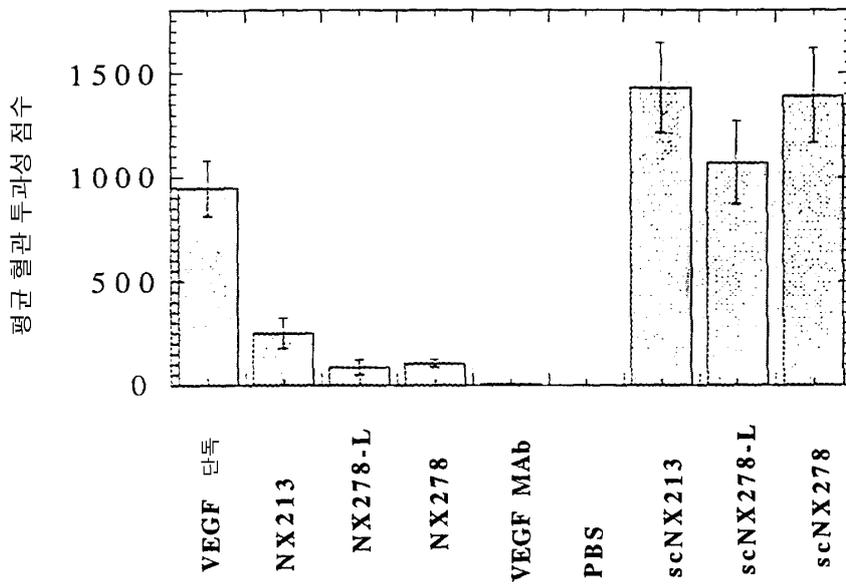
리간드 성분 =

5'-[C5 NH₂ link]-fCrAfUfUmAfCmAfCfCmGrAmAmGfUfUfUmAfCmGfUmGmAmGfUmAfUmG-3'3'dT-3'

