



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0003824
 (43) 공개일자 2015년01월09일

- | | |
|--|---|
| (51) 국제특허분류(Int. C1.)
<i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A61K 31/7088</i> (2006.01)
<i>A61P 3/10</i> (2006.01) | (71) 출원인
노그라 파마 리미티드
아일랜드, 뉴캐슬 2, 써 존 로저슨'즈 키 33
유니버시티 오브 마이애미
미국, 플로리다 33136, 마이애미, 슈트 110, 1951
엔더블유 7티에이치 애비뉴 |
| (21) 출원번호 10-2014-7032172 | (72) 발명자
몬테레온, 지오반니
이탈리아 00133 로마 비아 몽펠리에 1
부흐발트, 피터
미국 33136 플로리다 마이애미 1120 엔더블류 14
번 스트리트 유니버시티 오브 마이애미/밀러 스쿨
오브 메디슨, 룸 650
(뒷면에 계속) |
| (22) 출원일자(국제) 2013년04월18일
심사청구일자 없음 | (74) 대리인
양영준, 양영환 |
| (85) 번역문제출일자 2014년11월17일 | |
| (86) 국제출원번호 PCT/US2013/037150 | |
| (87) 국제공개번호 WO 2013/158868
국제공개일자 2013년10월24일 | |
| (30) 우선권주장
61/625,904 2012년04월18일 미국(US) | |

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 당뇨병 치료 및/또는 이식 후 혀장섬 생존 촉진 방법

(57) 요약

본원에 개시된 바는 SMAD7 발현 또는 기능의 특이적 억제제를 이용한 당뇨병 치료 및/또는 예방 방법이다. 또한 개시된 바는 SMAD7 발현 또는 기능의 특이적 억제제를 이용한 이식 후 장기 및/또는 세포, 예컨대 혀장섬 세포의 생존 촉진 방법이다.

(72) 발명자

인베라르디, 루카

미국 33136 플로리다 마이애미 1120 엔더블류 14번
스트리트 유니버시티 오브 마이애미/밀러 스쿨 오
브 메디슨, 룸 650

필레기, 안토넬로

미국 33136 플로리다 마이애미 1120 엔더블류 14번
스트리트 유니버시티 오브 마이애미/밀러 스쿨 오
브 메디슨, 룸 650

리코르디, 카밀로

미국 33136 플로리다 마이애미 1120 엔더블류 14번
스트리트 유니버시티 오브 마이애미/밀러 스쿨 오
브 메디슨, 룸 650

토메이, 엘리스

미국 33136 플로리다 마이애미 1120 엔더블류 14번
스트리트 유니버시티 오브 마이애미/밀러 스쿨 오
브 메디슨, 룸 650

특허청구의 범위

청구항 1

SMAD7 발현 또는 기능의 특이적 억제제의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병 치료 및/또는 예방 방법.

청구항 2

SMAD7 발현 또는 기능의 특이적 억제제의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 이식 후 장기 및/또는 세포 생존 촉진 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 세포가 체장섬 세포인 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 SMAD7 발현 또는 기능의 특이적 억제제가 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드가 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11, 및 서열 12로 구성되는 군으로부터 선택된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드가 서열 5 또는 서열 9를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드가 서열 6 또는 서열 10을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드가 비경구로 투여되는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드가 피하로 투여되는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제약학적 허용가능한 담체 및 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드가 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11, 및 서열 12로 구성되는 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드가 서열 5 또는 서열 9를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드가 서열 6 또는 서열10을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제약학적 조성물이 피하 투여되는 것인 방법.

청구항 15

제1항 및 제4항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당뇨병이 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 및 임신성 당뇨병으로 구성되는 군으로부터 선택된 것인 방법.

명세서**기술 분야**

<관련 분야와의 상호 참조>

본 출원은 2012년 4월 18일에 출원된 미국 가출원 61/625,904의 이익을 주장하며, 이는 전체 내용이 본원에 참조문헌으로 인용된다.

<본 발명의 분야>

본 발명은 일반적으로 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 당뇨병 치료 및/또는 예방 및/또는 이식 후 췌장섬 세포 생존 촉진을 위한 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0005] 당뇨병은 혈액 내 높은 당 농도를 특징으로 하는 대사성 질환이다. 당뇨병의 가장 흔한 두 가지 종류는 1형 당뇨병(T1DM) 및 2형 당뇨병(T2DM)이다. 1형 당뇨병, 또는 인슐린-의존성 당뇨병(IDDM)은, 인슐린을 생산하는 췌장섬 내 베타 세포의 광범위한 손실을 특징으로 하는 만성 자가 면역 질환이다. 2형 당뇨병, 또는 비-인슐린 의존성 당뇨병(NIDDM)은, 근육, 지방 및 간 세포가 인슐린에 대해 정상적으로 반응하지 못한 때(인슐린 저항성) 발병한다. 특히, 2형 당뇨병은, 비만 및 좌식 생활스타일의 증가, 및 여러 국가에서의 인구의 전반적인 고령화에 의해 유행성이 되었다. 최근 임상 실험에서는, T1DM이 있는 많은 어린이들이 진단 당시 과체중이고, 의사가 T2DM으로 진단한 젊은이들의 상당 비율이 췌장 자가면역의 증거를 가짐에 따라, T1DM과 T2DM을 구분하는 것이 점점 어려워지고 있다(문헌[바다루(Badaru), A. 및 피호커(Pihoker), C. "Type 2 diabetes in childhood: clinical characteristics and role of beta-cell autoimmunity," *Curr. Diab. Rep.*, 2012, 12, 75-81]). 2011년에는, 세계 3 억 4 천 6백만 이상의 인구가 당뇨병에 감염되었다.

[0006] 최근의 연구들은 TGF- β 가 췌장섬 기능 및 당뇨병 발병에 중요한 역할을 한다는 점을 입증하였다(문헌[모리타니(Moritani), M. 등 "Abrogation of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice and protection against effector lymphocytes by transgenic paracrine TGF- β 1," *J. Clin. Invest.*, 1998, 102, 499-506; 올리비에리(Olivieri), A. 등 "Serum transforming growth factor β 1 during diabetes development in non-obese diabetic mice and humans," *Clin. Exp. Immunol.*, 2010, 162, 407-414]). 예를 들어, 1 주 동안 TGF- β 발현의 섬-특이적 펄스는, 1형 당뇨병의 통상 사용되는 동물 모델(문헌[루에프(Roep), B. O. 등 "Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes," *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, 4, 989-997])인, NOD 마우스에서 당뇨병 발병을 늦추는 것으로 나타났다(문헌[왈버그(Wallberg), M. 등 "An islet-specific pulse of TGF- β abrogates CTL function and promotes β cell survival independent of Foxp3 $^+$ T cells," *J. Immunol.*, 2011, 186, 2543-2551]). TGF β 1은 당뇨병성 NOD 마우스에서 당뇨병 치료 및 섬 파괴성 자가면역의 차단 뿐 아니라, 섬 재생 유도에도 효과가 있었다(문헌[루오(Luo), X. 등 "Systemic transforming growth factor- β 1 gene therapy induces Foxp3 $^+$ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice," *Transplantation*, 2005, 79, 1091-1096]). 그러므로, 이 경로에 따른 치료적 개입은, 질병의 진행을 정지시킬 수 있을 뿐만 아니라, 고혈당증 발현 후에 기능도 복구(즉, 충분한 인슐린 생산)시킬 수 있다.

[0007]

TGF- β 1-3은 세포 성장, 장기 발달, 섬유 조직 생성, 및 면역 세포의 조절을 포함하는 다양한 생물학적 기능과 관련이 있다. TGF- β 1은 면역 시스템 내에서 발현되는 두드러진 형태이고, 이는 이제 T 세포 반응을 약화시킬 수 있는 면역 반응 내 핵심적인 조절인자로서 잘-인식되어 있다(문헌[리, M. O.(Li, M. O.) 및 플라벨, R. A.(Flavell, R. A.) "TGF-beta: a master of all T cell trades," *CelI*, 2008, 134, 392-404]). 구체적으로, TGF- β 1은, TGF β 1 R1 및 TGF- β 1 R2 2 개의 서브유닛을 함유하는 헤테로다이머 막관통 세린/트레오닌 키나아제 수용체에 결합한다. 리간드 결합시, TGF- β 1 R1 수용체는 구성 활성 TGF- β 1 R2 수용체에 의해 인산화되고, SMAD 계열에 속하는 단백질들에 의해 세포핵으로 신호가 전달된다. 활성화된 TGF- β 1 R1은 SMAD2와 SMAD3 단백질을 직접적으로 인산화시키고, 이들은 이후에 SMAD4와 상호작용한다. 이후 SMAD2/SMAD3/SMAD4 복합체는 핵으로 이동하여 특정 유전자의 전사를 조절한다. SMAD7은 음성-피드백 메커니즘을 통해 TGF- β 의 일반적인 길항제로 작용하는 이 단백질 계열의 또 다른 구성원이다(문헌[얀(Yan), X. 및 첸(Chen), Y. G. "Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF-beta signalling," *Biochem. J.*, 2011, 434, 1-10]).

[0008]

연구들은 SMAD7이 당뇨병 및 β -세포 기능에 중요한 역할을 한다는 것을 입증하였다. 세포내 단백질인 SMAD7은 SMAD2/SMAD3이 이러한 단백질들의 인산화 및 활성화를 막는 TGF- β 1 R1에 결합하는 것을 방해하여 TGF- β 1 매개-신호전달의 억제를 초래하는 것으로 나타났다. 췌장 β -세포 내 SMAD7의 발현은 TGF- β 신호전달을 방해하고 가역적 당뇨병을 유도하는 것으로 나타났다(문헌[스마트(Smart), N. G. 등 "Conditional expression of Smad7 in pancreatic beta cells disrupts TGF-beta signaling and induces reversible diabetes mellitus," *PLoS Biol.*, 2006, 4, e39]). 또한, NOD 쥐에서의 결과는 또한 당뇨병 발병에 있어 활성화된 수지상 세포 내에서의 Smad2 및 TGF- β 신호전달 경로를 시사하며, 인간 1형 당뇨병에서의 Smad7의 역할을 지지하는 인간 계놈-전체 연관성 연구의 증거가 존재한다(문헌[후크(Hook), S. M. 등 "Smad2: A candidate gene for the murine autoimmune diabetes locus Idd21.1," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011, 96, E2072-E2077]). TGF- β 1이 시토카인 생성 저해, T 세포 반응 억제, 및 조절 T 세포(Treg) 유도에 공헌하는 것으로 나타났기 때문에(문헌[가와모토(Kawamoto), K. 등 "Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) and rapamycin synergize to effectively suppress human T cell responses via upregulation of FoxP3⁺ Tregs," *Transpl. Immunol.*, 2010, 23, 28-33]), SMAD7 조절은 이식 기능 지지, 독성 제한, 및 면역 거부 반응 예방에 의하여 섬 이식에 있어서 또한 유리할 수 있다.

[0009]

그러므로, 당뇨병 및 췌장 섬 이식에 대한 새로운 치료법에 관해 미충족된 요구사항이 남아있다.

