



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월05일
(11) 등록번호 10-2417601
(24) 등록일자 2022년07월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/1136 (2013.01)
A61K 31/7125 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7028947(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2015년11월16일
심사청구일자 2021년09월08일
- (85) 번역문제출일자 2021년09월08일
- (65) 공개번호 10-2021-0113697
- (43) 공개일자 2021년09월16일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7016366
원출원일자(국제) 2015년11월16일
심사청구일자 2020년10월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2015/076730
- (87) 국제공개번호 WO 2016/075339
국제공개일자 2016년05월19일
- (30) 우선권주장
14193368.9 2014년11월16일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
W02005074981 A1
W02008109546 A1
W02003000656 A1
KR1020070004695 A
- (73) 특허권자
뉴로비전 파마 게엠베하
독일 82031 그윈발트, 에밀-가이스-슈트라쎄 4
- (72) 발명자
호스바흐, 마커스
독일, 95326 쿨름바흐, 바이헤르 슈트라쎄 30
크람퍼트, 모니카
독일, 96047 밤베르크, 카푸치너슈트라쎄 13
아르트, 한스-로타
독일, 14052 베를린, 자스민베그 9
- (74) 대리인
성낙훈

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 문동현

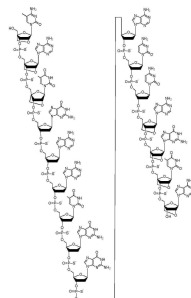
(54) 발명의 명칭 TGF-R 신호의 억제제로서의 안티센스-올리고뉴클레오타이드

(57) 요약

본 발명은 적어도 10개의 뉴클레오타이드의 길이를 가지며, 여기에서 뉴클레오타이드의 적어도 2개가 LNA인 안티센스-올리고뉴클레오타이드, TGF-R 신호의 억제제로서의 그의 용도, 이러한 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 조성물 및 신경 질환, 신경변성 질환, 섬유 질환 및 과증식성 질환의 예방 및 치료를 위한 용도에 관한

(뒷면에 계속)

대표도 - 도4



것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 9/0085 (2013.01)

C12N 15/1138 (2013.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/313 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/3231 (2013.01)

C12N 2310/341 (2013.01)

C12N 2310/346 (2013.01)

C12N 2320/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 3' 말단에 1 내지 5개의 LNA 단위 및 5' 말단에 1 내지 5개의 LNA 단위를 갖는 겹량체 구조를 갖고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **CCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 5) 또는 시퀀스 **ACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 6) 또는 시퀀스 **GGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 7) 또는 시퀀스 **GTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 8) 또는 시퀀스 **TTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 9)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **CCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 5) 또는 시퀀스 **ACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 6) 또는 시퀀스 **GGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 7) 또는 시퀀스 **GTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 8) 또는 시퀀스 **TTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 9)에 대하여 상보적인 시퀀스를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 선택적으로 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역의 시퀀스 **CCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 5) 또는 시퀀스 **ACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 6) 또는 시퀀스 **GGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 7) 또는 시퀀스 **GTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 8) 또는 시퀀스 **TTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 9)와만 하이브리드화하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 12 내지 20개의 뉴클레오타이드 길이를 갖거나, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 뉴클레오타이드간 가교로서 포스페이트, 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트를 갖는 안티센스-올리고뉴클레오타이드.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 일반식(S6):

5'-N¹-**GTCATAGA**-N²-3' (시퀀스 동정 번호 12) 또는

5'-N³-**ACGCGTCC**-N⁴-3' (시퀀스 동정 번호 98) 또는

5'-N⁵-**TTTGGTAG**-N⁶-3' (시퀀스 동정 번호 11) 또는

5'-N⁹-**ATTAATAA**-N¹⁰-3' (시퀀스 동정 번호 101) 또는

5'-N¹¹-**TGTTTAGG**-N¹²-3' (시퀀스 동정 번호 10)로 표현되고,

여기에서

N¹은: ATGGCAGACCCGCTGCTC-, TGGCAGACCCGCTGCTC-, GGCAGACCCGCTGCTC-, GCAGACCCGCTGCTC-, CAGACCCGCTGCTC-, AGACCCGCTGCTC-, GACCCGCTGCTC-, ACCCCGCTGCTC-, CCCCCTGCTC-, CCCGCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;

N²는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCCA, -CCGAGCCCCAG, -CCGAGCCCCAGC, -CCGAGCCCCAGCG, -CCGAGCCCCAGCGC, -CCGAGCCCCAGCGCA, -CCGAGCCCCAGCGCAG, -CCGAGCCCCAGCGCAGC, -CCGAGCCCCAGCGCAGCG 또는 -CCGAGCCCCAGCGCAGCGG를 나타내고;

N³은: GTGGGATCGTGCTGGCGAT-, TGGGATCGTGCTGGCGAT-, GGGATCGTGCTGGCGAT-, GGATCGTGCTGGCGAT-, GATCGTGCTGGCGAT-, ATCGTGCTGGCGAT-, TCGTGCTGGCGAT-, CGTGCTGGCGAT-, GTGCTGGCGAT-, TGCTGGCGAT-, GCTGGCGAT-, CTGGCGAT-, TGGCGAT-, GGCAT-, GCAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

N⁴는: -ACAGGACGATGTGCAGCG, -ACAGGACGATGTGCAGC, -ACAGGACGATGTGCAG, -ACAGGACGATGTGCAG, -ACAGGACGATGTGC, -ACAGGACGATGTG, -ACAGGACGATG, -ACAGGACGAT, -ACAGGACGA, -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타내고;

N⁵는: GCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CTGCCCCAGAAGAGCTA-, TGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCCCAGAAGAGCTA-, CCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGAAGAGCTA-, CCAGAAGAGCTA-, CAGAAGAGCTA-, AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;

N⁶은: -TGTTTAGGGAGCCGTCTT, -TGTTTAGGGAGCCGTCT, -TGTTTAGGGAGCCGTCT, -TGTTTAGGGAGCCGTC, -TGTTTAGGGAGCCGT, -TGTTTAGGGAGCCG, -TGTTTAGGGAGCC, -TGTTTAGGGAGC, -TGTTTAGGGAG, -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T를 나타내고;

N⁹는: TTCATATTTATATACAGGC-, TCATATTTATATACAGGC-, CATATTTATATACAGGC-, ATATTTATATACAGGC-, TATTTATATACAGGC-, ATTTATATACAGGC-, TTTATATACAGGC-, TTATATACAGGC-, TATATACAGGC-, ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;

N¹⁰은: -AGTGCAAATGTTATTGGCT, -AGTGCAAATGTTATTGGC, -AGTGCAAATGTTATTGG, -AGTGCAAATGTTATTG, -AGTGCAAATGTTATT, -AGTGCAAATGTTAT, -AGTGCAAATGTTA, -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내고;

N¹¹은: CAGAAGAGCTATTTGGTAG-, AGAAGAGCTATTTGGTAG-, GAAGAGCTATTTGGTAG-, AAGAGCTATTTGGTAG-, AGAGCTATTTGGTAG-, GAGCTATTTGGTAG-, AGCTATTTGGTAG-, GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-, TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GGTAG-, GTAG-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고,

N¹²는: -GAGCCGTCTTCAGGAATCT, -GAGCCGTCTTCAGGAATC, -GAGCCGTCTTCAGGAAT, -GAGCCGTCTTCAGGAA, -GAGCCGTCTTCAGGA, -GAGCCGTCTTCAGG, -GAGCCGTCTTCAG, -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타내는 안티센스-올리고뉴클레오타이드.

청구항 5

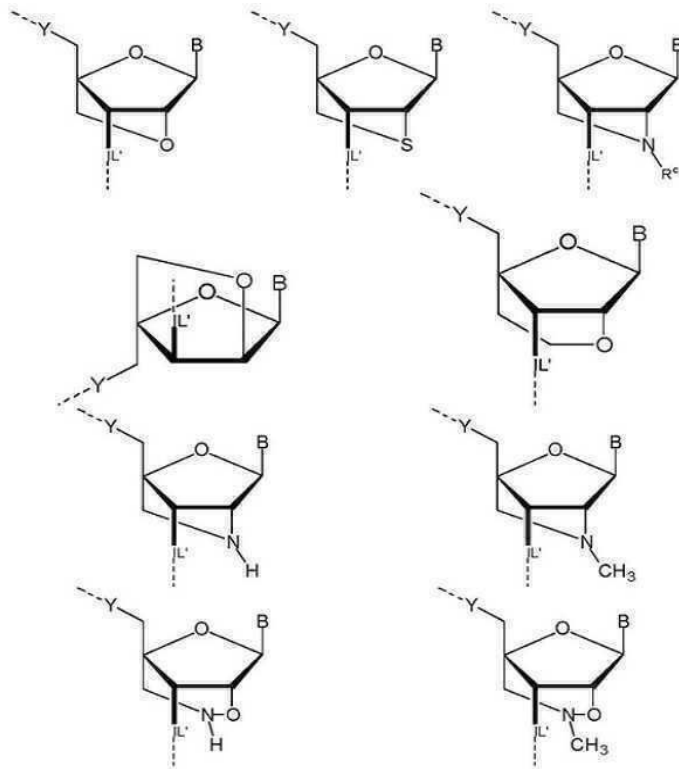
제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 5' 말단에서 마지막 2 내지 4개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고, 3' 말단에서 마지막 2 내지 4개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고, 5' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드와 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 사이에 비-LNA 뉴클레오타이드이거나 DNA 뉴클레오타이드인 적어도 6개의 연속적인 뉴클레오타이드가 존재하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 LNA 뉴클레오타이드가 포스포로티오에이트기 또는 포스포로디티오에이트기를 통하여 서로 연결되거나, 여기에서 모든 뉴클레오타이드가 포스페이트기 또는 포스포로티오에이트기 또는 포스포로디티오에이트기를 통하여 서로 연결되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드.

청구항 7

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 LNA 뉴클레오타이드가 하기 군:



로부터 선택되고

여기에서

IL' 은 $-X''-P(=X')(X^-)-$ 를 나타내고;

X' 는 $=O$ 또는 $=S$ 를 나타내고;

X^- 는 $-O^-$, $-OH$, $-OR^H$, $-NHR^H$, $-N(R^H)_2$, $-OCH_2CH_2OR^H$, $-OCH_2CH_2SR^H$, $-BH_3^-$, $-R^H$, $-SH$, $-SR^H$ 또는 $-S^-$ 를 나타내고;

X'' 는 $-O-$, $-NH-$, $-NR^H-$, $-CH_2-$ 또는 $-S-$ 를 나타내고;

Y 는 $-O-$, $-NH-$, $-NR^H-$, $-CH_2-$ 또는 $-S-$ 이고;

R^C 및 R^H 는 서로 독립적으로 수소 및 C_{1-4} -알킬로부터 선택되고.

B 는 하기 군:

아데닌, 티민, 구아닌, 시토신, 우라실, 5-메틸시토신, 5-하이드록시메틸시토신, N^4 -메틸시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 7-디아자크산틴, 2-아미노아데닌, 6-메틸아데닌, 6-메틸구아닌, 6-에틸아데닌, 6-에틸구아닌, 2-프로필아데닌, 2-프로필구아닌, 6-카복시우라실, 5,6-디하이드로우라실, 5-프로피닐우라실, 5-프로피닐시토신, 6-아자우라실, 6-아자시토신, 6-아자티민, 5-우라실, 4-티오우라실, 8-플루오로아데닌, 8-클로로아데닌, 8-브로모아데닌, 8-요오도아데닌, 8-아미노아데닌, 8-티올아데닌, 8-티오알킬아데닌, 8-하이드록실아데닌, 8-플루오로구아닌, 8-클로로구아닌, 8-브로모구아닌, 8-요오도구아닌, 8-아미노구아닌, 8-티올구아닌, 8-티오알킬구아닌, 8-하이드록실구아닌, 5-플루오로우라실, 5-브로로우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 5-트리플루오로메틸우라실, 5-플루오로시토신, 5-브로모시토신, 5-클로로시토신, 5-요오도시토신, 5-트리플루오로메틸시토신, 7-메틸구아닌, 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌, 8-아자아데닌, 7-디아자구아닌, 7-디아자아데닌, 7-디아자-8-아자아데닌, 3-디아자구아닌, 3-디아자아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신으로부터 선택되는 핵염기를 나타

내는 안티센스-올리고뉴클레오티드.

청구항 8

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 꺾임체 구조:

3-8-3, 4-8-2, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3 중의 하나를 갖는 안티센스-올리고뉴클레오티드.

청구항 9

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 안티센스 올리고뉴클레오티드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA에 100% 상보성으로 결합하고 인간 전사체 중의 임의의 다른 영역과 결합하지 않는 안티센스-올리고뉴클레오티드.

청구항 10

하기군:

Seq ID No.	Sequence, 5'-3'
232a	C ¹ b ¹ sGb ¹ sdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsAb ¹ sC ¹ b ¹
232b	C ¹ b ¹ Gb ¹ dTdC ¹ dAdTdAdGAb ¹ C ¹ b ¹
233a	Tb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsAb ¹ sC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹
233b	Tb ¹ C ¹ b ¹ Gb ¹ dTdC ¹ dAdTdAdGAb ¹ C ¹ b ¹ C ¹ b ¹
233c	Tb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsAsC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹
233d	Tb ¹ sdC ¹ sdGsdsdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsAsC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹
233e	Tb ¹ sC ¹ b ¹ sdGsdsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdsAsC ¹ sC ¹ b ¹
234a	Tb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sTb ¹ sdCsdAsdTsdAsdGsdsAsC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹
234b	Tb ¹ C ¹ b ¹ Gb ¹ Tb ¹ dCdAdUdAdGdAC ¹ b ¹ C ¹ b ¹ Gb ¹
234c	Tb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sTb ¹ sdC ¹ sdAsdTsdAsdGsdsAsC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹
234d	Tb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sdTsdC ¹ sdA ¹ sdTsdA ¹ sdGsdsA ¹ sdC ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹
234e	Tb ¹ sC ¹ b ¹ sdGsdsdTsdC ¹ sdAsdTsdA ¹ sdGsdsA ¹ sdC ¹ sdCsGb ¹
234f	Tb ¹ sdCsdGsdsdTsdC ¹ sdA ¹ sdTsdAsdGsAb ¹ sC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹
142c	C ¹ b ¹ sGb ¹ sTb ¹ sdCsdAsdTsdAsdGsdsAsCsdCsGb ¹ sAb ¹
143i	C ¹ b ¹ sTb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sdTsdCsdAsdTsdAsdGsAb ¹ sC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹
143j	C ¹ b ⁴ ssTb ⁴ ssC ¹ b ⁴ ssdGsdsTssdCsdsAssdTssdAssdGsdsA ¹ ssC ¹ b ⁴ ssC ¹ b ⁴ ssGb ⁴
143h	C ¹ b ¹ sTb ¹ sdCsdGsdsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdsAsC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹

143k	C b ⁴ ssTb ² ssC b ² ssdGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdAssC b ² ssC b ² ssG b ²
143m	C b ³ Tb ³ C b ³ Gb ³ dUsdCsdAsdTsdAsdGsAb ³ C b ³ C b ³ Gb ³
143n	C b ³ sTb ³ sC b ³ sGb ³ sTb ³ sdCsdA ³ sdTsdA ³ sdGsdA ³ sC b ³ sC b ³ sGb ³
143o	C b ³ sTb ³ sdCsdGsdUsdCsdAsdTsdAsdGsAb ³ sC b ³ sC b ³ sGb ³
143p	C b ³ sTb ³ sC b ³ sGb ³ sdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC b ³ sC b ³ sGb ³
143q	C b ² sTb ² sC b ² sdGsdUsdCsdA ² sdUsdA ² sdGsdA ² sC b ² sC b ² sGb ²
143r	C b ⁴ sTb ⁴ sC b ⁴ sGb ⁴ sdTsdC ⁴ sdA ⁴ sdTsdAsdGsdAsdC ⁴ sC b ⁴ sGb ⁴
143s	C b ⁴ Tb ⁴ C b ⁴ Gb ⁴ dTdCdAdTdAdGdAdCC b ⁴ Gb ⁴
143t	C b ³ ssTb ³ ssC b ³ ssdGssdTssdC ³ ssdAssdTssdAssdGssdAssC b ³ ssC b ³ ssGb ³
143u	C b ³ Tb ³ sdCsdGsdUsdC ³ sdAsdTsdAsdTsdAsdGsdAsC b ³ C b ³ Gb ³
143v	C b ³ Tb ³ sdC ³ sdGsdTsdC ³ sdA ³ sdTsdAsdTsdAsdGsdAsC b ³ C b ³ Gb ³
143w	C b ⁴ sTb ⁴ sdC ⁴ dGdTdC ⁴ dAdTdAdGdAsC b ⁴ sC b ⁴ sGb ⁴
143x	C b ² sTb ² sC b ² sGb ² sdTsdC ² sdAsdTsdAsdTsdAsdGsdAsC b ² sC b ² sGb ²
143y	C b ² sTb ² sdC ² sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdTsdAsdGsAb ² sC b ² sC b ² sGb ²
143z	C b ⁴ sTb ⁴ sdC ⁴ sdGsdTsdC ⁴ sdAsdTsdAsdTsdAsdGsdAsC b ⁴ sC b ⁴ sGb ⁴
143aa	C b ³ Tb ³ sdC ³ sdGsdTsdC ³ sdAsdTsdAsdTsdAsdGsdAsC b ³ C b ³ Gb ³
143ab	C b ³ sTb ³ sdC ³ sdGsdTsdC ³ sdA ³ sdTsdAsdTsdAsdTsdAsdGsdAsC b ³ sC b ³ sGb ³
143ac	C b ³ sTb ³ sdC ³ sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdTsdAsdGsdAsC b ³ sC b ³ sGb ³
143ad	C b ³ Tb ³ dC ³ dGdTdCdAdTdAdGdAdC b ³ C b ³ Gb ³
143ae	C b ³ sTb ³ sdC ³ dGdTdC ³ dAdTdAdGdAsC b ³ sC b ³ sGb ³
143af	/5SpC3s/C b ³ sTb ³ sdC ³ dGdTdC ³ dA ³ dTdAdGdA ³ sC b ³ sC b ³ sGb ³
143ag	C b ³ sTb ³ sdC ³ dGdTdC ³ dA ³ dTdAdGdA ³ sC b ³ sC b ³ sGb ³ /3SpC3s/
143ah	/5SpC3s/C b ³ sTb ³ sdC ³ dGdTdC ³ dA ³ dTdAdGdA ³ sC b ³ sC b ³ sGb ³ /3SpC3s/
143ai	C b ³ sTb ³ sdC ³ sdGsdUsdC ³ sdA ³ sdUsdA ³ sdGsdA ³ sC b ³ sC b ³ sGb ³
143aj	C b ³ sTb ³ sC b ³ sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdTsdAsdGsdAsC b ³ sC b ³ sGb ³
145c	Gb ³ sC b ³ sTb ³ sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdTsdAsdGsAb ³ sC b ³ sC b ³
235i	C b ³ sTb ³ sC b ³ sGb ³ sdTdC ³ dAdTdAdGdAsC b ³ sC b ³ sGb ³ sAb ³
235a	C b ³ ssTb ³ ssdCssdGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdAssdCssdCssdGssAb ³
235b	C b ³ Tb ³ dCdGdTdCdAdTdAdGdAdCdCdGAb ³
235c	C b ³ sTb ³ sdCsdGsdTsdCsdA ³ sdUsdAsdTsdAsdTsdAsdCsC b ³ sGb ³ sAb ³
235d	C b ³ Tb ³ sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdTsdAsdGsdAsC b ³ C b ³ Gb ³ Ab ³
235e	C b ⁴ sTb ⁴ sC b ⁴ sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdTsdAsdGsdAsdTsdCsGb ⁴ sAb ⁴
235f	C b ⁴ sTb ⁴ sC b ⁴ sdGdTdCdA ⁴ dTdAdGdAdC ⁴ sC b ⁴ sGb ⁴ sAb ⁴
235g	C b ³ sTb ³ sC b ³ sGb ³ sdTsdC ³ sdAsdTsdAsdTsdAsdGsdAsdTsdC ³ sdGsAb ³
235h	C b ³ ssTb ³ ssdCssdGssdUssdCssdAssdTssdAssdGssdAssdCssdCssGssAb ³

	ssAb ¹
144c	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹
141c	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sC ¹ b ¹ sdGsdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsdAsC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
141d	Gb ¹ C ¹ b ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹ sdGsdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsdAsdCsC ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹
141e	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sC ¹ b ¹ sdGsdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsdA ¹ sdC ¹ sdC ¹ sGb ¹ sAb ¹
141f	Gb ¹ sdC ¹ sdTsdCsdGsdTsdC ¹ sdA ¹ sdTsdAsdGsdA ¹ sdC ¹ sdC ¹ sdGsAb ¹
141g	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sdCsdGsdUdCsdAsdTsdA ¹ sdGsdAsdCsC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
141h	Gb ¹ ssC ¹ b ¹ ssTb ¹ ssdCsdGsdTssdCsdAsdTssdAssdGsdAssC ¹ b ¹ ssC ¹ b ¹ ssGb ¹ ssAb ¹
141i	Gb ¹ C ¹ b ¹ dTdCdGdTdCdA ¹ dTdA ¹ dGdA ¹ dCC ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹
141j	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
139c	C ¹ b ¹ sGb ¹ sTb ¹ sdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsdGsdAsGb ¹ sC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹
237a	Tb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sC ¹ b ¹ sdGsdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsAb ¹ sC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
237b	Tb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sdTsdGsdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsAb ¹ sC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
237c	Tb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sdC ¹ sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
237d	Tb ¹ sdGsdCsdUdC ¹ sdGsdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsAb ¹ sC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
237e	Tb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sdTsdGsdTsdC ¹ sdA ¹ sdTsdA ¹ sdGsAb ¹ sC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
237f	Tb ¹ Gb ¹ dC ¹ dTdGdTdC ¹ dAdTdAdGdAC ¹ b ¹ C ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹
237g	Tb ¹ sdGsdC ¹ sdTsdGsdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsdAsdC ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
237h	Tb ¹ Gb ¹ C ¹ b ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹ dGdTdC ¹ dA ¹ dTdA ¹ dGdA ¹ dC ¹ dC ¹ Gb ¹ Ab ¹
237i	Tb ¹ ssGb ¹ ssC ¹ b ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssdGsdTssdCsdAssdTssdAssdGsdAssdC ¹ ssC ¹ b ¹ ssGb ¹ ssAb ¹
237j	Tb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sdTdGdTdCdA ¹ dTdA ¹ dGdA ¹ sC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
237k	Tb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sdUdGsdUdC ¹ sdA ¹ sdUdA ¹ sdGsdA ¹ sdC ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
237m	Tb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sdC ¹ dGdTdC ¹ dAdTdAdGdAsC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹
238a	Tb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sC ¹ b ¹ sdGsdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsdAsC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sGb ¹
238b	Tb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sC ¹ b ¹ sdGsdTsdC ¹ sdAsdTsdAsdGsdAsdC ¹ sdC ¹ sdGsdAsGb ¹
238c	Tb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sdC ¹ sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sGb ¹
238d	Tb ¹ sGb ¹ sdC ¹ sdTsdC ¹ sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC ¹ sdC ¹ sGb ¹ sAb ¹ sGb ¹
238e	Tb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sTb ¹ sdC ¹ sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC ¹ sdC ¹ sGb ¹ sAb ¹ sGb ¹
238f	Tb ¹ Gb ¹ dC ¹ dUdC ¹ dGdTdC ¹ dAdTdAdGdA ¹ C ¹ b ¹ C ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Gb ¹
238g	Tb ¹ Gb ¹ C ¹ b ¹ Tb ¹ sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC ¹ b ¹ C ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Gb ¹

238h	Tb'ssGb'ssC'b'ssdTssdC'ssdGssdTssdC'ssdAssdTssdA'ssdGssdAssdC'ssdC'ssGb'ssAb'ssGb'
238i	Tb'Gb'A'C'b'dTdCdGdTdC'dAdTdAdGdAC'b'C'b'Gb'Ab'Gb'
239a	Tb'sGb'sC'b'sTb'sC'b'ssdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC'sC'b'sGb'sAb'sGb'sC'b'
239b	Tb'Gb'A'C'b'Tb'A'C'b'dGdTdC'dAdTdAdGdAdC'A'C'b'Gb'Ab'Gb'C'b'
239c	Tb'sGb'sC'b'sTb'sdC'sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsdGsAb'sGb'sC'b'
239d	Tb'sdGsdCsdTsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdA'sdC'sC'b'sGb'sAb'sGb'sC'b'
239e	Tb'sGb'sdCsdUsdCsdGsdUsdCsdAsdTsdAsdGsdA'sdC'sdC'sGb'sAb'sGb'sC'b'
239f	Tb'ssGb'ssC'b'ssTb'ssC'b'ssGsdTssdC'ssdAssdTssdAssdTssdAssdTssdAssdTssdAssGsb'ssC'b'
240a	C'b'sTb'sGb'sC'b'sTb'sdC'sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC'sC'b'ssGb'sAb'sGb'sC'b'
240b	C'b'sTb'sGb'sdC'sdTsdC'sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC'sC'b'sGb'sAb'sGb'sC'b'
240c	C'b'Tb'Gb'dC'dTdC'dGdTdCdAdTdAdGdAdC'dC'Gb'Ab'Gb'C'b'
240d	C'b'sdUsdGsdCsdUsdC'sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC'sC'b'sGb'sAb'sGb'sC'b'
240e	C'b'sTb'sGb'sC'b'sdTsdsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsGb'sAb'sGb'sC'b'
241a	Gb'sC'b'sTb'sGb'sC'b'sdTsdC'sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdC'sGb'sAb'sGb'sC'b'sC'b'
241b	Gb'C'b'Tb'Gb'C'b'dTdC'dGdTdC'dAdTdAdGdAdC'dC'Gb'Ab'Gb'C'b'C'b'
241c	Gb'sC'b'sTb'sGb'sC'b'sdTsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsGb'sAb'sGb'sC'b'sC'b'
242a	C'b'sGb'sC'b'sTb'sGb'sdCsdTsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdC'sdGsAb'sGb'sC'b'sC'b'sC'b'
242b	C'b'Gb'C'b'Tb'Gb'dC'dTdCdGdTdCdAdTdAdGdAdCdC'dGAb'Gb'C'b'C'b'C'b'
243a	C'b'sC'b'sGb'sC'b'sTb'sdGsdC'sdTsdCsdGsdTsdC'sdAsdTsdAsdGsdAsdCsdC'sdGsAdGsAb'sC'b'sC'b'sC'b'
243b	C'b'C'b'Gb'C'b'Tb'dGdC'dTdCdGdTdC'dAdTdAdGdAdCdC'dGdAGb'C'b'C'b'C'b'C'b'
244a	C'b'sC'b'sC'b'sGb'sC'b'sdTsdGsdCsdTsdCsdGsdTsdC'sdAsdTsdAsdGsdAsdC'sdCsdGsdAsdGsC'b'sC'b'sC'b'sC'b'
244b	C'b'C'b'C'b'Gb'C'b'dTdGdC'dTdCdGdTdC'dAdTdAdGdAdCdC'dCdGdAdG'C'b'C'b'C'b'C'b'C'b'
245a	Tb'sAb'sdC'sdGsdCsdGsdTsdC'sC'b'sAb'
245b	Tb'Ab'dCdGdC'dGdTdCC'b'Ab'
246a	Ab'sTb'sAb'sdC'sdGsdCsdGsdTsdCsC'b'sAb'sC'b'
246b	Ab'Tb'Ab'dCdGdCdGdTdC'b'Ab'C'b'

246c	Ab ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdCsdGsdCsdGsdTsdC ¹ sdC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹
246d	Ab ¹ sTb ¹ sdA ¹ sdC ¹ sdGsdCsdGsdTsdC ¹ sdC ¹ sdA ¹ sC ¹ b ¹
246e	Ab ¹ sdTsdA ¹ sdC ¹ sdGsdC ¹ sdGsdTsdC ¹ sdC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹
247a	Gb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdCsdGsdCsdGsdTsdCsC ¹ b ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹
247b	Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ Ab ¹ dCdGdCdGdUdCC ¹ b ¹ Ab ¹ C ¹ b ¹
247c	Gb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdC ¹ sdGsdCsdGsdTsdC ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹
247d	Gb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdA ¹ sdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹
247e	Gb ¹ sAb ¹ sdTsdA ¹ sdCsdGsdC ¹ sdGsdTsdCsdC ¹ sdA ¹ sC ¹ b ¹
247f	Gb ¹ sdA ¹ sdTsdA ¹ sdC ¹ sdGsdCsdGsdTsdC ¹ b ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹
153f	C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsC ¹ b ¹ sAb ¹
248a	Gb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdC ¹ sdGsdC ¹ sdGsdTsdC ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
248b	Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ Ab ¹ sdC ¹ sdGsdCsdGsdTsdC ¹ sdC ¹ sAb ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹
248c	Gb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdC ¹ sdGsdCsdGsdTsdC ¹ sdC ¹ sdA ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
248d	Gb ¹ sdA ¹ sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC ¹ sdA ¹ sdCsAb ¹
248e	Gb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdA ¹ sdCsdGsdCsdGsdUdCsdCsAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
248f	Gb ¹ ssAb ¹ ssdTssdAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssAb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹
248g	Gb ¹ Ab ¹ dTdA ¹ dCdGdCdGdCdCC ¹ b ¹ Ab ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹
152h	C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
152i	C ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ sdAsdCsdGsdCsdGsdUdCsdC ¹ sAb ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹
152j	C ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ sdA ¹ sdCsdGsdCsdGsdUdCsdCsAb ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹
152k	C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAdC ¹ dGdCdGdCdC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
152m	C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdC ¹ sdC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
152n	C ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ sdAsdC ¹ sdGsdC ¹ sdGsdTsdC ¹ sdC ¹ sAb ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹
152o	C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdA ¹ sdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
152p	C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
152q	C ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ dAdCdGdC ¹ dGdCdC ¹ Ab ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹
152r	C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAdC ¹ dGdC ¹ dGdCdC ¹ dC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
152s	/5SpC3s/C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdC ¹ sdGsdC ¹ sdGsdTsdCsdCsAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
152t	C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdC ¹ sdGsdCsdGsdTsdCsdC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ /3SpC3s/
152u	/5SpC3s/C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdC ¹ sdGsdC ¹ sdGsdTsdCsdCsAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ sAb ¹ /3SpC3s/
152v	C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdA ¹ sdC ¹ sdGsdC ¹ sdGsdUdC ¹ sdC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
152w	C ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAsdCsdGsdC ¹ sdGsdTsdCsC ¹ b ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
152z	C ¹ b ¹ sGb ¹ sdAsdUdAsdCsdGsdC ¹ sdGsdUdCsC ¹ b ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹
152aa	C ¹ b ¹ ssGb ¹ ssAb ¹ ssdTssdAssdC ¹ ssdGssdCssdGssdTssdCssdC ¹ ssAb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹
152ab	C ¹ b ¹ ssGb ¹ ssAb ¹ ssdTssdA ¹ ssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdA ¹ ss

	C ^b b ^s ssAb ¹
152ac	C ^b b ^s ssGb ¹ ssAb ² ssTb ² ssdAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdAssdCssAb ¹
152ad	C ^b b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ dAdCdGdCdGdUdCC ^b Ab ¹ C ^b Ab ¹
152ae	C ^b b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdCsdGsdCsdGsdUsdCsdCsAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹
152af	C ^b b ¹ sGb ¹ sdA ¹ sdTsdA ¹ sdCsdGsdCsdGsdTsC ^b b ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹
152ag	C ^b b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAssdCsdGsdCsdGsdTsdCsC ^b b ¹ sAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹
152ah	C ^b b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdUsdA ¹ sdCsdGsdCsdGsdUsdCsdCsAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹
152ai	C ^b b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdA ¹ sdCsdGsdCsdGsdTsdC ^b sdA ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹
152aj	C ^b b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ dAdCdGdCdGdCdCdCdAC ^b Ab ¹
152ak	C ^b b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAssdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹
249a	C ^b b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAdCdGdCdGdCdCdC ^b sAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹
249b	C ^b b ¹ ssGb ¹ ssdAssdTssdAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdAssdCssdAssGb ¹
249c	C ^b b ¹ Gb ¹ dAdTdAdCdGdCdGdCdCdCdAdCdAGb ¹
249d	C ^b b ¹ sGb ¹ sdAssdUsdAssdC ^b sdGsdCsdGsdUsdCsdC ^b sdAsC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹
249e	C ^b b ¹ Gb ¹ sdAssdTsdAssdC ^b sdGsdC ^b sdGsdTsdCsdC ^b sAb ¹ C ^b b ¹ Ab ¹ Gb ¹
249f	C ^b b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAssdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAssdCsAb ¹ sGb ¹
249g	C ^b b ¹ Gb ¹ Ab ¹ dTdA ¹ dCdGdCdGdCdCdCdA ¹ C ^b Ab ¹ Gb ¹
249h	C ^b b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAssdC ^b sdGsdCsdGsdTsdCsdC ^b sdAssdC ^b sdAssGb ¹
249i	C ^b b ¹ ssGb ¹ ssdAssdUssdAssdCssdGssdCssdGssdUssdCssdCssdAssdCssAb ¹ ssGb ¹
250a	Gb ¹ sC ^b b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAssdCsdGsdC ^b sdGsdTsdCsC ^b b ¹ sAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹
250b	Gb ¹ sC ^b b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAssdC ^b sdGsdC ^b sdGsdTsdC ^b sdC ^b sdAsC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹
250c	Gb ¹ sdC ^b sdGsdAssdUsdAssdCsdGsdC ^b sdGsdUsdCsC ^b b ¹ sAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹
250d	Gb ¹ sC ^b b ¹ sGb ¹ sdA ¹ sdTsdA ¹ sdC ^b sdGsdC ^b sdGsdTsdC ^b sC ^b b ¹ sAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹
250e	Gb ¹ C ^b b ¹ dGdAdTdAdCdGdC ^b dGdCdCdC ^b Ab ¹ C ^b b ¹ Ab ¹ Gb ¹
250f	Gb ¹ sdC ^b sdGsdAssdTsdAssdCsdGsdC ^b sdGsdTsdCsdCsdAsC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹
250g	Gb ¹ sC ^b b ¹ sGb ¹ sdAssdTsdAssdCsdGsdC ^b sdGsdTsdC ^b sC ^b b ¹ sAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹
250h	Gb ¹ C ^b b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ dA ¹ dCdGdC ^b dGdCdCdCdA ¹ dC ^b Ab ¹ Gb ¹
250i	Gb ¹ ssC ^b b ¹ ssGb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssdAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdAssC ^b b ¹ ssAb ¹ ssGb ¹
250j	Gb ¹ sC ^b b ¹ sGb ¹ sdA ¹ sdTsdA ¹ sdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹
250k	Gb ¹ sC ^b b ¹ sGb ¹ sdA ¹ sdUsdAssdCsdGsdCsdGsdUsdC ^b sdCsdA ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹
250m	Gb ¹ sC ^b b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTdAdCdGdCdGdCdCdC ^b dCsAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹

251a	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹
251b	Gb ² sC ² b ² sGb ² sAb ² sTb ² sdAsdC ² sdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdCsdAsdGsGb ²
251c	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAsdC ¹ sdGsdCsdGsdTsdCsdC ¹ sdAsC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹
251d	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sdAsdTsdAsdC ¹ sdGsdC ¹ sdGsdTsdCsdC ¹ sdAsC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹
251e	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAsdC ¹ sdGsdCsdGsdTsdCsdC ¹ sdAsdC ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹
251f	Gb ¹ C ¹ b ¹ dGdAdUdA ¹ dCdGdCdGdTdC ¹ dC ¹ Ab ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹ Gb ¹ Gb ¹
251g	Gb ⁴ C ⁴ b ⁴ Gb ⁴ Ab ⁴ sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb ⁴ C ⁴ b ⁴ Ab ⁴ Gb ⁴ Gb ⁴
251h	Gb ¹ ssC ¹ b ¹ ssGb ¹ ssdA ¹ ssdTsdA ¹ ssdCsdGssdCsdGssdTsdCsdCsdA ¹ ssdC ¹ ssAb ¹ ssGb ¹ ssGb ¹
251i	Gb ² C ² b ² Gb ² dAdTdAdCdGdC ² dGdTdCdC ² Ab ² C ² b ² Ab ² Gb ² Gb ²
252a	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdC ¹ sdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
252b	Gb ⁴ C ⁴ b ⁴ Gb ⁴ Ab ⁴ Tb ⁴ dAdC ⁴ dGdCdGdTdCdC ⁴ dAC ⁴ b ⁴ Ab ⁴ Gb ⁴ Gb ⁴ Ab ⁴
252c	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdC ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
252d	Gb ¹ sdC ¹ sdGsdA ¹ sdTsdA ¹ sdC ¹ sdGsdCsdGsdTsdCsdCsdA ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
252e	Gb ⁴ sC ⁴ b ⁴ sdGsdAsdUsdAsdCsdGsdCsdGsdUsdCsdCsdAsdC ⁴ sAb ⁴ sGb ⁴ sGb ⁴ sAb ⁴
252f	Gb ² ssC ² b ² ssGb ² ssAb ² ssTb ² ssdAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdAssdCssdAssdGssGb ² ssAb ²
253a	Gb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdC ¹ sdC ¹ sdAsC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
253b	Gb ² sGb ² sC ² b ² sdGsdAsdTsdAsdC ² sdGsdCsdGsdTsdC ² sdC ² sdAsC ² b ² sAb ² sGb ² sGb ² sAb ²
253c	Gb ¹ Gb ¹ C ¹ b ¹ dGdAdTdAdCdGdCdGdTdCdCdAdC ¹ Ab ¹ Gb ¹ Gb ¹ Ab ¹
253d	Gb ¹ sdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdC ¹ sdGsdUsdCsdCsdAsC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
253e	Gb ⁴ sGb ⁴ sC ⁴ b ⁴ sGb ⁴ sdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdCsAb ⁴ sGb ⁴ sGb ⁴ sAb ⁴
254a	Tb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sC ¹ Gb ¹ sdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdC ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹
254b	Tb ¹ Gb ¹ Gb ¹ C ¹ b ¹ Gb ¹ dAdTdAdC ¹ dGdCdGdTdCdC ¹ dAdCAb ¹ Gb ¹ Gb ¹ Ab ¹ C ¹ b ¹
254c	Tb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdCsdAsdGsGb ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹
255a	C ¹ b ¹ sTb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sdGsdAsdTsdAsdCsdGsdC ¹ sdGsdTsdCsdC ¹ sdAsdCsdAsGb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹
255b	C ¹ b ¹ Tb ¹ Gb ¹ Gb ¹ C ¹ b ¹ dGdAdTdAdCdGdC ¹ dGdTdCdC ¹ dAdC ¹ dAGb ¹ Gb ¹ Ab ¹ C ¹ b ¹ Gb ¹

[illegible]

[illegible]

263d	Gb'sdUsdA'sdGsdUsdGsdUsdTsdTdA'sdGsdGsGb'sAb'sGb'sC'b'sC*b'
263e	Gb'sTb'sAb'sdGsdTsdGsdUsdTsdTdA'sdGsdGsGb'sAb'sGb'sC'b'sC*b'
263f	Gb'Tb'dA'dGdTdGdTdTdTdAdGdGdGAB'Gb'C'b'C*b'
263g	Gb'sdTsdA'sdGsdTsdGsdTsdTsdTdA'sdGsdGsdGsdA'sGb'sC'b'sC*b'
263h	Gb'Tb'Ab'Gb'Tb'dGdTdUdTdAdGdGdGdA'dGc'B'b'C*b'
263i	Gb'ssTb'ssAb'ssGb'ssTb'ssdGsdTsddTssdTssdAssdGssdGssdAss Gb'ssC'b'ssC*b'
263j	Gb'Tb'dA'dGdTdGdTdTdTdAdGdGdGdA'Gb'C'b'C*b'
263k	Gb'ssTb'sAb'sdGsdTsdGsdUsdTsdTdAdGsdGsdGsdA'sGb'sC'b'sC*b'
263m	Gb'sTb'sAb'sGb'sdTdGdTdTdTdTdAdGdGdGsAb'sGb'sC'b'sC*b'
264a	Gb'sGb'sTb'sAb'sGb'sdTsdGsdTsdTsdTdA'sdGsdGsGb'sAb'sGb'sC'b' sC*b'
264b	Gb'sGb'sTb'sAb'sGb'sdTsdGsdTsdTsdTdAdGsdGsdGsdAsdGsdC'sC b'
264c	Gb'sGb'sTb'sAb'sGb'sdTsdGsdTsdTsdTdAdGsdGsdGsdA'sdGsdC's C*b'
264d	Gb'sGb'sTb'sAb'sGb'sdUsdGsdTsdTsdTdAdGsdGsdGsdA'sdGsdC's C*b'
264e	Gb'sGb'sTb'sAb'sdGsdTsdGsdTsdTsdTdA'sdGsdGsdGsAb'sGb'sC'b' sC*b'
264f	Gb'sGb'sTb'sdA'sdGsdTsdGsdTsdTsdTdA'sdGsdGsdGsAb'sGb'sC'b' sC*b'
264g	Gb'sGb'sTb'sAb'sdGsdTsdGsdTsdTsdTdA'sdGsdGsdGsdA'sGb'sC'b' sC*b'
264h	Gb'Gb'dUdA'dGdTdGdTdTdTdAdGdGGb'Ab'Gb'C'b'C*b'
264i	Gb'Gb'Tb'Ab'dGsdTsdGsdTsdTsdTdAdGsdGsGb'Ab'Gb'C'b'C*b'
264j	Gb'ssGb'ssTb'ssdA'ssdGssdTssdTssdUssdTssdTssdA'ssdGssdGssdGss dA'ssGb'ssC'b'ssC*b'
264k	Gb'Gb'Tb'dA'dGdTdGdTdTdTdAdGdGGb'Ab'Gb'C'b'C*b'
265a	Gb'sGb'sTb'sAb'sGb'sdTsdGsdTsdTsdTdA'sdGsdGsdGsAb'sGb'sC'b' sC'b'sGb'
265b	Gb'Gb'Tb'Ab'Gb'dTdGdTdTdTdTdAdGdGdGAB'Gb'C'b'C*b'Gb'
265c	Gb'sGb'sTb'sAb'sdGsdTsdGsdTsdTsdTdA'sdGsdGsdGsdA'sdGsC'b' sC'b'sGb'
265d	Gb'sdGsdTdA'sdGsdUsdGsdTsdUsdTsdA'sdGsdGsdGsAb'sGb'sC'b' sC'b'sGb'
265e	Gb'sGsb'sdUsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTdAdGsdGsdGsdA'sGb'sC'b'sC b' sGb'A
265f	Gb'ssGb'ssTb'ssAb'ssGb'ssdTssdTssdTssdTssdAssdGssdGssdGss dAssdGssdCssC'b'ssGb'
266a	Tb'sGb'sGb'sTb'sAb'sdGsdTsdGsdTsdTsdTdA'sdGsdGsdGsAb'sGb' sC'b'sC'b'sGb'
266b	Tb'sGb'sGb'sdTsdA'sdGsdTsdGsdTsdTsdTdA'sdGsdGsdGsAb'sGb' sC'b'sC'b'sGb'
266c	Gb'Gb'Tb'dA'dGdTdGdTdTdTdAdGdGdGdA'Gb'C'b'C'b'Gb'
266d	Tb'sdGsdGsdUsdA'sdGsdTsdGsdTsdUsdTsdA'sdGsdGsdGsAb'sGb'sC'b' sC'b'sGb'
266e	Tb'sGb'sGb'sTb'sdAdGsdTsdGsdTsdTsdTdAdGsdGsdGsdAsGb'sC'b' sC'b'sGb'

267a	Tb'sTb'sGb'sGb'sTb'sdAsdGsdTs dGsdTs dTsdTsdAsdGsdGs dGs dA'sGb'sC'b'sC'b'sGb'sTb'
267b	Tb'Tb'Gb'Gb'Tb'dA'dGdTdGdTdTdTdAdGdGdGdA'Gb'C'b'C'b'Gb'Tb' Tb'sTb'sGb'soGsdTs dAsdGsdTs dGsdTs dTsdTsdAsdGsdGs dGs dAsGb'sC'b'sC'b'sGb'sTb'
267c	Tb'sTb'sGb'sGb'sGb'sGb'sTdSdA'sdGsdTs dGsdTs dTsdTsdAsdGsdGs dGs dA'soGC'b'sC'b'sGb'sTb'sC'b'
268a	Tb'sTb'sTb'sGb'sGb'sTdSdA'sdGsdTs dGsdTs dTsdTsdAsdGsdGs dGs dA'soGC'b'sC'b'sGb'sTb'sC'b'
268b	Tb'Tb'Tb'Gb'Gb'dtA'A'dGdTdTdTdTdTdTdAdGdGdGdA'dGC'b'C'b'Gb'Tb'C'b'
268a	Ab'sTb'sTb'sTb'sGb'sdGsdTs dAsdGsdTs dGsdTs dTsdTsdAsdGsdGs dGs dAsdGsdC'sC'b'sGb'sTb'sC'b'sTb'
268b	Ab'Tb'Tb'Tb'Gb'dGdTdTdAdGdTdTdTdTdTdTdAdGdGdGdAdAdGdC'C'b'Gb'Tb'C'b'Tb'
270a	Tb'sAb'sTb'sTb'sTb'sdGsdGs dGs dTsdAsdGs dTs dGsdTs dTsdTsdAsdGsdGs dGs dAsdGsdC'sdCsGb'sTb'sC'b'sTb'sTb'
270b	Tb'Ab'Tb'Tb'Tb'dGdGdTdAdGdTdTdTdTdTdTdAdGdGdGdAdGdC'dC'Gb'Tb'C'b'Tb'Tb'
271a	Ab'sTb'sTdTs dTs dGs dGs dTs dA'sGb'sTb'
271b	Ab'Tb'dTdTdGdGdTdA'Gb'Tb'
272a	Tb'sAb'sTb'sdTsdTs dGs dGs dTs dA'sGb'sTb'sGb'
272b	Tb'Ab'Tb'dTdTdGdGdTdA'Gb'Tb'Gb'
272c	Tb'sAb'sTb'sdTsdTs dGs dGs dTs dA'sdGs Tb'sGb'
272d	Tb'sAb'sdTsdTs dGs dGs dTs dA'sdGs UsGb'
272e	Tb'sdAsdTs dUs dTs dGs dGs dUs dA'sdGs Tb'sGb'
273a	Tb'sAb'sTb'sdTsdTs dGs dGs dTs dAsGb'sTb'sGb'sTb'
273b	Tb'Ab'Tb'dUdUdGdGdUdAGb'Tb'Gb'Tb'
273c	Tb'sAb'sTb'sdTsdTs dGs dGs dTs dA'sGb'sTb'sGb'sTb'
273d	Tb'sAb'sTb'sdTsdTs dGs dGs dTs dA'sdGs UsGb'sTb'
273e	Tb'sAb'sdTsdUs dGs dGs dTs dA'sdGs UsGs Tb'
273f	Tb'sdA'sdTsdTs dUs dGs dGs dTs dA'sGb'sTb'sGb'sTb'
274a	C'b'Tb'Ab'sdUs dTs dTs dGs dGs dTs dA'sGb'Tb'Gb'Tb'
274b	C'b'sTb'sAb'sTb'sdTsdTs dGs dGs dTs dA'sdGs UsGb'sTb'
274c	C'b'sdTsdA'sdTsdTs dGs dGs dTs dAsdGs dTs dGs Tb'
274d	C'b'sTb'sAb'sdTsdTs dGs dGs dTs dA'sdGs Tb'sGb'sTb'
274e	C'b'ssTb'ssdAssdTs sdsTs sdsGs dGs dTs dAssdGs sTb'ssGb'ssTb'
274f	C'b'Tb'Ab'dTdTdTdGdGdTdA'Gb'Tb'Gb'Tb'
274g	C'b'sTb'sAb'sTb'sdTsdTs dGs dGs dTs dA'sGb'sTb'sGb'sTb'
275a	C'b'sTb'sAb'sTb'sdTsdTs dGs dGs dTs dA'sdGs dTs dGs TsTb'
275b	C'b'sTb'sdA'sdUs dTs dGs dGs dTs dAsdGs dUsGb'sTb'sTb'
275c	C'b'sTb'sAb'sdTsdTs dGs dGs dTs dAsdGs dTs dGs Tb'sTb'
275d	C'b'ssTb'ssdAssdTs sdsTs sdsGs dGs dTs dAssdGs sTb'ssGb'ssTb'
275e	C'b'ssTb'ssdAssdUs sdsTs sdsGs dGs dTs dAssdGs sTb'ssGb'ssTb'

	ssTb ¹
275f	C ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdTdTdGdGdTdA ^d GsTb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sTb ¹
275g	C ^b b ¹ Tb ¹ sdAsdTsdTsdGsdGsdTsdA ^d sdGsTb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Tb ¹
275h	C ^b b ¹ Tb ¹ Ab ^d dUdTdTdGdGdTdA ^d dGdUGb ¹ Tb ¹ Tb ¹
275i	C ^b b ¹ dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGdTb ¹
210a	Gb ¹ C ^b b ¹ Tb ¹ Ab ^d dTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ Tb ¹
210p	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA ^d sdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210q	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210r	Gb ¹ C ^b b ¹ Tb ¹ Ab ^d dTdTdTdGdGdTdA ^d dGdTGb ¹ Tb ¹ Tb ¹
210s	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdUsdUsdTsdGsdGsdTsdA ^d sdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210t	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdUsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210u	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdUsdUsdTsdGsdGsdUsdTsdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210v	/5SpC3s/Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210w	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹ /3SpC3s/
210x	/5SpC3s/Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹ /3SpC3s/
210y	Gb ¹ C ^b b ¹ Tb ¹ Ab ^d sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA ^d sdGsTb ¹ Tb ¹ Tb ¹
210z	Gb ¹ C ^b b ¹ Tb ¹ Ab ^d sdUsdTsdTsdGsdGsdUsdTsdGsTb ¹ Tb ¹ Tb ¹
210aa	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTdTdTdGdGdTdA ^d dGdTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210ab	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTdTdTdGdGdTdA ^d dGdTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210ac	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210ad	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sdA ^d sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA ^d sdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210ae	Gb ¹ sC ^b b ¹ sdUsdTsdTsdTsdGsdGsdUsdTsdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210af	Gb ¹ ssC ^b b ¹ ssTb ¹ ssdTsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA ^d ssdTsdTsdTsdGsTb ¹ ssTb ¹ ssTb ¹
210ag	Gb ¹ ssC ^b b ¹ ssTb ¹ ssdTsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA ^d ssdTsdTsdTsdGsTb ¹ ssTb ¹ ssTb ¹
210ah	Gb ¹ ssC ^b b ¹ ssTb ¹ ssdTsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA ^d ssdTsdTsdTsdGsTb ¹ ssTb ¹ ssTb ¹
210ai	Gb ¹ C ^b b ¹ Tb ¹ Ab ^d dUsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Tb ¹
210aj	Gb ¹ C ^b b ¹ Tb ¹ Ab ^d dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Tb ¹
210ak	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdTsdTsdGsdGsdTsdA ^d sdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210am	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdUsdTsdGsdGsdTsdA ^d sdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210an	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sdA ^d sdTsdTsdUsdTsdGsdGsdTsdA ^d sdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210ao	Gb ¹ sC ^b b ¹ sdUsdTsdUsdTsdTsdGsdGsdUsdTsdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
210ap	Gb ¹ sC ^b b ¹ sTb ¹ sdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹

[illegible]

	sTb'sTb'sAb ¹
279b	Gb'sAb'sGb'sdC'sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsb'sTb'sTb's sTb'sAb ¹
279c	Gb'sdTsdGsdC'sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA'sdTsdGsb'sTb'sTb's sTb'sAb ¹
279d	Gb'sAb'sGb'sC'b'sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsb'sTb'sTb's sTb'sAb ¹
279e	Gb'Ab'Gb'dC'dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGTb'Tb'Ab ¹
280a	Ab'sGb'sAb'sGb'sC'b'sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsb's sTb'sTb'sAb'sGb ¹
280b	Ab'Gb'Ab'Gb'C'b'dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGTb'Tb'Ab'Gb ¹
280c	Ab'sGb'sAb'sGb'sdC'sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsb's sTb'sTb'sAb'sGb ¹
280d	Ab'sGb'sAb'sGb'sdC'sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA'sdTsdGsb's TsTb'sAb'sGb ¹
281a	Ab'sAb'sGb'sAb'sGb'sdC'sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGs dTb'sTb'sAb'sGb'sGb ¹
281b	Ab'Ab'Gb'Ab'Gb'dC'dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGdTb'Tb'Ab'Gb'Gb ¹
282a	Gb'sAb'sAb'sGb'sAb'sdTsdGsdC'sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsd dTsdGsdTsTb'sAb'sGb'sGb'sGb ¹
282b	Gb'Ab'Ab'Gb'Ab'dGdC'dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGdTdTb'Ab'Gb ¹ Gb'Gb ¹
283a	Ab'sGb'sAb'sAb'sGb'sdTsdAsdTsdC'sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsd dTsdGsdTsTsdTsAb'sGb'sGb'sAb ¹
283b	Ab'Gb'Ab'Ab'Gb'dAdGdC'dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGdTdTAb'Gb ¹ Gb'Gb'Ab ¹
284a	C'b'sAb'sdTsdTsdAsdTsdA'sAb'sAb ¹
284b	C'b'Ab'dTdAdA'dAdTdA'Ab'Ab ¹
285a	Gb'sC'b'sAb'sdTsdTsdA'sdA'sdTsdAsAb'sAb'sGb ¹
285b	Gb'sC'b'sAb'sdTsdTsdA'sdA'sdTsdAsdTsdA'sAb'sGb ¹
285c	Gb'sC'b'sdTsdAsdTsdA'sdA'sdTsdUsdTsdA'sdA'sGb ¹
285d	Gb'sdC'sdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsAb'sGb ¹
285e	Gb'sdC'sdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdA'sAb'sGb ¹
285f	Gb'C'b'Ab'dTdAdA'dA'dTdAAb'Ab'Gb ¹
286a	Gb'sC'b'sAb'sTb'sdTsdAsdTsdAsdTsdAsAb'sGb'sTb ¹
286b	Gb'sC'b'sAb'sTb'sdTsdA'sdA'sdTsdAsdTsdAsAb'sGb'sTb ¹
286c	Gb'sC'b'sAb'sdTsdUsdTsdAsdTsdAsdTsdA'sGb'sTb ¹
286d	Gb'sC'b'sdTsdAsdTsdAsdTsdUsdTsdAsdTsdGsTb ¹
286e	Gb'sdC'sdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsAb'sAb'sGb'sTb ¹
286f	Gb'sdC'sdTsdAsdTsdAsdTsdA'sAb'sAb'sGb'sTb ¹
286g	Gb'C'b'Ab'Tb'dUdAdAdUdAdAAb'Gb'Tb ¹
287a	Gb'sGb'sC'b'sAb'sdTsdTsdA'sdTsdAsdTsdAsAb'sAb'sGb'sTb ¹

287b	Gb'sGb'sC'b'sAb'sdTsTsdA'sdAsdUsdAsdAsdA'sG'b'sTb'
287c	Gb'sdGsdcSdAsdUsdUsdAsdAsdTsdA'sdA'sdA'sdGsTb'
287d	Gb'sGb'sC'b'sdA'sdUsdTsdA'sdAsdTsdAsdA'sAb'sGb'sTb'
287e	Gb'Gb'C'b'Ab'sdTsTsdAsdAsdTsdA'sdA'sAb'Gb'Tb'
287f	Gb'sGb'sdC'sdAsdTsdTsTdAsdAsdTsdAsAb'sAb'sGb'sTb'
287g	Gb'sGb'sdC'dA'sdTsTsdA'sdA'sdTsTdA'sAb'sAb'sGb'sTb'
287h	Gb'Gb'dC'dAdTdAdAdTdAAb'Ab'Gb'Tb'
287i	Gb'ssGb'ssdCsddAssdTssdTssdAssdAssdTssdAssAb'ssAb'ssGb'ssTb'
287j	Gb'ssGb'ssdC'ssdAssdTssdTssdAssdAssdTssdAssAb'ssAb'ssGb'ssTb'
288a	Gb'sGb'sdC'sdAsdTsdTsTdAsdAsdTsdAsdAsGsGb'sTb'sGb'
288b	Gb'sGb'sC'b'sAb'sdTsTsdA'sdA'sdTsTdAsdAsdAsGsTsGb'
288c	Gb'sGb'sC'b'sdAdTsTdAsdAsdTsdTsTdAsdAsdAsGsTb'sGb'
288d	Gb'sGb'sC'b'sAb'sdTsTdAdAdTdAdAsAb'sGb'sTb'sGb'
288e	Gb'Gb'sdC'sdAsdTsdTsTdAsdAsdTsdAsdAsAb'Gb'Tb'Gb'
288f	Gb'ssGb'ssdCsddAssdUssdUssdAssdAssdUssdAssdAssdAssdGssTb'ssGb'
288g	Gb'ssGb'ssdCsddAssdTssdTssdAssdAssdTssdAssdAssdAssdGssdTssGb'
288h	Gb'Gb'C'b'dA'dTdTdAdAdUdA'dA'dAGb'Tb'Gb'
288i	Gb'Gb'C'b'dAdTdTdAdAdUdAdAdAgb'Tb'Gb'
288a	Ab'sGb'sGb'sC'b'sAb'sdTsTsdA'sdA'sdTsdA'sAb'sAb'sTb'sGb'
288b	Ab'sGb'sGb'sdC'sdAsdTsdTsTdAsdAsdTsdAsAb'sAb'sTb'sGb'
288c	Ab'sGb'sGb'sdC'sdA'sdTsTsdA'sdA'sdTsTdA'sAb'sAb'sTb'sGb'
288d	Ab'sGb'sGb'sdC'sdAsdTsdTsTdAsdAsdTsdAsAb'sAb'sGb'sTb'sGb'
288e	Ab'sdGsdcSdC'sdAsdTsdTsTdAsdAsdTsdAsAb'sAb'sTb'sGb'
288f	Ab'sdGsdcSdC'sdAsdTsdUsdAsdUsdAsAb'sAb'sTb'sGb'
288g	Ab'sGb'sGb'sdC'sdAsdTsdTsTdAsdAsdTsdAsAb'sGb'sTb'sGb'
288h	Ab'sGb'sGb'sC'b'sdA'sdTsTsdA'sdA'sdTsdA'sdAsdAsGb'sTb'sGb'
288i	Ab'sGb'sGb'sdC'sdA'sdUsTsTdAsdAsdTsdAsdAsGsGb'sTb'sGb'
288j	Ab'sGb'sGb'sdC'sdAsdTsdTsTdAsdAsdTsdAsdAsGsGb'sTb'sGb'
288k	Ab'sdGsdcSdC'sdAsdTsdTsTdAsdAsdTsdAsdAsGsGb'sTb'sGb'
288m	Ab'Gb'Gb'C'b'Ab'dUdTdA'dA'dTdAdAdAGTb'Gb'
288n	Ab'Gb'dGdC'dAdTdTdAdAdTdAdAAb'Gb'Tb'Gb'
288o	Ab'Gb'Gb'dCdA'dTdTdAdAdTdAdA'A'b'Gb'Tb'Gb'
288p	Ab'ssGb'ssGb'ssC'b'ssAb'ssdTsTsdTsdsdAssdAssdTssdAssdAssdAssGs'ssTb'ssGb'
288q	Ab'sGb'sGb'sC'b'sdA'dTdTdAdAdTdAdA'sAb'sGb'sTb'sGb'
213j	C'b'sAb'sGb'sdGsdc'sdAsdTsdTsTdAsdAsdTsdAsdAsGsGb'sTb'sGb'
213k	C'b'sAb'sGb'sdGsdc'sdAsdTsdTsTdAsdAsdTsdAsdAsGsGb'sTb'sGb'

213m	C*b'sAb'sGb'sdGsdC'sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdA'sdA'sGb'sTb'sGb ¹
213n	C*b'Ab'sGb'dGdC'dAdTdAdAdTdAdAdAGb'Tb'Gb ¹
213o	/5SpC3s/C'b'sAb'sGb'sdGsdC'sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb'sTb'sGb ¹
213p	C*b'sAb'sGb'sdGsdC'sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb'sTb'sGb ¹ /3SpC3s/
213q	/5SpC3s/C'b'sAb'sGb'sdGsdC'sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb'sTb'sGb ¹ sGb ¹ /3SpC3s/
213r	C*b'sAb'sGb'sdGsdC'sdAsdTsdTsdAsdAsdUsdAsdAsdA'sGb'sTb'sGb ¹
213s	C*b'sAb'sGb'sdGdC'dAdTdAdAdTdAdAdAsGb'sTb'sGb ⁹
213t	C*b'sAb'sGb'sdGdC'dAdTdAdAdTdAdAdAsGb'sTb'sGb ¹
213u	C*b'Ab'sGb'sdGsdC'sdAsdUsdUsdAsdAsdUsdAsdAsdAsGb'sTb'sGb ¹
213v	C*b'Ab'sGb'sdGsdC'sdAsdTsdTsdAsdA'sdTsdAsdAsdA'sGb'sTb'sGb ¹
213w	C*b'Ab'sGb'sdGsdC'sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb'sTb'sGb ¹
213x	C*b'sAb'sGb'sGb'sdC'sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb'sTb'sGb ⁷
213y	C*b'sAb'sGb'sGb'sdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb'sTb'sGb ⁸
213z	C*b'sAb'sGb'sdGsdCsdA'sdUsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAb'sGb'sTb'sGb ⁷
213aa	C*b'sAb'sGb'sGb'sdC'sdA'sdTsdTsdAsdAsdTsdAsdA'sdAsdGsTb'sGb ⁴
213ab	C*b'sAb'sGb'sGb'sC*b'sdA'sdTsdTsdA'sdA'sdTsdAsdA'sdA'sGb'sTb'sGb ¹
213ac	C*b'sAb'sGb'sdGsdCsdAsdTsdTsdA'sdA'sdTsdAsAb'sAb'sGb'sTb'sGb ¹
213ad	C*b'sAb'sdGsdGsdC'sdAsdTsdTsdAsdAsdUsdAsdAsAb'sGb'sTb'sGb ¹
213ae	C*b'ssAb'ssGb'ssdGsdC'ssdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAssAb'ssGb'ssTb'ssGb ¹
213af	C*b'ssAb'ssGb'ssdGsdCsdAsdTsdTsdA'ssdAsdTsdAsdAssdAssdGssTb'ssGb ⁴
213ag	C*b'ssAb'ssGb'ssGb'ssdCsdAsdTsdTsdAsdAssdAssdAssdAssdAssdGssdTssGb ²
213ah	C*b'Ab'sGb'sGb'sdCdAdTdAdAdUdAdAAb'sGb'sTb'sGb ¹
213ai	C*b'Ab'sGb'sGb'sdCdAdTdAdAdTdAdAdAdGTb'sGb ⁴
213aj	C*b'Ab'sGb'sdGdCdAdTdAdAdUdAdAdAGb'sTb'sGb ¹
213ak	C*b'sAb'sGb'sGb'sdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsAb'sGb'sTb'sGb ¹
290a	C*b'sAb'sGb'sGb'sC*b'sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdA'sdAsAb'sGb'sTb'sGb ¹ sC*b ¹
290b	C*b'sAb'sGb'sGb'sdC'sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb'sTb'sGb ¹ sC*b ¹
290c	C*b'sAb'sGb'sGb'sdC'sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdGsTb'sGb ¹ sC*b ¹
290d	C*b'sAb'sGb'sdGsdC'sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb'sTb'sGb ¹ sC*b ¹

290e	C ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sC ^b b ¹ sdA [*] sdTsdTsdAsdAsdAsdAsdAsdGsdTsdG sC ^b b ¹
290f	C ^b b ¹ Ab ¹ Gb ¹ Gb ¹ sdCsdAsdTsdTsdAsdAsdAsdA [*] sdAsAb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Gb ¹ C ^b b ¹
290g	C ^b b ¹ ssAb ¹ ssGb ¹ ssdGssdC [*] ssdAssdTsdTsdA [*] ssdAssdTsdA [*] ssdAssdA [*] ssdGssTb ¹ ssGb ¹ ssC ^b b ¹
290h	C ^b b ¹ Ab ¹ Gb ¹ GdC [*] dAdTdAdAdTdAdAdAb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Gb ¹ C ^b b ¹
290i	C ^b b ¹ Ab ¹ dGdGdC [*] dA [*] dUdUdAdAdUdA [*] dA [*] Ab ¹ Gb ¹ Tb ¹ Gb ¹ C ^b b ¹
291a	Ab ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sdC [*] sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsGb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sC ^b b ¹
291b	Ab ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sdGsdC [*] sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdGsTb ¹ sGb ¹ sC ^b b ¹
291c	Ab ¹ sC ^b b ¹ sdAsdGsdGsdC [*] sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdAsGb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sC ^b b ¹
291d	Ab ¹ sdC [*] sdAsdGsdGsdC [*] sdA [*] sdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sC ^b b ¹
291e	Ab ¹ ssC ^b b ¹ ssAb ¹ ssGb ¹ ssGb ¹ ssdCssdAssdTsdTsdAssdAssdTsdAssdAss dAssdGssdTssGb ¹ ssC ^b b ¹
291f	Ab ¹ C ^b b ¹ Ab ¹ Gb ¹ Gb ¹ dC [*] dAdTdTdAdAdTdAdAdAb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Gb ¹ C ^b b ¹
292a	Ab ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sdC [*] sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdAsGb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹
292b	Ab ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sdGsdGsdC [*] sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdAsGb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹
292c	Ab ¹ sdC [*] sdAsdGsdGsdC [*] sdAsdUdUdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdAsGb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹
292d	Ab ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sdGsdGsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdGsTb ¹ sGb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹
292e	Ab ¹ C ^b b ¹ Ab ¹ dGdGdC [*] dAdTdTdAdAdTdAdAdAdGtB ¹ Gb ¹ C ^b b ¹ Ab ¹
293a	Tb ¹ sAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sdGsdC [*] sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdGsTb ¹ sGb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹
293b	Tb ¹ Ab ¹ C ^b b ¹ Ab ¹ Gb ¹ dGdC [*] dAdTdTdAdAdTdAdAdAdGtB ¹ Gb ¹ C ^b b ¹ Ab ¹ Ab ¹
293c	Tb ¹ sAb ¹ sC ^b b ¹ sdAsdGsdGsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdGsTb ¹ sGb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sAb ¹
294a	Ab ¹ sTb ¹ sAb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sdGsdGsdC [*] sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdGsTb ¹ sdTsGb ¹ sC ^b b ¹ sAb ¹ sAb ¹ sAb ¹
294b	Ab ¹ Tb ¹ Ab ¹ C ^b b ¹ Ab ¹ dGdGdC [*] dAdTdTdAdAdTdAdAdAdGdTGb ¹ C ^b b ¹ Ab ¹ Ab ¹ Ab ¹
295a	Tb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sC ^b b ¹ sdAsdGsdGsdC [*] sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdGsTb ¹ sdGsTsdGsC ^b b ¹ sAb ¹ sAb ¹ sAb ¹ sTb ¹
295b	Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹ Ab ¹ C ^b b ¹ dAdGdGdC [*] dAdTdTdAdAdTdAdAdAdGdTGb ¹ C ^b b ¹ Ab ¹ Ab ¹ Ab ¹ Tb ¹
296a	Ab ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdC [*] sdAsdGsdGsdC [*] sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdTsdAsdGsTb ¹ sdAsdGsdTsdGsdC [*] sAb ¹ sAb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sGb ¹
296b	Ab ¹ Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹ Ab ¹ dC [*] dAdGdGdCsdAdTdTdAdAdTdAdAdAdGdTGdC [*] Ab ¹ Ab ¹ Ab ¹ Tb ¹ Gb ¹

으로부터 선택되고,

여기에서 약어 b, d, C^{*}, A^{*}, s, ss는 하기 의미를 갖는다:

b¹ β-D-옥시-LNA

b² β-D-티오-LNA

b³ β-D-아미노-LNA

b⁴ α-L-옥시-LNA

b⁵ β-D-ENA

b⁶ β-D-(NH)-LNA

b⁷ β-D-(NCH₃)-LNA

d 2-디옥시

C^{*} (5-메틸시토신)

A^{*} 2-아미노아데닌

s 뉴클레오타이드간 연결이 포스포로티오에이트기 (-O-P(0)(S⁻)-O-)임

ss 뉴클레오타이드간 연결이 포스포로디티오에이트기 (-O-P(S)(S⁻)-O-)임

/5SpC3s/ 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5'-말단기에서의 $-O-P(O)(S^-)OC_3H_6OH$

/3SpC3s/ 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 3'-말단기에서의 $-O-P(O)(S^-)OC_3H_6OH$

짧은 글씨체의 뉴클레오타이드는 LNA 뉴클레오타이드임

짧은 글씨체가 아닌 뉴클레오타이드는 비-LNA 뉴클레오타이드인 안티센스-올리고뉴클레오타이드.

청구항 11

손상된 신경 경로의 재생 및 기능적 재접속을 촉진하거나 신경 줄기 세포 회복의 나이로 인한 감소의 치료 및 보상을 촉진하기 위한 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 안티센스-올리고뉴클레오타이드.

청구항 12

신경퇴화성 질환, 신경염증성 질환, 외상성 또는 외상후 장애, 신경혈관 장애, 저산소증 장애, 감염후 중추신경계 장애, 섬유증 질환, 과증식성 질환, 암, 종양, 노인성 난청 및 노안의 예방 및 치료에서의 용도를 위한 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 안티센스-올리고뉴클레오타이드.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 여기에서 신경퇴화성 질환 및 신경염증성 질환이 알츠하이머병, 파킨슨병, 크로이펠츠 야곱병, 크로이펠츠 야곱병의 신규 변종, 할러보르덴 스파츠병, 헌팅턴병, 다체계 위축증, 치매, 전측두엽 치매, 운동신경 장애, 근위축성 측삭경화증, 척수성 근위축증, 척수-소뇌성 운동실조증, 조현병, 정동 장애, 주우울증, 수막뇌염, 세균 수막뇌염, 바이러스성 수막뇌염, 중추신경계 자가면역 장애, 다발성 경화증, 급성 허혈성/저산소성 병변, 뇌일혈, 중추신경계 및 척수 외상, 뇌 외상성 손상, 미세혈관병성 치매, 빈스방거병, 망막변성, 와우변성, 황반변성, 와우난청, AIDS-연관 치매, 망막색소변성증, 취약 반성 진전/운동실조 증후군, 진행성 핵상안근 마비, 줄무늬체 흑색질 변성증, 올리브교소뇌퇴화, 샤이-드래거증후군, 나이 의존성 기억 손상, 치매와 연관되는 신경 발달장애, 다운증후군, 시누클레인 병증, 과산화물 제거효소 돌연변이, 3염기 반복 장애, 및 중추신경계-노화로 이루어지는 군으로부터 선택되고 여기에서 섬유증 질환이 폐섬유증, 낭포성 섬유증, 간경변증, 심내막심근 섬유증, 진구성심근경색, 심방성 섬유증, 종격섬유증, 골수섬유증, 후복막 섬유증, 진행성 거대섬유화증, 신성 전신 섬유화증, 크론병, 켈로이드, 전신경화증, 관절섬유화, 페이로니병, 듀프이트렌구축 및 흉반성 낭창 후 잔적층으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드.

청구항 14

머리 및 척추 외상(head and spinal trauma), 동맥경화증, 죽상동맥경화증, 및 트라우마, 혈관질환, 혈관 염증의 예방 및 치료에서의 용도를 위한 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 안티센스-올리고뉴클레오타이드.

청구항 15

적어도 하나의 약제학적으로 수용가능한 담체, 부형제, 보조제, 용매 또는 희석제와 함께 제 1 항, 제 2 항, 제 3 항, 제 4 항 또는 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 종양학적 질환을 포함하는 신경성, 신경변성 및 과증식성 질환의 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 안티센스-올리고뉴클레오타이드, TGF-R 신호의 억제체로서의 그의 용도, 이러한 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 조성물 및 신경 질환, 신경변성 질환 및 종양학적 질환을 포함하여 과증식성 질환의 예방 및 치료를 위한 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] TGF-β는 인간에서 TGF-β1, TGF-β2 및 TGF-β3의 3가지의 공지된 아형(subtype)으로 존재한다. 이들은 ALS

및 일부 인간 암 등과 같은 신경변성 질환에서 상향조절되고(upregulated), 신경변성 질환, 급성 트라우마 및 신경-염증(neuro-inflammation)과 노화의 병리학적 상태에서의 이러한 성장인자의 증가된 발현이 입증되었다. 형질전환성장인자-베타의 동형 (TGF- β 1)이 또한 임신 중독증(pre-eclampsia)의 발병기전(pathogenesis)에 포함되는 것으로 고려되었다.

[0003] 활성화된 TGF- β 는 3가지 서로 다른 수용기 부류: 또한 액티빈-형 키나아제(activin-like kinase) (ALK; 53 kDa(킬로달톤))로 명명된 I형 (TGFRI), II형 (TGFRII; 70-100 kDa) 및 III형 (TGFRIII; 200-400 kDa을 경유하여 표적 세포에 그 영향을 발휘한다. TGF- β 수용기는 단일 경로 세린/트레오닌 키나아제 수용기이다. 반면에 II형 수용기 키나아제는 본질적으로 활성이고, I형 수용기는 활성화될 필요가 있다. 이러한 과정은 리간드의 TGFRII에의 결합을 통하여 개시되고; 이는 리간드와 수용기 I형 및 II형을 포함하는 복합체(complex)의 일과성 형성(transient formation)을 촉발한다. 리간드의 이량체성 조성(dimeric composition)을 고려하면, 수용기 복합체는 필시 각 수용기 형태의 2개의 쌍들로 형성되는 사량체성 구조로 이루어질 것이다.

[0004] TGF- β 신호 전달은 그의 수용기를 통하여 일어나고 Smad 단백질을 통하여 하향흐름된다. 특정한 TGFRI/II 수용기 쌍에의 TGF- β 동형의 결합에 의하여 개시되는 Smad-의존성 세포 신호 전달은 세포내 Smad의 포스포릴화 및 후속하는 활성화된 Smad 복합체의 핵내로의 전좌(translocation)를 야기하여 특정한 표적 유전자 발현에 영향을 준다. 다른 경로 내로의 신호 일탈 및 이웃하는 신호 경로로부터의 수렴이 고도로 복잡한 네트워크를 형성한다. 환경 및 세포상 정황에 따라, TGF-베타 신호는 종양 세포에 있어서의 세포 증식, 분화, 운동성 및 세포자멸 등과 같은 다양한 서로 다른 세포상 반응이라는 결과를 가져온다. 암에 있어서, TGF- β 는 종양 성장을 촉진하고, 상피-간엽이행(epithelial-mesenchymal transition: EMT)을 유도하고, 항종양 면역 반응을 차단하고, 종양-연관 섬유증을 증가시키고, 세포외 기질 (ECN) 및 세포 이동을 조절하고, 마지막으로 혈관신생을 향상시키는 것에 의하여 내적으로 (TGF- β 신호의 내인성 효과로 언급됨) 또는 외적으로 (외인성 효과로 언급됨) 종양 성장에 영향을 줄 수 있다. TGF- β 신호가 종양 촉진자 또는 억제자 기능을 갖는 지의 여부를 결정하는 인자들 (예를 들어 농도, 시간, 국소적 노출)이 집중적인 연구 및 논의의 대상이다. 현재, 다른 종양 억제자에서의 열성의 기능 소실 돌연변이(recessive loss-of-function mutations)와 유사하게 암의 초기 단계에서 TGF- β 신호의 종양 억제자 기능이 소실되는 것으로 상정되고 있다. 따라서 둘 다 TGFRI의 소분자 억제제이고 임상적인 조사 중에 있는 갈루니서티브(Galunisertib) 및 TEW-7197 그리고 TGFRII에 대한 항체인 LY3022859의 조사 등과 같은 TGF-베타 신호 경로를 차단하는 것에 의한 다양한 암의 치료에 대한 약학적 접근법이 존재하고 있다.

[0005] 신경 줄기 세포가 생리학적 상태 하에서 제어되나 다른 세포 형태에 유사한 계(system)를 나타내는 형질전환성장인자 (TGF- β) 족의 단백질에 의해 제공되는 신호가 암 줄기 세포에 대한 형질전환 이후 이러한 조절로부터 방출된다. TGF- β 는 뇌의 여러 생리학적 그리고 병리-생리학적 과정에 포함되는 다관능성 사이토카인이다. 이는 손상 혹은 저산소증(hypoxia) 이후 그리고 신경변성 동안에 염증 반응을 조절하고 약화시키는 경우에 성인 뇌내에서 유도된다. 손상 이후, 비록 TGF- β 가 일반적으로 신경보호적임에도 불구하고, 이는 신경 줄기 세포 증식을 억제하고 흉터 형성을 위한 섬유증(fibrosis)/신경교증(gliososis)을 유도하는 것에 의하여 뇌의 자가-복구를 제한한다. 신경 줄기 세포에 대한 그의 영향과 유사하게, TGF- β 는 대부분의 세포 형태에 대한 항-증식 제어를 나타내나; 그러나, 역설적으로, 많은 종양이 TGF- β 제어로부터 벗어난다. 게다가, 이러한 종양은 주로 기질, 이동 및 침습, 혈관신생 및 가장 중요하게도 면역 탈출 메카니즘에 대한 다중 TGF- β -매개 영향을 조정하는 것에 의하여 TGF- β 의 항-증식 영향을 발암 신호로 변화시키는 메카니즘을 발달시킨다. 따라서, TGF- β 가 종양 진행에 개입한다 (도 3을 참조하시오).

[0006] 따라서, TGF 수용기 II (형질전환성장인자, 베타 수용기 II; 동의어적으로 사용되는 기호: TGF-베타 II형 수용기, TGFBR2 ; AAT3; FAA3; LDS1B; LDS2; LDS2B; MFS2; RIIC; TAAD2; TGF-2; TGF베타-RII, TGF-RII, TGF-R_{II}) 및 특히 그의 억제제 ALS 등과 같은 신경변성 질환 및 암 및 섬유증 질환 등과 같은 과증식성 질환의 치료를 위한 목표로 평가되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본원의 목적은 TGF 수용기 II (TGF-R_{II})의 발현을 억제하고 따라서 TGF 수용기 II (TGF-R_{II})의 양을 감소시키고 TGF- β 하향흐름 신호의 활성을 감소시킬 수 있는 약제학적으로 활성인 화합물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 목적은 독립 청구항의 교시에 의해 해결된다. 추가로 본 발명의 유리한 특징, 관점 및 상세가 본원의

종속 청구항, 상세한 설명, 도면 및 실시예로부터 명백하게 된다.

[0009] 놀랍게도 단백질-뉴클레오타이드 복합체, siRNA, 마이크로RNA (miRNA), 리보자임, 압타머(aptamers), CpG-올리고 (CpG-oligos), DNA-자임(DNA-zymes), 리보스위치(riboswitches), 지질, 펩티드, 소분자(small molecules), 라프트(raft) 또는 카베올리(caveoli)의 변형자(modifiers), 골지체의 변형자, 항체 및 그들의 유도체, 특히 키메라, Fab-단편 및 Fc-단편 등과 같은 수천 종의 후보 물질 하에서 LNA (LNA[®]: 잠금 핵산) 함유 안티센스-올리고 뉴클레오타이드가 여기에서 기술되는 용도를 위한 가장 유망한 후보로 밝혀졌다.

과제의 해결 수단

[0010] 따라서, 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화(hybridizing)할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4) 또는 시퀀스 CCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 5) 또는 시퀀스 ACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 6) 또는 시퀀스 GGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 7) 또는 시퀀스 GTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 8) 또는 시퀀스 TTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 9)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4) 또는 시퀀스 CCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 5) 또는 시퀀스 ACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 6) 또는 시퀀스 GGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 7) 또는 시퀀스 GTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 8) 또는 시퀀스 TTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 9) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0011] 약간 달리 말하면 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임(open reading frame)의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4) 또는 시퀀스 CCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 5) 또는 시퀀스 ACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 6) 또는 시퀀스 GGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 7) 또는 시퀀스 GTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 8) 또는 시퀀스 TTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 9)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4) 또는 시퀀스 CCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 5) 또는 시퀀스 ACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 6) 또는 시퀀스 GGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 7) 또는 시퀀스 GTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 8) 또는 시퀀스 TTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 9) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0012] 달리 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4) 또는 시퀀스 CCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 5) 또는 시퀀스 ACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 6) 또는 시퀀스 GGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 7) 또는 시퀀스 GTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 8) 또는 시퀀스 TTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 9)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4) 또는 시퀀스 CCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 5) 또는 시퀀스 ACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 6) 또는 시퀀스 GGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 7) 또는 시퀀스 GTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 8) 또는 시퀀스 TTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 9) 각각에 대하여 상보적인 시퀀스를 포함한다.

[0013] 약간 달리 말하면 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 개방

판독 프레임의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4) 또는 시퀀스 CCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 5) 또는 시퀀스 ACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 6) 또는 시퀀스 GGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 7) 또는 시퀀스 GTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 8) 또는 시퀀스 TTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 9)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4) 또는 시퀀스 CCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 5) 또는 시퀀스 ACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 6) 또는 시퀀스 GGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 7) 또는 시퀀스 GTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 8) 또는 시퀀스 TTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 9) 각각에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0014] 바람직하게는 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0015] 약간 달리 말하면 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0016] 달리 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4)에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0017] 약간 달리 말하면 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체이고, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 TGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 4)에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0018] 바람직하게는 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 CCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 5)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 CCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 5)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0019] 약간 달리 말하면 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 CCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 5)를 포함

하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **CCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 5)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0020] 달리 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **CCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 5)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **CCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 5)에 대하여 상보적인 시퀀스를 포함한다.

[0021] 약간 달리 말하면 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체이고, 여기에서 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **CCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 5)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **CCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 5)에 대하여 상보적인 시퀀스를 포함한다.

[0022] 바람직하게는 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **ACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 6)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **ACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 6)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0023] 약간 달리 말하면 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **ACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 6)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **ACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 6)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0024] 달리 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **ACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 6)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **ACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 6)에 대하여 상보적인 시퀀스를 포함한다.

[0025] 약간 달리 말하면 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체이고, 여기에서 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **ACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 6)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **ACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 6)에 대하여 상보적인 시퀀스를 포함한다.

[0026] 바람직하게는 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하

는 mRNA의 영역이 시퀀스 **GGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 7)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **GGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 7)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0027] 약간 달리 말하면 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **GGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 7)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **GGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 7)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0028] 달리 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **GGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 7)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **GGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 7)에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0029] 약간 달리 말하면 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체이고, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **GGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 7)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **GGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 7)에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0030] 바람직하게는 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **GTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 8)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **GTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 8)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0031] 약간 달리 말하면 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **GTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 8)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **GTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 8)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0032] 달리 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **GTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 8)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **GTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 8)에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0033] 약간 달리 말하면 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체이

고, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **GTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 8)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **GTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 8)에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0034] 바람직하게는 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **TTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 9)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **TTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 9)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0035] 약간 달리 말하면 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **TTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 9)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **TTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 9)와 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0036] 달리 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **TTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 9)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **TTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 9)에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0037] 약간 달리 말하면 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체이고, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 개방 판독 프레임의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **TTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 9)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **TTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 9)에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0038] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 2 내지 10개의 LNA 단위, 보다 바람직하게는 3 내지 9개의 LNA 단위 그리고 여전히 보다 바람직하게는 4 내지 8개의 LNA 단위 그리고 또한 바람직하게는 적어도 6개의 비-LNA 단위, 보다 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위는 바람직하게는 DNA 단위이다. LNA 단위는 바람직하게는 3' 말단 단부 (또한 3' 말단이라고 칭함) 및 5' 말단 단부 (또한 5' 말단이라고 칭함)에 위치된다. 바람직하게는 적어도 하나 그리고 보다 바람직하게는 적어도 2개의 LNA 단위가 3' 말단 단부에 및/또는 5' 말단 단부에 존재한다.

[0039] 따라서, 3 내지 10개의 LNA 단위를 포함하고 특히 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 LNA 단위들 사이에 적어도 7개 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 단위를 포함하는 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다.

[0040] 게다가, 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 등과 같은 보통의 핵염기와 마찬가지로 이들의 보통의 유도체를 포함할 수 있다. 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 또한 포스페이트 가교(phosphate bridge) 대신 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 또는 포스포로디티오에이트(phosphorodithioate) 등과 같은 변성된 뉴클레오타이드간 가교를 포함할 수 있다. 이러한 변성은 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 단지 LNA 조각(LNA segment) 내에만 또는 단지 비-LNA 조각 내에만 존재할 수 있다.

[0041] 따라서, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하

는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 CTGGTCCATTTC (시퀀스 동정 번호 296), TGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 297), CTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 298), TCCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 299), CCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 300), TCCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 301), CACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 302), ACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 303), CACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 304), TGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 305), GGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 306), TGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 307), GGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 308), GTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 309), GGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 310), TTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 311), TTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 312) 또는 TTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 313)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 CTGGTCCATTTC (시퀀스 동정 번호 296), TGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 297), CTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 298), TCCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 299), CCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 300), TCCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 301), CACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 302), ACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 303), CACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 304), TGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 305), GGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 306), TGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 307), GGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 308), GTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 309), GGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 310), TTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 311), TTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 312) 또는 TTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 313) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0042] 달리 본 발명은 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 CTGGTCCATTTC (시퀀스 동정 번호 296), TGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 297), CTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 298), TCCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 299), CCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 300), TCCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 301), CACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 302), ACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 303), CACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 304), TGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 305), GGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 306), TGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 307), GGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 308), GTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 309), GGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 310), TTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 311), TTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 312) 또는 TTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 313)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 CTGGTCCATTTC (시퀀스 동정 번호 296), TGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 297), CTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 298), TCCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 299), CCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 300), TCCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 301), CACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 302), ACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 303), CACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 304), TGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 305), GGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 306), TGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 307), GGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 308), GTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 309), GGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 310), TTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 311), TTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 312) 또는 TTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 313) 각각에 대하여 상보적인 시퀀스를 포함한다.

[0043] 바람직하게는, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 CTGGTCCATTTC (시퀀스 동정 번호 296), TGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 297) 또는 CTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 298)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 CTGGTCCATTTC (시퀀스 동정 번호 296), TGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 297) 또는 CTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 298) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0044] 약간 달리 말하면, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고

뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **CTGGTCCATTTC** (시퀀스 동정 번호 296), **TGGTCCATTCA** (시퀀스 동정 번호 297) 또는 **CTGGTCCATTCA** (시퀀스 동정 번호 298)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **CTGGTCCATTTC** (시퀀스 동정 번호 296), **TGGTCCATTCA** (시퀀스 동정 번호 297) 또는 **CTGGTCCATTCA** (시퀀스 동정 번호 298) 각각에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0045] 바람직하게는, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **TCCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 299), **CCCTAAACACT** (시퀀스 동정 번호 300) 또는 **TCCCTAAACACT** (시퀀스 동정 번호 301)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **TCCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 299), **CCCTAAACACT** (시퀀스 동정 번호 300) 또는 **TCCCTAAACACT** (시퀀스 동정 번호 301) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0046] 약간 달리 말하면, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **TCCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 299), **CCCTAAACACT** (시퀀스 동정 번호 300) 또는 **TCCCTAAACACT** (시퀀스 동정 번호 301)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **TCCCTAAACAC** (시퀀스 동정 번호 299), **CCCTAAACACT** (시퀀스 동정 번호 300) 또는 **TCCCTAAACACT** (시퀀스 동정 번호 301) 각각에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0047] 바람직하게는, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **CACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 302), **ACTACCAAATA** (시퀀스 동정 번호 303) 또는 **CACTACCAAATA** (시퀀스 동정 번호 304)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **CACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 302), **ACTACCAAATA** (시퀀스 동정 번호 303) 또는 **CACTACCAAATA** (시퀀스 동정 번호 304) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0048] 약간 달리 말하면, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **CACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 302), **ACTACCAAATA** (시퀀스 동정 번호 303) 또는 **CACTACCAAATA** (시퀀스 동정 번호 304)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **CACTACCAAAT** (시퀀스 동정 번호 302), **ACTACCAAATA** (시퀀스 동정 번호 303) 또는 **CACTACCAAATA** (시퀀스 동정 번호 304) 각각에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0049] 바람직하게는, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **TGGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 305), **GGACGCGTATC** (시퀀스 동정 번호 306) 또는 **TGGACGCGTATC** (시퀀스 동정 번호 307)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **TGGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 305), **GGACGCGTATC** (시퀀스 동정 번호 306) 또는 **TGGACGCGTATC** (시퀀스 동정

번호 307) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0050] 약간 달리 말하면, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **TGGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 305), **GGACGCGTATC** (시퀀스 동정 번호 306) 또는 **TGGACGCGTATC** (시퀀스 동정 번호 307)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **TGGACGCGTAT** (시퀀스 동정 번호 305), **GGACGCGTATC**(시퀀스 동정 번호 306) 또는 **TGGACGCGTATC** (시퀀스 동정 번호 307) 각각에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0051] 바람직하게는, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **GGTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 308), **GTCTATGACGA** (시퀀스 동정 번호 309) 또는 **GGTCTATGACGA** (시퀀스 동정 번호 310)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **GGTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 308), **GTCTATGACGA** (시퀀스 동정 번호 309) 또는 **GGTCTATGACGA** (시퀀스 동정 번호 310) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0052] 약간 달리 말하면, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **GGTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 308), **GTCTATGACGA** (시퀀스 동정 번호 309) 또는 **GGTCTATGACGA** (시퀀스 동정 번호 310)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **GGTCTATGACG** (시퀀스 동정 번호 308), **GTCTATGACGA** (시퀀스 동정 번호 309) 또는 **GGTCTATGACGA** (시퀀스 동정 번호 310) 각각에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0053] 바람직하게는, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **TTTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 311), **TTATTAATGCC** (시퀀스 동정 번호 312) 또는 **TTTATTAATGCC** (시퀀스 동정 번호 313)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 **TTTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 311), **TTATTAATGCC** (시퀀스 동정 번호 312) 또는 **TTTATTAATGCC** (시퀀스 동정 번호 313) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0054] 약간 달리 말하면, 본 발명은 또한 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 **TTTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 311), **TTATTAATGCC** (시퀀스 동정 번호 312) 또는 **TTTATTAATGCC** (시퀀스 동정 번호 313)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 시퀀스 **TTTATTAATGC** (시퀀스 동정 번호 311), **TTATTAATGCC** (시퀀스 동정 번호 312) 또는 **TTTATTAATGCC** (시퀀스 동정 번호 313) 각각에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0055] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 3 내지 10개의 LNA 단위, 보다 바람직하게는 3 내지 9개의 LNA 단위 그리고 여전히 보다 바람직하게는 4 내지 8개의 LNA 단위 그리고 또한 바람직하게는 적어도 6개의 비-LNA 단위, 보다 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA

단위를 포함한다. 비-LNA 단위는 바람직하게는 DNA 단위이다. LNA 단위는 바람직하게는 3' 말단 단부 (또한 3' 말단이라고 칭함) 및 5' 말단 단부 (또한 5' 말단이라고 칭함)에 위치된다. 바람직하게는 적어도 하나 그리고 보다 바람직하게는 적어도 2개의 LNA 단위가 3' 말단 단부에 및/또는 5' 말단 단부에 존재한다.

[0056] 따라서, 3 내지 10개의 LNA 단위를 포함하고 특히 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 LNA 단위들 사이에 적어도 7개 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 단위를 포함하는 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다.

[0057] 게다가, 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 등과 같은 보통의 핵염기와 마찬가지로 이들의 보통의 유도체를 포함할 수 있다. 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 또한 포스페이 트 가교 대신 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등과 같은 변성된 뉴클레오타이드간 가교를 포함할 수 있다. 이러한 변성은 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 단지 LNA 조각 내에만 또는 단지 비-LNA 조각 내에만 존재할 수 있다.

[0058] 따라서, 본 발명은 또한 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 ACTGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 314), TGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 315), CTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 316), ACTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 317), ACTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 318), CTCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 319), CCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 320), TCCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 321), CTCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 322), CTCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 323), AACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 324), ACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 325), CACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 326), AACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 327), AACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 328), GTGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 329), GGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 330), TGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 331), GTGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 332), GTGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 333), CGGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 334), GTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 335), GGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 336), CGGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 337), CGGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 338), CTTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 339), TTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 340), TTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 341), CTTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 342) 또는 CTTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 343)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 상기 시퀀스 ACTGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 314), TGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 315), CTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 316), ACTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 317), ACTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 318), CTCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 319), CCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 320), TCCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 321), CTCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 322), CTCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 323), AACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 324), ACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 325), CACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 326), AACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 327), AACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 328), GTGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 329), GGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 330), TGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 331), GTGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 332), GTGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 333), CGGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 334), GTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 335), GGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 336), CGGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 337), CGGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 338), CTTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 339), TTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 340), TTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 341), CTTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 342) 또는 CTTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 343) 각 각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0059] 달리 본 발명은 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 ACTGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 314), TGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 315), CTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 316), ACTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 317), ACTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 318), CTCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 319), CCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 320), TCCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 321), CTCCTAAACACT (시퀀스 동정

번호 322), CTCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 323), AACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 324), ACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 325), CACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 326), AACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 327), AACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 328), GTGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 329), GGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 330), TGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 331), GTGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 332), GTGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 333), CGGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 334), GTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 335), GGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 336), CGGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 337), CGGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 338), CTTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 339), TTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 340), TTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 341), CTTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 342) 또는 CTTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 343)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 시퀀스 ACTGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 314), TGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 315), CTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 316), ACTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 317), ACTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 318), CTCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 319), CCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 320), TCCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 321), CTCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 322), CTCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 323), AACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 324), ACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 325), CACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 326), AACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 327), AACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 328), GTGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 329), GGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 330), TGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 331), GTGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 332), GTGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 333), CGGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 334), GTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 335), GGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 336), CGGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 337), CGGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 338), CTTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 339), TTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 340), TTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 341), CTTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 342) 또는 CTTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 343) 각각에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0060] 바람직하게는 본 발명은 또한 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 ACTGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 314), TGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 315), CTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 316), ACTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 317), ACTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 318)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 상기 시퀀스 ACTGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 314), TGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 315), CTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 316), ACTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 317), ACTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 318) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0061] 약간 달리 말하면, 본 발명은 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 ACTGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 314), TGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 315), CTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 316), ACTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 317) 또는 ACTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 318)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 시퀀스 ACTGGTCCATTC (시퀀스 동정 번호 314), TGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 315), CTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 316), ACTGGTCCATTCA (시퀀스 동정 번호 317) 또는 ACTGGTCCATTCAT (시퀀스 동정 번호 318) 각각에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

[0062] 바람직하게는 본 발명은 또한 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 CTCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 319), CCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 320), TCCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 321), CTCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 322) 또는 CTCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 323)를 포함하고, 안

티센스-올리고뉴클레오티드가 상기 시퀀스 CTCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 319), CCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 320), TCCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 321), CTCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 322) 또는 CTCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 323) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0063] 약간 달리 말하면, 본 발명은 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 CTCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 319), CCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 320), TCCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 321), CTCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 322) 또는 CTCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 323)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 시퀀스 CTCCTAAACAC (시퀀스 동정 번호 319), CCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 320), TCCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 321), CTCCTAAACACT (시퀀스 동정 번호 322) 또는 CTCCTAAACACTA (시퀀스 동정 번호 323) 각각에 대하여 상보적인 시퀀스를 포함한다.

[0064] 바람직하게는 본 발명은 또한 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 AACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 324), ACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 325), CACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 326), AACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 327) 또는 AACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 328)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 상기 시퀀스 AACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 324), ACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 325), CACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 326), AACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 327) 또는 AACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 328) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0065] 약간 달리 말하면, 본 발명은 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 AACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 324), ACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 325), CACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 326), AACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 327) 또는 AACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 328)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 시퀀스 AACTACCAAAT (시퀀스 동정 번호 324), ACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 325), CACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 326), AACTACCAAATA (시퀀스 동정 번호 327) 또는 AACTACCAAATAG (시퀀스 동정 번호 328) 각각에 대하여 상보적인 시퀀스를 포함한다.

[0066] 바람직하게는 본 발명은 또한 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 GTGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 329), GGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 330), TGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 331), GTGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 332) 또는 GTGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 333)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 상기 시퀀스 GTGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 329), GGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 330), TGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 331), GTGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 332) 또는 GTGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 333) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0067] 약간 달리 말하면, 본 발명은 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수

있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 GTGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 329), GGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 330), TGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 331), GTGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 332) 또는 GTGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 333)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 시퀀스 GTGGACGCGTAT (시퀀스 동정 번호 329), GGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 330), TGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 331), GTGGACGCGTATC (시퀀스 동정 번호 332) 또는 GTGGACGCGTATCG (시퀀스 동정 번호 333) 각각에 대하여 상보적인 시퀀스를 포함한다.

[0068] 바람직하게는 본 발명은 또한 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 CGGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 334), GTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 335), GGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 336), CGGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 337) 또는 CGGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 338)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 상기 시퀀스 CGGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 334), GTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 335), GGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 336), CGGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 337) 또는 CGGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 338) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0069] 약간 달리 말하면, 본 발명은 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 CGGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 334), GTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 335), GGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 336), CGGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 337) 또는 CGGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 338)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 시퀀스 CGGTCTATGACG (시퀀스 동정 번호 334), GTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 335), GGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 336), CGGTCTATGACGA (시퀀스 동정 번호 337) 또는 CGGTCTATGACGAG (시퀀스 동정 번호 338) 각각에 대하여 상보적인 시퀀스를 포함한다.

[0070] 바람직하게는 본 발명은 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 CTTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 339), TTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 340), TTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 341), CTTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 342) 또는 CTTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 343)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 상기 시퀀스 CTTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 339), TTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 340), TTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 341), CTTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 342) 또는 CTTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 343) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

[0071] 약간 달리 말하면, 본 발명은 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지고 14 내지 20개, 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 중의 적어도 4개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역이 시퀀스 CTTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 339), TTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 340), TTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 341), CTTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 342) 또는 CTTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 343)를 포함하고, 안티센스-올리고뉴클레오티드가 시퀀스 CTTTATTAATGC (시퀀스 동정 번호 339), TTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 340), TTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 341), CTTTATTAATGCC (시퀀스 동정 번호 342) 또는 CTTTATTAATGCCT (시퀀스 동정 번호 343) 각각과 하이브리드화할 수 있는 시퀀스를 포함한다.

(시퀀스 동정 번호 343) 각각에 대하여 상보성인 시퀀스를 포함한다.

- [0072] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 4 내지 11개의 LNA 단위, 보다 바람직하게는 4 내지 10개의 LNA 단위 그리고 여전히 보다 바람직하게는 4 내지 8개의 LNA 단위 그리고 또한 바람직하게는 적어도 6개의 비-LNA 단위, 보다 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위는 바람직하게는 DNA 단위이다. LNA 단위는 바람직하게는 3' 말단 단부 (또한 3' 말단이라고 칭함) 및 5' 말단 단부 (또한 5' 말단이라고 칭함)에 위치된다. 바람직하게는 적어도 하나 그리고 보다 바람직하게는 적어도 2개의 LNA 단위가 3' 말단 단부에 및/또는 5' 말단 단부에 존재한다.
- [0073] 따라서, 3 내지 10개의 LNA 단위를 포함하고 특히 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 LNA 단위들 사이에 적어도 7개 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 단위를 포함하는 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다.
- [0074] 게다가, 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 등과 같은 보통의 핵염기와 마찬가지로 이들의 보통의 유도체를 포함할 수 있다. 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 또한 포스페이트 가교 대신 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등과 같은 변성된 뉴클레오타이드간 가교를 포함할 수 있다. 이러한 변성은 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 단지 LNA 조각 내에만 또는 단지 비-LNA 조각 내에만 존재할 수 있다.
- [0075] 따라서, 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N¹-GTCATAGA-N²-3' (시퀀스 동정 번호 12) 또는 5'-N³-ACGCGTCC-N⁴-3' (시퀀스 동정 번호 98) 또는 5'-N¹¹-TGTTTAGG-N¹²-3' (시퀀스 동정 번호 10) 또는 5'-N⁵-TTTGGTAG-N⁶-3' (시퀀스 동정 번호 11) 또는 5'-N⁷-AATGGACC-N⁸-3' (시퀀스 동정 번호 100) 또는 5'-N⁹-ATTAATAA-N¹⁰-3' (시퀀스 동정 번호 101)로 표현되고, 여기에서
- [0076] N¹은: CATGGCAGACCCGCTGCTC-, ATGGCAGACCCGCTGCTC-, TGGCAGACCCGCTGCTC-, GGCAGACCCGCTGCTC-, GCAGACCCGCTGCTC-, CAGACCCGCTGCTC-, AGACCCGCTGCTC-, GACCCGCTGCTC-, ACCCGCTGCTC-, CCCGCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;
- [0077] N²는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCCC, -CCGAGCCCCA, -CCGAGCCCCAG, -CCGAGCCCCAGC, -CCGAGCCCCAGCG, -CCGAGCCCCAGCGC, -CCGAGCCCCAGCGCA, -CCGAGCCCCAGCGCAG, -CCGAGCCCCAGCGCAGC, -CCGAGCCCCAGCGCAGCG 또는 -CCGAGCCCCAGCGCAGCG를 나타내고;
- [0078] N³은: GGTGGGATCGTGCTGGCGAT-, GTGGGATCGTGCTGGCGAT-, TGGGATCGTGCTGGCGAT-, GGGATCGTGCTGGCGAT-, GGATCGTGCTGGCGAT-, GATCGTGCTGGCGAT-, ATCGTGCTGGCGAT-, TCGTGCTGGCGAT-, CGTGCTGGCGAT-, GTGCTGGCGAT-, TGCTGGCGAT-, GCTGGCGAT-, CTGGCGAT-, TGGCGAT-, GGCAT-, GCGAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;
- [0079] N⁴는: -ACAGGACGATGTGCAGCGC, -ACAGGACGATGTGCAGCG, -ACAGGACGATGTGCAGCG, -ACAGGACGATGTGCAGC, -ACAGGACGATGTGCAG, -ACAGGACGATGTGCA, -ACAGGACGATGTGC, -ACAGGACGATGTG, -ACAGGACGATGT, -ACAGGACGATG, -ACAGGACGAT, -ACAGGACGA, -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타내고;
- [0080] N⁵는: GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, AGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CTGCCCCAGAAGAGCTA-, TGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCCCAGAAGAGCTA-, CCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGAAGAGCTA-, CCAGAAGAGCTA-, CAGAAGAGCTA-, AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;
- [0081] N⁶은: -TGTTTAGGGAGCCGCTCTTCAGAA, -TGTTTAGGGAGCCGCTCTTCAGGA, -TGTTTAGGGAGCCGCTCTTCAGG, -TGTTTAGGGAGCCGCTCTTCAG, -TGTTTAGGGAGCCGCTCTTCA, -TGTTTAGGGAGCCGCTCTTC, -TGTTTAGGGAGCCGCTCTT, -TGTTTAGGGAGCCGCTCT, -TGTTTAGGGAGCCGCTC, -TGTTTAGGGAGCCGT, -TGTTTAGGGAGCCG, -TGTTTAGGGAGCC, -TGTTTAGGGAGC, -TGTTTAGGGAG, -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT,

-TGT, -TG 또는 -T를 나타내고;

[0082] N⁷은: TGAATCTTGAATATCTCATG-, GAATCTTGAATATCTCATG-, AATCTTGAATATCTCATG-, ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[0083] N⁸은: -AGTATTCTAGAACTCACCA, -AGTATTCTAGAACTCACC, -AGTATTCTAGAACTCAC, -AGTATTCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내고;

[0084] N⁹는: ATTCATATTTATATACAGGC-, TTCATATTTATATACAGGC-, TCATATTTATATACAGGC-, CATATTTATATACAGGC-, ATATTTATATACAGGC-, TATTTATATACAGGC-, ATTTATATACAGGC-, TTTATATACAGGC-, TTATATACAGGC-, TATATACAGGC-, ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;

[0085] N¹⁰은: -AGTGCAAATGTTATTGGCTA, -AGTGCAAATGTTATTGGCT, -AGTGCAAATGTTATTGGC, -AGTGCAAATGTTATTGG, -AGTGCAAATGTTATTG, -AGTGCAAATGTTATT, -AGTGCAAATGTTAT, -AGTGCAAATGTTA, -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내고;

[0086] N¹¹은: TGCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, GCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CAGAAGAGCTATTTGGTAG-, AGAAGAGCTATTTGGTAG-, GAAGAGCTATTTGGTAG-, AAGAGCTATTTGGTAG-, AGAGCTATTTGGTAG-, GAGCTATTTGGTAG-, AGCTATTTGGTAG-, GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-, TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GGTAG-, GTAG-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고,

[0087] N¹²는: -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTT, -GAGCCGTCTTCAGGAATCT, -GAGCCGTCTTCAGGAATC, -GAGCCGTCTTCAGGAAT, -GAGCCGTCTTCAGGAA, -GAGCCGTCTTCAGGA, -GAGCCGTCTTCAGG, -GAGCCGTCTTCAG, -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타낸다.

[0088] 따라서, 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오티드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오티드 중의 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오티드가 하기 시퀀스 5'-N¹-GTCATAGA-N²-3' (시퀀스 동정 번호 12) 또는 5'-N³-ACGCGTCC-N⁴-3' (시퀀스 동정 번호 98) 또는 5'-N¹¹-TGTTTAGG-N¹²-3' (시퀀스 동정 번호 10) 또는 5'-N⁵-TTTGGTAG-N⁶-3' (시퀀스 동정 번호 11) 또는 5'-N⁷-AATGGACC-N⁸-3' (시퀀스 동정 번호 100) 또는 5'-N⁹-ATTAATAA-N¹⁰-3' (시퀀스 동정 번호 101)로 표현되고, 여기에서 잔기 N¹ 내지 N¹²가 의미특히 여기에서 기술된 제한된 의미를 갖는다.

[0089] 게다가, 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오티드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오티드 중의 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오티드가 하기 시퀀스 5'-N¹-GTCATAGA-N²-3' (시퀀스 동정 번호 12)로 표현되고, 여기에서

[0090] N¹은: CATGGCAGACCCCGCTGCTC-, ATGGCAGACCCCGCTGCTC-, TGGCAGACCCCGCTGCTC-, GGCAGACCCCGCTGCTC-, GCAGACCCCGCTGCTC-, CAGACCCCGCTGCTC-, AGACCCCGCTGCTC-, GACCCCGCTGCTC-, ACCCCGCTGCTC-, CCCCCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;

[0091] N²는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCCC, -CCGAGCCCCA, -CCGAGCCCCAG, -CCGAGCCCCAGC, -CCGAGCCCCAGCG, -CCGAGCCCCAGCGC, -CCGAGCCCCAGCGCA,

-CCGAGCCCCAGCGCAG, -CCGAGCCCCAGCGCAGC, -CCGAGCCCCAGCGCAGCG 또는 -CCGAGCCCCAGCGCAGCGG를 나타낸다.

[0092] 식 S1 (시퀀스 동정 번호 12)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 2 내지 10개의 LNA 단위, 보다 바람직하게는 3 내지 9개의 LNA 단위 그리고 여전히 보다 바람직하게는 4 내지 8개의 LNA 단위 그리고 또한 바람직하게는 적어도 6개의 비-LNA 단위, 보다 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위는 바람직하게는 DNA 단위이다. LNA 단위는 바람직하게는 3' 말단 단부 (또한 3' 말단이라고 칭함) 및 5' 말단 단부 (또한 5' 말단이라고 칭함)에 위치된다. 바람직하게는 적어도 하나 그리고 보다 바람직하게는 적어도 2개의 LNA 단위가 3' 말단 단부에 및/또는 5' 말단 단부에 존재한다.

[0093] 따라서, 2 내지 10개의 LNA 단위를 포함하고 특히 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 LNA 단위들 사이에 적어도 7개 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 단위를 포함하는 갭량체(GAPmer)로서 디자인된 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다. 보다 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 5' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 여전히 보다 바람직하게는 5' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다.

[0094] 게다가, 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 등과 같은 보통의 핵염기와 마찬가지로 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌 등과 같은 이들의 보통의 유도체를 포함할 수 있다. 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 또한 포스페이트 가교 대신 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등과 같은 변성된 뉴클레오타이드간 가교를 포함할 수 있다. 이러한 변성은 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 단지 LNA 조각 내에만 또는 단지 비-LNA 조각 내에만 존재할 수 있다. LNA 단위로서 특히 여기에서 기술되는 바와 같은 잔기 b¹ 내지 b⁹가 바람직하다.

[0095] 따라서, 식 (S1)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다:

[0096] 5'-N¹-GTCATAGA-N²-3'(시퀀스 동정 번호 12)

[0097] 여기에서

[0098] N¹은: CATGGCAGACCCGCTGCTC-, ATGGCAGACCCGCTGCTC-, TGGCAGACCCGCTGCTC-, GGCAGACCCGCTGCTC-, GCAGACCCGCTGCTC-, CAGACCCGCTGCTC-, AGACCCGCTGCTC-, GACCCGCTGCTC-, ACCCGCTGCTC-, CCCGCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;

[0099] N²는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCCA, -CCGAGCCCCAG, -CCGAGCCCCAGC, -CCGAGCCCCAGCG, -CCGAGCCCCAGCGC, -CCGAGCCCCAGCGCA, -CCGAGCCCCAGCGCAG, -CCGAGCCCCAGCGCAGC, -CCGAGCCCCAGCGCAGCG 또는 -CCGAGCCCCAGCGCAGCGG로부터 선택된다.

[0100] 바람직하게는 일반식 (S1)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드 및 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다. LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(Locked Nucleic Acids: LNA[®])"의 장(chapter) 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오타이드간 가교로서 특히 "뉴클레오타이드간 가교(internucleotide bridge: IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.

[0101] 보다 바람직하게는 일반식 (S1)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다.

[0102] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S1)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 갭량체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하

게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기(Nucleobase)"의 장에 개시되었다.

[0103] 식 (S1)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 더 바람직하다:

[0104] $5'-N^1-GTCATAGA-N^2-3'$

[0105] 여기에서

[0106] N^1 은: TGGCAGACCCGCTGCTC-, GGCAGACCCGCTGCTC-, GCAGACCCGCTGCTC-, CAGACCCGCTGCTC-, AGACCCGCTGCTC-, GACCCGCTGCTC-, ACCCGCTGCTC-, CCCGCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;

[0107] N^2 는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCCA, -CCGAGCCCCAG, -CCGAGCCCCAGC, -CCGAGCCCCAGCG, -CCGAGCCCCAGCGC, -CCGAGCCCCAGCGCA, -CCGAGCCCCAGCGCAG 또는 -CCGAGCCCCAGCGCAGC로부터 선택된다.

[0108] 식 (S1)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 바람직하다:

[0109] $5'-N^1-GTCATAGA-N^2-3'$

[0110] 여기에서

[0111] N^1 은: GACCCGCTGCTC-, ACCCGCTGCTC-, CCCGCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;

[0112] N^2 는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCCA, -CCGAGCCCCAG 또는 -CCGAGCCCCAGC로부터 선택된다.

[0113] 식 (S1)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 바람직하다:

[0114] $5'-N^1-GTCATAGA-N^2-3'$

[0115] 여기에서

[0116] N^1 은: CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;

[0117] N^2 는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC 또는 -CCGAGCCC로부터 선택된다.

[0118] 바람직하게는, 본 발명은 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서

[0119] 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 $5'-N^{1A}-CGTCATAGAC-N^{2A}-3'$ (시퀀스 동정 번호 69)로 표현되고, 여기에서

[0120] N^{1A} 는: CATGGCAGACCCGCTGCT-, ATGGCAGACCCGCTGCT-, TGGCAGACCCGCTGCT-, GGCAGACCCGCTGCT-, GCAGACCCGCTGCT-, CAGACCCGCTGCT-, AGACCCGCTGCT-, GACCCGCTGCT-, ACCCGCTGCT-, CCCGCTGCT-, CCGCTGCT-, CGCTGCT-, GCTGCT-, TGCT-, GCT-, CT- 또는 T-를 나타내고;

[0121] N^{2A} 는: -C, -CG, -CGA, -CGAG, -CGAGC, -CGAGCC, -CGAGCCC, -CGAGCCCC, -CGAGCCCCA, -CGAGCCCCAG, -CGAGCCCCAGC, -CGAGCCCCAGCG, -CGAGCCCCAGCGC, -CGAGCCCCAGCGCA, -CGAGCCCCAGCGCAG, -CGAGCCCCAGCGCAGC, -CGAGCCCCAGCGCAGCG 또는 -CGAGCCCCAGCGCAGCG를 나타낸다.

[0122] 바람직하게는 N^{1A} 는: TGGCAGACCCGCTGCT-, GGCAGACCCGCTGCT-, GCAGACCCGCTGCT-, CAGACCCGCTGCT-, AGACCCGCTGCT-, GACCCGCTGCT-, ACCCGCTGCT-, CCCGCTGCT-, CCGCTGCT-, CGCTGCT-, GCTGCT-,

CTGCT-, TGCT-, GCT-, CT- 또는 T-를 나타내고;

[0123] N^{2A} 는: -C, -CG, -CGA, -CGAG, -CGAGC, -CGAGCC, -CGAGCCC, -CGAGCCCC, -CGAGCCCCC, -CGAGCCCCCA, -CGAGCCCCCAG, -CGAGCCCCCAGC, -CGAGCCCCCAGCG, -CGAGCCCCCAGCGC, -CGAGCCCCCAGCGCA, -CGAGCCCCCAGCGCAG 또는 -CGAGCCCCCAGCGCAGC를 나타낸다.

[0124] 보다 바람직하게는 N^{1A} 는: GACCCGCTGCT-, ACCCCGCTGCT-, CCCCCTGCT-, CCCGCTGCT-, CCGCTGCT-, CGCTGCT-, GCTGCT-, CTGCT-, TGCT-, GCT-, CT- 또는 T-를 나타내고;

[0125] N^{2A} 는: -C, -CG, -CGA, -CGAG, -CGAGC, -CGAGCC, -CGAGCCC, -CGAGCCCC, -CGAGCCCCC, -CGAGCCCCCA, -CGAGCCCCCAG 또는 -CGAGCCCCCAGC를 나타낸다.

[0126] 여전히 보다 바람직하게는 N^{1A} 는: CGCTGCT-, GCTGCT-, CTGCT-, TGCT-, GCT-, CT- 또는 T-를 나타내고;

[0127] N^{2A} 는: -C, -CG, -CGA, -CGAG, -CGAGC, -CGAGCC 또는 -CGAGCCC를 나타낸다.

[0128] 바람직하게는 일반식 (S1A / 시퀀스 동정 번호 69)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 12 내지 24개의 뉴클레오티드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오티드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오티드를 갖는다. LNA 뉴클레오티드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오티드간 가교로서 특히 "뉴클레오티드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.

[0129] 보다 바람직하게는 일반식 (S1A)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 12 내지 22개의 뉴클레오티드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오티드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오티드를 갖는다. 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S1A)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오티드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 캡량체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오티드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.

[0130] 게다가, 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오티드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오티드 중의 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오티드가 하기 시퀀스 5'-N³-ACGCGTCC-N⁴-3' (시퀀스 동정 번호 98)로 표현되고, 여기에서

[0131] N^3 은: GGTGGGATCGTGCTGGCGAT-, GTGGGATCGTGCTGGCGAT-, TGGGATCGTGCTGGCGAT-, GGGATCGTGCTGGCGAT-, GGATCGTGCTGGCGAT-, GATCGTGCTGGCGAT-, ATCGTGCTGGCGAT-, TCGTGCTGGCGAT-, CGTGCTGGCGAT-, GTGTGGCGAT-, TGCTGGCGAT-, GCTGGCGAT-, CTGGCGAT-, TGGCGAT-, GCGAT-, GCGAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0132] N^4 는: -ACAGGACGATGTGCAGCGC, -ACAGGACGATGTGCAGCGG, -ACAGGACGATGTGCAGCG, -ACAGGACGATGTGCAGC, -ACAGGACGATGTGCAG, -ACAGGACGATGTGCA, -ACAGGACGATGTGC, -ACAGGACGATGTG, -ACAGGACGATGT, -ACAGGACGATG, -ACAGGACGAT, -ACAGGACGA, -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타낸다.

[0133] 식 S2 (시퀀스 동정 번호 98)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 2 내지 10개의 LNA 단위, 보다 바람직하게는 3 내지 9개의 LNA 단위 그리고 여전히 보다 바람직하게는 4 내지 8개의 LNA 단위 그리고 또한 바람직하게는 적어도 6개의 비-LNA 단위, 보다 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위는 바람직하게는 DNA 단위이다. LNA 단위는 바람직하게는 3' 말단 단부 (또한 3' 말단이라고 칭함) 및 5' 말단 단부 (또한 5' 말단이라고 칭함)에 위치된다. 바람직하게는 적어도 하나 그리고 보다 바람직하게는 적어도 2개의 LNA 단위가 3' 말단 단부에 및/또는 5' 말단 단부에 존재

GCGAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0148] N^4 는: -ACAGGACGATGTGCAGCG, -ACAGGACGATGTGCAGC, -ACAGGACGATGTGCAG, -ACAGGACGATGTGCA, -ACAGGACGATGTGC, -ACAGGACGATGTG, -ACAGGACGATGT, -ACAGGACGATG, -ACAGGACGAT, -ACAGGACGA, -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타낸다.

[0149] 식 (S2)의 안티센스-올리고뉴클레오티드가 또한 바람직하다:

[0150] $5'-N^3-ACGCGTCC-N^4-3'$

[0151] 여기에서

[0152] N^3 은: TCGTGCTGGCGAT-, CGTGCTGGCGAT-, GTGCTGGCGAT-, TGCTGGCGAT-, GCTGGCGAT-, CTGGCGAT-, TGGCGAT-, GGCGAT-, GCGAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0153] N^4 는: -ACAGGACGATGTG, -ACAGGACGATGT, -ACAGGACGATG, -ACAGGACGAT, -ACAGGACGA, -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타낸다.

[0154] 식 (S2)의 안티센스-올리고뉴클레오티드가 또한 바람직하다:

[0155] $5'-N^3-ACGCGTCC-N^4-3'$

[0156] 여기에서

[0157] N^3 은: CTGGCGAT-, TGGCGAT-, GGCGAT-, GCGAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0158] N^4 는: -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타낸다.

[0159] 바람직하게는, 본 발명은 12 내지 24개의 뉴클레오티드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오티드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오티드가 하기 시퀀스 $5'-N^{3A}-TACGCGTCCA-N^{4A}-3'$ (시퀀스 동정 번호 70)로 표현되고, 여기에서

[0160] N^{3A} 는: GGTGGGATCGTGCTGGCGA-, GTGGGATCGTGCTGGCGA-, TGGGATCGTGCTGGCGA-, GGGATCGTGCTGGCGA-, GGATCGTGCTGGCGA-, GATCGTGCTGGCGA-, ATCGTGCTGGCGA-, TCGTGCTGGCGA-, CGTGCTGGCGA-, GTGCTGGCGA-, TGCTGGCGA-, GCTGGCGA-, CTGGCGA-, TGGCGA-, GGCGA-, GCGA-, CGA-, GA- 또는 A-를 나타내고;

[0161] N^{4A} 는: -CAGGACGATGTGCAGCGC, -CAGGACGATGTGCAGCGG, -CAGGACGATGTGCAGCG, -CAGGACGATGTGCAGC, -CAGGACGATGTGCAG, -CAGGACGATGTGCA, -CAGGACGATGTGC, -CAGGACGATGTG, -CAGGACGATGT, -CAGGACGATG, -CAGGACGAT, -CAGGACGA, -CAGGACG, -CAGGAC, -CAGGA, -CAGG, -CAG, -CA 또는 -C를 나타낸다.

[0162] 바람직하게는 N^{3A} 는: TGGGATCGTGCTGGCGA-, GGGATCGTGCTGGCGA-, GGATCGTGCTGGCGA-, GATCGTGCTGGCGA-, ATCGTGCTGGCGA-, TCGTGCTGGCGA-, CGTGCTGGCGA-, GTGCTGGCGA-, TGCTGGCGA-, GCTGGCGA-, CTGGCGA-, TGGCGA-, GGCGA-, GCGA-, CGA-, GA- 또는 A-를 나타내고;

[0163] N^{4A} 는: -CAGGACGATGTGCAGCG, -CAGGACGATGTGCAGC, -CAGGACGATGTGCAG, -CAGGACGATGTGCA, -CAGGACGATGTGC, -CAGGACGATGTG, -CAGGACGATGT, -CAGGACGATG, -CAGGACGAT, -CAGGACGA, -CAGGACG, -CAGGAC, -CAGGA, -CAGG, -CAG, -CA 또는 -C를 나타낸다.

[0164] 보다 바람직하게는 N^{3A} 는: TCGTGCTGGCGA-, CGTGCTGGCGA-, GTGCTGGCGA-, TGCTGGCGA-, GCTGGCGA-, CTGGCGA-, TGGCGA-, GGCGA-, GCGA-, CGA-, GA- 또는 A-를 나타내고;

[0165] N^{4A} 는: -CAGGACGATGTG, -CAGGACGATGT, -CAGGACGATG, -CAGGACGAT, -CAGGACGA, -CAGGACG, -CAGGAC, -CAGGA, -CAGG, -CAG, -CA 또는 -C를 나타낸다.

- [0166] 여전히 보다 바람직하게는 N^{3A}는: CTGGCGA-, TGGCGA-, GGC GA-, GCGA-, CGA-, GA- 또는 A-를 나타내고;
- [0167] N^{4A}는: -CAGGACG, -CAGGAC, -CAGGA, -CAGG, -CAG, -CA 또는 -C를 나타낸다.
- [0168] 바람직하게는 일반식 (S2A / 시퀀스 동정 번호 70)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다. LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오타이드간 가교로서 특히 "뉴클레오타이드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.
- [0169] 보다 바람직하게는 일반식 (S2A)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 22개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다.
- [0170] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S2A)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 겹량체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.
- [0171] 게다가, 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N¹¹-TGTTTAGG-N¹²-3' (시퀀스 동정 번호 10)로 표현되고, 여기에서
- [0172] N¹¹은: TGCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, GCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CAGAAGAGCTATTTGGTAG-, AGAAGAGCTATTTGGTAG-, GAAGAGCTATTTGGTAG-, AAGAGCTATTTGGTAG-, AGAGCTATTTGGTAG-, GAGCTATTTGGTAG-, AGCTATTTGGTAG-, GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-, TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GG TAG-, GTAG-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고,
- [0173] N¹²는: -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTT, -GAGCCGTCTTCAGGAATCT, -GAGCCGTCTTCAGGAAT, -GAGCCGTCTTCAGGAA, -GAGCCGTCTTCAGGA, -GAGCCGTCTTCAGG, -GAGCCGTCTTCAG, -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타낸다.
- [0174] 식 S3 (시퀀스 동정 번호 10)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 2 내지 10개의 LNA 단위, 보다 바람직하게는 3 내지 9개의 LNA 단위 그리고 여전히 보다 바람직하게는 4 내지 8개의 LNA 단위 그리고 또한 바람직하게는 적어도 6개의 비-LNA 단위, 보다 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비LNA 단위는 바람직하게는 DNA 단위이다. LNA 단위는 바람직하게는 3' 말단 단부 (또한 3' 말단이라고 칭함) 및 5' 말단 단부 (또한 5' 말단이라고 칭함)에 위치된다. 바람직하게는 적어도 하나 그리고 보다 바람직하게는 적어도 2개의 LNA 단위가 3' 말단 단부에 및/또는 5' 말단 단부에 존재한다.
- [0175] 따라서, 2 내지 10개의 LNA 단위를 포함하고 특히 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 LNA 단위들 사이에 적어도 7개 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 단위를 포함하는 겹량체로서 디자인된 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다. 보다 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 5' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 여전히 보다 바람직하게는 5' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위 그

리고 3' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다.

[0176] 게다가, 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 등과 같은 보통의 핵염기와 마찬가지로 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌 등과 같은 이들의 보통의 유도체를 포함할 수 있다. 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 또한 포스페이트 가교 대신 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등과 같은 변성된 뉴클레오타이드간 가교를 포함할 수 있다. 이러한 변성은 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 단지 LNA 조각 내에만 또는 단지 비-LNA 조각 내에만 존재할 수 있다. LNA 단위로서 특히 여기에서 기술되는 바와 같은 잔기 b^1 내지 b^9 가 바람직하다.

[0177] 따라서, 식 (S3)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다:

[0178] $5'-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3'$ (시퀀스 동정 번호 10)

[0179] 여기에서

[0180] N^{11} 은: TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, GCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CAGAAGAGCTATTTGGTAG-, AGAAGAGCTATTTGGTAG-, GAAGAGCTATTTGGTAG-, AAGAGCTATTTGGTAG-, AGAGCTATTTGGTAG-, GAGCTATTTGGTAG-, AGCTATTTGGTAG-, GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-, TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GG TAG-, GTAG-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고,

[0181] N^{12} 는: -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTT, -GAGCCGTCTTCAGGAATCT, -GAGCCGTCTTCAGGAAT, -GAGCCGTCTTCAGGAA, -GAGCCGTCTTCAGGA, -GAGCCGTCTTCAGG, -GAGCCGTCTTCAG, -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타낸다.

[0182] 바람직하게는 일반식 (S3)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다. LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오타이드간 가교로서 특히 "뉴클레오타이드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.

