



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0091337
(43) 공개일자 2007년09월10일

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006.01) A61P 27/02(2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7016318

(22) 출원일자 2007년07월16일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2007년07월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/046064

국제출원일자 2005년12월19일

(87) 국제공개번호 WO 2006/069037

국제공개일자 2006년06월29일

(30) 우선권주장

60/638,705 2004년12월23일 미국(US)

(71) 출원인

알콘, 인코퍼레이티드

스위스연방 취엔베르그 시에이취 6331 보쉬 69

(72) 발명자

셰퍼드 알란 알.

미국 텍사스 76132 포트 워서 하이 브룩 드라이브 6404

팡 이옥-허우

미국 텍사스 75052 그랜드 프래리 스타브리지 레인 125

(74) 대리인

이은선, 최규팔

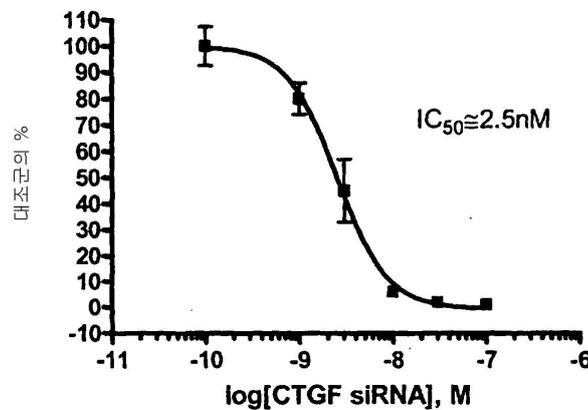
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 시각 장애의 치료를 위한 CTGF의 RNA i 저해

(57) 요약

RNA 간섭(RNA interference)은 CTGF 발현이 수반된 시각 장애에 있어서, 결합조직 성장인자 mRNA를 저해하는 작용을 한다. 비정상적인 CTGF 발현이 수반되는 시각 장애에는 녹내장, 황반변성, 당뇨망막변증, 맥락막혈관신생, 증식유리체망막병증 및 상처치유가 포함된다. 상기 장애들은 본 발명의 간섭 RNA의 도입으로 치료된다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

19 내지 49개의 뉴클레오타이드의 길이를 갖는 유효량의 간섭 RNA 및 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 대상의 안구에 투여하는 것을 포함하되, 여기에서 간섭 RNA는 센스 뉴클레오타이드 서열, 안티센스 뉴클레오타이드 서열, 및 적어도 19개 뉴클레오타이드의 적어도 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 가지며;

안티센스 서열은 생리적 상태에서 서열번호 1에 상응하는 mRNA 부분과 하이브리드화되고, 서열번호 1에 상응하는 하이브리드된 mRNA 부분과 함께 적어도 19개 뉴클레오타이드의 적어도 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 가지며,

결합조직 성장인자 mRNA의 발현이 약화되는 것인, 대상의 안구에서 결합조직 성장인자 mRNA의 발현을 약화시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 대상이 결합조직 성장인자-관련 시각장애를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 대상이 결합조직 성장인자-관련 시각 장애로 발달될 위험에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 결합조직 성장인자-관련 시각 장애가 녹내장, 황반변성(macular degeneration), 당뇨병망막병증(diabetic retinopathy), 맥락막혈관신생(choroidal neovascularization), 증식유리체망막병증(proliferative vitreoretinopathy) 또는 상처치유(wound healing)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 안티센스 서열이 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 하이브리드화 부분과 함께 적어도 21 내지 23개의 뉴클레오타이드와 적어도 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 가지며 각 센스 및 안티센스 서열의 3' 말단에 추가의 TT 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 센스 뉴클레오타이드 서열 및 안티센스 뉴클레오타이드 서열이 루프 뉴클레오타이드 서열로 연결되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 조성물이 국소적, 유리체내(intravitreal), 또는 경공막(transcleral)경로를 통하여 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 안티센스 서열이 뉴클레오타이드 379, 691, 801, 901, 932, 937, 969, 986, 1119, 1170, 1201, 1346, 1473, 1478, 1481, 1488, 1626, 1660, 또는 1666에서 시작하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 뉴클레오타이드 서열을 타겟하여 설계된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 안티센스 서열이 뉴클레오타이드 379, 901, 또는 1488에서 시작하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 뉴클레오타이드 서열을 타겟하여 설계된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 안티센스 서열이 뉴클레오타이드 379, 691, 801, 901, 932, 937, 969, 986, 1119, 1170, 1201, 1346, 1473, 1478, 1481, 1488, 1626, 1660, 또는 1666을 포함하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 뉴클레오타

드 서열을 타겟하여 설계된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서 안티센스 서열이 뉴클레오티드 379, 901, 또는 1488을 포함하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 뉴클레오티드 서열을 타겟하여 설계된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서 안티센스 서열이 3'-TTcccguuuuucacguaggca-5' 서열번호 33을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 안티센스 서열이 3'-TTcccggagaagacacugaag-5' 서열번호 31을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 안티센스 서열이 3'-TTccaaucauaguagucuauc-5' 서열번호 28을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 간섭 RNA가

5'-gggccucuucugugacuucTT-3' 서열번호 30 및

3' -TTcccggagaagacacugaag-5' 서열번호 31을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 간섭 RNA가

5'-gggcaaaaagugcauccguTT-3' 서열번호 32 및

3'-TTcccguuuuucacguaggca-5' 서열번호 33을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 간섭 RNA가

5'-gguuaguaucaucagauagTT-3' 서열번호 27 및

3 '-TTccaaucauaguagucuauc-5 ' 서열번호 28을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 19 내지 49개의 뉴클레오티드의 길이를 가지며, 센스 뉴클레오티드 서열, 안티센스 뉴클레오티드 서열, 및 적어도 19개의 뉴클레오티드와 적어도 거의-완벽한 상보성 부위를 포함하는 제 2 간섭 RNA를 대상의 안구에 투여하는 것을 추가로 포함하며, 여기에서 제 2 간섭 RNA의 안티센스 서열은 생리학적 조건에서 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 제 2 부분과 하이브리드되며, 서열번호 1에 사용하는 mRNA의 제 2 하이브리드된 부분과 함께 적어도 19개의 뉴클레오티드의 적어도 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

대상의 안구에 19 내지 49개의 뉴클레오티드의 길이를 갖는 유효량의 단일-가닥 간섭 RNA 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하여, 대상의 안구에서 결합조직 성장인자 mRNA의 발현을 약화시키는 방법으로서, 여기에서 단일 가닥 간섭 RNA는 생리학적 조건에서 뉴클레오티드 379, 691, 801, 901, 932, 937, 969, 986, 1119, 1170, 1201, 1346, 1473, 1478, 1481, 1488, 1626, 1660, 또는 1666에서 시작하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 부분에 하이브리드되고, 간섭 RNA는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 하이브리드된 부분과 적어도 거의-완벽한 상보성 부위를 가지며, 여기에서 결합조직 성장인자 mRNA의 발현이 약화되는 것을

특징으로 하는 방법.

청구항 20

치료를 요하는 대상에서, 결합조직 성장인자-관련 시각 장애의 치료용 약제를 제조하는데 있어서, 19 내지 49개의 뉴클레오티드 길이를 갖는 유효량의 간섭 RNA 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물의 용도로서, 간섭 RNA는:

센스 뉴클레오티드 서열, 안티센스 뉴클레오티드 서열, 및 적어도 19개의 뉴클레오티드와 적어도 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 포함하며;

여기에서, 안티센스 서열은 생리학적 조건에서 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 부분과 하이브리드되고, 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 하이브리드된 부분과 함께 적어도 19개의 뉴클레오티드의 적어도 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 갖는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 21

제20항에 있어서, 결합조직 성장인자-관련 시각 장애는 녹내장(glaucoma), 황반변성(macular degeneration), 당뇨병망막증(diabetic retinopathy), 맥락막혈관신생(choroidal neovascularization), 증식유리체망막병증(proliferative vitreoretinopathy) 또는 변종 상처치유(aberrant wound healing)인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 22

제20항에 있어서, 안티센스 서열은 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 하이브리드된 부분과 함께 적어도 21 내지 23개의 뉴클레오티드와 적어도 거의-완벽한 인접상보성 부위를 가지며, 각 센스 및 안티센스 서열 3'말단에 추가로 TT 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 23

제20항에 있어서, 센스 뉴클레오티드 서열 및 안티센스 뉴클레오티드 서열은 루프 뉴클레오티드 서열에 의해 연결되는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 24

제20항에 있어서, 조성물이 국소, 유리체강내(intravitreal), 경공막(transcleral) 경로를 통해 투여되기 위해 제조되는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 25

제20항에 있어서, 안티센스 서열은 뉴클레오티드 379, 691, 801, 901, 932, 937, 969, 986, 1119, 1170, 1201, 1346, 1473, 1478, 1481, 1488, 1626, 1660, 또는 1666에서 시작하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 뉴클레오티드 서열을 타겟하여 설계된 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 26

제20항에 있어서, 안티센스 서열은 뉴클레오티드 379, 901, 또는 1488에서 시작하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 뉴클레오티드 서열을 타겟하여 설계된 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 27

제20항에 있어서, 안티센스 서열은 뉴클레오티드 379, 691, 801, 901, 932, 937, 969, 986, 1119, 1170, 1201, 1346, 1473, 1478, 1481, 1488, 1626, 1660, 또는 1666을 포함하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 뉴클레오티드 서열을 타겟하여 설계된 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 28

제20항에 있어서, 안티센스 서열은 뉴클레오티드 379, 901, 또는 1488을 포함하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 뉴클레오티드 서열을 타겟하여 설계된 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 29

제20항에 있어서, 안티센스 서열은 3'-TTcccguuuuucacguaggca-5' 서열번호 33을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 30

제20항에 있어서, 안티센스 서열은 3'-TTcccggagaagacacugaag-5' 서열번호 31을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 31

제20항에 있어서, 안티센스 서열은 3'-TTccaaucauaguagucuauc-5' 서열번호 28을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 32

제20항에 있어서, 간섭 RNA는

5'-gggccucuucugugacuucTT-3' 서열번호 30 및

3'-TTcccggagaagacacugaag-5' 서열번호 31을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 33

제20항에 있어서, 간섭 RNA는

5'-gggcaaaaagugcauccguTT-3' 서열번호 32 및

3'-TTcccguuuuucacguaggca-5' 서열번호 33을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 34

제20항에 있어서, 간섭 RNA는

5'-gguuaguaucaucagauagTT-3' 서열번호 27 및

3'-TTccaaucauaguagucuauc-5' 서열번호 28을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 35

제20항에 있어서, 19 내지 49개의 뉴클레오티드의 길이를 가지며, 센스 뉴클레오티드 서열, 안티센스 뉴클레오티드 서열, 및 적어도 19의 뉴클레오티드와 적어도 거의-완벽한 상보성 부위를 포함하는 제 2 간섭 RNA를 대상의 안구에 투여하는 것을 추가로 포함하며, 여기에서 제 2 간섭 RNA의 안티센스 서열은 생리학적 조건에서 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 제 2 부분과 하이브리드되며, 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 제 2 하이브리드된 부분과 함께 적어도 19개 뉴클레오티드의 적어도 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 갖는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 36