발명의 내용

[0010]

<요약>

[0011]

개시된 방법은 부분적으로, SMAD7을 억제하고 그러므로 TGF- β 신호전달을 복구시키는, SMAD7 발현 또는 기능의 특이적 억제제, 예컨대 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 발현을 기반으로 한다. SMAD7에 대한 예시적인 안티센스 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어, 서열 5 또는 서열 6을 포함하며, 이는 제약학적 조성물에 이용될 수 있다. 개시된 SMAD7 억제제는 당뇨병, 예컨대 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 및 임신성 당뇨병을 치료 및 /또는 예방하는 데 이용될 수 있다. SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 또한 이식 후 췌장섬 세포 생존 촉진에 이용될 수도 있다.

[0012]

본 발명의 앞선 측면들 및 실시양태들은 이하의 도면, 상세한 설명 및 청구항에 의해 완전히 이해될 수 있다. 본원에 이용된, "포함된"은 제한 없음을 의미하고, 인용된 예들은 비-제한적이다.

도면의 간단한 설명

[0013]

도 1(a)는 SMAD7의 핵산 서열(서열 1)을 제공하고 (b)는 SMAD7의 아미노산 서열(서열 2)을 제공한다.

도 2(a)는 HEK-블루 TNF- α 센서 세포 내에서 NF- κ B 활성화에 대한 TGF β 및 GED-0301(SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드, 서열 6)의 효과를 나타내는 그래프이고 (b)는 각각 TNF- α 및 CD40L에 의해 투여된 HEK-블루 CD40L 센서 세포 내에서 NF- κ B 활성화에 대한 TGF β 및 GED-0301의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 3(a)는 마우스에 다양한 경로로 투여 후 플루오레세인-표지된 GED-0301의 기관-특이적 유입의 유동 세포 측정법(flow cytometry) 결과 분석에 사용된 게이팅(gating) 방법을 묘사하는 패널이고 도 3(b)는 지시된 장기 조직 내의 생육 세포 내의 상응하는 퍼센트 유입(FITC+)을 나타낸다.

도 4는 대조군 마우스 및 플루오레세인-표지된 GED-0301을 피하투여한 마우스의 췌장 색션을 묘사하는(투여 4시간 후) 다중경로 고 해상도 현미경 이미지이다. 색깔에 대한 설명: 녹색- 형광 GED-0301, 회색- DAPI(세포핵의 마커), 적색- 인술린(인술린-생성 β -세포를 지시), 및 청색-CD45(CD45 또는 백혈구 공통항원, LCA, 백혈구 마커, 면역성 및 염증 세포를 포함하는 혈액 순환 시스템의 성분을 지시함).

도 5(a)는 고혈당증 발현 후 SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드 GED-0301(AS GED-0301), 상응하는 센스 대조군(S 대조군), 및 생리식염수(대조군)(125 μ g/동물, 피하 투여(s.c.), 매일)로 처리한 NOD 마우스의 혈중 글루코스 레벨을 묘사한 그래프이고, 도 5(b)는 남아있는 당뇨병-없는 동물의 퍼센트를 시간의 함수로 나타낸 대응하는 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선이다.

도 6은 실험 종료일(150 일)까지 당뇨병성이 되지 않았던 GED-0301-처리된 NOD 마우스 및 대조군 마우스에서 수행된 경구 글루코스 내성 시험의 결과를 비교한 그래프이다.

도 7은 실험 종료일(150 일)까지 당뇨병성이 되지 않았던 GED-0301-처리된 NOD 마우스의 췌장의 대표적인 섬-섬유 색션을 이에 상응하는 대조군의 색션과 비교한 공초점 현미경 이미지의 다중경로 고 해상도 Z-스택(stack)을 나타낸다. 색깔에 대한 설명: 청색-DAPI(세포핵의 마커), 적색-인술린(인술린-생성 B-세포를 지시), 및 녹색-글루카곤(글루카곤-생성 α -세포를 지시함).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 개시는 일반적으로 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 이의 당뇨병 치료 및/또는 예방 및/또는 이식 후 췌장섬 세포 생존 촉진을 위한 용도에 관한 것이다.

항-SMAD7 치료

[0016] 개시된 방법은 당뇨병 치료 및/또는 예방 및/또는 이식 후 췌장섬 세포 생존 촉진을 위한, 소결합 분자, 예컨데 천연 및 합성 화합물, 항체, 압타머, 인트라머, RNAi(이중 가닥 RNA, siRNA) 및 항-SMAD7 안티센스 분자로 구성된 군으로부터 선택된 특이적 SMAD 7 억제제의 용도에 관한 것이다. SMAD7 억제제는 또한 SMAD7를 방해하고, 그에 따라 SMAD7 기능을 억제하는 말단절단되고/되거나 돌연변이된 SMAD7 분자를 포함할 수 있다.

[0017] 예를 들어, 항-SMAD7 요법은 SMAD7에 대한 타겟 요법(예컨데, 항-SMAD7 안티센스 요법 즉 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 SMAD7에 대한 항체)을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 메신저 RNA(mRNA) 와 상보적인 소합성 올리고뉴클레오티드 서열인데, 이는 타겟 단백질(예컨대, SMAD7)을 코딩한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 mRNA로 하이브리드화하여, 상시 발현된 촉매 효소, 예컨데 RNase H를 활성화시킬 수 있는 이중 가닥 하이브리드를 생성하는데 이는 DNA/RNA 하이브리드 가닥을 분해하여 단백질 번역을 막는다.

[0018] 특정 실시양태에서, 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드는 인간 SMAD7 mRNA(예컨대, 서열 1)의 403, 233, 294, 295, 296, 298, 299, 및/또는 533 부위(예컨대, 각각 뉴클레오티드 403, 233, 294, 295, 296, 298, 299, 및 533)을 타겟화할 수 있다(도 1 참조). 예시된 실시양태에서, 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드는 인간 SMAD7 mRNA의 핵산 403-423을 타겟화한다.

[0019] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이하의 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드 5'-GTCGCCCTCTCCCCGCAGC-3'(서열 3)으로부터 유래될 수 있다.

[0020] SMAD7을 타겟화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 CpG 쌍의 시토신 잔기가 5'-메틸시토신(약칭하여 Me-dC)으로 치환된 혼합-백본을 포함할 수 있다고 고려된다. 메틸포스포네이트 연결은 또한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 5' 및/또는 3' 말단에 위치할 수 있다(약칭하여 MeP). 고려된 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드의 포스포네이트 백본은 1 개, 2 개, 3 개, 4 개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 결합(예컨데, 포스포로티오에이트 결합이 포스포디에스테르 결합을 치환할 것이다)을 선택적으로 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 모든 포스포네이트 결합은 포스포로티오에이트 결합일 수 있다.

[0021] SMAD7을 타겟화하는 예시적인 안티센스 올리고뉴클레오티드 요법은:

[0022] 5'-GTXYCCCTTCTCCCXYCAG-3'(서열 4) (여기서 X는 시토신 및 5-메틸시토신 또는 2'-0-메틸시토신 뉴클레오시드로 구성된 군에서 선택된 질소 염기를 포함하는 뉴클레오티드이고, Y는 구아닌 및 5-메틸구아닌 또는 2'-0-메틸구아닌 뉴클레오시드로 구성된 군에서 선택된 질소 염기를 포함하는 뉴클레오티드이며, 단 뉴클레오티드 X 또는 Y 중 적어도 하나는 메틸화된 질소 염기를 포함한다);

- [0023] 5'-GTXGCCCTTCTCCXGCAG-3' (서열 5) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스페이트);
- [0024] 5'-GTXGCCCTTCTCCXGCAGC-3' (서열 6) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스페이트);
- [0025] 5'-ZTXGCCCTTCTCCXGCAZ-3' (서열 7) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스페이트이고 Z는 2'-데옥시구아노신 메틸포스포네이트);
- [0026] 5'-ZTXGCCCTTCTCCXGCAZC-3' (서열 8), (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스페이트이고 Z는 2'-데옥시구아노신 메틸포스포네이트)을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0027] 특정한 실시양태에서, 고려된 SMAD7 안티센스는:
- [0028] 5'-GTXGCCCTTCTCCXGCAG-3' (서열 9) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스포로티오에이트);
- [0029] 5'-GTXGCCCTTCTCCXGCAGC-3' (서열 10) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스포로티오에이트);
- [0030] 5'-ZTXGCCCTTCTCCXGCAZ-3' (서열 11) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스페이트이고 Z는 2'-데옥시구아노신 메틸티오포스포네이트);
- [0031] 5'-ZTXGCCCTTCTCCXGCAZC-3' (서열 12) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스페이트이고 Z는 2'-데옥시구아노신 메틸티오포스포네이트)를 중 하나를 포함하는 서열일 수 있다.
- [0032] 예를 들어, 서열 9-12는 1 개, 2 개, 3 개, 4 개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 서열 9-12의 모든 0,0 포스포네이트 결합은 포스포로티오에이트 결합이다.
- [0033] 치료 방법
- [0034] 본원에 제공된 바는 SMAD7 발현 또는 기능의 특이적 억제제, 예컨대 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 이식 후 장기 및/또는 세포, 예컨대 췌장섬세포 생존 촉진 방법이다.
- [0035] 또한, 본원에 제공된 바는 SMAD7 발현 또는 기능의 특이적 억제제, 예컨대 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 당뇨병, 예컨대 1형 당뇨병 및 2형 당뇨병의 치료 및/또는 예방 방법이다.
- [0036] 당뇨병은 고 혈당 또는 케톤산증을 특징으로 하는 대사 질환 뿐 아니라 연장된 고혈당 상태 또는 글루코스 내성의 감소로부터 야기된 만성, 전신 대사 이상증의 군을 포함한다. 당뇨병은 질병의 1형 및 2형 형태 둘다, 임신성 당뇨, 및 다른 인슐린 부족 병태를 포함한다.
- [0037] 개시된 방법들은 또한 잠재성 자가면역 당뇨병(즉, 1.5 형 당뇨병), 대사 불균형, 당뇨병전 상태, 대사 증후군, 지질 또는 글루코스 관련 장애, 예컨대 고지혈증 및/또는 고콜레스테롤혈증, 및 다른 관련 장애들을 치료 및 예방하는 데에도 적용 가능한 것으로 이해되어야 한다.
- [0038] 대사 불균형은 증가된 혈장 글루코스와 연관된 임의의 장애 또는 질환 상태 또는 병태를 포함할 수 있다. 대사 불균형은, 예를 들어, 당뇨병, 임신성 당뇨, β -세포 기능의 유전적 결함, 인슐린 작용의 유전적 결함, 외분비성 췌장 질환, 내분비성 질환, 약물 또는 화학품-유도성 감염, 당뇨병과 연관된 다른 유전적 증후군, 당뇨병전 상태, 및 대사 증후군을 포함한다.
- [0039] 대사 증후군은 미국 심장 협회(AHA)에서 기술한 바와 같이, 인체 내 대사 위험 인자의 군에 의해 특성화된다. 대사 증후군은 또한 대사 증후군 X, 증후군 X, 인슐린 저항성 증후군, 리븐스(Reaven's) 증후군, 또는 CHAOS라고도 공지된 바 있다. 위험 인자는 복부 비만, 아테로발생 이상지혈증, 고혈압, 인슐린 저항성 또는 글루코스 불내성, 혈전유발 상태(높은 피브리노겐 또는 플라스미노겐 활성화제 억제제-1), 및 염증유발 상태(증가된 C-반응성 단백질)를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 용어 "치료하다", "치료", "치료하는" 등은 본원에서 사용되어 일반적으로 바람직한 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 의미한다. 효과는 질병 또는 그에 따른 증상의 완전한 또는 부분적인 예방의 측면에서 질병 예방적이고/하거나 질병 및/또는 질병에 수반되는 부작용의 완전한 또는 부분적인 치료의 측면에서 치료적일 수 있다. 본원에 이용된 용어 "치료"는 포유류, 구체적으로 인간 내 질병의 임의의 치료를 다루고 있으며 이하를 포함한다: (a) 질병에 걸리기 취약한 상태이나 아직 걸린 것으로 진단되지는 않은 대상체로부터 질병의 발생을 예방; (b) 질병의 억제, 즉 발병의 정지; 또는 (c) 질병의 완화, 즉 질병의 퇴행 야기.