[0183] 보다 바람직하게는 일반식 (S3)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다.

[0184] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S3)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 깎여진 형태이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.

[0185] 식 (S3)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 더 바람직하다:

[0186] $5'-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3'$

[0187] 여기에서

[0188] N^{11} 은: AGAAGAGCTATTTGGTAG-, GAAGAGCTATTTGGTAG-, AAGAGCTATTTGGTAG-, AGAGCTATTTGGTAG-, GAGCTATTTGGTAG-, AGCTATTTGGTAG-, GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-, TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GG TAG-, GTAG-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고;

[0189] N^{12} 는: -GAGCCGTCTTCAGGAATC, -GAGCCGTCTTCAGGAAT, -GAGCCGTCTTCAGGAA, -GAGCCGTCTTCAGGA, -GAGCCGTCTTCAGG,

-GAGCCGTCTTCAG, -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타낸다.

[0190] 식 (S3)의 안티센스-올리고뉴클레오티드가 또한 바람직하다:

[0191] 5'-N¹¹-TGTTTAGG-N¹²-3'

[0192] 여기에서

[0193] N¹¹은: AGCTATTTGGTAG-, GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-, TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GGTA-, GTA-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고;

[0194] N¹²는: -GAGCCGTCTTCAG, -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타낸다.

[0195] 식 (S3)의 안티센스-올리고뉴클레오티드가 또한 바람직하다:

[0196] 5'-N¹¹-TGTTTAGG-N¹²-3'

[0197] 여기에서

[0199] *N¹¹은: TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GGTAG-, GTAG-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고;

[0200] N¹²는: -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타낸다.

[0201] 바람직하게는, 본 발명은 12 내지 24개의 뉴클레오티드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오티드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오티드가 하기 시퀀스 5'-N^{11A}-GTGTTTAGGG-N^{12A}-3' (시퀀스 동정 번호 71)로 표현되고, 여기에서

[0202] N^{11A}는: TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTA-, GCCCCAGAAGAGCTATTTGGTA-, CCCCAGAAGAGCTATTTGGTA-, CCCAGAAGAGCTATTTGGTA-, CCAGAAGAGCTATTTGGTA-, CAGAAGAGCTATTTGGTA-, AGAAGAGCTATTTGGTA-, GAAGAGCTATTTGGTA-, AAGAGCTATTTGGTA-, AGAGCTATTTGGTA-, GAGCTATTTGGTA-, AGCTATTTGGTA-, GCTATTTGGTA-, CTATTTGGTA-, TATTTGGTA-, ATTTGGTA-, TTTGGTA-, TTGGTA-, TGGA-, GGTA-, GTA-, TA- 또는 A-를 나타내고,

[0203] N^{12A}는: -AGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC, -AGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC, -AGCCGTCTTCAGGAATCTTCT, -AGCCGTCTTCAGGAATCTTC, -AGCCGTCTTCAGGAATCTT, -AGCCGTCTTCAGGAATCT, -AGCCGTCTTCAGGAATC, -AGCCGTCTTCAGGAAT, -AGCCGTCTTCAGGAA, -AGCCGTCTTCAGGA, -AGCCGTCTTCAGG, -AGCCGTCTTCAG, -AGCCGTCTTCA, -AGCCGTCTTC, -AGCCGTCTT, -AGCCGTCT, -AGCCGTC, -AGCCGT, -AGCCG, -AGCC, -AGC, -AG 또는 -A를 나타낸다.

[0204] 바람직하게는 N^{11A}는: AGAAGAGCTATTTGGTA-, GAAGAGCTATTTGGTA-, AAGAGCTATTTGGTA-, AGAGCTATTTGGTA-, GAGCTATTTGGTA-, AGCTATTTGGTA-, GCTATTTGGTA-, CTATTTGGTA-, TATTTGGTA-, ATTTGGTA-, TTTGGTA-, TTGGTA-, TGGA-, GGTA-, GTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;

[0205] N^{12A}는: -AGCCGTCTTCAGGAATC, -AGCCGTCTTCAGGAAT, -AGCCGTCTTCAGGAA, -AGCCGTCTTCAGGA, -AGCCGTCTTCAGG, -AGCCGTCTTCAG, -AGCCGTCTTCA, -AGCCGTCTTC, -AGCCGTCTT, -AGCCGTCT, -AGCCGTC, -AGCCGT, -AGCCG, -AGCC, -AGC, -AG 또는 -A를 나타낸다.

[0206] 보다 바람직하게는 N^{11A}는: AGCTATTTGGTA-, GCTATTTGGTA-, CTATTTGGTA-, TATTTGGTA-, ATTTGGTA-, TTTGGTA-, TTGGTA-, TGGA-, GGTA-, GTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;

[0207] N^{12A}는: -AGCCGTCTTCAG, -AGCCGTCTTCA, -AGCCGTCTTC, -AGCCGTCTT, -AGCCGTCT, -AGCCGTC, -AGCCGT, -AGCCG, -AGCC, -AGC, -AG 또는 -A를 나타낸다.

- [0208] 여전히 보다 바람직하게는 N^{11A} 는: TTTGGTA-, TTGGTA-, TGGTA-, GGTA-, GTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;
- [0209] N^{12A} 는: -AGCCGTC, -AGCCGT, -AGCCG, -AGCC, -AGC, -AG 또는 -A를 나타낸다.
- [0210] 바람직하게는 일반식 (S3A / 시퀀스 동정 번호 71)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다. LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오타이드간 가교로서 특히 "뉴클레오타이드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.
- [0211] 보다 바람직하게는 일반식 (S3A)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 22개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다.
- [0212] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S3A)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 겹량체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.
- [0213] 게다가, 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N⁵-TTTGGTAG-N⁶-3' (시퀀스 동정 번호 11)로 표현되고, 여기에서
- [0214] N^5 는: GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, AGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CTGCCCCAGAAGAGCTA-, TGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCCCAGAAGAGCTA-, CCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGAAGAGCTA-, CCAGAAGAGCTA-, CAGAAGAGCTA-, AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;
- [0215] N^6 은: -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGG, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAG, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCA, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTC, -TGTTTAGGGAGCCGTCTT, -TGTTTAGGGAGCCGTCT, -TGTTTAGGGAGCCGTC, -TGTTTAGGGAGCCGT, -TGTTTAGGGAGCCG, -TGTTTAGGGAGCC, -TGTTTAGGGAGC, -TGTTTAGGGAG, -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T를 나타낸다.
- [0216] 식 S4 (시퀀스 동정 번호 11)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 2 내지 10개의 LNA 단위, 보다 바람직하게는 3 내지 9개의 LNA 단위 그리고 여전히 보다 바람직하게는 4 내지 8개의 LNA 단위 그리고 또한 바람직하게는 적어도 6개의 비-LNA 단위, 보다 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위는 바람직하게는 DNA 단위이다. LNA 단위는 바람직하게는 3' 말단 단부 (또한 3' 말단이라고 칭함) 및 5' 말단 단부 (또한 5' 말단이라고 칭함)에 위치된다. 바람직하게는 적어도 하나 그리고 보다 바람직하게는 적어도 2개의 LNA 단위가 3' 말단 단부에 및/또는 5' 말단 단부에 존재한다.
- [0217] 따라서, 2 내지 10개의 LNA 단위를 포함하고 특히 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 LNA 단위들 사이에 적어도 7개 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 단위를 포함하는 겹량체로서 디자인된 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다. 보다 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 5' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 여전히 보다 바람직하게는 5' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위 그

리고 3' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다.

[0218] 게다가, 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 등과 같은 보통의 핵염기와 마찬가지로 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌 등과 같은 이들의 보통의 유도체를 포함할 수 있다. 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 또한 포스페이트 가교 대신 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등과 같은 변성된 뉴클레오타이드간 가교를 포함할 수 있다. 이러한 변성은 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 단지 LNA 조각 내에만 또는 단지 비-LNA 조각 내에만 존재할 수 있다. LNA 단위로서 특히 여기에서 기술되는 바와 같은 잔기 b^1 내지 b^9 가 바람직하다.

[0219] 따라서, 식 (S4)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다:

[0220] $5'-N^5-**TTTGGTAG**-N^6-3'$ (시퀀스 동정 번호 11)

[0221] 여기에서

[0222] N^5 는: GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, AGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CTGCCCCAGAAGAGCTA-, TGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGAAGAGCTA-, CCCAGAAGAGCTA-, CCAGAAGAGCTA-, CAGAAGAGCTA-, AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;

[0223] N^6 은: -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGG, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAG, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCA, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTC, -TGTTTAGGGAGCCGTCTT, -TGTTTAGGGAGCCGTCT, -TGTTTAGGGAGCCGTC, -TGTTTAGGGAGCCGT, -TGTTTAGGGAGCCG, -TGTTTAGGGAGCC, -TGTTTAGGGAGC, -TGTTTAGGGAG, -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T로부터 선택된다.

[0224] 바람직하게는 일반식 (S4)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다. LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오타이드간 가교로서 특히 "뉴클레오타이드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.

[0225] 보다 바람직하게는 일반식 (S4)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다.

[0226] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S4)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 갭량체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.

[0227] 식 (S4)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 더 바람직하다:

[0228] $5'-N^5-**TTTGGTAG**-N^6-3'$

[0229] 여기에서

[0230] N^5 는: CCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CTGCCCCAGAAGAGCTA-, TGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGAAGAGCTA-, CCCAGAAGAGCTA-, CCAGAAGAGCTA-, CAGAAGAGCTA-, AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;

[0231] N^6 은: -TGTTTAGGGAGCCGTCTT, -TGTTTAGGGAGCCGTCT, -TGTTTAGGGAGCCGTC, -TGTTTAGGGAGCCGT, -TGTTTAGGGAGCCG,

-TGTTTAGGGAGCC, -TGTTTAGGGAGC, -TGTTTAGGGAG, -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T로부터 선택된다.

[0232] 식 (S4)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 바람직하다:

[0233] 5'-N⁵-TTTGGTAG-N⁶-3'

[0234] 여기에서

[0235] N⁵는: CCCAGAAGAGCTA-, CCAGAAGAGCTA-, CAGAAGAGCTA-, AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-,CTA-,TA- 또는 A-를 나타내고;

[0236] N⁶은: -TGTTTAGGGAGCC, -TGTTTAGGGAGC, -TGTTTAGGGAG, -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T로부터 선택된다.

[0237] 식 (S4)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 바람직하다:

[0238] 5'-N⁵-TTTGGTAG-N⁶-3'

[0239] 여기에서

[0240] N⁵는: AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;

[0241] N⁶은: -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T로부터 선택된다.

[0242] 바람직하게는, 본 발명은 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N^{5A}-ATTTGGTAGT-N^{6A}-3' (시퀀스 동정 번호 72)로 표현되고, 여기에서

[0243] N^{5A}는: GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCT-, CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCT-, CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCT-, CAGCCTGCCCCAGAAGAGCT-, AGCCTGCCCCAGAAGAGCT-, GCCTGCCCCAGAAGAGCT-, CCTGCCCCAGAAGAGCT-, CTGCCCCAGAAGAGCT-, TGCCCCAGAAGAGCT-, GCCCCAGAAGAGCT-, CCCCAGAAGAGCT-, CCCAGAAGAGCT-, CCAGAAGAGCT-, CAGAAGAGCT-, AGAAGAGCT-, GAAGAGCT-, AAGAGCT-, AGAGCT-, GAGCT-, AGCT-, GCT-, CT- 또는 T-를 나타내고;

[0244] N^{6A}는: -GTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA, -GTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA, -GTTTAGGGAGCCGTCTTCAGG, -GTTTAGGGAGCCGTCTTCAG, -GTTTAGGGAGCCGTCTTCA, -GTTTAGGGAGCCGTCTTC, -GTTTAGGGAGCCGTCTT, -GTTTAGGGAGCCGTCT, -GTTTAGGGAGCCGTC, -GTTTAGGGAGCCGT, -GTTTAGGGAGCCG, -GTTTAGGGAGCC, -GTTTAGGGAGC, -GTTTAGGGAG, -GTTTAGGGA, -GTTTAGGG, -GTTTAGG, -GTTTAG, -GTTTA, -GTTT, -GTT, -GT 또는 -G를 나타낸다.

[0245] 바람직하게는 N^{5A}는: CCTGCCCCAGAAGAGCT-, CTGCCCCAGAAGAGCT-, TGCCCCAGAAGAGCT-, GCCCCAGAAGAGCT-, CCCCAGAAGAGCT-, CCCAGAAGAGCT-, CCAGAAGAGCT-, CAGAAGAGCT-, AGAAGAGCT-, GAAGAGCT-, AAGAGCT-, AGAGCT-, GAGCT-, AGCT-, GCT-, CT- 또는 T-를 나타내고;

[0246] N^{6A}는: -GTTTAGGGAGCCGTCTT, -GTTTAGGGAGCCGTCT, -GTTTAGGGAGCCGTC, -GTTTAGGGAGCCGT, -GTTTAGGGAGCCG, -GTTTAGGGAGCC, -GTTTAGGGAGC, -GTTTAGGGAG, -GTTTAGGGA, -GTTTAGGG, -GTTTAGG, -GTTTAG, -GTTTA, -GTTT, -GTT, -GT 또는 -G를 나타낸다.

[0247] 보다 바람직하게는 N^{5A}는: CCCAGAAGAGCT-, CCAGAAGAGCT-, CAGAAGAGCT-, AGAAGAGCT-, GAAGAGCT-, AAGAGCT-, AGAGCT-, GAGCT-, AGCT-, GCT-, CT- 또는 T-를 나타내고;

[0248] N^{6A}는: -GTTTAGGGAGCC, -GTTTAGGGAGC, -GTTTAGGGAG, -GTTTAGGGA, -GTTTAGGG, -GTTTAGG, -GTTTAG, -GTTTA, -GTTT, -GTT, -GT 또는 -G를 나타낸다.

- [0249] 여전히 보다 바람직하게는 N^{5A}는: AAGAGCT-, AGAGCT-, GAGCT-, AGCT-, GCT-, CT- 또는 T-를 나타내고;
- [0250] N^{6A}는: -GTTTAGG, -GTTTAG, -GTTTA, -GTTT, -GTT, -GT 또는 -G를 나타낸다.
- [0251] 바람직하게는 일반식 (S4A / 시퀀스 동정 번호 72)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다. LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오타이드간 가교로서 특히 "뉴클레오타이드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.
- [0252] 보다 바람직하게는 일반식 (S4A)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 22개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다.
- [0253] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S4)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 겹량체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.
- [0254] 게다가, 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N⁷-AATGGACC-N⁸-3' (시퀀스 동정 번호 100)로 표현되고, 여기에서
- [0255] N⁷은: TGAATCTTGAATATCTCATG-, GAATCTTGAATATCTCATG-, AATCTTGAATATCTCATG-, ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고;
- [0256] N⁸은: -AGTATTCTAGAACTCACCA, -AGTATTCTAGAACTCACC, -AGTATTCTAGAACTCAC, -AGTATTCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A를 나타낸다.
- [0257] 식 S6 (시퀀스 동정 번호 100)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2 내지 10개의 LNA 단위, 보다 바람직하게는 3 내지 9개의 LNA 단위 그리고 여전히 보다 바람직하게는 4 내지 8개의 LNA 단위 및 또한 바람직하게는 적어도 6개의 비-LNA 단위, 보다 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위는 바람직하게는 DNA 단위이다. LNA 단위는 바람직하게는 3' 말단 단부 (또한 3' 말단이라고 칭함) 및 5' 말단 단부 (또한 5' 말단이라고 칭함)에 위치된다. 바람직하게는 적어도 하나 그리고 보다 바람직하게는 적어도 2개의 LNA 단위가 3' 말단 단부에 및/또는 5' 말단 단부에 존재한다. 따라서, 2 내지 10개의 LNA 단위를 포함하고 특히 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 LNA 단위들 사이에 적어도 7개 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 단위를 포함하는 겹량체로서 디자인된 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다. 보다 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 5' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 여전히 보다 바람직하게는 5' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다.
- [0258] 게다가, 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 등과 같은 보통의 핵염기와 마찬가지로 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌 등과 같은 이들의 보통의 유도체를 포함할 수 있다. 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 또한 포스페이트 가교 대신 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등

과 같은 변성된 뉴클레오티드간 가교를 포함할 수 있다. 이러한 변성은 안티센스-올리고뉴클레오티드의 단지 LNA 조각 내에만 또는 단지 비-LNA 조각 내에만 존재할 수 있다. LNA 단위로서 특히 여기에서 기술되는 바와 같은 잔기 b^1 내지 b^9 가 바람직하다.

[0259] 따라서, 식 (S6)의 안티센스-올리고뉴클레오티드가 바람직하다:

[0260] $5'-N^7-AATGGACC-N^8-3'$ (시퀀스 동정 번호 100)

[0261] 여기에서

[0262] N^7 은: TGAATCTTGAATATCTCATG-, GAATCTTGAATATCTCATG-, AATCTTGAATATCTCATG-, ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[0263] N^8 은: -AGTATTCTAGAACTCACCA, -AGTATTCTAGAACTCACC, -AGTATTCTAGAACTCAC, -AGTATTCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A로부터 선택된다.

[0264] 바람직하게는 식 (S6)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 10 내지 28개의 뉴클레오티드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오티드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오티드를 갖는다. LNA 뉴클레오티드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오티드간 가교로서 특히 "뉴클레오티드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.

[0265] 보다 바람직하게는 일반식 (S6)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 11 내지 24개의 뉴클레오티드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오티드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오티드를 갖는다.

[0266] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S6)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오티드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 갭량체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오티드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.

[0267] 식 (S6)의 안티센스-올리고뉴클레오티드가 더 바람직하다:

[0268] $5'-N^7-AATGGACC-N^8-3'$

[0269] 여기에서

[0270] N^7 은: AATCTTGAATATCTCATG-, ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[0271] N^8 은: -AGTATTCTAGAACTCAC, -AGTATTCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A로부터 선택된다.

[0272] 식 (S6)의 안티센스-올리고뉴클레오티드가 또한 바람직하다:

[0273] $5'-N^7-AATGGACC-N^8-3'$

[0274] 여기에서

[0275] N^7 은: TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-,

CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[0276] N⁸은: -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A로부터 선택된다.

[0277] 식 (S6)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 바람직하다:

[0278] 5'-N⁷-AATGGACC-N⁸-3'

[0279] 여기에서

[0280] N⁷은: ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[0281] N⁸은: -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A로부터 선택된다.

[0282] 바람직하게는, 본 발명은 12 내지 24개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N^{7A}-GAATGGACCA-N^{8A}-3' (시퀀스 동정 번호 73)로 표현되고, 여기에서

[0283] N^{7A}는: TGAATCTTGAATATCTCAT-, GAATCTTGAATATCTCAT-, AATCTTGAATATCTCAT-, ATCTTGAATATCTCAT-, TCTTGAATATCTCAT-, CTGAATATCTCAT-, TTGAATATCTCAT-, TGAATATCTCAT-, GAATATCTCAT-, AATATCTCAT-, ATATCTCAT-, TATCTCAT-, ATCTCAT-, TCTCAT-, CTCAT-, TCAT-, CAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0284] N^{8A}는: -GTATTCTAGAAACTCACCA, -GTATTCTAGAAACTCACC, -GTATTCTAGAAACTCAC, -GTATTCTAGAAACTCA, -GTATTCTAGAAACTC, -GTATTCTAGAAACT, -GTATTCTAGAAAC, -GTATTCTAGAAA, -GTATTCTAGAA, -GTATTCTAGA, -GTATTCTAG, -GTATTCTA, -GTATTCT, -GTATTC, -GTATT, -GTAT, -GTA, -GT 또는 -G이다.

[0285] 바람직하게는 N^{7A}는: AATCTTGAATATCTCAT-, ATCTTGAATATCTCAT-, TCTTGAATATCTCAT-, CTGAATATCTCAT-, TTGAATATCTCAT-, TGAATATCTCAT-, GAATATCTCAT-, AATATCTCAT-, ATATCTCAT-, TATCTCAT-, ATCTCAT-, TCTCAT-, CTCAT-, TCAT-, CAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0286] N^{8A}는: -GTATTCTAGAAACTCAC, -GTATTCTAGAAACTCA, -GTATTCTAGAAACTC, -GTATTCTAGAAACT, -GTATTCTAGAAAC, -GTATTCTAGAAA, -GTATTCTAGAA, -GTATTCTAGA, -GTATTCTAG, -GTATTCTA, -GTATTCT, -GTATTC, -GTATT, -GTAT, -GTA, -GT 또는 -G를 나타낸다.

[0287] 보다 바람직하게는 N^{7A}는: TGAATATCTCAT-, GAATATCTCAT-, AATATCTCAT-, ATATCTCAT-, TATCTCAT-, ATCTCAT-, TCTCAT-, CTCAT-, TCAT-, CAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0288] N^{8A}는: -GTATTCTAGAAA, -GTATTCTAGAA, -GTATTCTAGA, -GTATTCTAG, -GTATTCTA, -GTATTCT, -GTATTC, -GTATT, -GTAT, -GTA, -GT 또는 -G를 나타낸다.

[0289] 여전히 보다 바람직하게는 N^{7A}는: ATCTCAT-, TCTCAT-, CTCAT-, TCAT-, CAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0290] N^{8A}는: -GTATTCT, -GTATTC, -GTATT, -GTAT, -GTA, -GT 또는 -G를 나타낸다.

[0291] 바람직하게는 일반식 (S6A / 시퀀스 동정 번호 73)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 24개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다. LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오타이드간 가교로서 특히 "뉴클레오타이드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.

[0292] 보다 바람직하게는 일반식 (S6A)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 22개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다.

- [0293] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S6A)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 겹량체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.
- [0294] 게다가, 본 발명은 10 내지 28개의 뉴클레오타이드로 이루어지고 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 중의 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N⁹-**ATTAATAA**-N¹⁰-3' (시퀀스 동정 번호 101)로 표현되고, 여기에서
- [0295] N⁹는: ATTCATATTTATATACAGGC-, TTCATATTTATATACAGGC-, TCATATTTATATACAGGC-, CATATTTATATACAGGC-, ATATTTATATACAGGC-, TATTTATATACAGGC-, ATTTATATACAGGC-, TTTATATACAGGC-, TTATATACAGGC-, TATATACAGGC-, ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;
- [0296] N¹⁰은: -AGTGCAAATGTTATTGGCTA, -AGTGCAAATGTTATTGGCT, -AGTGCAAATGTTATTGGC, -AGTGCAAATGTTATTGG, -AGTGCAAATGTTATTG, -AGTGCAAATGTTATT, -AGTGCAAATGTTAT, -AGTGCAAATGTTA, -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A를 나타낸다.
- [0297] 식 S7 (시퀀스 동정 번호 101)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2 내지 10개의 LNA 단위, 보다 바람직하게는 3 내지 9개의 LNA 단위 그리고 여전히 보다 바람직하게는 4 내지 8개의 LNA 단위 및 또한 바람직하게는 적어도 6개의 비-LNA 단위, 보다 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위는 바람직하게는 DNA 단위이다. LNA 단위는 바람직하게는 3' 말단 단부 (또한 3' 말단이라고 칭함) 및 5' 말단 단부 (또한 5' 말단이라고 칭함)에 위치된다. 바람직하게는 적어도 하나 그리고 보다 바람직하게는 적어도 2개의 LNA 단위가 3' 말단 단부에 및/또는 5' 말단 단부에 존재한다. 따라서, 2 내지 10개의 LNA 단위를 포함하고 특히 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 LNA 단위들 사이에 적어도 7개 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 단위를 포함하는 겹량체로서 디자인된 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다. 보다 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 5' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 여전히 보다 바람직하게는 5' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다.
- [0298] 게다가, 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 등과 같은 보통의 핵염기와 마찬가지로 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌 등과 같은 이들의 보통의 유도체를 포함할 수 있다. 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 또한 포스페이트 가교 대신 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등과 같은 변성된 뉴클레오타이드간 가교를 포함할 수 있다. 이러한 변성은 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 단지 LNA 조각 내에만 또는 단지 비-LNA 조각 내에만 존재할 수 있다. LNA 단위로서 특히 여기에서 기술되는 바와 같은 잔기 b¹ 내지 b⁹가 바람직하다.
- [0299] 따라서, 식 (S7)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다:
- [0300] 5'-N⁹-**ATTAATAA**-N¹⁰-3' (시퀀스 동정 번호 101)
- [0301] 여기에서
- [0302] N⁹는: ATTCATATTTATATACAGGC-, TTCATATTTATATACAGGC-, TCATATTTATATACAGGC-, CATATTTATATACAGGC-, ATATTTATATACAGGC-, TATTTATATACAGGC-, ATTTATATACAGGC-, TTTATATACAGGC-, TTATATACAGGC-, TATATACAGGC-, ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;

- [0303] N¹⁰은: -AGTGCAAATGTTATTGGCTA, -AGTGCAAATGTTATTGGCT, -AGTGCAAATGTTATTGGC, -AGTGCAAATGTTATTGG, -AGTGCAAATGTTATTG, -AGTGCAAATGTTATT, -AGTGCAAATGTTAT, -AGTGCAAATGTTA, -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A로부터 선택된다.
- [0304] 바람직하게는 식 (S7)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다. LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오타이드간 가교로서 특히 "뉴클레오타이드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.
- [0305] 보다 바람직하게는 일반식 (S7)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다.
- [0306] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S7)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 갭량체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.
- [0307] 식 (S7)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 더 바람직하다:
- [0308] 5'-N⁹-**ATTAATAA**-N¹⁰-3'
- [0309] 여기에서
- [0310] N⁹는: TCATATTTATATACAGGC-, CATATTTATATACAGGC-, ATATTTATATACAGGC-, TATTTATATACAGGC-, ATTTATATACAGGC-, TTTATATACAGGC-, TTATATACAGGC-, TATATACAGGC-, ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;
- [0311] N¹⁰은: -AGTGCAAATGTTATTGGC, -AGTGCAAATGTTATTGG, -AGTGCAAATGTTATTG, -AGTGCAAATGTTATT, -AGTGCAAATGTTAT, -AGTGCAAATGTTA, -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A로부터 선택된다.
- [0312] 식 (S7)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 바람직하다:
- [0313] 5'-N⁹-**ATTAATAA**-N¹⁰-3'
- [0314] 여기에서
- [0315] N⁹는: TTTATATACAGGC-, TTATATACAGGC-, TATATACAGGC-, ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;
- [0316] N¹⁰은: -AGTGCAAATGTTA, -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A로부터 선택된다.
- [0317] 식 (S7)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 바람직하다:
- [0318] 5'-N⁹-**ATTAATAA**-N¹⁰-3'
- [0319] 여기에서
- [0320] N⁹는: ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;
- [0321] N¹⁰은: -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A로부터 선택된다.

- [0322] 바람직하게는, 본 발명은 12 내지 24개의 뉴클레오티드로 이루어지고 12 내지 24개의 뉴클레오티드 중의 적어도 3개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오티드가 하기 시퀀스 5'-N^{9A}-CATTAATAAA-N^{10A}-3' (시퀀스 동정 번호 74)로 표현되고, 여기에서
- [0323] N^{9A}는: ATTCATATTTATATACAGG-, TTCATATTTATATACAGG-, TCATATTTATATACAGG-, CATATTTATATACAGG-, ATATTTATATACAGG-, TATTTATATACAGG-, ATTTATATACAGG-, TTTATATACAGG-, TTATATACAGG-, TATATACAGG-, ATATACAGG-, TATACAGG-, ATACAGG-, TACAGG-, ACAGG-, CAGG-, AGG-, GG- 또는 G-를 나타내고;
- [0324] N^{10A}는: -GTGCAAATGTTATTGGCTA, -GTGCAAATGTTATTGGCT, -GTGCAAATGTTATTGGC, -GTGCAAATGTTATTGG, -GTGCAAATGTTATTG, -GTGCAAATGTTATT, -GTGCAAATGTTAT, -GTGCAAATGTTA, -GTGCAAATGTT, -GTGCAAATGT, -GTGCAAATG, -GTGCAAAT, -GTGCAAA, -GTGCAA, -GTGCA, -GTGC, -GTG, -GT 또는 -G를 나타낸다.
- [0325] 바람직하게는 N^{9A}는: TCATATTTATATACAGG-, CATATTTATATACAGG-, ATATTTATATACAGG-, TATTTATATACAGG-, ATTTATATACAGG-, TTTATATACAGG-, TTATATACAGG-, TATATACAGG-, ATATACAGG-, TATACAGG-, ATACAGG-, TACAGG-, ACAGG-, CAGG-, AGG-, GG- 또는 G-를 나타내고;
- [0326] N^{10A}는: -GTGCAAATGTTATTGGC, -GTGCAAATGTTATTGG, -GTGCAAATGTTATTG, -GTGCAAATGTTATT, -GTGCAAATGTTAT, -GTGCAAATGTTA, -GTGCAAATGTT, -GTGCAAATGT, -GTGCAAATG, -GTGCAAAT, -GTGCAAA, -GTGCAA, -GTGCA, -GTGC, -GTG, -GT 또는 -G를 나타낸다.
- [0327] 보다 바람직하게는 N^{9A}는: TTTATATACAGG-, TTATATACAGG-, TATATACAGG-, ATATACAGG-, TATACAGG-, ATACAGG-, TACAGG-, ACAGG-, CAGG-, AGG-, GG- 또는 G-를 나타내고;
- [0328] N^{10A}는: -GTGCAAATGTTA, -GTGCAAATGTT, -GTGCAAATGT, -GTGCAAATG, -GTGCAAAT, -GTGCAAA, -GTGCAA, -GTGCA, -GTGC, -GTG, -GT 또는 -G를 나타낸다.
- [0329] 여전히 보다 바람직하게는 N^{9A}는: ATACAGG-, TACAGG-, ACAGG-, CAGG-, AGG-, GG- 또는 G-를 나타내고;
- [0330] N^{10A}는: -GTGCAAA, -GTGCAA, -GTGCA, -GTGC, -GTG, -GT 또는 -G를 나타낸다.
- [0331] 바람직하게는 일반식 (S7A / 시퀀스 동정 번호 74)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 12 내지 24개의 뉴클레오티드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오티드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오티드를 갖는다. LNA 뉴클레오티드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오티드간 가교로서 특히 "뉴클레오티드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.
- [0332] 보다 바람직하게는 일반식 (S7A)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 12 내지 22개의 뉴클레오티드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오티드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오티드를 갖는다.
- [0333] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S7A)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오티드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 캡슐체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오티드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.
- [0334] 게다가, 본 발명은 8 내지 18개, 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오티드로 이루어지고 8 내지 28개, 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오티드 중의 적어도 2개가 LNA이고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클

레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오티드가 하기 시퀀스 5'-(N¹³)_m-GTAGTGT-(N¹⁴)_n-3' (시퀀스 동정 번호 99)로 표현되고, 여기에서

[0335] N¹³은: CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, CAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, AGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, GCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, CCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, CTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, TGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, GCCCCAGAAGAGCTATTTG-, CCCCAGAAGAGCTATTTG-, CCCAGAAGAGCTATTTG-, CCAGAAGAGCTATTTG-, CAGAAGAGCTATTTG-, AGAAGAGCTATTTG-, GAAGAGCTATTTG-, AAGAGCTATTTG-, AGAGCTATTTG-, GAGCTATTTG-, AGCTATTTG-, GCTATTTG-, CTATTTG-, TATTTG-, ATTTG-, TTTG-, TTG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[0336] N¹⁴는: -TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC, -TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT, -TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT, -TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTT, TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCT, -TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATC, -TAGGGAGCCGTCTTCAGGAAT, -TAGGGAGCCGTCTTCAGGA, -TAGGGAGCCGTCTTCAGGA, -TAGGGAGCCGTCTTCAGG, -TAGGGAGCCGTCTTCAG, -TAGGGAGCCGTCTTCA, -TAGGGAGCCGTCTTC, -TAGGGAGCCGTCTT, -TAGGGAGCCGTCT, -TAGGGAGCCGTC, -TAGGGAGCCGT, -TAGGGAGCCG, -TAGGGAGCC, -TAGGGAGC, -TAGGGAG, -TAGGGA, -TAGGG, -TAGG, -TAG, -TA 또는 -T로부터 선택되고;

[0337] m은 0 또는 1을 나타내고;

[0338] n은 0 또는 1을 나타내고;

[0340] *n + m = 1 또는 2이다.

[0341] 식 S5 (시퀀스 동정 번호 99)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 2 내지 10개의 LNA 단위, 보다 바람직하게는 3 내지 9개의 LNA 단위 그리고 여전히 보다 바람직하게는 4 내지 8개의 LNA 단위 및 또한 바람직하게는 적어도 6개의 비-LNA 단위, 보다 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위는 바람직하게는 DNA 단위이다. LNA 단위는 바람직하게는 3' 말단 단부 (또한 3' 말단이라고 칭함) 및 5' 말단 단부 (또한 5' 말단이라고 칭함)에 위치된다. 바람직하게는 적어도 하나 그리고 보다 바람직하게는 적어도 2개의 LNA 단위가 3' 말단 단부에 및/또는 5' 말단 단부에 존재한다.

[0342] 따라서, 2 내지 10개의 LNA 단위를 포함하고 특히 안티센스-올리고뉴클레오티드의 5' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 1 내지 5개의 LNA 단위 그리고 LNA 단위들 사이에 적어도 7개 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 단위를 포함하는 겹량체로서 디자인된 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드가 바람직하다. 보다 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오티드는 5' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 2 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 여전히 보다 바람직하게는 5' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 3' 말단 단부에 3 내지 4개의 LNA 단위를 포함하고 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 바람직하게는 적어도 7개의 비-LNA 단위 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다.

[0343] 게다가, 안티센스-올리고뉴클레오티드는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 등과 같은 보통의 핵염기와 마찬가지로 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌 등과 같은 이들의 보통의 유도체를 포함할 수 있다. 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 또한 포스페이트 가교 대신 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등과 같은 변성된 뉴클레오티드간 가교를 포함할 수 있다. 이러한 변성은 안티센스-올리고뉴클레오티드의 단지 LNA 조각 내에만 또는 단지 비-LNA 조각 내에만 존재할 수 있다. LNA 단위로서 특히 여기에서 기술되는 바와 같은 잔기 b¹ 내지 b⁹가 바람직하다.

[0344] 따라서, 식 (S5)의 안티센스-올리고뉴클레오티드가 바람직하다:

[0345] 5'-(N¹³)_m-GTAGTGT-(N¹⁴)_n-3'

[0346] 여기에서

[0347] N¹³은: GCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, CCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, CTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, TGCCCCAGAAGAGCTATTTG-, GCCCCAGAAGAGCTATTTG-, CCCCAGAAGAGCTATTTG-, CCCAGAAGAGCTATTTG-, CCAGAAGAGCTATTTG-, CAGAAGAGCTATTTG-, AGAAGAGCTATTTG-, GAAGAGCTATTTG-, AAGAGCTATTTG-, AGAGCTATTTG-, GAGCTATTTG-, AGCTATTTG-, GCTATTTG-, CTATTTG-, TATTTG-, ATTTG-, TTTG-, TTG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

- [0348] N^{14} 는: -TAGGGAGCCGTCTTC, -TAGGGAGCCGTCTT, -TAGGGAGCCGTCT, -TAGGGAGCCGTC, -TAGGGAGCCGT, -TAGGGAGCCG, -TAGGGAGCC, -TAGGGAGC, -TAGGGAG, -TAGGGA, -TAGGG, -TAGG, -TAG, -TA 또는 -T로부터 선택되고;
- [0349] m은 0 또는 1을 나타내고; n은 0 또는 1을 나타내고; $n + m = 1$ 또는 2이다.
- [0350] 바람직하게는 일반식 (S5)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다. LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오타이드간 가교로서 특히 "뉴클레오타이드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.
- [0351] 보다 바람직하게는 일반식 (S5)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다.
- [0352] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S5)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 캡량체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.
- [0353] 식 (S5)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 더 바람직하다:
- [0354] $5'-(N^{13})_m-GTAGTGTT-(N^{14})_n-3'$
- [0355] 여기에서
- [0356] N^{13} 은: CCCCAGAAGAGCTATTTG-, CCCAGAAGAGCTATTTG-, CCAGAAGAGCTATTTG-, CAGAAGAGCTATTTG-, AGAAGAGCTATTTG-, GAAGAGCTATTTG-, AAGAGCTATTTG-, AGAGCTATTTG-, GAGCTATTTG-, AGCTATTTG-, GCTATTTG-, CTATTTG-, TATTTG-, ATTTG-, TTTG-, TTG-, TG- 또는 G-를 나타내고;
- [0357] N^{14} 는: -TAGGGAGCCG, -TAGGGAGCC, -TAGGGAGC, -TAGGGAG, -TAGGGA, -TAGGG, -TAGG, -TAG, -TA 또는 -T로부터 선택되고;
- [0358] m은 0 또는 1을 나타내고; n은 0 또는 1을 나타내고; $n + m = 1$ 또는 2이다.
- [0359] 식 (S5)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 바람직하다:
- [0360] $5'-(N^{13})_m-GTAGTGTT-(N^{14})_n-3'$
- [0361] 여기에서
- [0362] N^{13} 은: GAAGAGCTATTTG-, AAGAGCTATTTG-, AGAGCTATTTG-, GAGCTATTTG-, AGCTATTTG-, GCTATTTG-, CTATTTG-, TATTTG-, ATTTG-, TTTG-, TTG-, TG- 또는 G-를 나타내고;
- [0363] N^{14} 는: -TAGGG, -TAGG, -TAG, -TA 또는 -T로부터 선택되고;
- [0364] m은 0 또는 1을 나타내고; n은 0 또는 1을 나타내고; $n + m = 1$ 또는 2이다.
- [0365] 식 (S5)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 바람직하다:
- [0366] $5'-(N^{13})_m-GTAGTGTT-(N^{14})_n-3'$
- [0367] 여기에서
- [0368] N^{13} 은: CAGAAGAGCTATTTG-, AGAAGAGCTATTTG-, GAAGAGCTATTTG-, AAGAGCTATTTG-, AGAGCTATTTG-, GAGCTATTTG-,

AGCTATTTG-, GCTATTTG-, CTATTTG-, TATTTG-, ATTTG-, TTTG-, TTG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[0369] N¹⁴는: -TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCT, -TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATC, -TAGGGAGCCGTCTTCAGGAAT, -TAGGGAGCCGTCTTCAGGAA, -TAGGGAGCCGTCTTCAGGA, -TAGGGAGCCGTCTTCAGG, -TAGGGAGCCGTCTTCAG, -TAGGGAGCCGTCTTCA, -TAGGGAGCCGTCTTC, -TAGGGAGCCGTCTT, -TAGGGAGCCGTCT, -TAGGGAGCCGTC, -TAGGGAGCCGT, -TAGGGAGCCG, -TAGGGAGCC, -TAGGGAGC, -TAGGGAG, -TAGGGA, -TAGGG, -TAGG, -TAG, -TA 또는 -T로부터 선택되고;

[0370] m 은 0 또는 1을 나타내고; n 은 0 또는 1을 나타내고; $n + m = 1$ 또는 2이다.

[0371] 식 (S5)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 바람직하다:

[0372] 5'-(N¹³)_m-**G**TAGTGT**T**-(N¹⁴)_n-3'

[0373] 여기에서

[0374] N¹³은: GAGCTATTG-, AGCTATTG-, GCTATTG-, CTATTG-, TATTG-, ATTTG-, TTTG-, TTG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[0375] N¹⁴는: -TAGGGAGCCGCTCTTCAGG, -TAGGGAGCCGCTTTCAG, -TAGGGAGCCGCTCTTCA, -TAGGGAGCCGCTCTTC, -TAGGGAGCCGCTCTT, -TAGGGAGCCGCTCT, -TAGGGAGCCGTC, -TAGGGAGCCGT, -TAGGGAGCCG, -TAGGGAGCC, -TAGGGAGC, -TAGGGAG, -TAGGGA, -TAGGG, -TAGG, -TAG, -TA 또는 -T로부터 선택되고;

[0376] m 은 0 또는 1을 나타내고; n 은 0 또는 1을 나타내고; $n + m = 1$ 또는 2이다.

[0377] 식 (S5)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 바람직하다:

[0378] 5'-(N¹³)_m-**GTAGTGTT**-(N¹⁴)_n-3'

[0379] 여기에서

[0380] N¹³은: ATTTG-, TTTG-, TTG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[0381] N¹⁴는: -TAGGGAGCCGTCT, -TAGGGAGCCGTC, -TAGGGAGCCGT, -TAGGGAGCCG, -TAGGGAGCC, -TAGGGAGC, -TAGGGAG, -TAGGGGA, -TAGGG, -TAGG, -TAG, -TA 또는 -T로부터 선택되고;

[0382] m 은 0 또는 1을 나타내고; n 은 0 또는 1을 나타내고; $n + m = 1$ 또는 2이다.

[0383] 바람직하게는 일반식 (S5 / 시퀀스 동정 번호 99)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 12 내지 24개의 뉴클레오티드 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오티드 그리고 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 뉴클레오티드를 갖는다. LNA 뉴클레오티드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오티드간 가교로서 특히 "뉴클레오티드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다.

[0384] 보다 바람직하게는 일반식 (S5)의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 12 내지 22개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드 그리고 5' 말단에 적어도 2개의 LNA 뉴클레오타이드를 갖는다.

[0385] 여전히 보다 바람직하게는 일반식 (S5)의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 12 내지 20개, 보다 바람직하게는 13 내지 19개 그리고 여전히 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드 및 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖는다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오티드는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 겹량체이다. 바람직하게는 안티센스-올리고뉴클레오티드는 2개의 LNA 조각들 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 포함한다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다.

[0386] 본 발명의 다른 양태는 10 내지 28개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 10 내지 24개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 11 내지 22개의 뉴클레오티드 또는 12 내지 20개의 뉴클레오티드, 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19

개의 뉴클레오티드, 그리고 가장 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드의 길이를 갖는 안티센스-올리고뉴클레오티드(들) 및 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이며, 여기에서 뉴클레오티드의 적어도 2개, 바람직하게는 뉴클레오티드의 적어도 3개 그리고 보다 바람직하게는 뉴클레오티드의 적어도 4개가 LNA이고 10 내지 28개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 10 내지 24개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 11 내지 22개의 뉴클레오티드 또는 12 내지 20개의 뉴클레오티드, 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개의 뉴클레오티드 그리고 가장 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드의 안티센스-올리고뉴클레오티드의 시퀀스가 하기의 군:

- [0387] GAATCTTGAATATCTCATGAATGGACCAGTATTCTAGAAAC
- [0388] (시퀀스 동정 번호 75: 시퀀스 동정 번호 1의 383-423),
- [0389] TTCATATTTATATACAGGCATTAATAAAGTGCAAATGTTAT
- [0390] (시퀀스 동정 번호 77: 시퀀스 동정 번호 1의 2245-2285),
- [0391] TGAGGAAGTGCTAACACAGCTTATCCTATGACAATGTCAAAG
- [0392] (시퀀스 동정 번호 78: 시퀀스 동정 번호 1의 2315-2356),
- [0393] GCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAGTGTTAGGGAGCCGTCTTCAGG
- [0394] (시퀀스 동정 번호 79: 시퀀스 동정 번호 1의 2528-2576),
- [0395] CGCAGGTCCTCCAGCTGATGACATGCCGCGTCAGGTACTCCTGTAGGT
- [0396] (시퀀스 동정 번호 81: 시퀀스 동정 번호 1의 3205-3253),
- [0397] ATGTCGTTATTAACCGACTTCTGAACGTGCGGTGGGATCGTGCTGGCGATACGCGTCCACAGGACGATGTGCAGCGGC
- [0398] (시퀀스 동정 번호 83: 시퀀스 동정 번호 1의 4141-4218),
- [0399] GGCCACAGGCCCTGAGCAGCCCCGACCCATGGCAGACCCGCTGCTCGTCATAGACCGAGCCCCAGCGCAG
- [0400] (시퀀스 동정 번호 84: 시퀀스 동정 번호 1의 4216-4289),
- [0401] ATGTCGTTATTAACCGACTTCTGAACGTGCGGTGGGATCGTGCTGGCGATACGCGTCCACAGGACGATGTGCAGCGGCCACAGGCCCTGAGCAGCCCCGA
CCCATGGCAGACCCGCTGCTCGTCATAGACCGAGCCCCAGCGCAG
- [0402] (시퀀스 동정 번호 86: 시퀀스 동정 번호 1의 4141-4289),
- [0403] TTGAATATCTCATGAATGGACCAGTATTCTA
- [0404] (시퀀스 동정 번호 87: 시퀀스 동정 번호 1의 388-418),
- [0405] CAAGTGAATTTCTAGGCGCTCTATGCTACTG
- [0406] (시퀀스 동정 번호 88: 시퀀스 동정 번호 1의 483-515),
- [0407] ATTTATATACAGGCATTAATAAAGTGCAAAT
- [0408] (시퀀스 동정 번호 89: 시퀀스 동정 번호 1의 2250-2280),
- [0409] AAGTGCTAACACAGCTTATCCTATGACAATGT
- [0410] (시퀀스 동정 번호 90: 시퀀스 동정 번호 1의 2320-2351),
- [0411] CCCCAGAAGAGCTATTTGGTAGTGTTAGGGAGCCGTCT
- [0412] (시퀀스 동정 번호 91: 시퀀스 동정 번호 1의 2533-2571),
- [0413] CTGGTCGCCCTCGATCTCTCAACACGTTGTCCTTCATGCTTTGACACAGGGGTGCTCCCGCACCTTGAACCAAATG
- [0414] (시퀀스 동정 번호 92: 시퀀스 동정 번호 1의 2753-2830),
- [0415] GTCTCCAGCTGATGACATGCCGCGTCAGGTACTCCTG
- [0416] (시퀀스 동정 번호 93: 시퀀스 동정 번호 1의 3210-3248),

- [0417] CTCAGCTTCTGCTGCCGGTTAACGCGGTAGCAGTAGAAGA
- [0418] (시퀀스 동정 번호 94: 시퀀스 동정 번호 1의 3655-3694),
- [0419] GTTATTAACCGACTTCTGAACGTGCGGTGGGATCGTGTGGCGATACGCGTCCACAGGACGATGTGCA
- [0420] (시퀀스 동정 번호 95: 시퀀스 동정 번호 1의 4146-4213),
- [0421] CAGGCCCTGAGCAGCCCCGACCCATGGCAGACCCCGCTGCTCGTCATAGACCGAGCCCCCAG
- [0422] (시퀀스 동정 번호 96: 시퀀스 동정 번호 1의 4221-4284),
- [0423] CACGCGCGGGGTGTCGTCGCTCCGTGCGCGGAGTGACTCACTCAACTTCA
- [0424] (시퀀스 동정 번호 97: 시퀀스 동정 번호 1의 4495-4546)
- [0425] 으로부터 선택되는 시퀀스 중에 포함된 10 내지 28개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 10 내지 24개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 11 내지 22개의 뉴클레오티드 또는 12 내지 20개의 뉴클레오티드, 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개의 뉴클레오티드 그리고 가장 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오티드의 시퀀스의 군으로부터 선택되고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오티드가 전체 인간 전사체(transcriptome)에 관하여 단지 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자와 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA와 선택적으로 하이브리드화할 수 있다.
- [0426] 시퀀스 번호 75, 77, 78, 79, 81, 83, 84, 86 내지 97 중에 포함된 시퀀스를 갖는 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드는 3' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위 그리고 5' 말단 단부에 2 내지 5개, 바람직하게는 3 내지 5개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위를 갖고 바람직하게는 LNA 조각 A - DNA 조각 - LNA 조각 B 형태의 겹쌍체의 구조를 갖는다. LNA 뉴클레오티드 (LNA 단위)로서 특히 "잠금 핵산(LNA[®])"의 장 내에 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"의 장 내에 기술된 것들이 적절하고 뉴클레오티드간 가교로서 특히 "뉴클레오티드간 가교(IL)"의 장 내에 기술된 것들이 적절하다. 바람직하게는 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드는 2개의 LNA 조각 사이에 DNA 단위 등과 같은 적어도 6개, 보다 바람직하게는 적어도 7개 그리고 가장 바람직하게는 적어도 8개의 비-LNA 단위를 갖는다. 비-LNA 단위 및 LNA 단위로 적절한 핵염기가 "핵염기"의 장에 개시되었다. 상기 안티센스-올리고뉴클레오티드에 대한 적절한 예들이 식 (S1) 내지 (S7), (S1A) 내지 (S4A), (S6A) 및 (S7A)로 표현된다.
- [0427] **시퀀스 동정 번호 1**은 인간(*Homo sapiens*) 형질전환성장인자, 베타 수용기 II (TGF- R_{II}), 전사 변형 2(transcript variant 2)의 cDNA (cDNA) (5'-3' 안티센스-시퀀스)의 안티센스 가닥(antisense strand)을 나타낸다.
- [0428] **시퀀스 동정 번호 2**는 인간 형질전환성장인자, 베타 수용기 II(70/80kDa) (TGF- R_{II}), 전사 변형 2의 cDNA (5'-3' 센스-시퀀스)의 안티센스 가닥(sense strand)을 나타낸다. 달리, 시퀀스 동정 번호 2의 시퀀스가 인간 형질전환성장인자, 베타 수용기 II (TGF- R_{II}), 전사 변형 2의 mRNA (시퀀스 동정 번호 3)의 시퀀스이나 DNA 코드로 작성되고, 즉 G, C, A, T 코드로 표현되고 RNA 코드로 표현지 않은 것으로 고려될 수 있다.
- [0429] **시퀀스 동정 번호 3**은 인간 형질전환성장인자, 베타 수용기 II (TGF- R_{II}), 전사 변형 2의 mRNA (5'-3' 센스-시퀀스)를 나타낸다. 시퀀스 동정 번호 3에 표시된 mRNA가 RNA 코드로 작성되고, 즉 G, C, A, U 코드로 표현되었다는 것은 명백하다.
- [0430] 여기에서 사용되는 바와 같은 "코딩 DNA 가닥(coding DNA strand)"이 mRNA (DNA 코드로 작성되었다는 것을 제외)과 동일하고 단백질 번역에 사용되는 코돈(codon)을 포함하는 DNA 가닥을 의미한다는 것은 이해되어야 한다. 이는 mRNA로의 전사를 위한 주형(template)로 사용되지 않는다. 따라서, 용어 "코딩 DNA 가닥", "센스 DNA 가닥" 및 "비-주형 DNA 가닥(non-template DNA strand)"은 상호호환적으로 사용될 수 있다. 게다가, 여기에서 사용되는 바와 같은 "비-코딩 DNA 가닥(non-coding DNA strand)"은 "코딩 DNA 가닥"에 대하여 상보성이고 mRNA의 전사를 위한 주형으로 작용하는 DNA 가닥을 의미한다. 따라서, 용어 "비-코딩 DNA 가닥", "안티센스 DNA 가닥" 및 "주형 DNA 가닥"은 상호호환적으로 사용될 수 있다.
- [0431] 용어 "**안티센스-올리고뉴클레오티드**"는 리보핵산 (RNA) 또는 디옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 폴리머 또는 포스포로티오에이트 결합 등과 같은 변성된 뉴클레오티드간 결합 및/또는 5-메틸시토신 등과 같은 하나 이상의 변성된 핵염기 및/또는 β -D-옥시-LNA (β -D-oxy-LNA) 같은 LNA 등과 같은 하나 이상의 변성된 뉴클레오티드

단위를 갖는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 등과 같은 이의 모방체(mimetics) 또는 변종을 의미한다. 용어 "안티센스-올리고뉴클레오타이드"는 천연적으로-발생하는 핵염기, 당 및 공유 뉴클레오타이드간 (골격) 결합으로 이루어지는 올리고뉴클레오타이드와 마찬가지로 유사하게 기능하는 비-천연적으로-발생하는 부분을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 향상된 세포 섭취(cellular uptake), 핵산 표적에 대한 향상된 친화성(affinity) 및 뉴클레아제(nuclease)의 존재 중에서의 증가된 안정성 등과 같은 소정의 특성으로 인하여 이러한 변성되거나 치환된 올리고뉴클레오타이드가 종종 천연 형태에 비해 선호된다. 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 하이브리드화하고 그의 발현을 억제하는 짧은 촉매 RNA(short catalytic RNA) 또는 촉매 올리고뉴클레오타이드(catalytic oligonucleotide)이다.

[0432] 용어 "뉴클레오시드(nucleoside)"는 당해 기술분야에서 숙련된 자에게는 잘 알려진 것이고 리보오스, 디옥시리보오스 같은 펜토오스 당 성분(pentose sugar moiety) 또는 이하에서 상세하게 기술되는 LNA 같은 변성 또는 잠금 리보오스 또는 변성 또는 잠금 디옥시리보오스를 의미한다. 핵염기가 글리코시드의 탄소 원자 (펜토오스의 포지션 1')에 결합되고 뉴클레오타이드간 결합이 뉴클레오시드의 3' 산소 또는 황 원자 그리고 바람직하게는 3' 산소 원자와 인접하는 뉴클레오시드의 5' 산소 또는 황 원자 그리고 바람직하게는 5' 산소 원자와의 사이에 형성되는 한편으로 뉴클레오타이드간 결합은 뉴클레오시드에 속하지 않는다 (도 2를 참조하시오).

[0433] 용어 "뉴클레오타이드(nucleotide)"는 당해 기술분야에서 숙련된 자에게는 잘 알려진 것이고 리보오스, 디옥시리보오스 같은 펜토오스 당 성분 또는 이하에서 상세하게 기술되는 LNA 같은 변성 또는 잠금 리보오스 또는 변성 또는 잠금 디옥시리보오스를 의미한다. 핵염기가 글리코시드의 탄소 원자 (펜토오스의 포지션 1')에 결합되고 뉴클레오타이드간 결합이 뉴클레오타이드의 3' 산소 또는 황 원자 그리고 바람직하게는 3' 산소 원자와 인접하는 뉴클레오타이드의 5' 산소 또는 황 원자 그리고 바람직하게는 5' 산소 원자와의 사이에 형성되는 한편으로 뉴클레오타이드간 결합이 뉴클레오타이드의 일부이다 (도 2를 참조하시오).

[0434] 핵염기

[0435] 용어 "핵염기"는 여기에서는 "B"로 약칭되고 5가지 표준 뉴클레오타이드 염기 아데닌(A), 티민(T), 구아닌(G), 시토신(C) 및 우라실(U)과 마찬가지로 이들의 변성체(modifications) 또는 유사체(analogues) 또는 상보성 가닥 내에 염기를 수반하는 왓슨-크릭 염기쌍 형태에 대한 능력에 대한 유사체를 의미한다. 변성 핵염기는 5-메틸시토신 (C^*), 5-하이드록시메틸시토신, N^4 -메틸시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 7-디아자크산틴, 2-아미노아데닌, 6-메틸아데닌, 6-메틸구아닌, 6-에틸아데닌, 6-에틸구아닌, 2-프로필아데닌, 2-프로필구아닌, 6-카르복시우라실, 5-할로우라실, 5,6-디하이드로우라실, 5-할로시토신, 5-프로피닐우라실, 5-프로피닐시토신, 6-아자우라실, 6-아자시토신, 6-아자티민, 5-우라실(슈도우라실), 4-티오우라실, 8-플루오로아데닌, 8-클로로아데닌, 8-브로모아데닌, 8-요오도아데닌, 8-아미노아데닌, 8-티올아데닌, 8-티오알킬아데닌, 8-하이드록실아데닌, 8-플루오로구아닌, 8-클로로구아닌, 8-브로모구아닌, 8-요오도구아닌, 8-아미노구아닌, 8-티올구아닌, 8-티오알킬구아닌, 8-하이드록실구아닌, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 5-트리플루오로메틸우라실, 5-플루오로시토신, 5-브로모시토신, 5-클로로시토신, 5-요오도시토신, 5-트리플루오로메틸시토신, 7-메틸구아닌, 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌, 8-아자아데닌, 7-디아자구아닌, 7-디아자아데닌, 7-디아자-8-아자아데닌, 3-디아자구아닌, 3-디아자아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신 등과 같은 다른 합성 및 천연 핵염기를 포함하며, 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌 변성체들이 핵산 듀플렉스 안정성(duplex stability)을 증가시키는 것으로 나타났기 때문에 이들 변성체들이 선호된다.

[0436] 본 발명의 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 핵염기의 유사체를 포함할 수 있다. 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 단지 하나의 뉴클레오타이드 단위의 핵염기가 핵염기의 하나의 유사체로 치환될 수 있거나 안티센스-올리고뉴클레오타이드 중의 2개, 3개, 4개, 5개 또는 심지어 전체 핵염기가 5-메틸시토신 또는 N^6 -메틸-아데닌 또는 2-아미노아데닌 등과 같은 핵염기의 유사체로 치환될 수 있다. 바람직하게는 LNA 단위가 5-메틸시토신 등과 같은 핵염기의 유사체에 연결될 수 있다.

[0437] 뉴클레오타이드 또는 모노머의 시퀀스를 언급하는 경우, A, T, G, C 또는 U 등과 같은 염기의 시퀀스라고 언급되는 것임이 인식될 수 있을 것이다. 그러나, 표 3 내지 8에서 기술된 특정한 예들을 제외하고는 글자 코드 A, T, G, C 및 U에 의한 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 표시는 상기 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 여기에서 기술된 바와 같은 임의의 핵염기, 여기에서 기술된 바와 같은 임의의 3' 말단기, 여기에서 기술된 바와 같은 임의의 5' 말단기 그리고 여기에서 기술된 바와 같은 임의의 뉴클레오타이드간 결합 (또한 뉴클레오타이드간 가교로 언급됨)을 포함할 수 있다는 것은 이해되어야 한다. 뉴클레오타이드 A, T, G, C 및 U가 또한 LNA 뉴클레오타이드 또는 바람직

하계는 DNA 뉴클레오티드 등과 같은 비-LNA 뉴클레오티드인 것으로서 이해되어야 한다.

- [0438] 단지 표 4 내지 9에서 기술된 바와 같은 특정한 예들과 관련하여서는 핵염기, LNA 단위, 비-LNA 단위, 뉴클레오티드간 결합 및 말단기는 표 2 이전의 "범례"의 장에서 개괄된 바와 같이 추가로 특정된다.
- [0439] 여기에서 기술된 바와 같은 안티센스-올리고뉴클레오티드와 마찬가지로 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염은 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA인 표적에 대하여 상보성인, 즉 충분히 잘 그리고 충분한 특이성인 그리고 충분히 선택성으로 하이브리드화하여 소정의 억제 효과를 제공하는 것으로 입증되었다.
- [0440] 용어 "염(salt)"은 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드의 생리학적으로 및/또는 약제학적으로 수용가능한 염을 의미한다. 안티센스-올리고뉴클레오티드는 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신 또는 염기성이고 염화물 또는 메실산염 같은 염을 형성하는 이들의 유도체를 포함한다. 뉴클레오티드간 결합은 바람직하게는 나트륨, 리튬 또는 칼륨 염 같은 염을 형성하는 음으로 하전된 산소 또는 황 원자를 포함한다. 따라서, 약제학적으로 수용가능한 염기부가염(base addition salt)이 무기 염기 또는 유기 염기로 형성된다. 적절한 유기 및 무기 염기의 예들은 금속 이온, 예를 들어, 알루미늄, 나트륨 또는 칼륨 등과 같은 알칼리금속 이온, 칼슘 또는 마그네슘 등과 같은 알칼리토금속 이온, 또는 아민염 이온 또는 알칼리금속 또는 알칼리토금속의 수산화물, 알칼리금속 또는 알칼리토금속의 탄산염 또는 알칼리금속 또는 알칼리토금속의 중탄산염들로부터 파생되는 염기들이다. 예들에는 수성 LiOH, NaOH, KOH, NH₄OH, 탄산칼륨, 중탄산암모니아 및 중탄산나트륨, 암모늄염, 예를 들어 테트라알킬암모늄하이드록사이드 등과 같은 1차 아민, 2차 아민 및 3차 아민, 메틸아민 등과 같은 저급 알킬 아민, 3차-부틸아민, 프로카인, 에탄올아민, 디벤질아민 및 N,N-디벤질에틸렌디아민 등과 같은 아릴알킬아민, N-에틸피페리딘 등과 같은 저급 알킬 피페리딘, 시클로헥실아민 또는 디시클로헥실아민 등과 같은 시클로알킬아민, 몰포린, 글루카민, N-메틸글루카민 및 N,N-디메틸글루카민, 1-아다만틸아민, 벤자틴 또는 아르기닌, 리신, 오르니틴 같은 아미노산으로부터 파생되는 염 또는 본래 중성 또는 산성의 아미노산의 아마이드, 클로로프로카인, 콜린, 프로카인 등이 포함된다.
- [0441] 안티센스-올리고뉴클레오티드가 염기성이기 때문에, 이들은 유기 및 무기 산과 약제학적으로 수용가능한 염을 형성한다. 이러한 산부가염 형성을 위한 적절한 산의 예들은 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 아세트산, 시트르산, 옥살산, 말론산, 살리실산, p-아미노살리실산, 말산, 푸마르산, 숙신산, 아스코르브산, 말레산, 술폰산, 포스폰산, 과염소산, 질산, 흐름산, 프로피온산, 글루콘산, 젖산, 타르타르산, 하이드록시말레산, 피루브산, 페닐아세트산, 벤조산, p-아미노벤조산, p-하이드록시벤조산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 아질산, 하이드록시에탄술폰산, 에틸렌술폰산, p-톨루엔술폰산, 나프틸술폰산, 술폰산, 캄페르술폰산(camphersulfonic acid), 차이나산(china acid), 만델산, o-메틸만델산, 하이드로젠벤젠술폰산, 피크르산, 아디프산, D-o-톨릴타르타르산, 타르트론산, -톨루산, (o, m, p)-톨루산, 나프틸아민술폰산 및 당해 기술분야에서 숙련된 자에게 잘 알려진 다른 무기 또는 카르복실산들이다. 염은 바람직하게는 유리 염기 형태를 충분한 양의 소정의 산과 접촉시켜 통상적인 방법으로 염을 형성하는 것에 의하여 제조된다.
- [0442] 본 발명의 문맥에 있어서, "하이브리드화"는 핵산 하이브리드화를 의미하며, 여기에서 단일-가닥 핵산 (DNA 또는 RNA)이 매우 유사하거나 심지어 상보성 시퀀스를 갖는 다른 단일-가닥 핵산과 상호작용한다. 그에 의하여 특정한 핵염기들 사이에서의 수소 결합에 의하여 상호작용이 발생한다 (염기쌍합(base pairing)).
- [0443] 여기에서 사용되는 바와 같이, 용어 "상보성(complementarity)" (DNA 및 RNA 염기쌍 상보성)은 2개의 핵산 사이의 정밀한 쌍합을 위한 능력을 의미한다. 염기쌍 중의 뉴클레오티드는 이들의 형상이 이들을 수소 결합에 의하여 서로 결합하는 것을 허용하는 경우에 상보성이다. 그에 의하여 아데닌 및 티미딘 (또는 우라실)의 쌍이 2개의 수소 결합을 형성하고 시토신-구아닌 쌍이 3개의 수소 결합을 형성한다. 여기에서 사용되는 바와 같은 "상보성 시퀀스(complementary sequence)"는 DNA 또는 RNA가 서로에 대하여 역평행 정렬되는 경우에 시퀀스 중의 각 포지션에서 뉴클레오티드 염기가 거울에서 보는 것과 같이 그리고 사물의 역전을 보는 것과 같이 상보성이 되도록 하는 것인 DNA 또는 RNA를 의미한다.
- [0444] 여기에서 사용되는 바와 같은 용어 "특이적으로 하이브리드화 가능한(specifically hybridizable)"은 안티센스-올리고뉴클레오티드와 DNA 또는 RNA 표적 사이에서 안정하고 특이적인 결합이 발생하도록 표적 시퀀스에 대한 안티센스-올리고뉴클레오티드의 충분한 정도의 상보성 또는 정밀한 염기쌍합을 나타낸다. 비록 100% 상보성이 바람직하기는 하나, 본 발명에 따른 -올리고뉴클레오티드의 시퀀스는 특이적으로 하이브리드화 가능하게 되도록 그의 표적 핵산의 시퀀스에 100% 상보성이어야 할 필요는 없다. 그에 의하여 "100% 상보성(100% complementarity)"은 안티센스-올리고뉴클레오티드가 미스매치 없이 그의 완전한 또는 전장(full length)에 결

쳐 표적과 하이브리드화하는 것을 의미한다. 달리 말하면, 본 발명 내에서는 표적 DNA 또는 RNA에의 화합물의 결합이 생리학적 또는 병리학적 조건 하에서 발생하나 비-표적 시퀀스에의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 비-특이적 결합이 높은 정도로 일어나지 않거나 심지어 불가능한 경우에 안티센스 화합물이 특이적으로 하이브리드화하는 것으로 한정된다.

[0445] 따라서, 본 발명은 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 나타내며, 여기에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 TGF RII를 인코딩하는 mRNA에 100% 상보성으로 결합하고 완전 인간 전사체 중의 임의의 다른 영역과 결합하지 않는다. 더 바람직하게는 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 나타내며, 여기에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 TGF RII를 인코딩하는 mRNA에 그들 전장에 걸쳐 100% 상보성으로 결합하고 오작동 영향(off-target effect)을 갖지 않는다. 달리, 본 발명은 TGF RII를 인코딩하는 mRNA에 대하여 100% 상보성을 가지나 인간 전사체의 다른 mRNA에 대하여 상보성을 갖지 않는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 나타낸다. 그에 의하여 용어 "인간 전사체(human transcriptome)"는 인간 유기체 중의 전사체의 전체 세트를 의미하며, 이는 모든 세포 형태 및 환경 조건 (임의의 주어진 시간에서)의 전사물을 의미한다.

[0446] 특이성

[0447] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 이것이 TGF-RII를 인코딩하는 유전자에 또는 mRNA에 결합하는 영역과 관련하여 특이적이라는 공통점을 갖는다. 본 발명에 따르면, 인간 전사체 내에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 그들 전장에 걸쳐 단지 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA에 대하여 100% 상보성을 갖는다. 게다가, 본 발명의 목적은 원숭이 이외의 포유동물의 전사체 내에서 교차-반응이 없는 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 발견하는 것이고; 특히 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 단지 유인원의 전사체와만 교차-반응을 갖는다. 이는 오작동 효과를 피하는 것이 좋다. 따라서, 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 TGF-RII를 인코딩하는 유전자와 또는 mRNA와의 하이브리드화와 관련하여 고도로 특이적이다. 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 그의 전장에 걸쳐 TGF-RII를 인코딩하는 유전자에 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA에 대하여 특이적인 100% 상보성으로 결합하고 완전 인간 전사체 중의 임의의 다른 영역과는 결합하지 않는다. 이는 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 미스매치를 수반함이 없이 표적 (TGF-RII mRNA)과 하이브리드화하는 것을 의미한다.

[0448] 여기에서 사용되는 바와 같은 용어 "mRNA"는 인트론을 포함하는 mRNA (mRNA 전구체(Pre-mRNA)라고도 언급됨)와 마찬가지로 임의의 인트론을 포함하지 않는 mRNA 둘 다를 포함할 수 있다.

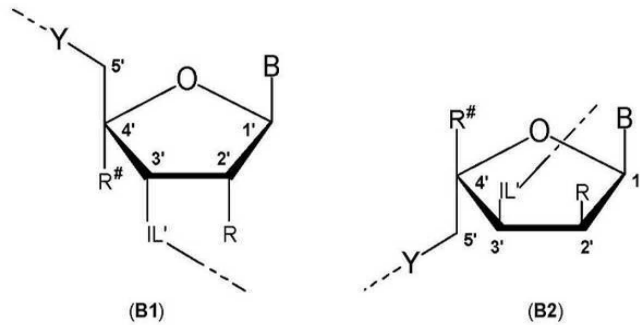
[0449] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 mRNA-전구체 및/또는 mRNA와 결합하거나 하이브리드화할 수 있다. 이는 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 mRNA-전구체의 인트론 영역에서 또는 인트론 영역 내에서 결합하거나 하이브리드화할 수 있거나 mRNA-전구체의 중첩하는 인트론 - 엑손 영역에서 결합하거나 하이브리드화할 수 있거나 mRNA-전구체의 엑손 영역에서 또는 엑손 영역 내에서 그리고 mRNA의 엑손 영역에서 결합하거나 하이브리드화할 수 있다는 것을 의미한다 (도 1을 참조하시오). mRNA-전구체 및 mRNA와 결합하거나 하이브리드화할 수 있는 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다. mRNA-전구체에의 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO)의 결합 또는 하이브리드화는 5' 캡 형성을 억제하고, mRNA-전구체의 스플라이싱을 억제하여 mRNA를 수득하도록 하고 mRNA-전구체를 개열하는 리보핵산가수분해효소(RNase) H를 활성화한다. mRNA에의 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO)의 결합 또는 하이브리드화는 mRNA를 개열하는 RNase H를 활성화하고 리보솜 소단위(ribosomal subunit)의 결합을 억제한다.

[0450] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 적어도 10개 그리고 28개 이하, 바람직하게는 24개 이하 그리고 보다 바람직하게는 20개 이하의 뉴클레오타이드로 이루어지고 연속적으로 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개의 뉴클레오타이드로, 바람직하게는 11 내지 20개, 또는 11 내지 19개, 또는 12 내지 19개, 또는 13 내지 19개, 또는 13 내지 18개의 뉴클레오타이드로 그리고 보다 바람직하게는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지고, 여기에서 이들 뉴클레오타이드 중의 적어도 2개, 바람직하게는 3개가 잠금 핵산 (LNA)이다. 보다 짧은 안티센스-올리고뉴클레오타이드, 즉 10개 이하의 뉴클레오타이드를 갖는 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 가능하나 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 짧을수록 하이브리드화가 더 이상 충분히 강해지지 않고 선택성이 감소하거나 소실될 수 있는 위험이 더 커진다. 비-선택적인 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 인간 전사체 중의 원치 않는 영역에 그리고 TGF-RII 이외의 다른 단백질을 코딩하는 원치 않는 mRNA들에 결합하는 위험성을 가지고 그에 의하여 원치 않는 부작용을 야기한다. 20개 이상의 뉴클레오타이드를 갖는 보다 긴 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 가능하나 길이의 추가의 증가는 선택성 또는 하이브리드화의 세기에서의 증가 또는 분해에 관련된 더 나은 안정성에서의 임의의 추가의 이점을 수반함이 없이 이러한 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 합성

을 심지어 보다 복잡하게 하고 고가가 되게 한다.

[0451] 따라서 본 발명은 10 내지 20개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 관한 것이고, 여기에서 적어도 2개의 뉴클레오타이드 그리고 바람직하게는 3' 및 5' 말단 뉴클레오타이드가 LNA이다. 따라서, 적어도 3' 말단 뉴클레오타이드가 LNA이고 또한 적어도 5' 말단 뉴클레오타이드가 LNA인 것이 바람직하다. 2개 이상의 LNA가 존재하는 경우, 여기에서 기술된 바와 같은 겹량체의 경우에서와 마찬가지로 추가의 LNA가 3' 또는 5' 말단 LNA에 연결되는 것이 바람직하다.

[0452] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드 내에 존재하는 하나의 뉴클레오타이드 빌딩 블록(nucleotide building block)은 하기 일반식 (B1) 및 (B2)로 표현될 수 있다:



[0453]

[0454] 여기에서

[0455] B는 핵염기를 나타내고;

[0456] IL'는 $-X''-P(=X')(X^-)-$ 를 나타내고;

[0457] R은 -H, -F, -OH, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₂OCH₃를 나타내고 R[#]는 -H를 나타내거나; R 및 R[#]는 함께 -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-NH-, -CH₂-N(CH₃)-, -CH₂-N(C₂H₅)-, -CH₂-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-S-, -CH₂-CH₂-NH-, -CH₂-CH₂-N(CH₃)- 또는 -CH₂-CH₂-N(C₂H₅)-로부터 선택되는 가교 -R[#]-R-를 형성하고;

[0458] X'는 =O 또는 =S를 나타내고;

[0459] X⁻는 O⁻, -OH, -OR^H, -NHR^H, -N(R^H)₂, -OCH₂CH₂OR^H, -OCH₂CH₂SR^H, -BH₃⁻, -R^H, -SH, -SR^H 또는 -S⁻를 나타내고;

[0460] X''는 -O-, -NH-, -NR^H-, -CH₂- 또는 -S-를 나타내고;

[0461] Y는 -O-, -NH-, -NR^H-, -CH₂- 또는 -S-를 나타내고;

[0462] R^H는 수소 및 C₁₋₄-알킬로부터 선택되고 바람직하게는 -CH₃ 또는 -C₂H₅이고 가장 바람직하게는 -CH₃이다.

[0463] 바람직하게는 X⁻는 O⁻, -OH, -OCH₃, -NH(CH₃), -N(CH₃)₂, -OCH₂CH₂OCH₃, -OCH₂CH₂SCH₃, -BH₃⁻, -CH₃, -SH, -SCH₃ 또는 -S⁻; 가장 바람직하게는 O⁻, -OH, -OCH₃, -N(CH₃)₂, -OCH₂CH₂OCH₃, -BH₃⁻, -SH, -SCH₃ 또는 -S⁻로부터 선택된다.

[0464] IL'는 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-, -O-P(O)(S⁻)-, -O-P(S)(S⁻)-, -S-P(O)(O⁻)-, -S-P(O)(S⁻)-, -S-P(S)(S⁻)-, -O-P(O)(O⁻)-, -O-P(O)(S⁻)-, -S-P(O)(O⁻)-, -O-P(O)(R^H)-, -O-P(O)(OR^H)-, -O-P(O)(NHR^H)-, -O-P(O)[N(R^H)₂]-, -O-P(O)(BH₃⁻)-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OR^H)-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SR^H)-, -O-P(O)(O⁻)-, -NR^H-P(O)(O⁻)-를 나타내고, 여기에서 R^H는 수소 및 C₁₋₄-알킬로부터 선택된다.

[0465] -O-P(O)(R^H)-O-기는 바람직하게는 -O-P(O)(CH₃)-O- 또는 -O-P(O)(C₂H₅)-O- 그리고 가장 바람직하게는 -O-

$P(O)(CH_3)-O$ 이다.

[0466] $-O-P(O)(OR^H)-O$ -기는 바람직하게는 $-O-P(O)(OCH_3)-O$ - 또는 $-O-P(O)(OC_2H_5)-O$ - 그리고 가장 바람직하게는 $-O-P(O)(OCH_3)-O$ -이다.

[0467] $-O-P(O)(NHR^H)-O$ -기는 바람직하게는 $-O-P(O)(NHCH_3)-O$ - 또는 $-O-P(O)(NHC_2H_5)-O$ - 그리고 가장 바람직하게는 $-O-P(O)(NHCH_3)-O$ -이다.

[0468] $-O-P(O)[N(R^H)_2]-O$ -기는 바람직하게는 $-O-P(O)[N(CH_3)_2]-O$ - 또는 $-O-P(O)[N(C_2H_5)_2]-O$ - 그리고 가장 바람직하게는 $-O-P(O)[N(CH_3)_2]-O$ -이다.

[0469] $-O-P(O)(OCH_2CH_2OR^H)-O$ -기는 바람직하게는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2OCH_3)-O$ - 또는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2OC_2H_5)-O$ - 그리고 가장 바람직하게는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2OCH_3)-O$ -이다.

[0470] $-O-P(O)(OCH_2CH_2SR^H)-O$ -기는 바람직하게는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2SCH_3)-O$ - 또는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2SC_2H_5)-O$ - 그리고 가장 바람직하게는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2SCH_3)-O$ -이다.

[0471] $-O-P(O)(O^-)-NR^H$ -기는 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-NH$ - 또는 $-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-$ 그리고 가장 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-NH$ -이다.

[0472] $-NR^H-P(O)(O^-)-O$ -기는 바람직하게는 $-NH-P(O)(O^-)-O$ - 또는 $-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O$ - 그리고 가장 바람직하게는 $-NH-P(O)(O^-)-O$ -이다.

[0473] 심지어 보다 바람직하게는 IL'은 $-O-P(O)(O^-)-$, $-O-P(O)(S^-)-$, $-O-P(S)(S^-)-$, $-O-P(O)(NHR^H)-$ 또는 $-O-P(O)[N(R^H)_2]-$ 를 나타내고, 심지어 보다 바람직하게는 IL'은 $-O-P(O)(O^-)-$, $-O-P(O)(S^-)-$ 또는 $-O-P(S)(S^-)-$ 를 나타내고, 가장 바람직하게는 IL'은 $-O-P(O)(S^-)-$ 또는 $-O-P(S)(S^-)-$ 를 나타낸다.

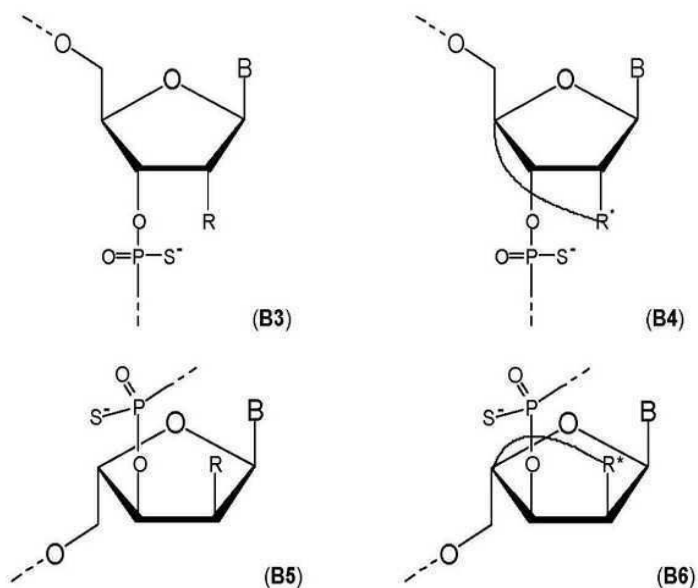
[0474] 바람직하게는 Y는 $-O$ -를 나타낸다.

[0475] 바람직하게는 B는 A, T, G, C, U로부터 선택되는 표준 핵염기를 나타낸다.

[0476] 바람직하게는 IL은 $-O-P(=O)(S^-)-$ 또는 $-O-P(=S)(S^-)-$ 를 나타낸다.

[0477] B, Y 및 IL'의 상기 정의는 또한 식 b^1 내지 b^9 에 적용된다.

[0478] 따라서 하기 일반식 (B3) 내지 (B6)이 바람직하다:



[0479]

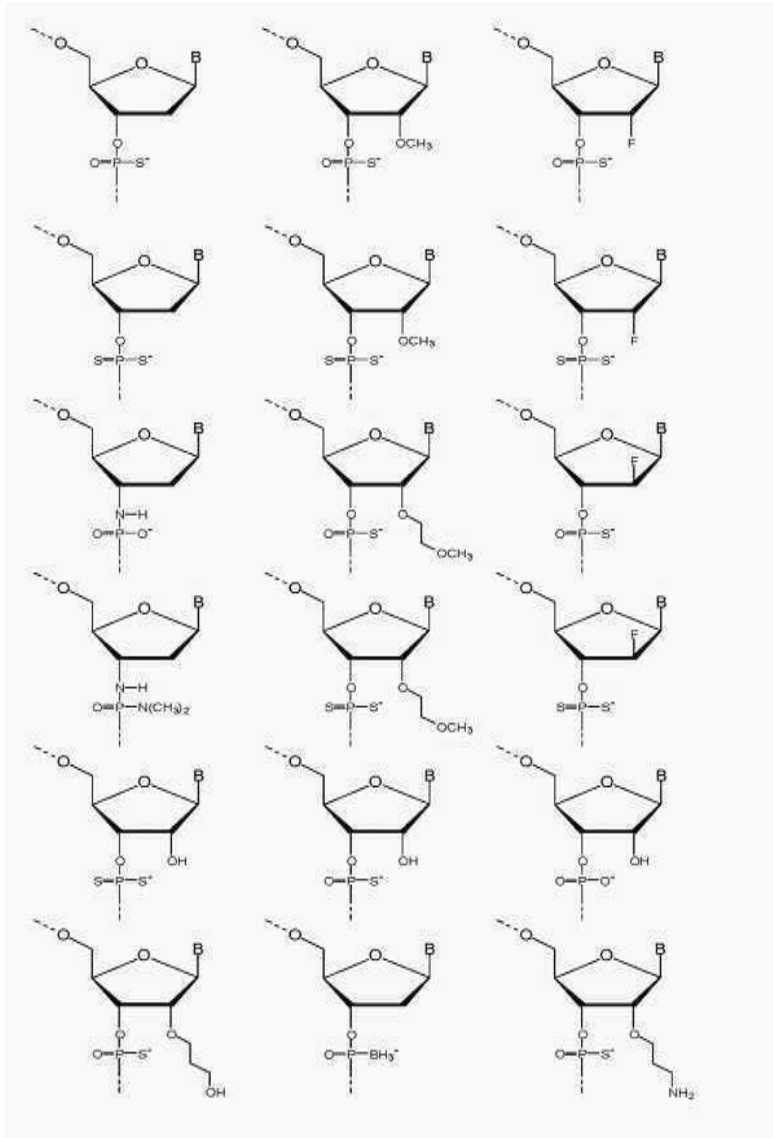
[0480] 여기에서

[0481] B는 핵염기 바람직하게는 A, T, G, C, U를 나타내고;

[0482] R은 -H, -F, -OH, -NH₂, -N(CH₃)₂, -OCH₃, -OCH₂CH₂OCH₃, -OCH₂CH₂CH₂OH, -OCH₂CH₂CH₂NH₂ 바람직하게는 -H를 나타내고;

[0483] R*는 이하에서 정의되는 바와 같은 성분 -R[#]-R-을 나타내고, 예를 들어, 바람직하게는 -C(R^aR^b)-O-, -C(R^aR^b)-NR^c-, -C-(R^aR^b)-S- 및 -C-(R^aR^b)-C(R^aR^b)-O-로부터 선택되고, 여기에서 치환기 R^a, R^b 및 R^c는 여기에서 정의되는 바와 같은 의미를 갖는다. 보다 바람직하게는 R*는 -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-NH-, -CH₂-N(CH₃)-, -CH₂-CH₂-O- 또는 -CH₂-CH₂-S-, 보다 바람직하게는 -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-CH₂-O- 또는 -CH₂-CH₂-S-, 여전히 보다 바람직하게는 -CH₂-O-, -CH₂-S- 또는 -CH₂-CH₂-O-, 여전히 보다 바람직하게는 -CH₂-O- 또는 -CH₂-S- 그리고 가장 바람직하게는 -CH₂-O-로부터 선택된다.

[0484] 비-LNA 단위인 바람직한 뉴클레오타이드의 예는 하기들이다:



[0485]

[0486] 뉴클레오타이드간 가교 (IL)

[0487] 여기에서 기술되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 모노머는 뉴클레오타이드간 연결을 경유하여 서로 결합된다. 적절하게는, 각 모노머는 뉴클레오타이드간 연결을 경유하여 3' 인접 모노머에 연결된다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 갖는 자는, 본 발명의 맥락에서, 5' 말단기를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있기는 하나, 올리고머의 말단의 5' 모노머가 5' 뉴클레오타이드간 연결을 포함하지는 않는다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 용어 "뉴클레오타이드간 연결"은 2개의 뉴클레오타이드, 2개의 LNA와 같은 2개의 뉴클레오타이드 유사체 및 뉴클레오타이드와 LNA와 같은 뉴클레오타이드 유사체를 서로 공유적으로 결합할 수 있는 기를 의미하는 것으로 의도된다. 특정하고 바람직한 예에는 포스페이트기 및 포스포로티오에이트기가 포함된다.

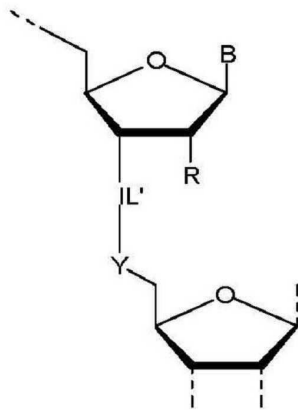
[0488] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 또는 그의 근접 뉴클레오타이드 시퀀스는 뉴클레오타이드간 연결을 경유하여 서로 결합된다. 적절하게도 각 뉴클레오타이드는 5' 위치를 통하여 3' 인접 뉴클레오타이드에 연결된다.

[0489] 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 여러 서로 다른 방법들로 변성될 수 있다. 백본 내에서의 변성이 가능하고 이들 뉴클레오타이드간 백본 내의 포스페이트기 (또한 포스포디에스테르기라고도 칭함)가 부분적으로 또는 완전히 다른 기로 치환되는 것이 언급된다. 바람직한 변성 안티센스-올리고뉴클레오타이드 백본에는, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸, 에틸 및 3'-알킬렌포스포네이트와 키랄 포스포네이트를 포함하는 C₃-C₁₀-알킬포스포네이트, 포스포네이트, 3'-아미노포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트를 포함하는 포스포르아미데이트, 티오노포스포

르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르 및 정상 3'-5' 연결을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결 유사체 및 뉴클레오타이드 단위의 인접하는 쌍이 3'-5'에서 5'-3'로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결되는 역전 극성을 갖는 것들이 포함된다. 여러 가지 염, 그의 혼합염 및 유리산이 또한 포함되고 여기에서 보다 상세하게 기술된다.

[0490] 적절한 뉴클레오타이드간 연결에는 W02007/031091에 나열된 것들, 예를 들어 W02007/031091 (여기에 참조로 포함됨)의 34페이지의 첫 번째 문단에 나열된 뉴클레오타이드간 연결이 포함된다. 일부 구체예들에 있어서, 뉴클레오타이드간 연결을 그의 정상 포스포디에스테르로부터 포스포로티오에이트 또는 보라노포스페이트 등과 같은 핵산가수분해효소에 대하여 보다 저항성인 것으로 변형시키는 것이 바람직하며, RNase H 매개 개열에 수용된 이들 둘은 또한 표적 유전자의 발현의 감소에서의 안티센스 억제제의 경로를 허용한다.

[0491] 뉴클레오타이드간 연결은 하기 식 (IL' Y)에 나타난 바와 같이 리보오스 성분의 3' 탄소 원자에 결합되는 기인 IL'기 및 인접 리보오스 성분의 5' 탄소 원자에 결합되는 기인 Y기로 이루어진다.



[0492]

[0493] 뉴클레오타이드간 연결 IL은 -IL'-Y-로 나타내어진다. IL'은 -X''-P(=X')(X⁻)-를 나타내고 따라서 IL은 -X''-P(=X')(X⁻)-Y-로 나타내어지고, 여기에서 치환기 X⁻, X', X'' 및 Y는 여기에서 기술된 바와 같은 의미를 갖는다.

[0494] 뉴클레오타이드간 연결 IL = -X''-P(=X')(X⁻)-Y-이고 바람직하게는:

[0495] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -S-P(S)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(R^H)-O-, -O-P(O)(OR^H)-O-, -O-P(O)(NHR^H)-O-, -O-P(O)[N(R^H)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃⁻)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OR^H)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SR^H)-O-, -O-P(O)(O⁻)-NR^H-, -NR^H-P(O)(O⁻)-O-로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 여기에서 R^H는 수소 및 C1-4-알킬로부터 선택된다.

[0496] -O-P(O)(R^H)-O-기는 바람직하게는 -O-P(O)(CH₃)-O- 또는 -O-P(O)(C₂H₅)-O- 그리고 가장 바람직하게는 -O-P(O)(CH₃)-O-이다.

[0497] -O-P(O)(OR^H)-O-기는 바람직하게는 -O-P(O)(OCH₃)-O- 또는 -O-P(O)(OC₂H₅)-O- 그리고 가장 바람직하게는 -O-P(O)(OCH₃)-O-이다.

[0498] -O-P(O)(NHR^H)-O-기는 바람직하게는 -O-P(O)(NHCH₃)-O- 또는 -O-P(O)(NHC₂H₅)-O- 그리고 가장 바람직하게는 -O-P(O)(NHCH₃)-O-이다.

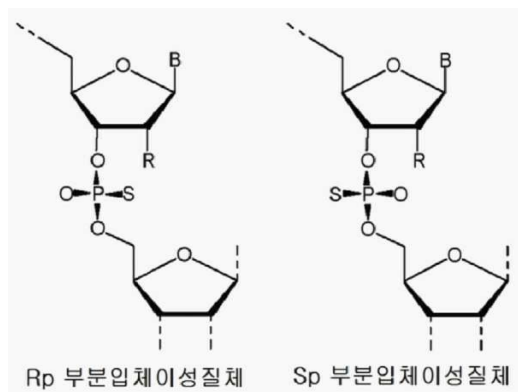
[0499] -O-P(O)[N(R^H)₂]-O-기는 바람직하게는 -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O- 또는 -O-P(O)[N(C₂H₅)₂]-O- 그리고 가장 바람직하게는 -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-이다.

- [0500] $-O-P(O)(OCH_2CH_2OR^H)-O-$ 기는 바람직하게는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2OCH_3)-O-$ 또는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2OC_2H_5)-O-$ 그리고 가장 바람직하게는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2OCH_3)-O-$ 이다.
- [0501] $-O-P(O)(OCH_2CH_2SR^H)-O-$ 기는 바람직하게는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2SCH_3)-O-$ 또는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2SC_2H_5)-O-$ 그리고 가장 바람직하게는 $-O-P(O)(OCH_2CH_2SCH_3)-O-$ 이다.
- [0502] $-O-P(O)(O^-)-NR^H-$ 기는 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-N-H$ 또는 $-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-$ 그리고 가장 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-NH-$ 이다.
- [0503] $-NR^H-P(O)(O^-)-O-$ 기는 바람직하게는 $-NH-P(O)(O^-)-O-$ 또는 $-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-$ 그리고 가장 바람직하게는 $-NH-P(O)(O^-)-O-$ 이다.
- [0504] 심지어 보다 바람직하게는 IL은 $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$, $-O-P(O)(NHR^H)-O-$ 또는 $-O-P(O)[N(R^H)_2]-O-$ 를 나타내고, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 IL은 $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$ 또는 $-O-P(S)(S^-)-O-$ 를 나타내고, 가장 바람직하게는 IL은 $-O-P(O)(S^-)-O-$ 또는 $-O-P(O)(O^-)-O-$ 를 나타낸다.
- [0505] 따라서 IL은 바람직하게는 포스페이트기 ($-O-P(O)(O^-)-O-$), 포스포로티오에이트기 ($-O-P(O)(S^-)-O-$) 또는 포스포로디티오에이트기 ($-O-P(S)(S^-)-O-$) 이다.
- [0506] 안티센스-올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 단위 또는 뉴클레오시드는 뉴클레오티드간 연결에 의하여 서로 연결되어 하나의 안티센스-올리고뉴클레오티드 내에 서로 다른 뉴클레오티드간 연결이 존재할 수 있다. LNA 단위는 바람직하게는 포스페이트기가 아닌 뉴클레오티드간 연결에 의하여 연결된다. LNA 단위는 바람직하게는 $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$, $-O-P(O)(NHR^H)-O-$ 및 $-O-P(O)[N(R^H)_2]-O-$ 로부터 그리고 보다 바람직하게는 $-O-P(O)(S^-)-O-$ 및 $-O-P(S)(S^-)-O-$ 로부터 선택되는 IL기에 의하여 서로 연결된다.
- [0507] 비-LNA 단위는 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$, $-O-P(O)(NHR^H)-O-$ 및 $-O-P(O)[N(R^H)_2]-O-$ 로부터 그리고 보다 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$ 및 $-O-P(S)(S^-)-O-$ 로부터 선택되는 IL기에 의해 서로 연결된다.
- [0508] 비-LNA 단위는 바람직하게는 $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$, $-O-P(O)(NHR^H)-O-$ 및 $-O-P(O)[N(R^H)_2]-O-$ 로부터 그리고 보다 바람직하게는 $-O-P(O)(S^-)-O-$ 및 $-O-P(S)(S^-)-O-$ 로부터 선택되는 IL기에 의해 LNA에 연결된다.
- [0509] 여기에서 사용된 바와 같은 용어 "**LNA 단위**"는 잠금된 뉴클레오티드, 즉 이환형 구조(bicyclic structure) 특히 이환형 리보오스 구조 더욱 특히 일반식 (II)에 나타낸 바와 같은 이환형 리보오스 구조를 갖는 뉴클레오티드를 의미한다. 가교는 리보오스를 3'-엔도(노쓰) 배좌(3'-endo(North) conformation) 내에 "잠근다". LNA 뉴클레오티드의 리보오스 성분은 2' 산소와 4' 탄소를 연결하는 별도의 가교로 변성된다. LNA에 대하여 대안으로 사용되는 용어는 이환형 뉴클레오티드 또는 가교화된 뉴클레오티드이고, 따라서 LNA 단위에 대한 대안의 용어는 이환형 뉴클레오티드 단위 또는 가교화된 뉴클레오티드 단위이다.
- [0510] 여기에서 사용되는 바와 같은 용어 "**비-LNA 단위**"는 잠금되지 않은 뉴클레오티드, 즉 이환형 당 성분을 갖지 않는, 특히 이환형 리보오스 구조를 갖지 않는 더욱 특히 일반식 (II)에 나타낸 바와 같은 이환형 리보오스 구조를 갖지 않는 뉴클레오티드를 의미한다. 비-LNA 단위는 가장 바람직하게는 DNA 단위이다.
- [0511] 여기에서 사용되는 바와 같은 용어 "**DNA 단위**"는 당으로서 2-디옥시리보오스를 포함하는 뉴클레오티드를 의미한다. 따라서, 뉴클레오티드는 핵염기 및 2-디옥시리보오스로 이루어진다.
- [0512] 여기에서 사용되는 바와 같은 용어 "**단위**"는 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드의 일부 또는 조각 또는 성분을 의미한다. 따라서 "단위"는 완전한 분자가 아니고, 이는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 다른 일부 또는 조각 또는 성분과의 공유 연결을 위한 적어도 하나의 포지션을 갖는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 일부 또는

단편(fragment) 또는 성분(moiety)이다. 예를 들어, 일반 구조 (B1) 내지 (B6)은 이들이 기 Y 및 IL' 또는 -O- 및 -O-P(O)(S⁻)- 각각을 통하여 공유적으로 연결될 수 있기 때문에 단위이다. 바람직하게는 하나의 단위는 펜토오스 구조, 펜토오스 구조에 연결되는 핵염기, 5' 라디칼기 및 IL' 라디칼기로 이루어지는 성분이다.

[0513] 여기에서 사용되는 바와 같은 용어 "**빌딩 블록(building block)**" 또는 "**모노머**"는 분자 특히 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 합성에서 사용되는 뉴클레오타이드를 의미한다. Y가 5'-말단기를 나타내고 IL'가 3'-말단기를 나타내는 일반식 (I)의 LNA 분자가 그 예이다.

[0514] 더욱이, 순수 부분입체이성질 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 바람직하다. 하기:



[0515]

에 나타난 바와 같은 Sp-부분입체이성질체 및 Rp-부분입체이성질체가 특히 바람직하다.

[0516]

여기에서 제공되는 바와 같은 적절한 황 (S) 함유 뉴클레오타이드간 연결이 바람직하다.

[0517]

뉴클레오타이드간 연결의 적어도 50%가 포스포로티오에이트기인 백본 중의 포스포로티오에이트 성분이 바람직하다. 또한, 만일 존재하는 경우, LNA 단위가 뉴클레오타이드간 연결로서 포스포로티오에이트를 통하여 연결되는 것이 바람직하다. 완전 포스포로티오에이트 백본이 가장 바람직하며, 즉 모든 뉴클레오타이드 단위 및 또한 LNA 단위 (만일 존재하는 경우)가 하기: -O-P(O,S)-O- 또는 -O-P(O⁻)(S)-O-와 동의어인 -O-P(O)(S⁻)-O-와 같이 정의되는 포스포로티오에이트기를 통하여 서로 연결되는 경우가 가장 바람직하다.

[0518]

안티센스-올리고뉴클레오타이드가 **갭량체(gapmer)**인 경우, LNA 영역이 -O-P(O)(S⁻)-O- 및 -O-P(S)(S⁻)-O-로부터 선택되는 뉴클레오타이드간 연결을 갖고 중간 부분인 비-LNA 영역이 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O- 및 -O-P(S)(S⁻)-O-로부터 선택되는 뉴클레오타이드간 연결을 갖고 LNA 영역이 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O- 및 -O-P(S)(S⁻)-O-로부터 선택되는 뉴클레오타이드간 연결을 통하여 비-LNA 영역에 연결되는 것이 바람직하다.

[0519]

10-량체(10-mer) 중의 9개 그리고 20-량체 중의 19개인 모든 뉴클레오타이드간 연결 모두가 -O-P(O)(S⁻)-O- 및 -O-P(S)(S⁻)-O-인 경우가 심지어 보다 바람직하다. 모든 뉴클레오타이드간 연결이 포스포로티오에이트기 (-O-P(O)(S⁻)-O-)이거나 포스포로디티오에이트기 (-O-P(S)(S⁻)-O-)인 것이 여전히 보다 바람직하다.

[0520]

[0521] 잠금 핵산 (LNA[®])

안티센스-올리고뉴클레오타이드 중의 일반식 (B1) 또는 (B2)의 뉴클레오타이드의 일부가 소위 LNA (잠금 핵산)로 치환되는 것이 특히 바람직하다. 약어 LNA는 등록상표이나, 여기에서 용어 "LNA"는 단지 설명적인 방법으로 사용되었다.

[0522]

바람직하게는 말단 뉴클레오타이드가 LNA로 치환되고 보다 바람직하게는 3' 말단에서 마지막 1 내지 4개의 뉴클레오타이드 및/또는 5' 말단에서 마지막 1 내지 4개의 뉴클레오타이드가 LNA로 치환된다. 3' 말단 및 5' 말단에서 적어도 말단 뉴클레오타이드가 각각 LNA로 치환되는 것이 또한 바람직하다.

[0523]

여기에서 사용되는 바와 같은 용어 "**LNA**"는 "잠금 핵산"으로도 알려진 이환형 뉴클레오타이드 유사체를 의미한다. 이는 LNA 모노머를 의미할 수 있거나, "LNA 안티센스-올리고뉴클레오타이드" 또는 "LNA를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드"의 문맥 중에서 사용되는 경우, LNA는 하나 이상의 이러한 이환형 뉴클레오타이드 유사체를 포함

[0524]

아릴 및 헤테로아릴은 선택적으로 치환될 수 있고, 여기에서 2개의 같은자리 치환기는 함께 옥소, 티옥소, 이미노 또는 선택적으로 치환된 메틸렌을 표기할 수 있고;

[0533] 여기에서 R^N 은 수소 및 C_{1-4} -알킬로부터 선택되고, 여기에서 2개의 인접 (비-같은자리의) 치환기는 이중 결합의 결과를 가져오는 부가의 결합을 표기할 수 있고; 존재하고 2가 라디칼(biradical) 내에 포함되지 않는 경우 R^N 은 수소 및 C_{1-4} -알킬; 및 그의 염기성 염 및 산부가염으로부터 선택된다. 모든 키랄 중심에 대하여, 비대칭기가 R 또는 S 배향에서 발견될 수 있다.

[0534] 바람직한 구체예에 있어서, R^a 및 R^b 은 함께 $-C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-$, $-C(R^aR^b)-O-$, $-C(R^aR^b)-NR^c-$, $-C(R^aR^b)-S-$ 및 $-C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-O-$ 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 기로 이루어지는 2가 라디칼을 나타내고, 여기에서 각 R^a , R^b 및 R^c 는 선택적으로 독립적으로 선택될 수 있다.

[0535] 일부 구체예에 있어서, R^a 및 R^b 는 수소 및 메틸 등과 같은 C_{1-6} -알킬로 이루어지는 군으로부터 선택적으로 독립적으로 선택될 수 있고, 수소가 바람직하다.

[0536] 바람직한 구체예에 있어서, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 및 R^5 는 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} -알킬, 치환된 C_{1-6} -알킬, C_{2-6} -알케닐, 치환된 C_{2-6} -알케닐, C_{2-6} -알키닐 또는 치환된 C_{2-6} -알키닐, C_{1-6} -알콕실, 치환된 C_{1-6} -알콕실, 아실, 치환된 아실, C_{1-6} -아미노알킬 또는 치환된 C_{1-6} -아미노알킬로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 모든 키랄 중심에 대하여, 비대칭기가 R 또는 S 배향에서 발견될 수 있다.

[0537] 바람직한 구체예에 있어서 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 및 R^5 는 수소이다.

[0538] 일부 구체예에 있어서, R^1 , R^2 및 R^3 은 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} -알킬, 치환된 C_{1-6} -알킬, C_{2-6} -알케닐, 치환된 C_{2-6} -알케닐, C_{2-6} -알키닐 또는 치환된 C_{2-6} -알키닐, C_{1-6} -알콕실, 치환된 C_{1-6} -알콕실, 아실, 치환된 아실, C_{1-6} -아미노알킬 또는 치환된 C_{1-6} -아미노알킬로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 모든 키랄 중심에 대하여, 비대칭기가 R 또는 S 배향에서 발견될 수 있다. 바람직한 구체예에 있어서, R^1 , R^2 및 R^3 은 수소이다.

[0539] 바람직한 구체예에 있어서, R^4 및 R^5 는 각각 독립적으로 $-H$, $-CH_3$, $-CH_2-CH_3$, $-CH_2-O-CH_3$ 및 $-CH=CH_2$ 로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 적절하게는 일부 구체예에 있어서, R^4 또는 R^5 는 수소인 반면에 다른 기 (R^4 또는 R^5 각각)는 C_{1-6} -알킬, C_{2-6} -알케닐, C_{2-6} -알키닐, 치환된 C_{1-6} -알킬, 치환된 C_{2-6} -알케닐, 치환된 C_{2-6} -알키닐 또는 치환된 아실 ($-C(=O)-$)로 이루어지는 군으로부터 선택되고; 여기에서 각 치환된 기는 할로젠, C_{1-6} -알킬, 치환된 C_{1-6} -알킬, C_{2-6} -알케닐, 치환된 C_{2-6} -알케닐, C_{2-6} -알키닐, 치환된 C_{2-6} -알키닐, $-OJ_1$, $-SJ_1$, $-NJ_1J_2$, $-N_3$, $-COOJ_1$, $-CN$, $-O-C(=O)NJ_1J_2$, $-N(H)C(=NH)NJ_1J_2$ 또는 $-N(H)C(=X)N(H)J_2$ 로부터 독립적으로 선택되는 단치환 또는 다치환된 기이고, 여기에서 X 는 O 또는 S 이고; 각 J_1 및 J_2 는 독립적으로 $-H$, C_{1-6} -알킬, 치환된 C_{1-6} -알킬, C_{2-6} -알케닐, 치환된 C_{2-6} -알케닐, C_{2-6} -알키닐, 치환된 C_{2-6} -알키닐, C_{1-6} -아미노알킬, 치환된 C_{1-6} -아미노알킬 또는 보호기이다. 일부 구체예에 있어서 R^4 또는 R^5 는 치환된 C_{1-6} -알킬이다. 일부 구체예에 있어서, R^4 또는 R^5 는 치환된 메틸렌이고, 여기에서 바람직한 치환기에는 독립적으로 $-F$, $-NJ_1J_2$, $-N_3$, $-CN$, $-OJ_1$, $-SJ_1$, $-O-C(=O)NJ_1J_2$, $-N(H)C(=NH)NJ_1J_2$ 또는 $-N(H)C(=O)N(H)J_2$ 로부터 선택되는 하나 이상의 기가 포함된다. 일부 구체예에 있어서 각 J_1 및 J_2 는 독립적으로 H 또는 C_{1-6} -알킬이다. 일부 구체예에 있어서 R^4 또는 R^5 는 메틸, 에틸 또는 메톡시메틸이다. 일부 구체예에 있어서 R^4 또는 R^5 는 메틸이다. 추가의 구체예에 있어서 R^4 또는 R^5 는 에틸레닐이다. 일부 구체예에 있어서 R^4 또는 R^5 는 치환된 아실이다. 일부 구체예에 있어서 R^4 또는 R^5 는 $-O-C(=O)NJ_1J_2$ 이다. 모든 키랄 중심에 대하여, 비대칭기가 R 또는 S 배향에서 발견될 수 있다. 이러한 5' 변성 이환형 뉴클레오타이드는 WO 2007/134181 A에 기술되고, 이는 그의 전체로서 참조로 여기에 포함된다.

- [0540] 일부 구체예에 있어서 B는 아데닌, 시토신, 티민, 아데닌, 우라실 및/또는 5-티아졸로-우라실, 2-티오-우라실, 5-프로피닐-우라실, 2'티오-티민, 5-메틸시토신, 5-티아졸로-시토신, 5-프로피닐-시토신 및 2,6-디아미노퓨린 등과 같은 변성되거나 치환된 핵염기 등과 같은 여기에서 언급되는 핵염기 등과 같은 퓨린 또는 피리미딘, 또는 치환된 퓨린 또는 치환된 피리미딘 등과 같은 핵염기 유사체 및 천연적으로 발생하는 핵염기를 포함하는 핵염기이다.
- [0541] 바람직한 구체예에 있어서, $R^{\#}$ 및 R은 함께 $-C(R^aR^b)-O-$, $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-O-$, $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-O-$, $-C(R^aR^b)-O-C(R^dR^e)-$, $-C(R^aR^b)-O-C(R^dR^e)-O-$, $-C(R^aR^b)-C(R^dR^e)-$, $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-$, $-C(R^a)=C(R^b)-C(R^dR^e)-$, $-C(R^aR^b)-N(R^c)-$, $-C(R^aR^b)-C(R^dR^e)-N(R^c)-$, $-C(R^aR^b)-N(R^c)-O-$, $-C(R^aR^b)-S-$ 및 $-C(R^aR^b)-C(R^dR^e)-S-$ 로부터 선택되는 2가 라디칼을 나타내고, 여기에서 R^a , R^b , R^c , R^d , R^e 및 R^f 각각은 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-12} -알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-6} -알케닐, 선택적으로 치환된 C_{2-6} -알키닐, 하이드록시, C_{1-12} -알콕시, C_{1-6} -알콕시- C_{1-6} -알킬, C_{2-6} -알케닐옥시, 카르복시, C_{1-12} -알콕시카르보닐, C_{1-12} -알킬카르보닐, 포밀, 아릴, 아릴옥시-카르보닐, 아릴옥시, 아릴카르보닐, 헤테로아릴, 헤테로아릴옥시-카르보닐, 헤테로아릴옥시, 헤테로아릴카르보닐, 아미노, 모노(C_{1-6} -알킬)아미노 및 디(C_{1-6} -알킬)아미노, 카르바모일, 모노(C_{1-6} -알킬)-아미노-카르보닐 및 디(C_{1-6} -알킬)-아미노-카르보닐, 아미노- C_{1-6} -알킬-아미노카르보닐, 모노(C_{1-6} -알킬)아미노- C_{1-6} -알킬-아미노카르보닐 및 디(C_{1-6} -알킬)아미노- C_{1-6} -알킬-아미노카르보닐, C_{1-6} -알킬-카르보닐아미노, 카르바미도, C_{1-6} -알카노일옥시, 설포노, C_{1-6} -알킬설포닐옥시, 니트로, 아지도, 설파닐, C_{1-6} -알킬티오, 할로젠으로부터 선택되고, 여기에서 아릴 및 헤테로아릴은 선택적으로 치환될 수 있고 여기에서 2개의 같은자리 치환기 R^a 및 R^b 는 함께 선택적으로 치환된 메틸렌($=CH_2$)을 나타낼 수 있다. 모든 키랄 중심에 대하여, 비대칭기가 R 또는 S 배향에서 발견될 수 있다.
- [0542] 추가의 구체예에 있어서 $R^{\#}$ 및 R은 함께 $-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-NH-$, $-CH_2-N(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-O-$, $-CH_2-CH(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-S-$, $-CH_2-CH_2-NH-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$, $-CH=CH-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-O-$, $-CH_2-NH-O-$, $-CH_2-N(CH_3)-O-$, $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH(CH_3)-O-$, $-CH(CH_2-O-CH_3)-O-$, $-CH_2-CH_2-$ 및 $-CH=CH-$ 로부터 선택되는 2가 라디칼 (2가 기)를 나타낸다. 모든 키랄 중심에 대하여, 비대칭기가 R 또는 S 배향에서 발견될 수 있다.
- [0543] 일부 구체예에 있어서, $R^{\#}$ 및 R은 함께 2가 라디칼 $-C(R^aR^b)-N(R^c)-O-$ 를 나타내고, 여기에서 R^a 및 R^b 는 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} -알킬, 치환된 C_{1-6} -알킬, C_{2-6} -알케닐, 치환된 C_{2-6} -알케닐, C_{2-6} -알키닐 또는 치환된 C_{2-6} -알키닐, C_{1-6} -알콕실, 치환된 C_{1-6} -알콕실, 아실, 치환된 아실, C_{1-6} -아미노알킬 또는 치환된 C_{1-6} -아미노알킬, 수소 등으로 이루어지는 군으로부터 선택되고; 여기에서 R^c 는 수소, 할로젠, C_{1-6} -알킬, 치환된 C_{1-6} -알킬, C_{2-6} -알케닐, 치환된 C_{2-6} -알케닐, C_{2-6} -알키닐 또는 치환된 C_{2-6} -알키닐, C_{1-6} -알콕실, 치환된 C_{1-6} -알콕실, 아실, 치환된 아실, C_{1-6} -아미노알킬 또는 치환된 C_{1-6} -아미노알킬 바람직하게는 수소로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0544] 바람직한 구체예에 있어서, $R^{\#}$ 및 R은 함께 2가 라디칼 $-C(R^aR^b)-O-C(R^dR^e)-O-$ 를 나타내고, 여기에서 R^a , R^b , R^d 및 R^e 는 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} -알킬, 치환된 C_{1-6} -알킬, C_{2-6} -알케닐, 치환된 C_{2-6} -알케닐, C_{2-6} -알키닐 또는 치환된 C_{2-6} -알키닐, C_{1-6} -알콕실, 치환된 C_{1-6} -알콕실, 아실, 치환된 아실, C_{1-6} -아미노알킬 또는 치환된 C_{1-6} -아미노알킬, 바람직하게는 수소로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0545] 바람직한 구체예에 있어서, $R^{\#}$ 및 R은 2가 라디칼 $-CH(Z)-O-$ 를 형성하고, 여기에서 Z는 C_{1-6} -알킬, C_{2-6} -알케닐, C_{2-6} -알키닐, 치환된 C_{1-6} -알킬, 치환된 C_{2-6} -알케닐, 치환된 C_{2-6} -알키닐, 아실, 치환된 아실, 치환된 아미드, 티올 또는 치환된 티오로 이루어지는 군으로부터 선택되고; 여기에서 치환된 기 각각은, 독립적으로, 할로젠, 옥소, 하이드록실, $-OJ_1$, $-NJ_1J_2$, $-SJ_1$, $-N_3$, $-OC(=X)J_1$, $-OC(=X)NJ_1J_2$, $-NJ_1C(=X)NJ_1J_2$ 및 $-CN$ 으로부터 독립적으로 선택되는 선택적으로 보호된 치환기로 단치환 또는 다치환되고, 여기에서 각 J_1 , J_2 및 J_3 은, 독립적으로, $-H$ 또는 C_{1-6} -알킬이고, X는 O, S 또는 NJ_1 이다. 바람직한 구체예에 있어서 Z는 C_{1-6} -알킬 또는 치환된 C_{1-6} -알킬이다.

추가에 바람직한 구체예에 있어서 Z는 메틸이다. 바람직한 구체예에 있어서 Z는 치환된 C₁₋₆-알킬이다. 바람직한 구체예에 있어서 상기 치환기는 C₁₋₆-알콕시이다. 일부 구체예에 있어서 Z는 CH₃OCH₂-이다. 모든 키랄 중심에 대하여, 비대칭기가 R 또는 S 배향에서 발견될 수 있다. 이러한 이환형 뉴클레오티드는 US 7,399,845에서 기술되고 이는 그의 전체로서 여기에 참조로 포함된다. 바람직한 구체예에 있어서, R¹, R², R³, R⁴ 및 R⁵는 수소이다. 바람직한 구체예에 있어서, 상기에서 그리고 WO2007/134181에서 언급되는 바와 같이 R¹, R² 및 R³는 수소이고, R⁴, R⁵ 중의 하나 또는 둘 다는 수소 이외의 것일 수 있다.

[0546]

바람직한 구체예에 있어서, R[#] 및 R은 함께 2가 라디칼 -CH₂-N(R^c)- 등과 같은 가교 내 치환된 아미노기를 포함하는 2가 라디칼을 나타내고, 여기에서 R^c는 C₁₋₁₂-알킬옥시이다. 바람직한 구체예에 있어서 R[#] 및 R은 함께 2가 라디칼 -Cq₃q₄-NOR-을 나타내고, 여기에서 q₃ 및 q₄는 독립적으로 수소, 할로젠, C₁₋₆-알킬, 치환된 C₁₋₆-알킬, C₂₋₆-알케닐, 치환된 C₂₋₆-알케닐, C₂₋₆-알키닐 또는 치환된 C₂₋₆-알키닐, C₁₋₆-알콕실, 치환된 C₁₋₆-알콕실, 아실, 치환된 아실, C₁₋₆-아미노알킬 또는 치환된 C₁₋₆-아미노알킬로 이루어지는 군으로부터 선택되고; 여기에서 각 치환된 기는, 독립적으로, 할로젠, -OJ₁, -SJ₁, -NJ₁J₂, -COOJ₁, -CN, -OC(=O)NJ₁J₂, -NH-C(=NH)NJ₁J₂ 또는 -NH-C(=X)NHJ₂로부터 독립적으로 선택되는 치환기로 단치환 또는 다치환되고, 여기에서 X는 O 또는 S이고; J₁ 및 J₂ 각각은, 독립적으로, -H, C₁₋₆-알킬, C₂₋₆-알케닐, C₂₋₆-알키닐, C₁₋₆-아미노알킬 또는 보호기이다. 모든 키랄 중심에 대하여, 비대칭기가 R 또는 S 배향에서 발견될 수 있다. 이러한 이환형 뉴클레오티드는 WO2008/150729에서 기술되고 이는 그의 전체로서 여기에 참조로 포함된다. 바람직한 구체예에 있어서, R¹, R², R³, R⁴ 및 R⁵는 독립적으로 수소, 할로젠, C₁₋₆-알킬, 치환된 C₁₋₆-알킬, C₂₋₆-알케닐, 치환된 C₂₋₆-알케닐, C₂₋₆-알키닐 또는 치환된 C₂₋₆-알키닐, C₁₋₆-알콕실, 치환된 C₁₋₆-알콕실, 아실, 치환된 아실, C₁₋₆-아미노알킬 또는 치환된 C₁₋₆-아미노알킬로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구체예에 있어서, R¹, R², R³, R⁴ 및 R⁵는 수소이다. 바람직한 구체예에 있어서, 바람직한 구체예에 있어서, 상기에서 그리고 WO2007/134181에서 언급되는 바와 같이 R¹, R² 및 R³는 수소이고, R⁴, R⁵ 중의 하나 또는 둘 다는 수소 이외의 것일 수 있다.

[0547]

바람직한 구체예에 있어서, R[#] 및 R은 함께 2가 라디칼 (2가 기) -C(R^aR^b)-O-를 나타내고, 여기에서 R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 할로젠, C₁₋₁₂-알킬, 치환된 C₁₋₁₂-알킬, C₂₋₆-알케닐, 치환된 C₂₋₆-알케닐, C₂₋₆-알키닐, 치환된 C₂₋₆-알키닐, C₁₋₁₂-알콕시, 치환된 C₁₋₁₂-알콕시, -OJ₁, -SJ₁, -S(O)J₁, -SO₂-J₁, -NJ₁J₂, -N₃, -CN, -C(=O)OJ₁, -C(=O)NJ₁J₂, -C(=O)J₁, -OC(=O)NJ₁J₂, -NH-C(=NH)NJ₁J₂, -NH-C(=O)NJ₁J₂ 또는 -NH-C(=S)NJ₁J₂이거나; R^a 및 R^b는 함께 =C(q₃)(q₄)이고; q₃ 및 q₄는 각각, 독립적으로, -H, 할로젠, C₁₋₁₂-알킬 또는 치환된 C₁₋₁₂-알킬이고; 각 치환된 기는, 독립적으로, 할로젠, C₁₋₆-알킬, 치환된 C₁₋₆-알킬, C₂₋₆-알케닐, 치환된 C₂₋₆-알케닐, C₂₋₆-알키닐, 치환된 C₂₋₆-알키닐, -OJ₁, -SJ₁, -NJ₁J₂, -N₃, -CN, -C(=O)OJ₁, -C(=O)NJ₁J₂, -C(=O)J₁, -OC(=O)NJ₁J₂, -NH-C(=O)NJ₁J₂ 또는 -NH-C(=S)NJ₁J₂로부터 독립적으로 선택되는 치환기로 단치환 또는 다치환되고; J₁ 및 J₂ 각각은 독립적으로 H, C₁₋₆-알킬, 치환된 C₁₋₆-알킬, C₂₋₆-알케닐, 치환된 C₂₋₆-알케닐, C₂₋₆-알키닐, 치환된 C₂₋₆-알키닐, C₁₋₆-아미노알킬, 치환된 C₁₋₆-아미노알킬 또는 보호기이다. 이러한 화합물은 WO2009006478A에서 기술되고, 그의 전체로서 여기에 참조로 포함된다.

[0548]

바람직한 구체예에 있어서, R[#] 및 R은 2가 라디칼 -Q-를 형성하고, 여기에서 Q는 -C(q₁)(q₂)C(q₃)(q₄)-, -C(q₁)=C(q₃)-, -C[=C(q₁)(q₂)]C(q₃)(q₄)- 또는 -C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)]-이고;

[0549]

q₁, q₂, q₃, q₄는 각각 서로 독립적으로 -H, 할로젠, C₁₋₁₂-알킬, 치환된 C₁₋₁₂-알킬, C₂₋₆-알케닐, 치환된 C₁₋₁₂-알콕시, -OJ₁, -SJ₁, -S(O)J₁, -SO₂-J₁, -NJ₁J₂, -N₃, -CN, -C(=O)OJ₁, -C(=O)NJ₁J₂, -C(=O)J₁, -OC(=O)NJ₁J₂, -NH-C(=NH)NJ₁J₂, -NH-C(=O)NJ₁J₂ 또는 -NH-C(=S)NJ₁J₂이고; J₁ 및 J₂ 각각은 서로 독립적으로 -H, C₁₋₆-알킬, C₂₋₆-알

케닐, C₂₋₆-알킬닐, C₁₋₆-아미노알킬 또는 보호기이고; 선택적으로 Q가 C(q₁)(q₂)C(q₃)(q₄)이고 q₃ 또는 q₄ 중의 하나가 -CH₃인 경우, q₃ 또는 q₄ 중의 적어도 다른 하나 또는 q₁ 및 q₂ 중의 하나는 -H 이외이다. 바람직한 구체예에 있어서 R¹, R², R³, R⁴ 및 R⁵는 수소이다. 모든 키랄 중심에 대하여, 비대칭기가 R 또는 S 배향에서 발견될 수 있다. 이러한 이환형 뉴클레오티드는 W02008/154401에서 기술되고 이는 그의 전체로서 여기에 참조로 포함된다. 바람직한 구체예에 있어서 R¹, R², R³, R⁴ 및 R⁵는 서로 독립적으로 수소, 할로젠, C₁₋₆-알킬, 치환된 C₁₋₆-알킬, C₂₋₆-알케닐, 치환된 C₂₋₆-알케닐, C₂₋₆-알키닐 또는 치환된 C₂₋₆-알키닐, C₁₋₆-알콕실, 치환된 C₁₋₆-알콕실, 아실, 치환된 아실, C₁₋₆-아미노알킬 또는 치환된 C₁₋₆-아미노알킬로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구체예에 있어서 R¹, R², R³, R⁴ 및 R⁵는 수소이다. 바람직한 구체예에 있어서 상기에서 그리고 W02007/134181 또는 W02009/067647에서 언급된 바와 같이 R¹, R² 및 R³은 수소이고 R⁴, R⁵ 중의 하나 또는 둘 또는 수소 이외일 수 있다 (알파-L-바이시클릭 핵산 유사체).

[0550] 여기에서 사용되는 바와 같이, 용어 "C₁-C₆-알킬"은 -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -CH(CH₃)₂, -C₄H₉, -CH₂-CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)-C₂H₅, -C(CH₃)₃, -C₅H₁₁, -CH(CH₃)-C₃H₇, -CH₂-CH(CH₃)-C₂H₅, -CH(CH₃)-CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₂-C₂H₅, -CH₂-C(CH₃)₃, -CH(C₂H₅)₂, -C₂H₄-CH(CH₃)₂, -C₆H₁₃, -C₃H₆-CH(CH₃)₂, -C₂H₄-CH(CH₃)-C₂H₅, -CH(CH₃)-C₄H₉, -CH₂-CH(CH₃)-C₃H₇, -CH(CH₃)-CH₂-CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-C₂H₅, -CH₂-CH(CH₃)-CH(CH₃)₂, -CH₂-C(CH₃)₂-C₂H₅, -C(CH₃)₂-C₃H₇, -C(CH₃)₂-CH(CH₃)₂, -C₂H₄-C(CH₃)₃, -CH₂-CH(C₂H₅)₂ 및 -CH(CH₃)-C(CH₃)₃를 의미한다. 용어 "C₁-C₆-알킬"은 또한 시클로-C₃H₅, 시클로-C₄H₇, 시클로-C₅H₉ 및 시클로-C₆H₁₁ 같은 "C₁-C₆-시클로알킬"을 포함할 수 있다.

[0551] -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -CH(CH₃)₂, -C₄H₉, -CH₂-CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)-C₂H₅, -C(CH₃)₃ 및 -C₅H₁₁이 바람직하다. -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇ 및 -CH(CH₃)₂가 특히 바람직하다.

[0552] 용어 "C₁-C₆-알킬"은 또한 시클로-C₃H₅, 시클로-C₄H₇, 시클로-C₅H₉ 및 시클로-C₆H₁₁ 같은 "C₁-C₆-시클로알킬"을 포함할 수 있다.

[0553] 여기에서 사용되는 바와 같이, 용어 "C₁-C₁₂-알킬"은 C₁-C₆-알킬, -C₇H₁₅, -C₈H₁₇, -C₉H₁₉, -C₁₀H₂₁, -C₁₁H₂₃, -C₁₂H₂₅를 의미한다.

[0554] 여기에서 사용되는 바와 같이, 용어 "C₁-C₆-알킬레닐"은 -CH₂-, -C₂H₄-, -CH(CH₃)-, -C₃H₆-, -CH₂-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂-, -C(CH₃)₂-, -C₄H₈-, -CH₂-C(CH₃)₂-, -C(CH₃)₂-CH₂-, -C₂H₄-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-C₂H₄-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-, -C₅H₁₀-, -CH(CH₃)-C₃H₆-, -CH₂-CH(CH₃)-C₂H₄-, -C₂H₄-CH(CH₃)-CH₂-, -C₃H₆-CH(CH₃)-, -C₂H₄-C(CH₃)₂-, -C(CH₃)₂-C₂H₄-, -CH₂-C(CH₃)₂-CH₂-, -CH₂-CH(CH₃)-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-CH₂-, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-CH(CH₃)-, -C(CH₃)₂-C₃H₆-, -CH₂-C(CH₃)₂-C₂H₄-, -C₂H₄-C(CH₃)₂-CH₂-, -C₃H₆-C(CH₃)₂-, -CH(CH₃)-C₄H₈-, -C₅H₁₂-, -CH₂-CH(CH₃)-C₃H₆-, -C₂H₄-CH(CH₃)-C₂H₄-, -C₃H₆-CH(CH₃)-CH₂-, -C₄H₈-CH(CH₃)-, -C₂H₄-CH(CH₃)-CH(CH₃)-, -CH₂-CH(CH₃)-CH(CH₃)-CH₂-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-C₂H₄-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂-CH(CH₃)-CH₂- 및 -CH(CH₃)-CH(CH₃)-C₂H₄-를 의미한다.

