

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 12월 2일 (02.12.2021)

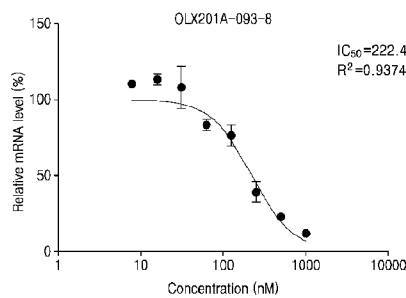


(10) 국제공개번호
WO 2021/241802 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/113* (2010.01) *A61P 27/02* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/010781
- (22) 국제출원일: 2020년 8월 13일 (13.08.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0063281 2020년 5월 26일 (26.05.2020) KR
- (71) 출원인: 올릭스 주식회사 (**OLIX PHARMACEUTICALS, INC.**) [KR/KR]; 16226 경기도 수원시 영통구 대학로 17, 1014호, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 홍선우 (**HONG, Sun Woo**); 16822 경기도 용인시 수지구 동천로113번길 10, 1201동 2303호, Gyeonggi-do (KR). 박준현 (**PARK, June Hyun**); 16281 경기도 수원시 장안구 금당로39번길 34, 208동 503호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 리앤목 특허법인 (**Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS**); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

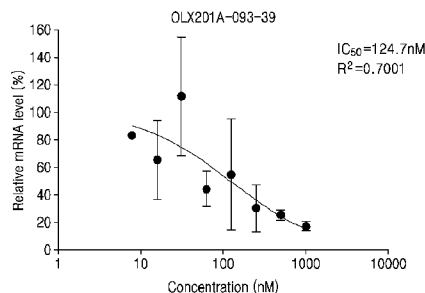
(54) Title: RNAI AGENT TARGETING CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 연결 조직 성장 인자를 표적으로 하는 RNAi 제제 및 이의 용도



(57) Abstract: The present application relates to an RNAi agent targeting connective tissue growth factor and use thereof, and provides an RNAi-inducing nucleic acid molecule for inhibiting the expression of connective tissue growth factor (CTGF), and a pharmaceutical composition for the prevention or treatment of subretinal fibrosis and/or wet age-related macular degeneration, the pharmaceutical composition comprising the RNAi-inducing nucleic acid molecule as an active ingredient.

(57) 요약서: 본 출원은 연결 조직 성장 인자를 표적으로 하는 RNAi 제제 및 이의 용도에 관한 것으로서, CTGF (Connective Tissue Growth Factor)의 발현을 억제하기 위한 RNAi 유도용 핵산 분자, 및 상기 RNAi 유도용 핵산 분자를 유효 성분을 포함하는 망막하섬유화증 및/또는 습성 노인성 황반변성의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.



WO 2021/241802 A1

명세서

발명의 명칭: 연결 조직 성장 인자를 표적으로 하는 RNAi 제제 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 RNA 간섭 현상을 통해 질병을 예방 또는 치료하는 핵산 분자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 노인성 황반 변성(Age-related Macular Degeneration, AMD)은 전 세계적으로 실명 원인 질환의 주요 원인을 차지하고 있다. 발병빈도가 높은 안구 질환 중 하나인 망막하섬유화증(subretinal fibrosis)은 망막주변에 섬유조직이 증식하는 현상으로 황반부종과 박리(macular edema and detachment)를 유도하여 시력을 영구적으로 훼손한다. 습성 노인성 황반 변성, 증식성 당뇨 망막병증(Proliferative diabetic retinopathy), 증식성 유리체망막병증(Proliferative vitreoretinopathy), 중심 망막혈관폐색증 (central retinal vein occlusion), 시신경신경병증 (optic neuropathy) 등 주요 만성 망막 질환들의 대부분에서 공통적으로 망막 섬유화가 발생하고 있지만 치료제가 전무한 상태이다.
- [3] 한편, 결합 조직 성장 인자(Connective tissue growth factor, CTGF)는 세포의 분화, 성장, migration, ECM production, adhesion 등에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 다양한 장기에서 fibrosis를 유도하여 장기의 기능에 손상을 일으키는 chronic fibrotic disorders의 경우, fibrotic disorder가 일어나는 조직에서 CTGF가 과 발현 되는 것으로 확인되었으며, 피부의 경우에는 CTGF와 fibrosis의 관계가 비교적 잘 연구되어 있다. 병리학적으로는, 전장 CTGF 분자는 결합 조직 세포의 과다증식 및 세포외 매트릭스의 과다침착이 있는 상태에 관여하는 것으로 보고되어 있다. CTGF는 또한 혈관 내피세포 이동 및 증식 및 혈관신생에 관련된 상태와도 연관이 있는 것으로 당업계에 알려져 있다.
- [4] 이에 본 발명자들은 습성 황반변성 및/또는 망막하섬유화증 환자를 치료할 수 있는 새로운 안전한 약물을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, RNA 간섭 기술을 이용한 RNA 제제를 개발하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 CTGF를 표적화하는 RNAi 제제를 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 다른 목적은 안구 질환, 특히 망막하섬유화증 및/또는 습성 노인성 황반변성의 치료를 위한 RNAi 제제 및 이의 의약적 용도를 제공하는 것이다.
- [7]
- [8] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본

출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 일 양상은 CTGF를 표적화하는 이중 가닥의 RNAi 유도용 핵산 분자를 제공한다.
- [10] 다른 양상은 상기 RNAi 유도용 핵산 분자를 유효성분으로 포함하는 습성 황반변성 및/또는 망막하섬유화증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [11] 일 양상에 따른 siRNA에 따르면, 비특이적 면역반응, 오프 타겟 효과와 같은 부작용을 완화하면서, CTGF를 인코딩하는 mRNA에 결합하여 이를 분해함으로써 상기 단백질의 발현을 억제할 수 있다. 따라서, 일 양상에 따른 핵산 분자는 만성 망막 질환인 습성 노인성 황반변성, 증식성 당뇨 망막병증, 증식성 유리체망막병증, 중심 망막혈관폐색증, 시신경신경병증 등에서 나타나는 망막하섬유화 및/또는 맥락막 신생혈관(Choroidal Neovascularization, CNV)의 형성 또는 진행을 억제하기 위한 약제학적 조성물의 유효성분으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1는 본 발명에 따른 siRNA의 처리에 따른 CTGF mRNA 수준의 변화를 보여준다.
- [13] 도 2a 내지 도 2d는 본 발명에 따른 siRNA의 처리에 따른 CTGF 단백질 수준의 변화를 보여준다.
- [14] 도 3a 및 도 3b는 본 발명에 따른 siRNA를 CNV 원숭이 모델에 안구 내 주사한 후, CNV 부피의 변화를 확인한 결과이다.
- [15] 도 4a 내지 도 4b는 CNV 유도에 따른 망막하 섬유화증 마우스 모델에서의 본 발명에 따른 siRNA의 치료 효능을 확인한 결과로서,
- [16] 도 4a는 CNV 병변 내에서의 콜라겐 deposition 변화를 보여주며, 도 4b는 CNV 병변에서 CTGF 면역반응성(immunoreactivity)를 보여준다.
- [17] 도 4c 내지 도 4e는 망막 박리에 의한 망막하섬유증 마우스 모델에서의 본 발명에 따른 siRNA의 치료 효능을 확인한 결과로서,
- [18] 도 4c는 망막하 섬유화 영역의 변화를 보여주며,
- [19] 도 4d는 콜라겐 deposition 영역의 변화를 보여주며,
- [20] 도 4e는 CTGF 단백질 수준의 변화를 보여준다.
- [21] 도 5a 내지 도 5f는 NHP CNV 원숭이 모델에서 본 발명에 따른 siRNA의 치료 효능을 확인한 결과로서,
- [22] 도 5a 내지 도 5d는 각각 OLX201A-093-8 투여에 따른 leakage 면적의 변화, 망막 두께의 변화, 콜라겐 deposition 면적의 변화, 그리고 CTGF 단백질 수준의 변화를

보여준다.

- [23] 도 5e 및 도 5f는 각각 OLX201A-093-39의 투여에 따른 leakage 면적의 변화 및 망막 두께의 변화를 보여준다.

발명의 실시를 위한 형태

- [24] 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[25]

- [26] 일 양상은 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중 가닥의 RNAi 유도용 핵산 분자로서,

- [27] 상기 센스 가닥은 15 내지 17nt의 길이를 가지고, 상기 센스 가닥 내 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드는 안티센스 가닥과 상보적이며;

- [28] 상기 센스 가닥은 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함하고; 그리고

- [29] 상기 안티센스 가닥(5'→3')은

P-mAAAUCUmGmGCUUmGUUmA*C*mA*mG*mG의 서열을 포함하며,

- [30] 상기에서, *는 포스포로티오에이트 결합으로의 변형, m은 2'-O-메틸로의 치환, 및 P는 5'-인산기의 결합을 의미하는 것인, RNAi 유도용 핵산 분자를 제공한다.

- [31] 다른 양상은 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중 가닥의 RNAi 유도용 핵산 분자로서,

- [32] 상기 안티센스 가닥은 19 내지 21nt의 길이를 가지고, 상기 안티센스 가닥 내 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드는 센스 가닥과 상보적이며;

- [33] 상기 안티센스 가닥은 적어도 하나 이상의 화학적 변형을 포함하고; 그리고

- [34] 상기 센스 가닥(5'→3')은 mGmUmACAAGCCAGAU*U*U*Lp의 서열을 포함하며,

- [35] 상기에서, *는 포스포로티오에이트 결합으로의 변형, m은 2'-O-메틸로의 치환, 및 Lp은 친유성 모이어티인, RNAi 유도용 핵산 분자를 제공한다.

- [36] 또 다른 양상은, CTGF의 발현을 억제하는, 이중 가닥의 siRNA를 포함하는 RNAi 유도용 핵산 분자로서,

- [37] 상기 이중 가닥의 siRNA는 서열번호:1의

염기서열(5'-AAAUCUGGCUUGUUACAGG-3')을 갖는 안티센스 가닥 및 서열번호:2의 염기서열(5'-GUAACAAGCCAGAUUU-3')을 갖는 센스 가닥을 포함하며,

- [38] 상기 안티센스 가닥과 센스 가닥은 서로 상보적으로 결합하여, 안티센스 가닥의 5' 말단 및 센스 가닥의 3' 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하며,

- [39] 상기 센스 가닥의 3' 말단에는 콜레스테롤, 토크페롤, 스테아르산, 레티노산,

DHA, 팔미트산, 리놀레산, 리놀렌산 및 탄소수 10개 이상의 장쇄 지방산으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 친유성 모이어티가 도입된, RNAi 유도용 핵산 분자를 제공한다.

[40]

[41] RNAi 유도용 핵산 분자

[42] 본 명세서에서 용어, "RNA 간섭 (RNA interference)" 또는 "RNAi"는 일반적으로 특정 표적 RNA의 파괴를 유발하고 서열-특이적 핵산 분자에 의해 매개됨으로써 세포에서 유전자 발현을 억제 또는 하향 조절하는 기술 분야에서 일반적으로 알려진 생물학적 과정을 지칭한다. 또한, RNAi라는 용어는 전사 후 유전자 침묵, 번역 억제, 전사 억제, 또는 후성 유전학 (epigenetics)과 같은 서열 특이적 RNA 간섭을 기술하기 위해 사용된 다른 용어와 동등한 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 siRNA 분자는 전사 후 수준 또는 전사 전 수준에서 유전자를 침묵시키는데 사용될 수 있다. 비 제한적인 예에서, siRNA 분자에 의한 유전자 발현의 조절은, RISC를 통한 mRNA의 siRNA-매개된 절단으로부터 초래될 수 있다.

[43] 본 명세서에서 용어, "RNAi 유도용 핵산 분자", "짧은 간섭 RNA (short interfering RNA)", "siRNA 분자" 또는 "siRNA"는, 서열-특이적 방식으로 상기 RNA 간섭을 매개함으로써 유전자 발현 또는 바이러스 복제를 억제 또는 하향 조절할 수 있는 임의의 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 개별 핵산 분자, 복수의 상기 핵산 분자, 또는 상기 핵산 분자의 풀 (pool) 모두를 지칭할 수 있다. 상기 siRNA는 자가-상보적인 (self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 포함하는 비대칭 이중 가닥 핵산 분자일 수 있다.

[44] 본 명세서에서 용어, "유전자"란 최광의의 의미로 간주되어야 하며, 구조 단백질 또는 조절 단백질을 암호화할 수 있다. 이때, 조절단백질은 전사인자, 열 충격단백질 또는 DNA/RNA 복제, 전사 및/또는 번역에 관여하는 단백질을 포함한다. 본 발명에 있어서, 발현 억제의 대상이 되는 목적 유전자는 바이러스 게놈에 내재된 것으로, 동물 유전자로 통합되거나 염색체 외 구성요소로서 존재할 수 있다.

[45] 본 명세서에서 용어, "안티센스 가닥 (antisense strand)"은 당업계에서 일반적으로 허용되는 의미를 지칭한다. 본 명세서에 기재된 siRNA 분자와 관련하여, 상기 용어는 CTGF RNA에 상보성을 갖는 siRNA 분자의 뉴클레오티드 서열을 지칭할 수 있다. 또한, 상기 siRNA 분자의 안티센스 가닥은 siRNA 분자의 센스 가닥 (sense strand)에 상보성을 갖는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 siRNA 분자의 안티센스 가닥은 안티센스 영역 (antisense region) 또는 가이드 가닥 (guide strand)으로 지칭될 수 있다.

[46] 본 명세서에서 용어, "센스 가닥 (sense strand)"은 당업계에서 일반적으로 허용되는 의미를 지칭한다. 본 명세서에 기재된 siRNA 분자와 관련하여, 상기 용어는 siRNA 분자의 안티센스 가닥에 상보성을 갖는, 상기 siRNA 분자의 뉴클레오티드 서열을 지칭할 수 있다. 또한, siRNA 분자의 센스 가닥은 표적

핵산 서열과 상동성 또는 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 일 구체예에서, siRNA 분자의 센스 가닥은 센스 영역(sense region) 또는 패신저 가닥 (passenger strand)으로 지칭될 수 있다.

[47] 본 명세서에서 용어, "상보성(complementarity)" 또는 "상보적인(complementary)"은 당업계에서 일반적으로 허용되는 의미를 지칭한다. 상기 용어는 일반적으로 전통적인 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 또는 본 명세서에 기술된 다른 비-전통적 유형의 결합에 의해, 하나의 핵산 서열과 다른 핵산 서열 사이에서의 수소 결합 (들)의 형성 또는 존재를 지칭할 수 있다. 완벽한 상보성은 핵산 서열의 모든 인접 잔기가 제 2 핵산 서열에서 동일한 수의 인접 잔기와 수소 결합한다는 것을 의미할 수 있다. 부분 상보성은 핵산 분자 내에서, 다양한 미스매치 (mismatch) 또는 비-염기쌍 뉴클레오티드 (non-based paired nucleotides) (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 개 이상의 미스매치, 비-뉴클레오티드 링커 (non-nucleotide linker), 또는 비-염기쌍 뉴클레오티드)를 포함할 수 있다. 상기 부분 상보성은, 핵산 분자의 센스 가닥 또는 센스 영역과, 안티센스 가닥 또는 안티센스 영역 사이에서, 또는 핵산 분자의 안티센스 가닥 또는 안티센스 영역과, 이와 상응하는 표적 핵산 분자 사이에서, 벌지 (bulges), 루프 (loops), 돌출 (overhang), 또는 블런트 말단(blunt end)을 초래할 수 있다.

