



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월28일

(11) 등록번호 10-1606495

(24) 등록일자 2016년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/02 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7007008

(22) 출원일자(국제) 2011년08월18일

심사청구일자 2014년02월11일

(85) 번역문제출일자 2013년03월19일

(65) 공개번호 10-2013-0099067

(43) 공개일자 2013년09월05일

(86) 국제출원번호 PCT/CA2011/000956

(87) 국제공개번호 WO 2012/021985

국제공개일자 2012년02월23일

(30) 우선권주장

61/375,257 2010년08월20일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20060074041 A1*

US20060293510 A1*

Nucleic Acids Symposium Series. 2008. No.52, pp.485-486.*

J Biol Inorg Chem. 2007. Vol.12, pp. 901-911.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

레플리코르 인코포레이티드

캐나다 에이치4피 2알2 퀘벡 몬트리올 스위트
다-101 로얄마운트 애비뉴 6100

(72) 발명자

베일런트 앤드류

캐나다 에이치8와이 3이6 퀘벡 록스보로 일레븐쓰
스트리트 74

바지넷 미셸

캐나다 에이치3피 2에이7 퀘벡 몬트리올 브룩필드
애비뉴 343

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 25 항

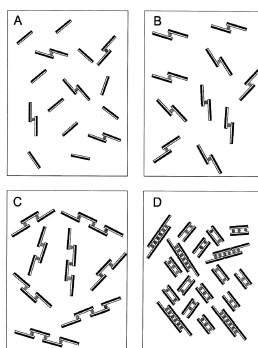
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체

(57) 요약

본 개시내용은 크기 또는 개질에 관계없이 임의의 올리고뉴클레오타이드(ON)에 의한 다양한 2가(2+) 금속 양이온의 광범위하게 활성적인 킬레이트화를 기술한다. 이러한 킬레이트화 효과는 2가(또는 더 높은 원자가)인 양이온에 특이적이며, 염과 같이 거동하지 않는 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체의 형성을 가져온다. 임의의 ON 및 2가 금속 양이온을 사용하여 제조되는 ON 킬레이트 복합체의 새로운 조성물 및 올리고뉴클레오타이드 투여 동안 ON 킬레이트 복합체의 사용에 의한 항응고 및/또는 피하 주사 부위 반응의 억제 및/또는 올리고뉴클레오타이드를 이용한 내약성 개선을 위한 방법이 본원에 기술되어 있다.

대표도 - 도15



명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합을 가지고 있는, 2가 양이온에 의해 분자간 연결된, 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체를 포함하는, 약학 조성물로서,

상기 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14로 구성되는 것인, 약학 조성물.

청구항 2

하나 이상의 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합을 가지고 있는, 2가 양이온에 의해 분자간 연결된, 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체로서,

상기 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14로 구성되고,

상기 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드가 포스포디에스테르 결합으로 연결된, 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 2가 양이온이 칼슘인, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 2가 양이온이 마그네슘인, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 2가 양이온이 코발트, 철(2+), 망간, 구리 또는 아연인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체가 2 이상의 상이한 2가 금속 양이온들을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체가 완전히 포스포로티오에이트화된 올리고뉴클레오타이드를 하나 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체가 하나의 2' 변형된 리보스를 가진 올리고뉴클레오타이드를 하나 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체가 각 리보스가 2' O-메틸화된 올리고뉴클레오타이드를 하나 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 피하 투여용인 약학 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 정맥내 주입용인 약학 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항에 따른 약학 조성물을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 제형.

청구항 15

제14항에 있어서, 피하 투여용인, 제형.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 제형이 정맥내 주입용인, 제형.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 5-메틸시토신을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 5-메틸시토신을 포함하는 서열번호 6으로 구성되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드가 각각의 시토신이 5-메틸시토신인 서열번호 6으로 구성되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 20

올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체를 포함하며,

상기 킬레이트 복합체가 2가 양이온에 의해 분자간 결합된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인,

개체에서 올리고뉴클레오타이드 투여에 따른 항응고 효과를 억제 또는 감소시키기 위한; 개체에서 올리고뉴클레오타이드 투여에 따른 피하 주사 부위의 반응을 억제 또는 감소시키기 위한; 또는 IV 주입에 의한 투여시 개체에서 올리고뉴클레오타이드에 대한 내약성 (tolerability)을 개선시키기 위한, 약학 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 킬레이트 복합체가 칼슘 킬레이트 복합체인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 킬레이트 복합체가 마그네슘 킬레이트 복합체인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 킬레이트 복합체가 혼합된 마그네슘 및 칼슘 킬레이트 복합체인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

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

청구항 36

삭제

청구항 37

제20항에 있어서, 상기 킬레이트 복합체가 서열번호 3 내지 서열번호 14로 구성되는 올리고뉴클레오타이드를 하나 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 38

삭제

청구항 39

제20항에 있어서, 상기 킬레이트 복합체가 하나 이상의 5-메틸시토신을 추가로 포함하는 서열번호 6으로 구성된 올리고뉴클레오타이드를 하나 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 40

제20항에 있어서, 상기 킬레이트 복합체가 각각의 시토신이 5-메틸시토신인 서열번호 3 내지 서열번호 12로 구성되는 올리고뉴클레오타이드를 하나 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 41

삭제

청구항 42

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드가, 각 시토신은 5-메틸시토신이고, 2'-O-메틸화된 하나 이상의 리보스를 가지는, 서열번호 6으로 구성되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체, 이의 조성물 및 킬레이트 복합체로서 올리고뉴클레오타이드(ON)의 형성을 위한 방법 및 ON 투여를 위한 이들 ON 킬레이트 복합체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

염은 산 및 염기의 상호작용(중화)으로 생성된 이온성 화합물이다. 전기적으로 중성 상태가 유지될 수 있도록 염은 상호작용하는 양이온 및 음이온으로 구성되어 있다. 음이온은 무기(예를 들어 Cl^-) 또는 유기(예를 들어 아세테이트(CH_3COO^-))일 수 있다. 수성 환경에서 음이온 및 양이온 쌍의 해리된 상태로 인하여 용해된 염(전해질)을 함유하는 수용액은 전기를 전도할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 폴리음이온이며, 이전에 양이온 대응물(counterpart)이 해리된 상태로 용액에 존재하는 염으로서 거동하는 것으로만 생각되어 왔다.

- [0003] 인간 환자에게 ON의 투여는 전형적으로 존재하는 뉴클레오타이드 서열과 관련이 없는 여러 가지 일반화된 부작용을 동반하여 왔다. 이는 혈액의 항응고(프로트롬빈 시간(또는 PTT 시간)의 상승)(문헌[Kandmimlla et al., 1998, Bioorgan. Med. Chem. Let., 8: 2103]; [Sheeban et al., Blood, 1998, 92: 1617]; [Nicklin et al., 1197, Nucleosides & Nucleotides, 16: 1145]; [Kwoh, 2008, Antisense Drug Tech. 2nd Ed., p374]) 및 피하투여로 인한 주사 부위 반응(또는 ISR(injection site reaction))(경결(induration), 염증, 압통(tenderness) 및 통증)(문헌[Webb et al., 1997, Lancet, 349: 9059]; [Schrieber et al., 2001, Gastroenterol., 120: 1339]; [Seawell et al., 2002, J. Pharmacol. Exp. Therap., 303: 1334]; [Kwoh, 2008, Antisense Drug Tech. 2nd Ed., p383]; [Raal et al., 2010, Lancet, 375: 998])을 포함한다. 항응고 효과는 응고 캐스케이드의 단백질과 비서열 특이적 상호작용에 의해 매개된다고 생각된다. ON은 (톨-유사 수용체 또는 TLR-매개 사이토카인 유도를 통해) 면역자극 특성을 가지는 것으로 보여졌으므로, ISR은 전형적으로 피하(SC) 주사에 있어서 소량(전형적으로 1cc)으로 고농도의 ON 투여에 대한 필요에 기인하였으며, 이는 주사 부위에서 국소 염증을 일으킬 것으로 생각된다.
- [0004] 최근 몇 년 동안 핵산 기반 치료법의 출현으로, 임상 개발에 있어서 ON 기반 화합물의 수가 증가하고 있다. 역사적으로 대부분의 ON 복용 요법은 ON의 양호하지 않는 경구적 생물학적 이용가능성으로 인하여 비경구적으로 주어져야 하는 주당 다수회 용량 또는 매주 1회 용량을 이용하여 왔다. ON의 정맥내 주입은 용량 및 속도가 전형적으로 반응성(발열, 오한, 허약)에 의해 제한되고 만성 복용 시나리오에서 논리적으로 큰 노력을 요할 것이므로, ON의 보다 최근 임상적인 적용은 피하(SC) 투여 경로를 사용하였다. 이는 최소한의 전신 복용 부작용을 가져오지만 전형적으로 또한 이러한 투여 경로에 의해 달성가능한 복용을 제한하는 (상기 기술된 바와 같이) 다양한 중증도의 주사 부위 반응을 동반한다.
- [0005] 그러므로 IV 또는 SC 투여 경로 동안 반응성을 완화시킬 ON 제형을 제공하는 것이 유용하고 바람직할 것이다. 또한, ON 투여의 항응고 효과가 최소한으로 고려되는 동안, ON의 이러한 부작용을 중화하여 인간 및 비인간 개체에서 안전성이 더 크게 보장되는 여유를 제공하는 것이 또한 유용할 것이다.
- [0006] 따라서 개선된 ON 제형을 제공할 필요가 있다.

발명의 내용

- [0007] 본 설명에 따라서, 이제 다가 양이온에 의해 결합된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체가 제공된다.
- [0008] 피하 투여용 올리고뉴클레오타이드 제형이 추가로 제공되며, 올리고뉴클레오타이드 제형은 본원에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체를 포함한다.
- [0009] 또한 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 또는 올리고뉴클레오타이드 제형 및 담체를 포함하는 약학 조성물이 개시된다.
- [0010] 본원에 기술된 바와 같은 킬레이트 복합체로서 개체에 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 단계를 포함하는 개체에 올리고뉴클레오타이드 투여와 연관된 간 또는 신장 기능장애를 감소시키는 방법, 본원에 개시된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 개시된 바와 같은 약학 조성물이 추가로 개시된다.
- [0011] 칼슘 킬레이트 복합체 또는 기타 다른 적절한 ON 금속 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물로서 ON을 투여함으로써 ON에 의한 혈액 항응고의 억제, 저해 또는 감소를 위한 방법이 본원에 개시된다.
- [0012] 칼슘 킬레이트 복합체 또는 기타 다른 적절한 ON 금속 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물로서 ON을 제조합으로써 IV 주입에 의해 투여되는 임의의 ON의 내약성의 개선을 위한 방법이 또한 본원에 개시된다.
- [0013] 칼슘 킬레이트 복합체 또는 기타 다른 적절한 ON 금속 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물로서 ON의 투여로 인한 주입 부위 반응의 억제 또는 감소를 위한 방법이 본원에 개시된다. 특히, ON은 피하로 투여된다.
- [0014] 칼슘 킬레이트 복합체 또는 기타 다른 적절한 ON 금속 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물로서 ON을 제조합으로써 임의의 경로에 의해 투여되는 임의의 ON으로 인한 금속 킬레이트화의 억제를 위한 방법이 본원에 개시된다.

- [0015] 칼슘 킬레이트 복합체 또는 기타 다른 적절한 ON 금속 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물로서 ON의 투여에 의하여 임의의 ON의 혈청 반감기의 감소를 위한 방법이 본원에 개시된다.
- [0016] 칼슘 킬레이트 복합체 또는 기타 다른 적절한 금속 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물로서 ON의 투여에 의하여 임의의 ON과 혈청 단백질 상호작용의 감소를 위한 방법이 본원에 개시된다. 특히, 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체, 제형 또는 조성물은 개체에 IV 주입에 의해 투여된다.
- [0017] 다음의 목록, 즉 칼슘, 마그네슘, 코발트, 철, 망간, 바륨, 니켈, 구리, 및/또는 아연 중 임의의 것으로부터의 2가 금속 양이온의 공급원이 올리고뉴클레오타이드 사용 시에 ON 킬레이트 복합체로서 올리고뉴클레오타이드와 함께 제공되는 올리고뉴클레오타이드 제형이 본원에 또한 개시된다. 따라서 칼슘을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 제형; 마그네슘을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 제형; 코발트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 제형; 철(2+)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 제형; 망간을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 제형; 구리를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 제형; 아연을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 제형이 본원에 기술된다.
- [0018] 다음의 금속 양이온, 즉 칼슘, 마그네슘, 코발트, 철, 망간, 바륨, 니켈, 구리, 및/또는 아연 중 임의의 것을 개별적으로 또는 조합하여 사용하여 ON 금속 킬레이트 복합체의 제조를 위한 방법이 본원에 개시된다.
- [0019] 본원에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물의 제조를 위한 방법이 또한 개시되며, 상기 방법은 약학적으로 허용가능한 수성 부형제 중에 임의의 올리고뉴클레오타이드 나트륨 염을 용해시키는 단계, 및 용해된 올리고뉴클레오타이드에 2가 금속 염 용액을 점진적으로 첨가하여 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체가 가용성 상태로 있게 하는 단계를 포함한다.
- [0020] 올리고뉴클레오타이드 나트륨 염을 사용하여 개체 내에서 다음의 2가 금속 양이온, 즉 2+ 또는 3+ 하전 상태로 존재할 수 있는, 칼슘, 마그네슘, 코발트, 철, 망간, 바륨, 니켈, 구리, 아연, 카드뮴, 수은, 납, 베릴륨, 스트론튬, 라듐, 및/또는 임의의 기타 다른 금속, 전이 금속, 전이후 금속, 란타나이드 또는 악티나이드 원소를 킬레이트화하기 위한 방법이 본원에 개시된다.
- [0021] 칼슘 킬레이트 복합체 또는 기타 다른 적절한 ON 금속 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물로서 ON을 제조함으로써 용액 중 임의의 ON의 안정성을 개선시키는 방법이 본원에 또한 개시된다. 특히, 수용액 중 올리고뉴클레오타이드를 안정화시키는 방법이 개시된다.
- [0022] 다가 양이온이 2가 양이온인 것이 본원에 포함된다.
- [0023] 2가 양이온이 2+ 하전 상태를 가지는 알칼리 토금속인 것이 본원에 포함된다.
- [0024] 2가 양이온이 2+ 하전 상태를 가지는 전이 또는 전이후 금속인 것이 본원에 포함된다.
- [0025] 2가 양이온이 2+ 하전 상태를 가지는 란타나이드 금속인 것이 본원에 포함된다.
- [0026] 2가 양이온이 2+ 하전 상태를 가지는 악티나이드 금속인 것이 본원에 포함된다.
- [0027] 2가 양이온은 칼슘, 마그네슘, 코발트, 철, 망간, 바륨, 니켈, 구리, 및/또는 아연의 개별 또는 조합일 수 있다.
- [0028] 특히, 본원에 기술된 킬레이트 복합체는 2가지 이상의 상이한 2가 금속 양이온을 포함할 수 있다.
- [0029] 추가의 실시형태에서, 킬레이트 복합체는 적어도 하나의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0030] 다른 실시형태에서, 킬레이트 복합체는 하나의 포스포로티오에이트 결합을 가지는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0031] 킬레이트 복합체는 또한 적어도 하나의 완전한 포스포로티오에이트화 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0032] 킬레이트 복합체는 또한 하나의 2' 변형 리보스를 가지는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0033] 킬레이트 복합체는 또한 각각의 리보스가 2' O-메틸화된 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [0034] 하나의 실시형태에서, 킬레이트 복합체 또는 제형은 피하 투여용으로 적합화되고; 다음의 투여 경로, 즉 안내, 경구 섭취, 장용, 흡입, 피부 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 척추강내 주사, 척추강내 주입, 기관내, 정맥내 주사, 정맥내 주입 및 국부적 투여 경로 중 적어도 하나를 위하여 적합화된다. 특히, 흡입 투여는 에어로졸일 수 있다.
- [0035] 올리고뉴클레오타이드가 서열번호 3 내지 14로 이루어지는 것이 추가로 포함된다.
- [0036] 금속 염 첨가 전에 용해된 올리고뉴클레오타이드 농도가 0.01 내지 100mg/ml인 것이 추가로 포함된다.
- [0037] 특히, 용해된 올리고뉴클레오타이드에 첨가되는 금속 염의 비율은 올리고뉴클레오타이드 100mg 당 2가 염 0.1 내지 40mg일 수 있다.
- [0038] 최종 올리고뉴클레오타이드 농도가 0.1 내지 100mg/ml인 것이 추가로 포함된다.
- [0039] 추가의 실시형태에서, 금속 염은 클로라이드 염, 글루코네이트 염, 시트레이트 염, 락테이트 염, 말레이트 염, 아스파테이트 염, 푸마레이트 염, 아스코베이트 염, 벤조에이트 염, 에리소베이트 염 및 프로피온에이트 염 중 적어도 하나이다.
- [0040] 다른 실시형태에서, 금속 염 용액은 칼슘, 마그네슘, 코발트, 철(2+), 망간, 구리 및/또는 아연 중 적어도 하나를 함유한다.
- [0041] 킬레이트 복합체가 칼슘 킬레이트 복합체; 마그네슘 킬레이트 복합체; 또는 혼합 마그네슘/칼슘 킬레이트 복합체인 것이 또한 포함된다.
- [0042] 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체의 제조에 있어서 본원에 기술된 바와 같은 다가 양이온의 용도가 또한 제공된다.
- [0043] 개체에 올리고뉴클레오타이드 투여의 항응고 효과를 억제 또는 감소시키기 위한 본원에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물의 용도가 추가적으로 제공된다.
- [0044] 개체에서 상기 피하로 투여된 올리고뉴클레오타이드의 피하 주사 부위 반응을 억제 또는 감소시키기 위한 본원에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물의 용도가 제공된다.
- [0045] IV 주입에 의해 투여될 때 개체에서 올리고뉴클레오타이드의 내약성을 개선시키기 위한 본원에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물의 용도가 또한 제공된다.
- [0046] 개체에게 IV 주입에 의해 투여될 때 올리고뉴클레오타이드의 혈청 단백질 상호작용을 감소시키기 위한 본원에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물의 용도가 또한 제공된다.
- [0047] 개체에서 올리고뉴클레오타이드의 혈청 반감기를 감소시키기 위한 본원에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물의 용도가 추가로 제공된다.
- [0048] 개체에서 올리고뉴클레오타이드 투여와 연관된 간 또는 신장 기능장애를 감소시키기 위한 본원에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물의 용도가 또한 제공된다.
- [0049] 수용액 중 올리고뉴클레오타이드의 안정화를 위한 본원에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체, 본원에 기술된 올리고뉴클레오타이드 제형, 또는 본원에 기술된 약학 조성물의 용도가 또한 제공된다.
- [0050] 표현 “항응고”는 정상적인 혈액 응고 또는 혈전 형성의 저해를 의미하는 것으로 의도된다.
- [0051] 표현 “킬레이트화”는 반대 이온에 결합할 수 있는 다른 분자에 의해 자유 용액(free solution) 반응으로부터 반대 이온(음성 또는 양성)을 격리 또는 제거하여 킬레이트화 복합체를 형성하는 것을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0052] 표현 “2가 금속 양이온”은 자연적으로 2+ 하전 상태로 존재할 수 있는 임의의 금속 양이온을 의미하는 것으로

의도되며, 알칼리 토금속(IUPAC 명명법에 따른 2족 원소), 전이 금속, 전이후 금속, 준금속 또는 란타노이드를 포함한다.

[0053]

표현 “3가 금속 양이온”은 자연적으로 3+ 하전 상태로 존재하는 임의의 금속 양이온을 의미하는 것으로 의도되며, 전이 금속, 전이후 금속, 준금속, 란타노이드 또는 악티노이드를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0054]

이제 첨부된 도면에 대하여 언급할 것이다.

도 1은 ON의 일반적인 생리화화학적 특징의 설명. 도 1a) 고성능 액체 크로마토그래피에 의한 정의된 서열을 가지는 21머(21mer) 포스포로티오에이트 ON과 REP 2006의 동시 분리. 도 1b) 질량 분석기에 의한 21머 ON 중 종(species)의 동정. 도 1c) 질량 분석기에 의한 REP 2006 ON 중 종의 동정.

도 2는 도 2a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 2b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C -REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-칼슘 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-칼슘 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 칼슘의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증되었다. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 3은 도 3a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 3b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C -REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-마그네슘 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-마그네슘 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 마그네슘의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증하였다. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 4는 도 4a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 4b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C -REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-코발트 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-코발트 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 코발트의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증하였다. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 5는 도 5a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 5b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C -REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-철 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-철 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 철의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증하였다. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 6은 도 6a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 6b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티

오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C -REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-망간 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-망간 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 망간의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증하였다. 값은 중복 측정의 평균 +/- 표준 편차를 나타낸다.

도 7은 도 7a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 7b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C -REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-바륨 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-바륨 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 바륨의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증하였다. 값은 중복 측정의 평균 +/- 표준 편차를 나타낸다.

도 8은 도 8a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 8b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C -REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-니켈 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-니켈 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 니켈의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증하였다. 값은 중복 측정의 평균 +/- 표준 편차를 나타낸다.

도 9는 도 9a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 9b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C -REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-구리 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-구리 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 구리의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증하였다. 값은 중복 측정의 평균 +/- 표준 편차를 나타낸다.

도 10은 도 10a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 10b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C -REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-아연 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-아연 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 아연의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증하였다. 값은 중복 측정의 평균 +/- 표준 편차를 나타낸다.

도 11은 도 11a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 11b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C -REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-카드뮴 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-카드뮴 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-카드뮴 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다.

드름 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 카드뮴의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증하였다. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 12는 도 12a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 12b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C-REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-수는 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-수는 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 수은의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증하였다. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 13은 도 13a) 다양한 크기인 6머(REP 2032-FL), 10머(REP 2003-FL), 20머(REP 2004-FL), 40머(REP 2006-FL)의 형광으로 표지된 축퇴 포스포로티오에이트 ON, 그리고 도 13b) 포스포로티오에이트화(REP 2006-FL), 포스포로티오에이트화 + 2' 0 메틸리보스(REP 2107-FL) 또는 2' 0 메틸리보스(REP 2086-FL) 및 상이한 서열(폴리 C-REP 2031-FL; 서열번호 4)을 이용하여 형광으로 표지된 축퇴 ON에 의한 ON-납 킬레이트 복합체 형성의 설명. ON 킬레이트 복합체 형성의 비서열 의존적 성질은 축퇴 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 입증되었지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여서도 입증된다. ON-납 킬레이트 복합체의 형성은 ACS 등급 염화 납의 농도를 증가시키는 것을 용액 중 FITC로 표지된 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 실시예 1에 기술된 바와 같은 형광 편광에서의 증가에 의한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체 형성을 모니터링함으로써 입증하였다. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 14A는 ON 서열에 의존적이지 않는 ON의 일반적인 화학적 특징의 설명. 서열에 관계없이, 임의의 ON은 소수성과 친수성 활성을 모두 가지는 중합체로서 존재한다. (본 도면에서 화학 구조로 그려져 있는) 포스포로티오에이트화는 ON 중합체의 소수성을 증가시키는 역할을 하지만 친수성에는 영향을 미치지 않는다. 도 14B는 2가 및 3가 금속 양이온의 올리고뉴클레오타이드 킬레이트화의 성질을 개념화한다. 금속 양이온(회색의 속이 찬 원으로 나타냄)은 포스포다이에스터 결합에서 2개 또는 3개의 비가교 산소 또는 황 원자 사이의 금속 이온 가교(타원으로 나타냄)를 통하여 ON 중합체의 친수성 표면을 결합한다.

도 15는 다양한 ON 및 2가 금속 양이온 농도에서 2가 금속 양이온의 존재하 ON의 용액 거동에 대한 모델의 설명. A) 낮은 2가/3가 금속 양이온, 낮은 ON 농도는 이량체 또는 낮은 차수의 ON 킬레이트 복합체를 생성한다. B) 2가/3가 금속 양이온 농도를 증가시키는 것은 용액 중 보다 완전한 ON 킬레이트 복합체 형성을 가져온다. C) 2가 또는 3가 금속의 존재하 ON 농도를 추가로 증가시키는 것은 금속 농도를 증가시키면서 보다 높은 차수의 ON 킬레이트 복합체를 생성할 수 있다. (A) 내지 (C)에서 모든 킬레이트 복합체는 여전히 수성 환경에 노출된 친수성 표면을 가져서 용해도를 유지하기 때문에 수용액에서 용해성이다. D) 충분한 ON 및 금속 농도에서, 모든 친수성 표면은 이제 ON 킬레이트 복합체 내에서 제한되어, 수성 환경에 노출된 소수성 표면만 남게 된다. 이는 ON 킬레이트 복합체의 침전을 가져온다.

도 16은 형광 편광에 대한 형광성-ON 킬레이트 복합체의 용액 거동의 효과의 설명. 금속 농도를 증가시키면서, ON 킬레이트 복합체 형성의 크기(및 질량)가 또한 증가하고(도 15를 참조), 따라서 용액에서 보다 천천히 붕괴한다. 용액 중 복합체의 이러한 보다 천천히 붕괴하는 것은 형광 편광의 증가 및 mP 값의 증가를 가져온다.

도 17은 형광 편광에 의해 측정된 염화 칼슘 또는 황산 칼슘과 ON 킬레이트 복합체의 형성을 나타냄. 도 17a) REP 2055-FL(서열번호 6) 및 REP 2056-FL(서열번호 7)과 ON 킬레이트 복합체 형성. 도 17b) REP 2033-FL(서열번호 5) 및 REP 2029-FL(서열번호 2)와 ON 킬레이트 복합체 형성. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 18은 형광 편광에 의해 측정된 염화 칼슘 또는 황산 칼슘과 ON 킬레이트 복합체의 형성을 나타냄. 도 18a) REP 2028-FL과 ON 킬레이트 복합체 형성 및 REP 2057-FL(서열번호 8)과 ON 킬레이트 복합체 형성의 부재. 도 18b) REP 2120-FL 및 REP 2030-FL과 ON 킬레이트 복합체 형성. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 19는 형광 편광에 의해 측정된 염화 칼슘 또는 황산 칼슘과 ON 킬레이트 복합체의 형성을 나타냄. 도 19a)

REP 2129-FL(서열번호 12) 및 REP 2126-FL(서열번호 9)과 ON 킬레이트 복합체 형성. 도 19b) REP 2128-FL(서열번호 11) 및 REP 2127-FL(서열번호 10)과 ON 킬레이트 복합체 형성. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 20은 형광 편광에 의해 측정된 염화 칼슘 또는 황산 칼슘과 ON 킬레이트 복합체의 형성을 나타냄. 도 20a) REP 2139-FL(서열번호 13) 및 REP 2006-FL과 ON 킬레이트. 도 20b) REP 2045-FL 및 REP 2007-FL과 ON 킬레이트 복합체 형성. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 21은 형광 편광에 의해 측정된 염화 마그네슘 또는 황산 마그네슘과 ON 킬레이트 복합체의 형성을 나타냄. 도 21a) REP 2055-FL(서열번호 6) 및 REP 2056-FL(서열번호 7)과 ON 킬레이트 복합체 형성. 도 21b) REP 2033-FL(서열번호 5) 및 REP 2029-FL(서열번호 12)과 ON 킬레이트 복합체 형성. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 22는 형광 편광에 의해 측정된 염화 마그네슘 또는 황산 마그네슘과 ON 킬레이트 복합체의 형성을 나타냄. 도 22a) REP 2028-FL(서열번호 11)과 ON 킬레이트 복합체 형성 및 REP 2057-FL(서열번호 8)과 ON 킬레이트 복합체 형성의 부재. 도 22b) REP 2120-FL 및 REP 2030-FL(서열번호 3)과 ON 킬레이트 복합체 형성. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 23은 형광 편광에 의해 측정된 염화 마그네슘 또는 황산 마그네슘과 ON 킬레이트 복합체의 형성을 나타냄. 도 23a) REP 2129-FL(서열번호 12) 및 REP 2126-FL(서열번호 9)과 ON 킬레이트 복합체 형성. 도 23b) REP 2128-FL(서열번호 11) 및 REP 2127-FL(서열번호 10)과 ON 킬레이트 복합체 형성. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 24는 형광 편광에 의해 측정된 염화 마그네슘 또는 황산 마그네슘과 ON 킬레이트 복합체의 형성을 나타냄. 도 24a) REP 2139-FL(서열번호 13) 및 REP 2006-FL과 ON 킬레이트. 도 24b) REP 2045-FL 및 REP 2007-FL과 ON 킬레이트 복합체 형성. 값은 중복 측정의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다.