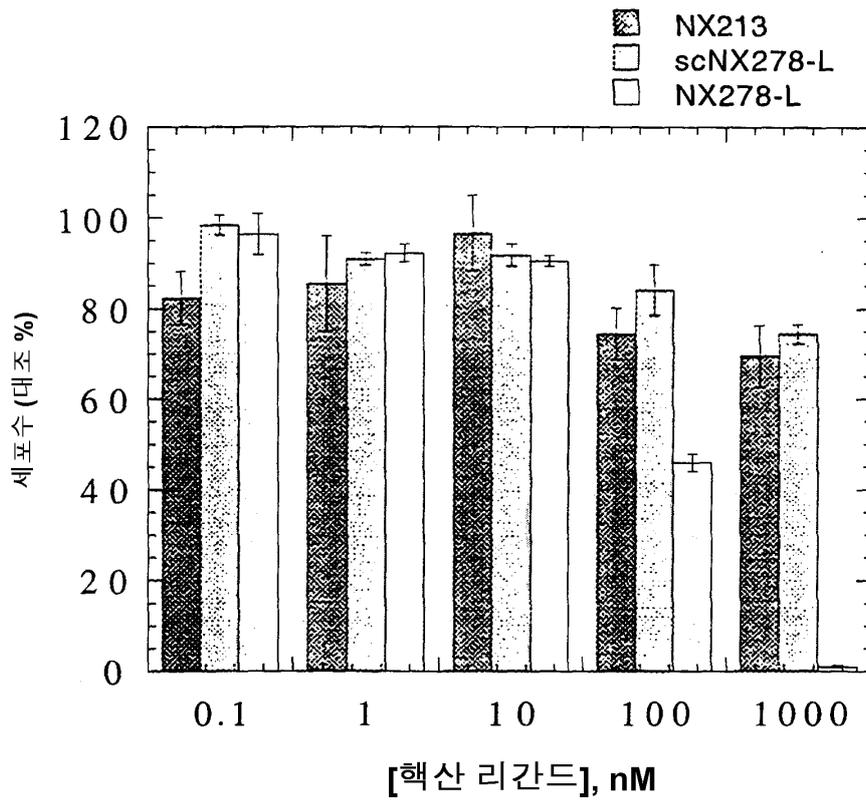
도면2



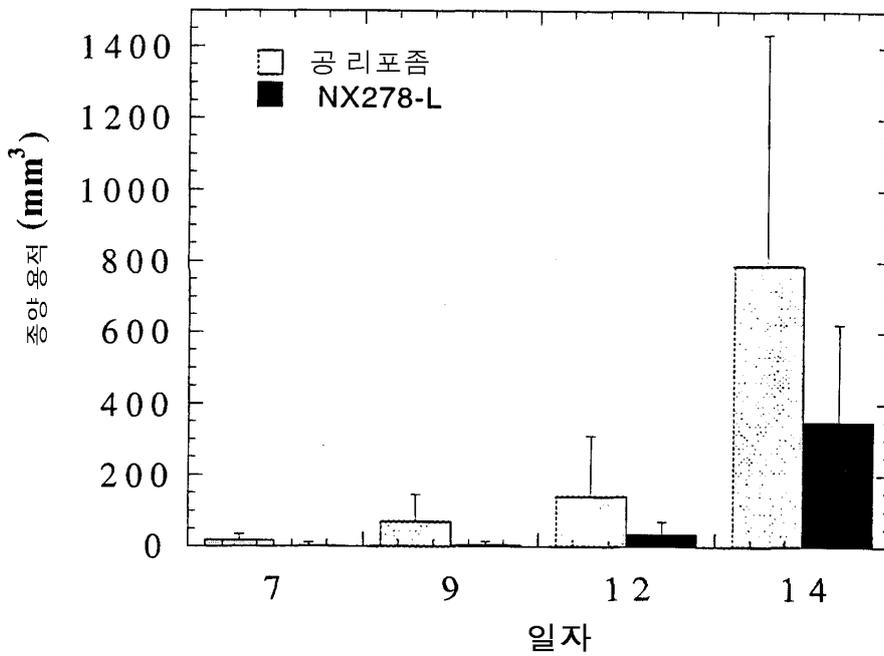
도면3



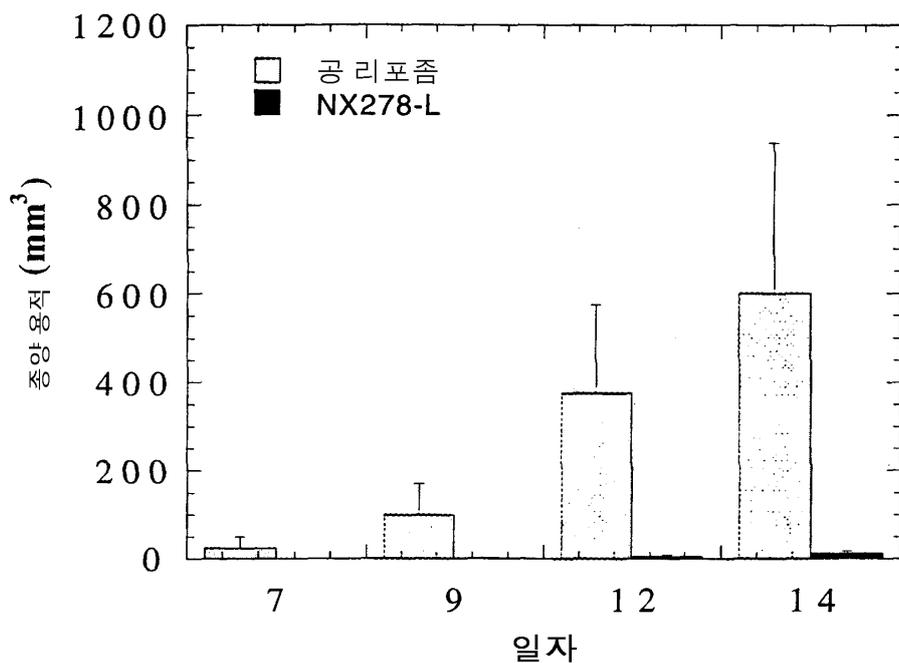