결합조직 성장인자-관련 시각 장애의 치료가 필요한 대상에 대한 그 치료를 위한 약제의 제조에 있어서, 19 내지 49개의 뉴클레오티드 길이를 갖는 유효량의 간섭 RNA 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물의 용도로서, 여기에서 단일 가닥 간섭 RNA는 생리학적 조건에서 뉴클레오티드 379, 691, 801, 901, 932, 937, 969, 986, 1119, 1170, 1201, 1346, 1473, 1478, 1481, 1488, 1626, 1660, 또는 1666에서 시작하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA 부분에 하이브리드되며, 간섭 RNA는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 하이브리드된 부분과 함께 적어도 거의-완벽한 상보성 부위를 갖는 것을 특징으로 하는 용도.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 시각 장애에 있어서, 결합조직 성장인자(CTGF)의 발현을 저해하는 간섭 RNA 조성물의 분야에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 대부분의 시각 장애는 세포 증식, 생존, 이동, 분화 및 혈관신생(angiogenesis)을 포함하는 세포 과정(cellular processes)과 연관되어 있다. CTGF는 분비 사이토카인이며, 이러한 세포성 과정에 있어서 중심 매개체이다. 특히, CTGF는 콜라겐 I 및 피브로넥틴의 퇴적이 증가되면 주로 세포외바탕질(extracellular matrix) 생산을 증가시키는 것으로 알려져 있다. CTGF의 과발현은 공피증(scleroderma), 피브로증식성 질환(fibroproliferative disease) 및 흉터형성과 같은 증상의 주요원인으로 관여하며, 여기에는 세포외바탕질 컴포넌트의 과축적이 있다.
- <3> 소주망(trabecular meshwork, TM) 부위내의 세포외바탕질 물질의 과다 축적은 다양한 형태의 녹내장의 특징이고; 이러한 증가는 수성 아웃플로우에 대한 저항성이 증가하도록 유도한다고 믿어지며, 따라서 안내압이 증가하게 된다.
- <4> Fleenor 등에 의한 WO 03/092584로 2003년 11월 13일 공개되고, 알콘사(Alcon, Inc.)에 양도된 국제특허출원(International Patent Application) 제 PCT/US2003/012521호는 녹내장성 TM 세포와 정상 TM 세포에 있어서 CTGF mRNA의 증가된 존재를 개시하고 있다. 따라서, 소주망세포에 의한 세포외바탕질의 생산에 있어 CTGF가 일정 역할을 담당한다고 여겨진다.
- <5> 황반변성(Macular degeneration)은 하이-시력(high-acuity vision)을 책임지는, 황반이라 불리는 중심망막의 부분의 광수용체가 손상되는 것이다. 황반의 변성은 망막색소 상피 및 혈관 맥락막(vascular choroid) 사이의 점막내의 세포외바탕질 컴포넌트의 비정상적 축적과 연관되어 있다. 이러한 데브리스(debris)-유사 물질은 드루젠(drusen)이라 불린다. 드루젠은 안저안구검사(funduscopy eye examination)을 이용하여 관찰된다. 정상 안구는 드루젠이 없는 황반을 갖고 있을 것이나, 드루젠은 망막 표면에 풍부할 수 있다. 황반에 소프트 드루젠이 존재하면, 황반 비전의 어떠한 손상이 없는, AMD의 초기 상태로 생각된다.
- <6> 맥락막의 신생혈관증식(Choroidal neovascularization)은 다른 시각 장애에 더하여 황반변성에서 보통 생겨나며, 맥락막의 내피세포의 증식, 세포외바탕질의 과생산, 섬유혈관 망막하 점막의 형성과 관련되어 있다. 망막색소 내피세포 증식 및 혈관신생 팩터의 생성은 맥락막의 신생혈관증식에 영향을 미치는 것으로 보인다.
- <7> 당뇨망막병증(Diabetic retinopathy)은 모세혈관의 기저막의 비후 및 모세혈관의 혈관주위세포(pericyte) 및 내피세포의 접촉의 결핍에 기인하는, 당뇨병에서 발생하는 시각 장애이다. 혈관주위세포의 손상으로 인하여 모세혈관의 누출이 증가하고, 혈액-망막 장막의 파괴가 유도된다.
- <8> 증식유리체망막변증(Proliferative vitreoretinopathy)은 유리체막내 및 망막 표면위의 세포막 및 섬유소성막(fibrotic membrane)의 세포의 증식과 연관되어 있다. 망막색소상피세포의 증식 및 이동은 이러한 시각 장애와 함께 흔하게 나타난다. 증식유리체망막변증과 관련된 점막은 세포외바탕질 컴포넌트, 예컨대 콜라겐 타입 I, II, 및 IV 및 피브로넥틴을 함유하며 점진적으로 섬유소성으로 된다.
- <9> 상처치유장애는 감염성 세포의 활성화, 성장인자 및 사이토카인의 분비 및 시각세포의 증식 및 분화, 모세혈관 투과성의 증대, 기저막 매트릭스 조성물내의 변화, 세포외 매트릭스의 침착의 증가, 피브로시스, 신생혈관증식, 및 조직 리모델링에 의해 심각한 시각 조직의 상해를 일으킬 수 있다.
- <10> 그러므로 CTGF의 과발현은 상기 시각 장애에 있어 주요한 발병인자로 생각된다. 현재 치료법은 상기 장애들의 병리학적 메커니즘을 직접 겨냥한 것이 아니다.

발명의 상세한 설명

- <11> 발명의 요약
- <12> 본 발명은 CTGF mRNA를 타겟으로 하여 CTGF mRNA 발현을 방해하는 간섭 RNA에 관한 것이다. 본 발명의 간섭 RNA는 CTGF-관련 시각 장애, 예컨대 녹내장, 황반변성(macular degeneration), 당뇨망막병증(diabetic retinopathy), 맥락막혈관신생(choroidal neovascularization), 증식유리체망막변증(proliferative vitreoretinopathy) 및 변종 상처치유(aberrant wound healing)를 치료하는 데에 유용하다.
- <13> 본 발명의 구체예는 대상의 안구에서 CTGF mRNA의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 유효량의 간섭 RNA, 예컨대 19 내지 49 뉴클레오티드를 갖는 이중가닥(ds) siRNA 또는 단일가닥(ss) siRNA와 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 대상의 안구에 적용하는 것을 포함한다.

- <14> 이중가닥 siRNA는 센스 뉴클레오티드 서열, 안티센스 뉴클레오티드 서열 및 적어도 19개 뉴클레오티드의 적어도 거의 완벽한 인접 상보성(near-perfect contiguous complementarity) 부위를 포함한다. 또한, 안티센스 서열은 생리적 상태에서 서열번호 1(인간의 CTGF에 대한 DNA의 센스 가닥 서열, GenBank 참조번호 NLM_001901)에 상응하는 mRNA의 부분과 하이브리드되며, 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 하이브리드된 부분을 갖는 적어도 19개 뉴클레오티드의 적어도 거의 완벽한 인접 상보성이 있는 부위를 포함한다. 상기 조성물을 적용하면 대상 안구의 결합조직 성장인자(connective tissue growth factor) mRNA의 발현이 약화된다.
- <15> 단일-가닥 siRNA는 19 내지 49개 뉴클레오티드의 길이를 가지며, 생리적 상태에서 뉴클레오티드 379, 691, 801, 901, 932, 937, 969, 986, 1119, 1170, 1201, 1346, 1473, 1478, 1481, 1488, 1626, 1660, 또는 1666에서 시작하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 부분과 하이브리드되며, 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 하이브리드된 부분을 갖는 적어도 거의 완벽한 인접 상보성 부위를 갖는다.
- <16> 본 발명의 구체예에서, 이중-가닥 간섭 RNA의 안티센스 서열은 뉴클레오티드 379, 691, 801, 901, 932, 937, 969, 986, 1119, 1170, 1201, 1346, 1473, 1478, 1481, 1488, 1626, 1660, 또는 1666를 포함하거나 여기에서 시작하는 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 뉴클레오티드 서열을 타겟으로 디자인된다.
- <17> 본 발명의 또 다른 구체예는 결합조직 성장인자-관련 시각 장애를 그 치료가 필요한 대상에 대해 치료하는 방법이다. 상기 방법은 대상의 안구에 19 내지 49개 뉴클레오티드의 길이를 갖는 유효량의 간섭 RNA를 포함하는 조성물 및 그의 약제학적으로 허용되는 염을 적용하는 것을 포함하며, 상기 간섭 RNA는 센스 뉴클레오티드 서열, 안티센스 뉴클레오티드 서열, 및 적어도 적어도 19개 뉴클레오티드와 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 포함한다. 안티센스 서열은 생리적 상태에서 서열번호 1에 상응하는 mRNA 부위와 하이브리드되며, 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 하이브리드된 부분을 갖는 적어도 19개 뉴클레오티드와 적어도 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 갖는다. 결합조직 성장인자-관련 시각 장애는 그에 의하여 치료된다.
- <18> 발명의 상세한 설명
- <19> "RNAi"라 명명되는 RNA 간섭은 소형 단일-또는 이중-가닥 RNA 분자에 의해 영향받는 타겟 유전자의 발현을 감소시키는 방법이다. 간섭 RNA는 소형 간섭 RNA들을 포함하며, 이중-가닥 또는 단일-가닥(ds siRNAs 또는 ss siRNAs), microRNAs (miRNAs), 작은 헤어핀 RNAs(shRNAs) 등을 포함한다. 이론에 구애됨이 없이, RNA 간섭은 dsRNA 전구체가 약 20 내지 25개 뉴클레오티드의 길이의 작은 RNA로 절단(cleavage)되면서 생체내에서(in vivo) 일어나는 것으로 보인다. 절단은 RNaseIII-RNA 헬리카제 다이스어(RNaseIII-RNA helicase Dicer)에 의해 수행된다. siRNA의 "센스"가닥, 즉, 타겟 mRNA 서열과 정확하게 같은 서열을 갖는 가닥이 제거되고, mRNA의 발현을 감소시키는 기능이 있는 타겟 mRNA에 대해 상보적인 "안티센스" 가닥이 남는다. siRNA의 안티센스 가닥은 mRNA에 대해 RISC (RNA-induced silencing complex)로 알려진 단백질 복합체를 유도하는 것으로 보이며, 이 복합체는 그 후 RISC의 아고노트(Argonaute) 단백질로 mRNA를 절단하며, 그로 인하여 mRNA에 의한 단백질의 생성이 감소한다. 간섭 RNA는 촉매성이 있고, mRNA의 발현의 감소는 mRNA와 관련이 있는 화학양론적 양의 간섭 RNA로 수행될 수 있다. mRNA 발현의 감소는 전사 및 번역 메커니즘을 경유하여 일어날 수도 있다.
- <20> 본 발명은 시각 장애에 있어서 결합조직 성장인자(CTGF)의 발현을 저해하기 위한 간섭 RNA의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 안구의 조직, 특히, 안구의 소주망(trabecular meshwork) 세포는 siRNA 침묵을 수행하며, 외인성으로 제공된 siRNA는 침묵하게 된다. 또한, 본 발명의 일면에서, siRNA 녹-다운의 유효성을 결정하기 위하여 PCR-기초한 접근법을 사용할 때, PCR 증폭 프라이머는 정확하게 침묵을 측정하기 위한 siRNA 타겟팅 서열을 포함하도록 디자인 되어야만 한다는 것이 결정되었다.
- <21> 본 명세서에 언급된 핵산 서열은 달리 지정하지 않는 한 5'에서 3'의 방향으로 명시하였다. 본 명세서의 "핵산"이라는 용어는 DNA 또는 RNA를 말하거나, 또는 그의 변형된 형태를 말하며 DNA에 존재하는 퓨린 또는 피리미딘 염기를 포함하거나 (아데닌은 "A," 사이토신은 "C," 구아닌은 "G," 티민은 "T"), 또는 RNA에 존재하는 퓨린 또는 피리미딘 염기를 포함한다(아데닌은 "A," 사이토신은 "C," 구아닌은 "G," 우라실은 "U"). 본 발명에서 제공되는 간섭 RNA는 비록 RNA에서 "T"염기가 자연발생적으로 생겨난 것이 아니라고 할지라도, 특히 3' 말단에 "T"염기를 포함할 수 있다. "핵산"은 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"라는 용어를 포함하며, 단일 가닥 분자 또는 이중 가닥 분자를 의미할 수 있다. 이중 가닥 분자는 A 및 T 염기사이, C 및 G 염기사이, A 및 U 염기 사이의 왓슨-크릭 염기 접합에 의해 형성된다. 이중 가닥 분자의 가닥은 서로 부분적으로, 상당히 또는 전체적으로 상보적일 수 있으며, 이중의 하이브리드를 형성할 것이며, 그 본당의 강도는 염기 서열의 상보성의 본질 및 정도에 의존한다. mRNA 서열은 그들 대신 코딩되는 DNA의 센스 또는 안티센스 서열을 알면 쉽게 결정된다. 예를 들면, 서열번호 1은 결합조직 성장인자에 대한 mRNA에 상응하는 DNA의 센스 가닥 서

열을 제공한다. mRNA의 서열은 "T" 염기가 "U" 잔기로 대체된 DNA의 센스 가닥의 서열과 동일하다. 그러므로, 결합조직 성장인자의 mRNA 서열은 서열번호 1로부터 알게된다.