도 25는 형광 편광에 의해 측정된 염화 칼슘 또는 염화 마그네슘의 존재하에서 2가지 상이한 이중 가닥 ON 킬레이트 복합체의 형성을 나타냄. 이중 가닥 ON은 REP 2033-FL(서열번호 5)과 REP 2055-FL(서열번호 6)의 혼성화 및 REP 2056-FL(서열번호 7)과 REP 2057-FL(서열번호 8)의 혼성화에 의해 제조하였다.

도 26은 2가 금속 양이온(Mg^{2+} 및 Ca^{2+})의 존재하에서만 다양한 ON 킬레이트 복합체가 형성되고 1가 양이온(Na^{+} , K^{+} 또는 NH_4^{+})의 존재하에서는 형성되지 않음을 나타냄.

도 27은 인간 혈액에 상이한 크기(REP 2004, REP 2006) 그리고 상이한 화학적 성질(REP 2006, REP 2107)의 ON의 다양한 농도의 첨가에 의한 항응고 효과를 나타냄. 이러한 상호작용의 비서열 의존적 방식은 축퇴 올리고뉴클레오타이드(REP 2004, REP 2006, REP 2107)를 사용함으로써 입증하였지만, 또한 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드(REP 2031; 서열번호 4)를 사용하여 입증하였다. 이러한 화합물의 존재하에서 혈액 항응고는 프로트롬빈 시간(PTT)을 측정하고 용인된 임상 검사실 시험 방법론을 사용하여 혈액 중 생리 식염수의 존재하에서 PTT와 상기 혈액 항응고를 비교함으로써 모니터링하였다. 약물의 존재 및 부재하에서 PTT의 비율은 정규화된 비율(NR)을 가져온다. NR이 1인 것은 정상적인 혈액 응고 활성을 나타내고 NR이 1을 초과하는 것은 혈액 응고 활성이 손상되었음(항응고)을 나타낸다.

도 28은 $CaCl_2$ 의 첨가에 의한 올리고뉴클레오타이드의 항응고 효과의 억제를 나타냄. REP 2055(서열이 (AC)₂₀인 40머 포스포로티오에이트; 서열번호 6)는, 상당한 혈액 항응고를 유도하는 농도인 2.5mM에서 혈액에 첨가하였다. REP 2055는 $CaCl_2$ 의 다양한 조합과 조합하였고, 첨가된 $CaCl_2$ 의 각각의 농도의 효과는 용인된 임상 검사실 시험 방법론을 사용하여 측정하였다. 이러한 화합물의 존재하에서 혈액 항응고는 프로트롬빈 시간(PTT)을 측정하고 용인된 시험 방법론을 사용하여 혈액 중 생리 식염수의 존재하에서 PTT와 상기 혈액 항응고를 비교함으로써 모니터링하였다. 약물의 존재 및 부재하에서 PTT의 비율은 정규화 비율(NR)을 가져온다. NR이 1인 것은 정상적인 혈액 응고 활성을 나타내고 NR이 1을 초과하는 것은 혈액 응고 활성이 손상되었음(항응고)을 나타낸다.

도 29는 만성 간 질환이 있는 환자에서 전체 혈청 칼슘에 대한 만성적인 ON 치료의 칼슘 킬레이트화 효과를 나타냄. 어떠한 무기질 보충도 받지 않은 환자는 도 29a에 나타내어져 있고, ON 치료를 겪으면서 무기질 보충을 받은 환자는 도 29b에 나타내어져 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] ON은 칼슘, 마그네슘, 코발트, 철, 망간, 바륨, 니켈, 구리, 아연, 카드뮴, 수은 및 납을 포함하는 다양한 2가 금속 양이온을 킬레이트화하는 설명이 본원에서 제공된다. 이러한 2가 양이온의 킬레이트화는 금속 양이온을 통하여 결합된 2개 이상의 ON으로 구성된 ON 킬레이트 복합체의 형성을 가져오고 예시된 바와 같이, 이에 제한되는 것은 아니지만 6 내지 80개 뉴클레오타이드 길이의 ON이 포스포다이에스터 또는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 존재하에서 일어남이 추가로 설명된다. 킬레이트화는 또한 리보스에 2' 개질을 포함하거나 그렇지 않는 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 일어난다. 게다가, 금속 양이온의 킬레이트화는 존재하는 뉴클레오타이드의 서열에 의존적이지 않지만, 대신 모든 올리고뉴클레오타이드에 공통적인 생리화학적 특징에 의존한다(도 14A를 참조).
- [0056] 2가(예를 들어 이에 제한되는 것은 아니지만 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+})인 임의의 단순한 금속 양이온을 함유하는 수용액 중 올리고뉴클레오타이드는 염으로서 존재하지 않지만 오히려 ON의 킬레이트화된 복합체로서 존재한다는 발견이 본원에서 제시된다. 이러한 복합체는 ON이 2가 금속 이온 가교를 통하여 포스포다이에스터 주쇄에서 결합되는 올리고뉴클레오타이드 이량체 또는 더 높은 차수의 분자 조직으로 구성된다(도 14B를 참조). 특이적인 ON 및 금속 양이온 농도에서, 이러한 킬레이트화된 복합체는 수용액 중 안정적이고 가용성이며, 용액 상호용액으로부터 ON 킬레이트 복합체에서 임의의 2가 양이온을 효과적으로 격리한다. 이러한 킬레이트 복합체 형성은 또한 3+ 또는 그 이상의 하전 상태인 단순한 금속 양이온과 함께 일어날 가능성이 있다(도 14B에 나타난 바와 같음). 따라서 ON은 2가 양이온 킬레이트물질로서 작용하며, 2가 양이온을 가지는 염을 형성하지 않는다.
- [0057] 중요하게도, 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체의 형성은 1가 양이온, 예를 들어 Na^+ , K^+ 또는 NH_4^+ 와 함께 일어나지 않으며, 따라서 임의의 1가 양이온과 함께 일어날 가능성은 없다. 따라서, 용어 “올리고뉴클레오타이드 염”은 구체적으로 올리고뉴클레오타이드와 킬레이트 복합체를 형성하지 않는 1가 양이온 또는 양이온을 가지는 올리고뉴클레오타이드 염으로만 제한되며, 2가 금속 양이온(또는 심지어 3가 금속 양이온)을 가지는 용액 중에 또는 분말 형태로 존재하는 올리고뉴클레오타이드를 기술하는데 부적절하게 사용된다.
- [0058] 당업계에서의 표준은 단지 나트륨 염으로서 ON의 투여를 명백하게 교시한다. 이는 포미비리센(Fomivirisen)(ISIS 2922), 미포머센(Mipomersen)(ISIS 301012), 트레코비센(Tecovirsen)(GEM 91), 커스티센(Custirsen)(OGX-011 / ISIS 112989), 제나센스(Genasense)(G3139) 및 아프리노카르센(Aprinocarsen)(ISIS 3531 / LY 900003)(문헌[Geary et al., 2002, Clin. Pharmacokinetics, 41: 255-260]; [Yu et al., 2009, Clin. Pharmacokinetics, 48: 39-50]; [Sereni et al., 1999, J. Clin. Pharmacol., 39: 47-54]; [Chi et al., 2005, J. Nat. Canc. Inst., 97: 1287-1296]; [Marshall et al., 2004, Ann. Oncol., 15: 1274-1283]; [Grossman et al., 2004, Neuro-Oncol, 6: 32-40])을 포함하는 나트륨 염으로서 임상 시험에서 다수의 올리고뉴클레오타이드의 투여에 의해 예시된다.
- [0059] 염화 칼슘의 첨가에 의해 혈액 중 정상적인 유리 칼슘의 회복에 의한 올리고뉴클레오타이드-유도 항응고의 역전에 의해 나타내어지는 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드에 의한 혈액의 항응고가 올리고뉴클레오타이드에 의한 칼슘의 킬레이트화에 의해 야기된다는 설명이 본원에 또한 제공된다.
- [0060] 칼슘 킬레이트 복합체로서 제조된 ON의 주사에 의해 주사 부위 반응(ISR)의 저해에 의해 나타내어지는 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드의 피하 주사로 관찰되는 주사 부위 반응(경결, 염증, 압통 및 통증)이 올리고뉴클레오타이드에 의한 주사 부위에서 적어도 부분적으로 칼슘 및 가능하게는 기타 다른 2가 양이온, 예를 들어 마그네슘의 국소적 킬레이트화에 의한 것이라는 설명이 본원에 또한 제공된다.
- [0061] 형광 편광은 분자간 상호작용을 시험하는데 사용되는 일반적인 방법론이다. 이 기술에서, 미끼(즉, 임의의 ON)는 형광성 표지(예컨대, FITC)로 표지된다. 용액에서, 미끼 분자는, 미끼가 옳은 파장의 빛으로 여기될 때 결과가 양호하지 않은 편광된 형광 방출인 브라운 운동에 의하여 용액 중에서 자유롭게 붕괴한다. 충분한 분자량(적어도 미끼와 동일한 크기)의 리간드를 가지고, 미끼와 리간드 사이의 상호작용은 용액 중에서 복합체의 붕괴의 충분한 저해를 도입한다. 용액 중에서 이러한 저해된 붕괴의 결과로서, 형광 방출은 여기서 상당히 편광된다. 따라서 이러한 기술로, 어느 쪽의 결합 파트너 상에서 물리적 제약이 없이 상호작용이 용액 중에서 측정될 수 있다. 형광 편광은 무차원 mP로서 기록되며, 이는 반응에서 결합된 미끼 분자의 분획에 직접적으로 비례한다. 예를 들어, 미끼 분자의 매우 작은 분획이 특정 리간드에 의해 결합된다면, 거의 형광 편광이 없어서 따라서 mP 값이 작을 것이다. 스펙트럼의 다른 끝에서, 미끼 분자의 큰 부분이 특정 리간드(또는 더 높은 농도의 리간드)

에 의해 결합한다면, 상당한 형광 편광이 있어서 따라서 mP 값이 클 것이다. 이러한 방식으로, 특정 미끼-리간드 상호작용에 대한 결합 등온선은 형광 표지된 미끼의 고정된 양의 존재하에서 리간드의 농도를 변화시킴으로써 생성될 수 있다.

[0062] 본원에서 다양한 형광으로 표지된 ON이 1가 및 2가 양이온의 존재하에서 상기 ON 복합체의 형성을 시험하는데 이용된다. 형광 편광에 의한 복합체 형성의 모니터링은 이러한 ON이 형광 표지되는 것을 필요로 하지만, 이러한 표지는 어느 쪽의 질소성 염기를 방해하지 않도록 3' 말단에서 ON에 부착되거나 ON의 포스포다이에스터 주쇄는 미지이다. 게다가, 형광성 표지는 고정된 3 탄소 링커에 의하여 ON으로부터 떨어져서 유지되어 용액 중 정상적인 ON 거동의 임의의 섭동을 추가로 차단한다. 따라서 형광으로 표지된 ON을 이용하여 형광 편광을 사용하여 본원에서 관찰된 임의의 ON 복합체 형성은 (복합체화되던 아니던) 비표지 ON의 용액 거동의 정확한 표현이다.

[0063] 용어 올리고뉴클레오타이드(ON)는 리보핵산(RNA) 및/또는 데옥시리보핵산(DNA) 및/또는 이의 유사체의 올리고머 또는 중합체에 관한 것이다. 이 용어는 자연적으로 생성되는 핵염기, 당 및 공유결합의 뉴클레오타이드간 (주쇄) 결합뿐만 아니라 유사하게 작용하는 비자연적으로 생성되는 부분을 가지는 올리고뉴클레오타이드로 구성되는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직한 특성, 예를 들어 뉴클레아제의 존재하에서 세포 흡수의 향상, 핵산 표적에 대한 친화도의 향상 및 안정성의 증가 때문에, 이러한 개질 또는 치환된 올리고뉴클레오타이드는 종종 원래 형태보다 바람직하다.

[0064] 본 출원에서, 용어 “축퇴 올리고뉴클레오타이드”는 모든 위치에서 위블(N)을 가지는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 NNNNNNNNN을 의미하는 것으로 의도된다. 각각의 염기는 위블로서 합성되어 이러한 ON은 실제로 동일한 길이 및 생리화학적 특성의 상이한 무작위로 생성된 서열의 집단으로서 존재한다. 예를 들어, ON 축퇴 40개 염기의 길이에 있어서, 집단에서 임의의 특정 서열은 이론적으로 전체 분획의 단지 $1/4^{40}$ 또는 8.3×10^{-25} 를 나타낼 것이다. 1mole이 6.022×10^{23} 개의 분자라는 것과, 축퇴물의 합성이 지금까지 2mmole을 초과한다는 사실을 고려할 때, 효과적으로 존재하는 특이적 서열을 가지는 임의의 올리고뉴클레오타이드가 임의의 제조물에서 1회 초과로 존재하지 않는다. 따라서, 제조물에서 독특한 정의된 서열의 임의의 특정 올리고뉴클레오타이드가 특이적인 뉴클레오타이드 서열에서 유래한 임의의 활성화에 기여하는 것으로 예측될 수 없으므로, 이러한 제조물에서 관찰되는 임의의 복합체 형성은 올리고뉴클레오타이드의 비서열 의존적인 (또는 서열에 독립적인) 생리화학적 특성으로 인한 것이어야 한다.

[0065] 이러한 개념의 추가의 설명으로서, 실시예 I은 고압 액체 크로마토그래피 및 질량 분석기에 의한 정의된 서열의 21머를 가지는 REP 2006(축퇴 포스포로티오에이트화 서열을 가지는 40머 ON)의 특성화와 비교하며 유사한 크기 및 화학적 개질(즉, 포스포로티오에이트화)을 가지는 임의의 ON은 존재하는 뉴클레오타이드의 서열에 의해 영향을 받지 않는 (만약 동일하지 않다면) 매우 유사한 생리화학적 특징을 가질 것이다.

[0066] 올리고뉴클레오타이드는 다양한 개질, 예컨대 안정화 개질을 포함할 수 있으며, 따라서 포스포다이에스터 결합에서 및/또는 당에서, 및/또는 염기에서 적어도 하나의 개질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 제한 없이 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합, 포스포로다이트오에이트 결합, 및/또는 메틸포스포네이트 결합을 포함할 수 있다. 상이한 화학적으로 양립가능한 개질된 결합, 예컨대 합성 조건이 화학적으로 양립가능한 개질은 조합될 수 있다. 개질된 결합이 유용한 동안, 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드 중합체의 일반적인 생리화학적 특성이 실질적으로 영향을 받지 않는 포스포다이에스터 결합을 포함할 수 있다. 추가적인 유용한 개질은 제한없이 당의 2' 위치에서의 개질, 예를 들어 2'-O-알킬 개질(예를 들어 2'-O-메틸 개질), 2'-아미노 개질, 2'-할로 개질(예를 들어 2'-플루오로); 비고리형 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 기타 다른 개질이 또한 당염기에 알려져 있으며, 예를 들어 잠금 핵산(locked nucleic acid)이 사용될 수 있다. 특히, 올리고뉴클레오타이드는 예컨대 포스포로티오에이트를 통하여 개질된 결합을 가지고; 3'- 및/또는 5'-캡을 가질 수 있으며; 말단 3'-5' 결합을 포함하고; 올리고뉴클레오타이드는 링커(들)에 의해 연결되는 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 연쇄체(concatemer)이거나 상기 연쇄체를 포함한다.

[0067] 다음의 금속 양이온, 즉 칼슘, 마그네슘, 코발트, 망간, 철, 구리, 및/또는 아연 중 임의의 것을 사용하여 제조되는 본원에 기술된 바와 같이 약리학적으로 허용가능한 올리고뉴클레오타이드 킬레이트 복합체의 치료적 유효량을 사용하여 올리고뉴클레오타이드-유도 항응고를 방지하는 약학적 ON 조성물이 또한 제공된다. ON 킬레이트 복합체는 또한 상기 기술된 바와 같이 2가지 이상의 상이한 양이온을 사용하여 제조될 수 있다. 특히, 약학 조성물은 인간, 또는 비인간 동물, 예를 들어 비인간 영장류에의 투여용으로 승인된다.

[0068] 다음의 금속 양이온, 즉 칼슘, 마그네슘, 코발트, 망간, 철, 구리, 및/또는 아연 중 임의의 것을 사용하여 제조

되는 본원에 기술된 바와 같이 약리학적으로 허용가능한 ON 킬레이트 복합체의 치료적 유효량을 함유하여 피하 투여로 인한 주사 부위 반응을 방지하는 약학적 ON 조성물이 또한 제공된다. ON 킬레이트 복합체는 또한 상기 기술된 바와 같이 2가지 이상의 상이한 양이온을 사용하여 제조될 수 있다. 특히, 약학 조성물은 인간, 또는 비인간 동물, 예를 들어 비인간 영장류에의 투여용으로 승인된다.

[0069] 다음의 금속 양이온, 즉 칼슘, 마그네슘, 코발트, 망간, 철, 구리, 및/또는 아연 중 임의의 것을 사용하여 제조되는 약리학적으로 허용가능한 ON 킬레이트 복합체의 치료적 유효량을 함유하여 IV 주입 내약성을 개선시킨 약학적 ON 조성물이 또한 제공된다. ON 킬레이트 복합체는 또한 상기 기술된 바와 같이 2가지 이상의 상이한 양이온을 사용하여 제조될 수 있다. 특히, 약학 조성물은 인간, 또는 비인간 동물, 예를 들어 비인간 영장류에의 투여용으로 승인된다.

[0070] 다음의 금속 양이온, 즉 칼슘, 마그네슘, 코발트, 망간, 철, 구리, 및/또는 아연 중 임의의 것을 사용하여 약리학적으로 허용가능한 ON 킬레이트 복합체의 치료적 유효량을 사용하여 칼슘, 마그네슘, 철, 망간, 구리 또는 아연의 올리고뉴클레오타이드-유도 결핍을 방지하는 약학적 ON 조성물이 또한 제공된다. ON 킬레이트 복합체는 또한 상기 기술된 바와 같이 2가지 이상의 상이한 양이온을 사용하여 제조될 수 있다. 특히, 약학 조성물은 인간, 또는 비인간 동물, 예를 들어 비인간 영장류에의 투여용으로 승인된다.

[0071] 다음의 금속 양이온, 즉 칼슘, 마그네슘, 코발트, 망간, 철, 구리, 및/또는 아연 중 임의의 것을 사용하여 약리학적으로 허용가능한 ON 킬레이트 복합체의 치료적 유효량을 함유하여 저장 안정성을 개선시킨 약학적 ON 조성물이 또한 제공된다. ON 킬레이트 복합체는 또한 상기 기술된 바와 같이 2가지 이상의 상이한 양이온을 사용하여 제조될 수 있다. 특히, 약학 조성물은 인간, 또는 비인간 동물, 예를 들어 비인간 영장류에의 투여용으로 승인된다.

[0072] 다음의 금속 양이온, 즉 칼슘, 마그네슘, 코발트, 망간, 철, 구리, 및/또는 아연 중 임의의 것을 사용하여 약리학적으로 허용가능한 ON 킬레이트 복합체의 치료적 유효량을 함유하여 혈청 반감기 또는 혈청 단백질과의 상호작용을 감소시킨 약학적 ON 조성물이 또한 제공된다. ON 킬레이트 복합체는 또한 상기 기술된 바와 같이 2가지 이상의 상이한 양이온을 사용하여 제조될 수 있다. 특히, 약학 조성물은 인간, 또는 비인간 동물, 예를 들어 비인간 영장류에의 투여용으로 승인된다.

[0073] 또한, 상기 조성물은 생리학적으로 및/또는 약학적으로 허용가능한 담체, 아쥬반트, 비히클 및/또는 부형제를 포함할 수 있다. 담체의 특징은 투여 경로에 의해 좌우될 수 있다. 용어 “약학적으로 허용가능한 담체, 아쥬반트, 비히클 및/또는 부형제”는 본 발명의 조성물 내로 포함되어, 개체에 투여될 수 있는, 그리고 이의 약리학적 활성을 파괴하지 않는 담체, 아쥬반트, 비히클 또는 부형제를 말한다. 본원에 기술된 약학 조성물에서 사용될 수 있는 약리학적으로 허용가능한 담체, 아쥬반트, 비히클 및 부형제는 이에 제한되는 것은 아니지만, 이온 교환체, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 자가 유화 약물 전달 시스템("SEDDS"), 약학적 투여형에서 사용되는 계면활성제(예를 들어 트윈(Tween) 또는 기타 다른 유사한 중합체 전달 매트릭스), 혈청 단백질(예를 들어 인간 혈청 알부민), 완충 물질(예를 들어 포스페이트, 글리신, 소르브산, 소르브산 칼륨, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세리드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예를 들어 황산 프로타민, 인산 수소 이나트륨, 인산 수소 칼륨, 염화 나트륨, 아연 염, 콜로이드 실리카, 삼규산 마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로오스계 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 라놀린(wool fat)을 포함한다. 사이클로덱스트린(예를 들어 α -, β - 및 γ -사이클로덱스트린), 또는 화학적으로 개질된 유도체(예를 들어 하이드록시알킬사이클로덱스트린, 예를 들어 2- 및 3-하이드록시프로필- β -사이클로덱스트린을 포함함), 또는 기타 다른 가용화 유도체가 또한 본 발명의 조성물의 전달을 향상시키는데 사용될 수 있다.

[0074] 본원에 기술된 조성물은 하기 기술된 바와 같이 기타 다른 치료제를 함유할 수 있고, 예를 들어, 약학 제형의 분야에 잘 알려져 있는 기술과 같은 기술에 따라서 통상적인 고체 또는 액체 비히클 또는 희석제 뿐만 아니라 원하는 투여의 방식에 적절한 유형의 약학적 첨가제(예를 들어, 부형제, 결합제, 보존제, 안정화제, 향미제 등)를 이용함으로써 제형화될 수 있다.

[0075] 본원에 기술된 조성물은 임의의 적당한 수단에 의해, 예를 들어 정제, 캡슐, 과립 또는 분말의 형태로, 경구로; 설하로; 구강으로; 비경구적으로, 예를 들어 피하, 정맥내, 근육내, 또는 복장뼈내(intrastemal) 주사 또는 주입 기술(예컨대, 멸균 주사용 수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액); 예를 들어 흡입식 스프레이에 의해 경비로; 예를 들어 크림 또는 연고의 형태로, 국부적으로; 또는 예를 들어 좌제의 형태로, 직장적으로; 비독성의 약학적으로 허용가능한 비히클 또는 희석제를 함유하는 투약 단위 제형으로 투여될 수 있다. 본 조성물은 예를 들어 속

방형(immediate release) 또는 복효형(extended release)에 적당한 형태로 투여될 수 있다. 속방형 또는 복효형은 적당한 약학 조성물의 사용에 의해, 또는 특히 복효형의 경우에는 경피 주입물 또는 삼투 펌프와 같은 장치의 사용에 의해 달성될 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 다음의 경로, 즉 안내, 경구 섭취, 장용, 흡입, 피부 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 척추강내 주사 또는 주입, 기관내, 정맥내 주사 또는 주입, 또는 국부적 경로 중 어느 하나에 의하여 투여용으로 적합화될 수 있다.

[0076]

경구 투여용의 예시적인 조성물은 예를 들어 당업계에 알려진 것과 같은 대규모 전달용 미정질 셀룰로스, 현탁제로서 알긴산 또는 알긴산 나트륨, 점도 증강제로서 메틸셀룰로스, 감미제 또는 향미제를 함유할 수 있는 현탁액; 및 예를 들어 당업계에 알려진 것과 같은 미정질 셀룰로스, 인산 이칼슘, 전분, 마그네슘 스테아레이트 및/또는 락토스 및/또는 기타 다른 부형제, 결합제, 증량제, 봉해제, 희석제 및 윤활제를 함유할 수 있는 속방형 정제를 포함한다. 본 조성물은 또한 설하 및/또는 구강 투여에 의하여 구강을 통하여 전달될 수 있다. 성형 정제, 압축 정제 또는 냉동건조 정제가 사용될 수 있는 예시적인 형태이다. 예시적인 조성물은 빠르게 용해하는 희석제, 예를 들어 만니톨, 락토스, 수크로스 및/또는 사이클로덱스트린과 함께 본 조성물을 제형화하는 것을 포함한다. 또한 이러한 제형에는 고분자량의 부형제, 예를 들어 셀룰로스(아비셀(avicel)) 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 포함될 수 있다. 이러한 제형은 또한 점막 부착을 돕는 부형제, 예를 들어 하이드록시 프로필 셀룰로스(HPC), 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로스(HPMC), 나트륨 카르복시 메틸 셀룰로스(SCMC), 말레산 무수물 공중합체(예컨대, 간트레즈(Gantrez)), 및 폴리아크릴 공중합체(예컨대, 카보폴(Carbopol) 934)와 같은 방출을 제어하는 제제가 포함될 수 있다. 윤활제, 활택제, 향미제, 착색제 및 안정화제가 또한 제작 및 사용의 용이를 위하여 첨가될 수 있다.

[0077]

본원에 기술된 화합물의 유효량은 당업자에 의해 결정될 수 있으며, 성인 사람에게 있어서 1일당 체중 kg 당 활성 화합물 약 0.1 내지 500mg의 예시적인 투약량을 포함하고, 이는 단일 용량으로 또는 개별적인 분할 용량으로, 예를 들어 1일당 1 내지 5회로 투여될 수 있다. 임의의 특정 개체에 대하여 구체적인 용량 수준 및 투약 빈도는 다양할 수 있으며, 이용되는 구체적인 화합물의 활성, 상기 화합물의 대사 안정성 및 작용 길이, 개체의 종, 연령, 체중, 일반적인 건강상태, 성별 및 식생활, 투여의 방식 및 시간, 배설 및 클리어런스 속도, 약물 조합, 및 특정 병태의 중증도를 포함한 다양한 인자에 좌우될 것이다. 치료에 있어서 바람직한 개체는 혈관 생성 의존성 또는 혈관 생성과 연관된 장애에 걸리는 동물, 가장 바람직하게는 포유동물 중, 예를 들어 인간, 및 가축(예를 들어 개, 고양이 등)을 포함한다.