[0555] 여기에서 사용되는 바와 같이, 용어 "C₂-C₆-알케닐"은 -CH=CH₂, -CH₂-CH=CH₂, -C(CH₃)=CH₂, -CH=CH-CH₃, -C₂H₄-CH=CH₂, -CH₂-CH=CH-CH₃, -CH=CH-C₂H₅, -CH₂-C(CH₃)=CH₂, -CH(CH₃)-CH=CH₂, -CH=CH(CH₃)₂, -C(CH₃)=CH-CH₃, -CH=CH-CH=CH₂, -C₃H₆-CH=CH₂, -C₂H₄-CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH-C₂H₅, -CH=CH-C₃H₇, -CH₂-CH=CH-CH=CH₂, -CH=CH-CH=CH-CH₃, -CH=CH-CH₂-CH=CH₂, -C(CH₃)=CH-CH=CH₂, -CH=CH(CH₃)-CH=CH₂, -CH=CH-C(CH₃)=CH₂, -C₂H₄-C(CH₃)=CH₂, -CH₂-CH(CH₃)CH=CH₂, -CH(CH₃)-CH₂-CH=CH₂, -CH₂-CH=C(CH₃)₂, -CH₂-C(CH₃)=CH-CH₃, -CH(CH₃)-CH=CH-CH₃, -CH=CH-CH(CH₃)₂, -CH=C(CH₃)-C₂H₅, -C(CH₃)=CH-C₂H₅, -C(CH₃)=C(CH₃)₂, -C(CH₃)₂-CH=CH₂, -CH(CH₃)-C(CH₃)=CH₂, -C(CH₃)=CH-CH=CH₂, -CH=C(CH₃)-CH=CH₂, -CH=CH-C(CH₃)=CH₂, -C₄H₈-CH=CH₂, -C₃H₆-CH=CH-CH₃, -C₂H₄-CH=CH-C₂H₅, -CH₂-CH=CH-C₃H₇, -CH=CH-C₄H₉, -C₃H₆-C(CH₃)=CH₂, -C₂H₄-CH(CH₃)-CH=CH₂, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-CH=CH₂, -CH(CH₃)-C₂H₄-

CH=CH₂, -C₂H₄-CH=C(CH₃)₂, -C₂H₄-C(CH₃)=CH-CH₃, -CH₂-CH(CH₃)-CH=CH-CH₃, -CH(CH₃)-CH₂-CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH-CH(CH₃)₂, -CH₂-CH=C(CH₃)-C₂H₅, -CH₂-C(CH₃)=CH-C₂H₅, -CH(CH₃)-CH=CH-C₂H₅, -CH=CH-CH₂-CH(CH₃)₂, -CH=CH-CH(CH₃)-C₂H₅, -CH=C(CH₃)-C₃H₇, -C(CH₃)=CH-C₃H₇, -CH₂-CH(CH₃)-C(CH₃)=CH₂, -CH(CH₃)-CH₂-C(CH₃)=CH₂, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-CH=CH₂, -CH₂-C(CH₃)₂-CH=CH₂, -C(CH₃)₂-CH₂-CH=CH₂, -CH₂-C(CH₃)=C(CH₃)₂, -CH(CH₃)-CH=C(CH₃)₂, -C(CH₃)₂-CH=CH-CH₃, -CH(CH₃)-C(CH₃)=CH-CH₃, -CH=C(CH₃)-CH(CH₃)₂, -C(CH₃)=CH-CH(CH₃)₂, -C(CH₃)=C(CH₃)-C₂H₅, -CH=CH-C(CH₃)₃, -C(CH₃)₂-C(CH₃)=CH₂, -CH(C₂H₅)-C(CH₃)=CH₂, -C(CH₃)(C₂H₅)-CH=CH₂, -CH(CH₃)-C(C₂H₅)=CH₂, -CH₂-C(C₃H₇)=CH₂, -CH₂-C(C₂H₅)=CH-CH₃, -CH(C₂H₅)-CH=CH-CH₃, -C(C₄H₉)=CH₂, -C(C₃H₇)=CH-CH₃, -C(C₂H₅)=CH-C₂H₅, -C(C₂H₅)=C(CH₃)₂, -C[C(CH₃)₃]=CH₂, -C[CH(CH₃)(C₂H₅)]=CH₂, -C[CH₂-CH(CH₃)₂]=CH₂, -C₂H₄-CH=CH-CH=CH₂, -CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH₂, -CH=CH-C₂H₄-CH=CH₂, -CH₂-CH=CH-CH=CH-CH₃, -CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₃, -CH=CH-CH=CH-C₂H₅, -CH₂-CH=CH-C(CH₃)=CH₂, -CH₂-CH=C(CH₃)-CH=CH₂, -CH₂-C(CH₃)=CH-CH=CH₂, -CH(CH₃)-CH=CH-CH=CH₂, -CH=CH-CH₂-C(CH₃)=CH₂, -CH=CH-CH(CH₃)-CH=CH₂, -CH=C(CH₃)-CH₂-CH=CH₂, C(CH₃)=CH-CH₂-CH=CH₂, -CH=CH-CH=C(CH₃)₂, -CH=CH-C(CH₃)=CH-CH₃, -CH=C(CH₃)-CH=CH-CH₃, -C(CH₃)=CH-CH=CH-CH₃, -CH=C(CH₃)-C(CH₃)=CH₂, -C(CH₃)=CH-C(CH₃)=CH₂, -C(CH₃)=C(CH₃)-CH=CH₂ 및 -CH=CH-CH=CH-CH=CH₂를 의미한다.

[0556] -CH=CH₂, -CH₂-CH=CH₂, -C(CH₃)=CH₂, -CH=CH-CH₃, -C₂H₄-CH=CH₂, -CH₂-CH=CH-CH₃가 바람직하다. -CH=CH₂, -CH₂-CH=CH₂ 및 -CH=CH-CH₃가 특히 바람직하다.

[0557] 여기에서 사용되는 바와 같이, 용어 "C₂-C₆-알킬닐"은 -C≡CH, -C≡C-CH₃, -CH₂-C≡CH, -C₂H₄-C≡CH, -CH₂-C≡C-CH₃, -C≡C-C₂H₅, -C₃H₆-C≡CH, -C₂H₄-C≡C-CH₃, -CH₂-C≡C-C₂H₅, -C≡C-C₃H₇, -CH(CH₃)-C≡CH, -CH₂-CH(CH₃)-C≡CH, -CH(CH₃)-CH₂-C≡CH, -CH(CH₃)-C≡C-CH₃, -C₄H₈-C≡CH, -C₃H₆-C≡C-CH₃, -C₂H₄-C≡C-C₂H₅, -CH₂-C≡C-C₃H₇, -C≡C-C₄H₉, -C₂H₄-CH(CH₃)-C≡CH, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-C≡CH, -CH(CH₃)-C₂H₄-C≡CH, -CH₂-CH(CH₃)-C≡C-CH₃, -CH(CH₃)-CH₂-C≡C-CH₃, -CH(CH₃)-C≡C-C₂H₅, -CH₂-C≡C-CH(CH₃)₂, -C≡C-CH(CH₃)-C₂H₅, -C≡C-CH₂-CH(CH₃)₂, -C≡C-C(CH₃)₃, -CH(C₂H₅)-C≡C-CH₃, -C(CH₃)₂-C≡C-CH₃, -CH(C₂H₅)-CH₂-C≡CH, -CH₂-CH(C₂H₅)-C≡CH, -C(CH₃)₂-CH₂-C≡CH, -CH₂-C(CH₃)₂-C≡CH, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-C≡CH, -CH(C₃H₇)-C≡CH, -C(CH₃)(C₂H₅)-C≡CH, -C≡C-C≡CH, -CH₂-C≡C-C≡CH, -C≡C-C≡C-CH₃, -CH(C≡CH)₂, -C₂H₄-C≡C-C≡CH, -CH₂-C≡C-CH₂-C≡CH, -C≡C-C₂H₄-C≡CH, -CH₂-C≡C-C≡C-CH₃, -C≡C-CH₂-C≡C-CH₃, -C≡C-C≡C-C₂H₅, -C≡C-CH(CH₃)-C≡CH, -CH(CH₃)-C≡C-C≡CH, -CH(C≡CH)-CH₂-C≡CH, -C(C≡CH)₂-CH₃, -CH₂-CH(C≡CH)₂, -CH(C≡CH)-C≡C-CH₃을 의미한다. -C≡CH 및 -C≡C-CH₃가 바람직하다.

[0558] 용어 "C₁₋₆-알콕실"은 "C₁-C₆-알킬-O-"를 의미한다.

[0559] 용어 "C₁₋₁₂-알콕실"은 "C₁-C₁₂-알킬-O-"를 의미한다.

[0560] 용어 "C₁₋₆-아미노알킬"은 "H₂N-C₁-C₆-알킬"을 의미한다.

[0561] 용어 "C₂-C₆-알케닐옥시"는 "C₂-C₆-알케닐-O-"를 의미한다.

[0562] 용어 "C₁₋₆-알킬카르보닐"은 "C₁-C₆-알킬-CO-"를 의미한다. 또한 "아실"로도 언급된다.

[0563] 용어 "C₁₋₁₂-알킬카르보닐"은 "C₁-C₁₂-알킬-CO-"를 의미한다. 또한 "아실"로도 언급된다.

[0564] 용어 "C₁₋₆-알콕시카르보닐"은 "C₁-C₆-알킬-O-CO-"를 의미한다.

[0565] 용어 "C₁₋₁₂-알콕시카르보닐"은 "C₁-C₁₂-알킬-O-CO-"를 의미한다.

[0566] 용어 "C₁-C₆-알카노일옥시"는 "C₁-C₆-알킬-CO-O-"를 의미한다.

[0567] 용어 "C₁₋₆-알킬티오"는 "C₁-C₆-알킬-S-"를 의미한다.

- [0568] 용어 " C_{1-6} -알킬설포닐옥시"는 " C_1-C_6 -알킬-SO₂-O-"를 의미한다.
- [0569] 용어 " C_{1-6} -알킬카르보닐아미노"는 " C_1-C_6 -알킬-CO-NH-"를 의미한다.
- [0570] 용어 " C_{1-6} -알킬아미노"는 " C_1-C_6 -알킬-NH-"를 의미한다.
- [0571] 용어 " $(C_{1-6})_2$ 알킬아미노"는 " $[C_1-C_6\text{-알킬}][C_1-C_6\text{-알킬}N\text{-}]"$ 같은 디알킬아미노기를 의미한다.
- [0572] 용어 " C_{1-6} -알킬아미노카르보닐"은 " C_1-C_6 -알킬-NH-CO-"를 의미한다.
- [0573] 용어 " $(C_{1-6})_2$ 알킬아미노카르보닐"은 " $[C_1-C_6\text{-알킬}][C_1-C_6\text{-알킬}N\text{-CO-}]"$ 같은 디알킬아미노카르보닐기를 의미한다.
- [0574] 용어 "아미노- C_{1-6} -알킬아미노카르보닐"은 " $H_2N-[C_1-C_6\text{-알킬레닐}]\text{-NH-CO-}]"$ 를 의미한다.
- [0575] 용어 " C_{1-6} -알킬-아미노- C_{1-6} -알킬아미노카르보닐"은 " C_{1-6} -알킬-HN-[C_1-C_6 -알킬레닐]-NH-CO-"를 의미한다.
- [0576] 용어 " $(C_{1-6})_2$ 알킬-아미노- C_{1-6} -알킬아미노카르보닐"은 " $[C_1-C_6\text{-알킬}][C_1-C_6\text{-알킬}N\text{-}[C_1-C_6\text{-알킬레닐}]\text{-NH-CO-}]"$ 를 의미한다.
- [0577] 용어 "아릴"은 페닐, 톨루일, 치환된 페닐 및 치환된 톨루일을 의미한다.
- [0578] 용어 "아릴옥시"는 "아릴-O-"를 의미한다.
- [0579] 용어 "아릴카르보닐"은 "아릴-CO-"를 의미한다.
- [0580] 용어 "아릴옥시카르보닐"은 "아릴-O-CO-"를 의미한다.
- [0581] 용어 "헤테로아릴"은 그 중 1 내지 4개가 O, N 및/또는 S로부터 선택되는 4 내지 9개의 고리 원자를 갖는 치환되거나 치환되지 않은 헤테로방향족기를 의미한다. 바람직한 "헤테로아릴"기는 5-원 또는 6-원 방향족 고리 내에 1 또는 2개의 헤테로원자를 갖는다. 단환형 및 이환형 고리 시스템이 포함된다. 전형적인 "헤테로아릴"기는 피리딜, 퓨릴, 티에닐, 피롤릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 이소티아졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 1,3,5-트리아지닐, 1,2,3-트리아졸릴, 1,3,4-티아디아졸릴, 인돌리지닐, 인돌릴, 이소인돌릴, 벤조[b]퓨릴, 벤조[b]티에닐, 인다졸릴, 벤즈이미다졸릴, 벤즈티아졸릴, 퓨리닐, 퀴놀리지닐, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 1,8-나프티리디닐, 테트라하이드로퀴놀릴, 벤조옥사졸릴, 크롬-2-오닐, 인다졸릴 등이다.
- [0582] 용어 "헤테로아릴옥시"는 "헤테로아릴-O-"를 의미한다.
- [0583] 용어 "헤테로아릴카르보닐"은 "헤테로아릴-CO-"를 의미한다.
- [0584] 용어 "헤테로아릴옥시카르보닐"은 "헤테로아릴-O-CO-"를 의미한다.
- [0585] 용어 "치환된"은 하나 이상의 수소 원자가 하나 이상의 하기 치환기: -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-시클로-C₃H₅, -OCH(CH₃)₂, -OCH₂Ph, -F, -Cl, -COCH₃, -COC₂H₅, -COC₃H₇, -CO-시클로-C₃H₅, -COCH(CH₃)₂, -COOH, -CONH₂, -NH₂, -NHCH₃, -NHC₂H₅, -NHC₃H₇, -NH시클로-C₃H₅, -NHCH(CH₃)₂, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -N(C₃H₇)₂, -N(시클로-C₃H₅)₂, -N[CH(CH₃)₂]₂, -SO₃H, -OCF₃, -OC₂F₅, 시클로-C₃H₅, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -CH(CH₃)₂, -CH=CH₂, -CH₂-CH=CH₂, -C≡CH 및/또는 -C≡C-CH₃로 치환되는 기를 의미한다.
- [0586] 일반 구조 (I)이 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 합성하는 모노머 또는 빌딩 블록을 나타내는 경우, 말단기 Y 및 IL'는 서로 독립적으로 수소, 아지도, 할로젠, 시아노, 니트로, 하이드록시, PG-O-, AG-O-, 머캡토, PG-S-, AG-S-, C_{1-6} -알킬티오, 아미노, PG-N(R^H)-, AG-N(R^H)-, 모노(C_{1-6} -알킬)아미노 또는 디(C_{1-6} -알킬)아미노, 선택적으로 치환된 C_{1-6} -알콕시, 선택적으로 치환된 C_{1-6} -알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-6} -알케닐, 선택적으로 치환된 C_{2-6} -알케닐옥시, 선택적으로 치환된 C_{2-6} -알키닐, 선택적으로 치환된 C_{2-6} -알키닐옥시, 모노포스페이트, 모노티오포스페이트, 디포스페이트, 디티오포스페이트, 트리포스페이트, 트리티오포스페이트, 카르복시, 설포노, 하이드록시메틸, PG-O-CH₂-, AG-O-CH₂-, 아미노메틸, PG-N(R^H)-CH₂-, AG-N(R^H)-CH₂-, 카르복시메틸, 설포

포노메틸로부터 선택되고, 여기에서 PG는 -OH, -SH 및 -NH(R^H) 각각에 대한 보호기이고, R^H는 수소 및 C₁₋₆-알킬로부터 선택된다.

[0587] 하이드록시 치환기의 보호기 PG는 4,4'-디메톡시트리틸 (DMT) 등과 같은 치환된 트리틸, 4-모노메톡시트리틸 (MMT), 선택적으로 치환된 9-(9-페닐)크산테닐 (픽실(pixyl)), 선택적으로 치환된 메톡시테트라하이드로피라닐 (mthp), 트리메틸실릴 (TMS), 트리이소프로필실릴 (TIPS), 3차-부틸디메틸실릴 (TBDMS), 트리에틸실릴 및 페닐 디메틸실릴 등과 같은 실릴, 3차-부틸에테르, 아세탈 (2개의 하이드록시기를 포함), 아세틸 또는 할로겐 치환된 아세틸, 예를 들어 클로로아세틸 또는 플루오로아세틸, 이소부티릴, 피발로일, 벤조일 및 치환된 벤조일 등과 같은 아실, 메톡시메틸 (MOM), 2,6-디클로로벤질 (2,6-Cl₂BzI) 등과 같은 벤질에테르 또는 치환된 벤질 에테르를 포함한다. 달리 Y 또는 IL'이 하이드록실인 경우 이들은 선택적으로 링커를 통한 고체 지지체에의 부착에 의해 보호될 수 있다.

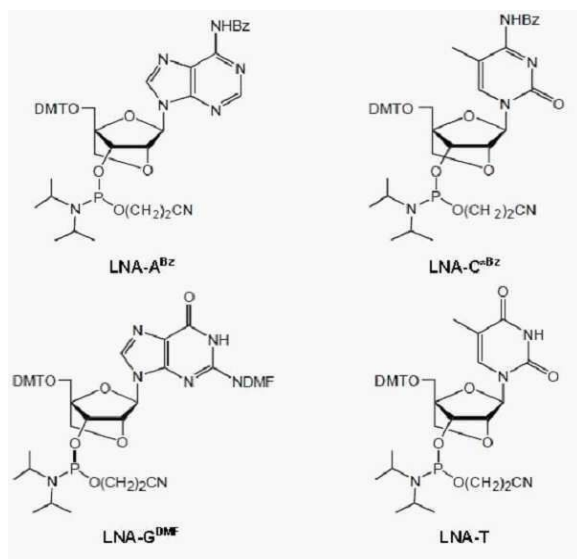
[0588] Y 또는 IL'이 아미노기인 경우, 아미노 보호기의 예시적인 예들은 플루오레닐메톡시카르보닐 (Fmoc), 3차-부틸 옥시카르보닐 (BOC), 트리플루오로아세틸, 알릴옥시카르보닐 (alloc 또는 AOC), 벤질옥시카르보닐(Z 또는 Cbz), 2-클로로벤질옥시카르보닐 (2-CIZ) 등과 같은 치환된 벤질옥시카르보닐, 모노메톡시트리틸 (MMT), 디메톡시트리틸 (DMT), 프탈로일 및 9-(9-페닐)크산테닐 (픽실)이다.

[0589] Act는 -OH, -SH 및 -NH(R^H) 각각에 대한 활성화기를 나타낸다. 이러한 활성화기는, 예를 들어, 선택적으로 치환된 0-포스포르아미다이트, 선택적으로 치환된 0-포스포트리에스테르, 선택적으로 치환된 0-포스포디에스테르, 선택적으로 치환된 H-포스포네이트 및 선택적으로 치환된 0-포스포네이트로부터 선택된다.

[0590] 본 문맥에 있어서, 용어 "포스포르아미다이트"는 식 -P(OR^x)-N(R^y)₂의 기를 의미하고, 여기에서 R^x는 선택적으로 치환된 알킬기, 예를 들어 메틸, 2-시아노에틸 또는 벤질을 나타내고, R^y 각각은 선택적으로 치환된 알킬기, 예를 들어 에틸 또는 이소프로필을 나타내거나, 기 -N(R^y)₂는 몰포리노기 (-N(CH₂CH₂)₂O)를 형성한다. R^x는 바람직하게는 2-시아노에틸을 나타내고 2개의 R^y는 바람직하게는 동일하고 이소프로필을 나타낸다. 따라서, 특히 연관되는 포스포르아미다이트는 N,N-디이소프로필-0-(2-시아노에틸)-포스포르아미다이트이다.

[0591] LNA 모노머 또는 LNA 빌딩 블록

[0592] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드의 합성에서 출발 물질로 사용되는 LNA 모노머 또는 LNA 빌딩 블록은 바람직하게는 하기 일반식의 LNA 뉴클레오타이드이다:



[0593]

[0594] LNA 빌딩 블록은 대개 4개의 서로 다른 핵염기: 아데닌 (A), 구아닌 (G), 5-메틸-시토신 (C^{*}) 및 티민 (T)을 수반하는 LNA 포스포르아미다이트로 제공된다. LNA 단위를 포함하는 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 표준 포스포르아미다이트 화학에 의해 합성된다. LNA 빌딩 블록에 있어서 핵염기는 보호된다. 퓨린 염기의 아미노

기에 대한 바람직한 보호기는 A^{Bz} 로 표시되는 벤조일기 (Bz)이다. 5-메틸피리미딘은 염기의 아미노기에 대한 바람직한 보호기는 C^{*Bz} 로 표시되는 벤조일기 (Bz)이다. 퓨린 염기의 아미노기에 대한 바람직한 보호기는 G^{DMF} , G^{DEF} , G^{DPF} , G^{DBF} 또는 G^{iBu} 로 표시되는 디메틸포름아미딘 (DMF)기, 디에틸포름아미딘 (DEF), 디프로필포름아미딘 (DPF), 디부틸포름아미딘 (DBF) 또는 이소-부틸릴 ($-CO-CH(CH_3)_2$)기이다. 따라서 기 -NDMF는 $-N=CH-N(CH_3)_2$ 를 의미한다. DMT는 4,4'-디메톡시트리틸을 의미한다.

[0595] 따라서, **LNA-T**는 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)-포스포르아미다이트-티미딘 LNA를 의미한다. **LNA-C^{*Bz}**는 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트-4-N-벤조일-5-메틸-2'-시티딘 LNA를 의미한다. **LNA-A^{Bz}**는 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디-이소프로필)포스포르아미다이트-6-N-벤조일-2'-아데노신 LNA를 의미한다. **LNA-G^{DMF}**는 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)-포스포르아미다이트-2-N-디메틸포름아미딘-2'-구아노신 LNA를 의미한다. **LNA-G^{iBu}**는 5'-O-(4,4'-디메톡시-트리틸)-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트-2-N-부틸릴-2'-구아노신 LNA를 의미한다.

[0596] 말단기

[0597] Y가 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5'-말단기를 나타내는 경우, 잔기 Y는 또한 $Y^{5'}$ 로 불리우며: -OH, -O-C₁₋₆-알킬, -S-C₁₋₆-알킬, -O-C₆₋₉-페닐, -O-C₇₋₁₀-벤질, -NH-C₁₋₆-알킬, -N(C₁₋₆-알킬)₂, -O-C₂₋₆-알케닐, -S-C₂₋₆-알케닐, -NH-C₂₋₆-알케닐, -N(C₂₋₆-알케닐)₂, -O-C₂₋₆-알키닐, -S-C₂₋₆-알키닐, -NH-C₂₋₆-알키닐, -N(C₂₋₆-알키닐)₂, -O-C₁₋₆-알킬레닐-O-C₁₋₆-알킬, -O-[C₁₋₆-알킬레닐-O]_m-C₁₋₆-알킬, -O-CO-C₁₋₆-알킬, -O-CO-C₂₋₆-알케닐, -O-CO-C₂₋₆-알키닐, -O-S(O)-C₁₋₆-알킬, -O-SO₂-C₁₋₆-알킬, -O-SO₂-O-C₁₋₆-알킬, -O-P(O)(O⁻)₂, -O-P(O)(O⁻)(O-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(S⁻)₂, -O-P(O)(S-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(S⁻)(O-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O⁻)(NH-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)(NH-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O⁻)[N(C₁₋₆-알킬)₂], -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)[N(C₁₋₆-알킬)₂], -O-P(O)(O⁻)(BH₃⁻), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)(BH₃⁻), -O-P(O)(O⁻)(O-C₁₋₆-알킬레닐-O-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬레닐-O-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(O⁻)(O-C₁₋₆-알킬레닐-S-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬레닐-S-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(O⁻)(OCH₂CH₂O-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(OCH₂CH₂O-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(O⁻)(OCH₂CH₂S-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(OCH₂CH₂S-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH, -O-P(S)(S⁻)OC₃H₆OH를 나타내며, 여기에서 C₁₋₆-알킬, C₂₋₆-알케닐, C₂₋₆-알키닐, -O-C₆₋₉-페닐 또는 -O-C₇₋₁₀-벤질은 추가로 -F, -OH, C₁₋₄-알킬, C₂₋₄-알케닐 및/또는 C₂₋₄-알키닐로 치환될 수 있고 여기에서 m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10으로부터 선택된다.

[0598] -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-시클로-C₃H₅, -OCH(CH₃)₂, -OC(CH₃)₃, -OC₄H₉, -OPh, -OCH₂-Ph, -O-COCH₃, -O-COC₂H₅, -O-COC₃H₇, -O-CO-시클로-C₃H₅, -O-COCH(CH₃)₂, -OCF₃, -O-S(O)CH₃, -O-S(O)C₂H₅, -O-S(O)C₃H₇, -O-S(O)-시클로-C₃H₅, -O-SO₂CH₃, -O-SO₂C₂H₅, -O-SO₂C₃H₇, -O-SO₂-시클로-C₃H₅, -O-SO₂-OCH₃, -O-SO₂-OC₂H₅, -O-SO₂-OC₃H₇, -O-SO₂-O-시클로-C₃H₅, -O(CH₂)_n[(CH₂)_nOH], -O(CH₂)_n[(CH₂)_n-H], -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH이 보다 바람직하고,

[0599] -OCH₃, -OC₂H₅, -OCH₂CH₂OCH₃(또한 MOE로도 알려짐), -OCH₂CH₂-N(CH₃)₂(또한 DMAOE로도 알려짐), -O[(CH₂)_nO]_mCH₃, -O(CH₂)_nOCH₃, -O(CH₂)_nNH₂, -O(CH₂)_nN(CH₃)₂, , -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH이 심지어 보다 바람직하고

[0600] 여기에서 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6으로부터 선택되고;

- [0601] 여기에서 m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10으로부터 선택된다.
- [0602] IL'이 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 3'-말단기를 나타내는 경우, 잔기 IL'은 또한 IL'^{3'}로 불리우며:
- [0603] -OH, -O-C₁₋₆-알킬, -S-C₁₋₆-알킬, -O-C₆₋₉-페닐, -O-C₇₋₁₀-벤질, -NH-C₁₋₆-알킬, -N(C₁₋₆-알킬)₂, -O-C₂₋₆-알케닐, -S-C₂₋₆-알케닐, -NH-C₂₋₆-알케닐, -N(C₂₋₆-알케닐)₂, -O-C₂₋₆-알키닐, -S-C₂₋₆-알키닐, -NH-C₂₋₆-알키닐, -N(C₂₋₆-알키닐)₂, -O-C₁₋₆-알킬레닐-O-C₁₋₆-알킬, -O-[C₁₋₆-알킬레닐-O]_m-C₁₋₆-알킬, -O-CO-C₁₋₆-알킬, -O-CO-C₂₋₆-알케닐, -O-CO-C₂₋₆-알키닐, -O-S(O)-C₁₋₆-알킬, -O-SO₂-C₁₋₆-알킬, -O-SO₂-O-C₁₋₆-알킬, -O-P(O)(O⁻)₂, -O-P(O)(O⁻)(O-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(S⁻)₂, -O-P(O)(S-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(S⁻)(O-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O⁻)(NH-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)(NH-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O⁻)[N(C₁₋₆-알킬)₂], -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)[N(C₁₋₆-알킬)₂], -O-P(O)(O⁻)(BH₃⁻), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)(BH₃⁻), -O-P(O)(O⁻)(O-C₁₋₆-알킬레닐-O-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬레닐-O-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(O⁻)(O-C₁₋₆-알킬레닐-S-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬레닐-S-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(O⁻)(OCH₂CH₂O-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(OCH₂CH₂O-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(O⁻)(OCH₂CH₂S-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(OCH₂CH₂S-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH를 나타내고,
- [0604] 여기에서 C₁₋₆-알킬, C₂₋₆-알케닐, C₂₋₆-알키닐, -O-C₆₋₉-페닐 또는 -O-C₇₋₁₀-벤질은 추가로 -F, -OH, C₁₋₄-알킬, C₂₋₄-알케닐 및/또는 C₂₋₄-알키닐로 치환될 수 있고 여기에서 m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10으로부터 선택된다.
- [0605] -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-시클로-C₃H₅, -OCH(CH₃)₂, -OC(CH₃)₃, -OC₄H₉, -OPh, -OCH₂-Ph, -O-COCH₃, -O-COC₂H₅, -O-COC₃H₇, -O-CO-시클로-C₃H₅, -O-COCH(CH₃)₂, -OCF₃, -O-S(O)CH₃, -O-S(O)C₂H₅, -O-S(O)C₃H₇, -O-S(O)-시클로-C₃H₅, -O-SO₂CH₃, -O-SO₂C₂H₅, -O-SO₂C₃H₇, -O-SO₂-시클로-C₃H₅, -O-SO₂-OCH₃, -O-SO₂-OC₂H₅, -O-SO₂-OC₃H₇, -O-SO₂-O-시클로-C₃H₅, -O(CH₂)_n[(CH₂)_nOH], -O(CH₂)_n[(CH₂)_n-H], -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH가 보다 바람직하고,
- [0606] -OCH₃, -OC₂H₅, -OCH₂CH₂OCH₃(또한 MOE로도 알려짐), -OCH₂CH₂-N(CH₃)₂(또한 DMAOE로도 알려짐), -O[(CH₂)_nO]_mCH₃, -O(CH₂)_nOCH₃, -O(CH₂)_nNH₂, -O(CH₂)_nN(CH₃)₂, -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH가 심지어 보다 바람직하고,
- [0607] 여기에서 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6으로부터 선택되고;
- [0608] 여기에서 m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10으로부터 선택된다.
- [0610] *IL'이 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 3'-말단기를 나타내는 경우, 잔기 IL'은 또한 IL'^{3'}로 불리우며:
- [0611] -OH, -O-C₁₋₆-알킬, -S-C₁₋₆-알킬, -O-C₆₋₉-페닐, -O-C₇₋₁₀-벤질, -NH-C₁₋₆-알킬, -N(C₁₋₆-알킬)₂, -O-C₂₋₆-알케닐, -S-C₂₋₆-알케닐, -NH-C₂₋₆-알케닐, -N(C₂₋₆-알케닐)₂, -O-C₂₋₆-알키닐, -S-C₂₋₆-알키닐, -NH-C₂₋₆-알키닐, -N(C₂₋₆-알키닐)₂, -O-C₁₋₆-알킬레닐-O-C₁₋₆-알킬, -O-[C₁₋₆-알킬레닐-O]_m-C₁₋₆-알킬, -O-CO-C₁₋₆-알킬, -O-CO-C₂₋₆-알케닐, -O-CO-C₂₋₆-알키닐, -O-S(O)-C₁₋₆-알킬, -O-SO₂-C₁₋₆-알킬, -O-SO₂-O-C₁₋₆-알킬, -O-P(O)(O⁻)₂, -O-P(O)(O⁻)(O-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(S⁻)₂, -O-P(O)(S-C₁₋₆-알킬)₂, -O-P(O)(S⁻)(O-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O⁻)(NH-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)(NH-C₁₋₆-알킬), -O-P(O)(O⁻)[N(C₁₋₆-알킬)₂], -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)[N(C₁₋₆-알킬)₂], -O-P(O)(O⁻)(BH₃⁻), -O-P(O)(O-C₁₋₆-알킬)(BH₃⁻), -O-P(O)(O⁻)(O-

C_{1-6} -알킬레닐- O - C_{1-6} -알킬), $-O-P(O)(O-C_{1-6}$ -알킬레닐- O - C_{1-6} -알킬) $_2$, $-O-P(O)(O^-)(O-C_{1-6}$ -알킬레닐- S - C_{1-6} -알킬), $-O-P(O)(O-C_{1-6}$ -알킬레닐- S - C_{1-6} -알킬) $_2$, $-O-P(O)(O^-)(OCH_2CH_2O-C_{1-6}$ -알킬), $-O-P(O)(OCH_2CH_2O-C_{1-6}$ -알킬) $_2$, $-O-P(O)(O^-)(OCH_2CH_2S-C_{1-6}$ -알킬), $-O-P(O)(OCH_2CH_2S-C_{1-6}$ -알킬) $_2$, $-O-P(O)(O^-)OC_3H_6OH$, $-O-P(O)(S^-)OC_3H_6OH$ 를 나타내고,

[0612] 여기에서 C_{1-6} -알킬, C_{2-6} -알케닐, C_{2-6} -알키닐, $-O-C_{6-9}$ -페닐 또는 $-O-C_{7-10}$ -벤질은 추가로 $-F$, $-OH$, C_{1-4} -알킬, C_{2-4} -알케닐 및/또는 C_{2-4} -알키닐로 치환될 수 있고 여기에서 m 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10으로부터 선택된다.

[0613] $-OCH_3$, $-OC_2H_5$, $-OC_3H_7$, $-O$ -시클로- C_3H_5 , $-OCH(CH_3)_2$, $-OC(CH_3)_3$, $-OC_4H_9$, $-OPh$, $-OCH_2-Ph$, $-O-COCH_3$, $-O-COC_2H_5$, $-O-COC_3H_7$, $-O-CO$ -시클로- C_3H_5 , $-O-COCH(CH_3)_2$, $-OCF_3$, $-O-S(O)CH_3$, $-O-S(O)C_2H_5$, $-O-S(O)C_3H_7$, $-O-S(O)$ -시클로- C_3H_5 , $-O-SO_2CH_3$, $-O-SO_2C_2H_5$, $-O-SO_2C_3H_7$, $-O-SO_2$ -시클로- C_3H_5 , $-O-SO_2-OCH_3$, $-O-SO_2-OC_2H_5$, $-O-SO_2-OC_3H_7$, $-O-SO_2$ - O -시클로- C_3H_5 , $-O(CH_2)_nN[(CH_2)_nOH]$, $-O(CH_2)_n[(CH_2)_n-H]$, $-O-P(O)(O^-)OC_3H_6OH$, $-O-P(O)(S^-)OC_3H_6OH$ 가 보다 바람직하고,

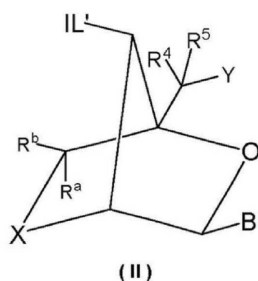
[0614] $-OCH_3$, $-OC_2H_5$, $-OCH_2CH_2OCH_3$ (또한 MOE로도 알려짐), $-OCH_2CH_2-N(CH_3)_2$ (또한 DMAOE로도 알려짐), $-O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $-O(CH_2)_nOCH_3$, $-O(CH_2)_nNH_2$, $-O(CH_2)_nN(CH_3)_2$, $-O-P(O)(O^-)OC_3H_6OH$, $-O-P(O)(S^-)OC_3H_6OH$ 가 심지어 보다 바람직하고,

[0615] 여기에서 n 은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6으로부터 선택되고;

[0616] 여기에서 m 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10으로부터 선택된다.

[0618] *바람직한 LNA

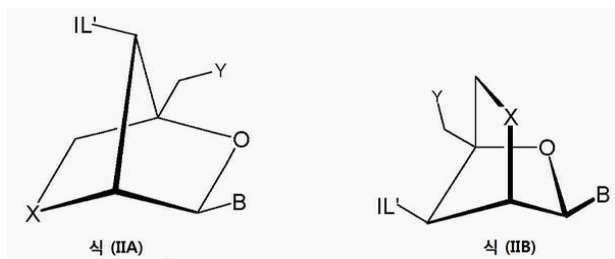
[0619] 바람직한 구체예에 있어서 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드에서 사용되는 LNA 단위는 바람직하게는 일반식 (II)의 구조를 갖는다:



[0620]

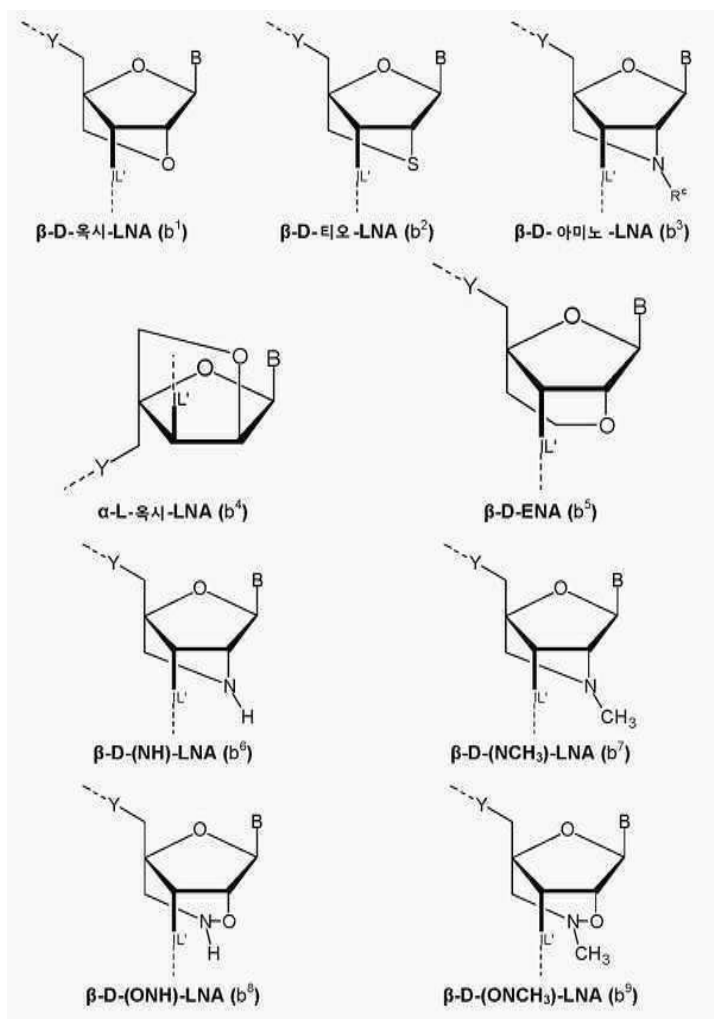
[0621] 성분 $-C(R^aR^b)-X$ 는 바람직하게는 $-C(R^aR^b)-O-$, $-C(R^aR^b)-NR^c-$, $-C(R^aR^b)-S-$ 및 $-C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-O-$ 를 나타내고, 여기에서 치환기 R^a , R^b 및 R^c 는 여기에서 정의되는 바와 같은 의미를 갖고 바람직하게는 C_{1-6} -알킬 보다 바람직하게는 C_{1-4} -알킬이다. 보다 바람직하게는 $-C(R^aR^b)-X$ 는 $-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-NH-$, $-CH_2-N(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-O-$ 또는 $-CH_2-CH_2-S-$, 보다 바람직하게는 $-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-CH_2-O-$ 또는 $-CH_2-CH_2-S-$ 그리고 여전히 보다 바람직하게는 $-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$ 또는 $-CH_2-CH_2-O-$ 그리고 여전히 보다 바람직하게는 $-CH_2-O-$ 또는 $-CH_2-S-$ 그리고 가장 바람직하게는 $-CH_2-O-$ 로부터 선택된다.

[0622] 모든 키랄 중심 및 비대칭 치환기 (만일 존재하는 경우)는 R 또는 S 배향에서 발견될 수 있다. 예를 들어, 2개의 예시적인 입체화학 이성질체는 베타-D 및 알파-L 동형은 다음과 같다:



[0623]

[0624] 바람직한 LNA 단위는 일반식 (b¹) 내지 (b⁹)로부터 선택된다:



[0625]

[0626] 용어 "티오-LNA"는 일반식 (II) 중의 X가 -S- 또는 -CH₂-S-로부터 선택되는 잠금 뉴클레오타이드를 포함한다. 티오-LNA는 베타-D 및 알파-L-배치(configuration) 둘 다에 존재할 수 있다.

[0627]

용어 "아미노-LNA"는 일반식 (II) 중의 X가 -NH-, -N(R)-, -CH₂-NH- 및 -CH₂-N(R)-로부터 선택되고, 여기에서 R 이 수소 및 C₁₋₄-알킬로부터 선택되는 잠금 뉴클레오타이드를 포함한다. 아미노-LNA는 베타-D 및 알파-L-배치 둘 다에 존재할 수 있다.

[0628]

용어 "옥시-LNA"는 일반식 (II) 중의 X가 -O-인 잠금 뉴클레오타이드를 포함한다. 옥시-LNA는 베타-D 및 알파-L-배치 둘 다에 존재할 수 있다.

[0629]

용어 "ENA"는 일반식 (II) 중의 X가 -CH₂-O (여기에서 -CH₂-O의 산소 원자는 염기 B에 대하여 2'-위치에 부착됨)인 잠금 뉴클레오타이드를 포함한다. R^a 및 R^b는 서로 독립적으로 수소 또는 메틸이다.

[0630]

바람직한 예시적인 구체예에서 LNA는 베타-D-옥시-LNA, 알파-L-옥시-LNA, 베타-D-아미노-LNA 및 베타-D-티오-

LNA, 특히 베타-D-옥시-LNA로부터 선택된다.

[0631] 하기 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 여전히 보다 바람직하다 (표 1):

[0632] [표 1]

SP	L	시퀀스 동정 번호	시퀀스 5'-3'
89	17	102a	GCGAGTGACTCACTCAA
90	15	103a	CGAGTGACTCACTCA
90	16	104a	GCGAGTGACTCACTCA
90	17	105a	CGCGAGTGACTCACTCA
91	14	106a	CGAGTGACTCACTC
91	16	107a	CGCGAGTGACTCACTC
91	17	108a	GCGCGAGTGACTCACTC
92	14	109a	GCGAGTGACTCACT
92	16	110a	GCGCGAGTGACTCACT
92	17	111a	CGCGCGAGTGACTCACT
93	12	112a	CGAGTGACTCAC
93	13	113a	GCGAGTGACTCAC
93	14	114a	CGCGAGTGACTCAC
93	16	115a	CGCGCGAGTGACTCAC
93	17	116a	GCGCGCGAGTGACTCAC
94	13	117a	CGCGAGTGACTCA
94	14	118a	GCGCGAGTGACTCA
94	15	119a	CGCGCGAGTGACTCA
94	16	120a	GCGCGCGAGTGACTCA

[0633]

94	17	121a	TGCGCGCGAGTGACTCA
95	14	122a	CGCGCGAGTGACTC
95	16	123a	TGCGCGCGAGTGACTC
95	17	124a	GTGCGCGCGAGTGACTC
96	13	125a	CGCGCGAGTGACT
97	14	126a	TGCGCGCGAGTGAC
97	16	127a	CGTGCGCGCGAGTGAC
98	13	128a	TGCGCGCGAGTGA
107	16	129a	GTCGTCGCTCCGTGCG
108	15	130a	GTCGTCGCTCCGTGC
108	17	131a	GTGTCGTCGCTCCGTGC
109	13	132a	TCGTCGCTCCGTG
109	15	133a	TGTCGTCGCTCCGTG
110	12	134a	TCGTCGCTCCGT
110	13	135a	GTCGTCGCTCCGT
110	14	136a	TGTCGTCGCTCCGT
110	15	137a	GTGTCGTCGCTCCGT
110	16	138a	GGTGTGTCGCTCCGT
351	16	139a	CGTCATAGACCGAGCC
351	12	140a	ATAGACCGAGCC
354	16	141a	GCTCGTCATAGACCGA
354	13	142a	CGTCATAGACCGA
355	14	143a	CTCGTCATAGACCG
355	15	144a	GCTCGTCATAGACCG
356	14	145a	GCTCGTCATAGACC
381	17	146a	CAGCCCCCGACCCATGG
382	16	147a	CAGCCCCCGACCCATG
383	14	148a	AGCCCCCGACCCAT
384	14	149a	CAGCCCCCGACCCA
422	17	150a	CGCGTCCACAGGACGAT
425	14	151a	CGCGTCCACAGGAC
429	15	152a	CGATACGCGTCCACA
431	13	153a	CGATACGCGTCCA
431	16	154a	TGGCGATACGCGTCCA
432	12	155a	CGATACGCGTCC
432	13	156a	GCGATACGCGTCC
432	17	157a	GCTGGCGATACGCGTCC
433	15	158a	CTGGCGATACGCGTC

[0634]

433	12	159a	GCGATACGCGTC
433	16	160a	GCTGGCGATACGCGTC
433	14	161a	TGGCGATACGCGTC
434	13	162a	TGGCGATACGCGT
434	14	163a	CTGGCGATACGCGT
434	12	164a	GGCGATACGCGT
435	13	165a	CTGGCGATACGCG
435	12	166a	TGGCGATACGCG
437	17	167a	ATCGTGCTGGCGATACG
449	16	168a	CGTGCGGTGGGATCGT
449	17	169a	ACGTGCGGTGGGATCGT
450	17	170a	AACGTGCGGTGGGATCG
452	15	171a	AACGTGCGGTGGGAT
452	17	172a	TGAACGTGCGGTGGGAT
459	17	173a	CGACTTCTGAACGTGCG
941	17	174a	TTAACGCGGTAGCAGTA
941	16	175a	TAACGCGGTAGCAGTA
942	17	176a	GTTAACGCGGTAGCAGT
943	15	177a	TTAACGCGGTAGCAG
944	13	178a	TAACGCGGTAGCA
945	12	179a	TAACGCGGTAGC
945	13	180a	TTAACGCGGTAGC
946	12	181a	TTAACGCGGTAG
946	13	182a	GTTAACGCGGTAG
946	15	183a	CGGTTAACGCGGTAG
946	16	184a	CCGGTTAACGCGGTAG
947	14	185a	CGGTTAACGCGGTA
947	13	186a	GGTTAACGCGGTA
947	15	187a	CCGGTTAACGCGGTA
947	16	188a	GCCGGTTAACGCGGTA
947	17	189a	TGCCGGTTAACGCGGTA
948	13	190a	CGGTTAACGCGGT
949	13	191a	CCGGTTAACGCGG
949	14	192a	GCCGGTTAACGCGG
949	15	193a	TGCCGGTTAACGCGG
950	13	194a	GCCGGTTAACGCG
950	15	195a	CTGCCGGTTAACGCG
950	16	196a	GCTGCCGGTTAACGCG

1387	16	197a	ATGCCGCGTCAGGTAC
1392	13	198a	ACATGCCGCGTCA
1393	16	199a	GATGACATGCCGCGTC
1394	12	200a	GACATGCCGCGT
1394	15	201a	GATGACATGCCGCGT
1395	13	202a	ATGACATGCCGCG
1805	17	203a	TCCCGCACCTTGGAACC
1851	16	204a	CGATCTCTCAACACGT
1851	17	205a	TCGATCTCTCAACACGT
1852	15	206a	CGATCTCTCAACACG
1852	16	207a	TCGATCTCTCAACACG
1852	17	208a	CTCGATCTCTCAACACG
2064	16	209a	GTAGTGTTAGGGAGC
2072	16	210a	GCTATTTGGTAGTGT
2284	15	211a	AGCTTATCCTATGAC
2285	14	212a	AGCTTATCCTATGA
2355	17	213a	CAGGCATTAATAAAGTG
4120	16	214a	CTAGGCGCCTCTATGC
4121	14	215a	TAGGCGCCTCTATG
4121	15	216a	CTAGGCGCCTCTATG
4122	13	217a	TAGGCGCCTCTAT
4217	16	218a	CATGAATGGACCAGTA

SP: 시퀀스 동정 번호 2의 출발 위치 또는 출발 뉴클레오티드
N: 시퀀스의 길이

표 1 내지 3의 안티센스-올리고뉴클레오티드 등과 같은 여기에 기술된 바와 같은 안티센스-올리고뉴클레오티드

및 특히 표 4 내지 9의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드, 바람직하게는 DNA 뉴클레오타이드로 이루어지고, 이는 LNA 단위 (또한 여기에서 LNA 뉴클레오타이드라고도 칭함)와 마찬가지로 비-LNA 단위 (또한 여기에서 비-LNA 뉴클레오타이드라고도 칭함)이다.

[0638] 비록 명백하게 표시되지 않았음에도 불구하고, 표 1의 시퀀스 동정 번호 102a 내지 218a 시퀀스들의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 2 내지 4개의 LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위) 그리고 5' 말단에 2 내지 4개의 LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위)를 포함한다. 비록 명백하게 표시되지 않았음에도 불구하고, LNA 단위를 의미하는 표 2 중의 "C"는 바람직하게는 핵염기로서 5-메틸시토신 (C^{*})을 포함한다.

[0640] *명백하게 표시되지 않는 한, 이는 본 발명의 또는 여기에서 문자 코드 A, C, G, T 및 U로 표시되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 여기에서 기술되는 바와 같은 임의의 뉴클레오타이드간 연결, 임의의 말단기 및 임의의 핵염기를 포함할 수 있다. 게다가 본 발명의 또는 여기에서 기술되는 바와 같은 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에서의 적어도 하나의 LNA 단위 및 5' 말단에서의 적어도 하나의 LNA 단위를 수반하는 여기에서 기술되는 바와 같은 임의의 핵염기 구조의 핵염기이다. 게다가 여기에서 기술되는 바와 같은 임의의 LNA 단위는 본 발명의 또는 여기에서 기술되는 바와 같은 안티센스-올리고뉴클레오타이드 내에서 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 안티센스-올리고뉴클레오타이드 GCTCGTCATAGACCGA (시퀀스 동정 번호 13) 또는 CGATACGCGTCCACAG (시퀀스 동정 번호 14) 또는 GTAGTGTTTAGGGAGC (시퀀스 동정 번호 15) 또는 GCTATTTGGTAGTGTT (시퀀스 동정 번호 16) 또는 CATGAATGGACAGTA (시퀀스 동정 번호 17) 또는 AGGCATTAATAAAGTG (시퀀스 동정 번호 18)는 여기에서 기술되는 바와 같은 5' 말단에 적어도 하나의 LNA 단위 및 3' 말단에 적어도 하나의 LNA 단위, 임의의 핵염기, 임의의 3' 말단기, 임의의 5' 말단기, 임의의 핵염기 구조 및 임의의 뉴클레오타이드간 연결을 포함하고 또한 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체를 커버한다.

[0641] LNA 단위의 사용은 3' 말단 및 5' 말단에서 특히 바람직하다. 따라서 특별히 여기에서 기술되고 특히 표 1의 시퀀스 동정 번호 102a 내지 218a의 시퀀스의 3' 말단에 마지막 1 내지 5개의 뉴클레오타이드 및 또한 5' 말단에 마지막 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 단위 (또한 LNA 뉴클레오타이드라고도 함)인 한편으로 3' 및 5'에의 1 내지 5개의 LNA 단위 사이에 바람직하게는 3 내지 12개, 보다 바람직하게는 4 내지 10개, 보다 바람직하게는 5 내지 9개, 여전히 보다 바람직하게는 6 내지 8개의 비-LNA 단위 (또한 비-LNA 뉴클레오타이드라고도 함)가 존재하는 것이 바람직하다. 이러한 종류의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 핵염기라 불리우고 이하에서 보다 상세하게 기술된다. 3' 말단에서의 2 내지 5개의 LNA 뉴클레오타이드 및 5' 말단에서의 2 내지 5개의 LNA 뉴클레오타이드 또는 3' 말단에서의 1 내지 4개의 LNA 뉴클레오타이드 및 5' 말단에서의 1 내지 4개의 LNA 뉴클레오타이드가 보다 바람직하고 3' 및 5' 말단에서의 LNA 단위들 간에 바람직하게는 4 내지 10개, 보다 바람직하게는 5 내지 9개, 여전히 보다 바람직하게는 6 내지 8개의 비-LNA 단위를 수반하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 2 내지 4개의 LNA 뉴클레오타이드 및 5' 말단에 2 내지 4개의 LNA 뉴클레오타이드가 여전히 보다 바람직하다.

[0642] 게다가 LNA 단위 간 및 LNA 단위와 비-LNA 단위 간의 뉴클레오타이드간 연결로서, 포스포로티오에이트 또는 포스포디티오에이트 바람직하게는 포스포로티오에이트의 사용이 바람직하다.

[0643] 따라서 뉴클레오타이드간 연결의 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 여전히 보다 바람직하게는 80% 이상 그리고 가장 바람직하게는 90% 이상이 포스포로티오에이트 또는 포스페이트이고 보다 바람직하게는 포스포로티오에이트 연결이고, 3' 말단에서의 마지막 1 내지 4개 또는 2 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 단위이고 5' 말단에서의 마지막 1 내지 4개 또는 2 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 단위이고 여기에서 6 내지 14개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 7 내지 12개, 바람직하게는 8 내지 11개, 보다 바람직하게는 8 내지 10개의 시퀀스의 말단에서의 LNA 단위들 사이에 비-LNA 단위, 바람직하게는 DNA 단위가 존재하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 더 바람직하다. 게다가 핵염기의 형태의 이러한 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 12 내지 20개, 바람직하게는 12 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 것이 바람직하다.

[0644] **핵염기**

[0645] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 비-LNA 단위와 마찬가지로 LNA 뉴클레오타이드인 두 DNA 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 시퀀스로 이루어질 수 있고, 핵염기의 형태로 배열될 수 있다.

[0646] 따라서, 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 핵염기이다. 핵염기는 잠금되지 않은, 따라서 비-LNA 단위인 DNA 뉴클레오타이드의 중간부(middle part)로 이루어진다. 이러한 중간부의 DNA 뉴클레오타이드는 바람직하게는 포스페이트기, 포스포로티오에이트기 또는 포스포로디티오에이트기일 수 있고 5-프로피닐시토신, 7-메틸구아닌, 7-메틸아데닌, 2-아미노아데닌, 2-티오티민, 2-티오시토신 또는 5-메틸시토신 등과 같은 핵염기 유

사체를 포함할 수 있는, 여기에서 기술되는 바와 같은 뉴클레오타이드간 연결 (IL)로 연결될 수 있다. 그 DNA 단위 또는 DNA 뉴클레오타이드는 이환형 펜토오스 구조가 아니다. 비-LNA 단위의 중간부는 3' 말단 및 5' 말단에서 LNA 단위로 이루어지는 시퀀스로 덧대어진다. 따라서 겹량체는 일반식:

[0647] LNA 시퀀스 1 - 비-LNA 시퀀스 - LNA 시퀀스 2

[0648] 또는

[0649] 영역 A - 영역 B - 영역 C

[0650] 를 갖는다.

[0651] 상보성 표적 RNA와 듀플렉스로 형성되는 경우, 비-LNA 단위인 DNA 뉴클레오타이드로 이루어지는 안티센스-올리고 뉴클레오타이드의 중간부는 RNase를 모집할 수 있다. 3' 및 5' 말단 뉴클레오타이드 단위는 바람직하게는 알파-L 배열, 특히 바람직하게는 베타-D-옥시-LNA 및 알파-L-옥시 LNA인 LNA 단위이다.

[0652] 따라서, 겹량체는 여기에서 중간부 또는 영역 B로 언급되는 비-LNA 단위인 적어도 6 또는 7개의 DNA 뉴클레오타이드의 영역 등과 같은 RNase H 등과 같은 RNase를 모집할 수 있는 DNA 뉴클레오타이드의 인접하는 스트레치 (contiguous stretch)를 포함하고, 여기에서 B가 RNase를 모집할 수 있는 DNA 뉴클레오타이드의 인접하는 스트레치에 1 내지 6개의 LNA 단위 5' 및 3' 등과 같은 5' 및 3' 둘 다에 LNA 단위인 친화성 항상 뉴클레오타이드 유사체로 덧대어지는 안티센스-올리고뉴클레오타이드이고 이들 덧대어지는 영역(flanking region)은 각각 영역 A 및 C로 언급된다.

[0653] 바람직하게는 겹량체는 식 (5'에서 3'), A-B-C 또는 선택적으로 A-B-C-D 또는 D-A-B-C의 (폴리)뉴클레오타이드 시퀀스를 포함하고, 여기에서; 영역 A (5' 영역)는 1 내지 6개이 LNA 단위 등과 같은 적어도 하나의 LNA 단위 등과 같은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체로 이루어지고, 영역 B는 비-LNA 단위이고 RNase를 모집할 수 있는 (mRNA 표적 등과 같은 상보성 RNA 분자와 듀플렉스를 형성하는 경우) 적어도 5개의 연속적인 DNA 뉴클레오타이드로 이루어지고, 영역 C (3' 영역)는 1 내지 6개의 LNA 단위 등과 같은 적어도 하나의 LNA 등과 같은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체로 이루어지고, 영역 D는 존재하는 경우 비-LNA 단위인 1, 2 또는 3개의 DNA 뉴클레오타이드로 이루어진다.

[0654] 일부 구체예에 있어서, 영역 A는 3 또는 4개의 LNA 단위 등과 같은 2 내지 5개의 LNA 단위 등과 같은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 LNA 단위로 이루어지고/이루어지거나 영역 C는 3 또는 4개의 LNA 단위 등과 같은 2 내지 5개의 LNA 단위 등과 같은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 LNA 단위로 이루어진다.

[0655] 일부 구체예에 있어서 B는 RNase를 모집할 수 있는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 연속적인 DNA 뉴클레오타이드 또는 RNase를 모집할 수 있는 8개 등과 같은 6 내지 10개 또는 7 내지 9개의 연속적인 뉴클레오타이드로 이루어진다. 일부 구체예에 있어서 영역 B는 비-LNA 단위인 1 내지 12개의 DNA 뉴클레오타이드 단위, 바람직하게는 4 내지 12개의 DNA 뉴클레오타이드 단위, 보다 바람직하게는 6 내지 10개의 DNA 뉴클레오타이드 단위, 여전히 보다 바람직하게는 7 내지 10개의 DNA 뉴클레오타이드 단위 등과 같은, 그리고 가장 바람직하게는 8, 9 또는 10개의 DNA 뉴클레오타이드 단위 등과 같은 적어도 하나의 DNA 뉴클레오타이드 단위로 이루어진다.

[0656] 일부 구체예에 있어서 영역 A는 3 또는 4개의 LNA로 이루어지고, 영역 B는 7, 8, 9 또는 10개의 DNA 뉴클레오타이드 단위로 이루어지고, 영역 C는 3 또는 4개의 LNA 단위로 이루어진다. 이러한 디자인은 (A-B-C): 1-7-2, 2-7-1, 2-7-2, 3-7-1, 3-7-2, 1-7-3, 2-7-3, 3-7-3, 2-7-4, 3-7-4, 4-7-2, 4-7-3, 4-7-4, 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 1-8-3, 3-8-1, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 3-9-3, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1, 2-10-2, 2-10-3, 3-10-2, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 1-11-1, 1-11-2, 2-11-1, 2-11-2, 1-11-3, 3-11-1, 2-11-2, 2-11-3, 3-11-2, 3-11-3, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3, 4-11-4를 포함하고, 추가로 영역 D를 포함할 수 있고, 이는 하나 또는 2개의 DNA 뉴클레오타이드 단위를 가질 수 있고, 이는 비-LNA 단위이다.

[0657] 추가로 겹량체 디자인은 WO2004/046160A에 기술되고 여기에 참조로 포함된다. 여기에 참조로 포함되는 미국 가 특허출원 60/977409는 '쇼트머(shortmer)'를 언급하고 있으며, 이는 또한 본 발명에 대하여 적절하다.

[0658] 일부 구체예에 있어서 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 총 10, 11, 12, 13 또는 14개의 뉴클레오타이드 단위 (LNA 단위 및 비-LNA 단위 함께)의 인접하는 뉴클레오타이드 시퀀스로 이루어지고, 여기에서 인접하는 뉴클레오타이드 시퀀스는 식 (5'- 3'), A-B-C 또는 선택적으로 A-B-C-D 또는 D-A-B-C이고, 여기에서 A는 1, 2 또는 3 LNA 단위

로 이루어지고, B는 비-LNA 단위이고 상보성 RNA 분자와 듀플렉스를 형성하는 경우 RNase를 모집할 수 있는 (mRNA 표적 등과 같은), 7, 8 또는 9개의 인접하는 DNA 뉴클레오타이드 단위로 이루어지고, C는 1, 2 또는 3개의 LNA 단위로 이루어진다. 존재하는 경우, D는 비-LNA 단위인 단일 DNA 뉴클레오타이드 단위로 이루어진다.

[0659] 일부 구체예에 있어서 A는 1개의 LNA 단위로 이루어진다. 일부 구체예에 있어서 A는 2개의 LNA 단위로 이루어진다. 일부 구체예에 있어서 A는 3개의 LNA 단위로 이루어진다. 일부 구체예에 있어서 C는 1개의 LNA 단위로 이루어진다. 일부 구체예에 있어서 C는 2개의 LNA 단위로 이루어진다. 일부 구체예에 있어서 C는 3개의 LNA 단위로 이루어진다. 일부 구체예에 있어서 B는 비-LNA 단위인 7개의 DNA 뉴클레오타이드 단위로 이루어진다. 일부 구체예에 있어서 B는 8개의 DNA 뉴클레오타이드 단위로 이루어진다. 일부 구체예에 있어서 B는 9개의 DNA 뉴클레오타이드 단위로 이루어진다. 일부 구체예에 있어서 B는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 DNA 뉴클레오타이드 단위 등과 같은 1 내지 9개의 DNA 뉴클레오타이드 단위로 이루어진다. DNA 뉴클레오타이드 단위는 항상 비-LNA 단위이다. 일부 구체예에 있어서 B는 바람직하게는 알파-L 배열이고 보다 바람직하게는 알파-L-옥시 LNA 단위인 1, 2 또는 3개의 LNA 단위를 포함한다. 일부 구체예에 있어서 A-B-C 중에 존재하는 뉴클레오타이드의 수는 (LNA 단위 - 영역 B - LNA 단위 보다 바람직하게는 알파-L-옥시 LNA 단위 (영역 A) - 영역 B - (영역 C) 알파-L-옥시 LNA 단위): 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 1-8-3, 3-8-1, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 3-9-3, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1, 2-10-2, 2-10-3, 3-10-2, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 1-11-1, 1-11-2, 2-11-1, 2-11-2, 1-11-3, 3-11-1, 2-11-2, 2-11-3, 3-11-2, 3-11-3, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3, 4-11-4로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 보다 바람직한 구체예에 있어서 A-B-C 중의 뉴클레오타이드의 수는: 3-8-3, 4-8-2, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3로 이루어지는 군으로부터 선택되고 여전히 보다 바람직하게는: 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 3-11-4 및 4-11-3이다.

[0660] 특히 껍질체 영역 B에 대하여 포스포로티오에이트, 포스페이트 또는 포스포로디티오에이트 및 특히 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결이 또한 바람직하다. 포스포로티오에이트, 포스페이트 또는 포스포로디티오에이트 연결 및 특히 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결은 또한 영역 (A 및 C 그리고 만일 존재하는 경우, D)에의 A 또는 C 및 D 내에서의 연결을 위하여)을 덧대는 데에 대하여 사용될 수 있다.

[0661] 그러나 영역 A, B 및 C는 예를 들어 뉴클레오타이드 유사체의 사용이 영역 A 및 C가 LNA 단위로 이루어지는 경우 등과 같은 특히 엔도-뉴클레아제 분해(endo-nuclease degradation)로부터 영역 A 및 C 내의 뉴클레오타이드간 연결을 보호하는 경우에 포스포디에스테르 연결 등과 같은 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 이외의 뉴클레오타이드간 연결을 포함할 수 있다.

[0662] 안티센스-올리고뉴클레오타이드 내의 뉴클레오타이드간 연결은 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 또는 보라노포스페이트이어서 표적화된 RNA의 RNase H 개열을 허용하도록 할 수 있다. 개선된 뉴클레아제 저항성 및 제조의 용이성 등과 같은 다른 이유로 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트가 바람직하다. 본 발명의 올리고머의 하나의 양태에 있어서, LNA 단위 및/또는 비-LNA 단위는 포스포로티오에이트기의 수단에 의하여 서로 연결된다.

[0663] 특히 LNA 단위 사이 또는 그에 인접하여 (전형적으로 영역 A 및 또는 C) 달리 포스포로티오에이트 안티센스-올리고뉴클레오타이드 내로의 하나 또는 2개의 연결 등과 같은 포스포디에스테르 연결의 내포(inclusion)는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 생물학적 이용가능성(bioavailability) 및/또는 생체-분배(bio-distribution)를 변형시킬 수 있다 (여기에 참조로 포함되는 W02008/053314A를 참조하시오).

[0664] 일부 구체예에 있어서, 여기에서 기술되고 적절하고 특별히 표시되지 않은 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 시퀀스에서와 같이 모든 잔류하는 뉴클레오타이드간 연결기는 포스포디에스테르기 또는 포스포로티오에이트기 또는 이들의 혼합물이다.

[0665] 일부 구체예에 있어서 모든 뉴클레오타이드간 연결기는 포스포로티오에이트기이다. 여기에서 제공되는 것 등과 같은 특정한 껍질체 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 언급하는 경우, 여러 구체예에 있어서, 연결이 포스포로티오에이트 연결인 경우, 여기에서 기술되는 것 등과 같은 대안의 연결이 사용될 수 있고, 예를 들어 특히 LNA 단위 등과 같은 뉴클레오타이드 유사체 간의 연결을 위하여 포스페이트 (또한 포스포디에스테르라고도 칭함) 연결이 사용될 수 있다. 유사하게, 여기에서 제공되는 것 등과 같은 특정한 껍질체 안티센스-올리고뉴클레오타이드 시퀀스를 언급하는 경우, C 잔기가 5'-메틸 변형 시토신으로 주해되는 경우, 여러 구체예에 있어서, 올리고머 내에 존

재하는 하나 이상의 Cs가 미변성된 C 잔기일 수 있다.

[0666] **범례**

[0667] 여기에서 사용되는 바와 같이 약어 b, d, s, ss는 하기 의미를 갖는다:

[0668] b LNA 단위 또는 LNA 뉴클레오타이드 (b^1 내지 b^7 로부터 선택되는 임의의 하나)

[0669] b^1 β -D-옥시-LNA

[0670] b^2 β -D-티오-LNA

[0671] b^3 β -D-아미노-LNA

[0672] b^4 α -L-옥시-LNA

[0673] b^5 β -D-ENA

[0674] b^6 β -D-(NH)-LNA

[0675] b^7 β -D-(NCH₃)-LNA

[0676] d 2-디옥시, 이는 2-디옥시리보오스 단위 (예를 들어 R = H를 수반하는 식 **B3** 또는 **B5**)

[0677] C^{*} 메틸-C (5-메틸시토신); [따라서 dC^{*}는 5-메틸-2'-디옥시시티딘임]

[0678] A^{*} 2-아미노아데닌 [따라서 dA^{*}는 2-아미노-2'-디옥시아데노신임]

[0679] s 뉴클레오타이드간 연결이 포스포로티오에이트기 (-O-P(O)(S⁻)-O-)임

[0680] ss 뉴클레오타이드간 연결이 포스포로디티오에이트기 (-O-P(S)(S⁻)-O-)임

[0681] /5SpC3/ 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5'-말단기에서의 -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH

[0682] /3SpC3/ 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 3'-말단기에서의 -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH

[0683] /5SpC3s/ 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5'-말단기에서의 -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH

[0684] /3SpC3s/ 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 3'-말단기에서의 -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH

[0685] **짧은 글씨체**의 뉴클레오타이드는 LNA 뉴클레오타이드임

[0686] 짧은 글씨체가 아닌 뉴클레오타이드는 비-LNA 뉴클레오타이드임

[0687] **캡랑체 시퀀스**

[0688] [표 2]

SP	L	시퀀스 동정 번호	시퀀스, 5'-3'
89	17	102b	GbsCbsGbsAbsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsdCsTbsCbsAbsAb
90	15	103b	CbsGbsAbsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsdCsTbsCbsAb
90	16	104b	GbsCbsGbsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsdCsTbsCbsAb
90	17	105b	CbsGbsCbsGbsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsCbsTbsCbsAb
91	14	106b	CbsGbsAbsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsCbsTbsCb
91	16	107b	CbsGbsCbsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsCbsTbsCb
91	17	108b	GbsCbsGbsCbsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsAbsCbsTbsCb
92	14	109b	GbsCbsGbsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsAbsCbsTb
92	16	110b	GbsCbsGbsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsAbsCbsTb
92	17	111b	CbsGbsCbsGbsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsCbsAbsCbsTb

[0689]

93	12	112b	CbsGbsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsAbsCb
93	13	113b	GbsCbsGbsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsAbsCb
93	14	114b	CbsGbsCbsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsCbsAbsCb
93	16	115b	CbsGbsCbsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsCbsAbsCb
93	17	116b	GbsCbsGbsCbsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsTbsCbsAbsCb
94	13	117b	CbsGbsCbsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsCbsAb
94	14	118b	GbsCbsGbsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsTbsCbsAb
94	15	119b	CbsGbsCbsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsTbsCbsAb
94	16	120b	GbsCbsGbsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsTbsCbsAb
94	17	121b	TbsGbsCbsGbsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsCbsTbsCbsAb
95	14	122b	CbsGbsCbsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsCbsTbsCb
95	16	123b	TbsGbsCbsdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsCbsTbsCb
95	17	124b	GbsTbsGbsCbsdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsAbsCbsTbsCb
96	13	125b	CbsGbsCbsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsCbsTb
97	14	126b	TbsGbsCbsdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsGbsAbsCb
97	16	127b	CbsGbsTbsdGsdCsdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsGbsAbsCb
98	13	128b	TbsGbsCbsdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsGbsAb
107	16	129b	GbsTbsCbsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsdGsdTsGbsCbsGb
108	15	130b	GbsTbsCbsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsdGsTbsGbsCb
108	17	131b	GbsTbsGbsTbsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsGbsTbsGbsCb
109	13	132b	TbsCbsGbsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsdGsTbsGb
109	15	133b	TbsGbsTbsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsGbsTbsGb
110	12	134b	TbsCbsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsGbsTb
110	13	135b	GbsTbsCbsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsGbsTb
110	14	136b	TbsGbsTbsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsCbsGbsTb
110	15	137b	GbsTbsGbsdTsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsCbsGbsTb
110	16	138b	GbsGbsTbsdGsdTsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsCbsGbsTb
351	16	139b	CbsGbsTbsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsdGsdAsGbsCbsCb
351	12	140b	AbsTbsdAsdGsdAsdCsdCsdGsdAsdGsCbsCb
354	16	141b	GbsCbsTbsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsCbsGbsAb
354	13	142b	CbsGbsTbsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsGbsAb
355	14	143b	CbsTbsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsCbsCbsGb
355	14	143c	CbsTbsCbsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsCbsGb
355	14	143d	CbsTbsCbsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsCbsCbsGb
355	15	144b	GbsCbsTbsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsCbsCbsGb
356	14	145b	GbsCbsTbsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsAbsCbsCb
381	17	146b	CbsAbsGbsCbsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAbsTbsGbsGb
382	16	147b	CbsAbsGbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAbsTbsGb

[0690]

382	16	147c	CbsAbsGbsdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAsTsG
382	16	147d	CbsAbsGbsdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsCbsAbsTbsGb
382	16	147e	CbsAbsGbsCbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAbsTbsGb
382	16	147f	CbsAbsGbsCbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsCbsAbsTbsGb
383	14	148b	AbsGbsdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsCbsAbsTb
383	14	148c	AbsGbsCbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAbsTb
383	14	148d	AbsGbsCbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsCbsAbsTb
384	14	149	CbsAbsGbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsCbsCbsAb
422	17	150b	CbsGbsCbsGbsdTsdcCsdCsdAsdCsdAsdGsdGsdAsCbsGbsAbsTb
425	14	151b	CbsGbsCbsdGsdTsdcCsdCsdAsdCsdAsdGsGbsAbsCb
429	15	152b	CbsGbsAbsdTsdcCsdCsdGsdCsdGsdTsdcCsdCsAbsCbsAb
429	15	152c	CbsGbsAbsdTsdcCsdCsdGsdCsdGsdTsdcCsCbsAbsCbsAb
429	15	152d	CbsGbsAbsTbsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdcCsdCsAbsCbsAb
432	12	155b	CbsGbsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsdGsdTsCbsCb
431	13	153b	CbsGbsAbsdTsdcCsdCsdGsdCsdGsdTsdcCsCbsAb
431	13	153c	CbsGbsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsdGsdTsCbsCbsAb
431	16	154b	TbsGbsGbsdCsdGsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsdGsdTsCbsCbsAb
432	12	155c	CbsGbsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsdGsdTsCsCb
432	12	155d	CbsdGsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsdGsdTsCbsCb
432	13	156b	GbsCbsGbsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsdGsdTsCbsCb
432	17	157b	GbsCbsTbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsGbsTbsCbsCb
433	15	158b	CbsTbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsGbsTbsCb
433	12	159b	GbsCbsdGsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsdGsTbsCb
433	16	160b	GbsCbsTbsdGsdGsdCsdGsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsGbsTbsCb
433	14	161b	TbsGbsGbsdCsdGsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsGbsTbsCb
434	12	164b	GbsGbsdCsdGsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsGbsTb
434	13	162b	TbsGbsGbsdCsdGsdAsdTsdcCsdCsdGsdCsGbsTb
434	13	162c	TbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdcCsdGsCbsGbsTb
434	14	163b	CbsTbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdcCsdGsCbsGbsTb
435	13	165b	CbsTbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdcCsdGsCbsGb
435	12	166b	TbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdcCsdGsCbsGb
437	17	167b	AbsTbsCbsGbsdTsdcGsdCsdTsdcGsdGsdCsdGsdAsTbsAbsCbsGb
449	16	168b	CbsGbsTbsdGsdCsdGsdGsdTsdcGsdGsdGsdAsTsCbsGbsTb
449	17	169b	AbsCbsGbsTbsdGsdCsdGsdGsdTsdcGsdGsdGsdAsTbsCbsGbsTb
450	17	170b	AbsAbsCbsGbsdTsdcGsdCsdGsdGsdTsdcGsdGsdGsAbsTbsCbsGb
452	15	171b	AbsAbsCbsdGsdTsdcGsdCsdGsdGsdTsdcGsdGsGbsAbsTb
452	17	172b	TbsGbsAbsAbsdCsdGsdTsdcGsdCsdGsdGsdTsdcGsGbsGbsAbsTb
459	17	173b	CbsGbsAbsCbsdTsdcCsdTsdcGsdAsdAsdCsdGsTbsGbsCbsGb

[0691]

941	17	174b	TbsTbsAbsAbsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsdCsAbsGbsTbsAb
941	16	175b	TbsAbsAbsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsdCsdAsGbsTbsAb
942	17	176b	GbsTbsTbsAbsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsCbsAbsGbsTb
943	15	177b	TbsTbsAbsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsCbsAbsGb
944	13	178b	TbsAbsAbsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsCbsAb
945	12	179b	TbsAbsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsGbsCb
945	13	180b	TbsTbsAbsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsGbsCb
946	12	181b	TbsTbsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsAbsGb
946	13	182b	GbsTbsTbsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsAbsGb
946	15	183b	CbsGbsGbsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsTbsAbsGb
946	16	184b	CbsCbsGbsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsTbsAbsGb
947	14	185b	CbsGbsGbsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsGbsTbsAb
947	13	186b	GbsGbsTbsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsTbsAb
947	15	187b	CbsCbsGbsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsGbsTbsAb
947	16	188b	GbsCbsCbsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsGbsTbsAb
947	17	189b	TbsGbsCbsCbsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsGbsGbsTbsAb
948	13	190b	CbsGbsGbsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsGbsTb
949	13	191b	CbsCbsGbsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsGbsGb
949	14	192b	GbsCbsCbsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsCbsGbsGb
949	15	193b	TbsGbsCbsdCsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsCbsGbsGb
950	13	194b	GbsCbsCbsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsCbsGb
950	15	195b	CbsTbsGbsdCsdCsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsGbsCbsGb
950	16	196b	GbsCbsTbsdGsdCsdCsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsGbsCbsGb
1387	16	197b	AbsTbsGbsdCsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdAsdGsdGsTbsAbsCb
1392	13	198b	AbsCbsAbsdTsdGsdCsdCsdGsdCsdGsdTsCbsAb
1393	16	199b	GbsAbsTbsdGsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsdCsGbsTbsCb
1393	16	199c	GbsAbsTbsdGsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsCbsGbsTbsCb
1393	16	199d	GbsAbsTbsGbsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsdCsGbsTbsCb
1393	16	199e	GbsAbsTbsGbsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsCbsGbsTbsCb
1394	12	200b	GbsAbsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsdCsGbsTb
1394	15	201b	GbsAbsTbsdGsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsCbsGbsTb
1395	13	202b	AbsTbsGbsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsCbsGb
1805	17	203b	TbsCbsCbsCbsdGsdCsdAsdCsdCsdTsdTsdGsdGsAbsAbsCbsCb
1851	16	204b	CbsGbsAbsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCsdAsCbsGbsTb
1851	17	205b	TbsCbsGbsAbsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCsAbsCbsGbsTb
1852	15	206b	CbsGbsAbsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCsAbsCbsGb
1852	16	207b	TbsCbsGbsdAsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCsAbsCbsGb
1852	17	208b	CbsTbsCbsGbsdAsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsCbsAbsCbsGb

[0692]

2064	16	209b	GbsTbsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsCb
2064	16	209c	GbsTbsAbsGbsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsCb
2064	16	209d	GbsTbsAbsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsCb
2064	16	209e	GbsTbsAbsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsCb
2064	16	209f	GbsTbsAbsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGbsAbsGbsCb
2064	16	209g	GbsTbsAbsGbsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGbsAbsGbsCb
2064	16	209h	GbsTbsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsCb
2064	16	209i	GbsTbsAbsGbsTbsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGbsAbsGbsCb
2064	16	209j	GbsTbsAbsGbsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsGbsGbsAbsGbsCb
2064	16	209k	GbsTbsAbsGbsTbsdGsdTsdTsdTsdAsdGsGbsGbsAbsGbsCb
2072	16	210b	GbsCbsdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGbsTbsTb
2072	16	210c	GbsCbsTbsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGbsTbsTb
2072	16	210d	GbsCbsTbsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGbsTbsTb
2072	16	210e	GbsCbsTbsAbsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGbsTbsTb
2072	16	210f	GbsCbsTbsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsTbsGbsTbsTb
2072	16	210g	GbsCbsTbsAbsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsTbsGbsTbsTb
2284	15	211b	AbsGbsCbsdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsdTsGbsAbsCb
2284	15	211c	AbsGbsCbsdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsTbsGbsAbsCb
2284	15	211d	AbsGbsCbsTbsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsdTsGbsAbsCb
2285	14	212b	AbsGbsdCsdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsTbsGbsAb
2285	14	212c	AbsGbsCbsdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsdTsGbsAb
2285	14	212d	AbsGbsCbsdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsTbsGbsAb
2355	17	213b	CbsAbsGbsdGsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsGbsTbsGb
2355	17	213c	CbsAbsGbsGbsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsGbsTbsGb
2355	17	213d	CbsAbsGbsdGsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsAbsGbsTbsGb
2355	17	213e	CbsAbsGbsGbsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsAbsGbsTbsGb
4217	16	218d	CbsAbsTbsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGbsTbsAb
4217	16	218e	CbsAbsTbsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAbsGbsTbsAb
4217	16	218f	CbsAbsTbsGbsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGbsTbsAb
4217	16	218g	CbsAbsTbsGbsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAbsGbsTbsAb
4120	16	214	CbsTbsAbsdGsdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTsAbsTbsGb
4121	14	215b	TbsAbsGbsdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTsAbsTbsGb
4121	15	216b	CbsTbsAbsdGsdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTsAbsTbsGb
4122	13	217b	TbsAbsGbsdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTsAbsTb

[0693]

[0694] [표 3]

SP	L	시퀀스동정번호	시퀀스, 5'-3'
2064	16	209m	GbsTbsAbsGbsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsC*b
2064	16	209n	GbsTbsAbsdTsdGsdTsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsC*b
2064	16	209o	GbsTbsAbsdTsdGsdTsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsC*b
2064	16	209p	GbsTbsAbsdTsdGsdTsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGbsAbsGbsC*b
2064	16	209q	GbsTbsAbsGbsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGbsAbsGbsC*b
2064	16	209r	GbsTbsdTsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsC*b
429	15	152e	C*bsGbsAbsTbsdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sdC*sAbsC*bsAb
4217	16	218j	C*bsAbsTbsdTsdGsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sAbsGbsTbsAb
2355	17	213f	C*bsAbsGbsdTsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsGbsTbsGb
2355	17	213g	C*bsAbsGbsdTsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsGbsTbsGb
432	12	155e	C*bsGbsdTsdAsdTsdC*sdGsdC*sdGsdTsC*bsC*b
4217	16	218h	C*bsAbsTbsGbsdTsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sAbsGbsTbsAb
2072	16	210h	GbsC*bsTbsAbsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdTsGbsTbsTb
2072	16	210i	GbsC*bsdTsdAsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdTsGbsTbsTb
432	12	155f	C*bsGbsdTsdAsdTsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sC*b
2072	16	210j	GbsC*bsTbsdTsdAsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdTsGbsTbsTb
432	12	155g	C*bsdTsdAsdTsdAsdTsdC*sdGsdC*sdGsdTsC*bsC*b
431	13	153d	C*bsGbsAbsdTsdAsdTsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sC*bsAb
429	15	152f	C*bsGbsAbsdTsdAsdTsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sdC*sAbsC*bsAb
4217	16	218i	C*bsAbsTbsGbsdTsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sAbsGbsTbsAb
1393	16	199f	GbsAbsTbsdTsdGsdAsdTsdGsdC*sdC*sdGsdC*sGbsTbsC*b
2285	14	212e	AbsGbsC*bsdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsTsGbsAb
355	14	143e	C*bsTbsC*bsdTsdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdTsdAsC*bsC*bsGb
2072	16	210k	GbsC*bsTbsdTsdAsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdTsGbsTbsTb
1393	16	199g	GbsAbsTbsdTsdGsdAsdTsdGsdC*sdC*sdGsC*bsGbsTbsC*b
2355	17	213h	C*bsAbsGbsGbsdTsdC*sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsGbsTbsGb
429	15	152g	C*bsGbsAbsdTsdAsdTsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sC*bsAbsC*bsAb
2285	14	212f	AbsGbsC*bsdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsTsGbsAb
355	14	143f	C*bsTbsC*bsdTsdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdTsdAsC*bsC*bsGb
1393	16	199h	GbsAbsTbsGbsdTsdAsdTsdGsdC*sdC*sdGsC*bsGbsTbsC*b
1393	16	199i	GbsAbsTbsGbsdTsdAsdTsdGsdC*sdC*sdGsdC*sGbsTbsC*b
4217	16	218k	C*bsAbsTbsdTsdGsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sdAsGbsTbsAb
2285	14	212g	AbsGbsdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsTsGbsAb
434	13	162d	TbsGbsGbsdTsdGsdAsdTsdAsdTsdGsdC*sGbsTb
383	14	148e	AbsGbsC*bsdTsdC*sdC*sdC*sdGsdAsdTsdC*sdC*sAbsTb
431	13	153e	C*bsGbsdTsdAsdTsdC*sdGsdC*sdGsdTsC*bsC*bsAb

[0695]

2284	15	211e	AbsGbsC*bsdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsTsGbsAbsC*b
355	14	143g	C*bsTbsC*bsdTsdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdTsdAsC*sC*bsGb
2284	15	211f	AbsGbsC*bsdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsTsGbsAbsC*b
383	14	148f	AbsGbsC*bsdTsdC*sdC*sdC*sdGsdAsdTsdC*sC*bsAbsTb
383	14	148g	AbsGbsdTsdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdTsdC*sC*bsAbsTb
382	16	147g	C*bsAbsGbsdTsdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdTsdC*sdC*sAbsTbsGb
2072	16	210m	GbsC*bsTbsdTsdAsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdTsGbsTbsTb
2072	16	210n	GbsC*bsTbsAbsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdTsGbsTbsTb
434	13	162e	TbsGbsdTsdGsdC*sdGsdAsdTsdAsdTsdGsdC*sGbsTb
2284	15	211g	AbsGbsC*bsTbsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsTsGbsAbsC*b
382	16	147h	C*bsAbsGbsdTsdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdTsdC*sC*bsAbsTbsGb
382	16	147i	C*bsAbsGbsC*bsdTsdC*sdC*sdC*sdGsdAsdTsdC*sdC*sAbsTbsGb
382	16	147j	C*bsAbsGbsdTsdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdTsdC*sdC*sAbsTbsGb
2355	17	213i	C*bsAbsGbsGbsdTsdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsGbsTbsGb
382	16	147k	C*bsAbsGbsC*bsdTsdC*sdC*sdC*sdGsdAsdTsdC*sC*bsAbsTbsGb

[0696]

[0697] 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오티드

[0698] 하기에서 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드가 기술된다.

[0699] 따라서, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지는 갱량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오티드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오티드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오티드가 LNA 뉴클레오티드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴

클레오티드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 뉴클레오티드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오티드가 하기 시퀀스 5'-N¹-GTCATAGA-N²-3' (시퀀스 동정 번호 12) 또는 5'-N³-ACGCGTCC-N⁴-3' (시퀀스 동정 번호 98) 또는 5'-N¹¹-TGTTTAGG-N¹²-3' (시퀀스 동정 번호 10) 또는 5'-N⁵-TTTGGTAG-N⁶-3' (시퀀스 동정 번호 11) 또는 5'-N⁷-AATGGACC-N⁸-3' (시퀀스 동정 번호 100) 또는 5'-N⁹-ATTAATAA-N¹⁰-3' (시퀀스 동정 번호 101)로 나타내어지고, 여기에서

[0700] N¹은: CATGGCAGACCCCGCTGCTC-, ATGGCAGACCCCGCTGCTC-, TGGCAGACCCCGCTGCTC-, GGCAGACCCCGCTGCTC-, GCAGACCCCGCTGCTC-, CAGACCCCGCTGCTC-, AGACCCCGCTGCTC-, GACCCCGCTGCTC-, ACCCCGCTGCTC-, CCCCGCTGCTC-, CCCGCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;

[0701] N²는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCCC, -CCGAGCCCCA, -CCGAGCCCCAG, -CCGAGCCCCAGC, -CCGAGCCCCAGCG, -CCGAGCCCCAGCGC, -CCGAGCCCCAGCGCA, -CCGAGCCCCAGCGCAG, -CCGAGCCCCAGCGCAGC, -CCGAGCCCCAGCGCAGCG 또는 -CCGAGCCCCAGCGCAGCG를 나타내고;

[0702] N³은: GGTGGATCGTGCTGGCGAT-, GTGGATCGTGCTGGCGAT-, TGGATCGTGCTGGCGAT-, GGGATCGTGCTGGCGAT-, GGATCGTGCTGGCGAT-, GATCGTGCTGGCGAT-, ATCGTGCTGGCGAT-, TCGTGCTGGCGAT-, CGTGCTGGCGAT-, GTGTGGCGAT-, TGCTGGCGAT-, GCTGGCGAT-, CTGGCGAT-, TGGCGAT-, GCGAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0703] N⁴는: -ACAGGACGATGTGCAGCGC, -ACAGGACGATGTGCAGCG, -ACAGGACGATGTGCAGCG, -ACAGGACGATGTGCAGC, -ACAGGACGATGTGCAG, -ACAGGACGATGTGCA, -ACAGGACGATGTGC, -ACAGGACGATGTG, -ACAGGACGATGT, -ACAGGACGATG, -ACAGGACGAT, -ACAGGACGA, -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타내고;

[0704] N⁵는: GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, AGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CCTGCCCCAGAAGAGCTA-, CTGCCCCAGAAGAGCTA-, TGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCCCAGAAGAGCTA-, CCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGAAGAGCTA-, CCAGAAGAGCTA-, CAGAAGAGCTA-, AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;

[0705] N⁶은: -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGG, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAG, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCA, -TGTTTAGGGAGCCGTCTTC, -TGTTTAGGGAGCCGTCTT, -TGTTTAGGGAGCCGTCT, -TGTTTAGGGAGCCGTCTC, -TGTTTAGGGAGCCGT, -TGTTTAGGGAGCCG, -TGTTTAGGGAGCC, -TGTTTAGGGAGC, -TGTTTAGGGAG, -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T를 나타내고;

[0706] N⁷은: TGAATCTTGAATATCTCATG-, GAATCTTGAATATCTCATG-, AATCTTGAATATCTCATG-, ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[0707] N⁸은: -AGTATTCTAGAACTCACCA, -AGTATTCTAGAACTCACC, -AGTATTCTAGAACTCAC, -AGTATTCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내고;

[0708] N⁹는: ATTCATATTTATATACAGGC-, TTCATATTTATATACAGGC-, TCATATTTATATACAGGC-, CATATTTATATACAGGC-, ATATTTATATACAGGC-, TATTTATATACAGGC-, ATTTATATACAGGC-, TTTATATACAGGC-, TTATATACAGGC-, TATATACAGGC-, ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;

[0709] N¹⁰은: -AGTGCAAATGTTATTGGCTA, -AGTGCAAATGTTATTGGCT, -AGTGCAAATGTTATTGGC, -AGTGCAAATGTTATTGG, -AGTGCAAATGTTATTG, -AGTGCAAATGTTATT, -AGTGCAAATGTTAT, -AGTGCAAATGTTA, -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내고;

- [0710] N¹¹은: TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, GCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CAGAAGAGCTATTTGGTAG-, AGAAGAGCTATTTGGTAG-, GAAGAGCTATTTGGTAG-, AAGAGCTATTTGGTAG-, AGAGCTATTTGGTAG-, GAGCTATTTGGTAG-, AGCTATTTGGTAG-, GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-, TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GGTAG-, GTAG-, TAG-, AG- or G-를 나타내고,
- [0711] N¹²는: -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTT, -GAGCCGTCTTCAGGAATCT, -GAGCCGTCTTCAGGAAT, -GAGCCGTCTTCAGGAA, -GAGCCGTCTTCAGGA, -GAGCCGTCTTCAGG, -GAGCCGTCTTCAG, -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타내거나;
- [0712] 여기에서 N¹ 내지 N¹²는 여기에서 기술되는 바와 같은 잔기의 제한된 목록 중의 임의의 것을 나타내는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다.
- [0713] 게다가, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 겹량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단예의 이들 뉴클레오타이드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단예의 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N¹-GTCATAGA-N²-3' (시퀀스 동정 번호 12)로 나타내어지고, 여기에서
- [0714] N¹은: GGCAGACCCGCTGCTC-, GCAGACCCGCTGCTC-, CAGACCCGCTGCTC-, AGACCCGCTGCTC-, GACCCGCTGCTC-, ACCCCGCTGCTC-, CCCCCTGCTC-, CCCGCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;
- [0715] N²는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCCC, -CCGAGCCCCA, -CCGAGCCCCAG, -CCGAGCCCCAGC, -CCGAGCCCCAGCG, -CCGAGCCCCAGCGC, -CCGAGCCCCAGCGCA 또는 -CCGAGCCCCAGCGCAG를 나타내는
- [0716] 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다.
- [0717] N¹ 및/또는 N²는 또한 여기에서 기술되는 바와 같은 추가의 3' 및 5' 잔기의 제한된 목록 중의 임의의 것을 나타낼 수 있다.
- [0718] 일반식 S1:
- [0719] 5'-N¹-GTCATAGA-N²-3' (시퀀스 동정 번호 12) S1
- [0720] 이 하기:
- [0721] CCGCTGCTCGTCATAGAC (시퀀스 동정 번호 19)
- [0722] CGCTGCTCGTCATAGACC (시퀀스 동정 번호 20)
- [0723] GCTGCTCGTCATAGACCG (시퀀스 동정 번호 21)
- [0724] CTGCTCGTCATAGACCGA (시퀀스 동정 번호 22)
- [0725] TGCTCGTCATAGACCGAG (시퀀스 동정 번호 23)
- [0726] GCTCGTCATAGACCGAGC (시퀀스 동정 번호 24)
- [0727] CTCGTCATAGACCGAGCC (시퀀스 동정 번호 25)
- [0728] TCGTCATAGACCGAGCCC (시퀀스 동정 번호 26)

- [0729] CGTCATAGACCGAGCCCC (시퀀스 동정 번호 27)
- [0730] CGCTGCTCGTCATAGAC (시퀀스 동정 번호 28)
- [0731] GCTGCTCGTCATAGACC (시퀀스 동정 번호 29)
- [0732] CTGCTCGTCATAGACCG (시퀀스 동정 번호 30)
- [0733] TGCTCGTCATAGACCGA (시퀀스 동정 번호 31)
- [0734] GCTCGTCATAGACCGAG (시퀀스 동정 번호 32)
- [0735] CTCGTCATAGACCGAGC (시퀀스 동정 번호 33)
- [0736] TCGTCATAGACCGAGCC (시퀀스 동정 번호 34)
- [0737] CGTCATAGACCGAGCCC (시퀀스 동정 번호 35)
- [0738] GCTGCTCGTCATAGAC (시퀀스 동정 번호 36)
- [0739] CTGCTCGTCATAGACC (시퀀스 동정 번호 37)
- [0740] TGCTCGTCATAGACCG (시퀀스 동정 번호 38)
- [0741] GCTCGTCATAGACCGA (시퀀스 동정 번호 39)
- [0742] CTCGTCATAGACCGAG (시퀀스 동정 번호 40)
- [0743] TCGTCATAGACCGAGC (시퀀스 동정 번호 41)
- [0744] CGTCATAGACCGAGCC (시퀀스 동정 번호 42)
- [0745] CTGCTCGTCATAGAC (시퀀스 동정 번호 43)
- [0746] TGCTCGTCATAGACC (시퀀스 동정 번호 44)
- [0747] GCTCGTCATAGACCG (시퀀스 동정 번호 45)
- [0748] CTCGTCATAGACCGA (시퀀스 동정 번호 46)
- [0749] TCGTCATAGACCGAG (시퀀스 동정 번호 47)
- [0750] CGTCATAGACCGAGC (시퀀스 동정 번호 48)
- [0751] TGCTCGTCATAGAC (시퀀스 동정 번호 49)
- [0752] GCTCGTCATAGACC (시퀀스 동정 번호 50)
- [0753] CTCGTCATAGACCG (시퀀스 동정 번호 51)
- [0754] TCGTCATAGACCGA (시퀀스 동정 번호 52)
- [0755] CGTCATAGACCGAG (시퀀스 동정 번호 53)
- [0756] 하에 속하는 갭량체 안티센스-올리고뉴클레오티드가 특히 바람직하다.
- [0757] 갭량체 (LNA 조각 1 - DNA 조각 - LNA 조각 2) 형태의 식 S1의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 LNA 조각을 포함하고 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 2개의 LNA 조각 및 2개의 LNA 조각 간에 6 내지 14개, 바람직하게는 7 내지 12개 보다 바람직하게는 8 내지 11개의 DNA 단위로 이루어지는 하나의 DNA 조각을 포함한다.
- [0758] 식 S1의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 여기에서 기술되는 바와 같은 LNA 뉴클레오티드 (LNA 단위), 특히 "잠금 핵산 (LNA[®])" 장에서 기술되는 것들 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"에서 기술되는 것들을 포함한다. LNA 단위 및 DNA 단위는 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T) 및 우라실 (U) 등과 같은 표준 핵염기를 포함할 수 있으나, 또한 "핵염기" 장에서 기술되는 바와 같은 변성된 핵염기를 포함할 수 있다. 식 S1의 안티센스-올리고뉴클레오티드 또는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 LNA 조각 및 DNA 조각은 여기에서 기술되는 바와 같은 임의의 뉴클레오티드간 연결 특히 "뉴클레오티드간 연결 (IL)" 장에서 기술되는 바와 같은 것들을 포함

할 수 있다. 식 **S1**의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 선택적으로 또한 3' 말단 및/또는 5' 말단에 말단기 특히 "말단기" 장에서 기술되는 것들을 포함할 수 있다.

[0759] 변성 핵염기가 시험된 신경학적 및 종양학적 적응증과 관련하여 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 활성을 상당히 증가 또는 변화하지는 않는다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 변성 핵염기 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌이 식 **S1** 특히 5-메틸시토신이 LNA 뉴클레오타이드에만 또는 LNA 뉴클레오타이드 중에 그리고 DNA 뉴클레오타이드 중에 사용되고/되거나 2-아미노아데닌이 DNA 뉴클레오타이드 중에 사용되고 LNA 뉴클레오타이드 중에는 사용되지 않는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 활성을 추가로 증가시킨다는 것이 입증되었다.

[0760] 식 **S1**의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 바람직한 겹량체 구조는 다음과 같다: 3-8-3, 4-8-2, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3 그리고 여전히 보다 바람직하게는: 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 3-11-4 및 4-11-3.

[0761] 식 **S1**의 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대한 LNA 단위로서 특히 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -L-옥시-LNA (b^4), β -D-ENA (b^5), β -D-(NH)-LNA (b^6), β -D-(NCH₃)-LNA(b^7), β -D-(ONH)-LNA (b^8) 및 β -D-(ONCH₃)-LNA(b^9)가 바람직하다. 이들 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 , b^7 , b^8 및 b^9 가 소정의 노력으로 합성될 수 있고 상당한 안정성 및 활성의 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 야기할 수 있다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 그러나 실험에 기초하여 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 및 b^7 이 보다 바람직하다. LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^6 및 b^7 이 여전히 보다 바람직하고, LNA 단위 b^1 및 b^4 가 심지어 보다 바람직하고, 화학적 합성의 복잡도와 관련하여 β -D-옥시-LNA(b^1)가 또한 가장 바람직하다.

[0762] 특정한 3' 말단기 또는 5' 말단기가 종양학적 또는 신경학적 적응증에 대하여 안정성 또는 활성을 뚜렷하게 변화시키거나 증가시키는 것으로 밝혀지지 않는 한에서, 3' 및 5' 말단기가 가능하나 명백하게 선호되지는 않는다.

[0763] 여러 뉴클레오타이드간 가교 또는 뉴클레오타이드간 연결이 가능하다. 여기에서 기술되는 식에 있어서 뉴클레오타이드간 연결 IL은 -IL'-Y-로 나타내어진다. 따라서, IL = -IL'-Y- = -X'-(=X')(X⁻)-Y-이고, 여기에서 IL은 바람직하게는:

[0764] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(CH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃⁻)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-, -O-P(O)(O⁻)-N(CH₃)-, -N(CH₃)-P(O)(O⁻)-O-로 이루어지는 군으로부터 선택된다. -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되고, 여전히 보다 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O- 및 -O-P(O)(S⁻)-O-로부터 선택되는 뉴클레오타이드간 연결 IL이 바람직하다.

[0765] 따라서, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 겹량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N¹-GTCATAGA-N²-3' (시퀀

스 동정 번호 12)로 나타내어지고, 여기에서

- [0766] N^1 은: GGCAGACCCGCTGCTC-, GCAGACCCGCTGCTC-, CAGACCCGCTGCTC-, AGACCCGCTGCTC-, GACCCGCTGCTC-, ACCCCGCTGCTC-, CCCCCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;
- [0767] N^2 는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCCA, -CCGAGCCCCAG, -CCGAGCCCCAGC, -CCGAGCCCCAGCG, -CCGAGCCCCAGCGC, -CCGAGCCCCAGCGCA 또는 -CCGAGCCCCAGCGCAG를 나타내고;
- [0768] LNA 뉴클레오타이드는 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -L-옥시-LNA (b^4), β -D-ENA (b^5), β -D-(NH)-LNA (b^6), β -D-(NCH₃)-LNA(b^7), β -D-(ONH)-LNA (b^8) 및 β -D-(ONCH₃)-LNA(b^9)로부터; 바람직하게는 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -L-옥시-LNA (b^4), β -D-(NH)-LNA (b^6) 및 β -D-(NCH₃)-LNA(b^7)로부터 선택되고;
- [0769] 뉴클레오타이드간 연결은
- [0770] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(CH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃⁻)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-, -O-P(O)(O⁻)-N(CH₃)-, -N(CH₃)-P(O)(O⁻)-O-로부터;
- [0771] 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.
- [0772] 보다 바람직하게는 N^1 은: CAGACCCGCTGCTC-, AGACCCGCTGCTC-, GACCCGCTGCTC-, ACCCCGCTGCTC-, CCCCCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;
- [0773] N^2 는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCCA, -CCGAGCCCCAG, -CCGAGCCCCAGC, -CCGAGCCCCAGCG 또는 -CCGAGCCCCAGCGC를 나타낸다.
- [0774] 여전히 보다 바람직하게는, 본 발명은 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 갭량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단예의 이들 뉴클레오타이드 중의 2 내지 5개 및 3' 말단예의 2 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 7개, 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'- N^1 -GTCATAGA- N^2 -3' (시퀀스 동정 번호 12)로 나타내어지고, 여기에서
- [0775] N^1 은: ACCCCGCTGCTC-, CCCCCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고; 바람직하게는 N^1 은: CCCCCTGCTC-, CCGCTGCTC-, CGCTGCTC-, GCTGCTC-, CTGCTC-, TGCTC-, GCTC-, CTC-, TC- 또는 C-를 나타내고;
- [0776] N^2 는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC 또는 -CCGAGCCCC, -CCGAGCCCCA 또는 -CCGAGCCCCAG를 나타내고; 바람직하게는 N^2 는: -C, -CC, -CCG, -CCGA, -CCGAG, -CCGAGC, -CCGAGCC, -CCGAGCCC, -CCGAGCCCC 또는 -CCGAGCCCC를 나타내고;

- [0777] LNA 뉴클레오타이드는 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -L-옥시-LNA (b^4), β -D-(NH)-LNA (b^6) 및 β -D-(NCH₃)-LNA(b^7)로부터 선택되고;
- [0778] 뉴클레오타이드간 연결은
- [0779] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되고; 바람직하게는 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.
- [0780] 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리고 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리고 LNA 단위의 2개의 조각 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 단위의 조각을 포함하고, 여기에서 LNA 단위가 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -L-옥시-LNA (b^4), β -D-(NH)-LNA (b^6) 및 β -D-(NCH₃)-LNA(b^7)로부터 선택되고 뉴클레오타이드간 연결이 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 시퀀스 동정 번호 19 내지 시퀀스 동정 번호 53의 껍질체 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 특히 바람직하다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단기도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 LNA 단위, 바람직하게는 모든 LNA 단위 내에 5-메틸시토신 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 2-아미노아데닌 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 5-메틸시토신을 포함할 수 있다.
- [0781] 표 4 (시퀀스 동정 번호 232a 내지 244b)의 껍질체 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 특히 바람직하다.
- [0782] 게다가, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 껍질체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N³-ACGCGTCC-N⁴-3' (시퀀스 동정 번호 98)로 나타내어지고, 여기에서
- [0783] N³은: GGGATCGTGCTGGCGAT-, GGATCGTGCTGGCGAT-, GATCGTGCTGGCGAT-, ATCGTGCTGGCGAT-, TCGTGCTGGCGAT-, CGTGCTGGCGAT-, GTGCTGGCGAT-, TGCTGGCGAT-, GCTGGCGAT-, CTGGCGAT-, TGGCGAT-, GGCGAT-, GCGAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;
- [0784] N⁴는: -ACAGGACGATGTGCAGC, -ACAGGACGATGTGCAG, -ACAGGACGATGTGCA, -ACAGGACGATGTGC, -ACAGGACGATGTG, -ACAGGACGATGT, -ACAGGACGATG, -ACAGGACGAT, -ACAGGACGA, -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타내는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다.
- [0785] N³ 및/또는 N⁴는 또한 여기에서 기술되는 바와 같은 추가의 3' 및 5' 잔기의 제한된 목록 중의 임의의 것을 나타낼 수 있다.
- [0786] 일반식 S2:
- [0787] 5'-N³-ACGCGTCC-N⁴-3' (시퀀스 동정 번호 98) S2
- [0788] 이 하기:
- [0789] GCTGGCGATACGCGTCCA (시퀀스 동정 번호 54)

- [0790] CTGGCGATACGCGTCCAC (시퀀스 동정 번호 55)
- [0791] TGGCGATACGCGTCCACA (시퀀스 동정 번호 56)
- [0792] GGGCGATACGCGTCCACAG (시퀀스 동정 번호 57)
- [0793] GCGATACGCGTCCACAGG (시퀀스 동정 번호 58)
- [0794] CGATACGCGTCCACAGGA (시퀀스 동정 번호 59)
- [0795] GATACGCGTCCACAGGAC (시퀀스 동정 번호 60)
- [0796] ATACGCGTCCACAGGACG (시퀀스 동정 번호 61)
- [0797] TACGCGTCCACAGGACGA (시퀀스 동정 번호 62)
- [0798] CTGGCGATACGCGTCCA (시퀀스 동정 번호 63)
- [0799] TGGCGATACGCGTCCAC (시퀀스 동정 번호 64)
- [0800] GGGCGATACGCGTCCACA (시퀀스 동정 번호 65)
- [0801] GCGATACGCGTCCACAG (시퀀스 동정 번호 66)
- [0802] CGATACGCGTCCACAGG (시퀀스 동정 번호 67)
- [0803] GATACGCGTCCACAGGA (시퀀스 동정 번호 68)
- [0804] ATACGCGTCCACAGGAC (시퀀스 동정 번호 349)
- [0805] TACGCGTCCACAGGACG (시퀀스 동정 번호 350)
- [0806] TGGCGATACGCGTCCA (시퀀스 동정 번호 351)
- [0807] GGGCGATACGCGTCCAC (시퀀스 동정 번호 352)
- [0808] GCGATACGCGTCCACA (시퀀스 동정 번호 353)
- [0809] CGATACGCGTCCACAG (시퀀스 동정 번호 354)
- [0810] GATACGCGTCCACAGG (시퀀스 동정 번호 355)
- [0811] ATACGCGTCCACAGGA (시퀀스 동정 번호 356)
- [0812] TACGCGTCCACAGGAC (시퀀스 동정 번호 357)
- [0813] GGGCGATACGCGTCCA (시퀀스 동정 번호 358)
- [0814] GCGATACGCGTCCAC (시퀀스 동정 번호 359)
- [0815] CGATACGCGTCCACA (시퀀스 동정 번호 360)
- [0816] GATACGCGTCCACAG (시퀀스 동정 번호 361)
- [0817] ATACGCGTCCACAGG (시퀀스 동정 번호 362)
- [0818] TACGCGTCCACAGGA (시퀀스 동정 번호 363)
- [0819] GCGATACGCGTCCA (시퀀스 동정 번호 364)
- [0820] CGATACGCGTCCAC (시퀀스 동정 번호 365)
- [0821] GATACGCGTCCACA (시퀀스 동정 번호 366)
- [0822] ATACGCGTCCACAG (시퀀스 동정 번호 367)
- [0823] TACGCGTCCACAGG (시퀀스 동정 번호 368)
- [0824] 하에 속하는 갱량체 안티센스-올리고뉴클레오티드가 특히 바람직하다.
- [0825] 갱량체 (LNA 조각 1 - DNA 조각 - LNA 조각 2) 형태의 식 S2의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 2 내

지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 LNA 조각을 포함하고 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 2개의 LNA 조각 및 2개의 LNA 조각 간에 6 내지 14개, 바람직하게는 7 내지 12개 보다 바람직하게는 8 내지 11개의 DNA 단위로 이루어지는 하나의 DNA 조각을 포함한다.

[0826] 식 S2의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 여기에서 기술되는 바와 같은 LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위), 특히 "잠금 핵산 (LNA[®])" 장에서 기술되는 것들 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"에서 기술되는 것들을 포함한다. LNA 단위 및 DNA 단위는 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T) 및 우라실 (U) 등과 같은 표준 핵염기를 포함할 수 있으나, 또한 "핵염기" 장에서 기술되는 바와 같은 변성된 핵염기를 포함할 수 있다. 식 S2의 안티센스-올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 LNA 조각 및 DNA 조각은 여기에서 기술되는 바와 같은 임의의 뉴클레오타이드간 연결 특히 "뉴클레오타이드간 연결 (IL)" 장에서 기술되는 바와 같은 것들을 포함할 수 있다. 식 S2의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 선택적으로 또한 3' 말단 및/또는 5' 말단에 말단기 특히 "말단기" 장에서 기술되는 것들을 포함할 수 있다.

[0827] 변성 핵염기가 시험된 신경학적 및 종양학적 적응증과 관련하여 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 활성을 상당히 증가 또는 변화하지는 않는다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 변성 핵염기 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌이 식 S2 특히 5-메틸시토신이 LNA 뉴클레오타이드에만 또는 LNA 뉴클레오타이드 중에 그리고 DNA 뉴클레오타이드 중에 사용되고/되거나 2-아미노아데닌이 DNA 뉴클레오타이드 중에 사용되고 LNA 뉴클레오타이드 중에는 사용되지 않는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 활성을 추가로 증가시킨다는 것이 입증되었다.

[0828] 식 S2의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 바람직한 겹량체 구조는 다음과 같다: 3-8-3, 4-8-2, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3 그리고 여전히 보다 바람직하게는: 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 3-11-4 및 4-11-3.

[0829] 식 S2의 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대한 LNA 단위로서 특히 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -L-옥시-LNA (b^4), β -D-ENA (b^5), β -D-(NH)-LNA (b^6), β -D-(NCH₃)-LNA(b^7), β -D-(ONH)-LNA (b^8) 및 β -D-(ONCH₃)-LNA(b^9)가 바람직하다. 이들 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 , b^7 , b^8 및 b^9 가 소정의 노력으로 합성될 수 있고 상당한 안정성 및 활성의 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 야기할 수 있다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 그러나 실험에 기초하여 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 및 b^7 이 보다 바람직하다. LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^6 및 b^7 이 여전히 보다 바람직하고, LNA 단위 b^1 및 b^4 가 심지어 보다 바람직하고, 화학적 합성의 복잡도와 관련하여 β -D-옥시-LNA(b^1)가 또한 가장 바람직하다.

[0830] 특정한 3' 말단기 또는 5' 말단기가 종양학적 또는 신경학적 적응증에 대하여 안정성 또는 활성을 뚜렷하게 변화시키거나 증가시키는 것으로 밝혀지지 않는 한에서, 3' 및 5' 말단기가 가능하나 명백하게 선호되지는 않는다.

[0831] 여러 뉴클레오타이드간 가교 또는 뉴클레오타이드간 연결이 가능하다. 여기에서 기술되는 식에 있어서 뉴클레오타이드간 연결 IL은 -IL'-Y-로 나타내어진다. 따라서, IL = -IL'-Y- = -X''-P(=X')(X⁻)-Y-이고, 여기에서 IL은 바람직하게는:

[0832] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(CH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃⁻)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-, -O-P(O)(O⁻)-N(CH₃)-, -N(CH₃)-P(O)(O⁻)-O-로 이루어지는 군으로부터 선택된다. -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터

선택되고, 여전히 보다 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$ 로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-O-$ 및 $-O-P(O)(S^-)-O-$ 로부터 선택되는 뉴클레오타이드간 연결 IL이 바람직하다.

[0833] 따라서, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 겹량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N³-ACGCGTCC-N⁴-3' (시퀀스 동정 번호 98)로 나타내어지고, 여기에서

[0834] N³은: GGGATCGTGCTGGCGAT-, GGATCGTGCTGGCGAT-, GATCGTGCTGGCGAT-, ATCGTGCTGGCGAT-, TCGTGCTGGCGAT-, CGTGCTGGCGAT-, GTGCTGGCGAT-, TGCTGGCGAT-, GCTGGCGAT-, CTGGCGAT-, TGGCGAT-, GGCGAT-, GCGAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0835] N⁴는: -ACAGGACGATGTGCAGC, -ACAGGACGATGTGCAG, -ACAGGACGATGTGCA, -ACAGGACGATGTGC, -ACAGGACGATGTG, -ACAGGACGATGT, -ACAGGACGATG, -ACAGGACGAT, -ACAGGACGA, -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타내고,

[0836] LNA 뉴클레오타이드가 β -D-옥시-LNA (**b**¹), β -D-티오-LNA (**b**²), α -L-옥시-LNA (**b**⁴), β -D-ENA (**b**⁵), β -D-(NH)-LNA (**b**⁶), β -D-(NCH₃)-LNA (**b**⁷), β -D-(ONH)-LNA (**b**⁸) 및 β -D-(ONCH₃)-LNA (**b**⁹)로부터; 그리고 바람직하게는 β -D-옥시-LNA (**b**¹), β -D-티오-LNA (**b**²), α -L-옥시-LNA (**b**⁴), β -D-(NH)-LNA (**b**⁶) 및 β -D-(NCH₃)-LNA (**b**⁷)로부터 선택되고;

[0837] 뉴클레오타이드가 연결이

[0838] $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$, $-S-P(O)(O^-)-O-$, $-S-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(O)(O^-)-S-$, $-O-P(O)(S^-)-S-$, $-S-P(O)(O^-)-S-$, $-O-P(O)(CH_3)-O-$, $-O-P(O)(OCH_3)-O-$, $-O-P(O)(NH(CH_3))-O-$, $-O-P(O)[N(CH_3)_2]-O-$, $-O-P(O)(BH_3^-)-O-$, $-O-P(O)(OCH_2CH_2OCH_3)-O-$, $-O-P(O)(OCH_2CH_2SCH_3)-O-$, $-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-$, $-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-$;

[0839] 그리고 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$, $-S-P(O)(O^-)-O-$, $-S-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(O)(O^-)-S-$, $-O-P(O)(S^-)-S-$, $-S-P(O)(O^-)-S-$ 로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.

[0840] 보다 바람직하게는 N³은: GATCGTGCTGGCGAT-, ATCGTGCTGGCGAT-, TCGTGCTGGCGAT-, CGTGCTGGCGAT-, GTGCTGGCGAT-, TGCTGGCGAT-, GCTGGCGAT-, CTGGCGAT-, TGGCGAT-, GGCGAT-, GCGAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0841] N⁴는: -ACAGGACGATGTGCA, -ACAGGACGATGTGC, -ACAGGACGATGTG, -ACAGGACGATGT, -ACAGGACGATG, -ACAGGACGAT, -ACAGGACGA, -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타낸다.

[0842] 여전히 보다 바람직하게는, 본 발명은 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 겹량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 2 내지 5개 및 3' 말단에서의 2 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 7개, 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역

과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N³-ACGCGTCC-N⁴-3' (시퀀스 동정 번호 98)로 나타내어지고, 여기에서

[0843] N³은: CGTGTGGCGAT-, GTGCTGGCGAT-, TGCTGGCGAT-, GCTGGCGAT-, CTGGCGAT-, TGGCGAT-, GCGAT-, GCGAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고; 바람직하게는 N³은: TGCTGGCGAT-, GCTGGCGAT-, CTGGCGAT-, TGGCGAT-, GCGAT-, GCGAT-, CGAT-, GAT-, AT- 또는 T-를 나타내고;

[0844] N⁴는: -ACAGGACGATGT, -ACAGGACGATG, -ACAGGACGAT, -ACAGGACGA, -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타내고; 바람직하게는 N⁴는: -ACAGGACGAT, -ACAGGACGA, -ACAGGACG, -ACAGGAC, -ACAGGA, -ACAGG, -ACAG, -ACA, -AC 또는 -A를 나타내고;

[0845] LNA 뉴클레오타이드는 β-D-옥시-LNA (b¹), β-D-티오-LNA (b²), α-L-옥시-LNA (b⁴), β-D-(NH)-LNA (b⁶) 및 β-D-(NCH₃)-LNA(b⁷)로부터 선택되고;

[0846] 뉴클레오타이드간 연결은

[0847] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되고; 바람직하게는 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.

[0848] 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리고 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리고 LNA 단위의 2개의 조각 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 단위의 조각을 포함하고, 여기에서 LNA 단위가 β-D-옥시-LNA (b¹), β-D-티오-LNA (b²), α-L-옥시-LNA (b⁴), β-D-(NH)-LNA (b⁶) 및 β-D-(NCH₃)-LNA(b⁷)로부터 선택되고 뉴클레오타이드간 연결이 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 시퀀스 동정 번호 54 내지 시퀀스 동정 번호 68 및 시퀀스 동정 번호 349 내지 시퀀스 동정 번호 368의 껍질체 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 특히 바람직하다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단기도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 LNA 단위, 바람직하게는 모든 LNA 단위 내에 5-메틸시토신 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 2-아미노아데닌 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 5-메틸시토신을 포함할 수 있다.

[0849] 표 5 (시퀀스 동정 번호 245a 내지 257b)의 껍질체 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 특히 바람직하다.

[0850] 게다가, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 껍질체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N¹¹-TGTTTAGG-N¹²-3' (시퀀스 동정 번호 10)로 나타내어지고, 여기에서

[0851] N¹¹은: GAAGAGCTATTTGGTAG-, AAGAGCTATTTGGTAG-, AGAGCTATTTGGTAG-, GAGCTATTTGGTAG-, AGCTATTTGGTAG-, GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-, TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GGTAG-, GTAG-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고,

- [0852] N¹²는: -GAGCCGTCTTCAGGAAT, -GAGCCGTCTTCAGGAA, -GAGCCGTCTTCAGGA, -GAGCCGTCTTCAGG, -GAGCCGTCTTCAG, -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타내는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다.
- [0853] N¹¹ 및/또는 N¹²는 또한 여기에서 기술되는 바와 같은 추가의 3' 및 5' 잔기의 제한된 목록 중의 임의의 것을 나타낼 수 있다.
- [0854] 일반식 S3:
- [0855] 5'-N¹¹-TGTTTAGG-N¹²-3' (시퀀스 동정 번호 10) S3
- [0856] 이 하기:
- [0857] ATTTGGTAGTGTTTAGGG (시퀀스 동정 번호 369)
- [0858] TTTGGTAGTGTTTAGGGA (시퀀스 동정 번호 370)
- [0859] TTGGTAGTGTTTAGGGAG (시퀀스 동정 번호 371)
- [0860] TGGTAGTGTTTAGGGAGC (시퀀스 동정 번호 372)
- [0861] GGTAGTGTTTAGGGAGCC (시퀀스 동정 번호 373)
- [0862] GTAGTGTTTAGGGAGCCG (시퀀스 동정 번호 374)
- [0863] TAGTGTTTAGGGAGCCGT (시퀀스 동정 번호 375)
- [0864] AGTGTTTAGGGAGCCGTC (시퀀스 동정 번호 376)
- [0865] GTGTTTAGGGAGCCGTCT (시퀀스 동정 번호 377)
- [0866] TTTGGTAGTGTTTAGGG (시퀀스 동정 번호 378)
- [0867] TTGGTAGTGTTTAGGGA (시퀀스 동정 번호 379)
- [0868] TGGTAGTGTTTAGGGAG (시퀀스 동정 번호 380)
- [0869] GGTAGTGTTTAGGGAGC (시퀀스 동정 번호 381)
- [0870] GTAGTGTTTAGGGAGCC (시퀀스 동정 번호 382)
- [0871] TAGTGTTTAGGGAGCCG (시퀀스 동정 번호 383)
- [0872] AGTGTTTAGGGAGCCGT (시퀀스 동정 번호 384)
- [0873] GTGTTTAGGGAGCCGTC (시퀀스 동정 번호 385)
- [0874] TTGGTAGTGTTTAGGG (시퀀스 동정 번호 386)
- [0875] TGGTAGTGTTTAGGGA (시퀀스 동정 번호 387)
- [0876] GGTAGTGTTTAGGGAG (시퀀스 동정 번호 388)
- [0877] GTAGTGTTTAGGGAGC (시퀀스 동정 번호 389)
- [0878] TAGTGTTTAGGGAGCC (시퀀스 동정 번호 390)
- [0879] AGTGTTTAGGGAGCCG (시퀀스 동정 번호 391)
- [0880] GTGTTTAGGGAGCCGT (시퀀스 동정 번호 392)
- [0881] TGGTAGTGTTTAGGG (시퀀스 동정 번호 393)
- [0882] GGTAGTGTTTAGGGA (시퀀스 동정 번호 394)
- [0883] GTAGTGTTTAGGGAG (시퀀스 동정 번호 395)

- [0884] TAGTGTTTAGGGAGC (시퀀스 동정 번호 396)
- [0885] AGTGTTTAGGGAGCC (시퀀스 동정 번호 397)
- [0886] GTGTTTAGGGAGCCG (시퀀스 동정 번호 398)
- [0887] GGTAGTGTTTAGGG (시퀀스 동정 번호 399)
- [0888] GTAGTGTTTAGGGA (시퀀스 동정 번호 400)
- [0889] TAGTGTTTAGGGAG (시퀀스 동정 번호 401)
- [0890] AGTGTTTAGGGAGC (시퀀스 동정 번호 402)
- [0891] GTGTTTAGGGAGCC (시퀀스 동정 번호 403)
- [0892] 하에 속하는 겹량체 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 특히 바람직하다.
- [0893] 겹량체 (LNA 조각 1 - DNA 조각 - LNA 조각 2) 형태의 식 S3의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 LNA 조각을 포함하고 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 2개의 LNA 조각 및 2개의 LNA 조각 간에 6 내지 14개, 바람직하게는 7 내지 12개 보다 바람직하게는 8 내지 11개의 DNA 단위로 이루어지는 하나의 DNA 조각을 포함한다.
- [0894] 식 S3의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 여기에서 기술되는 바와 같은 LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위), 특히 "잠금 핵산 (LNA[®])" 장에서 기술되는 것들 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"에서 기술되는 것들을 포함한다. LNA 단위 및 DNA 단위는 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T) 및 우라실 (U) 등과 같은 표준 핵염기를 포함할 수 있으나, 또한 "핵염기" 장에서 기술되는 바와 같은 변성된 핵염기를 포함할 수 있다. 식 S3의 안티센스-올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 LNA 조각 및 DNA 조각은 여기에서 기술되는 바와 같은 임의의 뉴클레오타이드간 연결 특히 "뉴클레오타이드간 연결 (IL)" 장에서 기술되는 바와 같은 것들을 포함할 수 있다. 식 S3의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 선택적으로 또한 3' 말단 및/또는 5' 말단에 말단기 특히 "말단기" 장에서 기술되는 것들을 포함할 수 있다.
- [0895] 변성 핵염기가 시험된 신경학적 및 종양학적 적응증과 관련하여 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 활성을 상당히 증가 또는 변화하지는 않는다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 변성 핵염기 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌이 식 S3 특히 5-메틸시토신이 LNA 뉴클레오타이드에만 또는 LNA 뉴클레오타이드 중에 그리고 DNA 뉴클레오타이드 중에 사용되고/되거나 2-아미노아데닌이 DNA 뉴클레오타이드 중에 사용되고 LNA 뉴클레오타이드 중에는 사용되지 않는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 활성을 추가로 증가시킨다는 것이 입증되었다.
- [0896] 식 S3의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 바람직한 겹량체 구조는 다음과 같다: 3-8-3, 4-8-2, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3 그리고 여전히 보다 바람직하게는: 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 3-11-4 및 4-11-3.
- [0897] 식 S3의 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대한 LNA 단위로서 특히 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -L-옥시-LNA (b^4), β -D-ENA (b^5), β -D-(NH)-LNA (b^6), β -D-(NCH₃)-LNA(b^7), β -D-(ONH)-LNA (b^8) 및 β -D-(ONCH₃)-LNA(b^9)가 바람직하다. 이들 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 , b^7 , b^8 및 b^9 가 소정의 노력으로 합성될 수 있고 상당한 안정성 및 활성의 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 야기할 수 있다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 그러나 실험에 기초하여 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 및 b^7 이 보다 바람직하다. LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^6 및 b^7 이 여전히 보다 바람직하고, LNA 단위 b^1 및 b^4 가 심지어 보다 바람직하고, 화학적 합성의 복잡도와 관련하여 β -D-옥시-LNA(b^1)가 또한 가장 바람직하다.
- [0898] 특정한 3' 말단기 또는 5' 말단기가 종양학적 또는 신경학적 적응증에 대하여 안정성 또는 활성을 뚜렷하게 변화시키거나 증가시키는 것으로 밝혀지지 않는 한에서, 3' 및 5' 말단기가 가능하나 명백하게 선호되지는 않는다.
- [0899] 여러 뉴클레오타이드간 가교 또는 뉴클레오타이드간 연결이 가능하다. 여기에서 기술되는 식에 있어서 뉴클레오타이드

간 연결 IL은 -IL'-Y-로 나타내어진다. 따라서, IL = -IL'-Y- = -X'-P(=X')(X⁻)-Y-이고, 여기에서 IL은 바람직하게는:

[0900] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(CH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃⁻)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-, -O-P(O)(O⁻)-N(CH₃)-, -N(CH₃)-P(O)(O⁻)-O-로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0901] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되고, 여전히 보다 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O- 및 -O-P(O)(S⁻)-O-로부터 선택되는 뉴클레오타이드간 연결 IL이 바람직하다.

[0902] 따라서, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 갭량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N¹¹-TGTTTAGG-N¹²-3' (시퀀스 동정 번호 10)로 나타내어지고, 여기에서

[0903] N¹¹은: GAAGAGCTATTTGGTAG-, AAGAGCTATTTGGTAG-, AGAGCTATTTGGTAG-, GAGCTATTTGGTAG-, AGCTATTTGGTAG-, GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-, TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GGTAG-, GTAG-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고,

[0904] N¹²는: -GAGCCGTCTTCAGGAAT, -GAGCCGTCTTCAGGAA, -GAGCCGTCTTCAGGA, -GAGCCGTCTTCAGG, -GAGCCGTCTTCAG, -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타내고;

[0905] LNA 뉴클레오타이드는 β-D-옥시-LNA (**b**¹), β-D-티오-LNA (**b**²), α-L-옥시-LNA (**b**⁴), β-D-ENA (**b**⁵), β-D-(NH)-LNA (**b**⁶), β-D-(NCH₃)-LNA(**b**⁷), β-D-(ONH)-LNA (**b**⁸) 및 β-D-(ONCH₃)-LNA(**b**⁹)로부터; 그리고 바람직하게는 β-D-옥시-LNA (**b**¹), β-D-티오-LNA (**b**²), α-L-옥시-LNA (**b**⁴), β-D-(NH)-LNA (**b**⁶) 및 β-D-(NCH₃)-LNA(**b**⁷)로부터 선택되고;

[0906] 뉴클레오타이드간 연결은

[0907] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(CH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃⁻)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-, -O-P(O)(O⁻)-N(CH₃)-, -N(CH₃)-P(O)(O⁻)-O-로부터;

[0908] 그리고 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올

리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.

[0909] 보다 바람직하게는 N¹¹은: AGAGCTATTTGGTAG-, GAGCTATTTGGTAG-, AGCTATTTGGTAG-, GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-, TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GGTAG-, GTAG-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고;

[0910] N¹²는: -GAGCCGTCTTCAGGA, -GAGCCGTCTTCAGG, -GAGCCGTCTTCAG, -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타낸다.

[0911] 여전히 보다 바람직하게는, 본 발명은 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 갱량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에의 이들 뉴클레오타이드 중의 2 내지 5개 및 3' 말단에의 2 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 7개, 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N¹¹-TGTTTAGG-N¹²-3' (시퀀스 동정 번호 10)로 나타내어지고, 여기에서

[0912] N¹¹은: GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-, TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GGTAG-, GTAG-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고; 바람직하게는 N¹¹은: TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, GGTAG-, GTAG-, TAG-, AG- 또는 G-를 나타내고;

[0913] N¹²는: -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타내고; 바람직하게는 N¹²는: -GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA 또는 -G를 나타내고;

[0914] LNA 뉴클레오타이드는 β-D-옥시-LNA (b¹), β-D-티오-LNA (b²), α-L-옥시-LNA (b⁴), β-D-(NH)-LNA (b⁶) 및 β-D-(NCH₃)-LNA(b⁷)로부터 선택되고;

[0915] 뉴클레오타이드간 연결은

[0916] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되고; 바람직하게는 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.