도면4



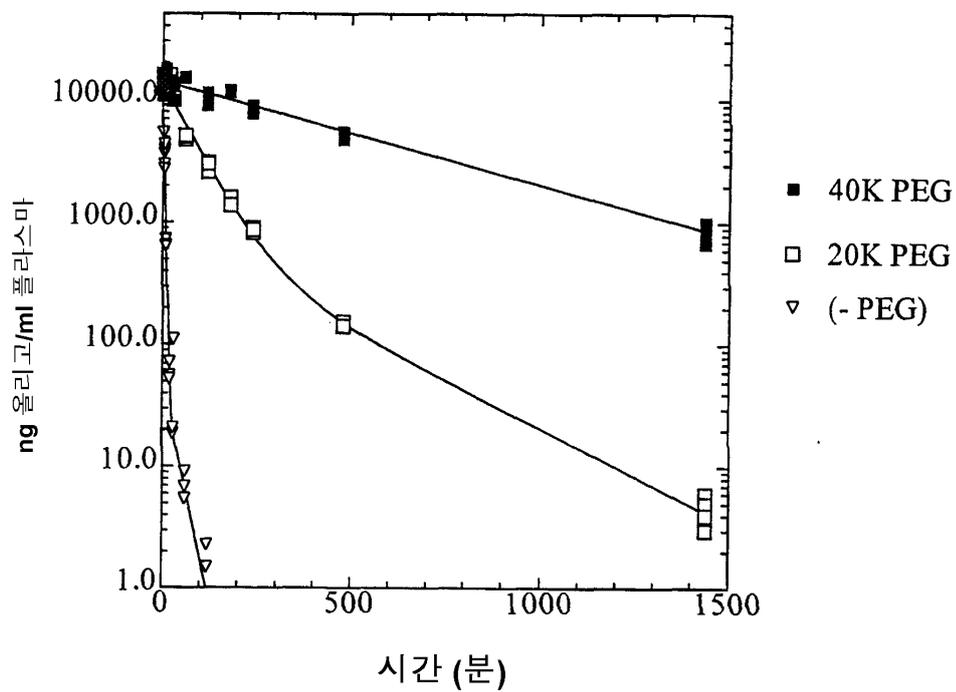
도면5a



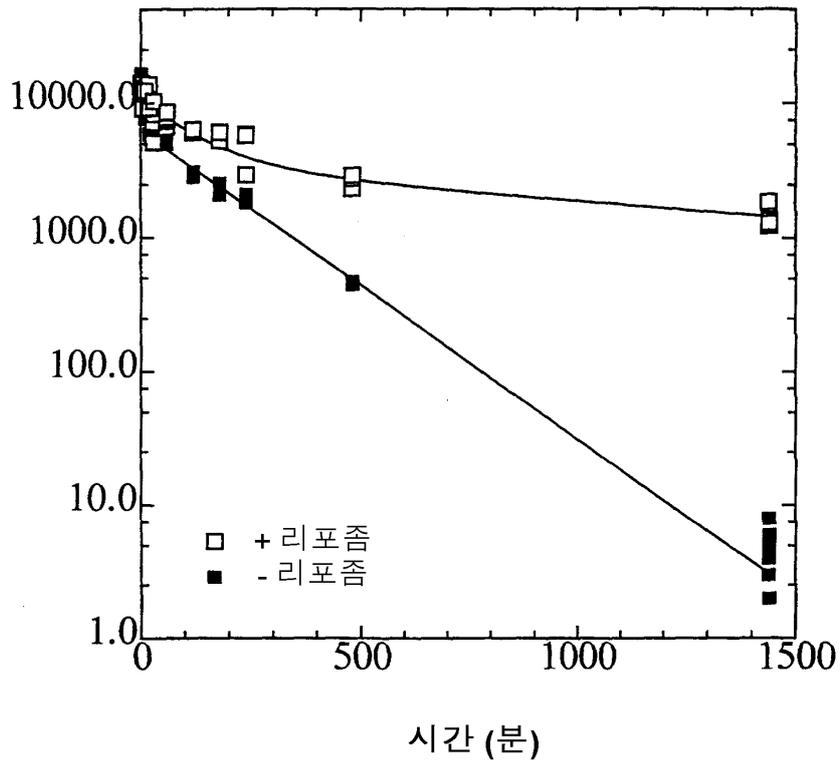
도면5b