[0041] 특정한 실시양태에서, 항-SMAD7 요법으로의 치료에 대한 대상체의 반응은 치료 전 대상체로부터 얻어진 대조군 샘플과 관련하여 해석될 수 있다(하술). SMAD7 발현의 감소가 있다면; 총 혈장 인슐린 함량의 증가가 있다면; (예를 들어, 표준 방법 예컨대 정맥내 글루코스 내성 시험, IVGTT을 통해 평가될 때) β -세포 기능이 유지되고/되거나 회복된다면; 및/또는 정상 혈당, 즉 혈액 내 정상 글루코스 함량이 유지되고/되거나 회복된다면, 대상체는 항-SMAD7 요법 치료에 대해 반응을 보인 것으로 확인될 수 있다. 다른 실시양태에서, 섬 이식, 예컨대 동종 섬 이식을 받은 대상체는, 섬의 거부 반응 예방 및/또는 연장된 생존이 있는 경우 항-SMAD7 요법 치료에 대해 반응을 보인 것으로 확인될 수 있다.

[0042] 시험 샘플을 예를 들어 치료 개시 후 1 주, 2 주, 4 주, 8 주, 10 주 후 또는 그 이후에 환자로부터 얻어 치료에 대한 민감성을 모니터링할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 시험 샘플은, 예를 들어 치료 개시 후 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 7 주, 8 주, 9 주, 10 주, 11 주, 12 주, 5 개월, 6 개월, 및/또는 1 년 또는 더 오랜 기간 후 얻어져 치료에 대한 민감성을 측정할 수 있다.

[0043] 대조군 샘플은, 항-SMAD7 요법 치료에 앞서 대상체로부터 얻은 샘플(예컨대, 혈액이나 조직 샘플)을 포함할 수 있다. 대조군 샘플은 대상체의 치료 진행을 모니터링하는 데에 있어서 기초 수준을 제공한다. 대조군 샘플은 항-SMAD7 요법이 처음 시행된 날(예컨대, 치료 요법 1일째), 대상체로부터 얻을 수 있다. 다른 실시양태에서, 대조군 샘플은 항-SMAD7 요법의 시작 하루 전날(예컨대, 치료 요법 0일째) 대상체로부터 얻을 수 있다. 다르게는 대조군 샘플은 항-SMAD7 요법 시작 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 또는 그 이상의 일 전에, 대상체로부터 얻을 수 있다. 예컨대, 특정 세포 샘플의 상향조절이나 하향조절은 치료 전(예컨대, 대조군 샘플), 치료 중, 및/또는 치료 이후 측정되어 대상체의 요법(예컨대, 항-SMAD7 요법)에 대한 반응을 모니터링할 수 있다.

[0044] 대조군 샘플은, 예를 들어, 항-SMAD7 요법 치료에 앞서 대상체로부터 얻은 샘플로서 대상체의 글루코스 레벨을 모니터링하기위한 샘플을 포함할 수 있다.

[0045] 일부 실시양태에서, 대조군 레벨은 대상체 내 특정 세포 군집의 장기간 모니터링을 기초로 대상체에 대해 확립될 수 있다. 이러한 실시예에서, 대상체는 수 회의 항-SMAD7 요법 치료를 경험할 수 있다고 고려된다. 수 회의 치료 이후 검출된 특정 세포 군집의 양은 대상체의 이전의 대조군 레벨과 비교되어, 대상체가 요법에 반응했는지 및/또는 추가적 항-SMAD7 요법 치료에 반응할 것인지 여부를 결정할 수 있다. 다른 실시양태에서, 대상체의 대조군 또는 기초 레벨은 일정 시간에 걸쳐 얻어진(예컨대, 수 주, 수 개월, 또는 수 년의 과정에 걸쳐 얻어진) 다수의 기초 수준 샘플로부터 결정된 특정 세포 군집의 평균 측정량을 기초로 확립될 수 있다. 그러므로, 본원에 개시된 모든 시험 또는 분석은 과거의 또는 확립된 대조군 레벨과 비교될 수 있고, 예컨대, 대상체가 한 회 초과의 항-SMAD7 요법 치료를 받을 때, 비교를 위해 대상체로부터 새로운 대조군 샘플을 얻는 것에 필수적이지 않을 수 있다.

투여 및 제제

[0047] 일부 실시양태에서는, 본원에서 고려된 바는 SMAD7에 대한 고려된 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 제약학적 허용가능한 담체를 포함하는 제약학적 조성물이다. 예를 들어, 제약학적 조성물은 피하로 투여될 수 있다. 다르게는, 제약학적 조성물은 경구로 투여될 수 있다.

[0048] 본원에 이용된, "제약학적 허용가능한 담체"는 합리적인 이익/위험 비에 잘 맞는, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉되어 이용하기에 적절한 완충제, 담체 및 부형제를 의미한다. 담체(들)은 제제의 다른 성분들과의 상용성의 면에 있어서 "허용가능"해야하고 수용자에게 유해하지 않아야 한다. 제약학적 허용가능한 담체는 완충제, 용매, 분산제, 코팅, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함하며, 이들은 제약학적 투여에 적합해야 한다. 제약 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 용도는 당업계에 공지되어 있다.

[0049] 하나의 실시양태에서, SMAD7에 대한 고려된 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 그의 임의의 제약학적 조성물은 경구, 국소, 비경구, 예컨대, 피하 주사, 스프레이 흡입 또는 직장을 포함하는 하나 또는 몇 가지 경로로 투여될 수 있다. 본원에 이용된 용어 비경구는 피하 주사, 혀내 투여, 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 예를 들어, SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 대상체에 대해 피하로 투여될 수 있다. 또다른 예에서, SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 대상체에 대해 경구로 투여될 수 있다.

[0050] 본원에 개시된 바와 같은 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드를 함유하는 제약학적 조성물은, 투여 단위 형태로 제공할 수 있고 임의의 적절한 방법으로 제조될 수 있다. 제약학적 조성물은 의도된 투여 경로에 상용 가능하도록 제제화되어야한다. 유용한 제제는 제약 업계에 잘 알려진 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어,

문현[*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990)] 참조.

[0051] 제약학적 제제는 바람직하게는 멸균이다. 멸균은, 예컨데, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결건조되는 경우, 동결건조 및 복원의 이전 또는 이후에 여과 멸균이 수행될 수 있다.

[0052] 예시적인 실시양태에서, SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 피하 투여용 제약학적 조성물은 예를 들어 서열 6에 의해 표현되는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 또는 그의 제약학적 허용가능한 염(예를 들어 나트륨 염), 및 제약학적 허용가능한 담체를 포함한다.

[0053] 또다른 실시양태에서, SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 경구 투여용 제약 정제 제제는 서열 6에 의해 표현되는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 또는 그의 제약학적 허용가능한 염(예를 들어 나트륨 염), 및 제약학적 허용가능한 충전제를 포함하는 과립내 상 및 봉해제와 같은 제약학적 허용가능한 부형제를 포함할 수 있는 과립외 상을 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, 제약학적 허용가능한 경구용 정제는 서열 6에 의해 표현되는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 약 5 내지 약 10 중량% 또는 그의 제약학적 허용가능한 염, 만니톨 약 40 중량%, 미세결정질 셀룰로스 약 8 중량%, 히드로프로필메틸 셀룰로스 약 5 중량%, 및 나트륨 전분 글리콜레이트 약 2 중량%를 포함하는 과립내 상; 미세결정질 셀룰로스 약 17 중량%, 나트륨 전분 글리콜레이트 약 2 중량%, 마그네슘 스테아레이트 약 0.4 중량%를 포함하는 과립외 상; 및 아크릴EZE(AcrylEZE)® 약 13 중량%를 포함하는 정제의 장용 코팅을 포함할 수 있다(예컨데, 전체가 본원에 참조문헌으로 인용된 PCT 공개 WO/2010/054826 참조).

[0054] 예시적인 제제는 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 약 35 mg 내지 약 500 mg을 포함하거나 이로 필수적으로 구성되는 투여 형태를 포함한다. 예를 들어, SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 약 35 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg 또는 250 mg을 포함하는 제제가 본원에서 고려된다. 하나의 실시양태에서, 제제는 SMAD7에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 약 40 mg, 80 mg, 또는 160 mg를 포함할 수 있다. 투여된 양은 변수, 예컨데 질환의 유형 및 정도 또는 치료되어야 할 증세, 전반적인 환자의 건강, 항체의 체내 효능, 제약학적 조성물, 및 투여 경로에 의존할 것이다. 초기 투여 용량은 바람직한 혈중 레벨 또는 조직 레벨을 빠르게 달성하기 위하여 상한선을 넘어 증가될 수 있다. 다르게는, 초기 투여 용량은 최적치보다 적을 수 있으며, 투여 용량은 치료 과정 중에 계속해서 증가될 수 있다. 인간 투여 용량은, 예컨데 40 mg 내지 160 mg까지 실험하도록 설계된 기준 I 상 용량 증가 시험에서 최적화될 수 있다. 투여 빈도는, 인자들 예컨데 투여 경로, 투여 용량 및 치료중인 질병에 의존하여 다양할 수 있다. 예시적인 투여 빈도는 하루에 한 번, 일주일에 한 번, 및 이주일에 한 번이다. 몇몇 실시양태에서는, 투여는 7 일 동안 하루에 한 번이다. 바람직한 투여 경로는 피하 투여이다.

[0055] 몇몇 실시양태에서는, 본원에 제시된 방법은 본원에 개시된 질환 및 장애의 치료에 관한 하나 이상의 다른 작용제를 투여하는 단계를 더 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서는, 고려된 다른 작용제는 공동-투여될 수 있다(예컨데, 순차적으로 또는 동시에).