[0917] 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리고 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리고 LNA 단위의 2개의 조각 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 단위의 조각을 포함하고, 여기에서 LNA 단위가 β-D-옥시-LNA (b¹), β-D-티오-LNA (b²), α-L-옥시-LNA (b⁴), β-D-(NH)-LNA (b⁶) 및 β-D-(NCH₃)-LNA(b⁷)로부터 선택되고 뉴클레오타이드간 연결이 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 시퀀스 동정 번호 369 내지 시퀀스 동정 번호 403의 갱량체 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 특히 바람직하다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단기도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 LNA 단위, 바람직하게는 모든 LNA 단위 내에 5-메틸시토신 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 2-아미노아데닌 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 5-메틸시토신을 포함할 수 있다.

[0918] 표 6 (시퀀스 동정 번호 258a 내지 270b)의 갱량체 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 특히 바람직하다.

- [0919] 게다가, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 갭량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N⁵-TTTGGTAG-N⁶-3' (시퀀스 동정 번호 11)로 나타내어지고, 여기에서
- [0920] N⁵는: CTGCCCCAGAAGAGCTA-, TGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCCCAGAAGAGCTA-, CCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGAAGAGCTA-, CCAGAAGAGCTA-, CAGAAGAGCTA-, AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;
- [0921] N⁶은: -TGTTTAGGGAGCCGTCT, -TGTTTAGGGAGCCGTC, -TGTTTAGGGAGCCGT, -TGTTTAGGGAGCCG, -TGTTTAGGGAGCC, -TGTTTAGGGAGC, -TGTTTAGGGAG, -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T를 나타내는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다.
- [0922] N⁵ 및/또는 N⁶은 또한 여기에서 기술되는 바와 같은 추가의 3' 및 5' 잔기의 제한된 목록 중의 임의의 것을 나타낼 수 있다.
- [0923] 일반식 S4:
- [0924] 5'-N⁵-TTTGGTAG-N⁶-3' (시퀀스 동정 번호 11) S4
- [0925] 이 하기:
- [0926] GAAGAGCTATTTGGTAGT (시퀀스 동정 번호 404)
- [0927] AAGAGCTATTTGGTAGTG (시퀀스 동정 번호 405)
- [0928] AGAGCTATTTGGTAGTGT (시퀀스 동정 번호 406)
- [0929] GAGCTATTTGGTAGTGTT (시퀀스 동정 번호 407)
- [0930] AGCTATTTGGTAGTGTTT (시퀀스 동정 번호 408)
- [0931] GCTATTTGGTAGTGTTTA (시퀀스 동정 번호 409)
- [0932] CTATTTGGTAGTGTTTAG (시퀀스 동정 번호 410)
- [0933] TATTTGGTAGTGTTTAGG (시퀀스 동정 번호 411)
- [0934] ATTTGGTAGTGTTTAGGG (시퀀스 동정 번호 412)
- [0935] AAGAGCTATTTGGTAGT (시퀀스 동정 번호 413)
- [0936] AGAGCTATTTGGTAGTG (시퀀스 동정 번호 414)
- [0937] GAGCTATTTGGTAGTGT (시퀀스 동정 번호 415)
- [0938] AGCTATTTGGTAGTGTT (시퀀스 동정 번호 416)
- [0939] GCTATTTGGTAGTGTTT (시퀀스 동정 번호 417)
- [0940] CTATTTGGTAGTGTTTA (시퀀스 동정 번호 418)
- [0941] TATTTGGTAGTGTTTAG (시퀀스 동정 번호 419)
- [0942] ATTTGGTAGTGTTTAGG (시퀀스 동정 번호 420)
- [0943] AGAGCTATTTGGTAGT (시퀀스 동정 번호 421)

- [0944] GAGCTATTTGGTAGTG (시퀀스 동정 번호 422)
- [0945] AGCTATTTGGTAGTGT (시퀀스 동정 번호 423)
- [0946] GCTATTTGGTAGTGTT (시퀀스 동정 번호 424)
- [0947] CTATTTGGTAGTGTTT (시퀀스 동정 번호 425)
- [0948] TATTTGGTAGTGTTTA (시퀀스 동정 번호 426)
- [0949] ATTTGGTAGTGTTTAG (시퀀스 동정 번호 427)
- [0950] GAGCTATTTGGTAGT (시퀀스 동정 번호 428)
- [0951] AGCTATTTGGTAGTG (시퀀스 동정 번호 429)
- [0952] GCTATTTGGTAGTGT (시퀀스 동정 번호 430)
- [0953] CTATTTGGTAGTGTT (시퀀스 동정 번호 431)
- [0954] TATTTGGTAGTGTTT (시퀀스 동정 번호 432)
- [0955] ATTTGGTAGTGTTTA (시퀀스 동정 번호 433)
- [0956] AGCTATTTGGTAGT (시퀀스 동정 번호 434)
- [0957] GCTATTTGGTAGTG (시퀀스 동정 번호 435)
- [0958] CTATTTGGTAGTGT (시퀀스 동정 번호 436)
- [0959] TATTTGGTAGTGTT (시퀀스 동정 번호 437)
- [0960] ATTTGGTAGTGTTT (시퀀스 동정 번호 438)
- [0961] 하에 속하는 겹량체 안티센스-올리고뉴클레오티드가 특히 바람직하다.
- [0962] 겹량체 (LNA 조각 1 - DNA 조각 - LNA 조각 2) 형태의 식 S4의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 LNA 조각을 포함하고 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 2개의 LNA 조각 및 2개의 LNA 조각 간에 6 내지 14개, 바람직하게는 7 내지 12개 보다 바람직하게는 8 내지 11개의 DNA 단위로 이루어지는 하나의 DNA 조각을 포함한다.
- [0963] 식 S4의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 여기에서 기술되는 바와 같은 LNA 뉴클레오티드 (LNA 단위), 특히 "잠금 핵산 (LNA[®])" 장에서 기술되는 것들 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"에서 기술되는 것들을 포함한다. LNA 단위 및 DNA 단위는 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T) 및 우라실 (U) 등과 같은 표준 핵염기를 포함할 수 있으나, 또한 "핵염기" 장에서 기술되는 바와 같은 변성된 핵염기를 포함할 수 있다. 식 S4의 안티센스-올리고뉴클레오티드 또는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 LNA 조각 및 DNA 조각은 여기에서 기술되는 바와 같은 임의의 뉴클레오티드간 연결 특히 "뉴클레오티드간 연결 (IL)" 장에서 기술되는 바와 같은 것들을 포함할 수 있다. 식 S4의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 선택적으로 또한 3' 말단 및/또는 5' 말단에 말단기 특히 "말단기" 장에서 기술되는 것들을 포함할 수 있다.
- [0964] 변성 핵염기가 시험된 신경학적 및 종양학적 적응증과 관련하여 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드의 활성을 상당히 증가 또는 변화하지는 않는다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 변성 핵염기 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌이 식 S4 특히 5-메틸시토신이 LNA 뉴클레오티드에만 또는 LNA 뉴클레오티드 중에 그리고 DNA 뉴클레오티드 중에 사용되고/되거나 2-아미노아데닌이 DNA 뉴클레오티드 중에 사용되고 LNA 뉴클레오티드 중에는 사용되지 않는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 활성을 추가로 증가시킨다는 것이 입증되었다.
- [0965] 식 S4의 안티센스-올리고뉴클레오티드의 바람직한 겹량체 구조는 다음과 같다: 3-8-3, 4-8-2, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3 그리고 여전히 보다 바람직하게는: 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 3-11-4 및 4-11-3.
- [0966] 식 S4의 안티센스-올리고뉴클레오티드에 대한 LNA 단위로서 특히 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -

L-옥시-LNA (b^4), β -D-ENA (b^5), β -D-(NH)-LNA (b^6), β -D-(NCH₃)-LNA(b^7), β -D-(ONH)-LNA (b^8) 및 β -D-(ONCH₃)-LNA(b^9)가 바람직하다. 이들 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 , b^7 , b^8 및 b^9 가 소정의 노력으로 합성될 수 있고 상당한 안정성 및 활성의 안티센스-올리고뉴클레오티드를 야기할 수 있다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 그러나 실험에 기초하여 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 및 b^7 이 보다 바람직하다. LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^6 및 b^7 이 여전히 보다 바람직하고, LNA 단위 b^1 및 b^4 가 심지어 보다 바람직하고, 화학적 합성의 복잡도와 관련하여 β -D-옥시-LNA(b^1)가 또한 가장 바람직하다.

[0967] 특정한 3' 말단기 또는 5' 말단기가 종양학적 또는 신경학적 적응증에 대하여 안정성 또는 활성을 뚜렷하게 변화시키거나 증가시키는 것으로 밝혀지지 않는 한에서, 3' 및 5' 말단기가 가능하나 명백하게 선호되지는 않는다.

[0968] 여러 뉴클레오티드간 가교 또는 뉴클레오티드간 연결이 가능하다. 여기에서 기술되는 식에 있어서 뉴클레오티드간 연결 IL은 -IL'-Y-로 나타내어진다. 따라서, IL = -IL'-Y- = -X'-'P(=X')(X⁻)-Y-이고, 여기에서 IL은 바람직하게는:

[0969] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(CH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃⁻)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-, -O-P(O)(O⁻)-N(CH₃)-, -N(CH₃)-P(O)(O⁻)-O-로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0970] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되고, 여전히 보다 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O- 및 -O-P(O)(S⁻)-O-로부터 선택되는 뉴클레오티드간 연결 IL이 바람직하다.

[0971] 따라서, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 이루어지는 핵산체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오티드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오티드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오티드가 LNA 뉴클레오티드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오티드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 뉴클레오티드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오티드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오티드가 하기 시퀀스 5'-N⁵-TTTGGTAG-N⁶-3' (시퀀스 동정 번호 11)로 나타내어지고, 여기에서

[0972] N⁵는: CTGCCCCAGAAGAGCTA-, TGCCCCAGAAGAGCTA-, GCCCCAGAAGAGCTA-, CCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGAAGAGCTA-, CCAGAAGAGCTA-, CAGAAGAGCTA-, AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;

[0973] N⁶은: -TGTTTAGGGAGCCGTCT, -TGTTTAGGGAGCCGTC, -TGTTTAGGGAGCCGT, -TGTTTAGGGAGCCG, -TGTTTAGGGAGCC, -TGTTTAGGGAGC, -TGTTTAGGGAG, -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T를 나타내고;

[0974] LNA 뉴클레오티드는 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -L-옥시-LNA (b^4), β -D-ENA (b^5), β -D-(NH)-LNA (b^6), β -D-(NCH₃)-LNA(b^7), β -D-(ONH)-LNA (b^8) 및 β -D-(ONCH₃)-LNA(b^9)로부터; 그리고 바람직하게는 β -

D-옥시-LNA (**b**¹), β-D-티오-LNA (**b**²), α-L-옥시-LNA (**b**⁴), β-D-(NH)-LNA (**b**⁶) 및 β-D-(NCH₃)-LNA(**b**⁷)로부터 선택되고;

[0975] 뉴클레오타이드간 연결이

[0976] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(CH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃⁻)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-, -O-P(O)(O⁻)-N(CH₃)-, -N(CH₃)-P(O)(O⁻)-O-로부터; 그리고 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.

[0977] 보다 바람직하게는 N⁵는: GCCCAGAAGAGCTA-, CCCCAGAAGAGCTA-, CCCAGAAGAGCTA-, CCAGAAGAGCTA-, CAGAAGAGCTA-, AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;

[0978] N⁶은: -TGTTTAGGGAGCCGT, -TGTTTAGGGAGCCG, -TGTTTAGGGAGCC, -TGTTTAGGGAGC, -TGTTTAGGGAG, -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T를 나타낸다.

[0979] 여전히 보다 바람직하게는, 본 발명은 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 겹량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 2 내지 5개 및 3' 말단에서의 2 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 7개, 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N⁵-TTTGGTAG-N⁶-3' (시퀀스 동정 번호 11))로 나타내어지고, 여기에서

[0980] N⁵는: CCAGAAGAGCTA-, CAGAAGAGCTA-, AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고; 바람직하게는 N⁵는: AGAAGAGCTA-, GAAGAGCTA-, AAGAGCTA-, AGAGCTA-, GAGCTA-, AGCTA-, GCTA-, CTA-, TA- 또는 A-를 나타내고;

[0981] N⁶은: -TGTTTAGGGAGC, -TGTTTAGGGAG, -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T를 나타내고; 바람직하게는 N⁶은: -TGTTTAGGGA, -TGTTTAGGG, -TGTTTAGG, -TGTTTAG, -TGTTTA, -TGTTT, -TGTT, -TGT, -TG 또는 -T를 나타내고;

[0982] LNA 뉴클레오타이드는 β-D-옥시-LNA (**b**¹), β-D-티오-LNA (**b**²), α-L-옥시-LNA (**b**⁴), β-D-(NH)-LNA (**b**⁶) 및 β-D-(NCH₃)-LNA(**b**⁷)로부터 선택되고;

[0983] 뉴클레오타이드간 연결은

[0984] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되고; 바람직하게는 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.

[0985] 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리

고 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리고 LNA 단위의 2개의 조각 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 단위의 조각을 포함하고, 여기에서 LNA 단위가 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -L-옥시-LNA (b^4), β -D-(NH)-LNA (b^6) 및 β -D-(NCH₃)-LNA(b^7)로부터 선택되고 뉴클레오타이드간 연결이 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 시퀀스 동정 번호 404 내지 시퀀스 동정 번호 438의 캡량체 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 특히 바람직하다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단기도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 LNA 단위, 바람직하게는 모든 LNA 단위 내에 5-메틸시토신 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 2-아미노아데닌 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 5-메틸시토신을 포함할 수 있다.

[0986] 표 7 (시퀀스 동정 번호 271a 내지 283b)의 캡량체 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 특히 바람직하다.

[0987] 게다가, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 캡량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N⁷-AATGGACC-N⁸-3' (시퀀스 동정 번호 100)로 나타내어지고, 여기에서

[0988] N⁷은: ATCTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[0989] N⁸은: -AGTATTCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다.

[0990] N⁷ 및/또는 N⁸은 또한 여기에서 기술되는 바와 같은 추가의 3' 및 5' 잔기의 제한된 목록 중의 임의의 것을 나타낼 수 있다.

[0991] 일반식 S6:

[0992] 5'-N⁷-AATGGACC-N⁸-3' (시퀀스 동정 번호 100) S6

[0993] 이 하기:

[0994] TATCTCATGAATGGACCA (시퀀스 동정 번호 439)

[0995] ATCTCATGAATGGACCAG (시퀀스 동정 번호 440)

[0996] TCTCATGAATGGACCAGT (시퀀스 동정 번호 441)

[0997] CTCATGAATGGACCAGTA (시퀀스 동정 번호 442)

[0998] TCATGAATGGACCAGTAT (시퀀스 동정 번호 443)

[0999] CATGAATGGACCAGTATT (시퀀스 동정 번호 444)

[1000] ATGAATGGACCAGTATTC (시퀀스 동정 번호 445)

[1001] TGAATGGACCAGTATTCT (시퀀스 동정 번호 446)

[1002] GAATGGACCAGTATTCTA (시퀀스 동정 번호 447)

[1003] ATCTCATGAATGGACCA (시퀀스 동정 번호 448)

- [1004] TCTCATGAATGGACCAG (시퀀스 동정 번호 449)
- [1005] CTCATGAATGGACCAGT (시퀀스 동정 번호 450)
- [1006] TCATGAATGGACCAGTA (시퀀스 동정 번호 451)
- [1007] CATGAATGGACCAGTAT (시퀀스 동정 번호 452)
- [1008] ATGAATGGACCAGTATT (시퀀스 동정 번호 453)
- [1009] TGAATGGACCAGTATTC (시퀀스 동정 번호 454)
- [1010] GAATGGACCAGTATTCT (시퀀스 동정 번호 455)
- [1011] TCTCATGAATGGACCA (시퀀스 동정 번호 456)
- [1012] CTCATGAATGGACCAG (시퀀스 동정 번호 457)
- [1013] TCATGAATGGACCAGT (시퀀스 동정 번호 458)
- [1014] CATGAATGGACCAGTA (시퀀스 동정 번호 459)
- [1015] ATGAATGGACCAGTAT (시퀀스 동정 번호 460)
- [1016] TGAATGGACCAGTATT (시퀀스 동정 번호 461)
- [1017] GAATGGACCAGTATTC (시퀀스 동정 번호 462)
- [1018] CTCATGAATGGACCA (시퀀스 동정 번호 463)
- [1019] TCATGAATGGACCAG (시퀀스 동정 번호 464)
- [1020] CATGAATGGACCAGT (시퀀스 동정 번호 465)
- [1021] ATGAATGGACCAGTA (시퀀스 동정 번호 466)
- [1022] TGAATGGACCAGTAT (시퀀스 동정 번호 467)
- [1023] GAATGGACCAGTATT (시퀀스 동정 번호 468)
- [1024] TCATGAATGGACCA (시퀀스 동정 번호 469)
- [1025] CATGAATGGACCAG (시퀀스 동정 번호 470)
- [1026] ATGAATGGACCAGT (시퀀스 동정 번호 471)
- [1027] TGAATGGACCAGTA (시퀀스 동정 번호 472)
- [1028] GAATGGACCAGTAT (시퀀스 동정 번호 473)
- [1029] 하에 속하는 갱량체 안티센스-올리고뉴클레오티드가 특히 바람직하다.
- [1030] 갱량체 (LNA 조각 1 - DNA 조각 - LNA 조각 2) 형태의 식 S6의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 LNA 조각을 포함하고 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 2개의 LNA 조각 및 2개의 LNA 조각 간에 6 내지 14개, 바람직하게는 7 내지 12개 보다 바람직하게는 8 내지 11개의 DNA 단위로 이루어지는 하나의 DNA 조각을 포함한다.
- [1031] 식 S6의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 여기에서 기술되는 바와 같은 LNA 뉴클레오티드 (LNA 단위), 특히 "잠금 핵산 (LNA[®])" 장에서 기술되는 것들 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"에서 기술되는 것들을 포함한다. LNA 단위 및 DNA 단위는 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T) 및 우라실 (U) 등과 같은 표준 핵염기를 포함할 수 있으나, 또한 "핵염기" 장에서 기술되는 바와 같은 변성된 핵염기를 포함할 수 있다. 식 S6의 안티센스-올리고뉴클레오티드 또는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 LNA 조각 및 DNA 조각은 여기에서 기술되는 바와 같은 임의의 뉴클레오티드간 연결 특히 "뉴클레오티드간 연결 (IL)" 장에서 기술되는 바와 같은 것들을 포함할 수 있다. 식 S6의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 선택적으로 또한 3' 말단 및/또는 5' 말단에 말단기 특히 "말단기" 장에서 기술되는 것들을 포함할 수 있다.

- [1032] 변성 핵염기가 시험된 신경학적 및 종양학적 적응증과 관련하여 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 활성을 상당히 증가 또는 변화하지는 않는다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 변성 핵염기 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌이 식 S6 특히 5-메틸시토신이 LNA 뉴클레오타이드에만 또는 LNA 뉴클레오타이드 중에 그리고 DNA 뉴클레오타이드 중에 사용되고/되거나 2-아미노아데닌이 DNA 뉴클레오타이드 중에 사용되고 LNA 뉴클레오타이드 중에는 사용되지 않는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 활성을 추가로 증가시킨다는 것이 입증되었다.
- [1033] 식 S6의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 바람직한 갭량체 구조는 다음과 같다: 3-8-3, 4-8-2, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3 그리고 여전히 보다 바람직하게는: 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 3-11-4 및 4-11-3.
- [1034] 식 S6의 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대한 LNA 단위로서 특히 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -L-옥시-LNA (b^4), β -D-ENA (b^5), β -D-(NH)-LNA (b^6), β -D-(NCH₃)-LNA(b^7), β -D-(ONH)-LNA (b^8) 및 β -D-(ONCH₃)-LNA(b^9)가 바람직하다. 이들 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 , b^7 , b^8 및 b^9 가 소정의 노력으로 합성될 수 있고 상당한 안정성 및 활성의 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 야기할 수 있다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 그러나 실험에 기초하여 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 및 b^7 이 보다 바람직하다. LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^6 및 b^7 이 여전히 보다 바람직하고, LNA 단위 b^1 및 b^4 가 심지어 보다 바람직하고, 화학적 합성의 복잡도와 관련하여 β -D-옥시-LNA(b^1)가 또한 가장 바람직하다.
- [1035] 특정한 3' 말단기 또는 5' 말단기가 종양학적 또는 신경학적 적응증에 대하여 안정성 또는 활성을 뚜렷하게 변화시키거나 증가시키는 것으로 밝혀지지 않는 한에서, 3' 및 5' 말단기가 가능하나 명백하게 선호되지는 않는다.
- [1036] 여러 뉴클레오타이드간 가교 또는 뉴클레오타이드간 연결이 가능하다. 여기에서 기술되는 식에 있어서 뉴클레오타이드간 연결 IL은 -IL'-Y-로 나타내어진다. 따라서, IL = -IL'-Y- = -X''-P(=X')(X⁻)-Y-이고, 여기에서 IL은 바람직하게는:
- [1037] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(CH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃⁻)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-, -O-P(O)(O⁻)-N(CH₃)-, -N(CH₃)-P(O)(O⁻)-O-로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [1038] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되고, 여전히 보다 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O- 및 -O-P(O)(S⁻)-O-로부터 선택되는 뉴클레오타이드간 연결 IL이 바람직하다.
- [1039] 따라서, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 갭량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N⁷-AATGGACC-N⁸-3'

(시퀀스 동정 번호 100)로 나타내어지고, 여기에서

[1040] N⁷은: ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[1041] N⁸은: -AGTATTCTAGAAACTCA, -AGTATTCTAGAAACTC, -AGTATTCTAGAAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내고;

[1042] LNA 뉴클레오티드는 β -D-옥시-LNA ($\mathbf{b}^1$), β -D-티오-LNA ($\mathbf{b}^2$), α -L-옥시-LNA ($\mathbf{b}^4$), β -D-ENA ($\mathbf{b}^5$), β -D-(NH)-LNA ($\mathbf{b}^6$), β -D-(NCH₃)-LNA($\mathbf{b}^7$), β -D-(ONH)-LNA ($\mathbf{b}^8$) 및 β -D-(ONCH₃)-LNA($\mathbf{b}^9$)로부터; 그리고 바람직하게는 β -D-옥시-LNA ($\mathbf{b}^1$), β -D-티오-LNA ($\mathbf{b}^2$), α -L-옥시-LNA ($\mathbf{b}^4$), β -D-(NH)-LNA ($\mathbf{b}^6$) 및 β -D-(NCH₃)-LNA($\mathbf{b}^7$)로부터 선택되고;

[1043] 뉴클레오티드간 연결은

[1044] $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$, $-S-P(O)(O^-)-O-$, $-S-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(O)(O^-)-S-$, $-O-P(O)(S^-)-S-$, $-S-P(O)(O^-)-S-$, $-O-P(O)(CH_3)-O-$, $-O-P(O)(OCH_3)-O-$, $-O-P(O)(NH(CH_3))-O-$, $-O-P(O)[N(CH_3)_2]-O-$, $-O-P(O)(BH_3^-)-O-$, $-O-P(O)(OCH_2CH_2OCH_3)-O-$, $-O-P(O)(OCH_2CH_2SCH_3)-O-$, $-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-$, $-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-$ 로부터; 그리고 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$, $-S-P(O)(O^-)-O-$, $-S-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(O)(O^-)-S-$, $-O-P(O)(S^-)-S-$, $-S-P(O)(O^-)-S-$ 로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오티드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오티드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.

[1045] 보다 바람직하게는 N⁷은: CTTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[1046] N⁸은: -AGTATTCTAGAAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A를 나타낸다.

[1047] 여전히 보다 바람직하게는, 본 발명은 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 갭량체의 형태이고 인티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 2 내지 5개 및 3' 말단에서의 2 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 7개, 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-RII를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-RII를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N⁷-AATGGACC-N⁸-3' (시퀀스 동정 번호 100)로 나타내어지고, 여기에서

[1048] N⁷은: GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고; 바람직하게는 N⁷은: ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- 또는 G-를 나타내고;

[1049] N⁸은: -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내고; 바람직하게는 N⁸은: -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내고;

[1050] LNA 뉴클레오타이드는 β -D-옥시-LNA (**b**¹), β -D-티오-LNA (**b**²), α -L-옥시-LNA (**b**⁴), β -D-(NH)-LNA (**b**⁶) 및 β -

D-(NCH₃)-LNA(**b**⁷)로부터 선택되고;

[1051] 뉴클레오타이드간 연결은

[1052] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터; 그리고 바람직하게는 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.

[1053] 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리고 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리고 LNA 단위의 2개의 조각 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 단위의 조각을 포함하고, 여기에서 LNA 단위가 β-D-옥시-LNA (**b**¹), β-D-티오-LNA (**b**²), α-L-옥시-LNA (**b**⁴), β-D-(NH)-LNA (**b**⁶) 및 β-D-(NCH₃)-LNA(**b**⁷)로부터 선택되고 뉴클레오타이드간 연결이 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 시퀀스 동정 번호 439 내지 시퀀스 동정 번호 473의 껍질체 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 특히 바람직하다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단기도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 LNA 단위, 바람직하게는 모든 LNA 단위 내에 5-메틸시토신 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 2-아미노아데닌 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 5-메틸시토신을 포함할 수 있다.

[1054] 표 8 (시퀀스 동정 번호 219a 내지 231b)의 껍질체 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 또한 특히 바람직하다.

[1055] 게다가, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 껍질체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF-R_{II}를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF-R_{II}를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N⁹-ATTAATAA-N¹⁰-3' (시퀀스 동정 번호 101)로 나타내어지고, 여기에서

[1056] N⁹는: CATATTTATATACAGGC-, ATATTTATATACAGGC-, TATTTATATACAGGC-, ATTTATATACAGGC-, TTTATATACAGGC-, TTATATACAGGC-, TATATACAGGC-, ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;

[1057] N¹⁰은: -AGTGCAAATGTTATTGG, -AGTGCAAATGTTATTG, -AGTGCAAATGTTATT, -AGTGCAAATGTTAT, -AGTGCAAATGTTA, -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다.

[1058] N⁹ 및/또는 N¹⁰은 또한 여기에서 기술되는 바와 같은 추가의 3' 및 5' 잔기의 제한된 목록 중의 임의의 것을 나타낼 수 있다.

[1059] 일반식 S7:

[1060] 5'-N⁹-ATTAATAA-N¹⁰-3' (시퀀스 동정 번호 101) S7

[1061] 이 하기:

[1062] TATACAGGCATTAATAAAA (시퀀스 동정 번호 474)

[1063] ATACAGGCATTAATAAAG (시퀀스 동정 번호 475)

- [1064] TACAGGCATTAATAAAAGT (시퀀스 동정 번호 476)
- [1065] ACAGGCATTAATAAAAGTG (시퀀스 동정 번호 477)
- [1066] CAGGCATTAATAAAAGTGC (시퀀스 동정 번호 478)
- [1067] AGGCATTAATAAAAGTGCA (시퀀스 동정 번호 479)
- [1068] GGCATTAATAAAAGTGCAA (시퀀스 동정 번호 480)
- [1069] GCATTAATAAAAGTGCAAA (시퀀스 동정 번호 481)
- [1070] CATTAATAAAAGTGCAAAT (시퀀스 동정 번호 482)
- [1071] ATACAGGCATTAATAAAA (시퀀스 동정 번호 483)
- [1072] TACAGGCATTAATAAAAG (시퀀스 동정 번호 484)
- [1073] ACAGGCATTAATAAAAGT (시퀀스 동정 번호 485)
- [1074] CAGGCATTAATAAAAGTG (시퀀스 동정 번호 486)
- [1075] AGGCATTAATAAAAGTGC (시퀀스 동정 번호 487)
- [1076] GGCATTAATAAAAGTGCA (시퀀스 동정 번호 488)
- [1077] GCATTAATAAAAGTGCAA (시퀀스 동정 번호 489)
- [1078] CATTAATAAAAGTGCAAA (시퀀스 동정 번호 490)
- [1079] TACAGGCATTAATAAAA (시퀀스 동정 번호 491)
- [1080] ACAGGCATTAATAAAAG (시퀀스 동정 번호 492)
- [1081] CAGGCATTAATAAAAGT (시퀀스 동정 번호 493)
- [1082] AGGCATTAATAAAAGTG (시퀀스 동정 번호 494)
- [1083] GGCATTAATAAAAGTGC (시퀀스 동정 번호 495)
- [1084] GCATTAATAAAAGTGCA (시퀀스 동정 번호 496)
- [1085] CATTAATAAAAGTGCAA (시퀀스 동정 번호 497)
- [1086] ACAGGCATTAATAAAA (시퀀스 동정 번호 498)
- [1087] CAGGCATTAATAAAAG (시퀀스 동정 번호 499)
- [1088] AGGCATTAATAAAAGT (시퀀스 동정 번호 500)
- [1089] GGCATTAATAAAAGTG (시퀀스 동정 번호 501)
- [1090] GCATTAATAAAAGTGC (시퀀스 동정 번호 502)
- [1091] CATTAATAAAAGTGCA (시퀀스 동정 번호 503)
- [1092] CAGGCATTAATAAAA (시퀀스 동정 번호 504)
- [1093] AGGCATTAATAAAAG (시퀀스 동정 번호 505)
- [1094] GGCATTAATAAAAGT (시퀀스 동정 번호 506)
- [1095] GCATTAATAAAAGTG (시퀀스 동정 번호 507)
- [1096] CATTAATAAAAGTGC (시퀀스 동정 번호 508)
- [1097] 하에 속하는 갭량체 안티센스-올리고뉴클레오티드가 특히 바람직하다.
- [1098] 갭량체 (LNA 조각 1 - DNA 조각 - LNA 조각 2) 형태의 식 S7의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 LNA 조각을 포함하고 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직

하계는 2 내지 4개의 LNA 단위로 이루어지는 2개의 LNA 조각 및 2개의 LNA 조각 간에 6 내지 14개, 바람직하게는 7 내지 12개 보다 바람직하게는 8 내지 11개의 DNA 단위로 이루어지는 하나의 DNA 조각을 포함한다.

[1099] 식 S7의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 여기에서 기술되는 바와 같은 LNA 뉴클레오타이드 (LNA 단위), 특히 "잠금 핵산 (LNA[®])" 장에서 기술되는 것들 그리고 바람직하게는 "바람직한 LNA"에서 기술되는 것들을 포함한다. LNA 단위 및 DNA 단위는 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T) 및 우라실 (U) 등과 같은 표준 핵염기를 포함할 수 있으나, 또한 "핵염기" 장에서 기술되는 바와 같은 변성된 핵염기를 포함할 수 있다. 식 S7의 안티센스-올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 LNA 조각 및 DNA 조각은 여기에서 기술되는 바와 같은 임의의 뉴클레오타이드간 연결 특히 "뉴클레오타이드간 연결 (IL)" 장에서 기술되는 바와 같은 것들을 포함할 수 있다. 식 S7의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 선택적으로 또한 3' 말단 및/또는 5' 말단에 말단기 특히 "말단기" 장에서 기술되는 것들을 포함할 수 있다.

[1100] 변성 핵염기가 시험된 신경학적 및 종양학적 적응증과 관련하여 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 활성을 상당히 증가 또는 변화하지는 않는다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 변성 핵염기 5-메틸시토신 또는 2-아미노아데닌이 식 S7 특히 5-메틸시토신이 LNA 뉴클레오타이드에만 또는 LNA 뉴클레오타이드 중에 그리고 DNA 뉴클레오타이드 중에 사용되고/되거나 2-아미노아데닌이 DNA 뉴클레오타이드 중에 사용되고 LNA 뉴클레오타이드 중에는 사용되지 않는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 활성을 추가로 증가시킨다는 것이 입증되었다.

[1101] 식 S7의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 바람직한 겹량체 구조는 다음과 같다: 3-8-3, 4-8-2, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3 그리고 여전히 보다 바람직하게는: 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 3-11-4 및 4-11-3.

[1102] 식 S7의 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대한 LNA 단위로서 특히 β -D-옥시-LNA (b^1), β -D-티오-LNA (b^2), α -L-옥시-LNA (b^4), β -D-ENA (b^5), β -D-(NH)-LNA (b^6), β -D-(NCH₃)-LNA(b^7), β -D-(ONH)-LNA (b^8) 및 β -D-(ONCH₃)-LNA(b^9)가 바람직하다. 이들 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 , b^7 , b^8 및 b^9 가 소정의 노력으로 합성될 수 있고 상당한 안정성 및 활성의 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 야기할 수 있다는 것이 실험으로 밝혀졌다. 그러나 실험에 기초하여 LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^5 , b^6 및 b^7 이 보다 바람직하다. LNA 단위 b^1 , b^2 , b^4 , b^6 및 b^7 이 여전히 보다 바람직하고, LNA 단위 b^1 및 b^4 가 심지어 보다 바람직하고, 화학적 합성의 복잡도와 관련하여 β -D-옥시-LNA(b^1)가 또한 가장 바람직하다.

[1103] 특정한 3' 말단기 또는 5' 말단기가 종양학적 또는 신경학적 적응증에 대하여 안정성 또는 활성을 뚜렷하게 변화시키거나 증가시키는 것으로 밝혀지지 않는 한에서, 3' 및 5' 말단기가 가능하나 명백하게 선호되지는 않는다.

[1104] 여러 뉴클레오타이드간 가교 또는 뉴클레오타이드간 연결이 가능하다. 여기에서 기술되는 식에 있어서 뉴클레오타이드간 연결 IL은 -IL'-Y-로 나타내어진다. 따라서, IL = -IL'-Y- = -X'-P(=X')(X⁻)-Y-이고, 여기에서 IL은 바람직하게는:

[1105] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(CH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃⁻)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-, -O-P(O)(O⁻)-N(CH₃)-, -N(CH₃)-P(O)(O⁻)-O-로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[1106] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되고, 여전히 보

다 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$ 로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-O-$ 및 $-O-P(O)(S^-)-O-$ 로부터 선택되는 뉴클레오타이드간 연결 IL이 바람직하다.

[1107] 따라서, 본 발명은 바람직하게는 10 내지 28개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 겹량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 1 내지 5개 및 3' 말단에서의 1 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 하기 시퀀스 5'-N⁹-ATTAATAA-N¹⁰-3' (시퀀스 동정 번호 101)로 나타내어지고, 여기에서

[1108] N⁹는: CATATTTATATACAGGC-, ATATTTATATACAGGC-, TATTTATATACAGGC-, ATTTATATACAGGC-, TTTATATACAGGC-, TTATATACAGGC-, TATATACAGGC-, ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;

[1109] N¹⁰은: -AGTGCAAATGTTATTG, -AGTGCAAATGTTATTG, -AGTGCAAATGTTATT, -AGTGCAAATGTTAT, -AGTGCAAATGTTA, -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내고;

[1110] LNA 뉴클레오타이드는 β -D-옥시-LNA (b¹), β -D-티오-LNA (b²), α -L-옥시-LNA (b⁴), β -D-ENA (b⁵), β -D-(NH)-LNA (b⁶), β -D-(NCH₃)-LNA (b⁷), β -D-(ONH)-LNA (b⁸) 및 β -D-(ONCH₃)-LNA (b⁹)로부터; 그리고 바람직하게는 β -D-옥시-LNA (b¹), β -D-티오-LNA (b²), α -L-옥시-LNA (b⁴), β -D-(NH)-LNA (b⁶) 및 β -D-(NCH₃)-LNA (b⁷)로부터 선택되고;

[1111] 뉴클레오타이드간 연결은

[1112] $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$, $-S-P(O)(O^-)-O-$, $-S-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(O)(O^-)-S-$, $-O-P(O)(S^-)-S-$, $-S-P(O)(O^-)-S-$, $-O-P(O)(CH_3)-O-$, $-O-P(O)(OCH_3)-O-$, $-O-P(O)(NH(CH_3))-O-$, $-O-P(O)[N(CH_3)_2]-O-$, $-O-P(O)(BH_3^-)-O-$, $-O-P(O)(OCH_2CH_2OCH_3)-O-$, $-O-P(O)(OCH_2CH_2SCH_3)-O-$, $-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-$, $-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-$ 로부터; 그리고 바람직하게는 $-O-P(O)(O^-)-O-$, $-O-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(S)(S^-)-O-$, $-S-P(O)(O^-)-O-$, $-S-P(O)(S^-)-O-$, $-O-P(O)(O^-)-S-$, $-O-P(O)(S^-)-S-$, $-S-P(O)(O^-)-S-$ 로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.

[1113] 보다 바람직하게는 N⁹는: TATTTATATACAGGC-, ATTTATATACAGGC-, TTTATATACAGGC-, TTATATACAGGC-, TATATACAGGC-, ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;

[1114] N¹⁰은: -AGTGCAAATGTTATT, -AGTGCAAATGTTAT, -AGTGCAAATGTTA, -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A를 나타낸다.

[1115] 여전히 보다 바람직하게는, 본 발명은 11 내지 24개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 12 내지 20개, 그리고 여전히 보다 바람직하게는 13 내지 19개 또는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 겹량체의 형태이고 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서의 이들 뉴클레오타이드 중의 2 내지 5개 및 3' 말단에서의 2 내지 5개의 뉴클레오타이드가 LNA 뉴클레오타이드이고 5' 말단과 3' 말단에서의 LNA 뉴클레오타이드 간에 적어도 7개, 바람직하게는 적어도 8개의 DNA 뉴클레오타이드가 존재하고 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 유전자의 영역과 또는 TGF- R_{II} 를 인코딩하는 mRNA의 영역과 하이브리드화할 수 있고, 여기에서 안티센스-올리고뉴클레오타이드가

하기 시퀀스 5'-N⁹-**ATTAATAA**-N¹⁰-3' (시퀀스 동정 번호 101)로 나타내어지고, 여기에서

- [1116] N⁹는: TTATATACAGGC-, TATATACAGGC-, ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고; 바람직하게는 N⁹는: ATATACAGGC-, TATACAGGC-, ATACAGGC-, TACAGGC-, ACAGGC-, CAGGC-, AGGC-, GGC-, GC- 또는 C-를 나타내고;
- [1117] N¹⁰은: -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내고; 바람직하게는 N¹⁰은: -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGTGC, -AGTG, -AGT, -AG 또는 -A를 나타내고;
- [1118] LNA 뉴클레오티드는 β-D-옥시-LNA (b¹), β-D-티오-LNA (b²), α-L-옥시-LNA (b⁴), β-D-(NH)-LNA (b⁶) 및 β-D-(NCH₃)-LNA(b⁷)로부터 선택되고;
- [1119] 뉴클레오티드간 연결은
- [1120] -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-로부터 선택되고; 바람직하게는 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 안티센스-올리고뉴클레오티드 및 그 안티센스-올리고뉴클레오티드의 염 및 광학 이성질체에 관한 것이다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오티드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 5-메틸시토신 및/또는 2-아미노아데닌을 포함하지 않을 수 있다.
- [1121] 3' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리고 5' 말단에 2 내지 5개, 바람직하게는 2 내지 4개 그리고 보다 바람직하게는 3 내지 4개의 LNA 단위의 조각 그리고 LNA 단위의 2개의 조각 간에 적어도 6개, 바람직하게는 7개 그리고 보다 바람직하게는 8개의 DNA 단위의 조각을 포함하고, 여기에서 LNA 단위가 β-D-옥시-LNA (b¹), β-D-티오-LNA (b²), α-L-옥시-LNA (b⁴), β-D-(NH)-LNA (b⁶) 및 β-D-(NCH₃)-LNA(b⁷)로부터 선택되고 뉴클레오티드간 연결이 포스페이트, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택되는 시퀀스 동정 번호 474 내지 시퀀스 동정 번호 508의 겹량체 안티센스-올리고뉴클레오티드가 특히 바람직하다. 이러한 바람직한 안티센스-올리고뉴클레오티드는 어떠한 변성 3' 및 5' 말단도 포함하지 않을 수 있거나 어떠한 3' 및 5' 말단기도 포함하지 않을 수 있고 변성 핵염기로서 LNA 단위, 바람직하게는 모든 LNA 단위 내에 5-메틸시토신 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 2-아미노아데닌 및/또는 일부 또는 모든 DNA 단위 내에 5-메틸시토신을 포함할 수 있다.
- [1122] 표 9 (시퀀스 동정 번호 284a 내지 236b)의 겹량체 안티센스-올리고뉴클레오티드가 또한 특히 바람직하다.

[1123] [표 4]

SP	L	시퀀스 동정번호	시퀀스, 5'→3'
357	10	232a	C ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sdTsdC ⁺ sdAsdTsdAsdGsAb ⁺ sC ⁺ b ⁺
357	10	232b	C ⁺ b ⁺ Gb ⁺ dTsdC ⁺ dAdTdAdGAb ⁺ C ⁺ b ⁺
356	12	233a	Tb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sdTsdC ⁺ sdAsdTsdAsdGsAb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺
356	12	233b	Tb ⁺ sC ⁺ b ⁺ Gb ⁺ dTsdC ⁺ dAdTdAdGAb ⁺ C ⁺ b ⁺ C ⁺ b ⁺
356	12	233c	Tb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sdTsdC ⁺ sdAsdTsdAsdGsAsC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺
356	12	233d	Tb ⁺ sdC ⁺ sdGsdTsdC ⁺ sdAsdTsdAsdGsAsC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺
356	12	233e	Tb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsAsdC ⁺ sC ⁺ b ⁺
355	13	234a	Tb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sTb ⁺ sdCsdAsdTsdAsdGsAsC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	13	234b	Tb ⁺ sC ⁺ b ⁺ Gb ⁺ Tb ⁺ dCdAdUdAdGdAC ⁺ b ⁺ C ⁺ b ⁺ Gb ⁺
355	13	234c	Tb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sTb ⁺ sdC ⁺ sdAsdTsdAsdGsAsC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	13	234d	Tb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sdTsdC ⁺ sdA ⁺ sdTsdA ⁺ sdGsAd ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	13	234e	Tb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sdGsdTsdC ⁺ sdAsdTsdA ⁺ sdGsAd ⁺ sC ⁺ sdCsGb ⁺
355	13	234f	Tb ⁺ sdCsdGsdTsdC ⁺ sdA ⁺ sdTsdAsdGsAb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
354	13	142c	C ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sTb ⁺ sdCsdAsdTsdAsdGsAdCsdCsGb ⁺ sAb ⁺
355	14	143i	C ⁺ b ⁺ sTb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sdTsdCsdAsdTsdAsdGsAb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	14	143j	C ⁺ b ⁺ ssTb ⁺ ssC ⁺ b ⁺ ssdGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdA ⁺ ssC ⁺ b ⁺ ssC ⁺ b ⁺ ssGb ⁺
355	14	143h	C ⁺ b ⁺ sTb ⁺ sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsAsC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	14	143k	C ⁺ b ⁺ ssTb ⁺ ssC ⁺ b ⁺ ssdGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdAssC ⁺ b ⁺ ssC ⁺ b ⁺ ssGb ⁺
355	14	143m	C ⁺ b ⁺ Tb ⁺ C ⁺ b ⁺ Gb ⁺ dUsdCsdAsdTsdAsdGsAb ⁺ C ⁺ b ⁺ C ⁺ b ⁺ Gb ⁺
355	14	143n	C ⁺ b ⁺ sTb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sTb ⁺ sdCsdA ⁺ sdTsdA ⁺ sdGsAd ⁺ sC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	14	143o	C ⁺ b ⁺ sTb ⁺ sdCsdGsUdCsdAsdUsdAsGb ⁺ sAb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	14	143p	C ⁺ b ⁺ sTb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sdTsdCsdAsdTsdAsdGsAsC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	14	143q	C ⁺ b ⁺ sTb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sdGsUdCsdA ⁺ sdUsdA ⁺ sdGsAd ⁺ sC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	14	143r	C ⁺ b ⁺ sTb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sdTsdC ⁺ sdA ⁺ sdTsdAsdGsAdC ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	14	143s	C ⁺ b ⁺ Tb ⁺ C ⁺ b ⁺ Gb ⁺ dTsdCdAdTdAdGdAdCC ⁺ b ⁺ Gb ⁺
355	14	143t	C ⁺ b ⁺ ssTb ⁺ ssC ⁺ b ⁺ ssdGssdTssdC ⁺ ssdAssdTssdAssdGssdAssC ⁺ b ⁺ ssC ⁺ b ⁺ ssGb ⁺
355	14	143u	C ⁺ b ⁺ Tb ⁺ sdCsdGsUdC ⁺ sdAsdUsdAsdGsAsC ⁺ b ⁺ C ⁺ b ⁺ Gb ⁺
355	14	143v	C ⁺ b ⁺ Tb ⁺ sdC ⁺ sdGsdTsdC ⁺ sdA ⁺ sdTsdAsdGsAsC ⁺ b ⁺ C ⁺ b ⁺ Gb ⁺
355	14	143w	C ⁺ b ⁺ sTb ⁺ sdC ⁺ dGdTsdC ⁺ dAdTdAdGdAsC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	14	143x	C ⁺ b ⁺ sTb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺ sdTsdC ⁺ sdAsdTsdAsdGsAsC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	14	143y	C ⁺ b ⁺ sTb ⁺ sdC ⁺ sdGsdTsdCsdAsdUsdAsdGsAb ⁺ sC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	14	143z	C ⁺ b ⁺ sTb ⁺ sdC ⁺ sdGsdTsdC ⁺ sdAsdTsdAsdGsAsC ⁺ b ⁺ sC ⁺ b ⁺ sGb ⁺
355	14	143aa	C ⁺ b ⁺ Tb ⁺ sdC ⁺ sdGsdTsdC ⁺ sdAsdTsdAsdGsAsC ⁺ b ⁺ C ⁺ b ⁺ Gb ⁺

[1124]

355	14	143ab	C ^b 1sTb ¹ sdC [*] sdGsdTsdC [*] sdA [*] sdTsdAsdGsdA [*] sC ^b 1sC ^b 1sGb ¹
355	14	143ac	C ^b 1sTb ¹ sdC [*] sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC ^b 1sC ^b 1sGb ¹
355	14	143ad	C ^b 1Tb ¹ dC [*] dGdTdCdAdTdAdGdAC ^b 1C ^b 1Gb ¹
355	14	143ae	C ^b 1sTb ¹ sdC [*] dGdTdC [*] dAdTdAdGdAsC ^b 1sC ^b 1sGb ¹
355	14	143af	/5SpC3s/C ^b 1sTb ¹ sdC [*] dGdTdC [*] dA [*] dTdAdGdA [*] sC ^b 1sC ^b 1sGb ¹
355	14	143ag	C ^b 1sTb ¹ sdC [*] dGdTdC [*] dA [*] dTdAdGdA [*] sC ^b 1sC ^b 1sGb ¹ /3SpC3s/
355	14	143ah	/5SpC3s/C ^b 1sTb ¹ sdC [*] dGdTdC [*] dA [*] dTdAdGdA [*] sC ^b 1sC ^b 1sGb ¹ /3SpC3s/
355	14	143ai	C ^b 1sTb ¹ sdC [*] sdGsdUsdC [*] sdA [*] sdUsdA [*] sdGsdA [*] sC ^b 1sC ^b 1sGb ¹
355	14	143aj	C ^b 1sTb ¹ sC ^b 1sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC ^b 1sC ^b 1sGb ¹
356	14	145c	Gb ¹ sC ^b 1sTb ¹ sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsAb ¹ sC ^b 1sC ^b 1
354	15	235i	C ^b 1sTb ¹ sC ^b 1sGb ¹ sdTsdC [*] dAdTdAdGdAsC ^b 1sC ^b 1sGb ¹ sAb ¹
354	15	235a	C ^b 1sTb ¹ ssdCsdGsdTssdCsdAssdTssdAssdGsdAssdCsdCsdGssAb ¹
354	15	235b	C ^b 1Tb ¹ dCdGdTdCdAdTdAdGdAdCdCdGAb ¹
354	15	235c	C ^b 1sTb ¹ sdCsdGsdTsdCsdA [*] sdUsdAsdGsdAsdCsC ^b 1sGb ¹ sAb ¹
354	15	235d	C ^b 1Tb ¹ sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC ^b 1C ^b 1Gb ¹ Ab ¹
354	15	235e	C ^b 1sTb ¹ sC ^b 1sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsGsb ¹ sAb ¹
354	15	235f	C ^b 1sTb ¹ sC ^b 1sGb ¹ sdGdTdCdA [*] dTdAdGdAdC [*] sC ^b 1sGb ¹ sAb ¹
354	15	235g	C ^b 1sTb ¹ sC ^b 1sGb ¹ sdTsdC [*] sdAsdTsdAsdGsdAsdC [*] sdC [*] sdGsAb ¹
354	15	235h	C ^b 1sTb ¹ ssdCsdGsdUssdCsdAssdUssdAssdGsdAssdCsdCsdGsGb ¹ ssAb ¹
355	15	144c	Gb ¹ sC ^b 1sTb ¹ sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC ^b 1sC ^b 1sGb ¹
354	16	141c	Gb ¹ sC ^b 1sTb ¹ sC ^b 1sdGsdTsdC [*] sdAsdTsdAsdGsdAsC ^b 1sC ^b 1sGb ¹ sAb ¹
354	16	141d	Gb ¹ C ^b 1Tb ¹ C ^b 1sdGsdTsdC [*] sdAsdTsdAsdGsdAsdCsC ^b 1Gb ¹ Ab ¹
354	16	141e	Gb ¹ sC ^b 1sTb ¹ sC ^b 1sdGsdTsdC [*] sdAsdTsdAsdGsdA [*] sdC [*] sdC [*] sGb ¹ sAb ¹
354	16	141f	Gb ¹ sdC [*] sdTsdCsdGsdTsdC [*] sdA [*] sdTsdAsdGsdA [*] sdC [*] sdC [*] sdGsAb ¹
354	16	141g	Gb ¹ sC ^b 1sTb ¹ sdCsdGsdUsdCsdAsdTsdA [*] sdGsdAsdCsC ^b 1sGb ¹ sAb ¹
354	16	141h	Gb ¹ ssC ^b 1sTb ¹ ssdCsdGsdTssdCsdAssdTssdAssdGsdAssC ^b 1ssC ^b 1ssGb ¹ ssAb ¹
354	16	141i	Gb ¹ C ^b 1dCdGdTdCdA [*] dTdA [*] dGdA [*] dCC ^b 1Gb ¹ Ab ¹
354	16	141j	Gb ¹ sC ^b 1sTb ¹ sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsC ^b 1sGb ¹ sAb ¹
351	16	139c	C ^b 1sGb ¹ sTb ¹ sdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsdGsdAsGb ¹ sC ^b 1sC ^b 1
354	17	237a	Tb ¹ sGb ¹ sC ^b 1sTb ¹ sC ^b 1sdGsdTsdC [*] sdAsdTsdAsdGsAb ¹ sC ^b 1sC ^b 1sGb ¹ sAb ¹
354	17	237b	Tb ¹ sGb ¹ sC ^b 1sTb ¹ sdGsdTsdC [*] sdAsdTsdAsdGsAb ¹ sC ^b 1sC ^b 1sGb ¹ sAb ¹
354	17	237c	Tb ¹ sGb ¹ sC ^b 1sTb ¹ sdC [*] sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC [*] sC ^b 1sGb ¹ sAb ¹
354	17	237d	Tb ¹ sdGsdCsdUsdC [*] sdGsdTsdC [*] sdAsdUsdAsdGsAb ¹ sC ^b 1sC ^b 1sGb ¹ sAb ¹
354	17	237e	Tb ¹ sGb ¹ sC ^b 1sdTsdGsdTsdC [*] sdA [*] sdGsAb ¹ sC ^b 1sC ^b 1sGb ¹ sAb ¹
354	17	237f	Tb ¹ Gb ¹ dC [*] dTdGdTdC [*] dAdTdAdGdAC ^b 1C ^b 1Gb ¹ Ab ¹

[1125]

354	17	237g	$Tb^1sdGsdC^*sdTsdGsdTsdC^*sdAsdTsdAsdGsdAsdC^*sC^b'sGb^1sAb^1$
354	17	237h	$Tb^1Gb^1C^b'Tb^1C^b'dGdTdC^*dAdTdAdGdA^*dC^*dC^*Gb^1Ab^1$
354	17	237i	$Tb^1ssGb^1ssC^b'ssTb^1ssC^b'ssdGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdAssdC^*ssC^b'ssGb^1ssAb^1$
354	17	237j	$Tb^1sGb^1sC^b'b'sdTdGdTdCdA^*dTdA^*dGdA^*sC^b'b'sGb^1sAb^1$
354	17	237k	$Tb^1sGb^1sC^b'b'sdUsdGsdUsdC^*sdA^*sdUsdA^*sdGsdA^*sdC^*sC^b'sGb^1sAb^1$
354	17	237m	$Tb^1sGb^1sC^b'b'sTb^1sdC^*dGdTdC^*dAdTdAdGdAsC^b'b'sC^b'b'sGb^1sAb^1$
353	18	238a	$Tb^1sGb^1sC^b'b'sTb^1sC^b'sdGsdTsdC^*sdAsdTsdAsdGsdAsC^b'sC^b'b'sGb^1sAb^1sGb^1$
353	18	238b	$Tb^1sGb^1sC^b'b'sTb^1sC^b'sdGsdTsdC^*sdAsdTsdAsdGsdAsdC^*sdC^*sdGsdAsGb^1$
353	18	238c	$Tb^1sGb^1sC^b'b'sTb^1sdC^*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC^*sC^b'sGb^1sAb^1sGb^1$
353	18	238d	$Tb^1sGb^1sdC^*sdTsdC^*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC^*sdC^*sGb^1sAb^1sGb^1$
353	18	238e	$Tb^1sGb^1sC^b'b'sTb^1sdC^*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC^*sdC^*sGb^1sAb^1sGb^1$
353	18	238f	$Tb^1Gb^1dC^*dUdC^*dGdTdC^*dAdTdAdGdA^*C^b^1C^b^1Gb^1Ab^1Gb^1$
353	18	238g	$Tb^1Gb^1C^b^1Tb^1sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC^b^1C^b^1Gb^1Ab^1Gb^1$
353	18	238h	$Tb^1ssGb^1ssC^b'b'ssdTssdC^*ssdGssdTssdC^*ssdAssdTssdA^*ssdGssdAssdC^*ssdC^*ssGb^1ssAb^1ssGb^1$
353	18	238i	$Tb^1Gb^1C^b^1b'sdTdCdGdTdC^*dAdTdAdGdAC^*b^1C^b^1Gb^1Ab^1Gb^1$
352	19	239a	$Tb^1sGb^1sC^b'b'sTb^1sC^b'sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC^*sC^b'sGb^1sAb^1sGb^1sC^b^1$
352	19	239b	$Tb^1Gb^1C^b^1b'sTb^1C^b'b'dGdTdC^*dAdTdAdGdAdC^*C^b^1Gb^1Ab^1Gb^1C^b^1$
352	19	239c	$Tb^1sGb^1sC^b'b'sTb^1sdC^*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsdGsAb^1sGb^1sC^b^1$
352	19	239d	$Tb^1sdGsdCsdTsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdA^*sdC^*sC^b'sGb^1sAb^1sGb^1sC^b^1$
352	19	239e	$Tb^1sGb^1sdCsdUsdCsdGsdUsdCsdAsdTsdAsdGsdA^*sdC^*sdC^*sGb^1sAb^1sGb^1sC^b^1$
352	19	239f	$Tb^1ssGb^1ssC^b'b'ssTb^1ssC^b'b'ssdGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdAssdC^*ssdCssdGssdAssGb^1ssC^b^1$
352	20	240a	$C^b^1sTb^1sGb^1sC^b'b'sTb^1sdC^*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC^*sC^b^1sGb^1sAb^1sGb^1sC^b^1$
352	20	240b	$C^b^1sTb^1sGb^1sdC^*sdTsdC^*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC^*sC^b^1sGb^1sAb^1sGb^1sC^b^1$
352	20	240c	$C^b^1Tb^1Gb^1dC^*dGdTdCdAdTdAdGdAdC^*dC^*Gb^1Ab^1Gb^1C^b^1$
352	20	240d	$C^b^1sdUsdGsdCsdUsdC^*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC^*sC^b^1sGb^1$

[1126]

			$sAb'sGb'sC^b$
352	20	240e	$C^b'sTb'sGb'sC^b'sdTsdcSdGsdTsdcSdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsGb^4$ $sAb'sGb'sC^b$
351	22	241a	$Gb'sC^b'sTb'sGb'sC^b'sdTsdC^*sdGsdTsdcSdAsdTsdAsdGsdAsdCsdC^*$ $sGb'sAb'sGb'sC^b'sC^b$
351	22	241b	$Gb'sC^b'Tb'Gb'C^b'dTdC^*dGdTdC^*dAdTdAdGdAdC^*dC^*Gb'Ab'Gb'C^b$ C^b
351	22	241c	$Gb'sC^b'sTb'sGb'sC^b'sdTsdTsdcSdGsdTsdcSdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsGb$ $sAb'sGb'sC^b$
350	24	242a	$C^b'sGb'sC^b'sTb'sGb'sdScdTsdTsdcSdGsdTsdcSdAsdTsdAsdGsdAsdCsdC^*$ $sdGsAb'sGb'sC^b'sC^b$
350	24	242b	$C^b'Gb'C^b'Tb'Gb'C^*dTdCdGdTdCdAdTdAdGdAdCdC^*dGAb'Gb'C^b$ $C^b'C^b$
349	26	243a	$C^b'sC^b'sGb'sC^b'sTb'sdGsdC^*sdTsdcSdGsdTsdcS^*sdAsdTsdAsdGsdAs$ $dCsdC^*sdGsAdGsGb'sC^b'sC^b'sC^b'sC^b$
349	26	243b	$C^b'sC^b'Gb'C^b'Tb'dGdC^*dTdCdGdTdC^*dAdTdAdGdAdCdC^*dGdAGb'C^b$ $C^b'C^b'C^b$
		244a	$C^b'sC^b'sC^b'sGb'sC^b'sdTsdTsdcSdCsdTsdcSdGsdTsdcS^*sdAsdTsdAsdGs$ $dAsdC^*sdCsdGsdAsdGsC^b'sC^b'sC^b'sC^b'sC^b$
348	28	244b	$C^b'C^b'C^b'C^b'C^b'dTdGdC^*dTdCdGdTdC^*dAdTdAdGdAdC^*dCdGdAdG$ $C^b'C^b'C^b'C^b'C^b$

[1127]

[1128] [표 5]

SP	L	시퀀스 통정번호	시퀀스, 5'-3'
431	10	245a	Tb ¹ sAb ¹ sdC [*] sdGsdCsdGsdTsdC [*] sC [*] b ¹ sAb ¹
431	10	245b	Tb ¹ Ab ¹ dCdGdC [*] dGdTdCC [*] b ¹ Ab ¹
430	12	246a	Ab ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdC [*] sdGsdCsdGsdTsdCsC [*] b ¹ sAb ¹ sC [*] b ¹
430	12	246b	Ab ¹ Tb ¹ Ab ¹ dCdGdCdGdTdC [*] C [*] b ¹ Ab ¹ C [*] b ¹
430	12	246c	Ab ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdCsdGsdCsdGsdTsdC [*] sdC [*] sAb ¹ sC [*] b ¹
430	12	246d	Ab ¹ sTb ¹ sdA [*] sdC [*] sdGsdCsdGsdTsdC [*] sdC [*] sdA [*] sC [*] b ¹
430	12	246e	Ab ¹ sdTsdA [*] sdC [*] sdGsdC [*] sdGsdTsdC [*] sdC [*] sAb ¹ sC [*] b ¹
430	13	247a	Gb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdCsdGsdCsdGsdTsdCsC [*] b ¹ sAb ¹ sC [*] b ¹
430	13	247b	Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ Ab ¹ dCdGdCdGdUdCC [*] b ¹ Ab ¹ C [*] b ¹
430	13	247c	Gb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdC [*] sdGsdCsdGsdTsdC [*] sC [*] b ¹ sAb ¹ sC [*] b ¹
430	13	247d	Gb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdA [*] sdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC [*] sAb ¹ sC [*] b ¹
430	13	247e	Gb ¹ sAb ¹ sdTsdA [*] sdCsdGsdC [*] sdGsdTsdCsdC [*] sdA [*] sC [*] b ¹
430	13	247f	Gb ¹ sdA [*] sdTsdA [*] sdC [*] sdGsdCsdGsdTsC [*] b ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹ sC [*] b ¹
431	13	153f	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsC [*] b ¹ sAb ¹
429	14	248a	Gb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdC [*] sdGsdC [*] sdGsdTsdC [*] sC [*] b ¹ sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
429	14	248b	Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ Ab ¹ sdC [*] sdGsdCsdGsdTsdC [*] sdC [*] sAb ¹ C [*] b ¹ Ab ¹
429	14	248c	Gb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdC [*] sdGsdCsdGsdTsdC [*] sdC [*] sdA [*] sC [*] b ¹ sAb ⁴
429	14	248d	Gb ¹ sdA [*] sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC [*] sdA [*] sdCsAb ¹
429	14	248e	Gb ² sAb ² sTb ² sdA [*] sdCsdGsdCsdGsdUdCsdCsAb ² sC [*] b ² sAb ²
429	14	248f	Gb ⁴ ssAb ⁴ ssdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdCsAb ⁴ ssC [*] b ⁴ ssAb ⁴
429	14	248g	Gb ¹ Ab ¹ dTdA [*] dCdGdCdGdTdCC [*] b ¹ Ab ¹ C [*] b ¹ Ab ¹
429	15	152h	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
429	15	152i	C [*] b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ sdAsdCsdGsdCsdGsdUdCsdC [*] sAb ¹ C [*] b ¹ Ab ¹
429	15	152j	C [*] b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ sdA [*] sdCsdGsdCsdGsdUdCsdCsAb ¹ C [*] b ¹ Ab ¹
429	15	152k	C [*] b ⁶ sGb ⁶ sAb ⁶ sTb ⁶ sdAdC [*] dGdCdGdTdCdC [*] sAb ⁶ sC [*] b ⁶ sAb ⁶
429	15	152m	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdC [*] sdC [*] sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
429	15	152n	C [*] b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ sdAsdC [*] sdGsdC [*] sdGsdTsdC [*] sdC [*] sAb ¹ C [*] b ¹ Ab ¹
429	15	152o	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdA [*] sdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC [*] sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
429	15	152p	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC [*] sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
429	15	152q	C [*] b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ dAdCdGdC [*] dGdTdCdC [*] Ab ¹ C [*] b ¹ Ab ¹
429	15	152r	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAdC [*] dGdC [*] dGdTdCdC [*] sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
429	15	152s	/5SpC3s/C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdC [*] sdGsdC [*] sdGsdTsdCsdCsAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
429	15	152t	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdC [*] sdGsdCsdGsdTsdCsdC [*] sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹ /3SpC3s/
429	15	152u	/5SpC3s/C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdC [*] sdGsdC [*] sdGsdTsdCsdCsAb ¹ sC [*] b ¹

[1129]

			sAb ¹ /3SpC3s/
429	15	152v	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdA [*] sdC [*] sdGsdC [*] sdGsdUsdC [*] sdC [*] sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
429	15	152w	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAsdCsdGsdC [*] sdGsdTsdCsC [*] b ¹ sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
429	15	152z	C [*] b ⁷ sGb ⁷ sdAsdUsdAsdCsdGsdC [*] sdGsdUsdCsC [*] b ⁷ sAb ⁷ sC [*] b ⁷ sAb ⁷
429	15	152aa	C [*] b ¹ ssGb ¹ ssAb ¹ ssdTsdAssdC [*] ssdGssdCssdGssdTsdCssdC [*] ssAb ¹ ssC [*] b ¹ ssAb ¹
429	15	152ab	C [*] b ¹ ssGb ¹ ssAb ¹ ssdTsdA [*] ssdCssdGssdCssdGssdTsdCssdCssdA [*] ssC [*] b ¹ ssAb ¹
429	15	152ac	C [*] b ² ssGb ² ssAb ² ssTb ² ssdAssdCssdGssdCssdGssdTsdCssdCssdAssdCssAb ²
429	15	152ad	C [*] b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ dAdCdGdCdGdUdCC [*] b ¹ Ab ¹ C [*] b ¹ Ab ¹
429	15	152ae	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdCsdGsdCsdGsdUsdCsdCsAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
429	15	152af	C [*] b ¹ sGb ¹ sdA [*] sdTsdA [*] sdCsdGsdCsdGsdTsC [*] b ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
429	15	152ag	C [*] b ⁶ sGb ⁶ sAb ⁶ sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsC [*] b ⁶ sAb ⁶ sC [*] b ⁶ sAb ⁶
429	15	152ah	C [*] b ⁷ sGb ⁷ sAb ⁷ sdUsdA [*] sdCsdGsdCsdGsdUsdCsdCsAb ⁷ sC [*] b ⁷ sAb ⁷
429	15	152ai	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdA [*] sdCsdGsdCsdGsdTsdC [*] sdC [*] sdA [*] sC [*] b ¹ sAb ¹
429	15	152aj	C [*] b ⁴ Gb ⁴ Ab ⁴ Tb ⁴ dAdCdGdCdGdTdCdCdAC [*] b ⁴ Ab ⁴
429	15	152ak	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹
428	16	249a	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAdCdGdCdGdTdCdC [*] sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹ sGb ¹
428	16	249b	C [*] b ¹ ssGb ¹ ssdAssdTsdAssdCssdGssdCssdGssdTsdCssdCssdAssdCssdAssGb ¹
428	16	249c	C [*] b ¹ Gb ¹ dAdTdAdCdGdCdGdTdCdCdAdCdAGb ¹
428	16	249d	C [*] b ¹ sGb ¹ sdAsdUsdAsdC [*] sdGsdCsdGsdUsdCsdC [*] sdAsC [*] b ¹ sAb ¹ sGb ¹
428	16	249e	C [*] b ¹ Gb ¹ sdAsdTsdAsdC [*] sdGsdC [*] sdGsdTsdCsdC [*] sAb ¹ C [*] b ¹ Ab ¹ Gb ¹
428	16	249f	C [*] b ⁴ sGb ⁴ sAb ⁴ sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdCsAb ⁴ sGb ⁴
428	16	249g	C [*] b ⁶ Gb ⁶ Ab ⁶ dTdAdCdGdCdGdTdCdA [*] C [*] b ⁶ Ab ⁶ Gb ⁶
428	16	249h	C [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdC [*] sdGsdCsdGsdTsdCsdC [*] sdAsdC [*] sdAsGb ¹
428	16	249i	C [*] b ¹ ssGb ¹ ssdAssdUsdAssdCssdGssdCssdGssdUsdCssdCssdAssdCssAb ¹ ssGb ¹
428	17	250a	Gb ¹ sC [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdCsdGsdC [*] sdGsdTsdCsC [*] b ¹ sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹ ssGb ¹
428	17	250b	Gb ¹ sC [*] b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdTsdAsdC [*] sdGsdC [*] sdGsdTsdC [*] sdAsC [*] b ¹ sAb ¹ ssGb ¹
428	17	250c	Gb ¹ sdC [*] sdGsdAsdUsdAsdCsdGsdC [*] sdGsdUsdCsC [*] b ¹ sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹ ssGb ¹
428	17	250d	Gb ¹ sC [*] b ¹ sGb ¹ sdA [*] sdTsdA [*] sdC [*] sdGsdC [*] sdGsdTsdC [*] sC [*] b ¹ sAb ¹ sC [*] b ¹ sAb ¹ ssGb ¹
428	17	250e	Gb ¹ C [*] b ¹ dGdAdTdAdCdGdC [*] dGdTdCdC [*] Ab ¹ C [*] b ¹ Ab ¹ Gb ¹
428	17	250f	Gb ¹ sdC [*] sdGsdAsdTsdAsdCsdGsdC [*] sdGsdTsdCsdCsdAsC [*] b ¹ sAb ¹ ssGb ¹
428	17	250g	Gb ² sC [*] b ² sGb ² sdAsdTsdAsdCsdGsdC [*] sdGsdTsdC [*] sC [*] b ² sAb ² sC [*] b ² sAb ² ssGb ²

[1130]

428	17	250h	Gb ¹ C ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ dA ¹ dCdGdC ¹ dGdTdC ¹ dCdA ¹ dC ¹ Ab ¹ Gb ¹
428	17	250i	Gb ¹ ssC ¹ b ¹ ssGb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssdAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdAssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssGb ¹
428	17	250j	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ s dA ¹ s dTsdA ¹ s dCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹
428	17	250k	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ s dA ¹ s dUsdAsdCsdGsdCsdGsdUsdC ¹ s dCsdA ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹
428	17	250m	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ s dTdAdCdGdCdGdTdC ¹ dCsAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹
427	18	251a	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ s dAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sGb ¹
427	18	251b	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ s dAsdC ¹ s dGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdCsdAsdGsGb ¹
427	18	251c	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ s dTsdAsdC ¹ s dGsdCsdGsdTsdCsdC ¹ s dAsC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹
427	18	251d	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ s dAsdTsdAsdC ¹ s dGsdC ¹ s dGsdTsdCsdC ¹ s dAsC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹
427	18	251e	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ s dTsdAsdC ¹ s dGsdCsdGsdTsdCsdC ¹ s dAsdC ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹
427	18	251f	Gb ¹ C ¹ b ¹ dGdAdUdA ¹ dCdGdCdGdTdC ¹ dC ¹ Ab ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹ Gb ¹ Gb ¹
427	18	251g	Gb ¹ C ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹ s dTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹ Gb ¹ Gb ¹
427	18	251h	Gb ¹ ssC ¹ b ¹ ssGb ¹ ssdA ¹ ssdTssdA ¹ ssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdA ¹ ssdC ¹ ssAb ¹ ssGb ¹ ssGb ¹
427	18	251i	Gb ¹ C ¹ b ¹ Gb ² dAdTdAdCdGdC ¹ dGdTdCdC ¹ Ab ¹ C ¹ b ¹ Ab ² Gb ² Gb ²
426	19	252a	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ s dAsdC ¹ s dGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
426	19	252b	Gb ¹ C ¹ b ¹ Gb ¹ Ab ¹ Tb ¹ dAdC ¹ dGdCdGdTdCdC ¹ dAC ¹ b ¹ Ab ¹ Gb ¹ Gb ¹ Ab ¹
426	19	252c	Gb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ s dAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdC ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
426	19	252d	Gb ¹ s dC ¹ s dGsdA ¹ s dTsdA ¹ s dC ¹ s dGsdCsdGsdTsdCsdCsdA ¹ sC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
426	19	252e	Gb ¹ sC ¹ b ¹ s dGsdAsdUsdAsdCsdGsdCsdGsdUsdCsdCsdAsdC ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
426	19	252f	Gb ¹ ssC ¹ b ¹ ssGb ¹ ssTb ¹ ssdAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdAssdCssdAssdGssGb ¹ ssAb ¹
426	20	253a	Gb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ sAb ¹ s dTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdC ¹ s dC ¹ s dAsC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
426	20	253b	Gb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ s dGsdAsdTsdAsdC ¹ s dGsdCsdGsdTsdC ¹ s dC ¹ s dAsC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
426	20	253c	Gb ¹ Gb ¹ C ¹ b ¹ dGdAdTdAdCdGdCdGdTdCdCdAdC ¹ Ab ¹ Gb ¹ Gb ¹ Ab ¹
426	20	253d	Gb ¹ s dGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdC ¹ s dGsdUsdCsdCsdAsC ¹ b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
426	20	253e	Gb ¹ sGb ¹ sC ¹ b ¹ sGb ¹ s dAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdCsAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹
425	22	254a	Tb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sC ¹ Gb ¹ s dAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdC ¹ sAb ¹ sGb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sC ¹ b ¹

[1131]

425	22	254b	$Tb^1Gb^1Gb^1C^bGb^1dAdTdAdC^dGdCdGdTdCdC^dAdACAb^1Gb^1Gb^1Ab^1C^b^1$
425	22	254c	$Tb^1sGb^1sGb^1sC^b^1b^1sdGsAdAsdTsdAsdCsdGsCdCsGsdTsdCsCdCsAdCsAd$ $sdGsGb^1sAb^1sC^b^1$
424	24	255a	$C^b^1sTb^1sGb^1sGb^1sC^b^1b^1sdGsAdTsAdAsdCsGsdCs^dGsGsdTsdCsCd^1sd$ $sdCsAdAsGb^1sGb^1sAb^1sC^b^1sGb^1$
424	24	255b	$C^b^1b^1Tb^1Gb^1Gb^1C^b^1b^1dGdAdTdAdCdGdC^dGdTdCdC^dAdC^dAGb^1Gb^1Ab^1$ $C^b^1b^1Gb^1$
423	26	256a	$Gb^1sC^b^1b^1Tb^1sGb^1sGb^1sdC^1sdGsAdTsAdAsdCsGsdCsGsdGsGsdTsdCsCdCsAd$ $sdCsAdGsGb^1sAb^1sC^b^1sGb^1sAb^1$
423	26	256b	$Gb^1C^b^1b^1Tb^1Gb^1Gb^1dC^1dGdAdTdAdCdGdCdGdTdCdCdAdC^dAdAGb^1Ab^1$ $C^b^1Gb^1Ab^1$
422	28	257a	$Tb^1sGb^1sC^b^1b^1Tb^1sGb^1sdCsCdCsGsdAsdTsdAsdC^1sdGsCd^1sdGsGsdTsdCsCd$ $sdAsdCsAdGsGb^1sAb^1sC^b^1sGb^1sAb^1$
422	28	257b	$Tb^1Gb^1C^b^1b^1Tb^1Gb^1dGdCdGdAdTdAdCdCdGdCdTdCdC^dAdC^dAdAGb^1Ab^1$ $C^b^1b^1Gb^1Ab^1$

[1132]

[1133] [ⅈ 6]

[illegible]

[1134]

[illegible]

[illegible]

[1136]

2060	24	268a	Tb [†] sTb [†] sTb [†] sGb [†] sGb [†] sdTsAd [†] sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdA sdGC ^b b [†] sC ^b b [†] sGb [†] sTb [†] sC ^b b [†]
2060	24	268b	Tb [†] Tb [†] Tb [†] Gb [†] Gb [†] dTd [†] dGdTdGdTdTdTdAdGdGdGdAd [†] GC ^b b [†] C ^b b [†] Gb [†] Tb [†] C ^b b [†]
2059	26	269a	Ab [†] sTb [†] sTb [†] sTb [†] sGb [†] sdGsdTsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdG sdAsdGsdC ^d sC ^b b [†] sGb [†] sTb [†] sC ^b b [†] sTb [†]
2059	26	269b	Ab [†] Tb [†] Tb [†] Tb [†] Gb [†] dGdTdAdGdTdGdTdTdTdTdAdGdGdGdAdGdC ^c C ^b b [†] Gb [†] Tb [†] C ^b b [†] Tb [†]
2058	28	270a	Tb [†] sAb [†] sTb [†] sTb [†] sTb [†] sGb [†] sdGsdTsdAsdGsdTsdAsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdG sdGsdsAdGsdC ^d sC ^b Gsb [†] Tb [†] sC ^b b [†] sTb [†] sTb [†]
2058	28	270b	Tb [†] Ab [†] Tb [†] Tb [†] Tb [†] dGdGdTdAdGdTdGdTdTdTdTdAdGdGdGdAdGdC ^d C ^b Gb [†] Tb [†] C ^a b [†] Tb [†] Tb [†]

[1137]

[1138] [표 7]

SP	L	시퀀스 종정번호	시퀀스, 5'-3'
2075	10	271a	Ab ¹ sTb ¹ sdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sGb ¹ sTb ¹
2075	10	271b	Ab ¹ Tb ¹ dTdTdGdGdTdA [*] Gb ¹ Tb ¹
2074	12	272a	Tb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sGb ¹ sTb ¹ sGb ¹
2074	12	272b	Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹ dTdTdGdGdTdA [*] Gb ¹ Tb ¹ Gb ¹
2074	12	272c	Tb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sdGsTb ¹ sGb ¹
2074	12	272d	Tb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sdGsTb ¹ sGb ¹
2074	12	272e	Tb ¹ sdAsdTsdUsdTsdGsdGsdUsdTsdA [*] sdGsTb ¹ sGb ¹
2073	13	273a	Tb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdTsdTsdGsdGsdTsdAsGb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sTb ¹
2073	13	273b	Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹ dUdUdGdGdUdAGb ¹ Tb ¹ Gb ¹ Tb ¹
2073	13	273c	Tb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sGb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sTb ¹
2073	13	273d	Tb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sdGsTb ¹ sGb ¹ sTb ¹
2073	13	273e	Tb ¹ sAb ¹ sdUsdTsdUsdTsdGsdGsdUsdTsdA [*] sdGsTb ¹ sGb ¹ sTb ¹
2073	13	273f	Tb ¹ sdA [*] sdTsdTsdUsdTsdGsdGsdTsdA [*] sGb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sTb ¹
2073	14	274a	C [*] b ¹ Tb ¹ Ab ¹ sdUsdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sGb ¹ Tb ¹ Gb ¹ Tb ¹
2073	14	274b	C [*] b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sdGsTb ¹ sGb ¹ sTb ¹
2073	14	274c	C [*] b ¹ sdUsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹
2073	14	274d	C [*] b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdUsdTsdGsdGsdTsdA [*] sdGsTb ¹ sGb ¹ sTb ¹
2073	14	274e	C [*] b ¹ ssTb ¹ ssdTsdAssdTsdTsdTsdGsdGssdTsdAssdTsdGsTb ¹ ssGb ¹ ssTb ¹
2073	14	274f	C [*] b ¹ Tb ¹ Ab ¹ dTdTdGdGdTdA [*] Gb ¹ Tb ¹ Gb ¹ Tb ¹
2073	14	274g	C [*] b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sGb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sTb ¹
2072	15	275a	C [*] b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sdGsTb ¹ sGb ¹ sTb ¹
2072	15	275b	C [*] b ¹ sTb ¹ sdA [*] sdUsdTsdUsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ sTb ¹
2072	15	275c	C [*] b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ sTb ¹
2072	15	275d	C [*] b ¹ ssTb ¹ ssdTsdAssdTsdTsdTsdGsdGssdTsdAssdTsdGssdTsdGssTb ¹
2072	15	275e	C [*] b ¹ ssTb ¹ ssdTsdAssdTsdTsdTsdGsdGssdTsdAssdTsdGssdTsdGssTb ¹
2072	15	275f	C [*] b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdTdTdGdGdTdA [*] dGsTb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sTb ¹
2072	15	275g	C [*] b ¹ Tb ¹ sdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sdGsTb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Tb ¹
2072	15	275h	C [*] b ¹ Tb ¹ Ab ¹ dUdTdTdGdGdTdA [*] dGdUGb ¹ Tb ¹ Tb ¹
2072	15	275i	C [*] b ¹ dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGdTb ¹
2072	16	210o	Gb ¹ C [*] b ¹ Tb ¹ Ab ¹ dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ Tb ¹ Tb ¹
2072	16	210p	Gb ¹ sC [*] b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA [*] sdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
2072	16	210q	Gb ¹ sC [*] b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹
2072	16	210r	Gb ¹ C [*] b ¹ Tb ¹ Ab ¹ dTdTdTdGdGdTdA [*] dGdTGb ¹ Tb ¹ Tb ¹
2072	16	210s	Gb ¹ sC [*] b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdUsdTsdUsdTsdGsdGsdTsdA [*] sdGsTb ¹ sTb ¹ sTb ¹

[1139]

[illegible]

[1140]

[illegible]

[1141]

			$sTb^1sTb^1sAb^1sGb^1$
2069	22	280d	$Ab^1sGb^1sAb^1sGb^1sdC^*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA^*sdGsdTsdGsdTsdTsb^1sAb^1sGb^1$
2068	24	281a	$Ab^1sAb^1sGb^1sAb^1sGb^1sdC^*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGsdTsb^1sTb^1sAb^1sGb^1sGb^1$
2068	24	281b	$Ab^1Ab^1Gb^1Ab^1Gb^1dC^*dTdAdTdTdGdGdTdAdGdTdGdTb^1Tb^1Ab^1Gb^1Gb^1$
2067	26	282a	$Gb^1sAb^1sAb^1sGb^1sAb^1sdGsdC^*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGsdTsdTsb^1sTb^1sAb^1sGb^1sGb^1$
2067	26	282b	$Gb^1Ab^1Ab^1Gb^1Ab^1dGdC^*dTdAdTdTdGdGdTdAdGdTdGdTdTb^1Ab^1Gb^1Gb^1Gb^1$
2066	28	283a	$Ab^1sGb^1sAb^1sAb^1sGb^1sdAsdGsdC^*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsb^1sAb^1sGb^1sGb^1sGb^1sAb^1$
2066	28	283b	$Ab^1Gb^1Ab^1Ab^1Gb^1dAdGdC^*dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGdTdTdTAb^1Gb^1Gb^1Gb^1Ab^1$

[1142]

[1143] [표 8]

SP	L	시퀀스 동정번호	시퀀스, 5'-3'
4220	10	219a	Gb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC [*] b ¹ sAb ¹
4220	10	219b	Gb ¹ Ab ¹ dAdTdGdGdAdCC [*] b ¹ Ab ¹
4219	12	220a	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC [*] b ¹ sAb ¹ sGb ¹
4219	12	220b	Tb ¹ Gb ¹ Ab ¹ dAdTdGdGdAdCC [*] b ¹ Ab ¹ Gb ¹
4219	12	220c	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC [*] sAb ¹ sGb ¹
4219	12	220d	Tb ¹ sdGsdA [*] sdAsdTsdGsdGsdAsdC [*] sdCsAb ¹ sGb ¹
4219	12	220e	Tb ¹ sGb ¹ sdA [*] sdA [*] sdTsdGsdGsdA [*] sdC [*] sdC [*] sdAsGb ¹
4218	13	221a	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sAb ¹ sdTsdGsdGsdAsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹
4218	13	221b	Tb ¹ Gb ¹ Ab ¹ Ab ¹ dUdGdGdAdCdCAb ¹ Gb ¹ Tb ¹
4218	13	221c	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sAb ¹ sdTsdGsdGsdAsdCsC [*] sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹
4218	13	221d	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdA [*] sdCsC [*] sdAsGb ¹ sTb ¹
4218	13	221e	Tb ¹ sGb ¹ sdA [*] sdAsdTsdGsdGsdAsdC [*] sdCsAsdGsTb ¹
4218	13	221f	Tb ¹ sdGsdAsdA [*] sdTsdGsdGsdAsdCsC [*] b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹
4218	14	222a	Ab ¹ sTb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC [*] b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹
4218	14	222b	Ab ¹ Tb ¹ Gb ¹ Ab ¹ dAdTdGsdGsdAsdCsC [*] sAb ¹ Gb ¹ Tb ¹
4218	14	222c	Ab ¹ Tb ¹ dGdA [*] dAdTdGdGdA [*] dCC [*] b ¹ Ab ¹ Gb ¹ Tb ¹
4218	14	222d	Ab ¹ sTb ¹ sGb ¹ sdA [*] sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC [*] sAbsGb ¹ sTb ⁴
4218	14	222e	Ab ¹ sdTsdGsdA [*] sdA [*] sdTsdGsdGsdA [*] sdC [*] sdC [*] sdA [*] sdGsTb ¹
4218	14	222f	Ab ² sTb ² sGb ² sdA [*] sdAsdUsdGsdGsdAsdCsC [*] sAb ² sGb ² sTb ²
4218	14	222g	Ab ⁴ ssTb ⁴ ssdGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCsAb ⁴ ssGb ⁴ ssTb ⁴
4217	15	223a	Ab ¹ sTb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAdTdGdGdAdCdC [*] sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	15	223b	Ab ¹ ssTb ¹ ssdGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCsAssdGssdTssAb ¹
4217	15	223c	Ab ¹ dTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTAb ¹
4217	15	223d	Ab ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdUsdGsdGsdA [*] sdCsCsdAsGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	15	223e	Ab ⁶ Tb ⁶ Gb ⁶ dA [*] dAdTdGdGdAdCdC [*] dAGb ⁶ Tb ⁶ Ab ⁶
4217	15	223f	Ab ¹ Tb ¹ dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC [*] sdC [*] sAb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Ab ¹
4217	15	223g	Ab ⁴ sTb ⁴ sGb ⁴ sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsCsdAsdGsTb ⁴ sAb ⁴
4217	15	223h	Ab ¹ sTb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdC [*] sdC [*] sdAsdGsdTsAb ¹
4217	15	223i	Ab ¹ ssTb ¹ ssdGssdAssdAssdUsdGssdGssdA [*] ssdCssdCsAssdGssTb ¹ ssAb ¹
4217	16	218y	C [*] b ² sAb ² sTb ² sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsAb ² sGb ² sTb ² sAb ²
4217	16	218z	C [*] b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC [*] sdC [*] sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218aa	C [*] b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssdGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssAb ¹ ssGb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹
4217	16	218ab	C [*] b ¹ Ab ¹ Tb ¹ dGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdC [*] sdC [*] sAb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Ab ¹
4217	16	218ac	C [*] b ¹ Ab ¹ Tb ¹ dGsdA [*] sdA [*] sdTsdGsdGsdA [*] sdCsAb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Ab ¹

[1144]

4217	16	218ad	C*b ⁸ sAb ⁹ sTb ⁸ sdGdAdAdTdGdGdAdCdCAB ⁸ sGb ⁸ sTb ⁸ sAb ⁸
4217	16	218ae	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sTb ¹ sAb ⁷
4217	16	218af	C*bs ¹ Ab ¹ sdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdUsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218b	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218m	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218n	C*b ¹ Ab ¹ Tb ¹ dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sAb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Ab ¹
4217	16	218o	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218p	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218q	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218c	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218r	C*b ¹ Ab ¹ Tb ¹ dGdAdAdTdGdGdAdCdCAB ¹ Gb ¹ Tb ¹ Ab ¹
4217	16	218s	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGdAdAdTdGdGdAdC*sdC*sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218t	/5SpC3s/C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218u	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹ /3SpC3s/
4217	16	218v	/5SpC3s/C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sAb ¹ /3SpC3s/
4217	16	218ag	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdA*sdA*sdUsdGsdGsdA*sdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218ah	C*b ⁴ ssAb ⁴ ssTb ⁴ sssdGssdA*ssdA*ssdTsdGssdGssdA*ssdCssdCssdAssdGss Tb ⁴ ssAb ⁴
4217	16	218ai	C*b ² ssAb ² ssTb ² ssGb ² sssdAssdAssdTsdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGss dTssAb ²
4217	16	218aj	C*b ¹ Ab ¹ Tb ¹ Gb ¹ dAdAdUdGdGdAdCdCAB ¹ Gb ¹ Tb ¹ Ab ¹
4217	16	218ak	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdA*sdUsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218am	C*b ¹ sAb ¹ sdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdCsC*b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218an	C*b ⁸ sAb ⁸ sTb ⁸ sGb ⁸ sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ⁸ sGb ⁸ sTb ⁸ sAb ⁸
4217	16	218ao	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdA*sdA*sdUsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	16	218ap	C*b ⁴ sAb ⁴ sTb ⁴ sGb ⁴ sdA*sdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*sdAsdGsTb ⁴ sAb ⁴
4217	16	218aq	C*b ⁴ Ab ⁴ Tb ⁴ Gb ⁴ dAdAdTdGdGdAdCdCdAdGTb ⁴ Ab ⁴
4217	16	218ar	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4216	17	224a	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹ Tb ¹
4216	17	224b	C*b ² sAb ² sTb ² sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ² sGb ² sTb ² sAb ² Tb ²
4216	17	224c	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹ Tb ¹
4216	17	224d	C*b ¹ sdAsdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdC*sdC*sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹ Tb ¹
4216	17	224e	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹
4216	17	224f	C*b ¹ Ab ¹ TdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAGb ¹ Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹
4216	17	224g	C*b ¹ sdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹ Tb ¹

[1145]

4216	17	224h	C ^b b ¹ Ab ¹ Tb ¹ Gb ¹ Ab ¹ dA ¹ dTdGdGdA ¹ dC ¹ dAdGdTA ¹ Tb ¹
4216	17	224i	C ^b b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssGb ¹ ssAb ¹ sssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4216	17	224j	C ^b b ¹ Ab ¹ Tb ¹ dGdA ¹ dA ¹ dTdGdGdA ¹ dCdCdAGb ¹ Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹
4216	17	224k	C ^b b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssdGsdA ¹ sdA ¹ sdUsdGsdGsdA ¹ sdC ¹ sdC ¹ sdAsdGsTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4216	17	224m	C ^b b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssGb ¹ ssdAdAdTdGdGdAdC ¹ dC ¹ dAsGb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4216	18	225a	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssGb ¹ ssdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssGb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4216	18	225b	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssGb ¹ ssdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssGb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4216	18	225c	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC ¹ sdC ¹ sdAsGb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4216	18	225d	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4216	18	225e	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4216	18	225f	Tb ¹ C ¹ b ¹ dA ¹ dTdGdAdAdTdGdGdAdCdC ¹ Ab ¹ Gb ¹ Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹
4216	18	225g	Tb ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹ Tb ¹ ssdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ Gb ¹ Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹
4216	18	225h	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ sssdTssdGssdA ¹ ssdA ¹ ssdTssdGssdGssdAssdCssdC ¹ ssdA ¹ ssdGssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4216	18	225i	Tb ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹ dTdGdAdAdTdGdGdAdC ¹ dC ¹ Ab ¹ Gb ¹ Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹
4215	19	226a	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssGb ¹ ssdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4215	19	226b	Tb ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹ Tb ¹ Gb ¹ dAdAdTdGdGdAdCdCdAGb ¹ Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹
4215	19	226c	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4215	19	226d	Tb ¹ ssCsdAsdTsdGsdAsdA ¹ sdUsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4215	19	226e	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssdAsdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdCsdC ¹ sdAsdGsTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4215	19	226f	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssGb ¹ sssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssdTssdAssTb ¹ ssTb ¹
4215	20	227a	C ^b b ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4215	20	227b	C ^b b ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4215	20	227c	C ^b b ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹ dAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdC ¹ dAdGTb ¹ Ab ¹ Tb ¹ Tb ¹
4215	20	227d	C ^b b ¹ ssUsdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4215	20	227e	C ^b b ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4214	22	228a	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssAb ¹ ssdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹
4214	22	228b	Tb ¹ C ¹ b ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹ Ab ¹ dTdGdAdAdTdGdGdAdCdC ¹ dAdGTb ¹ Ab ¹ Tb ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹
4214	22	228c	Tb ¹ ssC ¹ b ¹ ssTb ¹ ssdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹

4213	24	229a	Ab ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC ¹ sdCsdAsdGsdTsAb ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssTb ¹
4213	24	229b	Ab ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹ AdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTA ¹ Tb ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹ Tb ¹
4212	26	230a	Tb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssTb ¹ ssdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssdGsdTsAb ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssTb ¹ ssAb ¹
4212	26	230a	Tb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssTb ¹ ssdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssdGsdTsAb ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssTb ¹ ssAb ¹
4212	26	230b	Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹ Tb ¹ dCdAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTA ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹ Tb ¹ Ab ¹
4211	28	231a	Ab ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssC ¹ b ¹ ssdTsdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ ssdTsdTsAb ¹ ssC ¹ b ¹ ssTb ¹ ssAb ¹ ssGb ¹
4211	28	231b	Ab ¹ Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹ dTdCdAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTA ¹ Tb ¹ C ¹ b ¹ Tb ¹ Ab ¹ Gb ¹

[1148] [丑 9]

SP	L	시원스 동정번호	시원스, 5'-3'
2358	10	284a	C ^b 'sAb ¹ 'sdTsdTsdAsdAsdTsdA ^s 'sAb ¹ 'sAb ¹
2358	10	284b	C ^b 'b ¹ 'AdTdTdA ^s dAdTdA ^s 'Ab ¹ 'Ab ¹
2357	12	285a	Gb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sAb ¹ 'sdTsdTsdA ^s 'sdA ^s 'sdTsdAsAb ¹ 'sAb ¹ 'sGb ¹
2357	12	285b	Gb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sAb ¹ 'sdTsdTsdA ^s 'sdA ^s 'sdTsdAsdA ^s 'sAb ¹ 'sGb ¹
2357	12	285c	Gb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sdAsdTsdTsdA ^s 'sdA ^s 'sdUsdAsdA ^s 'sdA ^s 'sGb ¹
2357	12	285d	Gb ¹ 'sdC ^s 'sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsAb ¹ 'sGb ¹
2357	12	285e	Gb ¹ 'sdC ^s 'sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdA ^s 'sAb ¹ 'sGb ¹
2357	12	285f	Gb ¹ 'C ^b 'b ¹ 'Ab ¹ 'dTdTdA ^s 'dA ^s 'dTAAb ¹ 'Ab ¹ 'Gb ¹
2356	13	286a	Gb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sAb ¹ 'sTb ¹ 'sdTsdAsdTsdAsdTsdAsAb ¹ 'sGb ¹ 'sTb ¹
2356	13	286b	Gb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sAb ¹ 'sTb ¹ 'sdTsdA ^s 'sdA ^s 'sdTsdAsdAsAb ¹ 'sGb ¹ 'sTb ¹
2356	13	286c	Gb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sAb ¹ 'sdUsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdA ^s 'sGb ¹ 'sTb ¹
2356	13	286d	Gb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sdAsdTsdTsdAsdA ^s 'sdUsdAsdTsdAsdTsdGsTb ¹
2356	13	286e	Gb ¹ 'sdC ^s 'sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsAb ¹ 'sAb ¹ 'sGb ¹ 'sTb ¹
2356	13	286f	Gb ¹ 'sdC ^s 'sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsAb ¹ 'sAb ¹ 'sGb ¹ 'sTb ¹
2356	13	286g	Gb ¹ 'C ^b 'b ¹ 'Ab ¹ 'TdUdAdUdAdAAb ¹ 'Gb ¹ 'Tb ¹
2356	14	287a	Gb ¹ 'sGb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sAb ¹ 'sdTsdTsdA ^s 'sdAsdTsdAsAb ¹ 'sAb ¹ 'sGb ¹ 'sTb ¹
2356	14	287b	Gb ¹ 'sGb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sAb ¹ 'sdTsdTsdA ^s 'sdAsdTsdAsdTsdA ^s 'sGb ¹ 'sTb ¹
2356	14	287c	Gb ¹ 'sdGsdCsdAsdTsdUsdTsdAsdTsdA ^s 'sdA ^s 'sdA ^s 'sdGsTb ¹
2356	14	287d	Gb ¹ 'sGb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sdA ^s 'sdUsdTsdA ^s 'sdAsdTsdAsdTsdA ^s 'sAb ¹ 'sGb ¹ 'sTb ¹
2356	14	287e	Gb ¹ 'Gb ¹ 'C ^b 'b ¹ 'Ab ¹ 'sdTsdTsdAsdTsdA ^s 'sdA ^s 'sAb ¹ 'Gb ¹ 'Tb ¹
2356	14	287f	Gb ¹ 'sGb ¹ 'sdC ^s 'sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsAb ¹ 'sAb ¹ 'sGb ¹ 'sTb ¹
2356	14	287g	Gb ¹ 'sGb ¹ 'sdC ^s 'sdA ^s 'sdTsdTsdA ^s 'dA ^s 'sdTsdA ^s 'sAb ¹ 'sAb ¹ 'sGb ¹ 'sTb ¹
2356	14	287h	Gb ¹ 'Gb ¹ 'dC ^s 'dAdTdTdAdAdTdAAb ¹ 'Ab ¹ 'Gb ¹ 'Tb ¹
2356	14	287i	Gb ¹ 'ssGb ¹ 'ssdCssdTsdTsdTsdAsdTsdTsdAssAb ¹ 'ssAb ¹ 'ssGb ¹ 'ssTb ¹
2356	14	287j	Gb ¹ 'ssGb ¹ 'ssdC ^s 'ssdTsdTsdTsdAsdTsdTsdAssAb ¹ 'ssAb ¹ 'ssGb ¹ 'ssTb ¹
2355	15	288a	Gb ¹ 'sGb ¹ 'sdC ^s 'sdAsdTsdTsdAsdTsdTsdAsdTsdAsGb ¹ 'sTb ¹ 'sGb ¹
2355	15	288b	Gb ¹ 'sGb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sAb ¹ 'sdTsdTsdA ^s 'sdA ^s 'sdTsdAsdTsdAsdTsdGsTb ¹
2355	15	288c	Gb ¹ 'sGb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdGsTb ¹ 'sGb ¹
2355	15	288d	Gb ¹ 'sGb ¹ 'sC ^b 'b ¹ 'sAb ¹ 'sdTdTdTdAdTdAdTdAdAsAb ¹ 'sGb ¹ 'sTb ¹ 'sGb ¹
2355	15	288e	Gb ¹ 'Gb ¹ 'sdC ^s 'sdAsdTsdTsdAsdTsdTsdAsdTsdAsAb ¹ 'Gb ¹ 'Tb ¹ 'Gb ¹
2355	15	288f	Gb ¹ 'ssGb ¹ 'ssdTsdCsdAsdTsdUsdTsdUsdTsdAsdTsdUsdTsdAssdTsdAssdTsdGssTb ¹ 'ssGb ¹
2355	15	288g	Gb ¹ 'ssGb ¹ 'ssdTsdCsdAsdTsdTsdTsdAsdTsdTsdAssdTsdAssdTsdAssdTsdGssdTsdGssTb ¹
2355	15	288h	Gb ¹ 'Gb ¹ 'C ^b 'b ¹ 'dA ^s 'dTdTdAdAdUdA ^s 'dA ^s 'dAGb ¹ 'Tb ¹ 'Gb ¹
2355	15	288i	Gb ¹ 'Gb ¹ 'C ^b 'b ¹ 'dAdTdTdAdAdUdAdAdAgb ¹ 'Tb ¹ 'Gb ¹

[1149]

[illegible]

[illegible]

[1151]

[illegible]

[1152]

[1153]

약제학적 조성물

[1154]

본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 선택적으로 실질적으로 비독성인 약제학적으로 수용가능한 담체, 부형제, 보조제, 용매 또는 희석제를 사용하여 바람직하게는 그의 약제학적으로 활성인 염의 형태로 투여된다. 본 발명의 약물은 통상적인 고체 또는 액체 담체 또는 희석제 및 통상적인 약제학적으로-만들어진 보조제 중에 적절한 투여량 수준으로 공지의 방법으로 제조된다. 바람직한 제제 및 제형은 주입 또는 주사 (척추강내, 뇌실내, 두개내, 정맥내, 뇌실질내, 종양내, 안내 또는 안외, 복강내, 근내, 피하), 뇌 내로의 국소 투여, 흡입, 고형암 내로의 국소 투여 또는 경구 적용에 적절한 투여가능한 형태이다. 그러나 또한 상피 또는 점막피부 라이닝 (구강 점막, 직장 및 질 상피 라이닝, 비인두 점막, 장 점막)을 통한 흡수, 직장으로, 경피로, 국소적으로,

피내로, 위장내로, 피내로, 질내로, 맥관내로, 비내로, 구강내로, 경피적으로, 설하로의 적용, 또는 약제학적 기술분야에서 획득가능한 다른 수단 등과 같은 다른 적용 형태가 가능하다.

- [1155] 투여가능한 제형에는, 예를 들어, 주사가 가능한 액체 제형, 지연 제형, 특히 흡입을 위한 분말, 알약, 정제, 필름 정, 코팅정, 분산가능한 과립, 드라지, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁액, 에멀전, 캡슐 및 디포짓(deposit)이 포함된다. 이식가능한 펌프 또는 뇌 내로의 카테터를 통한 연속 주사와 같은 다른 투여가능한 갈레누스 제형(galenical formulation)이 또한 가능하다.
- [1156] 여기에서 사용되는 바와 같은 용어 "약제학적으로 수용가능한"은 제형 중의 활성 성분으로서의 안티센스-올리곤클레오티드의 생물학적 활성의 유효성에 간섭하지 않고 그에 투여되는 호스트(host)에 대하여 독성이 없는 임의의 담체를 의미한다. 적절한 약제학적 담체의 예는 당해 기술분야에서 잘 알려져 있고 인산염 완충 염수, 물, 유/수 에멀전 등과 같은 에멀전, 여러 형태의 적십제, 멸균 용액 등이 포함된다. 이러한 담체는 통상적인 방법으로 제형화될 수 있고 활성 화합물이 대상체에 유효한 투여량으로 투여될 수 있다.
- [1157] "유효한 투여량(effective dose)"은 질환의 과장 및 중증도에 영향을 주어 이러한 병리학의 감소 또는 차도를 야기하기에 충분한 활성 성분으로서의 안티센스-올리곤뉴클레오티드의 양을 의미한다. 이러한 질환 또는 장애를 치료하고/하거나 방지하기에 유용한 "유효한 투여량"은 당해 기술분야에서 숙련된 자에게 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 안티센스-올리곤뉴클레오티드는 리포솜, 착물형성제(complex forming agent), 수용기 표적 분자(receptor targeted molecule), 용매, 보존제 및/또는 희석제와 함께 혼합되고 투여될 수 있다.
- [1158] 활성 성분의 연속적인 방출을 위한, 특히 본 발명의 적어도 하나의 안티센스-올리곤뉴클레오티드의 **척추강내** 투여, 뇌실내 투여 또는 두개내 투여를 위한 연속 주입을 위한 **주입** 용액 또는 고체 매트릭스의 형태의 약제학적 제제가 바람직하다. 뇌 내로의 국소 투여에 적절한 용액 또는 고체 매트릭스의 형태의 약제학적 제제가 또한 바람직하다. 폐의 섬유성 질환에 대하여는, 흡입 제형이 특히 바람직하다.
- [1159] 사용준비된(ready-to-use) 멸균 용액은 예를 들어 1 내지 10 mg/ml, 바람직하게는 5 내지 10 mg/ml 농도 범위의 적어도 하나의 안티센스-올리곤뉴클레오티드 및, 예를 들어, 슈크로스, 락토오스, 만니톨 또는 소르비톨 등과 같은 당 중에서 선택되는 등장제(isotonic agent)를 포함한다. 용액 pH를 6 내지 8 (바람직하게는 7 내지 8)로 조절하는 적절한 완충제가 또한 포함될 수 있다. 제형의 다른 선택적인 성분은 트윈 20 또는 트윈 80 등과 같은 비-이온성 계면활성제일 수 있다.
- [1160] 사용을 위하여 재구성(reconstitute)되는 멸균 동결건조된 **분말**은 적어도 하나의 안티센스-올리곤뉴클레오티드 및 선택적으로 증량제 (예를 들어 만니톨, 트레할로스, 소르비톨, 글리신) 및/또는 저온보호제 (예를 들어 트레할로스, 만니톨)를 포함한다. 재구성을 위한 용매는 pH를 6 내지 8로 조절하기 위한 완충염을 수반하거나 수반함이 없이, 주사가 가능한 화합물을 위한 물일 수 있다.
- [1161] **흡입**을 위하여 적절한 에어로졸 제제는 용액 및 분말 형태의 고체를 포함할 수 있고, 이는 비활성 압축 가스, 예를 들어 질소 등과 같은 약제학적으로 수용가능한 담체와 조합될 수 있다.
- [1162] 흡입에 의하여 투여하거나 정맥내 투여에 적절한 동결건조된 (냉동-건조) 제제 (동결건조물)이 특히 바람직한 약제학적 조성물이다. 바람직한 동결건조된 제제를 제조하기 위하여 본 발명의 적어도 하나의 안티센스-올리곤뉴클레오티드가 4 내지 5% (w/v) 만니톨 용액 중에 가용화되고 계속해서 용액이 동결건조된다. 만니톨 용액은 또한 상기 기술된 바와 같이 적절한 완충 용액으로 제조될 수 있다.
- [1163] 적절한 저온보호제/동결보호제 (달리 증량제 또는 안정화제로 언급됨)이 추가의 예에는 무-티올(thiol-free) 알부민, 면역글로불린, 폴리알킬렌옥사이드 (예를 들어 PEG, 폴리프로필렌글리콜), 트레할로스, 글루코스, 슈크로스, 소르비톨, 텍스트란, 말토오스, 라피노스, 스타키오스 및 다른 사카라이드가 포함되며 (예를 들어 WO 97/29782를 참조하시오), 한편으로 만니톨이 바람직하게 사용된다. 이들은 통상적인 동결건조 기술에서 통상적인 양으로 사용될 수 있다. 동결건조의 방법은 약제학적 제형을 제조하는 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다.
- [1164] 흡입에 의한 투여를 위하여는 동결건조된 제제의 입자 직경은 바람직하게는 2 내지 5 μm , 보다 바람직하게는 3 내지 4 μm 이다. 동결건조된 제제는 흡입기, 예를 들어 OPTINEB[®] 또는 VENTA-NEB[®] 흡입기 (NEBU-TEC, Elsenfeld, Germany)를 사용하는 투여에 특히 적절하다. 동결건조된 제품은 멸균 증류수 또는 흡입 투여를 위한 임의의 다른 적절한 액체 중에서 재수화될 수 있다. 달리, 정맥내 투여를 위하여는 동결건조된 제품이 멸균 증류수 또는 정맥내 투여를 위한 임의의 다른 적절한 액체 중에서 재수화될 수 있다.

- [1165] 멸균 증류수 또는 다른 적절한 액체 중에서의 투여를 위한 재수화 이후 동결건조된 제제는 재수화된 펩티드 제제에 대한 표적 조직 즉 정맥 내 투여를 위한 혈액 또는 흡입 투여를 위한 폐 조직에 대한 근사 생리학적 삼투압 (osmolality)을 가져야 한다. 따라서 재수화된 제형이 실질적으로 등장인 것이 바람직하다.
- [1166] 정맥내, 경구 또는 흡입 투여에 대한 바람직한 투여량 농도는 10 내지 2000 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 이고, 보다 바람직하게는 200 내지 800 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 이다.
- [1167] 정제 또는 캡슐 형태의 **경구** 투여를 위하여는, 적어도 하나의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 락토오스, 녹말, 슈크로스, 셀룰로오스, 마그네슘스테아레이트, 칼슘스테아레이트, 칼슘살페이트, 활석, 만니톨, 에틸알코올 (액체 형태) 등과 같은 임의의 경구 비독성의 약제학적으로 수용가능한 비활성 담체와 결합될 수 있다. 게다가, 희망하거나 요구되는 경우, 적절한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 착색제가 또한 혼합물 내에 포함될 수 있다. 분말 및 정제에는 본 발명 조성물이 약 5 내지 95% 포함될 수 있다.
- [1168] 적절한 결합제에는 녹말, 젤라틴, 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 소듐알기네이트, 카르복시메틸-셀룰로오스 등과 같은 천연 및 합성 검, 폴리에틸렌글리콜 및 왁스가 포함된다. 윤활제 중에서 이들 투여량 형태 중에서 사용하기 위하여 붕산, 소듐벤조에이트, 소듐아세테이트, 염화나트륨 등이 언급될 수 있다. 붕해제에는 녹말, 메틸셀룰로오스, 구아검 등이 포함된다.
- [1169] 게다가, 본 발명의 조성물은 지연 방출 형태로 제형화되어 적어도 하나의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 속도 조절 방출을 제공하여 치료학적 효과를 최적화하도록 할 수 있다. 지연 방출을 위한 적절한 투여량 형태에는 적어도 하나의 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 포함하는 지연 방출을 위한 이식가능한 생분해성 매트릭스, 변화하는 붕해 속도의 층들을 포함하는 층이 진 정제 또는 적어도 하나의 안티센스-올리고뉴클레오타이드로 함침되는 제어 방출 폴리머 매트릭스가 포함된다.
- [1170] 액체 형태 제제에는 용액, 현탁액 및 에멀전이 포함된다. 예시로서 비경구 주사를 위하여는 경구 용액, 현탁액 및 에멀전을 위한 감미제 및 유백화제의 첨가의 물 또는 물-프로필렌글리콜 용액이 언급될 수 있다.
- [1171] 적절한 희석제는 대개는 조성물 또는 투여량 형태의 대부분을 구성하는 물질이다. 적절한 희석제에는 락토오스, 슈크로스, 만니톨 및 소르비톨 등과 같은 당, 소맥, 콘 라이스 및 감자로부터 파생되는 녹말 및 미정질 셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스가 포함된다. 조성물 중의 희석제의 양은 총 조성물의 약 5중량% 내지 약 95중량%, 바람직하게는 약 25중량% 내지 약 75중량%의 범위가 될 수 있다.
- [1172] 용어 붕해제는 조성물에 첨가되어 이를 분리 (붕해)하고 약물을 방출하는 데 도움을 주는 물질을 의미한다. 적절한 붕해제에는 녹말, 소듐카르복시메틸스타치 등과 같은 "냉수가용성" 변성 녹말, 로커스트 콩, 카라야, 구아, 트라가칸트 및 아가 등과 같은 천연 및 합성 검, 메틸셀룰로오스 및 소듐카르복시메틸셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 미정질 셀룰로오스 및 소듐크로스카멜로오스 등과 같은 가교화 미정질 셀룰로오스, 알긴산 및 소듐알기네이트 등과 같은 알기네이트, 벤토나이트 등과 같은 점토 및 발포성 혼합물 (effervescent mixture)이 포함된다. 조성물 중의 붕해제의 양은 조성물의 약 1 내지 약 40중량%, 바람직하게는 조성물의 2 내지 약 30중량%, 보다 바람직하게는 조성물의 약 3 내지 20중량% 그리고 가장 바람직하게는 약 5 내지 약 10중량%의 범위가 될 수 있다.
- [1173] 결합제는 분말을 서로 결합 또는 "접착"하고 과립을 형성하는 것에 의하여 이들을 응집시키고 따라서 제형 중에서 "접착제"로서 기능하는 물질을 특정한다. 결합제는 희석제 또는 증량제에서 이미 획득가능한 응집 강도를 더한다. 적절한 결합제에는 슈크로스 등과 같은 당, 소맥, 콘 라이스 및 감자로부터 파생되는 녹말; 아카시아, 젤라틴 및 트라가칸트 등과 같은 천연 검; 알긴산, 소듐알기네이트 및 암모늄칼슘알기네이트 등과 같은 해초의 유도체; 메틸셀룰로오스 및 소듐카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필-메틸셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 물질; 폴리비닐피롤리돈; 및 마그네슘알루미늄실리케이트 등과 같은 무기물이 포함된다. 조성물 중의 결합제의 양은 조성물의 약 1 내지 30 중량%, 바람직하게는 약 2 내지 약 20중량%, 보다 바람직하게는 약 3 내지 약 10중량%, 심지어는 보다 바람직하게는 약 3 내지 약 6중량%의 범위가 될 수 있다.
- [1174] 윤활제는 투여량 형태에 첨가되어 마찰 또는 마모를 감소시키는 것에 의하여 압축된 후, 정제, 과립 등이 주형 또는 다이로부터 방출되는 것을 가능하게 하는 물질을 의미한다. 적절한 윤활제에는 마그네슘스테아레이트, 칼슘스테아레이트 또는 포타슘스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 금속 스테아레이트; 고융점 왁스; 및 염화나트륨, 소듐벤조에이트, 소듐아세테이트, 소듐올레이트, 폴리에틸렌글리콜 및 D,L-류신 등과 같은 수용성 윤활제가 포함된다. 윤활제가 과립의 표면 상에 그리고 과립과 정제 프레스 (tablet press)의 부품 사이에 존재하여야 하기 때문에, 윤활제는 대개 압축 이전 가장 마지막 단계에서 첨가된다. 조성물 중의 윤활제의 양은 조성물의

약 0.05 내지 약 15중량%, 바람직하게는 조성물의 0.2 내지 약 5중량%, 보다 바람직하게는 약 0.3 내지 약 3%, 그리고 가장 바람직하게는 조성물의 약 0.3 내지 약 1.5중량%의 범위가 될 수 있다.

- [1175] 활택제는 고화(caking)되는 것을 방지하고 과립의 흐름 특성을 개선하여 흐름이 부드럽고 일정하게 되도록 하는 물질이다. 적절한 활택제에는 이산화규소 및 활석이 포함된다. 조성물 중의 활택제의 양은 조성물의 약 0.01 내지 10중량%, 바람직하게는 총 조성물의 0.1중량% 내지 약 7중량%, 보다 바람직하게는 약 0.2 내지 5중량%, 그리고 가장 바람직하게는 약 0.5 내지 약 2중량%의 범위가 될 수 있다.
- [1176] 여기에서 기술되는 약제학적 조성물에 있어서 안티센스-올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 이의 염의 형태로 그리고 선택적으로 안티센스-올리고뉴클레오티드의 안정성을 증가시키고, RNase H의 모집을 증가시키고, 표적 발견 특성을 증가시키고, 세포 섭취를 향상시키는 등의 다른 성분과 함께 포함된다. 이들 목표들을 달성하기 위하여, 안티센스-올리고뉴클레오티드는 이들 목표들을 달성하는 데 유용한 추가의 성분의 사용을 대신하거나 그 의 사용에 더하여 화학적으로 변성될 수 있다. 따라서 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 활성, 세포 분배 또는 세포 섭취 등을 향상시키는 성분 또는 구성요소에 화학적으로 연결될 수 있다. 이러한 성분에는 콜레스테롤 성분 등과 같은 지질 성분, 콜린산, 티오에테르, 헥실-S-트리틸티올, 티오콜레스테롤, 지방족 설페이트, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운테실 잔기, 디헥사데실-라세미-글리세롤(dihexadecyl-rac-glycerol) 또는 트리에틸암모늄-1,2-디-O-헥사데실-라세미-글리세로-3H-포스포네이트(triethylammonium-1,2-di-O-hexadecyl-rac-glycero-3H-phosphonate) 등과 같은 인지질, 폴리아민 또는 폴리에틸렌글리콜 설페이트 또는 아다만틴 아세트산, 팔미틸 성분, 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 성분이 포함될 수 있다. 본 발명에는 또한 키메라 화합물인 안티센스-올리고뉴클레오티드가 포함된다. 본 발명의 문맥에서 "키메라" 안티센스-올리고뉴클레오티드는 하나가 세포 섭취를 증가시키고, 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키고, 표적 핵산에 대한 결합 친화도를 증가시키고, RNase H의 모집을 증가시키는 등을 위한 성분 또는 구성요소에 연결되는 여기에서 기술되는 바와 같은 올리고뉴클레오티드 시퀀스인 둘 이상의 화학적으로 구별되는 영역들을 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오티드이다. 예를 들어, 안티센스-올리고뉴클레오티드의 추가의 영역 또는 성분 또는 구성요소는 RNA:DNA 하이브리드 또는 RNA:RNA 분자를 개열시킬 수 있는 효소에 대한 서브스트레이트로서 작용할 수 있다. 예시의 방법으로, RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 개열하는 세포 내부 리보뉴클레아제(cellular endoribonuclease)이다. 따라서, RNase H의 활성화는 TGF- R_{II} 를 코딩하고 그에 의하여 안티센스-올리고뉴클레오티드의 유전자 발현의 억제 효능을 크게 향상시키는 mRNA인 RNA 표적의 개열의 결과를 가져온다. 따라서, 키메라 올리고뉴클레오티드가 사용되는 경우 더 짧은 올리고뉴클레오티드로 상당한 결과가 종종 수득될 수 있다.
- [1177] **적용중**
- [1178] 본 발명은 여기에서 기술되는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 신경퇴화성 질환, 신경외상(neurotrauma), 중추신경계 (CNS)의 감염후 및 염증성 장애를 포함하여 신경혈관 및 신경염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 용도에 관한 것이다.
- [1179] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 손상된 신경 경로의 재생 및 기능적 재접속(functional reconnection)을 촉진하고/하거나 신경 줄기 세포 회복의 나이로 인한 감소의 치료 및 보상에 특히 유용하다.
- [1180] 따라서, 본 발명의 다른 양태는 여기에서 기술되는 바와 같은 안티센스-올리고뉴클레오티드의 신경발생을 재활성화하는 것에 의하여 신경 조직 재생을 촉진하고, 신경 분화 및 이동을 허용하고 새로운 신경의 해부학적 그리고 기능상 신경 회로 내로의 일체화를 유도하도록 하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [1181] 본 발명의 추가의 양태는 여기에서 기술되는 바와 같은 안티센스-올리고뉴클레오티드의 신경계에서의 손상 또는 섬유증 또는 줄기 세포 회전의 손상에 의해 유도되는 다른 기관계에서의 손상을 앓는 환자에서의 재생 및 임상적 (구조적) 복구를 촉진하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [1182] 게다가, 안티센스-올리고뉴클레오티드는 나이, 감염 또는 유전자 결함에 의해 유도되는 신경 줄기 세포 재생에서의 감소의 보상 및 치료에 유용하다.
- [1183] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드는 TGF- R_{II} 발현을 억제하고 따라서 상향-조절되거나(up-regulated) 향상된 TGF- R_{II} 및/또는 TGF- R_{II} 수준에 연관되는 질환의 치료에 사용된다.
- [1184] 따라서, 본 발명의 다른 양태는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 신경퇴화성 질환, 신경염증성 장애, 외상성 또는 외상후 장애, 혈관 보다 정확하게는 신경혈관 장애, 저산소증 장애, 감염후 중추신경계 장애, 섬유증 질환,

과중식성 질환, 암, 종양, 노인성 난청(presbyakusis) 및 노안(presbyopie)의 예방 및 치료에서의 용도에 관한 것이다.

[1185]

용어 "신경퇴화성 질환" 또는 "신경학적 질환" 또는 "신경염증성 장애"는 ADHD, AIDS-신경학적 합병증, 투명중격의 부재(absence of the Septum Pellucidum), 후천성 간질성 실어증(acquired epileptiform aphasia), 급성 과중뇌척수염, 부신백질이영양증, 뇌량결손(agenesis of the Corpus Callosum), 실인증, 에카르디 증후군(Aicardi Syndrome), 알렉산더병, 알파병, 교대성 편마비, 알츠하이머병, 근위축성 측삭경화증(ALS), 무뇌증, 동맥류, 엔젤만 증후군, 혈관종증, 무산소증, 실어증, 실행증, 거미막낭종, 지주막염, 아놀드 키아리 기형, 동정맥기형, 아스파탐, 아스퍼거 증후군, 모세혈관확장성운동실조증, 운동실조증, 주의력결핍장애, 자폐증, 자율신경실조증, 요통, 바쓰 증후군, 바텐병, 베체트병, 벨마비, 양성본태성안검경련, 양성국소근위축증, 양성두개내기능항진, 베른하르트-로트병, 빈스완거병, 안검경련, 블록 술즈베르거 증후군, 팔신경얼기 출산 손상(brachial plexus birth injuries), 팔신경얼기 손상(brachial plexus injuries), 브래드버리-이글스턴 증후군(Bradbury-Eggleston Syndrome), 뇌동맥류, 뇌손상, 뇌 및 척추 종양(brain and spinal tumors), 브라운-세카르증후군(Brown-Sequard Syndrome), 구척수 근위축증, 카나반병, 수근관 증후군, 작열통, 해면종, 해면상혈관종, 해면상 혈관기형, 중앙경수 증후군(central cervical cord syndrome), 중심척수 증후군(central cord syndrome), 중추통증 증후군, 두부 장애(cephalic disorders), 소뇌변성, 소뇌 저형성, 뇌동맥류, 뇌동맥경화증, 뇌위축, 뇌성 각기병(cerebral beriberi), 뇌성 거인증, 뇌저산소증, 뇌성마비, COFS 증후군(Cerebro-Oculo-Facio-Skeletal(COFS) 증후군, 뇌-눈-얼굴-골격 증후군), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease), 키아리 기형(Chiari Malformation), 무도증, 유극적혈구증가무도병, 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증(CIDP: chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy), 만성 기립성조절장애, 만성 통증, II형 코케인 증후군(Cockayne Syndrome Type II), 코핀 로우리 증후군(Coffin Lowry Syndrome), 지속성 식물인간 상태를 포함하여 혼수, 복합부위 통증 증후군, 선천성 안면 마비(congenital facial diplegia), 선천성 근무력증, 선천성 근육병, 선천성 혈관 해면 기형(congenital vascular cavernous malformations), 피질기저핵변성, 두개동맥염, 두개골유합증, 크로이츠펔트-야콥병, 누적외상성장애, 쿠싱 증후군, 거세포봉입체증(CIBD), 거대세포 바이러스 감염증, 안구간대경련-근간대경련 증후군(dancing eyes-dancing feet syndrome), 댄디-워커 증후군, 도슨병(Dawson Disease), 드모시어 증후군(De Morsier's Syndrome), 클룸프케-데제린마비(Dejerine-Klumpke Palsy), 다발경색성 치매, 피질하 치매, 루이체 치매(dementia with Lewy Bodies), 피부근염, 발달적 실행장애, 데빅 증후군(Devic's Syndrome), 당뇨병성 신경병증, 광범위경화증, 드라벳 증후군(Dravet's Syndrome), 자율신경장애, 난필증, 난독증, 연하곤란, 통합운동장애, 근긴장이상, 조기유아자폐증, 빈안장 증후군, 기면성 뇌염, 뇌염 및 뇌수막염, 뇌류, 뇌증, 뇌 3차신경 혈관종증(encephalotrigeminal angiomatosis), 뇌전증, 에르브마비(Erb's Palsy), 에르브-뒤시엔느 및 데제린-클룸프케 마비(Erb-Duchenne and Dejerine-Klumpke Palsies), 파브리병, 파르 증후군(Fahr's Syndrome), 실신, 가족성 자율신경이상증, 가족성 혈관종, 가족성 특발성 기저핵 석회화, 가족성 주기성 마비, 열성 경기 (예를 들어, GEFS 및 GEFS 플러스), 피셔 증후군, 저긴장 영아증후군, 프리드라이히운동실조증, 가우처병, 게르스트만 증후군, 게르스트만 슈투로이슬러 샤잉커 병, 거세포 동맥염, 거세포 봉입체병, 공세포백색질장애, 설인신경통, 길랭-바레 증후군, HTLV-1 연관 척수병증, 할러보르텐-스파츠 증후군, 두부 손상, 두통, 지속성 편두통, 반측안면근경련, 교호성 편측마비(hemiplegia alterans), 유전성 신경병증(hereditary neuropathies), 유전성 강직 하반신마비(hereditary spastic paraplegia), 유전성 다발신경염성 실조(heredopathia atactica polyneuritiformis), 귀대상포진, 대상포진, 히라야마 증후군(Hirayama Syndrome), 전전뇌증, 헌팅턴병, 수두무뇌증, 정상압수두증, 수두증 (특히 TGFβ-유도 수두증), 척수공동증, 고코르티솔증, 과수면증, 긴장항진, 근긴장 저하, 저산소증, 면역-매개 뇌척수염(immune-mediated encephalomyelitis), 봉입체 근염(inclusion body myositis), 색소실조증, 유아긴장감퇴, 유아피탄산축적병(infantile phytanic acid storage disease), 유아레프숨병(infantile refsum disease), 유아연축(infantile spasms), 염증성 근육병(inflammatory myopathy), 장성지방이영양증, 두개내 낭종(intracranial cysts), 두개내 고혈압(intracranial hypertension), 이삭 증후군(Isaac's Syndrome), 주버트 증후군(Joubert Syndrome), 컨스-세이어증후군(Kearns-Sayre Syndrome), 케네디병(Kennedy's Disease), 킨즈본 증후군(Kinsbourne syndrome), 클라인-레빈 증후군(Kleine-Levin syndrome), 클리펠 파일 증후군(Klippel Feil Syndrome), '클리펠-트레노네이 증후군(KTS: Klippel-Trenaunay Syndrome), 클뤼버-버시 증후군(Kluever-Bucy Syndrome), 코르사코프 기억 상실 증후군(Korsakoff's Amnesic Syndrome), 크라베병, 쿠겔베르그-웰란더 병(Kugelberg-Welander Disease), 쿠루(kuru), 람베르트-이튼 근무력 증후군(Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome), 란다우-클레프너 증후군(Landau-Kleffner Syndrome), 외측 대퇴 표피신경 포착(lateral femoral cutaneous nerve entrapment), 외측 연수 증후군 (lateral medullary syndrome), 학습장애, 라이병, 레녹스-가

스트 증후군(Lennox-Gastaut Syndrome), 레쉬-니한 증후군(Lesch-Nyhan Syndrome), 백질이영양증, 레빈-크리츨리 증후군(Levine-Critchley Syndrome), 루이스체 치매, 뇌회결손, 감금 증후군, 루게릭병, 루푸스-신경성 후유증(lupus-neurological sequelae), 라임병-신경성 합병증(Lyme Disease-Neurological Complications), 마카도-조셉병(Machado-Joseph Disease), 대뇌증, 거뇌증, 멜커슨 로젠탈 증후군(Melkersson-Rosenthal Syndrome), 뇌수막염, 멘케스병, 지각이상성대퇴신경통, 이염성백색질장애, 소두증, 편두통, 밀리퍼셔 증후군, 미니-스트로크(mini-strokes), 사립체 근병증(mitochondrial myopathies), 뫼비우스 증후군(Mobius Syndrome), 단일사지 근위축증, 운동신경 질환, 모야모야병, 점액지질증, 뮤코다당증, 다발성 경색성 치매, 다초점 운동 신경병증, 다발성 경화증 (MS), 다계통 위축증 (MSA-C 및 MSA-P), 기립성 저혈압을 수반하는 다계통 위축증(multiple system atrophy with orthostatic hypotension), 근육성이영양증, 선천성 근무력증, 중증 근무력증, 수초탈락성확산성경화증(myelinoclastic diffuse sclerosis), 유아의 간대성근경련성뇌증(myoclonic encephalopathy of infants), 근간대경련, 선천성 근육병증, 갑상선중독근질환(myopathy-thyrototoxic), 근육병, 선천성 근긴장증(myotonia congenita), 근긴장증, 기면증, 유극적혈구신경증, 퇴축축적 신경퇴화(neurodegeneration with brain iron accumulation), 신경섬유종증, 악성 신경이완 증후군, AIDS의 신경학적 합병증, 폼페병의 신경학적 증상(neurological manifestations of Pompe Disease), 시신경 척수염, 신경근긴장증, 신경 세로이드 리포푸신증(neuronal ceroid lipofuscinosis), 신경세포 이동장애, 선천성 신경통(neuropathy-hereditary), 신경사르코이드증, 신경독증, 모반 해면증(nevus cavernosus), 니만-피크병(Niemann-Pick Disease), 오설리반-맥러드 증후군(O'Sullivan-McLeod Syndrome), 후두신경통, 잠재성 척추 유합부전 속발증(occult spinal dysraphism sequence), 오타하라 증후군(Ohtahara Syndrome), 올리브교소뇌위축증, 안구간대경련-근간대경련(opsoclonus myoclonus), 기립성 저혈압, 과사용 증후군, 만성 통증, 부수종양성 증후군, 이상감각, 파킨슨병, 선천성 이상근긴장증(parmyotonia congenita), 발작성 무도 무정위 운동(paroxysmal choreoathetosis), 발작성 편두통, 패리-롬버그병(Parry-Romberg), 펠리체우스-메르츠바허병, 페나-쇼키어 II형 증후군 (Pena Shokeir II Syndrome), 척수주위 낭종, 주기성 마비증, 말초신경병증, 뇌실주위 백질연화증, 지속적 식물인간 상태, 전반적 발달장애, 피탄산축적증, 피크병, 이상근증후군, 뇌하수체 종양, 다발성 근염, 폼페병, 공뇌증, 후-소아마비 증후군, 대상포진후 신경통, 감염후 뇌척수염, 체위성 저혈압, 체위성기립빈맥증후군, 체위성 빈맥증후군, 일차성 측삭 경화증, 프리온병, 진행성 편측안면위축증, 진행성보행실조증, 진행성 다초점 백색질 뇌증, 진행성 경화성 회백질 위축증(progressive sclerosing poliodystrophy), 진행성 핵상안근 마비, 가성뇌종양, 피리독신 의존성 및 피리독신 감응성 경련성 장애(pyridoxine dependent and pyridoxine responsive seizure disorders), I형 람세이 헌트 증후군, II형 람세이 헌트 증후군, 라스무센 뇌염 및 다른 자가면역 간질, 반사교감신경이상 증후군, 영아형 레프숨병, 레프숨병, 반복성 동작 장애, 반복성 긴장 장애, 하지불안 증후군, 레트로바이러스-연관 척수병증, 레트 증후군, 라이증후군, 릴리-데이증후군, 단기지속편측 신경통혈두통(SUNCT headache), 천골 신경근 낭종(sacral nerve root cysts), 무도병, 침샘병(Salivary Gland Disease), 샌드호프병, 쉴더병, 분열뇌증, 경련성 장애, 중격 시신경 형성이상, 영아의 중증 근간대성 간질(SMEI: severe myoclonic epilepsy of infancy), 흔들린 아이 증후군, 대상 포진, 샤이-드래거증후군, 쇼그렌 증후군, 수면무호흡증, 수면병, 소토 증후군, 경직, 척추갈림증, 척수경색, 척수손상, 척수종양, 척수성 근위축증, 척수소뇌위축증(spino cerebellar atrophy), 스틸-리처드슨-울스제브스키증후군, 강직인간증후군, 줄무늬체 흑색질 변성증, 뇌일혈, 스티지-웨버 증후군(Sturge-Weber Syndrome), 아급성 경화성 범뇌염(subacute sclerosing panencephalitis), 피질하뇌병증, 삼킴 장애, 시테남 무도병, 실신, 척수후삭경화증, 척수공동증(syringohydromyelia), 척수공동증(syringomyelia), 전신 홍반 루푸스, 척수매독, 지연성 운동장애, 탈로프 낭종, 테이-삭스병, 측두동맥염, 결에 코드 증후군(tethered spinal cord syndrome), 톰슨병, 흉곽출구 증후군, 갑상샘중독성 근질환, 유통성 틱(Tic Douloureux), 토트마비, 투렛증후군, 일과성 허혈성 발작, 전달성 해면성 뇌증(transmissible spongiform encephalopathies), 횡단척수염, 외상성 뇌손상, 진전(tremor), 삼차 신경병증, 열대경련성 의사부전, 결절성 경화증, 혈관발기성 종양, 측두동맥염을 포함하여 혈관염, 폰이코노모병(Von Economo's Disease), 폰 힙펠-린도우병(VHL: Von Hippel-Lindau disease), 폰레클렐하우젠병, 발렌버그 증후군, 베르드니히-호프만병, 베르니케-코르사코프 증후군, 웨스트 증후군, 휘플병, 윌리엄스 증후군, 윌슨병, 만성 척수-안구 근위축증(X-Linked Spinal and Bulbar Muscular Atrophy) 및 젤웨거 증후군을 포함하여 중추 및 말초신경계에 영향을 주는 임의의 질환 장애 또는 상태를 의미한다.