[48] 본 명세서에서 용어 "블런트 말단 (blunt end)"은 당업계에서 일반적으로 허용되는 의미를 지칭한다. 본 명세서의 핵산 분자와 관련하여, 상기 용어는 돌출 뉴클레오티드가 없는, 이중 가닥 siRNA 분자의 말단을 지칭할 수 있다. 본 명세서에 기재된 siRNA 분자는 안티센스 가닥의 5'- 말단, 및 센스 가닥의 3'- 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하는 것일 수 있다.

[49]

[50] CTGF의 발현을 억제하기 위한 RNAi 유도용 핵산 분자

[51] "CTGF(Connective Tissue Growth Factor)"는 연결 조직 성장 인자 또는 CCN2으로도 지칭되며, 상기 CTGF는 세포의 부착, 이동, 증식, 혈관 형성, 골격 발달, 및 조직 상체의 복구를 포함하는 생물학적 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히, 섬유성 질환과 밀접한 관련성이 있는 것으로 알려져 있다. 상기 CTGF 단백질은 천연적으로 존재하는 야생형 CTGF 및 그의 기능적 변이체를 포함하는 것으로 해석될 수 있고, 상기 CTGF 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 서열은 미국국립보건원의 GenBank 등 공지의 데이터베이스로부터 취득할 수 있다.

[52] 본 명세서에서 용어, "발현(expression)"은 당업계에서 일반적으로 허용되는 의미를 지칭한다. 상기 용어는 일반적으로, 유전자가 궁극적으로 단백질을 생성하는 과정을 의미할 수 있다. 상기 발현은 전사, 스플라이싱, 전사 후 변형, 또는 번역을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 발현 수준은 mRNA 수준 또는 단백질 수준의 검출에 의해 결정되거나 모니터링될 수 있다.

- [53] 대상체에서의 CTGF 유전자 발현과 관련하여 사용된 용어, "억제" 또는 "감소"는 비처리군 또는 정상 대조군 대비 통계적으로 유의미한 감소를 지칭한다. 상기 감소는 예를 들어, 최소 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 이상일 수 있으나, 이는 검출 또는 측정 방법에 따라, 검출 수준 이하일 수도 있다.
- [54]
- [55] siRNA는 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA)로 RNAi(RNA interference) 작용에 관여한다. RNAi는 1998년 *Caenorhabditis elegans*에서 최초로 발견된 세포 내 유전자 조절 기작으로 작용기전은 세포 내로 투입된 RNA 이중 가닥 중 안티센스 가닥이 표적 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합함으로써 표적 유전자 분해를 유도한다고 알려져 있으며, 최근 가장 각광받는 신약 개발 후보 기술이다.
- [56] 다만, 이러한 가능성과 반대로 siRNA의 부작용 및 단점이 계속적으로 보고되어 있다. RNAi 기반 치료제의 개발이 이루어지기 위해서는 1) 효과적인 전달시스템의 부재 2) 오프타겟 효과 3) 면역반응 유도 4) 세포 내 RNAi 기구 포화와 같은 장벽을 극복해야 할 필요성이 있다. siRNA가 표적 유전자의 발현을 직접적으로 조절할 수 있는 효과적인 방법임에도 불구하고 이와 같은 문제들로 인해 치료제 개발에 어려움을 겪고 있다. 이와 관련하여, 비대칭 siRNA(asymmetric shorter duplex siRNA, asiRNA)는 종래의 siRNA가 가지는 19+2 구조에 비해 짧은 이중나선 길이를 갖는 비대칭 RNAi 유도 구조이다. 기존 siRNA 구조 기술에서 확인되는 오프-타겟 효과, RNAi 기작의 포화, TLR3에 의한 면역반응 등의 문제점들을 극복한 기술이며, 이에 따라 부작용이 낮은 RNAi 신약 개발이 가능하다.
- [57] 이를 바탕으로, 본 실시예에서 센스 가닥 및 상기 센스 가닥과 상보적인 안티센스 가닥을 포함하는 비대칭 siRNA를 제시하며, 일 실시예에 따른 siRNA는 오프-타겟 효과, RNAi 기작의 포화 등의 문제를 일으키지 않아 안정적으로 높은 전달 효율을 유지하면서, 목적하는 정도로 유효하게 CTGF 유전자에 대한 발현을 억제할 수 있다.
- [58] 일 실시예에서는 CTGF를 표적으로 하는 비대칭 siRNA (asymmetric siRNA: asiRNA)를 디자인 및 제작하였으며, CTGF를 발현하는 세포에 상기 asiRNA를 transfection한 뒤, knockdown efficiency가 우수한 RNAi 유도용 핵산 분자, 즉 CTGF asiRNA를 선별하였다.
- [59] 일 구체예에서, 상기 RNAi 유도용 핵산 분자는 서열번호 1의 안티센스 가닥 및 서열번호 2의 센스 가닥을 포함하며, 각각의 가닥은 화학적 변형이 도입되어 있는 것일 수 있다.
- [60] 또한, 상기 안티센스 가닥의 5'-말단, 및 센스 가닥의 3'-말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하는 것일 수 있다.
- [61]

- [62] 화학적 변형이 도입된 RNAi 유도용 핵산 분자
- [63] 상기 RNAi 유도용 핵산 분자에서, 상기 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함하는 것일 수 있다.
- [64] 일반적인 siRNA는 포스페이트 백본 구조에 의한 높은 음전하 및 높은 분자량 등의 이유로 세포막을 통과할 수 없고 혈액에서의 빠른 분해 및 제거되어 실제 표적 부위에 RNAi 유도를 위한 충분한 양을 전달하는데 어려움이 있다. 현재 *in vitro* 전달의 경우 cationic lipids와 cationic polymers들을 이용한 높은 효율의 delivery 방법이 많이 개발되어 있지만, *in vivo*의 경우에는 *in vitro* 만큼의 높은 효율로 siRNA를 전달하기 어렵고, 생체 내에 존재하는 다양한 단백질들과 상호작용에 의하여 siRNA 전달 효율이 감소하는 문제점이 있다.
- [65] 이에, 본 실시예에서는 비대칭 siRNA 구조에 화학적 변형을 도입하여 세포 침투능(cell-penetrating ability)을 가지는 RNAi 유도용 핵산 분자를 제시하여, 보다 구체적으로, 별도의 전달체 없이 효과적이고 세포 내 전달을 할 수 있는 비대칭 siRNA 구조체(cell-penetrating asymmetric siRNA)를 제시한다.
- [66] 한편, 상기 언급된 화학적 변형은 아래와 같은 기능성을 부여할 수 있다:
- [67] (1) 센스 가닥 3' 말단에 친유성 모이어티의 도입은 siRNA가 세포막을 용이하게 투과하도록 할 수 있으며, (2) 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 말단에 인접한 phosphate backbone을 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 등으로의 치환은 핵산외부가수분해 효소에 대한 저항성을 부여하며, 세포로의 흡수와 *in vivo*에서 siRNA의 생물학적 이용을 가능하게 할 수 있다. (3) 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기에 대한 메틸, 메톡시 등으로의 치환은 핵산가수분해 효소에 대한 저항성을 부여하고, siRNA immunogenicity를 낮추어 주며 off-target 효과를 감소시켜 줄 수 있으며, (4) 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기에 대한 fluoro로의 치환은 이중 가닥에 안정성을 부여하며, 혈청에서의 안정성을 높이고 *in vitro*와 *in vivo*에서 효율적인 silencing이 가능하게 할 수 있다.
- [68] 일 구체예에서, 상기 안티센스 가닥은 P-mAAAUCUmGmGCUUmGUUmA*C*mA*mG*mG 서열을 포함하며, 여기서, *는 포스포로티오에이트 결합으로의 변형, m은 2'-O-메틸로의 치환, 및 P는 5'-인산기의 결합을 의미한다.
- [69] 일 구체예에서, 상기 센스 가닥은 15 내지 17nt의 길이를 가지고, 상기 센스 가닥 내 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드는 안티센스 가닥과 상보적이며; 상기 센스 가닥은 적어도 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함할 수 있다. 상기 센스 가닥은 mGmUmAACCAAGCCAGAU*U*U*Lp 서열을 포함하며, 여기서, *는 포스포로티오에이트 결합으로의 변형, m은 2'-O-메틸로의 치환, 및 Lp은 3'-친유성 모이어티의 도입을 의미한다.
- [70] 상기 친유성 모이어티는 콜레스테롤, 토크페롤, 스테아르산(stearic acid), 레티노산(retinoic acid), DHA(docosahexaenoic acid), 팔미트산(palmitic acid), 리놀레산(linoleic acid), 리놀렌산(Linolenic acid) 및 탄소수 10개 이상의 장쇄

지방산으로부터 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는, 콜레스테롤, DHA, 또는 팔미트산일 수 있다. 가장 바람직하게는 팔미트산이다.

[71] 일 구체예에서, 상기 센스 가닥은 하기로부터 선택되는 어느 하나의 센스 가닥을 포함하며, 여기서, *는 포스포로티오에이트 결합으로의 변형, m은 2'-O-메틸로의 치환, chol은 3'-콜레스테롤의 결합, DHA는 3'-도코사헥사엔산(Docosahexaenoic Acid, DHA)의 결합, 및 PA는 3'-팔미트산(Palmitic acid)의 결합을 의미한다:

[72] (a) mGmUmAACAAGCCAGAU*U*U*chol

[73] (b) mGmUmAACAAGCCAGAU*U*U*DHA; 및

[74] (c) mGmUmAACAAGCCAGAU*U*U*PA.

[75]

[76] 다른 양상은 RNAi 유도용 핵산 분자를 유효성분으로 포함하는 안구 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[77] 상기 약제학적 조성물은 전술한 RNAi 유도용 핵산 분자를 그대로 포함하거나 이를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[78]

[79] 안구 질환

[80] 상기 약제학적 조성물은 CTGF 유전자의 발현을 억제함으로써 비정상적인 혈관신생을 저해하는 기능을 가지므로 혈관 이상을 수반하는 안구질환의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물의 유효성분으로 활용될 수 있다.

[81] 상기 안구 질환은 예를 들어, 망막하섬유화증이거나 습성 노인성 황반변성, 증식성 당뇨 망막병증, 증식성 유리체 망막병증, 중심 망막 혈관 폐색증, 시신경 신경병증으로부터 야기되는 망막하섬유화증일 수 있고, 여기서, "황반변성"은 신생 혈관이 비정상적으로 자라나 황반이 손상을 입게 되어 시력에 영향을 미치는 증상을 수반하는 안구 질환이다. 황반변성은 50세 이상의 연령층에서 주로 발생하며, 건성 황반변성과 습성 황반변성으로 나뉜다. 특히, 습성 황반변성의 경우는 실명을 유발할 수 있으며, 그 원인에 대해서는 아직 정확히 밝혀지지 않았으나 위험인자로 알려져 있는 것은 나이이며, 환경적 요인으로는 흡연, 고혈압, 비만, 유전적 소인, 과도한 자외선 노출, 낮은 혈중 항산화제 농도 등이 있다.

[82]

[83] 약제학적 조성물

[84] 본 명세서에서 용어, "유효성분 (effective ingredient)"은 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 적절한 유효량의 성분을 의미한다. 구체적으로는, 유효량의 제제, 활성제, 또는 핵산 분자를 의미할 수 있다.

[85] 상기 유효량은 한번 또는 그 이상 투여될 수 있고, 질병을 예방하거나, 질병 상태를 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화 (즉,

- 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 또는 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로)을 위한 적절한 양일 수 있다.
- [86] 본 명세서에서 용어, "예방 (prevention)"은 질환의 발생을 미리 차단하거나, 질환을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 예를 들어, 상기 안구 질환 또는 이의 특징적인 특성의 발생을 막거나, 발생을 방해하거나, 상기 안구 질환 또는 이의 특징적인 특성의 발생으로부터 방어 또는 보호하는 것을 지칭한다.
- [87] 본 명세서에서 용어, "치료 (treatment)"는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방조치 방법 모두를 의미한다. 또한, 질환의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 예를 들어, 상기 안구 질환 또는 이의 특징적인 특성을 예방, 감소 또는 개선하거나, 또는 대상체에서 상기 안구 질환 또는 이의 특징적인 특성의 진행을 지연 (약화)시키는 것이다.
- [88] 본 명세서에서 용어, "유효량 (effective amount)"은 당업계에서 일반적으로 허용되는 의미를 지칭한다. 상기 용어는 일반적으로 연구자, 의사, 또는 기타 임상 의사 등이 추구하는 세포, 조직, 시스템, 동물, 또는 인간의 의도된 생물학적 반응 (예: 유익한 반응)을 이끌어낼 분자, 화합물, 또는 구성물의 양을 의미할 수 있다. 구체적으로, "치료학적 유효량 (therapeutically effective amount)"은 예컨대, 질병이나 장애와 관련된 측정 가능한 파라미터에 있어서 치료적으로 관련된 변화가 있어 특정 임상적 치료가 효과적이라고 간주될 수 있는 정도의 바람직한 의학적 반응을 이끌어낼 수 있는 분자, 화합물, 또는 구성물의 양을 의미할 수 있다. 상기 질병 또는 장애의 치료를 위한 약물의 치료학적 유효량은 상기 파라미터에서 치료적으로 관련된 변화를 초래하는데 필요한 양일 수 있다.
- [89] 본 발명에 따른 핵산 분자를 포함하는 약제학적 조성물은 안구내(intraocular) 투여될 수 있다. 상기 핵산 분자의 안구내 투여는, 당해 투여 경로가 상기 핵산 분자를 눈으로 들어가도록 하는 한, 눈에 대한 주사 또는 직접(예를 들어, 국소) 투여에 의해 이루어질 수 있다. 상기한 눈으로의 국소 투여 경로 이외에, 적합한 안구내 투여 경로는 유리체내(intravitreal), 망막내, 망막하, 테논낭하(subtenon), 안구주위(peri-orbital) 및 안구후방(retro-orbital), 결막낭내, 결막하, 각막통과(trans-corneal) 및 공막통과(trans-scleral) 투여를 포함한다.
- [90]
- [91] 다른 양상은 치료학적 유효량의 상기 약제학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 안구 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [92] 상기 안구 질환을 치료하는 방법은 전술한 RNAi 유도용 핵산 분자 또는 약제학적 조성물을 그대로 포함하거나 이를 이용하기 때문에, 이들 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.
- [93] 본 명세서에서 용어, "개체"는 질병, 구체적으로 안구 질환의 치료를 필요로

하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말, 소, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양 등의 포유류를 모두 포함할 수 있다.

[94]

[95] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[96]

[97] 실시예 1. siRNA 서열 및 합성

[98] 본 실시예에서는 CTGF를 표적으로 하는 siRNA를 합성하였는데, 다양한 화학적 변형(2'OMe, PS, Fluoro)과 센스 가닥의 3' 말단에 콜레스테롤, DHA, PA와 같은 친유성 모이어티를 도입한 siRNA를 제조하였는데(표 1 참조), 이러한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 구체적으로, 본 실시예에서는 친유성 모이어티인 콜레스테롤, DHA 및 PA가 도입된 siRNA 합성을 위해 콜레스테롤-TEG-CPG(LGC Prime Synthesis사 제조) 및 표 3에 개시된 것들을 사용하였다.