<22> 결합조직 성장인자 mRNA:

<23> 바이오테크놀로지 인포메이션을 위한 내셔널 센터(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank 데이터베이스 중에, ncbi.nlm.nih.gov에서는 인간 결합조직 성장인자의 mRNA에 대해 상응하는 DNA 서열을 참고 번호 NM_001901로서 제공하며, 하기 서열번호 1로 나타내었다. 결합조직 성장인자에 대한 코딩 서열은 뉴클레오타이드 146-1195로부터온다.

<24> 서열번호 1:

```

1 tccagtgacg gagccgcccg gccgacagcc ccgagacgac agcccggcgc gtcccggctc
61 ccacctccga ccaccgccag cgctccaggc cccgcgctcc ccgctcgccg ccaccgcgcc
121 ctccgctccg cccgcagtc caacctgac cgccgccagt atgggccccg tccgcgtcgc
181 cttcgtggc ctctcgcgc tctgagccg gccggccgtc ggccagaact gcagcggggc
241 gtgccggtgc ccggacgagc cggcgccgcg ctgccggcg ggcgtgagcc tctgtctgga
301 cggctgcggc tctgcccgc tctgcgcaa gcagctgggc gagctgtgca ccgagcgcga
361 cccctgcgac ccgcacaagg gcctctctg tgacttcggc tccccggcca accgcaagat
421 cggcgtgtgc accgcaaaag atggtgtctc ctgcatctc ggtgggacg tgtaccgcag
481 cggagagtcc ttccagagca gctgcaagta ccagtgcacg tgctggacg gggcgggtgg
541 ctgcatgcc ctgtgcagca tggacgttc tctgccagc cctgactgcc cctccccgag
601 gagggtcaag ctgccggga aatgctgcga ggagtgggtg tgtgacgagc ccaaggacca
661 aaccgtggtt gggcctgcc tgcggctta ccgactggaa gacacgttg gccagaccc
721 aactatgatt agagccaact gctgttcca gaccacagag tggagcgcct gttccaagac
781 ctgtgggatg ggcactcaca cccgggttac caatgacaac gcctcctgca ggctagagaa
841 gcagagccgc ctgtgatgg tcaggcctg cgaagctgac ctggaagaga acattaagaa
901 gggcaaaaag tgcattccga ctccaaaat ctccaagcct atcaagttg agctttctgg
961 ctgcaccagc atgaagacat accgagctaa attctgtgga gtatgtaccg acggccgatg
1021 ctgcaccccc cacagaacca ccacctgcc ggtggagttc aagtgccctg acggcgaggt
1081 catgaagaag aacatgatgt tcatcaagac ctgtgcctgc cattacaact gtccccgaga
1141 caatgacatc ttgaatcgc tgtactacag gaagatgtac ggagacatgg catgaagcca
1201 gagagtgaga gacattaact ctagactg gaactgaac tgattcacat ctcattttc
1261 cgtaaaaatg atttcagtag cacaagttat ttaaatctgt ttttctaact gggggaaaag
1321 attcccacc aattcaaaac atttgccat gtcaaacaaa tagtctatct tccccagaca
1381 ctggttgaa gaatgttaag acttgacagt ggaactacat tagtacacag caccagaatg
1441 tatattaagg tgtggcttta ggagcagtg gagggtagca gcagaaagg tagtatcatc
1501 agatagctct tatacgagla atatgcctgc tatttgaagt gtaattgaga aggaaaattt
1561 tagcgtgctc actgacctgc ctgtagcccc agtgacagct aggatgtgca ttctccagcc
1621 atcaagagac tgagtcaagt tgttcctta gtcagaacag cagactcagc tctgacattc
1681 tgaltcgaat gacactgtc aggaatcggg atcctgtcga ttagactgga cagctgtgg
1741 caagtgaatt tctgtaca agccagattt ttaaaaattt atattgtaa tattgtgtg
1801 gtgtgtgtgt gttatata atatatata gtacagttat ctaagtaat ttaaagttg
1861 ttgtgcctt ttattttgt tttaatgct ttgatattc aatgttagcc tcaatttctg
1921 aacacatag gtagaatga aagctgtct gatcgtcaa agcatgaaat ggatactat
1981 atggaaatc tctcagatag aatgacagc cgtcaaaaca gattgtttgc aaaggggagg
2041 catcagtgct ctggcagggc tgatttctag gtaggaaatg tggtagctca cgctcacttt
2101 taatgaacaa atggccttta taaaaactg agtgactcta tatagctgat cagtttttc
2161 acctggaagc attgtttct accttgatat gactgtttt cggacagttt attgttgag
2221 agtgtgacca aaagtacat gttgcacct ttctagttga aaataaagta tatttttct
2281 aaaaaaaaaa aaaaacgaca gcaacggaat tc.
    
```

<25>

<26> 상기 언급한 CTGF mRNA 서열의 동등체(Equivalent)는 스플라이스(splice) 형태, 대립형질(allelic) 형태, 또는 그들과 동일기원(cognate)의 형태일 수 있다. 동일기원은 서열번호 1과 상동인 다른 포유류종으로부터의 결합조직 성장인자이다. 서열번호 1과 관련된 CTGF 핵산 서열은 GenBank 접근 번호 AK092280, AK125220, AY395801, AY550024, BT019794, BT019795, CR541759, M92934, U14750, 및 X78947를 갖는 것들이며, 본 명세서에 참고문헌으로 나와 있는 U.S. 5,585,270의 서열번호 1의 서열이다.

- <27>
- <28> mRNA의 발현 약화:
- <29> 본 명세서에 사용된 "mRNA의 발현을 약화시키는 것"이라는 표현은 세포내에서 타겟 유전자의 전체 mRNA 전사 레벨을 감소시키는 결과를 줄 수 있는 양의 간섭 RNA를 투여하여 mRNA가 단백질로 전사되는 것을 스크램블된 서열(scrambled sequence)을 갖는 대조군 RNA에 비하여 감소시키는 것을 의미한다. mRNA의 발현의 감소는 보통 mRNA의 "녹-다운"으로 나타낸다. 여기에서, 50% 및 100%의 양을 포함하여 그 사이의 양의 발현의 녹-다운이 구체예로 예상된다. 그러나, 본 발명의 목적을 위해 수행되는 상기 녹-다운 레벨은 불필요하다. 또한, 간섭 RNA의 두 세트가 개별적으로 녹-다운에 약한 영향을 미칠 수 있으나, 함께 투여되는 경우 현저하게 더욱 유효할 수 있다. 하나의 구체예에서, 개개의 ds siRNA는 적어도 70%까지의 양에서 녹-다운되었을 때 유효하다. 또 다른 구체예에서, 두 개 이상의 ds siRNA는 적어도 70%까지의 양에서 녹-다운될 때 함께 유효하다.
- <30> 녹-다운은 보통 정량적 폴리머라제 연쇄 반응(Quantitative Polymerase Chain Reaction, QPCR) 증폭으로 mRNA 레벨을 결정하거나 또는 웨스턴 블랏 또는 효소 결합 면역흡수분석법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)으로 단백질의 레벨을 결정하여 측정된다. 단백질 레벨의 분석은 RNA 유도성 침묵 복합체(RNA Induced Silencing Complex (RISC))에 의한 mRNA 분해 뿐만 아니라 전사 저해의 결과를 제공한다. 또한, 녹-다운을 측정하는 기술로는 RNA 용액 하이브리드화, 뉴클레아제 보호, 노던 하이브리드화, 역전사, 마이크로어레이로의 유전자 발현 모니터링, 항체 결합, 표지면역검정(radioimmunoassay), 및 형광 활성화 세포 분석(fluorescence activated cell analysis)이 포함된다. 또 다른 측정 방법에는 CTGF를 유도하는 TGF β 2를 과발현시키는 것, CTGF siRNA의 후첨가(adding back), 및 그 후 CTGF mRNA/단백질 녹다운을 상기 언급된 방법중 임의의 방법에 의하여 측정하는 방법을 포함한다.
- <31> 인간 또는 포유류에 있어서, CTGF의 저해는 시각장애의 발달이 관찰됨에 의해 추론될 수 있다. 예컨대, 황반 변성과 관련된 연령대에서, 시력 감퇴의 둔화 또는 반전은 CTGF의 저해 및 CTGF mRNA의 침묵을 가리키며, 녹내장 환자에 있어서 안내압이 감소하고, 녹내장 발달의 위험이 있는 대상에 있어 증상의 발현을 막거나 지연을 유도한다.
- <32> 본 발명의 구체예의 간섭 RNA는 촉매성 매너로 작용하는데, 즉, 화학양론적 양의 간섭 RNA는 타겟 mRNA의 저해에 영향을 줄 수 있다. 치료효과를 제공하기 위해 요구되는 간섭 RNA의 양은 안티센스 치료법에 비하여 현저하게 더 적다.
- <33> 이중-가닥 간섭 RNA:
- <34> 본 명세서 중의 이중 가닥 간섭 RNA (ds siRNA라고도 불림)은 센스 뉴클레오티드 서열 및 안티센스 뉴클레오티드 서열을 가지며, 센스 및 안티센스 서열은 적어도 19개 뉴클레오티드와 적어도 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 포함한다. 간섭 RNA의 길이는 19 내지 49개 뉴클레오티드이며, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 또는 49개 뉴클레오티드의 길이를 포함한다. ds siRNA의 안티센스 서열은 생리적 상태에서 서열번호 1에 상응하는 mRNA 부분과 하이브리드되며, 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 하이브리드된 부분을 갖는 19개 뉴클레오티드와 적어도 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 포함한다.
- <35> siRNA의 안티센스 가닥은 안티센스 가닥이 세포 내에서 RISC 복합체에 결합하고, 결합된 복합체가 안티센스 RNA의 서열에 상보적인 서열에서 mRNA에 특이하게 결합하도록 유도함으로써, 결합된 복합체에 의해 mRNA가 순차적으로 절단이 되도록 하게 한다는 점에서 siRNA의 활성있는 유도 제제(guiding agent)이다.
- <36> siRNA에 대한 타겟 서열을 선별하는 기술은 2004년 5월 6일 개정된 "The siRNA User Guide,"에서 Tuschl, T. 등에 의해 제공된 바 있으며, 록펠러 대학교 웹사이트에서 볼 수 있다. 또한, 엠비온 웹사이트(Ambion's web site)에 있는 Technical Bulletin #506, "siRNA Design Guidelines," Ambion Inc., min 35%, max 55% G/C 콘텐츠를 사용하여 인비트로젠 웹사이트에서, 및 다마콘 웹사이트(Dharmacon web site)에서 제공하고 있다. 타겟 서열은 mRNA의 코딩 부위 또는 5' 또는 3' 미전사 부위에 위치할 수 있다.
- <37> CTGF에 대한 DNA 타겟 서열의 구체예로 서열번호 1의 뉴클레오티드 1488 내지 1506에 존재하는 것을 들 수 있다:
- <38> 5'- ggtagtagtcatcagatag-3' 서열번호 18. 뉴클레오티드 1488.
- <39> 서열번호 18에 상응하는 mRNA 서열을 타겟으로 하는 각 가닥상에 오버행 (overhang) 3 'UU를 갖는 본 발명의 이

중 가닥 siRNA는:

<40> 5'-gguuaguaucaucagauagUU-3' 서열번호 25

<41> 3'-UUccaucauaguagucuauc-5' 서열번호 26

<42> 이다.

