



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년08월22일
(11) 등록번호 10-1176245
(24) 등록일자 2012년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7012303
(22) 출원일자(국제) 2005년11월09일
심사청구일자 2009년03월02일
(85) 번역문제출일자 2007년05월31일
(65) 공개번호 10-2007-0094891
(43) 공개일자 2007년09월27일
(86) 국제출원번호 PCT/DK2005/000721
(87) 국제공개번호 WO 2006/050734
국제공개일자 2006년05월18일
(30) 우선권주장
60/626,563 2004년11월09일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
Biochemical and Biophysical Research
Communications, Vol. 312, pp. 571-577 (2003)
FASEB J., Vol. 15, pp. 2715-2717 (2001)
W02003085110 A2

(73) 특허권자
엔존 파마슈티컬즈, 인코포레이티드
미합중국 뉴저지주 08854 피스카터웨이 킹스브릿지 로드 20
산타리스 팔마 에이/에스
덴마크 디케이-2970 홀슬름 코글 알레 6
(72) 발명자
라스무센 프랑크 원터
덴마크 디케이-4000 로스킬드 솔소르테베 6
웨스터가드 마켄
덴마크 디케이-3460 버커뢰드 엘레바켄 5
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강승옥, 김성기

전체 청구항 수 : 총 15 항

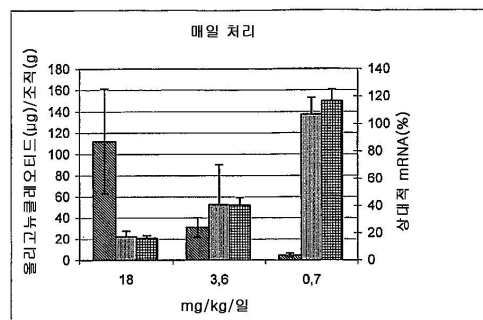
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 H I F - 1 a 발현의 억제를 위한 효능적 L N A 올리고뉴클레오타이드

(57) 요약

본 개시 내용은 하기 것들로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된 LNA 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다: 5'-(T_x)G_xG_xC_sA_sG_sC_sA_sT_sC_sC_sT_xG_xT-3' 및 5'-(G_x)T_xT_xA_sC_sT_sG_sC_sC_sT_sC_sT_xA-3' (여기에서, 대문자는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타내고, 소문자는 2-데옥시뉴클레오타이드를 나타내며, 밑줄은 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체 또는 2-데옥시뉴클레오타이드를 나타내고, 아랫첨자 "s"는 인접 뉴클레오타이드/LNA 뉴클레오타이드 유사체 간의 포스포로티오에이트 결합을 나타내며, 아랫첨자 "x"는 인접 뉴클레오타이드/LNA 뉴클레오타이드 유사체 간의 포스포로티오에이트 결합 또는 포스포로디에스테르 결합을 나타내고, 서열은 임의적으로 최대 5개의 2-데옥시뉴클레오타이드 단위만큼 연장됨). LNA 올리고뉴클레오타이드는 저산소 상태 유도성 인자-1α(HIF-1α)의 발현 조절, 특히 암 질환의 치료, 혈관신생의 억제, 아포토시스의 유도, 세포 증식의 예방, 또는 혈관신생성 질환, 예컨대 당뇨병성 망막증, 황반 변성(ARM D), 건선, 류마티스성 관절염 및 기타 염증성 질환의 치료에 유용하다.

대표도 - 도6a



● 간 내 올리고뉴클레오타이드의 양 [올리고뉴클레오타이드(μg)/간(g)] (우측 막대)
▨ (염수 처리군 대비) β-액틴 발현 대 마우스 HIF-1α mRNA 발현(중간축 막대)
□ (염수 처리군 대비) β-액틴 발현 대 마우스 VEGF mRNA 발현(좌측 막대)

(72) 발명자

한센 헨리크 프리덴룬드

덴마크 디케이-2610 뢰도브르 스트리트 타른베 33
에이

트루 살롯 알백

덴마크 디케이-1306 코펜하겐 케이 크론프린스세가
드 80 스트리트

(30) 우선권주장

60/647,186 2005년01월25일 미국(US)

60/699,721 2005년07월15일 미국(US)

60/724,621 2005년10월07일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 서열로 구성되는 LNA 올리고뉴클레오타이드:

5'-T_sG_sG_sC_sA_sA_sG_sC_sA_sT_sC_sC_sT_sG_sT_sA-3' (서열 번호 1)

(상기 서열에서, 대문자는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타내고, 소문자는 2-데옥시뉴클레오타이드를 나타내며, 아랫첨자 "s"는 인접 뉴클레오타이드/LNA 뉴클레오타이드 유사체 간의 포스포로티오에이트 결합을 나타냄).

청구항 2

제1항에 정의된 LNA 올리고뉴클레오타이드 및 상기 LNA 올리고뉴클레오타이드에 공유 결합된 하나 이상의 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 부분을 포함하는 집합체.

청구항 3

제1항에 정의된 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 제2항에 정의된 집합체와, 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 담체 또는 보조제를 포함하는, 암 치료에 사용되는 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 수성 담체를 포함하고, 상기 담체가 pH를 4.0 내지 8.5 범위로 유지시키고 이온 강도가 20 내지 2000 mM인 완충제를 포함하는 것인 암 치료에 사용되는 약제학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 안내 투여용이고, 암 치료에 사용되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 하나 이상의 화학요법제를 추가로 포함하는 암 치료에 사용되는 약제학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 암이 고형 종양의 형태인 약제학적 조성물.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 암이 간암, 두경부암, 다발성 골수종, 신장암, 자궁경부암, 결장암, 뇌암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 10

아테롬성 동맥경화증, 건선, 당뇨병성 망막증, 황반 변성, 류마티스성 관절염, 천식, 염증성 장 질환, 사마귀, 알레르기성 피부염, 염증 및 피부 염증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환을 치료하기 위한, 제1항에 정의된 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 제2항에 정의된 집합체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 질환이 염증성 장 질환, 건선 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 12

(a) 고체 형태의, 제1항에 정의된 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 제2항에 정의된 집합체를 함유하는 제1 성분,

및

(b) 상기 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 접합체의 재구성을 위한 염수 또는 완충제 용액을 함유하는 제2 성분을 포함하는 키트.

청구항 13

제5항에 있어서, 상기 압이 고형 종양의 형태인 약제학적 조성물.

청구항 14

제6항에 있어서, 상기 압이 고형 종양의 형태인 약제학적 조성물.

청구항 15

제5항에 있어서, 상기 압이 간암, 두경부암, 다발성 골수종, 신장암, 자궁경부암, 결장암, 뇌암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 16

제6항에 있어서, 상기 압이 간암, 두경부암, 다발성 골수종, 신장암, 자궁경부암, 결장암, 뇌암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 HIF-1 α 의 발현을 조절하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 HIF-1 α 를 코딩하는 핵산과 특이적으로 혼성화 가능한 LNA 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. LNA 올리고뉴클레오티드가 HIF-1 α 의 발현을 조절한다는 것을 확인하였으며, 그것의 억제학적 제제 및 암 질환, 염증성 질환 및 안질환의 치료제로서의 그것의 용도에 관해 개시한다.

배경기술

[0002] 고형 종양은 혈액 공급을 확립하고, 증진된 포도당 대사를 가져, 수 밀리미터를 초과하여 성장해야 한다. 그것이 어떻게 저산소 상태를 감지하고, 저산소 상태-유도성 유전자를 활성화하여 혈관신생 인자를 분비하여 혈계를 확립하는지는, 암 생물학에 있어 중추적이다. 많은 종양들이 저산소 상태의 미세환경을 가지고, 이는 악성 진행, 전이 및 방사선요법 및 화학요법에 대한 내성과 관련되었다.

[0003] 저산소 상태 유도성 인자-1(HIF-1)의 발견으로 인해 저산소 상태 유도성 유전자의 조절을 어느 정도 통찰할 수 있게 되었다(US 5,882,914, 및 WO 96/39426; WO 99/48916). HIF-1은 2개의 서브유닛 HIF-1 α (본원에서 "HIF-1 α "로도 일컬어지는 HIF-1 α 와) 및 HIF-1 β 로 구성되고, 그것은 혈관신생 인자, 예컨대 VEGF 및 해당(glycolysis)-관련 단백질, 예컨대 해당 효소 및 포도당 수송체 1 및 3(GLU-1 및 3)을 코딩하는 유전자의 인핸서 내의 1 저산소 상태-반응 요소(HRE)에 결합한다.

[0004] 안티센스 HIF-1 α 플라스미드의 종양 내 유전자 전달에 의한 HIF-1 α 의 조작된 하향 조절이 VEGF의 하향 조절, 및 감소된 종양 미세혈관 밀도를 초래한다는 것이 입증되었다(WO 00/76497, Sun X et al, Gene Therapy (2001) 8, 638-645). 플라스미드는 HIF-1 α 의 5'-말단을 코딩하는 320-bp cDNA 단편을 함유하였다(Nucleotides 152-454;

Genebank AF003698).

[0005] WO 2003/085110은 인간 HIF-1a 발현을 하향 조절하는 LNA 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 나타낸다. 한 화합물은 CUR813(서열 번호 11)로 칭해진다.

[0006] 본 발명은 CUR813(서열 번호 11)보다 효능있는 LNA 올리고뉴클레오타이드를 개시하였다. 또한, 본 발명에 따른 특정 LNA 올리고뉴클레오타이드는 아포토시스를 유도하고, 증식을 억제한다. 또한, 마우스 HIF-1a에 대해 100% 서열 일치도를 가지는 LNA 올리고뉴클레오타이드는 마우스의 간, 결장 및 신장 내 HIF-1a 발현을 하향 조절한다.

[0007] **발명의 개요**

[0008] 본 발명은 HIF-1a의 발현을 조절하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 HIF-1a를 표적화하는 2개 특정 모티프에 걸쳐 있는 LNA 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다. 이 모티프는 서열 번호 3 및 4로 개시되어 있다. 특히 바람직한 LNA 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 1 및 서열 번호 2이다. 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드는 HIF-1a mRNA 발현 및 단백질 수준의 효능적 억제제이다.

[0009] 보다 특히, 본 발명은 하기 것들로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된 LNA 올리고뉴클레오타이드를 제공한다:

[0010] 5'-(T_x)G_xG_xC_sA_sA_sG_sC_sA_sT_sC_sC_sT_xG_xT-3' (서열 번호 3)

[0011] 및

[0012] 5'-(G_x)T_xT_xA_sC_sT_sG_sC_sC_sT_sT_sC_sT_xA-3' (서열 번호 4)

[0013] (상기 서열에서, 대문자는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타내고, 소문자는 2-데옥시뉴클레오타이드를 나타내며, 밑줄은 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체 또는 2-데옥시뉴클레오타이드를 나타내고, 아랫첨자 "s"는 인접 뉴클레오타이드/LNA 뉴클레오타이드 유사체 간의 포스포로티오에이트 결합을 나타내며, 아랫첨자 "x"는 인접 뉴클레오타이드/LNA 뉴클레오타이드 유사체 간의 포스포로티오에이트 결합 또는 포스포로디에스테르 결합을 나타내고, 여기에서 괄호 안의 뉴클레오타이드 단위, (T_x), (T) 또는 (G_x), (A)는 각기 임의적 단위를 나타내고,

[0014] 서열은 임의적으로 최대 5개의 2-데옥시뉴클레오타이드 단위만큼 연장됨).

[0015] 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 억제학적 조성물이 또한 제공된다. 또한, 세포 또는 조직 내의 HIF-1a의 발현을 조절하는 방법으로서, 상기 세포 또는 조직을 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 조성물 중 하나 이상과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 치료 또는 예방적으로 유효량의 하나 이상의, 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 조성물 중 하나 이상을 투여함으로써, HIF-1a의 발현과 관련된, 질환 또는 병태에 걸렸거나 걸리기 쉬운 것으로 의심되는 동물 또는 인간을 치료하는 방법이 또한 개시된다. 또한, HIF-1a 발현의 억제 및 HIF-1a 활성 관련 질환의 치료를 위한 LNA 올리고뉴클레오타이드의 이용 방법이 제공된다.

발명의 상세한 설명

[0049] 본 발명은 HIF-1a를 코딩하는 핵산 분자의 기능을 조절하는데 사용하기 위한 특별한 LNA 올리고뉴클레오타이드, 즉 서열 번호 3 및 서열 번호 4의 서열을 포함하는 LNA 올리고뉴클레오타이드를 사용한다. 조절은 궁극적으로 HIF-1a 생성량의 변화이다. 한 실시양태에서, 이는 특히 HIF-1a를 코딩하는 핵산과 특별히 혼성화하는 안티센스 LNA 올리고뉴클레오타이드를 제공함으로써 달성된다. 조절은 바람직하게 HIF-1a의 발현의 억제이고, 이는 생성되는 기능성 HIF-1a 단백질의 개수를 감소시키게 된다.

[0050] *LNA 올리고뉴클레오타이드*

[0051] 보다 특히, 본 발명은 하기 것들로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된 LNA 올리고뉴클레오타이드를 제공한다:

[0052] 5'-(T_x)G_xG_xC_sA_sA_sG_sC_sA_sT_sC_sC_sT_xG_x(T)-3' (서열 번호 3)

[0053] 및

[0054] 5'-(G_x)T_xT_xA_sC_sT_sG_sC_sC_sT_sT_sC_sT_x(A)-3' (서열 번호 4)

[0055] (상기 서열에서, 대문자는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타내고, 소문자는 2-데옥시뉴클레오타이드를

나타내며, 밑줄은 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체 또는 2-데옥시뉴클레오타이드를 나타내고, 아랫첨자 "s"는 인접 뉴클레오타이드/LNA 뉴클레오타이드 유사체 간의 포스포로티오에이트 결합을 나타내며, 아랫첨자 "x"는 인접 뉴클레오타이드/LNA 뉴클레오타이드 유사체 간의 포스포로티오에이트 결합 또는 포스포로디에스테르 결합을 나타내고, 여기에서 괄호 안의 뉴클레오타이드 단위, (T_x), (T) 또는 (G_x), (A)는 각기 임의적 단위를 나타내고,

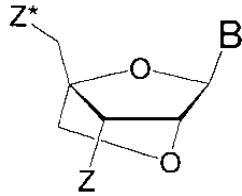
- [0056] 서열은 임의적으로 최대 5개의 2-데옥시뉴클레오타이드 단위만큼 연장됨).
- [0057] 용어 "본원에 정의된 LNA 올리고뉴클레오타이드", "본 발명에 따른 LNA 올리고뉴클레오타이드" 등은 하기에 제공되는 실시양태, 변형양태, 염, 프로드러그 등을 비롯한, 상기 정의된 "LNA 올리고뉴클레오타이드"를 가리킨다.
- [0058] 서열 번호 3 및 서열 번호 4에 기초한, 상기 정의된 LNA 올리고뉴클레오타이드는 13-20 뉴클레오타이드 단위의 길이를 가진다. 13의 최소의 서열 길이는, 괄호 안의 뉴클레오타이드 단위, (T_x), (T) 또는 (G_x), (A)가 각기 부재할 때 수득되고, 20의 최대의 서열 길이는 괄호 안의 뉴클레오타이드 단위, (T_x), (T) 또는 (G_x), (A)가 각기 존재하고, 또한 서열 번호 3 또는 서열 번호 4의 서열이 5개 2-데옥시뉴클레오타이드 단위만큼 연장될 때 수득된다.
- [0059] 한 실시양태에서, 괄호 안의 뉴클레오타이드 단위, (T_x), (T) 또는 (G_x), (A)는 각기 부재하고, 여기에서 더욱 바람직한 또 다른 실시양태에서는, 괄호 안의 뉴클레오타이드 단위, (T_x), (T) 또는 (G_x), (A)는 각기 존재한다. 또한, 5'-말단 임의적 단위, (T_x) 또는 (G_x)가 각기 존재하고, 3'-말단 임의적 단위, (T) 또는 (A)가 각기 부재하는 실시양태, 및 5'-말단 임의적 단위, (T_x) 또는 (G_x)가 각기 부재하고, 3'-말단 임의적 단위, (T) 또는 (A)가 각기 존재하는 실시양태가 유익하다.
- [0060] 상기 서열 번호 3 및 서열 번호 4 내 밑줄친 뉴클레오타이드 단위에 대한 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체 또는 2-데옥시뉴클레오타이드의 선택은 덜 결정적인 것으로 보인다. 그러나, 한 실시양태에서, 양 밑줄친 뉴클레오타이드 단위는 2-데옥시뉴클레오타이드를 나타낸다. 여기에서 더욱 바람직한 또 다른 실시양태에서, 양 밑줄친 뉴클레오타이드 단위 중 하나 또는 모두는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타낸다.
- [0061] 한 변형양태에서, 괄호 안의 5'-말단 뉴클레오타이드 단위, (T_x) 또는 (G_x)는 각기 부재하고, 3'-말단의 다른 밑줄친 뉴클레오타이드 단위, (T) 또는 (A)는 각기 2-데옥시뉴클레오타이드, 또한 더욱 바람직하게는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타낸다.
- [0062] 또 다른 변형양태에서, 5'-말단 괄호 안의 뉴클레오타이드 단위, (T_x) 또는 (G_x)는 각기 2-데옥시뉴클레오타이드, 또한 더욱 바람직하게는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타내고, 3'-말단의 다른 밑줄친 뉴클레오타이드 단위, (T) 또는 (A)는 각기 부재한다.
- [0063] 또 다른 변형양태에서, 괄호 안의 뉴클레오타이드 단위는 부재하고, 양 밑줄친 뉴클레오타이드 단위 중 하나 또는 모두는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타내는데, 즉 (i) 5'-말단 밑줄친 뉴클레오타이드는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타내고, 3'-말단 밑줄친 뉴클레오타이드 단위는 2-데옥시뉴클레오타이드를 나타내거나; (ii) 3'-말단 밑줄친 뉴클레오타이드는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타내고, 5'-말단 밑줄친 뉴클레오타이드 단위는 2-데옥시뉴클레오타이드를 나타내거나; (iii) 3'-말단 및 5'-말단 밑줄친 뉴클레오타이드는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타낸다.
- [0064] 다른 한 변형 양태에서, 괄호 안의 뉴클레오타이드 단위, (T_x) 또는 (G_x)는 각기 존재하고, 양 밑줄친 뉴클레오타이드 단위 모두는 2-데옥시뉴클레오타이드를 나타낸다.
- [0065] 서열 번호 3 및 서열 번호 4로 표시되는 서열(보다 구체적으로는 서열 번호 1 및 서열 번호 2(이하 참고)로 표시되는 서열)이 정의된 LNA 올리고뉴클레오타이드의 전체 기능성을 실질적으로 나타내는 것으로 판단되나, 서열 번호 3 및 서열 번호 4의 최대 5개의 2-데옥시뉴클레오타이드 단위, 예컨대 1개 단위, 2개 단위, 3개 단위, 4개 단위, 또는 심지어는 5개 단위의 연장은 염기 서열, 서열 번호 3 및 서열 번호 4의 이로온 성질에 해로운 영향을 미치지 않고도 가능한 것으로 판단된다. 이에 따라, 서열은 3'-말단부, 5'-말단부, 또는 3'-말단부 및 5'-말단부에서 연장될 수 있으나, 단 2-데옥시뉴클레오타이드 단위의 총수는 5를 초과하지 않는다.
- [0066] 이에 따라, 한 실시양태에서(상기와 조합될 수 있음), LNA 올리고뉴클레오타이드는 2-데옥시뉴클레오타이드 및 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체로부터 선택되는 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 뉴클레오타이드 단위로 구성되고, 특히 LNA 올리고뉴클레오타이드는 2-데옥시뉴클레오타이드 및 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체로부

터 선택되는 16개 뉴클레오타이드 단위로 구성된다. 다른 실시양태들에서(상기와 조합될 수 있음), LNA 올리고뉴클레오타이드는 2-데옥시뉴클레오타이드 및 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체로부터 선택되는 13, 14, 15, 또는 16개 뉴클레오타이드 단위로 구성되고, 특히 LNA 올리고뉴클레오타이드는 2-데옥시뉴클레오타이드 및 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체로부터 선택되는 14 또는 15개 뉴클레오타이드 단위로 구성된다.

- [0067] 적어도 LNA 올리고뉴클레오타이드의 제조 편의성을 위해, 서열이 3'-말단에서 하나의 2-데옥시뉴클레오타이드 단위만큼 연장되는 것이 종종 바람직하며, 예컨대 하기 서열 번호 1 및 서열 번호 2를 참고한다. 더욱 바람직하게는, 서열 번호 3이 3'-말단에서 하나의 아데노신 2-데옥시뉴클레오타이드 단위만큼 연장되고, 서열 번호 4는 3'-말단에서 하나의 시토신 2-데옥시뉴클레오타이드 단위만큼 연장된다.
- [0068] 상기 언급된 바와 같이, 아랫첨자 "s"는 인접 뉴클레오타이드/LNA 뉴클레오타이드 유사체 간의 포스포로티오에이트(-O-P(O,S)-O-) 결합을 나타내고, 아랫첨자 "x"는 인접 뉴클레오타이드/LNA 뉴클레오타이드 유사체 간의 포스포로티오에이트(-O-P(O,S)-O-) 결합 또는 포스포로디에스테르(-O-P(O)₂-O-) 결합을 나타낸다. 이에 따라, 서열이 연장되도록 하는 임의의 2-데옥시는 포스포로티오에이트(-O-P(O,S)-O-) 결합 또는 포스포로디에스테르(-O-P(O)₂-O-) 결합에 의해 연결될 수 있게 된다.
- [0069] 서열 번호 3의 부분서열 c_sa_sa_sg_sc_sa_st_sc_sc_sT, 및 서열 번호 4의 부분서열 a_sc_st_sg_sc_sc_st_sc_sT는 완전히 포스포리티올화된 것으로 표시되어 있다(아랫첨자 "s" 참조). 여기에서 바람직한 것은 아니나, 포스포로티오에이트 결합 중 하나, 또한 가능하게는 2개가 LNA 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 심하게 저해하지 않도록 다른 결합, 특히 포스포로디에스테르 결합으로 대체될 수 있는 것으로 생각된다. 따라서, 포스포로티오에이트 결합 중 1개 또는 2개가, 예컨대 포스포로디에스테르 결합으로 대체되는 상기와 같은 변형체 역시 본 발명이 의도하는 범주 내에 속한다.
- [0070] 그러나, 여기에서 바람직한 한 실시양태에서, 서열 내의 모든 뉴클레오타이드 단위는 포스포로티오에이트기에 의해 연결된다.
- [0071] 특히 이로운 LNA 올리고뉴클레오타이드의 한 하위군은 하기의 것들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것들이다:
- [0072] 5'-T_sG_sG_sc_sa_sa_sg_sc_sa_st_sc_sc_sT_sG_sT_sa-3'(서열 번호 1),
- [0073] 5'-T_sG_sG_sc_sa_sa_sg_sc_sa_st_sc_sc_sT_sG_sT-3'(서열 번호 15), 및
- [0074] 5'-G_sG_sc_sa_sa_sg_sc_sa_st_sc_sc_sT_sG_st-3'(서열 번호 16).
- [0075] 이들 중,
- [0076] 5'-T_sG_sG_sc_sa_sa_sg_sc_sa_st_sc_sc_sT_sG_sT_sa-3'(서열 번호 1)이 여기에서 가장 바람직하다.
- [0077] 특히 이로운 LNA 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 하위군은 하기의 것들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것들이다:
- [0078] 5'-G_sT_sT_sa_sc_st_sg_sc_sc_st_st_sc_sT_sT_sA_sc-3'(서열 번호 2),
- [0079] 5'-G_sT_sT_sa_sc_st_sg_sc_sc_st_st_sc_sT_sT_sA-3'(서열 번호 17), 및
- [0080] 5'-T_sT_sa_sc_st_sg_sc_sc_st_sc_sT_sT_sa-3'(서열 번호 18).
- [0081] 이들 중,
- [0082] 5'-G_sT_sT_sa_sc_st_sg_sc_sc_st_st_sc_sT_sT_sA_sc-3'(서열 번호 2)이 여기에서 가장 바람직하다.
- [0083] 본 문맥에서, 용어 "뉴클레오시드"는 그것의 통상적 의미로 사용되는데, 즉 그것은 1번 탄소를 통해 질소계 염기 아데닌(A), 시토신(C), 티민(T), 우라실(U) 또는 구아닌(G) 중 하나에 결합된 2-데옥시리보스 또는 리보스 단위를 함유한다.
- [0084] 유사한 방식으로, 용어 "뉴클레오타이드"는 1번 탄소를 통해 질소계 염기 아데닌(A), 시토신(C), 티민(T), 우라실(U) 또는 구아닌(G) 중 하나에 결합되고, 5번 탄소를 통해 뉴클레오시드 간 인산염기, 또는 말단기에 결합된 2-데옥시리보스 또는 리보스 단위를 의미한다.

[0085] 용어 "핵산"은 2개 이상의 뉴클레오타이드의 공유 결합에 의해 형성된 분자로 정의된다. 용어 "핵산"과 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호 교환하여 사용될 수 있다. 용어 "핵산 유사체"는 비천연 핵산 결합 화합물을 가리킨다. 용어 "LNA 단량체"는 전형적으로 본원에 각기 참고로 인용되는 국제 특허 출원 WO 99/14226 및 후속 출원 WO 00/56746, WO 00/56748, WO 00/66604, WO 00/125248, WO 02/28875, WO 2002/094250 및 WO 03/006475에 기재된 이환 뉴클레오타이드 유사체를 가리킨다.

[0086] 베타-D-옥시-LNA는 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드에 사용되는 LNA 뉴클레오타이드 유사체이고, 그 단량체 구조(뉴클레오타이드)가 식 1에 나와 있다.



[0087]

[0088] 베타-D-옥시-LNA

[0089] 식 1

[0090] 식 1에서, Z* 및 Z는 인접 뉴클레오타이드 또는 말단기(즉, 5'-말단기 또는 3'-말단기)에의 뉴클레오타이드 간 결합의 위치를 나타낸다.

[0091] 베타-D-옥시-LNA 단량체의 한 구체적 예는 티미딘 LNA 단량체(LNA 뉴클레오타이드 유사체)(1S,3R,4R,7S)-7-히드록시-1-히드록시메틸-5-메틸-3-(티민-1-일)-2,5-디옥사-비시클로[2:2:1]헵탄, 즉 T-베타-D-옥시-LNA이다.

[0092] 용어 "올리고뉴클레오타이드"는, 본 발명의 문맥에서, 당업계에 공지된 것들의, 올리고머(올리고라도고 불림) 또는 핵산 중합체(예컨대, 리보핵산(RNA) 또는 데옥시리보핵산(DNA)), 또는 핵산 유사체, 바람직하게는 고정(locked) 핵산(LNA), 또는 이들의 혼합물을 가리킨다. 이 용어에는 천연 발생 뉴클레오타이드, 당 및 뉴클레오타이드 간(골격) 연결기로 구성된 올리고뉴클레오타이드, 및 특정 향상된 기능을 가지거나 유사하게 기능하는 비천연 발생 부분을 갖는 올리고뉴클레오타이드가 포함된다. 완전 또는 부분 변형 또는 치환된 올리고뉴클레오타이드는 그러한 올리고뉴클레오타이드의 수가지 바람직한 성질들, 가령 예컨대 세포막 투과능, 세포외 및 세포내 뉴클레아제에 대한 양호한 내성, 고 친화성 및 핵산 표적에 대한 특이성으로 인해 천연 형태보다 종종 바람직하다. 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드는 상기 성질들을 나타낸다.

[0093] 용어 "단위" 및 "뉴클레오타이드 단위"는 단량체, 즉 2-데옥시뉴클레오타이드 또는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오타이드 유사체로 이해되어 진다.

[0094] 용어 "하나 이상"은 1 이상의 정수, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 등을 포함한다.

[0095] 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 유사체, 서열 번호 등에 관해 사용되는 단수 표현(영어의 관사 "a")은 하나 이상을 의미하기 위한 것이다. 특히, 표현 "~로 이루어진 군으로부터 선택되는 성분(예컨대, 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 유사체, 서열 번호 등)"은 인용된 성분들 중 하나 이상이 선택될 수 있음을 의미하기 위한 것이다. 따라서, "A, B 및 C로 이루어진 군으로부터 선택되는 성분"과 같은 표현은 A, B, 및 C의 모든 조합들, 즉, A, B, C, A+B, A+C, B+C 및 A+B+C를 포함하기 위한 것이다.

[0096] 본 명세서 전반에 걸쳐, 단어 "(복수개를) 포함하다", 또는 "(단수개를) 포함하다" 또는 "포함하는"과 같은 변형 표현은, 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 조합을 포함하는 것으로 이해되어질 것이나, 기타 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 조합을 배제하는 것은 아니다.

[0097] LNA 올리고뉴클레오타이드의 제조

[0098] LNA 뉴클레오타이드 유사체 구성요소(β -D-옥시-LNA)은 공개된 절차 및 거기에 언급된 참고문헌에 따라 제조될 수 있으며, 이에 대해 WO 03/095467 A1; [D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, Synthesis 6, 802-808]; 및 WO 2004/069991 A2를 참고한다.

[0099] LNA 올리고뉴클레오타이드는, 실시예 및 WO 99/14226, WO 00/56746, WO 00/56748, WO 00/66604, WO 00/125248,

WO 02/28875, WO 2002/094250 및 WO 03/006475에 기재된 바 대로 제조될 수 있다. 따라서, LNA 올리고뉴클레오타이드는 유기화학 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 핵산 화학의 올리고머화 기법을 이용하여 생성될 수 있다. 일반적으로, 포스포르아미다이트 접근법의 표준 올리고머화 사이클(S. L. Beaucage and R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123; S. L. Beaucage 및 R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223)이 이용되나, 예컨대 H-포스포네이트 화학, 포스포트리에스테르 화학도 또한 사용될 수 있다.

[0100] 일부 단량체들에 있어, 보다 긴 커플링 시간 및/또는 반복된 커플링 및/또는 보다 농축된 커플링 시약의 사용이 필요하거나 이로울 수 있다.

[0101] 이용된 포스포르아미다이트는 전형적으로 만족스러운 >95% 단계적 수율로 커플링하다. 인(phosphorous)(III)에서 인(V)로의 산화는 정상적으로 예컨대 요오드/피리딘/H₂O로 행해진다. 이는 탈보호 후에 네이티브 포스포로디에스테르 뉴클레오시드 간 연결기를 생성시킨다. 포스포로티오에이트 뉴클레오시드 간 연결기가 제조되는 경우, 티올화 단계는 포스포로디에스테르 뉴클레오시드 간 연결의 합성에 사용되는 정상적, 예컨대 요오드/피리딘/H₂O, 산화를 ADTT 시약(수소화탄산(아세트오니트릴:피리딘 9:1(v/v) 중 0.01 M)을 이용한 산화로 교체함으로써 수행된다. 뷰케이지(Beaucage) 및 PADS와 같은 다른 티올화 시약도 또한 사용될 수 있다. 포스포로티오에이트 LNA 올리고뉴클레오타이드는 단계적 커플링 수율 >= 98%로 효율적으로 합성되었다.