[1186] 신경퇴화성 질환 및 신경염증성 질환의 바람직한 예는:

[1187] 알츠하이머병, 파킨슨병, 크로이츠펔츠 야곱병 (CJD), 크로이츠펔츠 야곱병의 신규 변종(nvCJD), 할러보르텐 스파츠 병(Hallervorden Spatz disease), 헌팅턴병, 다체계 위축증, 치매, 전측두엽 치매, 다중 자발적 또는 유전적 배경의 운동 신경 장애, 근위축성 측삭경화증 (ALS), 척수성 근위축증, 척수-소뇌성 운동실조증 (SCAs), 조현병,

정동 장애, 주우울증, 수막뇌염, 세균 수막뇌염, 바이러스성 수막뇌염, 중추신경계 자가면역 장애(CNS autoimmune disorders), 다발성 경화증 (MS), 급성 허혈성/저산소성 병변(acute ischemic / hypoxic lesions), 뇌일혈, 중추신경계 및 척수 외상(CNS and spinal cord trauma), 머리 및 척추 외상(head and spinal trauma), 뇌 외상성 손상(brain traumatic injuries), 동맥경화증, 죽상동맥경화증, 미세혈관병성 치매, 빈스방거병 (백질병변), 망막변성, 와우변성, 황반변성, 와우난청(cochlear deafness), AIDS-연관 치매, 망막색소변성증, 취약반성 진전/운동실조 증후군(FXTAS: fragile X-associated tremor/ataxia syndrome), 진행성 핵상안근 마비(PSP), 줄무늬체 흑색질 변성증 (SND), 올리브교소뇌퇴화(OPCD: olivopontocerebellar degeneration), 샤이-드래거증후군 (SDS), 나이 의존성 기억 손상, 치매와 연관되는 신경 발달장애, 다운증후군, 시누클레인 병증, 과산화물 제거효소 돌연변이(superoxide dismutase mutations), 헌팅턴병 같은 3염기 반복 장애(trinucleotide repeat disorders as Huntington's Disease), 트라우마, 저산소증, 혈관질환, 혈관 염증, 중추신경계-노화(CNS-ageing)를 포함하거나 이로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또한 줄기 세포 회복의 나이 연관 감소가 접근될 수 있다.

[1188] 신경퇴화성 질환 및 신경염증성 질환의 특히 바람직한 예는:

[1189] 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭경화증 (ALS), 수두증 (특히 $TGF-\beta$ -유도 수두증), 척수 손상 등과 같은 중추신경계 및 척수 외상, 머리 및 척추 외상, 뇌 외상성 손상, 망막 변성, 황반 변성, 와우난청, AIDS-연관 치매, 헌팅턴병 같은 3염기 반복 장애 및 중추신경계-노화를 포함하거나 이로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[1190] 안티센스-올리고뉴클레오티드는 또한 **섬유성 질환**의 예방 및 치료에 유용하다. 섬유증 또는 섬유성 질환은 회복 과정 또는 반응 과정에서의 기관 또는 조직 내에서의 과도한 섬유성 연결조직의 형성이다. 이는 반응성, 양성 또는 병리학적 상태가 될 수 있다. 손상에 대응하여 이는 흉터로 불리우고 섬유증이 단일 세포주로부터 일어나는 경우 이는 섬유종이라고 불리운다. 생리학적으로 이는 세포외 기질 침착으로 작용하고, 이는 내재하는 기관 또는 조직의 구조(architecture) 및 기능을 없앨 수 있다. 섬유증은 섬유상 조직의 과도한 침착의 병리학적 상태와 마찬가지로 치유에서의 연결조직 침착의 과정을 기술하는 데 사용될 수 있다. 섬유증은 자극된 세포가 콜라겐 및 글리코사미노글리칸을 포함하여 연결조직을 형성하는 것을 포함하는 과정이다. 후속하여 간질 간에 마크로파지 및 손상된 조직이 $TGF-\beta$ 를 방출한다. $TGF-\beta$ 는 연결조직을 침착하는 섬유아세포의 증식 및 활성화를 촉진한다. $TGF-\beta$ 수준을 감소시키는 것은 연결조직의 형성을 방지하고 감소시키고 따라서 섬유증을 방지하고 치료한다.

[1191] 섬유성 질환에 대한 예는

[1192] 폐: • 폐섬유증

[1193] • 특발성 폐섬유증 (특발성은 원인이 불명하다는 것을 의미함)

[1195] *• 낭포성 섬유증

[1196] 간: • 다중 원점의 간경변증

[1197] 심장: • 심내막심근 섬유증

[1198] • 진구성심근경색

[1199] • 심방성 섬유증

[1200] 기타: • 종격섬유증 (종격의 연부 조직)

[1201] • 녹내장 (눈, 안구)

[1202] • 골수섬유증 (골수)

[1203] • 후복막 섬유증 (후복막의 연부 조직)

[1204] • 진행성 거대섬유화증 (폐); 탄광부의 진폐증의 합병증

[1205] • 신성 전신 섬유화증 (피부)

[1206] • 크론병 (장)

[1207] • 켈로이드 (피부)

- [1208] · 피부경화증/전신경화증 (피부, 폐)
- [1209] · 관절섬유화 (무릎, 어깨, 다른 관절)
- [1210] · 페이로니병 (음경)
- [1211] · 듀프이트렌구축 (손, 손가락)
- [1212] · 유착성 관절낭염이 일부 형태 (어깨)
- [1213] · 홍반성 낭창 후 잔적층
- [1214] 이다.
- [1215] 따라서 본 발명의 다른 양태는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 폐섬유증, 낭포성 섬유증, 간경변증, 심내막심근 섬유증, 진구성심근경색, 심방성 섬유증, 종격섬유증, 골수섬유증, 후복막 섬유증, 진행성 거대섬유화증, 신성 전신 섬유화증, 원발성개방각녹내장 등과 같은 녹내장, 크론병, 켈로이드, 전신경화증, 관절섬유화, 페이로니병, 듀프이트렌구축 및 홍반성 낭창 후 잔적층의 예방 및/또는 치료를 위한 용도 또는 이들의 예방 및/또는 치료를 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 용도에 관한 것이다.
- [1216] 본 발명의 여전히 다른 양태는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 과증식성 질환, 암, 종양 및 이들의 전이의 예방 및/또는 치료를 위한 용도 또는 과증식성 질환, 암, 종양 및 이들의 전이의 예방 및/또는 치료를 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 용도에 관한 것이다.
- [1217] 과증식성 질환, 암, 종양의 예는: 선암, 흑색종, 급성 백혈병, 청신경초종, 팽대부성 암, 항문암, 성상세포종, 기저세포암, 췌장암, 테스모이드 종양, 방광암, 기관지내 종양, 비소세포폐암 (NSCLC), 유방암, 버킷 림프종, 코퍼스암, CUP-증후군(CUP-syndrome: 원발 미상의 암종), 대장암, 소장암, 소장 종양, 난소암, 자궁내막암, 상 의세포종, 상피암형(epithelial cancer types), 유잉 종양(Ewing's tumors), 위장관 종양, 위암, 담낭암, 담낭 암종, 자궁암, 자궁경부암, 자궁경관, 교모세포종, 부인과 종양, 이비인후 종양(ear, nose and throat tumors), 혈액 신생물(hematologic neoplasias), 모양세포 백혈병, 요도암, 피부암, 피부고환암(skin testis cancer), 뇌암 (신경교종, 예를 들어 성상세포종, 핍지교종, 수모세포종, 신경내분비종양(PNET's), 혼합교종), 뇌전이암 (brain metastases), 고환암, 뇌하수체 종양(hypophysis tumor), 암양종, 카포시육종, 후두암, 생식세포종, 골 암, 결직장암, 두경부 종양 (이비인후 영역의 종양), 결장암, 두개인두종, 구강암 (구강 영역 이내 및 입술 상 의 암), 중추신경계의 암, 간암, 간전이암, 백혈병, 안검 종양, 폐암, 림프절암 (호지킨/비-호지킨), 림프종, 위암, 악성 흑색종, 악성 신생물, 위장관 악성 종양(malignant tumors gastrointestinal tract), 유방암종, 직 장암, 수모세포종, 흑색종, 수막종, 호지킨병, 균상식육종, 비암, 신경근종, 신경모세포종, 신장암, 신세포암종, 비-호지킨 림프종, 핍지교종, 식도암종(esophageal carcinoma), 용골 암종 및 골형성 암종 (osteolytic carcinomas and osteoplastic carcinomas), 골육종, 난소암종, 췌장암종, 음경암, 형질세포종, 두 경부의 편평세포암종 (SCCHN), 전립선암, 인두암, 직장암종, 망막아세포종, 질암, 갑상선암종, 슈넬베르크병, 식도암, 슈피날리움(spinaliomas), T-세포 림프종 (균상식육종), 흉선종, 관암종(tube carcinoma), 안/안구 종 양(eye/ocular tumors), 요로종양, 비뇨기과 종양(urologic tumors), 요로상피세포암종, 외음암, 사마귀 외양 (wart appearance), 연부 조직 종양, 연부 조직 육종, 빌름스종양, 자궁경부암종 및 설암을 포함하거나 이로 이 루어지는 군으로부터 선택된다.
- [1218] 용어 "암"은 바람직하게는 폐암종 등과 같은 폐암, 간세포암종 등과 같은 간암, 흑색종 또는 악성 흑색종, 췌장 상피암종 또는 췌장선암 등과 같은 췌장암, 결직장선암종 등과 같은 결장암, 위암 또는 위암종, 유선암종, 악성 성상세포종, 위암종 등과 같은 전립선암, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 단구성 백혈병, 전골수구성 백 혈병, 림프성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 림프성 백혈병 및 급성 림프구성 백혈병 등과 같은 백혈병 및 조 직구 림프종 등과 같은 림프종으로 이루어지거나 이를 포함하는 군으로부터 선택되는 암을 의미한다.
- [1219] 과증식성 질환, 암, 종양 및 이들의 전이의 치료를 위하여, 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13 일 등과 같이, 약 1 주 등과 같이, 6, 7 또는 8 일 등과 같이 3일 내지 2주의 정규 간격 (투여 간격, D1)으로 투여될 수 있다. 적절하게는 D1 기간에 대하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 각 투여량 간에서 투여 간격 (D) 각각으로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 투여량 등과 같이 두 투여량 간으로 적어도 2회 투여량이 제공된다. 각 투여량 간의 D1 간격은 3일 내지 2 주 등과 같이, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 일 등과 같이, 약 1 주 등과 같이, 6, 7 또는 8 일 등과 같이 동일할 수 있다.
- [1220] 바람직하게는, 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 각 투여량은 약 0.5mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2mg/kg, 약 3mg/kg,

약 4mg/kg, 약 5mg/kg, 약 6mg/kg, 약 7mg/kg, 약 8mg/kg, 약 9mg/kg 등과 같이 약 0.25mg/kg 내지 약 10mg/kg 사이가 될 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 각 투여량은 약 2 mg/kg 내지 약 8 mg/kg 또는 약 4 내지 약 6 mg/kg 또는 약 4mg/kg 내지 약 5mg/kg 사이가 될 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 각 투여량은 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 mg/kg 등과 같이, 6 mg/kg 등과 같이 적어도 2mg/kg이다. 일부 구체예에 있어서 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대한 투여 체계는 초기 투여 체계 이후, 예를 들어 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 투여되지 않는 휴지기 이후 반복될 수 있다. 이러한 휴지기는 약 3 주 또는 약 4 주 또는 약 5 주 또는 약 6 주 등과 같이 2 주 이상의 기간일 수 있다. 일부 구체예에 있어서 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대한 투여 체계는 3, 4 또는 5회 반복되는 1 주 투여이다. 계속해서 이 투여 체계는 예를 들어 약 4 주 등과 같이 약 3 내지 5 주의 휴지기 이후 반복될 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 2 내지 10회 투여를 위하여 4 내지 13 일 간의 제1 투여 체계 동안 정규 투여 간격 (D1)으로 투여된다.

[1221] 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 투여는 전형적으로 피하, 근내, 정맥내 또는 복강내 투여 등과 같이 비경구 투여에 의해 수행된다.

도면의 간단한 설명

[1222] 도 1은 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO)의 억제 효과를 나타내고 있다. DNA가 Pre-mRNA로 전사되고 세포의 핵 중에서 그에 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO)가 엑손 (우측으로부터 제1 ASO 및 좌측으로부터 제1 ASO로 표현되는 바와 같이) 내 또는 인트론 (우측으로부터 제2 ASO로 표현되는 바와 같이) 내 또는 엑손의 영역 및 인접 인트론의 영역 (좌측으로부터 제2 ASO로 표현되는 바와 같이)으로 이루어지는 할당에 상보성 시퀀스에 결합하거나 하이브리드화할 수 있다. 후-전사 변성, 즉 스플라이싱에 의하여, mRNA의 단백질 시퀀스로의 번역을 억제하도록 세포의 세포질 중에서 그에 ASO이 결합하거나 하이브리드화할 수 있는 mRNA가 형성된다. 따라서, ASO는 표적 유전자 및 단백질 발현을 선택적으로 억대운시킨다.

도 2는 비-LNA 단위이고 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드 내에 특히 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 캡량체인 경우에 영역 B 내에 포함될 수 있는 뉴클레오타이드 단위 (뉴클레오타이드간 연결을 수반하지 않음) 또는 뉴클레오타이드 단위 (뉴클레오타이드간 연결을 수반함)를 나타내고 있다.

도 3은 TGF-베타 및 그의 신경 줄기 세포, 암 줄기 세포 및 종양에 대한 효과를 나타내고 있다. TGF-베타는 신경 줄기 세포 증식을 억제한다. 이는 암 줄기 세포에로의 전이에 영향을 줄 수 있으며, 이는 TGF-베타 성장 조절로부터 탈출할 수 있을 것이다. 이후 종양 진전에 있어서, TGF-베타는 발암유전자로서 작용하고; 이는 추가로 혈관신생을 촉진하고 면역계를 억제하는 것에 의하여 종양 성장을 촉진한다. 게다가, 이는 세포 이동을 촉진하고, 그에 의하여 세포를 전이암으로 구동시킨다.

도 4는 5' 말단예의 3개의 LNA 단위 (C^*b^1 및 Ab^1 및 Tb^1) 및 3' 말단예의 4개의 LNA 단위 (Ab^1 및 Gb^1 및 Tb^1 및 Ab^1) 및 LNA 조각들 사이에 9개의 DNA 뉴클레오타이드 (dG, dA, dA, dT, dG, dG, dA, dC 및 dC)를 수반하고 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결(들) 및 5' 말단으로부터 첫 LNA 단위 내에 핵염기 5-메틸시토신 (C^*)을 수반하는 16개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 캡량체 형태의 시퀀스 동정 번호 218b의 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 나타내고 있다.

SP	L	시퀀스 동정번호	시퀀스, 5'-3'
4217	16	218b	$C^*b^1sAb^1sTb^1sdGsdAsdAsdTsdsGsdGsdAsdCsAb^1sGb^1sTb^1sAb^1$

도 5: ASO (시퀀스 동정 번호 218b) 처리는 세포 내 pSmad2 단백질 감소를 유도한다. ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달(gymnotic transfer) 각 72 시간 또는 96 시간 이후 A549 (도 5a) 및 ReNcell CX® (도 5b) 세포 중에서의 pSmad2에 대한 항체에 대한 표지화 (좌측란, 적색). 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b.

도 6: ASO (시퀀스 동정 번호 218c) 처리는 세포 내 pSmad2 단백질 감소를 유도한다. ASO 시퀀스 동정 번호 218c로의 김노틱 전달 각 72 시간 또는 96 시간 이후 A549 (도 6a) 및 ReNcell CX® (도 6b) 세포 중에서의 pSmad2에 대한 항체에 대한 표지화 (좌측란, 적색). 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소

프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c.

도 7: TGF-β1의 존재 중에서, ASO (시퀀스 동정 번호 218b) 처리는 TGF-R_{II} mRNA의 하향조절을 유도한다. TGF-β1 사전-배양 (48 시간) A549 (도 7a) 및 ReNcell CX® (도 7b) 세포 중에서의 TGF-R_{II} 특이적 ASO의 김노틱 전달 이후의 TGF-R_{II} mRNA의 잠재 하향조절. ASO를 TGF-β1의 존재 중에서 각각 72 시간 또는 96 시간 동안 배양시켰다. mRNA 발현 수준을 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 정량하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E= TGF-β1, ± = 표준오차(SEM), A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01, E+B와 관련하여 ⁺⁺p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

도 8: TGF-β1의 존재 중에서, ASO (시퀀스 동정 번호 218c) 처리는 TGF-R_{II} mRNA의 하향조절을 유도한다. TGF-β1 사전-배양 (48 시간) A549 (도 8a) 및 ReNcell CX® (도 8b) 세포 중에서의 TGF-R_{II} 특이적 ASO의 김노틱 전달 이후의 TGF-R_{II} mRNA의 잠재 하향조절. ASO를 TGF-β1의 존재 중에서 각각 72 시간 또는 96 시간 동안 배양시켰다. mRNA 발현 수준을 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 정량하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c, E= TGF-β1, ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01, E+B와 관련하여 ⁺⁺p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

도 9는 5' 말단에는 2개의 LNA 단위 (Gb¹ 및 Tb¹) 및 3' 말단에는 3개의 LNA 단위 (Ab¹ 및 Gb¹ 및 C^{*}b¹) 및 LNA 조각들 사이에 11개의 DNA 뉴클레오티드 (dA, dG, dT, dG, dT, dT, dA, dG, dG 및 dG)를 수반하고 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결(들) 및 5' 말단으로부터 마지막 LNA 단위 내에 핵염기 5-메틸시토신 (C^{*})을 수반하는 16개의 뉴클레오티드로 이루어지는 겹량체 형태의 시퀀스 동정 번호 209y의 안티센스-올리고뉴클레오티드를 나타내고 있다.

SP	L	시퀀스 동정번호	시퀀스, 5'-3'
2064	16	209y	Gb ¹ sTb ¹ sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb ¹ sGb ¹ sC [*] b ¹

도 10은 5' 말단에는 4개의 LNA 단위 (Gb¹ 및 C^{*}b¹ 및 Tb¹ 및 Ab¹) 및 3' 말단에는 3개의 LNA 단위 (Gb¹ 및 Tb¹ 및 Tb¹) 및 LNA 조각들 사이에 9개의 DNA 뉴클레오티드 (dT, dT, dT, dG, dG, dT, dA, dG 및 dTs)를 수반하고 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결(들) 및 5' 말단으로부터 두 번째 LNA 단위 내에 핵염기 5-메틸시토신 (C^{*})을 수반하는 16개의 뉴클레오티드로 이루어지는 겹량체 형태의 시퀀스 동정 번호 210q의 안티센스-올리고뉴클레오티드를 나타내고 있다.

SP	L	시퀀스 동정번호	시퀀스, 5'-3'
2072	16	210q	Gb ¹ sC [*] b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb ¹ sTb ¹ sTb ¹

도 11: TGF-β1의 존재 중에서, ASO (시퀀스 동정 번호 218b) 처리는 CTGF mRNA의 하향조절을 유도한다. TGF-β1 사전-배양 (48 시간) A549 (도 11a) 및 ReNcell CX® (도 11b) 세포 중에서의 TGF-R_{II} 특이적 ASO의 김노틱 전달 이후의 CTGF mRNA의 잠재 하향조절. ASO를 TGF-β1의 존재 중에서 각각 72 시간 또는 96 시간 동안 배양시켰다. mRNA 발현 수준을 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 정량하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E= TGF-β1, ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01, E+B와 관련하여 ⁺⁺p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

도 12: TGF-β1의 존재 중에서, ASO (시퀀스 동정 번호 218b) 처리는 CTGF 세포 단백질의 감소를 유도한다. TGF-β1 사전-배양 (48 시간) A549 (도 12a) 및 ReNcell CX® (도 12b) 세포 중에서의 TGF-R_{II} 특이적 ASO의 김노틱 전달 이후 CTGF 단백질 발현이 감소되었다. ASO를 TGF-β1의 존재 중에서 각각 72 시간 또는 96 시간 동안 배양시켰다. 세포를 CTGF에 대한 항체로 표지하였다 (좌측란, 적색). 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및

CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF-β1.

도 13: TGF-β1의 존재 중에서, ASO (시퀀스 동정 번호 218b) 처리는 세포 내 pSmad2 단백질 감소를 유도한다. TGF-β1 사전-배양 (48 시간) A549 (도 13a) 및 ReNcell CX® (도 13b) 세포 중에서의 TGF-R_{II} 특이적 ASO의 김노틱 전달 이후 pSmad2 단백질 발현이 감소되었다. ASO를 TGF-β1의 존재 중에서 각각 72 시간 또는 96 시간 동안 배양시켰다. 세포를 pSmad2에 대한 항체로 표지하였다 (좌측란, 적색). 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF-β1.

도 14: TGF-β1의 존재 중에서, ASO (시퀀스 동정 번호 218c) 처리는 CTGF mRNA의 하향조절을 유도한다. TGF-β1 사전-배양 (48 시간) A549 (도 14a) 및 ReNcell CX® (도 14b) 세포 중에서의 TGF-R_{II} 특이적 ASO의 김노틱 전달 이후의 CTGF mRNA의 잠재 하향조절. ASO를 TGF-β1의 존재 중에서 각각 72 시간 또는 96 시간 동안 배양시켰다. mRNA 발현 수준을 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 정량하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c, E = TGF-β1, ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다. 다른 축척에 주의하시오.

도 15: TGF-β1의 존재 중에서, ASO (시퀀스 동정 번호 218c) 처리는 CTGF 세포 단백질의 감소를 유도한다. TGF-β1 사전-배양 (48 시간) A549 세포 중에서의 TGF-R_{II} 특이적 ASO의 김노틱 전달 이후 CTGF 단백질 발현이 감소되었다. ASO를 TGF-β1의 존재 중에서 각각 72 시간 동안 배양시켰다. 세포를 CTGF에 대한 항체로 표지하였다 (좌측란, 적색). 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c, E = TGF-β1.

도 16: TGF-β1의 존재 중에서, ASO (시퀀스 동정 번호 218c) 처리는 세포 내 pSmad2 단백질 감소를 유도한다. TGF-β1 사전-배양 (48 시간) A549 (도 16a) 및 ReNcell CX® (도 16b) 세포 중에서의 TGF-R_{II} 특이적 ASO의 김노틱 전달 이후 pSmad2 단백질 발현이 감소되었다. ASO를 TGF-β1의 존재 중에서 각각 72 시간 또는 96 시간 동안 배양시켰다. 세포를 pSmad2에 대한 항체로 표지하였다 (좌측란, 적색). 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218c, E = TGF-β1.

도 17: ASO (시퀀스 동정 번호 218b) 전처리 및 후속하는 TGF-β1 공-노출이 TGF-R_{II} 막 단백질의 감소를 야기한다. TGF-R_{II} 특이적 ASO의 김노틱 전달 및 후속하는 TGF-β1 (48 시간) A549 (도 17a) 및 ReNcell CX® (도 17b) 세포의 공-노출 이후 TGF-R_{II} 단백질이 감소되었다. 48 시간 TGF-β1 공-노출에 앞서 ASO를 각각 72 시간 또는 96 시간 동안 배양시켰다. 세포를 TGF-R_{II}에 대한 항체로 표지하였다 (좌측란, 적색). 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF-β1.

도 18: ASO (시퀀스 동정 번호 218b) 전처리 및 후속하는 TGF-β1 공-노출이 세포 내 pSmad3 단백질의 감소를 야기한다. TGF-R_{II} 특이적 ASO의 김노틱 전달 및 후속하는 TGF-β1 (48 시간) A549 (도 18a) 및 ReNcell CX® (도 18b) 세포의 공-노출 이후 pSmad3 단백질 발현이 감소되었다. 48 시간 TGF-β1 공-노출에 앞서 ASO를 각각 72 시간 또는 96 시간 동안 배양시켰다. 세포를 pSmad3에 대한 항체로 표지하였다 (좌측란, 적색). 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF-β1.

도 19: 인간 신경 전구체 ReNcell CX® 세포에서 신경 신생을 ASO (시퀀스 동정 번호 218b)는 증가시키고 TGF-β1은 감소시킨다. 신경 신생 마커 DCX mRNA는 본 발명 ASO의 반복되는 김노틱 전달 (2 x 96 시간) 이후

ReNcell CX® 세포 중에서 상향조절된다. 8-일 TGF- β 1 노출 이후 DCX mRNA 발현의 강한 감소가 인식되었다. mRNA 발현 수준을 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 정량하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF- β 1. $\pm$ = 표준오차, C 2.5 μ M과 관련하여 $p < 0.05$, C 10 μ M과 관련하여 $p < 0.05$.

도 20: 인간 신경 전구체 ReNcell CX® 세포에서 증식을 ASO (시퀀스 동정 번호 218b)는 증가시키고 TGF- β 1은 감소시킨다. 증식 마커 Ki67 단백질 발현은 본 발명 ASO의 반복되는 김노틱 전달 (2 x 96 시간) 이후 ReNcell CX® 세포 중에서 증가된다. 8-일 TGF- β 1 노출 이후 감소된 Ki67 단백질 발현이 인식되었다. 세포를 Ki67에 대한 항체로 표지하였다 (좌측란, 녹색). 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF- β 1.

도 21: 증식 조건에도 불구하고 ASO (시퀀스 동정 번호 218b)는 인간 신경 전구체 ReNcell CX® 세포에서의 분화를 향상시킨다. ReNcell CX® 중의 신경 마커 NeuN (도 23a, 좌측란, 적색) 및 β III-튜불린 (도 23b, 좌측란, 적색)이 관측되었다. ASO 처리는 초기 4 일 동안 증식 조건에 그리고 후속하여 추가의 4 일 동안 증식 (+ EGF/FGF) 또는 분화 조건 (- EGF/FGF)에 적용에 적용되었다. 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF- β 1. + EGF/FGF = 증식, - EGF/FGF = 분화.

도 22: TGF- β -유도 신경 줄기 세포 증식 저지로부터의 ASO-매개 (시퀀스 동정 번호 218b) 구출. 7 일 동안의 TGF- β 1 노출 및 후속하여 8 일 동안의 ASO 처리를 수반하거나 수반하지 않고 인간 신경 전구체 ReNcell CX® 세포 증식이 관측되었다. TGF- β 1 사전-배양 7 일 후 GFAP (도 24a), Ki67 (도 24b) 및 DCX (도 24c) mRNA의 상향조절은 줄기 세포 증식의 회복을 나타낸다. mRNA 발현 수준을 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 정량하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF- β 1. $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 $*p < 0.05$, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* multiple 비교를 사용하여 산출하였다.

도 23: ASO는 인간 폐암 세포 (A549)의 증식을 감소시킨다. 증식 마커 Ki67 단백질 발현은 본 발명의 ASO의 김노틱 전달 (72 시간) 후 A549 세포 중에서 감소되었다. 감소된 Ki67 단백질 발현이 인식되었다 (좌측란, 녹색). 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF- β 1.

도 24: ASO는 여러 인간 종양 세포주의 증식을 감소시킨다. HPAFII, K562, MCF-7, Panc-1 및 HTZ-19 세포들을 본 발명의 ASO에 4x 72 시간 노출시키고 증식을 광학 현미경 (Nikon, TS-100® F LED)으로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b.

도 25: ASO 처리는 신경 항-섬유화 효과를 매개하고 세포 스트레스를 개선한다. TGF- β 1-사전 배양 (48 시간) 후속하여 본 발명의 ASO의 김노틱 전달 및 96 시간 동안의 TGF- β 1 처리로의 공-노출 후 ReNcell CX® 세포를 관측하였다. 세포를 CTGF (도 29a, 좌측란, 적색), FN (도 29b, 좌측란, 녹색) 및 팔로이딘 (액틴-세포골격, 도 29c, 좌측열, 적색)에 대한 항체로 표지하였다. 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF- β 1.

도 26: ASO 처리는 신경 항-섬유화 효과를 매개하고 세포 스트레스를 개선한다. TGF- β 1 또는 본 발명의 ASO의 김노틱 전달 후 A549 세포를 관측하였다 (72 시간). 세포를 FN에 대한 항체 (도 30a, 좌측란, 녹색), 팔로이딘 (액틴-세포골격, 도 30b, 좌측란, 적색)로 표지하였다. 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다 (중앙란, 청색). 세포의 검사를 형광현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)으로 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF- β 1.

도 27: ASO 처리는 종양 항-섬유화 효과를 매개한다. TGF- β 1-사전 배양 (48 시간) 후속하여 본 발명의 ASO의 김노틱 전달 및 72 시간 동안의 TGF- β 1 처리로의 공-노출 후 A549 인간 폐암 세포를 관측하였다. 세포를 CTGF (도 31a, 좌측란, 적색) 및 FN (도 31b, 좌측열, 녹색)에 대한 항체로 표지하였다. 핵 DNA는 DAPI로 염색되었다

- [1224] 재료 및 방법
- [1226] *여기에서 사용되는 대부분의 안티센스-올리고뉴클레오타이드와 마찬가지로 대조 또는 기준 올리고뉴클레오타이드는 발명자/출원인의 요구에 따라 상용 올리고뉴클레오타이드로서의 EXIQON으로 합성되었다. 하기 시퀀스를 갖는 올리고뉴클레오타이드가 기준으로 사용되었다:
- [1227] Ref. 0 = dCsdAsdGsdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsdAsdTsdG (Seq. ID No. 147c);
- [1228] Ref. 1 = Ab1sAb1sC^{*}b1sdAsdCsdGsdTsdCsdTsdAsdTsdAsC^{*}b1sGb1sC^{*}b1 (시퀀스 동정 번호 76);
- [1229] Ref. 2 = C^{*}b¹sAb1sGb1sdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAb1sTb1sGb1 (시퀀스 동정 번호 147m);
- [1230] Ref. 3 = TTGAATATCTCATGAATGGA; 2'-MOE-윙 (5 단위 5' 및 3') 및 포스포로티오에이트 연결을 가짐 (시퀀스 동정 번호 80);
- [1231] Ref. 4 = ; CAGAAGAGCTATTTGGTAGT, 2'-MOE-윙 (5 단위 5' 및 3') 및 포스포로티오에이트 연결을 가짐 (시퀀스 동정 번호 82);
- [1232] Ref. 5 = TGGTAGTGTTTAGGGAGCCG (시퀀스 동정 번호 85),
- [1233] 기준 6 = GTGCAGGGGAAAGATGAAAA (시퀀스 동정 번호 344),
- [1234] Ref. 7 = GAGCTCTTGAGGTCCCTGTG (시퀀스 동정 번호 345),
- [1235] Ref. 8 = AGCCTCTTTCCTCATGCAAA (시퀀스 동정 번호 346),
- [1236] Ref. 9 = CCTTCTCTGCTTGGTTCTGG (시퀀스 동정 번호 347) 및
- [1237] Ref. 10 = GCCATGGAGTAGACATCGGT (시퀀스 동정 번호 348).
- [1238] 표준 절차 프로토콜
- [1239] 세포 배양:

[1240] [표 10]: 안티센스-올리고뉴클레오타이드 실험을 위하여 하기 인간 세포주를 사용하였다:

설명	세포주	CO ₂ - 함량	배지
멜라노마	HTZ-19	5%	DMEM F12 (Gibco 31331-018) + 1 % dM-트립플 (트랜스페린(835 µl 수 중 30 mg/ml, 비-필수 아미노산 (100x) 10 ml, 소듐셀레나이트 (수 중 0.2 mg/ml) 70 µl, 10 ml PBS), 1% P/S
폐암종	A549	5%	Kaighn's F12 K + 10% FCS + 1% P/S
간세포암종	HepG2	5%	DMEM (Sigma D6429) + 10% FCS + 1% P/S
간세포암종	Hep3B	5%	DMEM (Sigma D6429) + 10% FCS + 1% P/S
췌장상피암종	Panc-1	5%	DMEM (Sigma D6429) + 10% FCS + 1% P/S
췌장선암종	HPAFII	5%	DMEM (Sigma D5796) + 15 % FCS, 1 % P/S, 1% 항생제/항진균제, 1% MEM 비타민 용액, 1% 비-필수아미노산 (100x)
췌장선암종	BxPC-3	5%	RPMI (Gibco A10491-01) + 10% FCS + 1% P/S + 1% 항생제/항진균제, 1% MEM 비타민 용액
췌장암 간전이암	L3.6pl	5%	DMEM (Sigma D5796) + 15 % FCS, 1% P/S, 1% 항생제/항진균제, 1% 비타민, 1% 비-필수아미노산 (100x)
결직장선암종	HT-29	5%	DMEM (Sigma D5796) + 15 % FCS, 1% P/S, 1% 항생제/항진균제, 1% MEM 비타민 용액, 1% 1% 비-필수아미노산 (100x)
결직장상피 선암종	CaCo2	5%	DMEM (Sigma D5796) + 20 % FCS + 1% P/S
위암종	TMK-1	5%	DMEM (Sigma D5796) + 10% FCS + 1% P/S, 1% 항생제/항진균제, 1% MEM 비타민 용액
악성성상세포종	HTZ-243	5%	DMEM (Sigma D6046) + 10% FCS + 1% P/S + 1% 비-필수아미노산 + 1% MEM 비타민 용액
유선암종	MCF-7	5%	DMEM (Sigma D6046) + 10 % FCS + 1% P/S
전립선선암종	PC-3M	5%	RPMI (Gibco #61870-010), 10 % FCS, 1% 소듐 피루베이트, 1% 소듐바이카보네이트, 1% P/S
급성골수성 백혈병	KG-1	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 %FCS + 1% P/S

[1241]

만성골수성 백혈병	K562	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 1% P/S
단구성 백혈병	THP-1	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0.5 % P/S
전골수구성 백혈병	HL60	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0.5 % P/S
림프구성 백혈병	CEM-C7H2	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0.5 % P/S
급성림프성 백혈병	Pre-B697	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0.5 % P/S
조직구성 백혈병	U937	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0.5 % P/S
대뇌 피질영역의 신경 전구체 세포	ReNcell CX	5%	ReNcell 신경 줄기세포 유지 배지 (Millipore #SCM005) + 인간 FGF 배아적 인간 + 인간 EGF + N2-보충제

[1242]

[1243] 재료:

[1244] 우태혈청(FCS: ATCC #30-2020)

- [1245] 소듐피루베이트 (Sigma #S8636)
- [1246] 소듐바이카보네이트 (Sigma #S8761-100ML)
- [1247] 트랜스페린 (Sigma #T8158-100MG)
- [1248] 소듐셀레나이트 (Sigma #S5261-10G)
- [1249] 페니실린 / 스트렙토마이신 (P/S) (Sigma-Aldrich #P4458)
- [1250] 비-필수 아미노산 (AS) 100x (Sigma #M7145)
- [1251] 항생제/항진균제 (Sigma #A5955)
- [1252] MEM 비타민 용액 (Sigma #M6895)
- [1253] 인산염완충염수(PBS: Sigma #D8537)
- [1254] 인간 섬유아세포성장인자 베이직(FGF Basic human: Millipore #GF003)
- [1255] 인간 상피세포성장인자(EGF human: Millipore #GF144)
- [1256] N-2 보충제 (Life Technologies #17502048)
- [1257] ReNcell 신경 줄기 세포 유지 배지 (Millipore #SCM005)
- [1258] 세포 배양 및 산포:
- [1259] 배지를 제거한 후, 세포를 PBS로 세척하고 accutase (Sigma-Aldrich #P4458)로 배양하였다 (5 분, 실온(RT)). 배양 후, 세포를 피닝하고(peened) 완전 배지 (3 ml, 회사: 개개 세포주에 대하여 표 10을 참조하시오)를 첨가하였다. 그 후, 세포를 5 ml Eppendorf Cup으로 옮기고 원심분리하였다 (5 분, 1000 rpm, RT). 1 T75-병 (Sarstedt #833.910.302)으로부터 펠릿을 2.5 ml 신재 배지 중에 재현탁시켰다. 아크리딘 오렌지/프로피디움이오다이드 분석 생존도 키트(acridine orange/propidium iodide assay viability kit)(Biozym #872045)로 염색하는 것에 의하여 세포 현탁액 중의 세포 수를 Luna-FL™ 자동화 세포계수기 (Biozym #872040)로 결정하였다. 2 µg/cm²의 농도 중에서의 실험을 위한 세포의 접종(seeding) 이전에 ReNcell CX® 세포의 부착을 위하여 접시의 Laminin-코팅 (Millipore #CC095)이 요구된다. Laminin-PBS 용액이 개별적 양으로 직접적으로 웰 및 플라스크에 제공되고 1.5 시간 동안 37℃에서 배양하였다. 실험을 위하여 개별 실험 장의 방법부에서 언급된 바에 따라 세포를 접종하고 수확하였다. 세포의 37℃ 및 5% CO₂에서의 밤샘 배양 후, 개별 실험 기술에서 설명된 바와 같이 세포를 처리하였다. 10 ml의 세포를 배양시키기 위한 신재 완전 배지로 채워진 신재 T75-병에 잔여 세포 현탁액 중의 500 µl를 제공하였다.
- [1260] RNA-분석
- [1261] cDNA 합성을 위한 총 DNA를 제조업자의 지시에 따라 innuPREP® RNA Mini Kit (Analytik Jena #845-KS-2040250)를 사용하여 분리시켰다. cDNA를 합성하기 위하여, 총 RNA 함량을 광도계 (Eppendorf, BioPhotometer D30 #6133000907)를 사용하여 결정하고, 무-뉴클레아제 물로 희석시켰다. 그 후 제1-가닥 cDNA를 제조업자의 추천에 따라 iScript™ cDNA 합성 키트 (BioRad#170-8891)를 사용하여 제조하였다. mRNA 분석을 위하여 실시간 RT-PCR을 CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection System (BioRad #185-5196)을 사용하여 수행하였다.
- [1262] 모든 프라이머 쌍은 사용준비되고 표준화되었고 제조업자의 지시 (BioRad Prime PCR Quick Guide)에 따라 개개 사용준비된 Mastermix 용액 (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad #172-5271)과 혼합시켰다. 생체 내 실험을 위한 프라이머-쌍을 개개 중에 따라 적용시켰다.

[1263] [표 11]: mRNA 분석에 사용된 프라이머 쌍

프라이머 쌍	회사	독특한 분석 동정
인간 CDKN1A	BioRad	qHsaCID0014498
인간 CDKN1B	BioRad	qHsaCID0012509
인간 CFLAR	BioRad	qHsaCID0038905
인간 Col4A1	BioRad	qHsaCID0010223
인간 CTGF	BioRad	qHsaCED0002044
인간 DCX	BioRad	qHsaCID0010869
인간 FN1	BioRad	qHsaCID0012349
인간 GFAP	BioRad	qHsaCID0022307
인간 GNB2L1	BioRad	qHsaCEP0057912
인간 ID-2	BioRad	qHsaCED0043637
인간 MKI67	BioRad	qHsaCID0011882
인간 네스틴	BioRad	qHsaCED0044457
인간 SERPINE1	BioRad	qHsaCED0043144
인간 SOX2	BioRad	qHsaCED0036871
인간 TGFβ-RII	BioRad	qHsaCID0016240
인간 TP53	BioRad	qHsaCID0013658

[1264]

[1265] 주형(template)으로서, 1 ml의 개개 cDNA가 사용되었다. 역전사 되지 않은 RNA는 실시간 RT-PCR에 대한 음성 대조로서 제공되었다. 상대적인 정량을 위하여 자가 보관 유전자 구아닌 뉴클레오티드-결합 단백질 서브유닛 베타-2-유사 1 (GNB2L1: Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1)이 사용되었다. 실시간 RT-PCR을 하기 프로토콜로 수행하였다:

[1266] [표 12]: 실시간 RT-PCR에 대한 프로토콜

개시 기간	2 분	95 °C	1x
변성	5 초	95 °C	40x
어닐링, 연장	30 초	60 °C	40x
융합 곡선		65 °C – 95 °C (0.5 °C 경사)	1x

[1267]

[1268] 그 후, BioRad CFX Manager 3.1을 사용하여 GNB2L1 mRNA에 대한 개개 mRNA-수준을 정량하고 계속해서 미처리된 대조에 대하여 정규화시켰다.

[1269] **웨스턴 블롯(Western Blot):**

[1270] 단백질 분석을 위하여, 세포/조직을 제조업자의 지시에 따라 각각 M-PER® 포유동물 단백질 추출 시약/ T-PER® 조직 단백질 추출 시약 (Thermo Scientific, #78501/ #78510)을 사용하여 용해시켰다. SDS-아크릴아미드-겔 (10%)을 제조업자 지시에 따라 TGX Stain Free™ FastCast™ 아크릴아미드 키트 (BioRad #161-0183)를 사용하여 제조하였다. 단백질 샘플 (20 μl)을 1:5로 Laemmli-완충제(6.5 μl, Roti®-Load1, Roth #K929.1)로 희석시키고, 60 °C에서 30 분 동안 배양시키고 단백질 용액 전체 용적으로 겔 상에 적하시켰다. 단백질의 분리를 PowerPac™ 베이직 파워 서플라이 (Biorad #164-5050SP) 및 Mini-PROTEAN® 테트라 셀 전기영동 챔버 (BioRad #165-8001-SP)를 사용하는 전기영동으로 수행하였다 (200V, 45 분). 전기영동에 후속하여, 단백질을 Trans-Blot® 터보 트랜스퍼 시스템 (BioRad #170-4155SP)을 사용하여 블롯팅시켰다. 웨스턴 블롯팅을 위한 모든 물질은 Trans-Blot® Turbo RTA PVDF-Midi Kit (BioRad #170-4273) 중에 포함되었다.

[1271] 블롯팅 절차를 위한 PVDF-막을 메탄올 (Merck #1.06009.2511) 중에서 활성화시키고 1x 트랜스퍼 완충제 (transfer buffer) 중에서 평형화시켰다. 블롯팅 (25 V, 1 A, 30 분)에 후속하여, 막을 0.5 ml Tween-20 (Roth #9127.1)을 포함하는 1x TBS (Roth #10.60.1)로 세척 (3x, 10 분, RT)하였다. 그 후, 막을 5% BSA (무-알부민-IgG, Roth #3737.3)로 블로킹시키고 TBS-T로 1 시간 동안 RT에서 희석시키고, 일차 항체 (TBS-T 내의 0.5% BSA 중에 희석시킴, 표 13)를 첨가하고 4 °C에서 2 일 동안 배양하였다. 따라서 종 특이성에 대하여 생체 내 실험을 위한 항체가 선택되었다.

[1272] [표 13]: 웨스턴 블롯 분석에 사용되는 항체.

일차 항체	희석	회사	주문 번호
알파-튜불린 HRP-연결 (래빗)	1:2000	Cell Signaling	cs12351s
ColIV (래빗)	1:1000	Abcam	ab6586
CTGF (래빗)	1:1000	Genetex	GTX-26992
FN (래빗)	1:250	Proteintech	15613-1-AP
GAPDH XP HRP-연결 (래빗)	1:1000	Cell Signaling	cs8884s
Ki67 (래빗)	1:500	Abcam	ab15580
pAkt (래빗)	1:1000	Cell signaling	cs4060s
pErk1/2 (래빗)	1:1000	Cell signaling	cs4370s
pSmad (래빗)	1:500	Cell Signaling	cs3104
TGF-βRII (래빗)	1:400	Aviva	ARP44743-T100
이차 항체	희석	회사	주문 번호
항-래빗 IgG, HRP-연결	1:10000	Cell signaling	cs#12351S

[1273]

[1274]

다음 단계에서, 막을 TBS-T (3x 10 분, RT)로 세척하고 이차 항체로 배양하였다 (1 시간, RT, 표 13). 배양 후, 블랏을 TBS-T로 세척하고, Luminata™ Forte Western HRP 서브스트레이트 (Millipore #WBLUF0500)를 사용하여 출현시키고 밴드를 형광 영상 분석기(luminescent image analyzer: ImageQuant™ LAS4000, GE Healthcare)로 검출하였다. 그 후, 블랏을 TBS-T (3x 10분, RT)로 세척하고 TBS-T 중에 희석된 5% BSA로 블로킹시켰다 (1시간, RT). 자가 보관 비교를 위하여, 막을 HRP-콘주게이트화(HRP-conjugated) 항 알파-튜불린 (0.5% BSA 중의 1:2000, 4 °C, 밤샘(overnight))으로 배양하였다. 다음 날 블랏을 Luminata™ Forte Western HRP 서브스트레이트 (Millipore #WBLUF0500)를 사용하여 출현시키고 밴드를 형광 영상 분석기로 검출하였다. 마지막으로, 블랏을 TBS-T로 세척하고(3x, 5 분) 1x Roti®-Blue 용액 (Roth #A152.2)를 사용하여 염색하고 RT에서 건조시켰다.

[1275]

면역세포화학

[1276]

앞서 기술된 바와 같이 세포를 처리하고 수확하였다. 8-웰 상에서의 Roti®-Histofix 4 % (Roth #P087.4)로의 세포의 고정 후, 세포 배양 슬라이드 접시 (6 분, RT)를 3회 PBS로 세척하였다. 1 시간 동안 RT에서 블로킹 용액 (Zytomed #ZUC007-100)으로 세포를 블로킹한 후, 세포를 표 13에 나열된 개개 일차 항체로 배양시키고 4 °C 에서 밤새도록 배양하였다.

[1277]

그 후, 이차 항체로 배양 (1 시간, RT) 후 세포 배양 슬라이드를 PBS로 3회 세척하였다. 항체-희석제(Antibody-Diluent: Zytomed #ZUC025-100)로 모든 항체-희석물을 제조하였다.

[1278] [표 14]: 면역세포화학에 사용된 항체.

일차 항체	희석	회사	주문 번호
ColIV (래빗)	1:50	Abcam	ab6586
CTGF (래빗)	1:50	Genetex	GTX26992
βIII-튜불린 (래빗)	1:100	cell signaling	cs5568
FN (래빗)	1:50	Proteintech	15613-1-AP
Ki67 (래빗)	1:100	Abcam	ab15580
NeuN (래빗)	1:250	Abcam	Ab104225
팔로이딘 알렉사 플루오르 555	1:20	Cell signaling	cs8953
pSmad2 (래빗)	1:50	Cell signaling	cs3104s
pSmad3 (래빗)	1:50	Cell signaling	cs9520s
TGF-R _{II} (래빗)	1:50	Millipore	06-227
이차 항체	희석	회사	주문 번호
알렉사 플루오르 488	1:750	Life Technologies	A21441
Cy3 고트-항-래빗	1:1000	Life Technologies	A10520

[1279]

[1280]

이차 항체로의 배양 후, 세포를 PBS로 3회 세척하고, 커버슬립을 세포 배양 접시로부터 분리시키고 DAPI (Biozol #VEC-H-1500)를 수반하는 VECTASHIELD® HardSet™에 장착하였다. 슬라이드를 밤새도록 4 °C에서 건조시킨 후 형광 현미경 (Zeiss, Axio® Observer.Z1)으로 검사하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다.

[1281]

생체 내 실험

[1282]

말초혈액 단핵 세포 (PBMC) 분석

[1283]

백혈구연층으로부터 500 ml 전혈 수혈 단위에 대응하는 PBMC를 분리시켰다. 각 유닛을 건강한 지원자로부터 획득하고 글루코스-시트레이트를 항-응집제로 사용하였다. 백혈구연층 혈액을 준비하고 Blood Bank Suhl of the Institute for Transfusion Medicine, Germany로 배달하였다. HIV 항체, HCV 항체, HBs 항원, TPHA, HIV RNA 및 SPGT (ALAT)에 대하여 각 혈액 기증자를 모니터링하였다. 감염원에 대하여 음성으로 시험되고 정상 SPGT 값을 갖는 혈액 샘플만 저속 원심분리에 의한 백혈구 및 적혈구 분리에 사용하였다. 혈액 기증 약 40 시간 후 Ficoll-Histopaque® 1077 (Heraeus™ Multifuge™ 3 SR)를 사용하는 경사 원심분리에 의하여 PBMC의 단리를 수행하였다. IFN α 분석을 위하여, 100 μl의 완전 배지 플러스 첨가제 (RPMI1640, + L-Glu, + 10% FCS, + PHA-P (5 μg/ ml), + IL-3 (10 μg/ ml)) 중에서 100,000 세포/ 96-웰에 PBMC를 접종하고 시험 화합물 (5 μl)을 첨가하고 직접 배양하였다 (24 시간, 37 °C, 5% CO₂). TNF α 분석을 위하여, 100 μl의 첨가제를 수반하지 않는 완전 배지 (RPMI1640, + L-Glu, + 10% FCS) 중에서 100,000 세포/ 96-웰에 PBMC를 접종하고 시험 화합물 (5 μl)을 첨가하고 직접 배양하였다 (24 시간, 37 °C, 5% CO₂). huIFN α (eBioscience, #BMS216INSTCE)에 대하여 제조업자의 프로토콜에 따라 효소결합면역흡착분석법(ELISA: 수집된 상청액 중의 이중 측정, 20 μl)을 수행하였다. huTNF α (eBioscience, #BMS223INSTCE)에 대하여 제조업자의 프로토콜에 따라 효소결합면역흡착분석법(ELISA: 수집된 상청액 중의 이중 측정, 20 μl)을 수행하였다.

[1284]

bDNA 분석

[1285]

간, 신장 및 폐 용해물 중에서의 TGF-R_{II} mRNA 수준을 제조업자의 지시 (QuantiGene® 키트, Panomics/Affimetrix)에 따라 bDNA 분석으로 결정하였다.

[1286]

면역형광법

[1287]

파라핀-포매 척수 및 뇌 조직을 5 μm 절편으로 절단하였다 (대상 플레이트 당 3 내지 4 조각). 파라핀 절편을 탈파라핀화하고 전자레인지(microwave oven)에서 시트레이트 완충제 (10 mM, 40 분) 중에서의 가열에 의하여 탈마스킹하였다. 그 후, 탈파라핀화된 절편을 0.3 % H₂O₂로 배양시키고 (30 분, RT), PBS로 세척하고 (10 분, RT), 블로킹 용액 (Zytomed #ZUC007-100)으로 30 분 동안 블로킹시켰다. 1 시간 동안 RT에서 블로킹 용액 (Zytomed)으로 블로킹한 후 슬라이드를 개개 일차 항체 150 μl와 함께 배양시키고 4 °C에서 밤새도록 배양하였다. PBS로의 세척 (3회, 5 분, RT) 후 절편을 이차 항체와 함께 1 시간 동안 RT에서 배양하였다. 모든 항체 희석물을 항체 희석제 (Zytomed #ZUC025-100)로 제조하였다. 그 후 절편을 다시 PBS로 세척 (3회, 5 분, RT)하고 VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI(Vector)를 사용하여 장착하였다. 면역형광법에 대한 항체가 세포 배

양 실험에 필적하였고 각 종에 대하여 적용되었다.

[1288] **전기화학발광법**

[1289] 번역학적 그리고 혈액학적 변형을 위하여, 전기화학발광 기술 (MesoScale Discovery®, Maryland, United States)이 사용되었다. 각 분석을 위하여, 25 μ l의 단백질, 혈액 및 액체 샘플을 사용하고 제조업자의 지시에 따라 절차를 수행하였다.

[1290] **BrdU 분석**

[1291] 0.9% (w/v) NaCl 용액 중에 용해된 10 mg/ml의 BrdU의 멸균 용액을 사용하여 50 mg/kg 체중으로 티미딘 유사체 BrdU (Sigma, Steinheim, Germany)의 복강 내 주사에 의하여 분열 중의 세포의 표지화를 수행하였다. 마지막 실험 주 내에서 매일 BrdU 주사를 수행하였다.

[1292] **수술**

[1293] 장기 중심 주입 (chronic central infusion)을 위하여, Alzet® 삼투 미니펌프 (마우스, 랫트, 주입 속도: 0.25 μ l/h, Alzet®, Model 2004, Cupertino, USA) 또는 가스압 펌프 (시노몰구스 몽키(Cynomolgus monkeys), 주입 속도 0.25 ml/24 h, Tricumed®, Model IP 2000V, Germany)에 부착된 뇌실 내부 주사 캐놀라(icv cannula)을 위한 수술을 동물에 수행하였다. 캐놀라 및 펌프를 케타민/자일라신 마취제(ketamine/xylacin anesthesia: Baxter, GmbH, Germany) 및 반-멸균 조건 하에서 입체 정위 이식하였다. 각 삼투압 미니펌프/ 가스압 펌프를 복부 영역 내에 동물의 목에서 피부 절개를 통하여 피하로 이식시키고 실리콘 튜브로 icv 캐놀라로 연결시켰다. 동물을 입체 정위 프레임 내에 위치시키고, icv 캐놀라를 우측뇌실 내로 낮추었다. 캐놀라를 치과 용 시멘트 (Kallocryl, Speiko®-Dr. Speier GmbH, Muenster, Germany)를 사용하여 2개의 스테인레스강 스크류로 고정시켰다. 목의 피부를 봉합하였다. 수술 동안, 체온을 전기 담요로 유지시켰다. 수술-후 감염을 피하기 위하여, 동물을 국소적으로 betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Germany)으로 처치하고 항생제 (피하, Baytril® 2.5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany)를 제공하였다. 튜브를 개개 용액으로 채웠다. 분석을 위하여 혈액, 액체 및 조직을 수집하였다. icv 이식 자리의 조직학적 확진을 40 μ m 두정의 크레질 바이올렛-염색(cresyl violet-stained) 뇌 절편에서 수행하였다.

[1294] **결과 매개변수 및 기능 분석**

[1295] 증상 질환의 발현, 일차 부전 마비의 발현 및 생존이 생체 내 종말점으로 사용되었다. 꼬리 매달기(tail suspending)의 반응에서의 다리 신축의 결여로 증상 질환의 발현을 정의하였다. 보행 장애가 처음 관측되는 시점 (예를 들어, 저축거리거나 뒤뚱거리거나 보행)을 일차 부전 마비로 분류하였다. 이러한 매개변수를 40 일령에서 시작하여 매일 결정하였다.

[1296] 질환 진전을 모니터링하기 위하여, 쳃바퀴 실험(running wheel testing: LMTB, Berlin, Germany)을 수행하였다. 동물을 개별적으로 가두고 33일령에서 출발하여 쳃바퀴에 접근시켰다. 운동 활동은 쳃바퀴에서 각 동물에 의해 발생된 분 당 회전과 직접적으로 연관되었다. 바퀴의 각 완전 회전은 2개의 전자기 신호를 촉발하고, 최대 120 개의 바퀴에 부착되는 컴퓨터에 직접적으로 공급되었다. 쳃바퀴 데이터를 기록하고 "Maus Vital" 소프트웨어 (Laser- und Medizin-Technologie, Berlin, Germany)로 분석하였다. 평가 시간은 6:00 pm 내지 6:00 am으로 12 시간 동안 지속되었다.

[1297] **공간 학습 시험 (Morris-Water-Maze)**

[1298] 8:00 내지 13:00에서 거동 시험을 수행하였다.

[1299] 랫트를 어두운 원형 풀 (직경 1.4 m, 높이 50 cm, 30 cm의 높이까지 20 °C의 온수로 채워짐) 내에서 동일한 상 상 사분면의 중심 내의 가시적인 백색 표적 (직경 10 cm, 수면으로부터 대략 1 cm 위로 올려짐)을 찾도록 훈련 시켰다 (근사적으로 단서가 주어짐). 각 동물을 12회 시도/세션, 1 일 당 1 세션 및 10 내지 20 초의 시도-간격으로 3 연속 세션에서 플랫폼까지 길을 찾도록 훈련시켰다.

[1300] **미생물학적 분석**

[1301] 총 호기성 미생물 계수 (TAMC: Total Aerobic Microbial Count) 및 총 결합 효모 및 곰팡이 계수 (TYMC: Total Combined Yeast and Mould Count)와 관련하여 Ph. Eur. 2.6.12, USP 30 <61>에 따라 안티센스-올리고뉴클레오타이드 샘플을 미생물학적으로 분석하였다.

- [1302] **양이온-교환 고성능 액체 크로마토그래피 (AEX-HPLC)**
- [1303] 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO) 샘플의 온전도 및 안정성을 AEKTAexplorer™System (GE healthcare, Freiburg, Germany)을 사용하여 AEX-HPLC로 결정하였다. 정제된 ASO 샘플을 에탄올 침강에 의하여 탈염시켰다. ASO의 동정을 전자분무-이온화-질량-분광분석 (ESI-MS)로 확증하고 순도를 Dionex DNAPac™ 200(4 x 250 mm) 컬럼을 수반하는 AEX-HPLC로 결정하였다.
- [1304] **실시예 1: 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 mRNA 수준에 대한 억제 활성의 결정**
- [1305] **1.1 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 형질감염**
- [1306] TGF-R_{II}에로 지향되는 여러 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 억제 활성을 인간 폐암 세포 (A549)에서 시험하였다. TGF-R_{II} 특이적 올리고뉴클레오타이드와 함께 배양된 세포로부터 단리된 총 mRNA 중의 분지 DNA 분석으로 TGF-R_{II} mRNA를 정량하였다.
- [1307] **방법의 설명:**
- [1308] 상기 기술된 바와 같이 세포를 수득하고 배양하였다. 96-웰 플레이트 상에 10,000 A549 / 웰로 접종한 후 직접적으로 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 형질감염을 수행하고, Lipofectamine® 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany, cat. No. 11668-019)으로 제조업자에 의해 기술된 바와 같이 수행하였다. 2개의 독립적인 단일 투여량 실험을 4중으로 수행하여, 올리고뉴클레오타이드가 20 nM의 농도로 형질감염되었다. 형질감염 후, 세포를 24 시간 동안 37 °C 및 5 % CO₂에서 가습된 인큐베이터 (Heraeus GmbH, Hanau, Germany) 내에서 배양하였다. TGF-R_{II} mRNA의 측정을 위하여, 세포를 수확하고 분지된 DNA(bDNA)의 단리를 위하여 QuantiGene® Explore 키트 (Panomics, Fremont, Calif., USA, cat.No. QG0004)의 제조업자에 의해 추천되는 절차에 따라 53 °C에서 용해시켰다. 자가 보관 유전자 글리세르알데히드-3포스페이트 디하이드로게나아제 (GAPDH) mRNA의 정량을 위하여 QuantiGene® Explore 키트가 사용됨에 비하여, TGF-R_{II} mRNA의 정량은 QuantiGene® 2.0 (Axolabs GmbH, Kulmbach, Germany 상용 제조)으로 수행되었다. 배양 및 용해 후, 10 µl의 용해물을 인간 TGF-R_{II} 및 인간 GAPDH에 특이적인 프로브 셋트(probe set)로 배양하였다. 두 반응 형들을 제조업자의 프로토콜에 따라 개개 QuantiGene® 키트에 대하여 진행하였다. 화학발광을 Victor²™ 다표지 계수기 (PerkinElmer, Wiesbaden, Germany) 내에서 RLU(상대 광 단위)로 측정하였고 TGF-R_{II} 프로브 셋트 대하여 수득된 값을 각 웰에 대한 개개 GAPDH 값에 대하여 정규화시키고 계속해서 가성-처리된(mock-treated) 세포로부터 판독된 대응하는 mRNA에 대하여 정규화시켰다.
- [1309] **결과**
- [1310] 결과는 A549 세포의 형질감염 이후 여러 ASO에 의한 TGF-R_{II}의 유효한 하향조절을 나타내고 있다. 기준 올리고뉴클레오타이드 Ref. 6 내지 Ref. 10의 형질감염 이후 하향조절은 그와 같이 유효하지 않았고 >60%의 하향조절의 결과를 가져왔다.
- [1311] **[표 15]: TGF-R_{II}mRNA의 하향조절.** 인간 폐 상피 암종 세포 (A549) 중에서의 TGF-R_{II} 특이적 안티센스-올리고뉴클레오타이드(ASO)로의 형질감염. QuantiGene® 키트를 사용하여 자가 보관 유전자 GAPDH에 비하여 mRNA 발현 수준의 정량을 수행하였다. 계속해서 프로브를 가성-처리된 세포로부터의 대응하는 mRNA 판독에 대하여 정규화시켰다.

	A549 (c= 20 nM)			
	GAPDH		TGF-R _{II}	
	평균	표준편차	평균	표준편차
ASO				
시퀀스 동정 번호 141j	1.41	0.05	0.02	0.01
시퀀스 동정 번호 143aj	0.76	0.03	0.02	0.01
시퀀스 동정 번호 139c	0.9	0.03	0.02	0.01
시퀀스 동정 번호 145c	0.91	0.05	0.03	0.01
시퀀스 동정 번호 209ax	1.52	0.58	0.03	0.01
시퀀스 동정 번호 152ak	0.88	0.03	0.04	0
시퀀스 동정 번호 218ar	1.08	0.03	0.04	0
시퀀스 동정 번호 144c	0.5	0.07	0.05	0.03
시퀀스 동정 번호 210ap	0.92	0.05	0.05	0.01
시퀀스 동정 번호 142c	1.33	0.05	0.06	0.03
시퀀스 동정 번호 213ak	1.2	0.03	0.07	0.01
시퀀스 동정 번호 153f	1.09	0.07	0.08	0.03

[1312]

[1313]

결론

[1314]

TGF-R_{II} mRNA는 본 발명의 ASO에 의해 효율적으로 표적화되었다. 호칭된 ASO는 A549 세포의 형질감염 이후 유효한 표적 mRNA 하향조절을 달성하였다.

[1315]

1.2 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 김노틱 섭취

[1316]

1.2.1a A549 및 Panc-1 세포에서의 김노틱 전달에 의한 본 발명의 ASO 및 선행-기술 시퀀스 간의 표적-넉다운의 비교

[1317]

TGF-R_{II}로 지향되는 여러 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 하향조절 활성을 형질감염 시약을 수반하지 않는 직접적인 섭취 ("김노틱 섭취(gymnotic uptake)")로 인간 폐 상피 종양 세포 (A549) 중에서 시험하였다. TGF-R_{II} 특이적 올리고뉴클레오타이드와 함께 배양한 세포로부터 단리된 총 mRNA 중의 분지 DNA 분석에 의하여 TGF-R_{II} mRNA를 정량하였다.

[1318]

방법의 설명:

[1319]

일반 방법에서 기술된 바와 같이 세포를 수득하고 배양하였다. 개개 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대하여 96-웰 플레이트를 제조하고 후속하여 10,000 세포 (Panc-1) 또는 8,000 세포 (A549) /웰로 접종하는 것에 의하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 김노틱 전달을 수행하였다. 실험을 4중으로 수행하고, 올리고뉴클레오타이드를 5 μ M (Panc-1) 및 7.5 μ M (A549)의 최종 농도에서 사용하였다. 세포를 72 시간 동안 37 $^{\circ}$ C 및 5 % CO₂에서 가습된 인큐베이터 (Heraeus GmbH, Hanau, Germany) 내에서 배양하였다. TGF-R_{II} mRNA를 측정하기 위하여, 세포를 수확하고 분지된 DNA(bDNA)에 대하여 QuantiGene® Explore 키트 (Panomics, Fremont, Calif., USA, cat.No. QG0004)의 제조업자에 의해 추천되는 절차에 따라 53 $^{\circ}$ C에서 용해시켰다. 자가 보관 유전자 GAPDH mRNA의 정량을 위하여 QuantiGene® Explore 키트가 사용됨에 비하여, TGF-R_{II} mRNA의 정량은 QuantiGene® 2.0 (Axolabs GmbH, Kulmbach, Germany 상용 제조)으로 수행되었다. 배양 및 용해 후, 10 μ l의 용해물을 인간 TGF-R_{II} 및 인간 GAPDH에 특이적인 프로브 셋트(probe set)로 배양하였다. 두 반응 형들을 제조업자의 프로토콜에 따라 개개 QuantiGene® 키트에 대하여 진행하였다. 화학발광을 Victor²™ 다표지 계수기 (PerkinElmer, Wiesbaden, Germany) 내에서 RLU(상대 광 단위)로 측정하였고 TGF-R_{II} 프로브 셋트 대하여 수득된 값을 각 웰에 대한 개개 GAPDH 값에 대하여 정규화시키고 계속해서 PBS 처리된 세포로부터 관독된 대응하는 mRNA에 대하여 정규화시켰다.

[1320]

선택된 결과를 표 16a에 나타내었다. 시퀀스 동정 번호 209ay, 시퀀스 동정 번호 209ax 및 시퀀스 동정 번호 209y, 즉 상세한 설명의 표 6에 나열된 ASO의 추가의 변성은 이러한 3가지 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대한 비교가능한 값을 나타내었다. 게다가, 시퀀스 동정 번호 152h, 즉 상세한 설명의 표 5에 나열된 ASO의 변성은 이러한 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대한 비교가능한 값을 나타내었다. 시퀀스 동정 번호 218b, 즉 상세한

설명의 표 8에 나열된 ASO의 변성은 안티센스-올리고뉴클레오타이드 시퀀스 동정 번호 218b에 대한 비교가능한 값을 나타내었다. 시퀀스 동정 번호 213k, 즉 상세한 설명의 표 9에 나열된 ASO의 변성은 안티센스-올리고뉴클레오타이드 시퀀스 동정 번호 213k에 대한 비교가능한 값을 나타내었다. 또한 시퀀스 동정 번호 210q, 즉 상세한 설명의 표 7에 나열된 ASO의 변성은 안티센스-올리고뉴클레오타이드 시퀀스 동정 번호 210q에 대한 비교가능한 값을 나타내었다. 마지막으로, 시퀀스 동정 번호 143h, 즉 상세한 설명의 표 4에 나열된 ASO의 변성은 안티센스-올리고뉴클레오타이드 시퀀스 동정 번호 143h에 대한 비교가능한 값을 나타내었다. 표 4 내지 9에 나열된 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 전달은 시험된 기준 시퀀스 (A549: 하향조절 < 0.5; Panc1 세포: 하향조절 < 0.4)의 전달에 비하여 표적 TGF-RII mRNA의 보다 강력한 하향조절의 결과를 가져왔다.

[표 16a] 김노틱 전달에 의한 표적 mRNA 하향조절의 효율. A549 및 Panc-1 세포 중에서의 선택된 TGF-RII 특이적 ASO의 김노틱 섭취 후의 잔여 TGF-RII mRNA. mRNA 발현 수준이 자가 보관 유전자 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나아제 (GAPDH)에 대하여 결정되었고 QuantiGene® 키트를 사용하여 기준대조 (=1)로서 PBS 처리된 세포와 비교하였다.

ASO	TGF-RII의 잔여 mRNA (PBS 처리된 세포 = 1)			
	A549 세포		Panc1 세포	
	평균	표준편차	평균	표준편차
시퀀스 동정 번호 209ay	0.11	0.01	0.07	0.02
시퀀스 동정 번호 209ax	0.14	0.02	0.08	0.01
시퀀스 동정 번호 209bb	0.19	0.01	0.11	0.01
시퀀스 동정 번호 209az	0.19	0.03	0.13	0.02
시퀀스 동정 번호 209ba	0.23	0.02	0.18	0.03
시퀀스 동정 번호 209y	0.27	0.04	0.17	0.01
시퀀스 동정 번호 152h	0.29	0.04	0.12	0.02
시퀀스 동정 번호 218b	0.30	0.02	0.07	0.01
시퀀스 동정 번호 213k	0.34	0.04	0.17	0.04
시퀀스 동정 번호 210q	0.37	0.05	0.18	0.02
시퀀스 동정 번호 210aq	0.39	0.03	0.18	0.02
시퀀스 동정 번호 143h	0.43	0.04	0.35	0.05
기준 2	0.59	0.05	0.40	0.04
기준 0	0.89	0.06	1.10	0.07
기준 3	0.68	0.03	0.62	0.03
기준 4	0.74	0.04	0.71	0.01

결론

본 발명의 ASO의 김노틱 전달은 시험된 기준 시퀀스의 전달에 비하여 표적 TGF-RII mRNA의 연속적으로 더 강한 하향조절의 결과를 가져온다. 청구된 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 선택된 인간 세포주에 무관하게 당해 기술 분야에서 공지된 모든 시험된 시퀀스를 능가하였다. 게다가, 일반적으로 12 내지 20개의 뉴클레오타이드의 길이를 갖는 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 더 짧거나 더 긴 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 비하여 표적 TGF-RII의 보다 유효한 하향조절의 결과를 가져온다. 이러한 효과는 일반적으로 가장 강력한 효과를 나타내는 14 내지 18개의 뉴클레오타이드를 갖는 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대하여 심지어 보다 뚜렷하였다.

1.2.1b 분지된 DNA 분석에 의한 A549에서의 김노틱 전달의 분석

형질감염 스크린으로부터 TGF-RII에 대한 가장 효과적인 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 A549 세포에서의 김노틱 흡수에 의해 추가로 특정되었다. TGF-RII mRNA를 TGF-RII 특이적 안티센스-올리고뉴클레오타이드로 배양한 세포로부터 단리된 총 mRNA 중의 분지된 DNA로 정량하였다.

방법의 설명:

A549 세포를 앞서 기술된 바와 같이 표준 조건 하에서 배양하였다. 단일-투여량 및 투여량-의존성 실험을 위하여 80,000 A549 세포/웰을 6-웰 배양 접시에 접종하고 직접적으로 7.5 μ M 농도로 올리고뉴클레오타이드와 함께 배양하였다. TGF-RII mRNA의 측정을 위하여, 세포를 수확하고, 상기 기술된 바와 같이 QuantiGene® Explore 키

트 (Panomics, Fremont, Calif., USA, cat.No. QG0004)의 제조업자에 의해 추천되는 절차에 따라 53 ℃에서 용해시키고 분석하였다 (1.1을 참조하시오).

[1329] 결과

[1330] 표 16b에 나열된 ASO는 A549 세포 중의 자가 보관 유전자 GAPDH에 비하여 TGF-RII의 감소된 표적 mRNA 수준을 나타내었다. 가장 강력한 10개의 ASO가 억제 농도 50 (IC₅₀)에 대하여 또한 시험되었다. 시퀀스 동정 번호 209t, 시퀀스 동정 번호 218b, 시퀀스 동정 번호 218c 및 시퀀스 동정 번호 209y 모두 함께 낮은 농도 수준에서 TGF-RII의 가장 적절한 너다운을 야기하였다.

[1331] **표 16b: A549 세포 중에서의 TGF-RII 특이적 ASO의 김노틱 섭취 후의 TGF-RII mRNA의 하향조절** QuantiGene® 키트를 사용하여 자가 보관 유전자 GAPDH에 대한 mRNA 수준을 결정하였다. IC₅₀ = 50%의 하향조절에 대한 억제 농도, Pos. Ctrl: aha-1 = 양성 대조로서 LNA에 지향된 열충격 90kDa 단백질 ATPase 동족체 1 (Aha1)의 활성화제, Ref. 1 = 혼성된 대조.

ASO	TGF-RII n=4	표준편차	GAPDH n=4	표준편차	IC ₅₀ n=4
시퀀스 동정 번호 209t	0.19	0.05	1.13	0.11	1.63
시퀀스 동정 번호 218c	0.25	0.04	0.94	0.18	1.17
시퀀스 동정 번호 218b	0.26	0.08	1.08	0.28	2.54
시퀀스 동정 번호 218q	0.27	0.07	1.11	0.08	2.39
시퀀스 동정 번호 209y	0.34	0.06	0.96	0.06	1.57
시퀀스 동정 번호 218t	0.36	0.12	0.76	0.04	2.57
시퀀스 동정 번호 218m	0.41	0.06	1.16	0.29	1.66
시퀀스 동정 번호 209w	0.44	0.07	1.00	0.11	5.76
시퀀스 동정 번호 218p	0.46	0.12	0.88	0.07	
시퀀스 동정 번호 209v	0.48	0.25	0.96	0.07	3.10
시퀀스 동정 번호 209x	0.52	0.02	0.87	0.06	5.60
시퀀스 동정 번호 218u	0.53	0.20	0.79	0.05	
시퀀스 동정 번호 218v	0.54	0.13	0.77	0.04	
시퀀스 동정 번호 210q	0.60	0.23	1.11	0.11	
시퀀스 동정 번호 218o	0.61	0.15	0.96	0.06	
시퀀스 동정 번호 210p	0.65	0.24	1.01	0.23	
시퀀스 동정 번호 218n	0.89	0.36	1.07	0.22	
시퀀스 동정 번호 210o	0.95	0.08	0.97	0.14	
시퀀스 동정 번호 209s	0.96	0.31	1.14	0.24	
양성 대조 aha-1	0.22	0.04	0.77	0.02	
기준 1	1.43	0.40	1.27	0.18	

[1332]

[1333] 결론

[1334] 가장 효과적인 본 발명의 ASO에 의한 표적 하향조절이 다시 형질감염 시약을 수반함이 없이 우수하였다. 따라서, 김노틱 전달이 실현가능하고 추가의 약물 개발을 위하여 바람직한 방법이다.

[1335] **1.2.2 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 김노틱 섭취의 분석**

[1336] 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO)에 의한 표적 mRNA에 대한 억제 활성이 외피 내영역으로부터의 인간 신경 전구체 세포 (ReNcell CX® 세포, Millipore #SCM007) 중에서 결정되었다. 치료 표적으로서 성인 신경 생성에 관한 의문이 가장 효과적인 ASO로 김노틱 전달 시험에 의하여 평가되었다. A549 세포가 기준 세포주로 사용되었다.

[1337] 방법의 설명:

[1338] A549 및 ReNcell CX® 세포가 상기 기술된 바와 같이 배양되었다. 처리 시험을 위하여 세포를 24-웰 배양 접시

(Sarstedt #83.1836.300) (50,000 세포 / 웰)에 접종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. A549 및 ReNcellCX® 세포의 처리를 위하여, 배지를 제거하고 신생의 배지 (24-웰에 대하여 0.5mL)로 교체하였다. 계속해서 서로 다른 시점 (A549 세포: 18 시간, 72 시간, 6 일, ReNcell CX® 세포: 18 시간, 96 시간, 8 일)에서의 표적 하향조절의 분석을 위하여 37°C 및 5% CO₂에서 Ref. 1, 시퀀스 동정 번호 218b를 갖는 ASO 및 시퀀스 동정 번호 218c를 갖는 ASO를 배지 중에 2.5 및 10 µM의 농도로 첨가하였다. 수확을 위하여, 세포를 PBS로 2회 세척하고 -20°C에서 동결시켰다. 실시간 RT-PCR에 의한 mRNA의 분석을 위하여, 세포를 상기 기술된 바와 같이 가공하였다. 제조업자의 지시 (BioRad Prime PCR Quick Guide)의 지시에 따라 실시간 RT-PCR (표 11을 참조하시오)을 위한 사용준비되고 표준화된 프라이머 쌍을 사용하고 개개 사용준비된 Mastermix 용액 (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad #172-5271)와 혼합하였다. 조사를 3중으로 분석하였고 데이터를 BioRad CFX Manager™ 3.1을 사용하여 GNB2L1 mRNA에 대하여 정량하고 계속해서 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

[1339] 결과:

[1340] 결과는 시퀀스 동정 번호 218b 및 218c로의 김노틱 전달이 투여량- 및 시간 의존적으로 A549 및 ReNcellCX® 세포에서의 TGF-R_{II} mRNA의 적절한 하향조절의 결과를 가져온다는 것 (표 17)을 나타내었다. A459에서의 표적 mRNA는 18 시간 후 유의미하게 감소되었고, 심지어 72 시간 및 6 일 후 보다 효율적으로 감소되었다. ReNcell CX® 에서 18 시간 후 단지 10 µM의 김노틱 섭취 이후 TGF-R_{II} mRNA의 억제가 관측될 수 있었으나, 두 시험된 농도들에 대하여 72 시간 후 표적 하향조절이 유의미하게 되었고 8일 까지 안정하였다.

[1341] **표 17: A549 및 ReNcellCX® 세포에서의 TGF-R_{II} 특이적 ASO로의 김노틱 전달 이후 TGF-R_{II} mRNA의 투여량- 및 시간 의존적 하향조절.**

[1342] 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준이 결정되었고 계속해서 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, D = 시퀀스 동정 번호 218c, ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01, B와 관련하여 +p < 0.05, ++p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	A549		
표적 시점	TGF-R _{II} 18 시간, n=3	TGF-R _{II} 72 시간, n=3	TGF-R _{II} 6 일, n=3
A	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.38
B 2.5 µM	1.17 ± 0.06	0.87 ± 0.21	0.88 ± 0.14
B 10 µM	0.98 ± 0.10	0.77 ± 0.06	1.03 ± 0.10
C 2.5 µM	0.60*** ± 0.09	0.41* ± 0.07	0.13 ± 0.03
C 10 µM	0.49*** ± 0.02	0.15** ± 0.02	0.02* ± 0.00
D 2.5 µM		0.46** ± 0.09	
D 10 µM		0.21* ± 0.04	

세포주	ReNcell CX		
표적 시점	TGF-R _{II} 18 시간, n=3	TGF-R _{II} 96 시간, n=3	TGF-R _{II} 8 일, n=3
A	1.00 ± 0.41	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.18
B 2.5 µM	1.38 ± 0.58	0.89 ± 0.09	0.80 ± 0.33
B 10 µM	1.70 ± 0.68	0.81 ± 0.10	1.16 ± 0.43
C 2.5 µM	1.04 ± 0.36	0.32** ± 0.06	0.42 ± 0.16
C 10 µM	0.64 ± 0.24	0.16** ± 0.02	0.21 ± 0.09
D 2.5 µM		0.53 ± 0.07	
D 10 µM		0.23** ± 0.03	

[1343] 결론:

[1344] ASO의 김노틱 섭취에 의한 표적 mRNA의 효율적이고 안정한 하향조절이 심지어 장기 적용에서 달성되었다. 따라서 ReNcell CX® 세포는 예를 들어 환자에서의 치료 옵션으로서 성인 신경 생성의 회복을 평가하는 실험을 위하여

여 사용될 수 있다. A549 실험에 의해 나타난 바와 같이 다른 적응증에 대하여도 동일한 것이 적용된다.

[1346] 종합해보면, TGF- R_{II} 의 효율적인 하향조절이 전달의 방법 및 셀 형태와는 무관하게 적절하다. 임상 적용에서 별도의 형질감염체의 부재가 환자에 대한 높은 안정성을 시사하기 때문에 ASO의 김노틱 섭취는 바람직한 전달 방법이다.

[1347] **실시예 2: 단백질 수준에 대하여 TGF- R_{II} 으로 지향되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 억제 활성의 결정**

[1348] 웨스턴 블롯 분석 및 면역세포화학을 수행하여 인간 폐암 세포 (A549) 및 인간 신경 전구체 세포 (ReNcell CX®)에서의 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO)에 의하여 매개되는 감소된 TGF- R_{II} mRNA 수준이 표적 단백질의 감소의 결과를 가져오는지의 여부를 결정하였다.

[1349] 방법의 설명:

[1350] 세포를 상기 기술한 바와 같이 배양하였다. 처리를 위하여, 세포를 6-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.3920.300, 80,000 세포 / 웰) 및 8-웰 배양 슬라이드 접시 (Sarstedt #94.6140.802, 10,000 세포 / 웰)로 접종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. A549 및 ReNcell CX® 세포의 김노틱 전달을 위하여 배지를 제거하고 신생 전 배지 (6-웰에 대하여 1 ml 그리고 8-웰에 대하여 0.5 ml)로 교체하였다. A549 세포에서의 72 시간 그리고 ReNcell CX® 세포에서의 96 시간 후 표적 하향조절의 단백질 분석을 위하여 Ref. 1 (혼성된 대조), 계속해서 개개의 본 발명의 ASO를 배지 중에 2.5 및 10 μ M의 농도로 첨가하였다. 일반적인 방법 부분에서 기술되는 바와 같이 세포를 용해시키고 웨스턴 블롯에 의하여 검사하였다. 일차 항체 항-TGF- R_{II} 를 TBS-T 중의 0.5% BSA 중에 희석시키고 4 °C에서 2 일 동안 배양하였다. 그 후 막을 TBS-T 중의 0.5% BSA 중에 희석된 이차 항체 항-라빗 IgG HRP-연결과 함께 배양하였다 (1시간, RT). 배양에 후속하여, 블롯을 TBS-T로 세척하고, Luminata™ Forte Western HRP 서브스트레이트 (Millipore #WBLUF0500)를 사용하여 출현시키고 밴드를 형광 영상 분석기 (ImageQuant™ LAS4000, GE Healthcare)로 검출하였다. 자가 보관 비교를 위하여, 막을 HRP-콘쥬게이트화 항-GAPDH와 함께 배양하였다 (0.5 % Blotto 중의 1:1000, 4 °C, 밤새도록). GAPDH에 대하여 비중 정량 (densitometric quantification)을 산출하고 계속해서 Image Studio™ Lite 소프트웨어로 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다.

[1351] 면역세포화학에 대한 절차를 표준 프로토콜에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 표적-하향조절을 증명하기 위하여 항-TGF- R_{II} 를 희석시키고 밤새도록 4 °C에서 배양하였다. Cy3 고트-항-라빗이 이차 항체로 사용되었다. 모든 항체-희석물을 Antibody-Diluent (Zytomed® #ZUC025-100)로 제조하였다. 형광 현미경 (Zeiss Axio® Observer.Z1)에 의하여 세포의 검사를 수행하였다. 영상을 Image J 소프트웨어 및 CorelDRAW® X7 소프트웨어로 분석하였다.

[1352] 김노틱 전달 후의 결과:

[1353] 웨스턴 블롯 분석 및 면역세포화학을 사용하여 TGF- R_{II} 단백질 수준의 감소를 입증하였다. 김노틱 전달 72 시간 후, A549 세포에서의 미처리 대조에 비하여 본 발명에 따른 서로 다른 ASO의 고농도를 사용하여 TGF- R_{II} 단백질이 유의미하게 감소되었다 (표 18). 감소된 TGF- R_{II} 수준이 ReNcell CX® 세포에서 관측되었다 (표 18). 두 세포주에 대하여, TGF- R_{II} 단백질 수준의 감소가 웨스턴 블롯 분석에 의하여 나타났다. 면역세포화학은 미처리 세포 및 혼성 대조 처리 세포에 비하여 두 세포주에서 TGF- R_{II} 단백질의 강한 투여량-의존성 감소를 나타냈다.

[1354] **표 18: TGF- R_{II} 웨스턴 블롯 후의 비중 분석.** A549 및 ReNcell CX® 세포에서의 TGF- R_{II} 특이적 ASO로의 김노틱 전달 후의 TGF- R_{II} 단백질의 감소가 각각 72 시간 또는 96 시간 후 관측될 수 있었다. 단백질 수준은 Image Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가 보관 유전자 GAPDH에 비하여 결정되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, D = 시퀀스 동정 번호 218c, F = 시퀀스 동정 번호 210q, G = 시퀀스 동정 번호 213k, H = 시퀀스 동정 번호 143h, I = 시퀀스 동정 번호 152h, J = 시퀀스 동정 번호 209az, K = 시퀀스 동정 번호 209y, $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	A549	ReNcell CX
표적 시점	TGF-R _{II} 72 시간, n=3	TGF-R _{II} 96 시간, n=2
A	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
B 2.5 μ M	0.85 ± 0.13	0.91 ± 0.12
B 10 μ M	1.06 ± 0.47	1.23 ± 0.16
C 2.5 μ M	0.34 ± 0.11	0.59 ± 0.05
C 10 μ M	0.39* ± 0.11	0.63 ± 0.17
D 2.5 μ M	0.68 ± 0.14	1.21 ± 0.28
D 10 μ M	0.39* ± 0.07	0.77 ± 0.10
F 2.5 μ M	0.51 ± 0.08	0.71 ± 0.16
F 10 μ M	0.45 ± 0.09	0.57 ± 0.12
G 2.5 μ M	0.41 ± 0.13	0.61 ± 0.10
G 10 μ M	0.40* ± 0.06	0.58 ± 0.08
H 2.5 μ M	0.75 ± 0.12	0.83 ± 0.13
H 10 μ M	0.51 ± 0.07	0.77 ± 0.06
I 2.5 μ M	0.58 ± 0.14	0.91 ± 0.21
I 10 μ M	0.38* ± 0.14	0.67 ± 0.09
J 2.5 μ M	0.42 ± 0.15	0.75 ± 0.23
J 10 μ M	0.34* ± 0.05	0.59 ± 0.08
K 2.5 μ M	0.45 ± 0.17	0.69 ± 0.16
K 10 μ M	0.36* ± 0.09	0.49 ± 0.09

[1355]

[1356]

결론:

[1357]

표적 mRNA 하향조절에 더하여, 시퀀스 동정 번호 218b, 시퀀스 동정 번호 218c, 시퀀스 동정 번호 210q, 시퀀스 동정 번호 213k, 시퀀스 동정 번호 143h, 시퀀스 동정 번호 152h, 시퀀스 동정 번호 209az 및 시퀀스 동정 번호 209y의 김노틱 전달은 A549 및 ReNcell CX® 세포에서의 단백질 수준의 우수한 감소의 결과를 가져왔다. TGF-R_{II}의 염색은 두 세포주들에서의 이러한 ASO로의 처리 후 TGF-R_{II} 단백질의 투여량-의존성 감소를 나타내었다.

[1358]

추가 ASO로의 김노틱 전달 후의 결과:

[1359]

단백질 분석은 시험된 ASO의 A549 세포 및 ReNcell CX® 세포 김나틱 전달에서 TGF-R_{II}의 감소된 양을 나타내었다 (10 μ M, 표 19). 이는 또한 면역세포화학에 의하여 입증되었다. 두 세포주에 대하여, 미처리된 세포 및 혼성 대조 시험된 세포에 비하여 시험된 ASO의 김노틱 전달에 의한 TGF-R_{II} 단백질 수준의 감소가 검출될 수 있었다.

[1360]

표 19: TGF-R_{II} 웨스턴 블롯 후의 비중 분석. A549 및 ReNcell CX® 세포에서의 추가 TGF-R_{II}-특이적 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)로의 김노틱 전달 이후 TGF-R_{II} 단백질의 감소가 각각 72 시간 또는 96 시간 후 관측될 수 있었다. Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가 보관-유전자 GAPDH에 대하여 단백질 수준이 결정되었고, 계속해서 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다. ASO 1 내지 25에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키(key)로 표시되었다: A = 시퀀스 동정 번호 143h에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호 143h에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 143h에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함. ASO 26 내지 48에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키로 표시되었다: A = 시퀀스 동정 번호 152h에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호 152h에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 152h에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함. ASO 49 내지 74에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키로 표시되었다: A = 시퀀스 동정 번호 209az 및 시퀀스 동정 번호 209y로부터 파생되는 평균값에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호 209az 및 시퀀스 동정 번호 209y로부터 파생되는 평균값에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 209az 및 시퀀스 동정 번호 209y로부터 파생되는 평균값에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함. ASO 75 내지 100에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키로 표시되었다: A = 시퀀스 동정 번호 210q에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호 210q에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 210q에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함. ASO 101 내지 124에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키로 표시되었다: A = 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c로부터 파생되는 평균값에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c로부터 파생되는 평균값에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c로부터 파생되는 평균값에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함. ASO 125 내지 152에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키로 표시되었다: A = 시퀀스 동정 번호 213k에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호

213k에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 213k에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함. 동정 번호 213k에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함.

시험에서의 ASO 번호	시퀀스 동정 번호	결과
1	233d	B
2	234d	A
3	143j	C
4	143p	A
5	143q	A
6	143r	A
7	143w	A
8	143af	C
9	143ag	C
10	143ah	C
11	235b	B
12	235d	A
13	141d	A
14	141g	A
15	141i	A
16	237b	A
17	237c	A
18	237i	C
19	237m	A
20	238c	A
21	238f	A
22	239e	B
23	240c	B
24	241b	C
25	242a	C
26	246e	C
27	247d	A
28	248b	A
29	248e	B
30	248g	A
31	152k	B
32	152s	B
33	152t	B
34	152u	B
35	152ab	C
36	152ag	B
37	152ah	C
38	152ai	C
39	249c	A
40	249e	A
41	250b	A
42	250g	B
43	251c	A
44	251f	A
45	252e	B
46	253c	A

[1361]

47	254b	C
48	255a	C
49	259e	C
50	260d	B
51	261b	A
52	261e	B
53	261g	A
54	262d	B
55	262e	A
56	209s	A
57	209v	B
58	209w	B
59	209x	C
60	209ai	B
61	209an	C
62	209at	A
63	209au	B
64	209av	B
65	263b	B
66	263c	A
67	263i	B
68	263m	A
69	264e	A
70	264h	A
71	265e	B
72	266c	A
73	267b	B
74	268a	B
75	272e	B
76	273d	A
77	274a	A
78	274d	B
79	274f	A
80	275g	A
81	275i	B
82	210o	A
83	210v	B
84	210w	B
85	210x	C
86	210ab	B
87	210ac	A
88	210ad	B
89	210af	A
90	210am	B
91	276b	B
92	276c	A
93	276j	B
94	276k	B
95	277d	A

[1362]

96	277e	A
97	278f	B
98	279c	B
99	280b	C
100	281a	C
101	220d	C
102	221d	B
103	222b	A
104	222c	A
105	222f	B
106	223c	B
107	223f	A
108	218ad	B
109	218n	A
110	218t	B
111	218u	B
112	218v	C
113	218ah	C
114	218an	A
115	218ao	B
116	218ap	B
117	224i	B
118	224m	B
119	225c	A
120	225f	A
121	226e	B
122	227c	A
123	228b	C
124	229a	C
125	285d	C
126	286d	A
127	287d	B
128	287e	A
129	287f	A
130	288e	A
131	288i	A
132	289d	B
134	289h	A
135	289o	B
136	289p	B
137	289q	B
138	213o	B
139	213p	B
140	213q	B
141	213s	B
142	213y	B
143	213z	B
144	213aa	B
145	213af	B

[1363]

146	290c	A
147	290f	B
148	290i	A
149	291c	B
150	292c	C
151	293b	C
152	294a	C

[1364]

[1365]

결론:

[1366]

종합해보면, A549 및 ReNcell CX® 세포에서의 김노틱 전달에 의한 TGF- R_{II} mRNA의 투여량-의존성 하향조절은 단백질 수준의 투여량-의존성 감소의 결과를 가져왔다. 본 발명의 ASO는 A549 및 ReNcell CX® 세포에서 입증된 바와 같이 단백질 표적 하향조절에서 잠재성을 갖는다.

[1367]

실시예 3: TGF- R_{II} 의 하향류 신호 경로(downstream signaling pathway)에 대한 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 영향의 분석.

[1368]

기능 분석이 인간 폐 암세포 (A549) 및 인간 신경 전구체 세포 (ReNcell CX®)에서 수행되었다. TGF- β 하향류 신호 경로가 분석된 후, TGF- R_{II} mRNA의 유효 하향조절 및 본 발명의 ASO의 김노틱 전달에 의한 단백질 수준의 감소가 분석되었다. 따라서, mRNA 및 TGF- β 의 하향류-매개자(downstream-mediator)로도 알려진 연결조직 성장 인자(CTGF: Connective Tissue Growth Factor)의 단백질 수준이 평가되었다. 게다가, Smad2 (테카펜타플렉틱 동족체 2(decapentaphlegic homolog 2)에 대한 부모)의 포스포릴화가 검사되었다. Smad2의 포스포릴화는 하향류

표적 유전자 CTGF의 상향조절에 후속하는 활성 TGF- β 경로에 대한 표지자이다.

[1369]

방법의 설명:

[1370]

세포를 앞서 기술된 바와 같이 배양하였다. 처리를 위하여, 세포를 6-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.3920.300) (80,000 세포 / 웰) 및 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시 (Sarstedt #94.6140.802) (10,000 세포 / 웰)에 접종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 김노틱 전달을 위하여, A549 및 ReNcell CX® 세포 배지를 제거하고 신생 전 배지 (6-웰에 대하여는 1 ml 그리고 8-웰에 대하여는 0.5 ml)로 교체하였다. Ref. 1 (혼합된 대조), 계속해서 시퀀스 동정 번호 218b (시퀀스 동정 번호 218b), No. 218c (시퀀스 동정 번호 218c)를 갖는 ASO를 배지 중에 2.5 및 10 μ M로 첨가하고 개개 분석이 A549 세포 중에서 72 시간 후 그리고 ReNcell CX® 세포 중에서 96 시간 후에 수행되었다. CTGF mRNA 수준에 대한 영향을 평가하기 위하여, 실시간 RT-PCR이 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다. CTGF의 분석을 위한 프라이머 쌍이 사용준비되고 표준화되었다. CTGF 및 pSmad2 단백질 수준에 대하여 체크하기 위하여, 웨스턴 블롯 및 면역세포화학이 앞서 기술된 바와 같이 사용되었다. 개개 방법에 대한 항체의 형태 및 사용된 희석을 표 13 및 14에 나열하였다.

[1371]

3.1. 시퀀스 동정 번호 218b에 대한 결과

[1372]

3.1.1 CTGF mRNA 및 단백질 수준에 대한 영향

[1373]

A549 (72 시간) 및 ReNcell CX® (96 시간) 세포에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 이후 CTGF mRNA가 유의미하게 그리고 투여량-의존적으로 감소되었다. 10 μ M 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 이후 TGF- β 의 하향류-매개자가 ReNcell CX® 세포 중에서 52 % $\pm$ 0.02까지 그리고 A549 세포 중에서 39 % $\pm$ 0.03까지 감소되었다 (표 20). 이러한 하향조절된 CTGF mRNA 수준에 따라, A549 세포 중에서 CTGF 단백질 발현의 강한 감소가 관측되었다 (표 21).

[1374]

표 20: A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 이후 CTGF mRNA의 투여량-의존성 및 유의미한 하향조절.

[1375]

정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 정량하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b. $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	A549	ReNcell CX
표적 시점	CTGF 72 시간, n=3	CTGF 96 시간, n=3
A	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.04
B 2.5 μ M	0.87 $\pm$ 0.06	0.97 $\pm$ 0.06
B 10 μ M	0.80 $\pm$ 0.03	0.86 $\pm$ 0.17
C 2.5 μ M	0.60** $\pm$ 0.04	0.66** $\pm$ 0.02
C 10 μ M	0.39** $\pm$ 0.03	0.52** $\pm$ 0.02

[1376]

[1377]

표 21: CTGF 웨스턴 블롯의 비중 분석. A549 중에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 72 시간 후 CTGF 단백질의 하향조절이 인식되었다. Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가 보관 유전자 알파-튜불린에 대하여 단백질 수준이 결정되고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b.

세포주	A549
표적 시점	CTGF 72 시간, n=1
A	1.00
B 2.5 μ M	0.91
B 10 μ M	1.31
C 2.5 μ M	0.05
C 10 μ M	0.086

[1378]

[1379] 결론:

[1380] A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 표적 CTGF mRNA 및 감소된 CTGF 단백질 수준의 하향조절로 나타난 바와 같이 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달로 TGF-β 신호의 기능 억제가 달성되었다.

[1381] 3.1.2 pSmad2 단백질 수준에 대한 영향

[1382] ASO-매개 TGF-β 신호 억제의 특이적인 결과로서 CTGF 하향조절을 증거하기 위하여 pSmad2 단백질 수준이 분석되었다.

[1383] A549에서의 72 시간 및 ReNcell CX® 세포에서의 96 시간의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 후 pSmad2에 대한 염색으로 Smad2 포스포릴화의 투여량-의존성 억제가 나타났다 (도 5). 게다가, ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의한 pSmad2 발현 수준의 감소가 A549 세포 중에서의 웨스턴 블롯에 의하여 입증되었다 (표 22).

[1384] 표 22: pSmad2 웨스턴 블롯의 비중 분석. A549 중에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 72 시간 후 pSmad2 단백질의 하향조절이 인식되었다. Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가 보관 유전자 GAPDH에 대하여 단백질 수준이 결정되고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b.

세포주	A549
표적 시점	pSmad2 72 시간, n=1
A	1.00
B 2.5 μM	1.81
B 10 μM	1.79
C 2.5 μM	0.66
C 10 μM	0.72

[1385]

[1386] 결론:

[1387] A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달이 TGF-β 신호의 하향류 매개자의 투여량-의존성 억제의 결과를 가져왔다. Smad2의 CTGF 및 포스포릴화가 ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의하여 감소되어 둘 다 억제된 TGF-β 경로를 나타낸다.

[1388] 3.2 시퀀스 동정 번호 218c에 대한 결과

[1390] *3.2.1 CTGF mRNA 및 pSmad2 단백질 수준에 대한 영향

[1391] ASO 시퀀스 동정 번호 218c의 김노틱 전달이 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 CTGF mRNA를 하향조절한다 (표 23). pSmad2에 대한 면역세포화학이 TGF-β 신호의 억제를 확증하였다 (도 6). 따라서, CTGF mRNA의 하향조절은 감소된 TGF-β 신호의 직접적인 효과이다.

[1392] 표 23: A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서 CTGF mRNA의 유의미한 하향조절이 관측되었다. 정량 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준이 정량되고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c. ± = 표준오차, A와 관련하여 **p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	A549	ReNcell CX
표적 시점	CTGF 72 시간, n=4	CTGF 96 시간, n=3
A	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.10
B 2.5 μM	0.97 ± 0.07	0.88 ± 0.08
B 10 μM	0.85 ± 0.06	0.89 ± 0.07
D 2.5 μM	0.49** ± 0.05	1.10 ± 0.08
D 10 μM	0.31** ± 0.03	0.82 ± 0.02

[1393]

[1394] 결론:

[1395] ASO 시퀀스 동정 번호 218c는 표적 TGF- R_{II} mRNA의 하향조절 이후 TGF- β 신호를 억제하는 데 효과적이었다. 이는 TGF- β 신호에 대한 표지자로서 하향조절된 CTGF mRNA 및 감소된 pSmad2 단백질 수준의 결정에 의하여 검사되었다.

[1396] 종합해보면, 본 발명의 ASO는 TGF- R_{II} 의 하향조절에 의한 TGF- β 신호의 기능 억제를 매개함에 있어서 효과적이다. 따라서, 본 발명의 ASO는 상승된 TGF- β 수준이 포함되는 의학적 적응증, 예를 들어 신경 질환, 섬유증 및 종양 진전에 대하여 이로울 것이다.

[1397] **실시예 4: TGF- β 1 처리 세포 중에서의 표적 mRNA 수준에 대한 본 발명의 ASO의 억제 활성.**

[1398] **4.1 TGF- β 1 전-처리 후의 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 ASO의 김노틱 섭취**

[1399] 병적 상태(pathological condition) 하의 외피 뇌영역으로부터의 인간 신경 전구체 세포 (ReNcell CX®) 중에서의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)의 억제 활성을 분석하기 위하여, 세포를 형질전환성장인자- β 1 (TGF- β 1)과 함께 전-처리하였다. 이전 연구에서 TGF- β 1이 모든 신경 장애 예를 들어 ALS의 뇌척수액 (CSF) 중에서 높은 농도로 발견되었다는 것이 공지되어 있다. 따라서, 전-처리 및 TGF- β 1과의 존재 중에서의 TGF- β -신호에 대한 ASO의 억제 효능이 검사되었다. A549 세포가 기준 세포주로 사용되었다.

[1400] **방법의 설명:**

[1401] A549 및 ReNcell CX®가 앞서 기술된 바와 같이 배양하였다. 처리 연구를 위하여 세포를 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (50,000 세포 / 웰)에 접종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. A549 및 ReNcell CX® 세포의 처리를 위하여, 배지를 제거하고 신생 전 배지 (24-웰에 대하여 0.5 ml)로 교체하였다. 48 시간 동안의 TGF- β 1 (10 ng/ml, PromoCell #C-63499) 제시 후, 배지가 교체되고, 배지 중의 Ref. 1 (혼성 대조, 10 μ M), ASO 시퀀스 동정 번호 218b (10 μ M) 또는 ASO 시퀀스 동정 번호 218c (10 μ M)와 함께 TGF- β 1 재-처리(re-treatment)가 수행되었다. A549 세포가 추가 72 시간 동안 배양됨에 반하여 ReNcell CX® 세포를 96 시간 후에 수확하였다. 따라서, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 앞서 기술된 바와 같이 RNA 단리 (24-웰 접시)를 위하여 사용되었다. 실시간 RT-PCR을 위하여 사용된 프라이머 쌍들이 표 11에 나열되었다.

[1402] **4.1.1 시퀀스 동정 번호 218b에 대한 결과**

[1403] ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의한 TGF- R_{II} 의 mRNA 하향조절에서의 효능은 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 TGF- β 1 사전-배양에 의하여 영향을 받지 않았다 (표 24, 도 7). A549 중에서의 표적 mRNA는 ASO로의 단일 처리 (잔여 mRNA: 15 % $\pm$ 0.05) 이후, 그러나 전-처리 후의 TGF- β 1의 존재 중에서의 처리 (잔여 mRNA: 7 % $\pm$ 0.01) 이후 유의미하게 하향조절되었다. ReNcell CX® 세포에 있어서 ASO 시퀀스 동정 번호 218b는 TGF- β 1의 부재 중에서 (25 % $\pm$ 0.01) 또는 TGF- β 1의 존재 중에서 TGF- β 1의 전-처리 후 (17 % $\pm$ 0.02) TGF- R_{II} mRNA 억제에서 유사한 효능을 나타내었다.

[1404] **표 24: TGF- β 1의 존재 중에서, ASO 시퀀스 동정 번호 218b는 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서 김노틱 전달 이후 TGF- R_{II} mRNA의 강력한 하향조절을 야기한다.** 정량 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대한 mRNA 발현 수준이 정량되고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF- β 1, $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적 시점	TGF- R_{II} 48 시간 TGF- β 1 -> 72 시간 / 96 시간 TGF- β 1 + ASO / 단일 처리	
	A549 n= 4	ReNcell CX n= 3
A	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.11
B 10 μ M	0.90 $\pm$ 0.17	0.89 $\pm$ 0.26
C 10 μ M	0.15** $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.01
E 10 ng/ml	0.71 $\pm$ 0.05	0.79 $\pm$ 0.34
E 10 ng/ml + B 10 μ M	0.74 $\pm$ 0.05	0.89 $\pm$ 0.25
E 10 ng/ml + C 10 μ M	0.07** $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.02

[1405]

[1406] 결론:

[1407] 두 가지 시험된 세포주 중에서 TGF-β1의 존재 중에서 본 발명의 ASO의 김노틱 섭취에 후속하는 사전-배양에 의하여 표적 mRNA가 대략 20 %까지 효과적으로 하향조절되었다.

[1408] 4.1.2 시퀀스 동정 번호 218c에 대한 결과

[1409] ASO 시퀀스 동정 번호 218c에 의한 TGF-R_{II} mRNA의 하향조절이 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서 TGF-β1의 존재 중에서 유효하였다 (표 25, 도 8). 두 가지 시험된 세포주에서 표적 mRNA가 ASO 시퀀스 동정 번호 218c로의 단일 처리 또는 TGF-β1의 존재 중에서도 무관하게 유의미하게 하향조절되었다.

[1410] 표 25: TGF-β1의 존재 중에서, ASO 시퀀스 동정 번호 218c는 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서 김노틱 전달 후 TGF-R_{II} mRNA의 강력한 하향조절을 야기한다. 정량 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대한 mRNA 발현 수준이 정량되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c, E = TGF-β1, ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적 시점	TGF-R _{II} 48 시간 TGF-β1 → 72 시간 / 96 시간 TGF-β1 + ASO / 단일 처리	
	A549 n= 2	ReNcell CX n= 2
세포주		
A	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.18
B 10 μM	0.92 ± 0.06	0.51 ± 0.14
D 10 μM	0.31** ± 0.04	0.05** ± 0.01
E 10 ng/ml	0.68 ± 0.05	0.88 ± 0.73
E 10 ng/ml + B 10 μM	0.86 ± 0.04	0.45 ± 0.09
E 10 ng/ml + D 10 μM	0.16** ± 0.05	0.03** ± 0.01

[1411]

[1412] 결론:

[1413] 종합해보면, 본 발명의 ASO가 TGF-β1의 존재 중에서 TGF-R_{II} mRNA를 하향조절함에 있어서 효과적이어서 ASO가 병리학적 상태 하에서 기능적이라는 것을 나타내었다.

[1414] 실시예 5: TGF-β1 처리 세포에서의 표적 단백질 수준에 대한 본 발명의 ASO의 억제 활성.

[1415] 병적 상태 하의 외피 뇌영역으로부터의 인간 신경 전구체 세포 (ReNcell CX®) 중에서의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)의 억제 활성을 분석하기 위하여, 세포를 형질전환성장인자-β 1 (TGF-β1)과 함께 전-처리하였다. 이전 연구에서 TGF-β1이 모든 신경 장애 예를 들어 ALS의 뇌척수액 (CSF) 중에서 높은 농도로 발견되었다는 것이 공지되어 있다. 따라서, 전-처리 및 TGF-β1과의 존재 중에서의 TGF β-신호에 대한 ASO의 억제 효능이 검사되었다. A549 세포가 기준 세포주로 사용되었다.

[1416] 방법의 설명:

[1417] 세포를 앞서 표준 프로토콜에서 기술된 바와 같이 배양하였다. 처리를 위하여, 세포를 6-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.3920.300) (80,000 세포 / 웰) 및 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시 (Sarstedt #94.6140.802) (10,000 세포 / 웰)에 접종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 김노틱 전달 효과의 조사를 위하여 (A549 및 ReNcell CX), TGF-β1 (Promocell # C-63499)으로의 사전-배양 후, 배지를 제거하고 신생 전 배지 (6-웰 접시 및 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시에 대하여 1 ml)로 교체하였다. TGF-β1 (10 ng/ml, 48 시간)의 제시 후 배지가 교체되고, TGF-β1 (10 ng/ml), Ref. 1 (혼합 대조, 10 μM) 및 본 발명의 ASO (10 μM)를 조합하여 그리고 단일 처리로 세포에 첨가하였다. A549 세포가 추가로 72 시간 동안 배양된 반면에, ReNcell CX® 세포는 96 시간 후 수확되었다. 따라서, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 단백질 단리 (6-웰 접시)를 위하여 후속하여 세포 (8-웰 세포 배양 슬라이드 접시 중의)의 웨스턴 블롯 분석 또는 면역세포화학 검사에 사용되었다. 사용되는 기술에 대한 절차가 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다. 사용된 항체 및 개개 방법을 위한 희석이 표 13 및 14에 나열되었다.

[1418] 김노틱 전달 후의 결과

[1419] A549 세포에 대한 웨스턴 블롯 및 면역세포화학 분석은 시퀀스 동정 번호 218b, 시퀀스 동정 번호 218c, 시퀀스 동정 번호 210q, 시퀀스 동정 번호 213k, 시퀀스 동정 번호 143h, 시퀀스 동정 번호 152h, 시퀀스 동정 번호 209az, 시퀀스 동정 번호 209y를 갖는 ASO가 TGF- β 1의 존재 중에서 강력한 표적 하향조절을 생성한다는 것을 나타내었다 (표 26). 고정된 ReNcell CX® 세포에 대한 TGF-R_{II}의 염색은 A549 세포에서 관측된 결과를 확증하였다. 시험된 ASO는 단일 처리 이후 그러나 또한 TGF- β 1의 존재 중에서 강한 표적 하향조절을 나타내었다.

[1420] **표 26: TGF-R_{II} 웨스턴 블롯의 비중 분석.** A549 중에서의 서로 다른 ASO로의 김노틱 전달에 후속한 TGF- β 1 사전-배양 후 TGF-R_{II} 단백질의 감소가 관측되었다. 단백질 수준은 Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가 보관 유전자 GAPDH에 비하여 결정되었고 계속해서 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, D = 시퀀스 동정 번호 218c, F = 시퀀스 동정 번호 210q, G = 시퀀스 동정 번호 213k, H = 시퀀스 동정 번호 143h, I = 시퀀스 동정 번호 152h, J = 시퀀스 동정 번호 209az, K = 시퀀스 동정 번호 209y, E = TGF- β 1.

표적 시점	TGF-R _{II} 48 시간 TGF- β 1 → 72 시간 TGF- β 1 + ASO / 단일 처리
세포주	A549 n= 1
A	1.00
B 10 μ M	1.20
C 10 μ M	0.31
D 10 μ M	0.42
F 10 μ M	0.45
G 10 μ M	0.35
H 10 μ M	0.47
I 10 μ M	0.33
J 10 μ M	0.27
K 10 μ M	0.30
E 10 ng/ml	2.03
E 10 ng/ml + B 10 μ M	1.50
E 10 ng/ml + C 10 μ M	0.78
E 10 ng/ml + D 10 μ M	1.16
E 10 ng/ml + F 10 μ M	1.21
E 10 ng/ml + G 10 μ M	0.83
E 10 ng/ml + H 10 μ M	1.02
E 10 ng/ml + I 10 μ M	0.76
E 10 ng/ml + J 10 μ M	0.69
E 10 ng/ml + K 10 μ M	0.77

[1421]

[1422] 결론:

[1423] 시퀀스 동정 번호 218b, 시퀀스 동정 번호 218c, 시퀀스 동정 번호 210q, 시퀀스 동정 번호 213k, 시퀀스 동정 번호 143h, 시퀀스 동정 번호 152h, 시퀀스 동정 번호 209az 및 시퀀스 동정 번호 209y의 김노틱 전달에 후속하여 TGF- β 1 사전-배양이, 표적 mRNA 하향조절에 더하여, A549 및 ReNcell CX® 세포에서의 단백질 수준의 감소의 결과를 가져왔다.

[1424] 추가의 ASO로의 김노틱 전달 후 결과:

[1425] 웨스턴 블롯 분석은 미처리 세포 및 혼합 대조로 처리된 세포에 비하여 김노틱 전달 72 시간 후 A549 세포 (표 27)에서의 TGF-R_{II} 단백질의 감소된 양을 나타내었다. TGF- β 1의 사전-배양하고 후속하여 시험된 ASO의 김노틱 전달은 TGF- β 1으로 사전-처리되고 후속하여 혼합 대조로 김노틱 전달된 세포에 비하여 감소를 나타내었다. TGF-R_{II}에 대하여 염색된 후의 A549 및 ReNcell CX®의 면역세포화학 검사는 시험된 ASO가 TGF- β 1 사전-처리를 수반하거나 수반함이 없이 김노틱 전달 후 표적 단백질의 강한 감소를 매개하였다는 것을 나타내었다.

[1426] **표 27 TGF-R_{II} 웨스턴 블롯의 비중 분석.** A549에서의 TGF- β 1 사전-배양에 후속하는 추가의 TGF-R_{II}-특이적 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)로의 김노틱 전달에 의하여 TGF-R_{II} 단백질의 감소가 검출될 수 있었다. 단백질 수준은 Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가 보관 유전자 GAPDH에 비하여 결정되었고 계속해서 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. ASO 1 내지 25에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키로 표시되었다: A = 시퀀스 동

정 번호 143h에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호 143h에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 143h에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함. ASO 26 내지 48에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키로 표시되었다: A = 시퀀스 동정 번호 152h에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호 152h에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 152h에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함. ASO 49 내지 74에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키로 표시되었다: A = 시퀀스 동정 번호 209az 및 시퀀스 동정 번호 209y로부터 파생되는 평균값에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호 209az 및 시퀀스 동정 번호 209y로부터 파생되는 평균값에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 209az 및 시퀀스 동정 번호 209y로부터 파생되는 평균값에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함. ASO 75 내지 100에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키로 표시되었다: A = 시퀀스 동정 번호 210q에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호 210q에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 210q에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함. ASO 101 내지 124에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키로 표시되었다: A = 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c로부터 파생되는 평균값에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c로부터 파생되는 평균값에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c로부터 파생되는 평균값에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함. ASO 125 내지 152에 대한 단백질 수준의 감소가 하기 키로 표시되었다: A = 시퀀스 동정 번호 213k에 대하여 10% 이하로 열악함; B = 시퀀스 동정 번호 213k에 대하여 10% 이상 그러나 20% 이하로 열악함; C = 시퀀스 동정 번호 213k에 대하여 20% 이상 그러나 30% 이하로 열악함.

시험에서의 ASO 번호	시퀀스 동정 번호	결과
1	233d	B
2	234d	A
3	143j	C
4	143p	A
5	143q	A
6	143r	A
7	143w	A
8	143af	B
9	143ag	C
10	143ah	C
11	235b	B
12	235d	A
13	141d	A
14	141g	A
15	141i	B
16	237b	A
17	237c	A
18	237i	C
19	237m	A
20	238c	A
21	238f	A
22	239e	B
23	240c	B
24	241b	C
25	242a	C
26	246e	C
27	247d	A
28	248b	A
29	248e	B
30	248g	A
31	152k	B
32	152s	B
33	152t	B
34	152u	B
35	152ab	C
36	152ag	B
37	152ah	A
38	152ai	A
39	249c	A
40	249e	A
41	250b	A
42	250g	B
43	251c	A
44	251f	A
45	252e	B

[1427]

46	253c	A
47	254b	C
48	255a	C
49	259e	C
50	260d	B
51	261b	A
52	261e	B
53	261g	A
54	262d	B
55	262e	A
56	209s	A
57	209v	B
58	209w	A
59	209x	C
60	209ai	B
61	209an	C
62	209at	B
63	209au	B
64	209av	B
65	263b	B
66	263c	A
67	263i	B
68	263m	A
69	264e	A
70	264h	A
71	265e	B
72	266c	A
73	267b	B
74	268a	B
75	272e	B
76	273d	B
77	274a	A
78	274d	B
79	274f	A
80	275g	A
81	275i	B
82	210o	A
83	210v	B
84	210w	B
85	210x	C
86	210ab	B
87	210ac	A
88	210ad	B
89	210af	A
90	210am	B
91	276b	B
92	276c	A
93	276j	B
94	276k	B

[1428]

95	277d	A
96	277e	A
97	278f	B
98	279c	B
99	280b	C
100	281a	C
101	220d	C
102	221d	B
103	222b	A
104	222c	A
105	222f	B
106	223c	B
107	223f	A
108	218ad	B
109	218n	A
110	218t	B
111	218u	B
112	218v	C
113	218ah	C
114	218an	A
115	218ao	B
116	218ap	B
117	224i	B
118	224m	B
119	225c	A
120	225f	A
121	226e	B
122	227c	B
123	228b	C
124	229a	C
125	285d	C
126	286d	A
127	287d	B
128	287e	A
129	287f	A
130	288e	A
131	288i	A
132	289d	B
134	289h	A
135	289o	B
136	289p	A
137	289q	B
138	213o	B
139	213p	B
140	213q	B
141	213s	B
142	213y	B
143	213z	B
144	213aa	B

[1429]

145	213af	C
146	290c	A
147	290f	B
148	290i	A
149	291c	B
150	292c	C
151	293b	C
152	294a	C
125	285d	C

[1430]

[1431] 결론:

[1432] 심지어 TGF- β 1 사전-배양 이후, 본 발명의 ASO의 김노틱 전달은 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 TGF-R_{II} 단백질의 감소의 결과를 가져온다.

[1433] 실시예 6: TGF- β 1-사전배양 이후의 TGF-R_{II}의 하향류 신호 경로에 대한 본 발명의 ASO의 영향의 분석

[1434] 기능 분석이 인간 폐 암세포 (A549) 및 인간 신경 전구체 세포 (ReNcell CX®)에서 수행되었다. TGF- β 하향류 신호 경로가 분석된 후, TGF-R_{II} mRNA의 유효 하향조절 및 TGF- β 1의 존재 중에서의 본 발명의 ASO의 김노틱 전달에 의한 단백질 수준의 감소가 분석되었다. 따라서, mRNA 및 TGF- β 의 하향류-매개자로도 알려진 연결조직 성장인자(CTGF)의 단백질 수준이 평가되었다. 게다가, Smad2 (테카펜타플레직 동족체 2에 대한 부모)의 포스포릴화가 검사되었다. Smad2의 포스포릴화는 하향류 표적 유전자 CTGF의 상향조절에 후속하는 활성 TGF- β 경로에 대한 표지자이다.

[1435] 방법의 설명:

[1436] 세포를 앞서 표준 프로토콜에서 기술된 바와 같이 배양하였다. 처리를 위하여, 세포를 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (50,000 세포 / 웰), 6-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.3920.300) (80,000 세포 / 웰) 및 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시 (Sarstedt #94.6140.802) (10,000 세포 / 웰)에 접종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 김노틱 전달 효과 (A549 및 ReNcell CX® 세포)의 조사를 위하여, TGF-β1과 함께 사전-배양 후, 배지를 제거하고 신생 전 배지 (6-웰 접시 및 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시에 대하여는 1 ml)로 교체하였다. TGF-β1 (10 ng/ml, 48 시간)의 노출 후 배지를 교체하고, TGF-β1 (10 ng/ml), Ref. 1 (혼합 대조, 10 μM), 시퀀스 동정 번호 218b (10 μM)를 갖는 ASO 및 시퀀스 동정 번호 218c (10 μM)를 갖는 ASO를 조합하여 그리고 단일 처리로 세포에 첨가하였다. A549 세포를 추가로 72 시간 동안 배양시킨 반면에 ReNcell CX® 세포는 96 시간 후에 수확되었다. 따라서, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 RNA (24-웰 접시) 및 단백질 단리 (6-웰 접시) 또는 세포의 면역세포화학 검사 (8-웰 세포 배양 슬라이드 접시)를 위하여 사용하였다. CTGF mRNA 수준에 대한 영향을 평가하기 위하여, 실시간 RT-PCR이 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다. CTGF의 분석을 위한 프라이머 쌍이 사용준비되고 표준화되었다. CTGF 및 pSmad2 단백질 수준에 대하여 체크하기 위하여, 웨스턴 블롯 및 면역세포화학이 앞서 기술된 바와 같이 사용되었다. 개개 방법에 대한 항체의 형태 및 사용된 희석을 표 13 및 14에 나열하였다.

[1437] 6.1. Results for 시퀀스 동정 번호 218b에 대한 결과

[1438] 6.1.1 CTGF mRNA 및 단백질 수준에 대한 영향

[1439] A549 (72 시간, 0.52 ± 0.05) 및 ReNcell CX® (96 시간, 0.70 ± 0.25) 세포 중에서 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 이후 CTGF mRNA가 하향조절됨에 반하여, 각각 5 일 (A549: 48 시간 + 72 시간, 6.92 ± 2.32) 또는 6 일 (ReNcell CX: 48 시간 + 96 시간, 1.60 ± 0.15) 동안의 TGF-β1 배양이 CTGF mRNA의 유의미한 하향조절을 야기하였다. ASO 시퀀스 동정 번호 218b는 TGF-β1의 존재 중에서 TGF-β1 영향을 차단하는 것에 의하여 CTGF mRNA 하향조절을 야기하기에 충분히 강력하였다 (표 28, 도 11). mRNA 수준에 대한 관찰에 따라, CTGF에 대한 면역화학 염색 또한 단백질 수준에 대한 이러한 관찰을 확증하였다 (도 12).

[1440] 표 28: A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 CTGF mRNA의 하향조절 후의 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달. mRNA 발현 수준을 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 정량하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF-β1, ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01, E+B와 관련하여 ⁺⁺p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF-β1, ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, E+B와 관련하여 **p < 0.01, ⁺⁺p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적 시점	CTGF 48 시간 TGF-β1 → 72 시간 / 96 시간 TGF-β1 + ASO / 단일 처리	
	A549 n= 5	ReNcell CX n= 3
세포주		
A	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.04
B 10 μM	0.89 ± 0.19	0.85 ± 0.01
C 10 μM	0.52 ± 0.05	0.70* ± 0.25
E 10 ng/ml	6.92* ± 2.32	1.60** ± 0.15
E 10 ng/ml + B 10 μM	8.79** ± 2.72	1.71** ± 0.03
E 10 ng/ml + C 10 μM	2.53** ± 0.59	1.19** ± 0.04

[1441]

[1442] 결론:

[1443] TGF-β1의 존재 중에서 그리고 후속하는 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 처리는 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서 일차로 TGF-R1I mRNA의 하향조절 그리고 이차로 감소된 CTGF mRNA 및 단백질 수준의 결과를 가져왔다. 이는 ASO 시퀀스 동정 번호 218b가 높은 TGF-β1 병적 상태 하에서 활성이기에 충분히 강력하고 TGF-β1 매개 영향으로부터 구출될 수 있다는 것을 나타내고 있다.

[1444] 6.1.2 pSmad2 단백질 수준에 대한 영향

[1445] CTGF 하향조절이 TGF- β 1의 존재 중에서 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로 매개되는 특이적인 TGF- β 신호 억제의 결과인지를 확증하기 위하여, pSmad2 단백질 수준이 분석되었다.