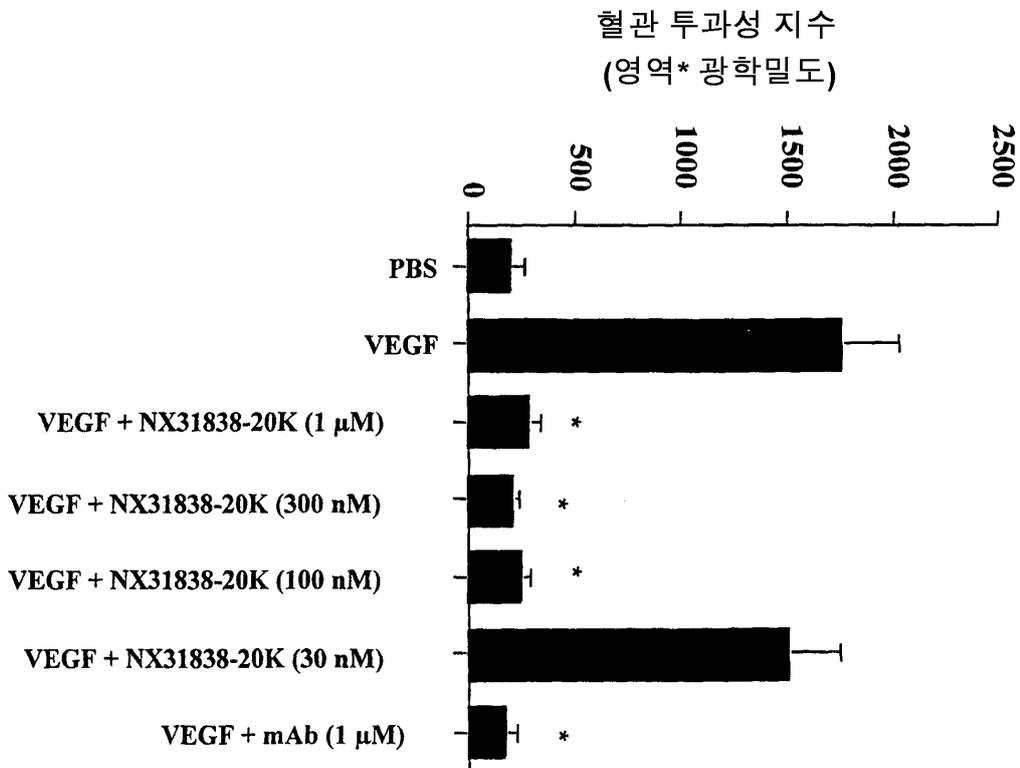
도면6



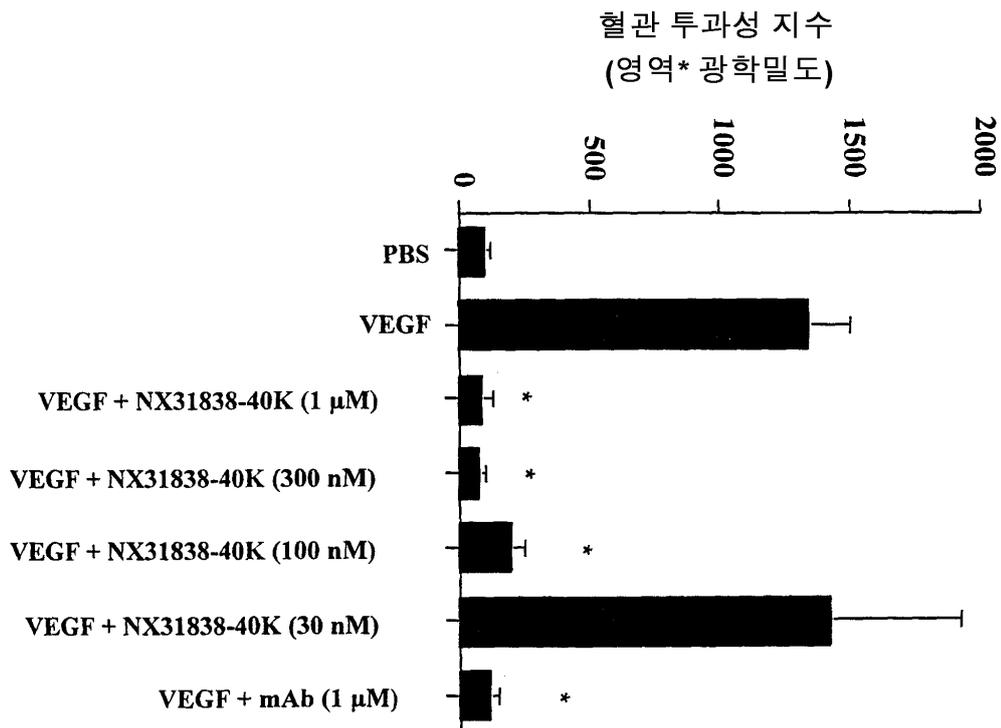
도면7



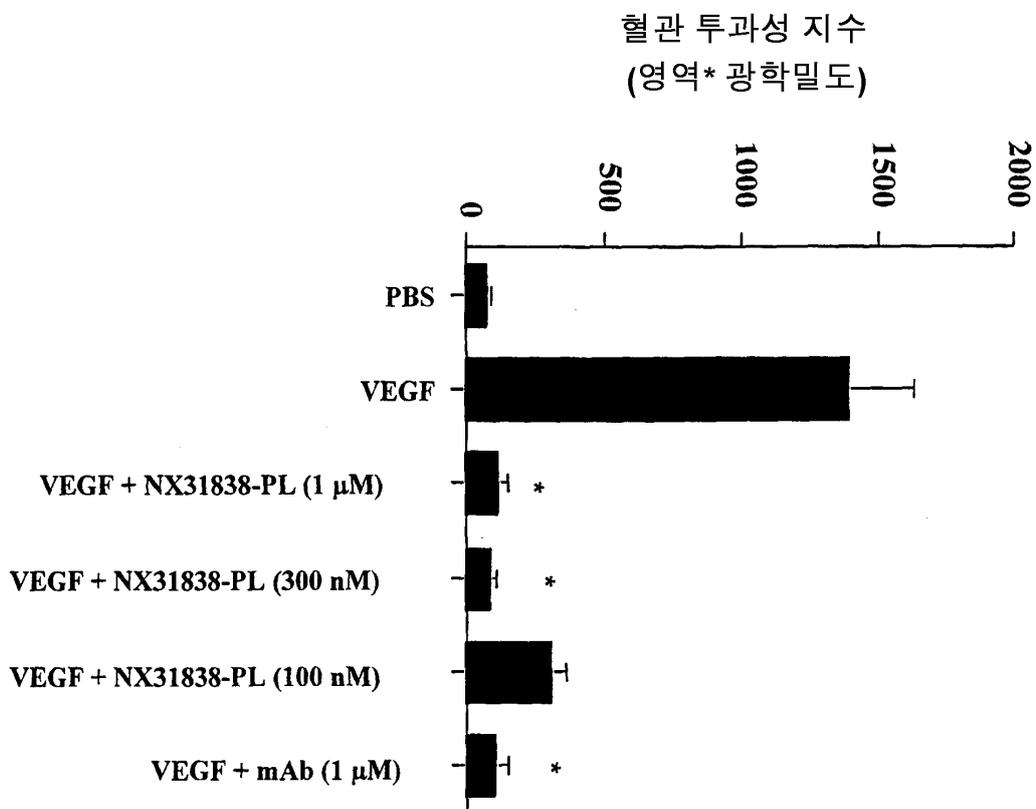
도면8a