[0102] LNA 올리고뉴클레오타이드의 정제는 일회용 역상 정제 카트리지 및/또는 역상 HPLC 및/또는 에탄올 또는 부탄올로 부터의 석출을 이용하여 달성될 수 있다. 모세관 겔 전기영동, 역상 HPLC, MALDI-MS 및 ESI-MS를 사용하여, 합성된 LNA 올리고뉴클레오타이드의 순도를 입증하였다.

[0103] 염

[0104] LNA 올리고뉴클레오타이드가 다양한 약제학적으로 허용 가능한 염에 이용될 수 있다. 본원에 사용되는 그 용어는 LNA 올리고뉴클레오타이드의 원하는 생물학적 활성을 보유하고, 최소의 원하지 않는 독성학적 효과를 나타내는 염을 가리킨다. 그러한 염의 비제한적 예는, 아연, 칼슘, 비스무트, 바륨, 마그네슘, 알루미늄, 구리, 코발트, 니켈, 카드뮴, 나트륨, 칼륨 등과 같은 금속 양이온으로, 또는 암모니아, N,N-디벤질에틸렌-디아민, D-글루코사민, 테트라에틸암모늄, 또는 에틸렌디아민; 또는 이들의 조합물, 예컨대, 주석산아연 염 등으로 형성된 양이온으로 형성된 유기 아미노산 및 염기 부가염으로 이루어질 수 있다.

[0105] 그러한 염은, 포스포로디에스테르기 및/또는 포스포로티오에이트기를 갖는 LNA 올리고뉴클레오타이드로부터 형성되고, 예를 들어, 적당한 염기와 염이 그러하다. 이 염에는 예를 들어, 원소주기율표의 Ia, Ib, IIa 및 IIb 족의 금속으로부터 유래된 비독성 금속 염, 특히 적당한 알칼리 금속 염, 예를 들어 리튬, 나트륨 또는 칼륨 염, 또는 알칼리성 토금속 염, 예를 들어 마그네슘 또는 칼슘 염이 포함된다. 그것에는 또한 아연 및 암모늄 염, 및 적당한 유기 아민, 예컨대 비치환 또는 히드록실-치환 모노-, 디- 또는 트리-알킬아민, 특히 모노-, 디- 또는 트리-알킬아민으로 형성된 염, 또는 4차 암모늄 화합물, 예를 들어 N-메틸-N-에틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 모노-, 비스- 또는 트리스-(2-히드록시-저급 알킬)아민, 예컨대 모노-, 비스- 또는 트리스-(2-히드록시시에틸)아민, 2-히드록시-tert-부틸아민 또는 트리스(히드록시메틸)메틸아민, N,N-디-저급 알킬-N-(히드록시-저급 알킬)아민, 예컨대 N,N-디메틸-N-(2-히드록시에틸)-아민 또는 트리-(2-히드록시에틸)아민, 또는 N-메틸-D-글루카민, 또는 4차 암모늄 화합물, 예컨대 테트라부틸암모늄 염으로 형성된 염이 포함된다. 리튬 염, 나트륨 염, 마그네슘 염, 아연 염 또는 칼륨 염이 바람직하고, 나트륨 염이 특히 바람직하다.

[0106] 프로드러그

[0107] 한 실시양태에서, LNA 올리고뉴클레오타이드는 프로드러그의 형태일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 실제로 음으로 하전된 이온이다. 세포막의 친지성 성질에 의해, 올리고뉴클레오타이드들의 세포 흡수는 중성 또는 친지성 등가물에 비해 감소된다. 이 양극성의 "방해"는 프로드러그 접근법을 이용함으로써 막을 수 있다(Crooke, R. M. (1998), Crooke, S. T., *Antisense research and Application*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, vol. 131, pp. 103-140). 이 접근법에서, LNA 올리고뉴클레오타이드는 그것이 투여될 때 중성이 되도록, LNA 올리고뉴클레오타이드가 보호된 방식으로 제조된다. 이 보호기는, LNA 올리고뉴클레오타이드가 세포로 흡수되었을 때 제거될 수 있는 방식으로 설계된다. 그러한 보호기들의 예는 S-아세틸티오에틸(SATE) 또는 S-피발로일티오에틸(t-부틸-SATE)가 있다. 이 보호기들은 뉴클레아제 내성을 가지고, 선택적으로 세포 내 제거된다.

[0108] 접합체(Conjugate)

[0109] 본 발명의 다른 한 측면은 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오타이드, 상기 LNA 올리고뉴클레오타이드에

공유 결합된 하나 이상의 비-뉴클레오타이드 또는 비-폴리뉴클레오타이드 부분(moiety)을 포함하는 접합체에 관한 것이다.

- [0110] 본 발명의 한 관련 측면에서, 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드는 리간드에 연결되어, 접합체를 형성하고, 상기 리간드는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 비해 접합체의 세포 흡수를 증가시키기 위한 것이다.
- [0111] 본 문맥에서, 용어 "접합체(conjugate)"는 본원에 정의된 LNA 올리고뉴클레오타이드(즉, 뉴클레오시드 또는 LNA 뉴클레오시드 유사체들의 서열을 포함하는 LNA 올리고뉴클레오타이드)를 하나 이상의 비-뉴클레오타이드 또는 비-폴리뉴클레오타이드 부분에 공유 결합시킴으로써 형성된 외래 분자를 가리키기 위한 것이다.
- [0112] 따라서, LNA 올리고뉴클레오타이드는 2량체 또는 수지상 구조로 배열될 수 있는 바, LNA 올리고뉴클레오타이드는 접합되거나, 펩티드 핵산(PNA), 단백질(예, 표적 단백질에 대한 항체), 거대분자, 저분자량 약물 물질, 지방산 사슬, 당 잔기, 당단백질, 중합체(예, 폴리에틸렌 글리콜), 미셀-형성기, 항체, 탄수화물, 수용체-결합기, 스테로이드류, 에센셜 콜레스테롤, 폴리펩티드, 인터칼레이팅 시약, 에센셜 아크리딘 유도체, 장쇄 알콜, 텐드리머, 인지질 및 다른 친지성 기, 또는 이들의 조합들 등을 포함하는 비-뉴클레오타이드 또는 비-폴리뉴클레오타이드 부분과 키메라를 형성할 수 있다. 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 접합체는 또한 접합될 수 있거나, 활성 약물 물질, 예를 들어 아스피린, 이부프로펜, 술과 약물, 항당뇨제, 항세균제, 화학요법제 또는 항생제에 추가 결합될 수 있다.
- [0113] 이러한 방식의 접합은 LNA 올리고뉴클레오타이드의 약력학적 특성과 관련된 유리한 성질들을 부여할 수 있고, 특히 이러한 방식의 접합은 증가된 세포 흡수를 달성한다.
- [0114] 한 실시양태에서, LNA 올리고뉴클레오타이드는 리간드에 연결되어, 접합체를 형성하고, 상기 리간드는 안티센스 LNA 올리고뉴클레오타이드에 대한 접합체의 세포 흡수를 증가시키기 위한 것이다. 이 접합은 말단 위치 5'/3'-OH에서 일어날 수 있으나, 리간드는 또한 당 및/또는 염기에서 일어날 수도 있다. 특히, 안티센스 LNA 올리고뉴클레오타이드가 결합될 수 있는 성장 인자는 트랜스페린 또는 염산염을 포함할 수 있다. 트랜스페린-폴리리신-올리고뉴클레오타이드 착물 또는 염산염-폴리리신-올리고뉴클레오타이드 착물은 높은 수준의 트랜스페린 또는 염산염 수용체를 발현하는 세포에 의한 흡수를 위해 제조될 수 있다. 접합체/리간드의 기타 예는 콜레스테롤 부분, 아크리딘과 같은 이중 인터칼레이터, 폴리-L-리신, 및 포스포로모노티오에이트와 같은 하나 이상의 핵-내성 연결기와의 "말단-캡핑" 등이 포함된다.
- [0115] 세포로의 올리고뉴클레오타이드 흡수를 위한 운반체로서의 트랜스페린 착물의 제조는 [Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990)]에 기재되어 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 전달을 포함하여, 염산염 수용체 세포내이입(endocytosis)을 통한 염산염-거대분자 접합체의 세포 전달은 Low 등의 U.S. 특허 No. 5,108,921에 기재되어 있다. 또한, [Leamon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 5572 (1991)]을 참고한다.
- [0116] **약제학적 조성물**
- [0117] 본 발명의 특히 이로운 한 측면은 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오타이드, 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체, 및 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 담체 또는 보조제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 약제학적 조성물은 바람직하게 주사, 국소 투여, 또는 안내 투여(추가로 하기 참고)에 적합하다.
- [0118] 약제학적 조성물의 제조에 대한 지시사항을, ["Remington: The Science and Practice of Pharmacy" by Alfonso R. Gennaro] 및 하기에서 찾아볼 수 있다.
- [0119] 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 담체 또는 보조제는 약제학적 조성물의 부분이다. 캡슐, 정제 및 환약 등은 예를 들어 하기 화합물들을 함유할 수 있다: 결합체로서의 미세결정성 셀룰로스, 검 또는 젤라틴; 부형제로서의 전분 또는 락토스; 윤활제로서의 스테아레이트; 각종 감미 및 향미제. 캡슐에 있어, 투여 단위는 지방 오일과 같은 액체 담체를 함유할 수 있다. 마찬가지로, 당의 또는 장용제가 투여 단위의 부분일 수 있다. 약제학적 조성물은 또한 활성 약제학적 성분 및 미셀 유화액 형성 지질의 유화액(LNA 올리고뉴클레오타이드 포함)일 수 있다.
- [0120] LNA 올리고뉴클레오타이드는 원하는 작용을 저해하지 않는 임의의 물질, 또는 원하는 작용을 보충하는 물질과 혼합될 수 있다. 이는 다른 올리고뉴클레오시드 화합물을 포함하는 다른 약물을 포함할 수 있다.
- [0121] 비경구, 피하, 경피 또는 국소 투여를 위해, 제형물은 무균 희석제(예컨대, 물), 완충제(들), 등장성 및 이온강도 조절제, 및 항세균제를 포함할 수 있다. 흡수를 촉진하거나, 분해로부터 또는 신체에서의 즉각적 제거로부터 보호하는 담체, 에센셜 제어 방출 성질을 갖는 마이크로캡슐 또는 이식물을 이용하여, 활성 LNA 올리고뉴클레오

티드를 제조할 수 있다. 정맥내 투여를 위해, 바람직한 담체는 생리 염수(0.9%) 또는 완충 염수(예컨대, 인산염 완충 염수)이다.

[0122] 한 바람직한 실시양태에서, LNA 올리고뉴클레오타이드의 주사 또는 주입은 혈관신생의 부위, 또는 그 부근에 행해진다. 예를 들어, 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드는 눈 내 망막 색소 상피 세포에 전달될 수 있다. 바람직하게, LNA 올리고뉴클레오타이드는 예컨대 액체 또는 겔 형태로, 아래 눈꺼풀 또는 결막 cul-de-sac에 국소 투여되며, 이는 당업자의 기술 내에 속한다(예컨대, 전체 내용이 본원에 참고로 인용되는 [Acheampong AA et al, 2002, Drug Metabol. and Disposition 30: 421-429] 참고).

[0123] 본 발명의 약제학적 조성물은 국소 또는 전신 처리가 요망되는지의 여부, 및 피처리 부위에 따라 수많은 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 (a) 경구 투여, (b) 폐 투여, 예컨대, 네블라이저 등을 이용한 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 흡취에 의한 투여; 기관내, 비강내 투여, (c) 국소 투여, 예컨대 경피, 피부내, 점안, 및 질 및 직장 전달을 비롯한 점막으로의 투여; 또는 (d) 비경구 투여, 예컨대 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입; 또는 두개내 투여, 예컨대 경막내 투여일 수 있다. 한 실시양태에서, 활성 LNA 올리고뉴클레오타이드는 정맥내, 복강내, 경구, 국소 투여되거나, 볼루스 주사되거나, 표적 장기에 직접 투여된다.

[0124] 가장 적당한 투여 형태는 정맥내 주입 또는 경구에 의한 것으로 현재 판단된다.

[0125] 국소 투여를 위한 약제학적 조성물 및 제형물에는 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 드롭제, 스프레이제, 좌약, 액체 및 분말이 포함될 수 있다. 통상적 약제학적 담체, 수성, 분말 또는 유성 베이스, 증점제 등이 필요하거나 바람직할 수 있다. 코팅된 콘돔, 장갑 등도 또한 유용할 수 있다. 바람직한 국소 제형물에는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드가 국소 전달제, 예컨대 지질, 리포솜, 지방산, 지방산 에스테르, 스테로이드, 킬레이트화제 및 계면활성제와 혼합된 것들이 포함된다. 경구 투여를 위한 조성물 및 제형물에는, 분말 또는 과립, 마이크로입상물, 나노입상물, 물 또는 비수성 매질 중 현탁액 또는 용액, 캡슐, 젤 캡슐, 사케이(sachet), 정제 또는 소형(mini)-정제가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 비경구, 경막내 또는 정맥내 투여를 위한 조성물 및 제형물에는, 완충제, 희석제 및 기타 적당한 첨가제, 가령 투과 증진제, 담체 화합물 및 기타 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제(단, 이에 제한되지 않음)를 함유할 수 있는 무균 수용액이 포함될 수 있다.

[0126] 본 발명의 약제학적 조성물에는 용액, 유화액, 및 리포솜 함유 제형물이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 이 조성물은 예비형성된 액체, 자기유화성 고체, 및 자기유화성 반고체를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 성분들로부터 생성될 수 있다. 약물의 중앙 조직으로의 전달은 양이온성 리포솜, 시클로텍스트린, 포르피린 유도체, 분지쇄 덴드리머, 폴리에틸렌이민 중합체, 나노입자 및 미소구체를 포함하나, 이에 제한되지 않는 담체-매개 전달에 의해 증진될 수 있다(Dass CR. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1):3-27).

[0127] 특히 바람직한 한 비경구 투여 경로는 안내 투여이다. 본 LNA 올리고뉴클레오타이드의 안내 투여는, 투여 경로가 LNA 올리고뉴클레오타이드를 눈에 들여보내는 한, 눈으로의 주사 또는 직접적(예컨대, 국소적) 투여에 의해 달성될 수 있다. 상기 눈으로의 국소 투여 경로에 부가하여, 적당한 안내 투여 경로에는 유리체강내, 망막내, 망막하, 테논낭하, 안와주위 및 안와후부, 경각막, 및 경공막 투여가 포함된다. 안내 투여를 위해, 약제학적 조성물을 국소적으로, 예를 들어 패치에 의하거나 직접 눈에 적용하여, 또는 이온영동에 의해 투여할 수 있다. 연고, 스프레이제 또는 점적용 액체를, 애플리케이션 또는 점안제와 같은 당업계에 공지된 안 전달 시스템에 의해 전달할 수 있다. 조성물을 눈의 표면 또는 눈꺼풀의 안쪽에 직접적으로 전달할 수 있다. 그러한 조성물은 점막모방제, 예컨대 히알루론산, 콘드로이틴 황화물, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 또는 폴리(비닐 알코올), 보존제, 예컨대 소르브산, EDTA 또는 벤질크로늄 염화물, 및 통상적 양의 희석제 및/또는 담체를 포함할 수 있다.

[0128] 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, U.S. 특허 No. 5, 672,659 및 No. 5,595,760에 기재된 것들과 같은 지연 방출성 조성물에 제공될 수 있다. 속방출성 또는 지연 방출성 조성물은 피치료 상태의 성질에 의존한다. 상태가 급성 또는 초급성 장애로 이루어지는 경우, 속방출성 형태를 이용한 치료가 지연 방출성 조성물보다 바람직할 것이다. 대안적으로, 특정 보존제 또는 장기 치료를 위해, 지연 방출성 조성물이 적당할 수 있다.

[0129] LNA 올리고뉴클레오타이드를 눈의 안쪽에, 예컨대 바늘 또는 기타 전달 장치를 이용하여 주사할 수 있다.

[0130] 한 실시양태에서, 약제학적 조성물은, 생리학적으로 허용 가능한 담체 매질과 혼합된, 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 0.1 내지 90 중량%), 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 바람직한 생리학적으로 허용 가능한 담체 매질은 물, 완충수, 정상 염수, 0.4% 염수, 0.3% 글리신, 히알루론산 등이다.

[0131] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 통상적 약제학적 부형제 및/또는 첨가제를 포함할 수 있다. 적당한 약제학적 부형제에는 안정화제, 산화방지제, 삼투압 조정제, 완충제, 및 pH 조정제가 포함된다. 적당한 첨가제에는 생리

학적으로 생체적합한 완충제(예컨대, 트로메타민 히드로클로라이드), (예를 들어, DTPA 또는 DTPA-비스아미드와 같은) 킬레이트화제 또는 (예를 들어, 칼슘 DTPA, CaNaDTPA-비스아미드와 같은) 칼슘 킬레이트 착물의 첨가, 또는 임의적으로 칼슘 또는 나트륨 염(예를 들어, 염화칼슘, 아스코르브산칼슘, 글루콘산칼슘 또는 락트산칼슘)의 첨가가 포함된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 액체 형태로 사용하기 위해 포장될 수 있거나, 동결건조될 수 있다.

[0132] 고체 조성물을 위해, 통상적 비독성 고체 담체, 예를 들어 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산 마그네슘, 나트륨 사카린, 활석, 셀룰로스, 포도당, 수크로스, 탄산마그네슘 등을 사용할 수 있다.

[0133] 바람직하게, LNA 올리고뉴클레오타이드가 피치료 환자에게 심각한 부작용을 일으키지 않으면서 치료적으로 유효한 양으로 환자에게 전달되도록 하기에 충분한 양으로 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제 내에서와 같이 단위 제형물 내에 포함된다.

[0134] 단위 투여 형태로 편리하게 제공될 수 있는 본 발명의 약제학적 제형물은 약제 산업에 공지된 통상적 기법에 따라 제조될 수 있다. 그러한 기법은, 활성 성분을 약제학적 담체(들) 또는 부형제(들)와 연합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형물은, 활성 성분을 액체 담체 또는 미분 고체 담체, 또는 이 둘 모두와 균일하게 또한 친밀하게 연합시킨 후, 필요에 따라 생성물을 형상화함으로써 제조된다.

[0135] 본 발명의 조성물은 정제, 캡슐, 겔 캡슐, 액체 시럽, 연질 겔 및 좌약제와 같은 많은 가능한 투여 형태들 중 임의의 형태로 제형될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한, 수성, 비수성 또는 혼합 매질 중 현탁액으로서 제형될 수 있다. 수성 현탁액은 예를 들어, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 소르비톨 및/또는 텍스트란을 포함한, 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 추가로 함유할 수 있다. 현탁액은 또한 안정화제를 함유할 수 있다.

[0136] 약제학적 조성물의 바람직한 실시양태들에서, LNA 올리고뉴클레오타이드는 수성 담체, 특히 pH를 4.0 내지 8.5 범위로 유지시키고, 이온 강도가 20 내지 2000 mM인 완충제를 포함하는 수성 담체 내에 제형된다.

[0137] 용어 "수성 담체"는, 관심 약제학적 조성물이 액체 형태이고, 액체 담체가 주로 물로 이루어지고, 즉 담체의 80%(w/w) 이상, 또는 90%(w/w) 이상, 또는 심지어는 95%(w/w) 이상이 물로 이루어짐을 의미한다. 에탄올, DMSO, 에틸렌 글리콜 등과 같은 다른 액체 성분들도 또한 사용될 수 있다.

[0138] 수성 담체는 바람직하게 pH를 4.0 내지 8.5 범위로 유지시키기 위한 염수 또는 완충제를 포함한다. 바람직하게, 완충 염수, 예컨대 인산염 완충 염수(PBS)와 같은 완충제는 pH를 5.0 내지 8.5 범위, 예컨대 6.0 내지 7.5 범위로 유지시킬 것이다.

[0139] 약제학적 조성물의 이온 강도/등장성(tonicity)도 또한 중요하다. 따라서, 일반적으로, 액체 약제학적 조성물은 이온 강도가 20 내지 2000 mM 범위, 예컨대 50 내지 1500 mM 범위, 또는 100 내지 1000 mM 범위이다.

[0140] 조합 약물

[0141] 발명에 따른 약제학적 조성물은 임의적으로 안티센스 화합물, 화학요법제, 항염증성 화합물, 항바이러스성 화합물, 세포 증식 억제성(cytostatic) 화합물, 항혈관신생성 화합물, 항증식성 화합물, 항아포토시스성 화합물, 신호 유도 조절 물질, 키나제 억제제 및/또는 면역 조절 화합물을 추가로 포함함을 이해해야 한다. LNA 올리고뉴클레오타이드를 하나 이상의 화학요법제와 조합하는 것이 특히 이로운 것으로 현재 판단된다.

[0142] 상술된 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 화학요법제를 추가로 포함할 수 있다. 화학요법 화합물은 전형적으로 하기 것들로 이루어진 군으로부터 선택된다: 부신피질스테로이드, 예컨대 프레드니손, 텍사메타존 또는 데카드론; 알트레타민(헥살렌, 헥사메틸멜라민(HMM)); 아미포스틴(에티올); 아미노글루테티마이드(시타드렌); 암사크린(M-AMSA); 아나스트로졸(아리미덱스); 안드로젠, 예컨대 테스토스테론; 아스파라기나아제(엘스파); 아바스틴(Avastin); 바실러스 칼메테-구린; 비칼루타마이드(카소텍스); 비포스파네이트; 블레오마이신(블레녹산); 보르테조미; 부셀판(마이러란); 카보플라틴(파라플라틴); 칼무스틴(BCNU, BiCNU); 클로람부실(루케란); 클로로데옥시아데노신(2-CDA, 클라드리빈, 루스타틴); 시스플라틴(플라티놀); 시클로포스파미드; 시토신 아라비노시드(사이타라빈); 다카르바진(DTIC); 닥티노마이신(악티노마이신-D, 코스메젠); 다우노루비신(세루비딘); 데세탁셀(탁소테르); 독소루비신(아드리오마이신); 에피루비신; 에스트라마우스틴(엠시트); 에스트로젠, 예컨대 디에틸stil베스트롤(DES); 에토프시드(VP-16, 베페시드, 에토포포스); 플루타라빈(플루다라); 플루타미드(엘루신); 5-FUDR(플록수리딘); 5-플루오로우라실(5-FU); 겐시타빈(겐자르); 고세렐린(조달렉스); 헤르셉틴(트라스투주맵); 히드록시우레아(히드레아); 이다루비신(이다마이신); 이포스파마이드; IL-2(프로루킨, 알데스루킨); 인터페론 알파(인트론 A, 로페론 A); 이리노테칸(캄프토사르); 루프롤라이드(루프론); 레바미솔(에르

가미솔); 로무스틴(CCNU); 메클로라타민(무스타르젠, 니트로젠 무스타드); 멜팔란(알케란); 메르캅토피린(퓨리 네톨, 6-MP); 메토트렉세이트(멕세이트); 2-메톡시에스트라디올(2ME, 판렘); 미토마이신-C(무타무신); 미토산트 론(노반트론); 옥트레티드(산도스타틴); 펜토스타틴(2-데옥시코포르마이신, 니펜트); 폴리카마이신(미트라마이 신, 미트라신); 프로로갈바진(마투란); 스트렙토조신; 타목시펜(놀바텍스); 탁솔(파클리탁솔); 테니포시드(부몬, VM-26); 탈리도미드; 티오테과; 토포테칸(하이캄틴); 트레티노인(베사노이드, 올-트랜스 레티 노산); 빈블라스틴(발반); 빈크리스틴(온코빈) 및 비노렐빈(나벨빈).

[0143] 다발성 골수종의 치료를 위해, 멜팔란, 시클로포스파미드, 프레드니손, 빈크리스틴, 독소루비신, 카르무스틴, 텍사메타손, 탈리도미드, 보르테조미 및 비포스파네이트와 같은 화학요법제가 바람직하다.

[0144] 신세포암의 치료를 위해서는, 겐시타빈, 5-플루오로우라실(5-FU), 5-플루오로데옥시우리딘, 파클리탁셀, 카르보 플라틴, 이포스파미드, 독소루비신, 빈블라스틴, IFN-알파 및 IL-2와 같은 화학요법제가 바람직하다.

[0145] 한 변형양태에서, 본 발명은 (a) 하나 이상의 LNA 올리고뉴클레오타이드, 및 (b) 비-안티센스 기작에 의해 기능하 는 하나 이상의 기타 화학요법 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 그러한 화학요법 화합물은 LNA 올리고뉴클레오타이드와 함께 사용될 때, 개별적으로(예컨대, 미트라마이신 및 올리고뉴클레오타이드), 순차적으로 (예컨대, 일정 기간 동안은 미트라마이신 및 올리고뉴클레오타이드, 이어서 또 다른 제제 및 올리고뉴클레오타 이드), 또는 하나 이상의 기타 그러한 화학요법 화합물과 조합하거나 방사선요법과 조합하여 사용될 수 있다. 상 기 명시적으로 언급된 것들을 비롯한, 당 기술분야의 숙련가에게 공지된 모든 화학요법 화합물들은 본 발명에 따른 LNA 올리고뉴클레오타이드와의 조합 치료로서 여기에 인용된다.

[0146] 한 실시양태에서, 약제학적 조성물은 탁산 화합물과 조합되어 투여된다.

[0147] 용어 "탁산 화합물"은 파클리탁셀(탁솔[®]), 파클리탁셀 유도체, 도세탁셀, 탁소테르, 변형 탁산, 및 탁소이드 유 사체를 포함하기 위한 것이다. 파클리탁셀(탁솔[®])은 웨스턴(퍼시픽) 주목(Western (Pacific) yew), 주목 나무 (Taxus brevifolia)의 껍질로부터 분리된 디테르펜이고, 탁산 환계를 갖는 한 부류의 치료제를 대표한다. 파클 리탁셀 및 그것의 유사체는 10-데아세틸박카틴 III, 주목 침엽 및 잔가지로부터 수득된 전구체로부터 부분적인 합성에 의해, 또한 전체적인 합성에 의해 생산되었다. 이에 대해, [Holton, et al., J. Am. Chem. Soc. 116:1597-1601 (1994)] 및 [Nicolaou, et al., Nature 367:630 (1994)]을 참고한다. 파클라탁셀은 임상 시험에 서 수가지 인간 종양에 효능을 나타냈다. [McGuire, et al., Ann. Int. Med. 111:237-279, (1989)]; [Holmes, et al., J. Natl. Cancer Inst. 83:1797-1805 (1991)]; [Kohn et al., J. Natl. Cancer Inst. 86:18-24 (1994)]; 및 [Kohn, et al., American Society for Clinical Oncology 12 (1993)]을 참고한다. 변형 탁산 또는 탁소이드 유사체는 변형 측쇄를 갖는 탁산 환을 갖는 화합물이다. 수많은 이 유사체들은 향상된 성질들, 예컨대 천연 파클리탁셀보다 더 큰 수용해도 및 안정성을 가진다. 이 유사체들은 당 기술분야의 숙련가에게 알려져 있 고, 개시내용이 본원에 참고로 각기 인용되는 U.S. 특허 No. 5,278,324; No. 5,272,171; No. 5,254,580; No. 5,250,683; No. 5,248,796; 및 No. 5,227,400에 개시되어 있다. 파클리탁셀 및 탁소테르는 개시내용이 본원에 참고로 각기 인용되는 WO 93/18210, EP 0 253 739, EP 0 253 739, 및 WO 92/09589에 개시된 방법에 의해 제조 될 수 있다. 특별한 실시양태들에서, 탁산 화합물은 파클리탁셀 또는 탁소테르이다.

[0148] 상기 조성물 내의 탁산 화합물(들):LNA 올리고뉴클레오타이드의 중량비는 전형적으로 50:1 내지 1:25 범위, 예컨 대 25:1 내지 1:25 범위, 또는 10:1 내지 1:25 범위, 또는 1:1 내지 1:25 범위, 또는 50:1 내지 1:10 범위, 또 는 1:1 내지 1:50 범위 또는 25:1 내지 1:10 범위이다.

[0149] 다른 한 실시양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 LNA 올리고뉴클레오타이드, 및 제2 핵산 표적에 표적화된 하나 이상의 부가적 안티센스 화합물을 함유할 수 있다. 2개 이상의 조합된 화합물은 함께 또는 순차 적으로 사용될 수 있다.

[0150] 비스테로이드계 항염증성 약물 및 코르티코스테로이드, 항바이러스성 약물 및 면역 조절 약물을 포함하나, 이에 제한되지 않는 항염증성 약물이 본 발명에 또한 조합될 수 있다. 2개 이상의 조합된 화합물은 함께 또는 순차적 으로 사용될 수 있다.

[0151] 또한, LNA 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 조성물은 방사선요법 등과 조합되어 사용될 수 있다.

[0152] *의료적 치료*

[0153] 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드는 본원에 나타난 바와 같은 수많은 치료 용도들에 유용하다. 일반적으로, 본

발명의 치료 방법은 치료 유효량의 LNA-변형 올리고뉴클레오타이드를 포유동물, 특히 인간에 투여하는 단계를 포함한다.