[0056] 고려된 작용제는 글루코코르티코이드, 세포증식억제제, 항체, 이뮤노필린에 작용하는 작용제, 인터페론, 오피오이드, TNF 결합 단백질, 미코페놀레이트, 및 소 생물학적 작용제를 포함하는 면역 억제제를 포함한다. 예를 들어, 고려된 면역 억제제는: 타크롤리무스, 시클로스포린, 피메크롤리무스, 시롤리무스, 에베롤리무스, 미코페놀산, 평골리모드, 텍사메타손, 플루다라빈, 시클로포스파미드, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 레플루노미드, 테리플루노미드, 아나친라, 항흉선세포 글로불린, 항립프구 글로불린, 무로모닙-CD3, 아푸투주맙, 리툭시맙, 테플리주맙, 에팔리주맙, 다클리주맙, 바실릭시맙, 아달리무맙, 인플릭시맙, 및 에타네르셉트를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0057] 고려된 작용제는 혈당강하제 및/또는 경구 항-당뇨병성 작용제로의 경구 요법, 주사가능한 요법 등을 포함하는 혈당 레벨 조절을 위한 약물 요법을 포함한다. 혈당 레벨 조절을 위한 비-약물 요법은, 식이 및/또는 운동 조절 조치를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0058] 혈당 레벨 조절을 위한 경구 약물 요법은: 아카르보스, 아세토헥사미드, 클로르프로파미드, 다르글리타존 나트륨, 글리메피리드, 글리피지드, 글리부리드, 레파글리니드, 트로글리타존, 톨라자미드, 및 톨부타미드를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아닌 혈당강하제를 포함한다.

[0059] 혈당 레벨 조절을 위한 경구 약물 요법은: 아카르보스, 아세토헥사미드, 부포르민, 부톡사민 히드로클로라이드, 카미글리보스, 클로르프로파미드, 시글리타존, 엔글리타존 나트륨, 에토포르민 히드로클로라이드, 글리아밀리드, 글리보르누리드, 글리세타닐, 글리클라지드 나트륨, 글리플루마이드, 글리피지드, 글루카곤, 글

리부리드, 글리헥사미드, 글리미딘 나트륨, 글리옥타미드, 글리파라미드, 인슐린 이소판, 인슐린 휴먼 아연, 연장된 인슐린, 인슐린 리스프로, 리노글리리드, 리노글리리드 푸마레이트, 메트포르민, 메틸 팔목시레이트, 팔목시레이트 나트륨, 피오글리타존 히드로클로라이드, 피로글리리드 타르트레이트, 프로인슐린 인간, 레파글리니드, 세글리티드 아세테이트, 틀라자미드, 틀부타미드, 틀페라미드, 트로글리타존, 및 조플레스스타트를 포함할 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아닌 항당뇨병성 작용제를 포함한다.

[0060] 혈당 레벨 조절을 위한 주사가능 요법은: 속효성 인슐린, 지효성 인슐린 및 관련 인슐린을 포함할 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 속효성 인슐린은 레귤러 인슐린, 프롬프트(prompt) 인슐린 아연 혼탁액 및 세밀렌테(Semilente)® 인슐린, 휴마로그(Humalog)® 주사, 휴몰린(Humulin)® R, 일레틴(Iletin) II, 노볼린(Novolin) R, 정제된 돼지 레귤러 인슐린, 및 베로술린(Velosulin) BR 인간 인슐린을 포함한다. 지효성 인슐린은 프로타민 아연 인슐린 혼탁액, 연장된 인슐린 아연 혼탁액, 울트라렌테(Ultralente)® 인슐린, 및 휴몰린® U를 포함한다. 다른 인슐린은 이소판 인슐린 혼탁액, NPH 인슐린, 이소판 인슐린; 인슐린 아연 혼탁액 렌테® 인슐린, 인간 인슐린 이소판 혼탁액/인간 인슐린 주사, 휴몰린® 50/50, 휴몰린® 70/30, 및 노보린® 70/30을 포함한다.

[0061] 실시예

[0062] 본원 발명은 아래의 실시예에 의해 더 분명하게 예시된다. 본 실시예는 예시적인 목적으로만 제공될 뿐, 어떤 식으로든 본원 발명의 범위나 내용을 제한하는 것으로 해석되어져서는 아니 된다.

[0063] 실시예 1: NF-κB 활성화에 대한 SMAD7 안티센스의 효과

[0064] NF-κB 경로의 활성화를 모니터링하여 HEK-블루™(인비보겐(InvivoGen)) TNF-α / IL-1β 센서 세포를 생물활성 TNF-α 및 IL-1β를 검출하도록 설계하였다. 5 개의 NF-κB 및 5 개의 AP-1 결합 부위에 융합시킨 IFN-β 최소 프로모터의 조절 하에서 인간 배아 신장 HEK293 세포를 SEAP 리포터 유전자로 안정적으로 형질감염시켜 이러한 세포들을 생성시켰다. HEK-블루™(인비보겐) CD40L 센서 세포를 CD40 자극 후 NF-κB 활성화에 대한 배아 염기성 포스파타제의 분비(SEAP)를 통해 CD154(CD40L)의 생물활성을 측정하는 데 이용하였다. HEK293 세포를 NF-κB-유도성 SEAP 구축물(construct) 및 인간 CD40 유전자로 안정적으로 형질감염시켜 이러한 세포들을 생성시켰다. 그러므로, HEK-블루™ 세포는 TNFR/CD40 자극 후 NF-κB 활성화에 대한 배아 염기성 포스파타제의 분비(SEAP)를 통해 TNF α/CD40L의 생물활성을 측정한다. 종양 괴사 인자 알파(TNF-α)는 면역 세포의 조절 및 전신 염증에 관련된 것으로 알려진 시토카인이다. CD40L은 효과적인 면역 반응의 발달 및 T-세포 활성화에 관련된 공동-자극성 단백질이고, T1DM을 포함한 자가면역 질환의 발병에 관련된 것으로 여겨진다(문헌[마르콜레스-클라크(Margolles-Clark), E. 등 "Small molecule costimulatory blockade: organic dye inhibitors of the CD40-CD154 interaction," *J. Mol. Med.*, 2009, 87, 1133-1143]).

[0065] HEK-블루 TNF α 및 CD40L 센서 세포(인비보겐)(50,000/웰)를 리포택타민(LPF)의 존재 하에 6 시간 동안 GED-0301 안티센스(AS) 또는 대조군 센스(S) 올리고뉴클레오티드(OGN; 4 μg/mL)와 함께 인큐베이션시킨 후 18 시간 동안 매질에 인큐베이션시키고 뒤이어 TGF-β(200 ng/mL; 24 시간, DMEM P/S 2 % 혈청)의 존재 또는 부재 하에 TNF α(1 ng/mL) 또는 CD40L(25 ng/mL)을 투여하였다. GED-0301은 SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드(GTXGCCCTTCTCCCCXGCAGC(여기서 X는 5'-메틸-2'-데옥시시티딘 5' 모노포스페이트(5'-Me-dC)(서열 6)이다))이다. 이 세포에서 TNF α 또는 CD40L에 의해 유도된 SEAP의 분비를, 제조자에 의해 공급된 분석법으로서 이러한 목적으로 특이적으로 개발된, SEAP 존재 하에서는 자주색-청색으로 변화하는 매질과 비색성 효소 분석법인 콘티(QUANTI)-블루™를 이용하여 정량화하였는데, 이는 625-655 nm에서 OD를 판독함으로써 정량화할 수 있다. 데이터는 비처리된 대조군 세포 내에서의 자극 반응으로 정상화시킨 값(TNF α 또는 CD40L 단독)을 이용하여 플레이트당 4 번 반복한 3 회의 독립적 실험의 평균이다.

[0066] TGF-β 및 GED-0301의 TNF α 및 CD40L에 의한 HEK-블루 세포 내에서의 NF-κB 활성화에 대한 효과가 각각 도 2a 및 2b에 나타나 있다. 결과는 TNF α 및 CD40L 둘다 상당한 NF-κB 활성화(SEAP 발현에 의해 측정함)을 생성하였고 이들이 둘다 TGF-β에 의해 저해된다는 것을 보여준다. SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드 GED-0301로 처리함에 의해 이 저해를 상당히 더 증대시켰는데, 이는 이 처리가 TGF-β의 효과를 증대 및/또는 복원시킬 수 있다는 점을 가리킨다. 세포 배양 시스템에서, TGF-β는 이용한 세포 유형에 의존하여 NF-κB 활성화를 촉진시키기도 하고 억제시키기도 할 수 있다(문헌[홍(Hong), S. 등, "Smad7 sensitizes tumor necrosis factor induced apoptosis through the inhibition of antiapoptotic gene expression by suppressing activation of the nuclear factor-κappaB pathway," *Cancer Res.*, 2007, 67, 9577-9583 및 그 밖의 참조문헌]). TGF-β는 B 세포 및 인간 장 고유관 단핵 세포(LPMC) 내 NF-κB의 음성 조절제였다. 형질감염된 HEK 세포에 대한 결과는

TGF- β 1이 정상 LPMC에서 NF- κ B 활성화를 음성적으로 조절하고(TGF- β 1으로의 예비처리가 TNF- α -유도성 NF- κ B 활성화 억제시켰기 때문이다), IBD LPMC의 특이적 Smad7 안티센스로의 처리가 NF- κ B 활성 억제를 초래한다는 점을 나타낸, LPMC에 대해 관찰된 결과와 유사하였다(문현[몬테레온(Monteleone), G. 등 "A failure of transforming growth factor- β 1 negative regulation maintains sustained NF- κ B activation in gut inflammation," *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 3925-3932]).

[0067]

GED-0301이 분석된 세포를 투과시킬 수 있다는 것을 확인하기 위해, HEK 블루 센서 세포(50000/웰)를 리포펙타민(LPF, 인비트로젠)의 존재 또는 부재 하에서 48 시간 동안 플루오레세인-표지된 GED-0301 AS OGN으로 인큐베이션시키고 세포 내 유입을 분석하였다. 현미경 이미지는 리포펙타민 존재 하에서 플루오레세인-표지된 GED-0301과 인큐베이션된 HEK-블루 센서 세포가 리포펙타민으로 처리되지 않은 세포에서보다 플루오레세인-표지된 GED-0301의 유입이 더 양호하였다는 것을 나타냈다.

[0068]

실시예 2: 마우스에서 SMAD7 안티센스의 분포 실험

[0069]

다중 저용량 스트렙토조토신-유도성 당뇨병(STZ, β -세포 특이적 독소; 5 일 연속 40 mg/kg i.p.)이 있는 레귤러 B6 마우스(6 주 된 수컷; 잭슨(Jackson) 연구소)에 세 가지의 서로 다른 경로: 경구(p.o.), 복강내(i.p.), 및 피하(s.c.)(125 μ g/마우스=5 mg/kg; 500 μ L 바이카르보네이트 용액, pH 9.5를 경구 위관영양(gavage)으로 경구투여하여 위 분해를 예방하였다)로 플루오레세인-표지된 GED-0301 안티센스 올리고뉴클레오티드(트리링크(Trilink))를 투여하였다. 두 개의 다른 시간 지점(4 시간 및 24 시간)에서, 두 마리의 서로 다른 동물(하나는 현미경검사 용, 하나는 유동 세포 측정법 용)로부터 장기를 수집하였고 가공하였다. 이하의 장기를 수집하였다: 췌장, 간, 신장, 비장, 흉선, 장, 뇌, 혈액, 췌장 림프절, 상완 림프절, 소화관-연관 림프성 조직. 유동 세포 측정법 분석을 위해, 장기를 콜라게나제 D(로슈(Roche))를 이용하여 소화시켰고, 세포 스트레이너(cell strainer)(70 μ m; BD 팔콘(Falcon))를 통과시켰고, HBSS에서 재현탁시키고, 생육 세포(LIVE/DEAD® 고정 가능한 자주색 사멸 세포 염색 키트; 인비트로젠) 및 백혈구(항-마우스 CD45 APC; 이바이오사이언스(eBioscience))를 염색시켰다. 이들을 그 후 BD LSR II 유동 세포측정기 (BD 바이오사이언시스, 산호세(San Jose), CA) 및 소프트웨어 플로우조 버전(software FlowJo version) 7.2.2 (앳슈랜드(Ashland), OR)을 이용하여 생육 세포의 플루오레세인 함량을 분석하였다. 도 3a는 유동 세포 측정법 결과 분석에 사용한 게이팅 방법을 묘사하는 예들을 나타낸다. 도 3b는 특이적 기관 내 생육 세포 내의 상응하는 퍼센트 유입에 의해 얻어진 예시적인 유동 세포 측정법 결과를 포함하며, 이들은, 특히 피하 투여 후, 췌장, 췌장 림프절, 및 다른 기관(백혈구 내의, CD45+/FITC+, 및 다른 세포 내의, CD45-/FITC+ 둘 다)에 의한 상당한 안티센스 올리고뉴클레오티드 유입(백분율 FITC+)을 입증한다. 몇몇 기관 예컨대 뇌는 상당한 유입을 나타내지 않는다. 이러한 결과는 GED-0301이 피하 투여를 포함한 임상적으로 허용가능한 투여 경로를 이용하여 특이적 장기로 전달될 수 있다는 것을 확인시켜준다.