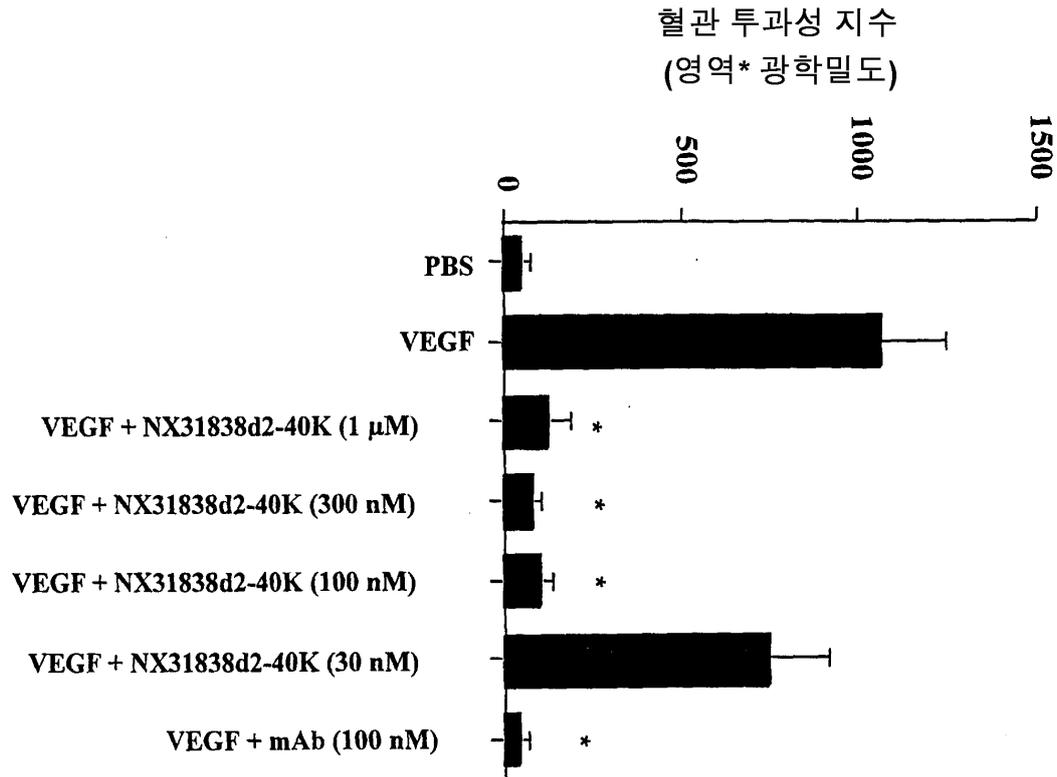
도면8b



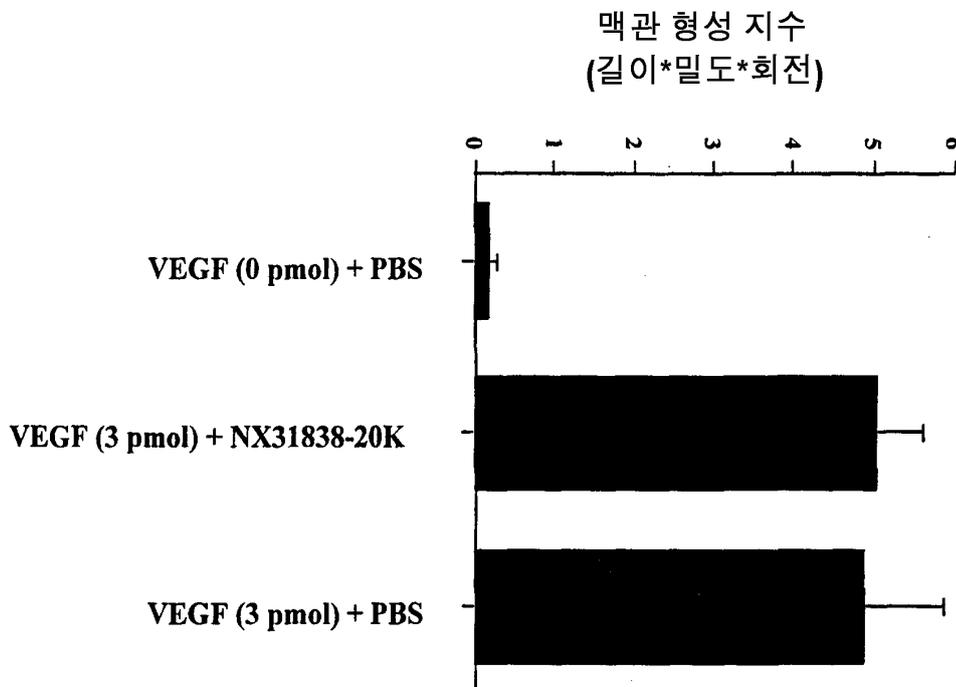
도면8c



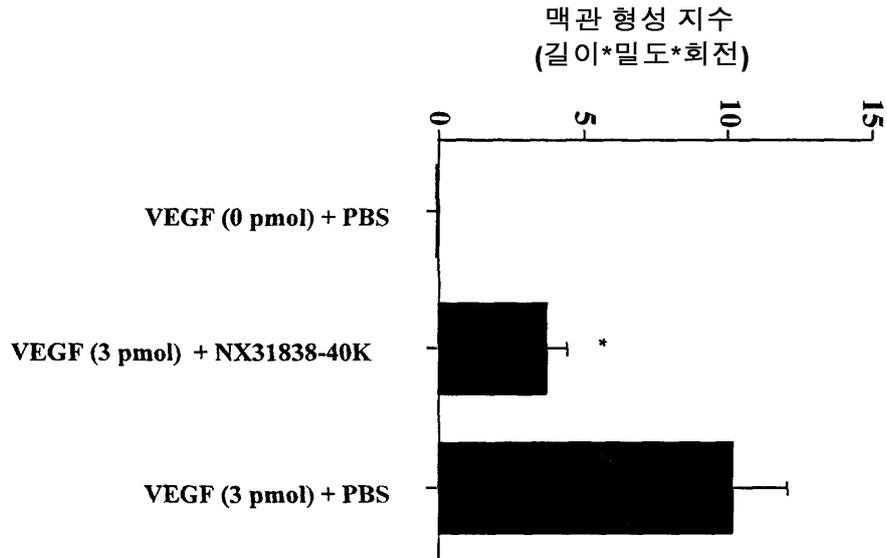