- [0154] 이에 따라, 본 발명은 또한 의약으로 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오타이드, 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체에 관한 것이다.
- [0155] 투여는 피치료 질환 상태의 중도 및 반응성, 수일 내지 수개월 지속되는 치료 과정에 의존하거나, 치유되거나 질환 상태의 약화가 달성될 때까지 행해진다. 최적의 투여 스케줄은 또한 환자의 신체 내 약물의 측정에 의해, 또는 대리 마커에 의해 평가될 수 있다.
- [0156] 최적 투여량은 개별 올리고뉴클레오타이드의 상대적 효능에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 그것은 시험관내 및 생체내 동물 모델에서 효과적인 것으로 나타난 EC₅₀s에 기초하여 평가될 수 있다. 일반적으로, 투여량은 0.01 μ g 내지 1 g/신체 체중 kg이고, 매일, 매주, 매월 또는 매년 1회 이상, 또는 2 내지 10년마다 1회, 또는 수시간 내지 수개월 동안 연속 주입에 의해 이루어진다. 반복 투여 속도는 체액 또는 조직 내 측정된 약물의 체류 시간 및 농도에 기초하여 평가될 수 있다. 성공적 처리 후, 환자에게 유지 치료를 수행하여, 질환 상태의 재발을 방지하는 것이 바람직할 수 있다. 대부분 관련 용량은 0.01 mg 내지 100 mg, 예컨대 0.1 mg 내지 40 mg, 또는 0.5 mg 내지 10 mg/신체 체중 kg인 것으로 현재 판단된다. 그러한 투여는 매일 1회 제공되거나, 더욱 바람직하게 보다 적은 빈도로, 예컨대 1 내지 4주 동안 주당 1 내지 3회로 제공된다. 유지 치료는 월당 예컨대 1 내지 4회, 또는 연 1 내지 10회와 같이 보다 적은 빈도로 이루어진다.
- [0157] 당업자는 많은 상이한 원칙들에 의해 HIF-1a 관련 질환에 투항하기 위해 LNA 올리고뉴클레오타이드를 사용할 수 있음을 인지할 것이며, 따라서 이는 본 발명의 사상 내에 속한다.
- [0158] 본원에 사용되는 용어 "표적 핵산"은 HIF-1a를 코딩하는 DNA, 그러한 DNA로부터 전사된 RNA(프리-mRNA 및 mRNA), 및 그러한 RNA로부터 유도된 cDNA를 포괄한다.
- [0159] 본원에 사용되는 용어 "유전자"는 엑손, 인트론, 비코딩 5' 및 3' 영역 및 조절 요소, 및 조절 요소를 포함하는 유전자, 및 이의 현재 공지된 모든 변형체, 및 임의의 추가적 변형체(이는 이후 규명될 수 있음)를 의미한다.
- [0160] 본원에 사용되는 용어 "LNA 올리고뉴클레오타이드"는, 예를 들어 표적 유전자 "키메라플라스트(Chimeraplast)" 및 "TFO" 중 어느 하나를, 표적 유전자 "안티센스 억제제", "siRNA", "miRNA", "리보자임" 및 올리고자임"의 RNA 전사체(들)에, 또는 표적 유전자 "애타머(aptamer)", "스피겔머(spiegelmer)" 또는 "데코이(decoy)"에 의해 코딩되는 단백질(들)에 수소 결합으로 결합시킴으로써 인간에 있어 원하는 치료적 효과를 유도할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 가리킨다.
- [0161] 본원에 사용되는 용어 "mRNA"는 표적화된 유전자의 현재 공지된 mRNA 전사체 및 임의의 추가적 전사체(이는 동정될 수 있음)를 의미한다.
- [0162] 본원에 사용되는 용어 "조절"은 유전자의 발현의 증가(자극) 또는 감소(억제)를 의미한다. 본 발명에서, 억제는 유전자 발현의 조절의 바람직한 형태이고, mRNA가 한 바람직한 표적이다.
- [0163] 본원에 사용되는, 특별한 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물을 "표적화한다"는 것은, 안티센스 화합물이 그것의 의도 표적에 결합하고 그 표적의 기능을 조절할 수 있도록 하는 방식으로, 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 세포, 동물 또는 인간에게 제공함을 의미한다.
- [0164] LNA 올리고뉴클레오타이드는 지금까지는 잘 이해되지 않았던 "안티센스와 같은" 기작에 의해 특정 내인성 또는 외인성 유전자를 침묵화하기 위해 세포에 의해 사용되는 이중 나선 RNA 분자인 siRNA로 설계될 수 있다.
- [0165] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 임상적 효능은 상당한 정도로 그것의 약력학적 성질, 예컨대 흡수, 분포, 세포 흡수, 대사 및 분비에 의존한다. 이에 이 파라미터들은 기저 화학, 및 올리고뉴클레오타이드의 크기 및 3차원 구조에 의해 상당히 좌우된다.
- [0166] 본 발명에 따른 LNA 올리고뉴클레오타이드의 약력학적 성질의 조절은 다양한 상이한 부분들의 부착을 통해 추가로 달성될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 세포막 투과능은 예를 들어 지질 부분, 예컨대 콜레스테롤 부분, 티오에테르, 지방족 사슬, 인지질 또는 폴리아민을 올리고뉴클레오타이드에 부착시킴으로써 증진될 수 있다. 마찬가지로, LNA 올리고뉴클레오타이드의 세포로의 흡수는, 부분을 막에서, 세포질로의 수송을 매개하는 분자와 상호작용하는 올리고뉴클레오타이드에 접합시킴으로써 증진될 수 있다.
- [0167] 약동학적 성질은 본 발명에 따라 LNA 올리고뉴클레오타이드 흡수를 향상시키고/거나, LNA 올리고뉴클레오타이드의

분해 내성을 증진시키는 것과 같은 생체안정성을 증진시키며/거나, 표적 서열, 예컨대 mRNA 서열과의 올리고뉴클레오티드 혼성화 특성의 특이성 및 친화성을 증가시키는 기로 증진될 수 있다.

- [0168] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 다종 다양한 질환의 치료에 사용될 수 있다. 암 세포와 마찬가지로, 증식하는 혈관 내피 세포는 HIF-1a 발현의 하향 조절에 민감하다. 그러므로, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 혈관 신생을 유발하는 이상(abnormal) 질환을 특징으로 하는 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 그러한 질환의 예로는 일반 암, 및 아테롬성 동맥경화증, 건선, 당뇨병성 망막증, 황반 변성, 류마티스성 관절염, 천식, 염증성 장 질환, 사마귀, 알레르기성 피부염 및 카포시 육종이 있다.
- [0169] 일반적으로 언급하여, 본 발명의 한 측면은 이상 혈관신생에 의해 유발되는 질환을 걸러 있거나 걸리기 쉬운 포유동물을 치료하는 방법으로서, 포유동물에 치료 유효량의, 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오티드 또는 접합체를 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0170] 또한, 본 발명은 혈관신생의 억제 방법으로서, 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오티드 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체 또는 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 이로운 측면은 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오티드, 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체의, 아테롬성 동맥경화증, 건선, 당뇨병성 망막증, 황반 변성, 류마티스성 관절염, 천식, 염증성 장 질환, 사마귀, 알레르기성 피부염, 염증 및 피부 염증, 또는 기타 피부 관련 질환으로부터 선택된 질환을 치료하기 위한 의약 제조를 위한 용도에 관한 것이다.
- [0171] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 또한 염증성 질환, 염증, 예컨대 피부 염증s 또는 기타 피부 질환 또는 장애, 예컨대 건선 및 류마티스성 관절염의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0172] 유사하게, 본 발명의 또 다른 이로운 측면은, 아테롬성 동맥경화증, 건선, 당뇨병성 망막증, 류마티스성 관절염, 천식, 염증성 장 질환, 사마귀, 알레르기성 피부염, 염증, 및 피부 염증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환을 치료하는 방법으로서, 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오티드 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체 또는 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 상기 질환의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0173] 특히 이롭게도, 혈관신생성 질환에는 당뇨병성 망막증, 황반 변성, 건선, 류마티스성 관절염, 염증성 장 질환, 및 기타 염증성 질환이 포함된다. 이 질환은 혈관신생의 부위에 새로 형성된 혈관에 의한 정상 조직의 파괴를 그 특징으로 한다. 예를 들어, 황반 변성에서, 맥락막이 침투되어, 모세관에 의해 파괴된다. 혈관신생-유도의, 황반 변성에서의 맥락막의 파괴는 궁극적으로 부분 또는 완전실명을 야기한다.
- [0174] 본 발명의 방법은 바람직하게 암에 의해 유발되는 질환에 대한 치료 또는 예방을 위해, 특히 폐, 유방, 결장, 전립선, 췌장, 간, 갑상선, 신장, 뇌, 고환, 위, 소장, 대장, 척수, 누(sinuses), 방광, 요로 또는 난소 암과 같은 조직에서 발병할 수 있는 암의 치료를 위해 이용될 수 있다.
- [0175] 또한, 본원에 기재된 발명은 암의 예방 또는 치료 방법으로서, 고용량의 LNA 올리고뉴클레오티드를 포함하나 이에 제한되지 않는 치료 유효량의 HIF-1a 조절 LNA 올리고뉴클레오티드를 그러한 치료를 필요로 하는 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 포괄한다. 본 발명은 HIF-1a 조절 LNA 올리고뉴클레오티드의 단기 투여의 사용을 추가로 포괄한다. 정상적 비암성 세포는 특별한 세포 유형에 대한 빈도 특성으로 나뉜다. 세포가 암성 상태로 변형되면, 비조절 세포 증식 및 감소된 세포사멸이 초래되고, 이에 따라 무작위 세포 분할 또는 세포 성장이 암성 세포 유형의 특징이다.
- [0176] 암 유형의 예에는 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 급성 백혈병(예컨대, 급성 림프성 백혈병 및 급성 골수구성 백혈병과 같은 급성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 다발 골수종), 결장 암종, 직장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 신장 세포 암종, 간암, 담관 암종, 용모막암종, 자궁경부암, 고환암, 폐암종, 방광암, 흑색종, 두부 및 목부 암, 뇌암, 알려지지 않은 일차 부위의 암, 신생물(neoplasms), 말초 신경계의 암, 중추 신경계의 암, 종양(예, 섬유육종, 혈관육종, 내피육종(endotheliosarcoma), 림프관육종, 림프관내피육종, 율활막종, 증피종, 유잉 종양(Ewing's tumour), 평활근육종, 가로무늬근육종, 편평세포암종, 기저 세포암종, 샘암종, 한선암종, 지방분비선암종, 유두암종, 유두선암종, 낭샘암종, 수질암종, 기관지원성 암종, 고환종, 배아암종, 율름 종양, 작은 세포 폐 암종, 상피 암종, 신경아교종, 별아교세포종, 속질모세포종, 머리인두종, 뇌실막세포종, 술방울샘종, 혈관모세포종, 청신경초종, 회소돌기아교세포종, 수막종, 신경모세포종 및 망막모세포종), 중쇄 질환, 암전이, 또는 비조절 또는 이상 세포 성장을 그 특징으로 하는 일부 질환 또는 장애가 포함되나 이에 제한되지 않는다.

- [0177] 용어 "암종(carcinoma)"은 상피 기원의 악성 종양을 가리키기 위한 것이다. 상피 조직은 신체의 내부 및 외부에서 신체 표면을 덮거나 윤곽을 형성한다. 상피 조직의 예에는 신체 공동(cavities) 및 내부의 장기, 예컨대 내장, 방광, 자궁 등을 윤곽짓는 점막 및 용모막, 및 피부이다. 상피 조직은 또한 보다 깊은 조직층으로 연장되어, 분비선, 예컨대 점액-분비선을 형성할 수 있다.
- [0178] 용어 "육종(sarcoma)"은 연결 조직, 예컨대 연골, 지방, 근육, 힘줄 및 뼈로부터 성장하는 악성 종양을 가리키기 위한 것이다.
- [0179] 본원에 사용되는 용어 "신경교종(glioma)"은 신경아교세포가 기원인 악성 종양을 포함하기 위한 것이다.
- [0180] 암 치료용 의약 제조를 위해 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 본 발명의 접합체가 사용될 때, 상기 암은 적당하게도 고형 종양의 형태일 수 있다. 또한, 상기 암은 또한 적당하게는 암종이다. 암종은 전형적으로 악성 흑색종, 기저 세포 암종, 난소 암종, 유방 암종, 비소세포 폐 암, 신장 세포 암종, 방광 암종, 재발 표재성 방광 암, 위 암종, 전립선 암종, 췌장 암종, 폐 암종, 자궁경부 암종, 경부 이형성증, 후두유두종증, 결장 암종, 결장직장 암종 및 카르시노이드 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 전형적으로는, 상기 암종은 악성 흑색종, 비소세포 폐 암, 유방 암종, 결장 암종 및 신장 세포 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 악성 흑색종은 전형적으로 표재성 확장성 흑색종, 결절성 흑색종, 악성 흑점 흑색종, 선단 흑색종, 무멜라닌 흑색종 및 결절형악성 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0181] 대안적으로, 암은 적당하게는 육종일 수 있다. 육종은 전형적으로 골육종, 유방 육종, 연골육종, 악성 섬유 조직구종, 섬유육종 및 카포시 육종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 형태이다.
- [0182] 대안적으로, 암은 신경교종일 수 있다.
- [0183] 본원에 정의된 LNA 올리고뉴클레오타이드 및 접합체는 또한 다발성 골수종, 신장암, 자궁경부암, 뇌암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암 질환을 치료하는데 특히 유용한 것으로 판단된다.
- [0184] 본 발명은 또한 암의 치료 방법으로서, 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체 또는 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 당해 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 한 변형양태에서, 암은 고형 종양의 형태이다. 고형 암은 적당하게 상기 논의된 바와 같은 암종 또는 육종 또는 신경교종일 수 있다.
- [0185] 따라서, 본 발명의 다른 한 측면은 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체의, 암 치료용 의약을 제조하기 위한 용도로서, 상기 의약이 "조합 약물"에 대해 상기 정의된 것들로부터 선택되는 화학요법제를 추가로 포함하는 것인 용도에 관한 것이다. 적당하게, 추가적 화학요법제는 타산, 예컨대 타솔, 파클리탁셀 또는 도세탁셀로부터 선택된다.
- [0186] 대안적으로 언급하건대, 본 발명은 또한 암의 치료 방법으로서, 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오타이드, 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체 또는 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 당해 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 추가적 화학요법제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법에 관한 것이다. 상기 추가적 투여는, 추가적 화학요법제가 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드에 접합되거나, 약제학적 조성물 내에 존재하거나, 분리된 제형물로 투여되도록 하는 것일 수 있다.
- [0187] 한 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 (a) 하나 이상의 안티센스 화합물, 및 (b) 자매염색체의 동원판에 형성되는 마이크로튜브의 탈중합 및 긴장(tension)을 방지하나 마이크로튜브가 동원판에 부착되지 않는 하나 이상의 기타 화학요법제를 함유하는 약제학적 조성물을 제공한다. 그러한 화학요법제에는 상기 정의된 바와 같은 타산, 특히 타솔, 파클리탁셀 및 도세탁셀이 포함된다. 그러한 화학요법제가 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드와 함께 사용될 경우, 그것은 순차적으로 표적 세포를 감각화하는 시간 동안 올리고뉴클레오타이드 처리로 출발하여, 그에 이어 종양 세포 내 HIF-1 α 단백질의 수준을 감소시키고, 종양 혈관구조 내 내피 세포를 증식시킴으로써 화학요법제로 공동 처리하도록 사용되어야 한다.
- [0188] 바람직한 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 LNA 올리고뉴클레오타이드를 이용한 의료적 치료는 방사능요법과 조합된다. 방사능요법은 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드와 함께 사용될 때 순차적으로 표적 세포를 감각화하는 시간 동안 올리고뉴클레오타이드 처리로 출발하여, 그에 이어 종양 세포 내 HIF-1 α 단백질의 수준을 감소시키고, 종양 혈관구조 내 내피 세포를 증식시킴으로써 부가적 방사선요법을 행하도록 되어야 한다.
- [0189] 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드는 또한 진단제, 치료제 및 예방용 연구 시약으로도 이용될 수 있다. 연구에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는, 특히 세포 및 실험 동물의 세포 내 HIF-1 α 유전자의 합성을 억제하고, 이

로써 표적의 기능적 분석을 용이하게 하거나 그것의 치료적 개입을 위한 표적으로서의 유용성 인정을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 진단제에 있어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 노던 블로팅(Northern blotting), 인-시츄 혼성화 또는 유사한 기법에 의해 세포 및 조직 내 HIF-1a 발현을 검출하고 정량화하기 위해 사용될 수 있다. 치료제에 있어, HIF-1a의 발현을 조절함으로써 치료될 수 있는 질환 또는 장애에 걸린 것으로 의심되는 동물 또는 인간을, 본 발명에 따른 안티센스 LNA 올리고뉴클레오타이드를 투여함으로써 치료한다. 또한, 치료 또는 예방적으로 유효량의 안티센스 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 접합체, 또는 본 발명의 약제학적 조성물 중 하나 이상을 투여함으로써, HIF-1a의 발현과 관련된 질환 또는 병태에 걸리거나 걸리기 쉬운 것으로 의심되는 인간을 치료하는 방법이 제공된다.

[0190] 본 발명의 다른 한 측면은 아포토시스의 유도 방법으로서, 본원에 정의된 LNA 올리고뉴클레오타이드, 본원에 정의된 바와 같은 접합체, 또는 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 아포토시스의 유도는 시험관내 또는 생체내일 수 있다. 유도는 세포 검정에서 행해지거나, 조직 샘플 내 또는 살아있는 포유동물 내에 행해질 수 있다.

[0191] 본 발명의 한 관련 측면은 세포 증식의 예방 방법으로서, 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체 또는 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 증식 예방은 시험관내 또는 생체내 일 수 있다. 예방은 세포 검정에서 행해지거나, 조직 샘플 내 또는 살아있는 포유동물 내에 행해질 수 있다.

[0192] 또한, 본 발명은 혈관신생성 질환의 치료 방법으로서, 본원에 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체 또는 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 투여하여, 혈관신생성 질환과 관련된 혈관신생이 억제되도록 하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0193] 한 실시양태에서, 혈관신생성 질환은 암과 관련된 종양을 포함하고, 이에 대해 상기를 참고한다. 암은 바람직하게 유방암, 폐암, 두부 및 목부암, 뇌암, 복부암, 결장암, 결장직장암, 식도암, 위장관암, 신경교종, 간암, 설암, 신경아세포종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 망막모세포종, 윌름 종양, 다발성 골수종, 피부암, 임파종 및 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 대안적으로, 암은 다발성 골수종, 신장암, 자궁경부암, 결장암, 뇌암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0194] 혈관신생성 질환은 또한 당뇨병성 망막병증, 황반 변성 및 염증성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 특히, 혈관신생성 질환은 염증성 장 질환, 건선 및 류마티스성 관절염으로부터 선택되는 염증성 질환이다.

[0195] 황반 변성의 치료는 본 발명의 LNA 올리고뉴클레오타이드와 특히 관련되는 것으로 판단된다.

[0196] 키트

[0197] 액체 형태의 약제학적 조성물이 LNA 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 저해하게 되는 조건에 걸릴 위험에 처하는 경우, 고체 형태, 예컨대 동결 건조된 물질로서의 LNA 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 최종 제품을 생성시키고, 그 생성물을 그러한 고체 형태로 저장하는 것이 바람직할 수 있다. 이어서, 생성물을 투여 직전에 바로 사용하기 위해 염수 또는 완충 염수 내에 재구성(예컨대, 용해 또는 현탁)시킬 수 있다.

[0198] 그러므로, 본 발명은 또한

[0199] (a) 고체 형태의, 상기 정의된 바와 같은 LNA 올리고뉴클레오타이드 또는 접합체를 함유하는 제1 성분, 및

[0200] (b) 상기 LNA 올리고뉴클레오타이드의 재구성(예컨대, 용해 또는 현탁)에 적합한 염수 또는 완충제 용액(예컨대, 완충 염수)을 함유하는 제2 성분

[0201] 을 포함하는 키트를 제공한다.

[0202] 바람직하게 상기 염수 또는 완충 염수는 pH가 4.0 내지 8.5 범위이고, 몰 농도가 20 내지 2000 mM이다. 한 바람직한 실시양태에서, 염수 또는 완충 염수는 pH가 6.0 내지 8.0 범위이고, 몰 농도가 100 내지 500 mM이다. 한 가장 바람직한 실시양태에서, 염수 또는 완충 염수는 pH가 7.0 내지 8.0 범위이고, 몰 농도가 120 내지 250 mM이다.

[0203] 그러한 키트에 있어, LNA 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 15, 서열 번호 16, 서열 번호 17 및 서열 번호 18로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 구체적으로, LNA 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 1 및 서열 번호 2로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0204] 본 발명은 하기 실시예에 의해 비제한적 방식으로 추가로 설명한다.

실시예

[0205] 실험예

[0206] 실시예 1: 단량체 합성

[0207] 공개된 절차 및 그 안에 인용된 참고문헌, 예컨대 WO 03/095467 A1, 및 [D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, Synthesis 6, 802-808]에 따라, LNA 구성요소(building blocks) 및 이의 유도체를 제조하였다.

[0208] 실시예 2: 올리고뉴클레오타이드 합성

[0209] 익스퍼다이트(Expedite) 8900/MOSS 합성장치(다중 올리고뉴클레오타이드 합성 시스템; Multiple Oligonucleotide Synthesis System)에서 1 μmol 또는 15 μmol 규모로 포스포르아미다이트를 이용하여 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다. 보다 큰 규모의 합성을 위해, 아크타(Akta) 올리고 파이프를 사용하였다. 합성(DMT-온) 종료 시에, 올리고뉴클레오타이드를 1 내지 2시간 동안 실온에서 수성 암모니아를 이용하여 고체 지지체로부터 절단하여, 4시간 동안 65°C에서 추가로 탈보호한다. 올리고뉴클레오타이드를 역상 HPLC(RP-HPLC)로 정제하였다. DMT-기의 제거 후, 올리고뉴클레오타이드를 AE-HPLC, RP-HPLC 및 CGE로 특징화하였고, 분자량은 ESI-MS에 의해 분자량을 추가로 확인하였다. 보다 상세한 내용에 대해 하기를 참고한다.

[0210] LNA-고체 지지체의 제조:

[0211] LNA 숙시닐 반에스테르의 제조

[0212] 5'-O-Dmt-3'-히드록시-LNA 단량체(500 mg), 숙신산 무수물(1.2 당량) 및 DMAP(1.2 당량)를 DCM(35 mL) 내에 용해시켰다. 반응물을 하룻밤 동안 실온에서 교반하였다. NaH_2PO_4 0.1 M pH 5.5(2×) 및 염수(1×)로 추출한 후, 유기층을 무수 Na_2SO_4 로 추가로 건조시키고, 여과시킨 후, 증발시켰다. 반에스테르 유도체가 95% 수율로 수득되었고, 이를 어떠한 추가적 정제없이 사용하였다.

[0213] LNA-지지체의 제조

[0214] 상기 제조된 반에스테르 유도체(90 μmol)를 최소량의 DMF 내에 용해시켰고, DIEA 및 pyBOP(90 μmol)를 첨가하여 1분 동안 함께 혼합하였다. 이 예비활성화된 혼합물을 매뉴얼 합성장치에서 LCAA-CPG(500 Å, 80 내지 120 메쉬 크기, 300 mg)과 조합하였고, 교반하였다. 실온에서 1.5시간 후에, 지지체를 여과 제거하고, DMF, DCM 및 MeOH로 세정하였다. 건조시킨 후, 로딩율이 57 $\mu\text{mol/g}$ 인 것으로 결정되었다([Tom Brown, Dorcas J. S. Brown. Modern machine-aided methods of oligodexoxyribonucleotide synthesis. In: F. Eckstein, editor. Oligonucleotide and Analogues, A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1991: 13-14] 참고).

[0215] 올리고뉴클레오타이드의 신장

[0216] 포스포르아미다이트의 커플링(A(bz), G(ibu), 5-메틸-C(bz)) 또는 T- β -시아노에틸-포스포르아미다이트)을, 아세토니트릴 중 5'-O-DMT-보호 아미다이트의 0.1 M 용액, 및 활성화제로서의 아세토니트릴 중 DCI (4,5-디시아노이미다졸)(0.25 M)를 이용하여 수행한다. 염화잔탄(아세토니트릴 중 0.01 M:피리딘 10%)을 이용하여 티올화를 수행한다. 시약의 나머지는 올리고뉴클레오타이드 합성에 전형적으로 사용되는 것들이다. 공급업자에 의해 제공되는 프로토콜은 편의상 최적화되었다.

[0217] RP-HPLC에 의한 정제:

[0218] 칼럼: Xterra RP₁₈

[0219] 유속: 3 mL/분

[0220] 완충제: 0.1 M 아세트산암모늄 pH 8, 및 아세토니트릴

[0221] 약어

[0222] DMT: 디메톡시트리틸

[0223] DCI: 4,5-디시아노이미다졸

- [0224] DMAP: 4-디메틸아미노피리딘
- [0225] DCM: 디클로로메탄
- [0226] DMF: 디메틸포름아미드
- [0227] THF: 테트라히드로푸란
- [0228] DIEA: N,N-디이소프로필에틸아민
- [0229] PyBOP: 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄 헥사플루오로인산염
- [0230] Bz: 벤조일
- [0231] Ibu: 이소부틸
- [0232] 실시예 3: LNA 올리고뉴클레오티드의 설계

표 1

LNA 올리고뉴클레오티드

서열 번호 1	5'-T ₅ G ₅ G ₅ C ₅ A ₅ A ₅ G ₅ C ₅ T ₅ T ₅ A-3'
서열 번호 2	5'-G ₅ T ₅ T ₅ A ₅ C ₅ G ₅ C ₅ T ₅ C ₅ T ₅ A ₅ C-3'
서열 번호 3	5'-(I _x)G _x C _x A _x A _x G _x C _x T _x G _x (I)-3'
서열 번호 4	5'-(G _x)T _x T _x A _x C _x G _x C _x T _x C _x T _x (A)-3'
서열 번호 5	5'-TGGC ₅ A ₅ A ₅ G ₅ C ₅ T ₅ C ₅ TGTa-3'
서열 번호 6	5'-TGGCaagcatccTGTa-3'
서열 번호 7	FAM-T ₅ G ₅ G ₅ C ₅ A ₅ A ₅ G ₅ C ₅ T ₅ G ₅ T ₅ A-3'
서열 번호 8	5'-C ₅ G ₅ T ₅ C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ T ₅ C-3'
서열 번호 9	5'-T ₅ G ₅ G ₅ C ₅ A ₅ A ₅ C ₅ A ₅ T ₅ C ₅ T ₅ G ₅ T ₅ A-3'
서열 번호 10	5'-T ₅ G ₅ A ₅ C ₅ A ₅ A ₅ G ₅ C ₅ T ₅ C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ A-3'
서열 번호 11	5'-TGGTg ₅ A ₅ G ₅ C ₅ T ₅ g ₅ CCGA-3'
서열 번호 12	5'-TTGCg ₅ A ₅ C ₅ T ₅ g ₅ ATGG-3'
서열 번호 13	5'-t ₅ g ₅ g ₅ C ₅ A ₅ A ₅ C ₅ t ₅ C ₅ t ₅ g ₅ t ₅ A-3'
서열 번호 14	5'-T ₅ T ₅ ^m C ₅ t ₅ A ₅ t ₅ g ₅ C ₅ t ₅ A ₅ T ₅ ^m C ₅ C-3'
서열 번호 15	5'-T ₅ G ₅ G ₅ C ₅ A ₅ A ₅ G ₅ C ₅ T ₅ C ₅ T ₅ G ₅ T-3'
서열 번호 16	5'-G ₅ G ₅ A ₅ A ₅ G ₅ C ₅ A ₅ T ₅ C ₅ T ₅ G ₅ t-3'
서열 번호 17	5'-G ₅ T ₅ T ₅ A ₅ C ₅ T ₅ G ₅ C ₅ T ₅ C ₅ T ₅ A ₅ -3'
서열 번호 18	5'-T ₅ T ₅ A ₅ C ₅ T ₅ G ₅ C ₅ T ₅ C ₅ T ₅ A-3'
서열 번호 19	5'-T ₅ G ₅ G ₅ A ₅ A ₅ G ₅ C ₅ T ₅ C ₅ T ₅ G ₅ t-3'
서열 번호 20	FAM-C ₅ G ₅ T ₅ C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ A ₅ T ₅ G ₅ C ₅ A ₅ T ₅ C-3'

[0233]

[0234] 표 1에서, 대문자는 β-D-옥시-LNA 뉴클레오티드 유사체(β-D-옥시-LNA)를 나타내고, 소문자는 2-데옥시뉴클레오티드를 나타내며, 밑줄은 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오티드 유사체 또는 2-데옥시뉴클레오티드를 나타내고, 아랫첨자 "s"는 인접 뉴클레오티드/LNA 뉴클레오티드 유사체 간의 포스포로티오에이트 결합을 나타내며, 인접 뉴클레오티드/LNA 뉴클레오티드 유사체 간에 첨자가 없음은 포스포로디에스테르 결합을 나타내며, 아랫첨자 "x"는 인접 뉴클레오티드/LNA 뉴클레오티드 유사체 간의 포스포로티오에이트 결합 또는 포스포로디에스테르 결합을 나타내고, 괄호 안의 뉴클레오티드 단위, 예컨대 (I_x) 또는 (G_x)는 각기 임의적 단위를 나타낸다. 모든 LNA-C 단량체는 5-메틸-C(^{Me}C)이다.

[0235] 화합물의 용점(T_m) 측정:

[0236] 10 mM 인산나트륨/100 mM NaCl/0.1 nM EDTA(pH 7.0) 중 서열 번호 1의 3 μM 용액을, 10 mM 인산나트륨/100 mM

NaCl/ 0.1 nM EDTA(pH 7.0) 중 상기 것의 상보체 DNA/RNA 3 μ M 용액과 90℃에서 1분 동안 혼합하고, 실온으로 냉각시켰다. 이어서, 온도를 1℃/분의 속도로 25℃에서 95℃로 증가시킴으로써 이중체의 T_m 을 구하였다. 서열 번호 1의 T_m 이 하기 표 2에 나와 있다:

표 2

서열 \ T_m	DNA	RNA
서열 번호 1	64.2℃	68.4℃
T ₅ G ₂ G ₂ C ₂ A ₂ A ₂ G ₂ C ₂ A ₂ T ₂ G ₂ T ₂ A		

실시예 4: 인간 또는 래트 혈장 내 LNA 뉴클레오타이드의 안정성

LNA 올리고뉴클레오타이드 안정성을 인간 또는 래트로부터의 혈장(이는 또한 마우스, 원숭이 또는 개 혈장일 수 있음)에서 시험하였다. 45 μ L 혈장에서, 5 μ L LNA 올리고뉴클레오타이드가 첨가된다(최종 농도는 20 μ M임). LNA 올리고뉴클레오타이드를 37℃에서 0 내지 96시간 동안 혈장 중에서 인큐베이션하였다(혈장을 96시간 이하 동안 뉴클라제 활성에 대해 시험하고, 뉴클라제 절단-패턴에 차이를 나타내지 않음). 표시된 시간에, 샘플을 액체 질소 중에 순간 냉동시켰다. 15 μ L의 물 및 3 μ L의 6×로딩 염료(인비트로젠(Invitrogen))를 첨가함으로써, 혈장 내 2 μ L(40 pmol와 동등) LNA 올리고뉴클레오타이드를 희석하였다. 마커로서, 10 bp 래더(ladder)(인비트로젠 10821-015)를 사용한다. 1 μ L 래더에 1 μ L 6×로딩 염료 및 4 μ L 물을 첨가한다. 샘플을 혼합하고, 10분 동안 65℃로 가열하며, 예비 전개(prerun) 겔(16% 아크릴아미드, 7 M UREA, 1×TBE, 1시간 동안 50 와트에서 예비전개함)에 로딩하여, 2½시간 동안 50-60 와트에서 전개한다. 후속하여, 겔을 15분 동안 1×TBE 내 1×SyBR 골드(분자성 프로브)로 염색하였다. 바이오래드(Biorad)로부터의 포스포이미저(phosphoimager)를 이용하여 밴드를 가시화하였다. (도 1a의 래트 혈장, 및 도 1b의 인간 및 래트 혈장을 참고한다).