[0078]

약학 조성물은 또한 기타 다른 활성 인자 및/또는 활성을 향상시키는 제제를 함유할 수 있다. 투여용 약학 조성물 및 제형은 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 겔, 점적약, 좌제, 스프레이, 액체, 분말 및 에어로졸을 포함할 수 있다. 통상적인 약학적 담체, 수성, 분말 또는 유성 기재, 증점제 등이 필요하거나 바람직할 수 있다. 기타 다른 제형은 ON이 국부적 전달제, 예를 들어 지질, 리포솜, 지방산, 지방산 에스터, 스테로이드, 킬레이트화제 및 계면활성제와 혼합되는 것을 포함한다. 바람직한 지질 및 리포솜은 중성(예컨대, 다이올레오일포스파티딜 DOPE 에탄올아민, 다이미리스토일포스파티딜 콜린 DMPC, 다이스테아로일포스파티딜 콜린), 음성(예컨대, 다이미리스토일포스파티딜 글리세롤 DMPG) 및 양이온성(예컨대, 다이올레오일테트라메틸아미노프로필 DOTAP, 다이올레오일포스파티딜 에탄올아민 DOTMA) 및 기타 다른 전달제 또는 분자를 포함한다. ON은 리포솜 내에 캡슐화될 수 있거나 리포솜에, 특히 양이온성 리포솜에 복합체를 형성할 수 있다. 대안적으로, ON은 지질, 특히 양이온성 지질에 복합체를 형성할 수 있다. 바람직한 지방산 및 에스터는 이에 제한되는 것은 아니지만 아라키돈산, 올레산, 에이코사논산, 라우르산, 카프릴산, 카프르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 다이카프레이트, 트리카프레이트, 모노올레인, 다이라우린, 글리세릴 1-모노카프레이트, 1-도데실아자사이클로헥탄-2-온, 아실카르니틴, 아실콜린, 또는 C₁₋₁₀ 알킬 에스터(예컨대, 아이소프로필미리스테이트 IPM), 모노글리세라이드, 다이글리세라이드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다.

[0079]

본 개시내용은 다음의 실시예를 참조함으로써 보다 용이하게 이해될 것이다.

[0080]

실시예 1

[0081]

축퇴 ON의 특성화

[0082]

도 1a는 동시에 컬럼으로 동시 주입되는 2가지 올리고뉴클레오타이드 제조물의 HPLC(소수성 컬럼을 사용함)에 의한 분리를 상세히 나타낸다. 이 중 첫번째는 내부 표준으로 부르고 구체적으로 정의된 서열을 가지는 21머 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드이며, 두번째는 REP 2006(40머 축퇴 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오

타이드)이다. 이들 중 모두 이들의 생리화학적 특성(즉, 크기 및 소수성)만을 기초로 하여 별개의 정의된 피크로 구분되며; 이들 ON 각각에 존재하는 뉴클레오타이드의 서열은 이들의 생리화학적 특성에는 어떠한 의미있는 영향을 미치지 않고, 따라서 이들 분리에 어떠한 영향도 미치지 않는다. 그래서, 단지 이들 2가지 ON의 크기에서의 차이로 인하여, REP 2006과 비교하여 내부 표준은 더 작은 보유 시간을 가지는 엄격하게 정의된 피크로서 컬럼으로부터 용리한다. REP 2006 피크의 어느 쪽의 어깨는 더 긴 올리고뉴클레오타이드의 생성에 있어서 전형적인 결핍된 서열로 인한 것임을 주목한다. REP 2006의 이질적인 서열 성질에도 불구하고, 이는, 매우 많은 양의 상이한 서열이 존재하지만 REP 2006 제조물 중 모든 종의 일반적인 생리화학적 특성을 설명하는 21머의 특이적인 서열로서 HPLC에 의해 유사하게 잘 정의된 피크로서 분해한다. REP 2006 및 21머 피크의 HPLC 분리 다음에, 이에 질량 분석기(MS)를 적용하여 이러한 정의된 피크 내에 존재하는 종을 동정할 수 있다(도 1b 및 1c).

[0083] 도 1b에서, 21머는 MW가 7402.6Da인 단일 종으로 분해되며, 이는 정의된 서열을 가지는 이러한 PS-ON과 일치한다. 그러나, REP 2006의 MS 분석(도 1c)은 질량 범위가 거의 완전한 정규 분포를 가지는 것으로 존재하는 매우 많은 양의 종을 나타내며, 이는 완전한 축퇴 성질과 일치한다. 이러한 질량 범위는 C₄₀(가장 작은 종) 내지 A₄₀(가장 큰 종)에 이르며, 질량이 질량 범위의 중심에 접근하므로 종의 수가 증가(피크 강도)하는 이들 종의 확산은 매우 작다. 이는 점점 더 많은 양의 상이한 서열이 유사한 질량을 가질 것이기 때문이다. REP 2006에 존재하는 모든 상이한 ON 종이 HPLC 분리 동안 소수성 컬럼 상에서 동일한 보유 시간을 가진다는 사실은 동일한 크기 및 동일한 화학적 개질(즉, 포스포로티오에이트화)을 가지는 모든 ON이 (만약 동일하지 않다면) 매우 유사한 생리화학적 특성을 가질 것이며, 그래서 특정 ON 분자에 존재하는 뉴클레오타이드의 서열에 의존적이지 않는 임의의 적용 또는 특성에서 기능적으로 유사한 것으로 고려될 수 있음을 명확하게 입증한다. 따라서, 임의의 특정 축퇴 ON(예컨대, REP 2003, REP 2004)과 함께 관찰되는 임의의 ON 길레이트 복합체 형성은 존재하는 올리고뉴클레오타이드 상의 서열에 의존적이지 않을 수 있으며, 임의의 ON의 보존된 생리화학적 특성에 의존적이어야 한다.

[0084] 실시예 II

[0085] ON은 다양한 2가 금속 양이온과 함께 길레이트 복합체를 형성한다

[0086] 다양한 2가 금속 양이온과 올리고뉴클레오타이드 암모늄 염의 상호작용은 상기 기술된 바와 같이 형광 편광(FP)에 의해 시험하였다. 올리고뉴클레오타이드 합성 동안, 각각의 올리고뉴클레오타이드는 잘 확립된 시약 및 합성 프로토콜을 사용하여 고정된 3 탄소 링커에 의하여 3' 말단에서 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)에 접합하였다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 합성으로부터 제거하였고 암모늄 염으로서 남겨두었다. 이 실시예에서 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 표 1에 기술되어 있다.

표 1

[0087]

실시예 II에 사용된 ON		
올리고뉴클레오타이드	서열(5' - 3')	개질
REP 2032-FL	N ₆	PS
REP 2003-FL	N ₁₀	PS
REP 2004-FL	N ₂₀	PS
REP 2006-FL	N ₄₀	PS
REP 2107-FL	N ₄₀	PS + 2' O Me
REP 2086-FL	N ₄₀	2' O Me
REP 2031-FL	C ₄₀ (서열번호 4)	PS
N = 축퇴 서열(A, G, C 또는 T의 무작위 포함) PS = 각각의 결합에서 포스포로티오에이트화 2' O Me = 각각의 리보스에서 2' O 메틸화		

[0088] 사용된 3' FITC 표지 올리고뉴클레오타이드는 REP 2032-FL(6머 포스포로티오에이트화 축퇴 올리고데옥시뉴클레오타이드), REP 2003-FL(10머 포스포로티오에이트화 축퇴 올리고데옥시뉴클레오타이드), REP 2004-FL(20머 포스

포스포티오에이트화 축퇴 올리고데옥시뉴클레오타이드), REP 2006-FL(40머 포스포티오에이트화 축퇴 올리고데옥시뉴클레오타이드), REP 2031-FL(40머 폴리 시토신 포스포티오에이트화 올리고데옥시뉴클레오타이드; 서열번호 4), REP 2107-FL(각각의 리보스가 2' 0 메틸화로 개질된 40머 포스포티오에이트화 축퇴 올리고뉴클레오타이드) 및 REP 2086-FL(각각의 리보스가 2' 0 메틸화로 개질된 40머 축퇴 포스포다이에스터 올리고뉴클레오타이드)이었다. 이들 ON의 각각은 1mM 트리스(TRIS)(pH 7.2) 중 0.5mM 모액(stock)으로서 제조하였다. 이 모액을 사용하여 FP 완충액(10mM 트리스, 80mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM β -머캅토에탄올 및 0.1% 트윈(등록상표)-20) 중 3nM 형광성 ON 용액을 제조하였다. EDTA는 FP 측정 전에 용액에 존재하는 임의의 2가 금속을 제거하도록 존재한다. 이들 완충액 용액 각각은 또한 80mM NaCl을 함유하여 과몰량의 1가 양이온의 존재하에서 ON 복합체 형성을 평가하였다(도 1 내지 12의 각각의 그래프에서, 이는 0mM 금속 염화물로서 기록되어 있음). 용액 중 각각의 형광성 ON에 다양한 양의 ACS 등급 2가(2+) 금속의 염화 염을 첨가하였다. 이들 염은 염화 칼슘, 염화 마그네슘, 염화 코발트, 염화 철, 염화 망간, 염화 바륨, 염화 니켈, 염화 구리, 염화 아연, 염화 카드뮴, 염화 수은 및 염화 납을 포함하였다. 이량체 또는 더 높은 차수의 ON 킬레이트 복합체의 형성은 형광 편광에서의 증가에 의해 모니터링(무차원 단위 “mP”에 의해 정량화됨)하였으며 ON 킬레이트 복합체 형성의 증가는 중량에서의 더 큰 변화를 야기하였다. 용액 중 이러한 ON 킬레이트 복합체의 야기된 더 느린 붕괴는 방출된 형광의 편광 증가를 가져온다(도 16을 참조). 이러한 실험의 결과는 도 2 내지 13에 제시되어 있다. 각각의 경우에서, 형광 편광에서의 상당한 증가는 모든 2가 양이온의 존재하에서 모든 ON과 함께 확인되었지만 Na^+ (NaCl로서 공급됨)의 높은 과량의 존재하에서는 확인되지 않았으며 이는 단지 2가 금속 양이온만을 이용하는 ON 킬레이트 복합체의 형성을 나타낸다. 이러한 결과는 다음을 설명한다:

- [0089] · 80mM NaCl의 존재하에서 ON은 이량체 또는 임의의 다른 더 높은 차수의 ON 복합체의 임의의 검출가능한 형성을 나타내지 않는다.
- [0090] · ON은 다음의 2가 금속 양이온, 즉 칼슘, 마그네슘, 코발트, 철, 망간, 바륨, 니켈, 구리, 아연, 카드뮴, 수은 및 납이 2+ 하전 상태로 존재할 때 상기 2가 금속 양이온의 존재하에서 이량체 및 더 높은 차수의 복합체를 형성한다. 이러한 ON 복합체의 형성은 이들 2가 금속 양이온과 ON의 상호작용을 수반한다.
- [0091] · ON 복합체의 형성은 테스트되는 ON의 축퇴 성질로 인하여 전통적인 왓슨-크릭 상호작용을 통하여 질소성 염기 사이에서의 혼성화로 인한 것이 아닐 수 있다. 추가적으로, REP 2031(서열번호 4)은 이용되는 실험 조건 하에서 자가 혼성화되지 않을 수 있다.
- [0092] · ON 복합체의 형성은 수용액 중에서 안정적이고 가용성이며, 이들 복합체는 형성되는 복합체의 부분으로서 미지의 2가 금속을 포함하는 것으로 보이므로, 이들 ON 복합체는 ON 복합체가 형성되는 용액으로부터 미지의 2가 금속을 킬레이트화하는 효과를 가진다.
- [0093] · 축퇴 올리고뉴클레오타이드와 함께 관찰되는 킬레이트화에 의하여 입증되는 바와 같이, 이들 금속의 킬레이트화 및 ON 킬레이트 복합체의 형성은 특정 뉴클레오타이드 서열에 의존적이지 않으며, 또한 포스포다이에스터 결합 또는 2' 리보스 부분의 개질을 수반하는 뉴클레오타이드 개질에 의존적이지 않다.
- [0094] · 이들 금속의 킬레이트화는 길이가 6 내지 40 뉴클레오타이드인 올리고뉴클레오타이드와 함께 일어난다.
- [0095] · 이들 금속의 킬레이트화는 포스포티오에이트화 또는 2' 리보스 개질의 존재 또는 부재하에서 일어난다.
- [0096] 이 실시예에서 모든 ON과 함께 다수의 2가 금속 양이온을 이용하는 ON 킬레이트 복합체의 광범위한 형성은 또한 다음을 강하게 시사한다:
- [0097] · 2가 양이온은 ON 복합체 형성을 촉진시키고 1가 양이온은 그렇지 않으며, ON 복합체 형성은 상기 기술된 바와 같이 염기 혼성화를 통하여 일어나지 않기 때문에, ON 킬레이트 복합체 형성은 양이온에서 빈 전자 오비탈을 채울 수 있는 전자를 용이하게 공유하는 위치에서 2개의 ON 사이에 “금속 이온 가교”의 몇몇 형태를 수반하여야 한다. 이러한 “전자 공유”에 가장 익숙한 위치는 포스포다이에스터 결합 중 비가교 산소(또는 포스포티오에이트화의 경우에는 황) 원자이다(도 14B를 참조).
- [0098] · DNA 이든 RNA이든 이중 가닥 ON은 동일한 킬레이트 복합체 형성을 나타내는 것으로 예측되므로 따라서 용액으로부터의 금속 양이온을 킬레이트화하는 동일한 경향을 가진다.
- [0099] · 분자내 상호작용은 임의의 상당하게 증가된 형광 편광을 가져오지 않을 것이므로, 이들 금속 가교는 분자간 상호작용을 수반하여야 한다(도 15A 내지 도 15C 및 도 16 참조).
- [0100] · 가용성 ON 킬레이트 복합체는 킬레이트 복합체 침전물을 형성하지 않는 ON 및 2가 양이온의 임의의 농도로

존재한다(도 14D를 참조).

- [0101] · ON은 2가 금속 양이온과 함께 염을 형성할 수 없으며 수용액 중 염으로서 거동하지 않는다. 이는 ON과 함께 염을 형성하고 용액 중에서 염(전해질)으로서 거동하는 1가 양이온(본 실시예에서는 나트륨으로 예시되지만 또한 기타 다른 1가 양이온, 예를 들어 칼륨, 리튬 또는 암모늄에도 적용가능함)과 반대이다. 게다가, 본 실시예에서 사용되는 모든 ON은 암모늄 염이었지만, 수용액 중에서 암모늄 이온은 ON으로부터 해리할 가능성이 있고(염에 대하여 예측될 바와 같음) 2가 양이온에 의해 ON 킬레이트 복합체의 형성에 대한 어떠한 저해도 제공하지 않는다. 이는 추가적인 1가 염(이 경우에는 80mM NaCl)이 2가 양이온과 ON 킬레이트 복합체의 형성을 방해하는 것으로 보이지 않는다는 관찰에 의해 추가로 강화된다.
- [0102] · ON 킬레이트 복합체의 형성은 2+ 하전 상태를 가지는 임의의 금속, 전이 금속, 란타나이드 또는 악티나이드 원소와 함께 일어나는 것으로 예측될 수 있으며 또한 3+ 또는 그 이상의 하전 상태(예컨대, 크롬)로 존재할 수 있는 금속 이온과 함께 일어날 가능성이 있다.
- [0103] · 길이가 40머를 초과하거나 또는 다른 기타 개질을 은닉하거나 또는 임의의 특정 정의된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 ON은 또한, ON 킬레이트 복합체가 전통적인 포스포다이에스터 결합에서 비가교 산소(또는 황) 원자와 동일한 방식으로 전자를 공유할 수 있는 결합을 포함하는 한, 2가 금속 양이온과 함께 ON 킬레이트 복합체를 형성하는 것으로 예상될 수 있다.
- [0104] · ON 염(예컨대, 나트륨 염)은 인간 또는 비인간 환자 내에서 2가 금속, 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니지만 카드뮴, 수은, 납을 킬레이트화하는데 유용할 수 있다. 추가적으로, 나트륨 염 올리고뉴클레오타이드에 의한 어느 하나의 특정 2가 금속 양이온(예컨대, 철)의 킬레이트화는 다른 2가 금속 양이온(예컨대, 칼슘)을 이용하는 ON 킬레이트 복합체로서 ON 나트륨 염을 제조함으로써 억제될 수 있다.
- [0105] · 염화 염 이외의 금속 염은 또한 ON 킬레이트 복합체의 형성을 허용할 수 있다. 칼슘 염을 예로 들면, ON 킬레이트 복합체 형성과 양립가능한 기타 다른 칼슘 염은 제한없이 칼슘 글루코네이트, 칼슘 시트레이트, 칼슘 락테이트, 칼슘 말레이트, 칼슘 아스파테이트, 칼슘 푸마레이트, 칼슘 아스코베이트, 칼슘 벤조에이트, 칼슘 에리소베이트, 및/또는 칼슘 프로피온에이트를 포함할 수 있다.

실시예 III

ON은 칼슘 및 마그네슘의 상이한 염과 함께 킬레이트 복합체를 형성한다

ON 킬레이트 복합체 형성의 보편적인 성질을 추가로 설명하고 또한 ON 킬레이트 복합체의 형성에 있어서 2가 금속 양이온의 상이한 염의 유용성을 설명하기 위하여, 칼슘 및 마그네슘 염의 2가지 상이한 형태가 상이한 특이적인 서열의 ON을 가지는 다양한 ON 킬레이트 복합체를 제조하는데 사용하였다. 사용된 염은 염화 칼슘, 황산 칼슘, 염화 마그네슘 및 황산 마그네슘이었다. 사용된 ON은 하기 표 2에 열거되어 있다. 임의의 EDTA-매개 효과의 부재하에서 ON 킬레이트 복합체의 형성을 설명하는데 EDTA가 빠지는 것을 제외하고 FP 반응 조건은 실시예 1에서의 조건과 동일하였다.

표 2

실시예 III에 사용된 ON			
올리고뉴클레오타이드	서열(5'-3')	서열번호	개질
REP 2055-FL	(AC) ₂₀	6	PS
REP 2056-FL	(TC) ₂₀	7	PS
REP 2033-FL	(TG) ₂₀	5	PS
REP 2029-FL	A ₄₀	2	PS
REP 2028-FL	G ₄₀	1	PS
REP 2057-FL	(AG) ₂₀	8	PS
REP 2120-FL	N ₄₀ (C = 5' 메틸시티딘)	NA	PS
REP 2030-FL	T ₄₀	3	PS
REP 2129-FL	C ₆₀	12	PS
REP 2126-FL	C ₂₀	9	PS

REP 2128-FL	C ₅₀	11	PS
REP 2127-FL	C ₃₀	10	PS
REP 2006-FL	N ₄₀	NA	PS
REP 2139-FL	(A5'MeC) ₂₀	13	PS + 2' O Me
REP 2045-FL	N ₆₀	NA	PS
REP 2007-FL	N ₈₀	NA	PS
N = 축퇴 서열(A, G, C 또는 T의 무작위 포함) PS = 각각의 결합에서 포스포로티오에이트화 2' O Me = 각각의 리보스에서 2' O 메틸화 NA = 적용 불가능(서열은 축퇴성임)			

[0110] 이들 실험의 결과는 도 17 내지 도 24에 설명되어 있으며 시험된 모든 ON이 칼슘 및 마그네슘의 상이한 염을 이용하여 ON 복합체를 형성할 수 있음을 입증한다. 이러한 일반적인 관찰에 대한 2가지 예외는 REP 2028-FL(40머 폴리 G, 서열번호 1; 도 18a 및 도 22a) 및 REP 2029-FL(40머 폴리 A, 서열번호 2; 도 17b 및 도 21b)이다. 이들 ON 모두 폴리퓨린이고, 특히 폴리 G의 경우에는, 포스포다이에스터 주쇄가 단단한 분자내 복합체 내에서 부분적으로 접힐 가능성이 있거나 또는 더 이상 용액 상호작용(킬레이트 복합체 형성과 같음)에 참여할 수 없는 경우에, 상기 ON이 단단한 분자내 복합체를 형성하게 하는 열역학적으로 안정적인 분자내 상호작용을 형성(폴리 G 부분의 경우에 “G-쿼테트(G-quartet)”로 칭함)하는 것으로 알려져 있다. REP 2029-FL(서열번호 2)은 이러한 ON과 함께 일어나는 약한 “A-쿼테트” 상호작용으로 인한 가능성이 있는 킬레이트 복합체를 약하게 형성할 수 있었다. 따라서, 열역학적으로 안정적인 분자내 상호작용을 형성하는 폴리 A 및 폴리 G와 앵타머만을 포함하는 ON은 본원에 포함되지 않는다. 본원에 포함되는 ON은 완전한 폴리 A 또는 폴리 G ON 및/또는 헵타머가 아니다.

[0111] 실시예 II로부터의 결과는 마그네슘 및 칼슘의 상이한 염 형태가 ON 킬레이트 복합체를 제조하는데 사용될 수 있으며 다음을 추가로 설명할 수 있음을 나타낸다:

[0112] · 실시예 II에서 모든 ON(REP 2006-FL을 제외함)은 헤어핀을 형성할 수 있는 임의의 앞뒤 역순상 동일한 서열(palindromic sequences)을 포함하지 않는 특이적인 서열(이들 서열 중 어떤 것도 자기 상보성이 아님)을 포함한다. 그러므로, 관찰되는 ON 킬레이트 복합체 형성 중 어느 것도 혼성화 사건에서 기인하지 않는다.

[0113] · ON 킬레이트 복합체를 형성하는 REP 2028-FL(서열번호 1) 및 REP 2029-FL(서열번호 2)의 양호하지 못한 능력은, 킬레이트 복합체를 형성하는 2개 이상의 ON의 결합을 위해 필요로 하는 ON에 대한 화학적 특징으로서 포스포다이에스터 주쇄를 다시 나타내는 ON 킬레이트 복합체 형성을 위해 이완된 포스포다이에스터 주쇄를 필요로 함을 시사한다.

[0114] · 포스포다이에스터 주쇄를 포함하는 임의의 ON은, 포스포로티오에이트화, 2' 리보스 개질 또는 잠금 핵산 개질과 같은 기타 다른 존재하는 개질과 관계없이 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 것으로 예측된다.

[0115] · ON 킬레이트 복합체는 길이가 80머만큼 큰 ON과 함께 형성될 수 있으며, 길이가 80머 초과인 ON은 또한 2가 금속 양이온의 존재하에서 동일한 거동을 나타낸다.

[0116] 실시예 IV

[0117] **이중 가닥 ON을 이용하는 ON 킬레이트 복합체의 형성**

[0118] 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 왓슨-크릭 상호작용을 통하여 수용액 중에서 서로 혼성화하는 2개의 단일 가닥 보완적 올리고뉴클레오타이드로부터 형성된다. 이중 가닥 ON은 형성된 DNA 나선의 외부에 노출된 포스포다이에스터 주쇄를 여전히 가지므로, 상기 ON은 2가 양이온의 존재하에서 킬레이트 복합체를 형성할 수 있어야 한다. 이러한 가설을 시험하기 위하여, 2가지 상이한 이중 가닥 DNA 올리고뉴클레오타이드는 REP 2033-FL(40머 폴리 TG; 서열번호 5)과 함께 REP 2055-FL(40머 폴리 AC; 서열번호 6) 및 REP 2056-FL(40머 폴리 TC; 서열번호 7)과 함께 REP 2057-FL(40머 폴리 AG; 서열번호 8)을 혼성화함으로써 제조하였다. ON 혼성화는 이중나선(duplex)을 생성시키므로, 초래된 질량에서의 증가는 복합체를 제조하는데 사용되는 단일 가닥 ON에 대하여 형광 편광에서의 증가에 의해 검출될 수 있다. 단일 가닥 ON(REP 2055-FL(서열번호 6), Rep 2033-FL(서열번호 5), Rep 2057-FL(서열번호 8) 및 REP 2056-FL(서열번호 7))은 각각 1X FP 완충액 중에서 20nM으로 희석하였다.

상기 확인된 바와 같은 2가지 상보적 쌍의 혼성화는 또한 1X FP 완충액 중에서 수행되며(각각의 ON의 10nM) 혼성화는 형광 편광에서 증가에 의해 확인하였다. 그 다음 이중 가닥 구성체는 100mM CaCl₂ 또는 100mM MgCl₂에 노출시켰다. ON 킬레이트 복합체 형성은 형광 편광에서 추가 증가에 의해 모니터링하였다(도 25를 참조). 이 실험의 결과는, 형광 편광에서 증가에 의해 입증된 바와 같이 ON의 2가지 상보적인 쌍의 이중 가닥 ON으로의 성공적인 혼성화를 확인한다. 게다가, 이들 이중 가닥 ON으로 CaCl₂ 또는 MgCl₂의 첨가는 형광 편광에서 추가의 증가를 가져오며, 이는 이러한 이중 가닥 ON이 또한 2가 금속 양이온의 존재 하에서 킬레이트 복합체를 형성할 수 있음을 나타낸다. 이들 결과는 또한 이중 가닥 ON이 임의의 2가 양이온과 함께 ON 킬레이트 복합체를 형성할 수 있으며, 또한 용액으로부터 상기 2가 양이온을 격리하는 효과를 가지는 것으로 예측될 것임을 강하게 시사한다.

실시예 V

다양한 1가 양이온은 ON과 킬레이트 복합체를 형성하지 않는다

ON 킬레이트 복합체의 형성은 1가 양이온의 존재하에서는 일어날 수 없고 구체적으로 그 형성을 위해서는 2가 양이온을 필요로 한다는 것을 보다 구체적으로 입증하기 위하여, 다수의 ON을 이용한 ON 복합체 형성(실시예 2를 참조)을 단지 하나의 양이온의 공급원만을 함유하는 FP 완충액 중에서 관찰하였다. 다음의 염, 즉 염화 나트륨, 염화 칼륨, 염화 암모늄, 염화 칼슘 또는 염화 마그네슘 중 단지 1가지만 함유하고, 모두 80mM의 농도로 하여 FP 완충액 중 양이온의 농도가 동일한 1X FP 완충액을 제조하였다. 실시예 2에 기술한 바와 같은 형광으로 표지한 ON을 상이한 FP 완충액 중에서 10nM으로 희석하고 ON 킬레이트 복합체 형성은 형광 편광에 의해 모니터링하였다(도 26을 참조). 시험한 각각의 ON의 경우에, 킬레이트 복합체 형성은 양이온 Mg²⁺ 및 Ca²⁺을 이용한 경우에만 관찰되었고 1가 양이온 중 어느 것(Na⁺, K⁺ 또는 NH₄⁺)으로 시험한 경우에는 관찰되지 않았다. 실시예 III에서 관찰된 바와 같이, REP 2029-FL(서열번호 2) 및 REP 2028-FL(서열번호 1)은 각각 칼슘 또는 마그네슘의 존재하에서 단지 중간정도의 복합체 형성을 보이거나 복합체 형성을 보이지 않았다. 이는 ON이 2가 양이온을 이용하여서만 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 반면, ON이 1가 염을 가지는 염으로서만 존재할 수 있음을 추가로 확인한다.

실시예 VI

WFI 중에서 제조한 ON 킬레이트 복합체 중 금속 함량의 평가

모든 ON에 대하여 ON 킬레이트 복합체 제조의 광범위한 적용가능성을 입증하기 위하여, 여러 가지의 상이한 ON 킬레이트 복합체를 표 3에 나타난 바와 같은 ON 및 ²⁺ 금속 염화물 염을 사용하여 제조하였다. 이 제조에서 사용한 모든 ON은 NaCl로부터 유래한 나트륨을 제거하고 최종 동결건조된 ON 중에서 ON 염 형성에 필수적인 나트륨만을 남기도록 탈염된 나트륨 염이었다. ON 킬레이트 복합체는 먼저 50mg/ml 농도로 ON 나트륨 염의 처방된 양을 용해시키고 2가 금속 염화물 염의 처방된 양을 ON 용액에 첨가함으로써 주사용 증류수(WFI) 중에서 제조하였다. 2가 금속 염화물 첨가/ON 킬레이트 형성 전에 ON 용액을 유도결합플라즈마 발광광도법(ICP-OES)에 의해 나트륨 및 관련 금속에 대하여 분석하였다. ON 킬레이트 복합체 형성 후에, 샘플을 5000 MWCO 재생 셀룰로스 필터를 사용하여 한외여과에 의해 탈염시켰다. 이 필터는 자유 염은 투과시키지만 ON 또는 ON에 부착된 양이온은 투과시키지 않음을 미리 입증하였다. 존재하는 2가 금속은 ON 상에서 킬레이트화하지만 잔류물 용액에 존재하는 2가 금속 염으로부터 유래한 것은 킬레이트화하지 않음을 확인하기 위하여, 잔류물 용액(ON 킬레이트 복합체를 포함함)을 ICP-OES에 의해 나트륨 및 금속 함량에 대하여 분석하였고, 이온 크로마토그래피에 의해 염화물의 함량에 대하여 분석하였다(표 4).