도면8d



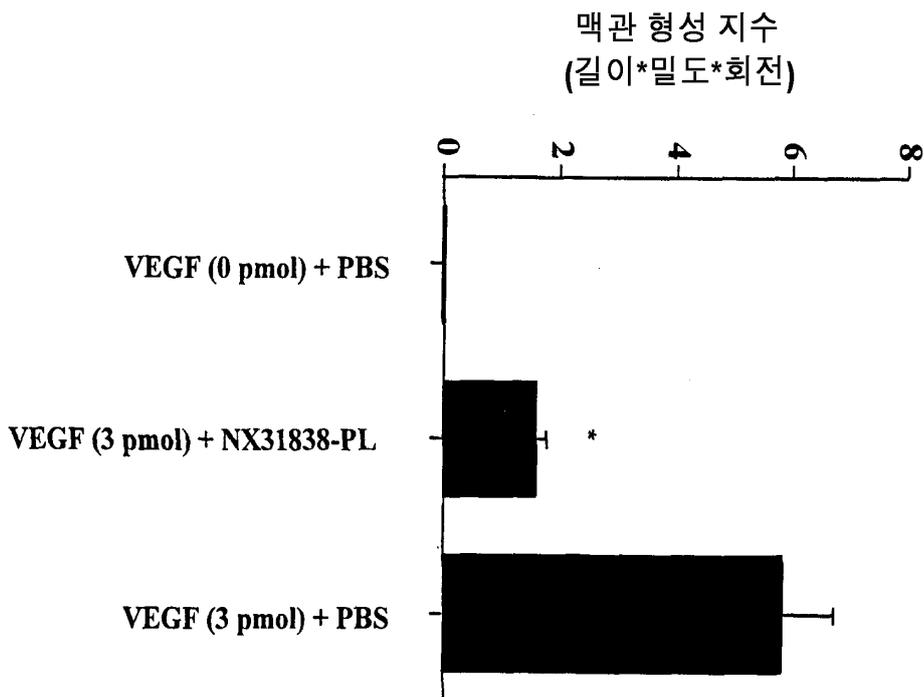
도면9a



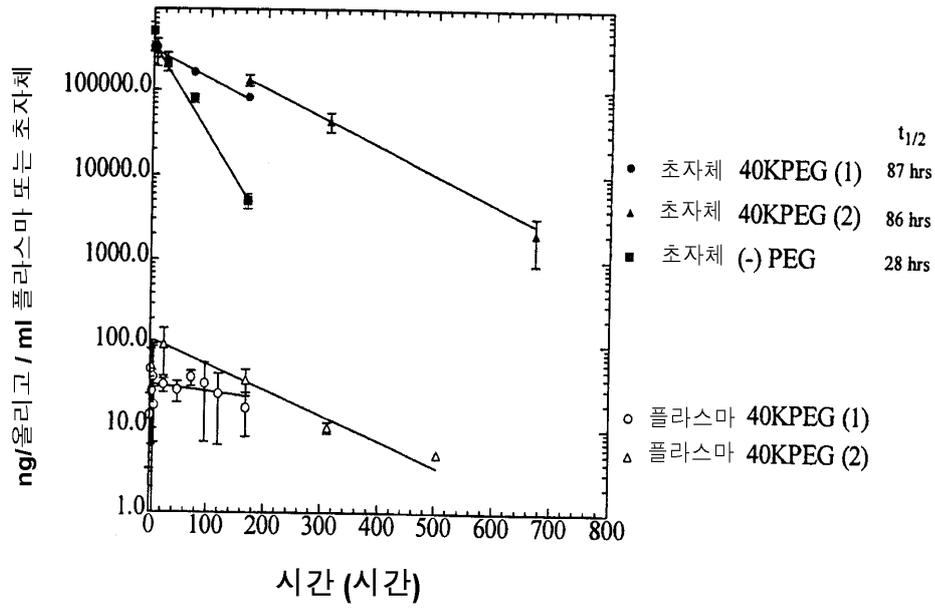
도면9b