[0070]

다중경로 고 해상도 현미경 이미지(도 4)는, 유동 세포 측정법 결과와 마찬가지로(도 3b), 형광 표지된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 피하 투여 후 GED-0301의 마우스 췌장으로의 분포를 확인시켜준다. 색깔에 대한 설명: 녹색- 형광 GED0301, 회색-DAPI (세포핵의 마커), 적색-인슐린(인슐린-생성 β -세포를 지시), 및 청색-CD45(CD45 또는 백혈구 공통항원, LCA, 백혈구 마커, 면역성 및 염증 세포를 포함하는 혈액 순환 시스템의 성분을 지시함).

[0071]

실시예 3: SMAD7 안티센스의 체내 시험

[0072]

동물 모델에서 치료의 효과를 확립하기 위해 추가 체내 실험을 이용할 수 있다.

[0073]

NOD 마우스에서 SMAD7 안티센스의 고혈당증 역전 실험

[0074]

비만이 아닌 당뇨병성(NOD) 마우스, 예컨데 NOD 마우스를 고혈당증 발병시에만 처리를 시작하는 처치-유형 당뇨병 예방 시험에 이용하였다. NOD 마우스는 1형 당뇨병의 동물 모델로 통상 사용하고(문현[로엡(Roep), B. O. 등 Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, 4, 989-997]), 이들은 많은 가능한 처리를 평가하는 데 이용해왔다(문현[쇼다(Shoda), L. K. 등 "A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation" *Immunity*, 2005, 23, 115-126]). 8 주 된 당뇨병전 상태의 암컷 동물을 입수하였고(타코닉(Taconic), 10 주부터 시작하여(환경적응 후), 당뇨를 1 주에 두 번 모니터링하였다. 양성으로 나타난 동물에서는, 혈액 글루코스 레벨(혈당)을 일주일에 3 번 모니터링하였다. 이를 연속 상승된 글루코스 레벨(200 mg/dL 초과의 비공복 혈당)을 갖는 동물은, 하나의 서방형-방출 인슐린 펠릿 이식물(implant)(린빗, 린신 캐나다, 인크(LinBit,

LinShin Canada, Inc.,)을 주입하여 심각한 고혈당증 및 남아있는 β 세포의 탈진/과다작용을 피도록 하였고, 이들을 처리하기 시작하였다. 처리는 피하로 투여시켰는데, 이는 이 경로가 임상적으로 적절하고 상술된 분포 실험이 가능한 대상의 췌장, 췌장 LN, 및 다른 장기를 타겟화하는데 효과적인 것으로 나타난 바 있기 때문이다. 고혈당증 발병 순서대로 예비정의된 회전 패턴에 따라 세 처리군 중 하나에 동물들을 배정하였다. 처리(GED-0301 = Smad7 AS OGN; 125 $\mu\text{g}/\text{마우스}$) 및 상응하는 대조군(S OGN 및 생리 식염수 단독)을 매일 투여하였다. 동물들을 일주일에 2 번 모니터링하였고 정상 혈당을 유지하는 능력을 평가하였다. 삽입된 인슐린 펠릿의 효과가 사라진 후(대략 25 일), 세 번 계속 글루코스가 250 mg/dL 초과였던 동물을 당뇨병인 것으로 여기고 회생시켜 대표적인 장기(췌장, PLN)를 얻었다. 당뇨병이 아니었던 동물들에서는, 10 주 후 매일 이루어졌던 처리를 중지하였고, 이들을 추가 12 주 간 모니터링하여(총 150 일 이하) 지속적인 효과가 있는지 여부를 확립하였다. 마지막에는, 모든 동물을 회생시키고 대표적인 장기(췌장, PLN, 및 그 외)를 얻었다.

[0075] 실험 결과가 도 5a의 혈액 글루코스 레벨 및 도 5b의 남아있는 당뇨병-없는 동물의 퍼센트를 시간의 함수로 나타낸 대응하는 카플란-마이어 생존 곡선과 함께 도 5에 나타나 있다. β -세포 손상이 이미 발생된 경우 고혈당증의 시작 후 처리를 시작하였다. 그러므로, 심각한 고혈당증이 매우 빠르게 발병될 수 있었다. 생리식염수 또는 센스 올리고뉴클레오티드 대조군으로 처리된 모든 동물들에서는, 20-25일 째에 지속 방출 인슐린을 갖는 린벳 이식물이 고갈된 후의 고혈당증(혈액 글루코스>250 mg/dL)이 나타내는 것과 같이, 당뇨병이 발병하였다 ($n=7$ 및 6, 각각). 활성 GED-0301 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리된 동물에서는, 처리된 11 마리 중 6 마리에서 고혈당증이 발병되지 않았으며, 이들은 처리가 멈춰진(70 일) 후 오랜 시간 뒤인 실험 종료(150 일)시까지 당뇨병 없는 상태를 유지하였다.

[0076] 실험 종료시(150 일)에 비-당뇨병 동물의 글루코스 반응을 확인하기 위해, 경구 글루코스 내성 시험(OGTT)을 몇몇 GED-0301-처리된 마우스 뿐 아니라 대조군 마우스에서도 수행하였다. 150 mg의 글루코스 용량을 경구 위관 영양으로 16 시간 단식시킨 마우스에 투여하였고 혈액 샘플을 150 분 까지로 사전정의된 시간 간격으로 수집하였다. 도 6에 나타난 결과는 글루코스 반응, 및 그러므로 인슐린 분비 능력이 건강한 동물의 그것과 유사하였다는 것을 확인한다. 혈액 글루코스 레벨은 모든 동물에서 경구 투여 150 분 내로 정상으로 돌아왔다.

[0077] 실험 종료시(150 일)까지 당뇨병성이 되지 않았던 GED-0301 처리된 NOD 마우스로부터 췌장 섹션의 고-해상도 공초점 현미경 이미지화를 수행하여 인슐린-생성 β -세포의 존재를 확인하였다. 도 7은 GED-0301 처리된 마우스 및 상응하는 대조군으로부터의 췌장의 대표적인 섬-함유 섹션의 일련의 다중채널 Z-스택 이미지를 나타낸다. 서로 다른 색깔(컬럼)은 다음과 같다: 청색은 DAPI(세포 핵의 마커), 적색은 인슐린(인슐린-생성 β -세포를 지시), 및 녹색은 글루카곤(글루카곤-생성 α -세포를 지시). 축척 막대는 100 μm 를 가리킨다. 정상의 비-당뇨병성 대조군 동물이 인슐린- 및 글루카곤-생성 세포(상부 열)를 모두 함유하는 정상 섬을 가진 데 반해, 실험 도중 당뇨병성이 된 NOD 마우스는 그들의 섬에서 인슐린-생성 β -세포가 손실되었다(하부 열; 정상혈당으로 되돌아가지 않았던 센스 올리고뉴클레오티드-처리 마우스로부터 얻음). 고혈당증 발병시 처리 시작 후 당뇨병성이 되지 않았던 GED-0301 안티센스(AS) 처리된 동물은 인슐린-생성 세포가 손실된 일부 섬을 가졌다(나(글루카곤의 존재는 나타나나, 인슐린의 존재는 나타나지 않는 상부로부터 두번째 열), 그러나 이들은 또한 보존된 인슐린-생성 세포를 갖는 섬도 가졌다(상부로부터 세 번째 열)). 그러므로, 고혈당증 발병시 시작한 GED-0301 처리는 NOD 마우스에서 자가면역 공격의 효과를 호전시킬 수 있고 인슐린-생성 β -세포를 충분한 숫자로 보존하여 정상 혈액 글루코스 반응을 유지하고 고혈당증의 발병을 피할 수 있는 것으로 보여진다.

섬 이식에서 SMAD7 안티센스의 실험

[0079] 국부 미세환경 내의 TGF- β 신호전달의 복원은 근본적인 자가면역 질환의 존재를 포함하는, 동종 섬 이식 모델 실험 내에서의 가능성을 나타냈다. GED-0301 처리를 행하여 동종 섬 이식에 대한 생존 및/또는 내성에 있어서의 안티센스 타겟화한 SMAD7의 효과를 확립하였다. 구체적으로, 베타 세포-특이적 독성(STZ)의 투여에 의해 당뇨병성이 된 설치류내 동종 이식 모델에서의 섬의 생존 연장 및/또는 거부 반응 예방에 있어서의 GED-0301의 효과를 측정할 수 있었다. 일차 종점은 이식 부위 내 Smad7 발현/조절과의 상관 관계로서 섬 동종이식 생존률, T림프구, 수지상 세포에 대한 활성화 마커, Treg 및 다른 억제제 세포의 빈도 및 억제 기능을 포함할 수 있다.

2형 당뇨병에서 SMAD7 안티센스 및 낮은 등급의 염증 실험

[0081] 당뇨병전 상태 및 제2형 당뇨병에서는 낮은 등급의 전신 및 국소 염증이 특징적으로 나타나는 바, 췌장섬 내 낮은 등급 염증의 발병에 있어 SMAD7의 잠재적인 역할을 측정할 수 있었다. 또한, 당뇨병에서 섬 혈관 합병증에 있어 SMAD7의 역할도 실험할 수 있었다.

[0082] 당뇨병성 신병증에서 SMAD7의 안티센스 실험

인간 당뇨병성 신병증 및 다른 단백뇨 사구체 질환에서, Smad7을 강하게 상향조절시켰다. 이 상향조절은 사구체 여과 장애물의 일체성 및 알부민뇨의 예방을 책임지는 사구체 세포, 족세포(podocyte)에서 주로 발생하는데, 이는 전반적인 군집 내의 심혈관 결과의 독립 예측변수이다. TGF-베타의 타겟화는 강한 번역 노력(피르페니돈(pirfenidone)으로 시도)의 주제였다. 이러한 노력에 있어서, 결과는 당뇨병성 신병증 및 다른 만성 신장 질환의 치료에 있어서 예상 외로 음성이었다. Smad7 억제에 의한 적절한 TGF- β 신호전달의 복원은 이러한 질병을 치료하는 데에 있어 유망하고 신규 접근법이 될 수 있다. NIH 컨소시엄에 의해 개발된 당뇨병성 합병증에 대한 당뇨병성 신병증의 확립된 실험 모델을 연성 및 경성 신장 결과(알부민뇨, 사구체 여과율, 사구체경화증)에 대한 예비적 생체내 데이터를 생성하는 데 이용할 수 있다. 후속 임상 연구를 당뇨병성 리서치 인스티튜트(Research Institute)의 당뇨병성 신병증 분야에서 개발할 수 있다.