[99]

[표 1]

[100]

cp-asiCTGF 종류	Sequence (5' →3')	
	Sense (16 mer)	Anti-sense (19 mer)
OLX201A-093-8	mGmUmACAAGCCAGAU*U*U*chol	P-mAAAUCUmGmGCUUmGUUmA*C*mA*mG*mG
OLX201A-093-37	mGmUmACAAGCCAGAU*U*U*DHA	P-mAAAUCUmGmGCUUmGUUmA*C*mA*mG*mG
OLX201A-093-38	mGmUmACAAGCCAGAU*U*U*PA(1)	P-mAAAUCUmGmGCUUmGUUmA*C*mA*mG*mG
OLX201A-093-39	mGmUmACAAGCCAGAU*U*U*PA(2)	P-mAAAUCUmGmGCUUmGUUmA*C*mA*mG*mG

[101]

한편, 상기 표 1에 "*", "m", "f", "chol", "DHA" 및 "PA"로 표기된 화학적 변형은 표 2에 나타낸 바와 같고 "DHA" 및 "PA"로 표기된 화학적 변형은 각각 3'-말단에 도코사헥사엔산(Docosahexaenoic Acid, DHA) 및 팔미트산(Palmitic acid)이 첨가된 형태를 의미한다.

[102]

[표 2]

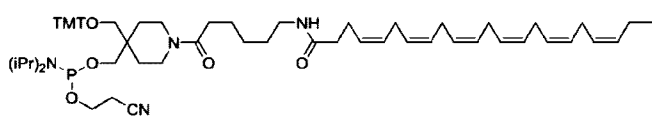
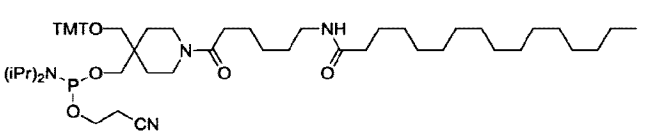
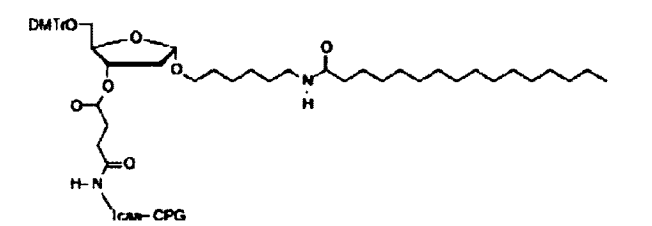
[103]

표기법	화학적 변형
*	포스포로티오에이트 결합(phosphorothioated bond)
m	2'-O-메틸(Methyl)
f	2'-플루오르(Fluoro)
chol	콜레스테롤
DHA	도코사헥사엔산(Docosahexaenoic Acid)
PA	팔미트산(Palmitic acid)

[104]

[표 3]

[105]

DHA		AM Chemicals LLC (미국 캘리포니아 소재)
PA(1)		AM Chemicals LLC (미국 캘리포니아 소재)
PA(2)		LGC LINK (영국, 스코틀랜드 소재)

[106]

[107]

[108]

실시예 2. siRNA 처리에 따른 CTGF mRNA 수준 평가 - *in vitro* 녹다운 분석

상기 실시예 1에서 제조된 siRNA인 OLY201A-093-8 및 OLY201A-093-39가 CTGF 발현을 억제하는 지 알아보기 위해 아래와 같은 실험을 수행하였다. 각각 6, 16, 31, 63, 125, 250, 500, 1000nM의 siRNA를 A549 세포에 처리하고, 이를 인큐베이션(free uptake)한 다음, Realtime qPCR로 CTGF mRNA의 발현 수준을 측정하였다. 구체적으로, A549 세포는 24-웰 플레이트에 3×10^4 cells/well로 씨딩되었고, 이로부터 24시간 후, 여기에 100 nM의 cp-siRNA를 첨가한 후, Opti-MEM media 조건에서 세포를 인큐베이션하였다. 이로부터 24시간 후, Tri-RNA reagent (FAVORGEN)을 이용하여 total RNA를 추출한 후, High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems)를 이용해 cDNA를 합성하였다. 이후, TB Green Premix Ex Taq (Takara, RR420A)와 표 3의 프라이머를 이용하여 CFX Connect Real-Time PCR Detection System (BioRad)으로 CTGF 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

[109]

[표 4]

[110]

Name	Sequence (5' →3')	
Human CTGF	Forward	ACCCCAGACTGGTTTGAAG
	Reverse	CTCCCACTGCTCCTAAGCC

[111]

[표 5]

[112]

OLX201A-93-8의 처리농도 (nM)	8	16	31	63	125	250	500	1000
상대적인 mRNA level(%)	110.5	113.2	107.9	83.3	76.5	39.2	22.9	12.1

[113]

[표 6]

[114]

OLX201A-93-39의 처리농도 (nM)	8	16	31	63	125	250	500	1000
상대적인 mRNA level(%)	83.7	66.0	112	44.5	55.2	30.8	26.2	17.6

[115]

표 5 및 표 6으로부터, OLX201A-93-8 및 OLX201A-93-39는 mRNA level을 감소시키는 것으로 나타났다. (도 1 참조)

[116]

[117]

[118]

실시예 3. siRNA 처리에 따른 CTGF 단백질 수준 평가 - *in vivo* 녹다운 분석
본 실시예에서는 *in vivo*에서 siRNA인 OLX201A-093-8, OLX201A-093-37 및 OLX201A-093-39가 CTGF 단백질의 발현을 억제하는지 알아보기 위해 아래와 같은 실험을 수행했다.

[119]

9주령의 수컷 C57BL/6 마우스 망막색소상피세포(retinal pigmented epithelium, RPE)에서의 OLX201A-093-8 투여에 따른 CTGF 단백질 발현 정도를 western blot analysis를 통해 확인하였다. 구체적으로, C57BL/6 마우스(그룹당 6 마리, 안구 12개)에 0.125, 0.25 그리고 0.5 μ g의 OLX201A-093-8를 10 mM PBS에 혼합한 용액 0.8 μ l를 유리체 내 주사 (intravitreal injection, IVT) (Day 0) 하였다. 투여 14일째 마우스로부터 RPE를 분리하여 RIPA buffer (SIGMA, R0278)를 넣고, tissue grinder pestle (Scienceware, 199230001)와 sonicator (Sonics, VC505)를 이용하여 균질화하였다. 이후, 원심분리하여 얻은 상층액으로부터 BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23225)를 이용하여 단백질을 정량하고, 각 샘플마다 5 μ g의 단백질을 8-16% Precast Gel (Bio-rad, 456-1106)를 사용하여 전기영동하고, PVDF membrane (Bio-rad, 1620177)으로 transfer 하였다. 3% BSA/TBS-T (bioPLUS™, 22070008-3)에 blocking하고, CTGF antibody (1:1,000; Abcam, Ab125943)와 Vinculin antibody (1:2,000; Santa Cruz, sc-73614) 및, HRP-conjugated anti-rabbit과 anti-mouse IgG (1:10,000; Santa Cruz, sc-2357와 Bethyl laboratories, A90-116P)를 사용하여 각 제조사의 프로토콜에 따라 반응시켰다. ECL (Thermo, 34580, or 34095)을 처리하여 ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, 1708265)으로 CTGF와 Vinculin 단백질 발현 정도를 확인하였다. 해당 시험의 음성 대조군으로는 10 mM PBS 투여군이 사용되었다. (표 7, 도 2a 참조)

[120]

[표 7]

[121]

	OLX201A-093-8의 투여량 (μ g)		
	0.125	0.25	0.5
CTGF 단백질 level (% of vehicle control)	45.99	41.17	51.90

[122] 그 결과, 표 7 및 도 2a에서 확인한 바와 같이 CTGF 단백질 수준이 감소됨을 확인하였다.

[123]

[124] 또한, OLX201A-093-37과 OLX201A-093-39의 Laser-injury 마우스 모델에서의 CTGF 단백질 발현 억제 효과를 확인하기 위해, 9주령의 수컷 C57BL/6 마우스 (그룹당 8 마리의 마우스, 안구 16개)에 Laser injury (Power: 100 mW, Duration: 80 ms, Size: 125 μ m, 6 lasers/eye)를 준 직후, 0.25 μ g의 OLX201A-093-37과 OLX201A-093-39를 10 mM PBS에 혼합한 용액 0.8 μ l를 유리체 내 주사 (intravitreal injection, IVT)하였다. 투여 7일째에 상기와 동일한 방법으로 마우스 RPE를 분리하여 각 샘플마다 20 μ g의 단백질에 대한 Western blot analysis를 통해 CTGF 단백질 발현 수준을 측정하였다. 상기의 실험과 상이한 부분은 1) SDS-PAGE gel 조건 (8-16% Precast Gel (Bio-rad, 456-1106) 및 4-12% Precast Gel (Invitrogen, XP04125BOX)을 사용), 2) Blocking 조건 (SuperBlock™ (TBS) blocking buffer (Thermo, 37535)사용), 3) CTGF antibody 희석 조건 (1:500) 이다. 해당 시험의 음성 대조군으로는 10 mM PBS 투여군이 사용되었다. (표 8, 도 2b 참조)

[125] [표 8]

[126]

	투여량 (0.25 μ g)	
	OLX201A-093-37	OLX201A-093-39
CTGF protein level (% of vehicle control)	52.42	31.11

[127] 그 결과, 표 8 및 도 2b에서 확인한 바와 같이 CTGF 단백질 수준이 감소됨을 확인하였다.

[128]

[129] 뿐만 아니라 토끼에서의 OLX201A-093-37 및 OLX201A-093-39 투여에 의한 CTGF 발현 변화를 확인하고자, 2~2.5 kg의 11주령 수컷 New Zealand white 토끼 (Vehicle 투여군은 그룹당 3 마리의 토끼, 안구 3개; cp-asiRNA 처리군은 그룹당 4 마리의 토끼, 안구 4개)에 10, 20 그리고 50 μ g의 OLX201A-093-37과 OLX201A-093-39를 10 mM PBS에 혼합한 용액 50 μ l를 유리체 내 주사 (intravitreal injection, IVT) (Day 0) 하였다. 투여 14일째 상기와 동일한 방법으로 토끼로부터 RPE를 분리하여, Western blot analysis로 CTGF 단백질의 발현 수준을 측정하였다. 상기의 실험과 상이한 부분은 균질화 과정 (homogenizer (Daihan scientific, HG-15A)를 이용)이다. 해당 시험의 음성 대조군으로는 10 mM PBS 투여군이 사용되었다. (표 9 및 10, 도 2c 및 도 2d 참조)

[130] [표 9]

[131]

	OLX201A-093-37의 투여량 (μ g)		
	10	20	50
CTGF 단백질 level (% of vehicle control)	71.13	93.77	54.89

[132] [표 10]

[133]

	OLX201A-093-39의 투여량 (μg)		
	10	20	50
CTGF 단백질 level (% of vehicle control)	115.79	69.19	53.03

[134] 그 결과, 표 9 및 10 그리고 도 2c 및 도 2d에서 확인한 바와 같이 CTGF 단백질 수준이 감소됨을 확인하였다.

[135]

[136] 실시예 4. 마우스 CNV 모델에서의 효능 평가

[137] 본 실시예에서는 레이저 광응고에 의한 맥락막 신생 혈관 (Choroidal neovascularization: CNV)이 유도된 9주령의 수컷 C57BL/6 마우스에서의 OLX201A-093-8, OLX201A-093-37, OLX201A-093-38 및 OLX201A-093-39 투여에 따른 치료 효능을 평가하였다. 구체적으로, 마우스 (그룹 당 8마리, 8안구)에 레이저 광응고 (Power: 140 mW, Duration: 100 ms, Size: 75 μm, 4 lasers/안구)를 유도한 직후, 0.25, 0.5 및 1 μg의 OLX201A-093-8를 1X PBS와 혼합한 용액 0.8 μl를 유리체 내 투여하였다. 이로부터 7일째에 마우스의 안구로부터 분리한 RPE flat은 혈관 내피세포에 특이적인 Isolectin B4 (Vector laboratories, FL-1201) 형광 염색을 하였다. 이후 공초점 현미경 (Leica, TCS SP8)을 이용하여 형광이 관찰되는 시작부터 끝 지점까지 촬영하였다. Image J software를 통해 촬영된 이미지로부터 IB4 염색이 된 영역을 수치화 하여 CNV 부피를 측정하고, 음성 대조군(1X PBS 투여군)과의 상대적인 % 비교를 통해 치료 효능을 평가하였다.

[138] 하기 표 11 내지 표 14는 실시예 1에서 제조된 각각의 cp-siRNA의 투여에 따른 CNV 부피의 감소를 나타내었다. (도 3 참조)

[139] [표 11]

[140]

	OLX201A-093-8의 투여량 (μg)		
	0.125	0.25	0.5
CNV 부피 (% of vehicle control)	103.26	86.20	73.55

[141] [표 12]

[142]

	OLX201A-093-37의 투여량 (μg)		
	0.125	0.25	0.5
CNV 부피 (% of vehicle control)	71.84	62.98	60.34

[143] [표 13]

[144]

	OLX201A-093-38 의 투여량 (µg)		
	0.125	0.25	0.5
CNV 부피 (% of vehicle control)	95.72	85.06	92.30

[145]

[표 14]

[146]

	OLX201A-093-39 의 투여량 (µg)		
	0.125	0.25	0.5
CNV 부피 (% of vehicle control)	78.43	79.61	73.14

[147] 상기 표 11 내지 14에서 보는 바와 같이, CNV 부피가 감소함을 확인하였다. (도 3a 및 3b 참조)

[148]

[149] 실시예 5. 마우스 망막하 섬유증 (Subretinal fibrosis, RF) 모델에서의 효능 평가
[150] 본 실시예에서는 OLX201A-093-8의 마우스 망막하 섬유증(subretinal fibrosis, RF)에서의 치료적 효능을 평가하고자, 각기 다른 두가지 질환 마우스 모델을 이용하여 하였다.

[151]

(1) 첫번째로, 레이저 광응고에 의한 맥락막 신생 혈관 유도에 의한 망막하 섬유증 마우스 (laser-Choroidal neovascularization-induced subretinal fibrosis, laser-CNV-RF) 모델에서의 OLX201A-093-8, OLX201A-093-37, OLX201A-093-38, 및 OLX201A-093-39 투여에 따른 치료 효능을 평가하였다. 구체적으로, 10주령의 수컷 C57BL/6 마우스 (그룹 당 3마리, 4안구)에 레이저 광응고 (Power: 140 mW, Duration: 80 ms, Size: 75 µm, 11 lasers/안구)하여 맥락막 신생혈관을 유도하였다. 유도 14일째에 망막하 섬유증의 발생을 확인하고, 0.5 µg의 OLX201A-093-8를 1X PBS와 혼합한 용액 0.8 µl를 유리체 내 투여하였다. 투여 14일후에 마우스의 안구를 분리하여 망막 파라핀 절편을 제작하고, 결합조직에 특이적인 Masson's trichrome stain kit (Empire Genomics, BPK2916-2)를 이용하여 안구 조직을 염색하였다. 현미경(Nikon, ECLIPSE TS100)을 이용하여 염색 부위를 촬영하고, 망막하 섬유증이 발생한 지역 내 콜라겐 섬유(파란색으로 염색)가 응축된 영역을 Image J software로 수치화 분석하여 망막하 섬유증의 치료 효력을 평가하였다. 해당 시험의 음성 대조군으로는 1X PBS 투여군, 양성 대조군으로는 2µg의 Eylea가 이용되었다. 그 결과, 양성 대조군인 Eylea에 비해 본 발명에 따른 cp-siRNA인 OLX201A-093-8을 투여한 경우 콜라겐 deposition 면적이 줄어들음을 확인하였다. (표 15, 도 4a 참조)

[152]

[표 15]

[153]

	OLX201A-093-8 (0.5 µg)	Eylea (2 µg)
콜라겐 deposition 면적/CNV-RF 면적 (% of vehicle control)	53.98	111.04

[154] 상기 표 15에서 보는 바와 같이, 양성 대조군을 사용하는 경우와 비교하여 OLX201A-093-8을 투여한 경우가 콜라겐 deposition 면적이 더 많이 감소함을 확인하였다.