LNA 올리고뉴클레오타이드 안정성을 인간으로부터의 혈장(이는 또한 래트, 마우스, 원숭이 또는 개 혈장) 내에서 시험하였다. 최종 농도 20 μ M(1 내지 5 μ L)의 LNA 올리고뉴클레오타이드를 총 부피가 20 μ L 혈장이 되도록 첨가하였고, 0 내지 24시간 동안(이는 72시간 이하일 수 있음 - 혈장을 72시간 이하 동안 뉴클라제 활성에 대해 시험하였고, 절단-패턴에 차이가 없음) 인큐베이션하였다. 표시된 시간에, 샘플을 -80℃에서 저장하였다. 혈장 내 1 μ L(20 pmol와 동등) LNA 올리고뉴클레오타이드를 물로 10x로 희석하였고, 16% 아크릴아미드, 10 bp 래더가 있는 7 M UREA 겔(인비트로젠(카탈로그 번호 10821-015)) 상에서 전개하였다. 겔을 15분 동안 1×TBE 내 1×SyBR 골드(분자 프로브)로 염색하기 전에, 2 내지 3시간 동안 대략 40 와트에서 전개하였다. 바이오래드로부터의 포스포이미저를 이용하여 밴드를 가시화하였다. (도 1을 참고한다).

실시예 5: 시험관내 모델: 세포 배양

표적 핵산 발현에 대한 LNA 올리고뉴클레오타이드의 영향을, 표적 핵산이 측정가능한 수준으로 존재하는 한, 다양한 세포 유형들 중 임의의 유형으로 시험할 수 있다. 표적은 내인적으로, 또는 상기 핵산을 코딩하는 핵산의 일시적이거나 안정한 트랜스팩션에 의해 발현될 수 있다.

표적 핵산의 발현 수준은 예를 들어, 노던 블롯 분석, 정량적 PCR, 리보뉴클라제 보호 검정을 이용하여 통상적으로 결정될 수 있다. 하기 세포 유형들은 예시적 목적을 위해 제공되나, 표적이 선택된 세포 유형에서 발현되는 한, 기타 세포 유형들도 통상적으로 사용될 수 있다.

세포를 하기 기재된 적당한 배지에서 배양하였고, 37℃, 95 내지 98% 습도, 및 5% CO₂에서 유지시켰다. 저산소 상태 또는 무산소 상태 하에 배양될 때, O₂ 수준을 각기 1 내지 2%, 또는 0 내지 0.5%로 유지시켰다. 세포를 주 2 내지 3회 통상적인 방식으로 계대 배양하였다.

15PC3: 인간 전립선 암 세포주 15PC3은 친절하게도 [Dr. F. Baas, Neurozintuigen Laboratory(AMC)(네덜란드)]에 의해 제공받아, [DMEM(시그마(Sigma)) + 10% 우태아 혈청(FBS) + 글루타맥스(Glutamax) I + 젠타마이신] 중에서 배양하였다.

PC3: 인간 전립선 암 세포주 PC3을 ATCC로부터 구매하였고, 글루타민(Gibco) + 10% FBS + 젠타마이신이 첨가된 F12 Coon에서 배양하였다.

518A2: 인간 흑색종 암 세포주 518A2는 친절하게도 [Dr. B. Jansen, Section of experimental Oncology, Molecular Pharmacology, Department of Clinical Pharmacology, 비엔나대학]에서 증여받았고, [DMEM(시그마)]

+ 10% 우태아 혈청 (FBS) + 글루타맥스 I + 젠타마이신 중에서 배양하였다.

- [0248] U373: U373 교모세포종 세포를 10% 우태아 혈청 + 글루타맥스 I, NEAA, 피루브산나트륨 및 젠타마이신을 함유하는 EMEM(시그마) 중에서 37℃, 95% 습도 및 5% CO₂ 하에 배양하였다.
- [0249] HeLa: 자궁경부 암종 세포주 HeLa를 10% 우태아 혈청 젠타마이신을 함유하는 MEM(시그마) 중에서 37℃, 95% 습도 및 5% CO₂ 하에 배양하였다.
- [0250] MPC-11: 쥐과동물 다발성 골수종 세포주 MPC-11을 ATCC에서 구입하여, 4 mM 글루타맥스 + 10% 말 혈청 함유의 DMEM에서 유지시켰다.
- [0251] DU-145: 인간 전립선 암 세포주 DU-145를 ATCC에서 구입하여, 글루타맥스 + 10% FBS 함유의 RPMI에서 유지시켰다.
- [0252] RCC-4 +/- VHL: VHL를 발현하는 플라스미드, 또는 공(empty) 플라스미드로 안정하게 트랜스펙션된 인간 신장 암 세포주 RCC4를 ECACC로부터 구입하여, 제조업자의 지시에 따라 유지시켰다.
- [0253] 786-0: 인간 신장 세포 암종 세포주 786-0을 ATCC에서 구입하여, 제조업자의 지시에 따라 유지시켰다.
- [0254] HUVEC: 인간 체대 정맥 내피 세포주 HUVEC를 캄크렉스(Camrex)로부터 구입하여, EGM-2 배지에서 유지시켰다.
- [0255] K562: 인간 만성골수성백혈병 세포주 K562를 ECACC로부터 구입하여, 글루타맥스 + 10% FBS 함유의 RPMI에서 유지시켰다.
- [0256] U87MG: 인간 교모세포종 세포주 U87MG를 ATCC로부터 구입하여, 제조업자의 지시에 따라 유지시켰다.
- [0257] B16: 쥐과동물 흑색종 세포주 B16을 ATCC로부터 구입하여, 제조업자의 지시에 따라 유지시켰다.
- [0258] LNcap: 인간 전립선 암 세포주 LNcap를 ATCC로부터 구입하여, 글루타맥스 + 10% FBS 함유의 RPMI에서 유지시켰다.
- [0259] *실시예 6: 시험관내 모델: 안티센스 올리고뉴클레오티드를 이용한 처리*
- [0260] 세포 배양 및 트랜스펙션: U373 또는 HeLa 세포를 10% FBS, 글루타맥스 I 및 젠타마이신이 보충된 D 배양 배지 중 37℃(5% CO₂)에서 12-웰 플레이트에 씨딩하였다. 세포가 60 내지 70% 융합상태(confluent)일 때, 그것을 리포펙타민 2000(2.5 내지 5 µg/ml)을 이용하여, 상이한 농도의 올리고뉴클레오티드(0.2 내지 100 nM)로 이중으로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션을 본질적으로 [Dean et al. (1994, JBC 269: 16416-16424)]에 기재된 바 대로 수행하였다. 간략히, 세포를 OptiMEM 중 리포펙타민과 함께 10분간 인큐베이션한 후, 올리고뉴클레오티드를 첨가하여 총 부피가 웰 당 0.5 ml 트랜스펙션 믹스가 되도록 하였다. 4시간 후, 트랜스펙션 믹스를 제거하였고, 세포를 세정하였으며, 정상산소 상태 또는 저산소 상태 중에 있는 동안 적절한 배양 배지 중, 37℃에서 대략 20 시간 동안 배양하였다(mRNA 분석 및 단백질 분석). 이어서, 단백질 및 RNA 분석을 위해, 세포를 수확하였다.
- [0261] *실시예 7: 시험관내 모델: RNA의 추출 및 cDNA 합성*
- [0262] 총 RNA 단리
- [0263] RNeasy 미니키트(키아젠(Qiagen) 카탈로그 번호 74104)을 이용하거나, 트리아졸 시약(라이프 테크놀로지스(Life technologies) 카탈로그 번호 15596)을 이용하여, 총 RNA를 단리하였다.
- [0264] RNeasy 미니 키트(키아젠)를 이용한 총 RNA 단리를 위해, 세포를 PBS로 세정하였고, 1% 머캅토에탄올로 보충된 세포 용해 완충제(RTL, 키아젠)를 웰에 직접 첨가하였다. 수분 후, 샘플을 제조업자의 지시에 따라 가공하였다.
- [0265] 렛쉬(Retsch) 300MM 호모지나이저를 이용하여 균질화하였고, 제조업자에 의해 기재된 바 대로, 트리아졸 시약 또는 RNeasy 미니 키트를 이용하여 총 RNA를 단리하였다.
- [0266] 제1 가닥 합성
- [0267] 제조업자의 지시(키아젠)에 따라, 본질적으로 제조업자(엠비온(Ambion))에 의해 기재된 옴니스크립트(OmiScript) 역전사효소 키트 또는 M-MLV 역전사효소를 이용하여, 제1 가닥 합성을 수행하였다. 옴니스크립트 역전사효소를 이용할 때, 각 샘플의 0.5 µg 총 RNA를 12 µl로 조정하고 0.2 µl 폴리(dT)₁₂₋₁₈ (0.5 µg/µl)(라이프 테크놀로지스), 2 µl dNTP 믹스(각각 5 mM), 2 µl 10×RT 완충제, 0.5 µl RNA가드(RNAGuard)TM RNase 억제

제(33 단위/ml, 아머샴(Amersham)) 및 1 μ l 옴니스크립트 역전사효소와 혼합한 후, 37℃에서 60분 동안 인큐베이션하고, 93℃에서 5분 동안 가열 불활성화하였다.

[0268] 무작위 10량체 및 (본질적으로 제조업자(엠티비온)에 의해 기재된) M-MLV-역전사효소를 이용하여 제1 가닥 합성을 수행하였다. 각 샘플에 대해, 0.25 μ g 총 RNA를 H₂O 중 10.8 μ l로 조정하였다. 2 μ l 10량체 및 2 μ l dNTP 믹스(각각 2.5 mM)를 첨가하였다. 샘플을 3분 동안 70℃로 가열하고, 빙수 내 즉각적으로 냉각시켰으며, (2 μ l 10× RT 완충제; 1 μ l M-MLV 역전사효소; 0.25 μ l RNAase 억제제)를 함유하는 3.25 μ l의 믹스를 첨가하였다. cDNA를 42℃에서 60분 동안 합성한 후, 95℃에서 10분 동안 가열 불활성화하는 단계를 수행하고, 마지막으로 4℃로 냉각시켰다.

[0269] 실시예 8: 시험관내 및 생체내 모델: 실시간 PCR에 의한 HIF-1 α 발현의 올리고뉴클레오타이드 역제의 분석

[0270] HIF-1 α 발현의 안티센스 조절을 당업계에 공지된 다양한 방식으로 검정할 수 있다. 예를 들어, HIF-1 α mRNA 수준을 예컨대, 노던 블롯 분석, 경쟁적 폴리머라제 사슬 반응(PCR), 리보뉴클레아제 보호 검정(RPA) 또는 실시간 PCR에 의해 정량화할 수 있다. 실시간 정량적 PCR이 여기에서 바람직하다. RNA 분석을 총 세포 RNA 또는 mRNA에 대해 수행할 수 있다.

[0271] RNA 단리 및 RNA 분석의 방법, 예컨대 노던 블롯 분석은 당업계에서 통상적이고, 예를 들어 [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons]에 교시되어 있다.

[0272] 실시간 정량(PCR)을, 시중 입수가 가능한 iQ 다색 실시간 PCR 보호 시스템(바이오래드(BioRAD)로부터 입수가 가능함)을 이용하여 편리하게 달성할 수 있다.

[0273] HIF-1 α mRNA 수준의 실시간 정량적 PCR 분석

[0274] mRNA 수준의 정량화를 iQ 다색 실시간 PCR 검출 시스템(바이오래드)를 이용하여, 제조업자의 지시에 따라, 실시간 정량적 PCR에 의해 결정할 수 있다.

[0275] 실시간 정량적 PCR은 당업계에 공지된 기법이며, 예를 들어 [Heid et al. Real time quantitative PCR, Genome Research (1996), 6: 986-994]에 교시되어 있다.

[0276] 백금 정량적 PCR 슈퍼믹스 UDG 2×PCR 마스터 믹스를 인비트로젠 카탈로그# 11730로부터 입수하였다. 프라이머 및 태크맨(TaqMan)[®] 프로브를 MWG-바이오테크 AG(독일 에베르스베르크 소재)로부터 입수하였다.

[0277] 글리세르알데히드-3-인산염 데히드로게나제(GAPDH), 18S RNA 또는 β -액틴 mRNA 양을 샘플 제조에 있어 임의의 변화를 정규화하기 위한 내인성 대조군으로 사용하였다.

[0278] 인간 GAPDH mRNA의 샘플 함량을 인간 GAPDH ABI 프리즘(Prism) 예비-개발 태크맨 검정 시약(어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 카탈로그 번호 4310884E)을 이용하여 제조업자의 지시에 따라 정량화하였다.

[0279] 인간 HIF-1 α 의 경우, PCR 프라이머는 전방향 프라이머: 5'-CTCATCCAAGAAGCCCTAACGTGTT-3'(서열 번호 21)(검정에서의 최종 농도; 0.9 μ M) 역방향 프라이머: 5'-GCTTCTCTGAGCATCTGCAAAGC-3'(서열 번호 22)(검정에서의 최종 농도; 0.9 μ M)였고, PCR 프로브는 5' FAM-CCTCAGGAAGTGTAGTTCTTGACTCAAAGCGACA-TAMRA 3'(서열 번호 23)(검정에서의 최종 농도; 0.1 μ M)였다.

[0280] 실험용 원숭이 HIF-1 α 의 경우, PCR 프라이머는 I 전방향 프라이머: 5'-GCTTACCATCAGCTATTTGCGTGTG-3'(검정에서의 최종 농도; 0.9 μ M)(서열 번호 24) 역방향 프라이머: 5'-GAACCATAACAAAACCATCCAAGGC-3'(서열 번호 25)(검정에서의 최종 농도; 0.9 μ M)였고, PCR 프로브는 5' FAM-TCATCTTCAATATCCAAATCACCAGCATCCAGAAG-TAMRA 3'(서열 번호 26)(검정에서의 최종 농도; 0.1 μ M)였다.

[0281] 18S 리보솜형 RNA의 정량화를 위해, 태크맨 진핵세포 18S rRNA 내인성 조절 시약(파트# 4310875, 어플라이드 바이오시스템즈)을 제조업자의 지시에 따라 사용하였다.

[0282] 마우스 GAPDH mRNA의 정량화를 위해, 하기 프라이머 및 프로브를 설계하였다: 센스 프라이머 5'-AAGGCTGTGGCAAGGTCATC-3'(서열 번호 27)(0.3 μ M 최종 농도),

[0283] 안티센스 프라이머 5'-GTCAGATCCACGACGGACACATT-3'(서열 번호 28)(0.6 μ M 최종 농도),

[0284] 태크맨 프로브 5'-FAM-GAAGCTCACTGGCATGGCATGGCCTTCGTTGTC-TAMRA-3'(서열 번호 29)(0.2 μ M 최종 농도).

- [0285] 태크맨 프로브를 이용한 실시간 PCR
- [0286] 실시예 6에 기재된 바 대로 수행된 제1 가닥 합성으로부터의 cDNA를 2 내지 20배로 희석하였고, 실시간 정량적 PCR에 의해 정량화하였다. 프라이머 및 프로브를 2×백금 정량적 PCR 슈퍼믹스 UDG(카탈로그 # 11730, 인비트로젠)와 혼합하였고, 3.3 μ l cDNA에 첨가하여, 최종 부피가 25 μ l가 되도록 하였다. 각 샘플을 삼벌로 분석하였다. 관심 RNA를 발현하는 세포주로부터 정제된 물질에 제조된 cDNA의 2배 희석물을 검정함으로써 검정을 위한 표준 곡선을 생성시켰다. 주형 대조군이 없는 경우, cDNA 대신에 무균 H₂O를 사용하였다. PCR 프로그램: 50℃에서 2분간, 95℃에서 10분간, 이어서 95℃, 15 초, 60℃, 1분의 40 사이클.
- [0287] i사이클러(iCycler) iQ 실시간 검출 시스템 소프트웨어를 이용하여, 표적 mRNA 서열의 상대적 양을 계산된 역치 사이클로부터 구하였다(도 2 참고).
- [0288] SyBR 그린 실시간 PCR
- [0289] 상대적 마우스 HIF1 α mRNA 수준을 구하기 위해, cDNA를 바이오래드의 i사이클러를 이용하는 정량적 PCR 분석에 사용하였다.
- [0290] 8 μ l의 5배 희석된 cDNA를 29.5 μ l 백금 qPCR 슈퍼믹스-UDG(인비트로젠), 1030 nM의 각 프라이머, 0.57×SYBR 그린(몰레큘러 프로브스) 및 11.4 nM 플루오레신(몰레큘러 프로브스)를 함유하는 52 μ l의 믹스에 첨가하였다.
- [0291] Q-PCR에 25 μ l의 이중체를 사용하였다: 50℃에서 120초 간, 95℃에서 120초간, 및 [95℃에서 30초간 및 60℃에서 60초간]의 40 사이클.
- [0292] HIF1 α mRNA 발현을, Q-PCR을 이용하여 유사하게 정량화된 마우스 β -액틴 mRNA에 정규화하였다.
- [0293] 프라이머:
- [0294] mHIF1 α : 5'-TGCGACTTTCTTTTACCATGC-3'(서열 번호 30) 및 5'-GGAGTGTTCACGTTTCTGAAG-3'(서열 번호 31)
- [0295] m β -액틴: 5'-CCTTCCTTCTTGGGTATGGAA-3'(서열 번호 32) 및 5'-GCTCAGGAGGAGCAATGATCT-3'(서열 번호 33)
- [0296] mVEGF: 5'-CACGACAGAAGGAGAGCAGAAGTC-3'(서열 번호 34) 및 5'-GTCGGGTACTCCTGGAAGATGT-3'(서열 번호 35)
- [0297] BCL-2: 전방향: 5'-gccctgtggatgactgagta-3'(서열 번호 36) 및 역방향: 5'-cagccaggagaaatcaaacag-3'(서열 번호 37)
- [0298] 미처리 마우스 섬유아세포(Ltk 셀즈(Ltk Cells))(5배 희석되고, HIF1 α 및 β -액틴 모두를 발현함)로부터 합성된 2배 희석물을 사용하여, 검정을 위한 표준 곡선을 제조하였다. i사이클러 iQ 실시간 검출 시스템을 이용하여, 계산된 역치 사이클로부터 HIF1 α mRNA의 상대적 양을 구하였다.
- [0299] 실시예 9: 시험관내 분석: HIF-1 α 단백질 수준의 웨스턴 블롯 분석
- [0300] HIF-1 α LNA 올리고뉴클레오타이드의 트랜스펙션된 세포 내 HIF-1 α 단백질 수준에 대한 시험관내 영향을 웨스턴 블로팅에 의해 구하였다.
- [0301] 세포를 수확하여, 50 mM 트리스-HCl(pH 6.8), 10% 글리세롤, 2.5% SDS, 5 mM DTT, 및 프로테아제 억제제 콕테일(로쉐(Roche))로 보충된 6 M 우레아에 용해시켰다. BCA 단백질 검정 키트(피어스(Pierce))를 이용하여 총 단백질 농도를 측정하였다. 20 내지 100 μ g 총 단백질을 MOPS 완충제 내 10 내지 12% 비스-트리스 겔 상, 또는 3 내지 8% 트리스 아세테이트 겔 상에 전개하고, 제조업자의 지시에 따라(인비트로젠), PVDF 막에 블로팅하였다. 블로킹 완충제(5% 저지방 우유 분말로 보충된 PBS-T)에서 하룻밤 동안 인큐베이션한 후, 막을 항HIF-1 α 항체, Bcl-2 항체 VEGF 항체, 또는 HIF-1 α 의 다른 다운 스트림을 검출하는 항체를 이용하여 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 네오마커(Neomarker)로부터의 단클론성 항체를 이용하여, 로딩의 대조군으로서 튜블린 또는 액틴을 검출하였다. 이어서, 막을 2차 항체와 함께 인큐베이션하였고, HIF-1 α 를 유색 면역검출 키트(인비트로젠) 또는 화학 발광 ECL⁺ 검출 키트(아머삼)를 이용하여 가시화하였다(도 2a 및 도 2b 참고).
- [0302] 실시예 10: 시험관내 분석: 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용한 인간 HIF-1 α 발현의 안티센스 억제, 및 그것의 다운스트림 표적 VEGFA 및 MMP-2에 대한 영향
- [0303] LNA 올리고뉴클레오타이드는 또한 U373 세포로부터의 배지 중 다운스트림 표적 VEGFA 및 MMP-2에 대한 영향을 미친다. U373 세포를 T25 플라스크 내 0.3×10^6 개 세포(시간 연구), 또는 T80 플라스크 내 0.6×10^6 개 세포(48시

간 농도, 연구)에 씨딩하였다. U373 세포를 37℃(5% CO₂)에서 10% FBS, 글루타맥스 I 및 젠타마이신으로 보충된 배양 배지에 둔다. 씨딩한 다음 날, 세포에 리포팩타민 2000(2.5 µg/ml)을 이용하여, 상이한 농도의 올리고뉴클레오티드(0.2 내지 10 nM)를 이용하여 이별 또는 삼별로 LNA 올리고뉴클레오티드를 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션을 본질적으로 [Dean et al. (1994, JBC 269: 16416-16424)]에 기재된 대로 수행하였다. 간략히, 세포를 OptiMEM 내 리포팩타민과 함께 10분 동안 인큐베이션한 후, 올리고뉴클레오티드를 첨가하였다. 4시간 후, 트랜스펙션 믹스를 제거하였고, 세포를 세정하였으며, 적당한 배양 배지 내에 정상산소 상태 또는 저산소 상태에서 37℃에서 대략 20시간 동안 배양하였다(mRNA 분석 및 단백질 분석). 세포로부터의 상등액을 표시된 시간에 수확하였다. 프로테아제 억제제를 첨가한 후, -80℃에서 저장하였다. 인간 VEGFA 엘리사(elisa)(카탈로그 #DVE-00) 및 MMP-2 엘리사(카탈로그 # DMP-200)(RD 시스템즈)를 제조업자에 따라 사용하였다. 수확 시간에 따라, 상등액을 5 내지 50배로 희석한 후, 측정하였다. 도 12a-e를 참고한다.

[0304] 실시예 11 : LNA 올리고뉴클레오티드에 의한 아포토시스 유도

[0305] 세포의 배양

[0306] 교모세포종 세포주 U373(ATCC)을 37℃, 95% 습도 및 5% CO₂에서, 10% 우태아 혈청, 글루타맥스 I, NEAA, 피루브산나트륨 및 젠타마이신으로 보충된 MEM(시그마)에서 배양하였다. 세포가 60 내지 70% 융합상태에 도달했을 때, 세포에 리포팩타민 2000(2.5 µg/ml)을 이용하여 트랜스펙션하였다.

[0307] 자궁경부암종 세포주 HeLa를, 37℃, 95% 습도 및 5% CO₂에서 10% 우태아 혈청 젠타마이신을 함유하는 MEM(시그마)에서 배양하였다. 세포가 60 내지 70% 융합상태에 도달했을 때, 세포를 리포팩타민 2000(5 µg/ml)을 이용하여 트랜스펙션하였다.

[0308] 활성 카스파제 3/7 활성의 측정

[0309] U373 세포를 트랜스펙션 전날 완전 MEM 내 백색 96 웰 플레이트(Nunc 136101) 내 웰당 7000개 세포의 밀도로 씨딩하였다. 그 다음 날, 세포를 미리 가온된 OptiMEM로 1회 세정한 후, 2.5 µg/ml 리포팩타민2000(인비트로젠)을 함유하는 72 µl OptiMEM를 첨가하였다. 세포를 OptiMEM 내 희석된 18 µl 올리고뉴클레오티드를 첨가하기 전 7분 동안 인큐베이션하였다. 최종 올리고뉴클레오티드 농도는 0.2 nM 내지 100 nM 범위였다. 6시간 동안 처리한 후, 세포를 OptiMEM로 세정하였고, 혈청을 함유하는 100 µl DMEM를 첨가하였다. U373 세포로 처리된 유사한 96 웰 플레이트를, 96 웰 플레이트를 수확 시까지 통기배양(aerocult) 백(머크(Merck))에 둬으로써 정상산소 상태 또는 저산소 상태/무산소 상태 하에서 배양하였다. 플레이트를 표시된 시간에 15분 동안 실온으로 평형화하였다. 100 µl의 매우 민감한 카스파제 3/7-GloTM 시약(프로메가(Promega))을 96웰 내 세포에 직접 첨가하였고, 1분 정지(lag) 시간 후에 써모 랩 시스템즈(Thermo Lab Systems)사의 루미노스칸 애스센트(Luminoskan Ascent) 기기에서 발광(루시페라제 활성)을 기록하기 전에 1시간 동안 인큐베이션하였다. 루시페라제 활성을 상대 광 단위/초(RLU/s)로서 측정된다. 데이터를 애스센트(Ascent) 소프트웨어 2.4.2.로 처리하였고, 모의체에 대한 유도 배수(fold)의 그래프를 엑셀로 그렸다.

[0310] 활성 카스파제 3/7의 활성을 차단하는 카스파제 3/7 억제제와 함께 인큐베이션된 트랜스펙션된 세포를 사용하여, 아포토시스성 반응의 특이성을 입증하였다. 또한, 스타우로스포린(Staurosporine), 캄프토테신(camptothecin) 또는 탁솔 유도 세포를 양성 대조군으로 사용하였다(도 3a 및 도 3b 참고).

[0311] 아넥신 V-FITC 유세포분석

[0312] 1×10^6 개 HeLa 세포를 트랜스펙션 하루 전날 T75 플라스크에 씨딩하였다. 트랜스펙션하는 당일, 세포를 37℃의 OptiMEM로 1회 세정한 후, 2.5 µg/ml 리포팩타민2000(인비트로젠)을 함유하는 7 ml의 OptiMEM를 첨가하였다. 세포를 7분 동안 인큐베이션한 후, 최종 농도가 1 내지 25 nM가 되도록 OptiMEM 내 희석된 1700 µl 올리고뉴클레오티드를 첨가하였다. 모의체가 트랜스펙션된 세포가 대조군으로 작용하였다. 4시간 동안 처리한 후, 세포를 OptiMEM에서 세정하고, 10 ml의 배지를 첨가하였다. 올리고뉴클레오티드 처리 후, 세포를 24 내지 72시간 동안 회복시킨 후, PBS에서 스크래핑하고 2회 세정함으로써 세포를 수확하였다. 2×10^5 세포를 5 µl 아넥신 V-FITC 및 10 µl 요오드화프로피듐(PI - 10 mg/ml)와 함께 인큐베이션하고, 암 상태 하에 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 트랜스펙션된 세포를 정제된 재조합 아넥신 V(10 µg)와 함께 인큐베이션한 후, 아넥신 V-FITC를 첨가하는 것을 이용하여, 염색의 선택성 및 특이성을 입증하였다. 또한, TRAIL(Apo2L) 유도된 HeLa 세포(0.5 µg/ml)를 양성 대조군으로 사용하였다.

- [0313] 0.6×10^6 개 U373 세포를 트랜스펙션 하루 전날 T75 플라스크에 씨딩하였다. 트랜스펙션하는 당일, 세포를 37℃의 OptiMEM로 1회 세정한 후, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 리포펙타민2000(인비트로젠)을 함유하는 7 ml의 OptiMEM를 첨가하였다. 세포를 7분 동안 인큐베이션한 후, 최종 농도가 1 내지 25 nM가 되도록 OptiMEM 내 희석된 1700 μl 올리고뉴클레오타이드를 첨가하였다. 모의체가 트랜스펙션된 세포가 대조군으로 사용되었다. 6시간 동안 처리한 후, 세포를 OptiMEM에서 세정하고, 10 ml의 배지를 첨가하였다. 올리고뉴클레오타이드 처리 후, 세포를 24-48시간 동안 회복시킨 후, PBS에서 스크래핑하고 2회 세정함으로써 세포를 수확하였다. 2×10^5 세포를 5 μl 아넥신 V-FITC 및 10 μl 요오드화프로피듐(PI - 10 mg/ml)와 함께 인큐베이션하고, 암 상태 하에 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 트랜스펙션된 세포를 정제된 재조합 아넥신 V(10 μg)와 함께 인큐베이션한 후, 아넥신 V-FITC를 첨가하는 것을 이용하여, 염색의 선택성 및 특이성을 입증하였다. 또한, 스타우로스포린(0.2 μM) 유도 U373 세포를 양성 대조군으로 사용하였다(도 4a 및 4b 참고).
- [0314] 실시예 12: LNA 올리고뉴클레오타이드에 의한 증식 억제
- [0315] 세포를 실시예 11에 따라 처리하였다.
- [0316] 증식하는 생육성 세포의 측정(MTS 검정)
- [0317] U373 세포를, DMEM 내 트랜스펙션 전날 투명한 96 웰 플레이트(사이언티픽(Scientific) 오렌지 no. 1472030100) 내 웰당 7000개 세포의 밀도로 씨딩하였다. 그 다음 날, 세포를 미리 가온된 OptiMEM로 1회 세정한 후, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 리포펙타민 2000(인비트로젠)을 함유하는 72 μl OptiMEM를 첨가하였다. 세포를 OptiMEM 내 희석된 18 μl 올리고뉴클레오타이드를 첨가하기 전에 7분 동안 인큐베이션하였다. 최종 올리고뉴클레오타이드 농도는 5 nM 내지 100 nM 범위였다. 6시간 동안 처리한 후, 세포를 OptiMEM로 세정하였고, 혈청을 함유하는 100 μl DMEM를 첨가하였다. U373 세포로 처리된 유사한 96 웰 플레이트를, 96 웰 플레이트를 수확 시까지 통기배양 백(머크)에 덮으로써 정상산소 상태 또는 저산소 상태/무산소 상태 하에서 배양하였다. 20 μl 의 테트라졸륨 화합물 [3-(4,5-디메틸-2-일)-5-(3-카르복시메톡시페닐)-2-(4-술포페닐)-2H-테트라졸륨, 내부 염; MTS] 및 전자 커플링 시약(페나진 에토설페이트; PES)(셀티터(CellTiter) 96[®] 수성 1-용액 세포 증식 검정, 프로메가(Promega))를 첨가함으로써 표시된 시간에서 생육성 세포를 측정하였다. 생육성 세포를 파워웨이브(Powerwave)(바이오테크 인스트루먼트즈(Biotek Instruments))에서 490 nm 및 650 nm에 측정하였다.
- [0318] 성장율의 억제 $\Delta\text{OD}(490 \text{ 내지 } 650 \text{ nm})/\text{h}$ 를 100%로 설정된 모의체에 대한 LNA 올리고뉴클레오타이드 농도를 플로팅하였다(도 5a 및 도 5b 참고).
- [0319] 실시예 13: LNA 올리고뉴클레오타이드의 생체내 흡수 및 표적 하향 조절
- [0320] 털 마우스를, 14일 동안 염수 또는 서열 번호 1 및 2의 상이한 티올화 양태를 i.p 주사하여 매일 또는 주당 2회(5번)으로 처리하였다. 서열 번호 5는 (겍을 두고) 부분 티올화되고, 반면 서열 번호 6은 포스포디에스테르 골격을 가진다. 마우스를 매일 또는 주당 2회로 10 mg/kg/14일, 50 mg/kg/14일, 또는 250 mg/kg/14일의 총 용량으로 처리하였다.
- [0321] 조직으로부터의 RNA 정제 및 cDNA 합성
- [0322] 대략 10 mg 조직을 1% 머캅토에탄올로 보충된 400 μl RTL 완충제(퀴아젠) 내 균질화하였다. RNeasy 미니 키트(퀴아젠)를 이용하여 제조업자의 지시에 따라, 총 RNA를 분리하였다.
- [0323] 무작위 10량체 및 (본질적으로 제조업자(앰비온)에 의해 기재된) M-MLV-역전사효소를 이용하여 제1 가닥 합성을 수행하였다. 각 샘플에 대해, 0.25 μg 총 RNA를 H₂O 중 10.8 μl 로 조정하였고, 2 μl 10량체 및 2 μl dNTP 믹스(각각 2.5 mM)를 첨가하였다. 샘플을 3분 동안 70℃로 가열하고, 빙수 내 즉각적으로 냉각시켰으며, (2 μl 10× RT 완충제; 1 μl M-MLV 역전사효소; 0.25 μl RNAase 억제제)를 함유하는 3.25 μl 의 믹스를 첨가하였다. cDNA를 42℃에서 60분 동안 합성한 후, 95℃에서 10분 동안 가열하여 불활성화시키고, 마지막으로 4℃로 냉각시켰다.
- [0324] 정량적 실시간 PCR 분석
- [0325] 처리 및 미처리 샘플 내 상대적 마우스 HIF1 α mRNA 수준을 구하기 위해, 발생된 cDNA를 바이오래드의 i사이클러를 이용하여, 정량적 PCR 분석에 사용하였다.
- [0326] 8 μl 의 5배 희석된 cDNA를 29.5 μl 백금 qPCR 슈퍼믹스-UDG(인비트로젠), 1030 nM의 각 프라이머, 0.57×SYBR 그린(몰레큘러 프로브스) 및 11.4 nM 플루오레신(몰레큘러 프로브스)를 함유하는 52 μl 의 믹스에 첨가하였다.