<43> 3' 오버행(overhang)은 많은 "U" 잔기를 가질 수 있으며, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 및 6을 포함하여 이들 사이의 수의 "U" 잔기를 가질 수 있다. 5' 말단은 뉴클레오티드의 5' 오버행을 가질 수도 있다. 서열번호 18의 상응하는 mRNA 서열을 타겟으로 하고 각 가닥상에 3'TT 오버행을 갖는 본 발명의 이중 가닥 siRNA는:

<44> 5'-gguuaguaucaucagauagTT-3' 서열번호 27

<45> 3'-TTccaucauaguagucuauc-5' 서열번호 28

<46> 이다.

<47> 이중-가닥 siRNA의 가닥은 헤어핀 루프로 연결되어 하기의 단일 가닥 siRNA를 형성할 수 있다:

5'- gguuaguaucaucagauagUUNNN \

N

3' – UUccaucauaguagucuaucNNNN /

서열번호 29

<48>

<49> N은 뉴클레오티드 A, T, C, G, U, 또는 이 기술분야의 공지기술로 알려진 변형된 형태이다. 뉴클레오티드 N의 개수는 3 및 23을 포함하여 3 내지 23개이거나, 5 및 15를 포함하여 5 내지 15개이거나, 7 및 13을 포함하여 7 내지 13개이거나, 4 및 9를 포함하여 4 내지 9개이거나, 9 및 11을 포함하여 9 내지 11개이며, 또는 뉴클레오티드 N의 갯수는 9개이다.

<50> 표 1은 본 발명의 siRNA가 상기 언급한 매너로 디자인된 것으로부터 서열번호 1의 CTGF DNA 타겟 서열의 예를 나타낸 것이다.

<51> 표 1. siRNA에 대한 CTGF 타겟 서열

타겟 서열	서열번호 1의 레퍼런스에서 시작 뉴클레오티드의 번호	서열번호
GGGCCTCTTCTGTGACTTC	379	2
CCGACTGGAAGACACGTTT	691	3
CCCGGGTTACCAATGACAA	801	4
GGGCAAAAAGTGCATCCGT	901	5
TCCAAGCCTATCAAGTTTGAGCTTT	932	6
GCCTATCAAGTTTGAGCTT	937	7
GCATGAAGACATACCGAGCTAAATT	969	8
GCTAAATTCTGTGGAGTAT	986	9
GCCATTACAAGTGTCCCGGAGACAA	1119	10
GGAAGATGTACGGAGACAT	1170	11
GAGAGTGAGAGACATTAAGTCAATTA	1201	12
GCCATGTCAAACAAATAGTCTATCT	1346	13
GGGTACCAGCAGAAAGGTT	1473	14
CCAGCAGAAAGGTTAGTAT	1478	15
GCAGAAAGGTTAGTATCAT	1481	16
GCAGAAAGGTTAGTATCATCAGATA	1481	17
GGTTAGTATCATCAGATAG	1488	18
GGTTAGTATCATCAGATAGCTCTTA	1488	19
GAGACTGAGTCAAGTTGTTCTTAA	1626	20
GCAGACTCAGCTCTGACAT	1660	21
TCAGCTCTGACATTCTGATTGCAAT	1666	22
TCCTGTGATTAGACTGGACAGCTT	1712	23
GCTTGTGGCAAGTGAATTT	1733	24

<52>

<53> 상기 예에 나와 있는 바와 같이, 이 기술분야의 기술자는 표 1에 제공된 타겟 서열 정보를 이용하여 서열번호 1의 서열 포지션을 참조하고, 서열번호 1에 대해 상보적이거나 거의 상보적인 뉴클레오티드를 첨가 또는 제거시킴으로써 표 1에 제공된 서열보다 짧거나 더 긴 길이를 갖는 간섭 RNA를 디자인할 수 있다.

- <54> 이중 가닥 또는 단일 가닥 siRNA에 의해 유도되는 타겟 RNA 절단 반응은 서열특이성이 매우 높다. 일반적으로, 타겟 mRNA의 부분 및 센스 서열에 대해 정확히 상보적인 안티센스 부분과 동일한 센스 뉴클레오티드 서열을 함유하는 siRNA는 CTGF mRNA의 저해를 위한 siRNA 구체예이다. 그러나, siRNA의 안티센스 가닥과 타겟 mRNA 사이에 100% 서열 상보성은 본 발명을 실시하는 데 필수적이지는 않다. 따라서, 본 발명에서는 유전적 변이, 스트레인 다형성(strain polymorphism), 또는 진화적 차이에 기인하여 생길 수 있는 서열 다양성이 허용된다. 예를 들면, 타겟 서열에 대하여 삽입, 제거, 또는 싱글 포인트 변이가 된 siRNA 서열은 저해에 유효하다.
- <55> siRNA의 안티센스 서열은 mRNA의 타겟서열과 적어도 19개 뉴클레오티드와 거의-완벽한 인접 상보성을 갖는다. 본 명세서 중의 "거의-완벽한"은 siRNA의 안티센스 서열이 "실질적으로 상보적" 이고, siRNA의 센스 서열이 타겟 mRNA의 부분과 적어도 "실질적으로 동일"한 것을 의미한다. 이 기술분야에 통상적으로 알려진 바와 같이 "동일성"은 서열사이의 뉴클레오티드의 순서를 매칭시켜 측정된 뉴클레오티드 서열 사이의 서열 관련성의 정도이다. 일 구체예에서, 타겟 mRNA 서열에 대하여 80% 및 80% 에서 100% 까지의 상보성을 갖는 안티센스 RNA는 거의-완벽한 상보성이 있다고 볼 수 있고, 본 발명에 사용될 수 있다. "완벽한" 인접 상보성은 인접하는 염기 쌍의 표준 왓슨-크릭 염기 접합이다. "적어도 거의-완벽한"인접 상보성은 "완벽한" 상보성을 포함하는 개념이다. 동일성 또는 상보성을 측정하기 위한 컴퓨터적 방법은 뉴클레오티드 서열의 매칭 정도가 매우 높은 것을 제공하기 위하여 디자인되며, 예컨대 BLASTP 및 BLASTN (Altschul, S.F., et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410), 및 FASTA를 들 수 있다.
- <56> 서열번호 1의 타겟 서열은 mRNA의 5' 또는 3' 미전사 부위 뿐만 아니라 mRNA의 코딩 부위에 존재할 수 있다.
- <57> 이중-나선 간섭 RNA의 한 가닥 또는 양 가닥은 리보뉴클레오티드 또는 데옥시뉴클레오티드 또는 그의 혼합물일 수 있는 1 내지 6 뉴클레오티드의 3' 오버행을 가질 수 있다. 오버행의 뉴클레오티드는 염기-접합된 것이 아니다. 본 발명의 일구체예에서 간섭 ds RNA는 TT 또는 UU의 3' 오버행을 포함한다.
- <58> 이중 나선 siRNA의 센스 및 안티센스 가닥은 상기 기재된 바처럼 두 단일 가닥이 이중 형성되어 존재할 수 있거나 상보성 부위가 염기-접합되고 헤어핀 또는 루프로 공유적으로 연결되어 단일 가닥을 형성하도록 단일분자로 존재할 수 있다. 헤어핀은 다이서(Dicer)로 명명된 단백질에 의해 세포간적으로 절단되어 두 개의 개의 염기-접합된 RNA 분자의 간섭 RNA를 형성한다.
- <59> 간섭 RNA는 첨가, 제거, 치환 또는 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드가 변형되어 자연발생적으로 생겨난 RNA와는 다를 수 있다. 비-뉴클레오티드(Non-nucleotide) 물질이 간섭 RNA에 결합할 수 있으며, 5' 말단, 3' 말단 또는 내부적으로 결합할 수 있다. 상기 변형은 간섭 RNA의 뉴클레아제 저항성을 증가시키기 위하여, 세포의 업테이크를 향상하기 위하여, 세포의 타겟팅을 증진시키기 위하여, 간섭 RNA를 모사하는 것을 보조하기 위하여 또는 안정성을 더욱 증진시키기 위하여 흔히 디자인된다. 예컨대, 간섭 RNA는 오버행의 말단에 퓨린 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 피롤리딘 링커를 사용하여 이중가닥 siRNA 분자의 센스 가닥의 3' 말단에 콜레스테롤이 접합시키면, 예컨대 siRNA에 대해 안정성을 제공할 수도 있다. 추가적 변형으로는 예컨대 3' 종말 비오티ن 분자, 세포-투과 특성을 갖는다고 알려진 펩티드, 펩티도미메틱, 형광 다이, 또는 덴드리머를 포함한다.
- <60> 뉴클레오티드는 그들의 염기 부분, 그들의 당부분, 또는 분자의 인산염 부분이 변형될 수 있으며, 본 발명의 구체예에서 기능할 수 있다. 변형은 예컨대, 알킬, 알콕시, 아미노, 데아자(deaza), 할로, 히드록실, 티올 그룹, 또는 그들의 조합으로 치환된 것을 포함한다. 뉴클레오티드는 예컨대 U 대신 2' 데옥시-T로 치환하여 더 높은 안정성을 갖거나, 2'OH를 2' 아미노 또는 2' 메틸 그룹, 2' 메톡시에틸 그룹, 또는 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지로 치환하는 당 변형을 갖는 아날로그로 치환될 수 있다. 뉴클레오티드의 퓨린 또는 피리미딘 아날로그의 예로 잔틴, 하이포잔틴, 아자퓨린, 메틸티오아데닌, 7-데아자-아데노신 및 O- 및 N-변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 뉴클레오티드의 인산염 그룹은 인산염 그룹의 하나 또는 그 이상의 산소가 질소 또는 황으로 치환됨에 의해 변형될 수 있다 (포스포로티오에이트, phosphorothioates).
- <61> 서열번호 1에 상응하는 mRNA의 부분에 상보적이지 않은 안티센스 siRNA의 부위가 존재할 수 있다. 비-상보적 부위는 상보적 부위의 3', 5' 또는 양 말단에 있을 수 있다.
- <62> 간섭 RNA는 예컨대, 합성, 시험관내 전사, siRNA 발현 벡터, 또는 PCR 발현 카세트의 방법으로 생성될 수 있다. 형질감염된 siRNA로 잘 기능하는 간섭 RNA는 또한 생체내에서 발현되는 siRNA로서도 잘 기능한다.
- <63> 간섭 RNA는 보호되는 리보뉴클레오사이드 포스포라미디트(ribonucleoside phosphoramidites) 및 통상의 DNA/RNA 합성기를 사용하여 화학적으로 합성되며, 예컨대 Ambion Inc. (Austin, Texas), Invitrogen (Carlsbad, CA), 또는 Dharmacon (Lafayette, Colo., USA)과 같은 상업적 공급원으로부터 얻을 수 있다. 간섭

RNA는 용매 또는 수지를 이용한 추출, 침강, 전기이동(electrophoresis), 크로마토그래피, 또는 그를 조합한 방법에 의해 정제된다. 또는, 샘플 프로세싱으로 인한 손실을 피하기 위한 정제법이 만약 있다면 간접 RNA가 소량 사용될 수 있다.