[155]

[156] 또한, 상기와 동일한 레이저-CNV-RF 모델 마우스 안구에서 OLX201A-093-8에 의한 CTGF 단백질 발현 정도를 확인하고자, 상기와 동일하게 제작된 망막 파라핀 절편을 CTGF 항체 (1:100; Abcam, Ab125943)와 ABC HRP Kit (Vector laboratories, PK-6101)을 이용하여 면역반응시켰다. 이후, DAB substrate Kit (Abcam, ab64238)로 발색하여 현미경(Nikon, ECLIPSE TS100)을 이용하여 이미지를 촬영하였다. 촬영된 이미지는 망막하 섬유증이 발생한 지역 내 CTGF 발현이 나타난 영역을 Image J software로 분석하여 CTGF 단백질 발현 수준을 평가하였는 바, 그 결과 CTGF 단백질이 감소된 것을 확인하였다. (표 16, 도 4b 참조)

[157] [표 16]

[158]

	OLX201A-093-8(0.5 μg)
CTGF 단백질 수준/CNV-RF 면적 (% of vehicle control)	74.87

[159] 상기 표에서 보는 바와 같이, OLX201A-093-8를 투여하는 경우 단백질 수준이 감소함을 확인하였다.

[160]

[161] (2) 두번째로, 망막 박리에 의한 망막하 섬유증 (Retinal detachment-subretinal fibrosis, RD-RF) 마우스 모델을 대상으로 0.5 μg 의 OLX201A-093-8의 투여에 따른 치료적 효능을 확인하였다. 구체적으로, 10 주령의 수컷 C57BL/6 마우스 (그룹 당 3마리, 5 안구)에 1 μl 의 0.2% sodium hyaluronate(Sigma, 1614159-250MG)를 망막하 주사한 후(subretinal administering, SRI)(Day 0), TGF β 1 (2 ng, 0.5 $\mu\text{l}/\text{eye}$)를 동일 지역에 망막하 주사하여 망막하 섬유화를 유도하였다(Day 3). 7일째에 0.25 및 0.5 μg 의 OLX201A-093-8를 1X PBS와 혼합한 용액 0.8 μl 를 유리체 내 투여하였다. 이로부터 14일째에 OCT (Phoenix, SN7055)를 이용하여 살아있는 마우스 안구조직의 단층을 촬영하고, 이미지를 Image J software로 분석하여 망막하 분리가 일어난 영역을 측정하였으며, 그 결과 그 영역이 감소함을 확인하였다. (표 17, 도 4c 참조)

[162] [표 17]

[163]

	Vehicle (1X PBS)		OLX201A-093-8 (0.25 μg)		OLX201A-093-8 (0.5 μg)	
	Pre dose	Post dose	Pre dose	Post dose	Pre dose	Post dose
Subretinal fibrosis area (% of pre dose)	100	97.8	100	74.0	100	62.0

[164] 상기와 동일한 RD-RF 모델 마우스 안구에서 OLX201A-093-8에 의한 콜라겐

응집 (Collagen deposition) 정도를 확인하고자, 안구를 분리하여 망막 냉동 절편을 제작하고 콜라겐 섬유에 특이적인 Sirius red 염색(Abcam, ab246832)하였다. 염색 부위를 현미경(Nikon, ECLIPSE TS100)을 이용하여 촬영하고, 망막하 섬유증이 발생한 지역 내 콜라겐 응집 영역을 Image J software로 분석하여 망막하 섬유증의 치료 효력을 평가하였다. 그 결과 콜라겐 deposition 정도가 감소된 것을 확인하였다. (표 18, 도 4d 참조)

[165] [표 18]

[166]

	Normal	Vehicle (1XPBS)	OLX201A-093-8 (0.5 μ g)
Collagen deposition area/CNV-RF area (% of normal)	100	231.8	133.8

[167] 상기와 동일한 RD-RF 모델 마우스 안구에서 OLX201A-093-8에 의한 CTGF 단백질 발현 정도를 확인하고자, 상기와 동일하게 제작된 망막 냉동 절편을 CTGF antibody (1:100; Abcam, Ab125943)와 ABC HRP Kit (Vector laboratories, PK-6101)을 이용하여 면역반응 시켰다. 이후, DAB substrate Kit (Abcam, ab64238)로 발색하여 현미경(Nikon, ECLIPSE TS100)을 이용하여 이미지를 촬영하였다. 촬영된 이미지는 망막하 섬유증이 발생한 지역 내 CTGF 발현이 나타난 영역을 Image J software로 분석하여 CTGF 단백질 발현 수준을 평가하였다. 그 결과, OLX201A-093-8의 투여한 결과 CTGF 단백질 수준이 감소하였다. (표 19, 도 4e 참조)

[168] [표 19]

[169]

	Normal	Vehicle (1X PBS)	OLX201A-093-8 (0.5 μ g)
CTGF protein level/RD-RF area (% of normal)	100	193.1	130.3

[170] 상기와 동일한 RD-RF 모델 마우스 안구에서 OLX201A-093-8의 투여에 의한 망막 기능을 측정하고자, RD-RF 유도 후 5일과 19일 (유리체내 주사 후 12일째)에 Full-field electroretinogram (ffERG, Phoenix, MICRON, Ganzfeld ERG)을 측정하였다. 구체적으로, 동물들은 12시간 이상 충분히 어두운 곳에서 암순응을 시키고, 이후 순간적인 빛 자극을 통해 나타나는 망막세포들의 전기생리학적 반응을 ffERG로 측정하였다. Photoreceptor의 기능과 연관된 a-wave 수치와 photoreceptor 외 내부 망막세포에 의해 생성되는 b-wave 수치를 분석하여 망막의 전체적인 시력 기능을 평가하였다.

[171] [표 20]

[172]

	Normal		PBS		OLX201A-093-8 (0.25 μ g)		OLX201A-093-8 (0.5 μ g)	
	Day 5	Day 19	Pre dose	Post dose	Pre dose	Post dose	Pre dose	Post dose
a waves (μ V)	239.1	235	188.2	215.6	198.7	213.7	192.6	252.6
b waves (μ V)	664	669.9	522	611.8	564.1	623.7	523.8	653.8

[173] 그 결과, 상기 표 20에서 보는 바와 같이 본 발명에 따른 siRNA를 투여함에 따라 시력기능이 향상되는 것을 확인하였다.

[174]

[175] 실시예 6. NHP CNV에서의 치료 효능 평가

[176] 본 실시예에서는 레이저 광응고에 의해 맥락막 신생 혈관 (Choroidal neovascularization: CNV)이 유도된 붉은털 원숭이 모델을 이용하여, 실시예 1에서 합성된 siRNA인 OLX201A-093-8, OLX201A-093-37, OLX201A-093-39의 치료 효능을 평가하였다.

[177] 첫번째로, OLX201A-093-8의 원숭이 CNV 모델에서의 Leakage area, Retinal thickness, Collagen deposition 및 CTGF 단백질 발현 정도를 분석하여 치료적 효능을 평가하였다. 구체적으로, 붉은털 원숭이(Rhesus monkeys) (각 그룹당 2 내지 3 마리, 안구 4개)에 레이저 광응고 (Energy: 650-700 mW, Laser wavelength: 532 nm, Diameter of facula: 50 μ m, Exposure time: 0.1 sec, 8 spots/안구)를 유도하고, 3주 후에 0.05 및 0.1 mg의 OLX201A-093-8를 1X PBS와 혼합한 용액 50 μ l를 유리체 내 투여하였다. Leakage area 측정을 위해, 투여 전 (Day -2)과 투여 후 2주, 4주, 6주, 8주 및 10주 마다 fundus fluorescein angiography (FFA)를 수행하였다. 신생혈관에 반응하는 Fluorescein sodium (Alcon)을 0.075 mL/kg로 원숭이의 정맥에 주사하고, 10분 후 안저 촬영을 하여 형광이 응집되어 나타난 영역을 Image J software를 통해 분석하였다. (표 21, 도 5a 참조)

[178] [표 21]

[179]

Leakage area (mm ²)	Vehicle (1X PBS)	OLX201A-093-8 투여량	
		0.05 mg	0.1 mg
Pre-dosing	4.43	3.965	4.195
Week 2	3.96	1.84	2.4975
Week 4	2.905	3.0675	2.745
Week 6	2.71	3.545	1.3475
Week 8	2.74	3.5125	0.625
Week 10	2.035	2.89	0.0725

[180] 상기와 동일한 실험 동물을 레이저 광응고 전 (Day -35), 투여 전 (Day -2)과 투여 후 2주, 4주, 6주, 8주 및 10주 마다 Optical coherence tomography (OCT)를 이용하여 안구 조직의 단층을 촬영하고, built-in software (Heidelberg)를 이용하여 수치화하여 망막 두께를 분석하였다. (표 22, 도 5b 참조)

[181] [표 22]

[182]

망막 두께 (μm)	Vehicle (1X PBS)	OLX201A-093-8 투여량	
		0.05 mg	0.1 mg
Pre-lasering	333.75	333.5	300.25
Pre-dosing	531.25	400.25	441.25
Week 2	481	368.5	390.5
Week 4	460.5	366.5	357.5
Week 6	451.5	357.25	329
Week 8	448.25	349.25	318.5
Week10	436	345.5	305

[183] 10주 후, 상기에서의 동물을 희생하여 안구를 분리하고 망막 파라핀 조직을 제작한다. 결합조직에 특이적인 Masson's Trichrome Staining Kit (Solarbio)를 이용하여 콜라겐 섬유가 염색된 영역을 Image J software로 수치화 분석하여 collagen deposition 영역을 분석하였다. (표 23, 도 5c 참조)

[184] [표 23]

[185]

	Vehicle (1X PBS)	OLX201A-093-8 투여량	
		0.05 mg	0.1 mg
Collagen deposition area (% of vehicle)	100	39.17	25.90

[186] 또한, 상기와 동일한 CNV 모델 원숭이 안구에서 OLX201A-093-8에 의한 CTGF 단백질 발현 정도를 확인하고자, 상기와 동일하게 제작된 망막 파라핀 절편을 CTGF antibody (1:150; Abcam, ab5097)와 Streptavidin-Peroxidase Immunohistochemical staining kit (ZSGB-BIO)을 이용하여 면역반응 시켰다. 이후, DAB 염색을 통해 발색하여 현미경으로 이미지를 촬영하였고, Image J software로 CNV 지역에서의 CTGF 단백질 발현 수준을 분석하였다. (표 24, 도 5d 참조)

[187] [표 24]

[188]

	Vehicle (1X PBS)	OLX201A-093-8 투여량	
		0.05 mg	0.1 mg
CTGF protein level (% of vehicle)	100	65.22	45.22

[189] 그 결과, OLX201A-093-8 투여 결과 Collagen deposition area이 감소했을 뿐만 아니라, CNV 영역에서의 CTGF 단백질 발현도 감소됨을 확인하였다.

[190]

[191] 두번째로, OLX201A-093-39의 원숭이 CNV 모델에서의 Leakage area, Retinal thickness를 분석하여 치료적 효능을 평가하였다. 구체적으로, 붉은털 원숭이(Rhesus monkeys) (각 그룹당 2 내지 3 마리, 안구 4개)에 레이저 광응고 (Energy: 600-670 mW, Laser wavelength: 532 nm, Diameter of facula: 50 μm , Exposure time: 0.1 sec, 7-8 spots/안구)를 유도하고, 3주 후에 0.1 mg의

OLX201A-093-39를 1X PBS와 혼합한 용액 50 μ l를 유리체 내 투여하였다. Leakage area 측정을 위해, 투여 전 (Day -2)과 투여 후 2 주, 4주 및 6주마다 상기와 동일한 방법으로 fundus fluorescein angiography (FFA)를 수행하고, 신생혈관의 염색이 응집되어 나타난 영역을 분석하였다. (표 25, 도 5e 참조)

[192] [표 25]

[193]

Leakage area (mm^2)	Vehicle (1X PBS)	OLX201A-093-39 (0.1 mg)
Pre-dosing	3.08	3.98
Week 2	4.12	2.54
Week 4	5.31	1.49
Week 6	6.25	1.6

[194] 상기와 동일한 실험 동물을 레이저 광응고 전 (Day -35), 투여 전 (Day -2), 투여 후 2 주, 4주 및 6주마다 Optical coherence tomography (OCT)를 이용하여 안구 조직의 단층을 촬영하고, built-in software (Heidelberg)를 이용하여 수치화하여 망막 두께를 분석하였다. (표 26, 도 5f 참조)

[195] [표 26]

[196]

망막 두께(μm)	Vehicle (1X PBS)	OLX201A-093-39 (0.1 mg)
Pre-lasering	316	309
Pre-dosing	459	522
Week 2	434	422
Week 4	441	392
Week 6	449	367

[197] 그 결과, OLX201A-093-39 투여 결과 Leakage area가 감소했을 뿐만 아니라, 망막 두께도 상당히 감소됨을 확인하였다.

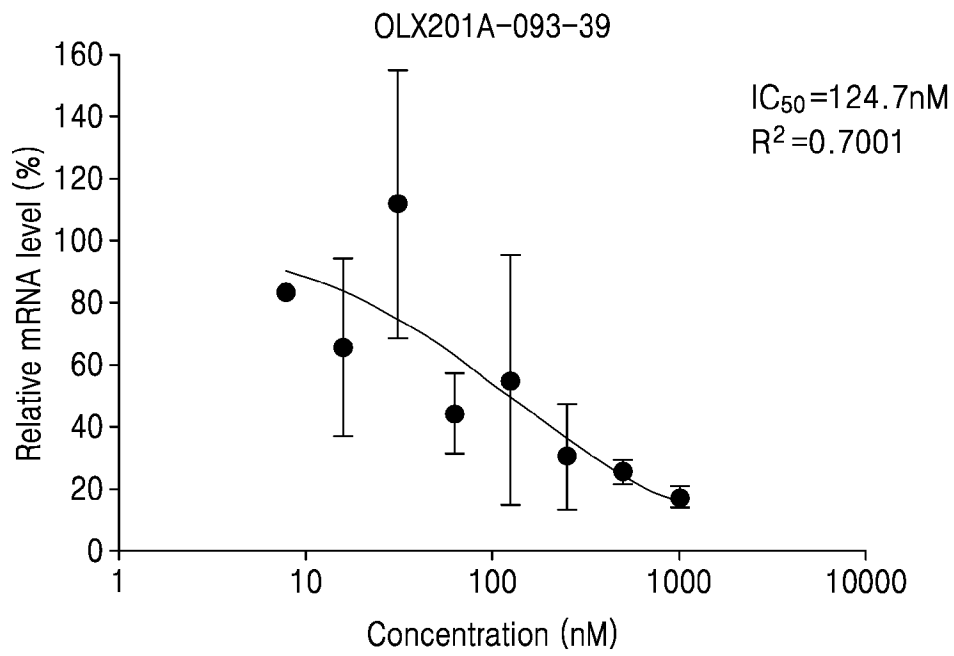
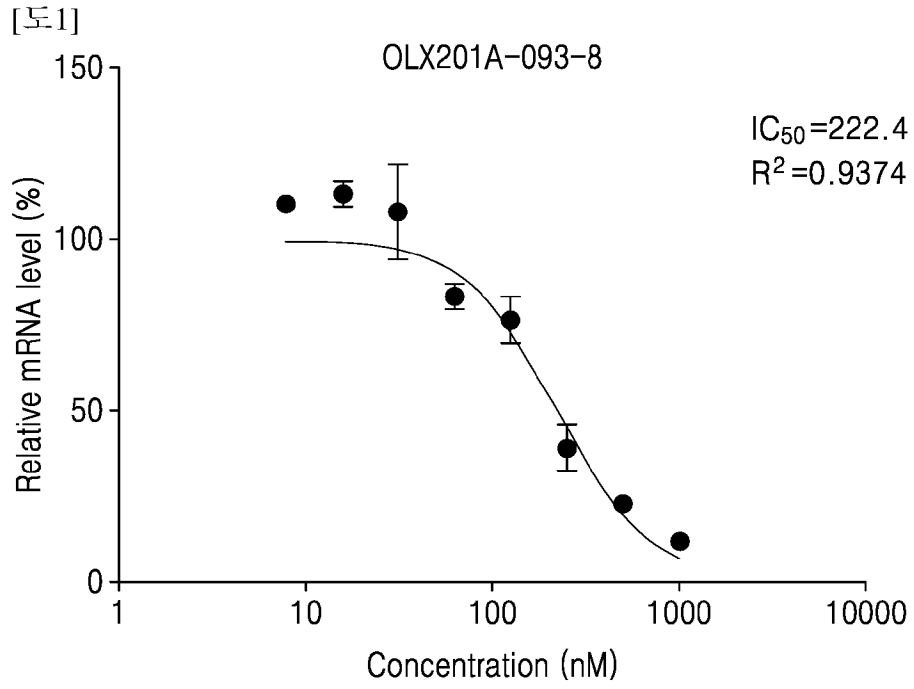
[198]