[1446] TGF- β 1 사전-배양 후 병행 TGF- β 1 노출을 수반하는 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 후의 pSmad2 염색이 두 시험된 세포주에서 Smad2 포스포릴화의 억제를 야기한다 (도 13). 게다가, 감소된 pSmad2 단백질 수준이 A549 및 ReNcell CX® 세포에서의 웨스턴 블롯 분석에 의하여 확증되었다 (표 29).

[1447] **표 29: pSmad2 웨스턴 블롯의 비중 분석.** ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 이후 pSmad2의 하향조절이 인식되었다. 또한, 조합 치료와 비교하는 경우, 본 발명의 ASO에 의한 TGF- β 1 매개 영향의 복귀(reversion)가 발견되었다. Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가 보관 유전자 GAPDH에 대하여 단백질 수준이 결정되었고 계속해서 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF- β 1. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적 시점	pSmad2 48 시간 TGF- β 1-> 72 시간 / 96 시간 TGF- β 1 + ASO / 단일 처리	
	A549 n= 2	ReNcell CX n= 2
세포주		
A	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
B 10 μ M	1.23 ± 0.47	0.89 ± 0.22
C 10 μ M	0.58 ± 0.08	0.66 ± 0.14
E 10 ng/ml	1.40 ± 0.31	1.19 ± 0.61
E 10 ng/ml + B 10 μ M	1.27 ± 0.46	2.19 ± 0.76
E 10 ng/ml + C 10 μ M	0.81 ± 0.31	1.55 ± 0.42

[1448]

[1449] 결론:

[1450] ASO 시퀀스 동정 번호 218b는 Smad2의 감소된 포스포릴화로 확증된 TGF- β 1의 존재 중에서 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서 TGF- β 신호의 기능 억제의 결과를 가져온다.

[1451] **6.2 시퀀스 동정 번호 218c에 대한 결과**

[1452] **6.2.1 CTGF mRNA 및 단백질 수준에 대한 영향**

[1453] 데이터는 혼합 대조 및 TGF- β 1으로의 조합 처리에 비한 (A549: 0.86, ReNcell CX®: 0.23) ASO 시퀀스 동정 번호 218c 및 TGF- β 1로의 조합 처리 이후 CTGF mRNA 하향조절 (A549: 5.89, ReNcell CX®: 1.25)을 나타내고 있다 (표 30 및 도 14). 이러한 관측에 더하여, CTGF의 번역화학 염색은 ASO 시퀀스 동정 번호 218c에 의한 단백질 수준에 대한 TGF- β 1 매개 영향의 억제를 확증하였다 (도 15).

[1454] **표 30: TGF- β 1 사전-배양 후 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218c 및 병행 TGF- β 1 처리 후의 CTGF mRNA 수준.** 데이터는 ASO 시퀀스 동정 번호 218c로의 CTGF mRNA 수준에 대한 TGF- β 1 영향의 효과적인 방지를 확증하였다. 정량 실시간 RT-PCT를 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준이 정량되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c, E = TGF- β 1, $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 $**p < 0.01$, E+B와 관련하여 $++p < 0.01$. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적 시점	CTGF 48 시간 TGF-β1 → 72 시간 / 96 시간 TGF-β1 + ASO / 단일 처리	
	A549 n= 3	ReNcell CX n= 2
A	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.03
B 10 μM	0.86 ± 0.11	0.85 ± 0.01
D 10 μM	0.53 ± 0.10	0.17* ± 0.02
E 10 ng/ml	4.71 ± 1.76	1.39 ± 0.08
E 10 ng/ml + B 10 μM	5.89* ± 2.16	1.25 ± 0.44
E 10 ng/ml + D 10 μM	0.86** ± 0.06	0.23*** ± 0.02

결론:

데이터는 ASO 시퀀스 동정 번호 218c에 의한 CTGF mRNA 및 단백질 수준에 대한 TGF-β1 유도 효과의 효과적인 방지를 입증하였다.

6.2.2 pSmad2 단백질 수준에 대한 영향

심지어 TGF-β1-사전-배양의 존재 중에서도, CTGF 하향조절 (6.2.1)이 ASO 시퀀스 동정 번호 218c에 의해 매개된 TGF-β1 신호-억제 매개의 결과인지를 입증하기 위하여, pSmad2 단백질 수준이 분석되었다.

Smad2의 포스포릴화가 TGF-β1 배양 (1.52 ± 0.19)에 의하여 유도된 반면에, ASO 김노틱 전달은 A549 세포 중에서의 pSmad2의 감소를 매개하였다 (0.89 ± 0.05). 조합 처리 후의 TGF-β1 사전-배양은 Smad2의 포스포릴화에 대한 TGF-β1의 억제 효과의 결과를 가져온다 (웨스턴 블롯 분석, 표 31). 면역세포화학은 웨스턴 블롯 분석에 의하여 관측된 데이터를 지지하였다 (도 16).

표 31: pSmad2 웨스턴 블롯의 비중 분석. ASO 시퀀스 동정 번호 218c로의 김노틱 전달 이후 pSmad3 단백질의 하향조절이 측정되었다. 조합 처리와 비교하는 경우, 본 발명의 ASO에 의한 TGF-β1 매개의 억제 효과가 나타났다. 단백질 수준은 Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가 보관 유전자 GAPDH에 비하여 결정되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c, E = TGF-β1. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적 시점	pSmad2 48 시간 TGF-β1 → 72 시간 TGF-β1 + ASO / 단일 처리	
	A549 n= 2	
A	1.00 ± 0.00	
B 10 μM	1.23 ± 0.27	
D 10 μM	0.89 ± 0.05	
E 10 ng/ml	1.52 ± 0.19	
E 10 ng/ml + B 10 μM	1.27 ± 0.29	
E 10 ng/ml + D 10 μM	0.93 ± 0.35	

결론:

ASO 시퀀스 동정 번호 218c는 TGF-β1 사전-배양 후의 ASO 김노틱 전달 후 TGF-β 신호를 효과적으로 억제한다. 이는 하향류 pSmad2 단백질 수준의 감소로 나타났다.

종합해보면, 본 발명의 ASO는 효과적으로 TGF-R_{II} mRNA를 하향조절하는 것에 의하여 비범하게 병리학적인, 높은 TGF-β1 수준의 존재 중에서의 TGF-β 신호의 기능 억제를 매개할 수 있다. 따라서, 본 발명의 ASO는 상승된 TGF-β 수준이 포함되는 의학적 적응증, 예를 들어 신경 질환, 섬유증 및 종양 진전 등에 대하여 이로울 것이다.

실시예 7: mRNA 수준에 대한 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 예방학적 활성의 결정 (TGF-β1 사전-처리)

[1467] 외피 뇌영역으로부터의 인간 신경 전구체 세포 (ReNcell CX®) 중에서의 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO)의 예방학적 활성을 분석하기 위하여, 형질전환성장인자-β 1 (TGF-β 1) 처리 후 ASO를 김노틱 섭취에 의하여 세포로 전달하였다.

[1468] 방법의 기술:

[1469] 상기 기술된 바와 같이 A549 및 ReNcell CX® 세포를 배양하였다. 예방학적 치료 시험을 위하여, 세포를 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (50,000 세포 / 웰)에 접종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 그 후, Ref. 1 (혼성 대조, 10 μM) 또는 시퀀스 동정 번호 218b를 갖는 ASO (10 μM)를 배지에 72 시간 (A549) 또는 96 시간 (ReNcell CX®) 동안 첨가하였다. 배양 시간 후 김노틱 전달 후, 배지 교체 없이, TGF-β 1 (10 ng/ml, Promocell #C-63499)을 추가 48 시간 동안 세포에 첨가하였다. 수확을 위하여, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 실시간 RT-PCR에 의한 mRNA 분석 후 RNA 단리 (24-웰 접시)에 사용하였다. 제조업자의 지시 (BioRad Prime PCR Quick Guide)의 지시에 따라 실시간 RT-PCR을 위한 사용준비되고 표준화된 프라이머 쌍을 사용하고 개개 사용준비된 Mastermix 용액 (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad #172-5271)와 혼합하였다. 방법을 상기 기술된 바와 같이 수행하였다.

[1470] 7.1 시퀀스 동정 번호 218b에 대한 결과

[1471] ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의한 TGF-R_{II} mRNA 하향조절에서의 효능은 A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 TGF-β 1 사후-배양에 의하여 영향을 받지 않았다 (표 32). ReNcell CX® 세포에서의 표적 mRNA의 유의미한 감소가 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 단일 처리 ($0.33^* \pm 0.11$) 이후에 나타났다. TGF-β 1의 사후-처리를 수반하는 ASO 김노틱 전달은 표적 TGF-R_{II} mRNA를 강하게 감소시켰다. A549 세포에 있어서, 시퀀스 동정 번호 218b는 단일 (0.25 ± 0.07) 또는 TGF-β 1의 사후-배양과의 조합 처리 (0.24 ± 0.06)에서 TGF-R_{II} mRNA를 억제함에 있어서 유사한 효능을 나타내었다.

[1472] **표 32: A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 본 발명의 ASO의 TGF-β 1 처리 후 김노틱 전달 후의 TGF-R_{II} mRNA의 하향조절.** 정량 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 정량하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF-β 1. ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, E+B와 관련하여 ++p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적 시점	TGF-R _{II}	
	72 시간 / 96 시간 ASOs -> 48 시간 TGF-β1	
세포주	A549 n= 3	ReNcell CX n= 3
A	1.00 ± 0.44	1.00 ± 0.19
B 10 μM	0.95 ± 0.22	1.42 ± 0.14
C 10 μM	0.25 ± 0.07	0.33* ± 0.11
E 10 ng/ml	1.96 ± 0.16	1.42 ± 0.08
E 10 ng/ml + B 10 μM	1.14 ± 0.39	1.25 ± 0.14
E 10 ng/ml + C 10 μM	0.24** ± 0.06	0.56** ± 0.10

[1473]

[1474] 결론:

[1475] ASO 시퀀스 번호 218b의 김노틱 섭취 후 TGF-β 1 사후-배양이 표적 TGF-R_{II} mRNA 하향조절에 효과적이어서 ASO 시퀀스 동정 번호 218b가 의학적 적응증에서의 예방학적 치료를 위하여 실현가능하다는 것을 나타내었다.

[1476] 실시예 8: TGF-β 1 처리 후 단백질 수준에 대한 본 발명의 ASO의 억제 활성의 결정

[1477] 외피 뇌영역으로부터의 인간 신경 전구체 세포 (ReNcell CX®) 중에서의 본 발명의 ASO의 예방학적 활성을 분석하기 위하여, ASO를 TGF-β 처리 후 김노틱 섭취에 의하여 세포로 전달하였다.

[1478] 방법의 설명:

[1479] 세포를 앞서 표준 프로토콜에서 기술된 바와 같이 배양하였다. 처리를 위하여 세포를 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시 (Sarstedt #94.6140.802) (10,000 세포 / 웰)에 접종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 그

후, Ref. 1 (혼성 대조, 10 μ M) 또는 ASO 시퀀스 동정 번호 218b (시퀀스 동정 번호 218b, 10 μ M)를 배지에 72 시간 (A549) 또는 96 시간 (ReNcell CX $\otimes$) 동안 첨가하였다. 김노틱 전달 후 배지의 교체 없이 TGF- β 1 (10 ng/ml, PromoCell #C-63499)을 세포에 추가 48 시간 동안 첨가하였다. 수확을 위하여, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 면역세포화학 분석을 위하여 사용하였다. 절차는 앞서 기술된 바와 같이 수행하였다. 사용된 개개 방법을 위하여 사용된 항체 및 희석이 표 13 및 14에 나열되었다.

[1480] 8.1 TGF- β 1 처리 후 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 후 TGF-R_{II} 단백질 감소의 결과

[1481] A549 및 ReNcell CX $\otimes$ 세포에 대한 TGF-R_{II}에 대한 면역세포화학 분석은 ASO 시퀀스 동정 번호 218b가 TGF- β 1 처리 후 강력한 TGF-R_{II} mRNA 표적 하향조절을 생성한다는 것을 나타내었다 (도 17).

[1482] 결론:

[1483] TGF- β 1 처리 후의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달은 표적 mRNA 하향조절과 마찬가지로 A549 및 ReNcell CX $\otimes$ 세포 중에서의 TGF-R_{II} 단백질 수준의 강력한 감소의 결과를 가져온다.

[1484] 종합해보면, TGF- β 1의 사후-처리와의 조합으로의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의해 매개되는 TGF-R_{II} 단백질 하향조절의 효능이 여전히 주어져서, 본 발명의 ASO가 예방학적 응용에 유효하다는 결론을 가져왔다.

[1485] 실시예 9: TGF- β 1 처리 후 TGF-R_{II}의 하향류 신호 경로에 대한 ASO 처리 효과.

[1486] TGF- β 신호의 억제를 매개함에 있어서의 본 발명의 ASO의 효능이 인간 폐 암세포 (A549) 및 인간 신경 전구체 세포 (ReNcell CX $\otimes$) 중에서의 TGF- β 1 처리 후의 김노틱 전달에 대하여 평가되었다. 따라서, TGF- β 신호의 하향류 분자, Smad3 (테카펜타플렉틱 동족체 3(decapentaphlegic homolog 3)에 대한 부모) 및 연결조직 성장인자 (CTGF)들이 분석되었다.

[1487] 방법의 기술:

[1488] 세포를 앞서 표준 프로토콜에서 기술된 바와 같이 배양하였다. 처리를 위하여, 세포를 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (50,000 세포 / 웰) 및 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시 (Sarstedt #94.6140.802) (10,000 세포 / 웰)에 집중하고 밤새도록 37 $^{\circ}$ C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 그 후, Ref. 1 (혼성 대조, 10 μ M) 또는 ASO 시퀀스 동정 번호 218b (10 μ M)를 배지에 72 시간 (A549) 또는 96 시간 (ReNcell CX $\otimes$) 동안 첨가하였다. 김노틱 전달 후, 배지의 교체 없이 TGF- β 1 (10 ng/ml, PromoCell #C-63499)을 세포에 추가 48 시간 동안 첨가하였다. 수확을 위하여, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 RNA 단리 (24-웰 접시) 또는 세포의 면역세포화학 검사 (8-웰 세포 배양 슬라이드 접시)를 위하여 사용하였다. CTGF mRNA 수준에 대한 영향을 평가하기 위하여, 실시간 RT-PCR을 앞서 기술된 바와 같이 수행하였다. CTGF의 분석을 위한 프라이머 쌍은 사용준비되고 표준화되었다. pSmad3 단백질을 결정하기 위하여, 면역세포화학이 앞서 기술된 바와 같이 사용되었다. 개개 방법을 위하여 사용된 형태 및 희석은 표 13 및 14에 나열되었다.

[1489] 9.1. 시퀀스 동정 번호 218b에 대한 결과

[1490] 9.1.1 CTGF mRNA 및 pSmad3 단백질 수준에 대한 영향

[1491] A549 (5 일: 0.67 $\pm$ 0.02) 및 ReNcell CX $\otimes$ (6 일: 0.70 $\pm$ 0.02) 세포 중에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 이후 CTGF mRNA가 감소되었다. TGF- β 1 추가 각각 72 시간 또는 96 시간 후, 세포는 CTGF mRNA의 증가와 반응하나, TGF- β 1 처리 후의 혼합 대조의 김노틱 전달에 비하여, CTGF mRNA의 유도가 강하게 감소되었다 (표 33). CTGF mRNA 하향조절이 ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의해 매개되고 또한 후속하는 TGF- β 1 처리 후의 TGF- β 신호 억제의 결과이었던 지의 여부를 입증하기 위하여, pSmad3 단백질을 검사되었다. 도 18은 TGF- β 신호가 실제로 A549 (도 18 a) 및 ReNcell CX $\otimes$ 세포 (도 18 b) 중에서 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달에 의하여 차단되었다는 것을 입증하고 있다. 이러한 효과는 또한 TGF- β 1 처리 후 시험된 ASO이 김노틱 전달 이후에 또한 나타났다.

[1492] 표 33: A549 및 ReNcell CX $\otimes$ 세포 중에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 후 TGF- β 1 처리 후의 CTGF mRNA의 하향조절.

[1493] mRNA 발현 수준의 정량을 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 수행되었고 계속해서 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E =

TGF- β 1. $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01, E+B와 관련하여 +p < 0.05, ++p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적 시점	CTGF	
	72 시간 /96 시간 ASOs -> +/- 48 시간 TGF- β 1	
세포주	A549 n= 3	ReNcell CX n= 3
A	1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.09
B 10 μ M	0.80 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.07
C 10 μ M	0.67 $\pm$ 0.02	0.70 $\pm$ 0.02
E 10 ng/ml	4.54** $\pm$ 0.68	1.56* $\pm$ 0.08
E 10 ng/ml + B 10 μ M	4.07** $\pm$ 0.38	1.62* $\pm$ 0.09
E 10 ng/ml + C 10 μ M	1.90* $\pm$ 0.03	0.97** $\pm$ 0.10

결론:

ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달은 TGF- β 1 처리와는 무관하게, A549 및 ReNcell CX® 세포 중에서의 TGF- β 1 mRNA 및 단백질의 하향조절과 마찬가지로 감소된 CTGF mRNA 및 pSmad3 단백질 수준의 결과를 가져왔다.

이는 ASO 시퀀스 동정 번호 218b가 또한 예방학적 상태 하에서 TGF- β 1 매개 효과를 재개시키거나 진행 중인 것을 감소시키는 데 활성이 되도록 하기에 충분히 강력하다는 것을 나타내고 있다.

실시예 10: 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 잠재적 염증전 및 독성 효과의 분석

10.1 말초혈액 단핵 세포 (PBMC) 분석

면역자극 특성에 대한 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO)를 분석하기 위하여, 말초혈액 단핵 세포 (PBMC)를 대조 ASO 및 시험 화합물과 함께 배양시키고 후속하여 IFN α 및 TGF α 에 대하여 ELISA를 수행하였다.

방법의 설명:

연층(buffy coat)으로부터 500 ml 전혈 수혈 단위(full blood transfusion unit)에 대응하는 PBMC를 분리시켰다. 각 단위는 건강한 지원자로부터 수득하였고 글루코스-시트레이트(glucose-citrate)를 항-응집제(anti-agglutinant)로 사용하였다. 연층을 준비하고 Institute for Transfusion Medicine, Germany의 Blood Bank Suhl에 의해 배달하였다. 각 혈액 기증을 HIV 항체, HCV 항체, HBs 항원, TPHA, HIV RNA 및 SPGT (ALAT)에 대하여 모니터링하였다. 감염제(infectious agent)에 대하여 음성이고 정상 SPGT 값을 갖는 혈액 샘플만 시험되었고 저속 원심분리에 의하여 백혈구 및 적혈구 분리에 사용되었다. 혈액 기증 약 40 시간 후 Ficoll-Histopaque® 1077 (Heraeus™ Multifuge™ 3 SR)를 사용하여 경사 원심분리(gradient centrifugation)로 PBMC의 단리를 수행하였다. IFN α 분석을 위하여, PBMC를 100 μ l 완전 배지 플러스 첨가제 (RPMI1640, + L-Glu, + 10% FCS, + PHA-P (5 μ g/ ml), + IL-3 (10 μ g/ ml)) 중에 100,000 세포/ 96-웰로 접종하고 직접 배양 (24 시간, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)을 위하여 시험 화합물 (5 μ l)이 첨가되었다. TNF α 분석을 위하여, PBMC를 첨가제가 없는 100 μ l 완전 배지 (RPMI1640, + L-Glu, + 10% FCS) 중에 100,000 세포/ 96-웰로 접종하고 직접 배양 (24 시간, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)을 위하여 시험 화합물 (5 μ l)이 첨가되었다. huIFN α (eBioscience, #BMS216INSTCE)에 대한 ELISA (수집된 상청액 중의 이중 측정, 20 μ l)를 제조업자의 프로토콜에 따라 수행하였다. huTNF α (eBioscience, #BMS223INSTCE)에 대한 ELISA (수집된 상청액 중의 이중 측정, 20 μ l)를 제조업자의 프로토콜에 따라 수행하였다.

결과:

ASO 배양에 의한 검출불가능한 IFN α (표 34) 및 TNF α (표 35) 분비로 나타난 PBMC에 대한 ASO 처리의 면역자극 효과는 없었다. 분석 기능은 면역자극의, 콜레스테롤-콘주게이트 siRNA (XD-01024; IFN α) 및 TLR3에 결합하고 면역계를 자극하는 이중-가닥 RNA의 합성 유사체인 폴리이노신:폴리시티딜산(polyinosinic:polycytidylic acid; poly I:C; TNF α ; InvivoGen # tlr1-pic)의 면역자극 효과로 입증되었다.

표 34 본 발명의 ASO 노출에 대한 IFN α 반응:은 ASO 배양에 의한 PBMC의 IFN α 반응을 나타내고 있다. 발현 수준의 정량은 ELISA 분석을 사용하여 양성 대조 (ODN2216 [클래스 A CpG 올리고뉴클레오타이드; TLR9로 인식되고

강한 면역자극 효과를 야기함; InvivoGen tlr1-2216], poly I:C, XD-01024)에 대하여 결정되었다.

시험 후보	이중 실험의 평균 [pg/ml]	
	기증자 1	기증자 2
위약(mock)	- 0.084	0.720
시퀀스 동정 번호 209y	- 0.061	- 0.039
시퀀스 동정 번호 209t	- 0.308	- 0.520
시퀀스 동정 번호 209v	- 0.191	- 1.252
시퀀스 동정 번호 218b	- 0.001	- 0.093
시퀀스 동정 번호 218m	- 0.140	- 0.163
시퀀스 동정 번호 218q	- 0.755	0.005
시퀀스 동정 번호 218c	- 0.852	- 0.805
시퀀스 동정 번호 218t	- 0.469	0.450
ODN2216	0.300	1.311
poly I:C	- 1.378	2.053
XD-01024	13.961	26.821
정량 한계 이하의 양성 대조 (XD-01024)를 제외한 모든 값		

표 35 본 발명의 ASO 노출에 대한 TNF α 반응: ELISA 분석을 사용하여 대조 후보 (ODN2216, poly I:C, XD-01024)에 대하여 발현 수준의 정량을 결정하였다.

시험 후보	이중 시험의 평균 [pg/ml]	
	기증자 1	기증자 2
위약	0.647	-0.137
시퀀스 동정 번호 209y	2.397	-0.117
시퀀스 동정 번호 209t	0.734	0.193
시퀀스 동정 번호 209v	0.360	0.063
시퀀스 동정 번호 218b	0.670	0.183
시퀀스 동정 번호 218m	0.594	0.519
시퀀스 동정 번호 218q	0.049	0.194
시퀀스 동정 번호 218c	-0.212	0.029
시퀀스 동정 번호 218t	0.593	0.758
ODN2216	0.085	0.894
폴리 I:C	115.026	102.042
XD-01024	1.188	1.418
양성 대조 (폴리 I:C)를 제외한 모든 값들은 정량의 한계 이하임		

10.2 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 생체 내 독성학

독성학적 특성에 대한 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO)를 분석하기 위하여, C57/B16N 마우스가 3회 정맥내 ASO 주사를 수령하였고, 희생 후, 혈청, 간 및 신장 내 트랜스아미나아제 수준을 검사하였다.

방법의 설명:

6주령의 암컷 C57/B16N 마우스를 시험 화합물 (시퀀스 동정 번호 218b, 시퀀스 동정 번호 218c)로 7일 동안 처리하였다. ASO (200 μ l, 15 mg/kg/체중(BW))를 처리 기간의 1일차, 2일차 및 3일차에 정맥내로 주사하였다. 매 연속일에 체중 발달 (시퀀스 동정 번호 218c)을 모니터링하였고 4일차에서 섬유속 정맥 (vena fascicularis)으로부터 혈청을 수집하였다. 8일차에서 동물을 희생시키고 mRNA 및 트랜스아미나아제 정량을 위하여 대정맥, 간 (약 50 mg의 조각), 신장 및 폐로부터 혈청을 수집하였다. bDNA 분석 (QuantiGene® 키트, Panomics/Affimetrix)으로 간, 신장 및 폐 용해물 중에서 TGF- R_{II} mRNA 수준을 결정하였다. CobasIntegra®400에서 1:10 희석 혈청으로부터 아스파르테이트 트랜스아미나아제 (ASP) 및 알라닌 트랜스아미나아제 (ALT)를 측정하였다.

표 36: 반복된 ASO 정맥내 주사 후 C57/B16N 마우스의 알라닌 트랜스아미나아제 및 아스파르테이트 트랜스아미나아제의 혈청 발현 수준. 염수-처리 동물의 발현 수준과 비교하는 것에 의하여 발현 수준의 정량을

달성하였다. $\pm$ = 표준오차.

시험 화합물	혈청 트랜스아미나아제 [U/L]			
	주사 3 일 후		주사 7 일 후	
	ALT	AST	ALT	AST
시퀀스 동정 번호 209ax	13.87 $\pm$ 1.44	47.33 $\pm$ 15.88	64.91 $\pm$ 21.01	108.99 $\pm$ 13.56
시퀀스 동정 번호 143h	13.68 $\pm$ 3.33	53.50 $\pm$ 6.99	12.47 $\pm$ 1.64	33.35 $\pm$ 8.17
시퀀스 동정 번호 152h	16.66 $\pm$ 6.29	67.23 $\pm$ 29.91	17.49 $\pm$ 2.81	45.75 $\pm$ 17.14
시퀀스 동정 번호 209ay	18.29 $\pm$ 6.37	69.96 $\pm$ 35.44	287.29 $\pm$ 65.39	273.45 $\pm$ 101.33
시퀀스 동정 번호 210q	11.70 $\pm$ 3.80	36.44 $\pm$ 5.36	11.11 $\pm$ 6.31	40.81 $\pm$ 13.32
시퀀스 동정 번호 218b	19.60 $\pm$ 8.62	67.61 $\pm$ 42.75	18.38 $\pm$ 4.60	48.91 $\pm$ 17.86
시퀀스 동정 번호 213k	13.59 $\pm$ 3.28	54.47 $\pm$ 36.15	96.00 $\pm$ 46.74	89.12 $\pm$ 21.82
염수	9.52 $\pm$ 9.21	67.18 $\pm$ 28.60	9.99 $\pm$ 2.29	28.29 $\pm$ 2.23

표 37: 반복된 ASO 정맥내 주사 후 C57/B16N 마우스의 간, 신장 및 폐 내에서의 TGF- R_{II} 의 발현 수준. 염수-처리 동물의 발현 수준과 비교하는 것에 의하여 발현 수준의 정량을 달성하였다. $\pm$ = 표준오차.

시험 화합물	TGF- R_{II} mRNA/GAPDH mRNA 발현		
	간	신장	폐
시퀀스 동정 번호 209ax	0.64 $\pm$ 0.03	1.31 $\pm$ 0.11	13.25 $\pm$ 0.67
시퀀스 동정 번호 143h	0.26 $\pm$ 0.02	0.65 $\pm$ 0.22	11.10 $\pm$ 0.11
시퀀스 동정 번호 152h	0.58 $\pm$ 0.10	0.87 $\pm$ 0.17	13.42 $\pm$ 0.69
시퀀스 동정 번호 209ay	0.62 $\pm$ 0.06	1.30 $\pm$ 0.10	13.93 $\pm$ 0.57
시퀀스 동정 번호 210q	0.39 $\pm$ 0.06	0.83 $\pm$ 0.15	13.53 $\pm$ 1.23
시퀀스 동정 번호 218b	0.72 $\pm$ 0.08	0.97 $\pm$ 0.06	15.63 $\pm$ 1.45
시퀀스 동정 번호 213k	0.42 $\pm$ 0.01	1.20 $\pm$ 0.04	14.44 $\pm$ 1.03
염수	0.66 $\pm$ 0.04	1.10 $\pm$ 0.08	15.14 $\pm$ 0.65

표 38: 반복된 ASO 정맥내 주사 후 C57/B16N 마우스의 알라닌 트랜스아미나아제 및 아스파르테이트 트랜스아미나아제의 혈청 발현 수준. 염수-처리 동물의 발현 수준과 비교하는 것에 의하여 발현 수준의 정량을 달성하였다. $\pm$ = 표준오차.

시험 화합물	혈청 트랜스아미나아제 [U/L]			
	주사 3 일 후		주사 7 일 후	
	ALT	AST	ALT	AST
시퀀스 동정 번호 218c	24.63 $\pm$ 2.10	51.87 $\pm$ 5.99	18.10 $\pm$ 4.01	39.99 $\pm$ 2.09
염수	28.68 $\pm$ 3.23	79.95 $\pm$ 30.24	14.52 $\pm$ 4.89	36.08 $\pm$ 3.32

표 39: 반복된 ASO 정맥내 주사 후 C57/B16N 마우스의 간 및 신장 내의 TGF- R_{II} 의 발현 수준. 염수-처리 동물의 발현 수준과 비교하는 것에 의하여 발현 수준의 정량을 달성하였다. $\pm$ = 표준오차.

시험 화합물	TGF-RII mRNA/GAPDH mRNA 발현	
	간	신장
시퀀스 동정 번호 218c	0.21 ± 0.03	0.16 ± 0.02
염수	0.35 ± 0.05	0.24 ± 0.03

표 40: 7-일 ASO 처리 패러다임 동안의 체중 발달. 100%로 설정된 0일차 체중과 비교하여 체중 이득을 정량하였다.

시험 화합물	체중 발달 [%]					
	0 일차	1 일차	2 일차	3 일차	4 일차	7 일차
시퀀스 동정 번호 218c	100%	99%	99%	99%	102%	104%
염수	100%	99%	100%	100%	101%	103%

결론: PBMC 또는 C57/B16N 마우스에 대하여 연관된 본 발명의 ASO의 염증전 또는 독성 효과는 없었다. 따라서, TGF-RII 표적화 ASO 처리는 다양한 TGF-β 연관 질환을 처리하는 안전한 방법임을 반영하고 있다.

실시예 11: 생체 내에서의 TGF-β 유도 신경 줄기 세포 억제 및 신경 전구체 세포 증식에 대한 본 발명의 ASO의 뇌실내 주입의 결정

본 시험의 목표는 생체 내에서 신경 줄기 세포 및 전구체 세포 증식에 대한 TGF-β1을 i) 방지하거나 ii) 치료 하기 위한 TGF-RII에 대한 본 발명의 ASO의 잠재력(potential)을 평가하는 것이다.

방법의 설명:

11.1 신경 생성의 TGF-β1 연관 하향조절의 억제

2월령 암컷 Fischer-344 랫트 (n = 32)가 스테인레스강 캐눌러(cannula)에 연결된 삼투압 미니펌프 (Model 2002, Alzet)를 통하여 뇌실내 주입을 수령하였다. 근육내 주사를 사용하는 깊은 마취(deep anesthesia) 하에서 미니펌프의 외과적 이식이 수행되었다. 동물들은 본 발명에 따른 본 발명의 ASO (펌프 중에서 1.64 mM 농도로 존재), 뒤섞인 ASO (펌프 중에서 1.64 mM 농도로 존재) 또는 aCSF (인공 뇌척수액)로 7일 동안 주입되었다. 8일 차에서, 펌프를 교환하고 동물들은 i) aCSF, ii) TGF-β1 (펌프 중에 500 ng/ml로 존재), iii) TGF-β1 (펌프 중에 500 ng/ml로 존재) 더하기 뒤섞인 ASO (펌프 중에 1.64 mM 농도로 존재) 또는 iv) TGF-β1 (펌프 중에 500 ng/ml로 존재) 더하기 본 발명의 ASO (펌프 중에 1.64 mM 농도로 존재)로 14일 동안 주입되었다. 주입-기간 마지막에서 모든 동물을 심장을 통하여 4% 파라포름알데히드로 관류시켰다. 캐눌러 관 폐쇄에 대하여 뇌를 분석 하였고 부정확한 캐눌러 배치를 갖는 동물을 분석으로부터 배제하였다. 펌프 주기의 마지막 24 시간 동안, 동물은 200 mg/kg 브로모-디옥시우리딘 (BrdU)의 복강내 주사를 수령하였다.

40 μm 시상면 절편 중의 BrdU-양성 세포의 발색 면역검출(chromogenic immunodetection)을 위하여 조직을 가공 하였다. 뇌실하대(subventricular zone)의 최하단, 중간 및 상단부에 위치하는 절편 당 3개의 50 μm x 50 μm 계 수 프레임 내의 BrdU 양성 세포를 계수하였다. 계수 프레임의 최상단 초점면 (배제 영역) 또는 측방 배제 경계 를 가로지르는 양성 프로파일은 계수하지 않았다. 해마의 분석을 위하여, 해마의 용적을 결정하고 경계 내 그리 고 그에 인접하는 모든 양성 세포를 계수하였다. 각 구조에 대한 BrdU-양성 세포의 예상 수를 획득하기 위하여 샘플 용적에 대한 기준 용적의 비로 양성 프로파일의 총 계수를 곱하였다. 하나의 뇌 반구에 대하여 모든 외삽 을 산출하였고 2배수화하여 총 뇌 값을 나타내도록 하였다. 데이터는 평균값 ± 표준편차 (SD)로 제공되었다. unpaired, two-sided t-test comparison-Student's t-test를 사용하여 TGF-β1 처리 및 대조군 간의 통계 분석 을 수행하였다 (GraphPad Prism 4 소프트웨어, USA). 유의성 수준은 p < 0.05로 가정하였다.

11.2 신경 생성의 TGF-β1 연관 하향-조절의 처리

동물들은 시간 당 0.5 μl의 유속으로 14일 동안 aCSF 또는 재조합 인간 TGF-β1 (펌프 중에 500 ng/ml로 존재) 을 수령하였다. 14일 후, 펌프를 교환하고 동물들은 i) aCSF, ii) 재조합 인간 TGF-β1 (펌프 중에 500 ng/ml로

존재) 또는 iii) 본 발명의 ASO (펌프 중에 1.64 mM 농도로 존재) 더하기 제조합 인간 TGF- β 1 (펌프 중에 500 ng/ml로 존재)와의 공-주입 또는 iv) 뒤섞인 ASO (펌프 중에 1.64 mM 농도로 존재) 더하기 제조합 인간 TGF- β 1 (펌프 중에 500 ng/ml로 존재)로 주입되었다. 주입-기간 마지막에서 모든 동물을 심장을 통하여 4% 파라포름알데히드로 관류시켰다. 캐놀러 관 편재에 대하여 뇌를 분석하였고 부정확한 캐놀러 배치를 갖는 동물을 분석으로부터 배제하였다. 펌프 주기의 마지막 24 시간 동안, 동물은 200 mg/kg 브로모-디옥시우리딘 (BrdU)의 복강내 주사를 수령하였다.

[1532] 상기 기술된 바와 같이 조직학적 분석을 수행하였다 (11.1).

[1533] 결과:

[1534] 시퀀스 동정 번호 143aj, 시퀀스 동정 번호 143h 및 시퀀스 동정 번호 210q로의 ASO 처리는 특히 그리고 부분적으로 해마 내 및 뇌실 벽 내에서 세포 증식에 대한 TGF- β 1의 영향을 감소시켰다. 본 발명의 ASO로의 처리는 특히 그리고 부분적으로 신경 생성에 대한 TGF- β 1의 억제 효과로부터 구제되었다.

[1535] 결론: 로텐트에 대한 교차-반응성을 입증하고 있는 본 발명의 ASO는 이러한 생체 내 실험에서 신경 생성을 유도한다. 교차-반응성을 입증하지 않는 본 발명의 ASO는 대부분 심지어 시험관 내 실험에서 보다 더 강력한 영향을 발휘하였다. 그 결과, 이러한 본 발명의 ASO는 또한 비-인간 영장류 및 인간에 대하여 설정된 생체 내에서 보다 더 효과적이고 따라서 신경 줄기 세포 및 전구체 증식의 TGF- β 1 유도 억제를 방지하거나 치료하기 위한 더 고도하게 잠재적인 약물로서 작용한다고 가정된다.

[1536] **실시예 12: 인간 신경 전구체 세포의 증식 및 특정한 마커에 대한 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 영향의 분석**

[1537] 근위축성 측삭 경화증(ALS: 루게릭병)은 지금까지는 치료 효과가 없는 신경퇴화성 측삭 경화증이다. 현재 분자유전학 캠페인은 ALS 환자의 뇌척수액 (CSF) 중에서 TGF- β 가 높은 농도로 발견되고 있다는 것으로 알려진 이전의 연구로부터 이러한 치명적인 질환의 분자 병인론의 설명이 증가하고 있다. 이러한 높은 수준의 순환 TGF- β 가 줄기 세포 침묵을 증진하고 따라서 뇌의 뇌실하대 (SVZ) 내에서의 성인 신경 생성의 억제를 야기하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 퇴화하는 신경의 재생이 TGF- β 신호를 향상시키는 것에 의하여 방지될 수 있을 것으로 여겨진다.

[1538] 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 의해 매개되는 TGF- β 신호의 선택적 억제가 성인 신경 생성의 재활성화를 허용할 수 있는지의 여부를 밝히기 위하여, TGF- β 매개 세포 주기 억제의 증거가 입증되어야 한다.

[1539] 방법의 설명:

[1540] 세포 주기 억류 시험: 세포를 앞서의 표준 프로토콜에서 기술된 바와 같이 배양하였다. 실험을 위하여, 세포를 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (30,000 세포 / 웰)에 과중하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 증식 (+EGF/FGF) (Millipore: EGF #GF144, bFGF #GF003) 또는 분화 (-EGF/FGF) 조건 하의 세포 주기에 대한 TGF- β 1 매개 영향의 결정을 위하여, 개개 배지를 제거 및 교체한 후 세포를 4 일 동안 TGF- β 1 (PromoCell #C-63499, 10 또는 50 ng/ml)으로 처리하였다. 4일 차에서 배지를 다시 교체하고 7일차까지 TGF- β 1 처리를 반복하였다. 7일차에서, PBS로 2회 세척하는 것에 의하여 세포를 수확하고 후속하여 상기 기술된 바와 같이 RNA (24-웰 접시) 단리를 위하여 사용하였다. 실시간 RT-PCR로 세포 주기에 대한 TGF- β 1-매개 영향을 평가하기 위하여, 증식 마커 Ki67의 mRNA, 종양 억제 유전자 p53, 사이클린-의존성 키나아제 억제제 1 (p21) 및 신경 생성 마커 더블코르틴 (DCX: Doublecortin)을 분석하였다. 개개 프라이머 쌍을 표 11에 나열하였다.

[1541] 인간 신경 전구체 세포에 대한 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 영향에 대한 mRNA 분석: 세포를 앞서의 표준 프로토콜에서 기술된 바와 같이 배양하였다. 실험을 위하여, 세포를 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (30,000 세포 / 웰)에 과중하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 본 실험을 위하여, 세포 배지를 교체하고 Ref. 1 (뒤섞인 대조, 2.5 및 10 μ M), 시퀀스 동정 번호 218b를 갖는 ASO (2.5 및 10 μ M) 또는 TGF- β 1 (10 ng/ml, Promocell #C-63499)을 세포에 96 시간 동안 첨가하였다. 배양 시간 후, 배지를 한 번 더 교체하고 추가로 처리를 추가의 96 시간 동안 수행하였다. 처리 8 일 후 세포를 수확하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 RNA (24-웰 접시) 단리를 위하여 사용하였다. 전구체 세포, 네스틴 (초기 신경 마커), Sox2 (초기 신경 마커), DCX (신경 생성의 표지자) 및 Ki67 (증식 마커)에 대한 영향을 평가하기 위하여, 앞서 기술된 바와 같이 실시간 RT-PCR로 mRNA를 결정하였다. 개개 프라이머 쌍을 표 11에 나열하였다.

[1542] ReNcellCX® 세포에 대한 김노틱 전달에 의한 TGF β ₁ 특이적 ASO의 증식 및 분화 영향: 다음 목표는 TGF- β ₁ 특이적 ASO가 ReNcellCX® 세포의 증식에 영향을 주는 지의 여부를 조사하는 것이다. 따라서, 세포를 앞서 기술된 바와 같이 배양하고 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (30,000 세포 / 웰) 또는 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시 (Sarstedt #94.6140.802) (10,000 세포 / 웰)에 파종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 증식 곡선을 수득하기 위하여, 배지 교체 후 세포를 Ref. 1 (뒤섞인 대조, 2.5 및 10 μ M,)으로 그리고 ASO 시퀀스 동정 번호 218b (2.5 및 10 μ M)로 72 시간 동안 처리하였다. 배양 시간 후, 배지를 교체하고 처리를 2회 반복하였다. 상청액을 수집한 후, 세포 수의 결정을 위하여 잔여의 세포를 24-웰 접시로부터 수확하였다. 이러한 목적을 위하여, 잔여 세포를 PBS (2x)로 세척하고, accutase (500 μ l/웰)로 처리하고 5 분 동안 37 °C에서 배양하였다. 그 후 500 μ l 배지를 첨가하고 제조업자의 지시에 따라 Luna FL™ Automated Cell Counter Fluorescence and Bright Field (Biozym, #872040)를 사용하여 세포 수를 결정하였다. 요약하면, 18 μ l의 세포 현탁액을 2 μ l의 아크리딘 오렌지/요오드화프로피디움 분석 생존도 키트 (acridine orange/propidium iodide assay viability kit) (Biozym #872045)에 첨가하였다. 침강 1 분 후, 10 μ l을 세포 계수 슬라이드 (Biozym # 872011) 상에 첨가하고, 세포를 계수하고 총 세포/ml 및 사멸 세포에 대한 생존 세포의 비율을 산출하였다. Ref. 1 (10 μ M), 시퀀스 동정 번호 218b (10 μ M)의 김노틱 전달 및 8 일 동안의 TGF- β 1 (10 ng/ml)의 대응 처리 후, 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시의 세포를 고정시키고 Ki67에 대한 항체로 염색하였다. 김노틱 전달 후 ReNcell CX® 세포의 분화능을 조사하기 위하여, 다른 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시를 Ref. 1 (10 μ M), 시퀀스 동정 번호 218b (10 μ M)로 처리하고 96 시간 동안 증식 조건 (+EGF/FGF) 하에서 대응하는 TGF- β 1 (10 ng/ml) 처리를 하였다. 그 후, 세포의 한 부분을 추가로 96 시간 동안 증식 조건 하에서 처리한 반면에 세포의 다른 부분은 분화 조건 (- EGF/FGF) 하에 처리하고 유지시켰다. 세포의 염색 후, 신경 세사 N (NeuN: Neurofilament) 및 β III-튜불린 발현 수준을 형광현미경으로 결정하였다. 세포를 수확, 고정 및 염색하기 위한 절차는 상기에서 기술되었고 개개 항체 희석은 표 14에 나열하였다.

[1543] TGF- β 1 사전-배양 후의 김노틱 전달 후 증식 및 신경 생성에 대한 마커의 mRNA 분석: 세포를 앞서 표준 프로토콜에서 기술된 바와 같이 배양하였다. 실험을 위하여 세포를 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (30,000 세포 / 웰)에 파종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 세포 주기 억류를 유도하기 위하여, ReNcellCX® 세포를 TGF- β 1으로 4 일 동안 처리하였다. 그 후 배지를 교체하고 TGF- β 1 (10 ng/ml)을 새로이 첨가하였다. 8 일차에서 배지를 한 번 더 교체하고, 96 시간 동안 TGF- β 1 (10 ng/ml)과의 조합으로 Ref. 1 (10 μ M), 시퀀스 동정 번호 218b (10 μ M)를 첨가하는 것에 의하여 김노틱 전달을 수행하였다. 배양 후 PBS로 2회 세척하는 것에 의하여 세포를 수확하였다. RNA 단리 후 기술된 바와 같이 실시간 RT-PCR로 mRNA 분석을 수행하였다.

[1544] 12.1.1 인간 신경 전구체 세포 중에서의 TGF- β 1에 의한 세포 주기 억류의 매개

[1545] 줄기 세포 침묵 증진 마커의 검출은 TGF- β 1이 세포의 노출 7 일 후 세포 주기 억류를 매개한다는 것을 나타내었다. 증식 마커 Ki67 mRNA 발현은 투여량-의존적으로 감소되었다. 또한 종양 억제 유전자 p53이 TGF- β 1 농도에 대응하여 하향조절되었다. 대조적으로, 사이클린-의존성 키나아제 억제제 1 (p21)은 TGF- β 1에 의하여 유의미하게 상향조절되었다. 요약하면 이러한 결과들은 줄기 세포 침묵이 TGF- β 1에 의하여 유도되었다는 것을 나타내고 있다. 흥미롭게도, 신경 생성에 대한 마커인 DCX는 TGF- β 1에 의하여 강하게 감소되었다 (표 41).

[1546] **표 41: ReNcell CX® 세포 중에서의 TGF- β 1 처리 7 일 후 Ki67, p27, p21 및 DCX의 mRNA 발현.**

[1547] 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, E = TGF- β 1. $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple post hoc 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	ReNcell CX			
	TGF-β1 노출 7 일 후 mRNA 수준			
표적	Ki67 n = 3	p53 n = 3	p21 n = 3	DCX n = 3
A + EGF/FGF	1.00 ± 0.38	1.00 ± 0.38	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.49
E 10 ng/ml + EGF/FGF	0.67 ± 0.20	0.66 ± 0.18	1.90* ± 0.22	0.37 ± 0.06
E 50 ng/ml + EGF/FGF	0.43 ± 0.09	0.42 ± 0.06	1.45 ± 0.16	0.16 ± 0.01
A - EGF/FGF	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.31
E 10 ng/ml - EGF/FGF	0.87 ± 0.08	0.97 ± 0.10	1.00 ± 0.04	0.72 ± 0.14
E 50 ng/ml - EGF/FGF	0.93 ± 0.11	0.93 ± 0.09	0.90 ± 0.09	0.71 ± 0.24

결론

ReNcell CX® 세포의 증식이 TGF-β1에 의하여 차단되었다.

12.1.2 인간 신경 줄기 세포의 마커에 대한 안티센스-올리고뉴클레오타이드 영향의 결과

줄기 세포 마커에 대한 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 영향을 밝히기 위하여, ReNcell CX® 중에서의 반복된 김노틱 전달 (2 x 96 h) 8 일 후, 초기 신경 전구체 세포의 서로 다른 마커가 시험되었다 (표 42). Nestin 및 Sox2의 유전자 발현 수준은 ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의하여 영향을 받지 않았다. 10 μM ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 후 GFAP mRNA가 약간 상향조절되었으나 대조적으로, DCX가 명백하게 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 섭취 후 명백하게 유도되었다. 모든 시험된 마커의 발현은 TGF-β1 처리 (8일) 후 강하게 감소되었다 (표 42, 도 19).

표 42: ReNcell CX® 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 8일 후 Nestin, Sox2, GFAP 및 DCX의 mRNA 발현. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF-β1. ± = 표준오차, C 2.5 μM와 관련하여 *p < 0.05, C 10 μM와 관련하여 #p < 0.05. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	ReNcell CX			
	김노틱 전달 또는 TGF-β1 노출 8 일 후 mRNA 수준			
표적	Nestin n = 4	Sox2 n = 4	GFAP n = 4	DCX n = 4
A	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.32
B 2.5 μM	0.97 ± 0.32	0.88 ± 0.33	0.78 ± 0.13	1.31 ± 0.42
B 10 μM	0.89 ± 0.16	0.79 ± 0.13	1.02 ± 0.20	1.44 ± 0.48
C 2.5 μM	1.09 ± 0.21	0.93 ± 0.09	0.99 ± 0.14	1.67 ± 0.46
C 10 μM	0.90 ± 0.09	0.89 ± 0.11	1.21 ± 0.11	1.95 ± 0.37
E 10 ng/ml	0.48 ± 0.12	0.32 ± 0.06	0.41# ± 0.13	0.05+ ± 0.01

결론:

mRNA 분석에 대한 결과들은 ASO 시퀀스 동정 번호 218b가 ReNcell CX® 세포를 심지어 보다 더 줄기 세포 유사 상태의 방향으로 안내한다는 것을 나타내고 있다 (GFAP 상향조절). 게다가, DCX의 유도는 상승된 신경 생성을 나타내고 있다. TGF-β1 처리는 반대 방향의 결과를 야기한다.

12.1.3 인간 신경 줄기 세포의 증식에 대한 안티센스-올리고뉴클레오타이드 영향의 결과

추가적 분석을 수행하여 반복된 김노틱 전달 (3 x 72 시간) 9일 후 세포를 계수하고 김노틱 섭취 (2 x 96 시간) 8일 후 Ki67 단백질 수준의 결정에 의하여 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달이 실제로 증식 속도에 대하여 영향을 갖는 지의 여부를 조사하였다.

결과

[1560] 세포의 면역화학 염색에서 관측된 증식 마커 Ki67의 증가된 단백질 발현에 따라 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 섭취 후 세포 수가 증가되었다 (표 43, 도 20). 면역세포화학 염색의 형광 분석은 또한 TGF- β 1에 의해 매개되는 증식 중단을 나타내었다.

[1561] **표 43: ReNcell CX® 세포의 반복된 김노틱 전달 (3 x 72 시간) 9일 후의 증가된 세포 수.** 제조업자의 지시에 따라 Luna FL™ Automated Cell Counter Fluorescence and Bright Field (Biozym, #872040)를 사용하여 세포 수를 결정하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, $\pm$ = 표준오차.

세포주	ReNcell CX	
세포 수	생존 세포 $\times 10^5$, n = 2	사멸 세포 $\times 10^5$, n = 2
A	3.34 ± 0.09	0.51 ± 0.05
B 2.5 μ M	4.34 ± 0.56	0.60 ± 0.09
B 10 μ M	4.36 ± 0.96	0.58 ± 0.09
C 2.5 μ M	4.63 ± 1.28	0.47 ± 0.02
C 10 μ M	5.24 ± 0.42	0.37 ± 0.02

[1562]

[1563] 결론

[1564] ReNcell CX® 세포 중에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달은 향상된 Ki67 단백질 발현과 평행하게 증가된 세포 수의 결과를 가져와 함께 증가된 신경 전구체 증식을 나타내었다.

[1565] **12.1.3 인간 신경 줄기 세포의 분화능에 대한 안티센스-올리고뉴클레오타이드 영향의 결과**

[1566] 세포의 분화능에 대한 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 영향을 배제하기 위하여, 증식 조건 (+ EGF/FGF) 하에서 96 시간 동안 김노틱 섭취에 의하여 ASO 시퀀스 동정 번호 218b를 세포로 전달하였다. 배양 시간 후, 배지를 교체 하고 세포의 한 부분에는 증식성 배지(proliferative medium)를 첨가한 반면에 세포의 다른 부분에는 분화 배지(differentiating medium) (- EGF/FGF)를 첨가하였다. 그 후, 96 시간 동안 다른 김노틱 전달을 수행하였다. 신경 마커 신경 세사 N (NeuN) 및 β III-튜불린의 발현 수준으로 세포를 분석하였다.

[1567] 결과

[1568] NeuN (도 23a) 및 β III-튜불린 (도 23b)에 대한 면역화학 염색은 증식 조건 하에서의 김노틱 ASO 전달에 후속 하여 분화 조건 하에서의 김노틱 전달 후 분화능에 대하여 영향이 없음을 입증하고 있다. 인간 신경 특이적 단백질인 β III-튜불린은 분화 조건 하에서 ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의하여 영향을 받지 않았고 미처리 대조에 필적하였다. 또한 NeuN 발현은 분화 조건 하에서 김노틱 전달 후 영향을 받지 않았다. 따라서, 세포는 여전히 신경 세포로 분화될 수 있다. 놀랍게도, ReNcell CX® 세포는 두 기간 동안 증식 조건 (2 x 96 시간) 하에서 ASO의 김노틱 전달 후 신경 마커 NeuN 및 β III-튜불린을 발현하여 ASO의 김노틱 전달이 증식 조건 하에서조차도 신경의 분화로의 특이적인 이동을 촉진할 수 있다는 것을 나타내고 있다. 게다가, 신경 전구체 세포의 상승된 증식 속도가 관측되었다 (표 43, 도 20). 추가로, NeuN에 대한 염색은 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로 처리된 세포가 모든 다른 처리에 비하여 더 생존가능한 것으로 보인다는 것을 나타내었다 (도 21a). 명백하게도, TGF- β 1으로 처리된 세포는 유의미하게 덜 증식적이었다.

[1569] 결론

[1570] 분화능은 본 발명의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의하여 영향을 받지 않았다. 흥미롭게도, ReNcell CX® 세포는 증식 및 분화 조건들 하에서 김노틱 전달 이후 신경으로의 분화를 나타내었다. 이는 증가된 증식 속도의 관측과 같은 상황에서 본 발명의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b가 증가된 신경 분화 쪽으로의 경향으로 신경 생성을 촉진한다는 것을 나타내고 있다.

[1571] **12.1.4 TGF- β 1 사전-배양 후 인간 신경 줄기 세포의 증식에 대한 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 결과**

[1572] ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달이 ReNcell CX® 세포에 대한 TGF- β 1 매개 영향을 가역함에 있어서 효율적인 지의 여부를 분석하기 위하여, 7 일 동안의 TGF- β 1 사전-배양에 후속하는 8 일 동안의 김노틱 전달 (2 x 96 시간)에 의하여 추가의 시험이 수행되었다.

[1573] 결과

[1574] 초기 신경 마커로서의 GFAP (표 44, 도 22a), 증식에 대한 마커로서의 Ki67 (표 44, 도 22b) 및 신경 생성에 대한 마커로서 DCX (표 44, 도 22c)의 유전자 발현이 단일의 ASO 처리 이후 상승된 반면에 TGF-β1은 반대의 결과를 가져왔다. 게다가, TGF-β1 사전-배양 7 일 후, 본 발명의 ASO 처리는 TGF-β1-유도 영향을 역전시켰다. 따라서 분석은 ASO 시퀀스 동정 번호 218b가 줄기 세포 및 증식 마커에 대한 TGF-β1 매개 영향을 강력하게 회복한다는 것을 입증하고 있다.

[1575] **표 44: ReNcell CX® 세포 중에서의 TGF-β1 사전-배양 7 일 후 시퀀스 동정 번호 218b의 2 x 96 시간 김노틱 전달 후의 GFAP, Ki67 및 DCX의 mRNA 발현.** 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가 보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF-β1. ± = 표준오차, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	ReNcell CX		
	TGF-β1 사전-배양 7 일 후 2 x 96 시간 김노틱 전달 후의 mRNA 수준		
표적	GFAP n = 2	Ki67 n = 1	DCX n = 2
A	1.00 ± 0.20	1.00	1.00 ± 0.16
B 10 μM	1.62 ± 0.15	0.91	1.52 ± 0.24
C 10 μM	2.23 ± 0.52	1.52	4.82 ± 1.15
E 10 ng/ml	0.76 ± 0.01	0.48	0.68 ± 0.03
E 10 ng/ml + B 10 μM	0.58 ± 0.07	0.61	0.83 ± 0.10
E 10 ng/ml + C 10 μM	2.04 ± 1.04	7.40	1.55 ± 0.24

[1576]

[1577] 결론

[1578] 결과는 성인 신경 생성이 본 발명의 TGF-β 신호의 TGF-R_{II} 특이적 ASO-매개 차단에 의하여 재활성화될 수 있다는 것을 나타내고 있다. 종합해보면, TGF-R_{II} 특이적 ASO 시퀀스 동정 번호 218b는 TGF-β 매개 줄기 세포 침묵으로부터 세포를 구출하고 분화에 대한 영향을 수반함이 없이 성인 신경 생성을 촉진한다. 이는 뇌 손상에 대한 이상적인 약물 치료를 가능하게 한다.

[1579] **실시예 13: 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 SOD1 마우스에서의 ALS의 질환 진전 치료 활성의 결정**

[1580] 근위축성 측삭경화증 (ALS)에 대한 약물로서의 ASO의 치료 잠재력을 분석하기 위하여 수컷 및 암컷 형질전환 SOD1 G93A 마우스를 서로 다른 투여량의 본 발명의 ASO를 뇌실내(icv) 투여로 삼투압 ALZET® 미니펌프를 통하여 측뇌실 내로 처리하였다. 게다가, 대조로서 릴루졸(riluzole)이 사용되었다. 릴루졸은 근위축성 측삭경화증을 치료하는 데 사용되는 약물이고 Sanofi Pharmaceuticals에 의해 판매되고 있다. 이는 선택된 환자에서의 인공호흡기- 의존성(ventilator-dependence) 또는 기관절개술(tracheostomy)의 발병을 지연시키고 대략 2 내지 3 개월로 생존을 증가시킬 수 있다.

[1581] 방법의 설명:

[1582] 장기 중심 주입을 위하여 ALZET® 삼투압 미니펌프 (주입 속도: 0.25 μl/시간, Alzet®, Model 2004, Cupertino, USA)에 부착된 뇌실내 캐뉼러를 이소플루레인 마취(isoflurane anesthesia) (Baxter, GmbH, Germany) 및 반-멸균 조건 하에서 주축적으로 이식하였다. 각 삼투압 미니펌프를 피하로 복부 영역 내에 이식하고 마우스의 목에서의 1 cm 길이 피부 절개를 통하여 실리콘 튜브로 뇌실내 캐뉼러에 연결시켰다. 동물을 입체공간틀(stereotaxic frame) 내에 위치시키고, 뇌실내 캐뉼러 (23G, 3 mm 길이)를 우측뇌실 (정수리점(bregma))에 대하여 후위 0.3 mm, 측위 1 mm, 심도 3 mm)내로 늘어뜨렸다. 캐뉼러를 치과용 시멘트 (Kallocryl, Speiko® Dr. Speier GmbH, M?nster, Germany)를 사용하여 2개의 스테인레스강 나사로 고정시켰다. 목의 피부를 봉합사로 봉합시켰다. 수술 동안, 체온을 전기 담요로 유지시켰다. 수술-후 감염을 피하기 위하여, 마우스를 국소적으로 betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Germany)로 처리하고 0.1 ml 항생제 (피하, Baytril® 2.5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany)를 수령하였다. 튜브를 개개 용액으로 채웠다. ALS의 발달 및 진전에 대한 ASO의 영향을 결정하기 위하여, 증후군의 발병, 부전마비 및 생존을 생체 내 종말점으로서 사용하였다. 9주령에

서, 마우스를 희생시키고 신경병리학적 분석을 위하여 뇌를 제거하였다. 40- μ m 두정의 cresyl violet-염색 뇌 영역에서 뇌실내 이식 자리의 조직학적 확인(histological verification)을 수행하였다.

[1583] 본 발명의 ASO는 시험관 내 실험에서 잠재적인 효과를 발휘한다. 상당한 일치로, 시퀀스 동정 번호 143aj, 시퀀스 동정 번호 143h 및 시퀀스 동정 번호 210q를 수반하는 로덴트 교차-반응성의 본 발명의 ASO들이 또한 상기 실험들에서 효과적이어서 ALS 모델 동물의 치료에서의 효과를 증명하고 있다. 교차-반응성이 없음을 입증하는 본 발명의 ASO들은 시험관 내 실험에서 보다 강력한 잠재적인 효과를 발휘한다. 그 결과, 이러한 본 발명의 ASO들은 또한 비-인간의 영장류 및 인간에 대한 생체 내 설정에서 보다 효과적이고 따라서 신경 줄기 세포 및 전구체 증식의 TGF- β 1 유도 억제를 방지하거나 치료하고 그에 의하여 ALS 및 다른 신경퇴화성 질환을 치료하기 위한 고도로 강력한 약물로서 작용한다는 것이 가정된다.

[1584] **실시예 14: R6/2 마우스에서의 질환 발달 및 헌팅턴병의 진전에 대한 TGF- R_{II} 로 지향되는 안티센스-신규 ASO의 치료 활성의 결정**

[1585] 헌팅턴병 (HD)에 대한 약물로서의 ASO의 치료 잠재력을 분석하기 위하여, 수컷 및 암컷 형질전환 R6/2 마우스를 서로 다른 투여량의 본 발명의 TGF- R_{II} 특이적 ASO로 뇌실내 투여로 삼투압 ALZET® 미니펌프를 통하여 측뇌실 내로 처리하였다.

[1586] **방법의 설명:** 지속적인 중추 주입을 위하여, 마우스에 5주령에서 Alzet® 삼투압 미니펌프 (주입 속도: 0.25 μ l/시간, Alzet®, Model 2004, Cupertino, USA)에 부착된 뇌실내 캐뉼러를 위한 수술을 진행하였다. 케타민/자일라진 마취(ketamine/xylacin anesthesia) (Baxter, GmbH, Germany) 및 반-멸균 조건 하에서 캐뉼러 및 펌프를 주축적으로 이식하였다. 각 삼투압 미니펌프를 피하로 복부 영역 내에 이식하고 마우스의 목에서의 1 cm 길이 피부 절개를 통하여 실리콘 튜브로 뇌실내 캐뉼러에 연결시켰다. 동물을 입체공간틀 내에 위치시키고, 뇌실내 캐뉼러 (23G, 3 mm 길이)를 우측뇌실 (정수리점에 대하여 후위 0.3 mm, 측위 1 mm, 심도 3 mm)내로 늘어뜨렸다. 캐뉼러를 치과용 시멘트 (Kallocryl, Speiko® Dr. Speier GmbH, Muenster, Germany)를 사용하여 2개의 스테인레스강 나사로 고정시켰다. 목의 피부를 봉합사로 봉합시켰다. 수술 동안, 체온을 전기 담요로 유지시켰다. 수술-후 감염을 피하기 위하여, 마우스를 국소적으로 betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Germany)로 처리하고 0.1 ml 항생제 (피하, Baytril® 2.5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany)를 수령하였다. 튜브를 개개 용액으로 채웠다. HD의 발달 및 진전에 대한 ASO의 영향을 결정하기 위하여, 증후군의 발병, 파지강도, 종합적인 운동 및 생존을 생체 내 종말점으로서 사용하였다. 9주령에서, 마우스를 희생시키고 조직학적 분석을 위하여 뇌를 제거하였다. 40- μ m 두정의 cresyl violet-염색 뇌 영역에서 뇌실내 이식 자리의 조직학적 확인을 수행하였다.

[1587] 본 발명의 ASO는 시험관 내 실험에서 잠재적인 효과를 발휘한다. 상당한 일치로, 시퀀스 동정 번호 143aj, 시퀀스 동정 번호 143h 및 시퀀스 동정 번호 210q를 수반하는 로덴트 교차-반응성의 본 발명의 ASO들이 또한 상기 실험들에서 효과적이어서 헌팅턴병 모델 동물의 치료에서의 효과를 증명하고 있다. 교차-반응성이 없음을 입증하는 본 발명의 ASO들은 시험관 내 실험에서 보다 강력한 효과를 발휘한다. 그 결과, 이러한 본 발명의 ASO들은 또한 비-인간의 영장류 및 인간에 대한 생체 내 설정에서 보다 효과적이고 따라서 신경 줄기 세포 및 전구체 증식의 TGF- β 1 유도 억제를 방지하거나 치료하고 그에 의하여 HD 및 다른 신경퇴화성 질환을 치료하기 위한 고도로 강력한 약물로서 작용한다는 것이 가정된다.

[1588] **실시예 15: Fischer-344 랫트 내에서의 TGF- β 유도 수두증 및 연관 인지 부족의 질환 진전에 대한 본 발명의 ASO의 치료 활성의 결정**

[1589] 본 시험의 목표는 투여량-의존적인 방법으로 본 발명의 ASO의 뇌실내 주입에 의하여 i) 신경 줄기 세포 증식 및 신경 생성, ii) 수두증의 형성 및 iii) 공간 학습 부족에 대하여 TGF β 유도 영향으로 고통받는 동물을 치료하는 것이다.

[1590] **방법의 설명:** 뇌실내 주입을 위한 삼투압 미니펌프가 180 내지 200 g 체중의 암컷 Fischer-344 랫트 내로 이식되었다 ($n_{\text{총수}} = 70$, $n_{\text{군}} = 10$). Alzet® 삼투압 펌프 2004를 사용하여 0.25 μ l/시간의 유속으로 14 일 동안 대조로서 a) 인공 뇌척수액 (aCSF: 148.0 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 1.4 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgCl_2 , 1.5 mM Na_2HPO_4 , 0.2 mM NaH_2PO_4 , 100 μ g/ml 랫트 혈청 알부민, 50 μ g/ml 겐타마이신, pH 7.4) 또는 b) TGF- β 1 1 μ g/ml가 주입되었다. 14 일 후 펌프를 교환하고 하기 주입물들에 대하여 Alzet® 삼투압 펌프 2004 (유속 0.25 μ l/시간)가 사용되었다: 변화하는 농도의 TGF- R_{II} ASO (1.1 mmol/l, 3.28 mmol/l, 9.84 mmol/l) 또는 뒤섞인 ASO (3.28

mmol/ℓ)와의 조합으로 aCSF 또는 TGF-β1 (1 μg/ml)이 주입되었다 (2 x 4 주). 주입 기간의 마지막 4 일 동안, 동물은 매일 BrdU (50 mg/kg의 체중)의 복강내 주사를 수령하여 증식하는 세포를 표지시켰다. 펌프를 제거하고, 2 주 후 동물을 공간 학습 시험(Morris-Water-Maze)에서 14 일 동안 기능적으로 분석하였다. 1 일 후, 동물을 0.9% NaCl로 관류시키고, 뇌를 제거하고, PCNA, BrdU, DCX, BrdU/NeuN 및 BrdU/GFAP에 대한 정량적 조직학적 분석을 위하여 그리고 수두증에 대한 측정으로서 측뇌실의 용적의 입체논리적 분석을 위하여 동측 반구 (ipsilateral hemisphere)를 4% 파라포름알데히드 내에 후고정시켰다. 대측 반구(contralateral hemisphere)를 추가로 절개하고 정량적 RT-PCR을 위하여 서로 다른 영역 (뇌실 벽, 해마, 피질)을 가공하여 TGF-R_{II} 발현 수준을 분석하였다. 펌프 이식 4 일 전, 펌프 이식 1 주 후에, 제1 펌프 교체일에 그리고 그때부터 주입 기간의 종결까지 매 2 주 마다 그룹 1, 그룹 3 및 그룹 6의 4개체의 동물의 자기공명(MR) 영상을 취하였다. 40-μm 두정의 cresyl violet-염색 뇌 절편에서 icv 이식 자리의 조직학적 확진을 수행하였다.

표 46: 수두증 실험의 처리 계획 및 그룹 분류.

그룹	1.aCSF	2.aCSF+ ASO	3. TGF- β1	4. TGF-β1+ 뒤섞인-ASO	5.-7. TGF-β1+ ASO
처리	aCSF-주입	aCSF + ASO 주입	TGF-β1- 주입	TGF-β1 + ASO 주입	TGF-β1 + ASO 주입
처리계획	1 내지 10 주	1 주 및 2 주: aCSF 3 주 내지 10 주: ASO: 3.28 mmol/l	1 주 및 2 주: 1 μg/ml 3 주 내지 10 주: 1 μg/ml	1 주 및 2 주: TGF-β1: 1 μg/ml 3 주 내지 10 주: TGF-β1: 1 μg/ml scramb.-ASO: 3.28 mmol/l	1 주 및 2 주: TGF-β1: 1 μg/ml 3 주 내지 10 주: TGF-β1: 1 μg/ml ASO: 1.1 mmol/l 3.28 mmol/l 9.84 mmol/l
N	10	10	10	10	투여량 당 10
n-총수	10	10	10	10	30

본 발명의 ASO는 시험관 내 실험에서 잠재적인 효과를 발휘한다. 상당한 일치로, 시퀀스 동정 번호 143aj, 시퀀스 동정 번호 143h 및 시퀀스 동정 번호 210q를 수반하는 로텐트 교차-반응성의 본 발명의 ASO들이 또한 상기 실험들에서 효과적이어서 수두증 모델 동물의 치료에서의 효과를 증명하고 있다. 교차-반응성이 없음을 입증하는 본 발명의 ASO들은 시험관 내 실험에서 보다 강력한 효과를 발휘한다. 그 결과, 이러한 본 발명의 ASO들은 또한 비-인간의 영장류 및 인간에 대한 생체 내 설정에서 보다 효과적이고 따라서 신경 줄기 세포 및 전구체 증식의 TGF-β1 유도 억제제를 방지하거나 치료하고 그에 의하여 수두증 및 다른 신경퇴화성 질환을 치료하기 위한 고도로 강력한 약물로서 작용한다는 것이 가정된다.

실시예 16: Fischer 344 랫트에서의 척수 손상의 재활 치료에 대한 TGF-R_{II}로 지향되는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 치료 활성의 결정

척수 손상 (SCI)에 대한 약물로서의 ASO의 치료 잠재력을 분석하기 위하여, 수컷 및 암컷 Fischer-344 랫트를 서로 다른 투여량의 본 발명의 ASO를 삼투압 미니펌프를 통하여 뇌실내 투여로 측뇌실 내로 처리하였다.

방법의 설명: C3 수준으로의 경부 텅스텐 와이어 나이프 후주 완전 절단(cervical tungsten wire knife dorsal column transection)으로 SCI를 모의실험하였다. 다음 단계에서, 지속적인 중추 주입을 위하여, 랫트 (180 내지 200 g 체중)에 Alzet® 삼투압 미니펌프 (주입 속도: 0.25 μℓ/시간, Alzet®, Model 2004, Cupertino, USA)에 부착된 뇌실내 캐놀러를 위한 수술을 진행하였다. 케타민/자일라진 마취 (Baxter, GmbH, Germany) 및 반-멸균 조건 하에서 캐놀러 및 펌프를 주축적으로 이식하였다. 각 삼투압 미니펌프를 피하로 복부 영역 내에 이식하고 랫트의 목에서의 1 cm 길이 피부 절개를 통하여 실리콘 튜브로 뇌실내 캐놀러에 연결시켰다. 동물을 입체공간틀 내에 위치시키고, 뇌실내 캐놀러 (23G, 3 mm 길이)를 우측뇌실 (정수리점에 대하여 후위 1.0 mm, 측위 1.0 mm, 심도 1.8 mm)내로 늘어뜨렸다. 캐놀러를 치과용 시멘트 (Kallocryl, Speiko®-Dr. Speier GmbH, Muenster, Germany)를 사용하여 2개의 스테인레스강 나사로 고정시켰다. 목의 피부를 봉합사로 봉합시켰다. 수술 동안, 체온을 전기 담요로 유지시켰다. 수술-후 감염을 피하기 위하여, 랫트를 국소적으로 betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Germany)로 처리하고 0.5 ml 항생제 (피하, Baytril® 2.5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany)를 수령하였다. 튜브를 개개 용액으로 채웠다. SCI 후의 재활과정에 대한 ASO의 영향을 결정하기 위하여, 수술 4 주 후 생체내 자기공명영상(MRI) 구조 분석을 수행하였다 (3T MRI, Allegra Siemens, phased array - small animal coil). 수술 6 주 후, 마우스를 희생시키고 조직학적 분석 및 면역조직화학 분석을 위하여 뇌를

제거하였다. 40- μ m 두정의 cresyl violet-염색 뇌 영역에서 뇌실내 이식 자리의 조직학적 확진을 수행하였다.

[1597] 본 발명의 ASO는 시험관 내 실험에서 잠재적인 효과를 발휘한다. 상당한 일치로, 시퀀스 동정 번호 143aj, 시퀀스 동정 번호 143h 및 시퀀스 동정 번호 210q를 수반하는 로텐트 교차-반응성의 본 발명의 ASO들이 또한 상기 실험들에서 효과적이어서 Fischer-344 - 랫트 척수 대마비 모델의 치료에서의 효과를 증명하고 있다. MRI 영상 및 신경병리학적 분석에서, 본 발명의 ASO들이 높은 치료 효능을 나타내었다. 교차-반응성이 없음을 입증하는 본 발명의 ASO들은 시험관 내 실험에서 보다 강력한 잠재적인 효과를 발휘한다. 그 결과, 이러한 본 발명의 ASO들은 또한 비-인간의 영장류 및 인간에 대한 생체 내 설정에서 보다 효과적이고 따라서 신경 줄기 세포 및 전구체 증식의 TGF- β 1 유도 억제를 방지하거나 치료하고 그에 의하여 척수손상 및 다른 신경퇴화성 질환을 치료하기 위한 고도로 강력한 약물로서 작용한다는 것이 가정된다.

[1598] **실시예 17: 인간 폐암 세포주 A549의 증식에 대한 ASO-매개 효과.**

[1599] 여러 종양 세포에서의 증식 마커로서 Ki67, p53, Caspase 8 (Casp8) 및 DNA-결합 단백질 억제자 2 (ID2: DNA-binding protein inhibitor 2)의 mRNA들이 분석되었다. 이전의 연구들에서 종양 억제 유전자 p53 및 ID2의 발현이 종종 종양 조직들 중에서 극적으로 상승된다는 것이 밝혀졌다. Ki67은 증식 마커이고 Casp8은 세포자멸사의 표지자이다. 게다가, 김노틱 전달 후 세포 수가 결정되었다.

[1600] 방법의 설명:

[1601] A549가 상기 기술된 바와 같이 배양되었다. 세포를 처리하기 위하여, 배지를 제거하고 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (30,000 세포 / 웰), 6-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.3920.300) (50,000 세포 / 웰) 또는 8-x-웰 세포 배양 슬라이드 접시 (Sarstedt #94.6140.802) (20,000 세포 / 웰) (24-웰 및 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시에 대하여는 0.5 ml 그리고 6-웰 접시에 대하여는 1 ml) 중에서 신생 전 배지로 교환하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. mRNA 발현 및 증식에 대한 영향을 분석하기 위하여, 세포를 Ref. 1 (뒤섞인 대조) 및 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로 2.5 μ M 및 10 μ M의 농도로 처리하고 72 시간 동안 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 배지 교환을 포함하여 처리를 매 72 시간 3회 반복하였다 (총 12일). 증식 (Ki67)의 면역세포화학 분석을 위하여, ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달을 72 시간까지로 제한하였다. 그 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 단백질 단리 (6-웰 접시), 면역세포화학 (8-웰 세포 배양 슬라이드 접시 중의), 증식 곡선 및 RNA 단리 (24-웰 접시)를 위하여 사용하였다. RNA, 단백질 및 면역세포화학에 대한 프로토콜이 상기 기술된 바와 같이 수행되었다. 증식 곡선에 대하여는, 세포 수를 결정하기 위하여 24-웰 접시로부터 잔여 세포를 수확하였다. 이러한 목적을 위하여, 잔여 세포를 PBS (2x)로 세척하고, accutase (500 μ l/ 웰)로 처리하고 7 분 동안 37 °C에서 배양하였다. 그 후 500 μ l 배지를 첨가하고 세포 수를 제조업자의 지시에 따라 Luna FL™ Automated Cell Counter Fluorescence and Bright Field (Biozym, #872040)를 사용하여 결정하였다. 요약하면, 18 μ l의 세포 현탁액을 2 μ l의 아크리딘 오렌지/프로피디움이오다이드 분석 생존도 키트 (Biozym #872045)에 첨가하였다. 침강 1 분 후, 10 μ l를 Cell Counting Slide (Biozym # 872011) 상으로 첨가하였다. 세포를 계수하고 생존 세포와 사멸 세포를 구분하여 산출하였다.

[1602] **17.1 ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 대한 결과**

[1603] mRNA 분석은 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 감소된 Ki67, p53 및 ID2 발현 수준을 나타내었다. 대조적으로, Casp8은 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 낮은 수준으로 상승되었다 (표 46). 이러한 관측은 감소된 종양 성장이 세포자멸사 세포에서의 약간의 증가와 연관된다는 것을 나타내고 있다. 더욱이, 웨스턴 블롯 분석은 본 발명의 ASO의 김노틱 전달 12 일 후 Ki67 및 pAkt의 단백질 수준에서의 감소를 나타내었다 (표 47). ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 후 A549 세포의 면역화학 검사는 적용된 두 농도들에 대하여 뒤섞인 대조에 비하여 Ki67 신호의 감소된 수준을 나타내었다 (도 23). 마지막으로, A549 세포의 세포 수는 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 약 50 %에 근접하게 감소되었다 (표 48).

[1604] **표 46: A549 세포 중에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 Ki67, p53, Casp8 및 ID2의 mRNA 발현.** 검사된 유전자의 조절은 본 발명의 ASO들의 김노틱 전달 후 감소된 증식 속도를 입증하고 있다. 감소된 ID2 mRNA 수준은 종양 세포의 확장을 약화시키는 데 이롭다. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, $\pm$ = 표준오차, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple post hoc 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	A549			
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 mRNA 수준			
표적	Ki67 n = 2	p53 n = 2	Casp8 n = 2	ID2 n = 2
A	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.31	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.03
B 2.5 μM	0.92 ± 0.05	1.06 ± 0.02	1.36 ± 0.37	0.73 ± 0.01
B 10 μM	0.96 ± 0.03	1.11 ± 0.92	1.52 ± 0.15	0.82 ± 0.15
C 2.5 μM	0.55 ± 0.33	0.27 ± 0.04	1.59 ± 0.48	0.59 ± 0.01
C 10 μM	0.57 ± 0.20	0.53 ± 0.07	0.98 ± 0.17	0.35 ± 0.02

표 47: Ki67 및 pAkt 웨스턴 블롯의 비중 분석. TGF-RII 특이적 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 12 일 후 Ki67 및 pAkt 단백질의 하향조절이 A549에서 관측되었다. Image Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가보관 유전자 GAPDH에 대한 단백질 수준을 결정하고 계속해서 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, ± = 표준오차.

세포주	A549	
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 단백질 수준	
표적	Ki67 n = 1	pAKT n = 1
A	1.00	1.00
B 10 μM	1.18	0.80
C 10 μM	0.57	0.39

표 48: 반복된 김노틱 전달 12 일 후 세포 수. 제조업자의 지시에 따라 Luna FL™ Automated Cell Counter Fluorescence and Bright Field (Biozym, #872040)를 사용하여 A549 세포의 반복된 김노틱 전달 (4 x 72 시간) 12 일 후 세포 수를 결정하였다. A = 미처리 대조, C = 시퀀스 동정 번호 218b, ± = 표준오차.

세포주	A549	
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 세포 수	
세포 수	생존 세포 x 10 ⁵ n = 3	사멸 세포 x 10 ⁵ n = 3
A	4.25 ± 0.50	0.47 ± 0.09
B 10 μM	3.88 ± 0.95	0.31 ± 0.11
C 10 μM	2.35 ± 0.07	0.35 ± 0.16

결론

이러한 관측은 감소된 종양 성장이 세포자멸사세포에서의 증가와 연관된다는 것을 나타내고 있다. 뚜렷하게도, 종양에 있어서의 가능한 치료 표적 유전자인 ID2가 TGF-RII 특이적 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 후 감소되었다. 종합해보면, ASO 시퀀스 동정 번호 218b 증식 속도를 최소화하는 데 효과적이고 종양 촉진 유전자 발현을 감소시킨다.

실시예 18: 여러 종양 세포주의 증식에 대한 ASO 김노틱 전달의 영향

TGF-β 신호는 암 발달에서의 절대적인 경로이다. 한편으로는 TGF-β는 종양을 억제하는 작용을 하는 인자를 촉진하나 다른 한편으로는, 이러한 성장 인자는 세포 이동, 세포 침습, 세포 증식, 면역 조절의 자극을 야기하고 종양 세포의 진전 및 전이에 이로운 환경 재구성을 촉진한다. 따라서, TGF-β는 암 치료에 있어서 핵심 표적이다. 종양 세포에서의 증식 속도의 마커로서 본 발명의 ASO의 김노틱 섭취 후 증식 마커 (Ki67)의 mRNA 및 단백질 수준 그리고 세포 수가 결정되었다. 게다가, 종양 억제 유전자 p53 및 DNA-결합 단백질 억제자 2 (ID2)의

mRNA 수준이 검사되었다.

[1614] 방법의 설명

[1615] 여러 종양 세포주들이 상기 기술된 바와 같이 배양되었다 (표 10). 세포를 처리하기 위하여, 배지를 제거하고 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (30,000 세포 / 웰), 6-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.3920.300) (50,000 세포 / 웰) (24-웰 접시에 대하여는 0.5 ml 그리고 6-웰 접시에 대하여는 1 ml) 중에서 신생 전 배지로 교체하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 증식에 대한 mRNA 발현 및 영향을 분석하기 위하여, 세포를 2.5 μM 및 10 μM의 농도에서 Ref. 1 (뒤섞인 대조) 및 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로 처리하고 72 시간 동안 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 배지 교체를 포함하여 처리를 매 72 시간 3회 반복하였다 (총 12일). 수확을 위하여, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 RNA 단리 (24-웰 접시), 단백질 단리 (6-웰 접시) 또는 증식 곡선에 사용하였다. RNA 및 단백질 단리에 대한 프로토콜이 상기 기술된 바와 같이 수행되었다. 증식 곡선을 위한 세포 계수에 앞서, 광학 현미경 (Nikon, TS-100 F LED #MFA33500)을 사용하여 세포를 분석하였다. 계속해서 잔여 세포를 24-웰 접시로부터 수확하여 세포 수의 결정에 사용하였다. 이러한 목적을 위하여, 잔여 세포를 PBS (2x)로 세척하고, accutase (500 μl/ 웰)로 처리하고 5 내지 7 분 동안 37 °C에서 배양하였다. 그 후 500 μl 배지를 첨가하고 세포 수를 제조업자의 지시에 따라 Luna FL™ Automated Cell Counter Fluorescence and Bright Field (Biozym, #872040)를 사용하여 결정하였다. 요약하면, 18 μl의 세포 현탁액을 2 μl의 아크리딘 오렌지/프로피디움이오다이드 분석 생존도 키트 (Biozym #872045)에 첨가하였다. 침강 1 분 후, 10 μl를 Cell Counting Slide (Biozym # 872011) 상으로 첨가하였다. 세포를 계수하고 생존 세포와 사멸 세포를 구분하여 산출하였다.

[1616] **18.1 시퀀스 동정 번호 218b에 대한 결과**

[1617] 김노틱 전달 12 일 후, 사용된 ASO 농도에 독립적으로 (A549, L3.6pl, Panc-1) 또는 그에 종속적으로 (HT-29, Panc-1, CaCo2) Ki67 mRNA 수준이 효과적으로 감소되었다 (표 40). p53의 유전자 발현 수준이 또한 시험된 ASO에 의하여 A549, HT-29, K562, KG-1, CaCo2 및 TMK-1에서 영향을 받았다 (표 50). 감소된 Ki67 단백질 발현의 확진이 A549, L3.6pl, TMK-1, HT-29 및 K562에 대하여 나타났다 (표 51). 뚜렷하게도, ID2 mRNA 발현은 일정하게 효율적으로 그리고 투여량-의존적으로 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로 매개된 A549, HT-29, K562 및 TMK-1 세포에서 하향조절을 나타내었다 (표 51). 게다가, ASO 시퀀스 동정 번호 218b는 여러 종양 세포주의 감소된 증식 속도의 결과를 가져왔다 (표 53). 세포 수의 투여량-의존적인 감소가 HPAFII, MCF-7, KG1, K562, U937 및 HTZ-19 세포들에 대하여 인식되었다. 폐암 세포 (A549)는 ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의해 유도된 세포 수의 대략 50 % 감소를 나타내었다. 감소된 세포 수는 추가로 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 HPAFII, K562, MCF-7, Panc-1 및 HTZ-1에 대한 광학 현미경으로 확인되었다 (도 24).

[1618] 시퀀스 동정 번호 141d, 141g, 141i, 143r, 143w, 143af, 143ag, 143ah, 143j, 143p, 143q, 233d, 234d, 235b, 235d, 237b, 237c, 237i, 237m, 238c, 238f, 239e, 240c, 241b, 242a, 246e, 247d, 248b, 248e, 248g, 152k, 152s, 152t, 152u, 152ab, 152ag, 152ah, 152ai, 249c, 249e, 250b, 250g, 251c, 251f, 252e, 253c, 254b, 255a, 259e, 260d, 261b, 261e, 261g, 262d, 262e, 209s, 209v, 209w, 209x, 209ai, 209an, 209at, 209au, 209av, 210o, 210v, 210w, 210x, 210ab, 210ac, 210ad, 210af, 210am, 263b, 263c, 263i, 263m, 264e, 264h, 265e, 266c, 267b, 268a, 272e, 273d, 274a, 274d, 274f, 275g, 275i, 276b, 276c, 276j, 276k, 277d, 277e, 278f, 279c, 280b, 281a, 218ad, 218n, 218t, 218u, 218v, 218ah, 218an, 218ao, 218ap, 220d, 221d, 222b, 222c, 222f, 223c, 223f, 224i, 224m, 225c, 225f, 226e, 227c, 213o, 213p, 213q, 213s, 213y, 213z, 213aa, 213af, 228b, 229a, 285d, 286d, 287d, 287e, 287f, 288e, 288i, 289d, 289h, 289o, 289p, 289q, 290c, 290f, 290i, 291c, 292c, 293b 및 294a들의 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대하여 필적하는 결과들이 수득가능하였다. 상기-언급된 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 대부분은 시퀀스 동정 번호 218b 및 218c를 넘어 설 수는 없으나, 여전히 당해 기술분야의 안티센스-올리고뉴클레오타이드들 보다 훨씬 더 이로웠다. 따라서 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 암 및 종양 등과 같은 과증식 질환의 치료에 고도로 유용하다.

[1619] **표 49: 증식 마커 Ki67의 mRNA 발현.** A549, HT-29, L3.6pl, KG1, Panc-1 및 CaCo2 세포들 중에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후, Ki67 mRNA가 모든 세포주들에서 각각 감소되었다. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 수준이 결정되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, ± = 표준오차, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	Ki67					
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 mRNA 수준					
세포주	A549 n = 2	HT-29 n = 2	L3.6pl n = 2	KG1 n = 1	Panc-1 n = 1	CaCo2 n = 1
A	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.25	1.00	1.00	1.00
B 2.5 μM	0.92 ± 0.05	0.89 ± 0.46	0.93 ± 0.03	0.72	0.76	1.21
B 10 μM	0.96 ± 0.03	0.60 ± 0.11	0.96 ± 0.16	0.76	0.79	1.07
C 2.5 μM	0.55 ± 0.33	0.34 ± 0.11	0.42 ± 0.03	0.16	0.68	0.99
C 10 μM	0.57 ± 0.20	0.17 ± 0.02	0.64 ± 0.05	0.33	0.37	0.37

[1620]

[1621]

표 50: 중앙 억제자 p53의 mRNA 발현. A549, HT-29, K562, KG1, CaCo2 및 TMK-1 세포들 중에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후, p53 mRNA가 모든 세포주들에서 각각 감소되었다. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준이 결정되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	p53					
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 mRNA 수준					
세포주	A549 n = 2	HT-29 n = 1	K562 n = 1	KG1 n = 1	TMK-1 n = 1	CaCo2 n = 1
A	1.00 ± 0.31	1.00	1.00	1.00	1.00 ± 0.04	1.00
B 2.5 μM	1.06 ± 0.02	0.72	0.90	1.37	0.74 ± 0.11	0.82
B 10 μM	1.11 ± 0.92	0.68	1.35	0.87	0.71 ± 0.15	1.25
C 2.5 μM	0.27 ± 0.04	0.51	0.27	0.65	0.14* ± 0.14	0.99
C 10 μM	0.53 ± 0.07	0.32	0.46	0.67	0.21* ± 0.05	0.30

[1622]

[1623]

표 51: ID2의 mRNA 발현. A549, HT-29, K562 및 TMK-1 세포들에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후, ID2 mRNA는 모든 세포주들에서 각각 투여량-의존적으로 하향조절되었다. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준이 결정되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* multiple 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	ID2			
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후의 mRNA 수준			
세포주	A549 n = 2	HT-29 n = 1	K562 n = 1	TMK-1 n = 1
A	1.00 ± 0.03	1.00	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.23
B 2.5 μM	0.73 ± 0.01	0.93	0.97 ± 0.15	0.88 ± 0.15
B 10 μM	0.82 ± 0.15	1.00	0.82 ± 0.05	0.82 ± 0.05
C 2.5 μM	0.59 ± 0.01	0.31	0.70 ± 0.10	0.70 ± 0.10
C 10 μM	0.35 ± 0.02	0.25	0.29* ± 0.09	0.30* ± 0.09

[1624]

[1625]

표 52: Ki67 웨스턴 블릿의 비중 분석. ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 후 Ki67 단백질의 하향조절이 인식되었다. Image Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가보관 유전자 알파-튜불린에 대하여 단백질 수준이 결정되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	Ki67				
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후의 단백질 수준				
세포주	A549 n = 1	L3.6pl n = 2	TMK-1 n = 2	HT29 n = 2	K562 n = 1
A	1.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00
B 10 μM	1.18	0.59 ± 0.00	0.75 ± 0.00	1.19 ± 0.68	1.05
C 10 μM	0.57	0.19 ± 0.17	0.53 ± 0.26	0.69 ± 0.05	0.35

표 53: 반복된 김노틱 전달 (4 x 72 시간) 12 일 후 여러 암 세포주에서의 세포 수. ASO 시퀀스 동정 번호 218b를 여러 암 세포주에 전달하였다. 제조업자의 지시에 따라 Luna FL™ Automated Cell Counter Fluorescence and Bright Field (Biozym, #872040)를 사용하여 세포 수를 결정하였다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, a = 생존 세포, d = 사멸 세포. ± = 표준오차. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" *post hoc* 비교 시험을 사용하여 산출하였다.

처리														
세포주	A		B 2.5 μM		B 10 μM		C 2.5 μM		C 10 μM		p=			
	세포 수 x 10 ⁵													
	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	n	
A549	4.25	0.47			3.88	0.31			2.35	0.35			3	
	±	±			±	±			±	±				
HPAFI	0.50	0.09			0.95	0.11			0.07	0.16			2	
	±	±			±	±			±	±				
KG1	2.80	0.35	2.88	0.36	2.56	0.39	0.66	0.25	0.20	0.06			3	A 대 C 10 μM *p < 0.01
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±				B 2.5 μM 대 C 10 μM *p < 0.01
	0.33	0.11	2.04	0.06	0.45	0.06	0.47	0.07	0.09	0.02			3	C 10 μM 대 D 10 μM #p < 0.01
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±				A 대 C 10 μM *p < 0.01
K562	10.93	1.37	7.44	2.40	6.40	2.36	5.60	2.66	3.33	0.52*			3	A 대 C 10 μM *p < 0.01
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±				
MCF-7	1.58	0.40	1.05	0.62	0.38	0.30	0.06	0.41	0.54	0.07			1	
	6.73	2.37	6.51	1.57	6.51	3.35	5.21	1.64	2.47	0.73				
U937	26.43	7.04	14.5	2.88	17.67	2.36	11.34*	3.07	7.56*	2.25			3	A 대 C 2.5 μM *p < 0.01
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±				A 대 C 10 μM *p < 0.01
Panc-1	2.05	0.28	2.73	0.37	0.50	0.30	2.85	0.97	1.49	0.44			3	A 대 C 2.5 μM *p < 0.05
	2.16	0.11	1.82	0.15	2.98	0.16	1.16*	0.07	1.20*+	0.36				A 대 C 10 μM *p < 0.05
HTZ-19	0.08	0.02	0.36	0.04	0.27	0.02	0.51	0.02	0.23	0.02			3	B 10 μM 대 C 10 μM *p < 0.01
	2.06	3.05	2.57	1.78	2.55	1.22	1.78	0.88	1.17+	0.49			3	B 10 μM 대 C 10 μM *p < 0.05
	0.03	0.36	0.16	0.15	0.22	0.15	0.25	0.09	0.44	0.05				

결론

ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의한 Ki67, p53 및 ID2 mRNA의 조절은 여러 기관 중에서 그리고 서로 다른 기원에 대한 종양 확장을 약화시킴에 있어서 이로온 효과를 나타낸다. Ki67, ID2 및 p53은 상향조절되고 서로 다른 암 형태들에서 세포 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 증식 마커 Ki67, p53 및 ID2는 효율적으로 하향조절되었다. 김노틱 전달 12 일 후 여러 종양 세포들의 세포 계수 및 광학 현미경은 세포 증식을 감소시키기 위한 강력한 약제로서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b를 나타내었다.

종합해보면, TGF-R_{II} 특이적 ASO 시퀀스 동정 번호 218b는 인식된 Ki67, p53 및 ID2의 mRNA 조절과 평행하게 증식 속도를 효과적으로 감소시켰다. 이러한 데이터는 본 발명의 ASO가 종양 세포 진전 및 종양 세포의 전이를 약화시키기 위한 유망한 약물 후보라는 것을 암시한다.

실시예 19: 여러 종양 세포주들에서의 혈관 신생에 대한 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 영향의 분석

- [1633] 혈관 신생의 조절은 기관 성장 및 복구에 필수적이다. 혈관 성장에서의 불균형은 예를 들어 종양 성장, 허혈, 염증 및 면역 장애 등과 같은 서로 다른 질환에 기여한다. TGF- β 는 전-혈관신생 인자(pro-angiogenic factor)인 것으로 알려져 있다. 이는 초과량(overshooting) 혈관 신생이 질환 진전에 책임이 있는 경우, 이는 염증 및 신생물 진행에 가장 연관될 수 있다. 이러한 영향은 TGF- β 1 유도 섬유증과 연관될 수 있다. 따라서 TGF β 1 특이적 ASO에 의한 TGF- β 신호의 억제가 적절한 치료적 접근법을 대표할 수 있을 것이다.
- [1634] 이러한 가정을 시험하기 위하여, 이러한 ASO를 김노틱 섭취에 의하여 여러 종양 세포주에 전달하였다. 반복된 김노틱 전달 12 일 후, 복합 분석(multiplex analysis)에 의하여 전-혈관 신생 인자의 단백질 수준에 대하여 세포 상청액을 분석하였다. 이 기술은 전기-화학발광(electro-chemiluminescence)에 의한 복합 전-혈관 신생 단백질 (VEGF, Tie-2, Flt-1, PIGF 및 bFGF)의 조사를 허용한다. 혈관내피성장인자 (VEGF)는 혈관 신생을 촉진하고 그와 함께 예를 들어 종양 증식에 기여하는 강력한 종양 분비 사이토카인이다. Tie-2는 활발하게 성장하는 혈관 으로부터 발현되는 단백질이다. 또한 혈관내피성장인자 수용기 1 (VEGFR1)로도 알려진 Fms-유사 티로신 키나아 제 1 (Flt-1)은 혈관내피 세포에서 고도로 발현되는 막관통 티로신 수용기 키나아제이고 태반성장인자 (PIGF)는 VEGF와 함께 작용하고 병리학적 조건 하에서 예를 들어 종양 형성에서 상향조절된다. 게다가, 염기성 섬유모세 포성장인자 (bFGF)는 또한 혈관 신생을 유도하는 성장 인자이다. PAI-1은 TGF- β 의 표적 유전자이고 흉터 형성 및 TGF- β 의 혈관 신생 효과를 매개한다. 따라서, PAI-1은 또한 종양 침습 및 전이에 대한 핵심 인자를 입증한 다. 높은 PAI-1 농도 수준을 나타내는 환자는 예를 들어 유방암, 폐암, 결장암 및 위암에서 형편없는 진단 인자 로 고려된다. 높은 PAI-1 농도는 또한 혈전증이 일정한 역할 (예를 들어 심근경색증, 뇌졸중)을 하는 질환에 대 한 위험 인자이다. 따라서, TGF- β 특이적 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 PAI-1 mRNA 조절이 또한 시험되 었다.
- [1635] 방법의 설명:
- [1636] 종양 세포주들을 상기 기술된 바와 같이 배양하였다 (표 10). 세포를 처리하기 위하여, 배지를 제거하고 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (30,000 세포 / 웰) 중에서 신생 전 배지로 교환하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 다음 날, Ref. 1 (뒤섞인 대조) 및 ASO 시퀀스 동정 번호 218b를 (신생 배지에 2.5 및 10 μ M의 농도로 첨가하고 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 배지 교체를 포함하여 처리를 매 72 시간 3회 반 복하였다 (총 12일). 그 후 세포 상청액을 수집하고 MesoScale Discovery® 분석 (MSD Discovery)에 의하여 분 석하였다. 이 기술은 전기-화학발광에 의한 복합 전-혈관 신생 단백질 (VEGF, Tie-2, Flt-1, PIGF 및 bFGF)의 조사를 허용한다. 개개 성장 인자들에 대한 실험 성능 및 정보는 제조업자 지시 (MSD MesoScale Discovery®, #K15198G)로부터 추출하였다. 결과들을 GraphPad Prism® 6.0 소프트웨어로 평가하였다.
- [1637] 그 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 RNA 단리 (24-웰 접시)를 위하여 사용하여 실시간 RT-PCR에 의하여 ASO의 김노틱 전달이 Plasminogen Activator inhibitor-1 (PAI-1)의 mRNA 수준을 조절할 수 있는지의 여부를 분석하였다. 프로토콜 및 프라이머들은 앞서 기술된 바와 같이 사용되고 나열되었다.
- [1638] **19.1 시퀀스 동정 218b에 대한 결과**
- [1639] 표 54는 PAI-1 mRNA가 여러 시험된 암세포들 (A549: 폐암, HPAFII: 췌장 선암, HT-29: 결직장 선암종, HTZ-19: 흑색종, TMK-1: 위암종, THP-1: 단핵구성 백혈병)에서 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 반복된 김노틱 전달 후 투 여량-의존적인 방법으로 하향조절되었다는 것을 입증하고 있다. 게다가, 자극된 세포 상청액 중의 VEGF 단백질 수준은 또한 A549, HTZ-19, HPAFII 및 PC3M (전립선 선암종)에서의 투여량-의존적 감소를 나타내었다. HPAFII 및 PC3M 세포들에 대하여는 하향조절이 뚜렷하였다 (표 55). bFGF에 대한 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 영향은 ASO 시퀀스 동정 번호 218b가 혈관 신생을 억제하는 데 잠재성이라는 것을 의미하는 VEGF에 대한 관측을 확증하 였다 (표 56) A549 및 PC3M에서 결과들은 또한 bFGF의 유의미한 감소를 나타내었다. 세포 상청액 중의 PIGF의 단백질 양은 단지 약간 그러나 A549 및 HTZ-19 세포들 중에서 투여량-의존적으로 억제되었다. PC3M 세포 중에서 염기성 내인성 PIGF 수준이 모든 다른 시험된 세포에서보다 더 높았고 ASO가 또한 더 강하였다 (표 57). 마지막 으로, HT-29 세포 중에서의 Flt-1 단백질의 하향조절 (표 58) 및 HTZ-19 (ASO 시퀀스 동정 번호 218b 2.5 μ M) 및 MCF-7 (유방암종(mamma-carcinoma), 10 μ M)에서의 Tie-2 억제가 검출될 수 있었다 (표 59).
- [1640] 시퀀스 동정 번호 141d, 141g, 141i, 143r, 143w, 143af, 143ag, 143ah, 143j, 143p, 143q, 152k, 152s, 152t, 152u, 152ab, 152ag, 152ah, 152ai, 209s, 209v, 209w, 209x, 209ai, 209an, 209at, 209au, 209av, 210o, 210v, 210w, 210x, 210ab, 210ac, 210ad, 210af, 210am, 213o, 213p, 213q, 213s, 213y, 213z, 213aa, 213af, 218ad, 218n, 218t, 218u, 218v, 218ah, 218an, 218ao, 218ap, 220d, 221d, 222b, 222c, 222f, 223c,

223f, 224i, 224m, 225c, 225f, 226e, 227c, 228b, 229a, 233d, 234d, 235b, 235d, 237b, 237c, 237i, 237m, 238c, 238f, 239e, 240c, 241b, 242a, 246e, 247d, 248b, 248e, 248g, 249c, 249e, 250b, 250g, 251c, 251f, 252e, 253c, 254b, 255a, 259e, 260d, 261b, 261e, 261g, 262d, 262e, 263b, 263c, 263i, 263m, 264e, 264h, 265e, 266c, 267b, 268a, 272e, 273d, 274a, 274d, 274f, 275g, 275i, 276b, 276c, 276j, 276k, 277d, 277e, 278f, 279c, 280b, 281a, 285d, 286d, 287d, 287e, 287f, 288e, 288i, 289d, 289h, 289o, 289p, 289q, 290c, 290f, 290i, 291c, 292c, 293b 및 294a들의 안티센스-올리고뉴클레오타이드에 대하여 필적하는 결과들이 수득가능하였다. 상기-언급된 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 대부분은 시퀀스 동정 번호 218b 및 218c를 넘어설 수는 없으나, 여전히 당해 기술분야의 안티센스-올리고뉴클레오타이드들 보다 훨씬 더 이로웠다. 따라서 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 암 및 종양 등과 같은 과증식 질환의 치료에 고도로 유용하다.

표 54: A549, HPAFII, HT-29, HTZ-19, TMK-1 및 THP-1 세포들 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 PAI-1의 mRNA 발현. PAI-1 유전자 발현의 조절은 ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의하여 개선된 질환 진단을 위한 방법으로 투여량-의존적으로 영향을 받았다. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 수준이 결정되었고 계속해서 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, $\pm$ = 표준오차, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	PAI-1					
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 mRNA 수준					
세포주	A549 n = 3	HPAFII n = 1	HT-29 n = 2	HTZ-19 n = 2	TMK-1 n = 2	THP-1 n = 2
A	1.00 $\pm$ 0.10	1.00	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.21	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.11
B 2.5 μ M	1.28 $\pm$ 0.03	1.48	0.88 $\pm$ 0.27	0.99 $\pm$ 0.34	0.89 $\pm$ 0.04	1.14 $\pm$ 0.79
B 10 μ M	1.03 $\pm$ 0.27	1.05	0.81 $\pm$ 0.08	1.30 $\pm$ 0.00	1.16 $\pm$ 0.00	1.21 $\pm$ 0.37
C 2.5 μ M	0.91 $\pm$ 0.28	0.62	0.60 $\pm$ 0.13	1.13 $\pm$ 0.10	0.56 $\pm$ 0.04	0.83 $\pm$ 0.20
C 10 μ M	0.56 $\pm$ 0.13	0.32	0.50 $\pm$ 0.18	0.77 $\pm$ 0.10	0.45 $\pm$ 0.23	0.09 $\pm$ 0.02

표 55: MesoScale Discovery® 분석 (MSD Mesoscale Discovery, #K15198G)에 의한 A549, HPAFII, HTZ-19, PC3M 세포들 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 세포 상청액 중의 VEGF 단백질 수준. 전기-화학발광 측정에 의하여 단백질 수준이 결정되었다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05 및 **p < 0.01, B 2.5 μ M와 관련하여 +p < 0.05 및 ++p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	VEGF			
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 단백질 (pg / ml)			
세포주	A549 n = 1	HPAFII n = 2	HTZ-19 n = 2	PC3M n = 2
A	8186	23266 $\pm$ 876	4411 $\pm$ 66	2657 $\pm$ 103
B 2.5 μ M	8387	22278 $\pm$ 5711	3385 $\pm$ 57	1993 $\pm$ 5.4
B 10 μ M	8623	20776 $\pm$ 497	4044 $\pm$ 21	813 $\pm$ 0.8
C 2.5 μ M	8846	15479**++ $\pm$ 512	3444 $\pm$ 197	1266*+ $\pm$ 20.5
C 10 μ M	6842	11214** $\pm$ 898	2882 $\pm$ 90	442** $\pm$ 14.3

표 56: MesoScale Discovery® 분석 (MSD Mesoscale Discovery, #K15198G)에 의한 A549 및 PC3M 세포들 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 세포 상청액 중의 bFGF 단백질 수준. 전기-화학발광 측정에 의하여 단백질 수준이 결정되었다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05 및 **p < 0.01, B 2.5 μ M와 관련하여 +p < 0.05 및 ++p < 0.01, B 10 μ M와 관련하여 #p < 0.05 및 ##p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	bFGF	
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 단백질 (pg / ml)	
세포주	A549 n = 2	PC3M n = 2
A	50.7 ± 2.9	21.2 ± 0.2
B 2.5 μM	54.4 ± 3.1	16.8 ± 0.1
B 10 μM	51.8 ± 2.7	14.7 ± 0.2
C 2.5 μM	26.7**++ ± 2.1	11.3**+ ± 0.0
C 10 μM	24.2 ± 3.4	7.6**++ ± 0.0

표 57: MesoScale Discovery® 분석 (MSD Mesoscale Discovery, #K15198G)에 의한 A549, HTZ-19 및 PC3M 세포들 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 세포 상청액 중의 PIGF 단백질 수준. 전기-화학발광 측정에 의하여 단백질 수준이 결정되었다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, ± = 표준오차, A와 관련하여 **p < 0.01, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	PIGF		
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 단백질 (pg / ml)		
세포주	A549 n = 2	HTZ-19 n = 1	PC3M n = 2
A	9.9 ± 0.4	11.6	61.7 ± 2.1
B 2.5 μM	9.6 ± 0.2	8.1	54.1 ± 1.9
B 10 μM	8.6 ± 0.1	8.4	59.5 ± 3.2
C 2.5 μM	8.2 ± 0.8	8.2	69.4 ± 2.4
C 10 μM	6.3** ± 0.9	6.5	45.0 ± 3.5

표 58: MesoScale Discovery® 분석 (MSD Mesoscale Discovery, #K15198G)에 의한 HTZ-19 세포들 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 세포 상청액 중의 Flt-1 단백질 수준. 전기-화학발광 측정에 의하여 단백질 수준이 결정되었다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, ± = 표준오차, A와 관련하여 **p < 0.01, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	Flt-1
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 단백질 (pg / ml)
세포주	HT-29 n = 1
A	33.9
B 2.5 μM	27.7
B 10 μM	27.7
C 2.5 μM	18.2
C 10 μM	18.7

표 59: MesoScale Discovery® 분석 (MSD Mesoscale Discovery, #K15198G)에 의한 HTZ-19 및 MCF-7 세포들 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 세포 상청액 중의 Tie-2 단백질 수준을 나타낸다. 전기-화학발광 측정에 의하여 단백질 수준이 결정되었다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, ± = 표준오차, A와 관련하여 **p < 0.01, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	Tie-2	
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 단백질 (pg / ml)	
세포주	HTZ-19 n = 1	MCF-7 n = 1
A	13.5	98.1
B 2.5 μ M	6.2	
B 10 μ M		149.2
C 2.5 μ M	3.2	
C 10 μ M		76.9

[1652]

[1653]

결론

[1654]

모든 분석된 전-혈관 신생 인자 (VEGF, bFGF, PIGF, Flt-1 및 Tie-2)는 종양 진전 및 향상된 혈관 신생에 의존적인 다른 병리학적 메커니즘에 우호적인 영향을 줄 수 있는 방법으로 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로 조절될 수 있다. 게다가, PAI-1 mRNA는 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로 투여량-의존적으로 감소되었다. TGF- β 표적 유전자 및 예를 들어 유방암에서 승인된 진단 마커인 이러한 인자는 또한 투여량-의존적으로 하향조절되었다.

[1655]

종합해보면, 모든 시험된 본 발명의 ASO는 종양 진전, 전이, 염증 및 혈전증에 우호적인 혈관 신생 과정을 감소시키는 데 효율적이었다. 따라서, TGF- R_{II} 에 대하여 지향되는 본 발명의 ASO는 서로 다른 형태의 암 및 혈전증 연관 질환에서의 잠재적인 치료 후보이다.

[1656]

실시예 20: 섬유증에 대한 본 발명의 ASO의 영향의 분석

[1657]

TGF- β 가 세포 증식, 이동, 상처 치료, 혈관 신생 및 세포-세포 상호작용 등과 같은 다수의 과정에 개입된다. 이러한 인자가 종종 원발성 개방각 녹내장, 알츠하이머병, 폐섬유증 및 당뇨병성 신장병증을 포함하여 여러 질환에서의 발병 동안 상승된다는 것이 여러 연구들로부터 공지되었다. 이러한 질환들은 세포외 기질 (ECM) 및 액틴-세포골격에서의 병리학적 변성과 연관된다. 종종, 이러한 관측된 변화는 종종 질환 진전 및 치료에 대한 내성과 상관된다 (종양에서의 상피간엽이행 - EMT). 연결조직성장인자 (CTGF)는 TGF- β 의 하향흐름-매개자 (downstream-mediator)이고 TGF- β 의 섬유화 효과를 매개한다. 따라서, CTGF가 ECM의 침착(deposition)을 매개하고 액틴-세포골격의 재구성을 매개한다는 것이 밝혀졌다. 본 발명의 ASO가 TGF- β 신호를 억제하는 것에 의하여 섬유화 과정의 해결에 기여하는지의 여부를 조사하기 위하여, 여러 서로 다른 암 세포들의 2가지 주요 성분을 나타내는 피브로넥틴 (FN) 및 콜라겐 IV (ColIV)에 대하여 CTGF 수준이 평가되었다. 더욱이, 신경 전구체 (ReNcell CX) 및 인간 폐암 (A549) 세포들에서 CTGF, FN에 대한 그리고 액틴-세포골격에 대한 ASO의 영향이 검사되었다.

[1658]

20.1 신경변성에서의 섬유증

[1659]

방법의 설명

[1660]

세포를 앞서 표준 프로토콜에서 기술된 바와 같이 배양하였다. 처리를 위하여, 세포를 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (50,000 세포 / 웰), 6-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.3920.300) (80,000 세포 / 웰) 및 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시 (Sarstedt #94.6140.802) (10,000 세포 / 웰) 중에 과중하고 밤새도록 37 $^{\circ}$ C 및 5 % CO_2 에서 배양하였다. TGF- β 1에 대한 ReNcell CX $^{\circ}$ 세포의 반응을 조사하기 위하여 배지를 교환한 후 세포를 TGF- β 1 (2 및 10 ng/ml, PromoCell #C63499)로 48 시간 동안 처리하고 후속하여 CTGF에 대한 mRNA 분석을 하였다. CTGF 및 FN, ReNcell CX $^{\circ}$ 세포에 대한 ASO 영향을 밝히기 위하여, 배지를 제거하고 신생 전 배지 (6-웰에 대하여는 1 ml 그리고 8-웰에 대하여는 0.5 ml)로 교환하였다. 계속해서 Ref. 1 (뒤섞인 대조), ASO 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218b를 배지 중에 2.5 및 10 μ M의 농도로 첨가하고 96 시간 후 개개 분석 (실시간 RT-PCR, 웨스턴 블롯 분석 및 면역세포화학)을 수행하였다. TGF- β 1으로의 사전-배양의 조사 후의 ASO 충격을 검사하기 위하여, 배지를 제거하고 신생 전 배지 (6-웰 접시 및 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시에 대하여 1 ml)로 교환하였다. TGF- β 1 노출 (10 ng/ml, 48 시간) 후, 배지를 교환하고, TGF- β 1 (10 ng/ml), Ref. 1 (10 μ M), 시퀀스 동정 번호 218b (10 μ M)를 수반하는 ASO 및 시퀀스 동정 번호 218c (10 μ M)를 수반하는 ASO를 조합으로 그리고 단독 처리로 세포에 첨가하였다. 계속해서 ReNcell CX $^{\circ}$ 세포를 김노틱 전달 96 시간 후 수확하였다. 따라서, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 RNA (24-웰 접시) 및 단백질 단리 (6-웰 접시) 또는 세포의 면역세포화학 검사 (8-웰 세포 배양 슬라이드 접시 중에서)에 사용하였다. 프로토콜, 항체, 희석 및 프라이머는 앞서 기술된 바와 같이 사용하였다.

[1661] 20.1.1 신경 전구체 세포 (ReNcell CX)에 대한 TGF-β1 영향의 결과

[1662] TGF-β1 노출에 대한 ReNcell CX®의 반응에 대하여는 밝혀진 것이 없다. 따라서 ReNcell CX® 세포를 48 시간 동안 2가지 서로 다른 농도로 TGF-β1으로 처리하였다 (표 60). 실시간 RT-PCR의 평가는 CTGF- 및 TGF-β1 유전자 발현의 투여량-의존적인 유도를 나타내었다.

[1663] **표 60: TGF-β1으로의 자극 48 시간 후 CTGF 및 TGF-β1 mRNA 발현.** 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, E = TGF-β1. ± = 표준오차, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	ReNcell CX	
	TGF-β1 처리 48 시간 후 mRNA 수준	
표적 시점	CTGF 48 시간 n=3	TGF-β1 48 시간 n=3
A	1.00 ± 0.43	1.00 ± 0.10
E 2 ng/ml	1.73 ± 0.92	1.34 ± 0.45
E 10 ng/ml	2.15 ± 1.14	1.85 ± 0.65

[1664]

[1665] 결론

[1666] ReNcell CX® 세포는 TGF-β1 노출에 대한 반응을 나타내어 TGF-β1의 자가-유도 및 TGF-β1 표적 유전자 CTGF의 상승을 나타내고 있다. 종합해보면, ReNcell CX® 세포는 TGF-β 효과에 접근하는 의문점을 검사하기에 이상적이다.

[1667] 20.1.2 시퀀스 동정 번호 218b에 대한 결과

[1668] 20.1.2.1 김노틱 전달의 영향

[1669] ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달은 CTGF 및 FN의 투여량-의존적으로 그리고 유의미한 감소의 결과를 가져온다 (표 61). ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 이러한 충격은 FN 단백질 수준에 대하여 입증되었다. FN 단백질 수준은 시험된 ASO의 김노틱 전달 96 시간 후 약 70 %로 감소된 반면에 ReNcell CX® 세포의 TGF-β1 처리는 FN의 3.4-배 유도의 결과를 가져왔다 (표 62).

[1670] **표 61: ReNcell CX® 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 후의 CTGF mRNA의 투여량-의존적으로 그리고 유의미한 하향조절.** 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b. ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	ReNcell CX	
	김노틱 전달 후 mRNA 수준	
표적 시점	CTGF 96 시간, n=3	FN 96 시간, n=3
A	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.00
B 2.5 μM	0.97 ± 0.06	0.81 ± 0.14
B 10 μM	0.86 ± 0.17	0.67 ± 0.07
C 2.5 μM	0.66** ± 0.02	0.59 ± 0.02
C 10 μM	0.52** ± 0.02	0.39* ± 0.03

[1671]

[1672] **표 62: 피브로넥틴에 대한 웨스턴 블롯 후의 비중 분석.** ReNcell CX® 세포 중에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 96 시간 후 FN 단백질의 하향조절이 인식될 수 있었다. 단백질 수준은 Image Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가 보관 유전자 알파-튜블린에 비하여 결정되었고 계속해서 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b.

세포주	ReNcell CX 김노틱 전달 후 단백질 수준
표적 시점	FN 96 시간, n=1
A	1.00
B 2.5 μ M	1.06
B 10 μ M	0.60
C 2.5 μ M	0.46
C 10 μ M	0.30
E 10 ng/ml	3.43

[1673]

[1674]

[1675]

결론

ASO 시퀀스 동정 번호 218b는 인간 신경 전구체 세포에서 CTGF 및 FN의 mRNA 수준을 강력하게 하향조절하였다. ASO 시퀀스 동정 번호 218b 처리는 김노틱 전달 96 시간 후 FN 단백질을 감소시켰다. 따라서, TGF- β 특이적 ASO는 TGF- β 유도 섬유증 영향 ReNcell CX® 세포의 차단을 매개한다.

[1676]

20.1.2.2 TGF- β 사전-배양 후 김노틱 전달의 효과

[1677]

ASO 시퀀스 동정 번호 218b가 또한 병리학적 조건 하에서 TGF- β 에 의해 매개되는 섬유증 영향을 억제함에 있어서 강력한 지의 여부를 분석하기 위하여, ReNcell CX® 세포를 TGF- β 로 사전-배양시키고 사전-배양 후 96 시간 동안 김노틱 전달을 수행하였다. 그 후, 결정된 CTGF 및 FN의 mRNA 수준은 또한 CTGF 및 FN 유전자 발현의 TGF- β 유도 후 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 강한 항-섬유증 효과를 나타낸다 (표 63). CTGF (도 25a) 및 FN (도 25b)에 대한 면역세포화학 염색은 mRNA 분석으로부터의 데이터를 확증하였다. 게다가, 액틴-세포골격의 분석을 위한 팔로이딘(phalloidin)으로의 염색은 TGF- β 처리 후 스트레스-섬유의 유도를 나타낸 반면에 ASO 시퀀스 동정 번호 218b는 TGF- β -매개 스트레스 섬유 유도를 차단하는 데 효율적이었다 (도 25c).

[1678]

표 63: ReNcell CX® 세포 중에서의 TGF- β 1-사전-배양 후 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 후 CTGF 및 FN mRNA의 하향조절 (뒤섞인 대조와 비교). 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF- β , $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05, **p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	ReNcell CX TGF- β 1 48 시간 후 mRNA 수준 $\rightarrow$ 96 시간 TGF- β 1 + ASOs / 단일 처리	
표적 시점	CTGF 96 시간, n=3	FN 96 시간, n=3
A	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.10
B 10 μ M	0.85 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.20
C 10 μ M	0.70* $\pm$ 0.25	0.44 $\pm$ 0.04
E 10 ng/ml	1.60** $\pm$ 0.15	2.25 $\pm$ 0.31
E 10 ng/ml + B 10 μ M	1.71** $\pm$ 0.03	4.08*++ $\pm$ 0.90
E 10 ng/ml + C 10 μ M	1.19++ $\pm$ 0.04	1.74++ $\pm$ 0.61

[1679]

[1680]

결론

ASO 시퀀스 동정 번호 218b는 모의된 병리학적 상태 (TGF- β 1 사전-배양) 하에서 강한 항-섬유증 효과를 나타내었다. ECM의 하나의 주요 성분으로의 FN의 하향조절과는 별개로, 액틴-세포골격이 또한 섬유증 질환에서의 더 나은 결과에 유리할 수 있는 방법으로 본 발명의 ASO로 영향을 받았다.

[1682]

20.1.3 시퀀스 동정 번호 218c에 대한 결과

[1683]

20.1.3.1 김노틱 전달의 영향

[1684]

ASO 시퀀스 동정 번호 218c의 김노틱 전달은 10 μ M ASO 시퀀스 동정 번호 218c의 김노틱 전달 후 CTGF mRNA의

강하고 유의미한 감소의 결과를 가져온다 (표 64).

표 64: ReNcell CX® 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218c의 김노틱 전달 후 CTGF mRNA의 하향조절. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c. $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	ReNcell CX 김노틱 전달 후 mRNA 수준
표적 시점	CTGF 96 시간, n=3
A	1.00 $\pm$ 0.10
B 2.5 μ M	0.88 $\pm$ 0.08
B 10 μ M	0.89 $\pm$ 0.07
D 2.5 μ M	0.48 $\pm$ 0.08
D 10 μ M	0.17* $\pm$ 0.02

결론

ASO 시퀀스 동정 번호 218c는 CTGF mRNA의 투여량-의존적 감소에 효율적이었다.

20.1.3.2 TGF- β 사전-배양 후 김노틱 전달의 효과

ASO 시퀀스 동정 번호 218c에 대한 김노틱 전달 후 TGF- β 1 사전-배양에 대한 결과는 CTGF mRNA 수준에 대한 TGF- β 1 유도 효과의 효과적인 차단을 입증하였다 (표 65). ASO는 조합 치료가 ASO 시퀀스 동정 번호 218c 단일 처리에 필적하는 정도로 CTGF에 대한 TGF- β 1 영향을 강력하게 차단하였다.

표 65: ReNcell CX® 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218c의 김노틱 전달 후 TGF- β 1 사전-배양 후 및 병행 TGF- β 1 처리 후의 CTGF mRNA 수준. 데이터는 조합 치료와 비교하여 ASO 시퀀스 동정 번호 218c에 의한 CTGF mRNA 수준에 대한 TGF- β 1 유도 효과의 효과적인 차단을 확증하였다. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c, E = TGF- β 1. $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적 시점	ReNcell CX TGF- β 1 48 시간 후 mRNA 수준 $\rightarrow$ 96 시간 TGF- β 1 + ASOs /단일 처리
세포주	CTGF n= 3
A	1.00 $\pm$ 0.03
B 10 μ M	0.85 $\pm$ 0.01
D 10 μ M	0.17* $\pm$ 0.02
E 10 ng/ml	1.39 $\pm$ 0.08
E 10 ng/ml + B 10 μ M	1.25 $\pm$ 0.44
E 10 ng/ml + D 10 μ M	0.23* $\pm$ 0.02

결론

ASO 시퀀스 동정 번호 218c는 심지어 인공적인 병리학적 상태 (TGF- β 1 사전-배양) 하에서도 CTGF mRNA 및 단백질의 강한 하향조절을 나타내었다. 종합해보면, 강한 항-섬유증 효과와는 별개로, TGF- R_{II} 특이적 ASO는 액틴-세포골격의 조절을 나타내었다. 스트레스 섬유증의 유도는 예를 들어 알츠하이머병 및 다른 신경퇴화성 장애에서 하나의 역할을 할 수 있는 세포 강성도(cell rigidity) 및 경도(stiffness)의 상승을 야기할 수 있다. ECM 침착은 또한 예를 들어 원발성 개방각 녹내장에서 빠른 병원성 변성을 매개할 수 있다. 따라서, ECM 침착의 감소 및 스트레스 섬유 형성의 억제는 섬유증 연관 신경 장애에서 더 나은 진단에 이로울 수 있다. 그에 의하여, TGF- R_{II} 특이적 ASO는 예를 들어 알츠하이머병 및 원발성 개방각 녹내장 치료에 대한 잠재적인 치료제이다.

[1695] 20.2. 폐 섬유증

[1696] 방법의 설명

[1697] 폐 중에서의 ECM 및 액틴-세포골격에 대한 ASO 영향의 조사를 위하여, 인간 폐암 (A549) 세포를 검사하고 앞서 기술된 바와 같이 배양하였다. 처리를 위하여, 세포를 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (50,000 세포 / 웰), 6-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.3920.300) (80,000 세포 / 웰) 및 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시 (Sarstedt #94.6140.802) (10,000 세포 / 웰) 중에 파종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. TGF-β1에 대한 A549 세포의 반응을 조사하기 위하여 배지를 교환한 후 세포를 CTGF에 대한 mRNA 분석 후 TGF-β1 (2 및 10 ng/ml, PromoCell #C63499)으로 48 시간 동안 처리하였다. CTGF 및 FN A549 세포에 대한 ASO 영향을 조사하기 위하여, 배지를 제거하고 신생 전 배지 (6-웰에 대해서는 1 ml 그리고 8-x-웰에 대해서는 0.5 ml)로 교환하였다. 계속해서 Ref. 1 (뒤섞인 대조), ASO 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218b를 배지 중에 2.5 및 10 μM의 농도로 첨가하고 ReNcell CX® 세포 중에서 72 시간 후 개개 분석 (실시간 RT-PCR, 웨스턴 블롯 분석 및 면역세포화학)을 수행하였다. TGF-β1으로의 사전-배양 후 가능한 ASO 충격을 보기 위하여, 배지를 제거하고 신생 전 배지 (6-웰 접시 및 8-웰 세포 배양 슬라이드 접시에 대하여 1 ml)로 교환하였다. TGF-β1 (10 ng/ml, 48 시간)의 노출 후, 배지를 교환하고, TGF-β1 (10 ng/ml), Ref. 1 (10 μM), 시퀀스 동정 번호 218b를 수반하는 ASO (10 μM) 및 시퀀스 동정 번호 218c를 수반하는 ASO (10 μM)을 조합으로 그리고 단독 처리로 세포에 첨가하였다. 계속해서 김노틱 전달 72 시간 후 A549 세포를 수확하였다. 그에 따라, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 RNA (24-웰 접시) 및 단백질 단리 (6-웰 접시) 또는 세포의 면역세포화학 검사(8-웰 세포 배양 접시 중에서)에 사용하였다. 프로토콜, 사용된 항체, 희석 및 프라이머는 앞서 기술된 바와 같이 사용하였다.

[1698] 20.2.1 폐암 세포 (A549)에 대한 TGF-β1 영향의 결과

[1699] TGF-β1 노출에 대하여 A549 세포가 반응하는 능력을 조사하기 위하여, 세포를 2가지 서로 다른 농도로 TGF-β1으로 48 시간 동안 처리하였다 (표 66). 실시간 RT-PCR의 평가는 CTGF 및 TGF-β1 자체에 대하여 유전자 발현의 투여량-의존적인 유도를 나타내었다.

[1700] 표 66: A549 세포 중에서의 TGF-β1으로의 48 시간 자극 후 유도된 CTGF 및 TGF-β1 mRNA 발현. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, E = TGF-β1. ± = 표준오차, A와 관련하여 *p < 0.05 및 **p < 0.01, E 2 ng/ml와 관련하여 +p < 0.05. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple post hoc 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	A549	
	TGF-β1 처리 48 시간 후 mRNA 수준	
표적 시점	CTGF 48 h, n=3	TGF-β1 48 h, n=3
A	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.31
E 2 ng/ml	2.44* ± 0.18	1.60 ± 0.34
E 10 ng/ml	11.35**++ ± 0.52	2.37 ± 0.36

[1701]

[1702] 결론

[1703] A549 세포는 TGF-β1 노출에 대하여 CTGF의 투여량-의존적으로 그리고 유의미한 mRNA 상향조절을 나타내었다. 게다가, TGF-β1의 자가-유도가 관측되었다. 종합해보면, A549 세포는 폐 및 폐암에서의 TGF-β 영향에 접근하기는 의문을 검사하기 위한 좋은 모델이다.