- <64> 간접 RNA가 이 기술분야에 알려진 구조적 또는 유도성 프로모터, 예컨대 U6 또는 H1 RNA pol III 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터, SP6, T3, 또는 T7 프로모터를 사용하여 재조합 플라스미드로부터의 발현에 의해 대상에게 제공될 수 있다. 예를 들면, InvivoGen (San Diego, CA)으로부터의 psiRNA™로는 세포 내에서 RNA pol III 프로모터로부터 siRNA를 생산할 수 있다. 재조합 플라스미드로부터 발현된 간접 RNA는 표준 기술을 사용하여 분리할 수 있다.
- <65> 간접 RNA의 발현을 위한 바이러스성 벡터는 예컨대, 플라스미드에 대한 상기 기재된 프로모터를 사용하여 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 박시니아 바이러스(vaccinia virus), 레트로바이러스(예컨대, 렌티바이러스, 랩도바이러스, 루케미아 바이러스), 헤르페스 바이러스 또는 기타 등으로부터 유래할 수 있다. 바이러스성 벡터의 선택, 벡터에 의한 간접 RNA를 발현하기 위한 방법 및 바이러스성 벡터를 전달하는 방법은 이 기술분야에 공지된 범위내에 있다.
- <66> 간접 RNA의 발현은 PCR에 의한 인간 H1, 인간 U6, 또는 마우스 U6 프로모터를 갖는 발현 카세트(SECs)를 경유하여 SILENCER EXPRESS™ (Ambion, Austin, Texas)을 사용하여 또한 제공될 수 있다. 침묵발현 카세트(Silencer expression cassettes)는 헤어핀 siRNA 주형의 측면에 위치하는 프로모터 및 터미네이터 서열(promoter and terminator sequences flanking a hairpin siRNA template)을 포함하는 PCR 생성물이다. 세포에 형질감염시킬 때, 헤어핀 siRNA는 PCR 생성물로부터 발현되며, 특이적 침묵을 유도한다.
- <67> 생리적 상태에서의 하이브리드화:
- <68> "하이브리드화"는 단일-가닥 핵산(DNA 또는 RNA)가 상호작용하여 상보적이거나 거의-상보적인 염기 서열을 갖는 핵산들에 의해 하이브리드라 불리는 수소-결합된 복합체를 형성하게 하는 기술을 말한다. 하이브리드화 반응은 민감하고 선택성이 있어 중요한 특정 서열이 샘플중에서 낮은 농도로 존재하는 경우라도 감별할 수 있다. 하이브리드화의 선택성(즉, 엄격한, stringency)은 시험관내에서, 예를 들면 전하이브리드화(prehybridization) 및 하이브리드 용액 중의 염 또는 포름아미드의 농도에 의해 조절되며, 하이브리드화 온도 및 이 기술분야에 공지된 방법에 의해 조절된다. 특히, 엄격한(stringency)은 염의 농도가 감소하고 포름아미드의 농도가 증가함에 따라 또는 하이브리드화 온도가 증가함에 따라 증가한다.
- <69> 예를 들면, 매우 엄격한 조건 (stringency condition)은 약 50% 포름아미드, 37°C 내지 42°C에서 나타날 수 있다. 감소된 엄격한 조건은 약 35% 내지 25%의 포름아미드, 30°C 내지 35°C에서 나타날 수 있다. 하이브리드화를 위한 엄격한 조건의 예는 Sambrook, J., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y 에 나와있다. 또 다른 엄격한 하이브리드화 조건의 예로 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA, 50°C 또는 70°C, 12-16 시간동안, 그 후 세척, 또는 IXSSC중에서 70°C에서 하이브리드화, 또는 IXSSC 중에서 50°C에서 하이브리드화, 50% 포름아미드 후 0.3XSSC 중에서 70°C에서 세척, 또는 4XSSC 중에서 70°C에서 하이브리드화 또는 4XSSC 중에서 50°C에서 하이브리드화, 50% 포름아미드 후 1XSSC 중에서 67°C에서 세척을 포함한다. 하이브리드화시 온도는 하이브리드의 녹는점(Tm) 이하인 약 5-10°C이며, Tm은 다음 식을 사용하여 19 및 49 염기 쌍의 길이 범위 사이에 있는 하이브리드에 대한 값이 결정된다: $Tm^{\circ}C = 81.5 + 16.6(\log_{10}[Na^{+}]) + 0.41 (\% G+C) - (600/N)$, 여기에서 N은 하이브리드 중의 염기의 개수이고, [Na⁺]는 하이브리드화 완충액 중의 소듐 이온의 농도이다.
- <70> 본 발명의 구체예에서, 매우 엄격한 조건에서 시험관내 CTGF mRNA와 하이브리드화된 간접 RNA의 안티센스 가닥은 생체내에서 생리적 조건하에서 특이적으로 결합할 것이다. 매우 엄격한 조건에서 핵산과 하이브리드되지 않은 관련 핵산의 감별 또는 분리는 감소된 엄격한 조건에서 수행된다.
- <71> 단일 가닥 간접 RNA:
- <72> 상기와 같이, 간접 RNA는 궁극적으로 단일 가닥으로서 기능한다. 비록 이중-가닥 RNA보다 덜 효율적이기는 하나 단일 가닥 siRNA는 mRNA 침묵에 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 그러므로, 본 발명의 구체예에는 단일 가닥 siRNA를 투여하기 위해 제공되며, 단일 가닥 siRNA는 생리적 조건에서 서열번호 1에 상응하는 mRNA 부분과 하이브리드화되고, 서열번호 1에 상응하는 하이브리드된 mRNA 부분을 갖는 적어도 19개 뉴클레오티드의 적어도 거의-완벽한 인접 상보성 부위를 갖는다. 단일 가닥 siRNA는 상기 이중 가닥 siRNA에 대해서 19 내지 49개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 단일 가닥 siRNA는 5'인산염을 갖거나 인 시츄(in situ) 또는 생체내에서 5' 포

지션이 인산화되어 있다. "5' 인산화된"이라는 기재는 예를 들면 5' 당 (예컨대, 5' 리보스 또는 데옥시리보스, 또는 같은 아날로그)의 C5 히드록실과 에스터 결합으로 부착된 인산염 그룹을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 나타내는 데 사용된다. 단일 가닥 siRNA는 모노-, 디-, 또는 트리인산염 그룹을 가질 수 있다.

<73>

<74> 단일 가닥 siRNA는 화학적으로 합성되거나 이중 가닥 siRNA에 대하여 벡터를 경유하여 합성된다. 5' 인산염 그룹은 키나제를 경유하여 첨가될 수 있거나, 5' 인산염은 RNA의 뉴클레아제 절단의 결과물일 수 있다. 전달은 이중 가닥 siRNA에 대해 일어난다. 한 구체예에서, 보호된 말단을 갖고 뉴클레아제 저항성 변형이 된 단일 가닥 siRNA는 침투를 위해 적용된다. 단일 가닥 siRNA는 저장을 위해 건조되거나 액상 용액중에 용해될 수 있다. 용액은 어닐링(annealing)을 저해하기 위하여 또는 안정화를 위하여 완충액 또는 염을 포함할 수 있다.

<75>

헤어핀 간섭 RNA:

<76>

헤어핀 간섭 RNA는 단일-가닥이며, 센스 및 안티센스 서열을 한 가닥 내에 함유한다. DNA 벡터를 이용하여 발현하기 위해서, 센스 siRNA 서열에 상응하는 적어도 19-뉴클레오티드에 상응하는 DNA 올리고뉴클레오티드는 짧은 스페이서에 의해 그와 반대되는 상보성을 나타내는 안티센스 서열과 연결된다. 만약 선택된 발현 벡터를 위해 필요하다면, 3' 터미널 T'와 제한 사이트를 형성하는 뉴클레오티드가 첨가될 수 있다. 그 결과 생성된 RNA 전사는 그 자체 위에서 되접어 꺾어져(fold back) 스템-루프 구조를 형성한다.

<77>

<78>

투여 모드:

<79>

간섭 RNA는 시각 조직 주사, 예컨대 눈주위(periorcular), 결막(conjunctival), 서브-테논(sub-Tenons), 앞방내(intracameral), 유리체강내(intravitreal), 망막하(sub-retinal), 눈뒤(retrobulbar) 또는 소관내(intracanalicular) 주사; 카테터 또는 다른 플레이트먼트 장치(placement device) 예컨대 망막 펠렛(retinal pellet), 안내 삽입(intraocular insert), 좌제 또는 다공성, 비다공성 또는 젤라틴성 물질을 포함하는 임플란트를 이용하여 안구에 직접 적용; 국소용 안구 드롭(topical ocular drops) 또는 연고; 쿨-데-삭(cul-de-sac)중의 또는 공막(sclera, (transscleral))에 인접하여 임플란트된 또는 안구내의 서방출형 장치를 통해 직접 안구로 전달할 수 있다. 앞방내(Intracameral) 주사는 각막을 통과하여 전방(anterior chamber)내로 주어진 약제를 소주망에 다다르게 할 수 있다. 소관내(Intracanalicular) 주사는 정맥 콜렉터 채널 배농 설렘 채널(venous collector channels draining Schlemm's canal) 또는 설렘 채널내로 줄 수 있다.

<80>

대상:

<81>

시각 장애 또는 시각 장애로 발달할 위험이 있어 치료가 필요한 대상은 CTGF의 활성화 또는 발현, 즉, CTGF-관련 시각 장애와 관련된 상태를 나타낼 위험이 있거나 그러한 상태를 갖는 인간 또는 기타 포유류이다. 이러한 시각장애는 예를 들면, 녹내장, 황반변성, 당뇨망막병증, 맥락막혈관신생, 증식유리체망막병증, 상처치유, 및 과도한 흉터형성, 내피세포 증식, 또는 피브로증식(fibroproliferation)을 갖는 상태를 포함한다. 상기 장애와 관련된 안구 구조로는 예컨대 망막, 맥락막(choroid), 수정체(lens), 각막(cornea), 소주망(trabecular meshwork), 로드(rod), 콘(cone), 갱글리아, 황반(macula), 홍채(iris), 공막(sclera), 전방(aqueous chamber), 유리체방(vitreous chamber), 모양체(ciliary body), 시각신경유두(optic disc), 유두(papilla), 망막중심오목(fovea)을 포함할 수 있다.

<82>

<83>

제형(formulation) 및 제형(dosage):

<84>

약제학적 제형에는 생리학적으로 허용되는 눈의 담체 매질, 예컨대 물, 완충액, 생리식염수, 글리신, 히알유론산, 만니톨 기타 등과 혼합하여 중량의 99% 미만으로 본 발명의 간섭 RNA, 또는 그의 염이 포함된다.

<85> 본 발명의 간섭 RNA는 액제, 현탁제, 또는 유제로 투여된다. 다음은 본 발명에 따른 가능한 제형의 예이다.

	중량% 단위의 함량
간섭 RNA	99이하; 0.1-99; 0.1-50; 0.5-10.0
하이드록시프로필메틸셀룰로즈	0.5
소듐 클로라이드	.8
벤잘코늄 클로라이드	0.01
EDTA	0.01
NaOH/HCl	qs pH 7.4
정제수	qs 100mL

<86>

	중량% 단위의 함량
간섭/RNA	99이하; 0.1-99; 0.1-50; 0.5-10.0
인산완충식염수	1.0
벤잘코늄 클로라이드	0.01
폴리소르베이트 80	0.5
정제수	q.s. to 100%

<87>

간섭 RNA	99이하; 0.1-99; 0.1-50; 0.5-10.0
제1인산나트륨	0.05
제2인산나트륨 (무수)	중량% 단위의 함량 0.15
소듐 클로라이드	0.75
디소듐 EDTA	0.05
크레모포르EL	0.1
벤잘코늄 클로라이드	0.01
HCl 및/또는 NaOH	pH 7.3-7.4
정제수	q.s. to 100%

<88>

	중량% 단위의 함량
간섭 RNA	99이하; 0.1-99; 0.1-50; 0.5-10.0
인산완충식염수	1.0
하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린	4.0
정제수	q.s. to 100%

<89>

<90> 보통, 본 발명의 구체예에서 유효량의 간섭 RNA의 세포 사이의 농도는 안구 부위에 200pM 내지 100 nM 또는 1 nM 내지 50 nM, 5 nM 내지 약 25 nM이거나 이에 근접하는 농도를 포함한다. 국소용 조성물은 숙련된 임상주의 통상의 재량에 따라 하루에 1 내지 4회 안구의 표면으로 전달된다. 제형의 pH는 약 pH 4-9, 또는 pH 4.5 내지 pH 7.4이다.