- [0327] Q-PCR에 25 μ l의 이중체를 사용하였다: 50℃에서 120초 간, 95℃에서 120초간, 및 40 사이클[95℃에서 30초간 및 60℃에서 60초간].
- [0328] HIF1 α mRNA 발현을, Q-PCR을 이용하여 유사하게 정량화된 마우스 β -액틴 및/또는 Gapdh mRNA에 정규화하였다.
- [0329] mHIF1 α : 5'-TGGGACTTTCTTTTACCATGC-3'(서열 번호 30) 및 5'-GGAGTGTTCCTGTTTCCTGAAG-3'(서열 번호 31)
- [0330] m β -액틴: 5'-CCTTCCTTCTTGGGTATGGAA-3'(서열 번호 32) 및 5'-GCTCAGGAGGAGCAATGATCT-3'(서열 번호 33)
- [0331] mVEGF: 5'-CACGACAGAAGGAGAGCAGAAGTC-3'(서열 번호 34) 및 5'-GTCGGGTACTCCTGGAAGATGT-3'(서열 번호 35)
- [0332] mGAPDH: 5'-AGCCTCGTCCCGTAGACAAAAT-3'(서열 번호 38) 및 5'-GTTGATGGCAACAATCTCCACTTT- 3'(서열 번호 39)
- [0333] mBcl-2: 전방향: 5'-gccctgtggatgactgagta-3'(서열 번호 36) 및 역방향: 5'-cagccaggagaaatcaaacag-3'(서열 번호 37)
- [0334] 미처리 마우스 섬유아세포(Ltk 셀즈)(5배 희석되고, HIF1 α 및 β -액틴 모두를 발현함)로부터 합성된 2배 희석 물을 사용하여, 검정을 위한 표준 곡선을 제조하였다. i사이클러 iQ 실시간 검출 시스템 소프트웨어를 이용하여, 계산된 역치 사이클로부터 HIF1 α mRNA의 상대적 양을 구하였다.
- [0335] 조직으로부터의 LNA 올리고뉴클레오티드의 추출
- [0336] 대략 100 mg 조직을 500 μ l 추출 완충제(0.5% 이계팔(Igepal) CA-630, 25 mM 트리스 pH 8.0, 25 μ M EDTA, 1 mg/ml RNase A 함유의 100 mM NaCl) 내 기계적으로 교반하고, 37℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 500 ml 을 기준 올리고뉴클레오티드로 스파이킹하고, 1 ml 페놀-이소아밀-클로로포름(25:1:24(v/v/v))을 첨가하여 추출 하였다. 수성상을 새 관에 옮기고, 다시 추출하였다. 필요한 경우, 추출물을 동결건조하였다.
- [0337] 추출된 LNA 올리고뉴클레오티드의 IEX HPLC 분석
- [0338] 50 μ l의 샘플 부피를, 가드 칼럼 DNAPac PA-100(2 \times 50 mm, 디오넥스(Dionex))가 장착된 DNAPac PA-100(2 \times 250 mm, 디오넥스) 칼럼에서 분리하였다. 칼럼을 40℃로 가열하였다. 유속은 0.25 mL/분이었고, 검출 파장은 260 nm 이었다. 이동상 A의 구성: 트리스(20 mM), EDTA(1 mM) 및 과염소산나트륨(10 mM) pH: 7.6, B: 트리스(20 mM), EDTA(1 mM) 및 과염소산나트륨(1 M) pH: 7.6, (0 내지 13분, A: 20%, B: 20%; 14 내지 18분, A: 40%, B: 60%; 22 내지 28분, A 0%, B: 100%; 33 내지 38 분, A: 80%, B: 20%).
- [0339] 도 6a 및 도 6b는 (상기 기재된 바와 같이) 14일 동안 매일 또는 주당 2회 서열 번호 1을 i.p. 투여한 후, 생체 내 흡수(μ g/g 조직) + 표적 하향 조절(염수 처리 마우스 대비, β -액틴 발현 대 HIF-1 α mRNA 발현의 % 억제 율)을 나타낸다.
- [0340] 도 6c는 서열 번호 1의 14일 처방을 위해 털 마우스에 매일 i.p. 주사를 투여한 생체내 내인성 신장 표적 하향 조절을 나타낸다.
- [0341] 도 7a는 서열 번호 1이 매일 투여 시에 HIF-1 α 발현에 대한 Q-PCR에 의한 측정에 따라 간 내 효능적 억제제임을 나타낸다.
- [0342] 도 7b는 서열 번호 1이 주당 2회 투여 시에 HIF-1 α 발현에 대한 Q-PCR에 의한 측정에 따라 간 내 효능적 억제제임을 나타낸다.
- [0343] 도 7c는 서열 번호 1이 매일 투여 시에 HIF-1 α 발현에 대한 Q-PCR에 의한 측정에 따라 신장 내 효능적 억제제임을 나타낸다.
- [0344] 실시예 14: U373 이중이식편 종양을 갖는 마우스 내 서열 번호 1의 생체내 효능
- [0345] 누드 마우스에서의 종양 이중이식편의 성장에 대한 올리고뉴클레오티드 처리의 영향을, 상이한 종양 세포주를 이용하여 측정할 수 있다. 그러한 세포주의 예는 인간 종양 세포주 U87(교모세포종), U373(교모세포종), 15PC3(전립선 암), PC3(전립선 암), DU145(전립선 암), LNCap(전립선 암 및 쥐과동물 종양 세포주 B16(흑색종))이다.
- [0346] LNA 올리고뉴클레오티드를 이용한 누드 마우스에서의 피하 종양 이중이식편의 처리.
- [0347] 종양 세포를 피하 이식한 후, 3회 연속 이식에 의해 연속적으로 계대 배양하였다. 1 mm의 종양 절편을 NMRI 누드 마우스에서 크로카(krocar) 바늘로 피하 이식하였다. 대안적으로, 300 μ L 마트릭젤(matrigel)(BD 바이오사이언스) 내에 현탁된 암 세포, 전형적으로는 10E6 내지 10E7 세포를 NMR1:누드 마우스의 옆구리에 피하 주사하

였다. 복강내 주사 5 mg/kg/일에 의해 마우스를 처리하였다. 종양 부피가 50 mm³에 도달하면, 마우스의 개별 처리를 개시하였다. 대조군(염수 처리군)의 평균 종양 부피가 50 mm³에 도달하면, PBS를 이용한 처리를 개시하였다. 임의의 군의 종양이 최대 허용된 크기에 도달하면, 실험을 종료하였다. 모든 마우스들의 종양 크기를 칼리퍼 측정에 의해 매일 측정하였다. 종양 크기 및 종양 성장으로서 처리 효과를 측정하였다.

[0348] 서열 번호 1을 이용한 또 다른 연구에서, U373 공여자 마우스로부터의 중요 종양 조각을 누드 마우스의 난소 지방 조직(0일째)에 이식한다. 이식 후 4일 및 9일째에, 마우스를 50 mg/kg(i.p)로 LNA 올리고뉴클레오타이드로써 처리한다. 마우스를 마지막 날 후 2일째(11일째)에 희생하고, CD-31 ab를 갖는 종양의 칭량 + 염색을 수행한다(도 8a 및 8c 참고).

[0349] 도 8b 및 8c는 서열 번호 1로 처리된 이중이식편으로부터의 U373 종양의 혈관 밀도를 나타낸다. 도 10d는 QPCR에 의해 측정된 U373 종양 내 HIF-1 α mRNA 발현을 나타낸다.

[0350] 서열 번호 1을 1주일 동안 주당 2회로 50 mg/kg를 난소에 이식된 U373 이중이식편 마우스에 투여하였다. 마지막 투여 후 2일째에, 동물을 희생시킨다. CD31 염색 후, 총 면적 대비, 혈관 밀도를 계산하였다. 통계학적 유의 차(P=0.005)가 염수 군과 조합된 대조군(서열 번호 12)으로 처리된 마우스 사이에 나타났다.

[0351] 실시예 15: 서열 번호 1의 간 및 신장 내 조직 반감기 및 표적 녹다운(knockdown)

[0352] 60 NMRI 암컷 마우스(대략 25 g)를 5개 군으로 나누고, 30 mg/kg 서열 번호 1을 0, 3, 7, 10 및 14일째에 i.p.(10 mL/kg, 2.5 mg/ml) 투여하였다. 14일째에 군을 희생시켰다. 대조군에 0.9% 염수를 투여하였다. 조직 샘플을 취하여 RNA-레이터(RNA-later)에서 제조하였다. 도 11은 서열 번호 1 30 mg/kg을 5회 i.p 투여한 후, 마우스의 생체내 흡수(μ g/g 조직) + 표적 하향 조절(β -액틴 발현 대 HIF-1 α 및 VEGF mRNA 발현의 % 억제율)을 나타낸다.

[0353] 실시예 16: 생체내 작용 기간 및 LNA 올리고뉴클레오타이드 흡수

[0354] 작용 기간: 20 Balb/cA-nu, 암컷 마우스(대략 25 g) PC3, 전립선 암 세포주(ECACC#90112714)를 5개 군으로 나누고, 25 mg/kg 서열 번호 7을 7일째 내지 13일째에 매일 i.p.(10 mL/kg, 2.5 mg/ml) 투여하였다. 투여 후 1일째 및 5일째에 군을 희생시켰다. 대조군에 0.9% 염수를 투여하였다. 조직 샘플을 취하여 RNA-레이터에서 제조하였다. 도 10a는 처리 후 1일 및 5일째의 mRNA 발현의 작용 기간을 나타낸다.

[0355] LNA 올리고뉴클레오타이드 흡수: 포르말린 고정 후, 조직을 파라핀 포매하였다. 조직을 홀트액(Holt's solution)(30 g 사카로스, 1 g 아카시아 검, 15 mg 티몰, 증류수 100 ml)에 하룻밤 동안 두고, 냉동시켰다. 4 my의 동결절편을 코팅된 유리에 탑재하고, DAPI 용액 중에 두었다. 형광색소를 형광현미경법으로 가시화하였다. 도 10b는 7일 동안 25 mg/kg/일로 fam-표지 양태 서열 번호 1로 처리되고, 마지막 처리로부터 5일째에 희생시킨 마우스로부터의 간, 신장 및 종양의 조직으로부터 조직학적 결과를 나타낸다. 피부의 사진은 동일한 방식으로 처리되었으나, 마지막 처리 다음 날 희생시켰고, 피부의 기저 세포의 약한 염색을 확인하기 위해 과노출한 마우스로부터의 것이다(하부 청색 선). 이 데이터는 하기 것들을 제시한다:

[0356] 간: 세포질에 주로 위치한 간세포의 염색

[0357] 신장: 토리쪽 세관의 매우 강한 염색, 및 먼쪽 세관의 약한 염색.

[0358] 종양: 내피 세포, 대식세포가 염색됨(마우스 세포).

[0359] 피부: 진피(내피 세포 및 대식세포), 및 표피의 기저층의 세포질의 강한 염색

[0360] 실시예 17: 생체내 LNA 올리고뉴클레오타이드 흡수 및 효능

[0361] 당일에, 0.3×10^6 개 세포(PC3 및 HT29)를 300 μ l 매트릭스겔(Matrixgel)과 혼합하여, Balb/cA-nu, 암컷 마우스(대략 25 g)에 이식하였다. 7, 10, 13, 17일째에 마우스를 복강내 주사 5 mg/kg/일로써 염수, fam-표지 양태의 서열 번호 1(서열 번호 7) 또는 fam-표지 양태의 서열 번호 8(서열 번호 20)로 처리하였다. 마지막 투여 후 3일(20일)째 또는 10일(27일)째에, 동물을 희생시켰다. 염수 대조군에 0.9% 염수를 투여하였다. 조직 샘플을 취하여, HPLC 분석 또는 HIF-1 α mRNA 하향 조절의 분석에 의한 LNA 올리고뉴클레오타이드 함량의 측정 시까지 RNA-레이터에서 제조하였다(도 10c-e 참고).

[0362] LNA 올리고뉴클레오타이드 흡수의 가시화: 포르말린 고정 후, 조직을 파라핀 포매하였다. 조직을 홀트액(30 g 사

카로스, 1 g 아카시아 검, 15 mg 티몰, 증류수 100 ml)에 하룻밤 동안 두고, 냉동시켰다. 4 my의 동결절편을 코팅된 유리에 탑재하고, DAPI 용액 중에 두었다. 형광색소를 형광현미경법으로 가시화하였다(데이터는 도 10b에 서와 동일한 생체분포를 나타내며, 이에 도시되지 않음).

[0363] 실시예 18: HIF-1 α 및 VEGF의 생체내 LNA 올리고뉴클레오티드 특이성 연구

[0364] 미스매치 연구: 15 NMRI 암컷 마우스(대략 25 g)를 5개 군으로 나누고, 30 mg/kg 서열 번호 1 또는 서열 번호 9를 30초에 걸쳐, 0, 3, 7, 10, 14일째에 i.p. (10 mL/kg, 3.0 mg/ml) 투여하였다. 대조군에 0.9% 염수를 투여하였다. 마지막 주사로부터 3 내지 4시간 후에 조직 샘플을 취하고 제조하였다. 조직 샘플을 취하고, RNA-레이터에서 제조하였다.

[0365] 도 11은 하나의 미스매치 대조군 서열 번호 9 대비, 3일마다 30 mg/kg의 서열 번호 1을 5회 투여한 후의, HIF-1 α 및 VEGF mRNA의 생체내 내인성 간 표적 하향 조절을 나타낸다.

[0366] 실시예 19: 서열 번호 1의 14량체-양태의 생체내 효능(potency).

[0367] NMRI 암컷 마우스(0.025 kg)를 복강내 주사에 의해 5 mg/kg/일로 서열 번호 1로써 처리하였다. 염수 동물은 대조군 동물로서 작용하였고, 여기에 0.9% 염수를 투여하였다. 5마리 동물을 투여 후 1일 또는 10일째에 희생시켰다. 조직 샘플을 취하고, QPCR에 의한 HIF-1 α mRNA 발현 측정 시까지 RNA-레이터에서 제조하였고, M&M에 기재된 바와 같이 베타-액틴에 정규화하였다.

[0368] 실시예 20: 3차원 대동맥 환 배양물의 제조

[0369] [래트 대동맥(Masson et al., 2002 Biol Preoced Online 4(1) p.24-31)]에 대해 본래 보고된 방법의 일부 변형 방법으로 3차원 콜라겐 겔에서 마우스 대동맥의 환을 배양함으로써, 혈관신생을 연구하였다. 털 마우스를 (10 mg/kg 내지 50 mg/kg) 범위의 투여량으로 LNA 올리고뉴클레오티드를 i.v. 1회 처리하였다. 투여한지 3일째에, 흉복부 대동맥을 마우스로부터 제거하고, 자궁경부 변위에 의해 희생시킨 직후, 10% 우태아 혈청이 함유된 빙냉 RPMI 배지(인비트로젠)를 포함하는 배양판에 옮겼다. 대동맥주위 섬유지방 조직을, 대동맥 벽에 손상주지 않도록 특별히 주의하면서, 미세 마이크로분할 집게(forceps) 및 홍채절제 가위를 이용하여 주의하여 제거하였다. 1 밀리미터 길이의 긴 대동맥 환(대동맥 당, 대략 15 최대 1.5 cm의 대동맥)를 절단하고, FBS와 함께 RPMI로 3회 연속 세정하여 연장하여 행구었다. 마우스 대동맥의 환 모양의 외식편을 96 웰 플레이트의 한 웰 내 60 μ l의 매트릭스겔(BD 바이오사이언시스(BD biosciences), 매트릭스겔: 356234)에 포매하였다. 대동맥을 삽입한 후, 또 다른 40 μ l의 매트릭스겔을 첨가하고, 37°C에서 10분 동안 방치하여 고화하였다. 성장 인자의 존재 및 부재 하에 100 μ l의 EGM2(캠브릭스(Cambrix))을 웰에 첨가한다. 대조군으로서, 대동맥 환을 10 μ M 시플라틴(Ciplatin)을 함유하는 EGM2 배지로 부가적으로 피복한다. 배지를 2일마다 교체하였다.

[0370] 실시예 21: ^3H -표지 서열 번호 1의 단일 정맥내 투여 후, 마우스에 있어 정량적 전신 방사능사진촬영술

[0371] 9마리 암컷 C57B1/6J(8주 타코닉, DK) 마우스에 꼬리 정맥 1.5 mCi/kg ^3H -서열 번호 1을 정맥 내 각 시험 항목 별로 50 mg/kg 투여하였다.

[0372] ^3H -서열 번호 1은 비활성이 155 μ Ci/mL였다.

[0373] 각 동물에 투여된 부피는 10 mL/시험 제형물 kg이었다. 개별 마우스는 각 시험 항목을 투여한지 5분, 15분, 1시간, 4시간, 24시간, 2일, 4일, 7일 및 18일의 시점에 사멸되었다.

[0374] 전신 방사능사진촬영술을 위해, 마우스를 이소플루판으로 마취한 직후, -80°C로 드라이아이스로 냉각된 핵산 내 침액시켰다(ABR-SOP-0130/04). 냉동된 카케스(carcass)를 수성 카르복시메틸 셀룰로스(CMC)의 겔 내 포매하고, 에탄올 중 냉동시키며, 드라이아이스(-80°C)로 냉각시키고, 표준 방법, ABR-SOP-0131/04에 따라 전신 방사능사진촬영술을 위해 시상으로 절단하였다. 각 동물로부터, 20 μ m 절편을 약 -20°C의 온도에서 동결마이크로톰(레이카(Leica) CM 3600)을 이용하여 상이한 수준으로 절단하였다. 얻어진 절편을 테이프(미네소타 마이닝 앤드 매뉴팩처링 컴퍼니(Minnesota Mining and Manufacturing Co.), No. 810)에 고정하고, 방사능 잉크를 이용하여 연속적으로 넘버링하였다. 약 24시간 동안 -20°C에 동결 건조한 후, 선택된 절편을 활석 분말의 박층으로 피복하고, 이미징 플레이트(후지(Fuji), 일본)에 두었다.

[0375] 관심 조직 및 장기를 최량으로 나타내고자 인광체 이미징을 위해 절편을 선택하였다. 한 세트의 ^3H 적정 표준과 함께, 절편을 활석 분말의 박층으로 피복하고, 이미징 플레이트에 두었다. 3H의 낮은 에너지로 인해, 플라스틱

호일 대신에 활석 분말을 사용하여, 이미지 플레이트를 보호하였다. 이미징 플레이트를 실온에서 3 내지 7일 동안 노출시켰고, 납 차폐 상자 내 광 밀착 카세트에 넣어, 환경 복사로부터 보호하였다.

[0376] 노출 후, 이미징 플레이트를, BAS 2500(후지 필름(Fuji Film) 스웨덴 스베리지 아베)을 이용하여 50 μm 의 픽셀 크기로 스캔하였다. 관심 조직 및 장기를 AIDA(버전 2.43(독일 레이테스트 소재))를 이용하여 정량화하였다.

[0377] ^3H 방사능의 수용성 표준 시험 용액을 전혈(whole blood)과 혼합하여 적정 규모의 생산을 위해 사용한다. 표준 시리즈는 65.44 내지 0.30 nCi/mg의 10개 희석물로 구성되었다. 정량화를 위한 목적으로, 모든 조직은 전혈과 유사한 밀도 및 켄치(quench) 특성을 가지는 것으로 추정된다. 조직 밀도를 1 g/ml로 설정하였다. 정량화 한도는 배경에 대한 8개 측정값의 평균 농도 값 + 이 측정값의 표준편차 값의 3배로 정의된다.

[0378] 각종 조직 및 장기를 자가방사선상 또는 상응하는 조직 절편에서 확인하였다. 본 연구에 사용되는 용어 포도막(uvea)에는 멜라닌 함유 구조, 맥락막 및 눈의 공막의 구조를 나타내는 망막 색소 상피세포가 포함된다(도 14a 및 14b 참고).

[0379] *실시예 22: 서열 번호 1이 트랜스펙션된 HUVEC 세포의 웨스턴 블롯*

[0380] 정상 인간 제대 정맥 내피(HUVEC) 세포를 캄브릭스-EGM2 배지에서 배양하였고, 2 및 5 nM 서열 번호 1 또는 5 nM 서열 번호 8을 이용하여 실시예에 기재된 바 대로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 후, 세포를 16시간 동안 저산소 상태(1% 산소)로 노출하였다. 수확 시, 세포를 PBS에 세정하였고, (실시예에 기재된 바 대로) 용해 완충제를 함유하는 SDS에 용해시켰다. 50 μg 을 트리스-아세트이트 겔에 로딩하여, 1시간 동안 150 V에서 전개하였다. 웨스턴 블로팅을 실시예에 기재된 바 대로 수행하였고, 블롯을 항인간-HIF-1 α (1:500)에서 인큐베이션한 후, 증진된 화학발광(chemiluminescence)에 의해 가시화하였다. 서열 번호 1에 의한 효능적 하향 조절이 나타나고, 반면 조합된 대조군 서열 번호 8은 HUVEC 세포에서 HIF-1 α 발현을 하향 조절하지 않는다.

[0381] *실시예 23: 시험관내 관형성/모세관형 구조 형성 검정*

[0382] 마트리젤(Venetsanakos E, Mirza A, Fanton C et al. Induction of tubulogenesis in telomerase-immortalized human microvascular endothelial cells by glioblastoma cells. Exp Cell Res 2002;273:21-33)을 이용하여, 세관형성의 유도를 수행하였다. 마트리젤을 얼음 상에서 해동하여, 초기 중합을 방지하였고; 50 μl 의 분취량을 96-웰 조직 배양 플레이트(Nunc)의 개별 웰에 플레이트팅하여, 37°C에서 30분 이상 동안 중합시켰다. 트립신 0.05%-EDTA로 처리함으로써 트랜스펙션된 HUVEC 세포를 제거하였다. 세포를 혈청-함유 배지로 세정한 후, 2×10^5 세포/ml로 재현탁시켰다. 각 배양웰에, 성장 인자(VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1, 및 FBS(2%) 함유의 hEGF) 및 헤파린을 갖는 배지 내 100- μl 의 트랜스펙션 또는 비트랜스펙션된 HUVEC 세포 현탁액을 첨가하였다(n=10). 조합된 대조군 올리고뉴클레오타이드(서열 번호 8)가 트랜스펙션된 HUVEC 세포, 및 미처리된 모의체가 트랜스펙션된 웰을 대조군으로 사용하였다. 대조군 또는 시험 화합물의 용량을 6 내지 10 개별 웰에서 검정하고, 3회 이상 실험하였다. 관 형성의 정량화를 위해, 웰을 사진촬영하였다(도 13 참고).

[0383] *실시예 24: 비장, 골수 및 말초혈의 세포 내 흡수의 FACS 분석*

[0384] NMRI 암컷 마우스(0.025 kg)를 fam-표지 양태의 서열 번호 1, 서열 번호 7(50 mg/kg) 또는 동등한 수의 아미다이트 분자(3 mg/kg) 또는 0.9% 염수로 처리하였다. 주사 후 1시간째에 세포를 희생시키고, 비장, 말초혈(말초혈 1 ml에 0.1% 나트륨 아지드 + 50 ml 헤파린 술페이트를 함유하는 1 ml PBS가 첨가되고, 이는 얼음에 놓임)) 또는 골수로부터의 세포를 수확한다.

[0385] **비장**

[0386] 금속 매쉬에 비장을 두고, 아지드를 함유하는 1 ml R10(10% FCS 함유의 R10 조직 배지)로 습윤시킨다. 조직을 매쉬를 통해 넣고, 총 4 ml R10 + 아지드를 통해 플러싱한다. 0.5 ml의 조직 현탁액을 제거하고, 나머지를 폐기한다. 50 ml의 적혈구 용해 완충제 믹스를 첨가함으로써 적혈 세포를 현탁액 내에 용해시키고, 10분간 실온에 둔다. 2000 rpm에서 10분 동안 회전시킨다. 나머지 적혈구를 제거할 필요가 있는 경우, 이 과정을 반복한다. 세포를 계수하고 블록킹한다.

[0387] 세포를 회전-침착시켜 아지드 함유의 1.0 ml FACS 완충제 내에 재현탁시킨다. 블록킹을 위해, 세포수가 5×10^6 개 세포/비장인 것으로 추정하고, 5 μl 의 쥐과동물 CD16/CD32/백만개 세포를 첨가한다(25 μl 블록킹을 첨가함).