[199] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

청구범위

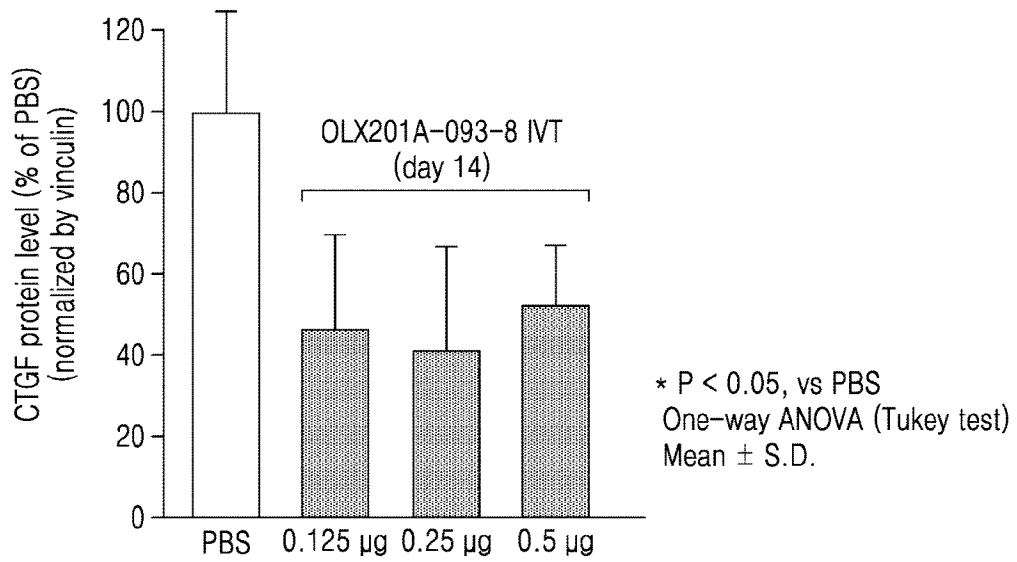
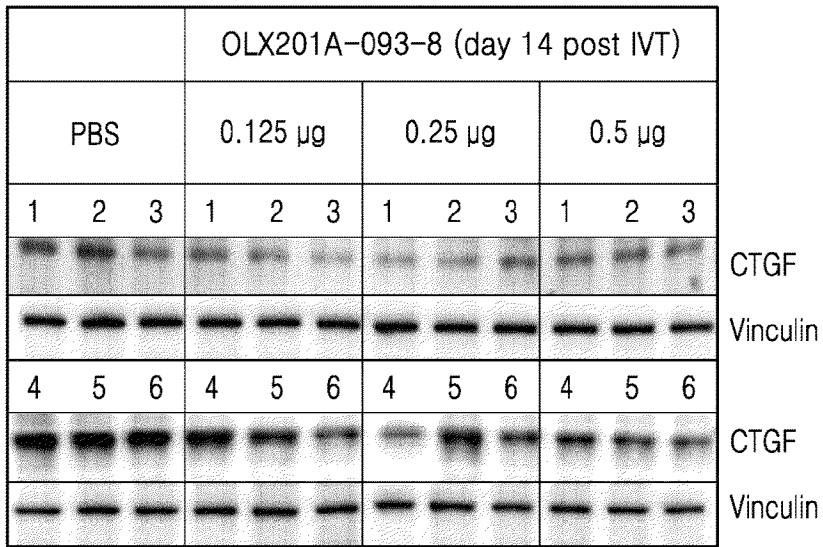
- [청구항 1] 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중 가닥의 RNAi 유도용 핵산 분자로서,
 상기 센스 가닥은 15 내지 17nt의 길이를 가지고, 상기 센스 가닥 내 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드는 안티센스 가닥과 상보적이며;
 상기 센스 가닥은 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함하고; 그리고
 상기 안티센스 가닥(5'→3')은
 P-mAAAUCUmGmGCUUmGUUmA*C*mA*mG*mG의 서열을 포함하며,
 상기에서, *는 포스포로티오에이트 결합으로의 변형, m은 2'-O-메틸로의 치환, 및 P는 5'-인산기의 결합을 의미하는 것인, RNAi 유도용 핵산 분자.
- [청구항 2] 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중 가닥의 RNAi 유도용 핵산 분자로서,
 상기 안티센스 가닥은 19 내지 21nt의 길이를 가지고, 상기 안티센스 가닥 내 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드는 센스 가닥과 상보적이며;
 상기 안티센스 가닥은 적어도 하나 이상의 화학적 변형을 포함하고;
 그리고
 상기 센스 가닥(5'→3')은 mGmUmACAAGCCAGAU*U*U*Lp의 서열을 포함하며,
 상기에서, *는 포스포로티오에이트 결합으로의 변형, m은 2'-O-메틸로의 치환, 및 Lp은 친유성 모이어티인, RNAi 유도용 핵산 분자.
- [청구항 3] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 RNAi 유도용 핵산 분자는 siRNA인, RNAi 유도용 핵산 분자.
- [청구항 4] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 화학적 변형은:
 하나 이상의 뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 결합으로의 변형;
 하나 이상의 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -O-메틸(Methyl)로 치환; 또는
 콜레스테롤, 토크페롤, 스테아르산(stearic acid), 레티노산(retinoic acid), DHA(docosahexaenoic acid), 팔미트산(palmitic acid), 리놀레산(linoleic acid), 리놀렌산(Linolenic acid) 및 탄소수 10개 이상의 장쇄 지방산으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 친유성 모이어티가 도입되는, RNAi 유도용 핵산 분자.
- [청구항 5] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 RNAi 유도용 핵산 분자는 비대칭 이중가닥 구조를 형성하며, 상기 안티센스 가닥의 5' 말단 및 센스 가닥의 3' 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하는 것인, RNAi 유도용 핵산 분자.

- [청구항 6] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 RNAi 유도용 핵산 분자는 연결 조직 성장 인자(Connective tissue growth factor, CTGF)의 발현을 억제하는 것인, RNAi 유도용 핵산 분자.
- [청구항 7] 청구항 1 또는 2에 따른 RNAi 유도용 핵산 분자를 유효성분으로 포함하는 망막하 섬유화증 또는 노인성 황반변성의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 8] CTGF의 발현을 억제하는, 이중 가닥의 siRNA를 포함하는 RNAi 유도용 핵산 분자로서,
 상기 이중 가닥의 siRNA는 서열번호:1의 염기서열(5'-AAAUCUGGCUUGUUACAGG-3')을 갖는 안티센스 가닥 및 서열번호:2의 염기서열(5'-GUAACAAGCCAGAUUU-3')을 갖는 센스 가닥을 포함하며,
 상기 안티센스 가닥과 센스 가닥은 서로 상보적으로 결합하여, 안티센스 가닥의 5' 말단 및 센스 가닥의 3' 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하며,
 상기 센스 가닥의 3' 말단에는 콜레스테롤, 토크페롤, 스테아르산, 레티노산, DHA, 팔미트산, 리놀레산, 리놀렌산 및 탄소수 10개 이상의 장쇄 지방산으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 친유성 모이어티가 도입된, RNAi 유도용 핵산 분자.



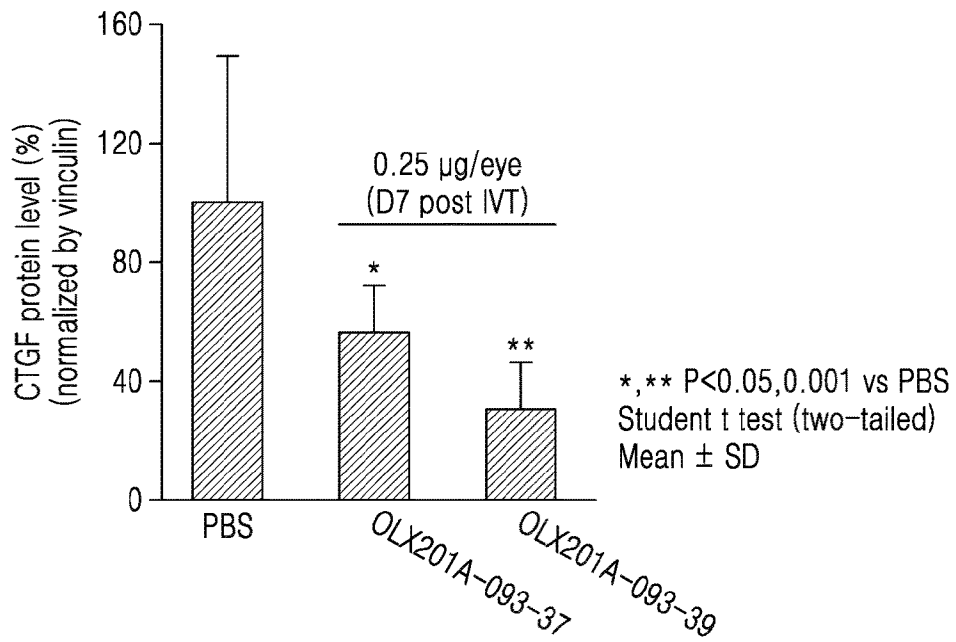
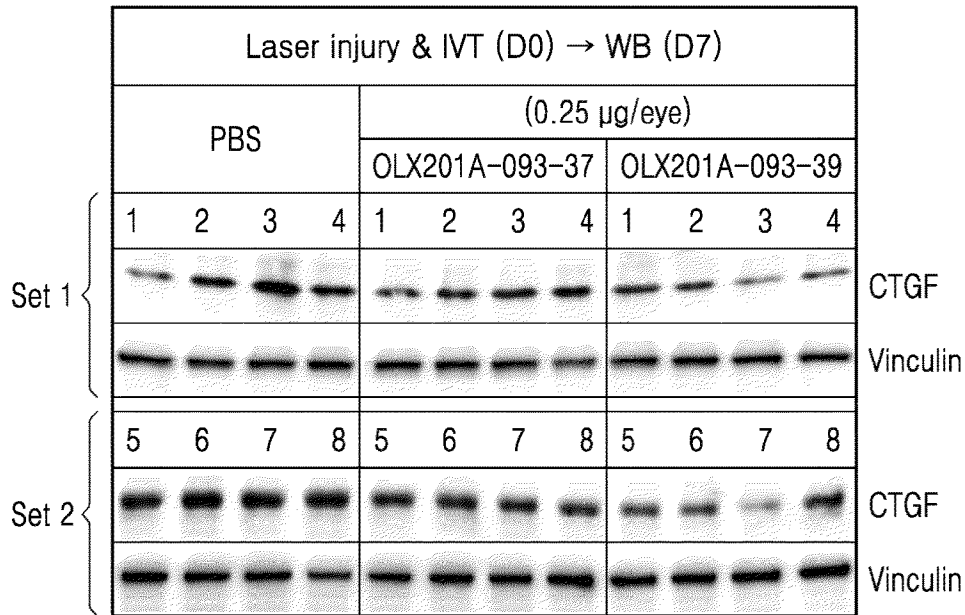
[도2a]

Two quantitative western blots for CTGF
in mouse RPE on day 14 post IVT



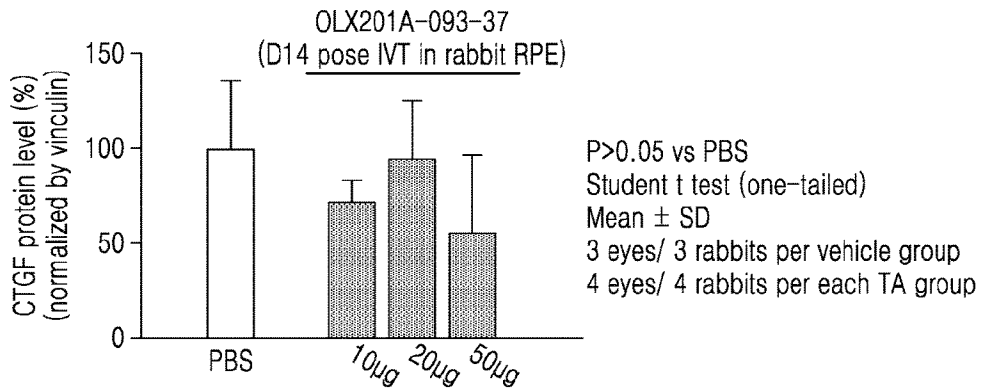
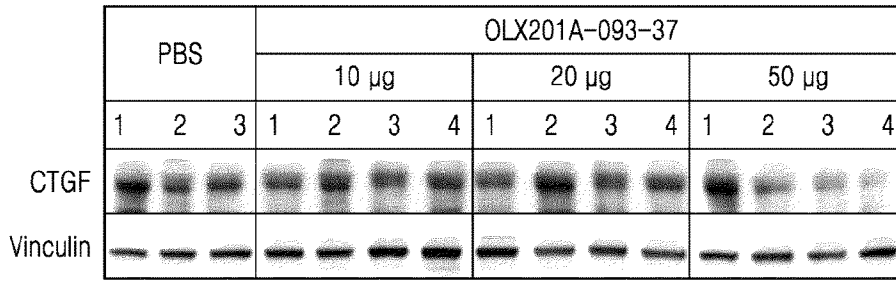
[도2b]

Western blot analysis for CTGF
in laser-injured mouse RPE on D7 post IVT



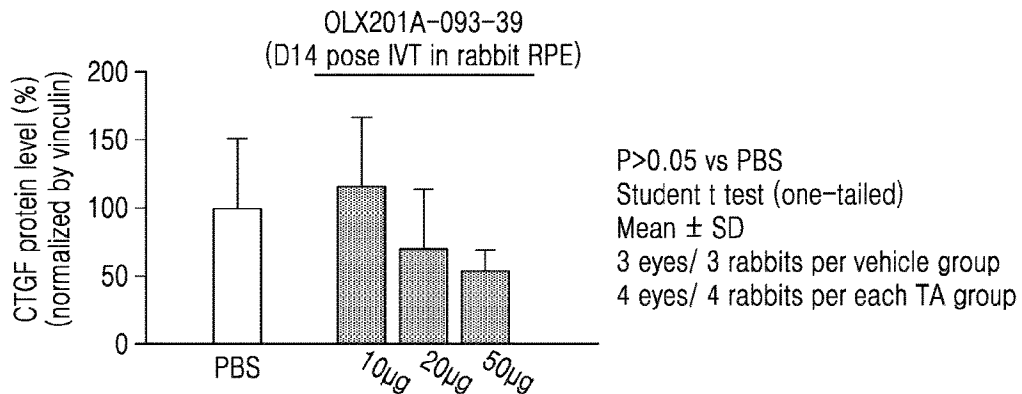
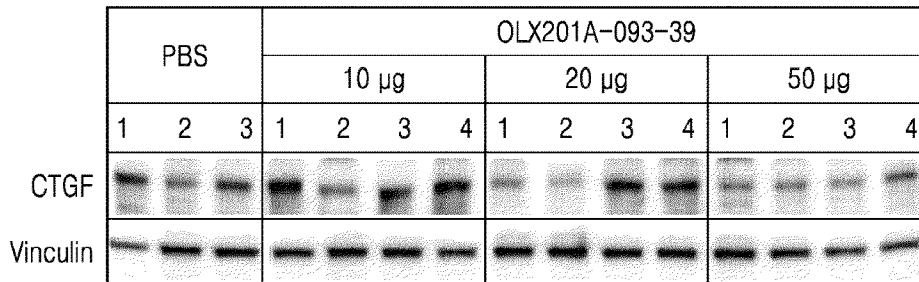
[도2c]