<91> 정확한 투약계획은 임상주의 재량이지만, 간섭 RNA는 하루에 1 내지 4 회, 각 안구당 한 방울씩 적용함으로써, 또는 임상주의에 의해 직접 투여될 수 있다. 유효량의 제형은 예컨대 대상의 나이, 인종, 및 성별, 또는 시각장애의 심각도와 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 한 구체예에서, 간섭 RNA는 국소적으로 안구에 전달되어 그 치료용량이 소주망, 망막 또는 안구의 신경 헤드(optic nerve head)에 도달함으로써, CTGF-관련 질병 과정을 개선시켜준다.

<92> 허용되는 담체:

<93> 눈에 허용되는 담체는 안구 자극성이 기껏해야 매우 적거나 없는 담체를 말하며, 만약 필요하다면 적절한 보존성(preservation)을 제공하고, 균일한 제형의 하나 이상의 본 발명의 간섭 RNA를 전달한다. 본 발명의 구체예에서 간섭 RNA의 투여를 위해 허용되는 담체는 미러스 트랜스IT®-TKO siRNA 가로절단 시약(Mirus TransIT®-TKO siRNA Transection Reagent, Mirus Corporation, Madison, Wisconsin), 리포펙틴®(LIPOFECTIN®), 리포펙타민(lipofectamine), 올리고펙타민™(OLIGOFECTAMINE™, Invitrogen, Carlsbad, CA), 셀펙틴®(CELLFECTIN

®), 다르마펙트™(DHARMAFECT™, Dharmacon, Chicago, IL) 또는 폴리리신, 리포솜과 같은 다중양이온 (polycations) 또는 콜레스테롤과 같은 지방-용해성 약제를 포함한다. 리포솜은 표준 전달체-형성 리피드 및 콜레스테롤과 같은 스테롤로부터 형성되며, 예컨대 내피세포 표면 항원에 결합 친화력을 갖는 모노클로날 항체와 같은 타겟팅 분자를 포함할 수 있다. 또한, 리포솜은 폴리에틸렌글리콜화된 리포솜(PEGylated liposomes)일 수 있다.

<94>

<95>

안구 전달을 위하여, 간접 RNA를 눈에 허용되는 방부제, 공동용매, 계면활성제, 점도 증강제, 투과 증강제 (penetration enhancers), 완충액, 소듐 클로라이드, 또는 물과 혼합할 수 있으며, 액상, 멸균 점안 현탁액 또는 점안액을 만든다. 점안액 제형은 생리학적으로 허용되는 등장 액상 완충액중에 저해제를 용해시켜 제조될 수 있다. 또한, 점안액은 저해제 용해를 보조하기 위하여 눈에 허용되는 계면활성제를 포함할 수 있다. 예컨대 하이드록시메틸 셀룰로즈, 하이드록시에틸 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 기타 등의 점도 증강제(viscosity building agents)가 화합물의 체류를 증진시키기 위하여 본 발명의 조성물에 첨가될 수 있다.

<96>

멸균 안연고 제형을 제조하기 위하여 간접 RNA를 예컨대 미네랄 오일, 액상 라놀린, 또는 백색 바셀린(white petrolatum)과 같은 적당한 전달체내에서 방부제와 혼합한다. 멸균 점안겔 제형은 친수성 염기중에서 간접 RNA와 현탁되어 제조될 수 있으며, 친수성 염기는 다른 점안 제형에 대한 기술분야에 공지된 방법으로 예컨대 카보폴-940(CARBOPOL®-940, BF Goodrich, Charlotte, NC) 또는 기타 등과 혼합됨으로써 제조된다. 비스코트(VISCOAT®, Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX)는 예컨대 안내 주사로 이용될 수 있다. 본 발명의 다른 조성물은 간접 RNA가 눈에 투과가 잘 안 될 경우, 예컨대 크레메포르(cremephor) 및 트윈 80(TWEEN® 80, polyoxyethylene sorbitan monolaureate, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)과 같은 투과증진제(penetration enhancing agents)를 함유할 수 있다.

<97>

키트: 본 발명의 구체예에서 세포내에서 CTGF mRNA의 발현을 약화시키기 위한 시약을 포함하는 키트가 제공된다. 키트는 두 개의 상이한 프로모터, 예컨대 T7 프로모터, T3 프로모터 또는 SP6 프로모터가 간접 RNA에 상응하는 두 개의 상보적인 단일-가닥 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 주형을 함유한다. RNA는 DNA 주형으로부터 전사되며, 어닐링되어 타겟 mRNA의 발현을 약화시키는 데에 유용한 이중-가닥 RNA를 형성한다. 키트는 RNA 합성을 위하여 DNA 주형 및 뉴클레오티드 삼인산(즉, ATP, GTP, CTP 및 UTP)으로부터 DNA 서열을 증폭시키기 위한 증폭 프라이머를 임의로 함유한다. 임의로, 키트는 각각이 DNA 주형상의 프로모터에 결합할 수 있고, 프로모터가 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열의 전사가 효과적일 수 있는 두 개의 RNA 폴리머라제, 예컨대 크기 배제 칼럼 (size exclusion column)과 같은 단일-가닥 RNA를 정제하기 위한 정제 칼럼, 단일-가닥 RNA를 어닐링하여 이중 가닥 RNA로 만드는 완충액과 같은 하나 이상의 완충액, 및 이중 가닥 RNA를 정제하기 위한 RNase A 또는 RNase T를 함유한다.

실시예

<107>

실시예 1

<108>

소주망 세포에 있어서 CTGF 침묵을 위한 간접 RNA 및 침묵을 측정하기 위한 기준

<109>

본 연구는 인간 소주망 세포내의 내생 CTGF 발현 레벨을 녹-다운시키기 위한 CTGF 간접 RNA의 능력을 측정하는 것이다. 본 연구는 또한 QPCR 프라이머가 측정을 위해 사용되었을 때 mRNA 레벨상의 간접 RNA의 효능을 측정하는 기준을 제공한다.

<110>

GTM3 또는 HTM-3으로 명명되는 형질변환된 인간 TM 세포 라인(see Pang, LH. et al., 1994. Curr. Eye Res. 13:51-63)의 트랜스펙션이 표준 시험관내 농도의 CTGF 간접 RNA(100 nM) 및 리포펙타민 2000(LIPOFECTAMINE™ 2000, Invitrogen, Carlsbad, California)을 1:1 (w/v) 비율로 사용하여 수행하였다. 상업적으로 디자인된 알려지지 않은 서열(siGENOME SMARTPOOL® CTGF 간접 RNA (여기에서는 siRNA S4라고 명명되었다), Dharmacon, Lafayette, Colorado)의 간접 RNA의 풀(pool)이 타겟 CTGF로 사용되었다. 스크램블된 siRNA와 라민 A/C siRNA (Dharmacon)가 대조군으로 사용되었다.

<111>

대조군 실험은 스크램블된 간접 RNA 대조군과 비교해보았을 때 라민 A/C 간접 RNA를 사용한 라민 A/C의 효능이 90%에 가깝게 녹-다운되는 결과를 보였다. 초기 연구결과 엑손 5에 있는 CTGF mRNA 3'UTR에 직접 프라이머/프로브 세트 Q2를 사용하여 siGENOME SMARTPOOL® CTGF siRNA M-012633-00-0020 (siRNA S4)를 사용하였을 때 약 20-30%의 CTGF의 녹-다운의 효능을 나타냈다 (도. 2B). Q2는 ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA)로부

터의 QPCR TAQMAN® 프라이머/프로브 세트이다.

- <112>
- <113> 낮은 CTGF siRNA 효능의 이유가 무엇인지 결정하기 위하여, 몇 가지 변수에 대한 테스트가 시행되었다. 차선의 간섭 RNA 농도 또는 차선의 간섭 RNA:지방 비율이 사용되었는지를 결정하기 위하여 GF 간섭 RNA의 용량 반응이 테스트 되었다. 결과 데이터를 보면, 적용된 간섭 RNA의 농도 또는 간섭 RNA:지방 비율과 상관없이 CTGF mRNA 녹-다운은 낮게 나타났다. siRNA 활성상의 세포 업테이크의 중요성 및 트랜스펙션된 TM 세포의 고유의 어려움 (inherent difficulty)이 주어졌을 때, TM 세포 트랜스펙션 효능을 상기-언급된 조건하에서 측정하였다. 트랜스펙션 효능은 SITOXTM (Dharmacon)을 세포질로 전달함에 의해 유도되는 세포 사멸 또는 SIGLOTM (Dharmacon)로 의 세포질 형광도를 측정함으로써 세포 형광도로서 측정하였다. 이 두가지 경우에 있어서, 거의 모든 세포가 사멸하거나 (도. IA; SITOXTM) 형광을 나타냈으며 (도. IB; SIGLOTM), 이는 트랜스펙션 효능이 거의 정량적이고 과정에 있어서 율속단계(rate-limiting step)가 아님을 의미한다.
- <114> 또한, siRNA S1, S2, 및 S3라고 명명되는 암비온 사(Ambion Inc., Austin, Texas)의 세 가지 추가적인 개개의 CTGF siRNA 서열이 Q2 및 Q1이라고 명명되는 두 개의 상이한 QPCR TAQMAN® 프라이머/프로브 세트((ABI, Applied Biosystems, Foster City, CA))와 함께 혼합되어 테스트 되었다. 암비온 siRNA에 대한 타겟 서열은 CTGF의 뉴클레오티드 (nts)의 GenBank 레퍼런스 서열 번호 NM_001901를 사용하여 하기와 같다:
- <115> S1에 대한 타겟: (nts 379-397): gggcctcttctgtgacttc 서열번호 2
- <116> S2에 대한 타겟: (nts 901-919): gggcaaaaagtgcacccgt 서열번호 5
- <117> S3에 대한 타겟: (nts 1488-1506): ggttagtatcatcagatag 서열번호 18
- <118> 상기 타겟으로 하는 서열의 각각에 대한 각 가닥상에 3'TT 오버행을 갖는 이중 나선 siRNA는:
- <119> siRNA S1:
- <120> 5'-gggccucucugugacuucTT-3' 서열번호 30
- <121> 3'-Ttcccgagaagacacugaag-5' 서열번호 31
- <122> siRNA S2:
- <123> 5'-gggcaaaaagugcauccguTT-3' 서열번호 32
- <124> 3'-TTcccguuuuucacguaggca-5' 서열번호 33
- <125> siRNA S3:
- <126> 5'-gguuaguaucaucagauagTT-3' 서열번호 27
- <127> 3'-TTccaucaguagucuauc-5' 서열번호 28
- <128> QPCR Q1 프라이머는 ABI ASSAY ON DEMAND™ Hs 00170014_ml (Applied BioSystems)로부터의 독점적 서열 (proprietary sequence)이다.
- <129> QPCR Q2 포워드 프라이머는 다음 서열을 갖는다:
- <130> 5'-CAGCTCTGACATTCTGATTCGAA-3' 서열번호 34
- <131> 및 Q2 역프라이머(reverse primer)는 다음 서열을 갖는다:
- <132> 5'-TGCCACAAGCTGTCCAGTCT-3' 서열번호 35
- <133> Q2 프로브는 다음 서열을 갖는다:
- <134> 5'-AATCGACAGGATTCCGATTCCTGAACAGTG-3' 서열번호 36 그리고, 5'말단(6-카르복시플루오레신, 6-carboxyfluorescein)에 FAM 그룹을, 3'말단에 TAMRA 그룹을 갖는다(Applied Biosystems).
- <135> 단위 siRNA에 대한 siRNA 타겟 부위와 관련된 프라이머/프로브 세트의 위치를 도 2A에 도시하였다. 또한 도 2A의 도식에 나타나는 바와 같이 siRNA S1, S2 및 S3의 CTGF 유전자 엑손 (박스) 및 인트론 (선) 구조 및 위치이고, GenBank CTGF 서열 NM_001901, 즉, 서열번호 1로 제공되는 서열과 관련된 QPCR 프라이머/프로브 세트 Q1

및 Q2이다.