[1704] 20.2.2 시퀀스 동정 번호 218b에 대한 결과

[1705] 20.2.2.1 김노틱 전달의 효과에 대한 결과

[1706] ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달은 CTGF 유전자 발현의 투여량-의존적으로 그리고 고도로 유의미한 감소를 야기한다 (표 67). FN mRNA 수준은 또한 시험된 ASO에 의하여 그러나 투여량-의존적이지 않게 영향을 받았다. 대조적으로, FN에 대한 염색은 뒤섞인 대조에 비하여 FN의 투여량-의존적 감소를 나타내었다 (도 260a). 더

육이, 액틴-세포골격에 대한 ASO 및 TGF- β 충격이 검사되었다. 도 26b는 A549 세포에서의 TGF- β 1 처리 후의 스트레스-섬유 형성을 포함하여 액틴-섬유의 감소를 투여량-의존적인 방법으로 나타낸 반면에 A549 세포 중에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 후 신호는 TGF- β 1-매개 영향의 인식된 회귀에 평행하게 유의미하게 하향조절되었다. 단백질 분석에 대하여 그에 의하여 CTGF가 그의 섬유증 효과를 매개하는 pErk1/2의 억제에 평행하는 CTGF의 적절한 하향조절이 나타났다 (표 68). 더욱이, ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 72 시간 후 2가지 ECM 주요 성분 FN 및 ColIV의 감소가 뚜렷하였다 (표 68).

[1707] **표 67: A549 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 후 CTGF mRNA의 투여량-의존적이고 유의미한 하향조절.** 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b. $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 $**p < 0.01A$. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" post hoc 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	A549	
	김노틱 전달 후 mRNA 수준	
표적 시점	CTGF 72 시간, n=3	FN 72 시간, n=3
A	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.07
B 2.5 μ M	0.87 $\pm$ 0.06	1.08 $\pm$ 0.02
B 10 μ M	0.80 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.08
C 2.5 μ M	0.60** $\pm$ 0.04	0.77 $\pm$ 0.17
C 10 μ M	0.39** $\pm$ 0.03	0.74 $\pm$ 0.16

[1708]

[1709] **표 68: CTGF, FN, ColIV 및 pErk11/2 웨스턴 블롯 후의 비중 분석 :** A549 중에서의 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로의 김노틱 전달 72 시간 후. 단백질 수준을 Image Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가 보관 유전자 알파-튜불린에 비하여 결정되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b.

세포주	A549			
	김노틱 전달 후 단백질 수준			
표적 시점	CTGF 72 시간 n = 1	FN 72 시간 n = 1	ColIV 72 시간 n = 1	pErk1/2 72 시간 n=2
A	1.00	1.00	1.00	1.00 $\pm$ 0.00
B 2.5 μ M	0.91	0.89	1.19	1.00 $\pm$ 0.14
B 10 μ M	1.31	0.76	0.87	0.98 $\pm$ 0.02
C 2.5 μ M	0.05	0.81	1.16	0.67 $\pm$ 0.26
C 10 μ M	0.09	0.46	0.65	0.61 $\pm$ 0.13

[1710]

[1711] **결론**

[1712] 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달이 인간 폐 세포 중에서의 ECM 침착 및 액틴-세포골격 재구성에 포함되는 인자를 조절하는 데 효율적이었다.

[1713] **20.2.2.2 TGF- β 1 사전-배양 후 김노틱 전달의 영향에 대한 결과**

[1714] TGF- β 1 후 ASO 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달에 대한 결과는 CTGF 및 FN mRNA 수준에 대한 강한 TGF- β 1 유도 영향의 효과적인 차단을 입증하였다 (표 69). CTGF (도 27a) 및 FN (도 27b)에 대한 면역세포화학 염색은 단백질 수준에 대한 mRNA 검출을 확증하였다.

[1715] **표 69: A549 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b 및 평행하는 TGF- β 1 처리 후 TGF- β 1-사전-배양 후의 CTGF 및 FN mRNA 수준.** 데이터는 조합 치료에 비하여 ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의한 CTGF 및 FN mRNA 수준에 대한 TGF- β 1 유도 영향의 효율적인 차단을 확증하였다. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, E = TGF- β 1. $\pm$ = 표준오차, A와 관련하여 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" post hoc 비교를 사용하여 산출하였다.

표적 시점	A549 48 시간 TGF-β1 mRNA 수준 → 72 시간 TGF-β1 + ASO / 단일 처리	
	CTGF n= 5	FN n= 3
세포주		
A	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.45
B 10 μM	0.89 ± 0.19	1.02 ± 0.37
C 10 μM	0.52 ± 0.05	0.35 ± 0.06
E 10 ng/ml	6.92* ± 2.32	2.92 ± 1.02
E 10 ng/ml + B 10 μM	8.79** ± 2.72	2.90 ± 0.56
E 10 ng/ml + C 10 μM	2.53 ± 0.59	1.18 ± 0.28

결론

ASO 시퀀스 동정 번호 218b는 TGF-β1의 과도한 농도를 모방하는 인공적인 병리학적 상태 하에서 A549 세포 중에서의 항-섬유증 영향을 매개함에 있어서 효율적이었다.

20.2.3 Results for 시퀀스 동정 번호 218c에 대한 결과

20.2.3.1 김노틱 전달의 영향에 대한 결과

ASO 시퀀스 동정 번호 218c의 김노틱 전달은 A549 세포 중에서의 김노틱 전달 72 시간 후 CTGF mRNA의 강력한 투여량-의존적이고 유의미한 감소를 매개한다 (표 70).

표 70: A549 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218c의 김노틱 전달 72 시간 후 CTGF mRNA의 하향조절. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c. ± = 표준오차, A와 관련하여 **p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Dunnett's" post hoc 비교를 사용하여 산출하였다.

세포주	A549 김노틱 전달 후 mRNA 수준
	CTGF 72 시간 n=4
A	1.00 ± 0.08
B 2.5 μM	0.97 ± 0.07
B 10 μM	0.85 ± 0.06
D 2.5 μM	0.49** ± 0.05
D 10 μM	0.31** ± 0.03

결론

ASO 시퀀스 동정 번호 218c의 김노틱 전달은 TGF-β 하향흐름-매개자 CTGF의 mRNA를 감소시킴에 효과적이었다.

20.2.2.2 TGF-β 사전-배양 후 김노틱 전달의 영향에 대한 결과

TGF-β1 사전-배양 후의 ASO 시퀀스 동정 번호 218c에 대한 김노틱 전달에 대한 결과는 CTGF mRNA 수준에 대한 강한 TGF-β1 유도 영향의 효과적인 차단을 입증하였다 (표 71). CTGF에 대한 면역세포화학 염색은 단백질 수준에 대한 이러한 발견을 확증하였다 (도 28).

표 71: A549 중에서의 시퀀스 동정 번호 218c의 김노틱 전달 및 평행하는 TGF-β1 처리 후의 TGF-β1 사전-배양 후 CTGF mRNA 수준.

데이터는 조합 처리와 비교하여 ASO 시퀀스 동정 번호 218c에 의한 CTGF mRNA 수준에 대한 TGF-β1 유도 영향의 효율적인 차단을 입증하였다. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, D = 시퀀스 동정 번호 218c, E = TGF-β1. ± = 표준오차, A와 관련하여 **p < 0.01, E+B와 관련하여 ++p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" post hoc 비교를 사용하여 산출하였다.

표적 시점	A549 48 시간 TGF-β1 → 72 시간 TGF-β1 + ASO / 단일 처리
세포주	CTGF n= 3
A	1.00 ± 0.05
B 10 μM	0.86 ± 0.11
D 10 μM	0.53 ± 0.10
E 10 ng/ml	4.71 ± 1.76
E 10 ng/ml + B 10 μM	5.89* ± 2.16
E 10 ng/ml + D 10 μM	0.86++ ± 0.06

[1730]

[1731]

[1732]

ASO 시퀀스 동정 번호 218c는 과도한 TGF-β1 농도를 모방하는 인공적인 병리학적 상태 하에서 A549 세포 중에서의 항-섬유증 영향을 강력하게 매개하였다. 종합해보면, 폐 섬유증의 병리학이 CTGF, FN 및 ColIV를 감소시키는 것에 의하여 늦추어질 수 있기 때문에 ASO 시퀀스 동정 번호 218c는 효과적인 치료제이다. 게다가, TGF-R_{II} 특이적 ASO에 의하여 스트레스 섬유 형성이 효과적으로 감소될 수 있어 본 발명의 ASO를 이상적인 치료제로 만든다.

[1733]

20.3 여러 암 세포에 대한 영향

[1734]

방법의 설명

[1735]

ECM (CTGF, FN, ColIV)에 어드레싱(addressing)하는 ASO의 조사를 위하여 앞서 표준 프로토콜에서 기술된 바와 같이 세포를 사용하여 배양하였다 (표 10). 처리를 위하여, 세포를 24-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.1836.300) (30,000 세포 / 웰), 6-웰 배양 접시 (Sarstedt #83.3920.300) (50,000 세포 / 접시) 중에 파종하고 밤새도록 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. mRNA 발현 및 CTGF, FN 및 ColIV mRNA 그리고 단백질 수준에 대한 영향을 분석하기 위하여 세포를 2.5 및 10 μM 농도로 Ref. 1 (뒤섞인 대조) 또는 ASO 시퀀스 동정 번호 218b로 처리하고 72 시간 동안 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 배지 교체를 포함하여 처리를 매 72 시간 3회 반복하였다 (총 12일). 수확을 위하여, 세포를 PBS로 2회 세척하고 후속하여 RNA 단리 (24-웰 접시) 및 단백질 단리 (6-웰 접시)에 사용하였다. RNA를 위한 프로토콜 및 단백질 단리와 마찬가지로 사용된 항체 및 희석을 상기 기술된 바와 같이 수행하였다.

[1736]

20.3.1 Results for 시퀀스 동정 번호 218b에 대한 결과

[1737]

CTGF, FN, ColIV mRNA 및 단백질 수준의 분석에 의하여 항-섬유증 효과가 검출되었다. HT-29, HTZ-19, MCF-7 및 THP-1 세포 중에서 시퀀스 동정 번호 218b에 의하여 CTGF mRNA (표 72)가 투여량-의존적으로 감소되었다. KG-1 세포에 대하여는 2.5 μM ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 대하여 TGF-β 하향류-매개자의 하향조절이 인식되었다. A549, Panc-1 및 CaCo2 세포에 대하여는 THP-1, HTZ-19 및 L3.6p1 세포 (표 65) 중에서의 ColIV mRNA (Table 74)의 투여량-의존적 감소에 따라 FN의 감소가 입증되었다 (표 73). 웨스턴 블롯 분석은 HT-29, MCF-7, TMK-1 및 L3.6p1 세포 중에서의 CTGF 단백질의 강한 감소를 나타내었다. MCF-7에 대한 결과는 유의미하였다 (표 75). 게다가, A549 및 TMK-1 세포 중에서의 Erk1/2의 포스포릴화가 ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의하여 억제되었다. pErk1/2는 대개 CTGF에 의하여 활성화되어 TGF-β 매개 섬유 효과를 유발한다 (표 76). FN (A549, MCF-7, HT-29, HTZ-19, HPAFII) 및 Col IV (A549, HTZ-19, HPAFII, PC3M)에 대하여는 (표 77 및 78), ECM, 단백질 수준의 2가지 주요 성분이 약 50 %로 최소화되었다.

[1738]

표 72: HT-29, HTZ-19, KG1, MCF-7 및 THP-1 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 CTGF의 mRNA 발현. 모든 시험된 세포주에 대하여 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 후 CTGF mRNA가 감소되었다. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, ± = 표준오차, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple post hoc 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	CTGF				
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 mRNA 수준				
세포주	HT-29 n = 2	HTZ-19 n = 1	KG-1 n = 1	MCF-7 n = 1	THP-1 n = 2
A	1.00 ± 0.28	1.00	1.00	1.00	1.00 ± 0.28
B 2.5 µM	0.68 ± 0.11	1.30		0.93	0.99 ± 0.68
B 10 µM	0.65 ± 0.03	1.20	0.88	0.91	1.15 ± 0.34
C 2.5 µM	0.40 ± 0.20	0.64		0.24	0.98 ± 0.11
C 10 µM	0.33 ± 0.19	0.55	0.26	0.22	0.09 ± 0.03

표 73: A549, Panc-1 및 CaCo2 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 FN의 mRNA 발현. 모든 시험된 세포주에 대하여 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 후 FN mRNA가 감소되었다. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, ± = 표준오차, A와 관련하여 **p < 0.01. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple post hoc 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	FN		
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 시간 후 mRNA 수준		
세포주	A549 n = 2	Panc-1 n = 1	CaCo2 n = 2
A	1.00 ± 0.39	1.00	1.00 ± 0.30
B 2.5 µM	0.83 ± 0.08	1.29	0.55 ± 0.13
B 10 µM			1.00 ± 0.76
C 2.5 µM	0.35 ± 0.20	0.15	0.73 ± 0.54
C 10 µM			0.18 ± 0.17

표 74: A549, HTZ-19, THP-1, L3.6pl, Panc-1 및 CaCo2 세포 중에서의 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 ColIV의 mRNA 발현. 모든 시험된 세포주에 대하여 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 후 ColIV mRNA가 감소되었다. 정량적 실시간 RT-PCR을 사용하여 자가보관 유전자 GNB2L1에 대하여 mRNA 발현 수준을 결정하고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b, ± = 표준오차, 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple post hoc 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	Col IV					
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 시간 후 mRNA 수준					
세포주	A549 n = 2	THP-1 n = 2	HTZ-19 n = 1	L3.6pl n = 2	Panc-1 n = 1	CaCo2 n = 2
A	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.22	1.00	1.00 ± 0.20	1.00	1.00 ± 0.71
B 2.5 µM	1.18 ± 0.31	0.71 ± 0.25	0.94	0.83 ± 0.09	0.98	1.37 ± 0.19
B 10 µM	1.11 ± 0.60	0.61 ± 0.03		0.91 ± 0.29	0.57	2.61 ± 0.01
C 2.5 µM	0.84 ± 0.02	0.65 ± 0.19	0.51	1.14 ± 0.13	0.59	1.30 ± 0.03
C 10 µM	0.75 ± 0.02	0.30 ± 0.13		0.69 ± 0.05	0.30	0.57 ± 0.14

표 75: 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 HT-29, MCF-7, L3.6pl 및 TMK-1 세포 중에서의 웨스턴 블롯 후 비중 분석.

ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의한 CTGF 단백질의 하향조절이 인식될 수 있었다. Image Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가보관 유전자 알파-튜블린에 대하여 단백질 수준이 결정되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple post hoc 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	CTGF			
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 단백질 수준			
세포주	HT-29 n = 1	MCF-7 n = 2	TMK-1 n = 1	L3.6pl n = 1
A	1.00	1.00 ± 0.0	1.00	1.00
B 10 μ M	1.19	1.12 ± 0.11	0.85	0.93
C 10 μ M	0.50	0.22*** ± 0.03	0.38	0.22

표 76: 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 A549 및 TMK-1 세포 중에서의 웨스턴 블롯 후 비중 분석. ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의한 pErk1/2 단백질의 하향조절이 결정되었다. Image Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가보관 유전자 알파-튜불린에 대하여 단백질 수준의 정량이 수행되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	pErk1/2	
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 단백질 수준	
세포주	A549 n = 1	TMK-1 n = 1
A	1.00	1.00
B 10 μ M	1.21	1.14
C 10 μ M	0.58	0.76

표 77: 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 A549, MCF-7, HT-29, HTZ-19 및 HPAFII 세포 중에서의 웨스턴 블롯 후 비중 분석. ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의한 FN 단백질의 하향조절이 결정되었다. Image Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가보관 유전자 알파-튜불린에 대하여 단백질 수준의 정량이 수행되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	FN				
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 단백질 수준				
세포주	A549 n = 1	MCF-7 n = 2	HT-29 n = 1	HTZ-19 n = 1	HPAFII n = 1
A	1.00	1.00 ± 0.22	1.00	1.00	1.00
B 10 μ M	1.10	1.08 ± 0.25	0.81	1.20	1.12
C 10 μ M	0.56	0.69 ± 0.18	0.40	0.83	0.56

표 78: 시퀀스 동정 번호 218b의 김노틱 전달 12 일 후 A549, MCF-7, HT-29, HTZ-19 및 HPAFII 세포 중에서의 웨스턴 블롯 후 비중 분석. ASO 시퀀스 동정 번호 218b에 의한 FN 단백질의 하향조절이 결정되었다. Image Studio™ Lite 소프트웨어를 사용하여 자가보관 유전자 알파-튜불린에 대하여 단백질 수준이 분석되었고 미처리 대조에 대하여 정규화시켰다. A = 미처리 대조, B = Ref. 1, C = 시퀀스 동정 번호 218b. 통계를 Ordinary-one-way-ANOVA에 후속하여 "Tukey's" multiple *post hoc* 비교를 사용하여 산출하였다.

표적	Col IV			
	반복된 김노틱 전달 (4x 72 시간) 12 일 후 단백질 수준			
세포주	A549 n = 1	HTZ-19 n = 1	HPAFII n = 1	PC3M n = 1
A	1.00	1.00	1.00	1.00
B 10 μ M	1.31	1.01	1.05	1.07
C 10 μ M	0.61	0.36	0.76	0.43

결론

그의 하향류-매개자 CTGF를 통한 TGF- β 1에 의하여 매개되는 ECM의 증가된 침착이 서로 다른 종양 세포주에서 본 발명의 TGF-R_{II} 특이적 ASO에 의해 효율적으로 역전될 수 있다. ECM 성분의 감소된 수준은 종양 진전에 있어서 덜 공격적이 되도록 기여할 수 있다. 종합해보면, 시험된 ASO는 서로 다른 섬유증-연관 질환에서 신규한 치료 전략을 입증할 수 있다.

실시예 21: 시노몰구스(Cynomolgus)에서 투여량-증가 패러다임을 사용하는 장기 뇌실내 투여에 의한 본 발명의

ASO의 독성에 대한 문턱값.

[1756] GLP-독성 시험에 대한 이상적인 투여량 범위를 평가하기 위하여, 증가하는 투여량을 수반하는 장기 뇌실내 (icv) 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO) 투여를 사용하는 사전-실험이 시노물구스 몽키에서 수행되었다. 투여 패러다임 동안 동물을 면역조직학적, 혈액학적 그리고 생리학적 변화에 대하여 모니터링하였다.

방법의 설명:

[1758] 수컷 및 암컷 시노물구스 몽키에서 장기 중추 ASO 주입을 위하여, 가스-압 펌프 (0.25 ml/ 24 시간, Tricumed-IP 2000V®)를 실리콘 카테터에 연결하고, 케타민/자일라진 마취 및 반-멸균 조건 하에서 표적하는 우측뇌실에 피하로 이식하였다. 각 처리 조건 (시퀀스 동정 번호 218b, 시퀀스 동정 번호 218c, 표 79에 주어진 농도)에 대하여 1개체의 수컷 및 1개체의 암컷 몽키가 사용되었다. 각 펌프를 복부 영역 내에 몽키의 목에서 피부 절개를 통하여 피하로 이식시키고 실리콘 카테터로 icv 캐놀러로 연결시켰다. 동물을 입체 정위 프레임 내에 위치시키고, icv 캐놀러를 우측뇌실 내로 낮추었다. 캐놀러를 치과용 시멘트 (Kallocryl, Speiko®-Dr. Speier GmbH, Muenster, Germany)를 사용하여 2개의 스테인레스강 스크류로 고정시켰다. 목의 피부를 봉합하였다. 수술 동안, 체온을 전기 담요로 유지시켰다. 수술-후 감염을 피하기 위하여, 몽키를 국소적으로 betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Germany)으로 처리하고 항생제 1 ml (피하, Baytril® 2.5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany)를 제공하였다. 튜브 및 개개 펌프를 개개 처리 용액으로 채웠다. ASO 주입 기간 (각 투여량 당 1주)은 배타적으로 투여되는 0.9% NaCl로의 1주의 세척기간으로 중단되었다. 전체 투여 패러다임 동안 체중 발달 및 음식 소모가 모니터링되었다. 추가로, 혈액 및 뇌척수액 샘플을 주 1회 취하여 혈액학적과 마찬가지로 면역학적 변화 또한 전신적 ASO 농도를 결정하였다. 마지막 날에, 동물을 희생시키고, 기관 (간, 신장, 뇌)을 제거하고, 증식, 세포자멸사, mRNA 낙다운 및 종양 형성에 대하여 분석하였다.

표 79: 7-주 투여 패러다임 동안 주어진 ASO의 실험 설계 및 투여량.

처리 조건	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주
시퀀스 동정 번호 218b	0.048 mM	0.9% NaCl	0.24 mM	0.9% NaCl	1.2 mM	0.9% NaCl	6 mM
시퀀스 동정 번호 218c	0.048 mM	0.9% NaCl	0.24 mM	0.9% NaCl	1.2 mM	0.9% NaCl	6 mM

결론:

[1762] 본 발명의 모든 시험된 ASO들이 1 내지 6주 동안 적어도 비-독성이었고 따라서 추가 연구 및 독성 검사에 사용되었다. 그러나, 안티센스-올리고뉴클레오타이드 시퀀스 동정 번호 214, 시퀀스 동정 번호 138b, 시퀀스 동정 번호 172b와 마찬가지로 Ref. 0 및 Ref. 5들의 주입은 상기 개요에서 초기에 독성 영향의 결과를 가져왔다. 따라서, 이들 안티센스-올리고뉴클레오타이드는 치료제로서 적절하지 않았고 추가 시험에 대하여는 사용되지 않았다.

실시예 22: 중추 안티센스-올리고뉴클레오타이드 투여 후 거동 및 생리학적 비정상성의 결정

[1764] 이 연구의 목표는 랫트에서의 신경 및 그 결과의 거동 매개변수에 대한 단일 뇌실내 (icv) 안티센스-올리고뉴클레오타이드 투여의 영향을 조사하는 것이었다.

방법의 설명:

[1766] 케타민/자일라진 마취 및 반-멸균 조건 하에서 입체 정위 절차를 수행하였다. 수술 후, 랫트를 2 일 동안 회복시켰다.

icv 가이드 캐놀러의 이식

[1768] 동물을 입체공간틀 내에 위치시키고, 가이드 캐놀러 (12 mm)를 좌측내실 상 2 mm (정수리점에 대한 좌표: 후위 1.0 mm, 정중선에 대한 측위 -1.6 mm, 두개골의 표면 하 1.8 mm에 이식하였다.

[1769] 가이드 캐놀러를 치과용 아크릴 시멘트 (Kallocryl, Speiko® Dr. Speier GmbH, Muenster, Germany)를 사용하여 2개의 스테인레스강 나사로 고정시키고 더미 캐놀러(dummy cannula)로 폐쇄시켰다. 수술 동안, 체온을 전기 담요로 유지시켰다. 수술-후 감염을 피하기 위하여, 마우스를 국소적으로 betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Germany)로 처리하고 0.1 ml 항생제 (피하, Baytril® 2.5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany)를 수령하였다.

- [1770] ICV 주입
- [1771] 느슨하게 구속된 랫트는 가이드 캐놀러 2 mm 너머 연장되고 보급을 허용하도록 30 초 동안 제 위치에 잔류하는 27-게이지 캐놀러를 사용하여 ASO (2 μ M/5 μ l, 10 μ M/5 μ l, 50 μ l, 250 μ M/5 μ l) 또는 비히클 (5 μ l, 0.9% NaCl, pH 7.4, Braun)의 icv 주입을 수행하였다. icv 투여 15, 30, 60 및 120 분 후 거동 반응, 운동 활성, 중추신경계 여기(CNS excitation), 자세, 운동 조화, 근긴장, 반사작용 및 체온에 대하여 랫트를 모니터링 하였다.
- [1772] 캐놀러 및 미세투석 탐침 배치의 확인
- [1773] 희생 후, 뇌를 제거하고, 즉각 동결시키고 분석할 때까지 -80 °C에서 저장하였다. icv 이식 자리의 조직학적 확인을 40- μ m 두정의 크레질 바이올렛-염색 뇌 절편에서 수행하였다.
- [1774] 본 결과는 서로 다른 투여량에 대한 단일 ASO (2개의 시퀀스 동정 번호 218b, 시퀀스 동정 번호 218c들에 대하여) icv 투여가 신경학적 매개변수에 대하여 영향이 없기 때문에 랫트에서 안전하고 확실한 기술인 것을 입증하고 있다.
- [1775] **실시예 23: 시노물구스 GLP-독성 시험에 대한 이상적인 투여량 범위의 결정 (랫트에서의 사전-독성 실험)**
- [1776] 매일 정맥내 (iv) 안티센스-올리고뉴클레오티드 (ASO) 투여의 임의의 일반적인 독성 효과를 조사하고, 랫트에서의 GLP-사전-독성 시험에 대한 완전한 투여량-범위를 알아내기 위하여, 랫트에서의 사전-독성 실험이 수행되었다.
- [1777] 방법의 설명:
- [1778] 반복된 정맥내 ASO 주사를 위하여 20개체의 수컷 및 20 개체의 암컷 랫트를 4개의 처리군, 비히클군, ASO_{낮음}, ASO_{중간}, ASO_{높음} 군의 4개로 분할하였다. 이 패러다임을 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c에 대하여 수행하였다. 랫트는 15 연속일 동안 매일 iv 1회분(bolus) ASO 주사를 수령하였다. 사망률 (1일 2회), 임상적인 증후군 (1일 1회, 체중 발달 (주간), 음식 소모 (주간)에 대하여 랫트를 모니터링하였다. 실험 패러다임의 15일차에서, 동물을 희생시키고, 기관 (간, 신장, 뇌)를 제거하고 동체 혈액(trunk blood)을 수집하였다. 그 후 면역학적 및 혈액학적 변화에 대하여 조직 및 혈액을 분석하였다.
- [1779] 본 시험의 결과는 낮음 및 중간 투여량으로 투여되는 경우 2가지 ASO 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c가 독성 영향을 수반함이 없이 다양한 서로 다른 장애에 대하여 안전한 약물인 것을 입증하고 있다.
- [1780] **실시예 24: 반복되는 정맥내 안티센스-올리고뉴클레오티드 주사에 의한 임의의 일반적인 독성 영향의 결정**
- [1781] 본 연구의 목표는 랫트에서 어느 투여량으로의 매일 정맥내 (iv) 안티센스-올리고뉴클레오티드 (ASO) 투여가 임의의 일반적인 독성 영향을 발휘하는 지를 조사하는 것이었다.
- [1782] 방법의 설명:
- [1783] 반복된 정맥내 ASO 주사를 위하여 80개체의 수컷 및 80 개체의 암컷 랫트를 4개의 처리군, 비히클군, ASO_{낮음}, ASO_{중간}, ASO_{높음} 군의 4개로 분할하였다. 랫트는 29 연속일 동안 매일 iv 1회분 ASO 주사를 수령하였다. 사망률 (1일 2회), 임상적인 증후군 (1일 1회, 체중 발달 (주간), 음식 소모 (주간)에 대하여 랫트를 모니터링하였다. 실험 패러다임의 29일차에서, 동물을 희생시키고, 기관 (간, 신장, 뇌)를 제거하고 동체 혈액을 수집하였다. 게다가, 골수 도말을 수집하였다. 그 후 면역학적, 혈액학적 그리고 조직병리학적 변화에 대하여 조직 및 혈액을 분석하였다.
- [1784] 본 시험의 결과는 낮음 및 중간 투여량으로 투여되는 경우 2가지 ASO 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c가 독성 영향을 수반함이 없이 다양한 서로 다른 장애에 대하여 안전한 약물인 것을 입증하고 있다.
- [1785] **실시예 25: 시노물구스 몽키에서 장기 중추 안티센스-올리고뉴클레오티드의 독성학적 특성의 결정**
- [1786] 효과를 결정하기 위하여, 그리고 독성 투여량을 동정하기 위하여, 수컷 및 암컷 시노물구스 몽키는 장기 뇌실내 투여에 의하여 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오티드 (ASO)의 서로 다른 투여량을 수여하였다. 투여 패러다임 동안, 면역학적, 혈액학적 그리고 생리학적 변화에 대하여 동물을 모니터링하였다.
- [1787] 방법의 설명:

[1788] 수컷 및 암컷 시노물구스 몽키에서 장기 중추 ASO 주입을 위하여, 가스-압 펌프 (0.25 ml/ 24 시간, Tricumed-IP 2000V®)를 실리콘 카테터에 연결하고, 케타민/자일라신 마취 및 반-멸균 조건 하에서 표적하는 우측뇌실에 피하로 이식하였다. 각 처리 조건 (비히클, ASO_{낮음}, ASO_{높음}, 표 79에 주어진 농도)에 대하여 3개체의 수컷 및 3개체의 암컷 몽키가 사용되었다. 추가로, 회복에 대한 시간 프레임을 조사하기 위하여, 2개체의 수컷 및 2개체의 암컷 몽키 (비히클 및 ASO_{높음})를 ASO 투여가 종결된 4 주 후 희생시켰다. 각 펌프를 복부 영역 내에 동물의 목에서 피부 절개를 통하여 피하로 이식시키고 실리콘 카테터로 icv 캐놀러로 연결시켰다. 동물을 입체 정위 프레임 내에 위치시키고, icv 캐놀러를 우측뇌실 내로 낮추었다. 캐놀러를 치과용 시멘트 (Kallacryl, Speiko®-Dr. Speier GmbH, Muenster, Germany)를 사용하여 2개의 스테인레스강 스크류로 고정시켰다. 목의 피부를 봉합하였다. 수술 동안, 체온을 전기 담요로 유지시켰다. 수술-후 감염을 피하기 위하여, 몽키를 국소적으로 betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Germany)으로 처치하고 항생제 1 ml (피하, Baytril® 2.5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany)를 제공하였다. 튜브를 개개 처리 용액으로 채웠다. 전체 투여 패러다임 동안 체중 발달 및 음식 소모가 모니터링되었다. 추가로, 혈액 및 뇌척수액 샘플을 주 1회 취하여 혈액학적과 마찬가지로 면역학적 변화 또한 전신적 ASO 농도를 결정하였다. 마지막 날에, 주 연구의 동물을 희생시키고, 기관 (간, 신장, 뇌)을 제거하고, 증식, 세포자멸사, mRNA 억다운 및 종양 형성에 대하여 분석하였다. 57 주 후, 회복기간 조사를 위하여 추가의 동물이 사용되었고 또한 희생되고 동일한 관독 매개변수들이 결정되었다.

[1789] 표 80. 처리 조건 및 4-주 GLP-독성 시험 및 추가 4-주 회복기간에 대한 군 당 동물.

처리조건	주 연구		4-주 회복기간	
	수컷 [n]	암컷 [n]	수컷 [n]	암컷 [n]
비히클	3	3	2	2
ASO _{낮음}	3	3	/	/
ASO _{높음}	3	3	2	2

[1790]

[1791] 본 연구의 결과는 장기 뇌실내 ASO 투여가 다양한 서로 다른 질환의 치료를 위한 비-독성이고 안전한 약물임을 입증하고 있다.

[1792] 실시예 26: 서로 다른 비히클 용액 중에서의 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 안정성 및 생물학적 활성의 결정

[1793] 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (시퀀스 동정 번호 218b, 시퀀스 동정 번호 218c)와 주입 용액의 임의의 상호작용 영향이 존재하는 지의 여부를 조사하기 위하여, 29-일 사전-실험이 수행되었다. 따라서, 2가지 ASO가 서로 다른 무-엔도톡신 비히클 용액 (PBS, 주사용수 [WFI], 0.9 % NaCl) 중에 재구성시키고 각각 서로 다른 조건에 저장하였다. 매 1주 마다 샘플을 수집하고 pH-값, ASO-안정성, 함량 및 AEX-HPLC에 의한 무결성(integrity)에 대하여 분석하였다. 각 샘플에 대하여 각각 세포-배양 분석 중에서의 TGF-RII mRNA 억다운의 잠재능을 입증하는 것에 의하여 효능 조건에서의 임의의 변화가 시험되었다.

[1794] 방법의 설명:

[1795] 동결건조된 ASO를 멸균 조건 (충류, BOWIZARD Golden GL-170 Ergoscience®, S1 조건) 하에서 개개 비히클 용액 (주사용수, 0.9% NaCl, PBS)으로 희석시켰다. 1.5 ml Eppendorf Cup을 라벨링하고 개개 용액 100 µl (AEX-HPLC) 또는 250 µl (표적 억다운)로 채웠다 (모든 단계는 충류, BOWIZARD Golden GL-170 Ergoscience®, S1 조건 하에서 수행됨, 피펫팅/라벨링 개요 표 81을 참조하십시오). 다음 단계에서, 모든 샘플을 그들 개개 저장 조건에서 저장하고 샘플을 매 주 수집하고 (샘플링 개요 표 82를 참조하십시오) 분석까지 - 80 °C에서 저장하였다.

[1796] 표 81: ASO-비히클-안정성 시험을 위한 라벨링 개요. 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c (각각 10 µM 및 0.24 mM)에 대하여 그리고 3가지 모든 비히클 WFI, 0.9% NaCl 및 PBS (⇒ 12가지 서로 다른 개요)에 대하여 라벨링 개요를 수행하였다.

라벨	비히클 (WFI, 0.9% NaCl 또는 PBS)	조건	일수					
			0	6	12	18	24	29
ASO [10 µM]	X	기저선	ASO [10 µM] X_기저선				ASO [10 µM] X_-20°C_Day 24	ASO [10 µM] X_-20°C_29일
ASO [10 µM]	X	-20°C	ASO [10 µM] X_-20°C_6일	ASO [10 µM] X_-20°C_12일	ASO [10 µM] X_-20°C_18일	ASO [10 µM] X_-20°C_24일	ASO [10 µM] X_-20°C_Day 24	ASO [10 µM] X_-20°C_29일
ASO [10 µM]	X	+4°C	ASO [10 µM] X_+4°C_6일	ASO [10 µM] X_+4°C_12일	ASO [10 µM] X_+4°C_18일	ASO [10 µM] X_+4°C_Day 24	ASO [10 µM] X_+4°C_29일	ASO [10 µM] X_+4°C_29일
ASO [10 µM]	X	+20°C	ASO [10 µM] X_+20°C_6일	ASO [10 µM] X_+20°C_12일	ASO [10 µM] X_+20°C_18일	ASO [10 µM] X_+20°C_Day 24	ASO [10 µM] X_+20°C_29일	ASO [10 µM] X_+20°C_29일
ASO [10 µM]	X	+37°C	ASO [10 µM] X_+37°C_6일	ASO [10 µM] X_+37°C_12일	ASO [10 µM] X_+37°C_18일	ASO [10 µM] X_+37°C_Day 24	ASO [10 µM] X_+37°C_29일	ASO [10 µM] X_+37°C_29일
ASO [10 µM]	X	+40°C	ASO [10 µM] X_+40°C_6일	ASO [10 µM] X_+40°C_12일	ASO [10 µM] X_+40°C_18일	ASO [10 µM] X_+40°C_Day 24	ASO [10 µM] X_+40°C_29일	ASO [10 µM] X_+40°C_29일
ASO [10 µM]	X	pH 값	ASO [10 µM] X_pH 값_0일					ASO [10 µM] X_pH 값_29일
ASO [0.24 mM]	X	기저선	ASO [0.24 mM] X_기저선					
ASO [0.24 mM]	X	-20°C	ASO [0.24 mM] X_-20°C_6일	ASO [0.24 mM] X_-20°C_12일	ASO [0.24 mM] X_-20°C_18일	ASO [0.24 mM] X_-20°C_Day 24	ASO [0.24 mM] X_-20°C_29일	ASO [0.24 mM] X_-20°C_29일
ASO [0.24 mM]	X	+4°C	ASO [0.24 mM] X_+4°C_6일	ASO [0.24 mM] X_+4°C_12일	ASO [0.24 mM] X_+4°C_18일	ASO [0.24 mM] X_+4°C_Day 24	ASO [0.24 mM] X_+4°C_29일	ASO [0.24 mM] X_+4°C_29일
ASO [0.24 mM]	X	+20°C	ASO [0.24 mM] X_+20°C_6일	ASO [0.24 mM] X_+20°C_12일	ASO [0.24 mM] X_+20°C_18일	ASO [0.24 mM] X_+20°C_Day 24	ASO [0.24 mM] X_+20°C_29일	ASO [0.24 mM] X_+20°C_29일
ASO [0.24 mM]	X	+37°C	ASO [0.24 mM] X_+37°C_6일	ASO [0.24 mM] X_+37°C_12일	ASO [0.24 mM] X_+37°C_18일	ASO [0.24 mM] X_+37°C_Day 24	ASO [0.24 mM] X_+37°C_29일	ASO [0.24 mM] X_+37°C_29일
ASO [0.24 mM]	X	+40°C	ASO [0.24 mM] X_+40°C_6일	ASO [0.24 mM] X_+40°C_12일	ASO [0.24 mM] X_+40°C_18일	ASO [0.24 mM] X_+40°C_Day 24	ASO [0.24 mM] X_+40°C_29일	ASO [0.24 mM] X_+40°C_29일
ASO [0.24 mM]	X	pH 값	ASO [0.24 mM] X_pH 값_0일					ASO [0.24 mM] X_pH 값_29일

표 82: ASO-비히클-안정성 시험을 위한 수집 개요. 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c (각각 10 µM 및 0.24 mM)에 대하여 그리고 3가지 모든 비히클 WFI, 0.9% NaCl 및 PBS (⇒ 12가지 서로 다른 개요)에 대하여 수집 개요를 수행하였다.

샘플	일수					
	0	6	12	18	24	29
조건						
기저선	X					
-20°C		X	X	X	X	X
+4°C		X	X	X	X	X
+20°C		X	X	X	X	X
+37°C		X	X	X	X	X
+40°C		X	X	X	X	X
pH 값	X					X

임의의 비히클 용액이 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c의 안정성, 함량 및 무결성에 대하여 영향이 없기 때문에, 0.9% NaCl이 ASO-사용-안정성 실험을 위하여 사용되었다.

실시예 27: 비히클 용액 중에서의 본 발명의 안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO)의 사용중 안정성 및 생물학적 활성의 결정

안티센스-올리고뉴클레오타이드 (ASO) (시퀀스 동정 번호 218b, 시퀀스 동정 번호 218c)와 가스압 펌프 또는 카테터의 임의의 상호작용 영향이 있는 지의 여부를 조사하기 위하여, 29-일 사전-실험이 수행되었다. 따라서, 2가지 ASO가 0.9% NaCl 중에서 재구성되었고 펌프 및 카테터가 제조업자의 설명에 따라 충전되었다. 샘플이 매 주

수집되고 pH-값, 미생물 및 올리고 안정성, 함량 및 AEX-HPLC에 의한 무결성에 대하여 분석되었다. 모든 샘플 각각에 대한 세포-배양 분석 중에서의 TGF-R₁₁ mRNA의 억다운에 대한 잠재능을 입증하는 것에 의하여 효능 조건에서의 임의의 변화가 또한 시험되었다.

방법의 설명:

동결건조된 ASO를 멸균 조건 (충류, B1OWIZARD Golden GL-170 Ergoscience®, S1 조건) 하에서 0.9% NaCl로 희석시켰다. 5 ml Eppendorf Cup을 라벨링 개요 (표 83을 참조하십시오)에 따라 멸균 조건 (충류, B1OWIZARD Golden GL-170 Ergoscience, S1 조건) 하에서 라벨링하였다. 2개의 가스압 펌프 (Tricumed Model IP-2000 V®) 및 카테터 (척수 카테터 세트 4000)를 제조업자의 설명에 따라 개개 ASO 용액으로 충전시켰다 (모든 단계는 충류, B1OWIZARD Golden GL-170 Ergoscience®, S1 조건 하에서 수행됨, 피펫팅/라벨링 개요 표 83을 참조하십시오).

다음 단계에서, 5 ml Eppendorf Cup의 뚜껑에 연결된 카테터에 펌프를 연결하고 잔여의 컵을 임의의 오염을 피하도록 모든 개구들이 Parafilm®으로 폐쇄된 저장 박스 내에 저장하였다. 매 주 샘플을 수집하고, -80 °C에서 분석할 때까지 저장하고 5 ml Eppendorf Cup의 뚜껑에 연결된 카테터를 다음 컵으로 옮겨 샘플링 절차를 지속하였다. 게다가, 하나의 샘플을 회분 포트(bolus port)를 통하여 직접적으로 펌프로부터 취하고 -80 °C에서 저장하였다. 마지막 날에, 미생물 분석을 위한 추가 샘플을 수집하였다.

표 83: ASO 사용중-안정성 시험을 위한 라벨링 개요. 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c (각각 0.24 mM)에 대한 라벨링 개요를 수행하였다. PS: (펌프샘플(PumpSample)): 카테터로부터 직접적으로 취한 샘플), AS: (추가샘플(AdditionalSample)): 회분포트를 통하여 펌프 내 저장소로부터 직접적으로 취한 샘플, MB: (미생물(MicroBiology)): PS 및 AS로부터의 500 µM)

샘플		일자						
용리고	컵	조건	0	6	12	18	24	29
시퀀스동정번호 218b [0.24 mM]	5ml	PS	시퀀스동정번호 218b [10 μM] 기저선	시퀀스동정번호 218b +37°C PS_6 일	시퀀스동정번호 218b +37°C PS_12 일	시퀀스동정번호 218b +37°C PS_18 일	시퀀스동정번호 218b +37°C PS_24 일	시퀀스동정번호 218b +37°C PS_29 일
시퀀스동정번호 218b [0.24 mM]	5 ml	AS		시퀀스동정번호 218b +37°C AS_6 일	시퀀스동정번호 218b +37°C AS_12 일	시퀀스동정번호 218b +37°C AS_18 일	시퀀스동정번호 218b +37°C AS_24 일	시퀀스동정번호 218b +37°C AS_29 일
시퀀스동정번호 218b [0.24 mM]	5 ml	MB						시퀀스동정번호 218b +37°C MB_29 일
시퀀스동정번호 218c [0.24 mM]	5 ml	pH 값	시퀀스동정번호 218c pH 값 0 일					시퀀스동정번호 218b pH 값 29 일
시퀀스동정번호 218c [0.24 mM]	5 ml	PS	시퀀스동정번호 218c 기저선	시퀀스동정번호 218c +37°C PS_6 일	시퀀스동정번호 218c +37°C PS_12 일	시퀀스동정번호 218c +37°C PS_18 일	시퀀스동정번호 218c +37°C PS_24 일	시퀀스동정번호 218c +37°C PS_29 일
시퀀스동정번호 218c [0.24 mM]	5 ml	AS		시퀀스동정번호 218c +37°C AS_6 일	시퀀스동정번호 218c +37°C AS_12 일	시퀀스동정번호 218c +37°C AS_18 일	시퀀스동정번호 218c +37°C AS_24 일	시퀀스동정번호 218c +37°C AS_29 일
시퀀스동정번호 218c [0.24 mM]	5 ml	MB						시퀀스동정번호 218c +37°C MB_29 일
시퀀스동정번호 218c [0.24 mM]	5 ml	pH 값	시퀀스동정번호 218c pH 값 0 일					시퀀스동정번호 218c pH 값 29 일

[1808] 표 84: ASO 사용중-안정성 시험을 위한 수집 개요. 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c (0.24 mM)에 대하여 수집 개요를 수행하였다. PS: (펌프샘플: 카테터로부터 직접적으로 취한 샘플), AS: (추가샘플: 회분포트를 통하여 펌프 내 저장소로부터 직접적으로 취한 샘플, MB: (미생물: PS 및 AS로부터의 500 μ M)

샘플		일차					
컵	조건	0	6	12	18	24	29
5 ml	기저선	X					
5 ml	PS		X	X	X	X	X
5 ml	AS		X	X	X	X	X
5 ml	MB						X
5 ml	pH 값	X					X

[1809]

[1810] 시퀀스 동정 번호 218b 및 시퀀스 동정 번호 218c의 안정성, 함량 및 무결성에 대한 펌프 및 카테터의 영향이 없고, 또한 감지할만한 미생물 문제가 없기 때문에, 본 응용 패러다임은 시노물구스 몽키 및 인간에의 척추강내 및 뇌실내 투여를 위한 적정 기술을 나타낸다.

[1811] 화학적 합성

[1812] 약어

[1813] Pybop: (벤조트리아졸-1-일-옥시)트리피롤리디노포스포늄-헥사플루오로포스페이트

[1814] DCM: 디클로로메탄

[1815] DMF: 디메틸포름아미드

[1816] DMAP: 4-디메틸아미노피리딘

[1817] DMT: 4,4'-디메톡시트리틸

[1818] LCAA: 장쇄 알킬아미노

[1819] TRIS: 트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄

[1820] TRIS-HCl: 트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄 염산염

[1821] DEPC: 디에틸디카르보네이트

[1822] 캡량체 안티센스-올리고뉴클레오타이드 합성 및 정제

[1823] 캡량체의 형태의 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 ABI 3900 상에서 또는 ABI 394 합성기 상에서 또는 ExpediteTM (Applied Biosystems) 상에서 포스포르아미다이트 올리고머화 화학에 따라 조립하였다. ABI3900 상에서, 고체 지지체는 UnySupport (구입처 Glen Research, Sterling, Virginia, USA)로 담지된 폴리스티렌이고 0.2 μ mol의 합성 규모를 제공한다. ABI 394 상에서 고체 지지체는 Chemgenes (Wilmington, MA, USA)으로부터 구입된 UnylinkerTM로 담지된 500 A 제어 다공성 유리 (CPG: controlled pore glass)이고 3 μ mol 합성 규모를 제공한다.

[1824] "탈블록제(Deblock)", "산화제(Oxidizer)", "CapA" 및 "CapB" 등과 같은 보조 합성 시약과 마찬가지로 DNA 포스포르아미다이트는 SAFC Proligo (Hamburg, Germany)로부터 수득하였다. 특히, 디옥시티미딘 (dT)의 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-O,3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필) 포스포르아미다이트 모노머, 4-N-벤조일-2'-디옥시시티딘 (dC^{Bz}), 6-N-벤조일-2'-디옥시아데닌 (dA^{Bz}) 및 2-N-이소부틸-2'-디옥시구아노신 (dG^{iBu})을 DNA 구축-단위로 사용하였다. 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘-구아노신-3'-((2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (LNA-G^{DMF}), 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-티미딘 3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (LNA-Tb), 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-((2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (LNA-A^{Bz}), 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-((2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (LNA-C^{*Bz}))를 LNA-구축-단위로 사용하였다. LNA 포스포르아미다이트는 Exiqon (Vebaek, Denmark)으로부터 구입하였다.

[1825] 표 85의 LNA의 예들로 나타난 바와 같이, THF/아세트니트릴 (25/75 (v/v)) 중에 용해되는 LNA-C^{*Bz}를 제외하고는 포스포르아미다이트를 무수 아세트니트릴 중에 용해시켜 0.07 M 올리고뉴클레오타이드를 수득하였다.

[1826] 표 85:

	분자량 g/mole	CAS 번호	용매	0.07 M 용액 100 mg을 수득하기 위하여
LNA-A ^{Bz}	885.9	[206055-79-0]	무수 아세트니트릴	1.6 ml
LNA-C ^{*Bz}	875.9	[206055-82-5]	THF/아세트니트릴 25/75 (v/v)	1.6 ml
LNA-G ^{DMF}	852.9	[709641-79-2]	무수 아세트니트릴	1.7 ml
LNA-T	772.8	[206055-75-6]	무수 아세트니트릴	1.8 ml

[1827]

[1828] The β-D-티오-LNA 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-머캅토-2'-S,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-머캅토-2'-S,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-다이소프로필)포스포르아미다이트, 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-머캅토-2'-S,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-머캅토-2'-S,4'-C-메틸렌-티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트 및 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-아미노-2'-N,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-다이소프로필)포스포르아미다이트를 J. Org. Chem. 1998, 63, 6078 - 6079에서 기술된 바와 같이 합성하였다.

[1829] β-D-아미노-LNA 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-아미노-2'-N,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-[(2-시아노에틸-N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-아미노-2'-N,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-아미노-2'-N,4'-C-메틸렌-티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-메틸아미노-2'-N,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트 및 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-메틸아미노-2'-N,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-다이소프로필)포스포르아미다이트, 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-메틸아미노-2'-N,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트

[1830] 5'-O-DMT-2'-디옥시-2'-메틸아미노-2'-N,4'-C-메틸렌-티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트의 합성을 문헌 절차 (J. Org Chem. 1998, 63, 6078 - 6079)에 따라 실행하였다.

[1831] α-L-옥시-LNA α-L-5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-다이소프로필)포스포르아미다이트, α-L-5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-다이소프로필)포스포르아미다이트, α-L-5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트 및 α-L-5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트를 문헌 (J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 2164-2176; Angew. Chem. Int. Ed. 200, 39, 1656 - 1659)에서 기술된 절차와 유사하게 수행하였다.

[1832] 포스포로티오에이트 골격을 수반하는 올리고뉴클레오타이드의 합성을 위한 (β-벤조일머캅토)에틸)피롤리디놀티오 포스포르아미다이트가 Caruthers (J. Org. Chem. 1996, 61, 4272-4281)에 의해 보고된 프로토콜과 유사하게 제조되었다.

[1833] "포스포르아미다이트-C3" (3-(4,4'-디메톡시트리틸옥시)프로필-1-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이소프로필)]-포스포르아미다이트 및 "3'-스페이스 C3 CPG" (1-디메톡시트리틸옥시-프로판디올-3-숙시노일)-장쇄 알킬아미노-CPG는 Glen Research로부터 구입하였다.

[1834] 일반적인 절차

- [1835] LNA-고체 지지체의 제조:
- [1836] 1) LNA 숙시닐 헤미에스테르의 제조 (W02007/112754)
- [1837] 5'-O-DMT-3'-하이드록시뉴클레오시드 모노머, 숙신산 무수물 (1.2 당량) 및 DMAP (1.2 당량)을 35 ml 디클로로메탄 (DCM) 중에 용해시켰다. 반응을 실온에서 밤새도록 교반시켰다. NaH_2PO_4 0.1 M pH 5.5 (2x) 및 염수 (1x)로 추출한 후, 유기층을 추가로 무수 NaSO_4 로 건조시키고 여과하고 증발시켰다. 헤미에스테르 유도체가 95% 수율로 수득되었고 어떠한 추가 정제 없이 사용되었다.
- [1838] 2) LNA-지지체의 제조 (W02007/112754)
- [1839] 상기 제조된 헤미에스테르 유도체 (90 μmol)를 최소량의 DMF 중에 용해시키고 DIEA 및 pyBOP (90 μmol)를 첨가하고 1 분 동안 함께 혼합시켰다. 이러한 사전-활성화 혼합물을 수동 합성기(manual synthesizer) 중에서 LCAA-CPG (500 Å, 80 내지 120 메쉬 크기, 300 mg)와 결합시키고 교반시켰다. 실온에서 1.5 시간 후, 지지체를 여과해내고 DMF, DCM 및 MeOH로 세척하였다. 건조 후, 적하량(loading)은 57 $\mu\text{mol/g}$ 인 것으로 결정되었다 (Tom Brown, Dorcas J. S. Brown. Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis. In: F.Eckstein, editor. Oligonucleotides and 35 Analogues A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1991: 13-14을 참조하시오).
- [1840] 올리고뉴클레오타이드의 연장 (커플링)
- [1841] 포스포라미다이트의 커플링을 위하여 활성화제로서 5-에틸티오-1H-테트라졸 (ETT) (아세토니트릴 중의 0.5 M)을 채용하였다. ETT 대신 W02007/112754에서 기술된 바와 같은 4,5-디시아노이미다졸 (DCI), 5-벤질티오-1H-테트라졸 또는 사카린-1-메틸이미다졸 등과 같은 다른 시약이 활성화제로 사용될 수 있다. 아세토니트릴 중의 0.25 M DCI가 LNA와의 커플링을 위하여 사용되었다.
- [1842] 캡핑
- [1843] THF (HPLC 등급) 중의 10% 아세트산 무수물 (Ac_2O) 및 THF/피리딘 (8:1) (HPLC 등급) 중의 10% N-메틸이미다졸 (NMI)을 첨가하고 반응하도록 방치하였다.
- [1844] 산화
- [1845] 인(III)의 인(V)는 보통 Glen Research로부터 구입한 THF/피리딘/ H_2O 중의 0.02 M 요오드를 사용하는 요오드/THF/피리딘/ H_2O 또는 Glen Research로부터의 무수 아세토니트릴 중의 0.5 M 1S)-(+)-(10-캄페솔포닐)-옥사지리딘 (CSO)으로 수행되었다.
- [1846] 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이 준비되는 경우, 무수 아세토니트릴/피리딘 (1:1 v/v) 중의 3-((디메틸아미노-메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸-3-티온 (DDTT, Chemgenes (Wilmington, MA, USA)로부터 수득됨)의 0.05 M 용액을 사용하여 티올화 단계가 수행된다. LNA가 사용되는 경우, 무수 아세토니트릴 중의 0.2 M 3,4,5-벤조티올-3-온 1,1-디옥사이드 (Beaucage reagent)를 사용하여 티올화가 실행된다. 일반적으로, 티올화는 또한 W02007/112754에서 기술된 바와 같이 염화크산탄(xanthane chloride) (아세토니트릴/피리딘 10% 중의 0.01 M)을 사용하는 것에 의하여 실행될 수 있다. 대안으로, 크산탄수소화물 (xanthane hydride: 5-이미노-(1,2,4)디티아졸리딘-3-티온), 페닐아세틸디설파이드 (PADS) 등과 같은 티올화 단계를 위한 다른 시약이 적용될 수 있다.
- [1847] 포스포로티오에이트가 합성되는 경우, 그 결과의 티오포스포이트트리에스테르가 피리딘/아세토니트릴 (4:1 v/v) 중의 0.05 M DDTT (3-((디메틸아미노-메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸-3-티온)의 첨가에 의하여 포스포로티오트리에스테르로 산화되었다.
- [1848] 고체 지지체로부터의 개열 및 탈보호
- [1849] 고상 합성의 말기에서, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 "DMT-온(DMT-on)" 또는 "DMT-오프(DMT-off)"로 개열될 수 있다. "DMT 오프"는 최종 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)기가 "Deblock" 시약을 사용하여 합성기 상에서 제거되는 것을 의미하고 DMT-온은 기가 존재하는 한편으로 올리고뉴클레오타이드가 고체 지지체로부터 개열되는 것을 의미한다. DMT기는 트리클로로아세트산으로 제거되었다.
- [1850] "DMT-오프"

- [1851] 고상 합성의 완료에 대하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 아세토니트릴 중의 20% 디에틸아민 용액 (Biosolve BV, Valkenswaard, The Netherlands)으로 20 분 동안 처리되어 포스페이트 골격 상의 시아노에틸 보호기를 제거하였다. 후속하여, 안티센스-올리고뉴클레오타이드가 고체 지지체로부터 개열되고 1 to 5 ml 농축 암모니아수 (Sigma Aldrich로부터 수득됨)를 사용하여 16 시간 동안 55 °C에서 탈보호되었다. 고체 지지체가 여과 또는 원심분리에 의하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드로부터 분리되었다.
- [1852] 올리고뉴클레오타이드가 포스포로디티오에이트트리에스테르를 포함하는 경우, 티올-기가 티오펜올:트리에틸아민:디옥산, 1:1:2, v/v/v으로 24 시간 동안 탈보호되고, 계속해서 암모니아수를 사용하여 1 내지 2 시간 동안 실온에서 올리고뉴클레오타이드가 고체 지지체로부터 개열되고, 추가로 4 시간 동안 65 °C에서 탈보호되었다.
- [1853] "DMT-온"
- [1854] 암모니아수를 사용하여 1 내지 2 시간 동안 실온에서 올리고뉴클레오타이드가 고체 지지체로부터 개열되고 추가로 4 시간 동안 65 °C에서 탈보호되었다. 역상 HPLC (RP-HPLC)에 의하여 올리고뉴클레오타이드가 정제되고, 계속해서 DMT-기가 트리클로로아세트산으로 제거되었다.
- [1855] 올리고뉴클레오타이드가 포스포로디티오에이트트리에스테르를 포함하는 경우, 55 °C에서 15 내지 16 시간 동안 농축 에탄올 (암모니아/에탄올 3:1 v/v) 중의 암모니아 850 μ l의 첨가에 의하여 고체-지지체로부터의 개열 및 티올-기의 탈보호가 수행되었다.
- [1856] 말단기
- [1857] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에서의 말단기
- [1858] 고체 지지된 올리고뉴클레오타이드를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 (w/v)으로 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 추가로, 화합물을 적절한 말단기로 시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트-성분으로 전환시켰다. 인(III)의 인(V)으로의 산화 후, 탈보호, 고체 지지체로부터 탈착 및 탈보호 시퀀스가 상기 기술된 바와 같이 수행되었다.
- [1859] 정제
- [1860] 다음으로, 조(crude) 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 AKTA Explorer System (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 및 Source Q15 (GE Helthcare)로 충전된 컬럼 상의 음이온 교환 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 정제하였다. 완충제 A는 10 mM 과염소산나트륨, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4이었고 20% 아세토니트릴 중에 포함되었고 완충제 B는 500 mM 과염소산나트륨을 제외하고는 완충제 A와 동일하였다. 32 컬럼 용적 (CV) 내에서의 15%B 내지 55%B의 경사가 채용되었다. 280 nm에서의 UV 추적이 기록되었다. 적절한 분획을 수집하고 3 M NaOAc, pH= 5.2 및 70% 에탄올로 침전시켰다. 마지막으로, 펠릿을 70% 에탄올로 세척하였다. 분석 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 동정은 전기분무 이온화 질량 분광분석기 (ESI MS)로 확증하였고 순도는 분석 OligoPro Capillary Electrophoresis (CE)로 확증하였다.
- [1861] 디티오에이트의 정제는 Mono Q 10/100 GL 컬럼이 장착된 Amersham Biosciences P920 FPLC instrument 상에서 수행되었다. 완충제를 DEPC-처리수로 제조하고, 그들의 조성은 다음과 같다: 완충제 A: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0; 완충제 B: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8.0.
- [1862] **실시예 28**
- [1863] $Gb^1sTb^1sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb^1sGb^1sC^*b^1$ (시퀀스 동정 번호 209y)
- [1864] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤즈옥실시티딘-3'-O-숙신노일-결합 LCAA CPG (0.2 μ mol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총 량 800 μ l의 아세토니트릴로 수차례 세척한 후, 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초

동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1865] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1866] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부티릴-2'-디옥시구아노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1867] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부티릴-2'-디옥시구아노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1868] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부티릴-2'-디옥시구아노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1869] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1870] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1871] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였

다 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1872] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1873] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N²-이소부틸릴-2'-디옥시구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필]포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1874] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1875] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N²-이소부틸릴-2'-디옥시구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필]포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1876] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-[(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필]포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1877] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

- [1878] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O-, 4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1879] 고상 합성의 완결에 의하여, 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 아세토니트릴 중의 20% 디에틸아민 용액 (Biosolve BV, Valkenswaard, The Netherlands)으로 20 분 동안 처리하여 포스페이트 골격 상의 시아노에틸 보호기를 제거하였다. 후속하여, 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체로부터 개열하고 추가로 5 ml 농축 암모니아수를 사용하여 16 시간 동안 55°C에서 탈보호시켰다. 여과 또는 원심분리에 의하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드로부터 고체 지지체를 분리하였다.
- [1880] 다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 AKTA Explorer System (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 및 Source Q15 (GE Healthcare)로 충전된 컬럼 상의 음이온 교환 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 정제하였다. 완충제 A는 10 mM 과염소산나트륨, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4이었고 20% 아세토니트릴 중에 포함되었고 완충제 B는 500 mM 과염소산나트륨을 제외하고는 완충제 A와 동일하였다. 32 컬럼 용적 (CV) 내에서의 15%B 내지 55%B의 경사가 채워되었다. 280 nm에서의 UV 추적이 기록되었다. 적절한 분획을 수집하고 3 M NaOAc, pH=5.2 및 70% 에탄올로 침전시켰다. 마지막으로, 펠릿을 70% 에탄올로 세척하였다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 93.7%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5387.3 Da; 이론값: 5387.80 Da.
- [1881] **실시예 29**
- [1882] Gb¹Tb¹dAdGdTdGdTdTdTdAdGdGdGAb¹Gb¹C^{*}b¹ (시퀀스 동정 번호 209u)
- [1883] 일반 절차에 따라 LNA를 CPG에 결합시켰다. 커플링 반응 및 캡핑 단계를 또한 실시예 28에서 기술된 바와 같이 실행하였다. 캡핑 단계 이후, 시스템을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱하고, THF/피리딘/H₂O 중의 0.02 M 요오드 400 μ l를 컬럼에 45 초 동안 삽입하였다. 산화 단계 후 24 μ l 아세토니트릴로 시스템을 플래싱하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 95.3%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5146.80 Da; 이론값: 5146.4 Da.
- [1884] **실시예 30**
- [1885] /5SpC3s/Gb¹sTb¹sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb¹sGb¹sC^{*}b¹ (시퀀스 동정 번호 209v)
- [1886] 실시예 28에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 그러나 마지막 뉴클레오타이드가 올리고뉴클레오타이드에 결합되고 후속하여 산화 및 캡핑 단계가 수행된 후, 아세토니트릴 중의 80 μ l 포스포르아미다이트-C3 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)가 첨가된 것은 예외로 한다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시켰다. 후속 단계들을 실시예 28에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 97.4%의 순도로 수득되었다. HRMS (ESI): 실험값: 5540.70 Da; 이론값: 5541.4 Da.
- [1887] **실시예 31**
- [1888] Gb¹sTb¹sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb¹sGb¹sC^{*}b¹/3SpC3s/ (시퀀스 동정 번호 209w)
- [1889] 3'-스페이스 C3 CPG (0.2 μ mol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μ l 아세토니트릴로 수차례 세척한 후, 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O-, 4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-[(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 후속 반응들을 실시예 28

에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 92.7%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5541.70 Da; 이론값: 5541.4 Da.

실시예 32

Gb¹ssTb¹ssAb¹ssdGssdTssdTssdTssdTssdTssA^{*}ssdGssdTssdTssdTssAb¹ssGb¹ssC^b¹ (시퀀스 동정 번호 209an)

5'-0-DMT-2'-0,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤즈옥실시티딘-3'-0-숙시노일-결합 LCAA CPG (0.2 μmol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μl 아세토니트릴로 수차례 세척한 후, 아세토니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μl 5'-0-DMT-2'-0,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(β-벤조일머캅토)에틸]피롤리딘올티오포스포아미다이트 (0.15 M) 및 아세토니트릴 중의 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 900 μl의 DDTT (피리딘/아세토니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

아세트오니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μL 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-[(β -벤조일머캅토)에틸]피롤리디놀티오포스포라미다이트 (0.15 M) 및 아세트오니트릴 중의 236 μL DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μL 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 900 μL 의 DDTT (피리딘/아세트오니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μL 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μL 및 448 μL N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μL 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μL 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

올리고뉴클레오타이드의 추가의 연장을 동일한 방법으로 수행하였다.

고상 합성의 완결에 의하여, 고체-지지체로부터 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 개열시키고 티올-기를 탈보호하기 위하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 55 °C에서 15 내지 16 시간 동안 농축 에탄올 (암모니아/에탄올 3:1 v/v) 중의 암모니아 850 μ l로 처리하였다.

다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 Mono Q 10/100 GL 컬럼을 사용하는 음이온-교환 크로마토그래피로 정제하였다. 완충제를 DEPC-처리수로 제조하고, 그들의 조성은 다음과 같다: 완충제 A: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0; 완충제 B: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8.0.

실시예 33

Gb¹ sTb¹ sAb¹ sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGbsAb¹ sGb¹ sC^{*} b¹ (시퀀스 동정 번호 209az)

실시예 28에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 90.5%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5442.9 Da; 이론값: 5443.3 Da.

실시예 34

Gb¹ sTb¹ sAb¹ sGb¹ sdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGb¹ sAb¹ sGb¹ sC^{*} b¹ (시퀀스 동정 번호 209ba)

실시에 28에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타드가 89.4%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5469.9 Da; 이론값: 5471.3 Da.

실시예 35

Gb¹sTb¹sAb¹sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAsGb¹sC^{*}b¹ (시퀀스 동정 번호 209bb)

- [1905] 실시예 28에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 88.4%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5386.5 Da; 이론값: 5387.3 Da.
- [1906] **실시예 36**
- [1907] $Gb^1Tb^1dAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb^1Gb^1C^*b^1$ (시퀀스 동정 번호 209s)
- [1908] 실시예 28 및 실시예 29에서 기술된 바와 같은 절차에 따라 적절한 DNA, DNA-유도체 및 LNA 구축 단위로 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 96.8%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5323.30 Da; 이론값: 5323.0 Da.
- [1909] **실시예 37**
- [1910] $Gb^1sTb^1sdA^*sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdA^*sdGsdGsdGsAb^1sGb^1sC^*b^1$ (시퀀스 동정 번호 209t)
- [1911] 일반 절차에 따라 그리고 실시예 28에서 예시화된 바와 같이 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 91.4%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5416.30 Da; 이론값: 5417.3 Da.
- [1912] **실시예 38**
- [1913] $/5SpC3s/Gb^1sTb^1sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb^1sGb^1sC^*b^1/3SpC3s/$ (시퀀스 동정 번호 209x)
- [1914] 일반 절차에 따라 실시예 28, 실시예 30 및 실시예 31에서 예시화된 바와 같이 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 95.1%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5696.30 Da; 이론값: 5695.5 Da.
- [1915] **실시예 39 내지 132**
- [1916] 표 6의 다른 올리고뉴클레오타이드가 일반 절차에 따라 그리고 실시예들에서 나타낸 바와 같이 합성되었다. β -D-티오-LNA, α -L-옥시-LNA, β -D-(NH)-LNA 또는 β -D-(NCH₃)-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 제조가 β -D-옥시-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드에서와 동일한 방법으로 수행되었다.
- [1917] **실시예 133**
- [1918] $Gb^1sC^*b^1sTb^1sAb^1sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb^1sTb^1sTb^1$ (시퀀스 동정 번호 210q)
- [1919] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌티미딘-3'-O-숙시노일-결합 LCAA CPG (0.2 μ mol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μ l 아세토니트릴로 수차례 세척한 후, 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1920] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1921] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고,

과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1922]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부틸릴-2'-디옥시구아노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1923]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1924]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1925]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부틸릴-2'-디옥시구아노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1926]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부틸릴-2'-디옥시구아노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1927]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

- [1928] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-다옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1929] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-다옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1930] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-0,4'-C-메틸렌- N^6 -벤조일아데노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1931] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-0,4'-C-메틸렌티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1932] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-0,4'-C-메틸렌-5-메틸- N^4 -벤조일시티딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1933] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-0,4'-C-메틸렌- N^2 -디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1934] 고상 합성의 완결에 의하여, 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 아세토니트릴 중의 20% 디에틸아민 용액 (Biosolve BV, Valkenswaard, The Netherlands)으로 20 분 동안 처리하여 포스페이트 골격 상의 시아노에틸 보호기를 제거하였다.
- [1935] 후속하여, 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체로부터 개열하고 추가로 5 ml 농축 암모니아수를 사용하여 16 시간 동안 55°C에서 탈보호시켰다. 여과 또는 원심분리에 의하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드로부터 고

체 지지체를 분리하였다.

[1936] 다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 AKTA Explorer System (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 및 Source Q15 (GE Healthcare)로 충전된 컬럼 상의 음이온 교환 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 정제하였다. 완충제 A는 10 mM 과염소산나트륨, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4이었고 20% 아세토니트릴 중에 포함되었고 완충제 B는 500 mM 과염소산나트륨을 제외하고는 완충제 A와 동일하였다. 32 컬럼 용적 (CV) 내에서의 15%B 내지 55%B의 경사가 채용되었다. 280 nm에서의 UV 추적이 기록되었다. 적절한 분획을 수집하고 3 M NaOAc, pH=5.2 및 70% 에탄올로 침전시켰다. 마지막으로, 펠릿을 70% 에탄올로 세척하였다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 87.1%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5384.30 Da; 이론값: 5384.3 Da.

[1937] 실시예 134

[1938] $Gb^1 C^* b^1 Tb^1 Ab^1 dTdTdTdGdGdTa^* dGdTGb^1 Tb^1 Tb^1$ (시퀀스 동정 번호 210r)

[1939] 일반 절차에 따라 LNA를 CPG에 결합시켰다. 커플링 반응 및 캡핑 단계를 또한 실시예 133에서 기술된 바와 같이 실행하였다. 캡핑 단계 이후, 시스템을 800 μ l 아세토니트릴로 플러싱하고, THF/피리딘/H₂O 중의 0.02 M 요오드 400 μ l를 컬럼에 45 초 동안 삽입하였다. 산화 단계 후 24 μ l 아세토니트릴로 시스템을 플러싱하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 95.3%의 순도로 수득되었다.

[1940] 실시예 135

[1941] /5SpC3s/ $Gb^1 sC^* b^1 sTb^1 sAb^1 sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb^1 sTb^1 sTb^1$ (시퀀스 동정 번호 210v)

[1942] 실시예 133에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 그러나 마지막 뉴클레오타이드가 올리고뉴클레오타이드에 결합되고 후속하여 산화 및 캡핑 단계가 수행된 후, 아세토니트릴 중의 80 μ l 포스포르아미다이트-C3 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)가 첨가된 것은 예외로 한다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플러싱시켰다. 후속 단계들을 실시예 133에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 93.9%의 순도로 수득되었다.

[1943] 실시예 136

[1944] $Gb^1 sC^* b^1 sTb^1 sAb^1 sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb^1 sTb^1 sTb^1$ /3SpC3s/ (시퀀스 동정 번호 210w)

[1945] 3'-스페이서 C3 CPG (0.2 μ mol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μ l 아세토니트릴로 수차례 세척한 후, 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플러싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 후속 반응들을 실시예 133에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 89.7%의 순도로 수득되었다.

[1946] 실시예 137

[1947] $Gb^1 C^* b^1 Tb^1 Ab^1 dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb^1 Tb^1 Tb^1$ (시퀀스 동정 번호 210o)

[1948] 실시예 133 및 실시예 134에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 83.8%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5288.10 Da; 이론값: 5287.9 Da.

[1949] 실시예 138

[1950] $Gb^1 sC^* b^1 sTb^1 sAb^1 sdTsdTsdTdTsdGsdGsdTsdA^* sdGsdTsGb^1 sTb^1 sTb^1$ (시퀀스 동정 번호 210p)

[1951] 실시예 133에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정

제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 80.7%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5398.40 Da; 이론값: 5399.3 Da.

[1952] 실시예 139

[1953] $Gb^{1}ssC^{*}b^{1}ssTb^{1}ssdAssdTssdTssdTssdTssGssdTssdA^{*}ssdTssGssGb^{1}ssTb^{1}ssTb^{1}$ (시퀀스 동정 번호 210af)

[1954] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-티미딘-3'-O-숙시노일-결합 LCAA CPG (0.2 μ mol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μ l 아세토니트릴로 수차례 세척한 후, 아세토니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-티미딘-3'-[(β -벤조일머캅토)에틸]피롤리딘티오포스포라미다이트 (0.15 M) 및 아세토니트릴 중의 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 900 μ l의 DDTT (피리딘/아세토니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1955] 아세토니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌- N^2 -디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(β -벤조일머캅토)에틸]피롤리딘티오포스포라미다이트 (0.15 M) 및 아세토니트릴 중의 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 900 μ l의 DDTT (피리딘/아세토니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1956] 올리고뉴클레오타이드의 추가의 연장을 동일한 방법으로 수행하였다.

[1957] 고상 합성의 완결에 의하여, 고체-지지체로부터 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 개열시키고 티올-기를 탈보호하기 위하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 55 °C에서 15 내지 16 시간 동안 농축 에탄올 (암모니아/에탄올 3:1 v/v) 중의 암모니아 850 μ l로 처리하였다.

[1958] 다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 Mono Q 10/100 GL 컬럼을 사용하는 음이온-교환 크로마토그래피로 정제하였다. 완충제를 DEPC-처리수로 제조하고, 그들의 조성은 다음과 같다: 완충제 A: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0; 완충제 B: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8.0.

[1959] 실시예 140 내지 233

[1960] 표 7의 다른 올리고뉴클레오타이드가 일반 절차에 따라 그리고 실시예들에서 나타낸 바와 같이 합성되었다. β -D-티오-LNA, α -L-옥시-LNA, β -D-(NH)-LNA 또는 β -D-(NCH₃)-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 제조가 β -D-옥시-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드에서와 동일한 방법으로 수행되었다.

[1961] 실시예 234

[1962] $C^{*}b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}$ (시퀀스 동정 번호 218b)

[1963] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌- N^6 -벤조일아데노신-3'-O-숙시네이트

[1964] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌- N^6 -벤조일아데노신 (500 mg, 0.73 mmol), 95 mg 숙신산 무수물 (0.95 mmol, 1.2 당량) 및 116 mg DMAP (0.95 mmol, 1.2 당량)를 35 ml 디클로로메탄 중에 용해시켰다. 반응을 실온에서 밤새도록 교반시켰다. 반응 용액을 NaH₂PO₄ (0.1 M pH 5.5)로 2회 그리고 염수로 1회 추출하였다. 유기상을 무수 NaSO₄ 하에서 건조시키고, 여과하고 진공 중에서 건조될 때까지 농축시켰다. 헤미에스테르 유도체가 95% 수율로 수득되었고 어떠한 추가 정제 없이 사용되었다.

[1965] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌- N^6 -벤조일아데노신-3'-O-숙시노일-결합 LCAA CPG

- [1966] 70 mg 헤미에스테르 유도체 (90 μmol)를 0.3 ml DMF 중에 용해시키고, 11.6 μl DIEA (90 μmol) 및 pyBOP (90 μmol)를 첨가하고 1 분 동안 함께 혼합시켰다. 이 혼합물을 수동 합성기 중에서 LCAA CPG (500 Å, 80 내지 120 메쉬 크기, 300 mg)와 결합시키고 1.5 시간 동안 실온에서 교반시켰다. 지지체를 여과해내고 DMF, DCM 및 MeOH로 세척하였다. 건조 후, 적하량은 57 $\mu\text{mol/g}$ 인 것으로 결정되었다.
- [1967] 연장
- [1968] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤즈옥살아데노신-3'-O-숙시노일-결합 LCAA CPG (0.2 μmol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μl 아세토니트릴로 수차례 세척한 후, 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포라미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1969] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포라미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1970] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포라미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1971] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁴-벤조일-2'-디옥시시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포라미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1972] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁴-벤조일-2'-디옥시시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포라미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1973] 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포라미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안

삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1974]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부티릴-2'-디옥시구아노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1975]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부티릴-2'-디옥시구아노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1976]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1977]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1978]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1979]

아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부티릴-2'-디옥시구아노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플러싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

- [1980] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1981] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-[(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필]포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1982] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-[(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필]포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [1983] 고상 합성의 완결에 의하여, 안티센스-올리고뉴클레오티드를 아세토니트릴 중의 20% 디에틸아민 용액 (Biosolve BV, Valkenswaard, The Netherlands)으로 20 분 동안 처리하여 포스페이트 골격 상의 시아노에틸 보호기를 제거하였다. 후속하여, 안티센스-올리고뉴클레오티드를 고체 지지체로부터 개열하고 추가로 5 ml 농축 암모니아수를 사용하여 16 시간 동안 55°C에서 탈보호시켰다. 여과 또는 원심분리에 의하여 안티센스-올리고뉴클레오티드로부터 고체 지지체를 분리하였다.
- [1984] 다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오티드를 AKTA Explorer System (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 및 Source Q15 (GE Healthcare)로 충전된 컬럼 상의 음이온 교환 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 정제하였다. 완충제 A는 10 mM 과염소산나트륨, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4이었고 20% 아세토니트릴 중에 포함되었고 완충제 B는 500 mM 과염소산나트륨을 제외하고는 완충제 A와 동일하였다. 32 컬럼 용적 (CV) 내에서의 15%B 내지 55%B의 경사가 채용되었다. 280 nm에서의 UV 추적이 기록되었다. 적절한 분획을 수집하고 3 M NaOAc, pH=5.2 및 70% 에탄올로 침전시켰다. 마지막으로, 펠릿을 70% 에탄올로 세척하였다. 안티센스 올리고뉴클레오티드가 94.8%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5365.80 Da; 이론값: 5365.30 Da.
- [1985] **실시예 235**
- [1986] C^{*}b¹Ab¹Tb¹dGdAdAdTdTdGdAdCdCAB¹Gb¹Tb¹Ab¹ (시퀀스 동정 번호 218r)
- [1987] 일반 절차에 따라 LNA를 CPG에 결합시켰다. 커플링 반응 및 캡핑 단계를 또한 실시예 234에서 기술된 바와 같이 실행하였다. 캡핑 단계 이후, 시스템을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱하고, THF/피리딘/H₂O 중의 0.02 M 요오드 400 μ l를 컬럼에 45 초 동안 삽입하였다. 산화 단계 후 24 μ l 아세토니트릴로 시스템을 플래싱하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 97.8%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5125.10 Da.; 이론값: 5124.4 Da.
- [1988] **실시예 236**
- [1989] /5SpC3s/C^{*}b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹ (시퀀스 동정 번호 218t)
- [1990] 실시예 234에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 그러나 마지막 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드에 결합되고 후속하여 산화 및 캡핑 단계가 수행된 후, 아세토니트릴 중의 80 μ l 포스포르아미다이트-C3 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)가 첨가된 것은 예외로 한다. 커플

링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시켰다. 후속 단계들을 실시예 234에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 94.2%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5519.60 Da; 이론값: 5519.4 Da.

[1991] 실시예 237

[1992] $C^*b^1sAb^1sTb^1sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb^1sGb^1sTb^1sAb^1s/3SpC3/$ (시퀀스 동정 번호 218u)

[1993] 3'-스페이서 C3 CPG (0.2 μmol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μl 아세트니트릴로 수차례 세척한 후, 아세트니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌- N^6 -벤조일아데노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 후속 반응들을 실시예 234에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 94.3%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5519.10 Da; 이론값: 5519.4 Da.

[1994] 실시예 238

[1995] $C^*b^1ssAb^1ssTb^1ssdGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssAb^1ssGb^1ssTb^1ssAb^1$ (시퀀스 동정 번호 218aa)

[1996] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌- N^6 -벤조일아데노신-3'-O-숙시노일-결합 LCAA CPG (0.2 μmol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μl 아세트니트릴로 수차례 세척한 후, 아세트니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-티미딘-3'-[(β -벤조일머캅토)에틸]피롤리딘티오포스포르아미다이트 (0.15 M) 및 아세트니트릴 중의 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시키고, 900 μl 의 DDTT (피리딘/아세트니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1997] 아세트니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌- N^2 -디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(β -벤조일머캅토)에틸]피롤리딘티오포스포르아미다이트 (0.15 M) 및 아세트니트릴 중의 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시키고, 900 μl 의 DDTT (피리딘/아세트니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[1998] 올리고뉴클레오타이드의 추가의 연장을 동일한 방법으로 수행하였다.

[1999] 고상 합성의 완결에 의하여, 고체-지지체로부터 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 개열시키고 티올-기를 탈보호하기 위하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15 내지 16 시간 동안 농축 에탄올 (암모니아/에탄올 3:1 v/v) 중의 암모니아 850 μl 로 처리하였다.

[2000] 다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 Mono Q 10/100 GL 컬럼을 사용하는 음이온-교환 크로마토그래피로 정제하였다. 완충제를 DEPC-처리수로 제조하고, 그들의 조성은 다음과 같다: 완충제 A: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0; 완충제 B: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8.0.

[2001] 실시예 239

- [2002] $C^*b^1sAb^1sTb^1sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC^*sdC^*sAb^1sGb^1sTb^1sAb^1$ (시퀀스 동정 번호 218m)
- [2003] 실시예 234에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 93.8%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5394.00 Da; 이론값: 5393.3 Da.
- [2004] **실시예 240**
- [2005] $C^*b^1Ab^1Tb^1dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC^*sdC^*sAb^1Gb^1Tb^1Ab^1$ (시퀀스 동정 번호 218n)
- [2006] 실시예 234 및 실시예 235에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 구축 단위 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 94.7%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5297.30 Da; 이론값: 5297.0 Da.
- [2007] **실시예 241**
- [2008] $C^*b^1sAb^1sTb^1sdGsdA^*sdA^*sdTsdGsdGsdA^*sdCsAb^1sGb^1sTb^1sAb^1$ (시퀀스 동정 번호 218o)
- [2009] 실시예 234에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 92.8%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5410.40 Da; 이론값: 5410.3 Da.
- [2010] **실시예 242**
- [2011] $C^*b^1sAb^1sTb^1sdGsdA^*sdA^*sdTsdGsdGsdA^*sdC^*sdC^*sAb^1sGb^1sTb^1sAb^1$ (시퀀스 동정 번호 218p)
- [2012] 실시예 234에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 95.3%의 순도로 수득되었다. ESI-MS: 실험값: 5437.40 Da; 이론값: 5438.4 Da.
- [2013] **실시예 243**
- [2014] $C^*b^1sAb^1sTb^1sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC^*sdCsAbsGb^1sTb^1sAb^1$ (시퀀스 동정 번호 218q)
- [2015] 실시예 234에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 93.9%의 순도로 수득되었다. ESI MS: 실험값: 5378.80 Da; 이론값: 5379.3 Da.
- [2016] **실시예 244**
- [2017] $C^*b^1sAb^1sTb^1sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdc^*sAb^1sGb^1sTb^1sAb^1$ (시퀀스 동정 번호 218c)
- [2018] 실시예 234에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 92.9%의 순도로 수득되었다. ESI MS: 실험값: 5379.10 Da ; 이론값: 5379.3 Da.
- [2019] **실시예 245**
- [2020] $C^*b^1sAb^1sTb^1sdGdAdAdTdGdGdAdC^*sdC^*sAb^1sGb^1sTb^1sAb^1$ (시퀀스 동정 번호 218s)
- [2021] 실시예 234에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 94.5%의 순도로 수득되었다. ESI MS: 실험값: 5152.70 Da; 이론값: 5152.4 Da.
- [2022] **실시예 246**
- [2023] /5SpC3/sC^{*}b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹s/3SpC3/ (시퀀스 동정 번호 218v)
- [2024] 실시예 234, 실시예 236 및 실시예 237에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 구축 단위 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 94.4%의 순도로 수득되었다. ESI

MS: 실험값: 5673.50 Da; 이론값: 5673.5 Da

[2025] 실시예 247 내지 335

[2026] 표 8의 다른 올리고뉴클레오타이드가 일반 절차에 따라 그리고 실시예들에서 나타낸 바와 같이 합성되었다. β -D-티오-LNA, α -L-옥시-LNA, β -D-(NH)-LNA 또는 β -D-(NCH₃)-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드의 제조가 β -D-옥시-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오타이드에서와 동일한 방법으로 수행되었다.

[2027] 실시예 336

[2028] C^{*}b¹sGb¹sAb¹sTb¹sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb¹sC^{*}b¹sAb¹ (시퀀스 동정 번호 152h)

[2029] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-O-숙시노일-결합 LCAA CPG (0.2 μ mol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μ l 아세토니트릴로 수차례 세척한 후, 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플레싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2030] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플레싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2031] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N⁴-벤조일-2'-디옥시시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플레싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2032] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N⁴-벤조일-2'-디옥시시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플레싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2033] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-디옥시시티딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플레싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아

세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2034] 아세트니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부티릴-2'-디옥시구아노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2035] 아세트니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁴-벤조일-2'-디옥시시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2036] 아세트니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부티릴-2'-디옥시구아노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2037] 아세트니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁴-벤조일-2'-디옥시시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2038] 아세트니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2039] 아세트니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2040] 아세트니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초

동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2041] 아세트니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트니트릴로 플러싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2042] 아세트니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-[(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필]포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트니트릴로 플러싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2043] 고상 합성의 완결에 의하여, 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 아세트니트릴 중의 20% 디에틸아민 용액 (Biosolve BV, Valkenswaard, The Netherlands)으로 20 분 동안 처리하여 포스페이트 골격 상의 시아노에틸 보호기를 제거하였다. 후속하여, 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체로부터 개열하고 추가로 5 ml 농축 암모니아수를 사용하여 16 시간 동안 55°C에서 탈보호시켰다. 여과 또는 원심분리에 의하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드로부터 고체 지지체를 분리하였다.

[2044] 다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 AKTA Explorer System (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 및 Source Q15 (GE Healthcare)로 충전된 컬럼 상의 음이온 교환 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 정제하였다. 완충제 A는 10 mM 과염소산나트륨, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4이었고 20% 아세트니트릴 중에 포함되었고 완충제 B는 500 mM 과염소산나트륨을 제외하고는 완충제 A와 동일하였다. 32 컬럼 용적 (CV) 내에서의 15%B 내지 55%B의 경사가 채용되었다. 280 nm에서의 UV 추적이가 기록되었다. 적절한 분획을 수집하고 3 M NaOAc, pH=5.2 및 70% 에탄올로 침전시켰다. 마지막으로, 펠릿을 70% 에탄올로 세척하였다.

[2045] 실시예 337

[2046] C^{*}b¹Gb¹Ab¹Tb¹dAdCdGdC^{*}dGdTdCdC^{*}Ab¹C^{*}b¹Ab¹ (시퀀스 동정 번호 152q)

[2047] 일반 절차에 따라 LNA를 CPG에 결합시켰다. 커플링 반응 및 캡핑 단계를 또한 실시예 336에서 기술된 바와 같이 실행하였다. 커플링 단계 이후, 시스템을 800 μ l 아세트니트릴로 플러싱하고, THF/피리딘/H₂O 중의 0.02 M 요오드 400 μ l를 컬럼에 45 초 동안 삽입하였다. 산화 단계 후, 24 μ l 아세트니트릴로 시스템을 플러싱하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 93.1%의 순도로 수득되었다.

[2048] 실시예 338

[2049] /5SpC3s/C^{*}b¹sGb¹sAb¹sTb¹sdAsdC^{*}sdGsdC^{*}sdGsdTsdCsAb¹sC^{*}b¹sAb¹ (시퀀스 동정 번호 152s)

[2050] 실시예 336에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 그러나 마지막 뉴클레오타이드가 올리고뉴클레오타이드에 결합되고 후속하여 산화 및 캡핑 단계가 수행된 후, 아세트니트릴 중의 80 μ l 포스포르아미다이트-C3 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)가 첨가된 것은 예외로 한다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트니트릴로 플러싱시켰다. 후속 단계들을 실시예 336에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 96.5%의 순도로 수득되었다.

[2051] 실시예 339

- [2052] $C^*b^1sGb^1sAb^1sTb^1sdAsdC^*sdGsdCsdGsdTsdCsdC^*sAb^1sC^*b^1sAb^1/3SpC3s/$ (시퀀스 동정 번호 152t)
- [2053] 3'-스페이서 C3 CPG (0.2 μ mol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μ l 아세트오니트릴로 수차례 세척한 후, 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 후속 반응들을 실시예 336에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 92.1%의 순도로 수득되었다.
- [2054] 실시예 340
- [2055] $C^*b^1ssGb^1ssAb^1ssdTssdAssdC^*ssdGssdCssdGssdTssdCssdC^*ssAb^1ssC^*b^1ssAb^1$ (시퀀스 동정 번호 152aa)
- [2056] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-O-숙시노일-결합 LCAA CPG (0.2 μ mol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μ l 아세트오니트릴로 수차례 세척한 후, 아세트오니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-[(β -벤조일머캅토)에틸]피롤리딘놀티오포스포르아미다이트 (0.15 M) 및 아세트오니트릴 중의 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 900 μ l의 DDTT (피리딘/아세트오니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [2057] 아세트오니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-[(β -벤조일머캅토)에틸]피롤리딘놀티오포스포르아미다이트 (0.15 M) 및 아세트오니트릴 중의 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링을 실행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 900 μ l의 DDTT (피리딘/아세트오니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.
- [2058] 올리고뉴클레오티드의 추가의 연장을 동일한 방법으로 수행하였다.
- [2059] 고상 합성의 완결에 의하여, 고체-지지체로부터 안티센스-올리고뉴클레오티드를 개열시키고 티올-기를 탈보호하기 위하여 안티센스-올리고뉴클레오티드를 55 °C에서 15 내지 16 시간 동안 농축 에탄올 (암모니아/에탄올 3:1 v/v) 중의 암모니아 850 μ l로 처리하였다.
- [2060] 다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오티드를 Mono Q 10/100 GL 컬럼을 사용하는 음이온-교환 크로마토그래피로 정제하였다. 완충제를 DEPC-처리수로 제조하고, 그들의 조성은 다음과 같다: 완충제 A: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0; 완충제 B: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8.0.
- [2061] 실시예 341 내지 433
- [2062] 표 5의 다른 올리고뉴클레오티드가 일반 절차에 따라 그리고 실시예들에서 나타낸 바와 같이 합성되었다. β -D-티오-LNA, α -L-옥시-LNA, β -D-(NH)-LNA 또는 β -D-(NCH₃)-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 제조가 β -D-옥시-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오티드에서와 동일한 방법으로 수행되었다.

[2063] 실시예 434

[2064] $C^*b^1sTb^1sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC^*b^1sC^*b^1sGb^1$ (시퀀스 동정 번호 143h)

[2065] 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-메틸렌- N^2 -디메틸포르미딘구아노신-3'-O-숙시노일-결합 LCAA CPG (0.2 μmol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μl 아세트오니트릴로 수차례 세척한 후, 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-메틸렌-5-메틸- N^4 -벤조일시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2066] 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-메틸렌-5-메틸- N^4 -벤조일시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2067] 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT- N^6 -벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2068] 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT- N^2 -이소부틸렌-2'-디옥시구아노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2069] 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT- N^6 -벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2070] 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였

다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2071] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아테노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2072] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N⁴-벤조일-2'-디옥시시티딘-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2073] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2074] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N²-이소부틸-2'-디옥시구아노신-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2075] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N⁴-벤조일-2'-디옥시시티딘-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2076] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-메틸렌티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2077] 아세트오니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-[(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초

동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2078] 고상 합성의 완결에 의하여, 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 아세트오니트릴 중의 20% 디에틸아민 용액 (Biosolve BV, Valkenswaard, The Netherlands)으로 20 분 동안 처리하여 포스페이트 골격 상의 시아노에틸 보호기를 제거하였다.

[2079] 후속하여, 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체로부터 개열하고 추가로 5 ml 농축 암모니아수를 사용하여 16 시간 동안 55°C에서 탈보호시켰다. 여과 또는 원심분리에 의하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드로부터 고체 지지체를 분리하였다.

[2080] 다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 AKTA Explorer System (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 및 Source Q15 (GE Healthcare)로 충전된 컬럼 상의 음이온 교환 고정능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 정제하였다. 완충제 A는 10 mM 과염소산나트륨, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4이었고 20% 아세트오니트릴 중에 포함되었고 완충제 B는 500 mM 과염소산나트륨을 제외하고는 완충제 A와 동일하였다. 32 컬럼 용적 (CV) 내에서의 15%B 내지 55%B의 경사가 채용되었다. 280 nm에서의 UV 추적기 기록되었다. 적절한 분획을 수집하고 3 M NaOAc, pH=5.2 및 70% 에탄올로 침전시켰다. 마지막으로, 펠릿을 70% 에탄올로 세척하였다.

[2081] 실시예 435

[2082] $C^*b^1Tb^1sdC^*dGdTdCdAdTdAdGdAC^*b^1C^*b^1Gb^1$ (시퀀스 동정 번호 143ad)

[2083] 일반 절차에 따라 LNA를 CPG에 결합시켰다. 커플링 반응 및 캡핑 단계를 또한 실시예 434에서 기술된 바와 같이 실행하였다. 캡핑 단계 이후, 시스템을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱하고, THF/피리딘/H₂O 중의 0.02 M 요오드 400 μl 를 컬럼에 45 초 동안 삽입하였다. 산화 단계 후 24 μl 아세트오니트릴로 시스템을 플래싱하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 88.7%의 순도로 수득되었다.

[2084] 실시예 436

[2085] /5SpC3s/ $C^*b^1sTb^1sdC^*dGdTdC^*dA^*dTdAdGdA^*sC^*b^1sC^*b^1sGb^1$ (시퀀스 동정 번호 143af)

[2086] 실시예 434 및 실시예 435에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 그러나 마지막 뉴클레오타이드가 올리고뉴클레오타이드에 결합되고 후속하여 산화 및 캡핑 단계가 수행된 후, 아세트오니트릴 중의 80 μl 포스포르아미다이트-C3 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)가 첨가된 것은 예외로 한다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시켰다. 후속 단계들을 실시예 434 및 실시예 435에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 94.4%의 순도로 수득되었다.

[2087] 실시예 437

[2088] $C^*b^1sTb^1sdC^*dGdTdC^*dA^*dTdAdGdA^*sC^*b^1sC^*b^1sGb^1/3SpC3s/$ (시퀀스 동정 번호 143ag)

[2089] 3'-스페이서 C3 CPG (0.2 μmol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μl 아세트오니트릴로 수차례 세척한 후, 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O, 4'-C-메틸렌- N^2 -디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 후속 반응들을 실시예 434 및 실시예 435에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 91.6%의 순도로 수득되었다.

[2090] 실시예 438

[2091] $C^*b^1ssTb^1ssC^*b^1ssdGssdTssdC^*ssdAssdTssdAssdGssdAssC^*b^1ssC^*b^1ssGb^1$ (시퀀스 동정 번호 143t)

[2092] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-O-숙시노일-결합 LCAA CPG (0.2 μmol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μl 아세트오니트릴로 수차례 세척한 후, 아세트오니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-[(β-벤조일머캅토)에틸]피롤리디놀티오포스포르아미다이트 (0.15 M) 및 아세트오니트릴 중의 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 900 μl의 DDTT (피리딘/아세트오니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2093] 아세트오니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-[(β-벤조일머캅토)에틸]피롤리디놀티오포스포르아미다이트 (0.15 M) 및 아세트오니트릴 중의 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 900 μl의 DDTT (피리딘/아세트오니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2094] 올리고뉴클레오티드의 추가의 연장을 동일한 방법으로 수행하였다.

[2095] 고상 합성의 완결에 의하여, 고체-지지체로부터 안티센스-올리고뉴클레오티드를 개열시키고 티올-기를 탈보호하기 위하여 안티센스-올리고뉴클레오티드를 55 °C에서 15 내지 16 시간 동안 농축 에탄올 (암모니아/에탄올 3:1 v/v) 중의 암모니아 850 μl로 처리하였다.

[2096] 다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오티드를 Mono Q 10/100 GL 컬럼을 사용하는 음이온-교환 크로마토그래피로 정제하였다. 완충제를 DEPC-처리수로 제조하고, 그들의 조성은 다음과 같다: 완충제 A: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0; 완충제 B: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8.0.

[2097] 실시예 439 내지 534

[2098] 표 4의 다른 올리고뉴클레오티드가 일반 절차에 따라 그리고 실시예들에서 나타낸 바와 같이 합성되었다. β-D-티오-LNA, α-L-옥시-LNA, β-D-(NH)-LNA 또는 β-D-(NCH₃)-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 제조가 β-D-옥시-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오티드에서와 동일한 방법으로 수행되었다.

[2099] 실시예 535

[2100] $C^*b^1sAb^1sGb^1sdGsdCsdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsGb^1sTb^1sGb^1$ (시퀀스 동정 번호 213k)

[2101] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-O-숙시노일-결합 LCAA CPG (0.2 μmol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μl 아세트오니트릴로 수차례 세척한 후, 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT

보호기를 완전히 제거하였다.

[2102] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2103] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2104] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2105] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2106] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2107] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2108] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나

도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2109] 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2110] 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-디옥시티미딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2111] 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁶-벤조일-2'-디옥시아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2112] 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N⁴-벤조일-2'-디옥시시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2113] 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-N²-이소부티릴-2'-디옥시구아노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2114] 아세트오니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μl 아세트오니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전

히 제거하였다.

[2115] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-메틸렌-N⁶-벤조일아데노신-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2116] 아세토니트릴 중의 80 μ l 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-메틸렌-5-메틸-N⁴-벤조일시티딘-3'-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μ l Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다. 시스템을 320 μ l 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2117] 고상 합성의 완결에 의하여, 안티센스-올리고뉴클레오티드를 아세토니트릴 중의 20% 디에틸아민 용액 (Biosolve BV, Valkenswaard, The Netherlands)으로 20 분 동안 처리하여 포스페이트 골격 상의 시아노에틸 보호기를 제거하였다.

[2118] 후속하여, 안티센스-올리고뉴클레오티드를 고체 지지체로부터 개열하고 추가로 5 ml 농축 암모니아수를 사용하여 16 시간 동안 55°C에서 탈보호시켰다. 여과 또는 원심분리에 의하여 안티센스-올리고뉴클레오티드로부터 고체 지지체를 분리하였다.

[2119] 다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오티드를 AKTA Explorer System (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 및 Source Q15 (GE Healthcare)로 충전된 컬럼 상의 음이온 교환 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 정제하였다. 완충제 A는 10 mM 과염소산나트륨, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4이었고 20% 아세토니트릴 중에 포함되었고 완충제 B는 500 mM 과염소산나트륨을 제외하고는 완충제 A와 동일하였다. 32 컬럼 용적 (CV) 내에서의 15%B 내지 55%B의 경사가 채용되었다. 280 nm에서의 UV 추적이 기록되었다. 적절한 분획을 수집하고 3 M NaOAc, pH=5.2 및 70% 에탄올로 침전시켰다. 마지막으로, 펠릿을 70% 에탄올로 세척하였다.

[2120] 실시예 536

[2121] C^{*}b¹Ab¹Gb¹dGdC^{*}dAdTdAdAdTdAdAdAGb¹Tb¹Gb¹ (시퀀스 동정 번호 213n)

[2122] 일반 절차에 따라 LNA를 CPG에 결합시켰다. 커플링 반응 및 캡핑 단계를 또한 실시예 535에서 기술된 바와 같이 실행하였다. 캡핑 단계 이후, 시스템을 800 μ l 아세토니트릴로 플러싱하고, THF/피리딘/H₂O 중의 0.02 M 요오드 400 μ l를 컬럼에 45 초 동안 삽입하였다. 산화 단계 후 24 μ l 아세토니트릴로 시스템을 플러싱하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 91.4%의 순도로 수득되었다.

[2123] 실시예 537

[2124] /5SpC3s/C^{*}b¹sAb¹sGb¹sdGsdC^{*}sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsGb¹sTb¹sGb¹ (시퀀스 동정 번호 213o)

[2125] 실시예 535에서 예시화된 바와 같은 적절한 DNA 및 LNA 구축 단위로 일반 절차에 따라 화합물이 합성되었다. 그러나 마지막 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드에 결합되고 후속하여 산화 및 캡핑 단계가 수행된 후, 아세토니트릴 중의 80 μ l 포스포르아미다이트-C3 (0.07 M) 및 236 μ l DCI (0.25 M)가 첨가된 것은 예외로 한다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세토니트릴로 플래싱시켰다. 후속 단계들을 실시예 535에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 87.1%의 순도로 수득되었다.

[2126] 실시예 538

[2127] C^{*}b¹sAb¹sGb¹sdGsdC^{*}sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsGb¹sTb¹sGb¹/3SpC3s/ (시퀀스 동정 번호 213p)

[2128] 3'-스페이서 C3 CPG (0.2 μmol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μl 아세토니트릴로 수차례 세척한 후, 아세토니트릴 중의 80 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포라미다이트 (0.07 M) 및 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세토니트릴로 플래싱시키고, 640 μl Beaucage (0.2 M)를 컬럼에 180 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세토니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세토니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl 로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 후속 반응들을 실시예 535에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 정제 후, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 95.7%의 순도로 수득되었다.

[2129] 실시예 539

[2130] C^{*}b¹ssAb¹ssGb¹ssdGssdC^{*}ssdAssdTssdTssdAssdAssdTssdAssdAssAb¹ssGb¹ssTb¹ssGb¹ (시퀀스 동정 번호 213ae)

[2131] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-O-숙시노일-결합 LCAA CPG (0.2 μmol)를 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다. 총량 800 μl 아세트니트릴로 수차례 세척한 후, 아세트니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-티미딘-3'-[(β-벤조일머캅토)에틸]피콜리디놀티오포스포르아미다이트 (0.15 M) 및 아세트니트릴 중의 236 μl DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μl 아세트니트릴로 플래싱시키고, 900 μl의 DDTT (피리딘/아세트니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μl 아세트니트릴로 플러싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μl 및 448 μl N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μl 아세트니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μl로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2132] 아세트오니트릴 중의 10% 디클로로메탄 (v/v) 중의 38 μ l 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-메틸렌-N²-디메틸포름아미딘구아노신-3'-[(β -벤조일머캅토)에틸]피롤리딘놀티오포스포라미다이트 (0.15 M) 및 아세트오니트릴 중의 236 μ l DCI (0.25 M)로 커플링 반응을 수행하였다. 커플링 반응이 250 초 동안 일어나도록 허용하고, 과량의 시약을 800 μ l 아세트오니트릴로 플래싱시키고, 900 μ l의 DDTT (피리딘/아세트오니트릴 4:1 v/v 중의 0.05 M)를 컬럼에 240 초 동안 삽입하였다 시스템을 320 μ l 아세트오니트릴로 플래싱하였다. 캡핑 단계를 위하여, THF 중의 아세트산 무수물 (1:9 v/v) 448 μ l 및 448 μ l N-메틸이미다졸 (NMI)/THF/피리딘 (1:8:1)을 첨가하고 45 초 동안 반응하도록 허용하였다. 이 사이클의 말기에서, 시스템을 480 μ l 아세트오니트릴로 세척하였다. 화합물을 디클로로메탄 중의 3% 트리클로로아세트산 1400 μ l로 60 초 동안 처리하여 5'-DMT 보호기를 완전히 제거하였다.

[2133] 올리고뉴클레오타이드의 추가의 연장을 동일한 방법으로 수행하였다.

[2134] 고상 합성의 완결에 의하여, 고체-지지체로부터 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 개열시키고 티올-기를 탈보호하기 위하여 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 55 °C에서 15 내지 16 시간 동안 농축 에탄올 (암모니아/에탄올 3:1 v/v) 중의 암모니아 850 μ l로 처리하였다.

[2135] 다음으로, 조 안티센스-올리고뉴클레오타이드를 Mono Q 10/100 GL 컬럼을 사용하는 음이온-교환 크로마토그래피로 정제하였다. 완충제를 DEPC-처리수로 제조하고, 그들의 조성은 다음과 같다: 완충제 A: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0; 완충제 B: 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8.0.

[2136] 실시예 540 내지 640

[137] 표 9의 다른 올리고뉴클레오티드가 일반 절차에 따라 그리고 실시예들에서 나타낸 바와 같이 합성되었다. β -D-티오-LNA, α -L-옥시-LNA, β -D-(NH)-LNA 또는 β -D-(NCH₃)-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오티드의 제조가 β -D-옥시-LNA 단위를 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오티드에서와 동일한 방법으로 수행되었다.

[2138] 시퀀스 목록

[2139] 시퀀스 동정 번호 1: 호모 사피엔스 형질전환성장인자, 베타 수용기 II (TGFB2), 전사 변형 2, (안티센스; DNA

코드)

[2140] TTTAGCTACT AGGAATGGGA ACAGGAGGCA GGATGCTCAC CTGAGTATTT TGCTTTATTC 60

[2141] AATCTAATAA ACATTTTATT TATGTAAAAG ACAAACAATG CATAGAATAA AAATAAGTGC 120

[2142] TTGAGACTTT TGATATAAAA AGAGTATATA GCATTACAT TCCTATTTTA ATACATGAGT 180

[2143] ACAGCTGAAG TGTTCATAA AAGAATAAAA CTTTCCCTTT ATGTATAGTA GTGAAAAAAG 240

[2144] TCAGTATTTT TAGGAACTAC AGAATGTTAT TCCTTGGTCT TTTTCTTGA ATAAGAAAA 300

[2145] AAAACATAAA CAAAACAAGC CACAGTATCC TCTGACACTA CATTCCAGTT TATGCTGATA 360

[2146] ACCCAGAAGT GAGAATACTC TTGAATCTTG AATATCTCAT GAATGGACCA GTATTCTAGA 420

[2147] AACTCACCAC TAGAGGTCAA TGGGCAACAG CTATTGGGAT GGTATCAGCA TGCCCTACGG 480

[2148] TGCAAGTGGA ATTTCTAGGC GCCTCTATGC TACTGCAGCC AACTGTCTT TAACTCTCAG 540

[2149] CCCACCCACA CTGAGGAGGG TGCCTAGAGG TTCTATTTC AAACCTTTGC ATGTATCTTA 600

[2150] AAAATCTCAA TAAAATGAGA CCTTCCACCA TCCAAACAGA GCTGATATTC TCACTACCAG 660

[2151] TCCCTCTCTA ATATTCCTAT TTGGCTGAAA ATAAGTAGCT TCAAAAAGTT TTAAGAAAA 720

[2152] GATTACTTGC AGCATTAAAC CTTCTTTGTT GATTAACAAG TTTCCTATGG AGTTTTAAAG 780

[2153] CTCATACTTT GTTCTTGTC TTGTGGACAC AAATTTTCTA ACTGCAAATG GGACCTTTGT 840

[2154] GTCCACATT CAAATCCTCT CTAGTAATTT CTGCAAAGGT TGAGAAGGCT GGCATGATGG 900

[2155] AGAGAACGGT AACCATGAGG AAAGCTTCTT GGAGTAAAGC ACTCCTCTCT CCAATGCAGA 960

[2156] GGGTAAACT ATTAACATAT AAGCAAAAGA AACTTGGGCT AACTGAGACC CTAAAGGAG 1020

[2157] TTCCCTTTA GTCCAATAA AGGCCAACTT CAAATCTTAA CACCAGATAA GGTAGTCAA 1080

[2158] ATCATATTAT ATACCCAGAG AATGACTGCT TGAATGGACA TTTCTTACAA GGGACCTTGG 1140

[2159] TTAGGTGCAG ATTTAATTCC TAGACTGGG TCCAGGTAGG CAGTGGAAG AGCTAATGTT 1200

[2160] TACAGTGAGA AGTGAGGCAG CTTTGTAAGT GTCTCCACAC CTTACATTT TGTGAACGTG 1260

[2161] GACTGGAGAT AACTGAAAAC CATCTGCTAT CCTTACCTGG GGATCCAGAT TTTCTGCAA 1320

[2162] AATCTCCAAA TATTTATAA GTGGCTTCAC TTTTGAAC GCTGTGCTGA CCAACAAAA 1380

[2163] CATATGTTTA GAGTGCCTGA GGTATAGTC CTGACAATGA TAGTATTGTG TAGTTGAAAT 1440

[2164] CCTCTTCATC AGGCCAACT GTGCTTGAGC AATCAGGAGC CCAGAAAGAT GGAACCCATT 1500

[2165] GGTGTTTGTA TAGAAAATA GAAATCAAG TCAAGTGTA TGAAGAAAGTA AACACGATAA 1560

[2166] AGCCTAGAGT GAGAATTGTC TCCTTTTGTG AAAAGGATGA AGGCTGGGAG CAGAGAATAG 1620

[2167] TAACATAAGT GCAGGGGAAA GATGAAAAA AGAACAATTT TTCATTAGTA GATGGTGGGG 1680

[2168] CAATCGCATG GATGGGGACA TCTGTTCTGA TTTTCTGCA ACCCATGAAG GTAAAAAGTG 1740

[2169] GGGTTCAAAA CATCAAGGT ATTAAGATG GGTAGAGTT TCTAACTAG GTTGAGGGAG 1800

[2170] AGTTTCTAAA CTAGCCCCC AGATTGGGG CTGGAGCTT AAATGAAAAG TCCAGGAGAA 1860

[2171] ATAAGGCAC ACAGGAACCC CGGGAACACT GGTCTCAAA CAGTGCCACT GTACTTAGTT 1920

[2172] CCATGGCCAG AAGAGAAGTG CTAGGCAGG AATGATTATT TTGCAAAGC AAGTGCAATG 1980

[2173] TGGTCATAGC TGGCTGTGAG ACATGGAGCC TCTTCTCTCA TGCAAAGTTC ACTGTTTTAC 2040

[2174] AGTCAGAGAA CCACTGCATG TGTGATTGTC AAATGCTAAT GCTGTCATGG GTCCCTTCCT 2100

[2175] TCTCTGCTTG GTTCTGGAGT TCTCCAATAA AACCAATTTC CTGGGAATAT TTGATGTTTT 2160

[2176] TCCTTGCTCTC TTTTCAAGGT ATGGCTATAT ATATAGAGCT ATAGACATAT ATAGATATAT 2220

[2177] ATATATATAT ATAAAAATA GCTATTCATA TTTATATACA GGCATTAATA AAGTGCAAAT 2280

[2178] GTTATTGGCT ATTGTAAAA TCAATCTCAT TTCCTGAGGA AGTGCTAACA CAGCTTATCC 2340

[2179] TATGACAATG TCAAAGGCAT AGAATGCTCT ATGTCACCCA CTCCCTGCTG CTGTTGTTTC 2400

[2180] TGCTTATCCC CACAGCTTAC AGGGAGGGGA GTGACCCCT TGGTTTCCA GGAAGCATCA 2460

[2181] GTTCAGGGG AGCTTCCTGC TGCCTCTGTT CTTTGGTGAG AGGGGAGCC TCTTTGGACA 2520

[2182] TGGCCCAGCC TGCCCCAGAA GAGCTATTTG GTAGTGTTTA GGGAGCCGTC TTCAGGAATC 2580

[2183] TTCTCCTCCG AGCAGCTCCT CCCCAGAGC CTGTCCAGAT GCTCCAGCTC ACTGAAGCGT 2640

[2184] TCTGCCACAC ACTGGGCTGT GAGACGGGCC TCTGGGTCGT GGTCCCAGCA CTCAGTCAAC 2700

[2185] GTCTCACACA CCATCTGGAT GCCCTGGTGG TTGAGCCAGA AGCTGGGAAT TTCTGGTCGC 2760

[2186] CCTCGATCTC TCAACACGTT GTCCTTCATG CTTTCGACAC AGGGGTGCTC CCGCACCTTG 2820

[2187] GAACCAAATG GAGGCTCATA ATCTTTTACT TCTCCCACTG CATTACAGCG AGATGTCATT 2880

[2188] TCCCAGAGCA CCAGAGCCAT GGAGTAGACA TCGGTCTGCT TGAAGGACTC AACATTCTCC 2940

[2189] AAATTCATCC TGGATTCTAG GACTTCTGGA GCCATGTATC TTGCAGTTCC CACCTGCCCA 3000

[2190] CTGTTAGCCA GGTCATCCAC AGACAGAGTA GGGTCCAGAC GCAGGGAAAG CCCAAAGTCA 3060

[2191] CACAGGCAGC AGGTTAGGTC GTTCTTCACG AGGATATTGG AGCTCTTGAG GTCCCTGTGC 3120

[2192] ACGATGGGCA TCTTGGGCT CCCACATGGA GTGTGATCAC TGTGGAGGTG AGCAATCCCC 3180

[2193] CGGGCGAGGG AGCTGCCAG CTTGCGCAGG TCCTCCCAGC TGATGACATG CCGCGTCAGG 3240

[2194] TACTCTGTA GGTGCCCCTT GCGTGGAAG GCGGTGATCA GCCAGTATTG TTTCCCCAAC 3300

[2195] TCCGTCTTCC GCTCCTCAGC CGTCAGGAAC TGGAGTATGT TCTCATGCTT CAGATTGATG 3360

[2196] TCTGAGAAGA TGTCTTCTC TGTCTTCAA GAGGCATACT CCTCATAGGG AAAGATCTTG 3420

[2197] ACTGCCACTG TCTCAAAGTG CTCTGAAGTG TTCTGCTTCA GCTTGGCCTT ATAGACCTCA 3480

[2198] GCAAAGCGAC CTTTCCCCAC CAGGGTGTCC AGCTCAATGG GCAGCAGCTC TGTGTTGTGG 3540

[2199] TTGATGTTGT TGGCACACGT GGAGCTGATG TCAGAGCGGT CATCTTCCAG GATGATGGCA 3600

[2200] CAGTGCTCGC TGAAGTCCAT GAGCTTCCGC GTCTTGCCG TTTCCAGGT TGAAGTCCAG 3660

[2201] TTCTGCTGCC GGTAAACGCG GTAGCAGTAG AAGATGATGA TGACAGATAT GGCAACTCCC 3720

[2202] AGTGGTGCCA GGAGGCTGAT GCCTGTCCTT TGAAATATGA CTAGCAACAA GTCAGGATTG 3780

[2203] CTGGTGTTAT ATTCTTCTGA GAAGATGATG TTGTCATTGC ACTCATCAGA GCTACAGGAA 3840

[2204] CACATGAAGA AAGTCTCACC AGGCTTTTTT TTTTCTTCA TAATGCATT TGGAGAAGCA 3900

[2205] GCATCTTCCA GAATAAAGTC ATGGTAGGGG AGCTTGGGGT CATGGCAAAC TGTCTCTAGT 3960

[2206] GTTATGTTCT CGTCATTCTT TCTCCATACA GCCACACAGA CTTCTGTGG CTTCTCACAG 4020

[2207] ATGGAGGTGA TGCTGCAGTT GCTCATGCAG GATTTCTGGT TGTCACAGGT GGAAATCTC 4080

[2208] ACATCACAAA ATTTACACAG TTGTGGAAAC TTGACTGCAC CGTTGTTGTC AGTGAATATC 4140

[2209] ATGTCGTTAT TAACCGACTT CTGAACGTGC GGTGGGATCG TGCTGGCGAT ACGCGTCCAC 4200

[2210] AGGACGATGT GCAGCGGCCA CAGGCCCTG AGCAGCCCC GACCCATGGC AGACCCCGCT 4260

[2211]	GCTCGTCATA GACCGAGCCC CCAGCGCAGC GGACGGCGCC TTCCCGGACC CCTGGCTGCG 4320
[2212]	CCTCCGCGCC GCGCCCTCTC CGGACCCCGC GCCGGGCCGG CAGCGCAGAT GTGCGGGCCA 4380
[2213]	GATGTGGCGC CCGCTCGCCA GCCAGGAGGG GGCCTGGAGG CCGGCGAGGC GCGGGGAGGC 4440
[2214]	CCCCGGCGGC CGAGGGAAGC TGCACAGGAG TCCGGCTCCT GTCCCGAGCG GGTGCACGCG 4500
[2215]	CGGGGGTGTC GTCGCTCCGT GCGCGCGAGT GACTCACTCA ACTTCAACTC AGCGCTGCGG 4560
[2216]	GGGAAACAGG AAACCTCTCG CCAACAGCTG GGCAGGACCT CTCTCCGCCC GAGAGCCTTC 4620
[2217]	TCCCTCTCC 4629
[2218]	시퀀스 동정 번호 2: 호모 사피엔스 형질전환성장인자, 베타 수용기 II (TGFB2), 전사 변형 2, mRNA (센스; DNA 코드로 작성됨)
[2219]	GGAGAGGGAG AAGGCTCTCG GCGGAGAGA GGTCTGCCC AGCTGTTGGC GAGGAGTTTC 60
[2220]	CTGTTTCCCC CGCAGCGCTG AGTTGAAGTT GAGTGAGTCA CTCGCGCGCA CGGAGCGACG 120
[2221]	ACACCCCGC GCGTGCACCC GCTCGGACA GGAGCCGAC TCCTGTGAG CTTCCCTCGG 180
[2222]	CCGCCGGGGG CCTCCCCGCG CCTCGCCGGC CTCCAGGCC CCTCTGGCT GCGAGCGGG 240
[2223]	CGCCACATCT GGCCCGACA TCTGCGCTGC CGGCCGCG CGGGGTCCG AGAGGCGCG 300
[2224]	GCGCGGAGGC GCAGCCAGGG GTCCGGGAAG GCGCCGTCCG CTGCGCTGGG GGCTCGGTCT 360
[2225]	ATGACGAGCA GCGGGGTCTG CCATGGGTCG GGGGCTGCTC AGGGGCTGT GGCCGCTGCA 420
[2226]	CATCGTCCTG TGGACGCGTA TCGCCAGCAC GATCCCACCG CACGTTTACA AGTCGGTTAA 480
[2227]	TAACGACATG ATAGTCACTG ACAACAACGG TGCAGTCAAG TTTCCACAAC TGTGTAAATT 540
[2228]	TTGTGATGTG AGATTTTCCA CCTGTGACAA CCAGAAATCC TGCATGAGCA ACTGCAGCAT 600
[2229]	CACCTCCATC TGTGAGAAGC CACAGGAAGT CTGTGTGGCT GTATGGAGAA AGAATGACGA 660
[2230]	GAACATAACA CTAGAGACAG TTTGCCATGA CCCAAGCTC CCCTACCATG ACTTTATTCT 720
[2231]	GGAAGATGCT GCTTCTCAA AGTGCATTAT GAAGGAAAAA AAAAGCCTG GTGAGACTTT 780
[2232]	CTTCATGTGT TCCTGTAGCT CTGATGAGTG CAATGACAAC ATCATCTTCT CAGAAGAATA 840
[2233]	TAACACCAGC AATCCTGACT TGTTGCTAGT CATATTTCAA GTGACAGGCA TCAGCCTCCT 900
[2234]	GCCACCCTG GGAGTTGCCA TATCTGTCAT CATCATCTTC TACTGCTACC GCGTTAACCG 960
[2235]	GCAGCAGAAG CTGAGTTCAA CCTGGGAAAC CGCAAGACG CGGAAGCTCA TGGAGTTCAG 1020
[2236]	CGAGCACTGT GCCATCATCC TGAAGATGA CCGCTCTGAC ATCAGCTCCA CGTGTGCCAA 1080
[2237]	CAACATCAAC CACAACACAG AGCTGCTGCC CATGAGCTG GACACCCTGG TGGGAAAGG 1140
[2238]	TCGCTTTGCT GAGGTCTATA AGGCCAAGCT GAAGCAGAAC ACTTCAGAGC AGTTTGAGAC 1200
[2239]	AGTGGCAGTC AAGATCTTTC CCTATGAGGA GTATGCCTCT TGAAGACAG AGAAGGACAT 1260
[2240]	CTTCTCAGAC ATCAATCTGA AGCATGAGAA CATACTCCAG TTCCTGACGG CTGAGGAGCG 1320
[2241]	GAAGACGGAG TTGGGAAAC AATACTGGCT GATCACCGCC TTCCACGCCA AGGGCAACCT 1380
[2242]	ACAGGAGTAC CTGACGCGGC ATGTCATCAG CTGGGAGGAC CTGCGCAAGC TGGGAGCTC 1440
[2243]	CCTCGCCCGG GGGATTGCTC ACCTCCACAG TGATCACT CCATGTGGGA GGCCCAAGAT 1500
[2244]	GCCCATCGTG CACAGGGACC TCAAGAGCTC CAATATCCTC GTGAAGAAGC ACCTAACCTG 1560
[2245]	CTGCCTGTGT GACTTTGGGC TTTCCCTGCG TCTGGACCCT ACTCTGTCTG TGGATGACCT 1620

[2246] GGCTAACAGT GGGCAGGTGG GAACTGCAAG ATACATGGCT CCAGAAGTCC TAGAATCCAG 1680

[2247] GATGAATTTG GAGAATGTTG AGTCCTTCAA GCAGACCGAT GTCTACTCCA TGGCTCTGGT 1740

[2248] GCTCTGGGAA ATGACATCTC GCTGTAATGC AGTGGGAGAA GTAAAAGATT ATGAGCCTCC 1800

[2249] ATTTGGTTTC AAGGTGCGGG AGCACCCCTG TGTCGAAAAGC ATGAAGGACA ACGTGTGTAG 1860

[2250] AGATCGAGGG CGACCAGAAA TTCCAGCTT CTGGCTCAAC CACCAGGGCA TCCAGATGGT 1920

[2251] GTGTGAGACG TTGACTGAGT GCTGGGACCA CGACCCAGAG GCCCGTCTCA CAGCCCAGTG 1980

[2252] TGTGGCAGAA CGCTTCAGTG AGCTGGAGCA TCTGGACAGG CTCTCGGGGA GGAGCTGCTC 2040

[2253] GGAGGAGAAG ATTCTTGAAG ACGGCTCCCT AAACACTACC AAATAGCTCT TCTGGGGCAG 2100

[2254] GCTGGGCCAT GTCCAAAGAG GCTGCCCCCTC TCACCAAAGA ACAGAGGCAG CAGGAAGCTG 2160

[2255] CCCCTGAACT GATGCTTCCT GGAAAACCAA GGGGGTCACT CCCCTCCCTG TAAGCTGTGG 2220

[2256] GGATAAGCAG AAACAACAGC AGCAGGGAGT GGGTGACATA GAGCATTCTA TGCCTTTGAC 2280

[2257] ATTGTCATAG GATAAGCTGT GTTAGCACTT CCTCAGGAAA TGAGATTGAT TTTTACAATA 2340

[2258] GCCAATAACA TTTGCACTTT ATTAATGCCT GTATATAAAT ATGAATAGCT ATGTTTTATA 2400

[2259] TATATATATA TATATCTATA TATGTCTATA GCTCTATATA TATAGCCATA CCTTGAAAAG 2460

[2260] AGACAAGGAA AAACATCAAA TATTCCCAGG AAATTGGTTT TATTGGAGAA CTCCAGAACC 2520

[2261] AAGCAGAGAA GGAAGGGACC CATGACAGCA TTAGCATTTG ACAATCACAC ATGCAGTGGT 2580

[2262] TCTCTGACTG TAAAACAGTG AACTTTGCAT GAGGAAAGAG GCTCCATGTC TCACAGCCAG 2640

[2263] CTATGACCAC ATTGCACTTG CTTTGTGAAA ATAATCATTC CCTGCCTAGC ACTTCTCTTC 2700

[2264] TGGCCATGGA ACTAAGTACA GTGGCACTGT TTGAGGACCA GTGTTCCCGG GGTTCTCTGTG 2760

[2265] TGCCCTTATT TCTCTGGAC TTTTCATTTA AGCTCCAAGC CCCAAATCTG GGGGGCTAGT 2820

[2266] TTAGAAATCT TCCCTCAACC TAGTTTAGAA ACTCTACCCC ATCTTTAATA CCTTGAATGT 2880

[2267] TTTGAACCCC ACTTTTTACC TTCATGGGTT GCAGAAAAAT CAGAACAGAT GTCCCCATCC 2940

[2268] ATGCGATTGC CCCACCATCT ACTAATGAAA AATTGTTCTT TTTTTCATCT TTCCCCTGCA 3000

[2269] CTTATGTTAC TATTCTCTGC TCCCAGCCTT CATCCTTTTC TAAAAAGGAG CAAATTCTCA 3060

[2270] CTCTAGGCTT TATCGTGTTC ACTTTTTCAT TACACTTGAC TTGATTTTCT AGTTTTCTAT 3120

[2271] ACAAACACCA ATGGGTTCCT TCTTCTGGG CTCCTGATTG CTCAAGCACA GTTTGGCCTG 3180

[2272] ATGAAGAGGA TTTCAACTAC ACAATACTAT CATTGTCAGG ACTATGACCT CAGGCACTCT 3240

[2273] AAACATATGT TTTGTTTGGT CAGCACAGCG TTCAAAAAG TGAAGCCACT TTATAAATAT 3300

[2274] TTGGAGATTT TGCAGGAAAA TCTGGATCCC CAGGTAAGGA TAGCAGATGG TTTTCAGTTA 3360

[2275] TCTCCAGTCC ACGTTCACAA AATGTGAAGG TGTGGAGACA CTTACAAAGC TGCCTCACTT 3420

[2276] CTCCTGTAA ACATTAGCTC TTTCCACTGC CTACCTGGAC CCCAGTCTAG GAATTAAATC 3480

[2277] TGCACCTAAC CAAGGTCCTT TGTAAGAAAT GTCCATTCAA GCAGTCATTC TCTGGGTATA 3540

[2278] TAATATGATT TTGACTACCT TATCTGGTGT TAAGATTGA AGTTGGCCTT TTATTGGAAT 3600

[2279] AAAGGGGAAC TCCTTTAAGG GTCTCAGTTA GCCCAAGTTT CTTTGTCTTA TATGTTAATA 3660

[2280] GTTTTACCCT CTGCATTGGA GAGAGGAGTG CTTTACTCCA AGAAGCTTTC CTCATGGTTA 3720

[2281] CCGTTCTCTC CATCATGCCA GCCTTCTCAA CCTTTCAGTA AATTACTAGA GAGGATTGTA 3780

[2282]	ATGTGGGACA CAAAGGTCCC ATTTGCAGTT AGAAAATTTG TGTCCACAAG GACAAGAACA 3840
[2283]	AAGTATGAGC TTAAAACTC CATAGGAAAC TTGTTAATCA ACAAAGAAGT GTTAATGCTG 3900
[2284]	CAAGTAATCT CTTTTTAAA ACTTTTGTAA GCTACTTATT TTCAGCCAAA TAGGAATATT 3960
[2285]	AGAGAGGGAC TGGTAGTGAG AATATCAGCT CTGTTTGGAT GGTGGAAGGT CTCATTTTAT 4020
[2286]	TGAGATTTTT AAGATACATG CAAAGGTTTG GAAATAGAAC CTCTAGGCAC CCTCCTCAGT 4080
[2287]	GTGGGTGGGC TGAGAGTTAA AGACAGTGTG GCTGCAGTAG CATAGAGGCG CCTAGAAATT 4140
[2288]	CCACTTGCAC CGTAGGGCAT GCTGATACCA TCCAATAGC TGTGCCCCAT TGACCTCTAG 4200
[2289]	TGGTGAGTTT CTAGAATACT GGTCCATTCA TGAGATATTC AAGATTCAAG AGTATTCTCA 4260
[2290]	CTTCTGGGTT ATCAGCATAA ACTGGAATGT AGTGTGAGAG GATACTGTGG CTTGTTTTGT 4320
[2291]	TTATGTTTTT TTTTCTTATT CAAGAAAAAA GACCAAGGAA TAACATTCTG TAGTTCCTAA 4380
[2292]	AAATACTGAC TTTTTCCTACT ACTATACATA AAGGGAAAGT TTTATTCTTT TATGGAACAC 4440
[2293]	TTCAGCTGTA CTCATGTATT AAAATAGGAA TGTGAATGCT ATATACTCTT TTTATATCAA 4500
[2294]	AAGTCTCAAG CACTTATTTT TATTCTATGC ATTGTTTGTG TTTTACATAA ATAAAAATGTT 4560
[2295]	TATTAGATTG AATAAAGCAA AATACTCAGG TGAGCATCCT GCCTCCTGTT CCCATTCTTA 4620
[2296]	GTAGCTAAA 4629
[2297]	시퀀스 동정 번호 3: 호모 사피엔스 형질전환성장인자, 베타 수용기 II (TGFB2), 전사 변형 2, mRNA (센스; RNA 코드로 작성됨)
[2298]	GGAGAGGGAG AAGGCUCUCG GGCGGAGAGA GGUCCUGCCC AGCUGUUGGC GAGGAGUUUC 60
[2299]	CUGUUUCCCC CGCAGCGCUG AGUUGAAGUU GAGUGAGUCA CUCGCGCGCA CGGAGCGACG 120
[2300]	ACACCCCGC GCGUGCACCC GCUCGGGACA GGAGCCGGAC UCCUGUGCAG CUUCCUCGG 180
[2301]	CCGCCGGGGG CCUCCCCGCG CCUCGCCGGC CUCCAGGCC CCUCCUGGCU GGCGAGCGGG 240
[2302]	CGCCACAUCU GGCCCGCACA UCUGCGCUGC CGGCCCGGCG CGGGGUCCGG AGAGGGCGCG 300
[2303]	GCGCGGAGGC GCAGCCAGGG GUCCGGGAAG GCGCCGUCCG CUGCGCUGGG GGUCUGGUCU 360
[2304]	AUGACGAGCA GCGGGGUCUG CCAUGGGUCG GGGGCUGCUC AGGGGCCUGU GGCCGCUGCA 420
[2305]	CAUCGUCCUG UGGACGCGUA UGCCAGCAC GAUCCACCG CACGUUCAGA AGUCGGUUA 480
[2306]	UAACGACAUG AUAGUCACUG ACAACAACGG UGCAGUCAAG UUCCACAAC UGUGUAAA 540
[2307]	UUGUGAUGUG AGAUUUUCCA CCUGUGACAA CCAGAAAUCC UGCAUGAGCA ACUGCAGCAU 600
[2308]	CACCUCAUC UGUGAGAAGC CACAGGAAGU CUGUGUGGCU GUAUGGAGAA AGAAUGACGA 660
[2309]	GAACAUACA CUAGAGACAG UUUGCCAUGA CCCCAGCUC CCUACCAUG ACUUUAUUCU 720
[2310]	GGAAGAUGCU GCUUCUCCAA AGUGCAUUAU GAAGGAAAAA AAAAGCCUG GUGAGACUUU 780
[2311]	CUUCAUGUGU UCCUGUAGCU CUGAUGAGUG CAAUGACAAC AUCAUCUUCU CAGAAGAAUA 840
[2312]	UAACACCAGC AAUCCUGACU UGUUGCUAGU CAUAUUUCA GUGACAGGCA UCAGCCUCCU 900
[2313]	GCCACCACUG GGAGUUGCCA UAUCUGUCAU CAUCAUCUUC UACUGCUACC GCGUUAACCG 960
[2314]	GCAGCAGAAG CUGAGUUCAA CCUGGGAAAC CGCAAGACG CGGAAGCUA UGGAGUUCAG 1020
[2315]	CGAGCACUGU GCCAUCAUCC UGGAAGAUGA CCGCUCUGAC AUCAGCUCCA CGUGUGCCAA 1080
[2316]	CAACAUCAAC CACAACACAG AGCUGCUGCC CAUUGAGCUG GACACCCUGG UGGGGAAAGG 1140