표 3

다양한 ON 킬레이트 복합체의 제조				
ON	서열 / 화학적 성질	제조된 금속 킬레이트	첨가된 금속 염화물 (mg/ 100mg ON)	ON 농도
REP 2004	N ₂₀ / PS	Ca	10	50mg/ml
REP 2006	N ₄₀ / PS	Ca	10	50mg/ml
REP 2006	N ₄₀ / PS	Ca	20	50mg/ml
REP 2006	N ₄₀ / PS	Ca	30	25mg/ml
REP 2006	N ₄₀ / PS	Mg	20	50mg/ml

REP 2006	N ₄₀ / PS	Fe ²⁺	2	25mg/ml
REP 2107	N ₄₀ / PS, 2'OMe	Ca	10	37.5mg/ml
REP 2107	N ₄₀ / PS, 2'OMe	Mg	15	37.5mg/ml
REP 2107	N ₄₀ / PS, 2'OMe	Fe ²⁺	2	37.5mg/ml
REP 2138 (서열번호 14)	C ₄₀ / 2'OMe	Ca	10	50mg/ml
REP 2126 (서열번호 9)	C ₂₀ / PS	Ca	10	50mg/ml
REP 2031 (서열번호 4)	C ₄₀ / PS	Ca	10	50mg/ml
REP 2129 (서열번호 12)	C ₆₀ / PS	Ca	10	50mg/ml
REP 2057 (서열번호 8)	(AG) ₂₀ / PS	Ca	10	50mg/ml
REP 2057 (서열번호 8)	(AG) ₂₀ / PS	Mg	15	50mg/ml
REP 2057 (서열번호 8)	(AG) ₂₀ / PS	Fe ²⁺	2	50mg/ml
REP 2055 (서열번호 6)	(AC) ₂₀ / PS	Ca	10	50mg/ml
REP 2139 (서열번호 13)	(A,5MeC) ₂₀ / PS,2'OMe	Ca	10	50mg/ml
REP 2139 (서열번호 13)	(A,5MeC) ₂₀ / PS,2'OMe	Ca	30	25mg/ml
REP 2139 (서열번호 13)	(A,5MeC) ₂₀ / PS,2'OMe	Mg	15	50mg/ml
REP 2139 (서열번호 13)	(A,5MeC) ₂₀ / PS,2'OMe	Ca, Mg	5 / 7.5	50mg/ml

N = 축퇴 서열(A, G, T 또는 C의 무작위 분포임)
 PS = 포스포로티오에이트
 2'OMe = 2' O 메틸화 리보스
 5MeC = 5' 메틸시티딘

표 4

다양한 ON 킬레이트 복합체 용액 중 금속 함량의 입증						
ON	금속 킬레이 트 (mg / 100mg ON)	예비-킬레이트 ON 용액		후-탈염 ON 킬레이트 복합체		
		나트륨	금속	염화물	나트륨	금속
REP 2004	Ca (10)	0.276%	< 2.0ppm	< 10ppm	< 0.03%	664ppm
REP 2006	Ca (10)	0.381%	< 11ppm	< 8ppm	400ppm	614ppm
REP 2006	Ca (20)	0.443%	1.21ppm	< 8ppm	141ppm	0.11%
REP 2006	Ca (30)	0.399%	2.0ppm	< 8ppm	< 110ppm	861ppm
REP 2006	Mg (20)	0.390%	< 5ppm	< 9ppm	110ppm	564ppm
REP 2006	Fe ²⁺ (2)	0.394%	< 5ppm	< 10ppm	979ppm	176ppm
REP 2107	Ca (10)	0.232%	< 6ppm	< 9ppm	215ppm	539ppm
REP 2107	Mg (15)	0.237%	< 0.9ppm	< 9ppm	162ppm	339ppm
REP 2107	Fe ²⁺ (2)	0.219%	2.5ppm	15ppm	0.049%	141ppm
REP 2138 (서열번호 14)	Ca (10)	0.210%	< 0.04%	< 10ppm	3.2ppm	745ppm
REP 2126 (서열번호 9)	Ca (10)	0.266%	< 2.3ppm	< 10ppm	< 0.04%	681ppm

REP 2031 (서열번호 4)	Ca (10)	0.222%	< 2.4ppm	< 9ppm	< 0.03%	772ppm
REP 2129 (서열번호 12)	Ca (10)	0.236%	< 2.4ppm	< 10ppm	< 0.03%	681ppm
REP 2057 (서열번호 8)	Ca (10)	0.257%	5.5ppm	< 10ppm	398ppm	743ppm
REP 2057 (서열번호 8)	Mg (15)	0.250%	< 1ppm	< 9ppm	177ppm	531ppm
REP 2057 (서열번호 8)	Fe ²⁺ (2)	0.244%	0.7ppm	< 9ppm	0.101%	195ppm
REP 2055 (서열번호 6)	Ca (10)	0.238%	< 6ppm	< 9ppm	351ppm	639ppm
REP 2139 (서열번호 13)	Ca (10)	0.244%	< 6ppm	< 8ppm	347ppm	638ppm
REP 2139 (서열번호 13)	Ca (30)	0.236%	< 1.8ppm	< 8ppm	91ppm	937ppm
REP 2139 (서열번호 13)	Mg (15)	0.247%	< 1ppm	< 9ppm	248ppm	472ppm
REP 2139 (서열번호 13)	Ca (5), Mg (7.5)	0.276%	< 9ppm (Ca)	< 10ppm	0.022%	0.033% (Ca)
			< 5ppm (Mg)			0.314% (Mg)

[0127] 이들 결과는 길이가 20 내지 60머로 다양하고, 완전한 축퇴 ON으로부터 3가지 특이적인 서열(폴리 C, 폴리 AC 및 폴리 AG)까지 서열이 다양하며, 포스포로티오에이트 개질이 있거나 없는 ON, 2' 리보스 개질이 있거나 없는 ON 및 포스포로티오에이트 및 2' 리보스 개질을 포함하는 ON으로 다양한 ON에서 칼슘, 마그네슘 또는 철(2+)에 의해 나트륨의 부분적인 대체를 확인한다. 킬레이트 복합체로서 2' O 메틸 리보스가 개질된 ON을 만들어내는 능력은 또한 이에 제한되지는 않지만 예를 들어 2' 플루오로 및 2' O 메틸옥시메틸과 같은 임의의 다른 2' 리보스 개질을 포함하는 ON으로 확장되는 것으로 예측된다. 또한, 이들 결과는 상당한 나트륨 대체가 2가 금속 함량에서의 최소한의 증가로 달성됨을 입증하며, 이는 도 15에 기술된 ON 킬레이트 복합체 구조와 일치한다. 이들 결과는 또한 ON 킬레이트 복합체를 제조하는데 사용될 수 있는 칼슘, 마그네슘, 철(2+) 및 혼합 칼슘/마그네슘 염 용액의 다양한 조합을 설명하며 임의의 2가 금속 염 용액 또는 2가 금속 염 용액의 혼합물은 ON 킬레이트 복합체를 제조하는데 유사하게 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0128] 그러므로, ON 킬레이트 복합체는 완전히 포스포로티오에이트화되거나 그렇지 않거나, 임의의 수의 포스포로티오에이트화 결합을 포함하거나 적어도 하나의 2' 리보스 개질 또는 완전히 개질된 2' 리보스 또는 어떠한 2' 리보스 개질을 포함하지 않는 ON으로부터 제조할 수 있다. ON은 RNA 또는 DNA 또는 RNA 및 DNA를 포함하는 혼성체일 수 있다. ON 킬레이트 복합체의 제조에서 사용되는 금속 염은 제한 없이 칼슘 염, 마그네슘 염, 철 염, 임의의 기타 다른 2가 금속 염을 포함한다.

[0129] 실시예 VII

[0130] 생리 식염수 중 안정적인 ON 킬레이트 복합체의 제조

[0131] ON 킬레이트 복합체 형성의 광범위하게 보존된 성질 및 실시예 II 및 III에서 상이한 2가 금속을 이용한 제조를 설명하여, 안정적인면서 가용성인 ON 칼슘 킬레이트 복합체의 제조는 개체에의 ON 킬레이트 복합체 투여에 대하여 보다 적절한 부형제인 생리 식염수 중에서 시험하였다. 이 실험에 있어서, 생리 식염수 중 REP 2006의 나트륨 염의 200mg/ml 용액은 ON의 공급원으로서 사용하였다. 칼슘의 공급원은 WFI 중 CaCl₂의 10% 용액(100mg/ml CaCl₂)이었다. 상이한 칼슘 및 REP 2006 농도를 사용하는 다양한 REP 2006 칼슘 킬레이트 복합체를 다음의 프로토콜에 따라서 실온에서(표 5를 참조) 1ml 용액 중에서 제조하였다: 1) 바이알에 REP 2006을 첨가, 2) 생리 식염수를 첨가하고 혼합, 및 3) CaCl₂을 첨가하고 혼합. 이들 REP 2006 칼슘 킬레이트 용액을 36일에 걸쳐서 침전물이 나타나는 것에 대하여 관찰하였다(표 6을 참조).

표 5

[0132]

다양한 REP 2006 칼슘 킬레이트 복합체의 제조를 위한 조건						
[REP2006] (mg/ml)	CaCl ₂ (REP 2006의 100mg 당 mg)					
	15	20	25	30	35	40
100	500 μ l REP 2006 + 350 μ l NS + 150 μ l CaCl ₂	500 μ l REP 2006 + 300 μ l NS + 200 μ l CaCl ₂	500 μ l REP 2006 + 250 μ l NS + 250 μ l CaCl ₂	500 μ l REP 2006 + 200 μ l NS + 300 μ l CaCl ₂	500 μ l REP 2006 + 150 μ l NS + 350 μ l CaCl ₂	500 μ l REP 2006 + 100 μ l NS + 400 μ l CaCl ₂
50	250 μ l REP 2006 + 675 μ l NS + 75 μ l CaCl ₂	250 μ l REP 2006 + 650 μ l NS + 100 μ l CaCl ₂	250 μ l REP 2006 + 625 μ l NS + 125 μ l CaCl ₂	250 μ l REP 2006 + 600 μ l NS + 150 μ l CaCl ₂	250 μ l REP 2006 + 575 μ l NS + 175 μ l CaCl ₂	250 μ l REP 2006 + 550 μ l NS + 200 μ l CaCl ₂
25	125 μ l REP 2006 + 837.5 μ l NS + 37.5 μ l CaCl ₂	125 μ l REP 2006 + 825 μ l NS + 50 μ l CaCl ₂	125 μ l REP 2006 + 812.5 μ l NS + 62.5 μ l CaCl ₂	125 μ l REP 2006 + 800 μ l NS + 75 μ l CaCl ₂	125 μ l REP 2006 + 787.5 μ l NS + 87.5 μ l CaCl ₂	125 μ l REP 2006 + 775 μ l NS + 100 μ l CaCl ₂

표 6

[0133]

다양한 ON 및 칼슘 농도로 REP 2006 칼슘 킬레이트 복합체에서의 침전물의 형성							
시간	[REP 2006] (mg/ml)	CaCl ₂ (NAP의 100mg 당 mg)					
		15	20	25	30	35	40
1시간	100	-	+	++	+++	+++	++++
	50	-	-	-	-	-	+
	25	-	-	-	-	-	-
24시간	100	-	-/+	++++	++++	++++	++++
	50	-	-	-	-	+	++++
	25	-	-	-	-	-	-
7일	100	-	-/+	++++	++++	++++	++++
	50	-	-	-	-	++++	++++
	25	-	-	-	-	-	-
36일	100	-/+	-/+	++++	++++	++++	++++
	50	-/+	-/+	-/+	-/+	++++	++++
	25	-	-	-	-	-	-
- 맑고 투명한 용액 + 바이알의 바닥에 매우 소량의 백색 침전물 ++ 미세한 콜로이드 침전물, 반투명 +++ 미세한 콜로이드 침전물, 불투명 ++++ 주로 튜브 바닥에 침전하지만 잔여 콜로이드 존재 +++++ 튜브 바닥에 침전, 나머지 용액은 맑고 투명함							

[0134]

바이알을 천천히 뒤집을 때 바이알에서 및 점성 용액 거동에서 보다 확연한 메니스커스에 의해 입증된 바와 같이, 모든 경우에 있어서, REP 2006 칼슘 킬레이트의 용액은, (시험된 모든 농도에서) 칼슘의 부재하 REP 2006 용액과 비교하여 표면 장력의 감소와 점성의 증가를 나타내었다. 이러한 용액 거동은 도 15A 내지 C에 나타낸

바와 같이 큰 가용성 다량체 복합체(킬레이트 복합체)의 형성과 일치한다. 침전물이 형성된 바이알에서조차도, 나머지 용액은 여전히 표면 장력 및 점성에서 이러한 특징적인 증가를 나타내었다. 이들 용액에서 형성된 침전물은 도 15D에 설명한 바와 같이 포화된 (그리고 불용성인) ON 킬레이트 구조를 채택하고, 나머지 비침전 ON 및 칼슘은 여전히 용액 중에서 가용성 킬레이트를 형성하는 것이 가능하다. 이러한 거동은 ON 길이, 화학적 성질, 구조(단일 가닥 또는 이중 가닥) 또는 존재하는 2가 금속에 관계없이 임의의 ON 킬레이트 복합체의 거동을 일반적으로 대표하는 것으로 예측된다. 게다가, 이들 실험은 또한 ON 및 칼슘의 더 높은 농도가 초기에 완전히 가용성인 복합체를 형성할 수 있는 반면, 이들은 역학적으로 불안정적이고 가용성 킬레이트 복합체(도 15A 내지 C에서와 같음)로부터 불용성 킬레이트 복합체(도 15D)로 천천히 전이할 가능성이 있음을 설명한다. 따라서 용액 중에서 안정적인 가용성 ON 킬레이트 복합체를 가지는, 표 5에 나타난 바와 같은 ON 및 금속 농도에서 ON 킬레이트 복합체를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 상이한 ON 및 금속 조합에 있어서, 시간이 경과함에 따라서 용액 중에 가용성으로 있는 가용성 ON 킬레이트 복합체를 생성하는 최적의 ON 및 금속 농도는 표 5에서 REP 2006 및 칼슘에 대하여 나타난 농도로부터 변화할 수 있다.

[0135] 실시예 VI 및 VII은 ON 킬레이트 복합체의 제조에서 유용할 수 있는 다양한 부형제 중 ON 및 2가 금속 염 농도의 다양한 조합을 기술하며 생리 식염수에서 빠르게 침전하거나 천천히 침전하거나 또는 장기간 동안 완전히 가용성인 상태로 있는 ON 킬레이트 복합체 용액을 생성하는 ON 및 2가 금속 염 또는 2가 금속 염의 혼합물의 조합을 기술한다. 이들 안정성 특성 중 어떤 것을 가지는 ON 킬레이트 용액을 사용하는 것이 유리할 수 있다.

[0136] 그러므로, ON 킬레이트 복합체는 이에 제한되지 않지만 ON 나트륨 염 또는 ON 암모늄 염 또는 혼합 나트륨/암모늄 ON 염을 포함하는 임의의 ON 염을 사용하여 제조할 수 있다. 이상적으로, ON 염은 이에 제한되는 것은 아니지만 주사용 증류수 또는 생리 식염수를 포함하는 수성 부형제에 용해된다. ON 킬레이트 형성에 사용되는 2가 금속의 공급원은 클로라이드 염, 설페이트 염, 또는 이에 제한되는 것은 아니지만 글루코네이트 염, 시트레이트 염, 락테이트 염, 말레이트 염, 아스파테이트 염, 푸마레이트 염, 아스코베이트 염, 벤조에이트 염, 에리스베이트 염 및/또는 프로피오네이트 염을 포함하는 임의의 다른 기타 약학적으로 허용가능한 염일 수 있다. 염은 다음의 2가 금속 양이온, 즉 칼슘, 마그네슘, 철(2+), 망간, 구리 및/또는 아연 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 추가적으로, 하나 초과 2가 금속 염의 혼합물을 사용할 수 있다. 상기 금속 염은 분말 형태로 직접적으로 사용될 수 있지만, 바람직하게는 ON이 용해되므로 동일한 부형제 중 수용액으로서 제조된다. 금속 염은 상기 부형제 중 상기 금속 염에 대하여 용해도의 한계까지 임의의 농도로 제조될 수 있다. ON 킬레이트 복합체는 바람직하게, 염 용액의 첨가 동안 ON 킬레이트 침전물의 축적을 방지하기 위하여 일정하게 혼합하면서 ON 용액에 금속 염 용액을 천천히 첨가함으로써 제조된다. 사용되는 ON 및 금속 염의 농도에 따라서, ON 킬레이트 용액은 시간의 경과에 따라서 ON 킬레이트 침전물을 천천히 형성할 수 있거나 완전히 가용성으로 있을 수 있다(실시예 VII을 참조).

[0137] **실시예 VIII**

[0138] **ON에 의한 혈청 칼슘의 킬레이트화는 혈액의 항응고를 야기한다.**

[0139] 구체적인 ON의 항응고 효과는 이미 기술되어 있지만 본 개시내용에서 ON 킬레이트 복합체의 항응고 효과를 설명하는 것은 아니며, 비 FITC 표지 ON은 생물학적으로 양립가능하도록 고순도의 나트륨 염으로서 제조하였다. 이들 ON은 REP 2004, REP 2006, REP 2107 및 REP 2031(서열번호 4)이었고, 이들은 실시예 1에 기술된 ON의 비표지 형태이다. 다양한 농도에서 (생리 식염수 500 μ l 중) 이들 ON은 시트레이트화 튜브에 수집한 신선한 인간 전혈 5ml에 첨가하였다. 이들 ON의 존재하에서 프로트롬빈 시간(혈액의 응고 상태에 대하여 허용되는 측정) 허용되는 임상검사실 방법론을 사용하여 평가하였으며 동일한 부피의 생리 식염수의 존재하에서 프로트롬빈 시간과 비교하였다. 응고에 대한 상대적인 효과는 비율($PTT_{\text{ON}}/PTT_{\text{생리 식염수}}$)로서 표현하였고 정규화된 비율(NR)로서 기록하였다. NR이 1인 것은 정상적인 응고 상태를 나타내고 NR이 1을 초과하는 것은 혈액이 항응고됨을 나타내었다. 이들 실험의 결과는 도 27에 설명되어 있다. 평가된 모든 ON에 대하여, 항응고에 있어서 용량 의존적인 증가가 있었다.

[0140] REP 2055(서열번호 6)는 서열이 (AC)₂₀인 40머 포스포로티오에이트화 ON이다. 혈액 응고 상태에 대한 REP 2055의 나트륨 염의 2.5mM의 첨가의 효과는 상기 기술된 바와 같이 평가하였다. 항응고 효과가 혈액으로부터 칼슘의 킬레이트로 인한 것인지를 결정하기 위하여, REP 2055(서열번호 6)-유도 항응고에 대한 (염화 칼슘의 형태로) 칼슘 보충물의 다양한 양의 효과를 관찰하였다. 이 실험의 결과는 도 28에 나타나어져 있다. 도 27의 결과로부터 예측되는 바와 같이, 2.5mM REP 2055(서열번호 6)는 혈액의 현저한 항응고를 유도하였다. 이러한 항응고는 칼슘의 보충에 의해 효과적으로 억제되었고 2.25mM 초과 2가 염화 칼슘 농도에서 완전히 역전될 수 있었다. 이들

결과는, 상기 실시예에서 기술된 바와 같이 칼슘 킬레이트화를 가져오는 ON 투여 후에 올리고뉴클레오타이드의 항응고 효과가 혈액 중 ON 킬레이트 복합체의 형성에 의해 매개되는 것을 강하게 시사한다. 게다가, 이들 결과는, 칼슘 킬레이트 복합체로서 ON을 제조함으로써 투여되는 ON의 킬레이트화 효과를 증화하는 ON에 의한 혈액의 항응고를 방지하는 방법을 추가로 확인한다. 칼슘 킬레이트화의 증화는 또한 이에 제한되는 것은 아니지만 마그네슘, 망간, 철(2+), 구리, 및/아연을 포함하는 다른 2가 금속의 염을 사용하여 제조되는 ON 킬레이트 복합체를 이용하여 달성될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드-매개 항응고를 억제하는 이러한 방법은 IV 또는 기타 다른 투여 경로에 의하여 인간 또는 비인간 개체에 투여되는 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 효과적인 것으로 예측될 수 있다.

[0141] 이 실험의 결과는 또한 혈청 단백질과 ON의 상호작용의 성질에 의문점을 갖는다. ON 항응고의 성질의 이전 가정은 ON이 응고 캐스케이드의 단백질과 직접적으로 상호작용한다는 것이었지만, 본 발명자들은 이들 단백질의 대부분이 칼슘 결합 단백질 또는 칼슘 의존성 응고 캐스케이드에 수반되는 단백질을 주목한다(문헌[Sheerhan 및 Lan, 1998, Blood 92: 1617]). ON의 혈액의 항응고가 칼슘을 첨가함으로써 증화될 수 있다는 사실과 ON이 칼슘 킬레이트 물질로서 작용한다는 사실은 다음을 시사한다:

[0142] · 항응고에 수반되는 ON 단백질 결합은 필수적이지만 항응고에 충분하지는 않을 수 있다 - ON에 의한 킬레이트를 통하여 칼슘 의존성 단백질로부터의 칼슘의 제거는 ON이 항응고 활성을 발휘하는 기작일 수 있다.

[0143] · 응고 캐스케이드의 성분과의 ON 단백질 상호작용은 그 자체가 칼슘 의존성일 수 있다.

[0144] 주요 혈액 단백질인 알부민은 또한 칼슘과 결합하며, 혈청 칼슘 조절 기작의 부분이다. 알부민은 또한 ON과 상호작용하는 것으로 알려져 있으며, 혈액 중 ON의 순환 반감기에서 중요한 역할을 할 것이다. 상기 항응고 실험의 결과로부터, 혈액에서 대부분의 단백질 상호작용은 ON의 칼슘 킬레이트화 기능성에 의해 많은 부분에서 촉진될 수 있다. 그러므로 또한 ON의 순환 반감기를 감소시키고 비경구 투여를 이용한 내약성을 개선시키는 효과를 가질 가능성이 있는 혈청 단백질 상호작용을 감소시키기 위하여, ON은 ON 킬레이트 복합체로서 개체에 투여될 수 있었다. 이들 복합체는 칼슘 염으로부터 제조될 수 있었지만, 또한 투여될 때 칼슘을 킬레이트화하는 ON에 대한 경향을 증화시키기 위하여 기타 다른 적절한 금속 염으로부터 제조할 수 있다. 이러한 복합체는 이미 증화된 킬레이트화 활성을 가질 것이며 따라서 혈청 단백질과의 상호작용이 상당히 감소될 것으로 예측될 것이다. 이러한 감소된 혈청 단백질 상호작용의 이점은 (킬레이트 복합체로서) 투여된 ON의 내약성의 개선 및 혈액 중 자유 ON의 보다 짧은 반감기일 것이다.

[0145] 실시예 IX

[0146] 만성적인 ON 처치를 이용한 인간 개체에서 저칼슘혈증의 발전 및 예방

[0147] 상기 실시예에서 기술된 ON에 의한 2가 금속 양이온의 킬레이트화가 인간 개체에서 생물학적 관련성을 가지는지를 추가로 시험하기 위하여, 혈청 칼슘에 대한 만성적인 ON 투여의 효과를 만성 간 질환이 있는 환자에서 시험하였다. 이들 개체는 전형적으로 무기질 대사 장애 및 저하된 골 무기질 밀도가 수반되는 비타민 D 결핍증을 앓고 있는 것으로 보여졌으므로 (만약 있다면) ON 킬레이트화의 생물학적 영향을 시험하는데 특히 매우 적합하다(문헌[Arteh et al., 2010, Dig. Dis. Sci., 55: 2624-2628] 및 [George et al., 2009 World J Gastroenterol., 15: 3516-3522]). 따라서, 만성적으로 투여된 ON의 킬레이트화 효과가 인간 개체에서 2가 금속 항상성(예를 들어 칼슘)을 변경시킨다면, 변경이 발생한다면 이들 환자는 임의의 혈청 금속 불균형을 형편없이 대응할 수 있을 것이므로 이러한 변경의 효과는 이들 환자에서 가장 용이하게 관찰될 것이다. 만성 B형 간염이 있는 환자(만성 간 질환으로 진단받음)는 (GMP 등급 나트륨 염으로서) 느린 IV 주입에 의해 생리 식염수 중 ON REP 2055(서열번호 6)로 매주 한번씩 처리하였다. 전체 혈청 칼슘 수준은 용인된 임상검사실 방법에 의해 개체에서 모니터링하였다. ON 처치를 받은 처음 2명의 개체는 처리 12주 이내에 상당한 저칼슘혈증을 발전시켰다(도 29a). 이러한 저칼슘혈증은 중증도가 여러가지였지만, 그 후 처리 13주 동안 계속 지속하였다. 이후에 REP 2055(서열번호 6)로 만성적인 ON 처치를 받은 개체들은 무기질 보충(칼슘, 마그네슘 및 아연을 제공함)을 받아서 ON 처리의 킬레이트화 효과에 대응하였다. 무기질 보충을 받은 개체 중 어느 누구도 ON 처리 동안 저칼슘혈증을 발전시키지 않았다(도 29b). 이러한 결과는 ON의 킬레이트화 활성이 인간 개체에서 일어남을 설명한다. 이는 혈청 칼슘으로 직접적으로 관찰하였지만 또한 마그네슘, 아연 및 구리와 같은 기타 다른 생물학적으로 관련된 2가 금속 양이온과 함께 일어날 수 있다. 추가적으로, ON 킬레이트화 효과에 의해 야기된 금속 결핍증은 무기질 보충에 의해 바로잡을 수 있으며, 또한 킬레이트 복합체로서 ON을 투여함으로써 감소될 수 있다.

[0148] ON은 인간 개체에서 2가 금속 양이온을 킬레이트화하는 것으로 나타났으므로, 비 킬레이트화된 ON의 투여는 개

체에서 해로운 중금속, 예를 들어 수은, 카드뮴, 납 또는 심지어 크로뮴(6+)의 킬레이트화에 유용할 수 있었다. 이러한 방법은 적절한 부형제 중에서 약학적으로 허용가능한 ON 염의 투여를 수반할 것이며, 상기 ON은 바람직 하게는 IV 투여에 의해서 또한 기타 다른 비경구 경로에 의해서 서열 의존적 기능성(예를 들어 이로 제한되는 것은 아니지만 실시예 III에 기술된 특이적 서열의 ON)이 없도록 고안될 것이다. 정상적인 간 기능을 가지는 환 자는 일어날 것인 칼슘 킬레이트화에 대응할 수 있을 것으로 예측될 것이지만, 그러나 생물학적으로 중요한 2가 양이온의 혈청 고갈을 방지할 것임을 보장하도록 무기질 보충을 제공받을 수 있을 것이다(실시예 IX에서와 같음). 중금속의 해로운 영향을 즉시 감소 또는 제거하여 이러한 비킬레이트화된 ON은 혈액에 존재하는 중금속 을 격리시킬 것이며, 또한 미지의 개체로부터 이들 제거를 잠재적으로 가속화시킬 것이다.

[0149] 또한 이중 가닥 ON은 또한 ON 킬레이트 복합체를 형성(그리고 또한 2가 금속을 격리)할 수 있음이 입증되었으므 로, 임의의 이중 가닥 핵산(예를 들어 siRNA)의 투여는 또한 상기 실시예에서 단일 가닥 ON에 대하여 기술된 킬 레이트화 효과 중 적어도 일부를 가지는 것으로 예측될 것임이 예측된다. 그러므로, 투여 전에 킬레이트 복합체 로서 이중 가닥 ON을 제조하는 것이 유리할 것이다.