<136>

<137> 도 2B는 엑손 5 프라이머/프로브 세트 Q2 및 siRNA S1-S4를 사용한 CTGF mRNA의 QPCR 증폭을 도시한 것이다. S1 및 S4 siRNA를 사용하면, CTGF mRNA 레벨의 현저한 녹-다운은 Q2 프라이머/프로브 세트에 검출되지 않는다. 녹-다운은 siRNAs S2 및 S3에 의해 설명되었다. 프라이머/프로브 세트 Q2는 S1 siRNA의 타겟과 비교해 보았을 때 S2 및 S3 siRNA의 타겟에 더 근접성을 가지고 있었다.

<138> 도 2C는 엑손 4/5 스페닝 프라이머/프로브 세트 Q1을 사용한 CTGF mRNA의 QPCR 증폭을 도시한 것이다. CTGF mRNA의 녹-다운은 각 siRNA에 의해 설명되었으며, 검출을 위해 Q1 프라이머/프로브 세트를 사용한 S2 siRNA에서 ~90% 녹다운이 관찰되었다. 프라이머/프로브 세트 Q1이 Q2 프라이머/프로브 세트와 비교해 보았을 때 siRNA에 의한 녹-다운 증명에 더욱 유효한 것으로 나타났다.

<139> 도 2B 및 도 2C의 데이터는 3'-UTR-방향성 프라이머/프로브 세트 Q2를 사용하여 증폭된 특정 부위가 비교적 안정할 수 있고 따라서 타겟팅 siRNA에 의한 CTGF mRNA의 절단 및 분해를 평가하기 위한 선택으로는 좋지 않음을 나타낸다.

<140> 그러므로, siRNA 효능은 QPCR 증폭 부위가 siRNA 타겟팅 부위 밖에 놓여 있는 특정한 경우, 불충분하게 나타날 수 있다.

<141> 비-특이, 오프-타겟 효과의 가능성을 줄이기 위하여, CTGF mRNA 발현을 저해하기 위한 가능한 가장 낮은 siRNA 농도로 측정하였다. CTGF mRNA 녹다운을 프라이머/프로브 세트 Q1을 사용한 PCR 증폭으로 평가하였다. GTM3 세포내의 CTGF S2 siRNA의 용량 반응을 도 3에 도시하였다. S2 siRNA의 0, 1, 3, 10, 30, 및 100 nM의 용량 범위로 투여한 후 24시간 후, GTM3 세포에서의 IC₅₀은 ~2.5 nM로 측정되었다. 데이터는 그래프패드 프리즘 4 소프트웨어를 사용하여 가변 슬로프(variable slope), 시그모이달 용량 반응 알고리즘(sigmoidal dose response algorithm) 및 100%의 톱 컨스트레인트(top constraint)로 피팅되었다(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

<142> 상기 실시예의 결과는 i) 소주망 세포에서 siRNA 침묵이 일어나고, ii) 본 명세서에 인용된 모든 siRNA는 침묵 정도에 영향이 있으며, iii) siRNA 녹다운의 효능을 측정하기 위하여 PCR-기초한 접근법을 사용하였을 때, PCR 증폭 프라이머는 침묵검출의 최적화를 위해 siRNA 타겟팅 서열을 포함하도록 디자인된다.

<143> 타겟 mRNA의 RUSC 엔도뉴클레아제에 의한 절단이 siRNA 타겟팅 서열의 중심부위근처에서 일어나는 것으로 나타났다(Elbashir, S.M., et al, 2001. Genes Dev 75:188-200), 아고노트 RNaseH 활성에 의해 완성되었다(Liu, J., et al., 2004. Science 305:1437-1441). 반면, 잔여 mRNA의 완전한 분해는 담보되지 않는 것으로 나타났다. 안정한 mRNA 조각이 아고노트 절단후에 남아있을 수 있으며, QPCR에 의한 상기 조각들 중 하나의 증폭은 본 명세서에 나타난 바와 같이 siRNA 효능이 불충분하게 나타나게 할 수 있다. 본 발명은 QPCR 프라이머 세트가 siRNA 타겟 서열에 포함되어 최적의 siRNA 효능을 나타내는 것을 입증하는 구체예를 제공한다.

<144> 본원에 참조되고 있는 참조문헌은 예시적 과정 또는 다른 상세한 보조적 사항들을 제공하기 위한 정도로 본원에 참조로 인용되고 있는 것이다.

<145> 당업자라면, 본원에 개시된 것들을 이해하여 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 본원에 기재된 구체예의 자명한 정도의 변형은 할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 본원에 개시된 모든 구체예는 개시내용에 비추어 불 때 실험을 거치지 않고 만들거나 수행될 수 있다. 본원의 전체 보호범위는 개시 내용 및 그 균등범위를 포함한다. 본 상세한 설명의 기재내용은 본 발명의 전체 보호범위를 좁히는 것으로 해석되지 않아야 한다.

<146> 달리 언급이 없는 한, 단수는 "하나의", "적어도 하나의" 또는 "하나 이상의"를 의미한다.

도면의 간단한 설명

<98> 도 1A는 도 1B의 데이터와 함께 보았을 때, 소주망 세포의 트랜스펙션 효능이 율속단계가 아님을 증명하는 SITOX™ 데이터를 도시한 것이다. GTM3 세포가 SITOX™ (Dharmacon) 트랜스펙션 대조군으로 트랜스펙션되었다. 24시간 후, 트리판 블루 배제(trypan blue exclusion)를 사용하여 SITOX™ 배양중에 생존한 남아있는 세포의 수를 측정하였으며, 이는 상대적인 트랜스펙션 효능을 나타낸다.

<99> 오픈 바: 트랜스펙션이 일어나지 않음; 솔리드 바: SITOX™처리한 것.

<100>

<101> 도 1B는 GTM3 세포 내로의 siRNA 업테이크의 SIGLO™ 영상을 도시한 것으로, 트랜스펙션 효율이 도 1A의 데이터와 함께 보았을 때 율속단계가 아님을 증명하고 있다. GTM3 세포를 LIPOFECTAMINE 2000™를 사용하여 SIGLO™ siRNA (Dharmacon)로 트랜스펙션 시켰다. 24시간 후 형광현미경(fluorescence microscopy, 적색 불규칙한 형상)을 사용하여 SIGLO™ siRNA 업테이크를 측정하였다. 각각의 세포의 핵을 이중 가닥 DNA의 염색제인 DAPI (4',6-디아미디노-2-페닐인들)로 식별하였다(청색 둥근 부위). 도 1A의 데이터 및 도 1B의 영상에 나타난 바와 같이 거의 모든 세포가 사멸하거나(SITOX™) 형광성(SIGLO™)이었다.

<102>

<103> 도 2A는 siRNAs S1, S2, 및 S3의 CTGF 유전자 엑손(박스) 및 인트론(라인) 구조 및 위치, 및 서열번호 1로 제공되는 서열인 GenBank CTGF 서열 NM_001901과 관련된 QPCR 프라이머/프로브 세트 Q1 및 Q2를 도시한 것이다. siRNA 및 프라이머/프로브 세트의 서열은 실시예 1에 나와 있다.

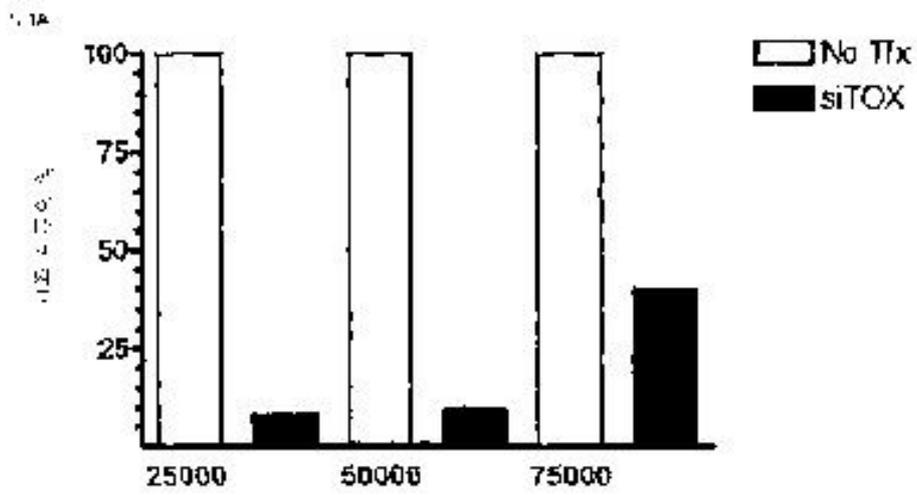
<104> 도 2B는 엑손 5 프라이머/프로브 세트 Q2를 사용한 CTGF mRNA의 QPCR 증폭을 도시한 것이다. S1 및 S4 siRNA를 사용한 경우 CTGF mRNA 레벨의 현저한 녹-다운이 관찰되지 않았다.

<105> 도 2C는 엑손 4/5 스패닝 프라이머/프로브 세트 Q2(exon 4/5 spanning primer/probe set Q1)를 사용한 CTGF mRNA의 QPCR 증폭을 도시한 것이다. 각각의 siRNA에 의해 CTGF mRNA의 녹-다운이 관찰되었으며, S2 siRNA의 경우 ~90%의 녹-다운이 관찰되었다.

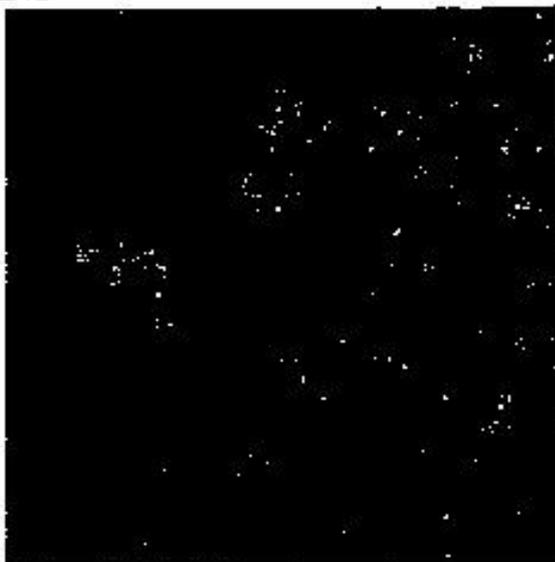
<106> 도 3은 S2 siRNA의 다양한 농도에서 CTGF mRNA 레벨의 녹-다운의 효능을 테스트한 역가 스테디를 도시한 것이다. CTGF mRNA 녹-다운은 프라이머/프로브 세트 Q1을 사용한 QPCR 증폭으로 평가하였다. 실시예 1에 나와 있는 바와 같이, 0, 1, 3, 10, 30, 및 100 nM S2 siRNA로 처리한 후 24시간 뒤에 GTM3 세포에서 IC₅₀은 ~2.5nM로 측정되었다.