[0388] **말초혈**

- [0389] 50 ml의 적혈구 용해 용액을 첨가하여 적혈구를 용해시킨다. 세포를 회전에 의해 가라 앉히고, 필요한 경우 이 과정을 반복한다. 세포를 PBS로 1회 세정하고, 재현탁시키며, 계수한다. 쥐과동물 CD16/CD32을 5 μ l/백만개 세포의 비율로 첨가함으로써, 비특이적 항체 결합을 막는다. 실온에서 10분간 둔 후, 계통 염색으로 진행한다.
- [0390] **골수**
- [0391] 무균 가위를 이용하여 뼈를 각 말단에 최대한 가깝게 절단한다. 1 ml의 무균 PBS를 25G 바늘이 장착된 1 ml 주사기에 취한다. 바늘을 뼈의 한 말단에, 통상적으로는 가장 편리하게는 무릎에 삽입하고, 뼈를 통해 PBS를 흘려준다. 뼈가 투명해질 때까지 반복한다. 골수가 파괴되도록 바늘에 골수를 수회 투입한다. 적혈구 개수가 우려된다면, 용해 단계를 상기와 같이 이용할 수 있다.
- [0392] 상기와 같이 세포 및 블록을 계수한다. 골수 배양을 위해 얼음 상의 무균 에펜도르프관에 150,000개 세포를 둔다.
- [0393] **FACS 염색**
- [0394] 특정 마커를 이용하여 계통 염색을 수행한다. 하기 기재된 바와 같다:
- [0395] 염색
- [0396] 1. CD4 APC, CD8 PE FITC, 7AAD T-세포
- [0397] 2. Gr-1 PE, f4/80 APC 호중구, 대식세포
- [0398] 3. Gr-1 PE, Mac-IAPC 골수-단구
- [0399] 4. CD34 PE 계통 APC 줄기 세포
- [0400] 5. B220 APC, CD19 PE B 세포
- [0401] 6. CD11b PE, CD11c APC 수지상 세포
- [0402] 아형태
- [0403] 7. 미국 햄스터(American hamster) IgG1 APC CD11c
- [0404] 8. 래트 IgG2a APC CD4, B220
- [0405] 9. 래트 IgG2a PE cd8a, CD19, CD34
- [0406] 10. 래트 IgG2b PE Gr-1, CD11b
- [0407] 염색을 96 웰에서 수행하고, 총 개수 100 μ l 블록킹된 세포를 100 μ l 염색 믹스(아형태 대조군 또는 특정 계통 마커)로 염색한다. 염색을 얼음 상에 수행하고, 30분 동안 방치한다. 세포를 2000 rpm에서 2분 동안 회전시킨다. 상등액을 흡취하고, 세포를 200 μ l FACS 완충제로 세정하고, 원심분리 단계를 반복한다. 총 3회 세정한다. 종료 시, 세포를 200 μ l의 FACS 완충제 내에 재현탁시키고, 이미 200 μ l의 FACS + 5 μ l의 7AAD를 함유하는 FACS 관에 첨가한다.
- [0408] 벡톤 디킨슨 FACS 칼리버(Becton Dickinson FACS Calibur)를 이용하여 FACS 분석을 수행하였다(도 15 참고).
- [0409] 내피 세포, 과립구 및 CD4+림프구, 말초혈의 대식세포, 수지상 세포, 골수의 과립구, 및 비장의 과립구는 서열 번호 7을 투여한 후 5일째에 FAM-표지에 대해 양성 염색을 나타냈다.
- [0410] **실시예 25: 사이노물거스 원숭이 조직 내 서열 번호 1의 HIF-1 α 및 올리고뉴클레오타이드 함량**
- [0411] 사이노물거스 원숭이에서의 주요 독성 연구에서, 간 및 신장 샘플을 포함하는 조직을 순간 냉동시키고, 후속 분석을 위해 -70°C에 저장하였다(도 16a 및 16b 참고) 원숭이를 4주 동안 0, 6, 10 및 40 mg/kg/회로 정맥내 주사하여 처리하였다. 0, 10 또는 40 mg/kg/회를 투여한 동물의 군들에서, 일부 동물은 처리없이 4주의 회복 기간이 이어졌다.
- [0412] 실시예 13에 기재된 바와 같이 샘플로부터 RNA를 추출하고, 실시예 8에 기재된 바와 같이 HIF-1 α mRNA 함량을 측정하였다(도 16a 참고). 하기 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오타이드 함량을 측정하였다(도 16b 참고).
- [0413] 샘플 제조: 간 및 신장 조직으로부터의 추출

- [0414] 화학품/시약:
- [0415] 프로테이나제 K(25.1 mg/ml): 시그마 P4850.
- [0416] 페놀-클로로포름-이소아밀-알코올(25:24:1(v/v/v)), 10 mM 트리스로 포화, pH: 8.0, 1 mM EDTA: 시그마 P2069
- [0417] 이계팔 CA-630: 시그마, I8896
- [0418] 추출 완충제: 0.5% 이계팔 CA-630, 25 mM 트리스 pH 8.0, 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0(1 N NaOH를 이용하여 조정)
- [0419] 추출 완충제 내 1 mg/ml의 프로테이나제 K: 각 추출 전에 제조됨.
- [0420] 조직(~100 mg)을 칭량한다(조직을 칭량 전 및 후에 드라이아이스 상에 유지시킴). 프로테이나제 K(1 mg/ml) 함유의 500 μ l 추출 완충제를 첨가한다. 조직을 기계적으로 균질화하고, 균질물을 37°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션한다.
- [0421] 서열 번호 2를 추출 완충제 내에 관련 농도 범위에서 용해시킴으로써, 기준 샘플을 제조한다. 비처리 동물로부터의 정확히 100 mg의 간 조직을 칭량한다(조직을 칭량 전 및 후에 드라이아이스에 유지시킴). 기준 물질을 함유하는 추출 완충제(프로테이나제 K, 1 mg/ml 함유)를 조직 샘플에 첨가하여, 총 부피가 0.5 ml가 되도록 한다. 조직을 기계적으로 균질화하고, 37°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션한다. 이 샘플로부터의 서열 번호 2의 검출 신호를 사용하여, 처리한 동물에서 나타나는 최저 및 최고 농도를 커버하는 표준 곡선을 제작한다.
- [0422] 조직 샘플을 스크류 마개가 있는 2 ml 마이크로관에 옮긴다. 5분 동안 격렬하게 흔든 후, 1 ml 페놀-클로로포름-이소아밀-알코올(25:24:1(v/v/v))을 첨가한다. 4000 RPM에서 15 분간 원심분리하여 상 분리한다. 수성상(상부상)을 (증발기와 상용적인) 새 관에 옮기고, 500 μ l 밀리-Q-H₂O를 유기상(첫 번째 추출에서의 잔류물)에 첨가한다. 4000 RPM에서 15분간 원심분리(115실에서 SAN039)한 후, 관을 5분 동안 다시 격렬하게 교반한다. 수성상(1. 추출 및 세정에서의 수상)을 폴링하고, 증발 건조시킨다(80°C, 질소 하). 잔류물을 4000 RPM에서 15 분간 원심분리한 후, 200 μ l 밀리-Q-물에 재현탁한다. 분석을 위해 샘플을 HPLC-바이얼에 옮긴다.
- [0423] 간 및 신장 조직 내 올리고뉴클레오타이드의 HPLC 분석: 추출에 이어, 서열 번호 2를 이온 교환 HPLC에 의해 분석한다:
- [0424] 칼럼: 디오넥스, DNA pac PA 100: 2×50 mm(가드), 2×250 mm(분석)
- [0425] 칼럼 온도: 42°C
- [0426] 주입 부피: 50 μ l 세정-용매: 밀리-Q-H₂O
- [0427] 퍼지-용매: 밀리-Q-H₂O
- [0428] 검출: UV, 260 nm
- [0429] **용매:**
- [0430] 완충제 A: 1 mM EDTA, 20 mM TRIS-Cl, 10 mM NaClO₄, pH: 7.6(1 N NaOH)
- [0431] 완충제 B: 1 mM EDTA, 20 mM TRIS-Cl, 1 M NaClO₄, pH: 7.6(1 N NaOH)
- [0432] *실시예 26: 서열 번호 1을 이용한 생체내 처리의 작용 기간*
- [0433] 털 마우스를 50 mg/kg 서열 번호 1을 1회 i.p. 주사로 처리하였다. 각 군의 5마리 동물을 투여 후 1 및 10일째에 희생시키거나(도 9c 참고), 투여 후 1, 2, 3, 4, 5 및 10일째에 희생시켰다(도 9b 참고). 실시간 QPCR에 의해 HIF-1 α mRNA 발현을 분석하고, GAPDH에 정규화하였다.
- [0434] *실시예 27: 생체내 안정한 각막 모델*
- [0435] **마우스 및 마취.** BALB/c 마우스 6-8주령. 마우스를 케타민 및 자일라진의 혼합물을 이용하여 마취하였다(각기 120 mg/kg 체중 및 20 mg/kg 체중).
- [0436] **봉합 유도, 염증성 각막 혈관신생의 마우스 모델.** 봉합 유도 염증성 각막 혈관신생(CNV)의 마우스 모델을 [Streilein JW, Bradley D, Sano Y, Sonoda Y. Immunosuppressive properties of tissues obtained from eyes

with experimentally manipulated corneas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996; 37:413-424]에 전술된 바대로 사용하였다. 간략히, 2-mm 직경의 각막 원형질제거기(trephine)를 마취된 마우스의 중심 각막에만 살짝 두어, 중심 각막 부위를 표시하였다. 이어서, 3개 11-0 봉합사를 각막 주위의 120°로 각기 연장되는 2개의 각막 침습으로 각막내 두었다. 선택된 봉합사 배치의 외부 지점을 가장자리와 2-mm 원형질제거기에 의해 윤곽잡힌 선의 중간에 두었고; 내부 봉합 지점은 2-mm 원형질제거기 선으로부터 동일한 거리에 두어, 표준화 혈관신생 반응을 수득하였다. 봉합사를 7일 동안 제자리에 두었다. 마우스를 안락사시키고, 가장자리를 갖는 각막을 절개하였으며, 편평 탑재 이중면역조직화학을 수행하였다. 봉합사 배치 후 1주일째 각막으로의 정상적 각막의 집합 및 정상적 각막 내 염증성 세포의 존재를, 안락사 후 10% 파라포름알데히드 중 고정된, 플라스틱-포매 각막의 헤마톡실린 및 에오신-염색 일련 절편에서 정량화하였다. 또한, 각막에 집합된 염증성 세포를 더욱 특징화하기 위해, 이중면역 조직화학을 대식세포 마커 CD11b가 있는 냉동 절편 및 각막 전층에서 수행하였다. 또한 절편을 내피 세포(CD31에 의한 판), VEGF에 대한 마커, 및 VEGFR에 대해 염색하였다.

[0437] 실시예 28: 각막 미세주머니 검정

[0438] 각막 미세주머니 검정을 전술된 바와 같이[Cao Y, et al. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95: 14389-14394] 수행하였다. 간략히, 개질된 폰그라페(von Graefe) 나이프를 이용하여 각막 미세주머니를 생성시켰고, 200 ng의 VEGF-A₁₆₄(R&D) 또는 200 ng의 재조합 bfgf(RDI, 미국 뉴저지주 프랜더스 소재)를 함유하는 하이드론 중합체로 코팅된 수크로스 알루미늄 술페이트의 마이크로펠렛(0.4×0.4 mm)을 각 주머니에 이식하였다. 펠렛을 가장자리에서 0.6 내지 0.8 mm 떨어진 위치에 두고, 그 부위를 항생 연고(에리트로마이신)로 피복하고, 10일 동안 그대로 두었다(각기 n>5 내지 10 마우스). 혈액 혈관신생 및 림프 혈관신생 반응을 CD31/LYVE-1을 이용한 이중 면역 염색을 사용하여 상기 기재한 바대로 정량화하였다. 아래 가장자리와 펠렛 사이의 혈관 대 림프관 과다성장의 최대 정도를 양 혈관 유형에 대해 4개 카테고리로 반정량적으로 분류하였다: 0: 성장없음; 1: 가장자리-펠렛 거리의 1/3 미만 과다성장; 2: 가장자리-펠렛 거리의 1/3 내지 2/3 과다성장; 3: 혈관이 펠렛에 도달함.

[0439] 실시예 29: 생체내 건선 모델

[0440] 생체내 인간 피부/SCID 마우스 키메라

[0441] [Wrone-Smith T, Nickoloff BJ: Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest* 1996, 98: 1878-1887]에 의해 전술된 절차에 따라, 인간 피부 이종이식편을 7- 내지 8-주령 SCID 마우스(타코닉, DK)에 직접 이식하였다. 간략히, 1.5×1.5×0.5 cm 크기의 인간 피부 이종이식편을 흡수가능한 5-0 비크릴 래피드(Vicryl Rapide) 봉합사(에티콘(Ethicon), 미국 뉴저지주 소머빌 소재)를 이용하여 SCID 마우스의 옆구리에 봉합하고, 제로폼(Xeroform) 드레싱(켄달 컴퍼니(Kendall Co.), 미국 메사추세츠주 맨스필드 소재)으로 덮었다. 드레싱을 1주일 후에 제거하였고, 동물을 연구 전반에 걸쳐 병원체가 없도록 유지시켰다. 마우스를 이식 후 1 내지 3주 동안 주당 2회 50 mg/kg로 서열 번호 1 및 서열 번호 7로써 처리하였다. 인간 피부/SCID 마우스 키메라가 2 내지 3주의 처리 후에 사멸되었고, 4-mm 펀치 생체검(Baker's Biopsy Punch, Cummins Derm, 미국 플로리다주 마이애미 소재)을 각 이종이식편으로부터 수득하였다. 생체검을 파라핀 포매를 위해 중성-완충 포르말린에 고정하고/하거나, 트라가칸트 검(시그마 케미칼 컴퍼니(Sigma Chemical Co.), 미국 미주리주 세인트루이스 소재)에 탑재하고, 액체 질소로 냉각된 이소펜탄 중에 순간 냉동시켰으며, -80℃에서 저장하였다.

[0442] 면역염색

[0443] 피부의 저온유지장치(Cryostat) 절편을 내피 세포(CD31/CD34), 대식세포(cd11b) VEGF, VEGFR 또는 HIF-1a를 포함한 관련 마커에 대해 염색하였다. 절편을 (전술된 바와 같이) 헤마토타일린 또는 에오신으로 대조-염색하였다. 모든 슬라이드를 조사하고, 사진촬영하였다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1a는 래트 혈장(NtacSD 수컷, Li-헤파린(Heparine)(타코닉(Taconic), M&B))에 있어, 서열 번호 6 대비, 서열 번호 1 및 서열 번호 5의 증가된 안정성을 나타낸다. 올리고뉴클레오타이드를 20 μM 농도로 37℃에서 0-, 4-, 또는 24-시간 동안 인큐베이션하였다. 24시간 소화 후에도 서열 번호 1의 어떠한 분해 단편도 검출할 수 없었다.

[0017] 도 1b는 래트 및 인간 혈청 내, 전장 서열 번호 1 및 서열 번호 13(포스포로티오에이트, 및 서열 번호 1에 대한 아형 서열)의 안정성을 나타낸다. 올리고뉴클레오타이드를 20 μM의 최종 농도로 인간 또는 래트 혈청에 첨가하였

다. 본 도면은 37℃에서 인간 및 래트 혈청 각각에 있어 1 내지 96시간 이하 동안의 LNA 뉴클레오타이드 안정성을 나타낸다. 래트 혈청의 경우, 도 1b의 두 번째로 마지막에 있는 패널은 48시간 및 96시간 후에도 지속되는 효소 활성을 입증한다. 후자 패널은 혈장 첨가 없이 37℃에서 인큐베이션될 때, 서열 번호 1 및 서열 번호 13의 분해가 없음을 입증하는 음성 대조군으로 기능한다.

- [0018] 도 1c는 인간 및 래트 혈장에 있어 서열 번호 1의 극히 긴 안정성을 나타낸다. 올리고뉴클레오타이드를 1-96시간 동안, 인간 또는 래트 혈장 내에 인큐베이션하였고, 변성 겔 상에 전개하였다. SyBr 골드로 염색한 후, 전장 생성물의 양을 포스포리미지를 이용하여 측정 한 후, 시간에 대해 플로팅하였다.
- [0019] 도 2a는 LNA 올리고뉴클레오타이드가 트랜스펙션된 U373 세포에 있어 HIF-1 α 단백질 하향 조절을 나타낸다. U373 세포에 2 또는 10 nM 화합물, 또는 모의체(mock)를 트랜스펙션하여, 저산소 상태에서 인큐베이션하였고, 웨스턴 블로팅(Western Blotting)에 의해 HIF-1 α 단백질 하향 조절에 대해 분석하였다. 튜블린 발현을 동등한 로딩의 대조군으로서 분석하였다.
- [0020] 도 2b는 U373 교모세포종 암 세포주에 있어 서열 번호 1로 처리한 후 HIF-1 α 와 단백질 하향 조절을 나타낸다. Pan-액틴 발현을 동등한 로딩의 대조군으로서 분석하였다. 세포에 0.2, 1 및 10 nM 서열 번호 1, 또는 서열 번호 1에 대해 2bp mm인 서열 번호 10을 트랜스펙션하였다. 하부 패널은 겔의 정량화이다.
- [0021] 도 2c는 U373 세포에서, HIF-1 α 표적화 LNA 올리고뉴클레오타이드, 서열 번호 1, 및 조합된(뒤섞인)(scrambled) LNA 함유 대조 올리고뉴클레오타이드 서열 번호 8로 처리한 지 24시간 후의 HIF-1 α 발현의 하향 조절을 나타낸다. HIF 발현은 GAPDH 또는 베타-액틴과 상관되고, 트랜스펙션되지 않은 대조군(모의체)과 대비된다. RNA 정제 후, mRNA 발현이 QPCR에 의해 정량화된다.
- [0022] 도 3a 및 3b는 정상산소 상태 또는 저산소 상태에서 교모세포종 세포주 U373에 있어 LNA 올리고뉴클레오타이드로 처리한지 24 내지 72시간 후의 유도된 유도된 카스파제 3/7 활성의 역학 프로파일로 측정되는 아포토시스의 유도를 나타낸다. 서열 번호 1은 조기 아포토시스의 효능적 유도자인 것으로 보인다.
- [0023] 도 4a: 48시간 후 아넥신(Annexin) V-FITC 및 PI 유세포분석에 의한 측정에 따른 조기-아포토시스성 세포 단계의 유도 단계. LNA 올리고뉴클레오타이드 서열 번호 1로 처리된 U373 세포를 모의체 및 서열 번호 12 처리 세포와 대비되는, 더욱 "조기 아포토시스성"인 것으로 분류되었다.
- [0024] 도 4b: 서열 번호 1로 처리한 후 U373 세포에서의 조기 아포토시스의 유도의 정량화. 상이한 투여량으로 서열 번호 1로 처리한지 48시간 후 조기 아포토시스로 돌입된 세포의 퍼센티지. U373 세포에 서열 번호 1, 또는 2개의 상이한 조합된 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 번호 8 및 서열 번호 12를 트랜스펙션하였다. 수확, 및 아넥신 V ab 및 PI와의 인큐베이션 후, 조기 아포토시스 중인 세포의 수를 유세포분석으로 측정하였다.
- [0025] 도 5a 및 5b는 저산소 상태 또는 정상산소 상태에서 트랜스펙션 및 인큐베이션한지 24 내지 72시간 후에 트랜스펙션된 교모세포종 세포주 U373 세포를 나타낸다. 서열 번호 1은 MTS 검정에 의한 측정에 따라 증식의 효능적 억제제인 것으로 보인다.
- [0026] 도 6a 및 도 6b는 서열 번호 1을 이용한 2가지 투여 처방의 생체내 내인성 간 표적 하향 조절을 나타낸다. 다운스트림 표적 VEGF 및 HIF-1 α 의 mRNA 수준의 측정은, 서열 번호 1이 또한 상기 표적의 효과적 억제제임을 나타낸다. 도 6a: 14일 동안 털 마우스에 대한 매일 i.p. 주사. 도 6b: 14일 동안 털 마우스에 대한 주당 2회 i.p. 주사.
- [0027] 도 6c는 서열 번호 1이 서열 번호 1의 14일 처방을 위해 털 마우스에 i.p. 주사를 매일 투여하여 한 후, 생체내 내인성 신장 HIF-1 α 를 나타낸다.
- [0028] 도 7a는 서열 번호 1의 투여 후, 간에서의 생체내 HIF-1 α 의 발현의 하향 조절에 의한 측정에 따라, 서열 번호 1이 효능적 억제제임을 나타낸다. 서열 번호 1의 상이한 티올화 양태(서열 번호 5 및 서열 번호 6), 및 서열 번호 1은 각기 14일 동안 1일 18 또는 3.6 mg/kg로 털 마우스에 투여하고, 희생시켰다. HIF-1 α 의 발현을 QPCR에 의해 mRNA 수준에서 측정하였고, M&M에 기재된 바 대로 베타-액틴에 정규화하였다.
- [0029] 도 7b는 서열 번호 1의 투여 후, 간에서의 생체내 HIF-1 α 의 발현의 하향 조절에 의한 측정에 따라, 서열 번호 1이 효능적 억제제임을 나타낸다. 서열 번호 1의 상이한 티올화 양태(서열 번호 5 및 서열 번호 6), 및 서열 번호 1은 각기 14일 동안 1일 50, 10 또는 2 mg/kg로 털 마우스에 투여하고, 희생시켰다. HIF-1 α 의 발현을 QPCR에 의해 mRNA 수준에서 측정하였고, 베타-액틴에 정규화하였다.

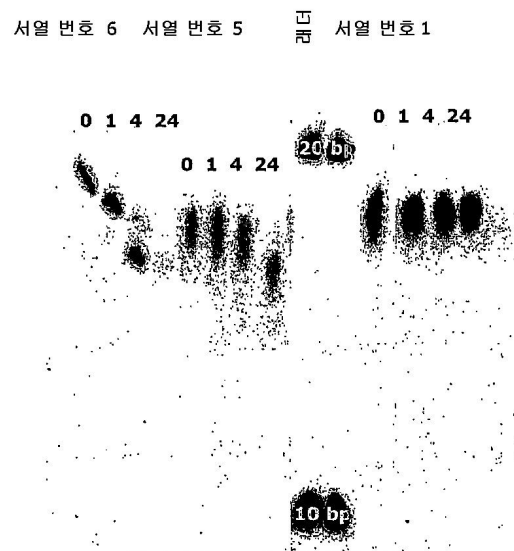
- [0030] 도 7c는 서열 번호 1의 투여 후, 간에서의 생체내 HIF-1 α 의 발현의 하향 조절을 나타낸다. 서열 번호 1의 상이한 티올화 양태(서열 번호 5 및 서열 번호 6), 및 서열 번호 1은 각기 14일 동안 1일 18 또는 3.6 mg/kg로 털마우스에 투여하고, 희생시켰다. HIF-1 α 의 발현을 QPCR에 의해 mRNA 수준에서 측정하였고, 베타-액틴에 정규화하였다.
- [0031] 도 8a는 이종이식편으로부터의 U373 종양의 종양 중량에 의한 측정에 따른, 서열 번호 11 및 서열 번호 12(조합된 대조군) 대비, 서열 번호 1을 이용할 때의 생체내 효능을 나타낸다. 서열 번호 1, 서열 번호 11 및 서열 번호 12를 난소에 이식된 U373 이종이식편 마우스에 주당 2회 50 mg/kg로 1주 동안 투여하였다. 마지막 투여 후 2일째에, 동물을 희생시켰다. 희생 시, 종양을 칭량하였고, 개별 종양 중량 + 평균 종양 중량(적색)을 계산하여 플로팅하였다. 통계학적 유의 차(P=0.005)가 대조군(조합된 대조군 서열 번호 12)과 서열 번호 1로 처리된 마우스 사이에 있는 것으로 나타났다.
- [0032] 도 8b는 서열 번호 1로 처리된 이종이식편으로부터의 U373 종양 내 혈관 밀도를 나타낸다. 서열 번호 1을 난소에 이식된 U373 이종이식편 마우스에서 1주일 동안 주당 2회 50 mg/kg로 투여하였다. 마지막 투여 후 2일째에, 동물을 희생시켰다. CD31 염색 후 혈관 밀도를 계산하였고, 총 면적과 대비하였다. 통계학적 유의 차(P=0.005)가 염수 군과 조합된 대조군으로 처리된 마우스(서열 번호 12) 사이에 발견되었다.
- [0033] 도 8c는 난소에 이식되고 도 8b에 대해 기재된 바와 같이 서열 번호 1로 처리된 U373 종양으로부터의 절편 내 CD의 염색을 나타낸다.
- [0034] 도 8d는 난소에 이식되고 도 8b에 대해 기재된 바와 같이 서열 번호 1, 서열 번호 11, 서열 번호 12 및 PBS로 처리된 U373 종양에서, 실시간 PCR에 의해 정량화되고 GAPDH에 정규화된 HIF-1 α 발현을 나타낸다.
- [0035] 도 9a는 25 mg/kg의 서열 번호 1을 1회 i.v. 투여한 후, 털 마우스의 생체내 흡수(μ g/g 조직) + 표적 하향 조절(β -액틴 발현 대 HIF-1 α mRNA 발현의 % 억제율)을 나타낸다. 서열 번호 1은 반감기가 신장에서는 대략 46시간이고, 간에서는 66시간이다. 도 9b 상부 패널은 털 마우스에 1회 i.p. 50 mg/kg으로 투여되는 서열 번호 1을 나타낸다. 서열 번호 1을 50 mg/kg로 처리한 5마리 동물을 처리 후 1, 3, 4, 5 및 8일째에 희생하였고, HIF-1 α 발현을 분석하여 베타-액틴에 정규화하였다. HIF-1 α 의 발현을 QPCR에 의해 mRNA 수준에서 측정하고, 하부 패널에 실시예 8에 기재된 바와 같이 베타-액틴에 정규화하였다. 서열 번호 1을 털 마우스에 1회 i.p. 25 또는 50 mg/kg으로 투여하였다. 25 또는 50 mg/kg을 투여한 5마리 동물을 처리 후 1, 2, 3, 4, 5 및 8일째에 희생하였고, 실시예 13에 기재된 바와 같이 HPLC 방법에 의해 전장 서열 번호 1에 대해 분석하였다. 데이터는 μ g 서열 번호 1/조직의 그래프로 나타낸다.
- [0036] 도 9c는 서열 번호 1 및 서열 번호 16을 1회 50 mg/kg i.p. 투여한 후, 1 및 10일째에 희생한 마우스에 있어, 실시간 PCR에 의해 정량화되고, 마우스 간 내 GAPDH에 정규화한 HIF-1 α 발현을 나타낸다.
- [0037] 도 10a은 7일 동안 25 mg/kg을 투여하고, 마지막 투여 후 1 또는 5일째에 희생시킨 이종이식편 마우스 내 HIF-1 α 발현을 억제하는 서열 번호 1의 작용 시간을 나타낸다.
- [0038] 도 10b는 7일 동안 25 mg/kg/일로 서열 번호 1의 fam-표지 양태(서열 번호 7)을 처리하고, 마지막 처리 후 5일째에 희생시킨 생체내 간, 피부, 종양 및 신장 흡수를 나타낸다.
- [0039] 도 10c는 실시예 17에 기재된 바와 같이 이식한 후 7, 10, 13 및 17일째에, 5 mg/kg/일 서열 번호 7, 조합된 대조군 서열 번호 20, 또는 염수를 i.p. 처리한 이종이식편 마우스의 간에서의 표적 하향 조절(GAPDH 발현 대 HIF-1 α mRNA 발현의 % 억제율) + 서열 번호 7의 생체내 흡수(μ g/g 조직)을 나타낸다.
- [0040] 도 10d는 실시예 17에 기재된 바와 같이 처리된 마우스 결장에 있어 또는 조합된 대조군 서열 번호 20으로 처리한 후의 표적 하향 조절(β -액틴 발현 대 HIF-1 α mRNA 발현의 % 억제율) + 서열 번호 7의 생체내 흡수(μ g/g 조직)을 나타낸다.
- [0041] 도 10e는 실시예 17에 기재된 바와 같이 처리된 이종이식편 종양 HT29 및 PC3에 있어, 서열 번호 7의 생체내 흡수(μ g/g 조직)를 나타낸다.
- [0042] 도 11은 하나의 미스매치 대조군 실시예 9 대비, 서열 번호 1을 3일마다 30 mg/kg으로 5회 투여한 후의 HIF-1 α 및 VEGF mRNA의 생체내 내인성 간 표적 하향 조절을 나타낸다.
- [0043] 도 12a, 도 12b, 도 12c 및 도 12d는 U373 세포에서 HIF-1 α 표적화 LNA 올리고뉴클레오타이드, 서열 번호 1, 및 조합된 대조군 서열 번호 8로 처리한 후, VEGFA 및 MMP-2의 발현을 나타낸다. VEGFA 및 MMP-2 발현(분비)의 투

여량-의존성 하향 조절이 U373 세포에서 서열 번호 1 또는 조합된 대조군(서열 번호 8)으로 처리한지 48시간째에 관찰된다. VEGFA(도 12a, 12b 및 12c), 및 MMP-2(도 12d 및 12e) 발현은 세포 개수와 대비되고, 모의체에 정규화된다. 도 12a, 12c 및 12d에서, VEGFA 및 MMP-2 발현을 처리 후 48시간째에 측정하며, 반면 도 12b 및 12e에서는, VEGFA 및 MMP-2의 분비를, 트랜스펙션 후 24 내지 120시간째에 정량화한다.

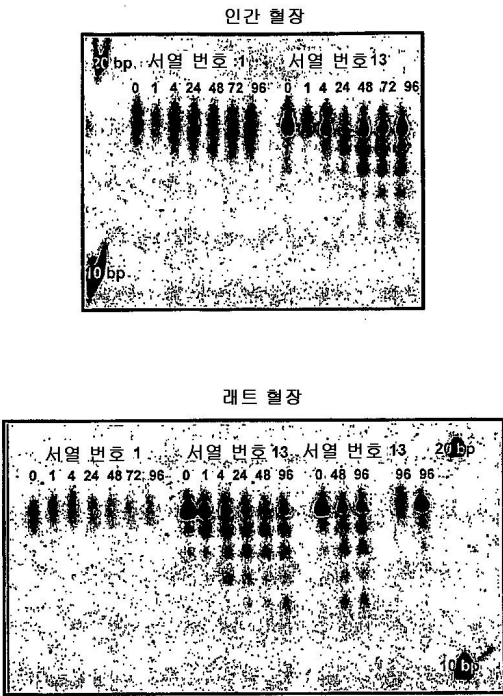
- [0044] 도 13은 웨스턴 블롯에 의한 측정에 따른 HIF-1a 단백질의 하향 조절, 및 서열 번호 8 및 미처리 대조군 대비, 1 및 5 nM로 서열 번호 1로 처리된 HUVEC 세포의 관(tube) 형성의 중단을 나타낸다.
- [0045] 도 14a는 암컷 색소침착 마우스에서 ³H-표지 서열 번호 1을 단일 정맥내 투여한 후, 5분 a), 4시간 b), 24시간 c) 및 18일 d)째의 방사능 분포를 나타내는 전신 방사성조사그램(radioluminogram)을 나타낸다.
- [0046] 도 14b는 5분 및 7일째의 방사능의 분포를 나타내고, ³H-표지 서열 번호 1 화합물의 매우 강한 체류가 7일 후 골수, 신장, 간, 폐, 피부, 비장, 뇨, 위점막, 림프절, 눈의 포도막 및 자궁에서 관찰됨을 보여준다.
- [0047] 도 15는 FACS 분석에 의한 측정에 따른, 미처리 세포 대비, 서열 번호 7을 투여한 후 1일째에 골수, 비장 및 말초혈 내 상이한 세포 유형에서 서열 번호 1의 FAM-표지 양태(서열 번호 7)의 흡수를 나타낸다.
- [0048] 도 16a는 4주 동안 매주 2회 40, 10 및 6 mg/kg 서열 번호 1을 처리한 사이노몰거스 원숭이(cynomolgus monkey)의 간 및 신장에서의 실시간 PCR에 의해 측정되고, 18S RNA에 정규화되는 HIF-1a 발현을 나타낸다. 도 16b는 처리 종료 후, 4주 동안 미처리로 둔 회복 동물(R)에 대한 데이터와 함께 상기와 같이 처리된 마지막 투여 후 1일 또는 4일째의 사이노몰거스 원숭이(회복 동물)의 간 및 신장에서의 서열 번호 1의 흡수를 나타낸다.