[0150] 실시예 X

[0151] ON 킬레이트 복합체는 피하로 투여된 올리고뉴클레오타이드의 주사 부위 반응을 억제할 수 있다

[0152] 인간 환자에서 피하로 투여된 올리고뉴클레오타이드로 인한, 심지어 면역자극 특성을 최소화하도록 크게 개선된 올리고뉴클레오타이드로 인한 주사 부위 반응(ISR)은 일반적이다. 피하 투여는 많이 농축된 올리고뉴클레오타이드 (전형적으로 > 100mg/ml)의 주사를 수반하므로, 주사 부위 주위에서 국소화된 킬레이트화 효과(칼슘 그러나 아 마도 또한 마그네슘과 같은 다른 2가 금속의 가능한 킬레이트화 효과)는 상당하여야 하며, 일상적으로 관찰되는 ISR에 기여할 수 있었다. 이러한 가정을 시험하기 위하여, REP 2055(서열번호 6) 또는 REP 2139(서열번호 13, 모든 리보스가 2' O 메틸화되고 모든 시토신 염기가 5' 메틸화된 REP 2055 유사체)를 인간 환자에게 피하 투여 에 의하여 투여하였다. 2가지 용액 모두 생리 식염수 중에서 나트륨 염 또는 칼슘 킬레이트 복합체로서 무균으 로 제조하였다(표 7 및 8을 참조하고 실시예 VIII의 절차를 따름). 환자 대 환자 변화에 대하여 제어하기 위하 여, 각각의 ON의 모든 제형을 동일한 인간 개체에서의 주사 반응성에 대하여 평가하였다. 개체를 REP 2055(서열 번호 6) 투여 후 12시간 동안, 그리고 REP 2139(서열번호 13) 투여 후 72시간 동안 각각의 주사 부위에서 ISR에 대하여 모니터링하였다. 이러한 실험의 결과는 표 7 및 8에 제시되어 있다.

표 7

칼슘 킬레이트 복합체로서 REP 2055(서열번호 6)의 제조에 의한 REP 2055의 주사 부위 반응성의 억제(1cc 볼루스 주사, 20mg CaCl ₂ / 100mg ON)				
인간 개체	주사 부위 반응 25mg REP 2055(서열번호 6); 주사 후 12시간)			
	25mg REP 2055 (나트륨 염)	25mg REP 2055 (Ca 킬레이트)	100mg REP 2055 (Ca 킬레이트)	
1	경결: +++, 염증: +++, 압통: ++, 통증: ++	경결: 없음 염증: 없음 압통: 없음 통증: 없음	경결: + 염증: 없음 압통: 없음 통증: 없음	
2	경결: +++, 염증: +++, 압통: +++, 통증: +++	평가되지 않음		경결: + 염증: ++ 압통: 없음 통증: 없음

표 8

칼슘 킬레이트 복합체로서 REP 2139(서열번호 13)의 제조에 의한 REP 2139의 주사 부위 반응성의 억제 (2cc 볼루스 주사, 30mg CaCl ₂ / 100mg ON)							
인간 개체	주사 부위 반응 100mg REP 2139(서열번호 13)						
	ISR 부작용	24시간		48시간		72시간	
		나트륨 염	칼슘 킬레이트	나트륨 염	칼슘 킬레이트	나트륨 염	칼슘 킬레이트

1	경결	++	-	++	-	+	-
	염증	++	+	++	-	+	-
	압통	+	-	+	-	-	-
	통증	+	-	-	-	-	-
2	경결	++	+	++	+/-	+	-
	염증	+++	+	++	+/-	+	-
	압통	+	-	+/-	-	-	-
	통증	+	-	+/-	-	+/-	-

[0155]

이들 결과는 칼슘 킬레이트 복합체로서 ON의 투여는 실질적으로 2가지의 상이한 피하로 투여된 ON으로 인한 ISR을 감소 또는 제거한다는 것을 입증한다. 이들 결과는 ON에 의한 칼슘(및 잠재적으로는 기타 다른 2가 금속)의 킬레이트화는 ON의 피하 투여와 전형적으로 연관된 ISR의 징후에서 역할을 하는 것임을 추가로 입증한다. 또한, 이들 결과는 킬레이트 복합체로서 상기 ON의 투여를 실험함으로써 임의의 피하로 투여된 ON으로 인한 ISR의 예방 방법을 확인한다. 이들 실시예에서, 칼슘을 킬레이트 복합체 형성을 위한 비히클로서 사용하였지만 ISR의 경감은 또한 칼슘 이외의 다른 적절한 2가 금속으로 제조된 ON 킬레이트 복합체와 함께 일어나는 것으로 예측될 것이다. 임의의 ON 금속 킬레이트 복합체는 킬레이트 복합체로서 투여될 때 ON의 SC 내약성의 개선을 위하여 기본적인 기작일 것인 중성화된 칼슘을 킬레이트화하는 것에 대한 경향을 가지는 것으로 예측될 것이다. 올리고뉴클레오타이드-유도 ISR을 억제하는 ON 킬레이트 복합체의 능력은 본원의 실시예에 개시된 ON 킬레이트 복합체 형성의 광범위하게 보존된 성질을 고려하여 임의의 특이적인 서열의 임의의 ON 및/또는 개질 또는 단일 또는 이중 가닥 ON에 대하여 효과적인 것으로 예측된다. 본 실시예에서 예시적인 2가 금속으로서 칼슘을 사용하여 기타 다른 칼슘 염은 ON 킬레이트 복합체의 제조에서 사용될 수 있었으며, 이에 제한되는 것은 아니지만 칼슘 글루코네이트, 칼슘 시트레이트, 칼슘 락테이트, 칼슘 말레이트, 칼슘 아스파테이트, 칼슘 푸마레이트, 칼슘 아스코베이트, 칼슘 벤조에이트, 칼슘 에리소베이트, 및/또는 칼슘 프로피온에이트를 포함하는 피하 투여로 인하여 올리고뉴클레오타이드-매개 ISR에 대하여 동일한 억제 영향을 미치는 ON 킬레이트 복합체를 생성하는 것으로 예측될 수 있었다. ON 킬레이트 복합체는 기타 다른 2가 금속 양이온, 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니지만 마그네슘, 망간, 철, 구리, 아연의 염과 함께 제조될 수 있었다.

[0156]

ON 킬레이트 복합체의 제조에 있어서, 2가 원자가 아니지만 올리고뉴클레오타이드의 킬레이트화 효과를 유사하게 방지할 수 있는 기타 다른 양이온을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이들 양이온과 함께 제조되는 ON 킬레이트 복합체는 또한 ON에 의한 항응고를 억제하거나 피하로 투여될 때 ON으로 인한 주사 부위 반응을 억제하거나 ON 투여 후 생물학적으로 중요한 2가 금속의 격리를 방지하는 제형에 사용될 수 있다. 이러한 반대 이온은 제한없이 3+ 이상의 하전 상태 또는 유기 양이온의 원자를 포함할 수 있다.

[0157]

ON 킬레이트 복합체의 제조에 있어서, 2가 양이온의 혼합물을 사용하여(즉, 칼슘 및 마그네슘 염을 이용하여) ON 킬레이트를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 혼합된 ON 킬레이트는 단일의 2가 양이온을 이용하여 제조된 킬레이트보다 제조하기 더 용이하고 용해도가 더 클 수 있으며, 따라서 고농도 적용에 보다 더 적합할 것이다.

[0158]

다양한 ON 서열을 사용하는 상기 실시예를 고려해볼 때, 다양한 개질을 가지고 단일 가닥 또는 이중 가닥 상태에서 그리고 다양한 2가 금속을 사용하여, ON 킬레이트화 복합체의 형성은 기타 다른 개질에 관계없이 포스포다이에스터 주쇄(포스포로티오에이트화가 있던 없던)를 가지는 임의의 그리고 모든 ON의 보편적인 특징일 것으로 고려될 수 있다. 그래서, 혈액 또는 피하 공간에서 ON 킬레이트 복합체의 형성은 ON이 염(전형적으로 나트륨 염)으로서 투여될 때 정상적인 특성의 임의의 ON 투여이며, 이러한 킬레이트화의 2차 효과가 미지의 ON을 받은 구체적인 개체 집단에서 무증상일 수 있음에도 2가 금속 양이온의 격리를 가져온다. 중요하게도, 실시예 IX에서 관찰된 ISR과 유사한 (나트륨 염으로서) 피하 투여로 인한 ISR 반응을 명확하게 나타내는 ON의 여러 가지 실시예가 있으며(문헌[PRO-051 / GSK2402968 - Goemans et al., 2011 New England J. Med., 364: 1513-1522] 및 문헌[ISIS 301012 (mipomersen) - Viser et al., 2010, Curr. Opin. Lipidol. 21: 319-323]) 따라서 투여 후 ON 킬레이트 복합체 형성의 진단을 나타낸다. 이들 ON 모두가 상이한 서열 및 상이한 2' 리보스 개질을 가짐에도 불구하고, 이들은 모두 포스포다이에스터 주쇄(2가지 경우 모두에서 포스포로티오에이트화)를 가지며, 따라서 ON 킬레이트 복합체를 형성하고 국소적 환경으로부터 2가 금속을 격리(이 경우에는 피하 공간)시킬 수 있다. 게다가, 이들 ON 모두 ON 킬레이트화가 일어나야 함에도 상기 ON의 생물학적 효과를 발휘할 수 있는 것으로 나타났다. 그러므로 생물계에서 ON 킬레이트 복합체가 ON의 생물학적 활성을 방해하지 않는다.

[0159]

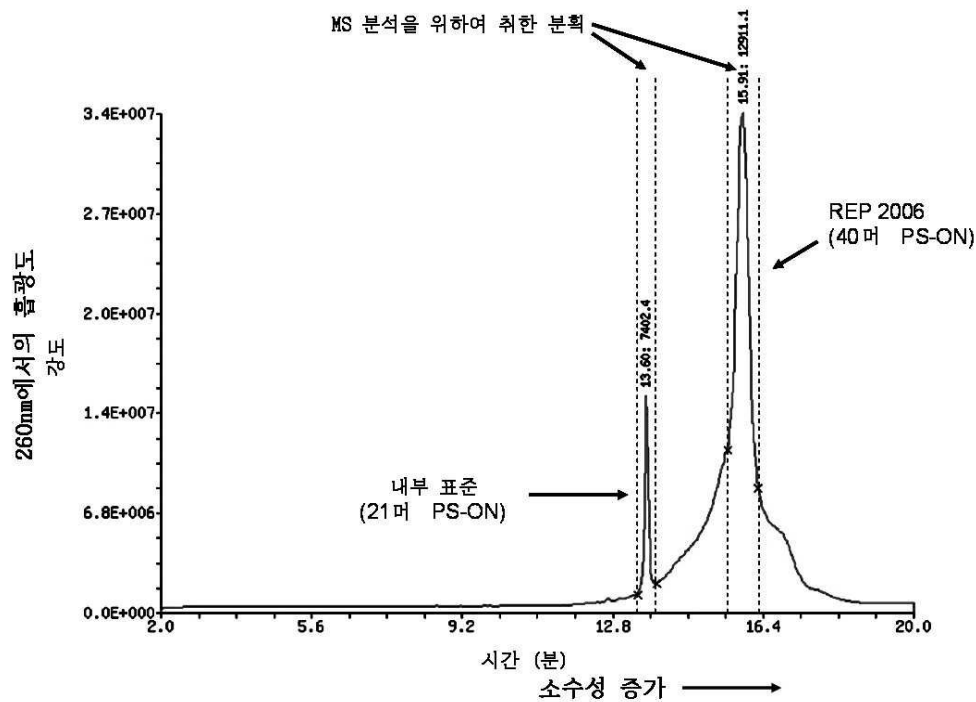
모든 포스포로티오에이트화 ON(뉴클레오타이드 서열과 관계없음)은 전형적으로 신장 및 간에서 가장 높은 약물 농도를 달성한다는 것이 당업계에서 널리 허용되고 잘 입증되어 있다. 역사적으로, 다수의 상이한 포스포로티오에이트화 ON의 만성적인 투여는 가벼운 간 또는 신장 기능장애와 연관되어 왔다. 일반적으로 ON의 보존된 킬레이트화 영향을 고려하여 이들 기능장애의 원인이 명백하게 해명되어 있지 않지만, 킬레이트화 활성이 존재하는 ON의 고농도로 인하여 이들 기관에서 가장 현저할 수 있으므로 만성적인 ON 투여로 인하여 간 및 신장에서 2가 금속의 킬레이트화가 상당할 것이다. 킬레이트 복합체로서 ON의 투여는 기관의 생체 내 분포를 변경하지 않을 것(또는 상기 나타낸 바와 같은 생물활성에 영향을 미치지 않을 것)이지만 이들 기관의 정상적인 기능에 영향을 미치는 간 및 신장에서 금속 결핍증을 방지하는 역할을 할 수 있다.

[0160]

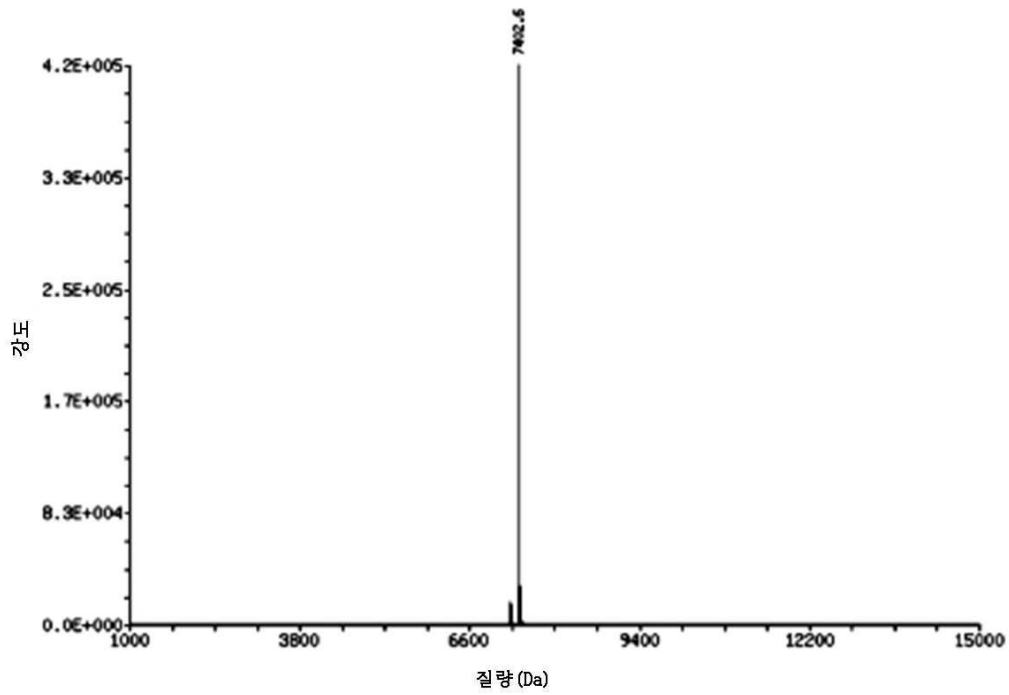
ON 킬레이트 복합체는 용액 중 다량체 ON 복합체의 형성을 가져오는 것을 고려하면, 이들 복합체는 뉴클레아제 분해에 대하여 그리고 가수분해에 대하여 잠재적으로 훨씬 더 큰 저항성을 가질 것이며, 포스포로티오에이트 ON은 또한 산화에 대하여 더 저항성일 수 있다. 그러므로, 킬레이트 복합체로서 임의의 ON의 저장은 개체에 투여될 때 킬레이트 복합체의 생물활성을 상당히 변경시키지 않고 수용액 중에서의 안정성을 크게 증가시킬 수 있다.