Western blot analysis for CTGF
in normal rabbit RPE on D14 post IVT

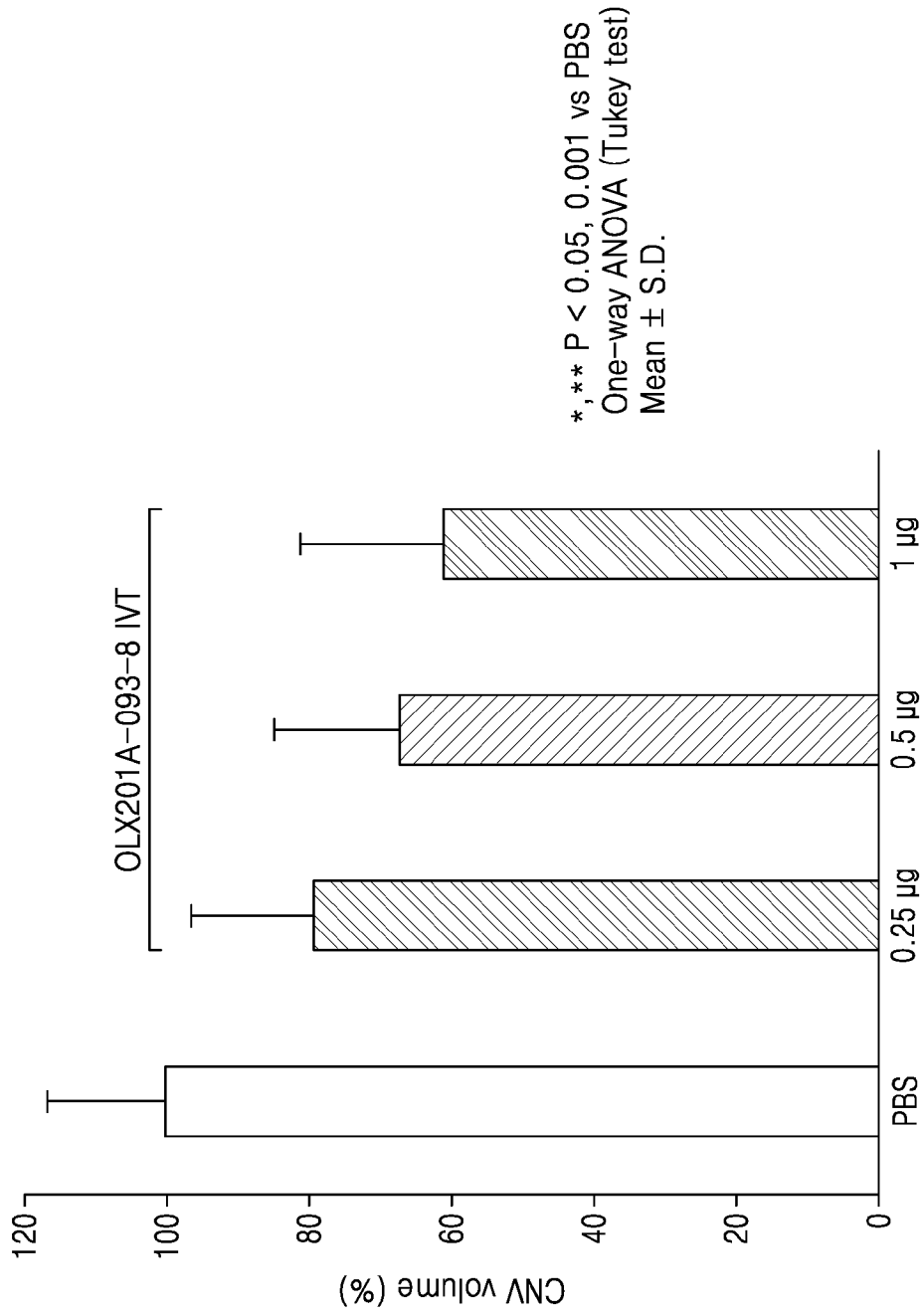


[도2d]

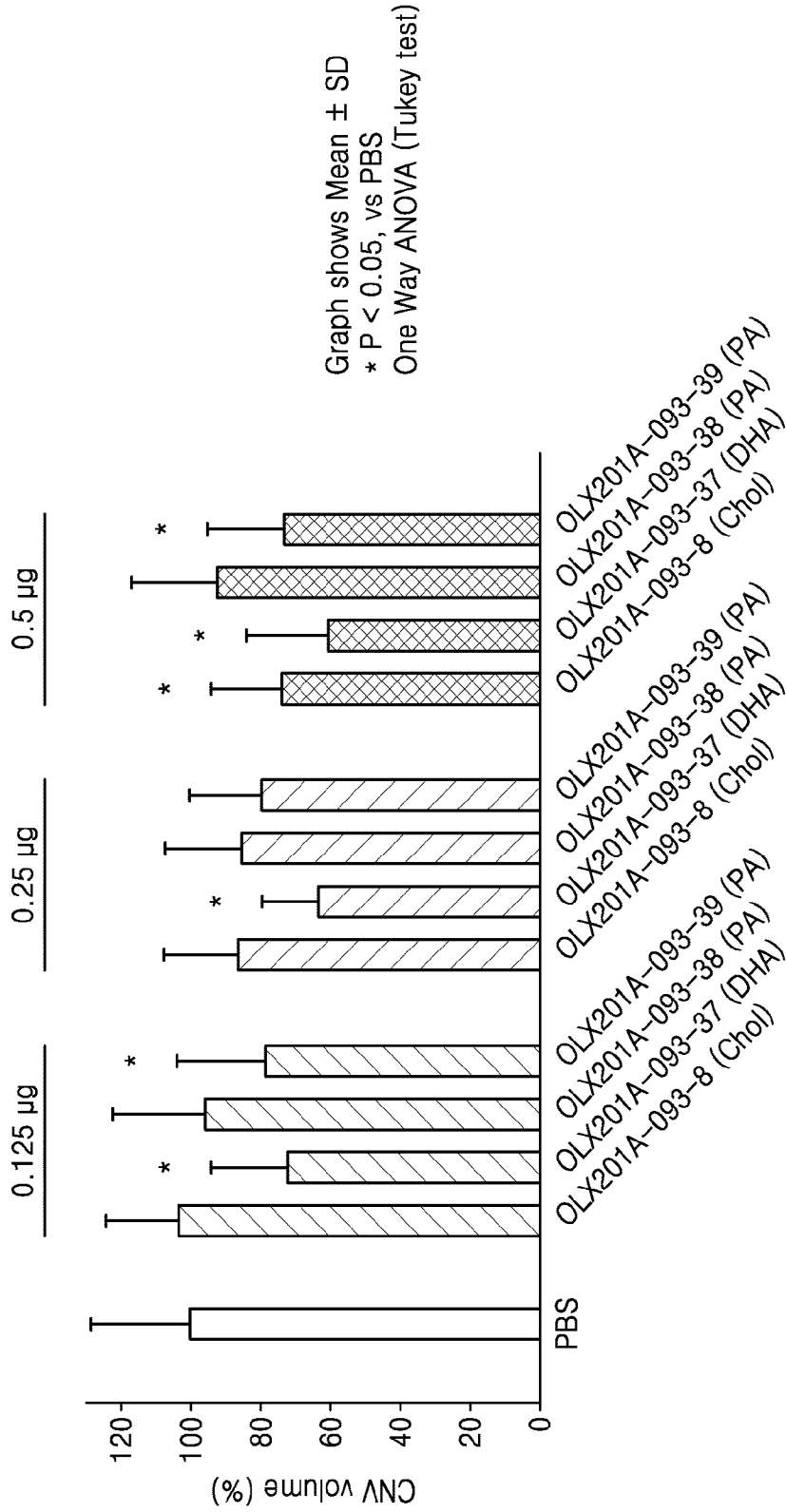
Western blot analysis for CTGF
in normal rabbit RPE on D14 post IVT



[도3a]

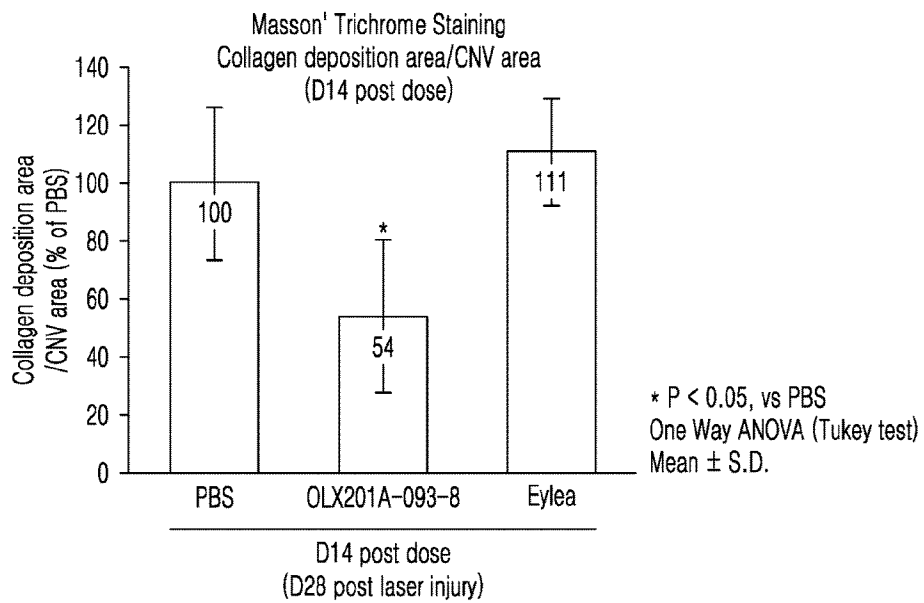
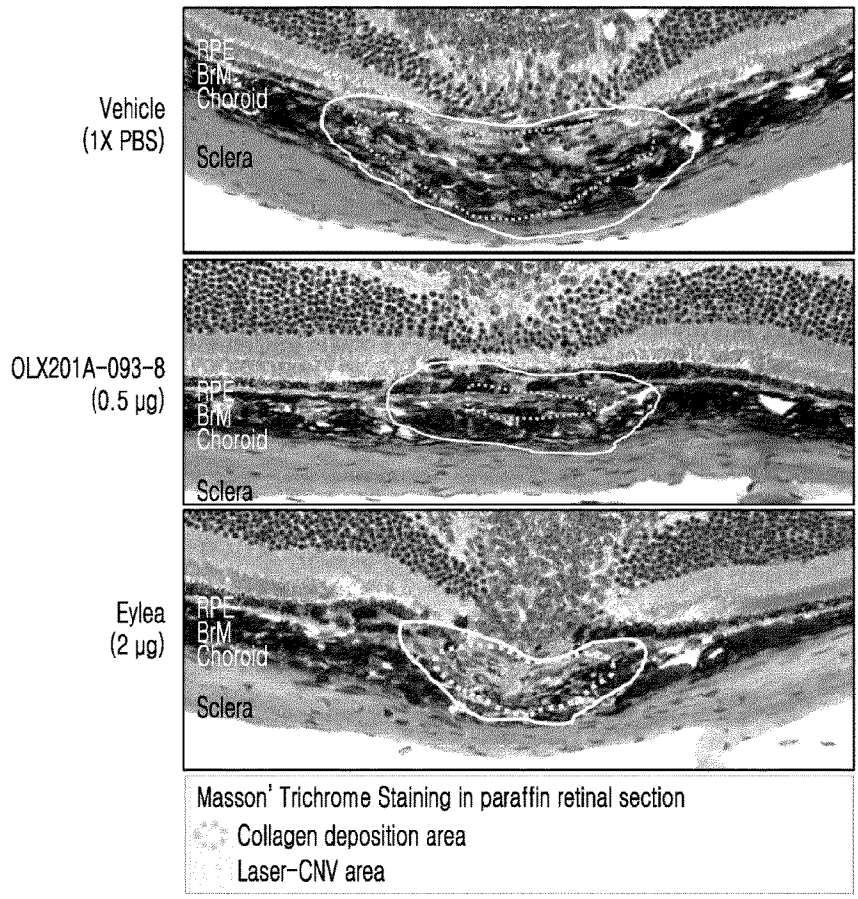


[도3b]



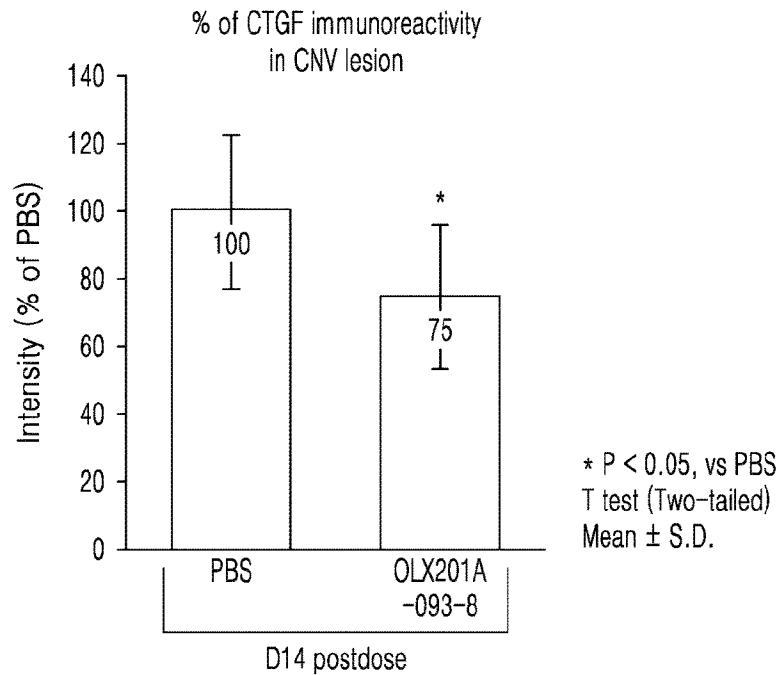
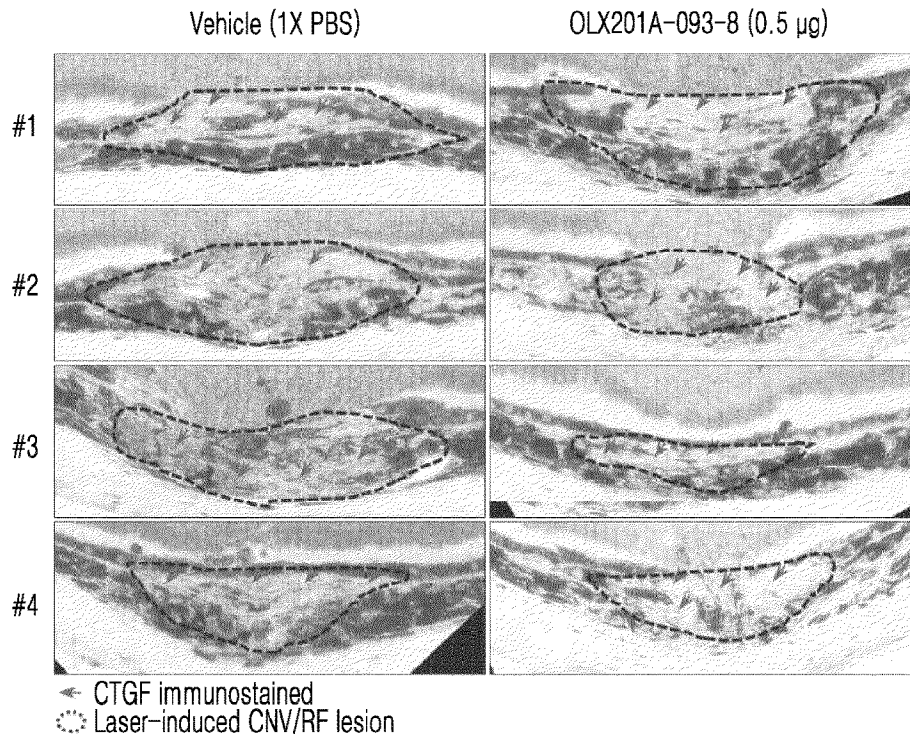
[도4a]