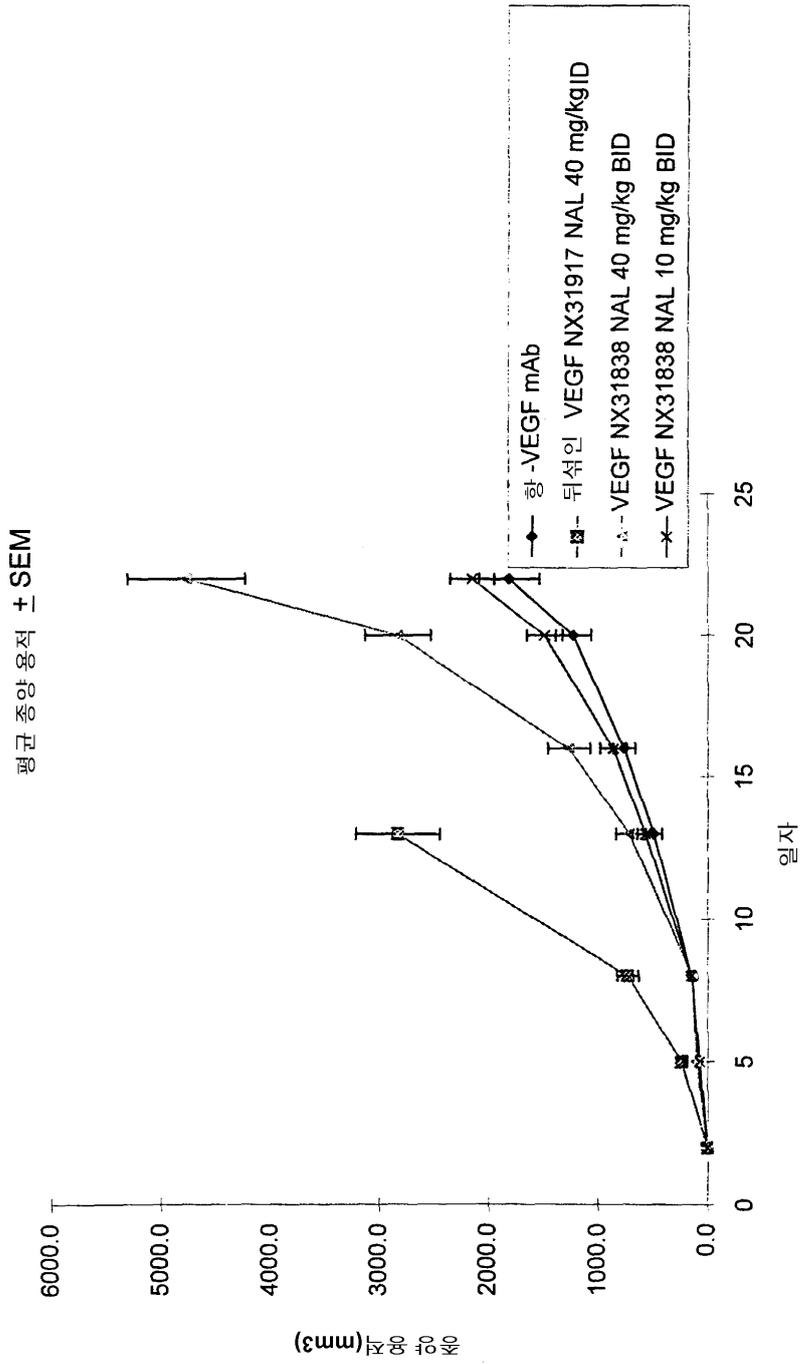
도면9c

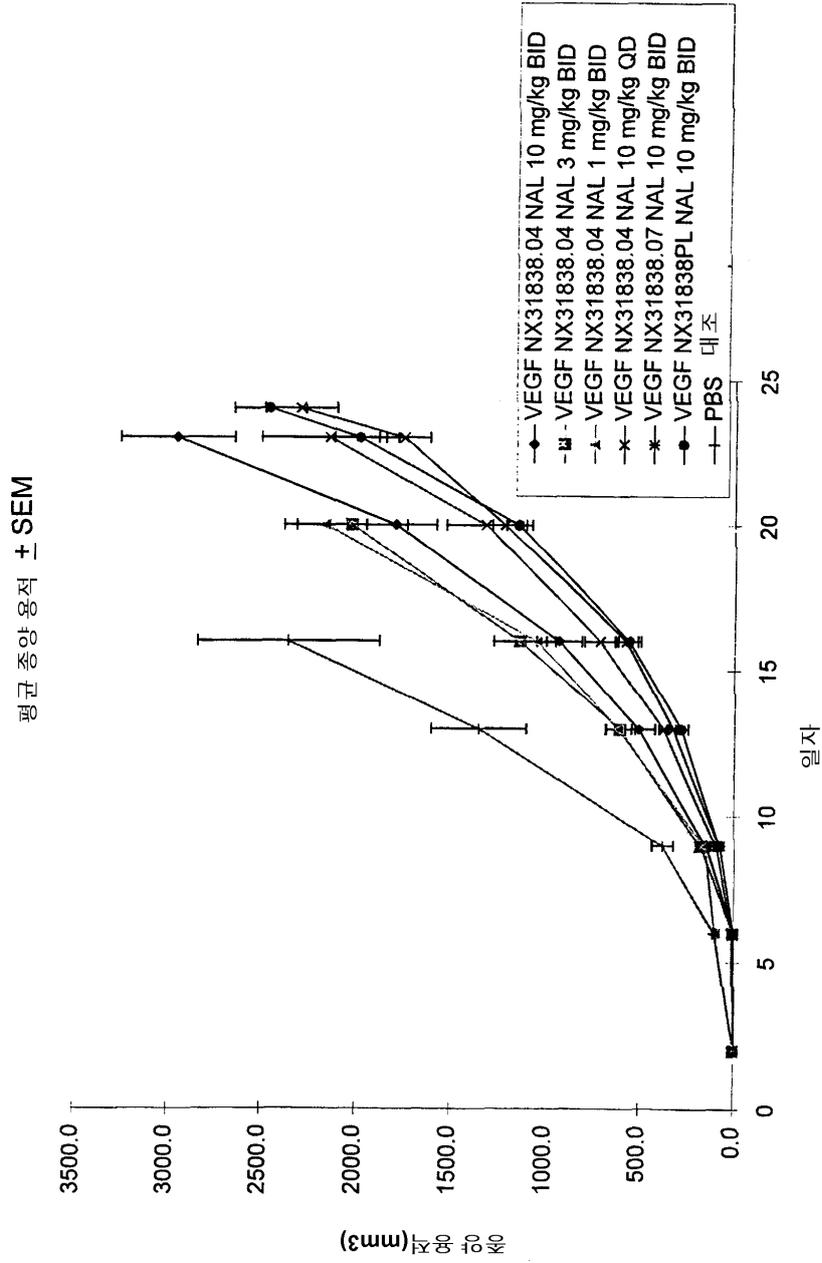


도면 10

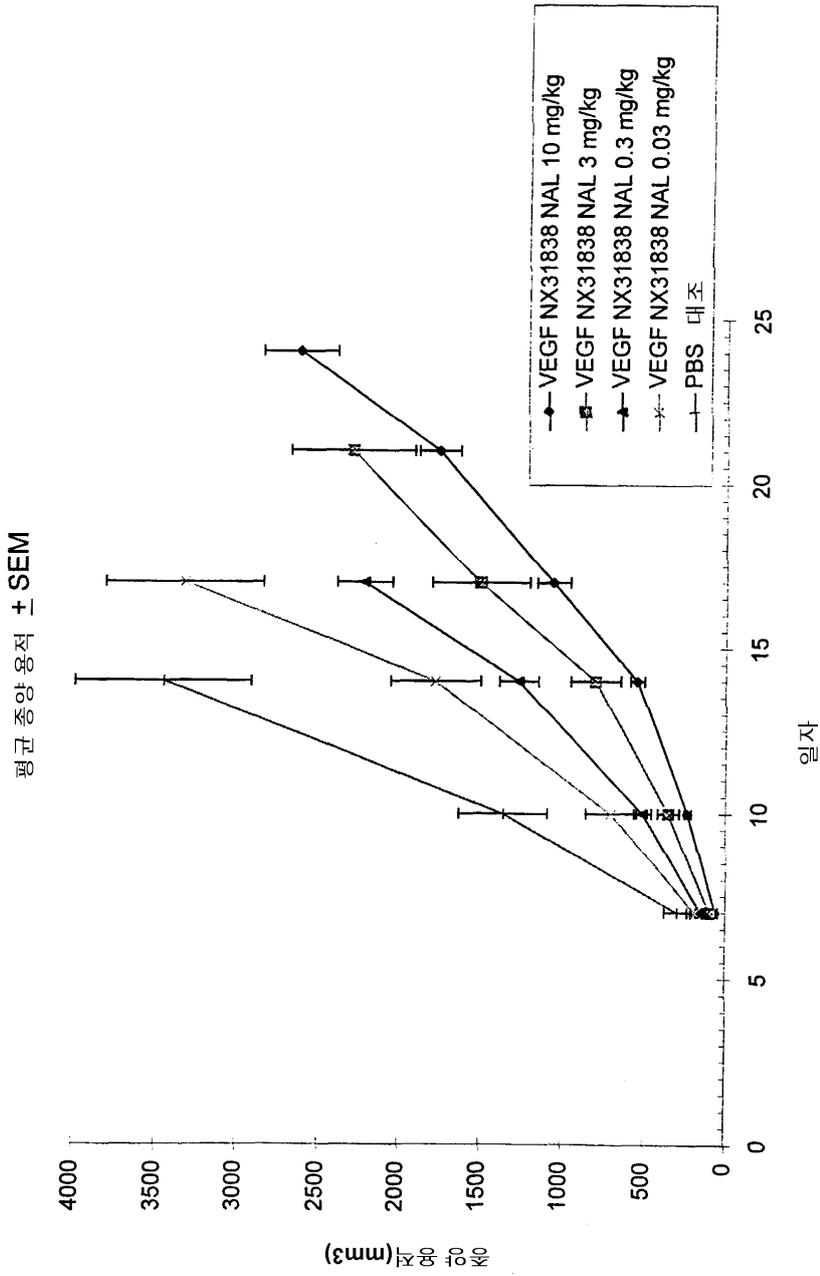