도면

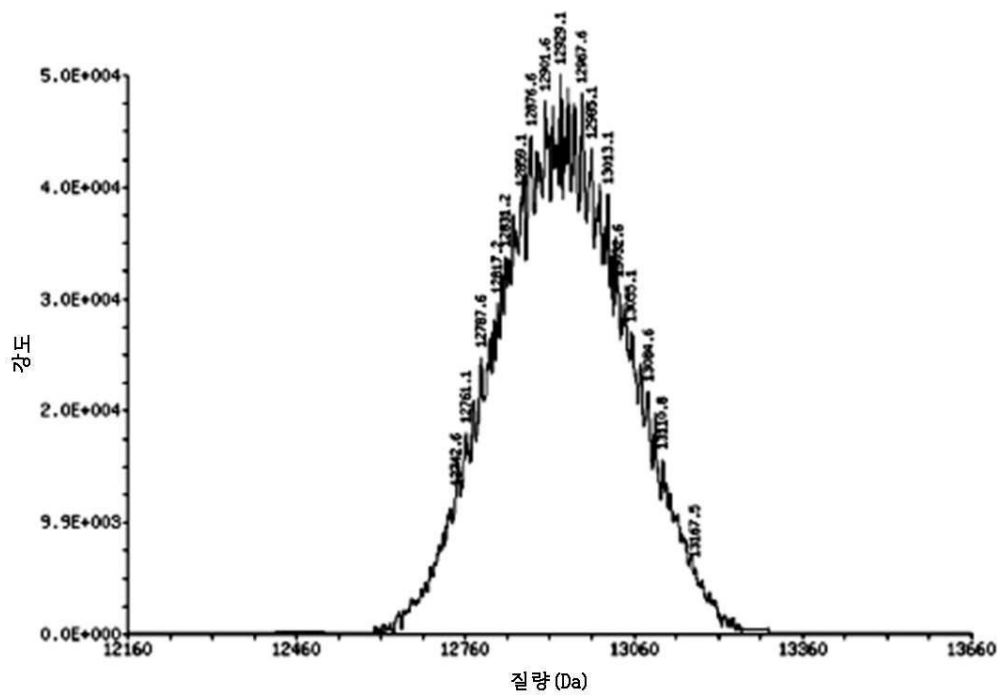
도면1a



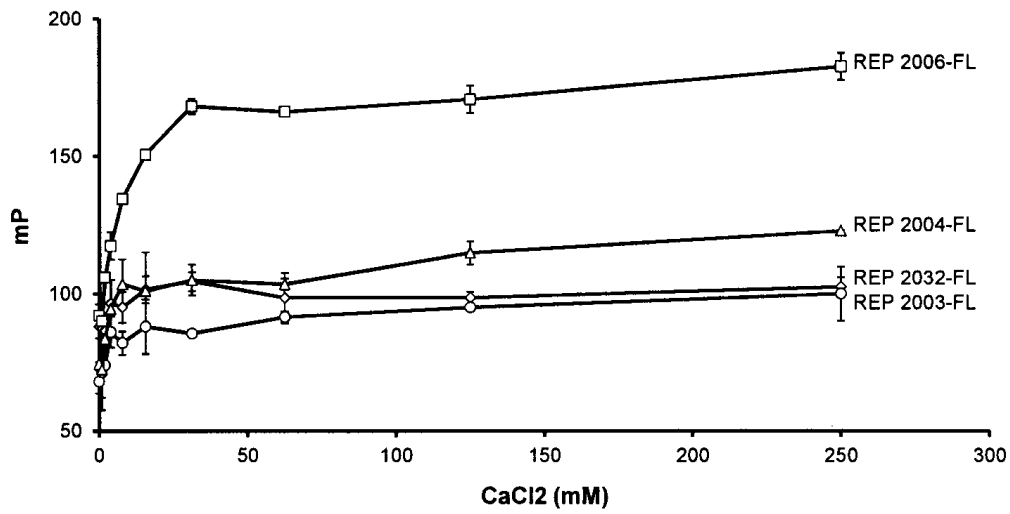
도면1b



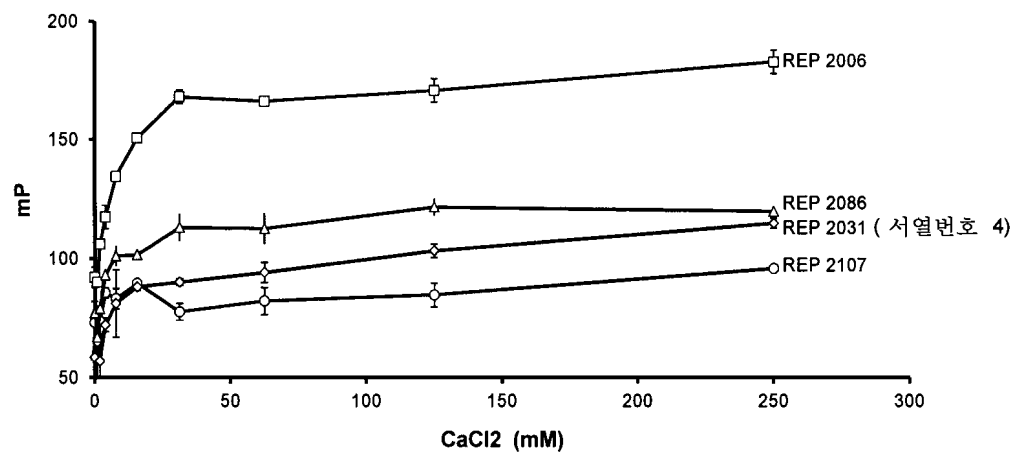
도면1c



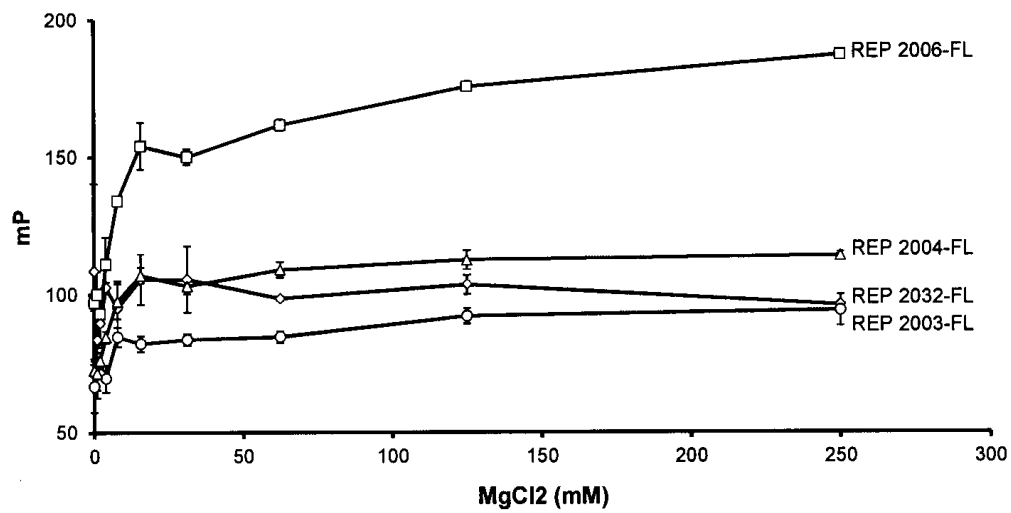
도면2a



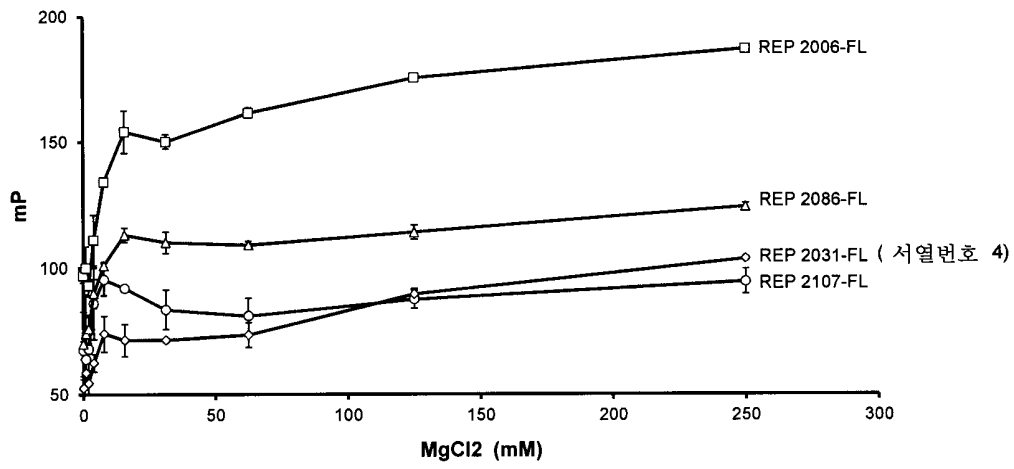
도면2b



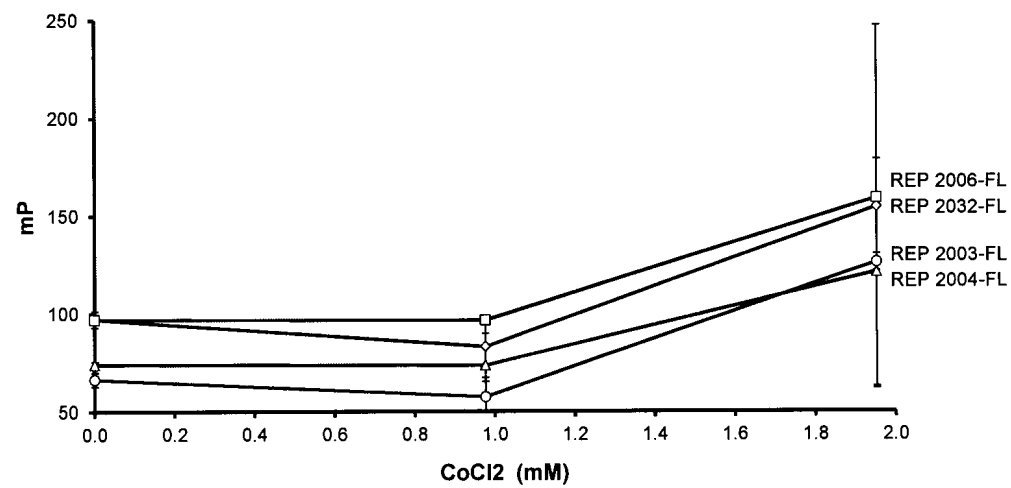
도면3a



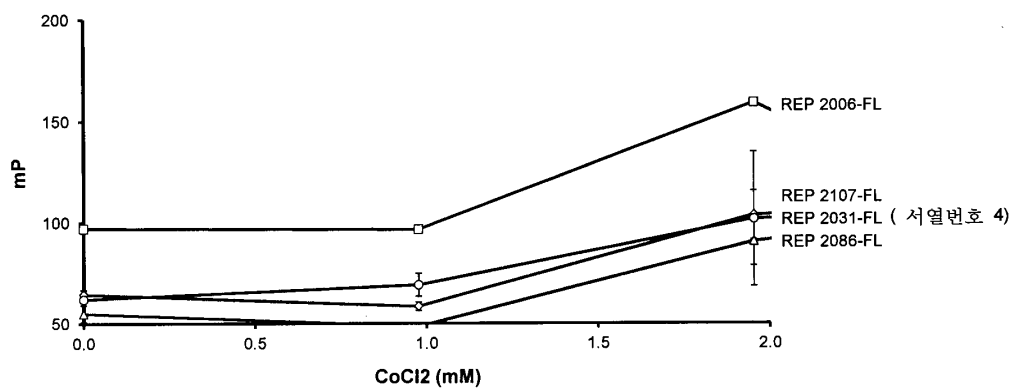
도면3b



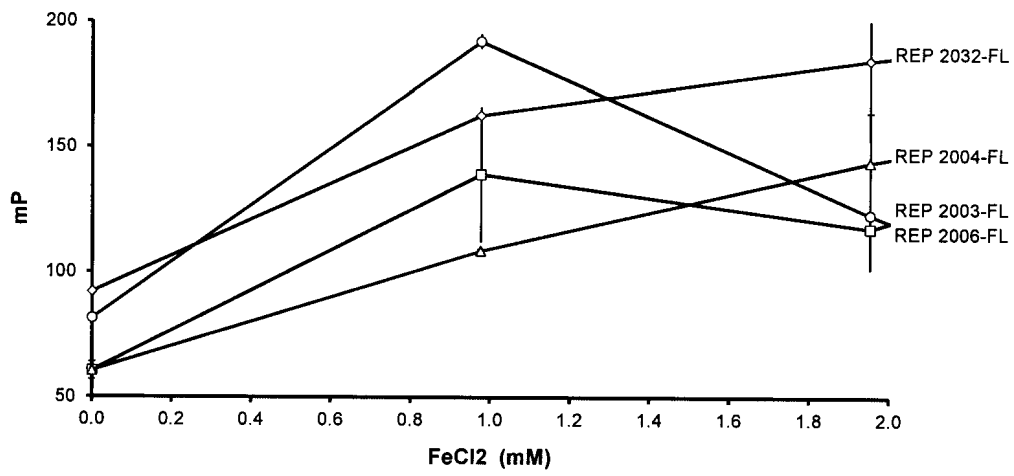
도면4a



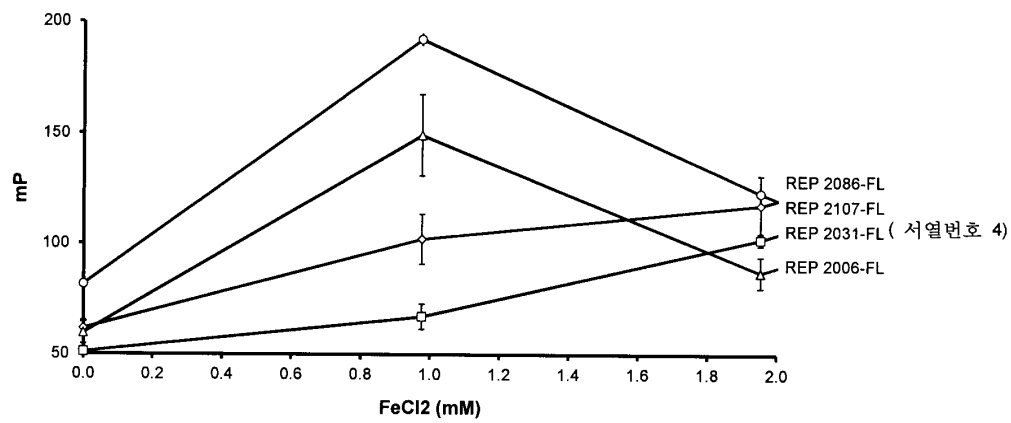
도면4b



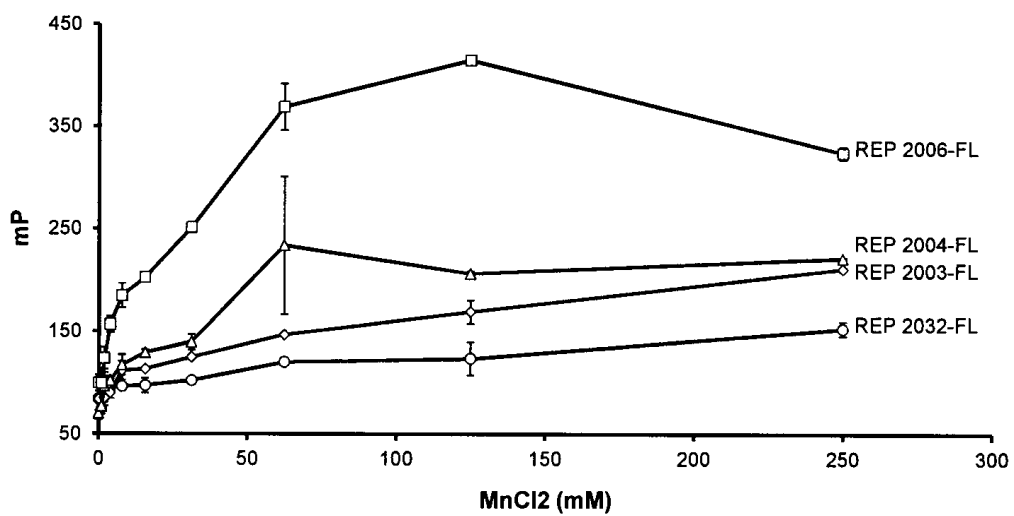
도면5a



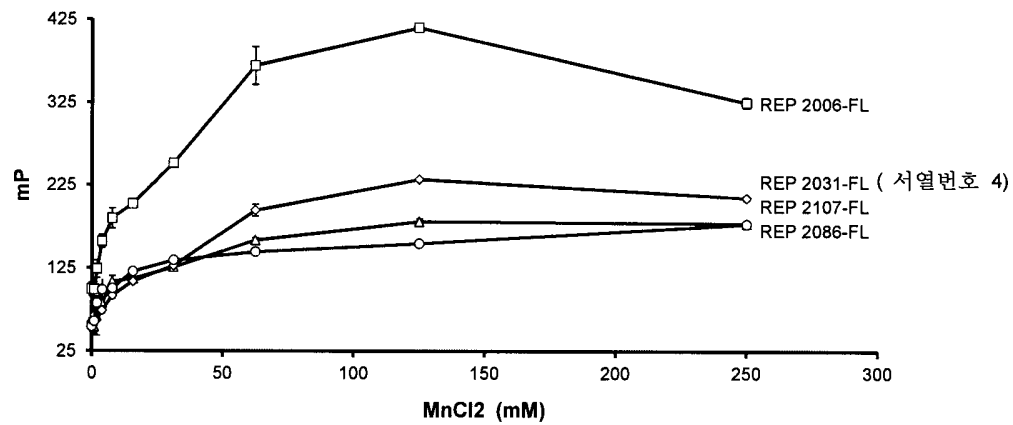
도면5b



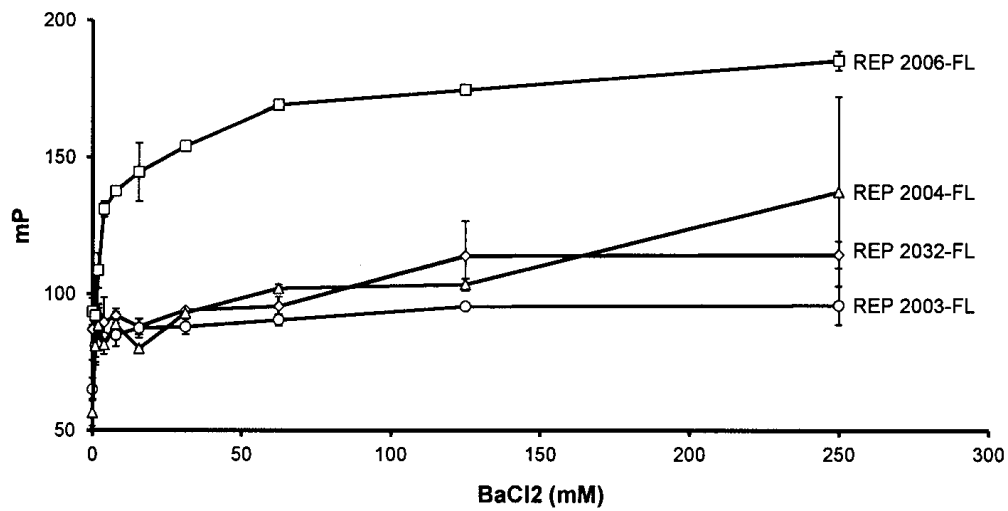
도면6a



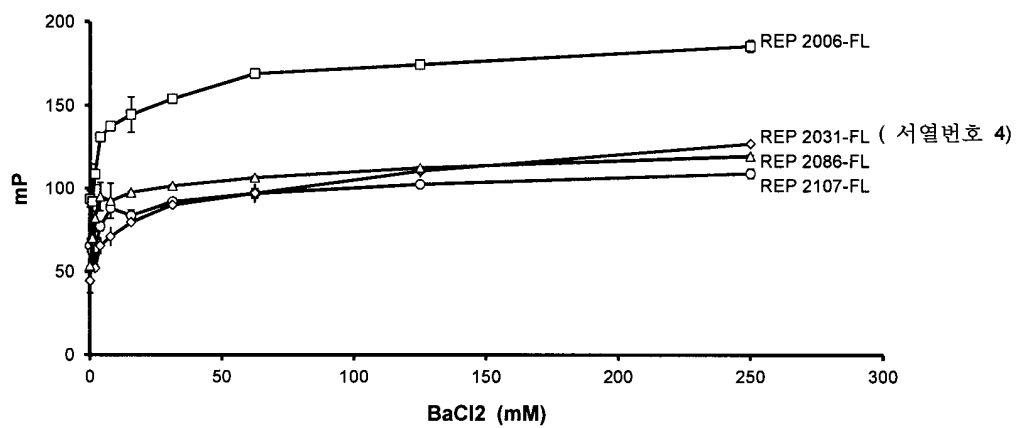
도면6b



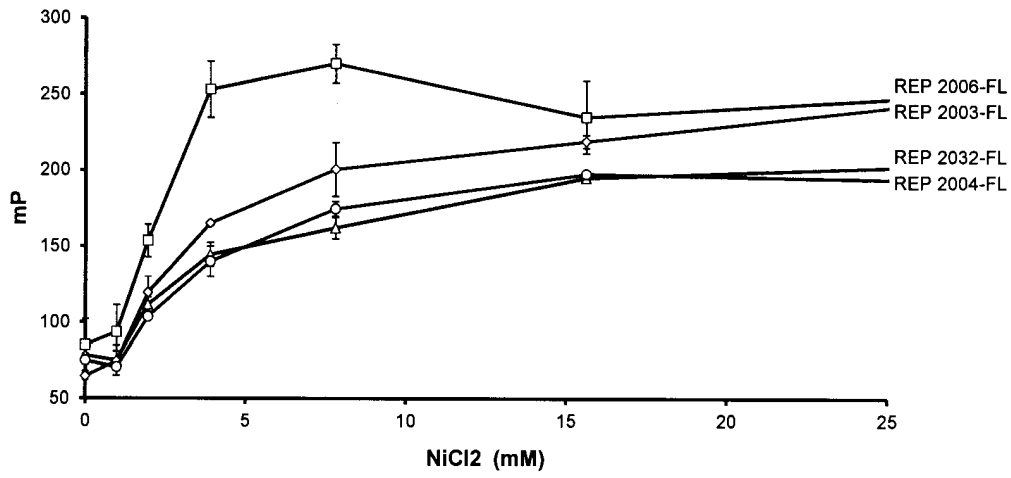
도면7a



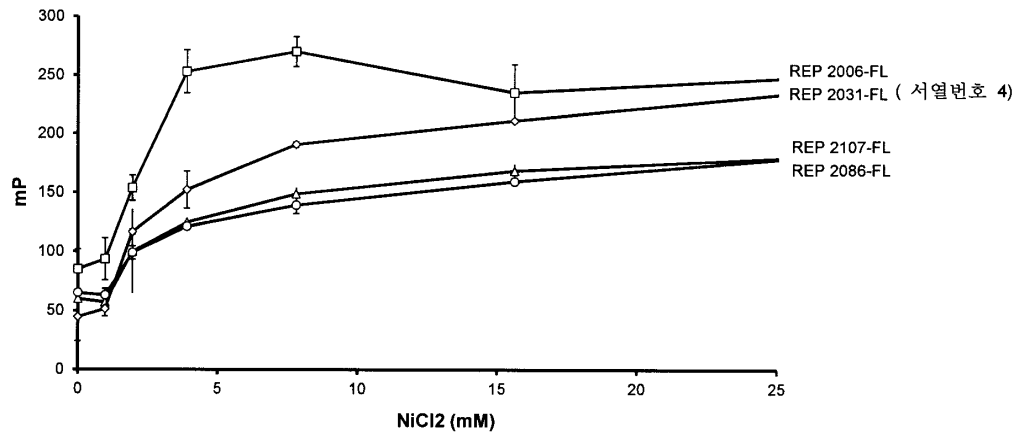
도면7b



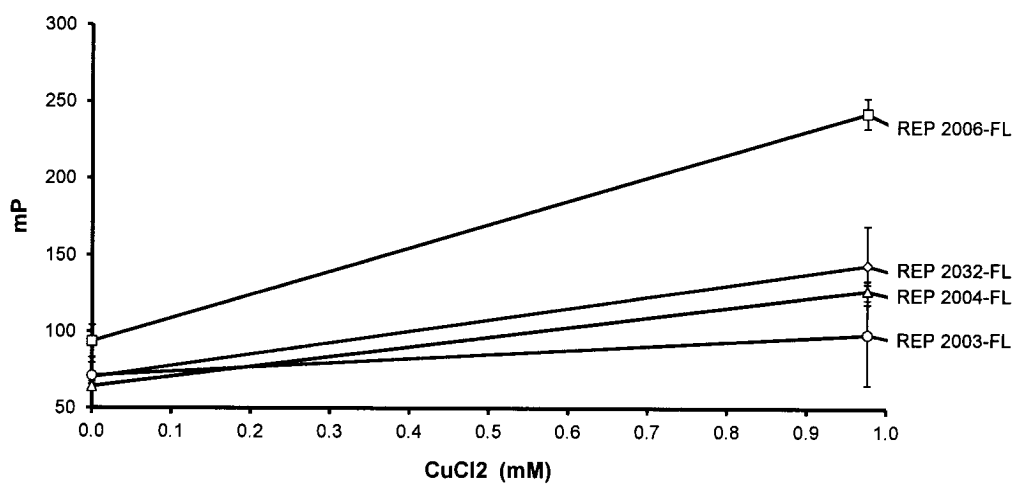
도면8a



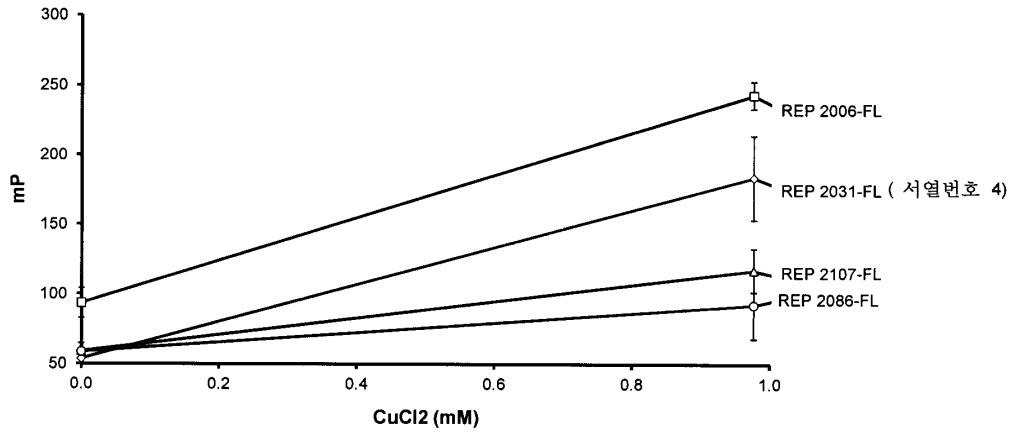
도면8b



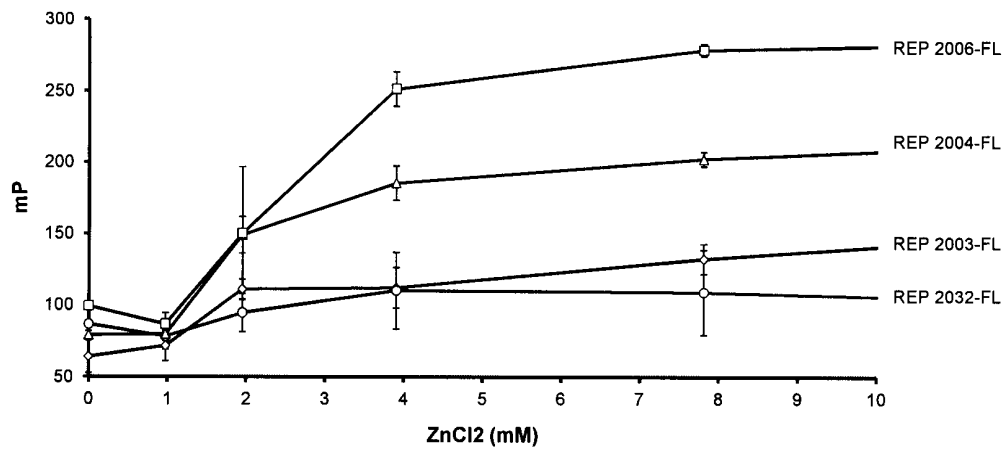
도면9a



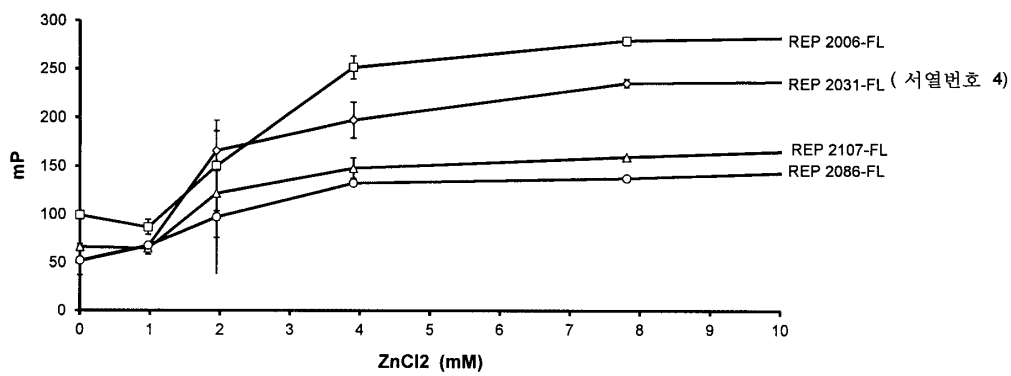
도면9b



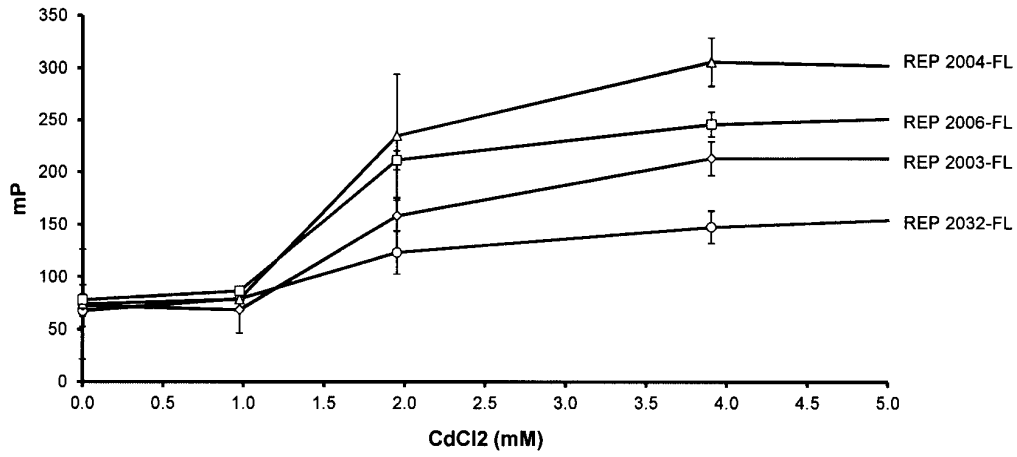
도면10a



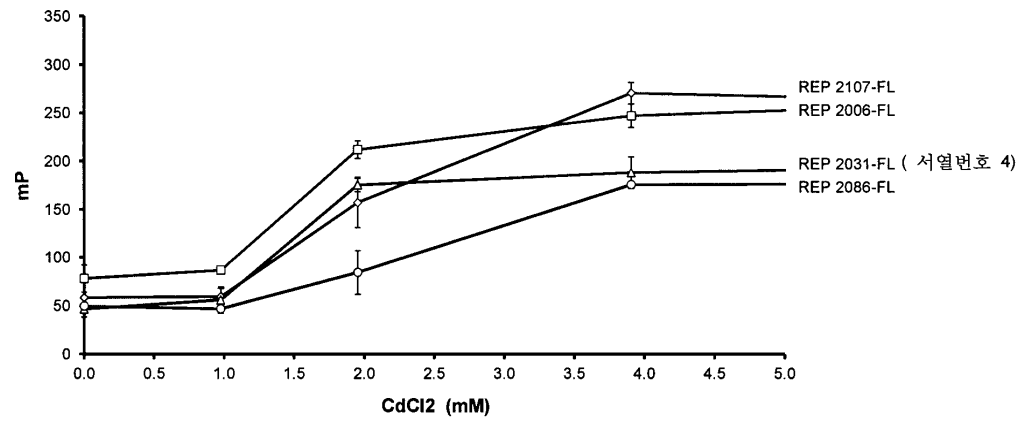
도면10b



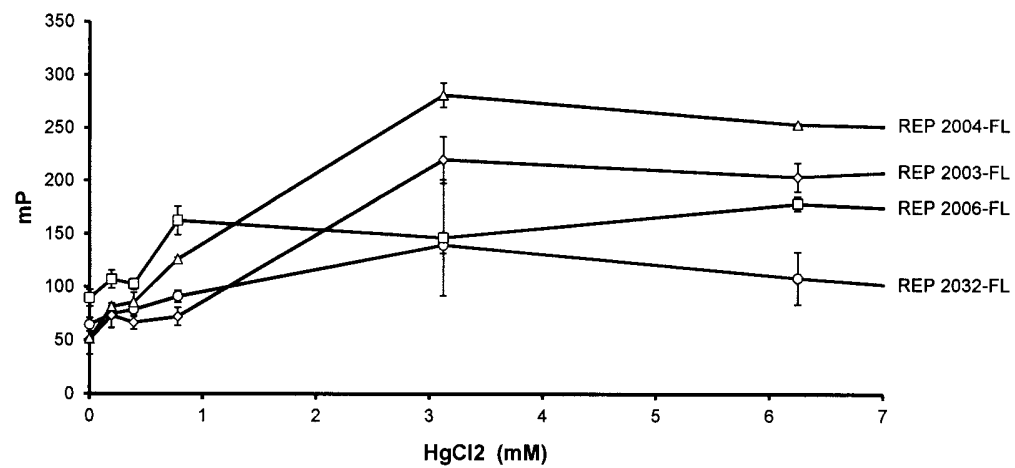
도면11a



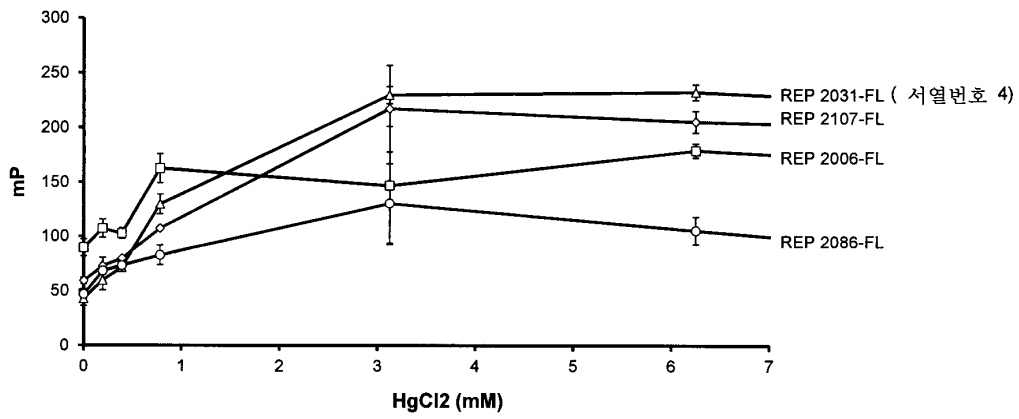
도면11b



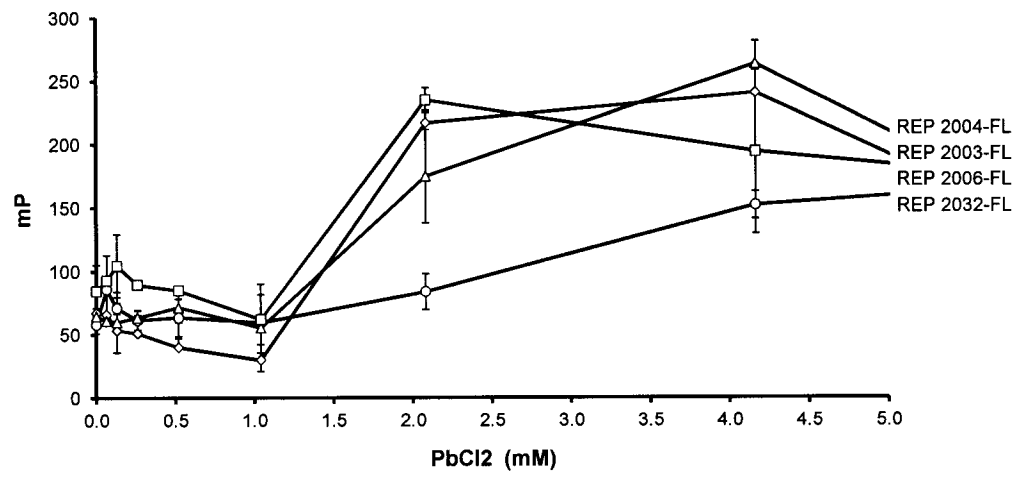
도면12a



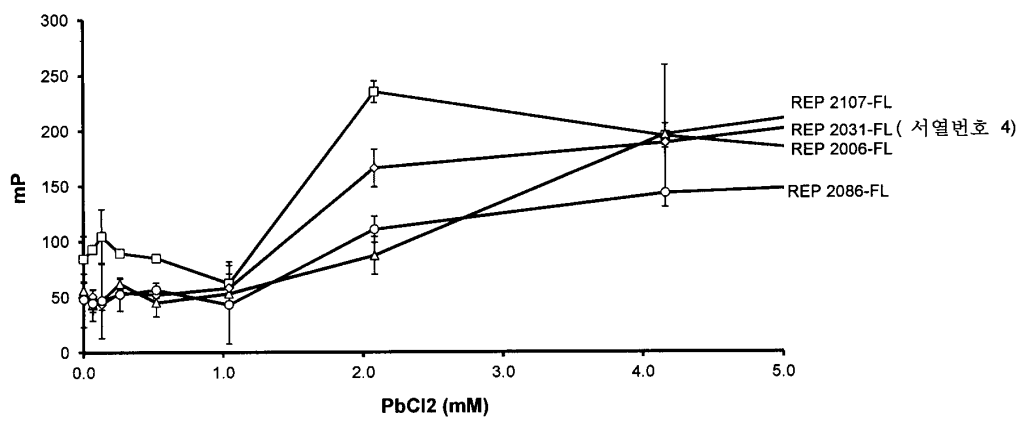
도면12b



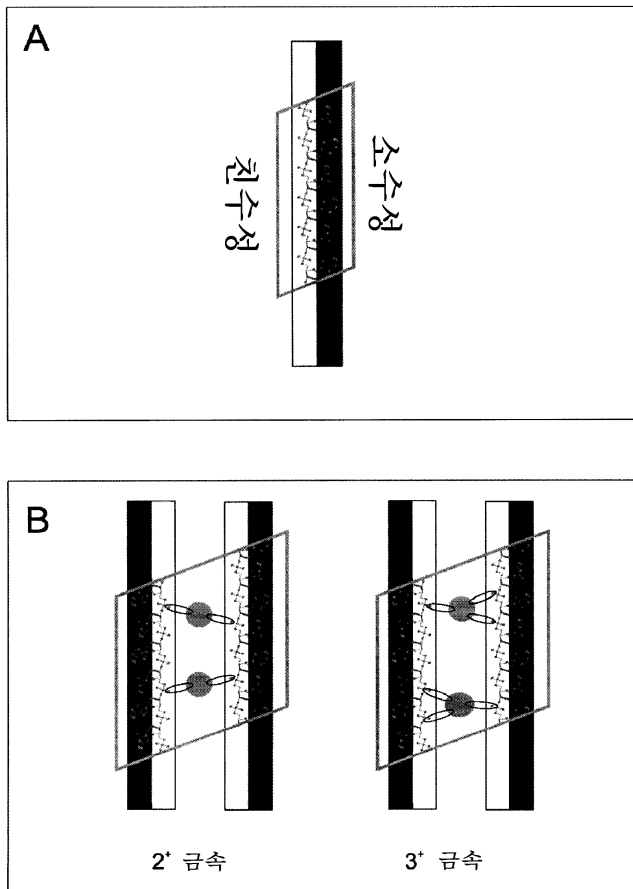
도면13a



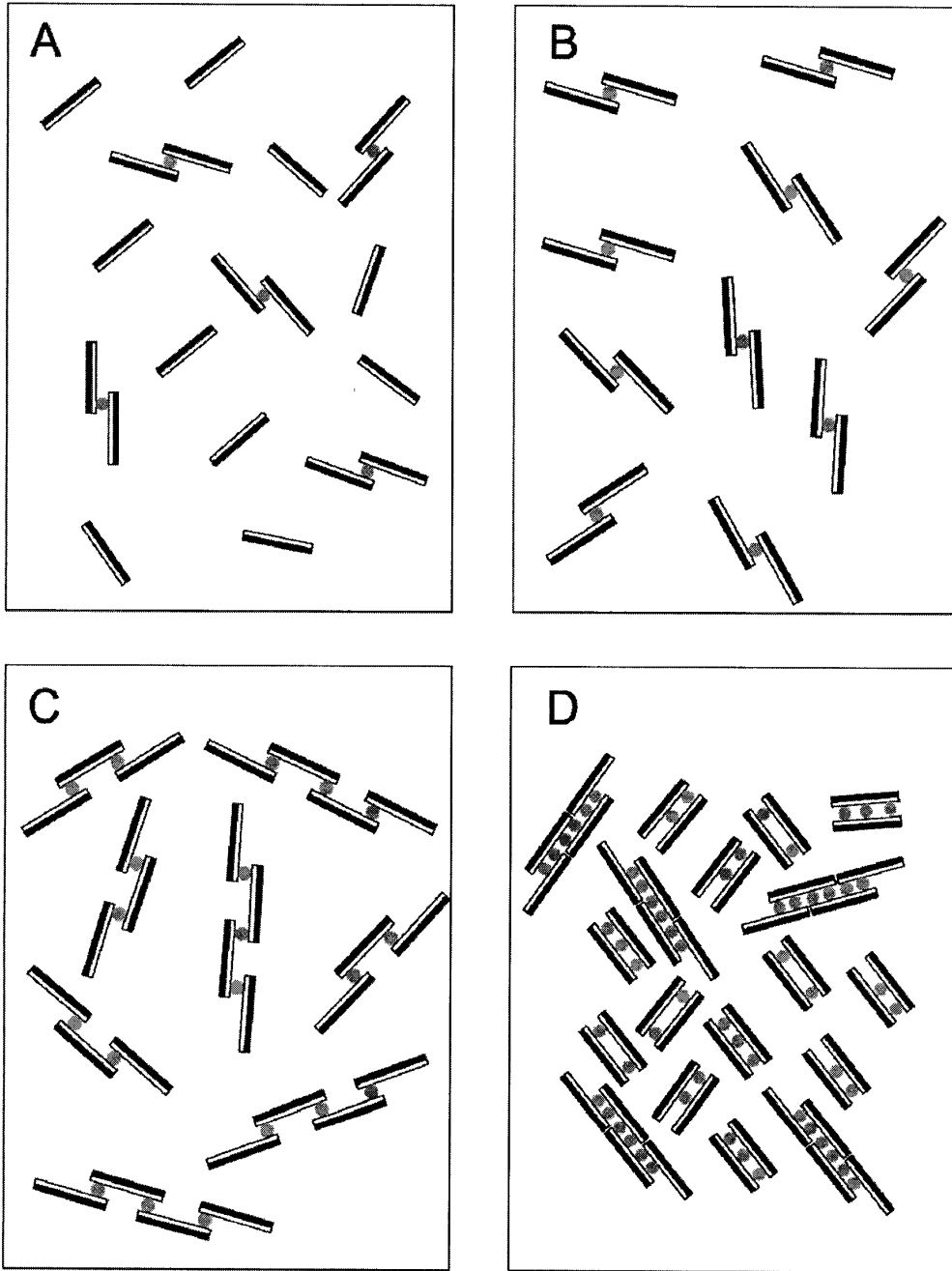
도면13b



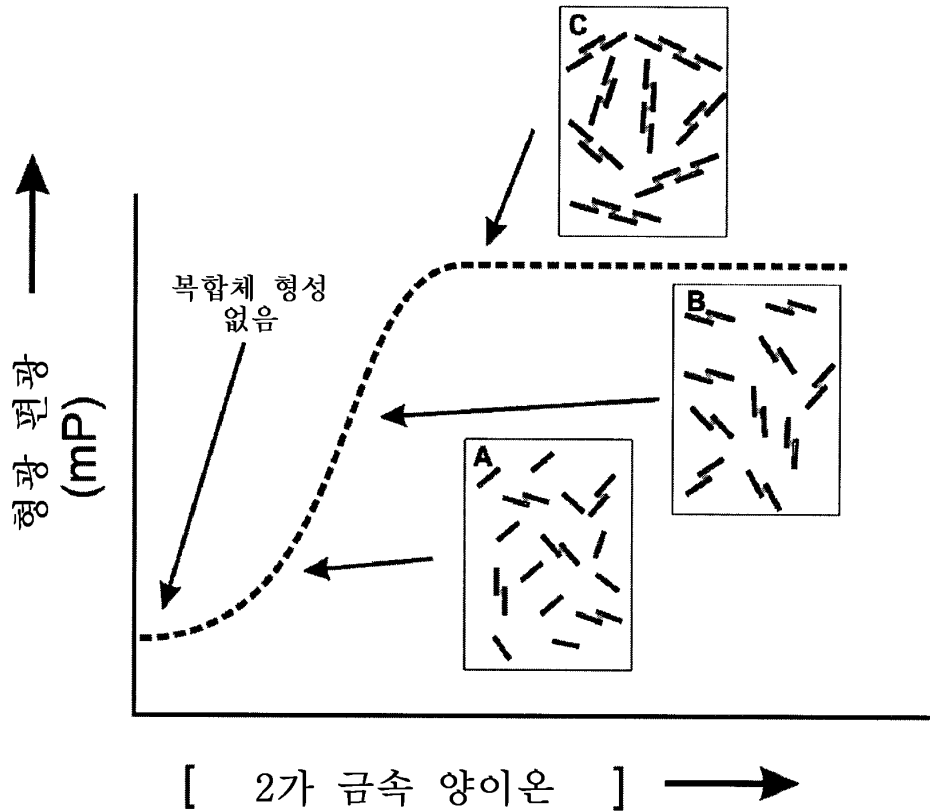
도면14



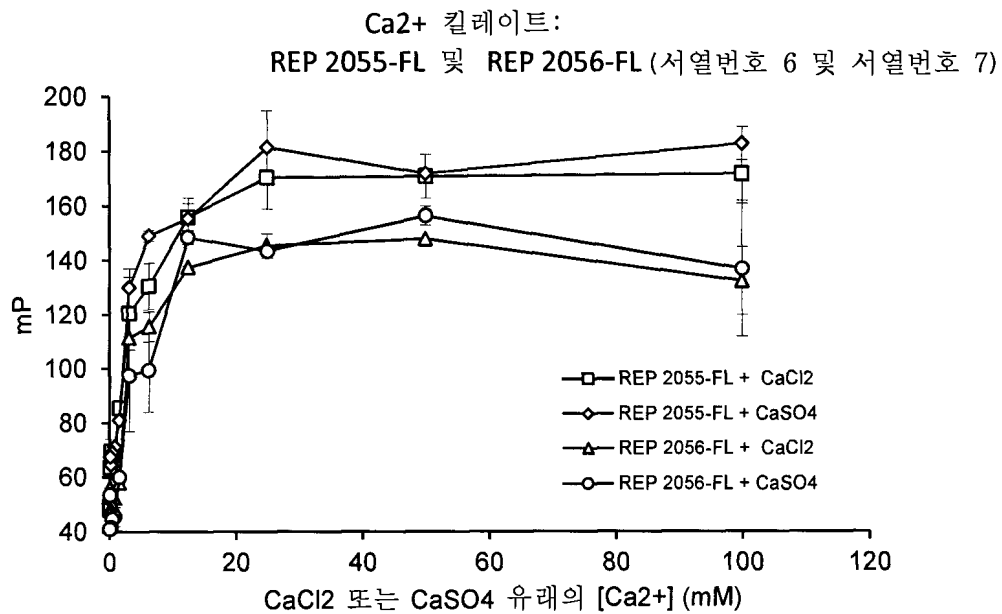
도면15



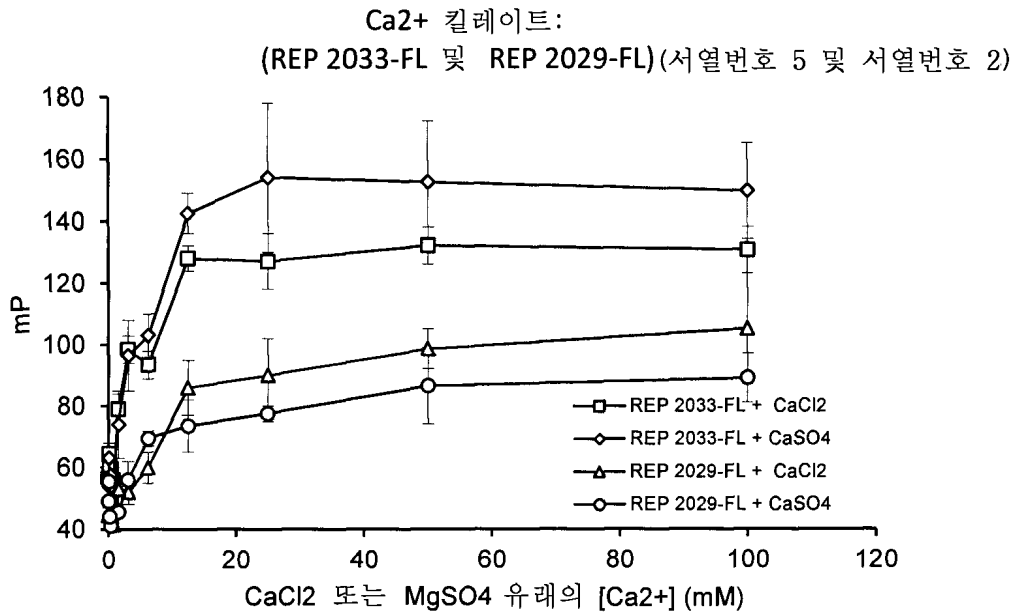
도면16



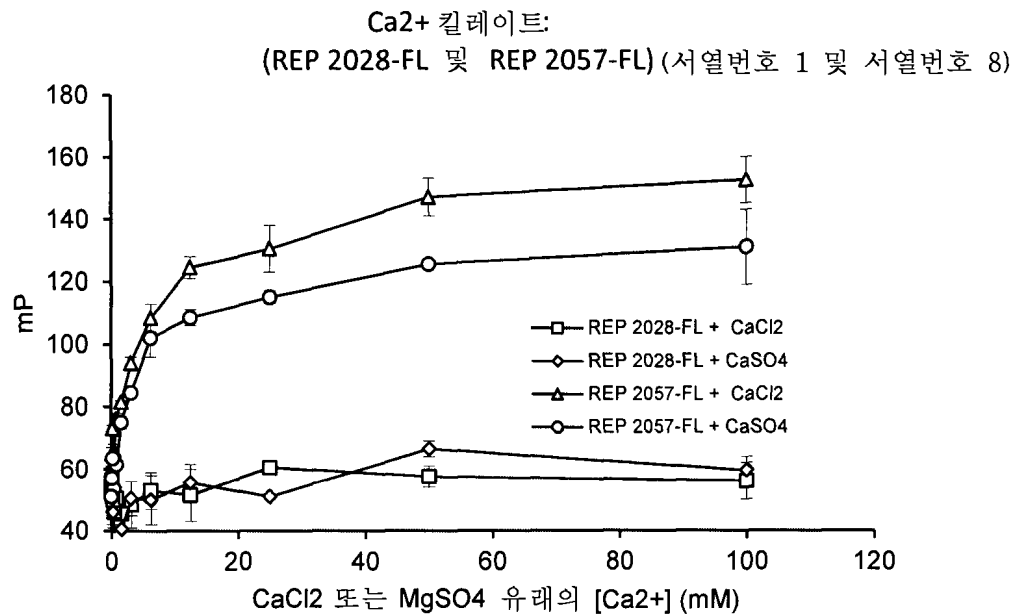
도면17a



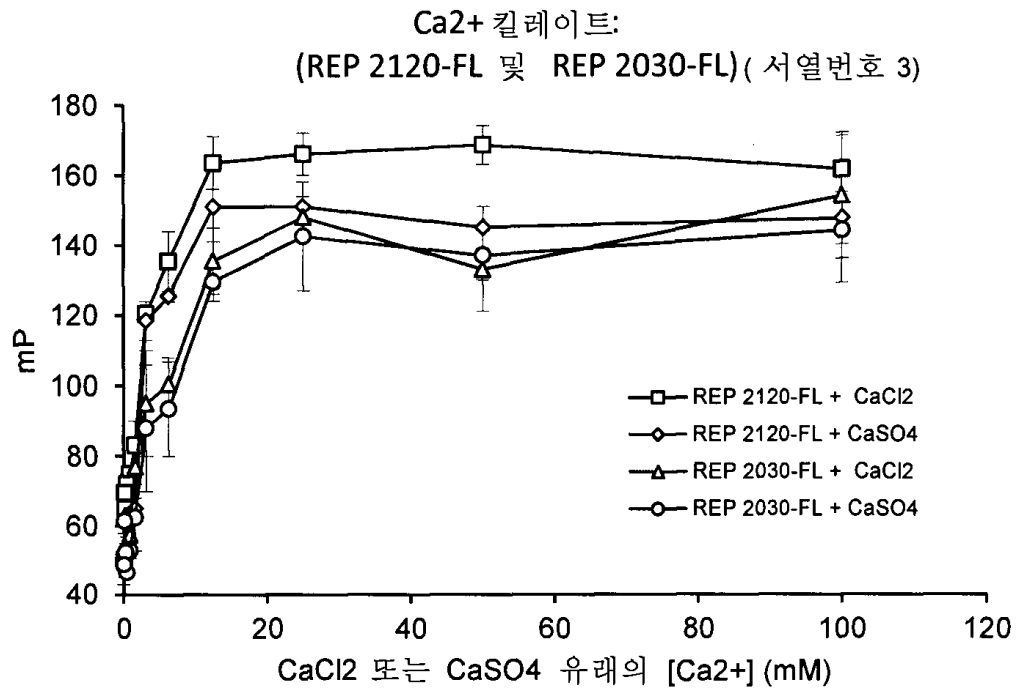
도면17b



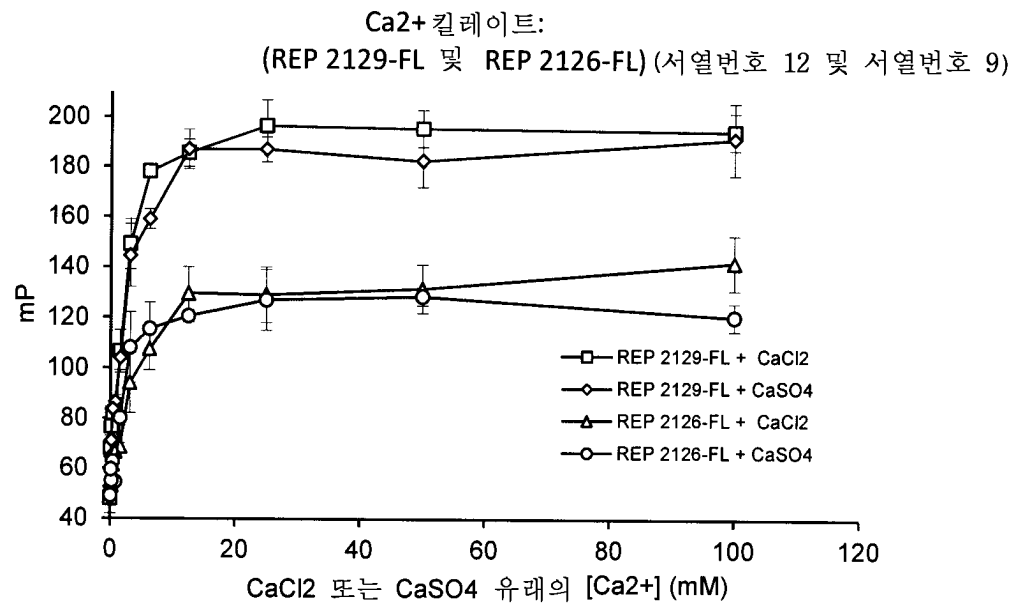
도면18a