[0084] 글루코스 자극 인슐린 분비에 대한 SMAD7 안티센스 실험

Smad7 과다발현을 갖는 췌장 β -세포를 갖는 마우스는 인슐린 방출 장애 및 증가된 공복 혈당을 특징으로 한다. 그러므로, Smad7 억제는 췌장 β -세포 기능의 개선을 초래할 수 있다. 유전적으로 조작되어 다른 레벨의 SMAD7 을 발현하는 인간 췌 내의 글루코스-자극 인슐린 방출 실험을 수행할 수 있다. 추가 실험에서, 인간 환자들을 실험하여 당뇨병전 상태의 대상체에서의 글루코스 내성에 있어서의 Smad7 억제의 역할을 측정할 수 있다.

<참조문헌 인용>

본원에 인용된 각각의 특허 자료 및 과학적 문헌의 전체 공개 내용은 모든 목적으로 참조문헌으로 포함된다.

<동등물>

본원 발명은, 본원 발명의 본질적 특징에서 출발한 다른 특정 형태로 구현될 수 있다. 상기 실시양태는 그러므로 이제까지 기술된 발명을 제한하는 것이 아니라, 실례로 보여주는 것이라고 여겨져야 한다. 본원 발명의 범위는 이제까지 상세한 설명에 의한 것보다는 첨부된 청구항에 의해 나타나는 것이며, 청구항의 의미와 동등물의 범위 내에 속하는 모든 변경은 이 안에 포함되는 것으로 의도된 것이다.

도면

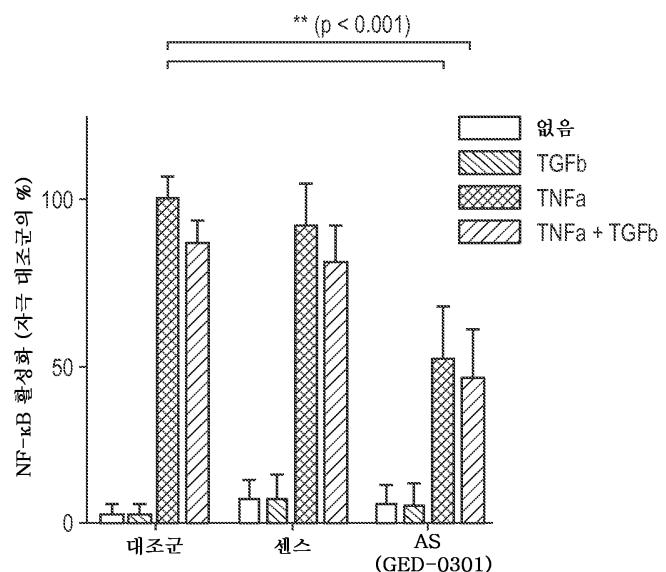
도면1a

도면1b

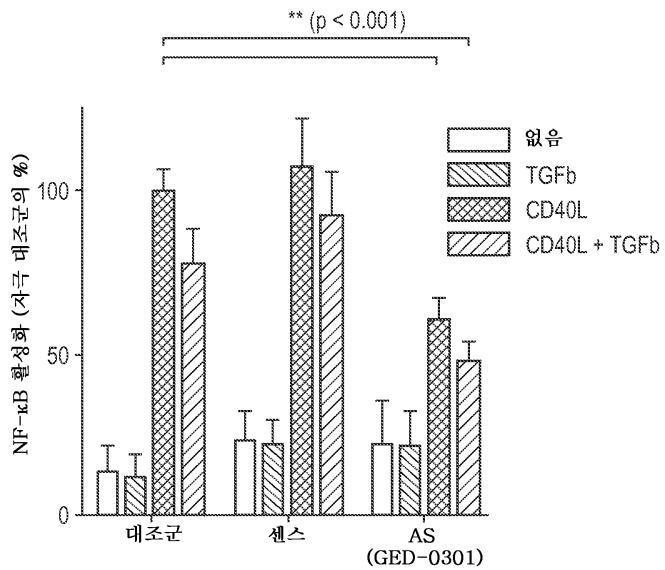
MFRTRKRSALVRRILWRSRAPGGEDEEEGAGGGGGGEI.RGEGATD
SRAHGAGGGPGRAGCCLGKAVRGAKGHHHPNPAAGAGAAGGAEADLKALTHSVLKK
LKERQLELLLQAVESRGGTRTAACLLLPGRLDCLLGPGAPAGAQPAQPPSSYSLPLLLC
KVFRNPDLRHSSEVKRLCCCESYGKTNPELVCCNPHILSRLCELESPPPPYSRYPMDF
LKPTADCPDAVPSSAETGGTNYLA PGGLSDSQLLEPGDRSHNCVVAYWEEKTRVGRL
YCVQEPESDLIFYDLPGNGFCLGQLNSDNKSQVLQVYRSKIGCGIQLTREVDGVWYN
RSSYPIFKSATLDNFDSTRTLLVHKVFPGFSIKAFDYEKAYSLSQRPNDFHEFMQQWPWTG
FTVOISFYKGWGOCTBDFISSCPCWLEVITNSR