[2317] UCGCUUUGCU GAGGUCUAUA AGGCCAAGCU GAAGCAGAAC ACUUCAGAGC AGUUUGAGAC 1200

[2318] AGUGGCAGUC AAGAUCUUUC CCUAUGAGGA GUAUGCCUCU UGGAAGACAG AGAAGGACAU 1260

[2319] CUUCUCAGAC AUCAAUCUGA AGCAUGAGAA CAUACUCCAG UUCCUGACGG CUGAGGAGCG 1320

[2320] GAAGACGGAG UUGGGGAAAC AAUACUGGCU GAUACCGGCC UUCCACGCCA AGGGCAACCU 1380

[2321] ACAGGAGUAC CUGACGCGGC AUGUCAUCAG CUGGGAGGAC CUGCGCAAGC UGGGCAGCUC 1440

[2322] CCUCGCCCGG GGAUUGCUC ACCUCCACAG UGAUCACACU CCAUGUGGGA GGCCCAAGAU 1500

[2323] GCCCAUCGUG CACAGGGACC UCAAGAGCUC CAAUAUCCUC GUGAAGAACG ACCUAACCUG 1560

[2324] CUGCCUGUGU GACUUUGGGC UUUCCUGCG UCUGGACCCU ACUCUGUCUG UGGAUGACCU 1620

[2325] GGCUAACAGU GGCAGGUGG GAACUGCAAG AUACAUGGCU CCAGAAGUCC UAGAAUCCAG 1680

[2326] GAUGAAUUUG GAGAAUGUUG AGUCCUCAA GCAGACCGAU GUCUACUCCA UGGCUCUGGU 1740

[2327] GCUCUGGGAA AUGACAUCUC GCUGUAAUGC AGUGGGAGAA GUAAAAGAU AUGAGCCUCC 1800

[2328] AUUUGGUUCC AAGGUGCGGG AGCACCCUG UGUCGAAAGC AUGAAGGACA ACGUGUUGAG 1860

[2329] AGAUCGAGGG CGACCAGAAA UUCCAGCUU CUGGCUCAAC CACCAGGGCA UCCAGAUGGU 1920

[2330] GUGUGAGACG UUGACUGAGU GCUGGGACCA CGACCCAGAG GCCCGUCUCA CAGCCCAGUG 1980

[2331] UGUGGCAGAA CGCUUCAGUG AGCUGGAGCA UCUGGACAGG CUCUCGGGGA GGAGCUGCUC 2040

[2332] GGAGGAGAAG AUUCCUGAAG ACGGCUCCCU AAACACUACC AAUAGCUCU UCUGGGGCAG 2100

[2333] GCUGGGCCAU GUCCAAAGAG GCUGCCCUC UCACCAAAGA ACAGAGGCAG CAGGAAGCUG 2160

[2334] CCCUGAACU GAUGCUUCCU GGAAAACCA GGGGUCACU CCCUCCUG UAAGCUGUGG 2220

[2335] GGAUAAGCAG AAACAACAGC AGCAGGGAGU GGGUGACUA GAGCAUUCUA UGCCUUUGAC 2280

[2336] AUUGUCAUAG GAUAAGCUGU GUUAGCACUU CCUCAGGAAA UGAGAUUGAU UUUUACAAUA 2340

[2337] GCCAAUACA UUUGCACUU AUUAAUGCCU GUUAUAAAU AUGAAUAGCU AUGUUUUAUA 2400

[2338] UAUUAUAUA UUAUCUAUA UAUGUCUAUA GCUCUAUAUA UAUAGCCUA CCUUGAAAAG 2460

[2339] AGACAAGGAA AAACAUCAAA UAUUCCAGG AAUUGGUUU UAUUGGAGAA CUCCAGAACC 2520

[2340] AAGCAGAGAA GGAAGGGACC CAUGACAGCA UUAGCAUUUG ACAUUCACAC AUGCAGUGGU 2580

[2341] UCUCUGACUG UAAAACAGUG AACUUUGCAU GAGGAAAGAG GCUCCAUGUC UCACAGCCAG 2640

[2342] CUAUGACCAC AUUGCACUUG CUUUUGCAAA AUAUUAUUC CCUGCCUAGC ACUUCUCUUC 2700

[2343] UGGCCAUGGA ACUAAGUACA GUGGCACUGU UUGAGGACCA GUGUCCCGG GGUUCCUGUG 2760

[2344] UGCCCUIAUU UCUCUGGAC UUUUCAUUA AGCUCCAAGC CCCAAUCUG GGGGGCUAGU 2820

[2345] UUAGAAACUC UCCCUCAACC UAGUUUAGAA ACUCUACCCC AUCUUUAUA CCUUGAAUGU 2880

[2346] UUUGAACCCC ACUUUUUACC UUCAUGGGU GCAGAAAAU CAGAACAGAU GUCCCCAUCC 2940

[2347] AUGCGAUUGC CCCACCAUCU ACUAAUGAAA AAUUGUUCU UUUUUAUCU UUCCCCUGCA 3000

[2348] CUUAUGUAC UAUUCUCUGC UCCAGCCU CAUCCUUUC UAAAAAGGAG CAAAUUCUCA 3060

[2349] CUCUAGGCUU UAUCGUGUU ACUUUUUCAU UACACUUGAC UUGAUUUUCU AGUUUUCUAU 3120

[2350] ACAAACACCA AUGGGUCCA UCUUUCUGG CUCCUGAUUG CUAAGCACA GUUUGGCCUG 3180

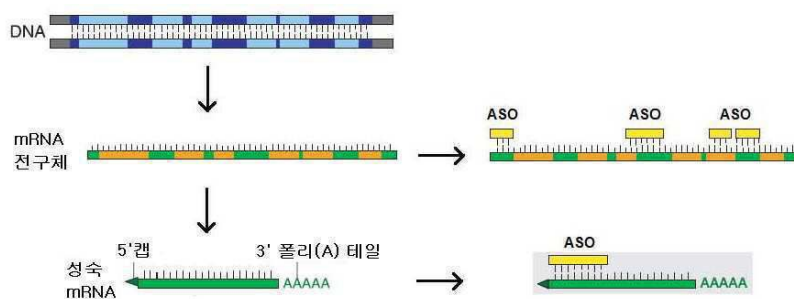
[2351] AUGAAGAGGA UUUAACUAC ACAAUACUAU CAUUGUCAGG ACUAUGACCU CAGGCACUCU 3240

[2352] AAACAUUGU UUUGUUUGU CAGCACAGCG UUCAAAAAG UGAAGCCACU UUAUAAUAU 3300

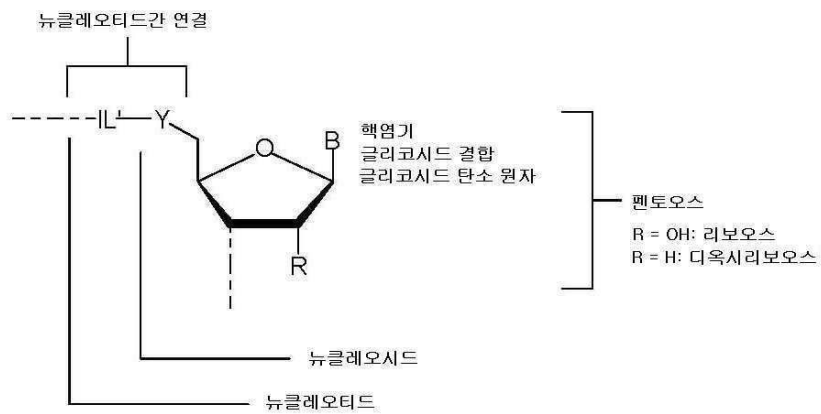
[2353] UUGGAGAUUU UGCAGGAAAA UCUGGAUCCC CAGGUAAGGA UAGCAGAUGG UUUUCAGUUA 3360
 [2354] UCUCAGUCC ACGUUCACAA AAUGUGAAGG UGUGGAGACA CUUACAAAGC UGCCUCACUU 3420
 [2355] CUCACUGUAA ACAUUAGCUC UUUCCACUGC CUACCUGGAC CCCAGUCUAG GAAUUAUAUC 3480
 [2356] UGCACCUAAC CAAGGUCCCU UGUAAGAAAU GUCCAUAUCAA GCAGUCAUUC UCUGGGUAUA 3540
 [2357] UAAUAUGAUU UUGACUACCU UAUCUGGUGU UAAGAUUUGA AGUUGGCCUU UUAUUGGACU 3600
 [2358] AAAGGGGAAC UCCUUUAAGG GUCUCAGUUA GCCCAAGUUU CUUUUGCUUA UAUGUUAUA 3660
 [2359] GUUUUACCCU CUGCAUUGGA GAGAGGAGUG CUUUACUCCA AGAAGCUUUC CUCAUGGUUA 3720
 [2360] CCGUUCUCUC CAUACUGCCA GCCUUCUCAA CCUUUGCAGA AAUACUAGA GAGGAUUUGA 3780
 [2361] AUGUGGGACA CAAAGGUCCC AUUUGCAGUU AGAAAAUUG UGUCCACAAG GACAAGAACA 3840
 [2362] AAGUAUGAGC UUUAAAACUC CAUAGGAAAC UUGUAAUUA ACAAAGAAGU GUUAAUGCUG 3900
 [2363] CAAGUAAUCU CUUUUUUAAA ACUUUUUGAA GCUACUUAU UUCAGCCAAA UAGGAAUAU 3960
 [2364] AGAGAGGGAC UGGUAGUGAG AAUAUCAGCU CUGUUUGGAU GGUGGAAGGU CUCAUUUUAU 4020
 [2365] UGAGAUUUU AAGAUACAUG CAAAGGUUUG GAAUAGAAC CUCUAGGCAC CCUCCUCAGU 4080
 [2366] GUGGGUGGGC UGAGAGUUA AGACAGUGUG GCUGCAGUAG CAUAGAGGCG CCUAGAAAU 4140
 [2367] CCACUUGCAC CGUAGGGCAU GCUGAUACCA UCCCAAUAGC UGUUGCCCAU UGACCUCUAG 4200
 [2368] UGGUGAGUUU CUAGAAUACU GGUCCAUUA UGAGAUUUC AAGAUUCAAG AGUAUUCUA 4260
 [2369] CUUCUGGUU AUCAGCAUA ACUGGAAUGU AGUGUCAGAG GAUACUGUG CUUGUUUUGU 4320
 [2370] UUAUGUUUUU UUUUCUUAU CAAGAAAAA GACCAAGGAA UAACAUUCUG UAGUCCUA 4380
 [2371] AAAUACUGAC UUUUUCACU ACUAUACAUA AAGGGAAAGU UUAUUCUUU UAUGGAACAC 4440
 [2372] UUCAGCUGUA CUCAUGUAU AAAAUAGGAA UGUGAAUGCU AUAUACUCU UUUUAUCAA 4500
 [2373] AAGUCUCAAG CACUUAUUU UAUUCUAUGC AUUGUUUGUC UUUUACUAA AUAAAUGUU 4560
 [2374] UAUUAGAUU AAUAAAGCAA AAUACUCAGG UGAGCAUCCU GCCUCCUGU CCCAUUCCUA 4620
 [2375] GUAGCUAAA 4629

도면

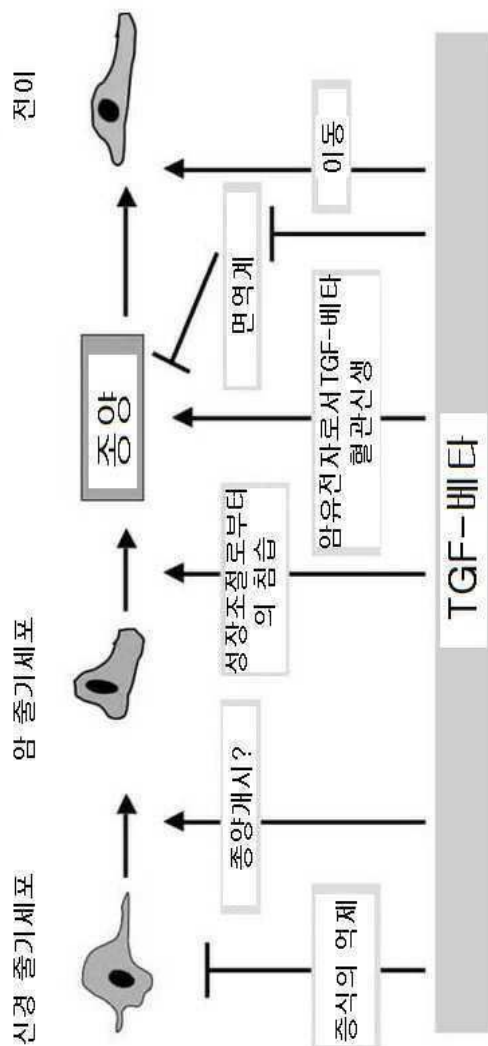
도면1



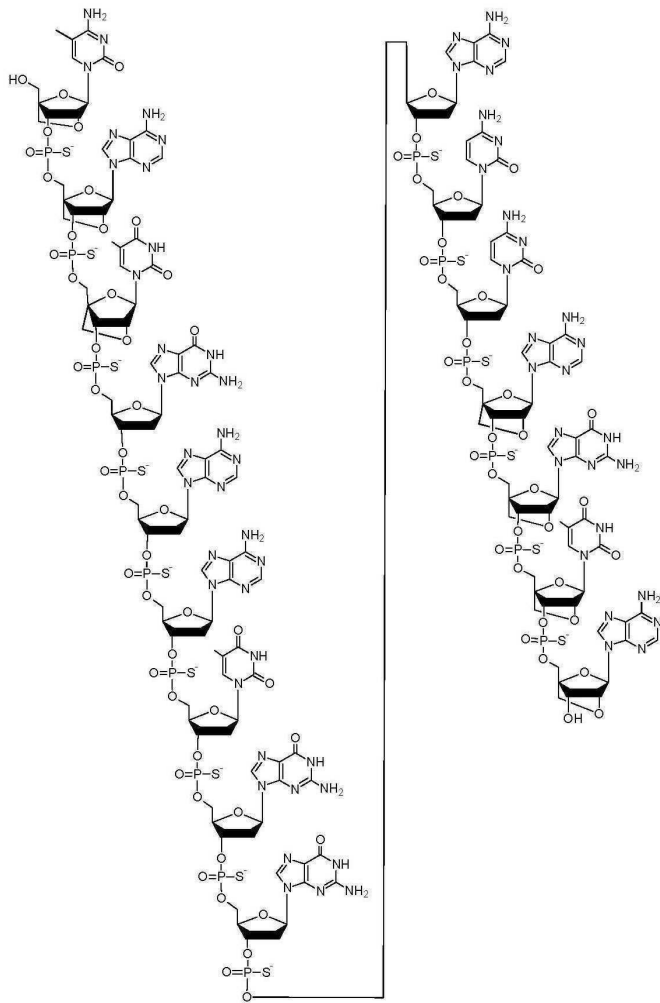
도면2



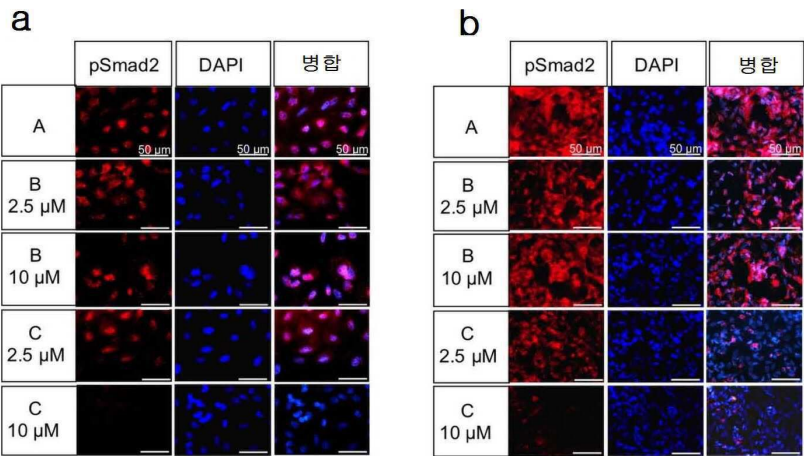
도면3



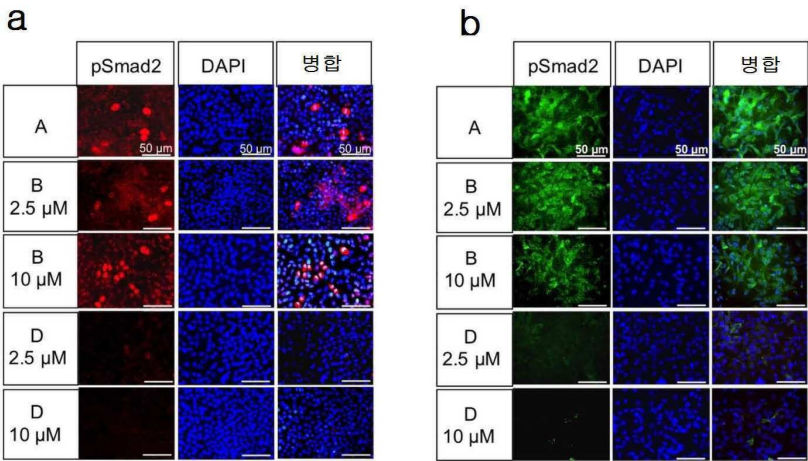
도면4



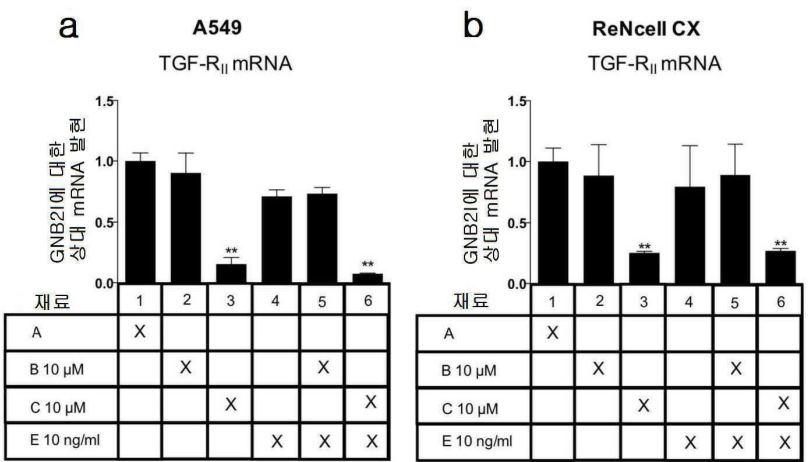
도면5



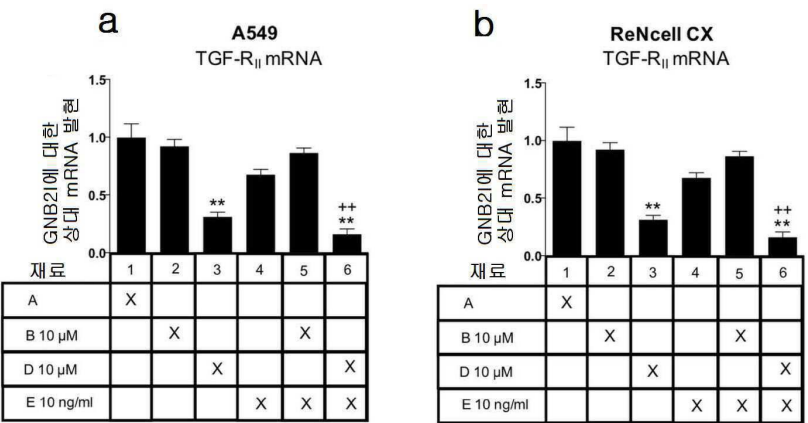
도면6



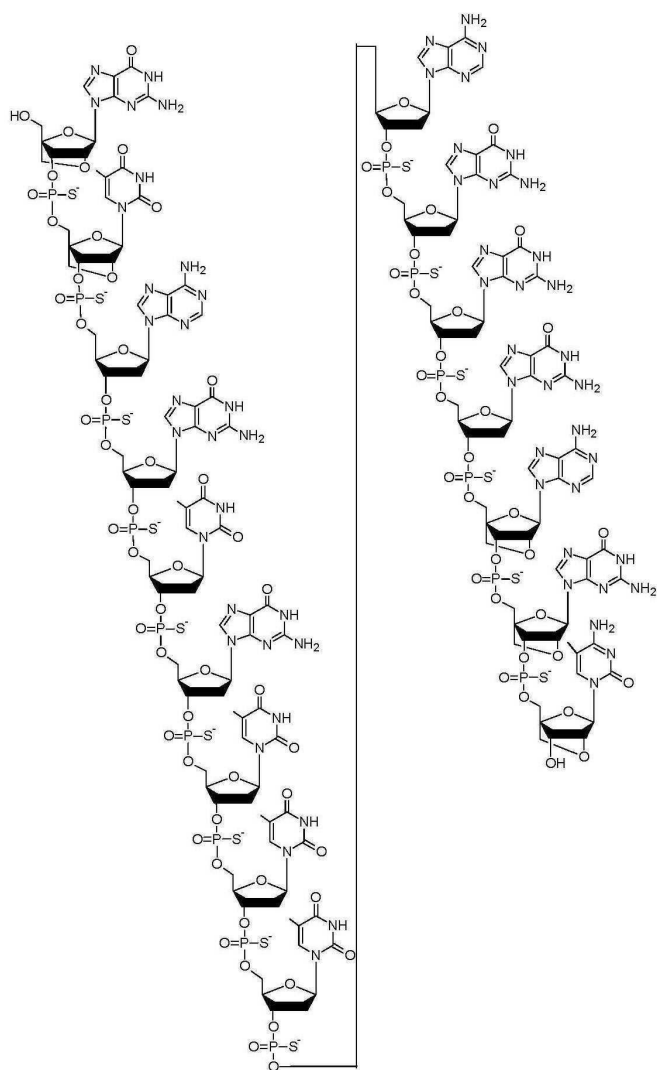
도면7



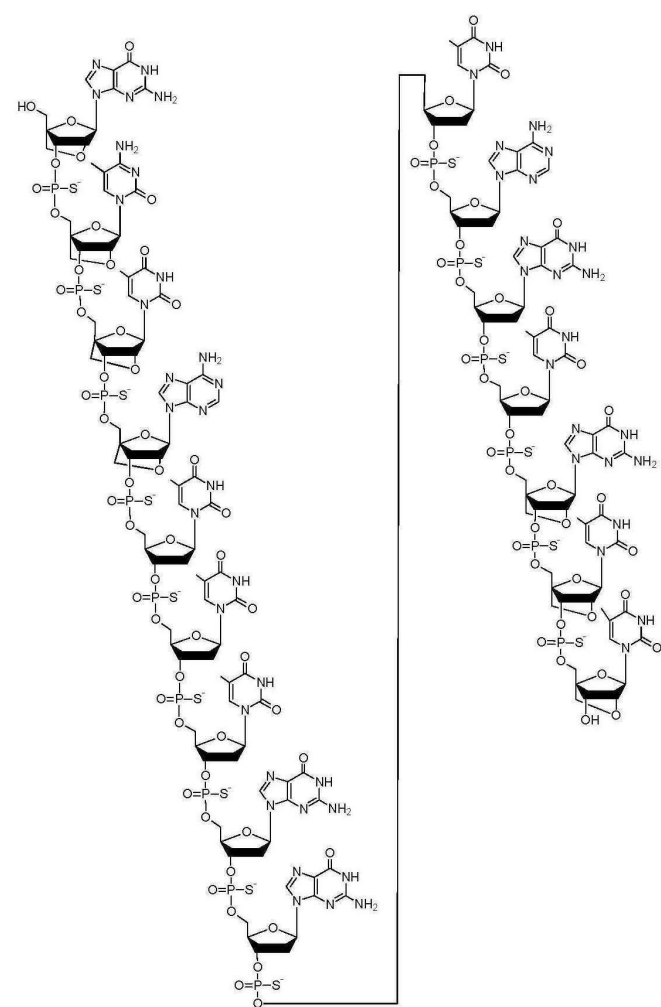
도면8



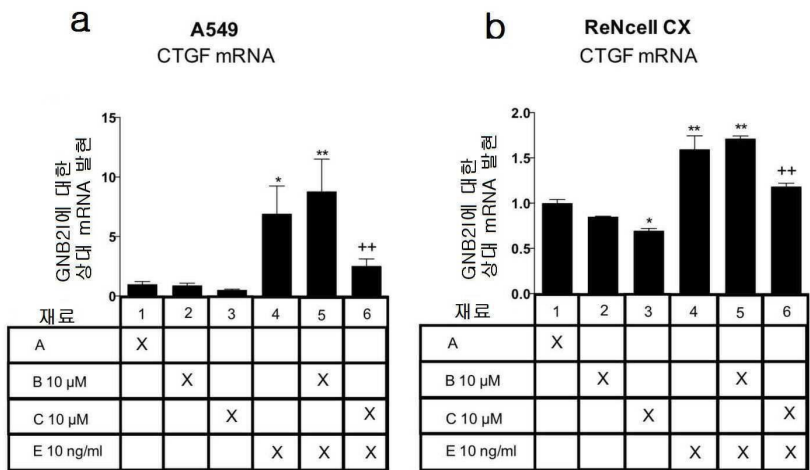
도면9



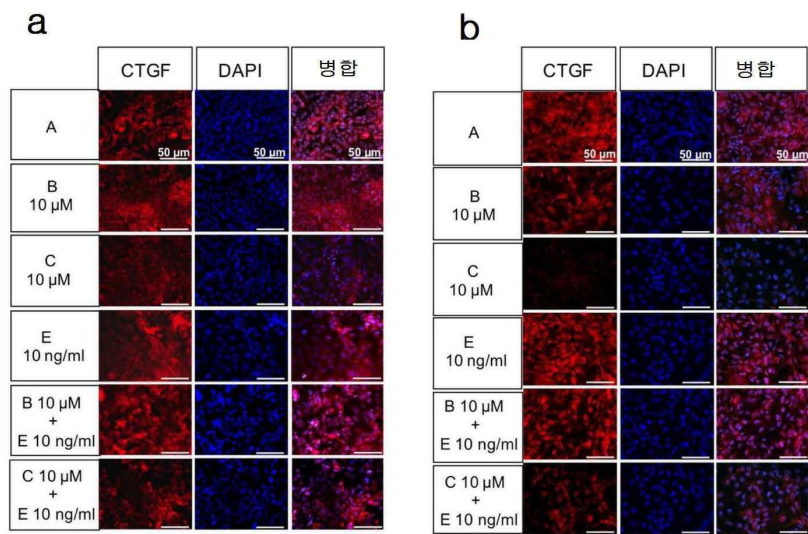
도면10



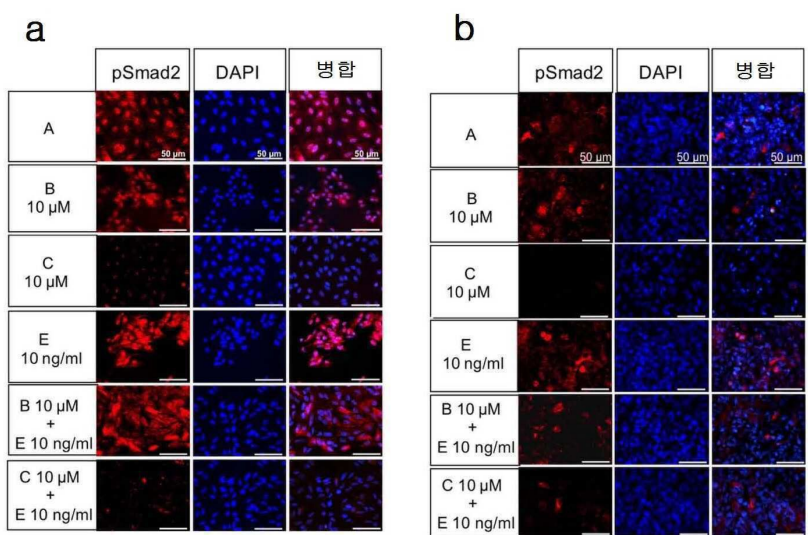
도면11



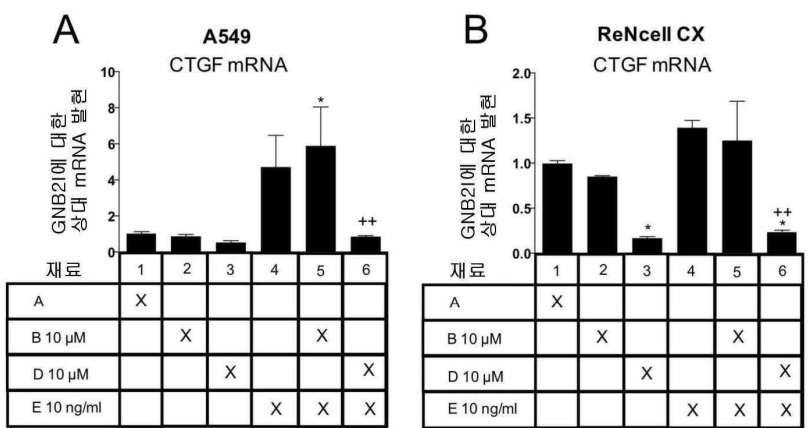
도면12



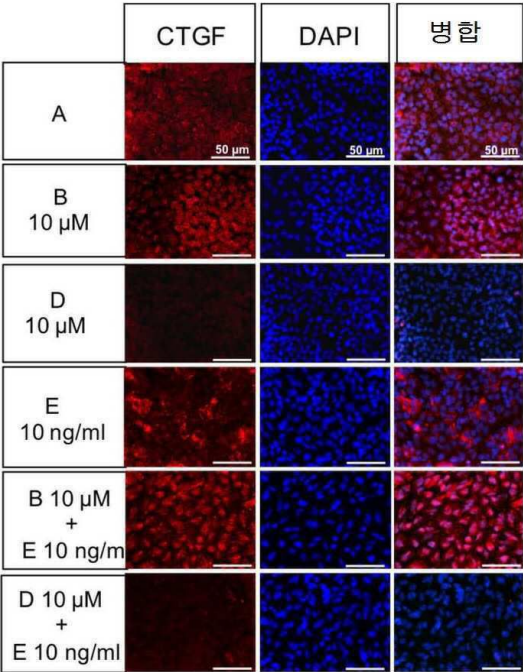
도면13



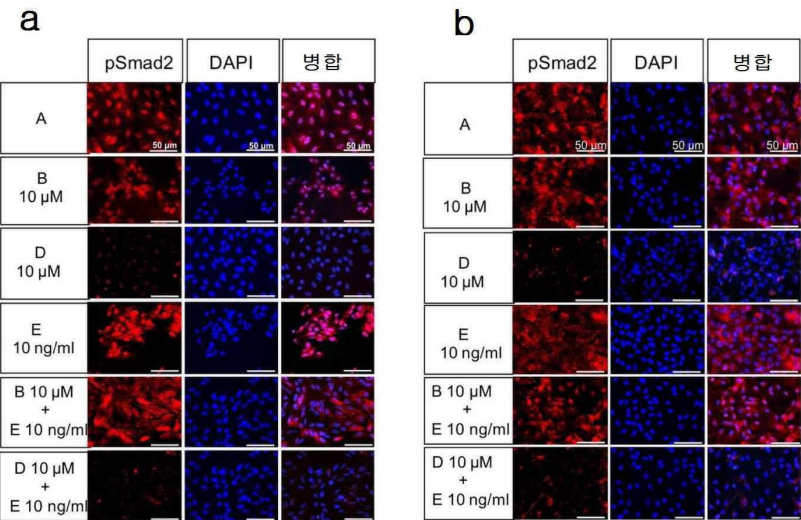
도면14



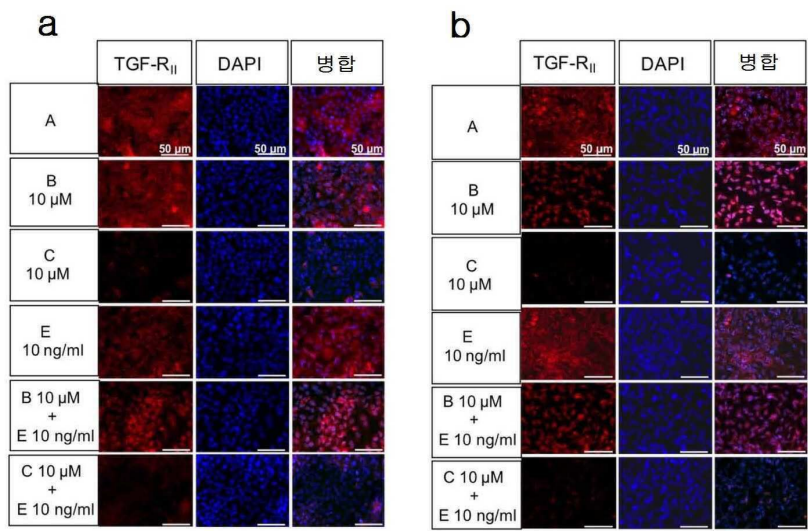
도면15



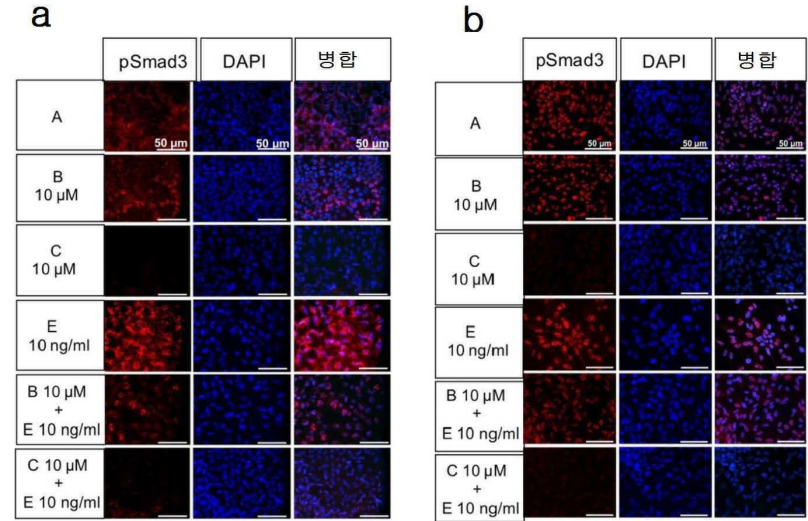
도면16



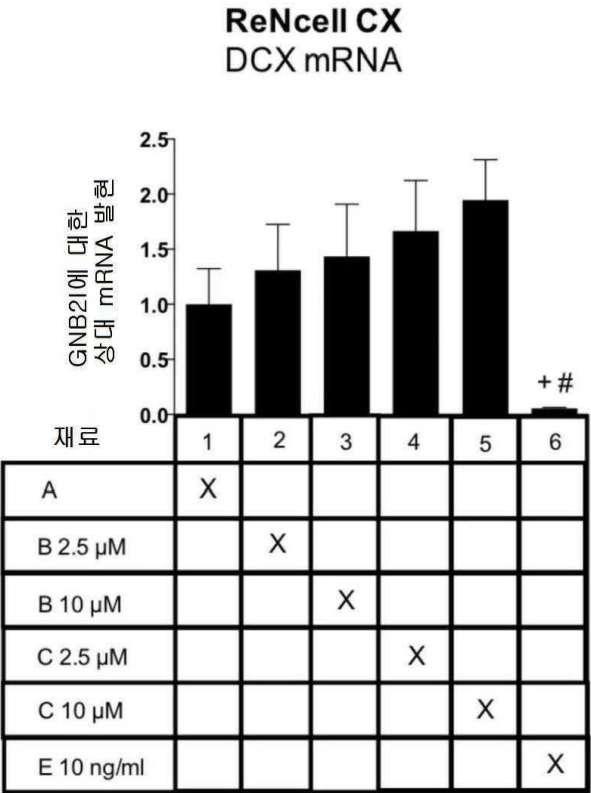
도면17



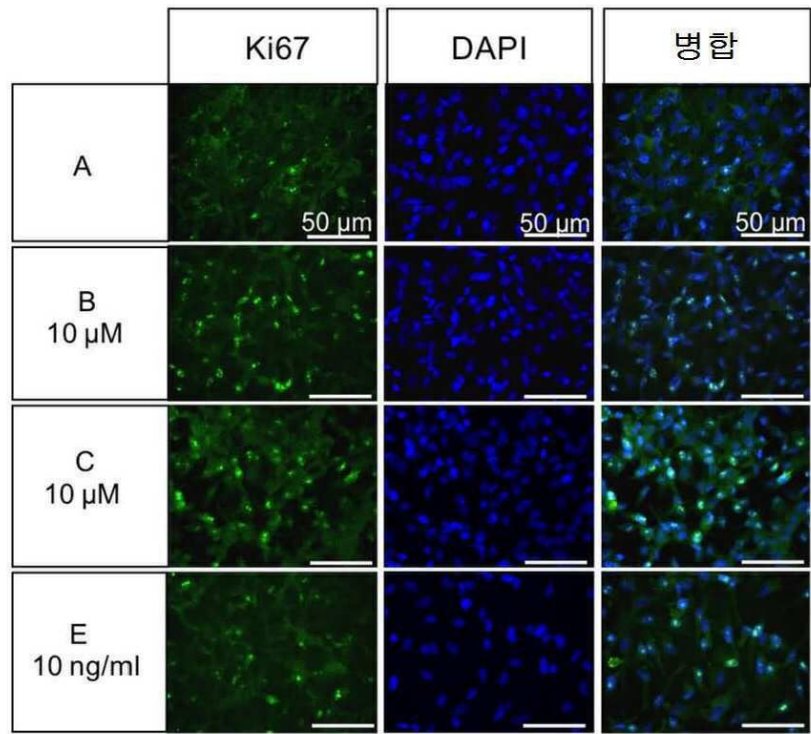
도면18



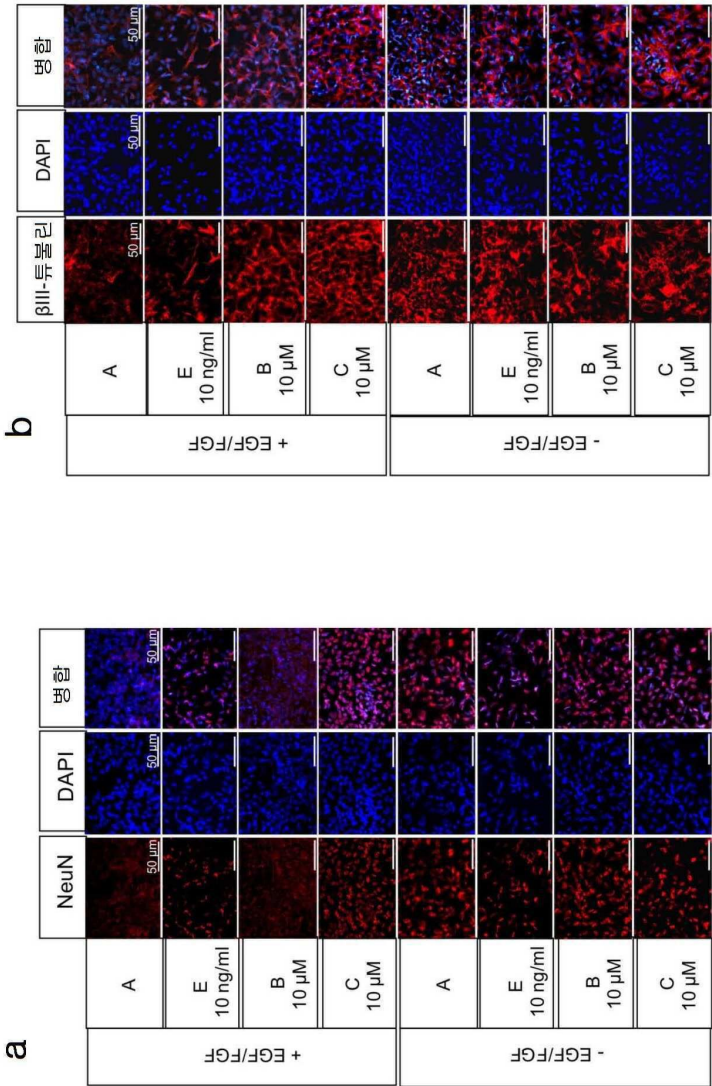
도면19



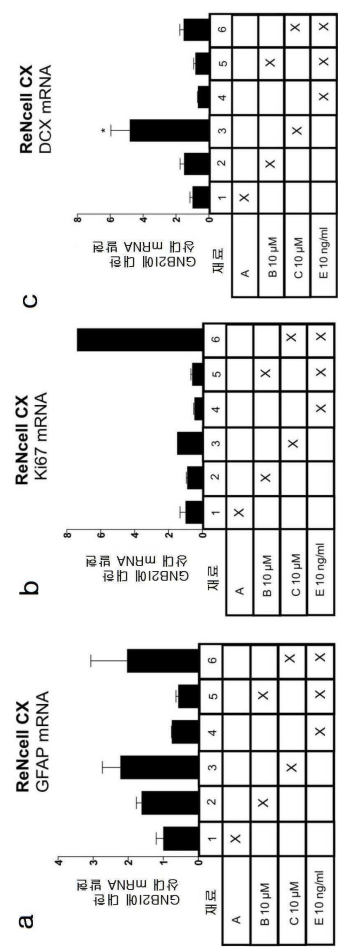
도면20



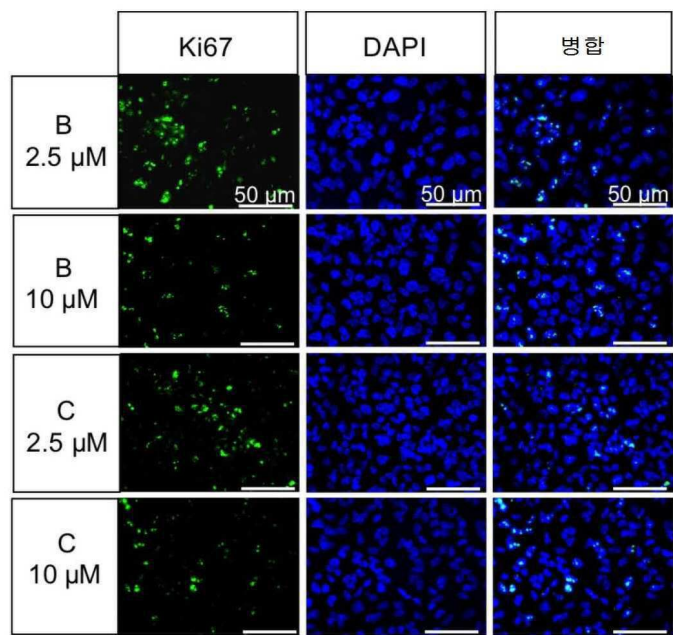
도면21



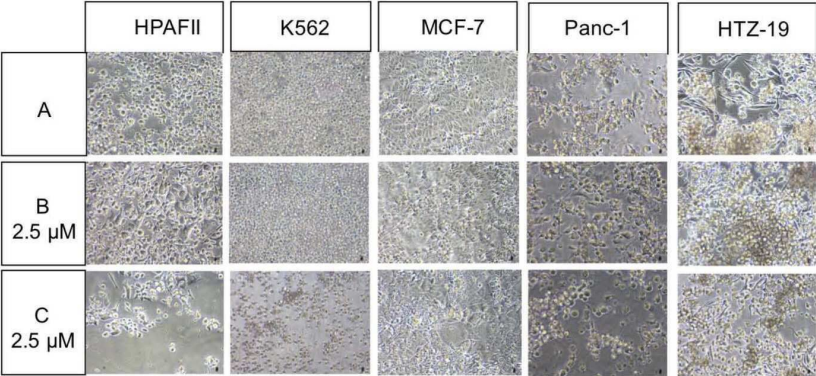
도면22



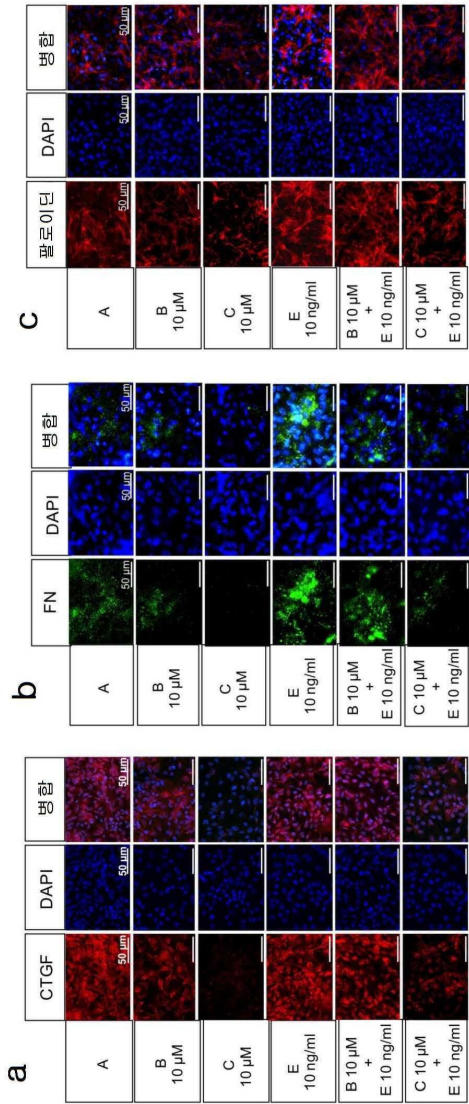
도면23



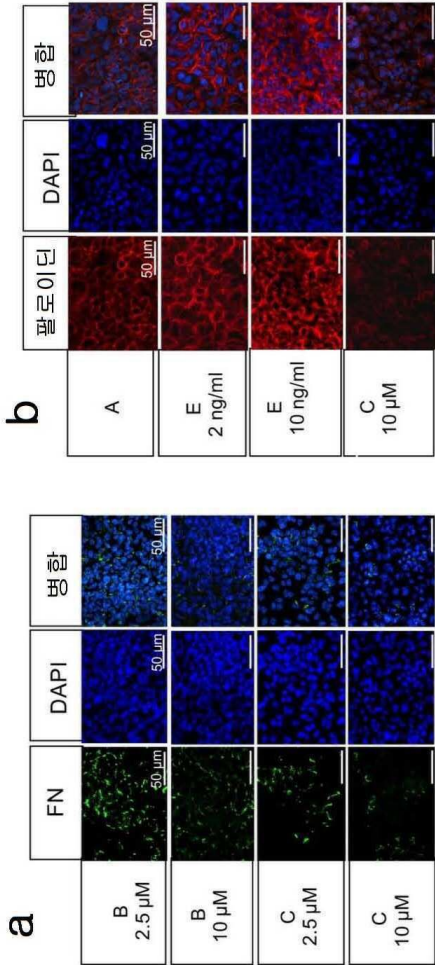
도면24



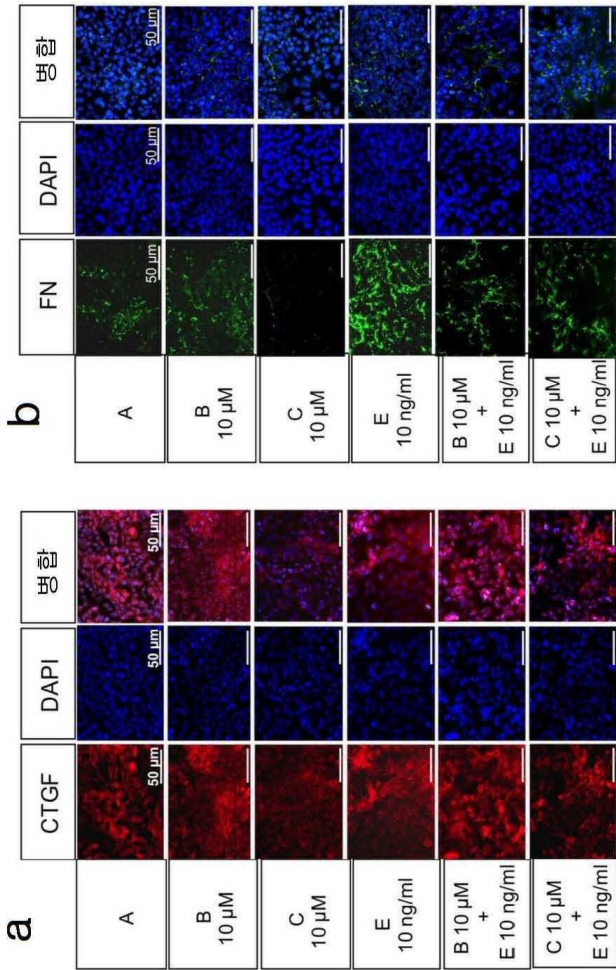
도면25



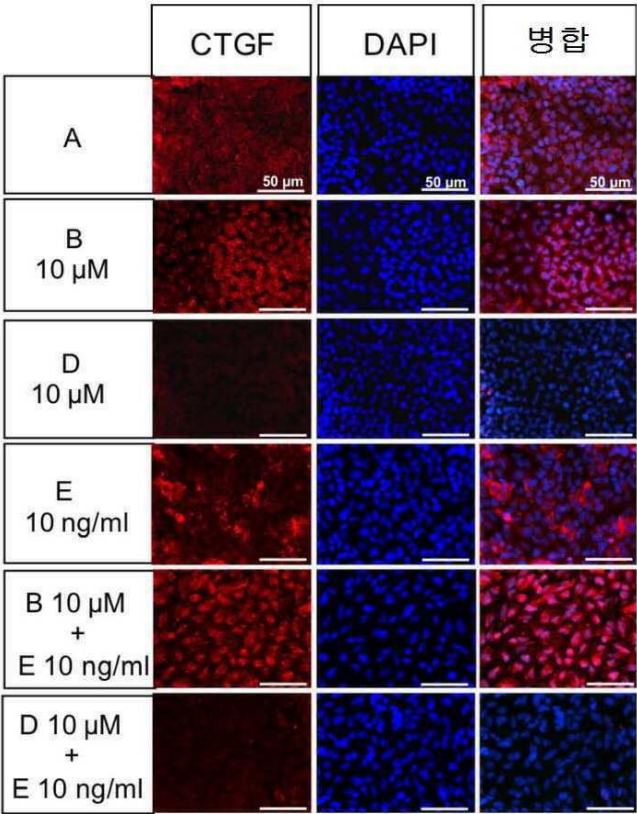
도면26



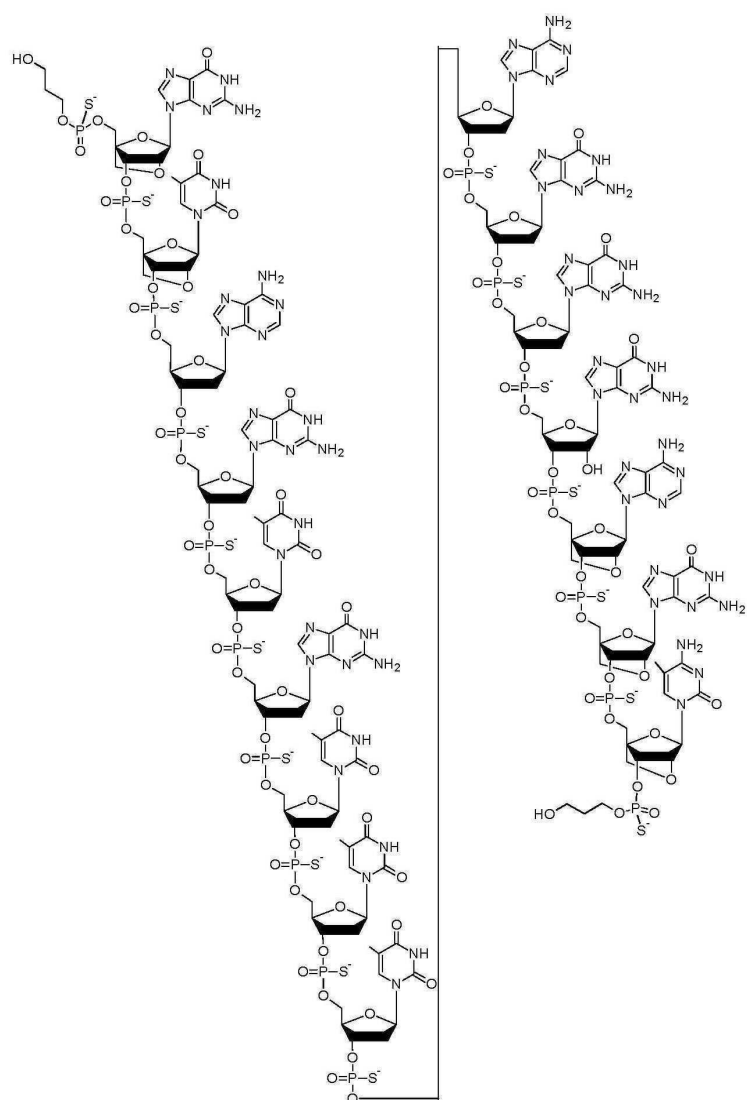
도면27



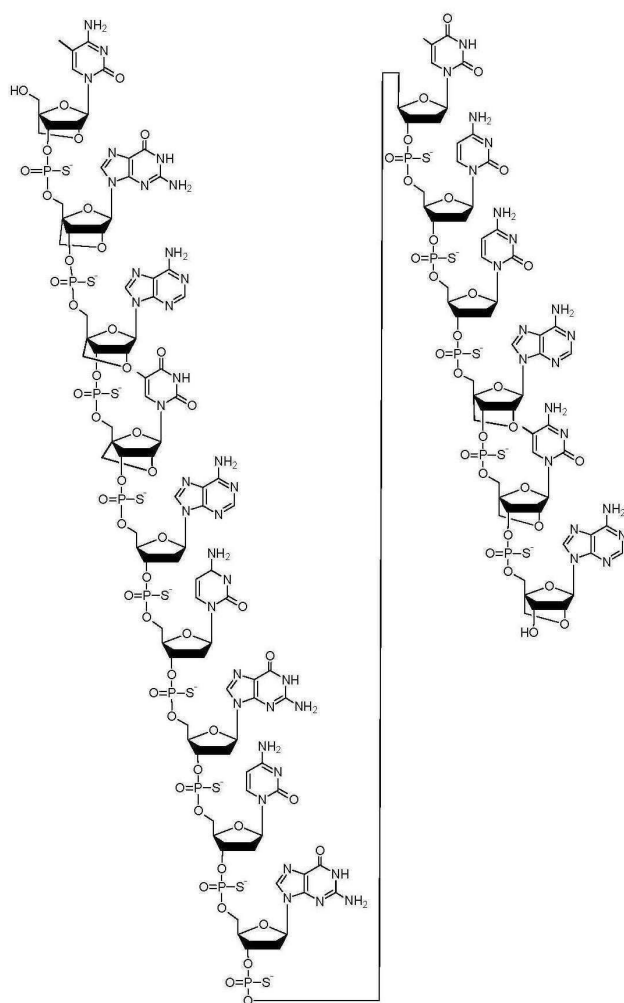
도면28



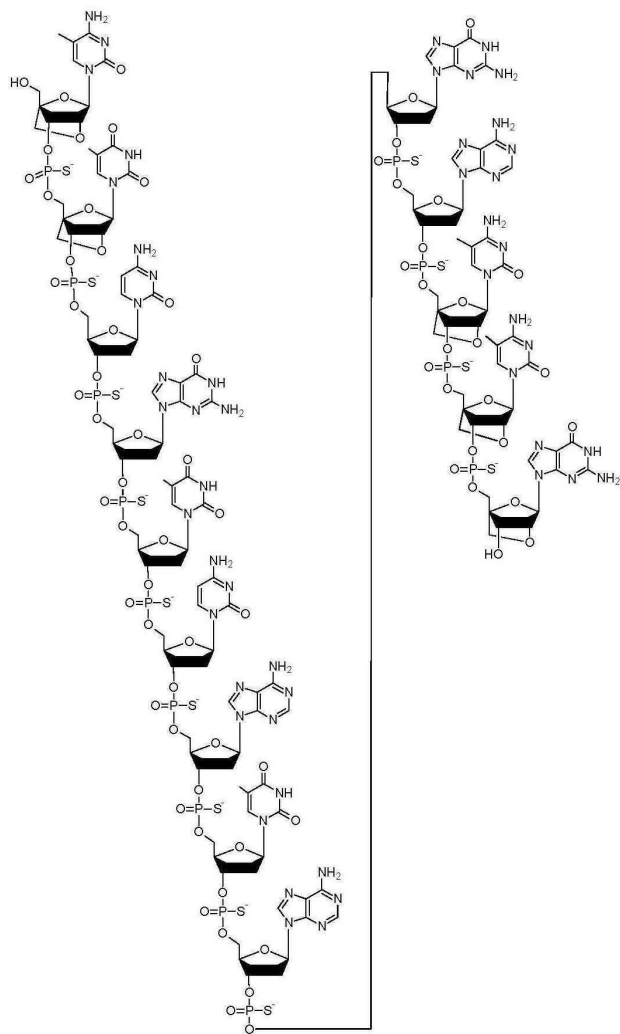
도면29



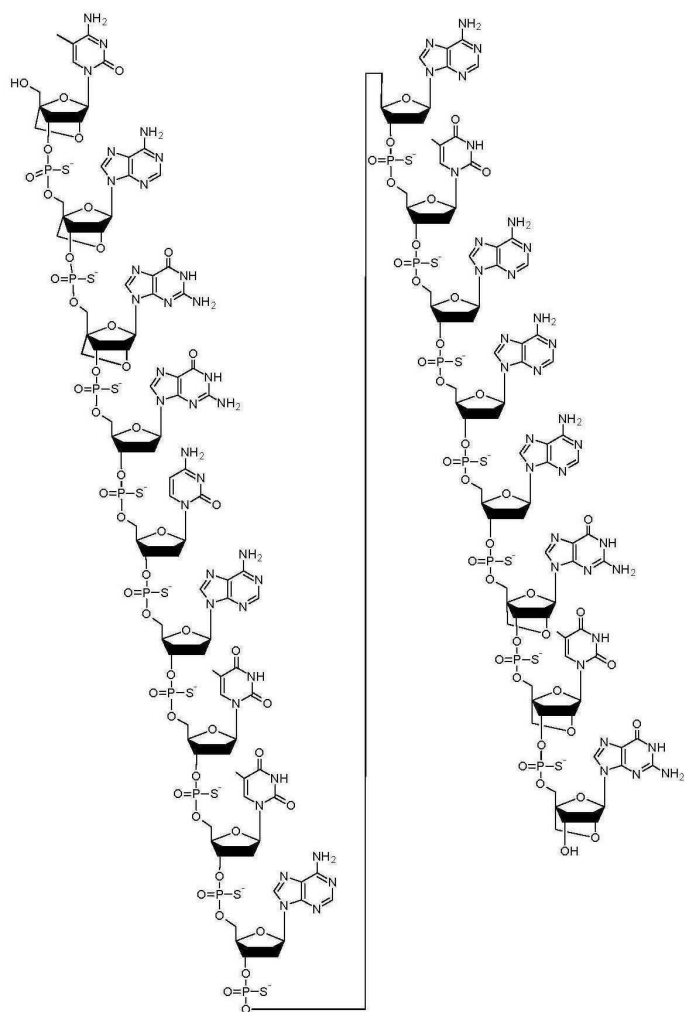
도면30



도면31



도면32



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Neurovision Pharma GmbH

<120> Antisense-Oligonucleotides as Inhibitors of TGF-R signaling

<130> NVP-P03653W0

<150> EP14193368

<151> 2014-11-16

<160> 508

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 4629

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II
(70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2, antisense DNA

<400> 1

tttagctact aggaatggga acaggaggca ggaatgctcac ctgagtatctt tgcttttattc	60
aatctaataa acatctttatt tatgtaaaag acaacaatg catagaataa aaataagtgc	120
ttgagacttt tgatataaaa agagtataata gcattcacat tcctatttta atacatgagt	180
acagctgaag tgttccataa aagaataaaa ctttcctttt atgtatagta gtgaaaaaag	240
tcagtatttt taggaactac agaattgtat tccttgggtct tttttcttga ataagaaaaa	300
aaaacataaa caaaacaagc cacagtatcc tctgacacta cattccagtt tatgctgata	360
accagaagt gagaatactc ttgaatcttg aatatctcat gaattggacca gtattctaga	420
aactcaccac tagaggctca tgggcaacag ctattgggat ggtatcagca tgccttacgg	480
tgcaagtgga atttctaggc gcctctatgc tactgcagcc acactgtctt taactctcag	540
cccaccaca ctgaggaggg tgcctagagg ttctatttcc aaacctttgc atgtatctta	600
aaaatctcaa taaatgaga ccttcacca tccaacaga gctgatattc tcactaccag	660
tccctctcta atattcctat ttggctgaaa ataagtagct tcaaaaagtt ttaaaaaaga	720
gattacttgc agcattaaca cttctttgtt gattaacaag tttctatgg agttttaaag	780
ctcactcttt gtcttctgcc ttgtggacac aaattttcta actgcaaatg ggacctttgt	840
gtccacatt caaatcctct ctagtaattt ctgcaaaggt tgagaaggct ggcattgatgg	900
agagaacggt aaccatgagg aaagcttctt ggagtaaagc actcctctct ccaatgcaga	960
gggtaaaact attaacatat aagcaaaaga aacttgggct aactgagacc cttaaaggag	1020
ttcccttta gtccaataaa aggccaactt caaatcttaa caccagataa ggtagtcaaa	1080
atcatattat ataccagag aatgactgct tgaatggaca tttcttaca gggaccttgg	1140
ttaggtgcag atttaattcc tagactgggg tccagtagg cagtggaaag agctaattgt	1200
tacagtgaga agtgaggcag ctttctaagt gtctccacac cttcacattt tgtgaacgtg	1260
gactggagat aactgaaaac catctgctat ccttacctgg ggatccagat tttcctgcaa	1320
aatctccaaa tatttataaa gtggcttcac ttttgaac gctgtgctga ccaacaaaa	1380
catatgttta gattgcctga ggtcatagtc ctgacaatga tagtattgtg tagttgaaat	1440
cctcttcac aggccaaact gtgcttgagc aatcaggagc ccagaaagat ggaaccatt	1500
ggtgtttgta tagaaaacta gaaaatcaag tcaagtgtaa tgaaaaagta aacacgataa	1560
agcctagagt gagaatttgc tccttttttag aaaaggatga aggctgggag cagagaatag	1620
taacataagt gcaggggaaa gatgaaaaaa agaacaattt ttcattagta gatgggtggg	1680

caatcgcgatg gatggggaca tctgttctga tttttctgca acccatgaag gtaaaaagt	1740
gggttcaaaa cattcaaggt attaaagatg gggtagagtt tctaaactag gttgaggag	1800
agtttctaaa ctagccccc agatttgggg cttggagctt aaatgaaaag tccaggagaa	1860
ataagggcac acaggaaccc cgggaacact ggtcctcaaa cagtgccact gtacttagtt	1920
ccatggccag aagagaagtg ctaggcaggg aatgattatt ttgcaaaagc aagtgcaatg	1980
tggtcatagc tggtctgag acatggagcc tctttcctca tgcaaagttc actgttttac	2040
agtcagagaa ccatgcatg tgtgattgtc aaatgctaata gctgcatgg gtcccttctt	2100
tctctgcttg gttctggagt tctccaataa aaccaatttc ctgggaatat ttgatgtttt	2160
tccttgtctc ttttcaaggt atggctatat atatagagct atagacatat atagatatat	2220
atatatatat ataaaacata gctattcata ttatatata gccattaata aagtgcaaat	2280
gttattggct attgtaaaaa tcaatctcat ttctgagga agtgctaaca cagcttatec	2340
tatgacaatg tcaaaggcat agaatgctct atgtcaccca ctccctgctg ctgttgtttc	2400
tgcttatccc cacagcttac agggagggga gtgacccctt tggttttcca ggaagcatca	2460
gttcaggggc agcttctgc tgcctctgtt ctttggtag aggggcagcc tctttggaca	2520
tggcccagcc tgcccagaa gagctatttg gtagtgttta gggagccgtc ttcaggaatc	2580
ttctcctcgc agcagctcct ccccgagagc ctgtccagat gctccagctc actgaagcgt	2640
tctgccacac actgggctgt gagacgggcc tctgggtcgt ggtcccagca ctcagtcaac	2700
gtctcacaca ccatctggat gccctgggtg ttgagccaga agctgggaat ttctgtctgc	2760
cctcgatctc tcaacacgtt gtcttcatg ctttcgacac aggggtgctc ccgcaccttg	2820
gaaccaaag gaggtcata atcttttact tctccactg cattacagcg agatgtcatt	2880
tcccagagca ccagagccat ggagtagaca tcggtctgct tgaaggactc aacattctcc	2940
aaattcatcc tggattctag gacttctgga gccatgtatc ttgcagttcc cacctgccc	3000
ctgttagcca ggtcatccac agacagagta ggtccagac gcagggaag cccaaagtca	3060
cacaggcagc aggttaggtc gttcttcacg aggatattgg agctcttgag gtccctgtgc	3120
acgatgggca tcttgggcct cccacatgga gtgtgatcac tgtggagggt agcaatcccc	3180
cgggcgaggg agctgccag cttgcgcagg tctccagc tgatgacatg ccgcgtcagg	3240
tactctgtga ggttgccctt ggcgtggaag gcggtgatca gccagtattg ttcccccaac	3300
tccgtcttcc gctcctcagc cgtcaggaac tggagtatgt tctcatgctt cagattgatg	3360
tctgagaaga tgtccttctc tgtcttccaa gaggcatact cctcataggg aaagatcttg	3420

actgccactg tctcaaatg cctgaagtg ttctgcttca gcttggcctt atagacctca 3480
gcaaagcgac ctttccccac cagggtgtcc agtcaatgg gcagcagctc tgtgtgtgg 3540
ttgatgttgt tggcacacgt ggagctgatg tcagagcggg catcttcag gatgatggca 3600
cagtgtctgc tgaactccat gagcttccgc gtcttgccgg tttcccaggt tgaactcagc 3660
ttctgtctcc ggtaacgcg gtagcagtag aagatgatga tgacagatat ggcaactccc 3720
agtggaggca ggaggctgat gcctgtcact tgaatatga ctagcaacaa gtcaggattg 3780
ctggtgttat attcttctga gaagatgatg ttgtcattgc actcatcaga gctacaggaa 3840

cacatgaaga aagtctcacc aggccttttt ttttcttca taatgcactt tggagaagca 3900
gcatcttcca gaataaagtc atggtagggg agcttggggg catggcaaac tgtctctagt 3960
gttatgttct cgtcattctt tctccataca gccacacaga cttcctgtgg cttctcacag 4020
atggaggatga tgcctgcagt gctcatgcag gatcttctgg tgtcacaggt ggaataatctc 4080
acatcacaaa atttacacag ttgtggaaac ttgactgcac cgttgtttgc agtgactatc 4140
atgtcgttat taaccgactt ctgaacgtgc ggtgggatcg tgctggcgat acgcgtccac 4200
aggacgatgt gcagcggcca caggccctg agcagccccc gacctatggc agaccccgct 4260

gctcgtcata gaccgagccc ccagcgcagc ggacggcgcc ttcccgacc cctggctgcg 4320
cctccgcgcc gcgccctctc cggaccccgcc gccggggcgg cagcgcagat gtgcgggcca 4380
gatgtggcgc ccgtcgcga gccaggaggg ggcctggagg ccggcgaggc gcggggaggc 4440
ccccggcgcc cgagggaagc tgcacaggag tccggctcct gtcccagcg ggtgcacgcg 4500
cgggggtgtc gtcgtccgt gcgcgcgagt gactcactca acttcaactc agcgtgcgg 4560
gggaaacagg aaactcctcg ccaacagctg ggcaggacct ctctccgcc gagagccttc 4620
tccctctcc 4629

<210> 2

<211> 4629

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggagaggag aaggctctcg ggccgagaga ggtcctgccc agctgttgcc gaggagtctc 60
ctgtttcccc cgcagcgtcg agttgaagtt gattgagtc ctcgcgcga cggagcgacg 120
acacccccgc gcgtgcaccc gctcgggaca ggagccggac tcctgtgcag cttccctcgg 180
ccgccggggg cctccccgcg cctcggcgcc ctccaggccc cctcctggct ggcgagcggg 240
cgccacatct ggccgcaca tctgcgctgc cggcccgccg cggggtccgg agaggcgcg 300

gcgcggaggc gcagccaggg gtccgggaag gcgccgtccg ctgcgctggg ggctcggctc 360

atgacgagca gcggggctcg ccatgggtcg ggggctgctc aggggcctgt ggccgctgca 420

catcgtcctg tggacgcgta tcgccagcac gatcccaccg cacgttcaga agtcggttaa 480

taacgacatg atagtactg acaacaacgg tgcagtcaag tttccacaac tgtgtaaatt 540

ttgtgatgtg agattttcca cctgtgacaa ccagaaatcc tgcagtgcga actgcagcat 600

cacctccatc tgtgagaagc cacaggaagt ctgtgtggct gtatggagaa agaattgacga 660

gaacataaca ctagagacag tttgcatga cccaagctc ccctaccatg actttattct 720

ggaagatgct gcttctccaa agtgcattat gaaggaaaaa aaaaagcctg gtgagacttt 780

cttcatgtgt tctgtagct ctgatgagtg caatgacaac atcatcttct cagaagaata 840

taacaccagc aatcctgact tgttgctagt catatttcaa gtgacaggca tcagcctcct 900

gccaccactg ggagtggcca tatctgtcat catcatcttc tactgctacc gcgttaaccg 960

gcagcagaag ctgagttcaa cctgggaaac cggcaagacg cggaagctca tggagttcag 1020

cgagcactgt gccatcatcc tggaagatga ccgctctgac atcagctcca cgtgtgccaa 1080

caacatcaac cacaacacag agctgctgcc cattgagctg gacaccctgg tggggaaagg 1140

tcgctttgct gaggctcata aggccaagct gaagcagaac acttcagagc agtttgagac 1200

agtggcagtc aagatcttcc cctatgagga gtatgcctct tggaagacag agaaggacat 1260

cttctcagac atcaatctga agcatgagaa catactccag ttcctgacgg ctgaggagcg 1320

gaagacggag ttggggaaac aatactggct gatcaccgcc ttccacgcca agggcaacct 1380

acaggagtac ctgacgcggc atgtcatcag ctgggaggac ctgcaagc tgggcagctc 1440

cctcgcccgg gggattgctc acctccacag tgatcacact ccatgtggga ggcccaagat 1500

gccccatgct cacagggacc tcaagagctc caatatctc gtgaagaacg acctaacctg 1560

ctgcctgtgt gactttgggc tttccctgcg tctggaccct actctgtctg tggatgacct 1620

ggctaacagt gggcagggtg gaactgcaag atacatggct ccagaagtcc tagaatccag 1680

gatgaatttg gagaatgtg agtcttcaa gcagaccgat gtctactcca tggctctggt 1740

gctctgggaa atgacatctc gctgtaatgc agtgggagaa gtaaaagatt atgagcctcc 1800

atttggttcc aagggtcggg agcaccctg tctcgaagc atgaaggaca acgtgttgag 1860

agatcgaggg cgaccagaaa tteccagctt ctggctcaac caccagggca tccagatggt 1920

gtgtgagacg ttgactgagt gctgggacca cgaccagag gccctctca cagcccagtg 1980

tgtggcagaa cgcttcagtg agctggagca tctggacagg ctctcgggga ggagctgctc 2040

ggaggagaag attcctgaag acggctccct aaacactacc aaatagctct tctggggcag 2100
 gctgggccat gtccaaagag gctgcccctc tcaccaaga acagaggcag caggaagctg 2160
 cccctgaact gatgcttcct ggaaaaccaa gggggtcact cccctccctg taagctgtgg 2220
 ggataagcag aaacaacagc agcagggagt gggtgacata gagcattcta tgcctttgac 2280
 attgtcatag gataagctgt gtttagcatt cctcaggaaa tgagattgat ttttacaata 2340
 gccataaaca tttgactttt attaatgcct gtatataaat atgaatagct atgttttata 2400
 tataatatata tatatctata tatgtctata gctctatata tatagccata ccttgaaaag 2460

 agacaaggaa aaacatcaaa tattcccagg aaattggttt tattggagaa ctccagaacc 2520
 aagcagagaa ggaagggacc catgacagca ttagcatttg acaatcacac atgcagtgg 2580
 tctctgactg taaaacagtg aactttgcat gaggaaagag gctccatgtc tcacagccag 2640
 ctatgaccac attgacttg cttttgcaaa ataatcattc cctgcctagc acttctcttc 2700
 tggccatgga actaagtaca gtggcactgt ttgaggacca gtgttcccgg ggttcctgtg 2760
 tgcccttatt tctcctggac ttttcattta agctccaagc cccaatctg gggggctagt 2820
 ttagaaaactc tcctcaacc tagtttagaa actctacccc atctttaata ccttgaatgt 2880

 ttgaaacccc actttttacc ttcatgggtt gcagaaaaat cagaacagat gtcccatcc 2940
 atgcgattgc cccaccatct actaatgaaa aattgttctt ttttctatct tccccctgca 3000
 cttatgttac tattctctgc tcccagcctt catccttttc taaaaaggag caaattctca 3060
 ctctaggctt tatcgtgttt actttttcat tacacttgac ttgattttct agttttctat 3120
 acaaacacca atgggttcca tctttctggg ctcttgattg ctcaagcaca gtttggcctg 3180
 atgaagagga tttaactac acaatactat cattgtcagg actatgacct caggcactct 3240
 aaacatatgt ttgttttggc cagcacagcg tttcaaaaag tgaagccact ttataaatat 3300

 ttggagattt tgcaggaaaa tctggatccc caggtaagga tagcagatgg ttttcagtta 3360
 tctccagtcc acgttcacaa aatgtgaagg tgtggagaca cttacaaagc tgcctcattt 3420
 ctactgtaa acattagctc ttccactgc ctacctggac cccagtctag gaattaaatc 3480
 tgcacetaac caagtcctt tgtaagaaat gtccattcaa gcagtcattc tctgggtata 3540
 taatatgatt ttgactacct tatctgggtg taagatttga agttggcctt ttattggact 3600
 aaaggggaac tcctttaagg gtctcagtta gcccaagttt cttttgctta tatgttaata 3660
 gttttaccct ctgcattgga gagaggagtg ctttactcca agaagctttc ctcattggtta 3720

 ccgttctctc catcatgcca gccttctcaa cctttgcaga aattactaga gaggatttga 3780
 atgtgggaca caaaggtccc atttgcagtt agaaaatttg tgtccacaag gacaagaaca 3840
 aagtatgagc tttaaaactc cataggaaac ttgttaatca acaagaagt gttaatgctg 3900

caagtaatct cttttttaaa actttttgaa gctacttatt ttcagccaaa taggaatatt	3960
agagagggac tggtagtgag aatatcagct ctgttttgat ggtggaaggt ctcattttat	4020
tgagattttt aagatacatg caaaggtttg gaaatagaac ctctaggcac cctcctcagt	4080
gtgggtgggc tgagagttaa agacagtgtg gctgcagtag catagaggcg cctagaaatt	4140
ccacttgac cgtagggcat gctgatacca tcccaatagc tgttgcccat tgacctctag	4200
tggtagagttt ctagaatact ggtccattca tgagatattc aagattcaag agtattctca	4260
cttctgggtt atcagcataa actggaatgt agtgtcagag gatactgtgg cttgttttgt	4320
ttatgttttt ttttcttatt caagaaaaaa gaccaaggaa taacattctg tagttcctaa	4380
aaatactgac ttttttact actatacata aagggaagt tttattcttt tatggaacac	4440
ttcagctgta ctcatgtatt aaaataggaa tgtgaatgct atatactctt tttatatcaa	4500
aagtctcaag cacttatttt tattctatgc attgtttgtc tttacataa ataaaatgtt	4560
tattagattg aataaagcaa aatactcagg tgagcatcct gcctcctgtt cccattccta	4620
gtagctaaa	4629
<210> 3	
<211> 4629	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 3	
ggagagggag aaggcucucg ggcgagagaga gguccugccc agcuguuggc gaggaguuc	60
cuguuucccc cgagcgcgug aguugaaguu gagugaguca cucgcgcgca cggagcgacg	120
acacccccgc gcgugcaccg gcucgggaca ggagccggac uccugugcag cuuccucgg	180
ccgccggggg ccucccgcg ccucgccggc cuccaggccc ccuccuggu ggcgagcggg	240
cgccacaucu ggccccgaca ucugcgugc cgccccggcg cgggguccgg agaggcgcg	300
gcgcggaggc gcagccaggg guccgggaag gcgccgucg cugcguggg ggcucggucu	360
augacgagca gcgggguguc ccaugggucg ggggcugcuc aggggcuugu ggccgcugca	420
caucgucugc uggacgcgua ucgccagcac gaucaccag cacguucaga agucgguuaa	480
uaacgacaug auagucacug acaacaacgg ugcagucaag uuuccacaac uguguaauu	540
uugugaugug agauuuucca ccugugacaa ccagaaaucc ugcaugagca acugcagcau	600
caccuccauc ugugagaagc cacaggaagu cuguguggcu guauggagaa agaauacga	660
gaacauaaca cuagagacag uuugccauga cccaagcuc ccuaccaug acuuuauucu	720
ggaagaugcu gcuucuccaa agugcauuu gaaggaaaaa aaaaagccug gugagacuuu	780

cuucaugugu uccuguagcu cugaugagug caaugacaac aucaucuucu cagaagaaua	840
uaacaccagc aauccugacu uguugcuagu cauauuucaa gugacaggca ucagccuccu	900
gccaccacug ggaguugcca uaucugucan caucaucuuc uacugcuacc gcguuaaccg	960
gcagcagaag cugaguuaa ccugggaaac cggcaagacg cggaagcuca uggaguucag	1020
cgagcacugu gccaucaucc uggaagauga ccgcucugac aucagcucca cgugugccaa	1080
caacaauaac cacaacacag agcugcugcc cauugagcug gacaccuugg uggggaagg	1140
ucgcuuugcu gaggucuuaa aggccaagcu gaagcagaac acuucagagc aguugagac	1200
aguggcaguc aagaucuuu ccuauagagga guaugccucu uggaagacag agaaggacau	1260
cuucucagac aucaaucuga agcaugagaa cauacuccag uuccugacgg cugaggagcg	1320
gaagacggag uggggaaac aaucuggcug gaucaccgcc uuccacgcca agggcaaccu	1380
acaggaguac cugacgcggc augucaucag cugggaggac cugcgcaagc ugggcagcuc	1440
ccucgcccgg gggauugcuc accuccacag ugaucacacu ccauguggga ggccaagau	1500
gcccuaucug cacagggacc ucaagagcuc caauauccuc gugaagaacg accuaaccug	1560
cugccugugu gacuuggggc uuucccugcg ucuggacccu acucugucug uggaugaccu	1620
ggcuaacagu gggcaggugg gaacugcaag aucauaggcu ccagaagucc uagaauccag	1680
gaugaauuug gagaauuug aguuccucaa gcagaccgau gucuacucca uggcucuggu	1740
gcucugggaa augacauuc gcuguaaagc agugggagaa guaaaagau augagccucc	1800
auuugguucc aaggugcggg agcaccuccg ugucgaaagc augaaggaca acguguugag	1860
agaucgaggg cgaccagaaa uucccagcuu cuggcucaac caccagggca uccagauggu	1920
guugagagc uugacugagu gcugggacca cgaccagag gcccgucua cagcccagug	1980
uguggcagaa cgcuucagug agcuggagca ucuggacagg cucucgggga ggagcugcuc	2040
ggaggagaag auuccugaag acggcucccu aaacacuacc aaauagcucu ucuggggcag	2100
gcugggccau guccaaagag gcugcccccuc ucaccaaga acagaggcag caggaagcug	2160
ccccugaacu gaugcuuccu ggaaaaccaa gggggucacu cccucccug uaagcugugg	2220
ggauaagcag aaacaacagc agcaggagag gggugacaua gagcauucua ugccuuugac	2280
auugucauag gauaagcugu guuagcacuu ccucaggaaa ugagauugau uuuuacaaua	2340
gccauaaca uuugcacuuu auuaauagcu guauauaaau augaaugcu auguuuuua	2400
uauauauua uauaucuaa uaugucuaa gcucuaaua uauagccaua ccuugaaaag	2460
agacaaggaa aaacaucuaa uauucccagg aaauugguu uauuggagaa cuccagaacc	2520
aagcagagaa ggaagggacc caugacagca uuagcauuug acauacacac augcaguggu	2580
ucucugacug uaaaacagug aacuugcau gaggaaagag gcuccauguc ucacagccag	2640

cuaugaccac auugcacuug cuuuugcaaa auaaucauuc ccugccuagc acuucucuuc	2700
uggccaugga acuaaguaca guggcacugu uugaggacca guuuucccg ggguuccugug	2760
ugcccuuuu ucuccuggac uuuucauuua agcuccaagc cccaaaucug gggggcuagu	2820
uuagaaacuc ucccucaacc uaguuuagaa acucuacccc aucuuuaaua ccuugaaugu	2880
uuugaacccc acuuuuuacc uucauggguu gcagaaaaau cagaacagau guccccaucc	2940
augcgauugc cccaccaucu acuaaugaaa aauguucuu uuuuucacu uuccccugca	3000
cuuauuguac uauucucugc ucccagccuu cauccuuuuc uaaaaaggag caaaucuca	3060
cucuaggcuu uaucguguuu acuuuuuacau uacacuugac uugauuuucu aguuuucua	3120
acaaacacca auggguuca ucuuucuggg cuccugauug cucaagcaca guuuggccug	3180
augaagagga uucaacuac acaauacuau cauugucagg acuaugaccu caggcacucu	3240
aaacauaugu uuuguuuggu cagcacagcg uuucaaaaag ugaagccacu uuauaaaau	3300
uuggagauuu ugcaggaaaa ucuggaucac cagguaagga uagcagaugg uuucaguua	3360
ucuccagucc acguucacaa aaugugaagg uguggagaca cuuacaaagc ugccucacuu	3420
cucacuguaa acauuagcuc uuuccacugc cuaccuggac cccagucua gaauuuuuac	3480
ugcaccuaac caaggucucu uguaagaaau guccauucaa gcagucuuuc ucuggguua	3540
uaauaugauu uugacuaccu uaucuggugu uaagauuuga aguuggccuu uuauuggacu	3600
aaagggaac uccuuuaagg gucucaguua gccaaguuu cuuuugcuua uauguuaaua	3660
guuuuacccu cugcauugga gagaggagug cuuuacucca agaagcuuc cucaugguua	3720
ccguucucuc caucaugcca gccuucuaa ccuuugcaga aaauacuaga gaggauuuga	3780
augugggaca caaaggucac auuugcagu agaaaauuug uguccacaag gacaagaaca	3840
aaguaugagc uuuuuuacuc cauaggaaac uuuguuaaua acaagaagu guuaaugcug	3900
caaguaaucu cuuuuuuuaa acuuuuugaa gcuacuuaa uucagccaaa uaggaauuu	3960
agagagggac ugguagugag aaauacagcu cuguuuggau gguggaaggu cucuuuuuau	4020
ugagauuuuu aagauacaug caaagguuug gaaauagaac cucuaggcac ccuccucagu	4080
gugggugggc ugagaguuaa agacagugug gcugcaguag cauagaggcg ccuagaaau	4140
ccacuugcac cguagggcac gcugauacca ucccaauagc uguugccau ugaccucua	4200
uggugaguuu cuagaauacu gguccauuca ugagauauuc aagauucaag aguauucua	4260
cuucuggguu aucagcaua acuggaauug agugucagag gauacugugg cuuguuuugu	4320
uuauuuuuu uuuuucuuuu caagaaaaa gaccaaggaa uaacauucug uaguuccuaa	4380

aaauacugac uuuuuucacu acuaauacaua aagggaaagu uuuauucuuu uauggaacac 4440

 uucagcugua cucauguauu aaaaauaggaa ugugaaugcu auauacucuu uuuauaucaa 4500
 aagucucaag cacuuauuuu uauucuaugc auuguuuguc uuuuacauaa aaaaaauguu 4560
 uauuagauug aauaaagcaa aaucacagg ugagcauccu gccuccuguu ccgauuccua 4620
 guagcuaaa 4629

 <210> 4
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant

 2, sense
 <400> 4
 tggtcattc 10

 <210> 5
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense
 <400> 5
 ccctaaacac 10

 <210> 6
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth

 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense
 <400> 6
 actacaaat 10

<210> 7

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2, sense

<400> 7

ggacgcgtat 10

<210> 8

<211>

> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2, sense

<400> 8

gtctatgacg 10

<210> 9

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2, sense

<400> 9

ttattaatgc 10

<210> 10

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> General Formula S3

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n may represent 5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG'3 or sequences derived from 5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 5'-end and wherein n is at least G

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n may represent 5'GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC'3 or sequences derived from 5'GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 3'-end and wherein n is at least G

<400> 10

ntgttttaggn 10

<210> 11

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> General Formula S4

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n may represent 5'GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA'3 or sequences derived from 5'GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 5'-end and wherein n is at least A

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n may represent 5'TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA'3 or sequences derived from 5'TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 3'-end and wherein n is at least T

<400> 11

nttttggtagn 10

<210> 12

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> General Formula S1

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n may represent 5'CATGGCAGACCCCGCTGCTC'3 or sequences derived from 5'CATGGCAGACCCCGCTGCTC'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 5'-end and wherein n is at least C

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n may represent 5'CCGAGCCCCCAGCGCAGCGG'3 or sequences derived from 5'CCGAGCCCCCAGCGCAGCGG'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 3'-end and wherein n is at least C

<400> 12

ngtcatagan 10

<210> 13

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 13

gctcgtcata gaccga 16

<210> 14

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 14
cgatacgcgt ccacag 16
<210> 15
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 15
gtagtgttta gggagc 16
<210> 16
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 16
gctatttggt agtggt 16
<210> 17
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 17
catgaatgga ccagta 16
<210> 18
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 18
aggcattaat aaagtg 16
<210> 19

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 19
ccgctgctcg tcatagac 18
<210> 20
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 20
cgctgctcgt catagacc 18
<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 21
gctgctcgtc atagaccg 18
<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 22

ctgctcgtca tagaccga 18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 23

tgctcgtcat agaccgag 18

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 24

gctcgtcata gaccgagc 18

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 25

ctcgtcatag accgagcc 18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 26

tcgtcataga ccgagccc 18

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 27

cggtcatagac cgagcccc 18

<210> 28

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 28

cgctgctcgt catagac 17

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 29

gctgctcgtc atagacc 17

<210> 30

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 30

ctgctcgtca tagaccg 17

<210> 31

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 31

tgctcgtcat agaccga 17

<210> 32

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 32

gctcgtcata gaccgag 17

<210> 33
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 33
 ctggtcatag accgagc 17
 <210> 34

 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 34
 tcgtcataga ccgagcc 17
 <210> 35
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

 variant 2
 <400> 35
 cgtcatagac cgagccc 17
 <210> 36
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 36

gctgctcgtc atagac 16

<210> 37

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 37

ctgctcgtca tagacc 16

<210> 38

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 38

tgctcgtcat agaccg 16

<210> 39

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 39

gctcgtcata gaccga 16

<210> 40

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 40

ctcgatcatag accgag 16

<210> 41

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 41

tcgatcataga ccgagc 16

<210> 42

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 42

cgtcatagac cgagcc 16

<210> 43

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 43

ctgctcgtca tagac 15

<210> 44

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 44

tgctcgatcat agacc 15

<210> 45

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 45

gctcgatcata gaccg 15

<210> 46

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 46

ctcgatcatag accga 15

<210> 47

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 47
tcgtcataga ccgag 15

<210> 48
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 48
cgtcatagac cgagc 15

<210> 49

<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 49
tgctcgtcat agac 14

<210> 50
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 50
gctcgtcata gacc 14

<210> 51
<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 51

ctcgatcatag accg 14

<210> 52

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 52

tcgatcataga ccga 14

<210> 53

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 53

cgatcatagac cgag 14

<210> 54

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 54

gctggcgata cgcgcca 18

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 55

ctggcgatac gcgtccac 18

<210> 56

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 56

tggcgatacg cgtccaca 18

<210> 57

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 57

ggcgatacgc gtccacag 18

<210> 58

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 58
gcgatacgcg tccacagg 18
<210> 59

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 59
cgatacgcg tccacagg 18
<210> 60
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 60
gatacgcg tccacagg 18
<210> 61
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 61
atacgcg tccacagg 18
<210> 62
<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 62
tacgcgtcca caggacga 18

<210> 63

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 63
ctggcgatac gcgtcca 17

<210> 64

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 64
tggcgatacg cgtccac 17

<210> 65

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 65
ggcgatacgc gtccaca 17
<210> 66
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 66
gcgatacgcg tccacag 17
<210> 67
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 67
cgatacgcgt ccacagg 17
<210> 68
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 68
gatacgcgtc cacagga 17
<210> 69
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> General Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n may represent 5'CATGGCAGACCCCGCTGCT'3 or sequences derived from 5'CATGGCAGACCCCGCTGCT'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 5'-end and wherein n is at least T

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n may represent 5'CGAGCCCCAGCGCAGCGG'3 or sequences derived from 5'CGAGCCCCAGCGCAGCGG'3, wherein one or more nucleotides are

eliminated from the 3'-end and wherein n is at least C

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 69

ncgtcataga cn

12

<210> 70

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> General Formula

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n may represent 5'GGTGGGATCGTGCTGGCGA'3 or sequences derived from 5'GGTGGGATCGTGCTGGCGA'3, wherein one or more nucleotides are

eliminated from the 5'-end and wherein n is at least A

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n may represent 5'CAGGACGATGTGCAGCGGC'3 or sequences derived from 5'CAGGACGATGTGCAGCGGC'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 3'-end and wherein n is at least C

<400> 70

ntacgcgtcc an

12

<210> 71
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> General Sequence
 <220><221>
 > misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n may represent 5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTA'3 or sequences derived
 from 5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTA'3, wherein one or more nucleotides
 are eliminated from the 5'-end and wherein n is at least A
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n may represent 5'AGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC'3 or sequences derived
 from 5'AGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC'3, wherein one or more nucleotides
 are eliminated from the 3'-end and wherein n is at least A

 <400> 71
 ngtgttttagg gn 12
 <210> 72
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> General Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n may represent 5'GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCT'3 or sequences derived
 from 5'GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCT'3, wherein one or more nucleotides
 are eliminated from the 5'-end and wherein n is at least T
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n may represent 5'GTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA'3 or sequences derived

 from 5'GTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA'3, wherein one or more nucleotides
 are eliminated from the 3'-end and wherein n is at least G

<400> 72
natttgtag tn 12

<210> 73
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> General Sequence
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n may represent 5'TGAATCTTGAATATCTCAT'3 or sequences derived from
5'TGAATCTTGAATATCTCAT'3, wherein one or more nucleotides are

eliminated from the 5'-end and wherein n is at least T
<220><221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n may represent 5'GTATTCTAGAACTCACCA'3 or sequences derived from
5'GTATTCTAGAACTCACCA'3, wherein one or more nucleotides are
eliminated from the 5'-end and wherein n is at least G

<400> 73
ngaattgacc an 12

<210> 74
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> General Sequence
<220><221>
> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n may represent 5'ATTCATATTTATATACAGG'3 or sequences derived from
5'ATTCATATTTATATACAGG'3, wherein one or more nucleotides are
eliminated from the 5'-end and wherein n is at least G
<220><221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n may represent 5'GTGCAAATGTTATTGGCTA'3 or sequences derived from
5'GTGCAAATGTTATTGGCTA'3, wherein one or more nucleotides are

eliminated from the 3'-end and wherein n is at least G

<400> 74

ncattaataa an 12

<210> 75

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 75

gaatcttgaa tatctcatga atggaccagt attctagaaa c 41

<210> 76

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reference Oligonucleotide (scrambled control)

<400> 76

aacacgtcta tacgc 15

<210> 77

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 77

ttcatattta tatacaggca ttaataaagt gcaaatgtta t 41

<210> 78

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 78

tgaggaagtg ctaacacagc ttatcctatg acaatgtcaa ag 42

<210> 79

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 79

gcctgcccc gaagagctat ttggtagtgt ttagggagcc gtcttcagg 49

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reference Oligonucleotide

<400> 80

ttgaatatct catgaatgga 20

<210> 81

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 81

cgcagtcct cccagctgat gacatgccgc gtcaggtact cctgtagg 49

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reference Oligonucleotide

<400> 82

cagaagagct atttgtagt 20

<210> 83

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 83

atgtcgttat taaccgactt ctgaacgtgc ggtgggatcg tgctggcgat acgcgtccac 60

aggacgatgt gcagcggc 78

<210> 84

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 84

ggccacaggc ccctgagcag cccccgacc atggcagacc ccgtgctcg tcatagaccg 60

agccccagc gcag 74

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reference Oligonucleotide

<400> 85

tggtagtgtt tagggagccg 20

<210> 86

<211> 149

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 86

atgtcgttat taaccgactt ctgaacgtgc ggtgggatcg tgctggcgat acgcgtccac 60

aggacgatgt gcagcggcca caggccctg agcagccccc gacccatggc agaccccgct 120

gctcgtcata gaccgagccc ccagcgcag 149

<210> 87

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 87

ttgaatatct catgaatgga ccagtattct a 31

<210> 88

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 88

caagtggaat ttctaggcgc ctctatgcta ctg 33

<210> 89

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 89
atttatatac aggcattaat aaagtgc aaa t 31
<210> 90
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 90
aagtgctaac acagcttatac ctatgacaat gt 32
<210> 91
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 91
ccccagaaga gctatttggt agtggttagg gagccgtct 39
<210> 92

<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 92
ctggtcgccc tcgatctctc aacacgttgt ccttcattgct ttgcacacag gggtgctccc 60
gcaccttgga accaaatg 78
<210> 93

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 93

gtctccag ctgatgacat gccgcgtcag gtactcctg 39

<210> 94

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 94

ctcagcttct gctgccggtt aacgcggtag cagtagaaga 40

<210> 95

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 95

gttattaacc gacttctgaa cgtgcggtgg gatcgtgctg gcgatacgcg tccacaggac 60

gatgtgca 68

<210> 96

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 96
caggccccctg agcagccccc gacccatggc agaccccgct gtcgtcata gaccgagccc 60
ccag 64

<210> 97
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 97
cacgcgcggg ggtgtcgtcg ctccgtgcgc gcgagtgact cactcaactt ca 52

<210> 98
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> General formula S2

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> w may represent 5'GGTGGGATCGTGCTGGCGAT'3 or sequences derived
from 5'GGTGGGATCGTGCTGGCGAT'3, wherein one or more nucleotides
are eliminated from the 5'-end and wherein w is at least T

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> r may represent 5'ACAGGACGATGTGCAGCGGC'3 or sequences derived
from 5'ACAGGACGATGTGCAGCGGC'3, wherein one or more nucleotides
are eliminated from the 3'-end and wherein w is at least A

<400> 98
nacgcgtccn 10

<210> 99
<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> General formula S5

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> w may represent 5'CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG'3 or sequences derived from 5'CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 5'-end and wherein w is at

least G

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> r may represent 5'TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC'3 or sequences derived from 5'TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 3'-end and wherein w is at

least G

<400> 99

ngtagtgtn

10

<210> 100

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> General formula S6

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> w may represent 5'TGAATCTTGAATATCTCATG'3 or sequences derived from 5'TGAATCTTGAATATCTCATG'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 5'-end and wherein w is at least G

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n may represent 5'TGAATCTTGAATATCTCATG'3 or sequences derived from 5'TGAATCTTGAATATCTCATG'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 5'-end and wherein n is at least G

<220><221> misc_feature

<

<222> (10)..(10)

<223> r may represent 5'AGTATTCTAGAACTCACCA'3 or sequences derived from 5'AGTATTCTAGAACTCACCA'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 3'-end and wherein w is at least A

<400> 100

naatggaccn

10

<210> 101

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> General formula S7

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> w may represent 5'ATTCATATTTATATACAGGC'3 or sequences derived

from 5'ATTCATATTTATATACAGGC'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 5'-end and wherein w is at least C

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> r may represent 5'AGTGCAAATGTTATTGGCTA'3 or sequences derived from 5'AGTGCAAATGTTATTGGCTA'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 3'-end and wherein w is at least A

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n may represent 5'AGTGCAAATGTTATTGGCTA'3 or sequences derived

from 5'AGTGCAAATGTTATTGGCTA'3, wherein one or more nucleotides are eliminated from the 3'-end and wherein n is at least A

<400> 101

nattaataan

10

<210> 102

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 102

gcgagtgact cactcaa 17

<210> 103

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 103

cgagtgactc actca 15

<210> 104

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 104

gcgagtgact cactca 16

<210> 105

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 105

cgcgagtgac tcactca 17

<210> 106

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 106

cgagtgactc actc 14

<210> 107

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 107

cgcgagtgc tcactc 16

<210> 108

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 108

gcgcgagtga ctcactc 17

<210> 109

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 109

gcgagtgcact cact 14

<210> 110

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 110

gcgcgagtga ctcact 16

<210> 111

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 111

cgcgcgagtgc actcact 17

<210> 112

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 112

cgagtgcac ac 12

<210> 113

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 113

gcgagtgact cac 13

<210> 114

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 114

cgcgagtgac tcac 14

<210> 115

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 115

cgcgagtg actcac 16

<210> 116

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 116

gcgcgagtg gactcac 17

<210> 117
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 117
 cgcgagtgac tca 13
 <210> 118

 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 118
 gcgcgagtga ctca 14
 <210> 119
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

 variant 2
 <400> 119
 cgcgcgagtg actca 15
 <210> 120
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 120

gcgcgcgagt gactca 16

<210> 121

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 121

tgcgcgcgag tgactca 17

<210> 122

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 122

cgcgcgagtg actc 14

<210> 123

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 123

tgcgcgcgag tgactc 16

<210> 124

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 124

gtgcgcgcga gtgactc 17

<210> 125

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 125

cgcgcgagtg act 13

<210> 126

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 126

tgcgcgcgag tgac 14

<210> 127

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 127

cgtgcgcgcg agtgac 16

<210> 128

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 128

tgcgcgcgag tga 13

<210> 129

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 129

gtcgctgctc cgtgcg 16

<210> 130

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 130

gtcgctgctc cgtgc 15

<210> 131

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 131
gtgtcgtcgc tccgtgc 17

<210> 132
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 132
tcgtcgtcc gtg 13

<210> 133

<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 133
tgtcgtcgt ccgtg 15

<210> 134
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 134
tcgtcgtcc gt 12

<210> 135
<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 135

gtcgtcgctc cgt 13

<210> 136

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 136

tgctcgctcgct ccgt 14

<210> 137

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 137

gtgtcgctgc tccgt 15

<210> 138

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 138

ggtgtcgtcg ctccgt 16

<210> 139

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 139

cgtcatagac cgagcc 16

<210> 140

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 140

atagaccgag cc 12

<210> 141

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 141

gctcgtcata gaccga 16

<210> 142

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 142

cgtcatagac cga 13

<210> 143

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 143

ctcgtcatag accg 14

<210> 144

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 144

gctcgtcata gaccg 15

<210> 145

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 145

gctcgtcata gacc 14

<210> 146

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 146

cagccccga cccatgg 17

<210> 147

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reference Oligonucleotide

<400> 147

cagccccga cccatg 16

<210> 148

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 148

agcccccgac ccat 14

<210> 149

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 149

cagccccga cccaagcccc cgacccat 28

<210> 150

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 150

cgcggtccaca ggacgat 17

<210> 151

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 151

cgcggtccaca ggac 14

<210> 152

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 152

cgatacgcggt ccaca 15

<210> 153

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 153

cgatacgcgt cca 13

<210> 154

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 154

tggcgatacg cgtcca 16

<210> 155

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 155

cgatacgcgt cc 12

<210> 156

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 156

gcgatacgcg tcc 13

<210> 157

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 157

gctggcgata cggtcc 17

<210> 158

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 158

ctggcgatac gcgtc 15

<210> 159

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 159

gcgatacgcg tc 12

<210> 160

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 160

gctggcgata cgcgtc 16

<210> 161

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 161

tggcgatacg cgtc 14

<210> 162

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 162

tggcgatacg cgt 13

<210> 163

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 163

ctggcgatac gcgt 14

<210> 164

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 164

ggcgatacgc gt 12

<210> 165

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 165

ctggcgatac gcg 13

<210> 166

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 166

tggcgatacg cg 12

<210> 167

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 167

atcgtgctgg cgatacg 17

<210> 168

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 168

cgtgcggtgg gatcgt 16

<210> 169

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 169

acgtgcggtg ggatcgt 17

<210> 170

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 170

aacgtgcggt gggatcg 17

<210> 171

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 171
aacgtgcggt gggat 15
<210> 172
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 172
tgaacgtgcg gtgggat 17
<210> 173
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 173
cgacttctga acgtgcg 17
<210> 174
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 174
ttaacgcggt agcagta 17
<210> 175

<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 175

taacgcgta gcagta 16

<210> 176

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 176

gttaacgcgg tagcagt 17

<210> 177

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 177

ttaacgcggt agcag 15

<210> 178

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 178

taacgcgta gca 13

<210> 179

<211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 179
 taacgcgta gc 12
 <210> 180

<211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 180
 ttaacgcggt agc 13
 <210> 181

<211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 181
 ttaacgcggt ag 12
 <210> 182

<211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2

<400> 182
gttaacgcgg tag 13
<210> 183
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 183
cgggttaacgc ggtag 15
<210> 184
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 184
ccgggttaacgc cggtag 16
<210> 185
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 185
cgggttaacgc ggta 14
<210> 186
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 186

ggttaacgcg gta 13

<210> 187

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 187

ccggttaacg cggta 15

<210> 188

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 188

gccggttaac gcgta 16

<210> 189

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 189

tgccggttaa cgcgta 17

<210> 190

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 190

cgggtaacgc ggt 13

<210> 191

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 191

ccgggtaacg cgg 13

<210> 192

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 192

gccgggtaac gcgg 14

<210> 193

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 193

tgccgggttaa cgcg 15

<210> 194

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 194

gccgggttaac gcg 13

<210> 195

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 195

ctgccgggtta acgcg 15

<210> 196

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 196

gctgccgggtt aacgcg 16

<210> 197

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 197

atgccgcgtc aggtac 16

<210> 198

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 198

acatgccgcg tca 13

<210> 199

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 199

gatgacatgc cgcgtc 16

<210> 200

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 200

gacatgccgc gt 12

<210> 201

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 201

gatgacatgc cgcgt 15

<210> 202

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 202

atgacatgcc gcg 13

<210> 203

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 203

tcccgacact tggaacc 17

<210> 204

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 204

cgatctctca acacgt 16

<210> 205

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 205

tcgatctctc aacacgt 17

<210> 206

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 206

cgatctctca acacg 15

<210> 207

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 207

tcgatctctc aacacg 16

<210> 208

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 208

ctcgatctct caacacg 17

<210> 209

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 209

gtagtggtta gggagc 16

<210> 210

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 210

gctatttggt agtggt 16

<210> 211

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 211
agcttatacct atgac 15
<210> 212
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 212
agcttatacct atga 14
<210> 213
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 213
caggcattaa taaagtg 17
<210> 214
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 214
ctaggcgcct ctatgc 16
<210> 215
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 215

taggcgcctc tatg 14

<210> 216

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 216

ctaggcgct ctatg 15

<210> 217

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 217

taggcgcctc tat 13

<210> 218

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 218

catgaatga ccagta 16

<210> 219

<211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 219
 gaatggacca 10
 <210> 220

 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 220
 tgaatggacc ag 12
 <210> 221
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

 variant 2
 <400> 221
 tgaatggacc agt 13
 <210> 222
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2

<400> 222
atgaatggac cagt 14
<210> 223
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 223
atgaatggac cagta 15
<210> 224
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 224
catgaatgga ccagtat 17
<210> 225
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 225
tcatgaatgg accagtat 18
<210> 226
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 226

tcatgaatgg accagtatt 19

<210> 227

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 227

ctcatgaatg gaccagtatt 20

<210> 228

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 228

tctcatgaat ggaccagtat tc 22

<210> 229

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 229

atctcatgaa tggaccagta ttct 24

<210> 230

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 230

tatctcatga atggaccagt attcta 26

<210> 231

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 231

atatctcatg aatggaccag tattctag 28

<210> 232

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 232

cgtcatagac 10

<210> 233

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 233

tcgtcataga cc 12

<210> 234

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 234

tcgtcataga ccg 13

<210> 235

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 235

ctcgtcatag accga 15

<210> 236

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 236

atatacaggc attaataaag tgcaaatg 28

<210> 237

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 237

tgctcgatc agaccga 17

<210> 238

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 238

tgctcgatc agaccgag 18

<210> 239

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 239

tgctcgatc agaccgagc 19

<210> 240

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 240

ctgctcgtca tagaccgagc 20

<210> 241

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 241

gctgctcgtc atagaccgag cc 22

<210> 242

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 242

cgctgctcgt catagaccga gccc 24

<210> 243

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 243

ccgtgctcg tcatagaccg agcccc 26

<210> 244

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 244
cccgtgctc gtcataagacc gagccccc 28
<210> 245

<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 245
tacgcgtcca 10
<210> 246
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 246
atacgcgtcc ac 12
<210> 247
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 247
gatacgcgtc cac 13
<210> 248
<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 248

gatacgcgtc caca 14

<210> 249

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 249

cgatacgcgt ccacag 16

<210> 250

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 250

gcgatacgcg tccacag 17

<210> 251

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 251
gcgatacgcg tccacagg 18
<210> 252
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 252
gcgatacgcg tccacagga 19
<210> 253
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 253
ggcgatacg gtccacagga 20
<210> 254
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 254
tggcgatacg cgtccacagg ac 22
<210> 255
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 255

ctggcgatac gcgtccacag gacg 24

<210> 256

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 256

gctggcgata cggtccaca ggacga 26

<210> 257

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 257

tgctggcgat acggtccac aggacgat 28

<210> 258

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 258

gtgttttaggg 10

<210> 259

<211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 259
 agtggttagg ga 12
 <210> 260

<211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 260
 tagtggttag gga 13
 <210> 261

<211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 261
 tagtggttag ggag 14
 <210> 262

<211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2

<400> 262
tagtgtttag ggagc 15

<210> 263
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 263
gtagtgttta gggagcc 17

<210> 264
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 264
ggtagtgttt agggagcc 18

<210> 265

<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 265
ggtagtgttt agggagccg 19

<210> 266
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 266

tggtagtgtt tagggagccg 20

<210> 267

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 267

ttggtagtgt ttagggagcc gt 22

<210> 268

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 268

tttggtagtg tttaggagc cgtc 24

<210> 269

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 269

atttggtagt gtttagggag ccgtct 26

<210> 270

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 270

tatttgtag tgtaggga gccgtctt 28

<210> 271

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 271

atttgtagt 10

<210> 272

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 272

tatttgtag tg 12

<210> 273

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 273

tatttgtag tgt 13

<210> 274

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 274

ctatttgta gtgt 14

<210> 275

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 275

ctatttgta gtgtt 15

<210> 276

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 276

gctatttggt agtgttt 17

<210> 277

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 277

agctatttgg tagtggtt 18

<210> 278

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 278

agctatttgg tagtggtta 19

<210> 279

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 279

gagctatttg gtagtggtta 20

<210> 280

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 280

agagctatatt ggtagtggtt ag 22

<210> 281

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 281

aagagctatt tgtagtggt tagg 24

<210> 282

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 282

gaagagctat ttgtagtgt ttaggg 26

<210> 283

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 283

agaagagcta ttgtagtg ttaggga 28

<210> 284

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 284
cattaataaa 10
<210> 285

<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 285
gcattaataa ag 12
<210> 286
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 286
gcattaataa agt 13
<210> 287
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 287
ggcattaata aagt 14
<210> 288
<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 288

ggcattaata aagtg 15

<210> 289

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 289

aggcattaat aaagtg 16

<210> 290

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 290

caggcattaa taaagtgc 18

<210> 291

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 291
acaggcatta ataaagtgc 19

<210> 292
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 292
acaggcatta ataaagtgc 20

<210> 293
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 293
tacaggcatt aataaagtgc aa 22

<210> 294
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 294
atacaggcat taataaagtg caaa 24

<210> 295

<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 295

tatacaggca ttaataaagt gcaaat 26

<210> 296

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant

2, sense

<400> 296

ctggtccatt c 11

<210> 297

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant

2, sense

<400> 297

tggtccattc a 11

<210> 298

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth

factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant

2, sense

<400> 298

ctggtccatt ca 12

<210> 299

<211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense
 <400> 299
 tccctaaaca c 11
 <210> 300

 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense
 <400> 300
 ccctaaacac t 11
 <210> 301
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense
 <400> 301
 tccctaaaca ct 12
 <210> 302
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense

<400> 302
cactaccaaa t 11
<210> 303
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense
<400> 303
actaccaa a 11
<210> 304
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense
<400> 304
cactaccaaa ta 12
<210> 305
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense
<400> 305
tggacgcgta t 11
<210> 306
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant

2, sense

<400> 306

ggacgcgtat c 11

<210> 307

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant

2, sense

<400> 307

tggacgcgta tc 12

<210> 308

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth

factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant

2, sense

<400> 308

ggtctatgac g 11

<210> 309

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant

2, sense

<400> 309

gtctatgacg a 11

<210> 310

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2, sense

<400> 310

ggtctatgac ga 12

<210> 311

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2, sense

<400> 311

tttattaatg c 11

<210> 312

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2, sense

<400> 312

tttattaatgc c 11

<210> 313

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth

factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 313
tttattaatg cc 12
<210> 314
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 314
actggtccat tc 12
<210> 315

<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 315
tgggtccattc at 12
<210> 316
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 316
ctggtccatt cat 13
<210> 317
<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2, sense

<400> 317

actggtccat tca 13

<210> 318

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2, sense

<400> 318

actggtccat tcat 14

<210> 319

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2, sense

<400> 319

ctccctaaac ac 12

<210> 320

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2, sense

<400> 320

ccctaaacac ta	12
<210> 321	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant	
2, sense	
<400> 321	
tccctaaaca cta	13
<210> 322	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant	
2, sense	
<400> 322	
ctccctaaac act	13
<210> 323	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant	
2, sense	
<400> 323	
ctccctaaac acta	14
<210> 324	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth	

factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 324

acactaccaa at 12

<210> 325

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 325

actaccaa at ag 12

<210> 326

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 326

cactaccaa tag 13

<210> 327

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 327

acactaccaa ata 13

<210> 328

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 328

acactaccaa atag 14

<210> 329

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 329

gtggacgcgt at 12

<210> 330

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 330

ggacgcgtat cg 12

<210> 331

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 331
 tggacgcgta tcg 13
 <210> 332
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense
 <400> 332
 gtggacgcgt atc 13
 <210> 333
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense
 <400> 333
 gtggacgcgt atcg 14
 <210> 334
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense
 <400> 334
 cggctctatga cg 12
 <210> 335
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 335

gtctatgacg ag 12

<210> 336

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 336

ggtctatgac gag 13

<210> 337

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 337

cgtctatga cga 13

<210> 338

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense

<400> 338

cgtctatga cgag 14

<210> 339

<211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense
 <400> 339
 ctttattaat gc 12
 <210> 340

 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense
 <400> 340
 ttattaatgc ct 12
 <210> 341
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense
 <400> 341
 tttattaatg cct 13
 <210> 342
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
 factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
 2, sense

<400> 342
ctttattaat gcc 13
<210> 343
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Target sequence within the homo sapiens transforming growth
factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant
2, sense
<400> 343
ctttattaat gcct 14
<210> 344
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reference Oligonucleotide
<400> 344
gtgcagggga aagatgaaa 20
<210> 345
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reference Oligonucleotide
<400> 345
gagctcttga ggtccctgtg 20
<210> 346
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reference Oligonucleotide
<400> 346
agcctctttc ctcatgcaa 20
<210> 347

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reference Oligonucleotide
 <400> 347
 ccttctctgc ttggttctgg 20
 <210> 348
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reference Oligonucleotide
 <400> 348

 gccatggagt agacatcgg 20
 <210> 349
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 349
 atacgcgtcc acaggac 17
 <210> 350
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 350
 tacgcgtcca caggacg 17
 <210> 351
 <211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 351

tggcgatacg cgtcca 16

<210> 352

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 352

ggcgatacgc gtccac 16

<210> 353

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 353

gcgatacgcg tccaca 16

<210> 354

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 354

cgatacgcgt ccacag 16

<210> 355

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 355

gatacgcgtc cacagg 16

<210> 356

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 356

atacgcgtcc acagga 16

<210> 357

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 357

tacgcgtcca caggac 16

<210> 358

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 358

ggcgatacgc gtcca

15

<210> 359

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 359

gcgatacgcg tccac

15

<210> 360

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 360

cgatacgcgt ccaca

15

<210> 361

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 361

gatacgcgtc cacag

15

<210> 362

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 362

atagcggtcc acagg 15

<210> 363

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 363

tacggtcca cagg 15

<210> 364

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 364

gcgatacgcg tcca 14

<210> 365

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 365
cgatacgcgt ccac 14

<210> 366
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 366
gatacgcgtc caca 14

<210> 367

<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 367
atacgcgtcc acag 14

<210> 368
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 368
tacgcgtcca cagg 14

<210> 369
<400> 369
000
<210> 370

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 370

tttgtagtg ttaggga 18

<210> 371

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 371

tttgtagtg ttagggag 18

<210> 372

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 372

tggtagtgt tagggagc 18

<210> 373

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 373
ggtagtgttt agggagcc 18
<210> 374
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 374
gtagtgttta gggagccg 18
<210> 375
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 375
tagtgtag ggagccgt 18
<210> 376
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 376
agtgttagg gagccgtc 18
<210> 377
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 377

gtgttttaggg agccgtct 18

<210> 378

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 378

tttggtagtgt ttttaggg 17

<210> 379

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 379

ttggtagtgt ttaggga 17

<210> 380

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 380

tggtagtgtt tagggag 17

<210> 381

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 381

gtagtggttt agggagc 17

<210> 382

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 382

gtagtgttta gggagcc 17

<210> 383

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 383

tagtggttag ggagccg 17

<210> 384

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 384

agtgtttagg gagccgt 17

<210> 385

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 385

gtgttttagg agccgtc 17

<210> 386

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 386

ttggtagtgt ttaggg 16

<210> 387

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 387

tggtagtgtt taggga 16

<210> 388

<400> 388

000

<210> 389
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 389
 gtagtggtta gggagc 16
 <210> 390
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 390
 tagtggttag ggagcc 16
 <210> 391
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 391
 agtggttagg gagccg 16
 <210> 392
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 392

gtgttttaggg agccgt 16

<210> 393

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 393

tggtagtgtt taggg 15

<210> 394

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 394

ggtagtggtt aggga 15

<210> 395

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 395

gtagtgttta gggag 15

<210> 396

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 396

tagtgtttag ggagc 15

<210> 397

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 397

agtgttttagg gagcc 15

<210> 398

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 398

gtgttttaggg agccg 15

<210> 399

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 399

ggtagtggtt aggg 14

<210> 400
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 400
 gtagtggtta ggga 14
 <210> 401
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 401
 tagtggttag ggag 14
 <210> 402
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 402
 agtggttagg gagc 14
 <210> 403
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 403

gtgttttaggg agcc 14

<210> 404

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 404

gaagagctat ttgtagt 18

<210> 405

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 405

aagagctatt tgtagtg 18

<210> 406

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 406

agagctattt ggtagtgt 18

<210> 407

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 407

gagctatttg gtagtggt 18

<210> 408

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 408

agctatttgg tagtggtt 18

<210> 409

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 409

gctatttgg agtggtta 18

<210> 410

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 410

ctatttggtgta gtgttttag 18

<210> 411

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 411

tatttggttag tgtttagg 18

<210> 412

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 412

atttggtagt gtttaggg 18

<210> 413

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 413

aagagctatt tggtagt 17

<210> 414

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 414

agagctattt ggtagtg 17

<210> 415

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 415

gagctatttg gtagtgt 17

<210> 416

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 416

agctatttgg tagtggt 17

<210> 417

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 417

gctatttggt agtgttt 17

<210> 418

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 418

ctatttggtgta gtgttta 17

<210> 419

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 419

atttggtagt gtttagg 17

<210> 420

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 420

atttggtagt gtttagg 17

<210> 421

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 421

agagctattt ggtagt 16

<210> 422

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 422

gagctatttg gtagtg 16

<210> 423

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 423

agctatttgg tagtgt 16

<210> 424

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 424

gctatttgg agtggt 16

<210> 425

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 425

ctatttggtgta gtgttt 16

<210> 426

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 426

tatttggtag tggtta 16

<210> 427

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 427

atttggtagt gtttag 16

<210> 428

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 428

gagctatttg gtagt 15

<210> 429

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 429

agctatttgg tagtg 15

<210> 430

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 430

gctatttggg agtgt 15

<210> 431

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 431

ctatttggta gtgtt 15

<210> 432

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 432
tatttggtag tgttt 15
<210> 433
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 433
atttggtagt gttta 15
<210> 434
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 434
agctatttgg tagt 14
<210> 435
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 435
gctatttgg agtg 14
<210> 436
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 436

ctatttggtgta gtgt 14

<210> 437

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 437

tatttggtag tggt 14

<210> 438

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 438

atttggtagt gttt 14

<210> 439

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 439

tatctcatga atggacca 18

<210> 440

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 440

atctcatgaa tggaccag 18

<210> 441

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 441

tctcatgaat ggaccagt 18

<210> 442

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 442

ctcatgaatg gaccagta 18

<210> 443

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 443
tcatgaatgg accagtat 18
<210> 444

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 444
catgaatgga ccagtatt 18
<210> 445
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 445
atgaatggac cagtattc 18
<210> 446
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 446
tgaatggacc agtattct 18
<210> 447
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 447

gaatggacca gtattcta 18

<210> 448

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 448

atctcatgaa tggacca 17

<210> 449

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 449

tctcatgaat ggaccag 17

<210> 450

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 450

ctcatgaatg gaccagt 17

<210> 451
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 451
 tcatgaatgg accagta 17
 <210> 452
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 452
 catgaatgga ccagtat 17
 <210> 453
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 453
 atgaatggac cagtatt 17
 <210> 454
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 454

tgaatggacc agtattc 17

<210> 455

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 455

gaatggacca gtattct 17

<210> 456

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 456

tctcatgaat ggacca 16

<210> 457

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 457

ctcatgaatg gaccag 16

<210> 458

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 458

tcatgaatgg accagt 16

<210> 459

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 459

catgaatgga ccagta 16

<210> 460

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 460

atgaatggac cagtat 16

<210> 461

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 461

tgaatggacc agtatt 16

<210> 462
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 462
 gaatggacca gtattc 16
 <210> 463
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 463
 ctcatgaatg gacca 15
 <210> 464
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 464
 tcatgaatgg accag 15
 <210> 465
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 465

catgaatgga ccagt 15

<210> 466

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 466

atgaatggac cagta 15

<210> 467

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 467

tgaatggacc agtat 15

<210> 468

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 468

gaatggacca gtatt 15

<210> 469

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 469

tcatgaatgg acca 14

<210> 470

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 470

catgaatgga ccag 14

<210> 471

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 471

atgaatggac cagt 14

<210> 472

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 472
tgaatggacc agta 14
<210> 473
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 473
gaatggacca gtat 14
<210> 474

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2
<400> 474
tatacaggca ttaataaa 18
<210> 475
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2
<400> 475
atacaggcat taataaag 18
<210> 476
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 476
tacaggcatt aataaagt 18

<210> 477
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 477
acaggcatta ataaagtg 18

<210> 478
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 478
caggcattaa taaagtgc 18

<210> 479

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 479
aggcattaat aaagtgca 18

<210> 480

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 480

ggcattaata aagtgcaa 18

<210> 481

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 481

gcattaataa agtgcaaa 18

<210> 482

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 482

cattaataaa gtgcaaat 18

<210> 483

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 483
 atacagggcat taataaa 17
 <210> 484
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 484
 tacagggcatt aataaag 17
 <210> 485
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 485
 acagggcatta ataaagt 17
 <210> 486
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 486
 cagggcattaa taaagt 17
 <210> 487
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 487

aggcattaat aaagtgc 17

<210> 488

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 488

ggcattaata aagtgc 17

<210> 489

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
variant 2

<400> 489

gcattaataa agtgca 17

<210> 490

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 490

cattaataaa gtgcaaa 17

<210> 491
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 491
 tacaggcatt aataaa 16
 <210> 492
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 492
 acaggcatta ataaag 16
 <210> 493
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2
 <400> 493
 caggcattaa taaagt 16
 <210> 494
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 494

aggcattaat aaagtg 16

<210> 495

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 495

ggcattaata aagtgc 16

<210> 496

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 496

gcattaataa agtgca 16

<210> 497

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 497

cattaataaa gtgcaa 16

<210> 498

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 498

acaggcatta ataaa 15

<210> 499

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 499

caggcattaa taaag 15

<210> 500

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 500

aggcattaat aaagt 15

<210> 501

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript variant 2

<400> 501

ggcattaata aagtg 15

<210> 502
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2

<400> 502
 gcattaataa agtgc 15

<210> 503
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2

<400> 503
 cattaataaa gtgca 15

<210> 504

 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming
 growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript
 variant 2

<400> 504
 caggcattaa taaa 14

<210> 505
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 505

aggcattaat aaag 14

<210> 506

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 506

ggcattaata aagt 14

<210> 507

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 507

gcattaataa agtg 14

<210> 508

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide against Homo sapiens transforming

growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), transcript

variant 2

<400> 508

cattaataaa gtgc 14