도면

도면1

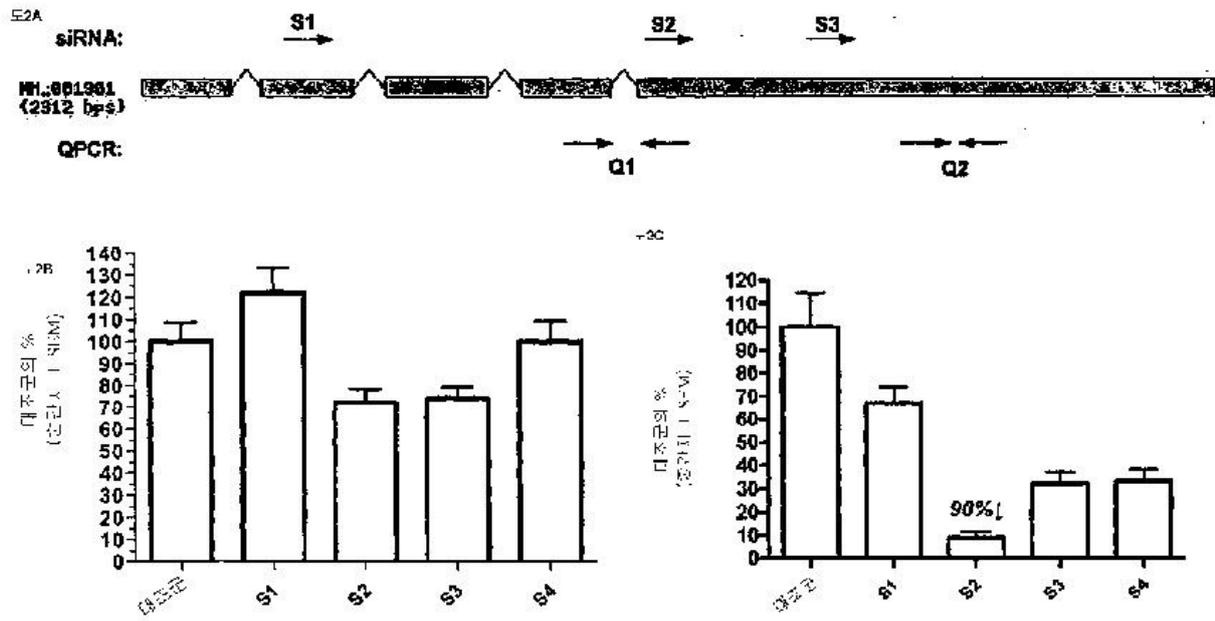


□ 1B

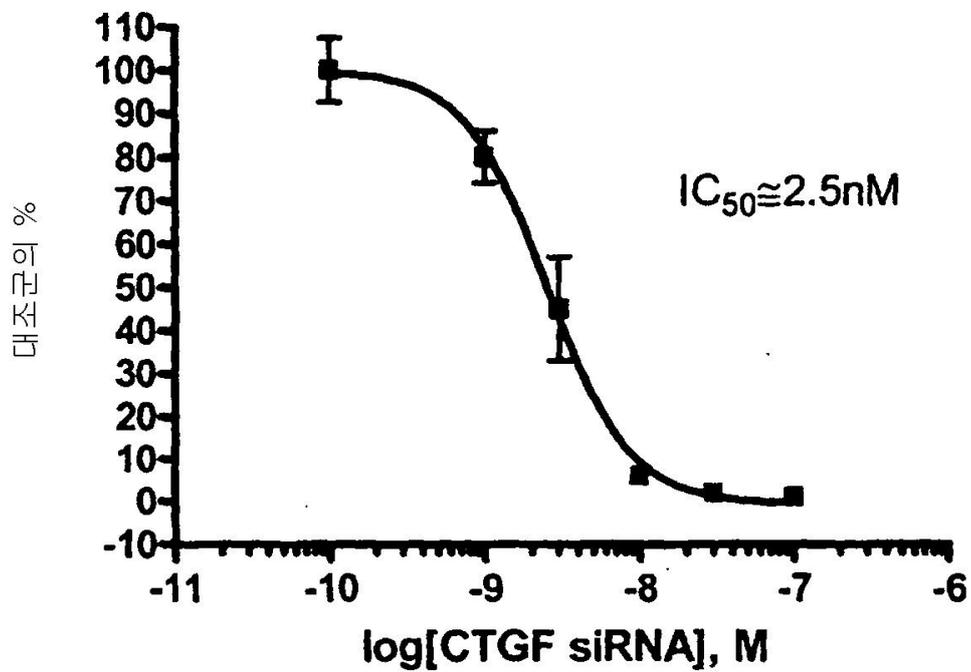


CTV2를 발현하는 세포의 DNA 양을 측정함

도면2



도면3



SEQUENCE LISTING

<110> Shepard, Allan R.
Pang, Lok-Hou

<120> RNAi INHIBITION OF CTGF FOR TREATMENT OF OCULAR DISORDERS

<130> 34576.40

<150> 60/638,705

<151> 2004-12-23

<160> 36

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2312

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
tccagtgacg gagccgcccc gccgacagcc ccgagacgac agcccggcgc gtcccggctcc 60

ccacctccga ccaccgccag cgctccagc cccgcgctcc ccgctcgccg ccaccgcgcc 120

ctccgctccg cccgcagtgc caaccatgac cgcgcgccagt atgggccccg tccgctcgc 180

cttcgtggte ctctcgccc tctgcagccg gccggccgtc ggccagaact gcagcgggcc 240

gtgccggtgc ccggacgagc cggcgcgccg ctccccggcg ggctgagacc tcgtgctgga 300

cggctgcggc tgctgccgcg tctgcgcaa gcagctgggc gagctgtgca ccgagcgca 360

cccctgcgac ccgacaagg gcctcttcig tgacttcggc tccccggcca accgcaagat 420

cggcgtgtgc accgcaaag atgggtctcc ctgcatcttc ggtggtacgg tgtaccgag 480

cggagagtcc ttccagagca gctgcaagta ccagtgcacg tgccctggacg gggcgggtggg 540

ctgcatgccc ctgtgcagca tggacgttcg tctgcccagc cctgactgcc ctttcccag 600

gagggtaag ctgcccggga aatgctgcga ggagtgggtg tgtgacgagc ccaaggacca 660

aaccgtggtt gggcctgccc tgcggcttia ccgactggaa gacacgtttg gccagaccc 720

aactatgatt agagccaact gcctggtcca gaccacagag tggagcgctt gttccaagac 780

ctgtgggatg ggcattcca cccgggttac caatgacaac gcctcctgca ggctagagaa 840

gcagagccgc ctgtgcatgg tcaggccttg cgaagctgac ctggaagaga acattaagaa 900

gggcaaaaag tgcattcgta ctccaaaat ctccaagcct atcaagtttg agctttctgg 960

ctgcaccagc atgaagacat accgagctaa attctgtgga gtatgtaccg acggccgatg 1020

ctgcaccccc cacagaacca ccaccctgcc ggtggagttc aagtgccctg acggcgaggt 1080

catgaagaag aacatgatgt tcatcaagac ctgtgcctgc cattacaact gtcccggaga 1140

caatgacatc ttigaatgcg tgtactacag gaagatgtac ggagacatgg catgaagcca 1200

gagagtgaga gacattaact cattagactg gaacttgaac tgattcacat ctcatTTTT 1260

cgtaaaaatg atttcagtag cacaagttat ttaaactctgt ttttctaact gggggaaaag 1320

attcccacc aattcaaac attgtgcat gtcaaacaaa tagtctatct tcccagaca 1380

ctggtttgaa gaatgtaag acttgacagt ggaactacat tagtacacag caccagaatg 1440

tatattaagg tgtggcttta ggagcagtgg gaggtacca gcagaaaggt tagtatcatc 1500

agatagctct tatacgagta atatgcctgc tatttgaagt gtaattgaga aggaaaattt 1560

tagcgtgctc actgacctgc ctgtagcccc agtgacagct aggatgtgca ttctccagcc 1620

atcaagagac tgagtcaagt tgttccctaa gtcagaacag cagactcagc tetgacattc 1680

tgattcgaat gacactgttc aggaatcgga atcctgtcga ttagactgga cagcttgtgg 1740
 caagtgaatt tectgtaaca agccagattt tttaaaattt atattgtaa tattgtgtgt 1800
 gtgtgtgtgt gtgtatatat atatatatat gtacagtat ctaagttaat ttaaagttgt 1860
 ttgtgccttt ttatTTTTgt ttttaatgct ttgatatttc aatgttagcc tcaatttctg 1920
 aacaccatag gtagaatgta aagcttgtct gatcgttcaa agcatgaaat ggatacttat 1980
 atggaaattc tctcagatag aatgacagtc cgtcaaaaca gattgtttgc aaaggggagg 2040
 catcagtgtc ctggcaggc tgatttctag gtaggaaatg tggtagctca cgctcacttt 2100
 taatgaacaa atggccttta ttaaaaactg agtgactcta tatagctgat cagttttttc 2160
 acctggaagc atttgtttct actttgatat gactgttttt cggacagttt atttgttgag 2220
 agtgtgacca aaagttacat gtttgcacct ttctagtga aaataaagta tattttttct 2280
 aaaaaaaaa aaaaacgaca gcaacggaat tc 2312

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TARGETING SEQUENCE

<400> 2

gggcctcttc tgtgacttc 19

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 3

ccgactggaa gacacgttt

19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 4

cccgggttac caatgaaa

19

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 5

tccaagccta tcaagtttga gcttt

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 6

tccaagccta tcaagtttga gcttt

25

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 7

gcctatcaag ttgagctt

19

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 8

gcatgaagac ataccgagct aaatt

25

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 9

gctaaattct gtggagtat	19
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Targeting Sequence	
<400> 10	
gccattacaa ctgtcccga gacaa	25
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Targeting Sequence	
<400> 11	
ggaagatgta cggagacat	19
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Targeting Sequence	
<400> 12	
gagagtgaga gacattaact catta	25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 13

gccatgtcaa acaaatagtc tatct

25

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 14

gggtaccagc agaaaggtt

19

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 15

ccagcagaaa ggttagtat

19

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 16

gcagaaaggt tagtatcat

19

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 17

gcagaaaggt tagtatcatc agata

25

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 18

ggttagtatc atcagatag

19

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 19

ggttagtatc atcagatagc tctta

25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 20

gagactgagt caagttgttc cttaa

25

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 21

gcagactcag ctctgacat

19

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 22

tcagctctga cattctgatt cgaat

25

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 23

tcctgtcgat tagactggac agctt

25

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Targeting Sequence

<400> 24

gcttgtggca agtgaattt

19

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense Strand

<400> 25

gguuaguauc aucagauagu u 21

<210> 26

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Strand

<400> 26
 cuaucugaug auacuaaccu u 21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense Strand with 3'TT

<220>

<221> misc_RNA

<222> (1)..(19)

<223> ribonucleotides

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> deoxyribonucleotides

<400> 27
 gguuaguauc aucagauagt t 21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Strand with 3'TT

<220>

<221> misc_RNA

<222> (1)..(19)

<223> ribonucleotides

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> deoxyribonucleotides

<400> 28

cuaucugaug auacuaacct t

21

<210> 29

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hairpin Duplex With Loop

<220>

<221> misc_RNA

<222> (1)..(21)

<223> ribonucleotides

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(30)

<223> any, A, T/U, C, G

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(51)

<223> ribonucleotides

<400> 29

gguuaguauc aucagauagu unnnnnnnn cuaucugaug auacuaaccu u

51

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense Strand with 3'TT

<220>

<221> misc_RNA

<222> (1)..(19)

<223> ribonucleotides

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> deoxyribonucleotides

<400> 30

gggccucuuc ugugacuuct t

21

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Strand with 3'TT

<220>

<221> misc_RNA

<222> (1)..(19)

<223> ribonucleotides

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> deoxyribonucleotides

<400> 31

gaagucacag aagaggcct t

21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense Strand with 3'TT

<220>

<221> misc_RNA

<222> (1)..(19)

<223> ribonucleotides

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> deoxyribonucleotides

<400> 32

gggcaaaaag ugcauccgut t

21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Antisense Strand with 3'TT

<220>

<221> misc_RNA

<222> (1)..(19)

<223> ribonucleotides

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> deoxyribonucleotides

<400> 33

acggaugcac uuuuugcct t

21

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe/Primer Sequence

<400> 34
cagctctgac attctgattc gaa 23

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe/Primer Sequence

<400> 35
tgccacaagc tgtccagtct 20

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe/Primer Sequence

<400> 36
aatcgacagg attccgattc ctgaacagtg 30