서열 2

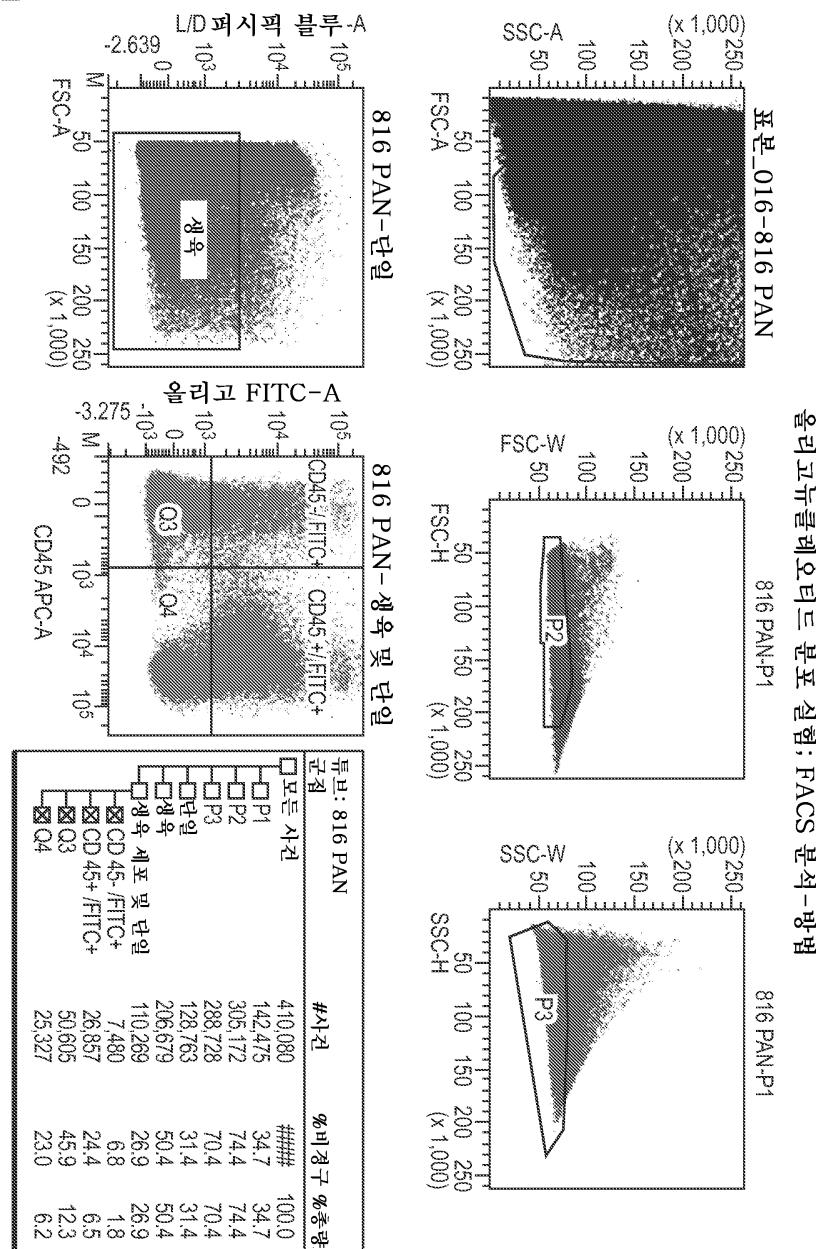
도면2a

TNF- α 자극된 HEK-블루 세포 내에서 NF- κ B 활성화에 대한
SMAD7 AS& TGF β 의 효과

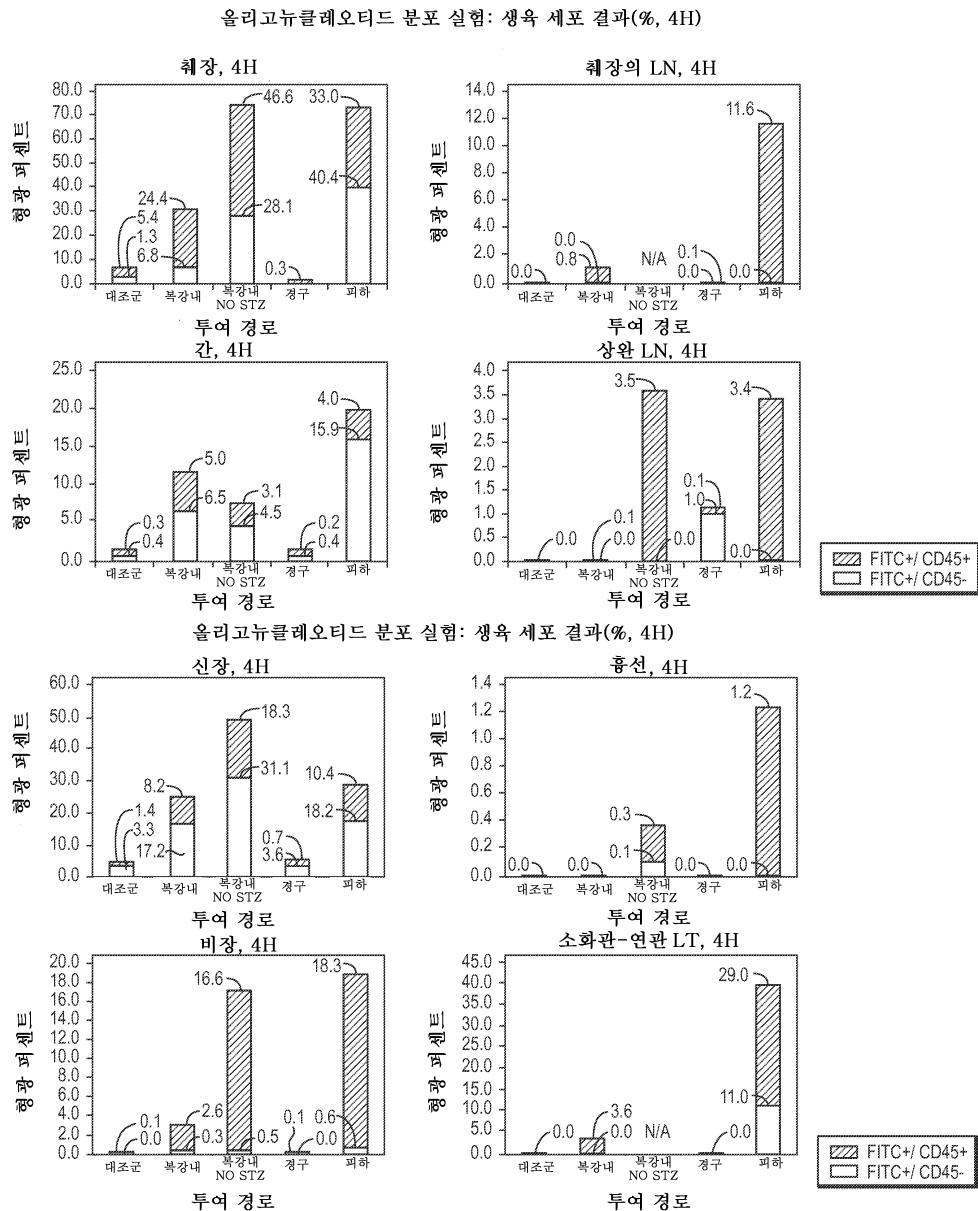
도면2b

CD40L-자극된 HEK-블루 세포 내에서 NF- κ B 활성화에 대한
SMAD7 AS& TGF β 의 효과

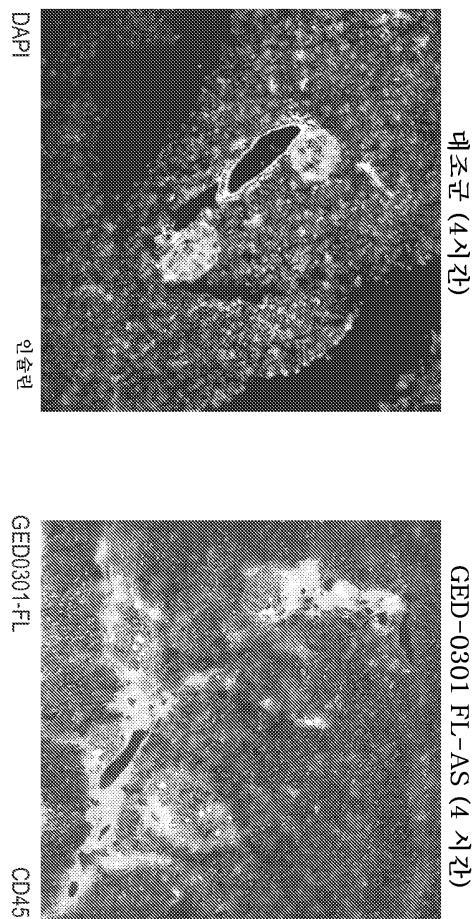
도면3a



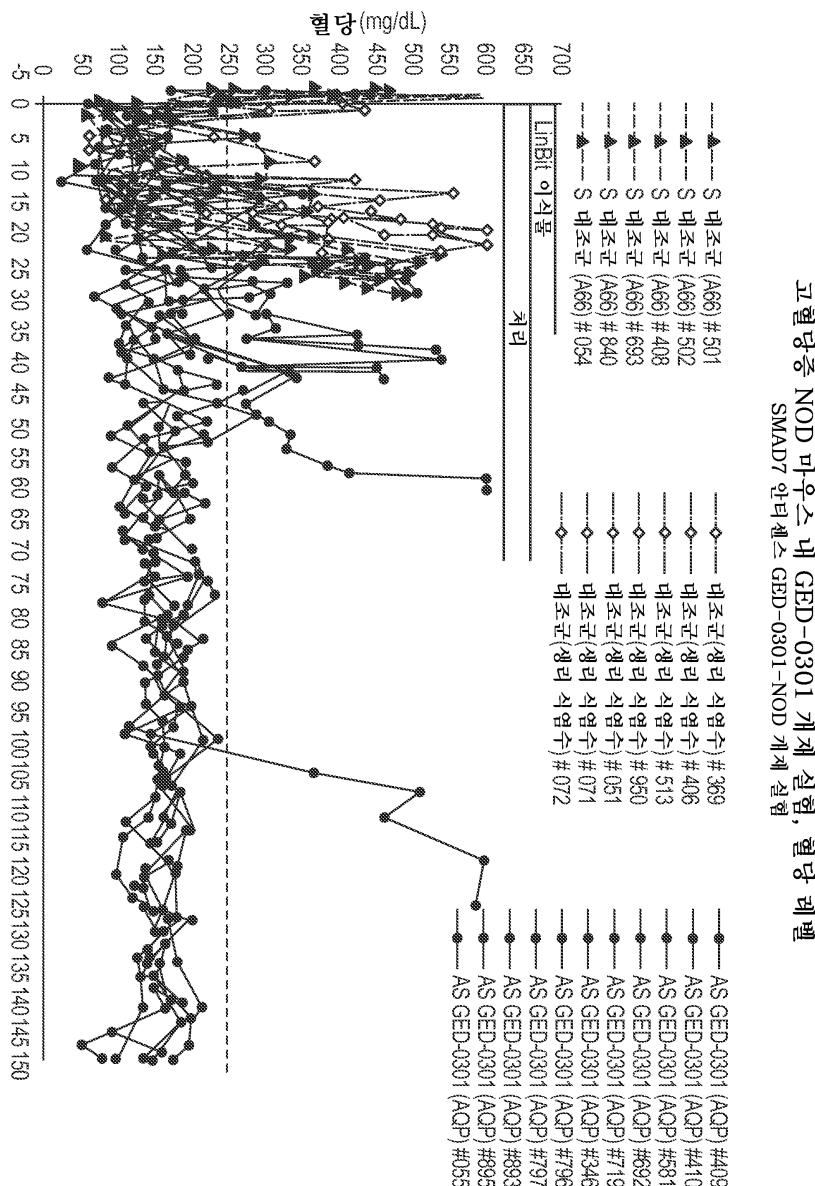
도면3b



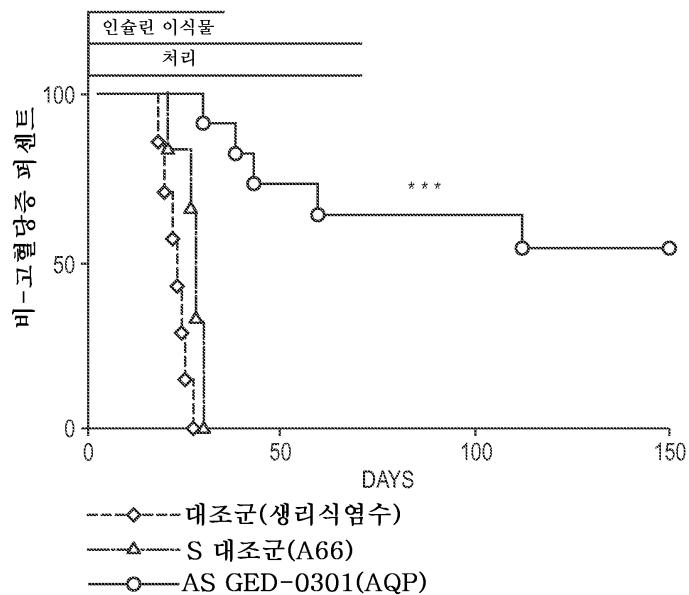
도면4



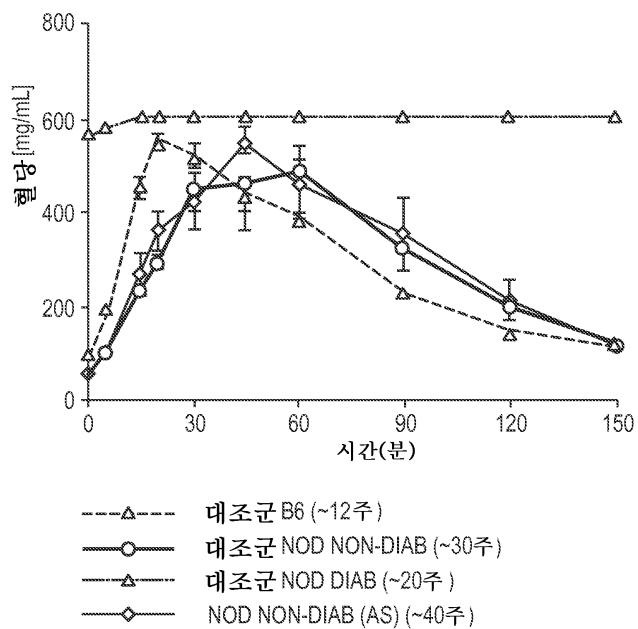
도면5a



도면5b

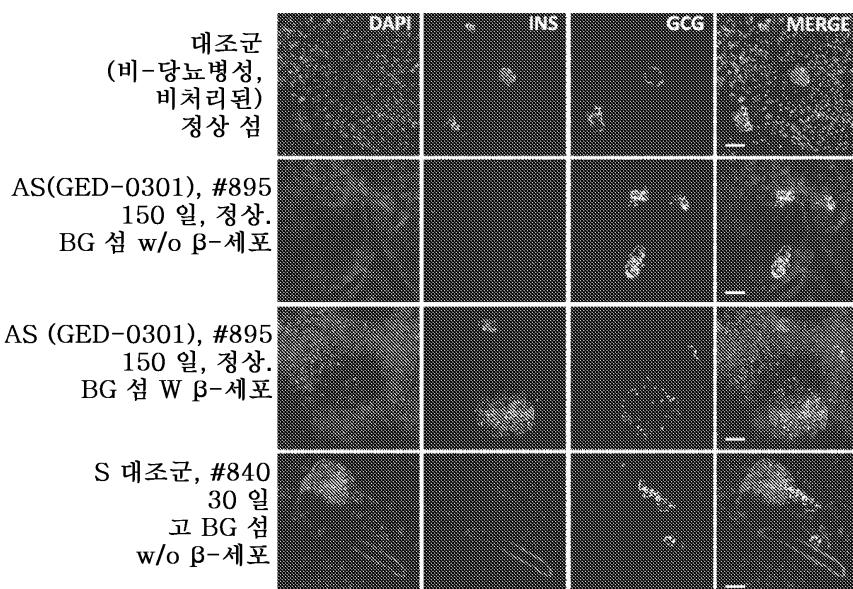
고혈당증 NOD 마우스 내 GED-0301 개재 실험,
카플란 마이어 생존률 그래프

도면6

고혈당증 NOD 마우스 내의 GED-0301 개재 실험,
경구 글루코스 내성 실험(OGTT)