도면

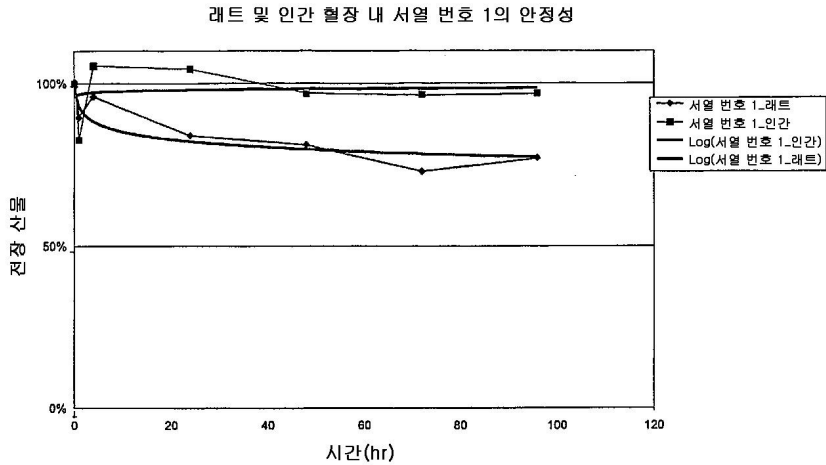
도면1a



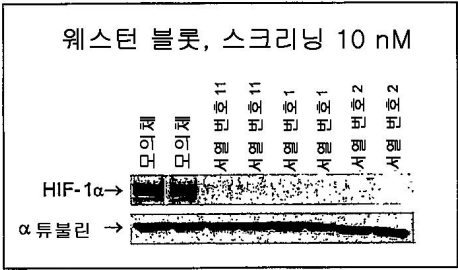
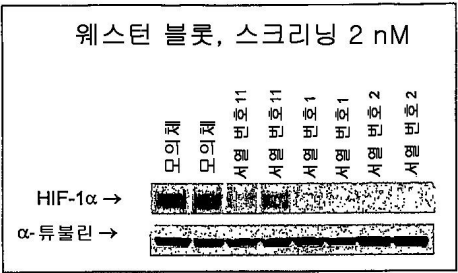
도면1b



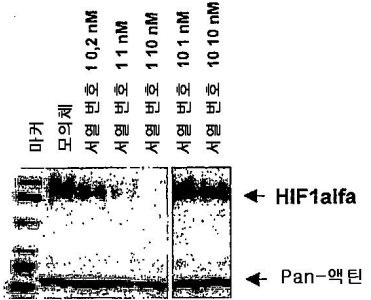
도면1c



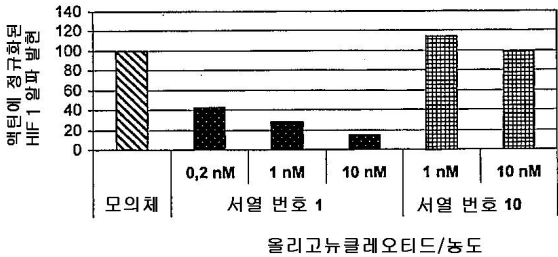
도면2a



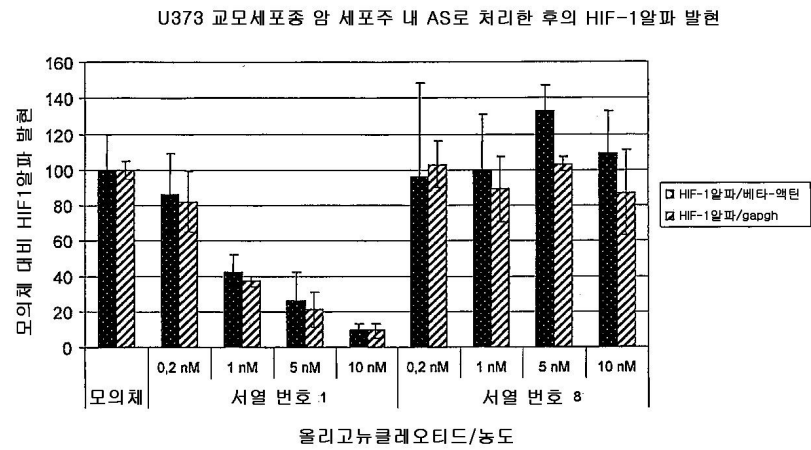
도면2b



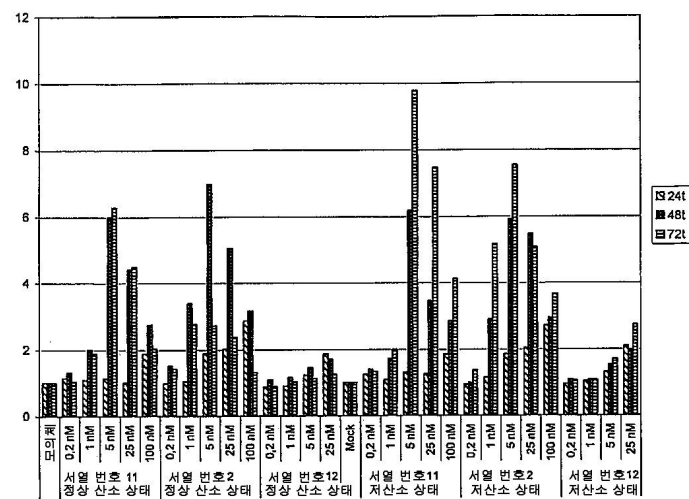
U373 인간 교모세포종 암 세포주 내 서열 번호 1로 처리한 후의 HIF1알파 발현



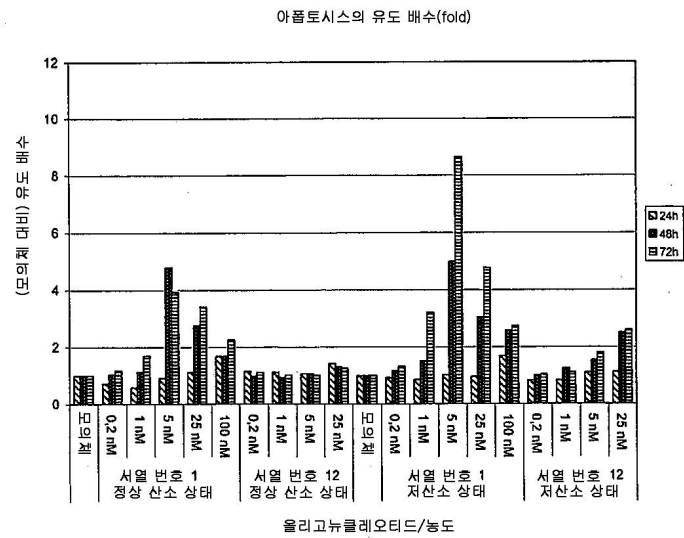
도면2c



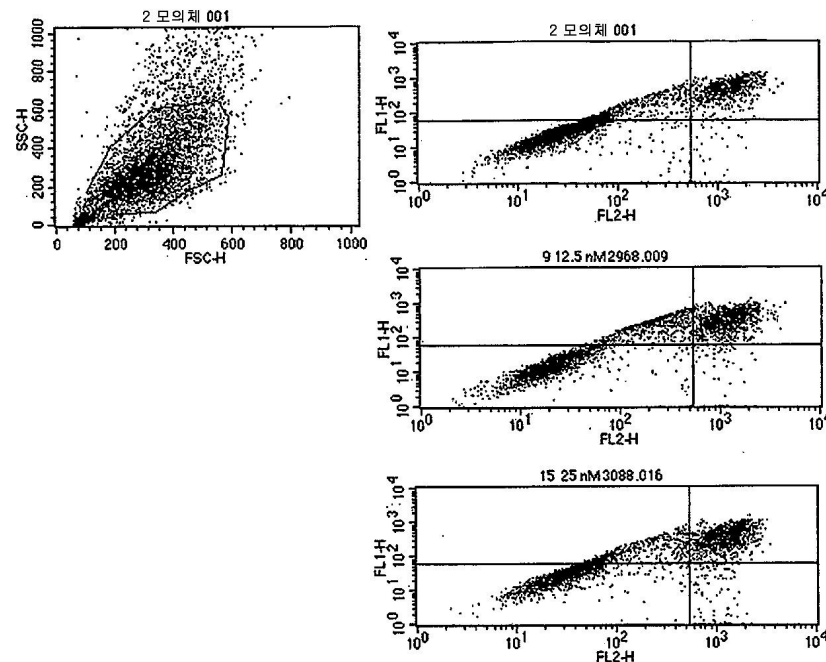
도면3a



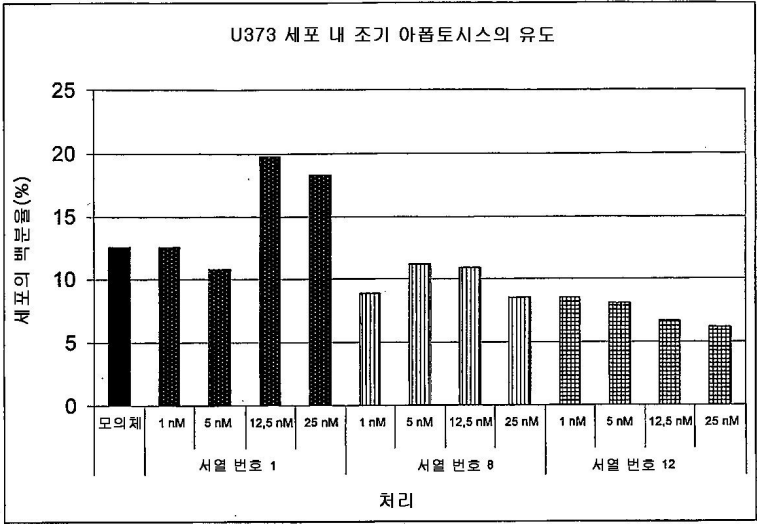
도면3b



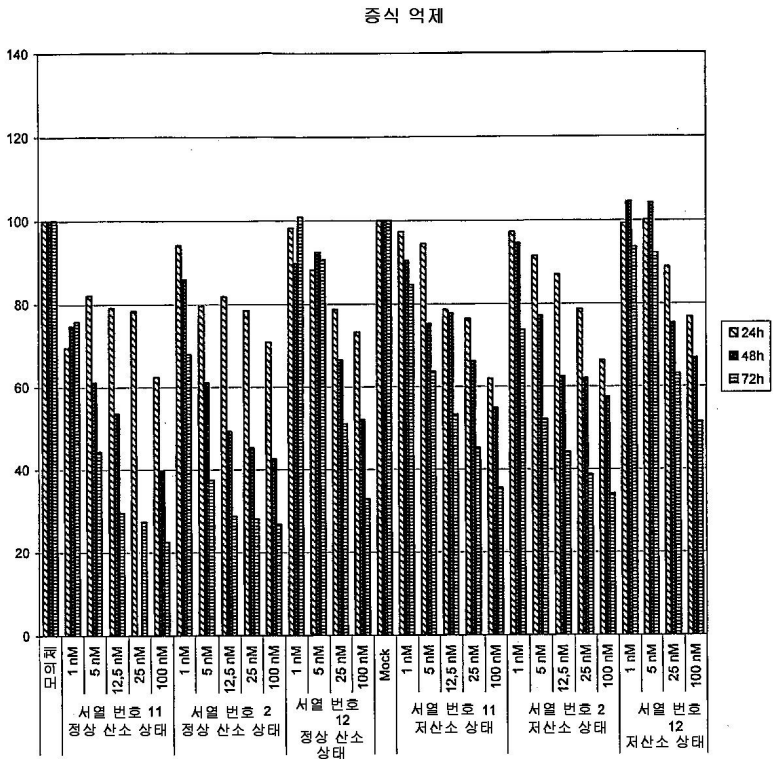
도면4a



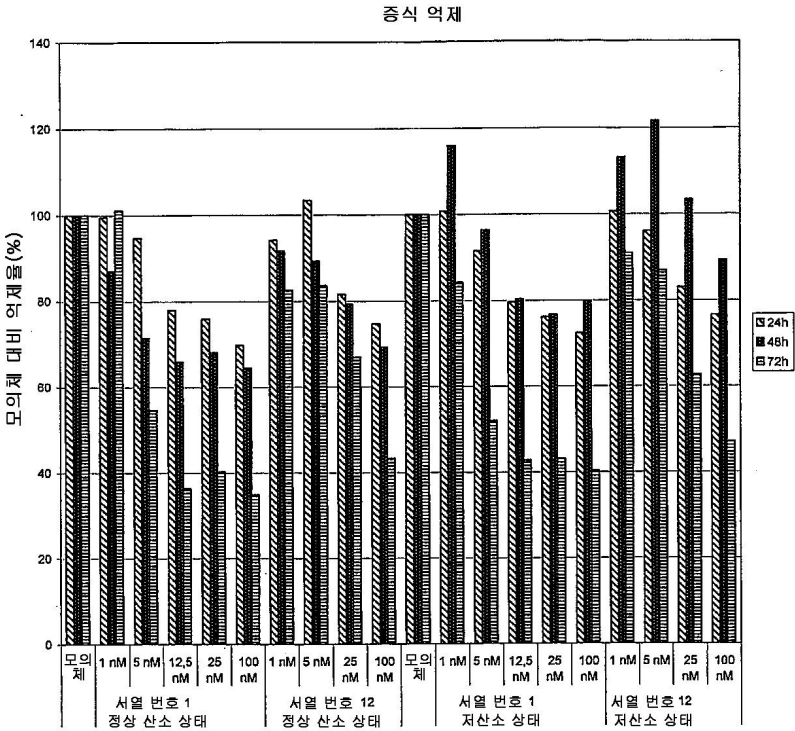
도면4b



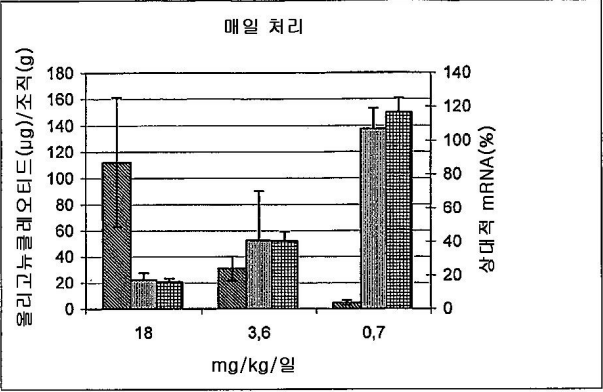
도면5a



도면5b

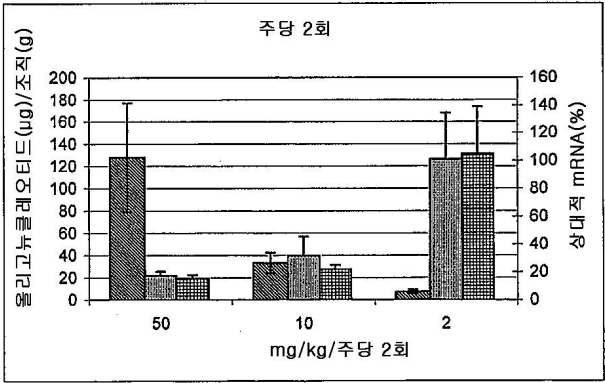


도면6a



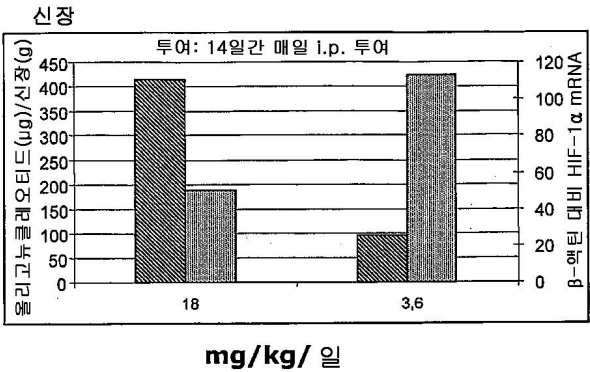
● 간 내 올리고뉴클레오타이드의 양[올리고뉴클레오타이드(µg)/간(g)](우측 막대)
● (염수 처리군 대비) β-액틴 발현 대 마우스 HIF-1α mRNA 발현(중간축 막대)
● (염수 처리군 대비) β-액틴 발현 대 마우스 VEGF mRNA 발현(좌측 막대)

도면6b



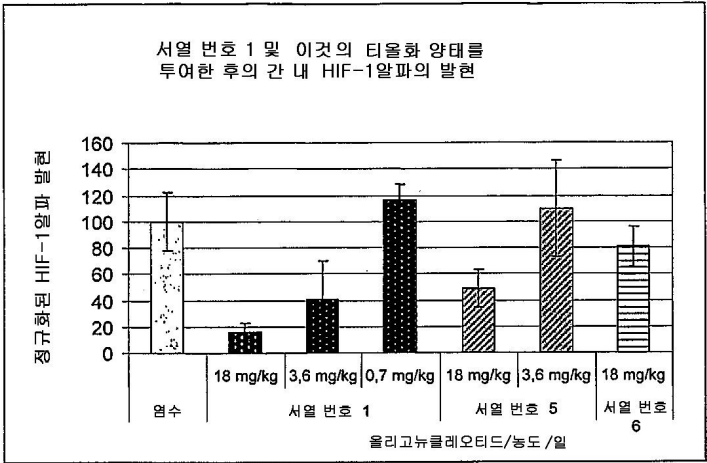
● 간 내 올리고뉴클레오타이드의 양[올리고뉴클레오타이드(µg)/간(g)](우측 막대)
● (염수 처리군 대비) β-액틴 발현 대 마우스 HIF-1α mRNA 발현(중간축 막대)
● (염수 처리군 대비) β-액틴 발현 대 마우스 VEGF mRNA 발현(좌측 막대)

도면6c

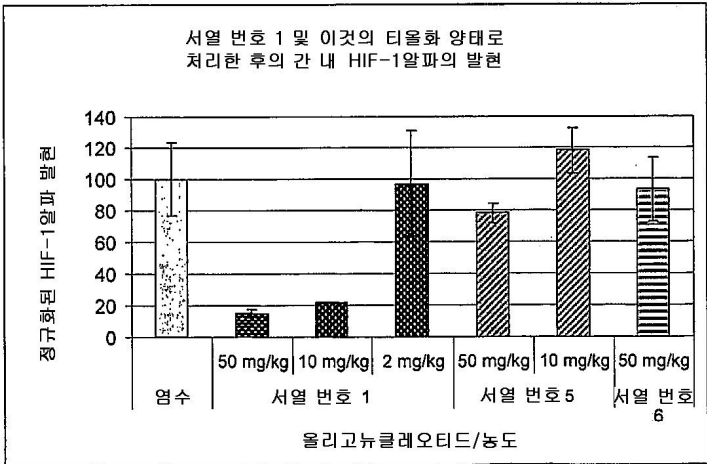


● 간 내 올리고뉴클레오타이드의 양[올리고뉴클레오타이드(µg)/간(g)](좌측 막대)
● (염수 처리군 대비) β-액틴 발현 대 마우스 HIF-1α mRNA 발현(우측 막대)

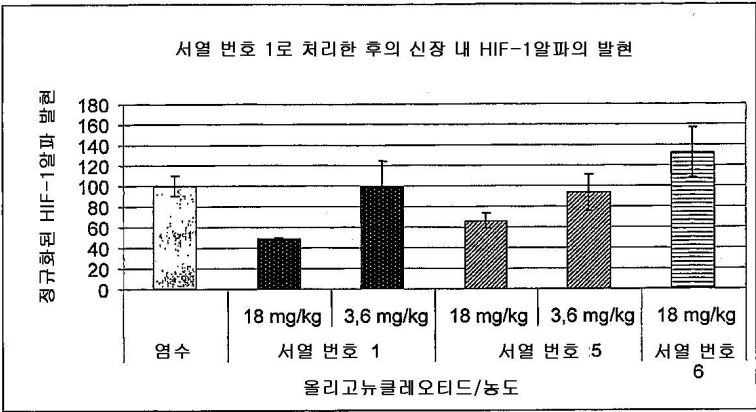
도면7a



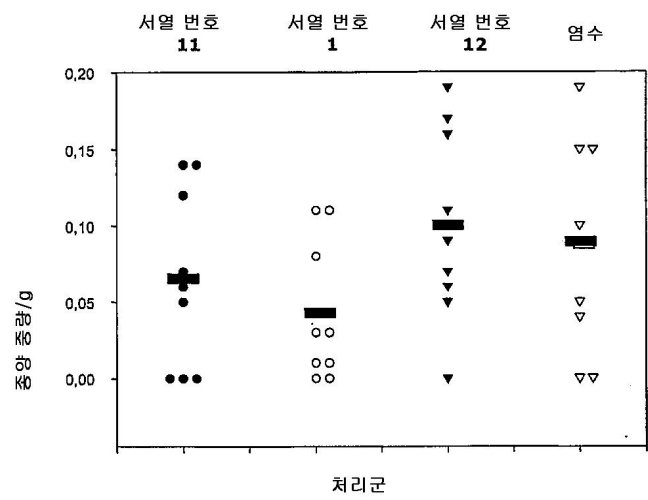
도면7b



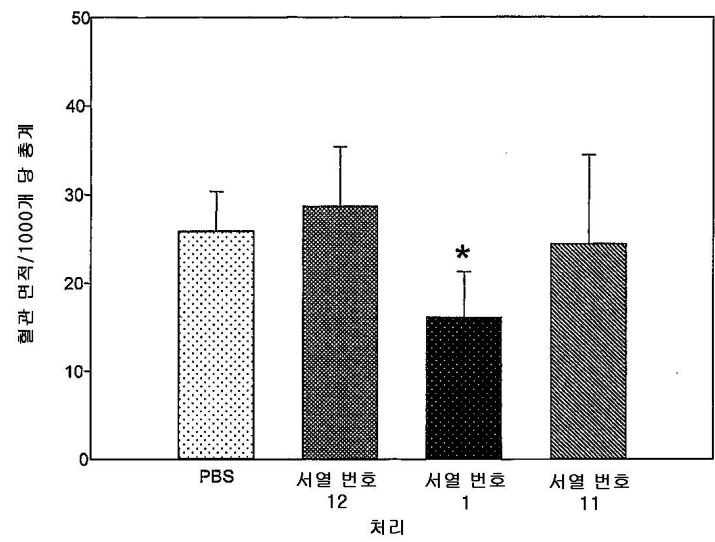
도면7c



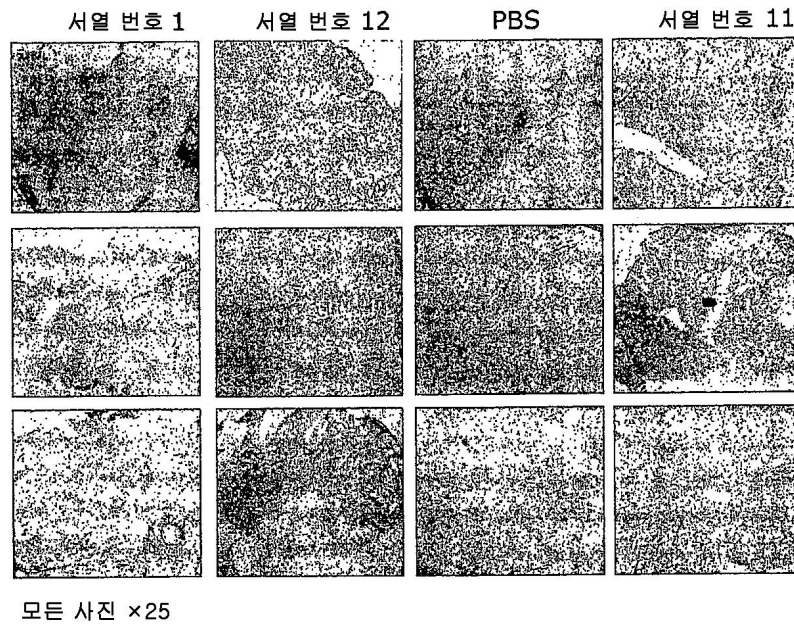
도면8a



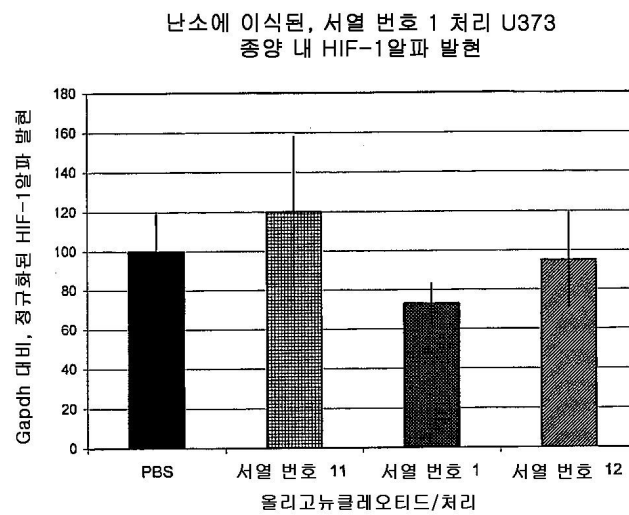
도면8b



도면8c



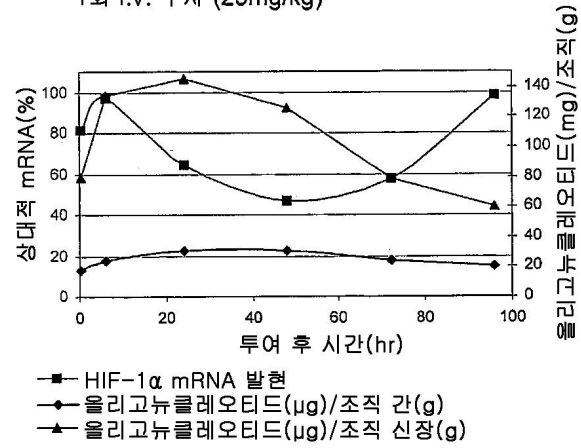
도면8d



도면9a

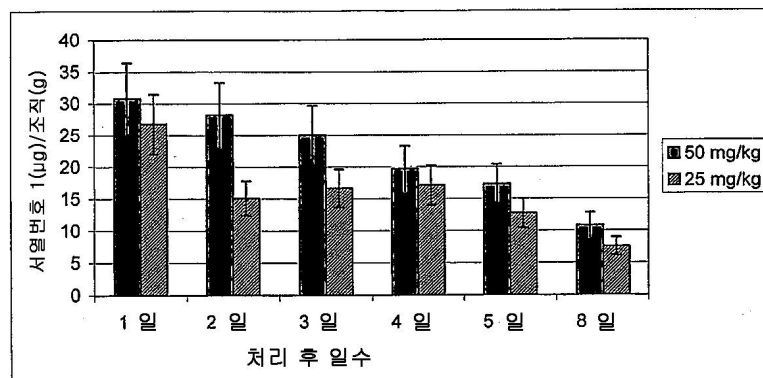
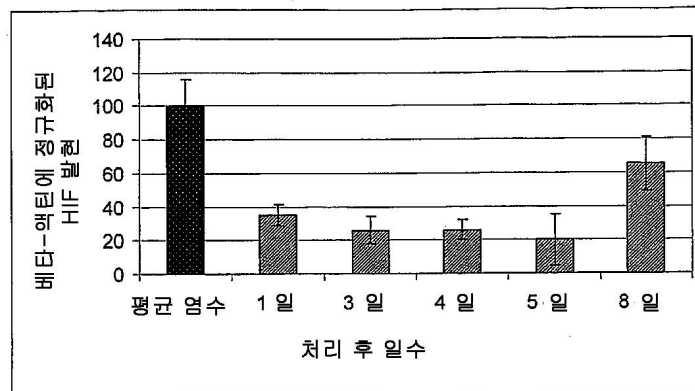
간 및 신장 내 반감기 대 표적-녹다운

1회 i.v. 주사 (25mg/kg)

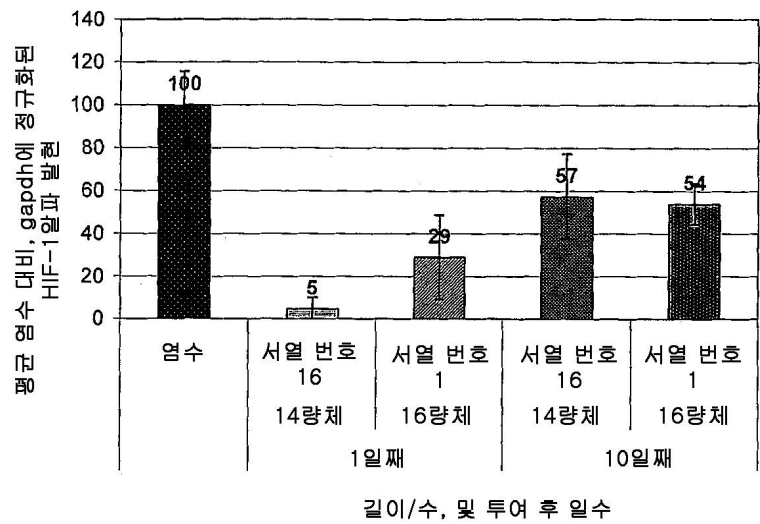


신장 내 t_{1/2} ~46 h
간 내 t_{1/2} ~66 h

도면9b

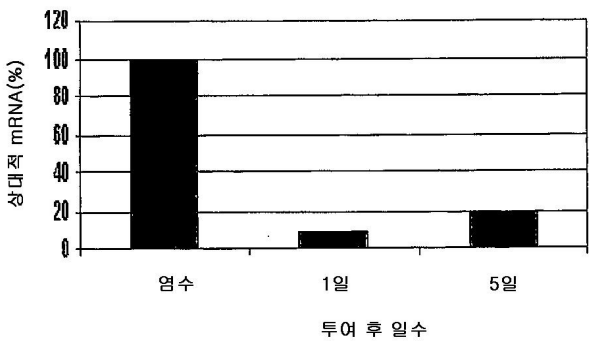


도면9c



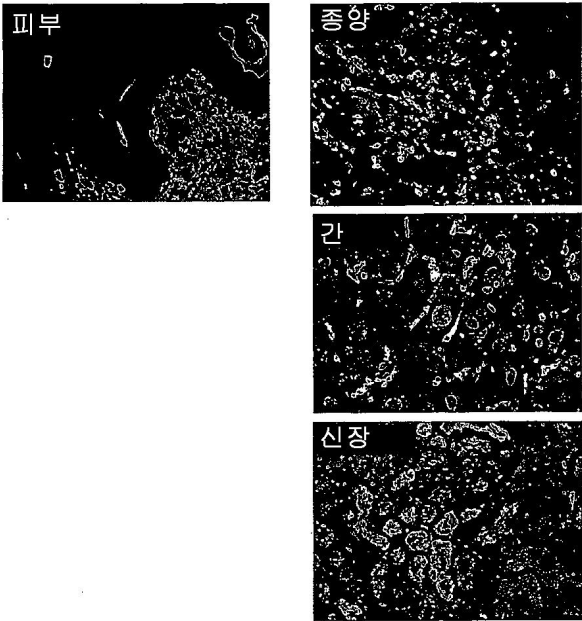
도면10a

작용 기간
7일 동안 25 mg/kg/일을 투여하고, 1 또는 5일 후에
희생시킨 이중이식편 마우스 내 HIF-1α 발현

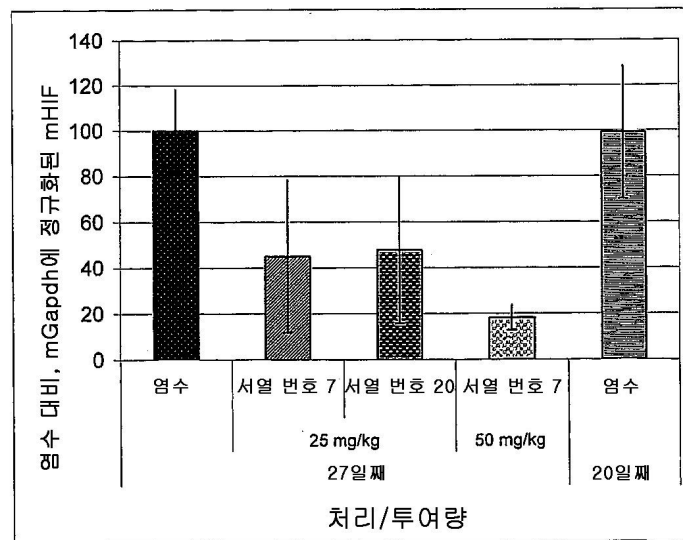
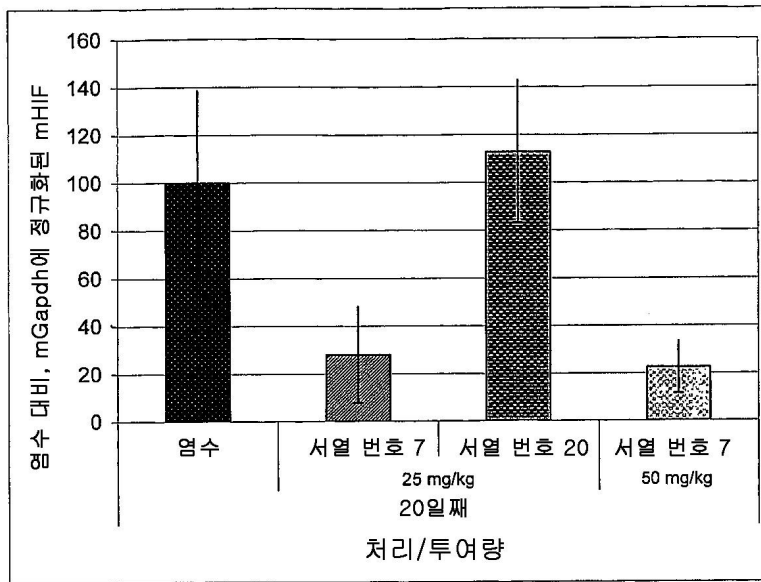