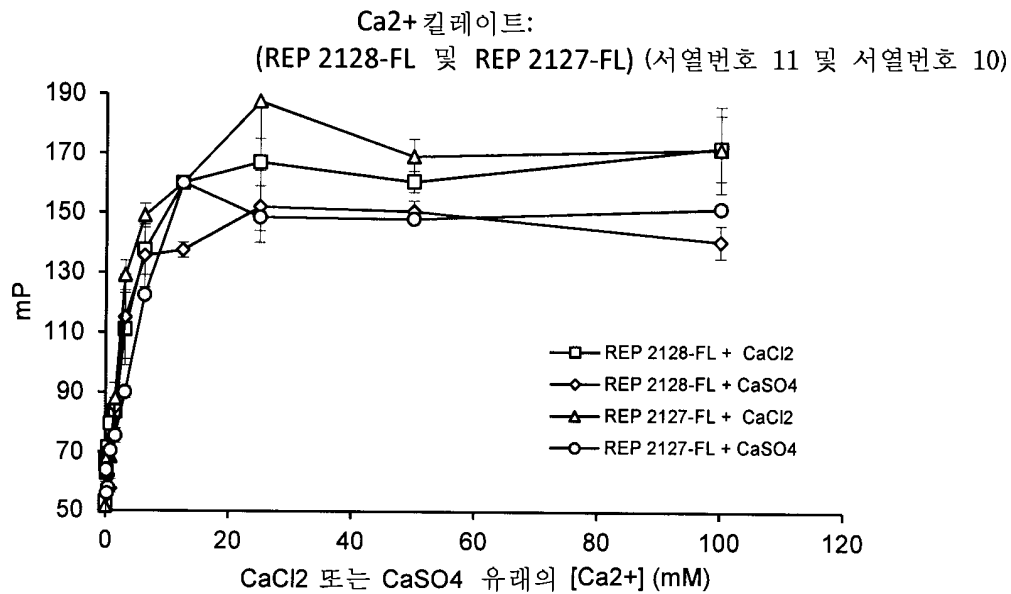
도면18b



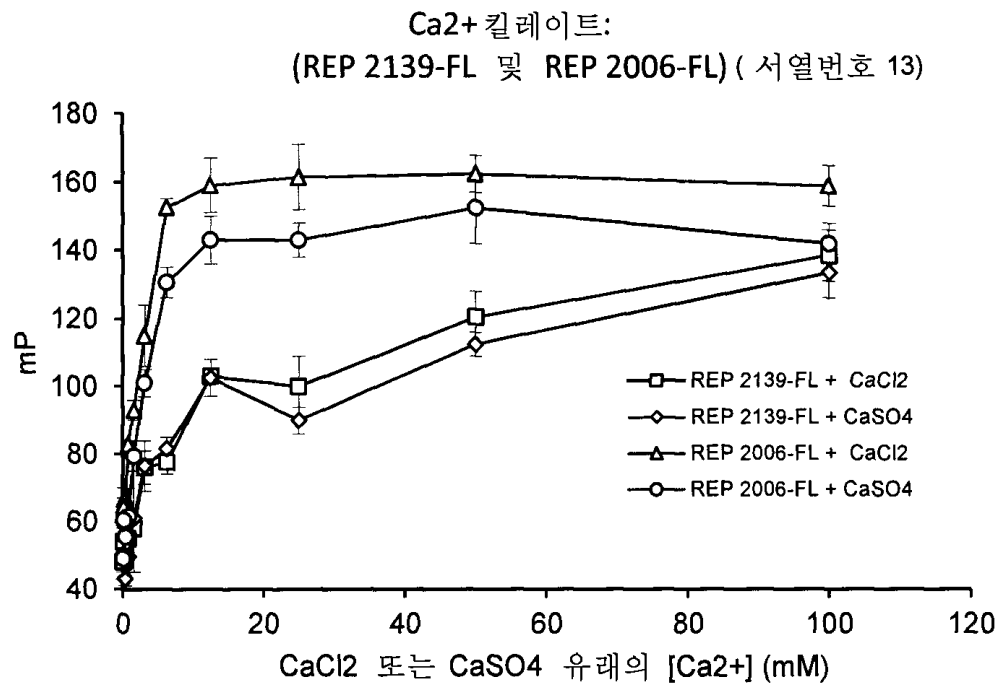
도면19a



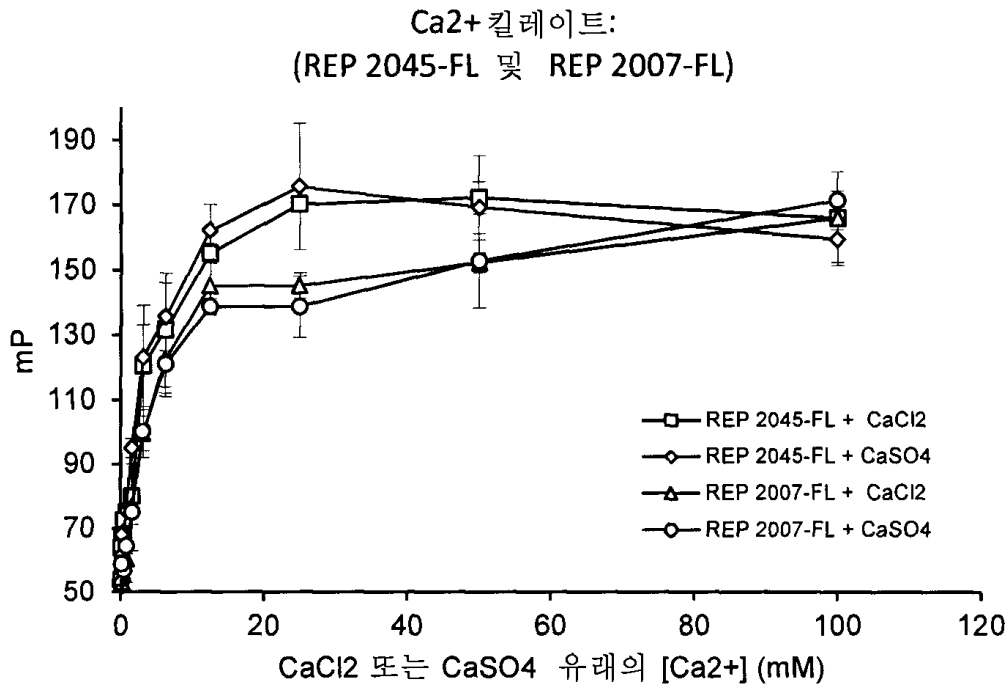
도면19b



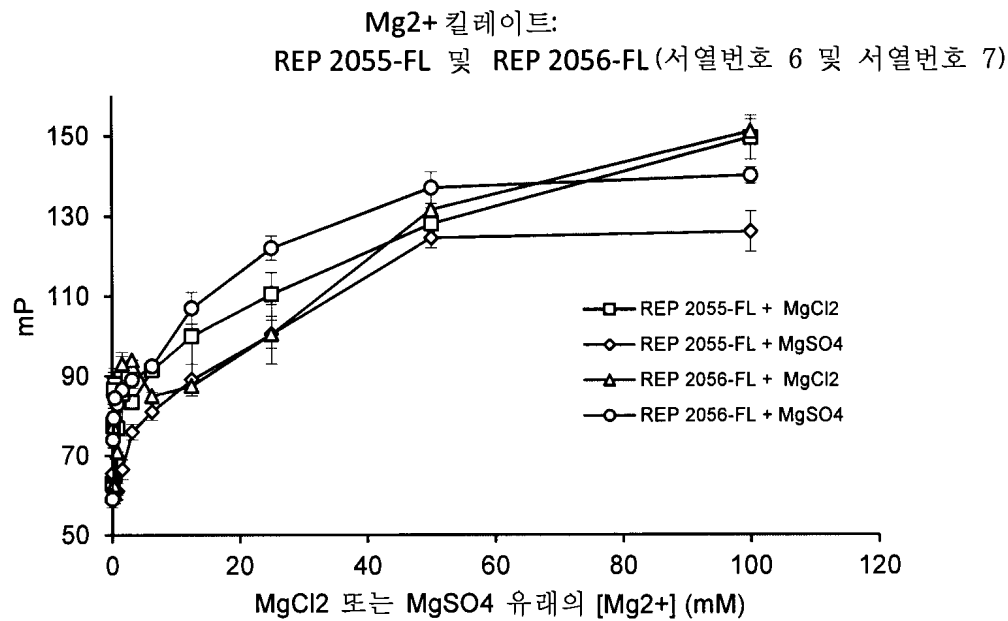
도면20a



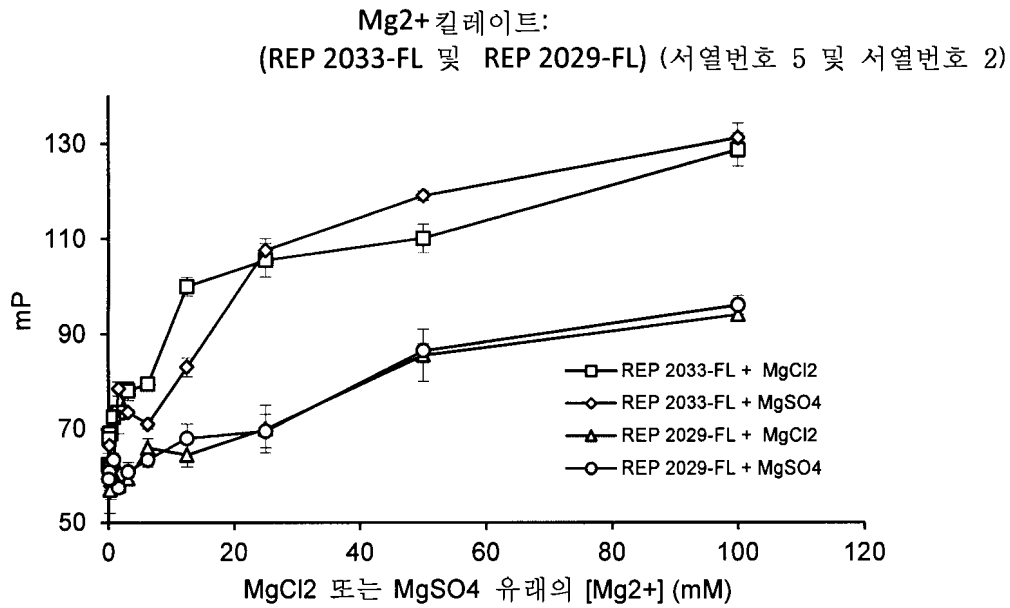
도면20b



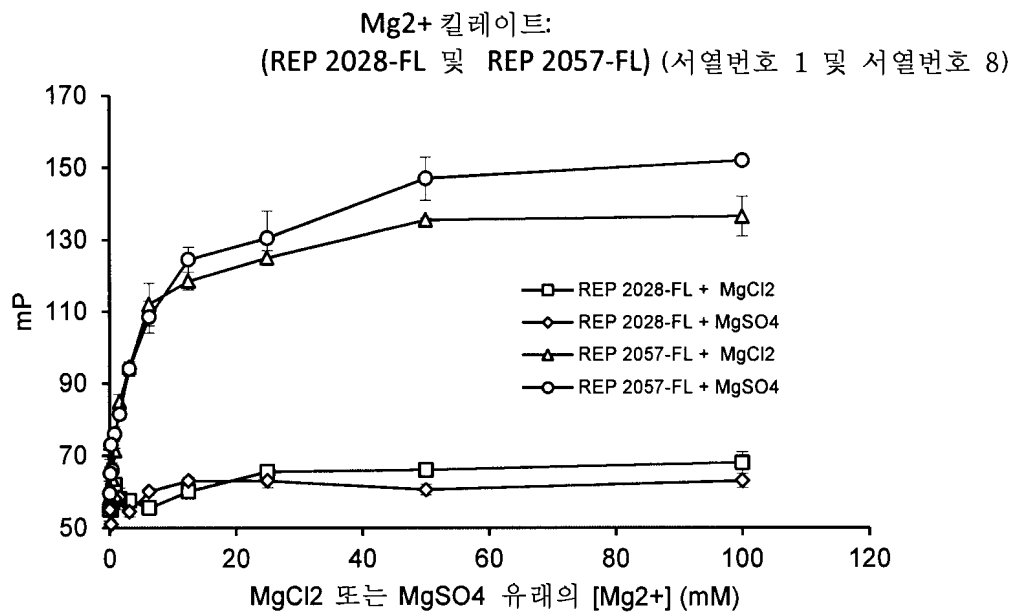
도면21a



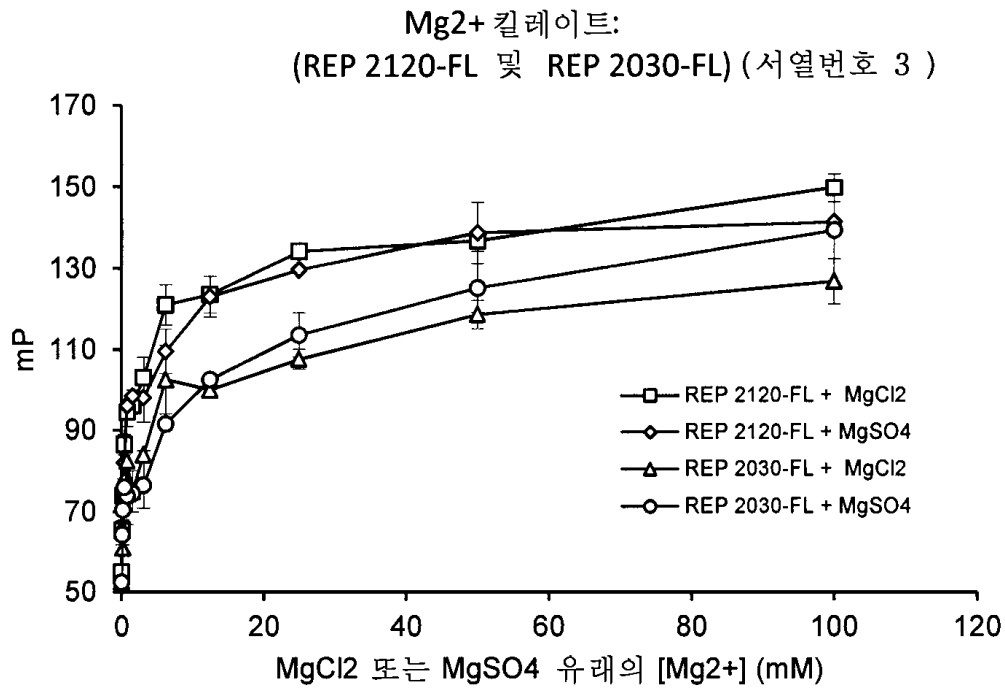
도면21b



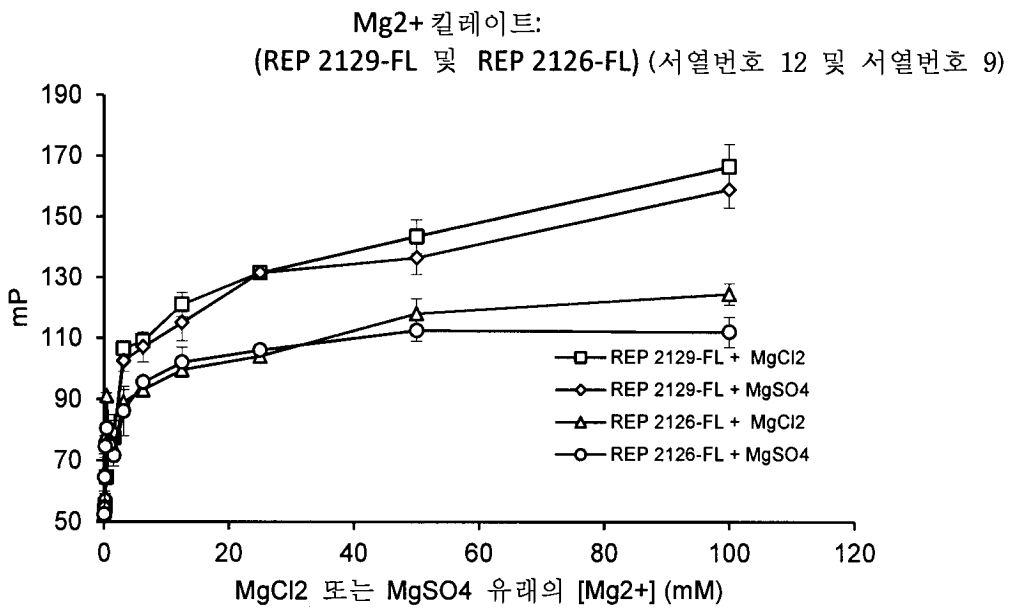
도면22a



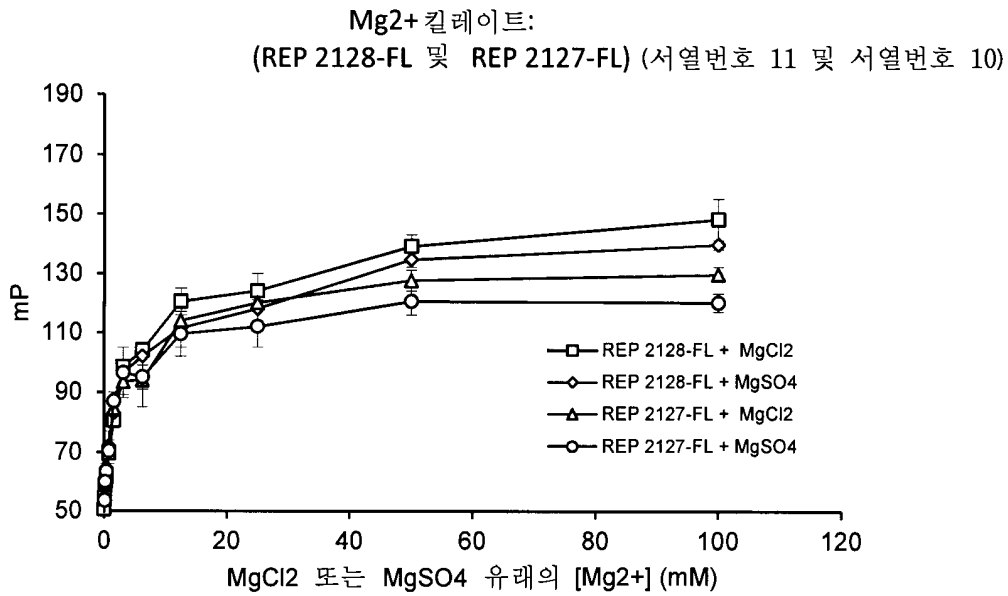
도면22b



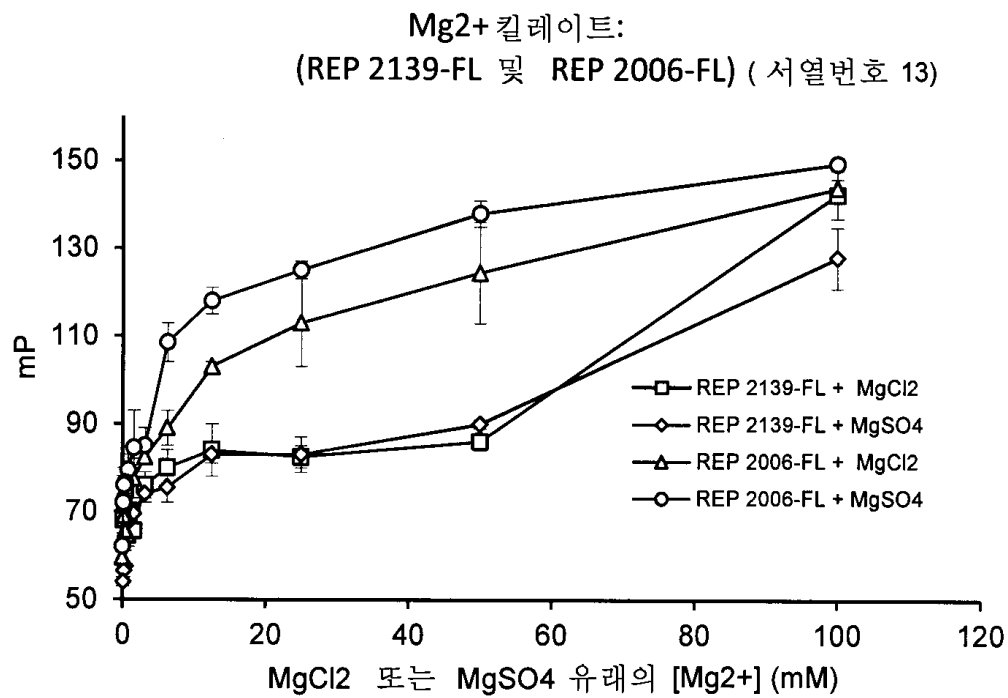
도면23a



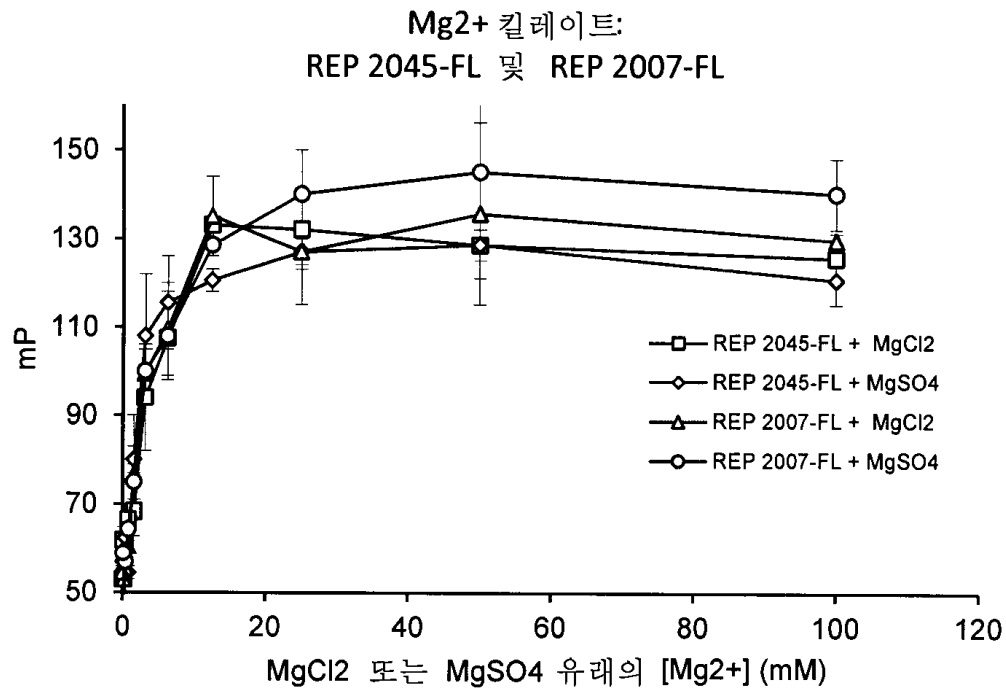
도면23b



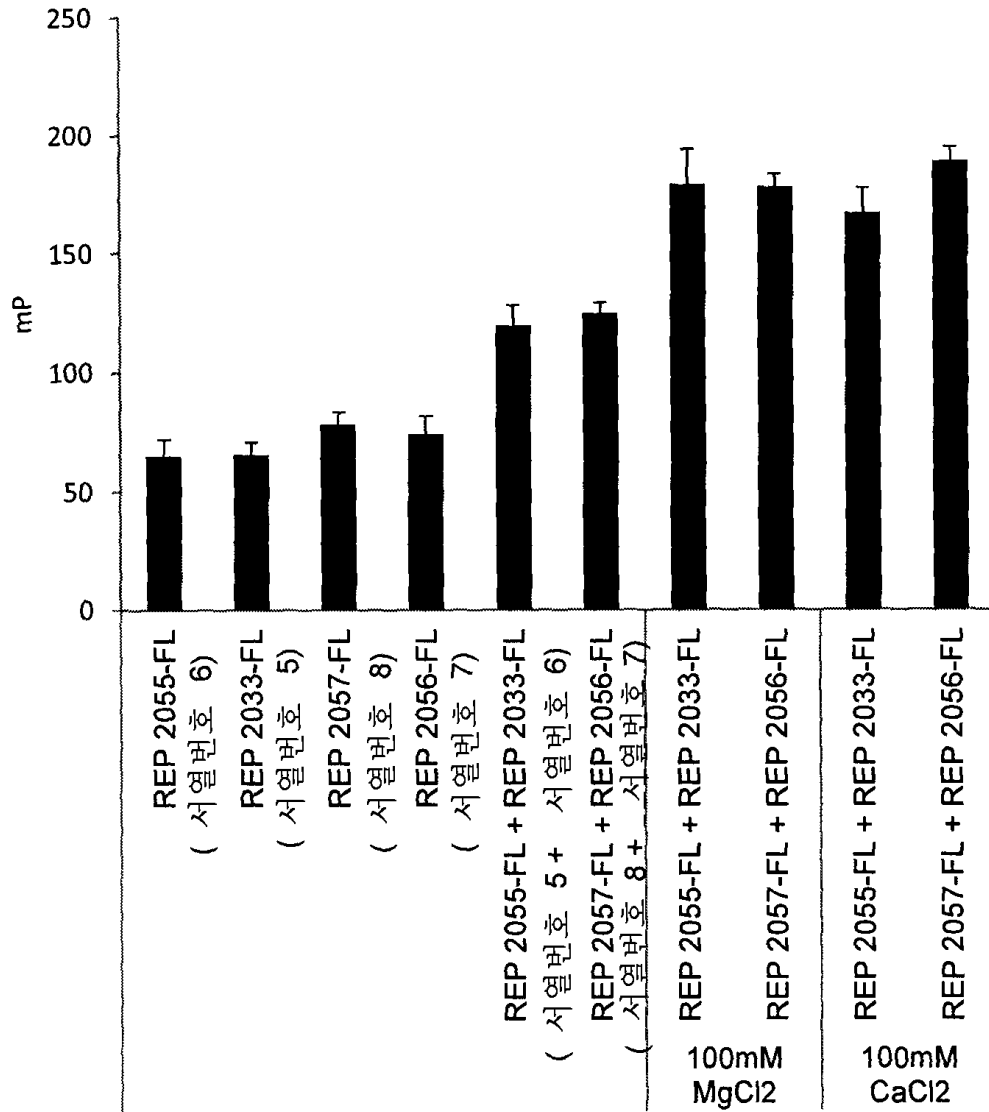
도면24a



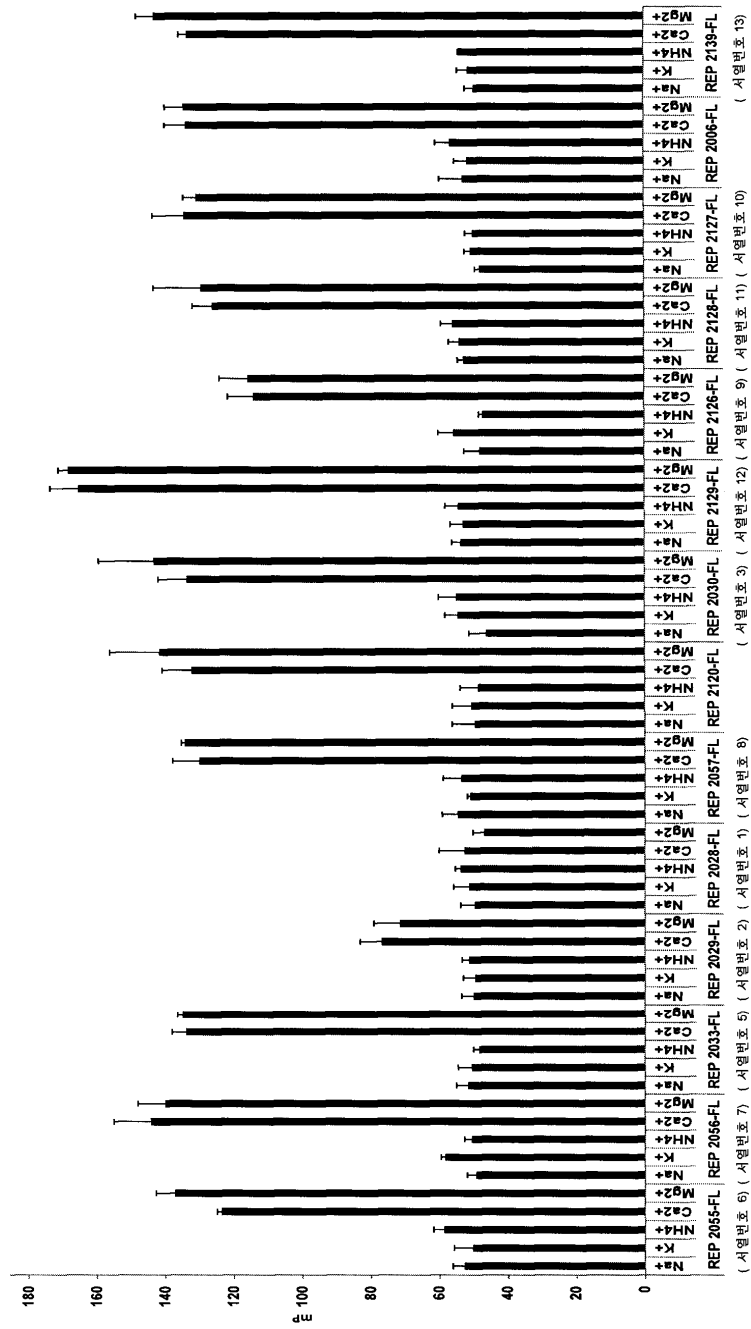
도면24b



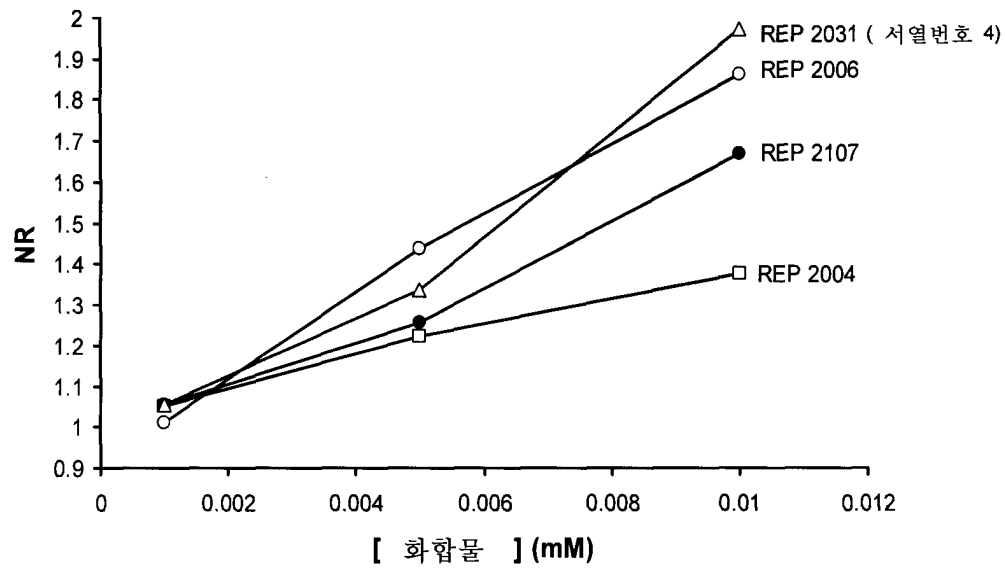
도면25



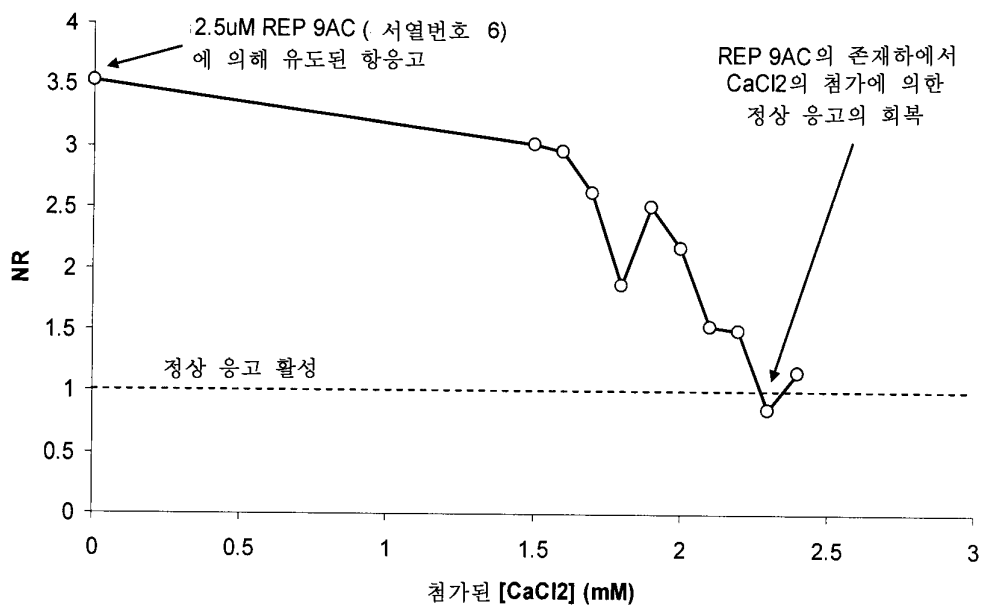
도면26



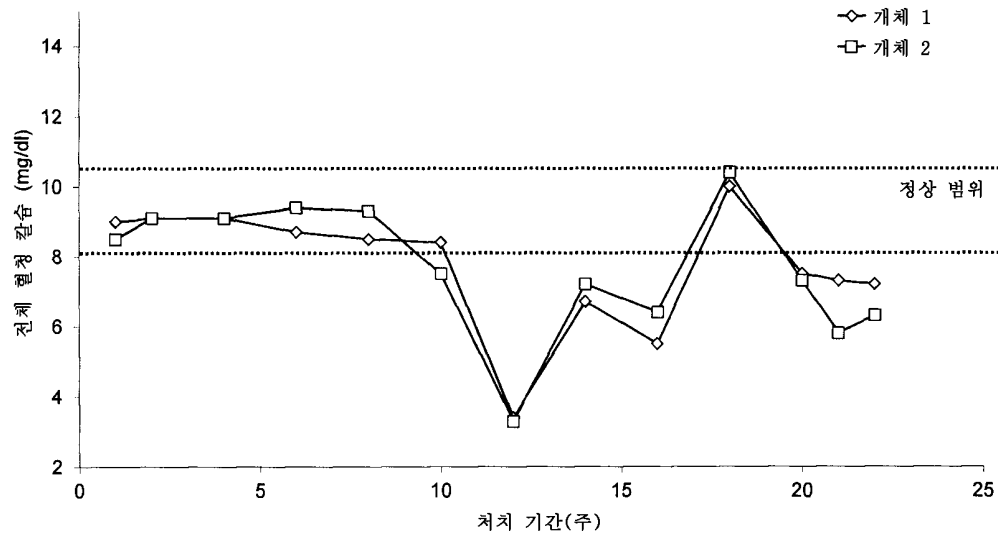
도면27



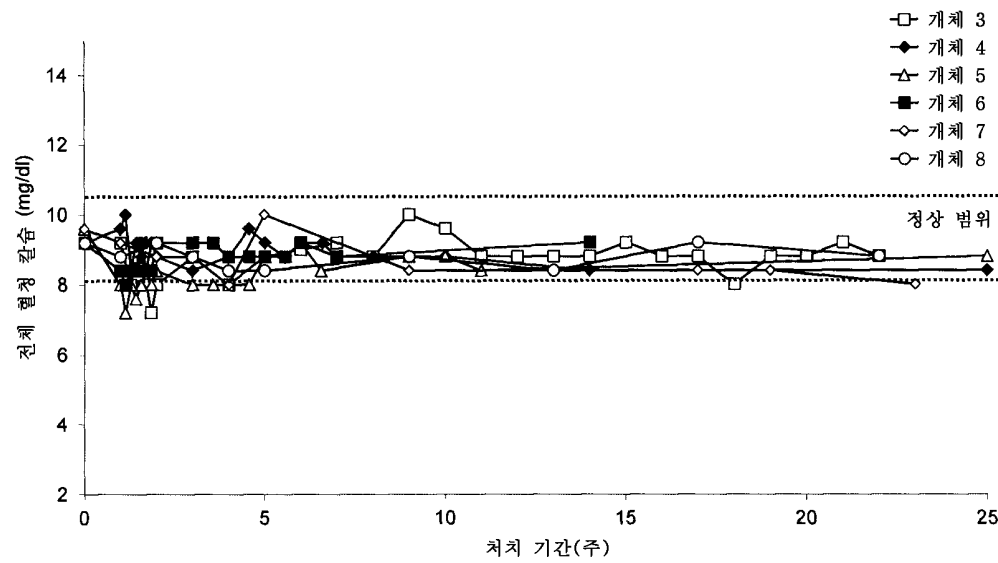
도면28



도면29a



도면29b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> REPLICOR INC.

<120> OLIGONUCLEOTIDE CHELATE COMPLEXES

<130> W02012/021985

<150> US 61/375257

<151> 2010-08-20

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> REP 2028, full phosphorothioate
 <400> 1
 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg 40
 <210> 2
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> REP 2029, full phosphorothioate
 <400> 2
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 40
 <210> 3
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> REP 2030, full phosphorothioate
 <400> 3
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 40
 <210> 4
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> REP 2031, full phosphorothioate
 <400> 4
 cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc 40
 <210> 5
 <211> 40
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> REP 2033, full phosphorothioate

<400> 5

tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 40

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> REP 2055, full phosphorothioate

<400> 6

acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 40

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> REP 2056, full phosphorothioate

<400> 7

tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc 40

<

210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> REP 2057, full phosphorothioate

<400> 8

agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 40

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> REP 2126, full phosphorothioate
 <400> 9
 cccccccccc cccccccccc 20
 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> REP 2127, full phosphorothioate
 <400> 10
 cccccccccc cccccccccc cccccccccc 30
 <210> 11
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> REP 2128, full phosphorothioate
 <400> 11
 cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc 50
 <210> 12
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> REP 2129, full phosphorothioate
 <400> 12
 cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc 60
 <210> 13
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> REP 2139, full phosphorothioate, full 2' O methyl

ribose, C = 5' methylcytidine

<400> 13

acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 40

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> REP 2138; full 2' O methyl ribose

<400> 14

cccccccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc 40