도면7

고혈당증 NOD 마우스 내의 GED-0301 개재 실험,
인슐린 및 글루카곤을 위해 염색된 대표적인 체장 섹션



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> NOGRA PHARMA LIMITED

UNIVERSITY OF MIAMI

<120> METHODS OF TREATING DIABETES AND/OR PROMOTING SURVIVAL OF
PANCREATIC ISLETS AFTER TRANSPLANTATION

<130> GIU-031PC

<140> PCT/US2013/037150

<141> 2013-04-18

<150> 61/625,904

<151> 2012-04-18

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3111

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggcgcggcg	gagagccgcg	cagggcgcgg	gccgcgcgg	gtggggcagc	cgagacgcag	60
ccccccgatc	ccggcgggac	ccccccgggc	ccccgcgcgc	ccccggcct	ccgggagact	120
ggcgcatgcc	acggagcgcc	cctcgccgcg	cgccgcgtcc	tgcggggcc	cctgctgtcg	180
ctgtgtcg	ctgcgcgtgc	tgcggcaact	cggcgcgcga	cttcttcatg	gtgtgcggag	240
gtcatgttcg	ctcccttagca	ggcaaacgac	tttctcctc	gcctcctcgc	cccgcatgtt	300
caggaccaaa	cgatctgcgc	tcgtccggcg	tctctggagg	agccgtgcgc	ccggcggcga	360
ggacgaggag	gagggcgcag	ggggaggtgg	aggaggaggc	gagctgcggg	gagaagggc	420
gacggacagc	cgagcgcata	ggcccggtgg	ccggcccccgg	ggcaggcgtg	gatgctgcct	480
ggcaaggcg	gtgcgaggtg	ccaaaggta	ccaccatccc	caccgcgcag	ccgcgggcgc	540
cgccgcggcc	gggggcgcgc	aggcgatct	gaaggcgctc	acgcactcg	tgcgtcaagaa	600
actgaaggag	cggcagctgg	agctgctgt	ccaggccgtg	gagtccgcgc	gccccgacgcgc	660
caccgcgtgc	ctccctgcgtc	ccggccgcct	ggactgcagg	ctggggccgg	ggccgcggcgc	720
cgccgcgcag	cctgcgcagc	cgccctcgctc	ctactcgctc	ccctcctgc	tgtgc当地	780
gttcaggtgg	ccggatctca	ggcattcctc	ggaagtcaag	aggctgtgtt	gctgtgaatc	840
ttacggaaag	atcaaccccg	agctgggtgt	ctgcaacccc	catcaccta	gccgactctg	900
cgaactagag	tctccccccc	ctccttactc	cagatacccg	atggatttc	tcaaaccaac	960
tgcagactgt	ccagatgtg	tgccttcctc	cgctgaaaca	ggggAACGA	attatctggc	1020
ccctgggggg	cttcagatt	cccaacttct	tctggagcct	ggggatcggt	cacactggtg	1080
cgtgggtggca	tactggagg	agaagacgag	agtggggagg	ctctactgtg	tccaggagcc	1140
ctctctggat	atcttctatg	atctacctca	gggaaatggc	tttgcctcg	gacagctcaa	1200
ttcgacaaac	aagagtacgc	tggtgcaagaa	ggtgccggc	aaaatcggt	gccccatcca	1260
gctgacgcgg	gaggtggatg	gtgtgtgggt	gtacaacccgc	agcagttacc	ccatcttcat	1320
caagtccgcc	acactggaca	accggactc	caggacgctg	ttggtacaca	agggtttccc	1380
cggtttctcc	atcaaggctt	tgcactacga	gaaggcgatc	agcctgcagc	ggccaaatga	1440
ccacgagttt	atgcagcagc	cgtggacggg	cttaccgtg	cagatcagct	ttgtgaaggg	1500
ctgggttcag	tgctacaccc	gccagttcat	cagcagctgc	ccgtgctggc	tagaggtcat	1560
cttcaacagc	cggtagccgc	gtgcggaggg	gacagagcgt	gagctgagca	ggccacactt	1620
caaactactt	tgctgtcaat	atttccctc	ttagtgtctg	ctttcatgc	aaactctttg	1680
gtcgaaaaat	ttttgtttgt	tgggtgggtt	tcttcctc	gtccctcggtt	gtgttctgtt	1740

ttgtttcgct ctttgagaaa tagcttatga aaagaattgt tgggggtttt ttggaagaa	1800
ggggcaggta tgatcgccag gacaccctga taggaagagg ggaagcagaa atccaagcac	1860
caccaaacac agtgtatga gggggcggt catcattca ctgtcagga gtgtgtgtga	1920
gtgtgagtgt gcggctgtgt gtgcacgcgt gtgcaggagc ggcagatgg gagacaacgt	1980
gtctttgtt ttgtgtctt tatggatgtc cccaggcagag aggttgcag tcccaagcgg	2040
tgtctctctt gcccttgga cacgctcagt gggcagagg cagtagctgg gcaagctggc	2100
ggctggggtc ccagcagctg ccaggagcac ggctctgtcc ccagcctggg aaagcccctg	2160
ccccctcctt ccctcatcaa ggacacggc ctgtccacag gcttctgagc agcgagcctg	2220
ctagtggccg aaccagaacc aattatttc atcctgtct tattccctt ctgcagccc	2280
ctgccattgt agcgctttc tttttggcc atctgctct ggatccctt gagatggct	2340
tcccaaggc tgccgggca gcccctcac agtattgctc acccagtgcc ctctccctc	2400
agcctctccc ctgcctgcc tggacatc aggtttcc cggacttaga aaaccagctc	2460
agcaactgcct gctccatcc tgtgtttaa gctctgtat taggcccagca agcggggatg	2520
tccctgggag ggacatgctt agcagtcccc ttccctccaa gaaggattt gtcgtcata	2580
acccaaggta ccatcctagg ctgacaccta actcttctt cattttctt acaactcata	2640
cactcgtagt atacttcgac actgttctt acaatgag catgtttaga cttaacata	2700
agctatttt ctaactacaa aggttaaat gaacaagaga agcattctca ttggaaattt	2760
agcattgtatg tgcttgaga gagaaaggac tcctgaaaaaa aacctgaga ttatataag	2820
aaaaaaaaatgt attttatgtt atatataaat atattattac ttgttaaat aaagacgttt	2880
tataagcatac attttatgt tattgtgcaa tgtgtataaa caagaaaaat aaagaaaaga	2940
tgcactttgc ttaatataa atgcaataaa caaatgcca attaaaaaag ataaacacaa	3000
gattgggttt tttcctatg ggtgttatca cctagctgaa tggtttctt aaggagttt	3060
tgttccatta aacgatttt aaaatgtaca cttgaaaaaa aaaaaaaaaa a	3111
<210> 2	
<211> 425	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
Met Phe Arg Thr Lys Arg Ser Ala Leu Val Arg Arg Leu Trp Arg Ser	
1 5 10 15	
Arg Ala Pro Gly Gly Glu Asp Glu Glu Gly Ala Gly Gly Gly	
20 25 30	

Gly Gly Gly Glu Leu Arg Gly Glu Gly Ala Thr Asp Ser Arg Ala His

35 40 45

Gly Ala Gly Gly Gly Pro Gly Arg Ala Gly Cys Cys Leu Gly Lys

50 55 60

Ala Val Arg Gly Ala Lys Gly His His Pro His Pro Pro Ala Ala

65 70 75 80

Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Glu Ala Asp Leu Lys Ala Leu Thr

85 90 95

His Ser Val Leu Lys Leu Lys Glu Arg Gln Leu Glu Leu Leu

100 105 110

Gln Ala Val Glu Ser Arg Gly Thr Arg Thr Ala Cys Leu Leu

115 120 125

Pro Gly Arg Leu Asp Cys Arg Leu Gly Pro Gly Ala Pro Ala Gly Ala

130 135 140

Gln Pro Ala Gln Pro Pro Ser Ser Tyr Ser Leu Pro Leu Leu Cys

145 150 155 160

Lys Val Phe Arg Trp Pro Asp Leu Arg His Ser Ser Glu Val Lys Arg

165 170 175

Leu Cys Cys Cys Glu Ser Tyr Gly Lys Ile Asn Pro Glu Leu Val Cys

180 185 190

Cys Asn Pro His His Leu Ser Arg Leu Cys Glu Leu Glu Ser Pro Pro

195 200 205

Pro Pro Tyr Ser Arg Tyr Pro Met Asp Phe Leu Lys Pro Thr Ala Asp

210 215 220

Cys Pro Asp Ala Val Pro Ser Ser Ala Glu Thr Gly Gly Thr Asn Tyr

225 230 235 240

Leu Ala Pro Gly Gly Leu Ser Asp Ser Gln Leu Leu Leu Glu Pro Gly

245 250 255

Asp Arg Ser His Trp Cys Val Val Ala Tyr Trp Glu Glu Lys Thr Arg

260 265 270

Val Gly Arg Leu Tyr Cys Val Gln Glu Pro Ser Leu Asp Ile Phe Tyr

275	280	285
Asp Leu Pro Gln Gly Asn Gly Phe Cys Leu Gly Gln Leu Asn Ser Asp		
290	295	300
Asn Lys Ser Gln Leu Val Gln Lys Val Arg Ser Lys Ile Gly Cys Gly		
305	310	315
Ile Gln Leu Thr Arg Glu Val Asp Gly Val Trp Val Tyr Asn Arg Ser		
325	330	335
Ser Tyr Pro Ile Phe Ile Lys Ser Ala Thr Leu Asp Asn Pro Asp Ser		
340	345	350
Arg Thr Leu Leu Val His Lys Val Phe Pro Gly Phe Ser Ile Lys Ala		
355	360	365
Phe Asp Tyr Glu Lys Ala Tyr Ser Leu Gln Arg Pro Asn Asp His Glu		
370	375	380
Phe Met Gln Gln Pro Trp Thr Gly Thr Val Gln Ile Ser Phe Val Lys		
385	390	395
Gly Trp Gly Gln Cys Tyr Thr Arg Gln Phe Ile Ser Ser Cys Pro Cys		
405	410	415
Trp Leu Glu Val Ile Phe Asn Ser Arg		
420	425	

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 3

gtcgccctt ctccccgag c 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="5-methylcytosine" or "2'-0-methylcytosine"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="5-methylguanine" or "2'-0-methylguanine"

<220><221> VARIANT

<222> (16)..(16)

<223> /replace="5-methylcytosine" or "2'-0-methylcytosine"

<220><221> VARIANT

<222> (17)..(17)

<223> /replace="5-methylguanine" or "2'-0-methylguanine"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 4

gtcgccctt ctccccgcag 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<400> 5

gtcgccctt ctccccgcag

20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<400> 6

gtcgccctt ctccccgcag c

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-deoxyguanosine methylphosphonate

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-deoxyguanosine methylphosphonate

<400> 7

gtcgccctt ctccccgcag

20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-deoxyguanosine methylphosphonate

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-deoxyguanosine methylphosphonate

<400> 8

gtcgccctt ctccccgcag c

21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphorothioate

<400> 9

gtcgccctt ctccccgag

20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphorothioate

<400> 10

gtcgccctt ctccccgag c

21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-deoxyguanosine methylthiophosphonate

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-deoxyguanosine methylthiophosphonate

<400> 11

gtcgccctt ctccccgcag

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-deoxyguanosine methylthiophosphonate

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-deoxyguanosine methylthiophosphonate

<400> 12

gtcgccctt ctccccgcag c

21