도면10b

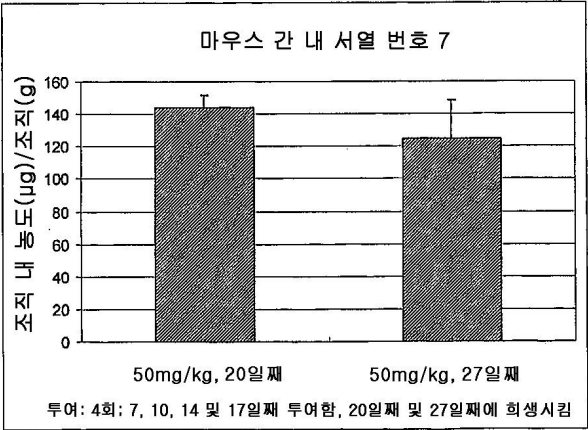
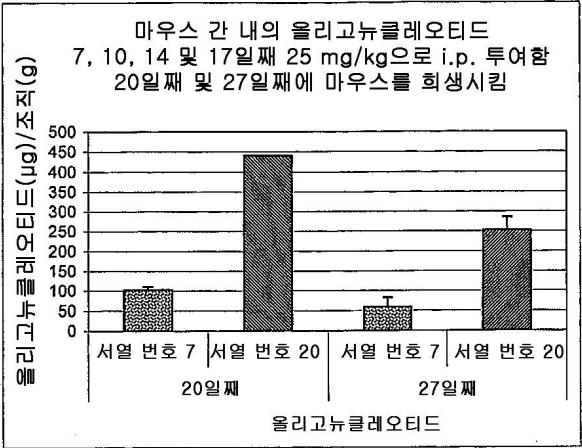
조직 내 분포



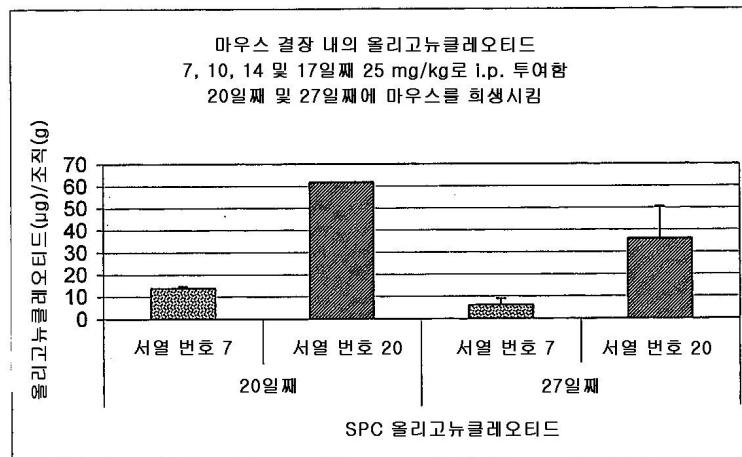
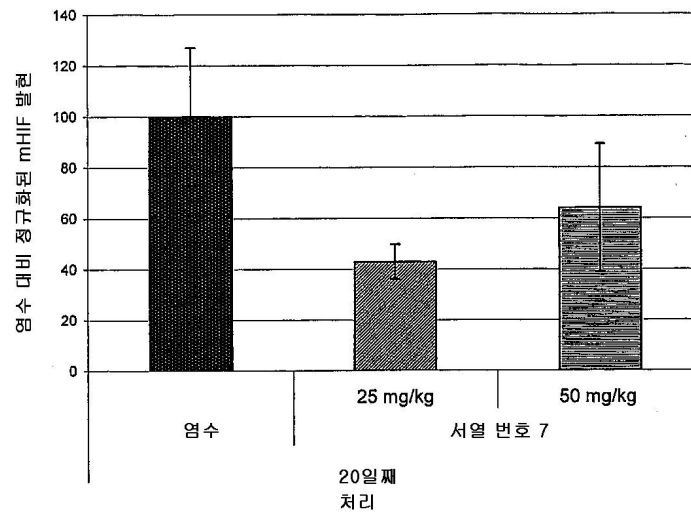
도면10c1



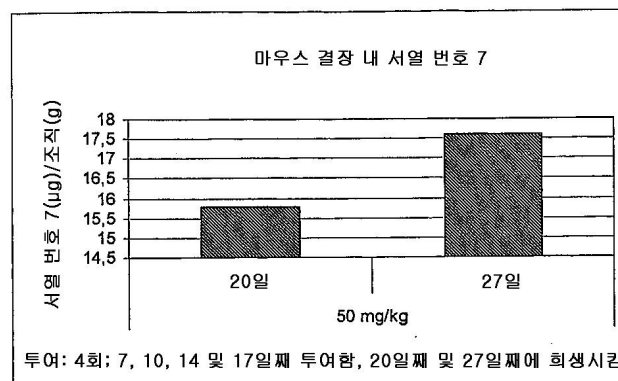
도면10c2



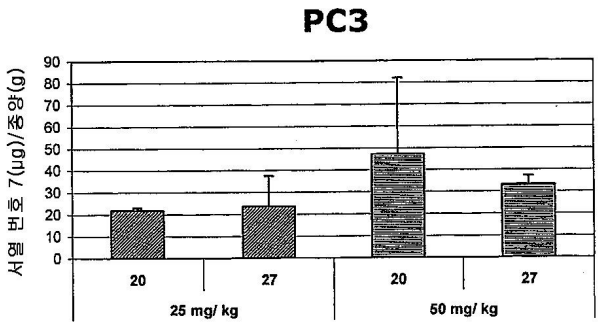
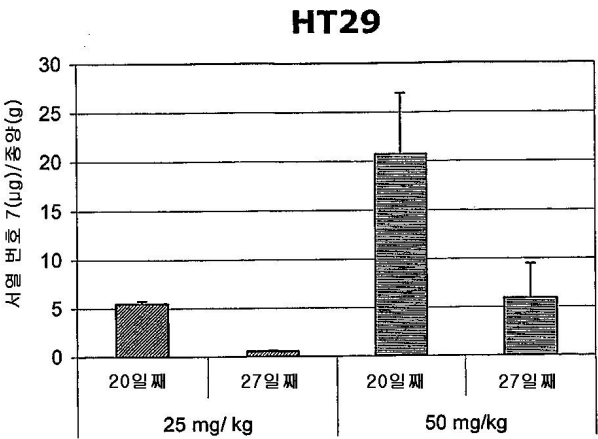
도면10d1



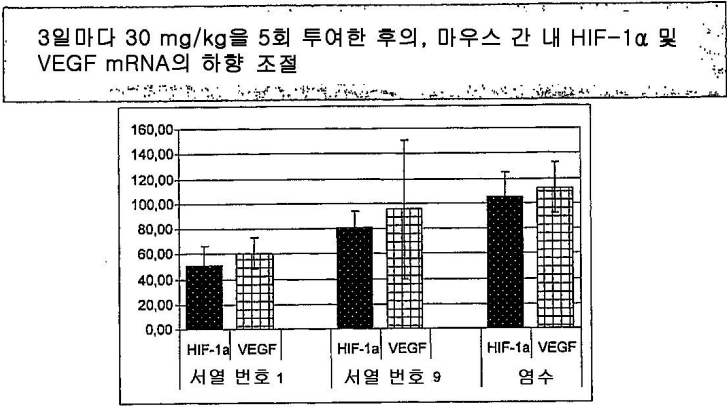
도면10d2



도면10e

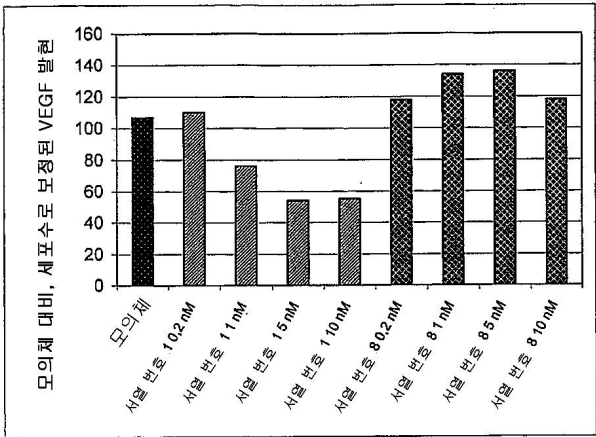


도면11

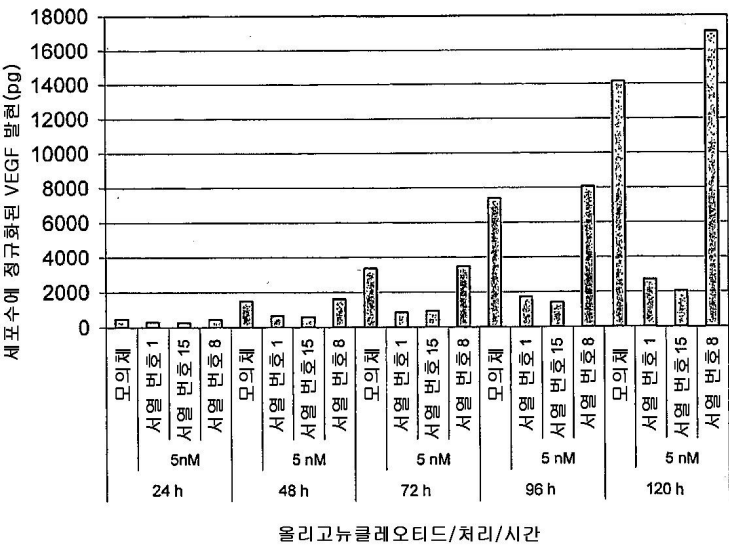


m-GAPDH-10에 정규화된 마우스 HIF-1 α mRNA 발현(좌측 막대)
m-GAPDH-10에 정규화된 마우스 VEGF mRNA 발현(우측 막대)

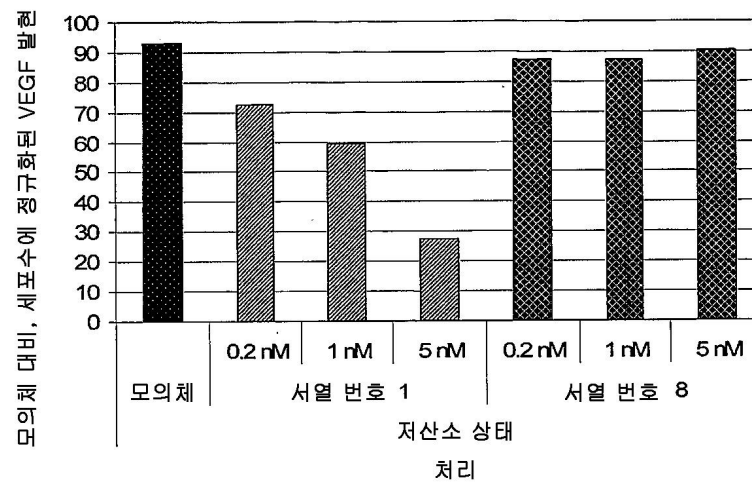
도면12a



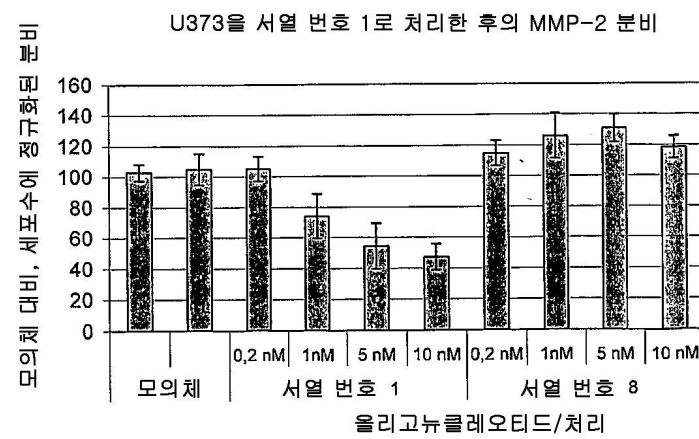
도면12b



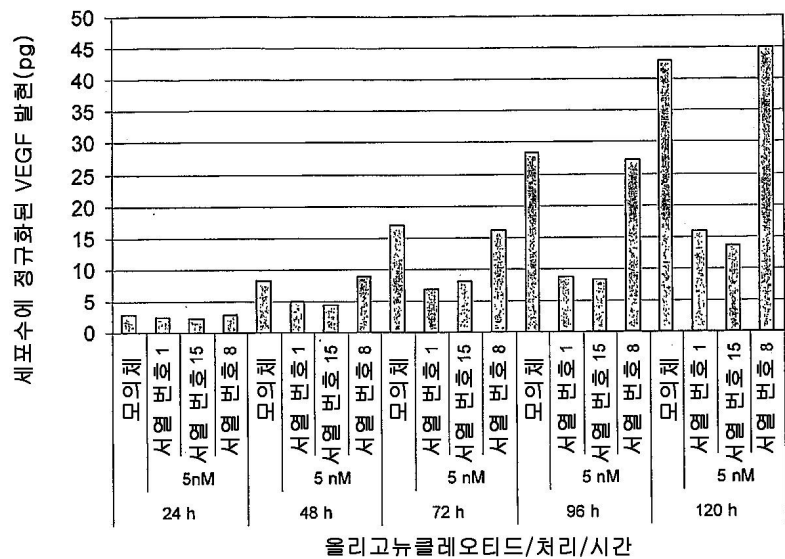
도면12c



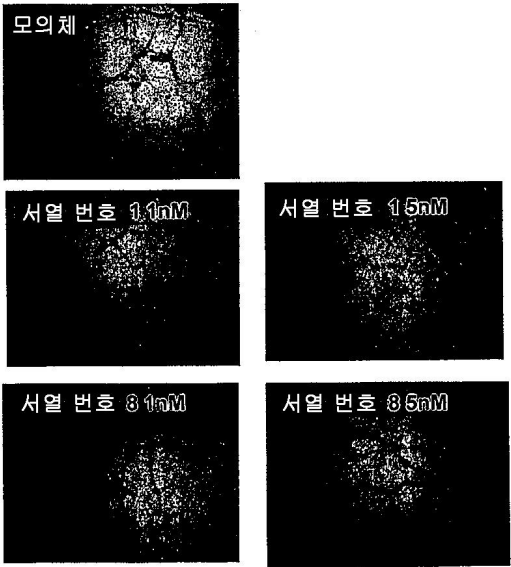
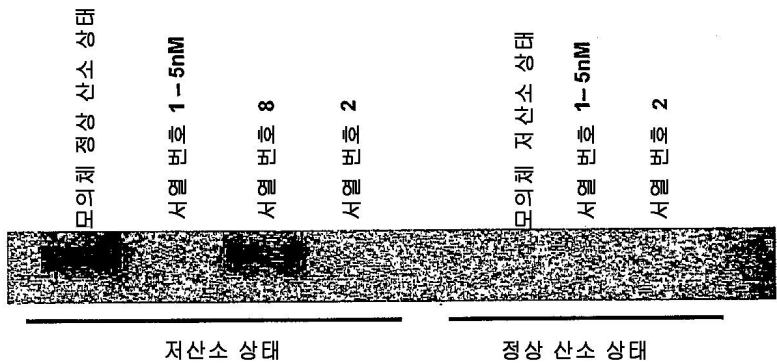
도면12d



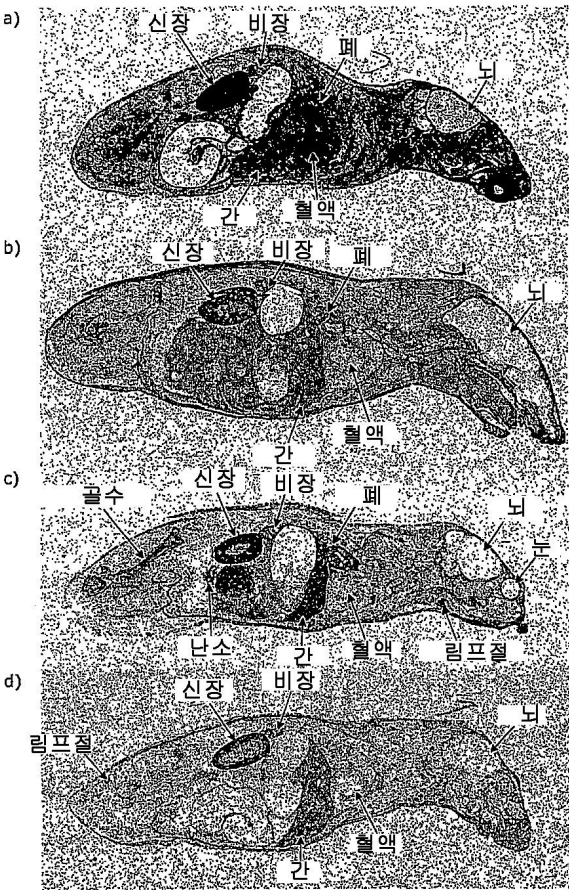
도면12e



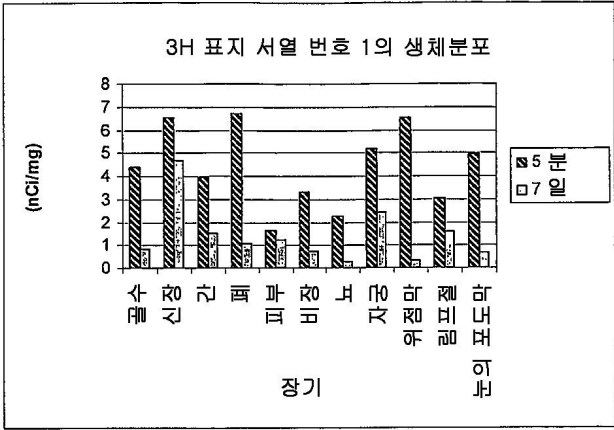
도면13



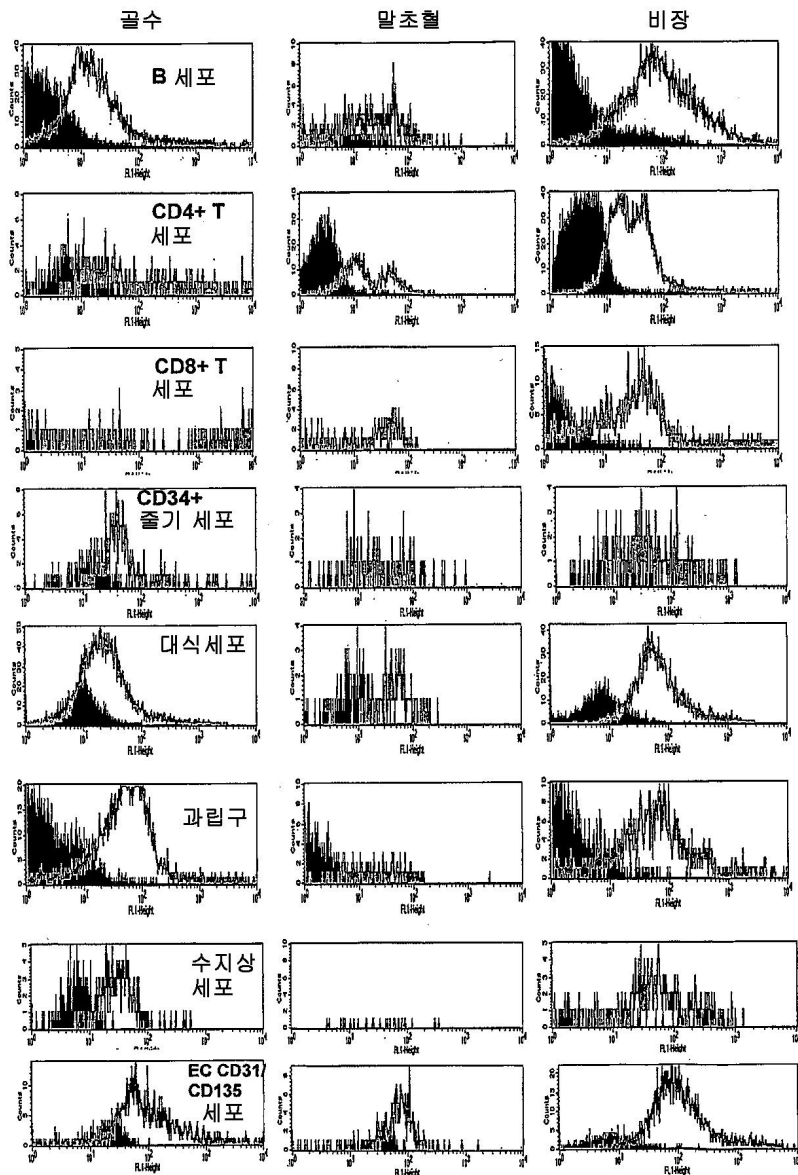
도면14a



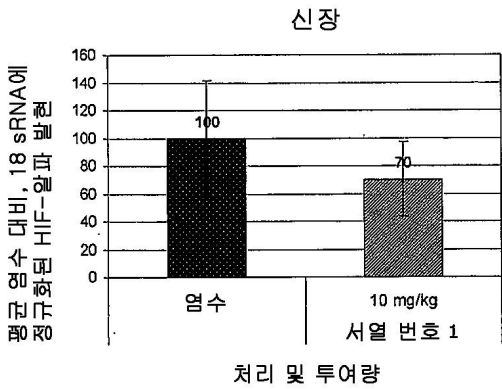
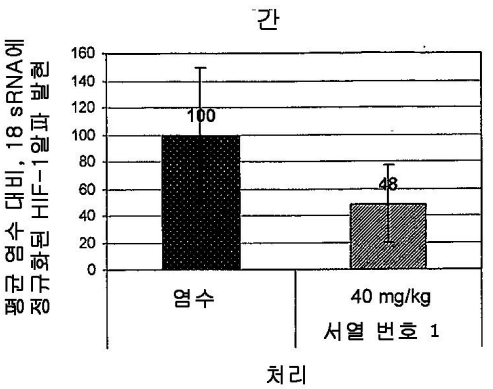
도면14b



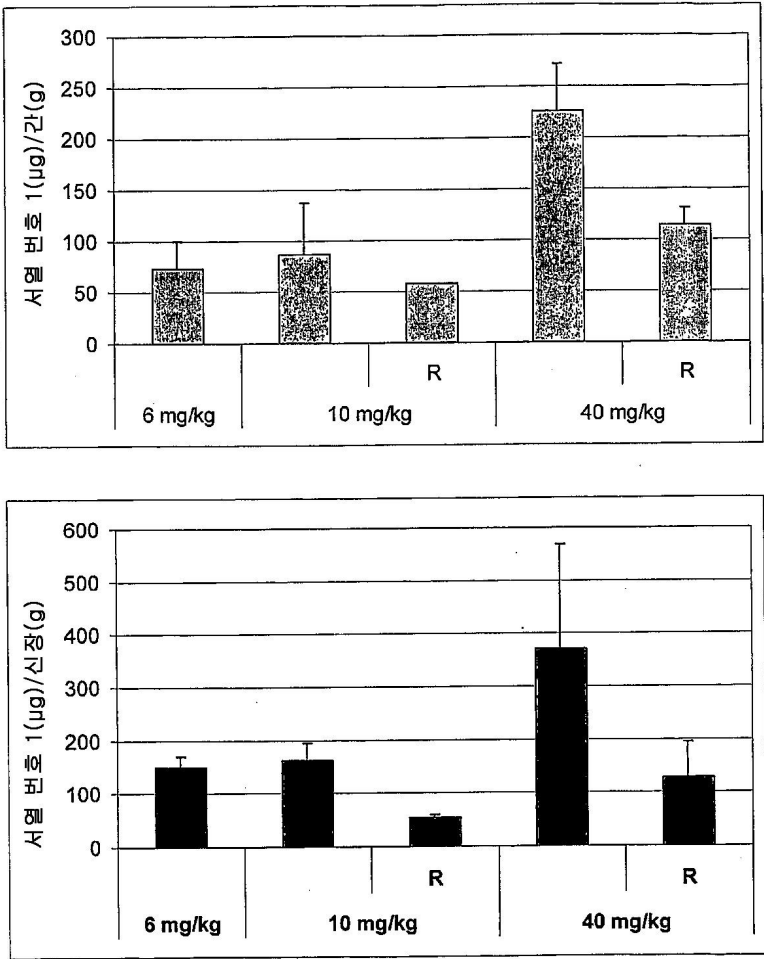
도면15



도면16a



도면16b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Santaris Pharma A/S
- <120> POTENT LNA OLIGONUCLEOTIDES FOR THE INHIBITION OF HIF-1A
EXPRESSION
- <130> 16372PCT00
- <160> 39
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 16
- <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA modified nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> Phosphorothioate linkage

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(15)

<223> LNA modified nucleotide

<400> 1

tggcaagcat cctgta

16

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA modified nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> Phosphorothioate linkage

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(15)

<223> LNA modified nucleotide

<400> 2

gttactgcct tcttac

16

<210> 3

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA modified nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(15)

<223> LNA modified nucleotide

<400> 3

tggcaagcat cctgt

15

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA modified nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(15)

<223> LNA modified nucleotide

<400> 4

gttactgcct tctta

15

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA modified nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(15)

<223> LNA modified nucleotide

<400> 5

tggcaagcat cctgta

16

<210> 6

<211> 16

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> LNA modified nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> LNA modified nucleotide

<400> 6
tggcaagcat cctgta

16

<210> 7
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> LNA modified nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> Phosphorothioate linkage

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> LNA modified nucleotide

<400> 7

tggcaagcat cctgta

16

<210> 8
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> LNA modified nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> Phosphorothioate linkage

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> LNA modified nucleotide

<400> 8
cgtcagtatg cgaatc

16

<210> 9
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> LNA modified nucleotide

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(15)
<223> Phosphorothioate linkage

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> LNA modified nucleotide

<400> 9
tggcaaacat cctgta

16

<210> 10
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> LNA modified nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> Phosphorothioate linkage

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> LNA modified nucleotide

<400> 10
tgacaagcat ccagta

16

<210> 11
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> LNA modified nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(16)

<223> LNA modified nucleotide

<400> 11

tggtgaggct gtccga

16

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> LNA modified nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(16)

<223> LNA modified nucleotide

<400> 12

ttgcggactc ggatgg

16

<210> 13
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> Phosphorothioate linkage

<400> 13
tggcaagcat cctgta

16

<210> 14
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> LNA modified nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> Phosphorothioate linkage

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 5-methyl modified LNA cytosine

<220>
<221> misc_feature

<222> (13)..(14)
 <223> LNA modified nucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-methyl modified LNA cytosine

<400> 14
 ttctatgct gtatcc 16

<210> 15
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA modified nucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> Phosphorothioate linkage

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA modified nucleotide

<400> 15
 tggcaagcat cctgt 15

<210> 16
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> LNA modified nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> Phosphorothioate linkage

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> LNA modified nucleotide

<400> 16

ggcaagcatc ctgt

14

<210> 17

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA modified nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> Phosphorothioate linkage

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(15)

<223> LNA modified nucleotide

<400> 17

gttactgcct tctta

15

<210> 18
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> LNA modified nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(14)
<223> Phosphorothioate linkage

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> LNA modified nucleotide

<400> 18
ttactgcctt ctta

14

<210> 19
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> LNA modified nucleotide

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(14)
<223> Phosphorothioate linkage

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> LNA modified nucleotide

<400> 19
tggcaagcat cctgt 15

<210> 20
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> LNA modified nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> Phosphorothioate linkage

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> LNA modified nucleotide

<400> 20
cgtcagtatg cgaatc 16

<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 21

ctcatccaag aagccctaac gtgtt

25

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 22

gctttctctg agcattctgc aaagc

25

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 23

cctcaggaac ttagttctt tgactcaaag cgaca

35

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 24

gcttaccatc agctatttgc gtgtg

25

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 25

gaaccataac aaaacatcc aaggc

25

<210> 26

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 26

tcatcttcaa tatccaaatc accagcatcc agaag

35

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 27

aaggctgtgg gcaaggtcat c

21

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 28

gtcagatcca cgacggacac att

23

<210> 29
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

<400> 29
 gaagctcact ggcatggcat ggccttcgt gttc 34

<210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

<400> 30
 tgggactttc tttaccatg c 21

<210> 31
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

<400> 31
 ggagtgttta cgttttcctg aag 23

<210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

<400> 32

ccttccttct tgggtatgga a 21

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

<400> 33
 gctcaggagg agcaatgac t 21

<210> 34
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

<400> 34
 cacgacagaa ggagagcaga agtc 24

<210> 35
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

<400> 35
 gtcggggtac tcctggaaga tgt 23

<210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 36

gccctgtgga tgactgagta

20

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 37

cagccaggag aaatcaaaca g

21

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 38

agcctcgtcc cgtagacaaa at

22

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 39

gttgatggca acaatctcca cttt

24