Collagen deposition in CNV lesion (D14 post dose)

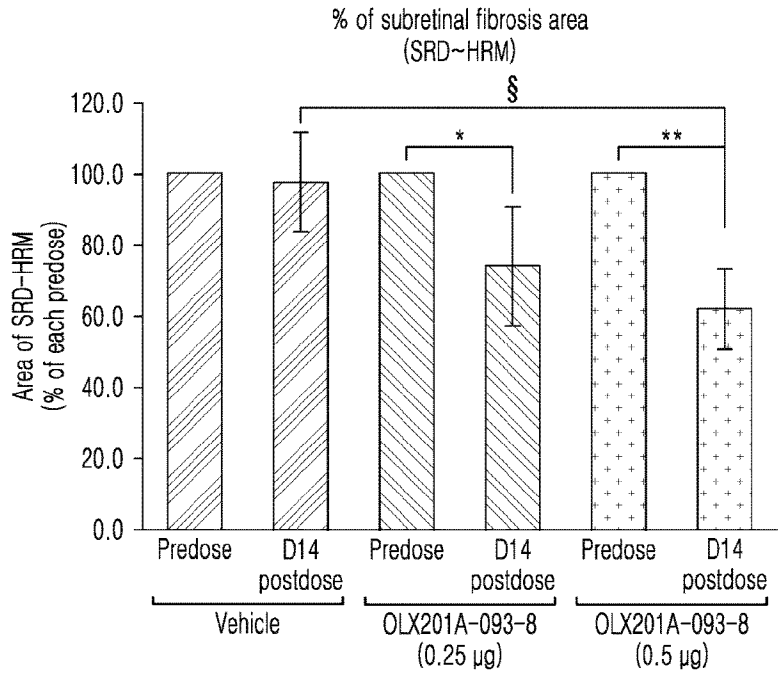
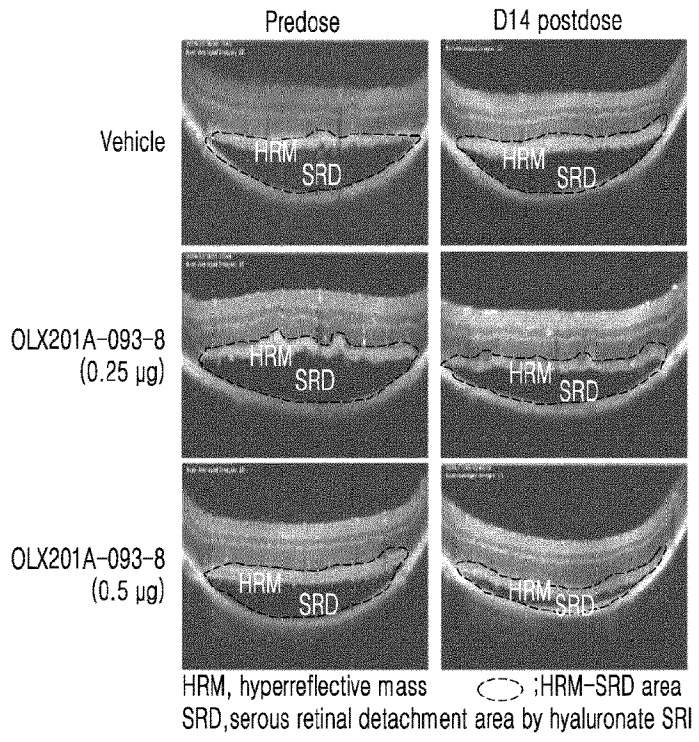


[도4b]

Immunohistochemical analysis of CTGF
in the laser-induced CNV RF (D14 post dose)

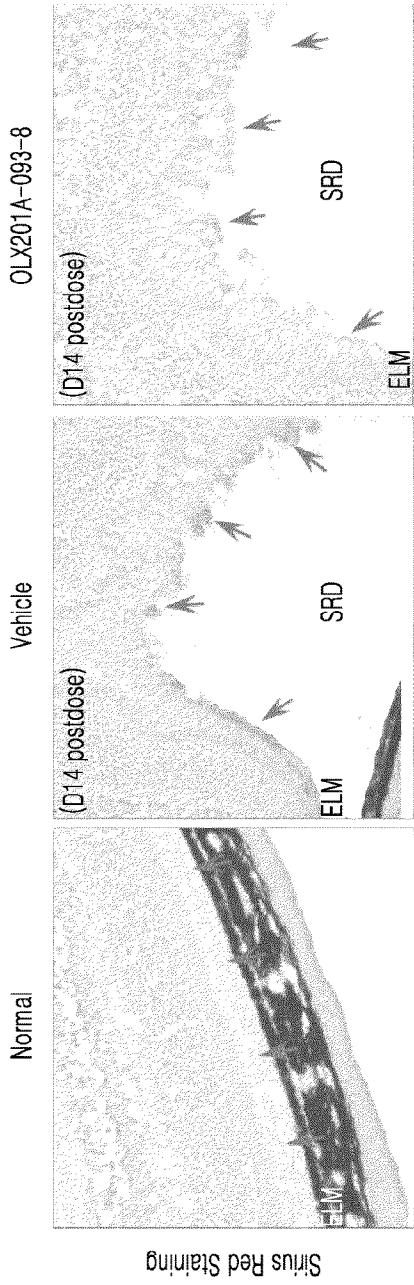


[도4c]

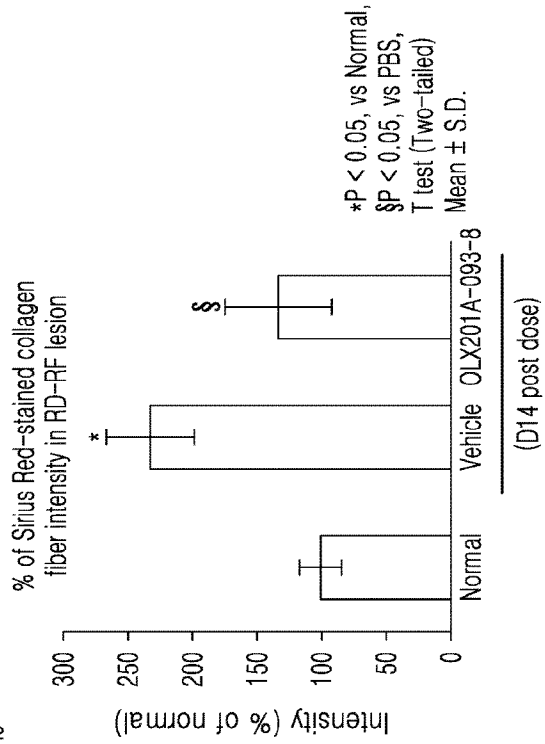


*,** p < 0.05, 0.001, predose vs postdose
 § p < 0.05, vs vehicle
 One Way ANOVA (Tukey test)
 Mean ± S.D.

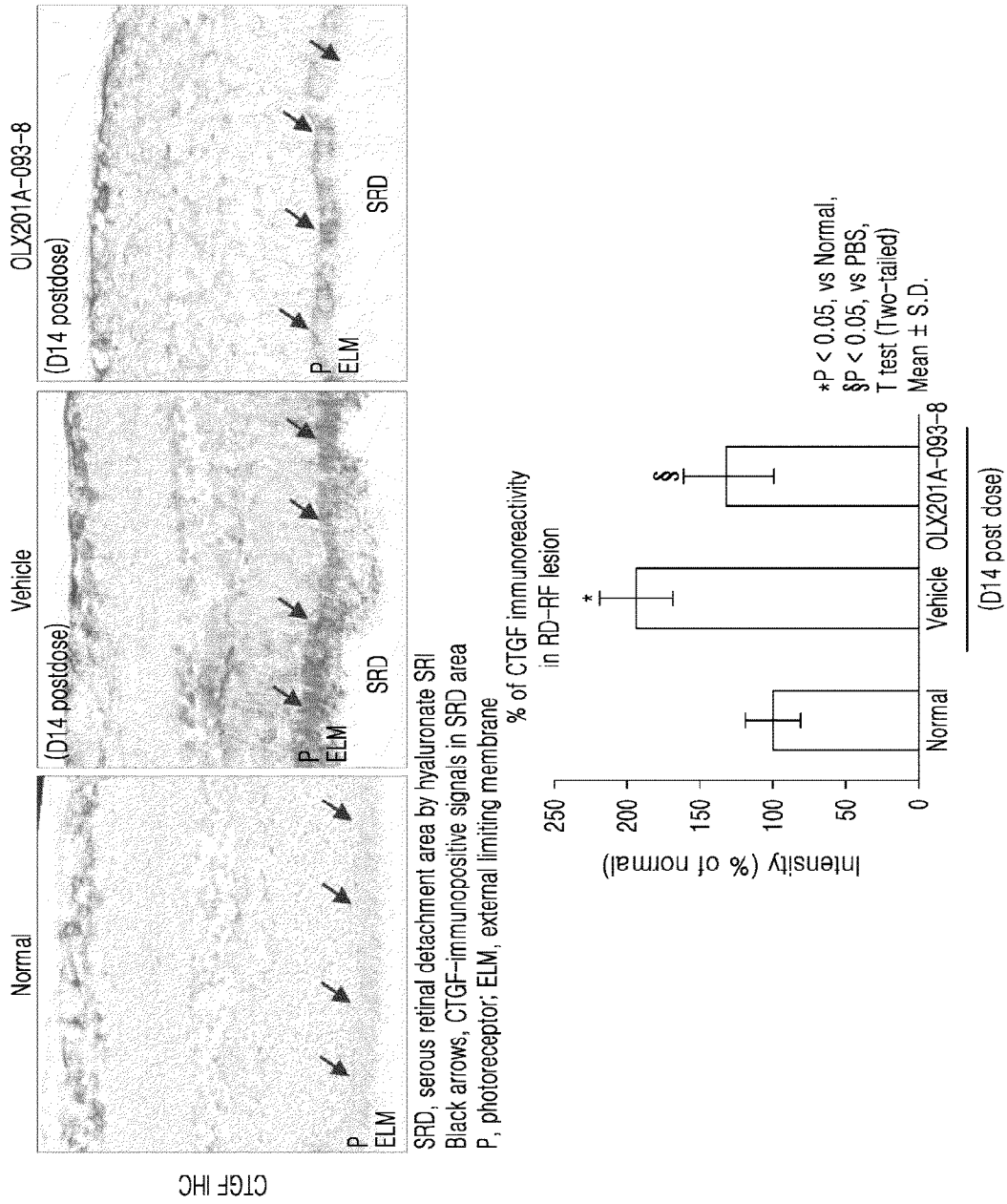
[도4d]



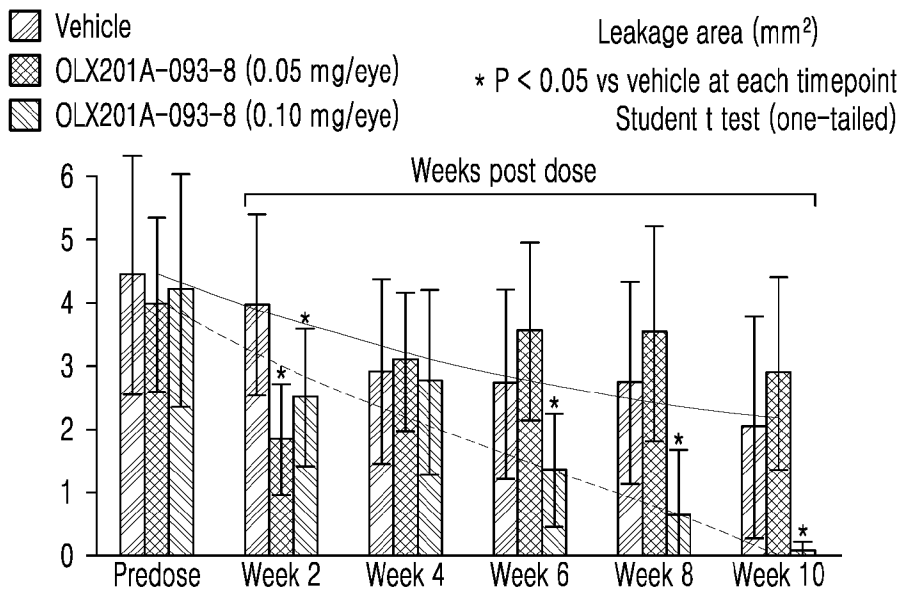
SRD, serous retinal detachment area by hyaluronate SRI
 Red arrows, Sirius Red stained collagen fibers:
 ELM, external limiting membrane



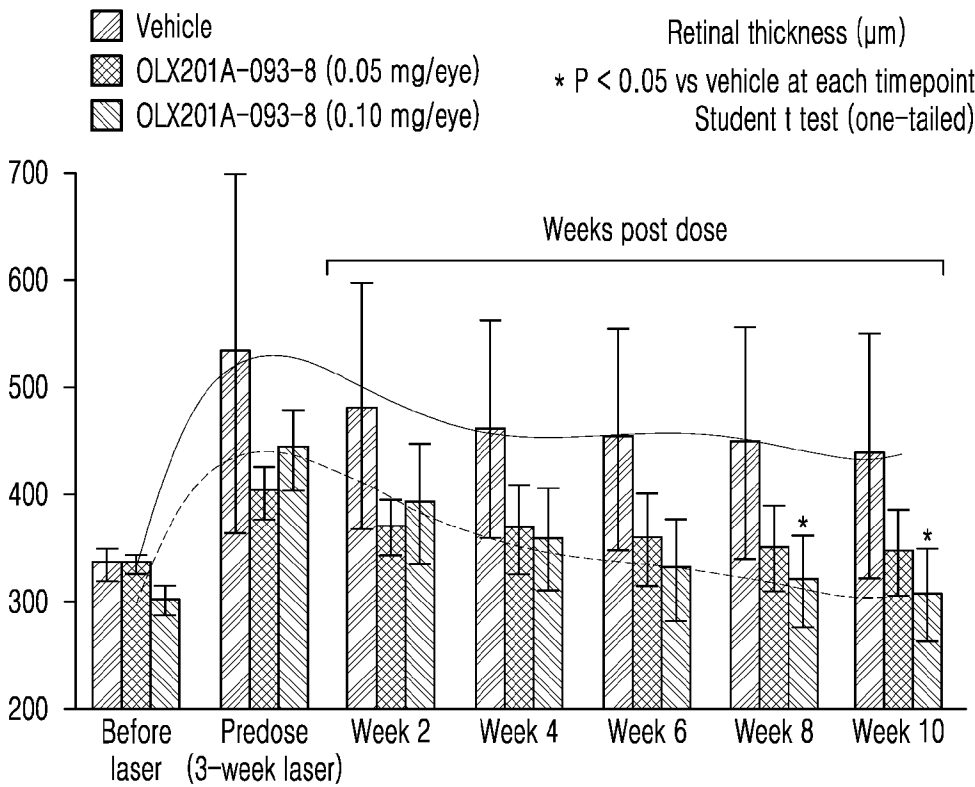
[도4e]