도면11

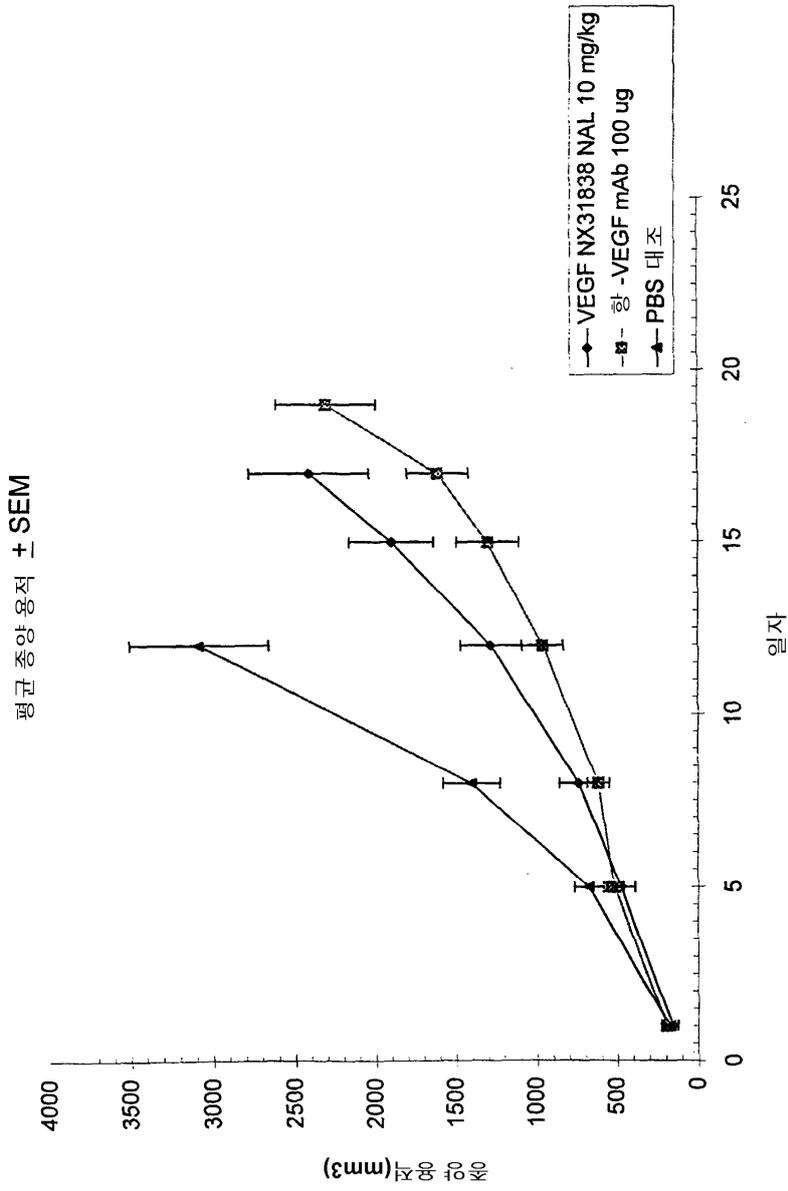




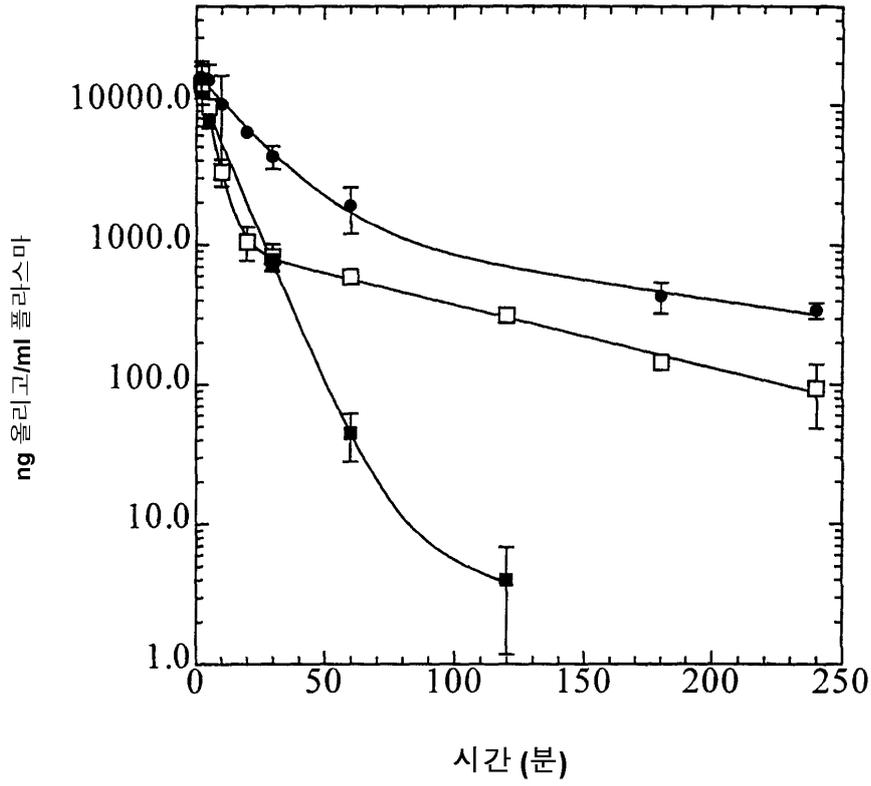
도면 13



도면 14



도면15



도면16