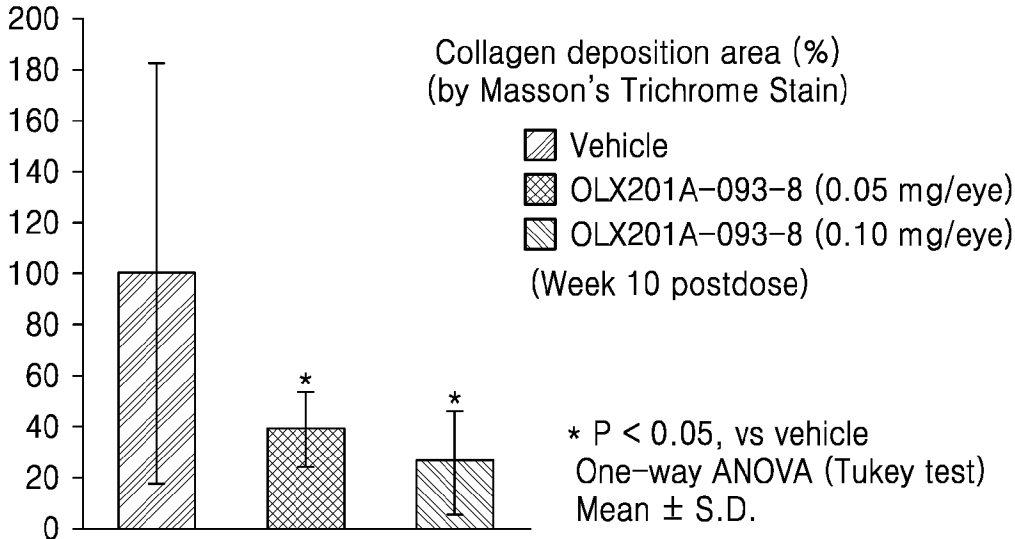
[도5a]



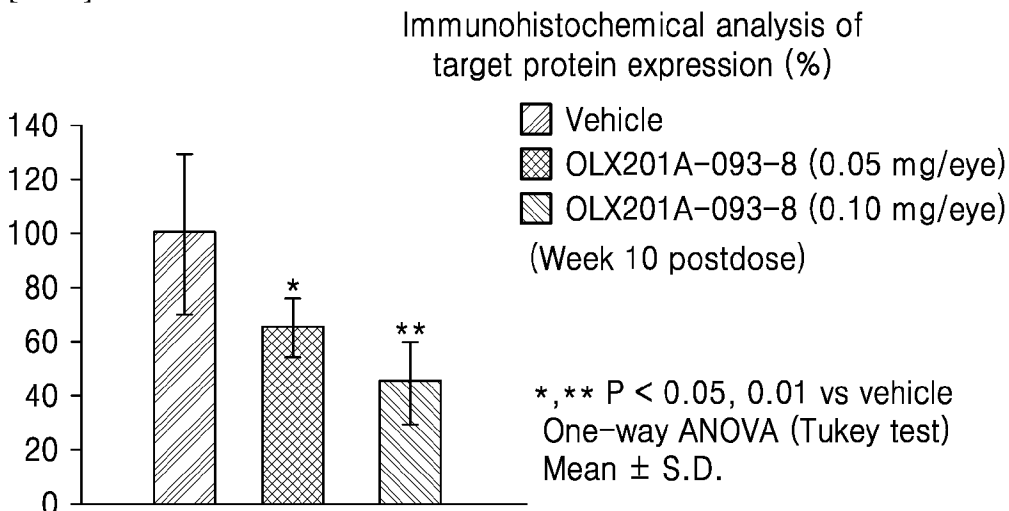
[도5b]



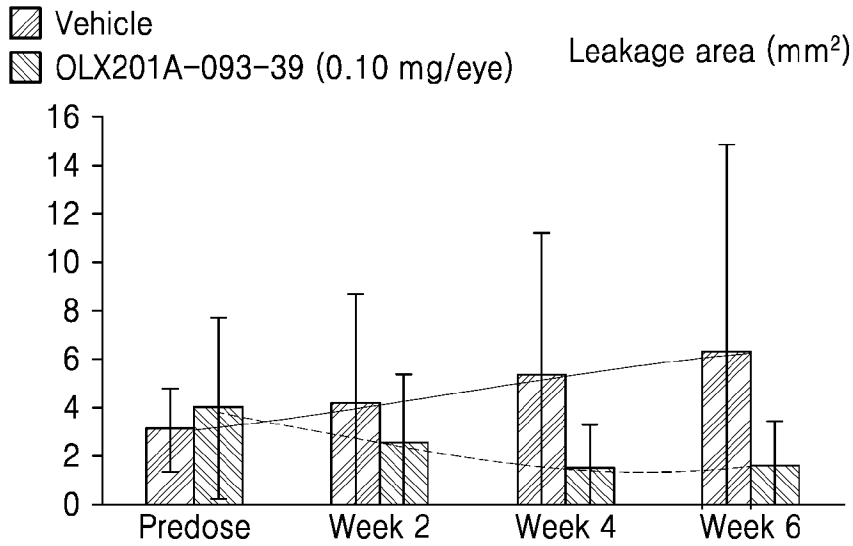
[도5c]



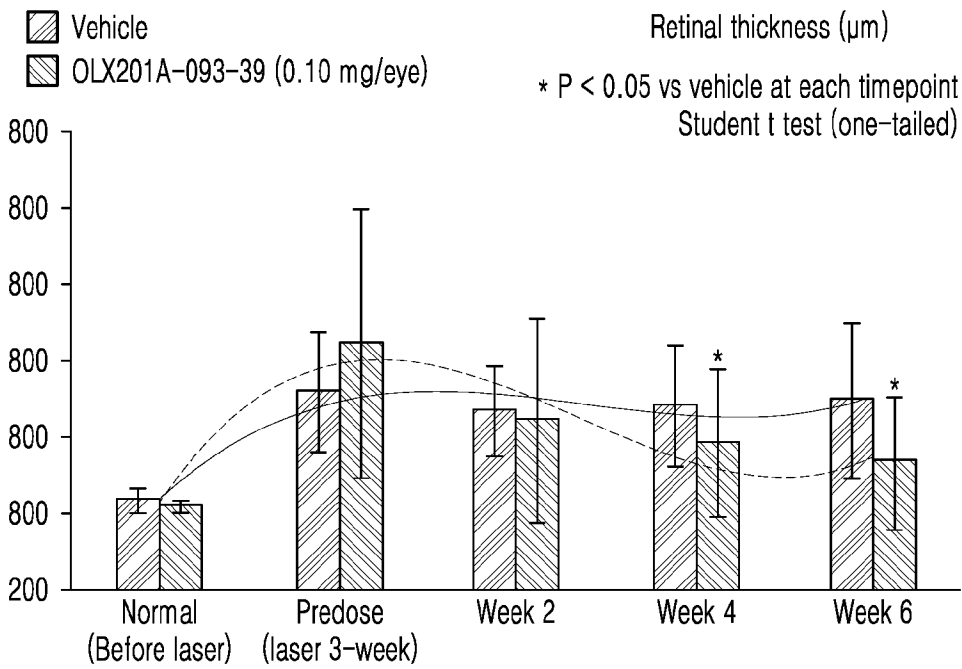
[도5d]



[도5e]



[도5f]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/010781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/113(2010.01); A61K 31/7105(2006.01); A61K 31/713(2006.01); A61K 48/00(2006.01); A61P 27/02(2006.01); C07H 21/02(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/10(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: CTGF, RNAi, 센스 가닥(sense), 안티 센스(anti-sense), 오버행(overhang), 화학적 변형(chemical modification), 노인성 황반변성(Age-related macular degeneration), 망막하 섬유증(subretinal fibrosis)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2018-0128423 A (OLIX PHARMACEUTICALS, INC.) 03 December 2018 (2018-12-03) See paragraphs [0007] and [0015]; claims 1, 10-11, 29-33, 45 and 49; and table 2.	1-6,8
Y		7
Y	KR 10-2019-0037166 A (OLIX PHARMACEUTICALS, INC.) 05 April 2019 (2019-04-05) See claims 1 and 28.	7
Y	US 2010-0035969 A1 (SHEPARD, Allan R. et al.) 11 February 2010 (2010-02-11) See abstract.	7
A	WO 2011-119887 A1 (RXI PHARMACEUTICALS CORPORATION) 29 September 2011 (2011-09-29) See entire document.	1-8
A	KR 10-0949791 B1 (LEE, Dong Ki) 30 March 2010 (2010-03-30) See entire document.	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 February 2021		Date of mailing of the international search report 24 February 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/010781

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR 10-2018-0128423	A	03 December 2018	CN	109072238	A	21 December 2018	
			EP	3443093	A2	20 February 2019	
			JP	2019-513384	A	30 May 2019	
			US	10301628	B2	28 May 2019	
			US	10829761	B2	10 November 2020	
			US	2017-0298358	A1	19 October 2017	
			US	2019-0367925	A1	05 December 2019	
			WO	2017-178883	A2	19 October 2017	
KR 10-2019-0037166	A	05 April 2019	WO	2019-066519	A1	04 April 2019	
US 2010-0035969	A1	11 February 2010	CN	101160138	A	09 April 2008	
			EP	1827503	A1	05 September 2007	
			EP	2319543	A1	11 May 2011	
			JP	2008-525460	A	17 July 2008	
			JP	2012-097119	A	24 May 2012	
			JP	5095414	B2	12 December 2012	
			KR 10-2007-0091337	A	10 September 2007		
			US	2006-0166919	A1	27 July 2006	
			US	2011-0028534	A1	03 February 2011	
			US	2014-0094502	A1	03 April 2014	
			US	7622454	B2	24 November 2009	
			US	7838507	B2	23 November 2010	
			WO	2006-069037	A1	29 June 2006	
			WO 2011-119887	A1	29 September 2011	CN	103108642
CN	105131067	A				09 December 2015	
CN	110042099	A				23 July 2019	
EP	2550002	A1				30 January 2013	
EP	2550002	B1				08 May 2019	
EP	3560503	A1				30 October 2019	
JP	2013-532952	A				22 August 2013	
JP	2017-018109	A				26 January 2017	
JP	2019-071881	A				16 May 2019	
JP	6060071	B2				11 January 2017	
JP	6553001	B2				31 July 2019	
KR	10-1852210	B1				25 April 2018	
KR 10-2013-0062917	A	13 June 2013					
KR 10-2018-0044433	A	02 May 2018					
US	2014-0113950	A1				24 April 2014	
US	2017-0067056	A1				09 March 2017	
US	2018-0371464	A1				27 December 2018	
US	9340786	B2				17 May 2016	
US	9963702	B2	08 May 2018				
KR 10-0949791	B1	30 March 2010	CN	101970660	A	09 February 2011	
			EP	2222848	A2	01 September 2010	
			EP	2222848	B1	25 February 2015	
			JP	2011-505868	A	03 March 2011	
			JP	5624474	B2	12 November 2014	
			KR 10-2009-0065880	A	23 June 2009		
			US	2012-0238017	A1	20 September 2012	
			US	2018-0127747	A1	10 May 2018	
			WO	2009-078685	A2	25 June 2009	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/010781

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/113(2010.01); A61K 31/7105(2006.01); A61K 31/713(2006.01); A61K 48/00(2006.01); A61P 27/02(2006.01); C07H 21/02(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/10(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: CTGF, RNAi, 센스 가닥(sense), 안티 센스(anti-sense), 오버행(overhang), 화학적 변형(chemical modification), 노인성 황반변성(Age-related macular degeneration), 망막하 섬유증(subretinal fibrosis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2018-0128423 A (올릭스 주식회사) 2018.12.03 단락 [0007], [0015]; 청구항 1, 10-11, 29-33, 45, 49; 표 2 참조.	1-6,8
Y		7
Y	KR 10-2019-0037166 A (올릭스 주식회사) 2019.04.05 청구항 1, 28 참조.	7
Y	US 2010-0035969 A1 (SHEPARD, ALLAN R. 등) 2010.02.11 요약 참조.	7
A	WO 2011-119887 A1 (RXI PHARMACEUTICALS CORPORATION) 2011.09.29 전체 문헌 참조.	1-8
A	KR 10-0949791 B1 (이동기) 2010.03.30 전체 문헌 참조.	1-8
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2021년02월24일 (24.02.2021)	2021년02월24일 (24.02.2021)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	정다원	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
 - b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
 - c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0128423 A	2018/12/03	CN 109072238 A	2018/12/21
		EP 3443093 A2	2019/02/20
		JP 2019-513384 A	2019/05/30
		US 10301628 B2	2019/05/28
		US 10829761 B2	2020/11/10
		US 2017-0298358 A1	2017/10/19
		US 2019-0367925 A1	2019/12/05
		WO 2017-178883 A2	2017/10/19
		KR 10-2019-0037166 A	2019/04/05
US 2010-0035969 A1	2010/02/11	CN 101160138 A	2008/04/09
		EP 1827503 A1	2007/09/05
		EP 2319543 A1	2011/05/11
		JP 2008-525460 A	2008/07/17
		JP 2012-097119 A	2012/05/24
		JP 5095414 B2	2012/12/12
		KR 10-2007-0091337 A	2007/09/10
		US 2006-0166919 A1	2006/07/27
		US 2011-0028534 A1	2011/02/03
		US 2014-0094502 A1	2014/04/03
		US 7622454 B2	2009/11/24
		US 7838507 B2	2010/11/23
		WO 2006-069037 A1	2006/06/29
		WO 2011-119887 A1	2011/09/29
CN 105131067 A	2015/12/09		
CN 110042099 A	2019/07/23		
EP 2550002 A1	2013/01/30		
EP 2550002 B1	2019/05/08		
EP 3560503 A1	2019/10/30		
JP 2013-532952 A	2013/08/22		
JP 2017-018109 A	2017/01/26		
JP 2019-071881 A	2019/05/16		
JP 6060071 B2	2017/01/11		
JP 6553001 B2	2019/07/31		
KR 10-1852210 B1	2018/04/25		
KR 10-2013-0062917 A	2013/06/13		
KR 10-2018-0044433 A	2018/05/02		
US 2014-0113950 A1	2014/04/24		
US 2017-0067056 A1	2017/03/09		
US 2018-0371464 A1	2018/12/27		
US 9340786 B2	2016/05/17		
US 9963702 B2	2018/05/08		
KR 10-0949791 B1	2010/03/30	CN 101970660 A	2011/02/09
		EP 2222848 A2	2010/09/01
		EP 2222848 B1	2015/02/25
		JP 2011-505868 A	2011/03/03
		JP 5624474 B2	2014/11/12
		KR 10-2009-0065880 A	2009/06/23
		US 2012-0238017 A1	2012/09/20
		US 2018-0127747 A1	2018/05/10

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2009-078685 A2

2009/06/25